(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 9 월 1 일 (01.09.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/137113 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/000084

(22) 국제출원일: 2016 년 1 월 6 일 (06.01.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0028232 2015 년 2 월 27 일 (27.02.2015) KR

(71) 출원인: **연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: **백순명 (PAIK, Soon Myung)**; 04036 서울시 마포구 양화로 45, 2202, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 정안 (HONESTY & JR PARTNERS INTELLECTUAL PROPERTY LAW GROUP)**; 135-833 서울시 강남구 선릉로 615 5 층, Seoul (KR).

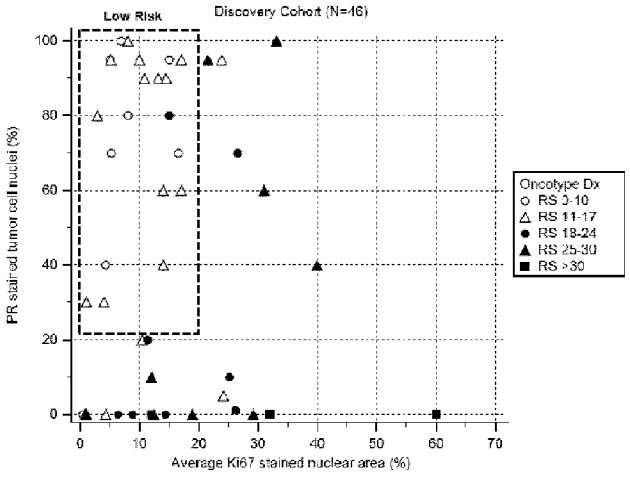
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: APPARATUS AND METHOD FOR DETERMINING PROGNOSIS OF BREAST CANCER AND WHETHER TO USE CHEMOTHERAPY

(54) **발명의 명칭** : 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to an apparatus and method for determining the prognosis of breast cancer and whether to use chemotherapy and, more specifically, to an apparatus and method capable of predicting a necessary prognosis and chemotherapeutic effects in determining the cancer treatment direction for breast cancer using progesterone receptor immunostaining results and Ki67 protein immunostaining results. The method for determining the prognosis of breast cancer of the present invention can be performed at lower costs compared with a conventional method for determining the prognosis of breast cancer, and can provide a normalized index in predicting the prognosis of breast cancer and the chemotherapeutic effect due to relatively high accuracy, and thus finally can contribute to the improvement in national health and welfare.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/137113 A1

본 발명은 유방암의 예후 및 항암화학요법 치료 여부의 판단 장치 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로게스테론 수용체 면역 염색 결과와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하여 유방암의 항암 치료 방향을 결정함에 있어서 필요한 예후 및 항암화학요법 치료 효과를 예측할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유방암 예후 판단 방법은 종래의 유방암 예후 판단 방법에 비하여 저렴한 비용으로 수행할 수 있으면서도, 비교적 정확도가 높아 유방암의 예후 및 항암화학요법 치료 효과를 예측함에 있어 표준화된 지표를 제공할 수 있어, 최종적으로는 국민 건강 복지를 높이는 데에 이바지할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법

기술분야

[1] 본 발명은 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하여 유방암의 항암 치료 방향을 결정함에 있어서 필요한 예후 및 항암화학요법의 효과를 예측할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 유방암 환자의 절반 정도를 차지하는 액와임프선 전이가 없는 에스트로겐 호르몬 수용체 양성 (ER+) 유방암은 5년 항호르몬 치료만으로도 10년 재발율이 15%이며, 항암화학요법을 더할 경우 10년 재발율의 절대값이 약 5% 정도로 감소된다(Fisher et al, Lancet. 10;364(9437):858-68, PMID: 15351193). 하지만 2004년 온코타입 Dx(Oncotype Dx) 테스트의 개발로 일부 환자에서만 항암화학요법이 필요하다는 사실이 밝혀졌다(Paik et al, J Clin Oncol 24(23):3726-34, PMID: 16720680).

[3] 온코타입 Dx가 개발된후에 Mammaprint, Endopredict, Breast Cancer Index, Prosigna 등 전사 유전자 분석에 근거한 유방암 예후 예측 테스트가 많이 개발 및 상용화 되었지만, 항암화학요법 사용 여부를 결정하는 임상 적용성이 증명된 테스트는 온코타입 Dx 뿐이다(Paik et al, J Clin Oncol 24(23):3726-34, PMID: 16720680).

[4] 메타 분석에 의하면 온코타입 Dx 나 Mammaprint와 같은 전사 유전자 분석에 근거한 유방암 예후예측 테스트들은 모두 ER+ 유방암 중 증식 속도가 낮은 유방암을 예후가 좋은 암으로 분류해준다는 것이 밝혀졌기 때문에 이론적으로는 증식 속도를 측정해주는 모든 테스트가 온코타입 Dx 와 상호 대체 가능하다고 할 수 있다 (Wirapati et al, Breast Cancer Research. 2008;10(4):R65. doi: 10.1186/bcr2124. PMID: 18662380).

[5] 하지만 실제 상황에서는 개개의 환자에 대한 임상 적용 시엔 각 테스트 마다 유전자 발현 분석방법이 서로 다르며, 전체 전사 유전체를 분석하는 것이 아니고 특정 유전자만 분석하기 때문에, 샘플 내 대조 유전자의 발현량으로 정규화 단계를 거치게 되므로 메타 분석과는 다른 결과를 보이며 온코타입 Dx 와 일치율이 낮다. 한 예로 EndoPredict의 경우 온코타입 Dx 위험군 분류와 일치율이 76% 에 해당하였다 (Varga et al, PLoS One. 2013;8(3):e58483, PMID: 23505515). 그럼에도 불구하고, 상기 여러 전사 유전자 테스트들은 국내를 비롯한 전세계 여러 국가에서 이미 임상에 사용되고 있으며 온코타입 Dx 와 마찬가지로

고가라는 문제점을 안고 있다.

[6] 따라서 본 발명의 발명자들은 증식관련 대표 단백질인 Ki67 단백질을 이용하여 저렴한 방법으로 온코타입 Dx 위험군 분류를 75% 이상의 정확도로 예측할 수 있는 유방암 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명의 일 목적은 저렴하면서도 온코타입 Dx 위험군 분류와의 일치율이 75% 이상의 높은 정확도로 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단할 수 있는 장치를 제공하고자 한다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 저렴하면서도 온코타입 Dx 위험군 분류와의 일치율이 75% 이상의 높은 정확도로 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[9] 종래에는 유방암 환자의 후속적인 항암 치료 방법을 선택하기 위한 예후 판단 방법으로 온코타입 Dx(Oncotype Dx) 테스트가 제안되었으나, 검사 비용이 매우 비싸 극히 일부 환자에만 적용되고 있어 문제가 되었다.

[10] 상기한 온코타입 Dx는 21개 유전자의 발현량을 역전사 중합효소 연쇄반응 방법으로 측정하여 1에서 100 사이의 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 결과값을 보고한다. RS 18 미만은 저위험군으로 분류되어 항암화학요법을 사용하지 않고 호르몬 요법만으로 치료하여도 10년 재발율이 10% 미만이라고 검증되었다. 반면에 RS 30 초과인 고위험군은 재발율이 매우 높은 대신 항암제의 치료 효과가 매우 크다는 것이 검증되었다. RS 18 이상 30 이하의 중간위험군은 항암 효과가 적거나 없고, 재발율은 10% 이상이므로 아직 뚜렷한 치료 방향이 없다(Paik et al, J Clin Oncol 24(23):3726-34, PMID: 16720680). 이러한 중간 위험군은 보통 환자에게 치료방향의 선택을 주며 약 절반 정도의 환자가 항암제 치료를 선택한다고 알려져 있으며 앞으로 TAILORx(the Trial Assigning IndividuaLized Options for Treatment Rx) 임상 시험의 결과에 따라 치료 방향이 결정될 예정이다(Sparano et al N Engl J Med. 2015 Sep 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26412349).

[11] TAILORx 임상 시험에서는 RS 11 미만인 경우 저위험군으로 분류하며 항암화학요법을 사용하지 않았고, RS 11 이상 25 미만인 경우 중간위험군으로 분류하여 무작위 임상 시험을 진행하였으며, RS 25 이상인 경우 고위험군으로 분류하여 항암화학요법을 사용하였다. 중간위험군의 임상 시험 결과는 아직 보고된 바 없으나, 최근 New England Journal of Medicine에서 RS 11 미만의 저위험군 환자의 경우 항호르몬 치료만으로도 예후가 매우 좋았다는 결과가 발표된 바 있다(Sparano et al, N Engl J Med. 2015 Sep 27. [Epub ahead of print]

PubMed PMID: 26412349). 따라서 온코타입 Dx의 예후 재발율의 값을 하기 표 1과 같이 분류화하는 것이 임상적으로 매우 의미가 있다.

[12] [표1]

온코타입 Dx 예후 재발율(RS)	TAILORx 기반 위험군 분류	치료 방법
< 11	1. TAILORx 저위험군	항암화학요법은 사용하지 않음
11 ~ 17	2. 저위험군 (TAILORx 중간 위험군)	
18 ~ 24	**3.** TAILORx 중간 위험군	**TAILORx** 결과를 기다리며 선택적 항암화학요법
25 ~ 30	**4. 중간위험군** (TAILORx 고위험군)	**항암화학요법**
> 30	**5. 고위험군**	

[13]

[14] 온코타입 Dx는 현재 미국, 아일랜드, 이스라엘 등 선진 국가에서는 이미 국가 보험으로 시행하고 있어 연 7만명의 환자에게 적용되고 있으나, 국내에서는 보험 대상이 아니어서, 검사 비용이 400만원 이상 들어 매우 비싸기 때문에 극히 일부 환자에만 적용되고 있다.

[15] 한편, 온코타입 Dx 21개 유전자 중 가장 중요한 유전자들은 에스트로겐 수용체 그룹(estrogen receptor group) 유전자인 ESR1, PGR, BCL2, SCUBE2와 증식 그룹(proliferation group) 유전자인 MKI67, STK15, Survivin, CCNB1, MYBL2이다(Paik et al, N Eng J Med, 351(27):2817-26, PMID 15591335). 따라서 상기 에스트로겐 수용체 그룹을 대표하는 프로게스테론 수용체(Progesterone receptor)와 증식 그룹을 대표하는 MKI67, 즉 Ki67 단백질을 면역 염색으로 대체할 수 있는 가능성이 있으며 많은 연구자들이 이를 시도하고 논문을 발표하였으나, 아직 Ki67이 NSABP B-20 임상시험에서 항암화학요법 치료 효과를 예측할 수 있다는 검증은 되지 않았다.

[16] 항암화학요법 치료 효과를 예측할 수 있다는 것이 검증된 유일한 마커인 온코타입 Dx 결과를 Ki67 단백질을 이용하여 예측할 수 있다면, Ki67 단백질의 임상 적용이 가능하다. 그러나 현재 Ki67 단백질을 이용하여 온코타입 Dx 결과를 정확히 예측할 수 없는 가장 큰 이유는 면역 염색 결과의 판단이 표준화되어 있지 않기 때문이다. 최근 6곳의 유명 암 병원에서 같은 환자의 조직을 가지고 링스터디를 시행하여 그 중 두 병원에서 병리 의사가 현미경을 육안으로 보고 판단한 결과의 관계도를 도 1에 그래프로 나타내었는데, 도 1에서 보는 바와 같이 판단 결과가 서로 일치하지 않는 것을 볼 수 있다(Polley et al, J

Natl Cancer Inst. 2013 Dec 18;105(24):1897-906. doi: 10.1093/jnci/djt306. Epub 2013 Nov 7. PubMed PMID:24203987).

