



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0014714
(43) 공개일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0095181
(22) 출원일자 2023년07월21일
심사청구일자 2023년07월21일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김성진
강원특별자치도 강릉시 사천면 방동길 36, 102동
401호 (강릉아산병원아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

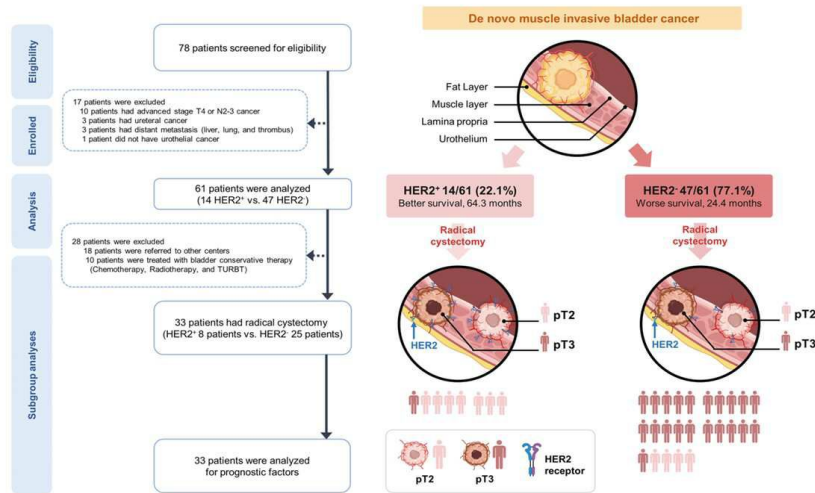
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 HER2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 근침윤성 방광암의 병기가 T2 단계인 환자군에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2)가 과발현하는 반면, 병기가 T3 단계인 환자군에서 HER2 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인함으로써, 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물로써 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57407 (2013.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 병기는 T2 또는 T3 단계인 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 발현 수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타미 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항 또는 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 키트.

청구항 6

개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계(제1단계); 및

상기 분리된 생물학적 시료에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계(제2단계)를 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 방법은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 방광암(Urothelial carcinoma)은 전 세계적으로 10번째로 흔한 암으로 연간 525,000건이 새로 발생하고 있으며 암 관련 사망 중 13번째로 높다. 근침윤성 방광암(Muscle-invasive bladder cancer; 이하 MIBC라 함)은 방광암 진단의 약 25%를 차지한다. MIBC에 대해 권장되는 표준 치료법은 시스플라틴 기반의 수술 전 화학요법(neoadjuvant chemotherapy; 이하 NAC라 함) 후 방광 절제술(Radical cystectomy; 이하 RC라 함)이며, 이는 5년 동안 약 8%의 생존율(OS)을 증가시켰다. 그러나 개인별 효과 차이가 크고, 부작용 등의 문제로 환자의 19%만이 상기 치료법을 받고 있다. NAC에 호의적으로 반응할 환자를 예측하는 방법의 부재, 방사선 검사의 제한된 예측 값, 바이오마커의 부재 등에 의해 권장 치료법과 임상 적용간의 격차가 크다. NAC 효능에 대한 신뢰할 수 있는 예측 바이오마커를 개발하는 것은 MIBC 치료를 최적화하고 환자 결과를 개선하는 데 중요하다.

[0003] MIBC는 특정 유전자와 종양학적 경로의 발현에 기초하여 하위 유형으로 분류된 이종(heterogeneous) 질환이다. 상기 분류는 진단에 의해 하위 유형을 계층화하고, 다양한 치료의 효과를 예측하는 데 도움이 된다. HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2)는 특정 하위 유형에서만 발현되므로 분자 하위 유형과 관련이 있다. 방광암 및 유방암은 HER2 과발현(HER2⁺)의 높은 비율과 같은 분자적 유사성을 공유한다. 유방암과 위암에 대해서는 HER2 관련 치료제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 방광암에 대한 예후 지표로서의 가능성에 대한 연구는 전무하다. 따라서 방광암에서 예후 마커로서 HER2의 역할을 탐색하고 HER2 표적 치료법이 효과적일 수 있는 환자군을 파악하기 위한 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 KR 10-0972618(2010.07.21. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단

단용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 근침윤성 방광암의 병기가 T2 단계인 환자군에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2)가 과발현하는 반면, 병기가 T3 단계인 환자군에서 HER2 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인함으로써, 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물로써 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 MIBC 환자군에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 발현 변화 관련 실험에 대한 전반적인 모식도이다.

도 2는 유방암에서 HER2 발현에 따른 면역조직화학(Immunohistochemistry; IHC) 염색 결과이다.

도 3은 유방암에서 HER2 발현에 따른 PD-1(도 3A), CD-8(도 3B) 및 Ki-67(도 3C)의 면역조직화학 염색 결과이다.

