



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051748
 (43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6876 (2013.01)
C12Q 1/6837 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0152443
 (22) 출원일자 2015년10월30일
 심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 엘지생활건강

서울특별시 중로구 새문안로 58 (신문로2가)

(72) 발명자
장윤희

대전광역시 유성구 가정로 175 주식회사 엘지생활
 건강기술연구원 (장동)

임준만

대전광역시 유성구 가정로 175 주식회사 엘지생활
 건강기술연구원 (장동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **피부 보습 진단용 단일염기다형성 마커 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 피부 보습 정도를 판단할 수 있는 단일염기다형성 (SNP) 마커들 중에서 선택된 1종 이상의 단일염기다형성 마커를 포함하는 피부 보습 정도 진단용 마커, 상기 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 이를 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트 또는 마이크로어레이 및 상기 마커를 이용한 피부 보습 정도의 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명의 단일염기다형성 마커는 각각의 개체에 대한 피부 보습 정도를 진단할 수 있는 마커로, 개체에 대한 정확한 피부 타입에 대한 정보를 줄 수 있으며, 이를 통해 화장품 소비자의 피부 특성을 과학적으로 분류하여 피부 특성별 맞춤형 화장품 개발에 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

- C12Q 1/686 (2013.01)
- C12Q 2561/113 (2013.01)
- C12Q 2600/124 (2013.01)
- C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

이상화

대전광역시 유성구 가정로 175 주식회사 엘지생활
건강기술연구원 (장동)

박선규

대전광역시 유성구 가정로 175 주식회사 엘지생활
건강기술연구원 (장동)

이영

대전광역시 중구 태평로 15, 126동 701호 (태평동,
버드내마을아파트)

신영아

경기도 수원시 영통구 광교로 145 차세대융합기술
원 B동 2층 테라젠이텍스

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465016717
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	글로벌화장품신소재. 신기술연구개발지원
연구과제명	유전자 타입별 피부 분류 기준 확립과 개인 맞춤형 유효성분 개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교산학협력단
연구기간	2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

표 3에 표시된 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 마커들 중에서 선택된 1 종 이상의 단일염기다형성 마커를 포함하는, 피부 보습 정도 진단용 마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 피부 보습 정도 진단용 마커는, 서열번호 1 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 염기서열 중, 26 번째 염기를 SNP로서 포함하고 5 내지 51 개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로서,

- (i) 상기 서열번호 1의 26 번째 염기는 C 또는 G이고,
 - (ii) 서열번호 2의 26 번째 염기는 C 또는 T이고,
 - (iii) 서열번호 3의 26 번째 염기는 G 또는 T이고,
 - (iv) 서열번호 4의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (v) 서열번호 5의 26 번째 염기는 C 또는 T이고,
 - (vi) 서열번호 6의 26 번째 염기는 G 또는 T이고,
 - (vii) 서열번호 7의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (viii) 서열번호 8의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (ix) 서열번호 9의 26 번째 염기는 A 또는 C이고,
 - (x) 서열번호 10의 26 번째 염기는 T 또는 C이고,
 - (xi) 서열번호 11의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (xii) 서열번호 12의 26 번째 염기는 G 또는 C이고,
 - (xiii) 서열번호 13의 26 번째 염기는 G 또는 A이고,
 - (xiv) 서열번호 14의 26 번째 염기는 C 또는 A이고,
 - (xv) 서열번호 15의 26 번째 염기는 C 또는 A이고,
 - (xvi) 서열번호 16의 26 번째 염기는 G 또는 A이고,
 - (xvii) 서열번호 17의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (xviii) 서열번호 18의 26 번째 염기는 A 또는 G이고,
 - (xix) 서열번호 19의 26 번째 염기는 A 또는 G이고
 - (xx) 서열번호 20의 26 번째 염기는 G 또는 A인,
- 피부 보습 정도 진단용 마커.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 피부 보습 정도 진단용 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 이를 증폭할 수 있는 체제를 포함하는, 피부 보습 정도 진단용 조성물.

청구항 4

제3항의 조성물을 포함하는 피부 보습 정도 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트인 피부 보습 정도 진단용 키트.

청구항 6

제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 피부 보습 정도 진단용 마이크로어레이.

청구항 7

- (a) 분리한 개체의 시료로부터 수득된 DNA 로부터 제1항 또는 제2항의 단일염기다형성 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프로브와 혼성화하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 또는 혼성화된 다형성 부위의 염기를 확인하는 단계를 포함하는, 피부 보습 정도의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, (b) 단계에서 확인된 염기서열 중, 1 종 이상의 단일염기다형성 마커가,

- 서열번호 1로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;
- 서열번호 2로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;
- 서열번호 3으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;
- 서열번호 4로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;
- 서열번호 6으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우;
- 서열번호 7로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 8로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 9로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;
- 서열번호 10으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우;
- 서열번호 11로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 12로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;
- 서열번호 13으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 14로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;
- 서열번호 15로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 16으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;
- 서열번호 17로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;
- 서열번호 18로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 19로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 또는

서열번호 20으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우, 건조한 피부인 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 피부 보습 정도 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, (b) 단계에서 확인된 염기서열 중, 1 종 이상의 단일염기다형성 마커가,

서열번호 1로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 2로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우;

서열번호 3으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우;

서열번호 4로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우;

서열번호 6으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 7로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 8로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 9로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;

서열번호 10으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;

서열번호 11로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 12로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;

서열번호 13으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 14로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;

서열번호 15로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우;

서열번호 16으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우;

서열번호 17로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;

서열번호 18로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우;

