

명세서

발명의 명칭: 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대한 유전자 마커

기술분야

- [1] 본 출원은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 연관 질환의 진단 및 치료에 유용하게 사용될 수 있는 유전자 마커에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 1983년 호주의 미생물학자인 마샬(Marshall)과 와렌(Warren)은 최초로 B 형 위염 환자의 위점막 생검 조직에서 만곡성 세균을 발견하고, 상기 세균을 배양하여 캄필로박터 종(*Campylobacter* genus)과 연관된 새로운 종의 세균임을 규명한 이래, 헬리코박터 파일로리와 위염 및 소화성 궤양 등의 상부위장관 질환 간의 연관성에 대한 활발한 연구가 이루어져 왔다. 헬리코박터 파일로리는 그람 음성의 간균으로서 얇은 막으로 둘러싸인 편모가 있으며, 다량의 유레아제(urease)를 방출하고, 대변-구강 경로를 통해 전파되는 것으로 알려져 있으며, 1994년에는 세계보건기구(WHO)가 확실한 발암 인자라고 밝혀 세계적으로 주목을 받고 있는 병원균이다.
- [3] 현재 헬리코박터 파일로리에 의한 질병의 발병 기전은 음식물과 함께 위 내강에 들어온 세균이 강한 운동성을 가진 편모를 이용하여 위 점액층을 뚫고 들어가서 위 점액층 내 위 상피세포층 상부와 세포 간 접합부에 서식하면서 다량의 유레아제를 분비해 점액층을 알칼리성으로 변화시킴으로써 가스트린에 의한 위산 분비 축진을 비정상적으로 과다하게 유도하고, 결국 염증 및 궤양을 초래하는 것으로 알려져 있다. 또한, 헬리코박터 파일로리가 위 선암(gastric adenocarcinoma) 발병의 중요한 위험 요소임을 규명한 최근의 연구 보도에 따라 국제보건기구에서는 헬리코박터 파일로리를 제1군 발암 물질로 지정하였다.
- [4] 특히, 헬리코박터 파일로리에 의한 감염은 한국을 비롯한 개발도상국에서 많이 발생하는 것으로 보고되어 있으며, 상부위장관 증상이 없는 사람 5,732명을 대상으로 시행한 전국 역학조사 결과에 따르면, 헬리코박터 파일로리 감염률은 전 국민에서 46.6%였고, 16세 이상의 성인에서 69.4%, 특히 40대에서 78.5%라는 높은 감염률을 보이는 것으로 확인되었다. 또한, 소화성 궤양 환자 1,031명을 대상으로 헬리코박터 파일로리 감염률을 조사한 결과, 위궤양 환자의 66% 및 십이지장궤양 환자의 79%가 헬리코박터 파일로리에 감염된 것으로 확인되었고, 위 및 십이지장 동반 궤양 환자의 71%가 헬리코박터 파일로리에 감염된 것으로 보고되었다.
- [5] 다수의 질병 상태는 유전자 DNA의 카피(copy) 수의 변화 또는 특정 유전자의 전사 수준의 변화에 의한 (예를 들어, 개시 제어, RNA 전구체의 제공, RNA 프로세싱 등에 의한) 다양한 유전자의 발현 수준의 차이를 특징으로 한다. 예를 들어, 유전 물질의 손실 및 획득은 악성 전환(malignant transformation) 및 진행에

있어서 중요한 역할을 한다. 이러한 획득 및 손실은 적어도 2 종류의 유전자, 즉, 종양 유전자 및 종양 억제 유전자에 의해 "구동되는(driven)" 것으로 생각된다. 종양 유전자는 종양발생의 양성 조절인자이고, 종양 억제 유전자는 종양발생의 음성 조절인자이다. 따라서, 특정 유전자 (예를 들어, 종양 유전자 또는 종양 억제 유전자)의 발현 (전사) 수준의 변화는 다양한 질환, 예컨대 암의 존재 및 진행에 대한 길잡이 역할을 한다.

- [6] 헬리코박터 파일로리의 감염은 상기 유전자 발현 패턴의 일부 또는 전부를 반전시킨다. 따라서, 이러한 유전자의 일부 또는 전부의 발현 패턴의 변화는 치료제의 효능을 모니터하거나 예측하는 방법으로 사용될 수 있다. 유전자 발현 변화의 분석은 관심있는 표적 조직 (예를 들어, 종양) 또는 몇몇 대용적 세포 집단 (예를 들어, 말초혈 백혈구)에서 수행될 수 있다. 후자의 경우, 유전자 발현 변화와 효능 (예를 들어, 종양 수축 또는 무성장(non-growth))의 상관관계는 효능에 대한 마커로서 사용하려는 유전자 발현 패턴의 변화에 대해 특히 강력해야 한다. 종래 헬리코박터 파일로리 감염을 검출할 수 있는 다수의 진단용 제제가 본 기술분야에 공지되어 있다(특허문헌 1 및 특허문헌 2).

- [7] 그러나, 현재까지 헬리코박터 파일로리의 감염으로 인해 그 발현 패턴이 변화될 수 있는 특정 유전자군에 대한 정보와, 이러한 정보를 이용하여 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 발생, 진행 및 예후를 진단 또는 예측하는 방법에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

- [8] 선행기술문헌

- [9] 특허문헌

- [10] (특허문헌 1) 한국 공개특허공보 제2003-0001506호

- [11] (특허문헌 2) 한국 공개특허공보 제2000-0033013호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 출원은 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 이용하여 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 갖는 환자의 진단, 예후 예측 및 치료 전략 결정에 도움을 줄 수 있는 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

- [13] 또한, 본 출원은 포유동물 조직 또는 세포 샘플에서 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 그 발현이 특이적으로 변화하는 유전자군을 확인 및 분석하는 방법을 제공하고, 상기 유전자군을 바이오마커로 하여 포유동물 개체에서 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 진단 및 치료 효과를 예측하는 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 출원의 일 측면은 헬리코박터 파일로리의

감염에 의해 발현이 증감되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물 및 키트를 제공한다.

