

명세서

발명의 명칭: 신규한 PNA 올리고머, 이의 DNA 메틸화 검출용도 및 이를 이용한 DNA 메틸화 검출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 PNA 올리고머에 관한 것으로, 신규한 PNA 프로브를 이용하여 DNA 메틸화를 검출하는 기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] DNA 메틸화는 주로 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬(CpG island)의 시토신(cytosine)에서 일어나고, 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해받게 되어 특정 유전자의 발현을 차단(gene silencing) 시키며, 이는 생체 내에서 유전자의 염기서열에 돌연변이(mutation)가 없이도 그 유전자의 기능이 소실되는 주요 기전으로 작용한다. 또한, 인체 암에서 다수의 종양 억제 유전자(tumor suppressor genes)의 기능이 소실되는 원인으로 해석되고 있다.
- [3] 프로모터 CpG 섬에서의 비정상적인 메틸화/탈메틸화는 여러 암에서 종양 억제 유전자, DNA 수선 유전자(DNA repair gene), 세포 주기 조절 유전자 등의 과메틸화(hyper-methylation)되어 있어 이들 유전자의 발현이 차단되어 있다는 것이 확인되었다. 특히 암 발생의 초기 단계에서 특정 유전자의 프로모터 부위에 과메틸화가 일어난다는 것은 주지의 사실이다. 따라서, 종양관련 유전자의 프로모터 메틸화가 암의 중요한 지표이며, 이는 암의 조기진단, 발암 위험의 예측, 암의 예후 예측, 치료 후 추적 조사, 항암요법에 대한 반응 예측 등 다방면으로 이용될 수 있다. 바이설파이트 시퀀싱(bisulfite sequencing), combined bisulfite restriction analysis(COBRA), 파이로시퀀싱(pyrosequencing)과 메틸화 특이 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction: MSP) 등의 방법으로 검사하여 암의 진단과 스크리닝 등에 이용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있으며 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변 등에서 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여 각종 암 진료에 사용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다.
- [4] 그러나, 현재 연구자들이 DNA 메틸화 확인을 위해 가장 일반적으로 이용하고 있는 바이설파이트 및 메틸화 특유의 효소를 처리한 후 MSP를 수행하는 방법은, Bisulfite를 처리하여 비메틸화된 시토신을 우라실로 전환되도록 하고, 이미 메틸화되어 있는 5-메틸 시토신은 그대로 유지되는 점을 이용하여 DNA 내의 개별 시토신의 메틸화 상태를 확인하는 방법으로서, 한 번에 검사할 수 있는 유전자의 수나 검체의 수에 한계가 있으며, Bisulfite를 처리한 genomic DNA의 90% 이상이 분해(degradation)됨으로써 검출시 많은 양의 DNA가 필요하다. 또한, 시토신이 우라실로 전환되는 비율 또는 전환 효율에 따른 검출용 프라이머의 디자인이 어렵고, 프라이머의 비특이적 결합으로 인해 검출 결과의 재현성이

떨어지는 문제가 있다.

- [5] 뿐만 아니라, Bisulfite를 처리하더라도 비메틸화 시토신이 우라실로 전환되지 않거나, 5-메틸 시토신이 그대로 유지되어 있는 것이 아니라 티민으로 전환 등의 오류가 발생할 수 있다. 이런 오류로 인해 Bisulfite 처리를 필요로 하는 DNA 메틸화 검출 방법은 위양성 결과를 나타내어 결국 정확도, 특이도, 민감도와 재현성이 모두 떨어지는 문제를 가진다.
- [6] 한편, PNA(Peptide nucleic acid: 펩티드 핵산)는 핵산염기가 당과 인산 결합이 아닌 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로서, 1991년에 처음 보고되었다. PNA는 화학적인 방법으로 합성되고 자연에서는 발견되지 않는 인공핵산으로서, 공지된 일반적인 PNA 구조는 N-(2-아미노에틸)글리신 (N-(2-aminoethyl)glycine) 단위가 아마이드 결합에 의해 반복적으로 연결되어 N-(2-아미노에틸)글리신 골격을 형성하고, 이 골격에 퓨린(purine: A 및 G)과 피리미딘(pyrimidine: C 및 T)염기와 같은 핵산 염기를 가지고 있어 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 통해 이중가닥을 형성할 수 있다.
- [7] 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다 안정하고, 단일 염기 부정합(single nucleotide polymorphism: SNP)으로 인하여 이중가닥이 불안정해지는 정도가 크기 때문에 SNP를 검출하는 능력이 천연핵산보다 더 뛰어나다. PNA는 화학적으로 안정할 뿐만 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.
- [8] PNA가 이처럼 생물학적 효소에 안정한 성질을 이용한 연구들이 진행되고 있는데, 일 예로 프로브로 활용하는 것이다. 예를 들면, PNA 프로브와 표적 핵산 간의 혼성화 효율을 조절하는 것으로 다양한 검출 방법으로 이용할 수 있다.
- [9] 이에 본 발명자들은 DNA 메틸화 검출 방법에 있어서, 상술한 종래 방식의 기술적 과제를 해결하고자 바이설파이트를 처리하지 않고도 DNA 메틸화를 손쉽게 검출할 수 있는 PNA 프로브 및 상기 PNA를 이용한 메틸화 검출 방법을 고안하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 바이설파이트 전처리 없이, 유전자의 메틸화를 검출할 수 있는 신규한 PNA 올리고머 및 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 바이설파이트의 전처리 없이 PNA 프로브를 이용하여 유전자의 증폭없이 또는 메틸화 된 DNA의 증폭을 억제시키고 메틸화 되지 않은 DNA를 선택적으로 증폭하여 각 PCR 산물의 Ct 차이를 이용하여 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법을 제공하기 위한 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 PNA 프로브를 이용하여 유전자의 증폭없이 또는 메틸화 된 DNA의 증폭을 억제시키고 메틸화 되지 않은 DNA를 선택적으로

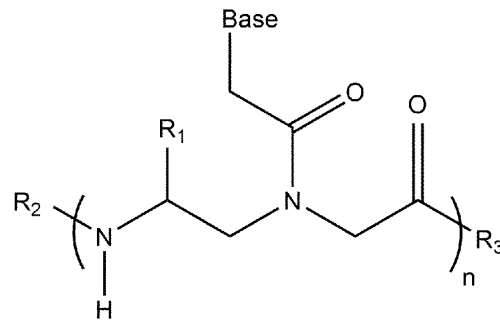
증폭하여 각 PCR 산물의 Ct 차이를 이용하여 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 키트를 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 올리고머를 제공한다.

