(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0123698
(43) 공개일자 2020년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 6/00 (2006.01) *A61B 6/03* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61B 6/5217 (2020.08)
A61B 6/032 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0046947
(22) 출원일자 2019년04월22일
심사청구일자 2019년04월22일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김범산
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
김예미
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

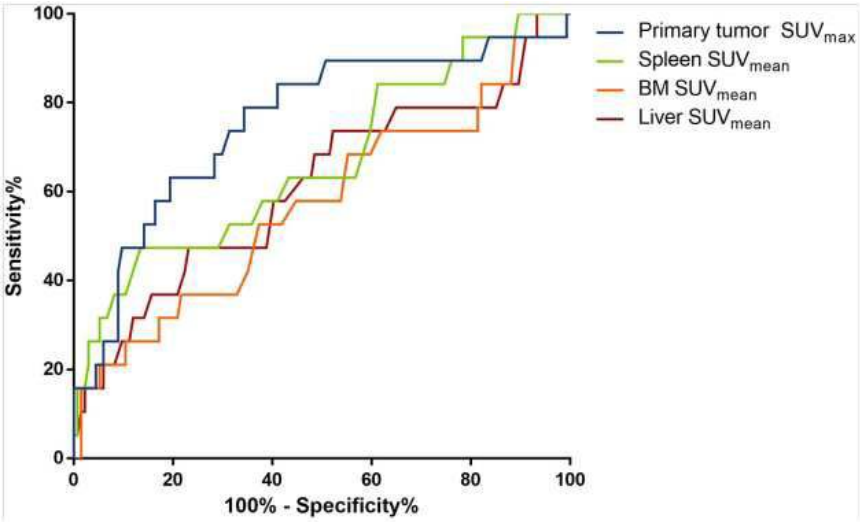
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **유방암의 예후를 예측하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법**

(57) 요 약

유방암의 예후를 예측하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법에 관한 것으로, F-18 FDG PET/CT에서 비장, 골수 또는 간과 같은 세망내피계의 포도당 대사 변화 등이 말초 혈액의 세포 수 변화 등보다 먼저 일어나는 바, 유방암의 재발을 초기에 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61B 6/037 (2020.08)
A61B 6/50 (2013.01)
(72) 발명자
방지인
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
윤혜전
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345297753
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 방사선 악골괴사의 비침습적 치료법으로 네크롭토시스 저해제, Necrostatin (Nec-1)의 적용 가능성 탐색 및 새로운 치료법 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345297252
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 생광화작용이 있는 근관실러를 적용한 새로운 근관충전법의 효능에 관한 전임상 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

개체에 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체를 투여하는 단계; 및

세망내피계(reticuloendothelial system, RES)에서 상기 포도당 또는 그의 유사체의 신호를 검출하는 단계를 포함하는, 유방암의 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 포도당 유사체는 플루오로데옥시글루코스(fluorodeoxyglucose; FDG)인 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체는 동위원소로 표지된 것인 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 동위원소는 ^{18}F, ^{11}C, ^{15}O, ^{13}N, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 신호를 검출하는 단계는 단층촬영(tomography)을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 단층 촬영은 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET), 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography, CT), 단일 광자 방출 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT), 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 신호를 검출하는 단계는 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET) 이미지, 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography, CT) 이미지, 단일 광자 방출 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 이미지 또는 이들의 조합을 분석하는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 개체의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호가 음성 대조군의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호에 비해 증가하는지 여부를 판단하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호로부터 포도당 또는 그의 유사체의 표준화된 흡수값(standardized uptake value, SUV)을 산출하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 SUV는 최대 SUV 또는 평균 SUV인 것인 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 개체의 산출된 SUV가 음성 대조군의 SUV에 비해 증가하는지 여부를 판단하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유방암의 예후를 예측하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 전신성 염증 반응은 다양한 암의 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 최근 몇 년 동안 암에 대한 전신성 염증 반응은 암 발생과 예후의 예측에 중요한 요소로서 점점 더 많은 관심을 받아왔다. 따라서, 암 환자의 전신성 염증 반응을 평가하는 것은 종양학적 임상 실습을 위한 계층화 마커로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 림프구 대비 호중구 비율(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR), 림프구 대비 혈소판 비율(platelet-to-lymphocyte ratio, PLR), C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP), 및 사이토카인과 같은 생체 표지 물질이 다양한 암에서 전신성 염증 및 예후 예측 인자의 측정 가능한 파라미터로서 제안되어 왔다.

[0003] 한편, F-18 플루오디옥시글루코스(F-18 fluorodeoxyglucose, FDG) 양전자-방출 단층 촬영/컴퓨터 단층 촬영(positron-emission tomography/computed tomography, PET/CT)은 종양의 신진 대사를 평가하기 위해 종양학에서 널리 사용되어 왔다. F-18 FDG PET/CT에서 전신성 염증 반응을 측정하려는 시도가 있었는데 F-18 FDG 섭취가 종양 상태뿐만 아니라, 염증 상태에서도 분해 작용을 나타내기 때문에, F-18 FDG PET/CT 이미지를 통해 전신성 염증 반응을 감지하고 평가할 수 있다. 골수의 대사는 혈액학적 파라미터와 관련이 있기 때문에, 골수의 F-18 FDG 섭취는 폐암 및 대장암을 비롯하여 다양한 암에서 예후 예측의 인자로서 전신성 염증 반응을 평가하는데 유용할 수 있다. 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)의 구성요소로서 비장과 간은 암에서의 전신성 염증 반응의 중요한 부분으로 간주되어 왔다. 세망내피계 기관의 활성화는 F-18 FDG PET/CT를 사용하여 신진 대사 활동을 측정할 수 있다. 폐암 및 담관암에서 비장의 대사 활성은 독립적인 예후 인자로 알려져 있다. 따라서, F-18 FDG PET/CT에서 골수와 비장의 대사 활성은 다양한 종류의 암 환자에서 유망한 예후 지표가 될 수 있다.