도 4는 MIBC 환자군에서 HER2⁺의 특성을 분석한 결과이다. 도 4a는 모든 환자군에서 연령에 따른 전체 생존율을 분석한 결과이다. 도 4b는 모든 환자군에서 HER2⁺에 따른 전체 생존율을 분석한 결과이다. 도 4c는 RC 하위그룹에서 연령에 따른 전체 생존율을 분석한 결과이다. 도 4d는 RC 하위그룹에서 HER2⁺에 따른 전체 생존율을 분석한 결과이다. 도 4e는 HER2⁺에 따른 필드 당(0.1590mm²) PD-1 종양 침윤 림프구 수를 분석한 결과이다(vs. HER2⁻). 도 4f는 HER2⁺에 따른 필드 당(0.1590mm²) CD28 종양 침윤 림프구 수를 분석한 결과이다(vs. HER2⁻). 도 4g는 HER2⁺에 따른 세포(Ki-67)의 성장분율(growth fraction)을 분석한 결과이다(vs. HER2⁻). 도 4h는 HER2 발현에 따른 필드 당(0.1590mm²) PD-1 종양 침윤 림프구 수를 분석한 결과이다. 도 4i는 HER2 발현에 따른 CD8의 필드 당(0.1590mm²) 종양 침투 림프구 수를 분석한 결과이다. 도 4j는 HER2 발현에 따른 세포(Ki-67)의 성장분율을 분석한 결과이다. 도 4e~4j는 아래쪽, 위쪽 및 아래쪽 사분위수를 나타낸다. 가운데 띠는 중앙값을 나타내고, whisker은 95번째 백분위수까지 연장된다. p 값은 $p < 0.05$ 로 표시되고 유의하지 않은 값인 경우에는 가장 작은 p 값으로 표시된다. HER2⁺에는 HER2²⁺와 HER2³⁺가 포함되고, HER2⁻에는 HER2⁰과 HER2¹⁺가 포함된다. MIBC, muscle-invasive bladder cancer; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; HER2⁺, HER2 overexpression.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명자는 근침윤성 방광암의 병기가 T2(pT2) 단계인 환자군에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2)가 과발현하는 반면, 병기가 T3(pT3) 단계인 환자군에서 HER2 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명은 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 병기는 T2 또는 T3 단계일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서, “진단(diagnosis)”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로, 본 발명의 목적상 근침윤성 방광암 병기를 확인하는 것을 의미하며, 근침윤성 방광암 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상에 대한 대상의 감수성을 판정하는 것, 테라메트릭스(therametrics)(예를 들어, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것) 등을 포함한다. 또한, 임상 상태의 일차 진단 또는 재발한 질병의 진단을 포함

한다.

- [0021] 본 명세서에서, “바이오마커(biomarker)”란 몸 안의 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 이의 변화 여부 등을 확인할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있고, 이를 이용하여 본 발명과 같이 근침윤성 방광암 병기를 진단할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 ER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 발현 수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 명세서에서, “프라이머(primer)”는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서, “프로브(probe)”는 유전자 또는 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 유전자의 존재 유무 및 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 근침윤성 방광암 병기 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단용 키트를 제공한다.
- [0029] 상기 키트는 근침윤성 방광암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하여 근침윤성 방광암 여부 또는 근침윤성 방광암 병기를 진단하는 데 사용될 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 키트는 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$ 를 포함할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 HER2(Human Epidermal growth factor Receptor 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 근침윤성 방광암 병기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0035] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역 분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산

법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 방법은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] [실험예 1] 윤리 승인

[0042] 본 실험은 대한민국 강릉시 강릉아산병원 기관심사위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호: 2022-04-013). 연구의 회고적 특성(retrospective nature) 때문에 사전 동의에 대한 요건은 포기되었다. 본 실험은 STrobe(Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) 보고 지침을 준수하였다.

[0044] [실험예 2] 환자 적격성(Patient eligibility)

[0045] 최근 방광암(Urothelial carcinoma) 진단을 받았고 방광암 병력은 없는 환자를 모집하였다. 2005년 1월부터 2013년 12월까지 강릉아산병원 경요도 방광암 절제술(transurethral resection of bladder tumor; 이하 TURBT라 함)을 이용하여 판정한 근침윤에 해당하는 pT2 단계의 환자 78명을 포함하였다. 도 1과 같이, 상기 78명의 환자 중, 임상 코호트는 신체검사, 흉부 X선, IVP(intravenous pyelogram), 뼈 스캔 및 컴퓨터 단층 촬영(CT)을 포함한 초기 검사에서 주변 장기로의 전이(metastasis) 또는 침윤(invasion)의 증거가 없는 임상적으로 비전이성(non-metastatic) d-MIBC로 진단된 61명의 환자로 구성하였다. 나머지 17명의 환자는 T4 또는 N2-3의 국소 T 단계, 요관암(ureteral cancer), 원거리 전이 또는 다른 유형의 방광암의 이유로 제외하였다.

