(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0149103
(43) 공개일자 2021년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/517 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/444 (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 10-2021-7035240
(22) 출원일자(국제) 2020년03월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/025228
(87) 국제공개번호 WO 2020/205521
국제공개일자 2020년10월08일
(30) 우선권주장
62/826,843 2019년03월29일 미국(US)

(71) 출원인
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, 1515 홀콤 블러바드, 씨/오 더 유니버시티 오브 텍사스 엠디 앤더슨 캔서 센터
닐슨 모니크
미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 1515 홀콤 블러바드, 씨/오 더 유니버시티 오브 텍사스 엠디 앤더슨 캔서 센터
헤이마치 존 브이.
미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 1515 홀콤 블러바드, 씨/오 더 유니버시티 오브 텍사스 엠디 앤더슨 캔서 센터
(74) 대리인
특허법인한얼

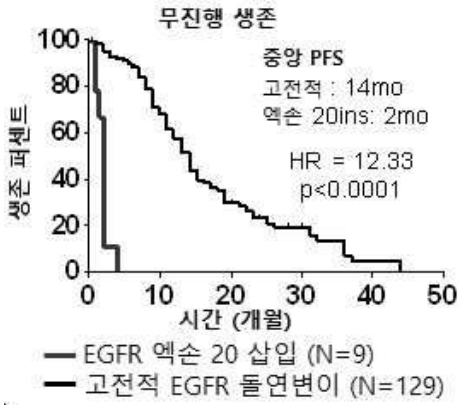
전체 청구항 수 : 총 123 항

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

(57) 요 약

본 개시내용은 3세대 티로신 키나제 억제제, 예를 들어, 포지오티닙 또는 아파티닙을 투여함으로써, EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 삽입 돌연변이를 갖는 것으로 결정된 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/444 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체(subject)에게 유효량의 포지오티닙(poziotinib)을 투여하는 단계를 포함하여, 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체가 하나 이상의 EGFR 엑손(exon) 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포지오티닙이 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 포지오티닙 하이드로클로라이드 염이 정제로서 제형화되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 신규(*de novo*) EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이(point mutation), 삽입 및/또는 결실을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 2, 3, 또는 4개의 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 T790M 및/또는 C797S가 아닌, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 이전에 티로신 키나제 억제제를 투여받은, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 대상체가 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 티로신 키나제 억제제가 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, 및 V774로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 잔기 C797에서 EGFR 돌연변이를 갖지 않는 것으로 결정된, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, H771del insGY, H771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, V772insDNP, H773insAH, H773insH, 및 V774insHV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엑손 20 돌연변이가 D770insNPG인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 상기 환자로부터의 게놈 샘플(genomic sample)을 분석함으로써 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 방법.

청구항 19

제19항에 있어서, 상기 게놈 샘플이 타액, 혈액, 소변, 정상 조직(normal tissue), 또는 종양 조직으로부터 단리되는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재가 핵산 서열분석(sequencing) 또는 PCR 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 경구 투여되는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 5-25mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 8mg, 12mg, 또는 16mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 매일 투여되는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 연속적으로 투여되는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 28일 주기로 투여되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 항암 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 추가의 항암 요법이 화학요법, 방사선 요법, 유전자 요법, 수술, 호르몬 요법, 항혈관신생 요법 또는 면역요법인, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 포지오티닙 및/또는 항암 요법이 정맥내, 피하, 골내, 경구, 경피, 지속 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제로서, 또는 설하 투여되는, 방법.

청구항 30

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙 및/또는 항암 요법을 투여하는 단계가 국소, 국부 또는 전신 투여를 포함하는, 방법.

청구항 31

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙 및/또는 항암 요법이 2회 이상 투여되는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 구강암(oral cancer), 구강인두암(oropharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 호흡기암(respiratory cancer), 비뇨생식기암(urogenital cancer), 위장관암(gastrointestinal cancer), 중추 또는 말초신경계 조직암(central or peripheral nervous system tissue cancer), 내분비 또는 신경내분비암 또는 조혈암(endocrine or neuroendocrine cancer or hematopoietic cancer), 신경교종(glioma), 육종(sarcoma), 암종(carcinoma), 림프종(lymphoma), 흑색종(melanoma), 섬유종(fibroma), 수막종(meningioma), 뇌암(brain cancer), 구강인두암(oropharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 신장암(renal cancer), 담도암(biliary cancer), 갈색세포종(pheochromocytoma), 췌도세포암(pancreatic islet cell cancer), 리-프라우메니 종양(Li-Fraumeni tumor), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 부신 종양(adrenal gland tumors), 골형성 육종 종양(osteogenic sarcoma tumors), 다발성 신경내분비 I형 및 II형 종양(multiple neuroendocrine type I and type II tumors), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 전립선암(prostate cancer), 식도암(esophageal cancer), 기관암(tracheal cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 위암(stomach cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁암(uterine cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 고환암(testicular cancer), 결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer) 또는 피부암(skin cancer)인, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)인, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 인간인, 방법.

청구항 35

하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된 대상체에서 사용하기 위한 포지오티닙을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 조성물이 경구 조성물로서 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 조성물이 5-25mg의 포지오티닙을 포함하는, 조성물.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 8mg, 12mg, 또는 16mg의 포지오티닙을 포함하는, 조성물.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 정제로서 제형화되는, 조성물.

청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 42

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 신규 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 43

제35항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는, 조성물.

청구항 44

제35항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 2, 3, 또는 4개의 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 조성물.

청구항 45

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 T790M 및/또는 C797S가 아닌, 조성물.

청구항 46

제35항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이가 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, 및 V774로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 조성물.

청구항 47

제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이가 A763, A767,

S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 조성물.

청구항 48

제35항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 잔기 C797에서 EGFR 돌연변이를 갖지 않는 것으로 결정된, 조성물.

청구항 49

제35항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, H771del insGY, H771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, V772insDNP, H773insAH, H773insH 및 V774insHV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 50

제35항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 51

제35항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 항암 요법으로 치료되고 있는, 조성물.

청구항 52

환자로부터 수득된 게놈 샘플에서 EGFR 엑손 20 돌연변이를 검출하는 단계를 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 포지오티닙 단독 또는 제2 항암 요법과의 병용에 대한 반응을 예측하는 방법으로서, 상기 샘플이 EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성인 경우, 상기 환자가 포지오티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대해 유리한 반응을 갖는 것으로 예측되는, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 엑손 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 게놈 샘플이 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리되는, 방법.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재가 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는, 방법.

청구항 57

제52항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 T790M 및/또는 C797S가 아닌, 방법.

청구항 58

제52항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 잔기 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773 및/또는 V774에 있는, 방법.

청구항 59

제52항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 잔기 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774, 및/또는 R776에 있는, 방법.

청구항 60

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, H771del insGY, H771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, V772insDNP, H773insAH, H773insH 및 V774insHV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 61

제52항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 62

제52항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 포지오티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 유리한 반응이 종양 크기 또는 부담의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 비진행, 증가된 질환 부재 간격, 진행까지의 시간 증가, 관해의 유도(induction of remission), 전이의 감소 또는 환자 생존의 증가를 포함하는, 방법.

청구항 63

제52항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 유리한 반응을 가질 것으로 예측된 상기 환자에게 포지오티닙을 단독으로 또는 제2 항암 요법과 병용하여 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 64

제52항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 경구 투여되는, 방법.

청구항 65

제52항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 5 내지 25mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 66

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 8mg, 12mg, 또는 16mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 67

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 68

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙 하이드로클로라이드 염이 정제로서 제형화되는, 방법.

청구항 69

대상체에게 유효량의 포지오티닙 또는 아파티닙을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체가 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 상기 포지오티닙이 경구 투여되는, 방법.

청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 5 내지 25mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 73

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 8mg, 12mg, 또는 16mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 74

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙이 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 75

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포지오티닙 하이드로클로라이드 염이 정제로서 제형화되는, 방법.

청구항 76

제69항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 77

제69항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780 및/또는 L786에 있는, 방법.

청구항 78

제69항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 잔기 V773, A775, G776, V777, G778, S779 및/또는 P780에 있는, 방법.

청구항 79

제69항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HER 엑손 20 돌연변이가 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 80

제69항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HER 엑손 20 삽입 돌연변이가 A775insYVMA인, 방법.

청구항 81

제69항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, mTOR 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 mTOR 억제제가 라파마이신, 템시롤리무스, 에베롤리무스, 리다포롤리무스 또는 MLN4924인, 방법.

청구항 83

제81항에 있어서, 상기 mTOR 억제제가 에베롤리무스인, 방법.

청구항 84

제81항에 있어서, 상기 포지오티닙 또는 아파티닙 및/또는 mTOR 억제제가 정맥내, 피하, 골내, 경구, 경피, 지속 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제로서, 또는 설하 투여되는, 방법.

청구항 85

제69항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 상기 환자로부터의 게놈 샘플을 분석함으로써 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 게놈 샘플이 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리되는, 방법.

청구항 87

제69항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재가 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 88

제69항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 항암 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 89

제69항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추가의 항암 요법이 화학요법, 방사선 요법, 유전자 요법, 수술, 호르몬 요법, 항혈관신생 요법(anti-angiogenic therapy) 또는 면역요법인, 방법.

청구항 90

제69항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 구강암, 구강인두암, 비인두암, 호흡기암, 비뇨생식기암, 위장관암, 중추 또는 말초신경계 조직암, 내분비암 또는 신경내분비암 또는 조혈암, 신경교종, 육종, 암종, 림프종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인두암, 비인두암, 신장암, 담도암, 갈색세포종, 췌도세포암, 리-프라우메니 종양(Li-Fraumeni tumor), 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골형성 육종 종양, 다발성 신경내분비 I형 및 II형 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암인, 방법.

청구항 91

제69항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암인, 방법.

청구항 92

제69항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 93

A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC,

P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된 대상체에 사용하기 위한, 포지오티닙 또는 아파티닙을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 상기 HER2 엑손 20 돌연변이가 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 조성물.

청구항 96

제93항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HER2 엑손 20 돌연변이가 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 97

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780, 및/또는 L786에 있는, 조성물.

청구항 98

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 잔기 V773, A775, G776, V777, G778, S779, 및/또는 P780에 있는, 조성물.

청구항 99

제93항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 항암 요법으로 치료되고 있는, 약제학적 조성물.

청구항 100

상기 대상체로부터 수득된 게놈 샘플에서 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HER2 엑손 20 돌연변이를 검출하는 단계를 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 반응을 예측하는 방법으로서, 상기 샘플이 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성인 경우, 상기 환자가 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대해 유리한 반응을 가질 것으로 예측되는, 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 HER2 엑손 20 돌연변이가 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의되는, 방법.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 상기 게놈 샘플이 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리되는, 방법.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재가 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정되는, 방법.

청구항 104

제100항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암 요법이 mTOR 억제제인, 방법.

청구항 105

제100항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 포지오티닙 또는 아파티닙 억제제 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 유리한 반응이 종양 크기 또는 부담(burden)의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 비진행, 질환 부재 간격의 증가, 진행까지의 시간 증가, 관해의 유도, 전이의 감소 또는 환자 생존의 증가를 포함하는, 방법.

청구항 106

제100항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 유리한 반응을 가질 것으로 예측된 상기 대상체에게 포지오티닙 또는 아파티닙을 단독으로 또는 제2 항암 요법과 병용하여 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 107

(a) 인간 암 세포로부터 단리된 핵산; 및

(b) 인간 EGFR 또는 HER2 코딩 서열의 엑손 20의 적어도 제1 부분을 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍(primer pair)을 포함하는 조성물.

청구항 108

제107항에 있어서, 서열에 돌연변이가 존재할 경우, 인간 EGFR 또는 HER 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 특이적으로 혼성화될 수 있는 표지된 프로브 분자(labeled probe molecule)를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 109

제107항 또는 제108항에 있어서, 열안정성 DNA 중합효소를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 110

제107항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, dNTPS를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 111

제108항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지된 프로브가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, P772insDNP, H773insAH, H773insH, 및 V774insHV로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 경우, 인간 EGFR 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화되는, 조성물.

청구항 112

제108항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지된 프로브가 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 경우, 인간 EGFR 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화되는, 조성물.

청구항 113

제108항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지된 프로브가 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 경우, 인간 HER2 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화되는, 조성물.

청구항 114

돌연변이체(mutant) EGFR 단백질을 인코딩(encoding)하는 단리된 핵산으로서, 상기 돌연변이체 단백질이 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 EGFR과 상이한, 단리된 핵산.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, 및 V774로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 단리된 핵산.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 상기 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이가 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774, 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있는, 단리된 핵산.

청구항 117

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, P772insDNP, H773insAH, H773insH, 및 V774insHV로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 핵산.

청구항 118

제114항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 엑손 20 돌연변이가 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 핵산.

청구항 119

제114항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산이 서열번호 8, 9, 10, 11 또는 12의 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 120

돌연변이체 HER2 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산으로서, 상기 돌연변이체 단백질이 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 HER2와 상이한, 단리된 핵산.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780, 및/또는 L786에 있는, 단리된 핵산.

청구항 122

제120항 또는 제121항에 있어서, 상기 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이가 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 단리된 핵산.

청구항 123

제120항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산이 서열번호 14, 15, 16, 17 또는 18의 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2019년 3월 29일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/826,843호의 이익을 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0002] **서열 목록의 통합**

[0003] 3.59KB(Microsoft Windows에서 측정됨)이고 2020년 3월 27일에 생성된 "UTFCP1383WO.txt"라는 명칭의 파일에 함유된 서열 목록은 전자 제출을 통해 여기에 제출되었으며, 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에서 수여한 승인 번호 CA190628하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0005] **1. 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 의학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 그것은 삽입 돌연변이와 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손(exon) 20 돌연변이를 갖는 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0007] **2. 관련 기술의 설명**

[0008] NSCLC의 약 10-15%는 활성화 EGFR 돌연변이를 보유한다. 종양이 "고전적인" 감작 돌연변이(L858R 및 엑손 19 결실)를 갖는 이러한 환자의 대다수의 경우, 게피티닙 및 에를로티닙과 같은 TKI는 극적인 임상 이점을 제공하며, 약 70%가 화학요법 단독과 비교하여 객관적 반응(OR), 개선된 무진행 생존(PFS), 및 삶의 질을 경험한다(Maemondo et al., 2010). 그러나, EGFR 돌연변이체(mutant) NSCLC 종양의 약 10-12%는 EGFR의 엑손 20 내에 인-프레임 삽입을 갖고(Arcila et al., 2012), 일반적으로 EGFR TKI에 내성이 있다. 또한, NSCLC에서 HER2 돌연변이의 90%는 엑손 20 돌연변이이다(Mazieres et al., 2013). 함께, EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이는 NSCLC 환자의 약 4%를 포함한다. 지금까지 데이터는 일부 전임상 활성이 아파티닙으로 처리된 HER2 마우스 모델에서 관찰되었지만(Perera et al., 2009), HER2의 이용 가능한 TKI(아파티닙, 라파티닙, 네라티닙, 다코미티닙)가 40% 이하의 OR 비율을 보고하는 많은 연구로 HER2 돌연변이체 종양을 갖는 환자에서 제한된 활성을 가짐(Kosaka et al., 2017)을 시사한다.

[0009] EGFR 및 HER2의 엑손 20은 c-나선(EGFR의 잔기 762-766 및 HER2의 770-774)과 c-나선 후 루프(EGFR의 잔기 767-774 및 HER2의 775-783)의 두 가지 주요 영역을 포함한다. EGFR 엑손 20 삽입 D770insNPG의 결정학은 잔기 764 이후의 삽입에서 1세대 TKI에 대한 내성을 유도하는 안정화되고 융기된 활성 형태를 나타냈다. 그러나, EGFR A763insFQEA의 모델링은 잔기 764 이전의 삽입이 이러한 효과를 나타내지 않고 약물 내성을 유도하지 않는다는 것을 입증했다(Yasuda et al., 2013). 또한, 삽입이 c-나선(EGFR H773insNPH) 이후 루프에 있는 EGFR 엑손 20 구동 NSCLC의 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서, 3세대 EGFR TKI, 오시머티닙(AZD9291) 및 로실레티닙(CO-1696)이 최소 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Yang et al., 2016). 희귀한 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이의 최근 연구에서, 저자는 다코미티닙 및 아파티닙과 같은 공유 퀴나졸린 기반 2세대 억제제에 대한 이종성 반응을 발견했지만; 보다 일반적인 엑손 20 삽입 돌연변이를 표적으로 하는 데 필요한 농도는 임상적으로 달성 가능한 농도 이상이었다(Kosaka et al., 2017). 따라서, EGFR 및 HER2에서 엑손 20 돌연변이, 특히 삽입 돌연변이를 보유하는 NSCLC 종양의 선천적 약물 내성을 극복하기 위한 신규 요법을 식별하기 위한 상당한 임상적 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 개시내용의 구현예는 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 환자에서 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 대상체(subject)에게 유효량의 포지오티닙(poziotinib)을 투여하는 단계를 포함하여, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 대상체는 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다. 특정 측면에서, 대상체는 인간이다.

과제의 해결 수단

[0011] 일부 측면에서, 포지오티닙은 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의된다. 특정 측면에서, 포지오티닙 하이드로클로라이드 염은 정제로서 제형화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 신규(*de novo*) EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의된다.

[0012] 특정 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이(point mutation), 삽입 및/또는 결실을 포함한다. 일부 측면에서, 대상체는 2, 3, 또는 4개의 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774, 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있다.

[0013] 특정 측면에서, 대상체는 C797S 및/또는 T790M과 같은 잔기 C797 및/또는 T790에서 EGFR 돌연변이를 갖지 않는 것으로 결정되었다. 일부 측면에서, 하나 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 측면에서, 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771delNPH insFH 및/또는 N771dupNPH이다.

[0014] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성이거나 내성을 나타냈다. 특정 측면에서, 티로신 키나제 억제제는 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙이다.

[0015] 특정 측면에서, 포지오티닙은 경구 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 5-25mg, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25mg의 용량으로 투여된다. 특정 측면에서, 포지오티닙은 8mg, 12mg 또는 16mg의 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 매일 투여된다. 특정 측면에서, 포지오티닙은 연속적으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 28일 주기로 투여된다.

[0016] 특정 측면에서, 대상체는 대상체로부터의 게놈 샘플(genomic sample)을 분석함으로써 삽입 돌연변이와 같은 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다. 일부 측면에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직(normal tissue), 또는 종양 조직으로부터 단리된다. 특정 측면에서, EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 서열분석(sequencing)(예: 종양 조직의 DNA 서열분석 또는 혈장으로부터 순환 유리 DNA) 또는 PCR 분석에 의해 결정된다.

[0017] 특정 측면에서, 상기 방법은 추가의 항암 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 항암 요법은 화학요법, 방사선 요법, 유전자 요법, 수술, 호르몬 요법, 항혈관신생 요법(anti-angiogenic therapy) 또는 면역요법이다. 특정 측면에서, 포지오티닙 및/또는 항암 요법은 정맥내, 피하, 골내, 경구, 경피, 지속 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제로 또는 설하 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙 및/또는 항암 요법의 투여는 국소, 국부 또는 전신 투여를 포함한다. 특정 측면에서, 포지오티닙 및/또는 항암 요법은 매일, 격일 또는 매주와 같이 2회 이상 투여된다.

[0018] 일부 측면에서, 암은 구강암(oral cancer), 구강인두암(oropharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 호흡기암(respiratory cancer), 비뇨생식기암(urogenital cancer), 위장관암(gastrointestinal cancer), 중추 또는 말초신경계 조직암(central or peripheral nervous system tissue cancer), 내분비 또는 신경내분비암 또는 조혈암(endocrine or neuroendocrine cancer or hematopoietic cancer), 신경교종(glioma), 육종(sarcoma), 암종(carcinoma), 림프종(lymphoma), 흑색종(melanoma), 섬유종(fibroma), 수막종(meningioma), 뇌암(brain cancer), 구강인두암(oropharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 신장암(renal cancer), 담도암(biliary cancer), 갈색세포종(pheochromocytoma), 췌도세포암(pancreatic islet cell cancer), 리-프라우메니 종양(Li-Fraumeni tumor), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 뇌하수체 종양(pituitary tumors), 부신 종양(adrenal gland tumors), 골형성 육종 종양(osteogenic sarcoma tumors), 다발성 신경내분비 I형 및 II형 종양(multiple neuroendocrine type I and type II tumors), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 전립선암(prostate cancer), 식도암(esophageal cancer), 기관암(tracheal cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 위암

(stomach cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁암(uterine cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 고환암(testicular cancer), 결장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer) 또는 피부암(skin cancer)이다. 특정 측면에서, 암은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)이다.

[0019] 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 것으로 결정된 환자를 위한 포지오티닙을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함한다. 특정 측면에서, 대상체는 2, 3, 또는 4개의 EGFR 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다.

[0020] 일부 측면에서, 포지오티닙은 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의된다. 특정 측면에서, 포지오티닙 하이드로클로라이드 염은 정제로서 제형화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 신규 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의된다.

[0021] 일부 측면에서, 포지오티닙은 경구 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 5-25mg, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25mg의 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 8mg, 12mg 또는 16mg의 용량으로 투여된다. 특정 측면에서, 포지오티닙은 매일 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 연속적으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 28일 주기로 투여된다.

[0022] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성이거나 내성을 나타냈다. 특정 측면에서, 티로신 키나제 억제제는 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙이다.

[0023] 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 및 H773으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있다. 특정 측면에서, 대상체는 C797S 및/또는 T790M과 같은 잔기 C797 및/또는 T790에서 EGFR 돌연변이를 갖지 않는 것으로 결정되었다. 특정 측면에서, 하나 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 환자는 항암 요법으로 치료받고 있다.

[0024] 또 다른 구현예에서, 상기 환자로부터 수득된 게놈 샘플에서 EGFR 엑손 20 돌연변이(예: EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이)를 검출하는 단계를 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 포지오티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 반응을 예측하는 방법이 제공되고, 여기서 상기 샘플이 EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성이면, 환자는 포지오티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대해 유리한 반응을 가질 것으로 예측된다. 일부 측면에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리된다. 특정 측면에서, EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정된다. 특정 측면에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함한다. 일부 측면에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 잔기 A763, H773, A767, S768, V769, D770, N771 및/또는 D773에 있다. 일부 측면에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH 및 N771dupNPH로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0025] 특정 측면에서, 포지오티닙 억제제 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 유리한 반응은 종양 크기 또는 부담(burden)의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 무진행, 질환 부재 기간의 증가, 진행까지의 시간의 증가, 관해의 유도(induction of remission), 전이의 감소 또는 환자 생존의 증가를 포함한다. 추가 측면에서, 유리한 반응을 가질 것으로 예측된 환자는 포지오티닙을 단독으로 또는 제2 항암 요법과 병용하여 투여된다.

[0026] 일부 측면에서, 포지오티닙은 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의된다. 특정 측면에서, 포지오티닙 하이드로클로라이드 염은 정제로서 제형화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 신규 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의된다.

[0027] 일부 측면에서, 포지오티닙은 경구 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 5-25mg, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25mg의 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 8mg, 12mg 또는 16mg의 용량으로 투여된다. 특정 측면에서, 포지오티닙은 매일 투여된다.

일부 측면에서, 포지오티닙은 연속적으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 28일 주기로 투여된다.

[0028] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성이거나 내성을 나타냈다. 특정 측면에서, 티로신 키나제 억제제는 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙이다.

[0029] 추가 구현예는 유효량의 포지오티닙 또는 아파티닙을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 대상체는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780, 및/또는 L786에 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 V773, A775, G776, S779, G778, 및/또는 P780에 있다. 특정 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0030] 일부 측면에서, 포지오티닙은 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의된다. 특정 측면에서, 포지오티닙 하이드로클로라이드 염은 정제로서 제형화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 신규 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의된다.

[0031] 일부 측면에서, 포지오티닙은 경구 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 5-25mg, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25mg의 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 8mg, 12mg 또는 16mg의 용량으로 투여된다. 특정 측면에서, 포지오티닙은 매일 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 연속적으로 투여된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 28일 주기로 투여된다.

[0032] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성이거나 내성을 나타냈다. 특정 측면에서, 티로신 키나제 억제제는 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙이다.

[0033] 일부 측면에서, 상기 방법은 mTOR 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 측면에서, mTOR 억제제는 라파마이신, 템시롤리무스, 에베롤리무스, 리다포롤리무스 또는 MLN4924이다. 특정 측면에서, mTOR 억제제는 에베롤리무스이다.

[0034] 특정 측면에서, 포지오티닙 또는 아파티닙 및/또는 mTOR 억제제는 정맥내, 피하, 골내, 경구, 경피, 지속 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제로서 또는 설하 투여된다. 일부 측면에서, 환자는 환자로부터의 게놈 샘플을 분석함으로써 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정되었다. 특정 측면에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리된다. 일부 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정된다.

[0035] 추가 측면에서, 상기 방법은 추가 항암 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 항암 요법은 화학요법, 방사선 요법, 유전자 요법, 수술, 호르몬 요법, 항혈관신생 요법 또는 면역요법이다.

[0036] 일부 측면에서, 암은 구강암, 구강인두암, 비인두암, 호흡기암, 비뇨생식기암, 위장관암, 중추 또는 말초신경계 조직암, 내분비암 또는 신경내분비암 또는 조혈암, 신경교종, 육종, 암종, 림프종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인두암, 비인두암, 신장암, 담도암, 갈색세포종, 췌도세포암, 리-프라우메니 종양, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골형성 육종 종양, 다발성 신경내분비 I형 및 II형 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 특정 측면에서, 암은 비소세포 폐암이다.

[0037] 다른 구현예에서, A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 결정된 환자를 위한 포지오티닙 또는 아파티닙을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770-785 사이의 3-

18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780, 및/또는 L786에 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 V773, A775, G776, S779, G778, 및/또는 P780에 있다. 일부 측면에서, 환자는 항암 요법으로 치료받고 있다.

[0038] 일부 측면에서, 포지오티닙은 포지오티닙 하이드로클로라이드 염으로서 추가로 정의된다. 특정 측면에서, 포지오티닙 하이드로클로라이드 염은 정제로서 제형화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 신규 EGFR 20 삽입 돌연변이로서 추가로 정의된다.

[0039] 일부 측면에서, 포지오티닙은 5-25mg, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25mg의 용량으로 조성물에 포함된다. 일부 측면에서, 포지오티닙은 8mg, 12mg 또는 16mg의 용량이다.

[0040] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 투여된 티로신 키나제 억제제에 내성이거나 내성을 나타냈다. 특정 측면에서, 티로신 키나제 억제제는 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, 오시머티닙, 이브루티닙, 나자르티닙 또는 베라티닙이다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 상기 환자로부터 수득된 게놈 샘플에서 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및 L786V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 HER2 엑손 20 돌연변이(예: HER2 엑손 20 삽입 돌연변이)를 검출하는 단계를 포함하는, 암에 걸린 환자에서 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 반응을 예측하는 방법이 제공되고, 여기서 상기 샘플이 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성이면, 환자는 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대해 유리한 반응을 갖는 것으로 예측된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 추가로 포함한다. 특정 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 V773, A775, G776, V777, G778, S779, 및/또는 P780에 있다. 다른 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779 및/또는 P780에 있다.

[0042] 일부 측면에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직, 또는 종양 조직으로부터 단리된다. 특정 측면에서, HER2 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 서열분석 또는 PCR 분석에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 항암 요법은 mTOR 억제제이다. 일부 측면에서, 포지오티닙 또는 아파티닙 억제제 단독 또는 항암 요법과의 병용에 대한 유리한 반응은 종양 크기 또는 부담의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 비진행, 질환 부재 간격의 증가, 진행 시간의 증가, 관해의 유도, 전이의 감소 또는 환자 생존의 증가를 포함한다. 추가 측면에서, 유리한 반응을 가질 것으로 예측된 환자는 포지오티닙이 단독으로 또는 제2 항암 요법과 병용하여 투여된다.

[0043] 또한, 인간 암 세포로부터 단리된 핵산; 및 인간 EGFR 또는 HER2 코딩 서열의 엑손 20의 적어도 제1 부분을 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍(primer pair)을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 조성물은 서열에 돌연변이가 존재하는 경우, 인간 EGFR 또는 HER 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 특이적으로 혼성화될 수 있는 표지된 프로브 분자(labeled probe molecule)를 추가로 포함한다. 특정 측면에서, 조성물은 열안정성 DNA 중합효소를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 조성물은 dNTPS를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 표지된 프로브는 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 경우, 인간 EGFR 코딩 서열의 엑손 20의 첫 번째 부분에 혼성화된다.

[0044] 특정 측면에서, 표지된 프로브는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및 P780insGSP로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 돌연변이가 존재할 경우, 인간 HER2 코딩 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화된다.

[0045] 또 다른 구현예에서, 돌연변이체 EGFR 단백질을 인코딩(encoding)하는 단리된 핵산이 제공되고, 여기서 상기 돌연변이체 단백질은 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 EGFR과 상이하다. 일부 측면에서, 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774, 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 있다. 특정 측면에서, 하나 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A763insLQEA, A767insASV, S768dupSVD, S768I, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, N771dupNPH, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, N771dupN, P772insDNP, H773insAH, H773insH, V774M, V774insHV, R776H, 및 R776C로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 측면에서, 핵산은 서열번호 8, 9, 10, 11 또는 12의 서열을 포함한다.

[0046] 또 다른 구현예에서, 돌연변이체 HER2 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서 상기 돌연변이체 단백질은 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 HER2와 상이하다. 일부 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 V773, A775, G776, V777, G778, S779, 및/또는 P780에 있다. 특정 측면에서, 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, 및 V773M으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 측면에서, 핵산은 서열번호 14, 15, 16, 17 또는 18의 서열을 포함한다.

[0047] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는, 본 발명의 정신 및 범위 내에서 다양한 변경 및 변형이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내면서 단지 예시 목적으로 제공된 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0048] 다음 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1j: Exon 20 삽입 돌연변이는 공유 및 비공유 TKI에 대한 새로운 내성을 유도한다. (**도 1a**) 고전적 및 엑손 20 EGFR 돌연변이를 갖는 환자의 무진행 생존(PFS)은 제1 라인 요법에 대한 내성을 입증한다. 엑손 20 삽입을 갖는 환자는 생존 퍼센트가 감소했다. (**도 1b**) 안정한 Ba/F3 모델에서 생성된 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이의 개략도. 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 EGFR(**도 1c-e**) 및 (**도 1f-h**) HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. (**도 1c-h**) 6개 세포주의 평균 ± SEM을 각 농도에 대해 플롯팅하였다(n=3). (**도 1i**) EGFR D770insNPG 및 T790M의 3-D 모델링. P-루프와 α-c-나선이 결합 포켓으로 이동하면 입체 장애를 유도하여 AZD9291을 결합 포켓의 밖으로 밀어낸다. (**도 1j**) HER2 A775insYVMA 및 WT의 3-D 모델링. P-루프와 α-c-나선이 결합 포켓으로 전체적으로 이동하면 결합 포켓의 크기가 전반적으로 감소한다.

도 2a-2g: 포지오티닙은 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 강력하게 억제한다. 72시간 동안 포지오티닙으로 처리된 EGFR(**도 2a**) 및 HER2(**도 2b**) 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. 각 개별 세포주의 평균 ± SEM은 각 농도에 대해 플롯팅된다(n=3). (**도 2c**) 웨스턴 블롯팅은 2시간의 포지오티닙 처리 후 Ba/F3 세포주에서 p-EGFR 및 p-HER2의 억제를 확인한다(n=2). (**도 2d**) Ba/F3 EGFR 엑손 20 삽입 위치와 아미노산 위치의 상관관계(n=2). 피어슨(Pearson) 상관 관계 및 p-값은 GraphPad Prism을 사용하여 결정되었다. (**도 2e**) 72시간 동안 포지오티닙 또는 아파티닙으로 처리된 EGFR A767dupASV를 발현하는 환자 유래 세포주 CUTO14의 세포 생존력의 용량 반응 곡선및 (**도 2f**) EGFR N771del insFH를 발현하는 YULO019의 세포 생존력의 용량 반응 곡선(n=3). (도 2f) 72시간 동안 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙 또는 포지오티닙과 함께 배양한 후 Ba/F3 EGFR T790M 세포주의 IC50 값으로 정규화된 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포의 IC50 값(n=3). (**도 2g**) 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. 1보다 큰 값은 T790M에 비해 덜 강력한 억제를 나타내는 반면, 1보다 작은 값은 T790M에 비해 엑손 20 삽입에 대한 더 강력한 억제를 나타낸다.

