

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 23일 (23.04.2020)



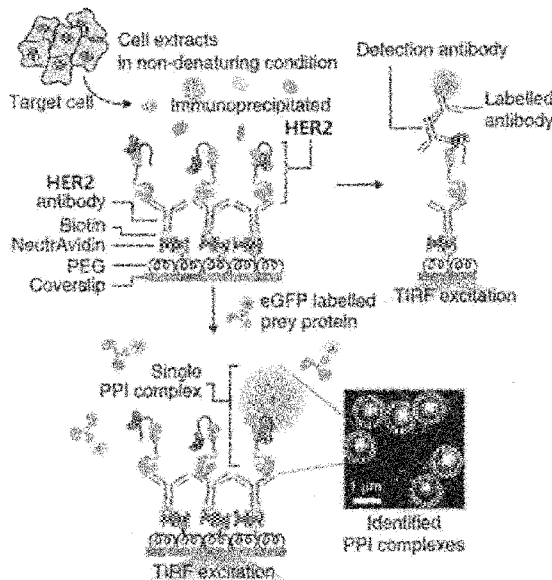
(10) 국제공개번호
WO 2020/080891 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/574* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/013761
- (22) 국제출원일: 2019년 10월 18일 (18.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0125513 2018년 10월 19일 (19.10.2018) KR
10-2019-0053223 2019년 5월 7일 (07.05.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 프로티나 (PROTEINA, INC.) [KR/KR]; 34051 대전시 유성구 문지로 193, 133호, Daejeon (KR). 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이홍원 (LEE, Hong Won); 06966 서울시 동작구 장승배기로4길 9, 121동 605호, Seoul (KR). 이정언 (LEE, Jeong Eon); 06351 서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 김상민 (KIM, Sangmin); 06351 서울시 강남구 일원로 81, Seoul (KR). 최희준 (CHOI, Hee Jun); 51353 경상남도 창원시 마산회원구 팔용로 158, Gyeongsangnam-do (KR). 이슬 (LEE, Seul); 08104 서울시 양천구 목동남로4길 6-46, 102동 1002호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING RECURRENCE OF BREAST CANCER

(54) 발명의 명칭: 유방암 재발 예측 방법

[도 1]



(57) Abstract: Disclosed is a method and a kit for predicting (or diagnosing) a breast cancer prognosis (for example, whether the cancer is recurring) through the analysis of protein-protein interactions from among proteins associated with breast cancer and/or the measurement of expression levels of the proteins associated with breast cancer, or for providing information for the prediction (or diagnosis). In addition, the present invention relates to: a method for predicting (or diagnosing) a breast cancer prognosis or whether breast cancer is recurring or for selecting a patient suitable for HER2 targeted therapy, through HER2 protein expression level; or a method for providing information for the prediction (or diagnosis) or selection.



WO 2020/080891 A1

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 제21조(3))

(57) 요약서: 유방암과 관련된 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 분석 및/또는 상기 유방암과 관련된 단백질의 발현 수준 측정을 통하여 유방암 예후 (예컨대, 재발 여부)를 예측 (또는 진단) 또는 상기 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하기 위한 방법 및 키트에 관한 것이다. 또한, HER2 단백질 발현수준을 통하여 유방암 예후 또는 재발 여부를 예측 (또는 진단)하거나 HER2 표적 치료에 적합한 환자를 선별하는 방법 또는 상기 예측 (또는 진단) 또는 선별에 정보를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

【명세서】

【발명의 명칭】

유방암 재발 예측 방법

5 **【기술분야】**

유방암과 관련된 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 분석 및/또는
 상기 유방암과 관련된 단백질의 발현 수준 측정을 통하여 유방암 예후
 (예컨대, 재발 여부)를 예측 (또는 진단) 또는 상기 예측 (또는 진단)에
 정보를 제공하기 위한 방법 및 키트에 관한 것이다. 또한, HER2 단백질
 10 발현수준을 통하여 유방암 예후 또는 재발 여부를 예측 (또는 진단)하거나
 HER2 표적 치료에 적합한 환자를 선별하는 방법 또는 상기 예측 (또는 진단)
 또는 선별에 정보를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

15 최근까지는 질병의 개인에 따른 맞춤형 진단 및 치료는 주로 유전자
 분석(genomic profiling)에 집중되어 왔다. 그러나, 암을 비롯한 특정
 질병의 발병원인은 신체를 구성하는 세포의 비정상적인 활동, 더욱
 자세하게는 세포를 구성하고 조절하는 다양한 단백질의 비정상적인 발현
 (예컨대, 과발현) 및/또는 단백질간의 비정상적인 상호작용에 의한
 20 것이므로, 유전자 분석을 통한 관찰만으로는 이해하기 어려운 문제가 있다.
 단백질-단백질 상호작용의 정확한 분석은 세포 내 신호전달 네트워크
 (signaling network)가 어떻게 변화하는 지를 이해할 수 있도록 할 뿐
 아니라, 개별적인 암의 진행과 특성을 예측할 수 있어서 그 치료를 위한
 적절하고 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

25 기존의 유방암 진단은 특정 단백질 세트에 대한 IHC
 (Immunohistochemistry)를 통해 molecular subtype(HER2(+)) 또는 HER2(-
))을 결정하게 된다. 그 중 Luminal A type 또는 삼중음성 유방암은 IHC
 scoring을 통해 HER2(-)로 결정된 검체를 지칭한다.

일반적으로 HER2(+))인 경우 표적항암요법과 화학요법을 처방하게
 30 되고, HER2(-))인 경우 호르몬요법으로 처방하게 된다. 그리고, HER2(-))의
 경우 재발 또는 전이가능성이 높은 고위험군은 화학요법을 병용하여

처방하게 된다. 기존의 HER2(-) 유방암의 재발 진단에서는 특정 복수의 유전자를 대상으로 RT-PCR 또는 Microarray를 이용하여 전이 또는 재발여부를 예측하여 고위험군, 저위험군으로 구분한다.

5 HER2 (+/-) 진단에 활용되는 IHC scoring 기법은 염색의 정도를 기초로 한 결과 해석이 시험자에 따라 다를 수 있고, 분석기법의 정교함이 낮아서, IHC scoring 결과 HER2(-)로 결정된 검체에서도 실제 HER2가 상당수준 포함될 수 있어, 환자의 적절한 치료에 장애가 될 수 있다.

HER2 발현수준을 더욱 정밀하게 측정 및 정량화하여, 유방암 예후(재발) 진단 및 치료에 활용할 필요성이 있다.

10

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 명세서에서는, 단백질 진단법에 있어서, 전통적인 IHC scoring 기법보다 정교하게 단백질 수준을 측정하는 기술을 제공하고, 재발가능성이 15 높은 고위험군을 보다 효과적으로 분류하고자 한다.

일 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암 예후 또는 재발 예측 (또는 진단) 방법, 또는 유방암 예후 또는 재발 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

20 보다 구체적으로, 상기 방법은,

(i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 25 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD))과 비교하는 단계

를 포함할 수 있다.

상기 단계 (i)의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계는, 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2에 표지물질이 부착된 HER2 30 결합물질을 투여하고, 표지물질로부터 발생하는 신호를 근접장 영역에서 측정하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 근접장은 발생하는 신호

(형광신호)에 따라서 결정될 수 있다.

상기 단계 (ii)의 비교하는 단계는, 상기 단계 (i)에서 측정된 신호 값을 기준 값(예컨대, 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서 표지된 HER2 결합 물질과의 반응에 의하여 발생하는 신호의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD))과 비교하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

상기 방법은, 상기 단계 (ii) 이후에, (iii-a) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준 (신호 값)이 기준 발현 수준 (기준 값) 이상인 경우, 기준 발현 수준 (기준 값)보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 또는 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계, 및/또는 (iii-b) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준 (신호 값)이 기준 발현 수준 (기준 값)보다 낮은 경우, 기준 발현 수준 (기준 값) 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 또는 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

다른 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (iii-a) 이후에, 유방암 예후 또는 재발 여부를 모니터링하는 단계, 또는 유방암 재발을 예방, 및/또는 치료하는 단계 (예컨대, 유방암 재발의 예방 또는 치료를 위한, 약물 투여, 방사선 조사, 및/또는 외과적 수술 등)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (iii-b) 이후에, 유방암 예후 또는 재발을 모니터링하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 유방암 예후 또는 재발을 모니터링하는 단계는 앞서 설명한 유방암 예후 또는 재발 예측 방법을 1회 이상 수행하는 것일 수 있다.

다른 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별 방법, 또는 환자 선별에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

보다 구체적으로, 상기 방법은,

- (i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및
- (ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지

않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계
 를 포함할 수 있다.

5 상기 방법은, 상기 단계 (ii) 이후에, (iii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 생물학적 시료가 유래된 유방암 환자를 HER2 표적 치료에 적합한 환자로 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

10 다른 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (iii) 이후에, (iv) 상기 단계 (iii)에서 선택된 유방암 환자에게 HER2 표적 치료를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

 다른 예는,

 (i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계,

15 (ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

20 (iii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 생물학적 시료가 유래된 유방암 환자를 HER2 표적 치료에 적합한 환자로 선택하는 단계,

 (iv) 상기 단계 (iii)에서 선택된 유방암 환자에게 HER2 표적 치료를 수행하는 단계

 를 포함하는, 유방암 치료 방법을 제공한다.

 다른 예는,

25 표면에 HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기관을 포함하는 HER2 단백질 발현 수준 측정부를 포함하는, 유방암의 예후 또는 재발 여부) 예측 또는 진단용 키트, 또는 HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별용 키트를 제공한다. 상기 키트는, HER2 단백질에 특이적으로 결합하는, 표지된 HER2 결합 물질 (예컨대, 형광 표지된 항-HER2 항체 등),
 30 및/또는 HER2 단백질과 결합 물질 간의 결합 (반응)에 의하여 발생한 신호 (예컨대, 형광 신호 등)을 검출할 수 있는 신호검출 수단을 추가로 포함할

수 있다.

다른 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계 및 HER2 및/또는 HER3의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암 예후 여부 예측 (또는 진단) 방법, 또는 유방암 예후 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

보다 구체적으로, 상기 방법은,

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계, 및

(II) 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계

를 포함할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 방법은,

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계, 및

(II) 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계

를 포함할 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 방법은,

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계,

(II) 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계, 및

5 (II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

10 다른 구체예에서, 상기 방법은,

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계,

(II) 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계, 및

25 (II-b) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 기준 발현 수준보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계 및/또는 (II-c) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준보다 낮은 경우, 기준 발현 수준 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의

재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계
를 포함할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 상기 방법은,

(II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 및/또는
5 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을
기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나
포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는
HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계, 및

10 (I) 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 측정된 HER2
및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적
시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는
단계

를 포함할 수 있다.

15 또 다른 구체예에서, 상기 방법은,

(II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 및/또는
HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을
기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나
20 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는
HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

(I) 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 측정된 HER2
및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적
시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는
25 단계, 및

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma
단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용
수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질
상호작용 수준)을 비교하는 단계

30 를 포함할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 상기 방법은,

(II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

(I) 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계, 및

(I-b) 상기 단계 (I)에서 측정된 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계, 및/또는 (I-c) 상기 단계 (I)에서 측정된 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계

를 포함할 수 있다.

다른 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (II-b) 또는 (I-b) 이후에, 유방암 예후를 모니터링하거나, 유방암 재발을 예방, 및/또는 치료하는 단계 (예컨대, 유방암 재발의 예방 또는 치료를 위한, 약물 투여, 방사선 조사, 및/또는 외과적 수술 등)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (II-c) 또는 (I-c) 이후에, 유방암 예후를 모니터링하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 유방암 예후를 모니터링하는 단계는 앞서 설명한 유방암 예후 예측 방법을 1회 이상

수행하는 것일 수 있다.

다른 예는,

표면에 HER2에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기판을 포함하는 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응부,

5 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준 측정부, 또는 이들 모두

를 포함하는, 유방암의 예후 (예컨대, 재발 여부) 예측 또는 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 상기 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응에 의한 신호 (예컨대, 형광신호 등)을 검출할 수 있는 신호검출 수단, 10 및/또는 신호물질 (예컨대, 형광물질) 표지된 PLC-gamma 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

【기술적 해결방법】

본 명세서에서는, 단백질 상호작용 분석기술을 이용하여, 유방암 15 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서, 유방암과 관련된 단백질, 예컨대, HER2 및/또는 HER3 단백질 발현 수준 및/또는 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 보다 정밀하게 측정하여, 유방암의 적절한 치료 전략 수립에 유용한 진단 기술을 제공한다.

본 명세서에서 사용된 바로서, "유방암 예후"는 유방암의 진행과 20 관련된 모든 증상 및/또는 상태를 의미하는 것으로, 예컨대, 항 유방암 치료에 따른 유방암 증상 변화 (개선, 완화, 치료(제거), 또는 악화 등), 유방암의 재발 여부 등을 의미할 수 있으며, 예후가 좋다고 함은 유방암 증상이 개선, 완화, 또는 치료(제거)되거나, 및/또는 유방암의 재발 가능성이 낮은 것을 의미하고, 예후가 나쁘다 함은 유방암 증상이 25 악화되거나, 유방암의 재발 가능성이 높은 것을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 바로서, "유방암 재발"은 유방암이 치유된 후에 다시 발생하는 것을 총칭하는 의미로, 유방암이 치유 (예컨대, 외과적 수술, 약물 투여, 방사선 조사 등의 항암 치료에 의한 유방암 조직의 제거, 소멸, 및/또는 소멸과 동등한 정도의 감소)된 후 동일형의 종양이 동일 30 부위 (원발성 재발) 또는 다른 부위 (전이성 재발)에 다시 발생하는 경우를 의미한다. 유방암 재발은 ① 완전히 제거되지 않은 종양세포가 증식하는

직접 재발 (예컨대, 국소성 재발 및 전이성 재발); 및 ② 종양세포가 완전히 제거된 후에 새롭게 같은 종류의 종양이 발생하는 간접재발 등이 있다. 유방암의 재발은 일반적으로 악성 종양에서 많이 일어나지만 양성 종양에서 나타나는 경우 (예컨대, 국소성 재발)를 배제하지 않는다. 본 명세서에서, "유방암 재발 예측 또는 진단"은 유방암이 치유된 환자에서의 유방암 재발 여부 또는 재발 가능성을 미리 확인 또는 판단 또는 결정하는 것을 의미할 수 있다. 통상적으로, 유방암의 재발 가능성은 유방암 치료 후 대략 5년, 6년, 또는 7년을 기준으로 판단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

10 본 명세서에서 사용된 바로서, "HER2 표적 치료"는 HER2 단백질을 특이적으로 불활성화, 발현 억제 또는 수준(농도) 감소, 및/또는 제거하는 모든 치료적 수단들 중에서 선택될 수 있으며, 예를 들어, HER2 단백질 및/또는 유전자를 표적으로 하는 (예컨대, HER2 단백질 및/또는 유전자를 특이적으로 억제하는) 약물 (예컨대, 소분자 화합물, HER2 표적 단백질 15 (예컨대, 항체 등))을 투여하는 것을 포함할 수 있다.

 본 명세서에서 사용된 바로서, "HER2 표적 치료에 적합한 환자"는 앞서 설명한 HER2 표적 치료가 효과적일 것으로 예측되는 환자를 의미할 수 있으며, 상기 HER2 표적 치료가 효과적이라 함은 HER2 표적 치료 적용시 소망하는 유방암에 대한 항암 효과 (예컨대, 암조직 감소, 소멸, 및/또는 20 재발을 감소 등)를 얻을 수 있음을 의미할 수 있다.

 일 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암 예후 또는 재발 예측 (또는 진단) 방법, 또는 유방암 예후 또는 재발 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

25 보다 구체적으로, 상기 방법은,
 (i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및
 (ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 30 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD))과 비교하는 단계

를 포함할 수 있다.

상기 단계 (i)의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계는, 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 표지물질이 부착된 HER2 결합물질을 투여(첨가)하고, 표지물질로부터 발생하는 신호를 근접장 영역에서 측정하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

상기 단계 (ii)의 비교하는 단계는, 상기 단계 (i)에서 측정된 신호 값을 기준 값(예컨대, 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서 표지된 HER2 결합 물질과의 반응에 의하여 발생하는 신호의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD))과 비교하는 단계에 의하여 수행될 수 있다.

상기 방법은, 상기 단계 (ii) 이후에, (iii-a) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준 (신호 값)이 기준 발현 수준 (기준 값) 이상인 경우, 기준 발현 수준 (기준 값)보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 또는 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계, 및/또는 (iii-b) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준 (신호 값)이 기준 발현 수준 (기준 값)보다 낮은 경우, 기준 발현 수준 (기준 값) 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 또는 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

다른 예에서, 상기 유방암 예후 또는 재발 예측 방법은, 상기 단계 (iii-a) 이후에, 유방암 예후 또는 재발 여부를 모니터링하는 단계, 또는 유방암 재발을 예방, 및/또는 치료하는 단계 (예컨대, 유방암 재발의 예방 또는 치료를 위한, 약물 투여, 방사선 조사, 및/또는 외과적 수술 등)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (iii-b) 이후에, 유방암 예후 또는 재발을 모니터링하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 유방암 예후 또는 재발을 모니터링하는 단계는 앞서 설명한 유방암 예후 또는 재발 예측 방법을 1회 이상 수행하는 것일 수 있다.

다른 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별 방법, 또는 환자 선별에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

보다 구체적으로, 상기 방법은,

(i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계

를 포함할 수 있다.

상기 방법은, 상기 단계 (ii) 이후에, (iii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 생물학적 시료가 유래된 유방암 환자를 HER2 표적 치료에 적합한 환자로 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

다른 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (iii) 이후에, (iv) 상기 단계 (iii)에서 선택된 유방암 환자에게 HER2 표적 치료를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

다른 예는,

(i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계,

(ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

(iii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 생물학적 시료가 유래된 유방암 환자를 HER2 표적 치료에 적합한 환자로 선택하는 단계,

(iv) 상기 단계 (iii)에서 선택된 유방암 환자에게 HER2 표적 치료를 수행하는 단계

를 포함하는, 유방암 치료 방법을 제공한다.

다른 예는,

표면에 HER2 단백질이 고정화된 기관을 포함하는 HER2 단백질 발현 수준 측정부를 포함하는, 유방암의 예후 또는 재발 여부) 예측 또는 진단용 키트, 또는 HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별용 키트를 제공한다. 상기

5 키트는, HER2 단백질에 특이적으로 결합하는, 표지된 HER2 결합 물질 (예컨대, 형광 표지된 항-HER2 항체 등), 및/또는 HER2 단백질과 결합 물질 간의 결합 (반응)에 의하여 발생한 신호 (예컨대, 형광 신호 등)을 검출할 수 있는 신호검출 수단을 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트는 본 명세서에 제안된 방법에 사용하기 위한 것일 수 있다.

상기 단계 (ii), (iii-a), 및 (iii-b) 에서, 기준 발현 수준(기준 값)은 2 이상의 기준 유방암 시료에서의 HER2의 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD)를 의미하는 것일 수 있다. 상기 기준 유방암 시료는 유방암 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으며, 시험 대상 시료를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 일 예에서, 상기 기준 유방암 시료는 유방암 치료 (예컨대, 외과적 수술 치료)를 받은 2인 이상의 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있고, 상기 치료 후 약 5년, 약 6년, 또는 약 7년이 경과하여 유방암 예후 또는 재발 여부의 확인이 가능한 시료일 수 있다. 상기 기준 발현 수준은 데이터베이스화되어 본 명세서에서 제공되는 방법에 적용될 수 있다.

일 예에서, 상기 HER2 단백질의 발현 수준은 통상적으로 사용되는 단백질 발현 수준 측정 방법(예컨대, ELISA, 웨스턴블라팅, Immunohistochemistry (IHC) 등)에 의하여 측정 및/또는 정량화될 수 있다. 예컨대, 상기 HER2 단백질의 발현 수준은 단분자 풀다운 분석법 (single-molecule pull down assay) 으로 측정 및/또는 정량화될 수 있다. 상기 단분자 풀다운 분석법 (single-molecule pull down assay)은 목적 단백질 (HER2)이 직접 또는 간접 (예컨대, 항체 등을 통하여) 고정된 기판에 목적 단백질을 포함하는 시료를 적용하는 단계; 표지물질(예컨대, 형광 물질)이 부착된 HER2 결합 물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및 발생한 신호 (예컨대, 형광 신호)를 근접장 영역에서 측정하는 검출(측정)하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 검출(측정된) 신호 (예컨대, 형광 신호)를 이용하여 목적 단백질 발현 수준을 측정 및/또는 정량화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 근접장은 발생하는 신호 (형광신호)에 따라서 결정될 수 있다. 상기 HER2 결합 물질은 (a) HER2 단백질(bait protein)에 특이적으로 결합하는 표지(예컨대, 형광 물질 부착)되거나 표지되지 않은

포획 단백질 (prey protein) 및/또는 (b) HER2 단백질 또는 상기 포획 단백질(예컨대, 표지되지 않은 포획 단백질)에 특이적으로 결합하는 표지(예컨대, 형광 물질 부착)된 물질 (예컨대, 항체)를 포함할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 HER2의 기준 발현 수준은 본 명세서에서 5 제공되는 방법으로 측정시, 45(um)*90(um) 영역에서 측정되는 형광 spot의 개수로 표현되는 단백질 양을 시료 내 단백질 총 함량이 0.5mg/ml이 되도록 표준화한 수치가 400 내지 450 또는 410 내지 450, 420 내지 450, 430 내지 450, 400 내지 440 또는 410 내지 440, 420 내지 440, 또는 430 내지 440 범위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

10 본 명세서에서 제공되는 방법에서 수행되는 모든 단계는 생체 (예컨대 인체)로부터 분리된 세포에서(*in vitro*) 수행되는 것일 수 있다.

상기 HER2 단백질 발현 수준 측정과 마찬가지로 HER3 단백질 발현 수준 측정도 실시할 수 있다.

