

<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서							
연구분야(코드)	G0205	과제번호	1210500		지원 프로그램	창의 일반 과제	
과제성격(기초,응용,개발)	응용	실용화 대상여부	실용화	공개가능여부 (공개,비공개)		비공개	
연구과제명	(국문) 비소세포폐암 환자에서 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)를 이용한 제피티닙 내성 관련 유전자의 빈도 분석과 임상학적 의의 검증 (영문) A MALDI-TOF MS study of <i>EGFR</i> T790M mutation gene resistant to gefitinib in non-small cell lung cancer patients						
과제책임자	소 속	폐암연구과	직 위	주임연구원			
	성 명	이영주	전 공	의학			
세부과제	구분	세부과제명		세부과제책임자			
				성명	소속(직위)	전 공	
	1						
	2						
3							
총 연구기간	2012년 1월~ 2013년 12월(총 2년)		참여연구원수 (단위: 명, MY)		4명		
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립 암센터	기업부담금		
					소계	현금	현물
	계	2012.01.01~2013.12.31	100	110	0	0	0
	제1차	2012.01.01~2012.12.31	60	60	0	0	0
	제2차	2013.01.01~2013.12.31	50	50	0	0	0
제3차	~						
참여기업	명칭		전화		FAX		
기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.							
2013년 10월 31 일							
		과제책임자		이영주		(서명)	
국립 암 센터 원 장 귀 하							
(첨부서류)							

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

<p>연구목표 (200자 이내)</p>	<p><최종목표></p> <p>- EGFR tyrosine kinase 억제제인 제피티닙에 대한 대표적인 획득 내성 기전인 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 약물 노출 이전 존재 유무와 그 빈도를 고민감도 염기 서열 분석 방법 중에 하나인 MALDI-TOF MS를 통하여 알아보고 이 유전자 돌연변이를 갖는 환자군의 병태생리적 특징을 규명하고 검증함으로써 비소세포폐암 환자의 제피티닙 치료 효과를 향상시킬 수 있는 방안을 제시한다.</p> <p><당해연도목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 후향적 이행성 연구를 위한 적절한 비소세포폐암 환자 대상자 선정 2. 환자 종양 조직을 이용하여 EGFR T790M 유전자 돌연변이에 대한 MALDI-TOF MS 시행 3. 제피티닙 치료 효과 및 예후와 MALDI-TOF MS 결과 분석 4. EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암 세포주를 이용하여 제피티닙 내성 세포주 확립 5. EGFR T790M 유전자 돌연변이 제피티닙 내성 세포주와 민감성 세포주의 cell mixture 실험을 통하여 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 영향을 정량적으로 측정
<p>연구내용 및 방법 (500자 이내)</p>	<p>◆ 연구내용</p> <p>- EGFR 돌연변이 비소세포 폐암 환자는 EGFR tyrosine kinase 억제제인 제피티닙에 70%~ 80%의 높은 반응률을 보이지만 약 8~9개월 이후에는 획득 내성을 보이고 있으며 내성 발생 시점 또한 환자마다 개인 차이가 있어서 약 30%는 3개월 미만의 짧은 반응 기간을 보임.</p> <p>- EGFR 돌연변이 폐암 환자에서 각기 다른 제피티닙 효과를 보이는 원인에 대하여 EGFR T790M 유전자 돌연변이가 제피티닙 사용 이전부터 적은 수로 존재하고 있다가 제피티닙 사용 이후에 선택적으로 증폭되어 내성을 보이게 할 수 있다는 주장이 있으나 이를 뒷받침할 수 있는 검증된 임상적 데이터는 없음.</p> <p>- 기존의 direct sequencing 방법을 이용한 돌연변이 검사는 종양 조직 내에 소량으로 존재할 수 있는 EGFR T790M 유전자를 발견하기에는 민감도가 낮을 수 있어 이를 극복할 수 있는 다른 sequencing 방법들이 시도되고 있지만 아직 까지 일관성 있는 결과를 보이지 못함.</p> <p>- 따라서, 종양 조직 내에 존재하는 이질적인 유전자 돌연변이들의 식별이 쉽고 적은 DNA 양으로도 측정 가능한 MALDI-TOF MS를 이용하여 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 약물 노출 이전 존재 유무와 그 빈도를 알아보려고 함.</p> <p>◆ 연구 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 후향적 이행성 연구를 위한 적절한 비소세포폐암 환자 대상자 선정

