



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0069869
(43) 공개일자 2022년05월27일

<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>C12Q 1/6886</i> (2022.01) <i>C12Q 2527/107</i> (2019.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0161420</p> <p>(22) 출원일자 2021년11월22일 심사청구일자 2021년11월22일</p> <p>(30) 우선권주장 1020200156644 2020년11월20일 대한민국(KR)</p>	<p>(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>세종대학교산학협력단 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)</p> <p>(72) 발명자 김영준 서울특별시 강남구 논현로160길 31, 2층 2호(신사동)</p> <p>하정실 서울특별시 강남구 논현로160길 31, 2층 2호(신사동) (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인다나</p>
---	--

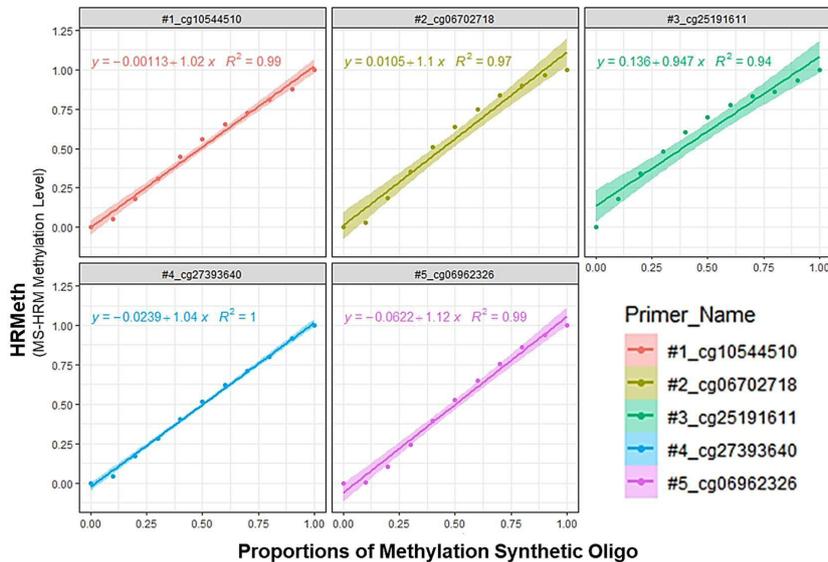
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 간암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법

(57) 요약

본 발명은 계놈 DNA의 메틸화 수준을 분석 및 정규화하는 방법, 이를 이용한 간암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로 상기 정규화 방법을 이용하면 간암 조직에서 분리한 계놈 DNA에서 메틸화 마커의 메틸화 수준을 확인할 수 있고, 특정 컷오프 값을 초과하면 간암 환자의 예후가 불량할 것으로 판단할 수 있다.

대표도 - 도11



- (52) CPC특허분류
 C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)

이진영

경기도 안산시 단원구 초지1로 78, 2002동 404호(초지동, 행복한마을아파트)

- (72) 발명자

김시초

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104687
과제번호	2016M3C9A4921712
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	포스트게놈 다부처유전체 사업
연구과제명	[통합이지마로][총괄/1세부]세포 특이적 후성유전체마커 발굴 및 검증(3/3단계, 1/3차년도) (총괄:국제 협력 기반 암 특이적 후성유전체 마커 개발)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법:

- a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- b) 분리된 게놈 DNA에서 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및
- c) 측정된 메틸화 수준을 하기 표의 컷오프 값과 비교하는 단계.

CpG 부위	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	서열번호 4	서열번호 5
컷오프	0.33	0.35	0.507	0.6	0.555

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은 a) 단계 이후 분리된 게놈 DNA에 아황산 (bisulfite)을 처리하는 단계를 추가로 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방법은 c) 단계 이후 3개 이상의 CpG 부위에서 메틸화 수준이 컷오프를 넘으면 암이 1년 이내에 재발할 가능성이 낮은 것으로 판단하고, 3개 이상의 CpG 부위에서 메틸화 수준이 컷오프를 넘지 못하면 암이 1년 이내에 재발할 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 b)의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 하기 단계를 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법:

- b-1) 아황산 처리된 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열의 CpG 부위에 대한 프라미어로 MS-HRM (methylation-sensitive high resolution melting) 분석을 수행하는 단계;
- b-2) 하기 식 1 및 2에 따라 MS-HRM 분석 데이터를 정규화하는 단계; 및

[식 1]

$$a = \frac{\ln \frac{dF}{dT}(T_R) - \ln \frac{dF}{dT}(T_L)}{T_R - T_L}$$

$$C = \frac{\frac{dF}{dT}(T_L)}{a}$$

$$M(T) = F(T) - Ce^{a(T-T_L)}$$

T_L: 녹는점의 아래 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

T_R: 녹는점의 위 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

dF/dT: 각 온도(T) 지점에서의 형광 변화율;

a: 지수함수 배경 노이즈의 파라미터;

C: 지수함수 배경 노이즈 값;

F(T): 해당 온도 지점에서의 총 형광값;

e: 자연상수; 및

M(T): 해당 온도 지점에서의 잔여 dsDNA에 기인한 총 형광값

[식 2]

$$M_{max} = \max(M(T)), T \in [TL, TR]$$

$$M_{min} = \min(M(T)), T \in [TL, TR]$$

$$M_1(T) = \frac{M(T) - M_{min}}{M_{max} - M_{min}}$$

M_{max}: [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최대값

M_{min}: [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최소값

M₁(T): 해당 온도 지점에서 변성(denature)되지 않은 잔여 dsDNA의 비율

b-3) 하기 식 3에 따라 CpG 부위의 메틸화 수준을 확인하는 단계.

[식 3]

$$HRMeth = \begin{cases} \max\left(0, 0.5 \times \frac{AUC_{sample} - AUC_{0\%}}{AUC_{50\%} - AUC_{0\%}}\right) & (AUC_{sample} \leq AUC_{50\%}) \\ \min\left(1, 0.5 + 0.5 \times \left(\frac{AUC_{sample} - AUC_{50\%}}{AUC_{100\%} - AUC_{50\%}}\right)\right) & (AUC_{sample} \geq AUC_{50\%}) \end{cases}$$

AUC_{sample}: 샘플 DNA의 [T_L, T_R] 구간 내에서 M₁(T)의 곡선 아래 면적(area under the curve, AUC) 값;

AUC_{0%}: 메틸화 수준이 0%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;

AUC_{50%}: 메틸화 수준이 50%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;

AUC_{100%}: 메틸화 수준이 100%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값; 및

HRMeth: 해당 CpG 부위의 메틸화 수준

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프라미어는 서열번호 6 내지 15로 이루어진 군에서 선택되는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 b)의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), MethyLight PCR, MehtyLight digital PCR, EpiTYPER, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 분자 비콘(molecular beacon), 차세대 염기서열분석 패널(NGS panel), 파이로시퀀싱 및 바이실라이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행되는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간암 환자로부터 분리된 조직, 세포, 혈액, 혈장, 체액, 대변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조직은 간암 조직인, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

서열번호 6 내지 15로 이루어진 군에서 선택되는 프라미어를 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 게놈 DNA의 메틸화 수준을 분석 및 정규화하는 방법, 이를 이용한 간암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간암 환자의 80%에서 조직학적 유형은 간세포암 (hepatocellular carcinoma, HCC)이며, 간세포암은 간경변 (cirrhosis), 비만(obesity), 바이러스성 간염(viral hepatitis) 등 다양한 원인에 의해 발생한다. 다른 암과 마찬가지로 간암의 치료도 크게 근치적 치료와 보존적 치료가 있으며, 근치란 암 자체를 완전하게 제거하는 치료를 의미하며 간 절제 수술, 간이식 및 고주파 열치료 등이 있다. 근치적 치료가 불가능한 경우 경동맥 화학 색전술, 방사선 치료 및 항암치료를 하게 된다. 간절제 수술을 받은 환자의 약 50%에서 재발이 발생하게 되는데, 그 이유는 절제되고 남아있는 간도 상기에 제시된 다양한 원인에 노출되어 간염이 발생한 상태이기 때문이다.

[0004] 간암의 예후(prognosis)는 간암이 진단된 이후 간암의 완치가능성, 치료 후 재발가능성 및 환자의 생존가능성 등 간암에 따른 환자의 각종 상태를 예측하는 것을 의미하며, 이는 질병의 심각성, 진단 시점, 치료경과 등 다양한 조건에 따라 달라진다. 간암은 예후에 따라 적합한 치료방법도 달라지며, 효과적인 치료경과를 기대할 수 있다. 즉, 간암 환자의 예후에 비해 약소하거나 과도한 치료는 환자의 생존율을 낮추거나 과도한 부담감을 줄 수 있다.

[0005] 근치적 수술 이후 암이 재발되면 환자자의 생존율은 급격하게 감소하며, 종래 기술을 통해 암의 정확한 예후를 예측하는 것에는 한계가 존재해왔다. 이러한 예후를 예측하여 적절한 치료를 진행하는 것은 환자의 생존율을 향상시키는데 상당한 도움이 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-2069043호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석하고, 이를 식 1 내지 3에 따라 정규화시킨 후 이를 컷오프 값과 비교하면 간암 환자들의 예후를 예측할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 하기 단계를 포함하는 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

[0012] a) 간암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0013] b) 분리된 게놈 DNA에서 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

[0014] c) 측정된 메틸화 수준을 하기 표의 컷오프 값과 비교하는 단계.

CpG 부위	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	서열번호 4	서열번호 5
컷오프	0.33	0.35	0.507	0.6	0.555

[0015]

[0017] 본 명세서에 사용된 용어, "메틸화(methylation)"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기(-CH₃)가 부착되는 것을 의미하며, 바람직하게는 특정 DNA의 특정 CpG 부위의 시토신에서 일어나는 메틸화를 의미한다.

