(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0036028
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/112 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0118116
(22) 출원일자 2020년09월15일
심사청구일자 2020년09월15일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
강원도 춘천시 삭주로 77
김봉준
강원도 춘천시 교동길 50
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

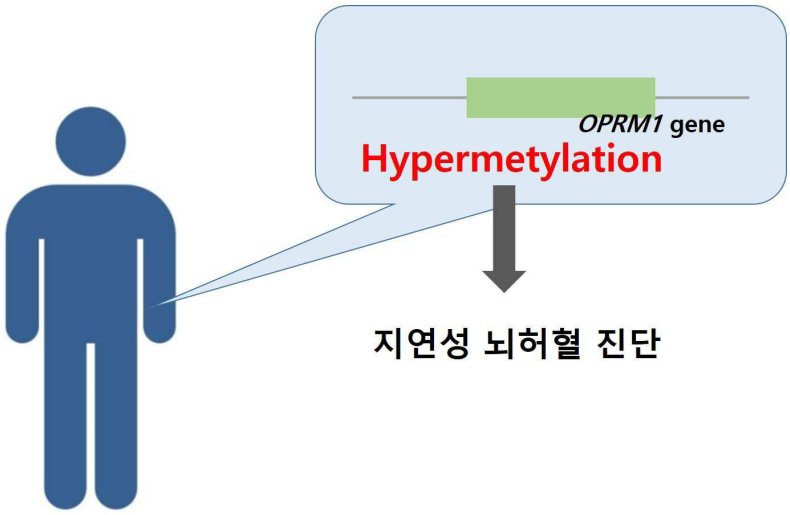
(54) 발명의 명칭 **지연성 뇌허혈 진단을 위한 OPRM1 유전자 과메틸화 마커**

(57) 요 약

본 발명은 *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트, 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명의 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준을 측정하여, 지주막하 출혈 후 발생하는 지연성 뇌허혈의 발병 위험 예측 또는 진단에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/154 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345322048
과제번호	2020R1I1A3070726
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	학문균형발전
연구과제명	마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 6을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 *VHL* (von Hippel-Lindau), *KIF3A* (kinesin family member 3A), *RACGAP1*(Rac GTPase Activating Protein 1), *RACGAP1* (Rac GTPase Activating Protein 1), *ALB* (albumin) 및 *IL5* (Interleukin 5)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지연성 뇌허혈은 지주막하 출혈 이후 발병하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 키트.

청구항 6

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방법은

대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계

를 추가로 포함하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 방법은

상기 개체의 *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 방법은 개체 및 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터,

A) VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A (kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3) 및 RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계;

B) 상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계; 및

C) 상기 개체의 상기 A 단계에서 측정한 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 방법은 개체 및 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터,

D) ALB(albumin) 및 IL5(Interleukin 5)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계;

E) 상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계; 및

F) 상기 개체의 상기 D 단계에서 측정한 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 낮은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 방법은

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 6을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트, 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뇌동맥류 파열에 의한 지주막하 출혈(Subarachnoid hemorrhage, SAH)은 생명을 위협하는 질환으로서, 발병 후 30일 안에 45%의 사망률에 이르는 질병이다. 또한, 지연성 뇌허혈(Delayed cerebral ischemia, DCI)은 지주막하 출혈 이후 30~40% 범위 내에서 발병할 수 있으며, 이는 사망률의 주요 원인과 관련이 있다. 지연성 허혈을 갖는 지주막하 출혈 환자의 경우, 지연성 허혈이 발병하지 않은 환자에 비해 폐렴, 심장 부정맥, 장출혈 및 요로 감염과 같은 다양한 합병증을 가질 가능성이 높고, 이로 인해 입원기간의 장기화 및 의료 비용 증가 등에 이를 수 있다. 이러한 지연성 허혈의 발병은 다양한 임상적 및 방사선학적 변수에 영향을 받는다. 잘 알려진 지연성 허혈의 임상적 위험인자는 여성 성별, 흡연 및 입원시의 낮은 임상 등급이다. 높은 Hunt-Hess-등급 (IV 및 V등급) 또는 세계신경외과학회연맹(World Federation of Neurosurgical Societies, WFNS) 등급은 지연성 허혈의 발병 가능성을 증가시킨다.

[0004] 지연성 허혈 발병과 관련하여, 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNP) 또는 전장유전체 관련 분석(genome-wide association study, GWAS)과 같은 다양한 유전학적 연구가 이루어지고 있다. 그러나, 민감성 유전적 변이의 비율은 5 내지 10% 정도만 관찰되었으며, 이는 DNA 서열 스케일을 넘어서는 아직 알려지지 않은 다양한 유전적 변이가 있음을 암시한다.

[0005] 상기 알려지지 않은 신규한 경로 중 하나로서, DNA 메틸화, 히스톤 변형 및 비-암호화 RNA 등을 포함하는 후생유전학적 메커니즘이 있다. 이 중, DNA 메틸화는 구아닌 앞의 시토신 뉴클레오타이드에 메틸기가 결합하는 과정으로서, 일반적으로 유전자 전사를 억제한다고 알려져 있다. 현재까지, 지주막하 출혈 환자에서 지연성 허혈에 따른 후생유전학적 프로파일을 확인하는 연구는 진행된 바 없었다.

[0006] 이에 본 발명자들은 지주막하 출혈 후 발생하는 지연성 뇌허혈의 발병 진단, 발병 위험 예측 및 예후 예측을 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 특정 유전자 상의 메틸화 수준을 측정하여 지연성 뇌허혈을 진단 또는 예측할 수 있는 진단용 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2019-0008216호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원은 *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트, 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하고자 한다.

[0010] 본원의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본원의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 원의 실시예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본원의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본원의 제 1 측면은, *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본원의 제 2 측면은, 상기 지연성 뇌허혈 진단용 조성물을 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본원의 제 3 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준을 측정하여, 지주막하 출혈 후 발생하는 지연성 뇌허혈의 발병 위험 예측 또는 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 *OPRM1* 유전자의 과메틸화를 이용한 지연성 뇌허혈 진단 과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈이 발생한 환자 및 발생하지 않은 환자 사이의 과메틸화 유전자의 기능 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다. 노란색 상자는 통계적으로 유의하다는 것을 의미한다.

도 3은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈이 발생한 환자 및 발생하지 않은 환자 사이의 저메틸화 유전자의 기능 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다. 노란색 상자는 통계적으로 유의하다는 것을 의미한다.

도 4는 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 과메틸화된 유전자의 단백질-단백질 상호작용 네트워크를 나타낸 도면이다.

도 5는 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 저메틸화된 유전자의 단백질-단백질 상호작용 네트워크를 나타낸 도면이다.

도 6은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 과메틸화된 유전자의 모듈 클러스터 분석 및 관련 유전자의 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 과메틸화된 유전자의 모듈 클러스터 분석 및 관련 유전자의 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 과메틸화된 유전자의 모듈 클러스터 분석 및 관련 유전자의 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 저메틸화된 유전자의 모듈 클러스터 분석 및 관련 유전자의 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 환자(DCI) 및 비-지연성 뇌허혈 환자(non-DCI) 사이의 저메틸화된 유전자의 모듈 클러스터 분석 및 관련 유전자의 농축 분석 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0021] 본원의 제 1 측면은, *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지연성 허혈 진단용 조성물을 제공한다.

