(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0133816
(43) 공개일자 2023년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/112 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0117488(분할)
(22) 출원일자 2023년09월05일
심사청구일자 2023년09월05일
(62) 원출원 특허 10-2020-0135216
원출원일자 2020년10월19일
심사청구일자 2020년10월19일
(30) 우선권주장
1020200121179 2020년09월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
남궁식
서울특별시 서초구 서초중앙로24길 33, 101동 302호 (서초동, 서초교대이편한세상)
한승규
서울특별시 서초구 서초중앙로 15, B동 1602호 (서초동, 현대슈퍼빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

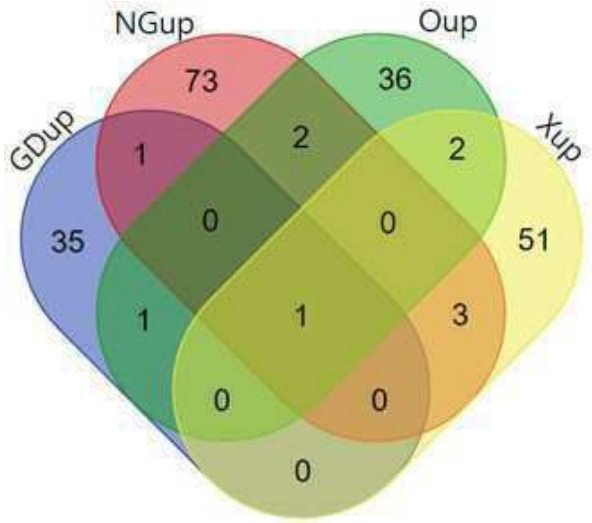
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **유전자의 특이적 메틸화를 이용하여 당뇨족부궤양 재발 또는 예후를 예측하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 *MORN1*, *NCOR2*, 및 *LINC00504*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 특이적 메틸화에 따른 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측 바이오마커 등에 관한 것이다. 본 발명은 당뇨족부궤양 재발 또는 예후의 특이적인 패턴을 확인하고, 유전자 데이터에 대한 기계학습을 통해 상기 패턴을 설명하는 주요 바이오마커를 발굴하며, 상기 혈액분석기반 임상적 바이오마커를 이용하여 당뇨족부궤양 재발 또는 예후를 예측할 수 있을 뿐 아니라 향후 당뇨족부궤양 예방 또는 치료 메커니즘 개발에 활용될 수 있으며, 생체 징후를 설명할 수 있는 인자를 발견함으로써 당뇨족부궤양 치료 또는 예후 예측을 가능하게 하여 질병 진행을 선제 조절할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자
김정안
경기도 군포시 공단로 356-54, 1동 2701호 (산본동, 금정삼성쉐르빌)
오현정
서울특별시 구로구 디지털로32다길 9, 504호 (구로동)
이현우
서울특별시 구로구 구로동로28길 33-26 (구로동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104823
과제번호 2019M3E5D1A01068996
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)(복지부, 과기정통부)
연구과제명 당뇨족부궤양 재발 및 예후진단키트 개발을 위한 바이오마커 발굴
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711097204
과제번호 2019M3E5D1A01068996
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)(복지부, 과기정통부)
연구과제명 당뇨족부궤양 재발 및 예후진단키트 개발을 위한 바이오마커 발굴
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2019.07.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345315996
과제번호 2018R1D1A1B07050442
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 인삼 [Panax ginseng] 추출물이 당뇨성 창상 치유에 미치는 영향
기 여 율 1/3
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

유전자의 CpG 부위를 포함하는, 당뇨족부궤양 재발 예측용 바이오마커 조성물로서,

상기 유전자는 *NCOR2* 인 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *NCOR2* 유전자의 CpG 부위는 서열번호 2 (assembly hg19 기준 12번 염색체의 124827121 내지124821421번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨족부궤양 재발 예측용 조성물로서,

상기 유전자는 *NCOR2*인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 메틸화 민감성 제한효소, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 5 내지 6으로 표시되는 프라이머로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

하기 단계를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 예측을 위한 정보제공방법.

