(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 4 월 21 일 (21.04.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/080598 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01) *G16H 50/70* (2018.01)
A61B 8/08 (2006.01) *G16H 50/50* (2018.01)
G16B 40/20 (2019.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/001477

(22) 국제출원일: 2021 년 2 월 4 일 (04.02.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0134676 2020 년 10 월 16 일 (16.10.2020) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR). 차의과학대학교 산학협력단 (**CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **서보경 (SEO, Bo Kyoung)**; 06647 서울시 서초구 반포대로 122 A동 703호, Seoul (KR). **박아영 (PARK, Ah Young)**; 13520 경기도 성남시 분당구 양현로 272, 301동 1203호, Gyeonggi-do (KR). **한미령 (HAN, Mi-Ryung)**; 06356 서울시 강남구 일원로 120, 103동 1003호, Seoul (KR).

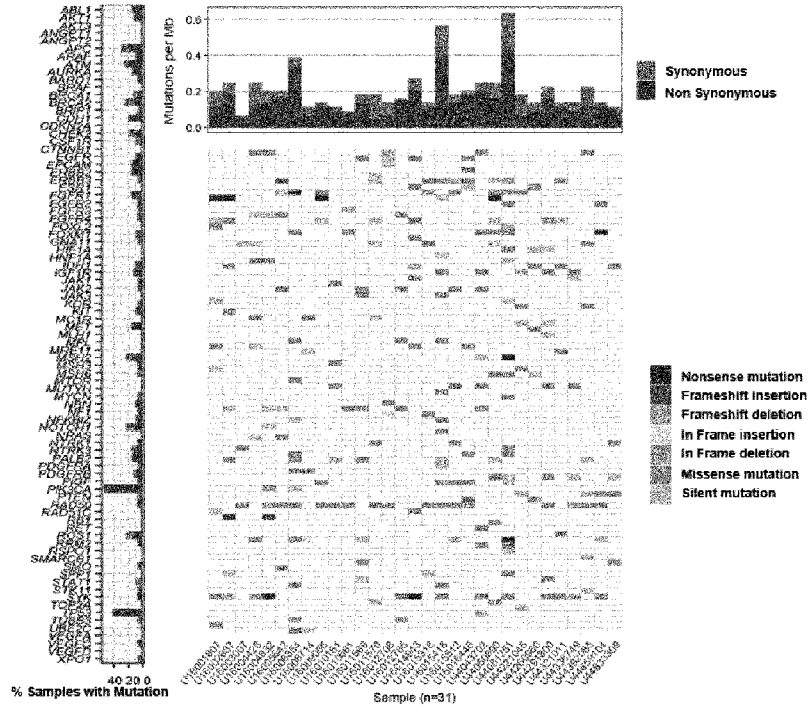
(74) 대리인: **공병욱 (KONG, Byung Wook)**; 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호., Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

WO 2022/080598 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PROVIDING DNA GENETIC INFORMATION USING BREAST CANCER ULTRASOUND IMAGES

(54) **발명의 명칭:** 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for providing DNA genetic information using breast cancer ultrasound images. When the method for providing DNA genetic information using breast cancer ultrasound images according to the present invention is used, information that is helpful in determining a treatment and a prognosis for breast cancer can be provided via a noninvasive method.

(57) **요약서:** 본 발명은 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 이용하는 경우, 비침습적인 방법을 통해 유방암 치료 및 예후 판단에 도움이 되는 정보를 제공받을 수 있다.

[다음 쪽 계속]

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 대한민국 과학기술정보통신부 지원 하에서 과제번호 2020R1F1A1073213에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "이공분야기초연구산업 기본연구", 연구과제명은 "3차원 CLARITY 병리이미징 기반 유방암 미세환경 평가를 위한 의료영상 지표 개발", 주관기관은 고려대학교, 연구기간은 2020-06-01 ~ 2021-05-31이다.

[2] 또한, 본 발명은 대한민국 과학기술정보통신부 지원 하에서 과제번호 2020R1C1C1012288에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "이공분야기초연구사업 (신진연구지원사업)", 연구과제명은 "영상 유전체 통합 빅데이터 분석을 활용한 여성암 정밀의료 기반 구축", 주관기관은 인천대학교, 연구기간은 2020-03-01 ~ 2025-02-28이다.

[3] 본 특허출원은 2020년 10월 16일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0134676호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[4] 본 발명은 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[5]

배경기술

[6] 유방암은 복잡한 유전자 변형의 축적으로 인해 발생하는, 여러 다른 종류의 원인들(heterogeneous)로 이루어진 질병 그룹이다. 비록 DNA 마이크로어레이 분석의 발전은 상이한 유전자 변형 및 생물학적 행동의 관점과 같은 유방암의 독특한 분자 하위 유형을 식별할 수 있게 하였고, 표적 요법, 질병 과정의 이질성 및 치료에 대한 반응으로 이어졌으나, 유방암의 분자 하위 유형에 대해서는 완벽하게 설명하지 못하고 있다.

[7] 종양에서 흔히 발생하는 저산소증(Tumor hypoxia)은 종양 세포의 급속한 증식과 상대적으로 불충분한 산소 공급의 병태 생리학적 결과이다. 저산소 스트레스를 극복하기 위해 저산소증 유발 인자-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)은 암 환자에서 과발현되고 그 결과 종양 혈관 생성, 유전적 불안정성, 조직 침습 및 전이가 증가한다. 종양 혈관 생성은 기존 혈관계에서 새로운 혈관이 생성되는 것을 말하며 유방암의 진행에 필수적인 현상이다. 혈관 생성 전환의 분자적 기초는 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF)와 같은 혈관 생성

인자의 증가 및 혈관 생성 억제제의 감소이다. 종양의 공격성을 더 잘 예측하기 위해서는 유방암의 병리 생리학적 특징과 종양 저산소증 및 혈관 생성의 역할을 이해하는 것이 중요하다.

[8] 차세대 염기서열분석(next-generation sequencing; 이하, NGS)이라는 고-처리량 시퀀싱 기술의 발전으로 유방암 게놈의 포괄적인 특성 규명, 아형-특이적 유전자 변형의 식별 및 개별화된 치료에 대한 접근이 가능해졌다.

[9] 최근의 방사선유전체학적(radiogenomics) 접근은 유방암에 대한 유전자 수준에서의 종양 이질성을 이해하고 유전자 변이의 이미지 써로게이트(surrogate)를 발견할 수 있게 하였다. 최초의 방사선유전학적 연구에서는 26개의 자기 공명(magnetic resonance; 이하, MR) 이미징 표현형 중 21개가 유방암 유전자의 71% (3717/5231)와 전체적으로 상관 관계가 있고, 여러 이미징 표현형이 유방암 또는 예후 유전자와 관련된 개별 유전자 세트와 상관 관계가 있다고 보고하였다.

[10] 대부분의 후속 연구는 MR 영상화 특징과 개별 유전자, 분자 아형 또는 다중 유전자 분석에 기반한 재발 점수 간의 상관 관계에 초점을 맞추었다.

[11] 또한, 최근 SMI(superb microvascular imaging) 및 조영 증강 초음파 (contrast-enhanced ultrasound; CEUS)와 같은 혈관 초음파 기술의 진보는 유방암에 관한 미세 혈관 정보를 제공하고 암의 발달 및 성장에 필수적인 조직 병리학적 변화인 종양 혈관 형성을 예측할 수 있다.

[12] 여러 연구에서 초음파 이미징의 악성 미세 혈관 특징이 종양 학적 등급, 종양 크기, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER) 양성, 인간 표피 성 장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2; HER2) 과발현 및 미세 혈관 밀도와 같은 조직학적 바이오 마커와의 관련성을 입증하였다. 이러한 결과는 혈관 특징 초음파 영상이 조직학적 공격성을 예측할 수 있으며, 심지어 유방암과 관련된 특정 유전자 변경과 관련성을 예측할 수 있다.

[13] 하지만 유방암의 혈관 초음파 특징이 특정 유전적 변화 특히 혈관 생성 또는 암 예후와 관련되어 있는 유전자 돌연변이 및 SNP(Single-nucleotide polymorphism)와 관계가 있음을 나타내는 연구는 존재하지 않았다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 본 발명자들은 초음파 형태학 및 혈관 표현형과 DNA 시퀀싱을 이용한 유방암의 유전자 변이 사이의 관계를 확인하여, 초음파 형태학 및 혈관 표현형은 호르몬 수용체 상태, 혈관 신생 또는 예후, 및 약물성 표적을 예측할 수 있는 유방암 관련 DNA 유전자와 관련이 있음을 확인하였다.

[16] 이에, 본 발명의 목적은 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택 시스템을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 유방암 환자의 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 수행하기 위한 프로그램이 기록된 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공하는 것이다.

[21]

과제 해결 수단

[22] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[23] 초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 표현형 결정 단계; 및

[24] 종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 유전자 정보 결정 단계.

[25] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 DNA 유전자 정보는 DNA 돌연변이 및 SNP에 관한 정보이다.

[26] 본 명세서의 상의 용어 "DNA 돌연변이" 또는 "돌연변이"란, 한 유전체 내에서 일어나는 뉴클레오티드 서열에 나타나는 변화를 의미하며 뉴클레오티드 치환, 삽입/제거, 재조합, 유전자전환, 유전자중복, 유전체중복 등의 현상을 포함한다. 대부분의 돌연변이는 DNA의 복제를 중지시키거나, 기능적으로 결함이 있는 단백질을 형성할 수 있기 때문에 개체가 살아가는데 위험 요소가 된다.

[27] 본 명세서 상의 용어 "SNP"란, DNA 염기서열의 한 부분에서 개체에 따라 다른 변이가 나타나는 것을 의미하며, 이러한 SNP는 개체마다 외모, 성격 등 유전적 다양성을 나타내거나 유전병을 유발하기도 한다.

[28] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 초음파 영상은 SMI(superb microvascular imaging) 초음파 영상 및 조영 증강 초음파(contrast-enhanced ultrasound; CEUS) 영상인 것이다.

[29] SMI(superb microvascular imaging) 초음파는 일반 초음파로는 검사할 수 없는 미세혈관 및 미세혈관에서의 혈류 흐름을 관찰할 수 있는 초음파 검사 방법이다.

[30] 조영 증강 초음파(contrast-enhanced ultrasound; CEUS)는 조영제를 이용하여 수행되는 초음파 검사 방법이다.

[31] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 SMI 초음파 영상을 통해 결정되는 표현형은 혈관 인덱스(vascular index), 혈관 형태(vessel morphology), 혈관 분포(vessel distribution) 및 관통 혈관(penetrating vessel)인 것이다.