[0004] 유방암에서, NLR 및 PRL의 전처리 값은 사망률을 예측할 수 있는 것으로 알려져 있다. 최근, 유방암 환자에서 F-18 FDG PET/CT에 대한 세망내피계 기관의 대사는 임상병리학적 특징과 유의한 상관 관계를 보였다. 그러나, 아직까지 유방암 환자의 비장, 골수 또는 간에서 F-18 FDG 섭취의 임상적 예후의 중요성이 평가되지 않았는바, F-18 FDG PET/CT에서 비장, 골수 및 간의 F-18 FDG 섭취와의 관계를 조사할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 유방암의 예후를 예측하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 개체에 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체를 투여하는 단계; 및 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)에서 상기 포도당 또는 그의 유사체의 신호를 검출하는 단계를 포함하는, 유방암의 예후를 예측하는데 필요한 정보를 제공하기 위해 세망내피계에서 포도당 또는 그의 유사체를 검출하는 방법을 제공한다.

[0007] 일 구체예에 따른 방법은 개체에 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 또한, 상기 포도당 유사체는 플루오로데옥시글루코스(fluorodeoxyglucose, FDG)인 것일 수 있다. 상기 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체는 동위원소로 표지된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 동위원소는 ^{18}F, ^{11}C, ^{15}O, ^{13}N, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체는 ^{18}F-플루오로데옥시글루코스(fluorodeoxyglucose, FDG)인 것일 수 있다. 상기 투여는 경구 투여, 정맥 내 투여, 국부 투여, 또는 이들의 조합인 것일 수 있다.

[0008] 일 구체예에 따른 방법은 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)에서 상기 포도당 또는 그의 유사체의 신호를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 세망내피계는 비장, 골수, 간 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 또한, 상기 신호는 검출 가능한 포도당 또는 그의 유사체로부터 유래된 신호인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 신호

는 방사성 신호인 것일 수 있다. 일 구체예에 따른 방법은 세망내피계에서 상기 포도당 또는 그의 유사체의 신호를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 신호를 검출하는 단계를 단층촬영(tomography)을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 상기 단층 촬영은 예를 들어, 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET), 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography, CT), 단일 광자 방출 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT), 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 상기 신호는 세망내피계, 구체적으로 비장, 골수, 간, 또는 이들의 조합에서 검출되는 신호이다. 예를 들어, 개체의 전신에 PET 또는 CT를 촬영한 경우, 전신의 결과로부터 비장, 골수, 간, 또는 이들의 조합에서의 신호를 검출할 수 있다.

[0009] 상기 신호를 검출하는 단계는 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET) 이미지, 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography, CT) 이미지, 단일 광자 방출 단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT) 이미지 또는 이들의 조합을 분석하는 것일 수 있다. 구체적으로, 양전자 방출 단층촬영으로부터 획득한 이미지의 비장, 골수, 간 부위에서 관심영역을 도식화하여 측정한 정량적 섭취 값을 분석함으로써 세망내피계에서 상기 포도당 또는 그의 유사체의 신호를 검출하는 것일 수 있다.

[0010] 일 구체예에 따른 방법은 상기 개체의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호가 음성 대조군의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호에 비해 증가하는지 여부를 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 개체의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호가 음성 대조군의 세망내피계에서 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호에 비해 증가할 경우, 상기 개체는 유방암이 재발된 것으로 진단할 수 있다.

[0011] 일 구체예에 따른 방법은 검출된 포도당 또는 그의 유사체의 신호로부터 포도당 또는 그의 유사체의 표준화된 흡수값(standard uptake value, SUV)을 산출하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 SUV는 최대 SUV 또는 평균 SUV인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 방법은 개체의 산출된 SUV가 음성 대조군의 SUV에 비해 증가하는지 여부를 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 개체의 산출된 SUV가 음성 대조군의 SUV에 비해 증가할 경우, 상기 개체는 유방암이 재발된 것으로 진단할 수 있다. 일 실시예에서는 유방암 병력이 있는 환자에 PET를 촬영하고 상기 PET 분석으로부터 평균 SUV를 산출한 결과, 유방암이 재발한 환자의 비장, 골수 및 간에서 재발하지 않은 환자에 비해 평균 SUV 값이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0012] 따라서, 비장, 골수, 및 간 대사는 유방암 재발의 중요한 예측 인자이며, 특히 비장 대사는 상기 세 가지 기관 중에서 가장 강력한 예후 예측 인자가 될 수 있다.

발명의 효과

[0013] 일 양상에 따른 방법에 의하면, 분자 영상 기법에서 유방암의 재발을 효과적으로 예측, 진단하는데 이용할 수 있다. 구체적으로, F-18 FDG PET/CT에서 비장, 골수 또는 간과 같은 세망내피계의 포도당 대사 변화 등이 말초 혈액의 세포 수 변화 등 보다 먼저 일어나는 바, 유방암의 재발을 초기에 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a는 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 및 비장 $SUV_{평균}$의 유의한 상관관계를 나타내는 산포도이다. 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 및 비장 $SUV_{평균}$ 값은 유의한 양의 상관관계를 보였으며, 상관계수 rho값은 0.187이었다. 또한, 원발성 종양의 $SUV_{최대}$ 값이 클수록, 즉 원발성 종양의 대사 정도가 심할수록 또는 원발성 종양의 악성도가 높게 나타날수록 비장 $SUV_{평균}$ 값도 증가하는 경향성을 보였다.

도 1b는 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 및 골수 $SUV_{평균}$의 유의한 상관관계를 나타내는 산포도이다. 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 및 비장 $SUV_{평균}$ 값은 유의한 양의 상관관계를 보였으며, 상관계수 rho값은 0.323이었다. 또한, 원발성 종양의 $SUV_{최대}$ 값이 클수록, 즉 원발성 종양의 대사 정도가 심할수록 또는 원발성 종양의 악성도가 높게 나타날수록 비장 $SUV_{평균}$ 값도 증가하는 경향성을 보였다.

