



등록특허 10-2559496



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월25일

(11) 등록번호 10-2559496

(24) 등록일자 2023년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2527/107 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2022-0051454

(22) 출원일자 2022년04월26일

심사청구일자 2022년06월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180014283 A

KR1020210044441 A

WO2019028556 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

세종대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

김영준

서울특별시 강남구 논현로160길 31, 청록빌라 202호(신사동)

김시초

서울특별시 도봉구 노해로44길 52, 302호(쌍문동, 북한산빌리지)

하정실

서울특별시 강남구 논현로160길 31, 청록빌라 202호(신사동)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 30 항

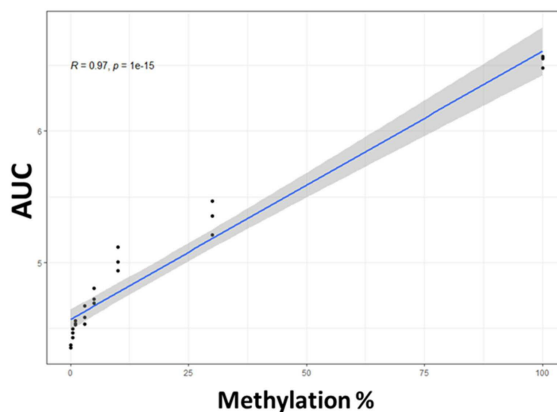
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물 및 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물 및 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6c



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/143 (2019.08)

C12Q 2600/154 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155613
과제번호	2017M3A9A7050614
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업/바이오·의료기술개발사업
연구과제명	대장암 특이적 정밀진단 마커 개발을 위한 다중유전체 데이터 연계 확장 분석
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2022.01.01~2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

확인 대상 핵산의 타겟 부위를 증폭하기 위한 프라이머 세트를 포함하며,

상기 프라이머 세트는,

- (1) 메틸화 정방향 프라이머, 비메틸화 정방향 프라이머, 및 역방향 프라이머; 또는
- (2) 정방향 프라이머, 메틸화 역방향 프라이머, 및 비메틸화 역방향 프라이머를 포함하며,

상기 메틸화 정방향 프라이머 및 상기 메틸화 역방향 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하고,

상기 비메틸화 정방향 프라이머 및 상기 비메틸화 역방향 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함하며,

상기 TpG 서열은 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열이 변환된 것인,

확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TpG 서열은 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 변형시키는 제제는 비메틸화 사이토신 잔기를 티민으로 변환하는 것인, 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 변형시키는 제제는 아황산, 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 및 다이설파이트로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CpG 인식 부위 또는 상기 TpG 인식 부위는, 상기 메틸화 정방향 프라이머, 상기 메틸화 역방향 프라이머, 상기 비메틸화 정방향 프라이머, 또는 상기 비메틸화 역방향 프라이머의 3' 말단으로부터 40 개 염기 이내에 위치하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 타겟 부위는 CpG 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 타겟 부위는 50 내지 150 bp 크기인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 프라이머는 15 내지 40개 염기를 포함하는 크기인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (1)의 역방향 프라이머, 또는 상기 (2)의 정방향 프라이머는, 확인 대상 핵산의 CpG 또는 TpG 인식 부위를 5개 이하 포함하는 것인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 (1)의 메틸화 정방향 프라이머 및 비메틸화 정방향 프라이머의 T_m 차이; 또는 상기 (2)의 메틸화 역방향 프라이머 및 비메틸화 역방향 프라이머의 T_m 차이는 15°C 이하인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 (1)의 메틸화 정방향 프라이머 및 비메틸화 정방향 프라이머; 또는 상기 (2)의 메틸화 역방향 프라이머 및 비메틸화 역방향 프라이머는, 100:1 내지 1:100의 농도비로 포함되는 것인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 확인 대상 핵산은 생물학적 시료에 포함된 것인, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 확인 대상 핵산 및 비메틸화된 확인 대상 핵산을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 메틸화된 확인 대상 핵산의 농도는, 상기 비메틸화된 확인 대상 핵산의 농도의 75% 이하인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 확인 대상 핵산은 암 진단용 마커를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 식도암, 위암, 직장암, 결장직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 비소세포폐암, 결장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 담도암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 흑색종, 뇌암, 두경부암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 요로암, 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 18

생물학적 시료에 포함된 확인 대상 핵산에서, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 단계; 및

상기 생물학적 시료에, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 처리하여 증폭하는 단계를 포함하는, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 변형시키는 단계는, 상기 생물학적 시료에, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제를 처리하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 정량하는 단계는 상기 생물학적 시료, 상기 확인 대상 핵산이 100% 메틸화된 시료, 및 상기 확인 대상 핵산이 100% 비메틸화된 시료의 정규화된 용융 곡선 (melting curve)의 AUC (Area under the curve)를 비교하여, 상기 생물학적 시료의 메틸화 정도를 정량하는 것인, 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 (melt curve)을 얻는 단계;

확인 대상 핵산의 메틸화 비율을 알고 있는 생물학적 시료의 정규화 용융 곡선 (normalized melt curve)를 얻는 단계; 및

상기 생물학적 시료의 용융 곡선 및 상기 정규화 용융 곡선을 비교하여, 상기 생물학적 시료의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 24

생물학적 시료에 포함된 확인 대상 핵산에서, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 단계;

상기 생물학적 시료에, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 처리하여 증폭하는 단계; 및

상기 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 단계를 포함하고,

상기 확인 대상 핵산은 암 진단용 마커를 포함하는 것인,

암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 암 진단용 마커 핵산은 암 환자에서 메틸화 또는 비메틸화된 것인, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 수준을 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 식도암, 위암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 키트.

청구항 29

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하며, 상기 확인 대상 핵산은 암 마커를 포함하는 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 30

제29항에 따른 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물 및 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] DNA 시료의 메틸화 수준을 측정하는 방법으로 qMSP, MethyLight, 및 MS-HRM 등이 존재하며, 모든 방법은 각 시료의 메틸화 수준을 상대적으로 확인하도록 구축되었다. 예를 들어, qMSP 방법은 동일한 양의 DNA 시료에 대하여 메틸화 (또는 비메틸화) 주형 가닥에만 결합하는 프라이머를 이용하여 해당 조건의 DNA를 시료에서 증폭시켜 만들어지는 DNA 양을 PCR Cq값을 측정하여 메틸화 수준을 확인하는 방법이다. MethyLight 방법은 qMSP에 프로브를 추가하여 증폭된 DNA 중 확인 대상 마커에 특이적인 DNA를 결합하게 하여 측정의 특이성을 높이는 방법이다. 또한, MS-HRM 방법은 사용하는 DNA 시료의 메틸화 상태에 상관없이 주형 가닥에 결합할 수 있는 프라이머를 사용하며, 증폭산물의 프라이머 결합 영역을 제외한 곳에 일정 수의 CpG를 포함시켜 온도 증가에 따른 증폭산물의 녹는점 차이의 신호를 확인하는 방법이다.

[0003] qMSP 및 MethyLight 분석은 프라이머 설계에 제한사항이 크지 않기 때문에 실험적 설계에 있어서 간편하다는 장점이 있고, 상대적으로 높은 민감도를 구현할 수 있다. 하지만 분석에 사용하는 시료 양을 보정하기 위한 추가적인 대조군 마커 분석이 필요하고, 그 결과를 이용하여 측정치를 보정하므로 정량적 분석이 간접적이고 제한적이며, 제2종오류 (type 2 error)의 빈도가 높다. 또한, 특정 주형 가닥의 편향된 증폭은 각 DNA 시료의 비특이적 증폭 빈도를 증가시킬 수 있어 특이도가 낮아지는 단점이 있다. 특이도를 보완하기 위한 방안으로 개발된 MethyLight의 경우 증폭산물에 특이적으로 결합 가능한 형광 프로브가 추가로 필요하며, 이는 비용적 증가 및 분석 시험 설계의 어려움을 증가시키는 단점이 된다. 또한 많은 경우 프로브의 특이적인 결합은 PCR의 증폭 효율을 감소시켜 매우 적은 양의 시료 분석이 어려운 한계가 있다.

[0004] MS-HRM 분석의 경우 동일 시험관 내에서 메틸화 및 비메틸화 핵산을 동시에 증폭시키므로 추가적인 대조마커 분석이 없이도 MSP보다 더 직관적으로 DNA 시료의 메틸화 수준을 정량적으로 측정할 수 있다. 하지만 프라이머 설계를 위해서 CpG가 프라이머 내에 포함되지 않거나 비특이적 염기를 포함시켜야 한다는 설계적 제한점 때문에 특이적인 분석법 개발이 쉽지 않다. 또한 프라이머 내 CpG가 없을 경우 메틸화된 가닥보다 비메틸화된 가닥에 편향되어 결합하는 문제점이 있고, 시료에 대한 검증 결과의 비메틸화 편향성으로 인하여 제1종오류 (type 1 error)가 발생할 수 있고, 암 진단과 같이 민감한 메틸화 변이 측정이 요구되는 실험에서는 실제 시료 내의 메틸화 비율을 낮게 측정하거나 부정확한 결과를 도출하는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 예는 종래의 실험적 검증법들의 단점을 보완한 메틸화 여부 확인 방법을 구축하고자 하였다. 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법은, 동일 시험관내에서 대조마커 분석 없이 상대적인 메틸화 비율을 측정 가능하고, 증폭 효율에 방해되는 프로브를 사용하지 않아 검출 민감도가 높다. 또한 혈액 등의 생물학적 시료에서 매우 낮은 비율의 메틸화 수준을 측정하기 위해 메틸화 및 비메틸화 DNA의 증폭 효율을 조절할 수 있다.

[0006] 본 발명의 일 예에 따른 조성물 및 방법은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 혼용 사용하여 비특이적 증폭 산물 발생이 발생하지 않고, 원하는 표적 핵산이 극미량 존재하는 조건에서도 기존의 PCR 기반의 분석방법보다 더 민감하게 시료의 메틸화 수준을 측정할 수 있다.

[0007] 본 발명의 일 예는 DNA 시료의 메틸화 수준을 측정하는 종래 방법들의 단점을 보완하여, 높은 민감도로 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물 및 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 일 예는 다양한 DNA 메틸화 마커에 범용적으로 적용할 수 있는 프라이머 설계 전략법 및 최적화 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료, 예컨대 혈액에 존재하는 cfDNA (cell-free DNA) 중 암 환자에서 소량으로 존재하는 ctDNA (circulating tumor DNA)의 DNA 메틸화 수준을 시료 내 반-정량 방법을 통해 확인하여, 이를 기반으로 높은 민감도 및 특이도를 달성하는, 암 진단 방법, 암 진단을 위한 정보를 제공하는

