

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2021/071164 A1

2021년 4월 15일 (15.04.2021)

(43) 국제공개일

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/6881 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013290
- (22) 국제출원일: 2020년 9월 29일 (29.09.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0124549 2019년 10월 8일 (08.10.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 레피다인 (LEPIDYNE CO., LTD.) [KR/KR]; 04779 서울시 성동구 상원1길 26, 411호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김영준 (KIM, Young Joon); 06024 서울시 강남구 논현로160길 31, 202호, Seoul (KR). 김다원 (KIM, Da Won); 06366 서울시 강남구 현릉로590길 100, 106동 701호, Seoul (KR). 하정실 (HA, Jeong Sil); 06024 서울시 강남구 논현로160길 31, 202호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

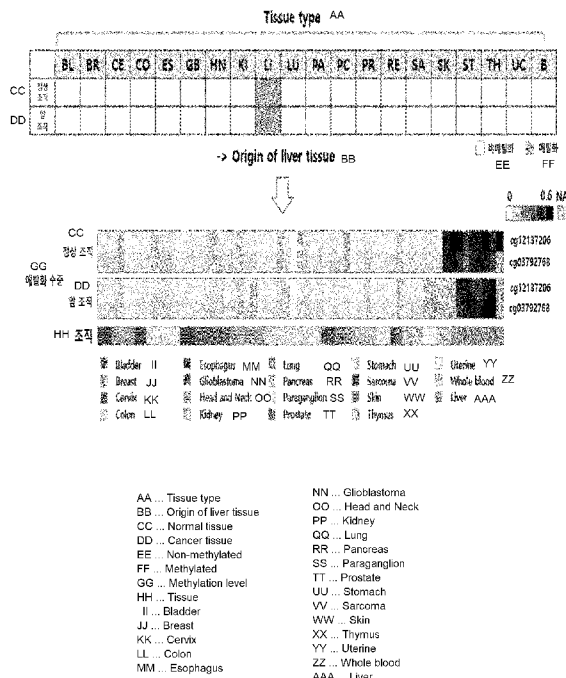
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING IF ORIGIN OF BIOLOGICAL SAMPLE IS FROM LIVER TISSUE

(54) 발명의 명칭: 생물학적 시료의 간 조직 유래 여부를 판별하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for determining whether or not a biological sample of unknown origin originates from a liver tissue and a composition comprising a liver tissue-specific DNA methylation marker for performing the method. The liver tissue-specific methylation marker can determine with excellent accuracy if the origin of a biological sample is from a liver tissue because normal liver tissues and liver cancer tissues are high in methylation level while tissues other than liver tissues are low in methylation level.

(57) 요약서: 본 발명은 기원을 모르는 생물학적 시료의 간 조직 유래 여부를 판별하는 방법 및 이를 수행하기 위한 간 조직 특이적 DNA 메틸화 마커를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 간 조직 특이적 DNA 메틸화 마커는 간 조직을 제외한 다른 조직에서는 메틸화 수준이 낮고, 정상 간 조직 및 간암 조직에서는 메틸화 수준이 높으므로 우수한 정확도로 생물학적 시료가 간 조직에서 유래했는지 여부를 판별할 수 있다.



WO 2021/071164 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 생물학적 시료의 간 조직 유래 여부를 판별하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 기원을 모르는 생물학적 시료의 간 조직 유래 여부를 판별하는 방법 및 이를 수행하기 위한 간 조직 특이적 DNA 메틸화 마커를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 사람 몸에 있는 세포들은 동일한 유전자 정보를 가지고 있지만, 각 세포들의 기능과 형태는 매우 다양하다. 이는 각 세포마다 특정한 유전자가 발현되고, 이에 따라 세포 분화 과정이 상이하어 최종적으로 세포 표현형의 차이를 보이기 때문이다. 이러한 특정 유전자의 발현에는 DNA 메틸화, 히스톤 변형, 조직 특이적 전사 인자 등 여러 요인들이 관여한다. 특히 DNA 메틸화, 구체적으로 CpG 부위의 메틸화는 세포 특이적 유전자 발현의 필수요소로 세포 또는 조직마다 고유한 DNA 메틸화 특징을 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서, DNA 메틸화 특징을 이용하면 세포 또는 조직이 유래한 기원을 용이하게 확인할 수 있다.
- [3] 세포 또는 조직의 기원을 확인하는 것은 질병의 조기 진단을 가능하게 하고, 진단의 정확도를 높일 수 있다. 예를 들어, 생체를 순환하는 혈액 속에는 순환 세포유리 DNA(cell free DNA, cfDNA)가 존재하고, 이 중에는 종양세포에서 흘러나온 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)가 있을 수 있다. 액체 생검으로 ctDNA의 존재를 검출한다고 하더라도 암을 정확히 진단하기 위해서는 해당 ctDNA가 기원한 조직을 추가로 확인하는 과정이 필요하며, 이러한 과정에서 암의 진단은 늦어지게 된다. 그러나 해당 ctDNA를 검출하면서 기원한 조직을 같이 확인할 수 있다면 암의 조기 진단이 가능해지며, 생물학적 시료의 기원을 밝히는 방법은 암뿐만 아니라 다른 질병의 조기 진단에 점점 필요해지고 있다.
- [4] 본 발명자들은 DNA 메틸화 데이터를 기반으로 기원을 모르는 조직 및 세포의 기원을 밝히는 방법을 연구한 결과, 간 조직 특이적으로 메틸화 수준이 높은 마커를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 기원이 불분명한 생물학적 시료가 간 조직에서 유래했는지 여부를 판별하는 방법 및 상기 방법을 수행하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

