

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 15일 (15.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/144137 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002462
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 11일 (11.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0034686 2015년 3월 12일 (12.03.2015) KR
- (71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로 43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 이정신 (LEE, Jung Shin); 06214 서울시 강남구 언주로 406, 35동 306호, Seoul (KR). 최은경 (CHOI, Eun Kyung); 05510 서울시 송파구 올림픽로 35길 93, 102동 2504호, Seoul (KR). 장세진 (JANG, Se Jin); 13517 경기도 성남시 분당구 야탑로 124, 605동 704호, Gyeonggi-do (KR). 천성민 (CHUN, Sung Min); 05240 서울시 강동구 상암로 11, 107동 1606호, Seoul (KR). 김태임 (KIM, Tae Im); 05707 서울시 송파구 송이로 88, 2동 1008호, Seoul (KR). 이지영 (LEE, Ji

Young); 08844 서울시 관악구 서원4길 6, 205호, Seoul (KR). 김유진 (KIM, Yu Jin); 05237 서울시 강동구 아리수로 74, 다동 101호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

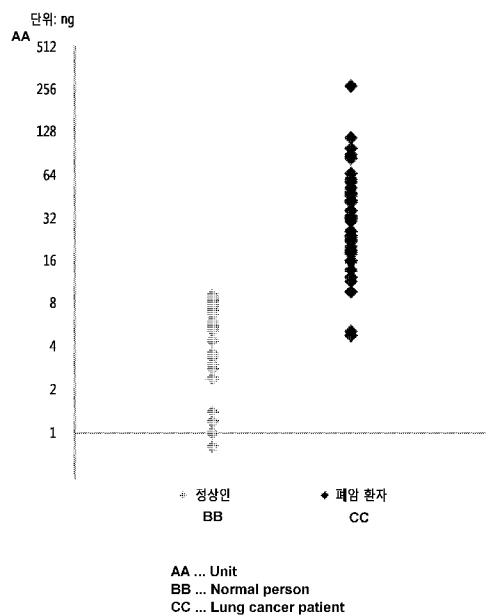
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD OF SEPARATING CIRCULATING CELL-FREE NUCLEIC ACID

(54) 발명의 명칭: 순환 유리 핵산의 분리 방법



(57) Abstract: The present invention relates to: a method of separating circulating cell-free nucleic acid from a sample including circulating cell-free nucleic acid; a circulating cell-free nucleic acid separating kit; and a dissolving buffer solution for separating circulating cell-free nucleic acid.

(57) 요약서: 본 발명은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법, 순환 유리 핵산 분리 키트 및 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액에 관한 것이다.

WO 2016/144137 A1



공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 순환 유리 핵산의 분리 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법, 순환 유리 핵산 분리 키트 및 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 혈액에 존재하는 암 특이적 세포 외 DNA 단편 및 mRNA, 또는 모체혈(maternal blood)에 존재하는 태아의 핵산(fetal nucleic acid)과 같은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid, cfNA)이 혈청 또는 혈장 내에 1000bp 이하의 DNA, 또는 100nt 이하의 RNA 형태로 존재하는 것이 알려져 있다. 특히, 암의 발달 과정 중 암의 괴사 혹은 사멸된 세포에 의해 유리된 핵산이 혈장 내에 존재하는 것이 알려져 있다. Kamat *et al*(Cancer Biol Ther. 2006 Oct;5(10):1369-74.)은 누드 마우스에 암세포를 주입하고 이후 cfDNA의 양을 측정하였을 때, cfDNA의 양이 암의 크기를 잘 반영하고, 이후의 치료에 대한 반응도 잘 반영한다고 보고한 바 있다. 이렇듯 cfDNA는 다양한 위치의 암에서 다양하게 유리되어 암의 발달, 진행 및 전이된 암의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있어, 이를 암의 연구 및 진단에 이용하고자 순환 유리 핵산의 효과적인 분리에 대한 필요성이 강조되고 있다.

[4]

- [5] 순환 유리 핵산의 분리 방법으로, 컬럼을 이용하여 순환 유리 핵산을 분리하는 키트 및 방법 등이 알려져 있다(QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit). 그러나, 기존에 알려진 방법에 비하여 개선된 순환 유리 핵산의 분리 키트 및 방법의 개발이 여전히 요구된다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 순환 유리 핵산을 효과적으로 수득할 수 있는 키트 및 방법의 개발을 위하여 예의 노력한 결과, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료를 용해시키고, 여기에 염 및 PEG를 포함하는 용액과 자성 비드를 첨가하여 순환 유리 핵산이 결합된 자성 비드로부터 순환 유리 핵산을 획득하는 방법을 개발하였다. 상기 개발된 방법을 사용하여 순환 유리 핵산을 포함하는 시료에서 순환 유리 핵산을 효과적으로 분리할 수 있음을 확인하였고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 하나의 목적은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 용해 완충액(lysis buffer); 염 및 PEG를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산 분리 키트를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 카오트로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액을 제공하는 것이다.

[12]

발명의 효과

- [13] 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트 및 방법에 따르면 순환 유리 핵산 분리를 포함하는 시료, 특히 혈장 또는 혈청 시료에서 순환 유리 핵산을 단기간 내에 고수율로 수득할 수 있는 효과를 가진다.

[14]

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은, 정상인 및 폐암 환자의 혈장 200 μ l로부터 수득한 cfDNA의 양을 그래프로 나타낸 것이다. 여기서, 회색 마름모는 정상인로부터 분리한 혈장에 대한 실험 결과를, 검은색 마름모는 폐암 환자로부터 분리한 혈장에 대한 실험 결과를 나타낸다. y 축은 cfDNA의 양(ng)을 나타낸다.
- [16] 도 2는, 폐암 환자로부터 분리한 혈장을 사용하여 cfDNA Prep을 2번 수행한 후, 재현성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 3a 및 b는, 본 발명의 방법에 따라 난소암 환자의 혈장에서 분리한 cfDNA의 패턴을 Bioanalyzer로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 혈장 cfDNA는 뉴클레오솜 단위로 단편화되어 있는 것으로 알려져 있는데, 본 발명의 방법에 따라 수득한 cfDNA의 크기가 뉴클레오솜 단위인 대략 180bp로 단편화 되어 있는 결과를 나타내어, 본 발명의 방법이 cfDNA 분리에 적합함을 시사하였다.
- [18] 도 4는, 본 발명의 방법에 따라 분리한 cfDNA를 주형으로 사용하여 ~100BP와 237BP 크기의 PCR 산물이 증폭되는지 여부를 확인한 결과이다. 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 PCR 산물이 잘 증폭되어, 본 발명의 방법에 따라 정제된 cfDNA가 DNA 중합효소의 효소 반응에 영향을 주지 않는, 높은 순도를 가지고 있음을 나타내었다.
- [19] 도 5a는, 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법으로 정상인의 혈액으로부터 혈장을 분리한 다음, cfDNA PREP을 수행하여 수득된 DNA 양을 확인한 결과를 각각 나타낸 것이다. x 축은 각 혈장 시료의 번호를, y 축은 cfDNA 양(단위: ng)을 나타낸다.
- [20] 도 5b는, 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법으로 정상인의 혈액으로부터 혈장을 분리한 다음, cfDNA PREP을 수행한 다음, 분리한

cfDNA를 Bioanalyzer로 분석한 결과를 나타낸다.

- [21] 도 6은, 본 발명에 따른 방법(CCGD_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 cfDNA를 분리한 결과를 나타내는 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.
- [22] 도 7은, 비교 완충액 1(카오토로픽 염, 킬레이트 제 및 Tris-Cl을 포함) 및 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하여 cfDNA PREP을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.
- [23] 도 8은, 비교 완충액 2(킬레이트 제, 비이온성 계면활성제 및 Tris-Cl을 포함) 및 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하여 cfDNA PREP을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.
- [24] 도 9는 10 명의 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 분리한 cfDNA의 수율을 Picogreen 정량법 (PG) 및 RQ-PCR 정량법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸다.
- [25] 도 10은 Picogreen 정량값 (PG) 및 RQ-PCR 정량값의 상관 계수를 분석한 결과를 나타낸다.
- [26] 도 11은 10 명의 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 분리한 cfDNA의 품질을 나타낸다.
- [27] 도 12는 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 분리한 cfDNA의 순도를 나타낸다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 구체적인 하나의 양태는
- [30] (a) 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 단계; 및
- [31] (b) 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계를 포함하는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법이다. 상기 핵산을 분리하는 방법은 PREP으로도 불릴 수 있다.
- [32]
- [33] 본 발명에서 용어, "순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)"은 혈액에서 순환하며 존재하는 DNA를 말한다. 상기 순환 유리 핵산은 구체적으로 순환 유리 DNA(circulating cell-free DNA, cfDNA), 순환 유리 RNA 등을 포함하며, 구체적으로는 순환 유리 DNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 순환 유리 핵산은 일반적으로 혈장 또는 혈청에 1000bp 이하(DNA), 100nt 이하(RNA)의 길이를 나타내나, 이에 제한되지 않는다. 상기 순환 유리 핵산은

혈액 내에 소량으로 존재하여 이를 높은 수율로 획득하는 방법의 개발이 요구되어 왔다.

- [34] 본 발명에서는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료를 자성 비드; 및 염 및 PEG를 포함하는 용액과 반응시키고, 자성 비드에 결합된 순환 유리 핵산을 분리하는 방법을 개발하였다. 자성 비드와 순환 유리 핵산을 반응시킴에 있어서, 염 및 PEG를 포함하는 용액을 모두 포함하는 용액을 사용하는 경우, 자성 비드가 순환 유리 핵산을 보다 효과적으로 포획할 수 있어, 고수율로 순환 유리 핵산을 수득할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 상기 방법에 있어 용해 완충액 및 혈장 제조 역시 최적화하여 재현성있게 순환 유리 핵산을 효과적으로 분리할 수 있는 기술을 개발하였다.

[35]

- [36] 이하 본 발명의 단계 및 각 구성을 보다 상세히 설명한다.

[37]

- [38] 본 발명의 방법에서 (a) 단계는 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG를 포함하는 용액, 및 자성 비드를 첨가하여 순환 유리 핵산이 자성 비드에 결합하도록 하는 단계이다.

[39]

- [40] 본 발명에서, 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료라면 그 종류는 특별히 제한되지 않으나, 혈장 또는 혈청일 수 있다. 구체적으로, 순환 유리 핵산의 분석 또는 수득이 필요한 개체로부터 분리된 혈장 또는 혈청, 보다 구체적으로는 혈장일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[41]

- [42] 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 혈장 또는 혈청을 용해 완충액(lysis buffer)으로 용해시켜 제조한 것일 수 있다.

- [43] 이에 따라 본 발명의 방법은 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 혈장 또는 혈청 시료에 용해 완충액을 첨가하는 제1 단계; 상기 제1 단계에서 용해된, 순환 유리 핵산을 포함하는 상기 시료에 염 및 PEG를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 제2 단계; 및 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 제3 단계를 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[44]

- [45] 혈장 또는 혈청의 용해를 위해 사용되는 상기 용해 완충액은 구체적으로, 카오트로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46]

본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 조성을 가진 용해 완충액을 사용하는 경우, 킬레이트제인 EDTA, 카오트로픽염인 SDS, 및 Tris-Cl로 구성된 용해

완충액을 비롯한 다른 완충액을 사용한 경우에 비하여, 자성 비드의 분리가 용이하거나/하며 수율이 높음을 확인하였다.

[47]

[48] 본 발명에서 카오토로픽 염은, 물 분자 간의 수소 결합을 방해할 수 있는 물질을 포함한다 또한, 상기 카오토로픽 염은 단백질의 구조 변화를 야기하여 상기 단백질과 DNA 간의 결합력을 약화시키고, 이에 따라 DNA를 순수하게 분리하는 정도를 높이는 역할을 수행할 수 있다.

[49] 상기 카오토로픽 염의 예로서, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea), 우레아(urea), 부탄올 또는 에탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[50] 상기 구아니디늄 염의 예로는, 구아니디늄 클로라이드를 들 수 있으며, 상기 리튬 염의 예로는 리튬 퍼클로레이트(lithium perchlorate), 리튬 아세테이트(lithium acetate)를, 마그네슘 염의 예로는 마그네슘 클로라이드를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 구아니디늄 클로라이드를 카오토로픽 염으로서 사용하였다.

[51]

[52] 본 발명에서, 킬레이트 제는 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 와 같은 이가 양이온을 격리시키기 위하여 사용될 수 있으며, 이에 따라 DNA를 이를 분해하는 효소들로부터 보호할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[53] 상기 킬레이트 제의 예로는, DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 EDTA를 킬레이트제로 사용하였다.

[54] 상기 EDTA는 EDTA 화합물(예, K_2EDTA , K_3EDTA , 또는 Na_2EDTA)중 EDTA 부분을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[55]

[56] 본 발명에서, 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 한 분자 내에 친수성과 소수성 부분을 함께 가지고 있는 물질로서, 해리 시 비이온성인 특성을 나타내는 물질이다.

[57] 본 발명에서 사용될 수 있는 상기 비이온성 계면활성제의 예로는, 트리톤(triton) X-100을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[58]

[59] 상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오토로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v) 비이온성 계면활성제; 또는/및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[60] 여기서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5일 수 있다.

[61] 보다 구체적으로, 상기 용해 완충액은 구아니디늄 클로라이드, EDTA, 트리톤

X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[62]

[63] 또한, 상기 용해 완충액으로 혈장 또는 혈청 시료를 용해시킬 때, 단백질분해효소를 함께 첨가할 수 있다.

[64] 상기 단백질분해효소는 핵산 분리에 통상적으로 사용되는 다양한 단백질분해효소가 사용될 수 있으나, 그 예로 단백질분해효소 K(proteinase K)를 사용할 수 있다.

[65]

[66] 한편, 상기 분리된 혈장 시료는 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하기 위해 제1 원심분리하는 단계; 및 제1 원심분리된 시료에서 혈장을 분리하고, 분리된 혈장을 제2 원심분리하는 단계를 포함하는 방법으로 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[67] 본 발명에서는, 혈액 시료에서 혈장 시료를 제조하는 경우에 있어서 저속도에서 1차 원심분리를 수행하고, 이후 고속에서 2차 원심분리를 수행하는 경우, 백혈구(WBC) 등에서 유래된 DNA의 오염 없이 cfDNA를 보다 순수하게 분리할 수 있음을 확인하였다.

[68] 구체적으로, 상기 제1 원심분리는 1900 내지 2000 x g의 조건에서 원심분리하고, 제2 원심분리는 12000 내지 18000 x g의 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 기술한 원심분리는 4 °C 내외의 온도 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[69]

[70] 본 발명에서, 상기 자성 비드와 염 및 PEG를 포함하는 용액을 상기 시료에 첨가하는 것은 순차적으로, 또는 동시에 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71] 순차적으로 수행하는 경우, 자성 비드의 첨가 후 상기 용액을 첨가하거나, 상기 용액을 첨가한 다음, 자성 비드를 첨가하는 방식 모두 수행될 수 있다.

[72]

[73] 본 발명에서, 상기 자성 비드와 함께 첨가되는 염 및 PEG를 포함하는 용액은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 100bp 혹은 100nt 이하의 작은 핵산 단편을 포획하는 것에 도움을 줄 수 있다.

[74]

[75] 상기 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액에서 상기 염은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 그 예로 염화나트륨일 수 있다.

