

## 명세서

### 발명의 명칭: 간암 발병의 위험성 예측용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 출원은 간암 발병의 위험성 예측용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 사람 몸에 존재하는 수많은 세포들은 동일한 DNA 염기서열을 보유하고 있지만, 각 세포들의 형태와 기능은 매우 다양하게 존재한다. 이는 각 세포마다 특정 유전자의 발현되고, 이에 따른 서로 다른 분화 과정을 거쳐 각 세포 독립적인 표현형을 보유하게 된다. 각 세포마다 차이가 있는 유전자 발현은 DNA 메틸화, 히스톤 변형 (histone modification), 조직 특이적 전사 인자 등 다양한 요인들이 관여한다.
- [3] 액체 생검은 비침습 또는 최소한의 침습을 통해 시료를 확보하여 검사하는 방법으로, 기존에 활용되고 있는 조직 생검보다 검사 대상자에게 부여되는 부담감이 적고 빈번한 검사를 통해 지속적인 관찰 (monitoring)을 가능하게 하고, 영상의학적 방법의 부작용인 방사선 노출 위험이 없는 방법이다.
- [4] 암 환자의 생존율은 진단 시점의 병기에 따라 유의미한 차이를 보이며, 암의 조기 발견 기반의 치료는 환자의 높은 생존율을 보장할 수 있다. 간암의 경우 현재 전세계적으로 증가하는 발병률을 보이고 있으며, 대부분의 환자가 암의 병기 수가 후기에 진단되는 경우가 대다수이다. 따라서 간암을 조기에 진단하기 위한 방법의 개발은 사회적 및 경제적인 이익을 초래할 수 있는 기술로 생각되고 있다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [5] 본 출원의 일 예는 간암 특이적인 바이오 마커를 이용하여 간암 발병의 위험성을 예측하고, 상기 마커를 혈액 유래 cell-free DNA (cfDNA)에서 검출할 수 있는, 간암 발병의 위험성 예측용 조성물 또는 간암 발병의 위험성 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하기 위한 것이다.

##### 과제 해결 수단

- [6] 본 출원의 일 예는 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역, 또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 CpG 사이트 중 적어도 하나의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [7] 본 출원의 또 다른 일 예는 대상체에서 분리된 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역, 또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 CpG 사이트 중 적어도 하나의 메틸화 수준을 측정하는 단

계를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측을 위한 정보 제공 방법, 또는 간암 발병의 위험성 예측 방법에 관한 것이다.

- [8]
- [9]       이하, 본 출원을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [10]       본 명세서에서 용어 “메틸화”는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착된 것을 의미한다. 예를 들어, 메틸화는 특정 유전자 또는 핵산의 특정 CpG 사이트의 사이토신에 일어난 것일 수 있다.
- [11]       본 명세서에서 용어 “메틸화 여부” 또는 “메틸화 상태”는 특정 유전자 또는 핵산의 특정 CpG 사이트의 사이토신에 일어난 메틸화 여부를 의미한다. 구체적으로, 염기서열 내에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드의 5-메틸-시토신의 존재 또는 비존재를 의미한다. 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 서열, 서열번호 2로 표시되는 서열, 또는 서열번호 3으로 표시되는 서열에 포함된 하나 이상의 CpG 부위의 사이토신에 일어난 메틸화 여부일 수 있다.
- [12]       본 명세서에서 용어 “메틸화 수준” 또는 “메틸화 정도”는 서열번호 1로 표시되는 서열, 서열번호 2로 표시되는 서열, 또는 서열번호 3으로 표시되는 서열 내의 염기서열에 존재하는 메틸화의 양을 의미한다.
- [13]       본 명세서에서 용어 “CpG 부위” 또는 “CpG 서열”은 특정 유전자 또는 핵산의 염기서열 상에 존재하는 CpG 부위를 의미한다. 상기 유전자는 발현하는데 필요하며 서로 작동 가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예컨대, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 CpG 부위일 수 있다.
- [14]       본 명세서에서 용어 “핵산”은 중합체 형태의 뉴클레오타이드로서, 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드를 나타내며, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 올리고머, 올리고, 코딩 서열 등의 의미를 포함한다. 상기 핵산은 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 비천연 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 갖는 중합체를 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다.
- [15]       본 명세서에서 구성요소를 “포함”한다고 기재할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

- [16] 본 명세서에서 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 기재된다.
- [17] 본 명세서에서 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다.
- [18] 본 출원의 일 예는 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역, 또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [19] 구체적으로, 본 출원의 일 예에 따른 조성물은, 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하고, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제; 및/또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 본원 실시예에 의하면, 상기 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준과, 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준 및/또는 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 모두 측정한 결과, tumor coverage가 더욱 향상되어, 간암 위험성 예측의 정확성이 높아졌다.
- [20] 상기 조성물은 상기 생물학적 시료에서 알파태아단백질 (Alpha Fetoprotein; AFP)의 농도를 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [21] 상기 서열 영역은 세포 유리 DNA (cell free DNA; cfDNA)에 포함된 것일 수 있다.
- [22] 본 출원의 일 예에 따른 “바이오 마커” 또는 “마커”는, 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역, 또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하는 핵산의 총칭이다.
- [23] 상기 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810280번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810450 내지 21810451번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810458 내지 21810459번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810489 내지 21810490번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810600 내지 21810601번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810750 내지 21810751번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 21810759 내지 21810760번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 및 21810791 내지 21810792번째 서열에 위치한 CpG 사이트로 이루어지는 군에서 선택된 하

나 이상일 수 있으며, 일 예로 인간 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것일 수 있다. 상기 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역은 서열번호 1로 표시되는 서열을 가지는 것일 수 있다. 본 명세서에서 상기 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하는 핵산을 “마커 1”, 또는 “marker 1”으로 명명하였다. 상기 핵산은 상기 서열 영역의 연속적인 일부 서열을 가지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역은, 구체적으로 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810760번째 서열 영역, 21810279 내지 21810751번째 서열 영역, 21810450 내지 21810792번째 서열 영역, 21810450 내지 21810760번째 서열 영역, 21810450 내지 21810751번째 서열 영역, 21810458 내지 21810792번째 서열 영역, 21810458 내지 21810760번째 서열 영역, 21810458 내지 21810751번째 서열 영역, 21810489 내지 21810792번째 서열 영역, 21810489 내지 21810760번째 서열 영역, 21810489 내지 21810751번째 서열 영역, 21810600 내지 21810792번째 서열 영역, 21810600 내지 21810760번째 서열 영역, 21810600 내지 21810751번째 서열 영역, 21810750 내지 21810792번째 서열 영역, 21810750 내지 21810760번째 서열 영역, 또는 21810750 내지 21810751번째 서열 영역일 수 있다.

- [24] 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 17번 염색체의 29298115 내지 29298116번째, 29298118 내지 29298119번째, 29298124 내지 29298125번째, 29298136 내지 29298137번째, 29298142 내지 29298143번째, 또는 29298184 내지 29298185번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것일 수 있다. 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역은 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있다. 본 명세서에서 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하는 핵산을 “마커 2”, 또는 “marker 2”로 명명하였다. 상기 핵산은 상기 서열 영역의 연속적인 일부 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [25] 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것일 수 있다. 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역은 서열번호 3으로 표시되는 것일 수 있다. 본 명세서에서 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하는 핵산을 “마커 3”, 또는 “marker 3”으로 명명하였다. 상기 핵산은 상기 서열 영역의 연속적인 일부 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [26] 본 출원의 일 예에서 “타겟 메틸화 부위”는, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 메틸화 여부를 확인하고자 하는 관심 부위이며, 적어도 1개 이상의 CpG 서열을 포함할 수 있다. 상기 타겟 메틸화 부위의 크기는 5 내지 150 bp, 5 내지 140

bp, 5 내지 130 bp, 5 내지 120 bp, 5 내지 110 bp, 5 내지 100 bp, 5 내지 90 bp, 5 내지 80 bp, 5 내지 70 bp, 5 내지 60 bp, 5 내지 50 bp, 5 내지 40 bp, 5 내지 30 bp, 5 내지 20 bp, 5 내지 15 bp, 5 내지 10 bp, 10 내지 150 bp, 10 내지 140 bp, 10 내지 130 bp, 10 내지 120 bp, 10 내지 110 bp, 10 내지 100 bp, 10 내지 90 bp, 10 내지 80 bp, 10 내지 70 bp, 10 내지 60 bp, 10 내지 50 bp, 10 내지 40 bp, 10 내지 30 bp, 10 내지 20 bp, 10 내지 15 bp, 20 내지 150 bp, 20 내지 140 bp, 20 내지 130 bp, 20 내지 120 bp, 20 내지 110 bp, 20 내지 100 bp, 20 내지 90 bp, 20 내지 80 bp, 20 내지 70 bp, 20 내지 60 bp, 20 내지 50 bp, 20 내지 40 bp, 20 내지 30 bp, 20 내지 25 bp, 30 내지 150 bp, 30 내지 140 bp, 30 내지 130 bp, 30 내지 120 bp, 30 내지 110 bp, 30 내지 100 bp, 30 내지 90 bp, 30 내지 80 bp, 30 내지 70 bp, 30 내지 60 bp, 30 내지 50 bp, 30 내지 40 bp, 30 내지 35 bp, 40 내지 150 bp, 40 내지 140 bp, 40 내지 130 bp, 40 내지 120 bp, 40 내지 110 bp, 40 내지 100 bp, 40 내지 90 bp, 40 내지 80 bp, 40 내지 70 bp, 40 내지 60 bp, 40 내지 50 bp, 40 내지 45 bp, 50 내지 150 bp, 50 내지 140 bp, 50 내지 130 bp, 50 내지 120 bp, 50 내지 110 bp, 50 내지 100 bp, 50 내지 90 bp, 50 내지 80 bp, 50 내지 70 bp, 50 내지 60 bp, 50 내지 55 bp, 60 내지 150 bp, 60 내지 140 bp, 60 내지 130 bp, 60 내지 120 bp, 60 내지 110 bp, 60 내지 100 bp, 60 내지 90 bp, 60 내지 80 bp, 60 내지 70 bp, 또는 60 내지 65 bp 일 수 있다.

[27] 상기 타겟 메틸화 부위는 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커에 존재하는 CpG 사이트 중 일부 또는 전부를 포함할 수 있으며, 일 예로 인간 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 서열, 인간 17번 염색체의 29298115 내지 29298116번째, 29298118 내지 29298119번째, 29298124 내지 29298125번째, 29298136 내지 29298137번째, 29298142 내지 29298143번째, 또는 29298184 내지 29298185번째 서열, 또는 인간 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것일 수 있다.

[28] 본 명세서에 사용된 용어, “간암 발병의 위험성에 대한 메틸화 마커”는 간암의 위험성을 가지지 않는 대상에서 유래한 샘플에서 분리한 DNA의 메틸화 수준과 비교하여, 간암의 위험성을 가지는 대상에서 유래한 샘플에서 분리한 DNA에서만 특이적인 메틸화 수준을 가지는 메틸화 마커를 의미한다. 예를 들어, 상기 간암 발병의 위험성에 대한 메틸화 마커는, 간암의 위험성을 가지지 않는 대상에서 유래한 샘플에서 분리한 DNA의 메틸화 수준과 비교하여, 간암의 위험성을 가지는 대상에서 유래한 샘플에서 분리한 DNA에서만 메틸화 수준이 높은 마커일 수 있다.

[29] 상기 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 서열은 간암 발병의 위험성에 대한 메틸화 마커일 수 있다. 구체적으로, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 간암 마커에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 간암 유래 샘플에서는 메틸화 수준이 높고, 정상 간을 포함한 그 외 유래 샘플에서는 메틸화 수준이 낮은 것일 수 있다.