[0018] 본 명세서에 사용된 용어, "메틸화 수준"은 특정 DNA 염기서열 내에 존재하는 CpG 부위의 메틸화 상태를 정량적으로 평가한 것을 의미하며, 메틸화 상태는 DNA 염기서열 내의 하나 이상의 CpG 부위에 5-메틸-시토신이 존재하거나 또는 존재하지 않는다는 것을 의미한다.

[0019] 본 명세서에 사용된 용어, "CpG 부위"는 시토신(cytosine, C)과 구아닌 (guanine, G)이 인산기(phosphate)로 연결된 서열을 말하며, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역 등을 포함하는 DNA 서열 내에 존재할 수 있다. CpG 부위의 메틸화는 유전체의 안정성 유지, 유전자의 발현 조절 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0020] 본 발명자들은 간암 환자의 예후를 예측할 수 있는 방법을 발굴하기 위해 노력한 결과, 간암 조직에서 분리한 게놈 DNA에서 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 새롭게 개발하였다.

[0021] 구체적으로 간암 조직에서 분리한 게놈 DNA에 아황산을 처리하고, 아황산 처리된 게놈 DNA를 주형으로 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 서열의 CpG 부위에 대한 프라미어로 MS-HRM (methylation-sensitive high resolution melting) 분석을 수행하였다. 이후 하기 식 1 및 2에 따라 MS-HRM 분석 데이터를 정규화하고, 식 3에 따라 CpG 부위의 메틸화 수준을 확인하였다.

[0022] [식 1]

$$a = \frac{\ln \frac{dF}{dT}(T_R) - \ln \frac{dF}{dT}(T_L)}{T_R - T_L}$$

$$C = \frac{\frac{dF}{dT}(T_L)}{a}$$

$$M(T) = F(T) - Ce^{a(T-T_L)}$$

[0023]

[0024] T_L: 녹는점의 아래 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

[0025] T_R: 녹는점의 위 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

[0026] dF/dT: 각 온도(T) 지점에서의 형광 변화율;

[0027] a: 지수함수 배경 노이즈의 파라미터;

[0028] C: 지수함수 배경 노이즈 값;

[0029] F(T): 해당 온도 지점에서의 총 형광값;

- [0030] e: 자연상수; 및
- [0031] M(T): 해당 온도 지점에서의 잔여 dsDNA에 기인한 총 형광값

[0033] [식 2]

$$M_{max} = \max(M(T)), T \in [TL, TR]$$

$$M_{min} = \min(M(T)), T \in [TL, TR]$$

$$M_1(T) = \frac{M(T) - M_{min}}{M_{max} - M_{min}}$$

- [0034]
- [0035] M_{max}: [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최대값
- [0036] M_{min}: [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최소값
- [0037] M₁(T): 해당 온도 지점에서 변성(denature)되지 않은 잔여 dsDNA의 비율

[0039] [식 3]

$$HRMeth = \begin{cases} \max\left(0, 0.5 \times \frac{AUC_{sample} - AUC_{0\%}}{AUC_{50\%} - AUC_{0\%}}\right) & (AUC_{sample} \leq AUC_{50\%}) \\ \min\left(1, 0.5 + 0.5 \times \left(\frac{AUC_{sample} - AUC_{50\%}}{AUC_{100\%} - AUC_{50\%}}\right)\right) & (AUC_{sample} \geq AUC_{50\%}) \end{cases}$$

- [0040]
- [0041] AUC_{sample}: 샘플 DNA의 [T_L, T_R] 구간 내에서 M₁(T)의 곡선 아래 면적(area under the curve, AUC) 값;
- [0042] AUC_{0%}: 메틸화 수준이 0%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;
- [0043] AUC_{50%}: 메틸화 수준이 50%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;
- [0044] AUC_{100%}: 메틸화 수준이 100%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값; 및
- [0045] HRMeth: 해당 CpG 부위의 메틸화 수준

[0047] MS-HRM (methylation-sensitive high resolution melting) 분석은 DNA의 메틸화 정도에 따라 PCR 수행 시 삽입 형광 염료(intercalating fluorescent dye)를 첨가하여 PCR 과정에서 생성되는 앰플리콘(amplicon)에 결합시키고, 이후 온도를 상승시키면서 타겟 부위(해당 CpG 부위)의 메틸화 정도에 따라 각기 다른 형태로 나타나는 형광 신호(fluorescence signal)의 변화 특성을 분석하는 방법이다.

[0048] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법은 a) 단계 이후 분리된 게놈 DNA에 메틸화된 시토신과 비메틸화된 구분할 수 있는 화합물을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 화합물의 예에는 이에 제한되지 않으나 아황산(bisulfite)이 있으며, 아황산은 비메틸화된 시토신을 우라실(uracil)로 변환시킨다.

[0049] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 정보 제공 방법은 d) 표의 컷오프 값과 비교하여 3개 이상의 CpG 부위에서 메틸화 수준이 컷오프를 넘으면 암이 1년 이내에 재발할 가능성이 낮은 것으로 판단하고, 3개 이상의 CpG 부위에서 메틸화 수준이 컷오프를 넘지 못하면 암이 1년 이내에 재발할 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 따라서, 본 발명의 정보 제공 방법은 서열번호 1 내지 5로 이루어진 군에서 선택되는 CpG 부위 중에서 적어도 3개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명자들은 상기 식 1 내지 3에 따라 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하고 컷오프 값과 비교한 결과와 간암환자들의 실제 임상 결과를 비교했을 때, 양성 일치율과 음성 일치율이 각각 100%, 97.8%로 나타나 해당 컷오프

값이 예후 예측에 우수한 성능을 보이는 것을 확인하였다.

- [0052] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 상기 대상체에서 분리된 조직, 조직 단편, 세포, 세포 단편, 혈액, 혈장, 체액, 대변 및 소변 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 조직, 조직 단편, 세포 및 세포 단편 등은 대상체에서 채취된 혈액, 혈장, 체액, 소변 등에서 분리될 것일 수 있다. 또한, 상기 DNA는 조직, 세포 등에서 분리된 DNA일 수 있고, 혈액, 혈장, 체액 등에 부유하는 세포유리 DNA(cell free DNA, cfDNA) 또는 종양세포에서 흘러나온 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)일 수 있다.
- [0053] 바람직하게는 상기 조직, 조직 단편, 세포 및 세포 단편은 간암 환자로부터 분리된 간암 조직에서 유래한 것일 수 있다.
- [0054] 한편, 상기 정보 제공 방법에서 단계 b)는 상기 식 1 내지 3의 방법 이외에도 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), MethyLight PCR, MehtyLight digital PCR, EpiTYPER, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 분자 비콘(molecular beacon), 차세대 염기서열분석 패널(NGS panel), 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0055] 예를 들어, 상기 메틸화 수준은 마이크로어레이에 의해 식별될 수 있고, 상기 마이크로어레이는 고상표면에 고정화된 프로브를 이용할 수 있다. 상기 프로브는 상기 CpG 부위를 포함하는 10 내지 100개의 연속 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [0056] 한편, 상기 표 3의 컷오프 값은 기존의 메틸화 유전체 데이터 (850K EPIC array)와 상관 관계가 높으므로 해당 플랫폼으로 측정된 메틸화 데이터에 대해서도 적용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 다른 양상은 서열번호 6 내지 15로 이루어진 군에서 선택되는 메틸화 독립적 중합효소연쇄반응 프라이머를 포함하는, 간암 환자의 예후 예측을 위한 정보 제공 키트를 제공한다.
- [0059] 상기 프라이머는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로 이용될 수 있고 기체(substrate) 상에 고정화될 수 있다. 상기 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 화학적 결합 방법, UV와 같은 공유 결합 방법 또는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체 상에 고정될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 생물학적 시료로부터 분리된 DNA(시료 DNA)는 혼성화 어레이에 적용되어 어레이 요소와 혼성화될 수 있으며, 혼성화 조건은 다양하게 변경될 수 있고, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 당업계에 알려진 기술에 따라 다양하게 실시될 수 있다. 또한, 상기 시료 DNA 및/또는 프라이머는 혼성화 여부를 확인케 하는 신호를 제공하기 위해 표지(labeling)될 수 있고, 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다.
- [0061] 상기 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), Cy3 및 Cy5(Pharmacia), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사성동위원소(P32 및 S35), 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예를 들어, 금), 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌(digoxigenin)과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 프라이머와 시료 DNA의 혼성화는 반응 온도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기, 뉴클레오티드의 길이, 뉴클레오티드 서열, GC 서열의 양 등의 다양한 인자에 의존한다. 상기 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., MolecularCloning, A LaboratoryManual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, NucleicAcid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)을 참조할 수 있다.
- [0063] 상기 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출할 수 있다. 예를 들어, 상기 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 상기 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다.
- [0064] 상기 효소 및 기질은 퍼옥시다아제(예컨대, 호스레디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉

스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR (p-phenylenediamine-HCl 및 pyrocatechol), TMB (tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로린; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움 (NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트 (naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코오스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)가 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0066]

본 발명의 일 예에 따른 방법을 사용하면 간암 조직에서 분리한 게놈 DNA에서 특정 CpG 부위의 대한 메틸화 수준을 확인할 수 있고, 메틸화 수준이 특정 컷오프 값을 초과하면 간암 예후가 불량한 것으로 판단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068]

도 1은 DNA 메틸화 마커 cg10544510에 대한 MIP (methylation independent PCR) 프라이머로 메틸화 정도가 상이한 게놈 DNA에 대해 MS-HRM(methylation-sensitive high resolution melting) 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선(melting curve)과 차이 곡선(difference curve)을 확인한 결과이다: 1. EpiTect Unmet. 100% (EpiTect 대조군, fully unmethylation); 2. EpiTect Unmet. 50%/EpiTect Met. 50%; 3. EpiTect Met. 100% (EpiTect 대조군, fully methylation); 4. EpiTect 100%; 5. HEK293T (HEK293T 세포주에서 분리한 gDNA); 및 6. Huh-1 (Huh-1 세포주에서 분리한 gDNA).