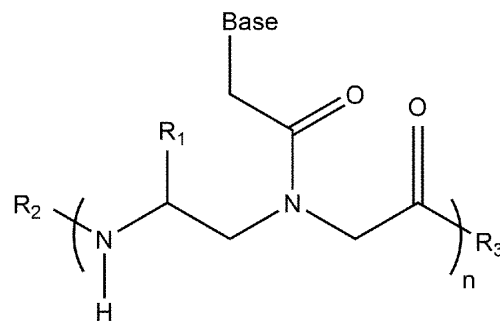
[14] [화학식 1]

[15]



- [16] 상기 화학식 1에서, R₁은 소수성 치환기, R₂는 수소 또는 소수성 치환기, R₃는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 올리고머에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 화학식 1의 소수성 치환기는 서로 독립적으로 C₃-C₃₀의 알킬기, C₃-C₃₀의 알케닐기, C₃-C₃₀의 알키닐기, C₆-C₃₀의 아릴기, C₃-C₃₀의 헤테로아릴기, 소수기를 포함하는 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 소수성 치환기의 수소 중 어느 하나 이상은 할로젠 원소로 대체될 수 있으며, 상기 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기의 탄소 중 어느 하나 이상은 O 또는 S로 대체될 수 있으며, 상기 헤테로아릴기는 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 화학식 1의 R₁의 소수성 치환기는 C₃-C₃₀의 알킬기, C₃-C₃₀의 알케닐기 및 C₃-C₃₀의 알키닐기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 화학식 1의 R₁의 소수성 치환기는 C₈-C₁₈의 알킬기일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 소수기를 포함하는 아미노산은 서로 독립적으로 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 트레오닌(Thr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [21] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브를 제공한다.
- [22] [화학식 1]

[23]

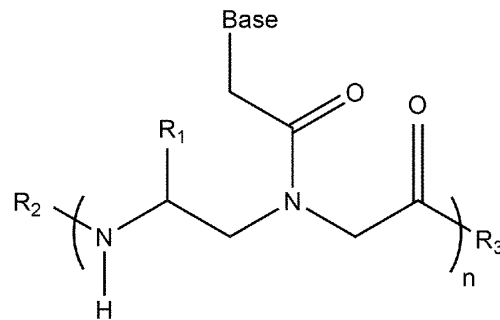


- [24] 상기 화학식 1에서, R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 올리고머에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 예에 있어서, 유전자 메틸화 검출용 PNA 프로브의 화학식 1의 소수성 치환기는 서로 독립적으로 C_3 - C_{30} 의 알킬기, C_3 - C_{30} 의 알케닐기, C_3 - C_{30} 의 알키닐기, C_6 - C_{30} 의 아릴기, C_3 - C_{30} 의 헤테로아릴기, 소수기를 포함하는 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 소수성 치환기의 수소 중 어느 하나 이상은 할로젠 원소로 대체될 수 있으며, 상기 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기의 탄소 중 어느 하나 이상은 O 또는 S로 대체될 수 있으며, 상기 헤테로아릴기는 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_3 - C_{30} 의 알킬기, C_3 - C_{30} 의 알케닐기 및 C_3 - C_{30} 의 알키닐기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_8 - C_{18} 의 알킬기인 것일 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 소수기를 포함하는 아미노산은 서로 독립적으로 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 트레오닌(Thr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [29] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 PNA 프로브는 리포터(Reporter) 및 소광자(Quencher)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘의 조합을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 PNA 프로브는 C-말단에 결합된 리포터 및 N-말단에 결합된 소광자를 포함하는 것이거나 N-말단에 결합된 리포터 및 C-말단에 결합된 소광자를 포함하는 것일 수 있다.
- [31] 또한, 본 발명은 상기 PNA 프로브를 이용한 메틸화 유전자 검출방법을 제공한다.

- [32] 구체적인 일 예에 있어서, 메틸화 되지 않은 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는, 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브 및 메틸화 되지 않은 유전자를 포함하는 제1혼합물을 제조하는 단계; 상기 염기서열과 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 분석용 표적 유전자 및 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 제2혼합물을 제조하는 단계; 상기 제1혼합물 및 제2혼합물의 온도를 변화시키는 단계; 및 상기 온도 변화에 따른 T_m (melting temperature)을 측정하여 용해곡선을 분석하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[33] [화학식 1]

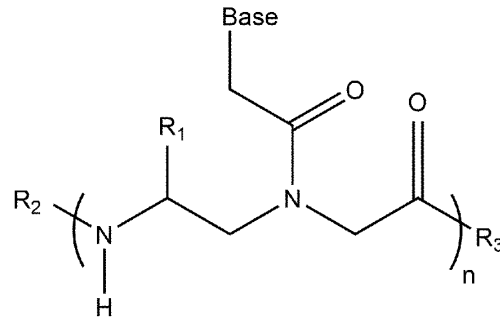
[34]



- [35] 상기 화학식 1에서, R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 용해곡선을 분석하는 단계는 ΔT_m 을 측정하여 $\Delta T_m \geq 3^\circ\text{C}$ 으로 나타나는 경우 유전자가 메틸화된 것으로 판단하는 것일 수 있고, 상기 $\Delta T_m = T_m(\text{메틸화 분석용 표적 유전자}) - T_m(\text{메틸화 분석용 표적 유전자와 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 되지 않은 유전자})$ 를 의미한다.
- [37] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 메틸화 유전자 검출방법은 메틸화 되지 않은 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는, 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브 및 메틸화 되지 않은 유전자를 포함하는 제1혼합물을 제조하는 단계; 상기 염기서열과 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 분석용 표적 유전자 및 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 제2혼합물을 제조하는 단계; 상기 제1혼합물 및 제2혼합물에 대하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하는 단계; 및 상기 PCR의 ΔCt (cycle threshold)값을 측정하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다. 이 경우 상기 $\Delta Ct = Ct(\text{메틸화 분석용 표적 유전자}) - Ct(\text{메틸화 분석용 표적 유전자와 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 되지 않은 유전자})$ 를 의미한다.
- [38] 또한, 본 발명은 메틸화가 일어날 수 있는 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는, 상기 메틸화 유전자 검출 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[39] [화학식 1]