[32] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 인덱스는 *ERBB2* 및 rs1136201으로

이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 상기 혈관 인덱스가 16.1% 이상인 경우에는 16.1% 미만인 경우와 비교하여 *ERBB2*에서의 SNP rs1136201가 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[34] 상기 혈관 인덱스는 종양 전체를 구성하는 픽셀 대비 혈관 신호를 구성하는 픽셀 수의 비율로 정의하였고, 31개 종양의 평균 혈관 인덱스를 기준으로 16.1% 미만과 16.1% 이상으로 분류하였다.

[35] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 형태는 *FGFR1*, *RET*, rs140382957, rs1799939으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 상기 혈관 형태가 복잡한(complex) 경우에는 단순한(simple) 경우나 종양내 혈관이 없는(none) 경우보다 *FGFR1*에서의 rs140382957과 *RET*에서의 rs1799939가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[37] 상기 혈관 형태는 혈류 신호가 없는 무(none)로 분류하였으며, 점 또는 선 모양의 단순(simple)으로 분류하였으며, 분지하는 양상이거나 여러 개의 혈관이 서로 연결되어 복잡한 네트워크를 이루는 경우를 복잡(Complex)으로 분류하였다.

[38] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 분포는 *KDR*, *FGFR1*, *HIF1A*, *UBE2C*, rs2305948, rs140382957, rs11549465, rs11537645으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[39] 상기 혈관 분포가 중심부에 있는 경우에는 혈류가 없는 경우나 변연부에 있는 경우보다, *KDR*에서의 rs2305948, *FGFR1*에서의 rs140382957, *HIF1A*에서의 rs11549465, *UBE2C*에서의 rs11537645가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[40] 상기 혈관 분포는 혈류 신호가 없는 무(none)로 분류하였으며, 혈류 신호가 보일 때는 종양의 변연부(pheripehral), 또는 중심(central)으로 분류하였다.

[41] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 관통 혈관은 *KDR*, *BRCA1*, rs2305948, rs80356892으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[42] 상기 관통혈관이 있는 경우에는 관통혈관이 없는 경우보다, *KDR* 에서의 rs2305948, *BRCA1* 에서의 rs80356892가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[43] 상기 관통 혈관은 종양 외부로부터 내부로 연결되어 들어오는 혈관이 있는 경우 유로 분류하였으며, 없는 경우를 무로 분류하였다.

[44] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조영 증강 초음파를 통해 결정되는 표현형은 피크 강도(peak intensity), 평균 통과 시간(mean transit time), 곡선 아래 면적(area under the curve), 조영 증강 정도(enhancement degree), 조영 증강 차수(enhancement order) 및 조영 증강 경계(enhancement margin)인 것이다.

[45] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 피크 강도는 *PDGFRA*, *KDR*, rs35597368, rs2305948으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된

것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 상기 피크 강도는 34.2 x 10^{-5} AU 이상인 경우에서 *PDGFRA* 에서의 rs35597368, *KDR* 에서의 rs2305948 이 34.2 x 10^{-5} AU 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[47] 상기 피크 강도는 시간-강도 곡선의 최대 강도로 정의하였으며, 31개 종양의 평균 피크 강도를 기준으로 34.2 x 10^{-5} AU 미만과 34.2 x 10^{-5} AU 이상으로 분류하였다.

[48] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 평균 통과 시간은 *ARNT*, *FGFR2*, rs2275237, rs755793으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[49] 상기 평균 통과 시간은 14.4초 이상인 경우에서 *ARNT*에서의 rs2275237, *FGFR2* 에서의 rs755793 이 14.4초 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[50] 상기 평균 통과 시간은 신호 강도가 평균 신호 강도 보다 높아지는 시간으로 정의하였으며, 31개 종양의 평균 통과시간을 기준으로 14.4초 미만과 14.4초 이상으로 분류하였다.

[51] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 곡선 아래 면적은 *PDGFRA* 및 rs35597368으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[52] 상기 곡선 아래 면적이 890.0 x 10^{-5} AU·초 이상인 경우에서 *PDGFRA* 에서의 rs35597368 이 890.0 x 10^{-5} AU·초 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[53] 상기 곡선 아래 면적은 총 혈액량과 관련된 곡선의 적분 값 및 투입 영역과 배출 영역 값의 합으로 정의하며, 31개 종양의 평균 곡선 아래 면적을 기준으로 890.0 x 10^{-5} AU·초 미만과 890.0 x 10^{-5} AU·초 이상으로 분류하였다.

[54] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 정도는 *MET, BCL2*, rs768678989 및 rs1800477으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[55] 상기 조영 증강 정도가 고-증강인 경우에서 *MET* 에서의 rs768678989, *BCL2* 에서의 rs1800477 이 등가-증강이거나 저-증강인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[56] 상기 조영 증강 정도는 유방암의 조영증강 정도가 주변 정상 유방조직과 비교하여 같은 경우 등가-증강으로 분류하였으며, 낮은 경우 저-증강으로 분류하였으며, 높은 경우 고-증강으로 분류하였다.

[57] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 차수는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 상기 조영 증강 차수가 구심(Centripetal)인 경우에서 *PALB2* 에서의 rs152451 이 분산(diffuse)이거나 원심(centrifugal)인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[59] 상기 조영 증가 차수는 종양 내 전반적으로 조영 증강되는 경우

분산(Diffuse)으로 분류하였으며, 종양의 내부에서 종양의 바깥으로 조영 증강되는 경우를 원심(centrifugal)으로 분류하였으며, 종양의 바깥에서 내부로 조영 증강되는 경우를 구심(Centripetal)으로 분류하였다.

[60] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 경계는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[61] 상기 조영 증강 경계가 비국한(not circumscribed)인 경우에서 *PALB2* 에서의 rs152451 이 조영 증강 경계가 국한(circimscribed) 인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[62] 상기 조영 증강 경계는 국한성인 경우 국한(circumscribed)으로 분류하였으며, 비국한성인 경우를 비국한(Not circumscribed)으로 분류하였다.

[63] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[64] 초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 표현형 결정 단계;

[65] 종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 유전자 정보 결정 단계; 및

[66] 결정된 DNA 유전자 정보를 유방암 치료법과 관련된 DNA 유전자 정보와 연관지어 개인별 유방암 치료법을 결정하는 치료법 결정 단계.

[67] 상기 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법은 상기 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법과 표현형 결정 단계 및 유전자 정보 결정 단계가 공통되기 때문에, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용의 기재는 생략한다.

[68] 본 발명에 있어서 치료법은 약물 치료법, 면역제 치료법, 호르몬제 치료법, 방사선 치료법 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 유방암 치료에 사용되는 모든 것을 포함하는 것일 수 있다.

[69] 상기 치료법 결정 단계는 유전자 정보 결정 단계를 통해 결정된 정보와 기존에 잘 알려진 사실을 연관시켜, 적절한 치료법을 결정하는 단계이다.

[70] 상기 유전자 정보 결정 단계를 통해 결정된 정보와 기존에 잘 알려진 사실을 연관시키는 것은 빅데이터 또는 AI등을 활용하여 이루어 질 수 있다.

[71] 본 발명의 실시예에 따르면, 혈관 인덱스의 증가는 *ERBB2*의 rs1136201과 연관이 있으며, *ERBB2*의 rs1136201은 표적 치료(트리스무주맙)에 대한 민감도와 관련이 있어, 혈관 초음파 검사를 통해 표적 치료제 선택이 가능하다.

[72] 본 발명의 실시예에 따르면, 피크 강도의 증가는 *KDR* 발현 및 rs2305948과 연관이 있으며, 상기 *KDR* 발현 및 rs2305948은 신보강 화학요법(neoadjuvant chemotherapy)의 예측인자이므로, 혈관 초음파 검사를 통해 유방암 치료를 위한 화학요법 선택이 가능하다.

[73]

[74] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 구성을 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택 시스템을 제공한다:

[75] 유방암 치료법과 관련된 유전자의 정보 검색 또는 추출이 가능한 데이터베이스;

[76] 상기 데이터베이스에 접근 가능한 통신부;

[77] 초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 제1 결정모듈;

[78] 종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 제2 결정모듈;

[79] 산출된 유전자 정보를 유방암 치료법과 관련된 유전자 정보와 연관 지어 개인별 유방암 치료법을 결정하는 제3 결정모듈; 및

[80] 각각의 결정모듈에서 결정된 결정 값을 표시하는 표시부.

[81] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 초음파 영상은 SMI(superb microvascular imaging) 초음파 영상 및 조영 증강 초음파 (contrast-enhanced ultrasound; CEUS) 영상인 것이다.

[82] SMI(superb microvascular imaging) 초음파는 일반 초음파로는 검사할 수 없는 미세혈관 및 미세혈관에서의 혈류 흐름을 관찰할 수 있는 초음파 검사 방법이다.

[83] 조영 증강 초음파(contrast-enhanced ultrasound; CEUS)는 조영제를 이용하여 수행되는 초음파 검사 방법이다.

[84] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 SMI 초음파 영상을 통해 결정되는 표현형은 혈관 인덱스(vascular index), 혈관 형태(vessel morphology), 혈관 분포(vessel distribution) 및 관통 혈관(penetrating vessel)인 것이다.

[85] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 인덱스는 ERBB2 및 rs1136201으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[86] 상기 혈관 인덱스가 16.1% 이상인 경우에는 16.1% 미만인 경우와 비교하여 *ERBB2*에서의 SNP rs1136201가 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[87] 상기 혈관 인덱스는 종양 전체를 구성하는 픽셀 대비 혈관 신호를 구성하는 픽셀 수의 비율로 정의하였고, 31개 종양의 평균 혈관 인덱스를 기준으로 16.1% 미만과 16.1% 이상으로 분류하였다.

[88] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 형태는 *FGFR1*, *RET*, rs140382957, rs1799939으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[89] 상기 혈관 형태가 복잡한(complex) 경우에는 단순한(simple) 경우나 종양내 혈관이 없는(none) 경우보다 *FGFR1*에서의 rs140382957과 *RET*에서의 rs1799939가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[90] 상기 혈관 형태는 혈류 신호가 없는 무(none)로 분류하였으며, 점 또는 선 모양의 단순(simple)으로 분류하였으며, 분지하는 양상이거나 여러 개의 혈관이

서로 연결되어 복잡한 네트워크를 이루는 경우를 복잡(Complex)으로 분류하였다.

[91] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 혈관 분포는 *KDR*, *FGFR1*, *HIF1A*, *UBE2C*, rs2305948, rs140382957, rs11549465, rs11537645으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[92] 상기 혈관 분포가 중심부에 있는 경우에는 혈류가 없는 경우나 변연부에 있는 경우보다, *KDR*에서의 rs2305948, *FGFR1*에서의 rs140382957, *HIF1A*에서의 rs11549465, *UBE2C*에서의 rs11537645가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[93] 상기 혈관 분포는 혈류 신호가 없는 무(none)로 분류하였으며, 혈류 신호가 보일 때는 종양의 변연부(pheripehral), 또는 중심(central)으로 분류하였다.

