(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 10 월 8 일 (08.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/204674 A2

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/004602

(22) 국제출원일: 2020 년 4 월 3 일 (03.04.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0039974 2019 년 4 월 5 일 (05.04.2019) KR
10-2019-0157368 2019 년 11 월 29 일 (29.11.2019) KR

(71) 출원인: 주식회사 제놉시 (**GENOPSY CO., LTD.**) [KR/KR]; 06159 서울시 강남구 테헤란로 427, 2층 102-5, Seoul (KR).

(72) 발명자: 조영남 (**CHO, Young Nam**); 06159 서울시 강남구 테헤란로 427, 2층 102-5, Seoul (KR).

(74) 대리인: 류종우 등 (**RYU, Jong Woo** et al.); 06160 서울시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층 선정국제특허법률사무소, Seoul (KR).

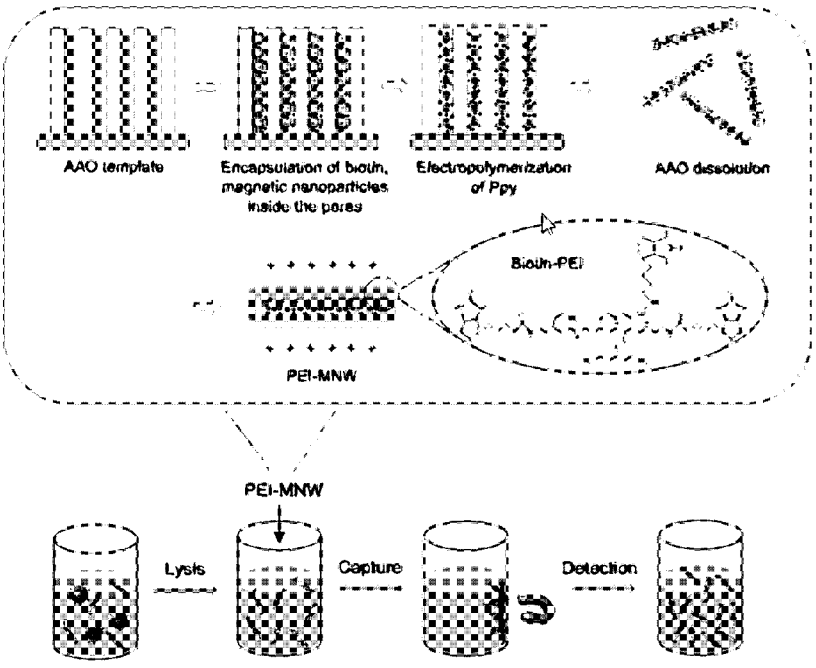
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

WO 2020/204674 A2

(54) **Title:** METHOD FOR DIAGNOSING CANCER USING CFDNA

(54) **발명의 명칭:** CFDNA를 이용한 암 진단방법



(57) **Abstract:** A diagnosis method according to the present invention relates to a technique for concentrating and separating small cfDNA from a liquid specimen such as urine, cerebrospinal fluid, plasma, blood, pleural fluid, or body fluid, and then detecting biomarkers, overexpressed in a specific cancer, with extreme sensitivity and without a PCR. A detection method according to one example of the present invention does not require a PCR amplification reaction, and thus can significantly reduce the time it takes to diagnose cancer. In addition, the method enables immediate on-site analysis, and can be used as point-of-care testing (POCT) that can simultaneously search a large number of genes in a short time.

[다음 쪽 계속]

럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명의 진단 방법은 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 또는 체액 등의 액체 시료로부터 작은 크기의 cfDNA 를 농축하고 분리한 후, PCR 없이 특정 암에서 과발현되는 바이오마커를 초고감도로 검출하는 기술에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예 따른 검출 방법은 PCR 증폭 반응이 필요 없어짐에 따라 암을 진단하기까지 걸리는 시간을 크게 줄일 수 있다. 또한, 현장에서 바로 분석할 수 있으며, 빠른 시간 내에 다수의 유전자를 동시에 검색할 수 있는 현장 진단용 검사(Point-Of-Care Testing, POCT)로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: CFDNA를 이용한 암 진단방법

기술분야

[1] 본 발명은 이중 나선 구조를 가지는 세포유리 DNA를 이용한 암 진단방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 암에서 특이적으로 발현되거나 또는 과발현되는 바이오마커의 유전자를 증폭하는 과정 없이 검출하는 방법 및 이를 이용하기 위한 장치에 관한 것이다.

배경기술

[2] 최근 전 세계적으로 암 질환의 조기 진단 중요성이 크게 부각되고 있다. 따라서 암 조기 진단 방법에 관한 연구가 증가하고 있다. 그러나 현재까지 암 진단 방법은 조직 샘플의 채취 및 내시경 검사와 같은 침습적인 방법으로 이루어지고 있다. 특히, 조직검사는 질병이 의심되는 부위의 일부를 적출해 현미경으로 관찰하는 방식으로 이루어지고 있다. 따라서, 조직 샘플을 채취하기 위해 침이나 펀치, 내시경 또는 복강경을 이용하기 위해서는, 인체를 절개하여야 하므로, 환자가 느끼는 불편함이 적지 않을 뿐 아니라 흉터가 남고 회복하는데 오랜 시간이 걸린다.

[3] 침습적인 진단 및 검사 방법의 대안으로 액체 생체 검사를 이용한 분자진단법이 주목받고 있다. 액체 생체 검사는 비침습적인(non-invasive) 방법을 사용하기 때문에, 검사 결과를 신속하게 확인할 수 있다. 그뿐 아니라, 질병의 일부분만 분석할 수 있었던 조직 샘플과 달리, 액체 생체 검사는 질병에 대해 다각도로 분석을 수행할 수 있다. 특히, 액체 생체 검사는 암의 진단에 탁월한 효용성을 발휘할 것으로 전망된다. 특히, 혈액, 소변 등의 체액 검사만으로 신체 부위별 혈액 내에 존재하는 암세포 유래 DNA를 분석하여 암 발생 및 전이 등에 대한 상세한 관찰이 가능할 것으로 예측된다.

[4] 분자진단법은 체외진단의 대표적인 기술로서, 혈액, 소변 등의 유전자 정보가 들어 있는 시료로부터, DNA 또는 RNA 변화를 수치 또는 영상을 통해 검출해 진단하는 기법이다. 이는 정확도가 높으며 조직검사를 하지 않아도 된다는 장점이 있기 때문에, 유전체 분석기술의 급속한 발전과 함께 비용 절감의 장점을 바탕으로 암 진단 기술에 적용하려는 시도가 이루어지고 있다.

[5] 한편, 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA라 함)는 혈장에 존재하는 세포에서 유래한 DNA를 의미한다. 상기 cfDNA는 통상 이중나선구조를 가질 뿐 아니라, 코일드코일 구조를 가지는 경우가 많다. 상기 cfDNA는 종양 세포에서 유래된 것일 수 있다. 또한, 암 환자로부터 수득된 혈액, 혈장 또는 소변 등과 같은 체액에서는 종양 세포에서 유래된 cfDNA를 발견할 수 있다.

[6] 암 환자에서 발견되는 cfDNA는 세포 괴사, 세포 사멸 또는 비뇨 기관의 정상세포 및/또는 암세포에서 유래하는 경우가 많다. 이러한, cfDNA는 다양한

과정을 통해 소변, 혈액 등으로 방출된다. 따라서, 혈액, 혈장 또는 소변 등의 생물학적 시료 내의 cfDNA를 분리하고 검출하는 기술이 발전함에 따라, 액체 생체 검사가 암 위험군 환자를 모니터링 하는데 보다 효과적이고 신뢰할 수 있는 도구가 될 것으로 예측되고 있다. 특히, 소변, 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF), 혈장, 흉수, 복수, 혈액 또는 체액은 쉽게 얻을 수 있는 시료이므로, 반복적인 샘플링을 통해 단순하고 비침습적인 방법으로 대량의 검체 수집이 가능하다.

[7] 그러나, 혈액, 소변 등 액체 시료 내 cfDNA를 분석하고 유전자에 존재하는 변이를 발견하여 암을 조기에 진단하는 방법은 현재의 기술 수준상 많은 어려움이 있다. 따라서, 용이하게 cfDNA를 검출하는 방법의 개발뿐 아니라, 검출 민감도의 향상 및 정확한 암 조기진단을 위한 기술이 요구되고 있는 실정이다.

[8] 한편, 한국등록특허 제10-1751962호에는 cfDNA를 검출하기 위하여 프라이머를 이용하여 연쇄중합반응을 하고, 이때, cfDNA에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용하여 cfDNA를 정량화할 수 있다는 점이 개시되어 있다. 그러나 연쇄중합반응을 하기 위하여는 별도의 중합효소 및 실험기자재가 필요하다는 문제점이 여전히 존재할 뿐 아니라, 현장 진단이 용이하지 않다는 문제점이 있다.

[9] 또한, 한국등록특허 제10-1701618호에서는 cfDNA를 효과적으로 분리하기 위하여 전기장 변화를 통해 표면의 성질이 변할 수 있는 나노구조체를 개시하고 있다. 상기 나노구조체는 전기변화를 통해, cfDNA를 결합시키거나 해리시킬 수 있어 시료로부터 용이하게 cfDNA를 분리할 수 있다. 그러나, 어떠한 cfDNA가 존재하는지를 확인하기 위하여는 여전히 연쇄중합반응을 이용하여야 하는 한계가 있다.

[10] 연쇄중합반응을 수행하여 cfDNA를 증폭하기 위해서는 여러 종류의 프라이머 세트가 필요할 뿐 아니라, 복잡한 단계를 수행해야 하므로 많은 시간이 소요된다. 따라서, PCR을 수행해야만 하는 한계를 극복하고, cfDNA를 높은 정확도로 분석하기 위한 방법을 개발하기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 뿐만 아니라, cfDNA가 액체 시료에서 극히 낮은 수준으로 발견되기 때문에, 높은 정확도와 적은 시료 양으로 DNA 수득 및 분석 방법을 개발하기 위한 연구 및 효율적인 분석 방법에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 종래에 cfDNA를 검출하기 위하여는 cfDNA와 상보적인 프라이머가 결합될 수 있도록 이중가닥의 cfDNA를 단일가닥의 DNA로 만드는 변성과정이 필수적이다. 따라서, cfDNA를 검출하기 위하여는 열을 가하는 과정이 필수적이고, 중합효소 등과 반응하는 과정이 필수적이다.

[12] 그러나, 본 발명자는 암 세포에서 DNA 전사과정이 활발하게 일어나 전사과정 중 이중가닥의 DNA가 단일가닥으로 풀린 DNA 구간이 많이 존재하고, 이러한

암세포로부터 유리된 cfDNA는 변성과정 없이도 프로브가 cfDNA와 결합할 수 있다는 점을 발견하여 본 발명을 착안하였다.