상기와 같은 HER2 단백질 발현 수준 측정, 및/또는 HER3 단백질 15 발현수준 측정에 더하여, HER2 및 이와 상호작용하는 단백질 간 단백질-단백질 상호작용 측정을 추가로 수행함으로써, 보다 정확한 유방암 예후 (예컨대, 유방암 재발) 예측이 가능하다.

다른 예는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC- 20 gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계 및 HER2 및/또는 HER3의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암 예후 예측 (또는 진단) 방법, 또는 유방암 예후 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

보다 구체적으로, 상기 방법은,

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 25 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계, 및

(II) 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계

를 포함할 수 있다. 상기 단계 (I)과 (II)은 순서에 무관하게 수행할 수 있다.

30 일 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (I) 및 (II)을 (I)에서 (II)의 순서로 순차적으로 포함하는 것일 수 있다.

상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 측정 시스템 내의 노이즈값 또는 배경신호값)보다 큰 경우, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋지 않음 (예컨대, 유방암 재발 확률이 높음)을 확인하였다.

따라서, 상기 방법은, 상기 단계 (I)의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계 이후에, (I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며 (이 경우, 비교하는 단계 이전에, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있음), 임의로, 이에 더하여, (I-b) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 단계 (II)의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계는, 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우에 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

상기 단계 (I) 및/또는 (I-a)에서의 기준 단백질-단백질 상호작용 수준은 측정 시스템 내의 노이즈값 또는 배경신호값을 의미하는 것으로, 생물학적 시료 또는 생물학적 시료와 PLC-gamma 단백질을 첨가하지 않은 상태에서 측정된 단백질-단백질 상호작용 수준일 수 있다.

상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값) 이상인 경우, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 재발 확률이 높음을 확인하였다.

따라서, 상기 방법은, 상기 단계 (II)의 HER2 및/또는 HER3의 발현

수준을 측정하는 단계 이후에, (II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며(이 경우, 상기 비교하는 단계 이전에, 기준 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있음), 임의로, 이에 더하여, (II-b)

5 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 기준 발현 수준보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계 및/또는 (II-c) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준보다

10 낮은 경우, 기준 발현 수준 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 단계 (II)의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계는, 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의

15 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 생물학적 시료에 대하여 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

다른 예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (I) 및 (II)을 (II)에서 (I)의 순서로 순차적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 단계 (II)의 HER2 및/또는

20 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계 이후에, (II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 임의로, 이에 더하여, (II-b) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 기준 발현 수준보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가

25 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계 및/또는 (II-c) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준보다 낮은 경우, 기준 발현 수준 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로

30 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 단계 (II) 이후에 수행되는 단계 (I)의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계는, 상기

단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우에 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

이 때, 상기 단계 (I)의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계 이후에, (I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 임의로, 이에 더하여, (I-b) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰 경우, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 단계 (I)의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계는 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준보다 큰 생물학적 시료에 대하여 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

상기 단계 (II), (II-a), (II-b), 및 (II-c)에서, 기준 발현 수준은 2 이상의 기준 유방암 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD)를 의미하는 것일 수 있다. 상기 기준 유방암 시료는 유방암 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으며, 시험 대상 시료를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 일 예에서, 상기 기준 유방암 시료는 유방암 치료 (예컨대, 외과적 수술 치료)를 받은 2인 이상의 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있고, 상기 치료 후 약 5년 또는 6년이 경과하여 유방암 예후 (예컨대 재발 여부)의 확인이 가능한 시료일 수 있다. 이에 더하여, 상기 기준 유방암 시료는 상기 단계 (I)에서 설명한 방법으로 측정된 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 2종 이상의 기준 유방암 시료를 의미할 수 있다. 상기 기준 발현 수준은 데이터베이스화되어 본 명세서에서 제공되는 방법에 적용될 수 있다.

다른 구체예에서, 유방암 예후가 유방암 재발 여부인 경우, 상기

기준 발현 수준은, 앞서 설명한 2 이상의 기준 유방암 시료에 대하여,

- 상기 단계 (I)과 단계 (II)를 모두 수행한 경우의 "민감도 (Sensitivity (%)) = [(바이오마커 발현 수준이 기준 발현 수준 초과인 샘플 중 재발 샘플 개수)/(재발 샘플 총 개수)]*100) + 특이도 (Specificity (%)) = [(바이오마커 발현 수준이 기준 발현 수준 미만인 샘플 중 비재발 샘플 개수)/(비재발 샘플 총 개수)]*100) - 1"로 얻어진 값 (Youden's index)이 0.5 이상, 0.51 이상, 0.52 이상, 0.53 이상, 0.54 이상, 0.55 이상, 또는 0.56 이상이거나, 및/또는

- 상기 단계 (I)과 단계 (II)를 순차적으로 모두 수행한 경우의 "양성가능성비 ([재발 양성(+) 판정 받은 샘플 중 실제 재발 샘플 비율/재발 음성(-) 판정 받은 샘플 중 실제 재발 샘플 비율]) - 음성가능성비 ([재발 양성(+) 판정 받은 샘플 중 실제 비재발 샘플 비율/재발 음성(-) 판정 받은 샘플 중 실제 비재발 샘플 비율])"로 얻어진 값이 2.5 이상, 2.75 이상, 3 이상, 3.25 이상, 3.5 이상, 3.75 이상, 또는 4 이상

이 되도록 하는 수치 (발현 수준)를 갖는 것일 수 있다. 상기 수치는 데이터베이스화되어 본 명세서에서 제공되는 방법에 적용될 수 있다.

일 구체예에서, 상기 기준 발현 수준은 통상적인 단백질 수준 측정 수단으로 측정시의 단백질 양으로서, HER2의 경우 면역형광법으로 측정시 45(um)*90(um) 영역에서 측정되는 형광 spot의 개수로 표현되는 단백질 양을 시료 내 단백질 총 함량이 0.5mg/ml이 되도록 표준화한 수치가 400 내지 450 또는 410 내지 450, 420 내지 450, 430 내지 450, 400 내지 440 또는 410 내지 440, 420 내지 440, 또는 430 내지 440 범위일 수 있다.

다른 예에서, 상기 기준 발현 수준은 2 이상의 기준 유방암 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD)를 의미하는 것일 수 있다. 상기 기준 유방암 시료는 유방암 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으며, 시험 대상 시료를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 일 예에서, 상기 기준 유방암 시료는 유방암 치료 (예컨대, 외과적 수술 치료)를 받은 2인 이상의 환자로부터 분리된 유방암 세포 또는 유방암 조직을 포함하는 생물학적 시료일 수 있고, 상기 치료 후 약 5년,

약 6년, 또는 약 7년이 경과하여 유방암 예후 또는 재발 여부의 확인이 가능한 시료일 수 있다. 상기 기준 발현 수준은 데이터베이스화되어 본 명세서에서 제공되는 방법에 적용될 수 있다.

5 본 명세서에 사용된 바로서, 단백질의 발현 수준은 시료 내의 단백질 양을 의미할 수 있으며, 이는 이 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자가 명확하게 알 수 있는 통상적인 방법 (예컨대, ELISA, 웨스턴블라팅, Immunohistochemistry (IHC) 등)으로 측정 및/또는 정량화될 수 있다.

 일 예에서, 상기 방법은,

10 (I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

 (I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계,

 (II) 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계, 및

20 (II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계

 를 포함할 수 있다.

 다른 예에서, 상기 방법은,

25 (I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

 (I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계,

30 (II) 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준

단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계, 및

5 (II-b) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 기준 발현 수준보다 낮은 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계, 및/또는 (II-c) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현
10 수준보다 낮은 경우, 기준 발현 수준 이상인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계

를 포함할 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 방법은,

15 (II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는
20 HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

(I) 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계, 및

25 (I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계

를 포함할 수 있다.

30 다른 예에서, 상기 방법은,

(II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 및/또는

HER3의 발현 수준을 측정하는 단계,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준 (예컨대, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는

5 HER3의 발현 수준의 평균값)과 비교하는 단계,

(I) 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 HER2 및/또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma

10 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 (예컨대, 생물학적 시료를 첨가하지 않은 경우의 단백질-단백질 상호작용 수준)을 비교하는 단계, 및

(I-b) 상기 단계 (I)에서 측정된 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준보다 큰

15 경우, 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로 확인하는 단계, 및/또는 (I-c) 상기 단계 (I)에서 측정된 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이하인 경우, 기준 단백질-

20 단백질 상호작용 수준보다 큰 경우와 비교하여, 상기 생물학적 시료가 분리된 환자의 유방암 예후가 좋은 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 낮은 것으로 확인하는 단계

를 포함할 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 방법은, 상기 단계 (II-b) 또는 (I-b) 이후에,

25 유방암 예후를 모니터링하거나, 유방암 재발을 예방, 및/또는 치료하는 단계 (예컨대, 유방암 재발의 예방 또는 치료를 위한, 약물 투여, 방사선 조사, 및/또는 외과적 수술 등)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 방법은, 상기 단계 II-c) 또는 (I-c) 이후에, 유방암 예후를 모니터링하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 유방암 예후를

30 모니터링하는 단계는 앞서 설명한 유방암 예후 예측 방법을 1회 이상 수행하는 것일 수 있다.

다른 예는 상기한 유방암 예후 여부 예측 (또는 진단) 방법, 또는 유방암 예후 예측 (또는 진단)에 정보를 제공하는 방법 이후 (예컨대, 상기 단계 (II-b) 또는 (I-b) 이후)에 또는 상기 단계 (II-b) 또는 (I-b)에서 유방암 예후가 나쁜 것, 예컨대, 유방암의 재발 가능성이 높은 것으로

5 확인된 환자에게 유방암 재발의 예방 또는 치료를 위한, 약물 투여, 방사선 조사, 및/또는 외과적 수술을 수행하는 단계를 포함하는, 유방암 또는 유방암 재발의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 방법들에 있어서, 생물학적 시료는 유방암 환자로부터 분리된 암조직, 암세포, 또는 이들의 배양물일 수 있다. 상기 유방암 환자는 유방암을

10 갖거나 유방암 진단 받은 환자, 유방암 치료 (예컨대, 외과적 수술, 약물 투여, 방사선 조사 등의 항암 치료)를 받은 환자, 및/또는 유방암이 치유 (예컨대, 외과적 수술, 약물 투여, 방사선 조사 등의 항암 치료에 의한 유방암 조직의 제거, 소멸, 및/또는 소멸과 동등한 정도의 감소)된 환자일 수 있다. 상기 환자는 인간 등의 포유 동물일 수 있으며, 유방암의 예후

15 또는 재발 여부를 예측 또는 진단하고자 하는 대상일 수 있다. 상기 유방암은 (1) HER2 음성(-)인 유방암, (2) 호르몬 수용체 (HR; 예컨대, 에스트로겐 수용체 (ER) 및/또는 프로게스테론 수용체 (PR)) 양성(+)인 유방암, 또는 (3) 상기 (1)과 (2)의 특성을 모두 갖는 유방암일 수 있다. 상기 유방암 환자는 HER2(-)로 결정(확인)되거나, 및/또는 ER/PR(+) 및

20 HER2(-)로 결정(확인)된 유방암 환자로 확인 (또는 진단, 또는 판단)된 환자일 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법은 HER2 음성(-), 및/또는 호르몬 수용체 (HR) (예컨대, 에스트로겐 수용체 (ER) 및/또는 프로게스테론 수용체 (PR)) 양성(+)으로 확인(진단, 판정)된 유방암 환자를 대상으로 수행하는 것일 수 있다.

25 상기 양성(+) 및 음성(-)의 판단은 통상적인 단백질 수준 측정 방법에 의하여 판단된 것일 수 있으며, 예컨대, ER 특이적 항체, PR 특이적 항체, 및/또는 HER2 특이적 항체를 사용하는 면역조직화학염색법 (IHC)에 의하여 결정된 점수 (IHC score)에 의하여 판단될 수 있다 (예컨대, IHC score (0-3) 판단 시, ER/PR(+)는 IHC score(intensity) ≥ 2 (2 또는 3)인

30 경우, HER2(-)는 IHC score(intensity) ≤ 1 (0, 또는 1+)인 경우일 수 있음).

상기 단계 (i)의 수행에 더하여, 시료에서 (a) 에스트로겐 수용체

(ER) 및/또는 (b) PD-1 및/또는 CD3e의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이 경우, 시료에서의 (a) ER 발현 수준이 높은 경우 및/또는 (b) PD-1 및/또는 CD3e의 발현 수준이 낮은 경우, 그렇지 않은 경우와 비교하여, 유방암 예후가 나쁘거나 유방암 재발 가능성이 높은 것으로 결정할 수 있다. 상기 ER 발현 수준 및 PD-1 및/또는 CD3e의 발현 수준의 평가(높거나 낮음)는 기준 발현 수준과 비교하여 평가하는 것일 수 있으며, 상기 기준 발현 수준은, 예컨대, IHC로 분석된 바로서, HER2(-) 세포 (e.g., SKBR3)에서의 ER 발현 수준, 또는 PD-1 및/또는 CD3e의 발현 수준일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 ER/PR 수준 판단에 있어서, 통상적인 항-ER 항체 (예컨대, clone 6F11, 1:200 dilution, Novocastra, Bond-Max system)와 항-PgR 항체 (예컨대, clone 16, 1:800 dilution, Novocastra, Bond-Max system)를 사용하여 면역 염색하고, 염색된 핵 (not cytoplasm)을 스코어링하여 (일반적인 IHC scoring을 따름; intensity score (0-3) and proportion score (0-5)), 그 수치가 암세포의 1%와 동등 이상인 나타난 경우 양성으로, 암세포의 1%보다 낮은 경우 음성으로 판단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 HER2의 수준 판단에 있어서, 항-HER2 항체 (예컨대, 4B5, Ventana, BenchMark XT)를 사용하여 면역 염색하고, 염색된 핵 (not cytoplasm)을 스코어링하여 (일반적인 IHC scoring을 따름), 다음의 기준으로 평가하였다:

Only the membrane staining intensity and pattern is evaluated using the new recommendations of the American Society of Clinical Oncology(ASCO)/College of American Pathologists (CAP) (2013 update, from 2013.11.01): Circumferential membrane staining that is complete, intense, and within > 10% of tumor cells results in a score of "3+". Circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak/moderate and within > 10% of tumor cells or Complete and circumferential membrane staining that is intense, and within >= 10% of tumor cells is scored "2+". Incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within >10 % of tumor cells is "1+". No staining is observed or membrane staining that is incomplete and is

faint/barely perceptible and within $\geq 10\%$ of tumor cells is "0". A positive test is defined as staining of 3+ score. The score of 2+ is interpreted as equivocal. And a negative test is defined as staining of 0/1+ scores.

5 본 명세서에서 사용된 바로서, 용어 "단백질-단백질 상호작용 (protein-protein interaction: PPI)"은 제1 단백질과 제2 단백질 간의 물리적 및/또는 화학적 결합 또는 복합체 형성을 의미할 수 있으며, 예컨대, 결합 빈도, 결합 세기(강도), 및 결합 시간 등의 인자들 중에서 하나 이상으로 측정될 수 있다. 또한, 상기 제1 단백질 (HER2)과 제2
10 단백질(PLC-gamma 또는 항 HER-2 항체) 간의 상호작용 (결합)은 이들 간의 직접적인 상호작용 (결합)뿐 아니라 중간에 다른 단백질 (신호전달경로 중에서 제1 단백질 및 제2 단백질 사이에 위치하는 단백질)을 매개로 한 상호작용 (결합)도 포함할 수 있다. 본 명세서에서의 단백질-단백질 상호작용은 단분자 (single molecule) 반응 (1 분자의 제1 단백질과 1
15 분자의 제2 단백질 간의 반응)일 수 있다.

본 명세서에서 사용된 HER2, 에스트로겐 수용체 (ER), PD-1, CD3e, EGFR, HER3, 및/또는 PLC-gamma는 각각 독립적으로 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유류로부터 유래된 것일 수 있다.

예컨대, 상기 HER2는 GenBank Accession No. X03363.1 등에 제공되는
20 뉴클레오타이드 서열 (mRNA)에 의하여 암호화된 폴리펩타이드일 수 있다. EGFR은 GenBank Accession Nos. JQ739160, JQ739161, JQ739162, JQ739163, JQ739164, JQ739165, JQ739166, JQ739167, NM_005228.3, NM_201284.1, NM_201282.1, 또는 NM_201283.1 등에 제공된 뉴클레오타이드 서열(mRNA)에 의하여 암호화된 폴리펩타이드일 수 있다. HER3는 GenBank Accession No.
25 NM_001982 등에 제공되는 뉴클레오타이드 서열 (mRNA)에 의하여 암호화된 폴리펩타이드일 수 있다. PLC-gamma (포스포리파아제 C (PLC)-gamma; 예컨대, PLC-gamma 1)은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유류로부터 유래된 것일 수 있으며, 예컨대, GenBank Accession No. NP_002651.2, NP_877963.1, NP_037319.1 등에 제공된
30 아미노산 서열을 갖는 단백질, 또는 이의 SH2 도메인(Src homology 2 domain: N-terminal SH2 domain 및 C-terminal SH domain 중 하나 이상을

포함; 예컨대, NP_037319.1 중의 545번째부터 765번째까지의 아미노산 서열 부위 또는 NP_002651.2 중의 540번째 또는 545번째부터 765번째까지의 아미노산 서열 부위 등)일 수 있다.

본 명세서에서 HER2 단백질, 에스트로겐 수용체 (ER), PD-1, 및/또는
 5 CD3e (이하, 제1 단백질로 칭함)의 발현 수준 측정은 단백질-단백질 상호작용에 의하여 수행될 수 있으며, 예컨대, 제1 단백질과 이에 결합하는 제2 단백질 간의 물리적 및/또는 화학적 결합(상호작용) 빈도, 결합 세기(강도), 및 결합 시간 등의 인자들 중에서 하나 이상으로 측정될 수 있다. 또한, 상기 제1 단백질과 제2 단백질 간의 결합은 이들 간의
 10 직접적인 결합뿐 아니라 중간에 다른 단백질 (제3 단백질; 제1 단백질에 결합하는 단백질, 이 경우 제2 단백질은 제3 단백질에 결합하는 단백질일 수 있음)을 매개로 한 결합도 포함할 수 있다. 본 명세서에서의 단백질-단백질 상호작용은 단분자 (single molecule) 반응 (1 분자의 제1 단백질과 1 분자의 제2 단백질 간의 반응)일 수 있다.

15 일 예에서, 제1 단백질 (HER2 단백질)의 발현 수준은 시료 내의 제1 단백질 (HER2 단백질) 양을 정량화한 것을 의미하고, 이는 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기관에 시료를 처리하여 상기 제1 단백질을 기관에 고정화 시키고, 여기에 표지된 검출 항체 (detecting antibody; 제2 단백질)를 첨가하고 이들 간의 단백질-단백질
 20 상호작용을 측정하여 정량화할 수 있다. 상기 단백질-단백질 상호작용은 제2 단백질에 부착된 표지물질에서 발생하는 신호를 측정함으로써 정량화할 수 있다.

본 명세서에서 제공되는 방법에서 수행되는 제1 단백질 (HER2)과 제2 단백질 (예컨대, HER2 결합 항체) 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는
 25 단계는 분리된 세포 또는 조직에 대하여 생체 외 또는 세포 외 (*in vitro*)에서 수행되는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 제공되는 방법에서 수행되는 제1 단백질 (HER2)과 제2 단백질 (PLC-gamma) 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계는 분리된 세포 또는 조직에 대하여 생체 외 또는 세포 외 (*in vitro*)에서 수행되는 것일 수 있다.

30 이하, 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계의 설명에서, 제1 단백질은 HER2를 의미하고 제2 단백질은 HER2 결합 항체 또는 PLC-gamma를

의미한다.

상기 제1 단백질과 제2 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계는 다음의 단계를 포함할 수 있다:

5 (1) 제1 단백질을 포함하는 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료를, 표면에 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질 (예컨대, 항-HER2 항체)을 포함하는 기관에 가하여 제1 단백질이 고정된 기관을 준비하는 단계;

(2) 상기 준비된 제1 단백질이 고정된 기관에 표지된 (표지 물질이 결합된) 제2 단백질을 첨가하여 반응시키는 단계; 및

10 (3) 단계 (2)에서 얻어진 반응물로부터 신호를 측정하는 단계 (단백질-단백질 상호작용 측정).

임의로, 상기 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계는, 앞서 설명한 단계 (1) 내지 (3)에 더하여,

15 (4) 상기 단계 (3)에서 측정된 신호를 이용하여 상기 단계 (1)에서 사용된 생물학적 시료의 단위량 및/또는 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질 단위량에 대한 신호값을 구하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

상기 생물학적 시료의 단위량에 대한 신호값은 단계 (3)에서 측정된 신호값을 단계 (1)에서 사용된 생물학적 시료의 양으로 나누어 얻어지는 것일 수 있고, 상기 제1 단백질 단위량에 대한 신호값은 단계 (3)에서 20 측정된 신호값을 단계 (1)에서 사용된 생물학적 시료 내의 제1 단백질의 양으로 나누거나, 단계 (1)에서 사용된 생물학적 시료의 양으로 나눈 후, 상기 시료 내의 제1 단백질 양으로 나누어 얻어지는 것일 수 있다.

본 명세서에서, 단백질-단백질 상호작용 수준은 상기 단계 (3)에서 측정된 신호값 또는 상기 신호값을 사용된 생물학적 시료의 양 및/또는 25 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질 (HER2)의 양으로 나눈 값을 의미할 수 있다.

이하, 상기 단계를 보다 상세히 설명한다:

단계 (1): 제1 단백질이 고정화된 기관 준비 단계

30 상기 단계 (1)은 제1 단백질을 포함하는 생물학적 시료를 표면에 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 기관에 가하여 제1 단백질이 고정된 기관을 준비하는 단계이다.

상기 제1 단백질은 HER2일 수 있다.