방법, 암 진단용 조성물, 또는 암 진단용 키트를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 예는 확인 대상 핵산의 타겟 부위를 증폭하기 위한 프라이머 쌍을 포함하는, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료에 포함된 확인 대상 핵산에서, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 단계; 및 상기 생물학적 시료에, 상기 조성물을 처리하여 증폭하는 단계를 포함하는, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0013] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0014] 본 발명의 일 예는 확인 대상 핵산의 메틸화 수준을 측정하는 종래의 실험적 검증법들의 단점을 보완한 확인 대상 핵산의 메틸화 수준을 측정하는 신규한 방법에 관한 것이다. 구체적으로, MS-HRM 프라이머 설계 시 프라이머 내에 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하는 메틸화 프라이머를 사용하고, 메틸화 주형 가닥만 증폭되는 것을 방지하기 위해 비메틸화 주형 가닥의 증폭에 사용될 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함하는 비메틸화 프라이머를 혼용하여 사용하였다. 이 때, MS-HRM의 상대적으로 낮은 민감도 및 TpG를 포함한 프라이머의 편향적 증폭을 방지하고자 PCR의 프라이머 어닐링(annealing) 단계의 온도를 조절하여 CpG를 포함한 프라이머의 결합 기회를 증가시키고 TpG를 포함한 프라이머의 결합 기회를 감소시키는 방법을 구축하였다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 “메틸화”는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착된 것을 의미한다. 예를 들어, 메틸화는 특정 유전자 또는 핵산의 특정 CpG 부위의 사이토신에 일어난 것일 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서 용어 “메틸화 여부” 또는 “메틸화 상태”는 특정 유전자 또는 핵산의 특정 CpG 부위의 사이토신에 일어난 메틸화 여부를 의미한다. 구체적으로, 염기서열 내에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드의 5-메틸-시토신의 존재 또는 비존재를 의미한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “메틸화 수준” 또는 “메틸화 정도”는 확인 대상 핵산 내의 염기서열에 존재하는 메틸화의 양을 의미한다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “CpG 부위” 또는 “CpG 서열”은 특정 유전자 또는 핵산의 염기서열 상에 존재하는 CpG 부위를 의미한다. 상기 유전자는 발현하는데 필요하며 서로 작동 가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예컨대, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 CpG 부위일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “핵산”은 중합체 형태의 뉴클레오타이드로서, 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 올리고머, 올리고, 코딩 서열 등의 의미를 포함한다. 상기 핵산은 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 플린 및 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 비천연 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 갖는 중합체를 포함하는 의미로 사용될 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 구성요소를 “포함”한다고 기재할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0021] 본 명세서에서 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 기재된다.
- [0022] 본 명세서에서 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일 예는 확인 대상 핵산의 타겟 부위를 증폭하기 위한 프라이머 쌍을 포함하며, 상기 프라이머 쌍은 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 정방향 프라이머 및 상기 역방향 프라이머 중 1종은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 포함하며, 상기 메틸화 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하고, 상기 비메틸화 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함하며, 상기 TpG 서열은 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열이 변환된 것인, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물, 또는 상기 조성물을 포함하는 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 키트에 관한 것이다.

- [0024] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료에 포함된 확인 대상 핵산에서, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 단계; 및 상기 생물학적 시료에 상기 조성물을 처리하여 증폭하는 단계를 포함하는, 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다. 상기 변형시키는 단계는, 상기 생물학적 시료에, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제를 처리하여 수행하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 타겟 부위는 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하고자 하는 관심 부위이며, 적어도 1개 이상의 CpG 서열을 포함할 수 있다. 상기 타겟 부위의 크기는 50 내지 150 bp, 50 내지 140 bp, 50 내지 130 bp, 50 내지 120 bp, 50 내지 110 bp, 50 내지 100 bp, 60 내지 150 bp, 60 내지 140 bp, 60 내지 130 bp, 60 내지 120 bp, 60 내지 110 bp, 또는 60 내지 100 bp 일 수 있다.
- [0026] 상기 프라이머 쌍은 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 정방향 프라이머 및 상기 역방향 프라이머 중 1종은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 포함한다.
- [0027] 상기 메틸화 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하고, 상기 비메틸화 프라이머는 상기 확인 대상 핵산의 CpG 서열이 변환된 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함한다. 상기 TpG 서열은 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 CpG 서열이 변환된 것이다. 예를 들어, 상기 변형시키는 제제는 비메틸화 사이토신 잔기를 티민으로 변환하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 변형시키는 제제는 아황산, 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 및 다이설파이트로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0028] 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제를 주형 가닥에 처리하면, 주형 가닥의 CpG 사이토신이 메틸화된 상태라면 CpG 사이토신이 티민으로 전환되지 않고, CpG 사이토신이 비메틸화된 상태라면 CpG 사이토신이 티민으로 전환될 것이다.
- [0029] 상기 메틸화 프라이머의 CpG 인식 부위는, 메틸화된 확인 대상 핵산의 CpG 서열을 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 CpG 인식 부위는 CG 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 비메틸화 프라이머의 TpG 인식 부위는, 비메틸화된 확인 대상 핵산의 CpG 서열이, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 TpG 서열을 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 TpG 인식 부위는 TG 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 상기 CpG 인식 부위 및 상기 TpG 인식 부위는, 각각 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 3' 말단 부근에 위치하여, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 메틸화된 확인 대상 핵산 및 비메틸화된 확인 대상 핵산을 각각 특이적으로 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 CpG 인식 부위 및 상기 TpG 인식 부위는, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 3' 말단으로부터 40개, 35개, 30개, 25개, 20개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 또는 2개 염기 이내에, 또는 3' 말단에 위치하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 비메틸화 프라이머는 상기 메틸화 프라이머에 비해 낮은 Tm값을 가지기 때문에, 이를 보완하기 위해 비메틸화 프라이머의 5' 말단에 뉴클레오타이드를 추가하여, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 Tm을 유사하게 설계할 수 있다. 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머는 5' 말단에 뉴클레오타이드를 추가로 포함하여, 상기 메틸화 프라이머보다 큰 크기를 가지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머는 상기 메틸화 프라이머와 비교하여 5' 말단에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 또는 1개의 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머의 Tm 차이는 15℃ 이하, 14℃ 이하, 13℃ 이하, 12℃ 이하, 11℃ 이하, 10℃ 이하, 9℃ 이하, 8℃ 이하, 7℃ 이하, 6℃ 이하, 5℃ 이하, 4℃ 이하, 3℃ 이하, 2℃ 이하, 또는 1.5℃ 이하인 것일 수 있다.
- [0033] 상기 프라이머 쌍은 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머가 정방향 프라이머일 경우, 반대 방향 프라이머는 역방향 프라이머이며, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머가 역방향 프라이머일 경우, 반대 방향 프라이머는 정방향 프라이머이다. 상기 반대 방향 프라이머는 메틸화 확인 대상 핵산 및 비메틸화 확인 대상 핵산에 모두 결합할 수 있다. 이에, 상기 반대 방향의 프라이머는 CpG 결합부위를 포함하지 않는 것일 수 있으나, 확인 대상 핵산의 구조상 반대 방향 프라이머에 CpG 결합부위가 포함되는 것이 불가피할 경우, 5' 말단 부위에 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 일 예로 1개의 CpG 결합부위를 포함할 수 있다. 다만, 이 때에도 상기 반대 방향 프라이머는, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머와 유사한 Tm을 가지도록 설계하는 것이 바

람직하다.

- [0034] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머는 15 내지 40개, 15 내지 35개, 15 내지 30개, 15 내지 25개, 18 내지 40개, 18 내지 35개, 18 내지 30개, 18 내지 25개, 20 내지 40개, 20 내지 35개, 20 내지 30개, 또는 20 내지 25개 염기를 포함하는 크기일 수 있다.
- [0035] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머는 Non-CpG 사이토신을 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 이상 포함하여, 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 확인 대상 핵산에 결합 가능한 것일 수 있다.
- [0036] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머의 T_m은 50 내지 80℃, 50 내지 75℃, 50 내지 70℃, 50 내지 65℃, 55 내지 80℃, 55 내지 75℃, 55 내지 70℃, 55 내지 65℃, 60 내지 80℃, 60 내지 75℃, 60 내지 70℃, 또는 60 내지 65℃ 일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 예에 따른 조성물은, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머를 100:1 내지 1:100, 100:1 내지 1:50, 100:1 내지 1:20, 100:1 내지 1:10, 100:1 내지 1:5, 100:1 내지 1:1, 100:1 내지 1:1 미만, 100:1 내지 1.3:1, 100:1 내지 1.5:1, 100:1 내지 2:1, 100:1 내지 2.5:1, 100:1 내지 3:1, 100:1 내지 3.5:1, 100:1 내지 4:1, 50:1 내지 1:100, 50:1 내지 1:50, 50:1 내지 1:20, 50:1 내지 1:10, 50:1 내지 1:5, 50:1 내지 1:1, 50:1 내지 1:1 미만, 50:1 내지 1.3:1, 50:1 내지 1.5:1, 50:1 내지 2:1, 50:1 내지 2.5:1, 50:1 내지 3:1, 50:1 내지 3.5:1, 50:1 내지 4:1, 10:1 내지 1:100, 10:1 내지 1:50, 10:1 내지 1:20, 10:1 내지 1:10, 10:1 내지 1:5, 10:1 내지 1:1, 10:1 내지 1:1 미만, 10:1 내지 1.3:1, 10:1 내지 1.5:1, 10:1 내지 2:1, 10:1 내지 2.5:1, 10:1 내지 3:1, 10:1 내지 3.5:1, 10:1 내지 4:1, 5:1 내지 1:100, 5:1 내지 1:50, 5:1 내지 1:20, 5:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 5:1 내지 1:1, 5:1 내지 1:1 미만, 5:1 내지 1.3:1, 5:1 내지 1.5:1, 5:1 내지 2:1, 5:1 내지 2.5:1, 5:1 내지 3:1, 5:1 내지 3.5:1, 5:1 내지 4:1, 4.5:1 내지 1:100, 4.5:1 내지 1:50, 4.5:1 내지 1:20, 4.5:1 내지 1:10, 4.5:1 내지 1:5, 4.5:1 내지 1:1, 4.5:1 내지 1:1 미만, 4.5:1 내지 1.3:1, 4.5:1 내지 1.5:1, 4.5:1 내지 2:1, 4.5:1 내지 2.5:1, 4.5:1 내지 3:1, 4.5:1 내지 3.5:1, 또는 4.5:1 내지 4:1의 농도비로 포함하는 것일 수 있다.
- [0038] 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머의 농도는, 상기 메틸화 프라이머 농도의 100% 이하, 100% 미만, 99.99% 이하, 99.95% 이하, 99.9% 이하, 99.5% 이하, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 25% 이하인 것일 수 있으며, 일 예로 50% 이하인 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 예에 따른 조성물 및 방법은, 증폭 산물을 탐지하는 형광 프로브의 사용 없이 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 정확하게 확인할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 예에 따른 조성물은 형광 프로브를 포함하지 않는 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 방법은 형광 프로브를 사용하지 않는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 예에 따른 조성물 및 방법에서 메틸화 여부를 확인하는 확인 대상 핵산은 생물학적 시료에 포함된 것일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 예에 따른 조성물 및 방법은, 생물학적 시료 내 메틸화된 확인 대상 핵산의 농도가 매우 낮은 경우에도, 높은 민감도로 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인할 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 상기 생물학적 시료의 메틸화된 확인 대상 핵산의 농도는 100 ng/ul 이하, 90 ng/ul 이하, 80 ng/ul 이하, 70 ng/ul 이하, 60 ng/ul 이하, 50 ng/ul 이하, 40 ng/ul 이하, 30 ng/ul 이하, 20 ng/ul 이하, 15 ng/ul 이하, 10 ng/ul 이하, 9 ng/ul 이하, 8 ng/ul 이하, 7 ng/ul 이하, 6 ng/ul 이하, 5 ng/ul 이하, 4 ng/ul 이하, 3 ng/ul 이하, 2 ng/ul 이하, 1.5 ng/ul 이하, 1 ng/ul 이하, 0.5 ng/ul 이하, 0.4 ng/ul 이하, 0.3 ng/ul 이하, 0.2 ng/ul 이하, 0.1 ng/ul 이하, 0.05 ng/ul 이하, 0.04 ng/ul 이하, 0.03 ng/ul 이하, 0.02 ng/ul 이하, 0.01 ng/ul 이하, 0.009 ng/ul 이하, 0.008 ng/ul 이하, 0.007 ng/ul 이하, 0.006 ng/ul 이하, 또는 0.005 ng/ul 이하인 것일 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 확인 대상 핵산 및 비메틸화된 확인 대상 핵산을 포함하며, 상기 메틸화된 확인 대상 핵산의 농도는, 상기 비메틸화된 확인 대상 핵산의 농도의 75% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 19% 미만, 18% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4.5% 이하, 4% 이하, 3.5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 또는

1.1% 이하인 것일 수 있다.