##### 과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 하기 단계를 포함하는 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부를 판별하는 방법을 제공한다:

- [7] (a) 대상체(subject)의 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- [8] (b) 상기 분리된 DNA에서 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계.
- [9] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 대상체는 인간일 수 있고, 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 분리한 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.
- [10] 본 명세서에 사용된 용어, "메틸화(methylation)"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기(-CH<sub>3</sub>)가 부착되는 것을 의미하며, 바람직하게는 특정 DNA의 특정 CpG 부위의 시토신에서 일어나는 메틸화를 의미한다. 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 부위에서 5-메틸-시토신의 존재 또는 부존재를 의미한다.
- [11] 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.
- [12] 본 발명자들은 간 조직 특이적 메틸화 마커를 발굴하기 위해 노력한 결과, 정상 간 조직, 간암 조직 샘플에서는 메틸화 수준이 높고, 혈액을 포함한 기타 조직에서는 메틸화 수준이 낮은 cg12137206 (서열번호 1), cg03792768(서열번호 2) 마커를 발굴하였다. 상기 두 마커의 타겟 메틸화 부위는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열에서 61번째 뉴클레오티드에 위치하는 CpG 부위이다. 그러나 상기 타겟 메틸화 부위 이외에 다른 CpG 부위에서도 메틸화가 일어날 수 있으므로 본 발명에서는 상기 타겟 CpG 부위를 포함하여 서열번호 1 및 2로 표시되는 서열에 존재하는 전체 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있다.
- [13] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (b)는 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), MS-HRM (Methylation-sensitive high resolution melting), 비대칭 PCR (asymmetric PCR), 비대칭 PCR MS-HRMA (asymmetric PCR Methylation-sensitive high resolution melting analysis), 재조합효소-중합효소 증폭법 (Recombinase

- Polymerase Amplification), LAMP법(Loop-Mediated Isothermal Amplification), Eclipse probe, 차세대 염기서열분석 패널(NGS panel), 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.
- [14] 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.
- [15] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 (c) 상기 (b) 단계 이후에, 상기 메틸화 수준을 정상 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 생물학적 시료의 메틸화 수준을 정상 대조군의 메틸화 수준과 비교하여 메틸화 수준이 높은 경우 상기 생물학적 시료가 간 조직으로부터 유래한 것으로 판별할 수 있고, 메틸화 수준이 낮거나 유사한 경우 상기 생물학적 시료는 간을 제외한 기타 조직에서 유래한 것으로 판별할 수 있다.
- [16]
- [17] 본 발명의 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 생물학적 시료에서 간 조직 유래 DNA를 검출하는 방법을 제공한다:
- [18] (a) 대상체의 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- [19] (b) 상기 분리된 DNA에서 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계.
- [20] 상기 방법은 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부를 판별하는 방법과 동일한 서열의 메틸화 수준을 측정하는 기술을 사용하므로 두 방법 사이에 중복되는 내용은 명세서의 과도한 기재를 피하기 위하여 생략한다.
- [21] 본 발명에서, 상기 간 조직 유래 DNA 검출 방법은 기존의 간암 진단 방법과 병용하여 사용될 수 있다.
- [22]
- [23] 본 발명의 또 다른 양상은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부 판별용 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 CpG 부위는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열에서 61번째 뉴클레오티드에 위치하는 CpG 부위를 포함하는 1개 내지 복수개가 될 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위에 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산일 수 있으며, 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산은 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로 이용될 수 있고 기체(substrate) 상에 고정화될 수 있다.
- [26] 또한, 상기 서열번호 1 또는 2로 표시되는 서열은 게놈 DNA일 수 있고, 술포산(bisulfite)이 처리되어 비메틸화된 시토신이 우라실로 전환된 서열일 수

- 있다.
- [27] 상기 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 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.
- [28] 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 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산은 혼성화 여부를 확인케 하는 신호를 제공하기 위해 표지(labeling)될 수 있고, 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다.
- [29] 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 호스래디쉬 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.
- [30] 본 발명에서, 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산과 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., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)을 참조할 수 있다.
- [31] 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.
- [32] 상기 효소 및 기질은 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 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/파이로닌; 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.

[33]

[34] 본 발명에서는 DNA 메틸화를 기반으로 간 조직 특이적인 마커를 발굴하였다. 구체적으로 혈액 내의 다양한 세포 타입, 여러 장기 샘플의 메틸화 분석을 진행하여 간 조직을 제외한 다른 장기에서는 메틸화가 낮고, 간 조직 특이적으로 메틸화가 높은 마커를 선별하고, 기계학습 기법으로 선별한 마커의 효율을 확인했다. 선별된 마커는 독립적 코호트인 정상 간 조직에서 간암까지 이르는 모든 샘플에서 메틸화 수준이 높았고, 혈액을 포함하여 다른 조직에서는 메틸화가 낮았으며, 2개 마커만으로도 99% 이상의 정확도로 간 특이성을 갖는 것을 검증하였다. 해당 마커의 유전자 발현 또한 간 특이적으로 높은 경향성을 확인했다. 간 특이적 메틸화 마커를 통해 조직의 기원을 확인할 수 있는 주요 마커로 활용될 수 있음을 규명했고, 향후 간 관련 질환의 모니터링 및 조기 검출의 정확도를 향상시킬 수 있는 지표로 활용하고자 한다.