도 **3a-3h**: 포지오티닙은 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이 마우스 모델에서 종양 부담을 감소시킨다. EGFR D770insNPG(**도 3a**) 또는 HER2 A775insYVMA(**도 3b**) 마우스를 비히클(EGFR n=5 및 HER2 n=4), 20mg/kg의 아파티

닙(EGFR n=4) 또는 10mg/kg의 포지오티닙(EGFR n=5 및 HER2 n=6)으로 4주 동안 매일 처리했다. MRI로 측정된 종양 용적 변화의 폭포 플롯은 각각 EGFR 및 HER2 GEMM에서 4주째에 포지오티닙으로 85% 및 60% 종양 억제를 입증한다. (**도 3a-b**) 양측 스튜던트 t-테스트(Two-sided student's t-test)를 사용하여 p-값을 계산했다. 4주 포지오티닙 처리 전후의 EGFR(**도 3c**) 및 HER2(**도 3d**) GEMM의 대표적인 MRI 이미지는 강력한 종양 퇴행을 입증한다. 12주 동안 5일/주로 10mg/kg의 포지오티닙으로 처리된 EGFR D770insNPG(**도 3e**)(n=4) 및 HER2 A775insYVMA(**도 3f**)(n=6)의 종양 용적 플롯은 마우스가 포지오티닙 처리에 계속 반응함을 나타낸다. (**도 3g**) 아파티닙 또는 포지오티닙으로 처리된 YUL-0019(EGFR N771delinsFH) 세포. 10mg/kg 포지오티닙으로 처리된 세포는 가장 낮은 종양 용적을 갖고, 5mg/kg으로 처리된 세포는 2번째 내지 가장 낮은 종양 용적을 가졌다. (**도 3h**) EGFR H773insNPH PDX 마우스를 비히클 대조군(n=6), 5mg/kg(n=6) 또는 10mg/kg(n=3)의 포지오티닙으로 처리하였다. 포지오티닙으로 처리된 마우스는 종양 용적이 감소되었다. 폭포 플롯은 모든 포지오티닙 처리 마우스에서 종양 부담이 >85%까지 감소되었으며, 포지오티닙 처리 마우스 9마리 중 8마리에서 이종이식편이 잔류 덩어리로 완전히 감소되었음을 입증한다. 일원 ANOVA 분석은 터키 테스트(Tukey's test)와 함께 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. ***, p<0.0001.

도 4a-4c: EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 활성화 돌연변이이다. (**도 4a**) EGFR 엑손 20 삽입을 갖는 개별 환자의 폭포 플롯은 에를로티닙, 게프티닙 또는 아파티닙에 대한 새로운 내성을 나타낸다. 환자 돌연변이는 각 대표 막대 아래에 나열된다. (**도 4b**) EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 안정한 Ba/F3 세포주는 Ba/F3 빈 벡터 발현 세포 또는 Ba/F3 세포를 발현하는 EGFR WT와 달리 IL-3 독립 조건에서 생존 가능하며, 이는 EGFR 엑손 20 삽입이 활성화 돌연변이임을 나타낸다. (**도 4c**) 상이한 HER2 돌연변이를 발현하는 11개의 안정한 Ba/F3 세포주의 IL-3 독립적 성장은 대부분의 HER2 활성화 돌연변이가 HER2의 엑손 20 내에 있음을 나타낸다. L755P를 제외한 모든 활성화 돌연변이는 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이였다. (**도 4b-c**) 세포 생존력은 세포 역가 Glo 검정에 의해 결정되었다. 평균 ± SEM은 각 세포주에 대해 플롯팅된다(n=3).

도 5: 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 개별 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. 평균 ± SEM은 각 농도에 대해 플롯팅된다(n=3).

도 6: 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 개별 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. 평균 ± SEM은 각 농도에 대해 플롯팅된다(n=3).

도 7a-7d: 잔기 A763 이후의 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 1세대 및 3세대 TKI에 내성이 있다. EGFR 엑손 20 삽입을 갖는 Ba/F3 세포를 1시간 동안 혈청 결핍시킨 다음, 지시된 용량의 (**도 7a**) 에를로티닙 또는 (**도 7c**) 오시머티닙으로 2시간 동안 처리하였다(N=2). (**도 7b**) 에를로티닙 처리 및 (**도 7d**) 오시머티닙 처리 후의 p-EGFR 및 p-HER2 수준을 Photoshop을 사용하여 정량화하였다. 값은 Graphpad Prism에 플롯팅되었으며, 막대는 평균 ±SEM을 나타낸다. (N=2) $p < 0.05(^{*})$, $p < 0.01(^{**})$ 또는 $p < 0.001(^{***})$.

도 8a-8e: EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 시험관내에서 포지오티닙에 민감하다. (**도 8a**) 표시된 Ba/F3 세포주에서 2시간의 포지오티닙 처리 후 p-EGFR 및 p-HER2의 웨스턴 블롯은 Photoshop을 사용하여 정량화하였다. 값은 Graphpad Prism에 플롯팅되었으며, 막대는 평균 ±SEM을 나타낸다. (N=2) (**도 8b**) 지시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙(N=3)의 3시간 후 CUTO-14 환자 유래 세포주의 웨스턴 블롯. (**도 8c**) CUTO-14 세포주에서 아파티닙 또는 포지오티닙의 지시된 용량의 3시간 후 웨스턴 블롯으로부터 p-EGFR의 정량화. 포지오티닙 처리는 p-EGFR을 감소시켰다. (**도 8d**) IC50 값 대 Ba/F3 세포주의 상대적 발현의 선형 회귀 플롯은 발현과 포지오티닙에 대한 감수성 사이에 상관관계가 없음을 입증하였다(n=2). (**도 8e**) IC50 값 대 HER2 수용체 내의 돌연변이 위치의 선형 회귀 플롯은 HER2 돌연변이체 Ba/F3 세포주(n=2)에서 위치와 포지오티닙에 대한 감수성 사이에 상관관계가 없음을 입증했다. 피어슨 상관관계 및 p-값은 Graphpad prism을 사용하여 계산되었다. $p < 0.05(^{*})$, $p < 0.01(^{**})$ 또는 $p < 0.001(^{***})$.

도 9: C797S 및 EMT는 시험관내 포지오티닙 내성의 두 가지 별개의 메커니즘이다. 72시간 동안 포지오티닙으로 처리된 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. 평균 ± SEM은 각 농도에 대해 플롯팅된다(n=3).

도 10: 표시된 TKI로 처리된 MCF10A HER2 G776del insVC 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선.

도 11a-11d: (**도 11a-b**) 72시간 동안 포지오티닙 또는 지시된 TKI로 처리된 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선. (**도 11c-d**) 72시간 동안 포지오티닙 또는 지시된 TKI로 처리된 내성 돌연변이를

포함하는 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선.

도 12: 72시간 동안 포지오티닙 또는 지시된 TKI로 처리된 HER2 돌연변이체 Ba/F3 세포주의 세포 생존력의 용량 반응 곡선.

도 13a-13b: HER2 돌연변이는 수용체에 걸쳐 발생하는 돌연변이 핫스팟을 갖는 다양한 암 유형에서 발생한다. 암에 의한 HER2 돌연변이(**a**) 및 HER2 엑손 20 돌연변이(**b**) 빈도의 가중 평균의 막대 플롯. 막대는 가중 평균 ± SEM을 나타낸다. 점 크기는 각 데이터베이스에서 환자 수를 나타낸다. Guardant Health에서 보고된 cfDNA에 의해 검출된 HER2 돌연변이의 빈도는 문헌(Odegaard et al 2018)에 보고된 바와 같이 임상 감수성에 대해 정규화되었다.

도 14a-14h: HER2 돌연변이 핫스팟은 암 유형에 따라 다르다. (**a**) 모든 암(N=2338), (**b**) 폐암(N=177), (**c**) 유방암(N=143) 및 (**d**) 결장직장암(N=219)에 걸친 HER2 돌연변이 위치의 빈도에 대한 파이 차트는 cBioportal 및 MD Anderson 데이터베이스에 보고되었다. (**e**) cBioPortal 및 MD Anderson(N=2338 HER2 돌연변이)에 보고된 모든 암에 걸쳐 10개의 가장 흔한 HER2 돌연변이의 Lollipop 플롯. 막대의 길이는 돌연변이의 빈도에 비례한다. (**e-h**) cBioPortal 및 MD Anderson 데이터베이스에서 NSCLC(**f**, N=177), 유방암(**g**, N=143) 및 결장직장암(**h**, N=219)에 걸친 10개의 가장 흔한 HER2 돌연변이의 Lollipop 플롯; 막대의 길이는 보고된 돌연변이의 빈도에 비례한다.

도 15a-15c: 티로신 키나제 도메인에서 가장 흔한 HER2 변이체는 활성화 돌연변이이다. 14일 동안 IL-3 비함유 조건에서 성장한 HER2 엑손 19(**a**), HER2 엑손 20(**b**) 및 HER2 엑손 21(**c**) 돌연변이를 발현하는 안정한 Ba/F3 세포주의 세포 생존력. 세포 생존력은 세포 역가 Glo 검정에 의해 3일 마다 결정되었다. 평균 ± SEM은 각 세포주에 대해 플롯팅된다(n=3 생물학적 독립 실험).

도 16a-16f: 포지오티닙은 Ba/F3 세포에서 HER2 돌연변이에 대해 테스트된 가장 강력한 억제제였다. (**a**) 약물 처리 72시간 후 표시된 돌연변이 및 약물을 안정적으로 발현하는 Ba/F3 세포에 대해 GraphPad에서 계산된 log IC_{50} 값의 히트맵. 세포 생존력은 세포 역가 Glo 검정(N≥3)에 의해 결정되었다. 아파티닙, 네라티닙, 타를록소티닙-TKI 또는 포지오티닙으로 72시간 동안 약물 처리 후 HER2 돌연변이(**b**), HER2 엑손 19 돌연변이체 세포주(**c**), HER2 엑손 20 돌연변이체 세포주(**d**) 또는 HER2 엑손 21 돌연변이체 세포주(**e**)를 발현하는 모든 Ba/F3 세포주에 대한 평균 IC_{50} 값. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다(N≥3). (**c-e**) Dunn의 다중 비교 테스트를 사용하는 일원 ANOVA를 사용하여 그룹 간의 통계적 유의성을 결정했다. (**f**) 표시된 억제제와 함께 L755S 또는 L755P를 발현하는 Ba/F3 세포의 평균 IC_{50} 값. 점은 평균 ± SEM(N≥3)을 나타낸다. 통계적 유의성은 쌍을 이룬 t-테스트(paired t-test)에 의해 결정되었다.

도 17a-17d: HER2 돌연변이체의 분자 동역학 시뮬레이션은 Y772dupYVMA 및 L755P 돌연변이에 대한 감소된 약물 감수성에 대한 가능한 메커니즘을 나타낸다. (**a**) 150ns 가속화 분자 동역학 시뮬레이션 동안 HER2 V777L 및 Y772dupYVMA 엑손 20 돌연변이체에 대한 α-C-나선 위치. (**b**) α-C-나선 "인(in)" 대 "아웃(out)" 형태에서 HER2 엑손 20 돌연변이체에 대한 분자 동역학 스냅샷의 분별 집단(fractional population). (**c**) V777L 및 Y772dupYVMA 돌연변이체의 분자 동역학 스냅샷. P-루프와 키나제 힌지(hinge) 형태에는 최소의 차이가 있지만 α-C 나선 위치에는 상당한 이동이 있다. (**d**) L755P 및 L755S HER2 돌연변이체의 분자 동역학 스냅샷. L755P 돌연변이체는 V790과의 백본 수소 결합이 부족하여 키나제 힌지의 불안정화와 결합 부위를 향한 P-루프의 수축을 초래한다.

도 18a-18f: HER2 돌연변이를 발현하는 인간 세포주는 또한 포지오티닙에 가장 민감하다. 72시간 동안 표시된 억제제로 처리된 엑손 20 삽입 돌연변이, HER2 G776delinsVC(**a**), HER2 Y772dupYVMA(**b**), HER2 G778dupGSP(**c**)를 발현하는 MCF10A 세포의 용량 반응 곡선. (**d**) MCF10A HER2 선택성 지수(selectivity index)의 막대 그래프. 돌연변이체 세포주의 IC_{50} 값을 각각의 표시된 약물에 대한 HER2 WT 발현 세포주의 평균 IC_{50} 값으로 나누었다. 점은 각 세포주에 대한 평균 ± SEM을 나타내고, 막대는 모든 3개 세포주의 평균 ± 최소/최대를 나타낸다(각 세포주에 대해 N≥3). (**e**) 72시간 동안 표시된 억제제로 처리된 HER2 엑손 19 돌연변이 L755S를 보유하는 CW-2 대장 세포의 용량 반응 곡선. (**a-c, e**) 곡선은 평균 ±SEM, N=3을 나타낸다. (**f**) 21일째의 CW-2 종양 용적의 막대 그래프. 마우스는 5일/주 비히클 대조군(N=5), 30mg/kg 네라티닙(N=5), 20mg/kg 아파티닙(N=5) 또는 5mg/kg 포지오티닙(N=5)으로 처리하였고, 종양은 점선으로 표시된 350mm^3에서 무작위화되었다. 점은 개별 종양을 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. 통계적 유의성은 일원 ANOVA에 의해 결정되었다.

도 19a-19d: HER2 돌연변이를 갖는 NSCLC 환자는 포지오티닙에 대해 42%의 확인된 반응률을 갖는다. (**a**) 임상 시험 NCT03066206에서 처음 12개의 HER2 엑손 20 환자 반응의 폭포 플롯. 객관적 부분 반응이 제시되고(왼쪽부터: 막대 7, 8, 10, 11, 12), 미확인 반응이 제시되고(막대 9), 안정한 질환이 제시되고(막대 3-6), 진행성 질환이 제시된다(막대 1-2). (**b**) 처음 12명의 HER2 엑손 20 환자의 무진행 생존에 대한 카플란-마이어(Kaplan-meier) 플롯은 2018년 12월 기준으로 mPFS가 5.6개월임을 입증한다. (**c**) 포지오티닙 처리 1일 전 및 요법 8주 후 HER2 Y772dupYVMA 돌연변이를 갖는 환자의 CT 스캔. (**d**) 포지오티닙 처리 1일 전 및 4주 후 HER2 L755P 돌연변이체 NSCLC 환자의 PET 스캔. 환자는 이전에 트라스투주맙, 니볼루맙 및 항 TDM1과 함께 백금 기반 화학요법을 통해 치료를 받고 진행되었지만, 포지오티닙 처리로 표적 병변이 -12% 감소했다.

도 20a-20g: 포지오티닙 처리는 세포 표면에 HER2의 축적을 유도하고, 포지오티닙과 T-DM1 치료의 조합은 항종양 활성을 강화한다. (**a**) 10nM 포지오티닙 처리 24시간 후 HER2 Y772dupYVMA, HER2 G778dupGSP 및 HER2 G776delinsVC를 발현하는 MC10A 세포주에 대한 HER2 수용체 발현의 FACS 분석. 막대는 평균 ± SEM을 나타내며, DMSO와 포지오티닙 처리 그룹 사이에서 스튜던츠 t-테스트에 의해 유의미한 차이가 결정되었다. (**b**) 포지오티닙, T-DM1 또는 포지오티닙과 지시된 용량의 T-DM1로 처리된 HER2 Y772dupYVMA, HER2 G778dupGSP 및 HER2 G776delinsVC를 발현하는 MCF10A 세포주의 IC_{50} 값의 막대 그래프. 막대는 평균 ± SEM을 나타내며(n=3 독립 실험), 유의미한 차이는 일원 ANOVA 및 Dunn의 다중 사후 비교에 의해 결정되었다. (**c**) 표시된 억제제로 처리된 HER2 Y772dupYVMA NSCLC PDX의 종양 성장 곡선. 포지오티닙 처리는 주당 5일 투여되었으며, T-DM1은 치료 초기에 1회 투여되었다. (**d**) 무진행 생존(PFS)의 카플란-마이어 곡선, 여기서 PFS는 최상의 반응으로부터 종양 배가로서 정의된다. Mantel-Cox 로그 순위 테스트는 그룹 간의 유의한 차이를 결정하는 데 사용되었다. 마우스는 안락사시에 검열되었다. (**e**) 15일째에 표시된 억제제로 처리된 마우스의 종양 용적 변화 퍼센트의 점 플롯. (**f**) 15일 및 45일째에 각 그룹에서 종양 보유 마우스 수의 차트. (**g**) 표시된 억제제로 처리된 HER2 Y772dupYVMA 마우스의 종양 용적의 스파이더 플롯. 빨간색 점선은 무작위화 지점($300mm^3$)을 나타낸다.

도 21a-21d: 엑손 20 삽입 돌연변이 다양성은 Guardant, cBioPortal 및 MD Anderson 데이터베이스에서 암 유형에 따라 다르다. (**a**) 모든 암 유형, N=517에서 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이 빈도의 파이 차트. 엑손 20 삽입 돌연변이의 빈도는 암 유형에 따라 추가로 분석되었다: (**b**) 폐암, N=362, (**c**) 유방암, N=30, (**d**) 기타 암, N=125.

도 22a-22b: 일반적인 HER2 돌연변이는 구성적으로 인산화되고, p-HER2 발현은 약물 감수성과 상관관계가 없다. (**a**) 상대적 p-HER2 발현은 ELISA에 의해 결정된 바와 같이 총 HER2에 대한 p-HER2의 비율을 취함으로써 결정되었다. 막대는 평균 ± SEM 및 n=3을 나타낸다. ND = 검출 한계 미만. (**b**) 상대적 HER2의 상관관계는 Ba/F3 HER2 돌연변이체 세포주에 대한 포지오티닙 IC50 값에 대해 플롯팅되었다. 피어슨 상관관계 및 p-값은 GraphPad Prism(n=3)에 의해 결정되었다.

도 23a-23b: 분자 모델링은 HER2 돌연변이체가 결합 포켓 크기가 다르다는 것을 나타낸다. (**a**) HER2 키나제 도메인 엑손 19, 20 및 21 단백질 백본은 각각 파란색, 분홍색 및 주황색으로 착색되었다. 주형 X선 구조(PDB 3PP0)로부터 리간드는 녹색 막대로 렌더링되고, 돌연변이된 잔류물/삽입 위치에 표지가 제공된다. (**b**) 가속화 분자 동역학 시뮬레이션으로부터 취한 HER2 돌연변이체에 대한 결합 포켓 용적 프로파일.

도 24: 포지오티닙은 HER2 돌연변이 세포주에서 p-HER2를 억제한다. 표시된 약물 및 용량의 2시간 처리 후 G776delinsVC를 발현하는 MCF10A 세포의 웨스턴 블롯.

도 25: 포지오티닙은 엑손 19 돌연변이체 결장직장암의 이종이식편에서 종양 성장을 억제한다. HER2 L755S 돌연변이를 보유하는 CW-2 세포를 6주령 암컷 nu/nu 누드 마우스의 옆구리에 주사했다. 종양이 $350mm^3$에 도달했을 때 마우스를 4개의 그룹: 20mg/kg 아파티닙, 5mg/kg 포지오티닙, 30mg/kg 네라티닙 또는 비히클 대조군으로 무작위화했다. 종양 용적은 주당 3회 측정하였고, 마우스는 월요일-금요일(주당 5일) 약물을 투여받았다. 기호는 각 시점에 대한 평균 ± SEM을 나타낸다. 터키의 다중 비교 테스트를 사용한 2원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. 별표는 비히클과 포지오티닙 또는 네라티닙 간의 유의성을 나타낸다. 각 비교에 대한 P-값은 유의한 차이가 처음 검출된 지 10일째부터 시작하여 아래에 나열되어 있다.

도 26: 포지오티닙은 EGFR S768dupSVD PDX 모델에서 고용량 오시머티닙보다 더 효과적이다. 6-8주령의 암컷 NSG 마우스에 EGFR S768dupSVD 돌연변이를 보유하는 환자 NSCLC 종양 단편을 이식하고, 종양이 $300mm^3$에 도달하면 마우스를 4개의 그룹: 비히클 대조군, 포지오티닙 2.5mg/kg, 오시머티닙 5mg/kg 또는 오시머티닙 25mg/kg으

로 무작위화했다. 약물은 주당 5일 마우스에 투여되었고, 종양 용적은 주당 3회 측정되었다. 기호는 각 시점에서 평균 ± SEM 종양 용적을 나타낸다. 점 플롯은 21일째의 평균 종양 용적의 변화 퍼센트를 나타내며, 여기서 각 점은 단일 마우스를 나타낸다.

도 27: 포지오티닙은 Y772dupYVMA를 보유하는 NSCLC의 PDX 모델에서 네라티닙보다 더 높은 항종양 활성을 갖는다. 6-8주령의 암컷 NSG 마우스에 HER2 Y772dupYVMA 돌연변이를 보유하는 환자 NSCLC 종양 단편을 이식하고, 종양이 300mm^{3}에 도달하면 마우스를 비히클 대조군, 포지오티닙 2.5mg/kg 또는 네라티닙 30mg/kg의 3개 그룹으로 무작위화했다. 약물은 주당 5일 마우스에 투여되었고, 종양 용적은 주당 3회 측정되었다. 기호는 각 시점에서 평균 ± SEM 종양 용적을 나타낸다. 점 플롯은 21일째의 평균 종양 용적의 변화 퍼센트를 나타내며, 여기서 각 점은 단일 마우스를 나타낸다. ANOVA를 사용하여 처리 종료시 표시된 막대에 대한 p-값을 결정했다.

도 28: 단일 제제 포지오티닙은 V777L을 보유하는 유방암 PDX에서 네라티닙보다 더 효과적이다. 6-8주령의 암컷 NSG 마우스에 HER2 V777L 돌연변이를 보유하는 환자 유방암 종양 단편을 이식하고, 종양이 300mm^{3}에 도달하면 마우스를 비히클 대조군, 포지오티닙 2.5mg/kg 또는 네라티닙 30mg/kg의 3개 그룹으로 무작위화했다. 약물은 주당 5일 마우스에 투여되었고, 종양 용적은 주당 3회 측정되었다. 기호는 각 시점에서 평균 ± SEM 종양 용적을 나타낸다. 점 플롯은 30일째의 평균 종양 용적의 변화 퍼센트를 나타내며, 여기서 각 점은 단일 마우스를 나타낸다. ANOVA를 사용하여 처리 종료시 표시된 막대에 대한 p-값을 결정했다.

도 29: 포지오티닙은 생체내 모델에서 다양한 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체에서 항종양 활성을 갖는다. PDX 모델의 경우, 6-8주령의 암컷 NSG 마우스에 다양한 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 보유하는 표시된 종양 단편을 이식하고, 종양이 300mm^{3}에 도달하면 마우스를 비히클 대조군 또는 포지오티닙 5mg/kg의 2개 그룹으로 무작위화했다. 약물은 주당 5일 마우스에 투여되었고, 종양 용적은 주당 3회 측정되었다. 막대는 4주째의 평균 종양 용적의 변화 퍼센트를 나타내며, 여기서 각 점은 단일 마우스를 나타낸다. GEMM의 경우, 종양에 독시사이클린 식이를 유도하고, MRI에 의해 종양 형태가 확인되면 마우스를 비히클 또는 포지오티닙 10mg/kg으로 4주 동안 매일 처리했다. 막대는 4주째 평균 종양 용적의 변화 퍼센트를 나타내며, 여기서 각 점은 단일 마우스를 나타내고 종양 용적은 MRI로 측정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 돌연변이체 비소세포 폐암(NSCLC)의 활성화 돌연변이의 대부분이 이용 가능한 EGFR 티로신 키나제 억제제(TKI)에 민감하지만, EGFR 및 HER2의 엑손 20에 변경이 있는 하위 집합은 본질적으로 내성이다. 현재 연구는 이러한 엑손 20 돌연변이에 의해 유도된 구조적 변경을 모델링하고 효과적인 억제제를 식별하기 위해 인실리코, 시험관내 및 생체내 테스트를 활용했다. 3-D 모델링은 약물 결합 포켓의 크기를 제한하는 상당한 변경을 나타내어 크고 단단한 억제제의 결합을 부과했다. 포지오티닙은 작은 크기와 유연성으로 인해 이러한 입체적 변화를 피할 수 있으며 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이체 단백질의 강력하고 상대적으로 선택적인 억제제인 것으로 밝혀졌다. 포지오티닙은 또한 돌연변이체 엑손 20 EGFR 또는 HER2 NSCLC 환자 유래 이종이식(PDX) 모델 및 유전자 조작된 마우스 모델에서 강력한 활성을 가지고 있다. 따라서, 이러한 데이터는 포지오티닙을 EGFR/HER2 엑손 20 돌연변이의 강력하고 임상적으로 활성인 억제제로서 식별하고, 이러한 삽입에 의해 유도된 입체적 변화를 우회할 수 있는 키나제 억제제의 분자 특징을 조명한다.

[0050] 따라서, 본 개시내용의 특정 구현예는 엑손 20 삽입과 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 암 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특히, 본 방법은 EGFR 및/또는 HER 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 환자에게 포지오티닙(HM781-36B로도 공지됨) 또는 아파티닙을 투여함을 포함한다. 포지오티닙의 크기와 유연성은 입체 장애를 극복하여 낮은 나노몰 농도에서 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체를 억제한다. 따라서, 포지오티닙 또는 아파티닙 뿐만 아니라 구조적으로 유사한 억제제는 비가역적인 2세대 및 3세대 TKI에 내성인 EFGR 및 HER2 엑손 20 삽입을 모두 표적으로 하는 데 사용될 수 있는 강력한 EGFR 또는 HER2 억제제이다.

[0051] **I. 정의**

[0052] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구범위(들)에서 본원에 사용된 바와 같이, "포함하는"이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "a" 또는 "an"은 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0053] 청구범위에서 "또는"이라는 용어의 사용은 본 개시내용이 대안 및 "및/또는"만을 지칭하는 정의를 지지하지만 대안만을 지칭하도록 명시적으로 지시되지 않는 한 또는 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하기

위해 사용된다. 본원에 사용된 "다른"은 적어도 두 번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0054] "약"이라는 용어는 명시된 값 + 또는 - 5%를 지칭한다.

[0055] "치료" 또는 "치료하는"은 (1) 질환의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 질환의 억제(예: 병리 및/또는 증상의 추가 발달 정지), (2) 질환의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 질환의 개선(예: 병리 및/또는 증상의 역전) 및/또는 (3) 질환의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 질환의 임의의 측정 가능한 감소에 영향을 미침을 포함한다. 예를 들어, 치료에는 유효량의 포지오티닙의 투여가 포함될 수 있다.

[0056] "예방적으로 치료하는"은 (1) 질환에 걸릴 위험에 있고/있거나 소인이 있을 수 있지만 아직 질환의 임의의 또는 모든 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내지 않는 대상체 또는 환자에서 질환 발병 위험의 감소 또는 완화 및/또는 (2) 질환에 걸릴 위험에 있고/있거나 소인이 있을 수 있지만 아직 질환의 임의의 또는 모든 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내지 않는 대상체 또는 환자에서 질환의 병리 또는 증상의 발병의 늦춤을 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "환자" 또는 "대상체"는 살아있는 포유동물 유기체, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 양, 염소, 개, 고양이, 마우스, 래트, 기니피그, 또는 이들의 유전자도입 종을 지칭한다. 특정 구현예에서, 환자 또는 대상체는 영장류이다. 인간 환자의 비제한적 예는 성인, 청소년, 유아 및 태아이다.

[0058] 명세서 및/또는 청구범위에서 사용될 때, 용어 "효과적인"은 목적하는, 예상되는 또는 의도된 결과를 달성하기에 적절함을 의미한다. 화합물로 환자 또는 대상체를 치료하는 맥락에서 사용될 때 "유효량", "치료적 유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 질환을 치료 또는 예방하기 위한 대상체 또는 환자에게 투여될 때 그 화합물의 양이 이러한 질환의 치료 또는 예방에 영향을 미치기에 충분한 양임을 의미한다.

[0059] 본원에 사용된 용어 "IC_{50}"은 수득된 최대 반응의 50%인 억제 용량을 지칭한다. 이 정량적 척도는 소정의 생물학적, 생화학적 또는 화학적 과정(또는 과정의 구성요소, 즉 효소, 세포, 세포 수용체 또는 미생물)을 절반으로 억제하는 데 특정 약물 또는 기타 물질(억제제)이 얼마나 많이 필요한지를 나타낸다.

[0060] "항암" 제제는, 예를 들어, 암 세포의 사멸을 촉진하고, 암 세포에서 아폽토시스를 유도하고, 암 세포의 성장 속도를 감소시키고, 전이의 발생 또는 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 억제하고, 종양 또는 암 세포에 혈액 공급을 감소시키고, 암 세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진시키고, 암의 진행을 예방하거나 억제하고 또는 암을 갖는 대상체의 수명을 연장시킴으로써 대상체에서 암 세포/종양에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다.

[0061] 용어 "삽입(들)" 또는 "삽입 돌연변이(들)"는 DNA 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 염기쌍의 추가를 지칭한다. 예를 들어, EGFR의 엑손 20의 삽입 돌연변이는 약 2-21개 염기쌍의 아미노산 767 내지 774 사이에서 발생할 수 있다. 또 다른 예에서, HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 아미노산 770-785 사이에 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 삽입을 포함한다. 예시적인 EGFR 및 HER 엑손 20 삽입 돌연변이가 본 개시내용의 도 1에 도시되어 있다.

[0062] "혼성화하다" 또는 "혼성화"는 핵산 간의 결합을 지칭한다. 혼성화 조건은 결합되는 핵산의 서열 상동성에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 대상체 핵산 간의 서열 상동성이 높으면 엄격한 조건이 사용된다. 서열 상동성이 낮으면, 완만한 조건이 사용된다. 혼성화 조건이 엄격할 경우, 혼성화 특이성이 증가하고, 이러한 혼성화 특이성의 증가는 비특이적 혼성화 생성물의 수율을 감소시킨다. 그러나, 완만한 혼성화 조건에서는 혼성화 특이성이 감소하고, 이러한 혼성화 특이성의 감소는 비특이적 혼성화 생성물의 수율을 증가시킨다.

[0063] "프로브" 또는 "프로브들"은 길이가 적어도 8개 뉴클레오티드인 폴리뉴클레오티드를 지칭하며, 이는 프로브 내의 적어도 하나의 서열과 표적 영역 내의 서열의 상보성으로 인해 표적 서열과 하이브리드 구조를 형성한다. 폴리뉴클레오티드는 DNA 및/또는 RNA로 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 프로브는 검출가능하게 표지된다. 프로브의 크기는 크게 다를 수 있다. 일반적으로, 프로브는, 예를 들어, 길이가 적어도 8개 내지 15개 뉴클레오티드이다. 다른 프로브는, 예를 들어, 적어도 20, 30 또는 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 또 다른 프로브는 다소 더 길고, 적어도, 예를 들어, 50, 60, 70, 80, 또는 90개 뉴클레오티드 길이이다. 프로브는 또한 상기 범위에 속하는 임의의 특정 길이일 수 있다. 바람직하게는, 프로브는 중합효소 연쇄 반응 동안 표적 서열을 프라이밍하는 데 사용되는 서열(들)에 상보적인 서열을 함유하지 않는다.

[0064] "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 지칭하며, 이는 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다.

[0065] "변형된 리보뉴클레오티드" 또는 데옥시리보뉴클레오티드는 핵산에서 천연 염기 대신에 사용될 수 있는 분자를 지칭하며, 변형된 퓨린 및 피리미딘, 소수 염기, 전환 가능한 뉴클레오사이드, 퓨린 및 피리미딘의 구조적 유사체, 표지된, 유도체화된 및 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오티드, 접합된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오티드, 서열 변형제, 말단 변형제, 스페이서 변형제 및, 리보스-변형된 뉴클레오티드, 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스폰아미디트, 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포르아미디트, 메틸 포스폰아미디트, 5'-β-시아노에틸 포스포르아미디트, 메틸렌포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 펩티드 핵산, 비키랄 및 중성 뉴클레오티드 간 연결을 포함하지만 이에 제한되지 않는 백본 변형을 갖는 뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0066] "변이체"는 각각 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입에 의해 개체의 집단에서 야생형 또는 가장 우세한 형태에 비해 상이한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 교환, 결실 또는 삽입된 뉴클레오티드 또는 아미노산의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상, 예를 들어, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개일 수 있다.

[0067] "프라이머" 또는 "프라이머 서열"은 핵산 합성 반응을 프라이밍하기 위해 표적 핵산 서열(예: 증폭될 DNA 주형)에 혼성화되는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 프라이머는 DNA 올리고뉴클레오티드, RNA 올리고뉴클레오티드 또는 키메라 서열일 수 있다. 프라이머는 천연, 합성 또는 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 프라이머 길이의 상한치 및 하한치는 모두 경험적으로 결정된다. 프라이머 길이의 하한치는 핵산 증폭 반응 조건하에 표적 핵산과 혼성화시 안정한 이중체를 형성하는 데 필요한 최소 길이이다. 매우 짧은 프라이머(보통 3-4개 미만의 뉴클레오티드 길이)는 이러한 혼성화 조건하에서 표적 핵산과 열역학적으로 안정한 이중체를 형성하지 않는다. 상한치는 종종 표적 핵산에서 미리 결정된 핵산 서열 이외의 영역에서 이중체 형성 가능성에 의해 결정된다. 일반적으로, 적합한 프라이머 길이는 약 10 내지 약 40개 뉴클레오티드 길이의 범위 내이다. 특정 구현예에서, 예를 들어, 프라이머는 10-40, 15-30, 또는 10-20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 프라이머는 적절한 조건하에 놓일 때 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 합성 개시점으로 작용할 수 있다.

[0068] "검출", "검출 가능한" 및 이의 문법적 등가물은 표적 핵산 서열의 존재 및/또는 양 및/또는 동일성을 결정하는 방법을 지칭한다. 일부 구현예에서, 검출은 표적 핵산 서열의 증폭을 일으킨다. 다른 구현예에서, 표적 핵산의 서열분석은 표적 핵산을 "검출함"으로써 특성화될 수 있다. 프로브에 부착된 표지는, 예를 들어, 화학적 또는 물리적 수단에 의해 검출될 수 있는 당업계에 공지된 임의의 다양한 상이한 표지를 포함할 수 있다. 프로브에 부착될 수 있는 표지에는, 예를 들어, 형광 및 발광 물질이 포함될 수 있다.