[76] 상기 용액의 PEG는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000 Da인 PEG일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[77] 보다 구체적으로, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60 %(w/v)의 PEG를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[78]

- [79] 본 발명에서 자성 비드는, 자기장에 반응하는 입자 또는 비드를 말한다. 일반적으로, 자성 비드는 자기장을 가지지 않으나, 자기장에 노출되는 자기 쌍극자를 형성하는 물질을 말한다. 예컨대, 자기장 하에서 자화될 수 있으나, 자기장의 부재 하에서는 스스로는 자성을 가지지 않는 물질을 말한다. 본 발명에서 사용되는 자성은 상자성(paramagnetic) 또는 초상자성(superparamagnetic) 물질을 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 본 발명의 목적상 상기 자성 비드는 핵산에 결합하는 성질을 가지는 비드임이 바람직하고, 그 예로 핵산에 결합하는 관능기, 예컨대 -COOH기를 가지는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81]
- [82] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계이다.
- [83]
- [84] 구체적으로, 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에서 첨가된 자성 비드에 부착되어 있는 순환 유리 핵산을 자성 비드로부터 분리하는 단계이다.
- [85]
- [86] 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하기 전, 자성 비드를 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [87] 이때, 상기 자성 비드의 세척은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액, 구체적으로는 80 내지 90 %(v/v) 에탄올 용액을 사용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [88] 이와 같은 세척 과정은 자성 비드를 자성 스탠드 하에 두어, 자성 비드를 모은 다음, 상층액을 제거하고, 여기에 세척 완충액을 첨가하여 세척하는 방식으로 수행할 수 있다. 또한, 이러한 세척 단계는 1회 이상 수행할 수 있다.
- [89] 이와 같은 세척 과정을 선택적으로 수행한 다음, 자성 비드를 분리하고, 분리된 자성 비드에 용출 완충액(elution buffer)을 첨가하는 등의 방식으로 자성 비드로부터 순환 유리 핵산을 분리할 수 있다.
- [90]
- [91] 본 발명의 구체적인 다른 양태는, 용해 완충액; 염 및 PEG를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산 분리 키트이다.
- [92] 용해 완충액, 염 및 PEG를 포함하는 용액, 및 자성 비드에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [93] 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트는 그 유래에 제한되지 않고 cfDNA를 분리할 수 있으므로, 암 환자 또는 산모에서 cfDNA를 추출할 수 있다. 따라서, 암 환자의 혈액에서 추출한 cfDNA를 이용하여 해당 암 환자 특이적인 유전변이를 진단할 수 있다. 또한, 산모의 혈장 내에는 태아로부터 유래된 cfDNA가 다량 존재하므로, 산모 혈액에서 추출한 cfDNA를 이용하여, 태아의 비침습적 산전 진단에 활용할 수 있다. 즉, 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트는 암 진단용 또는 산전 진단용 등으로 사용될 수 있으며, cfDNA를 활용할 수 있는 분야라면

그 용도에 특별히 제한되지 않는다.

[94] 또한, 상기 키트는 핵산 분리에 일반적으로 사용되는 다른 기구, 용액 등을 추가로 포함할 수 있으며, 순환 유리 핵산 분리를 위한 지시서 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[95] 또한, 상기 키트는 추가로 자성비드 세척 완충액, 및 자성비드 분리 기구(예, 자성 스탠드(magnetic stand))를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[96]

[97] 본 발명의 구체적인 다른 양태는, 카오토로픽 염, 킬레이트제, 비이온성 계면활성제 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액이다.

[98] 카오토로픽 염, 킬레이트제, 비이온성 계면활성제, 순환 유리 핵산 및 용해 완충액에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[99]

발명의 실시를 위한 형태

[100] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지는 않는다.

[101]

[102] 실시예 1: 혈장 시료의 제조

[103]

[104] 신선한 혈액 시료를 4 °C에서 1,900 x g로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장을 다시 4 °C에서 16,000 x g로 10분간 원심분리하고, 상층액을 분리하였다. 그 다음, 이렇게 수득한 혈장 시료는 DNA 분리 전에 -20°C에서 저장하였다. 특별히 기술된 경우를 제외하고는 하기 실시예에서는 상기 방법을 이용하여 제조된 혈장을 사용하였다.

[105]

[106] 실시예 2: cfDNA의 분리

[107]

[108] 동결된 혈장 시료는 DNA 분리 전에 녹인 후, 튜브에 혈장 시료 200 μ l를 담았다. 그 다음, 상기 시료 튜브에 혈장 용해 완충액(5.5M 구아니딘 HCl, 50mM Tris-Cl, pH 8.0, 20mM EDTA, pH 8.0, 1.3% Triton X-100) 400 μ l 및 단백질 분해효소 K(proteinase K) 10 μ l를 첨가하고, 이를 혼합하였다.

[109] 그 다음, 상기 튜브에 자성 비드(AMPure XP, Backman Coulter 사) 100 μ l 및 용액 A(2.5M NaCl, 20% PEG-8000) 1100 μ l를 각 튜브에 첨가하고, 이를 혼합하였다. 그 다음, 자성 스탠드(magnetic stand)에서 상기 튜브를 인큐베이션하고, 상기 튜브의 상층액을 제거하였다.

[110] 그 다음, 세척 완충액(85% EtOH) 1mL를 첨가하고 반응시킨 후, 자성 스탠드 위에서 에탄올 상층액을 제거하였고, 상기 세척 과정을 수회 반복하였다.

[111] 그 다음, 비드를 건조시켰고, 자성 스탠드에서 반응 튜브를 빼어낸 다음, 용출

완충액(순수 분리된 3차 증류수 또는 10 mM TE 완충액)을 첨가하였다. 그 다음, 자성 스탠드 위에서 반응 튜브를 둔 다음, 용출액을 분리하여, cfDNA 시료를 수득하였다.

[112]

[113] 실시예 3: 정상인 및 폐암 환자의 혈장으로부터의 cfDNA 시료 수득

[114]

[115] 상기 실시예 2의 cfDNA 분리 방법을 이용하여 정상인과 환자 간의 cfDNA 추출량을 비교하는 실험을 진행하였다.

[116] 구체적으로, 정상 개체의 시료 31개, 폐암 환자 시료 49개에서 얻은 혈장을 각각 200 μ l 이용하여 cfDNA를 분리하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 상기 시료는 서울 아산병원 BRC (Bio Resource Center)에서 분양 받았다.

[117] 그 결과, 정상 개체와 폐암 환자에서 얻은 cfDNA의 양을 비교하였을 때, 폐암 환자에서 훨씬 많은 cfDNA를 얻을 수 있었고, 이는 당업계에서 공지된 내용으로부터 예상된 사실이었다. 특히, 정상 개체의 200 μ l 혈장 시료에서 수득된 cfDNA의 양은 중간 값이 4.4ng (최대값: 9.2ng, 최소값: 0.8ng)이었고, 폐암 환자의 200 μ l 혈장 시료에서 수득된 cfDNA의 양은 중간 값이 32.0ng (최대값: 268.0 ng, 최소값: 4.78 ng)을 나타내어, 200 μ l 혈장 시료에서도 효과적으로 cfDNA를 분리할 수 있음을 확인하였다.

[118]

[119] 실시예 4: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법의 재현가능성 확인

[120]

[121] 상기 실시예 2의 cfDNA 분리 방법의 재현성을 조사하였다.

[122] 구체적으로, 폐암 환자 시료 49개에서 얻은 혈장을 각각 200 μ l 이용하여 두 번의 실험을 반복 수행한 후, 각각의 실험에서 얻은 cfDNA의 양을 비교하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[123]

[124] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 두 값 간의 상관 관계가 1에 가까울 정도로 재현성이 우수한 결과를 나타내었다.

[125]

[126] 실시예 5: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법으로 수득한 시료의 cfDNA 패턴 분석

[127]

[128] 실시예 2의 cfDNA PREP 방법을 이용하여 PREP한 cfDNA의 특성을 BioAnalyzer를 이용하여 분석하였다

[129] 먼저, 폐암 환자의 혈장 시료로부터 PREP한 cfDNA의 크기를 확인하여 도 3a 및 b에 그 결과를 나타내었다.

[130] 크기를 확인한 결과, 세포사멸(Apoptosis)에 의해 생성되는 cfDNA의 특성으로 잘 알려진, DNA Ladder 크기 형태의 패턴으로 나타남을 확인할 수 있었다.

[131] 또한, cfDNA는 뉴클레오솜(nucleosome) 단위로 잘려져 있기 때문에, 대략

180bp 정도의 크기가 최소 단위이며, 2, 3, 4 뉴클레오횜 단위 크기인 180*2, 180*3, 180*4bp 크기 형태도 보였다(도 3b).

[132] 하지만, 기대보다 큰 크기의 DNA도 보였는데, 이는 혈액에서 혈장을 제조하는 경우에 DNA가 완전히 제거되지 않았거나, 용혈된 백혈구(WBC)에서 나온 gDNA가 함께 추출되어 나온 것이었다. 이는, 오래 전에 준비되어 보관되었던 폐암환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였기 때문으로 여겨지며, 신선한 혈액을 이용하여, 실시예 1과 같이 2 단계 원심분리 법으로 혈장을 준비하면 해결될 수 있음을 확인하였다.

[133]

[134] 실시예 6: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법으로 수득한 cfDNA의 품질 분석

[135]

[136] 또한, 실시예 2의 cfDNA PREP 방법을 이용하여 PREP한 cfDNA의 품질(quality)를 확인하기 위하여, 100bp 및 237bp 크기의 생성 산물을 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때, 주형 DNA로는 폐암 환자의 시료로부터 분리한 1 내지 5번의 cfDNA 시료와 2개의 대조군 gDNA(Beas2B, H1975 세포주에서 PREP한 게놈 DNA)를 사용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다 (도 4에서, cfDNA 시료는 1 내지 5로 표시함).

[137]

[138] PCR 수행 조건은 하기와 같았다.

[139] 구체적으로, 순수분리한 cfDNA 2 μ l, 표 1에 표기된 프라이머쌍 (rs1952996 프라이머쌍 또는 RASSF1A 프라이머쌍 (각 프라이머쌍의 농도는 해당 F와 R 모두 각각 5 μ M) 1 μ l, dNTP mix (2.5 mM) 1 μ l, Qiagen 사의 HotStar Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 μ l, 10x PCR buffer 1 μ l, 최종 10 μ l가 되도록 3차 증류수를 첨가한 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 15분 반응시켜 HotStarTaq polymerase를 활성화한 후, [94 $^{\circ}$ C(20초)/60 $^{\circ}$ C(30초)/72 $^{\circ}$ C(30초)] 반응을 35회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 3분 반응시켜 증폭반응 종료하였다.

[140] 사용한 프라이머 정보는 하기와 같다.

[141] [표1]

Primer 이름	염기서열(5'→3')	서열번호	증폭산물 크기 (bp)
rs1952966-F	GGCTCTGGTTACAACAGCTT	1	100
rs1952966-R	AGAAGTTTGCTTGGCTGAAG	2	
RASSF1A-F	GTGGGGACCCTCTTCCTCTA	3	237
RASSF1A-R	GGAAGGAGCTGAGGAGAGC	4	

[142] 그 결과, 사용한 모든 cfDNA에서 PCR 산물 증폭이 잘 되었음을 확인하였다. 즉, PREP한 cfDNA의 품질에 문제가 없음을 확인하였다.

[143]

[144] 실시예 7: 혈장 제조 과정의 최적화

[145]

[146] 본 발명의 cfDNA PREP 방법에 사용되는 혈장의 제조 과정을 하기와 같이 최적화하였다.

[147] 구체적으로, cfDNA PREP 시, 2 단계 원심분리를 수행하여 혈장을 준비하는 경우의 효과를 1 단계 원심분리를 수행한 경우의 효과와 서로 비교하였다. 이를 위하여 정상 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 이용하였다. 1 단계 원심분리 방법은 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 1,900 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리하여 혈장 시료를 수득하는 방법이고, 2 단계 원심분리 방법은 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 1,900 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리한 다음에 16,000 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리하여 혈장 시료를 수득하는 방법이다.

[148] 상기 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법을 사용하여 수득한 혈장 시료를 실시예 2의 방법으로 cfDNA를 분리하고, 그 양과 특성을 비교하였다. 상기 결과를 도 5a, 표 2 및 5b에 각각 나타내었다.

[149] 도 5a 및 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 2 단계 원심분리 방법을 사용하여 획득한 혈장에서 분리한 cfDNA의 양이, 1 단계 원심분리 방법을 사용하여 획득한 혈장에서 분리한 cfDNA 양의 1/3 정도를 나타내었다. 1 단계 원심분리 방법의 경우, 추출된 cfDNA의 양에 편차가 크고 예상보다 양이 많았다.

[150] [표2]

Healthy plasma	1 step method(1,900g, 4 °C, 10min), total ng	2 step method(1,900g, 4 °C, 10min --> 16,000g, 4 °C, 10min), total ng	Ratio between 1 step / 2 step
1	17.05	6.26	2.72
2	7.11	2.91	2.45
3	10.76	2.75	3.92
4	10.64	6.26	1.70
5	16.98	5.26	3.23
6	21.76	2.95	7.36
7	31.87	4.52	7.06
8	9.66	3.68	2.63

[151] 또한, 도 5b에 나타낸 바와 같이, 2 단계 원심분리 방법 및 1 단계 원심분리 방법을 이용하여 제조한 혈장으로부터 수득한 cfDNA의 특성을 분석한 결과, 2 단계 원심분리 방법으로 획득된 DNA의 경우, 전형적인 cfDNA 특징인 180bp 정도의 최소 뉴클레오솜 단위 크기를 나타냄을 확인할 수 있었다. 반면, 1 단계

원심분리 방법으로 추출된 DNA의 경우, 게노믹 DNA (gDNA)가 섞인 형태의 패턴을 나타내었다. 즉, BioAnalyzer 로딩 시, 상위 마커(upper marker) 보다 큰 intact gDNA 및 일부 단편화(fragmentation)되어 smear 패턴으로 보이는 gDNA를 나타내었다.

[152]

[153] 실시예 8: 실시예 2의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트 간의 비교

[154]

[155] 본 발명에 따른 cfDNA PREP 법의 효과를 기존 상용화된 키트와 비교하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[156] 구체적으로, 현재 cfDNA PREP에 가장 많이 이용되고 있는 Qiagen circulating tumor DNA prep 키트와 성능을 비교하였다. 이를 위하여, 실제 난소암 환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였고, 그 결과를 하기 표 3 및 도 6에 나타내었다. 도 6에서 본 발명에 따른 cfDNA PREP(실시예 2)의 방법을 'CCGD_cfDNA'로 표시하였다. 상기 혈장은 서울 아산병원 BRC에서 분양 받았다.

[157]

[158] 그 결과, 하기 표 3 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 각 방법을 사용하여 cfDNA를 분리한 결과, 본 발명의 방법을 이용하는 경우에 Qiagen Kit를 사용한 경우에 비하여 4 내지 5배 가량 높은 양의 cfDNA를 수득할 수 있음을 확인하였다.

[159] [표3]

샘플번호	Qiagen Kit		CCGD_cfDNA	
	농도(ng/ μ l)	수득한 양 (ng)	농도(ng/ μ l)	수득한 양 (ng)
2395	0.02	0.8	0.20	4.0
2397	0.03	1.5	0.22	4.5
2672	0.01	1.0	0.20	3.9
2722	0.02	1.3	0.33	6.7
2772	0.02	1.5	0.37	7.5
2799	0.02	1.5	0.22	4.3
2834	0.23	2.3	0.26	5.1
3030	0.08	0.9	0.28	5.5
3051	0.05	0.6	0.17	3.4
3052	0.13	1.4	0.38	7.6
* 2차 원심 분리 후 수득한 200 μ l의 혈장을 사용함				

[160] 실시예 9: 완충액의 종류에 따른 효과 비교

[161]

[162] 본 발명의 cfDNA PREP 방법에 효과적으로 사용될 수 있는 용해 완충액의 최적 조건을 하기와 같이 규명하였다.

[163]

[164] 먼저, 카오토로픽 염, 킬레이트 제 및 Tris-Cl을 포함하는 완충액(비교 완충액 1)과 카오토로픽 염, 킬레이트 제, 비이온성 계면활성제, 및 Tris-Cl을 포함하는 완충액(실시 완충액)을 각각 사용하여 실시예 2의 방법으로 cfDNA를 분리하였다. 이때, 난소암 환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였고, 실시예 1과 같이 2번의 원심분리를 거친 시료를 사용하였다.