- [15] 본 출원의 다른 측면은 헬리코박터 파일로리가 감염된 환자의 생물학적 시료로부터 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증감되는 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질이 존재하는 양을 측정하여 정상인 개체의 시료로부터 측정한 양과 비교하는 단계를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단 또는 예후 예측 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 출원은 헬리코박터 파일로리의 감염과 관련하여 그 발현이 특이적으로 증가하는 또는 감소하는 유전자군을 확인하였으며, 헬리코박터 파일로리의 감염이 회복되는 경우 상기 유전자군의 발현이 정상 상태로 회복됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 키트는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단이나 예후 예측에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [17] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 본 기술분야의 통상의 기술자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 헬리코박터 파일로리의 감염에 따라 그 발현이 특이적으로 증가하는 유전자의 종류를 보여주는 그래프이다.
- [19] 도 2는 헬리코박터 파일로리가 감염되어 특정 유전자들의 발현이 증가된 세포주에 본 출원의 김치 추출물을 처리함으로써 그 발현이 정상 상태로 회복되는 유전자들의 목록을 보여주는 히트맵(Heatmap) 및 전기영동 사진이다.
- [20] 도 3은 헬리코박터 파일로리의 감염에 따라 그 발현이 특이적으로 감소하는 유전자의 종류를 보여주는 그래프이다.
- [21] 도 4는 헬리코박터 파일로리가 감염되어 특정 유전자들의 발현이 감소된 세포주에 본 출원의 김치 추출물을 처리함으로써 그 발현이 정상 상태로 회복되는 유전자들의 목록을 보여주는 히트맵 및 전기영동 사진이다.
- [22] 도 5는 동물 모델에서 헬리코박터 파일로리의 감염으로 인해 증가된 ER 스트레스 유전자의 발현이 본 출원의 김치 추출물을 처리함으로써 정상 상태로 회복됨을 보여주는 그래프이다.
- [23] 도 6은 동물 모델에서 헬리코박터 파일로리의 감염으로 인해 감소된 항산화 관련 유전자의 발현이 본 출원의 김치 추출물을 처리함으로써 정상 상태로 회복됨을 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 이하, 본 출원을 내용을 구체적으로 설명한다.
- [25] 본 명세서에 있어서, 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해

통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[26] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[27] **1. 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물 및 키트**

[28] 본 출원은 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 키트를 제공한다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가되는 유전자는 FGF21(fibroblast growth factor 21. Gene ID: 26291), CTH(cystathionine g-lyase. Gene ID: 1491), CREBRF(cAMP responsive element binding protein. Gene ID: 153222), DLL4(delta-like 4. Gene ID: 54567), FGF18(fibroblast growth factor 18. Gene ID: 8817), FOS(Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit. Gene ID: 2353), PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1, Gene ID: 5170), PTPRN(receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N, Gene ID: 5798), CLIC4(chloride intracellular channel 4. Gene ID: 25932), PTPRB(protein tyrosine phosphatase, receptor type B. Gene ID: 5787), PPP1R15A(protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A. Gene ID: 23645), PTPRH(protein tyrosine phosphatase, receptor type H. Gene ID: 5794), DDIT3(DNA damage inducible transcript 3. Gene ID: 1649), BIRC3(baculoviral IAP repeat containing 3. Gene ID: 330), FOXO3(forkhead box O3. Gene ID: 2309), BCL2(BCL2, apoptosis regulator. Gene ID: 596), PRKCE(protein kinase C epsilon. Gene ID: 5581), CHMP4C(charged multivesicular body protein 4C. Gene ID: 92421), CLDN14(claudin 14. Gene ID: 23562), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11. Gene ID: 23657), BOC(BOC cell adhesion associated, oncogene regulated. Gene ID: 91653), AJUBA(ajuba LIM protein. Gene ID: 84962), LMO7(LIM domain 7. Gene ID: 4008), MMP24(matrix metalloproteinase 24. Gene ID: 10893), C3orf58(divergent protein kinase domain 2A. Gene ID: 205428), KLF10(Kruppel like factor 10. Gene ID: 7071), CSGALNACT1(chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1. Gene ID: 55790), CEP120(centrosomal protein 120. Gene ID: 153241), CHAC1(ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1. Gene ID: 79094), ASNS(asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing). Gene ID: 440), NFE2L2(nuclear factor, erythroid 2 like 2. Gene ID: 4780), RIOK3(RIO kinase 3. Gene ID: 8780), TXNIP(thioredoxin interacting protein. Gene ID: 10628), MTR(5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase. Gene ID: 4548), IFRD1(interferon related developmental regulator 1. Gene ID: 3475), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 유전자의 발현의 증가 여부를 확인함으로써 헬리코박터 파일로리의 감염

여부를 진단할 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가되는 유전자는 FGF21, CTH, CREBRF, PTPRN 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [29] 본 출원의 다른 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 감소되는 유전자는 ADGRA2(adhesion G protein-coupled receptor A2. Gene ID: 25960), TBX4(T-box 4. Gene ID: 9496), OVOL2(ovo like zinc finger 2. Gene ID: 58495), ACVRL1(activin A receptor like type 1. Gene ID: 94), ALB(albumin. Gene ID: 213), JADE1(jade family PHD finger 1. Gene ID: 79960), MLLT11(MLLT11, transcription factor 7 cofactor. Gene ID: 10962), ADORA1(adenosine A1 receptor. Gene ID: 134), TNFRSF8(TNF receptor superfamily member 8. Gene ID: 943), NLRP12(NLR family pyrin domain containing 12. Gene ID: 91662), CASP14(caspase 14. Gene ID: 23581), LTA(lymphotoxin alpha. Gene ID: 4049), SMAGP(small cell adhesion glycoprotein. Gene ID: 57228), NEO1(neogenin precursor1. Gene ID: 4756), MTSS1(MTSS1, I-BAR domain containing. Gene ID: 9788), TSPAN32(tetraspanin 32. Gene ID: 10077), CLDN8(claudin 8. Gene ID: 9073), MYBPH(myosin binding protein H. Gene ID: 4608), SGCE(sarcoglycan epsilon. Gene ID: 8910), CDH15(cadherin 15. Gene ID: 1013), ARHGAP6(Rho GTPase activating protein 6. Gene ID: 395), ZFP36L2(ZFP36 ring finger protein like 2. Gene ID: 678), EHF(ETS homologous factor. Gene ID: 26298), SLAMF6(SLAM family member 6. Gene ID: 114836), HLA-DPB1(major histocompatibility complex, class II, DP beta 1. Gene ID: 3115), SSC5D(scavenger receptor cysteine rich family member with 5 domains. Gene ID: 284297), CCR4(C-C motif chemokine receptor 4. Gene ID: 1233), CCR7(C-C motif chemokine receptor 7. Gene ID: 1236), KLRG1(killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1. Gene ID: 10219), BLNK(B cell linker. Gene ID: 29760), IGFBP1(insulin-like growth factor-binding protein 1. Gene ID: 3484), GIF(MIF, macrophage migration inhibitory factor. Gene ID: 4282), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 유전자의 발현의 감소 여부를 확인함으로써 헬리코박터 파일로리의 감염 여부를 진단할 수 있다.
- [30] 본 출원에 있어서, 상기에서 예시된 것과 같은 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 염기서열 및 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 아미노산 서열은 NCBI의 GenBank 등의 공개된 데이터베이스나 문헌으로부터 본 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 입수할 수 있다. 구체적으로 본 출원의 Gene ID는 NCBI(The National Center for Biotechnology Information)의 UID(Unique identifiers)로 NCBI의 유전자 검색(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)을 통해 확인할 수 있다.
- [31] 본 출원의 한 구현예에서, 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가