[13] 따라서, 본 발명의 일 측면은 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혈장 또는 소변과 같은 액체 시료에 존재하는 암 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 바이오마커를 PCR이나 핵산의 증폭단계없이 검출하는 방법을 제공한다.

[14] 또 다른 측면에 따르면, 암세포 바이오마커의 돌연변이(예, SNP)를 PCR이나 핵산의 증폭단계 없이 검출하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA는 암세포에서 유래된 것이며, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 암을 진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[16] 본 발명의 암 진단 방법은 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 또는 체액 등의 액체 시료로부터 작은 크기의 cfDNA를 분리한 후, PCR 없이 암에서 특이적으로 또는 과발현되는 바이오마커를 초고감도로 검출하는 기술에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예 따른 검출 방법은 PCR 증폭 반응이 필요 없어짐에 따라 암을 진단하기까지 걸리는 시간을 크게 줄일 수 있다. 또한, 현장에서 바로 분석할 수 있으며, 빠른 시간 내에 다수의 유전자를 동시에 검색할 수 있는 현장 진단용 검사(Point-Of-Care Testing, POCT)로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 방법에 따르면, 정상인의 혈액에 존재하는 cfDNA와 암환자의 혈액에 존재하는 cfDNA를 구분할 수 있기 때문에 각종 암을 효과적으로 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[17] 도 1a는 양전하를 띠는 나노와이어(PEI/Ppy NW)의 주사전자현미경(SEM) 이미지를 나타낸 것이다.

[18] 도 1b는 HRP/스트렙타비딘이 결합된 나노입자의 주사전자현미경 이미지를 나타낸 것이다.

[19] 도 2a는 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)의 제조 및 이를 이용하여 cfDNA를 검출 및 회수하는 방법에 대한 개념적 모식도를 나타낸 도면이다.

[20] 도 2b는 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)이 표면에 결합된 자성나노구조체(PEI/mPpy NW)를 이용하여 cfDNA를 검출 및 회수하는 과정을 촬영하여 과정별로 나타낸 도면이다.

[21] 도 3은 에펜도르프 튜브를 이용하여 cfDNA를 회수하는 과정을 도식화한 도면이다.

[22] 도 4 및 도 5는 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PD-L1 DNA 발현(PD-L1 DNA expression) 및 PD-L1 mRNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[23] 도 6 및 도 7은 EpCAM 양성 암세포주 또는 EpCAM 음성 암세포주의 cfDNA로부터 EpCAM DNA 발현(EpCAM DNA expression) 및 EpCAM mRNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[24] 도 8 및 도 9는 FOLR1 양성 암세포주 또는 FOLR1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 FOLR1 DNA 발현(FOLR1 DNA expression) 및 FOLR1 mRNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[25] 도 10 및 도 11은 EGFR 양성 암세포주 또는 EGFR 음성 암세포주의 cfDNA로부터 EGFR DNA 발현(EGFR DNA expression) 및 EGFR mRNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[26] 도 12 및 도 13은 ERBB2 양성 암세포주 또는 ERBB2 음성 암세포주의 cfDNA로부터 ERBB2 DNA 발현(ERBB2 DNA expression) 및 ERBB2 mRNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[27] 도 14 및 도 15는 OGT 양성 암세포주 또는 OGT 음성 암세포주의 cfDNA로부터 OGT DNA 발현(OGT DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[28] 도 16 내지 도 18은 CEA 양성 암세포주 또는 CEA 음성 암세포주의 cfDNA로부터 CEA DNA 발현(CEA DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[29] 도 19 및 도 20은 PSA 양성 암세포주 또는 PSA 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PSA DNA 발현(PSA DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[30] 도 21 및 도 22는 CA19-9 양성 암세포주 또는 CA19-9 음성 암세포주의 cfDNA로부터 CA19-9 DNA 발현(CA19-9 DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[31] 도 23 및 도 24는 CA125 양성 암세포주 또는 CA125 음성 암세포주의 cfDNA로부터 CA125 DNA 발현(CA125 DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[32] 도 25 및 도 26는 AFP 양성 암세포주 또는 AFP 음성 암세포주의 cfDNA로부터 AFP DNA 발현(AFP DNA expression) 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[33] 도 27 내지 도 29는 전립선암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 PSA, PSMA, PAP 및 PAC3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[34] 도 30 내지 도 32는 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 PSA, PSMA, PAP

및 PAC3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[35] 도 33 및 도 34는 폐암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1 및 TPA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[36] 도 35는 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1 및 TPA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[37] 도 36 내지 도 38은 갑상선암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA, NSE, TG 및 CALCA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[38] 도 39 및 도 40은 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA, NSE, TG 및 CALCA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[39] 도 41 및 도 42는 방광암 환자로부터 수득한 소변을 이용하여 OGT, FGFR3, TP53, NMP22 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[40] 도 43 및 도 44는 방광염증 환자로부터 수득한 소변을 이용하여 OGT, FGFR3, TP53, NMP22 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[41] 도 45 및 도 46은 정상인으로부터 수득한 소변을 이용하여 OGT, FGFR3, TP53, NMP22 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[42] 도 47 및 도 48은 유방암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA27-29, CA15-3 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[43] 도 49 및 도 50은 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA27-29, CA15-3 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[44] 도 51 및 도 52는 대장암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA 및 CA19-9의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[45] 도 53 내지 도 55는 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA 및 CA19-9의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[46] 도 56은 담도암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA19-9, CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[47] 도 57 및 도 58은 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA19-9, CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[48] 도 59는 위암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA, CA19-9, CGB 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[49] 도 60 및 도 61은 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CEA, CA19-9, CGB 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[50] 도 62 내지 도 65는 췌장암 환자로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA19-9, CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[51] 도 66 내지 도 69는 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용하여 CA19-9, CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[52] 도 70은 폐암 환자로부터 수득한 혈장을 이용해 CPT1A의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[53] 도 71은 정상인으로부터 수득한 혈장을 이용해 CPT1A의 DNA 발현 정도를

측정하여 나타낸 도면이다.

[54] 도 72는 방광암 환자로부터 수득한 소변을 이용해 CPT1A의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[55] 도 73은 정상인으로부터 수득한 소변을 이용해 CPT1A의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[56] 도 74는 IFN-γ를 처리하지 않은 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PD-L1의 DNA 발현 정도와 본 발명의 일 구체예의 방법으로 PD-L1의 검출 여부를 측정하여 나타낸 도면이다.

[57] 도 75는 IFN-γ를 처리하지 않은 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 IFNG(IFN-γ)의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[58] 도 76은 IFN-γ를 처리하지 않은 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 IFNR1(IFN-γ receptor)의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[59] 도 77 내지 도 79는 IFN-γ를 처리한 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PD-L1, IFNG 및 IFNR1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[60] 도 80은 IFN-γ의 처리유무에 따라 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PD-L1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[61] 도 81은 IFN-γ의 처리유무에 따라 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 IFN-γ의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[62] 도 82는 IFN-γ의 처리유무에 따라 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 IFNR1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[63] 도 83은 IFN-γ의 처리유무에 따라 PD-L1 양성 암세포주 또는 PD-L1 음성 암세포주의 cfDNA로부터 PD-L1의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[64] 도 84는 본 발명의 검출 단계를 도식화한 것이다.

[65] 도 84a는 폴리에틸렌이민(PEI)이 표면에 결합된 나노와이어(PEI/Ppy NW)를 이용하여 환자의 체액으로부터 cfDNA를 수득한 후 프로브 및 HRP/스트렙타비딘-나노입자(HRP/st-tagged NP)와의 반응을 통하여 유전자 변이를 약 60분 이내에 분석하는 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

[66] 도 84b는 나노와이어, 프로브 및 HRP/스트렙타비딘 나노입자를 이용하여 불안정한 cfDNA를 검출하는 방법을 도식화한 것이다.

[67] 도 84c는 자성 나노입자를 포함하지 않은 나노와이어를 사용하여 스핀 컬럼(spin column)을 통해 유전자변이를 검출하는 과정을 나타낸 도면이다. 본

발명의 일 구체예에서 라이시스 버퍼를 처리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[68] 도 84d는 혈액, 뇌척수액 또는 흉수와 같은 시료에서 불안정한 cfDNA를 검출하기 위한 방법을 시계열적 흐름으로 나타난 것이다.

[69] 도 84e는 소변과 같은 시료에서 불안정한 cfDNA를 검출하기 위한 방법을 시계열적 흐름으로 나타난 것이다.

[70] 도 84f는 혈액에서 취득한 cfDNA의 상태에 따른 변성 조건의 차이를 도식화한 것이다.

[71] 도 84g는 소변, 타액 및 객담에서 취득한 cfDNA의 상태에 따른 변성 조건의 차이를 도식화한 것이다.

[72] 도 85는 자성 나노입자를 포함하지 않은 나노와이어를 사용한 스핀 컬럼(spin column)을 통해 cfDNA를 분리한 것을 나타낸 도면이다. 위 사진은 원심분리 전 스핀 컬럼의 SEM 이미지이며, 아래 사진은 원심분리 후 cfDNA가 분리된 스핀 컬럼의 SEM 이미지이다.

[73] 도 86은 주사바늘을 이용해 폐암환자로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[74] 도 87은 랜싯을 이용해 폐암환자로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[75] 도 88은 주사바늘을 이용해 정상인으로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[76] 도 89는 랜싯을 이용해 정상인으로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[77] 도 90은 EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 도면이다.

[78] 도 91은 EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 도면이다.

[79] 도 92는 EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 RT-PCR 및 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[80] 도 93은 EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK fusion var.1 또는 EML4-ALK fusion var.3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 도면이다.

[81] 도 94는 EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK fusion var.1 또는 EML4-ALK fusion var.3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[82] 도 95는 소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3,

KRAS, SYP, NCAM1, NKX2-1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않는다는 것을 알게되었다.

[83] 도 96은 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion이 암 조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하여 partial response (PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[84] 도 97은 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않을 것이기 때문에, 처음부터 alectinib을 처방하여 환자의 반응을 기다리고 있다.

[85] 도 98은 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3, BRAFV800E, TP53 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않는다는 것(PD)을 알게 되었다.

[86] 도 99는 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion 이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하여 partial response(PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[87] 도 100은 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 그 결과, EML4-ALK fusion 이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI가 잘 반응하여 partial response(PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[88] 도 101은 *in vitro* 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 도면이다.

[89] 도 102는 *in vitro* 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 도면이다.

[90] 도 103은 *in vitro* 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[91] 도 104는 *in vitro* 상에서 각 세포주의 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를

측정한 도면이다.