- [30] 예를 들어, 상기 생물학적 시료에서 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 메틸화된 비율이 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 또는 30% 이상인 경우, 상기 생물학적 시료가 유래한 대상은 간암 발병의 위험성을 가지는 것으로 판별할 수 있다. 상기 메틸화된 비율은 구체적으로 b-value 값으로 표시되는 것일 수 있다.
- [31] 상기 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 타겟 메틸화 부위를 증폭하기 위한 프라이머인 것일 수 있다.
- [32] 상기 프라이머는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 정방향 프라이머 및 상기 역방향 프라이머 중 1종은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 포함할 수 있다.
- [33] 상기 메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하고, 상기 비메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하며, 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열의 TpG 서열은, 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열의 비메틸화된 CpG 서열이 변환된 것이다. 상기 소정 길이는 예를 들어 5,000 bp 이하, 4,500 bp 이하, 4,000 bp 이하, 3,500 bp 이하, 3,000 bp 이하, 2,500 bp 이하, 2,000 bp 이하, 1,500 bp 이하, 1,400 bp 이하, 1,300 bp 이하, 1,300 bp 미만, 1,200 bp 이하, 1,100 bp 이하, 1,000 bp 이하, 900 bp 이하, 800 bp 이하, 700 bp 이하, 650 bp 이하, 620 bp 이하, 611 bp 이하, 610 bp 이하, 600 bp 이하, 550 bp 이하, 500 bp 이하, 450 bp 이하, 400 bp 이하, 350 bp 이하, 330 bp 이하, 329 bp 이하, 300 bp 이하, 250 bp 이하, 200 bp 이하, 150 bp 이하, 100 bp 이하, 또는 500 bp 이하일 수 있다. 이 때, 상기 소정 길이의 하한값이 특정되지 않아도, 타겟 메틸화 부위의 메틸화 수준을 측정하기 위해 통상의 기술자가 상기 소정 길이를 명확하게 설정할 수 있을 것이나, 예를 들어 2 bp 이상, 5 bp 이상, 10 bp 이상, 20 bp 이상, 30 bp 이상, 40 bp 이상, 또는 50 bp 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [34] 상기 TpG 서열은 메틸화된 CpG 서열과 비메틸화된 CpG 서열을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 비메틸화된 CpG 서열로부터 변환된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 변형시키는 제제는 비메틸화 사이토신 잔기를 티민으로 변환하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 변형시키는 제제는 아황산, 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 및 다이설파이트로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [35] 메틸화된 CpG 서열과 비메틸화된 CpG 서열을 서로 다르게 변형시키는 제제를 주형 가닥, 예를 들어 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 서열에 처리하면, 주형 가닥의 CpG 사이토신이 메틸화된 상태라면 CpG 사이토신이 티민으로 전환되지 않고, CpG 사이토신이 비메틸화된 상태라면 CpG 사이토신이 티민으로 전환될 것이다.

- [36] 상기 메틸화 프라이머의 CpG 인식 부위는, 메틸화된 핵산의 CpG 서열을 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 CpG 인식 부위는 CG 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [37] 상기 비메틸화 프라이머의 TpG 인식 부위는, 비메틸화된 핵산의 CpG 서열이, 메틸화된 핵산과 비메틸화된 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 TpG 서열을 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 TpG 인식 부위는 TG 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [38] 상기 CpG 인식 부위 및 상기 TpG 인식 부위는, 각각 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 3' 말단 부근에 위치하여, 메틸화된 핵산과 비메틸화된 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 메틸화된 핵산 및 비메틸화된 핵산을 각각 특이적으로 인식할 수 있다. 예를 들어, 상기 CpG 인식 부위 및 상기 TpG 인식 부위는, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 3' 말단으로부터 40개, 35개, 30개, 25개, 20개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 또는 2개 염기 이내에, 또는 3' 말단에 위치하는 것일 수 있다.
- [39] 상기 비메틸화 프라이머는 상기 메틸화 프라이머에 비해 낮은 Tm값을 가지기 때문에, 이를 보완하기 위해 비메틸화 프라이머의 5' 말단에 뉴클레오타이드를 추가하여, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머의 Tm을 유사하게 설계할 수 있다. 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머는 5' 말단에 뉴클레오타이드를 추가로 포함하여, 상기 메틸화 프라이머보다 큰 크기를 가지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머는 상기 메틸화 프라이머와 비교하여 5' 말단에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 또는 1개의 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머의 Tm 차이는 15°C 이하, 14°C 이하, 13°C 이하, 12°C 이하, 11°C 이하, 10°C 이하, 9°C 이하, 8°C 이하, 7°C 이하, 6°C 이하, 5°C 이하, 4°C 이하, 3°C 이하, 2°C 이하, 또는 1.5°C 이하인 것일 수 있다.
- [40] 상기 프라이머는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머가 정방향 프라이머일 경우, 반대 방향 프라이머는 역방향 프라이머이며, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머가 역방향 프라이머일 경우, 반대 방향 프라이머는 정방향 프라이머이다. 상기 반대 방향 프라이머는 메틸화 핵산 및 비메틸화 핵산에 모두 결합할 수 있다. 이에, 상기 반대 방향의 프라이머는 CpG 결합부위를 포함하지 않는 것일 수 있으나, 핵산의 구조상 반대 방향 프라이머에 CpG 결합부위가 포함되는 것이 불가피할 경우, 5' 말단 부위에 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 일 예로 1개의 CpG 결합부위를 포함할 수 있다. 다만, 이 때에도 상기 반대 방향 프라이머는, 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머와 유사한 Tm을 가지도록 설계하는 것이 바람직하다.
- [41] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머는 15 내지 40개, 15 내지 35개, 15 내지 30개, 15 내지 25개, 18 내지 40개, 18 내지 35

- 개, 18 내지 30개, 18 내지 25개, 20 내지 40개, 20 내지 35개, 20 내지 30개, 또는 20 내지 25개 염기를 포함하는 크기일 수 있다.
- [42] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머는 Non-CpG 사이토신을 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 이상 포함하여, 메틸화된 핵산과 비메틸화된 핵산을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 핵산에 결합 가능한 것일 수 있다.
- [43] 상기 메틸화 프라이머, 상기 비메틸화 프라이머, 및 상기 반대 방향 프라이머의 T<sub>m</sub>은 50 내지 80°C, 50 내지 75°C, 50 내지 70°C, 50 내지 65°C, 55 내지 80°C, 55 내지 75°C, 55 내지 70°C, 55 내지 65°C, 60 내지 80°C, 60 내지 75°C, 60 내지 70°C, 또는 60 내지 65°C 일 수 있다.
- [44] 본 출원의 일 예에 따른 조성물은, 상기 메틸화 프라이머 및 상기 비메틸화 프라이머를 100:1 내지 1:100, 100:1 내지 1:50, 100:1 내지 1:20, 100:1 내지 1:10, 100:1 내지 1:5, 100:1 내지 1:1, 100:1 내지 1:1 미만, 100:1 내지 1.3:1, 100:1 내지 1.5:1, 100:1 내지 2:1, 100:1 내지 2.5:1, 100:1 내지 3:1, 100:1 내지 3.5:1, 100:1 내지 4:1, 50:1 내지 1:100, 50:1 내지 1:50, 50:1 내지 1:20, 50:1 내지 1:10, 50:1 내지 1:5, 50:1 내지 1:1, 50:1 내지 1:1 미만, 50:1 내지 1.3:1, 50:1 내지 1.5:1, 50:1 내지 2:1, 50:1 내지 2.5:1, 50:1 내지 3:1, 50:1 내지 3.5:1, 50:1 내지 4:1, 10:1 내지 1:100, 10:1 내지 1:50, 10:1 내지 1:20, 10:1 내지 1:10, 10:1 내지 1:5, 10:1 내지 1:1, 10:1 내지 1:1 미만, 10:1 내지 1.3:1, 10:1 내지 1.5:1, 10:1 내지 2:1, 10:1 내지 2.5:1, 10:1 내지 3:1, 10:1 내지 3.5:1, 10:1 내지 4:1, 5:1 내지 1:100, 5:1 내지 1:50, 5:1 내지 1:20, 5:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 5:1 내지 1:1, 5:1 내지 1:1 미만, 5:1 내지 1.3:1, 5:1 내지 1.5:1, 5:1 내지 2:1, 5:1 내지 2.5:1, 5:1 내지 3:1, 5:1 내지 3.5:1, 5:1 내지 4:1, 4.5:1 내지 1:100, 4.5:1 내지 1:50, 4.5:1 내지 1:20, 4.5:1 내지 1:10, 4.5:1 내지 1:5, 4.5:1 내지 1:1, 4.5:1 내지 1:1 미만, 4.5:1 내지 1.3:1, 4.5:1 내지 1.5:1, 4.5:1 내지 2:1, 4.5:1 내지 2.5:1, 4.5:1 내지 3:1, 4.5:1 내지 3.5:1, 또는 4.5:1 내지 4:1의 농도비로 포함하는 것일 수 있다.
- [45] 예를 들어, 상기 비메틸화 프라이머의 농도는, 상기 메틸화 프라이머 농도의 100% 이하, 100% 미만, 99.99% 이하, 99.95% 이하, 99.9% 이하, 99.5% 이하, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 25% 이하인 것일 수 있으며, 일 예로 50% 이하인 것일 수 있다.
- [46] 본 출원의 또 다른 일 예는, 본 출원의 일 예에 따른 간암 발병의 위험성 예측용 조성물을 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측용 키트에 관한 것이다.
- [47] 본 출원의 또 다른 일 예는, 대상체에서 분리된 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역, 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역, 또는 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단

계를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측 방법, 또는 간암 발병의 위험성 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

- [48] 구체적으로, 본 출원의 일 예에 따른 방법은, 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 상기 생물학적 시료에서 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및/또는 상기 생물학적 시료에서 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [49] 상기 메틸화 수준을 측정하는 단계는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), MethyLight PCR, MehtyLight digital PCR, EpiTYPER, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, MS-HRM (Methylation sensitive high resolution melting), DNA 칩, 분자 비콘(molecular beacon), 차세대 염기서열분석패널(next generation sequencing(NGS) panel), 파이로시퀀싱 및 바이셀과이트 시퀀싱으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행될 수 있다. 일 예로, 상기 메틸화 수준을 측정하는 단계는 본 출원에서 확립한 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 병용 사용한 PCR 및/또는 MS-HRM 분석법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [50] 예를 들어, 상기 메틸화 수준은 마이크로어레이에 의해 식별될 수 있고, 상기 마이크로어레이는 고상표면에 고정화된 프로브를 이용할 수 있다. 상기 프로브는 상기 CpG 부위를 포함하는 10 내지 100개의 연속 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [51] 본 출원의 일 예에 따른 방법은, 상기 메틸화 정도를 정량하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 정량하는 단계는 상기 생물학적 시료, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커가 100% 메틸화된 시료, 및 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커가 100% 비메틸화된 시료의 용융 곡선 (melting curve)의 AUMC (Area under the melting curve; 용융 곡선 아래 면적)을 비교하여, 상기 생물학적 시료 내 포함된 바이오 마커의 메틸화 정도를 정량하는 것일 수 있다. 상기 용융 곡선은 정규화된 (normalized) 것일 수 있다.
- [52] 구체적으로, 상기 정량하는 단계는, 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 (melt curve)을 얻는 단계; 메틸화된 핵산과 비메틸화된 핵산의 함량비를 알고 있는 생물학적 시료의 정규화 용융 곡선 (normalized melt curve)를 얻는 단계; 및 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 및 상기 정규화 용융 곡선을 비교하여, 상기 생물학적 시료의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 생물학적 시료의 용융 곡선은 HRM 분석을 통해 얻는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기

핵산은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다. 상기 생물학적 시료의 용융 곡선은, 상기 정규화 용융 곡선과 비교되기 전에 정규화 (normalized) 되는 것일 수 있다.

- [53] 본 출원의 일 예에 따른 방법은 상기 메틸화 수준을 측정하는 단계 이후에, 상기 메틸화 수준을 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 대조군은 기원한 조직을 이미 알고 있는 생물학적 시료에서 분리한 DNA를 의미하며, 간암을 가지지 않는 대상 또는 간암을 가지는 대상에서 유래한 모든 샘플이 사용될 수 있다. 예를 들어, 대조군으로 간암을 가지는 대상에서 유래한 샘플을 사용한 경우, 생물학적 시료에서 분리한 DNA의 메틸화 수준이 대조군에서 분리한 DNA의 메틸화 수준과 유사하면, 상기 생물학적 시료가 유래한 대상은 간암 발병의 위험성을 가지는 것으로 판별할 수 있고, 대조군으로 간암을 가지지 않는 대상에서 유래한 샘플을 사용한 경우, 상기 생물학적 시료에서 분리한 DNA의 메틸화 수준이 대조군의 메틸화 수준보다 높으면, 상기 생물학적 시료가 유래한 대상은 간암 발병의 위험성을 가지는 것으로 판별할 수 있다. 상기 대상은 예를 들어, 척추동물, 포유류, 설치류, 염소, 사슴, 돼지, 조류, 닭, 칠면조, 소, 말, 양, 어류, 또는 영장류, 일 예로 인간일 수 있다.
- [54] 본 출원의 일 예에 따른 방법은, 상기 생물학적 시료에서 알파태아단백질 (Alpha Fetoprotein; AFP)의 농도를 측정하는 단계, 및/또는 상기 대상체의 성별 및/또는 나이 정보를 수집하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [55] 본 출원의 일 예에 따른 조성물 및 방법은, 생물학적 시료 내 메틸화된 바이오 마커의 농도가 매우 낮은 경우에도, 높은 민감도로 상기 바이오 마커의 메틸화 여부를 확인할 수 있다.
- [56] 종래의 실험적 검증법들의 단점을 보완하기 위해, MS-HRM 프라이머 설계 시 프라이머 내에 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 포함하는 메틸화 프라이머를 사용하고, 메틸화 주형 가닥만 증폭되는 것을 방지하기 위해 비메틸화 주형 가닥의 증폭에 사용될 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 포함하는 비메틸화 프라이머를 혼용하여 사용하였다. 이 때, MS-HRM의 상대적으로 낮은 민감도 및 TpG를 포함한 프라이머의 편향적 증폭을 방지하고자 PCR의 프라이머 어닐링 (annealing) 단계의 온도를 조절하여 CpG를 포함한 프라이머의 결합 기회를 증가시키고 TpG를 포함한 프라이머의 결합 기회를 감소시키는 방법을 구축하였다.
- [57] 따라서 혈액에 존재하는 circulating tumor DNA와 같이 매우 미량 존재하는 표적, 예를 들어 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 대해서 더 민감한 수준의 PCR을 진행할 수 있으며, 어닐링 온도 및 프라이머의 농도 비율에 따라 용도에 맞춰 주형 가닥에 대한 메틸화 및 비메틸화 프라이머의 결합 정도를 조절하여 실험을 설계할 수 있다. 기존 qMSP, MethyLight 및 MS-HRM 분석 방법의 단점을 보완하여 새로운 실험적 검증법의 설계를 구축할 수 있으며, 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 메틸화 마커를 액

체 생검을 통해 검출할 수 있고, 기존 MS-HRM 분석 방법보다 더 높은 민감도를 가지며 메틸화 수준의 정량화가 가능하다.