도 2는 원발성 종양 $SUV_{최대}$, 비장 $SUV_{평균}$, 골수 $SUV_{평균}$, 및 간 $SUV_{평균}$에 대해 재발의 예측 성능을 평가한 ROC 곡선이다. 각 최적의 컷 오프 포인트에 대하여 ROC(AUC) 미만의 면적을 계산하였다. 그 결과, 각각 0.76, 0.67, 0.57 및 0.61을 나타냈다.

도 3a는 무병 생존을 위한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 비장 $SUV_{평균}$ 컷 오프를 2.21로 하였을 때, 2.21

보다 높은 비장 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인하였다.

도 3b는 무병 생존을 위한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 골수 $SUV_{평균}$ 컷 오프를 2.6525로 하였을 때, 2.6525 보다 높은 골수 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인하였다.

도 3c는 무병 생존을 위한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 간 $SUV_{평균}$, 컷 오프를 2.935로 하였을 때, 2.935 보다 높은 간 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인하였다.

도 3d는 무병 생존을 위한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 컷 오프를 11.27로 하였을 때, 11.27 보다 높은 원발성 종양 $SUV_{최대}$를 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0016] **[실시예]**

[0017] 모든 절차는 1975년 헬싱키 선언(2013년 개정)의 원칙에 따라 수행되었다. 연구 설계 및 사전 동의 면제는 이화여자대학교 목동병원 기관생명윤리심의위원회(No.2018-04-036)의 승인을 받았다.

[0018] 또한, 모든 통계 분석은 상업용 통계 소프트웨어 패키지(SPSS Ver. 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하여 수행하였고, 양면 P 값은 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. ROC 분석은 GraphPad software (San Diego, CA)를 사용하여 수행하였다.

[0019] **실시예 1. 환자의 선별 및 특성 분석**

[0020] **1-1. 환자의 선별**

[0021] 조직학적으로 유방의 침윤성 관 종양(invasive ductal carcinoma, IDC)으로 진단된 환자들을 회고적(retrospective)으로 검토하였고, 초기 병기 결정을 위하여 상기 환자들을 이대 목동병원 의료 센터(2010년 11월부터 2014년 4월까지)에서 수술 전 F-18 FDG PET/CT 검사를 받도록 하였다. 다만, T4(cT4) 또는 N2(cN2) 이상의 임상적 단계로 인해 수술 전 선행 화학요법(neoadjuvant chemotherapy)을 받은 환자들은 포함시키지 않았다. cT3 또는 cN1 미만인 경우, 유방 보존을 목적으로 선행 화학요법을 받은 환자들 또한 포함시키지 않았다. 대상 환자 중, (ⅰ) F-18 FDG PET/CT 이미지의 분석에서 체적 평균화 효과를 최소화 하기 위해 종양 크기가 1 ㎝ 미만 이었던 환자, (ii) 추적 관찰 중 발생한 다른 악성 종양이나 기타 악성 종양의 병력이 있는 환자, (iii) 수술 후 6개월 이전에 특별한 사정없이 추적 관찰에 실패한 환자, (iv) 수술 후 보조 요법 받기를 거부한 환자, (v) 수술 전 만성 바이러스 감염(B형 또는 C형 간염) 또한 비정상 간 기능 검사(abnormal liver function test, LFT)를 포함한 간 질환이 있는 것으로 평가된 환자, 및 (vi) 과립구-콜로니 자극 인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)와 같은 약물의 최근 투여 경력이 있는 환자는 제외하였다. 또한, 수술 전후 유방암 이외의 임상 증상이나 징후를 밝혀내기 위하여 다른 기본 질환에 대한 전자 의료 기록을 검토하였다.

[0022] **1-2. 환자의 특성 분석**

[0023] 먼저, 상기 1-1에 기재된 기준을 충족시킨 226명의 여성 환자를 등록하였다. 이후, 선행 치료(neoadjuvant therapy)를 받은 11명의 환자(cN2 이상, n=8; 유방-보존, n=3)는 최종 분석에서 제외되었다. 1㎝ 미만의 종양 크기(n=29), 짧은 추적 기간(n=10), 유방암 이외의 악성 종양(n=12), 보조 요법 거부(n=5), 및 근본적인 간 질환 또는 비정상적인 LFT 결과(n=6)를 나타낸 총 62명의 환자 또한 최종 분석에서 제외되었다. 상기 73명의 환자들을 제외하고 153명의 환자가 최종 분석에 포함되었다. 등록된 153명의 인구 통계 및 종양 특성을 하기 표 1에 나타내었다. 등록된 환자 중 어느 누구도 수술 전 정밀검사에서 G-CSF를 받거나 또는 유방암 이외의 다른 심각한 증상이나 징후가 드러나지 않았다.

표 1

[0024]

특징	Nu수	%
성별		
여성, n (%)	153	100

초기 진단시 나이(년), 평균±SD (범위)	49.5±9.6 (30-79)	
폐경 여부		
폐경 전	105	68.6
폐경 후	48	31.4
상태		
유방 보존술	130	85.0
유방 절제술	23	15.0
pT 병기		
T1	90	58.8
T2	61	39.9
T3	2	1.3
pN 병기		
N0	107	69.9
N1	36	23.5
N2	9	5.9
N3	1	0.7
에스트로겐 수용체 상태		
양성	104	68.0
음성	49	32.0
프로게스테론 수용체 상태		
양성	105	68.6
음성	48	31.4
HER2 상태		
양성	40	26.1
음성	113	73.9
Ki67 지수 상태[쩔]		
<14%	53	36.3
=14%	93	63.7
절제면 침입(Resection margin involvement)		
음성	150	98.0
양성	3	2.0
핵 등급		
등급 1	6	3.9
등급 2	87	56.9
등급 3	60	39.2
조직학적 등급		
등급 1	28	18.3
등급 2	68	44.4
등급 3	57	37.3
병리학적 등급[쩔]		
I	74	48.4
II	68	44.4
III	11	7.2
보조 치료		
CTx+RTx+HTx	111	72.5
CTx+RTx	10	6.5
RTx+HTx	13	8.5
CTx+HTx	16	10.5
CTx	1	0.7
RTx	1	0.7
HTx	1	0.7
WBC[§], **평균±SD (범위)(x 10^{12} 세포/L)**	6.05±1.50 (3.03-10.00)	

