



(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

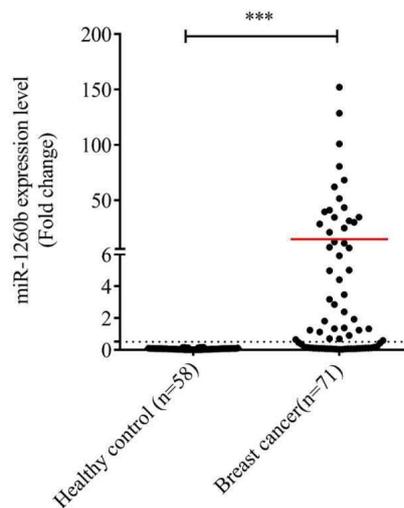
전체 청구항 수 : 총 18 항

(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 배울로 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 증합효소연쇄반응법을 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 증합효소연쇄반응법을 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 만들어진다 (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 발현양을 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 발현양을 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 평가해보았다.
- [0031] 본 발명의 실시간 중합효소연쇄반응 분자진단법기반 진단키트는 miR-1260b 유전자를 증폭하는 프라이머를 포함하며, 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 중합반응 (1시간) 및 실시간 중합효소 연쇄반응법을 진행하는 데 걸리는 시간은 PCR 진행 (1시간)내에 확인이 가능한 부분이 큰 장점이다.

**발명의 효과**

- [0034] 본 발명은 신속하게 환자의 혈장을 이용하여, miR-1260b 발현양상을 통하여 효과적인 유방암 진단 및 예후에 도움을 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 병기 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(0.15 μL), Reverse transcriptase(50 U/ μL)(1 μL), 10 x reverse transcription buffer (1.5 μL), RNase inhibitor(20 U/ μL)(0.19 μL), nuclease free water (4.16 μL) 그리고 miR-1260b specific RT primer (3 μL))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), 1 μL 20 x miR-1260b specific primer, 7.6 μL nuclease-free water 그리고 1.4 μL 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]  $\Delta \Delta C_T = 2^{-[\text{환자군}(\text{miR-1260b} - \text{reference})C_T - \text{정상군}(\text{miR-1260b} - \text{reference}) C_T]}$ 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	UCUCCGUUUUACCCACCACUGCCACCAUUAUUGCUACUGUUCAGCAGGUGCUGCUGGUGAUGGUGAUAGUCUGGUGGGGCGGUGG
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 ± SD, 49.5±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. 조직학적 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
≥ 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
≥ 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]

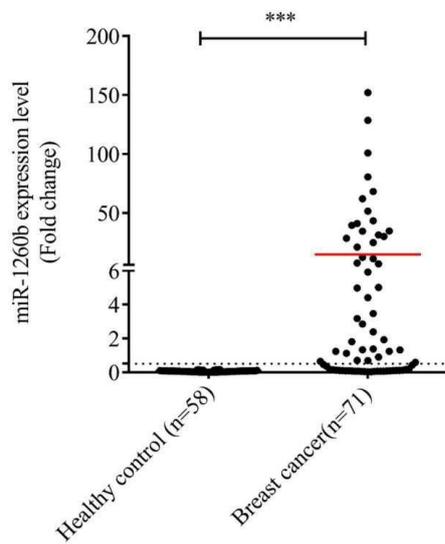
특성	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
연령 (years)						
< 50 vs ≥ 50	0.804	0.279-2.318	0.687			
TNM 단계						
I II vs IIIIV	9.020	3.009-27.039	< 0.001	6.053	1.935-18.932	< 0.01
조직학적 등급						
Well/ moderate vs Poor	0.848	0.891-2.893	0.848			
종양 크기(cm)						
< 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

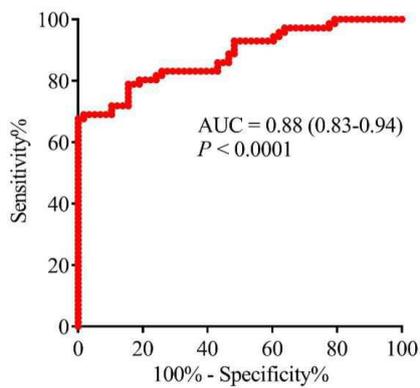
[0109] 표 7은 miR-1260b 발현 및 환자의 임상 인자들의 위험도 분석

도면

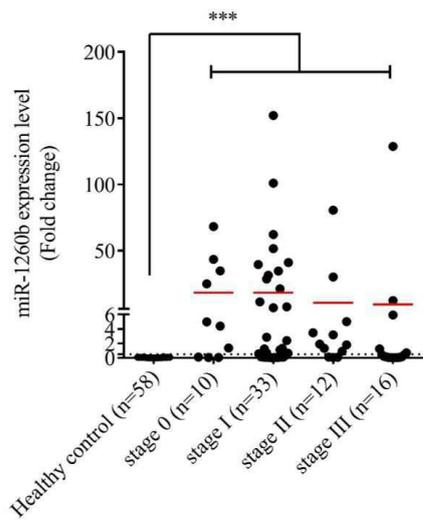
도면1



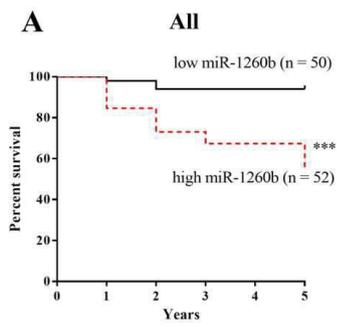
도면2



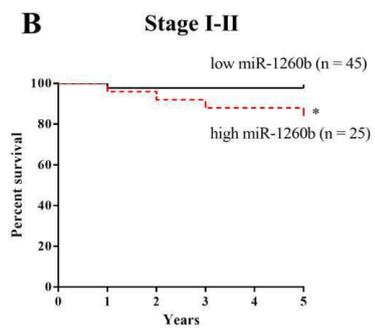
도면3



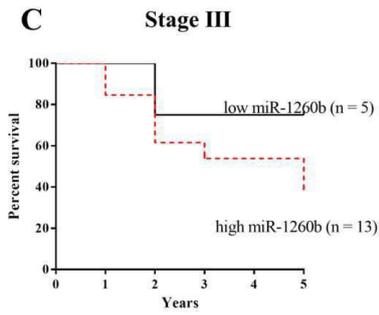
도면4a



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 gtcagggtc cgaggtattc gactggata cgacatggtg 50

<210

> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer

<400> 2

cagatcccac 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 tggtagg

16