



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월05일  
(11) 등록번호 10-2222523  
(24) 등록일자 2021년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2018.05)  
C12Q 2600/106 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0113229  
(22) 출원일자 2020년09월04일  
심사청구일자 2020년09월04일  
(56) 선행기술조사문헌  
Cells. 2020 Jun, 9(6): 1540  
Nat Rev Gastroenterol Hepatol 17, 111-130  
(2020)

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
서울대학교 산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(뒷면에 계속)  
(72) 발명자  
김형표  
경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 601호  
김항필  
경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로527번길 80,  
롯데캐슬에코 102동 1102호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이재영

전체 청구항 수 : 총 9 항

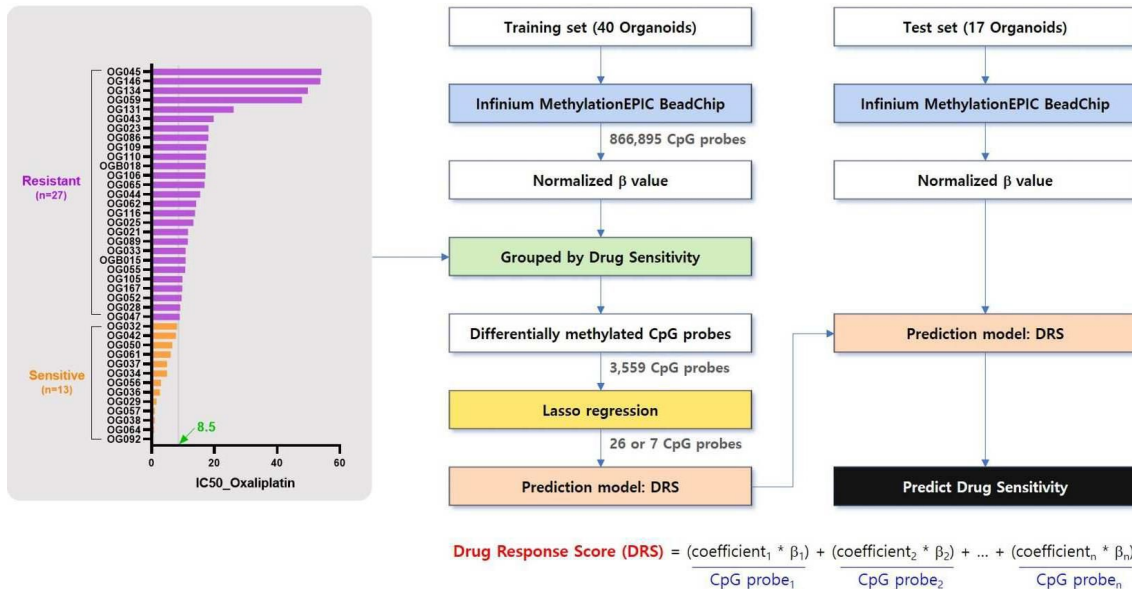
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 약물 반응성 예측용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 대장암 치료에 주로 사용되는 옥살리플라틴 (Oxaliplatin) 약물에 대한 반응성 예측을 위한 조성물에 관한 것으로, 대장암 환자에 대한 상기 치료제 사용의 적합성을 투약 전에 예측하여 임상치에 의한 향후 치료 계획에 있어 적절한 대체 항암제를 사용할 수 있도록 정확한 기초 정보를 제공함으로써 환자의 비용 부담을 줄일 수 있으며, 아울러 생존율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(73) 특허권자

**강원대학교산학협력단**

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

**이화여자대학교 산학협력단**

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

**숙명여자대학교산학협력단**

서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)

(72) 발명자

**조영원**

서울특별시 성동구 마조로 55 금호어울림아파트 101동 2404호

**최선심**

강원도 춘천시 방송길 70 온의롯데캐슬스카이클래스 105동 804호

**이상협**

경기도 김포시 양촌읍 삼도로 295-13

**김태수**

서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호

**유정현**

서울특별시 용산구 새창로 70 도원동삼성래미안 113동 605호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104093

과제번호 2017M3C9A5029978

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 포스트게놈신산업육성을 위한 다부처유전체사업

연구과제명 오가노이드를 활용한 약물후성유전체 분석 기반 대장암 맞춤형 치료제 예측 시스템

개발

기 여 율 9/10

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104716

과제번호 2017M3C9A5029980

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R &D)(과기정통부)

연구과제명 오가노이드를 활용한 약물통합전사체 분석 기반 대장암 맞춤형 치료제 예측 시스템

개발

기 여 율 1/10

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1로 표시되는 프로브를 포함하는 대장암 환자의 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 치료 반응성 예측용 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 2 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 2 내지 6으로 표시되는 프로브; 및 서열번호 7로 표시되는 프로브를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 2 내지 6으로 표시되는 프로브; 및 서열번호 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 7

제 1항 및 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 대장암 환자의 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 치료 반응성 예측 키트.

#### 청구항 8

목적하는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료에 대하여 서열번호 1로 표시되는 프로브를 이용하여 대장암 환자의 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 치료 반응성을 예측하는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 방법은 서열번호 2 내지 6으로 표시되는 프로브; 및 서열번호 7로 표시되는 프로브를 추가로 이용하는, 방법.

#### 청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 방법은 서열번호 2 내지 6으로 표시되는 프로브; 및 서열번호 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 추가로 이용하는, 방법.

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 방법은 서열번호 2 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 추가로 이용하는, 방법.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 항암 약물의 반응성을 예측하는 조성물 및 이를 이용한 항암 약물의 반응성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 대장암의 경우, 조직학적으로 점막 (mucosa)에서 시작되는 선암(adenocarcinoma)이 대부분이며, 드물게 유암종 (carcinoid), 림프종 (lymphoma) 등에 의한 암이 발생하기도 한다. 2017 년에 발표된 중앙 암 등록본부 자료에 의하면 2015 년에 우리나라에서는 214,701 건의 암이 발생했는데, 그 중 대장암은 남녀를 합쳐 26,790 건으로 전체의 12.5 %로 2 위를 차지한 것으로 보고되었다.

[0003] 대장암은 초기에는 별다른 자각증상이 없이 증상만으로는 조기 발견이 매우 어렵다. 1 기에 발견되는 경우는 전체 진단의 20 %로 조기 진단시 내시경 수술로 완치가 가능하고, 거의 95 % 이상이 완치된다. 특히, 대장암의 주요 증상인 복통 설사 혈변 등은 모두 3 기 이상의 진행된 암에서 나타나기 때문에 이러한 증상을 나중에 발견할 경우에는 이미 상당히 진행된 경우가 많다. 2/3 기에 발견되는 경우는 전체 진단의 60 %로 근치적 수술 이후 재발 방지를 위하여 항암 화학요법이 수반된다. 이때, 수술 이후 항암 치료가 요구되지 않는 환자는 이들 중 약 60 % 정도로 추정되며, 약 20 % 정도는 항암 치료에도 불구하고 재발하는 것이 관찰되어서, 실제로는 약 20% 환자만 항암 치료의 효과를 본다고 추론할 수 있다. 즉, 2/3 기의 수술 환자 중 60 %는 약한 치료 또는 치료 없이 경과 관찰해도 무방하나, 재발하는 20 %는 더 센 치료 또는 추가적으로 다른 치료가 필요한 데 이를 정확하게 판별할 수 있는 바이오 마커가 부족한 실정이다.

[0004] 대장암 환자에 대한 수술 전 화학 요법 또는 화학 방사선치료의 병행은 수술만을 단독으로 진행하는 경우와 비교하여 생존율을 향상시킨다. 현재 대장암 치료에 대표적으로 많이 사용되고 있는 세 종류의 세포 독성 치료제로는 5-플루오로우라실(5-Fu), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 이리노테칸(Irinotecan) 등이 있으나, 환자 별 특성에 따라 여러 항암 요법을 시도할 때 상기 약물에 대한 저항성(drug resistance)을 가진 경우 성공적인 항암 치료 효과를 반감시켜 대장암의 예후를 나쁘게 한다.