[0025] [쩔] 제7회 AJCC에 따른 병리학적 병기

[0026] [쩔]환자 146명의 Ki67 값

[0027] [§]검사 참고치는 4.00~10.00x10^{12} cells/L 이다.

[0028] 153명의 환자 중, 19명(12.4%)에서 종양이 재발하였다. 환자의 평균 임상 추적 기간은 79.2개월(95% CI 75.4 내지 83.1 개월, 범위 8 내지 88개월)이었다. 종양 재발 부위는 국소 부위(9명), 림프절(3명), 뼈(2명), 뇌(1명), 폐(2명), 간(1명), 및 복잡장기(1명)였다.

[0029] **실시예 2. 재발 예측을 위한 임상병리학적 자료 수집**

[0030] 잠재적으로 예후와 관련이 있는 것으로 여겨지는 임상 병리학적 자료를 전자 의료 기록에서 수집하였다. 초기 진단시 연령, 성별, 키(m) 제곱에 대한 몸무게(kg) 의 비율로 정의되는 폐경기 체질량 지수(Body Mass Index, BMI), 및 수술 전 정밀검사(preoperative work-up)로서 전혈 수(whole blood count), 혈소판, 및 헤모글로빈(Hb)을 포함한 혈액검사 결과 데이터를 수집하였다. 호중구-림프구 비율(neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR) 및 혈소판-림프구 비율(platelet-to-lymphocyte ratio, PLR)은 수술 전의 혈구 수 결과를 사용하여 계산되었다. 병리학적 자료에는 제7회 American Joint Committee on Cancer staging system, 병리학적 종양 직경, 수술 증거 침범, Black의 핵 등급, Bloom-Richardson의 조직학적 등급에 근거한 병리학적 단계(pT, pN)가 포함되었다. 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER), 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR), 인간 표피 성장인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2), 및 Ki67의 발현을 평가하는 면역조직화학 결과도 수집하였다. ER 및 PR 양성 상태는 양성 세포(0 내지 5) 및 염색 강도(0 내지 3)의 백분율의 스코어 파라미터(scoring parameter)를 모두 사용하여 정의하였다. 총 점수 0 내지 2는 각 호르몬에 대해 음성으로 간주하였고, 3 내지 8은 양성으로 간주하였다. HER2는 면역조직화학 검사 결과가 음성이거나 또는 1+ 일 때 음성으로 정의하였고, 3+일 때 양성으로 정의하였다. 결과가 2+일 때, HER2 양성은 형광 in situ hybridization(FISH)의 결과에 따라 정의하였다. 마커 Ki67의 경우, 과발현은 종양 세포의 14% 이상 존재하는 것으로 정의하였다.

[0031] 수술 전 정밀검사로서 간 전이효소인 아스파르테이트아미노전달효소(aspartate aminotransferase, AST) 및 알라닌아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT)와, 총 빌리루빈, 및 B형 및 C형 간염에 대한 혈청학적 평가를 포함한 정상 간기능검사(liver function test, LFT) 결과를 포함하였다.

[0032] 치유적 수술 후, 환자의 병리학적 단계 및 임상적 조건에 따라 보조 요법이 수행되었다. 처음 2년에는 매 3 내지 6개월 마다 신체검사, 혈액 검사, 초음파 검사, 흉부 X선 검사, 골 스캔으로 정기적인 추적 관찰이 이루어졌고 이후에는 매 6 내지 12개월 마다 추적 관찰이 이루어졌다. 재발이 의심되면, 병리학적 확인이나 영상 검사를 위한 추가적인 절차가 수행되었다. 생존 분석을 위해, 무병생존기간(disease-free survival, DFS)는 수술 날짜와 재발이 처음으로 확인된 날짜 사이의 시간으로 정의되었다.

[0033] **실시예 3. F-18 FDG PET/CT 획득 및 이미지 분석**

[0034] **3-1. F-18 FDG PET/CT 획득**

[0035] 모든 F-18 FDG PET/CT 촬영은 전용 PET/CT 스캐너(128-slice CT (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)가 장착된 Siemens Biograph mCT)를 사용하여 수행하였다. 모든 환자는 F-18 FDG PET/CT 스캔 전 적어도 6시간 이상 금식하였고, 촬영 전에 환자의 혈당 수준이 140 mg/dL 미만이 되도록 유지하게 하였다. PET/CT 스캔은 5.18 MBq/kg의 F-18 FDG를 정맥 내 주사한 후 1시간(평균 60.7분, 범위 51-79분)에 수행하였으며 CT 스캔은 감쇠보정(attenuation correction) 및 해부학적 정보를 위한 조영제 증강(contrast enhancement) 없이, 128-slice CT (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)가 장착된 Siemens Biograph mCT를 사용하여 뇌 기저부(skull base)부터 대퇴부(upper thigh)까지 120 kVp로 측정하였다. PET 중심에서의 공간 분해능은 경축 방향에서 2.0 ㎜ 반치전폭(full width at half maximum, FWHM)이었고, 축 방향에서 2.0 ㎜ FWHM 이었다. 3차원 방출은 PET 이미지의 획득 파라미터로 사용되었으며 5 내지 7 베드에 대해 각 베드당 2분 스캔이 필요하였다. PET 이미지는 비행 시간 정보의 이용 및 포인트 스프래드 기능이 있는 3차원 OSEM 반복 알고리즘(2 반복 및 21 부분 집합)을 사용하여 3.0 ㎜ 슬라이스 두께의 200 x 200 ㎜ 매트릭스 및 3.4 x 3.4 픽셀 크기로 재구성되었다. 환자는 누운 자세로, PET/CT 이미지 획득 동안에 정상적으로 호흡할 수 있도록 하였다.