- [0044] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 확인 대상 핵산 및 비메틸화된 확인 대상 핵산을 포함하며, 상기 메틸화된 확인 대상 핵산 및 상기 비메틸화된 확인 대상 핵산 전체 가닥 100% 기준으로, 상기 메틸화된 확인 대상 핵산을 100% 이하, 100% 미만, 99% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 10% 미만, 5% 이하, 5% 미만, 4.5% 이하, 4% 이하, 3.5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 또는 1% 이하 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 확인 대상 핵산을 20,000가닥 이하, 15,000가닥 이하, 10,000가닥 이하, 5,000가닥 이하, 4,000가닥 이하, 3,000가닥 이하, 2,000가닥 이하, 1,000가닥 이하, 500가닥 이하, 400가닥 이하, 300가닥 이하, 200가닥 이하, 150가닥 이하, 100가닥 이하, 90가닥 이하, 80가닥 이하, 70가닥 이하, 60가닥 이하, 50가닥 이하, 40가닥 이하, 30가닥 이하, 20가닥 이하, 10가닥 이하, 9가닥 이하, 8가닥 이하, 7가닥 이하, 6가닥 이하, 5가닥 이하, 4가닥 이하, 또는 3가닥 이하로 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 예에 따른 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법은, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 정량하는 단계는 상기 생물학적 시료, 상기 확인 대상 핵산이 100% 메틸화된 시료, 및 상기 확인 대상 핵산이 100% 비메틸화된 시료의 용융 곡선 (melting curve)의 AUC (Area under the curve)를 비교하여, 상기 생물학적 시료의 메틸화 정도를 정량하는 것일 수 있다.
- [0047] 구체적으로, 상기 정량하는 단계는, 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 (melt curve)을 얻는 단계;
- [0048] 확인 대상 핵산의 메틸화 비율을 알고 있는 생물학적 시료의 정규화 용융 곡선 (normalized melt curve)를 얻는 단계; 및 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 및 상기 정규화 용융 곡선을 비교하여, 상기 생물학적 시료의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 생물학적 시료의 용융 곡선은 정규화된 것일 수 있다. 상기 생물학적 시료의 용융 곡선은 HRM 분석을 통해 얻는 것일 수 있다. 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 비율은 메틸화된 확인 대상 핵산과 비메틸화된 확인 대상 핵산의 함량비로 얻어지는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 일 예에서, 상기 확인 대상 핵산은 암 진단용 마커를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 확인 대상 핵산은 암 진단용 마커, 예를 들어 암 환자에서 특이적으로 메틸화되거나 비메틸화된 마커를 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 예에 따른 조성물 또는 방법으로 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하여, 암 진단에 활용할 수 있다.
- [0050] 이에, 본 발명의 또 다른 일 예는, 본 발명의 일 예에 따른 확인 대상 핵산의 메틸화 여부 확인용 조성물을 포함하는, 암 진단용 조성물 또는 암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0051] 또한, 본 발명의 또 다른 일 예는, 본 발명의 일 예에 따른 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 방법으로 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 암 진단 방법 또는 암 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 상기 암 진단 방법 또는 암 진단을 위한 정보 제공 방법은, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 수준을 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 대조군은 기원한 대상을 이미 알고 있는 생물학적 시료에서 분리한 핵산을 의미하며, 간암을 가지지 않는 대상 (정상 대조군) 또는 감암을 가지는 대상에서 유래한 모든 샘플이 사용될 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 대조군으로 간암을 가지지 않는 대상 (정상 대조군)에서 유래한 샘플을 사용한 경우, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 수준이 상기 대조군에서 분리한 핵산의 메틸화 수준보다 높은 경우, 또는 상기 대조군보다 메틸화 수준이 높은 확인 대상 핵산이 생물학적 시료에 포함된 경우, 상기 확인 대상 핵산 또는 상기 생물학적 시료가 유래한 유기체 (예를 들어, 척추동물, 포유류, 설치류, 염소, 사슴, 돼지, 조류, 닭, 칠면조, 소, 말, 양, 어류, 영장류, 일 예로 인간)가 암을 가지는 것으로 결정, 진단, 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 것일 수 있다.
- [0055] 예를 들어, 대조군으로 간암을 가지는 대상에서 유래한 샘플을 사용한 경우, 상기 확인 대상 핵산의 메틸화 수준이 상기 대조군에서 분리한 핵산의 메틸화 수준과 유사한 경우, 또는 상기 대조군과 메틸화 수준이 유사한 확인 대상 핵산이 생물학적 시료에 포함된 경우, 상기 확인 대상 핵산 또는 상기 생물학적 시료가 유래한 유기체 (예를 들어, 척추동물, 포유류, 설치류, 염소, 사슴, 돼지, 조류, 닭, 칠면조, 소, 말, 양, 어류, 영장류, 일 예로 인간)가 암을 가지는 것으로 결정, 진단, 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 것일 수 있다.
- [0056] 상기 암은 간암, 대장암, 식도암, 위암, 직장암, 결장직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 비소세포폐암, 결

장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 담도암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 흑색종, 뇌암, 두경부암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 요로암, 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 간암은 간세포 암종, 간세포암, 담관암, 간내 담관암, 간 모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암, 경계불명료형 간암(vaguely nodular type HCC) 및 저혈관성 간암으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 일 예는 기존 qMSP, MethyLight 및 MS-HRM 분석 방법의 단점을 보완하여 새로운 실험적 검증법의 설계를 구축할 수 있으며, DNA 메틸화 마커를 액체 생검을 통해 검출할 수 있고, 기존 MS-HRM 분석 방법보다 더 높은 민감도를 가지며 메틸화 수준의 정량화가 가능하다.

[0059] 본 발명의 일 예는 혈액에 존재하는 circulating tumor DNA와 같이 매우 미량 존재하는 표적에 대해서 더 민감한 수준의 PCR을 진행할 수 있으며, 어닐링 온도 및 프라이머의 농도 비율에 따라 용도에 맞춰 주형 가닥에 대한 메틸화 및 비메틸화 프라이머의 결합 정도를 조절하여 실험을 설계할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1a 내지 도 1c는 종래의 MS-HRM 분석을 위해 MIP (methylation independent primer)를 사용하여 실험한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a 내지 도 2c는 MIP를 이용한 PCR 증폭시 일어나는 비메틸화 편향적 증폭을 억제하기 위해 프라이머의 5' 말단에 CpG를 포함시켜 개선을 시도한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3a 및 도 3b는 MethyLight 분석 등에 사용되는 형광 프로브를 사용할 경우 마커의 증폭을 방해하는 현상을 확인한 도면이다.

도 4a 내지 도 4c는 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 혼합하여 MS-HRM 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a는 샘플의 메틸화 비율에 따른 각 샘플의 melting peak 분포를 나타낸 도면이다.

도 5b는 샘플의 메틸화 비율에 따른 각 샘플의 HRM 분석 결과를 melting curve 분석으로 나타낸 도면이다.

도 6a는 메틸화 프라이머와 비메틸화 프라이머를 혼합하여 한 실험관에 사용하였을 경우 정량적인 증폭이 일어나는지 확인한 도면이다.

도 6b는 메틸화 비율을 나타내는 mAUC (melting curve area under curve)을 이용하여 메틸화 비율 측정의 정확성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6c는 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법은 메틸화 DNA 농도 1% 수준 (methylated DNA 3 가닥) 및 0% 농도를 구별하고, 비메틸화 DNA가 99% 농도로 존재하는 샘플에서 1%의 메틸화 DNA를 검출 가능한 것을 확인한 도면이다.

도 7은 메틸화 프라이머와 비메틸화 프라이머의 농도비에 따른 메틸화 DNA의 편향적 증폭 발생 여부를 확인한 도면이다.

도 8a 및 도 8b는 본 발명의 일 예에 다른 메틸화 여부 확인 방법을 실제 혈액에 적용하여 암을 진단한 예비임상 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0063] **비교예 1. 종래 MS-HRM 분석방법의 한계점 확인**

[0064] 확인 대상 핵산의 예시로서 서열번호 1의 서열을 가지는 핵산을 이용하여, 종래의 MS-HRM 분석방법의 한계점을 확인하였다. 서열번호 1의 핵산 서열은 간암 세포에서 특이적으로 메틸화 되어있는 간암 마커이며, 간암 세포에

서 분리된 DNA는 메틸화된 서열번호 1의 핵산을 포함할 것이고, 그 외 세포에서 분리된 DNA는 비메틸화된 서열번호 1의 핵산을 포함할 것이다. 서열번호 1의 핵산을 포함하는 다양한 샘플 및 대조군 샘플을 표 1과 같이 준비하여 실험에 사용하였다. 샘플 번호 2 내지 4의 샘플은 Qiagen에서 구입하여 사용하였으며, 샘플 번호 2는 샘플 번호 3의 gDNA를 EpiTect Bisulfite Kit를 이용하여 아황산 처리하여 사이토신 잔기가 모두 티민으로 변환된 것이고, 샘플 번호 4는 샘플 번호 3의 gDNA에 SssI methylase를 사용하여 100% 메틸화 후 EpiTect Bisulfite Kit를 이용하여 아황산 전환 처리하여 CpG 사이토신 외 사이토신이 티민으로 변환된 것이다. 샘플 번호 5 내지 7의 샘플은 PCR 반응 전 아황산 처리되어 비메틸화 사이토신이 티민으로 변환되었다.

표 1

샘플 번호	샘플명	샘플 설명	메틸화 여부
1	NTC	non-template control	-
2	EpiTect Unmet.	100% 비메틸화 샘플	X
3	EpiTect gDNA	아황산 미처리 샘플	-
4	EpiTect Met.	100% 메틸화 샘플	0
5	HEK293T	신장 세포 유래 샘플	X
6	Huh-1	간암 세포 유래 샘플	0
7	BS PBMC (NC114)	혈액 세포 유래 샘플	X

종래의 MS-HRM 분석은 아황산 처리된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 비선택적으로 증폭할 수 있도록, CpG 및 TpG 인식 부위를 포함하지 않는 메틸화 비의존적 프라이머 (methylation independent primer; MIP)를 사용한다. 사용된 메틸화 비의존적 프라이머의 서열은 다음과 같다:

- 정방향: gTgtatTatTgtTtagggTgtT (서열번호 7)

- 역방향: ccacaAAAcctccaAAcaAtAA (서열번호 8)

MS-HRM Master Mix를 표 2의 조성으로 혼합하여 제조하였다. 표 2에 기재된 용량은 1개 시료에 대한 필요량이며, 여러 개의 시료를 검사할 경우 시료 수 + 2 수준의 Master Mix를 제조하여 사용한다 (22 uL/rxn).

표 2

성분	부피
AccuPower® PCR Master Mix 2X (Bioneer)	12.5 uL
EvaGreen® Dye 20X (Biotium)	1.25 uL
정방향 프라이머 (10 uM)	1 uL
역방향 프라이머 (10 uM)	1 uL
Nuclease free water (NFW)	6.25 uL

제조된 Master Mix를 96-Well PCR plate(Hard-Shell® PCR Plates, Biorad)의 각 well에 22 uL씩 분주하였다. 표 1에 따른 샘플 7종을 0.33 ng/uL 농도를 갖도록 제조하고, 총 DNA 양이 1 ng가 되도록 각 well에 3 uL씩 분주하였다. PCR 반응은 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(BioRad)를 이용하여 변성 온도 95℃에서 5분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95℃에서 20초, 가열 냉각 온도 60℃에서 30초, 확장(extension) 온도 72℃에서 30초의 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 또한 가열 냉각 온도 30초 후 확장 온도 단계를 시작하기 전 형광 측정을 통해 각 사이클의 형광 값을 확인하였다. PCR 반응이 끝난 후, 72℃에서 5분 동안의 안정기를 거친 뒤 온도의 증가에 따른 증폭산물의 결합정도를 확인하는 melting 분석을 65℃부터 95℃까지 0.2℃씩 증가시키며 10초 간격으로 형광의 세기를 측정하여 HRM 분석을 진행하였다.