[0022] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "지연성 뇌허혈(delayed cerebral ischemia, DIC)"은 국소 신경 장애(예컨대, 반신불완전마비, 언어상실증, 행위상실증, 반맹 또는 무시)의 발생, 또는 글래스고 혼수 척도 (전체 스코어 또는 이의 개별 구성요소 중 하나)의 감소를 의미하는 것으로서, 지연성 뇌허혈의 발병은 다양한 임상적 및 방사선학적 변수에 의한 것일 수 있다. 본원에서, 상기 "지연성 뇌허혈"은 "DIC", "지연성 허혈"과 혼용되어 명명될 수 있다.

[0023] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 *OPRM1* 유전자의 프로모터 영역의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 6을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정할 수

있는 제제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 6은 *OPRM1* 유전자의 메틸화 영역 주변의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 *VHL* (von Hippel-Lindau), *KIF3A* (kinesin family member 3A), *KIFAP3* (kinesin associated protein 3), *RACGAP1* (Rac GTPase Activating Protein 1), *ALB* (albumin) 및 *IL5* (Interleukin 5)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1 내지 5, 7 내지 9의 염기서열 중 하나 이상을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 9는, 각각 하기 유전자들의 메틸화 영역의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적인 염색체 내의 위치, 각 서열번호의 염기서열 내의 메틸화 영역은 하기 실험예의 표 3에 기재하였다.

[0029] - 서열번호 1: *VHL*(von Hippel-Lindau), 3번 염색체 10182523-10182524

[0030] - 서열번호 2: *KIF3A*(kinesin family member 3A). 5번 염색체 132040050- 132040051

[0031] - 서열번호 3: *KIFAP3*(kinesin associated protein 3), 1번 염색체 170044709- 170044710

[0032] - 서열번호 4: *RACGAP1*(Rac GTPase Activating Protein 1), 12번 염색체 50397469- 50397470

[0033] - 서열번호 5: *RACGAP1*(Rac GTPase Activating Protein 1), 12번 염색체 50397685- 50397685

[0034] - 서열번호 6: *OPRM1* (Opioid Receptor Mu 1), 6번 염색체 154410759- 154410760

[0035] - 서열번호 7: *ALB* (albumin), 4번 염색체 74269995-74269996

[0036] - 서열번호 8: *IL5* (Interleukin 5), 5번 염색체 131879309- 131879310

[0037] - 서열번호 9: *IL5* (Interleukin 5), 5번 염색체 131891673- 131891674

[0039] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "메틸화(methylation)"또는 "DNA 메틸화"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 상기 메틸화 여부는 특정 유전자의 특정 CpG(Cytosine phosphate Guanine) 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미하는 것일 수 있다. 일반적으로, 메틸화 또는 과메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제될 수 있으며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 될 수 있다.

[0040] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후성유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0041] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "메틸화 수준의 측정"은 특정 유전자, 구체적으로 VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A(kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3), RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1), OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1), ALB(albumin) 및/또는 IL5(Interleukin 5) 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화된 염기와 메틸화되지 않은 염기의 차이를 이용하는 것일 수 있으며, 메틸화 특이적 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱, MS-HRM (Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Analysis, 메틸화 특이- 고해상도 융해곡선 분석)과 메틸화 민감성 제한효소를 사용한 메틸화 여부 측정, DNA 칩 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정하거나, DNA 메틸레이션 마이크로어레이, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 등을 사용할

수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본원의 일 구현예에 따르면, "메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제"는 특정 DNA 영역의 메틸화 수준을 측정하기 위해 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 구체적으로 VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A(kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3), RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1), OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1), ALB(albumin) 및/또는 IL5(Interleukin 5) 유전자에 대한 메틸화-특이적 PCR을 수행하기 위한 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 메틸화 수준을 측정에 사용되는 프라이머는, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있고, 상기 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0044] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프라이머"는, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 이때, PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0045] 상기 메틸화 수준을 측정에 사용되는 프로브는 혼성화 프로브를 의미하는 것일 수 있으며, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프로브는 메틸화 수준을 측정하여 지연성 뇌허혈을 진단하기 위한 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다. 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지될 수 있으며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0047] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제로서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸화 DNA에 특이적으로 결합하는 메틸화 DNA항체 (예를 들어, 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체) 등을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 바이설파이트 변형된 DNA 는 서열분석 또는 메틸화 특이적 PCR 등 다양한 방법을 통하여 메틸화를 검출할 수 있으며, 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0049] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, SmaI, SacII, EagI, HpaII, MspI, BssHII, BstUI, NotI 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0050] 한편, 메틸화 DNA 항체란, DNA 중의 메틸화된 염기에 특이적으로 결합하는 항체를 말한다. 구체적으로는, 메틸사이토신에 대한 항체와 같이, DNA 사슬 중 메틸화된 사이토신을 인식하여 결합하는 성질을 가진 항체를 들 수 있다. 또한, 시판되고 있는 메틸화 DNA 항체 중에서, 본원에 기재된 메틸화 상태의 DNA를 특이적으로 인식하여 특이적으로 결합할 수 있는 항체일 수 있다.

[0051] 메틸화 DNA 항체는 메틸화된 염기, 메틸화 DNA 등을 항원으로 하여 통상의 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들어, 메틸사이토신 항체를 제조하기 위해서는, 5-메틸사이티딘, 5-메틸사이토신, 또는 5-메틸사이토신을 포함하는 DNA 등을 항원으로 하여 항체를 제조한 후 DNA 중의 메틸사이토신으로의 특이적인 결합을 지표로서 선별할 수 있다.

[0052] 또한, 메틸화된 CpG 결합 도메인(CpG binding domain: MBD) 또는 메틸화 DNA 항체를 이용하여 메틸화 수준을 측정하는 경우, 이들을 이용하여 메틸화된 DNA 를 면역침강시킨 후, 서던블롯, PCR, 마이크로어레이, 또는 서열분석(sequencing) 등을 통해 특정 CpG 부위를 확인할 수 있다. 또한, 항체의 면역학적 검출 또는 정량을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질 표지, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 사용할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광 물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있고, 그 외 방사성 동위원소 표지, 라텍스 비드 표지, 콜로이드 표지, 비오틴 표지 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본원의 일 구현예에 따르면, OPRM1 유전자는 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 OPRM1 유전자의 과메틸화 상태가 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있다.

[0054] 본원의 일 구현예에 따르면, VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A (kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3) 및 *RACGAP1* (Rac GTPase Activating Protein 1)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자는 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 유전자의 과메틸화 상태가 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있다.

[0055] 본원의 일 구현예에 따르면, ALB(albumin) 및 IL5(Interleukin 5)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자는 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 유전자의 저메틸화 상태가 지연성 뇌허혈 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있다.

[0056] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "마커(marker)"는 바이오마커를 의미하며 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있다.

[0057] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 지연성 뇌허혈 진단용 조성물은 지연성 뇌허혈의 발병을 진단하거나, 지연성 뇌허혈 발병 위험을 예측하거나 또는 지연성 뇌허혈의 예후를 예측하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "진단"은, 특정 개인에 대하여 지연성 뇌허혈이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다.

[0059] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예측"은, 특정 개인에 대하여 지연성 뇌허혈이 발병할 가능성이 있는지, 발병할 가능성이 있다면 지연성 뇌허혈이 발병할 가능성이 불특정 다수인에 비하여 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 의미한다.

