

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0002012

(43) 공개일자 2006년01월06일

(21) 출원번호 10-2005-7020407

(22) 출원일자 2005년10월27일

번역문 제출일자 2005년10월27일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/002316

국제출원일자 2004년06월01일

(87) 국제공개번호 WO 2005/049829

국제공개일자 2005년06월02일

|            |           |             |        |
|------------|-----------|-------------|--------|
| (30) 우선권주장 | 0312451.8 | 2003년05월30일 | 영국(GB) |
|            | 0322636.2 | 2003년09월26일 | 영국(GB) |
|            | 0327132.7 | 2003년11월21일 | 영국(GB) |

(71) 출원인  
아스트라제네카 유케이 리미티드  
영국 런던 더블유1케이 1엘엔 스탠호프 게이트 15  
도쿄 다이가꾸  
일본 도쿄도 분쿄구 혼고 7-3-1

(72) 발명자  
츠루오 타카시  
일본 도쿄 156-0051 세타가야-구 미야사카 3-쵸메 36-6  
나카무라 유수케  
일본 가나가와 225-0011 요코하마-시 아오바-구 아자미노 1-쵸메17-33  
소네 사부로  
일본 토쿠시마 770-0037 미나미사코 7-반쵸 9-5  
후쿠오카 마사히로  
일본 나라 631-0007 소요다이 2-쵸메 25-21

(74) 대리인 김동완

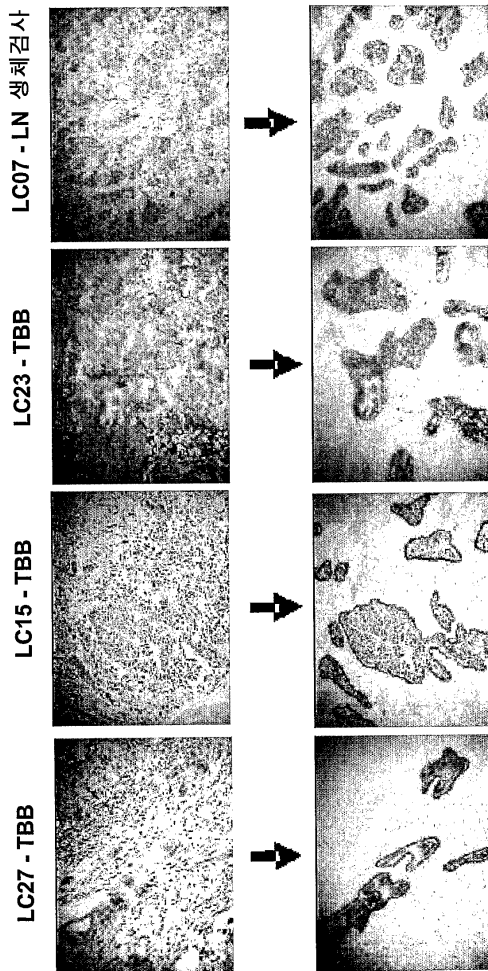
심사청구 : 없음

## (54) 방법

## 요약

본 발명은 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제에 대한 반응자와 무반응자인 환자들 사이에 지닌 차별적 발현으로 확인된 적어도 하나 이상의 유전자를 포함한 분리된 마커 유전자 세트; 상기 유전자 세트는 상기 유전자로부터 유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함한 여기에 목록된 (51) 유전자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함하고; 및 진단적 적용시 이러한 세트의 이용에 관한 것이다.

## 대표도



## 색인어

erbB 수용체 티로신 키나제 억제제, 반응자, 무반응자, 유전자

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 환자가 화학요법 약제에 반응할 것인지 여부를 예측하기 위한 마커 유전자 세트를 이용하는 개인화된 암 치료 방법 및 상기 방법에 이용되는 키트에 관한 것이다.

특히, 본 방법은 환자가 erbB 티로신 키나제 억제제에 반응하는 것을 예측한다. 더욱 특별하게는 본 방법은 erbB 티로신 키나제 억제제에 대한 반응자 및 무반응자 사이의 차별적 발현을 지닌 마커 유전자 세트의 수준을 이용한 erbB 티로신 키나제에 의해 단독으로 또는 부분적으로 매개된 암을 지닌 환자, 특히 선암과 같은 진행성 비소세포성 폐암(Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC)을 지닌 환자에 관한 것이다.

### 배경기술

폐암은 암 사망의 주요한 원인이고, 따라서 전세계적으로 주요한 건강 문제이다. 이러한 질병의 치료시 대부분 진단시 국부적으로 진행기 3(44%) 또는 전이기 4(32%) 질병을 지니기 때문에 화학치료가 주된 것이다. 그럼에도 불구하고 큰 메타-분석의 발견은 백금-기반 화학치료가 최상의 부양과 비교시 단지 약 6주까지만 진행성 비소세포성 폐암(NSCLC)을 지닌 환자의 평균 생존 시간을 연장시키는데 기여함을 나타내었다[2].

최근 10년간 많은 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 겐시타빈(gemcitabine) 및 비노렐빈(vinorelbine)을 포함한 새로운 세포독성적 약제가 개발되었고, 진행성 폐암 환자에게 다양한 선택을 제공하였다. 그러나 각 요법은 시스플라틴(cisplatin)-기반 치료와 비교시 크지 않은 생존 이익만을 제공하였다[3], [4]. 더욱 최근에는 통상의 세포독성 약제의 한계를 극복하기 위해 많은 분자적-타겟된 약제를 포함한 새로운 치료 전략이 개발되었다[5], [6].

최근, 특정한 성장 인자 티로신 키나제 효소가 세포 복제를 개시하는 생화학적 신호의 전달에 중요함이 발견되었다. 이들은 단백질 내 티로신 아미노산을 인산화하여 세포 증식에 영향을 미치기 위해 세포막에 걸쳐 있고 상피 성장 인자(EGF)와 같은 성장 인자에 대한 세포외 결합 도메인 및 키나제와 같이 기능하는 세포내 부분을 보유하는 큰 단백질이다.

수용체 티로신 키나제 다양한 분류가 다른 수용체 티로신 키나제에 결합하는 성장 인자 패밀리에 기반하여 알려져 있다 (Wilks, Advance in Cancer Research, 1993, 60:43-73). 본 분류는 수용체 티로신 키나제의 EGF 패밀리를 포함한 클래스 I 수용체 티로신 키나제를 포함한다. 이는 리간드 EGF, TGF $\alpha$ (TGFA로도 표기됨), 암피레굴린(amphiregulin)(AREG로도 표기됨), 베타셀룰린(betacellulin), 헤파린 결합 EGF, 에피레굴린(eiregulin)(NRG-1, NRG-2, NRG-3 및 NRG-4를 포함)을 포함한다. 더욱 상세하게는, 이들 수용체는 erbB1(EGFR), erbB2(Neu, Her2) 및 erbB4(Her 4) 및 erbB3(her3)로 불리는 기능성 키나제 도메인 포함을 포함하고, 이는 인슐린 및 IGF1 수용체 및 인슐린-관련 수용체(IRR)과 같은 수용체 티로신 키나제의 인슐린 패밀리를 포함한 클래스 II 수용체 티로신 키나제 및 PDGF $\alpha$ , PDGF $\beta$  및 콜로니-자극 인자 1(CSF 1) 수용체와 같은 수용체 티로신 키나제의 혈소판-유래 성장 인자(PDGF) 패밀리를 포함한 클래스 III 수용체 티로신 키나제를 포함하지 않는다.

EGFR, erbB2, erbB3 및 erbB4를 포함한 수용체 티로신 키나제의 erbB 패밀리는 종양 세포의 증식 및 생존을 이끄는 데 자주 관련된다고 알려져 있다(Olayioye et al., EMBO J., 2000, 19:3159에서 검토됨). 이러한 암이 발생하는 하나의 메커니즘은 일반적으로 유전자 증폭의 결과로서 단백질 수준에서의 수용체의 과발현이다. 이는 다른 폐암뿐만 아니라 (Hendler et al., Cancer Cells, 1989, 7:347) 선암(Cerny et al., Brit. J. Cancer, 1986, 54:265; Reubi et al., Int. J. Cancer, 1990, 45:269; Rusch et al., Cancer Research, 1993, 53:2379; Brabender et al., Clin. Cancer Res., 2001, 7:1850)을 포함한 비소세포성 폐암(NSCLCs)과 같은 많은 일반적 인간 암에서 관찰되었다(Klapper et al., Adv. Cancer Res., 2000, 77:25에서 검토됨). 하나 이상의 이들 수용체의 부-조절(mis-regulation)의 결과로서 많은 종양이 임상적으로 더욱 공격적으로 되고 환자의 더욱 불충분한 예후와 관련되는 것으로 여겨진다(Brabender et al., Clin. Cancer Res., 2001, 7:1850; Ross et al., Cancer Investigation, 2001, 19:554, Yu et al., Bioessays, 2000, 22:7:673)). 이들 임상적 발견에 더하여 많은 전-임상 정보는 수용체 티로신 키나제의 erbB 패밀리가 세포적 전환에 관련됨을 제안한다. 이에 더하여 많은 전-임상적 연구는 항-증식 효과가 작은 분자 억제제, 음성 우성적 또는 억제적 항체에 의한 하나 이상의 erbB 활성을 녹아웃(knock out)시킴으로서 유도됨을 증명하였다(Mendelsohn et al., Oncogene, 2000, 19:6550에서 검토됨).

따라서 이들 수용체 티로신 키나제의 억제제가 포유류 암 세포의 증식의 선택적 억제제로서 가치가 있어야 한다고 인식되었다(Yaish et al., Science, 1988, 242:933; Kolibaba et al., Biochemica et Biophysica Acta, 1997, 133:F217-F248; Al-Obeidi et al, 200, Oncogene, 19:5690-5701; Mendelsohn et al., 2000, Oncogene, 19:6550-6565). 이러한 전-임상적 데이터 이외에 EGFR 및 erbB2에 대한 억제적 항체(각각c-225 및 트라추주마브(trastuzumab))가 선택된 고형 종양의 치료에 임상적으로 유용한 것으로 판명되었다(Mendelsohn et al., 2000, Oncogene, 19:6550-6565에서 검토됨).

많은 수용체 티로신 키나제의 erbB 패밀리의 소분자 억제제, 특히 EGF 및 erbB 수용체 티로신 키나제의 억제제가 알려져 있다. 예를 들어 유럽 특허출원 제0566226호 및 국제 특허출원 WO 96/33980 및 WO 97/30034는 4-포지션에서 아닐리노(anilino) 치환체를 보유한 특정한 퀴나졸린(quinazoline) 유도체가 EGFR 티로신 키나제 억제 활성을 보유하고, 전립선 암을 포함한 암 조직 증식의 억제제임을 개시한다. J R Woodburn et al. in Proc. Amer. Assoc. Cancer Research, 1997, 38:633 및 Pharmacol. Ther., 1999, 82:241-250에 의해 N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-메톡시-6-(3-모폴리노프로폭시)퀴나졸린-4-아민 화합물이 유력한 EGFR 티로신 키나제 억제제임이 개시되었다. 이러한 화합물은 코드 번호 ZD1839 및 Chemical Abstracts Registry Number 184475-35-2에 의해 이레사(Iressa)(등록 상표), 게피티닙(gefitinib)(미국 채택명)으로도 알려져 있다. 화합물은 이후 게피티닙으로 확인된다. 게피티닙은 최근 수술 불가능하거나 재발성 비소세포성 폐암(NSCLC)의 치료를 위해 일본에서 승인되었고, 백금 및 도세탁셀 화학치료 실패 후 국부적 진행성 정적 NSCLC를 지닌 환자의 치료를 위한 단일요법(monotherapy)으로서 미국에서 승인되었다.

또한 국제 특허출원 WO 96/30347로부터 4-포지션에서 아닐리노 치환체를 보유한 특정 구조-관련 퀴나졸린 유도체도 EGFR 티로신 키나제 억제제 활성을 보유함이 알려져 있다. WO 99/55683에서 N-(3-에티닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시)퀴나졸린-4-아민 또는 그의 약제적으로 수용 가능한 염 화합물(코드 번호 CP 358774 및 OSI-774에 링크됨, 이후 코드 번호 OSI-774로 확인됨)이 EGFR TKI임이 개시되었다.

또한 WO 97/02266으로부터 다른 구조-관련 이중환식 유도체도 EGFR 티로신 키나제 억제 활성을 보유함이 알려져 있다. 예를 들어 4-[(1R)-1-페닐에틸아미노]-6-(4-하이드록시페닐)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘 화합물(코드 번호 PKI-166, GCP 75166 및 CGP 59326로 링크됨, 이후 코드 번호 PKI-166으로 확인됨)이 EGFR TKI이다.

또한 유럽 특허출원 제0787722호 및 국제 특허출원 WO 98/50038, WO 99/09016 및 WO 99/24037로부터 4-포지션에서 아닐리노 치환체를 보유한 다른 특정 구조-관련 퀴나졸린 유도체도 EGFR 티로신 키나제 억제 활성을 보유함이 알려져 있다. 예를 들어 N-[4-(3-브로모아닐리노)퀴나졸린-6-일(y1)]-부트(but)-2-인아미드(ynamide) 화합물(코드 번호 CL-387785 및 EKB-785로 링크됨, 이후 코드 번호 CL-387785로 확인됨)이 EGFR TKI이다.

또한 Nature Medicine, 2000, 6:1024-1028 및 미국 특허 제6,002,008호로부터 4-포지션에서 아닐리노 치환체를 보유한 다른 특정 구조-관련 퀴놀린 유도체도 EGFR 티로신 키나제 억제 활성을 보유함이 알려져 있다. 예를 들어 4-(3-클로로-4-플루오로아닐리노)-3-사이노-6-(4-디메틸아미노부트-2(E)-엔아미도)-7-에톡시퀴놀린 화합물(이후 코드 번호 EKB-569로 확인됨)이 EGFR TKI이다.

또한 WO 99/35146 및 WO 01/04111로부터 다른 특정 퀴나졸린 유도체가 하나 이상의 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제의 억제제임이 알려져 있다. 예를 들어 N-[3-클로로-4-[(3-플루오로벤질)옥시]페닐]-6-[5-([2-(메틸설포닐)에틸]아미노)메닐]-2-푸릴]퀴나졸린-4-아민 화합물(라파티닙(lapatinib)로 확인되거나 이후 코드 번호 GW2016으로 확인된 GW2016)이 EGF 및 erbB 수용체 티로신 키나제 모두의 억제제인 것으로 고려된다. Novartis AE788은 또다른 적당한 억제제 화합물이다. 또한 erbB 수용체 티로신 키나제의 억제는 erbB 수용체에 대한 적당한 항체를 이용한 수용체에 결합하는 세포의 리간드의 억제에 의해 달성된다. 예를 들어 항-erbB2 항체 트라추주마브[Herceptin<sup>TM</sup>] 및 항-erbb1 항체 세특시마브(cetuximab)[C225]를 이용한다. 이러한 억제 항체의 이용은 선택된 고형 종양의 치료에 임상적으로 유용한 것으로 판명되었다(Mendelsohn et al., 2000, Oncogene, 19:6550-6565에서 검토됨).

상기 논의된 바와 같이 게피티닙은 상피 성장 인자 수용체-티로신 키나제(EGFR-TK)의 구강 활성 억제제이고, 이는 암세포의 증식, 침입 및 생존을 이끄는 데 중요한 시그널링 경로를 차단한다[7]. NSCLC-관련 증상의 빠른 개선 및 삶의 질뿐만 아니라 유익한 항-종양 효과는 백금-기반 화학치료에 반응하지 않은 진행성 NSCLC를 지닌 환자를 기록한 임상 연구에서 관찰되었다. 무작위화된 이중-블라인드 단계 II 단일요법 시도시(IDEAL 1 시도) 진행성 NSCLC에 대한 두 번째 및 세 번째 라인 화학치료로서 게피티닙의 이용은 18.4%의 종양 반응률을 달성하였고, IDEAL 2 시도시 세 번째 및 네 번째 화학치료로서의 이용은 11.8%(95% CI: 6.2-19.7%)를 달성하였다[8], [27], [28].

이러한 시도에 더하여 이러한 약물 치료는 높은 질병 조절률(IDEAL 1에서 54.4%, IDEAL 2에서 42.2%) 및 전체 증상 개선률(IDEAL 1에서 40.3%, IDEAL 2에서 1.43%)을 달성하였다.

이러한 결과는 통상의 세포독성 약제에 대한 반응과 비교시 유망하였으나 이러한 연구에 기록된 환자의 약 반이 증상에 있어서 어떠한 개선도 없이 비-효과적 치료를 받았다는 사실이 남아있다. 더욱이 약물치료는 간질성 폐렴과 같이 삶을 위협하는 것을 포함한 부작용에 대한 무-반응자를 노출시켰다[11].

다양한 화학치료 처리에 대한 환자 반응이 다르고, 따라서 어떠한 치료 요법이 특정한 환자에 가장 알맞은지를 예측하는 방법을 찾을 필요가 있다.

수많은 약물에 대한 환자 반응은 예를 들어 개인화된 치료 요법을 환자에게 제공하는데 이용될 수 있는 특정한 약물에 대한 반응과 같이 환자 유전자 프로파일 및 영향을 미치는 유전 인자의 결정에 관련됨을 제안하는 증가하는 신체 증거가 있다. 이러한 개인화된 치료 요법은 환자에게 치료적인 유용성을 최대화하는 반면 대안적 및 덜 효과적인 치료 요법과 관련된 부작용을 최소화하는 잠재력을 제공한다.

