



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0109624  
(43) 공개일자 2020년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2018.05)  
C12Q 1/686 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0028920  
(22) 출원일자 2019년03월13일  
심사청구일자 2019년03월13일

(71) 출원인  
연세대학교 원주산학협력단  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1  
(72) 발명자  
이혜영  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미  
래관 205호  
김정호  
서울특별시 서대문구 연희로16길 20 썬빌 303호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인키

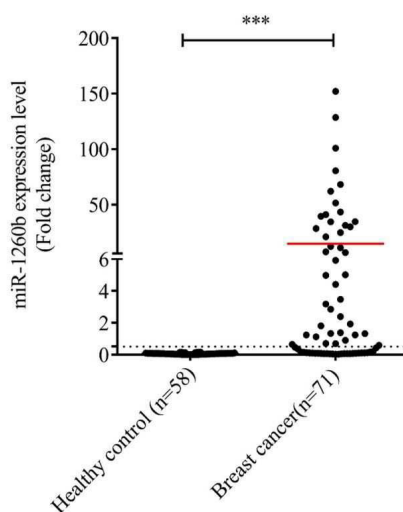
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 실시간 역전사효소 중합반응 기반 유방암 환자의 스크리닝을 위한 혈장에서 miR-1260b 발현을 이용한 분자진단법 및 그 키트

(57) 요약

본 발명은 실시간 역전사효소 중합반응기반 유방암 환자의 스크리닝 정보를 제공하는 miR-1260b 발현을 이용한 분자진단법 및 그 키트에 관한 것으로 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 방법 및 조성물은 신속하게 환자의 혈장을 이용하여 miR-1260b 발현양상을 통하여 효과적인 유방암 진단 및 예후에 도움을 줄 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

**안성우**

강원도 원주시 배율로 24 중흥 프로라디움아파트  
208동 1305호

**박선영**

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래  
관 216호

**황다솜**

강원도 원주시 흥업면 세동길 51, 104동 611호 (원  
주매지청솔아파트)

**하선목**

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 216호

**김승일**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 러들러교수동  
208호

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 대상의 혈장로부터 microRNA를 분리하는 단계;
- b) 상기 분리된 microRNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
- c) 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계; 및
- d) 상기 증폭된 miR-1260b 발현량을 정상인과 비교하는 단계;를 포함하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 증폭된 양을 정상인에 대해 증폭된 양과 비교하고 그 발현을 분석하는 단계는 표준 또는 컷오프 값에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 컷오프 값은 0.1199인 것을 특징으로 하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 4

제 1항 또는 2항에 있어서, 상기 방법은  $C_T$ 값을 사용하며, 상기  $C_T$  값은 PCR과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 사이클의 수치를 의미하는 것을 특징으로 하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 마이크로RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계에 사용된 프라이머는 서열번호 1의 프라이머인 것을 특징으로 하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 2 및 3에 기재된 프라이머인 것을 특징으로 하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 7

- a) 대상의 혈장로부터 microRNA를 분리하는 단계;
- b) 상기 분리된 microRNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
- c) 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계; 및
- d) 상기 증폭된 miR-1260b 발현량을 정상인과 비교하는 단계;를 포함하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 증폭된 양을 정상인에 대해 증폭된 양과 비교하고 그 발현을 분석하는 단계는 표준 또는 컷오프 값에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 컷오프 값은 0.1199인 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 10

제 7항 또는 8항에 있어서, 상기 방법은  $C_T$ 값을 사용하며, 상기  $C_T$  값은 PCR과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 사이클의 수치를 의미하는 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 상기 마이크로RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계에 사용된 프라이머는 서열번호 1의 프라이머인 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 2 및 3에 기재된 프라이머인 것을 특징으로 하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법.

#### 청구항 13

서열번호 2 및 3의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단용 프라이머 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 프라이머를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 프라이머 조성물.

#### 청구항 15

서열번호 4의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단용 조성물.

#### 청구항 16

서열번호 2 및 3의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 유방암 예후 예측용 프라이머 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 프라이머를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 유방암 예후 예측용 프라이머 조성물.

#### 청구항 18

서열번호 4의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 예후 예측용 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 실시간 역전사효소 중합반응 기반 혈장에서 miR-1260b 발현을 이용하여 유방암 환자의 스크리닝정보를 제공하는 진단법 및 그 키트에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 유방암은 전 세계적으로 매년 약 522,000명이 사망하는 질환으로 전체 여성 암 중 폐암 다음으로 2번째로 사망률이 높은 암이다 (Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.)