[0005] 이렇듯 약물 저항성이 예견되는 환자에게 해당 약물로 치료한다 할지라도 치료의 효과를 보장할 수 없어 임상 의사 및 환자들의 시간 및 비용이 불필요하게 소모되는 상황이 발생한다. 따라서, 항암 치료를 시작할 시에는 치료에 따른 환자의 개개인별 특성을 고려하여 결정하여야 하며, 무작정 치료를 감행하기보다는 개개인에게 맞는 맞춤형 약제를 선택적으로 사용할 수 있도록 미리 치료 효율을 가늠할 수 있는 척도가 현실적으로 필요한 상황이다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 약물에 대한 반응성을 예측할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 약물에 대한 반응성을 예측할 수 있는 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 약물에 대한 반응성을 예측할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0010] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0011] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 서열번호 1 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함하는 약물 반응성 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 "프로브 (probe)"는 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 목적하는 유전자에 특이적으로 부착되어 목적 유전자를 확인 및/또는 검출하는 탐침자를 포괄적으로 포함하는 광의의 개념이다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 프로브는 DNA 메틸화를 검출할 수 있는 표지자로서, 보다 구체적으로는 CpG 메틸화 (CpG methylation) 부위에 결합하는 프로브일 수 있으며, DNA 메틸화 (DNA methylation) 패턴 변화를 식별할 수 있도록 결합 가능한 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "CpG"란, CG 부위 (CG site)를 의미하며 시토신 (Cytosine; C)과 구아닌 (Guanine; G)가 인산기로 나란히 있는 서열을 말한다. CpG는 단순한 서열의 나열을 의미하는 것이 아니라 C와 G가 인산기 (phosphate)를 사이에 두고 하나로 연결된 상태를 의미한다. 따라서, CpG는 이중가닥 DNA에서 시토신 염기와 구아닌 염기가 상보적인 수소결합 쌍을 이룬 C-G와 구별된다. 종마다 전체 유전체의 CG 염기쌍 비율은 다르며, 사람의 경우 42% 정도이다. 통상 메틸화가 되지 아니한 시토신은 우라실 (Urasil; U)로 쉽게 바뀌기 때문에 CG 서열이 발생하는 빈도는 그리 높지 않다. 메틸화가 된 시토신은 아무런 영향을 받지 않는다. CpG 섬 (CpG island)은 시토신과 구아닌이 인산기 (phosphate)로 연결된 서열이 최소 200 bp 이상 연속된 부분을 말하며, 포유류의 CpG 섬은 0.4 kb에서 4 kb 정도의 크기를 가진다. 유전체 전체를 보면 1 % 정도인 CpG가 집중적으로 있는 곳으로 대략 이중나선 DNA 길이 300에서 2000 염기쌍 범위 내에 CG 염기쌍 비율이 50 % 이상인 부위가 이에 해당된다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "DNA 메틸화 (DNA methylation)"란, 고등 생물의 발달에 매우 중요한 생화학적 과정 중의 하나이다. 전체 DNA에서 시토신 (C) 다음에 구아닌 (G)이 연속적으로 나오는 염기의 조합은 확률상 1/16 로서 약 3 내지 4 % 정도이다. 그러나 DNA 특정 부위에 CG 조합이 집중적으로 있는 곳이 있는데 이를 CpG 섬 (CpG

island)라 부르며, 유전자의 스위치에 해당되는 프로모터 (promoter) 위치에 이런 구조가 집중되어 있다. DNA 메틸화는 주로 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬 (CpG island)의 시토신 (cytosine)에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 염기 중 하나인 시토신의 5 번째 탄소에 메틸기 (-CH<sub>3</sub>)가 붙는 것을 말한다. 그러나 모든 시토신에 메틸기가 붙는 것이 아니라, 시토신 (C) 다음에 구아닌 (G)이 바로 뒤에 오는 경우에서만 메틸화가 진행된다. 전사 인자의 결합 방해로 특정 유전자의 발현을 차단 (gene silencing)하게 되므로 코딩 서열 (coding sequence)에 돌연변이가 없어도 그 유전자의 기능이 소실되는 기전에 해당한다. DNA 메틸화는 안정적으로 세포에서 유전자 표현형을 변화시킨다. 이러한 변화는 세포 분화를 통해서 유전될 수 있으며, DNA 메틸화는 일반적인 유기체적 진화와 세포적 변이를 위해 결정적 부분이라 할 수 있다. 암을 포함한 다양한 질병들에서 CpG 섬에서의 이러한 비정상적인 메틸화/탈메틸화가 보고되며, 질병 관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여 각종 질환의 진단에 사용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다. 개개인별 상이한 메틸화를 보이는 CpG 영역은 잠재적인 마커로 활용될 수 있다.

- [0018] 본 발명에서 상기 서열번호 1로 표시되는 프로브는 WIPF1 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 서열번호 2로 표시되는 프로브는 TOPAZ1 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 서열번호 3으로 표시되는 프로브는 PRDM6 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 서열번호 4로 표시되는 프로브는 CSMD3 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 서열번호 5로 표시되는 프로브는 APOC2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 서열번호 6으로 표시되는 프로브는 APOC2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 서열번호 7로 표시되는 프로브는 FEM1C 및 TICAM2 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 서열번호 8로 표시되는 프로브는 SLC26A9 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 서열번호 9로 표시되는 프로브는 CPO 및 KLF7 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 서열번호 10으로 표시되는 프로브는 PDCD6IP 및 LOC101928135 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 서열번호 11로 표시되는 프로브는 ZIC4 및 LINC02010 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 서열번호 12로 표시되는 프로브는 C4orf22 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 상기 서열번호 13으로 표시되는 프로브는 KPNA5 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 서열번호 14로 표시되는 프로브는 ULBP2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 서열번호 15로 표시되는 프로브는 PTPRN2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 서열번호 16으로 표시되는 프로브는 NRG1 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 서열번호 17로 표시되는 프로브는 GPIHBP1 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 상기 서열번호 18로 표시되는 프로브는 FRMD3 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 서열번호 19로 표시되는 프로브는 PTPN5 및 MRGPRX1 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 서열번호 20으로 표시되는 프로브는 KRT2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 서열번호 21로 표시되는 프로브는 FOXA1 및 TTC6 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 서열번호 22로 표시되는 프로브는 ONECUT1 및 LINC02490 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 서열번호 23으로 표시되는 프로브는 LOC102724596 및 PHB 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼



성화되는 것일 수 있다.

- [0041] 본 발명에서 상기 서열번호 24로 표시되는 프로브는 SPAG4 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 서열번호 25로 표시되는 프로브는 LOC101928126 및 SLC5A3 유전자 사이 영역의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 서열번호 26으로 표시되는 프로브는 CACNG2 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 서열번호 27로 표시되는 프로브는 MTSS1 유전자의 CpG 부위에 혼성화되는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함하고, 서열번호 7로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 및 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함하고, 서열번호 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 프로브, 또는 서열번호 1 내지 7로 표시되는 프로브, 또는 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 프로브 및 서열번호 8 내지 27로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 프로브는 필요에 따라서는, 형광 물질, 방사선 물질, 생물 발광 물질, 화학 발광 물질, 효소, 수용체 또는 리간드 등으로 표시될 수 있다. 보다 구체적으로 상기 표시 물질은 형광 물질일 수 있으며, 형광 물질은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP) 또는 변형된 적색 형광 단백질(modified red fluorescent protein; mRFP)일 수 있다. 표시 방법은 당해 분야에 널리 알려진 기술로, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 프로브는 CpG 부위에 결합하여 DNA 메틸화 정도를 확인할 수 있도록 하며, 더 나아가서는 이를 바탕으로 목적하는 개체에 있어서 약물의 치료 반응성을 예측할 수 있도록 한다.
- [0053] 본 발명에서 상기 "약물"은 "암 치료제", "항암 치료제" 또는 "항암제"와 혼용하여 사용될 수 있으며, 상기 약물은 암 줄기세포만 아니라 암 세포에 작용하여 암 세포를 사멸시키는 기전을 가진 약물 또는 그 외 다른 기전으로 작용하여 항암 효과가 있는 약물일 수 있다. 예를 들어, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미토산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시물리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 펠파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는 약물일 수 있고, 바람직하게는 옥살리플라틴 (Oxaliplatin)일 수 있으나, 옥살리플라틴과 동일 계열이라고 볼 수 있는 약물의 종류에 해당한다면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 상기 "옥살리플라틴 (Oxaliplatin)"은 백금(platinum) 계열로 분류되는 항암제의 일종으로, DNA의

크로스 링크를 통해 DNA 수선, 및 DNA 합성을 억제한다. 백금 계열 항암제들의 예로는 카보플라틴 (Carboplatin), 시스플라틴 (Cisplatin), 네다플라틴 (Nedaplatin), 트리플라틴 테트라니트레이트 (Triplatin tetranitrate), 페난트리플라틴 (Phenanthriplatin), 사트라플라틴 (Satraplatin), 피코플라틴 (Picoplatin) 등이 존재한다 옥살리플라틴과 동일한 기전으로 작용하는 약물에 해당한다면, 상기에서 언급된 약물로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에서 상기 "약물 반응성"이란 개체, 바람직하게는 암 환자의 개체에 대하여 약물로 치료의 유효성의 정도를 지칭한다. 예를 들어, 암 환자의 치료에 관련하여 사용될 때 용어 "증가된 반응성" 또는 "좋은 반응성"은 당해 분야에서 공지된 임의의 방법을 이용하여 측정된 경우 약물의 유효성에서 증가를 지칭할 수 있다. 또 다른 예로서, 약물에 대한 암 환자의 반응은 완전 또는 부분 반응으로 특성 규명될 수 있다. 또 다른 예로서, 약물에 대한 암 환자의 증가된 반응성은 전체 생존율, 무질환 생존, 목적 반응 속도, 종양 진행까지 시간, 무진행 생존 또는 치료 실패까지 시간으로 특성 규명될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 "예측"이란, 환자가 약물 또는 약물 세트에 대해서 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후 예측이란 질환의 치료 후 결과는 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0057] 본 발명에서 상기 "암"이란, 일반적으로 제어되어 있지 않은 세포 증식을 특징으로 하는 포유류의 생리학적 상태를 지칭한다. 암의 예로서는 대장암, 유방암, 신경교종, 갑상선암, 폐암, 간암, 췌장암, 두경부암, 위암, 요로상피암, 신장암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 흑색종양, 난관암, 자궁암, 혈액암, 골암, 피부암, 뇌암, 질암, 내분비암, 부갑상선암, 요관암, 요도암, 기관지암, 방광암, 골수암, 급성 림프구성 또는 림프아구성 백혈병, 급성 또는 만성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 뇌종양, 경관암, 만성 골수성 백혈병, 장암, T-존 림프종, 식도암, 담즙 방광암, 유잉 육종 (Ewing's sarcoma), 설암, 흡킨스 림프종, 카포시스 육종, 중피종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 비흡킨 림프종, 골육종, 신경아세포종, 유선암, 경관암, 페니스암, 레티노블라스토마, 피부암, 및 자궁암을 들 수 있으며, 보다 바람직하게는 대장암 일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에서 상기 "대장암"은, 예컨대 대장 내시경 감시 및 생검 (biopsy) 조직에 의해 악성 병리 상태로 분류되는 상태이다. 대장암 진단의 임상적인 기술은 의학 분야에서 잘 알려져 있다. 대장은 소화 기관에 속하며 소장과 항문 사이에 위치하는 장기로 전체 길이가 평균 약 1.5 미터 정도 되고 우측에서부터 맹장, 상행결장, 횡행결장, 하행결장, S자결장, 직장으로 나누어 분류된다. 주로 대장암은 결장과 직장에 생기는 악성 종양으로 대장의 상피 세포에서부터 암 세포가 발생하게 되는데, 암의 발생 위치에 따라 결장에 생기는 암을 결장암, 직장에 생기는 암을 직장암이라고 하며, 이를 통칭하여 대장암 혹은 결장직장암이라고 한다. 본 발명의 대부분의 예에 있어서, 목적 대상자는 대장암으로 추측되거나 또는 실제 진단받은 인간 환자이다.