## 발명의 요약

화학치료 약제에 대한 특정 암의 민감도는 유전자 발현에 의해 예측될 수 있고, 따라서 이러한 화학치료 약제로의 치료를 위한 암 환자의 적합성이 환자 조직 내 특정 유전자의 상대 수준을 측정함으로써 결정될 수 있음이 발견되었다.

따라서 본 발명은 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제에 대한 반응자 및 무반응자인 환자 사이에 지닌 차별적 발현으로 확인된 적어도 하나 이상의 유전자를 포함한 분리된 마커 유전자 세트를 제공하고, 상기 유전자 세트는 상기 유전자로부터

유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함하여 표 4에 목록된 51개 유전자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함한다. 표 4에서 접근 번호는 GenBank 데이터베이스 상의 유전자에 제공된다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 제공된 접근 번호에서 유용한 서열은 표에 표기된 유전자의 서열의 예만을 나타내고; 대안적 서열, 시퀀싱 오류 교정, 대립유전성 또는 다른 변이, 스플라이스 돌연변이 등을 포함한 서열을 포함한 대안적 서열은 사용된 명칭에 의해 표현된 유전자의 정의에 포함된다. 가장 바람직한 실시태양에서 표기된 서열은 접근 번호에 나타난 서열 및 표 4a에 제공되고 상세하게 나타난 특정 서열이다.

또다른 관점에서 본 발명은 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제에 대한 반응자 및 무반응자인 환자 사이에 지닌 차별적 발현으로 확인된 적어도 하나 이상의 유전자를 포함한 분리된 마커 유전자 세트를 제공하고; 상기 유전자 세트는 상기 유전자로부터 유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함하여 표 4에 목록된 51개 유전자로 구성된 군으로부터 선택된다.

본 발명은 개별적 환자에게 치료를 매치시켜 유용한 약물 형태의 더욱 효과적인 이용을 이룸으로서 개선된 예후 및 그에 따른 삶의 질을 가능하게 한다.

바람직한 세트는 표 4에 목록된 첫 번째 40개 유전자의 적어도 하나 이상이다.

또한 바람직한 세트는 표 4에 목록된 첫 번째 20개 유전자의 적어도 하나 이상이다.

또한 바람직한 세트는 표 4에 목록된 첫 번째 12개 유전자의 적어도 하나 이상이다.

바람직한 세트는 표 4에 목록된 첫 번째 5개 유전자의 적어도 하나 이상이다.

특히 바람직한 세트는 표 4a에 목록된 첫 번째 12개 유전자 즉, FLJ22622(즉, GenBank NM\_024829), AREG(즉, GenBank BC009799), CORO1C(즉, GenBank NM\_014325), AVEN(즉, GenBank BC010488), DUSP3(즉, GenBank NM\_004090), DJ473B4(즉, GenBank AI026836), PHLDA2(즉, GenBank BU500509), RBM7(즉, GenBank NM\_0106090), EST(GenBank BX0952512), OSMR(즉, GenBank AI436027), GCLC(즉, GenBank AI971137), COL4A3BP(즉, GenBank BQ024877)이다.

바람직하게는 억제제는 게피티닙, OSI-774, PKI-166, EKB-569, GW2016, CI-1033 및 트라추주마브 및 세톡시마브와 같은 항-erbB 항체로부터 선택된다.

가장 바람직하게는 억제제는 게피티닙이다.

본 발명은 erbB 티로신 키나제에 의해 단독으로 또는 부분적으로 매개된 암을 지닌 환자 또는 환자군에서 전술된 화학치료 약제에 대한 반응의 예측에 이용하는데 특히 적당하다. 이러한 암은 예를 들어 백혈병, 다발 골수종 또는 림프종과 같은 비-고형성 종양 및 예를 들어 담관, 골격, 방광, 뇌/CNS, 유방, 결장, 자궁경부, 자궁내막, 위장, 머리 및 목, 간, 폐, 근육, 신경, 식도, 난소, 췌장, 늑막/복막, 전립선, 신장, 피부, 고환, 갑상선, 자궁 및 외음부 종양과 같은 고형 종양을 포함한다.

본 발명은 앞서 정의된 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제와 같은 화학치료 약제로의 치료에 반응할 NSCLC, 더욱 특별하게는 진행성 선암을 포함한 진행성 NSCLC를 지닌 환자를 확인하는데 특히 적당하다.

본 발명은 NSCLC의 "개별적 암 프로파일"을 확인하여 어떤 종양이 게피티닙에 반응하는지를 측정함으로써 NSCLC, 특히 진행성 NSCLC와 같은 암의 치료에 상당한 이점을 제공한다. 이는 첫 번째 라인 치료 및 예를 들어 화학치료 실패 환자와 같은 또다른 요법을 포함한다. 본 발명은 백금-기반 화학치료와 같은 앞선 화학치료에 실패한 진행성 NSCLC를 지닌 환자의 치료에 특히 유용하다.

또한 본 발명은 백금-기반 화학치료와 같은 앞선 화학치료를 받은 국부적 진행성(단계 IIIb) 또는 전이된(단계 IV) NSCLC를 지닌 환자의 치료에 특히 유용하다.

또한 본 발명은 상기 정의된 유전자 세트로부터 선택된 상기 마커 유전자 세트의 차별적 발현을 비교하는 것으로 포함한, 화학치료 약제, 특히 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제의 치료에 대한 암, 예를 들어 폐암을 지닌 환자 또는 환자군의 반응성을 예측하는 방법을 제공한다.

바람직하게는 발현의 평가는 어떠한 형태의 올리고뉴클레오타이드-기반 어레이 또는 cDNA-기반 어레이를 이용한 유전자 발현 프로파일에 의해 수행된다; RT-PCR(역전사 중합효소 연쇄 반응), 실제-시간 PCR, *in-situ* 하이브리다이제이션, 노던 블롯팅, 예를 들어 Velculescu et al. Science 270(5235):484-487에 기술된 바와 같은 유전자 발현의 연속 분석(SAGE) 또는 차별적 디스플레이. 이들의 상세한 설명 및 다른 방법은 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual에서 발견될 수 있다. 바람직하게는 평가는 마이크로어레이 분석을 이용한다.

대안으로, 또는 이에 더하여 평가는 면역조직화학 분석을 이용한다.

또다른 관점에서 본 발명은 적당한 지지 배지 상에서의 상기 정의된 마커 유전자 세트를 포함한, 화학치료 약제, 특히 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제로의 치료에 대한 암을 지닌 환자 또는 환자군의 반응성을 예측하는 방법에 이용되는 키트를 제공한다. 바람직하게는 마커 유전자는 니트로셀룰로스와 같은 지지 재료 또는 멤브레인 또는 나일론 또는 플라스틱 필름 또는 슬라이드에 부착된다.

바람직하게는 키트는 마이크로어레이를 포함한다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 더욱 상세히 설명되고 본 발명을 수행시 당업자를 돕고 본 발명의 범위를 제한하지 않는 하기 실시예에 의해 설명될 것이다. 또한 본 발명의 특정한 요소는 하기에 더욱 상세하게 설명된다.

"분리된 마커 유전자 세트"

여기에 기술된 실시태양에 따라 이는 본 발명에 따른 환자 반응의 분류 또는 범주에 이용될 수 있는 유전자 그룹이다.

"차별적 발현"

반응자 또는 무반응자 그룹 사이의 더 높거나 더 낮은 수준에서 발현되는 유전자.

"반응자/무반응자 "

Union International Contre le Cancer/World Health Organization(U ICC/WHO) 기준에 따른 목적 종양 반응은 하기와 같이 분류된다: 완전한 반응(CR): 모든 평가 가능한 손상에 대한 잔여 종양이 없음; 부분적 반응(PR): 모든 측정 가능한 손상 및 어떠한 새로운 손상도 없는 총합에서의 기준선 하의 화학치료-유도된 50% 이상의 감소의 증거를 지닌 잔여 종양; CR에 해당하지 않는 안정한 질환(SD) 잔여 종양; 및 진행성 질환(PD); 모든 측정 가능한 손상 또는 새로운 손상의 출현의 총합에서의 기준선 하의 25% 이상의 증가의 증거를 지닌 잔여 종양. 여기에 정의된 바와 같이 무반응자는 PD이다.

본 발명은 CR 또는 PR인 환자를 측정하는데 특히 효과적이다.

"제한없이 ErbB 수용체 티로신 키나제 억제제를 포함한 ErbB 수용체 억제제"

이러한 패밀리는 상기 본 발명의 배경기술에 기술된 바와 같이 EGF, erbB2(HER), erbB3(erbB3는 기능적인 키나제 도메인을 지니지 않음을 주의해야 함) 및 erbB4를 포함한다.

"유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드"

이는 예를 들어 유전자를 특이적으로 증명하는 유전자의 단편과 같이 각각의 유전자에 대해 특이적이다. 유리하게는, 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드는 5 내지 50 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 15 내지 30 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 약 23 뉴클레오타이드 길이이다.

"어레이 또는 마이크로어레이"

어레이 기술 및 이와 관련된 다양한 기술 및 적용은 많은 교본 및 문헌에 일반적으로 기술되어 있다. 유전자 어레이 기술은 본 발명의 실행에 특히 적당하다. 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다. 이는 Lemieux et

al.,(1998), Molecular Breeding 4:277-289, Schena and Davis, Parallel Analysis with Biological Chips. in PCR Methods Manual(eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky), Schena and Davis,(1999), Genes, Genomes and Chips. In DNA Microarrays: A Practical Approach(ed. M. Schena), Oxford University Press, Oxford, UK, 1999), The Chipping Forecast(Nature Genetics special issue; January 1999 Supplement), Mark Schena(Ed.), Microarray Biochip Technology, (Eaton Publishing Company), Cortes, 2000, The Scientist 14[17]:25, Gwynne and Page, Microarray analysis: the next revolution in molecular biology, Science, 1999 August 6; and Eakins and Chu, 1999, Trends in Biotechnology, 17:217-218을 포함한다.

기술은 PCT/US01/10063 및 US 2002 090979 및 참고문헌에 기술되어 있다.

상업적 공급은 Affymetrix(캘리포니아) 및 Clontech Laboratories(캘리포니아)를 포함한다.

어레이 기술에 대한 주요 적용은 서열(뉴클레오타이드 서열/뉴클레오타이드 서열 돌연변이)의 확인 및 뉴클레오타이드 서열의 발현 수준(풍부)의 측정을 포함한다. 유전자 발현 프로파일은 선택적으로 단백질 가수분해 기술과 결합하여 어레이 기술을 이용한다(Celis et al., 2000, FEBS Lett, 480(1):2-16; Lockhart and Winzeler, 2000, Nature 405(6788):827-836; Khan et al., 1999, 20(2):223-9). 어레이 기술의 또다른 적용은 당분야에 알려져 있다; 예를 들어 뉴클레오타이드 서열 발견, 암 연구(Marx, 2000, Science 289:1670-1672; Scherf et al., 2000, Nat Genet. 24(3):236-44; Ross et al., 2000, Nat Genet. 24(3):277-35), SNP 분석(Wang et al., 1998, Science, 280(5366):1077-82), 약물 발견, 약물유전학, 질병 진단(예를 들어, 미세유동(microfluidics) 장치를 이용: Chemical & Engineering News, February 22, 1999, 77(8):27-36, 독성학(Rockett and Dix (2000), Xenobiotica, 30(2):155-77; Afshari et al., 1999, Cancer Res. 59(19):4759-60) 및 독성유전체학(기능성 유전체학과 분자 독성학의 혼합). 독성유전체학의 목표는 독물에 대한 독성적 반응과 이러한 독물에 노출된 대상의 뉴클레오타이드 서열 프로파일 내 변화 사이의 관계를 발견하는 것이다(Nuwaysir et al., (1999), Molecular Carcinonucleotide sequences, 24:153-159).

일반적으로 어레이 내로 순차적인 방식으로 어떠한 라이브러리가 라이브러리의 멤버를 공간적으로 분리시킴으로서 배열된다. 배열을 위한 적당한 라이브러리의 예는 리간드 라이브러리와 같은 어떠한 분자를 포함한 라이브러리뿐만 아니라 핵산 라이브러리(DNA, 뉴클레오타이드 서열, 올리고뉴클레오타이드 등의 라이브러리를 포함), 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질 라이브러리를 포함한다. 따라서 참조가 "라이브러리"로 이루어지는 경우 이러한 참조는 어레이의 형태로 라이브러리에 참조를 포함한다.

T표본의 확산 및 혼합을 제한하기 위해 라이브러리의 멤버는 고정상, 바람직하게는 고정 기재 상에 일반적으로 고정되거나 고정된다. 특히, 라이브러리는 플라스틱 및 유리와 같은 멤브레인 및 비-다공성 기재를 포함한 실질적으로 평면이 고정상 내로 고정된다. 더욱이 표본은 바람직하게는 인덱싱(indexing)(즉, 특정 표본에 대한 참조 또는 접근)이 촉진되는 방식으로 배열된다. 일반적으로 표본은 그리드 형성시 스팟(spot)으로 적용된다. 일반적인 어레이 시스템이 이러한 목적으로 개조된다. 예를 들어 어레이는 웰 내에 다수의 표본을 지니거나 각 웰 내에 단일 표본을 지닌 마이크로플레이트의 표본 상에 고정된다. 더욱이 고정 기재는 니트로셀룰로스 또는 나일론 멤브레인(예를 들어 블롯팅 실험에 사용되는 멤브레인)과 같은 멤브레인이다. 대안적 기재는 유리 또는 실리카 기반 기재를 포함한다. 따라서 표본은 예를 들어 하전 상호작용에 의해 또는 웰의 벽 또는 바닥, 또는 멤브레인의 표면으로의 화학적 결합에 의해 당분야에 알려진 적당한 방법에 의해 고정된다. 예를 들어 피펫팅, 드롭-터치, 압전기 방법, 잉크-젯 및 버블젯 기술, 정전기적 적용 등과 같은 다른 배열 또는 고정 방법도 이용된다. 실리콘-기반 칩의 경우 사진식판이 칩 상에 표본을 배열하고 고정하는데 이용된다. 표본은 고정 기재 상에 "스팟"됨으로서 배열되고; 이는 손에 의해 또는 표본을 침착시키는 로봇공학을 이용함으로써 수행된다. 일반적으로 어레이는 매크로어레이 또는 마이크로어레이로서 기술되고, 그 차이는 표본 스팟의 크기이다. 매크로어레이는 일반적으로 약 300 마이크로 이상의 표본 스팟 크기를 포함하고 존재하는 젤 및 블롯 스캐너에 의해 용이하게 이미지화된다. 마이크로어레이 내의 표본 스팟 크기는 일반적으로 직경이 200 마이크로 이하이고 이들 어레이는 일반적으로 수천개의 스팟을 포함한다. 따라서 마이크로어레이는 전문화된 로봇공학 및 이미지 장치를 필요로 하고, 이는 주문품일 필요가 있다. 기재 사용은 Cortese, 2000, The Scientist 14[11]:26에 의한 연구에 일반적으로 기술되어 있다.

DNA 분자의 고정된 라이브러리의 제조 기술은 당분야에 기술되어 있다. 일반적으로 가장 앞선 방법은 예를 들어 고정 기재 상에 다양한 분리된 위치에서 다양한 서열 순열을 구조하는 마스크(masking) 기술을 이용하여 단일-나선 핵산 분자 라이브러리를 어떻게 제조하는지를 기술한다. 미국특허 제5,837,832호는 매우 큰 규모의 통합 기술에 기반하여 실리콘 기재에 고정된 DNA 어레이를 제조하는 개선했던 방법을 기술한다. 특히, 미국특허 제5,837,832호는 본 발명의 고정된 DNA 라이브러리를 제조하는데 이용되는 기재 상의 공간적으로-한정된 위치에서 특이적인 프로프 세트를 제조하는 "틸팅(tilting)"이라 불리는 전략을 기술한다. 또한 미국특허 제5,837,832호는 이용되는 앞선 기술에 대한 참조를 제공한다.

검출을 돕기 위해 타겟 및 프로브가 형광, 생물발광, 인광, 방사성 수용체와 같은 용이하게 검출 가능한 수용체로 표지된다. 프로브 및 타겟의 표지는 Shalon et al., 1996, Genome Res 6(7):639-45에 개시되어 있다.

본 발명의 방법에 이용되는 재료는 키트의 제조에 이상적으로 적당하다. 지침 세트가 일반적으로 포함된다.

#### 일반적 재조합 DNA 방법론 기술

본 발명은 나타내지 않는 한 화학, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상의 기술을 이용하고, 이는 당업자의 능력 내에 있는 것이다. 이러한 기술은 문헌에 설명되어 있다. 예를 들어 J. Sambrook, E.F. Fritsh and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel F.M. et al., (1995 and 정기 부록) Current Protocols in Molecular Biology, ch.9, 13 and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.; B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; M. J. Gait(Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; and D.M.J. Lilley and J.E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press 참조. 이들 일반적인 문헌 각각은 참고문헌으로 포함된다.

본 발명의 특이적 실시태양에서 27개, 648개 유전자를 나타내는 cDNA 마이크로어레이 시스템이 진행성 NSCLC에 있어서 게피티닙에 대한 반응성을 예측하는 유전자 세트를 선택하는데 이용된다. 발현 프로파일의 통계 분석은 게피티닙에 대한 반응자와 무반응자 사이의 차별적으로 발현되는 수십개의 유전자를 확인하였다. 이들 유전자 발현에 기반한 약물 반응 득점(DRS) 시스템은 게피티닙 치료에 대한 반응을 예측하였다.