[0036] **3-2. F-18 FDG PET/CT 이미지 분석**

[0037] 상업적으로 이용 가능한 시스템 (Syngo.via; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)을 사용하여 모든 PET/CT 데이터를 분석하였다. 원발성 유방암 병변(원발성 종양 $SUV_{최대}$)에 대한 개별 환자 체중에 대해 보정된 최대 표준화된 섭취량(standardized uptake value, $SUV_{최대}$) 및 비장, 간 및 골수의 평균 표준화된 섭취량($SUV_{평균}$)를 측정하여 하기 표 2에 나타내었다.

[0038] 상기 소프트웨어의 자동화된 묘사 기능을 사용하여 원발성 종양에 관심 영역(Regions of interest, ROI)을 배치하였다. 비장 $SUV_{평균}$의 경우, 구형 관심 부피(volume of interest, VOI)가 수동으로 비장 중심에 그려졌는데, 이는 축 상에서 가장 큰 전후 직경을 보이는 부위였다. 비장 SUV 측정의 방법을 검증하기 위해, 평가자 간의 신뢰도(inter-rater variability)를 평가하였다. 환자의 임상 정보에 대해 자세히 알지 못하는 두 명의 핵의학과 의사가 비장 SUV를 측정하였으며, 급간 내 상관계수(intraclass correlation coefficient)를 사용하여 평가하였다. 그 결과, 급간 내 상관계수는 0.954로, 비장 중심에 있는 구형 VOI를 통해 비장 SUV를 수동으로 측정한 결과 재현성이 높았다.

[0039] 골수의 신진대사는 이전에 보고된 방법을 사용하여 측정되었다. 구형 VOI는 T10 내지 T12 척추 및 L3 내지 L5 척추의 척추체에 그려졌고, $SUV_{평균}$은 $SUV_{최대}$의 75% 컷 오프 값을 사용하여 측정되었다. 압박 골절, 퇴행, 또는 수술 후 변화와 같은 손상된 척추는 골수 신진대사 측정에서 제외하였다. 골수의 $SUV_{평균}$의 평균값은 골수 $SUV_{평균}$으로 정의되었다. 간(간 $SUV_{평균}$)의 신진대사 측정을 위해, 구형 VOI를 고정된 크기(3㎝ 직경)를 사용하여 간의 오른쪽에 자동으로 배치하였다. 만약 CT 스캔 품질이 손상되거나 또는 간이 다른 병변으로 옮겨지면 자동으로 그려진 모든 참조 VOI가 검토되고 수동으로 다시 그려졌다.

[0040] **실시예 3. 재발의 예측 가능성 평가**

[0041] **3-1. 비장, 골수 및 간 대사 및 종양-관련 인자 간의 파라미터 상관 분석**

[0042] 비장, 골수, 및 간 대사 및 종양-관련 인자 간의 파라미터 상관 분석은 비장 $SUV_{평균}$이 원발성 종양 $SUV_{최대}$ (rho=0.187, P=0.021, 도. 1a), pT 병기 (pT1 vs T2+3; rho=0.165, P=0.042), 및 형태학적 등급 (등급 1 vs 등급 2+3; rho=0.212, P=0.008)과 유의한 양의 상관관계를 보이는 것을 나타냈다. 또한, 골수 $SUV_{평균}$은 원발성 종양 $SUV_{최대}$와 양의 상관관계를 나타냈다(rho=0.323, P<0.001, 도. 1b). 비장, 골수 및 간 대사 및 임상 파라미터와의 관계는 Spearman의 순위 상관 분석을 사용하여 분석하였으며 비장, 골수 및 간 $SUV_{최대}$가 각각 BMI와 양의 상관관계를 가지는 것을 확인할 수 있었다 (rho=0.551, 비장 $SUV_{평균}$ P<0.001; rho= 0.224, 골수 $SUV_{평균}$ P=0.005; rho=0.434, 간 $SUV_{평균}$ P<0.001). 골수 $SUV_{평균}$과 Hb 간에는 유의적인 음의 상관 관계가 있었다(rho=-0.202, P =0.012). 그러나, 비장, 골수 또는 간 $SUV_{평균}$은 WBC, NLR, 및 PLR을 포함한 어떠한 임상적 파라미터와도 상관 관계가 없었다.

[0043] **3-2. 임상병리학적 파라미터 및 PET 파라미터 평가**

[0044] 재발 가능성의 예측을 위한 임상병리학적 파라미터 및 PET 파라미터를 평가하기 위해 이원 로지스틱 회귀(Binary logistic regression) 분석을 수행하였다. 임상 파라미터의 경우, BMI만이 재발과 유의한 관련이 있었다. 병리학적 파라미터의 경우, pT 병기, 림프절 전이, ER/PR 상태, 절제면의 종양 침입, 핵 등급, 및 조직학적 등급이 종양의 재발과 유의한 관련이 있었다. 또한, PET 파라미터의 경우, 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 및 비장 $SUV_{평균}$이 재발과 유의한 관련이 있었다. 재발과 관련된 이원 로지스틱 회귀 분석 결과를 요약하여 표 2에 나타내었다.