[17] 이러한 제한에도 불구하고 일부 연구자들은 Ki67 단백질을 포함한 여러 마커를 이용해 온코타입 Dx 결과를 예측하는 알고리즘을 만들려는 시도를 하였지만 임상에 적용하기에는 정확도가 너무 낮았다. 가령 Allison 등은 트리형 분류 분석을 통해 온코타입 Dx 결과를 32% 정도 예측할 수 있었다(Allison et al, Breast Cancer Res Treat, 2012; 131(2):413-24, PMID 21369717). 또한, Kelin 등은 하기 식 (1)과 같은 예후 재발율의 알고리즘을 개발하여 온코타입 Dx 예후 재발율을 예측하려는 시도를 하였지만, 온코타입 위험 분류와의 일치율이 55% 정도에 불과하였다(Klein et al, Modern Pathology 2013; 26(5):658-64, PMID:23503643).

[18] [식 (1)]

[19] Recurrence score=15.31385+Nottingham score*1.4055+ERIHC*(0.01924)+PRIHC*(0.02925)+(0 for HER2 negative, 0.77681 for equivocal, 11.58134 for HER2 positive)+tumor size*0.78677+Ki-67 index*0.13269

[20]

[21] 이에 본 발명의 발명자들은 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하는 경우 매우 간단하고 저렴한 방법을 통해 온코타입 Dx 결과 및 유방암의 예후를 높은 정확도로 예측할 수 있음을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

[22] 즉, 본 발명은 환자로부터 유방 조직 샘플을 추출한 뒤, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율 또는 Allred 스코어와, Ki67 단백질의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포의 수의 비율에 따라 재발율의 위험도를 판단하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법을 제공한다.

[23] 구체적으로, 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플의 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%) 또는 Allred 스코어를 입력받기 위한 제1 입력부;

[24] Ki67 단백질을 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 입력받기 위한 제2 입력부;

[25] 상기 제1 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 초과이거나 Allred 스코어가 5 이상이고, 제2 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 미만인 경우 저위험군으로 분류하기 위한 분류 연산부; 및

[26] 상기 분류 연산부의 분석 결과를 출력하기 위한 출력부를 포함하는 유방암의

예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치를 제공한다.

[27] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플의 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%) 또는 Allred 스코어를 입력받기 위한 제1 입력부;

[28] Ki67 단백질을 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 입력받기 위한 제2 입력부;

[29] 상기 제1 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 이하이거나 Allred 스코어가 5 미만이고, 제2 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우 저위험군으로 분류하기 위한 분류 연산부; 및

[30] 상기 분류 연산부의 분석 결과를 출력하기 위한 출력부를 포함하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치를 제공한다.

[31] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 초과이거나 Allred 스코어가 5 이상이고;

[32] Ki67 단백질을 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 미만인 경우, 저위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[33] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 세포 수의 비율이 20% 이하이거나 Allred 스코어가 5 미만이고;

[34] Ki67 단백질을 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우, 저위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[35] 본 발명의 바람직한 한 구현 예에 따르면, 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 또는 Ki67 단백질 면역 염색 결과 염색 지수가 가장 높은 부위(hot spot)에 대하여 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체 또는 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 측정하거나 Allred 스코어를 측정함으로써 위험군 분류의 정확도를 높일 수 있다.

[36] 보다 바람직하게는 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된

프로게스테론 수용체를 포함하는 세포 수의 비율이 20% 이하이거나 Allred 스코어가 5 미만인 경우, Ki67 단백질 면역 염색 결과 염색 지수가 가장 높은 부위(hot spot)에 대하여 전체 암세포 수 대비 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 측정할 수 있다.

[37] 여기서, 상기 염색 지수가 가장 높은 부위, 즉 핫 스팟(hot spot)의 모양 또는 면적의 넓이는 제한하지는 않으나, 예를 들면 반경이 400~650㎛인 원형의 부위일 수 있다.

[38] 본 발명에서, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체 또는 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포의 수를 확인하는 방법은 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 400 배율의 현미경을 이용하여 육안으로 판별할 수 있다.

[39] 또한, 상기 저위험군은 종래의 온코타입 Dx에 따른 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 판단 값이 0 이상 30 이하, 바람직하게는, 0 이상 24 이하, 보다 바람직하게는 0 이상 18 이하에 해당하는 군을 의미할 수 있다.

[40] 본 발명에서 상기 "면역 염색"이란 항원-항체 반응을 이용하여 조직, 세포 내의 특정 물질을 표지한 항체를 사용하여 염색하는 면역 조직 화학 염색(immunohistochemical staining)을 의미하는 것으로, 보다 상세하게는 세포 내 특정 물질의 존재 유무를 시각적으로 확인할 수 있도록 효소 또는 형광 물질 등을 표지 마커를 이용한다. 우선, 검출 대상에 대하여 특이적이며 표지 또는 비표지된 1차 항체를 사용하고, 상기 1차 항체에 대하여 결합할 수 있으며 표지 마커가 결합된 2차 항체 또는 폴리머를 사용한다. 이후, 상기 표지 마커의 존재 유무 및 강도를 측정하여 검출 대상이 되는 물질의 존재 유무 및 그 양을 측정할 수 있다. 본 발명에서는 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR) 또는 Ki67 단백질에 특이적인 1차 효소와 형광 물질 또는 효소로 표지된 2차 항체 또는 폴리머를 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 프로게스테론 수용체의 면역 염색에는 벤타나 XT 장치(벤타나 재팬, 도쿄, 일본)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, Ki67 단백질의 면역 염색에는 Abcam (메사추세츠, 미국) 사 항-Ki67 단백질 항체를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당해 기술분야에서 면역 조직 화학 염색 시 사용할 수 있는 프로게스테론 수용체에 특이적인 항체 및 Ki67 단백질에 특이적인 항체라면 제한없이 사용할 수 있다.

[41] 본 발명에서 상기 "Allred 스코어"란 유방암 조직에서 호르몬 수용체, 본 발명에서는 프로게스테론 수용체가 얼마나 강하게 나타나는 지 보여주는 점수체계로(Harvey et al. Journal of Clinical Oncology, 17, 1474[1999] 참고), 보다 상세하게는 프로게스테론 수용체의 면역 조직 화학 염색 후 염색 강도(스코어 0 내지 3)와 염색된 비율(스코어 0 내지 5)을 수치화한 뒤 이들을 더하여 총 스코어로 표기한다. 염색 강도 스코어와 염색 비율 스코어의 평가 기준은 다음과 같다:

[42] (1) 염색 강도 스코어

[43] 0: 음성(negative); 1: 약함(weak); 2: 중간(intermediate); 3: 강함(strong)

[44] (2) 염색 비율 스코어

[45] 0: 염색된 암세포 비율 0%; 1: 염색된 암세포 비율 0 초과 1% 이하; 2: 염색된 암세포 비율 1 내지 10%; 3: 염색된 암세포 비율 11 내지 33%; 4: 염색된 암세포 비율 34 내지 66%; 5: 염색된 암세포 비율 67 내지 100%

[46] (단, 상기 '염색된 세포 비율'이란 프로게스테론 수용체 면역 조직 화학 염색 결과 시료 내 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수를 의미한다.)

발명의 효과

[47] 본 발명의 유방암 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법은 종래의 유방암 예후 판단 및 항암화학요법 사용 여부 판단 방법에 비하여 저렴한 비용으로 수행할 수 있으면서도, 비교적 정확도가 높아 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단함에 있어 표준화된 지표를 제공할 수 있어, 최종적으로는 국민 건강 복지를 높이는 데에 이바지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[48] 도 1은 Polley 등의 논문에서 발췌한 그림으로 임의의 두 병원에서 병리 의사가 Ki67 면역 염색 결과를 현미경을 통해 육안으로 판단한 결과의 관계도를 그래프로 나타낸 것이다 (Polley et al, J Natl Cancer Inst. 2013 Dec 18;105(24):1897-906. doi: 10.1093/jnci/djt306. Epub 2013 Nov 7. PubMed PMID:24203987).

[49] 도 2는 실험예 1에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율을 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[50] 도 3a는 실험예 1에서 유방암 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 면역 염색 후 핫 스팟을 제외한 임의의 스팟에 대하여 400배율 현미경으로 면역 염색 결과를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

[51] 도 3b는 실험예 1에서 유방암 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 면역 염색 후 면역 염색 지수가 가장 높은 핫 스팟에 대하여 400배율 현미경으로 면역 염색 결과를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

[52] 도 4는 실험예 1에서 Ki67 단백질 면역 염색 후 핫 스팟에 대하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율을 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[53] 도 5a 및 도 5b는 상기 도 4에서 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 염색된

암세포 수의 비율을 20% 이하이고, Ki67 면역 염색 결과 염색된 암세포 수의 비율이 10% 미만이나, ▲점으로 표시된 한 명의 환자에 대하여 Ki67 면역 염색 후 400배율 현미경으로 면역 염색 결과를 관찰한 사진을 나타낸 것이다. 도 5a에서는 암세포가 Ki67 염색이 되었으나, 도 5b에서는 암세포가 아닌 면역 세포들이 염색되었다.

[54] 도 6은 실험예 1에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과에 대하여 ROC 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

[55] 도 7은 실험예 1에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[56] 도 8은 실험예 1에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[57] 도 9는 실험예 2에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[58] 도 10은 실험예 2에서 핫 스팟에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어는 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[59] 도 11은 실험예 2에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과에 대하여 ROC 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

[60] 도 12는 실험예 2에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[61] 도 13은 실험예 2에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[62] 도 14는 실험예 3에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율을 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[63] 도 15는 실험예 3에서 핫 스팟에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 세포 수의 비율을 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입

Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[64] 도 16은 실험예 3에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과에 대하여 ROC 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

[65] 도 17은 실험예 3에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[66] 도 18은 실험예 3에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[67] 도 19는 실험예 4에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[68] 도 20은 실험예 4에서 핫 스팟에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포의 수를 측정한 결과는 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어는 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

[69] 도 21은 실험예 4에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과에 대하여 ROC 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

[70] 도 22는 실험예 4에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[71] 도 23은 실험예 4에서 본 발명의 방법에 의한 분류 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여, 본 발명의 방법에 의한 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하여 도표로 나타낸 것이다.

[72] 도 24는 비교예 1에서, 환자의 Ki67 단백질을 면역 염색하여 이미지 분석을 수행하지 않고 병리 의사의 주관적 판단에 따라 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율을 Y 축으로 정한 뒤, 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[73] 본 발명은 환자로부터 유방 조직 샘플을 추출한 뒤, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율 또는 Allred 스코어와, Ki67 단백질의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포의 수의 비율에 따라 재발율의 위험도를 판단하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및

항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[75]

[76] 실시예

[77]

[78] [실험예 1]

[79] 온코타입 Dx를 대체할 저렴한 비용의 테스트를 만들기 위해서 연세 암병원 유방암 센터에서 치료받은 ER+/N- 환자 중 온코타입 Dx를 시행한 46명의 환자군을 대상으로 프로게스테론 및 Ki67 면역 염색 결과에 대한 이미지 분석을 Image J 프로그램(http://imagej.nih.gov)과 ImmunoRatio plug in(Tumoinet et al, Breast Cancer Res. 2010; 12(4):R56)을 이용하여 시행하였다. 단, 본 실험에서 사용된 ImmunoRatio 는 당해 기술분야에 익숙한 통상의 기술자라면 누구나 이해할 수 있는 일반적인 이미지 분석법을 적용한 것으로, 이를 대체할 수 있는 다른 이미지 분석 방법이나 기존 프로그램으로 대체 가능하다.