[0004] 2015년 대한민국에서는 갑상선 암에 이어 두 번째로 발병률이 높은 암으로 68.2%의 발병률을 보였다 (Jung, K.W., et al., Cancer Res Treat, 2018. **50**(2): p. 303-316.).

[0005] 유방암은 초기에 발견되어 치료를 진행하게 되면 유방암 생존율을 향상시킬 수 있기 때문에, 유방암의 조기진단은 매우 중요하다. 따라서 유방암의 조기진단 및 스크리닝에 도움을 주는 새로운 바이오 마커 발굴이 중요하다.

[0006] microRNA (miRNA 또는 miR)는 18-25 nucleotide의 단일 가닥 RNA 분자로서 mRNA 3'UTR에 결합하여 진핵생물의

유전자 발현을 억제하는 물질이다 (Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, Nucleic Acids Research, 2014. **42**(D1): p. D68-D73.).

- [0007] microRNA의 생성은 Drosha (RNase III)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 microRNA로 만들어지고, 세포질로 이동하여 Dicer에 의해 절단되어 성숙한 microRNA로 만들어진다고 알려져 있다 (Achkar, N.P., D.A. Cambiagno, and P.A. Manavella, *miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway*. Trends Plant Sci, 2016. **21**(12): p. 1034-1044.).
- [0008] 최근에 유전자 발현을 조절하고 전이와 침윤으로 종양을 형성하도록 세포기전을 조절하는 잠재적 바이오 마커로써 microRNA가 연구되고 있다. 다양한 microRNA가 종양형성과 관련되어 있다고 알려져 있다 (Stahlhut, C. and F.J. Slack, Genome Med, 2013. **5**(12): p. 111., Kasinski, A.L. and F.J. Slack, Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 849-64.).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 실시간 중합효소 연쇄반응 기반 분자진단을 이용하여 유방암 환자의 스크리닝 정보를 제공하는 분자진단법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 분자진단을 이용하여 유방암 환자의 스크리닝 정보를 제공하는 진단용 키트를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 a) 대상의 혈장로부터 microRNA를 분리하는 단계; b) 상기 분리된 microRNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; c) 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계; 및 d) 상기 증폭된 miR-1260b 발현량을 정상인과 비교하는 단계;를 포함하는 유방암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 증폭된 양을 정상인에 대해 증폭된 양과 비교하고 그 발현을 분석하는 단계는 표준 또는 컷오프 값에 의하여 수행되는 것이 바람직하고, 상기 컷오프 값은 0.1199인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은  $C_T$  값을 사용하며, 상기  $C_T$  값은 PCR과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 사이클의 수치를 의미한다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 마이크로RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계에 사용된 프라이머는 서열번호 1의 프라이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고,
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 2 및 3에 기재된 프라이머인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 또한 본 발명은 a) 대상의 혈장로부터 microRNA를 분리하는 단계; b) 상기 분리된 microRNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; c) 상기 합성된 cDNA를 miR-1260b 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계; 및 d) 상기 증폭된 miR-1260b 발현량을 정상인과 비교하는 단계;를 포함하는 유방암 환자의 생존률의 예후에 대한 정보제공방법을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 서열번호 2 및 3의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단용 프라이머 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 프라이머를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0021] 또 본 발명은 서열번호 4의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명은 서열번호 2 및 3의 프라이머를 유효성분으로 포함하는 유방암 예후 예측용 프라이머 조성물을

제공한다.

- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 프라이머를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 또 본 발명은 서열번호 4의 프로브를 유효성분으로 포함하는 유방암 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 구현 예에 있어서, cDNA 합성에 필요한 시약으로 버퍼 및 dNTP, MMLV, DTT를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다. 또한, 상기 프로브는 형광이 표지된 것이 바람직하나 이에 한정 아니한다.
- [0026] 본 발명은 miR-1260b 프라이머와 프로브를 이용한 유방암 환자의 miR-1260b 발현을 확인하는 조성물을 제공한다.
- [0028] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0029] 본 발명에서는 유방암 환자와 건강인의 혈장 샘플을 이용하여 microRNA-1260b의 발현분석을 통해 건강인 대비 유방암 환자에서 높게 발현됨을 확인하였고, 초기 병기에서도 높게 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0030] 본 발명은 유방암환자의 스크리닝에 대한 정보를 제공하기 위한 분자진단 검사법으로 실시간 중합효소 연쇄반응 법기반을 이용하여 유방암으로 진단된 환자 혈장의 RNA를 이용하여 상기 키트의 임상적 유용성을 평가해 보았다.
- [0031] 본 발명의 실시간 중합효소연쇄반응 분자진단법기반 진단키트는 miR-1260b 유전자를 증폭하는 프라이머를 포함 하며, 형광 프로브를 이용하여 miR-1260b에 특이적인 PCR (RT-qPCR)로 유전자 발현 양의 정량 검사를 수행한다.
- [0032] 한 환자내의 miR-1260b의 발현양 측정값을 구하여 정량화하는 분자진단 검사법으로 구성되었다. 역전사효소 중 합반응 (1시간) 및 실시간 중합효소 연쇄반응법을 진행하는 데 걸리는 시간은 PCR 진행 (1시간)내에 확인이 가 능한 부분이 큰 장점이다.

### 발명의 효과

- [0034] 본 발명은 신속하게 환자의 혈장을 이용하여, miR-1260b 발현양상을 통하여 효과적인 유방암 진단 및 예후에 도 움을 줄 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 정상인 대비 유방암환자의 혈장에서의 miR-1260b 발현양상 분석결과의 실시 예,  
 도 2는 임상적 유용성을 확인하기 위한 miR-1260b의 ROC 분석 결과의 실시 예,  
 도 3은 유방암 병기별에 따른 miR-1260b의 발현양상 분석결과의 실시 예,  
 도 4는 유방암 환자의 조직을 이용하여 miR-1260b의 발현에 따른 예후를 분석한 것으로, (A)는 유방암 환자 총 102명에 대한 miR-1260b 발현에 따른 생존율, (B)는 병기 I-II에서의 miR-1260b 발현에 따른 생존율, (C)는 병 기 III에서의 miR-1260b 발현에 따른 생존율을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 비한정적인 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시 예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

- [0039] 실시예 1. 혈장 검체로부터 RNA의 분리 및 역전사효소 중합반응

- [0040] 1) 재료

- [0041] 본 발명에 사용된 검체는 신촌 세브란스병원에서 71명의 유방암 환자의 혈장을 대상으로 환자의 임상정보를 알고 있는 검체를 대상으로 실시하였다.
- [0043] 2) 혈액으로부터 혈장 분리
- [0044] 암 환자 및 정상인의 정맥에서 혈액을 EDTA 항응고제가 들어 있는 튜브를 사용하여 채취한다. 혈장 분리를 위해서, 채취한 혈액을 4° C, 600 xg에서 15분간 원심분리 후 혈장 층을 취하여 새로운 1.5ml 튜브에 옮긴다.
- [0046] 3) 분리된 혈장으로부터 microRNA 분리
- [0047] 분리된 혈장으로부터 microRNA 분리는 NucleoSpin miRNA Plasma (MACHEREY-NAGEL)을 이용하여 RNA를 제조 업체의 프로토콜에 따라 추출하였다.
- [0048] 4) cDNA 합성
- [0049] 추출된 RNA 5 µL와 TaqMan microRNA reverse transcription 시약(Applied Biosystem, USA) (100mM dNTPs(0.15µL), Reverse transcriptase(50 U/µL)(1µL), 10 x reverse transcription buffer (1.5µL), RNase inhibitor(20 U/ µL)(0.19 µL), nuclease free water (4.16µL) 그리고 miR-1260b specific RT primer (3µL))을 16 °C에서 30 분간, 42 °C에서 30 분간, 85 °C에서 5 분간 반응하여 합성하였다.
- [0051] 5) miR-1260b 유전자 증폭 및 발현양 확인
- [0052] 상기 실시예 1)~4)을 통해 준비한 환자의 cDNA로부터 miR-1260b 유전자를 검출하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.
- [0053] 실험과정의 조성은 10 µL 2x Tunderbird 프로브 qPCR (Toyobo, Osaka, Japan), 1µL 20 x miR-1260b specific primer, 7.6µL nuclease-free water 그리고 1.4µL 주형 cDNA, 최종 용량 20 µL 로 수행한다. PCR 반응은 95 °C에서 10 분간, 95 °C에서 15 초간, 60 °C에서 1 분으로 40 사이클을 수행하여 실시간으로 발현 양을 확인할 수 있다.
- [0054] miR-1260b의 발현은 형광이 배경 형광보다 훨씬 높은 값을 초과하는데 필요한 PCR 사이클의 수로 정의되는 C<sub>T</sub>를 측정하여 정량화하였다. miR-1260b의 양은 CFX Manager Software v1.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 참조 유전자에 상대적인 microRNA를 측정하는 비교 C<sub>T</sub> 방법 (Δ ΔCT 방법)을 사용하여 결정 하였다 (Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8).
- [0055] 본 발명에서 Δ ΔC<sub>T</sub>는
- [0056]  $\Delta \Delta C_T = 2^{-[\text{환자군(miR-1260b - reference)CT} - \text{정상군(miR-1260b - reference) C_T}]}$ 으로 계산하였다.
- [0057] 여기에서 C<sub>T</sub> 값이란 PCR 과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작하는 사이클의 수치를 의미한다.
- [0058]