- [58] 또한, 동일 시험관내에서 대조마커 분석 없이 상대적인 메틸화 비율을 측정 가능하고, 증폭 효율에 방해되는 프로브를 사용하지 않아 검출 민감도가 높다. 또한 혈액 등의 생물학적 시료에서 매우 낮은 비율의 메틸화 수준을 측정하기 위해 메틸화 및 비메틸화 DNA의 증폭 효율을 조절할 수 있다.
- [59] 본 출원의 일 예에 따른 조성물 및 방법은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 혼용 사용하여 비특이적 증폭 산물 발생이 발생하지 않고, 원하는 표적 핵산이 극미량 존재하는 조건에서도 기존의 PCR 기반의 분석방법보다 더 민감하게 시료의 메틸화 수준을 측정할 수 있다.
- [60] 본 출원의 일 예에 따른 조성물 및 방법은 생물학적 시료, 예컨대 혈액에 존재하는 cfDNA (cell-free DNA) 중 암 환자에게서 소량으로 존재하는 ctDNA (circulating tumor DNA)의 DNA 메틸화 수준, 일 예로 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 시료 내 반-정량 방법을 통해 확인하여, 이를 기반으로 높은 민감도 및 특이도를 달성할 수 있다.
- [61] 예를 들어, 상기 생물학적 시료 내 메틸화된 핵산의 농도는 100 ng/ul 이하, 90 ng/ul 이하, 80 ng/ul 이하, 70 ng/ul 이하, 60 ng/ul 이하, 50 ng/ul 이하, 40 ng/ul 이하, 30 ng/ul 이하, 20 ng/ul 이하, 15 ng/ul 이하, 10 ng/ul 이하, 9 ng/ul 이하, 8 ng/ul 이하, 7 ng/ul 이하, 6 ng/ul 이하, 5 ng/ul 이하, 4 ng/ul 이하, 3 ng/ul 이하, 2 ng/ul 이하, 1.5 ng/ul 이하, 1 ng/ul 이하, 0.5 ng/ul 이하, 0.4 ng/ul 이하, 0.3 ng/ul 이하, 0.2 ng/ul 이하, 0.1 ng/ul 이하, 0.05 ng/ul 이하, 0.04 ng/ul 이하, 0.03 ng/ul 이하, 0.02 ng/ul 이하, 0.01 ng/ul 이하, 0.009 ng/ul 이하, 0.008 ng/ul 이하, 0.007 ng/ul 이하, 0.006 ng/ul 이하, 0.005 ng/ul 이하, 또는 0.003 ng/ul 이하인 것일 수 있다. 상기 핵산은 예를 들어 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다.
- [62] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 핵산 및 비메틸화된 핵산을 포함하며, 상기 메틸화된 핵산의 농도는, 상기 비메틸화된 핵산의 농도의 75% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 19% 미만, 18% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4.5% 이하, 4% 이하, 3.5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 1% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 또는 0.45% 이하인 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속

적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다.

- [63] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 핵산 및 비메틸화된 핵산을 포함하며, 상기 메틸화된 핵산 및 상기 비메틸화된 핵산 전체 가닥 100% 기준으로, 상기 메틸화된 핵산을 100% 이하, 100% 미만, 99% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 10% 미만, 5% 이하, 5% 미만, 4.5% 이하, 4% 이하, 3.5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하, 2% 이하, 1.5% 이하, 1.4% 이하, 1.3% 이하, 1.2% 이하, 1.1% 이하, 1% 이하, 0.9% 이하, 0.8% 이하, 0.7% 이하, 0.6% 이하, 0.5% 이하, 또는 0.4% 이하 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다.
- [64] 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 메틸화된 핵산을 20,000가닥 이하, 15,000가닥 이하, 10,000가닥 이하, 5,000가닥 이하, 4,000가닥 이하, 3,000가닥 이하, 2,000가닥 이하, 1,000가닥 이하, 500가닥 이하, 400가닥 이하, 300가닥 이하, 200가닥 이하, 150가닥 이하, 100가닥 이하, 90가닥 이하, 80가닥 이하, 70가닥 이하, 60가닥 이하, 50가닥 이하, 40가닥 이하, 30가닥 이하, 20가닥 이하, 10가닥 이하, 9가닥 이하, 8가닥 이하, 7가닥 이하, 6가닥 이하, 5가닥 이하, 4가닥 이하, 3가닥 이하, 2가닥 이하, 또는 1가닥 이하로 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트를 포함하며, 상기 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산의 연속적인 일부 서열을 가지는 핵산일 수 있다. 일 예로, 상기 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 또는 서열번호 3으로 표시되는 핵산일 수 있다.
- [65] 본 출원의 일 예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 혈소판, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [66] 본 출원의 일 예에서, 상기 간암은 간세포암일 수 있다.
- [67] 본 출원의 일 예에 따른 방법은, 대상체를 치료하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 치료하는 단계는 상기 대상체에 유효량의 치료제 투여, 화학 요법, 호르몬 요법, 방사선 요법, 외과적 수술, 또는 이들의 조합을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 치료제는 예를 들어 간암 치료제일 수 있다.
- [68] 상기 치료제는 예를 들어 아파티닙 (Afatinib), AK105, 안로티닙 (Anlotinib), 아파티닙 (Apatinib), 아테졸리주맙 (Atezolizumab), 아벨루맙 (Avelumab), 악시티닙 (axitinib), 베바시주맙 (Bevacizumab), 보수티닙 (bosutinib), BSC, 카보잔티닙 (Cabozantinib), 카보잔티닙-S-말레이트 (Cabozantinib-S-Malate), 캄

렐리주맙 (Camrelizumab), 카메르티닙 (canertinib), 카보플라틴 (carboplatin), 카페시타빈 (capecitabine), 셀리콕십 (celecoxib), CC-122, CF102, 크리조티닙 (crizotinib), 다사티닙 (dasatinib), 도세탁셀 (docetaxel), 도나페닙 (Donafenib), 도비티닙 (Dovitinib), 독소루비신 (doxorubicin), 더발루맙 (Durvalumab), EKB-569, 엔트렉티닙 (entrectinib), 에피루비신 (epirubicin), 에를로티닙 (erlotinib), 에토포시드 (etoposide), 에베롤무스 (everolimus), FGF401, FOLFOX 4, 포스타마티닙 (fostamatinib), 갈루니세르티브 (Galunisertib), 게피티닙 (gefitinib), 겔시타빈 (gemcitabine), IBI305, 이브루티닙 (ibrutinib), 이마티닙 (imatinib), INC280, 인피그라티닙 (Infigratinib), 이필리무맙 (Ipilimumab), 이리노테칸 (irinotecan), 라파티닙 (lapatinib), 레플루노미드 (leflunomide), 렌바티닙 (Lenvatinib), LY2875358, 메실레이트 (Mesylate), 미토마이신 c (mitomycin c), MSC2156119J, 네라티닙 (neratinib), 닐로티닙 (nilotinib), 닌테다닙 (Nintedanib), 니볼루맙 (Nivolumab), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 팔보시클립 (Palbociclib), 파노비노스타트 (Panobinostat), 파조파닙 (pazopanib), PDR001, 펌브롤리주맙 (Pembrolizumab), 페미가티닙 (Pemigatinib), 펙사벡 (Pexavec), 인산염 (Phosphate), 라무시루맙 (Ramucirumab), 레고라페닙 (Regorafenib), 룩소리티닙 (ruxolitinib), 세막시닙 (semaxinib), 셀루메티닙 (selumetinib), SGO-110, SHR-1210, 신틸리맙 (Sintilimab), 소라페닙 (Sorafenib), SU6656, 수니티닙 (sunitinib), 신틸리맙 (sintilimab), 스파르탈리주맙 (spartalizumab), 수텐트 (sutent), TACE, 타스키니모드 (Tasquinimod), 테모졸로마이드 (Temozolomide), 템시롤리무스 (Temsilolimus), 티슬레리주맙 (Tislelizumab), 티반티닙 (Tivantinib), 토실레이트 (Tosylate), 토리팔리맙 (toripalimab), 트레멜리무맙 (Tremelimumab), 반데타닙 (vandetanib), 바탈라닙 (vatalanib), XL888, Y90, 이들의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

- [69] 본 출원의 또 다른 일 예는, 본 출원의 일 예에 따라 간암의 위험성을 가지는 것으로 판별된 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 간암 치료 방법에 관한 것이다. 상기 대상체를 치료하는 단계는 전술한 바와 같다.

### 발명의 효과

- [70] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커는 액체 생검을 통한 진단을 통해 기존에 활용되고 있는 액체 생검 진단법보다 더 높은 민감도를 달성할 수 있고, 이를 통해 간암 검사의 효율을 월등히 증가시켜 간암 환자들의 생존율을 현저히 높일 수 있다.