[94] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 관통 혈관은 *KDR*, *BRCA1*, rs2305948, rs80356892으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[95] 상기 관통혈관이 있는 경우에는 관통혈관이 없는 경우보다, *KDR* 에서의 rs2305948, *BRCA1* 에서의 rs80356892가 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[96] 상기 관통 혈관은 종양 외부로부터 내부로 연결되어 들어오는 혈관이 있는 경우 유로 분류하였으며, 없는 경우를 무로 분류하였다.

[97] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조영 증강 초음파를 통해 결정되는 표현형은 피크 강도(peak intensity), 평균 통과 시간(mean transit time), 곡선 아래 면적(area under the curve), 조영 증강 정도(enhancement degree), 조영 증강 차수(enhancement order) 및 조영 증강 경계(enhancement margin)인 것이다.

[98] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 피크 강도는 *PDGFRA*, *KDR*, rs35597368, rs2305948으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[99] 상기 피크 강도는 34.2 x 10^{-5} AU 이상인 경우에서 *PDGFRA* 에서의 rs35597368, *KDR* 에서의 rs2305948 이 34.2 x 10^{-5} AU 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[100] 상기 피크 강도는 시간-강도 곡선의 최대 강도로 정의하였으며, 31개 종양의 평균 피크 강도를 기준으로 34.2 x 10^{-5} AU 미만과 34.2 x 10^{-5} AU 이상으로 분류하였다.

[101] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 평균 통과 시간은 *ARNT*, *FGFR2*, rs2275237, rs755793으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[102] 상기 평균 통과 시간은 14.4초 이상인 경우에서 *ARNT*에서의 rs2275237, *FGFR2* 에서의 rs755793 이 14.4초 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[103] 상기 평균 통과 시간은 신호 강도가 평균 신호 강도 보다 높아지는 시간으로 정의하였으며, 31개 종양의 평균 통과시간을 기준으로 14.4초 미만과 14.4초 이상으로 분류하였다.

[104] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 곡선 아래 면적은 *PDGFRA* 및 rs35597368으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[105] 상기 곡선 아래 면적이 890.0×10^{-5} AU·초 이상인 경우에서 *PDGFRA* 에서의 rs35597368 이 890.0×10^{-5} AU·초 미만인 경우보다 더 높은 빈도로 관찰되었다.

[106] 상기 곡선 아래 면적은 총 혈액량과 관련된 곡선의 적분 값 및 투입 영역과 배출 영역 값의 합으로 정의하며, 31개 종양의 평균 곡선 아래 면적을 기준으로 890.0×10^{-5} AU·초 미만과 890.0×10^{-5} AU·초 이상으로 분류하였다.

[107] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 정도는 *MET, BCL2*, rs768678989 및 rs1800477으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[108] 상기 조영 증강 정도가 고-증강인 경우에서 *MET* 에서의 rs768678989, *BCL2* 에서의 rs1800477 이 등가-증강이거나 저-증강인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[109] 상기 조영 증강 정도는 유방암의 조영증강 정도가 주변 정상 유방조직과 비교하여 같은 경우 등가-증강으로 분류하였으며, 낮은 경우 저-증강으로 분류하였으며, 높은 경우 고-증강으로 분류하였다.

[110] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 차수는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[111] 상기 조영 증강 차수가 구심 (Centripetal)인 경우에서 *PALB2* 에서의 rs152451 이 분산 (diffuse)이거나 원심 (centrifugal)인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[112] 상기 조영 증가 차수는 종양 내 전반적으로 조영 증강되는 경우 분산(Diffuse)으로 분류하였으며, 종양의 내부에서 종양의 바깥으로 조영 증강되는 경우를 원심 (centrifugal)으로 분류하였으며, 종양의 바깥에서 내부로 조영 증강되는 경우를 구심(Centripetal)으로 분류하였다.

[113] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조영 증강 경계는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[114] 상기 조영 증강 경계가 비국한(not circumscribed)인 경우에서 *PALB2* 에서의 rs152451 이 조영 증강 경계가 국한(circimscribed) 인 경우보다 더 낮은 빈도로 관찰되었다.

[115] 상기 조영 증강 경계는 국한성인 경우 국한(circumscribed)으로 분류하였으며, 비국한성인 경우를 비국한(Not circumscribed)으로 분류하였다.

[116]

[117] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 유방암 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[118] 초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 표현형 결정 단계;

[119] 종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 유전자 정보 결정 단계; 및

[120] 결정된 DNA 유전자 정보를 통해 유방암 환자의 예후를 예측하는 예후 예측 단계.

[121] 상기 유방암 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법은 상기 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법과 표현형 결정 단계 및 유전자 정보 결정 단계가 공통되기 때문에, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용의 기재는 생략한다.

[122] 상기 예후 예측 단계는 유전자 정보 결정 단계를 통해 결정된 정보와 기존에 잘 알려진 사실을 연관시켜, 적절한 예후를 결정하는 단계이다.

[123] 상기 유전자 정보 결정 단계를 통해 결정된 정보와 기존에 잘 알려진 사실을 연관시키는 것은 빅데이터 또는 AI등을 활용하여 이루어 질 수 있다.

[124] 본 발명의 실시예에 따르면, 넓은 곡선 아래 면적 및 높은 피크 강도는 *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor A) 발현 및 rs35597368과 관련이 있으며, *PDGFRA* 및 rs35597368는 림프절 전이, 높은 조직학적 등급 및 삼중 음성 암 아형과 같은 불량한 조직학적 특징과 관련이 있기 때문에, 혈관 초음파 검사를 통해 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있다.

[125] 본 발명의 실시예에 따르면, 평균 통과 시간의 증가는 *ARNT*에서 rs2275237 및 *FGFR2*에서 rs755793과 관련이 있으며, *ARNT*에서 rs2275237 및 *FGFR2*에서 rs755793는 종양 저산소증 적응 및 종양 혈관 신생 촉진 등과 관련이 있기 때문에, 혈관 초음파 검사를 통해 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있다.

[126] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하고 질병을 치료하는 방법을 제공한다:

[127] 초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 표현형 결정 단계;

[128] 종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 유전자 정보 결정 단계;

[129] 결정된 DNA 유전자 정보를 유방암 치료법과 관련된 DNA 유전자 정보와 연관지어 개인별 유방암 치료법을 결정하는 치료법 결정 단계; 및

[130] 결정된 치료법을 이용하여 대상체를 치료하는 단계.

[131] 상기 대상체를 치료하는 단계는 수술요법, 항암 화학요법, 방사선 치료 요법, 호르몬 요법, 광역학치료법, 레이저 치료법, 면역요법, 유전자요법 등에 의해 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[132] 본 명세서에서 사용된 용어, "대상체(개체)"는 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 및 붉은털 원숭이 등을 포함하는 포유류이다. 가장 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[133] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 질병은 암이며, 보다 구체적으로 유방암이다.

[134] 본 발명의 상기 정보를 제공하고 질병을 치료하는 방법은, 본 발명의 일 양태인 i) DNA 유전자 정보를 제공하는 방법과 표현형 결정 단계, 유전자 정보 결정 단계가 중복되고, ii) 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법과 치료법 결정 단계가 중복되어, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[135]

[136] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 수행하기 위한 프로그램이 기록된 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공한다.

[137] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법을 수행하기 위한 프로그램이 기록된 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공한다.

[138] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유방암 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 수행하기 위한 프로그램이 기록된 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체를 제공한다.

[139] 본 발명의 기록매체는 프로그램 명령, 데이터 파일, 데이터구조 등을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다. 기록매체에 기록되는 프로그램 명령은 본 발명을 위하여 특별히 설계되고 구성된 것들이거나 컴퓨터 소프트웨어 당업자에게 공지되어 사용 가능한 것일 수도 있다. 예컨대 기록매체는 하드 디스크, 플로피 디스크 및 자기 테이프와 같은 자기 매체(magnetic media), CD-ROM, DVD와 같은 광 기록 매체(optical media), 플롭티컬 디스크(floptical disk)와 같은 자기-광 매체(magneto-optical media), 및 롬(ROM), 램(RAM), 플래시 메모리 등과 같은 프로그램 명령을 저장하고 수행하도록 특별히 구성된 하드웨어 장치를 포함한다. 프로그램 명령의 예에는 컴파일러에 의해 만들어지는 것과 같은 기계어 와이어뿐만 아니라 인터프리터 등을 사용해서 컴퓨터에 의해서 실행될 수 있는 고급 언어 와이어를 포함할 수 있다. 이러한 하드웨어 장치는 본 발명의 동작을 수행하기 위해 하나 이상의 소프트웨어 모듈로서 작동하도록 구성될 수 있으며, 그 역도 마찬가지이다.

[140]

발명의 효과

[141] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[142] (a) 본 발명은 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[143] (b) 본 발명은 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택을 위한 정보를 제공하는 방법 및 유방암 치료법 선택 시스템을 제공한다.

[144] (c) 본 발명은 유방암 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[145] (d) 본 발명의 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법을 이용하는 경우, 비침습적인 방법을 통해 유방암 치료 및 예후 판단에 도움이 되는 정보를 제공받을 수 있다.

[146]

도면의 간단한 설명

[147] 도 1은 31명 유방암환자의 유전자 변이를 DNA 시퀀싱으로 측정한 결과를 나타낸다.

[148] 도 2a는 높은 혈관 인덱스(22.2%)를 보이며, *ERBB2* 유전자의 rs1136201 SNP를 보인 유방암의 SMI 초음파 영상을 나타낸다.

[149] 도 2b는 낮은 혈관 인덱스(4.2%)를 보이며, *ERBB2* 유전자의 rs1136201 SNP를 보이지 않은 유방암의 SMI 초음파 영상을 나타낸다.

[150] 도 3a는 높은 피크 강도(84.6×10^{-5} AU)를 보이며, *KDR* 유전자의 rs2305948 SNP를 보인 유방암의 CEUS 영상을 나타낸다.

[151] 도 3b는 낮은 피크 강도(13.9×10^{-5} AU)를 보이며, *KDR* 유전자의 rs2305948 SNP를 보이지 않은 유방암의 CEUS 영상을 나타낸다.

[152]

발명의 실시를 위한 형태

[153] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[154]

[155] **실시예 1: 환자 특성**

[156] 본 실험은 기관 검토위원회의 승인을 받았다. 2016년 1월부터 10월까지, 유방암 분석에서의 초음파 혈관 영상 (SMI 초음파 영상 와 CEUS)의 가치를 평가하기 위한 전향적 연구에 41명의 환자가 포함되었으며, 유방 종양 환자 41 명 중 서면 동의서에 서명한 31명(평균 연령 49.4 세, 범위 36세-76세)이 본 연구에 포함되었다.