[165]

[166] 사용한 비교 완충액 1 및 실시 완충액의 구체적인 조성은 하기와 같았다.

[167] [표4]

비교 완충액 1	실시 완충액
10mM Tris-Cl (pH 8.0)0.1mM EDTA(pH 8.0)0.5% SDS	5.5M Guanidine-HCl50mM Tris-Cl(pH 8.0)20mM EDTA(pH 8.0)1.3% Triton X-100

[168] 그 결과, 하기 표 5 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하는 경우, 비교 완충액 1을 사용하는 경우에 비하여 훨씬 더 많은 양의 cfDNA를 얻을 수 있음을 확인하였다.

[169] [표5]

샘플 번호	비교 완충액 1		실시 완충액	
	농도(ng/ μ l)	수득한 양 (ng)	농도(ng/ μ l)	수득한 양 (ng)
2395	0.08	1.6	0.20	4.0
2397	0.08	1.6	0.22	4.5
2672	0.12	2.5	0.20	3.9
2722	0.08	1.6	0.33	6.7
2772	0.11	2.1	0.37	7.5
2799	0.11	2.2	0.22	4.3
2834	0.10	2.0	0.26	5.1
3030	0.07	1.4	0.28	5.5
3051	0.07	1.3	0.17	3.4
3052	0.14	2.8	0.38	7.6
* 2차 원심 분리 후 수득한 200 μ l의 혈장을 사용함				

[170] 또한, 용해 완충액의 카오토로픽 염의 포함 유무에 따른 cfDNA PREP 효과를

비교하였다. 구체적으로 하기 [표 6]의 조성을 가지는 본 발명에 따른 실시 완충액 및 비교 완충액 2를 각각 사용하여 실시예 2의 방법으로 DNA를 분리하였다. 이 때, 2명의 정상인 개체로부터 얻은 혈장에 200ng의 Highly degraded gDNA를 첨가하여 진행하여, 용해 완충액의 조건에 따른 DNA 획득률을 서로 비교하였다. 그 결과를 하기 표 7 및 도 8에 나타내었다.

[171] [표6]

	실시 완충액	비교 완충액 2
Guanidine-HCl	5.5M	-
Tris-Cl (pH8.0)	50mM	66.7mM
EDTA (pH8.0)	20mM	26.7mM
Triton X-100	1.30%	1.74%

[172] [표7]

	샘플번호	실시 완충액	비교 완충액 2
Healthy control-1	AppliedgDNA(ng)	200	200
	Total recovered amount (ng)	32.5	24.7
	Recoveryratio(%)	16.2	12.4
Healthy control-2	Applied FFPE gDNA(ng)	200	200
	Total recovered amount (ng)	48.8	19.4
	Recoveryratio(%)	24.4	9.7

[173] 그 결과, 두 명의 정상 개체의 혈장을 이용한 결과 모두에서, 본원발명에 따른 실시 완충액을 이용한 경우, 가장 높은 회수율을 나타내었다.

[174]

[175] 실시예 10: 산모의 혈장으로부터 cfDNA의 분리

[176]

[177] 본 발명의 cfDNA prep 방법은 폐암 환자뿐만 아니라, 정상 개체에서도 cfDNA를 수득할 수 있다. 즉, 개체의 상태에 제한 없이 분리된 혈장으로부터 cfDNA를 수득할 수 있다. 이에, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 특성을 더욱 분석하기 위하여 이하의 실시예에서는 산모로부터 cfDNA를 분리하여 분석을 수행하였다. 나아가, 상기 실시예 2에서는 200 μ l의 혈장 시료를 사용하였으나, 본 발명의 cfDNA prep 방법을 더 큰 부피의 시료에 적용하기 위해 분리 조건을

하기와 같이 적절히 변경하였다 (표 8).

[178] [표8]

	혈장(부피)	용해 완충액(부피)	단백질 분해 효소 K	용액 A		자성 비드
				조성	부피	
기준	200 μl	400 μl	20 μl	20 % PEG/2.5 M Nacl	1000 μl	200 μl
변경	500 μl	1000 μl	20 μl	40 % PEG/2.5 M Nacl	1100 μl	400 μl

[179]

[180] 구체적으로, 총 10 명의 산모로부터 채취한 신선한 혈액 시료를 4 °C에서 1,900 x g로 10 분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장을 다시 4 °C에서 16,000 x g로 10 분간 원심분리하고, 상층액을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장 500 μl 를 이용하여, 본 발명의 cfDNA prep 방법과 기존 상용화된 키트인 Qiagen circulating tumor DNA prep 키트와의 비교를 실시하였다.

[181]

[182] 실시예 11: 실시예 10의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트 간의 수율 비교

[183]

[184] 본 발명의 cfDNA prep 방법 (CCGD_cfDNA) 및 Qiagen 키트로 분리된 cfDNA의 수율을 Picogreen 정량법 (PG) 및 RQ-PCR 정량법을 이용하여 비교하였다 (도 9).

[185] 그 결과, 정량법에 관계 없이 본 발명의 cfDNA prep 방법은 Qiagen 키트를 이용한 경우와 비교하여 유사하거나 높은 수율로 나타나는 것을 확인하였다. 특히 산모 4 및 산모 6으로부터 분리된 샘플의 경우 2 배 이상의 수율이 확인되어, 본 발명의 cfDNA prep 방법이 Qiagen 키트에 비해 수율 면에서 매우 우수한 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[186]

[187] 한편, 각각의 정량법을 비교하였을 때, Qiagen 키트를 이용한 경우 PG 정량값과 RQ-PCR 정량값에서 큰 차이가 나는 것을 확인할 수 있었던 반면, 본 발명의 cfDNA prep 방법은 상기 두 정량법에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 더욱 명확히 하기 위하여 PG 정량값과 RQ-PCR 정량값 간의 일치율을 확인하였다 (도 10).

[188] 그 결과, Qiagen 키트를 이용한 경우, 상기 도 9에서도 확인한 것과 같이 농도가 높은 2 샘플을 제외하고는 모두 아주 낮은 농도로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, PG 정량값과 RQ-PCR 정량값 간의 일치율에서 상관성 계수가, Qiagen 키트를 이용한 경우 0.9245, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 경우 0.9676으로 나타나 본 발명의 cfDNA prep 방법이 더 높은 상관성 계수를 가지는

것을 확인하였다.

- [189] Qiagen 키트의 경우, 작은 조각으로 존재하는 cfDNA의 추출 효율을 높이기 위해 키트 안에 DNA 운반체로 tRNA를 이용하였기 때문에, 추출이 완료된 cfDNA에는 많은 양의 tRNA가 함께 존재하고 있다. 따라서, 이로 인해 Qiagen 키트를 이용해 cfDNA를 분리하는 경우 Picogreen을 이용한 정량값에서는 tRNA로 인한 과측정이 나타나며, 이로 인해 상기와 같은 낮은 상관성 계수가 나타난 것으로 파악된다. 즉, 10 ng 정도의 수율로 나타나는 8 개의 샘플은 많은 부분이 tRNA 오염에 의해 측정된 값으로 예상된다. 반면 본 발명의 경우 tRNA를 사용하지 않기 때문에 상기 두 종류의 정량법에서 높은 수준의 상관성 계수가 나타났다.

[190]

- [191] 실시예 12: 실시예 10의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트로 분리한 cfDNA의 품질 및 순도 비교

[192]

- [193] 10 명의 산모로부터 본 발명의 cfDNA prep 방법 및 Qiagen 키트를 이용해 추출된 cfDNA의 품질을 분석하기 위해, Bioanalyzer를 이용하여 추출된 cfDNA의 크기 분석을 수행하였다. 그 결과, 예상한 바와 같이 거의 모든 표본에서 cfDNA 크기 (~180 bp)로 보이는 피크 신호가 Qiagen 키트를 이용한 경우에 비해 본 발명의 cfDNA prep를 이용한 경우 매우 높게 나타나는 것을 확인하였다 (도 11).

[194]

- [195] 다음으로, 상기 두 방법으로 추출된 cfDNA의 순도가 효소반응이 가능한 수준으로 우수한지를 확인하고자 하였다. 3 명의 산모 (산모 8, 산모 9 및 산모 10)로부터 추출된 cfDNA를 대상으로, 110 bp 크기를 가지는 amplicon을 증폭시키는 RQ-PCR 반응을 수행하였다. 동일 조건에서, 각 산모로부터 추출한 cfDNA의 양을 1, 2 및 4 μ l씩 증가시키면서 RQ-PCR을 수행하여 Ct 값을 확인한 후 이를 상대량 ($1/2^{Ct}$)으로 변환하여, 사용된 cfDNA의 양에 따른 RQ-PCR로 확인된 상대량의 비례 정도를 확인함으로써, 추출된 cfDNA의 순도를 재확인하였다.

- [196] 그 결과, 세 명의 산모로부터 추출한 cfDNA 모두, 사용된 cfDNA 양에 비례하여 상대량 (RQ-PCR 값, $1/2^{Ct}$)이 증가하는 것으로 확인되었으며, 두 값 사이의 일치율 상관성 계수가, Qiagen 키트를 이용한 경우 0.9574, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 경우 0.9983으로 나타나 본 발명의 cfDNA prep 방법이 더 높은 상관성 계수를 가지는 것을 확인하였다 (도 12).

[197]

- [198] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만

한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

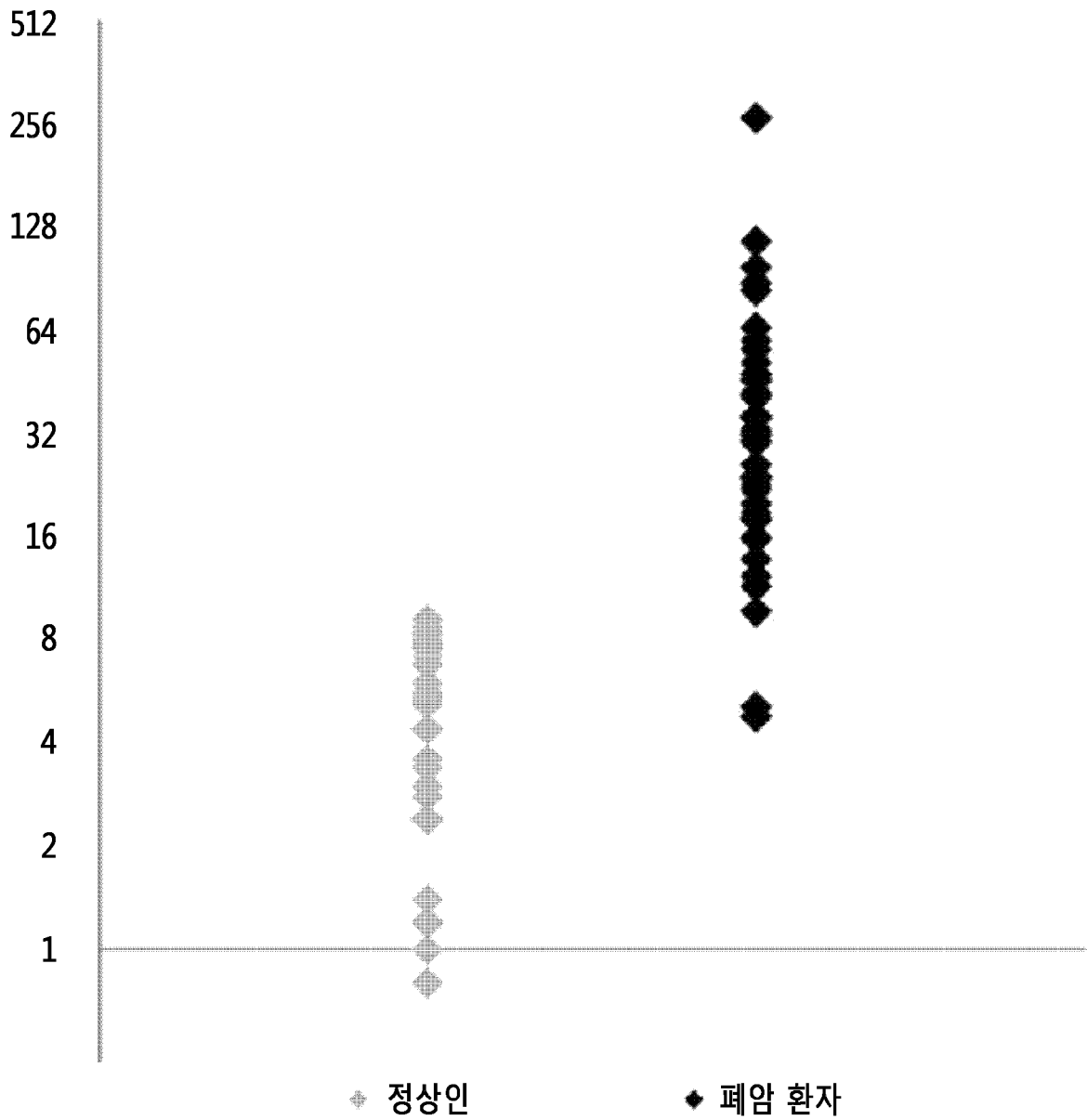
- [청구항 1] (a) 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 단계; 및
(b) 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계를 포함하는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 분리된 혈장 또는 혈청인 것인 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 혈장 또는 혈청을 용해 완충액(lysis buffer)으로 용해시켜 제조된 것인, 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 용해 완충액은 카오트로픽 염(chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오트로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v) 비이온성 계면활성제; 및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 6] 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5인 것인, 방법.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 카오트로픽 염은, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea), 우레아(urea), 부탄올 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 구아니디늄 염은 구아니디늄 클로라이드인, 방법.
- [청구항 9] 제4항에 있어서, 상기 킬레이트제(chelating agent)는 DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.
- [청구항 10] 제4항에 있어서,
상기 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 트리톤(triton) X-100인 것인, 방법.
- [청구항 11] 제3항에 있어서, 상기 용해 완충액은 구아니디늄 클로라이드, EDTA, 트리톤 X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.

- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 염화나트륨 및 PEG를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 PEG(polyethylene glycol)는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000Da인 PEG인 것인, 방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60%(w/v)의 PEG를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 15] 제3항에 있어서, 용해 완충액과 함께 단백질을 분해효소를 혈장 또는 혈청에 첨가하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, (b) 단계는 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 세척한 후, 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 것인, 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 세척은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액을 사용하여 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 18] 제2항에 있어서, 상기 분리된 혈장 시료는 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하기 위해 제1 원심분리하는 단계; 및 제1 원심분리된 시료에서 혈장을 분리하고, 분리된 혈장을 제2 원심분리하는 단계를 포함하는 방법으로 수득된 것인, 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 제1 원심분리는 1,900 내지 2,000 x g의 조건에서 원심분리하고, 제2 원심분리는 12,000 내지 18,000 x g의 조건에서 원심분리하는 것인, 방법.
- [청구항 20] 제1항에 있어서, 상기 순환 유리 핵산은 순환 유리 DNA(circulating cell-free DNA)인, 방법.
- [청구항 21] 용해 완충액(lysis buffer); 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid) 분리 키트.
- [청구항 22] 제21항에 있어서, 상기 용해 완충액은 카오트로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 23] 제21항에 있어서, 상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오트로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v) 비이온성 계면활성제; 및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 24] 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5인 것인, 키트.
- [청구항 25] 제22항에 있어서, 상기 카오트로픽 염은, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea),

- 우레아(urea), 부탄올 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 키트.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 구아니디늄 염은 구아니디늄 클로라이드인, 키트.
- [청구항 27] 제22항에 있어서,
상기 킬레이트제(chelating agent)는 DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 키트.
- [청구항 28] 제22항에 있어서,
상기 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 트리톤(triton) X-100인 것인, 키트.
- [청구항 29] 제21항에 있어서, 상기 용해 완충액은 구아니디늄 클로라이드, EDTA, 트리톤 X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 30] 제21항에 있어서, 상기 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액은 염화나트륨 및 PEG를 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 31] 제21항 또는 제30항에 있어서, 상기 PEG(polyethylene glycol)는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000 Da인 PEG인 것인, 키트.
- [청구항 32] 제21항 또는 제30항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60%(w/v)의 PEG를 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 33] 제21항에 있어서, 상기 키트는 추가로 자성비드 세척 완충액, 자성비드 분리 기구, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 34] 제33항에 있어서, 상기 자성비드 세척 완충액은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액인 것인, 키트.
- [청구항 35] 제33항에 있어서, 상기 자성비드 분리 기구는 자성 스탠드(magnetic stand)인 것인, 키트.
- [청구항 36] 제21항에 있어서, 상기 순환 유리 핵산은 순환 유리 DNA(circulating cell-free DNA)인, 키트.
- [청구항 37] 카오트로픽 염(chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid) 분리를 위한 용해 완충액.