### 발명의 효과

[35] 본 발명의 생물학적 시료의 간 조직 유래 여부를 판별하는 방법 및 이를 수행하기 위한 조성물은 간 조직 특이적 DNA 메틸화 마커를 이용하며, 상기 간 조직 특이적 마커는 간 조직을 제외한 다른 조직에서는 메틸화 수준이 낮고, 정상 간 조직 및 간암 조직에서는 메틸화 수준이 높으므로 생물학적 시료가 간 조직에서 유래했는지 여부를 우수한 정확도로 판별할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 본 발명의 간 조직 특이적 마커 발굴 과정을 개략적으로 나타낸다.

[37] 도 2는 발굴한 간 조직 특이적 마커의 변수 중요도 플랏(variable importance plot, VarImp Plot)을 나타낸다.

[38] 도 3은 발굴한 간 조직 특이적 마커의 수에 따른 성능을 확인한 결과를 나타낸다.

[39] 도 4에서 A는 최종 선별한 cg12137206, cg03792768 마커의 메틸화 수준을 정상 간 조직(Liver N) 및 간암 조직(Liver T)에서 확인한 결과, B는 간암 샘플의 정상 간 조직(LIHC\_N)과 간암 조직(LIHC\_T), 간을 제외한 기타 정상 조직(Pan\_N) 및 암 조직(Pan\_T)에서 확인한 결과를 나타낸다.

[40] 도 5는 cg12137206 마커의 메틸화 수준을 다양한 정상 조직(A)과 암 조직(B)에서 확인한 결과를 나타낸다.

[41] 도 6은 cg03792768 마커의 메틸화 수준을 다양한 정상 조직(A)과 암 조직(B)에서 확인한 결과를 나타낸다.

[42] 도 7은 cg12137206 및 cg03792768 마커의 메틸화 수준을 주요 정상 조직과 암 조직에서 확인한 결과를 나타낸다: 방광 (bladder, BL), 유방(breast, BR), 자궁 경부 (cervix, CE), 대장(colon, CO), 식도 (esophagus, ES), 교모세포종 (glioblastoma, GB), 두부 및 경부 (head and neck, HN), 신장(kidney, KI), 간(liver,

LI), 폐(lung, LU), 이자 (pancreas, PA), 부신경절종 (paraganglioma, PC), 전립선 (prostate, PR), 직장 (rectum, RE), 육종 (sarcoma, SA), 피부 (skin, SK), 위 (stomach, ST), 흉선 (thymus, TH), 자궁 (uterine, UC) 및 혈액(blood, B).

### 발명의 실시를 위한 형태

- [43] 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.
- [44]
- [45] **실시예 1: 간 조직 특이적 메틸화 마커 발굴**
- [46] 암유전체지도(The Cancer Genome Atlas; 이하, TCGA로 기재함)로부터 다양한 암종 및 정상 조직에 대한 DNA 메틸화 데이터를 다운로드하였다. TCGA에서 다운로드한 데이터로부터 간암 조직 샘플(n=379)에서 메틸화된 CpG 사이트를 선별하고, 이 중에서 다른 조직의 암종 샘플(n=7,260)에서는 비메틸화된 CpG 사이트를 추가로 선별하였다. 이때 기준은 50% 이상의 샘플에서 메틸화된 경우는 메틸화, 90% 이상의 샘플에서 비메틸화된 경우는 비메틸화로 분류하였다.
- [47] 이후 상기 추가 선별된 CpG 사이트로부터 간암을 제외한 암종 샘플(pan-tumor)의 90%에서 비메틸화된 CpG 사이트, 간을 제외한 정상 조직(pan-normal)의 90%에서 비메틸화된 CpG 사이트를 추가로 선별하였다.
- [48] 도 1에 본 발명의 간 조직 특이적 마커의 발굴 과정을 개략적으로 도시하였다.
- [49]
- [50] **실시예 2: 간 조직 특이적 메틸화 마커의 성능 검증**
- [51] 랜덤 포레스트 방법으로 상기 실시예 1에서 발굴한 간 조직 특이적 마커의 변수 중요도 플랏(variable importance plot, VarImp Plot)을 작성하고, 이를 도 2에 도시하였다. 도 2에서 X축의 MeanDecreaseAccuracy는 간 조직/기타 조직의 구분에 있어 각 마커가 정확도 개선에 기여하는 정도, Y축의 MeanDecreaseGini는 간 조직/기타 조직의 구분에 있어 각 마커가 불순도 개선에 기여하는 정도를 나타낸다. 즉, 값이 클수록 그 마커가 간 조직과 기타 조직을 명확히 구분할 수 있음을 의미한다.
- [52] 다음으로 실시예 1에서 사용한 암 조직의 메틸화 데이터를 무작위로 훈련 데이터와 검증 데이터로 구분하여 간 조직 특이적 마커를 테스트하였다. 그 결과, 아래 표 1에 기재된 바와 같이 발굴한 마커들이 간 조직과 기타 조직을 높은 효율과 정확도로 구분하는 것을 확인할 수 있었다. 간 조직 특이적 마커의 성능은 정확도(accuracy) 0.9988, 민감도(sensitivity) 0.9884, 특이도(specificity) 0.9994, 곡선 아래 면적(area under the curve, AUC) 0.9999로 나타났다.
- [53]

[표1]

	유형	기타 조직	간 조직
훈련 데이터	기타 조직	6345	3
	간 조직	7	337
검증 데이터	기타 조직	1586	1
	간 조직	1	85

[54] 또한, 마커의 수에 따른 성능을 확인하기 위하여 마커의 수를 다르게 하여 5번씩 테스트하고, 평균값을 확인하였다. 그 결과, 표 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이 2개 이상의 마커를 사용한 경우 성능이 0.999에 수렴하는 것을 알 수 있었다.