	<p>1) 2005년 1월 이전 진단</p> <p>2) 조직학적 혹은 세포학적으로 확인된 비소세포폐암 4기</p> <p>3) 선암종 혹은 비흡연자</p> <p>4) 제피티닙 혹은 타세바를 진행된 병기에서 사용</p> <p>5) 치료 전 종양 조직 검체 (조직검사 혹은 수술적 제거로 채집, 파라핀 블록으로 보관)</p> <p>6) Direct sequencing method으로 the kinase domain of <i>EGFR</i> gene에서 exons19, exon 21L858r mutation 존재</p> <p>2. 환자 조직 검체를 이용하여 EGFR 유전자에 대하여 염기서열 분석 시행</p> <p>1) genotyping by MALDI-TOF MS for EGFR T790M</p> <p>3. 제피티닙 치료 효과 및 예후와 MALDI-TOF MS 결과 분석</p> <p>1) Active mutation (EGFR 19del, EGFR L858R)를 가진 환자군에서 resistant mutation (EGFR T790M)을 동시에 가진 환자들의 빈도를 측정</p> <p>2) MALDI-TOF MS로 확인된 T790M 양성군과 음성군 사이의 EGFR-TKI 반응률과 반응 기간 비교</p> <p>3) MALDI-TOF MS로 확인된 T790M 양성군에서 1차 치료제로 EGFR-TKI를 사용한 군과 2차 이상의 치료제로 EGFR-TKI를 사용한 군 간의 반응률과 반응 기간 비교</p> <p>4) T790M 양성 종양의 병리생태적 특징 규명(흡연, 종양의 병기, 크기 혹은 분화도 등과의 관련성)</p> <p>5) 종양 내의 EGFR T790M 분포 양에 따른 EGFR-TKI 반응 기간에 대한 효과</p> <p>4. EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암 세포주를 이용하여 제피티닙 내성 세포주 확립</p> <p>5. Cell mixture 실험에서 MALDI-TOF MS 민감도 확인 및 EGFR T790M의 영향 정량 분석</p>												
<p>연구개발에 따른 기대성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="491 1413 1428 1552"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>0/1</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>0/4</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><정성적 성과></p> <p>-임상적 발견을 실험실내에서 재현하고 그 원리, 기전을 밝혀내어 다시 임상 모델에 적용하는 모범적인 성공 사례 제시</p> <p>-신진 의과학자의 연구 역량 고취</p>	구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	0/1	0%	IF 합	0/4	0%	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)											
SCI 논문 편수	0/1	0%											
IF 합	0/4	0%											
기타 성과													
<p>색인어</p>	<table border="1" data-bbox="448 1783 1489 2004"> <tr> <td data-bbox="323 1783 448 1877"> <p>국문</p> </td> <td data-bbox="448 1783 794 1877"> <p>비소세포폐암</p> </td> <td data-bbox="794 1783 1141 1877"> <p>EGFR</p> </td> <td data-bbox="1141 1783 1489 1877"> <p>유전자 돌연변이</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="323 1877 448 2004"> <p>영문</p> </td> <td data-bbox="448 1877 794 2004"> <p>non-small cell lung cancer gefitinib</p> </td> <td data-bbox="794 1877 1141 2004"> <p>EGFR drug resistance</p> </td> <td data-bbox="1141 1877 1489 2004"> <p>약물내성 gene mutation</p> </td> </tr> </table>	<p>국문</p>	<p>비소세포폐암</p>	<p>EGFR</p>	<p>유전자 돌연변이</p>	<p>영문</p>	<p>non-small cell lung cancer gefitinib</p>	<p>EGFR drug resistance</p>	<p>약물내성 gene mutation</p>				
<p>국문</p>	<p>비소세포폐암</p>	<p>EGFR</p>	<p>유전자 돌연변이</p>										
<p>영문</p>	<p>non-small cell lung cancer gefitinib</p>	<p>EGFR drug resistance</p>	<p>약물내성 gene mutation</p>										

Title of Project	A MALDI-TOF MS study of <i>EGFR</i> T790M mutation gene resistant to gefitinib in non-small cell lung cancer patients
Key Words	non-small cell lung cancer, EGFR, gene mutation, gefitinib, drug resistance
Project Leader	Youngjoo Lee
Associated Company	None

1. Study objectives

- Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKI) are clinically effective in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring sensitizing *EGFR* mutations.
- However, A subset of patients with sensitive *EGFR* mutations did not respond to EGFR-TKI therapy or their response was shorter than expected.
- The cause of this reduction in the efficacy of targeted therapy in a molecularly defined patient population remains unknown. Recently, some case reports and preclinical studies have suggested that the T790M resistance mutation may exist before EGFR-TKI exposure and may play a fundamental role in the inherent resistance of *EGFR*-mutant tumors to EGFR-TKI therapy
- The aims of this study were as follows:
 - (i) to determine the frequency of preexisting *EGFR* T790M mutations in Korean patients with advanced NSCLC harboring sensitive *EGFR* mutations,
 - (ii) to evaluate the clinical outcomes according to the level of the T790M mutation,
 - (iii) to estimate the minimum frequency of the T790M mutation with in a tumor to start to negatively influence the efficacy of EGFR-TKI. In this study, the *EGFR* T790M mutation frequency was determined using the MS genotyping assay.

2. Study method

- Advanced NSCLC patients who underwent routine direct sequencing of the *EGFR* gene and who were treated with an EGFR-TKI (e.g.,gefitinib or erlotinib) at the National Cancer Center Hospital were screened for this study.
- Archival formalin-fixed, paraffin-embedded pretreatment tumor tissues were collected for genetic analysis. A pathologist (K.G.L) reviewed hematoxylin-eosin stained sections of each tissue sample and identified tissue areas containing $\geq 70\%$ tumor for dissection. Genomic DNA was extracted from the dissected tumor tissue using a DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA), Genotyping for the T790M mutation was done using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/MS (MALDI-TOF/MS) using the standard protocol of the MassARRAY system (Sequenom, San Diego, CA).
- *In vitro* sensitivity to gefitinib (LC Laboratories, Woburn, MA) was measured in two pairs of cell line mixtures containing TKI - sensitive cells and TKI-resistant cells with the T790M mutation: HCC827/H1975 and PC9/PC9GR-T790M. TKI-sensitive cells and TKI-resistant cells with the T790M mutation were mixed at the indicated proportions and were treated with gefitinib for 72 hours. Growth inhibition was measured using the MTS colorimetric assay (Promega, Madison, WI).

3. Study results

-A total of 124 patients with sensitive *EGFR* mutations were further genotyped by the MS-based assay. Most of the patients were never smokers and had adenocarcinoma histology

(1) Frequency of T790M

-The MS-based genotyping assay detected *EGFR* T790M mutations in 31 patients (25.0%).

-Patient characteristics and sampling methods did not differ between the T790M-positive tumors and the T790M-negative tumors

(2) Effects of the T790M mutation on EGFR-TKI efficacy

-The response rate (RR) and disease control rate (DCR) were not significantly different between patients with T790M-positive mutant tumors and T790M-negative mutant tumors (RR: 71.0% vs. 83.9%, $P=0.115$; DCR: 83.9% vs. 92.5%, $P=0.173$).