[40]



[41] 상기 화학식 1에서, R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[42] 본 발명은 유전자 메틸화 검출용 PNA 프로브를 생물학적 시료와 혼합하여 상기 생물학적 시료에 포함된 표적 유전자와 PNA 프로브를 혼성화 시키는 단계; 비메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 T_m 보다 높고, 메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 T_m 보다 낮은 온도로 열을 가하는 단계; 및 상기 온도에서 용해된 비메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체를 제거하는 단계;를 포함하고, 상기 메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 이미징화된 형광 신호를 통하여 메틸화 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[43] 본 발명에 따른 메틸화 유전자 검출방법은 용해 곡선 분석방법을 통하여 유전자의 증폭 과정 없이도, 유전자의 메틸화 여부를 단시간 내에 검출이 가능하다. 또한, 유전자를 증폭하지 않고도 ΔT_m 을 이용하여, 극소량 포함된 메틸화 유전자를 우수한 민감도 및 특이도로 검출할 수 있다.

[44] 본 발명에 따른 또 다른 효과는 표적 유전자의 메틸화 된 서열에 상기 PNA를 결합시켜 상기 메틸화된 DNA의 증폭을 선택적으로 억제시켜 해당 증폭 효율에 관한 Ct 값과 메틸화 되지 않은 유전자의 해당 Ct 값 차이를 이용하여 표적 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있다. 또는 메틸화 된 유전자의 Ct 값과 internal control 유전자 (beta actin, GAPDH 등)의 Ct 값 (메틸 ΔCt) 및 메틸화 되지 않은 유전자와 상기 internal control 유전자의 Ct 값 (비메틸 ΔCt) 차이를 이용하여 $\Delta \Delta Ct$ ($\Delta \Delta Ct = \text{비메틸 } \Delta Ct - \text{메틸 } \Delta Ct$) 분석을 통해 표적 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있다.

[45] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 메틸화 유전자 검출방법은 바이설파이트 전처리 없이 간편하게 일 단계 과정만으로 메틸화 유전자를 검출할 수 있으며, 바이설파이트 처리를 통한 메틸화 검출시 가능한 오류가 발생할 염려가 없어 높은 정확도로 메틸화 여부를 검출할 수 있다.

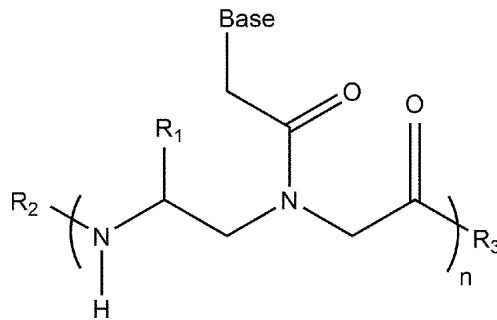
- [46] 또한, 본 발명에 따른 메틸화 유전자 검출방법은 PCR을 통한 유전자의 증폭 과정 없이 형광물질을 이용한 이미징화 기법을 통하여 메틸화 여부를 검출할 수 있다. 이미징화된 형광 신호의 세기 및 분포를 통하여 메틸화의 정량적 검출이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1은 본 발명의 비교예 1(A) 및 실시예 1(B)에 따른 융해곡선 그래프를 나타낸 것이다.
- [48] 도 2는 본 발명의 실시예 2(A) 및 비교예 2(B)에 따른 메틸화 검출 PCR의 증폭 곡선 결과 그래프를 나타낸 것이다.
- [49] 도 3은 본 발명의 실시예와 비교예에 따른 메틸화 여부 구별 기술을 나타낸 모식도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [50] 이하에서 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 따로 정의하지 않는 경우 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 내용으로 해석되어야 할 것이다. 본 명세서의 도면 및 실시예는 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 쉽게 이해하고 실시하기 위한 것으로 도면 및 실시예에서 발명의 요지를 흐릴 수 있는 내용은 생략될 수 있으며, 본 발명이 도면 및 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [51] 이하에서 사용되는 “메틸화”는 유전자를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본원에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 특정 CpG 부위의 시토신(cytosine)에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다.
- [52] 이하에서 사용되는 “Epi-sPNA” (Epigenome specific PNA)는 표적 유전자의 메틸화된 시토신의 메틸기와 상호작용할 수 있는 PNA로서, 소정의 위치에 소수성 치환기가 결합되어 변형된 PNA를 의미할 수 있다.
- [53] 이하에서 사용되는 PNA 올리고머는 2 이상의 PNA 모노머가 펩티드 결합으로 중합된 중합체를 의미할 수 있다.
- [54] 이하에서 사용되는 “특이적 결합”은 메틸화 및 비메틸화 유전자와 PNA의 염기 서열의 70% 이상의 상보적인 결합을 의미하고, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상보적 결합을 의미할 수 있다.
- [55] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 올리고머를 제공한다.
- [56] [화학식 1]
- [57]



- [58] 상기 R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 n 은 바람직하게는 8 내지 24인 정수일 수 있고, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 비천연 핵산염기는 구체적으로, 퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 7-데아자아데닌, 7-데아자구아닌, N^4N^4 -에타노시토신, N^6N^6 -에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-(C_3 - C_6)-알카닐우라실, 5-(C_3 - C_6)-알킬닐시토신, 5-플루오로우라실 및 슈도이소시토신을 포함할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [60] 본 발명에 따른 PNA 올리고머는 PNA 골격(backbone)의 특정 위치에 소수성 치환기가 결합된 형태로서, PNA 기본 골격의 감마 위치, N-말단, C-말단 또는 양쪽 말단에 모두 결합된 형태일 수 있고, 바람직하게는 감마 위치에 결합된 형태일 수 있다. 최소 하나 이상의 소수성 치환기가 연속적, 간헐적으로 PNA 프로브에 결합할 수 있다.
- [61] 본 발명에서 의미하는 상기 화학식 1의 소수성 치환기는 서로 독립적으로 C_3 - C_{30} 의 알킬기, C_3 - C_{30} 의 알케닐기, C_3 - C_{30} 의 알키닐기, C_6 - C_{30} 의 아릴기, C_3 - C_{30} 의 헤테로아릴기, 소수기를 포함하는 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 소수성 치환기의 수소 중 어느 하나 이상은 할로젠 원소로 대체될 수 있으며, 상기 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기의 탄소 중 어느 하나 이상은 O 또는 S로 대체될 수 있으며, 상기 헤테로아릴기는 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [62] 구체적으로 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_3 - C_{30} 의 알킬기, C_3 - C_{30} 의 알케닐기, C_3 - C_{30} 의 알키닐기, C_6 - C_{18} 의 아릴기 및 C_4 - C_{15} 의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 헤테로아릴기는 N을 포함하는 것이 바람직할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 보다 구체적으로 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_6 - C_{20} 의 알킬기, C_6 - C_{20} 의 알케닐기 및 C_6 - C_{20} 의 알키닐기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, C_8 - C_{18} 의 알킬기인, C_8 - C_{18} 의 알케닐기 또는 C_8 - C_{18} 의