[92] 도 105는 *in vitro* 상에서 각 세포주의 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[93] 도 106은 *in vitro* 상에서 각 세포주로부터 OGT의 발현 정도를 웨스턴블랏, RT-PCR 및 cfDNA 검출을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[94] 도 107은 *in vitro* 상에서 각 세포주로부터 자성 나노입자를 포함하지 않은 나노와이어에 검출된 OGT의 cfDNA를 촬영한 사진이다.

[95] 도 108은 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA를 정량한 그래프이다.

[96] 도 109는 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 그래프이다.

[97] 도 110은 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 그래프이다.

[98] 도 111 내지 도 113은 블라인드 테스트로 여러 암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 도면이다.

[99] 도 114 내지 도 116은 갑상선암 환자의 조직으로부터 수득한 cfDNA로부터 BRAF V600E 및 TERT C250T의 DNA 발현 정도를 분석한 도면이다.

[100] 도 117 및 도 121은 소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 SYP, CgA, NCAM1, NKX2-1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다. 특히, 도 120의 환자의 경우, small-cell-lung cancer(SCLC)로 원자력 병원에서 확인했으며, crizotinib을 처방했으나 효과가 없음이 확인되었다.

[101] 도 122는 비소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 SYP, CgA, NCAM1, NKX2-1의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[102] 도 123은 항암 치료 전과 후의 폐암환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA의 DNA 발현 정도 및 환자의 예후를 나타낸 도면이다.

[103] 도 124 내지 도 128은 폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 NSE, CEA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[104] 도 129 내지 도 133는 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 NSE, CEA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[105] 도 134는 전립선암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 PSA, PSMA, PAP, PCA3 등의 암 관련 바이오마커의 DNA 발현정도를 측정한 도면이다.

[106] 도 135는 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 PSA, PSMA, PAP, PCA3 등의 암 관련 바이오마커의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[107] 도 136은 전립선암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 TMPRSS2-ERG fusion의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[108] 도 137은 갑상선암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, NSE, TG(Thyroglobulin) 및 CALCA의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[109] 도 138은 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, NSE, TG(Thyroglobulin)

및 CALCA의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[110] 도 139는 갑상선암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 BRAF mutation(V600E), TERT Promotor mutation(C228T, C250T)의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[111] 도 140은 방광암 환자, 혈뇨환자 및 정상인으로부터 수득한 소변을 이용해 OGT, FGFR3, TP53, NMP22 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[112] 도 141은 유방암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CA27-29 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[113] 도 142는 대장암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA 및 CA19-9의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[114] 도 143 및 도 144는 담도암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CA 19-9, CEA 및 CA123의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[115] 도 145는 위암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9, CGB 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[116] 도 146은 난소암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[117] 도 147은 췌장암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9 및 CA125의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[118] 도 148은 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9 및 CA125의 DNA 발현 정도를 측정한 도면이다.

[119] 도 149 및 도 150은 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 암 관련 바이오마커의 DNA 발현 정도를 측정하여 조기 진단을 실시한 결과이다(PC: Positive control, PC는 조기 암진단 실험이 정확하게 진행되었는지 확인하는 도구로서, 조기 암진단 결과와 무관하다).

[120] 도 151 및 도 152는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 암종별 바이오마커를 정리한 도면이다.

[121] 도 153은 HPV 양성 자궁경부암 환자(HPV16(+) 및 HPV18(+)) 및 HPV 음성 건강 대조군(HPV-)의 소변에 존재하는 cfDNA와 HPV 18 또는 HPV 16에 특이적인 프로브의 결합 여부를 흡광도를 통하여 확인한 것이다.

[122] 도 154는 자궁경부암 환자의 소변에서 분리한 cfDNA에 HPV 16, EGFR19 deletion, HPV 18, 및 EGFR 21 L858R에 특이적인 프로브를 순차적으로 반응시킨 후, cfDNA와 각 프로브의 결합여부를 확인한 것이다.

[123] 도 155는 151명의 폐암 환자들의 혈장으로부터 수득한 cfDNA를 이용하여 폐암 환자의 유전자 변이를 분석한 표이다.

[124] 도 156는 EGFR 변이가 없는 환자(Wild type), EGFR exon19 deletion이 있는 환자 및 EGFR exon 21 L858R을 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon19 Del에 특이적인 프로브를 혼합한 후, UV 스펙트럼의 흡광도(ΔOD, 500 nm 내지 650 nm) 값의 분석을 통하여 폐암 환자의 유전자 변이를 확인한

것이다.

[125] 도 157은 EGFR exon19 deletion이 있는 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon19 Del에 특이적인 프로브를 혼합한 후, 유전자 변이의 특이도와 민감도를 분석한 것이다.

[126] 도 158은 EGFR 변이가 없는 환자(Wild type), EGFR exon19 deletion이 있는 환자 및 EGFR exon 21 L858R을 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon21 L858R에 특이적인 프로브를 첨가한 후, UV 스펙트럼의 흡광도(ΔOD, 500 nm 내지 650 nm) 값의 분석을 통하여 환자의 유전자 변이를 확인한 것이다.

[127] 도 159는 EGFR exon 21 L858R이 있는 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 추가한 후, 환자의 유전자 변이의 특이도와 민감도를 분석한 것이다.

[128] 도 160은 EGFR exon 19 deletion의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 CP_1 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다. 이때, CP는 변이가 있는 부분을 포함하거나 인접한 서열에 상보적으로 결합하도록 디자인한 프로브이며, DP는 변이 서열에서 이격된 부분에 상보적으로 결합하도록 디자인된 프로브를 의미한다.

[129] 도 161은 EGFR exon 20 T790M의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 CP2 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다.

[130] 도 162는 EGFR exon 21 L858R의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 CP2 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다.

[131] 도 163은 EGFR exon 19 deletion 및 EGFR exon 20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA를 EGFR exon 19 deletion(Del19), EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 이용하여 반응시킨 후 HRP/스트렙타비딘 나노입자(다량의 HRP를 포함)를 첨가하여 cfDNA의 검출여부를 색깔 변화 및 UV 흡광도로 확인한 것이다.

[132] 도 164는 도 163과 동일한 EGFR exon 19 deletion 및 EGFR exon 20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA를 EGFR exon 19 deletion(Del19), EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 이용하여 반응시킨 후 HRP/스트렙타비딘 복합체(HRP와 스트렙타비딘이 1:1로 결합된 복합체)를 첨가하여 cfDNA의 검출여부를 색깔 변화 및 UV 흡광도로 확인한 것이다. HRP/스트렙타비딘 나노입자에 비해 HRP/스트렙타비딘 복합체의 경우 노이즈가 생성됨을 확인한 것이다.

[133] 도 165는 5명의 EGFR exon19 deletion 및 exon20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장에서 cfDNA를 추출한 후 EGFR exon 19 Del, EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브 및 HRP/스트렙타비딘

나노입자(HRP/st-tagged NP)와 반응시킨 결과와 EGFR exon19 Del, EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브와 HRP/스트렙타비딘 복합체(HRP와 스트렙타비딘이 1:1로 결합)를 반응시킨 결과의 분석을 통하여 암조직과 유전형과의 일치성을 확인 및 비교한 것이다.

[134] 도 166은 EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L861Q 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 EGFR exon 19 deletion(19 Del), EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R 및 EGFR exon L861Q에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합한 결과 암조직과 동일하게 EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L861Q 에서만 유전자변이가 관찰됨을 UV 흡광도로 확인한 것이다.

[135] 도 167은 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(I1171N/T) 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(T1151, L1152P, L1152R, C1156Y, I1171N/T)에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합한 결과 암조직과 동일하게 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(I1171N/T) 유전형이 검출되는 것을 확인하였다.

[136] 도 168은 BRAF V600E 유전자 변이를 가진 갑상선암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 BRAF V600E에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합하였다. 그 결과 BRAF V600E 유전자 변이가 환자의 유전형과 동일하게 검출되는 것을 확인하였다.

[137] 도 169는 정상인의 혈액에서 채취한 시료를 여러가지 온도 조건으로 변성 시킨 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[138] 도 170은 환자의 혈액에서 채취한 시료를 여러가지 온도 조건으로 변성 시킨 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[139] 도 171은 돌연변이 세포주에서 얻은 fDNA를 여러가지 온도 조건으로 변성 시킨 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[140] 도 172는 돌연변이 세포주에서 얻은 fDNA를 DNase로 37℃, 30분간 처리 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[141] 도 173은 돌연변이 세포주에서 얻은 fDNA를 DNase로 37℃, 60분간 처리 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[142] 도 174는 돌연변이 세포주에서 얻은 fDNA를 DNase로 37℃, 120분간 처리 후, 처리조건에 따라 불안정한 cfDNA의 검출 결과를 나타낸 것이다.

[143] 도 175는 DNase의 활성에 따른 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA의 차이점을 확인하기 위하여, DNase 1 ㎕ 또는 2 ㎕를 24℃, 120분간 처리한 결과를 나타낸 것이다.

[144] 도 176은 DNase의 활성에 따른 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA의 차이점을 확인하기 위하여, DNase 1 ㎕ 또는 2 ㎕를 3℃, 120분간 처리한 결과를 나타낸 것이다.

[145] 도 177은 본 발명의 일 실시예로서 폐암환자의 혈장에서 cfDNA를 이용하여 EML4-ALK fusion gene을 검출할 때 cutoff 값의 일 구체예를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[146] <용어의 정의>

[147] 본 명세서에서 사용된 용어, "세포유리(cell-free) DNA"는 cfDNA로도 불린다. 또한, cfDNA는 종양 세포에서 기인하여 암 환자로부터 유래된 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 또는 체액 등의 생물학적 시료에서 발견될 수 있는 암세포 유래 DNA인 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)일 수도 있다. 또한, 소변, 뇌척수액, 흉수, 복수, 혈장, 혈액, 타액, 객담, 또는 체액 등의 생물학적 시료 내에 cfDNA가 존재할 수 있다. 이때, cfDNA는 약 80 bp 내지 약 10 kbp, 약 100 bp 내지 약 1 kbp, 약 120 bp 내지 약 500 bp의 크기를 가질 수 있다. 또한, cfDNA는 약 150 bp 내지 약 200 bp의 크기를 가질 수 있으며, 통상, 약 165 bp 내지 약 170 bp의 크기를 가질 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 cfDNA는 약 80 bp 또는 그 이하의 작은 크기의 cfDNA를 포함할 수 있다.