(a) 임상 샘플에서 DNA를 분리하는 단계;

(b) 상기 분리된 DNA에서 *NCOR2* 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군의 동일 유전체 상 영역의 CpG 부위 메틸화 수준과 비교하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *NCOR2* 유전자의 CpG 부위가 과메틸화된 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 임상 샘플은 당뇨족부궤양 재발 의심 환자 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 정보제공방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 메틸화 수준의 측정은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR), 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트시퀀싱으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자의 특이적 메틸화에 따른 당뇨족부궤양 재발 예측을 위한 바이오마커 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨병은 전 세계 4억 명이 넘는 유병률을 보이며, 당뇨병이 발생하면 혈액의 점성이 높아져 점차 혈관이 좁아지거나 막히게 되며, 이 때 하지로 가는 혈관이 좁아지거나 막히면 발은 혈액을 충분히 공급받지 못하게 되어, 혈액을 통한 영양분이나 산소의 공급이 원활하지 않고, 노폐물의 이동과 배출이 어려워, 궤양이 발생하기 쉬운 환경이 조성된다. 따라서, 당뇨병 환자 중 약 15~25%는 일생 중 일정 지점에서 족부궤양이 발병되며, 당뇨병 자체가 상처 치유를 지연시키기 때문에 족부궤양이 한 번 발병하면 자가 회복이 더딘 편이다.

[0004] 한편, 당뇨병성 신경병증은 당뇨에 의한 신경 손상이 다리와 족부에서 감각을 감소시키는 상태이다. 압박이나 절단에 의해 아물지 않은 부분이 환자에 발병하는 경우에도 환자의 다리 및 족부의 감각 저하로 인해 궤양 발생 위험이 증가하며, 이후 치료하지 않고 방치하는 경우, 손상된 부분이 빠르게 확대되어 괴장한 조직 파괴를 초래하는 다중미생물에 감염되기 쉬운 족부궤양으로 발전하게 된다.

[0005] 당뇨족부궤양은 한 번 앓고 나면 재발하는 경우가 흔해, 1년 내에 약 30%의 환자가 재발을 경험하고, 당뇨족부궤양으로 수술을 받은 환자의 절반 이상이 수술 후 4년 이내에 반대쪽 발도 수술을 받게 된다. 외상으로 인한 경우를 제외하고, 다리 일부를 절단하게 되는 원인 중 절반 이상이 당뇨족부궤양이며, 이는 당뇨병 환자의 삶의 질을 저하시키는 매우 중요한 원인이다.

[0006] 당뇨족부궤양이 발생한 경우 5년 후 사망률은 약 43~55%이고, 궤양이 심해져 하지 절단을 한 경우에는 5년 내 사망률이 78%에 달한다고 알려져 있다.

[0007] 그러나, 당뇨족부궤양은 진단 코드 자체가 갖춰져 있지 않고, 당뇨병의 심각한 합병증 중 하나의 질환으로만 인식되었으며, 근본적인 당뇨족부궤양을 진단하는 시스템이 없고, 재발을 진단하기 위한 바이오마커의 존재가 전무한 상태이다. 해외에서도 난치성 질환으로서 당뇨족부궤양의 치료에 대한 연구가 주로 이루어질 뿐, 재발 바이오마커 탐색과 재발 방지시스템 구축에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0008] 기존 당뇨병 진단 바이오마커와 달리 당뇨족부궤양의 바이오마커는 혈관 신생 정도, 감염, 신경병증, 세포치유능과 같이 다양한 평가가 종합적으로 이루어져야 하므로 당뇨병 진단 바이오마커와 차이가 존재한다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 당뇨족부궤양 환자의 후성유전체 데이터를 기반으로 기계학습 기반을 이용하여 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 여부에 따라 특이적으로 과메틸화 또는 저메틸화되는 유전자들을 연구하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) US 7465704