상기 생물학적 시료는 유방암 환자로부터 분리된 세포 (예컨대, 암세포), 조직 (예컨대, 암조직), 상기 세포 또는 조직의 용해물, 파쇄물, 또는 추출물, 체액 (예컨대, 혈액 (전혈, 혈장, 또는 혈청), 타액 등)일 수 있다. 생물학적 시료가 조직 (예컨대, 암조직)인 경우, 분쇄를 위하여 최소 5 125 mm³ 이상의 크기이면 족하고, 1회 측정에 필요한 조직 시료의 양은 최소 125 mm³ 이상의 약 1/50 내지 약 1/75 범위로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 생물학적 시료가 세포 (암세포)인 경우, 1회 측정에 필요한 세포 시료의 양은 약 10 cells 내지 10¹⁰ cells, 약 10 cells 내지 10⁷ 10 cells, 약 10 cells 내지 10⁵ cells, 약 10³ cells 내지 10¹⁰ cells, 약 10³ cells 내지 10⁷ cells, 약 10³ cells 내지 10⁵ cells, 예컨대 약 10⁴±50 cells 정도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이 발명이 속하는 기술분야의 통상적인 지식을 가진 자에 의하여 적절하게 정해질 수 있는 15 값이다. 상기 유방암 환자는 유방암 진단 및/또는 치료를 받은 인간 등의 포유 동물일 수 있으며, 유방암의 예후 (예컨대, 재발 여부)를 예측 또는 진단하고자 하는 대상일 수 있다.

상기 기판은 표면에 제1 단백질을 고정시킬 수 있는 모든 재질 및/또는 모든 구조를 갖는 것일 수 있다 (결정질 또는 비결정질 모두 사용 가능함). 일 예에서, 상기 기판은, 표지 신호의 검출 용이성을 고려하여, 20 빛의 굴절률이 생체 물질의 많은 부분을 차지하는 물의 굴절률 (약 1.3) 이상인 재질일 수 있다. 일 예에서, 상기 기판은 두께가 약 0.1 내지 약 1 mm, 약 0.1 내지 약 0.5 mm, 0.1 내지 약 0.25 mm, 또는 약 0.13 내지 약 0.21 mm 정도일 수 있으며, 굴절률이 약 1.3 내지 약 2, 약 1.3 내지 약 1.8, 약 1.3 내지 약 1.6, 또는 약 1.5 내지 약 1.54 정도인 것일 수 있다. 25 상기 기판은 상기 굴절률 범위를 만족시키는 모든 재질일 수 있으며, 예컨대 유리 (굴절률: 약 1.52), 석영 등으로 이루어진 균에서 선택된 재질로부터 얻어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 기판은 생물 시료 관찰에 통상적으로 사용되는 모든 형태를 갖는 것일 수 있으며, 예컨대, 웰 타입, 슬라이드 타입, 채널 타입, 어레이 형태, 30 미세유체칩, 미세관 (캐필러리) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 형광현미경 관찰시, 상기 시료가 적용된 기판 위에 커버글라스를

장착하여 관찰할 수 있으며, 커버글라스의 재질은 앞서 기판에서 설명한 바와 같고, 두께는 기판에서 설명한 범위 또는 이보다 얇을 수 있다 (예컨대, 굴절률 1.52, 두께 0.17mm일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아님).

상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질은 제1 단백질(HER2)과
 5 특이적으로 결합할 수 있는 모든 물질로부터 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원결합단편 (예컨대, 항체의 scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 등), 압타머 (단백질 또는 핵산분자), 소분자 화합물 등으로 이루어진 군에서
 10 선택된 1종 이상일 수 있다. 이 때, 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질은 제1 단백질과 제2 단백질과의 상호작용을 방해하지 않는 부위, 즉, 제1 단백질과 제2 단백질이 상호작용(결합)하는 부위가 아닌 부위에서 제1 단백질과 결합하는 것일 수 있다.

일 예에서, 상기 기판은 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 생물학적 물질 (예컨대, 항체 등)을 표면에 포함(고정)하기 위하여 적절히
 15 표면개질되거나, 표면에 직접 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 고정된 것일 수 있다. 상기 기판이 표면개질된 경우, 상기 기판은 일면에 상기 제1 단백질에 특이적으로 결합하는 생물학적 물질 (예컨대, 항체 등)을 고정화시킬 수 있는 작용기를 갖는 모든 화합물로 처리(예컨대, 도포)될 수 있으며, 예컨대, 알데히드기, 카르복실기 및 아민기로 이루어진
 20 군에서 선택된 작용기를 포함하는 화합물로 처리될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 알데히드기, 카르복실기 및 아민기로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 포함하는 화합물은 바이오틴(biotin), 소혈청알부민 (Bovine serum albumin; BSA), 바이오틴이 결합된 소혈청알부민, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG), 바이오틴이 결합된 PEG
 25 (폴리에틸렌글리콜-바이오틴; PEG-biotin), 폴리소베이트 (e.g., Tween20) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 표면 처리된 기판은 뉴트라비딘(neutravidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 추가로 처리(예컨대, 도포)될 수 있다.

30 단계 (2): 제1 단백질과 제2 단백질을 반응시키는 단계

상기 단계 (2)는, 상기 준비된 제1 단백질이 고정된 기판에, 표지된

제2 단백질을 첨가하여 반응시키는 단계이다.

상기 제2 단백질은 HER2 결합 항체일 수 있다.

상기 표지된 제2 단백질은 제2 단백질이 검출 가능한 신호를 발생시키는 표지 물질로 표지되거나 (표지 물질이, 예컨대, 화학적 (예컨대, 공유적 또는 비공유적), 재조합적, 또는 물리적으로, 결합되거나), 표지물질이 결합될 수 있는 tag이 부착된 형태를 의미할 수 있다. 상기 검출 가능한 신호는 통상적인 효소 반응, 형광, 발광, 및/또는 방사선 검출을 통하여 측정될 수 있는 모든 신호 (예컨대, 빛, 방사선 등)들 중에서 선택될 수 있다. 상기 표지 물질은 상기 표지 신호를 발생시킬 수 있는 모든 소분자 화합물, 단백질, 펩타이드, 핵산분자 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 형광 염료 (소분자 화합물; Cyanine, Alex, Dylight, Fluoprobes 등), 형광 단백질 (예컨대, 녹색형광단백질 (GFP, enhanced GFP), 황색형광단백질 (YFP), 청록색형광단백질(CFP), 청색형광단백질(BFP), 적색형광단백질(RFP) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 tag은 His-tag / Ni-NTA 등과 같이 통상적으로 사용되는 모든 종류에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 표지 물질의 사용 농도는, 노이즈를 발생시키지 않고 정확하고 용이한 검출이 가능하도록 하기 위하여, 약 1 μ M 이하의 범위에서 적절하게 정할 수 있으며, 예컨대, 1nM 내지 1000nM, 1nM 내지 500nM, 1nM 내지 100nM, 10nM 내지 1000nM, 10nM 내지 500nM, 또는 10nM 내지 100nM 정도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 표지물질로부터 발생하는 신호는 이를 검출 또는 측정하는데 통상적으로 사용되는 모든 신호 검출 수단 (예컨대, 통상의 형광 현미경, 형광 카메라, 형광세기 측정 (정량) 장치 등)에 의하여 측정될 수 있다.

제1 단백질과 제2 단백질 간의 상호작용을 보다 정확하게 측정하기 위하여, 반응시키는 단계 (단계 (2))와 후속하는 단백질-단백질 상호작용 측정 단계 (단계 (3)) 사이에, 상기 반응이 일어난 기관을 통상적인 방법으로 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

단계 (3): 단백질-단백질 상호작용 측정 단계

상기 단계 (3)은 상기 단계 (2)에서 얻어진 반응물로부터 신호를 측정하는 단계이다. 상기 신호 측정은 단계 (2)에서 사용된 표지

신호(예컨대, 효소 반응, 형광, 발광, 또는 방사선 검출 등의 통상적인 방법을 통하여 측정 가능한 신호)를 검출 (또는 측정 또는 확인)할 수 있는 모든 수단을 사용하여 수행될 수 있다.

일 예에서, 단계 (3)에서의 단백질-단백질 상호작용 측정은 실시간 분석에 의한 것일 수 있다.

일 예에서, 상기 표지 신호가 형광 신호인 경우, 상기 신호 검출은 상기 형광 신호를 발생시키는 표지 물질이 흡수하는 광원을 공급하여 발생하는 형광 신호를, 예컨대, 형광 현미경, 형광 카메라, 및/또는 형광 세기 측정 (정량) 장치 등을 사용하여, 영상화하거나 및/또는 정량할 수 있다.

일 구체예에서, 상기 신호는 형광 신호인 경우, 상기 형광 신호는 형광 카메라를 이용하여 영상화 및/또는 정량할 수 있다.

상기 신호가 형광 신호인 경우, 단계 (3) (단백질-단백질 상호작용 측정 단계)은

- 15 (a) 상기 단계 (2)의 반응물에 광원을 공급하는 단계; 및
- (b) 상기 공급된 광원에 의하여 발생한 형광 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 단계 (a)의 광원을 공급하는 단계는 상기 단계 (2)에서 얻어진 제1 단백질과 제2 단백질의 반응물에 광원을 공급하는 단계로서, 이와 같은 목적을 달성할 수 있다면, 광원의 공급 시기는 특별한 제한이 없다. 예컨대, 상기 광원은 단계 (1) 이전, 동시, 또는 이후부터 단계 (2) 이후까지 지속적으로 공급되거나, 단계 (2) 직전, 동시, 또는 직후에 소정의 시간 동안 공급될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 광원은 형광 신호에 해당하는 파장을 갖는 모든 광원일 수 있으며, 예컨대, 레이저, 할로겐 램프 등일 수 있다.

상기 광원의 파장은 사용된 형광 신호에 따라서 조절될 수 있으며, 예컨대, 약 300nm 내지 약 600nm 또는 약 350nm 내지 약 560nm 범위에서 선택될 수 있다. 보다 구체적으로, 녹색형광단백질은 약 480nm를 흡수하고, 황색형광단백질은 약 540nm를 흡수하고, 청색형광단백질은 약 375nm를 흡수하고, 청록색형광단백질은 약 425nm를 흡수하므로, 형광 신호로 녹색 형광을 사용하는 경우 상기 광원의 파장은 약 460 내지 약 500nm, 형광

신호로 황색 형광을 사용하는 경우 상기 광원의 파장은 약 520 내지 약 560nm, 형광 신호로 청색 형광을 사용하는 경우 상기 광원의 파장은 약 350 내지 약 400nm, 형광 신호로 청록색 형광을 사용하는 경우 상기 광원의 파장은 약 400 내지 약 450nm 범위에서 선택될 수 있다. 앞서 설명한
5 파장은 각각의 형광 물질에 대한 근접광일 수 있다.

일 구체예에서, 단계 (3)의 단백질-단백질 상호작용 측정 단계는 전반사 형광 현미경(Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscope) 또는 공초점 현미경 등을 사용하여 광원을 공급하고, 통상적인 방법으로 형광 신호를 관찰하여 수행될 수 있다. 다른 예에서, 상기
10 전반사 형광 현미경에 신호 영상화를 위한 형광 카메라, 예컨대 EMCCD (Electron-multiplying charge-coupled device) 카메라 또는 CMOS (Complementary metal oxide semiconductor) 카메라를 장착하여 사용함으로써, 광원 공급 및 형광 신호의 영상화 및/또는 정량을 수행할 수 있다.

15 다음에서는 단계 (3)의 단백질-단백질 상호작용 측정 단계를 전반사 현미경 및 형광 카메라를 사용하여 수행하는 경우를 예를 들어 보다 상세히 설명한다:

가) 상기 단계 (1) 또는 단계 (2)의 기판을 전반사 현미경에 장착시킨다. 전반사 현미경에서 광원의 공급 위치는 통상적으로
20 아래쪽이며, 전반사 현미경 종류에 따라서, 형광 신호를 기판의 위 (이 경우, 아래에서 위 방향으로, 광원 공급부, 기판, 렌즈, 또는 기판, 광원 공급부, 렌즈의 순서로 위치할 수 있음) 또는 아래에서 (이 경우, 아래에서 위 방향으로, 렌즈, 광원 공급부, 기판, 또는 광원 공급부, 렌즈, 기판, 또는 렌즈, 기판, 광원 공급부의 순서로 위치할 수 있음) 관찰할 수 있다.

25 나) 광원은 레이저일 수 있으며, 광원의 세기는 약 0.5 mW 내지 약 5 mW, 약 0.5 mW 내지 약 4.5 mW, 약 0.5 mW 내지 약 4 mW, 약 0.5 mW 내지 약 3.5 mW, 약 0.5 mW 내지 약 3 mW, 약 0.5 mW 내지 약 2.5 mW, 약 0.5 mW 내지 약 2 mW, 약 1 mW 내지 약 5 mW, 약 1 mW 내지 약 4.5 mW, 약 1 mW 내지 약 4 mW, 약 1 mW 내지 약 3.5 mW, 약 1 mW 내지 약 3 mW, 약 1 mW
30 내지 약 2.5 mW, 약 1 mW 내지 약 2 mW, 약 1.5 mW 내지 약 5 mW, 약 1.5 mW 내지 약 4.5 mW, 약 1.5 mW 내지 약 4 mW, 약 1.5 mW 내지 약 3.5 mW,

약 1.5 mW 내지 약 3 mW, 약 1.5 mW 내지 약 2.5 mW, 또는 약 1.5 mW 내지 약 2 mW, 예컨대, 약 2 mW일 수 있으며, 광원의 파장은 앞서 설명한 바와 같이 형광 신호 또는 사용된 표지 물질, 및/또는 장비의 구성 (예컨대 감쇄필터를 사용하는 경우 세기가 센 광원을 사용할 수 있음)에 따라서 적절하게 선택할 수 있다.

다) 상기 광원 공급에 의하여 발생한 형광 신호를 형광 카메라로 촬영하여 영상화 및/또는 정량할 수 있다.

상기 형광신호의 촬영 (또는 영상화)은, 표지 물질의 형광 신호 발생 유지 시간 (발광시간, lifetime)을 고려하여, 광원 공급과 동시 또는 상기 신호 발생 유지 시간 이내에 수행할 수 있다.

형광 카메라 (예컨대, EMCCD 카메라)로 형광 신호를 촬영(또는 영상화)함에 있어서, 1 프레임당 노출시간, 레이저 파워, 카메라 gain값, 총 촬영 프레임 등을 적절하게 조절할 수 있다. 예컨대, 1 프레임 당 노출시간이 짧을수록 1 프레임에 누적되는 신호가 줄어들게 되며, 이를 상쇄하기 위하여 레이저 파워를 높이거나, 형광 카메라의 감도를 높일 수 있다. 일 예에서, 1 프레임 당 노출시간을 약 0.001초 내지 약 5초, 약 0.001초 내지 약 3초, 약 0.001초 내지 약 2초, 약 0.001초 내지 약 1초, 약 0.001초 내지 약 0.5초, 약 0.001초 내지 약 0.3초, 약 0.001초 내지 약 0.1초, 약 0.01초 내지 약 5초, 약 0.01초 내지 약 3초, 약 0.01초 내지 약 2초, 약 0.01초 내지 약 1초, 약 0.01초 내지 약 0.5초, 약 0.01초 내지 약 0.3초, 약 0.01초 내지 약 0.1초, 약 0.05초 내지 약 5초, 약 0.05초 내지 약 3초, 약 0.05초 내지 약 2초, 약 0.05초 내지 약 1초, 약 0.05초 내지 약 0.5초, 약 0.05초 내지 약 0.3초, 약 0.05초 내지 약 0.1초, 약 0.07초 내지 약 5초, 약 0.07초 내지 약 3초, 약 0.07초 내지 약 2초, 약 0.07초 내지 약 1초, 약 0.07초 내지 약 0.5초, 약 0.07초 내지 약 0.3초, 약 0.1초 내지 약 5초, 약 0.1초 내지 약 3초, 약 0.1초 내지 약 2초, 약 0.1초 내지 약 1초, 약 0.1초 내지 약 0.5초, 또는 약 0.1초 내지 약 0.3초, 예컨대 약 0.1초로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

예컨대, EMCCD 카메라를 사용하는 경우, 표지 물질 (예컨대, eGFP)로부터 생성된 광자(photon)는 EMCCD의 소자를 통해 전자로 바뀌어

계측된다 (광전효과, photoelectric effect). 이 때, 광자 1개 당 생성되는 전자의 개수를 gain 값을 통해 변경할 수 있다. 설정된 gain값이 높을수록 광자 1개 당 생성되는 전자의 개수가 늘어나서, EMCCD의 감도가 높아지는 동시에 background noise도 함께 증가하므로 signal-to-noise
 5 비율이 중요하다. 일 구체예에서, 우수한 signal-to-noise 비율을 얻기 위하여, gain값을 약 10 내지 약 100, 약 10 내지 약 80, 약 10 내지 약 60, 약 10 내지 약 50, 약 20 내지 약 100, 약 20 내지 약 80, 약 20 내지 약 60, 약 20 내지 약 50, 약 30 내지 약 100, 약 30 내지 약 80, 약 30 내지 약 60, 또는 약 30 내지 약 50, 예컨대, 약 40 정도로 정할 수 있지만,
 10 이에 한정되지 않고 카메라의 감도, 수명, 장비 구축 현황, 노이즈, 시험 조건 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있다.

총 촬영 프레임 개수와 노출 시간을 곱하면 총 촬영 시간이 얻어진다 (노출시간 * 총 촬영 프레임 개수 = 촬영 시간). 형광 물질의 발광 시간 (lifetime) 이후에는 형광 신호가 사라지므로, 상기 촬영 시간이 발광시간
 15 내에 진행되도록 총 촬영 프레임 개수 및/또는 노출 시간을 조절할 수 있다.

단백질-단백질 상호작용 측정 결과의 정확도를 높이기 위하여, 상기 영상화를 하나 이상, 예컨대, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 7개 이상, 또는 10개 이상 (상한값은 기관의 크기 및 영상화 가능한 면적에
 20 따라서 결정됨)의 기관 또는 이를 포함하는 하나 이상의 채널 (각 채널은 2개 이상의 기관을 포함함)에서 수행하고, 신호가 나타난 spot (PPI complex라고도 함)의 개수를 구하거나, 및/또는 상기 얻어진 형광 신호를 정량화할 수 있으며, 이는 단백질-단백질 상호작용을 정량화한 것으로 볼 수 있다.

다른 예에서, 단계 (3)에서 측정된 형광 세기를 통상적인 장치를
 25 이용하여 수치화함으로써 단백질-단백질 상호작용을 정량할 수도 있다.

단계 (4): 생물학적 시료 단위량 및/또는 제1 단백질 단위량에 대한 단백질-단백질 상호작용 수준 측정 (임의 단계)

단계 (4)는 단계 (3)에서 측정된 신호를 이용하여 단계 (1)에서
 30 첨가한 생물학적 시료 단위량 및/또는 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질의 단위량에 대한 단백질-단백질 상호작용 수준을 구하는 단계일 수 있다.

생물학적 시료 및/또는 제1 단백질의 단위량에 대한 단백질-단백질 상호작용 수준이라 함은 생물학적 시료 및/또는 제1 단백질의 단위량 (단위 중량 또는 농도 (예컨대, $\mu\text{g/ml}$))에 대한 단계 (3)에서 측정된 신호값 (신호 또는 신호 세기의 정량화된 값)을 의미하는 것으로,

5 (a) 단계 (3)에서 측정된 신호값을 생물학적 시료 및/또는 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질의 양 (중량, 농도 또는 형광신호)로 나누어 주거나,

(b) 생물학적 시료 및/또는 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질의 양 (중량, 농도 또는 형광신호) 증가에 따른 단계 (3)에서 측정된 신호값의
 10 증가분 (즉, 생물학적 시료 및/또는 상기 생물학적 시료 내의 제1 단백질의 양 (중량, 농도 또는 형광신호)를 x축으로 하고, 단계 (3)에서 측정된 신호값을 y값으로 하여 얻어진 그래프의 기울기)을 구하여 얻어질 수 있다.

일 구체예에서, 단계 (4) 단위량에 대한 단백질-단백질 상호작용 수준 측정 단계는 단계 (3)에서 측정된 신호값을 단계 (1)에서 사용된
 15 생물학적 시료의 양(중량, 농도 또는 형광신호)으로 나누는 단계를 포함할 수 있다.

다른 구체예에서, 단계 (4) 단위량에 대한 단백질-단백질 상호작용 수준 측정 단계는,

- 단계 (3)에서 측정된 신호값을 단계 (1)에서 사용된 생물학적 시료
 20 내의 제1 단백질의 양 (중량, 농도 또는 형광신호)으로 나누거나,

- 단계 (3)에서 측정된 신호값을 단계 (1)에서 (1)에서 사용된 생물학적 시료의 양 (중량, 농도 또는 형광신호)으로 나누어 생물학적 시료의 단위량에 대한 신호값을 구하는 단계 (4-1), 및 상기 단계 (4-1)에서 얻어진 생물학적 시료의 단위량에 대한 신호값을 상기 생물학적
 25 시료 내의 제1 단백질의 양 (중량, 농도 또는 형광신호)으로 나누어 생물학적 시료에 포함된 제1 단백질의 단위량에 대한 신호값을 구하는 단계 (4-2)를 포함할 수 있다.

본 명세서에서 제공되는 방법은 단계 (I), 및/또는 (II)에서 얻어지는 측정값의 정확도를 높이기 위하여, 이를
 30 표준화(normalization)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

상기 표준화 단계는 단계 (i)에서의 HER2 단백질 발현 수준, 단계

(I)에서의 단백질-단백질 상호작용 수준 및/또는 단계 (II)에서의 HER2 및/또는 HER3 단백질 발현 수준의 측정을 시료 간 전체 단백질 양 또는 농도를 일정 수치로 동일하게 맞추어 진행하는 것일 수 있다. 이 경우, 단계 (I)과 단계 (II)에서의 표준화를 위한 전체 단백질 양 또는 농도는 서로 동일하거나 다르게 할 수 있다. 또한, 상기 표준화를 위한 전체 단백질 양 또는 농도는 시료 간 동일하도록 임의로 적절히 정할 수 있다.