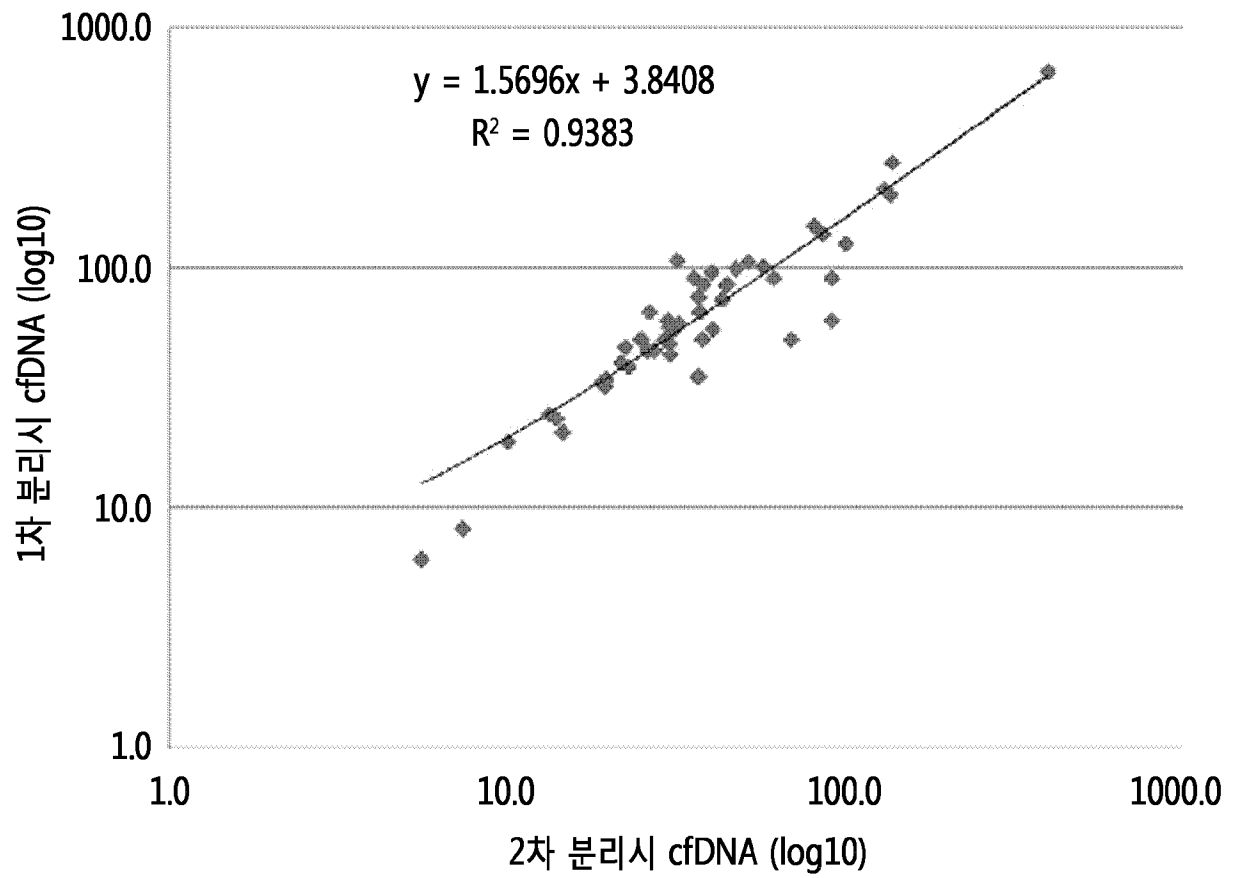
[도1]

단위: ng

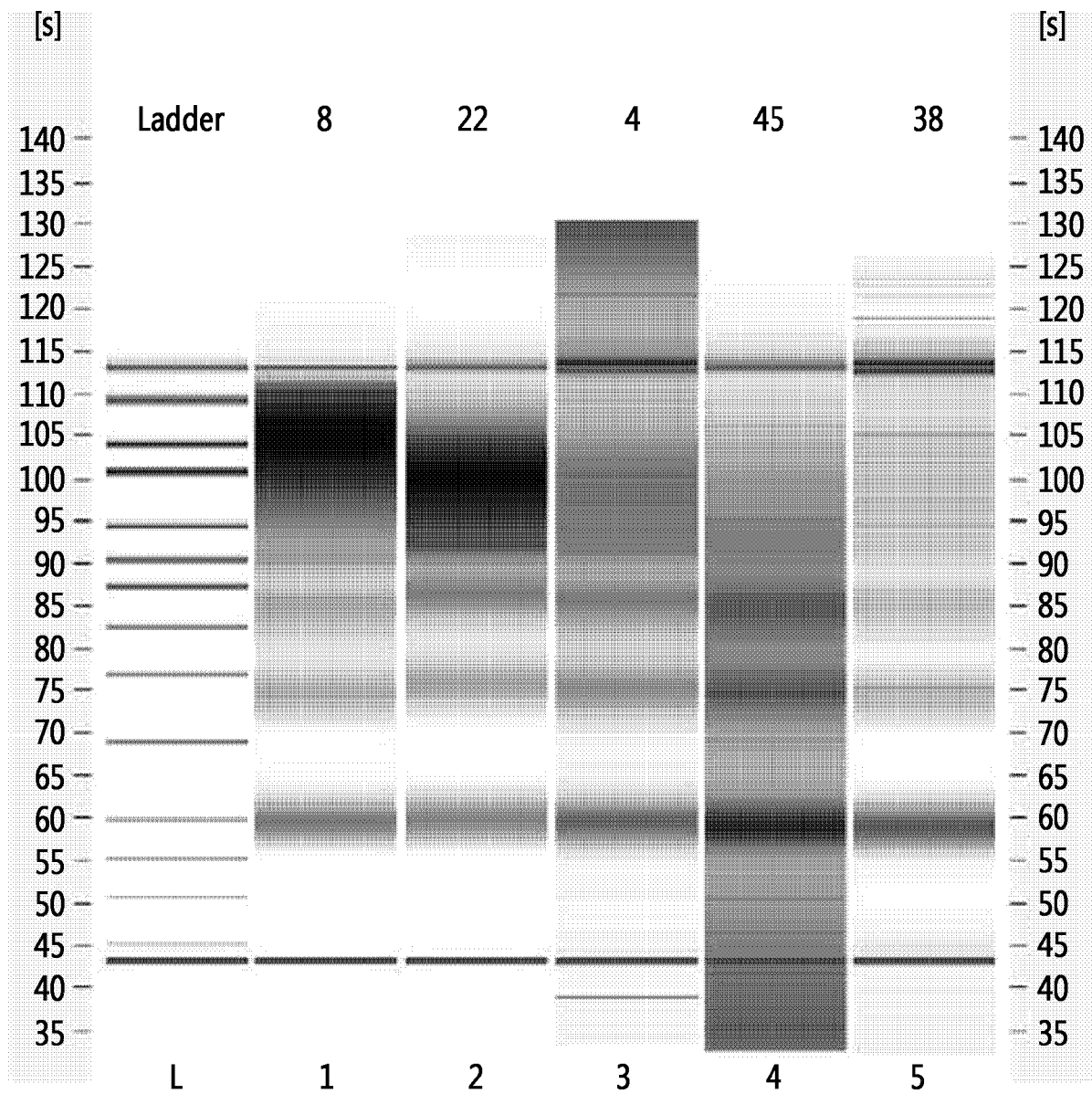


[도2]

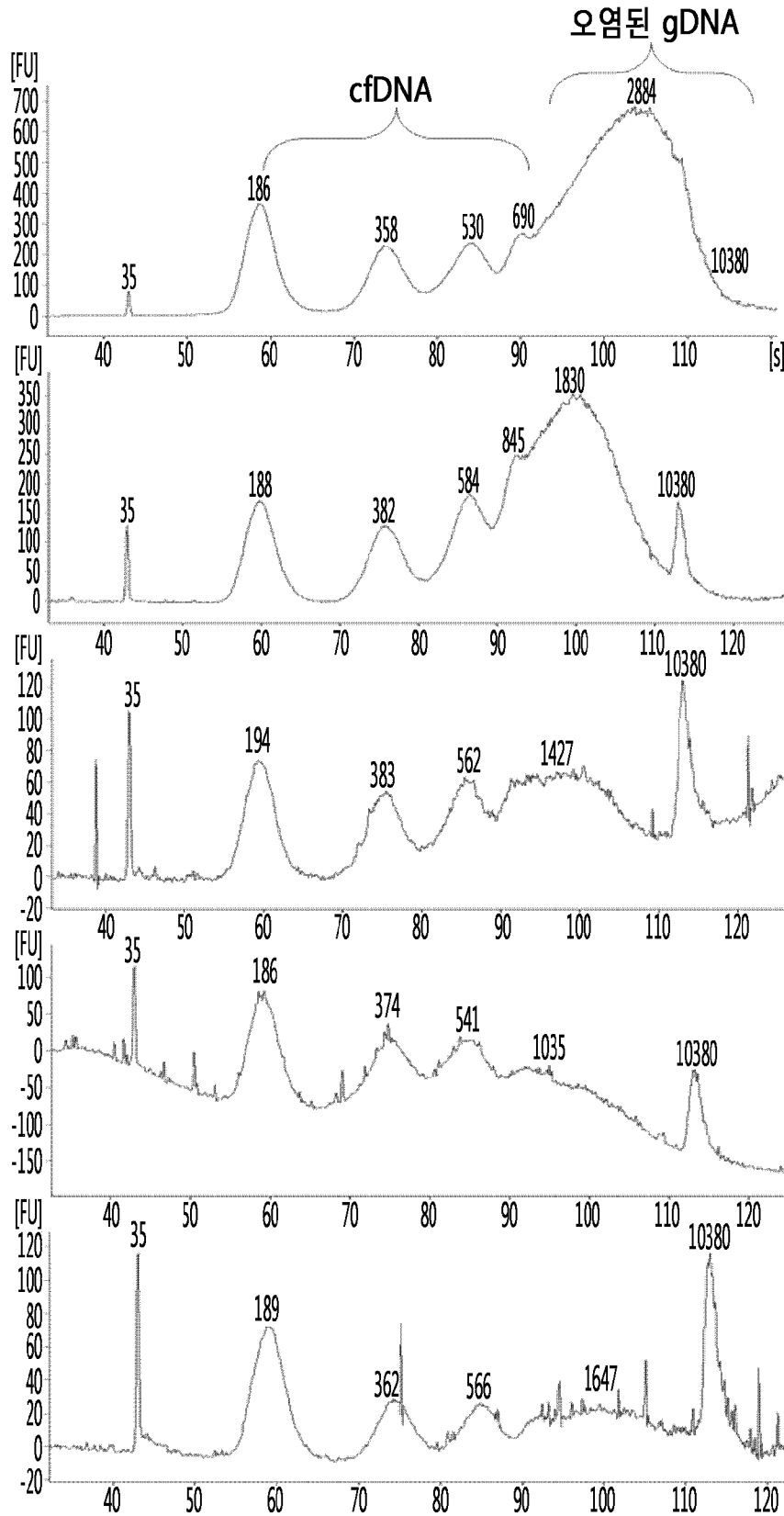
독립적인 2회 분리 후 cfDNA 양 비교



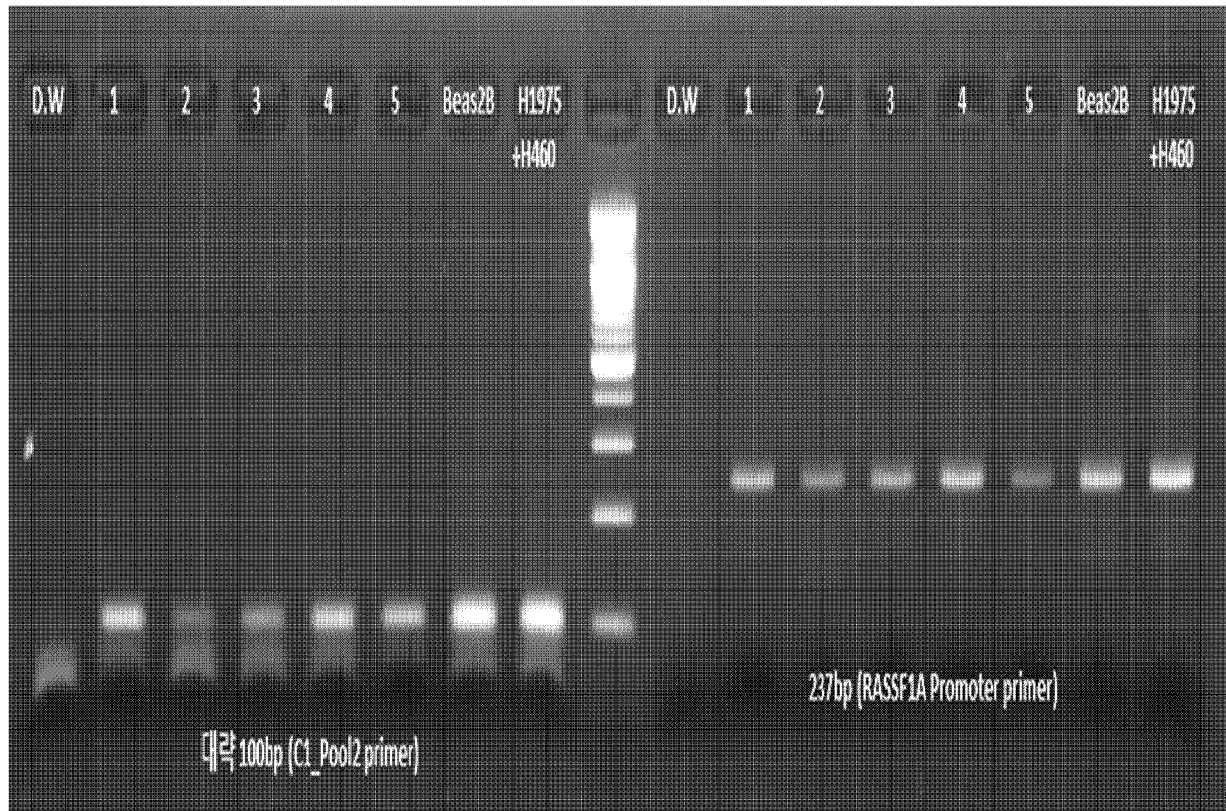
[도3a]