표 2

[0045]

	비-재발 (n 또는 평균±SD)	재발 (n 또는 평균±SD)	P 값	Odds 비율	95% CI
진단 시 나이(년)	49.5±9.9	49.0±7.3	0.806	0.994	0.944-1.046
BMI	23.2±3.2	25.2±4.2	0.014	1.181	1.034-1.349
폐경 여부					
폐경 전	94	11	-	-	-
폐경 후	40	8	0.289	1.638	0.659-4.071

WBC (x 10^{12} cells/L)	5.97±1.47	6.60±1.54	0.088	1.315	0.960-1.802
혈소판 (x 10^{12} cells/L)	262.1±62.8	270.7±58.0	0.573	1.002	0.995-1.010
헤모글로빈 (g/dL)	13.2±1.3	12.9±1.5	0.321	0.850	0.616-1.172
NLR	1.89±0.91	1.71±0.53	0.383	0.741	0.379-1.452
PLR	141.2±50.5	124.7±34.7	0.161	0.991	0.978-1.004
pT 병기[쩔]					
T1	89	1			
T2 + T3	45	18	0.001	35.600	4.604-272.251
림프절 전이					
무	99	8	-	-	-
유	35	11	0.007	3.889	1.447-10.456
ER 상태					
양성	33	16	-	-	-
음성	101	3	<0.001	16.323	4.474-59.550
PR 상태					
양성	34	14	-	-	-
음성	100	5	<0.001	8.235	2.761-24.561
HER2 상태					
음성	102	11			
양성	32	8	0.112	2.093	0.842-5.205
Ki67 지수 상태[쩔]					
<14%	50	3	-	-	-
= 14%	77	16	0.058	3.463	0.960-12.499
절제면의 종양 침입(Tumor involvement of resection margin)					
음성	133	17	-	-	-
양성	1	2	0.028	15.647	1.346-181.862
핵 등급					
등급1+2	89	4	-	-	-
등급 3	45	15	0.001	7.417	2.326-23.652
형태학적 등급					
등급 1+2	92	4	-	-	-
등급 3	42	15	<0.001	8.214	2.571-26.249
원발성 종양 $SUV_{최대}$	6.0±4.0	10.9±6.1	<0.001	1.210	1.098-1.333
비장 $SUV_{평균}$	1.90±0.21	2.62±0.31	0.004	25.321	2.807-228.393
골수 $SUV_{평균}$	2.06±0.32	2.16±0.42	0.212	2.400	0.607-9.487
간 $SUV_{평균}$	2.49±0.26	2.62±0.31	0.062	5.781	0.916-36.481

[0046] [쩔] 환자 146명의 Ki67 값

[0047] [쩔] 제7회 AJCC에 따른 형태학적 단계

[0048] 도 2는 원발성 종양 $SUV_{최대}$, 비장 $SUV_{평균}$, 골수 $SUV_{평균}$, 및 간 $SUV_{평균}$에 대해 재발의 예측 성능을 평가한 ROC 곡선을 나타낸다. 도 2에 나타난 바와 같이, 1차 종양 $SUV_{최대}$, 비장 $SUV_{평균}$, 골수 $SUV_{평균}$ 및 간 $SUV_{평균}$의 AUC는 각각 0.76, 0.67, 0.57 및 0.61이었다. 원발성 종양 $SUV_{최대}$, 비장 $SUV_{평균}$, 골수 $SUV_{평균}$ 및 간 $SUV_{평균}$에 대한 DFS의 가장 중요한(log-rank test) 분할 지점을 찾음으로써 결정된 최적의 컷 오프 포인트는 각각 11.27 (민감도 47.4%, 특이도 90.3%), 2.21 (민감도 31.6%, 특이도 94.8%), 2.625 (민감도 21.1%, 특이도 94.8%), 및 2.935 (민감도 21.1%, 특이도 94%)임을 확인할 수 있었다.

[0049] **3-3. 무병 생존(disease free survival)의 Cox 회귀 분석**

[0050] 무병 생존(disease free survival)의 단변량 Cox 회귀 분석 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 구체적으로, Kaplan-Meier 방법을 사용하여 DFS를 계산하였다. 먼저, 단변량 Cox 회귀분석은 각 파라미터 및 변수(variable)에 대해서 수행되었으며, P 값이 0.05 미만인 파라미터 및 변수는 다변량 분석에 포함되었다. 다변량 Cox 회귀 분석에서, 전방 조건적 방법(진입 임계값 P<0.05; 제거 임계값 P>0.1)이 적용되었다. 연속 변수의 경우, Budczies et al.에 의해 디자인되고 설계된 웹 기반 R 소프트웨어를 사용하여, DFX의 가장 중요한(로그 순위 테스트) 분할 포인트를 찾음으로써 파라미터의 최적 컷 오프 포인트를 결정하였다. 다음으로 ROC(Receiver Operating Characteristics) 커브를 생성하였고, 재발의 예측 성능을 평가하기 위해 각 최적의 컷 오프 포인트에 대한 ROC(AUC) 미만의 면적을 계산하였다.

표 3

[0051]