[0069] "증폭하는", "증폭" 및 이의 문법적 등가물은 표적 핵산 서열의 적어도 일부가, 제한 없이, 핵산 서열을 선형으로 또는 지수적으로 증폭시키기 위한 광범위한 기술을 포함하는 주형 의존 방식으로 복제되는 임의의 방법을 지칭한다. 증폭 단계를 수행하기 위한 예시적인 수단은 리가제 연쇄 반응(LCR), 리가제 검출 반응(LDR), 결찰 후 Q-복제효소 증폭, PCR, 프라이머 연장, 가닥 치환 증폭(SDA), 과분지형 가닥 치환 증폭, 다중 치환 증폭(MDA), 핵산 가닥 기반 증폭(NASBA), 2단계 다중화 증폭, 롤링 서클 증폭(RCA), 재조합효소-중합효소 증폭(RPA)(TwistDx, Cambridg, UK), 및, 예를 들어, OLA/PCR, PCR/OLA, LDR/PCR, PCR/PCR/LDR, PCR/LDR, LCR/PCR, PCR/LCR(결합된 연쇄 반응-CCR로서 공지되기도 함) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다중 버전 또는 이들의 조합을 포함하는 자가 유지 서열 복제(3SR)를 포함한다. 이러한 기술에 대한 설명은 특히 문헌(참조: Sambrook et al. Molecular Cloning, 3rd Edition)에서 찾을 수 있다.

[0070] "EGFR" 또는 "표피 성장 인자 수용체" 또는 "EGFR"은 티로신 키나제 세포 표면 수용체를 지칭하며, GenBank 수탁 NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1 및 NM_201284.1로서 나타나는 4개의 대안적 전사체 중 하나에 의해 인코딩된다. EGFR의 변이체는 엑손 20에 삽입을 포함한다.

[0071] "HER2" 또는 "ERBB2"는 EGFR/ErbB 계열의 구성원이며, GenBank 수탁 NM_004448.2로서 나타난다. HER2의 변이체는 엑손 20에 삽입을 포함한다.

[0072] 본원에서 일반적으로 사용되는 "약제학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증 없이 인간 및 동물의 조직, 기관 및/또는 체액과 접촉 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0073] "약제학적으로 허용되는 염"은 상기 정의된 바와 같이 약제학적으로 허용되고 목적하는 약리학적 활성을 포함하는 본 발명의 화합물의 염을 의미한다. 이러한 염의 비제한적인 예로는 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산 및 인산과 같은 무기산; 또는 1,2-에탄디설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 3-페닐프로피온산, 4,4'-메틸렌비스(3-하이드록시-2-엔-1-카복실산), 4-메틸비사이클로[2.2.2]옥트-2-엔-1-카복실산, 아세트산, 지

방족 모노- 및 디카복실산, 지방족 황산, 방향족 황산, 벤젠설폰산, 벤조산, 캄포르설폰산, 탄산, 신남산, 시트르산, 사이클로펜탄프로피온산, 에탄설폰산, 푸마르산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 헵탄산, 헥산산, 하이드록시나프토산, 락트산, 라우릴황산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 뮤콘산, o-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 옥살산, p-클로로벤젠설폰산, 페닐-치환 알칸산, 프로피온산, p-톨루엔설폰산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 3급-부틸아세트산, 및 트리메틸아세트산과 같은 유기산으로 형성된 산 부가 염을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 또한 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있을 때 형성될 수 있는 염기 부가 염을 포함한다. 허용되는 무기 염기는 수산화나트륨, 탄산나트륨, 수산화칼륨, 수산화알루미늄 및 수산화칼슘을 포함한다. 허용되는 유기 염기의 비제한적인 예는 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민 및 N-메틸글루카민을 포함한다. 본 발명의 임의의 염의 일부를 형성하는 특정 음이온 또는 양이온은 염이 전체적으로 약리학적으로 허용되는 한 중요하지 않음을 인지해야 한다. 약제학적으로 허용되는 염의 추가의 예 및 이들의 제조 및 사용 방법은 문헌[참조: Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)]에 제시되어 있다.

[0074] **II. EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이**

[0075] 본 개시내용의 특정 구현예는 대상체가 하나 이상의 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 삽입 돌연변이, 특히 도 1에 도시된 바와 같은 하나 이상의 삽입 돌연변이를 갖는지 여부를 결정하는 것에 관한 것이다. 대상체는 2, 3, 4개 또는 그 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 가질 수 있다. PCR 분석 및 핵산 서열분석 뿐만 아니라 FISH 및 CGH를 포함하는 돌연변이 검출 방법은 당업계에 공지되어 있다. 특정 측면에서, 엑손 20 돌연변이는 종양으로부터와 같은 DNA 서열분석 또는 혈장으로부터의 순환 유리 DNA로부터 검출된다.

[0076] EGFR 엑손 20 돌연변이(들)는 아미노산 763-778 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 하나 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, H773, V774, 및 R776으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 잔기에 위치될 수 있다.

[0077] EGFR 엑손 20 삽입은 H773_V774insH, A767_v769ASV, N771_P772insH, D770_N771insG, H779_V774insH, N771delinsHH, S768_D770dupDVD, A767_V769dupASV, A767_V769dupASV, P772_H773-Dup, N771_H773-DupNPH, S768_D770dupSVD, N771delinsGY, S768_D770delinsSVD, D770_D770delinsGY, A767_V769dupASV, H773-Dup, A767insTLA, V769insGVV, V769L, V769insGSV, V769ins MASVD, D770del ins GY, D770insG, D770insY H773Y, N771insSVDNR, N771insHH, P772insDNP, H773insAH, H773insH, 및/또는 V774insHV를 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH 및/또는 N771dupNPH이다.

[0078] 일부 측면에서, 대상체는 포지오티닙과 같은 TKI에 대한 내성을 초래할 수 있는 EGFR 잔기 C797에서 돌연변이를 갖거나 발달시킬 수 있다. 따라서, 특정 측면에서, 대상체는 EGFR C797 및/또는 T790, 예를 들어, C797S 및/또는 T790M에서 돌연변이를 갖지 않는 것으로 결정된다. 일부 측면에서, T790M과 같은 T790 돌연변이를 갖는 대상체는 오시머티닙이 투여될 수 있고, C797S와 같은 C797 돌연변이를 갖는 대상체는 화학요법 및/또는 방사선요법이 투여될 수 있다.

[0079] HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770-785 사이의 3-18개 뉴클레오티드의 하나 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 하나 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 Y772, A775, M774, G776, G778, V777, S779, P780, 및/또는 L786에 있을 수 있다. 하나 이상의 HER2 20 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, P780insGSP, V777L, G778insLPS, V773M, Y772dupYVMA, G776del insLC, G778dupGSP, V777insCG, G776V/S, V777M, M774dupM, A775insSVMA, A775insVA, 및/또는 L786V일 수 있다.

[0080] 환자 샘플은 대상체의 폐암으로부터의 핵산을 포함하는 임의의 신체 조직 또는 체액일 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 순환하는 종양 세포 또는 무세포 DNA를 포함하는 혈액 샘플일 것이다. 다른 구현예에서, 샘플은 폐 조직과 같은 조직일 수 있다. 폐 조직은 종양 조직에서 유래할 수 있으며, 새로 동결되거나 포르말린 고정되고 파라핀 매립될 수 있다(FFPE). 특정 구현예에서, 폐 종양 FFPE 샘플이 수득된다.

[0081] 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합한 샘플은 유전 물질, 예를 들어, 게놈 DNA(gDNA)를 함유한다. 게놈 DNA는 전형적으로 혈액 또는 입 안의 점막 긁기와 같은 생물학적 샘플에서 추출되지만 소변, 종양 또는 거담제를

포함한 다른 생물학적 샘플에서 추출될 수 있다. 샘플 자체는 전형적으로 유핵 세포(예: 혈액 또는 협측 세포) 또는 정상 또는 종양 조직을 포함하여 대상체로부터 제거된 조직을 포함할 것이다. 샘플을 수득하고, 처리하고, 분석하기 위한 방법 및 시약은 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 샘플은, 예를 들어, 채혈을 위해 의료 제공자의 도움으로 수득된다. 일부 구현예에서, 샘플은, 예를 들어, 샘플이 협측 면봉 또는 브러시를 사용하여 수득된 협측 세포를 포함하는 샘플, 또는 구강 세척제 샘플과 같이 비침습적으로 수득되는 경우 의료 제공자의 도움 없이 수득된다.

[0082] 일부 경우에, 생물학적 샘플은 DNA 단리를 위해 처리될 수 있다. 예를 들어, 세포 또는 조직 샘플의 DNA는 샘플의 다른 구성요소로부터 분리될 수 있다. 세포는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 생물학적 샘플로부터 수거될 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포 샘플을 원심분리하고 펠렛화된 세포를 재현탁함으로써 수거할 수 있다. 세포는 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 완충 용액에 재현탁될 수 있다. 세포 현탁액을 원심분리하여 세포 펠릿을 수득한 후, 세포를 용해하여 DNA, 예를 들어, gDNA를 추출할 수 있다. 예를 들어, 문헌[참조: Ausubel et al. (2003)]을 참조한다. 샘플을 농축시키고/시키거나 정제하여 DNA를 단리할 수 있다. 임의의 종류의 추가 처리에 적용된 것들을 포함하여 대상체로부터 수득된 모든 샘플은 대상체로부터 수득된 것으로 간주된다. 일상적인 방법은, 예를 들어, 페놀 추출을 포함하여 생물학적 샘플에서 게놈 DNA를 추출하는 데 사용될 수 있다. 또는, 게놈 DNA는 QIAamp® 조직 키트(Qiagen, Chatsworth, CA) 및 Wizard® 게놈 DNA 정제 키트(Promega)와 같은 키트(kit)를 사용하여 추출될 수 있다. 샘플 공급원의 비제한적 예에는 소변, 혈액 및 조직이 포함된다.

[0083] 본원에 기재된 바와 같이, EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 엑손 20 삽입 돌연변이의 존재 또는 부재는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 크기 배제 크로마토그래피, 서열분석 및/또는 어레이를 사용하여 삽입 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 바람직한 경우, 핵산의 증폭은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, PCR을 사용하여 달성될 수 있다. 하나의 예에서, 샘플(예: 게놈 DNA를 포함하는 샘플)은 대상체로부터 수득된다. 이어서, 샘플 내의 DNA를 검사하여 본원에 기재된 바와 같은 삽입 돌연변이의 동일성을 결정한다. 삽입 돌연변이는 본원에 기재된 임의의 방법, 예를 들어, 서열분석에 의해 또는 게놈 DNA, RNA 또는 cDNA의 유전자를 핵산 프로브, 예를 들어, DNA 프로브(cDNA 및 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함함) 또는 RNA 프로브에의 혼성화에 의해 검출될 수 있다. 핵산 프로브는 특정 변이체와 특이적으로 또는 우선적으로 혼성화하도록 설계될 수 있다.

[0084] 프로브 세트는 전형적으로 본 개시내용의 실행 가능한 치료 권장 사항에 사용되는 표적 유전자 변이(예: EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이)를 검출하는 데 사용되는 프라이머 세트, 일반적으로 프라이머 쌍 및/또는 검출 가능하게 표지된 프로브를 지칭한다. 프라이머 쌍은 전술한 유전자 각각에 대한 표적 유전자 변이에 대한 영역에 걸쳐 있는 앰플리콘을 정의하기 위해 증폭 반응에 사용된다. 앰플리콘 세트는 일치하는 프로브 세트에 의해 검출된다. 예시적인 구현예에서, 본 방법은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이와 같은 표적 유전적 변이의 세트를 검출하는 데 사용되는 TaqMan™(Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) 검정을 사용할 수 있다. 하나의 구현예에서, 프로브 세트는 차세대 서열분석 반응과 같은 핵산 서열분석 반응에 의해 검출되는 앰플리콘을 생성하는 데 사용되는 프라이머 세트이다. 이러한 구현예에서, 예를 들어, AmpliSEQ™(Life Technologies/Ion Torrent, Carlsbad, CA) 또는 TruSEQ™(Illumina, San Diego, CA) 기술이 사용될 수 있다.

[0085] 핵산 마커의 분석은, 제한 없이, 서열 분석 및 전기영동 분석을 포함하는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 서열 분석의 비제한적 예는 맥섬-길버트(Maxam-Gilbert) 서열분석, 생거(Sanger) 서열분석, 모세관 어레이 DNA 서열분석, 열 순환 서열분석(Sears et al., 1992), 고체상 서열분석(Zimmerman et al., 1992), 질량 분석법, 예를 들어, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분석법을 사용하는 서열분석(MALDI-TOF/MS; Fu et al., 1998) 및 혼성화에 의한 서열분석(Chee et al., 1996; Drmanac et al., 1993; Drmanac et al., 1998)을 포함한다. 전기영동 분석의 비제한적인 예에는 슬래브 겔 전기영동, 예를 들어, 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 모세관 전기영동 및 변성 구배 겔 전기영동이 포함된다. 추가로, 차세대 서열분석 방법은 Life Technologies/Ion Torrent PGM 또는 Proton, Illumina HiSEQ 또는 MiSEQ, Roche/454 차세대 서열분석 시스템과 같은 회사의 시판 키트 및 기기를 사용하여 수행될 수 있다.

[0086] 핵산 분석의 다른 방법은 직접 수동 서열분석(Church and Gilbert, 1988; Sanger et al., 1977; 미국 특허 제5,288,644호); 자동화된 형광 서열분석; 단일 가닥 형태 다형성 검정(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 분석법(WO 99/57318); 이동성 이동 분석(Orita et

al., 1989); 제한 효소 분석(Flavell et al., 1978; Geever et al., 1981); 정량적 실시간 PCR(Raca et al., 2004); 헤테로듀플렉스 분석; 화학적 불일치 절단(CMC)(Cotton et al., 1985); RNase 보호 검정(Myers et al., 1985); 뉴클레오티드 불일치를 인식하는 폴리펩티드, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) mutS 단백질의 사용; 대립유전자 특이적 PCR 및 이러한 방법의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공보 제2004/0014095호를 참조한다.

[0087] 한 예에서, 샘플에서 EGFR 및/또는 HER2 돌연변이를 식별하는 방법은 돌연변이된 EGFR 또는 HER2 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산에 특이적으로 혼성화하여 돌연변이를 도입할 수 있는 핵산 프로브와 상기 샘플의 핵산을 접촉시키는 단계 및 상기 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 프로브는, 예를 들어, 방사성 동위원소(^{3}H, ^{32}P, 또는 ^{33}P), 형광성 제제(로다민 또는 플루오레세인) 또는 발색제로 검출가능하게 표지된다. 특정 구현예에서, 프로브는 안티센스 올리고머, 예를 들어, PNA, 모르폴리노-포스포르아미데이트, LNA 또는 2'-알콕시알콕시이다. 프로브는 약 8개 뉴클레오티드 내지 약 100개 뉴클레오티드, 또는 약 10개 내지 약 75개, 또는 약 15개 내지 약 50개, 또는 약 20개 내지 약 30개일 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용의 상기 프로브는 샘플에서 EGFR 또는 HER2 돌연변이를 식별하기 위한 키트에 제공되고, 상기 키트는 EGFR 또는 HER2 유전자의 돌연변이 부위에 특이적으로 혼성화되거나 이에 인접하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 상기 키트는 상기 키트를 사용하는 혼성화 시험 결과에 기초하여 포지오티닙 또는 아파티닙으로 EGFR 또는 HER2 삽입 돌연변이를 함유하는 종양을 갖는 환자를 치료하기 위한 지침서를 추가로 포함할 수 있다.

[0088] 또 다른 측면에서, 샘플에서 엑손 20 돌연변이를 검출하는 방법은 상기 EGFR 유전자 또는 HER2, 또는 돌연변이를 함유하는 것으로 의심되는 이의 단편의 엑손 20에 상응하는 핵산을 상기 샘플로부터 증폭시키는 단계, 및 증폭된 핵산의 전기영동 이동성을 상응하는 야생형 EGFR 또는 HER2 유전자 또는 이의 단편의 전기영동 이동성과 비교하는 단계를 포함한다. 이동성의 차이는 증폭된 핵산 서열에 돌연변이의 존재를 나타낸다. 전기영동 이동성은 폴리아크릴아미드 겔 상에서 결정될 수 있다.

[0089] 대안적으로, 핵산은 효소 돌연변이 검출(EMD)을 사용하여 돌연변이의 검출을 위해 분석될 수 있다(Del Tito et al., 1998). EMD는 박테리오파지 리졸바제 T_4 엔도뉴클레아제 VII을 사용하고, 이는 점 돌연변이, 삽입 및 삭제로 인한 염기 쌍 불일치로 인한 구조적 왜곡을 검출하고 절단할 때까지 이중 가닥 DNA를 따라 스캔한다. 예를 들어, 겔 전기영동에 의한 리졸바제 절단에 의해 형성된 2개의 짧은 단편의 검출은 돌연변이의 존재를 나타낸다. EMD 방법의 이점은 PCR 반응에서 직접 검정된 점 돌연변이, 결실 및 삽입을 식별하여 샘플 정제의 필요성을 제거하고 혼성화 시간을 단축하고 신호 대 잡음 비를 증가시키는 단일 프로토콜이다. 최대 4kb 크기의 정상 DNA 및 단편을 최대 20배 초과로 함유하는 혼합된 샘플이 검정될 수 있다. 그러나, EMD 스캐닝은, 필요한 경우, 돌연변이를 식별하기 위해 추가 서열분석 절차를 필요로 하는 돌연변이 양성 샘플에서 발생하는 특정 염기 변화를 식별하지 않는다. CEL I 효소는 미국 특허 제5,869,245호에서 입증된 바와 같이 리졸바제 T_4 엔도뉴클레아제 VII과 유사하게 사용될 수 있다.

[0090] **III. 치료 방법**

[0091] EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 엑손 20 삽입을 갖는 것으로 결정된 대상체에게 유효량의 포지오티닙, 아파티닙 또는 구조적으로 유사한 억제제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 진행을 지연시키는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 대상체는 하나 이상의 EGFR 및/또는 HER 엑손 20 돌연변이를 가질 수 있다.

[0092] 치료를 위해 고려되는 암의 예는 폐암, 두경부암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 골암, 고환암, 자궁경부암, 위장관암, 림프종, 폐의 전종양 병변, 결장암, 흑색종 및 방광암을 포함한다. 특정 측면에서, 암은 비소세포 폐암이다.

[0093] 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어, 영장류, 바람직하게는 고등 영장류, 예를 들어, 인간(예: 본원에 기재된 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 환자)이다. 하나의 구현예에서, 대상체는 면역 반응을 향상시킬 필요가 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 면역손상되었거나 손상될 위험이 있다. 예를 들어, 대상체는 화학요법 치료 및/또는 방사선 요법을 받고 있거나 받았다. 대안적으로, 또는 조합하여, 대상체는 감염의 결과로 면역손상되었거나, 면역손상될 위험이 있다.

[0094] 특정 구현예는 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 엑손 20 삽입을 갖는 것으로 결정된 대상체에게 포지오티닙(또한, HM781-36B, HM781-36, 및 1-[4-[4-(3,4-디클로로-2-플루오로아닐리노)-7-메톡시퀴나졸린-6-일]옥시피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온으로 공지됨)의 투여에 관한 것이다. 포지오티닙은 HER1, HER2 및

HER4를 포함한 티로신 키나제 수용체의 HER 계열을 통한 신호전달을 비가역적으로 차단하는 퀴나졸린 기반 pan-HER 억제제이다. 포지오티닙 또는 구조적으로 유사한 화합물(예: 미국 특허 제8,188,102호 및 미국 특허 공보 제20130071452호; 본원에 참고로 포함됨)이 본 방법에서 사용될 수 있다.

[0095] 포지오티닙 하이드로클로라이드 염과 같은 포지오티닙은 정제와 같이 경구 투여될 수 있다. 포지오티닙은 4-25mg의 용량, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24mg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 매일, 격일로, 3일 마다 또는 매주일 수 있다. 투여는 28일 주기와 같이 연속적인 일정에 따라 이루어질 수 있다.

[0096] 일부 측면에서, T790M과 같은 T790 돌연변이를 갖는 대상체는 오시머티닙이 투여될 수 있고, C797S와 같은 C797 돌연변이를 갖는 대상체는 본원에 기재된 바와 같이 화학요법 및/또는 방사선요법이 투여될 수 있다. 오시머티닙, 화학요법 및/또는 방사선은 단독으로 또는 포지오티닙과 함께 투여될 수 있다. 오시머티닙은 약 40 또는 80mg과 같은 25 내지 100mg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 매일, 격일로, 2일 마다, 3일 마다, 또는 매주일 수 있다. 오시머티닙은 정제와 같이 경구 투여될 수 있다.

[0097] 아파티닙은 10, 20, 30, 40 또는 50mg과 같은 10-50mg의 용량으로 투여될 수 있다. 아파티닙이 투여될 수 있다.

[0098] **B. 약제학적 조성물**

[0099] 또한, EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 예를 들어, 엑손 20 삽입을 갖는 것으로 결정된 대상체를 위한 포지오티닙 또는 아파티닙 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형이 본원에 제공된다.

[0100] 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 및 제형은 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분(예: 항체 또는 폴리펩티드)을 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용되는 담체(Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012)와 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 수용액 형태로 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 완충제, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예: 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어, EDTA; 당, 예를 들어, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온, 예를 들어, 나트륨; 금속 착물(예: Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 간질성 약물 분산제, 예를 들어, 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예를 들어, rHuPH20(HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는 특정 예시적 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공보 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된다.

[0101] **C. 병용 요법(combination therapy)**

[0102] 특정 구현예에서, 본 구현예의 조성물 및 방법은 적어도 하나의 추가 요법과 조합된 포지오티닙 또는 아파티닙을 포함한다. 추가 요법은 방사선 요법, 수술(예: 종괴 절제술 및 유방 절제술), 화학 요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역 요법, 골수 이식, 나노 요법, 모노클로날 항체 요법 또는 이들의 조합일 수 있다. 추가 요법은 보조 요법 또는 신보조 요법의 형태일 수 있다.

[0103] 일부 구현예에서, 추가 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항전이제의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 부작용 제한제(예: 항메스꺼움제 등과 같은 치료 부작용의 발생 및/또는 중증도를 감소시키도록 의도된 제제)의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 방사선 요법이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 수술이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 방사선 요법과 수술의 조합이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 감마 조사이다. 일부 구현예에서, 추가 요법은 PBK/AKT/mTOR 경로, HSP90 억제제, 튜불린 억제제, 아폽토시스 억제제, 및/또는 화학예방제를 표적화하는 요법이다. 추가 요법은 당업계에 공지된 하나 이상의 화학요법제일 수 있다.

[0104] 포지오티닙 또는 아파티닙은 면역 체크포인트 요법과 같은 추가 암 요법에 대해 이전, 도중, 이후에 또는 다양

한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시에 내지 수 분 내지 수 일 내지 수 주에 걸친 간격으로 이루어질 수 있다. 포지오티닙 또는 아파티닙이 추가 치료제와 별도로 환자에게 제공되는 구현예에서, 일반적으로 상당한 기간이 각 전달 시간 사이에 만료되지 않도록 하여 두 화합물이 여전히 환자에게 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록 함을 보장할 것이다. 이러한 경우에, 항체 요법 및 항암 요법은 서로 약 12 내지 24 또는 72시간 이내에, 보다 구체적으로는 서로 약 6 내지 12시간 이내에 환자에게 제공될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 상황에서, 치료 기간을 상당히 연장시키는 것이 바람직할 수 있고, 여기서 몇 일(2, 3, 4, 5, 6, 7) 내지 몇 주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8)가 각 투여 사이에 경과한다.

[0105] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 아래 예에서 포지오티닙 또는 아파티닙은 "A"이고, 항암 요법은 "B"이다:

[0106] 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

[0107] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0108] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0109] 환자에 대한 본 구현예의 임의의 화합물 또는 요법의 투여는 존재하는 경우 제제의 독성을 고려하여 이러한 화합물의 투여를 위한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 병용 요법에 기인하는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0110] **1. 화학요법**

[0111] 매우 다양한 화학요법제가 본 구현예에 따라 사용될 수 있다. "화학요법"이라는 용어는 암을 치료하기 위해 약물의 사용을 지칭한다. "화학요법제"는 암 치료에 투여되는 화합물 또는 조성물을 함축하는 데 사용된다. 이러한 제제 또는 약물은 세포내 활동 방식, 예를 들어, 세포 주기에 영향을 미치는지 여부와 어떤 단계에서 영향을 미치는지에 의해 분류된다. 대안적으로, 제제는 DNA를 직접 가교결합하거나, DNA에 삽입하거나, 핵산 합성에 영향을 미쳐 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 능력을 기반으로 특성화될 수 있다.

[0112] 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드 및 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어, 엔디인 항생제(예: 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 비스포스포네이트, 예를 들어, 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백 엔디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴 및 조루비신; 항대사물질, 예를 들어, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 프테로프테린 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈 및 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄 및 테스토락톤; 항-부신, 예를 들어, 미토탄 및 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린;

펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포사이드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예: CPT-11); 토포아이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신, 젬시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 탄스페라제 억제제, 트랜스플래티늄, 및 상기 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0113] **2. 방사선 요법**

[0114] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용되는 다른 요인에는 일반적으로 γ-선, X-선 및/또는 종양 세포로의 방사성 동위원소의 직접 전달로 공지된 것이 포함된다. 마이크로파, 양성자 빔 조사(미국 특허 5,760,395 및 4,870,287) 및 UV 조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 인자도 고려된다. 이러한 모든 요인이 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 복구, 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 가장 높다. X선의 선량 범위는 장기간 동안(3 내지 4주) 50 내지 200뢴트겐의 1일 선량에서 2000 내지 6000뢴트겐의 단일 선량에 이른다. 방사성 동위원소의 선량 범위는 매우 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도와 유형 및 신생물 세포의 흡수에 따라 다르다.

[0115] **3. 면역요법**

[0116] 당업자는 추가의 면역요법이 구현예의 방법과 조합하여 또는 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료의 맥락에서, 면역치료제는 일반적으로 암 세포를 표적화하고 파괴하기 위해 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 리툭시맙(RITUXAN®)이 그러한 예이다. 면역 이펙터는, 예를 들어, 종양 세포의 표면의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독은 요법의 이펙터 역할을 할 수 있거나, 실제로 세포 사멸에 영향을 미치기 위해 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학치료제, 방사성핵종, 리신 A 쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수 있고, 표적화제로 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 운반하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포에는 세포독성 T 세포 및 NK 세포가 포함된다.

[0117] 항체-약물 접합체는 암 치료제 개발에 대한 획기적인 접근법으로 등장했다. 암은 세계에서 사망의 주요 원인 중 하나이다. 항체-약물 접합체(ADC)는 세포 사멸 약물에 공유적으로 연결된 모노클로날 항체(MAb)를 포함한다. 이 접근법은 항원 표적에 대한 MAb의 높은 특이성을 매우 강력한 세포독성 약물과 결합하여 항원 수준이 풍부한 종양 세포에 페이로드(약물)를 전달하는 "암화(armed)" MAb를 초래한다. 약물의 표적화 전달은 또한 정상 조직에서의 노출을 최소화하여 독성을 감소시키고 치료 지수를 향상시킨다. FDA는 2011년 ADCETRIS®(브렌툭시맙 베도틴) 및 2013년 KADCYLA®(트라스투주맙 엠탄신 또는 T-DM1)의 두 가지 ADC 약물의 승인으로 접근법을 검증했다. 현재 암 치료를 위한 다양한 임상 시험 단계에서 30개 이상의 ADC 약물 후보가 있다(Leal et al., 2014). 항체 조작 및 링커 페이로드 최적화가 점점 더 성숙해짐에 따라, 새로운 ADC의 발견 및 개발은 이 접근법에 적합한 새로운 표적의 식별 및 검증과 표적화 MAb의 생성에 점점 더 의존하고 있다. ADC 표적에 대한 두 가지 기준은 종양 세포에서의 상향 조절된/높은 수준의 발현 및 강력한 내재화이다.

[0118] 면역요법의 한 측면에서, 종양 세포는 표적화할 수 있는, 즉 대다수의 다른 세포에 존재하지 않는 일부 마커를 보유해야 한다. 많은 종양 마커가 존재하고 이들 중 임의의 것이 본 구현예의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다. 면역 요법의 다른 측면은 항암 효과와 면역 자극 효과를 결합하는 것이다. 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드를 포함하는 면역 자극 분자도 존재한다.

[0119] 면역요법의 예에는 면역 보조제, 예를 들어, 미코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 플라스모디움 팔시파룸(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, 예를 들어, 인터페론 α, β 및 γ, IL-1, GM-CSF 및 TNF(Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); 유전자 요

법, 예를 들어, 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 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-CD20, 항-강글리오사이드 GM2 및 항-p185(Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; 미국 특허 5,824,311)를 포함한다. 하나 이상의 항암 요법이 본원에 기재된 항체 요법과 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0120] 일부 구현예에서, 면역요법은 면역 체크포인트 억제제일 수 있다. 면역 체크포인트는 신호(예: 공동 자극 분자)를 발생시키거나 신호를 약하게 한다. 면역 체크포인트 차단에 의해 표적화될 수 있는 억제성 면역 체크포인트는 아데노신 A2A 수용체(A2AR), B7-H3(CD276으로 공지되기도 함), B 및 T 림프구 감쇠제(BTLA), 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA-4, CD152로 공지되기도 함), 인돌레아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 킬러 세포 면역글로불린(KIR), 림프구 활성화 유전자-3(LAG3), 프로그램된 사망 1(PD-1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3(TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제(VISTA)를 포함한다. 특히, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적으로 한다.

[0121] 면역 체크포인트 억제제는 소분자, 리간드 또는 수용체의 재조합 형태와 같은 약물일 수 있거나, 특히 인간 항체와 같은 항체일 수 있다(예: 국제 특허 공보 WO2015016718; Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012, 둘 다 본원에 참고로 포함됨). 면역 체크포인트 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있으며, 특히 키메라, 인간화 또는 인간 형태의 항체가 사용될 수 있다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 대안적 및/또는 등가 명칭이 본 개시내용에서 언급된 특정 항체에 대해 사용될 수 있다. 이러한 대안적 및/또는 등가 명칭은 본 발명의 맥락에서 상호교환가능하다. 예를 들어, 람브롤리주맙은 대안적 및 등가 명칭 MK-3475 및 펨브롤리주맙으로 공지되기도 한다는 것이 공지되어 있다.

[0122] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 그의 리간드 결합 파트너에 대한 PD-1의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는 그의 결합 파트너에 대한 PDL1의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구현예에서, PDL2 결합 길항제는 그의 결합 파트너에 대한 PDL2의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 측면에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역접합체, 융합 단백질, 또는 올리고펩티드일 수 있다. 예시적인 항체는 미국 특허 제8,735,553호, 제8,354,509호 및 제8,008,449호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참고로 포함된다. 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항제는 모두 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 공보 제US20140294898호, 제US2014022021호, 및 제US20110008369호에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0123] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체(예: 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 및 CT-011로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 면역접합체(예: 불변 영역(예: 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역접합체)이다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 및 OPDIVO®로서 공지되기도 한 니볼루맙은 WO2006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, Merck 3475, 람브롤리주맙, KEYTRUDA® 및 SCH-900475로서 공지되기 한 펨브롤리주맙은 WO2009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로서 공지되기도 한 CT-011은 WO2009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다 B7-DCIg로서 공지되기도 한 AMP-224는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0124] 본원에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 체크포인트는 CD152로서 공지되기도 한 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA-4)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 수탁 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포 표면에서 발견되며, 항원 제시 세포 표면의 CD80 또는 CD86에 결합될 때 "오프" 스위치 역할을 한다. CTLA4는 헬퍼 T 세포의 표면에서 발현되고 억제 신호를 T 세포에 전달하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다. CTLA4는 T 세포 공동 자극 단백질인 CD28과 유사하며, 두 분자 모두 항원 제시 세포에서 각각 B7-1 및 B7-2라고 지칭되기도 하는 CD80 및 CD86에 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포에 전달하는 반면, CD28은 자극 신호를 전달한다. 세포내 CTLA4는 조절 T 세포에서도 발견되며 기능에 중요할 수 있다. T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인 CTLA-4의 발현을 증가시킨다.

[0125] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체(예: 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체), 이의 항원 결합 단편, 면역접합체, 융합 단백질 또는 올리고펩티드이다.

[0126] 본 방법에 사용하기에 적합한 항-인간-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 당업계에 익히 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 기술분야에서 인식된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있

다. 예를 들어, 문헌(참조: 미국 특허 제8,119,129호; 국제 특허 공보 제WO 01/14424호, 제WO 98/42752호, 및 제WO 00/37504호(CP675,206, 트레멜리무맙으로 공지되기도 함; 이전에는 티실리무맙); 미국 특허 제6,207,156호; Hurwitz et al., 1998; Camacho et al., 2004; 및 Mokyr et al., 1998)에 기재된 항-CTLA-4 항체가 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 전술한 공보 각각의 교시는 본원에 참조로 포함된다. CTLA-4에 대한 결합에 대해 임의의 이러한 기술분야에서 인식된 항체와 경쟁하는 항체도 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화 CTLA-4 항체는 국제 특허 출원 제WO2001014424호 및 제WO2000037504호, 및 미국 특허 제8,017,114호에 기재되어 있고; 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0127] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙(10D1, MDX-010, MDX-101 및 Yervoy®로도 공지됨) 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체(예를 들어, WO 01/14424 참조)이다. 다른 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 CTLA-4 상의 동일한 에피토프와 결합을 경쟁하고/하거나 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90% 가변 영역 아미노산 서열 동일성을 갖는다(예를 들어, 이필리무맙과 적어도 약 90%, 95% 또는 99% 가변 영역 동일성).