[148] 본 명세서에서 사용된 용어, "불안정한 cfDNA"는 "안정한 cfDNA"에 비해 열역학적으로 불안정한 cfDNA를 의미한다. 즉, 안정한 cfDNA가 변성이 되는 조건보다 덜 가혹한 조건에서 불안정한 cfDNA는 변성이 될 수 있다. 상기 불안정한 cfDNA가 생성되는 이유는 불안정한 cfDNA는 불안정한 이중 나선 구조를 가지기 때문이다. 구체적으로, 암세포에서 과발현되는 유전자에서 유래되는 cfDNA는 불안정한 cfDNA의 일 구체예 일 수 있다.

[149] 본 명세서에서 사용된 용어, "불안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA"는 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 한다. 상기 Tm은 녹는 온도(melting temperature)를 뜻하며, 이중 가닥 DNA의 50%가 단일 가닥 DNA로 바뀌는 온도를 의미한다. Tm 값은 DNA의 길이에 비례하고, 뉴크레오티드 서열에 따라 상이할 수 있다. 다만, 게놈 DNA는 많은 수의 뉴클레오티드가 수소 결합을 하고 있으므로, 약 92℃ 내지 약 95℃로 5분 이상 가열하거나, 약 98℃에서 2분 이상 가열해야 한다. 또한, 약 90℃보다 낮은 온도에서는 게놈 DNA는 변성(denaturation)이 용이하게 일어나지 않는다. 이때, 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA는 평균 약 170 bp의 뉴클레오티드를 갖는다고 가정하면, 게놈 DNA와 유사한 Tm 값을 가질 수 있다.

[150] 그러나, 상기 "불안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA"는 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA 보다 낮은 Tm 값을 가진다. 따라서, 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 60분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약

120분 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 10초 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 10초 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 조건으로 변성을 시킨 후에 cfDNA의 일부 서열에 상보적인 서열을 갖는 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합 반응을 수행하였을 때, 안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA는 상기 프로브와 결합을 하지 않는다. 이때, "상온"은 실온을 의미하며, 약 18℃ 내지 약 25℃일 수 있다. 또한, 상기 조건 외에도 약 40℃ 내지 약 65℃에서 약 5분 내지 약 80분간 가열하는 조건을 더 포함할 수 있다.

[151] 그러나, 불안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA는 상술한 i) 내지 viii) 중 어느 하나의 조건으로 처리한 후, 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합 반응을 수행하였을 때, 상기 프로브와 결합을 하는 것을 확인하였다. 이때, 상기 프로브는 약 15머 내지 약 30머 또는 약 20머 내지 약 25머일 수 있으며, 약 21머, 약 22머, 약 23머, 약 24머의 프로브일 수 있다.

[152] 이때, 상기 불안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA는 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, 이하 ctDNA)일 수 있다.

[153] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 타겟 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 불안정한 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 디자인된 서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브"는 혈장와 같은 fluid sample에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중 나선 구조의 cfDNA에 상보적으로 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다.

[154] 이때, 프로브는 두가지 방식으로 제작될 수 있다. 하나는 유전자에 손상이 일어난 부분에 결합할 수 있도록 디자인된 제1 프로브(이하 CP라 함)이며, 다른 하나는 손상된 부분의 주변에 결합할 수 있도록 디자인된 제2 프로브(이하 DP라 함) 일 수 있다. DP는 표적이 되는 DNA 서열 또는 손상이 일어난 영역으로부터 약 10 bp 내지 약 100 bp, 약 20 bp 내지 약 50 bp 떨어진 위치의 서열에 상보적으로 결합하도록 디자인 될 수 있다.

[155] 여기에서, 상보적으로(complementary) 결합한다고 하는 것은, 적절한 hybridization conditions에서 probe가 target cfDNA에 결합하여 duplex를 형성할 수 있는 것을 의미하고, cfDNA의 타겟 서열에 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 약 100% 상보적인 서열을 갖는다.

[156] 혼성화 조건은, 예를 들어 프로브의 길이, 프로브의 상보성, 혼성화 완충액 중의 염 농도(즉, 이온 강도)와 같이 당업자에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 엄격한 혼성화 조건은 폴리뉴클레오티드가 그의 상보적인 서열에 우선적으로 결합할 수 있으며, 또한, 표적상의 임의의 다른 영역에 비해 높은 친화 도로 결합할 수 있는 조건이다. 20 개 염기를 갖는 폴리 뉴클레오티드

서열의 상보체에 대한 하이브리드화를 위한 예시적인 엄격한 조건은 약 50% G+C 함량, 50 mM 염(Na+) 및 어닐링 온도 60℃일 수 있다. 더 긴 서열의 경우, 더 높은 온도에서 혼성화가 수행될 수 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 어닐링이 폴리 뉴클레오티드의 녹는점(melting temperature)에서 약 5℃ 미만에서 수행되는 조건이다. "녹는점"은 소정의 이온 강도, pH 및 폴리뉴클레오티드 농도에서 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 폴리뉴클레오티드의 50%가 상보적인 결합하는 하는 온도이다.

[157] 본 명세서에서는 제1 프로브 및 제2 프로브를 동시에 사용하거나, 제1 프로브 또는 제2 프로브를 각각 사용하여도 손상된 cfDNA를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 프로브는 표지자와 결합하기 위하여 바이오틴과 같은 물질이 결합된 형태일 수 있다. 또는 상기 프로브는 표지자가 직접 결합되거나, 링커를 통해 결합된 것일 수 있다. 이때, 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소 일 수 있다. 또한, 상기 프로브는 표지자와 동시에 첨가될 수 있으며, 순차적으로 첨가될 수 있다.

[158] 본 발명의 일 구체예로 타겟 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있는 프로브는 하기 암세포에 특이적인 서열을 포함하는 영역에 상보적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 난소암 또는 유방암에 특이적인 서열의 경우 BRCA1 exon 7, BRCA1 exon 10, BRCA1 exon 11, BRCA1 exon 15에 존재하는 SNP일 수 있다. 또한, 위암에 특이적으로 서열의 경우에는 TP53, 대장암은 MSH2에 존재하는 SNP일 수 있다. 폐암에 특이적으로 서열의 경우 EGFR에 존재하는 SNP일 수 있다. 또한, 간암에 특이적으로 서열의 경우에는 FGFR3에 존재하는 SNP에서 선택될 수 있다.

[159] 암세포로부터 유래되며 암세포에 특이적인 biomarker gene은 당업자들에게 알려져 있다. 예를 들면, 다음과 같은 문헌을 참조할 수 있다: Circulating Cell-Free DNA in Plasma/Serum of Lung Cancer Patients as a Potential Screening and Prognostic Tool, Pathak et al, Clinical Chemistry October 2006 vol. 52 no. 10 1833-1842; Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer, Schwarzenbach et al, Clin Cancer Res Feb. 1, 2009 15; 1032; Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range, Wua et al, Clinica Chimica Acta, Volume 321, Issues 1-2, July 2002, Pages 77-87; Detection of Circulating Tumour DNA in the Blood (Plasma/Serum) of Cancer Patients, Anker et al, Cancer and Metastasis Reviews 1999, Volume 18, Issue 1, pp 65-73; Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, Schwarzenbach et al, Nature Reviews Cancer 11, 426-437 (June 2011); Circulating Tumor-Specific DNA: A Marker for Monitoring Efficacy of Adjuvant Therapy in Cancer Patients, Fiegl et al, Cancer Res Feb. 15, 2005 65; 1141.

[160] 본 발명의 일 구체예로 타겟 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있는 프로브는 하기 암세포에서 과발현되는 영역에 상보적으로 결합할 수 있다. 이와 같이,

암세포에서 과발현되는 영역은 암세포의 바이오마커일 수 있다. 이러한 암세포의 바이오마커는 도 151 및 도 152에 나타난 유전자일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서 전반에 걸쳐, 특정 종양/암 세포에 대한 다양한 바이오마커 유전자 및 바이오마커 유전자에 상보적으로 결합하는 예시적 프로브가 실시예에 의해 설명된다. 또한, 상기 프로브는 바이오틴 또는 아비딘 계열의 단백질을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 프로브는 바이오틴이 결합된 형태일 수 있다.

[161] 본 명세서에서 사용된 용어, "분리된 생물학적 시료"는 인체로부터 분리된 소변, 타액, 뇌척수액, 흉수, 복수, 혈장, 혈액, 객담 또는 체액 시료를 의미한다. 상기 분리된 생물학적 시료는 인체에서 분리된 액상 시료일 수 있다. 이때, 혈장은 혈액에서 수득될 수 있다.

[162] 본 명세서에서 사용된 용어, "양전하를 띠는 물질"은 양전하를 띠는 소재로서, 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 필터의 형태로 이용할 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띠는 물질"의 일 구체예로는 표면이 양전하를 띠는 나노와이어 또는 멤브레인일 수 있다. 상기 나노와이어 또는 멤브레인은 전도성 고분자를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 제작 방법에 따라 길이 및 직경이 적절히 조절될 수 있으나, 나노와이어의 경우, 직경은 약 50 nm 내지 약 500 nm, 약 100 nm 내지 약 500 nm, 약 100 nm 내지 약 400 nm, 약 150 nm 내지 약 350 nm, 약 200 nm 내지 약 400 nm, 또는 약 100 nm 내지 약 300 nm의 범위에서 선택될 수 있고, 길이는 수 ㎛에서 약 100 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 15 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 15 ㎛ 내지 약 40 ㎛, 또는 약 15 ㎛ 내지 약 30 ㎛의 범위에서 선택될 수 있다.

[163] 일 실시예로는 직경은 약 200 nm을 가지며, 길이는 약 18 ㎛를 가지는 나노와이어일 수 있다. 또한, 상기 나노와이어는 바이오틴을 결합한 형태로 제작할 수 있다.

[164] 상기 나노와이어 또는 멤브레인의 표면은 양이온 고분자에 의해 개질될 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI) 또는 폴리라이신(polylysine, PLL)일 수 있다. 또한, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다. 이러한 양이온성 고분자로 개질된

나노와이어 또는 멤브레인은 표면이 양전하를 띨 수 있다. cfDNA를 포획하기 위하여는 나노와이어 또는 멤브레인의 표면 전하(surface charge)가 약 20 mV 내지 약 80 mV일 수 있으며, 약 30 mV 내지 약 60 mV 일 수 있으며, 약 35 mV 내지 약 50 mV 일 수 있다. 또한, 상기 표면 전하는 약 36 mV, 약 37 mV, 약 38 mV, 약 39 mV, 약 40 mV, 약 41 mV, 약 42 mV, 약 43 mV, 또는 약 44 mV 일 수 있다.

[165] 일 구체예로 양전하를 띠는 나노와이어는 낮은 농도에서도 효율적으로 cfDNA를 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효과적으로 cfDNA를 포집할 수 있다.