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 유전자의 CpG 부위를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준(methylation level)을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커의 선별 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 유전자의 CpG 부위를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커를 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 유전자는 *MORN1*, *NCOR2*, 및 *LINC00504*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 *MORN1* 유전자의 CpG 부위는 인간 유전체 assembly hg19 기준 1번 염색체의 인트론 부분인 2274928 내지 2275044번째 염기서열(서열번호 1) 중에 나타나는 CpG 부위(cg01296877)를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 *NCOR2* 유전자의 CpG 부위는 인간 유전체 assembly hg19 기준 12번 염색체의 인트론 부분인 124827121 내지 124827421번째 염기서열(서열번호 2) 중에 나타나는 CpG 부위, 바람직하게는 12번 염색체의 124827315번째 나타나는 CpG 부위(cg23878260)를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 *LINC00504* 유전자의 CpG 부위는 인간 유전체 assembly hg19 기준 4번 염색체의 14868419번째 나타나는 CpG 부위(cg16033700)를 포함할 수 있다.

[0023] 하기 표 1은 bisulfite 처리 전 *MORN1* 유전자의 CpG 부위가 포함하는 서열번호 1(117 bp) 및 *NCOR2* 유전자의 CpG 부위가 포함하는 서열번호 2(301 bp)를 나타낸 것이다. 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하기 위해 bisulfite 처리 시, C가 T로 바뀌게 된다.

표 1

[0024]

서열번호 1	ATGCAGTGGAGGTGAGGAGAACCCTGAGGACAGCAGCCGCAGGGAGCCCCGGACCTTGGCCAGGCCCCCAGGCCCGAGTCTCAGTCCTCGAGGGGCCACTGCTGCTCAGCACAGCAC
서열번호 2	GGATTGGAAGACCCAACAGTGTAATCATGAGCTTAGGTTGGAGCAGAATTTCTCTTAGTAGTTTGCAGGACATGTGGGGTTAAACATTTCAGTGGTTTTCTTTTCCGGCAGGACTTATCAGTGCCTTTAGCAATGCAAAGGTATAGAATGAGGACTTGAGTATATGCATTTTTCAAATAGACATGATCTGAAAGTCTTTTTTAAAAGTTGCCGGGCACGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCGGATCACAAGGTCAGGAGATAGAGACCATCCTGGCT

[0025] 또한, 본 발명은 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 유전자는 *MORN1*, *NCOR2*, 및 *LINC00504*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 바이설파이트(bisulfite) 또는 메틸화 민감성 제한효소, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 3 내지 6으로 표시되는 프라이머로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

표 2

[0029]

서열번호 3	*MORN1* 정방향 프라이머	ATGTAGTGGAGGTGAGGAGAATTT
서열번호 4	*MORN1* 역방향 프라이머	ATACTATACTAAACAACAATAACCCCT
서열번호 5	*NCOR2* 정방향 프라이머	GGATTGGAAGATTTAATAGTGTAA
서열번호 6	*NCOR2* 역방향 프라이머	AACCAAAATAATCTCTATCTCCTAACCT

[0030] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0031] (a) 임상 샘플에서 DNA를 분리하는 단계;

[0032] (b) 상기 분리된 DNA에서 *MORN1*, *NCOR2*, 및 *LINC00504*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

[0033] (c) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군의 동일 유전체 영역 내 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계.

[0034] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *MORN1* 유전자 프로모터의 CpG 부위가 저메틸화된 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *MORN1* 유전자의 발현이 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군에 비해 저해되지 않는 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *NCOR2* 유전자 프로모터의 CpG 부위가 과메틸화된 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *NCOR2* 유전자의 발현이 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군에 비해 더 저해되는 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *LINC00504* 유전자 프로모터의 CpG 부위가 과메틸화된 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 비교하는 단계 이후에, 상기 *LINC00504* 유전자의 발현이 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군에 비해 더 저해되는 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험이 높을 것으로 예측하는 단계를 포

함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 임상 샘플은 당뇨족부궤양 재발 의심 환자 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 메틸화 수준의 측정은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR), 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트시퀀싱으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커의 선별 방법을 제공하는 것이다.