PCR 및 HRM 분석에 대한 형광값을 확인하고, melting curve 또는 peak를 확인하여 각 샘플의 특징을 확인하였다. 또한, PCR이 완료된 후 전기영동을 수행하고 증폭 산물의 사이즈가 설계된 프라이머에 의해 정확하게 생성되었는지 확인하였다.

도 1a에 나타난 바와 같이, 확인 대상 핵산이 100% 메틸화된 샘플 (EpiTect Met; 샘플번호 4)과 확인 대상 핵산이 100% 비메틸화된 샘플 (EpiTect Unmet; 샘플번호 2)의 증폭이 거의 비슷하게 나타났다. 또한, 간암세포 (Huh-1; 샘플번호 6)와, 신장세포 (Hek293T; 샘플번호 5) 및 혈액세포 (PBMC; 샘플번호 7)에서 비슷한 효율로 증폭되어, 메틸화 확인 대상 핵산 및 비메틸화 확인 대상 핵산 모두 증폭된 것을 PCR의 형광 RFU 값의 증가로

확인할 수 있었다. 그러나, 증폭이 되지 않아야 할 아황산 처리하지 않은 대조군 (EpiTect gDNA; 샘플번호 3) 및 확인 대상 핵산을 포함하지 않은 대조군 (NTC; 샘플번호 1)에서도 MIP의 결합에 의해 비특이적 증폭이 일어나는 문제점이 있었다.

[0074] 도 1b에 나타난 바와 같이, High Resolution Melting Curve (HRM) 분석을 통해 증폭된 DNA가 메틸화 마커, 비메틸화 마커와 비특이적 MIP 증폭 DNA임을 확인할 수 있었다. 또한, 도 1c에 나타난 전기영동 결과와 같이, 비특이적 증폭 DNA가 다수 존재함을 확인할 수 있었다.

[0075] 따라서, 종래의 MS-HRM 분석방법은 아황산 처리에 의해 genomic DNA 서열이 단순화되고, 아데닌, 구아닌, 및 티민으로만 구성된 MIP 프라이머 서열의 단순성으로 인해 비특이적 증폭산물의 발생이 빈번하게 나타나며, 표적 핵산의 증폭이 제한되는 문제점이 있다.

[0077] **비교예 2. 비메틸화 핵산의 편향적 증폭을 방지하기 위해 CpG 인식 부위가 추가된 프라이머를 사용한 MS-HRM 분석방법의 한계점 확인**

[0078] 메틸화 독립적인 프라이머를 이용한 PCDR 증폭시 발생하는 비메틸화 편향적 증폭을 억제하기 위해, 프라이머의 5' -말단에 CpG 서열을 포함하여 개선하고자 하였다. 실시예 1에서 사용한 MIP 프라이머를 하기 프라이머로 변경하고, 표 1의 샘플 번호 2, 3, 4 및 6번 샘플에 대해 동일한 방법으로 PCR을 수행하고, HRM 분석 및 전기영동을 수행하였다. 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다:

[0079] - 정방향: TTtCGgTtgTatTatTtgTTaggggT (서열번호 9)

[0080] - 역방향: AACGccccacaAAAcctccaAA (서열번호 10)

[0081] 도 2a에 나타난 바와 같이, MIP에 CpG를 5' 말단에 추가함으로써 메틸화 DNA가 더 유리하게 증폭될 수 있도록 편향성을 준 결과, 100% 메틸화 샘플 (EpiTect Met; 샘플번호 4) 및 간암세포 DNA (Huh-1; 샘플번호 6)은 효과적으로 증폭되었으며, 비메틸화된 DNA 시료 (EpiTect Unmet; 샘플번호 2) 및 아황산 처리하지 않은 대조군 (EpiTect gDNA; 샘플번호 3)은 증폭이 되지 않음을 확인하였다. 그러나, 도 2b의 HRM 분석 결과 및 도 2c의 전기영동 분석 결과에 나타난 바와 같이, 비메틸화 시료에서 비특이적인 증폭이 일어났다. 따라서, 비메틸화된 샘플을 메틸화로 편향성을 가중시킨 조건에서 분석할 경우 비특이적 증폭이 매우 높게 나타나는 문제점이 있었다.

[0083] **비교예 3. 형광 프로브를 사용한 MS-HRM 분석방법의 한계점 확인**

[0084] 비교예 1과 같이 수행하되, Methylite 분석 등에 사용되는 형광 프로브를 이용할 경우 PCR 증폭 효율을 확인하였다. 비교예 1과 같이 MIP를 이용하여 간암 샘플 (Huh-1; 샘플번호 2)과 100% 메틸화 샘플 (EpiTect Met; 샘플번호 1)에 대하여 MS-HRM을 수행한 결과를 도 3a에 나타냈고, 표 2의 조성에서 NFW를 10 μ L를 형광 프로브 (ggTTCGTTaCGTtgTTTt; 서열번호 11)로 대체하여 동일하게 수행한 결과를 도 3b에 나타냈다. 각 실험에서 대조군으로 아황산 미처리 샘플 (EpiTect gDNA; 샘플번호 3)을 사용하였다.

[0085] 도 3a는 메틸화 확인 대상 핵산에 특이적으로 결합하는 형광 프로브를 첨가하지 않은 경우의 증폭되는 DNA의 양을 PCR Cq 값으로 측정한 결과이며, 도 3b는 형광 프로브를 첨가하여 수행한 결과이다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 형광 프로브로 인해 Cq값이 약 4 정도 증가하여, 10 내지 20배의 증폭 효율이 감소하는 문제가 있었다.

[0087] **실시예 1. 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머 제작**

[0088] 확인 대상 핵산의 예시로서, 서열번호 1의 서열을 가지는 핵산의 메틸화 여부를 확인하기 위한 프라이머를 제작하였다. 서열번호 1의 핵산 서열을 표 3에 나타냈으며, 타겟 부위를 이탤릭 체로 표시하고, 프라이머 결합 부위에 밑줄을 그어 표시하였다. 서열번호 1의 서열에서 CpG 및 Non-CpG 사이토신을 대문자로 기재하고, 그 외의 염기는 소문자로 기재하였다. 서열번호 1의 서열에서 CpG 서열을 굵은 글자로 표시하였다.

[0089] 메틸화된 서열번호 1의 핵산 서열이 아황산 처리된 후의 핵산 서열을 서열번호 2로 나타내었고, 비메틸화된 서열번호 1의 핵산 서열이 아황산 처리된 후의 핵산 서열을 서열번호 3으로 나타냈다. 서열번호 2 및 서열번호 3에서 CpG 사이토신의 메틸화 여부에 따라 아황산 처리에 의해 차이가 발생한 염기를 굵은 글씨로 표시하였다.

[0090] 아황산 처리 후 전환될 주형 가닥의 서열을 고려하여, 정방향 또는 역방향 중 한 쪽 프라이머는 3' -말단 근처에 메틸화 또는 비메틸화 주형 가닥 중 하나에 특이적으로 결합할 수 있도록 CpG 또는 TpG 서열을 포함하도록 했다. 메틸화된 주형 가닥은 아황산 처리 후 CpG 사이토신이 티민으로 전환되지 않고 남아있으므로, 메틸화 프라이머는 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하도록 설계하고, 비메틸화 프라이머는 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함하도록 설계하였다. 이 때, 비메틸화 주형 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머가 메

틸화 주형 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머에 비해 T_m 이 낮기 때문에 이를 보완하기 위해 5' -말단에 뉴클레오타이드를 추가할 수 있다. 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머와 반대 방향의 프라이머는 메틸화 가닥 및 비메틸화 가닥의 메틸화 상태에 상관없이 결합이 가능한 프라이머로 설계하였다. 모든 프라이머가 Non-CpG 사이토신을 2개 이상 포함하여 아황산 전환 DNA 가닥에 특이적으로 결합할 수 있도록 하였다.

[0091] 정방향 프라이머는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 핵산 서열에서 147 내지 171번째 핵산에 결합할 수 있도록 설계하고, 역방향 프라이머는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 핵산 서열에서 206 내지 229번째 핵산에 결합할 수 있도록 제작하였다. 서열번호 2 또는 서열번호 3의 프라이머 결합 부위에 밑줄을 그어 표시하였다.

[0092] 정방향 프라이머는 서열번호 2의 핵산 서열에서 147 내지 171번째 핵산에 결합할 수 있는 메틸화 프라이머와, 서열번호 3의 핵산 서열에서 206 내지 229번째 핵산에 결합할 수 있는 비메틸화 프라이머 2종을 제작하였다. 제작된 프라이머의 서열을 표 3에 나타냈다. 메틸화 프라이머와 비메틸화 프라이머 서열에서 확인 대상 핵산의 메틸화 여부에 따라 달라진 서열에 밑줄을 그어 표시하였다.

표 3

구분	Sequence (5' → 3')	SEQ ID NO.
확인 대상 핵산	aggaaggagaCGgggtggCGCCaaggaaggaggagaaaaaggCGGCGagaaaaggaggaggCaagg ggaagaggaaggCGaggaggagCCTgaggagaCtCGCCCGCtCaaCCCGaCGtCCGCGCCCG gCGCCTgttggCCatggCGggCCTgggCtCGCGGttCCCGtgtggCtggCGaggaCGa CtCGGtGtCatCatCtGCCaggggCtGtggatggCCCGCaCGCtGCCtGCGCCaCagCttC tGCCGCaCtGCCtggaggCCTgtgggCGCCCGGaCGCCCGCGCtgggCtCCCCaCttGCC GCagggCGCCGCGCagCagCGCaCtGCGaagaaCaCGCtaCtGaggaCCTggCGaCaagt aCCGCGCGCGCGCaCGCGagataCaggCGggCtCCGaCCtGCCaCtGCCCGtGCCGggCtCCagt tCCCTCtCCag	1
아황산 처리된 메틸화 확인 대상 핵산	aggaaggagaCGgggtggCGTTaaggaaggaggagaaaaaggCGGTCGagaaaaggaggaggTaagg ggaagaggaaggCGaggaggagTTtgaggagaTtCGTTCGtTaaTTTCGaCGtTCGCGTTTCG gTCGTTtgttggTTatggCGggTTtgggTtTCGTCGttTTCGtgtggTtggTCGaggaCGa TTtCGGtGtTatTatTtGTTaggggTtGtggatggTTCGTTaCGTtGTTtGCGTTaTagTttT tGTCGTTaTtGTTtggaggTTTtgtgggCGTTCGCGaCGTTCGTCGtgggTTtGTTTtTtGTC GTTaggCGTCGCGTagTagTCGtaTtGCGaagaaTaCGTtaTtGTaggaTTtggTCGaTaagt aTCGTCGTCGTCGaCGCGagataTaggCGggTtTCGaTTTtGTTaTtGTTTtGTTGggTtTtagt tTTTtTtTtag	2
아황산 처리된 비메틸화 확인 대상 핵산	aggaaggagaTGgggtggTGTTaaggaaggaggagaaaaaggTGTTGagaaaaggaggaggTaagg ggaagaggaaggTGaggaggagTTtgaggagaTtTGTTGgTtTaaTTTTCGaTGtTTGTTTTCG gTTGTTtgttggTTatggTGggTTtgggTtTGTTGttTTTGtgtggTtggTTGaggaTga TTtTGgTtGtTatTatTtGTTaggggTtGtggatggTTGTTaTGTTtGTTtTGTTaTagTttT tGTTGTTaTtGTTtggaggTTTtgtgggTGTTTGTCGaTGTTTGTTGtgggTTtGTTTtTtTG GTTaggTGTTGTCGTagTagTTGtaTtTGaagaaTaTGTTaTtGTaggaTTtggTTGaTaagt aTTGTTGTTGTCGaTGTCagataTaggTGggTtTTGaTTTtGTTaTtGTTTtGTTTGggTtTtagt tTTTtTtTtag	3
정방향 메틸화 프라이머	TTatggCGggTTtgggTTtgggTtT	4
정방향 비메틸화 프라이머	TTatggTGggTTtgggTTtgggTtT	5
역방향 프라이머	caAcccctAAcaAatAatAcaAcC	6

[0094] 실시예 2. 메틸화 및 비메틸화 프라이머를 사용한 MS-HRM

[0095] 실시예 1에서 제작한 프라이머를 이용하여 MS-HRM 분석을 수행하였다. MS-HRM Master Mix를 표 4의 조성으로 혼합하여 제조하였다. 표 4에 기재된 용량은 1개 시료에 대한 필요량이며, 여러 개의 시료를 검사할 경우 시료 수 + 2 수준의 Master Mix를 제조하여 사용한다 (22 uL/rxn).