[166] 본 명세서 사용된 용어, "표지자"는 암세포에서 유래한 이중 나선 구조를 가진 cfDNA를 효과적으로 검출 및/또는 정량하기 위한 물질로서, 구체적으로, 양자점, 특정 기질을 분해하여 발색 반응을 나타내게 하는 물질, 특정 파장을 조사했을 때 발광을 나타내게 하는 물질 등일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 GFP(Green Fluorescent Protein). YFP(Yellow Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein) 또는 CFP(Cyan Fluorescent Protein)와 같은 형광 단백질 일 수 있다. 또는 상기 표지자는 알칼라인포스파타제(alkaline phosphatase, AP), HRP(Horseradish peroxidase), 또는 베타-갈락토시다제(β-galactosidase, BGAL)와 같은 발색효소 또는 생물발광효소일 수 있다.

[167] 상기 발색효소는 기질과 반응함으로써 발색반응 또는 발광반응을 매개한다. 이러한 기질로는 HRP의 경우 ABTS, OPD, AmplexRed, DAB, AEC, TMB, Homovanillic acid 및 Luminol 등이 사용될 수 있고, AP의 경우 BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate)/NBT(nitriblue tetrazolium), pNPP(p-Nitrophenyl Phosphate), Fast Red TR/Naphthol AS-MX 및 CDP-Star(Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate) 등이 사용될 수 있으며, BGAL의 경우 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside) 또는 ONPG(ortho-Nitrophenyl-β-galactoside)를 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 기질을 함께 사용할 수 있다. 상기 생물발광효소는 개똥벌레(*Photinus pyralis*), 바다팬지(*Renilla* sp.), 요각류인 *Metridiia longa*, *Vibrio* 속 세균, 또는 상편모조류(dinoflagellate) 유래의 루시퍼라제일 수 있다.

[168] 상기 표지자는 프로브에 결합할 수 있는 물질을 추가적으로 포함할 수 있다. 구체적으로, 프로브에 바이오틴이 결합되어 있는 경우, 상기 표지자는 아비딘 계열의 단백질을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함할 수 있다.

[169] 또한, 표지자는 바이오틴을 포함할 수 있다. 이러한 경우 프로브는 아비딘 계열의 단백질을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함할 수 있다.

[170] 이러한 표지자의 일 구체예로는 전도성 고분자 및 히알루론산으로 구성된 나노입자에 스트렙타비딘 및 HRP를 결합시킨 나노입자의 형태로 이용될 수 있다. 이때, 상기 전도성 고분자는 상술한 바와 같으며, 바람직하게는 폴리피롤일 수 있다. 또 다른 구체예로는 전도성 고분자 및 히알루론산으로 구성된 나노입자에 스트렙타비딘 및 형광단백질이 결합된 나노입자의 형태로 이용될 수 있다. 상기 HRP 나노입자의 크기는 약 20 nm 내지 약 150 nm일 수 있으며, 약 30 nm 내지 약 120 nm, 약 40 nm 내지 약 100 nm일 수 있다. 또한, 상기 HRP 나노입자는 약 50 nm, 약 60 nm, 약 65 nm, 약 70 nm, 약 75 nm, 또는 약 80 nm 일 수 있다.

[171] 또한, 표지자의 발색 반응을 일으키기 위해서 표지자에 적합한 기질을 함께 사용할 수 있다. 이때, 기질은 표지자와 동시에 첨가할 수도 있으나, 표지자를 첨가하기 전후로 첨가할 수 있다. 표지자 및 기질의 사용은 공지된 방법으로 사용할 수 있다. 일 구체예로, HRP를 표지자로 사용시에 ABTS(2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt), OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride), AmplexRed, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), AEC(3-Amino-9-ethylcarbazole), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), Homovanillic acid 또는 Luminol을 기질로 사용할 수 있다. 또한, 일 구체예로, 형광단백질을 사용할 경우에는 기질이 아닌 특정 파장의 빛을 조사한 후 방출되는 파장의 빛 존재 여부로 표지자를 검출할 수 있다.

[172] 일 구체예에 따르면, 본 진단방법은 고도의 정밀도와 정확도로 target cfDNA를 검출할 수 있고, 예를 들면 생물학적 시료에 target cfDNA가 극미량으로 포함되어 있는 경우에도 효과적으로 검출이 가능하다. 따라서, 초기 단계의 암 세포 검출에 유용하게 사용될 수 있다.

[173] 생체 시료내에 존재하는, 특정 비정상 세포/조직, 예를 들면 특정 암의 바이오마커를 코딩하는 cfDNA의 존재 유무를 검출함으로써, 해당 암의 diagnosis, prognosis, 또는 metastatis 상태를 알 수 있으며, 기존 치료방법에 대한 resistance/tolerance를 예측할 수도 있다.

[174] **<전립선암>**

[175] **전립선암 진단 방법**

[176] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에

혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 전립선암세포 유래의 유전자를 검출하여 전립선암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 전립선암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 전립선암 바이오마커로 알려진 유전자는 전립선암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[177] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[178] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[179] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[180] 또한, 아비딘 계열 단백질이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-아비딘 계열 단백질의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)을 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[181] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[182] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을

수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 전립선암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 전립선암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[183] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.007 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정한 후, 수신자 조작 특성 곡선을 그려 민감도와 특이도의 최대값에서 정해진 OD값이 기준이 될 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[184] 또한, 상기 전립선암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[185] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[186] 상기 전립선암세포에서 과발현 되는 유전자는 *KLK3*(NCBI Gene ID: 354), *FOLH1*(NCBI Gene ID: 2346), *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *PCA3*(NCBI Gene ID: 50652), *PDE4D7*(NCBI Gene ID: 5144), *SFMBT2*(NCBI Gene ID: 57713), *EFEMP1* (NCBI Gene ID: 2202), *RETN*(NCBI Gene ID: 56729), *ACADL*(NCBI Gene ID: 33), *AGR2*(NCBI Gene ID: 10551), *COL1A1*(NCBI Gene ID: 1277), *FAM13C*(NCBI Gene ID: 220965), *GPX8*(NCBI Gene ID: 493869), *GRHL2*(NCBI Gene ID: 79977), *HNF1A*(NCBI Gene ID: 6927), *HOXB13*(NCBI Gene ID: 10481), *KLK2*(NCBI Gene ID: 3817), *MYBPC1*(NCBI Gene ID: 4604), *NR0B1*(NCBI Gene ID: 190), *PITX2* (NCBI Gene ID: 5308), *SFRP4*(NCBI Gene ID: 6424), *SLCO1B3*(NCBI Gene ID: 28234), *TMEFF2*(NCBI Gene ID: 23671), *CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG* (NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072), *OGT*(NCBI Gene ID: 8473), *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[187] 일 구체예로서, 전립선암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *KLK3, FOLH1, PCA3, PDE4D7, SFMBT2, EFEMP1, RETN, ACADL, AGR2, COL1A1, FAM13C, GPX8, GRHL2, HNF1A, HOXB13, KLK2, MYBPC1, NR0B1, PITX2, SFRP4, SLCO1B3, TMEFF2, TMPRSS2-ERG* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ACPP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 및 *EPCAM*로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 마커 유전자를 추가적으로 검출하여 전립선암을 진단할 수 있다. 상기 추가 마커 유전자는 전립선암 특이적 마커 유전자는 아니나 상기 전립선암에 특이적으로 존재하는 유전자와 조합하여 사용할 경우 전립선암 진단방법의 민감도 및 특이도를 대폭 향상시킬 수 있다.

[188] 본 명세서에서 사용된 용어, "*KLK3*"이란, kallikrein-3, gamma-seminoprotein 또는 전립선 특이 항원(prostate specific antigen, PSA)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 PSA는 전립선의 상피세포에서 합성되는 단백분해 효소로 전립선 이외의 조직에서는 거의 발현되지 않아 전립선암의 선별에 이용되는 유용한 종양표지자이다. 또한, PSA는 전립선암의 선별 검사뿐만 아니라 수술 후 재발 판정에도 유용하게 이용되고 있다.

[189] 본 명세서에서 사용된 용어, "*FOLH1*"이란, 전립선 특이 세포막 항원(prostate-specific membrane antigen, PSMA)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 PSMA는 전립선에서 높게 발현되며, 전립선암세포에서 PSMA는 정상 전립선 세포보다 약 8배 내지 약 12배 정도 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. 이러한 PSMA는 전립선암의 진단을 위한 종양 표지자로 이용되고 있다.

[190] 본 명세서에서 사용된 용어, "*ACPP*"란, 전립선 산성 인산 가수분해 효소(Prostatic acid phosphatase, PAP)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 PAP는 전립선에서 생산되는 효소이다. 상기 PAP는 전립선암 또는 전립선 질환을 앓고 있는 남성에서 그 발현이 증가되는 양상을 보여, 전립선암 또는 전립선 질환의 지표로 이용되고 있다.

[191] 본 명세서에서 사용된 용어, "*PCA3*"이란, 사람의 전립선 조직에서 non-coding RNA 형태로 발현되는 유전자를 의미한다. 상기 PCA3은 사람의 전립선 조직에서만 발현되며, 전립선암세포에서 매우 과발현된다. 이러한, PCA3은 전립선암의 종양 표지자로서 이용되고 있다.

[192] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[193] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질

또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), BFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[194] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 아비딘(avidin), 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[195] 본 명세서에서 사용되는 용어, "아비딘"은 조류, 파충류 및 양서류의 난관에서 생산되는 동형사량체 단백질로서, 난백에 분포되어 있으며, 바오틴과 고친화성을 가지고 결합하며, 천연에서의 그 기능은 아지 규명되지 않고 있으나, 세균의 증식에 필수적인 바이오틴에 결합함으로써 세균의 증식을 억제하는 용도로 추정되고 있다.

[196] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 약 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 약 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[197] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[198] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(약 60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI= 약 6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로

스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[199] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[200] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 전립선암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[201] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[202] **진립선암 진단 키트**

[203] 본 발명의 다른 측면은, 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로

결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 전립선암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[204] 이때, 상기 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[205] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 전립선암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[206] 또한, *ACPP*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD274, FOLR1, EPCAM, OGT* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[207] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[208] **진립선암 진단 장치**

[209] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 전립선암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 전립선암세포 유래의 유전자를 검출하여 전립선암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[210] 이때, 상기 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[211] 또한, *ACPP*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD274, FOLR1, EPCAM, OGT* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[212] **<폐암>**

[213] **폐암 진단 방법**

[214] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 폐암세포 유래의 유전자를 검출하여 폐암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 폐암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 폐암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 폐암 바이오마커로 알려진 유전자는 폐암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다.

[215] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *ENO2*, *SART3*, *KRT19*, *PLAT*, *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *ERBB2*, *PI3K*, *S100P*, *MMP11*, *CDCA7*, *S100A2*, *ETV4*, *TOP2A*, *UBE2C* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[216] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[217] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[218] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[219] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA

성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[220] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 폐암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 폐암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다. 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 약 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 약 0.012 또는 약 약 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[221] 또한, 상기 폐암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[222] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건.

