

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0132485

(43) 공개일자 2023년09월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12Q 1/6886 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7025577
- (22) 출원일자(국제) 2021년12월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년07월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/087813
- (87) 국제공개번호 WO 2022/144407
국제공개일자 2022년07월07일
- (30) 우선권주장
63/131,722 2020년12월29일 미국(US)
- (71) 출원인
벨지언 볼리션 에스알엘
벨기에 베에-5032 이스네스 루 포카스 르웬느 22
- (72) 발명자
미칼레프, 제이콥 빈센트
벨기에 5032 이스네스 루 포카스 르웬느 22 벨지언 볼리션에스알엘 내
에클스틴, 마크 에드워드
벨기에 5032 이스네스 루 포카스 르웬느 22 벨지언 볼리션에스알엘 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

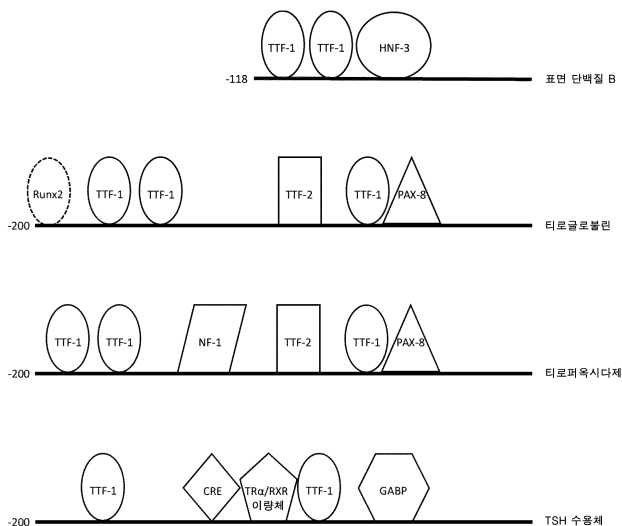
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 순환 전사 인자 분석

(57) 요약

본 발명은 대상체에서 질환, 예를 들어 암의 존재의 지표로서 전사 인자 및 관련된 DNA 서열을 포함하는 순환 염색질 단편의 검출을 위한 최소 침습 체액 검사에 의해 대상체에서 질환을 검출하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 관련된 DNA 서열을 시퀀싱하는 단계 및/또는 체액으로부터 세포 유리 뉴클레오솜을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

파마트, 도리안 페르난드 프랑수아

벨기에 5032 이스네스 루 포카스 르웬느 22 벨지언
볼리션에스알엘 내

헤르조그, 마리엘

벨기에 5032 이스네스 루 포카스 르웬느 22 벨지언
볼리션에스알엘 내

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는, 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법:

- (i) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- (ii) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출 또는 측정하는 단계; 및
- (iii) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 (ii)에서 관련된 DNA 단편을 검출하기 전에, 나머지 체액 샘플로부터 단계 (i)에서 결합된 전사 인자를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 단계 (ii)는 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 시퀀싱하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 전사인자와 관련된 DNA 단편을 추출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, PCR에 의한 것과 같은, 추출된 DNA 단편을 증폭하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 인자와 관련된 DNA 단편은 실시간 PCR에 의해 검출 및/또는 측정되는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 체액 샘플로부터 세포 유리 뉴클레오솜을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 단계 (ii) 이전에 체액 샘플을 뉴클레오솜 또는 이의 성분에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계 및 결합제에 결합된 샘플을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 유리 염색질 단편은 전사 인자 및 DNA 단편으로 구성되는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (ii)에서 관련된 DNA 단편의 검출 전에, 단계 (i)에서 결합제에 의해 결합된 전사 인자는 적어도 1% 농도의 세제를 함유하는 완충액으로 세척되는 방법.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법:

- (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출 또는 측정하는 단계; 및
- (iii) 대상체에서 질환 존재의 지표로서 DNA의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

청구항 12

제 11항에 있어서, 대상체에서 질환의 존재를 나타내기 위한 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 관련된 DNA의 서열을 사용하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환에 의해 영향을 받는 조직을 검출하는 방법:

- (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 시퀀싱하는 단계; 및
- (iii) 대상체에서 질환에 의해 영향을 받는 조직을 결정하기 위한 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 관련된 DNA의 서열의 존재를 사용하는 단계.

청구항 14

제 13항에 있어서, 질환에 의해 영향을 받는 조직은 원 기관인 방법.

청구항 15

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 암 또는 염증성 질환인 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 인자에 결합하는 결합제는 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 체액 샘플은 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플인 방법.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 체액 샘플은 (1) 전혈 샘플을 가교제와 접촉시키는 단계; (2) 가교된 샘플을 칼슘 이온 킬레이트제와 접촉시키는 단계; 및 (3) 샘플로부터 혈장을 분리하는 단계에 의하여 획득되는 혈장 샘플인 방법.

청구항 19

다음의 단계를 포함하는 의학적 치료의 적합성에 대한 동물 또는 인간 대상체를 평가하는 방법:

- (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- (ii) 대상체를 위한 적합한 치료의 선택을 위한 매개변수로서 단계 (i)에서 검출된 관련된 DNA 수준 및/또는 서열을 사용하는 단계.

청구항 20

다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체의 치료를 모니터링하는 방법:

- (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계;
- (ii) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA의 검출, 측

정 또는 시퀀싱을 1회 이상 반복하는 단계; 및

(iii) 대상체의 상태의 임의의 변화에 대한 매개변수로서 단계 (ii)와 비교하여 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 DNA 서열의 임의의 변화를 사용하는 단계.

청구항 21

제 20항에 있어서, 치료는 암 치료용인 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA는 측정 패널의 하나로서 검출 또는 측정되는 방법.

청구항 23

선택적으로 전사 인자와 관련된 DNA의 증폭 및/또는 시퀀싱을 위한 시약을 동반하는 전사 인자에 대한 리간드 또는 바인더, 및/또는 뉴클레오솜에 대한 리간드 또는 결합제 및/또는 제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항의 방법을 따르기 위한 키트의 사용 설명서를 포함하는 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 검출을 위한 키트.

청구항 24

다음의 단계를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법:

- (a) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- (b) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- (c) 대상체에서 암의 존재의 지표로서 DNA 단편의 존재, 양 또는 서열을 사용하는 단계; 및
- (d) 대상체가 단계 (c)에서 암을 갖는 것으로 결정되는 경우 치료를 시행하는 단계.

청구항 25

제 24항에 있어서, 치료는 수술, 방사선 요법, 화학 요법, 면역 요법, 호르몬 요법 및 생물학적 요법으로부터 선택되는 방법.

청구항 26

다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 태아에서 질환을 검출하는 방법:

- (i) 임신한 인간 또는 동물 대상체로부터 체액 샘플을 수득하는 단계;
- (ii) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- (iv) 태아에서의 질환 존재의 지표로서 DNA의 존재, 서열 또는 양을 사용하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 최소 침습 체액 검사에 의해 대상체의 질환을 검출하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 대상체에서 질환 존재의 지표로서 전사 인자를 포함하는 순환 염색질 단편의 측정 또는 검출에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 사망률이 높은 흔한 질환이다. 이 질환의 생물학은 전암성 상태에서 1기, 2기, 3기 및 결국에는 4기 암으로 이어지는 진행을 포함하는 것으로 이해된다. 대부분의 암 질환의 경우 사망률은 질환이 효과적인 치료 옵션을 사용할 수 있는 초기 국부 단계에서 발견되는지 또는 질환이 영향을 받은 장기 내에서 확산되었을 수 있는 말기 단계에서 발견되었는지 또는 치료가 더 어려운 그 이상에서 발견되었는지에 따라 크게 달라진다. 말기 암

증상은 눈에 보이는 혈변, 혈뇨, 기침 시 혈, 질에서 혈, 설명할 수 없는 체중 감소, 지속적인 설명할 수 없는 덩어리(예를 들어, 유방), 소화 불량, 삼키기 어려움, 암 유형에 따라 사마귀나 점뿐만 아니라 다른 많은 가능한 증상의 변화를 포함하는 것으로 다양하다. 그러나, 이러한 증상으로 진단된 대부분의 암은 이미 말기이며 치료가 어렵다. 대부분의 암은 초기에는 증상이 없거나 진단에 도움이 되지 않는 비특이적 증상이 있다. 따라서, 암은 이상적으로는 암 검사를 통해 초기에 발견되어야 한다.

[0003] 간단한 일상 암 혈액 검사의 필요성을 해결하기 위하여, 다양한 혈액 기원 단백질들이 CRC에 대한 CEA(carcinoembryonic antigen), 간암에 대한 AFP(alpha-fetoprotein), 난소암에 대한 CA125, 췌장암에 대한 CA19-9, 유방암에 대한 CA15-3 및 전립선암에 대한 PSA를 포함하는 잠재적 암 바이오마커로서 조사되어 왔다.

[0004] 보다 최근에, 현장의 작업자들은 암 검출을 위한 혈액 기반 바이오마커로서 순환 종양 DNA(ctDNA)를 조사하였다. 세포 유리 DNA(cfDNA)는 매일 수많은 세포의 세포사, 주로 세포 사멸에 의해 발생하는 것으로 생각되는 염색질 단편으로 혈액에서 순환한다. 세포 사멸 과정 동안 염색질은 모노뉴클레오솜 및 올리고뉴클레오솜으로 단편화되며, 이들 중 일부는 세포로부터 방출되어 세포 유리 뉴클레오솜으로 순환한다. 각 순환 세포 유리 뉴클레오솜은 길이가 200 염기쌍(bp) 미만인 작은 DNA 단편과 연결되어 있다. 유사하게, 순환계에서 DNA 결합 전사 인자 또는 기타 비-히스톤 염색질 단백질로 구성된 세포 유리 염색질 단편은 단편체학 분석에서 추론되었다. 건강한 대상체에서 순환하는 염색질 단편은 조혈 기원인 것으로 생각되며 수준은 낮다. 순환하는 뉴클레오솜 및 그에 따른 cfDNA 단편의 상승된 수준은 많은 암, 자가 면역 질환, 염증 상태, 뇌졸중 및 심근 경색을 포함하는 다양한 상태의 대상체에서 발견된다(Holdenrieder & Stieber, 2009).

[0005] 암 환자의 혈액에 있는 cfDNA의 적어도 일부는 죽어가거나 죽은 암세포에서 순환계로 뉴클레오솜 및 기타 염색질 단편이 방출되는 것에서 유래하는 것으로 생각된다(즉, cfDNA에는 일부 ctDNA가 포함됨). 암 환자의 일치하는 혈액 및 조직 샘플을 조사한 결과, 환자의 종양에 존재하는 암 관련 돌연변이(건강한 세포에는 없음)가 동일한 환자에서 채취한 혈액 샘플의 cfDNA에도 존재하는 것으로 나타났다(Newman et al., 2014). 유사하게, 암 세포에서 차등적으로 메틸화된(시토신 잔기의 메틸화에 의해 후생유전학적으로 변경된) DNA 서열도 순환계의 cfDNA에서 메틸화된 서열로 검출될 수 있다. 또한, ctDNA로 구성된 순환 cfDNA의 비율은 종양 부담과 관련이 있으므로 질환 진행은 존재하는 ctDNA의 비율에 의해 정량적으로 그리고 유전적 및/또는 후생유전학적 구성에 의해 정성적으로 모니터링될 수 있다. ctDNA의 분석은 종양 내의 모든 또는 많은 다른 클론에서 유래하여 종양 클론을 공간적으로 통합하는 DNA와 관련하여 매우 유용하고 임상적으로 정확한 데이터를 생성할 수 있다. 더욱이 시간이 지남에 따라 반복적인 혈액 샘플링은 예를 들어 반복적인 조직 생검보다 훨씬 더 실용적이고 경제적인 옵션이다. ctDNA 분석은 침습적 조직 생검 절차 없이 종양 DNA 조사를 통해 종양 치료 선택을 위한 초기 단계의 재발 및 후천적 약물 내성 감지뿐만 아니라 종양의 감지 및 모니터링에 혁명을 일으킬 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 이러한 ctDNA 테스트는 모든 유형의 암 관련 DNA 이상(예를 들어, 점 돌연변이, 뉴클레오티드 변형 상태, 전좌, 유전자 복제 수, 마이크로 위성 이상 및 DNA 가닥 무결성)을 조사하는데 사용될 수 있으며, 일상적인 암 스크리닝, 정기적이고 보다 빈번한 모니터링 및 최적의 치료 방법의 정기적 체크를 위한 적용 가능성을 가지게 한다(Zhou et al., 2017).

[0006] 혈장은 일반적으로 ctDNA 분석을 위한 기질로 사용된다. cfDNA 단편(모든 ctDNA 포함)은 혈장에서 추출되고(따라서 뉴클레오솜, 전사 인자 또는 기타 단백질에 대한 결합에서 제거됨) 뉴클레오티드 염기 서열에 대해 분석된다. 모든 DNA 분석 방법을 사용할 수 있지만, 일반적으로 분석은 차세대 시퀀싱 기기를 사용한 심층 시퀀싱으로 수행된다.

[0007] DNA 이상은 모든 암 질환의 특징이며 ctDNA는 조사된 모든 암 질환에서 관찰되었으므로 ctDNA 검사는 모든 암 질환에 적용할 수 있다. 조사된 암에는 방광암, 유방암, 결장직장암, 흑색종, 난소암, 전립선암, 폐간암, 자궁 내막암, 난소암, 림프종, 구강암, 백혈병, 두경부암 및 골육종이 포함되나 이에 국한되지 않는다(Crowley et al., 2013; Zhou et al., 2017; Jung et al., 2010).

[0008] cfDNA 분석의 한 가지 예시적인 방법은 대상체의 cfDNA 단편의 기원인 조직 또는 세포의 식별을 포함한다. 이 접근법의 기본은 순환계에 존재하는 모든 cfDNA 단편이 뉴클레오솜 내 단백질 결합에 의해 뉴클레아제 작용으로부터 보호되기 때문에 세포 사멸 동안 또는 순환계에서 뉴클레아제에 의한 분해를 피하였다는 것이다. 이 접근법은 대상체로부터 채취한 혈액 샘플에서 cfDNA의 뉴클레오솜 단편화 패턴을 결정하고 참조 게놈에서 cfDNA 단편의 게놈 위치를 찾는 것을 포함한다. 단편화 패턴은 세포 유형에 따라 다르며 대상의 cfDNA 기원 세포를 식별하는데 사용할 수 있다.

[0009] 이 접근법은 혈장 샘플에서 cfDNA(모든 ctDNA 포함) 추출과 DNA의 전체 게놈 시퀀싱을 포함하여 cfDNA 단편에

의해 표시되는 뉴클레오솜 결합 DNA 패턴을 검출한다. cfDNA 단편의 말단 서열은 컴퓨터 분석에 의한 생물정보학을 사용하여 참조 게놈 또는 게놈 내의 게놈 위치에 대해 위치가 결정된다. 참조 게놈 내 cfDNA 말단의 게놈 위치는 게놈의 뉴클레오솜 보호 cfDNA 적용 범위의 지도를 제공한다.

[0010] 대상체에서 cfDNA에 대한 다른 세포 타입 또는 조직의 비율적 분포는 W02017012592에 설명된 바와 같이 컴퓨터 분석에 의한 생물 정보학을 사용하여 상이한 세포 공급원으로부터의 알려진 상대적 풍부도의 cfDNA를 포함하는 보정 샘플에 대한 대상체의 뉴클레오솜 단편화 패턴의 비교에 의해 결정될 수 있다.

[0011] 뉴클레오솜을 포함하는 염색질 단편과 관련된 cfDNA 단편은 일반적으로 길이가 120-200bp이다. 그러나, cfDNA의 단백질 결합 및 보호는 뉴클레오솜에서 cfDNA의 히스톤 결합에 국한되지 않는다. 활성 유전자 프로모터 서열을 포함하는 다른 cfDNA 단편은 뉴클레오솜에 추가하거나 뉴클레오솜이 없는 상태에서 전사 인자, 보조인자 또는 기타 비히스톤 염색질 단백질에 의해 결합된다. 뉴클레오솜이 없는 경우, 이러한 단백질은 종종 35-80bp 범위의 더 짧은 cfDNA 단편에 결합하여 보호한다. 그러나, 이러한 더 짧은 cfDNA 단편은 사용된 DNA 단편 라이브러리 준비 방법이 길이가 100 염기쌍 미만인 짧은 DNA 단편의 분리, 증폭 및 시퀀싱에 적합한 경우에만 실험적으로 관찰된다(Snyder et al., 2016).

[0012] 살아있는 세포에서 게놈을 가로지르는 DNA의 단백질 결합 패턴은 세포 유형에 따라 달라지는데, 이는 상이한 프로모터 서열 및 유전자 서열을 포함하는 상이한 DNA 서열이 상이한 세포에서 활성이기 때문이다. 모든 세포 유형에서 DNA의 단백질 결합 패턴은 세포에서 추출한 염색질을 뉴클레아제 효소로 분해하고 분해되지 않은 DNA를 단백질로 보호된 염색질 단편으로 시퀀싱하여 뉴클레아제 접근 가능 부위 매핑으로 결정할 수 있다. 따라서, 혈액 내 cfDNA 단편을 생체 내 뉴클레아제 분해의 산물로 본다면 발견된 cfDNA 서열은 cfDNA가 유래한 세포의 단백질 결합 DNA 서열과 일치해야한다. 따라서, 원칙적으로 혈액 내 cfDNA 단편 서열의 패턴은 기원 세포의 뉴클레아제 역세서를 사이트(Nuclease Accessible Site) 매핑에 의해 생성된 염색질 단편 서열의 패턴과 유사해야한다. 따라서, 혈액 샘플로부터 결정된 cfDNA 서열의 단편화 패턴은 cfDNA의 기원 조직을 결정하기 위해 공지된 조직 또는 암 유형의 세포의 뉴클레아제 접근 가능한 사이트 분석에 의해 생성된 공지된 DNA 단편화 패턴에 생물정보학 방법을 사용하여 비교될 수 있다. 건강한 대상체로부터 채취한 샘플의 결과는 cfDNA의 기원 세포가 조혈 세포임을 나타낸다. 암 환자에게서 채취한 샘플에서 이 접근법의 결과는 cfDNA와 ctDNA가 조혈 세포와 다른 세포를 포함한 세포의 혼합물에서 유래했음을 나타낸다. 많은 경우에 표시된 비조혈 세포 유형은 환자의 암 질환 조직과 상관관계가 있다(Snyder et al., 2016).

[0013] 다른 연구자들은 전체 게놈 cfDNA 시퀀싱(모든 ctDNA 포함)을 포함하는 유사한 cfDNA 단편 말단 분석 접근법을 사용했지만 전사 인자 결합 부위(TFBS) 서열에 대한 생물정보학적 컴퓨터 분석에 초점을 맞췄다. 이 접근법의 목적은 TFBS 접근성을 결정하고 암 환자로부터 채취한 혈장 샘플에서 접근성이 변경된 TFBS DNA 서열을 식별하는 것이다(Ulz et al., 2019). 이 접근법에서는 피험자로부터 혈장 샘플을 채취하고 길이가 100bp 미만인 작은 DNA 단편에 적합한 DNA 라이브러리 준비 방법을 사용하여 cfDNA를 추출하고 증폭한다. DNA 라이브러리는 차세대 시퀀싱 방법을 사용하여 시퀀싱된다. 시퀀싱 데이터는 생물정보학 방법을 사용하여 TFBS 근처의 게놈 영역에서 cfDNA 단편화 패턴을 식별하는데 사용된다. 분석은 TFBS가 cfDNA를 포함하는 염색질 단편에서 전사 인자에 결합되었는지 여부를 결정하기 위해 유전자 프로모터 서열에서 TFBS 및 그의 플랭킹 서열에 걸친 cfDNA 단편의 뉴클레오솜 포지셔닝 프로파일을 결정하는 것을 포함한다. 이 방법은 복잡하지만 다음과 같이 요약할 수 있다.

[0014] TFBS에 걸쳐 있는 DNA 서열과 게놈의 인접 서열에서 관찰된 cfDNA 단편화 패턴이 약 200bp의 주기성을 표시하는 경우, 이는 교대로 분해로부터 DNA의 (뉴클레오솜 결합 위치의 중심에서) 더 강한 단백질 결합 보호와 (DNA가 결합되지 않고 보호되지 않은 뉴클레오솜 사이에서) 더 약한 단백질 결합 보호와 관련된다. 이 경우, TFBS 및 플랭킹 서열은 혈장 샘플에서 cfDNA를 포함하는 염색질 단편으로 덮힌 뉴클레오솜인 것으로 가정된다.

[0015] 존재하는 cfDNA 단편화 패턴이 추가로 TFBS 및 그 측면 서열의 단백질 결합 보호를 나타내지만 뉴클레오솜 관련 주기성이 없는 (또는 감쇠된) 경우, 이는 TFBS 및 그 측면 서열에서의 전사 조절 단백질 결합과 관련된다. 이 경우, TFBS는 혈장 샘플에서 cfDNA를 포함하는 염색질 단편에서 하나 이상의 전사 인자 및/또는 다른 조절 단백질에 결합된 것으로 가정한다.

[0016] 건강한 대상체에서 발견된 cfDNA 단편화 패턴은 일반적으로 조혈 세포의 뉴클레아제 접근 가능 부위 실험에서 얻은 패턴과 상관관계가 있다. 따라서, cfDNA에서 덮힌 전사 인자 결합 또는 뉴클레오솜인 TFBS 서열은 조혈 세포에서 발현되거나 발현되지 않는 전사 인자와 상관관계가 있다. 암 환자에서 패턴은 TFBS가 암 세포 유형에 결합된 전사 인자 및 조혈 세포 유형에 결합된 뉴클레오솜일 수 있는 세포 유형의 혼합과 관련이 있다. 대부분의 cfDNA는 조혈 세포에서 유래하고 소량만이 암세포에서 유래하므로 암 유래 단편체학 신호는 조혈 신호에 비해

작다. 그러나, 단편체학 생물정보학 방법은 ctDNA에 존재하는 작은 전사 인자 보호 TFBS 단편 신호를 조혈 유래 cfDNA 성분에 존재하는 훨씬 더 큰 중첩된 뉴클레오솜 주기성 신호로부터 분리하기 위해 개발되었다. 단편체학 분석은 혼합 패턴이 조혈 세포에서 발견되지 않지만 암 조직에서 발견되는 전사 인자에 결합된 전사 인자인 cfDNA TFBS 서열을 포함함을 나타낸다.

[0017] 염색질 면역침강(Chromatin Immunoprecipitation)에 이어 염색질 관련 DNA의 시퀀싱(ChIP-Seq)은 세포질 염색질 단백질의 게놈 위치를 매핑하는데 사용되는 분석 기술이다. 일반적인 방법은 세포에서 염색질을 추출한 다음 물리적 파괴(예를 들어, 초음파 처리) 또는 DNA를 절단하는 뉴클레아제 효소(예를 들어, DNase 또는 Micrococcal Nuclease)를 사용하여 염색질을 모노뉴클레오솜 또는 다른 염색질 단편으로 분해하는 것이다. 그런 다음 단편화된 염색질은 관심있는 특정 염색질 단백질, 예를 들어 특정 변형된 히스톤에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 고상 지지체에 노출된다. 특정 구조를 포함하는 크로마틴 단편은 고상에 흡착(면역침강)된다. 흡착된 염색질과 관련된 DNA는 고체상에서 추출되고 증폭효소 연쇄반응(PCR) 방법으로 증폭된다. 증폭된 DNA 단편 라이브러리는 관심 염색질 단백질이 결합된 게놈 내의 위치를 결정하기 위해 시퀀싱된다. 전사 인자에 대한 항체를 사용하는 ChIP 방법은 특정 전사 인자의 전사 인자 결합 부위(TFBS)의 게놈 위치를 확인하거나 특정 TFBS가 다른 세포 유형에서 특정 전사 인자에 의해 점유되는지 여부를 확인하는 데에도 사용된다.

[0018] 우리는 이전에 암 및 기타 질환의 검출을 위한 특정 번역 후 변형, 히스톤 이소형, 변형된 뉴클레오티드 및 비히스톤 염색질 단백질을 포함하는 특정 후성유전학적 신호를 포함하는 순환 세포 유리 뉴클레오솜에 대한 면역분석 테스트를 설명하였다(WO2005019826, WO2013030577, WO2013030579 및 WO2013084002 참조). 또한, 우리는 암 검출을 위한 전사 인자 결합 DNA를 포함하는 염색질 단편에 대한 면역분석 테스트를 설명하였다(WO2017162755 참조).

[0019] 우리는 이제 하나 이상의 전사 인자를 포함하는 순환 세포 유리 염색질 단편과 관련 DNA 단편을 분리하고 직접 분석하고 측정하기 위한 우수한 분석 및 임상 특이성과 민감도를 가진 방법을 보고한다. 훨씬 더 많은 뉴클레오솜 단편에서 전사 인자-DNA 복합체를 분리하면 분석이 간소화되고 우세한 뉴클레오솜 주기성 신호에서 전사 인자로 덮인 TFBS 신호를 분리할 필요가 없다. 이 방법은 암, 자가면역 질환 및 염증성 질환을 포함한 질환에 대한 비침습적 또는 최소 침습적 혈액 검사로 혈액 샘플에 사용될 수 있다.

발명의 내용

[0020] 발명의 요약

[0021] 본 발명의 제 1 측면에 따르면, 다음의 단계들을 포함하는 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:

[0022] (i) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

[0023] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출 또는 측정하는 단계; 및

[0024] (iii) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

[0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:

[0026] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

[0027] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출 또는 측정하는 단계; 및

[0028] (iii) 대상체에서 질환 존재의 지표로서 DNA의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

[0029] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환에 의해 영향을 받는 조직을 검출하는 방법:

[0030] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

[0031] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 시퀀싱하는 단계; 및

[0032] (iii) 대상체에서 질환에 의해 영향을 받는 조직을 결정하기 위한 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 관련 DNA의 서열의 존재를 사용하는 단계.

- [0033] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 의학적 치료에 대한 적합성에 대한 동물 또는 인간 대상체의 평가 방법을 제공한다:
- [0034] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0035] (ii) 대상체를 위한 적합한 치료의 선택을 위한 매개변수로서 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 서열을 사용하는 단계.
- [0036] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체의 치료를 모니터링하는 방법을 제공한다:
- [0037] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계;
- [0038] (ii) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA의 검출, 측정 또는 시퀀싱을 1회 이상 반복하는 단계; 및
- [0039] (iii) 대상체의 상태의 임의의 변화에 대한 매개변수로서 단계 (ii)와 비교하여 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 DNA 서열의 임의의 변화를 사용하는 단계.
- [0040] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 전사 인자와 관련된 DNA의 증폭 및/또는 시퀀싱을 위한 시약을 선택적으로 동반하는 전사 인자에 대한 리간드 또는 결합제, 및/또는 뉴클레오솜에 대한 리간드 또는 결합제 및/또는 상기 본 발명의 방법을 따르기 위한 키트의 사용 설명서를 포함하는 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 검출을 위한 키트를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다:
- [0042] (a) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0043] (b) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0044] (c) 대상체에서 암의 존재의 지표로서 DNA 단편의 존재, 양 또는 서열을 사용하는 단계; 및
- [0045] (d) 대상체가 단계 (c)에서 암에 걸린 것으로 결정되는 경우 치료를 시행하는 단계.
- [0046] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 태아에서 질환을 검출하는 방법을 제공한다:
- [0047] (i) 임신한 인간 또는 동물 대상체로부터 체액 샘플을 채취하는 단계;
- [0048] (ii) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0049] (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0050] (iv) 태아의 질환 존재의 지표로서 DNA의 존재, 서열 또는 양을 사용하는 단계.

도면의 간단한 설명

[0051] **도 1:** 계면활성제 단백질 B, 티로글로불린, 티로페록시다제 및 티로트로핀 수용체(TSH 수용체) 유전자의 프로모터 부위에서 다양한 전사 인자의 공동 결합에 대한 모식도. CRE: 사이클릭 아데노신 모노포스페이트 반응 요소; GABP: GA-결합 단백질; HNF-3: 간세포 핵 인자 3; NF-1: 핵 인자 1; PAX-8: 패어박스 유전자 8; Runx2: 런트-관련 전사 인자 2; TR α /RXR 이량체: 갑상선 호르몬 수용체 α /레티노이드 X 수용체 이량체; TTF-1: 갑상선 전사 인자 1(NK2 호메오박스 1, NKX2-1로도 알려짐); TTF-2: 갑상선 전사 인자 2.

도 2: 일반 전사 인자(GTF), 유전자 특이적 전사 인자(TF), 보조 인자, 활성화제, 억제 인자, 매개체, DNA 벤딩(bending) 단백질 및 RNA 중합효소를 제한 없이 포함하는 전사 복합체에 관련된 여러 조절 단백질의 공동-결합을 설명하기 위한 전사 복합체의 DNA 루프 구조의 예에 대한 모식도. 조절 단백질은 프로모터 서열, TATA 박스 서열, 인핸서 서열 및 억제 인자 서열을 포함하는 유전자로부터 멀리 떨어진 조절 서열뿐만 아니라 상기 유전자 근처에 위치한 조절 DNA 서열에 결합된다. 다른 조절 단백질(예를 들어, 염색질 리모델링 단백질) 및 다른 조절 서열도 가능하다.

도 3: 히스톤 H3에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 자기 비드에 흡착된 재조합 모노뉴클레오솜의 웨스턴 블롯 분석. 결과는 모노뉴클레오솜의 용량 의존적 흡착을 나타낸다.

도 4: 코팅되지 않은 자기 비드 또는 히스톤 H3에 결합하도록 유도된 항체로 코팅된 자기 비드를 사용하여 뉴클레오솜의 면역침강 후 인간 혈장 샘플 및 재조합 모노뉴클레오솜 용액에 대한 뉴클레오솜 ELISA 결과. 결과는 자연 발생 인간 순환 뉴클레오솜 및 용액 중의 재조합 뉴클레오솜 모두 코팅되지 않은 자기 비드에 의해 영향을 받지 않았지만 히스톤 H3에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 자기 비드를 사용한 면역침강에 의해 정량적으로 제거되었음을 나타낸다.

도 5: ER 음성 유방암(ER- BC), 난소암 또는 ER 점수가 7 또는 8인 ER 양성 유방암(ER+ BC)으로 진단된 여성에서 측정된 ER α 수준.

도 6: 0.1% 트윈이 포함된 일반 단일 세제 세척 완충제(0.1%) 또는 총 1.2% 세제가 혼합된 세제를 포함하는 강력한 세척 완충제(1.2%)를 사용하여 암 환자에게서 얻은 혈장 샘플에 노출된 자기 폴리스티렌 입자를 세척하는 효과. 비특이적 IgG 코팅된 입자는 특정 항체 결합 단백질(파릴화 단백질의 혼합물)의 파괴 없이(레인 6 및 7) 강력한 세제 세척의 사용을 통한 배경 결합에서 더 큰 감소를 보여준다(레인 4 및 5).

도 7: 강력한 1.2% 세제 혼합 세척 완충제를 사용하여 세척된 자기 폴리스티렌 비드에 고정된 마우스 항-CTCF 항체를 사용하여 ChIP에 의해 CRC로 진단된 환자로부터 채취한 4 폴딩 가교된 EDTA 혈장 샘플에서 면역침강된 염색질 단편의 웨스턴 블롯 분석. 4개의 혈장 샘플 모두는 CTCF 단백질(Anti CTCF; 레인 3, 5, 7 및 9)에 해당하는 약 140kD의 밴드를 나타냈다. 비특이적 마우스 IgG를 사용한 음성 대조군 실험은 CTCF(NS-IgG; 레인 2, 4, 6 및 8)에 해당하는 밴드를 나타내지 않았다. 실험은 CTCF 단백질이 혈장 샘플로부터 분리되었고 강한 세척 완충제의 사용이 혈장으로부터 상대적으로 순수한 CTCF 추출물을 유도한다는 것을 보여준다.

도 8: 환자로부터 채취한 교차 연결된 EDTA 혈장 샘플에서 CTCF 염색질 단편의 ChIP로 얻어진 어댑터 연결 cfDNA 단편 라이브러리의 분석을 보여주는 전기영동도. 약 140bp의 날카로운 피크는 어댑터 이합체를 나타내므로 175-220bp의 어댑터 연결 단편은 35-80bp의 cfDNA 단편(전기영동도에 표시됨)을 나타낸다. (a) 특정 CTCF ChIP 라이브러리에는 35-80bp 범위에서 약 1000 FU의 형광 피크를 갖는 작은 cfDNA 단편이 포함되어 있다. (b) 비특이적 대조군 IgG 라이브러리에는 약 80 FU의 형광 피크가 있는 작은 cfDNA 단편도 포함되어 있다.