변수	P 값	HR	95% CI
진단 시 나이	0.810	0.994	0.948-1.042
BMI (<25.0 vs. =25.0)	0.020	2.78	1.130-6.840
폐경 상태 (폐경 전 vs.폐경 후)	0.289	1.638	0.659-4.071
WBC (< 6.39×10^{12} cells/L vs. = 6.39×10^{12} cells/L)	0.022	2.84	1.120-7.210
혈소판 (<348×10^{12} cells/L vs. = 348×10^{12} cells/L)	0.240	2.05	0.600-7.030
Hb (<14.5 g/dL vs. = 14.5 g/dL)	0.288	0.041	0.000-15.070
NLR (<2.505 vs. = 2.505)	0.256	0.039	0.000-10.474
PLR (<140.7 vs. = 140.7)	0.051	0.293	0.085-1.005
pT 병기[쩔] (T1 vs. T2+T3)	0.001	30.100	4.016-225.582
림프절 전이 (무 vs. 유)	0.007	3.523	1.416-8.761
ER 상태 (양성 vs. 음성)	<0.001	13.754	4.003-47.256
PR 상태 (양성 vs. 음성)	<0.001	7.487	2.694-20.804
HER2 상태 (양성 vs. 음성)	0.112	0.478	0.192-1.188
Ki67 지수 상태 (<14% vs. = 14%)[쩔]	0.051	3.408	0.993-11.700
절제면의 종양 침입 (음성 vs.양성)	0.003	9.057	2.080-39.430
핵 등급 (등급 1+2 vs. 3)	0.001	6.634	2.200-20.001
형태학적 등급 (등급 1+2 vs. 3)	<0.001	7.290	2.418-21.982
원발성 종양 $SUV_{최대}$ (< 11.27 vs. = 11.27)	<0.001	6.83	2.770-16.850
비장 $SUV_{평균}$ (< 2.21 vs. =2.21)	<0.001	6.29	2.680-16.610
골수 $SUV_{평균}$ (< 2.625 vs. = 2.625)	0.010	3.87	1.280-11.690
간 $SUV_{평균}$ (< 2.935 vs. =2.935)	0.024	3.33	1.100-10.030

[0052] [쩔] 제7회 AJCC에 따른 형태학적 단계

[0053] [쩔]환자 146명의 Ki67 값

[0054] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 임상적 파라미터의 경우, BMI와 WBC가 DFS와 유의한 관련이 있었다(P<0.05). 병리학적 파라미터의 경우, pT 병기, 림프절 전이, ER/PR/HER2 상태, 절제면의 종양 침입, 핵 등급, 및 조직학적 등급이 DFS와 유의한 관련이 있었다(P<0.05). PET 파라미터의 경우, 비장 $SUV_{평균}$, 골수 $SUV_{평균}$, 간 $SUV_{평균}$, 및 원발성 종양 $SUV_{최대}$는 DFS의 유의한 예후 인자임을 확인할 수 있었다(P<0.05, 도 3).).

[0055] 도 3a 내지 3d는 무병 생존을 위한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 구체적으로 도 3a는 2.21에서 비장 $SUV_{평균}$ 컷 오프; 도 3b는 2.625에서 골수 $SUV_{평균}$ 컷 오프; 도 3c는 2.935에서 간 $SUV_{평균}$ 컷 오프 및 도 3d는 11.27에서 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 컷 오프를 나타낸다. 구체적으로, 비장 $SUV_{평균}$ 컷 오프를 2.21로 하였을 때 2.21 보다 높은 비장 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우, 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인할 수 있으며, 골수 $SUV_{평균}$ 컷 오프

를 2.6525로 하였을 때 2.6525 보다 높은 골수 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인할 수 있다. 또한, 간 $SUV_{평균}$ 컷 오프를 2.935로 하였을 때 2.935 보다 높은 간 $SUV_{평균}$을 나타내는 경우 무병생존기간이 유의하세 짧은 것을 확인할 수 있으며, 원발성 종양 $SUV_{최대}$ 컷 오프를 11.27로 하였을 때 11.27 보다 높은 원발성 종양 $SUV_{최대}$를 나타낸 경우 무병생존기간이 유의하게 짧은 것을 확인할 수 있다.

[0056] 상기 표 3의 변수 중, 다변량 분석을 위해 단변량 Cox 회귀분석에서 P 값이 0.05 미만인 경우를 선택하여 하기 표 4에 나타내었다. 이들 변수 중, 전신성 염증 변화에 반응하는 비장, 골수 및 간 간의 가능한 생물학적 상관관계로 인하여 골수와 간 $SUV_{평균}$은 제외되었으며, 오직 비장 $SUV_{평균}$만이 다변량 분석에 포함되었다.

표 4

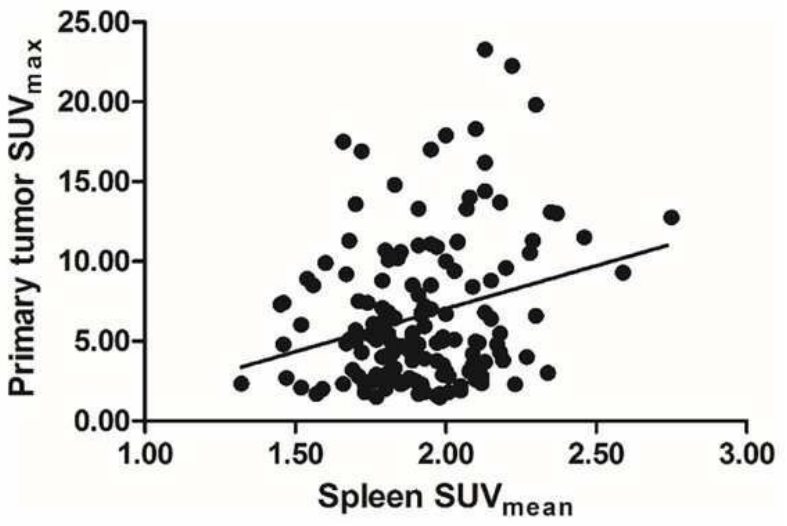
[0057]

변수	β	사망 위험률 (Hazard ratio)	95% CI	P 값
pT 병기 (T1 vs. T2+T3)	2.740	15.482	1.998-119.958	0.009
ER 상태 (양성 vs. 음성)	2.155	8.629	2.489-29.912	0.001
비장 $SUV_{평균}$(< 2.21 vs. =2.21)	1.080	2.944	1.098-7.896	0.032