#### **도면의 간단한 설명**

도 1은 4개의 대표적 폐 선암의 레이저-마이크로빔 현미해부를 나타내는 이미지이다. 상위 열은 해부 전 표본을 나타내고; 하위 열, 해부된 암세포(H.E. 염색 X100). TBB는 경기관지 생체검사를 나타낸다.

도 2는 게피티닙 치료 효율을 예측하는 득점 시스템을 수립하는 것을 나타낸 것이다. A. 차별적 유전자의 수가 변화될 때 다른 예측 득점이 나타난다. 차별적 유전자 세트의 수(5개 내지 51개)는 표 4의 순위-정돈된 목록의 상위로부터 선택된 유전자 수에 상응한다. 더 큰 수치의 분류 득점(CS)은 2개 그룹의 더 좋은 분리를 나타낸다.

B. 게피티닙-민감도에 대한 51개 후보 유전자를 이용한 17개 "학습" 사례의 계급 집단(좌측) 및 GRS에 대해 최종적으로 선택된 12개 예측 유전자(우측). 계통수는 개별적 사례 사이의 발현 패턴의 유사성을 나타내고; 긴 분지는 큰 차이를 나타낸다. 2개 그룹은 12-유전자 세트에 의해 가장 명백하게 분리되었다.

C. GRS의 기초 상에 검증된 반응자, 무반응자 및 "시험 사례"의 개략적 판별. 빨간색 다이아몬드는 학습 PR 사례에 대한 예측 득점을 나타내고 파란색 다이아몬드는 학습 PD 사례를 나타낸다. 분홍색 삼각형은 GRS를 수립하는데 이용되지 않은 시험 PR 사례를 나타내고, 파란색 삼각형은 PD 사례를 나타낸다. 노란색 삼각형은 4-개월 관찰 기간에 걸쳐 SD 상태를 유지한 시험 SD 사례를 나타내고, 녹색 삼각형은 연구의 특정 시간에 SD로 한번 판명되었으나 치료 시작 후 3 내지 4개월 내에 질병의 진전을 나타낸 시험 사례를 나타낸다.

도 3은 반-정량적 RT-PCR 및 면역조직화학 분석으로의 GRS의 확인을 나타낸다.

A. PR 및 PD 그룹으로부터의 RNA의 반-정량적 RT-PCR 분석의 대표 이미지. OSMR 및 GCLC 유전자는 무반응자(PD)에서 과-발현되었다. 각 cDNA 주형의 전체는 ACTB의 증폭을 통해 제어되었다.

B. 항-AREG 항체를 이용한 동일한 PD-환자(No. LC21)로부터의 파이버스코프(fiberscopic) 경기관지 생체검사(TBB) 및 임파절(LN) 생체검사로로부터의 대표적 표본의 면역조직화학적 염색(X200).

C. 다른 4개 예측 마커(TGFA, ADAM9, CD9 및 OSMR)에 대한 항체를 이용한 PD 환자로부터의 대표적 표본의 면역조직화학적 염색(X200).

도 4는 5 PR, 10 SD 및 20 PD 선암 사례에서의 ELISA에 의해 측정된 TGFA의 혈청 농도를 나타낸 것이다. TGFA의 평균 혈청 수준은 흑색 바로 나타나 있다: PD 환자의 경우  $19.0 \pm 2.8$  pg/ml(평균 $\pm$ SE), SD 환자의 경우  $13.9 \pm 1.9$  pg/ml 및 PR 환자의 경우  $12.8 \pm 1.4$  pg/ml.

도 5는 게피티닙-민감성 PC-9 세포 상의 분비된 AREG의 항-아포토시스 효과를 나타낸 것이다.

A. 폐-선암 세포주 PC-9, NCI-H358 및 -H522에서의 반-정량적 RT-PCR에 의해 평가된 *AREG* 전사체의 발현.

B. 10% FCS로 보충된 배지, 무혈청 배지 또는 NCI-H358 또는 -H522 세포 배양으로부터 수득된 무혈청 조건 배지(CM) 내에서 배양된 PC-9 세포. 각 배지는 48-시간 시점에서 동일 배지로 1회 대체되었고; 0.5 또는 1.0  $\mu$ M의 농도에서 게피티닙 첨가 72 시간 후 세포 활성이 MTT 분석에 의해 측정되었다. 실험은 3반복으로 수행되었다. Y-축은 다른 배지 내에서 인큐베이트된 세포의 상대 MTT 수치(0.5 또는 1.0  $\mu$ M의 존재시 MTT/게피티닙의 부재시 MTT)를 나타낸다.

C. 게피티닙에 대한 NSCLC 세포의 저항성에 있어서, 자가분비 방식으로 분비된 AREF의 효과. 배양 시작시 PC-9 세포는 1.0  $\mu$ M 게피티닙 및 재조합 AREG 단백질(최종 농도 1-100 ng/ml)을 함유한 배지 내로 접종되었고; 72시간 후 세포 활성이 3반복 MTT 분석에 의해 측정되었다(파란색 바). Y-축은 세포의 상대 MTT 수치(AREG의 개별 농도에서의 MTT/AREG 없는 MTT)를 나타낸다.

1.0  $\mu$ M 게피티닙의 부재시 NSCLC 세포의 활성 상의 AREG 효과도 연구되었다. 개별적인 PC-9 세포는 재조합 AREG 단백질은 포함하나 게피티닙을 포함하지 않는 배지 내로 첨가되었고; 72시간 후 활성이 3반복 MTT 분석에 의해 측정되었다(적색 바).

도 6은 PD 및 PR 환자로부터 유래된 섹션에서의 암피레굴린(amphiregulin) 발현의 면역조직화학 분석을 나타낸 것이다.

## 실시예

### 재료 및 방법

#### 환자 및 조직 표본

앞선 화학치료가 실패한 진행성 비소세포성 폐암 환자에게 매일 250 mg으로 투여된 ZD1839의 임상적 항-종양 효과, 약물 부작용(ADR) 및 약물동력학에 중요한 우성적 생물학적 인자를 조사하기 위해 다중-센터 시도를 포함한 단계 II 임상 연구가 수행되었다. 초기 종료점은 게피티닙의 잠재적 항-종양 효과를 미리 측정할 수 있는 유전자-발현 프로파일을 명백하게 하는 것이다. 연구의 시작시 표본 크기는 이론적 근거로서 수행된 연구를 이용하여 평가되었다<sup>12, 13</sup>. 폐암 환자에서 게피티닙에 대한 반응률이 20% 이하였기 때문에<sup>8-10</sup>, 약 50명의 환자들이 상기 평가된 학습 사례를 수득하는데 필요하도록 평가되었다. 국부적으로 진행된(단계 IIIB) 또는 전이된(단계 IV) NSCLC가 하나 이상의 통상의 화학치료 요법에 저항적인 환자가 본 실험에 기록되었다. 포함 표준은 (1) 20세 이상의 연령, (2) 수행 상태(Performance Status, PS) 0-2, (3) 적당한 간 및 신장 기능 시험이다. 모든 환자는 일본의 토쿠시마대학 또는 킨키대학 병원에서 하루에 1회 250 mg의 게피티닙이 경구적으로 치료되었다. 치료는 환자가 (1) 질병의 진행, (2) 견딜 수 없는 독성 또는 (3) 동의의 철회에 의해 연구에서 탈락될 때까지 계속되었다.

목적 종양 반응은 Union International Contre le Cancer/World Health Organization (UICC/WHO)에 의해 윤곽화된 기준에 따라 치료 시작 후 4주마다 평가되었다. 반응 카테고리는 하기와 같았다: 완전한 반응(CR), 어떠한 평가 가능한 손상 내에 잔여 종양이 없음; 부분적 반응(PR), 모든 측정 가능한 손상 및 새로운 손상이 없는 것의 총합 내의 기준선 하에서의 50% 이상의 감소의 증거를 지닌 잔여 종양; 진행성 질병(PD), 모든 측정 가능한 손상 또는 새로운 손상의 출현의 총합 내의 기준선 하에서의 25% 이상의 증가의 증거를 지닌 잔여 종양; 및 안정한 질병(SD), CR, PR 또는 PD에 해당되지 않는 잔여 종양. 모든 평가 가능한 손상은 기준선으로서 동일한 기술 즉, 평평 X-선, CT 또는 MRI를 이용하여 이차원적으로(측정 가능한 손상의 가장 긴 지름의 생성물과 그의 가장 긴 수직선의 총합) 측정되었다.

4-개월 치료의 종료(또는 철회)시 최상의 전체 반응은 하기와 같은 정의에 기반하여 각 환자에 대해 평가되었다: CR, 그들 사이에 적어도 28일 이상의 간격으로 2회의 연속적 조사 시점에서 CR에 해당되는 환자; PR, 그들 사이에 적어도 28일 이상의 간격으로 2회 연속적 조사 시점에서 PR 또는 그 이상으로 판단된 환자; SD, 적어도 28일 이상에서의 2회 연속적 조

사 시점에서 SD 또는 그 이상이나 CR 또는 PR에 해당하지 않은 환자. SD 사례의 첫 번째 판단은 첫 번째 종양 평가 시점(무작위화 후 28일)에 또는 그 후에 수행되어야 한다; PD, 첫 번째 종양 평가 시점(무작위화 후 28일)에 또는 그 전에 PD로 결정된 환자; 알려지지 않음, 환자가 증가된 질병의 최상의 반응에 해당하지 않고, 기준선 이후(무작위화 전) 및 진행 전의 모든 목적 상태가 알려지지 않았음.

게피티닙 처리 전에 종양 표본은 각 환자로부터의 서면화된 동의서와 함께 경기관지(TBB), 피부 또는 임프절 생체검사에 의해 채취되었다. 윤리적 승인은 개별 연구소의 윤리위원회로부터 취득되었다. 생체검사 표본은 즉시 동결되었고, TissueTek OCT 배지(Sakura, 일본 동경)에 함몰되었고,  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관되었다. 모든 표본은 현미경으로 조사되었고, 발현 프로파일의 분석을 위한 충분한 암세포를 포함한 28명의 환자로부터의 표본(17개 학습 및 11개 시험 사례)이 추가 분석을 위해 먼저 선택되었다. 예측 시스템의 확인을 위해 5개의 새롭게 기록된 사례(4 PD 및 1 SD)로부터의 블라인드 표본 세트도 11개 시험 사례에 첨가되었다. 이들 환자에 대한 임상적 및 조직학적 정보는 표 1-3에 요약되었다.

### 현미해부

하나의 종양으로부터 다른 종양까지 존재하는 암세포 및 다양한 형태의 실질세포의 비율의 유의적인 차이의 관점에서 현미해부가 cDNA 마이크로어레이 상의 정확한 유전자-발현 프로파일을 취득하는 필요한 수단이다. 따라서  $\mu\text{CUT}$  레이저-마이크로빔 현미해부 시스템(Molecular Machines & Industries AG, Glattbrugg, 스위스)을 이용하여 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)으로  $8\ \mu\text{m}$ -두께 동결 섹션을 염색하고 암세포를 선택적으로 수집하였다<sup>14</sup>. 이러한 시스템에서 조직 섹션은 타겟 조직과 함께 절단될 박층 지지 폴리에틸렌 멤브레인 상에 고정되고; 펄스된-자외선(UV) 협-빔-초점 레이저가 비디오 스크린 상에서 관찰될 수 있는 미리-선택된 트랙을 따라 암세포를 절단한다. 추출되는 물질은 레이저에 직접 노출되지 않고 단지 이에 의해 외접되고; 다른 LMM 시스템과 달리 이는 해부된 세포의 회복을 방사선없이 진행되도록 한다. 더욱이 멤브레인은 교차-오염에 대해 슬라이드 상의 조직을 보호한다. 이러한 시스템을 이용하여 조직의 작은 면적을 빠르게 분리하고, 조직학적 섹션으로부터 단일 세포를 분리 할 수 있었다(도 1).

### RNA 추출 및 T7-기반 RNA 증폭

총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 RNeasy mini kit 및 RNase-free DNase kit(QIAGEN, 독일 힐텐)를 이용하여 개별적인 현미해부된 암세포군으로부터 추출되었다. 총 RNA는 앞서 기술된 바와 같이 T7-기반 RNA 증폭되었다<sup>15</sup>. 2 라운드의 증폭은 각 표본으로부터  $40\sim 200\ \mu\text{g}$ 의 aRNA(증폭된 RAN)( $>100,000$ -배)를 산출하였다. 대조군 프로브로서 정상 인간 폐 폴리아+ RNA(BD Bioscience Clontech, 팔로알토, 캘리포니아 및 BIOCHAIN, Hayward, CA, USA)가 동일한 방식으로 증폭되었다. 개별적 표본 및 대조군으로부터의 aRNA의 알리퀀트( $2.5\ \mu\text{g}$ )가 각각 Cy5-dCTP 및 Cy3-dCTP의 존재 하에서 역전사되었다.

### cDNA 마이크로어레이

"게놈-와이드(genome-wide)" cDNA 마이크로어레이 시스템은 National Center for Biotechnology Information의 UniGene 데이터베이스로부터 선택된 27,648개 cDNA를 포함한다<sup>15</sup>. 마이크로어레이의 제작, 하이브리다이제이션, 세척 및 신호 강도의 검출이 앞서 기술되어 있다<sup>15</sup>. 종양과 대조군 사이의 mRNA의 양을 표준화하기 위해 52개 하우스키핑 유전자의 평균 Cy5/Cy3 비율이 하나로 동일하였다. 분석 편차를 이용하여 각 마이크로어레이 슬라이드에 컷오프(cutoff) 수치를 할당하였고, 유전자의 Cy5/Cy3 비율이 하기와 같이 계산되었다: (1) Cy5(암 표본)가 컷오프 수준 보다 낮은 경우 유전자의 Cy5/Cy3 비율은 Cy5 및 Cy3이 컷오프 수준보다 높은 다른 유전자의 Cy5/Cy3 비율 중 2.5 백분위수로 치환되었고; (2) Cy3(대조군 표본)이 컷오프 수준보다 낮은 경우 유전자의 Cy5/Cy3 비율은 Cy5 및 Cy3이 컷오프 수준보다 높은 다른 유전자의 Cy5/Cy3 비율 중 97.5 백분위수로 치환되었고; Cy5 및 Cy3 모두 컷오프 수준보다 낮은 경우 유전자의 Cy5/Cy3 비율은 좌측 블랭크였다.

### 게피티닙에 대한 반응성을 예측하기 위한 유전자의 추출

게피티닙에 대한 민감도와 관련되는 유전자를 발견하기 위해 약 27,648개 유전자의 개별적 측정이 게피티닙에 대한 반응자로 분류된 환자(PR) 및 무반응자로 분류된 다른 환자(PD)인 2개 그룹의 환자 사이에 비교되었다. 2개 부류 사이를 구별할 수 있는 유력한 유전자의 수를 차원성(dimensionality)을 감소시키기 위해 2개 기준을 충족시킨 유전자만을 추출하였다: 1) 신호 강도가 두 그룹의 적어도 60% 이상에서 컷오프 수준보다 높음; 및 2)  $|\text{MED}_{\text{PR}} - \text{MED}_{\text{PD}}| \geq 1$ , MED는 각 그룹 내의 로그-변화된 상대 발현 비율로부터 계산된 중수를 나타냄. 이후 2개 부류(PR 및 PD) 사이를 구별하는 개별적 유전자

의 능력을 평가하기 위해 무작위-순열 시험이 적용되었고; 평균( $\mu$ ) 및 표준편차( $\sigma$ )가 2개 그룹 내의 각 유전자의 로그-변환된 상태 발현 비율로부터 계산되었다. 각 유전자에 대한 식별 득점(discrimination score, DS)이 하기와 같이 정의되었다:

$$DS = (\mu_{PR} - \mu_{PD}) / (\sigma_{PR} + \sigma_{PD})$$

표본은 그룹의 각 쌍에 대해 무작위로 10,000회 순열되었다. 각 유전자의 DS 데이터셋이 정상 분포를 나타내었기 때문에 이용자-정의된 그루핑에 대한  $p$ -수치를 계산하였다.

#### 약물-반응 득점의 계산

앞서 기술된 절차에 따라 후보 예측-유전자의 발현 수준을 나타내는 게피티닙 반응 득점(GRS)을 계산하였다<sup>16-18</sup>. 각 유전자( $g_i$ )는 표본 내의 발현 수준( $x_i$ )이 하나의 그룹 또는 참조 표본 내의 다른 그룹의 평균 발현 수준에 근접한지 여부에 따라 반응자(PR) 또는 무반응자(PD)로 투표되었다. 투표( $v_i$ )의 규모는 2개 부류의 평균으로부터의 표본 내의 발현 수준의 편차를 나타낸다:

$$V_i = |x_i - (\mu_{PR} + \mu_{PD}) / 2|$$

반응자( $V_{PR}$ ) 및 무반응자( $V_{PD}$ )에 대한 총 투표를 수득하기 위해 투표를 합계하였고, GRS 수치를 하기와 같이 계산하였다:

$GRS = ((V_{PR} - V_{PD}) / (V_{PR} + V_{PD})) \times 100$ , GRS 수치는 반응자 또는 무반응자의 지시 승리의 마진(margin)을 반영한다. GRS 수치는 -100 내지 100의 범위이고; GRS의 절대 수치가 높을수록 예측이 더 강하다.

#### 득점의 교차-확인 및 예측 시스템의 평가

모든 표본의 예측 득점은 한 번에 하나의 표본이 표본 세트로부터 제거되는 리브-원-아웃(leave-one-out) 접근에 의해 수득되었고; 2개 부류의 순열  $p$ -수치 및 평균 수치가 잔여 표본을 이용하여 각 유전자에 대해 계산되었다. 보류된 표본의 약물-반응은 예측 득점을 계산함으로써 예측되었다. 이들 절차는 각 표본에 대해 반복되었다<sup>16-17</sup>.