[0060] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 지연성 뇌허혈은 지주막하 출혈 이후 발병하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본원의 일 실시예에 따르면, 지연성 뇌허혈이 발생한 환자에서의 상기 OPRM1 유전자는, 지연성 뇌허혈이 발생하지 않은 환자에 비해 높은 메틸화 수준을 보여주는 바, OPRM1 유전자의 메틸화 수준 확인을 통해 지연성 뇌허혈의 발병 여부, 지연성 뇌허혈의 발병 가능성 등을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0062] 본원의 일 실시예에 따르면, 지연성 뇌허혈이 발생한 환자에서의 상기 VHL, KIF3A, KIFAP3 및/또는 RACGAP1 유전자는, 지연성 뇌허혈이 발생하지 않은 환자에 비해 높은 메틸화 수준을 보여주는 바, 상기 유전자의 메틸화 수준 확인을 통해 지연성 뇌허혈의 발병 여부, 지연성 뇌허혈의 발병 가능성 등을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0063] 본원의 일 실시예에 따르면, 지연성 뇌허혈이 발생한 환자에서의 상기 ALB 및/또는 IL5 유전자는, 지연성 뇌허혈이 발생하지 않은 환자에 비해 낮은 메틸화 수준을 보여주는 바, 상기 유전자의 메틸화 수준 확인을 통해 지연성 뇌허혈의 발병 여부, 지연성 뇌허혈의 발병 가능성 등을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0064] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 한국인 및 아시아인을 대상으로 지연성 허혈을 진단하기 위한 조성물일 수 있다.

[0065] 본원의 일 실시예에 따르면, 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈 발병 환자의 유전자 메틸화 수준을 전후성유전체 연관성 연구(epigenome-wide association studies, EWAS) 데이터를 기반으로 생물정보학(bioinformatics)을 이용하여 분석한 결과, VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A(kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3), RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1) 및 OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 경우 지연성 뇌허혈 발병 환자가 비-지연성 뇌허혈 환자보다 과메틸화됨을 확인하였으며, ALB(albumin) 및 IL5(Interleukin 5) 유전자의 경우 지연성 뇌허혈 발병 환자가 지연성 뇌허혈 환자보다 저메틸화됨을 확인하였는 바, 상기 결과를 토대로 상기 유전자 각각 또는 이들의 조합을 메틸화 마커로 이용하여 지연성 뇌허혈을 진단할 수 있다.

[0066] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 '전후성유전체(epigenome)' 란 DNA 시퀀스에 부착되어 그 활성에 영향을 미치는 화학그룹(chemical groups)의 패턴을 총체적으로 지칭하는 말이다. 인간의 후성유전체를 탐사한 사상 최대의 연구 결과, 체질량지수(BMI)의 차이와 관련된 후성유전학적 태그(표지)가 발견되어 학계의 주목을 받고 있은 바 있다. 상기 전후성유전체를 이용한 전후성유전체 연관성연구(EWAS: epigenome-wide association studies)는 전유전체 연관성연구(GWAS: genome-wide association studies)에서 영감을 얻어 시작되었다. GWAS는 건강한 사람과 환자의 유전적 변이를 비교 검토함으로써 질병과 관련된 돌연변이를 찾아내는 것을 목표로 한다, EWAS의 목표도 기본적으로 GWAS와 동일한데, 단지 대상이 유전체에서 후성유전체로 바뀌었을 뿐이다. EWAS는 건강한 사람과 환자의 전유전체를 대상으로 수천 개의 특정 DNA 뉴클레오타이드에 부착된 메틸기의 분포를 비교검토하여, 질병 또는 형질변이와 관련된 표지를 찾아내는 것을 목표로 한다.

[0067] 후성유전학의 주요 연구대상은 메틸화(methylation)인데, 메틸화란 유전자에 메틸기가 부착되는 현상을 말한다. 메틸화는 유전자의 활성을 억제하는 경향이 있는데, 배아발생 과정에서 중요한 역할을 한다. 즉, 메틸화는 유전자의 발현을 총지휘함으로써 배아줄기세포가 전문조직으로 분화하도록 도와주는 역할을 한다. 그러나 메틸화는 환경변화에 대응하여 발생하기도 하는데, 이로 인한 유전자 변형은 자손에게 유전될 수도 있다. 메틸화는 암이나 2형당뇨 등의 발병에 기여하기도 한다. 이러한 후성유전학적 변형은 인간의 일생 동안 일어날 수도 있기 때문에, 유전학이 찾아낼 수 없는 질병에 관한 단서를 제공할 수 있다.

[0068] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "생물정보학 (bioinformatics)"은 생물학적인 문제를 응용수학, 정보과학, 통계학, 컴퓨터 과학, 인공지능, 화학, 생화학등을 이용하여 주로 분자 수준에서 다루는 학문이다. 전산생물학의 연구분야는 시스템즈 생물학과 중복되기도 한다. 주 연구분야는 서열정렬, 유전자 검색, 유전자 조합, 단백질 구조 정렬, 단백질 구조 예측, 유전자발현의 예측, 단백질간 상호작용, 진화모델 등 다양하다. 상기 생물정보학의 하위 분야로서, 유전체학(개인 유전체학, 기능 유전체학, 비교 유전체학), 변이체학, 단백체학, 상호작용체학 및 다중체학 등이 포함된다.

[0070] 본원의 제 2 측면은, 상기 지연성 뇌허혈 진단용 조성물을 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 키트를 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 지연성 뇌허혈 진단용 키트에도 공히 적용된다.

[0071] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR 키트, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 키트, 실시간 메틸화 특이적 PCR(real time methylation-specific polymerase chain reaction) 키트, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 키트, 또는 정량 파이로시퀀싱 키트, MS-HRM (Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Analysis, 메틸화 특이-고해상도 융해곡선 분석) 키트, 메틸화 민감성 제한효소를 사용한 메틸화 여부 측정, DNA 칩 키트, DNA 메틸레이션 마이크로어레이 키트, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 키트 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 PCR 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 유전자들 또는 메틸화 영역에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0073] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 칩 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일

수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 유전자들 또는 메틸화 영역에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0074] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, RT-PCR 키트는, 상기 유전자들 또는 메틸화 영역에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0076] 본원의 제 3 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, *OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1)* 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법에도 공히 적용된다.

[0077] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 6을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0078] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 지연성 뇌허혈 진단은 지연성 허혈 발병을 진단하거나, 지연성 뇌허혈 발병 위험을 예측하거나 또는 지연성 뇌허혈의 예후를 진단하는 것일 수 있으며, 또한 상기 지연성 뇌허혈은 지주막하 출혈 후에 발생한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"는 지연성 뇌허혈이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식 어류 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "시료"는 지연성 뇌허혈이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 DNA 메틸화 수준 또는 특정 유전자/단백질의 발현수준을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 인간일 수 있으며, 구체적으로 한국인 또는 아시아인일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0082] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 개체의 유전자의 메틸화 수준을 미리 결정된 임계값(cut-off)과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0083] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0084] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "대조군"은 지연성 뇌허혈이 발병되지 않은 일반 개체 또는 비환자군을 의미하는 것일 수 있다.