[0043] (a) 임상 샘플에서 DNA를 분리하는 단계;

[0044] (b) 상기 분리된 DNA로부터 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 획득하는 단계; 및

[0045] (c) 의사결정 나무(decision tree)를 이용하여 상기 메틸화 정보를 바탕으로 당뇨족부궤양 재발과 관련이 있는 유전자를 선별하는 단계.

발명의 효과

[0047] 본 발명은 *MORN1*, *NCOR2*, 및 *LINC00504*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 특이적 메틸화에 따른 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측 바이오마커 등에 관한 것이다. 본 발명은 당뇨족부궤양 재발 또는 예후의 특이적인 패턴을 확인하고, 유전자 데이터에 대한 기계학습을 통해 상기 패턴을 설명하는 주요 바이오마커를 발굴하며, 상기 혈액분석기반 임상적 바이오마커를 이용하여 당뇨족부궤양 재발 또는 예후를 예측할 수 있을 뿐 아니라 향후 당뇨족부궤양 예방 또는 치료 메커니즘 개발에 활용될 수 있으며, 생체 징후를 설명할 수 있는 인자를 발견함으로써 당뇨족부궤양 치료 또는 예후 예측을 가능하게 하여 질병 진행을 선제 조절할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 재발여부에 따라 과메틸화된 유전자와, 예후의 좋고 나쁨에 따라 과메틸화된 유전자를 벤다이어그램으로 나타낸 것이다.

도 2는 재발 조건에 따른 후성유전학적 인자의 각 조건을 의사결정나무로 나타낸 것이다. 이 때, 프로브는 *MORN1* 유전자이고, 주요 노드로서 cg01296877의 메틸화 수준이 0.394이하인 경우, 당뇨족부궤양 재발 위험이 높은 것으로 판단할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명자들은 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측에 대해 예의 연구한 결과, 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 여부에 따라 일부 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준이 달라짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0051] 보다 구체적으로 본 발명자들은 *MORN1* 유전자의 CpG 부위가 저메틸화된 경우, *NCOR2* 유전자의 CpG 부위가 과메틸화된 경우, 및 *LINC00504* 유전자의 CpG 부위가 과메틸화된 경우, 당뇨족부궤양의 재발 위험을 예측할 수 있다는 점을 알 수 있었다.

[0052] 이에, 본 발명은 유전자의 CpG 부위를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커, 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 조성물, 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법, 및 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측용 바이오마커의 선별 방법을 제공할 수 있다.

[0054] 본 발명에서 용어, "당뇨족부궤양 재발(recurrence)"은 기존의 당뇨족부궤양이 완전히 나아 완치(complete healing) 판정을 받은 후, 최소 6개월이 경과된 후, 같은 발의 동일 부위, 같은 발의 다른 부위, 또는 반대편

발의 특정 부위에 새롭게 궤양이 발생한 경우를 의미한다. 상기 "당뇨족부궤양의 완치"는 당뇨족부궤양의 창상 부위가 완전히 상피화되어, 열려 있는 부분이나 분비물(discharge)이 없어서 샤워가 가능한 상태를 의미한다.

[0055] 본 발명에서 용어, "메틸화" 또는 "메틸레이션"은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0056] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T에 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 반복 서열이 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.

[0057] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 유전자 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 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 또는 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.

[0058] 본 발명에서 용어, "유전자의 CpG 부위"는 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 유전자의 DNA는, 유전자가 발현하는데 필요하며 서로 작동가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함한다. 따라서, 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다. 바람직하게, TNFRSF19 유전자에서 질환 특이적 과메틸화가 일어나는 CpG 부위는 유전자의 프로모터에 존재할 수 있다.