예측 시스템의 신뢰도를 평가하기 위해 하기와 같이 각 유전자 세트 내의 반응자 및 무반응자의 GRS 수치를 이용하여 "분류 득점(classification score, CS)"을 계산하였다:

$$CS = (\mu_{GRSpr} - \mu_{GRSpd}) / (\sigma_{GRSpr} + \sigma_{GRSpd})^{17}.$$

더 큰 수치의 CS는 예측 시스템에 의한 2개 그룹의 더 좋은 분리를 나타낸다.

#### 계급적 집락화

마이크로어레이 데이터의 그래프 표시를 생성하고 계급적 집락화의 계통수를 생성하기 위해 M. Eisen에 의해 작성된 웹-이용가능한 소프트웨어("Cluster" 및 "TreeView")(<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/restech.html>)를 이용하였다. 집락화 알고리즘이 적용되지 전에 각 스팟에 대한 형광 비율이 먼저 로그-변환된 후 각 표본에 대한 데이터가 중수-센터되어 실험 편향을 제거하였다.

#### 반-정량적 RT-PCR 분석

개체 표본 및 정상 대조군 폐로부터의 마이크로어레이 슬라이드에 하이브리다이징된 동일한 aRNA의 알리쿼트( $5.0 \mu g$ )가 올리고(dT)12-18 프라이머 및 SuperScript II 역전사효소(Intitrogen, 칼스바드, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 역전사되었다. 반-정량적 RT-PCR 실험은 GRS를 수립하기 위해 이용되는 12개 상위-순위 유전자에 특이적인 합성 프라이머의 하기 세트 또는 내부 대조군으로서 베타-액틴(ACTB)-특이적 프라이머로 수행되었다: FLJ22662, 5'-GCCATAAGTGGTCCCACAGT-3' 및 5'-GTCTTCTAGTCCGTCATCTCCCT-3'; Amphiregulin(AREG), 5'-CCATAGCTGCCTTTATGTCTGC-3' 및 5'-CTTTTACCTTCGTGCACCTTT-3'; coronin, 액틴 결합 단백질,

1C(COR01C), 5'-TAATCTGCTGAGGACCTTTTGTC-3' 및 5'-TAATTCAGTGTCTCTTCTGGGA-3'; 아포토시스, 카스파제(caspase) 활성 억제제(AVEN), 5'-GCTCACAGCAGTAAATGCCTA-3' 및 5'-TGCTATGCTGTAAACACTGGCTA-3'; 이중 특이성 포스파타제 3(DUSP3), 5'-GGATCCTTTATTGGTGGTAGAGC-3' 및 5'-CCAGAGTGACCCTGAAGATAAAT-3'; DJ473B4, 5'-ACCTGATTCTCTAGGTGCAGTTT-3' 및 5'-GTCGTTTCAACCAGGTAGTTTTG-3'; 플렉스트린(pleckstrin) 상동성-유사 도메인, 패밀리 A, 멤버 2(PHLDA2), 5'-GGGCGCCTTAAGTTATTGGA-3' 및 5'-GGATGGTAGAAAAGCAAACACTGG-3'; RNA 결합 모티프 단백질 7(RBM7), 5'-TGTAATGGAGATTGTACAGGTTG-3' 및 5'-AGGAACAGTACAAATGCTGTGGT-3'; BX092512(EST), 5'-GCACTCCTTGAAGGTACACTAAC-3' 및 5'-ATTTGTATTCACTCAGCCATGC-3'; 옹코스타틴(oncostatin) M 수용체(OSMR), 5'-ACCCAACCTTCAAAACTAGGACTC-3' 및 5'-ACAGCTTGATGTCCTTTCTATGC-3'; 글루탐산-시스테인 리가제, 촉매 서브유니트(GCLC), 5'-TCATGAAAGGCACTGAGTTTTG-3' 및 5'-GTTAGCTGAAGCAGCTTTATTGC-3'; 콜라겐, 타입 IV, 알파 3 결합 단백질(COL4A3BP), 5'-ATATGCACAATCCTGGAAGTGA-3' 및 5'-TGCCTTACTAGCATTACCACCAT-3'; ACTB, 5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTTCG-3' 및 5'-CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3'. PCR 반응은 증폭의 대수 페이스(phase) 내에 생성물 강도를 보증하는 사이클 수로 최적화되었다. 포스포이미저(phosphorimager) 정량 분석(Molecular Imager FX: Bio-Rad Laboratories, 헤라클레스, 캘리포니아, 미국)을 수행하였고 RT-PCR 밴드 강도가 마이크로어레이 데이터로부터의 유전자 발현의 표준화된 Cy5/Cy3 비율과 정량적으로 비교되었다.

3개의 프라이머 세트를 이용하여 돌연변이의 핫 스팟(hot spot)으로 최근 보고된 EGFR의 코돈 709-870(p-루프로부터 활성 루프까지)의 전체 구역에서의 돌연변이를 선별하기 위해 RT-PCR이 수행되었다: 단편-1, 5'-TCTTACACCCAGTGGAGAAGC-3' 및 5'-GTCTTTGTGTTCCCGGACAT-3'; 단편-2, 5'-ACTATGTCCGGAACACAAA-3' 및 5'-TTCCGTCATATGGCTTGG-3'; 단편-3, 5'-CGTCGCTATCAAGGAATTAAGAG-3' 및 5'-GTAGCTCCAGACATCACTCTGGT-3'. 게피티닙으로 치료된 19명의 NSCLC 환자로부터의 RT-PCR 생성물이 직접 시퀀싱에 의해 분석되었다.

#### 면역조직화학적 분석

게피티닙에 대한 반응자 대 무반응자를 예측함에 있어서 EGFR에 대한 리간드를 인코딩하는 AREG 및 전환성 성장 인자-알파(TGFA) 및 다른 ERBB 멤버 및 EGFR 시그널링에 관련된 것으로 알려진 다른 3개 후보 마커(디스인테그린(disintegrin) 및 금속단백분해효소 도메인 9(ADAM9), CD9 항원(p24) 및 OSMR) 단백질의 차별적 발현을 확인하기 위해 ENVISION+ Kit/HRP(DakoCytomation, Glostrup Denmark)를 이용하여 파이버스코프 경기관지 생체검사(TBB) 및 임프절 생체검사에 의해 취득된 임상 조직 섹션을 염색하였다. 간단히, 내생적 퍼옥시다제 및 단백질 차단 반응 후 항-인간 AREG 폴리클론 항체(Neo Markers, Fremont, CA, USA), 항-인간 TGFA 단일클론 항체(Calbiochem, Darmstadt, Germany), 항-인간 ADAM9 단일클론 항체(R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA), 항-인간 CD9 단일클론 항체(Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) 또는 항-인간 OSMR 단일클론 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 후 2차 항체로서 HRP-표지된 항-토끼 또는 항-마우스 IgG가 첨가되었다. 이후 기질-색원체가 첨가되었고 표본은 헤마톡실린으로 대조염색되었다.

11명 환자로부터의 동결된 조직 표본이 면역조직화학 분석을 위해 선택되었다. 면역염색의 양서는 임상적 추적조사 데이터의 선지식 없이 3개의 독립적 조사에 의해 부재 또는 양성으로 강도를 기록함으로써 반-정량적으로 평가되었다. 조사자가 독립적으로 이들을 정의한 경우 사례들은 양성으로만 수용되었다.

#### ELISA

일본의 히로시마대학 병원에서 임상 연구로서 동일한 프로토콜에 기반하여 게피티닙으로 치료된 35명의 폐-ADC 환자의 독립 세트로부터 혈청이 취득되었다(PR의 경우 5개, SD의 경우 10개 및 PD의 경우 20개). 모든 환자의 혈청은 진단시점과 치료 시작 후 4주마다 동의에 따라 취득되었고, -80°C에서 보관되었다. 혈청 TGFA 수준은 통상으로 이용가능한 효소 시험 키트(TGF- $\alpha$  ELISA kit: Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA)를 이용한 ELISA에 의해 측정되었다.

#### 시험관 내에서의 게피티닙 치료 및 AREG-자가분비 분석

인간 HSCLS(선암) 세포주 PC-9, NCI-H358 및 NCI-H522는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, USA)로부터 구입되었다. 이들 NSCLC 세포 내의 AREG의 발현을 검출하기 위해 각 라인으로부터의 총 RNA가 올리

고(dT)12-18 프라이머 및 Superscript II(Intitrogen)를 이용하여 단일-나선 cDNA에 대해 역전사되었다. 반-정량적 역전사효소-PCR(RT-PCR)은 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다<sup>14</sup>. 상피 성장 인자 수용체 티로신 키나제의 억제제인 게피티닙 (4-(3-클로로-4-플루오로아닐리노)-7-메톡시-6-(3-모폴리노프로폭시) 퀴나졸린: ZD1839, 이레사)은 AstraZeneca Pharmaceuticals(Macclesfield, UK)에 의해 제공되었다. 약물은 10 mM의 농도로 DMSO 내에 용해되었고 -20°C에서 유지되었다.

게피티닙 치료에 대한 폐 선암의 민감도를 측정하기 위해 유세포분석(flow-cytometry)을 수행하였다. 세포는  $5 \times 10^5$  세포/100-mm 디쉬의 밀도로 플레이트되었고 적당한 무-혈청 배지 내에서 1.0  $\mu$ M의 게피티닙으로 처리되었다. 세포는 처리 72시간 후 트립신처리되었고, PBS 내에 수집되었고, 30분간 70% 차가운 에탄올에 고정되었다. 100  $\mu$ g/ml의 RNase(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로의 처리 후 세포는 PBS 내에서 50  $\mu$ g/ml 요오드화프로피듐(Sigma-Aldrich Co.)로 염색되었다. 유세포분석은 Becton Dickinson FACScan 상에서 수행되었고 ModFit 소프트웨어(Verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA)에 의해 분석되었다. 세포주기의 G0/G1, S 및 G2/M 단계 및 서브-G1 집단의 세포핵의 핵분율이 적어도 20,000 이상의 게이트되지 않은(ungated) 세포로부터 측정되었다.

AREG가 게피티닙로 처리된 폐 선암 세포 내의 자가분비 항-아포토시스 인자로서 기능하는지 여부를 조사하기 위해 하기 분석을 수행하였다. 먼저, AREG를 발현하지 않는 게피티닙-민감성 PC-9 세포가 게피티닙 처리 전 적어도 8시간 이상 동안 무-혈청 배지 내에서 배양되었다. 이후 이들 세포는 무-혈청 배지 또는 10% FCS가 보충된 배지 또는 AREG-발현 세포(NCI-H358 또는 NCI-H522)의 72-시간 배양액으로부터 수집된 무-혈청 조건 배지 내에서 72시간 동안 1.0  $\mu$ M의 게피티닙으로 인큐베이트되었다. 각 배지는 48-시간 시점에서 게피티닙을 함유한 동일한 배지로 1회 대체되었다. 게피티닙에 대한 각 세포주이 반응을 검출하기 위해 활성이 Cell Counting Kits(WAKO, Osaka, Japan)을 이용한 MTT 분석에 의해 평가되었다.

NSCLC 세포의 게피티닙-저항성 상의 AREG의 자가분비 효과를 확인하기 위해 1.0  $\mu$ M의 게피티닙 및 1~100 ng/ml의 최종 농도로 재조합 AREG 단백질(Genzyme-Techne, Minneapolis, MN, USA)을 함유한 무-혈청 배지 내에서 72시간 동안 PC-9 세포를 배양하였다. 세포 활성은 MTT 분석에 의해 평가되었다. 또한 NSCLC 세포의 활성 상의 AREG 자체의 가능한 효과가 재조합 AREG 단백질만을 함유한 무-혈청 및 무-게피티닙 배지 내에서 PC-9 세포를 배양함으로써 평가되었다. MTT 분석은 상기와 같이 수행되었다.

## 결과

### 게피티닙 치료에 대한 반응

이러한 실험에 기록된 53명의 환자 중 46명이 선암으로 진단된 종양을 지녔고; 5명은 편평세포암종이었고(9.4%); 2명은 대세포암종이었다(3.8%). 15명의 환자는 PR을 달성하였고, CR을 나타낸 환자는 없었고; 17명의 환자는 SD로 분류되었고, 19명은 PD로 분류되었다. 2명의 환자에게 유용한 임상적-반응 데이터는 없었다. 이러한 치료에 대한 종양-반응률(CR+ PR/CR+ PR+ SD+ PD)은 29.4%이었고, 질병 제어율(CR+ PR+ SD/CR+ PR+ SD+ PD)은 62.8%이었다(표 1).

43명의 환자로부터 종양 표본이 수집되었다. 이들 43개 중 32개의 표본은 cDNA 마이크로어레이 상의 발현 프로파일의 분석을 위한 충분한 수의 암세포 수를 포함하였다. 추가 마이크로어레이 분석에 적당한 것으로 판명된 표본의 수는 PR의 경우 8개, SD의 경우 7개 및 PD의 경우 13개이었다(표 2). 게피티닙 치료의 효율에 대한 예측 득점 시스템을 수립하기 위해 28개 표본 중 17개는 학습 사례로서(PR의 경우 7개 및 PD의 경우 10개), 11개는 시험 사례로서(PR의 경우 1개 및 SD의 경우 7개) 분석되었다. 예측 시스템의 추가적인 확인을 위해 5개의 새롭게 기록된 시험-사례(PD의 경우 4개 및 SD의 경우 1개)로부터의 또다른 블라인드 표본 세트가 획득되었고 상기 초기 11개 시험 사례에 최종적으로 첨가되었다.

### 게피티닙에 대한 민감도와 관련된 유전자의 확인

27,648개 유전자의 발현 수준을 비교함으로써 PR 그룹(반응자로 정의됨) 내의 7명의 환자로부터의 종양과 PD 그룹(무반응자로 정의됨) 내의 10명의 환자로부터의 종양 사이에서 차별적으로 발현되는 유전자를 추출하고자 하였다(표 2, 3).

종양 반응에 의해 정의된 2개의 하위부류와 사이를 구별하는 무작위-순열 시험을 수행하였고, 순열  $p$ -수치가 0.001 이하인 51개 유전자를 확인하였다(표 4). 무반응자에서 40개 유전자의 발현 수준은 더 높았고, 다른 11개 유전자는 더 낮았다.

### 게피티닙 치료의 효율에 대한 예측 득점 시스템의 수립

상기 선택된 51개 유전자의 발현 프로파일에 기반하여 게피티닙 처리의 효율에 대한 예측 득점 시스템을 수립하고자 하였다. 게피티닙 반응 득점(GRS)로 명명된 예측 득점은 앞서 기술된 절차에 따라 계산되었다(방법 참고). 2개 그룹의 최상의 분리를 제공하는 후보의 수를 측정하기 위해 순열  $p$ -수치의 유의성에 기반하여 51개 유전자를 분류하였고 순위 목록(51, 50, 49, 48 등)의 하부로부터 시작하여 1씩 감소하는 리브-원-아웃(leave-one-out) 시험에 의해 예측 득점을 계산하였다. 각 유전자 세트에 대해 2개 부류를 구별할 수 있는 능력의 평가로서 양성 정의한 표준인 분류 득점(CS)을 계산하였다.

도 2A에 나타난 바와 같이 식별 유전자의 수가 변화할 때 다른 예측 득점을 획득하였다. 후보 목록 내의 12개 상위-순위 유전자만을 이용하여 득점을 계산할 때 최상의 CS를 획득하였고, 이는 무반응자로부터의 반응자의 최상의 분리를 의미한다.

모든 51개 유전자 또는 상위 12개 유전자만을 이용한 계급적 집락화 분석은 게피티닙에 대한 반응에 따른 2 그룹 중의 하나로 모든 17개 사례를 분류하였다(도 2B). 상위 12개 유전자를 집합 분석에 이용하는 경우 2개 그룹이 가장 명백하게 분리되었다. 결국 12개의 선택된 유전자의 발현 수준을 기반으로 게피티닙에 대한 개별적 NSCLC의 민감도를 예측하는데 임상적으로 적용되는 수적 약물-반응-득점 알고리즘을 수립하였다.

예측 시스템을 확인하기 위해 상기 시스템을 수립하는데 이용된 17개 "학습" 사례와 완전히 독립적인 추가 8개("시험") NSCLC 사례를 조사하였다. 이들 표본 각각 내의 유전자-발현 프로파일을 조사하였고 12개 식별 유전자의 발현 수준을 기반으로 GRS를 계산하였다. 도 2C에 나타난 바와 같이 GRS 시스템에 의해 획득된 득점은 모든 8개 "시험" 사례 내의 게피티닙에 대한 임상적 반응과 일치하였다.

#### 중양 반응 내의 SD를 지닌 환자에 대한 GRS 수치

8명의 시험-SD 환자에 대한 GRS 수치가 상기 수립된 예측 득점 시스템에 따라 계산되었다. 수치가 83.0(무반응자로 예측됨)으로부터 61.6(반응자)까지 넓게 분포되었더라도 관찰 기간 동안 SD 상태로 유지된 환자의 득점은 특정 연구 시점에서 SD로 판명되었으나 치료 시작 후 3 또는 4개월 내에 질병의 진행을 나타낸 환자보다 높기 쉬웠다(도 2C). GRS 시스템이 중양 반응시 PR을 지닌 환자와 PD(SD 없이)를 지닌 환자 사이를 구별하는 유전자-발현 프로파일을 기반으로 수립되더라도 이들 결과는 GRS가 게피티닙에 대한 반응에 따른 그룹 내로 SD 환자를 분류하는 작용을 함을 나타낸다.