**표 1**

miRNA ID	Primer/probe		Sequence
miR-1260b	RT primer	서열 번호 1	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACATGGTG
	Forward primer	서열 번호 2	CAGATCCCACCACTGC
	Reverse primer	서열 번호 3	GTGCAGGGTCCGAGGT
	Probe	서열 번호 4	(6-FAM) GGATACGACATGGTGG (MGB)

[0060] 표 1은 본 발명에서 사용한 miR-1260b 프라이머와 프로브 정보

[0062] 6) 조직학적 분석

[0063] 6-1) 유방암 환자 조직 샘플

[0064] 6-2) 면역조직화학염색법 (Immunohistochemistry; IHC)

[0065] 파라핀 블록을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고 충분히 건조시킨 후 BenchMark ST (Ventana medical system, USA) 자동면역염색기기를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 슬라이드 염색한 후 암세포의 세포막에 ER, 그리고 PR 단백질이 염색되는 정도가 10% 이상일 때 ER 그리고 PR 양성으로 진단하였다.

[0066] HER2 단백질의 경우 염색되는 정도에 따라 4가지 등급, 즉 0, 1+, 2+, 3+으로 나누어 판정한다. 그 중에서 0, 1+ 일 경우 HER2 음성으로 진단하고, 3+일 경우 양성으로 진단하였으며, 2+일 경우 환자의 임상정보에 따라 양성 혹은 FISH를 수행하여 진단하였다.

[0068] 6-3) 형광동소보합법 (Fluorescence in situ Hybridization; FISH)

[0069] HER2 IHC법에서 2+가 나온 환자를 대상으로 하여, 파라핀으로 고정되어 있는 조직 블록을 microtome을 이용하여 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후, 탈파라핀화 및 함수 과정을 거쳐 상용화된 HER2 DNA probe kit (Vysis Inc, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 진행하였다.

[0070] HER2 발현 여부는 유전자 발현 정도에 따라서 Amplification Index가 2.2이상일 경우 양성으로 판독하였다.

[0072] 7) 통계학적 분석

[0073] GraphPad Prism 소프트웨어 버전 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) 및 SPSS Statistics 소프트웨어 버전 21.0 (IBM, Armonk, YN, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행 하였다. Mann-Whitney test와 Kruskal-Wallis test를 사용하여 통계적 유의성을 각각 non-parametric 통계치로 결정하였다.

[0074] 사례는 중앙값 miR-1260b 발현 수준에 의해 두 그룹으로 나누었다. miR-1260b의 발현과 다양한 임상 병리학 적 매개 변수간의 연관성을 Fisher's exact test로 분석하였다. 생존은 Kaplan-Meier 방법으로 추정하고 log-rank test로 평가하였다. 예후 가치에 대한 다변량 분석은 Cox 비례 위험 모델을 사용하여 평가하였다. 0.05 미만의 p값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 표 2

[0077]	microRNA	Has-miR-1260b
	Stem-loop Accession#	MI0014197
	Stem-loop sequence	UCUCCGUUUUCCCCACCACUGCCACCAUUAUUGCUACUGUUCAGCAGGUGCUGCUGGUGGAUGGUGAUAGUCUGGUGGGGCGGUGG
	Mature microRNA	miRBase Accession #: MIMAT0015041 miRBase ID: hsa-miR-1260b Mature miRNA Sequence: AUCCACCACUGCCACCAU

[0078] 표 2는 본 발명의 Has-miR-1260b에 대한 정보이다.