또는 감소되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 mRNA가 존재하는 양 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질이 존재하는 양을 측정하는 제제일 수 있다. 상기 유전자의 mRNA가 존재하는 양을 측정하는 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 양을 증폭시킬 수 있는 제제를 의미한다. 구체적인 예로, 상기 mRNA 또는 mRNA를 역전사시켜 만든 cDNA의 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍이나 프로브일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [32] 본 출원에 있어서, 상기 "프라이머"는 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)을 갖는 짧은 길이의 핵산 서열로 상보적인 주형 가닥(template strand)과 염기쌍을 형성함으로써 핵산 중합효소가 주형 가닥을 복제하여 증폭할 때의 시작 지점을 제공하는 역할을 하는 핵산 서열을 나타낸다. 그리고, 상기 "프로브"는 mRNA 또는 cDNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 서열로 이루어진 수 염기 내지 수백 염기의 길이를 갖는 핵산 절편을 나타낸다.
- [33] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 유전자의 mRNA가 존재하는 양은 상기 유전자 서열의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR) 등의 방법을 수행함으로써 측정할 수 있고, 상기 유전자의 mRNA 또는 역전사하여 만들어진 cDNA에 특이적 결합을 이룰 수 있는 서열을 가진 프로브를 이용하여 노던 블롯(Northern blot), 마이크로 어레이(Microarray) 등의 방법을 수행함으로써 측정할 수 있고, 나아가 RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 염기서열 분석(sequencing) 등의 방법으로 측정할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 어떠한 방법을 사용하는데 필요한 제제이든 가능하다.
- [34] 상기 유전자로부터 발현된 단백질이 존재하는 양을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하는 제제를 의미한다. 구체적인 예로서, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 애포타머(aptamer)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [35] 상기 "항체"는 면역학적으로 상기 단백질의 에피토프(epitope)와 특이적 결합하여 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미하며, 단일클론 항체, 다클론 항체, 전체 길이의 사슬 구조를 가진 항체, 적어도 항원 결합 기능을 갖는 기능적인 단편의 항체 및 재조합 항체를 비제한적으로 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 애포타머는 상기 단백질을 표적으로 하여 특이적인 결합을 형성할 수 있는 특징을 가지며 안정적인 3차 입체구조를 이루고 있는 단일가닥 핵산 분자를 의미하며, SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 기술 등을 이용하여 상기 단백질에 특이성을 가진 애포타머를 합성할 수 있다.
- [36] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양은 상기 항체 또는 애포타머를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot), 단백질 마이크로

어레이(단백질 칩), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 2차원 전기영동법(2-Dimensional Electrophoresis), 면역화학염색법(Immunohistochemistry, IHC), 면역형광법(Immunofluorescence), 공동면역침전법(Co-Immunoprecipitation Assay), FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사면역확산법(Radioimmunodiffusion), MALDI-TOF 분석(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 등의 방법으로 측정할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 어떠한 방법을 사용하는데 필요한 제제이든 가능하다.

- [37] 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 조성물은 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단뿐만 아니라 상기 질환을 갖는 환자의 예후에 대한 예측 용도로 이용할 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 유전자의 발현량을 측정한 결과, 상기 유전자의 발현량이 증가 또는 감소되어 있을 경우 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 갖는 환자의 예후가 나쁠 것이라는 예측을 가능하게 하게 하여, 치료를 위한 전략과 대책을 수립할 수 있다.
- [38] 본 출원에 있어서, "진단"이란 용어는 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로서, 본 발명의 목적상, 암 환자의 전이 여부에 따른 암 치료 효과의 차이를 확인하는 것뿐만 아니라 암의 치료 후 해당 개체의 재발, 약물 반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 바람직하게 본 발명의 유전자의 돌연변이를 이용하는 경우, 신장암 환자의 시료로부터 돌연변이 여부를 확인함으로써 해당 신장암 환자의 전이에 따른 신장암 치료 효과의 차이 및 향후 해당 환자의 예후를 알 수 있는 생존률 차이에 대해서도 예측이 가능하다.
- [39] 본 출원에 있어서, "예후"란 용어는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예를 들어 재발, 전이성 확산 및 약물 내성을 비롯한 병의 경과 및 완치 여부를 의미한다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리 연관 질환으로는 위염, 위궤양, 위암 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 본 출원에 있어서, "암"이란 용어는 이상 세포의 조절되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환 부류의 임의의 일원을 포함한다. 상기 용어는, 악성, 양성, 연조직 또는 고형 중 어느 것으로 특징지어지든, 모든 알려진 암 및 신생물 상태, 및 전이 전/후의 암을 포함하는 모든 시기 및 등급의 암을 포함한다.
- [41] 본 출원에 있어서, "유전자" 및 이의 변형물이란 용어는 폴리펩티드 사슬 생성에 관여한 DNA 조각을 포함하며; 이는 코딩 부위 이전 및 이후의 부위, 예를 들면 프로모터 및 3'-미번역 부위를 각각 포함할 뿐 아니라, 개별적인 코딩 단편(엑손) 사이의 개입 서열(인트론)을 포함한다.
- [42] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 유전자의 돌연변이는 임의의 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있고, 예를 들면, 절단형(truncating) 돌연변이, 미스센스(missense) 돌연변이(또는 과오 돌연변이), 넌센스(nonsense) 돌연변이, 프레임 시프트(frame shift) 돌연변이, 인프레임(in-frame) 돌연변이(또는 해독틀내

돌연변이), 스플라이스 돌연변이 및 스플라이스 사이트(splice region) 돌연변이로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 프레임 시프트 돌연변이는 프레임 시프트 삽입(frame shift insert, FS ins) 돌연변이 및 프레임 시프트 결실 돌연변이(frame shift delete, FS del) 중 적어도 하나일 수 있다. 상기 인-프레임 돌연변이는 인-프레임 삽입(in-frame insertion, IF ins) 돌연변이 및 인-프레임 결실(in-frame delete, IF del) 돌연변이 중 적어도 하나일 수 있다.