[223] 상기 폐암세포에서 과발현 되는 유전자는 *ENO2*(NCBI Gene ID: 2026), *SART3* (NCBI Gene ID: 9733), *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *KRT19*(NCBI Gene ID: 3880), *PLAT*(NCBI Gene ID: 5327), *EGFR*(NCBI Gene ID: 1956), *KRAS*(NCBI Gene ID: 3845), *ALK*(NCBI Gene ID: 238), *ROS1*(NCBI Gene ID: 6098), *RET*(NCBI Gene ID: 5979), *ERBB2*(NCBI Gene ID: 2064), *PI3K*(NCBI Gene ID: 5291), *S100P*(NCBI Gene ID: 6286), *MMP11*(NCBI Gene ID: 4320), *CDCA7*(NCBI Gene ID: 83879), *S100A2*(NCBI Gene ID: 6273), *ETV4*(NCBI Gene ID: 2118), *TOP2A*(NCBI Gene ID: 7153), *UBE2C*(NCBI Gene ID: 11065), *CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348),

EPCAM(NCBI Gene ID: 4072), *OGT*(NCBI Gene ID: 8473) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[224] 일 구체예로서, 폐암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ENO2, ACPP, KRT19, EGFR, KRAS, RET, ERBB2, MMP11, TOP2A, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 폐암을 진단할 수 있다.

[225] 본 명세서에서 사용된 용어 "*ENO2*"란, Gamma-enolase 또는 enolase 2 또는 NSE(neuron specific enolase)으로 알려진 효소를 코딩하는 유전자를 의미한다. 상기 NSE는 소세포폐암(작은세포허파암, small cell lung cancer), 신경모세포종(neuroblastoma), 갑상선수양암(medullary thyroid cancer)의 종양표지자로 이용되고 있다.

[226] 본 명세서에서 사용된 용어 "*SART3*"이란, 편평세포암 항원(Squamous Cell Carcinoma Antigen, SCCA)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 SCCA는 자궁경부의 편평상피암뿐만 아니라 외음암, 질암, 식도암, 설암, 인두암 등 많은 편평상피암의 환자혈중이 양성을 나타내어 종양표지자로서 이용되고 있다.

[227] 본 명세서에서 사용된 용어 "*KRT19*"란, Cyfra 21-1, CK-19(cytokeratin-19) 또는 K19(keratin-19) 로 알려진 단백질을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 Cyfra 21-1는 폐암 및 두경부암과 같은 상피세포 기원의 암과 관련이 있음이 알려져있다. 또한, Cyfra 21-1은 폐렴 또는 폐질환을 앓는 환자에서 정상인보다 혈중 수치가 증가됨이 보고된 바 있으며, 종양지표자로서 이용되고 있다.

[228] 본 명세서에서 사용된 용어 "*PLAT*"란, 혈병 붕괴에 관여하는 단백질인 TPA(Tissue plasminogen activator)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[229] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[230] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[231] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴

결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[232] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI= 약 5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 약 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI= 약 6.8 내지 약 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[233] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[234] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI= 약 6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[235] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을

관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[236] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 폐암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[237] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[238] **폐암 진단 키트**

[239] 본 발명의 다른 측면은, 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 폐암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[240] 이때, 상기 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[241] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 폐암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c)

cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[242] 또한, *ENO2, ACPP, KRT19, EGFR, KRAS, RET, ERBB2, MMP11, TOP2A, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[243] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[244] **폐암 진단 장치**

[245] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 폐암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 폐암세포 유래의 유전자를 검출하여 폐암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[246] 이때, 상기 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[247] 또한, *ENO2, ACPP, KRT19, EGFR, KRAS, RET, ERBB2, MMP11, TOP2A, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[248] **<갑상선암>**

[249] **갑상선암 진단 방법**

[250] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 갑상선암세포 유래의 유전자를 검출하여 갑상선암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 갑상선암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 갑상선암 바이오마커로 알려진 유전자는 갑상선암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[251] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[252] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[253] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[254] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[255] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[256] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 갑상선암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 갑상선암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[257] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해

조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[258] 또한, 상기 갑상선암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[259] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[260] 상기 갑상선암세포에서 과발현 되는 유전자는 *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *ENO2* (NCBI Gene ID: 2026),*TG*(NCBI Gene ID: 7038), *CALCA*(NCBI Gene ID: 796), *APOC1*(NCBI Gene ID: 341), *HIG2*(NCBI Gene ID: 29923), *TYRO3*(NCBI Gene ID: 7301),*CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[261] 일 구체예로서, 갑상선암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *TG*, *CALCA*, *APOC1, HIG2* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ENO2*, *ACPP, TYRO3, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 갑상선암을 진단할 수 있다.

[262] 본 명세서에 사용된 용어 "*TG*"란, 티로글로불린(thyroglobulin, Tg)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 티로글로불린은 인체 내 갑상선에서만 생산되며, 갑상선암이 발병 또는 전이되는 경우 혈중 티로글로불린 수치가 증가하게 된다. 혈중 티로글로불린 수치는 갑상선암 표지자로서 이용되고 있다.

[263] 본 명세서에서 사용된 용어 "*CALCA*"란, 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드(calcitonin gene-related peptide)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[264] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과

결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[265] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[266] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[267] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[268] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[269] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합

단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[270] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[271] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[272] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[273] **갑상선암 진단 키트**

[274] 본 발명의 다른 측면은, 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 갑상선암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[275] 이때, 상기 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[276] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 갑상선암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[277] 또한, *ENO2*, *ACPP*, *TYRO3*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD279*, *CD274*, *ERBB2*, *EGFR*, *FOLR1*, *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[278] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[279] **갑상선암 진단 장치**

[280] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 갑상선암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 갑상선암세포 유래의 유전자를 검출하여 갑상선암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[281] 이때, 상기 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[282] 또한, *ENO2*, *ACPP*, *TYRO3*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD279*, *CD274*, *ERBB2*, *EGFR*, *FOLR1*, *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[283] **<방광암>**

[284] **방광암 진단 방법**

[285] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기

cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 방광암세포 유래의 유전자를 검출하여 방광암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 방광암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 방광암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 방광암 바이오마커로 알려진 유전자는 방광암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[286] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[287] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[288] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[289] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[290] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[291] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 방광암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 방광암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[292] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[293] 또한, 상기 방광암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[294] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[295] 상기 방광암세포에서 과발현 되는 유전자는 *OGT*(NCBI Gene ID: 8473), *FGFR3* (NCBI Gene ID: 2261), *TP53*(NCBI Gene ID: 7157), *NUMA1*(NCBI Gene ID: 4926), *KRT19*(NCBI Gene ID: 3880), *COCH*(NCBI Gene ID: 1690), *CELSR3*(NCBI Gene ID: 1951), *HMOX1*(NCBI Gene ID: 3162), *KIF1A*(NCBI Gene ID: 547), *MGC17624* (NCBI Gene ID: 404550), *MTAP*(NCBI Gene ID: 4507), *PFKFB4*(NCBI Gene ID: 5210), *S100A8*(NCBI Gene ID: 6279), *RSPH9*(NCBI Gene ID: 221421), *CCNB1* (NCBI Gene ID: 891), *FOXM1*(NCBI Gene ID: 2305), *FANCB*(NCBI Gene ID: 2187), *FANCC*(NCBI Gene ID: 2176), *FANCD2*(NCBI Gene ID: 2177), *RUSC1-AS1*(NCBI Gene ID: 284618), *CACNA1B*(NCBI Gene ID: 774), *IMP-1*(NCBI Gene ID: 10642), *PDE3A*(NCBI Gene ID: 5139), *POU3F4*(NCBI Gene ID: 5456), *SOX3*(NCBI Gene ID: 6658), *DMC1*(NCBI Gene ID: 11144), *PLXDC2*(NCBI Gene ID: 84898), *ZNF312*

(NCBI Gene ID: 55079), *SYCP2L*(NCBI Gene ID: 221711), *HOXA9*(NCBI Gene ID: 3205), *ISL1*(NCBI Gene ID: 3670), *ALDH1A3*(NCBI Gene ID: 220), *CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1* (NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[296] 일 구체예로서, 방광암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 방광암을 진단할 수 있다.

[297] 본 명세서에서 사용된 용어 "*OGT*"란, O-GlcNAc transferase를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[298] 본 명세서에서 사용된 용어 "*FGFR1*"이란, 섬유아세포 증식인자 수용체 1(fibroblast growth factor receptor 1)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[299] 본 명세서에서 사용된 용어 "*NUMA1*"이란, NMP22(nuclear matrix protein-22)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 NMP22는 방광암을 포함한 일부 유형의 암을 가진 환자의 소변에서 정상 수치보다 높게 발견되어 방광암 표지자로 널리 사용되고 있다.

[300] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[301] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[302] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일

구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[303] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[304] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[305] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[306] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[307] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 방광암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[308] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[309] **방광암 진단 키트**

[310] 본 발명의 다른 측면은, 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 방광암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[311] 이때, 상기 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[312] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 방광암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c)

cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[313] 또한, *KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[314] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[315] **방광암 진단 장치**

[316] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 방광암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 방광암세포 유래의 유전자를 검출하여 방광암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[317] 이때, 상기 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2,RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[318] 또한, *KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[319] **<유방암>**

[320] **유방암 진단 방법**

[321] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 유방암세포 유래의 유전자를 검출하여 유방암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 유방암 바이오마커로 알려진 유전자에

상보적으로 결합하는 것인, 유방암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 유방암 바이오마커로 알려진 유전자는 유방암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[322] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[323] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[324] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[325] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[326] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[327] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 유방암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 유방암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[328] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[329] 또한, 상기 유방암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[330] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[331] 상기 유방암세포에서 과발현 되는 유전자는 *MUC1*(NCBI Gene ID: 4582), *ACPP* (NCBI Gene ID: 55), *MEST*(NCBI Gene ID: 4232), *TYRO3*(NCBI Gene ID: 7301), *NR1D1*(NCBI Gene ID: 9572), *UBE2C*(NCBI Gene ID: 11065), *BIRC5*(NCBI Gene ID: 332), *RACGAP1*(NCBI Gene ID: 29127), *DHCR7*(NCBI Gene ID: 1717), *STC2* (NCBI Gene ID: 8614), *AZGP1*(NCBI Gene ID: 563), *RBBP8*(NCBI Gene ID: 5932), *IL6ST*(NCBI Gene ID: 3572), *MGP*(NCBI Gene ID: 4256), *TRBC1*(NCBI Gene ID: 28639), *MMP11*(NCBI Gene ID: 4320), *COL10A1*(NCBI Gene ID: 1300), *C10orf64* (NCBI Gene ID: 57705), *COL11A1*(NCBI Gene ID: 1301), *POTEG*(NCBI Gene ID: 404785), *FSIP1*(NCBI Gene ID: 161835),*HER2*(NCBI Gene ID: 2064), *CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1* (NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[332] 일 구체예로서, 유방암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 유방암을 진단할 수 있다.