[0047] [실험예 3] 연구 디자인 및 하위집단 분석

[0048] 환자 생존율은 HER2 발현을 포함하는 임상변수를 사용하여 평가하였다. 하위 집단(subgroup) 분석에는 긴급 RC(Radical cystectomy)를 받은 33명의 환자가 포함되었다. 도 1과 같이, 나머지 환자 28명 중 18명은 2차 소견을 위해 다른 센터로 이송되었고, 10명은 화학요법, 방사선요법 또는 반복적인 TURBT 등 RC 이외의 치료를 받았다. 서브집단이 RC 검체의 병리학적 파라미터를 포함하는 환자 코호트의 특성을 반영하는지 여부를 평가하였고, 생존을 위한 예측 인자를 평가하기 위한 변수를 분석하였다. 또한, HER2 발현의 임상변수와 바이오마커를 평가하여 RC 후 pT3 단계 또는 N1-3 MIBC의 역(adverse) 병리학적 결과를 예측하였고, 종양 미세환경(Tumour microenvironment; 이하 TME라 함) 내 PD-1, CD8 및 Ki-67 발현을 HER2⁺ 상태에 따라 평가하였다.

[0050] [실험예 4] 결과 및 변수

[0051] 모든 환자는 국민 건강 보험 데이터베이스에 등록되었다. 방사선학적 및 병리학적 분석은 이전에 모든 환자에 대해 수행되었다. CT 스캔은 일부 강화되지 않은 스캔의 낮은 품질과 방사선학적 T 단계를 평가하기 위한 방광 필링(filling) 프로토콜을 수행하지 않았기 때문에, 재평가하지 않았다. 병리학적 검체는 WHO 2004 등급 시스템에 따라 분석되었다.

[0053] [실험예 5] 조직 마이크로어레이 및 면역조직화학

- [0054] MIBC로 진단된 78개의 TURBT 검체의 포르말린(Formalin)으로 고정된 파라핀(paraffin) 내장 종양 샘플은 조직 마이크로어레이(microarrayer)(Quick-Ray, Unitma Co., Ltd., Seoul, South Korea)를 사용하여 수집 및 배열되었다. 각 종양의 대표적인 부위를 선택하여 헤마톡실린 및 에오신 염색 슬라이드에 표시하고, 해당 조직 블록을 수집하였다. 두 개의 조직 실린더(직경 2mm)를 사용하여 각 종양 블록의 매칭 영역을 천공하고(punched), 각 코어를 해당 수용체(recipient) 마이크로어레이 블록으로 이동시켰다. 면역조직화학(Immunohistochemistry; 이하 IHC라 함)을 위해 조직 마이크로어레이(Tissue microarray; 이하 TMA라 함) 파라핀 블록에서 4 μ m 두께의 부분(sections)을 절단하였다.
- [0055] HER2 발현은 유방암에 대한 지침에 따라 평가되었다. 상기 지침 및 HER2 발현에 따른 IHC 염색 이미지 결과는 도 2와 같다. HER2⁻(과소 발현)는 HER2 0 및 HER2 1+를 포함하고, HER2 0은 염색 없음(도 2A; IHC 점수, 0)을 의미하고, HER2 1+는 $\leq 10\%$ 종양 세포에서 약하거나 부분적인 염색(도 2B; IHC 점수, 1)을 의미하고, HER2⁺(과 발현)는 HER2 2⁺ 및 HER2 3⁺를 포함하며, 상기 HER2 2⁺는 $>10\%$ 종양 세포에서 약하거나 중간 정도의 완전한 막 염색(도 2C; IHC 점수, 2)을 의미하고, HER2 3⁺는 $>10\%$ 종양 세포에서 강한 완전한 막 염색(도 2D; IHC 점수, 3)을 의미한다. HER2에 대한 IHC 염색(4B5; Roche Diagnostics, Tucson, AZ, USA)은 Benchmark automated staining system(Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA)을 사용하여 조직 마이크로어레이 블록에서 수행되었다.
- [0056] 염색 방법 및 연구 방법에 대한 정보가 포함된 PD-1, CD-8 및 Ki-67의 IHC 염색 이미지는 도 3에 나타났다. Ki-67(도 3C)에 대한 IHC 염색은 Benchmark automated staining system(Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA)을 사용하여 TMA 블록에서 수행되었다. PD-1(EPR4877; Abcam, Cambridge, UK; 1:100)(도 3A) 및 CD8(SP16; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:100)(도 3B)에 대한 IHC 염색은 Bond-Max automatic immunostaining device(Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 TMA 블록에서 수행되었다. 태반(Placental) 조직 섹션은 PD-L1에 대한 양성대조군으로 사용되었고, 편도(tonsil) 조직 섹션은 PD-1, CD8 및 Ki-67에 대한 양성대조군으로 사용되었습니다. 1차 항체를 제외하고 음성대조군을 얻었다. PD-1 및 CD8에 대해 면역염색된 섹션은 종양 베드(bed) 영역 내 종양 침윤 림프구에 대해 평가되었다. 각 섹션은 현미경으로 면역 세포에 대해 평가되었다(400 $\times$; BX51; Olympus, Tokyo, Japan). 대표성(representativeness) 및 동질성(homogeneity)을 확인하기 위해, 각 샘플에서 종양 침윤 림프구를 포함하는 5개의 비연속 현미경 영역을 무작위로 선별하였다. 각 영역의 면역 세포를 카운트하고, 200 $\times$ 현미경 영역(microscopic field)의 평균(0.1590mm²/field)을 계산하였다. 핵 Ki-67⁺ 세포의 백분율은 400배 배율로 1,000개의 세포에 대해 수동으로 카운트하였고, Ki-67 값은 라벨링 지수(labeling index)를 사용하여 점수를 매겼다.
- [0058] **[실험예 6] 통계 분석**
- [0059] HER2+ 상태에 따른 변수를 분석하기 위해 Pearson's Chi-Squared test 또는 Fisher's exact test를 사용하였으며, 연속형 변수에 대해서는 독립적인 t-test를 수행하였다. OS에 대한 임상병리학적 요인과 HER2⁺의 영향은 일변량 및 다변량 Cox proportional hazards model을 사용하여 평가되었다. Kaplan-Meier survival analysis는 log-rank test를 사용하여 수행되었다. 로지스틱 회귀분석 모델(logistic regression model)을 사용하여 병리학 단계에 대한 예측 요인을 평가하였다. Mann-Whitney U 및 Kruskal-Wallis test는 비매개변수(non-parametric variable)를 비교하기 위해 수행되었다. 통계 분석은 Prism 9.3 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.
- [0061] **[실시예 1] 환자의 임상병리학적 특성**
- [0062] 61명의 임상적으로 비전이성 d-MIBC 환자 그룹의 임상적 특성을 분석한 결과, 표 1과 같이 나타났다. 임상 T3(cT3) MIBC에 대한 방사선 소견과 첫 번째 TURBT 이전의 수인성 비율은 HER2⁺(각각 6/14, 42.9% 및 1/14, 7.1%)와 HER2⁻(각각 21/47, 44.7%, 6/47, 12.8%) 그룹 간에 비교할 수 있었다. TURBT 후 두 그룹에서 동시 암종(Carcinoma in situ; 이하 CIS라 함) 환자의 종양 수, 종양 크기 및 비율이 동일했으며 모든 환자가 고등급(high-grade) MIBC를 나타냈다. HER2⁺(64.3 months, interquartile range [IQR]: 28.6-123.0) 환자가 HER2⁻