표 4

성분	부피
AccuPower® PCR Master Mix 2X (Bioneer)	12.5 uL
EvaGreen® Dye 20X (Biotium)	1.25 uL
메틸화 정방향 프라이머 (10 uM)	1 uL
비메틸화 정방향 프라이머 (10nM)	0.5 uL
역방향 프라이머 (10 uM)	1 uL
Nuclease free water (NFW):	5.75 uL

[0097] 서열번호 1의 핵산을 포함하는 다양한 샘플 및 대조군 샘플을 표 5와 같이 준비하여 실험에 사용하였다.

표 5

샘플 번호	샘플명	샘플 설명	메틸화 여부
1	NTC	non-template control	-
2	EpiTect gDNA	아황산 미처리 샘플	-
3	EpiTect Unmet. DNA	100% 비메틸화 샘플	X
4	Healthy PBMC	정상 혈액 세포 유래 샘플	X
5	EpiTect Met.	100% 메틸화 샘플	0
6	Huh-1	간암 세포 유래 샘플	0

[0099] 제조된 Master Mix를 96-Well PCR plate(Hard-Shell® PCR Plates, Biorad)의 각 well에 22 uL씩 분주하였다. 표 5에 따른 샘플 6종을 0.33 ng/uL 농도로 포함하도록 제조하고, 총 DNA 양이 1 ng가 되도록 각 샘플 3uL를 각 well에 분주하였다.

[0100] PCR 반응은 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(BioRad)를 이용하여 변성 온도 95℃에서 5분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95℃에서 20초, 가열 냉각 온도 60℃에서 30초, 확장(extension) 온도 72℃에서 30초의 사이클을 50회 반복하여 수행하였다. 또한 가열 냉각 온도 30초 후 확장 온도 단계를 시작하기 전 형광 측정을 통해 각 사이클의 형광 값을 확인하였다. PCR 반응이 끝난 후, 72℃에서 5분 동안의 안정기를 거친 뒤 온도의 증가에 따른 증폭산물의 결합정도를 확인하는 melting 분석을 65℃부터 95℃까지 0.2℃씩 증가시키며 10초 간격으로 형광의 세기를 측정하여 HRM 분석을 진행하였다.

[0101] PCR 및 HRM 분석에 대한 형광값을 확인하고, melting curve 또는 peak를 확인하여 각 샘플의 특징을 확인하였다. 또한, PCR 완료 후 전기영동을 수행하여 증폭 산물의 사이즈가 설계된 프라이머에 의해 정확하게 생성되었는지 확인하였다.

[0102] 한 시료에 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 동시에 첨가하여, 메틸화 DNA와 비메틸화 DNA가 함께 증폭될 수 있는 조건으로 확인 대상 핵산을 증폭하였다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 아황산 처리한 메틸화 DNA(EpiTect Met 및 Huh-1)와 비메틸화 DNA(EpiTect Unmet 및 PBMC)에서 동등하게 증폭이 잘 일어났으며, 대조군 샘플(NTC 및 아황산 미처리 EpiTect gDNA)에서는 증폭이 일어나지 않았다. 도 4b의 HRM 분석 결과 및 도 4c의 전기영동 분석 결과에서 특이적인 증폭만이 일어난 것을 확인하였다.

[0104] 실시예 3. 검출 한계 확인 및 메틸화 수준의 정량화

[0105] 시료의 메틸화 비율 최소 검출 한계를 확인하기 위해 PBMC (0.33 ng/uL)과 Huh-1 (0.33 ng/uL)를 혼합하여 메틸화 비율 50%, 25%, 12.5%, 또는 6.25% 시료를 제조하여 실험에 사용하였다. 각 메틸화 비율 시료를 3uL씩 각 well에 분주하고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR 반응 및 HRM 분석을 수행하여 결과를 도 5a 및 도 5b에 나타냈다.

[0106] 도 5a는 아황산처리한 간암세포 DNA를 아황산 처리한 혈액세포 DNA와 제시한 비율로 섞은 후 1ng의 DNA를 프라이머 혼합 MS-HRM 방법으로 분석하여 각 시료의 melting peak 분포를 보여준다. 메틸화 된 Huh-1 DNA의 비율에 따라서 메틸화된 DNA의 melting peak와 비메틸화된 DNA의 melting peak의 크기 및 비율이 점진적으로 변화하는 것을 알 수 있다.

[0107] 도 5b는 HRM 분석결과를 melting curve 분석으로 나타낸 도면이다. 간암세포 DNA의 증가에 따라서 melting curve의 기울기가 완만하게 증가하여 비메틸화된 혈액세포의 기울기와 100% 메틸화된 간암세포의 기울기 사이에 존재하는 것을 보여준다. 따라서, melting curve의 아래 지역 Area Under Curve의 면적을 계산하면 메틸화 비율을 정량할 수 있다. 구체적으로, 미지 시료의 melting curve AUC 및 비메틸화 100% 시료의 meting curve AUC 차이를, 100% 메틸화 시료의 melting curve AUC 및 100% 비메틸화 시료의 melting curve AUC 차이로 나눈 백분율을, 미지 시료의 메틸화 수준으로 정량할 수 있다.

[0108] 더욱 구체적으로, 온도에 따른 총 형광 값에서 지수함수 배경 노이즈(exponential background)를 제거하기 위해, 녹는점(T_m , melting temperature) 아래 구간 및 위 구간 내 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도를 선정하

고(각 T_L , T_R) 각 지점에서의 형광 변화율(dF/dT)로부터 지수함수 배경 노이즈의 파라미터를 추정한다. 추정된 파라미터로부터 지수함수 배경 노이즈 값을 계산하여 각 온도 지점 별 총 형광 값에서 제거함으로써 잔여 dsDNA 양에 비례하는 형광 데이터 함수 $M(T)$ 를 산출한다. $M(T)$ 에 대해 $[T_L, T_R]$ 의 온도구간 내에서 최대-최소 정규화(min-max normalization)를 수행하여 온도 증가에 따른 잔여 dsDNA 비율 함수 $M1(T)$ 를 산출한다. 메틸화 수준을 도출하기 위해, 각 시료로부터 $[T_L, T_R]$ 구간 내에서 $M1(T)$ 의 곡선 아래 면적(AUC)값 S 를 구하고 이 후, S 값을 기준으로 시료의 Methylation 정도를 확인할 수 있다.

[0110] **실시예 4. 검출 민감도 확인**

[0111] 혈액 내 ctDNA는 매우 낮은 농도로 존재하기 때문에 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법을 실제 혈액 검사 기반의 암 진단에 활용 가능한지 확인하기 위해 검출 한계를 확인하였다.

[0112] 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법으로 확인 가능한 최소 DNA 가닥을 확인하기 위해, PBMC 및 Huh-1 (50ng/3uL) 시료를 NFW와 희석하여 50, 30, 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 또는 0.01ng/3uL 농도의 Huh-1 시료를 제조하였다. 각 농도의 시료를 3 uL씩 각 well에 분주하고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR 반응 및 HRR 분석을 수행하였다.

[0113] 아황산 처리한 간암세포 DNA를 0.01ng부터 50ng까지 5,000배 차이 나는 양을 사용하여 메틸화 및 비메틸화 혼합 프라이머 MS-HRM 분석을 수행하고, 확인 대상 핵산의 증폭량을 PCR Cq 값 측정으로 분석하여 도 6a에 나타냈다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 0.01ng (3가닥)의 DNA를 사용하였을 때 약 38의 Cq 값에서 시작하여 50ng (15,200가닥)까지 DNA를 증가시키며 증폭을 한 결과, DNA 양 증가와 정확히 일치하는 관계로 Cq 값의 감소가 나타났다. 이 결과 메틸화 및 비메틸화 프라이머 혼합 MS-HRM 분석이 0.01ng의 DNA도 효과적으로 증폭시키며 5,000배에 걸치는 넓은 영역에서 효과적으로 증폭이 가능함을 알 수 있었다.

[0114] 다양한 양의 DNA를 분석할 때 정확한 메틸화 비율 측정이 가능한지를 메틸화 비율을 나타내는 mAUC (melting curve area under curve)을 이용하여 분석한 결과를 도 6b에 나타냈다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 각 샘플의 양에 따라 AUC값의 차이가 크지 않고 일정하게 확인되었으며, 각 샘플의 증폭산물이 확인 대상 핵산이고, 각 샘플의 메틸화 수준을 확인할 수 있었다. 따라서, 확인 대상 핵산이 최소 3가닥 포함하는 샘플에서도 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인 가능하였다.

[0115] 또한, 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법이 비메틸화 DNA가 존재하는 환경에서 표적하는 메틸화 DNA를 확인할 수 있는 최소 비율을 확인하기 위해, 비메틸화 DNA와 메틸화 DNA를 연속 희석하여 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 100 %의 시료를 준비하여 MS-HRM 분석을 진행하여, 비율에 따른 AUC값의 변화의 상관관계를 확인하여 도 6c에 나타냈다.

[0116] 도 6c에 나타난 바와 같이, 비메틸화 DNA가 존재하는 조건에서 검출 가능한 최소 비율을 확인한 결과, 메틸화 DNA 농도 1% 수준 (methylated DNA 3 가닥)에서 0% 농도와 차이가 존재하는 것을 확인할 수 있었고, AUC값과 methylated DNA의 비율 간 상관관계 분석에서도 높은 R값을 확인할 수 있었다.

[0117] 따라서, 본 발명의 일 예에 따른 메틸화 여부 확인 방법은 99%의 unmethylated DNA가 존재하는 샘플에서도 1%의 methylated DNA를 검출할 수 있는 높은 검출 민감도를 가지는 것을 확인하였다.

[0119] **실시예 6. 비메틸화 프라이머에 의한 검출 민감도 향상**

[0120] 비메틸화 프라이머에 의해 검출 민감도가 향상되는지 확인하기 위해 Huh-1 6.25, 25.0, 50.0, 또는 100.0%의 시료를 사용하였다. 실시예 5와 같이 수행하되, 표 3의 조성에서 비메틸화 정방향 프라이머의 부피를 1, 0.75, 0.5, 또는 0.25 uL로 변경하고, 이에 따라 NFW 부피를 5.25, 5.50, 5.75, 또는 6 uL로 변경하여 수행하였다.

[0121] 메틸화 프라이머와 비메틸화 프라이머의 농도비에 따라 메틸화 DNA의 편향적 증폭이 발생하는지 확인하였다. 메틸화 프라이머의 양을 0.4 uM로 고정하고, 비메틸화 프라이머의 양을 0.4, 0.3, 0.2, 0.1uM로 감소시킨 조건에서 PCR을 수행하였다.