- [43] 폴리펩티드 서열에서의 돌연변이와 관련하여 "X#Y"란 용어는 본 기술분야의 통상의 기술자에서 자명하게 인식되는 것으로서, 여기서 "#"은 폴리펩티드의 아미노산 번호와 관련하여 돌연변이 위치를 나타내고, "X"는 야생형 아미노산 서열의 그 위치에서 발견되는 아미노산을 나타내며, "Y"는 그 위치에서의 돌연변이체 아미노산을 나타낸다.
- [44] 상기 유전자의 발현의 증가 또는 감소를 이용하여 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예후를 진단하기 위한 분석 방법으로는 차세대 염기서열분석법(next generation sequencing, NGS), RT-PCR, 직접 핵산 서열분석 방법, 마이크로 어레이 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 출원의 한 구현예에서, 유전자 발현의 증가 또는 감소를 확인하기 위한 항체 또는 핵산 프로브는 검출가능하게 표지되며, 상기 표지는 면역형광 표지, 화학발광 표지, 인광 표지, 효소 표지, 방사성 표지, 아비딘/비오틴, 콜로이드성 금 입자, 착색 입자 및 자기 입자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 출원의 다른 구현예에서, 유전자 발현의 증가 또는 감소는 방사성면역 검정, 웨스턴블롯 검정, 면역형광 검정, 효소면역 검정, 면역침전 검정, 화학발광 검정, 면역조직화학 검정, 도트 블롯 검정, 슬롯 블롯 검정 또는 유동 세포측정 검정에 의해 결정될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [45] 본 출원에 있어서, "폴리뉴클레오티드"란 용어는 일반적으로 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 나타낸다. 따라서, 예를 들어 본 출원에서 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오티드는 비제한적으로 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 RNA, 단일-가닥 또는 보다 전형적으로는 이중-가닥일 수도 있거나 또는 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함할 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함할 수 있다. 따라서, 안정성 또는 다른 이유로 인해 변형된 백본을 갖는 DNA 또는 RNA도 본 출원에서 의도된 용어와 같은 "폴리뉴클레오티드"에 해당된다. 또한, 이노신과 같은 비통상적 염기 또는 삼중수소화 염기와 같은 변형된 염기를 포함하는 DNA 또는 RNA가 본 출원에서 정의된 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"에 포함된다. 일반적으로, "폴리뉴클레오티드"란 용어는 비변형된 폴리뉴클레오티드의 모든 화학적으로, 효소적으로 및/또는 대사적으로 변형된 형태를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는

시험관내 재조합 DNA-매개 기술을 비롯한 다양한 방법에 의해, 그리고 세포 및 유기체 내의 DNA의 발현에 의해 제조될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [46] 본 출원의 키트는 상기에서 설명한 것과 같은 본 출원의 조성물을 포함하고 있으며, 본 출원의 키트는 종래의 일반적인 유전자의 검색 방법에 비하여 시간과 비용이 절감되어 매우 경제적이다. 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 키트는 칩 하나에 다양한 유전자의 발현 정도를 검출할 수 있는 프라이머 세트가 함께 집적될 수 있기 때문에 종래의 방법에 비해 시간뿐만 아니라 비용까지 절감할 수 있다.
- [47] **2. 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법**
- [48] 본 출원의 다른 측면은 개체의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계; 상기 시료 DNA를 본 출원의 조성물 또는 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 증폭 결과로부터 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 개체의 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [49] 상기 방법은 추가로 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자가 확인된 개체에게 임의의 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 치료 후보 물질을 처리하거나, 임의의 방법으로 치료하는 단계; 및 임의의 치료 후보 물질 또는 임의의 치료 방법이 상기 질환을 개선하거나, 치료할 경우 상기 환자에게 적합한 치료 후보 물질 또는 치료 방법으로 채택하는 단계;를 포함하는 헬리코박터 파일로리에 감염된 개체의 치료 효과의 차이를 판정하기 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [50] 본 출원의 또 다른 측면은 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계; 상기 시료 DNA를 본 출원의 조성물 또는 키트를 이용하여 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 결과로부터 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현 정도를 확인하는 단계;를 포함하는 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자에서 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단, 예컨대 예후 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [51] 상기 "헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물 및 키트"에 대한 설명은 "**1. 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물 및 키트**"에 기재한 바와 동일하므로 구체적인 설명을 생략한다.
- [52] 상기 임의의 치료 후보 물질은 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 치료를 위해서 통상적으로 쓰이는 치료제 또는 상기 질환에 대한 치료 효과가 알려지지 않은 신규 물질일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 임의의 치료 후보 물질을 헬리코박터 파일로리가 감염된 환자에 처리한 후 치료 효과를 확인함으로써, 치료 후보 물질이 특정 환자군에 효과가 있는지 여부를 알 수 있다. 만약 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발생한 위염에 치료 효과가 있다면 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발생하는 다른 질환, 예컨대 위궤양

또는 위암을 갖는 환자군에 적용할 때에도 치료 효과가 높을 것으로 예측할 수 있으므로 치료 전략을 결정하는데 유용한 정보를 제공할 수 있다. 또한, 만약 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발생한 위염에 대해 임의의 치료 후보 물질을 사용시에 치료 효과가 나타나지 않을 경우에는 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발생하는 다른 질환, 예컨대 위궤양 또는 위암을 갖는 환자군에는 더 이상 치료를 진행하지 않음으로써 불필요한 치료를 실시하지 않아도 되므로 치료 전략을 효율적으로 설계할 수 있다.