[0059] 본 발명에서, 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 DNA 항체 (예를 들어, 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체) 등을 포함할 수 있다.

[0060] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 바이설파이트 변형된 DNA는 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(예를 들어, WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0061] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 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.

[0062] 개체의 유전자의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 일예로서, 환자의 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0063] 따라서, 본 발명의 제제는 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할

수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0064] 본 발명의 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.

[0065] 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.

[0066] 상기 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.

[0067] 또한, 메틸화된 CpG 결합 도메인(CpG binding domain: MBD) 또는 메틸화 DNA 항체를 이용하여 메틸화 수준을 측정하는 경우, 이들을 이용하여 메틸화된 DNA를 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.

[0068] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 상기 키트는 DNA 메틸화 마이크로어레이 형태로 구현될 수 있다.

[0069] 본 발명에 있어서, 용어 "프로브(probe)"는 본 발명에서 DNA 메틸화 분석을 위해 마이크로어레이 칩(microarray chip)을 이용하여 실험하는 경우, 상기 칩에 존재하는 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로서, 검체(혈액 샘플)에서 얻은 DNA와 상보적으로 결합하게 되면 빛을 발현시킴으로써 환자의 DNA와 결합하는 칩의 유전자를 의미한다.

[0070] 보다 구체적으로 환자의 DNA와 부분적으로 또는 완전히 상보적인 핵산 가닥으로서, 환자의 DNA와 염기 특이적인 방식으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 환자의 DNA에 완전 상보적인 올리고뉴클레오티드이다. 상기 프로브는 핵산뿐만 아니라, 펩티드 핵산을 포함한 상보적 결합을 할 수 있는 종래 알려진 임의의 핵산 유도체가 포함된다.

[0071] 본 발명에 있어서, 용어 "의사결정 나무(decision tree)는, 데이터 마이닝(data mining)의 분석 기법 중 하나로 나무의 구조에 근거하여 의사결정 규칙을 찾아내는 방법이다. 의사결정 나무는 의사 결정 규칙을 도표화하여 관심의 대상이 되는 집단을 몇 개의 소집단으로 분류하거나 예측하는 강력하고 널리 쓰이는 분석 기법이다. 의사결정 나무의 일반적인 알고리즘에는 정지규칙 및 가지치기 등에서 서로 다른 형성 과정을 가지고 있다. 의사결정 나무에서 사용되는 규칙은 다음과 같다.

[0072] 1. 분리기준: 어떤 예측 변수를 이용하여 어떻게 분리하는 것이 목표 변수의 분포를 가장 잘 구별해 주는지 파악하여 자식마디가 결정되는데, 목표 변수의 분포를 구별하는 정도를 순수도 또는 다른 분류 기준을 이용하여 측정하는 것이다.

[0073] 2. 정지기준: 더 이상 분리가 일어나지 않고 현재의 마디가 끝 마디(terminal node)가 되도록 지정하는 규칙을 의미한다.

[0074] 3. 가지치기: 지나치게 많은 마디를 가지는 의사결정 나무는 새로운 자료에 적용될 때 예측 오차가 매우 클 가능성이 있다. 다라서 형성된 의사결정 나무에서 적절하지 않은 마디를 제거하여 적당한 크기의 부(sub) 나무

구조를 가지는 의사결정 나무를 최종적인 모형으로 선택하는 것이 바람직하다.

[0075] 본 발명에 있어서, 용어 "노드(node)"는 상기 의사결정 나무에서의 질문 또는 정답을 제시하는 분류 기준을 의미한다. 최초 분류 기준, 즉 첫 번째 질문을 뿌리 노드(root node)라 하며, 마지막 분류 기준을 끝 노드(terminal node)라고 하여 최종적인 분류 결과를 제시한다.