[0122] 도 7에 나타난 바와 같이, 메틸화된 간암세포의 DNA 비율이 25% 이하로 낮은 경우, 비메틸화 프라이머의 양이 메틸화 프라이머의 50% 이하일 경우 메틸화 DNA 검출 민감도가 더욱 높아졌다.

[0123] 따라서, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 병용 사용에 의해 검출 민감도가 높아져, 낮은 농도의 메틸화 DNA, 예를 들어 cfDNA의 메틸화 여부를 확인 가능하였다.

[0125] 실시예 7. 혈액 내 암 마커의 메틸화 여부를 측정된 암 진단

[0126] 메틸화 및 비메틸화 프라이머 혼합 MS-HRM 분석을 실제 혈액에 적용하여 확인 대상 핵산의 메틸화 여부를 확인 가능한지 예비 임상을 수행하였다.

[0127] 건강한 사람 및 간암 환자로부터 10 mL의 혈액을 추출한 후 원심분리기를 사용하여 혈장을 분리하였다 (1,900g, 15분). 제조사에서 제시한 방법을 따라 MagListo™ cfDNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하여 분리된 혈장으로부터 cfDNA를 추출하였다. 제조사에서 제시한 방법을 따라 EZ DNA Methylation-Lightning Kits (Zymo Research)를 사용하여 추출된 cfDNA는 MS-HRM 분석을 위해 아황산 전환을 진행하였다. 아황산 전환된 cfDNA는 다음 과정을 통해 MS-HRM 분석을 진행하였다.

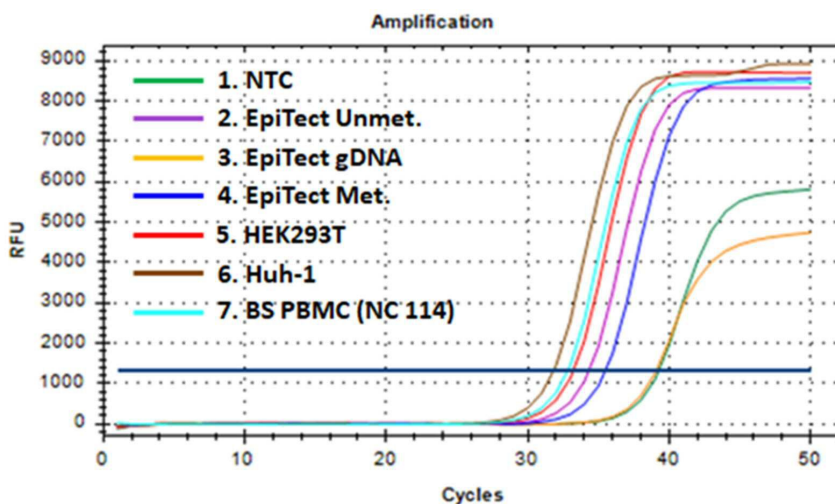
[0128] MS-HRM Master Mix를 표 3에 따라 제조하고, 제조된 Master Mix를 96-Well PCR plate(Hard-Shell® PCR Plates, Biorad)의 각 well에 22 μ L씩 분주하고, 실시예 2와 동일한 방법으로 PCR 반응 및 HRR 분석을 수행하였다. PCR 및 HRM 분석에 대한 형광값을 확인하고, melting curve 또는 peak를 확인하여 건강한 사람 및 간암 환자의 메틸화 수준을 확인하였다.

[0129] 도 8a는 건강한 사람 92명과 간암 환자 119명으로부터 혈액 2mL을 채취하여 플라스마를 분리하고, 이로부터 cfDNA를 분리하여 아황산 처리한 뒤 약 1ng의 cfDNA를 사용하여 프라이머 혼합 MS-HRM을 한 결과를 나타낸 도면이다. 건강한 (초록색)의 분석결과는 모두 비메틸화된 낮은 온도의 melting peak를 나타내며, 간암환자의 혈액 시료 (빨간색)는 높은 온도의 melting peak를 나타낸다.

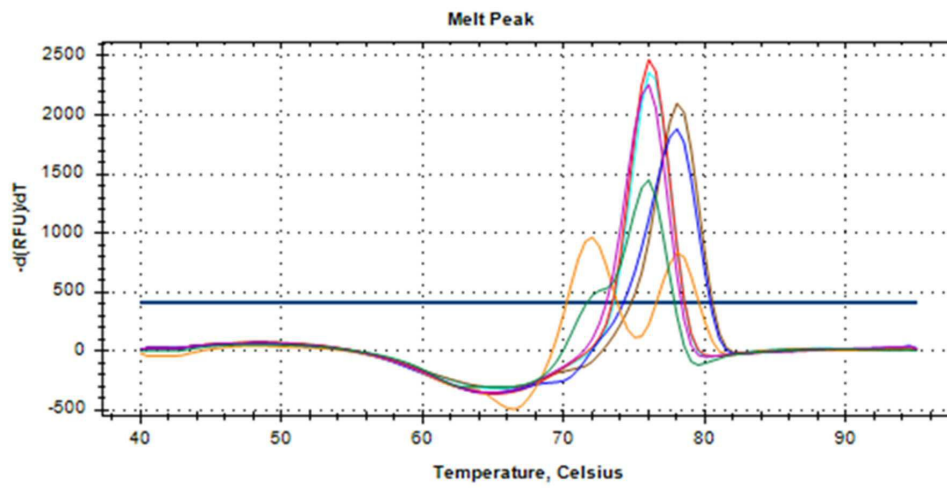
[0130] 도 8b는 정상인과 간암 환자의 혈액을 혼합 MS-HRM 방법을 이용하여 서열번호 1의 확인 대상 핵산에 대해 실험한 결과를 melting curve 분석으로 나타낸 도면이다. 정상인 (초록색)은 비메틸화 되어있어 증폭된 DNA가 빨리 녹아 급격한 커브 기울기를 보여주는데 반해 간암환자 혈액 시료 (빨간색)은 메틸화된 암 DNA의 증폭으로 높은 녹는점을 가지는 암 DNA를 포함하고 있어서 상대적으로 느리게 녹는 커브 기울기를 나타냈다. 약 60% 이상의 간암환자 cfDNA가 정상인의 cfDNA 보다 높은 메틸화 DNA를 포함하고 있음을 확인 가능하며, 따라서 cfDNA와 같이 매우 적은 양의 핵산, 예를 들어 100bp 정도의 매우 작게 조각난 메틸화된 cfDNA를 검출하여 혈액 내에 존재하는 미량의 메틸화 마커 DNA를 효과적으로 검출할 수 있다.