본 명세서에서, HER2, HER3, EGFR 등의 단백질의 발현 수준 또는 단백질의 양은 생물학적 시료 내의 단백질 양을 의미할 수 있고, 이는 통상적인 모든 방법으로 측정할 수 있으며, 예컨대, 통상적인 면역블라팅법 (예컨대, quantitative western blotting), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; direct assay, indirect assay, sandwich assay 등) 등을 사용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예에서, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기관에 생물학적 시료를 처리하여 상기 단백질을 기관에 고정화 시키고, 여기에 표지된 검출 항체 (detecting antibody)를 첨가하고 표지에서 발생하는 신호를 측정함으로써 상기 단백질을 정량할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

다른 예에서, 표면에 HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기관을 포함하는 HER2 단백질 발현 수준 측정부를 포함하는, 유방암의 예후 또는 재발 여부) 예측 또는 진단용 키트, 또는 HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별용 키트가 제공된다. 상기 키트는, HER2 단백질에 특이적으로 결합하는, 표지된 HER2 결합 물질 (예컨대, 형광 표지된 항-HER2 항체 등), 및/또는 HER2 단백질과 결합 물질 간의 결합 (반응)에 의하여 발생한 신호 (예컨대, 형광 신호 등)를 검출할 수 있는 신호검출 수단을 추가로 포함할 수 있다.

다른 예에서, 표면에 HER2에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기관을 포함하는 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응부, HER2 및/또는 HER3의 발현 수준 측정부, 또는 이들 모두를 포함하는, 유방암의 예후 (예컨대, 재발 여부) 예측 또는 진단용 키트가 제공된다. 상기 키트는 상기 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응에 의한 신호 (예컨대, 형광신호 등)를 검출할 수 있는 신호검출 수단, 및/또는 신호물질 (예컨대, 형광물질) 표지된 PLC-gamma 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

다른 예는,

표면에 HER2 단백질이 고정화된 기판을 포함하는 HER2 단백질 발현
수준 측정부를 포함하는, 유방암의 예후 또는 재발 여부) 예측 또는 진단용
5 키트, 또는 HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별용 키트를 제공한다. 상기
키트는, HER2 단백질에 특이적으로 결합하는, 표지된 HER2 결합 물질
(예컨대, 형광 표지된 항-HER2 항체 등), 및/또는 HER2 단백질과 결합 물질
간의 결합 (반응)에 의하여 발생한 신호 (예컨대, 형광 신호 등)을 검출할
수 있는 신호검출 수단을 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트에 있어서,
10 상기 HER2 단백질 발현 수준 측정부는 HER2와 표지된 HER2 결합물질 간
반응에 의하여 신호가 발생하는 부분으로, 웰 (예컨대, 멀티웰) 타입,
슬라이드 타입, 채널 타입, 어레이 형태, 미세유체칩, 미세관 (캐필러리)
등의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

다른 예는,

표면에 HER2에 특이적으로 결합하는 물질이 고정화된 기판을
15 포함하는 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응부,
HER2 및/또는 HER3의 발현 수준 측정부, 또는
이들 모두
를 포함하는, 유방암의 예후 (예컨대, 재발 여부) 예측 또는 진단용
키트를 제공한다. 상기 키트는 표지물질 (예컨대, 형광물질) 표지된 PLC-
20 gamma 단백질 및/또는 상기 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응에 의한 신호
(예컨대, 형광신호 등)을 검출할 수 있는 신호검출 수단을 추가로 포함할
수 있다. 상기 HER2와 PLC-gamma 단백질 간 반응부는 웰 (예컨대, 멀티웰)
타입, 슬라이드 타입, 채널 타입, 어레이 형태, 미세유체칩, 미세관
(캐필러리) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 기판과
25 HER2에 특이적으로 결합하는 물질은 앞서 단계 (1)에서 설명한 바와 같으며,
예컨대, 항-HER2 항체일 수 있다. 상기 PLC-gamma 단백질을 표지하는
표지물질은 앞서 단계 (2)에서 설명한 바와 같다.

본 명세서에서 제공되는 키트에 있어서, 상기 신호검출 수단은
사용된 표지 물질에서 발생시키는 신호에 따라서 통상적으로 사용되는 모든
30 신호 검출 수단일 수 있다. 예컨대, 상기 신호 검출 수단은 신호 자극부 및
신호 검출부를 포함할 수 있으며, 여기에 더하여 측정된 신호를 분석

(예컨대, 정량 또는 영상화)하는 신호 분석부를 추가로 포함할 수 있다. 일 예에서, 신호 자극, 신호 검출, 및 신호 분석은 각각 다른 부위에서 수행되거나, 이들 중 적어도 두 가지 이상이 하나의 부위에서 동시에 또는 연속하여 수행될 수 있다. 일 예에서, 상기 표지가 형광물질인 경우, 상기

5 신호 검출 수단은 형광 신호를 발생 및 검출할 수 있는 모든 수단들 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, 형광 신호 자극부 (예컨대, 광원), 및 형광 신호 검출부, 및/또는 형광 신호 분석부를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 신호 검출 수단은 전반사 형광 현미경(Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscope) 또는 공초점 현미경 (광원 및 형광신호

10 검출용)을 포함하거나, 여기에 더하여, 형광 카메라, 예컨대 EMCCD (Electron-multiplying charge-coupled device) 카메라 또는 CMOS (Complementary metal oxide semiconductor) 카메라를 추가로 포함하여, 광원 공급 및 형광 신호의 영상화 및/또는 정량을 수행할 수 있다. 상기 광원의 파장, 세기, 형광 카메라 측정 조건 (예컨대, 1 프레임당 노출시간,

15 레이저 파워, 카메라 gain값, 총 촬영 프레임 등)은 앞서 단계 (3)에서 설명한 바와 같다.

【발명의 효과】

본 명세서에서 제공되는 방법은 소정의 바이오마커의 발현수준을

20 측정하거나 및/또는 상기 바이오마커와 상호작용하는 단백질 간 PPI를 측정하여 검사함으로써, 유방암 환자의 예후, 특히 재발 여부를 미리 예측하거나, 환자 개개인에 맞는 치료법을 선택하여 보다 효과적인 치료 전략을 수립할 수 있도록 하므로, 환자 개개인의 맞춤형 치료를 위한 진단 기술로서 유용할 것으로 기대된다.

25

【도면의 간단한 설명】

도 1은 단백질-단백질 상호작용(PPI) 측정 방법에 관한 모식도이다.

도 2a는 일 실시예에서 73개 샘플에 대하여 측정된 HER2-PLCG1 PPI count를 나타낸 그래프이다.

30 도 2b는 일 실시예에서 73개 샘플에 대하여 측정된 EGFR-Grb2 PPI count를 나타낸 그래프이다.

도 3a는 일 실시예에서 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플에 대하여 측정된 HER2 발현 수준을 나타낸 그래프이다 (점선은 HER2 발현 수준 평균값을 나타내고, 붉은(진한) 막대는 재발 샘플을 나타냄).

5 도 3b는 일 실시예에서 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플에 대하여 측정된 HER3 발현 수준을 나타낸 그래프이다 (선은 HER3 발현 수준 평균값을 나타내고, 진한 막대(화살표 표시)는 재발 샘플을 나타냄).

도 4a는 73개 샘플에 대하여 측정된 EGFR 발현 수준을 나타낸 그래프이다 (붉은 선(2)은 전체 샘플의 EGFR 발현 수준 평균값, 녹색 선(1)은 전체 샘플의 EGFR 발현 수준 평균값+표준편차 (SD: Standard
10 Deviation), 빗금으로 표시한 막대는 재발 환자를 나타냄).

도 4b는 73개 샘플에 대하여 측정된 HER2 발현 수준을 나타낸 그래프이다 (붉은 선(1)은 전체 샘플의 HER2 발현 수준 평균값, 녹색 선(2)은 전체 샘플의 HER2 발현 수준 평균값+표준편차 (SD: Standard
15 Deviation), 빗금으로 표시한 막대는 재발 환자를 나타냄).

도 4c는 73개 샘플에 대하여 측정된 HER3 발현 수준을 나타낸 그래프이다 (붉은 선(1)은 전체 샘플의 HER3 발현 수준 평균값, 녹색 선(2)은 전체 샘플의 HER3 발현 수준 평균값+표준편차 (SD: Standard
20 Deviation), 빗금으로 표시한 막대는 재발 환자를 나타냄).

도 5는 73개 샘플 중 HER2 발현 수준이 평균값 이상인 샘플에 대하여 측정된 HER2-PLCG1 PPI count를 나타낸 그래프이다.

도 6은 ROC curve analysis 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 기존의 IHC 분석법으로 HER2 수준이 0 또는 1 (HER2(-))로 판단된 환자의 HER2 수준을 본 명세서에서 제공된 HER2 수준 측정 방법으로 측정된 결과를 보여주는 그래프이다.

25 도 8은 실시예 11의 72명의 유방암 환자군 시료에서 유방암이 실제로 재발한 재발 환자군 (R)과 재발하지 않은 비재발 환자군 (NR)의 HER2 발현 차이를 본 명세서에서 제공된 HER2 수준 측정 방법으로 측정된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 실시예 12에서 측정된 결과 HER2 발현수준이 기준수준보다
30 높아서 고위험군으로 분류된 환자군(high risk; 점선)과 HER2 발현수준이 기준수준보다 낮아서 저위험군으로 분류된 환자군(low risk; 실선)의

생존률 (Disease Free Survival) 추이를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 138개 유방암 샘플에 대한 고위험군(high risk) 및 저위험군(low risk) 분류 결과 및 재발률을 보여준다.

도 11은 실시예 14에서 측정된 결과 HER2 발현수준이 기준수준보다 높아서 고위험군으로 분류된 환자군(high risk; 점선)과 HER2 발현수준이 기준수준보다 낮아서 저위험군으로 분류된 환자군(low risk; 실선)의 생존률 (Disease Free Survival) 추이를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 명세서에 제공된 HER2 수준 측정 방법을 모식적으로 보여준다.

10

【발명의 실시를 위한 형태】

본 발명을 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

15

실시예 1: 유방암 샘플의 준비

ER(estrogen receptor)/PR(progesterone receptor) 양성 및 HER2 음성(HER2 IHC검사에서 0 또는 1 단계 검체; ER/PR+, HER2-)으로 판정받은 유방암 환자 73명을 72개월간 추적 조사한 결과, 이 중에서 18명의 환자에서 유방암이 재발된 것으로 관찰되었다. 상기 73명의 ER/PR+, HER2- 환자로부터 분리된 유방암 조직 샘플 (삼성서울병원 제공)을 준비하였다 (표 1 참조).

20

【표 1】

샘플	TC (%)	샘플	TC (%)	샘플	TC (%)
40	80	24	70	68	70
47	80	25	70	78	70
52	80	26	70	1	60
53	80	27	70	3	60
62	80	33	70	4	60
63	80	35	70	5	60
73	80	37	70	10	60
79	80	42	70	14	60

6	70	43	70	17	60
7	70	45	70	21	60
9	70	46	70	22	60
11	70	51	70	28	60
16	70	55	70	29	60
19	70	61	70	39	60
48	60	SPBCA69	80	44	70
50	60	SPBCA70	70	60	70
54	60	SPBCA71	70	80	70
58	60	SPBCA72	80	66	60
59	60	SPBCA73	70	70	60
20	70	67	70	72	60
74	60	SPBCA74	70		
75	60	SPBCA75	60		
76	60	SPBCA76	70		
77	60	SPBCA77	95		
8	50	SPBCA78	70		
12	50	SPBCA79	90		
31	50	SPBCA80	80		
69	50	SPBCA81	70		

(상기 표에서, 굵은 글씨로 표시된 샘플이 유방암이 재발된 환자로부터 얻은 샘플임,

TC: Tumor contents(%): 해당 조직에서 암세포/일반세포의 비율)

상기 준비된 얻어진 유방암 조직을 20 mm³ 정도 양으로 준비하였으나, 이보다 큰 경우라도 무방하다.

상기 준비된 조직을 액체질소에 미리 담궈둔 금속 몰타 (metal mortar)에 올려두고, 금속과 같은 단단한 물질을 이용해 가루 형태로 잘게 부숴준다. 이 때, 조직이 용해되지 않게 액체질소를 유지하는 것이 중요하다. 이를 통해 단위 부피 당 표면적을 넓게 하여, 용해 버퍼 내의 계면활성제에 의한 화학반응이 최대한 효율적으로 일어날 수 있도록 하였다.

상기 준비된 종양조직 20 mm³당 용해 버퍼(50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 1%(v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340) 및 1% (v/v)

tyrosine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, P5726))를 약 200 uL 정도 첨가하고, 4°C 냉장고에서 1시간 동안 계속 회전시키며 반응시켰다.

1시간 반응 후, 상기 반응물에 대하여 15,000g 및 4°C 조건에서 10분간 원심분리를 수행하였다. 그 후, 가라 앉은 부분 (pellet)은 버리고, 상청액(supernatant)만을 취하여 다음 시험에 사용시까지 보관하였다.

실시예 2: 제2 단백질 준비

본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 준비된 조직 용해액에 포함된 제1 단백질(EGFR, HER2, HER3)와 상호작용하는 단백질에 형광 단백질을 부착하여 표지된 제2 단백질을 준비하는 과정이 예시된다.

본 실시예에서 예시되는 제2 단백질을 아래의 표 2에 정리하였다:

【표 2】

단백질	Accession number	표지물질	발현벡터 (입수처)
PLC-gamma-SH2	PLCg (NM_013187.1) 중에서 545-765 아미노산 또는 NP_002651.2 중에서 540-765 아미노산을 암호화하는 핵산분자를 cloning 하여 사용	eGFP	pEGFP-C1 vector (clontech)
Grb2	Grb2 (NP_002077.1) 전체 sequence를 cloning 하여 사용		
PI3K	Human PI3K regulatory subunit alpha isoform 1 (NP_852664.1)의 전체 sequence를 cloning하여 사용		

상기 표 2에 기재된 제2 단백질 각각에 대한 발현벡터를 HEK293 세포 (ATCC) 에 주입하고 배양하여, 제2 단백질을 발현시켰다. 24시간 배양 후 세포를 수집한 후, 적절한 양으로 분배하여 -80°C에 보관하였다.

상기 세포에 용해액(50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 1%(v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340) 및 1% (v/v) tyrosine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, P5726))을 넣어 주었다. 높은 농도의 계면활성제 (Triton X-100)는 단백질 상호작용을 방해할 수 있으므로, 우선 5x10⁵ cells 혹은 그 상의 세포에 대하여 60 uL의 용해액을 투입하였다.

파이펫팅을 통해 뭉쳐있는 상기 얻어진 반응 혼합물 내의 세포를 모두 풀어준 후, 이를 얼음 위에 올려진 cold block (0-4°C)에 보관하면서 총 30분 반응시켰다. 이 때 10분 간격으로 주기적인 파이펫팅을 통해 물리적으로 섞는 과정을 수행하여 계면활성제에 의한 용해 반응이 활발하게 일어나도록 하였다.

30분 반응 후, 원심분리를 수행하였다 (10 min, 15,000g, 4°C). 가라 앉은 부분은 버리고 (pellet), 수용액만 (supernatant) 실험을 위해 새로운 튜브에 옮겨 담았다.

상기 얻어진 수용액 60 uL를 취하여 140 uL의 dilution buffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl)에 첨가해주었다. 이렇게 되면 최종적으로 0.3% Triton X-100이 포함된 제 2단백질의 용해액을 얻을 수 있다. Fluoremeter를 이용하여 제 2단백질에 부착된 형광단백질의 농도를 측정하였다. 그 결과 사용된 3종의 제2 단백질의 농도가 대략 400 내지 1000nM 범위 내로 측정되었다.

15

실시에 3: 기관의 준비

Coverslip을 3차 증류수로 잘 씻은 후, piranha solution(황산:과산화수소 = 2:1 ~ 3:1 (v/v))을 이용하여 세척하였다. 세척한 coverslip 표면에 대하여 aminopropylsilane와 polyethylene glycol (PEG)과 biotin-PEG이 100:3 비율로 섞인 PEG 혼합액을 차례로 처리하여 코팅을 수행하였다. Biotin-PEG의 비율은 100:3 이상일 수 있다.

2시간 반응 후, 3차 증류수로 세척한 뒤 PEG 코팅된 면이 접촉되지 않게 하여 -20°C에서 사용시까지 보관하였다.

하기 시험에서는 상기 준비된 coverslip과 아크릴 재질의 기관을 사용하여 25 사용하였으며, 시험 전에 상기 coverslip과 아크릴 재질의 기관을 해동하여 조립하거나, PEG 코팅이 끝난 뒤 미리 조립하고, 조립된 형태로 -20°C에 보관하여 사용 전에 해동하여 사용하였다.

실시에 4: 제1 단백질과 제2 단백질 간 단백질-단백질 상호 작용 이미징

상기 준비된 기관에 Avidin 계열의 단백질인 Neutravidin (Thermo,

A2666)을 0.1 mg/ml 농도로 투입하였다. 상온에서 10분 반응 시킨 후 0.1% Triton X-100이 포함된 dilution buffer 를 10 ml 정도 담은 용기에 기판을 넣고 30여 차례 정도 흔들어준다. 흔들는 방향은 커버슬립의 면과 평행하게 흔들어주는 것이 세척 효과에 좋다. 이를 이용하여 기판을 세척하였다. 이
 5 후, 다음 물질 주입을 위해 기판을 뒤집어 well에 들어있는 용액을 전부 털어주었다.

상기 준비된 기판에 표적이 되는 제 1단백질에 대한 항체를 투입하였다. 이 때, 사용되는 항체는 biotin이 접합된 형태인 것으로 준비하였다. 항체의 농도는 항체-항원의 affinity (dissociation constant,
 10 KD)에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 본 실험예에서는 2 ug/ml 정도로 사용하였으며, 반응시간은 10분 정도로 하였다. 만약 Biotin이 접합되어 있지 않은 항체를 사용하는 경우에는 이차 항체를 이용하여 제 1단백질의 항체를 부착할 수 있다.

이 때 사용된 제1 단백질에 대한 항체를 다음의 표 3에 정리하였다:

15 **【표 3】**

제1 단백질	항체	항체 입수처
EGFR	항-EGFR 항체	MS-378-B0, Thermo
HER2	항-HER2 항체	BMS120BT, Thermo
HER3	항-HER3 항체	BAM348, R&D systems

상기 항체가 처리된 기판을 앞선 neutravidin 세척에 사용된 방법을 이용하여 세척하였다. 상기 준비된 기판에 앞서 실시예 1에서 준비한 제1 단백질 용해액을 포함하고 있는 조직 용해액을 투입하였다. 항원-항체 반응의 경우
 15 15분까지는 계속 증가할 수 있고 15분을 초과하면서 시간대비 항원-항체 반응 효율이 낮아질 수 있어서, 반응시간을 15분 정도로 설정하였다.

반응 후, 기판을 앞서 실시된 세척방법과 동일하게 세척해 준다.

그 후, 상기 기판에 실시예 2에서 얻어진 제2 단백질 용해액을 투입하였다. 사용된 제1 단백질 용해액 내 제2 단백질의 농도는 형광단백질 기준으로 1-50 nM 사이의 값(약 30nM)으로 하였다. 제2 단백질 농도가 100
 25 nM 이상이 되면 형광현미경에서 background noise가 커지게 되어 정확한 형광신호를 측정하는데 방해가 된다.

형광현미경에 기판을 고정시키고 이미징하여, 각각의 제1 단백질/제2

단백질에 대한 데이터를 얻었다. 결과의 정확성을 높이기 위하여, 동일 조건에서 총 10개의 다른 위치에서 이미지를 획득하고, 이를 평균하여 대표값으로 사용하였다.

5 실시예 5: 단백질 복합체 (PPI complex) 분석

Matlab 프로그램(MathWorks 제공)에서 제공되는 toolkit에 기반하여 단백질 복합체를 분석하였다.

상기 실시예 4에서 얻어진 형광 이미지는 16bit unsigned integer 형식으로 저장하였다. 형광 신호는 eGFP (enhanced green fluorescent protein)로부터 얻었으며, 상기 신호를 관측하기 위하여 레이저의 파장을 488nm로 하였고, eGFP의 발광시간을 11초 정도 유지시키기 위하여 레이저 파워를 2mW로 조절하여 사용하였다. 전체 프레임 (10 프레임) 중, 초반 프레임을 버리고, 3개 프레임(7-9 번째 프레임)의 이미지를 평균하여 하나의 이미지를 생성하였으며, 이와 같은 과정을 well 안에서 위치를 옮겨가며 반복 수행하여 총 10개의 이미지를 획득하여 아래 과정을 수행하였다. 초반 6 프레임 정도를 버리는 이유는, 아무것도 없는 기관의 표면에서 발생하는 불필요한 신호 (autofluorescence)가 사라지고, eGFP 신호가 유지되는 구간을 선별하여 사용하기 위함이다. 이와 같이 선별되는 구간은 이미징 조건/장비구축 상태에 따라서 달라질 수 있다. 본 실시예에서는 EMCCD (Electron-multiplying charge-coupled device; Andor iXon Ultra 897 EX2 (DU-897U-CS0-EXF)) 카메라를 사용하여 1프레임당 노출시간을 0.1초로 하고, EMCCD gain 값은 40으로 하여 형광 이미지를 얻었다.

노이즈를 제거하기 위해, 각 프레임 마다 아래와 같은 절차를 수행하였다:

(a) 최초 시작은 왼쪽 상단에서 시작한다. 1 프레임은 512x512 개의 픽셀로 구성되어 있다. 기준 픽셀을 기준으로 오른쪽으로 11개, 아래쪽으로 11개인 11x11개의 픽셀에서 median 값을 구하고, 이 median 값을 기준 픽셀의 수치에서 빼주었다[(Intensity_pixel) - (medianIntensity_11x11neighborhood)]. 512x512의 모든 픽셀에 대해서 위 절차를 수행하였다. Median filtering을 통해서 pepper & salt noise를

제거하였다.