- [53] 본 출원에 있어서, "샘플"이란 용어는 환자로부터 수득한 임의의 생물학적 표본을 비제한적으로 포함하는 의미로 사용된다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 샘플은 환자의 위로부터 입수된 미세 바늘 흡인물(예를 들어 무작위 유선 미세 바늘 흡인에 의해 수확된 흡인물), 조직 샘플(예를 들어, 위염, 위궤양, 위암 조직), 예컨대 종양 생검(예를 들어 천자 생검, 종양의 수술적 절제), 및 이의 세포 추출물을 비제한적으로 포함할 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 샘플은 예를 들어 위염, 위궤양, 또는 위암으로부터 제조된 포르말린 고정된 파라핀 포매(FFPE) 조직 샘플이다. 본 출원의 다른 구현예에서, 상기 샘플은 위염, 위궤양, 또는 위암을 갖는 대상으로부터 수득한 동결 조직으로부터 제조된 조직 용해물 또는 추출물이다.
- [54] 본 출원의 "개체"는 인간을 포함하는 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물일 수 있으며, 구체적으로 헬리코박터 파일로리에 감염되었거나, 감염이 의심되는 개체일 수 있으며, 다른 일례로 헬리코박터 파일로리 연관 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 개체일 수 있다. 더욱 구체적으로 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자일 수 있다.
- [55] 본 출원에 있어서, "환자"란 용어는 통상 인간을 포함할 뿐 아니라 다른 동물, 예를 들어 다른 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 양, 돼지 등을 포함하는 의미로 사용된다.
- [56] 본 출원에 있어서, "개선"이란 용어는 치료와 연관된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 제한없이 나타내는 의미로 사용된다.
- [57] 본 출원에 있어서, "예방"이란 용어는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 증상을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 포함하는 의미로 사용된다.
- [58] 본 출원에 있어서, "치료"란 용어는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 제한없이 포함하는 의미로 사용된다.
- [59] 또한, 본 출원에 있어서, "투여"란 용어는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 의미로 사용된다.
- [60] 본 출원에 있어서, 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 갖는 환자의 샘플에서 본 출원에서 개시하고 있는 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현을 분석함으로써 대상 시료를 가진 개체가 상기 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 대해 어떤 예후를 가지는지를 확인할 수 있다.

본 출원의 한 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 증가되는 유전자는 FGF21, CTH, CREBRF, DLL4, FGF18, FOS, PDK1, PTPRN, CLIC4, PTPRB, PPP1R15A, PTPRH, DDIT3, BIRC3, FOXO3, BCL2, PRKCE, CHMP4C, CLDN14, SLC7A11, BOC, AJUBA, LMO7, MMP24, C3orf58, KLF10, CSGALNACT1, CEP120, CHAC1, ASNS, NFE2L2, RIOK3, TXNIP, MTR, IFRD1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 구체적으로 FGF21, CTH, CREBRF, PTPRN 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 출원의 다른 구현예에서, 상기 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 발현이 감소되는 유전자는 ADGRA2, TBX4, OVOL2, ACVRL1, ALB, JADE1, MLLT11, ADORA1, TNFRSF8, NLRP12, CASP14, LTA, SMAGP, NEO1, MTSS1, TSPAN32, CLDN8, MYBPH, SGCE, CDH15, ARHGAP6, ZFP36L2, EHF, SLAMF6, HLA-DPB1, SSC5D, CCR4, CCR7, KLRG1, BLNK, IGFBP1, GIF, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [61] 본 발명자들은 상기 유전자들의 발현의 증가 또는 감소를 헬리코박터 파일로리 연관 질환을 갖는 환자에 대한 치료 효과의 차이를 예측하거나, 예후를 진단할 수 있는 진단 표지자로 사용할 수 있음을 최초로 규명하였다. 본 출원의 한 구현예에서, 본 출원의 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 예후 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법은 상기 질환의 발생 여부를 진단하거나, 상기 질환을 갖는 환자의 생존율을 높이거나, 또는 재발율을 낮추는데 사용될 수 있다. 본 출원의 다른 구현예에서, 본 출원의 방법을 통해 상기 질환에 대한 치료 효과를 예측하거나, 상기 질환을 갖는 환자의 생존율 또는 재발율을 예측할 수 있으므로, 각 환자에 적합한 치료제 발굴뿐만 아니라, 치료법 선택에 있어 정보를 제공할 수 있어, 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 관한 치료적 전략을 효율적으로 설계할 수 있다.
- [62] 본 출원은 헬리코박터 파일로리 감염에 따른 생체내의 유전자 발현 변화를 분석함으로써 질병의 진단 및 예후를 예측하는 방법을 제공한다. 본 출원의 한 구현예에서, 분류화를 통해 치료법의 최적화, 특정 치료법의 진행 여부 결정 및 치료제의 용량, 선택 등의 최적화가 가능하다. 또한, 단일 세포에 대한 유전자군의 발현 패턴을 분석함으로써 질병 상태의 세포에서 돌연변이 및/또는 경로를 표적으로 하는 치료법의 동정 및 개발을 제공할 수 있다.
- [63] 본 출원의 다른 구현예에서, 본 출원은 포유동물 조직 또는 세포 샘플에서 하나 이상의 유전자 마커의 발현을 검사 및 분석하는 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 하나 이상의 유전자 마커의 발현은 그로부터 조직 또는 세포 샘플을 채취한 포유동물 개체가 헬리코박터 파일로리 연관 질환에 걸려있을 가능성이 더 큼을 나타낸다.
- [64] 본 출원의 한 구현예에서, 헬리코박터 파일로리에 감염된 개체는 유산균을 포함하는 김치를 섭취 또는 투여함으로써 헬리코박터 파일로리 연관 질환

증상이 개선 또는 치료될 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 김치는 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133을 포함하는 김치일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119는 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 13043BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 한국 등록특허공보 제1,807,995호에 구체적으로 개시되어 있다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 11403BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 한국 등록특허공보 제1,486,999호에 구체적으로 개시되어 있다.