(24.4 months, IQR: 7.2-43.0) 환자보다 더 긴 평균 생존율(median survival)이 관찰되었다.

표 1

[0063]

환자 수, n (%)	총 환자 61 (100)	HER2+ 환자 14 (22.9)	HER2- 환자 47 (77.1)	p value
연령, years				
Median (IQR)	70.0 [64.0-77.0]	65.5 [54.0-71.0]	71.0 [66.5-78.5]	0.031
연령 <60 (%)	9 (14.8)	5 (35.7)	4 (8.5)	0.037
성별, n (%),				0.762
남성	6 (19.1)	1 (7.1)	7 (14.9)	
여성	55 (80.9)	13 (92.9)	40 (85.1)	
BMI (kg/m ²)	22.9 [20.9-25.4]	23.0 [21.5-25.5]	22.9 [20.6-25.3]	0.861
흡연, n (%)	23 (37.7)	4 (28.6)	19 (40.4)	0.625
음주, n (%)	13 (21.3)	3 (21.4)	10 (21.3)	1.000
당뇨, n (%)	9 (14.8)	1 (7.1)	8 (17.0)	0.627
고혈압, n (%)	26 (42.6)	6 (42.9)	20 (42.6)	1.000
Preoperative radiologic findings				
Clinical stage of T3	27 (44.3)	6 (42.9)	21 (44.7)	1.000
Hydronephrosis	7 (11.5)	1 (7.1)	6 (12.8)	0.919
TURBT findings				
T2 stage, n (%)	61(100)	14 (22.9)	47 (77.1)	1.000
High grade, n (%)	61(100)	14 (22.9)	47 (77.1)	1.000
Concurrent CIS, n (%)	4 (6.6)	1 (7.1)	3 (6.4)	1.00
Survival period, months, median [IQR]	28.3 [8.9-58.4]	64.3 [28.6-123.0]	24.4 [7.2-43.0]	0.022
Expire event, months, n (%)	52 (85.2)	9 (64.3)	43 (91.5)	0.037

[0065]

[실시예 2] 환자 생존율에 대한 예측인자

[0066]