[0077] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0079] **실시예 1. 연구 대상**

[0080] 고려대학교 구로병원에서 당뇨족부궤양으로 입원한 환자 18명(당뇨족부궤양이 재발하지 않은 최초 입원 환자 중 예후가 좋은 6명, 예후에 변동이 심한 3명, 예후가 나쁜 2명, 당뇨족부궤양이 재발한 환자 중 예후가 좋은 6명, 예후에 변동이 심한 1명) 및 당뇨족부궤양 병리 소견이 없는 환자 1명, 당뇨 손 궤양 환자 1명을 연구 대상으로 선정하였다. 상기 환자들을 당뇨족부궤양 재발 여부, 치료 후 예후 상태, 나이, 성별, 백혈구 수치(White Blood cell count, WBC), 혈색소 농도(Hemoglobin, Hb), C-반응성 단백 수치(C-reactive protein, CRP) 등으로 분류하였다. 또한, 상기 환자들을 당뇨족부궤양 재발군 7명과 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군 13명으로 분류하였다. 상기 환자들로부터 치료 과정에서 2회 내지 4회의 혈액을 수집하여 총 48개의 검체를 수득하였다.

[0082] **실시예 2. DNA 메틸화 분석**

[0083] 상기 환자들의 혈액으로부터 얻은 백혈구로부터 DNeasy Blood & Tissue 키트를 이용하여 제조사인 QIAGEN에서 제공하는 프로토콜로 수행하여 genomic DNA(gDNA)를 수득하였다. 추출된 gDNA는 NanoDrop을 이용하여 정량하였고, gel loading을 통하여 integrity를 확인하였다. QIAGEN사의 EpiTect® Fast DNA Bisulfite 키트를 이용하여 DNA에 bisulfite를 처리하였다.

[0085] 상기 추출 및 bisulfite 처리된 DNA 샘플을 EPIC 850k 메틸화 칩(methylation chip)을 사용하여 862,873개의 CpG 부위에 대하여 메틸화 수준을 측정하였다. 구체적으로 NGS 또는 마이크로어레이 칩(microarray chip)을 이용하여 유전자별 메틸화 수준을 측정하였다. 이 때, 메틸화 수준은 0 ~ 1 값을 갖는 β 값으로 표시되며, β 값이 0인 경우 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화된 것을 의미하고, 1인 경우 완전히 메틸화된 것을 의미한다.

[0087] 상기 측정한 DNA 메틸화 수준을 파이썬(python) 또는 R에서 사용되는 데이터프레임(dataframe) 형태로 바꾸고, 결측치를 제거하고, 환자 정보와 환자의 임상 정보를 연결시키는 전처리 작업을 수행하였다. 이후, 당뇨족부궤양이 재발한 환자 군에서 차별적으로 메틸화되어 있는 유전자 및 치료 후 예후가 좋은 환자군에서 차별적으로 메틸화되어 있는 유전자를 확인하기 위하여 T-test를 통해 통계적으로 유의미한 결과를 도출하였다.

[0088] 보다 구체적으로, 당뇨족부궤양이 재발한 환자군과 재발하지 않은 환자군의 메틸화 수준(β 값)의 평균을 각각 구하고, 상기 평균값의 차이가 0.15 이상 또는 -0.15 이하인 CpG 부위를 가지는 유전자를 선별하였다. 상기 유전자 중 T-test 방법을 사용하여 p-value < 0.0005 이하인 유전자를 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 예측 바이오마커로 선정하였다. 이 때, 상기 메틸화 수준의 차이가 0.15 이상인 경우 유전자가 과메틸화(hypermethylation), 차이가 -0.15 이하인 경우 유전자가 저메틸화(hypomethylation)되었다고 정의하였다. 치료 후 예후가 좋은 환자군의 경우, 치료 후 예후가 나쁜 환자군을 대조군으로 하여 상술한 방법과 같이 바이오마커를 선정하였다.