도 2는 DNA 메틸화 마커 cg06702718에 대한 MIP 프라이머로 메틸화 정도가 상이한 게놈 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 3은 DNA 메틸화 마커 cg25191611에 대한 MIP 프라이머로 메틸화 정도가 상이한 게놈 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 4는 DNA 메틸화 마커 cg27393640에 대한 MIP 프라이머로 메틸화 정도가 상이한 게놈 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 5는 DNA 메틸화 마커 cg06962326에 대한 MIP 프라이머로 메틸화 정도가 상이한 게놈 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 6은 DNA 메틸화 마커 cg10544510에 대한 MIP 프라이머로 합성 올리고(synthetic oligo)를 계열 회석법을 통해 섞은 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다: Synthetic Unmet. (비메틸화 합성 올리고); 및 Synthetic Met. (메틸화된 합성 올리고).

도 7은 DNA 메틸화 마커 cg06702718에 대한 MIP 프라이머로 합성 올리고를 계열 회석법을 통해 섞은 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 8은 DNA 메틸화 마커 cg25191611에 대한 MIP 프라이머로 합성 올리고를 계열 회석법을 통해 섞은 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 9는 DNA 메틸화 마커 cg27393640에 대한 MIP 프라이머로 합성 올리고를 계열 회석법을 통해 섞은 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 10은 DNA 메틸화 마커 cg06962326에 대한 MIP 프라이머로 합성 올리고를 계열 회석법을 통해 섞은 DNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 11은 MS-HRM 정규화 결과의 검증을 위해 5개 메틸화 마커에 대하여 합성 올리고 비율에 따라 정규화된 메틸화 수준과 실제 메틸화 및 비메틸화 합성 올리고 비율을 비교한 결과이다.

도 12는 동일한 간암 조직 시료에 대하여 MS-HRM 정규화 결과로 확인한 메틸화 수준과 850K EPIC Array 메틸화 후성 유전체 데이터를 선형회귀 분석으로 비교한 결과이다: 예후의 'Bad'와 'Good'을 각각 붉은색, 파란색으로 표시하였고, 'pBad'와 'pGood'을 나누는 컷오프(Cut-off)는 수평 직선으로 표시하였다.

도 13은 DNA 메틸화 마커 cg10544510에 대한 MIP 프라이머로 간암 조직의 gDNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후

온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다: 분홍색-후기 재발(good prognosis); 회색-조기 재발(bad prognosis); 및 주황색-대조군(control, synthetic oligo).

도 14는 DNA 메틸화 마커 cg06702718에 대한 MIP 프라이머로 간암 조직의 gDNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 15는 DNA 메틸화 마커 cg25191611에 대한 MIP 프라이머로 간암 조직의 gDNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 16은 DNA 메틸화 마커 cg27393640에 대한 MIP 프라이머로 간암 조직의 gDNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

도 17은 DNA 메틸화 마커 cg06962326에 대한 MIP 프라이머로 간암 조직의 gDNA에 대해 MS-HRM 분석을 수행한 후 온도 증가에 따른 녹는점 곡선과 차이 곡선을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **실시예 1: 간암 조직 시료의 MS-HRM 분석**

[0072] **1-1. 프라이머 설계**

[0073] MIP (methylation independent PCR) 프라이머는 다음 조건으로 설계하였다: PCR 증폭산물의 사이즈는 80-150 bp 이내로 제한; PCR 가열 냉각(annealing) 온도 60℃를 고려하여 프라이머의 Tm은 60-65℃로 설계; 프라이머의 구아닌 및 시토신의 비율은 20-65%; 프라이머의 3' 말단 부위에 CpG가 포함되지 않도록 설계; PCR 증폭산물에서 프라이머 영역이 아닌 부분의 CpG 수는 5개 이상으로 설계.

[0074] 프라이머 설계에 사용한 CpG 부위 서열 및 상기 조건을 만족하는 프라이머 서열을 각각 표 1 및 2에 기재하였다.

표 1

[0075]

CpG 부위	서열
cg10544510	TTT TAGAGAGGAAGAATTTTAAGGTGTGTTAAGATAAGTGGAGTTGAGGATTTGTTTTGGGGAGGTTTATTTGAAAAGTTGTGTGGAAAAATTTGATTGTGATTTTTAAGTTTGTGTTTTATAATTTAGGAG (서열번호 1)
cg06702718	TATGAAAATGTGAATGATAGGATTTAAAAAGAATGTATGTTATTTGAGAGTGAAATAAGAAGGTGGGTGTGGTTTTATTTTTTTTTGGTTAGGTATGTATGTGGGTGATGTGGTTTTTAGAAGTTTTGTGTATGTT (서열번호 2)
cg25191611	GTAGGAGTTTGGTTTTTTGGAAGTTGTTGTTATGGTTGTTATATTTATTATTATTGTTGTTGTTGTTTATTATTATGTTTTT TAGTTTTATTTGAATTTTTAGTTATATTTGGTTGTTGGGGTG (서열번호 3)
cg27393640	TAGGGTGGTTGTTATGTGTTTTTTGGGCTGTTTGTGGATGTTTTTTGCGGTTGGGAGTTTTTTGGCGTAAGGAGGATGGCGGGGCTGTGTTGGCAGGAAATGAGGATTTTTTTGATGGTGGAA (서열번호 4)
cg06962326	TTTAGGTTGGATTTTAGAGGTTTGTGTATATGTGTTGTTGGTGTGTTATTATGGGGATTTTTATGGGTGGTTAAATAGTGGAAAGGAGGTGGGAAGGTGAGAATAAGGTGTGGTTGGAGTTGGTTTTTTGGAGG (서열번호 5)

표 2

[0077]

명칭	증폭산물 크기 (bp)	서열 번호	프라이머 서열(5'-3')	
cg10544510	135	6	Forward	TTT TAGAGAGGAAGAATTTTAAGG
		7	Reverse	CTCCTAAAATTATAAAACACAAACTTAAAAA
cg06702718	140	8	Forward	TATGAAAATGTGAATGATAGGATTT
		9	Reverse	AACATACACAAAACCTCTAAAAAC
cg25191611	135	10	Forward	CACCCCAACAACCAAAATATAACTA
		11	Reverse	GTAGGAGTTTGGTTTTTTGGAAG
cg27393640	122	12	Forward	ATCCCAACAACAATACACAAAAAC

cg06962326	141	13	Reverse	AAGGTGGTAGTTTTTTTAGGAGTAAA
		14	Forward	TTTAGGTTGGATTTTAGAGGTT
		15	Reverse	CCTCCAAAAAACCCTC

[0079] 1-2. gDNA (genomic DNA) 추출 및 아황산 전환

[0080] 90명의 HCC 환자에서 획득한 냉동 시료로부터 제조사의 설명에 따라 MagListo™ 5M 게놈 DNA 추출 키트 (Bioneer, 대한민국)로 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 gDNA 시료 500 ng으로 제조사의 표준 설명에 따라 EZ DNA Methylation-Gold Kits(Zymo research, 미국)로 아황산 전환을 진행하였다. 초기 실험에 사용된 Huh-1 및 HEK293T 세포주는 PureLink™ Genomic DNA Mini Kit(Invitrogen, 미국)로 gDNA를 추출하였고, 아황산 전환은 동일한 키트를 사용하였다.

[0082] 1-3. 임상정보를 통한 환자 선별

[0083] 본 발명과 관련하여 수행된 연구는 서울대학교 병원 (Seoul National University of Hospital) 검토위원회의 승인을 받고, 모든 환자로부터 서면 동의서를 받아 진행하였다. 2011년부터 2016년까지 서울대학교 병원 외과에서 간세포암 (hepatocellular carcinoma; 이하, HCC로 기재함) 절제술을 받은 환자들을 모집하였고, 수술 후 CT 스캔을 통해 깨끗한 미세 경계(microscopic margins) 및 종양의 완전 절제를 확인하였다. 상기 환자들은 정기적으로 병원을 방문하여 혈청 종양 마커, 알파-태아 단백질(α -fetoprotein, AFP) 수치, 조영 CT 스캔 (contrast CT scans) 또는 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)을 포함한 표준 프로토콜을 기반으로 3개월마다 재발(recurrence) 여부를 모니터링 받았다. 재발 여부는 조기(≤ 1 년) 및 후기(> 1 년) 재발로 분류하였다. 총 90명의 환자를 상기 기준으로 각각 조기 재발 46명, 후기 재발 44명으로 나누고, 본 발명에서 개발한 MS-HRM 분석 방법으로 임상 결과를 검증하였다. 재발 예측 마커는 조기 재발군은 메틸화 수준이 낮고, 후기 재발군은 메틸화 수준이 높은 것을 특징으로 한다.