-The median time to progression (TTP) was significantly shorter in patients with T790M-positive mutant tumors than in patients with T790M-negative mutant tumors (6.3 months vs. 11.5 months; $P<0.001$). The shorter TTP of T790M-positive mutant tumors was also observed at the 1st line EGFR-TKI subgroup (6.0 months vs. 10.5 months; HR 2.06, 95%CI, 0.94 - 4.48; $P=0.062$) and at the second-line EGFR-TKI or later subgroup (6.3 months vs. 11.5 months; HR 2.65, 95%CI, 1.53 - 4.60; $P=0.001$).

(3) Dose-dependent effect of the T790M mutation

-The optimal cut-off point of T790M mutant signal frequency to give the minimum P -value for the HR of progression to EGFR-TKI in T790M-positive mutant tumors was 45.7%, which corresponded to percentages of cells within a tumor of 28.1%, based on the cell-line mixture study. Patients with T790M-positive mutant tumors were divided into two subgroups according to this cut-off value of T790M mutant signal frequency.

-There was no significant difference in RR and DCR between high ($n=9$) and low T790M groups ($n=22$) (RR: 66.7% vs. 72.7%, $P=1.000$; DCR: 66.7% vs. 90.9%, $P=0.131$).

-The median TTP was significantly shorter in high T790M patients than in low T790M patients (2.4 months vs. 6.7 months; HR 2.91, 95% CI, 1.26 - 6.75; $P=0.009$)

(4) Estimated frequency of T790M mutant cells for inducing resistance

-The minimum cutoff level of the T790M signal at which the risk of progression increased during EGFR-TKI therapy ranged from 2.8% to 3.4%, which corresponds to between 1.6% and 2.0% of the estimated percentage.

-*In vitro* sensitivity to gefitinib was significantly lower in the cell mixtures containing $\geq 10\%$ of H1975 cells (TKI-resistant cells) compared with that of pure H827 cells (TKI-sensitive cells). Additionally, in mixtures of PC9GR-T790M cells and PC9 cells, the minimum percentage of PC9GR-T790M cells that started to show a reduction in gefitinib sensitivity relative to pure PC9 cells was 5%.

1. 연구의 최종목표

- EGFR tyrosine kinase 억제제 (EGFR-TKI)인 제피티닙에 대한 대표적인 획득 내성 기전인 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 약물 노출 이전 존재 유무와 그 빈도를 고민감도 염기 서열 분석 방법 중에 하나인 MALDI-TOF MS를 통하여 알아보고 이 유전자 돌연변이를 갖는 환자군의 병태생리학적 특징을 규명하고 검증함으로써 비소세포폐암 환자의 제피티닙 치료 효과를 향상시킬 수 있는 방안을 제시한다.

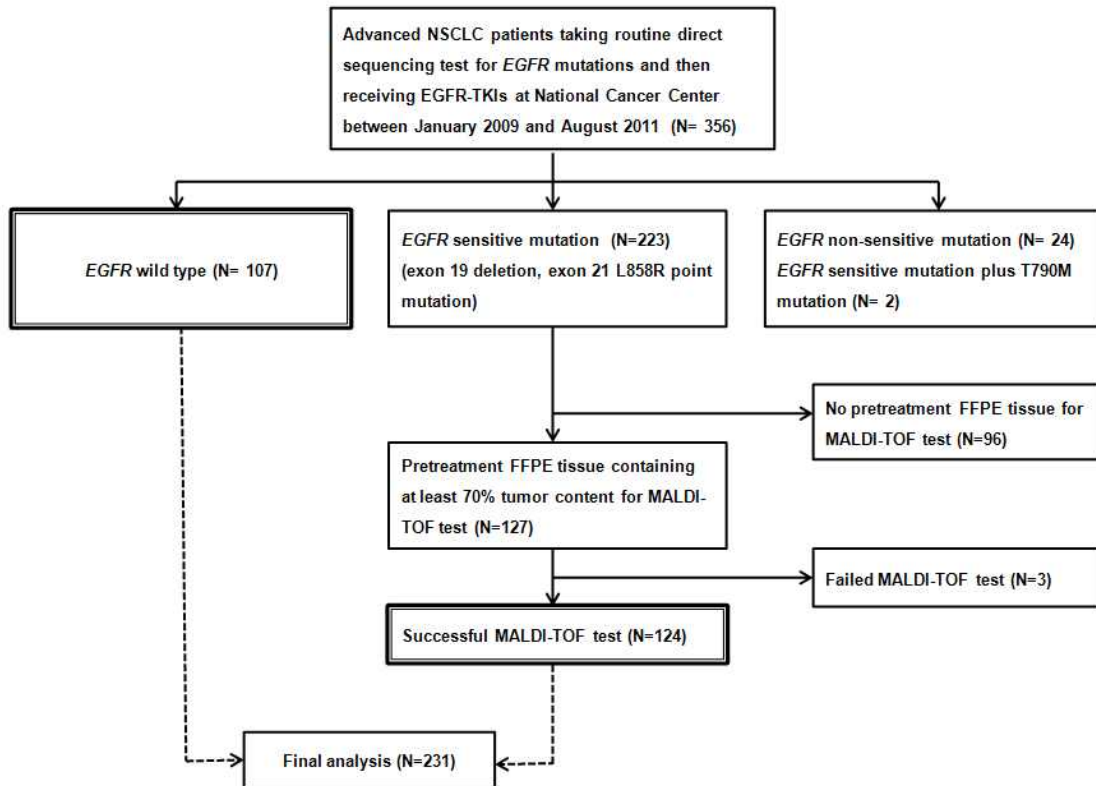
2. 연구의 내용 및 결과

(1) 연구의 방법

A. 후향적 종양 조직 모집

1) 국립암센터에서 진행성 비소세포폐암으로 진단받고 direct sequencing 방법으로 EGFR sensitive mutation 인 exon 19 deletion mutation 과 exon 21 L858R mutation 을 가진 환자들 중 EGFR tyrosine kinase inhibitor 인 제피티닙 혹은 얼로티닙으로 치료 받은 환자군의 자료를 우선 수집하고 이들 중 약물 투여 전 파라핀 블록으로 고정된 종양 조직이 있는 환자를 선택하였다. (그림 1)

2) 모두 124명이 선택되었고 이들의 종양 조직은 병리학자에 의하여 70% 이상의 종양 세포가 존재함을 확인 받았다.