61명의 환자에 대한 일변량(univariate) 및 다변량(multivariate)의 Cox proportional hazards model을 사용하여 생존 관련 분석을 수행한 결과, 표 2와 같이 나타났다. 일변량 분석에서는 연령 70세 미만(hazard ratio [HR]: 0.331, confidence interval [CI]: 0.181-0.606, $p<0.001$) 및 HER2⁺ 상태(HR: 0.411, CI: 0.165-0.851, $p=0.015$)는 유의한 예측인자임을 확인하였다. 다변량 분석에서는 연령 70세 미만(HR: 0.323, CI: 0.16-0.616, $p<0.001$)와 HER2⁺ 상태(HR: 0.411, CI: 0.16-0.87, $p=0.017$)는 임상병리학적 요인 조정 후 유의한 예측인자임을 확인하였다. 또한, 도 2와 같이, Kaplan-Meier 생존 곡선에서 연령 70세 미만(log-rank, $p<0.001$) 및 HER2⁺ 상태(log-rank, $p=0.012$)가 생존 예측인자임을 확인하였다. 또한, 다변량 분석에서 중요한 것으로 확인된 변수를 사용한 생존 분석 결과, 도 4A 및 4B와 같이, 연령 70세 미만(도 4A, log-rank, $p<0.001$) 및 HER2⁺ 상태(도 4B, log-rank, $p=0.012$)는 생존 예측 변수임을 확인하였다.

표 2

[0067]

		Univariate Overall survival		Multivariate Overall survival	
		HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
연령	Age ≥ 70 (n=34)	reference		reference	
	Age <70 (n=27)	0.323 [0.177-0.589]	<0.001	0.312 [0.164-0.592]	<0.001

성별	여성 (n=8)	reference		reference	
	남성 (n=53)	0.869 [0.39-1.934]	0.73	1.195 [0.519-2.748]	0.675
HER2 과발현	HER2- (n=47)	reference		reference	
	HER2+ (n=14)	0.404 [0.195-0.835]	0.015	0.401 [0.19-0.848]	0.017
Radiological findings					
Clinical local stage	No (n=27)	reference		reference	
	Yes (n=34)	0.951 [0.549-1.648]	0.859	1.045 [0.589-1.855]	0.88
Hydronephrosis	≥T3 (n=54)	reference		reference	
	≤T2 (n=7)	1.513 [0.68-3.365]	0.31	0.743 [0.305-1.811]	0.513
Pathological finding of TURBT					
Carcinoma in situ	No (n=57)	reference		reference	
	Yes (n=4)	0.786 [0.278-2.223]	0.65	0.666 [0.212-2.089]	0.486

[0069]

[실시예 3] RC 하위집단의 임상병리학적 특성

[0070]

61명의 환자 중 RC를 받은 33명의 환자에 대해 하위집단(subgroup) 분석을 수행한 결과, 표 3 및 표 4와 같이, 하위그룹에는 8/14(57.1%) HER2⁺ 및 25/47(53.2%) HER2⁻ 환자가 포함되었다.

[0071]

cT3(HER2⁺: 5, 62.3%; HER2⁻: 9, 36.0%)의 local T 단계 환자와 수술 전 수인성(HER2⁺: 0, 0.00%; HER2⁻: 4, 16.0%)의 환자 비율은 HER2⁺ 그룹과 HER2⁻ 그룹 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. HER2⁻ 그룹의 4명(16.0%)과 HER2⁺ 그룹의 7명(87.5%)은 병리학적 ≤pT2 단계였다. 또한, HER2⁺ 그룹의 환자 1명은 TURBT 완료 후 pT0으로 조정되었고, HER2⁻ 그룹의 환자 2명(8%)은 pT4 단계에 있었다. 12개 림프절(중양값)을 제거하고 RC 후 HER2⁺(12.0, IQR: 10.5-15.0) 및 HER2⁻(12.0, IQR: 7.0-18.0) 그룹 모두에서 평가하였다. 그룹 간 전이 림프절 환자 비율은 차이가 없었다(HER2⁺: 2/8[25.0%], HER2⁻: 6/25[24%]). HER2⁺ 그룹과 HER2⁻ 그룹에서 TURBT에서 RC까지의 평균 지속 시간은 각각 12일(IQR: 6.0-14.0) 및 8일(IQR: 7.0-12.0)로 나타났다. 임상 T 단계 ≤pT2 예측을 위한 병리학적 결과의 방사선 정확도와 관련하여, 6/19 환자(≤cT2)는 pT2로 진단된 반면, 9/14 환자(≤cT3)는 ≤pT3로 진단되었다. pT2 예측을 위한 방사선 조사 결과의 민감도와 특이도는 각각 40.0% 및 40.9%였다. HER2⁺ 그룹의 환자는 HER2⁻ 그룹의 환자(28.2개월, IQR: 7.5-89.8)보다 평균 생존 기간(99.3개월, IQR: 64.3-128.3)이 더 길었다.