- [65] 상기 "김치"는 채소를 소금에 절인 후 양념을 혼합하여 발효시킨 식품을 제한없이 포함하는 의미로 사용된다. 예컨대, 상기 채소는 배추, 무, 파, 갯, 오이 등이 사용될 수 있고, 구체적으로 배추가 사용될 수 있으나, 이들 외의 임의의 채소가 모두 김치의 원료로서 사용될 수 있다. 본 출원의 한 구현예에서, 상기 채소는 배추, 구체적으로 라이코펜의 함량이 높은 배추일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [66] 본 출원의 한 구현예에서, 상기 양념은 고춧가루, 마늘, 생강, 젓갈 등의 재료를 혼합하여 제조되는 것으로서, 양념을 구성하는 재료들은 이들 외에도 개인의 기호도, 발효 방식, 발효 기간 등에 따라 필요시 다른 임의의 재료들이 적절히 추가 또는 제외될 수 있다. 상기 김치는 통상의 김치의 제조 방법에 의해 소금에 절인 채소, 예컨대 소금에 절인 배추에 양념을 버무린 후 발효시키는 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 배추로는 라이코펜 함량이 높은 배추를 사용하는 것이 보다 적절할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 배추가 김치의 제조에 비제한적으로 사용될 수 있다.
- [67] 본 출원의 한 구현예에 따르면, 시험관내 또는 생체내에서 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 ER 스트레스 유전자, 산화 스트레스 유전자, 조직 재생 유전자, 혈관 신생 유전자 등의 유전자의 발현이 증가될 수 있다(도 1, 도 2 및 도 5 참조).
- [68] 본 출원의 다른 구현예에 따르면, 시험관내 또는 생체내에서 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 세포 방어 반응 유전자, 조직 재생 유전자, 항산화 유전자, 세포 접착 유전자 등의 유전자의 발현이 감소될 수 있다(도 3, 도 4 및 도 6 참조).
- [69] 이와 같이, 본 출원에서 확인된 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 그 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 목록은 헬리코박터 파일로리로부터 유발될 수 있는 다양한 질환들, 예컨대 위염, 위궤양 및 위암의 예방, 치료, 또는 개선을 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [70]
- [71] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

- [72] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [73] 하기 실시예 및 실험예에 있어서, 통계 분석은 GraphPad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)과 SPSS 소프트웨어(Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용해 수행하였고, 그룹들 사이의 통계적 유의성은 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney U test)에 의해 결정하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 에서 인정되었다.
- [74] 실시예 1: 헬리코박터 파일로리 감염 위암 세포 및 동물 모델의 준비
- [75] <1-1> 헬리코박터 파일로리 감염 위암 세포 모델
- [76] 위선암종(AGS)은 ATCC(Manassas, VA)에서 구입하여 보관하며 사용하였다. 모든 세포는 소생 후 6 개월 이상 사용하지 않았다. AGS 세포는 RPMI-1640 배양액(Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 및 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL)가 포함된 배지에서 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포를 6-웰 플레이트에 10⁵ 세포/ml 농도로 분주하고, 24 시간 동안 흡착시킨 후, 세포에 헬리코박터 파일로리를 50 MOI(500⁵ CFU)로 6시간 동안 노출시켜 감염시켰다.
- [77] <1-2> 항암 김치 준비
- [78] 김치는 통상의 김치 제조법에 따라 제조하였다. 항암 김치(이하, 'CpKimchi' 또는 'CPK'로 나타내는 경우가 있음)는 일반 배추가 아닌 라이코펜 함량이 높은 배추를 주원료로 사용하고 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119 및 락토바실러스 플란타럼 CJLP133의 2종의 유산균을 사용한 것을 제외하고는 일반 김치(이하, 'sKimchi' 또는 'SK'로 나타내는 경우가 있음)의 제조법과 동일하게 제조하였다. 상기 류코노스톡 메센테로이드 CJLM119는 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 13043BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 등록특허공보 제10-1807995호에 구체적으로 개시되어 있다. 또한, 상기 락토바실러스 플란타럼 CJLP133은 한국생명공학연구원 유전자은행에 수탁번호 KCTC 11403BP로 기탁된 미생물 균주로서, 상기 균주의 분리 및 동정 방법에 대해서는 등록특허공보 제10-1486999호에 구체적으로 개시되어 있으므로, 그 구체적인 기재를 생략한다.
- [79] <1-3> 김치 추출물의 농축액의 제조
- [80] 상기 실시예 <1-2>에서 제조된 김치를 동결 건조한 후 분쇄하여 분말로 준비하였다. 여기에 20배 중량의 메탄올을 가한 후, 교반기를 이용하여 12시간 동안 추출하였다. 추출된 상등액을 여과지로 여과하였고, 남은 침전물은 다시 메탄올을 추가하여 12시간 동안 추출하였다. 상기 추출물을 농축기로 약 40°C의 온도에서 가온농축한 농축물을 제조한 후, 이를 4°C에서 저장하여 추가적인 실험에 사용하였다.
- [81] <1-4> 시험관내 및 생체내 실험 모델을 위한 준비
- [82] 시험관내 실험에는 실시예 <1-3>에서 제조한 김치 추출물의 농축액 5 mg/ml 및 10 mg/ml로 각각 사용하였다. 생체내 실험을 위한 김치 섭취량은 다음과 같이

설정하였다: 한국인의 통상 김치 섭취량은 개인 취향에 따라 하루에 약 30 내지 100 g이며, 항암 김치 추출물의 농축액은 동물 모델의 식이요법 펠릿에 1 주일에 1 회, 체중 2 배, 1.7 g/kg/일, 5.1 g/kg/일의 비율로 혼합하여 일반적인 한국인의 김치 섭취량으로 환산하여 사용하였다.