(b) 위의 처리된 이미지에서 $\sigma=0.7$, $\text{size}=5 \times 5$ 의 Gaussian smoothing을 수행하여, 이미지를 부드럽게 만들어 주었다.

(c) Threshold를 설정하였다. Threshold는 전체 이미지에서 pixel intensity가 threshold 이하가 되는 pixel의 값을 threshold 값으로 모두 만들어 준다 (Matlab toolkit에서 local maximum을 찾는 알고리즘을 사용함). 이를 통해 이미지에서 형광신호에 의해서 만들어지지 않은 국소 극대값 (local maximum)을 제거할 수 있다. 본 실시예의 이미징 조건에서 사용되는 threshold 값은 70이다.

10 형광단백질로부터 나오는 신호는 특정 위치에 모여있는 형태(localized point spread function (PSF))로 발생하는데, 이 PSF 개수(물리적인 값)를 측정하고자 하는 제1 단백질과 제2 단백질 간의 PPI complex 숫자 (생물학적인 값)이다. 상기 PSF 값은 아래와 같은 과정을 거쳐서 생물학적인 값인 PPI complex 값으로 전환시켰다:

15 (a) Local maximum의 위치를 구하였다 (예를 들어, i 번째 row, j 번째 column pixel). 앞서 기술한 바와 같이, 단분자 형광신호는 512×512 픽셀 중에서 특정 위치(현재 관측장비 하에서 대략 5×5 픽셀 사이즈, 1 pixel = 0.167 마이크로미터)에 모여 형성되므로, local maximum을 찾으면 개별 PSF를 선별할 수 있다. 이는 Matlab에서 제공되는 toolkit을 이용하여 구할
20 수 있다.

(b) 상기 (a)에서 구한 local maximum이 실제 PSF로부터 발생한 것인지에 대한 판별과정을 거친다. 우선 local maximum의 최소값(minimum intensity value)을 정의하고, 상기 얻어진 local maximum 중에서 이 최소값보다 큰 경우만 분석에 사용하였다. 본 실시예에서 사용된 최소값은
25 75이고, 이 값은 레이저 파워/노출시간/장비구축 상황에 따라서 달라질 수 있다. 최종적으로 얻어진 local maximum 좌표를 중심으로 5×5 픽셀의 정보를 불러온 후, 이 5×5 픽셀에서 밝기에 대한 중심을 구하였다 (centroid of intensity). 이 때, 구해진 밝기 중심이 기존 local maximum 좌표에 대하여 0.5 pixel 이상 벗어나게 되면 (PSF 모양에 대한 2D 대칭이
30 사라지면), 정상적이지 않은 형광신호라고 판단하고 분석에서 제외시켰다.

(c) 모든 조건을 통과한 PSF 만 최종적으로 선별하여 좌표와 전체

개수를 구하였다. 이 때 얻어진 PSF 전체 개수가 PPI complex의 개수가 된다.

같은 조건하에서 촬영된 모든 파일에 대하여 상기 과정을 수행하여 PSF 개수를 구한 후, 이를 취합하여 평균과 표준편차를 구하였다. 이 값이
5 최종적으로 특정 조건에서 PPI complex의 개수를 나타내는 값이 된다 (도 1 참조).

실시예 6. PPI와 유방암 재발 여부와의 상관관계

제1 단백질로서 유방암에서 과발현되는 것으로 알려진 EGFR, HER2,
10 및 HER3를 선정하고, 이들의 대표적인 하위신호전달 경로 단백질인 PLCG1(PLC-gamma1), PI3K, 및 Grb2를 제2 단백질로 선정하여, 이들 간의 PPI (protein-protein interaction)을 측정하고, 그 결과와 유방암 재발 여부와의 상관 관계를 확인하였다.

상기 실시예 5에 기재된 방법으로 HER2-PLCG1, 및 EGFR-Grb2 간의
15 PPI complex를 측정한 후, 그 값에서 상기 실시예 3에서 준비된 기관에 샘플 처리 없이 제2 단백질만 처리한 경우의 PPI complex 값을 공제한 값 (PPI count)을 구하였다:

$$\text{PPI count} = [\text{샘플에서 측정된 PPI complex 값}] - [\text{샘플 미처리시 측정된 PPI complex 값}]$$

20 상기 얻어진 결과를 표 4 및 도 2a (HER2-PLCG1 PPI count), 2b (EGFR-Grb2 PPI count)에 나타내었다:

【표 4】

샘플번호	재발여부	HER2-PLCG1	EGFR-Grb2 (비교예)
#1		24.18182	17.04
#10		68.81819	33.84
#11		2.9	
#12		63.01818	77.40
#14		35.9	82.44
#16	0	-21.70909	-24.30
#17		78.9	133.14
#19		1.5	
#20		-36.5	-72.60

#21		16.17273	28.00
#22		138.8	72.84
#24		-17.58182	-60.43
#25		-29.7	-65.10
#26		-37.7	
#27		-5.12727	
#28		87.4	61.45
#29		32.2	29.10
#3		4.95455	15.84
#31		68.8	131.00
#33		-15.4	-42.57
#35		-14.03636	
#37		-8.9	
#39		17.56364	59.40
#4		2.25455	5.54
#40		40.01818	6.90
#42		-10.3	5.00
#43		9.87273	
#45		-13.72727	
#46		-28.4	13.60
#47		41.78333	5.20
#48		92.1	23.10
#5		12.36364	8.36
#50		425.4	22.60
#51		5.81818	25.36
#52		45.2	20.00
#53		29.10909	25.67
#54	0	-21.2	-0.40
#55		11.1	
#58		31.9	60.70
#59	0	222.35	89.62
#6		-2.2	17.40
#61		-24.98182	-5.20
#62		0.3	8.18
#63	0	30.10909	77.30

#66		18.01667	-2.00
#67		-11.8	13.40
#68		-8.09091	
#69		67.8	76.18
#7		-38.4	-63.30
#70		26.50909	5.60
#72		75.76667	52.70
#73	0	-11.4	11.80
#74		-9.49091	3.12
#75		91.6	73.00
#76		6.5	
#77		12.39091	
#78		-0.4	31.60
#79		-2.63636	18.46
#8		49.9	63.64
#9		20.2	-4.10
SP69	0	30	16.90
SP70	0	383.4	61.90
SP71	0	114.8	66.70
SP72	0	22.6	18.70
SP73	0	43.3	82.70
SP74	0	32.4	
SP75	0	-16.7	-5.91
SP76	0	-14.1	61.30
SP77	0	27.6	-4.20
SP78	0	-31	-14.70
SP79	0	50.92727	1.10
SP80	0	-0.8	68.40
SP81	0	64.74545	50.00

(상기 표에서, 재발 여부에 '0'이 표시된 샘플은 재발된 샘플을 의미함)

표 4 및 도 2a 내지 2b (진한 막대가 재발환자를 나타냄)에서 보여지는 바와 같이, PPI count가 0 이하 (즉, 샘플에서의 PPI 값이 측정 시스템의 노이즈값 또는 배경신호값 (즉, 샘플 미처리시 측정된 PPI complex 값)보다 낮은)) 샘플들 중 비재발 환자 비율이 가장 높은 HER2-

PLCG1의 경우가, PPI count가 0보다 큰 샘플들 중의 재발 환자 비율이 가장 높으므로, HER2-PLCG1 PPI count를 유방암의 재발에 대한 바이오마커로 선택하였다.

5 **실시예 7. HER2-PLCG1 PPI count>0인 경우의 HER2 또는 HER3 발현량과 유방암 재발 여부와의 상관관계**

상기 실시예 6에서 HER2-PLCG1 PPI count가 0보다 큰 (HER2-PLCG1 PPI count>0) 샘플들에 대하여 HER2 (바이오마커) 발현 수준을 측정하여, HER2 또는 HER3의 발현 수준과 유방암 재발 여부와의 상관관계를
10 시험하였다.

샘플에서의 HER2, HER3, 및 EGFR의 발현 수준은 다음과 같이 측정하였다 (도 1의 상단 오른쪽 그림 참조). 구체적으로, 준비된 기관에 항체를 고정하는 단계는 PPI 측정과 동일하게 진행된다.

HER2, HER3, EGFR 양 측정을 위해 Bradford 나 다른 단백질
15 정량방법을 통해 동일하게 맞춰진 검체 농도를 기관에 주입하여 제1단백질을 기관에 고정시킨다. 이후 세척과정을 진행하고, 제1단백질을 검출하는 검출항체를 주입한다 (표 5). 10분 반응 후 검출항체를 측정할 수 있는 2차 항체 (Rabbit IgG-Cy3 or Alexa 488 conjugation)을 주입하고, 역시 10분 반응 후 최종 세척과정을 진행한다.

20 **【표 5】**

제1 단백질	항체	항체 입수처
EGFR	항-EGFR 항체	#4267, CST
HER2	항-HER2 항체	MA5-15050, Thermo
HER3	항-HER3 항체	#4791, CST
Rabbit IgG	항-rabbit IgG 항체	111-165-046, Jackson

반응이 끝난 기관은 전반사 현미경을 통해 PPI complex 측정과 동일하게 단백질 PSF 개수를 측정하여 각 제1단백질 양을 정량하게 된다.

상기 얻어진 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들에서의 HER2 발현
25 수준을 도 3a에 나타내었다 (도 3a에서, 점선은 HER2 발현 수준 평균값을 나타내고, 진한 막대는 재발 샘플을 나타냄).

도 3a에서 알 수 있는 바와 같이, HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들의 HER2 발현 수준의 평균값보다 HER2 발현 수준이 높은 14개 샘플들 중에서 유방암이 재발한 샘플은 8개이고, 재발하지 않은 샘플은 6개로 나타난 반면, HER2 발현 수준이 평균값보다 낮은 33개 샘플들 중에서 유방암이 재발한 샘플은 3개이고, 재발하지 않은 샘플은 30개로 나타나서, HER2 발현 수준이 평균값보다 높은 샘플들에서의 유방암 재발 비율 ($[(8/14)*100=57\%]$)이 HER2 발현 수준이 평균값보다 낮은 샘플들에서의 유방암 재발 비율 ($[(3/33)*100=9\%]$)보다 현저하게 높은 것으로 나타났다.

이러한 결과는, HER2-PLCG1 PPI count 측정 후, 연속하여 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플에 대하여 HER2 발현 수준을 측정한 경우, HER2 발현 수준이 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들의 평균값 이상인 경우에 유방암의 재발 확률이 현저하게 높아짐을 확인시키는 결과이다.

상기 얻어진 HER2 (바이오마커) 발현 수준을 기초로 하기 지표들을 측정하여, 표 6에 나타내었다:

재발 환자 판정 신뢰도 (Positive Prediction Value, PPV; %) = $[(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD(\text{표준편차}) \text{ 초과인 샘플 중 재발된 샘플 개수})/(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD \text{ 초과인 샘플의 총 개수})]*100;$

비재발 환자 판정 신뢰도 (Negative Prediction Value, NPV; %) = $[(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD \text{ 미만인 샘플 중 비재발 샘플 개수})/(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD \text{ 미만인 샘플의 총 개수})]*100;$

재발 환자 판정률 (Sensitivity; %) = $[(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD \text{ 초과인 샘플 중 재발 샘플 개수})/(\text{재발 샘플 총 개수})]*100;$

비재발 환자 배제율 (Specificity; %) = $[(\text{바이오마커 발현 수준이 평균값 또는 평균값}+SD \text{ 미만인 샘플 중 비재발 샘플 개수})/(\text{비재발 샘플 총 개수})]*100;$

【표 6】

재발 여부	재발 샘플 개수	비재발 샘플 개수
-------	----------	-----------

Biomarker (HER2) 발현 수준	평균값 (434.5) 이상	8	6
	평균값 (434.5) 미만	3	30
재발환자 판정 신뢰도 (PPV)		57%	
비재발환자 판정 신뢰도 (NPV)		91%	
재발환자 판정률 (Sensitivity)		73%	
비재발환자 배제율 (Specificity)		83%	

또한, 상기와 동일한 방법으로, 상기 실시예 6에서 HER2-PLCG1 PPI count가 0보다 큰 (HER2-PLCG1 PPI count>0) 샘플들에 대하여 HER3 (바이오마커) 발현 수준을 측정하여, HER3 발현 수준과 유방암 재발 5 여부와의 상관관계를 시험하였다.

상기 측정된 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들에서의 HER3 발현 수준을 도 3b (선은 HER3 발현 수준 평균값을, 진한 막대(화살표)는 재발 샘플을 나타냄)에 나타내고, 재발 환자 판정 신뢰도, 비재발 환자판정 신뢰도, 재발 환자 판정률, 및 비재발 환자 배제율의 지표들을 측정하여, 10 표 7에 나타내었다:

【표 7】

재발 여부		재발 샘플 개수	비재발 샘플 개수
Biomarker (HER3) 발현 수준	평균값 이상	7	9
	평균값 미만	4	27
재발환자 판정 신뢰도 (PPV)		44%	
비재발환자 판정 신뢰도 (NPV)		87%	
재발환자 판정률 (Sensitivity)		64%	
비재발환자 배제율 (Specificity)		75%	

상기 표 6 및 표 7에서 확인되는 바와 같이, HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들에 대하여 바이오마커로서 HER2 또는 HER3의 발현 수준을 측정하여 평가하는 경우, 유방암 재발 진단 지표에서 대체적으로 우수한 15 결과를 나타냈으며, 특히, HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플들에 대하여 HER2의 발현 수준을 측정하여 평가하는 경우, 재발 환자 판정 신뢰도, 비재발 환자판정 신뢰도, 재발 환자 판정률, 및 비재발 환자 배제율의 평가된 모든 지표에서 보다 우수한 결과를 나타냈다.

실시에 8. 바이오마커 발현 수준 측정 후 HER2-PLCG1 PPI 측정하여 유방암 재발과의 상관관계 확인

HER2-PLCG1 PPI count 측정과 바이오마커(HER2 또는 HER3)의 발현 수준 측정의 순서를 바꾸어 수행한 경우의 유방암 재발 여부와의 상관관계를 시험하였다.

보다 구체적으로, 실시에 1에서 준비된 모든 샘플 (73개)에 대하여, 실시에 7의 방법을 참조하여, 바이오마커로서의 HER2, 및 HER3의 발현 수준을 각각 측정한 후, 그 발현 수준이 평균값 이상인 샘플을 선정하였다. 그 후 상기 선정된 샘플에 대하여, 실시에 6의 방법을 참조하여 HER2-PLCG1 PPI count 측정하고 HER2-PLCG1 PPI count>0인 샘플을 선정하여, 환자 판정 신뢰도, 비재발 환자판정 신뢰도, 재발 환자 판정률, 및 비재발 환자 배제율의 지표들을 측정하였다.

상기 얻어진 결과를 도 5 (HER2), 표 8 및 표 9에 나타내었다.

【표 8】

15 HER3 발현 수준이 평균값 이상인 샘플에 대한 HER2-PLCG1 PPI count 측정 결과

재발 여부		재발 샘플 개수	비재발 샘플 개수
Biomarker (HER2-PLCG1 PPI count)	>0	7	7
	<0	4	13
재발환자 판정 신뢰도 (PPV)		50.0%	
비재발환자 판정 신뢰도 (NPV)		76.5%	
재발환자 판정률 (Sensitivity)		63.6%	
비재발환자 배제율 (Specificity)		65.0%	

【표 9】

HER2 발현 수준이 평균값 이상인 샘플에 대한 HER2-PLCG1 PPI count 측정 결과

재발 여부		재발 샘플 개수	비재발 샘플 개수
Biomarker (HER2-PLCG1 PPI count)	>0	8	7
	<0	0	7
재발환자 판정 신뢰도 (PPV)		53.3%	
비재발환자 판정 신뢰도 (NPV)		100.0%	

재발환자 판정률 (Sensitivity)	100.0%
비재발환자 배제율 (Specificity)	50.0%

실시예 9. 진단 성능 평가

상기 실시예 6 내지 실시예 8에서 얻어진 결과의 유방암 재발 진단 성능을 양성/음성가능성비(Likelihood ratios in diagnostic testing) 및 Youden's index를 통하여 평가하고, 그 결과를 하기의 표 10에 나타내었다:

【표 10】

측정방법	Line color	Best cutoff	Youden's index	Sensitivity	Specificity	LR+	LR-
HER2	Gray (a)	434.51	0.26	44.4%	81.8%	2.44	0.68
EGFR	Black (b)	196.70	0.21	50.0%	70.9%	1.72	0.71
HER3	Orange (c)	239.52	0.25	61.1%	63.6%	1.68	0.61
HER2 PPI>0, HER2	Red (d)	434.51	0.62	72.7%	88.9%	6.55	0.31
HER2 PPI>0, EGFR	Cyan (e)	196.70	0.23	45.5%	77.8%	2.05	0.70
HER2 PPI>0, HER3	Magenta(f)	240.10	0.41	63.6%	77.8%	2.86	0.47
HER2>mean, HER2 PPI	Navy (g)	16.85	0.63	100.0%	62.5%	2.67	0.00
HER3>mean, HER2 PPI	Olive (h)	21.40	0.44	63.6%	80.0%	3.18	0.46
EGFR>mean, HER2 PPI	Brown (i)	21.40	0.33	60.0%	72.7%	2.20	0.55

(LR+, 양성가능성비: [재발 양성(+) 판정 받은 샘플 중 실제 재발 샘플 비율/재발 음성(-) 판정 받은 샘플 중 실제 재발 샘플 비율], 수치가 클수록 예측 성능이 우수함을 의미,

10 LR-, 음성가능성비: [재발 양성(+) 판정 받은 샘플 중 실제 비재발 샘플 비율/재발 음성(-) 판정 받은 샘플 중 실제 비재발 샘플 비율], 수치가 작을수록 예측 성능이 우수함을 의미,

Youden's index: Sensitivity + Specificity - 1; 상기 Sensitivity와 Specificity이 %로 표시된 경우 100으로 나눈 값을 사용함),
 15 1에 가까울수록 진단 성능이 우수함을 의미,

Best cutoff for HER2 PPI>0, HER2 level:

- 434.5
- Sensitivity : 72.7%
- Specificity : 88.9%

또한, 상기 표 8의 결과를 ROC curve analysis로 분석한 결과를 하기의 표 11 및 도 6 (ROC curve)에 나타내었다.

【표 11】

측정 방법	Line color	Area	Error	p-value	95% LCL	95% UCL
HER2	Gray	0.604	0.069	0.187	0.468	0.740
EGFR	Black	0.574	0.071	0.350	0.435	0.712
HER3	Orange	0.568	0.077	0.391	0.417	0.718
HER2 PPI>0, HER2	Red	0.770	0.068	0.007	0.637	0.903
HER2 PPI>0, EGFR	Cyan	0.551	0.094	0.615	0.366	0.735
HER2 PPI>0, HER3	Magenta	0.611	0.095	0.269	0.425	0.797
HER2>mean, HER2 PPI	Navy	0.719	0.138	0.086	0.449	0.988
HER3>mean, HER2 PPI	Olive	0.709	0.096	0.058	0.521	0.898
EGFR>mean, HER2 PPI	Brown	0.636	0.100	0.223	0.440	0.833

5 ROC curve analysis는 진단 분야에서 널리 사용하는 분석법으로, 그래프 아래 면적 (Area)이 클수록 성능이 우수한 방법이고, Asymptotic Probability (p-value)가 작을수록 통계적으로 유의미한 의미를 갖는 결과이다. 이를 통해서, 본 명세서에서 제공된 방법이 다른 방법들에 비해서 우수한 성능을 갖는다는 것을 객관적으로 입증할 수 있다.

10 ROC curve는 표 10의 LR+를 다양한 threshold에 대해서 그려준 결과를 보여준다 (LR+가 특정 위치에서 y축/x축 값이 됨).

 Area는 그래프 아래 면적을 적분한 값이고, standard error는 그래프를 이루는 점들을 이어줄 때 발생하는 부정확성으로 기인하는 오차이고, Asymptotic Probability(p-value)는 우연하게 검체를 선택했을 때, 재발환자가 발견될 확률과 얼마나 차이가 나는지를 보여주는 지표로서, 그 수치가 작을 수록 확률이 낮아짐을 의미하여, 우연에서 멀어지는, 즉
15 진단 정확성이 높음을 의미한다.

 UCL 및 LCL은 신뢰도 95%를 가정할 때의 Area 수치 범위를 나타낸 것으로, 정확한 Area 수치가 LCL<Area<UCL 사이에 있을 확률이 95%임을
20 의미한다.

 상기 표 10 및 11에 나타난 측정 방법을 아래의 표 12에 정리하였다:

【표 12】

측정방법	설명
HER2	샘플의 HER2 발현량을 측정하여 실시예 7을 참조로 유방암 재발 여부와의 상관관계 확인 (도 4b 참조)
EGFR	샘플의 EGFR 발현량을 측정하여 실시예 7을 참조로 유방암 재발 여부와의 상관관계 확인 (도 4a 참조)
HER3	샘플의 HER3 발현량을 측정하여 실시예 7을 참조로 유방암 재발 여부와의 상관관계 확인 (도 4c 참조)
HER2 PPI>0, HER2	실시예 4-7
HER2 PPI>0, EGFR	실시예 4-6 수행 후 EGFR 발현량 측정하여 실시예 7을 참조로 유방암 재발 여부와의 상관관계 확인
HER2 PPI>0, HER3	실시예 4-6 수행 후 HER3 발현량 측정하여 실시예 7을 참조로 유방암 재발 여부와의 상관관계 확인
HER2>mean, HER2 PPI	실시예 8 및 도 5 참조
HER3>mean, HER2 PPI	실시예 8 참조
EGFR>mean, HER2 PPI	EGFR 발현량이 평균값 이상인 샘플에 대하여 실시예 6을 참조로 HER2-PLCG1 PPI count 측정

상기 표 10, 11, 및 도 6에서 보여지는 바와 같이, HER2-PLCG1 PPI count 측정 및 HER2 또는 HER3 발현량 측정을 수행하여 평가하는 방법이, 시험된 지표들, 특히, Sensitivity와 Specificity 모두에서 가장 우수한 결과를 얻을 수 있고,

정량적인 진단 성능 지표인 Youden's index (Sensitivity+Specificity-1) 및 양성/음성 가능성비 (LR+/LR-)를 계산한 결과 또한 우수한 것으로 나타나서, 유방암 재발 여부 예측에 우수한 성능을 보임이 확인되었다.