[80] 구체적으로는, 상기 유방암 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축(최소 3개 이상의 400x field를 분석), 그리고 프로게스테론 수용체를 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 Y 축으로 정하고, 환자의 온코타입 Dx RS(Recurrence Score) 범위에 따라 표기를 달리하여 도 2에 그래프로 나타내었다.

[81] 도 2에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론을 포함하는 암세포 수의 비율이 20%를 초과하는 경우이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 미만인 경우, 중간 위험군 1례(●)를 제외하고는 모두 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[82] 또한, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색한 뒤 가장 염색 지수가 높은 부위를 400배율 현미경으로 관찰하여 반경이 대략 400 내지 650㎛인 원형의 부위를 핫 스팟으로 선정하였다. 이때 핫 스팟을 제외한 임의의 부위를 400배율 현미경으로 관찰한 사진(반경이 400~650㎛인 원형 부위)은 도 3의 (a)에 나타내었고, 상기 400배율 현미경으로 관찰한 핫 스팟의 사진은 도 3의 (b)에 나타내었다. 상기 핫 스팟에 있어서, 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축, 전체 암세포

수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 Y 축으로 정하고, 상기 유방암 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 4에 그래프로 나타내었다.

[83] 도 4에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 이하이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 핫 스팟에서 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우, 대부분이 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[84] 다만, 한 명의 환자가 프로게스테론 면역 염색 결과가 20% 이하이고, Ki67 면역 염색 결과가 10% 미만임에도 높은 RS 값을 보였는데(▲), 이 경우 병리 슬라이드 리뷰 결과 림프구성 침윤(lymphoid infiltrate)이 심하게 있는 경우였다. 즉, 도 5의 (a)에서 보는 바와 같이 암세포는 Ki67 염색이 매우 낮은 반면 도 5의 (b)에서 보는 바와 같이 주위의 림프구성 침윤에서 많은 림프구가 염색된 것을 볼 수 있다. 즉, RS 값이 고위험군으로 잘못 나타낸 것으로 보인다.

[85] 따라서, 본 발명의 방법에 의하는 경우 매우 간단한 방법이나 높은 정확도로 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있고, 특히 프로게스테론 면역 염색 결과 염색된 암세포 수의 비율이 20% 이하인 경우에는 핫 스팟을 선정하여 분석하는 경우 그 정확도를 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.

[86] 도 2 및 도 4에 나타낸 이미지 분석을 이용하여 프로게스테론 면역 염색 결과 및 Ki67 면역 염색 결과를 이용한 위험군 분류와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 2와 같다.

[87] [표2]

본 발명에 따른 분류	온코타입 Dx 분류		합계
	저위험군(RS 18 미만)	중위험군 내지 고위험군(RS 18 이상)	
저위험군	23	2	25 (54.3%)
중위험군 내지 고위험군	3	18	21 (45.7%)
합계	26 (56.5%)	20 (43.5%)	46

[88] (p=0.00000082 (Fisher's exact test))

[89]

[90] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하는 경우 비교적 정확히 항암화학요법이 필요없는 저위험군을 분류할 수 있다. 저위험군이 50% 이상이므로 많은 환자들을 불필요한 항암치료로부터 해방시킬 수 있어 그들을 심리적 불안과 항암치료 부작용에 의한 육체적 부담 및 경제적 부담감을 완화시킬 수 있다.

[91] 또한, 상기 결과의 통계적 정확도를 확인하기 위하여 ROC(Receiver-Operating Characteristic analysis) 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과는 하기 표 3 및 도 6에 나타내었다.

[92] [표3]

민감도(Sensitivity)	90.00%	68.30% to 98.77%
특정도(Specificity)	88.46%	69.85% to 97.55%
곡선하 면적(Area Under Curve)	0.89	0.77 to 0.96
양성우도비율(Positive Likelihood Ratio)	7.8	2.66 to 22.84
음성우도비율 (Negative Likelihood Ratio)	0.11	0.03 to 0.42
유병률(Disease prevalence)	50.00%	
양성예측도(Positive Predictive Value)	88.64%	68.71% to 97.91%
음성예측도(Negative Predictive Value)	89.84%	69.84% to 98.46%

[93]

[94] 상기 표 3 및 도 6에서 보는 바와 같이, 민감도(Sensitivity)가 90.0%이고, 특정도(Specificity)가 88.46%로 중간 또는 고위험도의 환자를 분류할 수 있음을 알 수 있다.

[95] 또한, 도 2 및 도 4에 나타낸 이미지 분석을 이용하여 프로게스테론 면역 염색 결과 및 Ki67 면역 염색 결과를 이용한 위험군 분류와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 4와 같다.

[96] [표4]

본 발명에 따른 분류	TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류					합계
	RS 11 미만	RS 11 이상 18이하	RS 18 초과 24 이하	RS 24 초과 30 이하	RS 30 초과	
저위험군	8(32%)	15(60%)	1(4%)	1 (4%)	0	25(54.3%)
중위험군 내지 고위험군	0	3(14.3%)	7(33.3%)	8(38.1%)	3(14.3%)	21(45.7%)
합계	8(17.4%)	18(39.1%)	8(17.4%)	9(19.6%)	3(6.5%)	46

[97] (p=0.00000082 (Fisher's exact test))

[98]

[99] 상기 표 4에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하는 경우 매우 정확하게 항암 화학요법이 필요가 없는 저위험군을 분류할 수 있는 것을 볼 수 있다.

[100] 또한, 상기 실험 결과의 통계적 유의성을 확인하기 위하여 카이-자승 검증(Chi-squared test)을 수행하였고, 그 결과는 하기 표 5에 나타낸 바와 같이 통계적으로 의미있는 결과임을 확인할 수 있다.

[101] [표5]

카이-자승	28.814
DF	4
유의도	P<0.0001

[102]

[103] 또한 상기 실험 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여 도표로 표시하여 도 7 및 도 8에 나타내었다. 현재 TAILORx 임상 시험에서 저위험군으로 분류되어 항암 화학요법을 안 받는 환자군 (RS<11)은 모두 본 발명의 방법에 의해 저위험군으로 분류되었으며, 나머지 환자 중에 일반적으로 저위험군으로 분류되는 RS 11 내지 18 인 환자 중 83.3% 가 본 발명의 방법에 의해 저위험군으로 분류되었다. 또한 현재 반드시 항암 화학요법을 받아야 하는 환자군 (RS>30) 은 모두 본 발명의 방법에 의해 고위험군으로 분류되었다.

[104]

[105] [실험예 2]

[106] 상기 실험예 1에서 연세 암병원 유방암 센터에서 치료받은 ER+/N- 환자 중 온코타입 Dx를 시행한 46명의 환자군에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 측정하여 이를 Y축으로 하고, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축으로 정한 뒤, 상기 유방암 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 9에 그래프로 나타내었다.

[107] 도 9에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어가 5 이상인 경우이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 미만인 경우, 대부분 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[108] 또한, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색한 뒤 그 중 염색 지수가 가장 높은 부위를 400배율 현미경으로 관찰하여 반경이 대략 400 내지 650㎛인 원형의 부위를 핫 스팟으로 선정하였다. 상기 핫 스팟에 대하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 Y 축으로 정한 뒤, 상기 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 10에 그래프로 나타내었다.

[109] 도 10에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른

Allred 스코어가 5 미만이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 핫 스팟에서 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우, 대부분이 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[110] 다만, 한 명의 환자(▲)가 RS 값으로 고위험군에 속하는 것으로 나타났으나, 이에 대하여 병리 슬라이드 리뷰 결과 상기 실험예 1에서와 마찬가지로 암세포가 아닌 림프구성 침윤(lymphoid infiltrate)에 염색된 것으로, 온코타입 Dx에서는 고위험군이었으나, 면역 염색 결과는 암세포만 스코어 하므로, 저위험군으로 분류할 수 있다.

[111] 이처럼 본 발명의 방법에 의하는 경우 Allred 스코어와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하여 매우 간단한 방법이나 높은 정확도로 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있고, 특히 Allred 스코어가 5 미만인 경우에는 핫 스팟을 선정하여 분석하는 경우 그 정확도를 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.

[112] 도 9 및 도 10에 나타낸 위험군 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 6과 같다.

[113] [표6]

본 발명에 따른 분류	온코타입 Dx 분류		합계
	저위험군(RS 18 미만)	중위험군 내지 고위험군(RS 18 이상)	
저위험군	24	3	29 (63%)
중위험군 내지 고위험군	2	15	17 (37%)
합계	26 (56.5%)	20 (43.5%)	46

[114] (p=0.000004738 (Fisher's exact test))

[115]

[116] 상기 표 6에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하는 경우 비교적 정확히 항암화학요법이 필요없는 저위험군을 분류할 수 있다. 저위험군이 50% 이상이므로 많은 환자들을 불필요한 항암치료로부터 해방시킬 수 있어 그들을 심리적 불안과 항암치료 부작용에 의한 육체적 부담 및 경제적 부담감을 완화시킬 수 있다.

[117] 또한, 상기 결과의 통계적 정확도를 확인하기 위하여 ROC(Receiver-Operating Characteristic analysis) 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과는 하기 표 7 및 도 11에 나타내었다.

[118] [표7]

민감도(Sensitivity)	75.00%	50.90% to 91.34%
특정도(Specificity)	92.31%	74.87% to 99.05%
곡선하 면적(Area Under Curve)	0.84	0.70 to 0.93
양성우도비율(Positive Likelihood Ratio)	9.75	2.51 to 37.81
음성우도비율 (Negative Likelihood Ratio)	0.27	0.13 to 0.58
유병률(Disease prevalence)	50.00%	
양성예측도(Positive Predictive Value)	90.70%	68.46% to 99.07%
음성예측도(Negative Predictive Value)	78.69%	58.75% to 91.97%

[119]

[120] 상기 표 7 및 도 11에서 보는 바와 같이, 민감도(Sensitivity)가 75%이고, 특정도(Specificity)가 92.31%로 중간 또는 고위험도의 환자를 분류할 수 있음을 알 수 있다.

[121] 또한, 도 9 및 도 10에 나타낸 위험군 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 8과 같고, 상기 실험 결과의 통계적 유의성을 확인하기 위하여 카이-자승 검증을 수행하여 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[122] [표8]

본 발명에 따른 분류	TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류					합계
	RS 11 미만	RS 11 이상 18이하	RS 18 초과 24 이하	RS 24 초과 30 이하	RS 30 초과	
저위험군	8 (27.6%)	16 (55.2%)	2 (6.9%)	3 (10.3%)	0	29 (63%)
중위험군 내지 고위험군	0	2 (11.8%)	6 (35.3%)	6 (35.3%)	3 (17.6%)	17 (37%)
합계	8 (17.4%)	18 (39.1%)	8 (17.4%)	9 (19.6%)	3 (6.5%)	46

[123]

[124] [표9]

카이-자승	23.347
DF	4
유의도	P<0.0001

[125]

[126] 또한 상기 실험 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여 도표로 표시하여 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[127] 상기 표 8 내지 9 및 도 12 내지 13에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의한 위험군 분류를 TAILROx 온코타입 Dx 위험군 분류와 비교해 보아도 통계적으로 매우 유의한 상관관계를 갖는 것을 관찰할 수 있다. 즉, 본 발명의 방법에 의하는 경우 반드시 항암 화학요법으로 치료받아야 하는 환자 3명 모두 저위험군으로 분류되지 않았고, 항암치료를 받지 않아도 되는 RS 11 미만의 저위험군 환자의 경우 모두 저위험군으로 분류되는 것을 볼 수 있다.