[0080] 상기의 실시예의 결과를 하기에 서술한다.



[0082] 신촌 세브란스병원으로부터 사용된 환자의 특성은 표 1에 요약되어있다. 본 연구에서의 검체 구성은 정상인 58명, stage 0 10명(14.1%), stage I 33명(46.5%), stage II 12명(16.9%), stage III 16명(22.5%) 이다 [표 3].

표 3

Characteristics	Healthy control	Breast cancer	P value
	n, (%)	n, (%)	
No. of participants	58 (100.0)	71 (100.0)	
Age (years)			0.274
< 50	40 (69.0)	42 (59.2)	
≥ 50	18 (31.0)	29 (40.8)	
TNM stage			
0		10 (14.1)	
I		33 (46.5)	
II		12 (16.9)	
III		16 (22.5)	

[0085] 표 3은 신촌 세브란스병원 정상 및 유방암 환자의 임상정보 결과

[0088] 유방암 환자에서 정상인 대비 miR-1260b 발현양은 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) [도 1].

[0089] 임상적 유용성을 확인하기 위해, ROC 곡선 분석이 수행되었으며, 곡선 아래의 면적 (AUC) 값에 의해 민감도와 특이도를 확인하였다. AUC 값이 1.0에 가까울수록 민감도와 특이도는 100%에 가깝다.

[0090] miR-1260b의 AUC 값은 0.88 [95 % 신뢰 구간 (CI) 0.83-0.94]이었다 [도 2]. 임상적인 ROC 곡선 분석에 따라 도출된 cut-off를 이용하여, 민감도와 특이성을 확인하였을 때, miR-1260b의 최적 cut-off 값은 0.1199이고, 그에 따른 민감도는 71.83%, 특이도는 89.66%이었다 [표 4].

표 4

Cut off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
0.1173	71.83%(59.90-81.87)	87.93% (76.70-95.01)	87.93% (78.18-93.68)	71.83% (63.47-78.91)
0.1199	71.83%(59.90-81.87)	89.66% (78.38-96.11)	89.47% (79.71-94.84)	72.22% (63.97-79.20)
0.1226	70.42%(58.41-80.67)	89.66% (78.83-96.11)	89.29% (79.38-94.75)	71.23% (63.12-78.18)
0.1252	69.01%(56.92-79.46)	89.66% (78.83-96.11)	89.09% (79.03-94.65)	70.27% (62.30-77.17)

[0094] 표 4는 ROC curve 분석을 통해 얻은 miR-1260b의 임상적 컷오프 값에 따른 민감도, 특이도, 양성 예측값, 음성 예측값.

[0096] 유방암 환자에서 stage에 따른 miR-1260b의 발현양을 확인하기 위해, stage별로 miR-1260b의 발현양을 분석하였다. Stage에 따른 miR-1260b의 발현양의 차이를 보이지 않았으며, early stage (stage 0-II)에서도 정상인 대비 통계학적으로 높게 발현하였다 [도 3].

[0097] 유방암 조직에서의 miR-1260b의 발현 수준과 임상 병리학 적 특성의 관계를 알아 보기 위해 miR-1260b 발현을 RT-qPCR로 102개의 유방암 조직을 이용하여 측정 하였다. 신촌 세브란스 병원으로부터 모집된 환자의 특징은 표 2에 요약되어 있다. 유방암 환자 102명의 연령은 30-84세 (평균  $\pm$  SD, 49.5 $\pm$ 11.3세, 95% CI, 47.3-51.8)였다. 102명의 유방암 환자 중 I-II 병기는 70명 (63.6%), III-IV 병기는 31명 (30.4%), 알려지지 않은 병기 1명 (1.0%) 이었다. 조직 학적 등급은 I-III 등급이 65명 (63.7%), III 등급이 35명 (34.3%) 그리고 알려지지 않은 등급이 2명 (2.0%)이었다. HER2 양성율, ER 양성율, PR양성율은 각각 28.4%, 69.9%, 및 41.1%였다(표 5).