[0059] 본 발명에서 "대장암의 병기"는 0 기 (in situ colon cancer), I 기 (T1N0 또는 T2N0), IIA 기 (T3N0), IIB 기 (T4N0), IIC 기 (T4bN0), IIIA 기(T1N1, T2N1 또는 T1N2a), IIIB 기 (T3N1, T4aN1, T2N2a, T3N2a, T1N2b 또는 T2N2b), IIIC 기 (T4aN2a, T3N2b, T4aN2b, T4bN1 또는 T4bN2), IVA 기 (M1a, T N 무관) 및 IVB 기 (M1b, T N 무관)로 나뉜다. 초기 단계의 대장암 환자에는 림프절 관여가 거의 또는 전혀 나타나지 않는다. 2 기의 대장암 환자의 경우 종양의 침윤이 장막 층을 뚫지 않은 경우로, 주변 림프절과 원격 전이가 없는 상태로서 5 년 생존율이 대략 70 % 정도로 보고되고 있으며, 3 기의 대장암 환자의 경우 종양의 침윤 정도와 무관하며, 주변 림프절에 전이가 있으며, 원격 전이가 없는 상태로서 5 년 생존율이 대략 50 % 정도로 보고되고 있다. 4 기의 대장암 환자의 경우 종양의 장벽 침윤 정도와 무관하며, 원격 전이가 있는 상태이지만 대개의 경우 주변 림프절에 전이가 발견되며 5 년 생존율은 대략 5 % 이하로 보고되고 있다. 대장암 환자의 생존율은 진단받은 시점의 병리학적 병기에 의존한다. 그러나, 특히 2/3 기와 같은 병기로 진단된 대장암이라도 그 예후는 환자마다 차이가 있으며, 치료 약물에 따른 반응성 또한 환자마다 다르므로 대장암의 효과적인 치료를 위해서는 대장암의 약물 치료 반응성을 통하여 예후를 예측하는 것이 무엇보다 중요하다.

[0060] 대장암 환자를 구별하는 방법과 질병의 단계를 매기는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 수동 조사, 생검, 환자 및/또는 가족력 조사, 및 직장 수지 검사 (rectal examination), 분변 잠혈 검사, 대장촬영술 (Double contrast Barium-enema), 대장 내시경 검사, 직장경 및 직장 항문 초음파 검사, 자기공명영상화 (MRI), 전산화 단층촬영 (computed tomography; CT), CT 대장촬영술 (CT colonography) 및 양전자 단층 촬영술(positron emission tomography; PET) 등과 같은 영상화 기법을 포함할 수도 있다. 또한, 대장암은 예컨대, 수술, 방사선



치료, 호르몬 치료, 항암 치료 또는 이의 일부 조합을 포함할 수 있으며, 당업계에 알려진 여러가지 대안적인 전략에 의해 관리될 수 있다.

- [0062] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 약물 반응성 예측용 조성물을 포함하는 약물 반응성 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명에서 "키트"란 바이오 마커 성분에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 항체를 검출 가능한 표지로 표시하여 바이오 마커의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브 또는 항체 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표시하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표시된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다. 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 약물 반응성 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 디지털 PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Droplet Digital PCR 키트 또는 MethylationEPIC BeadChip 키트일 수 있으나, 당업계에 공지되어 있는 것이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 대하여 서열번호 1 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 이용하여 약물 반응성을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명에서 상기 "인간"은 암이 발병하였거나 그 발병이 의심되는 환자로, 암의 적절한 치료가 필요하거나 예상되는 환자를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 보다 바람직하게는 환자의 유전자 정보를 확인할 수 있는 모든 시료를 의미할 수 있다. 구체적으로, 전혈 (whole blood), 백혈구 (leukocytes), 말초혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층 (buffy coat), 혈장 (plasma), 혈청 (serum), 객담 (sputum), 눈물 (tears), 점액 (mucus), 세비액 (nasal washes), 비강 흡인물 (nasal aspirate), 호흡 (breath), 소변 (urine), 정액 (semen), 침 (saliva), 복강 세척액 (peritoneal washings), 복수 (ascites), 낭종액 (cystic fluid), 뇌척수막 액 (meningeal fluid), 양수 (amniotic fluid), 선액 (glandular fluid), 췌장액 (pancreatic fluid), 림프액 (lymph fluid), 흉수 (pleural fluid), 유두 흡인물 (nipple aspirate), 기관지 흡인물 (bronchial aspirate), 활액 (synovial fluid), 관절 흡인물 (joint aspirate), 기관 분비물 (organ secretions), 세포 (cell), 세포 추출물 (cell extract) 및 뇌척수액 (cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 본 발명의 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함하고, 서열번호 7로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 및 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함하고, 서열번호 8 내지 27 중 적어도 하나로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 일 예시에서, 상기 프로브는 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 프로브, 또는 서열번호 1 내지

7로 표시되는 프로브, 또는 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 프로브 및 서열번호 8 내지 27로 표시되는 프로브를 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 약물 반응성을 예측하는 방법은 상기 프로브를 이용하여 DNA 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명에서 상기 DNA 메틸화 수준의 측정은 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR; MSP), EpiTYPER<sup>®</sup>, 메틸화-감수성 단일 뉴클레오타이드 프라이머 신장 (methylation-sensitive single-nucleotide primer extension; MS-SnuPE), 결합된 바이설파이트 제한 분석 (combined bisulfite restriction analysis of DNA; COBRA), 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 압타머를 이용한 PCR, 정량 PCR, 디지털 PCR, DNA 칩, 피로시퀀싱 (pyrosequencing) 및 바이설파이트-시퀀싱 (bisulfite-sequencing)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 방법에 의해 수행되는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 Droplet Digital PCR 또는 MethylationEPIC BeadChip에 의하여 수행될 수 있으나, 상기에서 기재된 방법 외 당업계에 알려진 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0077] 본 발명에서 바이설파이트-시퀀싱을 통하여 메틸화 CpG를 검출할 수 있으며, 피로시퀀싱을 수행하여 DNA 메틸화 패턴 변화를 확인할 수 있다. 특히, 바이설파이트 서열 분석은 유전체 DNA를 바이설파이트로 처리 후 CpG 염기 서열이 없는 부위에 해당하는 PCR 프라이머로 증폭한 다음, 염기서열 분석용 프라이머를 이용하여 염기서열 분석을 수행하는 것으로, CpG 부위에서 시토신과 티민의 양을 정량적으로 분석하여 메틸화 정도를 메틸화 지수로 나타낼 수 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 프로브를 2 개 이상 사용하는 경우, 각 프로브 별 DNA 메틸화 수준을 측정할 수 있다.

[0079] 본 발명의 약물 반응성을 예측하는 방법은 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 베타 값 ( $\beta$  value)을 얻는 단계를 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 상기 "베타 값 ( $\beta$  value)"은 메틸화 및 비 메틸화 대립 유전자 사이의 비율을 사용한 메틸화 수준의 추정치를 말한다. 베타 값은 0 내지 1의 범위에 포함될 수 있고, 0은 메틸화되지 않은 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다.

[0081] 본 발명에서 상기 프로브를 2 개 이상 사용하는 경우, 각 프로브별 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 베타 값을 얻을 수 있다.