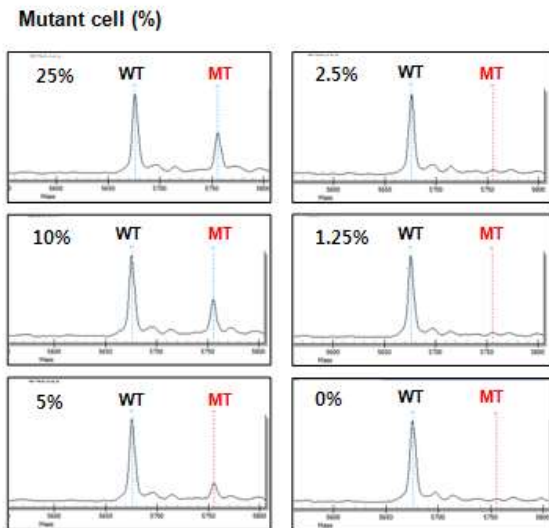


<그림 1> 종양 조직 모집 흐름도

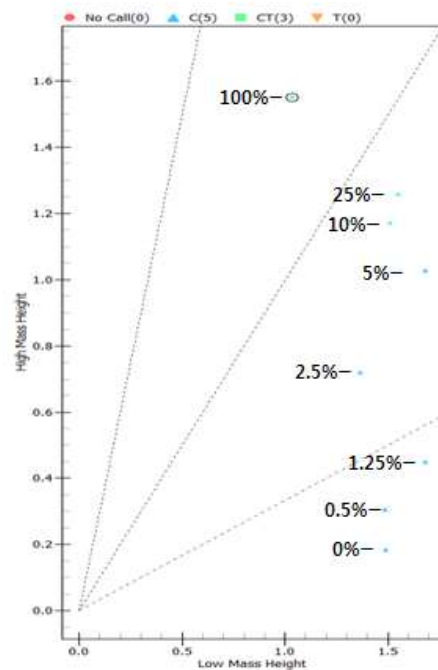
B. MALDI-TOF/MS assay 시행 및 cut-off level 결정

- 1) 종양 조직은 matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/MS (MALDI-TOF/MS)를 이용하여 EGFR T790M mutation 에 대하여 genotyping 을 실시 하였다. 이 실험은 본 연구소의 genomic core에서 시행하였다.
- 2) MS assay에서의 EGFR T790M mutation 에 대한 cut-off level를 결정하기 위하여 T790M mutation 을 가지고 있는 세포주 (PC9-GR)를 T790M mutation 이 없는 제피티닙 민감한 세포주 (PC9)와 일정 비율로 혼합하여 MS assay를 시행하였고 cut-off mutant signal frequency는 2.95%로 결정되었다. (그림2)

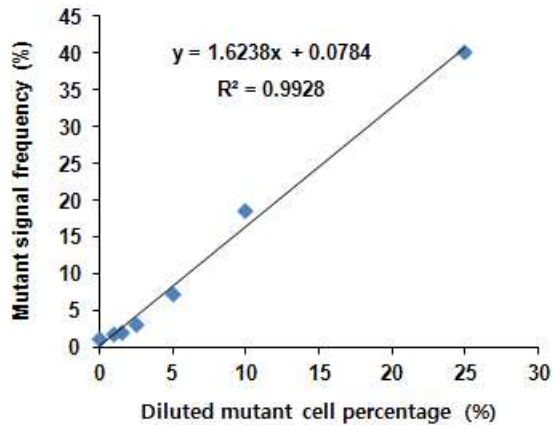
(A)



(B)



<그림 2> cell mixture 실험을 통한 MS assay 의 EGFR T790M 의 detection limit



<그림 3> cell mixture 실험에서 회석된 mutant DNA양은 MS assay에서 측정된 mutant signal frequency의 관계

3) 회석된 mutant DNA양은 MS assay에서 측정된 mutant signal frequency 와 선형적으로 유의하게 연관되었다. <그림 3>

C. In Vitro gefitinib sensitivity에 대한 cell mixture 실험

1) 두 개의 세포주 쌍을 (HCC827/H1975 PC9/PC9GR-T790M)을 이용하여 cell mixture 실험을 진행하였다. EGFR T790M mutation 을 가진 세포주의 양을 점차 증가시켜 혼합한 후 gefitinib 1uM를 처리하고 72시간 배양한 후 MTS assay 로 분석하였다.

(2) 연구 결과

A. 환자의 특성

1) 대부분의 환자는 비흡연자, 선암을 가지는 환자였으며 이들의 중앙 EGFR-TKIs에 대한 median progression free survival, median overall survival 은 각각 9.4 개월 (95% CI, 6.7 - 12.1 개월) and 23.5 개월(95% CI, 17.4 - 29.6 개월) 이었다.