도 9: 전사 인자 결합(35-80bp) 또는 뉴클레오솜 결합(135-155bp 또는 156-180bp) cfDNA 단편에 의한 9780개의 공개된 CTCF TFBS 유전자좌의 정규화된 적용 범위. (a) CRC 환자에 대해 얻은 cfDNA 서열 라이브러리에 의한 특정 CTCF 적용 범위. (b) 마우스 IgG 코팅된 입자에 비특이적으로 결합된 염색질 단편으로부터 얻은 cfDNA 서열 라이브러리에 의한 비특이적 적용 범위. 결과는 혈장 순환 CTCF-DNA 복합체에서 발생하는 특정 cfDNA 적용 범위의 피크가 공개된 CTCF TFBS 유전자좌와 상관관계가 있음을 보여준다. 뉴클레오솜 결합으로 인해 예상되는 진동 적용 범위 패턴은 조사된 5kb 범위에서 최소이다. 대조군 샘플에서는 CTCF 결합 유전자좌에서 피크 cfDNA 적용 범위가 관찰되지 않았다.

도 10: 암 세포에서 CTCF가 차지하지만 정상 세포에서는 차지하지 않는 1041개의 공개된 CTCF TFBS 유전자좌의 정규화된 적용 범위. 적용 범위는 전사 인자 결합(35-80bp) 또는 뉴클레오솜 결합(135-155bp 또는 156-180bp) cfDNA 단편에 대해 표시된다. (a) CRC 환자에 대해 얻은 cfDNA 서열 라이브러리에 의한 암 관련 유전자좌의 CTCF 점유. 결과는 이러한 1041개 부위 중 일부 또는 전부의 CTCF 점유를 확인하는 35-80bp 크기 범위의 적용 범위를 보여주므로 샘플을 채취한 대상에서 암을 나타낸다. (b) 비특이적 대조군 실험에서 CTCF 점유 피크가 관찰되지 않았다.

도 11: 강력한 1.2% 세제 혼합 세척 완충제를 사용하여 세척된 자기 폴리스티렌 비드 상에 고정된 마우스 항-AR 항체를 사용하여 ChIP에 의해 8개의 가교된 EDTA 혈장 샘플로부터 면역침강된 염색질 단편의 웨스턴 블롯 분석. 8개의 모든 혈장 샘플(S1-S8; 레인 2-9)은 AR 단백질에 해당하는 약 140kD의 밴드를 보여주었다. 샘플 S1 및 S2에서 가장 높은 밀도 밴드가 관찰되었다. 레인 10은 LnCAP 전립선암 세포의 단편화된 염색질을 사용한 양성 대조군을 나타낸다.

도 12: 8명의 전립선암 환자(S1-S8)로부터 채취한 가교된 EDTA 혈장 샘플에서 AR 염색질 단편의 ChIP로부터 생성된 어댑터 연결 cfDNA 단편 라이브러리의 분석을 보여주는 전기영동도. 약 140bp의 날카로운 피크는 어댑터 이합체를 나타내므로 175-220bp의 어댑터 연결 단편은 35-80bp의 cfDNA 단편을 나타냅니다. 음성 대조군(ctrl)에 대한 전기영동도도 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 전사 인자는 암에 관여하며 알려진 모든 발암유전자의 약 20%를 차지한다(Lambert et al., 2018). 우리는 이전에 대상체에서 암의 검출 또는 진단을 위한 혈청의 바이오마커로서 조직 특이적 전사 인자를 포함하는 염색질 단편의 사용을 기술하였다. 전사 인자의 조직 특이성은 암의 기원 조직을 나타내는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 전사 인자 TTF-1은 갑상선과 폐 조직에서 발현되고 다른 조직에서는 발현되지 않는 것으로 보고되었다. 따라서, TTF-1을 포함하는 순환 염색질 단편의 존재는 기원 조직이 폐 또는 갑상선임을 나타낸다. 우리는 또한 전사 인자를 포함하는 순환 세포 자유 염색질 단편의 측정을 위한 면역 분석 방법을 설명하였다. 이 면역분석법은 하나의 항체가 전사 인자에 결합하도록 지시되고 다른 하나는 전사 인자와 관련된 DNA 또는 염색질 단편에 포함된 뉴클레오솜 성분에 결합하도록 지시되는 이중 항체 (또는 다른 결합제) 방법을 포함한다. 설명된 일 구체에 있어서, 전사 인자에 결합하도록 표적화된 결합제는 전사 인자를 함유하는 염색질 단편을 분리하기 위해 (즉, 염색질 단편을 면역침강시키기 위해) 고상에 고정화된다. 분리된 염색질 단편은 DNA에 결합하도록 지시된 두 번째 결합제를 사용하여 검출된다. 이 면역 분석 방법은 간단하고 비용이 저렴하며 비침습적이다.
- [0053] ChIP-Seq는 일반적으로 뉴클레아제를 사용한 효소 소화 또는 초음파 처리에 의한 단편화 후 세포 염색질 추출물에 적용되는 방법이다. EDTA 혈장에 ChIP-Seq 방법을 적용한 몇 가지 보고가 있다. 혈장의 염색질은 이미 단편화되어 있으므로 샘플의 뉴클레아제 소화 또는 초음파 처리가 필요하지 않다. 혈장 내 ChIP-Seq에 대한 보고는 항히스톤 항체를 사용하여 EDTA 혈장에서 히스톤 단백질을 분리한 후 히스톤 관련 DNA 단편을 추출, 증폭 및 시퀀싱하는 것과 관련이 있다(Delizezer et al., 2008, Mansson et al., 2021, Sadeh et al., 2021, Vad-Nielsen et al., 2020).
- [0054] 온전한 순환 전사 인자-DNA 염색질 단편 및 관련 TFBS DNA 서열의 직접적인 분리, 분석 또는 매핑에 대한 문헌에 기술된 ChIP-Seq 방법은 없다. 대신 현장의 작업자들은 DNA 단편 분석을 기반으로 간접적인 방법을 개발하였다.
- [0055] 단편체학은 EDTA 혈장에서 추출한 cfDNA의 심층 시퀀싱을 생물정보학 방법으로 분석하여 원래 샘플에서 전사 인자-DNA 결합을 나타내는 DNA 단편화 패턴을 식별하는 간접 방법 중 하나이다(Snyder et al., 2016, Ulz et al., 2019). 단편체학의 첫 번째 단계는 조사된 샘플의 모든 DNA를 추출하는 것이며, 이것은 필연적으로 존재하는 모든 전사 인자-DNA 복합체의 파괴를 포함하기 때문에 간접적인 방법이다. 이것은 샘플의 전사 인자 또는 기타 염색질 단백질과 DNA 단편 또는 서열을 직접 연결하는 모든 정보를 파괴한다. TFBS의 점유는 추출된 DNA 라이브러리에서 적절한 서열의 짧은 cfDNA 단편(35-80bp)의 존재로부터 추론된다. 그러나, DNA 단편(DNA 추출 전)에 부착된 염색질 단백질의 정체는 알 수 없으며, 특히 많은 단백질이 도 1 및 도 2에 표시된 것처럼 관심 부위에 근접하여 결합될 수 있기 때문이다. 따라서, 단편체학 방법의 하나의 단점은 임의의 특정 TFBS에서 임의의 특정 전사 인자의 결합이 추론될 수 있지만 확립될 수는 없다는 것이다.
- [0056] 다른 최근의 간접적인 방법은 세포 유리 뉴클레오솜 포지셔닝을 직접 매핑하기 위하여 EDTA 혈장에서 뉴클레오솜 ChIP-Seq를 수행는 것 및 전사 인자 포지셔닝을 간접적으로 추론하기 위하여 뉴클레오솜 포지셔닝 데이터를 사용하는 것과 관련된다(Sadeh et al., 2021).
- [0057] 전사 인자-DNA 복합체에 대한 직접적인 ChIP 방법이 보고되지 않은 이유는 지금까지 해결되지 않은 상당한 기술적 어려움이나 장애물이 있기 때문이다. 이러한 기술적 어려움은 (i) 일부 전사 인자-DNA 복합체가 혈장에서 안정적으로 결합되는 반면, 생체 내에서 동적으로 결합되는 다른 전사 인자-DNA 복합체는 혈액 또는 기타 체액에서 분리된다는 인식, (ii) 대부분의 일반적인 종류의 전사 인자-DNA 복합체는 EDTA 혈장에서 해리되지만 이는 방지될 수 있다는 인식, (iii) 세포 또는 조직 물질의 핵 추출물은 μg 또는 mg 양으로 얻을 수 있는 비교적 순수한 염색질 준비물이지만, 대조적으로 혈액, 혈청 또는 혈장에는 높은 수준의 다른 순환 단백질로 "오염된" 매우 낮은 수준의 매우 불순한 염색질이 포함되어 있다는 인식, (iv) 적어도 수백 개의 전사 인자가 있으며 특정 전사 인자-DNA 복합체는 혈장에 존재하는 수천 가지의 서로 다른 전사 인자-DNA 복합체의 하나일 뿐이므로, cfDNA의 전체 전사 인자-DNA 부분은 전체 cfDNA(대부분 뉴클레오솜 단편을 포함)의 작은 부분이고 암 세포에서 유래한 cfDNA의 비율은 전체 cfDNA의 작은 부분이라는 인식을 포함한다. 따라서, 특정 전사 인자를 포함하는 전사 인자-DNA 복합체는 높은 수준의 다른 단백질 및 기타 물질로 오염된 작은 부분의 작은 부분 중 작은 부분이다. 이것의 한 가지 결과는 혈장 전사 인자-DNA ChIP-Seq 방법에서 생성된 특정 신호가 작아서(배경 신호보다 작음) 효과적인 데이터 분석에 문제가 있다는 것이다.
- [0058] 우리는 이제 우수한 분석 민감도와 우수한 조직 특이성을 가진 전사 인자-DNA 복합체를 포함하는 순환 세포 유

리 염색질 단편의 검출 방법을 보고한다. 상기 방법은 또한 대부분의 또는 모든 전사 인자를 포함하도록 적용 가능한 전사 인자의 사용을 넓힌다.

- [0059] 우리는 또한 질환의 검출을 위해 상기 전사 인자와 관련된 DNA 단편의 서열과 조합된 전사 인자를 함유하는 염색질 단편으로 구성된 조합 바이오마커의 사용을 보고한다. 이 조합 바이오마커는 또한 매우 높은 조직 특이성을 가지며 암의 바이오마커로 사용될 수 있다.
- [0060] 분석 민감도는 낮은 수준에서 발생하는 전사 인자를 포함하는 순환 세포 유리 염색질 단편, 면역분석에 의한 검출 한계 근처 또는 그 이하에서 중요하다. 면역분석법의 분석적 검출 한계는 분석법의 설계와 사용된 결합제(보통 항체)의 친화력에 따라 다르지만 피코몰 수준 범위에 있을 수 있다. 그러나 DNA의 중합효소 연쇄반응(PCR) 검출의 분석 민감도는 훨씬 낮다. 디지털 PCR은 샘플당 몇 개의 개별 분자만큼 낮은 수준을 검출할 수 있다. 따라서, DNA (또는 뉴클레오솜 에피토프)에 결합하도록 지시된 항체를 사용하는 대신 전사 인자와 관련된 DNA를 검출하기 위해 PCR 증폭 방법을 사용하면 매우 낮은 수준에서도 전사 인자를 포함하는 순환 염색질 단편을 검출할 수 있다.
- [0061] 검출을 위해 PCR을 사용하여 민감도를 높일 뿐만 아니라 관련 DNA 함량을 기반으로 전사 인자를 포함하는 염색질 단편을 분석하면 관련 뉴클레오솜을 포함하지 않는 대규모 전사 인자 풀을 처리하여 높은 분석 민감도를 얻을 수 있다.
- [0062] 따라서, 본 발명의 제 1측면에 따르면, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0063] (i) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0064] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출 또는 측정하는 단계; 및
- [0065] (iii) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.
- [0066] 일 구체예에 있어서, 단계 (i)에서 사용되는 전사 인자의 항체 또는 다른 결합제는 고상에 고정되어 전사 인자를 샘플로부터 분리한다.
- [0067] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 단계 (i)에서 결합된 전사 인자를 분리, 즉, 관련된 DNA 단편을 감지하기 전에 나머지 체액 샘플로부터 분리하는 것을 포함한다. 예를 들어, 결합제에 결합되지 않은 나머지 샘플을 제거하기 위해 단계 (i)에서 (고상) 결합제에 결합된 샘플 내의 전사 인자에 세척 완충제를 적용할 수 있다.
- [0068] 일 구체예에 있어서, 단계 (ii)에서 DNA 단편을 검출, 측정 또는 시퀀싱하기 위해 전사 인자 관련 DNA 단편이 전사 인자로부터 추출된다.
- [0069] 일 구체예에 있어서, DNA는 항-DNA 항체 또는 DNA 킬레이트제 또는 삽입제, 예를 들어 에티디움 브로마이드 및 SYBR 그린 및 SYBR 골드와 같은 시아닌 염료와 같은 일반적인 DNA 결합제를 사용하여 검출 또는 측정된다.
- [0070] 일 구체예에 있어서, 단계 (ii)는 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 시퀀싱하는 것을 포함한다. 시퀀싱 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다.
- [0071] 일 구체예에 따르면, 단계 (ii)에서 DNA 단편의 검출 또는 측정은 DNA 단편의 증폭, 예를 들어 정량적 PCR 방법을 사용하여 DNA 단편의 존재 및/또는 양을 결정함으로써 수행된다. 따라서, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0072] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0073] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0074] (iii) DNA를 증폭하는 단계; 및
- [0075] (iv) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 존재 또는 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.
- [0076] 일 구체예에 있어서, 증폭된 DNA는 DNA 혼성화 방법을 사용하여 검출 또는 측정된다.
- [0077] 추가적인 구체예에 있어서, 전사 인자 결합된 DNA 단편의 증폭은 DNA 단편에 대한 어댑터 올리고뉴클레오타이드의

연결 후에 수행된다. 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 PCR에 의한 DNA 단편의 증폭을 용이하게 하는 프라이머 서열을 포함할 수 있거나 프라이머 서열이 후속적으로 추가될 수 있다. 어댑터 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 차세대 시퀀싱을 위한 라이브러리를 준비하는데 일상적으로 사용된다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:

(i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

(ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;

(iii) 단리된 DNA에 어댑터 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 단계;

(iv) DNA를 증폭하는 단계; 및

(v) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

일 구체예에 있어서, 전사 인자 결합된 DNA 단편의 증폭은 특정 서열(들)을 포함하는 DNA 단편의 증폭을 위해 설계된 특정 서열(들)의 PCR 프라이머 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행된다. 이 구체예는 TFBS 서열(들) 및/또는 플랭킹 서열(들)을 포함하는 선택된 DNA 단편의 증폭을 용이하게 한다. 이 구체예는 또한 빠르고, 저렴하고, 높은 처리량을 위해 쉽게 자동화되고, 임의의 PCR 실험실에서 수행될 수 있고, 추가로 전사 인자 발현의 결합 조직 특이성을 TFBS 서열 및/또는 염색질 단편에서 관련된 DNA의 플랭킹 서열의 분석을 통한 계놈에서의 결합 위치 확인의 특이성과 조합하여 건강 또는 질환 cfDNA 조직 기원 특이성을 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:

(i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

(ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;

(iii) 서열 특이적 PCR 프라이머 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 DNA를 증폭하는 단계; 및

(iv) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

일 구체예에 있어서, 상기 방법은 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 추출하는 것을 포함한다. 추가 구체예에서, 상기 방법은 추출된 DNA 단편의 증폭을 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:

(i) 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

(ii) 결합된 전사 인자를 분리하는 단계;

(iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 추출하는 단계;

(iv) 추출된 DNA를 증폭하는 단계;

(v) 증폭된 추출 DNA를 검출하는 단계; 및

(vi) 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA의 존재 또는 양을 사용하는 단계.

바람직한 구체예에서, 전사 인자 관련 DNA의 증폭은 PCR에 의해 수행된다. 제한 없이 정량적 PCR, 실시간 PCR, 역전사효소 PCR, 네스티드 PCR, 디지털 PCR, 다중 PCR, 임의 프라이밍 PCR, 저온 PCR(더 낮은 변성 온도에서 동시 증폭-PCR)을 포함하는 공지된 다양한 PCR 방법이 있다. 일부 구체예에서, 증폭 방법은 DNA 정량을 포함한다.

본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:

(i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

(ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출 또는 측정하는 단계; 및

- [0099] (iii) 대상체에서 질환 존재의 지표로서 DNA의 존재 또는 양을 사용하는 단계.
- [0100] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0101] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0102] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0103] (iii) DNA를 DNA 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0104] (iv) DNA 결합제를 검출하는 단계; 및
- [0105] (v) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성의 지표로서 DNA 결합제의 존재 또는 양을 사용하는 단계.
- [0106] 항체를 포함하는 임의의 DNA 결합제가 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있다. DNA 결합제는 직접적으로 또는 간접적으로 (예를 들어, 비오틴/아비딘 또는 글루타티온과 같은 링커 시스템을 통해) 형광, 효소 또는 방사성 모이어티와 같은 검출 가능한 모이어티로 표지될 수 있다.
- [0107] 본 발명의 또 다른 측면에서, 전사 인자 및 관련 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출함으로써 특정 전사 인자에 의해 점유된 게놈 TFBS 위치 (따라서 또한 어떤 유전자가 조절되어짐)를 결정하는 방법이 제공된다. 여기서 전사 인자와 관련된 DNA 단편은 전사 인자가 결합된 게놈 위치를 결정하기 위해 시퀀싱된다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 전사 인자가 결합하는 게놈 위치를 결정하는 방법이 제공된다:
- [0108] (i) 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0109] (ii) 결합된 전사 인자를 분리하는 단계;
- [0110] (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 추출하는 단계;
- [0111] (iv) 추출된 DNA를 증폭하는 단계;
- [0112] (v) 증폭된 추출 DNA를 시퀀싱하는 단계; 및
- [0113] (vi) TFBS의 게놈 위치를 결정하기 위하여 추출된 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0114] 본 발명은 일반적으로 크기 범위가 35-80bp인 전사 인자에 의해 결합된 작은 DNA 단편을 분석하는데서 특별한 용도를 찾는다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 시퀀싱된 추출된 DNA는 약 100bp 미만, 예를 들어 약 80bp 미만, 특히 약 60bp 미만을 포함하는 DNA 단편과 같은 작은 DNA 단편에 관한 것이다. 이러한 DNA 단편 크기는 어댑터 연결이 없는/이전의 DNA 단편과 관련된다는 점에 유의하여야 한다. 일 구체예에 있어서, 시퀀싱된 추출된 DNA는 100bp 미만, 예를 들어 35-80bp(어댑터 연결 없이/전) 크기 범위의 DNA 단편을 포함한다. 일 구체예에 있어서, 시퀀싱된 추출된 DNA는 예를 들어 도 10 및 11에 나타낸 바와 같이 비교되는 다수의 DNA 크기 범위를 포함한다.
- [0115] 바람직한 구체예에서, 샘플은 체액 샘플이다. 추가 구체예에서, 체액 샘플은 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플이다.
- [0116] 바람직한 구체예에서, 사용되는 결합제는 특정 전사 인자에 결합하도록 지시된 항체이다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 전사 인자에 결합하는 결합제는 항체 또는 이의 단편 (즉, 결합 단편)이다.
- [0117] 바람직한 구체예에서, 항체는 항체 결합된 전사 인자-DNA 복합체 또는 염색질 단편의 분리를 용이하게 하기 위해 고상에 고정된다.
- [0118] 순환 염색질 단편에서 생체내 전사 인자와 일치하는 것으로 알려진 관련된 DNA 단편 서열과 함께 양 전사 인자의 존재는 전사 인자 및 DNA 단편 모두의 동일성을 추가로 확인하는 것이다. 관련 DNA 단편의 서열과 함께 전사 인자의 이러한 조합은 다양한 질환 상태의 진단 또는 평가를 위한 강력한 바이오마커 조합이다. 또한, 건강한 대상체에 존재하는 많은 전사 인자는 상이한 조직에서 상이한 세트의 TFBS에 결합되어 존재하는 관련 DNA를 통해 전사 인자에 의해 결합된 TFBS 위치를 식별하고 염색질 단편의 기원 조직을 식별한다. 또한 질환 상태에도 동일하게 적용된다. 따라서, 질환 상태의 존재는 (전사 인자 자체가 많은 또는 모든 조직에서 발현되더라도) 일반적으로 발현되는 전사 인자에 결합된 TFBS 세트로부터 식별될 수 있다. 예를 들어, 일반적으로 발현되는 전사 인자 CTCF는 불멸화 암 세포에서 1000개 이상의 특정 게놈 위치에 결합하지만 다른 비암세포에서는 결합하지 않는다(Wang et al., 2012, Liu et al., 2017). 따라서, 관련된 DNA 단편이 시퀀싱되고 CTCF에 대한 암 특이적 TFBS 위치 중 하나와 일치하는 서열인 것으로 관찰되는 순환하는 CTCF-DNA 복합체의 존재를 확인하는 것은 샘플

이 유래된 대상체에서 암 질환을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 매우 바람직한 구체예에서, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서, 질환 상태 또는 특정 조직과 일치하는 게놈에서 전사 인자 점유 TFBS 위치를 확인하는 조합 바이오마커를 함께 형성하는 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출함으로써 대상체에서 질환 상태를 검출하는 방법이 제공된다:

[0119] (i) 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

[0120] (ii) 결합된 전사 인자를 분리하는 단계;

[0121] (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 추출하는 단계;

[0122] (iv) 추출된 DNA를 증폭하는 단계;

[0123] (v) 증폭된 추출 DNA를 시퀀싱하는 단계; 및

[0124] (vi) 대상체의 질환 상태 또는 염색질 단편의 기원 조직의 지표로서 결합된 DNA 단편의 서열을 사용하는 단계.

[0125] 대상체의 질환 상태의 결정은 예를 들어 질환의 검출, 진단, 치료 선택, 모니터링 또는 예후를 포함할 수 있다.

[0126] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 대상에서 질환의 존재를 나타내기 위한 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 관련 DNA의 서열을 사용하는 것을 포함한다. "바이오마커"라는 용어는 프로세스, 이벤트 또는 조건의 독특한 생물학적 또는 생물학적으로 파생된 지표를 의미합니다. 바이오마커는 진단 방법, 예를 들어 임상 스크리닝, 예후 평가 및 치료 결과 모니터링, 특정 치료에 반응할 가능성이 가장 높은 대상체 식별, 약물 스크리닝 및 개발에 사용될 수 있다. 이러한 바이오마커는 예를 들어 전사 인자와 관련된 DNA의 존재(예를 들어, 서열), 수준, 농도 또는 양을 포함한다. 본원에서 "조합 바이오마커"에 대한 언급은 하나 이상의 생물학적 또는 생물학적으로 유래된 지표, 예를 들어 전사 인자 및 관련 DNA, 특히 특정 DNA의 서열 또는 서열들과 관련된 전사인자의 수준, 농도 또는 양과 관련되는 바이오마커를 지칭한다.

[0127] 대부분의 전사 인자는 완벽한 (단일 세포 유형) 발현 특이성을 갖지 않기 때문에 조직 특이성이 중요하다. 전사 인자를 포함하는 순환 염색질 단편에 대한 면역 분석의 조직 특이성은 사용된 항체의 분석 특이성과 사용된 전사 인자 또는 사용된 전사 인자 패널의 조직 특이성에 의해 제한된다. 따라서, 조직 특이성은 특정 전사 인자 모이어티를 이것이 결합된 cfDNA 단편의 서열과 조합함으로써 개선될 수 있다.

[0128] 그 이유는 전사 인자가 서로 다른 세포의 게놈에서 서로 다른 DNA 서열에 결합하기 때문이다. 유전자 발현은 반응 요소 또는 결합 모티프라고도 하는 짧은 TFBS DNA 서열에 대한 전사 인자의 특이적 결합에 의해 조절된다. TFBS는 반드시 그런 것은 아니지만 일반적으로 조절 유전자의 전사 시작 부위 근처의 유전자 프로모터 영역에 위치한다. 전사 인자는 DNA 결합 영역(DBD)을 통해 서열 특이적 방식으로 TFBS에 결합한다. 일반적으로 TFBS 서열은 표적 유전자의 프로모터 내에서 길이가 5-15bp이고 전사 인자 단백질은 일반적으로 다양한 결합 친화도로 유사한 DNA 서열 세트에 결합할 수 있다. 전사 인자를 포함하는 순환 염색질 단편과 관련된 DNA 단편의 길이는 단편이 추가 전사 인자, 보조 인자, 뉴클레오솜 또는 다른 염색질 단백질에 의해 결합된 추가 DNA 보호 서열을 포함하는지 여부에 따라 달라질 것이다. 많은 그러한 염색질 단편은 35-80bp 범위에서 발생하는 것으로 보고된다(Snyder et al., 2016). 또한, 이것은 암 환자의 세포에서 추출한 염색질의 뉴클레아제 소화에 의해 생성된 염색질 단편의 크기 범위와 일치하며 이 작은 약 35-80bp 단편 범위는 뉴클레오솜 결합 단편보다 전체 염색질 단편의 더 큰 비율을 포함한다는 점에 주목한다(Corces et al., 2018). 우리는 이러한 관련 DNA 단편이 일반적인 DNA 반응 요소보다 길기 때문에 측면 DNA 서열을 포함한다고 결론을 내린다. 그러나, 뉴클레오솜과 관련된 DNA 단편 크기는 일반적으로 100bp DNA를 초과한다. 따라서, 우리는 35-80bp DNA 단편 범위가 온전한 뉴클레오솜 DNA 단편을 포함하지 않는다고 결론을 내린다.

[0129] 전사 인자의 반응 요소 또는 TFBS 서열은 게놈 내의 여러 위치에서 반복적으로 발생할 수 있으며 일부 전사 인자의 경우 수천 개의 위치에서 발생할 수 있다. 따라서, 동일한 전사 인자가 세포 염색질 내의 매우 많은 위치에 결합될 가능성이 있다. 이것은 단일 세포의 사멸이 원칙적으로 동일한 전사 인자를 포함하는 많은 수의 순환 염색질 단편을 생성할 수 있음을 의미한다.

[0130] 더구나, 전사 인자는 단독으로 작용하지 않고 다른 전사 인자 또는 보조 인자 또는 특정 유전자의 조절에 필요한 다른 모이어티와 함께 작용하는 경향이 있다. 따라서, 전사 인자는 각각이 상이한 전사 인자와 협력하여 다수의 상이한 유전자의 프로모터에 있는 반응 요소에 결합할 수 있다. 따라서, 동일한 TFBS 서열 또는 동일한 전사 인자에 대한 반응 요소를 둘러싸는 DNA 플랭킹 서열은 상이한 전사 인자 조합에 대한 결합 모티프를 포함하

기 때문에 상이한 유전자의 프로모터에서 다양하다. 이것은 모든 또는 대부분의 전사 인자에 적용된다.

[0131] 또한, 반응 요소 자체의 결합 서열은 전사 인자가 다양한 상이한 모티프 서열에 결합할 수 있도록 축퇴될 수 있다. 예를 들어, 전사 인자 TTF-1은 건강한 폐 및 건강한 갑상선 조직에서 조직 특이적 방식으로 발현된다. 폐에서는 2개의 단백질 TTF-1 인자가 폐 특이적 계면활성제 단백질 B(SPB) 유전자의 프로모터 영역에 결합한다. SPB의 프로모터에서 TTF-1의 DNA 결합 서열 또는 결합 모티프는 GCNCTNNAG (서열번호 1)(여기서 A, C, G 및 T는 각각 DNA 염기 아데닌, 시토신, 구아닌 및 티민을 나타내고, N은 이러한 염기 중 하나를 나타냄)이다. TTF-1 결합을 둘러싸는 더 넓은 컨센서스 프로모터 DNA 서열은 (-118)GATCAAGCAGCTGGAGGGCTCTTCAGAGCAAAGACAAACACTGAGGTCGCTGCCA(-64) (서열번호 2)이고, 여기서 (-64)는 SPB 전사 시작 부위로부터의 거리(bp)를 나타낸다. 폐 조직의 SPB 프로모터에서, TTF-1은 도 1에 도시된 바와 같이 전사 인자 간세포 핵 인자 3(HNF3)과 협력하여 결합한다(Matys et al., 2006 및 Bohinski et al., 1994).

[0132] 갑상선에서 TTF-1은 티로글로불린, 갑상선 자극 호르몬 수용체 및 티로페록시다제를 비롯한 여러 유전자를 조절한다. 티로글로불린 유전자의 프로모터 영역에서 TTF-1에 대한 컨센서스 결합 서열은 폐와 다르며 TGGCCACACGAGTGCCCTCA (서열번호 3)로 보고된다. 티로글로불린 유전자의 프로모터에서 TTF-1은 TTF-2, PAX8 및 Runx2 전사 인자와 협력적으로 결합하고 5' 및 3' 말단에 50bp 플랭킹 서열을 포함하는 더 넓은 서열은 CCCACCCGTTCTGTTCACAGTTTAGACAAGATCCTCATGTCCACTGGCCACACGAGTGCCCTCAGGAGGTAGACACAGTGGAGGGAGCTCCTTTGACCAGCAGAGAAAAC (서열번호 4)이다. 유사하게, TTF-1은 또한 각각의 경우에 상이한 협력 전사 인자와 함께 갑상선 자극 호르몬 수용체 및 티로페록시다제 유전자의 프로모터 영역에 결합한다. 따라서, 갑상선이나 폐 조직에서 조절되는 유전자의 프로모터 서열에서 TTF-1 결합 부위를 둘러싼 DNA 서열이 다를 뿐만 아니라, TTF-1과 관련된 보조 인자, 따라서 주변 DNA 서열도 도 1에 표시된 것과 같이 동일한 조직의 다른 유전자에 결합에 대해 다르다(Matys et al., 2006 및 Maenhaut et al., 2015). 이것은 염색질 단편과 관련된 DNA 서열에 대한 지식과 함께 TTF-1을 포함하는 순환 염색질 단편의 조합이 염색질 단편의 기원을 폐 또는 갑상선으로 식별하기에 충분하다는 것을 보여준다.

[0133] 대략 1000-3000개의 인간 전사 인자가 있다고 생각되며, 각각은 게놈의 특정 위치에 결합하여 방대한 배열의 세포 과정을 구동하는 동적 전사 변화를 일으킨다. 우리는 하나의 예로서 TTF-1과 관련하여 본 발명의 원리를 설명하였다. 그러나, 임의의 전사 인자가 원칙적으로 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 심지어 Hox 단백질 전사 인자와 같이 많은 세포 유형에서 편재적으로 발현되고 분리된 DNA 서열에 결합하는 전사 인자는 보조 인자와 협력하여 다른 서열에 고유하게 결합하여 다른 조직에서 다른 유전자를 조절한다(Merabet 및 Mann, 2016, Mann et al., 2009). 이것은 그들의 TFBS 서열(선택적으로 플랭킹 서열을 포함함)과 함께 모든 또는 대부분의 전사 인자가 본 발명의 방법을 위한 조합 바이오마커로서 사용될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 에스트로겐 수용체- α (ER α) 전사 인자는 서로 다른 게놈 위치에서 적어도 60개의 다른 전사 인자의 조합과 협력하여 인간 게놈의 1,000개 이상의 결합 부위 또는 에스트로겐 반응 요소(ERE)에 결합한다(Lin et al., 2007). 유사하게, 안드로젠 수용체(AR)는 수천 개의 서로 다른 서열 유전자좌에서 다른 협력 전사 인자와 협력하여 수천 개의 유전자와 관련된 안드로젠 반응 요소(ARE)에 결합한다. 따라서, 본 발명의 방법은 이들 전사 인자가 다수의 조직에서 발현되더라도 연관된 DNA의 서열을 통해 ER α 또는 AR을 함유하는 염색질 단편의 기원 조직을 확인할 수 있다.