[0085] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 개체의 *OPRM1* 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0086] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 개체 및 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, A) VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A (kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3) 및 RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계; B) 상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계; 및 C) 상기 개체의 상기 A 단계에서 측정한 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0087] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 개체 및 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, D) ALB(albumin) 및 IL5(Interleukin 5)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는

단계; E) 상기 개체 및 상기 대조군의 메틸화 수준을 비교하는 단계; 및 F) 상기 개체의 상기 D 단계에서 측정한 유전자의 메틸화 수준이 상기 대조군의 메틸화 수준보다 낮은 경우, 상기 개체를 지연성 뇌허혈이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0088] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1 내지 5, 및 7 내지 9의 염기서열 중 하나 이상을 포함하는 뉴클레오타이드의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0090] **[실시예]**

[0092] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0094] **실시예 1: DNA 메틸화 데이터 및 가공**

[0096] 춘천시의 지역 뇌졸중 센터로부터 지주막하 출혈(SAH) 환자의 전후성 유전체 연관성 연구(epigenome-wide association studies, EWAS) 데이터를 분석하였다. 상기 데이터는 Infinium MethylationEPIC (EPIC) BeadChip(Illumina, CA, USA)을 사용하여, 동맥류 SAH 환자 40명에서 CpG 부위의 전후성 유전체 메틸화 프로파일과 관련되어 있다. 미가공 데이터의 미가공 품질 프로브는 minfi package (version 1.24.0)를 이용하여 필터링하였다. 구체적으로, 먼저 검출 P-값(>0.05)을 갖는 샘플을 제거하였다. 다음으로, 남은 프로브는 minfi 패키지에 구현된 preprocessFunnorm 알고리즘을 사용하여 정규화하였다. 상기 방법은 메틸화 마이크로 어레이에 존재하는 제어 프로브를 사용하여 가변성을 회귀함으로서 바람직하지 않은 변이를 제거하는 것이다. 마지막으로, 차별적으로 메틸화된 CpG 부위 (differentially methylated CpG site, DMCpG)를 0.01의 q-값 컷오프로 확인하였다. 확인된 DMCpG 중 베타(β) 값이 0.2보다 큰 차이를 보이는 CpG 부위를 추가 분석에 사용했다. DNA 메틸화 정도는 0~1 값을 갖는 β 값으로 표시되며 β값 0은 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화된 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다. 마지막으로, 프로모터 영역 (전사 시작 부위에서 ±2kb)에 위치한 DMCpG를 가진 유전자를 선택하고, 유전자 조절 용어에서 DMCpG의 잠재적 기능을 추론하는 데 사용했다.

[0098] **실시예 2: 생물 정보학 분석(Bioinformatics analysis)**

[0100] 기능 농축 분석(Functional enrichment analysis)은 웹-기반의 유전자 농축 분석(gene enrichment analysis) 및 시각화 툴 (http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il) 을 이용하여 수행하였다. 다음으로, STRING(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)을 이용하여 단백질-단백질 상호작용(protein-protein interaction, PPI)를 구축하였다. 컷-오프 기준은 상호 작용 점수(interaction score) 0.4로 설정하였다. Cluster-ONE 어플리케이션은 모듈 분석에 사용하였다. 모듈은 10개 초과의 연결된 상호 작용 수로 정의되었다. 허브 유전자는 후보 모듈에서 상위 10%의 높은 연결성을 가진 유전자로 정의하였다.

[0102] **실험예 1: 기능 농축 분석(Functional enrichment analysis) 결과**

[0104] 상기 실시예 1에 기재한 지주막하 출혈 후 발생된 지연성 뇌허혈 환자의 메틸화된 유전자에 대한 생물정보학(Bioinformatics) 분석을 수행하였다.

[0105] 구체적으로, 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈(delayed cerebral ischemia)이 발생한 환자와 발생하지 않은 환자 사이의 과메틸화 또는 저메틸화 유전자의 기능 농축 분석을 수행하였다.

[0106] 그 결과, 과메틸화(Hypermethylation)에서 검색된 유전자 온톨리지(gene ontology, GO) 생명 대사(biological

process, BP) 용어 중에서 유기 고리형 화합물(organic cyclic compound) 생합성 과정, 핵염기-포함 화합물(nucleobase-containing compound) 생합성 과정, 헤테로고리(heterocycle) 화합물 생합성 과정, 방향족 화합물(aromatic compound) 생합성 과정, 및 세포 질소 화합물(cellular nitrogen compound) 생합성 과정 관련 용어(term)가 가장 유의미한 것으로 판단되었다(표 1, 도 2). 저메틸화(Hypomethylation)에서 검색된 유전자 온톨리지 생명 대사 용어 는 탄수화물 대사 과정(carbohydrate metabolic process), 세포 크기 조절(regulation of cell size) 및 자극 검출(detection of stimulus)이다.

표 1

[0108]

카테고리	ID	설명(Description)	P-value	유전자(Genes)
과메틸화				
BP	GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	7.73E-05	DLAT, ADCY10, ERCC6, ACAT1, FUBP1, AK5, EGR2, LSM10, PTEN, HSD3B2, RRAGC, SMG7, THRAP3, PPT1
	GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	1.49E-04	DLAT, ADCY10, ACAT1, ERCC6, FUBP1, AK5, EGR2, LSM10, PTEN, RRAGC, SMG7, THRAP3, PPT1
	GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	1.49E-04	DLAT, ADCY10, ACAT1, ERCC6, FUBP1, AK5, EGR2, LSM10, PTEN, RRAGC, SMG7, THRAP3, PPT1
	GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	1.49E-04	DLAT, ADCY10, ACAT1, ERCC6, FUBP1, AK5, EGR2, LSM10, PTEN, RRAGC, SMG7, THRAP3, PPT1
	GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	2.17E-04	RPS24, DLAT, ADCY10, ERCC6, ACAT1, FUBP1, AK5, EGR2, LSM10, PTEN, RRAGC, ASAH2, SMG7, THRAP3, PPT1
저메틸화				
BP	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	5.01E-05	AMY2B, AMY2A
	GO:0008361	regulation of cell size	2.41E-04	CLCN6, MTOR
	GO:0051606	detection of stimulus	6.71E-04	RYR2, OR6A2, OR51G2, OR2T12, OR5AR1, OR5A1, OR5D18, OR8U1, OR2AK2, OR14A16, PDC, OR6N1, TAS1R3, OR14I1
MT	GO:0004556	alpha-amylase activity	5.15E-05	AMY2B, AMY2A
	GO:0016160	amylase activity	5.15E-05	AMY2B, AMY2A
	GO:0103025	alpha-amylase activity (releasing maltohexaose)	5.15E-05	AMY2B, AMY2A
	GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.96E-04	AMY2B, AMY2A

BP, biological process; GO, gene ontology; MT, molecular function

[0110] GO 분자수준에서의 기능(molecular function, MT) 용어는 알파-아밀라아제 활성(alpha-amylase activity), 아밀라아제 활성, 아밀라아제 활성(말토헥사오스 방출), 가수분해 효소 활성(hydrolase activity), 및 O-글리코실 화합물의 가수분해(hydrolyzing O-glycosyl compounds)로 판단된다(표 1 및 도 3).

[0112] **실험예 2: PPI 네트워크 및 모듈(Module) 분석**

[0114] 과메틸화에서는 총 367개의 노드(node) 및 756 엣지(edge), 저메틸화에서는 360개의 노드 및 644 엣지가 설정되었다. 과메틸화 및 저메틸화에 대한 PPI 네트워크는 각각 도 4 및 도 5에 나타냈다. 과메틸화된 유전자의 3개 모듈 (도 6 내지 도 8) 및 저메틸화된 유전자의 2개 모듈 (도 9 및 도 10)을 통계적으로 유의하게 구성하였다. 농축 분석(Enrichment analyse)은 과메틸화 모듈이 주로 항원 처리[유비퀴틴화 & 프로테오좀 분해(Ubiquitination & Proteasome degradation), 골지에서 ER로 역행 수송(Golgi-to-ER retrograde transport) 및 G 알파 (i) 시그널링 신호전달 이벤트(G alpha (i) signalling event)]와 관련되어 있음을 나타냈다. 2개의 과메틸화 모듈과 관련하여 번역 후 단백질 인산화(Post-translational protein phosphorylation) 및 자연살해 세포 주화성 조절(regulation of natural killer cell chemotaxis)이 밀접하게 관련이 있었다.