표 3

[0072]

환자 수, n (%)	총 환자 33 (100)	HER2+ 환자 8 (24.2)	HER2- 환자 25 (75.8)	p value
연령, years				
Median (IQR)	69.0 [62.0-74.0]	67.0 [56.0-74.0]	69.0 [64.0-74.0]	0.541
연령 <60 (%)	5 (15.2)	3 (37.5)	2 (8)	0.145
성별, n (%).	30 (90.9)	7 (87.5)	23 (92.0)	1.000
BMI (kg/m2)	22.7 [20.6-25.3]	22.2 [21.3-25.9]	22.7 [20.3-25.3]	0.821
흡연, n (%)	15 (45.5)	5 (62.5)	10 (40.0)	0.481

음주, n (%)	10 (30.3)	3 (37.5)	7 (28.0)	0.947
당뇨, n (%)	3 (9.1)	1 (12.5)	2 (8.0)	1.000
고혈압, n (%)	15 (45.5)	3 (37.5)	12 (48.0)	0.911
Preoperative findings				
Clinical stage of $\leq T2$	19 (57.6)	3 (37.5)	16 (64.0)	0.363
Clinical stage of T3	14 (42.4)	5 (62.5)	9 (36.0)	0.363
Hydronephrosis	4 (12.1)	0 (0)	4 (16.0)	0.559
RC pathological results				
pT2 (VS. T3-4)	11 (33.3)	7 (87.5)	4 (16.0)	<0.001
T2N0 (VS. T3-4 or N1-3)	9 (27.3)	6 (75.0)	3 (12.0)	0.002
No residual, n (%)	1 (3.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0.003
T2, n (%)	10 (30.3)	6 (75.0)	4 (16.0)	0.002
T3a, n (%)	16 (48.5)	0 (0.0)	16 (64.0)	0.003
T3b, n (%)	4 (12.1)	1 (12.5)	3 (12.0)	1.000
T4, n (%)	2 (6.1)	0 (0.0)	2 (8.0)	1.000
High grade	33 (100)	8 (100)	25 (100)	1.000

표 4

환자 수, n (%)	총 환자 33 (100)	HER2+ 환자 8 (24.2)	HER2- 환자 25 (75.8)	p value
Carcinoma in situ, n (%)	4 (12.1)	1 (12.5)	3 (12)	1.000
Lymphadenectomy data				
Evaluated nodes per patient, median [IQR]	12.0 [8.0-17.0]	12.0 [10.5-15.0]	12.0 [7.0-18.0]	0.817
Number of patients with positive lymph node	8 (24.2)	2 (25.0)	6 (24.0)	1.000
Time to cystectomy, days median [IQR]	8.0 [7.0-13.0]	12.0 [6.0-14.0]	8.0 [7.0-12.0]	0.422
Survival period, months, median [IQR]	42.4 [12.0-93.1]	99.3 [64.3-128.3]	28.2 [7.5-89.8]	0.013
Expire event	26 (78.8)	4 (50.0)	22 (88.0)	0.073

[실시예 4] RC 하위그룹 내 생존율에 대한 예측인자

RC를 받은 환자의 일변량 및 다변량 Cox proportional hazards model을 사용한 생존 분석을 수행한 결과, 표 5와 같이 나타났다. 일변량 분석에서는 연령 70세 미만(HR: 0.306, CI: 0.185-0.708, $p=0.006$)와 HER2⁺ 상태(HR: 0.185, CI: 0.101-0.882, $p=0.029$)가 유의한 예측인자임을 확인하였다. 다변량 분석에서는 연령 70세 미만(HR: 0.145, CI: 0.049-0.424, $p<0.001$)와 HER2⁺ 상태(HR: 0.113, CI: 0.024-0.536, $p=0.006$)가 RC 검체의 병리학적 결과가 조정된 후 유의한 예측인자임을 확인하였다. 양성(positive) 림프절은 다변량 분석에서 유의한 생존율에 대한 예측인자가 아님을 확인하였다(HR: 2.585, CI: 0.938-7.122, $p=0.066$). 또한, 다변량 분석에서 유의한 것으로 확인된 변수를 사용한 생존 분석을 수행한 결과, 도 4C 및 4D와 같이, 연령 70세 미만(도 4C, log-rank, $p=0.004$) 및 HER2⁺ 상태(도 4D, log-rank, $p=0.021$)가 생존율에 유의한 예측인자임을 확인하였다.