서열번호 19로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 또는

서열번호 20으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우, 촉촉한 피부인 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 피부 보습 정도의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 시료는 머리카락, 뇨, 혈액, 각종 체액, 분리된 조직, 분리된 세포 또는 타액인 것인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 다형성 부위의 증폭 및 확인은 SNP 칩을 이용하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개인의 피부 보습 상태를 판단할 수 있는 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 마커, 상기 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 이를 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트 또는 마이크로어레이 및 상기 마커를 이용한 피부 보습 상태의 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 개개인 피부의 보습 정도, 즉 피부가 촉촉하거나 건조한 정도는 개인이 가지고 있는 유전적 요인, 내분비 요인 및 개인이 처한 환경 등 다양한 요인들에 의해 결정되며, 개인의 피부의 각질 세포에 존재하는 천연 보습 인자 (natural moisturizing factor, NMF), 세라마이드 (ceramide)의 양, 아쿠아포린 (aquaporin)의 활성 또는 각질 세포 사이를 연결하는 치밀이음부 (tight junction)의 견고성 등에 따라 결정된다고 알려져 있다. 이러한 여러 가지 요인 중에서도, 유전적 요인이 피부 보습 정도를 결정하는 가장 강력한 결정인자로 알려져 있다.

[0004] 그러나, 현재까지 개개인의 보습 정도의 판단은 주로 단순한 피부문진 및 간단한 피부테스트를 통하여 피부상태를 파악하는 것으로, 이러한 방식은 개개인의 피부상태 정보에 대한 완전한 신뢰를 얻기 어렵다.

[0005] 그 예로, 코니오메타 (corneometer)를 이용하여 피부 보습량을 측정하는 방법은 피부표면에 대한 물리적인 상태를 단순하게 수치화하여 나타내는 것으로, 이 경우 측정하는 프로그램에 따라 그 보습 수치가 달라질 수 있기 때문에 피시험자의 작은 개선 정도를 평가하는데 있어서는 오차가 발생할 우려가 있다. 또한, 시험자의 육안평가 및 피시험자의 설문평가의 경우에는 주관적인 측면이 크게 작용하여 피시험자의 피부상태를 객관적이고 정밀하게 평가하기에는 어려운 단점이 있다. 또한 이러한 방법들은 현재의 보습 상태를 측정할 수 있지만 개인의 보습 상태를 예측하는 데에는 한계가 있다.

[0006] 따라서 과학적인 근거에 접근하여 피부 보습 정도를 정밀하게 진단하고 맞춤형 화장품을 제공하는 시스템은 거의 전무후무하다고 할 수 있다.

[0008] 이러한 배경하에 본 발명자들은 사람의 피부 보습 정도를 결정하는 유전적 특징을 파악하여, 이를 근거로 한 개인 맞춤형 유효성분을 개발하여, 피부 유전자별 맞춤형화장품 개발에 기여하고자 예의 노력한 결과, 피부 보습도와 유의적 상관관계를 갖는 단일염기다형성 마커를 선별하여 이를 진단하는 방법을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 피부 보습 정도를 판단할 수 있는 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 마커를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 피부 보습 정도 진단용 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 이를 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 피부 보습 정도 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 피부 보습 정도 진단용 조성물을 포함하는 피부 보습 정도 진단용 키트 또는 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 단일염기다형성 마커의 다형성 부위를 확인하는 단계를 포함하는 피부 보습 정도의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 피부 보습 정도를 판단할 수 있는 단일염기다형성

(SNP, single nucleotide polymorphism) 마커를 제공한다.