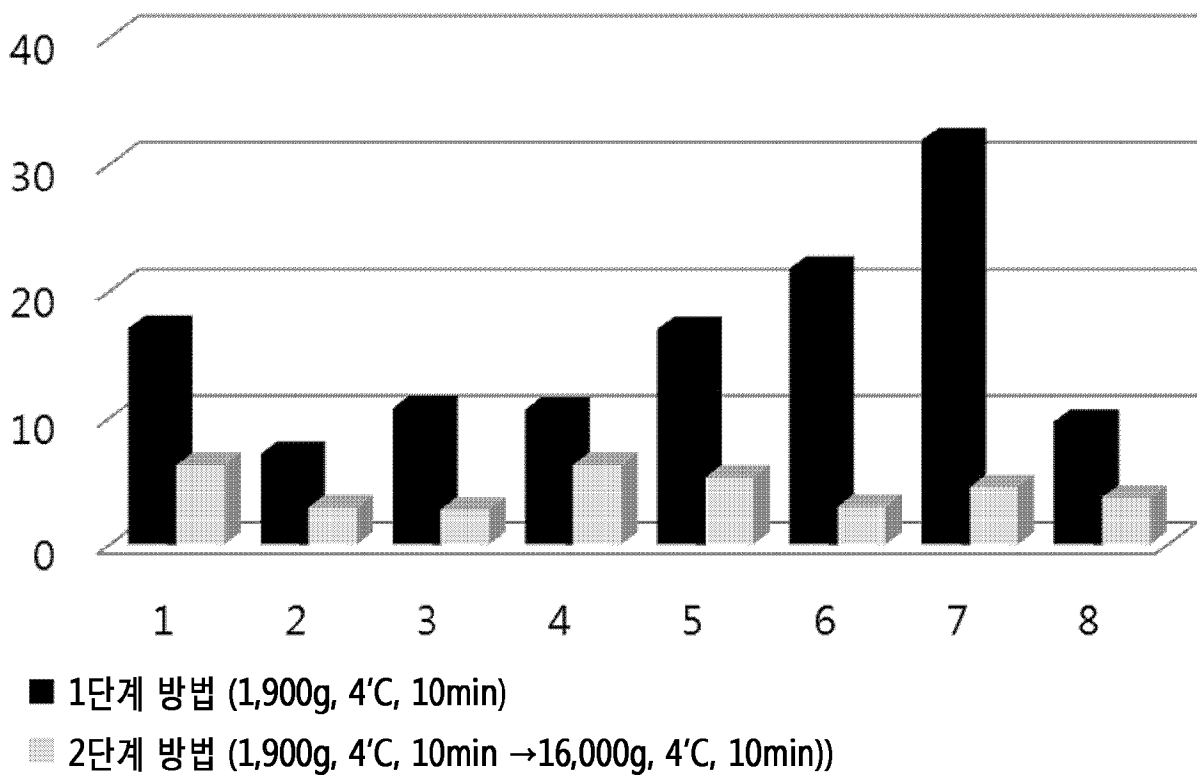
[도3b]



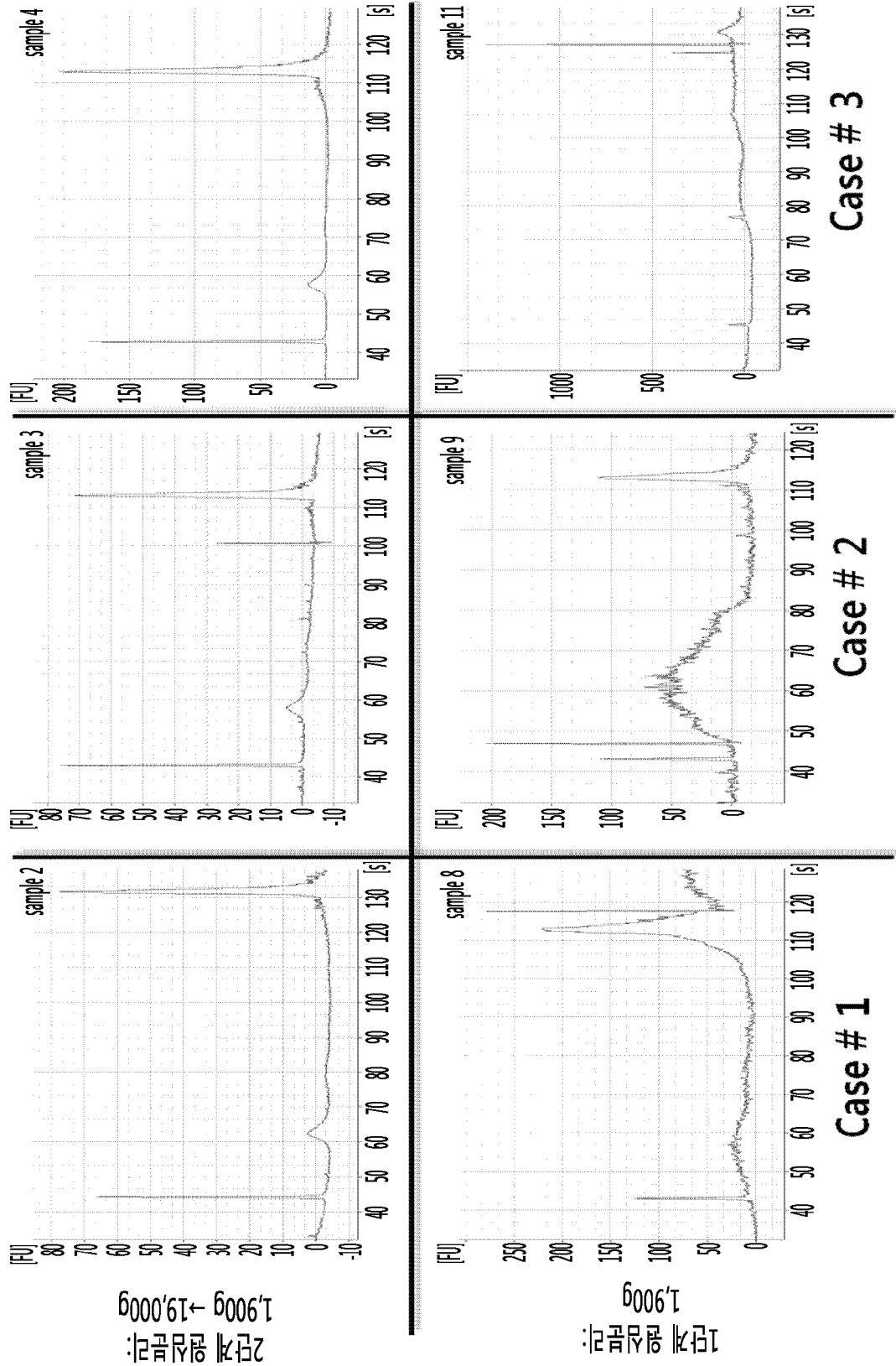
[도4]



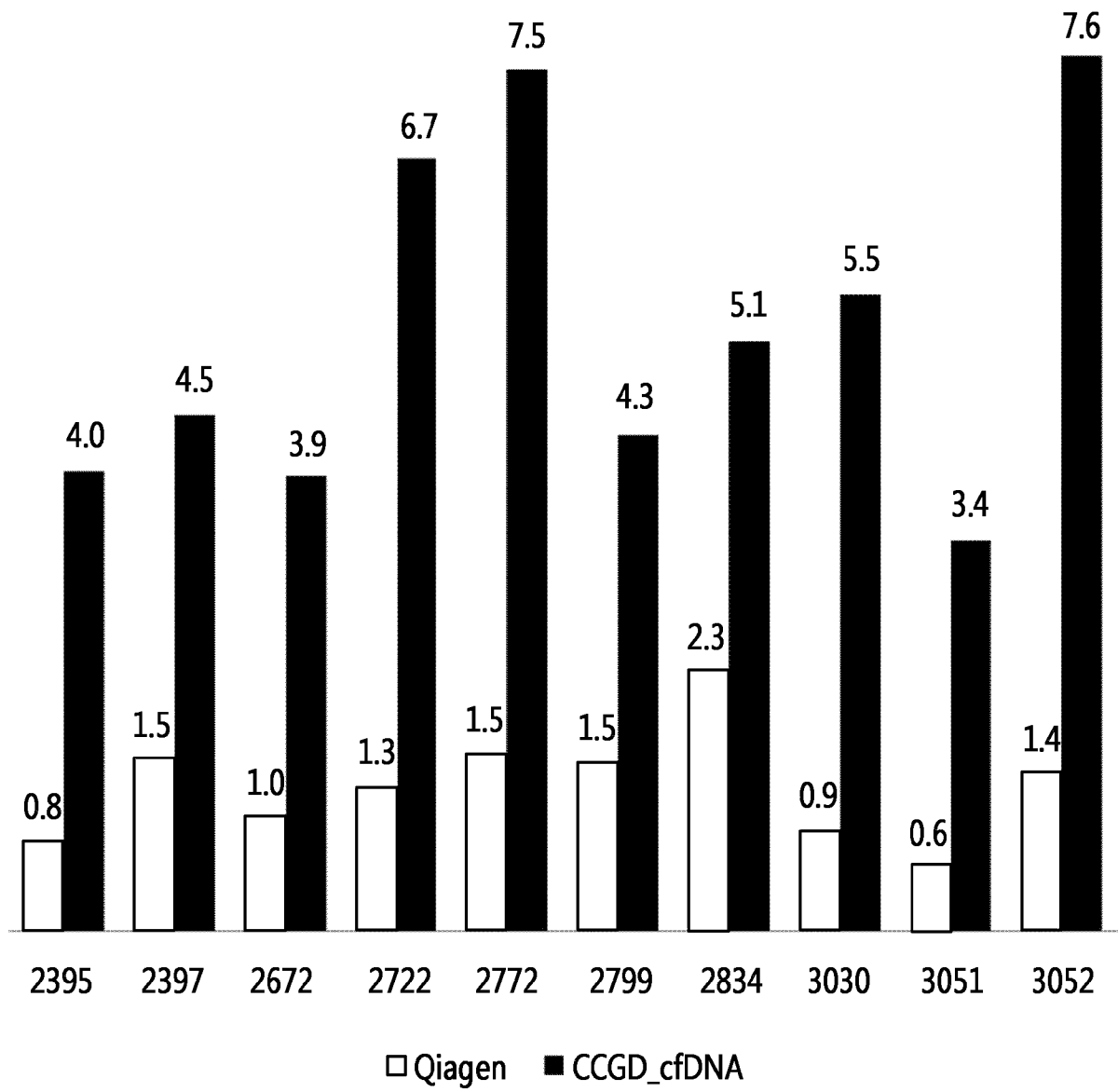
[도5a]



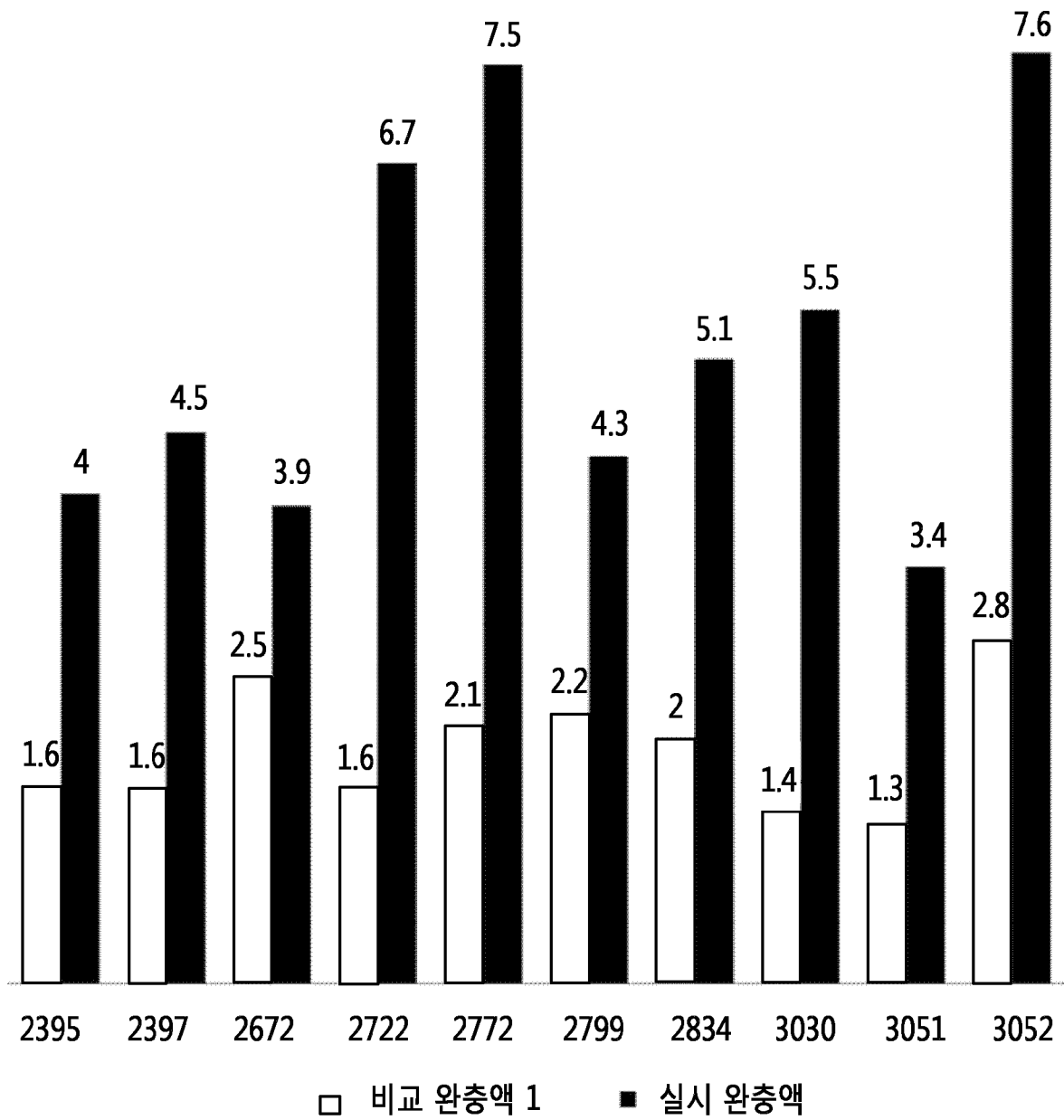
[도 5b]



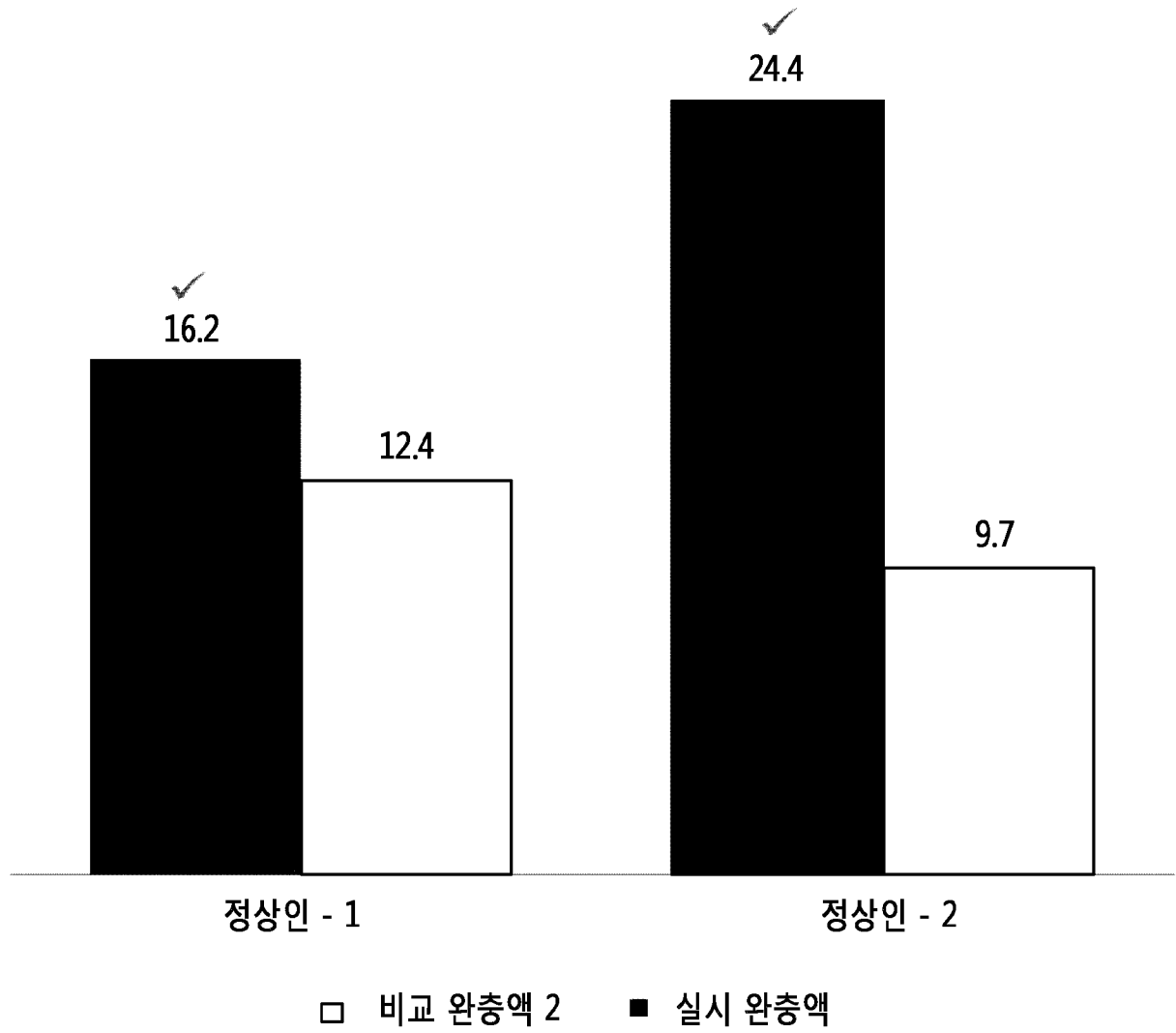
[도6]