도면

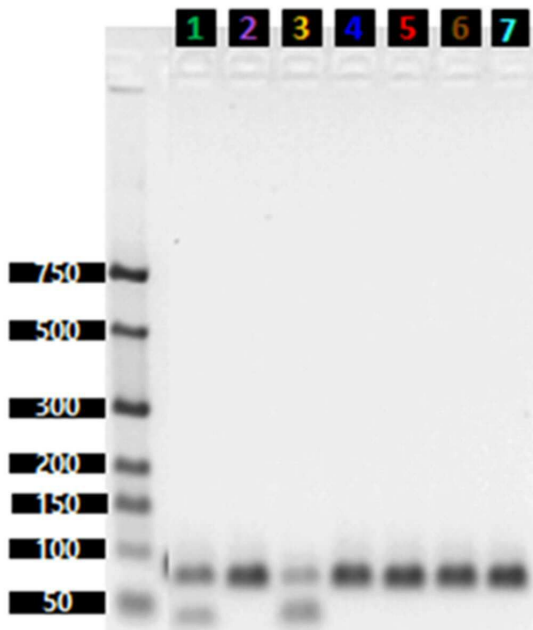
도면1a



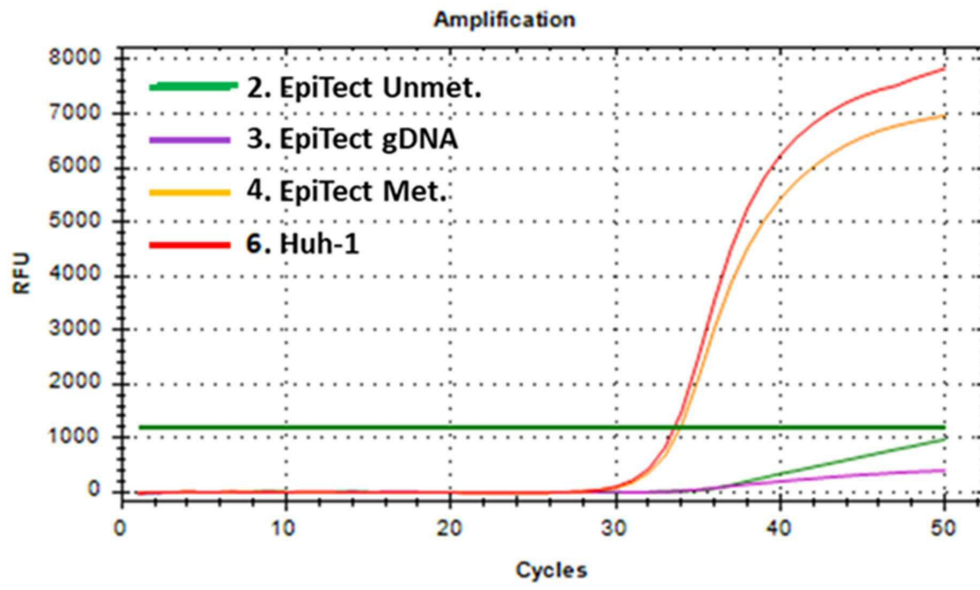
도면1b



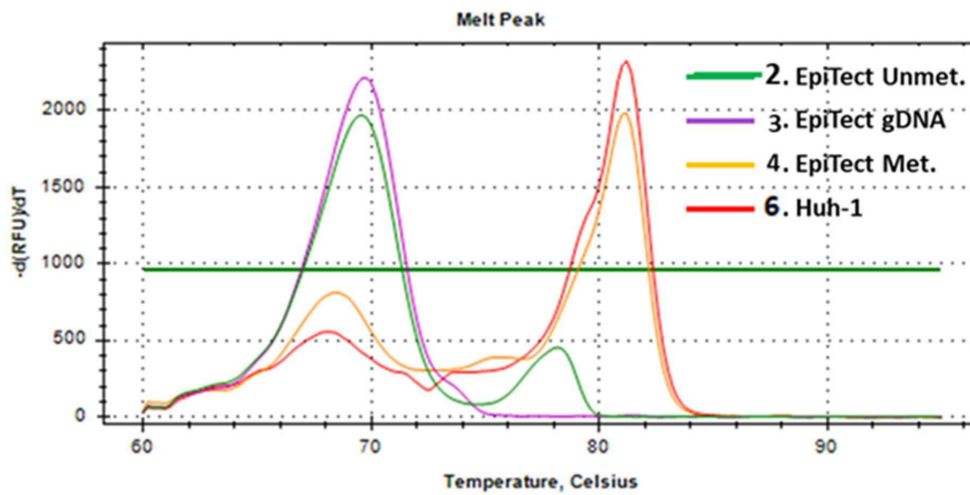
도면1c



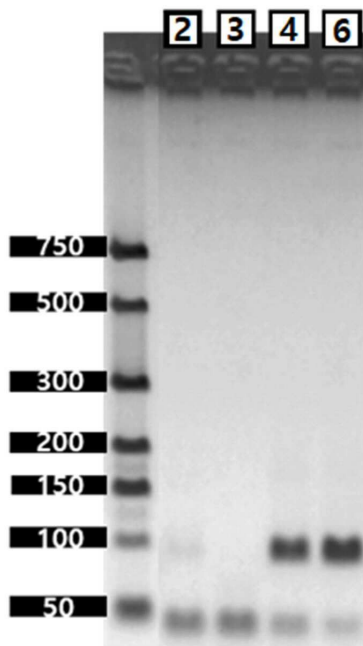
도면2a



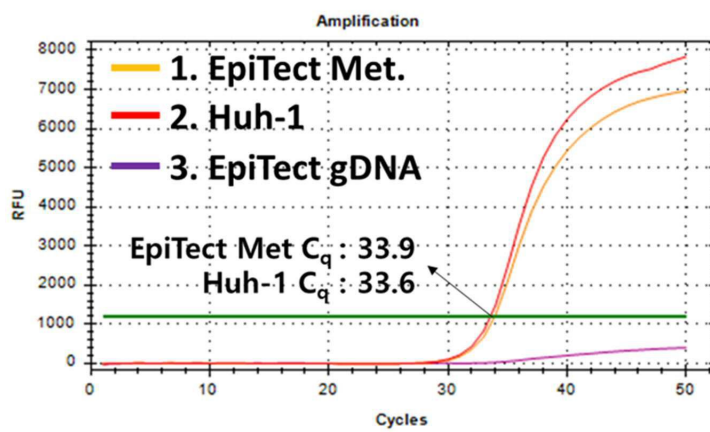
도면2b



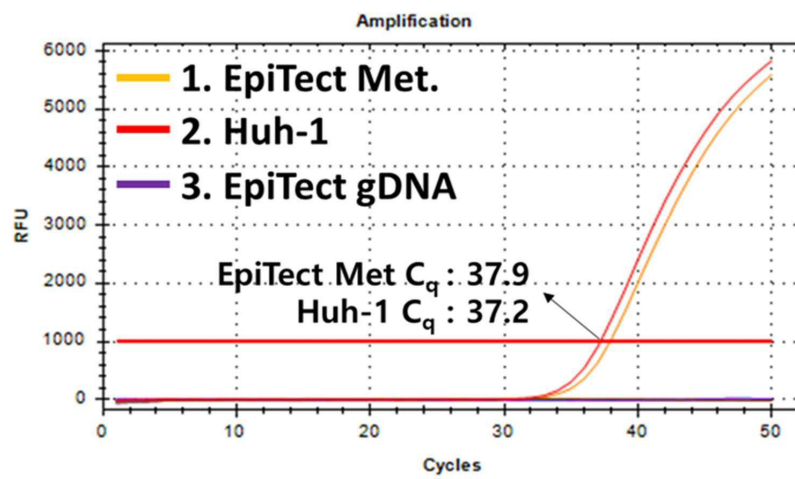
도면2c



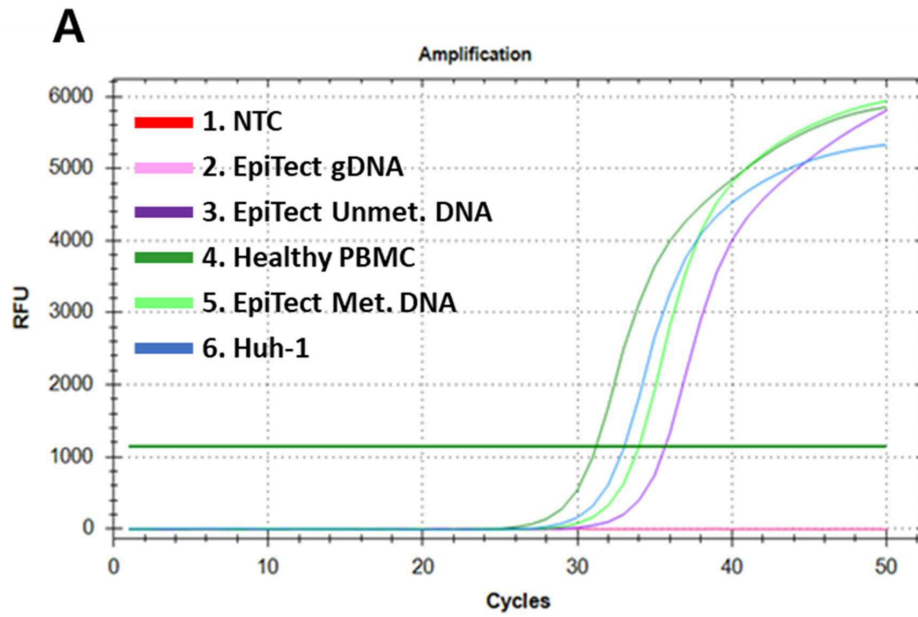
도면3a



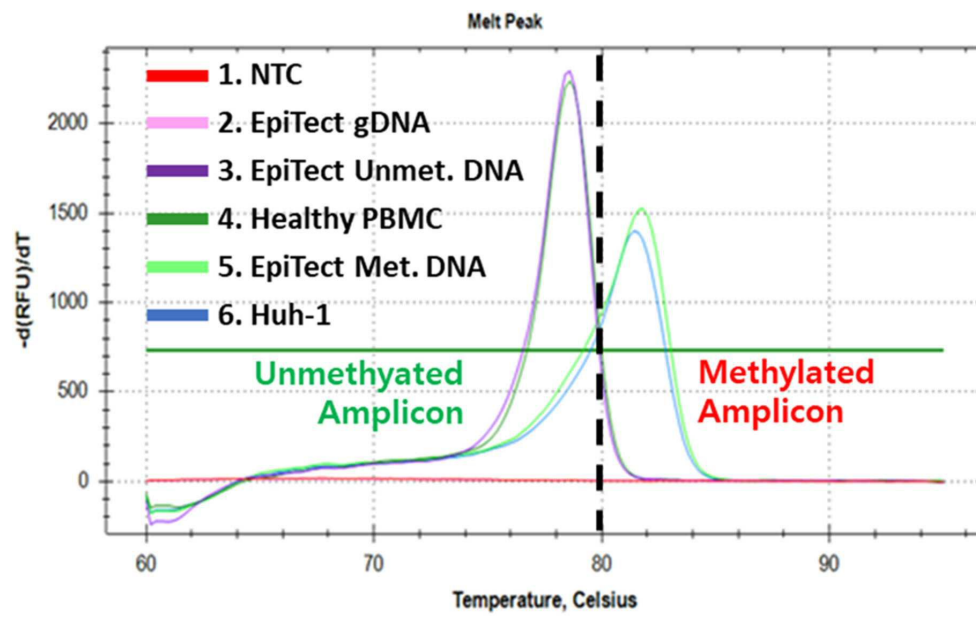
도면3b



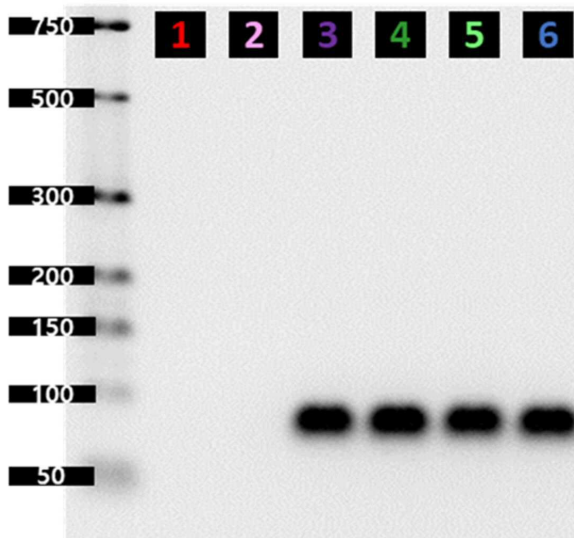
도면4a



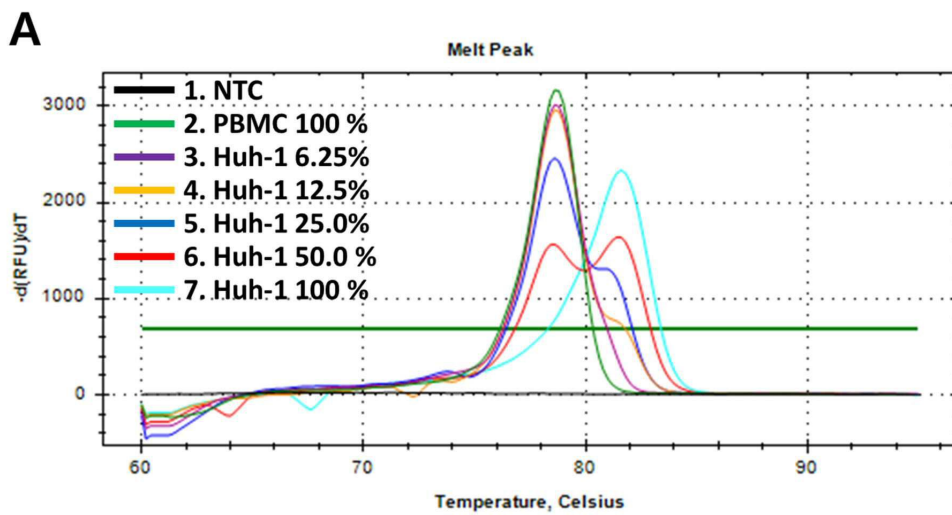
도면4b



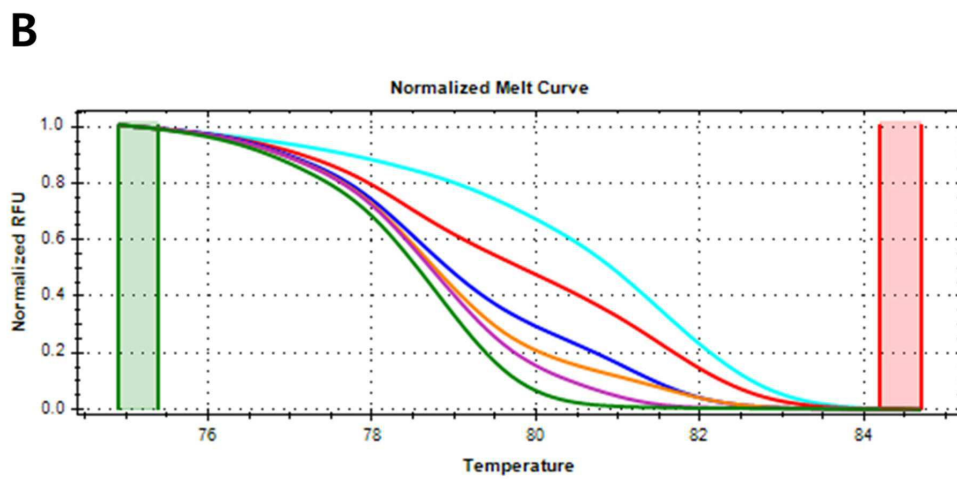
도면4c



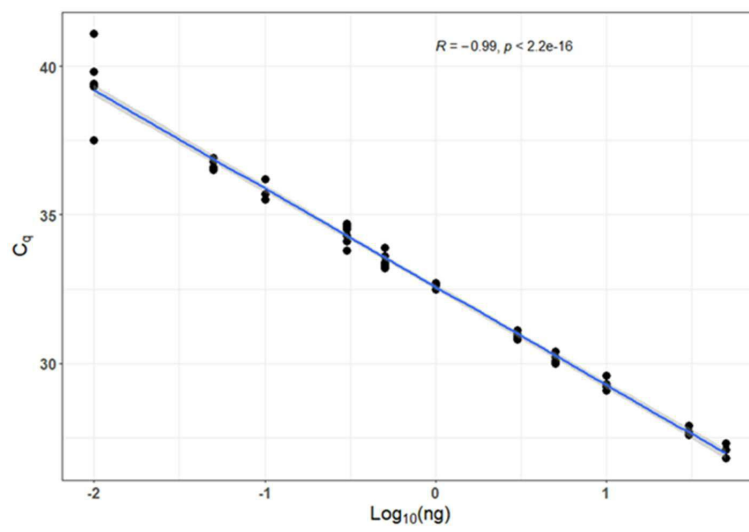
도면5a



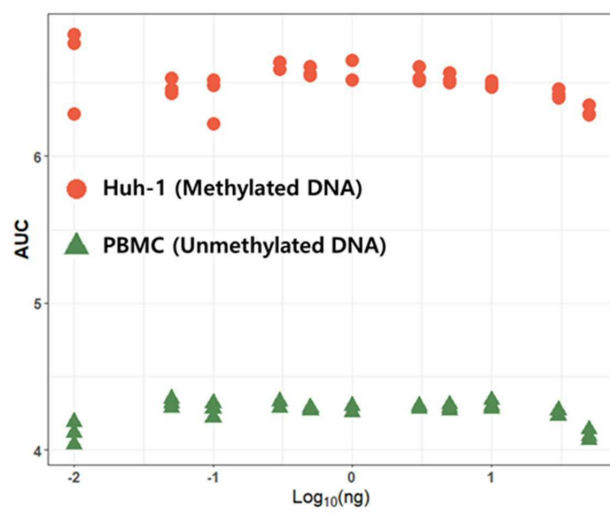
도면5b



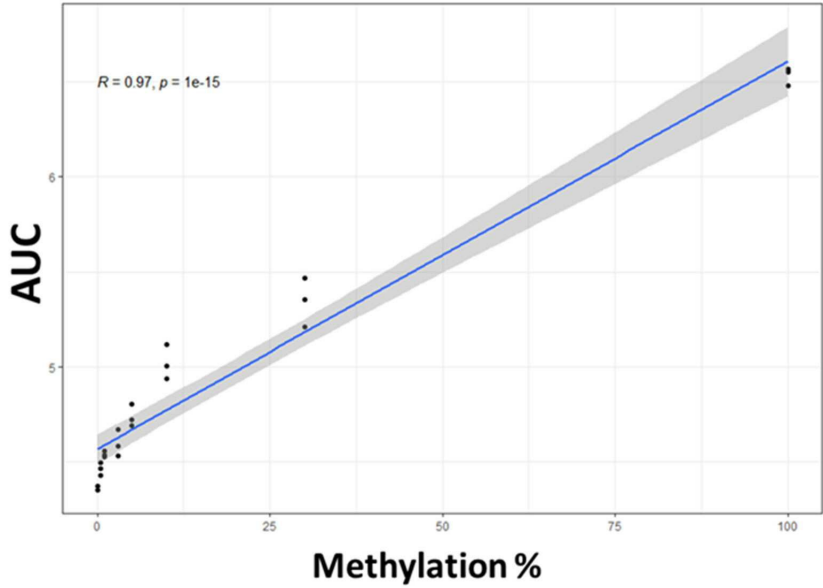
도면6a



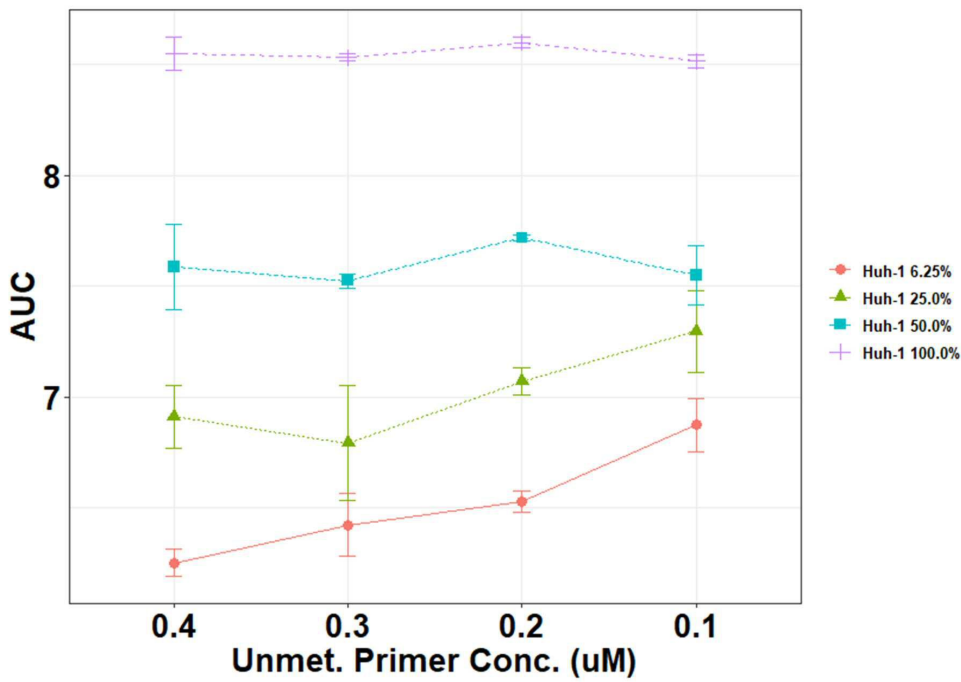
도면6b



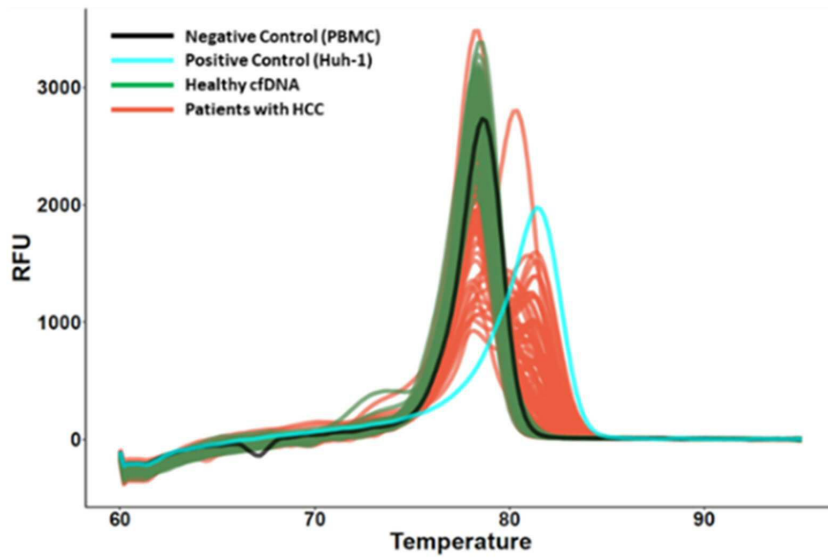
도면6c



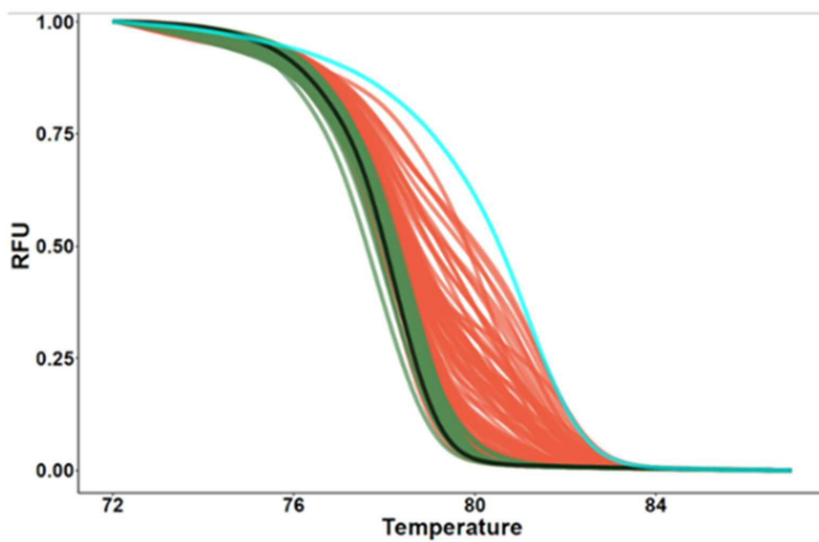
도면7



도면8a



도면8b



서열 목록

- <110> YONSEI UNIVERSITY, UNIVERSITY - INDUSTRY FOUNDATION (UIF)
INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY
- <120> Composition for determining whether a nucleic acid is methylated
and Method for determining whether a nucleic acid is methylated
- <130> DPP20221137KR
- <160> 11
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 480
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid to be identified

<400> 1

```

aggaaggaga cggggtggcg ccaaggaagg aggagaaaag gcggccgaga aaaggaggag      60
ggcaagggga agaggaaggg cgagggagga gcctgaggag actcgcccgg ctcaaccccg      120
acgtccgcgc cccggccgcc tggtggccat ggcgggcctg ggcctgggct cgcgcgttcc      180
cgtgtggctg gccgaggacg acctcggtcg catcatctgc caggggctgc tggactggcc      240
cgccacgtcg cctcgcgccc acagcttctg ccgccactgc ctggaggccc tgtggggcgc      300
ccgcgacgcc cgcgcgtggg cctgccccac ttcccgccag ggcgccgcgc agcagccgca      360
cctgcggaag aacacgttac tgcaggacct ggccgacaag taccgccgcg ccgcacgcga      420
gatacaggcg ggtccgacc ctgccactg cccctgcccg ggctccagtt ccctctccag      480

```

<210> 2

<211> 480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylated nucleic acid to be identified treated with sulfite

<400> 2

```

aggaaggaga cggggtggcg ttaaggaagg aggagaaaag gcggtcgaga aaaggaggag      60
ggtaagggga agaggaaggg cgagggagga gttttaggag attcgttcgg ttttaatttcg      120