[0090] **실시예 3. 당뇨족부궤양 재발 환자군에서 특이적 DNA 메틸화 변화 확인**

[0091] 재발과 예후 여부와 관련되어 특이적인 DNA 메틸화 변화를 보이는 프로브를 선별하고, 재발 또는 예후와 관련지어 벤다이어그램(venn-diagram), 의사결정 나무(decision tree)를 통해 시각화하였다.

[0093] 보다 구체적으로, 당뇨족부궤양 재발 또는 예후 여부에 따라 과메틸화 또는 저메틸화된 프로브를 선정하였다(이때, 재발한 경우 O, 재발하지 않은 경우 X, 예후가 좋은 경우 GD, 예후가 나쁜 경우 NG로 나타내었으며, 각 경우에 있어서 과메틸화된 유전자는 up으로 표시하였다.)

[0094] 재발 또는 예후 여부와 관련되어 특이적인 DNA 메틸화 패턴을 보이는 프로브는 총 416개였으며, 재발에 관련된 프로브가 200개, 예후에 관련된 프로브가 225개이며, 재발 및 예후에 모두 관련된 프로브는 9개였다.

[0096] 먼저, 재발 여부에 따라 과메틸화 및 저메틸화된 유전자와, 예후의 좋고 나쁨에 따라 과메틸화 및 저메틸화된 유전자를 벤다이어그램으로 나타내었다(도 1). 예후가 좋지 않은 샘플 및 재발된 샘플에서 공통적으로 과메틸화된 유전자로서 *NCOR2*와 *LINC00504* 유전자를 발굴하였다. 상기 두 유전자의 DNA 메틸화 변화를 분석한 결과는 다음과 같다.

표 3

[0097]

유전자	Target ID	메틸화 수준(β 값)의 차이	메틸화 상태	p-value
NCOR2	cg23878260	0.250000	과메틸화	0.0000416
LINC00504	Cg16033700	0.151801	과메틸화	0.000308

[0098] 재발 조건에 따른 후성유전학적 인자의 각 조건을 의사결정나무로 제시하였다(도 2). *MORN1* 유전자에 존재하는 cg01296877를 주요 노드로 하여, cg01296877의 메틸화 수준이 0.394보다 낮은 경우 재발로 분류하였다. 보다 구체적으로 18개의 당뇨족부궤양 재발군의 검체 중 15개의 검체에서 cg01296877의 메틸화 수준이 0.394보다 낮게 나타났다. 나머지 3개의 검체 및 30개의 재발하지 않은 군의 검체는 상기 메틸화 수준이 0.394보다 높게 나타났다. 즉, 상기 cg01296877의 메틸화 수준이 0.394보다 낮은 경우 당뇨족부궤양 재발 위험이 높은 것으로 분류되는 경향이 강하게 나타났다. 상기 유전자의 DNA 메틸화 변화를 분석한 결과는 다음과 같다.

표 4

[0099]

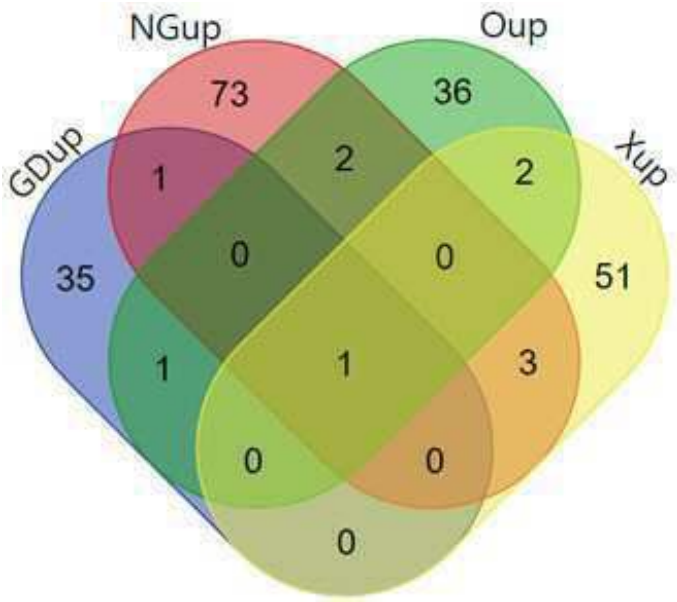
유전자	Target ID	메틸화 수준(β 값)의 차이	메틸화 상태	p-value
MORN1	cg01296877	-0.384	저메틸화	0.00000000424