[0082] 또한, 본 발명의 약물 반응성을 예측하는 방법은 얻어진 베타 값을 이용하여 약물 반응성 스코어 (Drug Response Score; DRS)를 계산하는 단계를 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명의 상기 약물 반응성을 예측하는 방법에서의 프로브, 약물, 약물 반응성에 관한 기재는 본 발명의 약물 반응성 예측용 조성물에 기재된 바와 중복되어 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

### 발명의 효과

[0084] 본 발명에서 제공하는 프로브를 이용하는 경우 암 환자 개인별 항암제에 대한 치료 반응성을 예측할 수 있고, 이에 따라 추가적인 치료 방법 또는 대체 약물의 사용 여부를 손쉽게 결정하는 등 개인 맞춤형 정밀 치료가 가능하도록 하여 궁극적으로는 암 환자의 생존율 또는 생존 기간을 향상시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 대장암 환자 유래 오가노이드를 기반으로 한 약물 반응성 스코어 (Drug Response Score; DRS) 예측 모델의 모식도를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 예측 정확도를 확인하기 위한 라소 회귀 곡선(Lasso regression)을 나타낸 도이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 7 개의 CpG 프로브를 통해 무작위로 선택된 40 개의 트레이닝 세트의 DRS 분포를 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 17 개의 테스트 세트로 DRS 분포를 정량화하여 7 개의 CpG 프로브를 통한 약물 반응성 예측 모델을 검증한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 26 개의 CpG 프로브를 통해 무작위로 선택된 40 개의 트레이닝

세트의 DRS 분포를 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 17 개의 테스트 세트로 DRS 분포를 정량화하여 26 개의 CpG 프로브를 통한 약물 반응성 예측 모델을 검증한 결과를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

#### [0088] 실시예 1: 대장암 임상 database 및 환자 유래 오가노이드의 준비

[0089] 환자 유래 오가노이드 배양을 위한 프로세스 구축을 위하여 외과 수술 후의 환자 시료(조직) 및 오가노이드 배양까지의 전 과정을 최적화하고, 추가로 승인된 2/3 기 대장암 환자들의 신선동결 조직 및 오가노이드를 확보하였다. 보다 상세하게는 수술장 또는 대장 내시경을 통해 수집된 검체는 신선동결 상태에서 오가노이드 수립을 위하여 사용되며, 동시에 해당 환자의 임상데이터는 전자의무기록 (electronic medical record; EMR) 확인을 통해 수술 후 경과, 항암 치료 경과 및 재발 여부 등의 정보 수집에 사용된다. 수집된 조직의 1 차 배양 (primary culture)을 통해 오가노이드 전용 배지를 이용하여 3D 배양을 하였다. 배양된 오가노이드로부터 상동성 검사 결과 초기 종양 조직(primary tumor tissue)에서의 모양을 유지하는지를 확인하였으며, 기능을 갖추었는지를 판별하기 위하여 면역형광 (immunofluorescence) 염색을 통해 확인하였으며, 마지막으로 유전체 검사 (whole exome sequencing; WES)를 수행하여 종양 조직의 유전적 변이 (genetic alteration)을 반영하는 지를 확인하였다. 상기와 같이 상동성 검사, 기능성 검사 및 유전체 검사를 수행하여 실험에 이용할 오가노이드를 최종적으로 수립하였다.

#### [0091] 실시예 2: 전유전체적 DNA methylation 지도 작성 및 약물 반응성 관련 후성유전인자 발굴

##### [0092] 2.1 약물 반응성 분석

[0093] 실시예 1에서 확보한 대장암 오가노이드로부터 세포 독성 항암제인 옥살리플라틴(Oxaliplatin)에 대한 반응성을 분석하였다. 이 때, 오가노이드의 약물 반응성은 cellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay와 현미경을 이용한 오가노이드 형태 측정 등 이중으로 검증하였다. 이때, 상기 약물을 처리하여 옥살리플라틴 약물 반응을 수치화하는 방법으로 예를 들어, IC<sub>50</sub> 은 약물이 투여되었을 때 세포의 활성도 (enzyme/protein activity)가 절반으로 떨어지는 순간의 최대 농도 (maximal concentration)를 가리키는 것으로 약물 반응성을 평가하는 지표로 사용되었다.

##### [0095] 2.2 전유전체적 DNA 메틸화 지도 작성

[0096] 대장암 오가노이드에서 개인별 차이나 항암 치료제 처리 여부에 의한 DNA 메틸화 (DNA methylation) 패턴 변화를 Illumina사의 Infinium MethylationEPIC BeadChip을 이용하여 분석하였다. Infinium MethylationEPIC BeadChip의 경우 850,000 여개의 메틸화 부위 (Methylation site)에 프로브 (Probe)가 존재하고 있으며, 지놈 DNA (genomic DNA)로부터 직접 메틸화된 DNA의 정량이 가능하여 매우 빠르게 시료를 분석할 수 있다는 장점이 있다.

[0097] 대장암 오가노이드에서 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 피코그린 (Picogreen)을 이용하여 정량화된 500 ng DNA 샘플을 준비하고, 바이설파이트 (Bisulfite) 처리 후 전유전체 증폭 (whole genome amplification) 방법으로 증폭시켰다. 증폭된 DNA (Amplified DNA)는 화학적 처리 (chemical method)로 무작위로 조각을 내어 정제 과정 (purification)을 수행하였다. 이후, 완충 용액으로 전 처리된 Chip에 DNA 샘플을 넣고 약 16 시간 동안 인큐베이션 (incubation) 시행 후 염색 (staining), 대립 유전자 특이적 프라이머 확장 (allele specific primer extension; ASPE), 혼성화 (hybridization), 타겟 제거 (target removal), 워싱 (washing)하여 Illumina iScan으로 스캐닝 (scanning)을 진행하였다.

[0098] Infinium MethylationEPIC BeadChip 실험 절차는 내부 대조물질 (internal control)을 이용하여 각 실험 단계에서 발생할 수 있는 에러를 체크할 수 있게 하여 실험 결과의 문제 발생 시, 추적 (tracking)하는 것을 도와주고, 실험 결과의 신뢰성을 확보할 수 있게 하였다. 내부 대조물질 (Internal control)은 샘플 퀄리티 (sample quality)와 무관하게 반응하는 샘플 비의존적 대조물질 (sample independent controls)과 샘플 퀄리티에 영향을 받는 샘플 의존적 대조물질 (sample dependent control)이 존재한다. 게놈 스튜디오 소프트웨어

(GenomeStudio S/W)를 이용하여 이미지 데이터 불러오기, 컨트롤 대시보드 (Control Dashboard) 및 발견된 CpG 프로브 (detected CpG probe) 수를 확인하였다. 각 유전자 별로 특이적인 DNA 메틸화 패턴 (DNA methylation pattern)을 조사하고 이러한 패턴이 약물 반응성 별로 차이를 보이는 곳을 집중적으로 탐색 확인해 나갔다. 후성 유전체 분석을 통해 일차적으로 선별된 부위들을 대상으로, 피로시퀀싱 (pyrosequencing)이나 바이설파이트-시퀀싱 (bisulfite-sequencing)을 수행하여 각 오가노이드 별로 약물 반응성에 따라 특이적으로 나타나는 DNA 메틸화 패턴을 이차적으로 검증하였다.

### [0100] 실시예 3: 옥살리플라틴 약물 반응성 관련 프로브 발굴

상기 실시예 1에서 확보된 오가노이드 57 개를 대상으로 Infinium MethylationEPIC BeadChip을 이용하여 866,895 개의 CpG 프로브 (probe)의 DNA 메틸화 (DNA methylation) 상태를 측정하였으며, 확보된 오가노이드 57 개를 대상으로 옥살리플라틴 (Oxaliplatin)에 대한 약물반응성 실험을 수행하여 각각의 오가노이드의 옥살리플라틴에 대한 IC<sub>50</sub> 을 확보하였다. 전체 오가노이드 57 개를 무작위로 트레이닝 세트 (training set) 40 개와 테스트 세트 (test set) 17 개로 분류한 뒤, 먼저 트레이닝 세트 40 개를 이용하여 약물 반응성 예측 모델을 확보하고, test set 17 개를 이용하여 예측 모델을 검증하고자 하였다. 이와 관련한 전체 과정의 모식도를 도 1에 나타내었다.

### [0103] 실시예 4: 옥살리플라틴 약물 반응성 예측 모델 도출

약물 반응성 예측 모델을 확보하기 위해, 먼저 1) 트레이닝 세트인 40 개의 오가노이드를 대상으로 IC<sub>50</sub> (옥살리플라틴) = 8.5 을 기준으로 옥살리플라틴에 대해 저항성이 약한 그룹 (13 개 오가노이드)과 저항성이 강한 그룹 (27 개 오가노이드)으로 분류하였으며, 2) 두 그룹 간의 메틸화(methylation)의 정도가 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 차이가 나는 3,559 개의 CpG 프로브 (Differentially methylated CpG probes; DMPs)를 선별한 후, 3) 라소 회귀 알고리즘 (Lasso regression algorithm)을 이용하여 저항성이 있는 그룹과 저항성이 없는 그룹을 구분할 수 있는 27 개의 CpG 프로브를 도출하였다(도 2 참조).

상기 과정을 통하여 최종적으로 선별된 CpG 프로브를 이용하여 약물 반응성을 예측할 수 있는 모델을 도출하였다. 구체적으로는 서열번호 1 내지 27 중 어느 하나로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준 (methylation level)으로부터 얻어진 베타 값과, 각 프로브에 해당하는 가중치 계수 값 (Coefficient)을 곱한 값이거나, 혹은 사용되는 프로브가 복수 개인 경우 각 프로브 별 얻어진 곱한 값을 합산하여 얻어진 총합에 해당하는 약물 반응성 스코어(Drug Respose Score; DRS)를 도출하였다(식 1). 교차 검증 (Cross-Validation)을 통해 트레이닝 세트와 테스트 세트로 나누어서 에러 (Error) 값을 가장 작게 만드는 각 프로브 별 가중치 계수 (Coefficient) 값을 도출해 내었다(하기 표 1 참조). 상기 과정을 거쳐 선별된 프로브에 따른 최적의 예측 모델로서의 안정도를 평가 검증하고자 하였다.