#### 반-정량적 RT-PCR 분석으로의 GRS 확인

PR과 PD 사례 사이의 상위 12개 예측 유전자의 차별적 발현을 확인하기 위해 마이크로어레이 데이터로부터 유래된 발현 수치가 동일한 환자(5 PR 및 7 PD)로부터의 RNA의 반-정량적 RT-PCR로부터의 수치와 상호관련되었다(도 3A, 표 5A). Spearman 순위 상관관계는 모든 12개 유전자에 대해 양성이었다고 12개 유전자 중 7개에 대해 유의적으로 양성이었다.

#### GRS의 면역조직화학적 확인

PR과 PD 사례 사이의 예측 단백질 마커의 차별적 발현을 확인하기 위해 모두 리간드-EGFR 시그널링에 관련되는 것으로 알려져 있고 순열  $p$ -수치가 0.01 이하인 AREG, TGFA, ADAM9, CD9 및 OSMR에 대한 5개 다른 항체로 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 먼저 이들 5개 항체를 이용하여 동일한 환자로부터의 TBB 및 임프절 생체검사에서부터 수득된 쌍을 이룬 중양 조직 섹션을 염색하였다. 이들 다른 환자 내에서 5개 마커의 단백질 발현 상의 환자-내 차이는 관찰되지 않았다(도 3B). 또한 11개 NSCLC 표본(PR의 경우 5개 및 PD의 경우 6개) 내의 5개 마커로 마이크로어레이 데이터를 확인하였다. 결과는 마이크로어레이 데이터와 일치하였다(도 3C, 표 5B).

#### TGFA의 혈청 수준

일반적인 임상적 상황에서의 예측 시스템의 유용성을 더욱 평가하기 위해 혈청학적 시험에 대해 독립적으로 수집되고 마이크로어레이 분석에 등록되지 않은 5명 PR, 10명 SD 및 20명 PD 환자로부터의 혈청 표본 내에서 ELISA를 이용하여 TGFA 단백질을 검출하였다. TGFA의 혈청 수준은 PD 환자의 경우  $19.0 \pm 2.8$  pg/ml(평균 $\pm$ SE), SD 환자의 경우  $13.9 \pm 1.9$  pg/ml 및 PR 환자의 경우  $12.8 \pm 1.4$  pg/ml이었다(도 4). 16.0 pg/ml가 컷오프로서 사용될 때 PD 환자로부터의 20개 혈청 표본 중 12개는 TGFA에 대해 양성이었다고 PR 환자로부터의 모든 표본은 음성이었다.

#### 시험관 내의 게피티닙 처리 및 AREG-자가분비 분석

EGFR 및 다른 ERBB 멤버에 대한 리간드인 AREG이 무반응자에서 과-발현되었으나 반응자에서는 검출되지 않았다(또는 거의). 자가분비 방식으로 분비될 때 AREG 단백질이 게피티닙 치료에 대한 NSCLC의 저항성을 지휘하는지 여부를 조사하기 위해 하기 생물학적 분석을 수행하였다. RT-PCR 실험에 의해 PC-9가 아닌 폐-선암 세포주 NCI-H358 및 -H522 내의 AREG mRNA의 발현을 먼저 확인하였다(도 5A). 다음으로, 1.0  $\mu$ M의 게피티닙으로의 PC-9 세포의 처리 72시간 후 유세포분석을 수행하였고 어떠한 처리도 없는 세포와 비교시(6%) 게피티닙이 서브-G1 내의 세포핵의 백분율(24%)을 증가시킴이 판명되었다.

무-혈청 배지 또는 0.5 또는 1.0  $\mu$ M의 게피티닙의 존재시 또는 부재시 NCI-H358 또는 -H522로부터 수득된 무-혈청 조건 배지에서의 배양 후 게피티닙-민감성이고 AREG를 발현하지 않는 PC-9 세포의 활성을 분석하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이 게피티닙을 함유한 무-혈청 조건 배지에서 인큐베이트된 PC-9 세포는 동일한 농도의 게피티닙을 지닌 무-혈청 배지에서 성장된 PC-9 세포보다 더 컸다. 게피티닙의 공급자가 앞서 보고된 바와 같이 게피티닙의 항-종양 효과가 10% FCS의 존재시 감소하고, 이는 이러한 분석이 게피티닙 투여량 및 활성의 정량적 측정에 적당해야함을 제안한다.

AREG가 자가분비 방식으로 분비되는지, 게피티닙 처리된 NSCLC 세포의 아포토시스를 억제하는지 여부를 조사하기 위해 1.0  $\mu$ M의 게피티닙의 존재시 또는 부재시 1~100 ng/ml의 최종 농도로 재조합 AREG 단백질을 포함한 무-혈청 배지 내에서 PC-9 세포를 배양하였다. AREG 및 1.0  $\mu$ M 게피티닙 모두로 인큐베이트된 PC-9 세포의 활성은 AREG-투여량-의존적 방식으로 1.0  $\mu$  게피티닙만으로 인큐베이트된 세포와 비교시 증가되었다(도 5C). 반대로 재조합 AREG 단독으로는 PC-9 세포의 활성에 어떠한 영향도 미치지 않았다(도 5C). 이러한 관찰은 AREG가 게피티닙에 의해 유도된 아포토시스를 억제하나 그 자체로는 세포 활성에 영향을 미치지 않음을 나타내었다. AREG의 면역염색은 도 6에 나타나 있다.

## 토론

많은 증거들이 EGFR 자기분비 경로 내의 분자가 암 증식, 혈관신생 및 전이 전개를 포함한 암 형성 및 진행에 중요한 많은 과정에 관련된다는 관점을 지지한다<sup>5</sup>. 따라서 특이적 시그널링의 치료적 봉쇄는 암 치료를 위한 유망한 전략이 될 수 있다. 합성 아닐리노퀴아졸린인 게피티닙은 수용체의 세포내 도메인 상의 결합 사이트에 대해 삼인산아데노신과 경쟁함으로써 EGFR의 티로신 키나제 활성을 억제한다<sup>7</sup>. 단계 II 실험에서(IDEA 1 및 IDEAL 2), 진행성 NSCLC에 대한 두 번째-, 세 번째-, 네 번째-라인 단일요법으로서의 게피티닙의 이용이 약 20%의 종양-반응률을 달성하였고<sup>8-10</sup>, 이는 통상의 세포독성제로 달성되는 것보다 우수하였다. IDEAL 1 연구에서의 환자의 다변수 분석은 여성의 반응률이 남성보다 높고, 편평세포암종 환자보다 선암 환자에서 반응률이 더 높다고 제안하였다(각각 교차비 2.7 및 3.5)<sup>9</sup>. 최근의 연구는 게피티닙이 효과가 있는 개체가 세기관지폐포 서프타입의 선암을 지니기 쉽고 비흡연자이기 쉽다는 것을 제안하였다(각각 교차비 13.5 및 4.2)<sup>19</sup>. 여기에 보고된 임상적 실험에 기록된 더 높은 종양-반응률(29.4%)는 다른 연구에서 사례가 된 것보다 선암 환자의 높은 비율을 반영한다(46명 선암, 5명 편평세포암종 및 2명 대세포암종). 세기관지폐포암종(BAC) 특징으로 포함한 게피티닙 민감도의 임상병리학적 결정소는 특정한 범위로 예측되나<sup>9,10,19,20</sup>, 앞선 보고 및 우리의 관찰은 게피티닙 처리에 대한 NSCLC의 반응을 완벽하게 예측할 수 있는 것은 없다고 명백하게 제안한다. 따라서 무반응자로부터 반응자를 미리 선별하는 신규한 방법이 임상적 셋팅시 더욱 집중된 게피티닙의 이용을 가능하게 할 수 있다.

cDNA 마이크로어레이 상에서 수득된 진행성 NSCLC의 유전자-발현 프로파일의 통계 분석에 의해 게피티닙에 대한 민감도와 관련된 수십개의 유전자를 확인하였다. 반응자군(PR)과 무반응자군(PD) 사이의 발현 수준의 가장 유의적인 차이를 나타낸 12개 유전자의 발현에 기반하여 예측-특점 시스템을 도입하였다. 이러한 유전자 세트는 폐 선암의 발현 프로파일로부터 선택되었고; 그러나 GRS 시스템은 게피티닙에 대한 임상적 반응에 따라 모든 8명의 "시험" PR 및 PD 사례로 성공적으로 분류하였고, 이들 중 하나는 편평세포암종이었다. 더욱이 이러한 시스템은 중간 종양 반응(SD)을 장기간 동안 종양-정지 효과를 유지하는데 성공한 환자를 나타낸 한 그룹 및 그렇게 되는 것에 실패한 환자를 나타낸 다른 그룹으로 분리하기 쉬웠다.

실용적인 면에서 진행성 NSCLC 환자가 종양의 외과 절제술에 대한 거의 드문 후보이기 때문에 모든 병원에서 유용한 최소한의 침입성 기술을 이용한 개체 종양의 화학민감도를 예측할 필요가 있다. 따라서 예를 들어 탄력적인 기관지점막유경에 의해 수득될 수 있는 암 조직의 양만을 요구하는 예측 시스템을 수립하고자 하였다. 본 방법의 개별적 단계를 검증함으로써 1 mm 정도의 작은 생체검사 표본 내의 유전자 발현을 정확하게 프로파일할 수 있었다. GRS 시스템을 수립하기 위해 관련 마이크로어레이 결과가 가장 차이를 나타낸 12개 유전자에 대한 반-정량적 RT-PCR에 의해 확인되었다. 더욱이 5개의 다른 바이오마커(AREG, TGFA, ADAM9, CD9 및 OSMR)에 대한 항체의 유효성을 확인하였고, 이들 모두는 TBB 및 임프절 생체검사 표본 내에서 무반응자로부터 반응자를 구별함에 있어서 리간드-EGFR 시그널링에 관련된다고 보고되었

다. 더욱이 ELISA에 의해 폐-ADC 환자 내에서 혈청 TGFA 단백질을 검출할 수 있었다. 또한 임상적 이용을 위한 이들 마커의 평가가 필요하다, 혈액의 혈청학적 검사, PCR 실험 또는 생체검사 표본의 면역조직화학적 분석을 이용하여 예측에 요구되는 제한된 수의 유전자는 연구소가 NSCLC 환자에 대한 게피티닙 치료의 효능을 실질적으로 미리 진단할 수 있게 해야 한다.

"초기" 폐암의 외과적으로 절제된 표본의 프로파일은 보고되었으나<sup>21, 22</sup>, 이는 비절제 가능한 "진행성" 폐암의 유전자-발현 프로파일에 대한 첫 번째 보고이다. 그러나 NSCLC로 진단된 환자의 약 70%의 종양이 이미 국부적으로 진행되거나 전이성이고, 이는 일반적으로 이들을 통상의 치료 양상에 저항적이게 한다. 따라서 여기에 목록된 유전자는 폐암 진행의 분자적 메커니즘을 밝히는데 유용해야 하고 약물 개발을 위한 잠재적인 타겟이 된다.

게피티닙은 EGFR-TK의 "선택적" 억제제로서 개발되었다; 그러나 EGFR 활성화 수준과 게피티닙에 대한 반응 사이의 어떠한 명백한 관계도 시험관 내에서 또는 생체 내에서 발견되지 않았다<sup>7, 23</sup>. 임상 실험에서 EGFR의 과발현이 선암에서 덜 빈번하더라도 게피티닙은 편평세포암종보다 선암에 더 효과적이었다<sup>9, 10</sup>. 따라서 어떤 개체 종양이 이러한 치료에 좋은 타겟인지를 확인하는 것이 중요하다. 임상적 표본을 이용한 분석에서 반응자와 무반응자 사이의 EGFR 단백질 발현의 차이는 통계적으로 유의적이지 않았다. 반대로 EGFR 및 다른 ERBB 멤버에 대한 리간드를 인코딩하는 암피레굴린(*AREG*) 및 전환성 성장 인자 알파(*TGFA*)는 무반응자에서 유의적으로 과발현되었으나 반응자에서는 검출 불가능하였다(또는 거의)(각각  $p=0.0000000000093$  및  $0.0095$ ; 표 4).

폐암 세포의 성장 및 생존에서의 리간드 및 EGFR 자가분비 루프의 유의성이 명백하나<sup>24-26</sup>, 암의 형성 및 진행에 있어서의 *AREG*의 역할은 불충분하게 이해된다. 그러나 여러 증거가 *AREG*의 과발현이 NSCLC 환자의 단축된 생존과 관련이 있다고 나타낸다<sup>24</sup>. 더욱이 인간 폐-선암 세포 내의 *AREG*의 항-아포토시스 활성이 최근 보고되었다<sup>25</sup>. *AREG*의 항-아포토시스 활성이 게피티닙 치료에 대한 NSCLC 세포의 저항성을 지휘하는지 여부를 조사하기 위해 게피티닙-민감성이나 *AREG*-비-발현성인 NSCLC 세포주, PC-9를 이용한 생물학적 분석을 수행하였다. PC-9 세포 상의 게피티닙의 항-종양 활성이 *AREG*의 자가분비성 분비에 의해 급격히 감소되었음을 발견하였다. 이러한 증거는 EGFR에 의한 성장-인자 시그널링이 리간드의 다양성, 이량화 파트너, 이펙터(effector) 및 다운스트림 경로 때문에 모든 단계에서 현저하게 복잡화되더라도<sup>26</sup>, *AREG*가 암 진행 및 게피티닙에 대한 저항성을 지휘하는 리간드-수용체 자가분비 성장 경로의 주된 활성제가 됨을 강하게 나타낸다.

EGFR-TK 경로와 관련된 여러 요소가 차별적으로-발현되는 유전자 목록 상에 존재한다. 예를 들어 이중 특이성 포스포타제 3(*DUSP3*), *ADAM9*, *CD9* 및 *OSMR*을 인코딩하는 유전자는 무반응자에서 우세하게 발현되었다(각각  $p=0.00000000094$ ,  $0.01$ ,  $0.000022$  및  $0.0000011$ ). *DUSP3* 유전자는 신호 전달의 중요한 매개자인 미토겐 활성화 단백질 키나제(MAPK)를 탈인산화시킴으로서 EGFR 시그널링을 조절하고<sup>27</sup>, *ADAM9*은 proHB-EGF(프로 헤파린-결합 상피 성장 인자-유사 성장 인자)의 엑토도메인(ectodomain)을 탈락시킴으로서 EGFR 시그널링의 활성화에 관련된다<sup>28</sup>. *CD9*는 트랜스멤브레인 TGFA과 물리적으로 상호작용한다. *CD9* 발현은 트랜스멤브레인의 용해성 TGFA로의 성장 인자- 및 PMA-유도된 단백질 가수분해성 전환을 강하게 감소시키고 TGFA-유도된 EGFR 활성화를 강하게 증가시킨다<sup>29</sup>. *OSMR*은 유방암 세포 내에서 ERBB2와 구성적으로 관련된다고 보고되었다<sup>30</sup>. 게피티닙에 대한 다른 타겟 분자가 제안되었으나 결과는 EGFR 시그널링이 이러한 약물에 대한 반응에 관련된 중요한 과정 중의 적어도 하나 이상임을 제안한다.

게피티닙이 생체 내에서 일부 암세포의 아포토시스를 유도할 수 있기 때문에 *AREG*뿐만 아니라 항-아포토시스 활성을 지닌 다른 분자는 약물에 대한 종양의 저항성에 기여한다. 무반응자에서 특이적으로 발현되는 *AVEN*(아포토시스, 카스파제-활성화 억제제)은( $p=0.00000000042$ ) Bcl-xL의 항-아포토시스 활성을 증가시키고 Apaf-1-매개 카스파제 활성화를 억제한다고 알려져 있다<sup>31</sup>. 반대로 약물 전달을 조절하는 메커니즘은 약물 저항성에도 영향을 미쳐야 한다. 시스플라틴(cisplatin), 에토포시드(etoposide) 및 독소루비신(doxorubicin)과 같은 항암 약물의 세포적 해독에 중요한 역할을 하는 *GCLC*(글루탐산-시스테인 리가제, 촉매 서브유닛)은 무반응자 그룹에서 과발현되었다. 이들 유전자가 종양의 패널 내에서 화학치료에 대한 반응에 음성적으로 상호관련되기 때문에(즉, 이들 유전자 발현이 높을수록 게피티닙에 대한 저항성이 더 커짐) 이들은 저항성을 지휘하는 메커니즘(들)에 관련된다. 또한 후보 예측-유전자의 거의 절반의 기능이 알려져 있지 않았음이 주지되어야 한다. 따라서 게피티닙에 대한 NSCLC의 반응의 기초를 이루는 생물학적 이벤트를 더욱 명백히 밝히는 추가 조사가 필요할 것이다.

요약적으로, 인간 폐 선암 중에서 게피티닙에 대한 반응자와 무반응자 사이에 발현이 유의적으로 다른 51개 유전자를 확인하였고 이러한 약물에 대한 개체 중양에 대한 반응을 예측하기 위해 이들 유전자의 12개의 발현 패턴을 기반으로 수적 특점 시스템을 수립하였다. 더 큰 세트의 임상 사례를 이용한 추가 확인이 필요하나 여기에 나타난 데이터는 시그널-억제 전략의 기초를 이루는 분자적 이벤트 내에 유용한 식견을 산출하고 높은 예측 수치를 지닌 유전자 세트를 시험함으로서 개체 NSCLC 환자에게 게피티닙 치료에 대한 중요한 정보를 제공한다.