[0085] 1-4. MS-HRM 분석

[0086] MS-HRM (methylation-sensitive high resolution melting) 분석에는 Accupower® Plus DualStar™ Master Mix 2X (Bioneer, 대한민국)를 사용하였고, 전방향(forward) 프라이머와 역방향(reverse) 프라이머 각각 0.2 μ M, 20X EvaGreen™을 1X (1.25 μ l), TDW 7.25 μ l, 아황산 전환된 DNA 1 ng (1 ng/3 μ l)을 최종 부피가 25 μ l가 되도록 혼합하였다.

[0087] PCR 반응은 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad)을 이용하였다. 변성 단계를 95°C에서 5분 동안 1회 수행하고, 변성 95°C에서 10초, 가열 냉각 60°C에서 30초 및 확장(extension) 72°C에서 30초의 사이클을 40회 반복하였다. 또한 가열 냉각 30초 후 확장 단계를 시작하기 전 형광 측정을 통해 각 사이클의 형광 값을 확인하였다. PCR 반응이 끝난 후 60°C에서 1분 동안의 안정기를 거친 후 온도 증가에 따른 증폭산물의 결합 정도를 확인하는 멜팅(melting) 분석을 65°C부터 95°C까지 0.2°C씩 증가시키며 10초 간격으로 형광 세기를 측정하여 진행하였다.

[0088] DNA는 간암 조직에서 분리한 DNA를 실험군으로, EpiTect PCR control DNA set(Qiagen, 미국)와 Huh-1(간암세포주) 및 HEK293T(인간 배아 신장 세포주) 세포에서 분리한 DNA를 대조군으로 사용하였다.

[0089] MS-HRM 분석 결과, EpiTect Unmethylation DNA와 Huh-1 세포주 DNA는 다른 DNA에 비해 더 낮은 Tm에서 증폭산물의 변성이 일어나고, EpiTect Methylation DNA와 HEK293T 세포주 DNA는 더 높은 Tm에서 증폭산물의 변성이 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (도 1 내지 5에서 A 및 B). 이 결과를 통해 상기 1-1에서 설계한 프라이머로 메틸화 수준이 다른 DNA를 구분할 수 있는 것을 확인하였다.

[0090] 또한, EpiTect gDNA PCR 결과에서 증폭산물이 생산되지 않는 것을 통해 프라이머가 아황산 전환된 DNA에 특이적으로 작용하는 것을 확인하였다 (도 1 내지 5에서 C).

[0091] 추가적으로 합성 올리고를 제작하여 메틸화 수준을 인위적으로 희석시키고, 각 조건에 따른 증폭산물의 변성 온

도의 변화를 확인하였다. 그 결과, DNA의 메틸화 수준이 증가할수록 PCR로 생성된 증폭산물의 변성 온도가 상승하는 것을 확인할 수 있었다 (도 6 내지 10). 이 결과를 통해 실제 간암 환자들에서 분리한 간암 조직 DNA의 메틸화 수준을 반-정량(semi-quantification) 값으로 추측 가능한 것을 확인하였다. DNA의 메틸화 수준을 반-정량(semi-quantification) 값으로 추측할 수 있다는 것은 실제 간암 조직에서 추출한 DNA에 존재하는 메틸화된 DNA의 가닥 수를 정확하게 확인하는 것이 아니라 도 6 내지 01의 기준점을 통해 메틸화가 되지 않은 가닥 대비 메틸화가 된 가닥의 존재 비율을 추측하는 것을 의미한다.

[0093] 1-5. MS-HRM 분석 데이터의 정규화

[0094] 온도에 따른 총 형광 값에서 지수함수 배경 노이즈(exponential background)를 제거하기 위해, Robert Palais and Carl T. Wittwer 2009에서 제시한 exponential background model을 활용하였다(식 1 및 식 2). 녹는점 (T_m , melting temperature) 아래 구간 및 위 구간 내 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도인 T_L 및 T_R 을 선정하였다. 이후 각 온도 지점에서의 형광 변화율(dF/dT)로부터 지수함수 배경 노이즈의 파라미터(식 1에서 a)를 추정하고, 추정된 파라미터로부터 지수함수 배경 노이즈 값(식 1에서 C)을 계산하여 각 온도 지점별 총 형광 값에서 제거함으로써 잔여 dsDNA 양에 비례하는 형광 데이터 함수 $M(T)$ 를 산출하였다.

[0095] [식 1]

$$a = \frac{\ln \frac{dF}{dT}(T_R) - \ln \frac{dF}{dT}(T_L)}{T_R - T_L}$$

$$C = \frac{\frac{dF}{dT}(T_L)}{a}$$

$$M(T) = F(T) - Ce^{a(T-T_L)}$$

[0096] [T_L : 녹는점의 아래 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

[0098] T_R : 녹는점의 위 구간에서 MS-HRM 형광 변화율이 일정한 온도;

[0099] dF/dT : 각 온도(T) 지점에서의 형광 변화율;

[0100] a: 지수함수 배경 노이즈의 파라미터;

[0101] C: 지수함수 배경 노이즈 값;

[0102] $F(T)$: 해당 온도 지점에서의 총 형광값;

[0103] e: 자연상수; 및

[0104] $M(T)$: 해당 온도 지점에서의 잔여 dsDNA에 기반한 총 형광값)

[0106] $M(T)$ 에 대해 [T_L , T_R]의 온도구간 내에서 최대-최소 정규화(min-max normalization)를 수행하여 온도 증가에 따른 잔여 dsDNA 비율 함수 $M_1(T)$ 를 산출하였다.

[0107] [식 2]

$$M_{max} = \max(M(T)), T \in [T_L, T_R]$$

$$M_{min} = \min(M(T)), T \in [T_L, T_R]$$

$$M_1(T) = \frac{M(T) - M_{min}}{M_{max} - M_{min}}$$

[0108]

- [0109] (M_{max} : [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최대값
- [0110] M_{min} : [TL, TR] 구간 내 M(T)의 최소값
- [0111] $M_1(T)$: 해당 온도 지점에서 변성(denature)되지 않은 잔여 dsDNA의 비율)

[0113] DNA의 메틸화 수준(HRMeth)을 도출하기 위해, 각 시료의 [TL, TR] 구간 내에서 $M_1(T)$ 의 곡선 아래 면적(area under the curve, AUC) 값을 R package DescTools package의 AUC 함수를 사용하고 3차 스플라인 보간법(cubic spline interpolation)을 옵션으로 설정하여 산출하였다. 시료의 AUC 값으로부터 메틸화 수준(Methylation Level)을 얻기 위해 0%, 50% 및 100% 메틸화 대조 시료의 AUC 값을 기준으로 표준화하여 HRMeth 값을 도출하였다.

[0114] [식 3]

$$HRMeth = \begin{cases} \max\left(0, 0.5 \times \frac{AUC_{sample} - AUC_{0\%}}{AUC_{50\%} - AUC_{0\%}}\right) & (AUC_{sample} \leq AUC_{50\%}) \\ \min\left(1, 0.5 + 0.5 \times \left(\frac{AUC_{sample} - AUC_{50\%}}{AUC_{100\%} - AUC_{50\%}}\right)\right) & (AUC_{sample} \geq AUC_{50\%}) \end{cases}$$

- [0115]
- [0116] (AUC_{sample} : 샘플 DNA의 [TL, TR] 구간 내에서 $M_1(T)$ 의 곡선 아래 면적(area under the curve, AUC) 값;
- [0117] $AUC_{0\%}$: 메틸화 수준이 0%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;
- [0118] $AUC_{50\%}$: 메틸화 수준이 50%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값;
- [0119] $AUC_{100\%}$: 메틸화 수준이 100%인 메틸화 대조 시료의 AUC 값; 및
- [0120] HRMeth: 해당 CpG 부위의 메틸화 수준)

[0122] **1-6. MS-HRM 분석 데이터 정규화 방법의 검증**

[0123] 메틸화 및 비메틸화 합성 올리고를 다양한 비율로 섞어 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 메틸화 수준을 나타내는 시료를 만들고, 5개 마커(cg10544510, cg06702718, cg25191611, cg27393640 및 cg06962326)에 대해 검증하였다. 선형 회귀 분석 결과 5개 마커 모두에서 최소 0.95 이상의 R^2 값이 확인되어, 메틸화 수준 계산 방법의 정확도를 검증할 수 있었다 (도 11).

[0124] 또한, HCC 환자 시료에서의 재현성을 검증하기 위해 정규화된 메틸화 수준과 850K EPIC Array 메틸화 후성유전체 데이터를 선형 회귀 분석한 결과 5개 마커 모두에서 R^2 값이 최소 0.77 이상으로 나타났다. 메틸화 수준을 측정하는 플랫폼의 차이와 암 이질성(tumor heterogeneity)을 고려할 때 본 MS-HRM 분석 데이터 정규화 방법은 상당히 준수한 성능을 보여주었다 (도 12).

[0126] **실시예 2: 간암 환자 시료의 메틸화 수준 정량 및 간암 예후 예측 분석**

[0127] **2-1. 간암 예후 예측을 위한 메틸화 수준 확인**

[0128] 상기 실시예 1-5의 방법으로 간암 조직에서 5개 DNA 메틸화 마커(cg10544510, cg06702718, cg25191611, cg27393640 및 cg06962326)의 메틸화 수준을 HRMeth로 확인하고, '컷-오프(cut-off)'를 설정하였다. 컷오프는 도 12의 결과에서 bad 및 good으로 표기된 시료의 MS-HRM 기반 메틸화 수준 분포를 참고하여 최종적인 성능 최적화를 통해 선정하였다. 최종적으로 5개의 마커 중 3개 이상의 마커에서 메틸화 정도가 컷오프를 넘으면 '예후가 좋음(pGood)'으로 판단하고, 3개 미만의 마커에서 메틸화 정도가 컷오프를 넘지 못하면 '예후가 나쁨(pBad)'으로 판단하였다 (표 3).