B. EGFR T790M mutation 의 빈도수

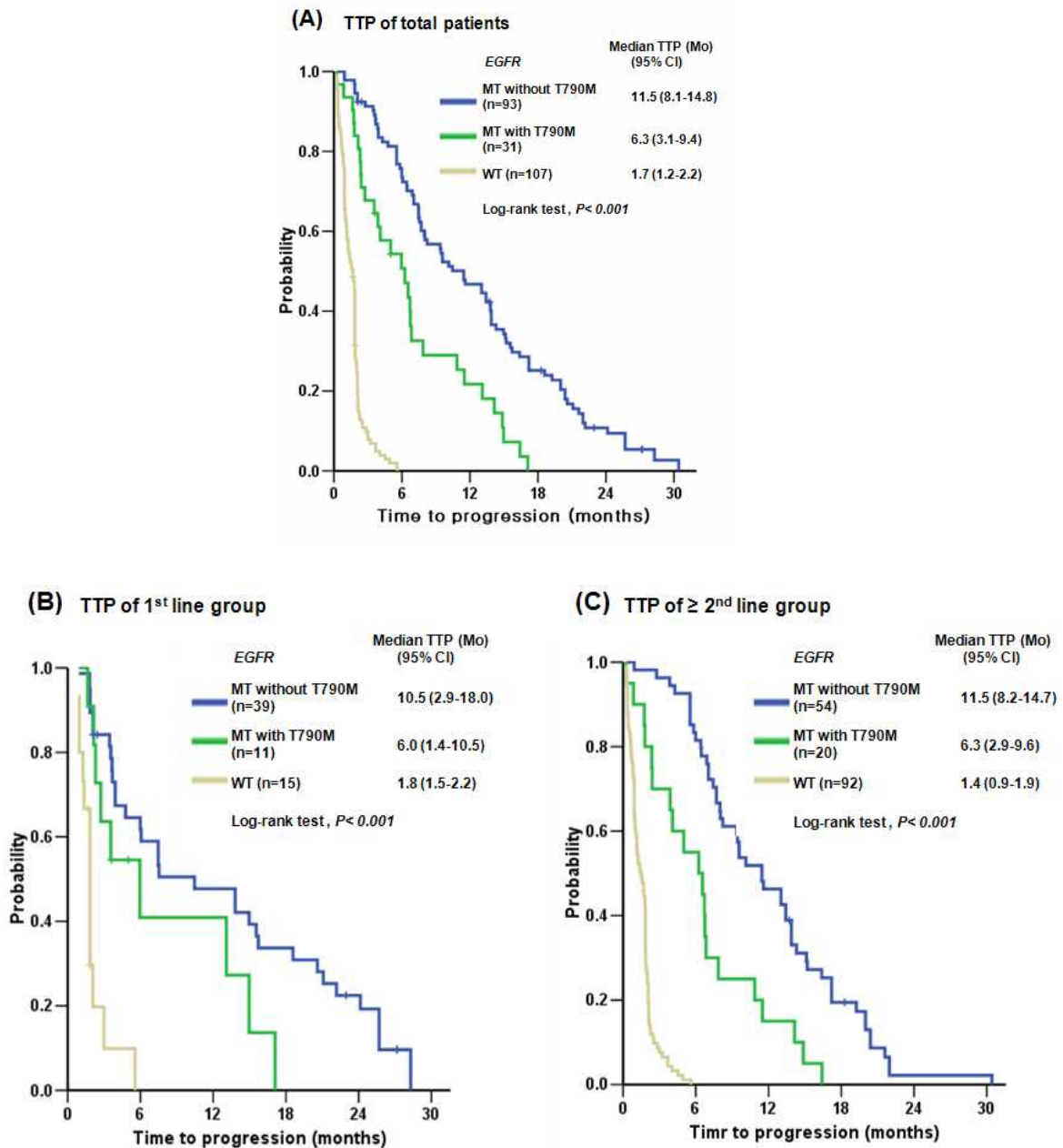
1) MS를 기반으로 하는 genotyping assay로 EGFR T790M mutation 이 발견된 환자는 31명이었으며 전체 환자의 25%를 차지하였다.

2) EGFR T790M mutation 과 흡연 여부, 종양의 크기, 종양의 진행 정도 (early vs late stage), 조직 검사의 방법, sensitive mutation 의 타입 (exon 19 vs exon 21)와는 관련이 없었다.

C. EGFR T790M mutation의 EGFR-TKI에 대한 영향

1) T790M 양성군과 T790M 음성군 사이에 EGFR-TKI에 대한 반응률 (RR)와 질병조절률(DCR)에는 차이가 없었다. (RR: 71.0% vs. 83.9%, $P=0.115$; DCR: 83.9%vs.92.5%, $P=0.173$).

2) T790M 양성군은 T790M 음성군에 비하여 유의하게 median time to progression (TTP)이 짧았다 (6.3 개월 vs. 11.5 개월; $P < 0.001$). 이러한 결과는 EGFR-TKI 치료 전 세포독성 항암치료의 유무와 상관이 없었다.(그림 4)



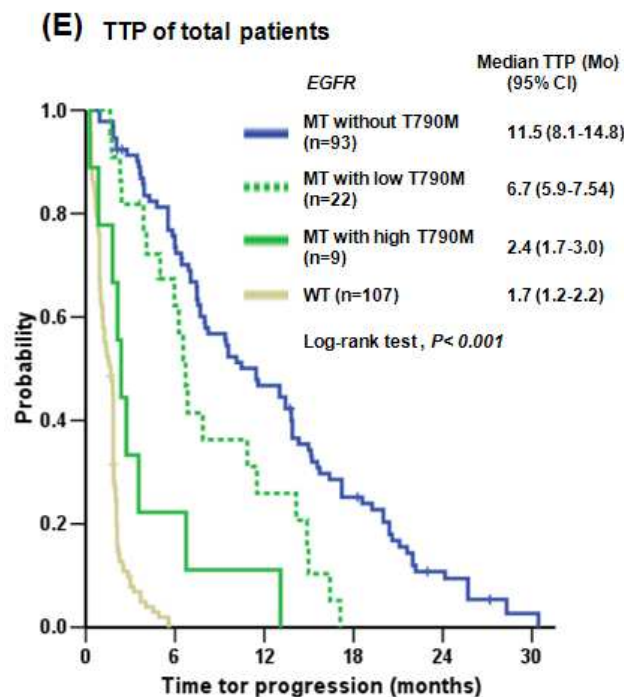
<그림 4> EGFR T790M mutation 양성군과 음성군 간의 TTP 곡선

D. EGFR T790M mutation의 양에 따른 효과

1) EGFR T790M mutation 양성 환자 31명 중 EGFR-TKI 사용 후 TTP에 대한 hazard ratio의 P 값이 가장 좋은 mutant signal frequency는 45.7%이다. 이를 기준으로 양성 환자군을 두 군으로 나누어 EGFR-TKI에 대한 효과에 대하여 비교하였다.