[55] [표2]

	1개	2개	3개	4개	5개	6개
Accuracy	0.9916	0.9976	0.99736	0.99784	0.99796	0.9982
Kappa	0.9142	0.97526	0.97264	0.97762	0.97886	0.98142
Sensitivity	0.923036	0.96968 6	0.96503 4	0.96963	0.97195 4	0.97671 8
Specificity	0.995338	0.99911 8	0.99911 8	0.99937	0.99937	0.99936 2
Pos Pred Value	0.915048	0.98376 4	0.98376 4	0.98817 2	0.98831 8	0.98842 8
Neg Pred Value	0.995844	0.99836 4	0.99811 2	0.99836 4	0.99849	0.99874 2
Balanced Accuracy	0.959188	0.98440 2	0.98207 8	0.9845	0.98566 4	0.98804 8

[56] 또한, 변수 중요도 플랏에서 중요도가 높은 것으로 나온 2개 마커 (cg12137206, cg03792768)의 성능을 추가로 검증하였다. 그 결과, 아래 표 3에 기재된 바와 같이 상기 마커가 간 조직과 기타 조직을 명확하게 구분하는 것을 확인할 수 있었다. 정확도 0.9982, 민감도 0.9647, 특이도 1, 곡선 아래 면적(AUC) 0.9939로 나타났다.

[57]

[표3]

	유형	기타 조직	간 조직
훈련 데이터	기타 조직	6340	8
	간 조직	11	333
검증 데이터	기타 조직	1587	3
	간 조직	0	82

[58]

[59] 상기 결과들을 근거로 cg12137206, cg03792768 마커를 간 조직 특이적 마커로 최종 선별하였다. 아래 표 4 및 표 5에 cg12137206, cg03792768 마커의 정보 및 서열을 기재하였다.

[60]

[표4]

Probe_I D	CGRC_ ID	Gene_I D	chr	start	end	CGI	CGI_lo ci
cg12137 206	CGRC_ LTO.1	GPAM	chr10	1139433 97	1139433 98	chr10:1139432 83-113943657	pCGI
cg03792 768	CGRC_ LTO.2	BDH1	chr3	1972819 34	1972819 35	chr3:19728160 5-197283128	pCGI

[61]

[표5]

Probe_ID	서열
<b>cg12137206</b>	GGGGACACGACTGCCCCAGCAACTTGCAGGAGTCGCACCAC CTCCATGCACTTGTCCCGG[CG]CTCCCGGCCCGAGTAGCCTC CCGCAGCCCACACCTGCCCTGGCAGTTCGCACCCTAGCAG (서열번호 1)
<b>cg03792768</b>	TTCCCATTTGGTTGAGACAGCACCGCCCAGCCAAAGCCCCCTT GTCCTCGCGCGGGTGC[CG]CCTGGACTCCCACCCTGGCCA GTCCCGGGCCCACCACCTCTGGCATCCCCAGCCTGTC (서열번호 2)

[62]

- 상기 표에서 [CG]는 각 프로브의 타겟 메틸화 부위를 의미함

[63]

[64]

실시예 3: 최종 선별한 간 조직 특이적 마커의 검증

[65]

최종 선별한 cg12137206, cg03792768 마커의 간 조직, 다른 조직에서의 메틸화 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 4의 A에 나타난 바와 같이 정상 간 조직(Liver N)과 간암 조직(Liver T) 모두에서 두 마커가 높은 수준으로 메틸화되는 것을 알

수 있었고, 도 4의 B에 나타난 바와 같이 두 마커 모두 기타 암 조직 및 기타 정상 조직에서는 메틸화 수준이 낮은 것을 알 수 있었다.

[66] 도 5 내지 도 7에 간 조직과 기타 조직에서 확인한 cg12137206, cg03792768 마커의 메틸화 수준을 도시하였고, 표 6 내지 8에는 상기 마커의 교차 검증 결과를 기재하였다.

[67] [표6]

조직		샘플수	정확도_N	정확도_T
혈액(whole blood, B)	KNIH	400	1	NA
	GEO_WBset	107	1	NA
간 종양 형성 (liver tumorigenesis)	GSE48325	79	1	NA
	GSE49542	59	1	NA
간세포암(HCC)	GSE43091	54	1	0.94
	GSE54503	132	1	0.9851
	GSE56588	234	1	0.9872
	GSE60753	66	0.9412	0.9375
	TCGA_LIHC	379	1	0.9921
	CGRC_HCC	307	1	0.9835
	TCGA_CHO L	45	1	0.5278
다른 조직	CGRC_CRC	709	1	1
	CGRC_lung	42	NA	1

[68]

[표7]

조직	TCGA	샘플수	정확도_N	정확도_T
방광 (bladder, BL)	BLCA	434	1	1
유방 (breast, BR)	BRCA	869	1	1
자궁 경부 (cervix, CE)	CESC	312	1	1
대장 (colon, CO)	COAD	335	1	1
직장 (rectum, RE)	READ	106	1	1
식도 (esophagus, ES)	ESCA	202	1	1
교모세포종 (glioblastoma, GB)	GBM	154	1	1
두부 및 경부 (head and neck, HN)	HNSC	580	1	1
신장 (kidney, KI)	KIRC	480	1	1
신장 (kidney, KI)	KIRP	321	1	1
폐 (lung, LU)	LUAD	492	1	1
폐 (lung, LU)	LUSC	412	1	1
이자 (pancreas, PA)	PAAD	195	1	1
부신경절종 (paraganglioma, PC)	PCPG	187	1	1
전립선 (prostate, PR)	PRAD	549	1	1
위 (stomach, ST)	STAD	397	1	1
육종 (sarcoma, SA)	SARC	269	1	1
피부 (skin, SK)	SKCM	475	1	1
흉선 (thymus, TH)	THCA	574	1	1
흉선 (thymus, TH)	THYM	126	1	1
자궁 (uterine, UC)	UCEC	466	1	1