- [0016] 본 발명에서 용어, "다형성 (polymorphism)"이란 하나의 유전자 좌위 (locus)에 두 가지 이상의 대립유전자 (allele)가 존재하는 경우를 말하며 다형성 부위 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 다른 것을 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)이라 한다. 본 발명에서 용어, "단일염기다형성 마커"는 단일염기다형성을 가지는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미하며, 이를 통해 피부 보습 정도를 판단할 수 있다. 바람직한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1 % 이상, 더욱 바람직하게는 10 % 또는 20 % 이상의 발생빈도를 나타내는 두 가지 이상의 대립유전자를 가진다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "대립유전자 (allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자 좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 말한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류의 대립인자 (biallele)를 갖는다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "rs_id"란 1998년부터 SNP 정보를 축적하기 시작한 NCBI가 초기에 등록되는 모든 SNP에 대하여 부여한 독립된 표지자인 rs-ID를 의미한다. 상기 rs_id는 본 발명의 SNP 마커를 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "피부 보습"이란 측정 또는 진단하고자 하는 개체의 피부 보습 정도를 의미하는 것으로 특히 피부의 수분이 많고 적음을 말하며, 용어 "피부 보습 정도"는 내인성 또는 외인성 요인 등에 의해 피부에 수분이 존재하는 정도를 의미한다. 본 발명의 단일염기다형성 마커는 피부 보습 정도를 측정하고자 하는 개체로부터 시료를 채취하여 상기 개체의 피부 보습 정도를 평가할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 일실시예에서, 본 발명자들은 피시험자의 보습 정도를 수분량 측정기기인 Corneometer CM825 (C+K, Germany)를 이용하여 측정한 수분량을 기준으로 분류하였고, CM value 34 이하는 수분이 적은 건조 피부, CM value 78 이상은 수분이 많은 보습 피부로 분류하였다.
- [0021] 본 발명의 단일염기다형성 마커는 정확한 피부 보습 정도를 측정할 수 있도록 하므로, 유효 성분과 접촉된 피부의 변화된 피부 보습 정도에 대한 정보도 줄 수 있다. 구체적으로, 예컨대 CM value 34 이하는 수분이 적은 건조 피부, CM value 78 이상은 수분이 많은 보습된 피부로 판단될 수 있으며, 이는 코니오미터 등을 사용하여 피시험자의 피부 타입을 측정하는 과정 없이, 본 발명의 단일염기다형성 마커를 이용하여 더욱 정밀하게 측정 및 진단될 수 있다.
- [0023] 구체적으로 상기 단일염기다형성 마커는 표 3에 표시된 단일염기다형성 마커들 중에서 선택된 1종 이상의 단일염기다형성 마커일 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 단일염기다형성 마커는 표 3에 표시된 단일염기 다형성 마커들 중에서 선택된 1 종 이상, 2 종 이상, 3 종 이상, 4 종 이상, 5 종 이상, 6 종 이상, 7 종 이상, 8 종 이상, 9 종 이상, 10 종 이상, 11 종 이상, 12 종 이상, 13 종 이상, 14 종 이상, 15 종 이상, 16 종 이상, 17 종 이상, 18 종 이상, 19 종 이상 또는 20 종의 단일염기다형성 마커일 수 있다. 상기 표 3에 표시된 단일염기다형성 마커는 피부 보습 정도를 판단하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 단일염기다형성 마커의 피부 보습 정도의 진단 여부는 각 마커들의 빈도 수를 측정하여 판단하였다. 이와 같은 유의성은 0.05 미만, 0.01 미만, 0.001 미만, 0.0001 미만, 0.00001 미만, 0.000001 미만, 0.0000001 미만, 0.00000001 미만, 또는 0.000000001 미만의 p-value와 같은 p-값을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로는 p-value가 0.01 미만일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 p-value가 0.001 미만일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 피부 보습 정도 진단용 마커는, 서열번호 1 내지 20으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 염기서열 중, 26 번째 염기를 SNP로서 포함하고 5 내지 51 개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로서, (i) 상기 서열번호 1의 26 번째 염기는 C 또는 G이고, (ii) 서열번호 2의 26 번째 염기는 C 또는 T이고, (iii) 서열번호 3의 26 번째 염기는 G 또는 T이고, (iv) 서열번호 4의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (v) 서열번호 5의 26 번째 염기는 C 또는 T이고, (vi) 서열번호 6의 26 번째 염기는 G 또는 T이고, (vii) 서열번호 7의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (viii) 서열번호 8의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (ix) 서열번호 9의 26 번째 염기는 A 또는 C이고, (x) 서열번호 10의 26 번째 염기는 T 또는 C이고, (xi) 서열번호 11의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (xii) 서열번호 12의 26 번째 염기는 G 또는 C이고, (xiii) 서열번호 13의 26 번째 염기는 G 또는 A이고, (xiv) 서열번호 14의 26 번째 염기는 C 또는 A이고, (xv) 서열번호 15의 26 번째 염기는 C 또는 A이고, (xvi) 서열번호 16의 26 번째 염기는 G 또는 A이고, (xvii) 서열번호 17의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (xviii) 서열번호 18의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (xix) 서열번호

19의 26 번째 염기는 A 또는 G이고, (xx) 서열번호 20의 26 번째 염기는 G 또는 A인, 피부 보습 정도 진단용 마커일 수 있다.

- [0026] 구체적으로 상기 피부 보습 정도 진단용 마커는, 서열번호 1 내지 20로 구성된 군에서 선택된 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상 19 이상 또는 20 개의 염기서열 중, 26 번째 염기를 SNP로서 포함하고 5 내지 51 개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명자들은 상기 SNP가 피부 보습 정도 진단용 마커임을 다음과 같은 입증을 통하여 확인하였다.
- [0029] 구체적으로, 피시험자의 보습 정도를 CM value 34 이하는 수분이 적은 건조 피부, CM value 78 이상은 수분이 많은 보습 피부로 양극단의 최고 값을 가지는 13 명을 대조군 (control), 최저 값을 가지는 13 명을 실험군 (case)으로 분류하였다 (표 2).
- [0030] 그 다음, 상기 분류된 개체의 타액으로부터 게놈 DNA (gDNA)를 추출하고, 대조군인 hg19 인간 게놈 레퍼런스 (human genome reference)와 서열을 정렬 비교하여 피부 보습 정도에 유의성을 갖는 SNP를 분류하였다 (표 3). 이와 같은 피부 보습 정도를 진단할 수 있는 SNP는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이다.
- [0031] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 피부 보습 정도 진단용 마커를 검출할 수 있는 프로브 또는 이를 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 피부 보습 정도 진단용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 용어, "피부 보습 정도 진단용 마커를 검출할 수 있는 프로브"는 상기와 같은 유전자의 다형성 부위와 특이적으로 혼성화 반응을 통해 확인하여 피부 보습 정도를 진단할 수 있는 조성물을 의미하며, 이와 같은 유전자 분석의 구체적 방법은 특별한 제한이 없으며, 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진 모든 유전자 검출 방법에 의하는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "피부 보습 정도 진단용 마커를 증폭할 수 있는 제제"란 상기와 같은 유전자의 다형성 부위를 증폭을 통해 확인하여 피부 보습 정도를 진단할 수 있는 조성물을 의미하며, 바람직하게는 상기 피부 보습 정도 진단용 마커의 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 의미한다.
- [0034] 상기 다형성 마커 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건 (예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 통상 15 내지 30 뉴클레오티드일 수 있다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0035] 본 발명에서 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 중합반응을 위한 시약 (즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 피부 타입을 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 프로브 또는 프라이머는 포스포로아미다이트 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. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 1 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.
- [0038] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 피부 보습 정도 진단용 조성물을 포함하는 피부 보습 정도 진단용 키트를

제공한다.