[도7]



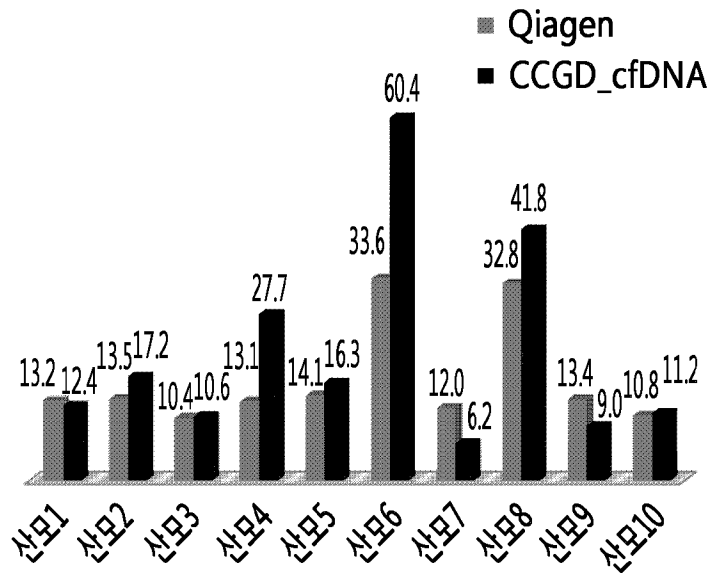
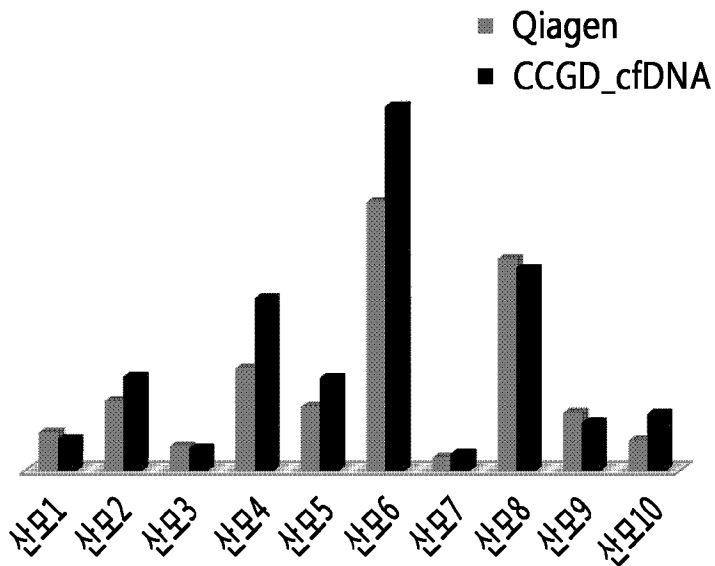
[도8]



[도9]

수율 비교 (PG, RQ-PCR)

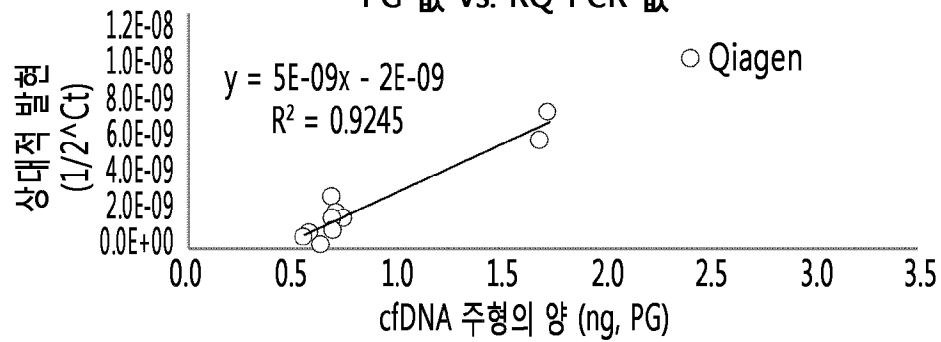
0.5 ml 혈장의 cfDNA 양 (PG)

상대적 발현 ($1/2^{Ct}$)

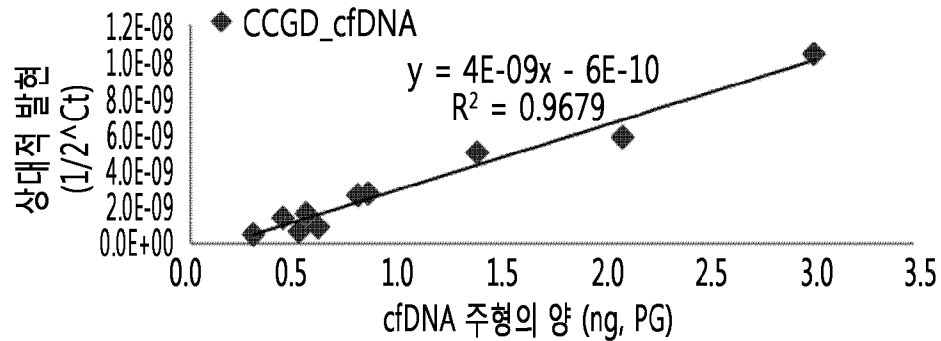
[도10]

PG 및 RQ-PCR 정량값의 상관성

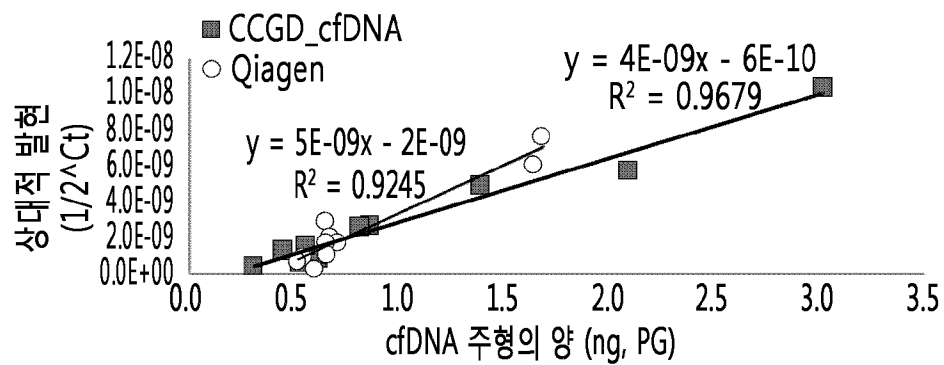
PG 값 vs. RQ-PCR 값



PG 값 vs. RQ-PCR 값



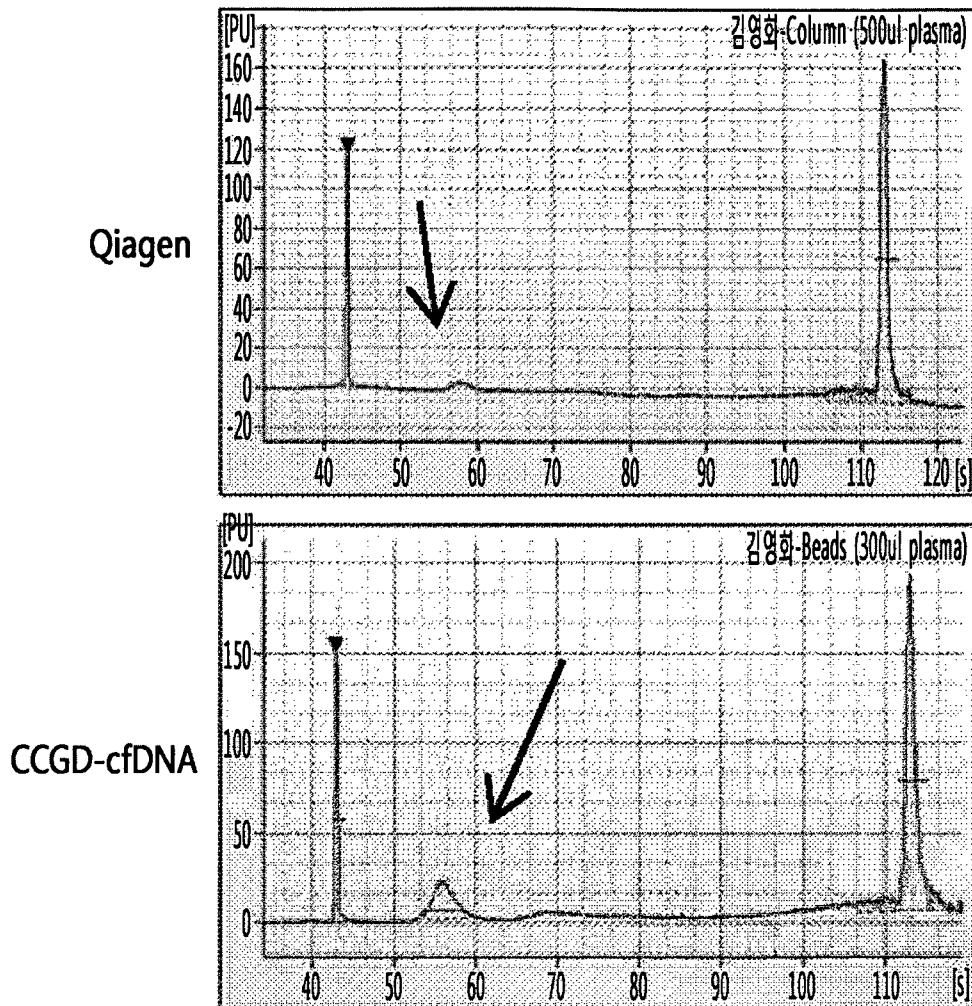
PG 값 vs. RQ-PCR 값



[도11a]

분리된 cfDNA의 정성분석

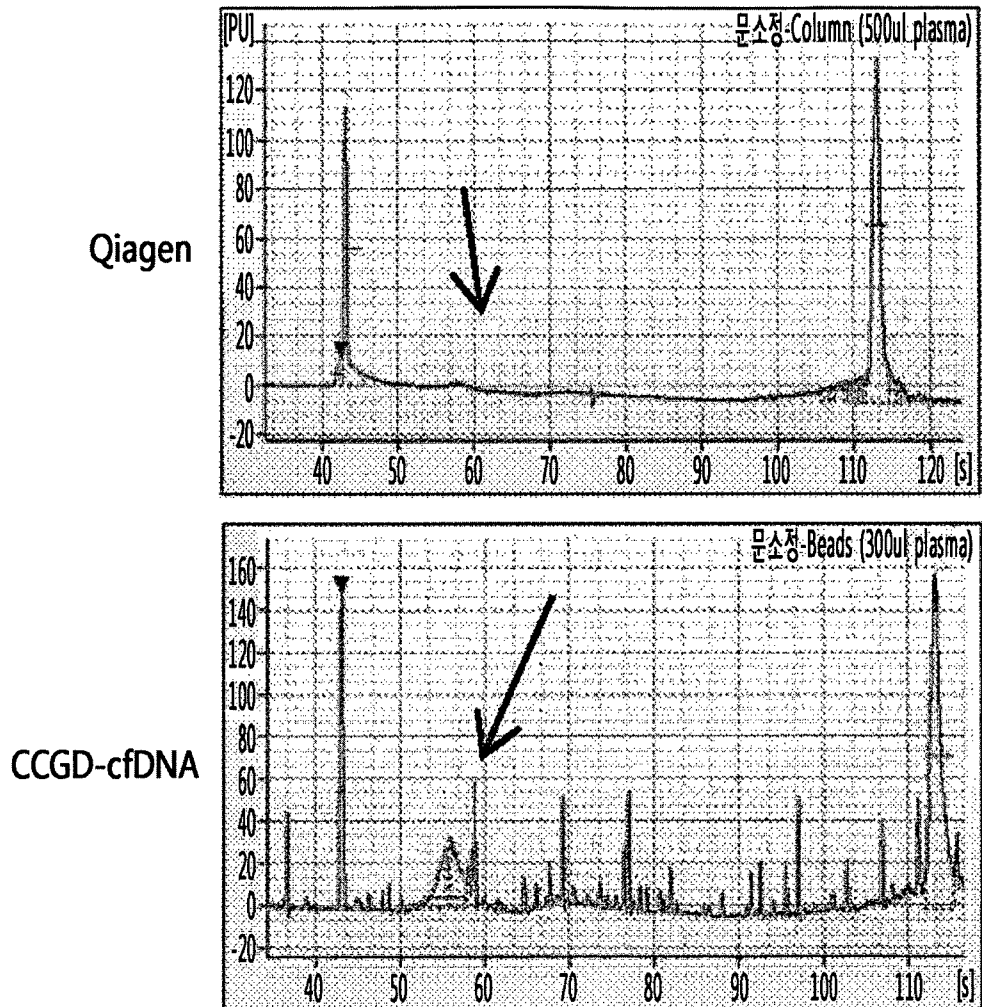
산모 1



[도11b]

분리된 cfDNA의 정성분석

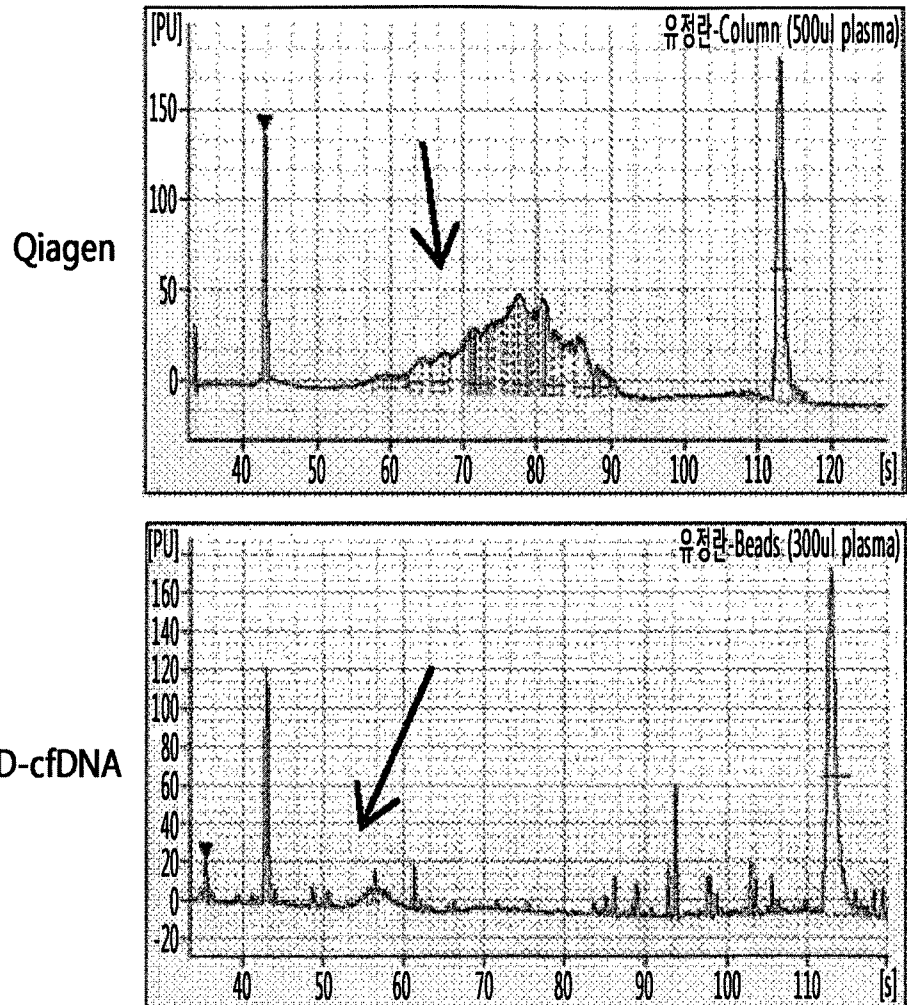
산모 2



[도11c]