[0134] 더욱이 전사 인자의 DNA 유전자좌에 대한 게놈 차원의 결합은 암에서 재프로그래밍되며 발현된 전사 인자와 암 세포에서 이들이 결합하는 TFBS는 동일한 조직의 건강한 세포에 결합된 것과는 다르므로, 관련된 DNA 단편의 서열 데이터와 조합된 순환의 전사 인자를 함유하는 염색질 단편의 확인은 암을 가진 대상체의 식별 뿐만 아니라 예를 들어 전립선암 또는 폐암 등과 같은 암 유형의 식별을 모두 가능하게 한다(Pomerantz et al., 2015). 이것은 염색질이 종양 형성 동안 리모델링되고 이 리모델링은 암세포에서 리모델링된 전사 인자 결합 패턴을 통해 종양 관련 단백질의 상향 조절을 수반하기 때문에 가능하다. 이 때문에 많은 전사 인자의 발현이 암세포에서 상향 조절된다. 이것은 광범위한 현상이지만 몇 가지 비제한적인 예로 예시될 수 있다. 예를 들어, 잘 알려진 암 관련 전사 인자 c-Myc 및 p53은 대부분의 암에서 상향 조절된다. AR에 의해 결합된 결합 부위 서열은 전립선암에서 크게 변경된다(Pomerantz et al., 2015). 유사하게, 전이 및 치료에 대한 내성과 관련된 암 세포의 상피에서 중간엽 전이(EMT)는 Fos I I, Fosb, Fos 및 Junb를 포함하는 전사 인자의 Jun/Fos 계열의 상향 조절을 포함한다. Runx I, Tead 및 Nfkb 전사 인자뿐만 아니라 ETS(E26 형질전환-특이적) 계열의 전사 인자도 종양 세포의 열린 염색질에서 매우 풍부한 것으로 밝혀졌다. 또한, p63, Klf, Grh I 및 Cepba는 종양 세포에서 상향 조절되는 것으로 보고되었으며, 이들의 결합 부위는 열린 염색질 영역에서 풍부하다. Klf5 및 p63 전사 인자는 암종과 관련이 있으며 폐 및 두경부 암종의 동인으로 작용한다. EMT와 관련된 추가 전사 인자로는 bHLH, Runx, Nfat, Tbx1, Tcf711 및 Smad2가 있다(Latil et al., 2017).

- [0135] 예를 들어, 도 2에 나타난 바와 같이, 진핵생물 유전자의 전사 조절은 유전자의 전사 개시 부위(TSS) 근거리 및 전사 복합체의 계층에서 TSS의 원거리 양쪽에 위치한 다양한 조절 DNA 서열에 결합된 다양한 조절 단백질과 관련된다. DNA의 원거리 조절 서열은 TSS에서 수백에서 백만 개 이상의 염기에 위치할 수도 있고 더 멀리 떨어져 있을 수도 있다. 예를 들어, 도 2에 나타난 바와 같이, 전사 복합체는 일반적으로 DNA 루프와 관련되며, 이는 DNA 벤딩 단백질과 관련될 수 있는데, 여기에서 이에 결합된 조절 단백질뿐만 아니라 더 원거리 조절 서열은 TSS에 더 가까운 조절 서열에 결합된 단백질과 접촉하게 된다. TATA 박스는 전사에 필요한 일반 전사 인자에 결합하는 반복적인 티민/아데닌 뉴클레오타이드 서열을 포함하기 때문에 그렇게 명명되었다. 추가 유전자 특이적 전사 인자는 특정 유전자의 발현에도 필요하다(예를 들어, 도 1에 표시된 것처럼 계면활성제 단백질 B, 티로글로불린, 티로페록시다제 및 TSH 수용체 유전자를 발현하는데 필요한 전사 인자). 또한, 예를 들어 제한 없이 보조 인자, 매개체, 활성화제, 보조활성화제, 억제인자, 보조억제인자, 염색질 리모델링 단백질, DNA 벤딩 단백질, 절연체, RNA 중합효소 모이어티, 신장인자, 염색질 리모델링 인자, STAT 모이어티 또는 사이토카인 인자 또는 STAT 모이어티에 결합된 사이토카인 관련 인자, 상류 결합 인자(UBF) 또는 그러한 유전자 조절 또는 전사 복합체와 관련된 임의의 다른 모이어티를 포함하는 다수의 다른 단백질이 필요하다. 이러한 복합체는 또한 뉴클레오솜 보호 DNA의 길이를 포함할 수 있다. 전사 복합체는 안정적이어서 고용량 전사를 용이하게 할 수 있다. 따라서, 건강한 및/또는 질환 기원의 순환 염색질 단편은 뉴클레아제 활성에 저항할 수 있는 다중 단백질을 포함하는 큰 단백질/DNA 복합체를 포함할 수 있다. 도 2에서 설명된 바와 같이, 근거리 및 원거리 조절 서열과 관련되는 일부 거대한 전사 복합체를 슈퍼 인헨서라고 한다. 슈퍼 인헨서는 높은 수준의 전사 인자 결합을 가진 큰 클러스터이며 세포 정체성 제어와 관련된 유전자의 발현을 주도하는데 핵심이다. 슈퍼 인헨서는 또한 암에서 발암 유전자의 전사를 자극하는데 핵심적이다. 암세포는 슈퍼 인헨서를 획득하고 암 표현형은 슈퍼 인헨서에 의해 구동되는 비정상적인 전사에 의존한다. 따라서, 본원에 기술된 방법에 의해 슈퍼 인헨서의 근거리 및 원거리 조절 서열에 상응하는 슈퍼 인헨서 복합체 및/또는 cfDNA 단편 서열 조합의 전부 또는 일부를 포함하는 염색질 단편의 존재의 검출은 암 세포 기원을 포함하는 염색질 단편의 세포 기원을 식별하는 방법을 제공한다. 우리는 또한 그 특성상 슈퍼 인헨서 복합체가 일시적으로 결합된 전사 인자보다 안정적으로 결합된 전사 인자를 포함할 가능성이 있다고 추론한다.
- [0136] 전사 복합체로부터 유도된 이러한 염색질 단편의 DNA 루프는 원칙적으로 온전하거나 하나 이상의 위치에서 분해되어 (i) 근거리 및 원거리 조절 서열에 상응하는 2개의 순환 염색질 단편; 또는 (ii) 두 개의 DNA 단편을 포함하는 큰 염색질 단편으로 될 수 있다. 따라서 cfDNA는 유전자의 근거리 및 원거리 조절 서열 모두에 해당하는 작은 DNA 단편을 포함할 수 있다.
- [0137] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0138] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0139] (ii) 전사 인자와 관련된 하나 이상의 DNA 단편의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0140] (iii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위한 조합된 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및 관련 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0141] DNA에 결합하고 그의 cfDNA 결합 패턴이 건강한 대상체와 질환 대상체에서 상이한 임의의 비-히스톤 염색질 단백질은 전사 인자 뿐만 아니라 염색질 변형 단백질, 유전 및 후생유전학적 읽기, 쓰기 및 삭제 단백질, RNA 전사에 관여하는 단백질(예를 들어, RNA 중합효소 분자) 및 골격 또는 구조적 염색질 단백질(예를 들어, DNA 벤딩 단백질)을 포함하는 다른 비-히스톤 염색질 단백질을 포함하여 본 발명의 방법에 사용하기에 적합할 것임을 이해할 것이다.
- [0142] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 개체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0143] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 비히스톤 염색질 단백질에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0144] (ii) 비히스톤 염색질 단백질과 관련된 하나 이상의 DNA 단편의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0145] (iii) 비-히스톤 염색질 단백질의 존재 및 관련 DNA의 서열을 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위한 조합된 바이오마커로 사용하는 단계.

- [0146] 바람직한 구체예에서 비-히스톤 염색질 단백질은 RNA 중합효소, 특히 RNA 중합효소 II이다. RNA 중합효소 II는 RNA 사본을 생성하기 위해 유전자의 DNA 서열을 전사하는 역할을 하는 DNA 결합 효소입니다. RNA 사본은 리보솜에 의해 해당 단백질 생산을 유도하는 메신저 RNA(mRNA) 분자이거나, 또는 단백질로 번역되지 않는 비암호화 RNA(ncRNA) 분자일 수 있다. 따라서, 순환하는 염색질 단편에 RNA 중합효소 II가 존재한다는 것은 단편이 유래한 세포에서 활성화된 유전자에서 파생된다는 것을 나타낸다. 따라서, RNA 중합효소 II와 관련된 염색질 단편에서 파생된 DNA 단편 서열 라이브러리는 샘플에 존재하는 활성 동적 유전자 라이브러리를 제공한다. 건강한 인간의 경우 이 라이브러리는 대부분 조혈 조직에 존재하는 활성 유전자에 해당한다. 질환에 걸린 인간에서 라이브러리는 질환에 의해 영향을 받는 조직(들)에서 활성화된 유전자를 추가로 포함한다. 이것은 질환의 영향을 받는 모든 조직일 수 있다. 예를 들어, 건강한 인간의 라이브러리에는 존재하지 않는 간 또는 신장 세포에서 활성화된 유전자는 간 또는 신장 질환 환자로부터 채취한 샘플로부터 생성된 RNA 중합효소 II 라이브러리에 나타날 수 있다. 유사하게, 건강한 인간의 라이브러리에는 존재하지 않는 암에서 상향조절된 유전자는 암 질환 환자로부터 채취한 샘플로부터 생성된 RNA 중합효소 II 라이브러리에 나타날 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, RNA 중합효소 II의 사용은 샘플에 나타난 활성 동적 유전자의 식별을 가능하게 한다. 이를 통해 암 질환을 감지하고 암의 영향을 받는 조직을 확인할 수 있다.
- [0147] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 개체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다.
- [0148] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 RNA 중합효소에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0149] (ii) RNA 중합효소와 관련된 하나 이상의 DNA 단편의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0150] (iii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위한 바이오마커로서 RNA 중합효소 관련 DNA 단편의 서열을 사용하는 단계.
- [0151] 일 구체예에 있어서, 질환은 암, 자가면역 질환 또는 염증성 질환으로부터 선택된다. 추가적인 구체예에 있어서, 질환은 암이다. 추가적인 구체예에 있어서, 자가면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 및 류마티스 관절염으로부터 선택된다. 추가적인 구체예에 있어서, 염증성 질환은 크론병, 대장염, 자궁내막증 및 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)으로부터 선택된다.
- [0152] 바람직한 구체예에서, 질환은 암이다. 추가적인 구체예에 있어서, 암은 유방암, 방광암, 결장직장암, 피부암(예를 들어, 흑색종), 난소암, 전립선암, 폐암, 췌장암, 장암, 간암, 자궁내막암, 림프종, 구강암, 두경부암, 백혈병 및 골육종으로부터 선택된다.
- [0153] 추가적인 구체예에 있어서, 질환은 태아 질환 또는 병태이다. 예를 들어 (XY) 남성 태아에서 유래한 Y-염색체 DNA 서열을 포함하는 태아 기원의 염색질 단편이 임신한 동물 및 인간(XX) 모체의 혈액에서 순환한다는 것은 당 업계에 잘 알려져 있다. 임신한 대상체에서 순환하는 cfDNA는 뉴클레옴 보호 DNA 단편(약 160bp)에서 예상되는 길이의 cfDNA 단편과 50bp 이상 범위의 더 짧은 cfDNA 단편을 모두 포함하는 것으로 보고되었다. 더욱이, 길이가 140bp 미만인 모체 cfDNA 단편이 태아 기원의 cfDNA에 대해 농축되는 것으로 보고되었다(Hu et al., 2019). 따라서, 본 발명의 방법은 샘플을 채취한 대상체의 질환 상태뿐만 아니라 산전 검사 또는 산모 혈액 샘플의 태아 상태 검사에도 적용할 수 있다.
- [0154] 따라서, 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 태아에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0155] (i) 임신한 인간 또는 동물 대상체로부터 체액 샘플을 채취하는 단계;
- [0156] (ii) 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0157] (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0158] (iv) 태아의 질환 존재의 지표로 DNA의 존재, 서열 또는 양을 사용하는 단계.
- [0159] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환 영향을 받는 조직을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0160] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0161] (ii) 전사 인자 또는 염색질 단편과 관련된 DNA의 DNA 염기 서열을 결정하는 단계; 및

- [0162] (iii) 대상체에서 질환에 의해 영향을 받는 조직의 지표로서 조합된 전사 인자/DNA 서열 바이오마커를 사용하는 단계.
- [0163] 바람직한 구체예에서, 질환은 암이다. 또 다른 구체예에서, 질환에 의해 영향을 받는 조직은 암의 원 기관과 같은 원 기관이다.
- [0164] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0165] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0166] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0167] (iii) 분리된 DNA를 PCR 방법으로 증폭하는 단계;
- [0168] (iv) 증폭된 DNA의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0169] (v) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질을 결정하기 위한 조합된 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및 관련 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0170] 또한, 특정 전사 인자에 의해 결합된 다양한 유전자좌에 상응하는 다수의 서열이 수득될 수 있고, 다양한 서열에 관한 데이터가 통합되어 질환 및/또는 질환에 영향을 받는 조직의 특성을 결정할 수 있다는 점은 당업자에 명백할 것이다.
- [0171] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0172] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0173] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0174] (iii) 분리된 DNA를 PCR 방법, 예를 들어 서열 특이적 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;
- [0175] (iv) 증폭된 DNA를 검출하는 단계; 및
- [0176] (v) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질의 지표로서 증폭된 DNA의 존재, 양 및/또는 서열을 사용하는 단계.
- [0177] 하나의 구체예에 있어서, 분리된 전사 인자가 결합된 DNA 단편의 증폭은 어댑터 올리고뉴클레오티드를 DNA 단편에 연결한 후에 수행된다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0178] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0179] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0180] (iii) 분리된 DNA에 어댑터 올리고뉴클레오티드를 연결하는 단계;
- [0181] (iv) DNA를 증폭시키는 단계; 및
- [0182] (v) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질의 지표로서 DNA 단편의 존재, 양 및/또는 서열을 사용하는 단계.
- [0183] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0184] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0185] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0186] (iii) 서열 특이적 프라이머 올리고뉴클레오티드를 사용하여 분리된 DNA를 증폭하는 단계;
- [0187] (iv) 증폭된 DNA를 검출하는 단계; 및
- [0188] (v) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질의 지표로서 증폭된 DNA의 존재, 양 및/또는 서열을 사용하는 단계.
- [0189] 이 측면은 바이오마커 목적을 위한 관심있는 TFBS 서열(들) 및/또는 플랭킹 서열을 포함하는 선택된 DNA 단편의 PCR 증폭에 의한 DNA 단편 어댑터 라이브러리 준비 및 차세대 DNA 시퀀싱을 배제하면서 본 발명의 조합된 전사

인자/DNA 서열 바이오마커의 조직 특이성을 사용하는 것이다. 상기 방법은 빠르고 저렴하며 높은 처리량을 위해 쉽게 자동화되며 모든 PCR 실험실에서 수행할 수 있다.

[0190] 단계 (i) 또는 (ii)에서 분리된 DNA 서열은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 증폭될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 분리된 DNA는 DNA 단편에 연결된 어댑터를 사용하는 PCR 방법을 사용하여 증폭된다. 다른 구체예에 있어서, PCR 프라이머는 DNA 증폭을 위해 사용된다. 프라이머는 단계 (i) 또는 (ii)에서 분리된 모든 DNA 서열을 증폭하도록 설계될 수 있거나, 선택적으로 측면 영역을 포함하는 전사 인자의 반응 요소의 서열과 관련된 특정 DNA 서열을 증폭하도록 설계될 수 있다.

[0191] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:

[0192] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;

[0193] (ii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리 (및 선택적으로 증폭)하는 단계;

[0194] (iii) 혼성화 방법으로 DNA를 검출하는 단계; 및

[0195] (iv) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질의 지표로서 혼성화된 DNA의 존재, 양 및/또는 서열을 사용하는 단계.

[0196] 이 측면은 TFBS 서열(들) 및/또는 플랭킹 서열(들)을 포함하는 DNA 단편의 선택적 DNA 혼성화에 의해 값비싼 차세대 DNA 서열분석을 배제하면서 본 발명의 조합된 전사 인자/DNA 서열 바이오마커의 조직 특이성을 사용하는 것이다. 이 방법은 비용이 저렴하며 모든 PCR 검사실에서 수행할 수 있다.

[0197] 바람직한 구체예에 있어서, 분리된 DNA는 혼성화 전에 증폭된다. 바람직한 구체예에 있어서, 혼성화 방법은 DNA 마이크로어레이 방법(DNA 칩 방법으로도 알려짐)이다.

[0198] 또한, 본 발명의 방법은 전사 인자 및 서열 관련 DNA의 조합 바이오마커를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0199] 전사 인자의 선택

[0200] 진핵 생물에서 유전자 전사의 조절은 매우 복잡하며 도 2와 같이 조절 전사 복합체에서 여러 조절 단백질에 의해 결합된 여러 조절 DNA 서열을 모으기 위해 DNA를 벤딩 및 루핑(looping)을 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 "전사 인자"라는 용어는 인핸서, 보조 인핸서, 억제 인자, 보조 억제 인자, 매개체, 활성화제, 보조 활성화제, 억제 인자, 보조 억제 인자, 염색질 리모델링 단백질, DNA 벤딩 단백질, 절연체, RNA 중합효소 모이어티, 신장 인자, STAT 모이어티, 사이토카인 인자 또는 STAT 모이어티, UBF 또는 이러한 유전자 조절 또는 전사 복합체와 관련된 임의의 다른 모이어티에 결합된 사이토카인 관련 인자뿐만 아니라 특정 유전자(들)의 조절과 관련된 일반 전사 인자 및 특정 전사 인자를 포함하나 이에 제한되지 않는 유전자의 전사를 조절하기 위해 게놈 내의 유전자 조절 서열에 직접 또는 간접적으로 결합하는 조절 단백질을 의미한다. 유사하게, 본원에서 사용되는 "전사 인자 결합 부위(TFBS)"라는 용어는 제한 없이 도 2에 나타난 바와 같은 원거리 또는 근거리 인핸서 및 억제 인자 서열을 포함하는 유전자의 전사 조절과 관련된 조절 단백질의 DNA 결합 부위를 의미한다.

[0201] 질환에서 전사 인자 발현이 변경된다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 질환에서 발현이 상향 조절되고/되거나 질환 조직, 예를 들어 암 조직에서 일반적으로 상기 (건강한) 조직에서 고도로 발현되지 않을 때 부적절하게 발현되는 전사 인자에 관한 것일 수 있다. 따라서, 체액 샘플에 존재하는 전사 인자의 수준은 질환의 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0202] 또한, 전사 인자에 의한 TFBS 점유 프로파일이 상이한 세포 유형 및 질환에서 변경된다는 것이 잘 알려져 있다 (Wang et al., 2012). 따라서, 체액 샘플에 존재하는 전사 인자에 의한 TFBS 점유 프로파일은 질환의 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0203] 건강한 대상체의 순환계에 존재하는 염색질 단편은 주로 조혈 기원이다. 따라서, 본 발명의 방법은 또한 일반적으로 조혈 조직에서 발현되지 않는 (그러나, 비조혈 조직에서는 발현될 수 있는) 관련 DNA와 함께 전사 인자를 포함하는 염색질 단편의 부적절한 존재를 검출하는 것에 관한 것이다.

[0204] 예를 들어, 많은 암 질환은 상피 조직에서 유래한다. 상피 GRHL2 전사 인자는 많은 상피 조직뿐만 아니라 많은 상피 조직 유래 암 질환에서 발현되지만 조혈 조직에서는 발현되지 않는다. 순환계에서 GRHL2의 존재는 예를 들어 결장직장암, 전립선암, 폐암 또는 유방암과 같은 상피 유래 암의 존재를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법

은 암 자체의 존재를 검출하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 계통 특이적 전사 인자 및/또는 연관된 DNA 서열과 전사 인자의 계통 특이적 조합을 사용하여 암의 기원 기관을 확인하는데 사용될 수 있다. 따라서, 임의의 전사 인자가 본 발명의 방법에 유용할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 선택된 전사 인자를 포함하는 염색질 단편의 수준은 질환 대상체의 체액에서 상승되고 (다른 대상체에서 발견되는 수준보다 높음), 부분적으로 또는 전체적으로 조직 및/또는 질환 특이적이며/이거나 계놈에서 다중 반응 요소를 갖는다.

[0205] 따라서, 일 구체예에 있어서, 전사 인자는 질환 특이적이다 (즉, 전사 인자를 포함하는 순환 염색질 단편의 수준은 질환에서 상향 조절된다.). 일 구체예에 있어서, 전사 인자는 조직 특이적이다. 일 구체예에 있어서, 전사 인자는 계놈의 1개 이상의 위치, 예를 들어 계놈의 5개 이상, 10개 이상, 100개 이상, 1000개 이상 또는 10,000개 이상의 위치에서 결합한다. 일부 전사 인자 결합 위치는 일부 조직 유형에서는 점유되지만 다른 조직 유형에서는 점유되지 않는다. 일부 전사 인자 결합 위치는 병든 세포에서 점유되지만 동일한 조직의 건강한 세포에서는 점유되지 않는다.

[0206] 전사 인자는 결합 영역에 의해 분류될 수 있다(예를 들어, 본원에서 참조로 포함된 Vaquerizas et al., 2009 참조). 일 구체예에 있어서, 전사 인자는 호메오도메인, HLH, bZip, NHR, 포크헤드, P53, HMG, ETS, aIPT/TIG, POU, MAD, SAND, IRF, TDP, DM, 열충격, STAT, CP2, RFX, AP2 또는 징크 핑거(예를 들어, 징크 핑거 C₂H₂ 또는 징크 핑거 GATA) 결합 도메인으로부터 선택되는 DNA 결합 도메인을 포함한다. 일 구체예에 있어서, 전사 인자는 비-징크 핑거 DNA 결합 영역을 포함한다.

[0207] 관심 있는 조직(들)에서 관심 있는 전사 인자를 확인하기 위해 고전적인 뉴클레아제 접근 가능 부위 매핑 방법을 사용하여 실험적으로 결정할 수 있다. 일반적인 실험에서 염색질은 관심 있는 세포(예를 들어, 암세포, 동일한 조직의 건강한 세포 및 조혈 세포)에서 추출되고 적절한 뉴클레아제를 사용하여 소화된다. 소화에 의해 생성된 염색질 단편은 전사 인자에 결합하는 항체에 노출되고 항체 결합 DNA 단편은 분리되고 전사 인자에 의해 결합된 TFBS 서열(들)(선택적으로 플랭킹 서열 포함)을 확인하기 위해 서열화된다. 결과는 본 발명에서 사용하기 위한 전사 인자를 선택하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 병에 걸린 세포에서는 상승하지만 조혈 세포에서는 낮거나 없는 전사 인자 및 전사 인자/TFBS(선택적으로 측면 서열 포함) 조합이 본 발명의 방법에 유용하다. 고전적인 뉴클레아제 접근성 방법은 최근에 개선되었으며 이제 기술에는 CUT&RUN 및 기타 방법과 같은 방법이 포함되며, 이는 수행하기가 더 간단하고 개선된 결과를 제공한다(Skene 및 Henikoff, 2017). 임의의 이러한 방법은 본 발명에서 사용하기에 적합한 전사 인자의 확인에 사용하기에 적합할 것이다.

[0208] 많은 그러한 실험 및 유사한 실험이 수행되었고, 그 결과 적합한 전사 인자가 당업계에서 이용가능하다. 본 발명의 방법에 유용한 전사 인자를 열거한 문헌에는 전사 인자 및 암에 관한 많은 간행물이 있다. 예를 들어, Lambert et al., 2018은 294개의 알려진 발암성 전사 인자 및 조절자를 기술한다. Gurel et al., 2010은 전사 인자 NKX3.1을 전립선암에 대한 마커로 기술한다. Darnell, 2002는 STAT3, 5, STAT-STAT, GR, IRF, TCF/LEF, β-카테닌, NF-κB, NOTCH(NICD), GLI, c-JUN, (c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF 및 CREB-CREM 패밀리를 포함하는) bZip 단백질, cEBP 패밀리를 포함하는 다수의 발암성 전사 인자를 기술한다. Vaquerizas et al., 2009는 본 발명의 방법에 유용한 다수의 조직 특이적 전사 인자를 기술한다. Ulz et al., 2019는 AR(안드로겐 수용체), NKX3-1 및 HOXB13뿐만 아니라 많은 암 유형에 존재하지만 혈액 조직에는 존재하지 않는 상피 전사 인자 GRHL2와 같은 전사 인자를 설명한다. Corces et al., 2018은 NR5A1, TP63, GRHL1, FOXA1, GATA3, NFIC, CDX2, RFX2, ASCL1, PAX2, HNF1A, NKX2.A, PHOX2B, DRGX, HOXB13, AR, MITF, HNF4 및 POU5F1을 포함한 다수의 암 특이적 및 조직 특이적 전사 인자를 설명한다. ChIP-Seq를 사용하여, Wang 등은 2012년 7개의 불멸 암 세포주와 12개의 정상 세포 유형을 포함하여 19개의 서로 다른 세포 유형에 걸쳐 전사 인자 CTCF에 대한 77,811개의 별개의 결합 부위를 확인하였다. 이 77,811개 CTCF TFBS 중 1236개 부위가 암 세포에서 차별적으로 점유되는 것으로 밝혀졌다. 195개 부위의 점유는 정상 세포 유형에서는 발생하지만 암세포에서는 발생하지 않는 것으로 나타났다. 1041개 부위의 점유는 정상 세포 유형이 아닌 암세포에서 발생하는 것으로 밝혀졌다(Liu et al., 2017). ChIP-Seq에 의해 체액에서 암 특이적 TFBS에 해당하는 CTCF 관련 cfDNA 단편의 발견은 조사 대상에서 암 질환의 존재를 나타내며 이러한 방식으로 바이오마커로 사용될 수 있다. 상기 참고문헌은 본원에 참조로 포함된다.

[0209] 또한, 본 발명의 방법과 함께 사용하기에 적합한 전사 인자는 다양한 전사 인자, 암 및 계놈 데이터베이스, 예를 들어 인간을 포함하는 다수의 종에 대한 주석이 달린 계놈 서열을 제공하는 ENSEMBL database, Encyclopedia of DNA Elements or (ENCODE) database(<https://www.encodeproject.org>), Transcription Factor(TRANSFAC) database(Matys et al., 2006), The Gene Transcription Regulation Database(GTRD) Version

18.01(<http://gtrd.biouml.org>), Human Transcription Factors database Version 1.01(<http://humantfs.cabr.utoronto.ca>), NIH Genomics Data Commons database(<https://gdc.cancer.gov>), The Cancer Genome Atlas(TCGA)(<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>), UCSC Xena Browser(<https://ataseq.xenahubs.net>) 및 전사 인자가 발현되는 건강한 조직 및 암 질환에서의 발현에 대한 데이터를 제공하는 Human Protein Atlas database(<https://www.proteinatlas.org>) 및 다른 데이터베이스를 사용하여 선택될 수 있다.

[0210] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 전사 인자 및 관련된 TFBS 서열 및 플랭킹 서열의 특성화를 위한 이러한 데이터베이스의 사용은 이러한 데이터베이스 중 일부를 참조하여 실시예로서 예시될 수 있다. TRANSFAC 데이터베이스는 수천 가지의 인간 및 기타 진핵 전사 인자에 대한 데이터를 제공한다. 각 전사 인자에 대해 제공되는 세부 사항은 게놈에서 결합하는 TFBS의 수, 전사를 조절하는 유전자 목록, 각 조절 유전자와 관련된 TFBS의 서열 및 게놈 위치, 전사 조절을 위한 협력 방식에서 작동하는 다른 전사 인자의 세부 사항, 컨센서스 TFBS DNA 서열, DBD 세부 사항 및 암 관련성을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 이 데이터의 사용은 예시 목적을 위해 전사 인자 CDX2 및 c-JUN에 대해 아래에 예시된다. TRANSFAC 데이터베이스에는 26개의 특정 유전자를 조절하는 48개의 인간 CDX2 TFBS가 나열되어 있다. CDX2 TFBS 서열은 게놈 위치 및 각각에 의해 조절되는 유전자와 함께 제공된다. 각 CDX2 TFBS에 대한 플랭킹 서열은 각 게놈 위치에서 서열에 대한 ENSEMBL 인간 게놈 데이터베이스를 참조하여 결정할 수 있다. 컨센서스 CDX2 TFBS 서열도 제공된다. 마찬가지로 TRANSFAC 데이터베이스에는 166개의 특정 유전자를 조절하는 265개의 인간 c-JUN TFBS가 나열되어 있다. c-JUN TFBS 서열은 게놈 위치 및 각각에 의해 조절되는 유전자와 함께 제공된다. 각 c-JUN TFBS에 대한 플랭킹 서열은 각 게놈 위치의 서열에 대한 ENSEMBL 인간 게놈 데이터베이스를 참조하여 결정할 수 있다. 컨센서스 c-JUN TFBS 서열도 제공된다.

[0211] 따라서, 전사 인자 및/또는 TFBS는 실험적으로 또는 문헌 및/또는 본 발명의 방법에 유용한 데이터베이스, 예를 들어 The Human Protein Atlas database로부터 선택될 수 있다. 전사 인자는 (i) 그것이 발현되는 건강한 조직 및 질환에 걸린 조직, (ii) 그러한 세포 또는 조직에서 조절되는 유전자, (iii) 이들 조직에서 그것이 결합하는 TFBS 서열 (선택적으로 플랭킹 서열 포함) 및 (iv) 전사 조절을 위해 TFBS에 공동 결합함으로써 그것이 협력하는 다른 인자의 관점으로 특성화될 수 있다. 이 특성화는 본원에 기술된 방법에 의해 체액 샘플에서 염색질 단편 및/또는 전사 인자 관련 cfDNA 단편의 기원인 건강한 조직 또는 질환 조직 또는 세포를 식별하는 데 사용될 수 있다.

[0212] 유사하게, 체액 샘플 내의 염색질 단편 및/또는 cfDNA 서열에 관한 실험 데이터는 cfDNA 단편에 포함된 플랭킹 서열을 선택적으로 포함하는 TFBS 서열의 전부 또는 일부를 식별하기 위해 이들 데이터베이스를 사용하여 해석될 수 있다. 그런 다음 이 데이터를 사용하여 cfDNA 단편의 기원 조직 또는 세포를 식별할 수 있다.

[0213] 현재 암에서 특히 중요한 것으로 인식되는 세 가지 주요 전사 인자 그룹이 있다. 첫 번째 그룹은 에스트로겐 수용체, 안드로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 글루코코르티코이드 수용체, 갑상선 수용체 및 레티노산 수용체를 포함하는 핵 호르몬 수용체 그룹이다. 전사 인자의 핵 호르몬 수용체 그룹은 리간드 결합에 의해 활성화될 수 있는 비활성 또는 잠재 전사 인자로 간주될 수 있는 세포 표면 수용체이다. 예를 들어, 에스트로겐 수용체는 에스트로겐에 결합함으로써 활성화된다. 리간드 결합은 핵 호르몬 수용체를 핵으로 이동시켜 표적 DNA 서열에 결합하고(예를 들어, 에스트로겐 수용체는 에스트로겐 반응 요소에 결합함) DNA 표적 서열과 관련된 유전자를 위 또는 아래로 조절한다(예를 들어, 에스트로겐 조절 유전자).

[0214] 암의 시작과 발달에 중요한 것으로 알려진 전사 인자의 두 번째 그룹은 신호 전달자 및 전사 활성화제(STAT)이다. 이들은 세포질 및/또는 세포 표면에서 매우 다양한 분자 트리거에 의해 활성화될 수 있는 잠재적인 세포질 전사 인자이다. STAT 활성화는 일반적으로 표적 유전자의 전사를 조절하는 단백질 또는 단백질 복합체의 핵으로 진입하는 키나아제 반응, 단백질 분해 반응 및 단백질-단백질 상호작용과 같은 세포질의 일련의 생화학적 사건을 포함한다. 종종 전사 활성화로 이어지는 생화학적 캐스케이드는, 예를 들어 사이토카인 수용체에 의한 사이토카인 모이머티의 결합, 또는 성장 인자 수용체에 의한 표적 성장 인자 또는 혈소판 유래 성장 인자와 같은 성장 인자의 결합, 또는 G 단백질 결합 수용체에 대한 펩티드 또는 단백질의 결합을 포함하는 세포 표면에서 리간드의 수용체 결합에 의해 촉발된다.

[0215] 암에서 중요한 전사 인자의 세 번째 그룹은 전사 효과가 일반적으로 세린 키나아제 반응과 관련된 일련의 생화학적 사건에 의해 활성화되는 상주 핵 단백질이다. 세린 키나아제의 표적이 되는 수백 개의 세린 키나아제 모이머티 및 수백 개의 핵 단백질이 있다.