특히, HER2-PLCG PPI count 측정 및 HER2 발현량 측정을 순서에 무관하게 수행하여 평가하는 방법에서의 Youden's index가 모두 0.5 초과하여 1과 가장 가깝게 나타났으며, 이러한 결과는 상기 방법이 유방암 재발 여부 예측에 매우 우수한 성능을 보임을 의미하는 것이다.

상기 결과를 종합할 때, 본 명세서에서 제공되는 HER2-PLCG PPI count 측정 및 HER2 또는 HER3 발현량, 특히 HER2 발현량 측정을 수행하여 평가하는 방법이 재발 환자 판정 신뢰도, 비재발 환자판정 신뢰도, 재발 환자 판정률, 및 비재발 환자 배제율의 모든 지표에서 우수한 결과를

나타냄은 물론이고, 양성/음성가능성비와 Youden's index로 평가한 결과에서도 우수한 유방암 재발 예측 성능을 보인다고 할 수 있다.

실시에 10: 유방암 환자로부터 수득한 시료의 HER2 발현수준 측정

5 polyethylene glycol (PEG)과 biotin-PEG를 포함하는 PEG 혼합액이 코팅된 기판에 Avidin 계열의 단백질인 Neutravidin을 투입하였다. 기판을 세척한 후 HER2 단백질에 대한 항체를 처리하였다. 이 때, 사용되는 항체는 biotin이 접합된 형태인 것으로 준비하였다. 항체의 농도는 항체-항원의 affinity (dissociation constant, KD)에 따라 적절히 조절될 수 있다.
 10 Biotin이 접합되어 있지 않은 항체를 사용하는 경우 이차 항체를 이용하여 HER2 단백질의 항체를 부착할 수도 있다.

상기 항체가 처리된 기판을 세척한 후 준비된 유방암 환자의 유방암 조직 용해액을 투입하였다. 항원-항체 반응의 경우 15분까지는 계속 증가할 수 있고 15분을 초과하면서 시간대비 항원-항체 반응 효율이 낮아질
 15 수 있어서, 반응시간을 15분 정도로 설정하였다.

그 후 형광단백질이 부착된 HER2 항체를 투입하였다. 이 때 사용되는 HER2 항체는 기판에 부착되는 항체와는 다른 부위에 작용하는 것을 특징으로 한다. 형광현미경에 기판을 고정시키고 이미징하여, 형광 단백질의 형광 신호를 측정하여 데이터를 얻었다. 결과의 정확성을 높이기
 20 위하여, 동일 조건에서 총 10개의 다른 위치에서 이미지를 획득하고, 이를 평균하여 대표 값으로 사용하였다.

실시에 11: 기준 값과 비교하여 유방암 재발여부 예측

기준 값을 설정하기 위한 방법으로, ER(estrogen
 25 receptor)/PR(progesterone receptor) 양성 (IHC검사에서 2 또는 3 단계) 및 HER2 음성(HER2 IHC 검사에서 0 또는 1 단계) (ER/PR+, HER2-)으로 판정받은 유방암 환자 72명의 유방암 조직샘플을 준비하여, 상기 실시예 10과 동일한 방법으로 HER2 발현수준에 의한 형광신호 값을 데이터로 확보하였다. 72개의 측정 값의 평균값 또는 평균값±표준편차(1*SD)를 기준
 30 값으로 설정하였다.

환자의 sample 수(즉, N값)가 증가하여 데이터가 누적될수록 기준

값은 다소 달라질 수 있으나, 그 정확도는 더 높아질 수 있다. 실시예 10에서 측정된 신호값이 기준 값 이상인 경우는 유방암 예후가 나쁜 것으로, 기준 값보다 낮은 경우는 유방암 예후가 좋은 것으로 예측하였다.

상기 얻어진 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

5 도 7은 기존의 IHC 분석법으로 HER2 수준이 0 또는 1 (HER2(-))로 판단된 환자의 HER2 수준을 본 명세서에서 제공된 HER2 수준 측정 방법으로 측정된 결과를 보여주는 그래프로서, IHC 분석법에 의하여 HER2(-)(HER2 0 또는 1)로 분류된 환자라도 본 명세서에서 제공된 HER2 수준 측정 방법으로
10 HER2 발현이 상당 수준인 환자가 존재할 수 있음을 보여준다.

도 8은 본 실시예에서 72명의 유방암 환자군 시료에서 유방암이 실제로 재발한 재발 환자군 (R)과 재발하지 않은 비재발 환자군 (NR)의 HER2 발현 차이를 본 명세서에서 제공된 HER2 수준 측정 방법으로 측정된 결과를 보여주는 그래프이다.

15

실시예 12: 유방암 재발여부 예측과 실제 생존율의 상관관계 분석

실시예 11에서 기준 값 설정에 사용된 72개 sample에 대하여, sample의 측정 신호 값이 기준 값 이상인 고위험군(high risk)과 기준 값보다 낮은 저위험군(low risk)으로 구분하였다. 상기 high risk군은
20 9개이고, low risk 군은 63개이었다. Sample을 취득한 유방암 환자 72명을 72개월간 추적 조사한 결과를 반영하여 유방암 재발여부 예측과 실제 생존율 (Disease Free Survival)의 상관관계를 도 69에 나타내었다. 도 9에서 점선은 고위험군의 생존률을, 실선은 저위험군의 생존률을 각각 보여준다. 도 9에서 보는 바와 같이 고위험군 군이 저위험군과 대비하여
25 생존율이 현저하게 빠른 속도로 급감하는 것을 확인할 수 있고, 이로써 본 실시예에서 수행된 재발 진단기술의 유효성이 입증된다.

실시예 13: HER2 표적치료요법 적용 환자군 선정단계

실시예 10 및 11에서, 기준 값 이상의 고위험군은 HER2의 발현수준이
30 상대적으로 높은 것으로, HER2 표적치료에 효과가 있는 환자군으로 선정할 수 있다. 상기 HER2 표적치료는 HER2 단백질을 target으로 하는 약물로,

대표적으로 허셉틴(trastuzumab)이 있고, 그 이외에도 HER2-TKI나 pan-HER2-TKI도 있으며, 이에 한정되지 않는다. 기존에는 HER2(-)로 분류되어 표적치료 처방을 받지 못하던 환자군을 대상으로 HER2 표적치료를 할 수 있어 HER2 표적치료의 동반진단법으로 활용될 수 있다.

5

실시예 14: 유방암 샘플의 확장 및 유방암 재발 여부 예측

실시예 11에 사용된 유방암 환자 72명의 유방암 조직샘플에, ER(estrogen receptor)/PR(progesterone receptor) 양성 (IHC검사에서 2 또는 3 단계) 및 HER2 음성(HER2 IHC 검사에서 0 또는 1 단계) (ER/PR+,
 10 HER2-)으로 판정받은 유방암 환자 66명의 유방암 조직 샘플을 추가하여, 총 138개의 유방암 조직 샘플을 준비하였다.

상기 실시예 10 및 11을 참조하여, 상기 준비된 138개의 유방암 샘플에 대하여 HER2 발현수준에 의한 형광신호 값을 측정하고, 상기 138개 유방암 샘플의 HER2 발현수준에 의한 형광신호 측정값의 평균값 또는
 15 평균값±표준편차(1*SD)를 기준 값으로 설정하였다.

상기 138개 유방암 샘플들 중 HER2 발현수준에 의한 형광신호 값이 기준 값 이상인 군을 고위험군(high risk)으로, 기준 값보다 낮은 군을 저위험군(low risk)으로 분류한 후, 재발여부를 분석하였다.

상기 얻어진 138개 유방암 샘플의 HER2 발현수준, 이들의
 20 고위험군(high risk) 및 저위험군(low risk)으로의 분류 결과 및 재발률을 분석한 결과를 도 10에 나타내었다. 또한, 상기 샘플을 취득한 유방암 환자 138명을 120개월간 추적 조사한 결과를 반영하여 유방암 재발여부 예측과 실제 생존율 (Disease Free Survival)의 상관관계를 측정하여 도 11에 나타내었다. 도 10에 나타난 바와 같이, 총 138개 샘플 중 28개
 25 샘플의 유래 환자에서 유방암이 재발되어 전체적인 재발률은 20.3%로 나타났으며, 이를 구체적으로 살펴보면, 저위험군으로 분류된 107개 샘플 중 17개 샘플의 유래 환자에서 유방암이 재발되어 저위험군의 재발률은 15.8%인 반면, 고위험군으로 분류된 31개 샘플 중 9개 샘플의 유래 환자에서 유방암이 재발되어 재발률이 29%로 나타나서, 저위험군의
 30 재발률보다 2배 정도 높게 나타났으며, 이는 Log-rank test에 의한 p-value가 0.014 정도의 통계적 유의미한 수준으로 재발 고위험성 예측이

가능함을 보여준다. 또한, 도 11에 나타난 바와 같이, 고위험군(점선)이 저위험군(실선)과 대비하여 생존율이 현저하게 빠른 속도로 급감하는 것을 확인할 수 있고, 이로써 본 실시예에서 수행된 재발 진단기술의 유효성이 입증될 수 있다.

【청구범위】

【청구항 1】

(I) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하는 단계, 및

5 (II) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 또는 HER3의 발현 수준을 측정하는 단계

를 포함하는, 유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

10 상기 단계 (I) 및 (II) 순서로 진행하고,

상기 단계 (I) 이후에,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하고,

15 상기 단계 (II)는, 상기 단계 (I-a)의 비교 결과, 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준이 기준 단백질-단백질 상호작용 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2 또는 HER3의 발현 수준을 측정하여 수행되고,

상기 기준 단백질-단백질 상호작용 수준은 생물학적 시료 또는
20 생물학적 시료와 PLC-gamma 단백질을 첨가하지 않은 상태에서 측정된 단백질-단백질 상호작용 수준인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

25 상기 단계 (II) 이후에, (II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 4】

30 제1항에 있어서,

상기 단계 (II) 및 (I) 순서로 진행하고,

상기 단계 (II) 이후에,

(II-a) 상기 단계 (II)에서 측정된 HER2 또는 HER3의 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하고,

상기 단계 (I)은, 상기 단계 (II-a)의 비교 결과, 단계 (II)에서 측정된 HER2 또는 HER3의 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 경우, 상기 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 측정하여 수행되고,

상기 기준 발현 수준은 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 또는 HER3의 발현 수준의 평균값인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 5】

제4항에 있어서,

상기 단계 (I) 이후에,

(I-a) 상기 단계 (I)에서 측정된 생물학적 시료의 HER2와 PLC-gamma 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용 수준을 기준 단백질-단백질 상호작용 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 6】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유방암은,

(1) HER2 음성(-)인 유방암,

(2) 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 또는 이들 모두가 양성(+)인 유방암, 또는

(3) 상기 (1)과 (2)의 특성을 모두 갖는 유방암인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서,

상기 HER2 음성(-)인 유방암은 HER2 특이적 항체를 사용하는 면역조직화학염색법 (IHC)에 의하여 결정된 점수 (IHC score)가 1 이하인 것이고,

상기 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 또는 이들

모두가 양성(+)인 유방암은 ER 특이적 항체, PR 특이적 항체 또는 이들 모두를 사용하는 면역조직화학염색법 (IHC)에 의하여 결정된 점수 (IHC score)가 2 이상인 것인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

5 【청구항 8】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유방암 예후는 유방암 재발인, 유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 9】

10 (i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계

를 포함하고,

15 상기 기준 발현 수준은 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD)이고,

상기 유방암은,

(1) HER2 음성(-)인 유방암,

20 (2) 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 또는 이들 모두가 양성(+)인 유방암, 또는

(3) 상기 (1)과 (2)의 특성을 모두 갖는 유방암인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

25 상기 HER2 음성(-)인 유방암은 HER2 특이적 항체를 사용하는 면역조직화학염색법 (IHC)에 의하여 결정된 점수 (IHC score)가 1 이하인 것이고,

30 상기 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 또는 이들 모두가 양성(+)인 유방암은 ER 특이적 항체, PR 특이적 항체 또는 이들 모두를 사용하는 면역조직화학염색법 (IHC)에 의하여 결정된 점수 (IHC score)가 2 이상인 것인,

유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

【청구항 11】

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 유방암 예후는 유방암 재발인, 유방암 예후 예측에 정보를 제공하는 방법.

5 【청구항 12】

(i) 유방암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 HER2 단백질 발현 수준을 측정하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준을 기준 발현 수준과 비교하는 단계

10 를 포함하고,

상기 기준 발현 수준은 상기 생물학적 시료가 분리된 환자를 포함하거나 포함하지 않은 2 이상의 유방암 환자로부터 분리된 시료에서의 HER2 단백질 발현 수준의 평균값 또는 평균값±표준편차(SD)이고,

상기 유방암은,

15 (1) HER2 음성(-)인 유방암,

(2) 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 또는 이들 모두가 양성(+)인 유방암, 또는

(3) 상기 (1)과 (2)의 특성을 모두 갖는 유방암인,

HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별에 정보를 제공하는 방법.

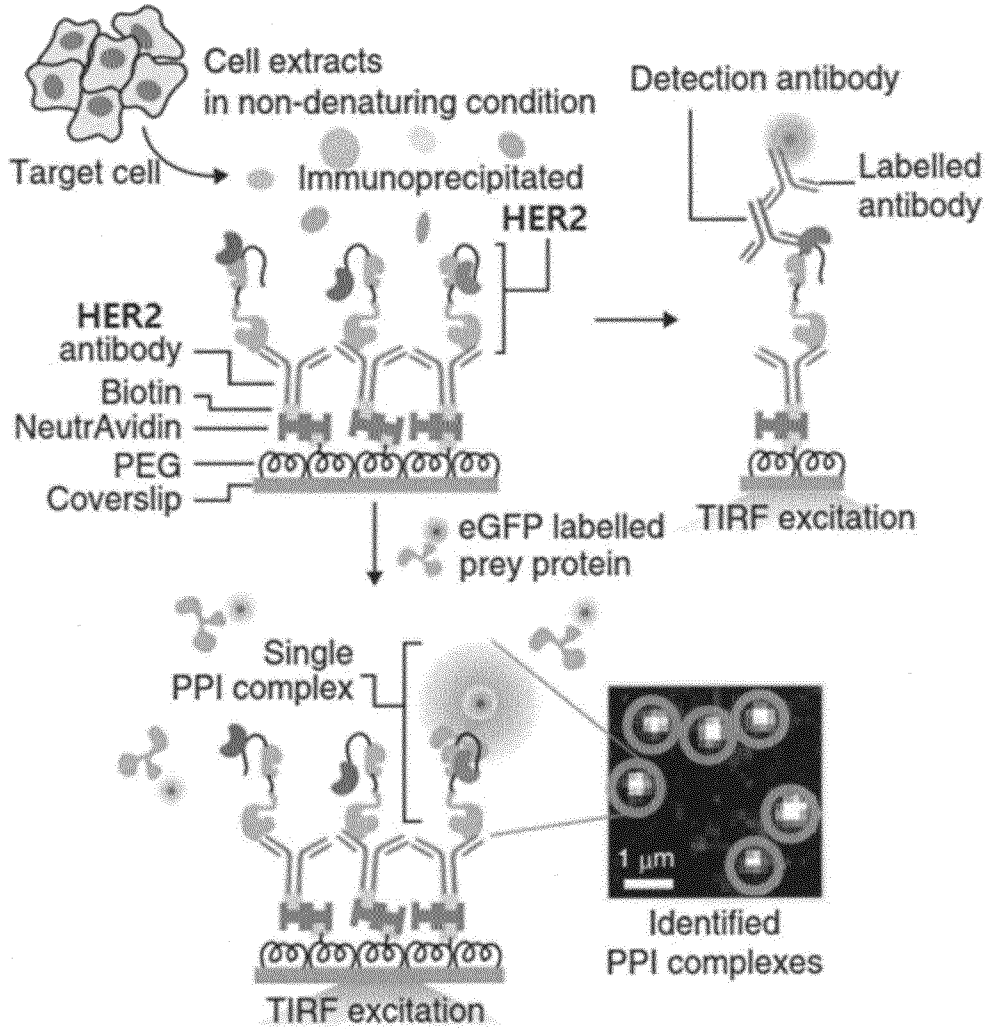
20 【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 단계 (ii) 이후에,

(iii) 상기 단계 (i)에서 측정된 HER2 단백질 발현 수준이 기준 발현 수준 이상인 생물학적 시료가 유래된 유방암 환자를 HER2 표적 치료에 적합한 환자로 선택하는 단계를 추가로 포함하는,

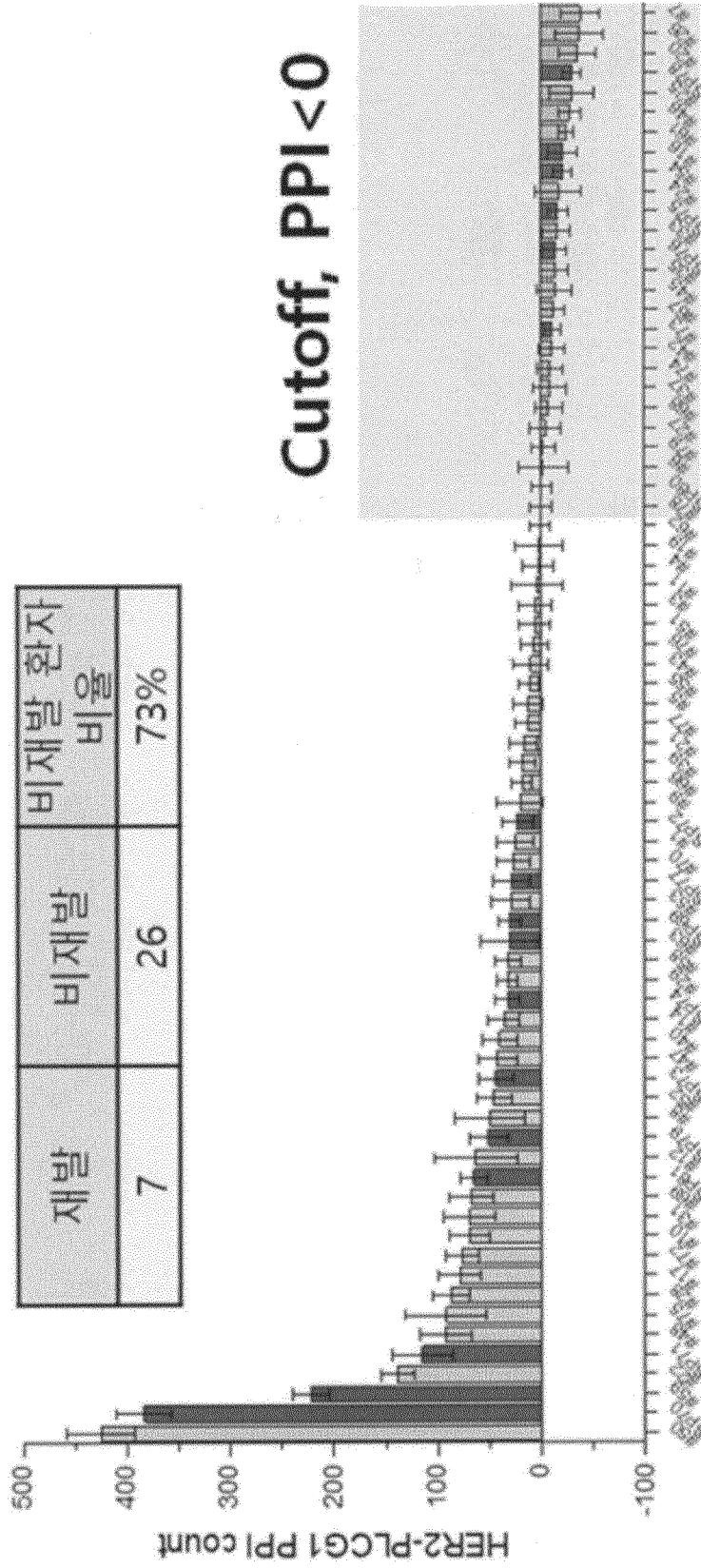
25 HER2 표적 치료에 적합한 환자 선별에 정보를 제공하는 방법.