[0128] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자에는 모두 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,844,905호, 제5,885,796호 및 국제 특허 출원 제WO1995001994호 및 제WO1998042752호에 기재된 것과 같은 CTLA-4 리간드 및 수용체, 및 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제8,329,867호에 기재된 것과 같은 면역접합체를 포함한다.

[0129] **4. 수술**

[0130] 암에 걸린 사람의 약 60%는 예방, 진단 또는 병기, 치료 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받을 것이다. 근치적 수술은 암성 조직의 전체 또는 일부를 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴하는 절제를 포함하며 본 구현예의 치료, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 요법과 같은 다른 요법과 함께 사용될 수 있다. 종양 절제는 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 지칭한다. 종양 절제 이외에, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동 수술, 전기 수술, 현미경으로 제어되는 수술(모스 수술) 등을 포함한다.

[0131] 암성 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부를 절제하면 체내에 공동이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주사 또는 추가 항암 요법과 함께 해당 부위의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 마다, 또는 1, 2, 3, 4 및 5주 마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 마다 반복될 수 있다. 이러한 치료도 다양한 용량을 가질 수 있다.

[0132] **5. 기타 제제**

[0133] 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 다른 제제가 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 추가 제제는 세포 표면 수용체 및 GAP 접합의 상향조절에 영향을 미치는 제제, 세포증식억제제 및 분화제, 세포 부착 억제제, 아폽토시스 유도제에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 제제, 또는 기타 생물학적 제제를 포함한다. GAP 접합 수를 증가시킴으로써 세포간 신호전달의 증가는 인접하는 과증식 세포 집단에 대한 항과증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포증식억제제 또는 분화제는 치료의 항과증식성 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 부착 억제제가 본 구현예의 효능을 개선하기 위해 고려된다. 세포 부착 억제제의 예는 초점 접착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 항체 c225와 같은 아폽토시스에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 다른 제제가 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 측면과 조합되어 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0134] **IV. 키트**

[0135] 또한, 본원에 개시된 것과 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 검출하기 위한 키트가 본 개시내용의 범위 내에 있다. 이러한 키트의 예는 엑손 20 돌연변이 특이적 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 키트는 본원에 기재된 특정 EFGR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 프라이머의 사용에 대한 지침서를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 진단 목적을 위한 지침서를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 암 환자의 샘플에서 본원에 기재된 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이의 양성 식별이 티로신 키나제 억제제 포지오티닙 또는 아파티닙 또는 구조적으로 유사한 억제제에 대한 감수성을 나타낸다는 것을 나타낸다. 키트는 암 환자로부터의 샘플에서 본원에 기재된 EGFR 및/또는 엑손 20 돌연변이의 양성 식별이 환자가 포지오티닙, 아파티닙 또는 구조적으로 유사한 억제제로 치료되어야 함을 나타냄을 나타내는 지침서를 추가로 포함할 수 있다.

[0136] **V. 실시예**

[0137] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 본 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시내용에 비추어, 개시되는 특정 구현예에서 많은 변화가 이루어질 수 있고 본 발명의 취지 및 범위에서 벗어나지 않고 유사하거나 유사한 결과를 여전히 수득할 수 있음을 인식해야 한다.

[0138] **실시예 1 - EGFR 또는 HER 엑손 20 삽입을 갖는 암 세포에 대한 약물의 식별**

[0139] TKI에 대한 임상 반응은 임상 데이터베이스에서 EGFR 엑손 20 삽입을 보유하는 종양이 있는 환자에서 조사되었고; 280명의 EGFR 돌연변이체 NSCLC 환자 중 129명의 환자는 고전적인 EGFR 돌연변이(엑손 19 결실, L858R 및 L861Q)로 식별되었고, 9명의 환자는 단일 제제 엘로티닙, 게피티닙 또는 아파티닙으로 처리된 EGFR 엑손 20 삽입을 갖는다. 고전적인 EGFR 돌연변이를 갖는 NSCLC 환자의 중앙값 PFS는 14개월인 반면, EGFR 엑손 20 삽입을 갖는 환자의 중앙값 PFS는 단지 2개월이었다($p<0.0001$, 로그 순위 테스트; 도 1a). 9명의 EGFR 엑손 20 삽입 환자 중 OR은 아파티닙을 투여받은 S768del-insIL 돌연변이를 보유하는 1명의 환자에서만 관찰되었다(도 4a). 이 임상 데이터는 EGFR 엑손 20 삽입 유도 NSCLC에서 이용 가능한 EGFR TKI의 제한된 활성을 입증하고, 이러한 특정 종양에 대해 대안적인 치료 전략이 필요함을 입증한다.

[0140] 약물 스크리닝의 초기 단계로서, 7개의 EGFR 및 11개의 HER2 돌연변이가 Ba/F3 세포에서 발현되었다. EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이의 위치는 도 1b에 요약되어 있다. EGFR 및 HER2의 어떤 엑손 20 돌연변이가 활성화되는지 평가하기 위해 Ba/F3 세포주를 IL-3 독립적 생존에 대해 스크리닝했다. 시험된 모든 EGFR 엑손 20 삽입은 활성화 돌연변이였고(도 4b), 6개의 HER2 엑손 20 돌연변이 및 엑손 19에 위치된 L755P가 활성화 돌연변이(도 4c)인 것으로 밝혀졌다. 다음으로, 가역적(1세대), 비가역적(2세대), 비가역적 돌연변이체 특이적 TKI(3세대)를 포함하는 임상 평가를 거친 EGFR 및 HER2 TKI에 대한 엑손 20 삽입에 대한 감수성을 테스트한 후, 고전적인 감작 돌연변이인 EGFR L858R과 감수성을 비교했다. EGFR A763insFQEA를 제외하고, EGFR 엑손 20 삽입(n=6)은 1세대(도 1c, IC_{50} = 3.3->10 μM), 2세대(도 1d, IC_{50} = 40-135 nM) 및 3세대(도 1e, IC_{50} = 103-850 nM) EGFR TKI에 대해 내성이었다(도 5, 표 1). 또한, HER2 엑손 20 돌연변이체(n=6)는 1세대(도 1f, IC_{50} = 1.2-13 μM) 및 3세대(도 1h, IC_{50} = 114-505nM) TKI에 대해 내성이었다. 2세대 TKI는 Ba/F3 HER2 엑손 20 돌연변이체 세포주에 대해 약간의 활성을 가졌다(도 1g, IC_{50} = 10-12 nM, 도 6, 표 1). 약물 스크리닝과 일관되게, 저용량에서 부분 억제를 나타내는 EGFR A763insFQEA를 제외하고, 웨스턴 블롯팅은 에를로티닙과 오시머티닙이 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이에서 p-EGFR2를 유의하게 억제하지 않았고, 500nM에서 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이체에서 p-HER2만 유의하게 억제하였음을 입증했다(도 7a-d).

[0141] [**표 1**]

EGFR/HER2 TKI 를 사용한 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입의 IC_{50}.

		평균 EGFR 엑손 20 삽입(N=6 세포주)	**평균 HER2 엑손 20 삽입 (N=6 세포주)**
1 세대 TKI	에를로티닙	3,310 nM	3,250 nM
	게피티닙	>10,000 nM	12,900 nM
	라파티닙	-	1,190 nM
	L858R + 에를로티닙	17.0 nM	
2 세대 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	
3 세대 TKI	오시머티닙	103nM	444 nM
	로실레티닙	850nM	505 nM
	이브루티닙	143 nM	114 nM
	올룸티닙	204 nM	352 nM
	나자르티닙	198 nM	233 nM
	L858R/T790M + 오시머티닙	9.00 nM	

[0142]

[0143] 엑손 20 삽입이 1세대 및 3세대 EGFR TKI에 내성인 이유를 조사하기 위해, EGFR T790M 및 EGFR WT를 사용하여 EGFR D770insNPG의 용해된 결정 구조에 대해 3-D 모델링을 수행하여 약물 결합 포켓 내의 변화를 시각화했다. 모델링에 따르면 EGFR 엑손 20 삽입은 게이트키퍼 잔기 T790의 정렬에서 T790M 돌연변이와 유사하고, 이는 ATP에 대한 친화도를 증가시키고 1세대 억제제의 결합을 감소시켜 이러한 돌연변이가 비공유 억제제에 내성이도록 하는 것으로 밝혀졌다. 또한, HER2 엑손 20 삽입은 구성적으로 활성 형태를 유도하여 비활성 형태로 HER2에 결합하는 비공유 HER2 억제제 라파티닙의 결합을 방지한다. 또한, EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입은 약물 결합 포켓에 극적인 영향을 미친다. EGFR(도 1i) 및 HER2(도 1j) 엑손 20 삽입의 인실리코 모델링은 α-c-나선(도 1j)의 C-말단 말단에서 삽입으로 인해 α-c-나선의 약물 결합 포켓(화살표)으로의 상당한 이동을 나타내어 안쪽의 활성화된 위치에서 α-c-나선의 융기된 배치를 강제한다. 또한, 3-D 모델링은 두 수용체의 약물 결합 포켓(도 1i, 1j)으로의 P-루프의 상당한 이동을 입증했다. 함께, 이러한 이동은 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체 단백질 모두에서 두 방향에서 약물 결합 포켓의 입체 장애를 초래한다. 위에서 언급된 시험관내 테스트와 일관되게, 3-D 모델링은 아파티닙이 오시머티닙보다 더 효과적으로 엑손 20 삽입을 억제한다는 관찰을 뒷받침한다. 오시머티닙은 단단한 피리미딘 코어에 직접 연결된 큰 말단 1-메틸인돌 그룹을 갖는다. 이러한 큰 비가요성 그룹은 EGFR 엑손 20 삽입에서 아파티닙만큼 효과적으로 C797 잔기에 도달하는 오시머티닙의 능력을 감소시킨다(도 1i). 대안적으로, 아파티닙은 2급 아민 그룹을 통해 퀴나졸린 코어에 간접적으로 연결된 더 작은 1-클로로-2-플루오로벤젠 환 말단 그룹을 가져서 아파티닙이 입체 장애 결합 포켓에 적합하도록 할 수 있다. 더욱이, 입체 장애는 HER2 A775insYVMA에 대한 오시머티닙의 결합을 방지한다. 종합하면, 시험관내 데이터와 인실리코 모델링은 작은 가요성 퀴나졸린 유도체가 EGFR/HER2 엑손 20 삽입을 표적으로 할 수 있음을 나타낸다.

[0144] 다음으로, 엑손 20 삽입에 대한 활성이 강화된 TKI를 식별하기 위해 노력했다. 아파티닙과 마찬가지로 포지오티닙도 또한 작은 말단 그룹과 가요성 퀴나졸린 코어를 함유한다. 그러나, 포지오티닙은 아파티닙에 비해 마이클 수용체 그룹을 퀴나졸린 코어에 연결하는 더 작은 치환체를 갖고 아파티닙에 비해 말단 벤젠 환의 할로겐화를 증가시킨다. 이 전자 풍부 부분은 또한 K745와 같은 EGFR의 염기성 잔기와 상호작용하여 이의 결합을 더욱 안정화시킨다. 따라서, 포지오티닙은 Ba/F3 시스템에서 테스트되었다. 시험관내에서, 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 1.0nM의 평균 IC_{50} 값을 가져 시험관내에서 포지오티닙이 오시머티닙보다 약 100배, 아파티닙보다 40배 더 강력하도록 했다. 더욱이, 포지오티닙은 HER2 엑손 20 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서 1.9nM의 평균 IC_{50} 값을 가져 시험관내에서 포지오티닙이 오시머티닙보다 200배, 아파티닙보다 6배 더 강력하도록 했다. 이러한 결과는 포지오티닙이 5nM만큼 낮은 농도에서 EGFR 및 HER2의 인산화를 억제하는 웨스턴 블롯팅에 의해 검증되었다(도 2c, 8a). 또한, 포지오티닙 감수성이 EGFR 또는 HER2 돌연변이체의 발현 수준으로 인한 것이 아님을 검증하기 위해, 각 돌연변이체의 발현을 ELISA에 의해 결정한 다음 IC_{50} 값에 대해 플롯팅하였다(도 8d). IC_{50}과 발현 사이에서 상관관계가 발견되지 않았지만(R=-0.056, p=0.856), 포지오티닙 감수성과 EGFR에 대한 돌연변이 위치 사이에서는 상관관계가 발견되었으며(R=0.687, p=0.044)(도 2d), 삽입이 α-c-나선에서 멀어질수록 IC_{50}이 더 높아진다는 것을 시사한다. 흥미롭게도, 이러한 상관관계는 위치보다 삽입 크기가 더 많이 변하는 HER2 엑손 20 돌연변이에 대해서는 발견되지 않았다(도 8e). 이 상관관계는 돌연변이의 정확한 위치가 약물 결합 포켓에 다양한 영향을 미치며, 보이는 약물 반응의 이질성에 기여함을 시사한다. 또한, 포지오티닙은 평균 IC_{50} 값이 각각 1.84nM 및 0.30nM인 환자 유래 세포주 CUTO14(EGFR A767dupASV) 및 YULO019(EGFR N771del insFH)의 성장을 효과적으로 억제했는데, 이는 CUTO14의 경우 아파티닙보다 15배 더 강력하고, YULO019의 경우 아파티닙보다 100배 이상 더 강력했다(도 2e, f). CUTO14 세포주의 웨스턴 블롯팅은 10nM 포지오티닙 처리에서 p-EGFR의 유의한 억제가 있었지만, p-EGFR은 1000nM까지 아파티닙에 의해 유의하게 억제되지 않았다는 것을 결정하였다(도 8b, c).

[0145] T790M 돌연변이체와 비교하여 엑손 20 돌연변이체를 억제하는 포지오티닙의 특이성을 결정하기 위해, 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙 및 포지오티닙의 IC_{50} 값을 엑손 20 돌연변이에서 EGFR T790M 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서의 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙 및 포지오티닙의 IC_{50} 값과 비교했다. 단일 EGFR T790M 돌연변이로 정규화된 IC_{50} 값을 나타내고, 여기서 1 미만의 값은 T790M과 비교하여 엑손 20 삽입에 대한 특이성을 나타낸다(도 2g). EGFR T790M 돌연변이체와 비교할 때, EGFR 엑손 20 삽입은 포지오티닙에 65배 더 민감했다. 더욱이, EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이는 EGFR T790M 돌연변이체보다 아파티닙에 대해 1.4배 더 내성이고, 오시머티닙에 대해 5.6배 더 내성이며, 로실레티닙에 대해 24배 더 내성이었다(도 2g).

[0146] 오시머티닙과 같은 3세대 TKI가 아닌 포지오티닙이 T790M 돌연변이와 비교하여 엑손 20 돌연변이를 선택적이고 강력하게 억제하는 이유를 조사하기 위해, 약물 결합 포켓의 변화가 약물 결합에 영향을 미치는 방법을 결정하기 위해 3-D 모델링을 수행했다. 오시머티닙이 EGFR T790M 돌연변이체 수용체의 약물 결합 포켓에 적합한 반면(도 2h), 엑손 20 돌연변이체에서, 결합 포켓 내의 큰 변화(도 2i)는 3세대 억제제의 결합을 입체적으로 방해한다. 그러나, 포지오티닙은 더 작으며 더 큰 가요성을 가져서 입체 장애된 엑손 20 결합 포켓에 적합하도록 한다(도 2i). 더욱이, 포지오티닙 및 아파티닙을 사용한 EGFR D770insNPG의 3-D 모델링은 약물 결합 포켓으로 이동된 P 루프가 포지오티닙이 아파티닙보다 약물 결합 포켓에 더 단단히 결합하도록 함을 시사한다. 구조적 모델링의 계산은 포지오티닙에 대한 결합 자유 에너지(London ΔG)가 아파티닙보다 낮음을 나타내며, 이는 포지오티닙의 더 강한 결합 친화도를 나타낸다. 오시머티닙을 사용한 WT HER2의 3-D 모델링은 WT HER2의 결합 포켓이 HER2 A775insYVMA의 결합 포켓보다 크다는 것을 입증한다. 따라서, 포지오티닙은 HER2 A775insYVMA의 입체 장애된 약물 결합 포켓에 깊숙이 단단히 결합하여 엑손 20 삽입에 의해 유도된 구조적 변화를 극복한다.

[0147] 포지오티닙의 효능은 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 유도 NSCLC의 GEM 모델을 사용하여 생체내에서 테스트되었다. 폐 종양은 이전에 기재된 EGFR D770insNPG(Cho et al., 2013) 및 HER2 A775insYVMA(Perera et al., 2009) 마우스에서 유도되었으며, 동물은 4주 동안 포지오티닙(10mg/kg) 또는 비히클 대조군을 매일 경구 투여 받았다. MRI에 의해 결정된 바와 같이, 포지오티닙은 종양 부담을 EGFR 엑손 20 GEMM에서 85%, HER2 엑손 20 GEMM에서 60%(도 3b, d)까지 감소시켰으며, 이는 동일한 GEM 모델에서 아파티닙에 대해 이전에 관찰된 37%보다 높은 수준의 억제이다. 포지오티닙 전후의 종양의 대표적인 MRI 이미지는 EGFR 및 HER2 GEMM 모두에 대해 표시된다(도 3c, d). EGFR 및 HER2 GEM 모델 모두에서, 10mg/kg 포지오티닙으로 처리된 마우스는 12주째에 진행의 징후 없이 지속적인 퇴행을 입증했다(도 3e, f). 또한, 포지오티닙 치료(5 또는 10mg/kg)는 EGFR 엑손 20 삽입 PDX 모델 LU0387(H773insNPH)에서 14일까지 종양을 완전히 감소시켰다(>85% 억제)(도 3g).

[0148] 포지오티닙이 다른 비가역적 억제제와 마찬가지로 C797에서 공유 결합하는지 여부를 결정하기 위해, 오시머티닙 내성을 갖는 환자의 약 30%에서 관찰된 C797S 돌연변이와 함께 Ba/F3 세포주가 생성되었다(Thress et al., 2015). C797S 돌연변이는 >10μM의 IC_{50} 값으로 포지오티닙에 대한 내성을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 함께, 이러한 실험은 포지오티닙이 다른 3세대 TKI와 유사한 획득 내성 메커니즘에 취약할 수 있음을 시사했다.

[0149] 위의 발견을 검증하기 위해, HER2 G776del insVC와 함께 유방암 세포주 MCF10A를 사용하여 실험을 수행했다. 세포를 다양한 용량으로 상이한 억제제로 처리하였고, 유방암 세포주가 시험된 다른 세포주에서 볼 수 있는 바와 같이 포지오티닙에 민감하다는 것이 발견되었다(도 10). 따라서, 포지오티닙은 엑손 20 돌연변이를 갖는 다른 암의 치료에 사용될 수 있다.

[0150] 따라서, 엑손 20 돌연변이체는 1세대, 2세대 및 3세대 TKI에 대한 새로운 내성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. EGFR D770insNPG 및 HER2 A775insYVMA의 3-D 모델링을 사용하여 포지오티닙은 엑손 20에의 삽입에 의해 유도된 약물 결합 포켓 내의 변화를 극복할 수 있는 구조적 특징을 갖는 것으로 식별되었다. 또한, 포지오티닙의 예측된 활성은 시험관내 및 생체내 모델을 사용하여 확인되었고, 이러한 돌연변이를 갖는 세포에서 포지오티닙의 강력한 항종양 활성을 입증했다.

[0151] 포지오티닙은 EGFR 엑손 20 돌연변이체에서 아파티닙보다 약 40배, 다코미티닙보다 65배 더 강력한 것으로 밝혀졌다. 또한, 포지오티닙은 시험관내에서 HER2 엑손 20 돌연변이체에서 아파티닙 및 다코미티닙보다 6배 더 강력했다. 종합하면, 이러한 데이터는 포지오티닙이 아파티닙 및 다코미티닙과 유사한 퀴나졸린 백본을 공유하지만, 키나제 억제제의 추가 특징으로 인해 보다 일반적인 T790M 돌연변이와 비교하여 EGFR 엑손 20 돌연변이에 대한 활성 및 상대적 특이성이 증가함을 나타낸다.

[0152] 3-D 모델링은 포지오티닙의 더 작은 크기, 증가된 할로겐화 및 가요성이 엑손 20 돌연변이체 EGFR/HER2의 입체 장애된 약물 결합 포켓에서 억제제에 경쟁적 이점을 제공함을 시사한다. α-c-나선으로부터 돌연변이의 거리와 약물 감수성 사이에는 음의 상관관계가 관찰되었다. 이 관계는 돌연변이의 정확한 위치가 TKI의 약물 결합 포켓 및/또는 결합 친화도에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 또한, 데이터는 삽입의 크기도 또한 약물 감수성에 영향을 미친다는 것을 나타냈다. 더욱이, 단지 하나의 아미노산의 순 이득을 갖는 환자 유래 세포주 YUL0019(N771del insFH)는 더 큰 EGFR 엑손 20 삽입을 갖는 세포주보다 퀴나졸린 기반 pan-HER 억제제에 더 민감했다.

[0153] **실시예 2 - 재료 및 방법**

[0154] *환자 집단 및 통계 분석*: 전향적으로 수집된 MD Anderson Lung Cancer Moon Shot GEMINI 데이터베이스에 등록

된 EGFR 돌연변이체 NSCLC 환자가 식별되었다. EGFR 돌연변이 상태는 일상적인 임상 치료에 사용되는 50, 134 또는 409개 유전자 패널의 PCR 기반 차세대 서열분석 중 하나를 사용하여 결정되었다. PFS는 카플란 마이어(Kaplan Meier) 방법을 사용하여 계산되었다. PFS는 EGFR TKI의 시작부터 방사선학적 진행 또는 사망까지의 시간으로 정의되었다. 재병기 스캔은 치료 동안 6-8주 간격으로 수득되었고, EGFR 엑손 20 삽입 NSCLC 환자의 반응 속도를 결정하기 위해 고형 종양의 반응 평가 기준(RECIST), 버전 1.1에 따라 후향적으로 평가되었다.

[0155] *세포주 생성 및 IL-3 결핍*: Ba/F3 세포주를 멸균 조건하에 L-글루타민, 10% 열 불활성화 FBS(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma Life Science) 및 10ng/ml 마우스 IL-3(R&D systems)이 보충된 완전 RPMI-1640(R8758; Sigma Life Science) 배지에서 배양했다. 12시간 동안 Ba/F3 세포주의 레트로바이러스 형질도입에 의해 안정한 세포주가 생성되었다. 표 2에 요약된 pBabe-Puro 기반 벡터(Addgene 및 Bioinnovatise)를 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여 Phoenix 293T 암포 패킹 세포주(Orbigen)로 형질감염시켜 레트로바이러스를 생성했다. 형질도입 72시간 후, 2㎍/ml 퓨로마이신(Invitrogen)을 배지에 첨가하였다. 선택 5일 후, 세포를 FITC-HER2(Biolegend) 또는 PE-EGFR(Biolegend)로 염색하고 FACS를 통해 분류했다. 이어서, 세포주를 15일 동안 IL-3의 부재하에 성장시키고, 세포 생존력을 세포 역가 Glo 검정(Progema)을 사용하여 3일 마다 결정하였다. 생성된 안정한 세포주는 IL-3이 없는 상기 기재된 완전 RPMI-1640 배지에서 유지시켰다. HCC827 및 HCC4006 폐암 세포주는 ATCC로부터 수득하였고 멸균 조건하에 10% RPMI 배지에서 유지시켰다. PowerPlex 1.2 키트(Promega)를 사용하여 짧은 탠덤 반복체를 통한 DNA 지문 채취로 세포주 동일성을 확인했다. 지문 채취 결과는 세포주의 1차 공급원에 의해 유지된 참조 지문과 비교되었다. 모든 세포주는 마이코플라스마가 없었다. 에를로티닙 내성 세포주를 생성하기 위해 HCC827 및 HCC4006(둘 다 EGFR 돌연변이체) 세포를 내성 변이체가 나타날 때까지 에를로티닙 농도를 증가시키면서 배양했다.

[0156] [표 2]

안정한 세포주를 생성하는 데 사용된 벡터

명칭	돌연변이	공급원
EGFR A763insFQEA (SEQ ID NO:1)	c.2290_2291insTCCAGGAAG CCT (SEQ ID NO:2)	Addgene (#11011)의 pBabe-puro-EGFR WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR A767insASV	c.2302_2303insGCCAGCGTG	Addgene (#32066) 으로부터 구입됨
EGFR S768dupSVD	c.2303_2304dupAGCGTGGAC	Addgene (#11011)의 pBabe-puro-EGFR WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR V769insASV	c.2308_2309insCCAGCGTGG	Addgene (#11011)의 pBabe-puro-EGFR WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR D770insNPG	c.2310_2311insAACCCCGGC	Addgene (#11016) 으로부터 구입됨
EGFR D770insSVD	c.2311_2312insGCGTGGACA	Addgene (#11011)의 pBabe-puro-EGFR WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR H773insNPH	c.2319_2320insAACCCCCAC	Addgene (#11011)의 pBabe-puro-EGFR WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR T790M		Addgene (#32070) 으로부터 구입됨
EGFR T790M L858R		Addgene (#32073) 으로부터 구입됨
EGFR T790M Ex19del		Addgene (#32072) 으로부터 구입됨
EGFR T790M L858R C797S	c.2389T>A	Addgene (#32073)의 pBabe-puro-EGFR L858R/T790M 으로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
EGFR T790M Ex19del C797S	c.2389T>A	Addgene (#32072)의 pBabe-puro-EGFR Del1/T790M 으로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 S310F	c.929C>T	Addgene (#40991) 으로부터 구입됨
HER2 S310Y	c.929C>A	Addgene (#40992) 으로부터 구입됨
HER2 C311R	c.931T>C	Addgene (#40980) 으로부터 구입됨
HER2 L755P	c.2263_2264delinsCC	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2	c.2323–2324insTTT	Addgene (#40979)으로부터 구입됨

[0157]

A775insV G776C		
HER2 A775insYVMA (SEQ IDNO:3)	c.2323_2324insTATGTCATGG CT (SEQ ID NO:4)	Addgene (#40982) 으로부터 구입됨
HER2 G776V	c.2327G>T	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G776C V777insV	c.2326G>T, c.2331_2332insTGT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G776del insVV	c.2327delinsTTGT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G776del insVC	c.2326_2328insTCT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨

[0158]

[0159] *세포 생존력 검정 및 IC_{50} 추정*: 세포 생존력은 세포 역가 Glo 분석법(Promega)을 사용하여 결정되었다. 세포를 현탁 배지로부터 수집하고, 300xg에서 5분 동안 회전시키고, 새로운 RPMI 배지에 재현탁시키고, Countess 자동

세포 계수기 및 트립판 블루(Invitrogen)를 사용하여 계수하였다. 웰당 1500개 세포를 384-웰 플레이트(Greiner Bio-One)에 기술적 삼중으로 플레이팅하였다. 세포는 웰당 40μL의 최종 용적에서 연속 3배 희석된 TKI 또는 비히클 단독으로 7가지 상이한 농도의 억제제로 처리하였다. 72시간 후, 11μL의 세포 역가 Glo를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 10분 동안 진탕시키고, FLUOstar OPTIMA 다중 모드 마이크로 플레이트 판독기(BMG LABTECH)를 사용하여 생물발광을 결정했다. 생물발광 값은 DMSO 처리된 세포에 대해 정규화되었고, 정규화된 값은 가변 기울기를 갖는 정규화된 데이터에 대한 비선형 회귀 적합을 사용하여 GraphPad Prism에 플롯팅되었다. IC_{50} 값은 50% 억제에서 GraphPad Prism에 의해 계산되었다. 각 실험은 표시되지 않는 한 3번 반복되었다.

[0160] *티로신 키나제 억제제*: 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, AZD9291, CO-1686, EGF816, 이브루티닙 및 HM781-36B는 Selleck Chemical에서 구입했다. 에를로티닙과 게피티닙은 The University of Texas MD Anderson Cancer Center의 기관 약국에서 수득했다. BI-694는 Boehringer-Ingelheim에 의해 제공되었다. 모든 억제제는 DMSO에 10mM 농도로 용해하고, -80℃에서 저장했다.

[0161] *3-D 모델링*: EGFR D770insNPG 단백질의 구조를 검색하고(단백질 데이터 뱅크 입력 코드: 4LRM), 이를 주형으로 사용하여 EGFR D770insNPG의 분자 3-D 구조 모델을 구축했다. HER2 A775insYVMA는 문헌(참조: Shen et al.)에 이전에 공개된 모델을 사용하여 구축되었다. 상동성 모델은 MODELLER 9v6을 사용하여 구축되었으며, 분자 작동 환경 소프트웨어 패키지(Chemical Computing Group, Montreal, Canada)를 사용하여 추가로 에너지 최소화되었다. TKI의 엑손 20 돌연변이체 EGFR 및 HER2로의 분자 도킹은 달리 명시되지 않는 한 기본 매개변수와 함께 GOLD 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 도킹 프로세스에서 조기 종료가 허용되지 않았다. 규제를 사용하여 수용체와 억제제 사이의 공유 결합 형성을 모델링하였다. 결합 포켓 내 잔류물의 가요성은 GOLD 소프트웨어를 사용하여 해결되었다. EGFR/HER2와 억제제 사이의 상호작용을 보여주는 도면은 PYMOL을 사용하여 시각화했다.

[0162] *Ba/F3 돌연변이체의 웨스턴 블롯팅*: 웨스턴 블롯팅을 위해, 세포를 인산염 완충 식염수로 세척하고, 단백질 용해 완충액(ThermoFisher) 및 프로테아제 억제제 칵테일 정제(Roche)에 용해시켰다. 단백질(30-40μg)을 BioRad에서 구입한 겔에 로딩했다. BioRad 반건조 전이제를 사용한 다음, pEGFR(#2234), EGFR(#4267), pHER2(#2247), HER2(#4290)(1:1000; Cell Signaling)에 대한 항체로 프로빙했다. 블롯은 로딩 대조군으로서 β-액틴(Sigma-Aldrich, #A2228) 또는 빈쿨린(Sigma-Aldrich, # V4505)에 대한 항체로 프로빙하였고, SuperSignal West Pico 화학발광 기질(ThermoFisher) 및 BioRad의 ChemiDoc 터치 이미징 시스템 또는 방사선 필름을 사용하여 노출시켰다. 대표적인 이미지는 두 개의 개별 단백질 단리를 나타내고, 블롯은 이중으로 실행한다. 웨스턴 블롯팅의 정량화는 Photoshop으로 완료하고, (배경 평균 강도 - 샘플 평균 강도) (픽셀 수) = 밴드 강도로서 계산되었다. 샘플을 먼저 로딩 대조군(β-액틴 또는 빈쿨린)으로 정규화한 다음, DMSO로 정규화하고, GraphPad Prism으로 그래프화했다. DMSO로부터의 유의성은 GraphPad Prism으로 계산되었다.

[0163] *ELISA 및 Ba/F3 돌연변이체의 상관관계*: 단백질을 모 Ba/F3 세포주로부터 수거하고 각각의 Ba/F3 엑손 20 돌연변이체는 상기 기재된 바와 같이 활성화 돌연변이인 것으로 밝혀졌다. 총 EGFR(Cell Signaling, #7250) 및 총 HER2(Cell Signaling, #7310)에 대한 제조 지침서에 의해 기재된 바와 같이 ELISA를 수행했다. ELISA에 의해 결정된 상대적 발현은 상기 기재된 바와 같이 계산된 IC_{50} 값에 대해 플롯팅되었다. 피어슨 상관관계 및 p-값은 GraphPad Prism에 의해 결정되었다.

[0164] *환자 유래 세포주 연구*: CUTO14 세포는 이전에 기재된 배양 방법을 사용하여 고지에 입각한 동의 후 폐 선암종 환자의 흉수에서 생성되었다(Davies et al., 2013). 세포주를 표시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙으로 72시간 동안 처리하고, MTS 검정(Promega)에 의해 세포 생존력을 결정하였다. IC_{50}은 이전에 기재된 바와 같이 계산되었다(n=3). 환자 유래 세포주를 사용한 웨스턴 블롯팅은 이전에 기재된 바와 같이 완료되었다(Hong et al., 2007)(n=3). 세포를 지시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙으로 2시간 동안 처리하였다. 총 EGFR(BD Transduction Laboratories) 및 GAPDH(Calbiochem)를 제외한 모든 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입했다.