[0216] 상기 기재된 3개 그룹의 전사 인자와 같이, 암의 개시, 발달 또는 유지에 관여하는 임의의 전사 인자를 포함하

는 (즉, 포함하거나 함유하는) 세포 유리 염색질 단편이 본 발명의 방법에서 유용할 것이라는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 암에서 역할이 알려져 있거나 암 질환에서 상승하는 것으로 알려진 일부 전사 인자 또는 전사 인자 패밀리는, 예를 들어 STAT, 특히 STAT3, STAT5 및 STAT-STAT 이량체 모이어티, NF- κ B, β -카테닌, γ -카테닌, 노치 및 노치 세포내 도메인(NICD), GLI, c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF, CREB-CREM, cEBP, ETS, MYC, N-MYC, MAX, E2F, 인터페론 조절 인자(IRF), T 세포 인자(TCF), 림프구 강화 인자(LEF), EN2, GATA3, CDX2, PAX8, WT1, NKX3.1, P63(TP63) 또는 P40 및 나선-루프-나선 단백질이 제한없이 포함된다(Darnell, 2002). 이러한 모든 전사 인자는 본 발명의 방법에 유용할 것이다.

[0217] 많은 전사 인자가 혈통 특이적이며 특정 조직과 관련되어 있으므로 조직 특이적 전사 인자, 즉 특정 조직이나 암에서는 항상 또는 일반적으로 발견되는 반면 다른 조직 또는 암에서는 거의 또는 전혀 발견되지 않는 전사 인자로 간주될 수 있음이 밝혀졌다. 본 발명의 방법은 결합된 DNA의 조합된 검출이 향상된 특이성 및/또는 민감도를 제공하는 조직 특이적 전사 인자와 함께 사용될 수 있다.

[0218] 갑상선 전사 인자 1(TTF-1)은 배아 발생 동안 갑상선, 간뇌 및 호흡기 상피에서 선택적으로 발현된다. TTF-1은 신경내분비 및 비신경내분비 폐암종에서 채취한 조직 샘플에서 발현되지만 발현 빈도는 조직학적 아형에 따라 현저하게 다르다. 따라서, 본 발명의 방법은 전사 인자 및 관련 DNA 서열을 함유하는 염색질 단편의 측정을 통해 암 유형 및 아형을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0219] PAX8은 갑상선, 신장 및 물리 시스템의 배아 발생에 관여하는 전사 인자이다. PAX8은 비점액성 난소 암종, 장액성, 자궁내막양, 투명 세포 및 이행 세포 암종에서 채취한 조직 샘플에서 높은 수준의 발현을 보여준다. 또한, PAX8은 자궁내막양 선암종, 자궁 장액성 암종, 자궁내막 투명 세포 암종뿐만 아니라 관 및 소엽 유방 암종 조직에서 발현된다.

[0220] CDX2는 장 상피 세포의 증식과 분화를 조절하는데 중요한 역할을 하는 계통 특이적 전사 인자이며 거의 모든 결장직장 선암종 조직 샘플에서 발현된다.

[0221] NKX3.1은 정상적인 전립선 발달에 필요하며 거의 모든 전립선암에서 발현되는 알려진 마커이다.

[0222] GATA3는 빠르면 인간 임신 4주차에 전사 활동을 한다. GATA3는 유방 암종, 특히 에스트로겐 수용체 양성 유방암 조직 샘플과 요로상피암 및 이행 세포 암종에서 채취한 조직 샘플에서 고도로 발현된다.

[0223] WT1은 배아 발달에 중요한 역할을 한다. WT1은 난소암 조직의 우수한 마커이며 매우 제한된 범위의 건강한 성인 조직에서 발현된다.

[0224] EN2는 배아 발달에 역할을 하며 다양한 암에서 발현되지만 성인의 건강한 조직에서는 거의 발현되지 않는다. 소변 내 EN2의 존재는 전립선암 검출을 위한 소변 검사의 기초로 사용되었다.

[0225] 다른 전사 인자가 본 발명의 방법에 유용할 수 있다. 예를 들어, UBF는 리보솜 RNA 유전자 프로모터에 결합하고, RNA 중합효소 I에 의해 매개되는 전사를 활성화하는 전사 인자이다. UBF 발현은 일부 암의 조직에서 증가하는 것으로 알려져 있다. 이러한 많은 다른 예는 의심할 여지없이 존재하며 본 발명의 방법과 함께 사용하기에 적합한 전사 인자이다. 또한, RNA 중합효소 I 및 RNA 중합효소 III도 암에서 증가한다. 이러한 모이어티는 tRNA 및 리보솜 RNA 유전자의 전사를 담당하여 암세포 및 조직의 특징인 상승되고 빠른 단백질 생산, 성장 및 세포 복제에 필요한 세포 기구를 제공한다. 본 발명의 추가적인 구체예에 있어서, UBF, RNA 중합효소 I 또는 RNA 중합효소 III를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 검출 또는 측정을 위한 방법이 제공된다.

[0226] 대안적 구체예에서, 전사 인자는 조직-특이적 전사 인자가 아니다. 또한, 본 발명의 방법은 일반적으로 발현되는 전사 인자, 즉 5개 초과, 10개 초과, 15개 초과, 20개 초과 또는 30개 초과 조직 유형에서 발현되는 전사 인자를 검출할 수 있다. 관련된 DNA 서열 (즉, 조합 바이오마커)과 검출을 결합함으로써, 본 발명의 방법은 일반적으로 발현되는 전사 인자를 검출하여 임상적으로 유용한 결과를 제공할 수 있다. 핵 호르몬 수용체 전사 인자가 그 예이다. 또한, 위에서 논의한 바와 같이 CTCF는 본원에서 더 조사된 예이다.

[0227] 전사 인자는 다른 전사 인자, 보조 인자, 보조 활성화제, 보조 억제 인자, RNA 중합효소 모이어티, 신장 인자, 염색질 리모델링 인자, 매개체, STAT 모이어티, UBF 및 다른 것들을 포함하는 많은 다른 인자들과 고도의 협력 방식으로 그들의 DNA 표적 서열에 결합한다. 이것은 본 발명에 의해 검출된 순환 전사 인자가 관련된 DNA를 갖는 뉴클레오솜, 핵 호르몬 수용체, 스테로이드 또는 핵 호르몬 수용체에 결합된 다른 호르몬, 기타 전사 인자, 보조 인자, 보조 활성화제, 보조 억제 인자, RNA 중합효소 모이어티, 신장 인자, 염색질 리모델링 인자, 매개체, STAT 모이어티 또는 사이토카인 인자 또는 STAT 모이어티에 결합된 사이토카인 관련 인자, 상류 결합

인자(UBF) 또는 세포 유리 염색질 단편에서 발생하는 이러한 유전자 조절 또는 전사 복합체와 관련된 임의의 기타 모이어티의 일부 또는 전부를 포함하는 더 큰 유전자 조절 복합체의 일부로서 다른 모이어티를 포함할 수 있음을 의미한다.

- [0228] 또한, 전사 인자 모이어티를 포함하는 세포 유리 염색질 단편은 온전한 뉴클레오솜 또는 복합체 내의 임의의 히스톤 단백질의 존재를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 이러한 모든 세포 유리 염색질 복합체는 본 발명에 유용할 것이며 본 발명에 포함된다.
- [0229] 바람직한 구체예에 있어서, 전사 인자는 STAT, NF- κ B, β -카테닌, γ -카테닌, 노치, 노치 세포내 도메인 (NICD), GLI, c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF, CREB-CREM, cEBP, ETS, MYC, MAX, E2F, 인터페론 조절 인자 (IRF), T 세포 인자 (TCF), 림프구 강화 인자 (LEF), 및 나선-루프-나선 단백질, HOX 단백질, EN2, GATA3, CDX2, TTF-1, PAX8, WT1, NKX3.1, P63 (또는 TP63), P40 또는 CTCF로부터 선택된다. 추가적인 구체예에 있어서, 전사 인자는 EN2, CDX2 또는 TTF-1로부터 선택된다. 다른 구체예에 있어서, 전사 인자는 CTCF이다.
- [0230] 이러한 전사 인자의 대부분은 100% 조직 특이적이 아니지만 일부 암 및 일부 성인 조직 유형에서 발현될 수 있다. 혈액 내 전사 인자를 포함하는 염색질 단편의 검출은 관련된 DNA 단편(들)을 검출하는 분석적으로 민감한 방법을 사용함으로써 향상된다. 본 방법의 질량 및/또는 조직 특이성은 전사 인자의 정체를 그것과 관련된 DNA의 특정 서열(들)과 조합함으로써 강화된다.
- [0231] 하나의 구체예에 있어서, 대상체로부터 취한 체액 샘플은 다중 분석에서 하나 이상의 질량 상태에 대해 테스트 하기 위해 선택된 하나 이상의 전사 인자 결합제와 접촉된다. 예를 들어, 선택적으로 많은 암에서 발현되는 전사 인자에 추가하여 하나 이상의 암 질환에 대해 각각 특이적인 다중 전사 인자에 대한 테스트는 단일 혈액 검사에서 암의 조직을 식별하는 것 외에도 많은 다른 암 질환의 검출을 위한 테스트를 가능하게 한다. 다중 테스트 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 제한 없이 루미넥스 사의 다중 비드 시스템을 사용하여 단일 샘플에서 다수의 다중 분석을 수행할 수 있다(Dunbar, 2006).
- [0232] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0233] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 복수의 전사 인자에 결합하는 복수의 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0234] (ii) 상이한 전사 인자와 관련된 DNA를 분석하는 단계; 및
- [0235] (iii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위해 복수의 전사 인자에 결합된 DNA의 존재 및/또는 양 및/또는 패턴을 사용하는 단계.
- [0236] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0237] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 2개 이상 (예를 들어, 복수)의 전사 인자에 결합하는 2개 이상 (예를 들어, 복수)의 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0238] (ii) 단계 (i)에서 결합된 전사 인자와 관련된 DNA의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0239] (iii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위해 전사 인자에 결합된 DNA의 존재 및/또는 양 및/또는 패턴 및/또는 서열(들)을 사용하는 단계.
- [0240] 일 구체예에 있어서, 복수의 전사 인자 각각은 별개의 고상 지지체에 부착되어 각각의 전사 인자가 그것의 관련된 DNA 단편의 분석 또는 시퀀싱을 위해 분리될 수 있다. 예를 들어, 루미넥스 멀티플렉스 비드 시스템은 단일 샘플에 노출되고, 다음으로 각 전사 인자와 독립적으로 관련되는 DNA의 (별도의) 시퀀싱을 위해 서로 분리될 수 있는 서로 다른 전사 인자 결합제로 코팅될 수 있는 다양한 비드 유형으로 구성된다.
- [0241] **전사 인자-DNA 크로마틴 단편**
- [0242] 순환계에 존재하는 염색질 단편은 다양한 출처에서 유래한다. 한 원인은 예를 들어 암 세포와 같은 질환 세포를 포함할 수 있는 세포의 사멸 후 순환계로 염색질을 방출하는 것이다. 어떤 경우에는 순환계로 염색질이 활발하게 방출될 수 있다.
- [0243] 순환계에서 염색질 단편의 주요 공급원은 네토시스(NETosis)로 알려진 과정에 의해 호중구 세포의 트랩(NET)의

생산을 통해 호중구에서 과생된다. 이 과정에서 호중구는 염색질 물질(NET)을 세포외 매트릭스로 방출하여 감염 부위에 국소적으로 병원체를 포획하고 중화한다. NET 및 그 대사산물은 크기가 150bp 이상인 구성 요소 DNA 단편을 가진 올리고뉴클레오솜과 모노뉴클레오솜으로 크게 구성된다.

[0244] 혈액에서 추출한 cfDNA의 크기 프로파일링은 cfDNA의 주요 구성 요소가 관련된 링커 DNA의 다양한 길이를 가진 모노뉴클레오솜에 해당하는 약 130-200bp 범위의 크기 분포 피크가 약 160-170bp인 모노뉴클레오솜이라는 것을 보여준다. 예를 들어, 디-뉴클레오솜(약 340bp), 트리-뉴클레오솜(510bp) 등을 포함하는 다양한 크기의 올리고 뉴클레오솜에 해당하는 추가 피크가 있을 수 있다. 네토시스에 의해 영향을 받는 샘플에는, 최대 수천 bp 길이에 이르는 큰 염색질 단편과 관련된 넓은 피크가 있을 수 있다.

[0245] 전사 인자는 짧은 DNA 서열에 결합하고, 전사 인자-DNA 복합체는 35-80bp 범위의 훨씬 더 짧은 DNA 단편을 포함한다(Snyder et al., 2016). 이중 가닥 혈장 cfDNA 라이브러리의 일반적인 크기 프로파일 다이어그램에서, 길이가 100bp 미만인 cfDNA 단편 길이에 해당하는 물질이 거의 또는 전혀 보이지 않는다. 그러나, 단일 가닥 라이브러리 준비는 35-80bp 범위에서 더 많은 cfDNA 단편을 포함한다(Snyder et al., 2016). 이 단백질 결합 35-80bp cfDNA 성분은 전체 순환 염색질 단편의 부수적인 성분이다.

[0246] 본 발명의 맥락에서 전사 인자-DNA 결합의 추가적인 중요한 측면은 전사 인자-DNA 결합의 동력학적 안정성에 관한 것이다. 일부 전사 인자는 생체 내에서 TFBS에서 DNA에 안정적으로 결합된다. 다른 전사 인자는 TFBS에서 생체 내 일시적으로 결합되어 동적 방식으로 결합, 분리 및 재결합한다. 세포 및 조직 기반 기질을 사용하는 ChIP-Seq 방법에서는 둘 다 가교 기술을 사용하여 검출할 수 있기 때문에 이는 문제가 되지 않는다. 동적으로 결합된 전사 인자는 결합된 형태와 자유 형태 사이에서 자연적으로 변갈아 가며 연결되지만, 교차 연결되면 결합된 형태로 "갇히게"된다. 따라서, 짧은 가교 시간을 사용하면 안정적으로 결합된 전사 인자의 높은 검출이 가능하지만 동적으로 결합된 전사 인자의 검출은 적게된다. 대조적으로, 더 긴 가교 시간의 사용은 시간이 지남에 따라 가교에 의해 연관된 형태로 "갇히게" 됨에 따라 동적으로 결합된 전사 인자의 검출을 증가시킨다(Poorey et al., 2013).

[0247] 그러나, 동역학적 고려 사항을 기반으로, 우리는 동적으로 결합된 전사 인자가 혈액이나 다른 체액의 순환에 존재할 가능성이 없다고 추론하였다. 생체 내에서 동적으로 결합된 전사 인자-DNA 복합체의 결합, 분리 및 재결합을 허용하는 염색질 및 전사 인자 모두의 핵 농도가 상대적으로 높다. 그러나, 체액 내 전사 인자-DNA 복합체의 수준은 매우 희석되어 매우 낮은 농도로 존재하므로 일단 해리되면 일시적으로 또는 동적으로 결합된 전사 인자와 DNA 구성 요소는 재결합할 가능성이 없다. 따라서, 우리는 혈장 내 교차 결합이 안정적으로 결합된 전사 인자에만 관련이 있고, 따라서 항상 빠를 것이라고 추론하였다(왜냐하면, 더 느리게 교차 결합하는 일시적으로 결합된 전사 인자는 분리되어 무시될 수 있기 때문임). 따라서, 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:

[0248] (i) 동역학적으로 안정한 전사 인자-DNA 복합체에 결합하는 결합제와 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 접촉시키는 단계;

[0249] (ii) 상기 역학적으로 안정한 전사 인자-DNA 복합체에서 전사 인자와 관련된 하나 이상의 DNA 단편의 서열을 결정하는 단계; 및

[0250] (iii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위한 조합된 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및 관련 DNA의 서열을 사용하는 단계.

[0251] 전사 인자 DNA 결합 도메인

[0252] 전사 인자는 DNA 결합 도메인(DBD)에 따라 분류될 수 있다. Vaquerizas et al., 2009는 1391개의 알려진 전사 인자를 조사하고 DBD를 기반으로 24가지 이상의 서로 다른 유형의 전사 인자를 확인하였다. 확인된 가장 일반적으로 발생하는 전사 인자는 징크 핑거 DBD를 가진 전사 인자였으며 이들은 전체 전사 인자의 거의 절반(48.5%)을 차지하였다.

[0253] cfDNA, ctDNA 또는 뉴클레오솜 분석에 선호되는 샘플 유형은 EDTA 혈장이다. 혈장 채혈 튜브에서 EDTA 또는 구연산염의 기능은 혈액 내 칼슘 이온을 킬레이트 및 격리하여 응고를 방지하는 것이다(혈액 내 응고 캐스케이드는 칼슘 이온의 존재를 필요로 함). 튜브를 원심분리하면 혈액의 세포 성분이 혈장 상층액에서 분리되어 많은 임상 진단 목적을 위한 시료 매트릭스로 사용된다.

[0254] DNA TFBS에 대한 징크 핑거 전사 인자의 결합은 아연 이온의 존재에 따라 달라진다. 그러나, 혈장 채혈 튜브에

사용되는 칼슘 킬레이트제는 아연 이온도 킬레이트화한다. 징크 핑거 전사 인자에서 아연 이온의 킬레이션 및 제거는 DNA에 결합하는 전사 인자의 손실을 초래할 수 있다(Ralston, 2008). 아연 킬레이트제와 징크 핑거 전사 인자의 상호 작용은 이 계열의 전사 인자가 EDTA 혈장에서 다른 DBD 유형을 통해 DNA에 결합하는 전사 인자와 다르게 작용한다는 것을 의미한다.

[0255] 혈액 내 징크 핑거 전사 인자-DNA 복합체의 존재는 직접 밝혀지지 않았다. 우리는 그러한 복합체가 존재하지만, 혈액의 작은 순환 염색질 단편 구성 요소의 작은 부분(대부분의 순환 염색질 단편은 뉴클레오솜임)이기 때문에 분리되지 않았으며, 더욱이 현장의 작업자에 의하여 사용된 혈장 샘플에서 분해되었다고 추론하였다. 본원에서 설명된 바와 같이, 우리는 이 두 가지 문제를 해결하고 징크 핑거 전사 인자인 CTCF의 플라스마 ChIP-Seq를 시연하였다.

[0256] 전사 인자 결합제

[0257] 바람직한 전사 인자 결합제는 전사 인자에 결합하도록 지시된 항체, 또는 TFBS의 DNA 서열(선택적으로 플랭킹 서열 포함)과 같은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 바람직한 결합제는 전사 인자에 대해 높은 친화성을 가지므로 낮은 전사 인자 농도에서 결합이 일어날 뿐만 아니라 전사 인자의 결합에 대한 높은 특이성을 가지므로 다른 단백질의 비특이적 결합이 최소화된다.

[0258] 결합제는 세파로스, 세파텍스, 플라스틱 또는 자기 비드와 같은 고체 지지체 상에 코팅될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 고체 지지체는 다공성 물질을 포함한다. 다른 구체예에서, 결합제는 태그에 결합하도록 유도체화된 적합한 지지체에 결합제를 부착하는데 사용될 수 있는 태그 또는 링커를 포함하도록 유도체화된다. 이러한 많은 태그 및 지지체는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 소르태그, 클릭 케미스트리, 비오틴/스트렙타비딘, 히스-태그/니켈 또는 코발트, GST-태그/GSH, 항체/에피토프 태그 등). 이어서, 결합제의 분리는 전사 인자와 결합제의 반응 이전에, 동시에 또는 이후에 수행될 수 있다. 사용의 용이성을 위해, 코팅된 지지체는 장치, 예를 들어 미세유체 장치 내에 포함될 수 있다. 다중 고상 결합제는 단일 체액 샘플의 단일 테스트에서 서로 다른 전사 인자를 포함하는 다중 염색질 단편의 존재에 대한 동시 테스트를 위한 다중 분석 형식으로 사용될 수 있다.

[0259] 다른 구체예에 있어서, 결합제는 용액에 첨가되고 결합된 뉴클레오솜을 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 침전제로 가교 및 침전시킴으로써 분리된다. 침전된 펠렛은 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 별도의 상으로 분리될 수 있다. 많은 면역침강 방법이 당업계에 공지되어 있고 임의의 그러한 방법이 본 발명의 방법에 유용할 수 있다.

[0260] 일부 구체예에 있어서, 전사 인자와 관련된 DNA는 DNA 결합제에 의해 결합된다. DNA 결합제는 고체상(예를 들어, 플라스틱 입자, 자기 입자, 아가로스 또는 기타 다수)에 부착될 수 있다. DNA 결합제는 직접 또는 간접적으로(예를 들어, 비오틴/아비딘 또는 글루타티온과 같은 링커 시스템을 통해) 고상에 부착될 수 있다.

[0261] 우리는 전사 인자에 결합하도록 지시된 상업적으로 이용 가능한 항체를 사용하였다. ChIP-Seq의 경우 상업적으로 이용 가능한 자기 폴리스티렌 입자에 항체를 고정하였다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 전사 인자 결합제는 자기 폴리스티렌 입자 상에 고정된 고상 항-전사 인자 항체 (또는 이의 일부)이다.

[0262] DNA 라이브러리 준비

[0263] 본 발명의 일부 구체예는 염색질 단편의 전사 인자와 관련된 cfDNA 단편 라이브러리의 제조를 포함한다. 라이브러리는 PCR 방법을 사용하여 검출 및 시퀀싱을 용이하게 하기 위해 증폭될 수 있다. 원칙적으로 임의의 라이브러리 제조 방법이 본 발명의 방법과 함께 사용하기에 적합할 수 있다.

[0264] DNA 단편 라이브러리 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 일반적으로 어댑터 올리고뉴클레오티드를 DNA 단편에 연결하는 것을 포함한다. 어댑터 연결 DNA 단편 라이브러리의 증폭은 일반적으로 PCR에 의해 수행된다. 또한, PCR 프라이머는 DNA 증폭에 사용될 수 있고 라이브러리에 존재하는 모든 서열을 증폭하기 위해 축소될 수 있거나, 선택적으로 플랭킹 지역을 포함하는 전사 인자의 반응 요소의 서열과 관련된 특정 DNA 서열을 증폭하기 위해 당업계에 공지된 소프트웨어를 사용하여 설계될 수 있다.

[0265] 라이브러리 제조 방법은 cfDNA 단편의 단일 가닥 또는 이중 가닥 어댑터 연결이 포함될 수 있다. 선호하는 라이브러리 제조 방법은 단일 가닥 cfDNA 어댑터 연결이 포함된다. 바람직한 라이브러리 제조 방법은 길이가 100bp 미만인 작은 DNA 단편의 증폭 및 분리에 대해 높은 효율성을 가지고 있다. 많은 이러한 라이브러리 제조 방법은 예를 들어 (i) 5-10ng의 입력 DNA에 대해 20-25 PCR 주기로 제조업체의 프로토콜에 따라 사용되는 TruSeq DNA Sample Preparation Kit(Illumina) (Ulz et al., 2019), (ii) MagMAX cfDNA Isolation Kit(Applied

Biosystems) 사용 후 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit(New England Biolabs)를 사용하여 라이브러리 준비 (Ulz et al., 2019) 또는 (iii) Life technology Ion Plus Fragment Library Kit를 사용한 PCR 증폭과 함께 Qiagen QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit-용 혈액 및 체액 프로토콜의 사용 (Hu et al., 2019)을 포함하여 당업계에 공지되어 있다. 다른 방법으로는 Sanchez et al., 2018, Skene 및 Henikoff, 2017, Snyder et al., 2016 및 Liu et al., 2019에 기술된 방법을 포함한다. 본원에서 제공된 실시예에서, 우리는 상업적으로 이용 가능한 단일 가닥 DNA 라이브러리 준비 키트(Claret Bio SRSly NGS 라이브러리 준비 키트)를 사용하였다.

[0266] 전사 인자 관련 DNA의 PCR 증폭이 (오직) 전사 인자 검출 또는 정량의 민감도를 증가시키기 위해 수행되고, 플랭킹 서열 없이도 반응 요소 서열 단독의 증폭이 충분하다는 본 발명의 구체예는 당업자에게 명백할 것이다.

[0267] 전사 인자-DNA 복합체의 면역침강

[0268] 면역침강은 원칙적으로 간단한 과정이다. 일반적인 방법에서, 관심 있는 단백질에 특이적으로 결합하도록 지시된 항체는 고체 지지체에 코팅되고 단백질을 포함하는 생물학적 샘플에 노출된다. 관심 있는 단백질은 항체에 의해 결합되어 고상 표면에 흡착되는 반면 다른 단백질 및 기타 물질은 용액에 남아 있다. 고체상은 샘플에서 분리되고 세척되어 고체 지지체에 부착된 관심 단백질의 순수한 샘플이 남는다.

[0269] 세포 및 조직 기반 ChIP-Seq 방법은 당업계에 잘 설명되어 있다. 조직 또는 배양 세포에서 추출한 소화 또는 초음파 처리된 염색질 20-30 μ g을 기질 물질로 사용하는 것이 일반적이다. 염색질은 약 40%의 DNA로 구성되어 있기 때문에 이것은 약 8-24 μ g의 기질 DNA를 나타낸다. 그러나, 순환하는 cfDNA의 농도는 낮고 건강한 인간 대상체에서 30 $\pm$ 14 ng/ml로, 위암 환자에서 71 $\pm$ 55 ng/ml로 측정되었다(Park et al., 2012). 따라서, 1ml 혈장 샘플은 ChIP-Seq에서 일반적으로 사용되는 것보다 약 200-500배 적은 염색질 물질을 생성한다.

[0270] 대부분의 순환 세포 유리 염색질은 뉴클레오솜으로 구성되어 있으므로 이용 가능한 순환 세포 유리 전사 인자-DNA 염색질 단편 물질은 극히 적다. 더욱이, 이용 가능한 순환 세포 유리 전사 인자-DNA 염색질 단편 물질은 수 천 개의 전사 인자를 포함할 것이다. 따라서, 단일 전사 인자로 대표되는 본 발명의 방법에 의한 분석을 위한 이용가능한 기질 물질은 순환계에 존재하는 소량의 순환 세포 유리 전사 인자-DNA 물질의 작은 부분일 것이다.

[0271] 또한, 세포로부터의 염색질 추출물은 비교적 순수한 염색질 물질이다. 대조적으로, 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 체액은 소량의 염색질을 함유하지만 고농도의 염청단 수의 단백질 및 기타 화합물을 함유하며, 이들 중 임의의 것은 고상 전사 인자 항체 또는 사용된 기타 결합체에 비특이적으로 부착함으로써 본 발명의 방법을 방해할 수 있다. 혈액, 혈청 또는 혈장에서 순환하는 전사 인자 DNA 복합체의 면역침강에 대한 추가적인 복잡성은 따라서 비특이적 배경 결합이 고상 지지체 상의 특정 결합체에 결합된 소량의 표적 전사 인자와 관련하여 높고, 그것의 탐지를 모호하게 할 수 있다는 것이다.

[0272] 이러한 모든 어려움으로 인해 혈장 또는 기타 혈액 샘플 매트릭스에서 ChIP-Seq에 대한 문헌 보고서는 거의 없다. 혈장 내 ChIP-Seq가 기술된 곳에서는 이들의 수준이 (단일 전사 인자의 수준과 관련하여) 높기 때문에 그것은 뉴클레오솜 및 뉴클레오솜 히스톤에 관한 것이다.

[0273] 우리는 높은 친화력 항체를 사용하고 고농도의 강력한 세제를 포함하는 용액으로 고상을 엄격하게 세척하는 것과 결합된 적절한 고상 지지체를 사용하여 고상 지지체 상의 다른 단백질의 비특이적 결합을 매우 낮은 수준으로 줄임으로써 이러한 어려움을 해결하였다.

[0274] 따라서, 항체 결합된 전사 인자-DNA 복합체는 전사 인자 관련 DNA의 추출 전에 강한 (예를 들어, 적어도 1%, 예를 들어 1.2%의 농도) 세제 또는 세제 혼합물로 세척될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 단계 (i)에서 결합체에 의해 결합된 전사 인자는 관련된 DNA 단편의 검출 전에 적어도 1% 농도의 세제를 함유하는 완충액으로 세척된다. 이러한 목적으로 사용할 수 있는 세제는 매우 많다. 몇 가지 일반적인 예로는 제한 없이 Triton 세제 (예를 들어, Triton X-100), Tween 세제(예를 들어, Tween 20 및 Tween 80), 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 도데실 설페이트, 옥틸페녹시폴리에톡시에탄올(IGEPAL CA-630), 트리코사에틸렌 글리콜 도데실 에테르(Brij), n-도데실-베타-말토사사이드, 옥틸-베타-글루코사이드, 옥틸티오 글루코사이드, 3-((3-콜라미도프로필) 디메틸암모니오)-1-프로판설포네이트(CHAPS) 등을 포함한다.

[0275] 우리는 자기 폴리스티렌 마이크로비드를 사용하였고, 1% 옥틸페녹시폴리에톡시에탄올, 0.1% 소듐 데옥시콜레이트 및 0.1% 소듐 도데실 설페이트의 혼합물을 포함하는 세척액으로 반복 세척 (5회 세척)하였다.

[0276] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 고상 지지체는 폴리스티렌 입자, 예를 들어 자기 폴리스티렌 입자이다. 사용된 항체 (또는 전사 인자의 다른 결합체)는 지지체에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다.