표 3

[0129]

CpG 부위(마커)	cg10544510	cg06702718	cg25191611	cg27393640	cg06962326
컷오프	0.33	0.35	0.507	0.6	0.555

[0131]

2-2. MS-HRM 분석 결과와 실제 임상 정보와의 비교

[0132]

총 90명의 HCC 환자 시료에 대해 5개의 간암 예후 예측 DNA 메틸화 마커의 프라이머를 사용하여 MS-HRM 분석 결과를 확인하였다. 사용된 총 90명의 HCC 환자 시료 중 임상정보 기반으로 나뉜 시료는 44개의 조기 재발 시료와 46개의 후기 재발 시료를 각각 'Bad' 및 'Good'으로 표기하였으며, 본 발명을 통해 개발된 기술로 환자의 예후 예측을 확인한 결과를 각각 'pBad' 및 'pGood'으로 표기하였다(표 4).

[0133]

실제 임상결과와 예측결과를 비교했을 때 총 90명의 환자에 대한 양성 일치율(percent positive agreement, %)와 음성 일치율(percent negative agreement, %)이 각각 100%, 97.8%인 것을 확인할 수 있었다 (도 13 내지 17).

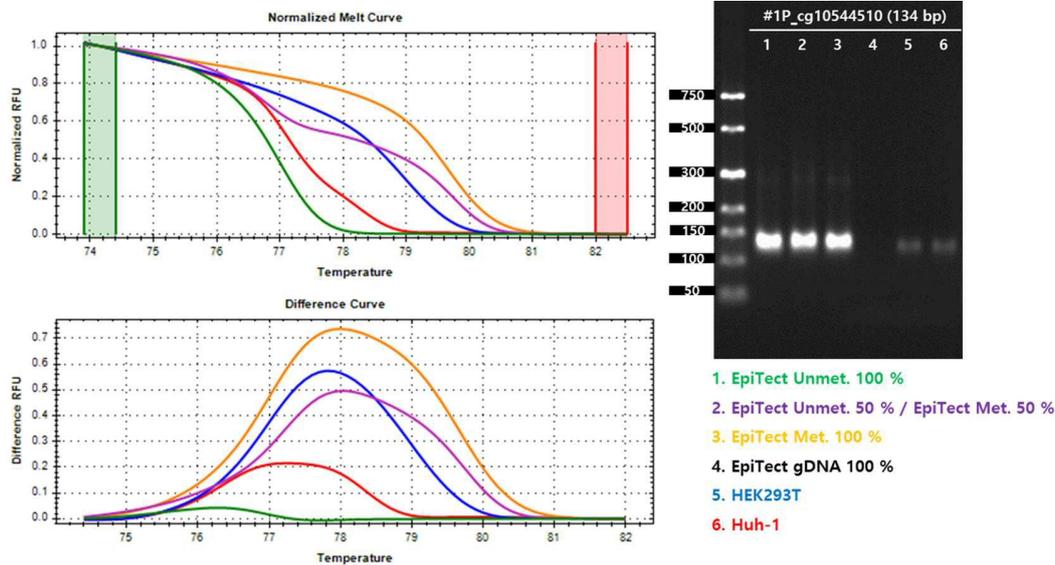
표 4

[0134]

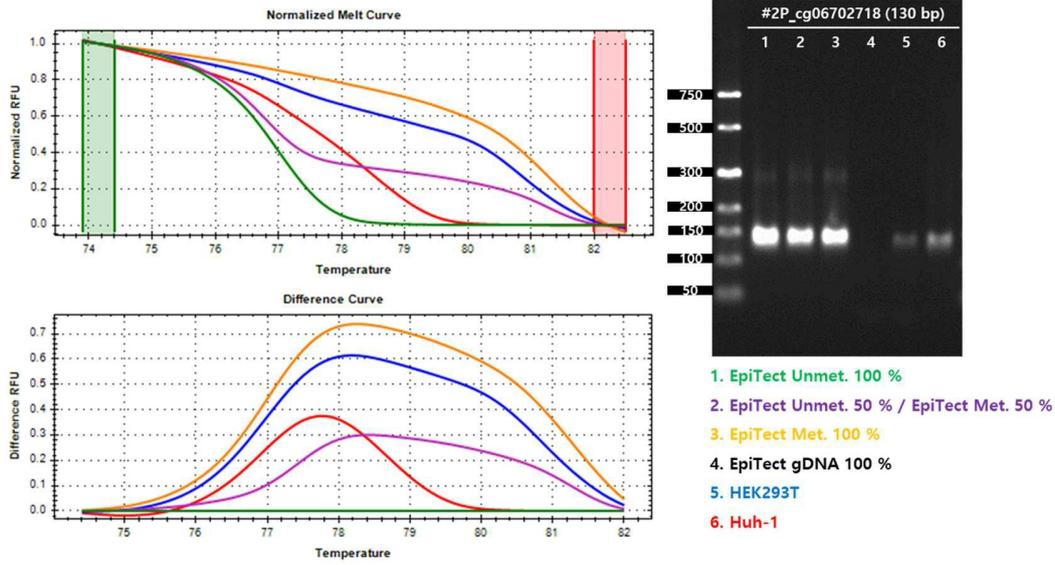
	Good (후기 재발)	Bad (조기 재발)
pGood	45	0
pBad	1	44

도면

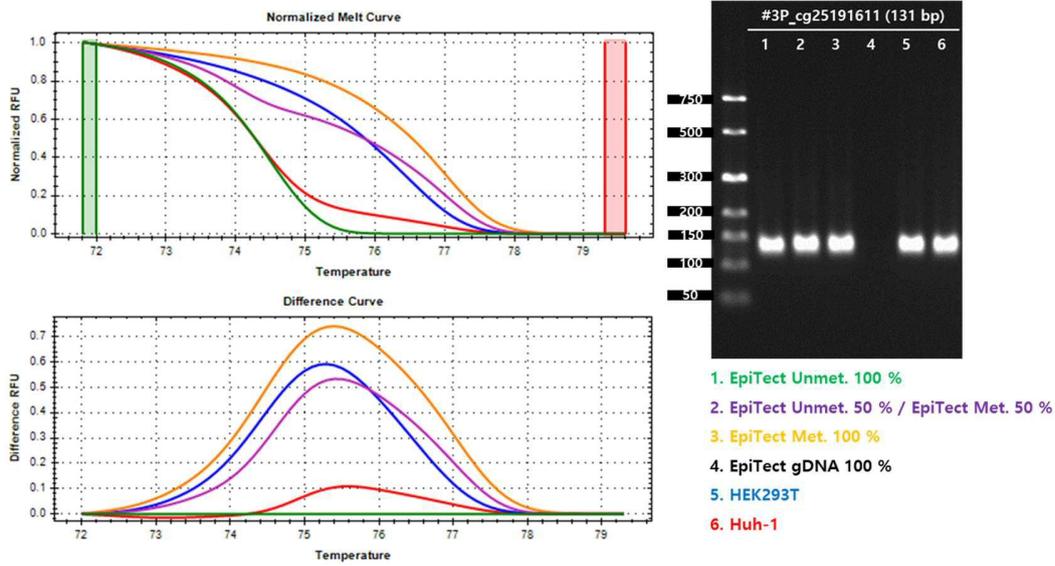
도면1



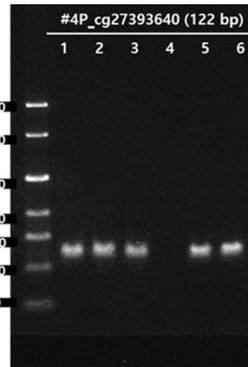
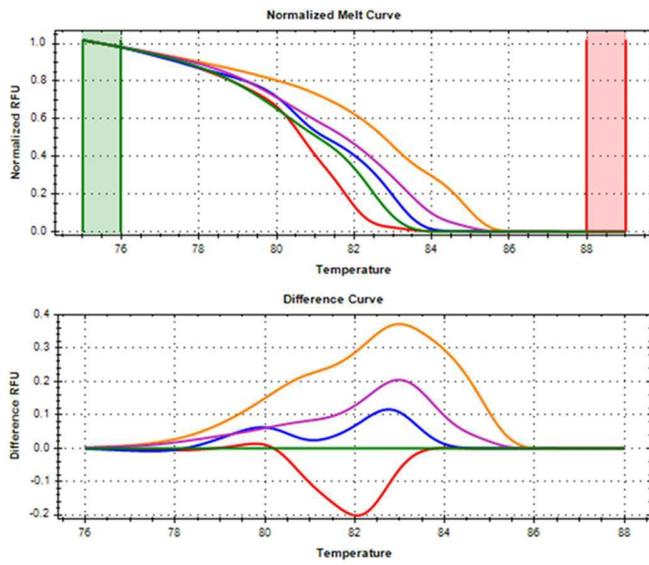
도면2