[0165] YUL0019 세포주는 IRB 승인 프로토콜에 따라 폐의 진행성 선암종 환자로부터 수득된 악성 심낭액으로부터 확립되었다. 세포주는 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청(Atlanta Biologicals) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Corning)이 보충된 RPMI + L-글루타민(Corning)에서 배양했다. EGFR 돌연변이의 존재를 확인하기 위해, RNA를 제조업체의 지침서에 따라 RNeasy 미니 키트(Qiagen #74104)를 사용하여 세포 펠릿으로부터 추출했다. cDNA는 Superscript III 제1-가닥 cDNA 합성 키트(Invitrogen #18080-051)를 사용하여 합성하였고, 주형으로 사용

하여 EGFR을 증폭시켰다. PCR 생성물은 다음 프라이머: EGFR-2080F: CTTACACCC AGTGGAGAAGC(서열번호 5) 및 EGFR-2507R ACCAAGCGACGGTCCTCCAA(서열번호 6)를 사용하여 생거 서열분석에 의해 서열분석하였다. 정방향 및 역방향 서열 추적을 수동으로 검토했다. 환자 유래 세포주에서 검출된 변이체는 EGFR(N771delinsFH)의 엑손 20에 복합 삽입되어 위치 771의 아미노산 아스파라긴이 2개의 아미노산 페닐알라닌과 히스티딘으로 대체되었다. 세포 생존력 및 IC_{50} 추정은 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0166] *환자 유래 이종이식편(PDX) 연구*: LU0387 PDX 실험은 Crown BioSciences에 의해 완료되었다. 간략하게, 종양을 발현하는 EGFR H773insNPH로부터의 종양 단편을 5-6주령 암컷 nu/nu 누드 마우스에 접종하였다. 종양이 100-200mm^3에 도달하면 마우스를 5mg/kg 포지오티닙, 10mg/kg 포지오티닙 또는 비히클 대조군(20% PEG-400, dH_2O 중 3% Tween-80)의 3개 그룹으로 무작위화했다. 종양 용적 및 체중을 매주 2회 측정하였다. 5mg/kg 포지오티닙을 투여받은 마우스는 4-5일 동안 약물을 투여받은 다음, 4일 동안 투여 휴가를 받은 다음 4일 추가 투여를 받았다. 이어서, 마우스를 투여하지 않고 추가 2일 동안 관찰하였다. 10mg/kg의 포지오티닙을 투여받은 마우스에 3-4일 동안 약물을 투여한 후, 투여하지 않고 10일 동안 관찰했다. 종양 부담과 관련이 없는 사건에 대해 인간적으로 안락사된 마우스는 최종 분석에서 제외되었다.

[0167] *유전자 조작된 마우스 모델(GEMM) 연구*: EGFR D770insNPG 및 HER2 A775insYVMA GEMM은 이전에 기재된 바와 같이 생성되었다(Perera et al., 2009; Cho et al., 2013). 실험 동물 복지국에서 정의하고 Dana-Farber Cancer Institute 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Boston, MA)의 승인을 받아 수행된 Good Animal Practices에 따라 마우스를 취급했다. 마우스는 6주령부터 지속적인 독시사이클린 식이를 급식했다. 종양 용적은 이전에 기재된 바와 같이 MRI에 의해 결정되었다(Perera et al., 2009; Cho et al., 2013). 동일한 초기 종양 용적을 갖는 마우스를 MRI에 의해 결정된 명백한 종양 형성시 비히클 및 10mg/kg 포지오티닙으로 매일 비맹검 무작위화하였다. 종양 부담과 관련이 없는 사건에 대해 인간적으로 안락사된 마우스는 최종 분석에서 제외되었다.

[0168] **실시예 3 - HER2 엑손 21 돌연변이를 갖는 암 세포에 대한 약물의 식별**

[0169] **HER2 돌연변이는 방광암, 위암, 담관암에서 가장 자주 발생한다**: 암 유형 전반에 걸친 HER2 돌연변이의 다양성을 이해하기 위해, cBioPortal, MD Anderson Cancer Center, Foundation Medicine의 코호트와 Guardant Health의 cfDNA 코호트를 포함한 여러 데이터베이스가 문의되었다. 모든 데이터베이스에 걸쳐, 모든 비동의어 HER2 돌연변이가 25가지 다른 암 유형 내에서 분석되었다(표 4). HER2 돌연변이에 대한 가중된 평균 빈도를 계산했다. AACR GENIE 데이터베이스(Meric-Bernstam et al., 2018)에서 관찰된 것과 유사하게, HER2 돌연변이는 방광암(8.3%), 담관암(5.3%) 및 위암(4.5%)에서 가장 자주 발생했고(도 13a); HER2 엑손 20 돌연변이는 소장암(1.8%), 폐암(1.5%) 및 유방암(0.9%)에서 가장 자주 발생했다(도 13b).

[0170] **HER2 돌연변이는 HER2의 티로신 키나제 도메인에서 가장 자주 발생하며, 돌연변이 핫스팟은 악성 종양에 따라 다르다**: 다음으로, 돌연변이 빈도를 cBioPortal 및 MD Anderson에서 보고된 HER2 수용체의 다양한 영역 내에서 분석했다. 모든 암 유형에 걸쳐, HER2 돌연변이는 엑손 20(20%), 엑손 19(11%) 및 엑손 21(9%)의 돌연변이를 포함하는 티로신 키나제 도메인(46%)에서 가장 자주 발생했다(도 14a). 또한, 세포외 도메인 돌연변이는 HER2 돌연변이의 37%를 구성했다. 문의된 모든 암에 걸쳐, 가장 흔한 HER2 돌연변이는 p.S310F/Y(11.0%), p.Y772_A775dupYVMA(5.7%), p.L755P/S(4.6%), p.V842I(4.4%) 및 p. V777L/M(4.0%)(도 14e)이었다. 폐암에서, 대부분의 HER2 돌연변이는 엑손 20(48%) 내에서 발생했으며, Y772_A775dupYVMA는 모든 HER2 돌연변이의 34%를 포함했다(도 14b, 14f). 유방암에서, 대부분의 HER2 돌연변이는 엑손 19(37%) 내에서 발생하였고, L755 돌연변이는 HER2 돌연변이의 22%에서 가장 널리 퍼졌다(도 14c). 그러나, 하나의 변이체가 우세한 폐암과 달리 유방암에서는 엑손 19 돌연변이 사이에 돌연변이 다양성이 더 많았다(도 14g). 결장직장암에서, HER2 돌연변이는 엑손 21(23%) 및 세포외 도메인(23%)에서 가장 자주 발생하였고, 엑손 21의 V842I 변이체가 가장 널리 퍼졌다(19%)(도 14d, 14h).

[0171] **Y772dupYVMA는 암 유형 전반에 걸쳐 가장 흔한 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이이다**: HER2 엑손 20 돌연변이는 HER2의 티로신 키나제 도메인 내의 가장 흔히 발생하는 돌연변이(모든 HER2 돌연변이의 16% 및 티로신 키나제 도메인 돌연변이의 43%)이고, HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 여전히 임상적 도전 과제로 남아 있다. 엑손 20 삽입의 다양성과 유병율을 이해하기 위해, HER2 엑손 20 삽입 서열의 빈도를 cBioportal, MD Anderson 및 Guardant Health 데이터베이스에서 암 유형에 의해 분석했다. Y772dupYVMA 삽입은 모든 HER2 엑손 20 삽입의 70%를 포함하는 가장 흔한 HER2 엑손 20 삽입이었고, p.G778dupGSP(14%) 및 p.G776del insVC(9%) 삽입이 두 번째와 세 번째로 가장 자주 발생했다(도 21a). NSCLC에서 엑손 20 삽입 돌연변이(N=362)는 엑손 20 삽입 돌연변이에서 가

장 큰 다양성을 나타냈고(도 21b), 유방암에서 엑손 20 삽입 돌연변이(N=30)는 보고된 단지 3개의 개별 변이체와 함께 삽입 서열에서 거의 다양성을 나타내지 않았다(도 21c). 추가의 희귀 삽입 돌연변이가 다른 암 유형에 걸쳐 나타났지만, Y772 및 G778에서의 중복은 분석된 모든 암 유형에서 가장 빈번하게 발생하였다(도 21d).

[0172] **자주 검출된 HER2 변경은 활성화 돌연변이이다**: 일반적인 HER2 돌연변이의 기능적 영향을 평가하기 위해, Ba/F3 세포는 엑손 19, 20 및 21에 걸쳐 가장 자주 검출된 16개의 HER2 돌연변이와 함께 안정적으로 발현되었다. 테스트된 16개의 HER2 돌연변이는 모두 Ba/F3 세포의 IL-3 독립적 생존을 유도하는 것으로 밝혀졌다(도 15a-c). 더욱이, 이들 16개의 HER2 돌연변이의 발현은 인산화된 HER2의 발현을 초래하였고(도 22a), 이는 이러한 돌연변이가 수용체 활성화를 초래함을 나타낸다.

[0173] **포지오티닙은 테스트된 가장 강력한 TKI였으며 시험관내에서 가장 흔한 HER2 돌연변이를 억제했다**: 최근 보고서는 HER2 돌연변이체 질환의 전임상 모델에서 공유 퀴나졸린아민 기반 TKI(즉, 아파티닙, 다코미티닙, 포지오티닙, 네라티닙)의 효과를 강조하고 있고, 아파티닙, 다코미티닙 및 네라티닙의 임상 연구는 ORR이 낮았을 뿐만 아니라 환자 결과에서 암 특이적 및 변이체 특이적 차이가 있었다. 가장 일반적으로 검출된 HER2 변이체 전반에 걸쳐 약물 감수성을 체계적으로 평가하기 위해, HER2 돌연변이체 Ba/F3 세포의 패널을 11개의 공유 및 비공유 EGFR 및 HER2 TKI에 대해 스크리닝했다. HER2 돌연변이체는 비공유 억제제인 라파티닙 및 사파티닙에 대해 강력한 내성을 나타내었다(도 16a). 공유 TKI인 오시머티닙, 이브루티닙 및 나자르티닙은 엑손 20 돌연변이를 발현하는 세포에서 세포 생존력을 억제하는 데 효과적이지 않았지만; 이러한 TKI는 D769 변이체를 발현하는 세포에 대한 활성을 입증하였다(도 16a). 비교에 의해, 공유 퀴나졸린아민 기반 TKI, 아파티닙, 네라티닙, 다코미티닙, 타를록소티닙-TKI 및 포지오티닙은 3개의 엑손 모두에 걸쳐 HER2 돌연변이체에 대한 억제 활성을 가졌다(도 16a). 테스트된 모든 HER2 돌연변이 변이체 및 TKI에 걸쳐, 포지오티닙은 평균 IC_{50}이 가장 낮았고, 아파티닙, 네라티닙 또는 타를록소티닙-TKI보다 세포 생존력 감소에 유의하게 더 효과적이었다(도 16b). 또한, 포지오티닙은 HER2 엑손 19 및 20 돌연변이에 대해 아파티닙, 네라티닙 또는 타를록소티닙-TKI보다 유의하게 더 효과적이었지만, 엑손 21 돌연변이체에 대한 평균 IC_{50}에는 유의한 차이가 없었으며(도 16c-e), 이는 돌연변이 위치가 약물 결합에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 또한, 엑손 19 내에서, L755S 및 L755P 변이체는 테스트된 모든 TKI에 걸쳐 약물 감수성에서 상당한 차이를 가졌으며(도 16f), 이는 이 부위의 특정 아미노산 변화가 약물 결합 친화도에 영향을 미쳤음을 나타낸다.

[0174] **HER2 돌연변이 위치 및 아미노산 변화는 약물 결합 친화도에 영향을 미친다:** 돌연변이 위치 및 아미노산 변화가 약물 결합 친화도 및 억제 효능에 어떻게 영향을 미칠 수 있는지 추가로 이해하기 위해, 분자 동역학 시뮬레이션을 사용하여 이러한 돌연변이가 HER2 키나제 도메인의 구조 및 동역학에 어떻게 영향을 미치는지를 조사했다. L755S, L755P, Y772dupYVMA, 및 V777L HER2 돌연변이체의 분자 모델(도 23a)은 공개적으로 이용 가능한 X-선 구조(PDB 3PP0)를 주형으로 사용하여 작제하였고, 단백질 형태 샘플링을 증가시키기 위해 가속화 분자 동역학에 적용하였다. 특히 P-루프 및 α-C-나선 위치와 관련하여 샘플링된 단백질 형태의 범위는 이러한 HER2 돌연변이체 사이에서 다양했다. 차이점은 특히 α-C-나선 영역에서 엑손 20 돌연변이 사이에서도 명백히 분명하였고, 여기서 α-C-나선 영역의 형태의 지속 기간이 "인"(더 작은 결합 포켓을 갖는 활성 형태) 및 "아웃"(더 큰 결합 포켓을 갖는 비활성 형태) 사이에서 다양했다. V777L 돌연변이체는 "아웃" 형태를 심하게 많이 샘플링한 반면, Y772dupYVMA 돌연변이체는 "인" 및 "아웃" 형태 둘 다를 샘플링하였다(도 17a). 전반적으로, 형태 상태의 이러한 차이는 V777L 돌연변이체보다 10배 더 자주 "in" 형태에 존재하는 Y772dupYVMA 돌연변이체를 초래하고(도 17b), 평균적으로 V777L에 비해 Y772dupYVMA에 대한 더 작은 결합 포켓 크기를 초래한다(도 17c 및 23b). 또한, Y772dupYVMA의 더 작은 결합 포켓은 네라티닙이 α-C-나선 방향으로 배향된 피리딜 환을 함유하기 때문에 V777L에 비해 Y772dupYVMA에 대한 네라티닙의 더 약한 효능의 원인일 수 있다.

[0175] HER2 돌연변이체 결합 포켓 용적의 추가 분석(도 22b)은 동일한 잔기에서의 돌연변이가 단백질 형태에 대해 극적으로 상이한 효과를 가질 수 있음을 입증하였다. 특히, L755P 돌연변이의 프롤린 잔기는 각각 L755와 V790 사이의 β3 및 β5 가닥 사이의 백본 수소 결합을 파괴하는 수소 결합 공여체가 결여되어 있다. 이러한 2개의 β-가닥 사이의 안정화의 결여는 β-시트의 불안정화 및 키나제 힌지 영역에서 구조적 재배열을 초래하였다(도 17d). 특히, L755P의 L800 잔기가 활성 부위로 돌출되어 포켓 크기를 상당히 줄였다. β3 가닥 형태의 변화는 또한 P-루프가 안쪽으로 붕괴되도록 하여 포켓 용적을 더욱 감소시키고 이 돌연변이체를 대부분의 TKI에 덜 민감하게 한다. 또한, 힌지 이동성의 변화는 또한 키나제 활성화에서 역할을 할 수 있다. L755P 돌연변이체 확인에서 이러한 뚜렷한 변화는 야생형 HER2와 더 유사한 형태 및 포켓 용적 프로파일을 갖는 L755S 돌연변이체의 거동과 대조를 이룬다(도 23b).

[0176] **HER2 돌연변이체 인간 암 세포주는 포지오티닙에 대해 향상된 감수성을 나타냈다**: HER2 억제제를 테스트하는 임상 연구는 약물 감수성에서 암 유형 특이적 차이를 나타냈다(Hyman et al., 2018). 공유 퀴나졸린아민 기반 TKI가 HER2 돌연변이체 질환 모델에서 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해, EGFR/HER2 TKI의 패널을 인간 암 세포주에서 테스트했다. 전종양 MCF10A 유방 상피 세포를 HER2 엑손 20 돌연변이로 형질감염시키고, 12개의 EGFR/HER2 TKI에 대한 시험관내 감수성을 평가하였다. G776del insVC, Y772dupYVMA, 또는 G778dupGSP HER2 돌연변이를 발현하는 MCF10A 세포는 각각 12nM, 8.3nM 및 4.5nM의 IC_{50} 값으로 포지오티닙에 가장 민감하였다(도 18a-c). 비교하여, 타를록소티닙-TKI 및 네라티닙은 각각 21nM 및 150nM의 평균 IC_{50} 값을 산출했으며(도 18a-c), 이는 포지오티닙이 타를록소티닙-TKI 및 네라티닙보다 각각 2.6배 및 19배 더 강력함을 나타낸다($p<0.001$). 또한, 포지오티닙 및 네라티닙을 사용한 MCF10A HER2 G776delinsVC 세포의 웨스턴 블롯팅은 네라티닙이 아닌 포지오티닙이 10nM에서 p-HER2를 완전히 억제한다는 것을 보여주었다(도 24a). 야생형(WT) HER2가 Ba/F3 세포를 IL-3와 무관하게 성장하도록 형질전환하지 않기 때문에, MCF10A 세포를 사용하여 WT HER2와 비교하여 돌연변이체 HER2에 대한 TKI의 선택성을 결정했다. 이를 위해, 각각의 억제제에 대한 선택성 지수(SI, IC_{50} 값 돌연변이체/IC_{50} 값 WT)를 계산하였고, 포지오티닙이 MCF10A 세포주(SI = 0.028)에서 테스트된 가장 돌연변이체택적 TKI인 것으로 밝혀졌고, 피로티닙(SI= 0.063) 및 타를록소티닙-TKI(SI= 0.111)가 뒤따랐다(도 18d). Ba/F3 세포를 사용하여 수득된 데이터(도 15c)와 일치하게, HER2 엑손 19 돌연변이체 결장직장암(CW-2) 모델에서, 포지오티닙, 타를록소티닙-TKI 및 네라티팁 사이의 감수성 차이는 유의적이지만($p=0.02$ 및 $p=0.0004$) 덜 극적이었고, 평균 IC_{50} 값은 각각 3.19nM, 4.24nM 및 68.8nM이다(도 18e). 또한, CW-2 결장직장 세포의 이종이식 마우스 모델에서, 21일째에 포지오티닙(5mg/kg) 처리 동물은 비히클 처리 그룹과 비교하여 종양 용적의 58% 감소를 나타내었다($p=0.011$). 이와 비교하여, 네라티닙(30mg/kg) 처리 동물은 비히클 대조군($p=0.023$)과 비교하여 종양 용적(28%) 증가를 나타냈고, 아파티닙(20mg/kg) 처리는 비히클 대조군과 비교하여 종양 성장에 유의하게 영향을 미치지 않았다(도 18f, 25).

[0177] **포지오티닙은 HER2 돌연변이를 갖는 NSCLC 환자에서 항종양 활성을 갖는다:** 이러한 전임상 데이터 및 엑손 20 돌연변이에 대한 이전에 공개된 연구(Robichaux et al., 2018)를 기반으로 하여, EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체 NSCLC(NCT03066206)에서 포지오티닙의 연구자 개시된, II상 임상 시험이 개시되었다. 환자는 진행, 사망 또는 중단될 때까지 포지오티닙 16mg으로 매일 경구 치료했다. 객관적 반응은 RECIST v1.1을 기준으로 하여 8주 마다 평가하였다. HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 보유하는 처음 12명의 평가 가능한 환자 중, 6/12(50%)의 환자가 부분 반응(PR)의 최상의 반응을 보였다. 이 반응은 2개월 후 5/12에서 반복 스캔에 의해 확인되었다(확인된 객관적 반응률, 42%)(도 19a). 이러한 12명의 환자 중, 2명의 환자는 첫 반응 평가에서 진행성 질환(PD)을 나타내어 83%의 질환 제어율(DCR)을 초래했다. 2018년 12월 기준으로 12명의 환자 중 10명이 진행되었고, 처음 12명의 환자에 대한 PFS 중앙값은 5.6개월이었다(도 19b). 지금까지 연구에 포함된 모든 환자는 2개의 가장 일반적인 HER2 엑손 20 삽입, Y772dupYVMA 및 G778dupGSP 중 하나를 보유했다(도 19a). 치료 전 및 후(8주) Y772dupYVMA 돌연변이를 갖는 1명의 NSCLC 환자의 대표적인 이미지는 오른쪽 폐에서 강력한 종양 수축을 나타냈다(도 19c). 이전 치료 라인의 수를 포함한 환자 특성은 표 3에서 찾을 수 있다. 또한, HER2 엑손 19 점 돌연변이인 L755P를 보유하는 과도하게 사전 치료된 NSCLC 환자 1명은 동정적 치료 사용 프로토콜(C-IND18-0014)에 따라 치료되었다. 환자는 매일 16mg의 포지오티닙으로 치료되었고, 4주째에 종양 수축이 있었다(도 19d, 흰색 상자). 환자는 RECIST v1.1에 따라 안정한 질환(SD)을 가졌다(표적 군단에서 -12% 감소). 환자는 영상에서 질환의 진행을 나타내고 포지오티닙이 중단될 때까지 7개월 이상 질환 제어와 함께 포지오티닙을 유지했다. 환자는 포지오티닙 치료 종료시 임상적으로 양호했으며, 추가의 전신 요법을 계속 받았다.

[0178] **포지오티닙과 T-DM1 치료의 조합은 항종양 활성을 강화한다**: HER2 양성 유방암 모델에서 HER2 TKI 라파티닙과 EGFR 돌연변이체 NSCLC 모델에서 EGFR 억제제에 대한 이전 연구는 TKI 치료가 세포 표면에의 수용체 축적를 증가시키고, 증가된 세포 표면 HER2/EGFR은 항체 의존 세포 세포독성(ADCC)에 대한 감수성을 증가시킨다는 것을 나타냈다. 포지오티닙 치료가 세포 표면에서 총 HER2 수용체 발현을 증가시키는지 여부를 결정하기 위해, 세포 표면 HER2 발현을 24시간의 저용량 포지오티닙 치료 후 FACS에 의해 분석하였다. 평균적으로 포지오티닙 치료는 세포 표면 HER2 발현을 2배 증가시킨 것으로 밝혀졌다(도 20a, $p<0.0001$). 다음으로, 포지오티닙과 T-DM1의 조합이 시험관내 세포 생존력을 감소시키는지 여부를 테스트하였고, T-DM1 단독은 MCF10A HER2 돌연변이체 세포주의 세포 생존력을 억제하지 않는 반면, T-DM1과 포지오티닙의 조합은 용량 의존 방식으로 어느 하나의 제제 단독보다 유의하게 더 낮은 IC_{50} 값을 초래하였음을 밝혀내었다(도 20b). 생체내에서 이러한 발견을 검증하기 위해, 저용량 포지오티닙과 단일 용량의 T-DM1의 조합을 HER2 돌연변이체 NSCLC PDX 모델인 HER2 Y772dupYVMA

에서 테스트하였다(도 20c). 치료에 대한 반응을 평가하기 위해, 무진행 생존(PFS)이 결정되었으며, 이는 최상의 반응으로부터 종양 배가까지의 시간으로 정의되었다. 비히클 대조군을 투여받은 마우스는 3일의 중앙값 PFS(mPFS)를 갖는 반면, 저용량 포지오티닙 또는 T-DM1을 투여받은 마우스는 각각 15일 및 27일의 mPFS를 가졌다. 그러나, 저용량 포지오티닙과 조합된 단일 용량의 T-DM1을 투여받은 (14/20) 마우스는 45일째에 종양 부재 상태로 유지되었다(도 20d). 또한, 최상 반응 시점 15일째에 저용량 포지오티닙(2.5mg/kg)과 단일 용량의 T-DM1(10mg/kg)의 조합은 T-DM1 단독을 투여받은 2/9 마우스 또는 저용량 포지오티닙을 투여받은 0/12 마우스와 비교하여 20/20마리의 마우스(100%)에서 완전한 종양 퇴행을 초래했다(도 20c-f). 30일까지, T-DM1만을 투여받은 모든 마우스에서 종양 성장이 재개되었지만; 조합 치료를 받은 14/20 마우스에서는 종양 재발의 증거가 없었다(도 20f, g).

[0179] 추가의 연구는 다른 TKI와 비교하여 포지오티닙의 효능을 검증했다. 포지오티닙은 EGFR S768dupSVD PDX 모델에서 고용량 오시머티닙보다 더 효과적인 것으로 밝혀졌다(도 26). 또한, Y772dupYVMA를 보유하는 NSCLC의 PDX 모델에서 포지오티닙이 네라티닙보다 더 높은 항종양 활성을 갖는 것으로 나타났다(도 27). 단일 제제 포지오티닙은 V777L을 보유하는 유방암 PDX 모델에서 네라티닙보다 더 효과적이었다(도 28). 다양한 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체 생체내 모델에서 포지오티닙 항종양 활성의 효능에 대한 요약이 도 29에 제시되어 있다.

[0180] 표 3: 표시된 EGFR 엑손 20 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포에 대한 평균 IC_{50} 값의 표. IC50 값을 결정하기 위해, Ba/F3 세포가 생성되었다. 세포를 웰당 2,000개 세포로 384-웰 플레이트에 기술적 삼중으로 플레이팅하였다. 24시간 후, 세포는 150nM 내지 0.01nM 범위의 7가지 다른 용량의 포지오티닙으로 처리하였다. 퍼센트 생존력을 결정하고 DMSO 처리된 대조군으로 정규화했다. 각 생물학적 복제에 대한 IC50 값은 GraphPad Prism에서 비선형 회귀 모델링을 사용하여 계산되었다. 평균 및 SEM은 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

	평균	SEM
EGFR WT	6.753	0.882
EGFR A763insLQEA	0.082	0.0002
EGFR A763insFQEA	0.354	0.097
EGFR A767insASV	0.275	0.009
EGFR A767insTLA	1.006	0.064
EGFR S768I	0.481	0.042
EGFR S768I/V769L	0.214	0.059
EGFR S768I V774M	0.601	0.016
EGFR S768dupSVD	1.198	0.166
EGFR S768dupSVD V7689M	0.401	0.004
EGFR V769L	0.392	0.095
EGFR V769insASV	2.028	0.355
EGFR V769insGSV	1.225	0.197
EGFR V769insGVV	1.248	0.208
EGFR V769insMASVD	1.124	0.184
EGFR D770del insGY	0.839	0.183
EGFR D770insG	1.491	0.183
EGFR D770insY H773Y	1.115	0.171
EGFR D770insNPG	1.238	0.257
EGFR D770insSVD	2.385	0.359
EGFR N771dupN	0.204	0.006
EGFR N771dupN G724S	1.103	0.470
EGFR N771insHH	1.533	0.201
EGFR N771insSVDNR	0.836	0.042
EGFR P772insDNP	2.890	0.554
EGFR H773insAH	1.999	0.428
EGFR H773insNPH	3.507	0.641
EGFR H773insH	18.132	2.066
EGFR V774insHV	2.385	0.463
EGFR V774M	0.095	0.006
EGFR R776H	0.084	0.0003
EGFR R776C	0.155	0.011

[0181]

[0182] 여기서, 특정 돌연변이 핫스팟이 악성 종양에 따라 다르지만, HER2 돌연변이가 다양한 종양 유형에서 발생한다고 보고되고 있다. 더욱이, HER2 TKI에 대한 감수성은 돌연변이 위치에 걸쳐 이질적이며, HER2 엑손 20 삽입 및 L755P 돌연변이는 약물 결합 포켓의 감소된 용적으로 인해 대부분의 HER2 TKI에 대해 내성이다. 또한, 포지오티닙은 HER2 엑손 20 삽입 및 L755P 돌연변이를 보유하는 NSCLC 환자에서 임상 효능이 있는 강력한 pan-HER2 돌연변이체 선택적 억제제로 식별되었다. 마지막으로, 포지오티닙 치료가 세포 표면에 HER2의 축적을 유도하고, 포지오티닙과 T-DM1 치료의 조합이 시험관내 및 생체내에서 항종양 활성을 향상시키는 것으로 확립되었다.

[0183] pan-암 분석은 HER2 돌연변이 핫스팟이 암 유형에 따라 다르며 시험관내에서 HER2 TKI에 대한 차등적 감수성을 갖고, 이는 임상 효능에 영향을 미칠 가능성이 있음을 나타낸다. SUMMIT 시험에서, 네라티닙은 유방암 환자에서 가장 큰 효능을 생성하였고, 대다수의 반응자들은 L755S, V777L 또는 L869R 돌연변이에 대해 양성이었다. 시험관내 Ba/F3 약물 스크리닝에서 이러한 돌연변이는 낮은 IC_{50} 값과 상관관계가 있었다. 대조적으로, 결장직장암 환자는 네라티닙에 반응하지 않았다. 이러한 임상적 관찰과 일치하게, V842I 돌연변이는 결장직장암 사례에서 가장 흔한 HER2 돌연변이이며, 이 특정 돌연변이는 약물 스크린 검정에서 네라티닙에 민감하지 않은 것으로 밝혀졌다. 이러한 데이터는 악성 종양 사이의 차등적 TKI 감수성이 약물 감수성에 직접적으로 영향을 미치는 암 특이적 돌연변이 핫스팟에 의해 부분적으로 설명될 수 있음을 시사한다. 그러나, HER2 돌연변이의 분포

가 종양 유형에 따라 달라지는 이유와 소정의 돌연변이가 다른 종양 유형에서 유사한 약물 반응을 생성하는지 여부에 대한 핵심 질문이 남아 있다. SUMMIT 시험 데이터에 따르면 특정 엑손 20 삽입이 유방암 환자에서 네라티닙 감수성과 관련이 있는 반면, 이러한 동일한 돌연변이는 다른 모든 암 유형의 내성과 관련되어 추가 조사가 필요한 감수성에서 이러한 종양 유형 특이적 차이에 기초하는 잠재적인 메커니즘이 있을 수 있음을 입증함을 나타냈다.

[0184] 엑손 20 삽입 돌연변이와 엑손 19 L755P 돌연변이는 대부분의 HER2 TKI에 대해 내성이다. 시험관내 약물 스크리닝은 엑손 20 삽입 돌연변이와 L755P 돌연변이가 테스트된 각 TKI에 대해 가장 높은 IC_{50} 값을 가졌음을 나타냈다. 분자 동역학 시뮬레이션은 이러한 돌연변이가 약물 결합 포켓의 전체 크기와 이동성에 영향을 미치는 형태 변화를 유도한다는 것을 보여주었다. 종합적으로, 이러한 시험관내 및 인 실리코 발견은 역사적으로 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 환자가 TKI에 대해 불량한 반응을 갖는다는 임상 관찰과 일치한다. 엑손 20 삽입이 자주 발생하는 폐암에서, HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 보유하는 환자는 네라티닙, 다코미티닙 및 아파티닙에 대해 각각 0%, 11.5% 및 18.2% 내지 18.8%의 반응률을 보였다. 더욱이, L755S 돌연변이는 네라티닙에 반응하는 것으로 나타났지만, L755P 돌연변이는 TKI와 항체-약물 접합체 모두에 대해 완전히 내성이 있다.

[0185] **실시예 4 - 재료 및 방법**

[0186] **HER2 돌연변이 유병률 및 변이체 빈도의 분석**: MD Anderson Cancer Center, cBioPortal, Foundation Medicine 또는 Guardant Health의 데이터베이스에서 보고된 각 HER2 돌연변이의 빈도를 결정하기 위해, 각 데이터베이스를 개별적으로 문의한 다음, 빈도는 각 데이터베이스에서 환자의 총 수로 가중화되었고, 가중된 평균으로 보고된다. cBioPortal에서 암 유형에 걸쳐 HER2 돌연변이의 빈도를 결정하기 위해, 모든 비중복 연구를 선택하여 내보냈다. 중복 연구의 경우, 가장 큰 데이터 세트만이 사용되었다. MD Anderson Cancer Center에서 HER2 돌연변이 빈도를 결정하기 위해, Institute for Personalized Cancer Therapy 데이터베이스에 암 유형과 무관한 모든 HER2 돌연변이에 대해 문의했다. Foundation Medicine의 HER2 엑손 20 돌연변이의 빈도를 결정하기 위해, HER2 결실, 프레임 이동, 삽입 및 점 돌연변이를 갖는 환자 수의 비식별 데이터를 표로 작성하고, 5개 미만의 돌연변이를 갖는 암 유형은 제외되었다. 마지막으로, Guardant Health에서 HER2 엑손 20 돌연변이의 빈도를 결정하기 위해, Guardant360 임상 데이터베이스에서 2015년 10월부터 2018년 5월 사이에 테스트된 ERBB2 엑손 20 돌연변이를 갖는 샘플(70개 및 73개 유전자 패널)에 대해 문의했다. Guardant360®은 최대 73개의 유전자에서 SNV, indel, 융합 및 SNV를 보고하는 CLIA 인증된, CAP/NYSDOH 인증 종합 cfDNA NGS 테스트이다. 그런 다음, Guardant Health에서 보고된 빈도는 문헌(참조: Odegaard et al 2018)에 보고된 바와 같이 임상 감수성을 교정하기 위해 정규화되었다. 구체적으로, 빈도를 임상 감수성 퍼센트(85.9%)로 나누었다.

[0187] **Ba/F3 세포주 생성 및 IL-3 결핍**: Ba/F3 세포주는 이전에 기재된 바와 같이확립되었다. 요약하면, 12시간 동안 Ba/F3 세포주의 레트로바이러스 형질도입에 의해 안정한 Ba/F3 세포주가 생성되었다. 레트로바이러스는 표 1에 요약된 pBabe-Puro 기반 벡터(Addgene 및 Bioinnovatise)를 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여 Phoenix 293T-암포 세포(Orbigen)로 형질감염시킴으로써 생성되었다. 형질도입 3일 후, 2㎍/ml 퓨로마이신(Invitrogen)을 RPMI 배지에 첨가하였다. 선택 5일 후, 세포를 FACS에 의해 분류된 FITC-HER2(Biolegend)로 염색하였다. 이어서, 세포주를 2주 동안 IL-3의 부재하에 성장시키고, 세포 생존력을 세포 역가 Glo 검정(Progema)을 사용하여 3일 마다 평가하였다. 생성된 안정한 세포주는 IL-3 없이 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지에서 유지시켰다.

[0188] **세포 생존력 검정 및 IC_{50} 추정**: 세포 생존력은 이전에 기재된 바와 같이 세포 역가 Glo 검정(Promega)을 사용하여 결정되었다(Robichaux et al., 2018). 요약하면, 웰당 2000-3000개의 세포를 384-웰 플레이트(Greiner Bio-One)에 기술적 삼중으로 플레이팅했다. 세포를 7가지 상이한 농도의 티로신 키나제 억제제 또는 비히클 단독으로 웰당 40㎕의 최종 용적으로 처리했다. 3일 후, 11㎕의 세포 역가 Glo를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 15분 동안 진탕시키고, FLUOstar OPTIMA 다중 모드 마이크로 플레이트 판독기(BMG LABTECH)를 사용하여 생물발광을 결정했다. 생물발광 값은 DMSO 처리된 세포로 정규화되었고, 정규화된 값은 가변적인 기울기를 갖는 정규화된 데이터에 대한 비선형 회귀 적합을 사용하여 GraphPad Prism에 플롯팅하였다. IC_{50} 값은 50% 억제에서 GraphPad Prism에 의해 계산되었다.