2) High T790M 양성군과 low T790M 양성군 사이의 반응률과 질병조절률 사이에 차이는 없었다. (RR: 66.7% vs. 72.7%, $P=1.000$; DCR: 66.7% vs. 90.9%, $P=0.131$).

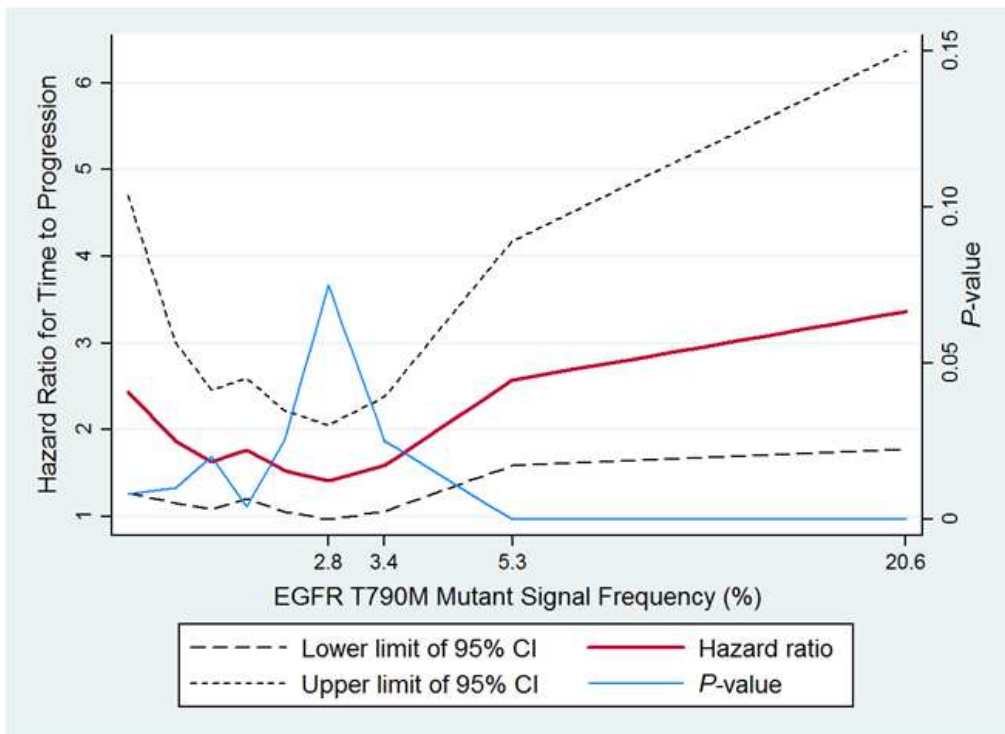
3) High T790M 양성군은 low T790M 양성군에 비하여 유의하게 median time to progression (TTP)이 짧았다 (2.4 개월 vs. 6.7 개월; $P=0.009$). 이러한 결과는 EGFR-TKI 치료 전 세포독성 항암치료의 유무와 상관없이 없었다. (그림 5)



<그림 5> High T790M 양성군은 low T790M 양성군의 TTP 곡선

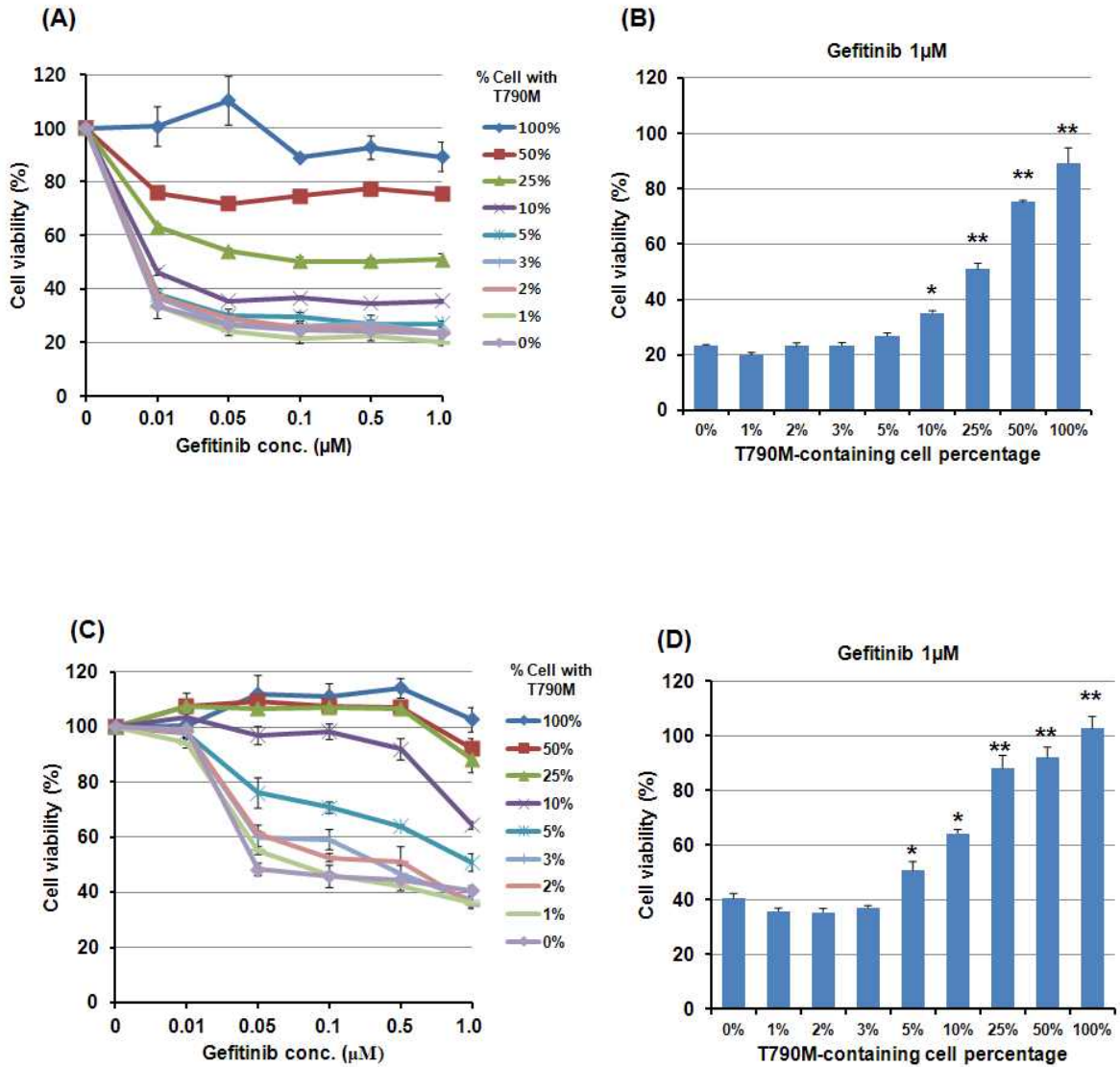
E. EGFR-TKI에 대한 저항성을 보이기 시작하는 EGFR T790M mutation의 최소 양