[333] 본 명세서에서 사용된 용어 "*MUC1*"이란, CA 15-3(Carcinoma Antigen 15-3) 및 CA 27-29 를 포함하는 단백질을 코딩하고 있는 유방암 관련 유전자를 의미한다. 상기 CA15-3은 유방암에서 조기 재발 가능성이 증가하는 것으로 나타났으며, 유방암 표지자로서 이용되고 있다.

[334] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[335] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[336] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[337] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[338] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된

단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[339] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[340] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[341] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 유방암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[342] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는

정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[343] **유방암 진단 키트**

[344] 본 발명의 다른 측면은, 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 유방암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[345] 이때, 상기 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[346] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 유방암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[347] 또한, *MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[348] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[349] **유방암 진단 장치**

[350] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 유방암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 유방암세포 유래의 유전자를 검출하여 유방암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[351] 이때, 상기 유방암에 상보적으로 발현하는 유전자는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[352] 또한, *MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[353] **<대장암>**

[354] **대장암 진단 방법**

[355] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 대장암세포 유래의 유전자를 검출하여 대장암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 대장암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 대장암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 대장암 바이오마커로 알려진 유전자는 대장암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[356] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA010* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[357] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는

양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[358] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[359] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[360] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[361] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 대장암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 대장암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[362] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[363] 또한, 상기 대장암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[364] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는

조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[365] 상기 대장암세포에서 과발현 되는 유전자는 *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *FLU3* (NCBI Gene ID: 837968),*TYRO3*(NCBI Gene ID: 7301), *NCKAP1*(NCBI Gene ID: 10787), *AUNIP*(NCBI Gene ID: 79000), *NOTUM*(NCBI Gene ID: 147111), *KRT5* (NCBI Gene ID: 3852), *TUBB*(NCBI Gene ID: 203068), *COL6A1*(NCBI Gene ID: 1291), *JUP*(NCBI Gene ID: 3728), *COTL1*(NCBI Gene ID: 23406), *CK7*(NCBI Gene ID: 3855), *CK20*(NCBI Gene ID: 54474), *CDX2*(NCBI Gene ID: 1045), *MUC2*(NCBI Gene ID: 4583), MELTF(NCBI Gene ID: 4241), *SDC2*(NCBI Gene ID: 6383), *EFEMP2*(NCBI Gene ID: 30008), *DEFA5*(NCBI Gene ID: 1670), *ASB9*(NCBI Gene ID: 140462), *CHEK1*(NCBI Gene ID: 1111), *MAD2L1*(NCBI Gene ID: 4085), *ENC1* (NCBI Gene ID: 8507), *CSE1L*(NCBI Gene ID: 1434), *RAD51AP1*(NCBI Gene ID: 10635), *ERICH3*(NCBI Gene ID: 127524), *SLC7A11*(NCBI Gene ID: 23657), *KRT23* (NCBI Gene ID: 25984), *PLAU*(NCBI Gene ID: 5328), *CCNB1*(NCBI Gene ID: 891), *MELK*(NCBI Gene ID: 9833), *CDCA1*(NCBI Gene ID: 83540), *KLK6*(NCBI Gene ID: 5653), *CKS2*(NCBI Gene ID: 1164), *IFITM1*(NCBI Gene ID: 8519), *DPEP1*(NCBI Gene ID: 1800), *CDH3*(NCBI Gene ID: 1001), *ANLN*(NCBI Gene ID: 54443), *CXCL1* (NCBI Gene ID: 2919), *CTHRC1*(NCBI Gene ID: 115908), *CEACAM6*(NCBI Gene ID: 4680), *LCN2*(NCBI Gene ID: 3934), *HS6ST2*(NCBI Gene ID: 90161), *EGFL6* (NCBI Gene ID: 25975), *CXCL3*(NCBI Gene ID: 2921), *CA9*(NCBI Gene ID: 768), *ATAD2*(NCBI Gene ID: 29028), *PROX1*(NCBI Gene ID: 5629), *SPP1*(NCBI Gene ID: 6696), *CST1*(NCBI Gene ID: 1469), *CXCL2*(NCBI Gene ID: 2920), *TSTA3*(NCBI Gene ID: 7264), *RRM2*(NCBI Gene ID: 6241), *MMP3*(NCBI Gene ID: 4314), *MMP7* (NCBI Gene ID: 4316), *MMP10*(NCBI Gene ID: 4319), *CXCL5*(NCBI Gene ID: 6374), *SERPINB5*(NCBI Gene ID: 5268), *TEAD4*(NCBI Gene ID: 7004), *BUB1*(NCBI Gene ID: 699), *CDC2*(NCBI Gene ID: 983), *CLDN2*(NCBI Gene ID: 9075), *HSPH1* (NCBI Gene ID: 10808), *LY6G6D*(NCBI Gene ID: 58530), *PRC1*(NCBI Gene ID: 9055), *PUS1*(NCBI Gene ID: 80324), *SQLE*(NCBI Gene ID: 6713), *TOP2A*(NCBI Gene ID: 7153), *TTK*(NCBI Gene ID: 7272), *DSCC1*(NCBI Gene ID: 79075), *ECT2* (NCBI Gene ID: 1894), *RNF183*(NCBI Gene ID: 138065), *FBXO39*(NCBI Gene ID: 162517), *TEX38*(NCBI Gene ID: 374973), *TTLL2*(NCBI Gene ID: 83887), *PRR7* (NCBI Gene ID: 80758), *CANP*(NCBI Gene ID: 823), *KIAA0101*(NCBI Gene ID: 9768),*CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126),*FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072), *KRAS*(NCBI Gene ID: 3845) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는

어느 하나일 수 있다.

[366] 일 구체예로서, 대장암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA010* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 대장암을 진단할 수 있다.

[367] 본 명세서에서 사용된 용어 "*FLU3*"이란, CA19-9(Carcinoma Antigen 19-9)를 포함하는 단백질을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[368] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[369] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[370] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[371] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지

않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[372] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[373] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[374] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[375] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 대장암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초,

약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[376] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[377] **대장암 진단 키트**

[378] 본 발명의 다른 측면은, 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 대장암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[379] 이때, 상기 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA0101* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[380] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 대장암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[381] 또한, *ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279,*

CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[382] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[383] **대장암 진단 장치**

[384] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 대장암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 대장암세포 유래의 유전자를 검출하여 대장암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[385] 이때, 상기 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA0101* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[386] 또한, *ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[387] **<담도암>**

[388] **담도암 진단 방법**

[389] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 담도암세포 유래의 유전자를 검출하여 담도암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 담도암 바이오마커로 알려진 유전자에

상보적으로 결합하는 것인, 담도암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 담도암 바이오마커로 알려진 유전자는 담도암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[390] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *MUC16,ASH1L, DOCK70* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[391] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[392] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[393] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[394] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[395] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 담도암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 담도암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[396] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이

0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[397] 또한, 상기 담도암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[398] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[399] 상기 담도암세포에서 과발현 되는 유전자는 *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *FLU3* (NCBI Gene ID: 837968), *MUC16*(NCBI Gene ID: 94025),*ASH1L*(NCBI Gene ID: 55870), *DOCK7*(NCBI Gene ID: 85440), *CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072), *CA125*(NCBI Gene ID: 94025), *CEACAM5*(NCBI Gene ID: 1048) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[400] 일 구체예로서, 담도암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *MUC16,ASH1L, DOCK70* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 담도암을 진단할 수 있다.

[401] 본 명세서에서 사용된 용어 "*MUC16*"이란, CA-125(Carcinoma Antigen 125)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다. 상기 CA-125는 특정 유형의 암을 가진 일부 환자의 혈액에서 양성인 종양 표지자 또는 생체 표지자로 이용되고 있다.

[402] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는

바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[403] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[404] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[405] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[406] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[407] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은

바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[408] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[409] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 담도암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[410] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[411] **담도암 진단 키트**

[412] 본 발명의 다른 측면은, 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의

단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 담도암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[413] 이때, 상기 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MUC16,ASH1L, DOCK7* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[414] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 담도암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[415] 또한, *ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[416] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[417] **담도암 진단 장치**

[418] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 담도암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 담도암세포 유래의 유전자를 검출하여 담도암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[419] 이때, 상기 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[420] 또한, *ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 특이적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[421] **<위암>**

[422] **위암 진단 방법**

[423] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b)

cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 위암세포 유래의 유전자를 검출하여 위암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 위암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 위암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 위암 바이오마커로 알려진 유전자는 위암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다.

[424] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[425] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[426] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[427] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[428] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의

특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[429] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 위암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 위암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[430] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[431] 또한, 상기 위암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[432] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[433] 상기 위암세포에서 과발현 되는 유전자는 *ACPP*(NCBI Gene ID: 55), *FLU3* (Gene ID: 837968), *CGB*(NCBI Gene ID: 1082), *KRT19*(NCBI Gene ID: 3880), *PARP1*(NCBI Gene ID: 142), *FOXO3A*(NCBI Gene ID: 2309), *MED30*(NCBI Gene ID: 90390), *ERBB2*(NCBI Gene ID: 2064), *CCNE1*(NCBI Gene ID: 898), *MYC*(NCBI Gene ID: 4609), *EGFR*(NCBI Gene ID: 1956), *KRAS*(NCBI Gene ID: 3845), *TFF1* (NCBI Gene ID: 7031), *FABP1*(NCBI Gene ID: 2168), *CK20*(NCBI Gene ID: 54474), *MUC2*(NCBI Gene ID: 4583), *SDC2*(NCBI Gene ID: 6383), *LAMP5*(NCBI Gene ID: 24141), *MATN3*(NCBI Gene ID: 4148), *CLIP4*(NCBI Gene ID: 79745), *NOX4*(NCBI Gene ID: 50507), *ADRA2C*(NCBI Gene ID: 152), *CSK*(NCBI Gene ID: 1445), *FZD9* (NCBI Gene ID: 8326), *GALR1*(NCBI Gene ID: 2587), *GRM6*(NCBI Gene ID: 2916),

INSR(NCBI Gene ID: 3643), *LPHN1*(NCBI Gene ID: 22859), *LYN*(NCBI Gene ID: 4067), *MRGPRX3*(NCBI Gene ID: 117195), *ADCY3*(NCBI Gene ID: 109), *HDAC2* (NCBI Gene ID: 3066), *CFL1*(NCBI Gene ID: 1072), *COTL1*(NCBI Gene ID: 23406), *NRP2*(NCBI Gene ID: 8828), *ANXA10*(NCBI Gene ID: 11199), *TFF2*(NCBI Gene ID: 7032), *CDCA5*(NCBI Gene ID: 113130), *ATAD2*(NCBI Gene ID: 29028), *ASB9*(NCBI Gene ID: 140462), *MMP1*(NCBI Gene ID: 4312), *CEACAM6*(NCBI Gene ID: 4680), *DSCC1*(NCBI Gene ID: 79075), *CKS2*(NCBI Gene ID: 1164), *CST1*(NCBI Gene ID: 1469), *IFITM1*(NCBI Gene ID: 8519), *NUSAP1*(NCBI Gene ID: 51203), *MELK*(NCBI Gene ID: 9833), *LGALS3BP*(NCBI Gene ID: 3959),*CPT1A*(NCBI Gene ID: 1374), *IFNG*(NCBI Gene ID: 3458), *CD274*(NCBI Gene ID: 29126), *FOLR1*(NCBI Gene ID: 2348), *EPCAM*(NCBI Gene ID: 4072), *CEACAM5*(NCBI Gene ID: 1048) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[434] 일 구체예로서, 위암에 특이적으로 존재하는 유전자는*CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1, MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1* 또는 *EPCAM* 유전자를 검출하여 위암을 진단할 수 있다.