분리된 cfDNA의 정성분석

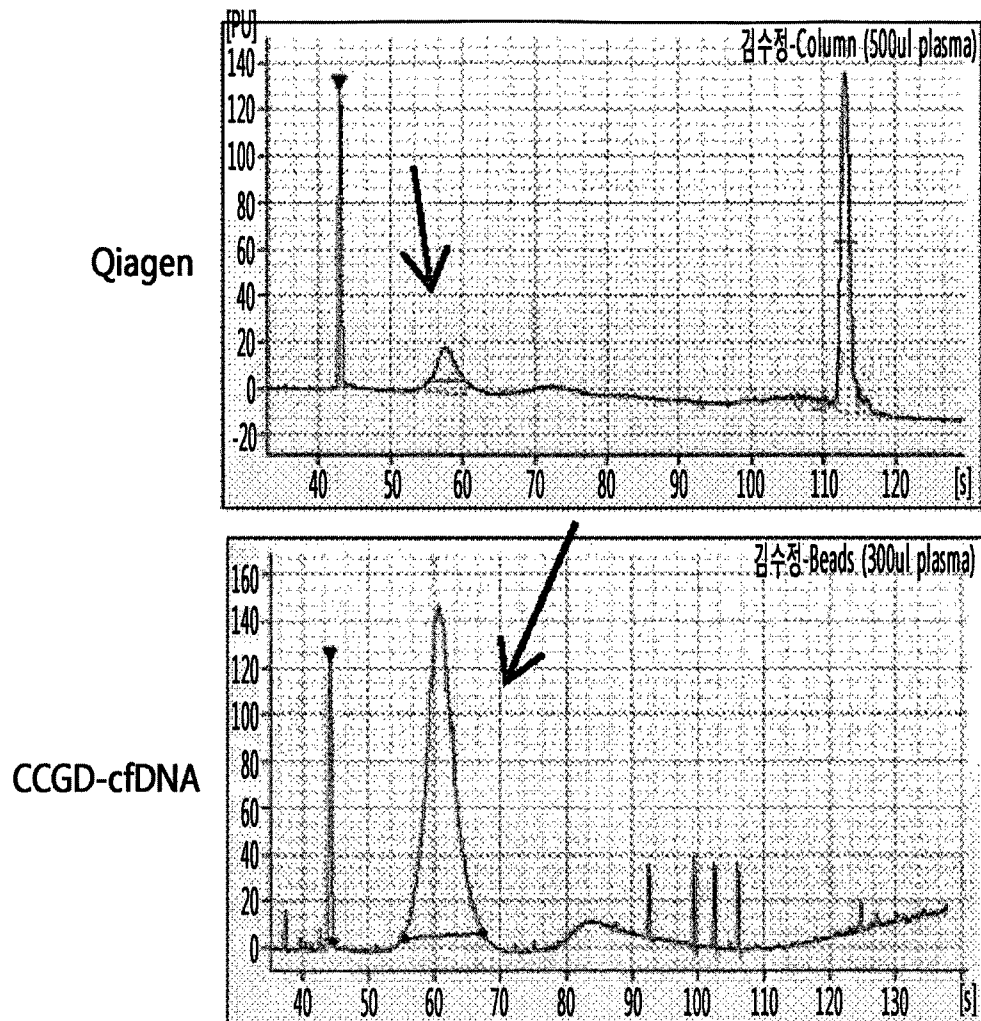
산모 3



[도11d]

분리된 cfDNA의 정성분석

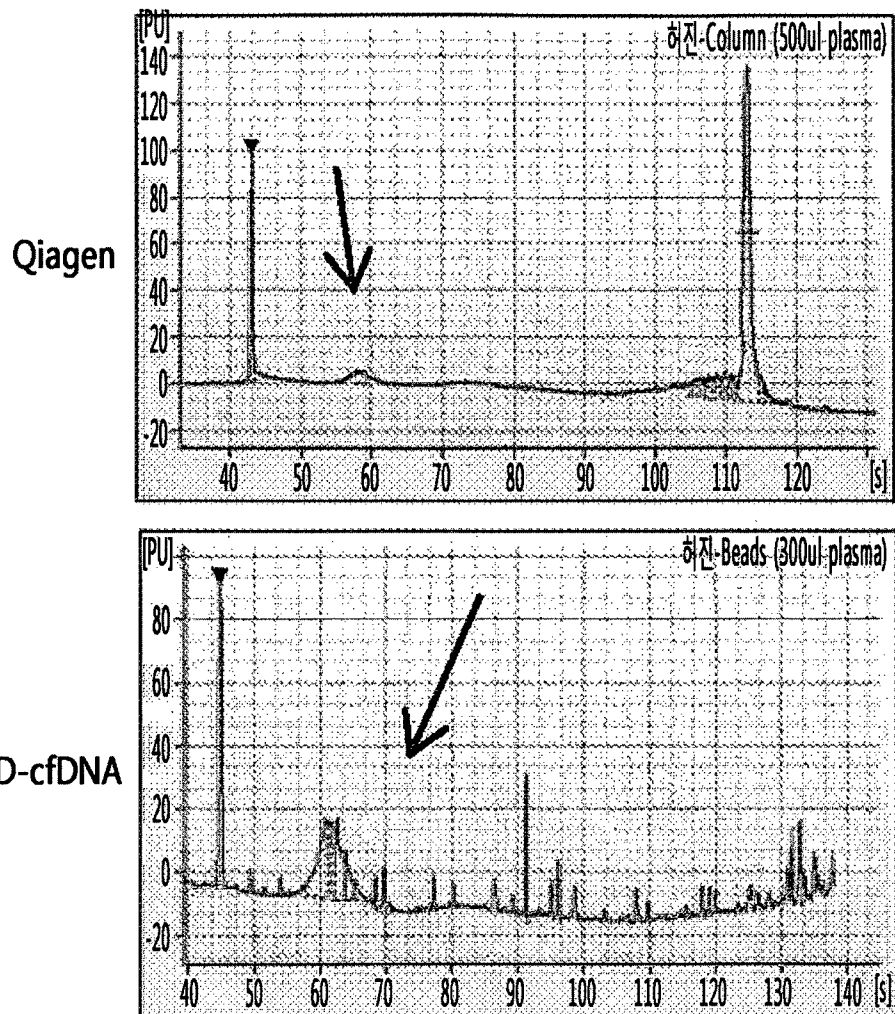
산모 4



[도11e]

분리된 cfDNA의 정성분석

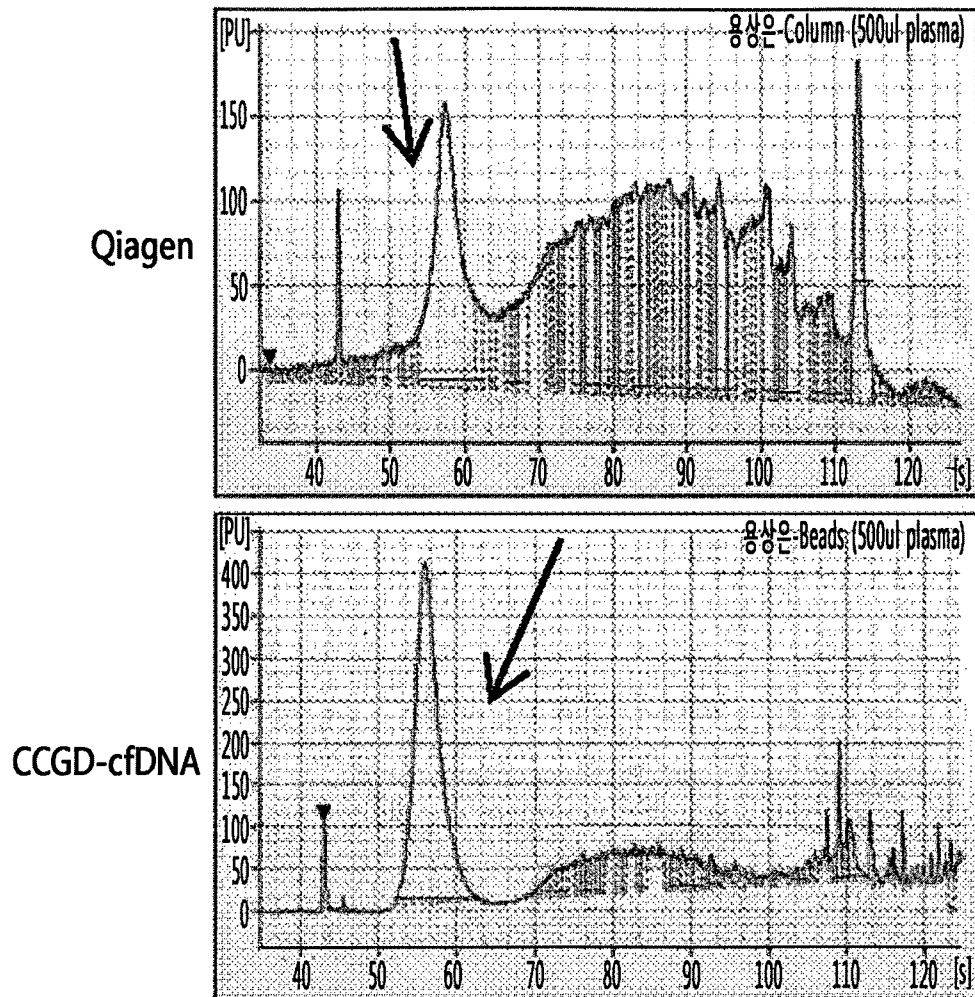
산모 5



[도11f]

분리된 cfDNA의 정성분석

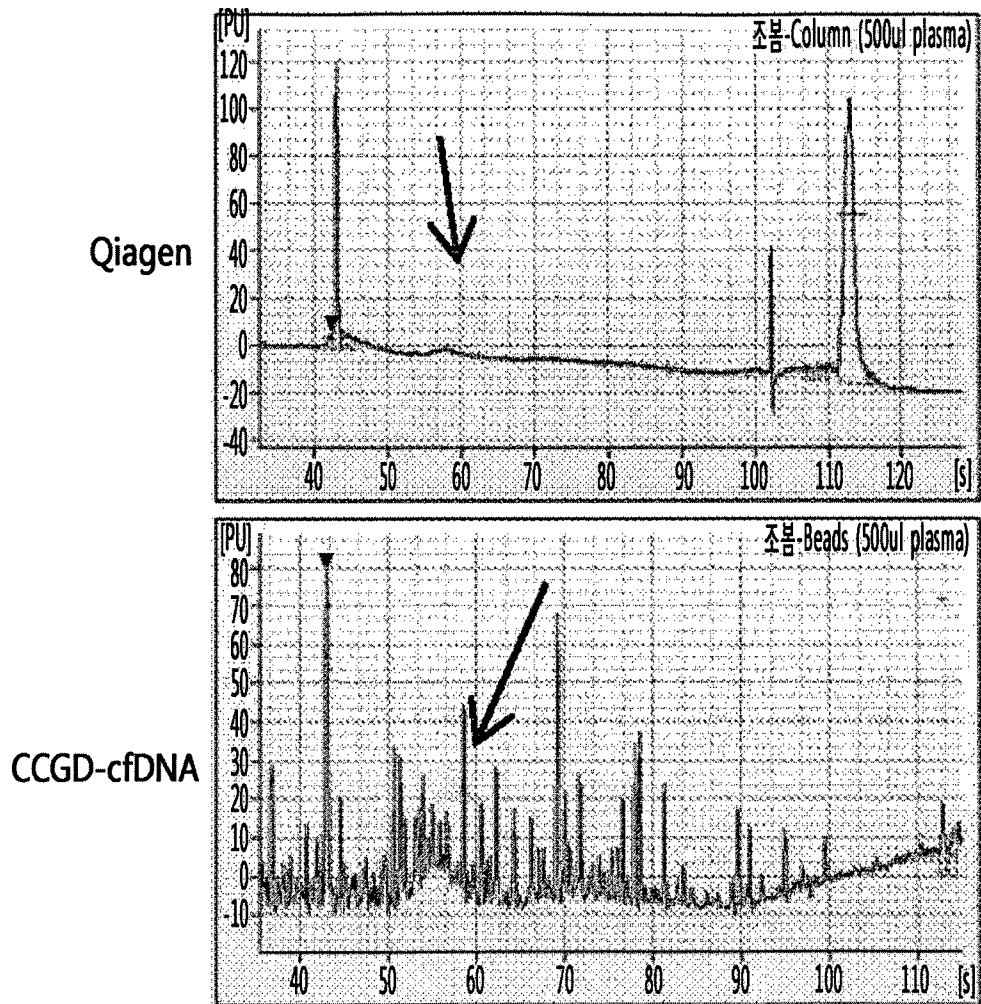
산모 6



[도11g]

분리된 cfDNA의 정성분석

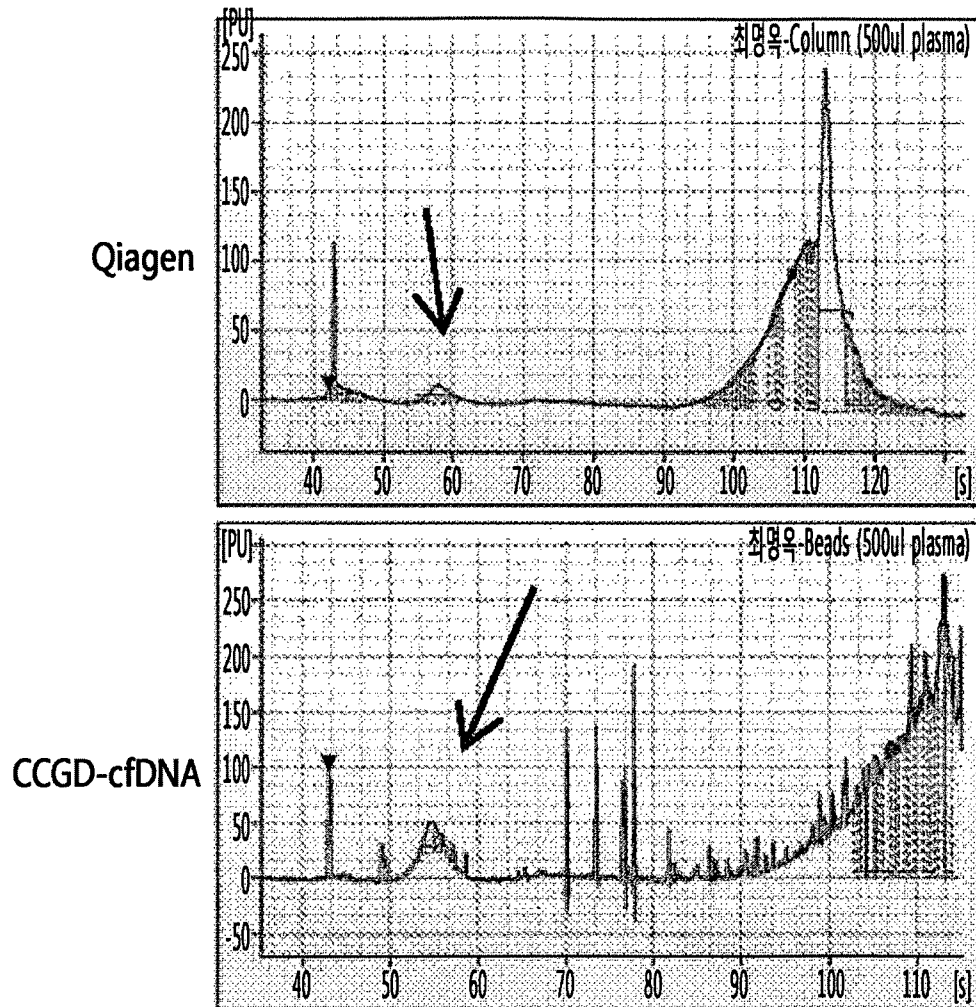
산모 7



[도11h]