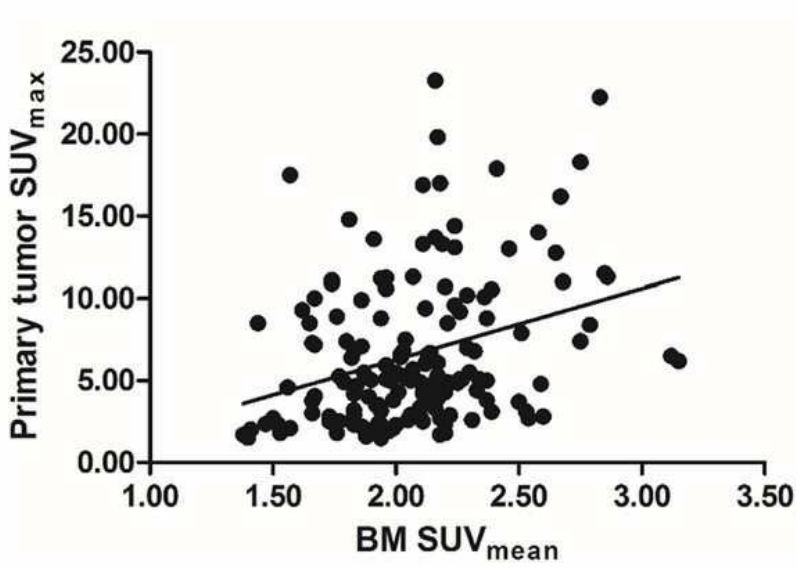
[0058] 다변량 분석 결과, 표 4에 나타난 바와 같이 비장 $SUV_{평균}$은 pT 병기 및 ER 상태와 무관하게 DFS를 예측하는 인자임을 확인할 수 있었고, 비장 $SUV_{평균}$ 값을 2.21 컷 오프로 하였을 때, 비장 $SUV_{평균}$ 값이 2.21 보다 큰 유방암 환자의 경우 비장 $SUV_{평균}$ 값이 2.21 보다 작은 환자에 비하여 재발 위험 가능성이 2.944 배 높은 것을 확인하였다(P=0.032).

도면

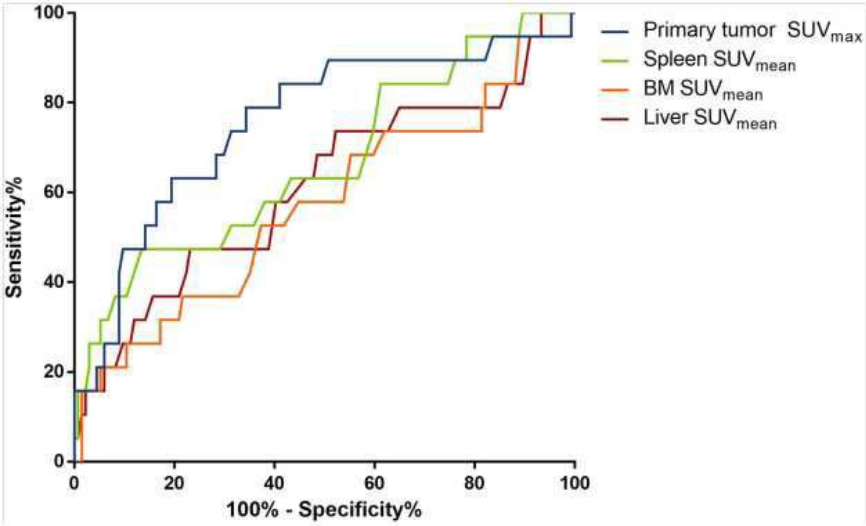
도면1a



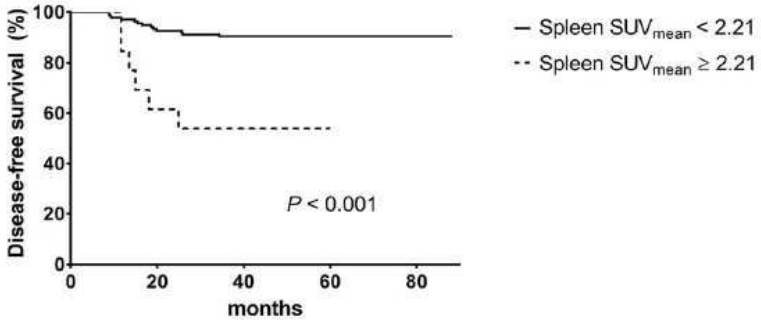
도면1b



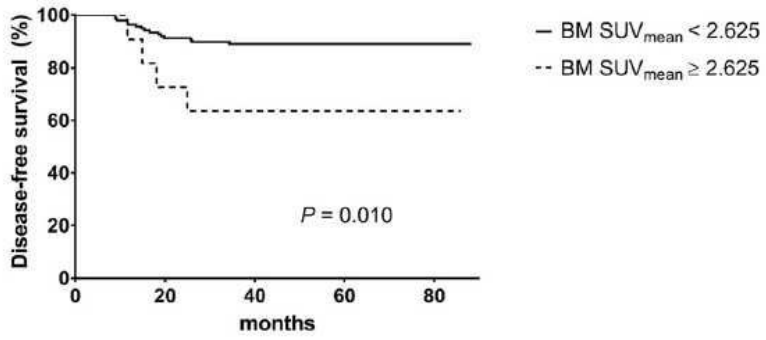
도면2



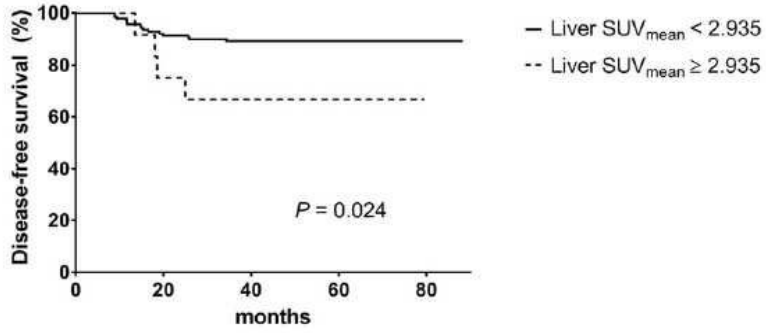
도면3a



도면3b



도면3c



도면3d