[69]

[표8]

조직	GEO #	샘플수	정확도
방광 (BL)	GSE52955	30	1
유방 (BR)	GSE52865	57	1
	GSE39451	20	1
	GSE60185	285	1
자궁 경부 (CE)	GSE46306	44	1
대장 (colon, CO)	GSE39958	45	1
	GSE42752	63	1
	GSE48684	147	1
식도 (ES)	GSE52826	12	1
교모세포종 (GB)	GSE36278	142	0.9787
	GSE58298	40	1
	GSE60274	77	0.987
두부 및 경부 (HN)	GSE40005	24	1
	GSE38266	42	0.9286
신장 (KI)	GSE50874	85	1
	GSE61441	92	1
폐 (LU)	GSE39279	444	1
	GSE52401	244	1
	GSE56044	136	1
이자 (PA)	GSE49149	196	1
부신경절종 (PC)	GSE43293	24	1
전립선 (PR)	GSE47915	8	1
	GSE55598	48	1
위 (ST)	GSE34387	76	0.9867
흉선 (TH)	GSE55111	11	1
자궁 (UC)	GSE45187	9	1

[70]

[71]

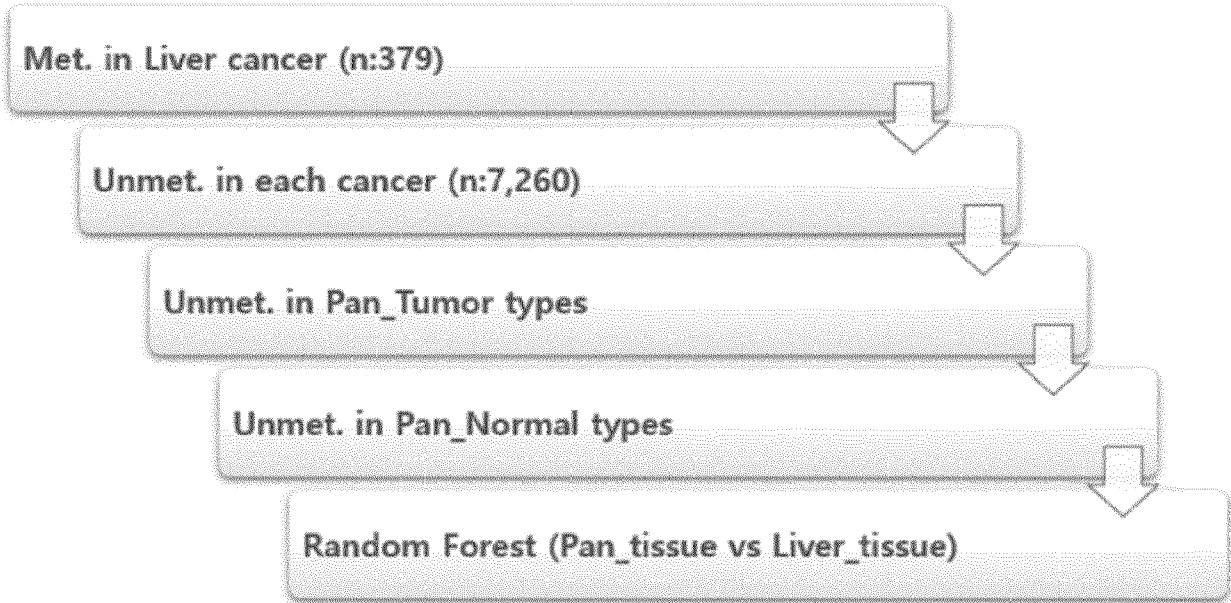
지금까지의 결과를 통하여, cg12137206, cg03792768 마커는 간 조직에서는 메틸화 수준이 높고, 기타 조직에서는 메틸화 수준이 낮은 것을 알 수 있으며,

따라서 상기 두 마커는 간 조직 특이적 마커로 사용될 수 있다.