[0115] 또한, 지주막하 출혈 후 발생된 지연성 뇌허혈 환자와 비-지연성 뇌허혈 환자를 비교하였을 때, 지연성 뇌허혈 환자에서 과메틸화와 관련된 5개의 허브 유전자는 VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A(kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3), RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1) 및 OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1)을 포함하고, 지연성 뇌허혈 환자에서 저메틸화와 관련된 2개의 허브 유전자는 ALB(albumin) 및 IL5(Interleukin 5)를 포함하는 것으로 확인되었는 바(표 2), 상기 허브 유전자들은 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈이 발생한 환자에서 과메틸화되거나 저메틸화되는 것임을 알 수 있다.

표 2

메틸화	모듈	크기	*P*-value	유전자
과메틸화 (Hypermethylation)	1	14	9.75E-05	VHL,ASB15,ASB18,KLHL5,MGRN1,PARK2,RNF19A,LONRF1, UBE2G1,SOCS5,CCDC182,SHISA9,SLITRK6,USP33
	2	12	8.60E-05	KIF3A,KIFAP3,RACGAP1,SEC22B,COPA,DCTN4,HLA-DOB,HLA-DQB1,KIF21A,NBAS,TAP1,AGPAT1
	3	10	0.025917	OPRM1,ADORA3,GNB4,C5,TAS2R16,NPL,GPM6A,LTBP1,NCAM2,PRKCH
저메틸화 (Hypomethylation)	1	13	0.016389	ALB,BCHE,ADRA1A,AFP,GABRR3,PRL,ENAM,MAP2,PPIG, AMELX,HSD17B6,GAP43,CDK13
	2	10	0.018602	IL5,IL18,TLR8,CCL3,CCL4,KLRK1,IL12RB2,SERPINB7,GPR115,TANK

[0117]

[0119] 또한, 상기 지주막하 출혈 후 지연성 뇌허혈이 발생한 환자에서 과메틸화되거나 저메틸화되는 7종의 유전자들이 메틸화 영역을 구체적으로 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 기재하였다.

표 3

유전자	염색체	염색체 위치_시작	염색체 위치_끝	Gene	기능	과메틸화/저메틸화 여부	메틸화 영역 및 이의 주변 염기서열 (메틸화 영역은 붉은색으로 표시함)	서열번호
VHL	chr3	10182523	10182524	VHL	protein_coding	과메틸화	CCTTGTGATCAGCCCACTTCAGCCTCCCAAAGTACTGGGAT TACAGGCATGAGCCACTGCACCCGGCCATAGTTGCTATTTT ATTTGTGTGATTGATTACCGTATGACGCTTTTATTGAAGTGC AGTGA (63번째 및 64번째 염기)	1
KIF3A	chr5	132040050	132040051	KIF3A	protein_coding	과메틸화	ATATCATCATACACTAAAGGAACAACTAAAATAGCTTGTTA TTATGTCAAACTCAGGACCCGAAGGCTCCCTAAGTCAGAG TAAACATGCCAAGTGTCAAATATAAGTAGAAATACTAC (60번째 및 61번째 염기)	2
KIFAP3	chr1	170044709	170044710	KIFAP3	protein_coding	과메틸화	GCACGTAGTTGCTCTGCTGCTTTTTTCAAATGTAGTACATTG ATGCAATTATTGATTATCCGTTATGTGTAAAACACCATGTTA AGGCACTGCATGGTATATTAAATATAGAAATACAG (60번째 및 61번째 염기)	3
RACGAP1	chr12	50397469	50397470	RACGAP1	protein_coding	과메틸화	GACTGTATCAGGAGATGACCTTTTATGCAGAAGCATCACTG TAAGTTAAAAGAAGTGTGCCGCCCCATAAAAGCAGGGCAA CAAATAGTTTAACATGTTAACCATTGTTGATGAAAGCA (60번째 및 61번째 염기)	4
RACGAP1	chr12	50397685	50397686	RACGAP1	protein_coding	과메틸화	GAACCAAACTAATTCAGAAATAAGGCACAAGTCTATTTAA GAGCAGCAAATAAACCCTGACGACATACAGTCTTGCTAAT ATTTTTATTATTAGCTGGGGCTTTAATAAGTCAAAATAT (60번째 및 61번째 염기)	5
OPRM1	chr6	154410759	154410760	OPRM1	protein_coding	과메틸화	TAACAGGGCAAGATCCTATCCAAAAAAAAAAAAAAAGGA AGAAACTCAACAAAGCAGCATCGTTGCTATTATTGCAGCT ATTTAGCCAATAGGTACATCATTGACATCATTGTAAATAG (60번째 및 61번째 염기)	6
ALB	chr4	74269995	74269996	ALB	protein_coding	저메틸화	GAGTCTAGTTAATAATCTACAATTATTGGTTAAAGAAGTAT ATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCCTAGCTTTTCTCTTCT GTCAACCCCACACGCCTTTGGCACAATGAAGTGGG (60번째 및 61번째 염기)	7
IL5	chr5	131879309	131879310	IL5	protein_coding	저메틸화	GTCTTTGAGGAAATGAATAATTTCTAACAATCAGATAGAGA ATGCCTAATAATGGCATATCGTGAAACTAAATGTTTCCAAT GCCTTATATCTTAAAAAATAAATTTACTTTTATCTTT (60번째 및 61번째 염기)	8
IL5	chr5	131891673	131891674	IL5	protein_coding	저메틸화	ATAATTTTAATGTTTTGTTCCATTAGTTATTTTAACTATTTTG TAATAACTGACACTTTCCGGTTTTTTTTAACCTGGTACAGCA AGAGACTATTTCTCACTGGTCTTCCCCACTTGCA (60번째 및 61번째 염기)	9

[0121]

[0123] 상기 결과를 종합해보면, 지주막하 출혈 후 발생한 지연성 뇌허혈 환자의 경우, 과메틸화와 관련된 5개의 허브 유전자인 VHL (von Hippel-Lindau), KIF3A(kinesin family member 3A), KIFAP3 (kinesin associated protein 3), RACGAP1 (Rac GTPase Activating Protein 1) 또는 OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1) 유전자의 과메틸화가 관찰되거나, 저메틸화와 관련된 2개의 허브 유전자인 ALB(albumin) 또는 IL5(Interleukin 5) 유전자의 저메틸화가 관찰되는 바, 상기 7종의 유전자 각각 또는 이들의 조합의 과메틸화 또는 저메틸화 정도를 분석함으로서, 지주막하 출혈 후 발생하는 지연성 뇌허혈을 효과적으로 진단하거나 예후를 예측할 수 있음을 알 수 있다.