[157] 31명 환자의 유방암 (평균 크기 21.8 mm, 범위 7 내지 48 mm)에 대해, B-모드 및 혈관 초음파 (SMI 및 CEUS) 영상을 관찰하였다. 수술로 절제된 유방암 조직으로부터 얻은 게놈 DNA를 사용하여 NGS를 수행하였다.

[158]

[159] **실시예 2: 초음파 이미징 분석 방법 및 결과**

[160] **2-1. 초음파 이미징 분석 방법**

[161]

[162] 혈관 초음파 분석은 5-14 MHz 선형 변환기(linear transducer)와 함께 Aplio 500 시스템(일본, 도쿄, 캐논 메디컬 시스템즈)을 사용하였다. 유방 초음파 검사는

18년의 경험을 가진 방사선 전문의가 수행하였다. 두 명의 방사선 전문의는 다음과 같은 혈관 초음파 특징을 분석하였다.

[163] SMI 초음파 영상의 경우, 혈관 인덱스(%, 도플러 신호에 대한 픽셀과 전체 병변에 대한 픽셀 사이의 비율)를 정량적 파라미터로 평가하였다. 혈관 형태(무 또는 단순 vs 복합), 분포(무 또는 주변 vs 중앙), 관통 혈관(유 vs 무)으로 평가하였다.

[164] CEUS의 경우 시간-강도 곡선을 평가하여 정량적 파라미터를 제공하고, 증강 패턴을 평가하여 정성적 파라미터를 제공하였다.

[165] 시간-강도 곡선 파라미터는 피크 강도($x10^{-5}$ AU [AU, 임의 단위], 시간 강도 곡선의 최대 강도), 피크까지의 시간(초 단위, 피크 강도에 도달하는데 필요한 시간), 평균 통과 시간(초 단위, 강도가 평균 값보다 높아지는 시간), 기울기($x10^{-5}$ AU/s, 조영제의 최대 배출 속도), 곡선 아래 면적 ($x10^{-5}$ AU*s 총 혈액량과 관련된 곡선의 적분 값 및 투입 영역과 배출 영역 값의 합). 조영 증강 패턴은 조영 증강 정도(등가 또는 저증강 vs 과증강), 차수(원심 또는 확산 vs 구심), 경계(국한 vs 국한되지않은), 내부 균질성(균질 vs 비균질), 관통 혈관(무 vs 유), 및 관류 검출(무 vs 유)를 포함한다. 정량적 파라미터는 31 개의 암에 대한 평균값으로 이분된다(dichotomized).

[166]

[167] **2-2. 초음파 이미징 분석 결과**

[168] 표 1은 혈관 초음파 특징과 유방암의 병리학적 특징을 나타낸다.

[169]

[170] [표1]

특징		값	환자 수 (백분율)
SMI 초음파 영상	혈관 인덱스(vascular index)	<16.1%	19 (61.3)
		≥16.1%	12 (38.7)
	혈관 형태(vessel morphology)	무 (None) 또는 단순 (simple)	6 (19.4)
		복잡 (Complex)	25 (80.6)
	혈관 분포(vessel distribution)	무 (None) or 주변 (peripheral)	2 (6.5)
		중앙 (Central)	29 (93.5)
	관통 혈관(penetrating vessel)	무 (Absent)	6 (19.4)
		유 (Present)	25 (80.6)

CEUS	피크 강도(peak intensity)	< 34.2 x 10^{-5} AU	18 (58.1)
		≥ 34.2 x 10^{-5} AU	13 (41.9)
	피크까지 시간(time to peak)	> 6.8 초	13 (41.9)
		≤ 6.8 초	18 (58.1)
	평균 통과 시간(mean transit time)	< 14.4 초	21 (67.7)
		≥14.4 초	10 (32.3)
	기울기(Slope)	< 10.2 x 10^{-5} AU /초	22 (71.0)
		≥ 10.2 x 10^{-5} AU /초	9 (29.0)
	곡선 아래 면적(area under the curve)	< 890.0 x 10^{-5} AU·초	21 (67.7)
		≥ 890.0 x 10^{-5} AU·초	10 (32.3)
	조영 증강 정도(enhancement degree)	등가(iso) 또는 저(hypo)-증강	2 (6.5)
		과(hyper)-증강	29 (93.6)
	조영 증강 차수(enhancement order)	원심 (centrifugal) 또는 분산 (diffuse)	9 (29.0)
		구심 (centripetal)	22 (71.0)
	조영 증강 경계(enhancement margin)	국한된 (circumscribed)	13 (41.9)
		국한되지 않은(Uncircumscribed)	18 (58.1)
	내부 균질성(internal homogeneity)	균질 (Homogeneous)	17 (54.8)
		비균질 (Heterogeneous)	14 (45.2)
	관통 혈관(penetrating vessel)	무 (absent)	11(35.5)
		유 (present)	20 (64.5)
	관류 결손(perfusion defect)	무 (absent)	20 (64.5)
		유 (present)	11 (35.5)

병리학적 특성	종양 유형(tumor type)	침윤성 유관암 (invasive ductal carcinoma)	27 (87.1)
		관상피내암 (ductal carcinoma in situ)	4 (12.9)
	면역조직화학적 결과(immunohistochemical results)	ER 양성	21/31(67.7)
		PR 양성	22/31 (71.0)
		HER2 양성	8/31 (25.8)

[171] 환자의 혈관 초음파 및 병리학적 특징AU: 임의 단위(arbitrary units), ER: 에스트로겐 수용체(estrogen receptor), PR: 프로게스테론 수용체(progesterone receptor), HER2: 인간 표피 성장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2)

[172] 환자들의 종양 크기는 7 내지 48 mm(평균, 22mm)이였다. 정량적 혈관 파라미터의 평균 값은 다음과 같았다: SMI 초음파 영상에서의 혈관 인덱스는 16.1%, 피크 강도는 34.2 x 10^{-5} AU, 피크까지 시간은 6.8 초, 평균 통과 시간은 14.4 초, 기울기는 10.2 x 10^{-5} AU/초, 및 CEUS의 곡선 아래 면적은 890.0 x 10^{-5} AU*s. 31개의 종양 중 27개는 침윤성 유관암이였으며, 나머지는 관상피내암이였다.

[173]

[174] **실시예 3: DNA 시퀀싱 및 분석**

[175] **3-1. DNA 시퀀싱 및 분석 방법**

[176] 표적 DNA 시퀀싱은 31개의 유방암 조직과 10개의 인접 정상 조직에서 획득한 게놈 DNA에 대하여 Agilent Customized SureDesign Kit 1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. Agilent Customized SureDesign Kit 1은 105개의 혈관 생성 및 종양 연관 유전자를 포함한다 (표 2).

[177]

[178] [표2]

기능	유전자 이름
혈관신생/저산소증 관련 유전자	*AKT1, AKT3, ANGPT1, ANGPT2, ARAF, ARNT, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FIGF, HIF1A, JAK1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, MET, NKFBIZ, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PIGF, SPP1, SRC, TGFB1, VEGF-A, VEGF-C, VHL*
유방암 관련 유전자	*AURKA, AURKB, BARD1, BIRC5, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, CXCL13, ERBB2, ERBB3, ESR1, FoxM1, IGF1R, IGF2, PALB2, PICK3CA, PTTG1, RAD50, RAD51C, RRM2, RUNX1, SPP1, STAT1, STK11, TOP2A, TUBB3, UBE2C*
종양 관련 유전자	*ABL1, APC, ATM, BCL2, BRAF, CDK4, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EPCAM, FBXW7, FOXL2, GNA11, HNF1A, HRAS, IDH1, KRAS, MLH1, MPL, MRE11A, MSH2, MSH3, MSH6, MTOR, MUTHY, MYC, MYCN, NBN, NF1, NOTCH1, NPM1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PTEN, RB1, RET, ROS1, RSPO1, RSPO2, SMAD4, SMARCB1, SMO, SYK, TP53, XPO1*

[179] 표준 엑솜 캡처 라이브러리 생성을 위해, Agilent SureSelect Target Enrichment 프로토콜을 제조업체의 지침에 따라 200ng 입력 DNA와 함께 수행하였다. HiSeq 2500 시스템 (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 차세대 시퀀싱을 수행하였다. 페어드-엔드 시퀀싱 데이터(FASTQ 형식)는 Burrows-Wheeler aligner-maximum exact matches를 사용하여 인간 참조 게놈 (hg19)에 정렬하였다. 중복된 유전자 DNA 라이브러리의 리드(read)는 Picard MarkDuplicates (버전 2.2.4)를 사용하여 삭제하였으며 중복 제거된 리드의 기본 품질은 GATK4 BaseRecalibrator를 사용하여 재교정하였다. MuTect2를 사용하여 체세포 돌연변이를 감지하고 GATK4 FilterMutectCalls, FilterAlignmentArtifacts 및 FilterByOrientationBias를 사용하여 돌연변이를 검사하여 위양성을 필터링하였다. ANNOVAR (Annotate Variation)는 코딩 영역에서 각 변형의 기능적 주석에 사용하였다. 동아시아인(gnomAD, 2.1.1 release) 및 한국인 변형 아카이브에 관한 게놈 데이터베이스에서 대립 유전자 빈도(minor allele frequency)가 ≥1 % 인 선천적 변이는 제외되었다. 위양성 변이를 최소화하기 위해 변이가 정상 샘플의 50 %를 초과하는 것으로 표시되면 필터하였다. 상기 필터링을 통해 위양성 결과 및 선척적 돌연변이가 결과에서 제외될 수 있었다.

[180] Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)는 단백질 기능 및 구조에 대한 아미노산 치환의 효과를 예측하는데 사용하였다. 31 개의 유방암 샘플에서 확인된 관심 유전자를 기능적으로 분석하기 위해 ToppGene Suite의 ToppFun을

사용하여 경로 농축 분석(pathway enrichment analysis)을 수행하였다.

[181] PolyPhen-2 알고리즘을 이용하여 유전자 염기서열 변이가 해당 유전자를 손상시키는 정도를 점수화하여 나타내었다. 산출 점수가 1에 가까울수록 해당 유전자가 코딩하는 단백질의 손상이 심해서 해당 기능이 손상되었다고 판단하고, 0에 가까울수록 해당 유전자가 코딩하는 단백질이 정상 기능을 유지하고 있다고 판단하였다. PolyPhen-2 점수는 0 (단백질 정상 기능을 유지, tolerated)에서 1 (단백질 기능이 매우 손상됨, deleterious); 단백질 기능이 어느정도 손상됨(probably damaging, ≥0.957), 단백질 기능이 손상되었을 가능성이 있음(possibly damaging, ≥0.453 및 ≤ 0.956), 또는 단백질 기능이 거의 손상되지 않음(benign, ≤ 0.452)이다.