acgttcgcgt ttcggtcgtt tggttggtat ggcgggtttg gggttgggtt tcgtcgtttt      180
cgtgtggttg gtcgaggacg atttcggttg tattatttgt taggggttgt tggattggtt      240
cgttacgttg ttttgcggtt atagtttttg tcgttattgt ttggagggtt tgtggggcgt      300
tcgcgacgtt cgtcgttggg tttgttttat ttgtcgttag ggcgtcgcgt agtagtcgta      360
tttgcggaag aatacgttat tgtaggattt ggtcgataag tatcgtcgcg tcgtacgcga      420
gatataggcg ggtttcgatt ttgtttattg tttttgttcg ggtttttagt ttttttttag      480

```

<210> 3

<211> 480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Unmethylated nucleic acid to be identified treated with sulfite

<400> 3

```

aggaaggaga tggggtggtg ttaaggaagg aggagaaaag gtggttgaga aaaggaggag      60

```

ggtaagggga agaggaaggg tgagggagga gtttgaggag atttgtttgg tttaatTTTg 120

atgtttgtgt tttggttgtt tgttggttat ggtgggtttg ggTTTgggtt ttgtttttt 180

tgtgtggttg gttgaggatg atTTTggttTg tattatttTg taggggtTgt tggattggtt 240

tgttatgttTg ttttTgtggtt atagtTTTtTg ttgttattTg ttggaggTTt tTgTgggtgt 300

ttgtgatgtt tgttTgttggg tttgtttttat ttgttTgttag ggtgtTgtgt agtagttgta 360

tttTgtggaag aatatgttat tTtaggattt ggttgataag tattgttTgt ttgtatgtga 420

gatataggTg ggTTTTgatt ttgtttattg tttttgttTg ggTTTTtagtt ttttttttag 480

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Methylation primer FWD

<400> 4

ttatggcggg tttgggtttg ggTTt 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Unmethylation primer FWD

<400> 5

ttatggTggg tttgggtttg ggTTt 25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> REV primer

<400> 6

caaccctaa caaataatac aacc 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> methylation independent primer FWD

<400> 7

gttgtattat ttgttagggg ttgt 24

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> methylation independent primer RVS

<400> 8

ccacaaaacc tccaacaat aa 22

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> primer with CpG recognition site FWD

<400> 9

tttcggttgt attatttgtt aggggt 26

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer with CpG recognition site RVS

<400> 10

aacgcccac aaaacctcca aa 22

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fluorescent probe

<400> 11

ggttcgttac gttgtttt 18