[83] <1-5> RNA 분리 및 RT-PCR 수행

[84] 실시예 <1-1>에서 제조한 헬리코박터 파일로리가 감염된 위암 세포의 배양 배지를 흡입하여 제거한 후, 상기 세포를 Dulbecco의 PBS로 2 회 세척하였다. RiboEX(500 μ l, GeneAll, Seoul, Korea)를 4°C에서 10 분간 배양한 플레이트에 첨가하였다. RiboEX를 수거하고 1.5 ml 튜브에 옮긴 후, 100 μ l의 클로로포름을 넣고 천천히 혼합하였다. 얼음에서 10 분간 정치한 후, 샘플을 10,000g에서 30 분간 원심분리하였다. 상등액을 200 μ l의 이소프로판올과 혼합한 후, 상기 혼합물을 4°C에서 1 시간 동안 정치하였다. 13,000g에서 30 분간 원심분리한 후, 침전물을 70%(vol / vol) 에탄올로 세척하였다. 에탄올을 완전히 증발시킨 후, 침전물을 100 μ l의 DEPC(Diethylene pyrocarbonate)로 처리된 물(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)에 용해시켰다. 물로니 뮤린 백혈병 바이러스(Promega, Madison, WI)로부터 유래된 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 제조하였다. PCR은 94°C에서 20 초, 58°C에서 30 초, 72°C에서 45 초의 30 사이클을 사용하여 수행하였다.

[85] <1-6> mRNA 염기서열 분석

[86] SMARTer Stranded RNA-Seq 키트(Clontech Laboratories, Inc., USA)를 사용하여 총 RNA로부터 2 μ g의 총 RNA로부터 라이브러리를 준비하였다. mRNA의 분리는 Poly (A) RNA SelectionKit (LEXOGEN, Inc., Austria)를 사용하여 수행하였다. 분리된 mRNA는 cDNA 합성 및 절단에 사용하였다. 인덱싱은 Illumina 지수 1-12를 사용하였고, PCR을 사용하여 증폭하였다. 이어서 Agilent 2100 bioanalyzer(DNA High Sensitivity Kit)를 사용하여 라이브러리를 확인하여 평균 단편의 크기를 평가하였다. 정량은 Step One 실시간 PCR 시스템(Life Technologies, Inc., USA)을 사용하여 라이브러리 정량 키트를 사용하였다. 대량-고효율 서열분석(high-throughput sequencing)은 HiSeq 2500(Illumina, Inc., USA)을 사용하여 페어드-엔드(paired-end) 100 서열분석으로 수행하였다.

[87] <1-7> 데이터 분석

[88] mRNA-Seq 분석은 정렬 파일을 얻기 위해 TopHat 소프트웨어(Cole Trapnell et al., 2009) 도구를 사용하였다. 차별적으로 발현된 유전자는 Bedtools(Quinlan AR, 2010)의 적용 범위를 사용하여 고유 및 다중 정렬의 계수를 기반으로 결정하였다. RT(Read Count) 데이터는 Bioconductor(Gentleman et al., 2004)를 사용하여 통계프로그램 R(R development Core Team, 2016)의 EdgeR을 사용하는 Quantile 정규화 방법을 기반으로 처리하였다. Cufflinks를 사용하여 전사체를 조립하고, 존재량을 추정하고, 발현 및 조절을 분석하였고, 유전자 또는 이소(iso)-형태의 차별적인 발현을 검출하는데 사용하였다. 유전자 영역의 발현

수준을 결정하는 방법으로 FPKM(fragments per kilobase of exon per million fragments)을 사용하였다. 유전자 분류는 DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)로 수행한 검색을 기반으로 하였다.

- [89] 실시예 2: 헬리코박터 파일로리 감염에 따라 특이적으로 증가하는 유전자
- [90] <2-1> RNAseq을 통한 유전자 확인
- [91] 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 표적 유전자를 찾기 위해 RNAseq 분석을 수행하였고, 유전자들 중 헬리코박터 파일로리 감염에서 발현이 증가되었으나 CpKimchi의 병용 처리로 정상화된 유전자 126 개를 확인하였다. 이들 유전자들은 ER 스트레스 유전자, 산화 스트레스 유전자, 조직 재생 유전자, 혈관 신생 유전자 등으로 나타났다(도 1).
- [92] <2-2> RNAseq의 결과를 RT-PCR로 검증
- [93] RNAseq의 히트맵 분석 결과를 RT-PCR로 검증하였다. 혈관 신생 유전자 중 DLL4(delta-like 4) 및 FGF18(fibroblast growth factor 18)가 CpKimchi 병용 처리 후 그 발현이 유의하게 감소하였고, ER 스트레스 유전자 중 FGF21(fibroblast growth factor 21), CTH(cystathionine-lyase) 및 CREBPF(cAMP responsive element binding protein)과 산화적 스트레스 유전자 중 FOS, PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1) 및 PTPRN(receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N) 또한 CpKimchi 병용 처리 후 그 발현이 유의하게 감소하였다(도 2).
- [94] 실시예 3: 헬리코박터 파일로리 감염에 따라 특이적으로 감소하는 유전자
- [95] <3-1> RNAseq을 통한 유전자 확인
- [96] 유전자 중 헬리코박터 파일로리 감염에서 발현이 감소되었지만 CpKimchi의 처리로 정상화되어 발현이 증가하는 유전자를 분석하였다. 총 262 개의 유전자가 동정되었다. 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 발현이 감소되었으나 CpKimchi의 병용 치료로 정상화된 유전자를 분류해 보면, 세포 방어 반응 유전자, 조직 재생 유전자, 항산화 유전자, 세포 접착 유전자 등이다(도 3).
- [97] <3-2> RNAseq의 결과를 RT-PCR로 검증
- [98] RNAseq의 히트맵 분석 결과를 RT-PCR로 검증하였으며, ALB, NEO1(neogenin precursor1), CLDN8(claudin 8), KLRG1(killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) 및 IGFBP1(insulin-like growth factor=binding protein 1)의 경우 CpKimchi 처리 후 감소된 유전자의 발현이 정상화되었음을 확인하였다(도 4).
- [99] 실시예 4: 헬리코박터 파일로리의 감염에 의해 특이적 증가하는 유전자의 생체내 검증
- [100] 헬리코박터 파일로리 감염 동물 모델 실험에서 RNAseq 결과와 동일하게 ER 스트레스 유전자의 발현을 확인하였다. 헬리코박터 파일로리가 감염된 그룹 2에서 ER 스트레스 유전자의 발현이 유의하게 증가하였으며, 이는 RNAseq의 결과와 일치하였다. ER 스트레스에 관여하는 이들 유전자는 CpKimchi가 투여된 그룹 3과 그룹 4에서 유의하게 개선되어 역시 RNAseq 결과와 일치하였다(도 5).
- [101] 실시예 5: 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 특이적 감소하는 유전자의 생체내