알킬닐기에서 선택되는 것이 바람직할 수 있으나, PNA 골격에 결합하여 메틸기와 소수성 상호작용을 일으킬 수 있는 소수성 치환기라면 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[64] 상기 PNA 올리고머의 감마 위치, 어느 한 쪽 말단 또는 양 말단에 결합된 소수성 치환기는 표적 유전자의 메틸기와 소수성 상호작용을 통하여 입체장애(steric hindrance) 없이 표적 유전자와의 결합력을 높일 수 있다.

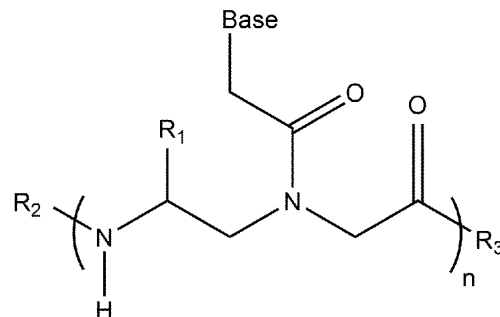
[65] 또한 소수기를 포함하는 아미노산의 경우 서로 독립적으로 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 트레오닌(Thr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe) 및 시스테인(Cys)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[66] 상기 아미노산의 곁사슬(side chain)에 결합된 소수기와 메틸화 유전자에 결합된 메틸기 사이의 소수성 상호작용은 비메틸화 유전자와 대비하여 분자 간 더 강한 결합력을 나타낼 수 있다.

[67] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 메틸화 유전자 검출용 PNA(Peptide Nucleic Acid) 프로브를 제공한다.

[68] [화학식 1]

[69]



[70] 상기 화학식 1에서, R₁은 소수성 치환기, R₂는 수소 또는 소수성 치환기, R₃는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n은 5 내지 30인 정수이며, 상기 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 n은 바람직하게는 8 내지 24인 정수일 수 있고, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.

[71] 상기 화학식 1의 소수성 치환기는 서로 독립적으로 C_3-C_{30} 의 알킬기, C_3-C_{30} 의 알케닐기, C_3-C_{30} 의 알킬닐기, C_6-C_{30} 의 아릴기, C_3-C_{30} 의 헤테로아릴기, 소수기를 포함하는 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 소수성 치환기의 수소 중 어느 하나 이상은 할로젠 원소로 대체될 수 있으며, 상기 알킬기, 알케닐기 또는 알킬닐기의 탄소 중 어느 하나 이상은 O

- 또는 S로 대체될 수 있으며, 상기 헤테로아릴기는 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [72] 구체적으로 상기 화학식 1의 R₁의 소수성 치환기는 C₃-C₃₀의 알킬기, C₃-C₃₀의 알케닐기, C₃-C₃₀의 알키닐기, C₆-C₁₈의 아릴기 및 C-4-C₁₅의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 헤테로 아릴기는 N을 포함하는 것이 바람직할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 보다 구체적으로 상기 화학식 1의 R₁의 소수성 치환기는 C₆-C₂₀의 알킬기, C₆-C₂₀의 알케닐기 및 C₆-C₂₀의 알키닐기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, C₈-C₁₈의 알킬기인, C₈-C₁₈의 알케닐기 또는 C₈-C₁₈의 알키닐기에서 선택되는 것이 바람직할 수 있으나, PNA 골격에 결합하여 메틸기와 소수성 상호작용을 일으킬 수 있는 소수성 치환기라면 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [74] 상기 소수기를 포함하는 아미노산은 서로 독립적으로 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 트레오닌(Thr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe) 및 시스테인(Cys)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [75] 상기 아미노산의 곁사슬(side chain)에 결합된 소수기와 메틸화 유전자에 결합된 메틸기 사이의 소수성 상호작용은 비메틸화 유전자와 대비하여 분자 간 더 강한 결합력을 나타낼 수 있다.
- [76] 상기 PNA 프로브의 감마 위치 또는 양 말단에 결합된 소수성 치환기는 표적 유전자의 메틸기와 소수성 상호작용을 통하여 입체장애(steric hindrance) 없이 표적 유전자와의 결합력을 높일 수 있다.
- [77] 상기 메틸화 유전자 검출용이라 함은 유전자의 메틸화 정도를 측정하여 암을 상기 조기에 진단하거나, 수술 후 암의 진행양상을 예측, 약물에 대한 반응성을 예측하기 위한 유전자 검사의 일환으로 이용될 수 있음을 의미한다.
- [78] 따라서 상기 메틸화 유전자는 암 특이적 메틸화 DNA일 수 있고, 예를 들어, 세포주기조절에 관여하는 p14, p16, Cyclin D, 세포부착에 관여하는 Twist, E-cadherin, DNA 복구에 관련된 MGMT, h-MLH, 세포신호전달과정에 참여하는 RASSF1α, DAPK, HIN-1, RARβ 일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [79] 상기 암에는 유방암, 전립선암, 방광암, 대장암, 폐암, 췌장암, 급성전골수성 백혈병, 난소암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 골수종, 림프종, 위암, 비소세포성폐암, 간암, 식도암, 소장암, 자궁내막암종, 신장암, 피부암, 골암, 갑상선암, 척수종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명에 따른 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브는 상보적인 염기서열의