1) 124명 환자 sample 의 EGFR T790M mutant signal frequency 를 10개로 나누고 각각의 median 값으로 전체 환자를 두 군으로 나누어 EGFR-TKI에 대한 TTP에 대한 hazard ratio와 P 값을 측정하였다. 이를 보인 그래프에서 T790M signal의 2.8%, 3.4%사이에서 progression 에 대한 위험도가 증가하기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. <그림3>의 그래프에 따르면 이 signal 값에 해당하는 mutant cell 의 percentage 는 1.6%에서 2%이다 (그림 6).



<그림 6> EGFR T790M mutant signal 에 따른 TTP의 HR 추이

2) Cell mixture 실험에서는 PC9GR-T790M 과 PC9 에서는 PC9GR-T790M이 5% 섞인 mixture에서 H1975와 HCC827에서는 H1975가 10% 섞인 mixture에서 제피티닙에 대한 반응률이 유의하게 떨어지기 시작하였다. (그림 7)



<그림 7> EGFR T790M mutant signal 에 따른 TTP의 HR 추이

3. 연구결과 고찰 및 결론

○ 제피티닙 민감성 EGFR 돌연변이 폐암 환자에서 25%에서는 제피티닙 노출 이전에 이미 획득 내성 돌연변이로 알려진 EGFR T790M 돌연변이를 가진 클론이 존재하고 있음을 확인하였고 이 저항성 클론이 제피티닙의 반응 기간에 부정적인 역할을 할 수 있으며 종양 내에 존재하는 분포가 환자 마다 다른데 그 분포 양이 많을수록 제피티닙의 반응 기간이 줄어들 수 있었음.

○ 현재 EGFR mutation 의 표준적인 검사 방법으로 사용하고 있는 direct sequencing 의 detection limitation 을 확인 하였으며 low frequency 로 존재하는 resistant mutation 들의 영향에 대하여 보다 확고한 증거들이 보충이 된다면 이들의 detection 을 위하여 보다 민감한 sequencing 방법의 도입도 고려해 보아야 함.

○ 또한 환자의 보관된 종양 조직을 가지고 유전자 검사를 시행할 때에는 tumor의 purity 를 반드시 확인해야하며 이것이 연구들 간의 상이한 결과를 보이는 원인일 수 있음.

○ 폐암처럼 환자의 조직을 얻기 어려운 환자들을 대상으로 하는 이행성 연구에서는 세포주를 이용한 실험실 연구를 병행함으로써 서로 단점을 보완하여 충실한 결과를 보일 수 있음을 본 연구를 제시하였음.

○ 잠복된 내성 클론이 일정양 이상 존재하면 표적 치료제의 효과를 반감시킬 수 있기 때문에 이런 환자군에서는 새로운 치료 전략이 필요함. 현재 EGFR T790M mutation 을 타겟으로 하는 표적 치료제가 개발되고 있으며 본 연구에서 밝혀진 잠복 내성 클론의 양이 높은 EGFR 돌연변이 폐암 환자에서는 이 새로운 신약의 우선 대상자가 되어야 할 것임. 따라서 이러한 치료제의 임상 시험 및 실제 사용에 있어서 소수로 존재하는 잠복 내성 클론을 발견할 수 있는 보다 민감한 sequencing 방법이 요구됨.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	지널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Clinical outcome according to the level of preexisting <i>EGFR</i> T790M mutation in lung cancer patients harboring sensitive <i>EGFR</i> mutations	교신, 1저자	Clinical Cancer Research (7.837)	Submitted	국외 SCI	1210500
Clinical significance of heterogeneity in response to retreatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer patients acquiring secondary resistance to the drug	교신, 1저자	Clinical Lung Cancer (2.038)	In revision	국외 SCIE	1210500
Impact of EGFR tyrosine kinase inhibitors versus chemotherapy on the development of leptomeningeal metastasis in never smokers with advanced adenocarcinoma of the lung.	1저자	Journal of neurooncology (3.115)	2013 115 (1):95-101	국외 SCI	없음