- [0277] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 고체상 지지체 상에 분리된 고체상 결합된 전사 인자-DNA 복합체는 적어도 0.25%, 또는 적어도 0.5% 또는 적어도 1%의 세제 또는 계면활성제를 함유하는 용액으로 세척된다. 사용되는 세제는 단일 세제 또는 본원에 기술된 세제 혼합물로 구성될 수 있다.
- [0278] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 사용되는 고상 전사 인자 결합체 지지체는 다중화 시스템, 예를 들어 다중화 비드 시스템(예를 들어, Luminex Corporation에서 제공하는 시스템)을 포함한다. 이 고체 지지체 시스템에서, 형광에 기초하여 구별될 수 있는 다수의 비드는 각각 상이한 전사 인자에 대한 상이한 특이적 결합체로 코팅될 수 있고 단일 샘플에서 다수의 전사-인자-DNA 복합체를 조사하기 위해 동시에 사용될 수 있다(Dunbar, 2006).
- [0279] **DNA 시퀀싱**
- [0280] DNA 서열을 분석, 정량화 또는 확인하기 위한 당업계에 공지된 많은 방법이 있으며, 본 발명의 방법에 적용될 수 있는 특정 DNA 분석 방법은 제한 없이 차세대 시퀀싱 방법, 등온 DNA 증폭, 저온 PCR(낮은 변성 온도에서 공동-증폭 PCR), MAP(MIDI-활성화 열인산화), PARE(재배열 말단의 개인화된 분석), DNA 혼성화 방법(유전자 칩 방법 및 제자리 혼성화 방법 포함)을 포함한다. 추가적으로, 유전자 서열은 후생유전학적 DNA 시퀀싱 분석에 의해 후생유전학적으로 변경된 DNA 서열(예를 들어, 미변형 시토신의 우라실로의 중아황산염 전환을 사용한 5-메틸 시토신을 함유하는 서열)에 대해 분석될 수 있다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 관련된 DNA는 DNA 시퀀싱, 예를 들어 차세대 시퀀싱(표적 또는 전체 게놈) 및 메틸화 DNA 시퀀싱 분석, BEAMing, 디지털 PCR 및 콜드 PCR(더 낮은 변성 온도에서 공동-증폭 PCR)을 포함하는 PCR, 등온 증폭, 혼성화, MIDI-활성화 열인산화(MAP) 또는 재배열된 말단의 맞춤형 분석(PARE)으로부터 선택되는 시퀀싱 방법을 사용하여 분석된다.
- [0281] 본원에 기재된 실시예는 Illumina NovaSeq 시퀀싱을 사용하였다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 분리된 전사 인자로부터 추출된 DNA는 차세대 시퀀싱에 의해 분석된다.
- [0282] **샘플 준비**
- [0283] 샘플은 염색질 단편이 검출될 수 있는 체액일 수 있다. 염색질 단편은 혈액, 대변, 소변 및 뇌척수액에서 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한, 우리는 가래에서 염색질 단편을 발견하였다. 바람직한 구체예에서, 체액 샘플은 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플이다. 이러한 샘플은 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 순환 세포 유리 염색질 단편을 측정하고 분석하는데 사용할 수 있다.
- [0284] 혈액 샘플이 본 발명의 방법에 사용되는 경우, 이는 전혈, 혈청 샘플 또는 혈장 샘플일 수 있다. 전혈 또는 혈청 샘플은 모든 DBD 유형의 전사 인자와 관련된 (안정적으로 결합된) 전사 인자-DNA 염색질 단편의 분석을 위한 기질로 사용될 수 있다.
- [0285] EDTA 혈장 시료와 같은 혈장 시료도 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 일반적인 혈장 검체 채취 방법은 구연산염 또는 EDTA 채혈관에 전혈을 채취하여 2시간 이내에 원심분리한다. 생성된 상청액 혈장은 신선하게 사용하거나 분석할 때까지 동결할 수 있다. 그러나, 혈장을 생성하기 위해 채혈 튜브에 첨가제로 사용되는 칼슘 이온 격리제는 순환하는 징크 핑거 전사 인자-DNA 복합체의 해리를 유발한다. 위에서 언급한 바와 같이, 가장 흔한 종류의 전사 인자는 징크 핑거 전사 인자이다.
- [0286] 이러한 문제점을 해결하기 위한 다양한 방법이 제한 없이 포함된다: (i) 징크 핑거 전사 인자를 사용하는 것을 피하기 위하여 다른 DBD 유형과 함께 전사 인자를 사용, (ii) 혈청 샘플을 사용, (iii) 헤파린 혈장을 사용하는 것 또는 칼슘 격리를 포함하지 않는 다른 혈장 샘플 유형을 사용 또는 (iv) 예를 들어 혈액 샘플의 염색질 단편에 있는 단백질 및/또는 DNA를 가교 결합하여 전사 인자-DNA 복합체의 분리를 방지.
- [0287] 일 구체예에 있어서, 체액 샘플은 혈청 샘플이다. 혈청은 백혈구에서 유래된 오염성 염색질 물질(예를 들어, NET)을 포함하는 것으로 생각된다. 이 오염은 cfDNA 분석을 방해하므로 혈청은 ctDNA 방법에 가장 일반적으로 사용되는 샘플 매트릭스이다. 그러나, DNA 분석 전에 존재하는 다른 염색질 물질로부터 전사 인자를 포함하는 염색질 단편을 분리하면 이러한 간섭이 제거된다. 더욱이, 염색질 물질에 의한 혈청의 오염은 응고에 의해 유발된 혈액 샘플에서 호중구 세포에 의한 호중구 세포의 트랩(NET)의 형성 결과이다(알려진 네토시스 유도제). 전혈을 포함하는 혈청 샘플 수집 튜브가 예를 들어 정맥 천자 후 15-60분과 같이 적시에 처리된다면 오염된 NET 물질은 작은 염색질 단편이 아닌 큰 염색질이 될 것이며 작은 전사 인자-DNA 복합체의 분석을 방해하지 않을 것이다. 따라서, 사용될 수 있는 샘플 유형을 넓히는 것이 본 발명의 방법의 또 다른 이점이다.
- [0288] 혈청 내 오염된 NET의 존재는 혈청 혈액 수집 튜브에 네토시스 저해제를 추가하여 더 최소화하거나 제거될 수 있다. 이는 네토시스를 방지함으로써 혈청 샘플에 존재하는 배경 염색질 수준을 최소화한다. 네토시스의 많은

저해제가 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 저해제는 안트라사이클린계 약물, 특히 독소루비신을 포함한다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 다음 단계를 포함하는, 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 혈청 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출하는 방법이 제공된다:

- [0289] (i) 혈청 채취관에 대상체로부터 전혈 시료를 채취하는 단계;
 - [0290] (ii) 전혈 샘플을 네토시스의 저해제와 접촉시키는 것;
 - [0291] (iii) 전혈 샘플에서 혈청 샘플을 분리하는 단계;
 - [0292] (iv) 혈청 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
 - [0293] (v) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출 또는 측정하는 단계; 및
 - [0294] (vi) 혈청 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 양의 척도로서 DNA 단편의 존재 또는 양 또는 서열을 사용하는 단계.
- [0295] 또한, 본 발명의 본 구체예는 본원에서 기술한 바와 같이 대상체의 질환 상태의 지표로서 정보를 제공하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0296] 일 구체예에 있어서, 채취 샘플은 EDTA 혈장 또는 구연산염 혈장과 같은 칼슘 격리제를 사용하여 생성된 혈장 샘플을 포함하는 임의의 혈장 샘플이며, 여기서 혈장 샘플은 전혈 샘플을 가교제와 접촉시켜 얻어진다. 가교제는 (1) 전혈 샘플을 가교제와 접촉시키는 단계; (2) 가교된 샘플을 칼슘 이온 킬레이트제와 접촉시키는 단계; 및 (3) 샘플로부터 혈장을 분리하는 단계와 관련되는 방법의 첫 단계에서 전혈과 접촉될 수 있다.
- [0297] 가교는 당업계에 잘 알려진 기술이다. 가장 일반적으로 사용되는 가교제는 단백질 분자를 서로 결합하고 DNA에 결합시키는 포르말데히드이다. 그러나, 과도한 가교는 전사 인자의 항체 결합 에피토프 구조의 변화 (따라서 항체 결합의 상실)와 분리된 단백질 분자 또는 복합체에 대한 전사 인자의 교차 결합으로 이어질 수 있다. 이를 방지하기 위해 포르말데히드를 첨가한 후 예를 들어 과량의 글리신 또는 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(TRIS)을 첨가하여 가교를 몇 초 또는 몇 분 후에 중단하여 더 이상의 가교를 중단한다. 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체로부터 채취한 혈액 샘플에서 전사 인자 및 관련 DNA 단편을 함유하는 염색질 단편을 검출, 분석 또는 측정하는 방법이 제공된다:
- [0298] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 가교제와 접촉시키는 단계;
 - [0299] (ii) 선택적으로 추가 가교를 중단시키기 위해 켄칭제를 첨가하는 단계;
 - [0300] (iii) 샘플을 칼슘 이온 킬레이트제와 접촉시키는 단계;
 - [0301] (iv) 샘플로부터 혈장을 분리하는 단계;
 - [0302] (v) 혈장 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
 - [0303] (vi) 전사 인자를 포함하는 결합된 염색질 단편을 분리하는 단계; 및
 - [0304] (vii) 분리된 염색질 단편을 (예를 들어, 본원에 기술된 방법에 의해) 분석하는 단계.
- [0305] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0306] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 가교제와 접촉시키는 단계;
 - [0307] (ii) 추가 가교를 중지하기 위해 선택적으로 켄칭제를 첨가하는 단계;
 - [0308] (iii) 샘플을 칼슘 이온 킬레이트제와 접촉시키는 단계;
 - [0309] (iv) 샘플로부터 혈장을 분리하는 단계;
 - [0310] (v) 혈장 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
 - [0311] (vi) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
 - [0312] (vii) 분리된 DNA를 PCR 방법으로 선택적으로 증폭하는 단계;
 - [0313] (viii) DNA의 양 및/또는 서열을 결정하는 단계; 및

- [0314] (ix) 대상체의 질환 상태를 검출하기 위한 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및/또는 관련된 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0315] 바람직한 구체예에 있어서, 포름알데히드 또는 포름알데히드 방출제가 가교제로서 사용된다. 일 구체예에 있어서, EDTA는 응고를 방지하기 위한 칼슘 이온의 킬레이트제로서 사용된다. 바람직한 구체예에 있어서, 포름알데히드는 예를 들어 이미 포름알데히드를 함유하고 있는 튜브에 전혈 샘플을 첨가함으로써 전혈 샘플의 수집 직후에 전혈에 첨가된다. 튜브는 가고 반응이 진행되도록 충분한 시간 동안 방치한 다음, 혈장 성분의 과도한 가교를 방지하기 위해 소광제를 첨가하여 반응을 중단한다. 소광제는 일반적으로 포름 알데히드와 반응하는 글리신 또는 TRIS와 같은 아민 화합물이다. 소광제는 예를 들어 TRIS 완충제에 글리신과 EDTA 용액을 첨가하여 EDTA와 함께 첨가할 수 있다. 그런 다음, 전혈 샘플을 원심분리하고 가고된 전사 인자 결합 DNA 복합체를 함유하는 혈장을 본 발명의 방법에 의한 분석을 위해 분리한다.
- [0316] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0317] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 가교제와 접촉시키는 단계;
- [0318] (ii) 전혈 샘플을 켄칭제 및 칼슘 이온 킬레이트제와 접촉시키는 단계;
- [0319] (iii) 단계 (ii)에서 샘플로부터 생성된 혈장을 분리하는 단계;
- [0320] (iv) 혈장 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0321] (v) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0322] (vi) 분리된 DNA를 선택적으로 증폭하는 단계;
- [0323] (vii) DNA의 양 및/또는 서열을 결정하는 단계; 및
- [0324] (viii) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 검출하기 위한 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및/또는 관련된 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0325] 위에서 논의한 바와 같이, 순환계에 존재하는 전사 인자는 DNA와 일시적으로 결합하고 역동적인 방식으로 분리하는 것보다 DNA에 안정적으로 결합하는 것일 가능성이 크다. 전사 인자를 포함하여 가장 안정적으로 결합된 DNA 순환 염색질 단편의 경우, 전체 배양 세포 또는 조직 샘플에서 포름알데히드와의 가교가 빠르고 1~2분 미만 이 소요된다. 우리는 포름알데히드가 확산되어 세포 내로 유입된 후 핵으로 유입된 후 염색질의 가교에 1~2분이 소요될 수 있지만, 염색질 단편은 용액에서 자유롭고 가교에 즉시 접근가능한 전혈 맥락에서 이 시간이 단축될 수 있다고 추론하였다. 사용되는 가교제는 포름알데히드이거나 포름알데히드 방출제(포름알데히드 방출제, 포름알데히드 공여체 또는 포름알데히드 방출 보존제라고도 함)일 수 있다. 포름알데히드 방출제는 포름알데히드를 천천히 방출하는 모이어티이다. 많은 포름알데히드 방출제가 당업계에 공지되어 있고 화장품 산업, 예를 들어 독성으로 인해 높은 수준의 포름알데히드를 피하지만 방출에 의해 낮은 보호 수준이 유지되는 스킨 케어 및 헤어 케어 제품에서 향미생물 방부제로 일반적으로 사용된다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 가교제는 포름알데히드 방출제이다.
- [0326] 우리는 (세포 또는 조직과 반대되는 것으로서) 전혈에서 세포 유리 순환 전사 인자-DNA 복합체의 가교가 빠르고 징크 핑거 단백질의 아연 고갈보다 더 빠르게 발생할 수 있다고 추론하였다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서 가교제를 칼슘 이온 킬레이트제와 동시에 첨가할 수 있다. EDTA와 포름알데히드 방출제를 모두 포함하는 혈액 수집 튜브(BCT)는 예를 들어 Streck Inc.에서 구입할 수 있는 Cell-Free DNA BCT와 같이 시중에서 구입할 수 있다. 이러한 튜브에 추가된 전혈은 EDTA와 가교제에 동시에 노출된다.
- [0327] 우리는 다양한 EDTA 샘플 제조 방법을 사용하여 여러 실험을 수행하였다. 예를 들어, 에스트로겐 수용체(ER)는 징크 핑거 전사 인자이다. ELISA 방법을 사용하여 (일반) EDTA 혈장 샘플에 존재하는 ER 수준을 측정하였다. ER은 도 5에 나타난 바와 같이 감지할 수 있다. 우리는 EDTA 혈장 샘플에서 ER을 면역침강하고 고상에 결합된 DNA를 추출하고 추출물에 존재하는 DNA를 증폭하였다. 그러나, 증폭된 샘플에서는 DNA가 관찰되지 않았다. 우리는 이것이 EDTA 혈장에서 ER-DNA 복합체가 분리되었기 때문이라고 추론하였다.
- [0328] CTCF (또는 CCCTC- 결합인자로 명명됨)는 진화적으로 보존된 징크 핑거 전사인자로서 11개의 징크 핑거 조합을 통해 게놈의 많은 부위에 결합하고 게놈 기능에 중요한 역할을 한다. 인간 게놈에서 CTCF 결합 부위를 조사한 결과 19개의 서로 다른 세포 유형에 걸쳐 77,811개의 별개의 결합 부위가 확인되었다(Wang et al., 2012).

77,811개의 결합 부위 중 27,662개가 조사된 모든 19개 세포 유형에서 점유된 것으로 밝혀졌다. 나머지 50,149개의 결합 부위의 CTCF 결합은 조직 특이성을 나타냈다. 조사된 19개 세포 유형에는 12개의 정상 세포 유형과 결장직장암(Caco-2), 자궁경부암(HeLa-S3), 간세포암(HepG2), 신경모세포종(SK-N-SH_RA), 망막모세포종(WERI-RB-1) 및 EBV-형질전환된 림프성형질체(GM06990)를 나타내는 7개의 암 또는 EBV 불멸화 세포주가 포함되었다. 1,236 결합 부위에서의 CTCF 결합은 암 세포주에 특이적인 것으로 밝혀졌으며, 이러한 결합 부위의 점유는 상피, 섬유아세포 및 내피를 포함한 정상 세포와 불멸 및 암 세포주를 구별하였다(Liu et al., 2017).

[0329] 우리는 마우스 항-CTCF 항체를 사용하여 암을 앓고 있는 것으로 진단된 18명의 대상체로부터 수집된 4개의 폴가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집)에서 CTCF-DNA를 면역침강하였다. 고체상 지지체에서 ChIP에 의해 분리된 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 7의 결과는 약 140kD의 분자량에서 CTCF에 해당하는 단백질 밴드가 폴딩된 4개의 모든 샘플에 존재한다는 것을 보여준다(그러나, 항-CTCF 항체 대신에 비특이적 마우스 IgG를 사용하는 대조군 실험에서는 그렇지 않음). 약 50kD의 밴드는 ChIP에 사용된 마우스 항-CTCF 항체의 중쇄에 대한 웨스턴 블롯에 사용된 표지된 항-마우스 IgG 항체의 결합에 해당한다.

[0330] 그런 다음, 유방암을 앓고 있는 것으로 진단된 대상체로부터 수집한 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집)을 사용하여 CTCF-DNA 복합체를 면역침강시키는 ChIP 방법을 반복하였다. 고체상 지지체에서 cfDNA 단편을 추출하고, 추출된 DNA 단편을 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 연결하고, 존재하는 cfDNA를 증폭하였다. 증폭된 cfDNA 라이브러리를 전기영동으로 분석했고, 전기영동 결과(도 8)는 라이브러리가 35-80bp 범위의 작은 단편을 포함하고 있음을 보여주었다(이는 어댑터 연결된 단편을 설명하기 위해 x축에서 175-220bp 사이의 피크에 해당). 어댑터 연결된 cfDNA 단편의 주요 피크는 대략 50bp 길이에서 관찰되었다(이는 어댑터 연결된 단편 길이를 설명하기 위해 x축에서 190bp의 피크에 해당). 증폭된 cfDNA 라이브러리에는 35-80bp 범위의 작은 단편이 포함되어 있지만 비특이적 마우스 IgG로 코팅된 고체 지지체에서 증폭된 추출물에 대해서도 작은 DNA 단편이 얻어졌기 때문에 이러한 모든 단편이 샘플의 CTCF에 결합되지는 않았다. 그러나, 특정 항-CTCF 항체 ChIP(1000 형광 단위(FU))로 얻은 특정 피크는 비특이 IgG 피크(80 FU)보다 높았다.

[0331] 항-CTCF 면역침강을 사용하여 분리된 증폭된 cfDNA 라이브러리는 차세대 시퀀싱 방법으로 시퀀싱되었다. CRC 진단을 받은 환자로부터 수집한 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집)에서 준비한 증폭 라이브러리의 결과는 도 9에서 보여준다. 우리는 9780개의 공개된 CTCF TFBS 시퀀스의 작은 cfDNA 단편 결합의 강화를 관찰하였다(Kelly et al., 2012). 대조적으로, 비특이적 마우스 IgG에 결합하기 위해 얻은 cfDNA 라이브러리는 강화를 나타내지 않았다. 입력 비특이적 제어를 참조하여 cfDNA 단편 서열의 피크 콜링은 CTCF가 가장 많은 TFBS 서열 단편을 갖는 전사 인자로 귀착되었다. 우리는 본 발명의 방법이 혈장 내 전사 인자의 ChIP-Seq에 대해 성공적이라는 결론을 내린다.

[0332] 안드로겐 수용체(AR)는 전립선암에서 흥미로운 징크 핑거 전사인자이다. 본 발명의 방법이 CTCF보다 덜 풍부한 전사 인자에 적용될 수 있음을 보여주기 위해, 동일한 방법을 AR에 적용하였다. 우리는 마우스 항-AR 항체를 사용하여 전립선암으로 진단된 8명의 대상체로부터 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집)로부터 AR을 면역침강시켰다. LnCAP 전립선 암 세포주 세포의 AR을 양성 대조군으로 사용하여 고체상 지지체에서 ChIP에 의해 분리된 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 11의 결과는 약 10kD의 분자량에서 AR에 해당하는 단백질 밴드가 모든 8개 샘플에 존재하고 특히 2개 샘플(도 11의 레인 2 및 3)에서 강하다는 것을 보여주었다. 약 50kD의 밴드는 ChIP에 사용된 마우스 항-AR 항체의 중쇄에 표지된 항-마우스 IgG 항체의 결합에 해당한다. 그런 다음, 고체상 지지체에서 DNA를 추출하고 추출된 DNA 단편을 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 연결하고 존재하는 DNA를 증폭하였다. 도 12의 결과는 증폭된 cfDNA 라이브러리가 35-80bp 범위의 작은 단편을 포함하고 있음을 보여준다(위와 같이, 어댑터 연결된 단편의 경우 175-220bp에서 피크가 나타남). 증폭된 cfDNA 라이브러리에는 35-80bp 범위의 작은 단편이 포함되어 있지만, 비특이적 마우스 IgG로 코팅된 고체 지지체에서 증폭된 추출물에 대해서도 작은 DNA 단편이 얻어졌기 때문에 이러한 모든 단편이 샘플의 AR에 결합되지는 않았다. 그런 다음, 웨스턴에서 가장 높은 AR 수준을 관찰한 2개 샘플에 대해 얻은 증폭된 cfDNA 라이브러리를 차세대 시퀀싱으로 시퀀싱하였다.

[0333] 분리된 전사 인자-DNA 복합체

[0334] 본 발명의 이전 측면은 DNA에 직접 또는 간접적으로 결합된 전사 인자를 포함하는 염색질 단편을 검출, 측정 또는 특성화하는 방법이다. 본 발명의 일 구체예에서, 대상체로부터 취한 체액 샘플에서 DNA 결합되지 않은 전사 인자(즉, 유리 또는 결합되지 않은 전사 인자)를 검출하는 방법이 있다. 유리 전사 인자의 검출은 선택적으로 플랭킹 서열을 포함하는 전사 인자의 TFBS DNA 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 유리 전사 인자에 대한

결합제로서 사용함으로써 수행될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 결합된 유리 전사 인자는 예를 들어 표지된 항-전사 인자 항체를 사용하여 검출될 수 있다(예를 들어, Active Motif, 2006 참조). 전사 인자는 초기에 예를 들어 인산화에 의해 번역 후 활성화될 수 있는 비활성 형태로 생산될 수 있다. 활성화 전사 인자 형태는 TFBS 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 결합한다. 비활성 전사 인자 형태는 그들의 TFBS 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 결합하지 않는다(Lee et al., 2007). 따라서, 활성의 유리 전사 인자는 전사 인자가 결합하는 DNA 서열, 예를 들어 전사 인자의 TFBS 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 대한 유리 전사 인자의 결합을 수반하는 검정을 사용, 이어서, 제2 전사 인자 결합제, 예를 들어 전사 인자에 특이적으로 결합하도록 지시된 항-전사 인자 항체의 첨가 및 샘플에서 존재하는 활성 유리 전사 인자의 존재 또는 양의 척도로서 항체 결합의 존재 또는 정도를 사용하여 체액 샘플에서 검출될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 자유 전사 인자를 검출하는 방법이 제공된다:

- [0335] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계;
- [0336] (ii) 올리고뉴클레오타이드 결합된 전사 인자를 분리하는 단계;
- [0337] (iii) 분리된 전사 인자를 전사 인자에 결합하는 제2 결합제와 접촉시키는 단계; 및
- [0338] (iv) 샘플에서 세포 유리 전사 인자의 양의 척도로서 전사 인자에 대한 제2 결합제의 존재 또는 정도를 사용하는 단계.
- [0339] 바람직한 구체예에서 유리 전사 인자에 결합하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 TFBS 서열을 포함한다. 바람직한 구체예에서 유리 전사 인자에 결합하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 고상 지지체에 부착된다. 바람직한 구체예에서 제2 결합제는 항체이다. 바람직한 구체예에서 제2 결합제는 고상 올리고뉴클레오타이드 결합된 전사 인자에 대한 그의 결합이 용이하게 검출 및/또는 정량화될 수 있도록 표지된다.
- [0340] 일 구체예에 있어서, 징크 핑거 전사 인자에 대한 올리고뉴클레오타이드의 결합을 용이하게 하기 위해 아연 이온이 샘플에 첨가된다. 아연 이온은 단계 (i)에서 올리고뉴클레오타이드의 첨가와 동시에 또는 단계 (i) 전에 첨가될 수 있다.
- [0341] 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0342] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계;
- [0343] (ii) 올리고뉴클레오타이드 결합된 전사 인자를 분리하는 단계;
- [0344] (iii) 분리된 전사 인자를 전사 인자에 결합하는 제2 결합제와 접촉시키는 단계; 및
- [0345] (iv) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 성질의 지표로서 전사 인자에 대한 제2 결합제의 존재 또는 결합 정도를 사용하는 단계.
- [0346] 일 구체예에 있어서, 대상체로부터 취한 체액 샘플을 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 하나 이상의 전사 인자에 결합하는데 특이적인 TFBS 서열)와 접촉시켜 질환의 존재 및/또는 성질을 확인한다. 추가적인 구체예에 있어서, 방법은 하나 이상의 질환에 대해 시험하기 위해 다중 검정(즉, 하나 초과)의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 바람직하게는 각각의 올리고뉴클레오타이드가 상이한 전사 인자에 대해 특이적임을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 선택적으로 많은 암에서 발현되는 전사 인자에 추가하여 하나 이상의 암 질환에 대해 각각 특이적인 다중 전사 인자에 대한 테스트는 단일 혈액 검사에서 암 조직을 확인하는 것 외에도 많은 다른 암 질환의 검출을 위한 테스트를 가능하게 한다. 다중 테스트를 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 제한 없이 단일 샘플에서 다수의 다중 분석을 수행하는데 사용할 수 있는 DNA 마이크로어레이 방법 또는 Luminex Corporation의 다중 비드 시스템이 있다(Dunbar, 2006).
- [0347] 바람직한 구체예에서, 질환은 암이다. 추가적인 구체예에 있어서, 질환의 성질은 암에 의해 영향을 받는 조직이다.
- [0348] 에스트로겐 수용체(ER)는 리간드 활성화 핵 호르몬 수용체 징크 핑거 전사 인자이다. 우리는 징크 핑거 전사 인자와 DNA 단편을 포함하는 혈액 내 순환 염색질 단편이 EDTA 혈장 샘플에서 파괴될 가능성이 있다고 추론하였다. 우리는 에스트로겐 수용체의 과발현과 관련되는 부인과 암 환자뿐만 아니라 ER 음성 유방암 환자로

부터 채취한 혈청 샘플에서 유리 (즉, DNA에 결합하지 않음) 에스트로겐 수용체 알파(ER α)에 대한 Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 수행하였다. ER은 많은 유전자의 전사 조절에 관여하며, 여성 생식 조직 및 생식 암 조직에서 높게 발현된다. ER은 조혈 세포에서 낮은 수준으로 발현되지만 ER 양성 유방암 및 난소암 세포에서는 높게 발현된다. ER-양성 암 세포는 에스트로겐 수용체를 가지고 있고, 에스트로겐에 민감하며 그들의 성장은 에스트로겐에 의해 자극된다. ER-음성 암세포는 에스트로겐 수용체가 없으며 에스트로겐에 둔감하다. 난소암과 유방암의 약 80%가 ER 양성이다. ER 양성 암은 ER 음성 암보다 더 나은 예후와 관련이 있다. ER-양성 암은 에스트로겐에 대한 반응으로 성장하기 때문에 에스트로겐에 결합하여 에스트로겐 수용체의 활성화를 억제하여 암 성장을 방지하는 타목시펜 및 아로마타제 저해제를 포함한 호르몬 요법에 순응한다.

[0349] 암의 ER 양성 또는 음성 상태는 외과적으로 제거된 암 조직의 면역조직화학 검사에 의해 결정된다. 전형적으로, ER에 결합하는 표지된 항체는 암 세포/조직과 함께 배양되고, 관찰된 항체 염색 수준이 상태를 결정한다. ER 양성 암에는 ER 점수가 지정된다. 호르몬 수용체에 양성 반응을 보이는 암세포의 비율과 염색 강도를 측정한다. 두 매개변수를 결합하여 샘플에 0에서 8까지의 점수를 매긴다. 더 높은 강도에서 볼 수 있는 더 많은 수용체가 있는 샘플이 더 높은 점수를 받는다.

[0350] 핵 호르몬 수용체는 세포 단백질이기에 때문에 ER은 순환계에 존재할 것으로 예상되지 않는다. 우리는 혈장에 존재하는 임의의 유리 ER α 가 ER α 를 포함하지만 혈장을 만들기 위해 EDTA를 첨가할 때 DNA 결합으로부터 유리 ER α 를 방출하기 위해 해리되는 순환하는 염색질 단편에서 유래해야 한다는 가설을 세웠다. 우리는 그러한 염색질 단편의 수준이 사라질 정도로 낮을 것으로 예상했기 때문에 혈장의 자유 ER α 수준이 ELISA 방법으로는 감지할 수 없고 사용된 ELISA의 최소 민감도(0.8pg/ml) 미만일 것으로 예상하였다. 놀랍게도 우리는 유리 ER α 가 최대 20pg/ml 수준으로 혈장에 존재한다는 것을 발견하였다(도 5). 이를 문헌에 나타내기 위해 인터류킨-6 및 종양 괴사 인자는 일반적으로 정상 범위가 각각 약 5-15pg/ml 및 최대 8pg/ml인 혈액 바이오마커로 측정된다. 또한, ER α 의 측정된 수준은 ER-음성 유방암보다 난소암 및 ER-양성 유방암에서 더 높았으며, 이는 ER α 에 대한 종양 기원을 나타낸다.

[0351] 따라서, 본 발명의 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 생물학적 샘플에서 징크 핑거 전사 인자의 존재를 검출하거나, 수준을 측정하는 방법이 제공된다:

[0352] (i) 샘플을 아연 이온 킬레이트 시약과 접촉시키는 단계; 및

[0353] (ii) 대체된 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 수준에 대해 샘플을 분석하는 단계.

[0354] 일 구체예에 있어서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 체액 샘플이다. 추가적인 구체예에서, 아연 이온 킬레이트 시약은 EDTA이다. 징크 핑거-DNA 결합을 방해하기 위해 EDTA를 체액 샘플에 첨가할 수 있다.

[0355] 바람직한 구체예에서, 생물학적 샘플은 전혈 샘플이고, 아연 이온 킬레이트 시약은 징크 핑거-DNA 결합을 방해할 뿐만 아니라 혈액 응고를 방지하여 유리 징크 핑거 전사 인자를 포함하는 혈장 샘플을 생성하기 위해 전혈 샘플에 첨가되는 EDTA이다. 전사 인자에 대한 샘플 분석을 위해 임의의 방법을 사용할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 사용되는 분석 방법은 면역분석법, 특히 2-부위 "샌드위치" 면역분석법이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 다음의 단계를 포함하는 대상체로부터 채취한 전혈 샘플에서 징크 핑거 전사 인자를 함유하는 순환 염색질 단편의 존재를 검출하거나 그 수준을 측정하는 방법이 제공된다:

[0356] (i) 전혈 샘플을 EDTA와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계; 및

[0357] (ii) 면역분석 방법을 사용하여 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 수준에 대해 혈장 샘플을 분석하는 단계.

[0358] 징크 핑거 전사 인자 패밀리는 가장 풍부한 전사 인자 패밀리이다. 따라서, 본 발명의 이러한 측면은 대부분의 관심 전사 인자를 검출하는 데 사용될 수 있다. 용어 "징크 핑거 전사 인자"는 징크 핑거-결합 도메인을 포함하는 임의의 전사 인자를 의미한다.