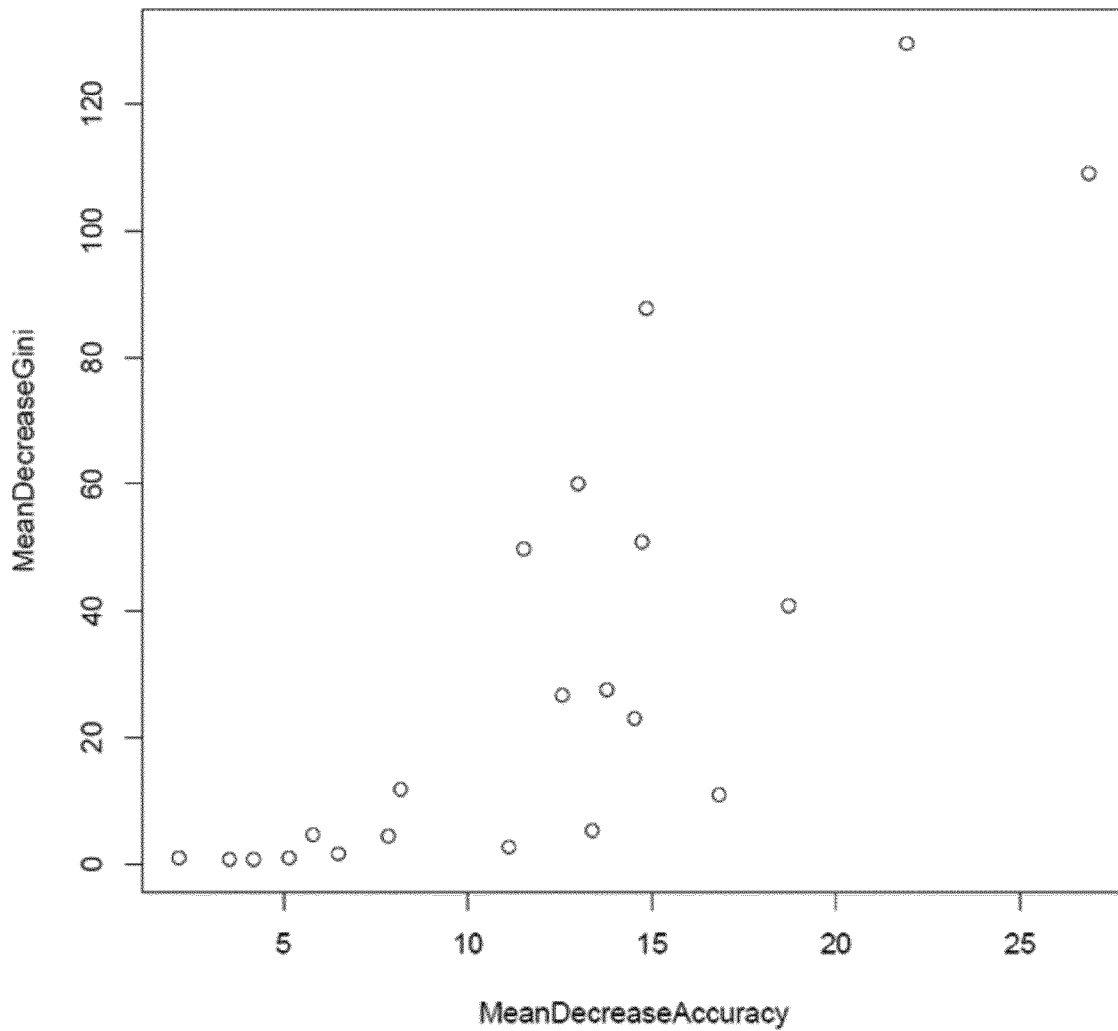
## 청구범위

- [청구항 1] (a) 대상체(subject)로부터 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및  
(b) 상기 분리된 DNA에서 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부를 판별하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 대상체로부터 분리된 조직, 조직 단편, 세포, 세포 단편, 혈액, 혈장, 체액, 대변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부를 판별하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 (b) 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), MS-HRM (Methylation-sensitive high resolution melting), 비대칭 PCR (asymmetric PCR), 비대칭 PCR MS-HRMA (asymmetric PCR Methylation-sensitive high resolution melting analysis), 재조합효소-중합효소 증폭법 (Recombinase Polymerase Amplification), LAMP법(Loop-Mediated Isothermal Amplification), Eclipse probe, 차세대 염기서열분석 패널(NGS panel), 파이로시퀀싱 및 바이셀과이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행되는 것인, 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부를 판별하는 방법.
- [청구항 4] (a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및  
(b) 상기 분리된 DNA에서 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 생물학적 시료에서 간 조직 유래 DNA를 검출하는 방법.
- [청구항 5] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부 판별용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 서열의 CpG 부위에 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 핵산인 것인 생물학적 시료의 간 조직 기원 여부 판별용 조성물.

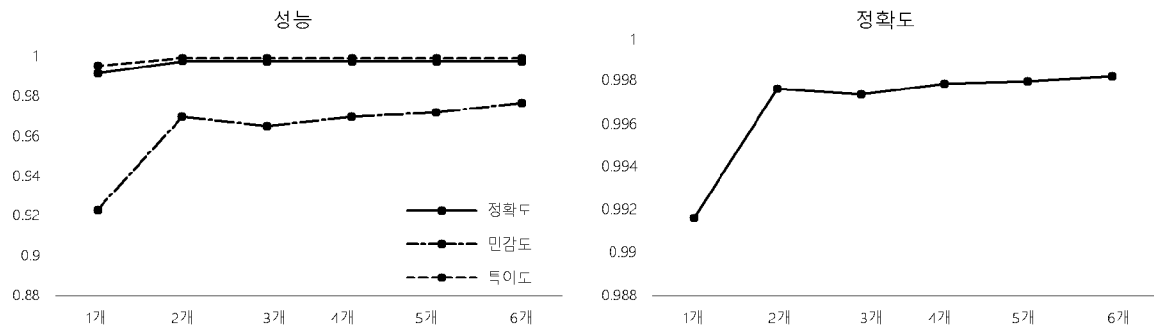
[도1]



[도2]

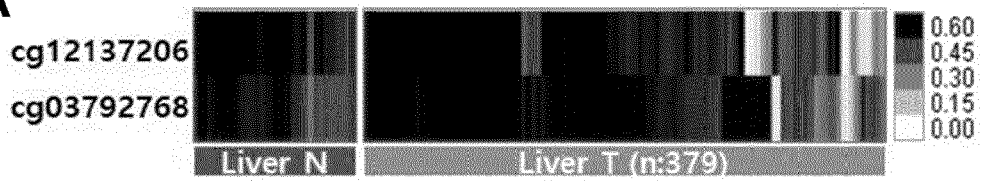


[도3]