- [71] 또한, 본 출원의 일 예는 혈액 기반의 액체 생검 방법을 통해 간암 특이적 조기 진단이 가능한 바이오 마커 및 이를 활용한 분자적 검사 방법을 제공할 수 있다. 특히, 혈액 유래 cell-free DNA (cfDNA)의 DNA 메틸화 수준을 확인하여, 검체의 간암 세포 유래의 cfDNA의 유무를 검출할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [72] 도 1은 본 출원의 일 예에 따른 마커의 각 조직에서의 메틸화 수준을 확인한 도면으로, 가로축에서 CGRC\_N: Cancer Genome Research Center normal; LIHC\_N: Liver Hepatocellular carcinoma normal, CGRC\_T: Cancer Genome Research Center tumor, 및 LIHC\_T: Liver Hepatocellular carcinoma tumor 를 의미한다.
- [73] 도 2는 정상 간 및 간 질환에서 본 출원의 일 예에 따른 마커의 메틸화 분포를 나타낸 도면으로, 가로축에서 Liver\_N: 정상 간; NAFLD: 비알코올성 지방간 질환 (Non-alcoholic fatty liver disease); NASH: 비알코올성 간염 (Non-alcoholic steatohepatitis); LGDN: 저등도 이형성 결절 (low-grade dysplastic nodule); HGDN: 고등도 이형성 결절 (high-grade dysplastic nodule); HCC: 간세포암 (Hepatocellular carcinoma); HepG2: 간세포암종(HCC) 세포주를 의미한다.
- [74] 도 3a 내지 도 3c는 범용적인 메틸화 데이터를 독립적 코호트로 사용하여 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 성능을 검증한 결과를 나타낸 도면이다.
- [75] 도 4는 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 간암 특이성을 나타낸 도면으로, X축은 간암을 포함하여 23개 암 종 데이터 세트의 정상 및 암 조직 샘플, Y축은 바이오 마커, 매트릭스의 컬러는 메틸화 수준을 나타낸다.
- [76] 도 5a 내지 도 5c는 Control DNA (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen, 59695), 간암 세포주의 gDNA 및 인간 Buffy Coat 유래의 아황산 전환된 gDNA를 사용하여, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 메틸화 수준 측정 방법이 메틸화 및 비메틸화된 가닥의 구분 가능성을 확인한 결과이다.
- [77] 도 6a 내지 도 6c는 본 출원의 일 예에 따른 메틸화 수준 측정 방법을 이용하여, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1의 메틸화 및 비메틸화된 DNA 가닥에 대한 최소검출한계 (limit of detection)를 분석한 결과이다.
- [78] 도 7은 다양한 암종의 정상 및 종양 조직 샘플에 대하여 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 메틸화 수준을 나타낸 boxplot 이다.
- [79] 도 8a 내지 도 8c는 55명의 건강한 사람으로부터 수집된 Buffy Coat 유래의 아황산 전환된 gDNA 기반의 MS-HRM 분석법 결과를 나타낸 도면으로, 도 8a 및 도 8b는 모든 검체의 정규화된 녹는점 곡선을 나타낸 도면이고, 도 8c는 녹는점 곡선 기반의 각 샘플의 적분값 (AUMC)의 분포를 나타낸 boxplot 이다.
- [80] 도 9a는 81명의 건강한 사람 및 319명의 HCC 환자의 AUMC를 나타낸 boxplot 으로, 81명의 Healthy의 AUMC 값의 97<sup>th</sup> Percentile을 기반으로 설정한 cut-off를 점선으로 나타냈다.
- [81] 도 9b는 총 420명의 임상 검체에 대해 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1의 간암 진단 정확성을 분석한 결과이다.
- [82] 도 10은 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1을 다양한 바이오 마커와 조합하였을 때 간암 진단 정확성이 상승하는 결과를 나타낸 도면이다.
- [83] 도 11은 본 출원의 일 예에 따른 진단 마커의 간암 특이성을 확인한 도면이다.
- [84] 도 12는 본 출원의 일 예에 따른 진단 마커의 메틸화 수준을 통해 간암 발명의 위험성을 정확하게 예측하는 것을 확인한 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [85]     이하, 본 출원을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [86]
- [87]     실시예 1. 간암 발병의 위험성 예측용 마커 발굴
- [88]     혈액 생검이 가능한 간암 발병의 위험성 예측용 마커를 발굴하기 위해, TCGA (The Cancer Genome Atlas) 데이터베이스 및 CGRC (Cancer Genome Research Center)의 DNA 메틸화 데이터를 분석하였다. 상기 데이터베이스의 정상 간 조직 및 간암 조직의 메틸화 데이터를 분석하여, 95% 이상의 정상 간 샘플에서는 15% 이하로 저메틸화되고, 95% 이상의 혈액 샘플에서도 15% 이하로 저메틸화되며, 간암 샘플에서는 30% 이상으로 고메틸화된 CpG site을 선별하였다.
- [89]     범용적인 바이오 마커를 발굴하기 위해서, 상기 데이터베이스의 각 데이터 세트 별로 기계학습을 진행하여 공통적으로 기계학습 중요도 순위가 높은 CpG site을 찾았다.
- [90]     혈액 생검이 가능한 마커를 발굴하기 위해서, 추가적으로 간 이외 기관의 정상 조직에서 15% 이하로 저메틸화된 마커 후보군을 발굴하였다.
- [91]     상기 조건을 모두 만족하는 것으로 선별된 마커의 정보를 표 1에 나타냈다. 상기 선별된 바이오 마커를 본 명세서에서 “마커 1 (marker 1)”로 명명하였다.
- [92]     또한, 간암에 특이적인 것으로 나타난 마커 2종을 추가로 선별하여 각각 “마커 2 (marker 2)” 및 “마커 3 (marker 3)”으로 명명하고, 그 정보를 표 1에 나타냈다.
- [93]     [표1]

| 명명   | 염색체   | 시작       | 끝        | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 서열번호 |
|------|-------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 마커 1 | Chr12 | 21810279 | 21810792 | CGAGGTAAAGATCGTCCAGCCT<br>TCATAGGCCACCTGGTTCCGTCC<br>CCCTCCCCCAGCTACTCGGGCA<br>CGTGTCCCGACTCCCGCCAGCA<br>GGCCGTGGGGGTGATGTGGCCG<br>CCATGAACCCACCAAGGACAAG<br>TAGGGCCTGGTTTTAGCTGCAA<br>ATGCAACAAGTCTCTCCGCTGA<br>GCCGCAGCTGCTACCCCTGTCCT<br>TCTGCTCCTCCGCCAGGGCACG<br>GCCCCCCTGCGCCCCAACTG<br>AGCGGCAAAGTCAGGGCCCGCG<br>GCCGGATGCTCAGAGCTAAAGG | 1    |

|      |        |              |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |   |
|------|--------|--------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|      |        |              |              | CCGCGGAGGACAGATGTGCTTC<br>TTCCTCCTTCCCGCGTCTCCCA<br>TACAAGTACTACCCCGCACGTC<br>CCATCAGGCTTGCCTGTGGGCC<br>AGGATTCAGGGTCCTGAGCCGA<br>AACCTACCAGGAGAGAGAAGGC<br>TCTGGAGACCTCTGTAACAGTC<br>GTGCGGAGAAGACAAAGTCAGC<br>TGCGTGCGTCTCCTCCGGCGCC<br>GGCTCTGCAAGGAGGGAGGAGG<br>GGGCG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |   |
| 마커 2 | Chr 17 | 2929802<br>1 | 2929863<br>1 | GGGCGAGGGAGGAGCCTGAGG<br>AGACTCGCCCGGCTCAACCCCG<br>ACGTCCGCGCCCCGGCCGCCTG<br>TTGGCCATGGCGGGCCTGGGCC<br>TGGGCTCCGCCGTTCCCGTGTG<br>GCTGGCCGAGGACGACCTCGGC<br>TGCATCATCTGCCAGGGGCTGC<br>TGGACTGGCCCGCCACGCTGCC<br>CTGCGGCCACAGCTTCTGCCGC<br>CACTGCCTGGAGGCCCTGTGGG<br>GCGCCCGCGACGCCCGCCGCTG<br>GGCCTGCCCCACTTGCCGCCAG<br>GGCGCCGCGCAGCAGCCGCACC<br>TGCGGAAGAACACGCTACTGCA<br>GGACCTGGCCGACAAGTACCGC<br>CGCGCCGCACGCGAGATACAGG<br>CGGGCTCCGACCCTGCCCACTG<br>CCCCTGCCCCGGGCTCCAGTTCCC<br>TCTCCAGCGCGGCCGCGAGGCC<br>CCGGCGCCGCCCGGAACTGCAG<br>CGGGTAGGGAGGCCGGGCCCGC<br>AGCTCCCCTGGCTCCCCGGGCT<br>GCCCCGCCCTGACCCTTTCCCA<br>TGTGGCTCGAACCCTTTCTCTCA<br>GCCGTTCTACTTTTACGTTCTT<br>TTCTCAGTCTAAAAGTCGAGTTC | 2 |

|      |        |              |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |   |
|------|--------|--------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|      |        |              |              | CGCTCTTCGGAGGCACTTTGGA<br>AAGTTCATAAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |   |
| 마커 3 | Chr 19 | 1973854<br>7 | 1973984<br>6 | GGGTGAGGTCACTTGCTAGAAC<br>CCTGCGAGGGGGCGGTGCCGAG<br>GCGTGAGGTGATCGGAGTGGA<br>CAGAGAGGCGGCCCCAGAAAGTT<br>AGTCGGCGGGATTTGGGCGCGA<br>GTGCTTCCCAAGCGGGCGGGGC<br>AATAGGCTGTTCCGGGTGGGAC<br>GGAGGACACTGGCGGTCTCCGG<br>GACAAAGACAGCGGTTGGGGAA<br>GGGATGGATGGCCGGGCCTCCA<br>GGCGTCTCCAGACTGGGGAAGG<br>GGTAGGGGGTTAAGGGATCAGA<br>GGGCGGCGTCCTGGCCCCGCAG<br>GCACGTGCCGCGCCCTTCCCCC<br>GGGCCCAGGCCCGCACCCGCCC<br>GCCTCCCGTCCGTGCAGGCCTC<br>ACCTGGGCCTCCAGTCACGCCG<br>CAGACAAGGCGGGCTCGCGGGG<br>GTTTCGGGGCGGGCTCGAGGCC<br>ATGGCCCGGCGACTGCGGCGGG<br>AGCGGTAGAGCGTCCGGGTGCG<br>CCCTGTGCGGGTTGCTGAGAGG<br>GCGCGGGAGGCGGGGTCTCCCC<br>GGCGCCCCGCCCCACCACTG<br>GGGGAGCCCTGCCCCGCCCCGC<br>CACCTGGGGGAGCCCCGCCTCC<br>ACGCGCCGCGTCGGGGGCGGTGT<br>CGCCCGGAACCGCAGCCCCCT<br>GTTTCCTCCCCGCCTCGCGGCC<br>CTCAGTCGCCCCTATTTCCGGCG<br>CGGGACCCCCACCCCGGTACCT<br>GCACACCTCATGCGCCCGCAGT<br>TTCGAGCCTGCGGGGCTGAGTC<br>ACTCGGCGACCCGAAAATTCCC<br>GCCGTGACCCCGCGCTGCCCGG | 3 |

|  |  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|--|--|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  |  |  |  | GCGGAGCTCCAGGTGGTCTTGG<br>GTCCGCGCCCCGCTCCGGACC<br>CCCAACCCTCCCAGCCCCACCC<br>CGCTCTCTTCTTCGTGTCCAATC<br>GGCCGCGGAGTTACAAGCCACT<br>CCCTGATCCGACTTGGCTCCCAC<br>CGCCCGGACCCCCGCCCAGCTT<br>CGGCTTTGCCAGCTCGCAGTATC<br>AGCGAGCCGCGGCCTCCTGTGC<br>GAGGCCACCTCTGCGGCCCCA<br>GCTGATCATCGGGCGCACGCTA<br>GGGTTTTGCAATCCCGCCCCCGT<br>ACCCCTCACCTGGGACAGCGC<br>TGCCCCCTGCAAAGCCCGGCC<br>TGCCCTGCCCTGCCCTGTGGCTT<br>CCTCCCTCGGCCTCCCTGCGGCG<br>GCCCCGGGCTCCCACGGTCCGG<br>AGCACACAGCCCCATTGTCCCG<br>GTTATCGGTACTTTGTTATACTG<br>TATTTGATTATGCAGGACCGGA<br>TCGGGGACGCAGAGCTCCGGGA<br>GGGCCGGGCTGGCGTGA CT CAG<br>CCGGGTGCTGCGACCCAGCTCC<br>AACTGCCTTTACGTA |  |
|--|--|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

[94] 이후 실시예에서 마커 1의 일 예로서 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 대표적으로 실험에 사용하였고, 마커 2의 일 예로서 17번 염색체의 29298124 내지 29298125번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 대표적으로 실험에 사용하였고, 마커 3의 일 예로서 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 대표적으로 실험에 사용하였다. 표 1의 서열에서 상기 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 상기 17번 염색체의 29298124 내지 29298125번째 서열에 위치한 CpG 사이트, 및 상기 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 굵은 글자 및 밑줄을 그어 표시하였다.

[95] 선별된 간암 마커를 Graph pad prism 툴을 사용하여 Box plot으로 시각화하여 도 1에 나타냈다 (X축: 샘플 타입; CGRC\_N: Cancer Genome Research Center normal; LIHC\_N: Liver Hepatocellular carcinoma normal; CGRC\_T: Cancer Genome

Research Center tumor; LIHC\_T: Liver Hepatocellular carcinoma tumor, Y축: 메틸화 B-value).

- [96] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 마커는 정상 혈액, 정상 간 조직, 간 이외 기관(organ)의 정상 조직 및 간 이외 기관의 암 조직에서는 저메틸화되어 있으며, 간암 샘플에서 특이적으로 고메틸화된 특징을 보였다. 구체적으로, 본 출원의 일 예에 따른 마커는 간암 샘플에서 평균 메틸화값이 30% 이상으로 나타났다으나, 그 외 샘플에서는 메틸화 수준이 현저히 낮아, 상기 마커의 메틸화 수준을 통해 간암 샘플을 특이적으로 구별할 수 있다.

[97]

[98] 실시예 2. 간암 발병 단계에 따른 메틸화 변이

- [99] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커에 대하여, 간암의 발병 단계에 따른 메틸화 변이를 확인하고자, GEO(Gene Expression Omnibus) 데이터베이스에서 암의 발병 단계에 있는 데이터 세트들을 다운받았다. 각 단계에 있는 여러 메틸화 데이터를 합쳐서 Graph pad prism 툴을 사용하여 Box plot으로 시각하여 도 2에 나타냈다 (X축: 샘플 타입; Liver\_N: 정상 간; NAFLD: 비알코올성 지방간 질환 (Non-alcoholic fatty liver disease); NASH: 비알코올성 간염 (Non-alcoholic steatohepatitis); LGDN: 저등도 이형성 결절 (low-grade dysplastic nodule); HGDN: 고등도 이형성 결절 (high-grade dysplastic nodule); HCC: 간세포암 (Hepatocellular carcinoma); HepG2: 간세포암종(HCC) 세포주, Y축: 메틸화 B-value).