표 5

		Univariate Overall survival		Multivariate Overall survival	
		HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
연령	Age ≥70 (n=34)	reference		reference	
	Age <70 (n=27)	0.306 [0.132-0.708]	0.006	0.145 [0.049-0.424]	<0.001
성별	여성 (n=3)	reference		reference	
	남성 (n=30)	1.542 [0.363-6.552]	0.558	4.109 [0.751-22.464]	0.103
HER2 과발현	HER2- (n=25)	reference		reference	
	HER2+ (n=8)	0.299 [0.101-0.882]	0.029	0.113 [0.024-0.536]	0.006
Radiologic findings					
Hydronephrosis	No (n=29)	reference		reference	
	Yes (n=4)	1.644 [0.563-4.804]	0.363	0.376 [0.101-1.393]	0.143
Pathological findings of RC	≥ T3 (n=14)				
	≥ T3 (n=22)	reference		reference	
Lymph node positive	No (n=25)	0.526 [0.221-1.257]	0.148	1.778[0.499-6.336]	0.375
	Yes (n=8)	reference		reference	
Carcinoma in situ	No (n=29)	1.552 [0.643-3.743]	0.328	2.585 [0.938-7.122]	0.066
	Yes (n=4)	reference		reference	
	No (n=29)	1.419 [0.488-4.132]	0.521	0.935 [0.294-2.976]	0.910
	Yes (n=4)				

[실시예 5] RC 후 병리학적 단계에 대한 예측인자

logistic regression model을 사용해서 RC 하위집단 내 병리학적 단계 pT2N0(vs. T3-4 또는 N1-3) 및 pT2(vs. T3-4 or Nx) 예측인자를 분석한 결과, 표 6과 같이 나타났다. HER2⁺ 상태는 RC 후 pT2N0(OR: 22.0, CI: 3.45-213.66, $p=0.003$) 및 pT2(OR: 36.75, CI: 4.83-797.41, $p<0.003$)의 유의한 예측인자임을 확인하였다. 4명의 수신증(hydronephrosis) 환자 모두가 pT3-4였기 때문에, 이에 대한 교차비(odds ratio)는 계산할 수 없었다. TURBT 후 CIS 진단을 받은 환자 중 한 명은 RC 후 pT3로 분류되었다.

표 6

		Univariate (pT2N0 VS. T3-4 or N1-3)		Univariate (pT2 VS. pT3-4)	
		OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
연령	Age ≥70 (n = 16)	reference		reference	
	Age <70 (n = 17)	2.36 [0.5-13.36]	0.29	1 [0.09-23.05]	1.00

성별	여성 (n = 3)	reference		reference	
	남성 (n = 30)	0.73 [0.06-16.91]	0.81	2.1 [0.49-10.06]	0.33
HER2 과발현	HER2- (n=25)	reference		reference	
	HER2+ (n=8)	22.00 [3.45-213.66]	0.003	36.75 [4.83-797.41]	0.003
Radiological findings					
Hydronephrosis	No (n = 29)	reference		reference	
	Yes (n = 4)	0.00 [0.00-∞]	0.99	0.00 [0.00-∞]	0.99
Pathologic findings of RC					
Clinical local stage	≥T3 (n = 14)	reference		reference	
	≤T2 (n = 19)	1.69 [0.36-9.54]	0.52	0.83 [0.19-3.69]	0.80
Pathological finding of TURBT					
Carcinoma in situ	No (n = 32)	reference		reference	
	Yes (n = 1)	0.00 [0.00-∞]	0.99	0.00 [0.00-∞]	0.99

[0083] [실시예 6] HER2 발현에 따른 TME 특성

[0084] HER2⁺ 발현에 따른 세포 주기(Ki-67)의 활성 단계에서 종양 침투 림프구(PD-1 및 CD8)와 세포의 밀도를 분석한 결과, 도 2E~2G 및 상기 표 7과 같이 나타났다. PD-1 밀도는 HER2 환자보다 HER2⁺ 환자에서 더 낮았고($p=0.05$; 도 2E), CD8 밀도는 HER2⁺ 및 HER2⁻ 그룹 간에 유의한 차이가 없었다($p=0.15$; 도 2F). Ki-67 값은 HER2⁺ 그룹에서 HER2 그룹보다 유의하게 낮았다($p=0.01$; 도 2G).

[0085] HER2 발현 상태에 따른 세포 주기(Ki-67)의 활성 단계에서 종양 침윤 림프구(PD-1 및 CD8)와 세포 밀도를 분석한 결과, 도 2H~2J 및 표 7과 같이 나타났다. 서로 다른 HER2 표현 상태 간에 PD-1 및 CD8 밀도에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 가장 큰 차이를 보이는 HER2 표현식의 범주는 도 2H~2I와 같이, 각각의 p -값과 함께 나타났다. Ki-67 값은 HER2 2⁺ 그룹에서 HER2 0 및 HER2 1⁺ 그룹보다 유의하게 낮았다(각각 $p=0.04$, $p=0.01$, 도 2J).