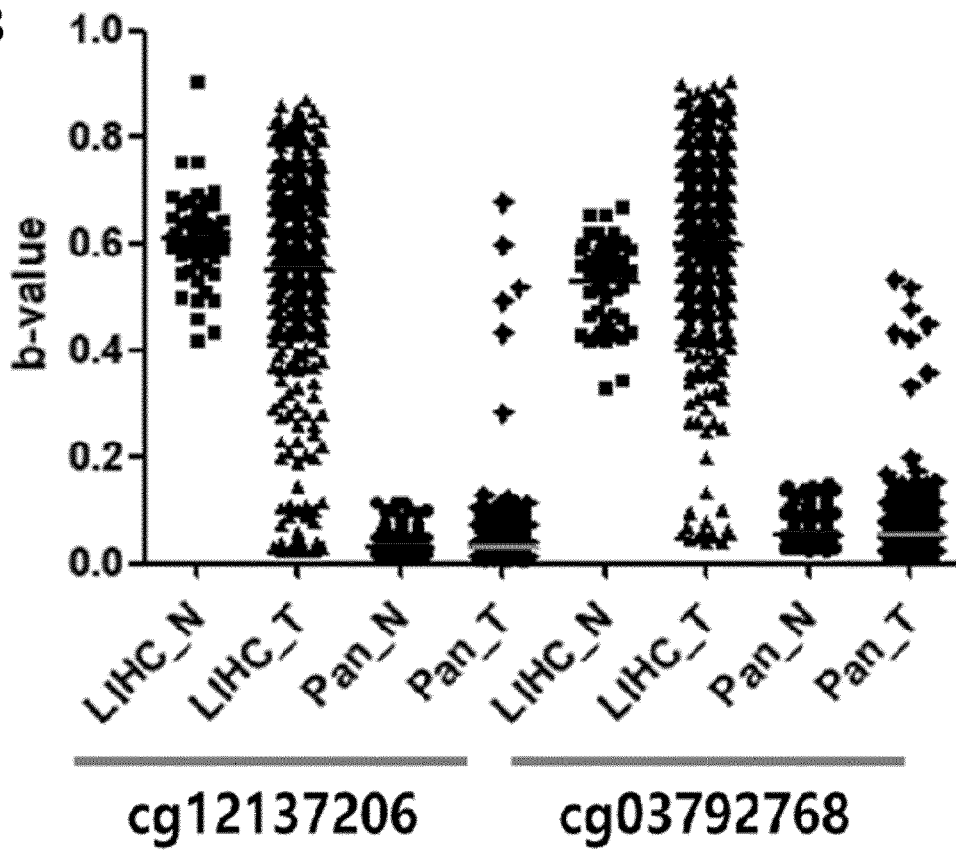


[도4]