- [100] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커는 정상 혈액, 정상 간조직, 지방간, 간경변에서는 저메틸화를 보이고, 간 이형성 (dysplastic liver) 및 간암의 전암성 병변인 dysplastic nodule(이형성 결절) 단계에서부터 메틸화가 점진적으로 증가하여, 간세포암 (HCC)에서 메틸화 수준이 현저히 높은 양상을 보였다. 도 2에서 X축은 검체, Y축은 메틸화 값을 의미한다.

[101]

[102] 실시예 3. 독립적 코호트에서 바이오 마커의 임상적 성능 검증

- [103] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커를 여러 독립적 코호트에서 검증하기 위해, GEO(Gene Expression Omnibus) 데이터베이스에서 4개 간암 메틸화 데이터 세트 GSE54503, GSE56588, GSE60753, 및 GSE89852를 다운받아 실험에 사용하였다. 실시예 1에서 마커 발굴용으로 사용한 2개의 데이터 세트 (CGRC HCC, TCGA HCC) 및 상기 4개 데이터 세트를 합쳐서, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커를 사용하여 hierarchical clustering을 진행하고, 이를 시각화하여 도 3a 내지 도 3c에 나타냈다 (X축: 샘플, Y축: 마커의 Probe ID, 초록 박스: 정상 샘플, 빨간 박스: 암 샘플).

- [104] 도 3a는 본 출원의 일 예에 따른 마커 1 단일 마커의 클러스터링 결과이며, 도 3b는 마커 1 및 마커 2 조합 마커의 클러스터링 결과이고, 도 3c는 마커 1 및 마커 3 조합 마커의 클러스터링 결과이다. 도 3a 내지 도 3c에서 히트맵의 (Heatmap)의 컬러는 메틸화 정도를 의미하며, 흰색에서 빨간색으로 갈수록 고메틸화를 나타

낸다. 도 3a 내지 도 3b에 나타난 바와 같이, 히트맵으로 6개 데이터 세트의 모든 샘플을 클러스터링한 결과, 초록색으로 표시된 정상 샘플과 분홍색으로 표시된 간암 샘플이 구분되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 출원의 일 예에 따른 마커 1과, 마커 2 또는 마커 3을 함께 적용하여 hierarchical clustering을 진행한 결과 Tumor coverage가 더욱 향상되었다.

[105]

[106] 실시예 4. 바이오 마커의 간암 특이성 확인

[107] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 간암 특이성을 확인하고자, 실시예 1 또는 실시예 2에서 사용한 TCGA 및 GEO 데이터베이스의 메틸화 데이터를 사용하여 암 종별로 평균 메틸화 정도를 분석하였다.

[108] 구체적으로, R software에서 ggplot2 R package을 사용하여 각 데이터 세트 별 마커 1 및 마커 2의 메틸화 정도를 heatmap으로 확인하여 도 4에 나타냈다 (파란색: 저메틸화, 빨간색: 고메틸화, X축: 샘플, Y축: 마커의 Probe ID, 초록 박스: 정상 샘플, 빨간 박스: 암 샘플).

[109] 도 4에 나타난 바와 같이, 각 암 종에서 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 평균 메틸화 값을 확인한 결과, 마커 1 및 마커 2는 간암 검체에서만 빨간색으로 나타나 고메틸화된 것을 확인하였고, 정상 간 및 타 암 종에서는 파란색으로 나타나 저메틸화된 패턴을 확인하였다. 따라서, 상기 2개 바이오 마커 모두 간암에서만 높은 메틸화 수준을 보이고, 다른 암 종에서는 낮은 메틸화 수준을 보여, 간암 특이성을 확인하였다.

[110]

[111] 실시예 5. 바이오 마커의 메틸화 수준 측정 방법의 확립

[112] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 메틸화 수준을 측정하기 위한 방법을 다음과 같이 확립하였다.

[113] 본 출원의 일 예에 따른 마커 1을 포함하는 다양한 샘플 및 대조군 샘플을 표 2와 같이 준비하여 실험에 사용하였다. 샘플 번호 2, 3 및 5의 샘플은 Qiagen에서 구입하여 사용하였으며, 샘플 번호 3은 샘플 번호 2의 gDNA를 EpiTect Bisulfite Kit를 이용하여 아황산 처리하여 사이토신 잔기가 모두 티민으로 변환된 것이고, 샘플 번호 5는 샘플 번호 2의 gDNA에 SssI methylase를 사용하여 100% 메틸화 후 EpiTect Bisulfite Kit를 이용하여 아황산 전환 처리하여 CpG 사이토신 외 사이토신이 티민으로 변환된 것이다. 샘플 번호 4의 경우 건강한 사람의 혈액으로부터 분리된 buffy coat를 이용하여 peripheral blood mononuclear cells로부터 제조사의 지시에 따라 QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen, Cat. No. 51104)를 사용하여 gDNA를 추출하였고, 추출된 gDNA는 EZ DNA Methylation-Lightning Kit를 사용하여 아황산 전환을 진행하여 실험에 사용하였다. 샘플 번호 6의 경우 간암 세포주인 Huh-1의 gDNA는 PBMC와 동일하게 QIAmp DNA Blood Kit 및 EZ DNA methylation-Lightning Kit를 사용하여 실험에 활용할 수 있도록 준비되었다. 각 샘플을 Qubit을 통해 농도를 측정한 후, 0.33 ng/ $\mu$ L로 희석하여 준비했다.

[114] [표2]

| 샘플 번호 | 샘플명                | 샘플 설명                | 메틸화 여부 | 도 5의 그래프 색깔 |
|-------|--------------------|----------------------|--------|-------------|
| 1     | NTC                | non-template control | -      | 검정색         |
| 2     | EpiTect gDNA       | 아황산 미처리 샘플           | -      | 초록색         |
| 3     | EpiTect Unmet. DNA | 100% 비메틸화 샘플         | X      | 보라색         |
| 4     | Buffy Coat gDNA    | 정상 혈액 세포 유래 샘플       | X      | 주황색         |
| 5     | EpiTect Met. DNA   | 100% 메틸화 샘플          | O      | 파란색         |
| 6     | Huh-1 gDNA         | 간암 세포 유래 샘플          | O      | 빨간색         |

[115] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커의 아황산 전환된 서열을 표 3에 나타냈다. 표 3에서 아황산 처리로 CT conversion이 발생한 C를 소문자 c로 나타냈고, 메틸화된 CpG 사이트는 대문자 CG로 나타냈다. 표 3에서 본원 실시예에서 대표적으로 실험에 사용된 CpG 사이트를 굵은 글자 및 밑줄을 그어 표시하였다.

[116] [표3]

| name | Bisulfite converted Sequence                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 서열번호 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 마커 1 | CGAGGTAAAGATCGTtAGtTTtATAGGtAttTGGTtCGTtttttTttttAGtAtTCGGGtACGTGTtCGAtTtCGtAGtAGGtCGTGGGGTGATGTGGtCGtATGAAttAttAAGGAtAAGTAGGGtTG GTTTTAGtTGtAAATGtAAtAAGTtTtTtCGtTGAGtCGtAGtTGtTAttTtTGtTTtTGtTtTCGtAGGGtACGGtttttTGCGtttAAAtTGAGCGGtAAAGTtAGGGtCGCGGtCGGATGtTtAGAGtTAAGGtCGCGGAGGAtAGATGTGtTTtTTtTtTTtCGCGTtTtttATAtAAGTAtTttCGtACGTtttAtAGGtTTGtTGTGGGtAGGATTtAGGGTtTGAGtCGAAAtTAttAGGAGAGAGAAGGtTtTGGAGAtTtTGTAAtAGTCGTGCGGAGAAGAtAAAGTtAGtTGCGTGCGTtTtTtCGGCGtCGGtTtTGtAAGGAGGGAGGAGGGGGCG | 4    |
| 마커 2 | GGGCGAGGGAGGAGtTGAGGAGAtTCGtCGGtTtAAtttCGACGTtCGCGtttCGGtCGtTGTGGtATGGCGGGtTGGGtTGGgtTtCGtCGTtTtCGTGTGGtTGGtCGAGGACGAtTCGGtTGtATtATtTGtAGGGGtTGtTGGAtTGGtCGtACGTGttTGCGGtAtA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 5    |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |   |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|      | <p>GtTtTtGtCGttAtTgTtTGGAGGtttTGTGGGGCGttCGCGACGttC<br/> GtCGtTGGGttTGttttAtTTGtCGttAGGGCGtCGCGtAGtAGtCGtA<br/> ttTGCGGAAGAAAtACGtTAiTGtAGGAAtTGGtCGAtAAGTAiCG<br/> tCGCGtCGtACGCGAGATAAtAGGCGGGtTiCGAtttTGtttAtTGtttt<br/> TGttCGGGtTttAGTTttTtTtAGCGCGGtCGCGAGGtttCGGCGt<br/> CGttCGGAAtTGtAGCGGGTAGGGAGGtCGGGttCGtAGtTtttT<br/> GGtTttttCGGGtTGttCGtCGttTGAttTTTttATGTGGtTCGAAtttt<br/> TTTttTiAGtCGTTtTAiTTTTACGTTttTTTTtTiAGtTAAAGT<br/> CGAGTTtCGtTtTCGGAGGAtTTTGGAAGTTtATAAAA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |
| 마커 3 | <p>GGGTGAGGTtAtTTGtTAGAAtttTGCGAGGGGGCGGTGtCGA<br/> GGCGTGGAGGTGATCGGAGTGGAAtAGAGAGGCGGttttAGA<br/> AGTTAGTTCGGCGGGATTtGGGCGCGAGTGtTTtttAAGCGG<br/> GCGGGGtAATAGGtTGTTtCGGGTGGGACGGAGGAAtAtTGG<br/> CGGTtTiCGGGAiAAAGAtAGCGGTTGGGGAAGGGATGGAT<br/> GGtCGGGttTttAGGCGTtTttAGAtTGGGGAAGGGGTAGGGG<br/> GTTAAGGGATtAGAGGGCGGCGTtTGgtttCGtAGGtACGTGt<br/> CGCGttTTttttCGGGtttAGGttCGtAttCGttCGttTttCGTtCGTGtAG<br/> GttTtAttTGGGttTttAGTtACGtCGtAGAtAAGGCGGGtTCGCGG<br/> GGGTTTCGGGGCGGGtTCGAGGtttATGGtCGGCGAtTGCGGC<br/> GGGAGCGGTAGAGCGTtCGGGTGCGtttTGtGCGGGTTGtTG<br/> AGAGGGCGCGGGAGGCGGGGTtTttCGGCGtttCGtttttAttAttT<br/> GGGGGAGttTGtttCGtttCGttAttTGGGGGAGtttCGttTttACGGtC<br/> GCGTCGGGGGCGGTGTCTGttCGGAAtCGtAGttttttTGTTTtTttt<br/> CGttTCGCGGttttTiAGTCGttttTATTTtCGGCGCGGGAAttttAttC<br/> GGTAttTGtAtAtTiATGCGttCGtAGTTTCGAGttTGCGGGGtTG<br/> AGTtAtTCGGCGAttCGAAAATTttCGtCGTGAtttCGCGtTGttCG<br/> GGCGGAGtTttAGGTGGTtTTGGGTtCGCGttttCGtTiCGGAAtttt<br/> AAtttTtttAGttttAttCGtTiTtTTtTTCGTGTttAATCGGtCGtCGAG<br/> TTAtAAGttAtTttTGATtCGAtTTGGtTttAtCGttCGGAAtttCGtttA<br/> GtTTCGGtTTTGttAGtTCGtAGTAtAGCGAGtCGCGGttTtTG<br/> TGCGAGGtttAttTiTGCGGttttAGtTGATtATCGGGCGtACGtTA<br/> GGGTTTTGtAATttCGttttCGTAAtttTiAtttTGGGAAtAGCGtTGtttt<br/> TGtAAAGttCGGtttTGtttTGtttTGtttTGTTGtTTtTttTCGGttTttT<br/> GCGGCGGtttCGGGtTttACGGTtCGGAGtAtAtAGttttATTGTtC<br/> GGTTATCGGTAtTTTGTTATAAtTGTATTTGATTATGtAGGAi<br/> CGGATCGGGGACGtAGAGtTiCGGGAGGGtCGGGtTGGCGT<br/> GAiTiAGtCGGGTGtTGCGAAttAGtTtAAAtTGttTTTACGTA</p> | 6 |

[117] \**t*: 아황산 처리로 CT conversion 이 발생한 C

[118] \*CG: 메틸화된 CG

[119]

[120] PCR 증폭산물의 크기는 50 내지 100 bp가 되도록 하였고, PCR 가열 냉각 (annealing) 온도가 약 60°C인 것을 고려하여 프라이머의  $T_m$ 은 60 내지 65°C가 되도록 하였다. 정방향 또는 역방향 중 한쪽 프라이머의 3'-말단 근처에 메틸화 또는 비메틸화 가닥 중 하나에 특이적으로 결합할 수 있도록 CpG 또는 TpG 서열을 포함하도록 하였다. 메틸화된 주형 가닥은 아황산 처리 후 CpG 사이토신이 티민으로 전환되지 않고 남아있으므로, 메틸화 프라이머는 CpG를 그대로 포함하도록 설계하고, 비메틸화 프라이머는 TpG를 포함하도록 설계하였다. 이 때, 비메틸화 주형 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머가 메틸화 주형 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머에 비해  $T_m$ 이 낮기 때문에 이를 보완하기 위해 5'-말단에 뉴클레오타이드를 추가하여 두 종류의 프라이머의  $T_m$ 을 유사하게 설계할 수 있다. 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머와 반대 방향의 프라이머는 메틸화 가닥 및 비메틸화 가닥의 메틸화 상태에 상관없이 결합이 가능한 프라이머로 설계하였다. 모든 프라이머가 Non-CpG 사이토신을 2개 이상 포함하여 아황산 전환 DNA 가닥에 특이적으로 결합할 수 있도록 하였다. 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1에 대하여 제작한 프라이머 세트의 예시적인 서열을 표 4에 나타냈다. 각 프라이머 서열에서 마커 1의 CpG 또는 Non-CpG 사이토신에 대응하는 부위를 대문자로 기재하고, 그 외의 염기는 소문자로 기재하였다.