【도 1】



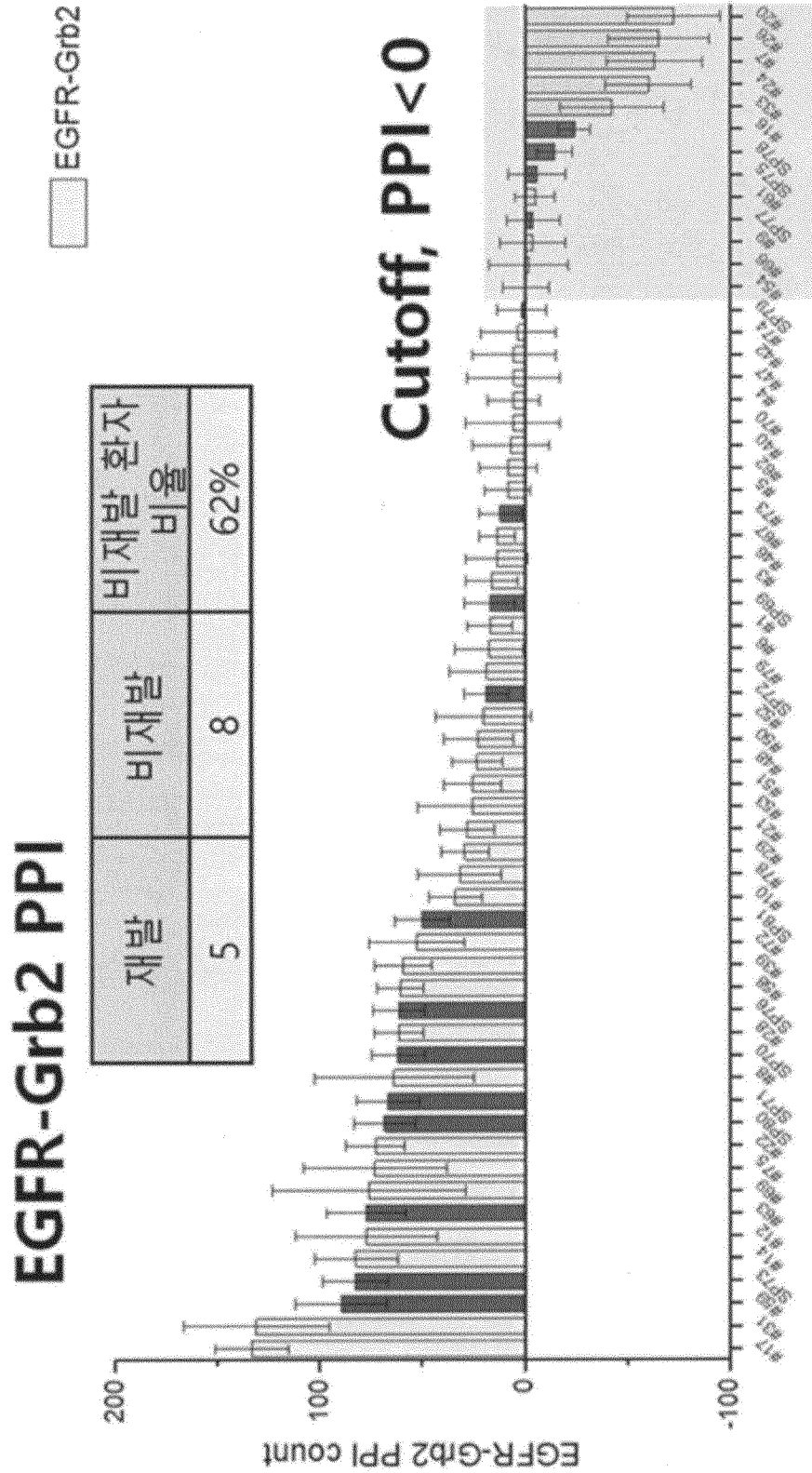
HER2-PLCG1 PPI

재발	비재발	비재발 환자 비율
7	26	73%



【도 2a】

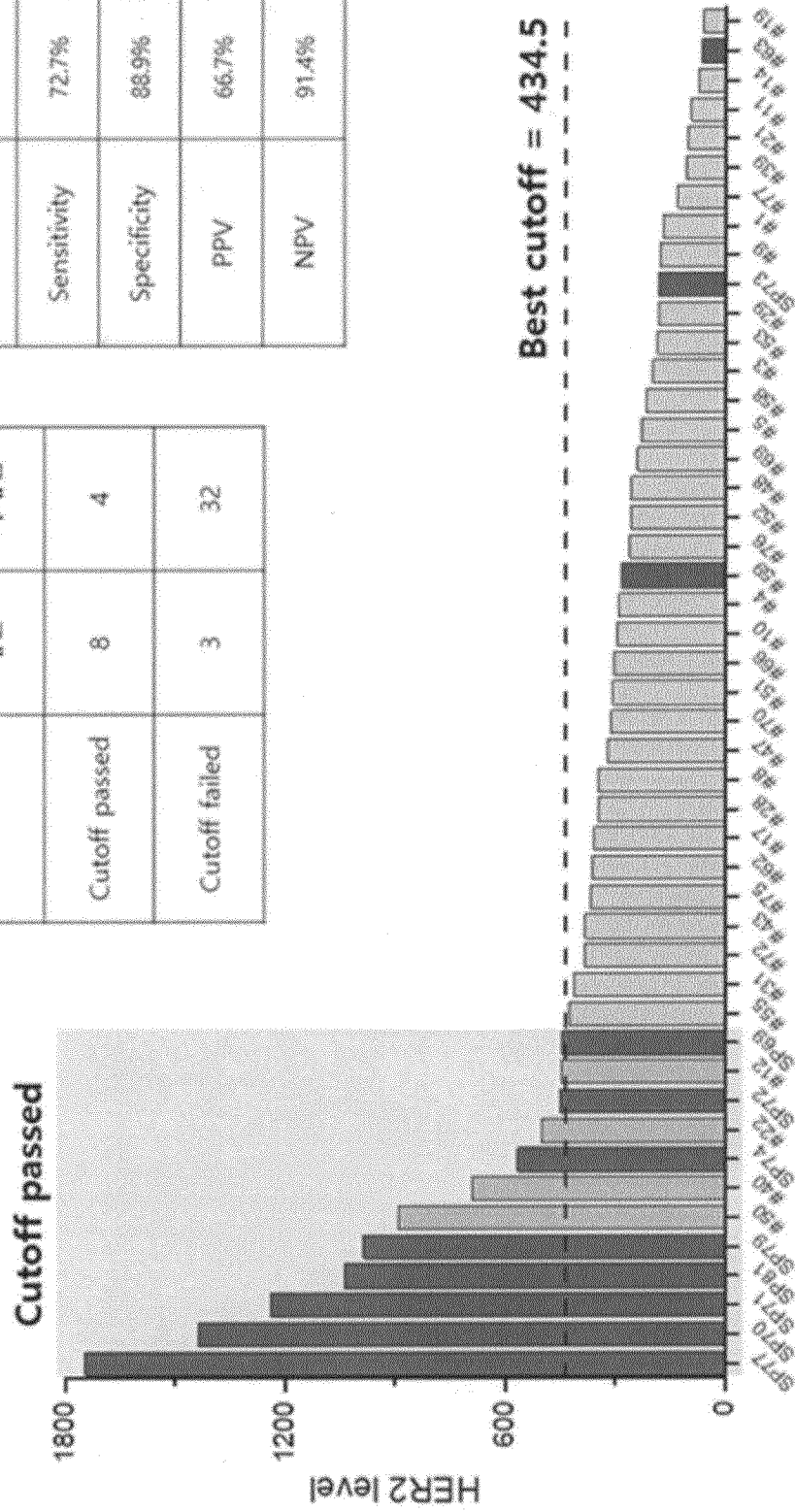
【도 2b】



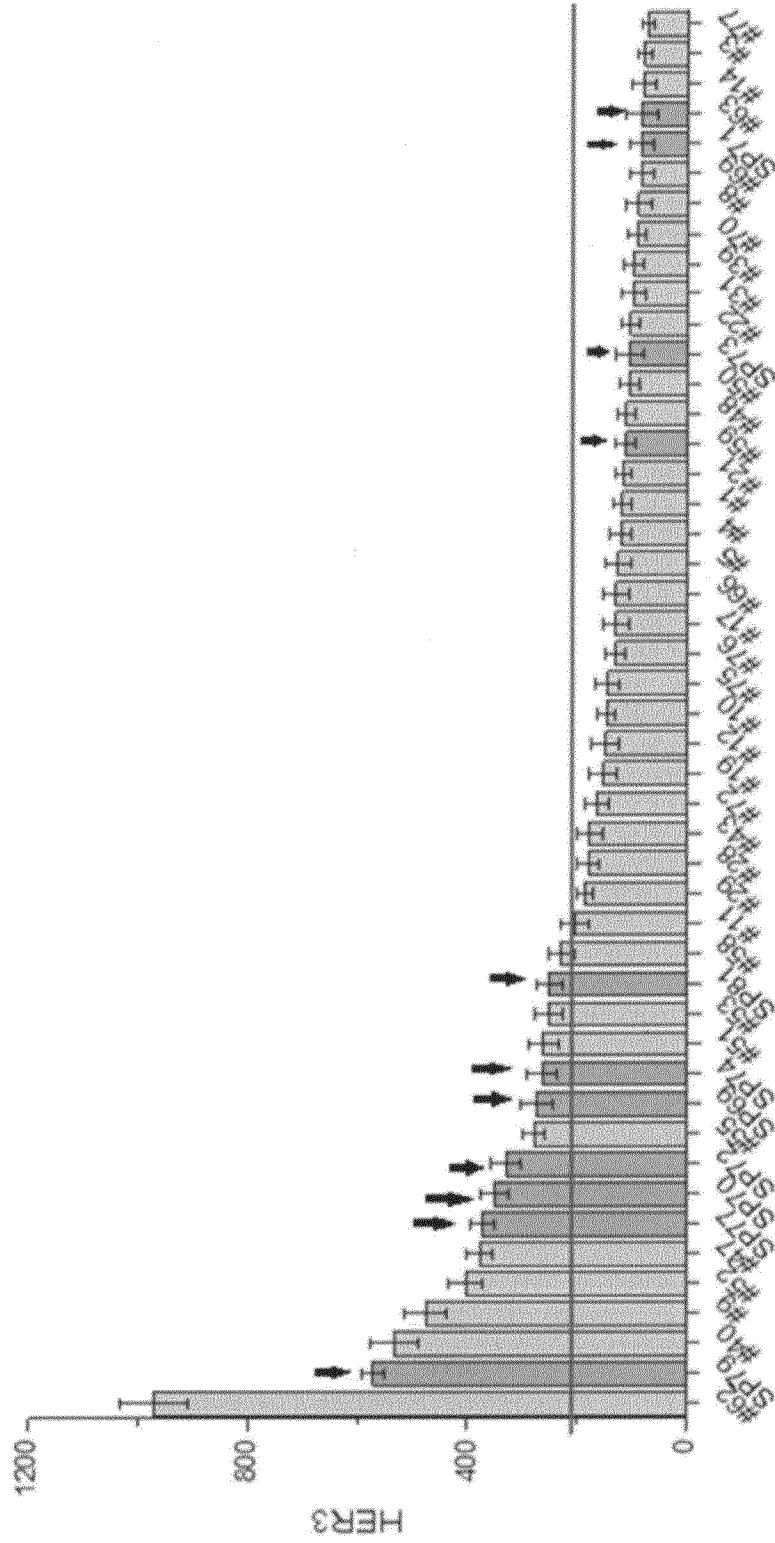
【도 3a】

		%
Sensitivity		72.7%
Specificity		88.9%
PPV		66.7%
NPV		91.4%

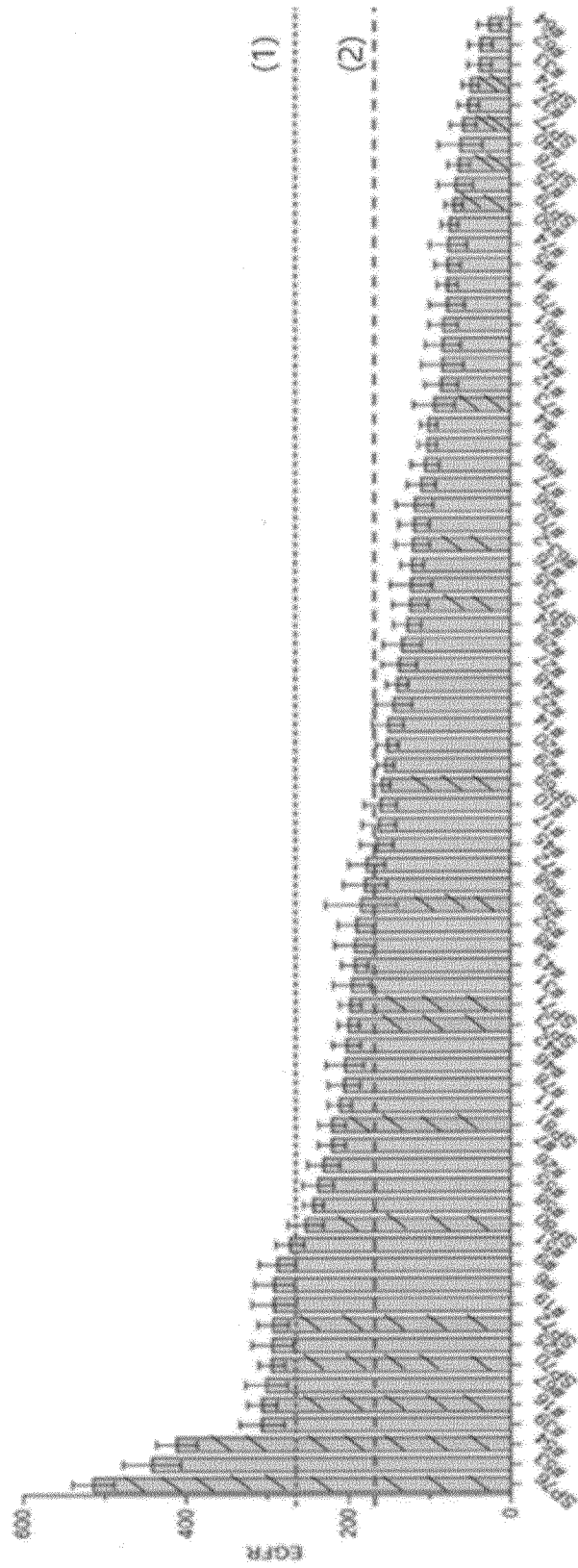
	세발	비세발
Cutoff passed	8	4
Cutoff failed	3	32