#### 참고문헌

1. Fossella, F.V., et al., *Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group.* J Clin Oncol, 2000. 18(12): p. 2354-62.
2. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials.* Bmj, 1995. 311(7010): p. 899-909.
3. Schiller, J.H., et al., *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2002. 346(2): p. 92-8.
4. Kelly, K., et al., *Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial.* J Clin Oncol, 2001. 19(13): p. 3210-8.
5. Baselga, J., *Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy.* Oncologist, 2002. 7 Suppl 4: p. 2-8.
6. Traxler, P., *Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures.* Expert Opin Ther Targets, 2003. 7(2): p. 215-34.
7. Wakeling, A.E., et al., *ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy.* Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5749-54.
8. Herbst, R.S., *Dose-comparative monotherapy trials of ZD1839 in previously treated non-small cell lung cancer patients.* Semin Oncol, 2003. 30(1 Suppl 1): p. 30-8.
9. Fukuoka, M., et al., *Final results from a phase II trial of ZD1839 ('Iressa') for patients with advanced non-small cell lung cancer (IDEAL 1).* Pro Am Soc Clin Oncol 2002. 21;298a(A1188).
10. Kris, MG., et al., *A phase II trial of ZD1839 ('Iressa') in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who had failed platinum- and docetaxel-based regimens (IDEAL 2).* Pro Am Soc Clin Oncol 2002. 21;292a(A1166).

11. Inoue, A., et al., *Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib*. Lancet, 2003. 361(9352): p. 137-9.
12. Bohm, M., et al., *Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue*. Am J Pathol, 1997. 151(1): p. 63-7.
13. Okabe, H., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression*. Cancer Res, 2001. 61(5): p. 2129-37.
14. Kitahara, O., et al., *Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia*. Cancer Res, 2001. 61(9): p. 3544-9.
15. Golub, T.R., et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science, 1999. 286(5439): p. 531-7.
16. MacDonald, T.J., et al., *Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease*. Nat Genet, 2001. 29(2): p. 143-52.
17. Kaneta, Y., et al., *Prediction of sensitivity to STI571 among chronic myeloid leukemia patients by genome-wide cDNA microarray analysis*. Jpn J Cancer Res, 2002. 93, p. 849-856.
18. Pavelic, K., et al., *Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma*. Anticancer Res, 1993. 13(4): p. 1133-7.
19. Kikuchi, T., et al., *Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: Identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs*. Oncogene, 2003. 22(14): p. 2192-205.
20. Heighway, J., et al., *Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification*. Oncogene, 2002. 21(50): p. 7749-63.
21. Beer, D.G., et al., *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma*. Nat Med, 2002. 8(8): p. 816-24.
22. Miura, K., et al., *Laser capture microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles*. Cancer Res, 2002. 62(11): p. 3244-50.
23. Moasser, M.M., et al., *The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells*. Cancer Res, 2001. 61(19): p. 7184-8.

24. Rusch, V., et al., *Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression.* Clin Cancer Res, 1997. 3(4): p. 515-22.
25. Fontanini, G., et al., *Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival.* Clin Cancer Res, 1998. 4(1): p. 241-9.
26. Brundage, M.D., D. Davies, and W.J. Mackillop, *Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress.* Chest, 2002. 122(3): p. 1037-57.
27. Hurbin, A., et al., *Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines.* J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49127-33.
28. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 127-37.
29. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF.* Nature 1999. 402(6764):884-8
30. Nelson, Chau, et al., *Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1.* Molec Cell 2000. 6: p. 31-41.
31. Tipnis, SR., et al., *Overexpression of the regulatory subunit of r-glutamylcysteine synthetase in Hela cells increases r-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance.* Biochem J 1999. 337, p. 559-566.

[표 1]

표 1: 기준선 환자 특성 및 반응의 요약

| 특성                                   | 백분율(%) | 환자 수 |
|--------------------------------------|--------|------|
| 성                                    |        |      |
| 남성                                   | 58.5   | (31) |
| 여성                                   | 41.5   | (22) |
| 연령                                   |        |      |
| 평균                                   | 59     |      |
| 범위                                   | 35-80  |      |
| 조직학                                  |        |      |
| 선암                                   | 86.8   | (46) |
| 편평세포암종                               | 9.4    | (5)  |
| 대세포암종                                | 3.8    | (2)  |
| 단계                                   |        |      |
| IIIA                                 | 1.9    | (1)  |
| IIIB                                 | 7.5    | (4)  |
| IV                                   | 90.6   | (48) |
| 수행 상태                                |        |      |
| 0                                    | 26.4   | (14) |
| 1                                    | 60.4   | (32) |
| 2                                    | 13.2   | (7)  |
| 이전 요법 수                              |        |      |
| 1                                    | 24.5   | (13) |
| 2                                    | 35.9   | (19) |
| 3                                    | 28.3   | (15) |
| 4                                    | 0      | (0)  |
| 5                                    | 7.5    | (4)  |
| 6                                    | 3.8    | (2)  |
| 게피티닙 치료에 대한 반응                       |        |      |
| CR                                   | 0      | (0)  |
| PR                                   | 28.3   | (15) |
| SD                                   | 32.1   | (17) |
| PD                                   | 35.8   | (19) |
| 알려지지 않음                              | 3.8    | (2)  |
| 종양 반응률 (%)<br>(CR+PR/CR+PR+SD+PD)    | 29.4   | (15) |
| 질병 제어율 (%)<br>(CR+PR+SD/CR+PR+SD+PD) | 62.8   | (32) |

[표 2]

| 표 2: 분석에 적당한 사례의 수 및 그의 최상의 전체 반응 |           |    |    |         |    |
|-----------------------------------|-----------|----|----|---------|----|
| 사례 수                              | 최상의 전체 반응 |    |    |         | 합계 |
|                                   | PR        | SD | PD | 알려지지 않음 |    |
| 기록된 모든 사례                         | 15        | 17 | 19 | 2       | 53 |
| 연구에 동의한 사례                        | 15        | 14 | 13 | 1       | 43 |
| 분석에 적당한 사례                        | 8         | 10 | 13 | 1       | 32 |
| 학습 사례 (1)                         | 7         | 0  | 10 | 0       | 17 |
| 시험 사례 (1, 2)                      | 1         | 7  | 3  | 0       | 11 |

(1) 학습 사례는 GRS를 개발하는데 이용된 반면, 시험 사례는 변형에 이용되었음.

(2) 새로 기록된 사례 (4 PD a/c 1 SD) 로부터의 또다른 세트는 이들 11개 시험 사례 후 첨가되었음.

[표 3]

표 3: 환자의 임상병리학적 실태

| 사례<br>번호 | 성별 | 연령        | 조직화<br>형태 (1) | 단계<br>분류 |   |   | 양성<br>화학치료<br>수 | EGFR 염색된<br>종양 세포<br>(%) | EGFR 돌연변이 (3) | 플라스마 게피티닌<br>농도<br>(ng/ml) | 게피티닌에 대한 반응 (4)    |             |             |             | 최상의 전체<br>반응 (5) | 예측<br>가능한<br>이익 (6) | GRS (7) |       |
|----------|----|-----------|---------------|----------|---|---|-----------------|--------------------------|---------------|----------------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|---------------------|---------|-------|
|          |    |           |               | T        | N | M |                 |                          |               |                            | 1st<br>mont        | 2nd<br>mont | 3rd<br>mont | 4th<br>mont |                  |                     |         |       |
| (°)      |    |           |               |          |   |   |                 |                          |               |                            |                    | h           | h           | h           | h                |                     |         |       |
| LC01     | 여성 | 36        | ADC           | 1        | 0 | 1 | IV              | 1                        | 80            | 검출안됨                       | 258.9              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC02     | 남성 | 64        | ADC           | 2        | 3 | 1 | IV              | 3                        | 80            | 검출안됨                       | 140.3              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC03     | 남성 | 54        | ADC           | 2        | 0 | 1 | IV              | 3                        | 80            | 검출안됨                       | 167.0              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC04     | 여성 | 75        | ADC           | 2        | 1 | 1 | IV              | 1                        | 20            | 검출안됨                       | 169.7              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC05     | 여성 | 73        | ADC           | 0        | 2 | 1 | IV              | 5                        | 30            | 46 A750del(2481 2495)      | 300.6              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC06     | 여성 | 75        | ADC           | 4        | 1 | 1 | IV              | 3                        | 80            | 검출안됨                       | 874.0              | SD          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC07     | 여성 | 70        | ADC           | 2        | 1 | 1 | IV              | 3                        | 80            | 47 A750del(2485 2496)      | 460.8              | SD          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 100   |
| LC08     | 여성 | 47        | ADC           | 4        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 95            | L858R(2819T>G)             | 306.5              | PR          | PR          | PR          | PR               | PR                  | 합승      | 54.8  |
| 평균(범위)   |    | 62(36-75) |               |          |   |   | IV              | 2.6(1-5)                 | 64(20-95)     |                            | 334.7(140.3-874.0) |             |             |             |                  |                     |         |       |
| LC09     | 여성 | 63        | ADC           | 4        | 0 | 1 | IV              | 3                        | 90            | 검출안됨                       | 743.4              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | 61.6  |
| LC10     | 남성 | 56        | ADC           | 2        | 0 | 1 | IV              | 6                        | 70            | 검출안됨                       | 511.8              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -9.8  |
| LC11     | 남성 | 67        | ADC           | 4        | 0 | 1 | IV              | 2                        | 0             | 검출안됨                       | 631.3              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -5.3  |
| LC12     | 남성 | 53        | ADC           | 4        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 40            | 검출안됨                       | 306.1              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -23.8 |
| LC13     | 여성 | 56        | ADC           | 4        | 2 | 0 | IIIB            | 2                        | 40            | 검출안됨                       | 364.8              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -58.5 |
| LC14     | 여성 | 62        | ADC           | 4        | 2 | 1 | IV              | 3                        | 60            | 검출안됨                       | 322.4              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -83   |
| LC15     | 남성 | 61        | ADC           | 0        | 0 | 1 | IV              | 5                        | 60            | 검출안됨                       | 278.9              | SD          | SD          | SD          | SD               | SD                  | 합승      | -40.5 |
| 평균(범위)   |    | 60(53-67) |               |          |   |   | IV              | 3.3(2-6)                 | 53(0-90)      |                            | 451.2(278.9-631.3) |             |             |             |                  |                     |         |       |
| LC16     | 남성 | 42        | ADC           | 4        | 3 | 1 | IV              | 5                        | 90            | 검출안됨                       | 212.6              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -63.9 |
| LC17     | 여성 | 54        | ADC           | 2        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 50            | 검출안됨                       | 320.6              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -86   |
| LC18     | 여성 | 61        | ADC           | 1        | 3 | 0 | IIIB            | 2                        | 30            | W817C(2697G>T)             | 229.3              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -67.8 |
| LC19     | 남성 | 59        | ADC           | 0        | 2 | 1 | IV              | 2                        | 30            | 검출안됨                       | 150.7              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -57.1 |
| LC20     | 남성 | 65        | ADC           | 0        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 30            | 검출안됨                       | 167.8              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -59.1 |
| LC21     | 남성 | 55        | ADC           | 0        | 3 | 1 | IV              | 3                        | 80            | 검출안됨                       |                    | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -73.1 |
| LC22     | 남성 | 80        | ADC           | 4        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 80            | Q787Q(2607G>A)             |                    | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -55.5 |
| LC23     | 남성 | 35        | ADC           | 4        | 0 | 1 | IV              | 5                        | 0             | 검출안됨                       |                    | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -100  |
| LC24     | 남성 | 57        | ADC           | 4        | 3 | 1 | IV              | 1                        | 0             | 검출안됨                       |                    | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -46.7 |
| LC25     | 여성 | 65        | ADC           | 2        | 0 | 1 | IV              | 1                        | 0             | 검출안됨                       | 356.3              | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -86.1 |
| LC26     | 남성 | 64        | ADC           | 3        | 3 | 1 | IV              | 2                        | 10            | 검출안됨                       | 405.6              | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -67.7 |
| LC27     | 여성 | 65        | ADC           | 4        | 2 | 1 | IV              | 1                        | 10            | 검출안됨                       |                    | SD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -69.4 |
| LC28     | 남성 | 74        | ADC           | 2        | 1 | 1 | IV              | 1                        | 10            | L858R(2819T>G)             |                    | PD          | PD          | PD          | PD               | PD                  | 합승      | -64.8 |
| 평균(범위)   |    | 60(35-80) |               |          |   |   | IV              | 2.3(1-5)                 | 49(0-90)      |                            | 263.2(150.7-405.6) |             |             |             |                  |                     |         |       |

- (1) ADC: 선암; SCC: 편평세포암종.  
 (2) TNM 임상 분류 및 단계 그룹화는 UICC/WHO 분류에 기반하여 평가됨.  
 (3) EGFR (GenBank: AF037503)의 모든 외인자 709-870 bp 부위로부터 활성 돌연변이(사)의 돌연변이.  
 (4) 게피티닌에 대한 반응은 UICC/WHO 표준에 따라 평가됨. PR: 부분적 반응, SD: 안정적 질병, PD: 진행성 질병.  
 (5) 전체 활성의 반응은 치료 첫 번째 평가 시점에 기록된 후 4주마다 평가됨. PR, 부분적 반응, SD, 안정적 질병, PD, 진행성 질병.  
 (6) 활성: GRS 기법에 이용된 표본 시점, GRS의 확인에 이용된 표본.  
 (7) GRS: 예측 시스템에 의해 측정된 게피티닌 반응.  
 (8) 추가적 GRS 확인을 위해 5개 세포 기독된 사례 (4 PD alc 1 SD)로부터의 표본의 또다른 플라이드 세트도 이들 28개 사례 후 첨가되었음.

[표 4]

표 4. 게피티닙에 대한 무반응자 (PD)로부터 반응자 (PR)을 구별하기 위한 51개 후보 유전자의 목록 (\*)

| 순위 | GenBank  | 기호       | 유전자 명칭                                                              | 우세하게<br>발현되는 클래스 | 순열<br>p-수치 | 평균-폴드<br>차이 (log2) |
|----|----------|----------|---------------------------------------------------------------------|------------------|------------|--------------------|
| 1  | NM_0248  | FLJ2266  | hypothetical protein FLJ22662                                       | PD               | 8.1E-12    | 2.0                |
| 2  | BC00979  | AREG     | amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)                     | PD               | 9.3E-12    | 8.0                |
| 3  | NM_0143  | CORO1C   | coronin, actin binding protein, 1C                                  | PD               | 2.3E-10    | 4.6                |
| 4  | BC01048  | AVEN     | apoptosis, caspase activation inhibitor                             | PD               | 4.2E-10    | 4.3                |
| 5  | NM_0040  | DUSP3    | dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-rel) | PD               | 9.4E-10    | 4.4                |
| 6  | AI026836 | DJ473B4  | hypothetical protein DJ473B4                                        | PD               | 1.7E-09    | 8.0                |
| 7  | BU50050  | PHLDA2   | pleckstrin homology-like domain, family A, member 2                 | PD               | 1.8E-09    | 8.0                |
| 8  | NM_0160  | RBM7     | RNA binding motif protein 7                                         | PD               | 1.8E-08    | 2.9                |
| 9  | BX092512 | EST      | EST                                                                 | PD               | 7.7E-08    | 3.0                |
| 10 | AI436027 | OSMR     | oncostatin M receptor                                               | PD               | 1.1E-07    | 3.7                |
| 11 | AI971137 | GCLC     | glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit                        | PD               | 1.2E-07    | 3.9                |
| 12 | BQ02487  | COL4A3   | collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein    | PD               | 2.0E-07    | 3.6                |
| 13 | U52522   | ARFIP2   | ADP-ribosylation factor interacting protein 2 (arfaplin 2)          | PD               | 2.6E-07    | 2.8                |
| 14 | BM99605  | C10orf9  | chromosome 10 open reading frame 9                                  | PD               | 4.2E-07    | 2.6                |
| 15 | AK025452 | NIP30    | NEFA-interacting nuclear protein NIP30                              | PD               | 5.1E-07    | 3.7                |
| 16 | N52048   | KIAA0771 | KIAA0776 protein                                                    | PD               | 5.4E-07    | 7.2                |
| 17 | AA50700  | SLC35F2  | solute carrier family 35, member F2                                 | PD               | 6.0E-07    | 5.8                |
| 18 | AA226243 | GAMLG    | calcium modulating ligand                                           | PD               | 6.8E-07    | 5.0                |
| 19 | AF005888 | NOC4     | neighbor of COX4                                                    | PD               | 1.1E-06    | 4.0                |
| 20 | AF012281 | PDZK1    | PDZ domain containing 1                                             | PD               | 1.3E-06    | 4.5                |
| 21 | AI188190 | DIS3     | mitotic control protein dis3 homolog                                | PD               | 1.7E-06    | 3.8                |
| 22 | BC00153  | CGI-48   | CGI-48 protein                                                      | PD               | 2.0E-06    | 3.5                |
| 23 | NM_00701 | CPSF6    | cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68kDa               | PD               | 2.2E-06    | 3.4                |
| 24 | NM_00221 | KIF3C    | kinesin family member 3C                                            | PD               | 2.2E-06    | 3.5                |
| 25 | BQ13523  | CD9      | CD9 antigen (p24)                                                   | PD               | 2.2E-06    | 1.7                |
| 26 | BC05132  | LRRCB8   | leucine rich repeat containing 8                                    | PD               | 2.5E-06    | 3.4                |
| 27 | BC03850  | SNF1LK   | SNF1-like kinase                                                    | PD               | 2.6E-06    | 2.8                |
| 28 | U78556   | CRA      | cisplatin resistance associated                                     | PD               | 2.7E-06    | 3.7                |
| 29 | BC03562  | EGR2     | early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)               | PD               | 3.4E-06    | 3.0                |
| 30 | X52426   | KRT13    | keratin 13                                                          | PD               | 1.9E-05    | 3.4                |
| 31 | NM_00551 | BCAT1    | branched chain aminotransferase 1, cytosolic                        | PD               | 2.3E-05    | 1.7                |
| 32 | NM_0066  | SDCCAG   | serologically defined colon cancer antigen 3                        | PR               | 2.6E-05    | 3.7                |
| 33 | AA46409  | PIGK     | phosphatidylinositol glycan, class K                                | PD               | 3.2E-05    | 1.1                |
| 34 | AA96118  | MRPS9    | mitochondrial ribosomal protein S9                                  | PD               | 9.8E-05    | 2.3                |
| 35 | NM_0181  | ASPM     | asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)   | PR               | 2.3E-04    | 2.8                |
| 36 | NM_0227  | ACBD3    | acyl-Coenzyme A binding domain containing 3                         | PD               | 2.4E-04    | 3.8                |
| 37 | AA160544 | ZNF325   | zinc finger protein 325                                             | PR               | 2.7E-04    | 4.5                |
| 38 | AK05765  | LOC285   | hypothetical protein LOC285513                                      | PD               | 2.7E-04    | 3.8                |
| 39 | NM_0033  | TSSC1    | tumor suppressing subtransferable candidate 1                       | PD               | 2.9E-04    | 4.7                |
| 40 | BC007451 | XAB1     | XPA binding protein 1                                               | PD               | 3.0E-04    | 1.3                |
| 41 | BC035467 | HNLF     | putative NFkB activating protein HNLF                               | PR               | 3.5E-04    | 1.1                |
| 42 | CK004097 | EIF4EBP  | eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2       | PR               | 3.6E-04    | 1.4                |
| 43 | NM_14461 | MGC232   | hypothetical protein MGC23280                                       | PR               | 4.2E-04    | 2.3                |
| 44 | NM_00461 | SSA2     | Sjogren syndrome antigen A2 (60kDa, ribonucleoprotein autoantigen)  | PR               | 4.2E-04    | 1.2                |
| 45 | NM_0027  | PRKACA   | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha                    | PR               | 5.0E-04    | 1.2                |
| 46 | NM_00511 | FEZ2     | fasciculation and elongation protein zeta 2 (zyglin II)             | PD               | 6.1E-04    | 3.3                |
| 47 | NM_0058  | SRRM1    | serine/arginine repetitive matrix 1                                 | PR               | 7.0E-04    | 1.4                |
| 48 | NM_00621 | PDGFRL   | platelet-derived growth factor receptor-like                        | PD               | 7.0E-04    | 2.4                |
| 49 | AI096936 | SNX13    | sorting nexin 13                                                    | PR               | 8.4E-04    | 1.6                |
| 50 | NM_01471 | KIAA0251 | KIAA0258 gene product                                               | PD               | 8.9E-04    | 2.5                |
| 51 | BF973104 | TOM7     | homolog of Tom7 (S. cerevisiae)                                     | PR               | 1.0E-03    | 1.5                |