[128]

[129] [실험예 3]

[130] 독립 검증 코호트에서도 같은 결과를 도출할 수 있는지 검증을 위해 강남 세브란스병원에서 치료받은 환자 중 온코타입 시행한 65명의 환자를 대상으로도 추가로 본 발명의 예후 판단 방법을 시행하였다. 즉 65명의 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플의 프로게스테론 및 Ki67 면역 염색 결과에 대한 이미지 분석을 Image J 프로그램과 ImmunoRatio plug in을 이용하여 시행하였다.

[131] 구체적으로는, 상기 유방암 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축, 그리고 프로게스테론 수용체를 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 Y 축으로 정한 뒤, 상기 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 하여 도 14에 그래프로 나타내었다.

[132] 도 14에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론을 포함하는 암세포 수의 비율이 20%를 초과하는 경우이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 미만인 경우, 모두 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[133] 또한, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색한 뒤 그 중 염색 지수가 가장 높은 부위를 400배율 현미경으로 관찰하여 반경이 대략 400 내지 650㎛인 원형의 부위를 핫 스팟으로 선정하였다. 상기 핫 스팟에 대하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의

비율(%)을 X 축, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 Y 축으로 정한 뒤, 상기 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 15에 그래프로 나타내었다.

[134] 도 15에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론을 포함하는 암세포 수의 비율이 20% 이하이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우, 대부분이 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[135] 본 발명에 따른 방법에 의한 결과가 온코타입 Dx의 RS 분류를 얼마나 정확하게 예측하는 지 검정하기 위하여, 도 14 및 도 15에 나타낸 프로게스테론 면역 염색 결과 및 Ki67 면역 염색 결과를 이용한 위험군 분류와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 10과 같다.

[136] [표10]

본 발명에 따른 분류	온코타입 Dx 분류		합계
	저위험군(RS 18 미만)	중위험군 내지 고위험군(RS 18 이상)	
저위험군	33 (86.5%)	6 (13.5%)	37 (56.9%)
중위험군 내지 고위험군	5 (21.4%)	21 (78.6%)	28 (43.1%)
합계	38 (58.5%)	27 (41.5%)	65

[137] (p=0.000000303 (Fisher's exact test))

[138]

[139] 상기 표 10에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 따른 분류와 온코타입 Dx의 위험군 분류의 상관관계는 매우 유의한 결과를 보였으며 (p=0.000000303 (Fisher's exact test)), 대략 83%((23 + 18)/65 *100)는 온코타입 Dx와 동일한 분류 결과를 보였다.

[140] 또한, 상기 결과의 통계적 정확도를 확인하기 위하여 ROC(Receiver-Operating Characteristic analysis) 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과는 하기 표 11 및 도 16에 나타내었다.

[141] [표11]

민감도(Sensitivity)	77.78%	57.74% to 91.38%
특정도(Specificity)	86.84%	71.91% to 95.59%
곡선하 면적(Area Under Curve)	0.82	0.71 to 0.91
양성우도비율(Positive Likelihood Ratio)	5.91	2.55 to 13.71
음성우도비율 (Negative Likelihood Ratio)	0.26	0.12 to 0.52
유병률(Disease prevalence)	41.54%	29.44% to 54.44%
양성예측도(Positive Predictive Value)	80.77%	60.65% to 93.45%
음성예측도(Negative Predictive Value)	84.62%	69.47% to 94.14%

[142]

[143] 상기 표 11 및 도 16에서 보는 바와 같이, 민감도(Sensitivity)가 77.78%이고, 특정도(Specificity)가 86.84%로 중간 또는 고위험도의 환자를 분류할 수 있음을 알 수 있다.

[144] 또한, 도 14 및 도 15에 나타낸 프로게스테론 면역 염색 결과 및 Ki67 면역 염색 결과를 이용한 위험군 분류와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 12와 같다.

[145] [표12]

본 발명에 따른 분류	TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류					합계
	RS 11 미만	RS 11 이상 18이하	RS 18 초과 24 이하	RS 24 초과 30 이하	RS 30 초과	
저위험군	12 (30.8%)	21 (53.8%)	5 (12.8%)	1 (2.6%)	0	39 (60.0%)
중위험군 내지 고위험군	1 (3.8%)	4 (15.4%)	11 (42.3%)	2 (7.7%)	8 (30.8%)	26 (40.0%)
합계	13 (20%)	25 (38.5%)	16 (24.6%)	3 (4.6%)	8 (12.3%)	65

[146] (p=0.00000082 (Fisher's exact test))

[147]

[148] 상기 표 12에서 보는 바와 같이, 본 발명에 의하는 경우 매우 정확하게 항암 화학요법이 필요가 없는 저위험군을 분류할 수 있는 것을 볼 수 있다.

[149] 또한, 상기 실험 결과의 통계적 유의성을 확인하기 위하여 카이-자승 검증(Chi-squared test)을 수행하였고, 그 결과는 하기 표 13에 나타낸 바와 같이 통계적으로 의미있는 결과임을 확인할 수 있다.

[150] [표13]

카이-자승	30.053
DF	4
유의도	P<0.0001

[151]

[152] 또한 상기 실험 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여 도표로 표시하여 도 17 및 도 18에 나타내었다. 본 발명의 방법에 의해 저위험군으로 분류된 환자 중에 현재 항암 화학요법이 반드시 필요한 온코타입 Dx RS가 30 초과인 환자는 없었다. 이처럼 본 발명의 방법에 의하는 경우 통계적으로 유의하게 또는 임상적으로 매우 의미있게 온코타입 Dx 위험군 분류를 예측할 수 있음을 알 수 있다.

[153]

[154] [실험예 4]

[155] 상기 실험예 3에서 강남 세브란스병원에서 치료받은 환자 중 온코타입 시행한 65명의 환자군에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 측정하여 이를 Y축으로 하고, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에서 Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 X 축으로 정한 뒤, 상기 유방암 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 19에 그래프로 나타내었다.

[156] 도 19에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어가 5 이상인 경우이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 미만인 경우, 대부분 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[157] 또한, 상기 환자로부터 채취한 유방 조직 샘플에 대하여 Ki67 단백질을 면역 염색한 뒤 그 중 염색 지수가 가장 높은 부위를 400배율 현미경으로 관찰하여 반경이 대략 400 내지 650㎛인 원형의 부위를 핫 스팟으로 선정하였다. 상기 핫 스팟에 대하여 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 X 축, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어를 Y 축, 상기 유방암 환자의 온코타입 Dx RS 범위에 따라 표기를 달리하여 도 20에 그래프로 나타내었다.

[158] 도 20에서 보는 바와 같이, 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과에 따른 Allred 스코어가 5 미만이고, Ki67 단백질을 면역 염색하여 전체 암세포 수 대비

염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율이 10% 미만인 경우, 모두 RS 저위험군에 속하는 것을 볼 수 있다.

[159] 이처럼 본 발명의 방법에 의하는 경우 Allred 스코어와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하여 매우 간단한 방법이나 높은 정확도로 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있고, 특히 Allred 스코어가 5 미만인 경우에는 핫 스팟을 선정하여 분석하는 경우 그 정확도를 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.

[160] 도 19 및 도 20에 나타낸 위험군 분류 결과와 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 14와 같다.

[161] [표14]

본 발명에 따른 분류	온코타입 Dx 분류		합계
	저위험군(RS 18 미만)	중위험군 내지 고위험군(RS 18 이상)	
저위험군	32 (86.5%)	5 (13.5%)	37 (56.9%)
중위험군 내지 고위험군	6 (21.4%)	22 (78.6%)	28 (43.1%)
합계	38 (58.5%)	27 (41.5%)	65

[162] (p=0.000004738 (Fisher's exact test))

[163]

[164] 상기 표 14에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하는 경우 비교적 정확히 항암화학요법이 필요 없는 저위험군을 분류할 수 있다. 저위험군이 50% 이상이므로 많은 환자들을 불필요한 항암치료로부터 해방시킬 수 있어 그들을 심리적 불안과 항암화학요법 부작용의 육체적 부담 및 경제적 부담감을 완화시킬 수 있다.

[165] 또한, 상기 결과의 통계적 정확도를 확인하기 위하여 ROC(Receiver-Operating Characteristic analysis) 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과는 하기 표 15 및 도 21에 나타내었다.

[166] [표15]

민감도(Sensitivity)	81.48%	61.92% to 93.70%
특정도(Specificity)	84.21%	68.75% to 93.98%
곡선하 면적(Area Under Curve)	0.83	0.71 to 0.91
양성우도비율(Positive Likelihood Ratio)	5.16	2.42 to 10.99
음성우도비율 (Negative Likelihood Ratio)	0.22	0.10 to 0.49
유병률(Disease prevalence)	41.54%	29.44% to 54.44%
양성예측도(Positive Predictive Value)	78.57%	59.05% to 91.70%
음성예측도(Negative Predictive Value)	86.49%	71.23% to 95.46%

[167]

[168] 상기 표 15 및 도 21에서 보는 바와 같이, 민감도(Sensitivity)가 81.48%이고, 특정도(Specificity)가 84.21%로 중간 또는 고위험도의 환자를 분류할 수 있음을 알 수 있다.

[169] 또한, 도 19 및 도 20에 나타낸 위험군 분류 결과와 TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류 결과를 대비하면 하기 표 16과 같고, 상기 실험 결과의 통계적 유의성을 확인하기 위하여 카이-자승 검증을 수행하여 그 결과는 하기 표 17에 나타내었다.

[170] [표16]

본 발명에 따른 분류	TAILORx 기반 온코타입 Dx 분류					합계
	RS 11 미만	RS 11 이상 18이하	RS 18 초과 24 이하	RS 24 초과 30 이하	RS 30 초과	
저위험군	12 (32.4%)	20 (54.1%)	5 (13.5%)	0	0	37 (56.9%)
중위험군 내지 고위험군	1 (3.6%)	5 (17.9%)	11 (39.3%)	3 (10.7%)	8 (28.6%)	28 (43.1%)
합계	13 (20%)	25 (38.5%)	16 (24.6%)	3 (4.6%)	8 (12.3%)	65

[171]

[172] [표17]

카이-자승	30.904
DF	4
유의도	P<0.0001

[173]

[174] 또한 상기 실험 결과가 임상에 미치는 영향을 예측하기 위하여 도표로 표시하여 도 22 및 도 23에 나타내었다.

[175] 상기 표 16 내지 17 및 도 22 내지 23에서 보는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의한 위험군 분류를 TAILROx 온코타입 Dx 위험군 분류와 비교해 보아도 통계적으로 매우 유의한 상관관계를 갖는 것을 관찰할 수 있다. 즉, 본 발명의 방법에 따라 저위험군으로 분류된 환자 중 온코타입 Dx나 TAILORx 상 반드시 항암 치료가 요구되는 고위험군의 환자가 존재하지 않았다.

[176]

[177] [비교예 1]

[178] 상기 실험예 1에 있어서 이미지 분석을 수행하지 않고, 병리 의사의 판단에 따라 임상 Ki67 면역 염색 결과에 의하면, 도 24에서 보는 바와 같이, Ki67 이나 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과만을 이용하여서는 RS 위험군의 분류 또는 예후에 대한 예측이 전혀 불가능하였다.

[179] 구체적으로 Ki67 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율을 20% 미만으로 하는 경우 여러 고 위험 환자가 저위험군으로 잘못 분류되는 것을 볼 수 있고, 또한 10% 미만으로 한다면 여러 저위험군 환자가 고위험군 환자로 분류되는 것을 볼 수 있다.