[182] 31 개의 유방암 샘플에서 확인 된 관심 유전자를 기능적으로 분석하기 위해 ToppGene Suite에서 ToppFun을 사용하여 경로 농축 분석을 수행하였다. 분자 기능, 생물학적 경로, 세포 경로와 관련된 유전자 온톨로지(Gene Ontology) 용어를 탐구했으며, 확률 밀도 함수를 사용하여 큐레이트된 경로 용어와 p 값을 얻었다. 농축 테스트에서 얻은 p-값은 다중 비교를 위해 Bonferroni 방법 (q 값)을 사용하여 조정하였다. 다중 비교를 위한 Bonferroni 조정은 여러 테스트를 동시에 평가할 때 위양성 오류율을 제어하는 유용한 방법이다.

[183]

[184] **3-2. DNA 시퀀싱 분석 결과**

[185] 본 출원인은 DNA 시퀀싱 분석을 통해 71 종의 유전자에서 총 198개의 비 침묵 돌연변이를 확인하였다. 상기 비 침묵 돌연변이는 표현형에 영향을 미치는 돌연변이였다. PIK3CA는 유방암 게놈에서 가장 빈번한 돌연변이를 나타냈으며, 16 명의 환자 유방암에서 22 개의 비 침묵 돌연변이 (51.6 %)를 나타내었다.

[186] 다른 반복 비 침묵 돌연변이(3 case 이상)는 24 개의 유방암 연관 유전자 또는 암 연관 유전자들에서 발견되었다. 상기 유전자는 TP53 (13 case), ATM (7 case), CDH1 (7 case), APC (6 case), ERBB2 (5 case), FGFR1 (5 case), 및 MET (5 case)이였다 (도 1). case는 DNA에서 비침묵 돌연변이가 발생한 환자의 수를 의미한다.

[187] PolyPhen-2 분석은 198 개의 돌연변이 중 111 개 (56 %)가 단백질 기능에 손상을 줄 것으로 예측하였다.

[188] 71 개의 유전자에 대한 경로 농축 분석 결과, 이들 환자들에서 암 경로, 세포 사멸 조절 및 세포 집단 증식 조절 ($q \leq 0.01$)과 같은 다양한 암 관련 기능이 상당히 증가한 것을 나타내었다.

[189] 상기 분석 결과는 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor, PDGF) ($q = 2.43 \times 10^{-15}$) 및 VEGF($q = 4.22 \times 10^{-15}$)에 의한 신호 전달과 같은 혈관 생성과 관련된 유전자가 본 연구와 관련된 유전자임을 나타내었다.

[190]

[191] **실시예 4: 초음파 이미징 분석 결과와 DNA 프로파일 사이의 연관성 분석**

[192] **4-1. 분석에 사용된 통계적 방법**

[193] 단일 변이 연관 테스트(single-variant association test)는 초음파 영상 특징과 유전자 프로파일 사이의 관계를 평가하기 위해 수행하였다. 변형은 다음 파라미터를 사용하여 필터링하였다: Hardy-Weinberg 평형의 정확한 테스트, p 값 <0.001 및 SNP (Single nucleotide polymorphism) 호출 속도 <95 %.

[194] 초음파 특징과 SNP 사이의 연관성을 탐지하기 위해, 카이-제곱 검정을 사용하여 p 값과 교차비(OR)를 추정하였다. 분석은 PLINK (http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/)를 사용하여 수행하였다.

[195]

[196] **4-2. 초음파 특징과 DNA 프로파일 사이의 연관성 분석 결과**

[197] 표 3은 10 개의 혈관 초음파 특징이 13 개의 SNP와 연관이 있음을 나타내었다($p < 0.05$).

[198]

[199] [표3]

초음파 특징		염색체:위치[1]	SNP	유전자	대립유전자	p 값	교차비	PolyPhen-2[2]
SMI 초음파 영상	혈관인덱스	chr17:37879588	rs1136201	ERBB2	A>G	0.04	7.75	benign
	혈관형태	chr8:38287238	rs140382957	FGFR1	G>A	0.004	0.06	benign
		chr10:43610119	rs1799939	RET	G>A	0.046	0.19	benign
	혈관분포	chr4:55979558	rs2305948	KDR	C>T	<0.001	0.03	probably damaging
		chr8:38287238	rs140382957	FGFR1	G>A	<0.001	0.04	benign
		chr14:62207557	rs11549465	HIF1A	C>T	0.01	0.05	possibly damaging
		chr20:44441403	rs11537645	UBE2C	C>G	0.01	0.05	benign
	관통혈관	chr4:55979558	rs2305948	KDR	C>T	<0.001	0.09	probably damaging
		chr17:41244982	rs80356892	BRCA1	A>G	0.03	0.10	probably damaging

CEUS	피크 강도	chr4:55979558	rs2305948	KDR	C>T	0.04	5.10	probably damaging
		chr4:55139771	rs35597368	PDGFRA	T>C	0.049	4.05	benign
	평균 통과 시간	chr1:150785811	rs2275237	ARNT	G>A	0.02	10.25	benign
		chr10:123310871	rs755793	FGFR2	A>G	0.02	10.25	benign
	곡선 아래 면적	chr4:55139771	rs35597368	PDGFRA	T>C	0.04	4.07*	benign
	조영 증강 정도	chr7:116411986	rs768678989	MET	C>T	0.01	0.05	probably damaging
		chr18:60985773	rs1800477	BCL2	C>T	0.001	0.05	benign
	조영 증강 차수	chr16:23646191	rs152451	PALB2	T>C	0.04	0.26	benign
	조영 증강 경계	chr16:23646191	rs152451	PALB2	T>C	0.003	0.11	benign

[200] [1] 염색체 위치(bp)는 NCBI(National Center for Biotechnology Information) Human Genome Build 37를 기반으로 한다.[2] PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)는 인간 SNP으로 인한 단백질 기능 손상 정도를 예측하는 도구이다. probably damaging (단백질 기능이 어느정도 손상됨) (≥ 0.957), possibly damaging (단백질 기능이 손상되었을 가능성이 있음) (≥ 0.453 및 ≤ 0.956) 또는 benign (단백질 기능이 거의 손상되지 않음) (≤ 0.452)

[201] 10 개의 혈관 초음파 특징과 13 개의 SNP사이의 총 18개의 연관성 중에서, 4개의 혈관 초음파 특징은 다음과 같이 5개의 SNP(OR > 1)와 연관성을 나타내었다: *ERBB2*에서 rs1136201(A > G)는 혈관 인덱스와 연관 (p = 0.04, OR = 7.75)(도 2); *PDGFRA*에서 rs35597368(T > C) 는 CEUS 곡선 아래 면적과 연관(p =

0.04, OR = 4.07); *PDGFRA*에서 rs35597368(T > C) (p = 0.049, OR = 4.05) 및 *KDR*에서 rs2305948(C>T) (p = 0.04, OR = 5.10)는 피크 강도와 연관(도 3); *ARNT*에서 rs2275237(G > A)(p = 0.02, OR = 10.25) 및 *FGFR2*에서 rs755793(A > G) (P = 0.02, OR = 10.25)는 평균 통과 시간(mean transit time)과 연관.

[202] PolyPhen-2를 사용한 SNP의 영향 예측 결과에 따르면, 혈관 분포(*KDR*에서 rs2305948), 관통 혈관(*KDR*에서 rs2305948, *BRCA1*에서 rs80356892), 피크 강도 (*KDR*에서 rs2305948), 증강 정도 (*MET*에서 rs768678989)와 관련있는 SNP는 상기 표현형에 영향을 주는 것으로 판단되며 (probably damaging 또는 possibly damaging), 나머지 12 개의 SNP는 표현형에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다(benign) (표 3).

[203]

[204] **4-3. 초음파 이미징 표현형, DNA 프로파일 및 유방암 치료법·예후관련 정보 사이의 연관성**

[205] SMI 초음파 영상 상에서 혈관 인덱스의 증가를 나타내는 유방암은 낮은 혈관 인덱스를 나타내는 유방암에 비해 더 높은 빈도로 *ERBB2*에서의 SNP rs1136201를 나타내었다.

[206] 일반적으로 HER2라고 지칭되는 ERBB는 20 %의 유방암 환자에서 과발현되고 공격적인 질병 지표 마커로 간주된다. 신생 혈관 생성과 관련된 분자들과 HER2 신호 전달 사이의 밀접한 관계를 통해 HER2 양성 암은 더 높은 수준의 신생 혈관 생성과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 방사선학 연구는 HER2-양성 유방암이 SMI 초음파 영상에서 더 높은 수준의 종양 혈관 분포(tumor vascularity)와 관련이 있음을 나타낸다. 혈관 인덱스는 종양 혈관 분포(tumor vascularity)를 평가하기 위한 객관적인 초음파 파라미터이다. 따라서, *ERBB2*의 SNP는 종양 혈관 생성을 촉진하는 중요한 유전적 변화이고, 미세 혈관 초음파에서 증가된 혈관 인덱스로 나타난다.

[207] Val-발현 세포는 시험관 내에서 증가된 증식 및 감소 된 세포 자멸사를 나타내기 때문에, HER2 Ile655Val 다형성(polymorphism)이라는 *ERBB2*의 rs1136201 (A>G)는 유방암에 대한 감수성 인자로 나타났다. Val 변종이 있는 HER2 양성 암 환자는 생존 기간이 짧지만 트라스투주맙 치료에 더 민감한 것으로 알려져 있다. 따라서 미세 혈관 초음파에서 증가된 혈관 인덱스를 나타내는 HER2 양성 유방암은 *ERBB2*에서의 rs1136201과 관련 있으며, 표적 치료에 대한 보다 유리한 반응을 예측할 수 있다.

[208]

[209] CEUS의 시간-강도 곡선에서 피크 강도가 증가한 유방암은 피크 강도가 낮은 유방암에 비해 더 높은 빈도로 *KDR*에서 SNP rs2305948를 나타내었다. 또한, 상기 SNP는 SNP annotation test에서 표현형에 영향을 주는 것으로 예측되었다. 피크 강도는 관심 영역(region of interest)을 통과하는 부분 혈류량을 반영하고, 피크 강도는 유방암의 미세혈관 밀도와 연관이 있다. 이러한 내용은 피크 강도가

종양 혈관 생성을 예측할 수 있음을 시사한다.