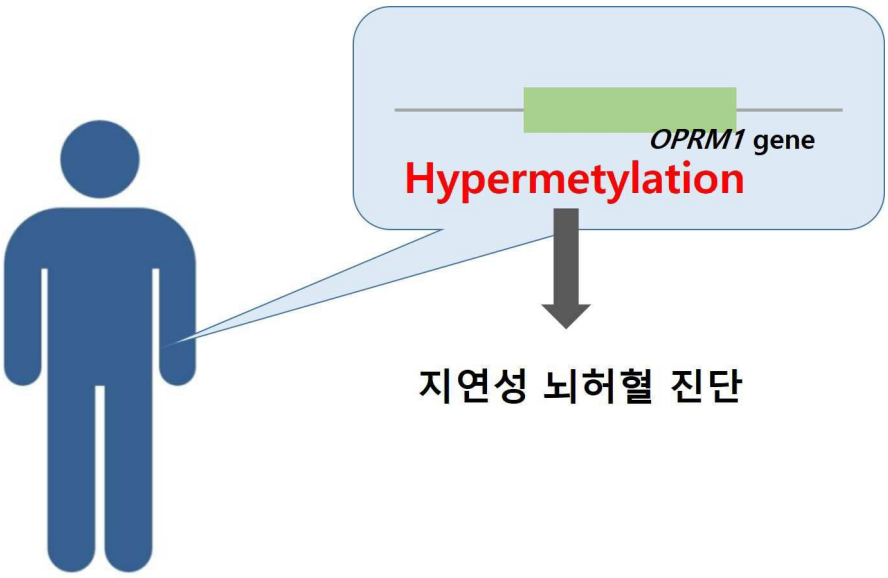
[0125] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 본 발명을 구현할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로 상기 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 한다.

[0126] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않

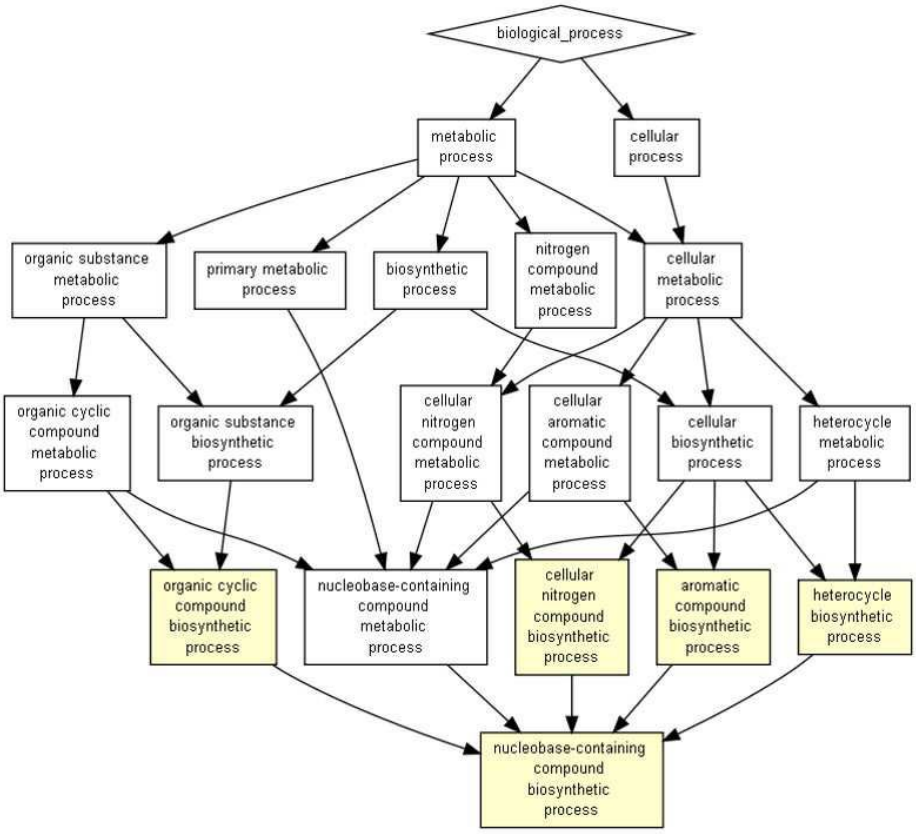
으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