[0100] 상기 결과에 따라, *MORN1* 유전자가 저메틸화된 경우, *NCOR2* 유전자가 과메틸화된 경우, 또는 non-coding 유전자로서 *LINC00504* 유전자가 과메틸화된 경우, 당뇨족부궤양 재발 위험이 높은 것을 확인하였다. 이는 상기 *NCOR2*, *LINC00504*, 및 *MORN1* 유전자가 당뇨족부궤양 재발하지 않은 대조군 대비 당뇨족부궤양 재발 환자군을 정확하게 판단하는 바이오마커로서 유효하다는 것을 나타낸다.

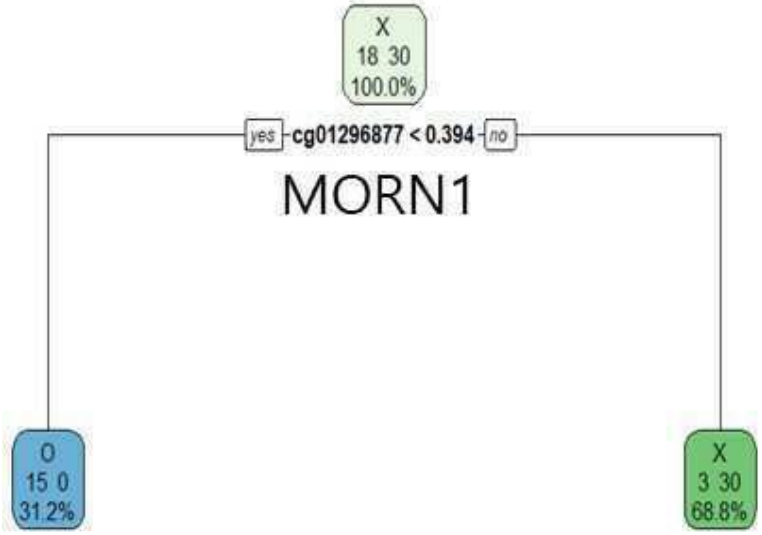
[0102] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Buisness Foundation

<120> Method of predicting Diabetic Foot Ulcer Recurrence or Prognostics using Specific Methylation of gene

<130> DP-2020-0585, DHP20-K111

<150> KR 10/2020/0121179

<151> 2020-09-21

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 117

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcagtgga ggtgaggaga accctgagga cagcagccgc agggagcccc ggaccttggc 60

caggccccca ggcccgagtc tcagtcctcg aggggccact gctgctcagc acagcac 117

<210> 2

<211> 301

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggattggaag acccaacagt gtaatcatga gcttaggttg gagcagaatt tctcttagta 60

gtttgcagga catgtggggt taaacatttc agtggttttc ttttccggca ggacttatca 120

gtgcctttag caatgcaaag gtatagaatg aggacttgag tatatgcatt tttcaaatag 180

acatgatctg aaagtctttt ttaaaagttg ccgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc 240

agcactttgg gaggccgagg caggcggatc acaaggtcag gagatagaga ccatcctggc 300

t 301

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MORN1 forward primer

<400> 3

atgtagtgga ggtgaggaga attt 24

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MORN1 reverse primer

<400> 4

atactatact aaacaacaat aacccct 27

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCOR2 forward primer

<400> 5

ggattggaag atttaatagt gtaa 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCOR2 reverse primer

<400> 6

atgtagtgga ggtgaggaga attt 24