- [0039] 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 키트는 피부 보습 정도 진단용 마커인 SNP 다형성 마커를 증폭을 통해 확인하거나, SNP 다형성 마커의 발현 수준을 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 피부 보습 정도를 진단할 수 있다.
- [0041] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 피부 보습 정도 진단용 마커의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 피부 보습 정도 진단용 마커의 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 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), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 피부 보습 정도 진단용 키트일 수 있다.
- [0042] DNA 칩 키트는, 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지 않은 유리 표면에 핵산 종을 격자형 배열 (gridded array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화 (hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구이다.
- [0044] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 피부 보습 정도 진단용 마커의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 피부 보습 정도 진단용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0045] 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오타이드에 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어진다.
- [0046] 프로브 폴리뉴클레오타이드를 기관상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 프로브 폴리뉴클레오타이드는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립유전자 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 이 경우 혼성화 조건은 대립유전자간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립유전자 중 하나에만 혼성화 하도록 충분히 엄격해야 한다. 이렇게 함으로써 다른 대립유전자 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 상기 프로브는 대립유전자를 검출하여 피부 타입 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯트 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기관에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다. 상기 혼성화란 엄격한 조건, 예를 들면 1 M 이하의 염 농도 및 25 °C 이상의 온도하에서 보통 수행될 수 있다.
- [0048] 예를 들면, 5 x SSPE (750 mM NaCl, 50 mM Na Phosphate, 5 mM EDTA, pH 7.4) 및 25 내지 30 °C의 조건이 대립유전자 특이적 프로브 혼성화에 적합할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 피부 진단과 연관된 프로브 폴리뉴클레오타이드의 기관상에 고정화하는 과정도 또한 이러한 종래 기술을 사용하여 용이하게 제조할 수 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 예를 들면, 핵산 시료를 형광 물질, 예를 들면 Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.
- [0051] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분리한 개체의 시료로부터 수득된 DNA로부터 상기 단일염기다형성 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프로브와 혼성화하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 또는 혼성화된 다형성 부위의 염기를 확인하는 단계를 포함하는, 피부 보습 정도 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 용어, "개체"란 피부 보습 정도에 대한 진단을 하기 위한 피시험자를 의미한다. 상기 검체에서 머리 카락, 뇨, 혈액, 각종 체액, 분리된 조직, 분리된 세포 또는 타액과 같은 시료 등으로부터 DNA를 수득할 수 있

으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0053] 상기 (a) 단계의 게놈 DNA 수득 방법은 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다.
- [0054] 상기 (a) 단계에서 수득한 DNA로부터 상기 단일염기다형성 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프로브와 혼성화하는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다. 그 외 리가아제 연쇄 반응 (LCR) (Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭 (transcription amplification)(Kwoh 등, Proc. Natl.Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)), 자가유지 서열 복제 (Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭 (NASBA)이 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 방법 중 (b) 단계의 다형성 부위의 염기를 결정하는 것은 시퀀싱 분석, 마이크로어레이 (microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR (allele specific PCR), 다이내믹 대립유전자 혼성화 기법 (dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석, SSCP, PCR-RFLP 분석 또는 TaqMan 기법, SNPlex 플랫폼 (Applied Biosystems), 질량 분석법 (예를 들면, Sequenom의 MassARRAY 시스템), 미니-시퀀싱 (mini-sequencing) 방법, Bio-Plex 시스템 (BioRad), CEQ and SNPstream 시스템 (Beckman), Molecular Inversion Probe 어레이 기술 (예를 들면, Affymetrix GeneChip), 및 BeadArray Technologies (예를 들면, Illumina GoldenGate 및 Infinium 분석법)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 방법들 또는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 이용가능한 다른 방법에 의해, 마이크로세틀라이트, SNP 또는 다른 종류의 다형성 마커를 포함한, 다형성 마커에서의 1 이상의 대립유전자가 확인될 수 있다. 이와 같은 다형성 부위의 염기를 결정하는 것은 바람직하게는 SNP 칩을 통해 수행할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 용어, "SNP 칩"은 수십만개의 SNP의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다.
- [0057] TaqMan 방법은 (1) 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하는 단계; (2) 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지 (Applied Biosystems)하는 단계; (3) 상기 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 및 탐침을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; (4) 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 핵산 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 (5) 상기 분석결과로부터 단계 (1)의 폴리뉴클레오티드의 유전자형을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0058] 상기에서, 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR은 SNP가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트에 상기 SNP가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. 상기 방법의 원리는, 예를 들어, 특정 염기가 A에서 G로 치환된 경우, 상기 A를 3' 말단염기로 포함하는 프라이머 및 적당한 크기의 DNA 단편을 증폭할 수 있는 반대 방향 프라이머를 고안하여 PCR 반응을 수행할 경우, 상기 SNP 위치의 염기가 A인 경우에는 증폭반응이 정상적으로 수행되어 원하는 위치의 밴드가 관찰되고, 상기 염기가 G로 치환된 경우에는 프라이머는 주형 DNA에 상보결합할 수 있으나, 3' 말단 쪽이 상보결합을 하지 못함으로써 증폭반응이 제대로 수행되지 않는 점을 이용한 것이다. DASH는 통상적인 방법으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 프린스 등에 의한 방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [0059] 한편, PCR 연장 분석은 먼저 단일염기 다형성이 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 SNP 특이적 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. 이때, 연장 프라이머는 SNP가 위치하는 염기의 5' 방향의 바로 인접한 염기를 3' 말단으로 삼으며, dNTP 혼합물에는 디디옥시뉴클레오티드와 동일한 염기를 갖는 핵산이 제외되고, 상기 디디옥시뉴클레오티드는 SNP를 나타내는 염기 종류 중 하나에서 선택된다. 예를 들어, A에서 G로의 치환이 있는 경우, dGTP, dCTP 및 dTTP 혼합물과 ddATP를 반응에 첨가할 경우, 상기 치환이 일어난 염기에서 프라이머는 DNA 중합효소에 의하여 연장되고, 몇 염기가 지난 후 A 염기가 최초로 나타나는 위치에서 ddATP에 의하여 프라이머 연장반응이 종결된다. 만일 상기 치환이 일어나지 않았다면, 그 위치에서 연장반응이 종결되므로, 상기 연장된 프라이머의 길이를 비교함으로써 SNP를 나타내는 염기 종류를 판별할 수 있게 된다.
- [0060] 이때, 검출방법으로는 연장 프라이머 또는 디디옥시뉴클레오티드를 형광 표지한 경우에는 일반적인 염기서열 결정에 사용되는 유전자 분석기 (예를 들어, ABI사의 Model 3700 등)를 사용하여 형광을 검출함으로써 상기 SNP를 검출할 수 있으며, 무-표지된 연장 프라이머 및 디디옥시뉴클레오티드를 사용할 경우에는 MALDI-TOF (matrix

assisted laser desorption ionization-time of flight) 기법을 이용하여 분자량을 측정함으로써 상기 SNP를 검출할 수 있다.