(\*) 12개 및 51개 유전자 세트가 0.001 이하인 순열 p-수치의 순위-순서로 목록되었음.

|                                                               |           |            |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------|-----------|------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 표 4A. 게피티닙에 대한 무반응자 (PD)로부터 반응자 (PR)을 구별하기 위한 132개 후보 유전자의 목록 |           |            |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 순위                                                            | 순서        | GenBank ID | 유전자 기호                        | 유전자 명칭                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                               |           |            |                               | 뉴클레오타이드                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 1                                                             | NM_024829 | FLJ22662   | hypothetical protein FLJ22662 | ATAGGGCATCCATGAAATATAT<br>CATCGGATACAACAATTATAAG<br>AAGGATCCTTACAGTAGAGTG<br>AACCCTGTAATACCATCTGCTG<br>CCGTGAGGACCTGAAGTACCT<br>AACCACAGTCTCGAGGTTGT<br>ATGACACAAAGGTGGAGATAT<br>CTACCTAGCATCTCAGTACACA<br>TCCTATGCCATAAGTGGTCCCA<br>CAGTACAAGGTGGCTCCCTGT<br>TTTGGCTGGGACCGTTTCAAC<br>AAACTCTACATCAGGGCATGC<br>CAGAGTCTACAACCTTGAATT<br>TATTACCATGAACCAATTTG<br>AAACTTGATATAAAATGAAGGA<br>GGGAGATGACGGACTAGAGAC |

|   |          |      |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---|----------|------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | BC009799 | AREG | <u>amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)</u> | <div>CCTCCTGGGCTCTTCCACCC<br/>CGCTCGTTTGGGGAGCTCGT<br/>GTCCAGAGACCGAGTTGCCCC<br/>AGAGACCGAGACCGCGCGCTG<br/>CGAGGACCAATGAGAGCCCG<br/>CTGCTAGCGCGGCGCGGTGG<br/>TGCTGTGCTCTTGATACTGG<br/>CTCAGGCCATTATGCTGCTGA<br/>TTGGACCTCAATGACACCTACT<br/>CTGGGAAGCGTGAACCATTTTC<br/>TGGGACCCACGTGCTGATGGA<br/>TTTGAGGTTACCTCAAGAAGTG<br/>AGATGCTTTCAGGGAGTGAGAT<br/>TTCCCTGTGAGTGAAATGCCT<br/>TCTAGTAGTGAACGCTCCTCGG<br/>GAGCCGACTATGACTACTCAGA<br/>AGAGTATGATAACGACCAAA<br/>ATACCTGGCTATATTGTGATG<br/>ATTCAAGTCAGAGTTGAACAGGT<br/>AGTTAGCCCCCCCAMAACAG<br/>ACGAAAGTGAAAATACCTCAG<br/>ATAAACCCAAAAGAGAAAAA<br/>GGGAGGCCAAAATGGAAAAAT<br/>AGAAGAACAGAAAAGAGAAA<br/>ATCCATGTAATGCAGAAATTCA<br/>AAATTCTGCATTCCGGAGAA<br/>TGCAATATATAGAGCACCTGG<br/>AAGCAGTAACATGCAAAATGCA<br/>GCAAGAAATTTCCGTGAACGG<br/>TGTTGGGAAAAGTCCATGAAA<br/>CTCACAGCATGATTGACAGTAG<br/>TTTATCAAAATTCATTAGCA<br/>GCCATAGCTGCCCTTATGCTG<br/>CTCTGATCTTCACAGCTTTGC</div> |
|---|----------|------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

GATAGGCCACATTCCAGTAAGA  
ACTCAATTGTCTCCCAATTT  
GCAGAACAAACGTGATTAA  
AAGCTAGCTTTTATCAGAA  
GCTTTTGTGTTTAAAGTGT  
TATGTACTGTGACTTTTT  
AAAAAGTGCTACTTTAAATC  
CCAGATACTCTGAATTTAGAA  
AACAACTAATTCGATTGTGT  
CGTGCCCAAGTACCTTTTTT  
TTTAATGAGTAGGACCAATGC  
CACATTGCTTTTATATTTCTT  
TCTTTTTAATGTGCAAAAC  
CAAAAGTACTTTGTTTCCTT  
TGTATTTGCTACTTTGCAGTA  
TTTGTGTGTGTTTTC  
CTTAATTGAAGGACACAC  
TGTGTATGTTA

coronin, actin binding protein, IC

CORO1C

3 NM\_014325

AGGAGACCAATTGGAAGAAGAA  
CTAGATCTCTTGTCTTAATTAG  
ATGCACCTATAAAGAGGAGAGA  
TAACATCTTACAGATCAGACG  
TCTCAGGAGCTGAAATCCAAGG  
AAGATGGGAGGTGCTCCAAGA  
GGAAGAAGTTTGTCAAAAACA  
TCTGTGACTGAAGAAAAAACA  
TGGAACTGACCAACCAAGTAC  
CTCCAAAATGTTACCGAGAA  
GAGCTGAAGACTGTTGGACA  
GCATGATTTCTTAAAAGGGA  
AAAAAGTCCCTGAAGCAATC  
TTGGTTGCCCTCTAACGGCAGG  
TGGCATAAGGCTGCTCTCAG  
GACCAGCCAGTTACAAAGCATG  
TCTCAAGCTAGTGTGTTCCATT  
ATGCTCACAGCAGTAAATGCCT  
ACCTCTGTGTTGACATCTGAA  
AGAATACATTGAAGCAGCTTGT  
TGCATTTGTTTTCTGGCTTAG  
TAATCTAATAGATTCTCTTAAG  
GCCAGAGATAGACTCTGGCCC  
TTGTTCTAGCCTCCTTCTTG  
CAGTGTTTACACATAGCCAGT  
GTTTACAGCATAGCA

apoptosis, caspase activation inhibitor

AVEN

4 BC010488

|             |         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------|---------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 NM_004090 | DUSP3   | dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related) | GGATCCTTTATTGGTGTAGAG<br>CAAAAAACCAACAGATAA<br>ACCTTTCAAAAGACTTCTAAG<br>GATGATATGGATCCACGAGC<br>CCTCACATGTGTATGCACATTT<br>GCCAGATATAAGAGTTTGT<br>TTAATACAGTCTTGTAGGAT<br>TTTACGTTTGTATTATGGA<br>AAGTATTGTGATGCTATTAT<br>CTTCAGGTCACCTCTGG            |
| 6 AI026836  | DJ473B4 | hypothetical protein dJ473B4                                            | GCAGTCGTTTCAACCAGGTAGT<br>TTTGGGTTGTTTAAAGCCT<br>TTTGAGGCTTACACATTATTA<br>ACTTTAAATAATCAGGCAGCT<br>AAGAATAATTACTAGAAAAATC<br>ATCTACCACTTCAACATGCTC<br>AACTACTTCAAACTGCACCTA<br>GAGAATCAGGTACTGAGTAG<br>ACAAGAGCCTGGAGGTGGAC<br>TTTGAGAGGAGGGGAATACCC |

TACGTGTAAGTTCACCATCGTCA  
CCACGACCAAGGAGATCGA  
CTTCGCTGGCGGGGAGAGC  
TGCTGGAACGGGGCATCGGGC  
TGGGCTCATCGATTCCAGAA  
CCGCCGGCCCTGCAGGACTTT  
CGCAGCGCCAGGAAGCACCG  
CACCGCGCACCGCCGAGGA  
CGCGTGGCTGCGGGGGCGCC  
GCACCTCGAGGCTCGGAGC  
CCTCCAGGCAATCCCGCAGCC  
CAACCCCGCAGCCCATGAGCC  
CGCGCGGGCCATACGCTGGAC  
GAGTCGAGCGAGGCTAGGACG  
TGGCGGCGCTCTCCAGCCCTG  
CAGCAGAAGAACTTCCCGTGG  
CGCGATCTCGCTCCGTTGCA  
CGGGGCGCTTAAGTTATGGAC  
TATCTAATATCTATGATTTAT  
TTGCTGGTTCTTTCTAGTCAC  
ATATTTATAGTCTTAATATCT  
TGTTTTGCATCATCTGCCCCA  
TTGCAATATCATCTTGGCCA  
GTTTGGCTTTCTACCATCC

pleckstrin homology-like domain, family A, member  
2

PHLDA2

7 BU500509

CTGTGACATGCTCTTGAGCTTT  
ACCCTAGTTGAACATACATGTG  
TAGATTTACACATACATGTTCA  
TTNNNAATTTAGAAATTGTTC  
ATTAATCCCATTTGAGGTATA  
AGTCACTCAGGAAGTTAAAATA  
TCTCTACAGGTATATTTTACA  
TTAAAAATACAGTGTAGCATTA  
ANNNNCCCTTTNNNNGAAGAA  
CAAAATGTCAGTGCATAGTTA  
GATAAAATGTTAAATGTTTAA  
CTGAAAGCATACTTTTGTGAA  
AATAGATTCAATCAGCCCTTAA  
GTGCTGCTTCTGTGAGTCAAAC  
GTTAAAACTTTACATTTTCA  
AAGTCCCAGACTGTGTACAAA  
GACACATGTAATGGAGATTGTA  
CAGGTGTGTTTTTGTGTAAC  
CTTGAAGAGTTTAATCTTAA  
CGTTTCTAATTTTAAAAATTT  
AAATCTTGTGTTACAAAAGCT  
TGTATTAGATACGTGTTTCAT  
TTCATTACAGAAATGTTTATAA  
AAGTTCAATTTGTTGAAAANNA  
GGATCCCTTTTAAACACAGC  
ATTGTACTGTTCTCT

RNA binding motif protein 7

RBM7

8 NM\_016090

|    |                 |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|-----------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9  | <u>BX092512</u> | EST                                      | ATATGTGCACACACACTCAC<br>ACCCACACCCATAAAGATTTG<br>CACTCCTTGAAGGTACTAAC<br>TCACCATTTTATCATACTAT<br>CCAGTGTGCCACAGTACTGG<br>CTTATATGCCCTGTCTGTCTAT<br>CTTATTTTATCTGTCTCCACAA<br>CACAGCAAACTACCTGGCTTC<br>AATAAAGGGCTTATGATTATT<br>CATGAATCCATTTGGCAGGTG<br>CCTAGCCCTGTGTCTGGCTGA<br>AGCAGGTGTTCCCAAGGTGTGG<br>CATGGCTGAGTGAATACAAAT |
| 10 | AI436027        | <i>OSMR</i><br><br>oncostatin M receptor | CACCAATGAGCTTACTACCCAA<br>CTTCAAAACTAGGACTCTAACA<br>ATAACTTCTGTCAATATCTCATC<br>CTGTAAAGGCCGCCAGCTTCGCT<br>CCTTCGCCCAAGATAATATCA<br>CTTTAAATTGTGTGCGTGTGA<br>TTCTCATTTCTTATGTGATGGT<br>AAAAATGCCITTATTTTGTGTG<br>GTTTTAATGCATAGAAAGGACA<br>TCAAGCTGT                                                                              |

|             |      |                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11 AI971137 | GCLC | glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit | CTCTAAAGCCATTCACTCCAG<br>ATTTTACCTGGGAATATCTA<br>CATACTGCTTACTTTCTCTATA<br>AACTCATCAATAAATCATGAA<br>AGGCACTGAGTTTGTAAATCA<br>GGACCCCTAAATGTTTAATTGA<br>AATAAGTTTCAGATAAATTATTA<br>TAGCTTTGCGTTGAAGTTNNN<br>NNNNTTTTTCTCACTAGTTA<br>AGTCAACTGCTTCTGAAATAC<br>TCTGTATTGTAGATTATGCAGA<br>TCITTACAGGCATAAATATTTA<br>AACTGTAATATGCTAACTTGAA<br>GAGATTGCAATAAAGCTGCTTC<br>AGCTAAC |
|-------------|------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

CTCAGTGAAGTTGAAATGACTG  
CCCACTTCAAAATCTTCAATGT  
GTTTACACACCAGTGATTTAT  
ACAAATCAGAGGCAITTTGTAG  
ATGCTTTGCTGACTTGTTCAGC  
TCTGTAAACACAGAAATCAG  
ACCCATTTTGTAAAGCGAAAA  
TCATGTTACATGGAACATGTCC  
TGATATATCACATACATGGA  
ATGGAGCTTAAATCAATAGTGC  
AAGATAATAATTTAATGATGGG  
ATTAGTCTGATCGCTTAATATG  
CACAATCCTGGAAGTGAATTAC  
TTGCATCAGATATAGTGATATT  
TATTATTCTGTACAGAGAGAAA  
AATACATATAAAACATATGCTT  
ACATTACATGCACCGGATTTC  
ATGCTCCATAATCTTTCTATT  
TTTAAATTAGCTTTCTGTAAA  
TGATGTGCATGGAATATGCCTT  
ATAGAAAAATCTGTTCATAAT  
TTGACTAGCTGGAAAAAGTGCT  
ATATGGTGGTAACTAGTAAG  
GCA

collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)  
binding protein

COL4A3BP

12 BQ024877

[표 5]

표 5A. cDNA 마이크로어레이와 반-정량적 RT-PCR과의 상관관계

|       |               | Spearman 순위 상관관계 |      |
|-------|---------------|------------------|------|
| 순위 순서 | 유전자 기호        | p                | p-수치 |
| 1     | FLJ22662      | 0.69             | 0.02 |
| 2     | AREG          | 0.53             | 0.08 |
| 3     | CORO1C        | 0.35             | 0.24 |
| 4     | AVEN          | 0.63             | 0.04 |
| 5     | DUSP3         | 0.63             | 0.04 |
| 6     | DJ473B4       | 0.45             | 0.14 |
| 7     | PHLDA2        | 0.84             | 0.01 |
| 8     | RBM7          | 0.83             | 0.01 |
| 9     | EST(BX092512) | 0.63             | 0.04 |
| 10    | OSMR          | 0.67             | 0.03 |
| 11    | GCLC          | 0.46             | 0.13 |
| 12    | COL4A3BP      | 0.27             | 0.24 |

모든 12개 유전자에 대해 양성 상관관계 및 12개 유전자 중 7개에 대해 유의적으로 양성임.