[210] *KDR*은 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 수용체 2를 암호화하는 인간 유전자로 내피 세포 발달 및 종양 혈관 신생의 직접적인 조절과 같은 VEGF 유도 반응을 매개하는 데 중요한 역할을 한다. *KDR* 발현은 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer) 환자에서 신보강 화학요법(neoadjuvant chemotherapy)에 대한 반응의 독립적인 예측인자로 확인되었으며, *KDR*의 rs2305948도 치료 반응과 연관되는 경향이 있다. 따라서, CEUS에서 유방암의 피크 강도 증가는 *KDR*의 rs2305948과 관련이 있으며, 특히 삼중 음성 암 환자에서 종양 혈관 생성 및 화학 요법에 대한 반응의 잠재적 지표가 될 수 있다.

[211]

[212] CEUS에서 넓은 곡선 아래 면적을 가지고 높은 피크 강도를 나타내는 암은 낮은 곡선 아래 면적을 가지고 피크 강도가 낮은 암에 비해 더 높은 빈도로 *PDGFRA*(Platelet-derived growth factor receptor A)에서의 rs35597368 돌연변이를 나타내었다. *PDGFRA* 는 PDGF 리간드에 대한 티로신 키나제 수용체이다. *PDGFRA*의 돌연변이 또는 과발현은 PDGF 신호 전달의 조절 장애를 유발하고 혈관 생성, 세포 이동 및 침입을 촉진하였다. 유방암 세포에서 *PDGFRA*의 높은 발현은 림프절 전이, HER2 양성, 높은 조직학적 등급 및 삼중 음성 암 아형과 같은 불량한 조직학적 특징과 관련이 있다. 따라서, CEUS에서 곡선 아래 면적 및 피크 강도의 증가는 *PDGFRA*의 돌연변이와 관련된 종양 혈관 생성 및 관류 증가를 반영 할 수 있다.

[213]

[214] CEUS의 시간-강도 곡선에서 평균 통과 시간이 더 긴 유방암은 평균 통과 시간이 더 짧은 유방암에 비해 *ARNT*에서 rs2275237 및 *FGFR2*에서 rs755793과 연관될 가능성이 10 배 더 높았다. 긴 평균 통과 시간은 병변 내부의 조영제의 긴 순환 시간을 반영하며 높은 수준의 종양 혈관 생성을 의미한다. 인간 *ARNT*는 HIF-1 β(Hypoxia-inducible factors-1 β)를 암호화하며, 이는 HIF-1α와 이종 헤테로다이머(heterodimeric) 결합을 통해 HIF-1을 생성한다. 산소가 없을 때, HIF-1은 혈관 신생, 포도당 대사, 세포 증식 및 세포 이동을 위한 다양한 유전자의 전사를 증가시켜 종양 저산소증에 대한 적응 반응을 활성화한다. 따라서 *ARNT* 돌연변이는 HIF-1 복합체 활성화에 기여 및 종양 혈관 신생을 촉진 할 수 있으며, 이는 CEUS에서 평균 통과 시간의 증가로 나타날 수 있다. *FGFR2*(Fibroblast Growth Factor Receptor 2)에 의해 암호화되는 FGFR2 단백질은 세포 증식, 분화 및 혈관 신생에 기여를 하는 *FGFR2* 매개 신호 전달 경로를 유발한다. 따라서, *FGFR2* 다형성(polymorphism)이 *FGFR2* 매개 신호 전달 경로에 영향을 미치고 종양 혈관 신생을 촉진하며, 이는 CEUS에서 증가된 평균 통과 시간으로 나타날 수 있다.

[215]

[216] **실시예 5: 초음파 이미징 표현형과 유전자 사이의 상관관계를 통한 치료법**

결정

[217] CEUS에서 높은 혈류 피크 강도를 보이고, KDR 유전자 발현이 증가된 유방암 환자들은 신생혈관형성 위험도가 높아 수술 후 모두 표적치료를 시행하였고, 추적관찰에서 재발이 없는 좋은 치료 반응을 나타내었다.

[218]

[219] 결론

[220] 상기 내용은 유방암 초음파 영상이 SNP 및 돌연변이와 같은 DNA 유전자 정보와 연관성이 있음을 나타내며, SMI 초음파 영상 및 CEUS에서의 4개의 정량적 혈관 초음파 특징이 종양 신생 혈관 생성관련 유전자에서의 5 개의 SNP와 유의미한 연관이 있음을 나타낸다.

[221] 또한, SMI 초음파 영상에서의 혈관 인덱스를 포함하는 정량적 혈관 초음파 특징과 CEUS에서 시간-강도 곡선에서의 피크 강도, 평균 통과 시간, 및 곡선 아래 면적은 *ERBB2, KDR, PDGFRA, ARNT*, 및 *FGFR2*에서의 돌연변이와 관련이 있었다.

[222]

[223] 결론적으로, 초음파 검사는 상기 유전적 변화에 의한 유방암 혈관 미세혈관의 변화를 나타낼 수 있으며, 유방암 예후평가 및 치료 방법을 선택하는데 유용한 잠재적인 서로게이트 마커를 제공할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 하기의 단계를 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 DNA 유전자 정보를 제공하는 방법:
초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 표현형 결정 단계; 및
종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 유전자 정보 결정 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 초음파 영상은 SMI(superb microvascular imaging) 초음파 영상 및 조영 증강 초음파(contrast-enhanced ultrasound; CEUS) 영상인 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 SMI 초음파 영상을 통해 결정되는 표현형은 혈관 인덱스(vascular index), 혈관 형태(vessel morphology), 혈관 분포(vessel distribution) 및 관통 혈관(penetrating vessel)인 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 혈관 인덱스는 *ERBB2* 및 rs1136201으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 혈관 형태는 *FGFR1, RET*, rs140382957, rs1799939으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 혈관 분포는 *KDR, FGFR1, HIF1A, UBE2C*, rs2305948, rs140382957, rs11549465, rs11537645으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 관통 혈관은 *KDR, BRCA1,* rs2305948, rs80356892으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 조영 증강 초음파를 통해 결정되는 표현형은 피크 강도(peak intensity), 평균 통과 시간(mean transit time), 곡선 아래 면적(area under the curve), 조영 증강 정도(enhancement degree), 조영 증강 차수(enhancement order) 및 조영 증강 경계(enhancement margin)인 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 피크 강도는 *PDGFRA, KDR,* rs35597368, rs2305948으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 평균 통과 시간은 *ARNT*, *FGFR2*, rs2275237, rs755793으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 곡선 아래 면적은 *PDGFRA* 및 rs35597368으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 조영 증강 정도는 *MET, BCL2*, rs768678989 및 rs1800477으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

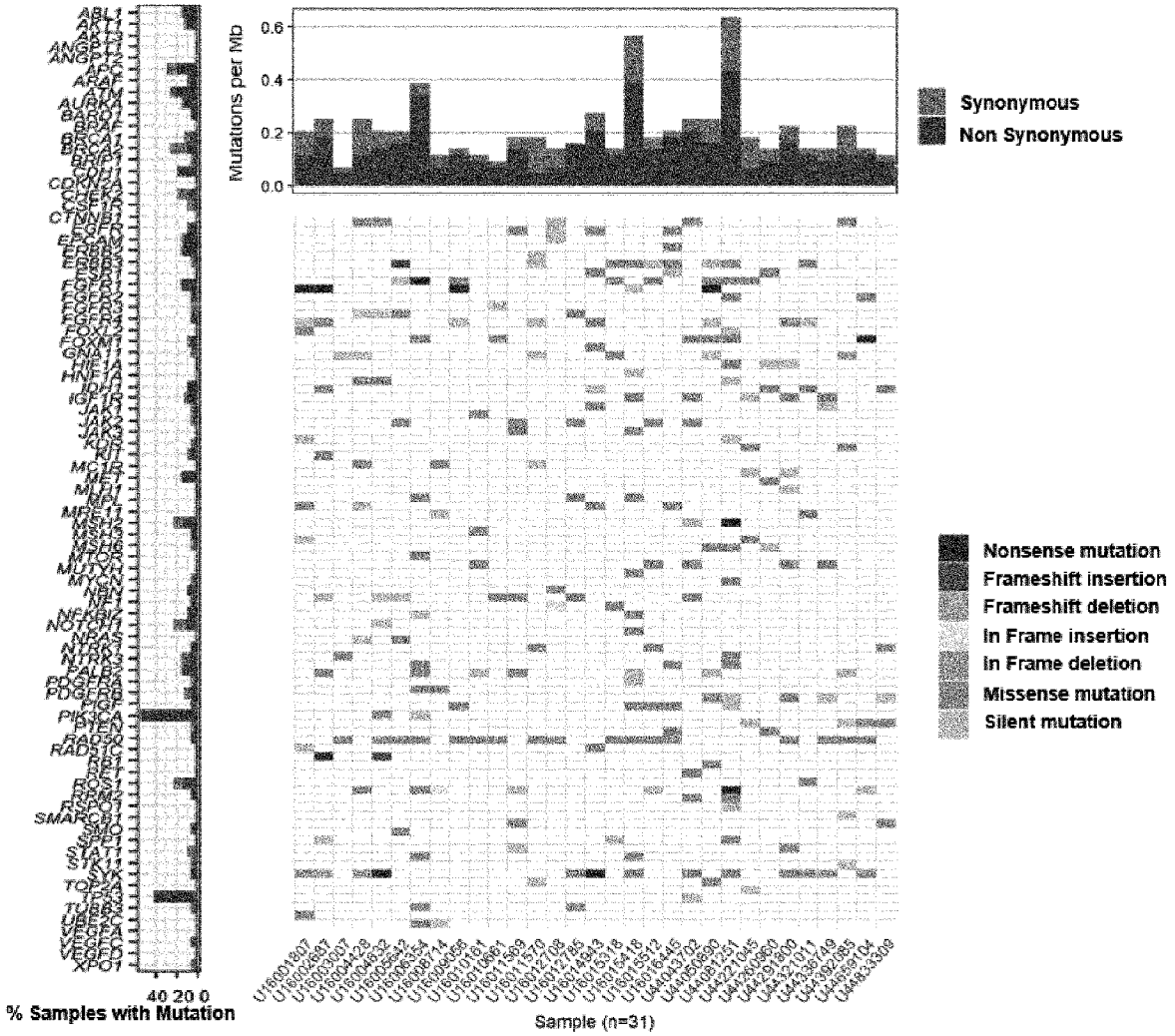
[청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 조영 증강 차수는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

[청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 조영 증강 경계는 *PALB2* 및 rs152451으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 DNA 유전자 정보와 관련된 것인, DNA 유전자 정보를 제공하는 방법.