[0062] 상기 피부 보습 정도 진단을 위한 정보의 제공 방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 (b) 단계에서 확인된 염기서열 중, 1 종 이상의 단일염기다형성 마커가, 서열번호 1로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 2로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 3으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 4로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 6으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우; 서열번호 7로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 8로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 9로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 10으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우; 서열번호 11로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 12로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 13으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 14로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 15로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 16으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 17로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 18로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 19로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 또는 서열번호 20으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우, 피부 수분 정도가 낮은 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에 따라 평가된 CM value에 기초하여 판단될 수 있다.

[0063] 또한, 서열번호 1로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 2로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우; 서열번호 3으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우; 서열번호 4로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 5로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 T인 경우; 서열번호 6으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 7로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 8로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 9로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 10으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 11로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 12로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 13으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 14로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 15로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 C인 경우; 서열번호 16으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 서열번호 17로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 18로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 A인 경우; 서열번호 19로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우; 또는 서열번호 20으로 기재된 폴리뉴클레오티드에 있어서, 26 번째 염기가 G인 경우, 피부 수분 정도가 높은 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에 따라 평가된 CM value에 기초하여 판단될 수 있다.

[0064] 상기 (b) 단계에서 확인된 염기서열은, 서열번호 1 내지 20으로 구성된 염기서열 중 선택된 1 종 이상, 2 종 이상, 3 종 이상, 4 종 이상, 5 종 이상, 6 종 이상, 7 종 이상, 8 종 이상, 9 종 이상, 10 종 이상, 11 종 이상, 12 종 이상, 13 종 이상, 14 종 이상, 15 종 이상, 16 종 이상, 17 종 이상, 18 종 이상, 19종 이상 또는 20 종의 단일염기다형성 마커를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 단일염기다형성 마커는 각각의 개체에 대한 피부 보습 상태를 진단할 수 있는 마커로, 개체에 대한 정확한 피부 타입에 대한 정보를 줄 수 있으며, 이를 통해 화장품 소비자의 피부 특성을 과학적으로 분류하여 피부 특성별 맞춤형 화장품 개발에 이용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0070] 실시예 1: 피부 보습 정도에 따른 분류 및 유전자 채취

[0072] 본 발명자들은 유전자 타입별로 피부 보습 정도를 판단하기 위한 기준을 확립하고 개인 맞춤형 유효성분을 개발하기 위하여 300 여명의 30~50 세의 건강한 여성 피시험자를 대상으로 하여 실험을 수행하였다 (표 1).

표 1

피시험자의 임상 특성

표본 수	300
연령 (평균 ± SD)	40.54 ± 4.34
여성 (%)	100%
흡연 이력 (%)	1%
피부암 이력 (%)	0%

[0076] 이때, ① 임신, 수유 중 또는 6 개월 이내에 임신을 계획하고 있는 경우, ② 피부질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부외형제를 1 개월 이상 사용한 경우, ③ 동일한 시험에 참가한 뒤 6 개월이 경과되지 않는 경우, ④ 민감성, 과민성 피부를 가진 경우, ⑤ 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 경우, ⑥ 시험시작 3 개월 이내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 경우, ⑦ 시험부위에 시술(피부 박피술, 보톡스, 기타 피부관리)을 받거나 6 개월 이내 계획한 경우, ⑧ 만성 소모성 질환이 있는 경우 (천식, 당뇨, 고혈압 등), ⑨ 아토피 피부염을 가지는 경우, 및 ⑩ 그 외 주 시험자의 판단으로 시험이 곤란하다고 판단되는 경우는 피시험자에서 제외하였다.

[0078] 그 다음, 피시험자의 보습 정도를 수분량 측정기기인 Corneometer CM825 (C+K, Germany)를 이용하여 측정한 수분량을 기준으로 분류하였고, CM value 34이하는 수분이 적은 피부, CM value 78 이상은 수분이 많은 보습 피부로, 양극단의 최고 값을 가지는 13 명을 대조군 (control), 최저 값을 가지는 13 명을 실험군 (case)으로 선별하였다 (표 2).

표 2

		보습 높음 (대조군)	보습 낮음 (실험군)	p-value
표본 수		13	13	
연령, 평균 ± SD		40.1±4.1	40.4±4.9	0.863
임상 점수	주름	4.31±1.38	4.23±1.36	0.887
	색소침착	2.85±1.28	2.69±1.18	0.762^
피부 수화 (a.u.)		78.14±2.50	34.10±3.85	<0.001^

밝은 부위의 피부색	밝기 (L^*)	64.59±2.55	61.90±2.53	0.012
	붉은 정도 (a^*)	8.02±1.92	9.19±1.52	0.169 [^]
	노란 정도 (b^*)	18.25±1.15	16.62±1.98	0.017
	ITA °	38.41±4.90	35.30±4.78	0.115
어두운 부위의 피부색	밝기 (L^*)	59.82±2.35	56.86±3.03	0.010
	붉은 정도 (a^*)	10.47±1.76	11.88±1.64	0.045
	노란 정도 (b^*)	18.95±1.57	17.44±2.45	0.077
	ITA °	27.37±6.64	20.92±8.49	0.041

[0081] p -value : 개별 t-테스트에 의한 유의성 ($p < 0.05$), [^] : Mann-Whitney 테스트.