표 5B. 면역조직화학 염색의 결과

|       | PR  | PD  |
|-------|-----|-----|
| AREG  | 1/5 | 5/6 |
| TGFA  | 2/5 | 6/6 |
| ADAM9 | 1/5 | 4/6 |
| CD9   | 2/5 | 5/6 |
| OSMR  | 2/5 | 6/6 |

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

erbB 수용체 티로신 키나제 억제제에 대해 반응자 및 무반응자인 환자 사이에 차별적 발현을 지닌 것으로 확인된 적어도 하나 이상의 유전자를 포함한 분리된 마커 유전자 세트에 있어서; 상기 유전자 세트는 상기 유전자로부터 유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함한 표 4에 목록된 51개 유전자로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 포함함을 특징으로 하는 분리된 마커 유전자 세트

### 청구항 2.

표 4에 목록된 첫 번째 40개 유전자의 적어도 하나 이상을 포함한 제 1항에 따른 세트

### 청구항 3.

표 4에 목록된 첫 번째 20개 유전자의 적어도 하나 이상을 포함한 제 1항에 따른 세트

### 청구항 4.

표 4에 목록된 첫 번째 12개 유전자의 적어도 하나 이상을 포함한 제 1항에 따른 세트

### 청구항 5.

표 4에 목록된 첫 번째 5개 유전자의 적어도 하나 이상을 포함한 제 1항에 따른 세트

## 청구항 6.

표 4에 목록된 첫 번째 12개 유전자 즉, FLJ22622(즉, GenBank NM\_024829), AREG(즉, GenBank BC009799), CORO1C(즉, GenBank NM\_014325), AVEN(즉, GenBank BC010488), DUSP3(즉, GenBank NM\_004090), DJ473B4(즉, GenBank AI026836), PHLDA2(즉, GenBank BU500509), RBM7(즉, GenBank NM\_0106090), EST(GenBank BX0952512), OSMR(즉, GenBank AI436027), GCLC(즉, GenBank AI971137), COL4A3BP(즉, GenBank BQ024877)임을 특징으로 하는 제 1항에 따른 세트

## 청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 유전자는 표 4a에 나타난 서열을 포함함을 특징으로 하는 세트

## 청구항 8.

제 6항에 있어서, 상기 세트는 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 올리고뉴클레오타이드는 표 4a에 나타난 서열의 5개 내지 50개 뉴클레오타이드를 포함함을 특징으로 하는 세트

## 청구항 9.

상기 어느 한 항에 있어서, 상기 억제제는 게피티닙(gefitinib), OSI-774, PKI-166, EKB-569, GW2016 및 CI-1033으로부터 선택됨을 특징으로 하는 세트

## 청구항 10.

제 9항에 있어서, 상기 약제는 게피티닙임을 특징으로 하는 세트

## 청구항 11.

제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에 있어서, 상기 억제제는 항-erbB 항체임을 특징으로 하는 세트

## 청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 항체는 트라추주마브(trastuzumab) 또는 세톡시마브(cetuximab)임을 특징으로 하는 세트

## 청구항 13.

erbB 수용체 키나제 억제제로의 치료에 대한 암 환자 또는 환자군의 반응성을 예측하거나, 하나 이상의 마커 유전자의 차별적 발현을 비교하는 것을 포함한 erbB 수용체 키나제 억제제에 대해 반응할 환자 또는 환자군을 선택하는 방법에 있어서, 상기 마커 유전자는 제 1항 내지 제 6항의 어느 한 항에서 정의된 유전자 세트로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법

**청구항 14.**

제 13항에 있어서, 상기 환자의 반응성은 약물 반응 득점(Drug Response Score)의 생성에 의해 표현됨을 특징으로 하는 방법

**청구항 15.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 상기 비교는 마이크로어레이 분석에 의해 수행됨을 특징으로 하는 방법

**청구항 16.**

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 상기 비교는 면역조직화학에 의해 수행됨을 특징으로 하는 방법

**청구항 17.**

제 16항에 있어서, 상기 방법은 암피레굴린(amphiregulin)의 차별적 발현을 검출하는 것을 포함함을 특징으로 하는 방법

**청구항 18.**

제 13항 내지 제 17항에 있어서, 상기 억제제는 제 9항 내지 제 12항의 어느 한 항에서 정의된 것임을 특징으로 하는 방법

**청구항 19.**

적당한 지지 배지 상에서 제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에서 정의된 그룹으로부터 선택된 마커 유전자 세트를 포함한 제 13항 내지 제 18항의 방법에 사용되는 진단 키트

**청구항 20.**

마이크로어레이를 포함한 제 19항에 따른 키트

**청구항 21.**

제 9항 내지 제 12항의 어느 한 항에 따라 억제제를 투여하고 마커 유전자 세트의 차별적 발현을 시험하는 것을 포함한 암 환자의 치료 방법에 있어서, 상기 세트는 제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에서 정의된 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법

**청구항 22.**

NSCLC를 지닌 환자로부터의 조직 표본 내의 유전자 발현 수준을 측정하기 위해 유전자로부터 유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함한 표 4에 목록된 51개 유전자로 구성된 군으로부터 선택된, 분리된 유전자 서열의 이용

**청구항 23.**

제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에서 정의된 분리된 마커 유전자 세트를 포함하고, 그의 적어도 하나 이상의 유전자가 부착된 지지 물질을 포함한, NSCLC 환자로부터의 조직 표본 내의 유전자로부터 유래된 유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함한 표 4에 목록된 51개 유전자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 수단을 포함한 진단 키트

#### 청구항 24.

제 13항의 방법에 따른 확인된 NSCLC 환자의 치료시 제 9항 내지 제 12항의 어느 한 항에서 정의된 억제제의 이용

#### 청구항 25.

erbB 수용체 티로신 키나제 억제제를 환자에게 투여하는 것으로 포함한 제 13항 내지 제 17항의 어느 한 항의 방법에 따라 확인된 NSCLC를 지닌 환자 또는 환자군의 치료 방법

#### 청구항 26.

제 13항 내지 제 17항의 어느 한 항의 방법에 따라 확인된 NSCLC를 지닌 환자 또는 환자군의 치료를 위한 약물의 제조시 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제의 이용

#### 청구항 27.

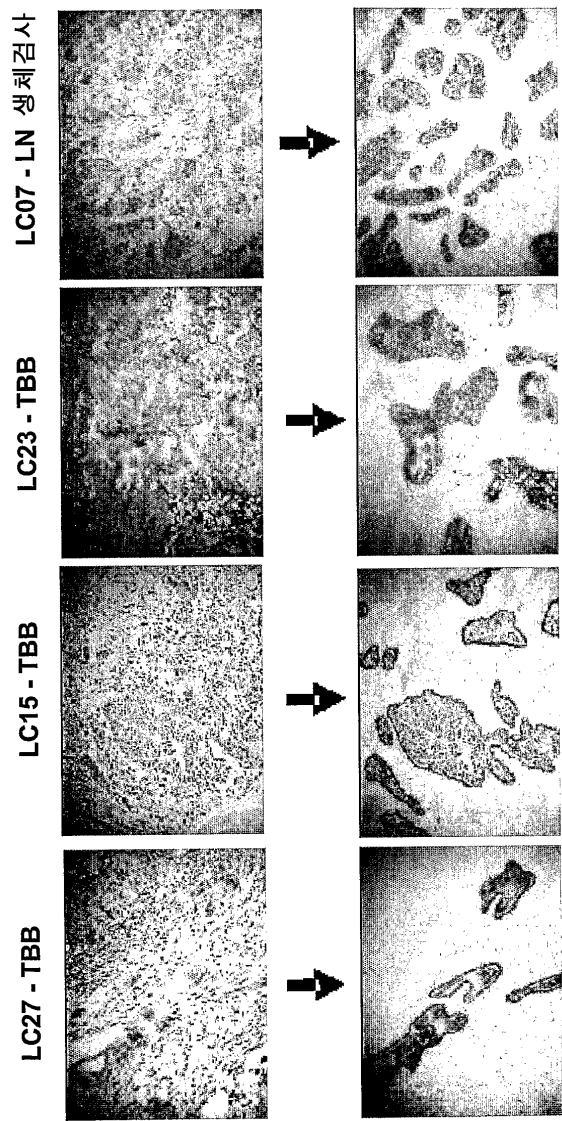
환자를 치료하고, 화합물이 관련 대조군에 대해 제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에 따른 마커 유전자 세트로부터의 적어도 하나 이상의 유전자의 유전자 발현을 조절하는지 여부를 평가하는 것을 포함한 erbB 수용체 티로신 키나제 억제제의 시험 방법

#### 청구항 28.

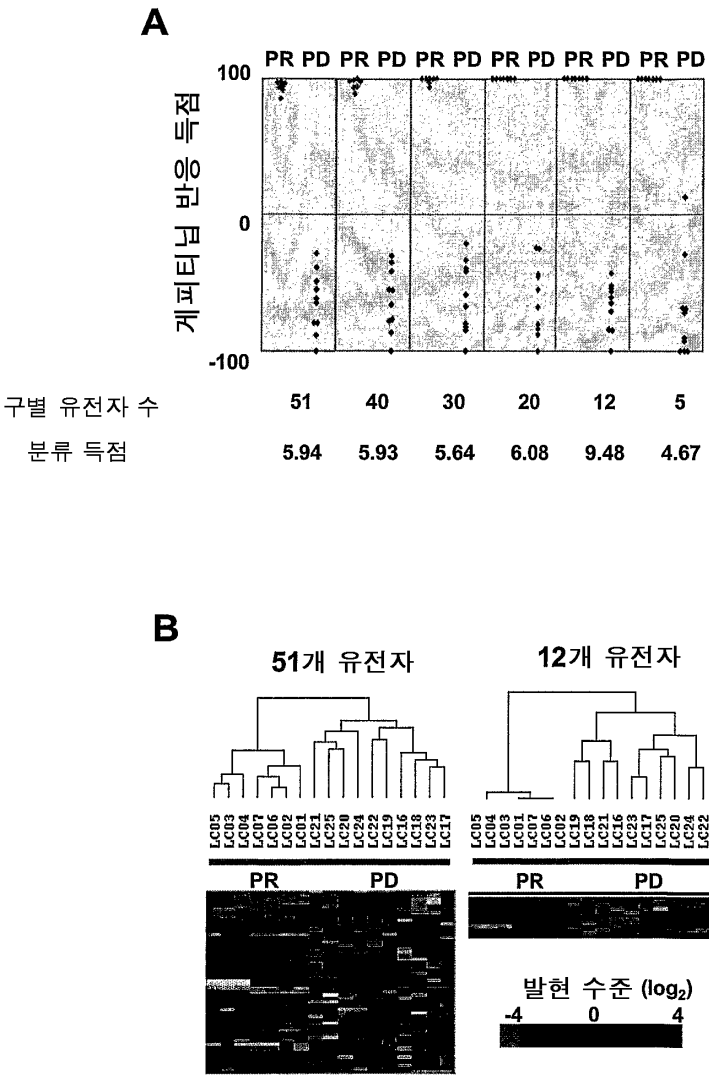
환자 또는 환자군 내에서의 제 1항 내지 제 8항의 어느 한 항에서 정의된 유전자 세트 발현의 상대 수준을 측정하는 것을 포함한 erbB 수용체 티로신 키나제 억제 또는 억제제의 효과 또는 유효성을 측정하는 임상적 실험의 수행 방법

도면

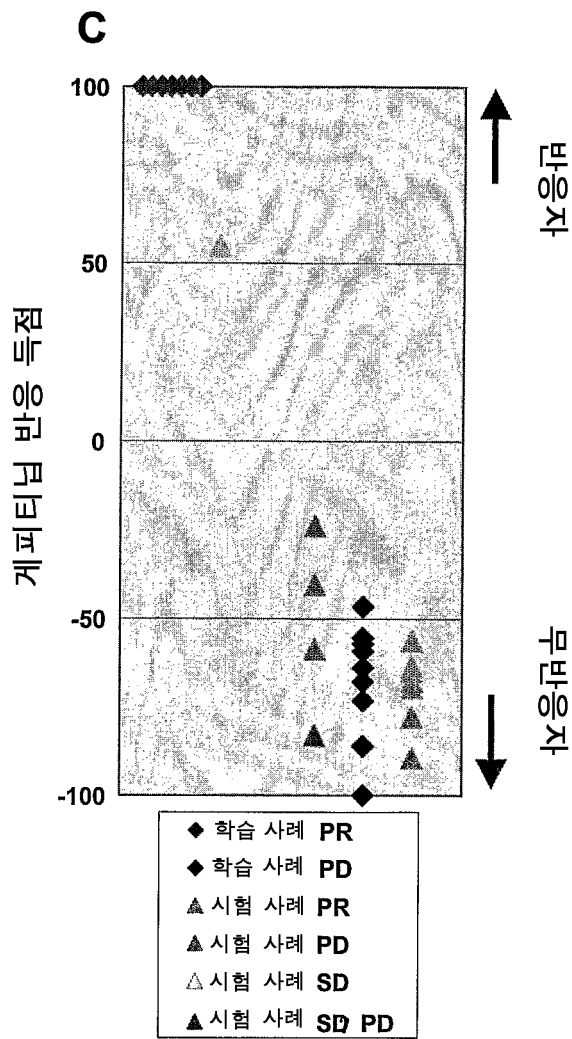
도면1



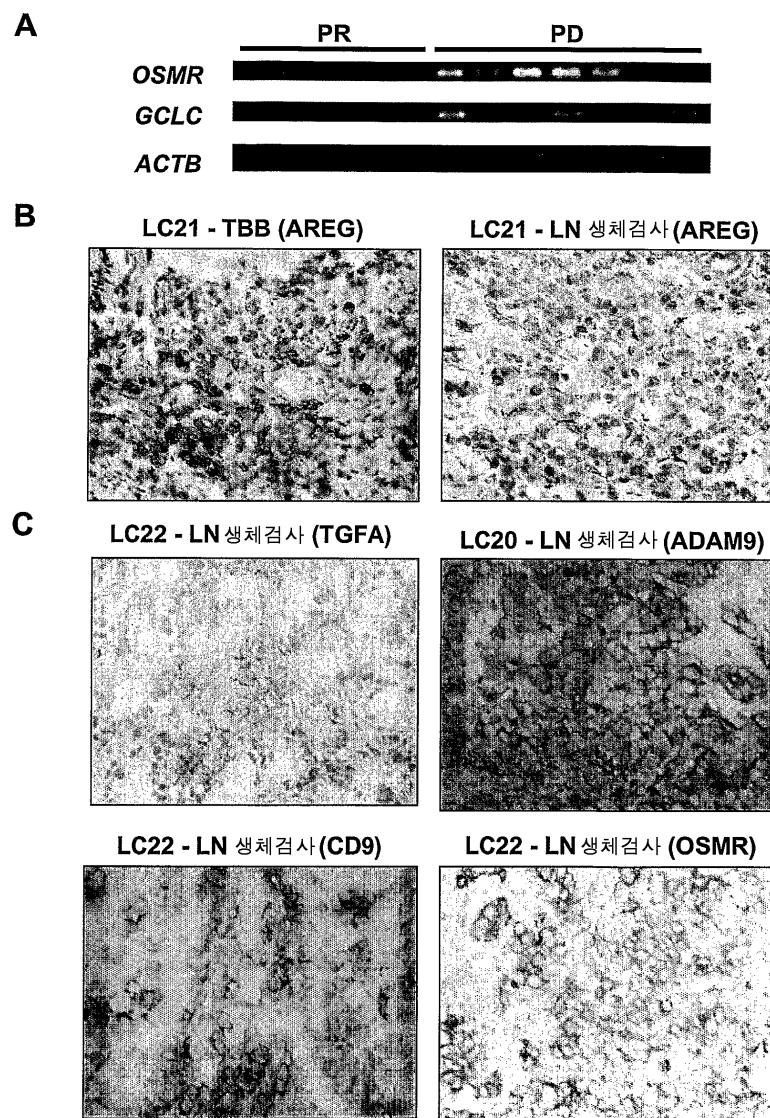
도면2



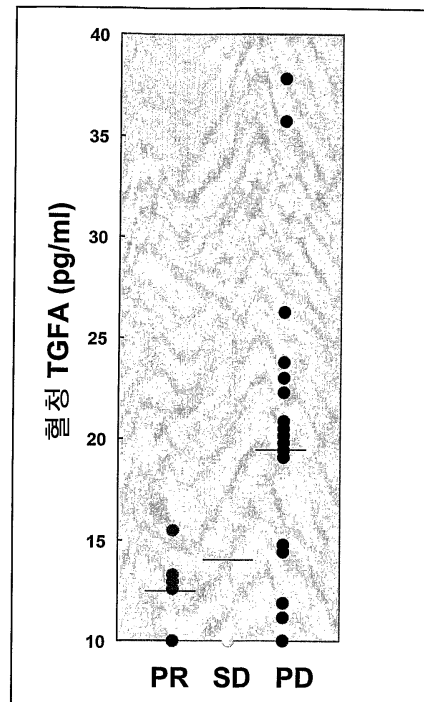
도면2-1



도면3

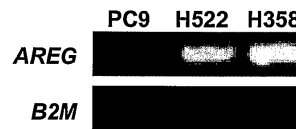


도면4

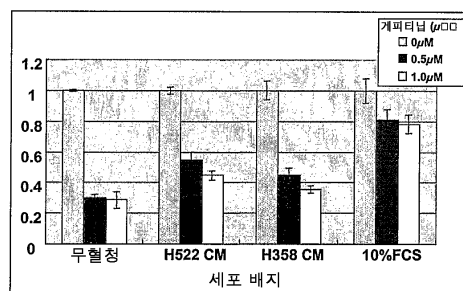


도면5

A



B



C