도면3

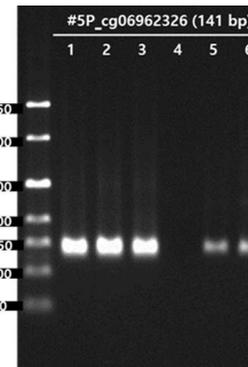
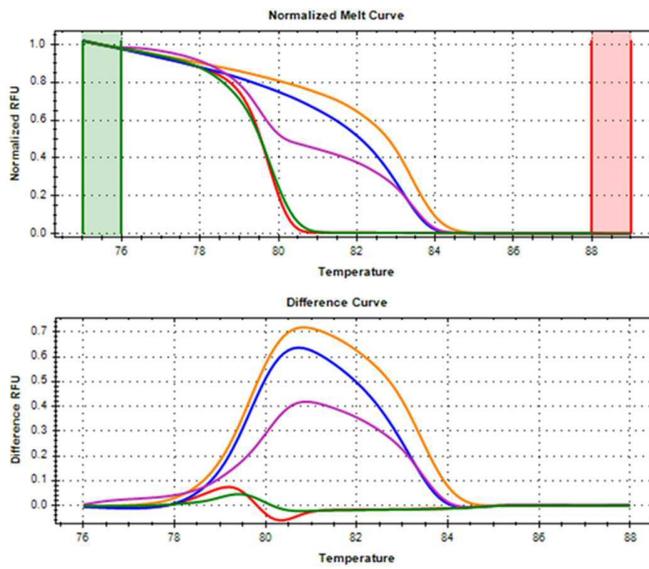


도면4



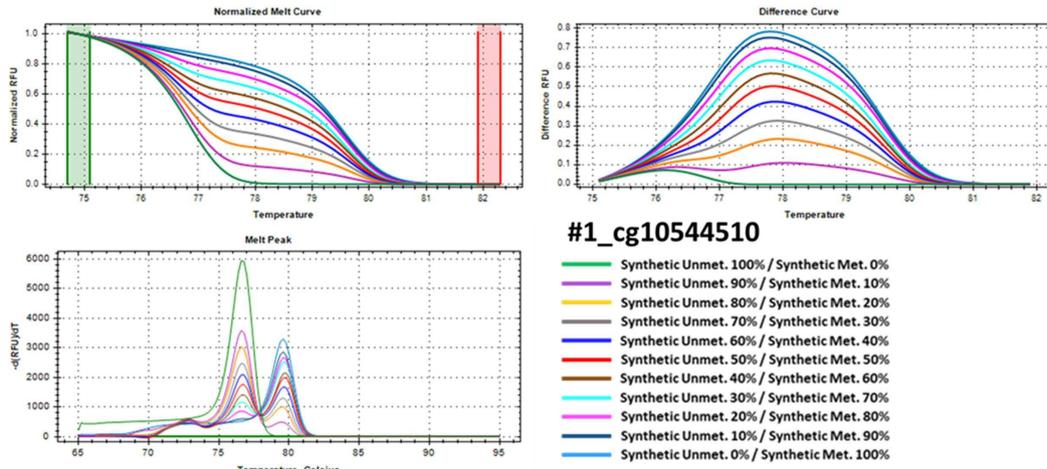
1. EpiTect Unmet. 100 %
2. EpiTect Unmet. 50 % / EpiTect Met. 50 %
3. EpiTect Met. 100 %
4. EpiTect gDNA 100 %
5. HEK293T
6. Huh-1

도면5

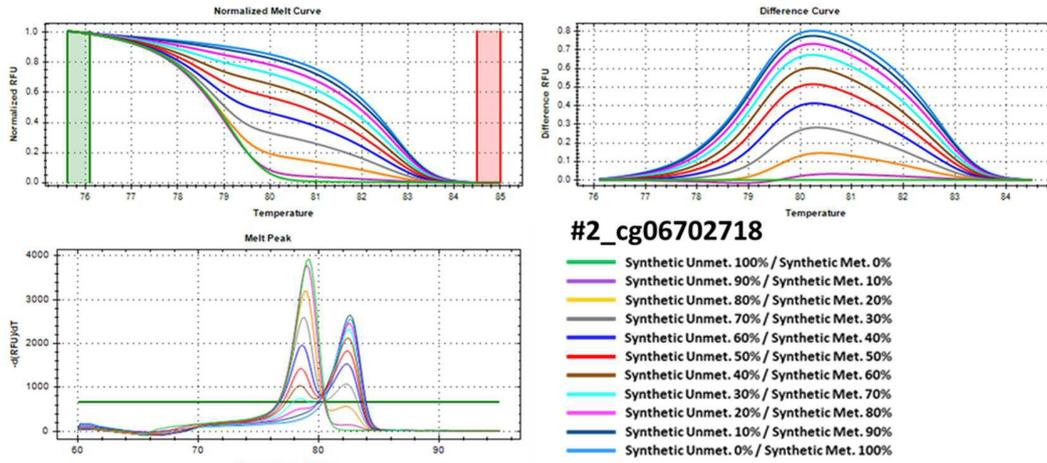


1. EpiTect Unmet. 100 %
2. EpiTect Unmet. 50 % / EpiTect Met. 50 %
3. EpiTect Met. 100 %
4. EpiTect gDNA 100 %
5. HEK293T
6. Huh-1