[0083] 피시험자의 주름 정도는 화장품 평가법 (KFDA 기준)의 육안 평가 기준 (visual assessment)에 근거하여, 사진 촬영 (facial stage DM3, Minolta, Japan) 후 전문가에 의한 육안 판정을 통하여, 육안평가 주름 등급을 최고 값 (7점)과 최저값 (2점)을 기준으로 하여 분류하였다. 주름이 많은 피부와 주름이 적은 피부의 등급은 재반복하여 측정하고 그 평균값을 계산하였다.

[0084] ITA 값은 피부의 흰 정도를 반영하는 것으로, 피부 밝기를 의미하는 L^* 값과 멜라닌 정도를 나타내는 b^* 값 (melanization parameter)을 이용하여 계산할 수 있다. ITA ° 값 계산식은 하기와 같다. 특히, ITA ° 값은 클수록 피부의 색상이 밝은 것이다 ($ITA^{\circ} = [\text{Arc tan}(L^* - 50)/b^*] \times 180/\pi$), L^* : 명도인자; 밝기, b^* : 색채 인자; 파랑-노랑). 상기 피부색 (L^* , a^* , b^*)은 Minolta 분광광도계 (CM2600d, Minolta, Japan)를 사용하여 측정 하였다. 밝은 부위의 피부와 어두운 부위의 피부를 재반복하여 측정하고 그 평균값을 계산하였다. 피부 측정 데이터는 독립 t-테스트 ($p < 0.05$)와 SPSS 소프트웨어 (Ver 22.0)를 이용한 Mann-Whitney 테스트로 통계처리 하였다.

[0086] 실시예 2. 타액으로 부터의 DNA 채취

[0088] 상기 실시예 1을 통해 분류가 완료된 26 명의 타액을 채취하였다. 타액 채취는 두 번에 걸쳐 이루어졌으며, 1 차 타액은 피시험자로 하여금 채취 1 시간 전에 금식하도록 한 후 채취하였고, 2 차 타액은 아침 기상 직후 피시험자가 채취한 타액을 수득하였다.

[0089] Oragene® saliva 키트를 이용하여 피시험자의 타액으로부터 고순도의 게놈 DNA (gDNA)를 추출하였다. 그 다음, 1 x TAE 1 % 아가로스 겔에서 OD 260/280 > 1.7, 10 ng/ μ l 이상의 온전한 (intact) gDNA 밴드를 확인한 후 유전자 분석 실험을 진행하였다.

[0091] 실시예 3. 전체 게놈 시퀀싱 (whole genome sequencing)

[0093] 상기 실시예 2에서 분리한 50 ng의 gDNA를 Ion AmpliSeq Exome 키트 (LifeTechnologies)의 매뉴얼에 따라 타겟 증폭 (target amplification)에 사용하였다.

[0094] 그 다음, Ion AmpliSeq™ Library 키트 2.0 (Life Technologies) 프로토콜 (Part #4475345 Rev. B)에 따라 Ion Torrent adapter-ligated library를 제작하였다. 각각의 증폭물 (amplicons)을 partially digest primer sequences로 만들고 DNA 리가아제 (ligase)를 이용하여 Ion Torrent adapters P1과 A에 연결하였다.

[0095] 그 다음, AMPure 비드 (Beckman Coulter)를 이용하여 라이브러리를 분리하였다. Library Quantification 키트 (LifeTechnologies)와 Agilent High Sensitivity DNA 키트 (Agilent Technologies)를 이용하여 분리된 라이브

러리 각각의 양과 질을 평가하였다.

[0097] Ion PI Template OT2 200 키트 v2 및 OneTouch 2 instrument (Life Technologies)를 이용하여 에멀전 PCR (Emulsion PCR)을 실시하였다. Ion OneTouch ES enrichment system (Life Technologies)을 이용하여, Ion PI 칩에서의 주형-양성 ISP (template-positive Ion Sphere Particles)의 농축 (enrichment)을 실시하였다. 매뉴얼에 따라 Ion PI chip을 준비하고 로딩하였다. Ion Torrent platform-specific pipeline 소프트웨어 (Torrent Suite v4.0)를 사용하여 hg19 인간 게놈 레퍼런스 (reference)와의 서열을 정렬하고 target-region coverage 분석을 실시하였으며, poor signal reads를 필터하고 제거하였다.

[0099] **실시예 4. 생물정보학 분석 (Bioinformatics analysis) 및 통계 처리**

[0101] TMAP (Torrent Suite version:4.0.2)을 이용하여 인간 게놈 레퍼런스 (hg19)와의 서열 정렬을 실시하였다.

[0102] GATK (Genome Analysis Toolkit, version:2.3.9)을 이용하여, Base quality recalibration, indel realignment 및 variant calling을 실시하였다. 변이들은 SnpEff 프로그램 (<http://snpeff.sourceforge.net/>) (ref. snpeff)과 1000 Genomes Project and NCBI dbSNP의 데이터베이스를 사용하여 주석 (annotation)을 달았다. 또한, dbNSFP 데이터베이스 (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) (ref. dbNSFP)를 이용하여 whole-exome 부위의 모든 가능한 nsSNVs (non-synonymous single-nucleotide variants)를 분석하였다.

[0103] Short read를 필터하기 위해서 창 크기 30에서 평균 품질 점수 (quality scorer)가 9 미만인 경우, short read 서열의 말단의 1 염기쌍을 제거하였다. SNP 콜링 (calling) 후, 깊이 (depth) < 10을 가지는 이형 (heterozygous) SNPs와 깊이 < 5를 가지는 동형 (homozygous) SNPs를 필터하였다.