[식 1]

약물 반응성 스코어 (DRS) = (coefficient<sub>1</sub> \* b<sub>1</sub>) + (coefficient<sub>2</sub> \* b<sub>2</sub>) + ... + (coefficient<sub>n</sub> \* b<sub>n</sub>)

상기 식 1에서,

n은 1 내지 27 중 어느 하나의 정수이며,

coefficient<sub>n</sub>은 -3.50 내지 4.35의 유리수로, 서열번호 n으로 표시되는 프로브 별 coefficient는 하기 표 1에 나타낸 바와 같으며,

b<sub>n</sub>은 서열번호 n으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며,

상기 n이 2 내지 27의 정수인 경우, 복수 개의 coefficient<sub>n</sub>은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

표 1

CpG probe (서열번호)	프로브 결합 부위	프로브 결합 유전자	사용되는 프로브 별 가중치 계수 값	
			Coef26	Coef7
cg24401656 (서열번호 1)	Body	WIPF1	3.10	1.31

cg13562675 (서열번호 2)	Body	TOPAZ1	-2.76	-0.68
cg27087956 (서열번호 3)	Body	PRDM6	-2.61	-0.40
cg26469483 (서열번호 4)	Body	CSMD3	-0.67	-0.06
cg09555818 (서열번호 5)	5'UTR	APOC2	2.85	0.91
cg08161337 (서열번호 6)	1 <sup>st</sup> Exon	APOC2	3.93	0.10
cg02637031 (서열번호 7)	Intergenic	FEM1C, TICAM2	0	-0.65
cg04292976 (서열번호 8)	TSS1500	SLC26A9	-0.43	
cg26879736 (서열번호 9)	Intergenic	CPO, KLF7	1.11	
cg09847528 (서열번호 10)	Intergenic	PDCD6IP, LOC101928135	-0.21	
cg08522426 (서열번호 11)	Intergenic	ZIC4, LINC02010	-1.77	
cg01791935 (서열번호 12)	Body	C4orf22	-0.06	
cg14627781 (서열번호 13)	3'UTR	KPNA5	-0.06	
cg02858652 (서열번호 14)	Body	ULBP2	0.16	
cg07859489 (서열번호 15)	Body	PTPRN2	0.28	
cg12954529 (서열번호 16)	Body, TSS200	NRG1	-0.45	
cg25496417 (서열번호 17)	1 <sup>st</sup> Exon, 5'UTR	GPIHBP1	0.49	
cg03665520 (서열번호 18)	Body	FRMD3	-1.06	
cg15998725 (서열번호 19)	Intergenic	PTPN5, MRGPRX1	-0.15	
cg20210559 (서열번호 20)	TSS1500	KRT2	0.52	
cg11090582 (서열번호 21)	Intergenic	FOXA1, TTC6	-0.24	
cg12352124 (서열번호 22)	Intergenic	ONECUT1, LINC02490	-0.54	
cg08176914 (서열번호 23)	Intergenic	LOC102724596, PHB	-1.31	
cg23713742 (서열번호 24)	TSS1500	SPAG4	-0.03	
cg12885728 (서열번호 25)	Intergenic	LOC101928126, SLC5A3	-0.06	
cg26757722 (서열번호 26)	5'UTR, 1 <sup>st</sup> Exon	CACNG2	0.76	
cg18209489 (서열번호 27)	Body	MTSS1	1.07	

[0116] 실시예 5: 옥살리플라틴 약물 반응성 예측 모델 검증

[0117] 본 발명자들은 신뢰 예측 값의 안정성 (예측의 정확도)을 확인하기 위하여 n 개의 CpG 프로브 예측 모델을 17



개의 테스트 샘플로 검증하였다. 7 개의 CpG 프로브를 이용한 모델, 26 개의 CpG 프로브를 이용한 모델 각각을 검증한 결과는 아래와 같다.

[0118] 5.1 7 개의 CpG 프로브를 이용한 모델의 검증

[0119] 도 3a 및 도 3b를 참조하면, 7 개의 CpG 프로브를 이용한 약물 반응성 예측 모델로서 무작위로 선택된 40 개의 트레이닝 세트 사용의 결과를 확인하였으며, 17 개의 테스트 샘플로 검증한 결과를 나타내었다(도 4 참조). 도 4에서 보는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 7의 CpG 프로브를 이용한 경우 약물 저항성 군과 약물 민감성 군에 대한 수신자 조작 특성(ROC) 그래프로 도시한 결과 곡선 하면적 (area under the curve; AUC) 값이 0.764로 매우 높은 진단의 정확도를 보였다. 해당 프로브에 의한 약물 반응성 스코어 (DRS)는 하기 식 2와 같다.

[0120] [식 2]

[0121] 
$$\text{약물 반응성 스코어 (DRS)} = (\text{coefficient}_1 * b_1) + (\text{coefficient}_2 * b_2) + (\text{coefficient}_3 * b_3) + (\text{coefficient}_4 * b_4) + (\text{coefficient}_5 * b_5) + (\text{coefficient}_6 * b_6) + (\text{coefficient}_7 * b_7)$$

[0122] 상기 식 2에서,

[0123] 상기  $\text{coefficient}_1$ 은 1.31이고;

[0124] 상기  $\text{coefficient}_2$ 는 -0.68이며;

[0125] 상기  $\text{coefficient}_3$ 은 -0.40이고;

[0126] 상기  $\text{coefficient}_4$ 는 -0.06이며;

[0127] 상기  $\text{coefficient}_5$ 는 0.91이고;

[0128] 상기  $\text{coefficient}_6$ 은 0.10이며;

[0129] 상기  $\text{coefficient}_7$ 은 -0.65이고;

[0130] 상기  $b_1$ 은 서열번호 1로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;

[0131] 상기  $b_2$ 는 서열번호 2로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;

[0132] 상기  $b_3$ 은 서열번호 3으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;

[0133] 상기  $b_4$ 는 서열번호 4로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;

[0134] 상기  $b_5$ 는 서열번호 5로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;

[0135] 상기  $b_6$ 은 서열번호 6으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;

[0136] 상기  $b_7$ 은 서열번호 7로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이다.

[0138] 상기와 같은 식 2의 DRS 값이 0.35 내지 0.65, 바람직하게는 0.50인 경우를 컷 오프 값 (cut off value)으로 하여, 각 개체에서 계산된 DRS 값이 상기 컷 오프 값 미만인 경우 옥살리플라틴의 치료 반응성이 좋은 것으로 예측할 수 있고, 계산된 DRS 값이 상기 컷 오프 값 이상인 경우 옥살리플라틴의 치료 반응성이 나쁠 것으로 예측할 수 있다.

[0140] 5.2 26 개의 CpG 프로브를 이용한 모델의 검증

[0141] 도 5a 및 도 5b를 참조하면, 26 개의 CpG 프로브를 이용한 약물 반응성 예측 모델로서 무작위로 선택된 40 개의 트레이닝 세트 사용의 결과를 확인하였으며, 17 개의 테스트 샘플로 검증한 결과를 나타내었다(도 6 참조). 도 6에서 보는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 6의 CpG 프로브 및 서열번호 8 내지 27의 CpG 프로브를 이용한 경우 약물 저항성 군과 약물 민감성 군에 대한 수신자 조작 특성(ROC) 그래프로 도시한 결과 곡선 하면적 (area under the curve; AUC) 값이 0.917으로 매우 높은 진단의 정확도를 보였다. 해당 프로브



에 의한 약물 반응성 스코어 (DRS)는 하기 식 3과 같다.

[0143] [식 3]

[0144] 약물 반응성 스코어 (DRS) = (coefficient<sub>1</sub> \* b<sub>1</sub>) + (coefficient<sub>2</sub> \* b<sub>2</sub>) + (coefficient<sub>3</sub> \* b<sub>3</sub>) + (coefficient<sub>4</sub> \* b<sub>4</sub>) + (coefficient<sub>5</sub> \* b<sub>5</sub>) + (coefficient<sub>6</sub> \* b<sub>6</sub>) + (coefficient<sub>8</sub> \* b<sub>8</sub>) + (coefficient<sub>9</sub> \* b<sub>9</sub>) + (coefficient<sub>10</sub> \* b<sub>10</sub>) + (coefficient<sub>11</sub> \* b<sub>11</sub>) + (coefficient<sub>12</sub> \* b<sub>12</sub>) + (coefficient<sub>13</sub> \* b<sub>13</sub>) + (coefficient<sub>14</sub> \* b<sub>14</sub>) + (coefficient<sub>15</sub> \* b<sub>15</sub>) + (coefficient<sub>16</sub> \* b<sub>16</sub>) + (coefficient<sub>17</sub> \* b<sub>17</sub>) + (coefficient<sub>18</sub> \* b<sub>18</sub>) + (coefficient<sub>19</sub> \* b<sub>19</sub>) + (coefficient<sub>20</sub> \* b<sub>20</sub>) + (coefficient<sub>21</sub> \* b<sub>21</sub>) + (coefficient<sub>22</sub> \* b<sub>22</sub>) + (coefficient<sub>23</sub> \* b<sub>23</sub>) + (coefficient<sub>24</sub> \* b<sub>24</sub>) + (coefficient<sub>25</sub> \* b<sub>25</sub>) + (coefficient<sub>26</sub> \* b<sub>26</sub>) + (coefficient<sub>27</sub> \* b<sub>27</sub>)

[0145] 상기 식 3에서,

[0146] 상기 coefficient<sub>1</sub>은 3.10이고;

[0147] 상기 coefficient<sub>2</sub>는 -2.76이며;

[0148] 상기 coefficient<sub>3</sub>은 -2.61이고;

[0149] 상기 coefficient<sub>4</sub>는 -0.67이며;

[0150] 상기 coefficient<sub>5</sub>는 2.85이고;

[0151] 상기 coefficient<sub>6</sub>은 3.93이며;

[0152] 상기 coefficient<sub>8</sub>은 -0.43이고;