[180] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

[181] 본 발명은 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과와 Ki67 단백질의 면역 염색 결과를 이용하여 유방암의 항암 치료 방향을 결정함에 있어서 필요한 예후 및 항암화학요법의 효과를 예측할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플의 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%) 또는 Allred 스코어를 입력받기 위한 제1 입력부;

Ki67 단백질을 면역 염색한 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 입력받기 위한 제2 입력부;

상기 제1 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 초과이거나, Allred 스코어가 5 이상이고, 제2 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 세포 수의 비율(%)이 20% 미만인 경우 저위험군으로 분류하기 위한 분류 연산부; 및

상기 분류 연산부의 분석 결과를 출력하기 위한 출력부를 포함하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

상기 제2 입력부에 입력되는 유방 조직 샘플의 Ki67 단백질을 면역 염색한 결과는 면역 염색 후 가장 염색 지수가 높은 400~650㎛ 반경의 원형 부위에 대하여 수행된 결과가 입력되는, 유방암 예후 분석 장치.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 저위험군은 온코타입 Dx에 따른 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 판단값이 0 이상 18 이하에 해당하는 군인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치.

[청구항 4] 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플의 프로게스테론 수용체의 면역 염색 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%) 또는 Allred 스코어를 입력받기 위한 제1 입력부;

Ki67 단백질을 면역 염색한 결과 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)을 입력받기 위한 제2 입력부;

상기 제1 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 이하이거나, Allred 스코어가 5 미만이고, 제2 입력부에서 입력된 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 10% 미만인 경우 저위험군으로 분류하기 위한 분류 연산부; 및

상기 분류 연산부의 분석 결과를 출력하기 위한 출력부를 포함하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치.

[청구항 5] 제4항에 있어서,

상기 제2 입력부에 입력되는 유방 조직 샘플의 Ki67 단백질을 면역

염색한 결과는 면역 염색 후 가장 염색 지수가 높은 400~650㎛ 반경의 원형 부위에 대하여 수행된 결과가 입력되는, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치.

[청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 저위험군은 온코타입 Dx에 따른 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 판단값이 0 이상 18 이하에 해당하는 군인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부 판단 장치.

[청구항 7] 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 초과이거나 Allred 스코어가 5 이상이고,
Ki67 단백질을 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 미만인 경우,
저위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 유방 조직 샘플의 Ki67 단백질을 면역 염색한 결과는 면역 염색 후 가장 염색 지수가 높은 400~650㎛ 반경의 원형 부위에 대하여 수행된 결과인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 저위험군은 온코타입 Dx에 따른 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 판단값이 0 이상 18 이하에 해당하는 군인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

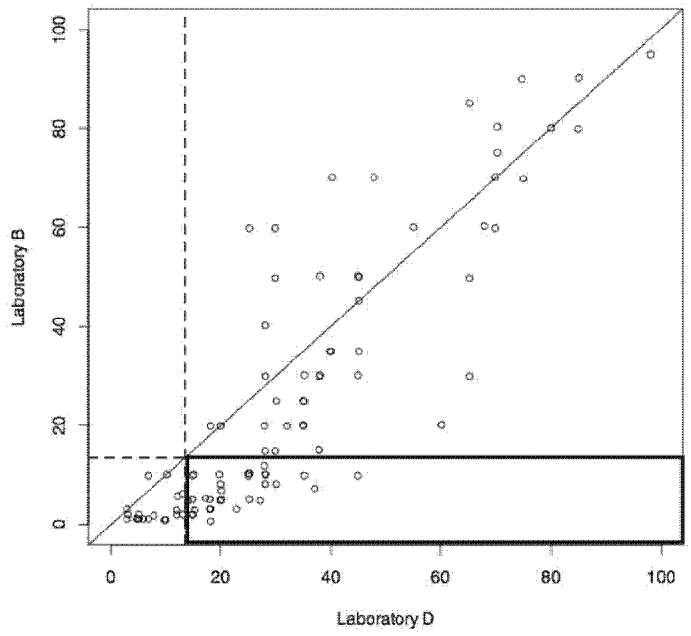
[청구항 10] 유방암 환자로부터 추출한 유방 조직 샘플에 대하여 프로게스테론 수용체의 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 프로게스테론 수용체를 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 20% 이하이거나 Allred 스코어가 5 미만이고,
Ki67 단백질을 면역 염색한 결과, 전체 암세포 수 대비 염색된 Ki67 단백질을 포함하는 암세포 수의 비율(%)이 10% 미만인 경우
저위험군으로 분류하는 것을 특징으로 하는 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 유방 조직 샘플의 Ki67 단백질을 면역 염색한 결과는 면역 염색 후 가장 염색 지수가 높은 400~650㎛ 반경의 원형 부위에 대하여 수행된 결과인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

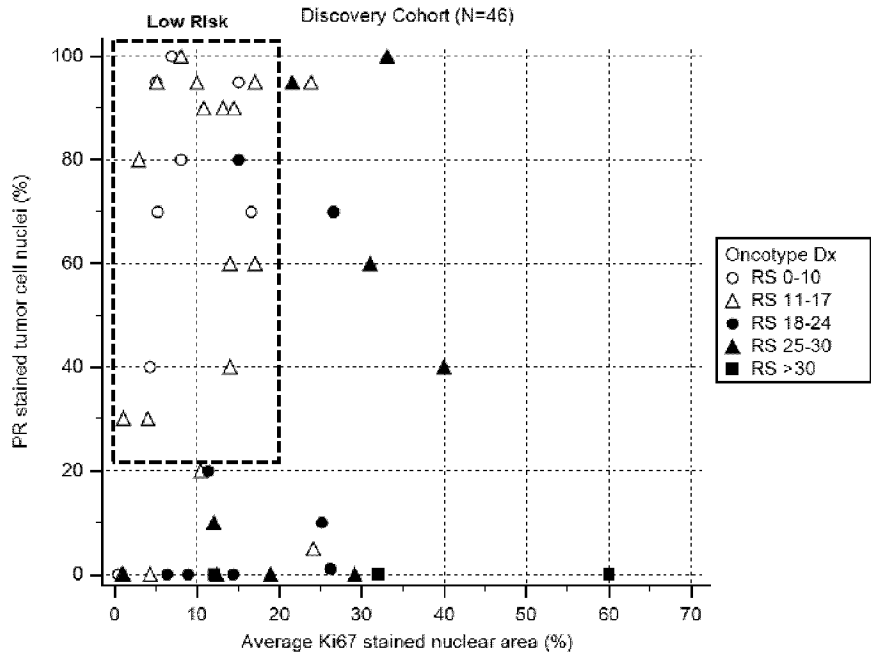
[청구항 12] 제10항에 있어서,

상기 저위험군은 온코타입 Dx에 따른 예후 재발율(Recurrence Score, RS)의 판단값이 0 이상 18 이하에 해당하는 군인, 유방암의 예후 및 항암화학요법 사용 여부를 판단하기 위한 정보 제공 방법.

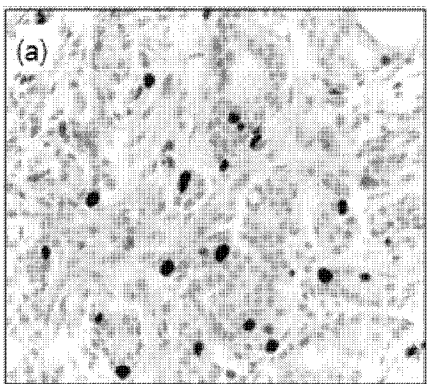
[도1]


Laboratory B
Laboratory D
0
20
40
60
80
100

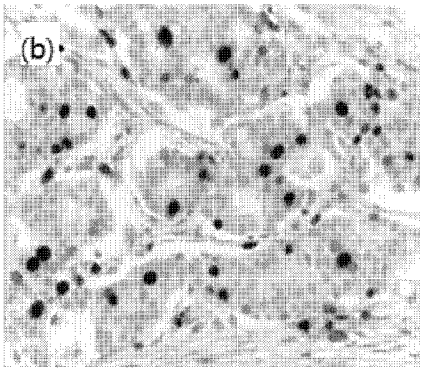
[도2]


Low Risk
Discovery Cohort (N=46)
PR stained tumor cell nuclei (%)
Average Ki67 stained nuclear area (%)
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

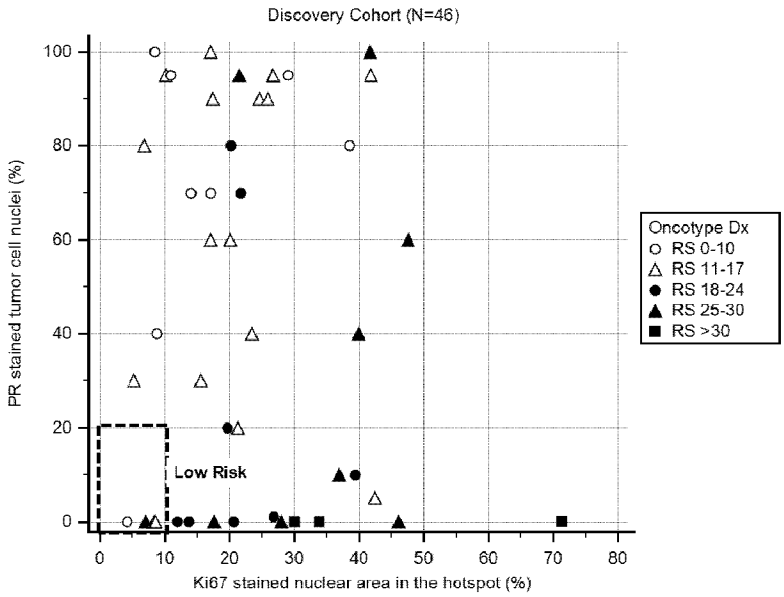
[도3a]


(a)

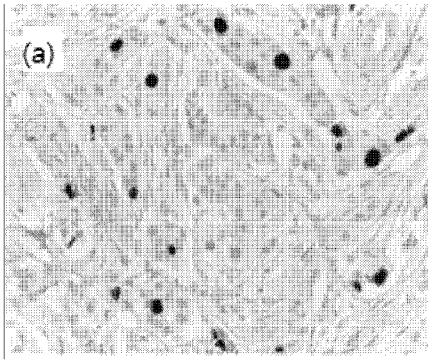
[도3b]



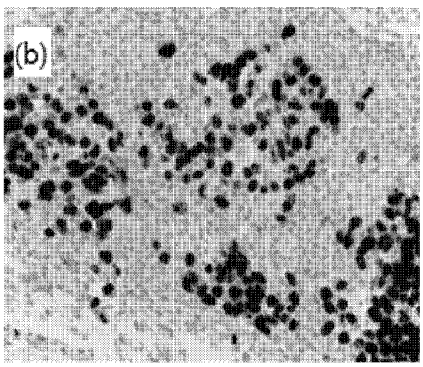
[도4]



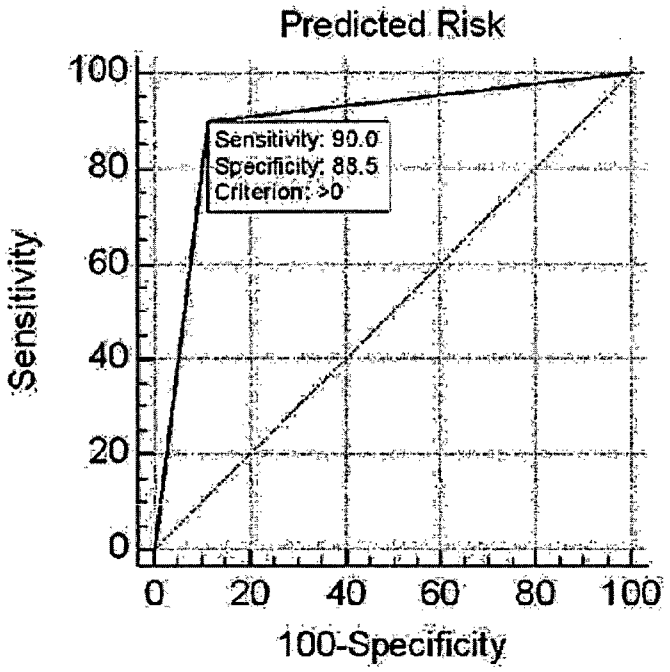
[도5a]