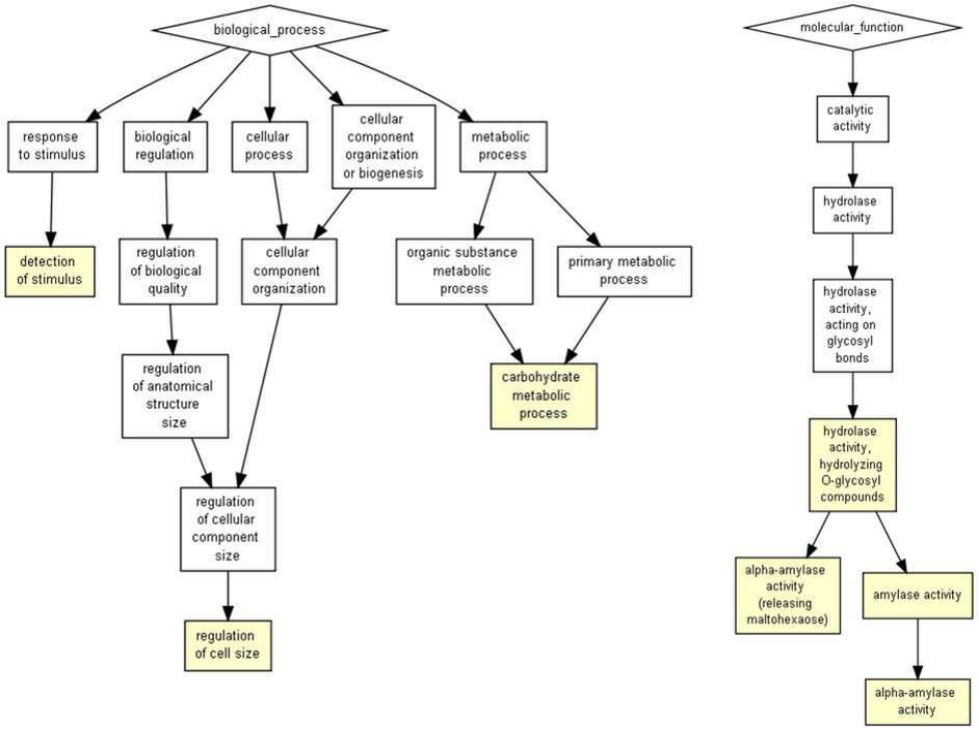
도면1



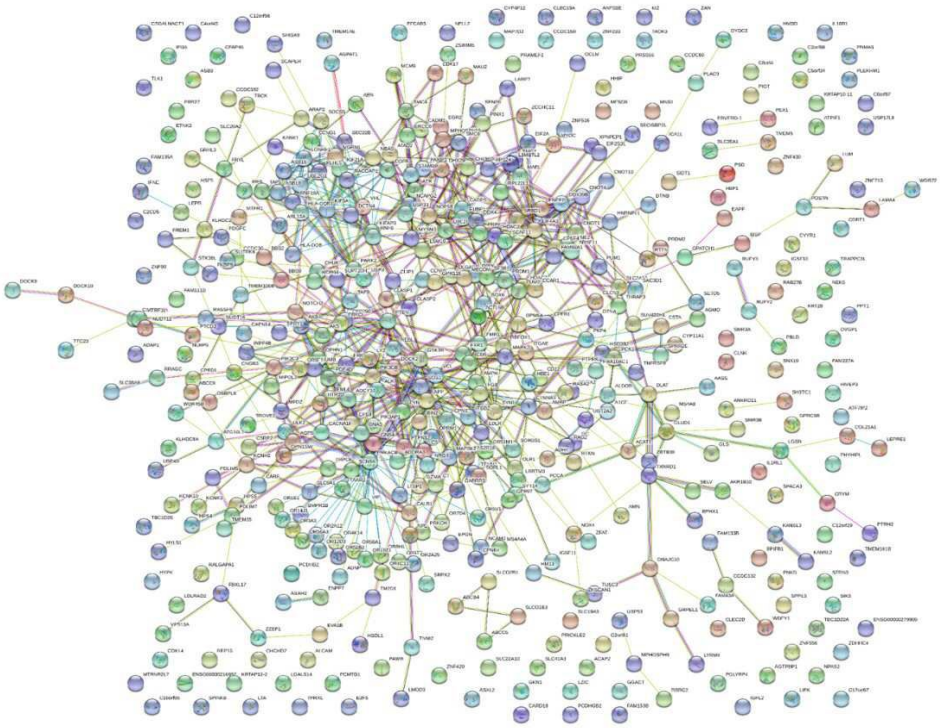
도면2



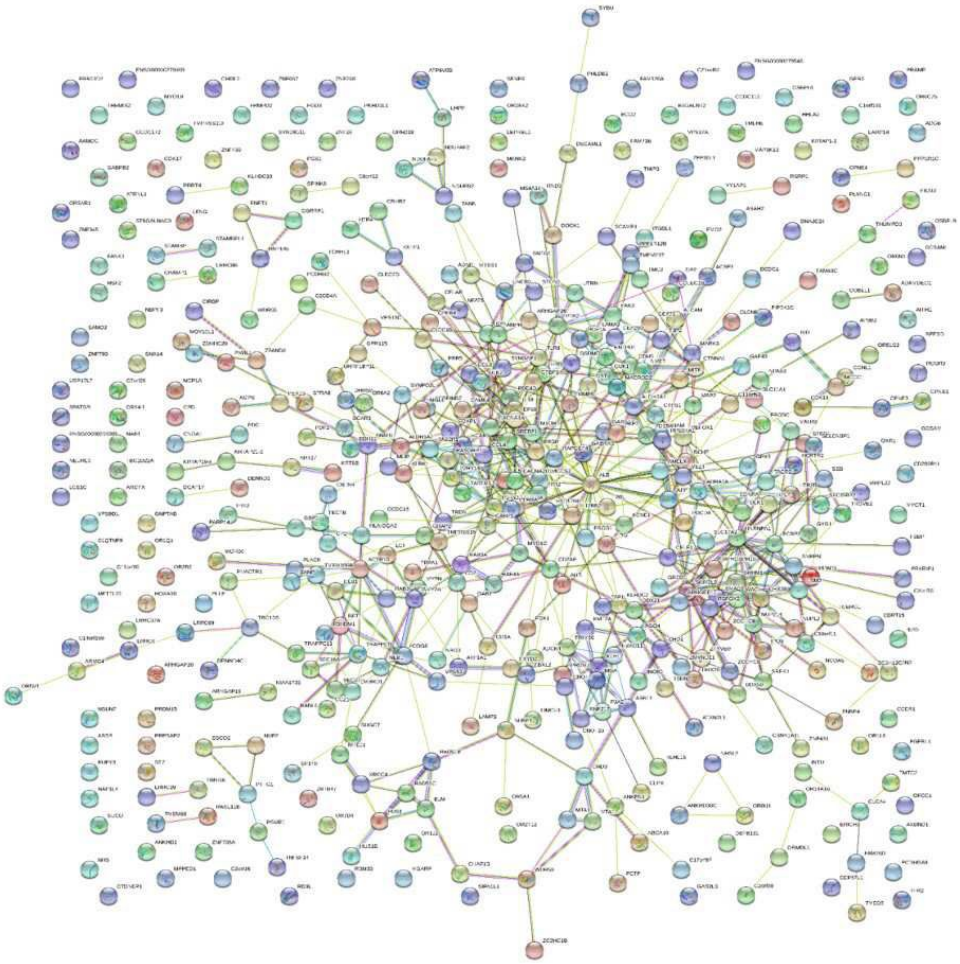
도면3


biological_process
response to stimulus
biological regulation
cellular process
cellular component organization or biogenesis
metabolic process
detection of stimulus
regulation of biological quality
cellular component organization
organic substance metabolic process
primary metabolic process
regulation of anatomical structure size
carbohydrate metabolic process
regulation of cellular component size
regulation of cell size
molecular_function
catalytic activity
hydrolase activity
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
alpha-amylase activity (releasing maltohexaose)
amylase activity
alpha-amylase activity

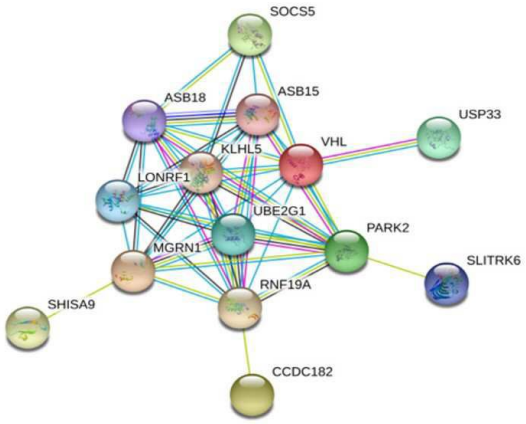
도면4



도면5

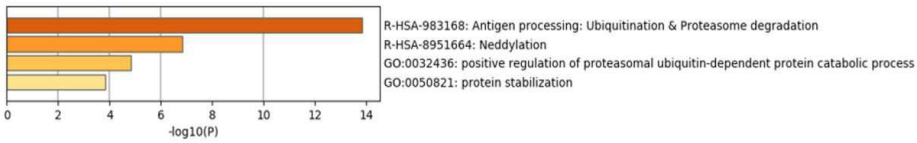


도면6

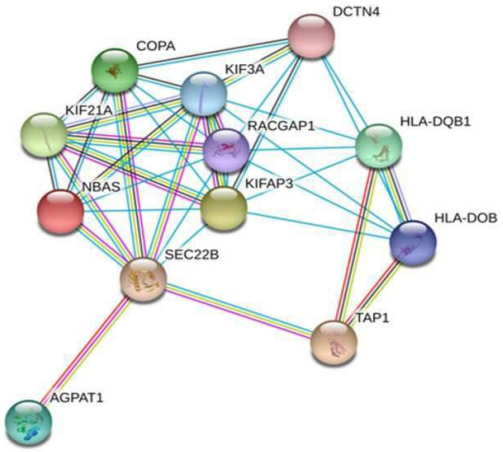


Gene	Interaction count
VHL	10
ASB15	9
ASB18	9
KLHL5	9
MGRN1	9
PARK2	9
RNF19A	9
LONRF1	8
UBE2G1	8
SOCS5	4
CCDC182	1
SHISA9	1
SLITRK6	1
USP33	1