표 7

[0086]

	Total (n = 61)	HER2-(n=47)		HER2+(n=14)		p value
		HER2 0 (n = 28)	HER2 1+ (n = 19)	HER2 2+ (n = 9)	HER2 3+ (n = 5)	
PD-1 median [IQR]	15.0 [3.0-43.0]	20.0 [5.0-43.0]		5.5 [0.0-17.3]		0.0512*
		21.0 [5.167-43]	20 [4-48]	8.0 [0.0-19.5]	3.0 [1.5-41.0]	0.280**
CD8 median [IQR]	38.0 [17.0-79.0]	44.0 [21.0-97.0]		23.5 [14.8-48.8]		0.149*
		44.5 [25.0-95.5]	42.0 [18.0-97.0]	21.0 [14.5-35.5]	38.0 [20.5-88.5]	0.320**
Ki-67 median [IQR]	28.6 [16.1-49.1]	38.06 [18.47-50.02]		16.51 [9.7-35.5]		0.011*
		28.8 [18.5-50.0]	40.2 [18.5-53.0]	16.2 [9.4-19.5]	34.7 [5.4-42.7]	0.070**

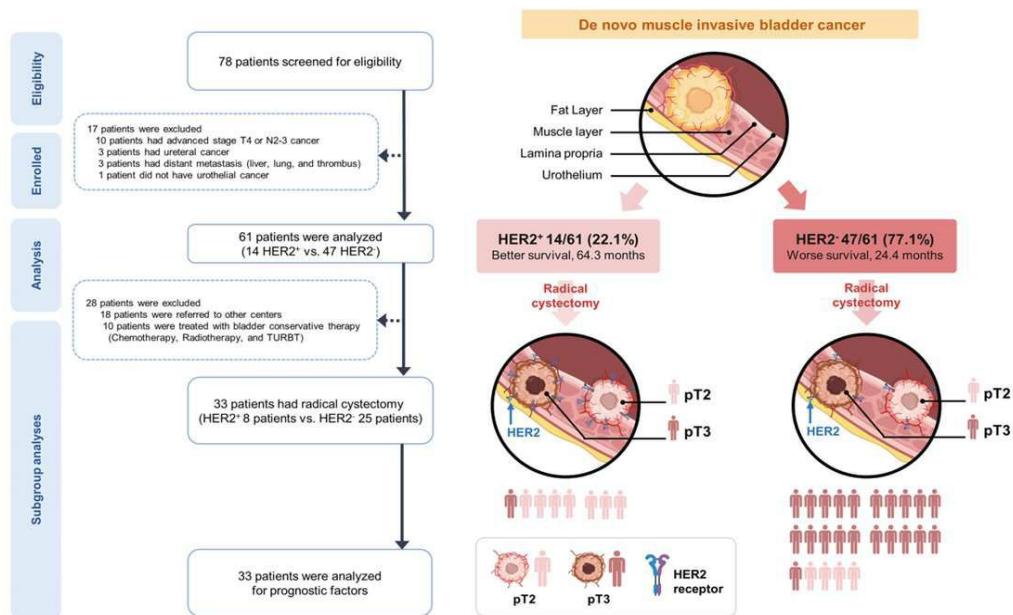
*Mann-Whitney U test; ** Kruskal-Wallis test

[0088]

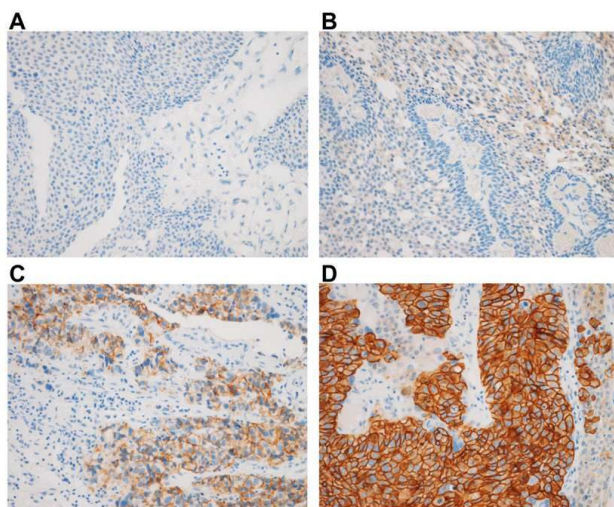
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

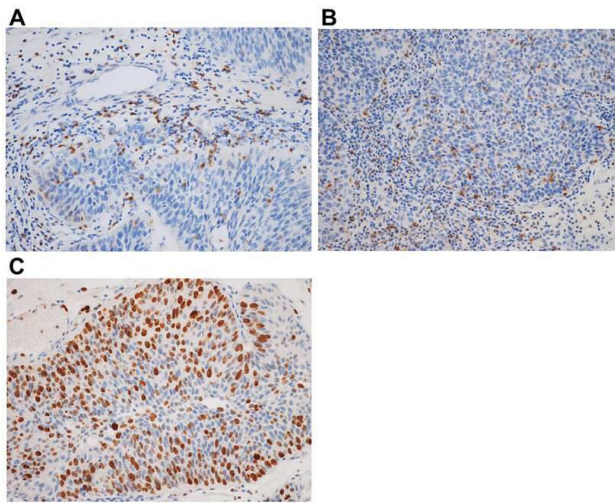
도면1



도면2



도면3



도면4