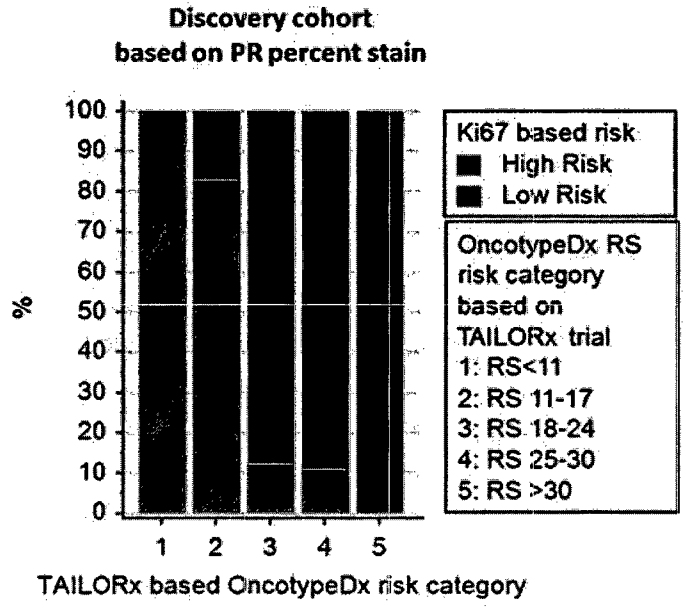
[도5b]



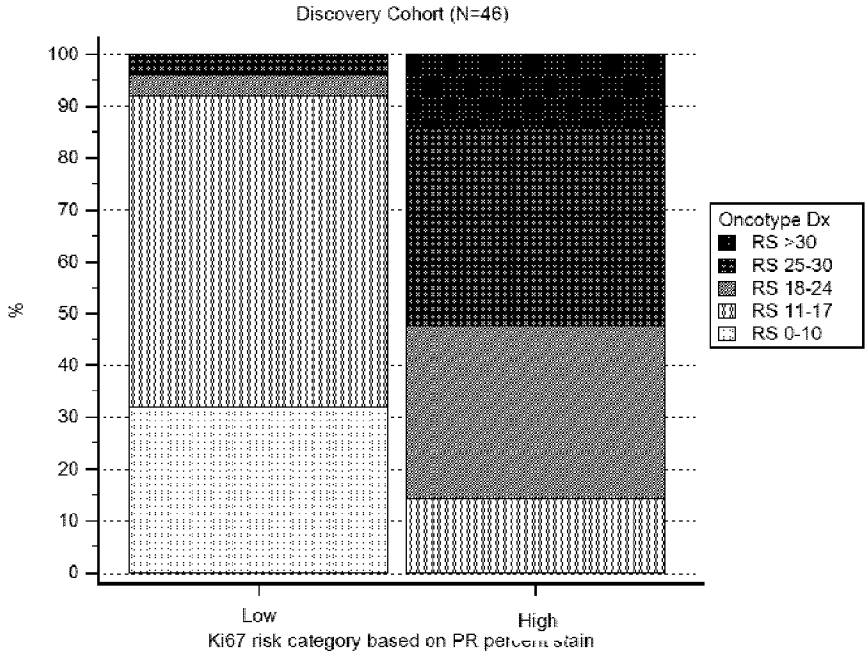
[도6]


Predicted Risk
Sensitivity: 90.0
Specificity: 88.5
Criterion: >0
Sensitivity
100-Specificity
0
20
40
60
80
100

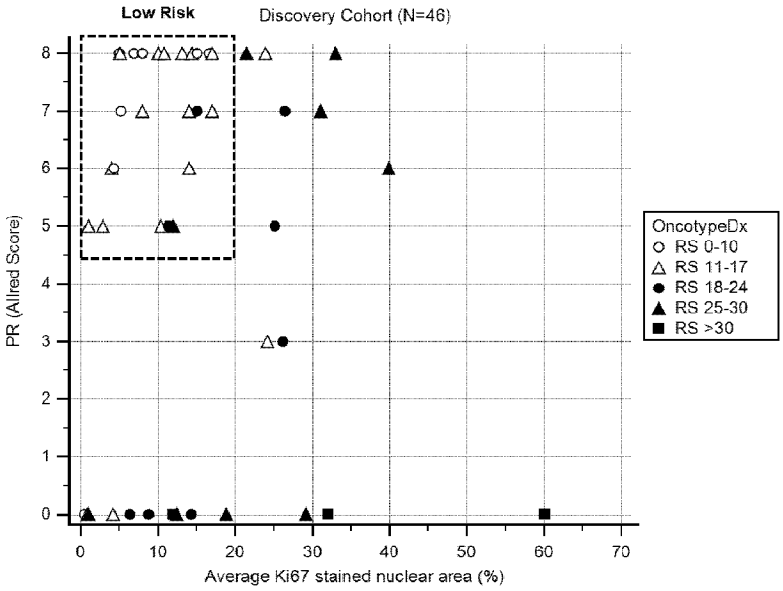
[도7]


Discovery cohort
based on PR percent stain
Ki67 based risk
High Risk
Low Risk
OncotypeDx RS
risk category
based on
TAILORx trial
1: RS<11
2: RS 11-17
3: RS 18-24
4: RS 25-30
5: RS >30
%
TAILORx based OncotypeDx risk category

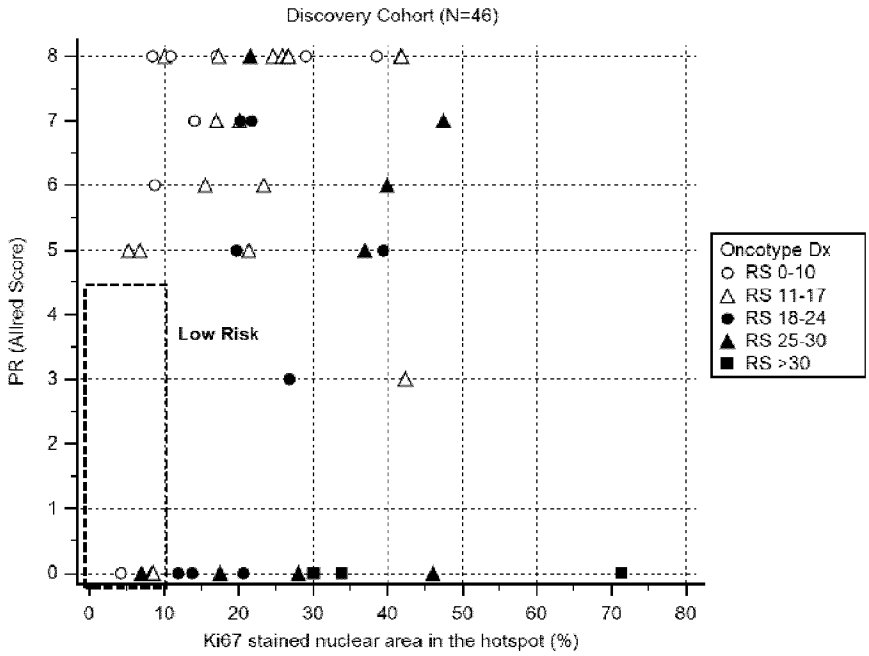
[도8]


Discovery Cohort (N=46)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%
Oncotype Dx
RS >30
RS 25-30
RS 18-24
RS 11-17
RS 0-10
Low
High
Ki67 risk category based on PR percent stain

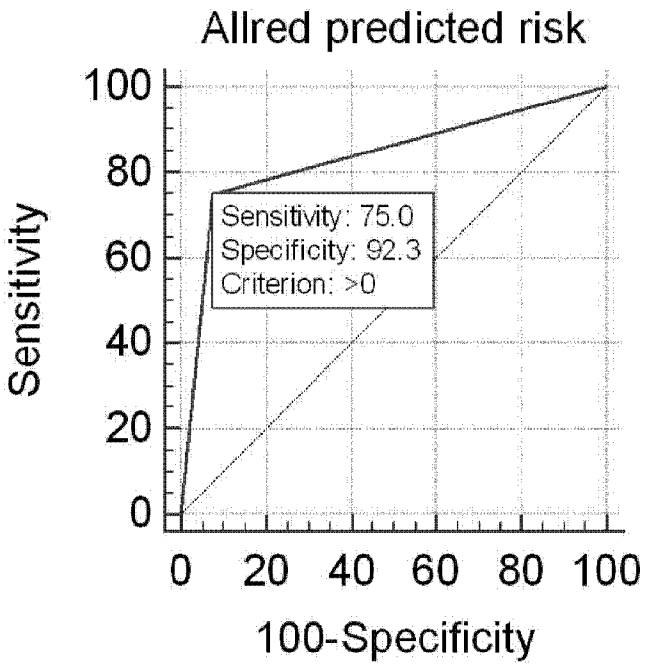
[도9]


Low Risk
Discovery Cohort (N=46)
PR (Allred Score)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Average Ki67 stained nuclear area (%)
OncotypeDx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

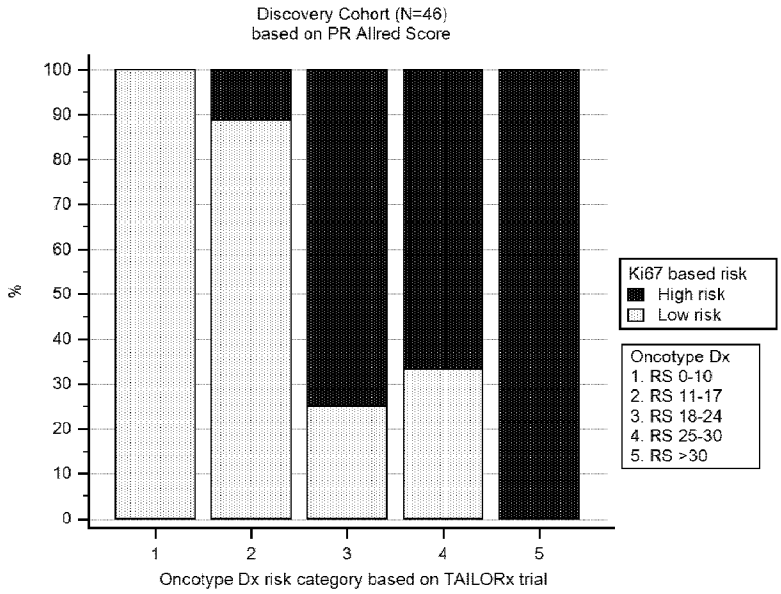
[도10]


Discovery Cohort (N=46)
PR (Allred Score)
Ki67 stained nuclear area in the hotspot (%)
Low Risk
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

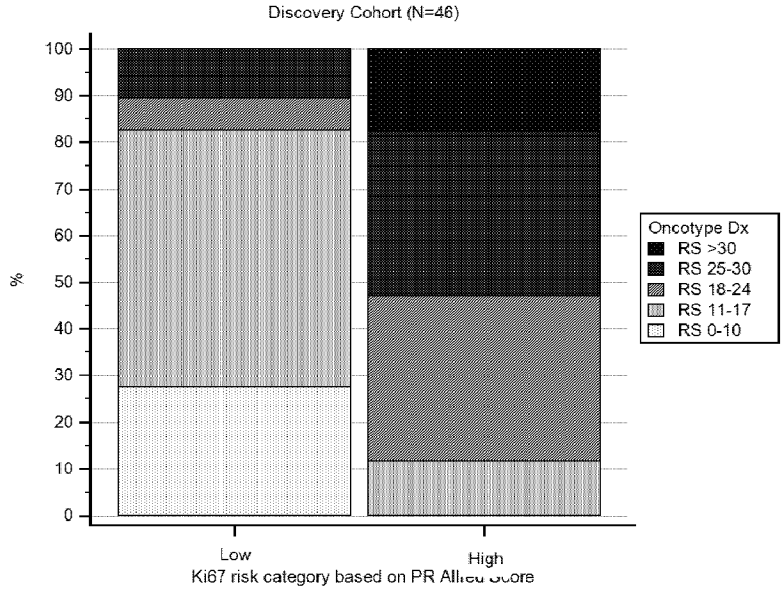
[도11]