[121] [표4]

| name                                     | Seq (5'→3')                     | SEQ ID NO. |
|------------------------------------------|---------------------------------|------------|
| Methylated Forward Primer for marker 1   | aAcCGACGcCGAaAAaAaC<br>G        | 7          |
| Methylated Reverse Primer for marker 1   | gaaggTtTtggagaTTtTgttaaTa<br>g  | 8          |
| Unmethylated Forward Primer for marker 1 | ttAcaAaAcCAACAcCAaAaA<br>AaAaCA | 9          |

[122] 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조하였다 (1 rxn 기준):

[123] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)

[124] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)

[125] Methylated Forward Primer (10  $\mu$ M): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4  $\mu$ M)

[126] Methylated Reverse Primer (10  $\mu$ M): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4  $\mu$ M)

[127] Unmethylated Forward Primer (10  $\mu$ M): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2  $\mu$ M)

[128] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L

- [129] Total: 22  $\mu$ L
- [130] 제조된 PCR Mixture를 각 96-well plate의 각 well에 22  $\mu$ L씩 분주 후, 0.33 ng/ $\mu$ L 농도의 대조군 핵산 시료를 3  $\mu$ L씩 각 well에 분주하였다. 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행하였다:
- [131] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 69°C 40초 (20 Cycle, 69°C를 시작으로 Cycle 당 0.3°C 감소 하여 63°C로 종료): PCR 반응
- [132] 95°C 20초 - 63°C 40초 (40 Cycle, 63°C로 일정하게 진행): PCR 반응
- [133] 63°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [134] PCR 및 HRM 분석에 대한 형광값을 확인하고, melting curve 또는 peak를 확인하여 메틸화 및 비메틸화 대조군의 특징을 확인하였다. 본 출원의 일 예에 따른 마커 1에 대한 PCR 및 HRM 분석 결과를 도 5a 내지 도 5c에 나타냈다.
- [135] 도 5a는 MS-HRM 분석 과정 중 PCR 단계의 형광 signal을 관측한 도면으로, MS-HRM 분석 시 샘플의 메틸아황산 전환된 검체들에 대한 signal만 확인되었다. 구체적으로, NTC 및 EpiTect gDNA 결과를 통해 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커에 대한 프라이머는 프라이머 간 반응을 통한 Dimer 형성이 발생하지 않고, 아황산 전환이 되지 않은 gDNA에 반응하지 않고 PCR 증폭산물을 생산하지 않았다. 따라서, 설계한 프라이머가 아황산 전환된 검체에만 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다.
- [136] 도 5b는 PCR 반응 이 후 온도의 증가에 따른 PCR 증폭산물의 이중가닥이 분해되는 것을 나타내는 melt curve이며, 도 5c는 도 5b의 melt curve에 대해 -(미분값)을 나타낸 melt peak 그래프이다. 메틸화된 주형가닥의 경우 CpG가 그대로 유지되어, TpG로 변형된 비메틸화 주형가닥보다 상대적으로 더 높은 온도에서 PCR 증폭산물의 Denaturation이 발생하였다. 즉, unmethylated DNA에 의해 생성된 PCR 증폭산물이 methylated DNA에 의해 생성된 PCR 증폭산물보다 더 낮은 온도에서 이중가닥이 단일가닥으로 분해되는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커를 표적으로 설계된 프라이머가 샘플의 메틸화 수준에 따라 증폭산물의 특징을 반영할 수 있음을 알 수 있다.
- [137]
- [138] 실시예 6. 최소검출한계 (Limit of detection, LoD)
- [139] (1) 최소검출한계 분석 (1)
- [140] 사용될 대조군 핵산 시료(Buffy Coat 및 Huh-1의 아황산 전환된 gDNA)를 Qubit을 통해 농도를 측정한 후, 1 ng/ $\mu$ L 로 희석하여 준비했다. 1 ng/ $\mu$ L의 대조군 핵산을 물과 2배씩 연속 희석하여 0.016 ng/ $\mu$ L 농도까지 각 시료를 제조했다 (1 ng/ $\mu$ L, 0.5 ng/ $\mu$ L, 0.25 ng/ $\mu$ L, 0.13 ng/ $\mu$ L, 0.06 ng/ $\mu$ L, 0.03 ng/ $\mu$ L, 및 0.016 ng/ $\mu$ L, 총 7개의 농도의 대조군 핵산).
- [141] 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조하였다 (1 rxn 기준):

- [142] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [143] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [144] Methylated Forward Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [145] Methylated Reverse Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [146] Unmethylated Forward Primer (10 uM): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2 uM)
- [147] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L
- [148] Total: 22  $\mu$ L
- [149] 제조된 PCR Mixture를 각 96-well plate의 각 well에 22  $\mu$ L씩 분주 후, 0.33 ng/ $\mu$ L 농도의 대조군 핵산 시료를 3  $\mu$ L씩 각 well에 분주하였다. 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행하였다:
- [150] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 69°C 40초 (20 Cycle, 69°C를 시작으로 Cycle 당 0.3°C 감소 하여 63°C로 종료): PCR 반응
- [151] 95°C 20초 - 63°C 40초 (40 Cycle, 63°C로 일정하게 진행): PCR 반응
- [152] 63°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [153] Input 농도에 따른 PCR Cq값의 상관성을 확인하고, 최소검출한계(limit of detection, LoD)를 확인하였다. 모든 농도 구간에서의 정규화된 녹는점 곡선 기반의 AUMC (area under the melting curve)를 통해 메틸화 및 비메틸화된 주형가닥의 PCR 증폭산물이 올바르게 형성되었는지 확인하였다.
- [154] 도 6a에 나타난 바와 같이, 아황산 전환된 메틸화(Huh-1 gDNA) 및 비메틸화 (Buffy Coat gDNA)된 gDNA에서 각각 농도가 증가할수록 감소되는 Cq값을 확인할 수 있었고, 농도에 따른 PCR 증폭의 상관성이 통계적으로 유의미한 것을 확인되었다 (사용한 검체의 농도가 높을수록 PCR 증폭이 빨리 이루어지기 때문에 Cq값이 낮게 확인됨). 이론적으로 1 ng DNA의 가닥 수는 304 가닥이며, 상기 실험에서 제일 낮은 양의 DNA를 사용한 0.0625 ng은 19 가닥이기 때문에 19 가닥까지 안정적으로 검출할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [155] 도 6b에 나타난 바와 같이, 사용된 검체의 PCR 증폭산물을 정규화된 녹는점 곡선 기반의 AUMC(area under the melting curve) 값을 산출하였고, 모든 메틸화 및 비메틸화된 gDNA의 농도 구간에서 각 메틸화 특징에 맞는 AUMC가 유사하게 나타나는 것을 확인하였다.
- [156]
- [157] **(2) 최소검출한계 분석 (2)**
- [158] Zymo Research사의 Human Methylated & Non-methylated DNA Set (Cat. # D5014) 제품을 동일 회사의 EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Cat. # D5030)을 활용하여 아황산 전환을 수행한 후, Qubit™ ssDNA Assay Kit (Cat. # Q10212)을 사용하여 정량을 수행하였다. 이 후, 아황산 전환된 Methylated & Non-methylated DNA를 각각 0.1ng/uL 수준으로 Nuclease-free Water (Cat. # AM9937)로 희석한 후, Methylated DNA를 Non-methylated DNA에 희석하는 방식으로 4배씩 Serial

Dilution을 수행하여 Methylated DNA 100%, 25%, 6.25%, 1.56%, 0.39%, 0%의 검체를 제작하였다.

- [159] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1에 대하여 제작한 프라이머 세트의 예시적인 서열을 표 5에 나타냈다. 각 프라이머 서열에서 마커 1의 CpG 또는 Non-CpG 사이토신에 대응하는 부위를 대문자로 기재하고, 그 외의 염기는 소문자로 기재하였다.

- [160] [표5]

| name                                     | Seq (5'→3')                     | SEQ ID NO. |
|------------------------------------------|---------------------------------|------------|
| Methylated Forward Primer for marker 1   | gagaaggTtTtgagaTTtTtgtaa<br>Tag | 10         |
| Methylated Reverse Primer for marker 1   | ctccttAcaAaAcCGACGcCG           | 11         |
| Unmethylated Reverse Primer for marker 1 | tccttAcaAaAcCAACAcCA            | 12         |

- [161] 최소 검출 한계 (limit of detection, LoD) 실험에 사용된 PCR Mixture는 표 5의 프라이머를 사용하여 다음과 같이 제조하였다 (1 rxn 기준):

- [162] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)

- [163] LightCycler (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)

- [164] Primer Mixture (각 Primer의 농도는 12  $\mu$ M): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 0.6  $\mu$ M)

- [165] Total: 15  $\mu$ L

- [166] 제조된 PCR Mixture를 96-well plate의 각 well에 15  $\mu$ L씩 분주 후, 0.1 ng/ $\mu$ L 농도의 Methylated DNA 100%, 25%, 6.25%, 1.56%, 0.39%, 0% 검체를 10  $\mu$ L씩 각 well에 분주하였다. 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행하였다:

- [167] 95°C 5분 / 95°C 10초 - 63°C 30초 - 72°C 15초 (39 Cycle): PCR 반응

- [168] 72°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석

- [169] 사용된 Methylated DNA의 비율에 따른 TS-AUMC (Temperature-shifted Area under the Melting Curve)를 확인하고, Non-methylated DNA가 Background로 존재할 때 검출 가능한 Methylated DNA를 측정하는 최소검출한계 (limit of detection, LoD)를 확인하였다.

- [170] 도 6c에 나타난 바와 같이, 비-메틸화 가닥이 99.6% 존재하는 환경에서도 0%와 Methylation Signal 값인 Temperature-shifted AUMC 값의 해상도가 확인되는 결과를 보였다. 구체적으로, Input DNA 1ng의 DNA에서 0.4% 수준을 Copy수로 변환하면 표적 가닥 1.2 Copy 수준으로 계산되므로, 실시예 5에서 확립한 바이오 마커의 메틸화 수준 측정 방법은 혈액에서 다량의 비-메틸화 가닥이 존재해도 미량의 메틸화 가닥을 검출할 수 있는 효과를 나타냈다.