Cluster 1

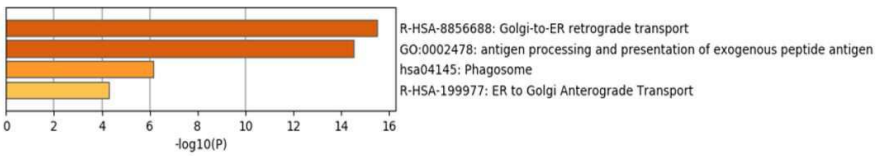


도면7

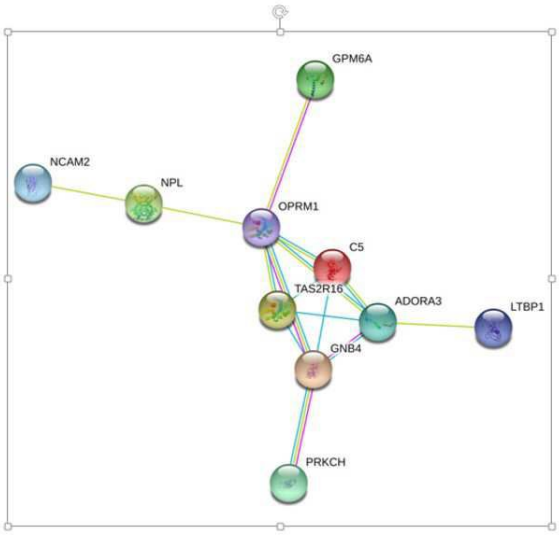


Gene	Interaction count
KIF3A	9
KIFAP3	9
RACGAP1	9
SEC22B	8
COPA	7
DCTN4	6
HLA-DOB	6
HLA-DQB1	6
KIF21A	6
NBAS	6
TAP1	3
AGPAT1	1

Cluster 2

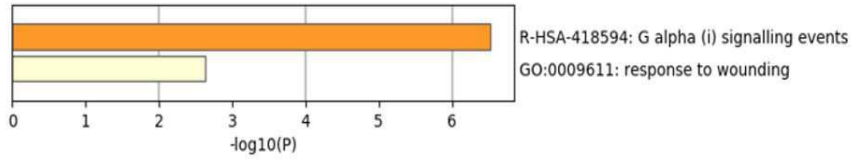


도면8

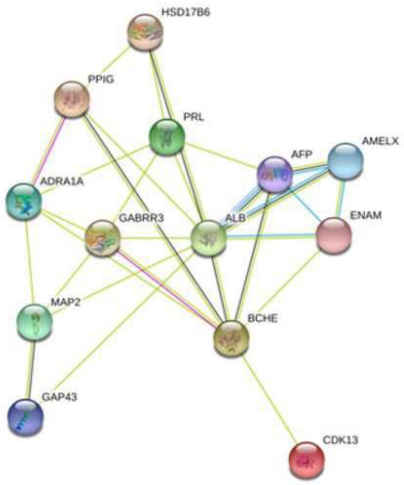


Cluster 3

Gene	Interaction count
OPRM1	6
ADORA3	5
GNB4	5
C5	4
TAS2R16	4
NPL	2
GPM6A	1
LTBP1	1
NCAM2	1
PRKCH	1

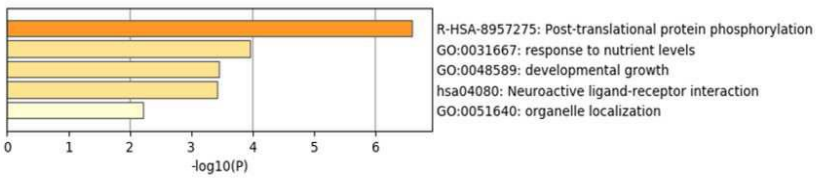


도면9

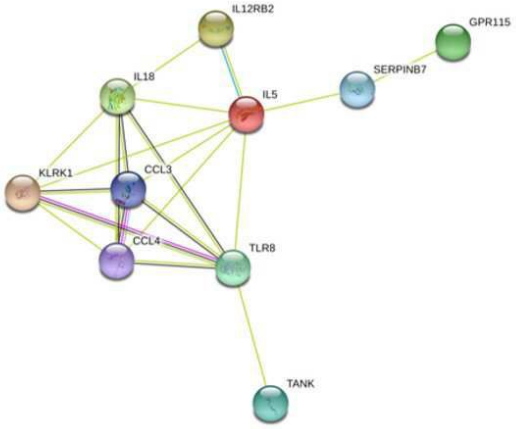


Cluster 1

Gene	Interaction count
ALB	10
BCHE	7
ADRA1A	5
AFP	5
GABRR3	5
PRL	5
ENAM	4
MAP2	4
PPIG	4
AMELX	3
HSD17B6	3
GAP43	2
CDK13	1

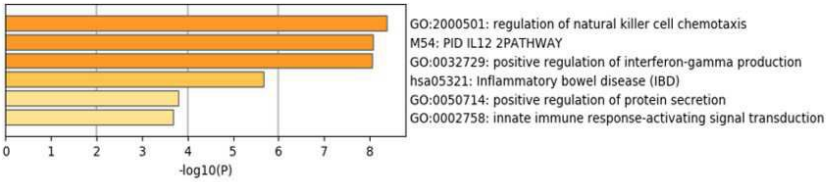


도면10



Gene	Interaction count
IL5	7
IL18	6
TLR8	6
CCL3	5
CCL4	5
KLRK1	5
IL12RB2	2
SERPINB7	2
GPR115	1
TANK	1

Cluster 2



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> OPRM1 Gene hypermethylation marker for diagnosis of delayed cerebral ischemia

<130> 5

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHL_hypermethylation

<400> 1

ccttgtgatc agcccacttc agcctcccaa agtactggga ttacaggcat gagccactgc 60

acccggccat agttgctatt ttatttgtgt gattgattac cgtatgacgc ttttattgaa 120

gtgcagtga 129

<210> 2

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIF3A_hypermethylation

<400> 2

atatcatcat acactaaagg aacaactaaa atagcttgtt attatgtcaa actcaggacc 60

cgaaggctcc ctaagtcaga gtaaacatgc caagtgtcaa atataagtag aaatactac 119

<210> 3

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIFAP3_hypermethylation

<400> 3

gcacgtagtt gctctgctgc ttttttcaaa tgtagtacat tgatgcaatt attgattatc 60

cgttatgtgt aaaacaccat gttaaggcac tgcatggtat attaaatata gaaatacag 119

<210> 4

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RACGAP1_hypermethylation_1

<400> 4

gactgtatca ggagatgacc ttttatgcag aagcatcact gtaagttaaa agaagtgtgc 60

cgccccataa aagcagggca acaaatagtt taacatgtta accattgttg atgaaagca 119

<210> 5

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RACGAP1_hypermethylation_2

<400> 5

gaaccaaact aattcagaaa taaggcacaa gtctatttaa gagcagcaaa taaaccctga 60

cgacatacag tcttgctaat atttttatta ttagctgggg ctttaataag tcaaaatat 119

<210> 6

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OPRM1_hypermethylation

<400> 6

taacagggca agatcctatc caaaaaaaaa aaaaaaggaa gaaactcaac aaagcagcat 60

cgttgctatt attgcagcta tttagccaat aggtacatca ttgacatcat tgtaaatag 119

<210> 7

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALB_hypomethylation

<400> 7

gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta tattagtgct aatttccctc 60

cgtttgtcct agcttttctc ttctgtcaac cccacacgcc tttggcacaa tgaagtggg 119

<210> 8

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL5_hypomethylation_1

<400> 8

gtctttgagg aaatgaataa tttctaacaa tcagatagag aatgcctaat aatggcatat 60

cgtgaaacta aatgtttcca atgccttata tcttaaaaaa taaatttact tttatcttt 119

<210> 9

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL5_hypomethylation_2

<400> 9

ataattttaa tgttttgttc cattagttat tttaactatt ttgtaataac tgacactttc 60

cggttttttt taacctggta cagcaagaga ctatttctca ctggtcttcc ccacttgca 119