Allred predicted risk
Sensitivity
100-Specificity
Sensitivity: 75.0
Specificity: 92.3
Criterion: >0

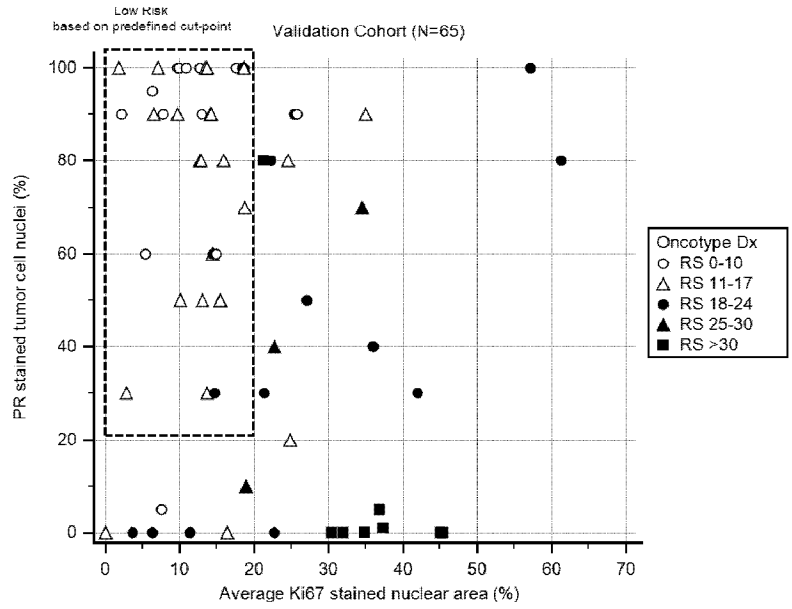
[도12]


Discovery Cohort (N=46)
based on PR Allred Score
%
Oncotype Dx risk category based on TAILORx trial
Ki67 based risk
High risk
Low risk
Oncotype Dx
1. RS 0-10
2. RS 11-17
3. RS 18-24
4. RS 25-30
5. RS >30

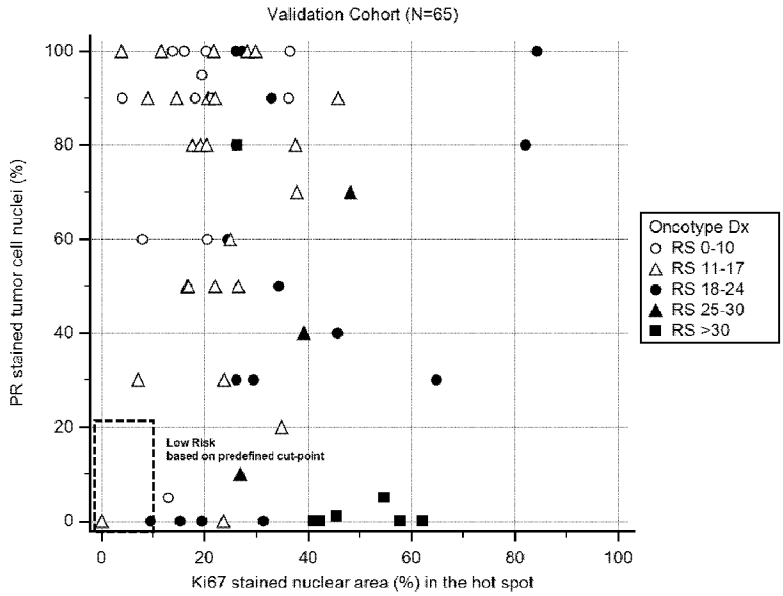
[도13]


Discovery Cohort (N=46)
%
Low
High
Ki67 risk category based on PR Allred Score
Oncotype Dx
RS >30
RS 25-30
RS 18-24
RS 11-17
RS 0-10

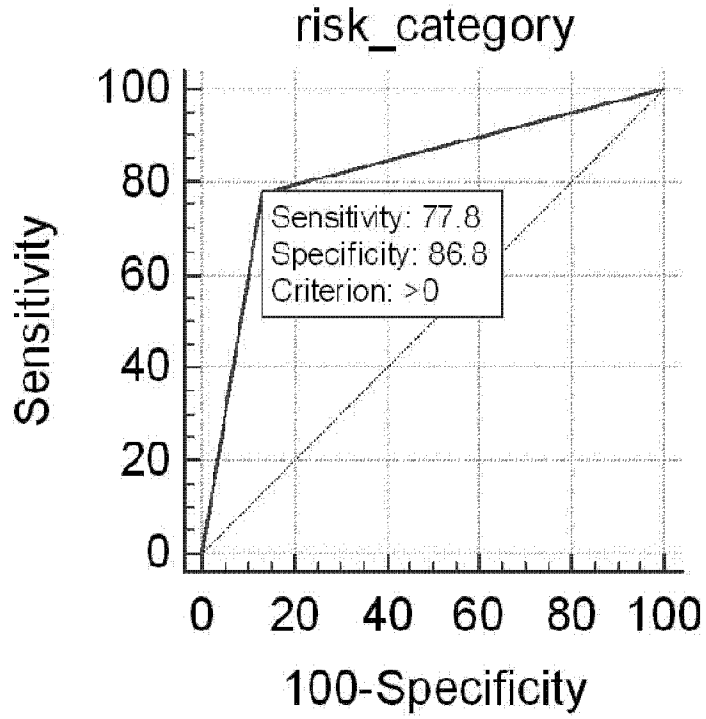
[도14]


Low Risk
based on predefined cut-point
Validation Cohort (N=65)
PR stained tumor cell nuclei (%)
Average Ki67 stained nuclear area (%)
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

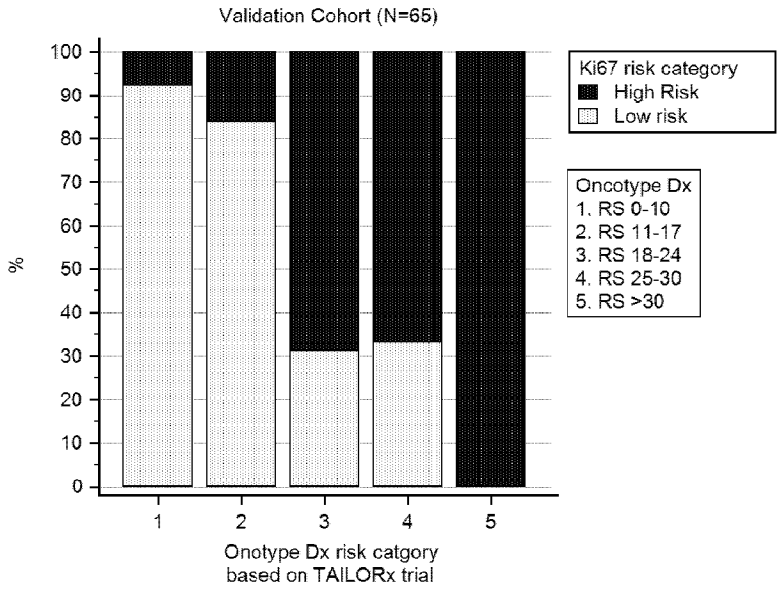
[도15]


Validation Cohort (N=65)
PR stained tumor cell nuclei (%)
Ki67 stained nuclear area (%) in the hot spot
Low Risk
based on predefined cut-point
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

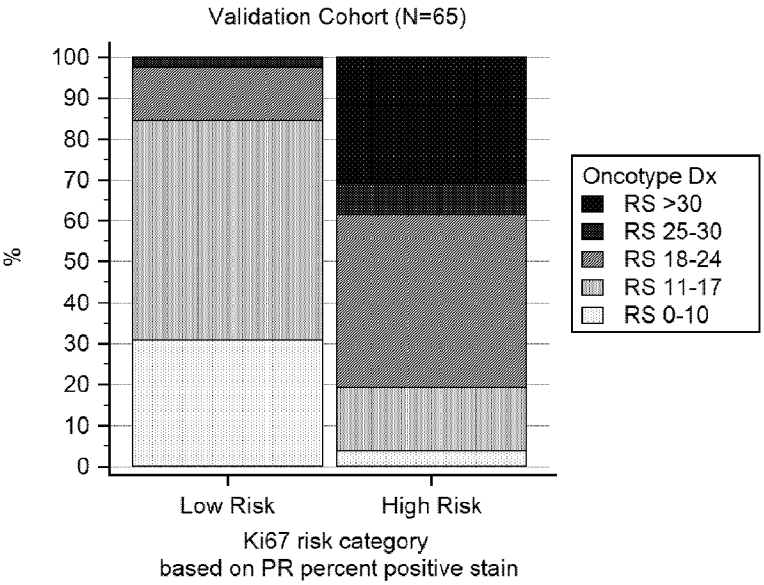
[도16]


risk_category
Sensitivity
100-Specificity
Sensitivity: 77.8
Specificity: 86.8
Criterion: >0

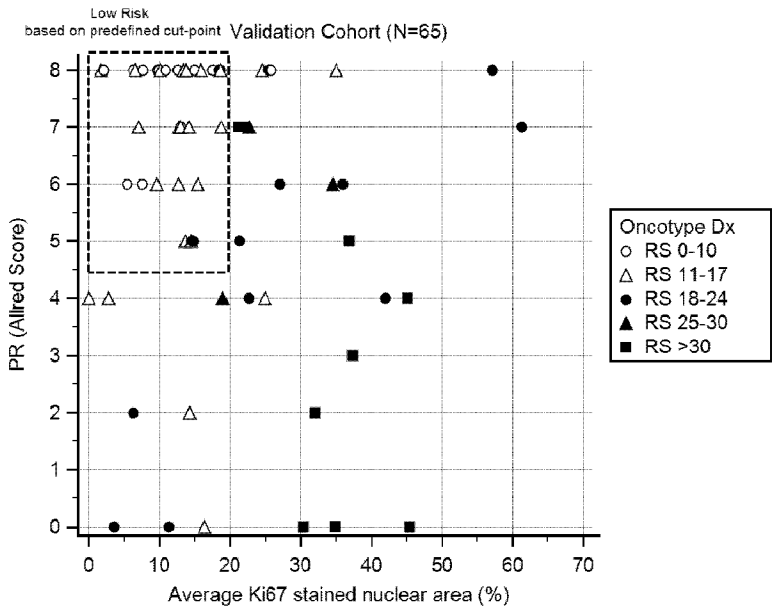
[도17]


Validation Cohort (N=65)
%
Ki67 risk category
High Risk
Low risk
Oncotype Dx
1. RS 0-10
2. RS 11-17
3. RS 18-24
4. RS 25-30
5. RS >30
Onotype Dx risk catgory
based on TAILORx trial