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
제피티닙에 대한 대표적인 획득 내성 기전인 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 약물 노출 이전 존재 유무와 그 빈도를 고민감도 염기 서열 분석 방법 중에 하나인 MALDI-TOF MS 를 통하여 알아본다	1차년도	I. 환자 대상자 선정	223명 후보자 선택	80	100
		II. tissue sample 확보	127개 tissue sample 확보		
		II. MALDI-TOF genotyping 시행	124개 DNA sample에서 MALDI-TOF 성공		
		III. 제피티닙 내성 세포주 확립	제피티닙 내성 세포주 확립		
	2차년도	I. EGFR T790M 유전자 돌연변이를 갖는 세포주의 항암제 종류 및 투여 순서에 따른 감수성 확인	Growth inhibition assay를 통한 결과 도출	100	100
		II. EGFR T790M 유전자 돌연변이 세포의 증식 속도에 영향을 미치는 요소 분석을 위한 예비연구	Growth inhibition assay를 통한 결과 도출		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
제피티닙 치료 효과 및 예후와 두 가지 염기 서열 분석법 결과를 분석	Detection limitation 을 갖는 Direct sequencing method에 서 찾지 못했던 소수로 존재하는 EGFR T790M mutation 을 MALDI-TOF assay 로 대상 환자의 25%에서 발견함. 가설과 일치함.
EGFR T790M 유전자 돌연변이를 갖는 세포주의 항암제 종류 및 투여 순서에 따른 감수성 확인	제피티닙을 장기간 투여하여 제피티닙 내성 세포주를 만들었으며 이중에 EGFR T790M 유전자 돌연변이를 갖는 세포주를 분리에 성공했음. 이 세포주를 가지고 In vitro 항암제 민감성 test 를 시행하였음. 항암제의 종류와 투여 순서에 따른 효과적인 항암 방법은 없었음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년 후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	3	Clinical Cancer Research (7.837) Clinical lung Cancer (2.038) Journal of Thoracic oncology (4.473)
산업재산권 등록		
학회 발표	1	AACR

(2) 연구성과의 활용계획

- 기존의 연구들의 일관되지 못했던 아시아인의 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 항암제 노출 이전 빈도수에 대한 해답을 줄 수 있음.
- 조직 세포들의 이질적인 특성을 반영할 수 있는 염기서열 분석 방법(MALDI-TOF MS)을 이용하여 Direct sequencing 방법의 한계를 극복할 수 있을 지를 보여 줄 수 있음.
- 이론적으로 항암제 노출 이후에나 발생할 수 있는 표적 단백질의 이차적 유전자 돌연변이인 EGFR T790M 유전자 돌연변이가 항암제 노출 이전에도 존재할 수 있다는 것이 실험실내의 결과를 바탕으로 한 가설을 넘어서 환자들의 실제 종양 조직에서 확인할 수 있음.
- EGFR T790M 유전자 돌연변이의 항암제 이전의 존재가 임상적 의의를 가지며 EGFR 돌연변이 양성 비소세포폐암 환자 중 예상된 반응 기간보다 빨리 내성이 발생하는 문제점에 대한 원인을 일부 제공하여 EGFR-TKI 사용 후 예후를 예측할 수 있고 앞으로 이런 환자군에서 내성 발현을 지연 혹은 방지할 수 있는 방안 모색의 실마리를 제공할 수 있음.
- EGFR T790M 유전자 돌연변이 비소세포폐암의 특징 (종양의 진행과 T790M 유전자의 발생양상, T790M 유전자 발생을 촉진하는 원인, T790M 유전자를 가진 클론과 이웃 클론과의 관계, T790M 유전자를 가진 종양의 항암제 감수성 등)을 포괄적으로 이해할 수 있고 이를 바탕으로 치료법의 향상에 대한 토대를 마련할 수 있음.
- EGFR-TKI에 잘 반응하는 EGFR 돌연변이과 T790M 유전자 돌연변이를 동시에 가지고 있는 비소세포폐암의 경우 세포독성 항암제의 우선 사용이 이후의 EGFR-TKI의 사용에 도움이 될 수 있을 지에 대한 단서를 제공할 수 있음. 세포 독성 항암제와 EGFR-TKI의 적절할 사용 순서 결정에 도움을 줄 수 있음.

○ 제피티닙 이외에도 특수한 발암 유전자를 표적으로 하는 표적 치료제들이 다량 개발되어 사용되고 있는 가운데 이 연구를 통해 밝혀질 EGFR T790M 유전자 돌연변이의 병태생리는 다른 표적 치료제 사용 후에 발생하는 이차적 유전자 돌연변이의 경우에도 적용될 수 있음.

○ 선행 연구에서 잠복 내성 클론의 존재와 빈도수를 확인하였다면 본 연구에서는 잠복 내성 클론의 특성을 파악하고 획득 내성 출현에 있어서의 역할에 대하여 *in vivo* resistance model 을 이용하여 알아 보고자함. 이 연구를 통해서 제피티닙 민감성 EGFR 돌연변이 폐암 환자의 제피티닙을 이용한 치료 방침에 있어서 중요한 가이드라인을 제시할 것임. 치료 전 잠복 내성 클론 타겟으로 한 치료의 필요성에 대한 답을 얻을 수 있을 것으로 생각됨.

6. 참고문헌

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
2. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786-92.
3. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73-e.
4. Yun C, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong K, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2070-5.
5. Sequist LV, Waltman BA, Dias Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26-75ra26.
6. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet oncology* 2010;11:121-8.
7. Zhou C, Wu Y, Chen G, Feng J, Liu X, Wang C, et al. Erlotinib versus

chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet oncology* 2011;12:735-42.

8. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet oncology* 2012;13:239-46.

9. Shih J, Gow C, Yang P. EGFR mutation conferring primary resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:207-8.

10. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7854-8.

11. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-77.

12. Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, Gemma A, Maemondo M, Inoue A, et al. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer* 2010;126:651-5.

13. Su K, Chen H, Li K, Kuo M, Yang JC, Chan W, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:433-40.

14. Fujita Y, Suda K, Kimura H, Matsumoto K, Arao T, Nagai T, et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2012;7:1640-4.

15. Fukuoka M, Wu Y, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong S, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29:2866-74.

- 16.** Rosell R, Molina-Vila MA, Taron M, Bertran-Alamillo J, Mayo C, Vergnenegre A, et al. EGFR compound mutants and survival on erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) in the EURTAC study. In: 2013 ASCO meeting; 2012; Chicago; 2012. p. Abstract 7522.
- 17.** Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
- 18.** Lee DH, Lee GK, Kong S, Kook MC, Yang SK, Park SH, et al. Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Pathol* 2007;60:881-4.
- 19.** Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486:532-6.
- 20.** Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537-40.
- 21.** Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011;17:1616-22.

7. 첨부서류