분리된 cfDNA의 정성분석

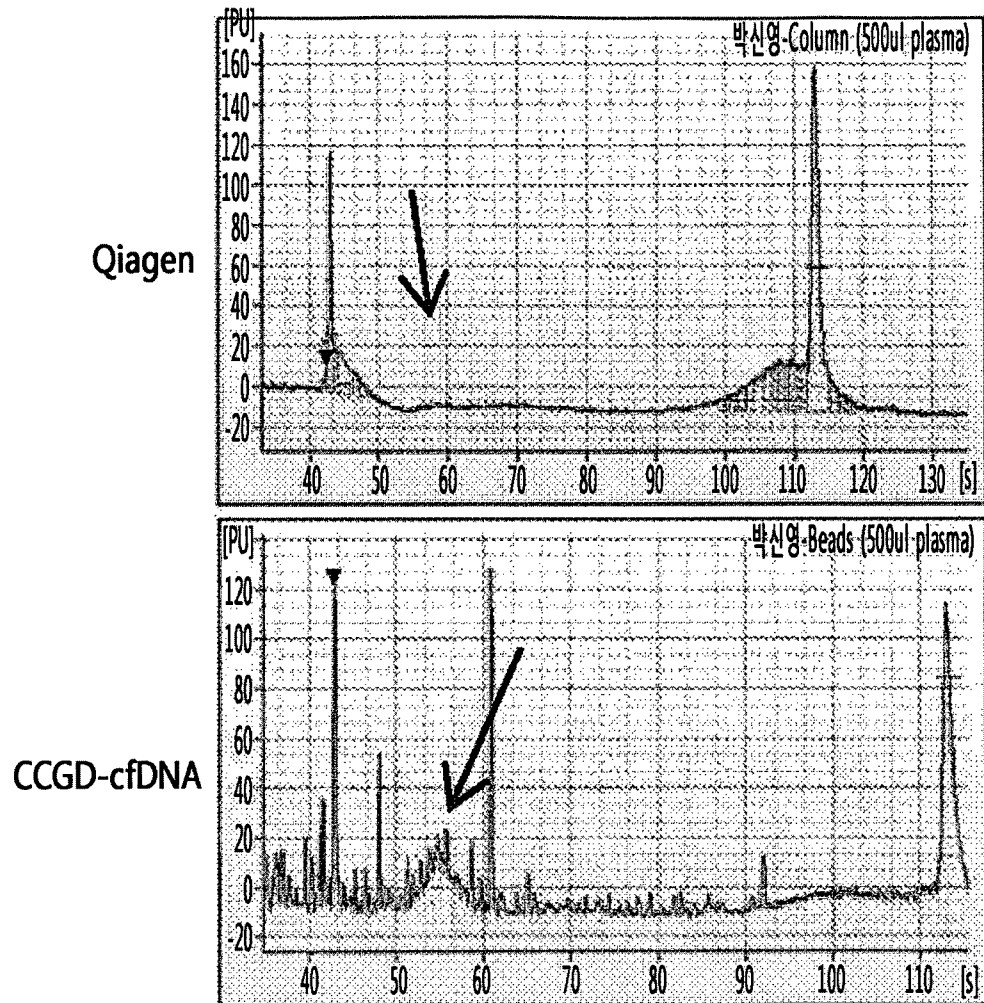
산모 8



[도11i]

분리된 cfDNA의 정성분석

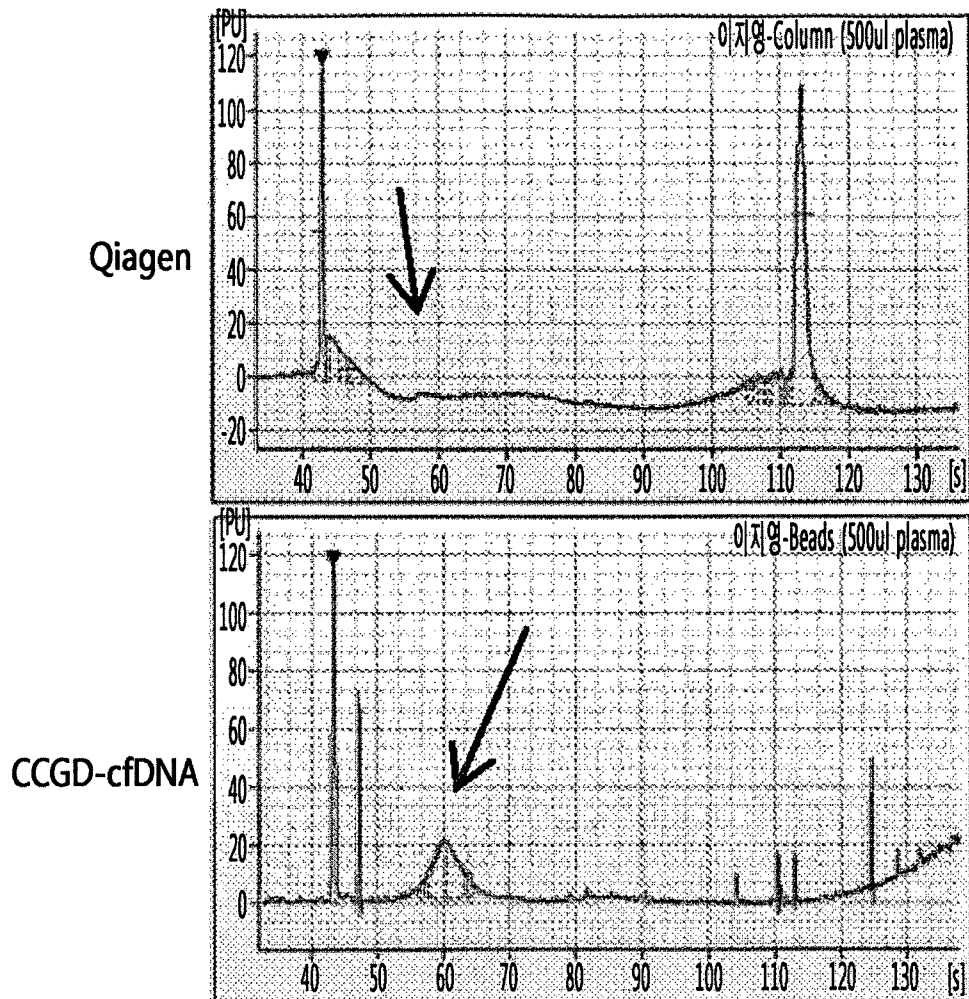
산모 9



[도11j]

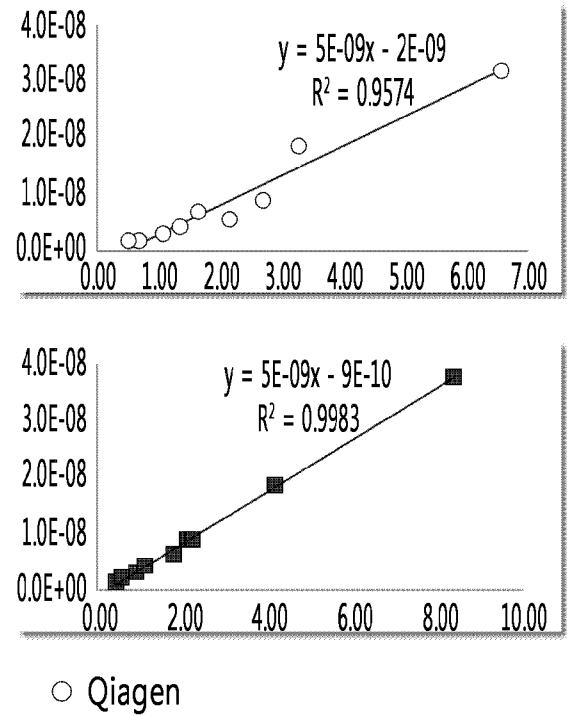
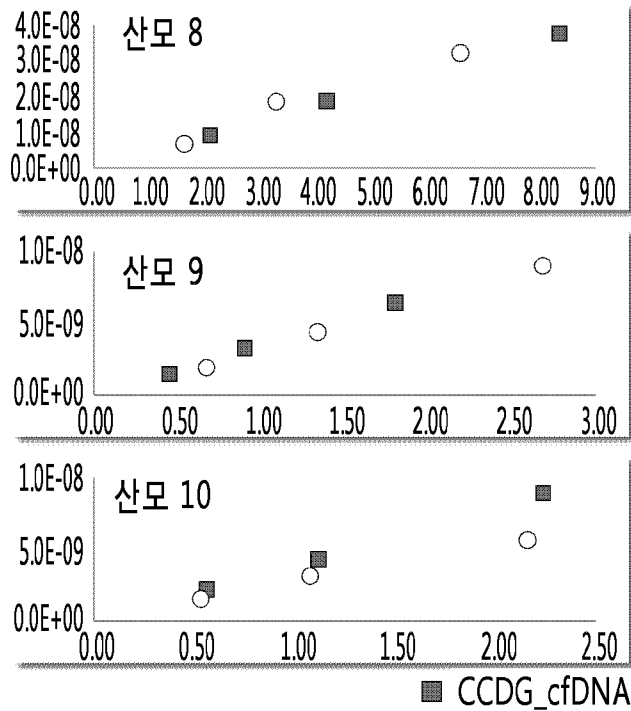
분리된 cfDNA의 정성분석

산모 10



[도12]

분리된 cfDNA의 순도



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002462

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/10; C12Q 1/70; C12Q 1/68; C07H 1/06; C12N 1/08; C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: circulating cell-free nucleic acid(circulating cell-free nucleic acid), isolation(isolation, seperation), lysis buffer, chaotropic salt, PEG, magnetic bead

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014-0274740 A1 (VERINATA HEALTH, INC.) 18 September 2014 See abstract; claim 1; and paragraphs [0113]-[0130]; [0332]-[0333]; figure 1A.	1-37
Y	US 2006-0078923 A1 (MCKERNAN, Kevin et al.) 13 April 2006 See abstract; claims 1-8; and paragraphs [0117]-[0124], [0146]-[0159]; example 6.	1-37
A	US 2012-0171675 A1 (HORLITZ, Martin et al.) 05 July 2012 See the entire document.	1-37
A	US 2006-0141450 A1 (ZHANG, Xu et al.) 29 June 2006 See the entire document.	1-37
A	US 7527929 B2 (MCKERNAN, Kevin J. et al.) 05 May 2009 See the entire document.	1-37



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 JULY 2016 (04.07.2016)

Date of mailing of the international search report

05 JULY 2016 (05.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002462

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0274740 A1	18/09/2014	CA 2906818 A1 EP 2971097 A1 WO 2014-145078 A1	18/09/2014 20/01/2016 18/09/2014
US 2006-0078923 A1	13/04/2006	CA 2622037 A1 CN 101268189 A EP 1608752 A2 EP 1608752 B1 EP 1937811 A1 JP 2009-508496 A US 2004-0197780 A1 US 2007-0054285 A1 WO 2004-090132 A2 WO 2007-035750 A1	29/03/2007 17/09/2008 28/12/2005 16/12/2009 02/07/2008 05/03/2009 07/10/2004 08/03/2007 21/10/2004 29/03/2007
US 2012-0171675 A1	05/07/2012	EP 2264168 A1 EP 2264168 B1 US 8980552 B2 WO 2010-145843 A1	22/12/2010 17/12/2014 17/03/2015 23/12/2010
US 2006-0141450 A1	29/06/2006	AU 2002-357423 A1 CA 2507592 A1 CN 1506460 A EP 1578960 A1 JP 2006-508668 A JP 5399600 B2 US 7776580 B2 WO 2004-053115 A1	30/06/2004 24/06/2004 23/06/2004 28/09/2005 16/03/2006 29/01/2014 17/08/2010 24/06/2004
US 7527929 B2	05/05/2009	CA 2575140 A1 EP 1776458 A2 JP 2008-510456 A US 2006-0177836 A1 US 2009-0191566 A1 WO 2006-015326 A2 WO 2006-015326 A3	09/02/2006 25/04/2007 10/04/2008 10/08/2006 30/07/2009 09/02/2006 13/04/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/10; C12Q 1/70; C12Q 1/68; C07H 1/06; C12N 1/08; C12N 1/20

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid), 분리(isolation, saperation), 용해 완충액, 카오토로픽염, PEG, 자성 비드

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2014-0274740 A1 (VERINATA HEALTH, INC.) 2014.09.18. 요약; 청구항 제1항; 및 단락 [0113]-[0130]; [0332]-[0333]; 도 1A 참조.	1-37
Y	US 2006-0078923 A1 (MCKERNAN, KEVIN 등) 2006.04.13. 요약; 청구항 제1-8항; 및 단락 [0117]-[0124], [0146]-[0159]; Example 6 참조.	1-37
A	US 2012-0171675 A1 (HORLITZ, MARTIN 등) 2012.07.05. 전체 문헌 참조.	1-37
A	US 2006-0141450 A1 (ZHANG, XU 등) 2006.06.29. 전체 문헌 참조.	1-37
A	US 7527929 B2 (MCKERNAN, KEVIN J. 등) 2009.05.05. 전체 문헌 참조.	1-37

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 04일 (04.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 05일 (05.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

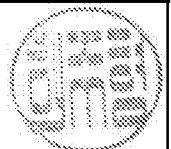
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0274740 A1	2014/09/18	CA 2906818 A1 EP 2971097 A1 WO 2014-145078 A1	2014/09/18 2016/01/20 2014/09/18
US 2006-0078923 A1	2006/04/13	CA 2622037 A1 CN 101268189 A EP 1608752 A2 EP 1608752 B1 EP 1937811 A1 JP 2009-508496 A US 2004-0197780 A1 US 2007-0054285 A1 WO 2004-090132 A2 WO 2007-035750 A1	2007/03/29 2008/09/17 2005/12/28 2009/12/16 2008/07/02 2009/03/05 2004/10/07 2007/03/08 2004/10/21 2007/03/29
US 2012-0171675 A1	2012/07/05	EP 2264168 A1 EP 2264168 B1 US 8980552 B2 WO 2010-145843 A1	2010/12/22 2014/12/17 2015/03/17 2010/12/23
US 2006-0141450 A1	2006/06/29	AU 2002-357423 A1 CA 2507592 A1 CN 1506460 A EP 1578960 A1 JP 2006-508668 A JP 5399600 B2 US 7776580 B2 WO 2004-053115 A1	2004/06/30 2004/06/24 2004/06/23 2005/09/28 2006/03/16 2014/01/29 2010/08/17 2004/06/24
US 7527929 B2	2009/05/05	CA 2575140 A1 EP 1776458 A2 JP 2008-510456 A US 2006-0177836 A1 US 2009-0191566 A1 WO 2006-015326 A2 WO 2006-015326 A3	2006/02/09 2007/04/25 2008/04/10 2006/08/10 2009/07/30 2006/02/09 2006/04/13