표 5

[0098]

Characteristics	Breast cancer patients	
	n = 102	%
Age (years)		
< 50	54	52.9
$\geq$ 50	48	47.1
TNM stage		
I - II	70	68.6
III-IV	31	30.4
Unknown	1	1.0
Histologic grade		
I - II	65	63.7
III	35	34.3
Unknown	2	2.0
Tumor size (cm)		
< 2	56	54.9
$\geq$ 2	46	45.1
Unknown	0	0.0
Lymph node invasion		
No	55	53.9
Yes	42	44.1
Unknown	2	2.0
HER2 <sup>a</sup>		
Negative	73	71.6
Positive	29	28.4
Unknown	0	0.0
ER <sup>b</sup>		
Negative	31	30.4
Positive	71	69.9
Unknown	0	0.0
PR <sup>c</sup>		
Negative	60	58.8
Positive	42	41.2
Unknown	0	0.0
miR-1260b expression		
Low	50	49.0
High	52	51.0
Unknown	0	0.0

[0100] 표 5는 102명 유방암 환자 조직의 임상정보 결과

[0101] 유방암 조직에서 miR-1260b 및 환자의 임상정보 (나이, TNM 병기, 조직학적 등급, 종양의 크기, 림프절 침윤, HER2, ER, 및 PR)의 연관성을 알아보기 위해 miR-1260b 발현을 중앙값에 따라 저 발현 군과 과 발현 군으로 나눈 후, 임상적 연관성을 분석하였다. miR-1260b의 발현에서 TNM 병기, 림프노드 침윤, 종양의 크기, HER2, 및

PR과 통계적으로 유의한 상관관계를 확인하였다(표 6).

표 6

[0103]

Variable	n	miR-1260b expression		p value
		Low, n (%)	High, n (%)	
연령 (years)				0.172
< 50	54	30 (55.6)	24 (44.4)	
≥ 50	48	20 (41.7)	28 (58.3)	
TNM stage				< 0.001
I / II	70	45 (64.3)	25 (35.7)	
III/IV	31	5 (16.1)	26 (83.9)	
Histological grade				0.092
Well/moderate	65	37 (56.9)	28 (43.1)	
poor	35	13 (37.1)	22 (62.9)	
Tumor size				< 0.001
< 2 cm	56	37 (66.1)	19 (39.9)	
≥ 2 cm	46	13 (28.3)	33 (71.7)	
림프 노드 침윤				< 0.05
No	55	35 (63.6)	20 (36.4)	
Yes	45	15 (33.3)	30 (66.7)	
HER2				< 0.01
Negative	73	42 (57.5)	31 (42.5)	
Positive	29	8 (27.6)	21 (72.4)	
ER				0.086
Negative	31	11 (35.5)	20 (64.5)	
Positive	71	39 (54.9)	32 (45.1)	
PR				< 0.05
Negative	60	24 (40.0)	36 (60.0)	
Positive	42	26 (61.9)	16 (38.1)	

[0104]

표 6은 miR-1260b 발현과 환자의 임상정보와의 상관성 분석

[0106]

생존 분석을 통한 예후를 분석하였다. miR-1260b의 발현과 전체 생존율 사이의 연관성을 Kaplan-Meier 분석 및 log-rank으로 조사하였다. 결과는 miR-1260b의 높은 발현이 전체 생존율 저하와 유의한 상관관계가 있음을 보여주었다 ( $p < 0.0001$ )(도 4). miR-1260b 발현의 다변량 Cox 비례 위험 모델 분석은 miR-1260b의 높은 발현이 전체 생존율에 대해 독립적인 예후 인자임을 보여준다. (Hazard ratio = 5.112,  $p < 0.05$ )(표 7)

표 7

[0108]