[0359] 순환하는 징크 핑거 전사 인자는 질환의 검출, 예를 들어 부인과 암의 검출, 진단, 치료 선택, 모니터링 또는 예후를 위한 바이오마커로 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 다음의 단계를 포함하는 예를 들어 대상체에서 질환의 검출, 진단, 치료 선택, 모니터링 또는 예후를 위해 대상의 질환 상태를 결정하기 위한 방법이 제공된다:

[0360] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계;

[0361] (ii) 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 수준에 대해 혈장 샘플을 분석하는 단계; 및

- [0362] (iii) 시료 내 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 수준을 대상체의 질환 상태의 지표로 사용하는 단계.
- [0363] 또한, 본 발명의 이러한 측면은 세포 배양 방법과 함께 사용하기에 적합하다. 전사 인자에 대한 염색질 면역침강(ChIP) 방법은 복잡하고 어렵고 시간이 많이 걸리며 강력하지 않다. 일반적인 ChIP 방법은 세포에서 염색질 물질 추출, DNA 소화 또는 초음파 처리와 같은 물리적 방법을 사용하여 염색질 단편화, 항체를 사용하여 염색질 단편 분리, 항체와 결합된 DNA 추출 및 추출된 DNA의 DNA 서열 결정과 관련된다. 본 발명의 방법을 사용하여, 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 양이 세포로부터 염색질 물질을 EDTA (또는 다른 아연 킬레이트제)를 함유하는 액체로 추출되고, (예를 들어, ELISA에 의해) 유리 징크 핑거 전사 인자를 측정함으로써 확립될 수 있다.
- [0364] 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 양에 대한 샘플 분석에는 질량 분석법 및 임의의 면역화학적 방법을 포함하지 않는 제한되지 않는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 징크 핑거 전사 인자의 존재 또는 양에 대한 샘플 분석에 사용되는 방법은 면역분석법이다.
- [0365] 징크 핑거 전사 인자를 포함한 염색질 단편을 포함하는 샘플에 아연 이온 킬레이트제를 첨가하면 염색질 단편이 파괴되어 유리 징크 핑거 전사 인자를 생성하고, EDTA는 (칼슘뿐만 아니라) 아연 이온의 강한 킬레이터인 것을 발견하였으므로, 징크 핑거 전사 인자 결합 DNA는 항체 (또는 다른 전사 인자 결합제)로 전사 인자를 분리하고, 전사 인자와 관련된 DNA를 분석하는 방법을 사용하여 EDTA 혈장 샘플에서 조사할 수 없다는 것이, DNA는 더 이상 전사 인자와 연결되지 않기 때문에, 분명할 것이다.
- [0366] DNA에 결합하는 징크 핑거 전사 인자의 파괴는 유리 징크 핑거 전사 인자 및 TFBS의 서열 및 계층의 플랭킹 DNA 서열을 포함하는 유리 DNA 단편 둘 다를 이어질 것임을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 징크 핑거 전사 인자를 함유하는 순환 염색질 단편 또는 징크 핑거 전사 인자에 결합된 DNA 단편의 서열(들)을 포함하는 대상체의 존재를 확인하는 방법이 제공된다:
- [0367] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계; 및
- [0368] (ii) 전사 인자 결합 부위 서열 또는 징크 핑거 전사 인자 결합 부위에 대한 플랭킹 서열을 포함하는 DNA 서열을 함유하는 유리 DNA 단편의 존재 또는 수준에 대해 혈장 샘플을 분석하는 단계.
- [0369] 전사 인자 및 관련된 TFBS를 함유하는 염색질 단편의 존재는 본원에 기술된 바와 같은 질환의 검출, 모니터링, 예후 또는 치료 선택을 포함하는 임상 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 다음의 단계를 포함하는 예를 들어 질환의 검출, 모니터링, 예후 또는 치료 선택을 위해 대상체의 질환 상태를 결정하는 방법이 제공된다:
- [0370] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계;
- [0371] (ii) 전사 인자 결합 부위 서열 또는 징크 핑거 전사 인자 결합 부위에 대한 플랭킹 서열을 포함하는 DNA 서열을 함유하는 유리 DNA 단편의 존재 또는 수준에 대해 혈장 샘플을 분석하는 단계; 및
- [0372] (iii) 샘플 내 DNA 단편의 존재 및/또는 수준 및/또는 서열을 대상체의 질환 상태의 지표로 사용하는 단계.
- [0373] 혈장 또는 다른 샘플의 뉴클레오솜 또는 다른 단백질 결합 DNA 단편 중 유리 DNA 단편의 존재 및/또는 서열은 샘플의 DNA 단편에 결합하기 위한 상보적 DNA 서열의 사용을 포함하는 여러 수단에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 이것은 다중 서열에 대한 샘플의 동시 탐색을 용이하게 하는 DNA 칩의 사용에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 또 다른 구체예는 특이적 DNA 결합제로서 외인성 징크 핑거 전사 인자의 사용을 포함한다. 이 방법에서는 아연 킬레이트제가 제거되어 징크 핑거 전사 인자가 DNA에 결합하는 것을 촉진한다. 이것은 버퍼 교환, 예를 들어 투석에 의해 또는 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여, 예를 들어 세포택스 크기 배제 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 수행할 수 있다. 징크 핑거 전사 인자의 TFBS를 포함하는 DNA 단편은 예를 들어 TFBS를 포함하는 유리 DNA에 대한 결합제로서 고상 결합된 전사 인자를 사용함으로써 분리될 수 있다. 분리된 DNA는 서열 및/또는 DNA 단편 길이에 대해 분석될 수 있다. 재조합 전사 인자 단백질은 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 재조합 징크 핑거 전사 인자 단백질은 고상 지지체에 연결되거나 링커 모이어티를 포함할 수 있으며 전사 인자는 액체 형태로 사용되며 연결 시스템을 통해 분리될 수 있다. 많은 그러한 연결 샘플이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 징크 핑거 전사 인자는 비오틀화되고 고상 스트렙타비딘을 사용하여 분리될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 다음의 단계를 포함하는 대상체에서 징크 핑거 전사 인자를 함유하는 순환 염색질 단편의 존재 및/또는 징크 핑거 전사 인자에 결합된 DNA 단편의 서열(들)을 확인하는 방법이 제공된다:
- [0374] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계;

- [0375] (ii) 샘플에서 아연 킬레이트제를 제거하는 단계;
- [0376] (iii) 샘플을 외인성 징크 핑거 전사 인자와 접촉시키는 단계; 및
- [0377] (iv) 외인성 전사 인자에 의해 결합된 DNA 단편을 분석하는 단계.
- [0378] 대안적으로 또는 추가적으로, 아연 킬레이트제는 샘플에서 단순히 불활성화될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 아연 킬레이트제는 외인성 전사 인자와 접촉하기 전에 과량의 이온, 바람직하게는 아연 이온의 첨가에 의해 불활성화된다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 다음의 단계를 포함하는 대상체에서 징크 핑거 전사 인자를 함유하는 순환 염색질 단편의 존재 및/또는 징크 핑거 전사 인자에 결합된 DNA 단편의 서열(들)을 확인하는 방법이 제공된다:
- [0379] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계;
- [0380] (ii) 과량의 아연 또는 기타 이온을 첨가하여 샘플에서 아연 킬레이트제를 비활성화하는 단계;
- [0381] (iii) 샘플을 외인성 징크 핑거 전사 인자와 접촉시키는 단계; 및
- [0382] (iv) 외인성 전사 인자에 의해 결합된 DNA 단편을 분석하는 단계.
- [0383] 전사 인자 및 관련된 TFBS를 함유하는 염색질 단편의 존재는 본원에 기술된 바와 같은 질환의 검출, 모니터링, 예후 또는 치료 선택을 포함하는 임상 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 다음의 단계를 포함하는, 예를 들어 질환의 검출, 모니터링, 예후 또는 치료 선택을 위해 대상체의 질환 상태를 결정하는 방법이 제공된다:
- [0384] (i) 대상체로부터 얻은 혈액 샘플을 아연 킬레이트제와 접촉시켜 혈장 샘플을 생성하는 단계;
- [0385] (ii) 샘플에서 아연 킬레이트제를 제거하거나 불활성화하는 단계;
- [0386] (iii) 샘플을 외인성 징크 핑거 전사 인자와 접촉시키는 단계;
- [0387] (iv) 외인성 전사 인자에 의해 결합된 DNA 단편을 분석하는 단계; 및
- [0388] (v) 대상체의 질환 상태의 지표로서 샘플 내 DNA 단편의 존재 및/또는 수준 및/또는 서열을 사용하는 단계.
- [0389] **세포 유리 뉴클레오솜 제거**
- [0390] 샘플 준비는 선택적으로 분석 전에 샘플에서 대부분의 뉴클레오솜 및 뉴클레오솜 결합 DNA를 제거하기 위한 사전 정제 단계를 포함할 수 있다. 이는 배경 신호를 감소시키고, 전사 인자 결합된 관심 DNA 단편의 분리 및 증폭 효율을 개선하고, 본 발명의 방법의 분석적 및 임상적 민감도를 개선할 수 있다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 체액 샘플로부터 세포 유리 뉴클레오솜을 제거하는 것을 추가로 포함한다. 뉴클레오솜을 포함하는 염색질 단편은 본원에 기술된 본 발명의 방법을 사용하기 전에 샘플로부터 제거될 수 있다(선택적으로 별도로 분석됨). 이 준비 단계의 목적은 샘플에서 대량의 DNA 단편을 제거하여 분석에서 생성할 수 있는 배경 신호를 낮추는 것이다. 이는 예를 들어 W02021038010에 기술된 단백질과 같은 뉴클레오솜 결합 단백질 또는 항체를 포함하는 고상 항-뉴클레오솜 결합제와 같은 뉴클레오솜에 결합하는 결합제와 샘플을 접촉시킴으로써(제한 없이) 수행될 수 있다. 항체는 히스톤 단백질, 예를 들어 H2A, H2B, H3 또는 H4와 같은 코어 히스톤 단백질 또는 H1과 같은 링커 히스톤 단백질에 선택적으로 결합할 수 있다. 히스톤 단백질에 대한 언급에는 히스톤 번역 후 수정 및 히스톤 변이체 또는 동형이 포함된다. 뉴클레오솜 결합 단백질은 링커 DNA에 결합하는 염색질 결합 단백질 또는 뉴클레오솜 관련 링커 DNA에 결합하는 단백질로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 링커 DNA에 결합하는 염색질 결합 단백질은 크로모도메인 헬리카제 DNA 결합(CHD) 단백질; DNA(시토신-5)-메틸트랜스퍼라제(DNMT) 단백질; 고 이동성 그룹 박스 단백질(HMGB) 단백질; 폴리[ADP-리보스] 중합효소(PARP) 단백질; 또는 MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 또는 Methyl CpG 결합 단백질 2(MECP2)와 같은 Methyl-CpG 결합 도메인(MBD) 단백질로부터 선택될 수 있다. 뉴클레오솜 관련 링커 DNA에 결합하는 단백질은 히스톤 H1, macroH2A(mH2A) 또는 이의 단편 또는 조작된 유사체로부터 선택될 수 있다.
- [0391] 샘플에 존재하는 모든 또는 대부분의 뉴클레오솜 물질은 (예를 들어, 고체상 상에) 흡착되어 샘플에서 제거될 수 있다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 체액 샘플을 뉴클레오솜 또는 그의 성분에 결합하는 결합제와 접촉시키고, 샘플을 전사 인자 결합제와 접촉시키기 전에 결합제에 결합된 샘플을 제거하는 것을 포함한다.
- [0392] 혈장에서 길이가 100bp 미만인 짧은 cfDNA 단편의 많은 부분 또는 대부분이 조절 단백질을 포함하는 염색질 단

편에서 과생되지 않고 하나 또는 양 DNA 가닥에서 Nicking되거나 파손된 뉴클레오솜 관련 DNA에서 과생되는 것으로 보고되었다. 이 경우 짧은 cfDNA 단편은, 예를 들어, 단일 150bp cfDNA 단편이 아닌 2개 이상의 더 작은 cfDNA 단편 (예를 들어, 75bp의 2개 단편)을 생성하기 위해 하나 이상의 위치에서 Nicking되는 뉴클레오솜과 관련된 150bp DNA 단편을 나타낼 수 있다(Sanchez et al., 2018). 따라서, 샘플을 전사 인자 결합체에 노출시키기 전에 샘플로부터 뉴클레오솜을 제거하면 뉴클레오솜 관련 Nick DNA에서 유래하는 100bp 미만의 짧은 cfDNA 단편을 제거하는 추가 이점이 있다. 이는 예를 들어 겔 분리 방법에 의한 추출된 cfDNA 단편의 크기 분리와 비교하여 샘플에서 뉴클레오솜 관련 cfDNA의 배경을 추가로 감소시킨다.

- [0393] 우리는 항-H3 항체를 사용하여 인간 혈장 샘플에서 뉴클레오솜을 포함하는 염색질 단편의 정량적 제거를 입증하였다.
- [0394] 바람직한 구체예에 있어서, 자기 비드가 고상 지지체로 사용되지만, 선택적으로 적합한 재료가 사용될 수 있다. 유사하게, 뉴클레오솜을 제거하는 방법으로서 W02016067029, W02017068371 및 W02021038010에 기재된 뉴클레오솜 결합 방법에 대한 선택적인 방법이 사용될 수 있다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 본 발명의 방법에 사용되는 샘플은 뉴클레오솜을 포함하지 않는다. 추가적인 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 검출된 세포 유리 염색질 단편은 전사 인자 및 DNA 단편으로 구성된다.
- [0395] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 인간 또는 동물 대상체에서 질환을 검출하는 방법이 제공된다:
- [0396] (i) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플로부터 세포 유리 뉴클레오솜을 제거하는 단계;
- [0397] (ii) 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0398] (iii) 전사 인자와 관련된 DNA를 분리하는 단계;
- [0399] (iv) 분리된 DNA를 PCR 방법으로 증폭하는 단계;
- [0400] (v) 증폭된 DNA의 서열을 결정하는 단계; 및
- [0401] (vi) 대상체에서 질환의 존재 및/또는 특성을 결정하기 위한 조합된 바이오마커로서 전사 인자의 존재 및 관련 DNA의 서열을 사용하는 단계.
- [0402] 발명의 일부 구체예에서, 세포 유리 전사 인자 또는 염색질 단편과 관련된 DNA 단편의 존재 또는 서열은 DNA의 분리 없이 결정될 수 있다. 이는 DNA 분리를 필요로 하지 않는 증폭 방법을 포함하되 이에 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0403] 본원에서 사용되는 용어 "결합제"는 바이오마커 (즉, 특정 전사 인자)에 특이적으로 결합할 수 있는 천연 발생 또는 화학적으로 합성된 화합물과 같은 리간드 또는 결합제를 의미한다. 본 발명에 따른 리간드 또는 결합제는 바이오마커에 특이적으로 결합할 수 있는 펩티드, 항체 또는 이의 단편, 또는 플라스틱 항체와 같은 합성 리간드, 압타머 또는 올리고뉴클레오타이드 또는 분자 각인 표면 또는 장치를 포함할 수 있다. 항체는 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 단클론 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 본 발명에 따른 리간드 또는 결합제는 검출가능한 마커, 예를 들어 발광, 형광, 효소 또는 방사성 마커; 대안적으로 또는 추가적으로 본 발명에 따른 리간드는 친화성 태그, 예를 들어 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 His (예를 들어, 헥사-His) 태그로 표지될 수 있다. 일 구체예에서, 결합제는 항체, 항체 단편 또는 압타머로부터 선택된다. 추가적인 구체예에서, 사용되는 결합제는 항체이다. 용어 "항체", "결합제" 또는 "결합제"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0404] 일 구체예에서, 샘플은 생물학적 액체(본원에서 "체액"이라는 용어와 상호교환적으로 사용됨)이다. 혈액, 혈장, 월경혈, 자궁내막액, 대변, 소변, 타액, 점액, 정액 및 예를 들어 농축된 호르몬과 같은 호르몬 또는 이들로부터의 정제물, 또는 이들의 희석물을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 체액 샘플 유형이 본 발명에 사용될 수 있다. 또한, 생물학적 샘플에는 살아 있는 대상의 표본이나 사후에 채취한 표본도 포함된다. 샘플은 예를 들어 적절하게 희석 또는 농축된 상태로 준비할 수 있으며, 일반적인 방식으로 보관할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 생물학적 액체 샘플은 혈액 또는 혈청 또는 혈장으로부터 선택된다. 체액에서 염색질 단편의 검출이 생검을 필요로 하지 않는 최소 침습적 방법이라는 이점을 갖는다는 것은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0405] 일 구체예에서, 대상체는 포유동물 대상체이다. 추가적인 구체예에서, 대상체는 인간 또는 동물 (예를 들어, 반려동물 또는 마우스) 대상체로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 일 구체예에서, 인간 대상체는 비배아 대상 (즉, 배아 이외의 임의의 발달 단계에 있는 인간)이다. 추가적인 구체예에서, 인간

대상체는 성인 대상체, 즉 16세 초과, 예를 들어 18세, 21세 또는 25세 초과이다. 대안적인 구체예에서, 대상체는 동물 대상체이다. 추가적인 구체예에서, 동물 대상체는 설치류 (예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 게르빌 또는 칩멍크), 고양이과 (즉, 고양이), 개과 (즉, 개), 말과 (즉, 말), 돼지과 (즉, 돼지) 또는 소과 (즉, 소) 대상체로부터 선택된다.

- [0406] 본 발명의 사용과 방법은 시험관 내 또는 생체 외에서 수행될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0407] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체에서 암을 검출 또는 진단하는 방법이 제공된다:
- [0408] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출 또는 측정하는 단계; 및
- [0409] (ii) 대상체의 질환 상태를 확인하기 위해 단계 (i)에서 검출된 관련된 DNA 수준 및/또는 DNA 서열을 사용하는 단계.
- [0410] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체에서 염증성 질환을 검출 또는 진단하기 위한 방법이 제공된다:
- [0411] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출 또는 측정하는 단계; 및
- [0412] (ii) 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 DNA 서열을 사용하여 대상체의 염증성 질환 상태를 확인하는 단계.
- [0413] 본 발명의 일 구체예에서, 샘플 내 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 존재는 그러한 치료가 필요한 대상체에 대한 최적의 치료 요법을 결정하는데 사용된다.
- [0414] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 의학적 치료에 대한 적합성에 대해 동물 또는 인간 대상체를 평가하는 방법이 제공된다:
- [0415] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0416] (ii) 대상체를 위한 적합한 치료의 선택을 위한 매개변수로서 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 DNA 서열을 사용하는 단계.
- [0417] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체의 치료를 모니터링하는 방법이 제공된다:
- [0418] (i) 대상체로부터 얻은 체액 샘플에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA를 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계;
- [0419] (ii) 대상체의 체액에서 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA의 검출, 측정 또는 시퀀싱을 1회 이상 반복하는 단계; 및
- [0420] (iii) 대상체의 상태의 임의의 변화에 대한 매개변수로서 단계 (ii)와 비교하여 단계 (i)에서 검출된 관련 DNA 수준 및/또는 DNA 서열의 임의의 변화를 사용하는 단계.
- [0421] 동일한 시험 대상자로부터 더 일찍 채취한 이전 시험 샘플에서 검출된 수준 또는 서열과 비교하여 시험 샘플에서 검출된 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 측정된 DNA 수준 및/또는 DNA 서열 수준의 변화는 장애 또는 의심되는 장애에 대한 상기 요법의 유의한 효과, 예를 들어 안정화 또는 개선을 나타낼 수 있다. 또한, 일단 치료가 완료되면, 질환의 재발을 모니터링하기 위해 본 발명의 방법을 주기적으로 반복할 수 있다.
- [0422] 본 발명의 이러한 측면은 본원에 개시된 방법과 조합하여 사용될 수 있음이 이해될 것이며, 예를 들어 단계 (i)은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시킨 다음, 상기 전사 인자와 관련되는 DNA를 검출 또는 측정하는 것을 포함한다.
- [0423] 일 구체예에 있어서, 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편 및 DNA 단편 (즉, 전사 인자를 포함하는 세포 유리 염색질 단편과 관련된 DNA)은 측정 패널 중 하나로 검출 또는 측정된다. 예를 들어, 다른 세포 유리 염

색질 전사 인자 마커, 또는 임의의 다른 바이오마커와의 조합.

- [0424] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 의학적 치료를 위한 적합성에 대하여 동물 또는 인간 대상체를 결정하거나 평가하는 목적을 위하여, 또는 동물 또는 인간 대상체의 치료를 모니터링하기 위하여, 실제 또는 의심되는 암 또는 양성 종양이 있는 대상체에서 사용하기 위하여, 단독으로 또는 측정 패널의 일부로서, 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 방법이 제공된다.
- [0425] 본 발명의 방법에 의해 수행되는 측정 또는 검정은 검정의 출력이 비교 또는 보정될 수 있는 것에 대한 표준을 제공하고/하거나 분석 화학의 올바른 기능을 확인 또는 모니터링하기 위한 측정자 또는 양성 대조군으로서 기준 물질의 사용을 포함할 수 있다. 적합한 기준 물질은 전사 인자 또는 재조합 전사 인자-DNA 복합체를 포함하나 이에 제한되지 않는 재조합 염색질 단편을 함유하는 생물학적으로 공급된 염색질 단편을 포함할 수 있다.
- [0426] 본원에서 사용되는 용어 "검출" 및 "진단"은 질환 상태의 식별, 확인 및/또는 특성화를 포함한다. 본 발명에 따른 검출, 모니터링 및 진단 방법은 질환의 존재를 확인하거나, 개시 및 진행을 평가함으로써 질환의 발달을 모니터링하거나, 질환의 개선 또는 퇴행을 평가하는 데 유용하다. 또한, 검출, 모니터링 및 진단 방법은 임상적 스크리닝, 예후, 요법의 선택, 치료적 이점의 평가, 즉 약물 스크리닝 및 약물 개발을 위한 방법에 유용하다.
- [0427] 검출 및 측정은 시퀀싱을 포함함을 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "시퀀싱"은 DNA 단편의 전부 또는 일부의 뉴클레오타이드 염기 서열 (보통 아데닌, 구아닌, 티민 및 시토신 염기 서열)의 결정을 포함한다.
- [0428] 효율적인 진단 및 모니터링 방법은 정확한 진단을 확립하고 가장 적절한 치료를 신속하게 식별할 수 있게 하여 (따라서 유해한 약물 부작용에 대한 불필요한 노출을 줄임) 재발률을 줄임으로써 개선된 예후 가능성을 가진 매우 강력한 "환자 솔루션"을 제공한다.
- [0429] 확인 및/또는 정량은 환자로부터의 생물학적 샘플 또는 생물학적 샘플의 정제 또는 추출물 또는 이의 회석물에서 특정 단백질 또는 DNA 단편 서열의 존재 및/또는 양을 확인하기에 적합한 임의의 방법에 의해 수행될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 방법에서, 정량은 시퀀싱에 의해 또는 샘플 또는 샘플들에서 바이오마커의 농도를 측정함으로써 수행될 수 있다. 본 발명의 방법에서 시험될 수 있는 생물학적 샘플은 상기 정의된 바와 같은 것들을 포함한다. 샘플은 예를 들어 적절하게 회석 또는 농축되어 준비할 수 있으며, 일반적인 방식으로 보관할 수 있다.
- [0430] 바이오마커의 식별 및/또는 정량은 바이오마커 또는 이의 단편, 예를 들어 C-말단 절단 또는 N-말단 절단을 갖는 단편의 검출에 의해 수행될 수 있다. 단편은 적합하게는 4개 이상의 아미노산 길이, 예를 들어 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 아미노산 길이이다.
- [0431] 바이오마커는 예를 들어 SELDI 또는 MALDI-TOF에 의해 직접 검출될 수 있다. 대안적으로, 바이오마커는 바이오마커에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 바이오마커-결합 단편, 또는 다른 펩티드 또는 리간드, 예를 들어 압타머 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은 리간드 또는 리간드와의 상호작용을 통해 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 리간드 또는 바인더는 발광, 형광 또는 방사성 라벨 및/또는 친화성 태그와 같은 검출 가능한 라벨을 가질 수 있다.
- [0432] 예를 들어, 검출 및/또는 정량은 SELDI(-TOF), MALDI(-TOF), 1-D 겔 기반 분석, 2-D 겔 기반 분석, 질량 분석 (MS), 역상(RP) LC, 크기 투과 (겔 여과), 이온 교환, 친화성, HPLC, UPLC 및 기타 LC 또는 LC MS 기반 기술로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있다. 적절한 LC MS 기술은 ICAT®(Applied Biosystems, CA, USA) 또는 iTRAQ®(Applied Biosystems, CA, USA)가 포함된다. 액체 크로마토그래피(예를 들어, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 저압 액체 크로마토그래피(LPLC)), 박층 크로마토그래피, NMR(핵 자기 공명) 분광법도 사용할 수 있다.
- [0433] DNA 검출 및/또는 측정은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혼성화 또는 시퀀싱을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0434] 본 발명에 따른 진단 또는 모니터링 방법은 바이오마커의 존재 또는 수준을 검출하기 위해 SELDI TOF 또는 MALDI TOF에 의해 샘플을 분석하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 방법은 임상 스크리닝, 예후, 치료 결과 모니터링, 특정 치료에 가장 반응할 가능성이 높은 환자 식별, 약물 스크리닝 및 개발, 약물 치료를 위한 새로운 표적 식별에 적합하다.
- [0435] 분석물 바이오마커의 확인 및/또는 정량은 바이오마커에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편을 포

합하는 면역학적 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0436] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 동물 또는 인간 대상체에서 질환을 검출 또는 진단하기 위한 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 확인하기 위한 방법이 제공된다:
- [0437] (i) 질환 대상체의 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편 조합 바이오마커를 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출 및/또는 측정 및/또는 시퀀싱하는 단계;
- [0438] (ii) 건강한 대상체 또는 대조군 대상체의 체액 샘플에서 전사 인자 및 DNA 단편 조합 바이오마커를 포함하는 세포 유리 염색질 단편을 검출 및/또는 측정 및/또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0439] (iii) 전사 인자 및 DNA 단편 조합 바이오마커를 포함하는 세포 유리 염색질 단편이 질환 상태에 대한 바이오마커로서 유용한지 여부를 확인하기 위해 병에 걸린 대상체와 건강한 대상체 또는 대조군 대상체에서 검출된 수준 및/또는 DNA 서열 간의 차이를 사용하는 단계.
- [0440] 본 발명의 이러한 측면은 본원에 기술된 방법과 조합될 수 있음을, 즉 단계 (i) 및/또는 (ii)는 본원에 정의된 방법을 사용하여 수행될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0441] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 본원에 기재된 방법에 의해 확인된 바이오마커 또는 조합된 바이오마커가 제공된다.
- [0442] 본 발명의 방법을 수행하기 위한 진단 또는 모니터링 키트가 본원에서 제공된다. 바이오마커 또는 조합된 바이오마커의 검출 및/또는 정량을 위한 이러한 키트는 전사 인자에 대한 리간드 또는 결합제 및 선택적으로 상기 전사 인자와 관련된 DNA의 증폭 및/또는 시퀀싱을 위한 시약 및 선택적으로 뉴클레오솜에 대한 리간드 또는 결합제, 선택적으로 키트 사용 설명서와 함께 적합하게 포함할 것이다. 바이오마커 모니터링 방법, 바이오센서 및 키트는 또한 의사가 재발이 장애 악화로 인한 것인지 여부를 결정할 수 있도록 하는 환자 모니터링 도구로서 중요하다. 약물 치료가 부적절하다고 평가되면 치료를 재개하거나 증가시킬 수 있다. 적절한 경우 치료법을 변경할 수 있다. 바이오마커는 장애 상태에 민감하기 때문에 약물 치료의 영향에 대한 지표를 제공한다.
- [0443] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 전사 인자에 대한 리간드 또는 결합제, 선택적으로 상기 전사 인자와 관련된 DNA의 증폭 및/또는 시퀀싱을 위한 시약, 및 선택적으로 뉴클레오솜에 대한 리간드 또는 결합제, 선택적으로 본원에서 설명된 방법을 따르기 위한 키트의 사용 설명서와 함께 포함하는 조합 바이오마커로서 전사 인자 및 DNA 단편을 포함하는 세포 유리 염색질 단편의 검출을 위한 키트가 제공된다.
- [0444] 본 발명의 추가적인 측면은 본원에 정의된 하나 이상의 바이오마커를 검출 및/또는 정량할 수 있는 바이오센서를 포함하는 질환 상태의 존재를 검출하기 위한 키트이다.
- [0445] 추가적인 측면에 따르면, 암 진단을 위한 본원에 정의된 키트의 용도가 제공된다. 추가적인 측면에 따르면, 염증성 질환의 진단을 위한 본원에 정의된 키트의 용도가 제공된다. 추가적인 측면에 따르면, 산전 질환의 진단을 위한 본원에 정의된 바와 같은 키트의 용도가 제공된다.
- [0446] 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법이 제공된다:
- [0447] (a) 인간 또는 동물 대상체로부터 얻은 체액 샘플을 전사 인자에 결합하는 결합제와 접촉시키는 단계;
- [0448] (b) 전사 인자와 관련된 DNA 단편을 검출, 측정 또는 시퀀싱하는 단계; 및
- [0449] (c) 대상체에서 질환의 존재를 나타내는 지표로서 DNA 단편의 존재, 양 또는 서열을 사용하는 단계; 및
- [0450] (d) 대상체가 단계 (c)에서 질환이 있는 것으로 결정되는 경우, 치료를 시행하는 단계.
- [0451] 일 구체예에 있어서, 질환은 암이다. 대안적인 구체예에서, 질환은 염증성 질환이다. 추가적인 측면에 따르면, 임신 대상체의 태아에서 태아기 질환의 진단을 위한 본원에 정의된 바와 같은 키트의 용도가 제공된다.
- [0452] 일 구체예에 있어서, 투여되는 치료는 수술, 방사선요법, 화학요법, 면역요법, 호르몬 요법 및 생물학적 요법으로부터 선택된다.
- [0453] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다:

- [0454] (a) 본원에 기재된 방법에 따라 대상체에서 암을 검출 또는 진단하는 단계; 다음으로
- [0455] (b) 상기 개인에게 항암 요법, 수술 또는 약제를 투여하는 단계.
- [0456] 일 구체예에 있어서, 대상체는 인간 또는 동물 대상체이다.
- [0457] 다음 실시예로 본 발명을 설명한다.
- [0458] **실시예**
- [0459] **실시예 1**
- [0460] 전사 인자 TTF-1(NKX2-1이라고도 함)에 특이적으로 결합하도록 지시된 항체는 생자기 분리를 위해 자기 비드(예를 들어, 상업적으로 이용 가능한 Dynabeads)에 코팅된다. TTF-1은 호메오박스 헬릭스-턴-헬릭스 전사 인자이다.
- [0461] 항-TTF-1 항체 코팅 자기 비드를 IV기 폐암, IV기 갑상선암 진단을 받은 인간 대상체 및 건강한 대상체로부터 수집한 EDTA 혈장 샘플에 첨가한다. (자기 입자의 현탁액을 유지하기 위해 부드럽게 회전시키면서) 인큐베이션 후, 자기 입자를 플라즈마 샘플에서 제거하고 분석 완충제로 세척한다. TTF-1 관련 DNA 단편은 Qiagen QiaAMP Circulating Nucleic Acids 키트를 사용하여 자기 고체상에서 분리한다. 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Snyder et al., 2016(본원에 참조로 포함됨)에 설명된 라이브러리 방법에 의해 각 혈장 샘플에 대해 TTF-1과 연관된 DNA 서열의 단일 가닥 DNA 라이브러리를 생성하기 위해 분리된 DNA 단편에 연결된다.
- [0462] 각 대상체별로 제작된 단편 라이브러리는 실시간 정량 PCR로 증폭된다. 증폭된 라이브러리는 차세대 시퀀싱 방법을 사용하여 시퀀싱되고 각 라이브러리의 DNA 양과 연관된 시퀀스가 비교된다. 35-80bp 범위의 작은 cfDNA 단편에 의한 TTF-1 TFBS 유전자좌의 적용 범위는 건강한 샘플에서 TTF-1 관련 DNA의 양이 적거나 감지할 수 없기 때문에 건강한 샘플에서 낮을 것이다. 대조적으로, 35-80bp 범위의 작은 cfDNA 단편에 의한 TTF-1 TFBS 유전자좌의 적용 범위는 단계 IV 폐암 또는 단계 IV 갑상선암을 갖는 환자들에서의 샘플에서의 TTF-1 연관 DNA의 양이 더 높기 때문에 암 샘플에서 높을 것이다. 갑상선암 샘플에서 결정된 연관된 TTF-1 DNA의 서열은 갑상선 세포에서 TTF-1 조절 유전자 프로모터의 알려진 서열과 상관관계가 있을 것이다. 유사하게, 폐암 샘플에서 결정된 연관 TTF-1 DNA의 서열은 갑상선 세포에서 TTF-1 조절 유전자 프로모터의 알려진 서열과 상관관계가 있을 것이다. 이를 바탕으로 대부분의 또는 모든 건강한 샘플, 갑상선암 샘플 및 폐암 샘플을 실험에서 생성된 데이터에서 식별할 수 있다.
- [0463] **실시예 2**
- [0464] 실시예 1에 기재된 실험을 반복하지만, 항-TTF1 항체로 코팅된 자기 입자와 함께 인큐베이션하기 전에, 항-뉴클레오타이드 항체로 코팅된 자기 비드를 혈장 샘플에 첨가하여 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 결합된 DNA 단편의 샘플을 미리 제거하였다. (자기 입자의 현탁액을 유지하기 위해 부드럽게 회전시키면서) 인큐베이션 후 자기 입자가 플라즈마 샘플에서 제거된다. 그런 다음, 실험은 나머지 샘플을 사용하여 실시예 1에 설명된 대로 완료되며, 건강한 샘플에서 발견되는 DNA의 배경 수준이 실시예 1에 대해 설명된 것보다 훨씬 더 낮을 것이라는 점을 제외하면 유사한 결과가 나타난다.
- [0465] **실시예 3**
- [0466] 항-TTF-1 항체 코팅 자기 비드를 폐암 IV기, 갑상선암 IV기의 인간 대상체 및 건강한 대상체로부터 수집한 EDTA 혈장 샘플에 첨가하였다. (자기 입자의 현탁액을 유지하기 위해 부드럽게 회전시키면서) 인큐베이션 후, 자기 입자를 플라즈마 샘플에서 제거하고 분석 완충제로 세척하였다. TTF-1 관련 DNA 단편은 Qiagen QiaAMP Circulating Nucleic Acids 키트를 사용하여 자기 고체상에서 추출된다. 인간 게놈의 SPB, 갑상선 자극 호르몬 수용체 및 티로피록시다제 유전자 프로모터 지역의 TTF-1 결합 위치와 관련된 특이 서열의 DNA 단편 및 플랭킹 DNA를 증폭하기 위한 특정 서열 프라이머는 프라이머 설계를 위해 당업계에 공지된 전형적인 소프트웨어를 사용하여 설계된다. 프라이머는 실시간 정량 PCR로 DNA 단편을 증폭하는 데 사용된다. 존재하는 DNA의 양은 각 혈장 샘플의 각 서열에 대해 측정된다. 건강한 대상체에게서 채취한 샘플의 결과는 낮거나 감지할 수 없다. 폐암 환자에게서 채취한 대부분의 샘플에는 검출 가능한 양의 SPB 유전자 프로모터 서열 DNA 단편이 포함되어 있다. 갑상선암 환자에게서 채취한 대부분의 샘플에는 검출 가능한 양의 갑상선 자극 호르몬 수용체 및/또는 티로피록시다제 유전자 프로모터 서열 DNA 단편이 포함되어 있다. 이를 바탕으로 대부분의 또는 모든 건강한 샘플, 갑상선암 샘플 및 폐암 샘플을 실험에서 생성된 데이터에서 식별할 수 있다.

[0467] **실시예 4**

[0468] 실시예 3에 기술된 실험을 반복하지만, 항-TTF-1 항체로 코팅된 자기 입자와 함께 인큐베이션하기 전에, 항-뉴클레오솜 항체로 코팅된 자기 비드를 혈장 샘플에 첨가하여 뉴클레오솜 및 뉴클레오솜 결합 DNA의 샘플을 미리 제거하였다. (자기 입자의 현탁액을 유지하기 위해 부드럽게 회전시키면서) 인큐베이션 후 자기 입자가 플라즈마 샘플에서 제거된다. 그런 다음, 실험은 나머지 샘플을 사용하여 실시예 3에 설명된 대로 완료되며, 건강한 샘플에서 발견되는 DNA의 배경 수준이 실시예 3에 대해 설명된 것보다 훨씬 더 낮을 것이라는 점을 제외하면 유사한 결과가 나타난다.