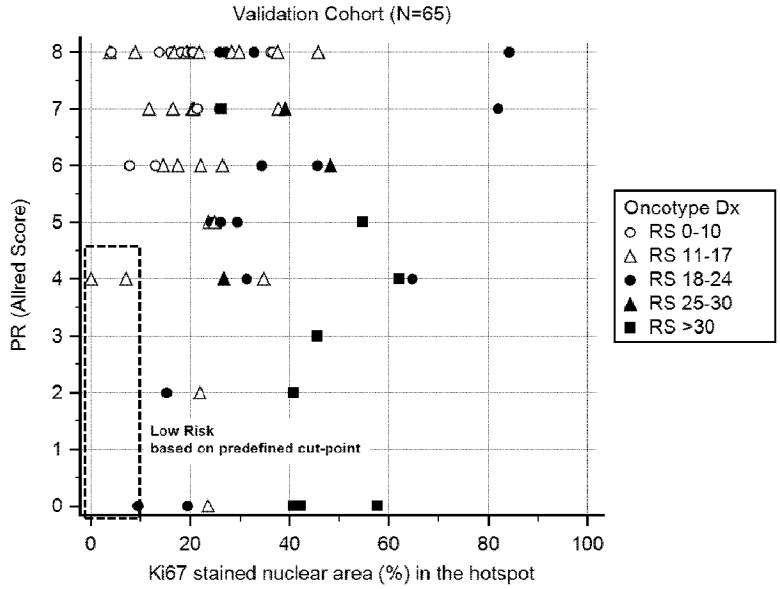
[도18]


Validation Cohort (N=65)
%
Oncotype Dx
RS >30
RS 25-30
RS 18-24
RS 11-17
RS 0-10
Low Risk
High Risk
Ki67 risk category
based on PR percent positive stain

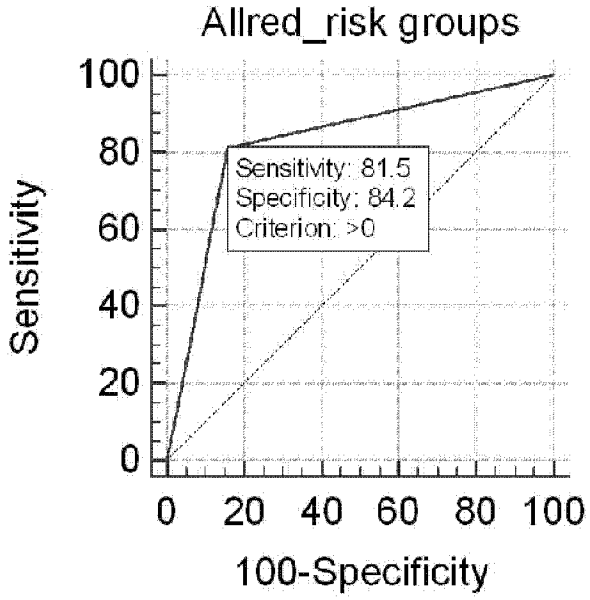
[도19]


Low Risk
based on predefined cut-point
Validation Cohort (N=65)
PR (Allred Score)
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30
Average Ki67 stained nuclear area (%)

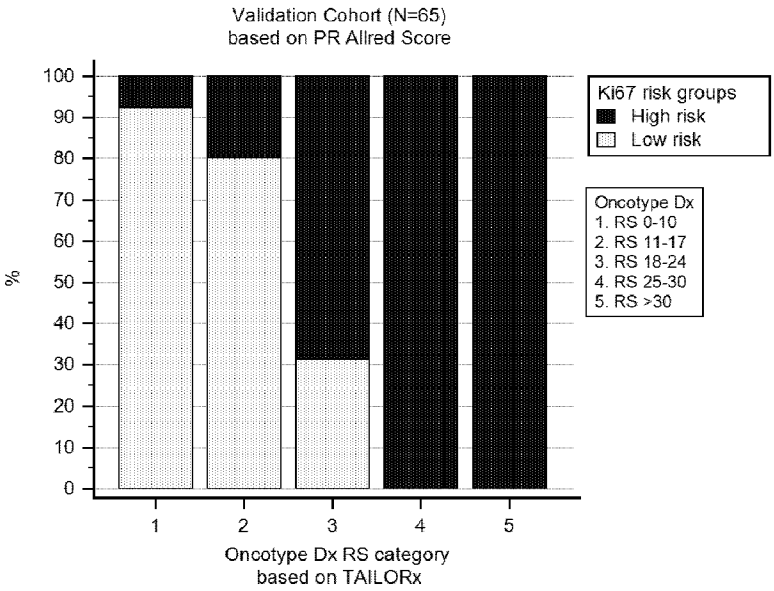
[도20]


Validation Cohort (N=65)
PR (Allred Score)
Ki67 stained nuclear area (%) in the hotspot
Low Risk
based on predefined cut-point
Oncotype Dx
RS 0-10
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

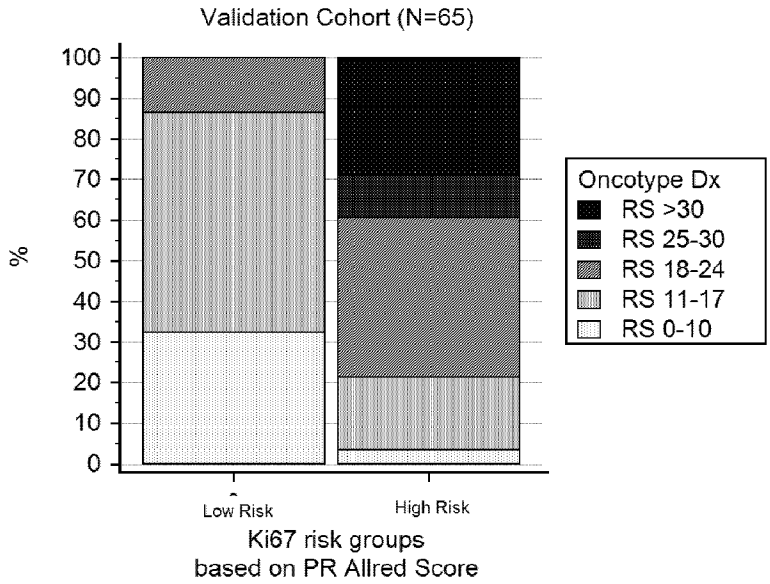
[도21]


Allred_risk groups
Sensitivity
100-Specificity
Sensitivity: 81.5
Specificity: 84.2
Criterion: >0

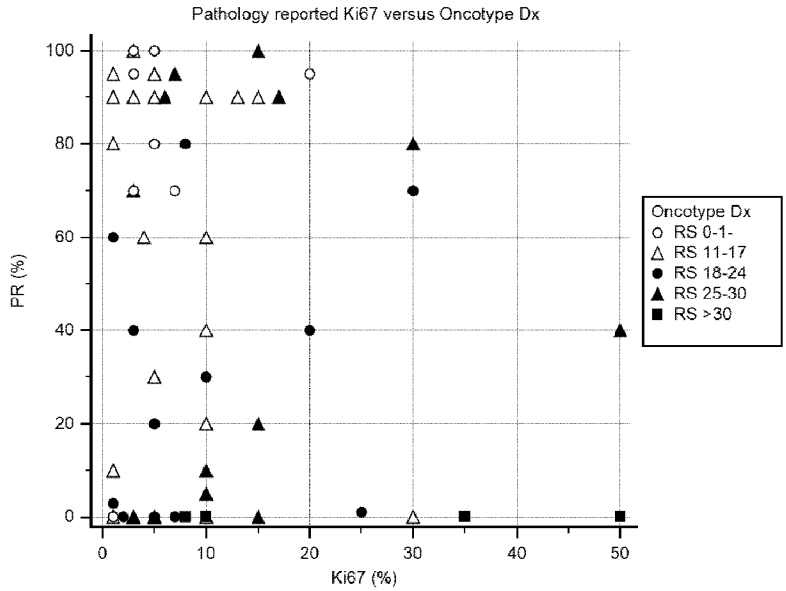
[도22]


Validation Cohort (N=65)
based on PR Allred Score
%
Oncotype Dx RS category
based on TAILORx
Ki67 risk groups
High risk
Low risk
Oncotype Dx
1. RS 0-10
2. RS 11-17
3. RS 18-24
4. RS 25-30
5. RS >30

[도23]


Validation Cohort (N=65)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%
Low Risk
High Risk
Ki67 risk groups
based on PR Allred Score
Oncotype Dx
RS >30
RS 25-30
RS 18-24
RS 11-17
RS 0-10

[도24]


Pathology reported Ki67 versus Oncotype Dx
PR (%)
Ki67 (%)
0
10
20
30
40
50
60
80
100
Oncotype Dx
RS 0-1-
RS 11-17
RS 18-24
RS 25-30
RS >30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/000084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)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)

G01N 33/574; G01N 33/74

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: breast cancer, progesterone receptor, Ki67, oncotype Dx

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALLISON, K. H. et al., "Routine Pathologic Parameters Can Predict Oncotype DXTM Recurrence Scores in Subsets of ER Positive Patients: Who Does Not Always Need Testing?", Breast Cancer Research and Treatment, 2012, vol. 131, pages 413-424 See abstract; pages 413-416; table 3; and figure 1.	1-12
A	ZONG, Y. et al., "Progesterone Receptor Status and Ki-67 Index May Predict Early Relapse in Luminal B/HER2 Negative Breast Cancer Patients: A Retrospective Study", PLoS One, 2014, vol. 9, no. 8, thesis number e95629, inner pages 1-8 See abstract.	1-12
A	KLEIN, M. E. et al., "Prediction of the Oncotype DX Recurrence Score: Use of Pathology-generated Equations Derived by Linear Regression Analysis", Modern Pathology, 2013, vol. 26, pages 658-664 See abstract.	1-12
A	WO 2013-173281 A1 (HISTORX, INC.) 21 November 2013 See abstract; and claims 1-42.	1-12

☒ 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
"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
10 MAY 2016 (10.05.2016)	**10 MAY 2016 (10.05.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/000084

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ONODA, T. et al., "The Value of Progesterone Receptor Expression in Predicting the Recurrence Score for Hormone-receptor Positive Invasive Breast Cancer Patients", Breast Cancer, Published online 2013, vol. 22, pages 406-412 See abstract.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/000084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-173281 A1	21/11/2013	US 2013-0310267 A1	21/11/2013

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/000084

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/574; G01N 33/74

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, 프로게스테론 수용체, Ki67, 온코타입 Dx

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ALLISON, K. H. 등, 'Routine pathologic parameters can predict Oncotype DXTM recurrence scores in subsets of ER positive patients: who does not always need testing?', Breast Cancer Research and Treatment, 2012년, 131권, 페이지 413-424 초록; 페이지 413-416; 표3; 및 도1 참조.	1-12
A	ZONG, Y. 등, 'Progesterone receptor status and Ki-67 index may predict early relapse in luminal B/HER2 negative breast cancer patients: a retrospective study', PLoS One, 2014년, 9권, 8호, 논문번호 e95629, 내부페이지 1-8 초록 참조.	1-12
A	KLEIN, M. E. 등, 'Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathology-generated equations derived by linear regression analysis', Modern Pathology, 2013년, 26권, 페이지 658-664 초록 참조.	1-12
A	WO 2013-173281 A1 (HISTORX, INC.) 2013.11.21 요약; 및 청구항 1-42 참조.	1-12

☒ 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

"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
2016년 05월 10일 (10.05.2016)	2016년 05월 10일 (10.05.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이동욱
전화번호 +82-42-481-8163

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/000084

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ONODA, T. 등, 'The value of progesterone receptor expression in predicting the recurrence score for hormone-receptor positive invasive breast cancer patients', Breast Cancer, 온라인 공개 2013년, 22권, 페이지 406-412 초록 참조.	1-12

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/000084

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2013-173281 A1	2013/11/21	US 2013-0310267 A1	2013/11/21