검증

- [102] 헬리코박터 파일로리 감염 동물모델 실험에서 RNAseq 결과와 동일하게 항산화 관련 유전자의 발현을 확인하였다. 항산화 유전자는 헬리코박터 파일로리가 감염된 그룹 2에서 유의하게 감소하였으나, CpKimchi가 투여된 그룹 3과 그룹 4에서 모두 유의하게 발현이 증가하여 회복되었다(도 6).
- [103] 상기에서는 본 출원의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] FGF21(fibroblast growth factor 21. Gene ID: 26291) 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
CTH(cystathionine g-lyase. Gene ID: 1491) 또는 CREBRF(cAMP responsive element binding protein. Gene ID: 153222) 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
DLL4(delta-like 4. Gene ID: 54567), FGF18(fibroblast growth factor 18. Gene ID: 8817), FOS(Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit. Gene ID: 2353), PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1, Gene ID: 5170), PTPRN(receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N, Gene ID: 5798), CLIC4(chloride intracellular channel 4. Gene ID: 25932), PTPRB(protein tyrosine phosphatase, receptor type B. Gene ID: 5787), PPP1R15A(protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A. Gene ID: 23645), PTPRH(protein tyrosine phosphatase, receptor type H. Gene ID: 5794), DDIT3(DNA damage inducible transcript 3. Gene ID: 1649), BIRC3(baculoviral IAP repeat containing 3. Gene ID: 330), FOXO3(forkhead box O3. Gene ID: 2309), BCL2(BCL2, apoptosis regulator. Gene ID: 596), PRKCE(protein kinase C epsilon. Gene ID: 5581), CHMP4C(charged multivesicular body protein 4C. Gene ID: 92421), CLDN14(claudin 14. Gene ID: 23562), SLC7A11(solute carrier family 7 member 11. Gene ID: 23657), BOC(BOC cell adhesion associated, oncogene regulated. Gene ID: 91653), AJUBA(ajuba LIM protein. Gene ID: 84962), LMO7(LIM domain 7. Gene ID: 4008), MMP24(matrix metalloproteinase 24. Gene ID: 10893), C3orf58(divergent protein kinase domain 2A. Gene ID: 205428), KLF10(Kruppel like factor 10. Gene ID: 7071), CSGALNACT1(chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1. Gene ID: 55790), CEP120(centrosomal protein 120. Gene ID: 153241), CHAC1(ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1. Gene ID: 79094), ASNS(asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing). Gene ID: 440), NFE2L2(nuclear factor, erythroid 2 like 2. Gene ID: 4780), RIOK3(RIO kinase 3. Gene ID: 8780), TXNIP(thioredoxin interacting protein. Gene ID: 10628), MTR(5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase. Gene ID: 4548), IFRD1(interferon related developmental regulator 1. Gene ID: 3475), ADGRA2(adhesion G protein-coupled receptor A2. Gene ID: 25960),

TBX4(T-box 4. Gene ID: 9496), OVOL2(ovo like zinc finger 2. Gene ID: 58495), ACVRL1(activin A receptor like type 1. Gene ID: 94), ALB(albumin. Gene ID: 213), JADE1(jade family PHD finger 1. Gene ID: 79960), MLLT11(MLLT11, transcription factor 7 cofactor. Gene ID: 10962), ADORA1(adenosine A1 receptor. Gene ID: 134), TNFRSF8(TNF receptor superfamily member 8. Gene ID: 943), NLRP12(NLR family pyrin domain containing 12. Gene ID: 91662), CASP14(caspase 14. Gene ID: 23581), LTA(lymphotoxin alpha. Gene ID: 4049), SMAGP(small cell adhesion glycoprotein. Gene ID: 57228), NEO1(neogenin precursor1. Gene ID: 4756), MTSS1(MTSS1, I-BAR domain containing. Gene ID: 9788), TSPAN32(tetraspanin 32. Gene ID: 10077), CLDN8(claudin 8. Gene ID: 9073), MYBPH(myosin binding protein H. Gene ID: 4608), SGCE(sarcoglycan epsilon. Gene ID: 8910), CDH15(cadherin 15. Gene ID: 1013), ARHGAP6(Rho GTPase activating protein 6. Gene ID: 395), ZFP36L2(ZFP36 ring finger protein like 2. Gene ID: 678), EHF(ETS homologous factor. Gene ID: 26298), SLAMF6(SLAM family member 6. Gene ID: 114836), HLA-DPB1(major histocompatibility complex, class II, DP beta 1. Gene ID: 3115), SSC5D(scavenger receptor cysteine rich family member with 5 domains. Gene ID: 284297), CCR4(C-C motif chemokine receptor 4. Gene ID: 1233), CCR7(C-C motif chemokine receptor 7. Gene ID: 1236), KLRG1(killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1. Gene ID: 10219), BLNK(B cell linker. Gene ID: 29760), IGFBP1(insulin-like growth factor=binding protein 1. Gene ID: 3484), GIF(MIF, macrophage migration inhibitory factor. Gene ID: 4282) 유전자, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.

[청구항 4]

청구항 1에 있어서,

상기 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 mRNA의 양을 측정하는 제제, 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양을 측정하는 제제, 또는 이들 둘 모두인 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.

[청구항 5]

청구항 4에 있어서,

상기 유전자의 mRNA의 양을 측정하는 제제는 상기 유전자의 mRNA 또는 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.

[청구항 6]

청구항 4에 있어서,

상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양을 측정하는 제제는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 조성물.

- [청구항 7] 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단용 키트.
- [청구항 8] 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자의 샘플로부터 시료 DNA를 준비하는 단계;
상기 시료 DNA를 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여 증폭하는 단계; 및
상기 증폭 결과로부터 헬리코박터 파일로리 감염에 의해 발현이 증가 또는 감소되는 유전자의 발현 정도를 확인하는 단계;
를 포함하는 헬리코박터 파일로리에 감염된 환자에서 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서,
상기 유전자의 발현 정도를 확인하는 단계는, 상기 유전자의 mRNA의 양, 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양, 또는 이들 둘 모두를 측정하는 것인 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 유전자의 mRNA의 양을 측정하는 것은 상기 유전자의 mRNA 또는 cDNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하는 것인 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서,
상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양을 측정하는 것은 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 이용하는 것인 헬리코박터 파일로리 연관 질환의 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.