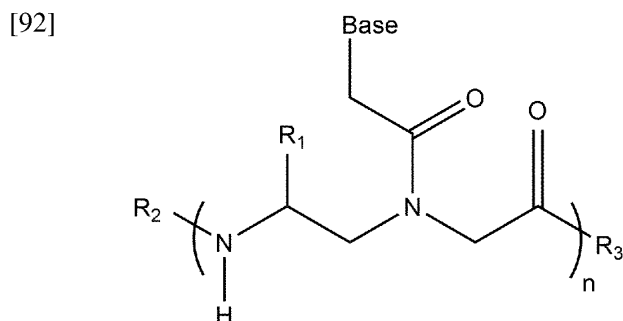
유전자와 혼성화(Hybridization) 반응을 일으켜 겹 가닥을 형성할 수 있다. PNA/DNA 겹 가닥은 DNA/DNA 겹 가닥보다 안정한데, 이는 음전하를 띠는 DNA의 기본 골격 구조상 DNA/DNA의 겹 가닥은 음전하의 반발력을 포함하고 있는 것에 반해, PNA는 전기적으로 중성을 띠어 반발력으로 인한 결합력의 상쇄가 없기 때문이다.

- [81] 본 발명에 따른 유전자 메틸화 검출용 PNA 프로브는 메틸화된 표적 유전자와의 결합 안정성을 더욱 높여 표적 유전자의 증폭을 저해하고 상대적으로 결합이 약한 비메틸화된 유전자는 증폭 반응이 일어나게 하는 원리를 기반으로 할 수 있다.
- [82] 다만, 본 발명은 이에 제한되지 않고, PNA 프로브와 메틸화된 표적 유전자와의 결합력 및 PNA 프로브와 비메틸화된 유전자와의 결합력의 차이가 반영된 ΔT_m 값을 이용하여 유전자의 증폭 반응 없이도 메틸화 유전자를 검출할 수 있다.
- [83] 구체적으로, PNA의 구아닌 염기는 상보적 염기에 해당하는 시토신과 결합하고, 상기 상보적 결합은 구아닌과 시토신 염기가 3개의 수소 결합을 함으로써 강한 분자 간의 인력을 형성하는 것이다. 메틸화된 시토신은 피리미딘 고리의 5번째 탄소에 메틸기가 결합된 것으로서, 메틸기는 전자 주는 기(Electron Donating group: EDG)에 해당하여 메틸화된 시토신은 상보적 염기인 구아닌과 더 강한 수소 결합을 할 수 있다.
- [84] 본 발명에 따른 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브는 비메틸화된 시토신에 비하여, 메틸화된 시토신과 더 강한 수소결합을 하는 것뿐만 아니라, 소수성 치환기가 결합된 변형 PNA로서 일반적인 형태의 PNA보다 메틸화된 시토신과 더 강하게 분자 간 상호작용을 할 수 있다. 예를 들어, 메틸기는 소수성의 성질을 가지고 있어 메틸기가 결합된 시토신은 소수성 치환기가 결합된 PNA 프로브와 소수성 상호작용이 발생하여 시토신과 구아닌 사이의 수소 결합과 함께 더 강한 분자 간의 인력을 형성할 수 있다.
- [85] 상기 PNA 프로브는 리포터(Reporter) 및 소광자(Quencher)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘의 조합을 더 포함하는 것일 수 있다. 바람직한 예를 들어, 상기 PNA 프로브는 C-말단에 결합된 리포터 및 N-말단에 결합된 소광자를 포함하는 PNA 프로브 또는 N-말단에 결합된 리포터 및 C-말단에 결합된 소광자를 포함하는 PNA 프로브일 수 있다.
- [86] 본 발명에 있어서, 리포터는 400 nm 내지 800 nm 영역의 파장을 발광하는 형광공여체(fluorescence donor)로서, 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), FITC, 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(Aleza Fluor), FAM(6-carboxyfluorescein), Texas red, HEX(2,4,5,7-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), JOE, ROX, TET, TRITC, TEMRA, CY3 및 CY5로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수

있고, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

- [87] 본 발명에 있어서, 소광자는 상기 리포터의 발광 에너지를 흡수하는 형광수용체(fluorescence acceptor)로서, TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), Eclipse, DDQ, QSY, 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), BHQ1, BHQ2 및 Dabcyl(4,4-Dimethylamino-azobenzene-4-carboxylic acid), 아이오와 블랙(Iowa black), FQ, IRDye QC-1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 본 발명에 따른 PNA 프로브는 리포터 및 소광자로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘의 조합을 포함함으로써, 메틸화 되지 않은 유전자 또는 메틸화 분석용 표적 유전자와 혼성화되어 혼성체(Hybrid)를 형성하면, 형광신호가 발생된다. 본 발명에 일 예에서는 PNA 프로브가 리포터 및 소광자로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘의 조합을 포함하는 것이나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니고, 상기 리포터 또는 소광자는 메틸화 되지 않은 유전자 또는 메틸화 분석용 표적 유전자에 결합된 것일 수 있다.
- [89] 상기 혼성체의 온도를 점차적으로 변화시키면 겹 가닥을 이루고 있는 PNA 프로브 및 유전자가 적정 용해 온도에서 빠르게 용해되어, 형광 신호가 소광되고, 소광되는 순간의 온도는 T_m 을 의미할 수 있다. 메틸화 되지 않은 유전자 및 PNA 프로브, 메틸화 분석용 표적 유전자 및 PNA 프로브 사이의 ΔT_m 을 측정함으로써 유전자의 메틸화 여부를 확인할 수 있다.
- [90] 본 발명은 상기의 메틸화 유전자 검출용 PNA 프로브를 이용하여 유전자 메틸화 여부를 검출하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 메틸화 되지 않은 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는, 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브 및 메틸화 되지 않은 유전자를 포함하는 제1혼합물을 제조하는 단계; 상기 염기서열과 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 분석용 표적 유전자 및 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 제2혼합물을 제조하는 단계; 상기 제1혼합물 및 제2혼합물의 온도를 변화시키는 단계; 및 상기 온도 변화에 따른 T_m (melting temperature)을 측정하여 용해곡선을 분석하는 단계;를 포함하는 메틸화 유전자 검출방법을 제공한다.

[91] [화학식 1]



[93] 상기 화학식 1에서, R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는

히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 n 은 바람직하게는 8 내지 24인 정수일 수 있고, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.