[0189] **포스포- 및 총-HER2에 대한 ELISA 및 IC_{50} 값과의 상관관계**: 단백질을 상기 기재된 바와 같이 모 Ba/F3 세포주 및 HER2 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포주 각각으로부터 수거했다. 5㎍/ml의 단백질을 각 ELISA 플레이트에 첨가하고, 인산화된 HER2 세포 신호전달(#7968) 및 총 HER2(Cell Signaling, #7310)에 대한 제조 지침서에 의

해 기재된 바와 같이 ELISA를 수행했다. 상대적 p-HER2 발현은 ELISA에 의해 결정된 바와 같이 총 HER2에 대한 p-HER2의 비율을 취하여 결정되었다. 상대적 p-HER2 비율은 상기 기재된 바와 같이 계산된 포지오티닙 IC_{50} 값에 대해 플롯팅하였다. 피어슨 상관관계 및 p-값은 GraphPad Prism에 의해 결정되었다.

[0190] **티로신 키나제 억제제 및 T-DM1**: MedChem Express에서 구입한 EGF816 및 피로티닙을 제외하고 모든 억제제는 Selleck Chemical에서 구입했다. 모든 억제제는 DMSO에 10mM 농도로 용해하고 -80℃에서 저장했다. 억제제는 폐기되기 전에 2회의 동결 해동/주기로 제한되었다. T-DM1은 M.D. Anderson Cancer Center 기관 약국에서 재구성하여 구입했다.

[0191] **분자 동역학 시뮬레이션**: HER2 돌연변이체의 단백질 구조 모델은 PDB 3PP0 X선 구조에 인 실리코 돌연변이를 도입함으로써 MOE 컴퓨터 프로그램(Chemical Computing Group)을 사용하여 작제했다. NAMD 시뮬레이션 패키지를 사용하여 고전적 및 가속화 분자 동역학 시뮬레이션을 수행했다. 추가의 상세함은 보충 정보 섹션에 제공된다.

[0192] **인간 세포주**: MCF10A 세포를 ATCC에서 구입하고, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 5% 말 혈청(sigma), 20ng/ml EGF, 0.5mg/ml 하이드로코르티손 및 10㎍/ml 인슐린이 보충된 DMEM/F12 배지에서 배양했다. 안정한 세포주는 레트로바이러스 형질도입에 의해 생성되었고, 레트로바이러스는 표 1에 요약된 pBabe-Puro 기반 벡터(Addgene 및 Bioinnovatise)를 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여 Phoenix 293T-ampho 세포(Orbigen)로 형질감염시켜 생성했다. 형질도입 2일 후, 0.5㎍/ml 퓨로마이신(Invitrogen)을 RPMI 배지에 첨가하였다. 선택 14일 후, 세포를 상기 기재된 바와 같이 세포 생존력 검정에서 시험하였다. CW-2 세포는 MTA 하에 Riken 세포주 데이터베이스에 의해 제공되었으며, 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 RPMI에서 유지시켰다.

[0193] **생체내 이종이식편 연구**: 6주령 암컷 nu/nu 누드 마우스에 50% 마트리겔 중 $1x10^6$ 세포를 주입하여 CW-2 세포주 이종이식편을 생성했다. 종양이 $350mm^3$에 도달했을 때 마우스를 20mg/kg 아파티닙, 5mg/kg 포지오티닙, 30mg/kg 네라티닙 또는 비히클 대조군(0.5% 메틸셀룰로스, dH2O 중 2% Tween-80)의 4개 그룹으로 무작위화했다. 종양 용적은 일주일에 세 번 측정하였다. 마우스는 월요일-금요일(주당 5일) 약물을 투여받았지만, 수요일에 투약을 시작하여 처음 투약 3일 후 2일의 휴일을 허용했다.

[0194] Y772dupYVMA PDX 마우스는 Jax Labs(모델 # TM01446)에서 구입했다. HER2 Y772dupYVMA를 발현하는 종양의 단편을 5 내지 6주령 암컷 NSG 마우스(Jax Labs #005557)에 접종했다. 마우스를 주당 3회 측정하고, 종양이 200-$300mm^3$의 용적에 도달하면 마우스를 비히클 대조군(0.5% 메틸셀룰로스, dH_2O 중 0.05% Tween-80), 2.5mg/kg 포지오티닙, 10mg/kg T-DM1, 또는 2.5mg/kg 포지오티닙과 10mg/kg T-DM1의 조합의 4개 처리 그룹으로 무작위화했다. 종양 용적 및 체중을 주당 3회 측정하였다. 2.5mg/kg 포지오티닙으로 처리된 마우스는 월요일-금요일(주당 5일) 경구로 약물을 투여받았다. 10mg/kg T-DM1로 처리된 마우스는 무작위화 당일에 T-DM1의 1회 정맥내(IV) 용량을 투여받았다. 포지오티닙과 T-DM1 조합으로 처리된 마우스는 T-DM1을 1회 IV 용량을 투여받고 T-DM1 투여 후 3일째에 주당 5일 2.5mg/kg의 포지오티닙을 시작했다. 마우스의 체중이 10% 초과 감소되거나 체중이 20g 미만으로 떨어지면 마우스는 투여로부터 휴가를 받았다. 무진행 생존은 2회 연속 측정에 대한 최상의 반응에서 종양 배가로서 정의되었다. 완전 퇴행은 종양 부담이 95% 초과 감소하는 것으로 정의되었으며, 완전 퇴행이 있는 마우스의 경우, 2회 이상의 연속 측정에 대해 종양 배가는 $75mm^3$ 초과로 정의되었다. 실험은 Good Animal Practices와 MD Anderson Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee(Houston, TX)의 승인을 받아 완료되었다.

[0195] [표 3]

안정한 세포주를 생성하기 위해 사용된 벡터

명칭	돌연변이	공급원
HER2 L755S	c.2264T>C	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 D769H	c.2305G>A	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 D769N	c.2305G>C	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 D769Y	c.2305G>T	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 Y772dupYVMA	c.2323_2324insTATGTCATGGCT	Addgene (#40982)으로부터 구입됨
HER2 G776del insVC	c.2326_2328insTCT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G776del insVV	c.2327delinsTTGT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G776del insLC	c.2326G>TTGT	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 V773M	c.2317G>A	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 V777L	c.2329G>T	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 G778insLPS	c.2332_2333insGGCTCCCCA	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 L786V	c. 2356C>G	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 V842I	c.2524G>A	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨
HER2 L869R	c.2606T>G	Addgene (#40978)의 pBabe-puro HER2 WT 로부터의 Bioinnovatise 로부터 생성됨

[0196]

[0197] [표 4]

데이터베이스에 걸친 암 유형에 의한 환자의 총 수.

암 유형	총 N	HER2 돌연변이의 가중된 평균 빈도	HER2 엑손 20 돌연변이의 가중된 평균 빈도
담관	829	5.307%	0.724%
방광	3146	8.295%	0.858%
뇌	10105	0.350%	0.040%
유방	29609	3.115%	0.882%
자궁경부	1301		0.384%
결장직장	33302	2.185%	0.287%
조기 위암	341	3.812%	0.293%
자궁내막	4962	2.156%	0.181%
식도	4824	2.902%	0.435%
두경부	3428	1.083%	0.146%
신장	3600	1.164%	0.167%
백혈병	2451	0.122%	0.082%
비소세포 폐암	7859	2.150%	1.525%
흑색종	7409	0.892%	0.165%
신경내분비	60085	0.896%	0.121%
난소	11762	2.380%	0.188%
췌장	7988	0.964%	0.100%
복막	693	0.937%	0.433%
전립선	5319	1.154%	0.019%
타액선	962	0.303%	0.832%
육종	3198	0.534%	0.063%
소세포	2380		0.336%
소장	1028	4.730%	1.751%
위	2969	4.515%	0.370%
갑상선	2175	0.181%	0.046%

[0198]

[0199] [표 5]

환자 특징 및 요법 이전 라인의 수.

연령	성별	이전 라인의 #	돌연변이
57	F	1	Y772_A775dupYVMA
64	F	6	Y772_A775dupYVMA
54	F	1	A775_G776insYVMA
59	F	0	Y772_A775dupYVMA
58	F	3	Y772_A775dupYVMA
60	F	1	G778_P780dupGSP
61	F	3	G778_P780dupGSP
62	F	0	A775_G776insYVMA
55	F	2	G778_P780dupGSP
61	M	4	Y772_A775dupYVMA
63	M	1	Y772_A775dupYVMA
60	F	3	Y772_A775dupYVMA

[0200]

[0201] **FACS**: HER2 돌연변이를 과발현하는 MCF10A 세포를 6웰 플레이트에 밤새 플레이팅한 다음, 10nM 포지오티닙으로 처리했다. 24시간 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 트립신 처리하였다. 그런 다음, 세포를 PBS 중 0.5% FBS에 재현탁시키고, 얼음 위에서 45분 동안 Biolegend(#324404)의 항-HER2-FITC 항체로 염색했다. 세포를 PBS 중 0.5% FBS로 2회 세척하고 유세포 분석으로 분석하였다. IgG 및 염색되지 않은 대조군을 게이팅에 사용했다.

[0202] **웨스턴 블롯팅**: 웨스턴 블롯팅을 위해, 세포를 PBS로 세척하고 RIPPA 용해 완충액(ThermoFisher) 및 프로테아제 억제제 칵테일 정제(Roche)에 용해시켰다. 단백질(30-40㎍)을 BioRad에서 구입한 겔에 로딩했다. BioRad 반건조 전이제를 사용한 다음 pHER2, HER2, pPI3K, PI3K, p-AKT, AKT, p-ERK1/2 및 ERK1/2(1:1000; Cell Signaling)에 대한 항체로 프로빙했다. 블롯은 로딩 대조군으로 빈쿨린 또는 β-액틴(Sigma-Aldrich)에 대한 항체로 프로빙하고, ECL 웨스턴 블롯팅 기질(Promega)을 사용하여 노출시켰다.

[0203] **HER2 발현 수준 및 Ba/F3 돌연변이체 IC50과의 상관관계**: 단백질을 Ba/F 세포주로부터 수거하고, 총 HER2(Cell Signaling, #7310)에 대한 제조 지침서에 의해 기재된 바와 같이 ELISA를 수행했다. ELISA에 의해 결정된 상대적 발현은 상기 기재된 바와 같이 계산된 IC50 값에 대해 플롯팅되었다. 피어슨 상관관계 및 p-값은 GraphPad Prism에 의해 결정되었다.

[0204] **임상 시험 및 CIND 식별자**: 환자는 동정적 사용 프로토콜(MD Anderson Cancer Center CIND-18-0014) 또는 임상 시험 NCT03066206에서 포지오티닙 치료에 대한 서면 동의서를 제공했다. 프로토콜은 MD Anderson Cancer Center 기관 검토 위원회와 식품 의약국 모두의 승인을 받았다.

[0205] * * *

[0206] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시내용에 비추어 과도한 실험 없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 구현예의 관점에서 기재되었지만, 변형이 본 발명의 개념, 취지 및 범위를 벗어나지 않고 방법 및 본원에 기재된 방법의 단계에 또는 단계의 순서에 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 모두 관련된 특정 제제가 동일하거나 유사한 결과를 달성하면서 본원에 기재된 제제를 대체할 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 치환체 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0207] **참조문헌**

[0208] 하기 참조문헌은 예시적인 절차 또는 본원에 제시된 것에 보충적인 다른 세부사항을 제공하는 정도로 본원에 참고로 구체적으로 포함된다.

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

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

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401 (1985).

Davidson *et al., J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davies *et al., Plos One* 8, *2013.*

Del Tito *et al.*, *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998.

Drmanac *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58, 1998.

Drmanac *et al.*, *Science*, 260:1649-1652, 1993.

Flavell *et al.*, *Cell* 15:25 (1978).

Fu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:381-384, 1998/

Geever *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5081 (1981).

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Hong *et al., J Biol Chem* 282:19781-7, 2007.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

[0209] Hurwitz *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.

Hyman *et al., Nature* 554:189-94, 2018.
International Patent Publication No. WO 99/57318
International Patent Publication No. WO1995001994
International Patent Publication No. WO1998042752
International Patent Publication No. WO2000037504
International Patent Publication No. WO2001014424
International Patent Publication No. WO2009/101611
International Patent Publication No. WO2009/114335
International Patent Publication No. WO2010/027827
International Patent Publication No. WO2011/066342
International Patent Publication No. WO2015016718
International Patent Publication No.WO 00/37504
International Patent Publication No.WO01/14424
International Patent Publication No.WO98/42752
Kosaka *et al., Cancer Res* 2017.
Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
Lynch *et al*., *N Engl J Med.* 350(21):2129-2139, 2004.
Maemondo *et al., N Engl J Med* 362:2380-8, 2010.
Meric-Bernstam *et al., Clin Cancer Res,* 2018.
Mitsudomi and Yatabe, *Cancer Sci.* 98(12):1817-1824, 2007.
Mokyr *et al. Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
Oxnard *et al*., *J Thorac Oncol.* 8(2):179-184, 2013.
Paez *et al*., *Science* 304(5676):1497-1500, 2004.
Pao *et al*., *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13306-13311, 2004.
Pardoll, *Nat Rev Cancer,* 12(4): 252-64, 2012.
Perera *et al., Proc Natl Acad Sci U S A* 106:474-9, 2009.
Qin *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
Raca *et al*., *Genet Test* 8(4):387-94 (2004).
Robichaux *et al*., *Nat Med* 24:638-46, 2018.
Sanger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467 (1977).
Sears *et al., Biotechniques,* 13:626-633, 1992.
Sheffield *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236 (1989).
Shen *et al., J Recept Signal Transduct Res* 36:89-97, 2016.
Thress *et al., Nat Med* 21:560-2, 2015.

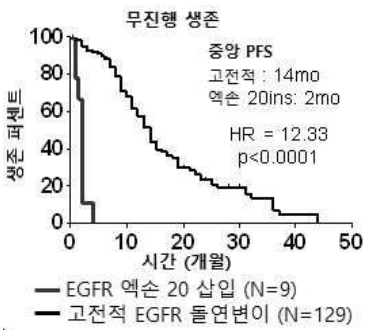
[0210]

U.S. Patent No. 4,870,287
U.S. Patent No. 5,288,644
U.S. Patent No. 5,739,169
U.S. Patent No. 5,760,395
U.S. Patent No. 5,801,005
U.S. Patent No. 5,824,311
U.S. Patent No. 5,830,880
U.S. Patent No. 5,844,905
U.S. Patent No. 5,846,945
U.S. Patent No. 5,869,245
U.S. Patent No. 5,885,796
U.S. Patent No. 6,207,156
U.S. Patent No. 8,008,449
U.S. Patent No. 8,017,114
U.S. Patent No. 8,119,129
U.S. Patent No. 8,188,102
U.S. Patent No. 8,329,867
U.S. Patent No. 8,354,509
U.S. Patent No. 8,735,553
U.S. Patent Publication No. 2004/0014095
U.S. Patent Publication No. 2005/0260186
U.S. Patent Publication No. 2006/0104968
U.S. Patent Publication No. 20110008369
U.S. Patent Publication No. 20130071452
U.S. Patent Publication No. 2014022021
U.S. Patent Publication No. 20140294898
Underhill *et al.*, *Genome Res.* 7:996-1005 (1997).
Yang *et al.*, *Int J Cancer* 2016.
Yasuda *et al.*, *Sci Transl Med* 5(216):216ra177, 2013.
Zimmerman *et al.*, *Methods Mol. Cell. Biol.*, 3:39-42, 1992.

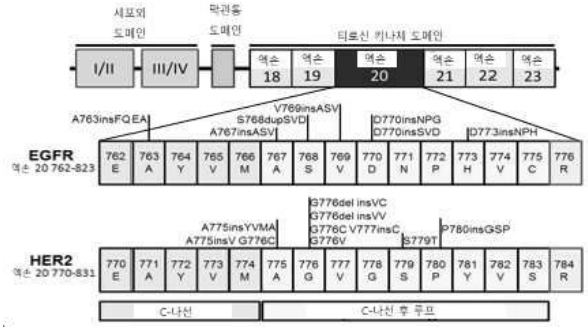
[0211]

도면

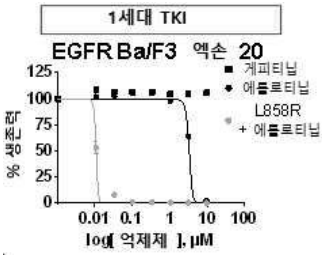
도면1a



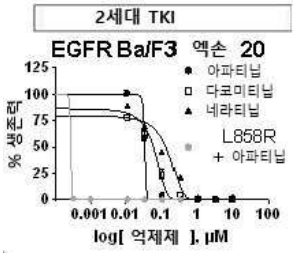
도면1b



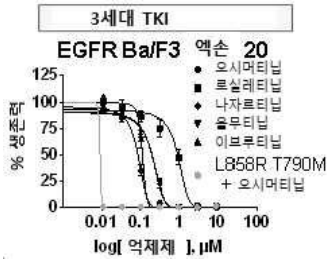
도면1c



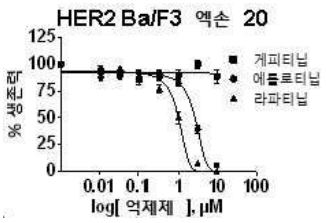
도면1d



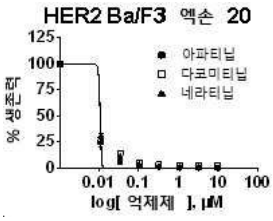
도면1e



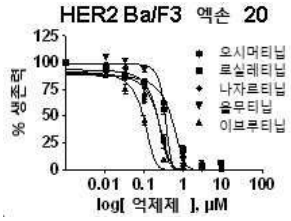
도면1f



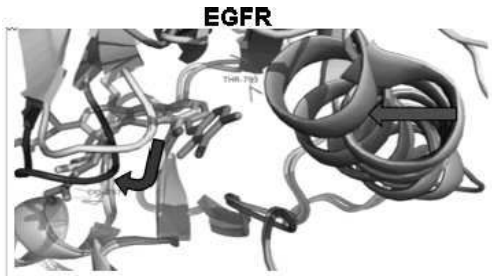
도면1g



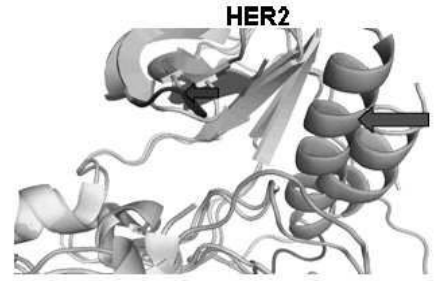
도면1h



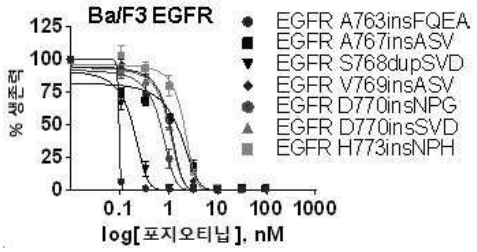
도면1i



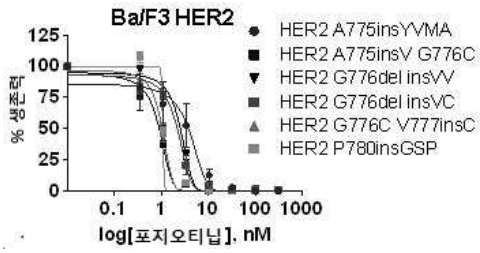
도면1j



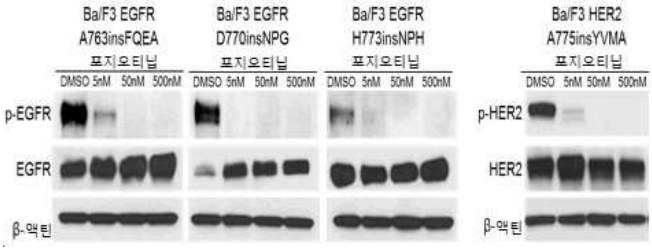
도면2a



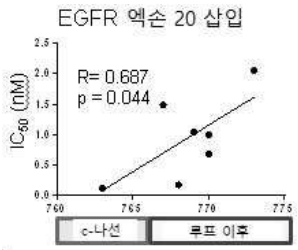
도면2b



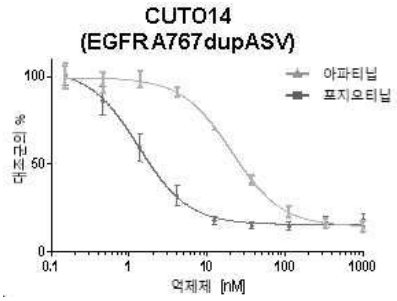
도면2c



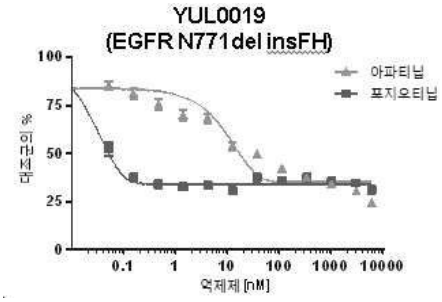
도면2d



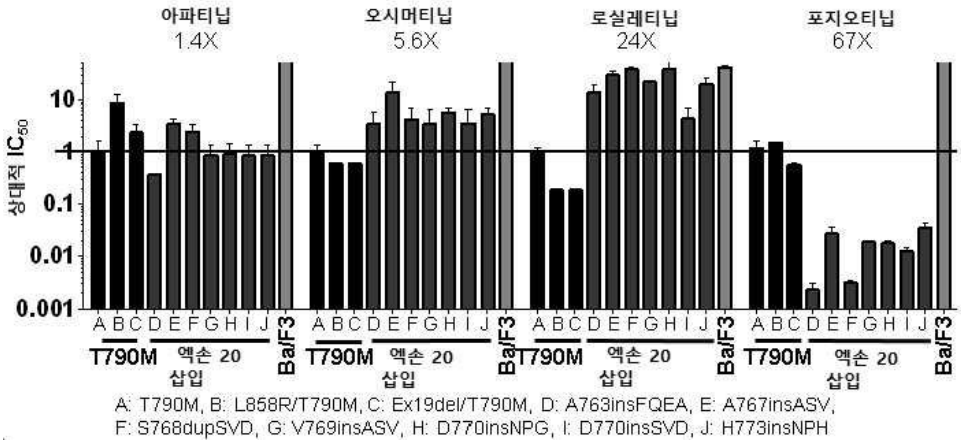
도면2e



도면2f

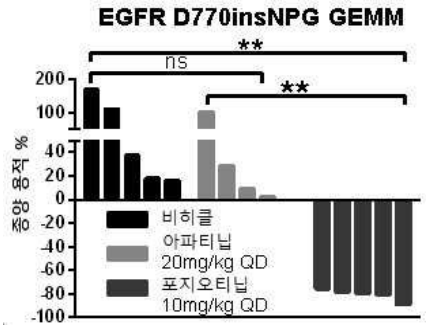


도면2g

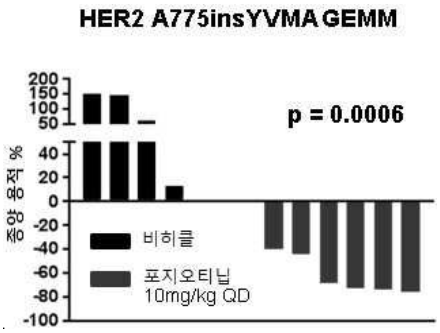


A: T790M, B: L858R/T790M, C: Ex19del/T790M, D: A763insFQEA, E: A767insASV, F: S768dupSVD, G: V769insASV, H: D770insNPG, I: D770insSVD, J: H773insNPH

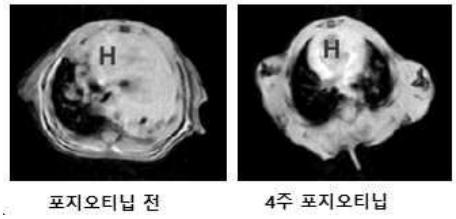
도면3a



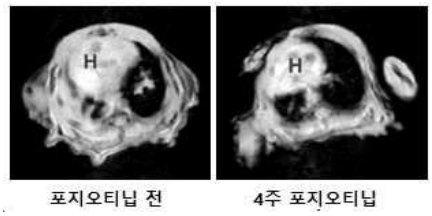
도면3b



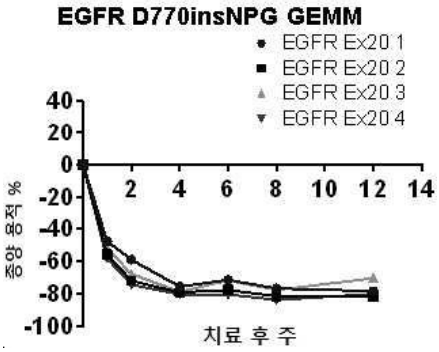
도면3c



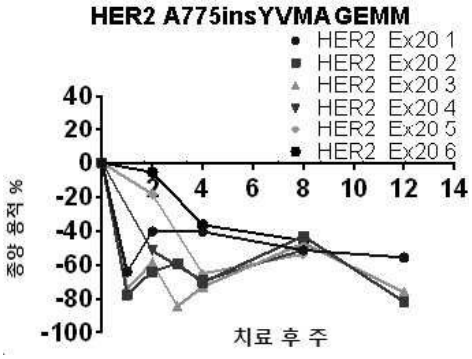
도면3d



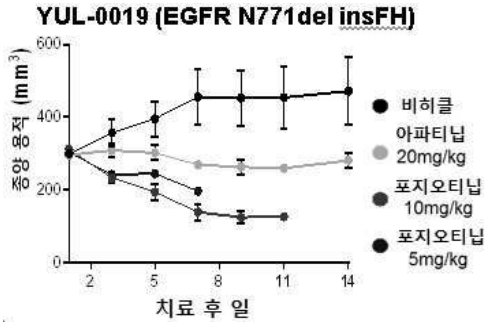
도면3e



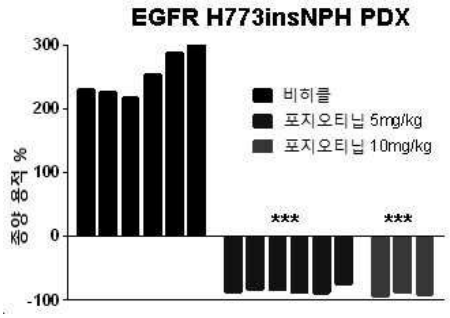
도면3f



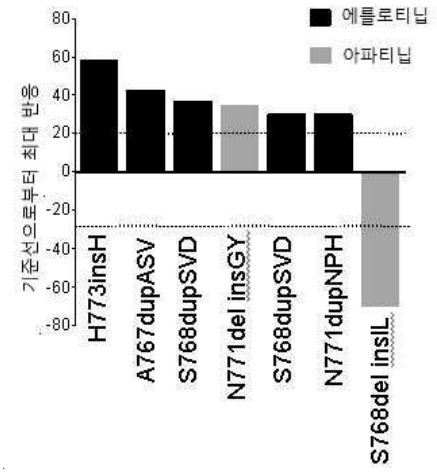
도면3g



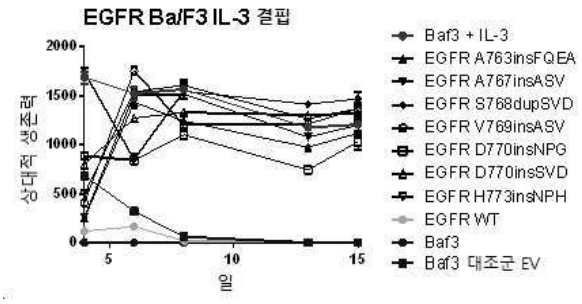
도면3h



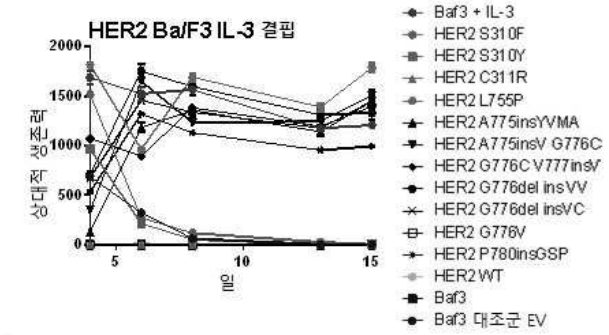
도면4a



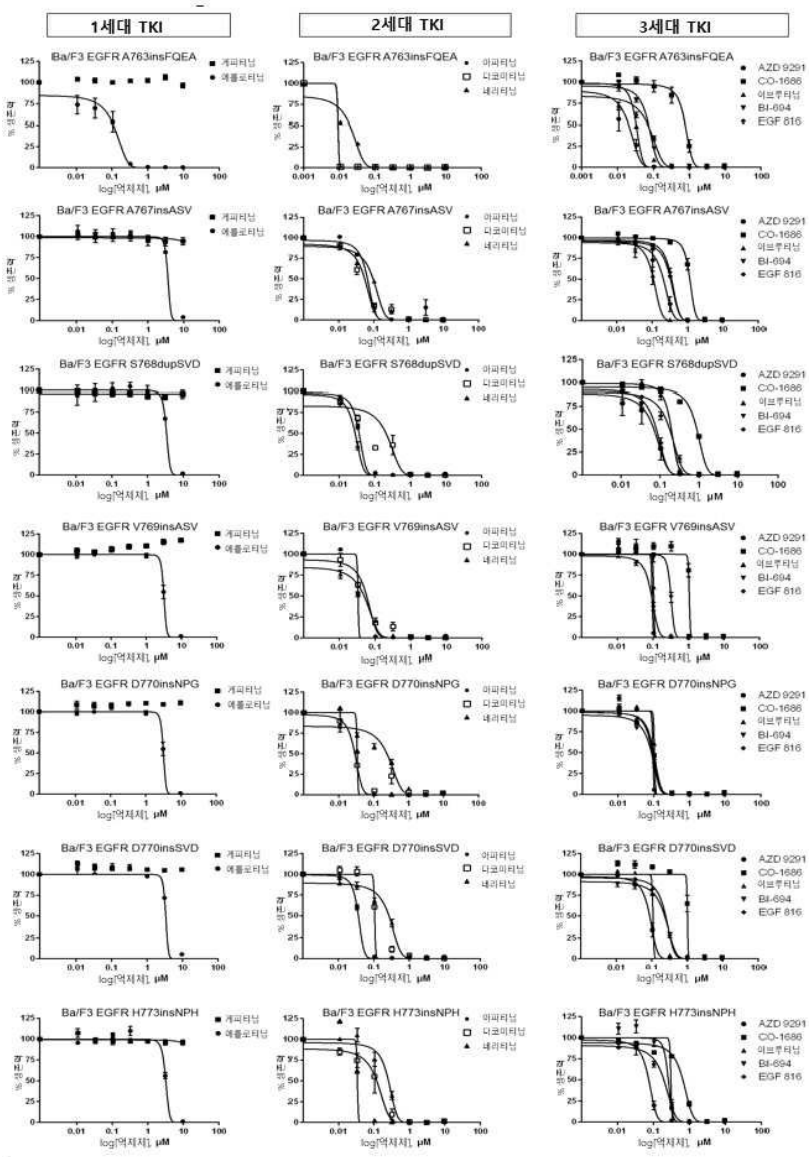
도면4b



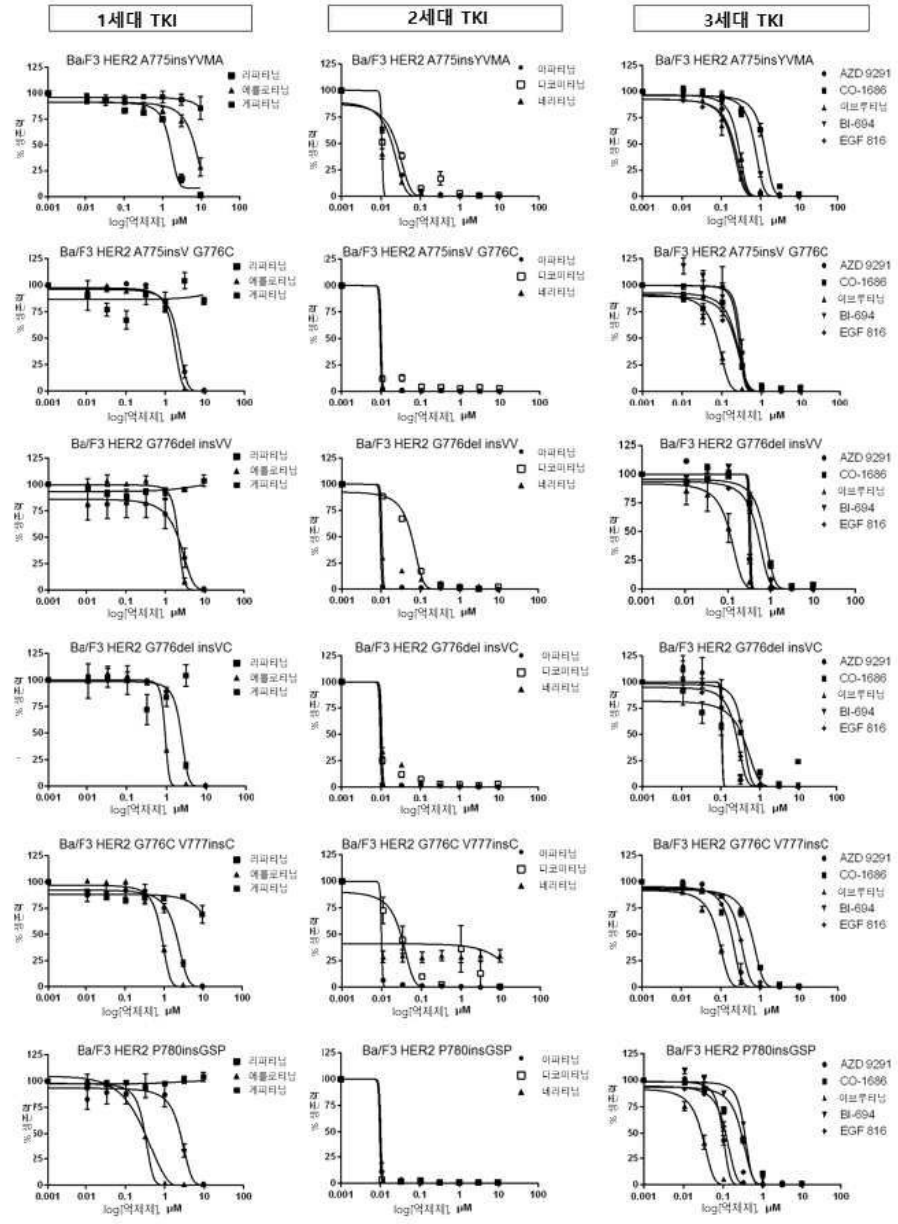
도면4c



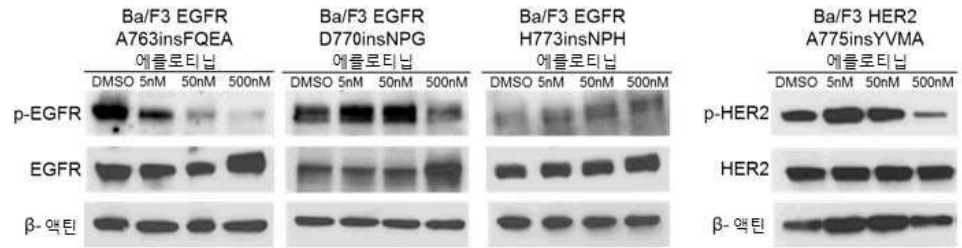
도면5


1세대 TKI
2세대 TKI
3세대 TKI
Ba/F3 EGFR A763insFQEA
Ba/F3 EGFR A767insASV
Ba/F3 EGFR S768dupSVD
Ba/F3 EGFR V769insASV
Ba/F3 EGFR D770insNPG
Ba/F3 EGFR D770insSVD
Ba/F3 EGFR H773insNPH
게피티닙
에를로티닙
아파티닙
다코미티닙
네라티닙
AZD 9291
CO-1686
아브루티닙
BI-694
EGF 816
% 생존율
log[억제제] μM