A



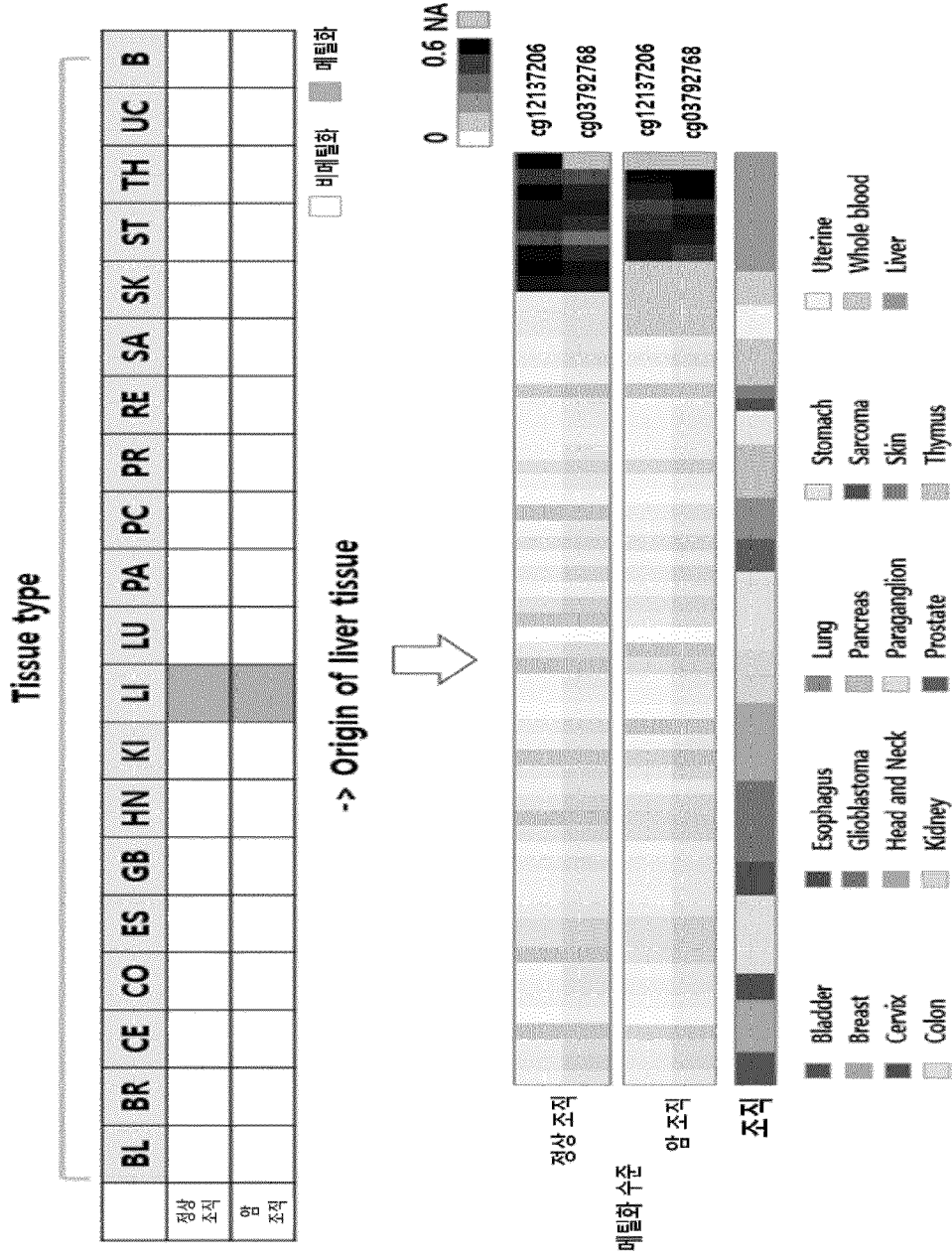
B







[도7]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2020/013290**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q 1/6881(2018.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6881; C12Q 1/68; C12Q 1/6886		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CpG부위(CpG region), 메틸화(methylation), 측정(measurement), DNA, 간 조직(liver tissue), 마커(marker), 프로브(probe)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GAL, W. et al. Liver-and colon-specific DNA methylation markers in plasma for investigation of colorectal cancers with or without liver metastases. Clinical Chemistry. 2018, vol. 64, no. 8, pp. 1239-1249. See abstract; page 1240, right column; and page 1242, right column.	1-6
A	LEHMANN-WERMAN, R. et al. Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA. JCI Insight. 2018, vol. 3, no. 12, thesis no. e120687, (pp. 1-9). See entire document.	1-6
A	KR 10-2017-0071724 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 26 June 2017. See entire document.	1-6
A	NCBI. GenBank accession no. AL391986.12. Human DNA sequence from clone RP11 -426E5 on chromosome 10. complete sequence. 13 December 2012. See entire document.	1-6
A	NCBI. GenBank accession no. AC128709.6. Homo sapiens 3 BAC RP13-61613 (Roswell park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence. 07 March 2003. See entire document.	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>12 January 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>13 January 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b> Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2020/013290**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2018-0274039 A1 (YOUHEALTH BIOTECH, LIMITED et al.) 27 September 2018. See entire document.	1-6
PX	KR 10-2103885 B1 (LEPIDYNE CO., LTD.) 24 April 2020. See claims 1-6. * This document is the published patent of a priority application of the present international application.	1-6

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2020/013290**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0071724	A	26 June 2017	None			
US	2018-0274039	A1	27 September 2018	CN	110603329	A	20 December 2019
				EP	3589371	A1	08 January 2020
				EP	3589371	A4	25 November 2020
				US	10513739	B2	24 December 2019
				US	2020-263256	A1	20 August 2020
				WO	2018-161031	A1	07 September 2018
KR	10-2103885	B1	24 April 2020	None			

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>C12Q 1/6881(2018.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6881; C12Q 1/68; C12Q 1/6886 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:CpG부위(CpG region), 메틸화(methylation), 측정(measurement), DNA, 간 조직(liver tissue), 마커(marker), 프로브(probe)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GAI, W. 등, "Liver-and colon-specific DNA methylation markers in plasma for investigation of colorectal cancers with or without liver metastases", Clinical Chemistry, 2018, 제64권, 제8호, 페이지 1239-1249 초록; 페이지 1240, 오른쪽 컬럼; 페이지 1242, 오른쪽 컬럼	1-6
A	LEHMANN-WERMAN, R. 등, "Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA", JCI Insight, 2018, 제3권, 제12호, 논문번호 e120687, (페이지 1-9) 전체 문헌	1-6
A	KR 10-2017-0071724 A (연세대학교 산학협력단) 2017.06.26 전체 문헌	1-6
A	NCBI, GenBank accession no. AL391986.12, "Human DNA sequence from clone RP11-426E5 on chromosome 10, complete sequence", 2012.12.13 전체 문헌	1-6
A	NCBI, GenBank accession no. AC128709.6, "Homo sapiens 3 BAC RP13-616I3 (Roswell park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence", 2003.03.07 전체 문헌	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년 01월 12일 (12.01.2021)	국제조사보고서 발송일 2021년 01월 13일 (13.01.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2018-0274039 A1 (YOUHEALTH BIOTECH, LIMITED 등) 2018.09.27 전체 문헌	1-6
PX	KR 10-2103885 B1 (주식회사 레피다인) 2020.04.24 청구항 1-6  ※ 위 문헌은 본 국제출원의 우선권 출원의 등록공보임.	1-6

## 제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 게시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a.  아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

부록 C/ST.25 텍스트 파일

서면 혹은 이미지 파일

b.  PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c.  국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2.  추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 게시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0071724 A	2017/06/26	없음	
US 2018-0274039 A1	2018/09/27	CN 110603329 A EP 3589371 A1 EP 3589371 A4 US 10513739 B2 US 2020-263256 A1 WO 2018-161031 A1	2019/12/20 2020/01/08 2020/11/25 2019/12/24 2020/08/20 2018/09/07
KR 10-2103885 B1	2020/04/24	없음	