- [94] 상기 화학식 1의 소수성 치환기는 서로 독립적으로 C_3-C_{30} 의 알킬기, C_3-C_{30} 의 알케닐기, C_3-C_{30} 의 알키닐기, C_6-C_{30} 의 아릴기, C_3-C_{30} 의 헤테로아릴기, 소수기를 포함하는 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 소수성 치환기의 수소 중 어느 하나 이상은 할로겐 원소로 대체될 수 있으며, 상기 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기의 탄소 중 어느 하나 이상은 O 또는 S로 대체될 수 있으며, 상기 헤테로아릴기는 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [95] 구체적으로 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_3-C_{30} 의 알킬기, C_3-C_{30} 의 알케닐기, C_3-C_{30} 의 알키닐기, C_6-C_{18} 의 아릴기 및 C_4-C_{15} 의 헤테로아릴기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 헤테로아릴기는 N을 포함하는 것이 바람직할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 보다 구체적으로 상기 화학식 1의 R_1 의 소수성 치환기는 C_6-C_{20} 의 알킬기, C_6-C_{20} 의 알케닐기 및 C_6-C_{20} 의 알키닐기로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, C_8-C_{18} 의 알킬기인, C_8-C_{18} 의 알케닐기 또는 C_8-C_{18} 의 알키닐기에서 선택되는 것이 바람직할 수 있으나, PNA 골격에 결합하여 메틸기와 소수성 상호작용을 일으킬 수 있는 소수성 치환기라면 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [97] 상기 소수기를 포함하는 아미노산은 서로 독립적으로 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 글리신(Gly), 트레오닌(Thr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는 이소류신(Ile), 발린(Val), 류신(Leu), 페닐알라닌(Phe) 및 시스테인(Cys)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [98] 상기 아미노산의 곁사슬(side chain)에 결합된 소수기와 메틸화 유전자에 결합된 메틸기 사이의 소수성 상호작용은 비메틸화 유전자와 대비하여 분자 간 더 강한 결합력을 나타낼 수 있다.
- [99] 상기 온도 변화는 30 °C 내지 95 °C 일 수 있고, 바람직하게는 40 °C 내지 90 °C일 수 있다.
- [100] 표적 유전자의 메틸화된 시토신과 PNA 프로브 사이의 강한 분자 간의 인력 형성으로 인하여 겹 가닥의 용해는 상대적으로 높은 온도에서 이루어질 수 있다. 구체적으로, 비메틸화된 시토신을 가진 유전자와 Epi-sPNA의 결합은 기본적인 수소 결합으로만 이루어지는 반면, 메틸화된 시토신이 포함된 유전자와 Epi-sPNA는 기본 수소 결합에 추가적으로 소수성 상호작용이 더해져 두 경우의

융해(Denaturation) 온도의 차이는 3°C 이상 나게 된다. 따라서 $\Delta T_m \geq 3^\circ\text{C}$ 으로 나타나는 경우 유전자가 메틸화된 것으로 판단할 수 있다. 바람직하게는 5°C 이상, 보다 바람직하게는 10°C 이상 차이가 날 수 있고, 메틸화된 시토신을 포함하는 경우가 결합력이 더 큰 것에 기인하여 융해 온도가 더 높게 나타난다. 다만, 이러한 온도 차이는 메틸화된 시토신의 개수에 따라 달라질 수 있어, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

- [101] 본 발명에 있어서, 상기 융해곡선 분석은 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis: 형광융해곡선 분석) 방법으로 수행되는 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [102] 상기 형광융해곡선 분석은 형광물질을 사용하여 융해곡선을 분석하는 것으로서, 상기 각 혼합물은 형광 표지물질을 더 포함하는 것일 수 있다. 표적 유전자, 메틸화 되지 않은 유전자 또는 Epi-sPNA가 형광 표지물질을 포함할 수 있고, 바람직하게는 Epi-sPNA가 형광 표지물질을 포함하는 것일 수 있다. 형광 표지물질은 리포터 및 소광자에서 선택되는 어느 하나 또는 둘의 조합일 수 있으며, 이 외에 인터칼레이팅 형광물질일 수 있다.
- [103] 본 발명에서 리포터는 특정 파장의 빛을 흡수, 방출하여 형광을 발하는 물질로서, 프로브에 표지하여 표적 핵산과 프로브 사이의 혼성화가 이루어졌는지 여부를 확인할 수 있는 물질이며, 소광자는 리포터 물질이 발생시킨 빛을 흡수하여 형광 세기를 감소시키는 물질을 의미한다.
- [104] 상기 인터칼레이팅 형광 물질은 아크리딘 호모다이어머(Acridine homodimer) 및 이의 유도체, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange) 및 이의 유도체, 7-아미노액티노마이신 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 및 이의 유도체, 액티노마이신 D(Actinomycin D) 및 이의 유도체, 에이씨엠에이(ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) 및 이의 유도체, 디에이피아이(DAPI) 및 이의 유도체, 디하이드로에티듐(Dihydroethidium) 및 이의 유도체, 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이어머-1(EthD-1) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이어머-2(EthD-2) 및 이의 유도체, 에티듐 모노아자이드(Ethidium monoazide) 및 이의 유도체, 헥시디움 아이오다이드(Hexidium iodide) 및 이의 유도체, 비스벤지마이드(bisbenzimidazole, Hoechst 33258) 및 이의 유도체, 호에크스트 33342(Hoechst 33342) 및 이의 유도체, 호에크스트 34580(Hoechst 34580) 및 이의 유도체, 하이드록시스티바미딘(hydroxystilbamidine) 및 이의 유도체, 엘디에스 751(LDS 751) 및 이의 유도체, 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide, PI) 및 이의 유도체, 사이다이스(Cy-dyes) 유도체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [105] 구체적으로 Epi-sPNA는 리포터(reporter) 및 소광자(quencher)를 포함할 수 있다. Epi-sPNA는 리포터 및 소광자를 포함함으로써 유전자와 상보적 결합을 이루어 혼성화된 후, 형광 신호가 발생될 수 있고, 상기 혼성화된 혼합물의 온도가 올라감에 따라 융해 온도에서 Epi-sPNA가 유전자와의 상보적 결합이 해리된

경우 형광 신호가 소광된다. 이러한 온도 변화에 따른 형광 신호 및 소광 신호로부터 얻어진 용해 곡선 분석을 통하여 유전자의 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