[0153] 상기 coefficient<sub>9</sub>는 1.11이며;

[0154] 상기 coefficient<sub>10</sub>은 -0.21이고;

[0155] 상기 coefficient<sub>11</sub>은 -1.77이며;

[0156] 상기 coefficient<sub>12</sub>는 -0.06이고;

[0157] 상기 coefficient<sub>13</sub>은 -0.06이며;

[0158] 상기 coefficient<sub>14</sub>는 0.16이고;

[0159] 상기 coefficient<sub>15</sub>는 0.28이며;

[0160] 상기 coefficient<sub>16</sub>은 -0.45이고;

[0161] 상기 coefficient<sub>17</sub>은 0.49이며;

[0162] 상기 coefficient<sub>18</sub>은 -1.06이고;

[0163] 상기 coefficient<sub>19</sub>는 -0.15이며;

[0164] 상기 coefficient<sub>20</sub>은 0.52이고;

[0165] 상기 coefficient<sub>21</sub>은 -0.24이며;

[0166] 상기 coefficient<sub>22</sub>는 -0.54이고;

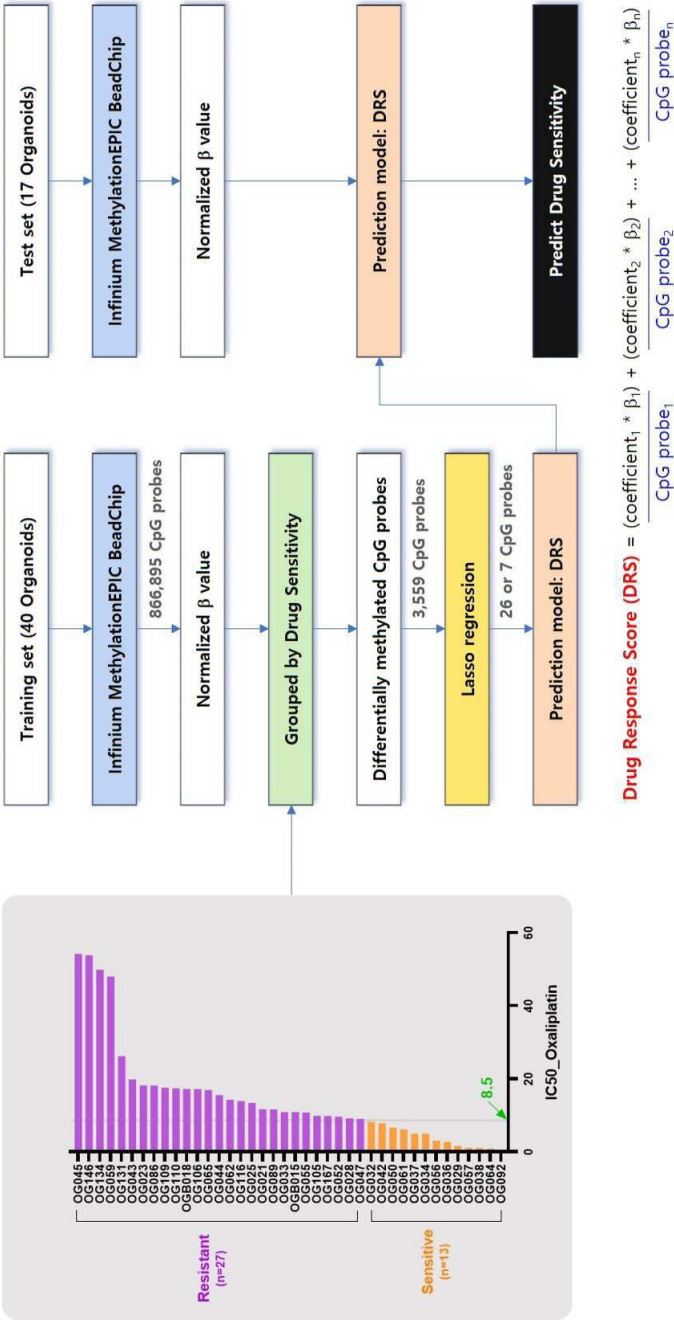
[0167] 상기 coefficient<sub>23</sub>은 -1.31이며;

- [0168] 상기 coefficient<sub>24</sub>는 -0.03이고;
- [0169] 상기 coefficient<sub>25</sub>는 -0.06이며;
- [0170] 상기 coefficient<sub>26</sub>은 0.76이고;
- [0171] 상기 coefficient<sub>27</sub>은 1.07이며;
- [0172] 상기 b<sub>1</sub>은 서열번호 1로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0173] 상기 b<sub>2</sub>는 서열번호 2로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0174] 상기 b<sub>3</sub>은 서열번호 3으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0175] 상기 b<sub>4</sub>는 서열번호 4로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0176] 상기 b<sub>5</sub>는 서열번호 5로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0177] 상기 b<sub>6</sub>은 서열번호 6으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0178] 상기 b<sub>8</sub>은 서열번호 8로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0179] 상기 b<sub>9</sub>는 서열번호 9로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0180] 상기 b<sub>10</sub>은 서열번호 10으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0181] 상기 b<sub>11</sub>은 서열번호 11로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0182] 상기 b<sub>12</sub>는 서열번호 12로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0183] 상기 b<sub>13</sub>은 서열번호 13으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0184] 상기 b<sub>14</sub>는 서열번호 14로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0185] 상기 b<sub>15</sub>는 서열번호 15로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0186] 상기 b<sub>16</sub>은 서열번호 16으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0187] 상기 b<sub>17</sub>은 서열번호 17로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0188] 상기 b<sub>18</sub>은 서열번호 18로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0189] 상기 b<sub>19</sub>는 서열번호 19로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0190] 상기 b<sub>20</sub>은 서열번호 20으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0191] 상기 b<sub>21</sub>은 서열번호 21로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0192] 상기 b<sub>22</sub>는 서열번호 22로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0193] 상기 b<sub>23</sub>은 서열번호 23으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0194] 상기 b<sub>24</sub>는 서열번호 24로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0195] 상기 b<sub>25</sub>는 서열번호 25로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이며;
- [0196] 상기 b<sub>26</sub>은 서열번호 26으로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이고;
- [0197] 상기 b<sub>27</sub>은 서열번호 27로 표시되는 프로브를 이용하여 측정된 DNA 메틸화 수준으로부터 얻어진 베타 값이다.

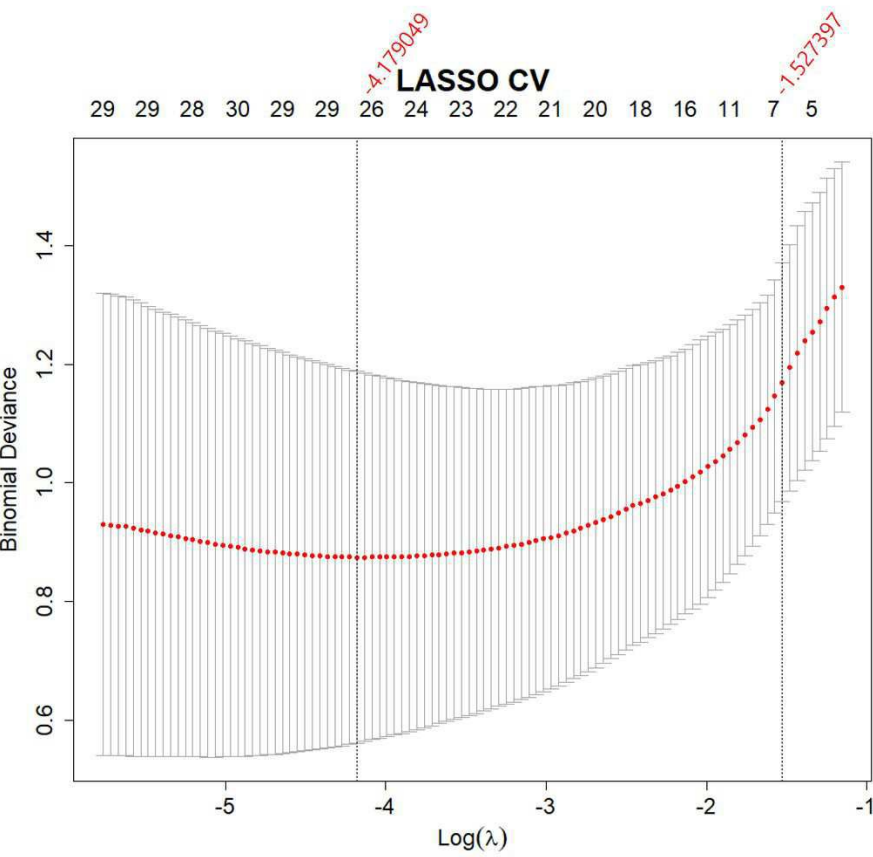
- [0199] 상기와 같은 식 3의 DRS 값이 4.20 내지 5.50, 바람직하게는 4.80인 경우를 컷 오프 값 (cut off value)으로 하여, 각 개체에서 계산된 DRS 값이 상기 컷 오프 값 미만인 경우 옥살리플라틴의 치료 반응성이 좋은 것으로 예측할 수 있고, 계산된 DRS 값이 상기 컷 오프 값 이상인 경우 옥살리플라틴의 치료 반응성이 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0201] 상기와 같이 테스트 세트인 17 개의 오가노이드를 대상으로 선별된 각각의 CpG 프로브에 의한 약물 반응성을 조사한 결과, DRS를 이용한 예측모델이 통계적으로 유의하게 저항성이 있는 환자와 저항성이 없는 환자를 구분할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이처럼, 본 발명은 개인별 옥살리플라틴에 대한 약물 반응성을 예측할 수 있는 신규 후성 유전인자를 발굴함으로써 개인별 맞춤형 치료 예측 시스템에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0203] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