- [171]

- [172] 실시예 7. 조직 샘플을 이용한 간암 진단

- [173] 간암 (LIHC) (정상;120, 종양;115), 폐암 (LUAD) (정상;8, 종양;9), 대장암 (COAD) (정상;10, 종양;10), 신장암 (KIRP 및 KIRC) (정상;16, 종양;15), 방광암 (BLCA) (정상;10, 종양;9), 갑상선암 (THYM) (정상;6, 종양;6) 환자로부터 수집된 정상 및 종양 조직으로부터 gDNA 추출 및 아황산 전환을 진행하였다. 신장암의 경우 신장 유두 세포 암(Kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP) (정상;9, 종양;5) 또는 신장 투명 세포 암(Kidney renal clear cell carcinoma, KIRC) (정상;7, 종양;10)로 구분하였다.
- [174] 구체적으로, 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조하였다(1 rxn 기준):
- [175] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [176] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [177] Methylated Forward Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [178] Methylated Reverse Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [179] Unmethylated Forward Primer (10 uM): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2 uM)
- [180] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L
- [181] Total: 22  $\mu$ L
- [182] 준비된 시료를 정량하여 0.33 ng/ $\mu$ L로 희석하여, 해당 시료를 3  $\mu$ L 넣어주었다. 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행하였다:
- [183] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 69°C 40초 (20 Cycle, 69°C를 시작으로 Cycle 당 0.3°C 감소하여 63°C로 종료): PCR 반응
- [184] 95°C 20초 - 63°C 40초 (40 Cycle, 63°C로 일정하게 진행): PCR 반응
- [185] 63°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [186] 각 검체에 실시예 5에서 확립한 MS-HRM 분석법을 적용하여, 정규화된 녹는점 곡선에서 AUMC (Area Under the Melting Curve)를 도출하였다.
- [187] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커는 간암 조직에서 유의하게 높은 메틸화 수준을 나타냈으며, 이에 간암 진단을 위해 활용될 수 있다.
- [188]
- [189] **실시예 8. 건강한 사람의 혈액 샘플 분석**
- [190] 시료 준비를 위해 55명의 건강한 사람으로부터 수집된 Buffy Coat로부터 gDNA 추출 및 아황산 전환을 진행했다. 본 출원의 일 예에 따른 마커 1의 메틸화 수준을 측정하기 위해, 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조했다(1 rxn 기준):
- [191] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [192] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [193] Methylated Forward Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [194] Methylated Reverse Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)

- [195] Unmethylated Forward Primer (10 uM): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2 uM)
- [196] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L
- [197] Total: 22  $\mu$ L
- [198] 농도가 0.33 ng/ $\mu$ L인 Buffy Coat 시료를 3  $\mu$ L 넣어주고, EpiTect Unmethylated DNA 및 Methylated DNA 또한 3  $\mu$ L를 PCR Mixture가 들어있는 각 well에 넣어주었다. 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행했다:
- [199] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 69°C 40초 (20 Cycle, 69°C를 시작으로 Cycle 당 0.3°C 감소하여 63°C로 종료): PCR 반응
- [200] 95°C 20초 - 63°C 40초 (40 Cycle, 63°C로 일정하게 진행): PCR 반응
- [201] 63°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [202] 각 검체에 실시예 5에서 확립된 MS-HRM 분석법을 적용하여, 정규화된 녹는점 곡선과 온도에 따라 미분하여 음수를 취한 녹는점 피크(Peak) 및 AUMC를 도출하였다.
- [203] 도 8에 나타난 바와 같이, 건강한 사람 55명의 Buffy Coat gDNA 모두 Unmethylated DNA와 동일한 녹는점 곡선과 녹는점 피크 결과를 보이며, 이는 정상인의 혈액 세포에는 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커에 대한 메틸화 수준을 보이지 않는 것을 나타낸다.
- [204]
- [205] 실시예 9. 혈액 샘플을 이용한 간암 진단
- [206] (1) 간암 진단의 정확성 분석 (1)
- [207] 총 81명의 건강한 사람과 319명의 HCC 환자의 혈장에서 추출된 cfDNA를 아황산 전환하여 MS-HRM 분석법에 적용하기 위한 검체를 준비하였다. 각 시료에서 본 출원의 일 예에 따른 마커 1의 메틸화 수준을 측정하기 위해, 표 4의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조했다(1 rxn 기준):
- [208] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [209] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [210] Methylated Forward Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [211] Methylated Reverse Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [212] Unmethylated Forward Primer (10 uM): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2 uM)
- [213] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L
- [214] Total: 22  $\mu$ L
- [215] 0.33 ng/ $\mu$ L짜리 대조군 핵산 시료를 3  $\mu$ L씩 각 well에 분주하고, 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행했다:
- [216] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 69°C 40초 (20 Cycle, 69°C를 시작으로 Cycle 당 0.3°C 감소하여 63°C로 종료): PCR 반응
- [217] 95°C 20초 - 63°C 40초 (40 Cycle, 63°C로 일정하게 진행): PCR 반응

- [218] 63°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [219] 각 검체에 실시예 5에서 확립된 MS-HRM 분석법을 적용하여, 정규화된 녹는 점 곡선에서 AUMC를 도출했다. 81명의 건강한 사람의 AUMC 기반으로 97<sup>th</sup> Percentile을 cut-off를 설정하였고, 건강한 사람 (Healthy)과 조기 (Early), 중기 및 말기 (Late) 간암 환자의 AUMC 분포를 boxplot으로 도 9a의 A에 나타냈다. 또한, 100% 메틸화된 대조군 샘플 및 100% 비메틸화된 대조군 샘플의 AUMC를 기준으로 메틸화 수준을 하기 수학식 1과 같이 정량하여 도 9a의 B에 나타냈다. 이 때, 메틸화 수준이 0 미만인 경우 0으로 계산하였고, 메틸화 수준이 100 이상인 경우 100으로 계산하였다. 도 9a에서 설정된 cut-off 값을 점선으로 나타냈다.
- [220] [수학식 1]
- [221] 메틸화 수준 =  $(AUMC_{\text{sample}} - AUMC_{\text{unmet.Ctrl}}) / (AUMC_{\text{Met.Ctrl}} - AUMC_{\text{unmet.Ctrl}})$
- [222]  $AUMC_{\text{sample}}$ : 샘플의 AUMC값
- [223]  $AUMC_{\text{unmet.Ctrl}}$ : 100% 비메틸화 대조군 샘플의 AUMC값
- [224]  $AUMC_{\text{Met.Ctrl}}$ : 100% 메틸화 대조군 샘플의 AUMC값
- [225]
- [226] 도 9a에 나타난 바와 같이, 건강한 사람 그룹과 HCC 환자 그룹간 AUMC의 분포가 t-test 기반 통계적으로 유의미한 차이를 보여, 본 출원의 일 예에 따른 마커 1의 메틸화 수준은 간암 발병의 위험성을 정확하게 예측하는 것을 확인했다.
- [227]
- [228] (2) 간암 진단의 정확성 분석 (2)
- [229] 총 420명의 임상 검체 (건강한 대조군; 89명, 고위험군; 196명, 간암군; 135명)에 대하여, 실시예 9의 (1)과 동일한 방법으로 검체를 준비하고, 표 5의 프라이머를 사용하여 AUMC 분석 결과를 도 9b에 나타냈다. 도 9b에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해서 조기 간암군(BCLC 0-A) 및 말기 간암군(BCLC B-D)에서 통계적으로 유의미한 AUMC 값 (해당 검체에서 메틸화된 정도)의 증가를 확인하였다.
- [230] 또한, 생산된 혈액 샘플 기반의 임상 데이터에서 건강한 대조군에서 관측된 TS-AUMC 값을 기준으로 특이도 95% 수준의 Cut-off를 설정하였고, 이를 기반으로 간암 환자의 BCLC stage 별 민감도를 계산하는 과정으로 민감도 및 특이도를 계산하여 표 6에 나타냈다. 표 6에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1은 높은 특이도 수준에서 조기 및 말기 간암 환자에서 각각 50% 이상 및 70% 이상 민감도를 보여주는 효과를 가져, 간암을 우수한 정확도로 진단할 수 있었다.
- [231] [표6]

| Type     | Sensitivity |        |        |          |       | Specificity |
|----------|-------------|--------|--------|----------|-------|-------------|
| Stage    | BCLC 0      | BCLC A | BCLC B | BCLC C-D | Total | Healthy     |
| Positive | 8           | 20     | 18     | 41       | 87    | 5           |

|           |       |       |       |       |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Negative  | 6     | 20    | 7     | 15    | 48    | 84    |
| Total     | 14    | 40    | 25    | 56    | 135   | 89    |
| Se.   Sp. | 57.1% | 50.0% | 72.0% | 73.2% | 64.4% | 94.4% |

[232]

[233] 실시예 10. 종래의 간암 진단 마커와 비교

[234] HCC 환자를 BCLC Stage에 따라 구분하여, Early 및 Late Stage로 구분하였다 (Early; BCLC 0 & A, Late; BCLC B, C & D). 종래의 간암 검사법인 AFP 수치 확인 대비 본 출원에서 개발된 분석법의 진단능을 HCC 환자 병기에 따라 비교하였다. 81명의 건강한 사람에서 확인된 AUMC 값의 97<sup>th</sup> Percentile 및 AFP 20 이상을 기준으로 HCC 양/음성 판정에 대한 민감도 및 특이도를 표 7에 나타냈다.

[235]

[표7]

| Marker      | Total    | Early | Se <sub>Early</sub> | Late | Se <sub>Late</sub> | HCC | Se <sub>Total</sub> | Healthy | Sp    |
|-------------|----------|-------|---------------------|------|--------------------|-----|---------------------|---------|-------|
| marker 1    | Positive | 118   | 62.4%               | 101  | 77.7%              | 219 | 68.7%               | 3       | 96.3% |
|             | Negative | 71    |                     | 29   |                    | 100 |                     | 78      |       |
|             | Total    | 189   |                     | 130  |                    | 319 |                     | 81      |       |
| AFP         | Positive | 61    | 32.3%               | 83   | 63.9%              | 144 | 45.1%               | -       | -     |
|             | Negative | 128   |                     | 47   |                    | 175 |                     | -       |       |
|             | Total    | 189   |                     | 130  |                    | 319 |                     | 81      |       |
| Combination | Positive | 137   | 72.5%               | 113  | 86.9%              | 250 | 78.4%               | -       | -     |
|             | Negative | 52    |                     | 17   |                    | 69  |                     | -       |       |
|             | Total    | 189   |                     | 130  |                    | 319 |                     | 81      |       |

[236]

표 7에 나타난 바와 같이, 종래의 간암 검사법인 AFP 검사보다 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커 기반의 간암 검사법의 진단 민감도가 전체 간암 환자에서 약 23.6% 높은 것을 확인할 수 있으며, 특히 조기 간암 환자에서는 AFP 검사보다 약 30.1% 높은 민감도가 확인되었다. 또한, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커를 이용한 간암 검사법과 AFP 검사법을 병행하였을 때 전체적인 진단 민감도가 월등히 증가하는 것을 확인하였고, 이는 혈액 기반의 액체 생검이라는 측면에서 종래의 검사법과 병행되어 간암 진단에 도움을 줄 수 있다.

[237]

[238] 실시예 11. 바이오 마커 조합에 의한 진단 성능 향상

[239] (1) 마커 1 및 마커 2 조합에 의한 간암 진단

[240] HCC 환자를 BCLC Stage에 따라 구분하여, Early 및 Late Stage로 구분했다 (Early; BCLC 0 & A, Late; BCLC B, C & D). 본 출원의 일 예에 따른 마커 1 및 마커 2의 조합 시 간암 진단능을 HCC 환자 병기에 따라 비교하여 표 8에 나타냈다.

[241] [표8]

| Marker      | Total    | Early | Se <sub>Early</sub> | Late | Se <sub>Late</sub> | HCC | Se <sub>Total</sub> | Healthy | Sp    |
|-------------|----------|-------|---------------------|------|--------------------|-----|---------------------|---------|-------|
| marker 1    | Positive | 121   | 63.0%               | 103  | 77.4%              | 224 | 68.9%               | 3       | 96.3% |
|             | Negative | 71    |                     | 30   |                    | 101 |                     | 79      |       |
| Total       |          | 192   |                     | 133  |                    | 325 |                     | 82      |       |
| marker 2    | Positive | 71    | 37.0%               | 90   | 67.7%              | 161 | 49.5%               | 1       | 98.8% |
|             | Negative | 121   |                     | 43   |                    | 164 |                     | 81      |       |
| Total       |          | 192   |                     | 133  |                    | 325 |                     | 82      |       |
| Combination | Positive | 143   | 74.5%               | 115  | 86.5%              | 258 | 79.4%               | 4       | 95.1% |
|             | Negative | 49    |                     | 18   |                    | 67  |                     | 78      |       |
| Total       |          | 192   |                     | 133  |                    | 325 |                     | 82      |       |

[242] 표 8에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 마커 1을 이용한 경우, 마커 2와 비교하여 모든 간암 병기에서 우월한 민감도를 확인하였고, 추가적으로 두 마커를 조합하여 사용할 경우 특이도는 동등하게 유지하면서 민감도가 10%이상 증가하여, 간암 진단 성능의 향상을 도모할 수 있다는 점을 보여준다.

[243]

[244] (2) 마커 1 및 다양한 바이오마커 조합에 의한 간암 진단

[245] 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1과 AFP, 나이, 및 성별 등 다양한 바이오 마커를 조합하여 간암 진단 정확도가 향상되는지 여부를 검증하였다. 대조군으로 종래의 MS-HRM 방법을 사용하였다. 구체적으로, 생산된 데이터 중, 나이, 성별 및 AFP 검사 수치가 모두 존재하는 검체들을 기반으로 R에서 glm() 함수를 사용한 로지스틱 회귀분석을 진행하였고, TS-AUMC 값과 조합하여 진단 예측 모델을 구축하여 roc() 함수를 활용하여 임상적 성능을 확인하였다.