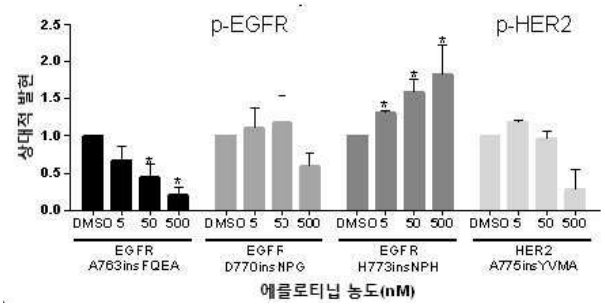
도면6


1세대 TKI
2세대 TKI
3세대 TKI
Ba/F3 HER2 A775insYVMA
Ba/F3 HER2 A775insV G776C
Ba/F3 HER2 G776del insVV
Ba/F3 HER2 G776del insVC
Ba/F3 HER2 G776C V777insC
Ba/F3 HER2 P780insGSP
리파티닙
에를로티닙
게피티닙
아파티닙
다코미티닙
네리티닙
AZD 9291
CO-1686
아브루티닙
BI-694
EGF 816
log[억제제] μM

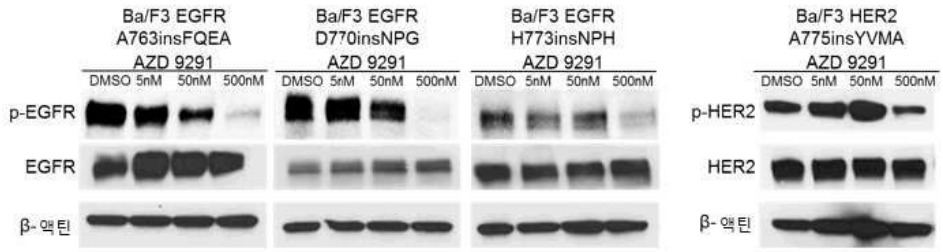
도면7a


Ba/F3 EGFR A763insFQEA 에를로티닙
Ba/F3 EGFR D770insNPG 에를로티닙
Ba/F3 EGFR H773insNPH 에를로티닙
Ba/F3 HER2 A775insYVMA 에를로티닙
DMSO 5nM 50nM 500nM
p-EGFR
EGFR
β-액틴
p-HER2
HER2
β-액틴

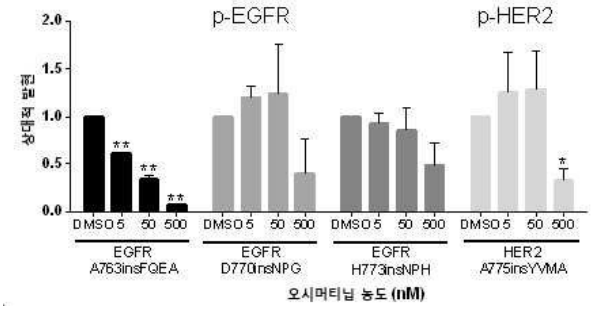
도면7b



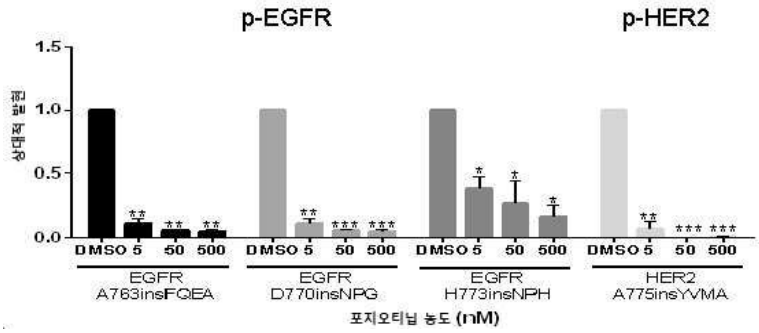
도면7c



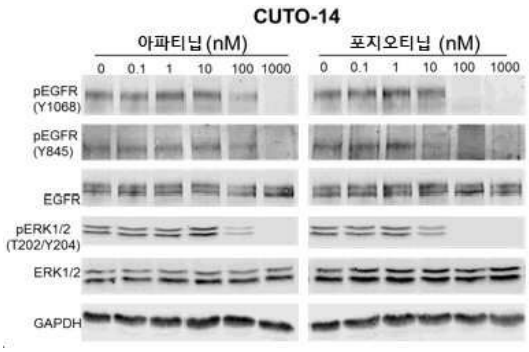
도면7d



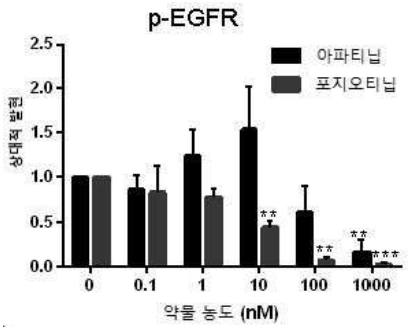
도면8a



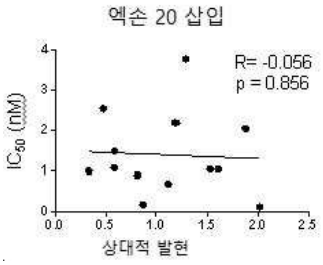
도면8b



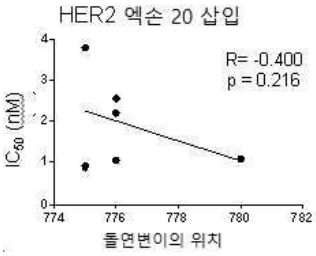
도면8c



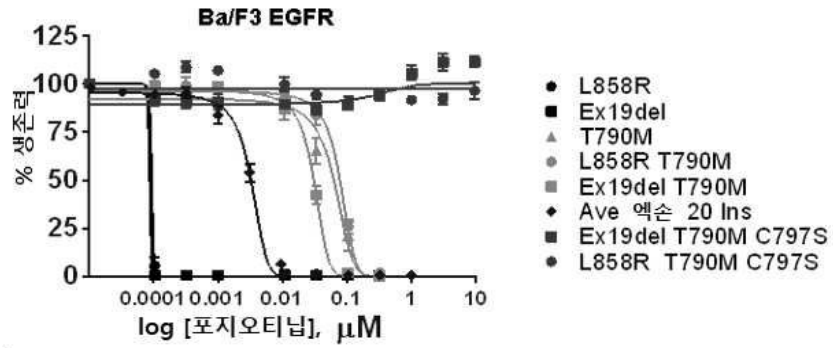
도면8d



도면8e



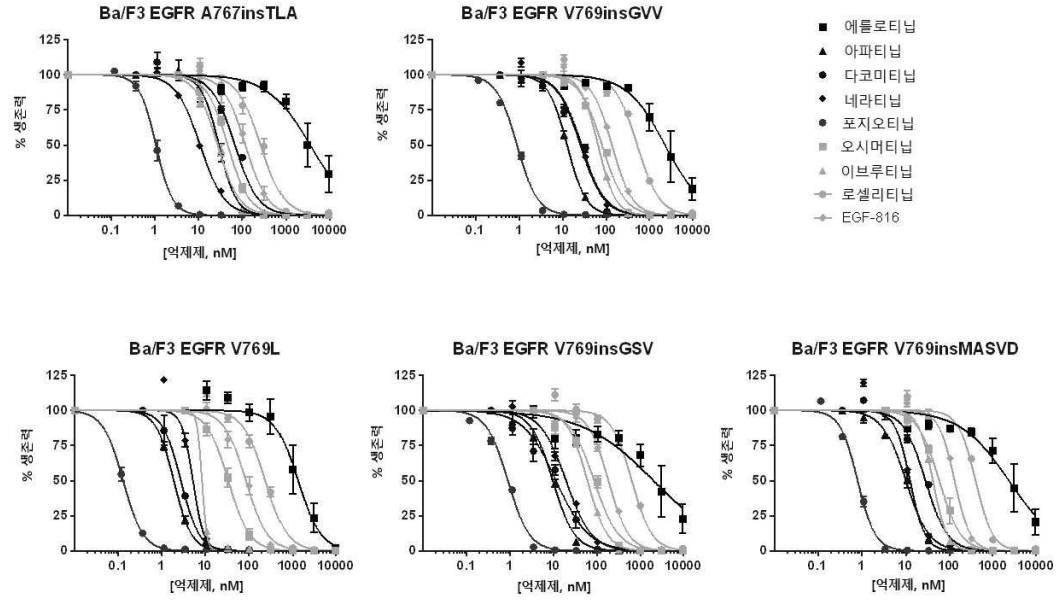
도면9



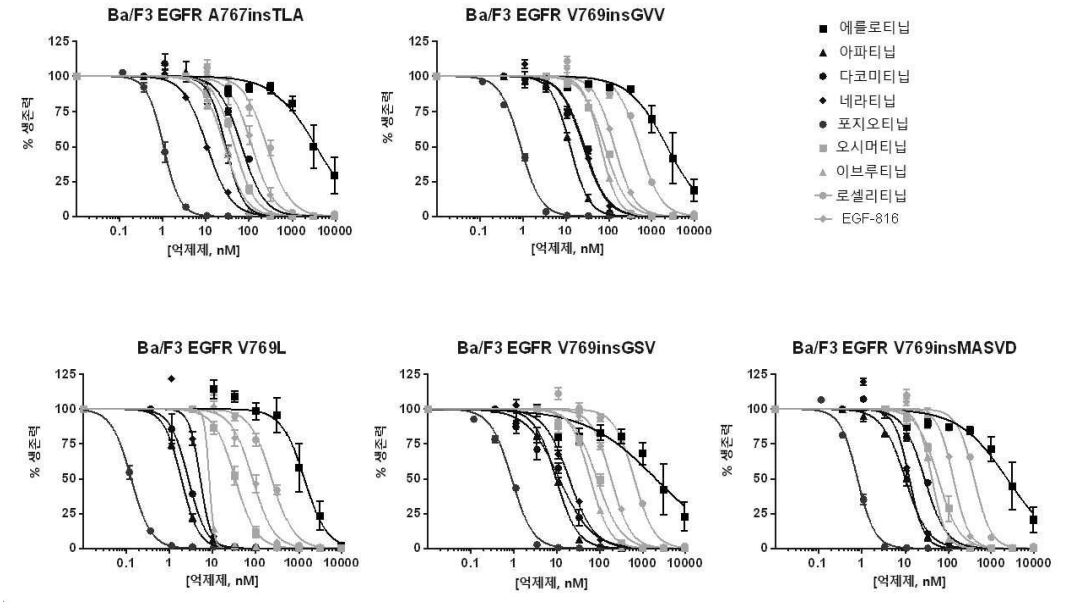
도면10



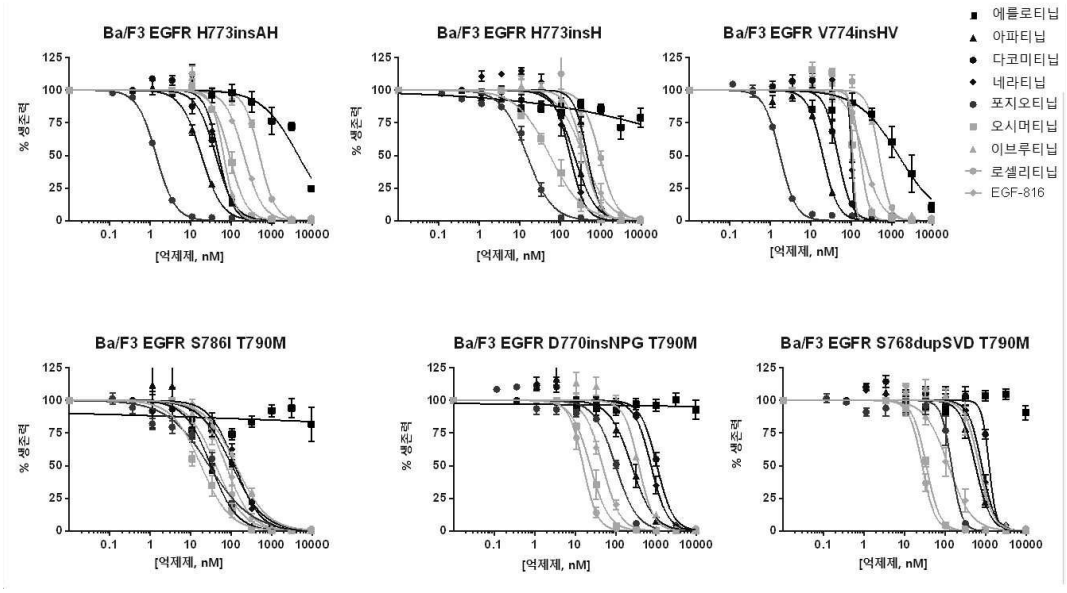
도면11a



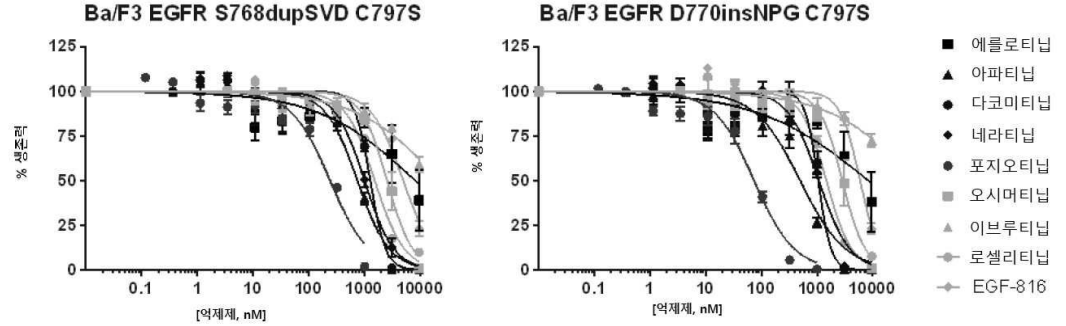
도면11b



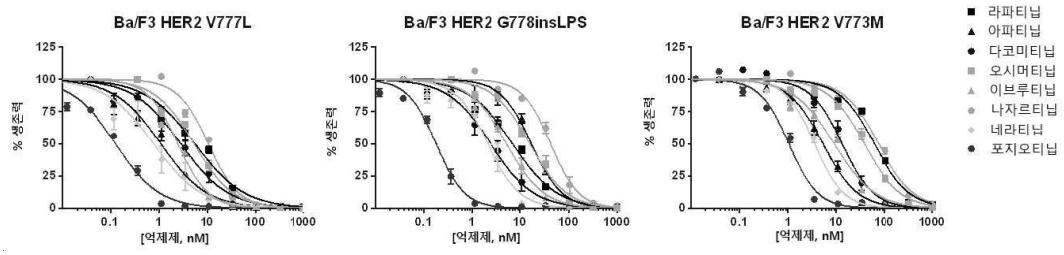
도면11c



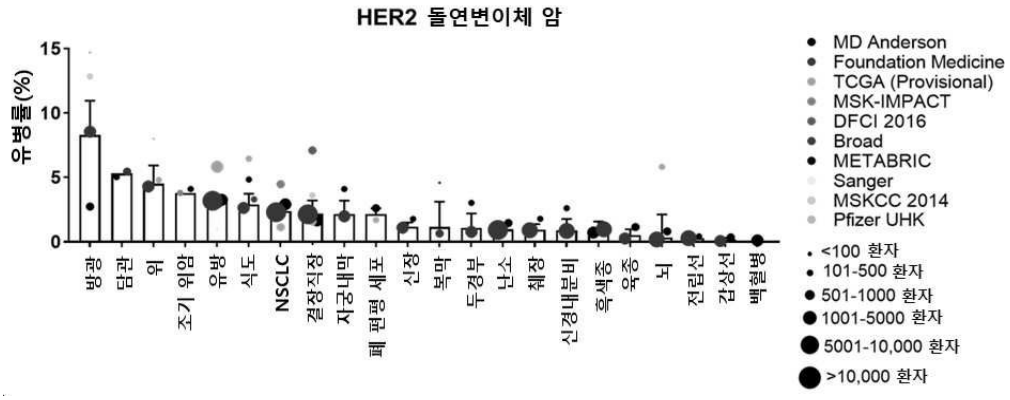
도면11d



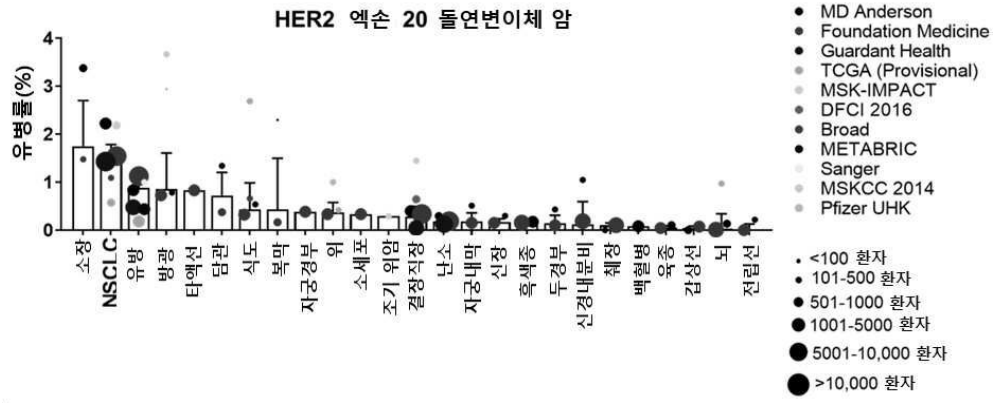
도면12



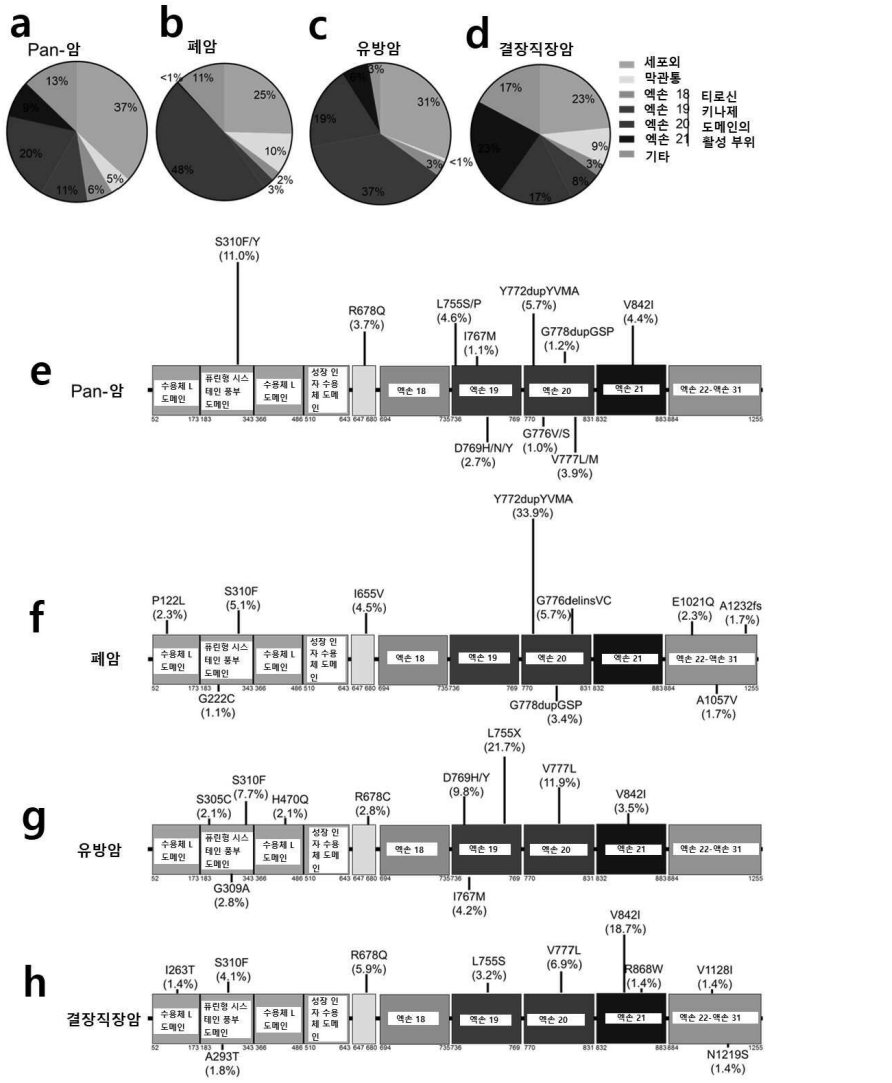
도면13a



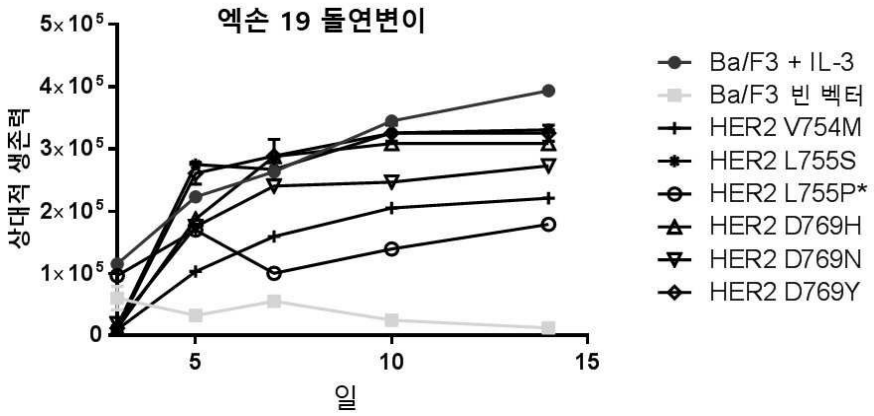
도면13b



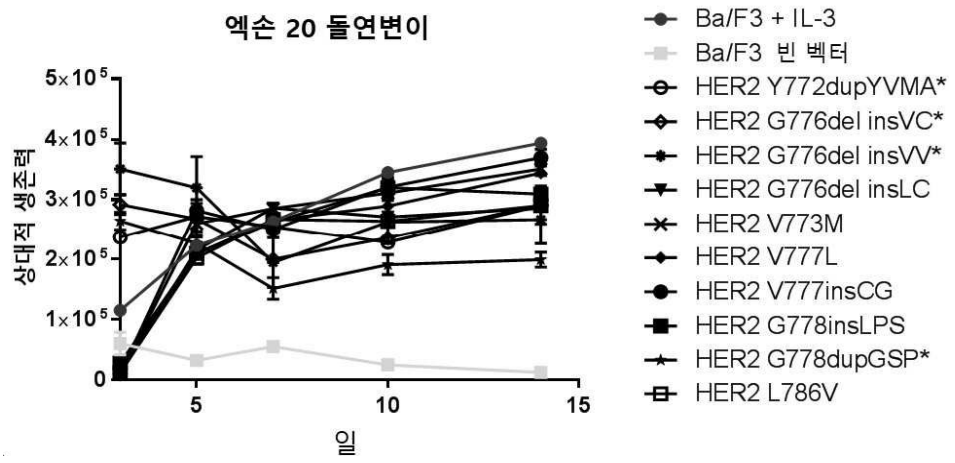
도면14


a
Pan-암
b
폐암
c
유방암
d
결장직장암
세포외
막관통
엑손 18
엑손 19
엑손 20
엑손 21
기타
티로신
키나제
도메인의
활성 부위
e
Pan-암
S310F/Y (11.0%)
R678Q (3.7%)
L755S/P (4.6%)
I767M (1.1%)
Y772dupYVMA (5.7%)
G778dupGSP (1.2%)
V842I (4.4%)
D769H/N/Y (2.7%)
G776V/S (1.0%)
V777L/M (3.9%)
f
폐암
Y772dupYVMA (33.9%)
P122L (2.3%)
S310F (5.1%)
I655V (4.5%)
G776delinsVC (5.7%)
E1021Q (2.3%)
A1232fs (1.7%)
G222C (1.1%)
G778dupGSP (3.4%)
A1057V (1.7%)
g
유방암
L755X (21.7%)
S310F (7.7%)
S305C (2.1%)
H470Q (2.1%)
R678C (2.8%)
D769H/Y (9.8%)
V777L (11.9%)
V842I (3.5%)
G309A (2.8%)
I767M (4.2%)
h
결장직장암
V842I (18.7%)
I263T (1.4%)
S310F (4.1%)
R678Q (5.9%)
L755S (3.2%)
V777L (6.9%)
R868W (1.4%)
V1128I (1.4%)
A293T (1.8%)
N1219S (1.4%)
수용체 L 도메인
유린형 시스테인 풍부 도메인
성장 인자 수용체 도메인
엑손 18
엑손 19
엑손 20
엑손 21
엑손 22-엑손 31

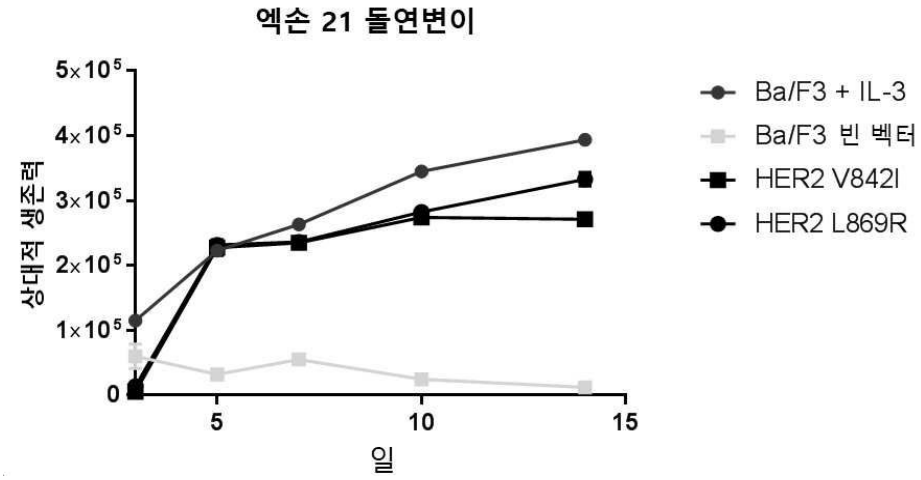
도면15a


엑손 19 돌연변이
상대적 생존력
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
5
10
15
일
Ba/F3 + IL-3
Ba/F3 빈 벡터
HER2 V754M
HER2 L755S
HER2 L755P*
HER2 D769H
HER2 D769N
HER2 D769Y