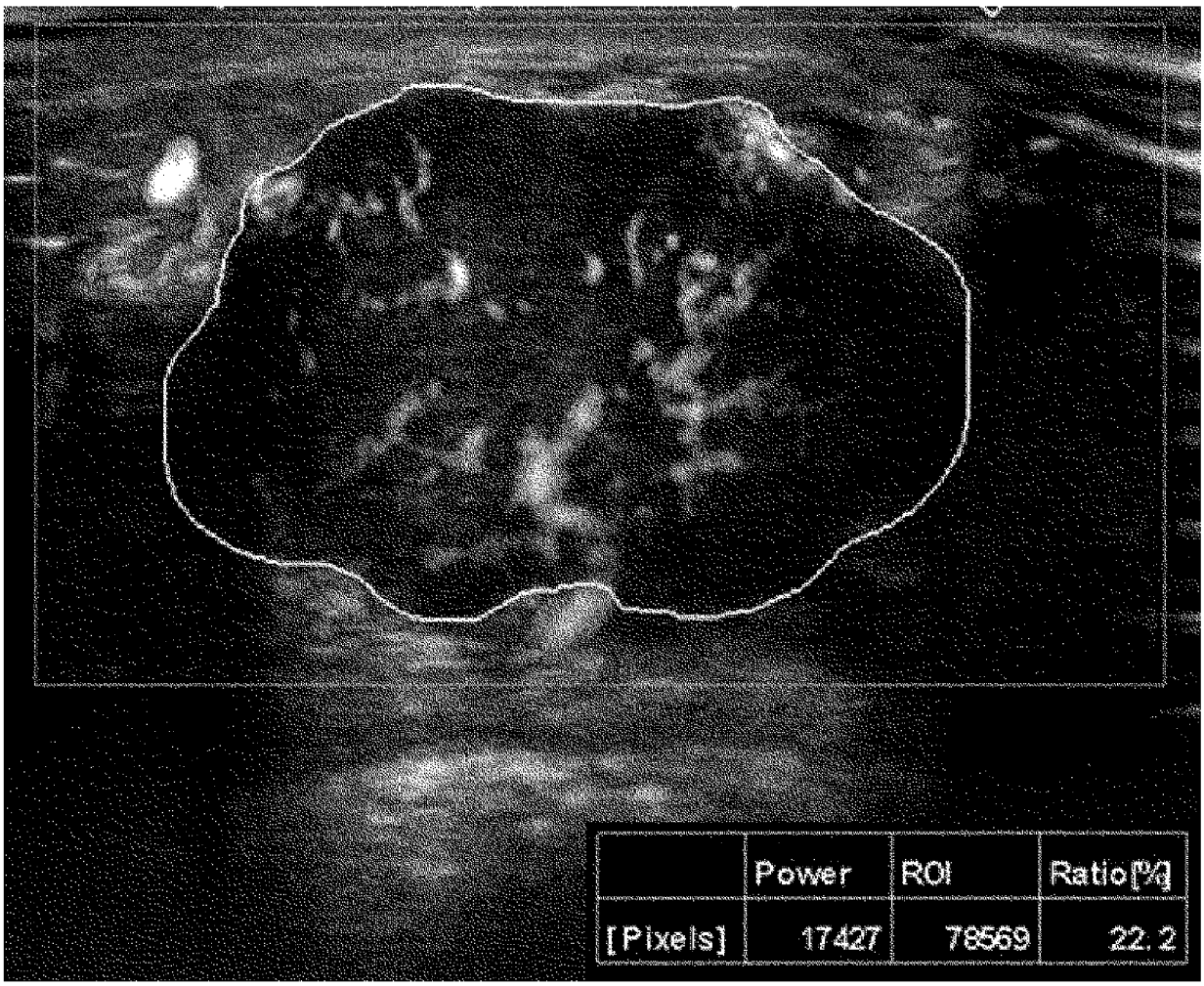
[청구항 15] 하기의 구성을 포함하는 유방암 초음파 영상을 이용한 유방암 치료법 선택 시스템:
유방암 치료법과 관련된 유전자의 정보 검색 또는 추출이 가능한 데이터베이스;
상기 데이터베이스에 접근 가능한 통신부;
초음파 영상을 이용하여 종양의 표현형을 결정하는 제1 결정모듈;
종양의 표현형을 이용하여 유방암에 관련된 하나 이상의 DNA 유전자 정보를 결정하는 제2 결정모듈;
산출된 DNA 유전자 정보를 유방암 치료법과 관련된 유전자 정보와 연관지어 개인별 유방암 치료법을 결정하는 제3 결정모듈; 및
각각의 결정모듈에서 결정된 결정 값을 표시하는 표시부.

[청구항 16] 청구항 제1항에 기재된 방법을 수행하기 위한 프로그램이 기록된 컴퓨터로 판독 가능한 기록매체.

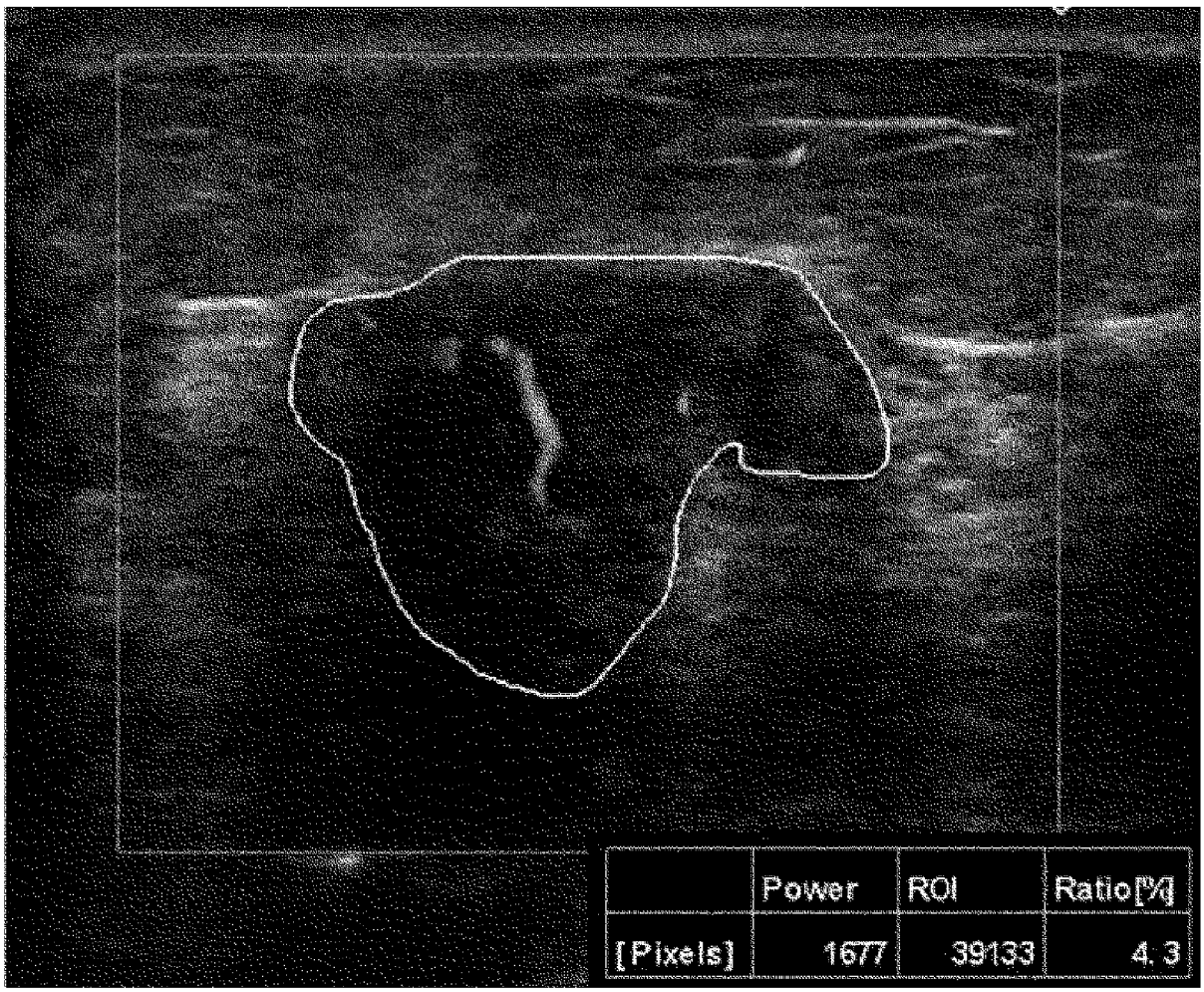
[도1]


Mutations per Mb
0.6
0.4
0.2
0.0
Synonymous
Non Synonymous
Nonsense mutation
Frameshift insertion
Frameshift deletion
In Frame insertion
In Frame deletion
Missense mutation
Silent mutation
40 20 0
% Samples with Mutation
Sample (n=31)

[도2a]