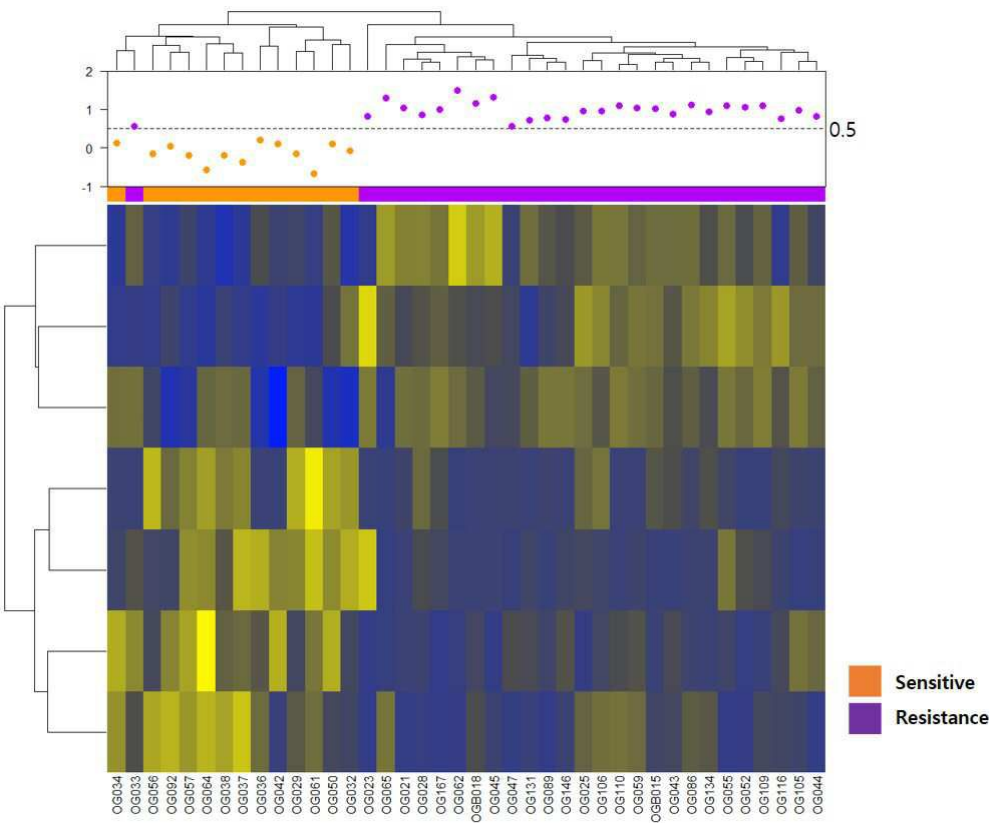
도면1



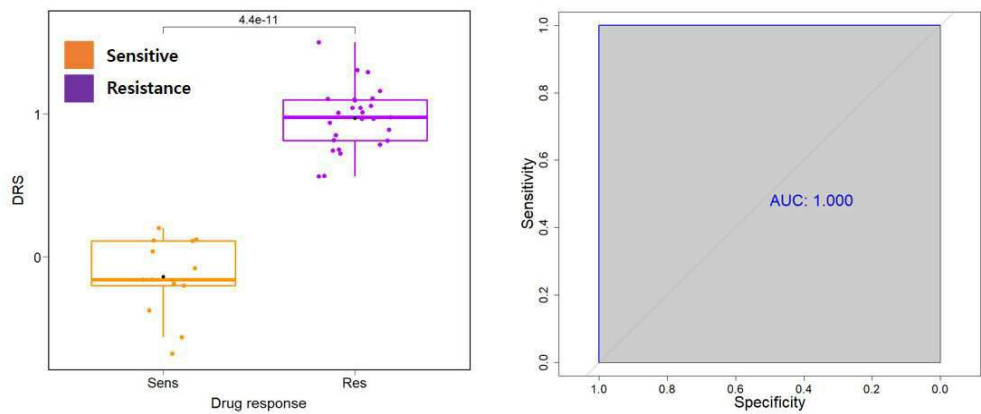
도면2



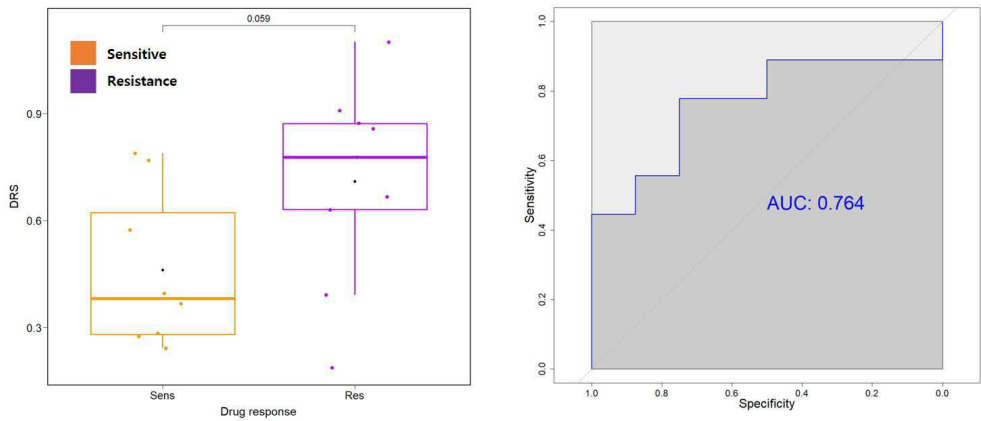
도면3a



도면3b

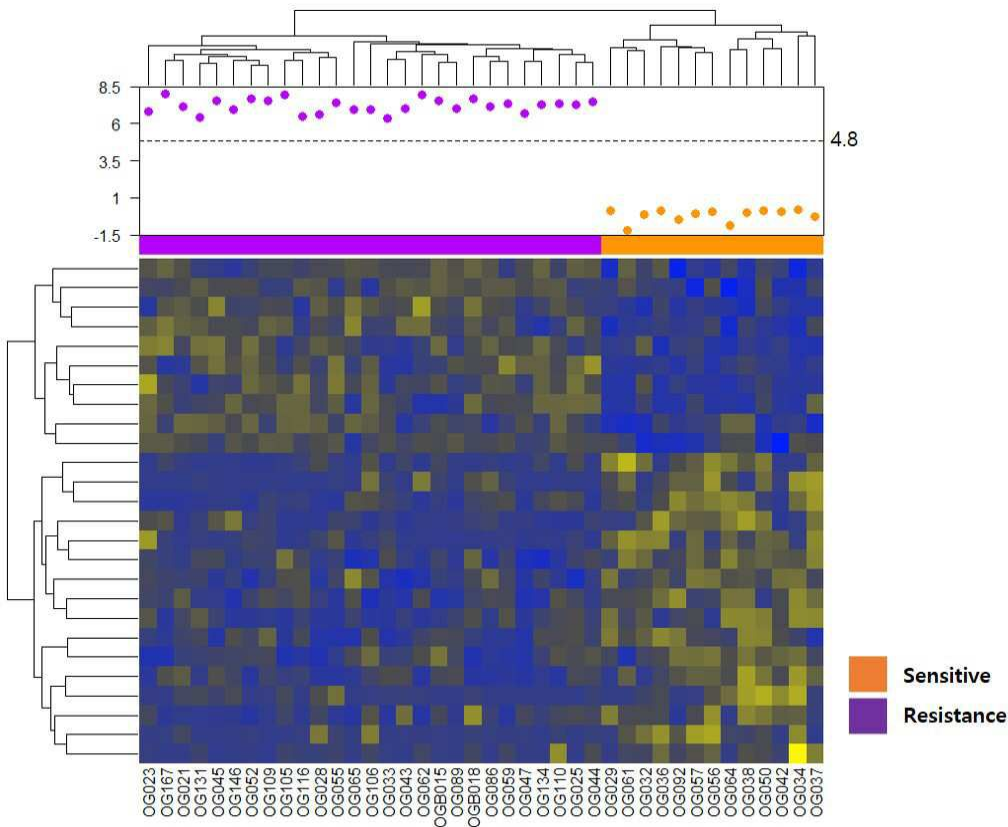


도면4

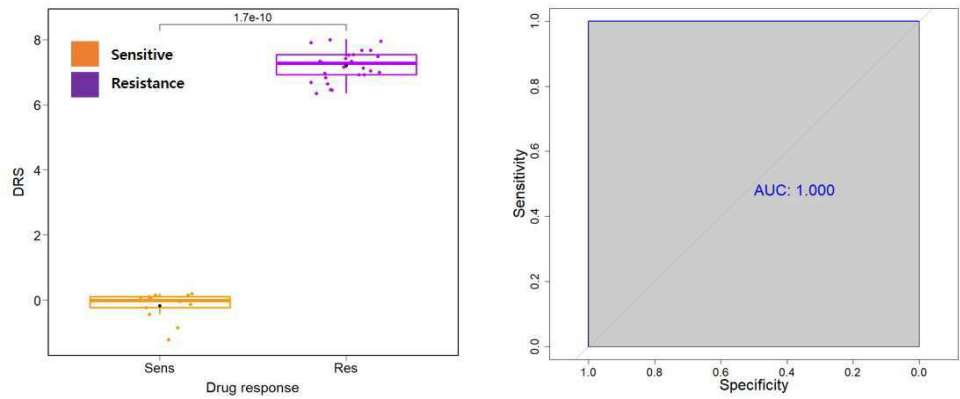




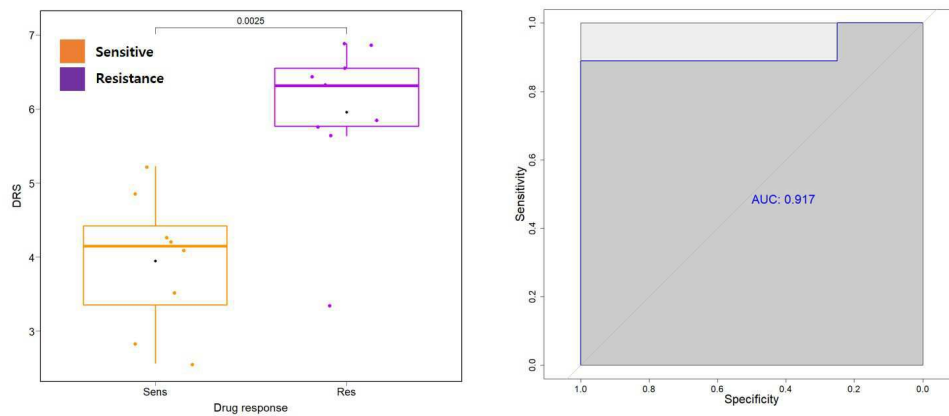
도면5a



도면5b



## 도면6



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University  
Seoul National University R&DB Foundation  
KNU-Industry Cooperation Foundation  
Ewha University - Industry Collaboration Foundation  
Sookmyung Women's university industry-academic
- <120> A composition for predicting drug responsibility and uses thereof
- <130> PDPB204179
- <160> 27
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 122
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223>
- > cg24401656
- <400> 1
- tcagccacat tcacccttg tactatccat cacacgagac cttaaacaaa caaaaccctt 60
- cgtgttggtt gtatttgctg ggtttcagga ttggcctac cctgggcact gggaaagcct 120
- gt 122
- <210> 2
- <211> 122
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> cg13562675

<400> 2

caaactgcc aactgtttcc tgaagaagct gcatcatttt atatttatat tcccaccagc 60

cgtgtacggg atttctgtt tctttatata ttcaccaaca cttgttactg tgttttttat 120

tt 122

<210> 3

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg27087956

<400> 3

gggagctttg gcttcagtgc gtgggctttt gtgtttctct ctctctctct ctctctctct 60

cgcggtgtgt caagcccagc ctcatcccat aacacacatg atttagctat ttacatctt 120

tc 122

<210> 4

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> cg26469483

<400> 4

atacaaggaa aaaagccatt ctatgttctt cttctgtgct ctcataatgt gtaaccatgc 60

cgtttgttta aataattcca gaaactggcc ttaggagatt cgaaatcaaa ccaagtttgc 120

ag 122

<210> 5

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg09555818

<400> 5

gggttgtggc tgtggagcgg aagtgggtct caaccactat aaatcctctc tgtgcccgtc 60

cggagctggt gaggacagcc tgccagagtc tgtaagaaa gggactcagg gtgcggggac 120

ag 122

<210> 6

<211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg08161337  
 <400> 6  
 caatgacacc tcagtcattgt ggaaaacact ttccgtgtcg ggggccagcagg tggatgccgg 60  
 cgtgcagagg taactcagaa tcggcccttg ccctccagcagg ctgcggggaa ggtgaatggg 120  
 aa 122  
 <210> 7  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > cg02637031  
 <400> 7  
 gtcttatttc ctgaagttgt cagggcccta actctagctc tctagccaca ccctaagtga 60  
 cgaactctgg tcttgagttc cccatcacca ccagactga tctcagatgg gccaggttc 120  
 tt 122  
 <210> 8  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg04292976  
 <400> 8  
 ttgtttttac ctggggagca gggctgtgtg atgggagctt ggcacttcct aaatccaccc 60  
 cgaagacaat aggtcacatt cagcggggct cctgccccac cggctcccc aaggcggccc 120  
 tg 122  
 <210> 9  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg26879736  
 <400> 9  
 ttgggatatt tgtgaagtga tggcccagga ttctctctc tgtttttgac acctgtttcc 60

cgaggacttt taigttaaatt gcaaaacacc tgaaaaatac agtactctat tggaaggatg 120

ca 122

<210> 10

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> cg09847528

<400> 10

tcggtggccc cttaaatggc cattcatag ggtgaagatt aaataagaca atgagcacia 60

cgggcttagc atagcatctg aaacatctta agagctcaat gaatggtagc cattgtcatt 120

at 122

<210> 11

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg08522426

<400> 11

gcccctaagc caatagatga aactcgtagt ttggaggaag actgcgacag cttaggccac 60

cggaaaatga ccagaagtt caacttctgc gctctccggg gaggctgggt cagagctcca 120

gc 122

<210> 12

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg01791935

<400> 12

ttgagtttct gagcctttgg cttccctgta gcttccagga gtcccctggt acctttagcc 60

cgtggggtct tcagcattgg tggagagtca aagatggcca cggtgccccc ggtggcactg 120

gt 122

<210> 13