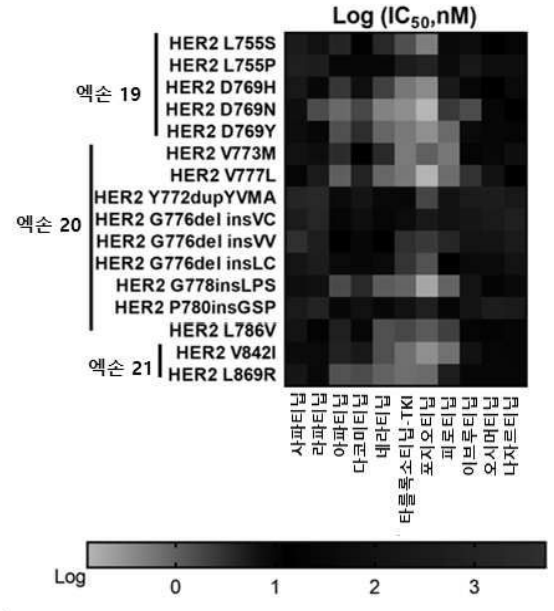
도면15b



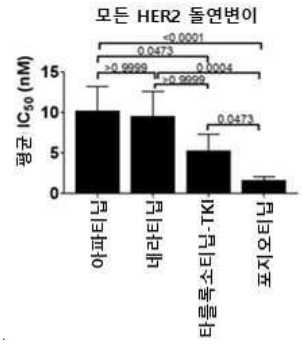
도면15c



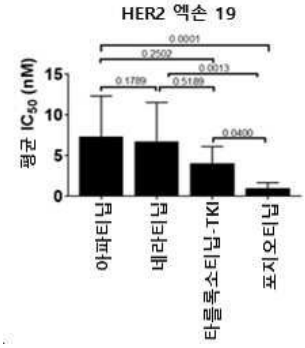
도면16a



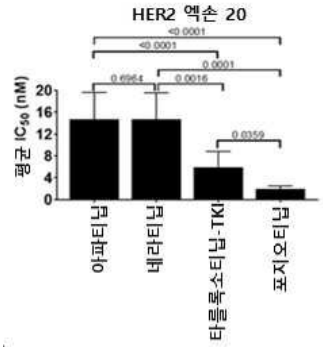
도면16b



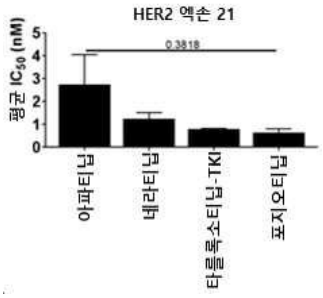
도면16c



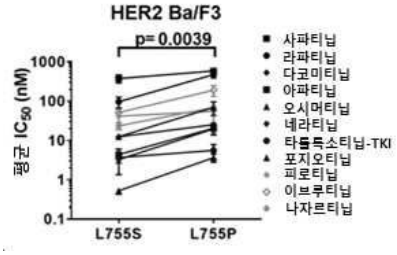
도면16d



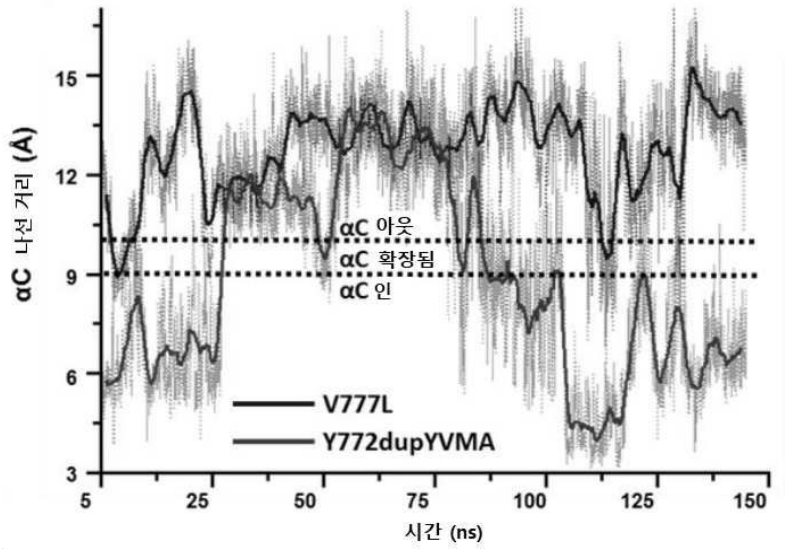
도면16e



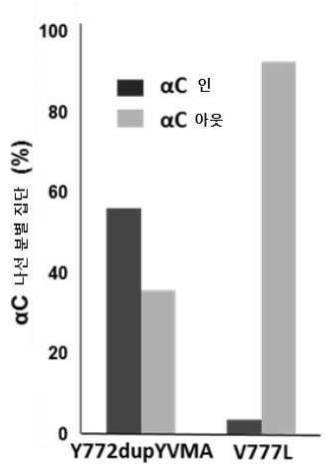
도면16f



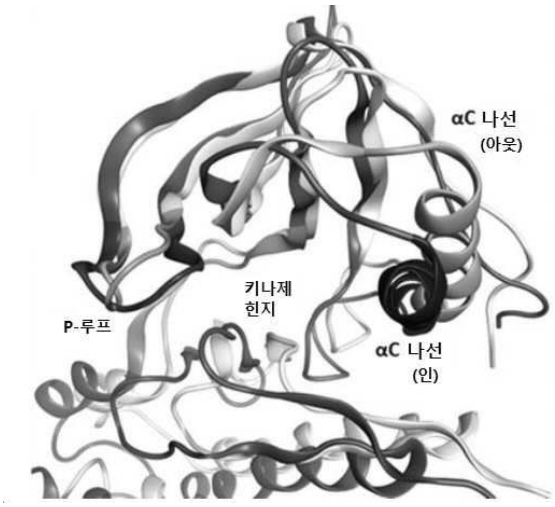
도면17a



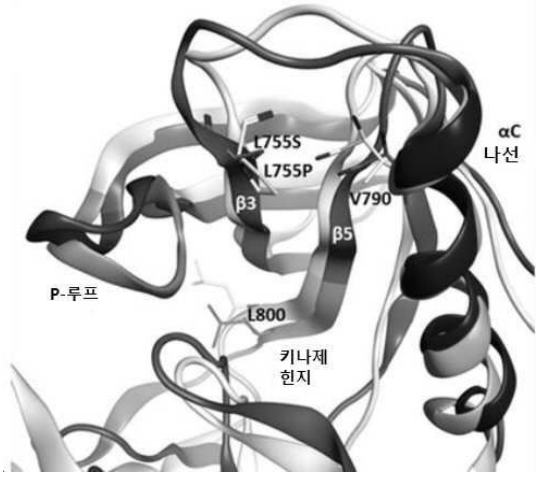
도면17b



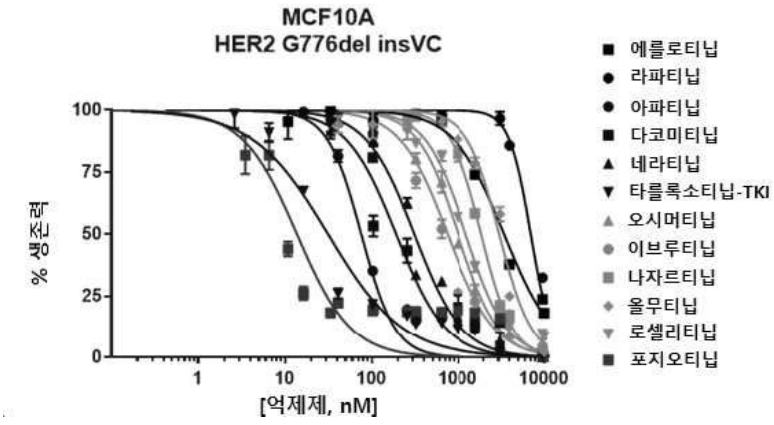
도면17c



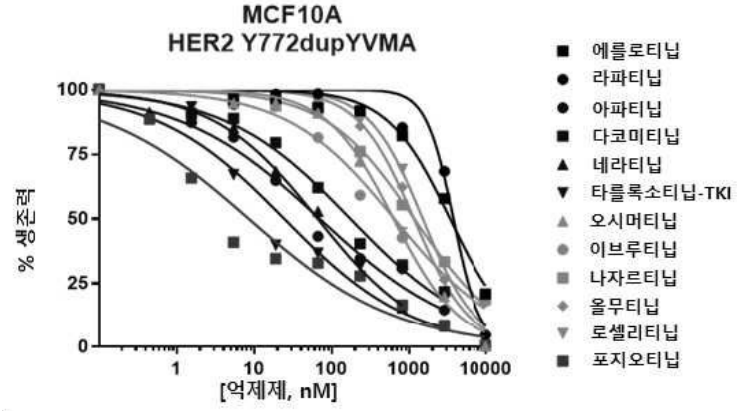
도면17d



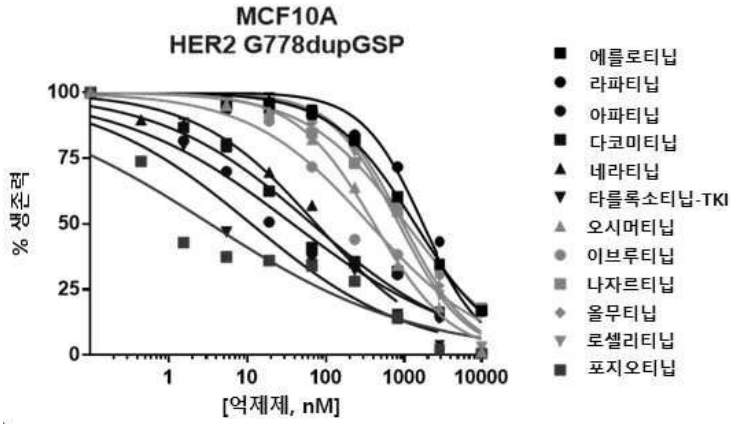
도면18a



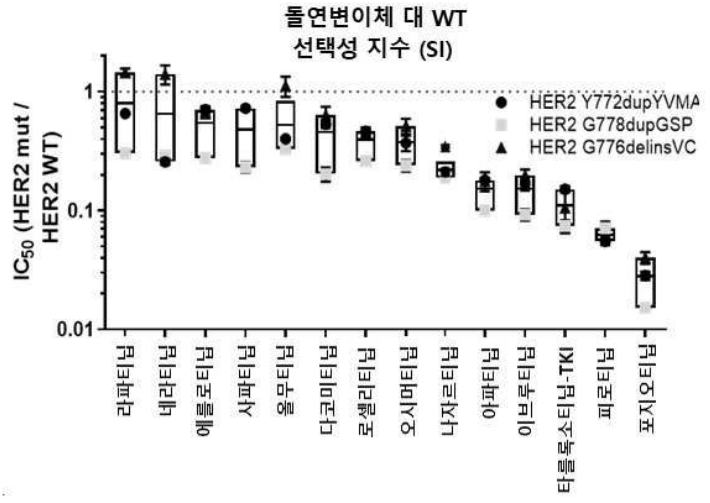
도면18b



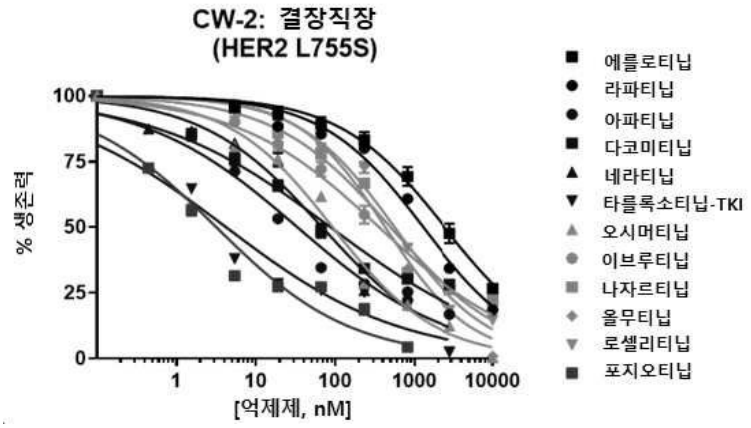
도면18c



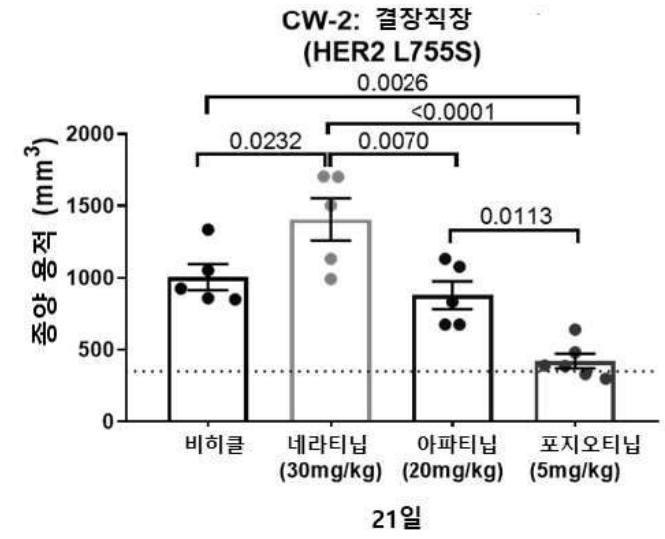
도면18d



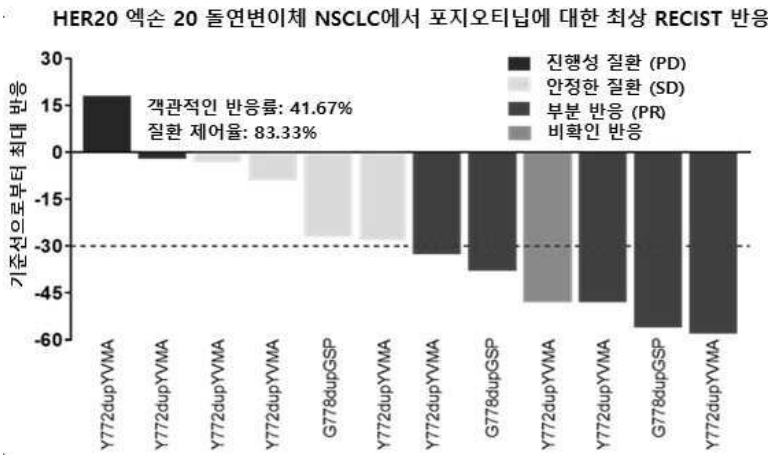
도면18e



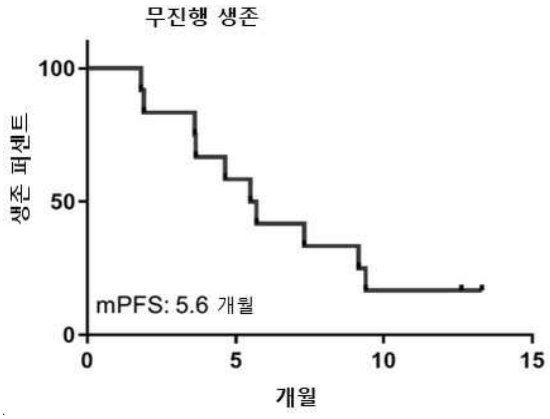
도면18f



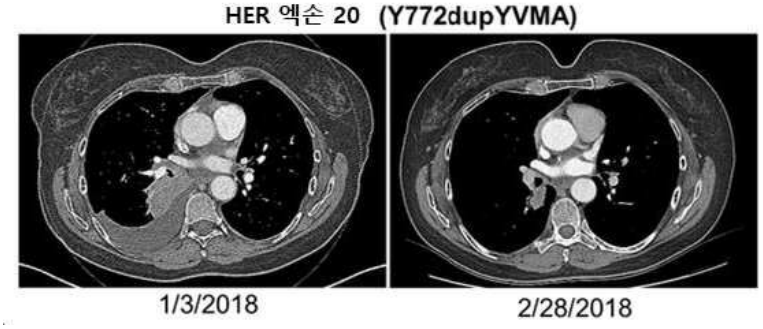
도면19a



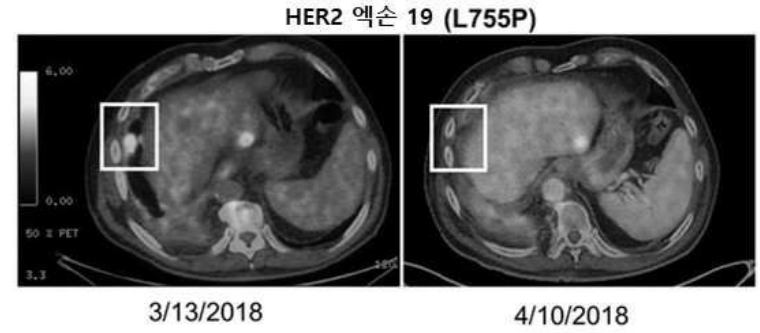
도면19b



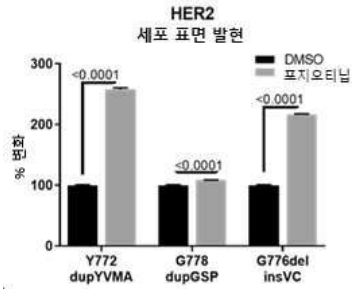
도면19c



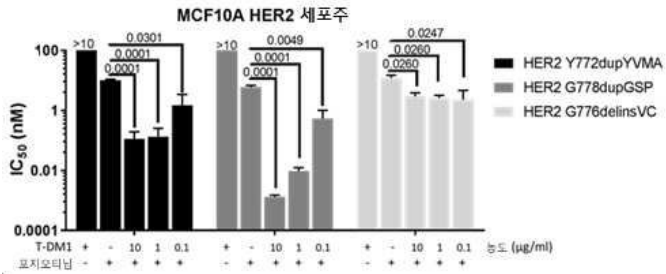
도면19d



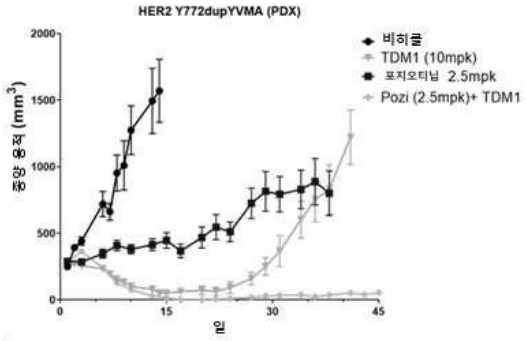
도면20a



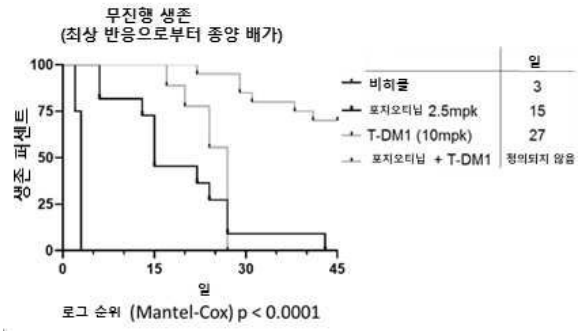
도면20b



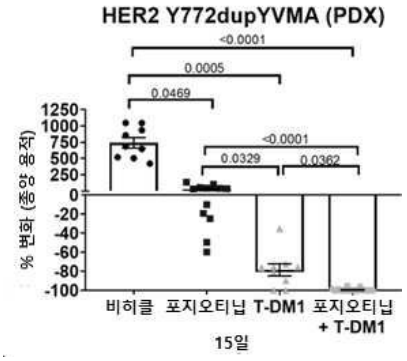
도면20c



도면20d



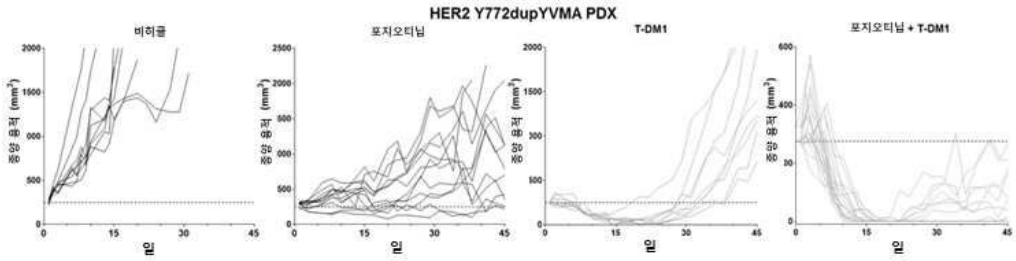
도면20e



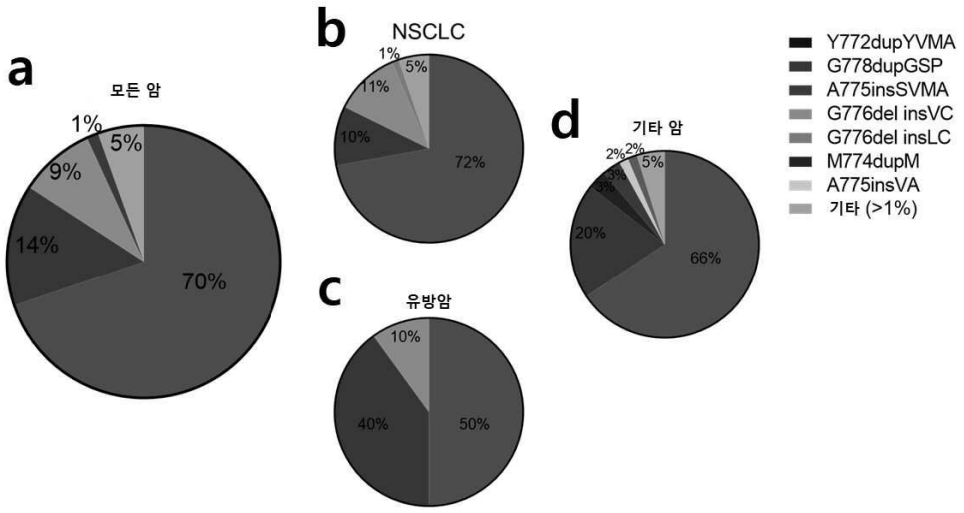
도면20f

종양 보유 마우스의 수 (%)				
	비히클	포지오티닙	T-DM1	포지오티닙 + T-DM1
15일	9/9 (100%)	12/12 (100%)	7/9 (78%)	0/20 (0%)
45일	N/A	12/12 (100%)	9/9 (100%)	6/20 (30%)

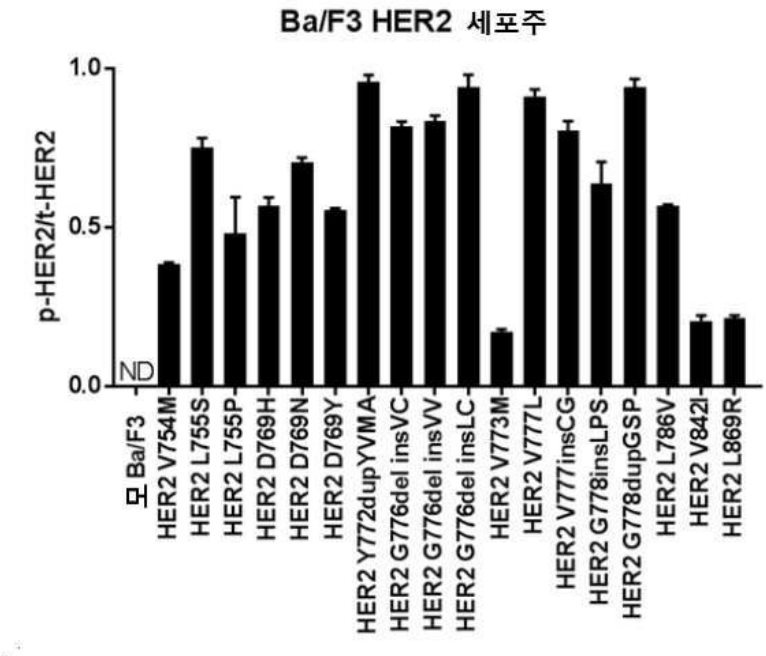
도면20g



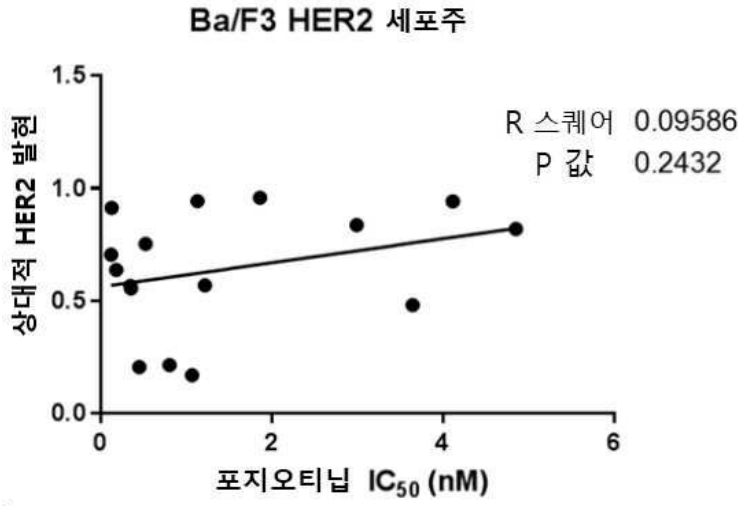
도면21



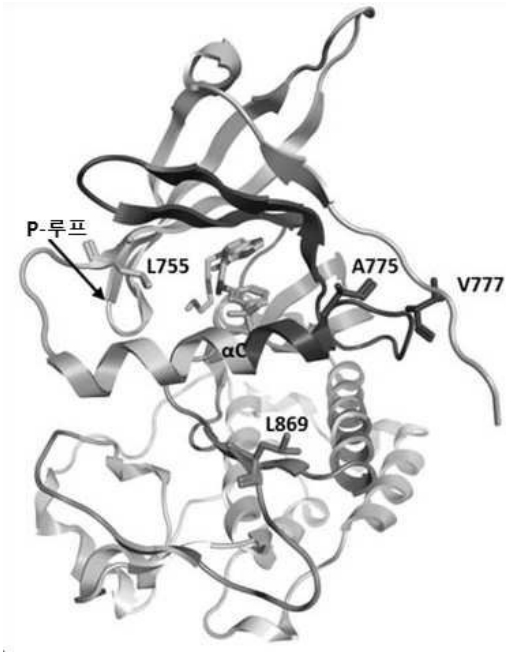
도면22a


Ba/F3 HER2 세포주
p-HER2/t-HER2
1.0
0.5
0.0
ND
모 Ba/F3
HER2 V754M
HER2 L755S
HER2 L755P
HER2 D769H
HER2 D769N
HER2 D769Y
HER2 Y772dupYVMA
HER2 G776del insVC
HER2 G776del insVV
HER2 G776del insLC
HER2 V773M
HER2 V777L
HER2 V777insCG
HER2 G778insLPS
HER2 G778dupGSP
HER2 L786V
HER2 V842I
HER2 L869R

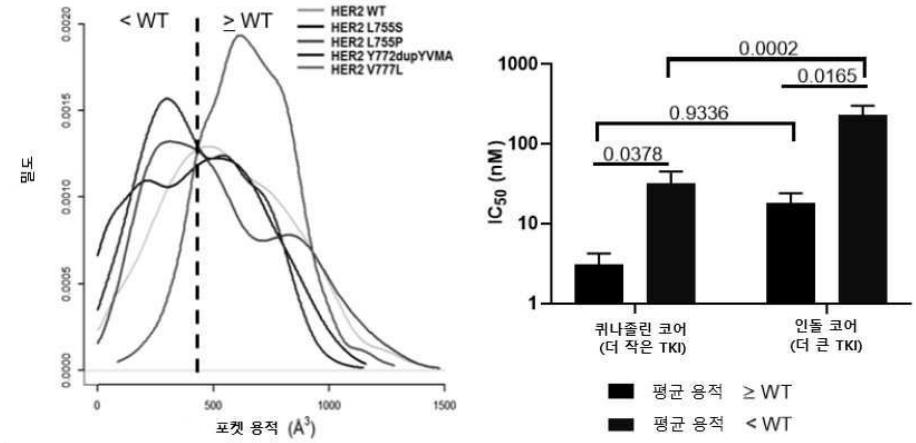
도면22b


Ba/F3 HER2 세포주
R 스퀘어 0.09586
P 값 0.2432
상대적 HER2 발현
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
포지오티닙 IC50 (nM)

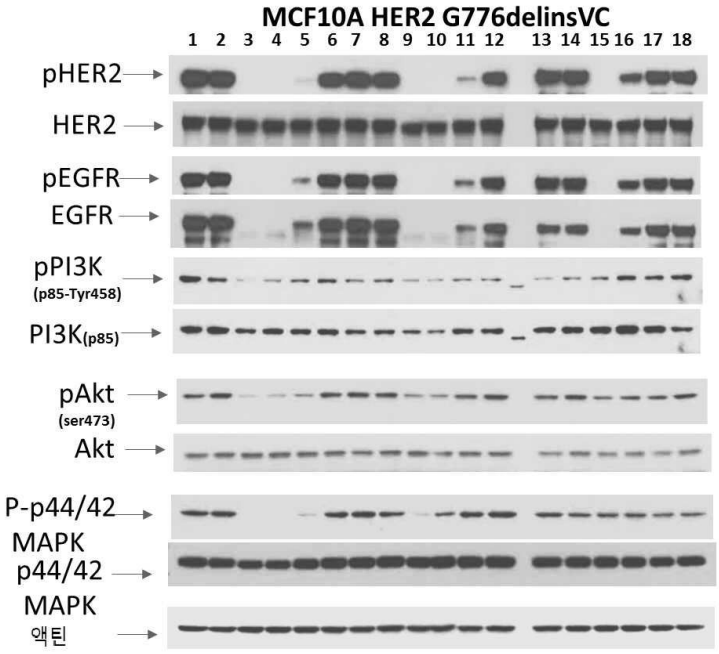
도면23a


P-루프
L755
A775
V777
αC
L869

도면23b

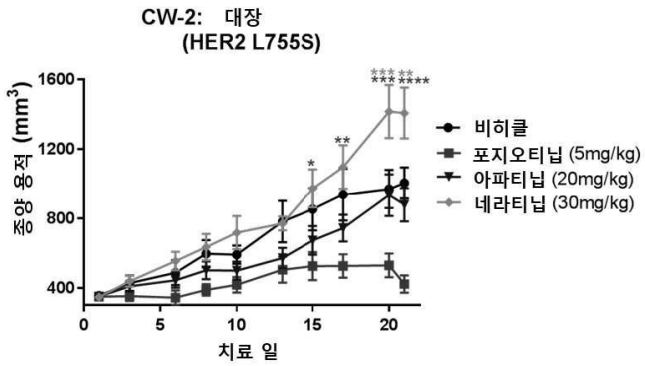

< WT
≥ WT
HER2 WT
HER2 L755S
HER2 L755P
HER2 Y772dupYVMA
HER2 V777L
밀도
포켓 용적 (Å³)
0.0002
0.0165
0.9336
0.0378
IC50 (nM)
퀴나졸린 코어
(더 작은 TKI)
인돌 코어
(더 큰 TKI)
평균 용적 ≥ WT
평균 용적 < WT

도면24



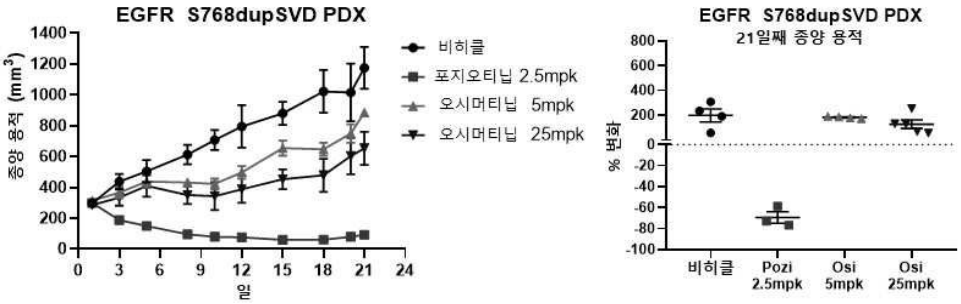
#1-6: No, DMSO, 1000, 100, 10, 및 1 nM 포지오티닙
7-12: No, DMSO, 1000, 100, 10, 및 1 nM 네라티닙
13-18: No, DMSO, 1000, 100, 10, 및 1 nM 라파티닙

도면25

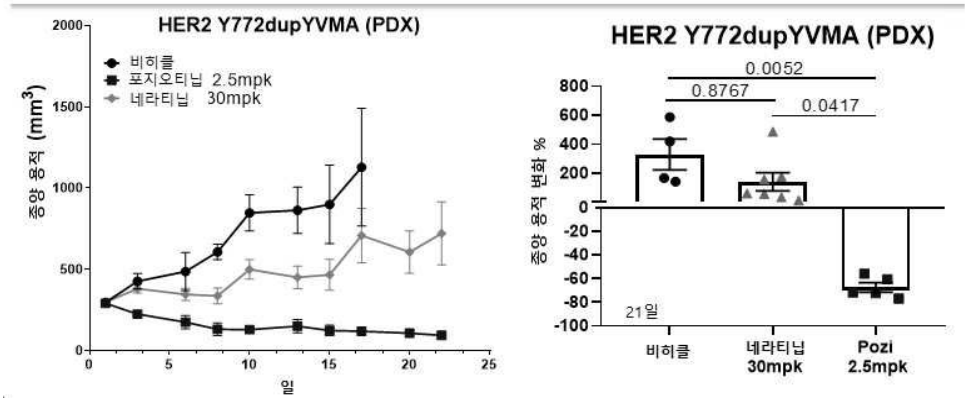


터키 다중 비교 테스트	요약	조정된 P 값
10일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	ns	0.3888
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.8492
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.6826
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.8809
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	*	0.0333
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.2222
13일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	ns	0.057
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.2563
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.9996
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.9266
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.0737
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.3041
15일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	*	0.0152
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.391
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.7201
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.5209
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	***	0.0003
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	*	0.0452
17일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	**	0.0012
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.3219
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	ns	0.5028
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.193
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	****	<0.0001
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	*	0.0118
20일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	***	0.0005
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.9896
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	***	0.0007
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	**	0.0015
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	****	<0.0001
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	***	0.0002
21일		
비히클 대 포지오티닙 (5mg/kg)	****	<0.0001
비히클 대 아파티닙 (20mg/kg)	ns	0.6886
비히클 대 네라티닙 (30mg/kg)	**	0.0029
포지오티닙 (5mg/kg) 대 아파티닙 (20mg/kg)	***	0.0003
포지오티닙 (5mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	****	<0.0001
아파티닙 (20mg/kg) 대 네라티닙 (30mg/kg)	****	<0.0001

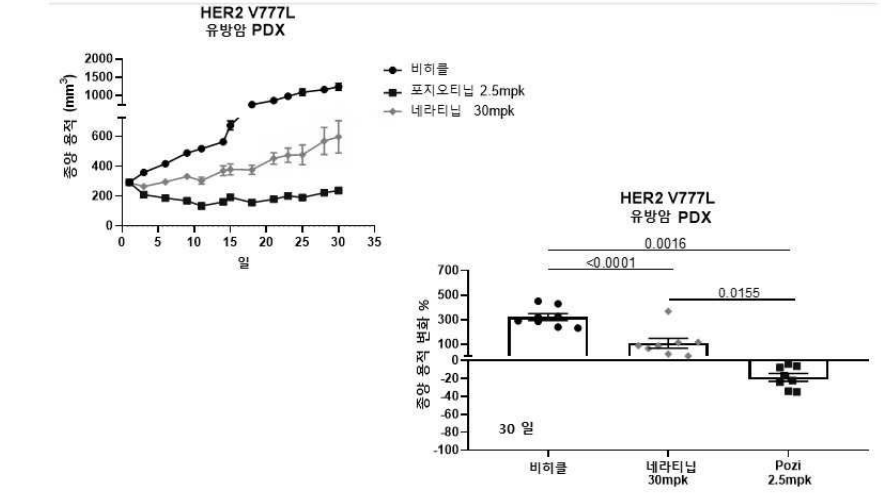
도면26



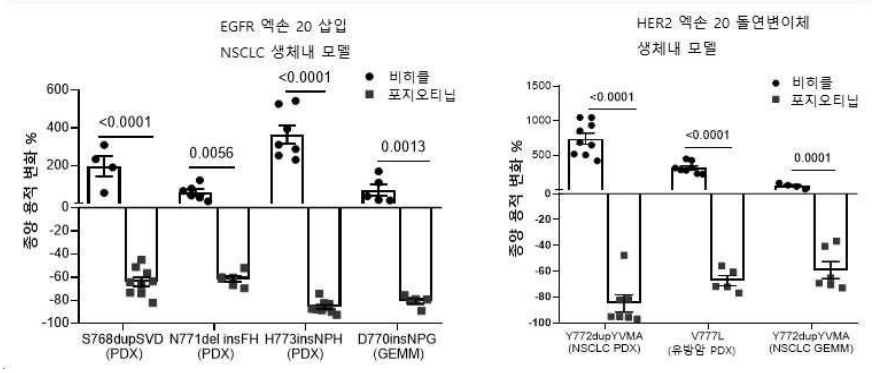
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록

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 INSERTIONS

<130> UTFC.P1383WO

<150> US 62/826,843

<151> 2019-03-29

<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

cttacaccca gtggagaagc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

accaagcgac ggtcctccaa 20

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaagcctacg tgatggccag cgtggacaac ccccacgtgt 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 ccccacgtgt gccgc 45

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR exon 20 V769insASV

<400> 10

gaagcctacg tgatggccag cgtgccagcg 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 tccccatatg tctcccgcct t 51

<210> 16

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon 20 G776del insVV

<400> 16

gaagcatacg tgatggctgt tgttgtgggc tccccatatg tctcccgcct t 51

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

cgaagcatac gtgatggctg gtgtgtctgg ctccccatat gtctcccgcc 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