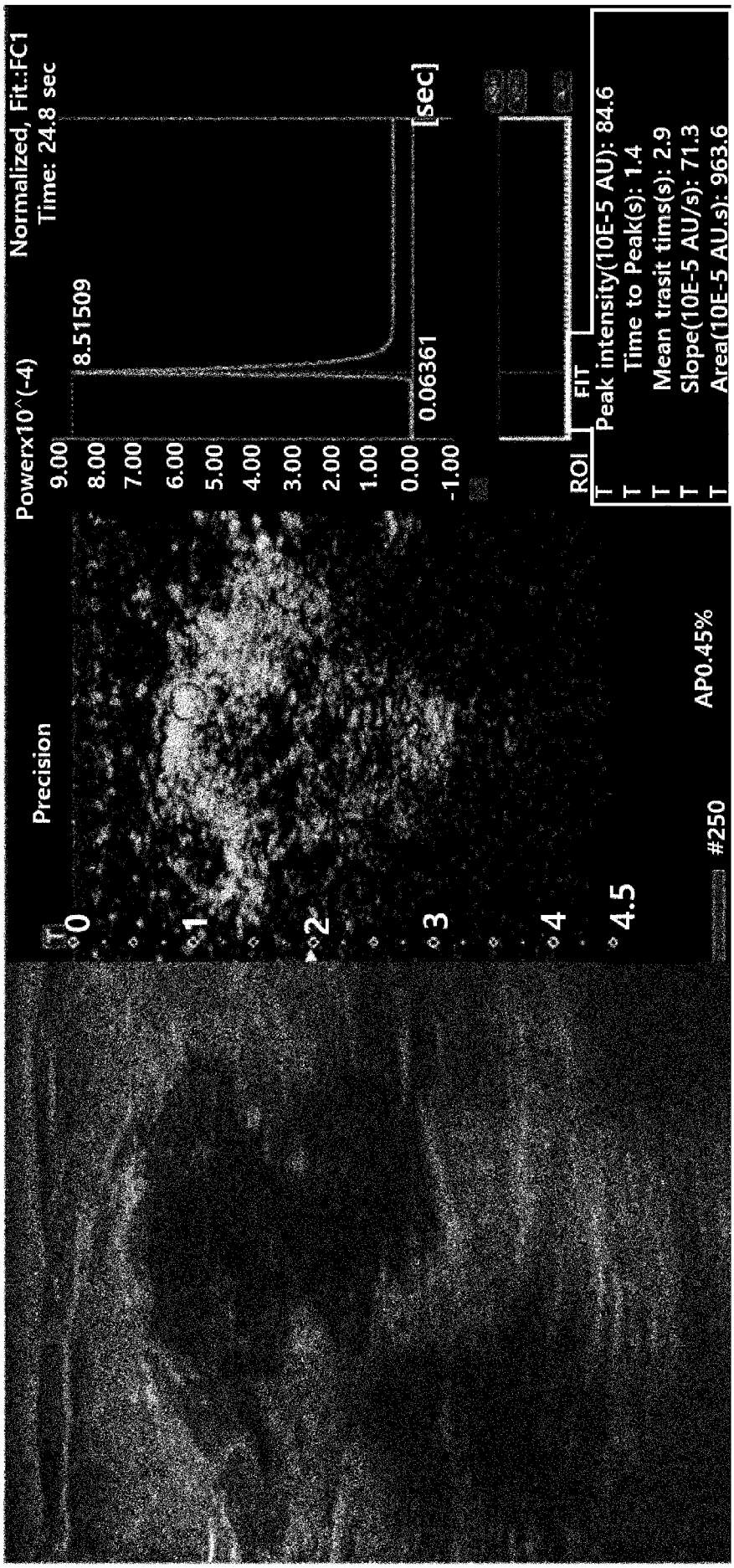


【도 2b】



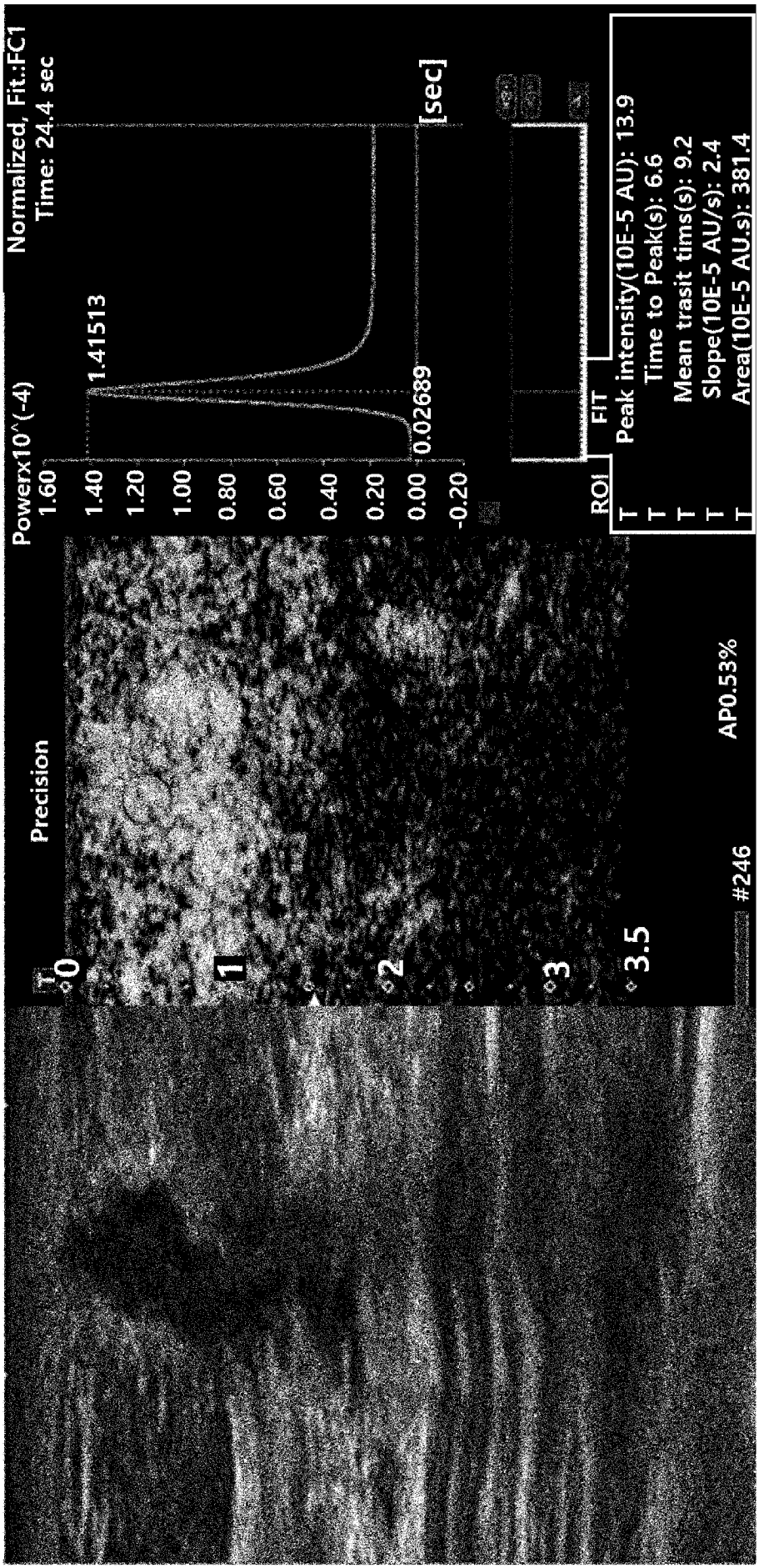
정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

【도 3a】



정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

【도 3b】



정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/001477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i; **A61B 8/08**(2006.01)i; **G16B 40/20**(2019.01)i; **G16H 50/70**(2018.01)i; **G16H 50/50**(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6886(2018.01); A61B 10/02(2006.01); A61B 5/00(2006.01); A61B 6/00(2006.01); A61B 8/08(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 유방암 (breast cancer), 초음파 (ultrasound), 영상 (imaging), 유전자 (DNA), 표현형 (phenotype), 혈관 (vascular), SNP, 돌연변이 (mutation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, L. et al. Identifying ultrasound and clinical features of breast cancer molecular subtypes by ensemble decision. Scientific reports. 2015, vol. 5, document no. 11085, pp. 1-14. See abstract; and pages 3 and 9.	1,16
Y		2,3,8,15
A		4-7,9-14
Y	PARK, A. Y. et al. A prospective study on the value of ultrasound microflow assessment to distinguish malignant from benign solid breast masses: association between ultrasound parameters and histologic microvessel densities. Korean journal of radiology. 2019, vol. 20, no. 5, pp. 759-772. See abstract; and page 762.	2,3,8
Y	WO 2009-108215 A1 (AVIARADX, INC.) 03 September 2009 (2009-09-03) See abstract; and claims 1, 2 and 12.	15
A	KR 10-2015-0043898 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 23 April 2015 (2015-04-23) See entire document.	1-16

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 July 2021	**16 July 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/001477

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0029388 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 15 March 2016 (2016-03-15) See entire document.	1-16
X	PARK, A. Y. et al. Radiogenomic analysis of breast cancer by using B-mode and vascular US and RNA sequencing. Radiology. 2020[April 2020], vol. 295, no. 1, pp. 24-34. See abstract; and pages 31-33. ※This document "PARK, A. Y. et al."is a known document that is declared by the applicant as an exception to lack of novelty in an earlier application.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/001477

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2009-108215 A1	03 September 2009	CA 2698569 A1	03 September 2009
		CN 102395682 A	28 March 2012
		CN 102395682 B	30 September 2015
		EP 2195467 A1	16 June 2010
		EP 2195467 B1	14 December 2016
		ES 2618353 T3	21 June 2017
		JP 2010-538609 A	16 December 2010
		JP 2015-057055 A	26 March 2015
		US 11021754 B2	01 June 2021
		US 2011-0136680 A1	09 June 2011
		US 2018-0291461 A1	11 October 2018
		US 9447470 B2	20 September 2016
KR 10-2015-0043898 A	23 April 2015	KR 10-1560880 B1	19 October 2015
KR 10-2016-0029388 A	15 March 2016	KR 10-1643166 B1	28 July 2016
		US 10603015 B2	31 March 2020
		US 2016-0066889 A1	10 March 2016

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/001477

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6886(2018.01)i; **A61B 8/08**(2006.01)i; **G16B 40/20**(2019.01)i; **G16H 50/70**(2018.01)i; **G16H 50/50**(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6886(2018.01); A61B 10/02(2006.01); A61B 5/00(2006.01); A61B 6/00(2006.01); A61B 8/08(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 유방암 (breast cancer), 초음파 (ultrasound), 영상 (imaging), 유전자 (DNA), 표현형 (phenotype), 혈관 (vascular), SNP, 돌연변이 (mutation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	ZHANG, L. 등, 'Identifying ultrasound and clinical features of breast cancer molecular subtypes by ensemble decision', Scientific reports, 2015, 5권, 문헌번호 11085, 페이지 1-14 초록; 페이지 3, 9	1,16 2,3,8,15 4-7,9-14
Y	PARK, A. Y. 등, 'A prospective study on the value of ultrasound microflow assessment to distinguish malignant from benign solid breast masses: association between ultrasound parameters and histologic microvessel densities', Korean journal of radiology, 2019, 20권, 5호, 페이지 759-772 초록; 페이지 762	2,3,8
Y	WO 2009-108215 A1 (AVIARADX, INC.) 2009.09.03 요약; 청구항 1, 2, 12	15
A	KR 10-2015-0043898 A (이화여자대학교 산학협력단) 2015.04.23 전체 문헌	1-16

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년07월16일(16.07.2021)	**2021년07월16일(16.07.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/001477

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0029388 A (삼성전자주식회사) 2016.03.15 전체 문헌	1-16
X	PARK, A. Y. 등, 'Radiogenomic analysis of breast cancer by using B-mode and vascular US and RNA sequencing', Radiology, 2020[2020.04], 295권, 1호, 페이지 24-34 초록; 페이지 31-33 ※ 위 문헌 "PARK, A. Y. 등"은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-16

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/001477

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-108215 A1	2009/09/03	CA 2698569 A1	2009/09/03
		CN 102395682 A	2012/03/28
		CN 102395682 B	2015/09/30
		EP 2195467 A1	2010/06/16
		EP 2195467 B1	2016/12/14
		ES 2618353 T3	2017/06/21
		JP 2010-538609 A	2010/12/16
		JP 2015-057055 A	2015/03/26
		US 11021754 B2	2021/06/01
		US 2011-0136680 A1	2011/06/09
		US 2018-0291461 A1	2018/10/11
		US 9447470 B2	2016/09/20
KR 10-2015-0043898 A	2015/04/23	KR 10-1560880 B1	2015/10/19
KR 10-2016-0029388 A	2016/03/15	KR 10-1643166 B1	2016/07/28
		US 10603015 B2	2020/03/31
		US 2016-0066889 A1	2016/03/10