[0469] **실시예 5**

[0470] 건강한 남성과 IV기 전립선암 진단을 받은 남성으로부터 수집한 혈장 샘플을 테스트하여 나선형-회전-나선형 전사 인자 NKX3.1에 대해 위의 실시예에서 설명된 것과 유사한 실험을 반복하였다. 건강한 대상체에게서 채취한 샘플의 결과는 낮거나 감지할 수 없다. 전립선암 환자에게서 채취한 대부분의 샘플에는 35-80bp 크기 범위의 검출 가능한 양의 NKX3.1 유전자 프로모터 서열 DNA 단편이 포함되어 있다. 이를 바탕으로 건강한 샘플과 전립선암 샘플의 대부분 또는 전부를 실험에서 생성된 데이터에서 식별할 수 있다.

[0471] **실시예 6**

[0472] 건강한 여성 및 IV기 난소암 진단을 받은 여성으로부터 수집한 혈청 샘플을 테스트함으로써 징크 핑거 전사 인자 WT1에 대해 상기 실시예에 기재된 것과 유사한 실험을 반복하였다. 건강한 대상체로부터 채취한 샘플에 대한 결과는 건강한 대상체에서 35-80bp 크기 범위의 WT1 관련 cfDNA 단편에 의한 WT1 TFBS 유전자좌의 적용 범위가 낮거나 감지할 수 없을 것이다. 난소암 환자로부터 채취한 대부분의 샘플은 검출 가능한 양의 WT1 유전자 프로모터 서열 35-80bp cfDNA 단편을 포함하므로 35-80bp 크기 범위의 WT1 관련 cfDNA 단편에 의해 WT1 TFBS 유전자좌의 더 높은 적용 범위를 보일 것이다. 이를 바탕으로 건강한 샘플과 난소암 샘플의 대부분 또는 전부를 실험에서 생성된 데이터에서 식별할 수 있다.

[0473] **실시예 7**

[0474] 아미노산 위치 30-33에 위치한 히스톤 H3 에피토프에 결합하도록 지시된 항체로 Dynabeads M280 Tosyl 활성화 자기 비드를 코팅하였다. 이 항체는 전체 히스톤 꼬리를 포함하는 뉴클레오솜과 잘린 히스톤 꼬리를 가진 뉴클레오솜 모두에 결합하는 것으로 관찰되었기 때문에 테스트한 여러 항체로부터 선택되었다.

[0475] Active Motif에서 구입한 다양한 농도의 제조합 모노뉴클레오솜(0.5ml)을 포함하는 용액에 항-H3 항체 코팅 자기 비드(1mg)를 첨가하였다. 비드를 현탁 상태로 유지하기 위해 튜브를 부드럽게 롤링하면서 실온에서 1시간 동안 뉴클레오솜과 함께 비드를 인큐베이션하였다. 비드를 자기적으로 분리하고 세척하였다. 이어서 비드에 흡착된 뉴클레오솜을 용출에 의해 제거하고 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 결과는 뉴클레오솜이 도 3과 같이 용량 의존 방식으로 자기 비드에 의해 용액에서 흡착되었음을 보여준다.

[0476] **실시예 8**

[0477] 항-H3 항체 코팅된 자기 비드를 제조하고 실시예 7에 기술된 바와 같이 사용하였다. 코팅되지 않은 비드뿐만 아니라 항-H3 항체 코팅된 자기 비드를 8개의 인간 EDTA 혈장 샘플 및 다양한 농도의 제조합 모노뉴클레오솜을 함유하는 용액에 첨가하였다. 제조합 모노뉴클레오솜 농도의 범위는 인간 임상 시료에서 전형적으로 관찰되는 수준을 포함하도록 선택되었다.

[0478] 우리는 광학 밀도(OD) 관독값이 있는 뉴클레오솜에 대해 ELISA를 사용하여 자기 비드와 함께 배양한 후 용액에 남아 있는 뉴클레오솜의 존재를 테스트하였다. 도 4에 표시된 결과는 항-H3 항체 코팅 자기 비드로 흡착한 후 용액에 남아 있는 제조합 모노뉴클레오솜의 수준이 감지할 수 없는 반면 (뉴클레오솜을 함유하지 않은 대조군 용액과 유사한 OD를 가짐), 코팅되지 않은 자기 비드와 함께 배양된 용액은 영향을 받지 않아 정상적인 ELISA 용량 반응 곡선으로 이어졌다. 유사하게, 항-H3 항체 코팅된 자기 비드로의 흡착 후, 테스트된 8개의 인간 혈장 샘플에서 용액에 남아 있는 뉴클레오솜의 수준도 낮거나 감지할 수 없었지만 코팅되지 않은 자기 비드와의 배양에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 인간 혈장 샘플에서 뉴클레오솜의 정량적 제거를 입증한다.

[0479] **실시예 9**

[0480] 다양한 색상의 Luminex 비드는 제조업체의 프로토콜에 따라 전사 인자 TTF-1, NKX3.1, GATA-3, CDX-2 및 GRHL2에 결합하도록 지시된 항체로 코팅되었다. 건강한 대상체와 다양한 암 진단을 받은 대상체로부터 채취한 혈장

샘플을 모든 비드의 혼합물과 접촉시켰다. 각각의 비드-결합된 전사 인자에 결합된 각각의 전사 인자 TFBS를 포함하는 35-80bp 범위의 cfDNA의 양 또는 적용 범위는 PCR 방법 또는 차세대 시퀀싱에 의해 측정된다. 결과는 NKX3.1 및 GRHL2에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 비드에 결합된 35-80bp cfDNA에 의한 NKX3.1 및 GRHL2 TFBS 적용 범위가 다른 비드(코팅된 항-TTF-1, GATA-3 또는 CDX-2 항체)가 낮다. 유사하게, TTF-1 및 GRHL2에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 비드에 결합된 짧은 35-80bp cfDNA 단편의 양은 폐암 환자로부터 채취한 샘플에서 증가하는 반면, (항-NKX3.1, GATA-3 또는 CDX-2 항체로 코팅된) 다른 비드에 결합하는 전사 인자는 낮다. 유사하게, GATA-3 및 GRHL2에 결합하도록 지시된 항체로 코팅된 비드에 결합된 짧은 35-80bp cfDNA 단편의 양은 유방암 환자로부터 채취한 샘플에서 증가하는 반면, (항-TTF-1, NKX3.1 또는 CDX-2 항체로 코팅된) 다른 비드에 결합은 낮다. 대조적으로 모든 비드에 대한 짧은 35-80bp cfDNA 단편의 결합은 건강한 대상체로부터 채취한 샘플에서 낮을 것이다.

[0481] **실시예 10**

[0482] 마그네틱 비드는 제조업체의 프로토콜에 따라 RNA 중합효소 II에 결합하도록 지시된 항체로 코팅되었다. 건강한 대상체와 다양한 암 진단을 받은 대상체로부터 채취한 혈장 샘플을 비드와 접촉시켰다. 결합되지 않은 염색질 단편을 제거하기 위해 비드를 세척하였다.

[0483] 비드에 결합된 DNA는 추출되고, 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 연결되며, 라이브러리는 대상체의 샘플에 존재하는 활성 유전자 세트를 찾기 위해 시퀀싱된다. 결과는 건강한 대상체로부터 채취한 샘플에 존재하는 활성 유전자가 조혈 세포에서 활성인 유전자를 대표한다는 것을 보여줄 것이다. 또한, 동일한 서열이 암 환자로부터 채취한 샘플에도 존재하지만, 이러한 샘플은 관련 조직의 (건강한 또는 질환에 걸린) 세포에서 전형적으로 활성이고 /이거나 암세포에서 상향 조절되는 유전자를 포함하는 조혈 세포에서는 활성이 아니지만 질환 조직의 세포에서는 활성인 유전자를 나타내는 RNA 중합효소 II 관련 DNA 서열을 추가로 포함하는 것으로 밝혀졌다.

[0484] **실시예 11**

[0485] 마그네틱 비드는 제조업체의 프로토콜에 따라 RNA 중합효소 II에 결합하도록 지시된 항체로 코팅되었다. 건강한 대상체와 다양한 암 진단을 받은 대상체로부터 채취한 혈장 샘플을 비드와 접촉시켰다. 결합되지 않은 염색질 단편을 제거하기 위해 비드를 세척하였다.

[0486] 비드에 결합된 DNA는 서열을 증폭하기 위해 PCR 프라이머를 사용하여 특정 DNA 서열의 존재에 대해 분석되었다. 분석할 서열은 결장직장암과 특이적으로 연관되도록 선택되었다. 결과는 결장직장암 대상체로부터 채취한 샘플에는 서열이 존재하지만 건강한 대상체 또는 다른 암 대상체로부터 채취한 샘플에는 존재하지 않는다는 것을 보여줄 것이다.

[0487] **실시예 12**

[0488] EDTA 혈장 샘플은 난소암 진단을 받은 여성 6명, ER 음성 유방암 진단을 받은 여성 2명, ER 양성 유방암 진단을 받은 여성 8명으로부터 수집되었으며, 이 중 4명의 여성은 ER 점수 7로 진단되었고, 4명의 여성은 ER 점수 8로 진단되었다. 상업용 ER α ELISA 키트를 사용하여 EDTA 혈장 샘플을 ER α에 대해 분석하였다. 사용된 ELISA 키트의 정량적 검출 범위는 3-200pg/ml였으며, ER α에 대한 검출 하한은 0.8pg/ml이었다. ER α의 평균 측정 수준은 ER-음성 대상체에 대해 낮았고, 난소암 또는 ER-양성 유방암으로 진단된 대상체에 대해 더 높았다. 또한, ER-양성 유방암으로 진단된 대상체에 대해 측정된 평균 수준은 ER 점수가 더 높은 여성에서 더 높았다(도 5). 우리는 여성으로부터 채취한 전혈 샘플로부터 제조된 EDTA 혈장 샘플에서 ER α의 존재가 부인과 암을 포함한 부인과 질환에 대한 바이오마커로 유용하다고 결론지었다.

[0489] **실시예 13**

[0490] PR-양성 또는 PR-음성인 유방암의 프로게스테론 수용체 상태는 부인과 암의 진단 및 치료에서 유사하게 중요하다. 또한, 우리는 여성으로부터 채취한 전혈 샘플로부터 제조된 EDTA 혈장 샘플에서 프로게스테론 수용체(PR) 수준의 측정이 부인과 암을 포함한 부인과 질환에 대한 바이오마커로서 유사하게 유용하다는 결론을 내린다.

[0491] **실시예 14**

[0492] 전립선암의 안드로겐 수용체 상태는 전립선암의 진단 및 치료에서 마찬가지로 중요하다. 또한, 우리는 남성에서 채취한 전혈 샘플로부터 제조된 EDTA 혈장 샘플에서 안드로겐 수용체(AR) 수준의 측정이 전립선암을 포함한 전립선 질환에 대한 바이오마커로 유용하다고 결론을 내린다.

[0493] 실시예 15

[0494] 혈장 샘플로부터 비특이적으로 (비특이적) 마우스 IgG 코팅된 자기 입자에 흡착된 단백질의 배경 수준은 현상을 위하여 쿠마시 블루 염색을 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다. 배경은 0.1% Tween 20 세제를 함유하는 전형적인 면역화학적 세척 완충제 또는 1% 옥틸페녹시폴리에톡시에탄올 세제, 0.1% 소듐 데옥시콜레이트 및 0.1% 소듐 도데실 설페이트를 포함하는 1.2%의 고수준의 세제 혼합물을 함유하는 세척 완충제로 입자의 5회 세척 후 평가되었다. 결과(도 6)는 강력한 세제를 사용하여 배경 염색이 훨씬 감소되었음을 보여주었다.

[0495] 동일한 실험을 (모든 크기의 과립화된 단백질에 결합하는) 마우스 항-polyADP 항체에 특이적으로 흡착된 단백질에 적용하였다. 이 경우 염색은 세척이 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하지만 항체에 부착된 특이적으로 결합된 단백질에는 영향을 미치지 않음 (또는 영향이 적음)을 보여줌으로써 영향을 덜 받았다.

[0496] 실시예 16

[0497] 전사 인자 CTCF에 특이적으로 결합하도록 지시된 단클론 항체를 표준 방법을 사용하여 자기 비드(MyOne TosylActivated DynabeadsTM) 상에 코팅하였다. 간단하게 0.86mg 단클론 항체를 1M 황산 암모늄을 함유하는 2.9mL 0.1M 붕산염 완충액 pH9.5에서 29mg 자기 비드(30 µg 항체/mg 비드)와 함께 롤링 병에서 18시간 동안 37 °C에서 배양하여 비드의 현탁액을 유지하였다. 비드를 침전시키고 상청액을 따라내었다. 비드를 재현탁하고, 0.1% Tween 20 및 1% 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 인산염 완충 식염수 pH7.4(PBS)의 차단 완충액 2.9mL에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 비드를 침전시키고, 0.1% Tween 20 및 1% BSA를 함유하는 3mL PBS 로 2회 세척하고, 0.1% Tween 20, 1% BSA 및 보존제를 함유하는 2.9mL PBS에 보관하였다. 비특이적 마우스 IgG는 비특이적 대조 시약으로서 자기 비드에 유사하게 코팅되었다.

[0498] CTCF-DNA 단편의 염색질 면역침강(ChIP)은 암 환자로부터 얻은 4 폴링 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck Cell-Free DNA BCTs에서 수집된 1.6mL)에서 수행되었다. 각각의 폴링된 샘플을 0.4mL의 상업적으로 이용 가능한 방사면역침강 분석 완충제로 희석하고, 1mg의 항-CTCF 코팅된 자기 입자를 첨가하였다. 비드의 현탁액을 유지하기 위해 롤링하면서 혼합물을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 비드를 침전시키고, 1% Triton X-100 세제, 0.1% 데옥시콜산 나트륨 및 0.1% 소듐 도데실 설페이트의 혼합물을 함유하는 강력한 세제 세척 용액으로 5회 세척하고, 0.1mL의 완충액에 보관하였다. 동시에, 1.6mL의 폴링된 각 혈장 샘플을 비특이적 마우스 IgG 코팅된 자기 비드와 함께 배양하여 대조군 실험을 수행하였다.

[0499] 폴링된 혈장 샘플과 함께 자기 입자를 배양한 후, 자기 입자 결합 단백질을 변성 1% SDS(sodium dodecyl sulphate) 완충액에 현탁시키고, 변성된 단백질을 항-CTCF 항체 및 검출을 위해 표지된 항-마우스 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 웨스턴 블롯 실험에서, CTCF의 존재는 130-140kD에서 밴드의 존재로 표시된다(Klenova et al., 1997). 웨스턴 블롯 분석의 결과는 도 7에 도시되어 있다. 간단히, CTCF 전사 인자의 존재에 반응하는 약 140kD의 단백질 밴드는 항-CTCF 항체(Anti CTCF)로 코팅된 자기 입자에 노출되었을 때 모든 4개의 샘플에 대해 가시적이었다. 대조적으로, 비특이적 마우스 IgG(NS-IgG)로 코팅된 자기 입자에 노출된 동일한 4개의 샘플 중 어느 것에서도 밴드가 보이지 않았다. 이는 사용된 ChIP 방법이 테스트된 모든 4개의 폴링된 샘플에서 순환 전사 인자 CTCF를 선택적으로 분리할 수 있음을 나타낸다. 또한, 사용된 세척 체계에 의해 생성된 깨끗한 배경을 보여준다.

[0500] 실시예 17

[0501] CTCF는 징크 핑거 전사 인자이다. CTCF-DNA 단편의 염색질 면역침강법(ChIP)은 유방암 진단을 받은 대상체로부터 얻은 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck Cell-Free DNA BCT에서 수집한 2.4mL)에서 수행되었다. 2.4mL 샘플을 0.6mL의 방사면역침강 검정 완충액으로 희석하고, 1.5mg 항-CTCF 코팅된 자기 입자를 첨가한 것을 제외하고는 실시예 16에서 설명한 바와 같이 ChIP를 수행하였다. 병렬 대조군 실험에서, 2.4mL의 가교된 EDTA 혈장 샘플을 비특이적 마우스 IgG로 코팅된 자기 비드와 함께 배양하였다. 자기 비드를 2분획으로 나누었다. 양성 대조군으로서 MCF7 유방암 세포로부터의 단편화된 염색질을 사용하여 비드 상의 CTCF 단백질의 존재를 확인한 웨스턴 블롯에 의한 분석을 위해 하나의 분획을 사용하였다.

[0502] (테스트 및 컨트롤) 비드의 두 번째 분획을 DNA 추출 및 분석에 사용하였다. 95°C에서 15분 동안 가열하면 자기 비드 관련 염색질 단편과 관련 DNA의 가교는 역전되었다. 자기 비드와 관련된 DNA는 제조업체의 지침에 따라 상업적으로 이용 가능한 DNA 추출 키트(Qiagen Q IAamp DSP 순환 NA 키트)를 사용하여 추출되었다.

[0503] 추출된 cfDNA를 증폭하여 16 증폭 주기를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 상업적으로 이용 가능한 키트

(Claret Bio SRSly NGS Library Prep Kit)를 사용하여 시퀀싱을 위한 단일 가닥 라이브러리를 생성하였다. 증폭된 테스트 및 비특이적 cfDNA 단편 라이브러리를 Bioanalyzer 기기를 사용하여 전기영동으로 분석하였다. 결과(도 8)는 특정 항-CTCF 코팅된 자기 입자에서 얻은 증폭된 cfDNA 라이브러리가 35-80bp 범위의 작은 단편을 포함하고 있음을 보여준다. 약 140bp에서 전기영동도의 날카로운 피크는 어댑터 이량체를 나타내므로 175-220bp의 어댑터 연결된 단편은 35-80bp의 cfDNA 단편을 나타낸다. 어댑터 연결된 cfDNA 단편의 주요 피크는 약 50bp 길이의 cfDNA 단편에 해당하는 약 190bp에서 관찰되었다. 증폭된 cfDNA 라이브러리에는 35-80bp 범위의 작은 단편이 포함되어 있지만 비특이적 마우스 IgG로 코팅된 고체 지지체에서 증폭된 추출물에 대해서도 작은 DNA 단편이 얻어졌기 때문에 이러한 모든 단편이 샘플의 CTCF에 결합되지는 않았다. 그러나, 특정 항-CTCF 항체 ChIP(1000 형광 단위[FU])로 얻은 특정 피크는 비특이 IgG 피크(80 FU)보다 높았다. 이 샘플은 시퀀싱을 위해 보내졌다.

[0504] 실시예 18

[0505] 상기 실시예 17에 기재된 바와 같이, 증폭된 cfDNA 라이브러리는 항-CTCF 면역침강에 의해 결장직장암(CRC)으로 진단된 환자로부터 수집된 가교된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집됨)로부터 제조되었다. 항-CTCF 면역침강을 사용하여 분리된 증폭된 cfDNA 라이브러리는 Next Generation Illumina NovaSeq 시퀀싱으로 시퀀싱되었다.

[0506] 각 cfDNA 단편을 나타내는 시퀀싱된 해독은 Illumina DRAGEN Bioinformatics pipeline(<https://emea.illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html>)을 사용하여 인간 참조 게놈 GRCh38/hg38에 정렬되었다. 정렬되지 않은 해독은 버려졌다. 생성된 정렬 BAM 파일은 Sequence Alignment/Map SAMtools(Li et al., 2009)를 사용하여 다양한 단편 크기(35-80bp, 135-155bp 및 156-180bp)의 하위 집합을 만드는데 사용되었다. 관독 적용 범위(특정 유전자좌를 덮는 것으로 발견된 단편의 수)는 1bp(가능한 가장 높은 분해능)의 빈 크기를 사용하여 계산되었다. 관독 적용 범위는 deepTools bamCoverage를 사용하여 RPGC(게놈 적용 범위당 해독)로 인간 게놈에 매핑된 총 해독 수로 정규화되었다. 적용 범위 프로파일 플롯(도 9 및 10)은 deepTools plotProfile(Ramirez et al., 2016)을 사용하여 각 단편 크기에 대해 생성되었다.

[0507] 순환 모노뉴클레오타이드 결합에 대해 예상되는 크기(135-155bp 및 156-180bp)와 일치하는 더 긴 cfDNA 단편에 의한 적용 범위와 비교하여 CTCF와 관련된 짧은 35-80bp 단편에 의한 9780개의 공개된 CTCF 결합 부위(Kelly et al., 2012)의 유전자좌에서의 적용 범위에 대한 결과는 도 9(a)에 보여진다. 적용 범위는 CTCF 바인딩 사이트 위치의 상류 및 하류 2500개 염기를 포함하여 5000bp 범위에 걸쳐 표시된다. 우리는 Kelly et al., 2012에 의해 보고된 CTCF TFBS 유전자좌의 게놈 위치에서 정확히 결합하는 작은 35-80bp cfDNA 단편에 의해 적용 범위의 강한 피크를 관찰하였다. 시퀀싱된 라이브러리는 배경이 낮은 CTCF 코팅된 자기 비드 상에서 단리된 CTCF 단백질에 부착된 cfDNA로부터 직접 생산되었기 때문에 cfDNA 라이브러리에는 뉴클레오타이드 거의 포함되지 않았고 뉴클레오타이드 포지셔닝 신호가 낮았다. 이 특징은 명확한 35-80bp 신호를 생성하고, 혼합 샘플(예를 들어, 조혈 및 암 조직에서 유래한 혼합 cfDNA 단편을 포함하는 샘플)에서 경쟁 신호의 디콘볼루션의 필요성을 제거하였다. 대조적으로, 비특이적 마우스 IgG에 결합하기 위해 얻은 cfDNA 라이브러리는 CTCF TFBS 유전자좌에서 피크를 나타내지 않았다(도 9(b)).

[0508] 많은 수의 단백질이 전사 인자, 또는 협력적으로 결합하는 다양한 전사 인자, 전사 인핸서, 억제 인자 또는 기타 조절 단백질의 조합을 포함하는 TFBS에 또는 그 근처에 결합할 수 있다. 본 발명의 방법의 주요 이점은 CTCF TFBS 유전자좌의 작은 cfDNA 단편 적용 범위가 CTCF와 관련된 cfDNA 단편에만 관련된 것으로 알려져 있다는 점이다. 당업계의 대조적인 방법, 예를 들어 Snyder et al., 2016 및 Ulz et al., 2019의 단편체학 방법은 EDTA 혈장에서 추출된 모든 크기의 모든 cfDNA 단편을 매핑하고 단백질 결합이 특정 게놈 위치에서 발생했거나 발생하지 않았음을 추론한다. 관련되는 단백질이 무엇인지는 알 수 없는데, 그 이유는 이러한 모든 방법의 첫 단계는 샘플에서 모든 핵단백질 염색질 단편(뉴클레오타이드 및 전사 인자-DNA 복합체 포함)의 분리를 수반하는 cfDNA의 추출인 관계로 임의의 특정 전사 인자 또는 다른 단백질에 대한 임의의 특정 cfDNA 서열을 연결하는 직접적인 정보를 파괴하기 때문이다.

[0509] 입력 비특이적 제어를 참조하여 cfDNA 단편 서열의 피크 콜링은 CTCF가 가장 많은 TFBS 서열 단편을 갖는 전사 인자로 귀착되었다. 피크 콜링은 MACS2(Zhang et al., 2008) 좁은 피크를 사용하여 BAM 파일에서 수행되었다. 피크 파일은 Homer Software package(Heinz et al., 2010)의 findMotifGenome tool을 사용하여 전사 인자 결합 부위를 탐지하는데 사용되었다.

- [0510] 그런 다음, 불멸화 암 세포에서 차지하는 1041 CTCF TFBS의 농축에 대한 분석을 반복하였다(Liu et al., 2017). 도 10(a)에 표시된 결과는 1041개의 암 특이적 CTCF TFBS 서열에 결합하는 35-80bp CTCF 관련 cfDNA 단편의 명확한 피크가 있음을 보여준다. 단편체학과 달리 분석에 기여하는 cfDNA 단편은 CTCF-DNA 복합체에서만 발생하며 CTCF를 포함하지 않는 경우 다른 전사 인자-DNA 또는 보조인자-DNA 복합체에서는 발생하지 않는다. 이것은 암 특이적 유전자좌의 CTCF 점유를 입증하고, 따라서 이러한 cfDNA 단편 및 이들이 과생된 CTCF-DNA 복합체에 대한 중앙 세포 기원을 나타낸다. 더 긴(뉴클레오타이드 크기) cfDNA 단편에 대한 피크는 없었다. 비특이적 마우스 IgG에 결합하기 위해 얻은 cfDNA 라이브러리는 피크를 나타내지 않았다(도 10(b)).
- [0511] CTCF 관련 cfDNA 단편이 ChIP-Seq에 의해 체액의 암 특이적 TFBS 유전자좌에 결합되었다는 증명은 조사 대상cp에서 암 질환의 존재를 나타내며, 이러한 방식으로 바이오마커로 사용될 수 있다. 우리는 본 발명의 방법이 혈장 내 전사 인자의 ChIP-Seq에 대해 그리고 질환에 대한 바이오마커로서 성공적이라는 결론을 내린다.
- [0512] **실시예 19**
- [0513] 안드로겐 수용체(AR)는 전립선암에서 흥미로운 징크 핑거 전사인자이다. 실시예 17의 CTCF에 대해 설명한 것과 동일한 방법을 AR에 적용하였다. 우리는 마우스 항-AR 항체를 사용하여 전립선암으로 진단된 8명의 대상체로부터 교차된 EDTA 혈장 샘플(Streck cfDNA BCT에서 수집)로부터 AR을 면역침강시켰다. LnCAP 전립선 암 세포주 세포의 AR을 양성 대조군으로 사용하여 고체상 지지체에서 ChIP에 의해 분리된 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 11의 결과는 약 100kD의 분자량에서 AR에 해당하는 단백질 밴드가 8개 샘플 모두에 존재하고, 2개 샘플에서 높은 수준으로 존재함을 보여준다(도 11의 레인 2 및 3). 약 50kD의 밴드는 ChIP에 사용된 마우스 항-AR 항체의 중쇄에 표시된 항-마우스 IgG 항체의 결합에 해당한다. 그런 다음, 고체상 지지체에서 DNA를 추출하고, 추출된 DNA 단편을 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 연결하고, 존재하는 DNA를 증폭하였다. 결과(도 12)는 증폭된 cfDNA 라이브러리가 모든 8개 샘플에 대해 35-80bp 범위의 작은 단편(175-220bp의 어댑터 연결된 단편)을 포함하고 있음을 보여준다. 증폭된 cfDNA 라이브러리에는 35-80bp 범위의 작은 단편이 포함되어 있지만 비특이적 마우스 IgG로 코팅된 고체 지지체에서 증폭된 추출물에 대해서도 작은 DNA 단편이 얻어졌기 때문에 이러한 모든 단편이 샘플의 AR에 결합되지는 않았다. 그런 다음, 웨스턴에서 가장 높은 AR 수준을 관찰한 2개 샘플에 대해 얻은 증폭된 cfDNA 라이브러리를 차세대 시퀀싱으로 시퀀싱하였다.
- [0514] **참고문헌**
- Active Motif, Nat. Methods 3: 658 (2006), doi:10.1038/NMETH907
- Bohinski et al. Molecular and Cellular Biology, 14(9): 5671 (1994)
- Corces et al. Science, 362(6413): eaav1898 (2018), doi:10.1126/science.aav1898.
- Crowley et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 10: 472-484 (2013), doi:10.1038/nrclinonc.2013.110
- Darnell, Nat. Rev. Cancer 2: 740-749 (2002), doi:10.1038/nrc906
- Deligezer et al. Clinical Chemistry 54:7 1125-1131 (2008)
- Dunbar, Clinica Chimica Acta 363 (1-2) : 71-82 (2006), doi.org/10.1016/j.cccn.2005.06.023
- Gurel et al. Am J Surg Pathol, 34(8):1097-105 (2010), doi:10.1097/PAS.0b013e3181e6cbf3.
- Heinz et al. Mol. Cell 38(4): 576-89 (2010), doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.004.
- Holdenrieder & Stieber, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 46(1):1-24 (2009), doi:10.1080/10408360802485875
- Hu et al. J. Trans. Med. 17: 124 (2019), doi:10.1186/s12967-019-1871-x
- Jung et al. Clin. Chim. Acta 411(21-22): 1611-24 (2010), doi:10.1016/j.cca.2010.07.032
- Kelly et al. Genome Res. 22: 2497-2506 (2012), doi:10.1101/gr.143008.112.
- Klenova et al. Nucleic Acids Res. 25(3): 466-473 (1997), doi.org/10.1093/nar/25.3.466
- Lambert et al. Cell 172(4):650-665 (2018), doi:10.1016/j.cell.2018.01.029

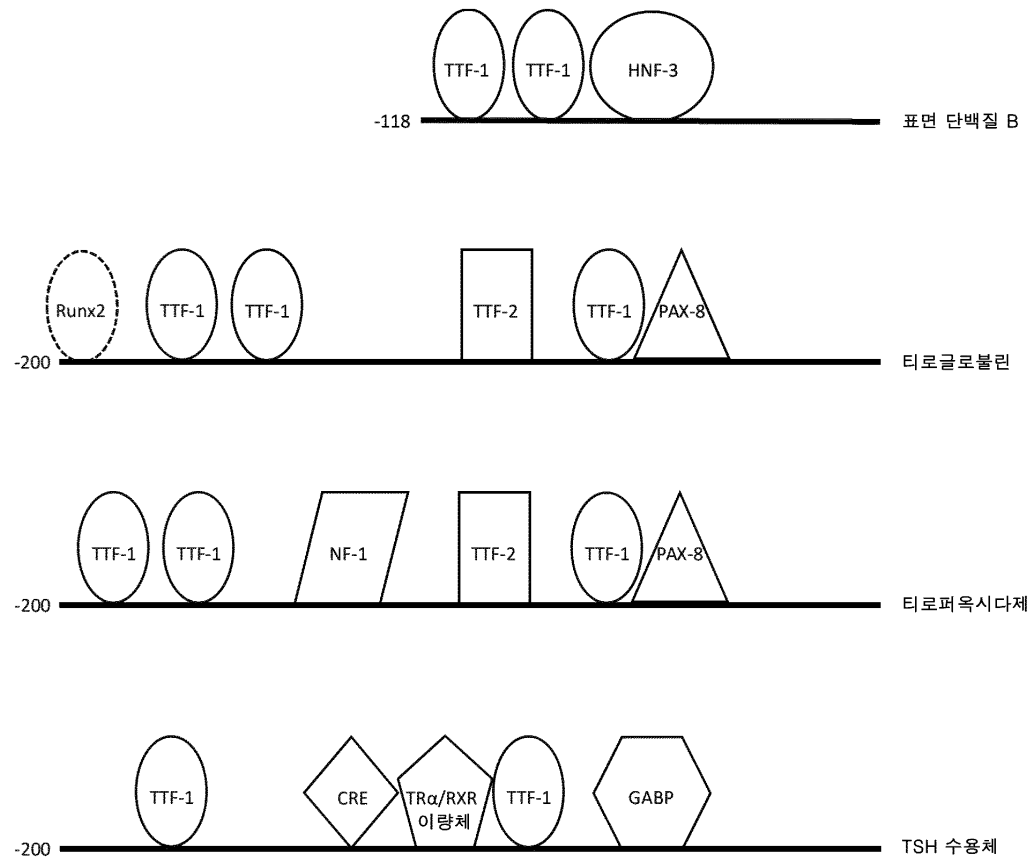
[0515]