- [106] 상기 각 혼합물은 유전자 증폭기를 통하여 30 °C 내지 95 °C, 바람직하게는 40 °C에서 90 °C까지 0.1 °C/s 내지 20 °C/s 의 속도로, 바람직하게는 0.2 °C/s 내지 15 °C/s의 속도로, 보다 바람직하게는 0.5 °C/s 내지 10 °C/s 의 속도로 온도를 변화시킬 수 있다. 어느 일정한 온도에 이르면 PNA/DNA 겹 가닥은 상보적 결합이 해리되어 분리되는데, 이 때의 온도가 용해 온도(T_m)이며, 형광 신호의 소멸을 통하여 용해 온도를 확인할 수 있다.
- [107] 상기 용해 곡선을 분석하는 단계는 ΔT_m 을 측정하여 $\Delta T_m \geq 3^\circ\text{C}$ 으로 나타나는 경우 유전자가 메틸화된 것으로 판단하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게는 $\Delta T_m \geq 5^\circ\text{C}$, 보다 바람직하게는 $\Delta T_m \geq 10^\circ\text{C}$ 일 수 있고, 상기 $\Delta T_m = T_m(\text{메틸화 분석용 표적 유전자}) - T_m(\text{메틸화 분석용 표적 유전자와 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 되지 않은 유전자})$ 이고, 메틸화된 시토신과 Epi-sPNA 사이의 결합력이 비메틸화된 시토신과 Epi-sPNA 사이의 결합력보다 강하므로 용해 온도는 메틸화된 시토신과 Epi-sPNA의 결합의 경우 더 높게 나타난다.
- [108] 본 발명에 따른 유전자 메틸화 검출방법은 상기 온도 변화에 따른 T_m 을 측정하여 용해곡선을 분석하는 단계를 통해 유전자의 증폭없이 상기 각 혼합물의 온도 변화에 따른 T_m 측정만으로 간편하게 메틸화 검출이 가능하다.
- [109] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 메틸화 유전자 검출방법은 메틸화 되지 않은 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는, 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브 및 메틸화 되지 않은 유전자를 포함하는 제1혼합물을 제조하는 단계; 상기 염기서열과 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 분석용 표적 유전자 및 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 제2혼합물을 제조하는 단계; 상기 제1혼합물 및 제2혼합물에 대하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하는 단계; 및 상기 PCR의 $\Delta Ct(\text{cycle threshold})$ 값을 측정하는 단계;를 포함할 수 있다. 이때, $\Delta Ct = Ct(\text{표적 유전자}) - Ct(\text{표적 유전자와 동일한 염기서열을 포함하는 메틸화 되지 않은 유전자})$ 를 의미한다.
- [110] PCR(Polymerase Chain Reaction: 중합효소 연쇄 반응)에 따라 얻어진 유전자의 증폭산물은 상기 인터칼레이팅 형광 물질에 의하여 측정이 가능하다. 특히, 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real Time PCR: RT-PCR)의 경우 전체 반응을 관찰하기 위하여 형광 염료를 사용하게 되는데, 형광 염료는 증폭의 매 주기마다 증폭 산물이 축적됨에 따라 비례하여 증가한다. 증폭의 초기의 경우 형광의 증가가 감지되지 않지만 일정 횟수 이상의 증폭이 진행되면서 축적된 형광량이 기기에 감지되어 최저 감지 가능 수준(background level)을 넘어서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 증폭 주기 수를 $Ct(\text{cycle threshold})$ 로 본다.
- [111] 본 발명은 구체적으로 PCR을 통하여 유전자를 증폭시키는 것일 수 있다. 메틸화된 유전자와 혼성화된 Epi-sPNA 프로브는 비메틸화된 유전자와 혼성화된

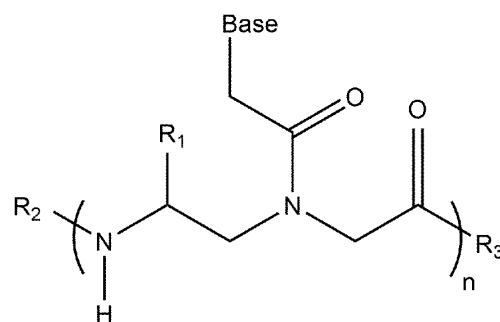
경우보다 수소 결합 및 소수성 상호작용으로 인한 분자 간 인력이 크게 작용하여 더 강하게 결합한다. 이로 인해 유전자의 증폭이 저해되므로 Ct값이 높게 나타난다. 즉, 표적 유전자의 Ct값에서 컨트롤 시료의 동일 유전자의 Ct값을 빼어 얻어진 ΔCt 값을 확인함으로써 메틸화 여부를 확인할 수 있다.

[112] 본 발명의 유전자 메틸화 검출방법에 의할 때, $\Delta Ct > 0.5$ 이거나, 바람직하게는 $\Delta Ct > 1$ 일 수 있다.

[113] 본 발명은 메틸화가 일어날 수 있는 유전자의 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는 하기 화학식 1로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는, 본 발명의 유전자의 메틸화 검출 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[114] [화학식 1]

[115]



[116] 상기 화학식 1에서, R_1 은 소수성 치환기, R_2 는 수소 또는 소수성 치환기, R_3 는 히드록시기 또는 소수성 치환기이며, Base는 아데닌, 티민, 구아닌, 시토신 및 우라실을 포함하는 천연 핵산염기 또는 비천연 핵산염기에서 선택되는 어느 하나의 염기이고, n 은 5 내지 30인 정수이며, 상기 PNA 프로브에 포함되는 각각의 구조단위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 상기 n 은 바람직하게는 8 내지 24인 정수일 수 있고, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.

[117] 본 발명은 상기 PNA 프로브를 생물학적 시료와 혼합하여 상기 생물학적 시료에 포함된 표적 유전자와 PNA 프로브를 혼성화 시키는 단계; 비메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 T_m 보다 높고, 메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 T_m 보다 낮은 온도로 열을 가하는 단계; 및 상기 온도에서 용해된 비메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체를 제거하는 단계;를 포함하고, 상기 메틸화된 유전자 및 PNA 프로브 혼성체의 이미징화된 형광 신호를 통하여 유전자 메틸화를 검출하는 방법을 제공한다.