[0104] 또한, MAF (minor allele frequency) < 5 % 인 SNPs와 콜 레이트 (call rate) < 95 % 인 SNPs를 SNP 품질 조절 (quality control)을 위해 PLINK 프로그램 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>) (Ver 1.07) (ref. plink) 을 이용하여 필터 하였다. SNP 필터링 후, 로지스틱 회귀 (logistic regression)의 첨가 모델 (additive model, one degree of freedom)을 이용하여 필터링을 통과한 SNP와 피부 색과의 관계를 분석하였다.

[0106] 그 결과, 총 387개의 SNPs가 높은 유의성을 보였으며, 그 중에서 ZNF100, OR10K2, TMEM235, PRCP, TIPIN, CFH, PIDD, CFH, AMER3, NAALADL2, EXOC2, KHDC1, LMBR1, TELO2, RAB31 및 SNRPA 유전자에 존재하는 유의성 상위 20 개의 SNP를 표시하였다 (표 3). 상기 상위 20 개의 유전자의 플랭킹 시퀀스 (flanking sequence)를 표 4에 나타내었다.

표 3

상위 20 위 SNP

[0108]

Chr.	Position	Func.	Gene	rs Number	Alleles(A/B)	RA	RAF		OR	P
							Case	Control		
chr 19	21950337	5'UTR	ZNF100	rs10412066	C/G	C	0.46	0.12	40	0.002741
chr 1	158389659	down	OR10K2	rs58605957	C/T	C	0.38	0.08	18.33	0.004052
chr 1	158390252	syn	OR10K2	rs12239443	G/T	G	0.38	0.08	18.33	0.004052
chr 1	158390501	syn	OR10K2	rs34616883	A/G	A	0.38	0.08	18.33	0.004052
chr 17	76230729	syn	TMEM235	rs11077350	C/T	C	0.46	0.12	17.09	0.004652
chr 11	82560312	intron	PRCP	rs10792653	G/T	T	0.88	0.5	0.06282	0.005198

chr 15	66644563	intron	TIPIN	rs9806130	A/G	A	0.46	0.15	27	0.006101
chr 1	196682947	syn	CFH	rs2274700	A/G	A	0.58	0.15	22.48	0.007674
chr 11	804212	syn	PIDD	rs7104785	A/C	C	0.88	0.62	0.09	0.009694
chr 1	196642072	intron	CFH	rs551397	T/C	T	0.54	0.15	10.67	0.009868
chr 1	196642233	missense	CFH	rs800292	A/G	A	0.54	0.15	10.67	0.009868
chr 2	131520178	missense	AMER3	rs77687733	G/C	G	0.35	0.08	12.38	0.009929
chr 3	175164937	intron	NAALADL2	rs79180420	G/A	A	H	0.65	0.08081	0.009929
chr 6	619600	intron	EXOC2	rs1150856	C/A	C	0.35	0.08	12.38	0.009929
chr 6	73952103	intron	KHDC1	rs6453660	C/A	A	0.92	0.65	0.08081	0.009929
chr 6	73952118	intron	KHDC1	rs6453661	G/A	A	0.92	0.65	0.08081	0.009929
chr 7	156480633	intron	LMBR1	rs3757433	A/G	G	0.92	0.65	0.08081	0.009929
chr 16	1552570	intron	TELO2	rs58893598	A/G	G	0.92	0.65	0.08081	0.009929
chr 18	9775372	intron	RAB31	rs6506697	A/G	A	0.42	0.15	12.38	0.009929
chr 19	41263403	syn	SNRPA	rs2230694	G/A	A	0.92	0.65	0.08081	0.009929

[0109] 요약약어 : Chr., 염색체 (chromosome); Func, SNP 기능 (function); Frq, 빈도 (frequency); RA, 위험 대립유전자 (risk allele); OR, 오차 비율 (odds ratio).

[0110] 계놈 위치는 NCBI build 37을 참고.

[0111] 실험군-대조군 분석에서 p-value는 로지스틱 회귀를 이용하여 계산함.

[0112] Alleles(A/B)에서 A는 minor allele을, B는 major allele을 나타냄.

[0113] RA는 보습이 낮은 피부에서 주로 나타나는 염기임.

표 4

[0115]

Gene	rs Number	Alleles (A/B)		Flanking sequence
ZNF100	rs10412066	C/G	forward	CCCTAGGAGCAGAAGACACAGAGAA[C/G]TGAGAGCAAACCTGGAGCTCCGGCT (서열번호 1)
OR10K2	rs58605957	C/T	forward	TCAGGTGATCCACCTGTCTCAGCCT[C/T]CCAAAATGCTGGGATTACAGTCGTG (서열번호 2)
OR10K2	rs12239443	G/T	forward	GTCCATACACACCCCATGTCCCAT[G/T]AGCACTGAGTAGCGCAGTGGGTTAC (서열번호 3)
OR10K2	rs34616883	A/G	forward	AGTACATGGGATATGAAGGGCCCT[A/G]TCCAGGACAATGGTGGAAATGATGA (서열번호 4)
TMEM235	rs11077350	C/T	forward	CCCTGAGCCTGGTCTTCTCGTGTG[C/T]GGCTGGATCTGCGCCTGCTCAGCT (서열번호 5)
PRCP	rs10792653	G/T	forward	TCTAAAAAGTACTGGTCAACAGATG[G/T]CTTTACAGATCATTTATCTTCACA (서열번호 6)
TIPIN	rs9806130	A/T	forward	TCCTGACTCTGGTAAACAAACCAC[A/G]ATTCACTATTACTGTACTTAAATGA (서열번호 7)
CFH	rs2274700	A/T	forward	CATATCCTAGTTTGATGATATTT[A/G]GCTTTTCTTTTAAAGCATATGTAT (서열번호 8)