- Latil *et al.* Cell Stem Cell 20(2): 191-204.e5 (2017), doi:10.1016/j.stem.2016.10.018.
- Lee *et al.* J. Mol. Med. (Berl). 85(12):1393-404 (2007), doi: 10.1007/s00109-007-0237-7
- Li *et al.* Bioinformatics 25(16): 2078-2079 (2009), doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Lin *et al.* PLoS Genet. 3(6):e87 (2007), doi:10.1371/journal.pgen.0030087.eor
- Liu *et al.* Oncotarget 8(69): 114183-114194 (2017), doi: 10.18632/oncotarget.23172
- Liu *et al.* EBioMedicine 41: 345-356 (2019), doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.010
- Maenhaut *et al.* 2015 In: Feingold, Anawalt, Boyce, et al., editors. Endotext. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285554/>
- Mann *et al.* Curr. Top Dev. Biol. 88: 63-101 (2009), doi:10.1016/S0070-2153(09)88003-4.
- Mansson *et al.* Mol. Oncol. 15(11): 2868-2876 (2021), doi:10.1002/1878-0261.13093
- Matys *et al.* Nucleic Acids Res. 34: D108-D110 (2006), doi:10.1093/nar/gkj143
- Merabet and Mann, Trends Genet. 32(6): 334-347 (2016), doi:10.1016/j.tig.2016.03.004.
- Newman *et al.* Nat. Med. 20(5): 548-54 (2014), doi:10.1038/nm.3519
- Park *et al.* Oncol. Lett. 3(4): 921-926 (2012), doi: 10.3892/ol.2012.592
- Pomerantz *et al.* Nat. Genet. 47(11): 1346-51 (2015), doi:10.1038/ng.3419.
- Poorey *et al.* Science 342(6156): 369-72 (2013), doi:10.1126/science.1242369.
- Ramírez *et al.* Nucleic Acids Res. 44(W1): W160-5 (2016), doi: 10.1093/nar/gkw257
- Ralston, Do transcription factors actually bind DNA? DNA footprinting and gel shift assays. Nature Education 1(1): 121 (2008)
- Sadeh *et al.* Nat. Biotechnol. 39: 586-598 (2021), doi.org/10.1038/s41587-020-00775-6
- Sanchez *et al.* NPJ Genom. Med. 3: 31 (2018), doi:10.1038/s41525-018-0069-0
- Skene and Henikoff, eLife 6:e21856 (2017), doi:10.7554/eLife.21856.002
- Snyder *et al.* Cell 164(1-2): 57-68 (2016), doi:10.1016/j.cell.2015.11.050
- Ulz *et al.* Nat. Commun. 10(1): 4666 (2019), doi:10.1038/s41467-019-12714-4
- Vad-Nielsen *et al.* Lung Cancer 147 : P244-251 (2020),
doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.07.023
- Vaquerizas *et al.* Nat. Rev. Genet. 10(4): 252-63 (2009), doi:10.1038/nrg2538
- Wang *et al.* Genome Res. 22(9): 1680-8 (2012), doi: 10.1101/gr.136101.111
- Zhang *et al.* Genome Biol. 9(9): R137 (2008), doi: 10.1186/gb-2008-9-9-r137
- Zhou *et al.* BMC Genomics 18(1):724 (2017), doi:10.1186/s12864-017-4115-6

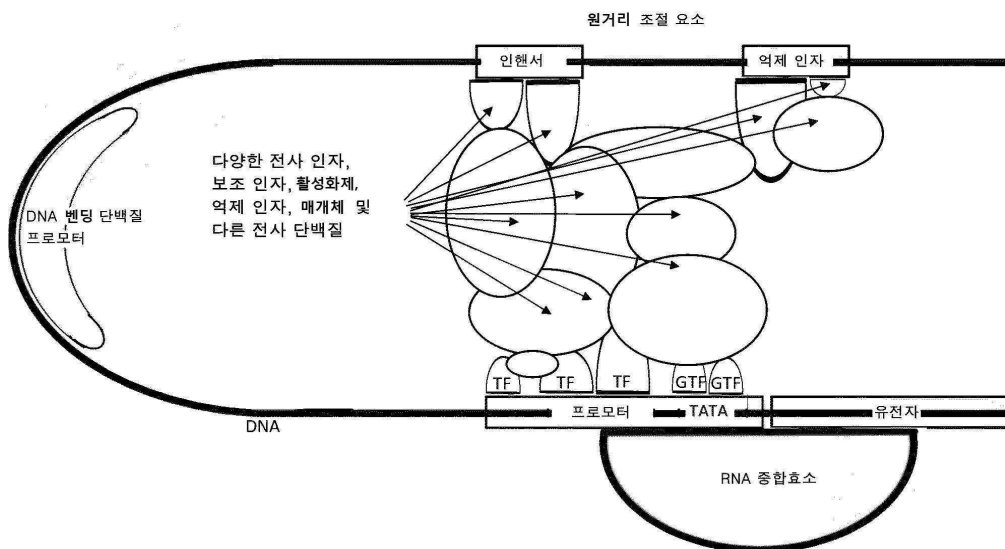
[0516]

도면

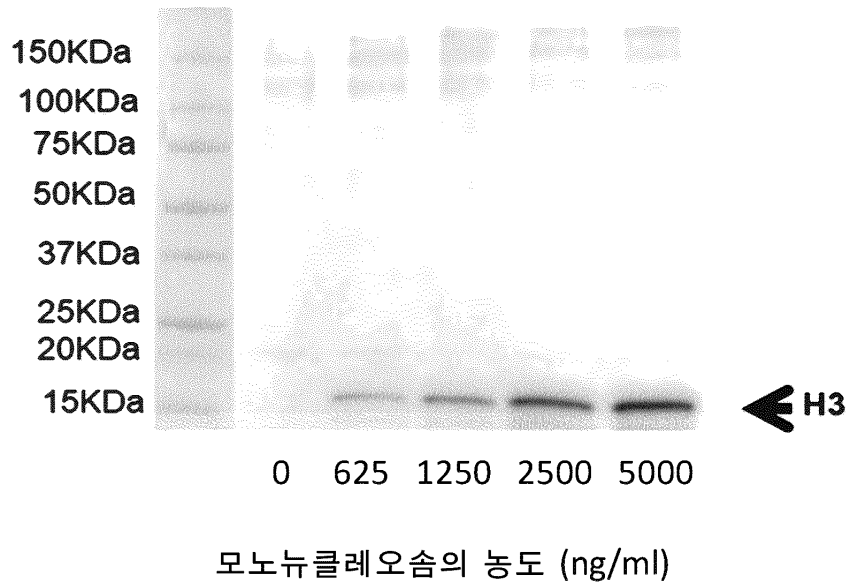
도면1



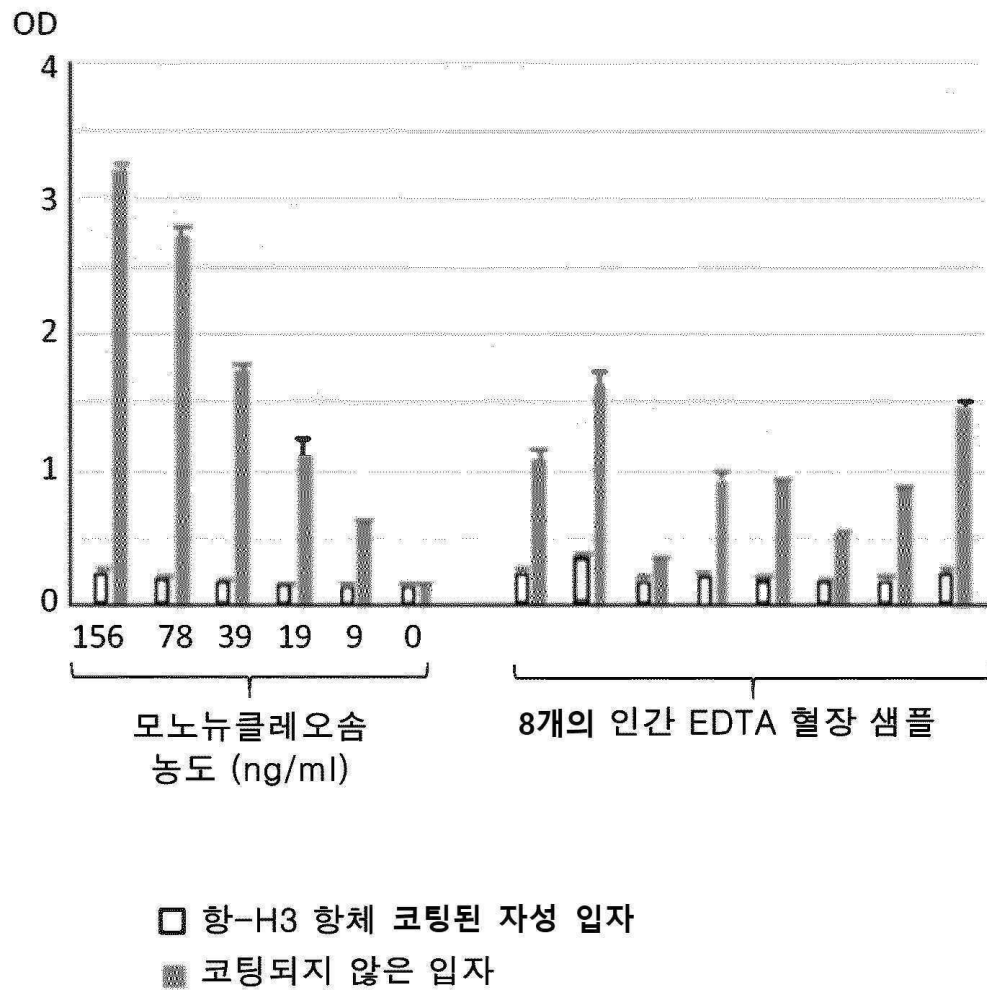
도면2



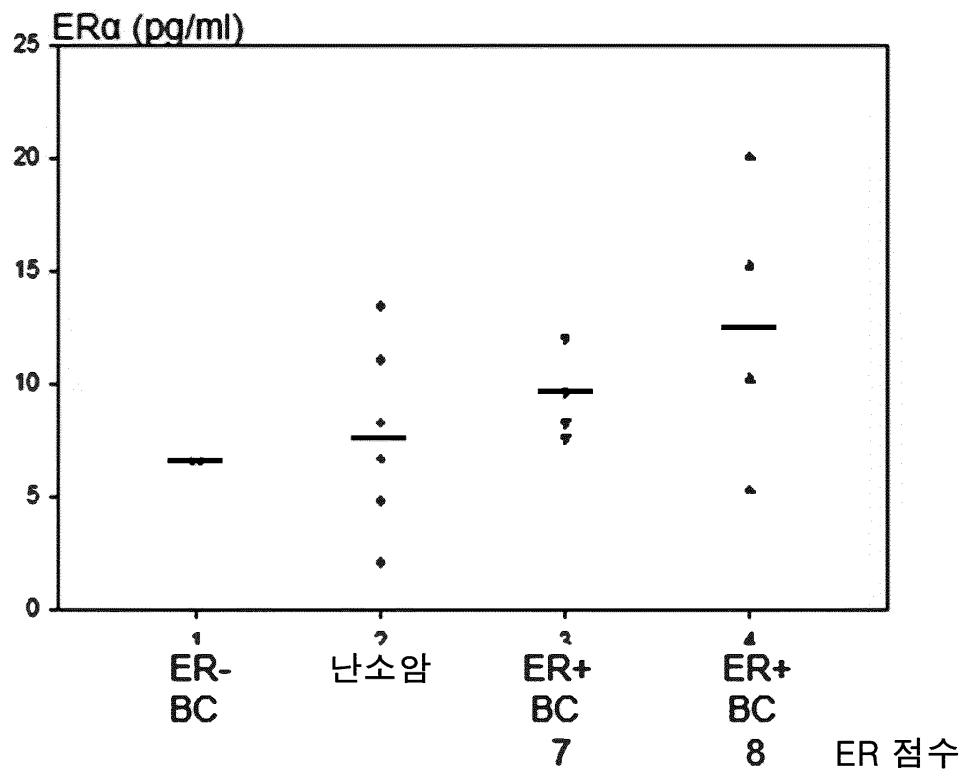
도면3



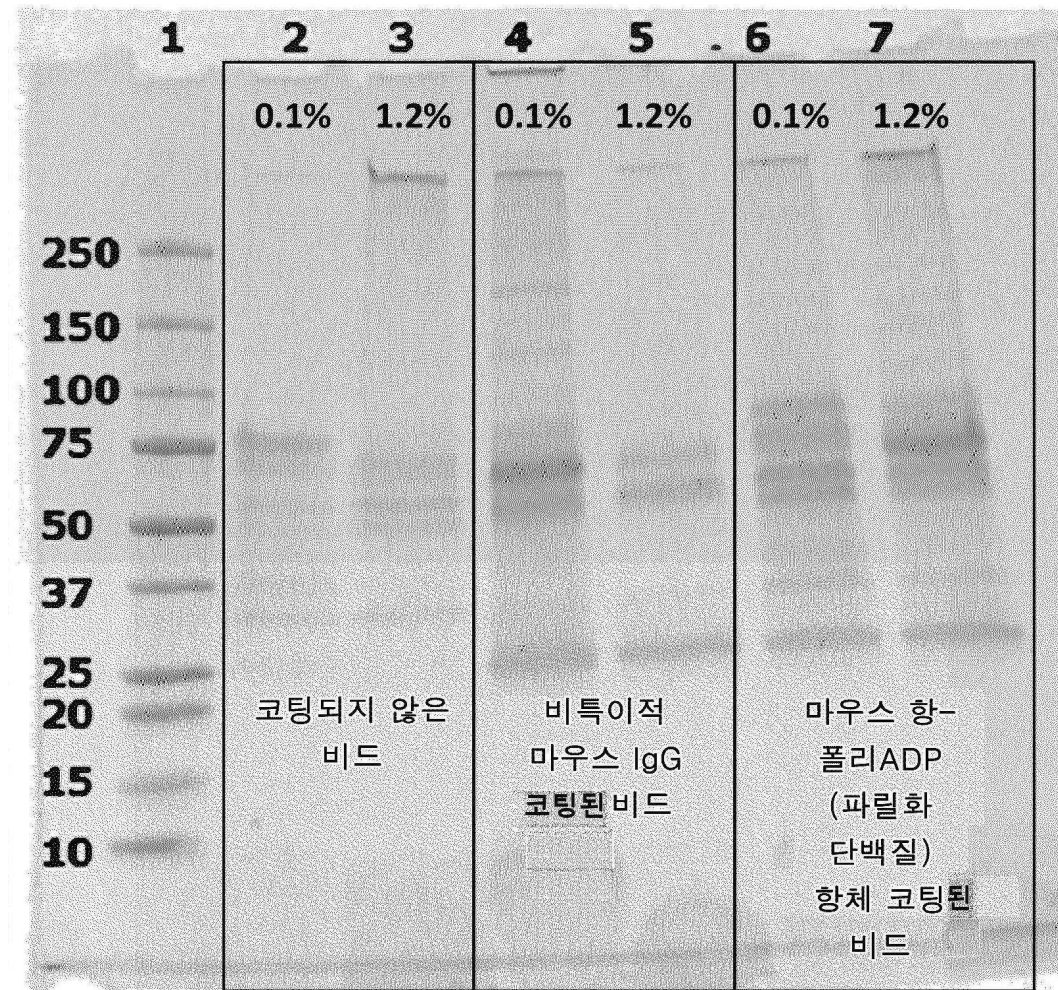
도면4



도면5

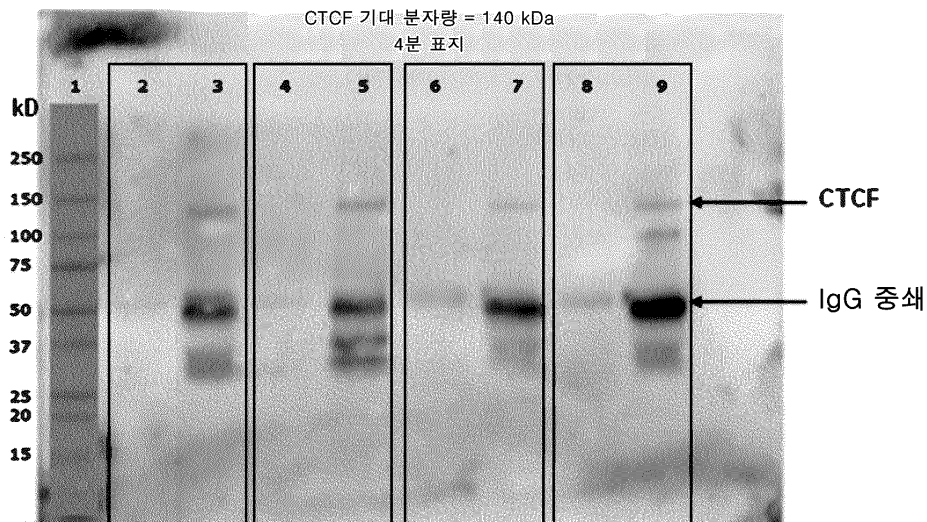


도면6

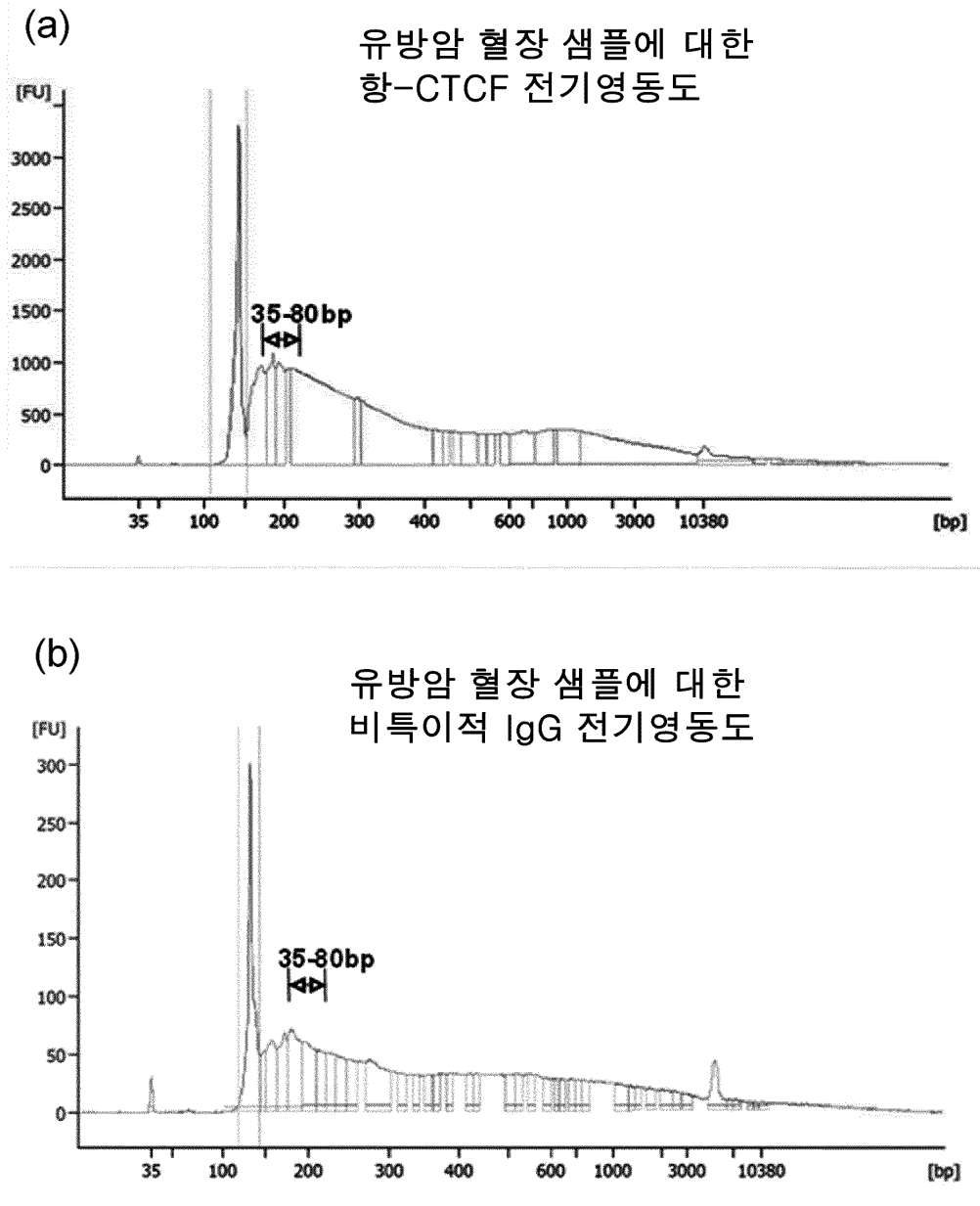


도면7

1	샘플 1		샘플 2		샘플 3		샘플 4	
래더	NS-IgG	항 CTCF	NS-IgG	항 CTCF	NS-IgG	항 CTCF	NS-IgG	항 CTCF

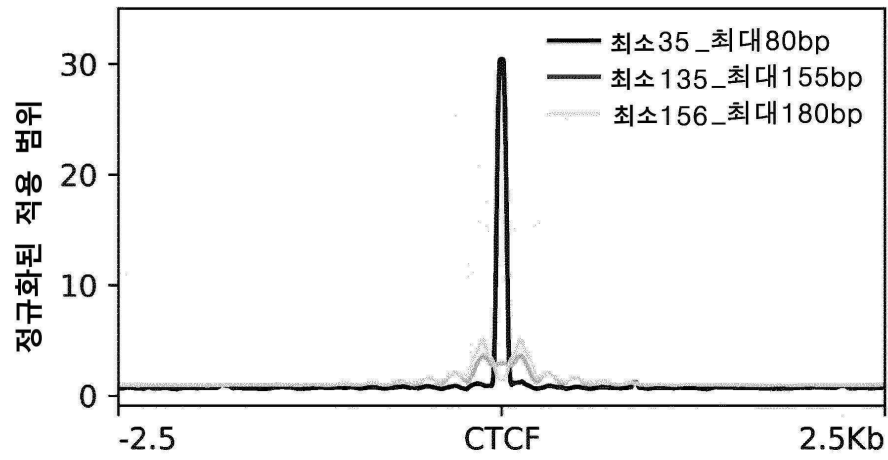


도면8

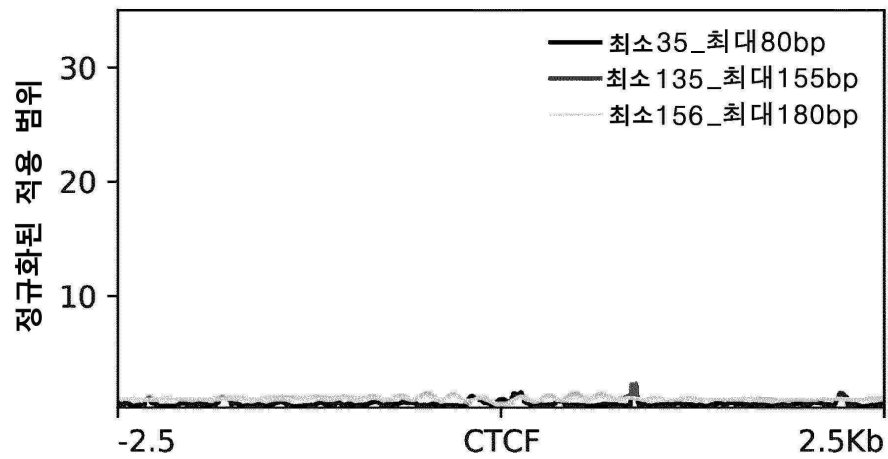


도면9

(a)

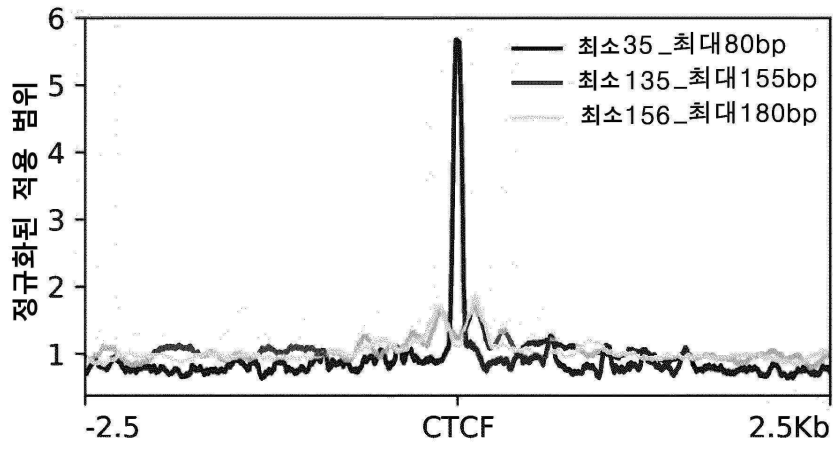


(b)

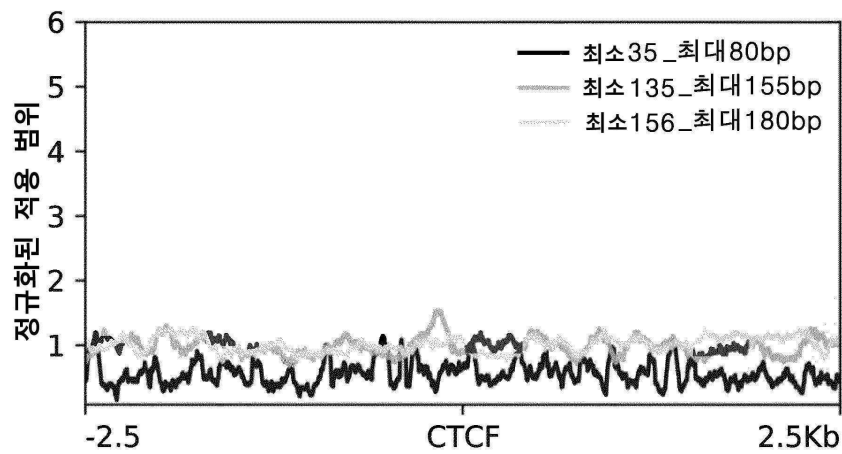


도면10

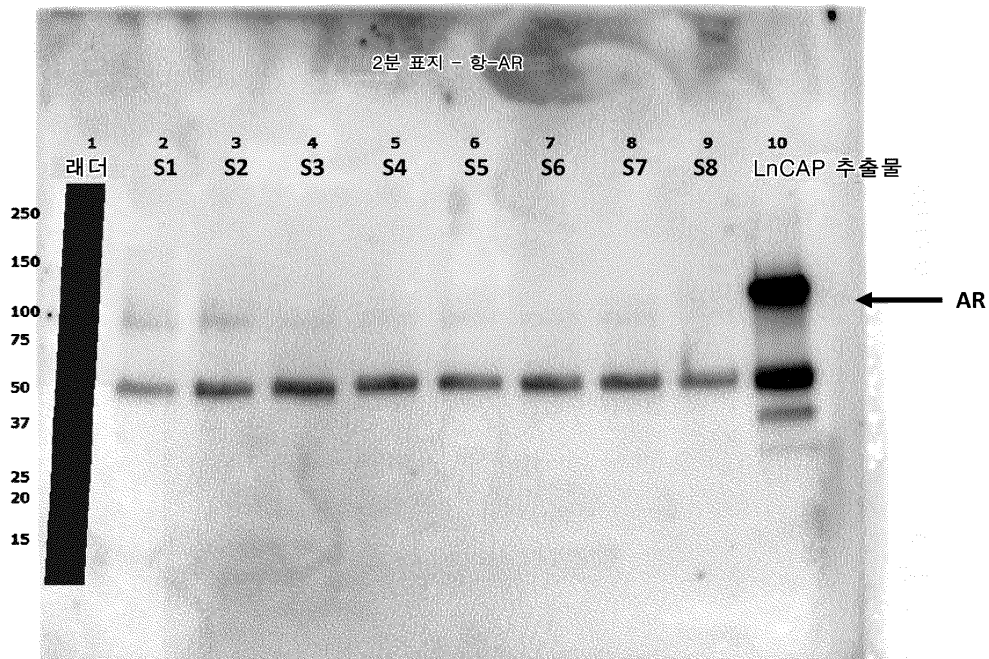
(a)



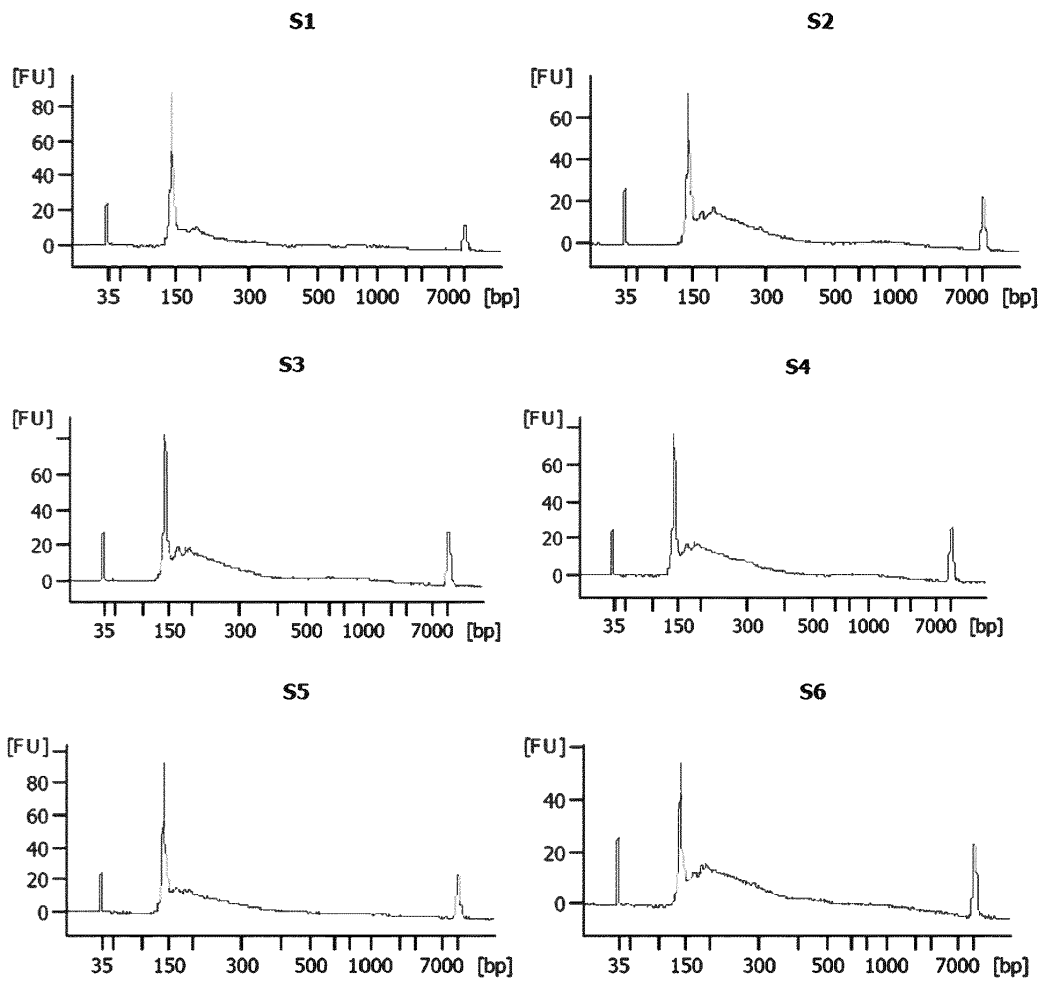
(b)



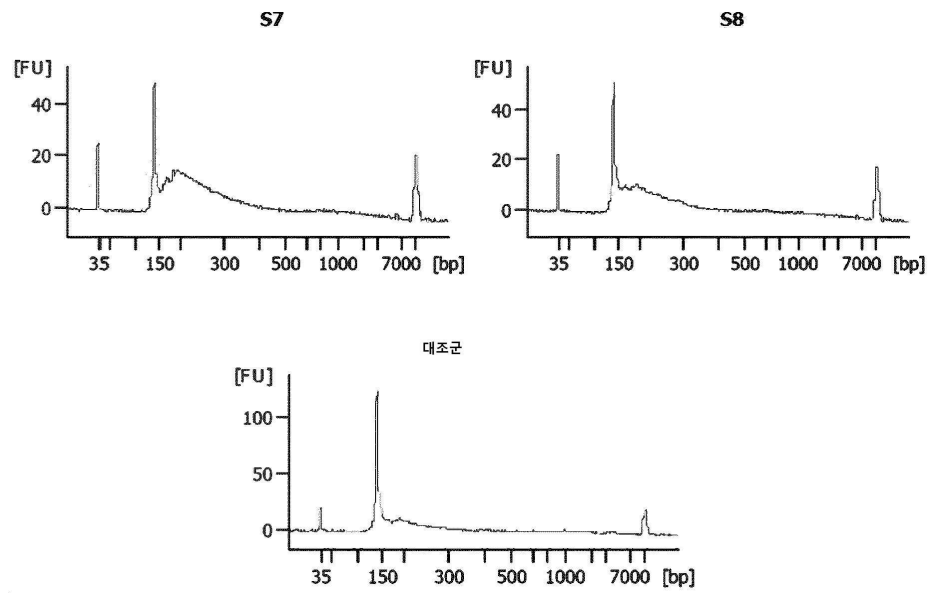
도면11



도면12a



도면12b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Belgian Volition SRL

<120> CIRCULATING TRANSCRIPTION FACTOR ANALYSIS

<130> VOL-C-P2959PCT

<150> 63/131,722

<151> 2020-12-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

gcncctnnag

<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gatcaagcac ctggagggt cttcagagca aagacaaaca ctgaggtcgc tgcca 55

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tggccacacg agtgcctca 20

<210> 4

<211> 120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ccccccgt tctgttccc cacagtttag acaagatcct catgctccac tggccacacg 60

agtgcctca ggaggagtag acacaggtgg agggagctcc ttttgaccag cagagaaaac 120