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> cg14627781

<400> 13

attattaaac ctttgttctg ggatttactg ttaaaaaaca aacaaaaaac aacaaaaaag 60

cgggtgacagg aaacagttaa ggaaatgatt taactgaagg gaagcaagat ttttttaaag 120

ca 122

<210> 14

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg02858652

<400> 14

cctcgggaag gaaaaaccag agcccccgga accggagctg gggacaggac aggggtgaag 60

cgggattcca cagggacgcg atcacagaca cccccaccag ccacaggcct gctctgctct 120

ca 122

<210> 15

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg07859489

<400> 15

aacgtgttca gagtcaattt tccaaaacag atatggatga cacaagctgt gggccagacc 60

cgctctgcaa gccatgttgc ccgccccatc catcagcttc agcagtagaa ttgtgaaatc 120

at 122

<210> 16

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> cg12954529

<400> 16

ccacctacac cccccccac cccatccca tcccagcttt gttagattgc tagcatcat 60

cgctggcttt ctctgaccca acagtgggtg aaggaaagag actgaaagct ggcaaggtgg 120

gg 122



<210> 17  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg25496417  
 <400> 17  
 gaggtctggag ctggtggggg ccactaggaa gcccacggca atgcccttca tcccacttac 60  
 cgcagctcca gagccctgcg ggaggactca gagtcaggga cacagcagcg tccggcgaga 120  
  
 tg 122  
 <210> 18  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg03665520  
 <400> 18  
 ttagttcaat gtgggacttg ggcttcttca gagaaacct agcactcttc agaaggaacc 60  
 cgtggcagct cgaggcatag acaatcctca ttaggtaccc aatatattt aactaaactc 120  
 tt 122  
 <210> 19  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg15998725  
 <400> 19  
 agagattcta agattcatca attcacagta atggtactgt ggtttggcaa gaatatgtaa 60  
 cgatgatattt ggccagagac tcagggccct aaggggatit gtacatcaca gcgaaagcag 120  
 ct 122  
 <210> 20  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cg20210559  
 <400> 20

tgaggctctg tggccccagc tataaaatgg gaaattcgta tgaagtgttt tgaaaaccac	60
cgtgcacaat aaaatgtcag tatcattatt gtttgggggtg agacaaagat aattcctttt	120
cc	122
<210> 21	
<211> 122	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cg11090582	
<400> 21	
catttttgtc cccatgacaa ccctatcagg tcaatagata ctaataaaaag tcctgtctga	60
cgtggaggcc ttctagcttt agtgaagtta aaaaagattg gcacagtgtt ctggagctaa	120
tg	122
<210> 22	
<211> 122	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><	
223> cg12352124	
<400> 22	
gggccttttg gggcgctttt taccccagag ctcaaaaagc tccgggcagc ggggtggtgg	60
cgggatggcc agtagccagg gccacctgg cgccccgcg ggatgtggag gccactggg	120
tt	122
<210> 23	
<211> 122	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> cg08176914	
<400> 23	
aaccccagca aggaggaagt ggactggctt cctgtttatt tatgaatctc agagcagcac	60
cgtgcagccg tgaacaccaa ccaagcacag caatcccagc ccaagccaag agccccaggg	120
ag	122
<210> 24	
<211> 122	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg23713742

<400> 24

gatagaaact ggtatttgct aagtgcaatt ttagatgggg ttttctagga agtgctgtga 60

cgctcatcact tgctttaaaa gaggccaggc gcagtagctg actcctgtaa tcccagcact 120

tt 122

<210> 25

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

223> cg12885728

<400> 25

cctctgaggg cacaggggca gacaggacat cctcccacca ggggctgcct agtgactggc 60

cgaagattct gatcatttca ggcctccctt cacattctcc agcggcattt taaggctttt 120

gc 122

<210> 26

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg26757722

<400> 26

ggatatatgt atgaatagag aatatggaga gttataaaaa aaggaggta agaaagctca 60

cggaaaagag tgtaaattat aaagatcaca cgggaaggagg cttgcctttt gagatcagaa 120

ac 122

<210> 27

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cg18209489

<400> 27

ctttctgctg gttttgtaaa cacaagaaac attcctgtgg gtgagtgcac aggctggata 60

cggctggggg atgagcaaac cactgtgcct agaggaaagg attcacattt cacaggcttt 120

tt

122