<i>PIDD</i>	rs7104785	A/C	reverse	TGCACCTGTGTGTCACGAGCCTCT[G/T]CAGCTGCTGCAGGTGGAATTCTTGC (서열번호 9)
<i>CFH</i>	rs551397	T/C	reverse	TAAAAACAAAATAAGTGCATAAAGT[A/G]TCTATTTAAATGTACAGTATATTTA (서열번호 10)
<i>CFH</i>	rs800292	A/G	reverse	TCTCCTTCTGCATACCATTTATTA[C/T]ATTCCAAGAGATCTATATCCAGGG (서열번호 11)
<i>AMER3</i>	rs7768773 3	G/C	forward	AAGACTGAGGACTTGGCCTCGCTGG[C/G]GGCCGAGGGGAAAAGCCTGCCTCC (서열번호 12)
<i>NAALADL2</i>	rs7918042 0	G/A	forward	TAAACTTACCAGTCATAATTTAAAT[A/G]CTTATTACAGATAACTTTTCCTTAA (서열번호 13)
<i>EXOC2</i>	rs1150856	C/A	reverse	TTATACTGGATACTTAGTGATACCT[G/T]TTCCATTTTTGTCATAATAACCATT (서열번호 14)
<i>KHDC1</i>	rs6453660	C/A	forward	AAAAGTGAAGAAGCAAGGATGAAGA[A/C]GGGGACGTGGGCAAAGGCCACTCAC (서열번호 15)
<i>KHDC1</i>	rs6453661	G/A	forward	AGGATGAAGAAGGGGACGTGGGCAA[A/G]GGCCACTCACGAAGATGAGCTCCT (서열번호 16)
<i>LMBR1</i>	rs3757433	A/G	reverse	ATTACATCTTCAGTATTTAGTTTC[C/T]CAAATTTGTAAAACCTTAGAGGTCA (서열번호 17)
<i>TELO2</i>	rs5889359 8	A/G	forward	GGCCTCTGCTGGGTGGGTGGCTCC[A/G]GCCCTGTGAGCCTCGGTGAGGCCTC (서열번호 18)
<i>RAB31</i>	rs6506697	A/G	forward	ACTATGGGTAAGTTCCTGTATGTC[A/G]TTCTCCTTCGCGTTGCTTCTTTCA (서열번호 19)
<i>SNRPA</i>	rs2230694	G/A	forward	TGCAGGGTTCCCTTTCTATGACAA[A/G]CCTATGGTGAGCATTGCCGGTACGG (서열번호 20)

[0117]

이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 다른 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

서열 목록

- <110> LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.
- <120> Single nucleotide polymorphism markers for determining of probability of skin hydration and use thereof
- <130> KPA151120-KR
- <160> 20
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 51
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> rs10412066
- <400> 1
- ccctaggagc agaagacaca gagaastgag agcaaacctg gagctccggct
- <210> 2
- <211> 51

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs58605957

<400> 2
 tcaggatgac cacctgtctc agcctyccaa aatgctggga ttacagtcgt g 51

<210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs12239443

<400> 3
 gtcccataca cacccatgt cccatgagca ctgagtagcg cagtgggtta c 51

<210> 4
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs34616883

<400> 4
 agtacatggg gatatgaagg gccctrtcca ggacaatggt ggaaatgatg a 51

<210> 5
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> rs11077350

<400> 5
 ccctgagcct ggccttctc gtgtgyggct ggatctgcgg cctgctcagc t 51

<210> 6
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs10792653

<400> 6
 tctaaaaagt actggtcaac agatgkcttt acagatcatt tattttcac a 51

<210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs9806130
 <400> 7
 tcctgactct ggTgaacaa accacratTC agtattactg tactTaaatg a 51

<210> 8
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs2274700
 <400> 8
 catatcctag ttTgcattga tattTrgctt tttcttttaa ggcatatgta t 51

<210> 9
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs7104785
 <400> 9
 tgcacctgtg tGtccagcag cctctkcagc tGctgcaggt ggaattcttg c 51

<210> 10
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs551397
 <400> 10
 taaaaacaaa ataagtGcat aaagTrrcta tTtaaTgta cagtatattt a 51

<210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rs800292

<400> 11
tctcccttcc tgcataccat tattayattt ccaagagatc tataatccagg g 51

<210> 12
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rs77687733
<400> 12
aagaactgagg acttggcctc gctggsggcc gaggggaaaa gcctgcctc c 51

<210> 13
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rs79180420
<400> 13
taaacttacc agtcataatt taaatrctta ttacagataa ctttcctta a 51

<210> 14
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rs1150856
<400> 14
ttatactgga tacttagtga tacctkttcc atttttgtca taataacat t 51

<210> 15
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rs6453660
<400> 15
aaaactgaga agacaaggat gaagamgggg acgtgggcaa aggccactca c 51

<210> 16
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> rs6453661
 <400> 16
 aggatgaaga aggggacgtg ggcaarggcc actcaccgaa gatgagctcc t 51

<210> 17
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> rs3757433
 <400> 17
 attacatctt cagctattta gtttcycaa tttgtaaac cttagagtc a 51

<210> 18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> rs58893598
 <400> 18
 ggctctgct ggggtgggtg gctcergccc tgtgagctc ggtgaggcct c 51

<210> 19
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> rs6506697
 <400> 19
 actattgggt aagttcctgt atgtrttct cttcgcgtt gcttccttc a 51

<210> 20
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> rs2230694
 <400> 20
 tgcagggttt cctttctat gacaarccta tggtagcat tgcgggtacg g 51