[246] 도 10에 나타난 바와 같이, 본 출원의 일 예에 따른 바이오 마커인 마커 1은, 단독 사용시에도 우수한 간암 진단능을 나타냈으며, AFP 검사법, 나이 정보, 및 성별 정보와 조합되어 로지스틱 회귀모델을 기반으로 간암군을 예측했을 때, 최대 AUC가 0.9524 (0.9309-0.9740)으로 증가하는 상승 효과를 나타냈다.

[247]

[248] 실시예 12. 타겟 메틸화 부위의 간암 특이성

[249] 본 출원의 일 예에 따른 마커 1 타겟 부위의 간암 특이성을 확인하고자, 실시예 4에서 사용한 TCGA 및 GEO 데이터베이스의 메틸화 데이터를 사용하여 암 종별로 평균 메틸화 정도를 분석하였다.

[250] 구체적으로, R software에서 ggplot2 R package을 사용하여 각 데이터 세트 별 메틸화 정도를 heatmap으로 확인한 결과를 도 11에 나타냈다 (X축: 샘플, Y축: LDHB 유전자 내의 Probe ID). 도 11에서 X축은 간암을 포함하여 23개 암 종 테

이더 세트의 정상 및 암 조직 샘플, Y축은 바이오 마커, 매트릭스의 컬러는 메틸화 정도를 의미하며, Probe ID가 표기된 지역에서 박스로 표시된 부분은 본 출원의 일 예에 따른 마커 1에 포함된 CGI 지역 중 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810280번째, 21810450 내지 21810451번째, 21810458 내지 21810459번째, 21810489 내지 21810490번째, 21810600 내지 21810601번째, 21810750 내지 21810751번째, 21810759 내지 21810760번째, 및 21810791 내지 21810792번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 나타내며, 음영 표시된 부분은 21810750 내지 21810751번째 CGI의 타겟 부위를 나타낸다.

- [251] 도 11에 나타난 바와 같이, 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 CGI (CpG island) 지역에서는 간암 샘플에서만 고메틸화되며, 정상 간 및 타 암 중에서는 저메틸화된 패턴을 나타냈으며, 따라서 타겟 부위의 메틸화 정도를 통해 높은 간암 특이성을 확보할 수 있다. 반면, 그 외 지역은 cg26362257 (12번 염색체의 21788425 내지 21788426번째 서열) 등과 같이 대다수의 검체에서 고메틸화되거나, cg03243946 (12번 염색체의 21811034 내지 21811035번째 서열) 및 cg10195295 (12번 염색체의 21809973 내지 21809974번째 서열) 등과 같이 담관암 (Cholangiocarcinoma; CHOL)을 포함하여 췌장 선암 (Pancreatic adenocarcinoma; PAAD) 및 전립선 선암 (Prostate adenocarcinoma; PRAD)에서 고메틸화되는 등, 간암 특이적인 메틸화 상태를 나타내지 않았다.
- [252] 따라서, 각 암 종에서의 평균 메틸화 값을 확인한 결과, 본 출원의 일 예에 따른 마커 1 영역에서만 간암 특이성이 있는 것을 확인하였다.

[253]

[254] 실시예 13. 바이오 마커의 간암 진단능 확인

- [255] 총 210명의 건강한 사람, 176명의 고위험군 환자 및 133명의 간암 환자의 혈장에서 추출된 cfDNA를 아황산 전환하여 MS-HRM 분석법에 적용하기 위한 검체를 준비하였다. 마커 2에 대하여 제작한 프라이머 세트의 예시적인 서열을 표 9에 나타냈고, 마커 3에 대하여 제작한 프라이머 세트의 예시적인 서열을 표 10에 나타냈다. 각 프라이머 서열에서 마커 3의 CpG 또는 Non-CpG 사이토신에 대응하는 부위를 대문자로 기재하고, 그 외의 염기는 소문자로 기재하였다.

[256] [표9]

| name                                   | Seq (5'→3')               | SEQ ID NO |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------|
| Methylated Forward Primer for marker 2 | TTatggCGggTTtgggTTtgggTtT | 13        |
| Methylated Reverse Primer for marker 2 | caAcccctAAcaAatAatAcaAcC  | 14        |

[257] [표10]

| name                                     | Seq (5'→3')            | SEQ ID NO |
|------------------------------------------|------------------------|-----------|
| Methylated Forward Primer for marker 3   | GgatTagggagtggTttgtaaT | 15        |
| Methylated Reverse Primer for marker 3   | ccCGctctcttcttCGtA     | 16        |
| Unmethylated Reverse Primer for marker 3 | acccCActctcttcttCAtA   | 17        |

- [258] 각 시료에서 본 출원의 일 예에 따른 마커 2의 메틸화 수준을 측정하기 위해, 표 7의 프라이머를 사용하여 실시예 5와 같이 PCR Mixture를 제조하고, 동일한 조건으로 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행하였다.
- [259] 또한, 각 시료에서 본 출원의 일 예에 따른 마커 3의 메틸화 수준을 측정하기 위해, 표 8의 프라이머를 사용하여 PCR Mixture를 다음과 같이 제조했다(1 rxn 기준):
- [260] Master Mix (2X): 12.5  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [261] EvaGreen (20X): 1.25  $\mu$ L (Final Conc. 1X)
- [262] Methylated Forward Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [263] Methylated Reverse Primer (10 uM): 1  $\mu$ L (Final Conc. 0.4 uM)
- [264] Unmethylated Reverse Primer (10 uM): 0.5  $\mu$ L (Final Conc. 0.2 uM)
- [265] NFW (nuclease-free water): 5.75  $\mu$ L
- [266] Total: 22  $\mu$ L
- [267] 0.33 ng/ $\mu$ L짜리 대조군 핵산 시료를 3  $\mu$ L씩 각 well에 분주하고, 아래의 조건과 같이 PCR 반응 및 HRM 분석을 진행했다:
- [268] 95°C 5분 / 95°C 20초 - 61°C 30초 - 72°C 30초 (50 Cycle): PCR 반응
- [269] 72°C 5분 / 60°C - 95°C (0.2°C씩 증가시켜 10초간 반응 후 형광값 측정): HRM 분석
- [270] 각 검체에 실시예 5에서 확립된 MS-HRM 분석법을 적용하여, 정규화된 녹는점 곡선에서 AUMC를 도출했다. 210명의 건강한 사람의 AUMC 기반으로 95th Percentile을 cut-off를 설정하였고, 건강한 사람, 고위험군 환자 및 간암 환자에서의 AUMC 분포를 boxplot으로 도 12에 나타냈다. 도 12에서 설정된 cut-off 값을 점선으로 나타냈다.
- [271] 도 12에 나타난 바와 같이, 건강한 사람 그룹, 고위험군 환자 및 간암 환자 그룹 간 t-test 기반 통계적으로 유의미하게 간암 환자군에서 높은 AUMC 분포를 보여, 본 출원의 일 예에 따른 마커 2 및 마커 3의 메틸화 수준은 간암 발병의 위험성을 정확하게 예측하는 것을 확인했다.

## 청구범위

- [청구항 1] 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 CpG 사이트는 인간 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 영역은 서열번호 1로 표시되는 서열을 가지는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제; 및/또는 상기 생물학적 시료에서 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 17번 염색체의 29298115 내지 29298116번째, 29298118 내지 29298119번째, 29298124 내지 29298125번째, 29298136 내지 29298137번째, 29298142 내지 29298143번째, 또는 29298184 내지 29298185번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하고, 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역은 서열번호 2로 표시되는 서열을 가지는 것이고, 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역은 서열번호 3으로 표시되는 서열을 가지는 것인, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 알파태아단백질 (Alpha Fetoprotein; AFP)의 농도를 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 서열 영역의 타겟 메틸화 부위를 증폭하기 위한 프라이머인, 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 프라이머는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며, 상기 정방향 프라이머 및 상기 역방향 프라이머 중 1종은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 포함하고,

상기 메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하고,

상기 비메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하며,

상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열의 TpG 서열은, 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열의 비메틸화된 CpG 서열이 변환된 것인, 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 TpG 서열은 메틸화된 CpG 서열과 비메틸화된 CpG 서열을 서로 다르게 변형시키는 제제에 의해 변환된 것인, 조성물.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 변형시키는 제제는 비메틸화 사이토신 잔기를 티민으로 변환하는 것인, 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 혈소판, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 서열 영역은 세포 유리 DNA (cell free DNA; cfDNA)에 포함된 것인, 조성물.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 간암은 간세포암 (Hepatocellular carcinoma, HCC)인, 조성물.

[청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측용 키트.

[청구항 16] 대상체에서 분리된 생물학적 시료에서 인간 12번 염색체의 21810279 내지 21810792번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간암 발병의 위험성 예측을 위한 정보 제공 방법.

[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 CpG 사이트는 인간 12번 염색체의 21810750 내지 21810751번째 CpG 사이트를 포함하는 것인, 방법.

[청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 영역은 서열번호 1로 표시되는 서열을 가지는 것인, 방법.

[청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및/또는 상기 생물학적 시료에서 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 17번 염색체의 29298115 내지 29298116번째, 29298118 내지 29298119번째, 29298124 내지 29298125번째, 29298136 내지 29298137번째, 29298142 내지 29298143

- 번째, 또는 29298184 내지 29298185번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하고,
- 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역에 포함된 적어도 하나의 CpG 사이트는, 인간 19번 염색체의 19739407 내지 19739408번째 서열에 위치한 CpG 사이트를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 21] 제19항에 있어서, 상기 인간 17번 염색체의 29298021 내지 29298631번째 서열 영역은 서열번호 2로 표시되는 서열을 가지는 것이고, 상기 인간 19번 염색체의 19738547 내지 19739846번째 서열 영역은 서열번호 3으로 표시되는 서열을 가지는 것인, 방법.
- [청구항 22] 제16항에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 알파태아단백질 (Alpha Fetoprotein; AFP)의 농도를 측정하는 단계, 상기 대상체의 성별 정보를 수집하는 단계, 및/또는 상기 대상체의 나이 정보를 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 23] 제16항에 있어서, 상기 메틸화 수준은 상기 서열의 타겟 메틸화 부위를 증폭하기 위한 프라이머를 이용하여 측정하는 것인, 방법.
- [청구항 24] 제23항에 있어서, 상기 프라이머는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하며,  
상기 정방향 프라이머 및 상기 역방향 프라이머 중 1종은 메틸화 프라이머 및 비메틸화 프라이머를 포함하고,  
상기 메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 CpG 서열을 인식하는 CpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하고,  
상기 비메틸화 프라이머는 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 TpG 서열을 인식하는 TpG 인식 부위를 적어도 1개 포함하며,  
상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열의 TpG 서열은, 상기 타겟 메틸화 부위를 포함하는 소정 길이 서열에 포함된 비메틸화된 CpG 서열이 변환된 것인, 방법.
- [청구항 25] 제16항에 있어서, 상기 CpG 사이트의 메틸화 수준을 정량하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 정량하는 단계는 상기 생물학적 시료; 상기 CpG 사이트가 100% 메틸화된 시료; 및 상기 CpG 사이트가 100% 비메틸화된 시료의 정규화된 용융 곡선 (melting curve)의 AUC (Area under the curve)를 비교하여, 상기 CpG 사이트의 메틸화 정도를 정량하는 것인, 방법.
- [청구항 27] 제16항에 있어서, 상기 생물학적 시료의 용융 곡선 (melt curve)을 얻는 단계;

상기 CpG 사이트가 메틸화된 서열 및 상기 CpG 사이트가 비메틸화된 서열의 함량비를 알고 있는 생물학적 시료의 정규화 용융 곡선 (normalized melt curve)을 얻는 단계; 및

상기 생물학적 시료의 용융 곡선 및 상기 정규화 용융 곡선을 비교하여, 상기 CpG 사이트의 메틸화 정도를 정량하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

- [청구항 28] 제16항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 29] 제16항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 정상 대조군의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 메틸화 수준이 상기 정상 대조군의 메틸화 수준보다 높을 경우, 상기 대상체는 간암 발병의 위험성을 가지는 것으로 정보를 제공하는 것인, 방법.
- [청구항 30] 제16항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 혈소판, 조직, 세포, 대변 및 소변으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.
- [청구항 31] 제16항에 있어서, 상기 서열은 세포 유리 DNA (cell free DNA; cfDNA)에 포함된 것인, 방법.
- [청구항 32] 제16항에 있어서, 상기 간암은 간세포암 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 인, 방법.