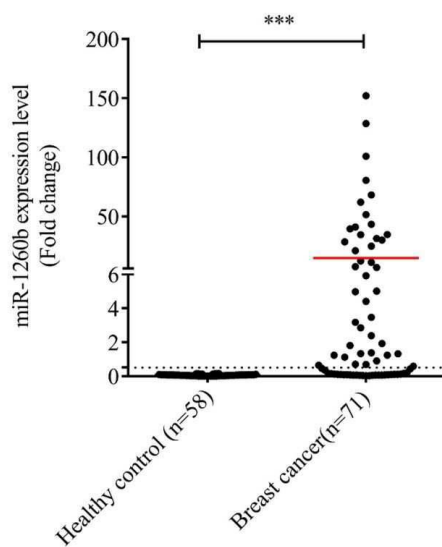
특성	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
연령 (years)						
< 50 vs ≥ 50	0.804	0.279-2.318	0.687			
TNM 단계						
I II vs IIIIV	9.020	3.009-27.039	< 0.001	6.053	1.935-18.932	< 0.01
조직학적 등급						
Well/ moderate vs Poor	0.848	0.891-2.893	0.848			
종양 크기(cm)						
< 2 vs ≥ 2	5.622	1.567-20.169	< 0.01	5.723	1.593-20.557	< 0.01
림프노드 침윤						
No vs Yes	4.281	1.342-13.658	< 0.05	3.599	1.067-12.134	< 0.05
HER2						

Negative vs Positive	4.714	1.635-13.598	< 0.05	3.766	1.230-11.528	< 0.01
ER						
Negative vs Positive	0.350	0.123-0.998	< 0.05	0.315	0.104-0.955	< 0.05
PR						
Negative vs Positive	0.449	0.141-1.431	0.176			
miR-1260b 발현						
Low vs High	8.523	1.906-38.109	< 0.01	5.112	1.080-24.197	< 0.05

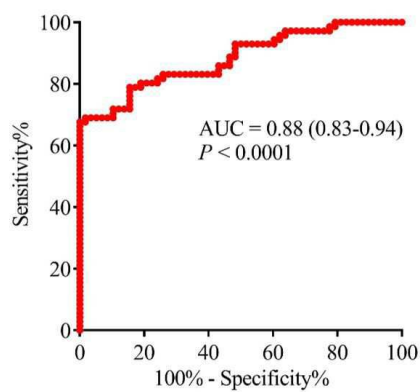
[0109] 표 7은 miR-1260b 발현 및 환자의 임상 인자들의 위험도 분석

## 도면

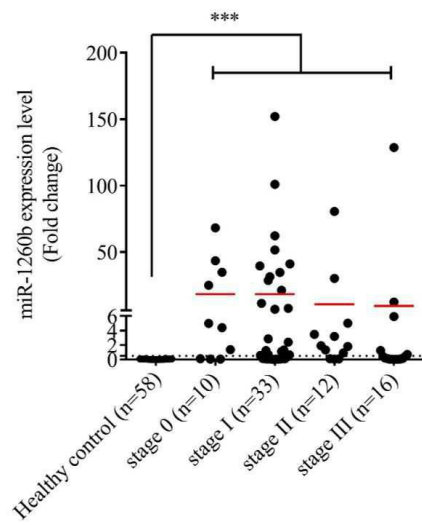
### 도면1



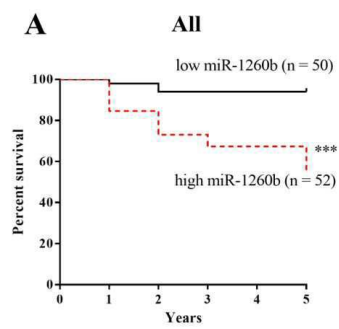
### 도면2



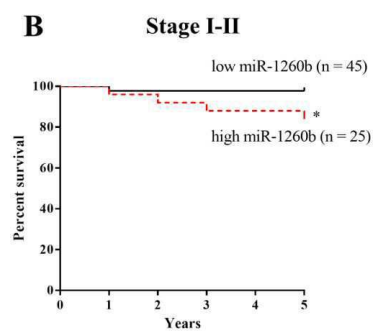
도면3



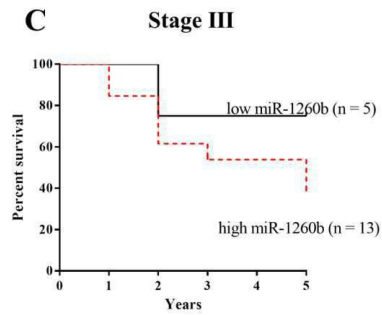
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110> YONSEI UNIVERSITY WONJU INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> A method for miR-1260b expression using plasma for providing screening in breast cancer, and a kit therefor based reverse transcription real time PCR

<130> P19-0013HS

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT Primer

<400> 1

gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgacatggtg 50

<210

> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer

<400> 2

cagatccac cactgc 16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer

<400> 3

gtgcagggtc cgaggt

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 4

ggatacgaca tgggtg

16