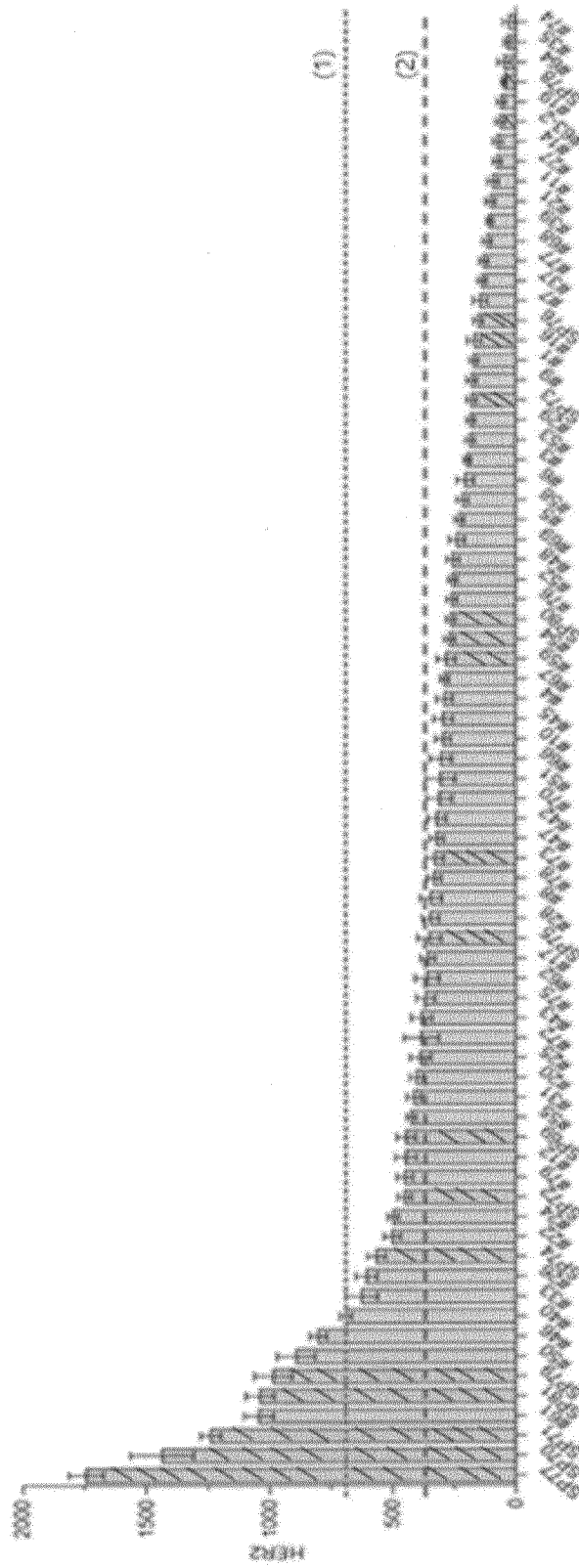
【도 3b】



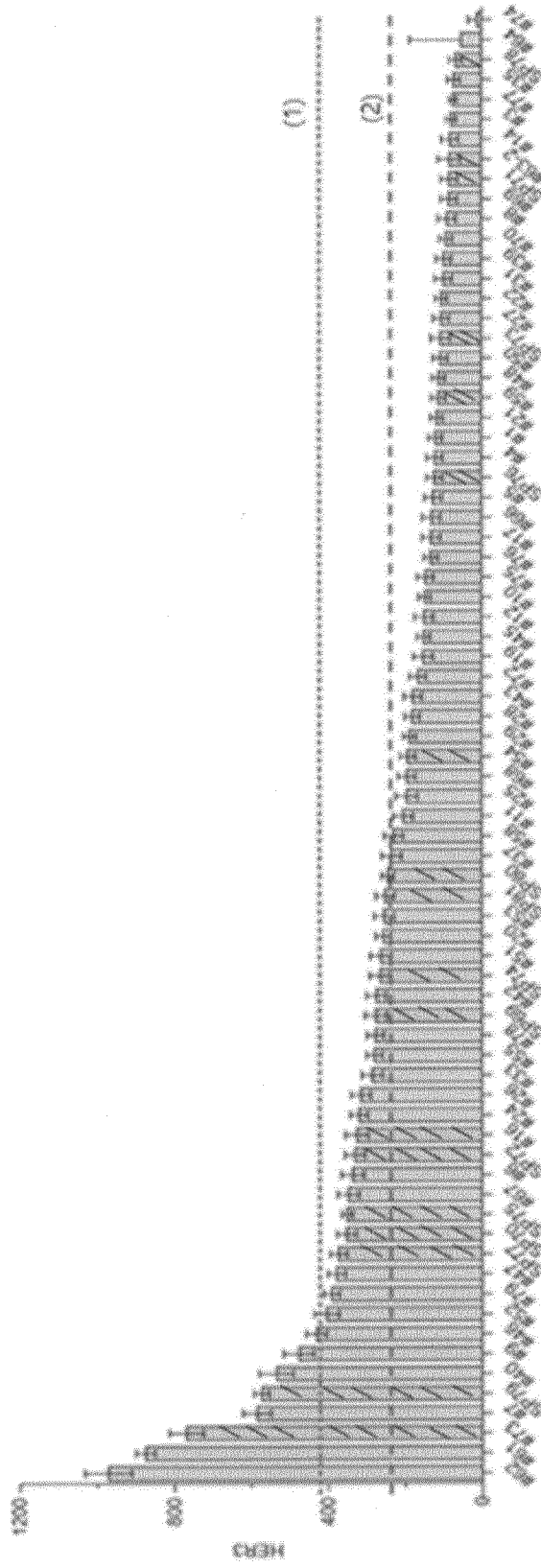
【도 4a】



【도 4b】



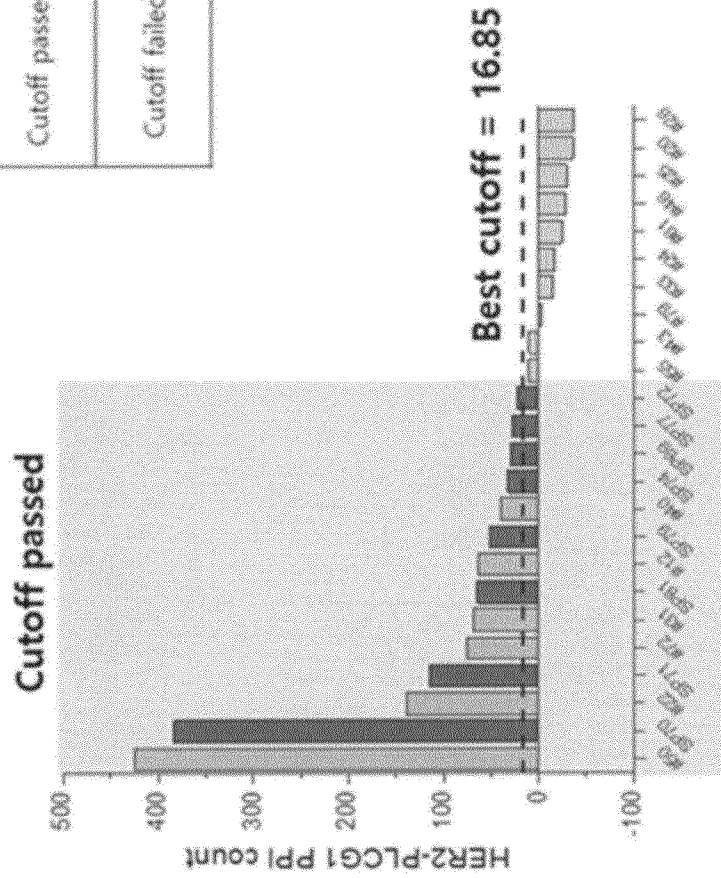
【도 4c】



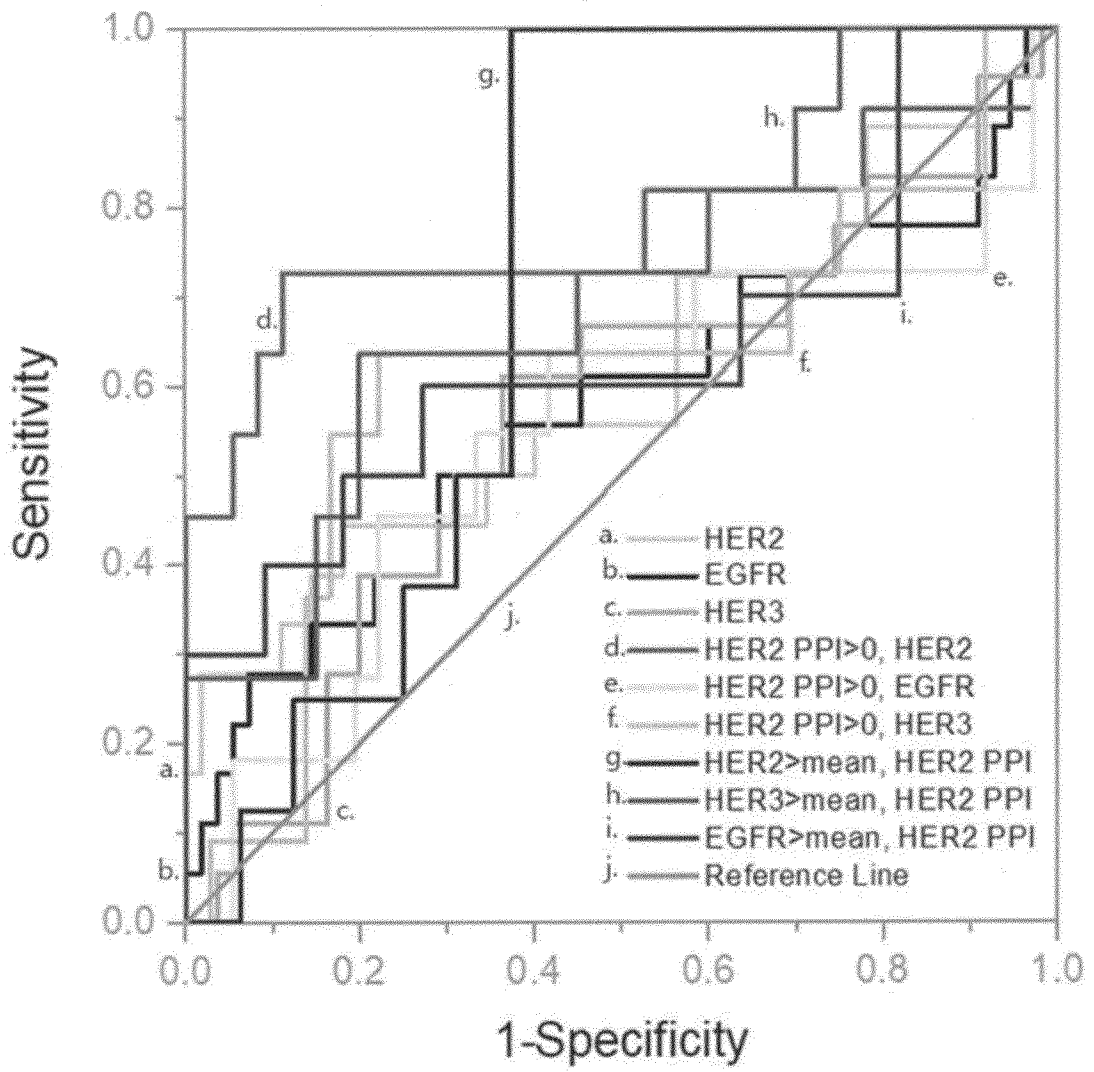
【도 5】

	%
Sensitivity	100%
Specificity	62.5%
PPV	57.1%
NPV	100%

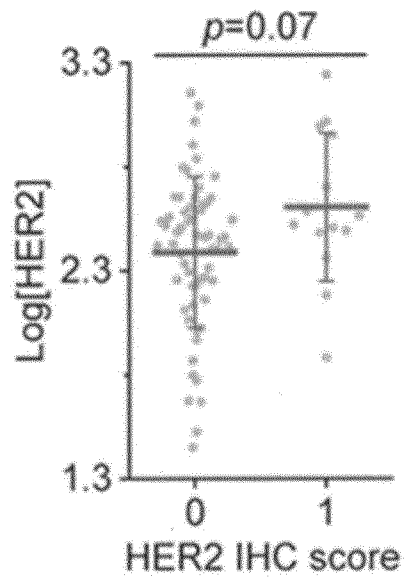
	재발	비재발
Cutoff passed	8	6
Cutoff failed	0	10



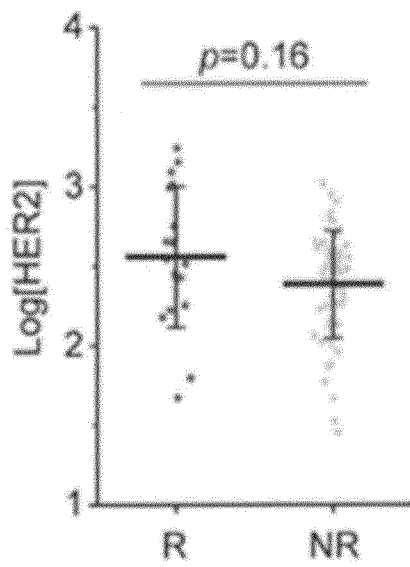
【도 6】



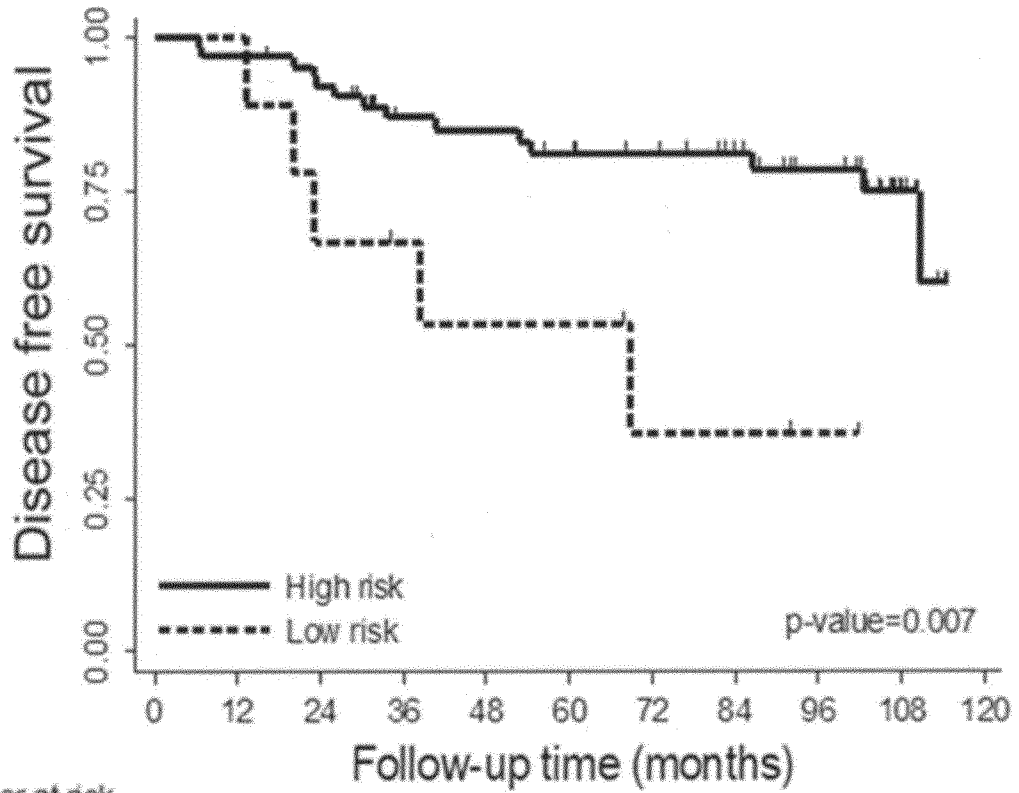
【도 7】



【도 8】

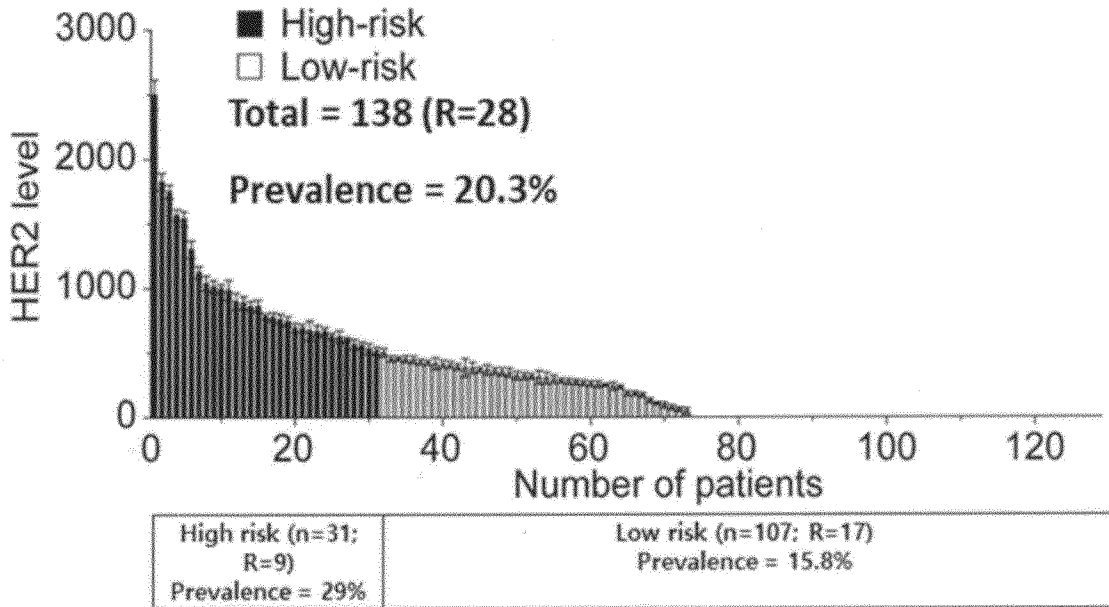


【도 9】

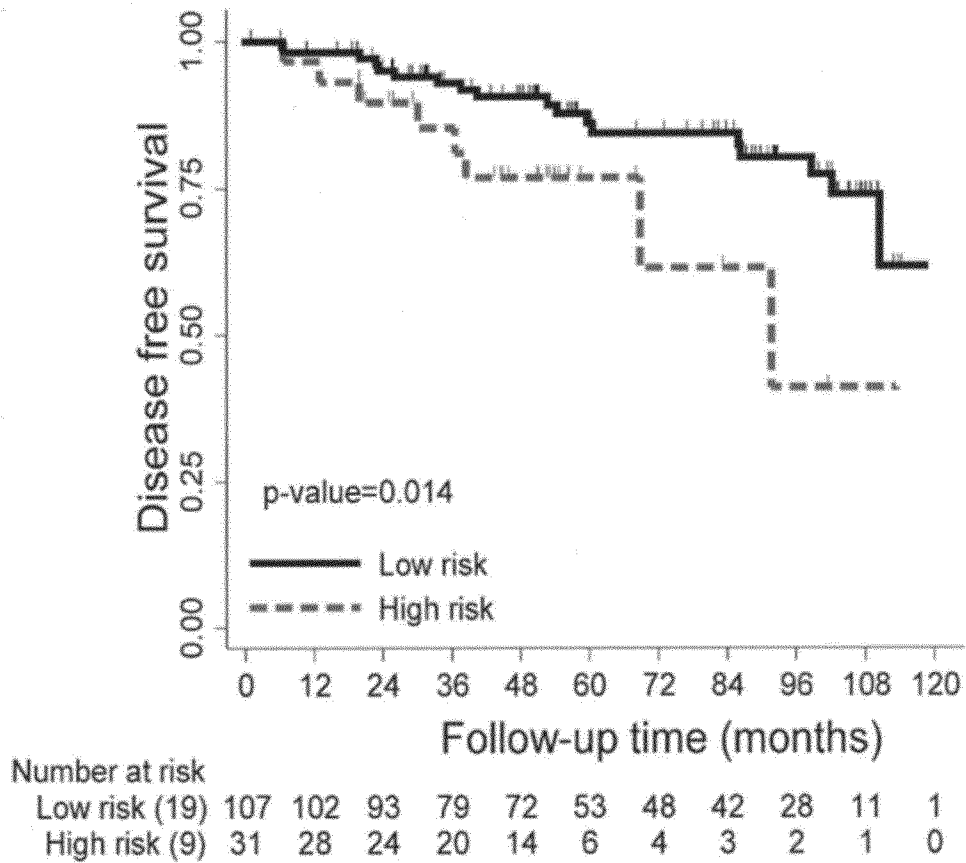


Number at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
High risk	63	61	57	46	45	41	37	32	26	10	0
Low risk	9	9	6	5	4	4	2	2	1	0	0

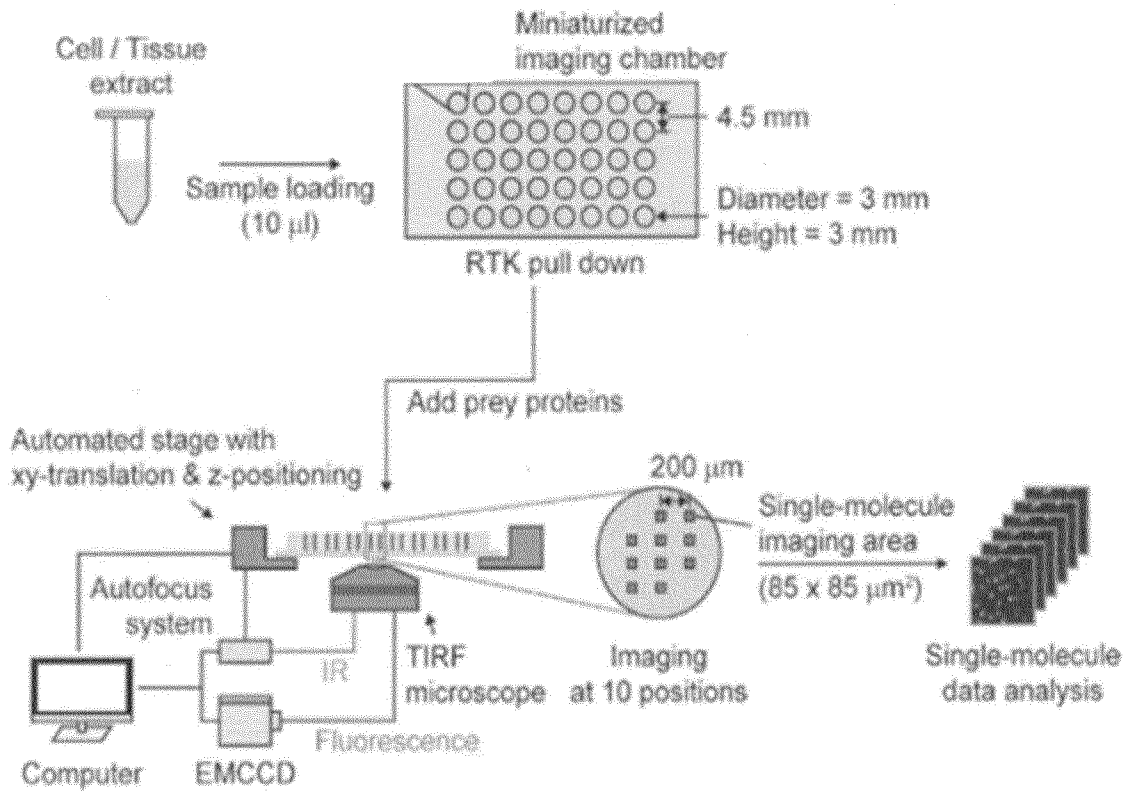
【도 10】



【도 11】



【도 12】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(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; A61K 39/395; A61K 48/00; G01N 33/68

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, recurrence, HER2, PLC-gamma, HER3, expression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BALZ, L. M. et al. The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC- γ 1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination. <i>Journal of Pathology</i> . 2012, vol. 227, pages 234-244 See abstract; and pages 234, 235.	1-8
X	GILCREASE, M. Z. et al. Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. <i>The American Journal of Surgical Pathology</i> . 2009, vol. 33, pages 759-767 See abstract; and page 759.	9-13
Y		1-8
X	KR 10-2011-0120890 A (LABORATORY CORPORATION OF AMERICA HOLDINGS) 04 November 2011 See claims 1-6, 13-20; and paragraphs [0005], [0052].	9-13
A	LEE, H. W. et al. Profiling of protein-protein interactions via single-molecule techniques predicts the dependence of cancers on growth-factor receptors. <i>Nature Biomedical Engineering</i> . Electronic publication on 02 April 2018, vol. 2, pages 239-253 See the entire document.	1-13



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

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DITTMAR, T. et al. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of e-erbB-2 receptor via epidermal growth factor receptor. The FASEB Journal. Electronic publication on 19 September 2002, vol. 16, no. 13, pages 1823-1825 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2012-0055450 A (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 31 May 2012 See the entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013761

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0120890 A	04/11/2011	AU 2010-204576 A1	01/09/2011
		AU 2010-204583 A1	25/08/2011
		AU 2010-204583 A2	01/09/2011
		BR P11007048 A2	10/02/2016
		BR P11007321 A2	10/07/2018
		CA 2749817 A1	22/07/2010
		CA 2749846 A1	22/07/2010
		CA 2749846 C	07/08/2018
		CN 102439452 A	02/05/2012
		CN 102439452 B	15/04/2015
		CN 102460152 A	16/05/2012
		CN 102460152 B	26/11/2014
		EP 2387711 A1	23/11/2011
		EP 2387711 B1	22/04/2015
		EP 2387717 A1	23/11/2011
		EP 2387717 B1	10/12/2014
		ES 2526519 T3	13/01/2015
		ES 2535723 T3	14/05/2015
		IL 214067 A	31/08/2011
		IL 214072 A	31/08/2011
		IL 214072 B	31/08/2016
		JP 2012-515226 A	05/07/2012
		JP 2012-515353 A	05/07/2012
		JP 2014-074724 A	24/04/2014
		JP 5615986 B2	29/10/2014
		JP 5746051 B2	08/07/2015
		KR 10-2011-0120891 A	04/11/2011
		SG 10201408392 A	29/01/2015
		SG 172983 A1	29/08/2011
		SG 172984 A1	29/08/2011
		US 2010-0210034 A1	19/08/2010
		US 2010-0233732 A1	16/09/2010
		US 2013-0071859 A1	21/03/2013
		US 2014-0370523 A1	18/12/2014
		US 2016-0061839 A1	03/03/2016
		US 2017-0082626 A1	23/03/2017
		US 8349574 B2	08/01/2013
		US 9110066 B2	18/08/2015
		US 9766242 B2	19/09/2017
		WO 2010-083463 A1	22/07/2010
WO 2010-083463 A9	23/12/2010		
WO 2010-083470 A1	22/07/2010		
KR 10-2012-0055450 A	31/05/2012	KR 10-1292163 B1	12/08/2013
		KR 10-1371127 B1	10/03/2014
		KR 10-2012-0055449 A	31/05/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574; A61K 39/395; A61K 48/00; G01N 33/68 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 유방암(breast cancer), 재발(recurrence), HER2, PLC-gamma, HER3, 발현(expression)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	BALZ, L. M. 등, `The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC-γ 1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination`, Journal of Pathology, 2012, 227권, 페이지 234-244 초록; 및 페이지 234, 235	1-8
X	GILCREASE, M. Z. 등, `Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer`, The American Journal of Surgical Pathology, 2009, 33권, 페이지 759-767 초록; 및 페이지 759	9-13
Y		1-8
X	KR 10-2011-0120890 A (래버러토리 코포레이션 오브 아메리카 홀딩스) 2011.11.04 청구항 1-6, 13-20; 및 단락 [0005], [0052]	9-13
A	LEE, H. W. 등, `Profiling of protein-protein interactions via single-molecule techniques predicts the dependence of cancers on growth-factor receptors`, Nature Biomedical Engineering, 전자공개 2018.04.02, 2권, 페이지 239-253 전체 문헌	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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 2020년 02월 05일 (05.02.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 02월 05일 (05.02.2020)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	DITTMAR, T. 등, `Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via epidermal growth factor receptor`, The FASEB Journal, 전자공개 2002.09.19, 16권, 13호, 페이지 1823-1825 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2012-0055450 A (한양대학교 산학협력단) 2012.05.31 전체 문헌	1-13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0120890 A	2011/11/04	AU 2010-204576 A1	2011/09/01
		AU 2010-204583 A1	2011/08/25
		AU 2010-204583 A2	2011/09/01
		BR PI1007048 A2	2016/02/10
		BR PI1007321 A2	2018/07/10
		CA 2749817 A1	2010/07/22
		CA 2749846 A1	2010/07/22
		CA 2749846 C	2018/08/07
		CN 102439452 A	2012/05/02
		CN 102439452 B	2015/04/15
		CN 102460152 A	2012/05/16
		CN 102460152 B	2014/11/26
		EP 2387711 A1	2011/11/23
		EP 2387711 B1	2015/04/22
		EP 2387717 A1	2011/11/23
		EP 2387717 B1	2014/12/10
		ES 2526519 T3	2015/01/13
		ES 2535723 T3	2015/05/14
		IL 214067 A	2011/08/31
		IL 214072 A	2011/08/31
		IL 214072 B	2016/08/31
		JP 2012-515226 A	2012/07/05
		JP 2012-515353 A	2012/07/05
		JP 2014-074724 A	2014/04/24
		JP 5615986 B2	2014/10/29
		JP 5746051 B2	2015/07/08
		KR 10-2011-0120891 A	2011/11/04
		SG 10201408392 A	2015/01/29
		SG 172983 A1	2011/08/29
		SG 172984 A1	2011/08/29
		US 2010-0210034 A1	2010/08/19
		US 2010-0233732 A1	2010/09/16
		US 2013-0071859 A1	2013/03/21
		US 2014-0370523 A1	2014/12/18
		US 2016-0061839 A1	2016/03/03
		US 2017-0082626 A1	2017/03/23
		US 8349574 B2	2013/01/08
		US 9110066 B2	2015/08/18
		US 9766242 B2	2017/09/19
		WO 2010-083463 A1	2010/07/22
WO 2010-083463 A9	2010/12/23		
WO 2010-083470 A1	2010/07/22		
KR 10-2012-0055450 A	2012/05/31	KR 10-1292163 B1	2013/08/12
		KR 10-1371127 B1	2014/03/10
		KR 10-2012-0055449 A	2012/05/31