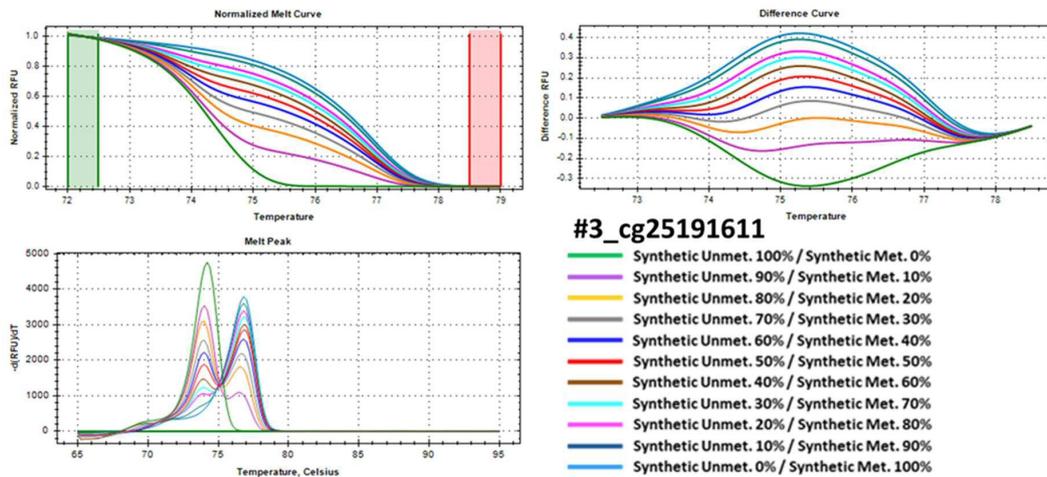
도면6



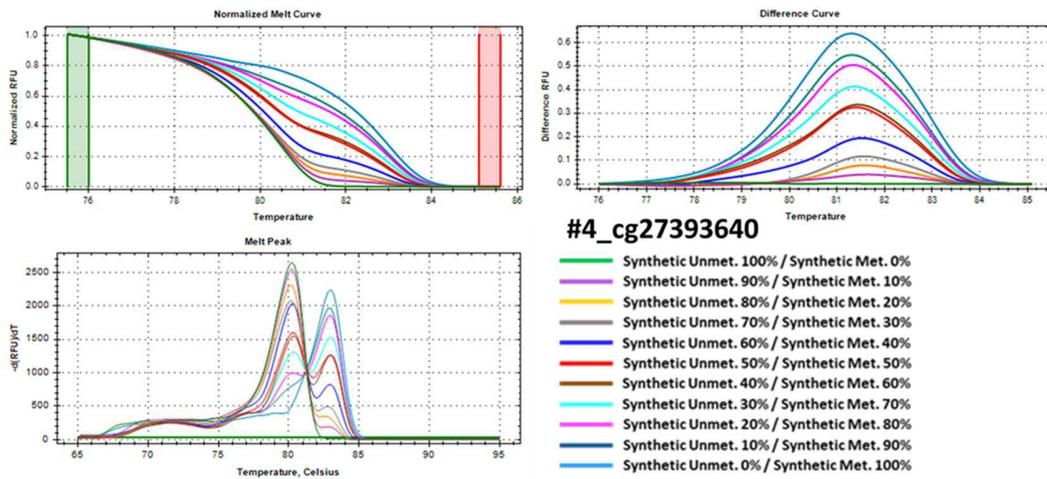
도면7



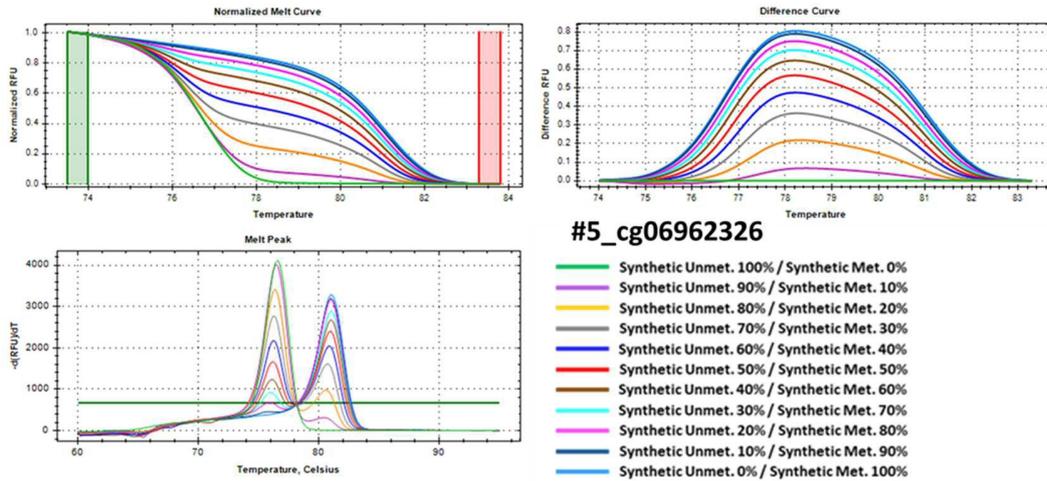
도면8



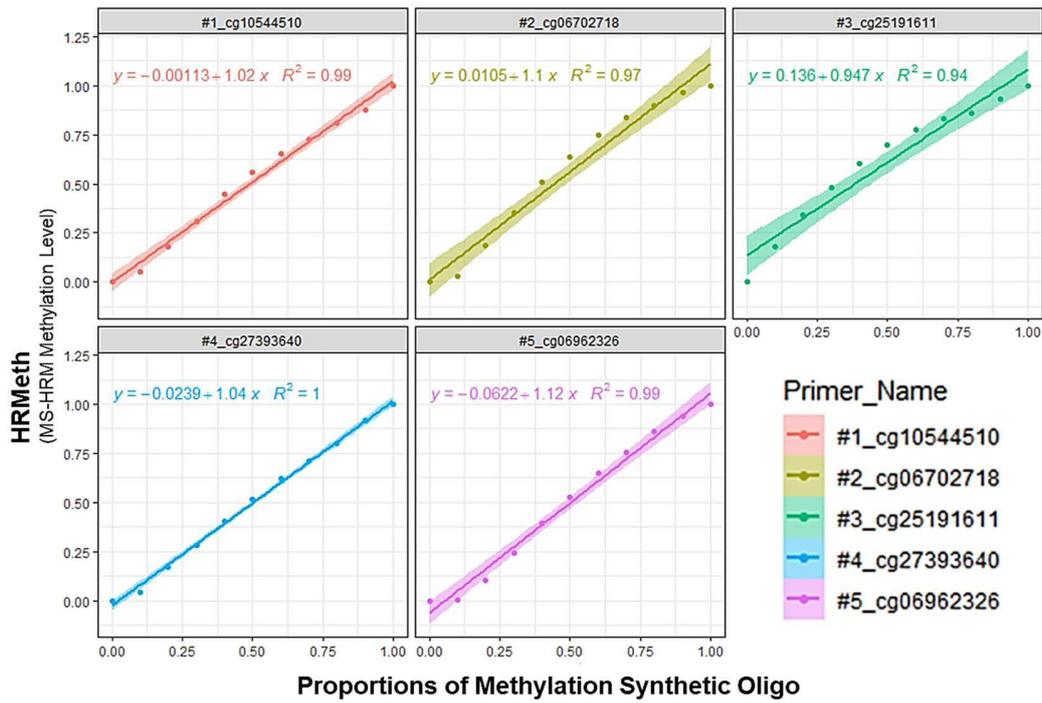
도면9



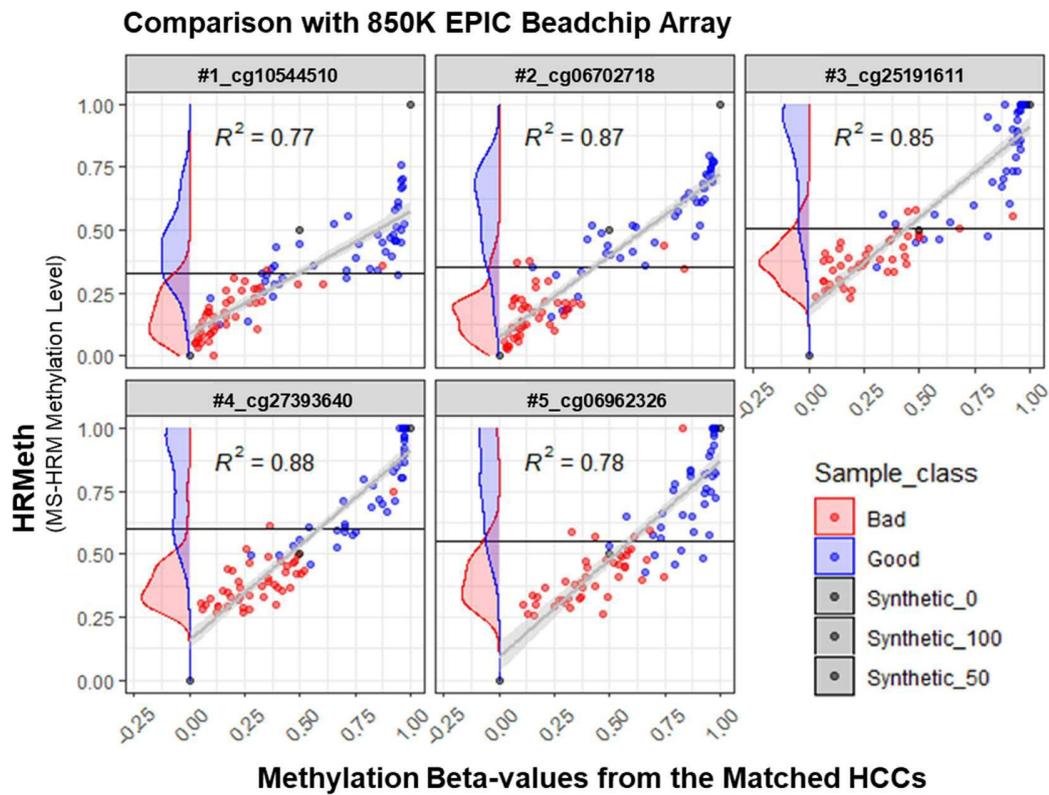
도면10



도면11

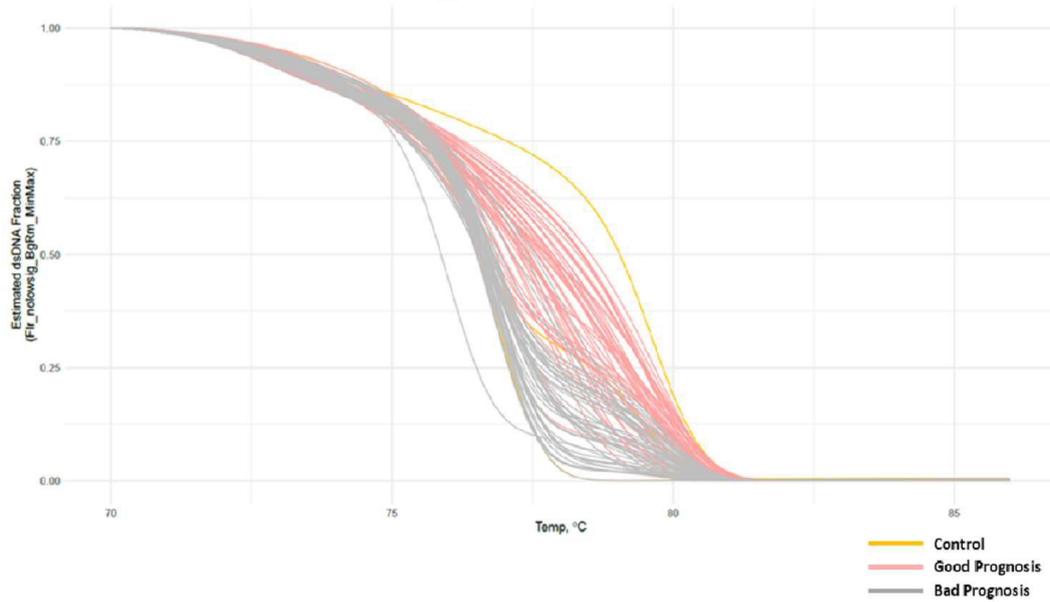


도면12



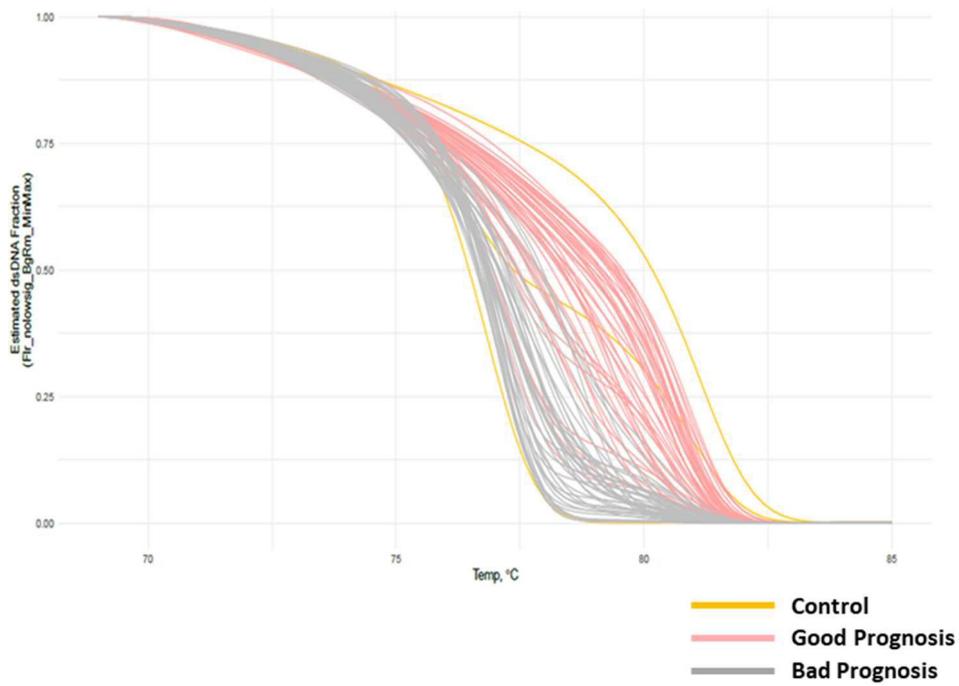
도면13

#1_cg10544510



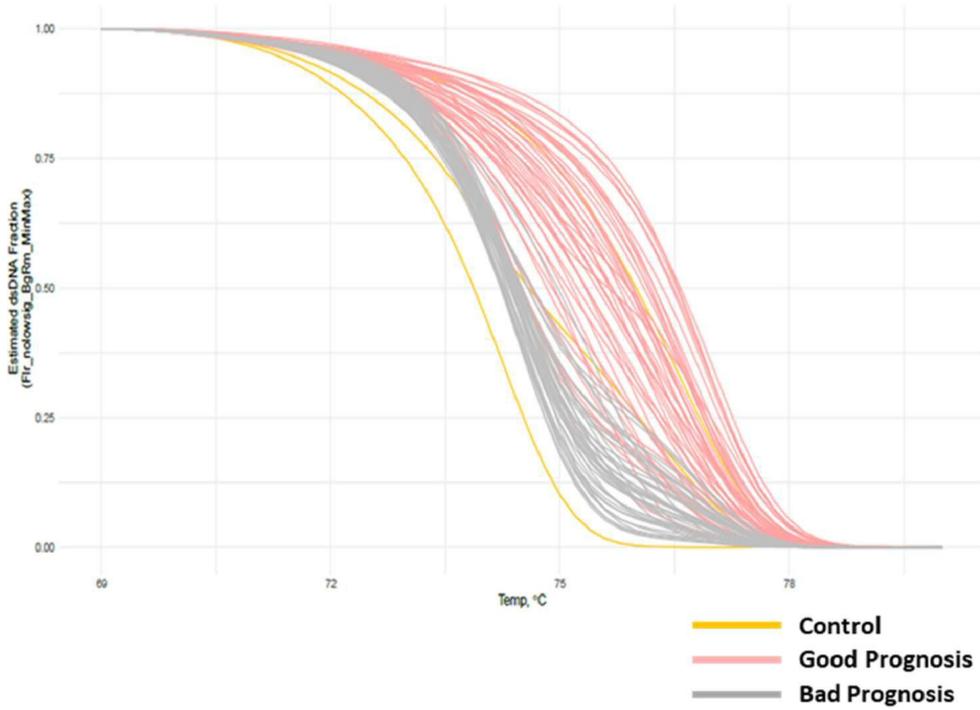
도면14

#2_cg06702718



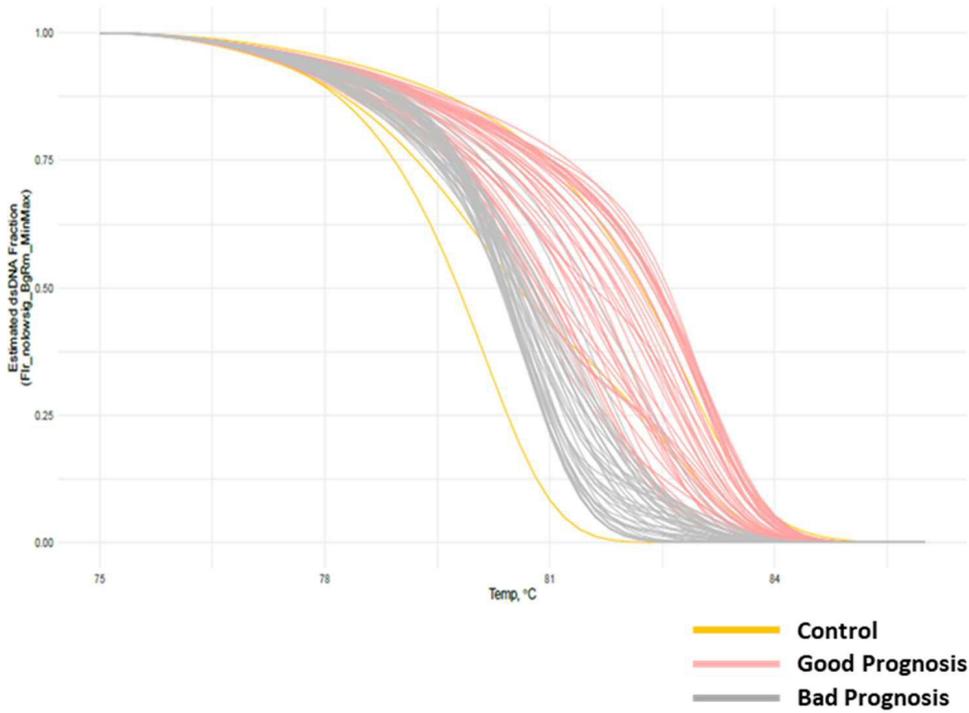
도면15

#3_cg25191611



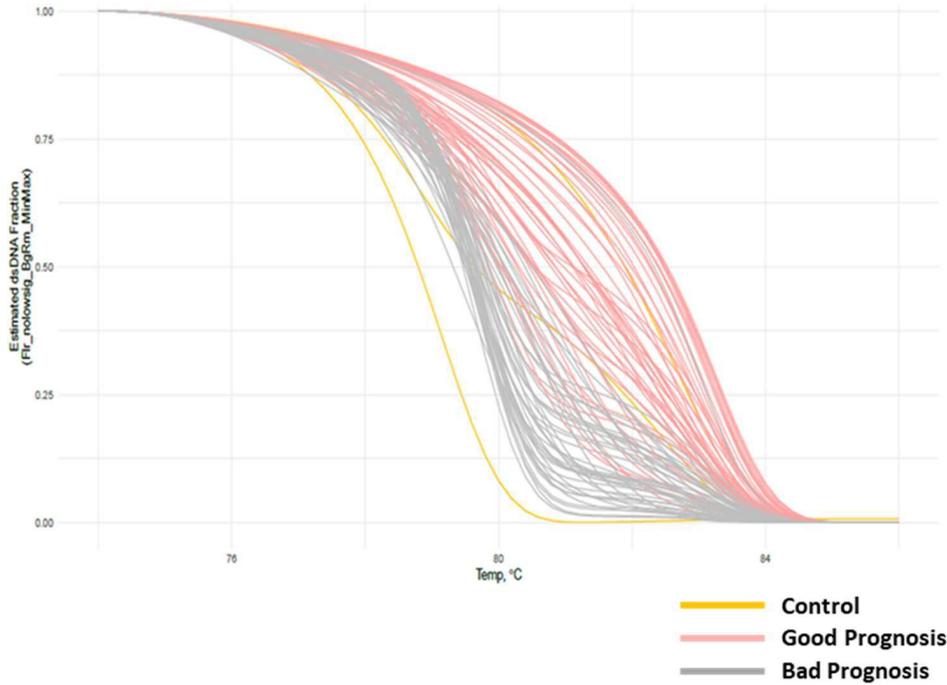
도면16

#4_cg27393640



도면17

#5_cg06962326



서열목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
INDUSTRY-ACADEMIA COOPERATION GROUP OF SEJONG UNIVERSITY
 - <120> METHOD FOR PROVIDING INFORMATION FOR PREDICTING OF LIVER CANCER
 - <130> P21U16C0497_DP-2021-0703
 - <150> KR 10-2020-0156644
 - <151> 2020-11-20
 - <160> 15
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 134
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> cg10544510
 - <400> 1
- ttttagagag gaagaat ttt aagggtgtgt taagataagt ggagttgagg attttgttt 60
- ggggagg ttt atttgaaaag ttgtgtggaa aaatttgatt gtgattttta agtttgtgtt 120

ttataattta ggag 134

<210> 2

<211> 140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg06702718

<400> 2

tatgaaaatg tgaatgatag gattttaaaa agaatgatg tttattttga gagtggaaat 60

aagaaggtag gtgtggtttt attttttttt ggtaggtat gtatgtgggt gatgtggttt 120

ttagaagttt tgtgtatgtt 140

<210>

> 3

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg25191611

<400> 3

gtaggagttt ggttttttgg aagttgttgt tatggttgtt atattttatt attattgtgt 60

tgtggttgtt tattattatt gtttttttagt ttattttgaa ttttttagtt atattttgg 120