[118] 상기 PNA 프로브와 메틸화된 유전자 또는 메틸화 되지 않은 유전자와의 결합 온도 차이를 이용하는 것으로서, 형광물질을 포함하는 PNA 프로브와 검출하고자 하는 유전자를 포함하는 조직, 세포에 해당하는 생물학적 시료를 *in-vitro*에서 결합시킬 수 있다. 결합 온도가 높은 메틸화된 유전자 및 PNA 프로브는 결합이 유지되고, 결합 온도가 낮은 메틸화 되지 않은 유전자 및 PNA 프로브의 결합이 분해될 수 있는 특정 온도에서 형광 신호를 검출하여 해당 생물학적 시료의 표적 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있다.

- [119] 이하 하기의 실시 예를 통하여 본 발명에 대해 설명하고자 한다. 다만, 하기의 실시 예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 하기의 실시 예로 한정하는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [120] <실시예 1> Epi-sPNA 프로브와 비메틸화 또는 메틸화된 표적 DNA의 결합온도 분석
- [121] 서열번호 2의 Epi-sPNA 프로브(시선바이오테크놀로지, 한국) 0.1 μ M, 서열번호 3의 비메틸화된 DNA 올리고머(Integrated DNA technologies, 미국) 0.1 μ M, 서열번호 4의 메틸화된 DNA 올리고머(Integrated DNA technologies, 미국) 0.1 μ M 및 2XPCR 증폭용액(시선바이오테크놀로지, 한국) 10 μ l와 7 μ l 증류수를 넣고 혼합하였다. 이후, 실시간 유전자 증폭기(Real-time PCR machine, CFX96TM Real-time PCR System, 바이오라드, 미국)를 이용하여 95 °C에서 5분 동안 반응시키고, 40 °C까지 낮춘 다음, 40 °C부터 90 °C까지 2 °C/s의 속도로 1 °C씩 온도를 상승시키며 유전자의 증폭 과정 없이, 510 nm의 형광파장을 측정하여 융해곡선 분석을 수행하였다. 상기 실험에 사용된 서열은 하기 표 1과 같다.
- [122] <비교예 1> 일반 PNA 프로브와 결합된 비메틸화 또는 메틸화된 표적 DNA의 결합온도 분석.
- [123] Epi-sPNA 프로브 대신 서열번호 1의 일반 PNA 프로브를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 진행되었다.
- [124] [표1]

서열번호	서열이름	서열(N'→C')	구분
1	PNA_1	Dabcyl-ACCCC GC GATCA-O-K(FAM)	일반 PNA
2	Epi-sPNA	Dabcyl-ACCCC G''C G''ATCA-O-K(FAM)	MS PNA
3	DNA_UC	CCAGCTGCGCGTTGACCGCGGGGTCCGACATGATGGCTGG	비메틸화 표적 DNA
4	DNA_MC	CCAGCTG <u>C</u> G <u>C</u> GTTGAC <u>C</u> G <u>C</u> GGGGTC <u>C</u> GACATGATGGCTGG	메틸화 표적 DNA
G'': 소수성 치환기로 변형된 구아닌 염기 <u>C</u> : 메틸화된 시토신 염기 O: 링커 G: 메틸화된 시토신 염기의 상보적인 염기 K: 라이신			

- [125] 도 1의 A)는 비교예 1, 도 1의 B)는 실시예 1에 대한 결과를 그래프로 나타낸 것으로서, 비교예 1의 경우 ΔT_m 은 1 °C, Epi-sPNA 프로브를 사용한 실시예 1의 경우 ΔT_m 은 13 °C로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 소수성 치환기가 결합된 변형된 Epi-sPNA의 경우 메틸화된 DNA와의 결합력이 변형되지 않은 PNA와 대비하여, 훨씬 더 강하게 작용함으로써 메틸화 검출에서의 민감도 및 특이도를

탁월하게 높일 수 있음을 확인할 수 있다.

[126] <실시예 2> Epi-sPNA 프로브와 결합된 비메틸화 또는 메틸화된 표적 DNA의 ΔC_t 분석

[127] Genomic DNA 45 ng, 서열번호 5 및 6의 DNA 프라이머 0.1 μ M, 서열번호 2의 Epi-sPNA 프로브 0.1 μ M 및 1XPCR 증폭용액(시선바이오테크놀로지, 한국) 10 μ l를 이용하여 PCR 증폭을 진행하였다. PCR 증폭 조건은 다음과 같다. 실시간 유전자 증폭기(Real-time PCR machine, CFX96™ Real-time PCR System, 바이오라드, 미국)를 이용하여 95 °C에서 5분 처리 후, 95 °C에서 30초, 58 °C에서 30초, 72 °C에서 30초로 총 25회 실시한 다음, 72 °C에서 5분 동안 반응시켰다.

[128] 비메틸화 표적 DNA는 Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA(Cat# D5014-01, Zymo Research, 미국)를 사용하고, 메틸화된 DNA는 Human HCT116 DKO Methylated DNA(Cat# D5014-02, Zymo Research, 미국)를 사용하였다.

[129] <비교예 2> SYBR green intercalating dye를 이용한 비메틸화 또는 메틸화된 표적 DNA의 ΔC_t 분석

[130] 실시예 2와 동일한 조건의 DNA와 프라이머를 사용하였으며, Epi-sPNA 대신 SYBR green dye(1X)를 intercalating dye로 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건 역시 실시예 2와 동일하게 진행되었다.

[131] [표2]

서열번호	서열이름	서열(N' -> C')	구분
5	Sep_F	GCCGCAGCAGCCAGCCA	정방향 프라이머
6	SepR_C2	ACCAGCCATCATGTCGGAC C	역방향 프라이머

[132] 도 2의 A)는 Epi-sPNA 프로브를 이용한 DNA 메틸화 검출 PCR의 증폭 곡선 결과 그래프이며, ΔC_t 는 3의 값을 나타내었다. 도 2의 B)는 intercalating dye를 이용한 PCR을 수행한 증폭 곡선 결과 그래프이며, 표적 DNA 농도에 따른 ΔC_t 를 normalization한 결과 ΔC_t 값은 0을 나타내었다.

[133] 이러한 결과는 Epi-sPNA 프로브를 사용한 경우 메틸화된 시토신과의 강한 상호작용으로 비메틸화된 유전자에 비해 증폭이 억제됨으로써 나타난 것이며, ΔC_t 의 측정으로 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.