tgtttgggggt g 131

<210> 4

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg27393640

<400> 4

taggttgggtt gttatgtgtt tttgggctgt ttgtggatgt tttttgcggt tgggagtttt 60

ttggcgtaag gaggatggcg gggctgtgtt ggcaggaat gaggattttt ttgatgttgg 120

aa 122

<210> 5

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg06962326

<400> 5
 ttttagttgg attttagagg tttgttgtat atgtgtttgt tgggtttgtt attatggggt 60
 atttttatgg gtggtttaaa tagtgggaaa ggaggtggga aggttgagaa taaggtgtgg 120
 ttggagttgg ttttttggag g 141

<210
 > 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for cg10544510
 <400> 6
 ttttagagag gaagaatfff aagg 24
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for cg10544510
 <400> 7
 ctccaaatt ataaaacaca aacttaaaaa 30
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for cg06702718
 <400> 8
 tatgaaaatg tgaatgatag gattt 25
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for cg06702718
 <400> 9
 aacatacaca aaacttctaa aaac 24
 <210> 10

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for cg25191611
 <400> 10
 caccccaaac aaccaaata taacta 26

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for cg25191611
 <400> 11
 gtaggagttt ggttttttgg aag 23

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for cg27393640
 <400> 12
 atcccaccaa caatacacia aaac 24

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for cg27393640
 <400> 13
 aaggtgtag ttttttagg agtaaa 26

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for cg06962326
 <400> 14

tttaggttg attttagagg tt 22

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for cg06962326

<400> 15

cctcaaaaa accaactc 18