[435] 본 명세서에서 사용된 용어 "*CGB*"란, hCG(Human chorionic gonadotropin) 호르몬을 코딩하는 유전자를 의미한다. 일부 암은 hCG 호르몬을 생성하기도 한다. 따라서 환자가 임신하지 않을 때 측정한 hCG 호르몬 수치가 높으면 암 진단을 받을 수 있다.

[436] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[437] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[438] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[439] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[440] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[441] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[442] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은

형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[443] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 위암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[444] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[445] **위암 진단 키트**

[446] 본 발명의 다른 측면은, 위암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 위암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[447] 이때, 상기 위암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[448] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 위암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적

시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[449] 또한, *ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1, MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[450] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[451] **위암 진단 장치**

[452] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 위암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 위암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 위암세포 유래의 유전자를 검출하여 위암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[453] 이때, 상기 위암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[454] 또한, *ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1, MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[455] **<췌장암>**

[456] **췌장암 진단 방법**

[457] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에

혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 췌장암세포 유래의 유전자를 검출하여 췌장암을 진단하는 방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 췌장암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 췌장암을 진단하는 방법을 제공한다. 이때, 췌장암 바이오마커로 알려진 유전자는 췌장암에서 과발현되는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.

[458] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[459] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[460] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[461] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[462] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[463] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 췌장암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 췌장암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[464] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[465] 또한, 상기 췌장암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[466] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[467] 상기 췌장암세포에서 과발현 되는 유전자는 *KRAS*(NCBI Gene ID: 3845), SMADA4(NCBI Gene ID: 4089), *APC*(NCBI Gene ID: 324), *GNAS*(NCBI Gene ID: 2788), *MUC1*(NCBI Gene ID: 4582), *CEACAM5*(NCBI Gene ID: 1048), *CEACAM1* (NCBI Gene ID: 634), *MUC16*(NCBI Gene ID: 94025) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[468] 일 구체예로서, 췌장암에 특이적으로 존재하는 유전자는 *SMAD4, APC, GNAS* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5* 또는 *MUC16* 유전자를 검출하여 췌장암을 진단할 수 있다.

[469] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[470] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[471] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[472] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[473] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[474] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[475] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[476] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 췌장암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[477] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[478] **췌장암 진단 키트**

[479] 본 발명의 다른 측면은, 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 췌장암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[480] 이때, 상기 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[481] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 췌장암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[482] 또한, *KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5* 또는 *MUC16* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[483] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[484] **췌장암 진단 장치**

[485] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 췌장암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 췌장암세포 유래의 유전자를 검출하여 췌장암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[486] 이때, 상기 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[487] 또한, *KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5* 또는 *MUC16* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[488] **<조기진단 및 예후예측>**

[489] **암 진단 방법**

[490] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을 조기진단 또는 예후예측하는

방법으로서, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 암을 조기진단 또는 예후를 예측하는 방법을 제공한다.

[491] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279, CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다. 이때, 바람직하게는 상기 군에서 선택되는 2개 이상의 유전자를 조합시킬 수 있다.

[492] 상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 림프종, 급성 백혈병, 다발성 골수종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다

[493] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[494] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[495] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[496] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[497] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다.

구체적으로, cfDNA는 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[498] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라 cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[499] 또한, 상기 암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[500] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[501] 상기 암세포에서 과발현 되는 유전자는 *FNG*(NCBI Gene ID: 3458), *IFNGR1* (NCBI Gene ID: 3459), *CD279*(NCBI Gene ID: 5133) 및 *CD274*(NCBI Gene ID: 29126) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로서, 상기 암세포에서 과발현되는 유전자의 조합이 2개인 경우 IFNG/IFNGR1, IFNG/CD274 또는 IFNG/CD279일 수 있으며, 상기 암세포에서 과발현되는 유전자의 조합이 3개인 경우, IFNG/IFNGR1/CD274, IFNG/CD274/CD279 또는 IFNGR1/CD274/CD279일 수 있으며, 상기 암세포에서 과발현되는 유전자의 조합이 4개인 경우는 INFG/IFNGR1/CD274/CD279일 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 유전자를 2개 이상 분석할 경우, 분석 결과의 신뢰도가 향상될 수 있다.

[502] 본 명세서에서 사용된 용어 "IFNG"란, 인터페론 감마(interferon gamma)를 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[503] 본 명세서에서 사용된 용어 "*IFNGR1*"란, 인터페론 감마 리셉터 1(Interferon gamma receptor 1)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[504] 본 명세서에서 사용된 용어 "*CD274*"이란, PD-L1(Programmed death-ligand 1)을 코딩하고 있는 유전자를 의미한다.

[505] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[506] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[507] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[508] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지 않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[509] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[510] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며

천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[511] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[512] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초, 약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[513] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할

수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[514] **암 진단 키트**

[515] 본 발명의 다른 측면은, 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 암 조기진단 또는 예후예측을 위한 키트를 제공하는 것이다.

[516] 이때, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279* 및*CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[517] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[518] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[519] **암 진단 장치**

[520] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 장치를 제공하는 것이다.

[521] 이때, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279, CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[522] **<암>**

[523] **암, 암의 전이 및 암의 약물에 대한 저항성 확인 방법**

[524] 본 발명의 일 측면은, a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계; b)

cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계; c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계; d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및 e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암의 존재 여부, 암의 전이상태 여부 및/또는 저항성 여부를 판단하는 방법으로서, 상기 cfDNA는 암세포에서 유래된 것이며, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 암의 존재 여부, 암의 전이 indicator 혹은 resistance 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인, 암의 전이상태 혹은 저항성 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 이때, 암, 암의 전이여부 혹은 resistance 바이오마커로 알려진 유전자는 암에서 single nucleotide polymorphism(snp)를 포함하는 유전자 일 수 있다(실시예 6 및 실시예 7 참조).

[525] 구체적으로, 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279,CD274G* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[526] 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 암세포에서 과발현 되는 유전자, 암에서 특이적으로 존재하는 유전자, 전이와 관련된 유전자 또는 약물 내성과 관련된 유전자에 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[527] 일 구체예로서, 상기 암세포에서 과발현 되는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279,CD274, NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, §-HCG(CGB). CA19-9, PSA,PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2)* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[528] 일 구체예로서, 상기 암에서 특이적으로 존재하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279,CD274* 유전자 일수 있으며, 추가적으로, *NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, §-HCG(CGB). CA19-9, PSA, PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167),* 또는 *HE4(WEDC2)* 유전자를 검출하여 암 종류를 진단할 수 있다.

[529] 일 구체예로서, 상기 암의 전이와 관련된 유전자는 "proliferation" 및 "invasion" 관련 유전자들 일 수 있으며, 예를 들어, Ki67, STK15, Survivin, Cyclin B1, MYBL2, Stromelysin3, Cathepsin L2 일 수 있다.

[530] 일 구체예로서, 상기 약물 내성에 관련된 유전자는 약물 및 암종에 따라 정해질 수 있다. 일 구체예로 EGFR-TKI에 획득 내성에 관련된 유전자는 EGFR T790M, PI3K, BRAF, MAPK1, HER2, KRAS, NRAS, RB deletion, p53 deletion, PTEN 및

NFkB로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

[531] 또한, 상기 분리된 생물학적 시료를 사용하는 목적은 시료 내에 존재하는 cfDNA를 검출하기 위함이다. 따라서, 시료내의 cfDNA를 다양한 방법으로 분리 및/또는 농축시켜 사용할 수 있다. 일 구체예로 핵산에 강한 친화성이 있는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)을 이용할 수 있다. 또한, 일 구체예로 음전하를 띄고 있는 cfDNA를 포집하기 위하여 양전하를 띄고 있는 물질을 이용할 수 있다. 상기 양전하를 띠고 있는 물질은 나노입자, 나노와이어, 망구조 또는 양전하를 띤 필터일 수 있으나, 그 형상에 제한되는 것은 아니다. 상기 "양전하를 띄고 있는 물질"의 일 구체예로는 양전하를 띈 나노구조체 또는 양전하를 띤 멤브레인일 수 있다.

[532] 나노구조체의 일 실시예는 양이온 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양이온성 고분자는 그 종류에 있어서 제한이 없다. 양이온성 고분자의 일 구체예로는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)일 수 있으며, 양이온성 가지형 고분자 폴리에틸렌이민(cationic branched polymer polyethyleneimene)일 수 있다.

[533] 또한, 스트렙타비딘이 표지된 나노와이어를 바이오틴이 결합된 PEI 용액과 혼합하여, 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 나노와이어에 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI)를 추가로 결합시킬 수 있다. 그 결과, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민이 표면에 결합된 나노구조체(PEI/mPpy NW)안에 나노입자가 높은 밀도로, 불규칙하게 분포되어 매립될 수 있다.

[534] 이러한 나노와이어는 높은 효율로 낮은 농도에서도 게놈 DNA 및 cfDNA 성공적으로 포집할 수 있다. 특히, DNA 등의 표적 분자와의 결합을 위한 넓은 표면적, DNA와의 상호 작용 촉진을 위한 향상된 이동성과 같은 나노와이어의 특징으로 인해, 효율적이고 효과적으로 표적 cfDNA를 포집할 수 있다.

[535] 이때, 상기 표적 cfDNA는 검출하려는 목적 cfDNA를 의미한다. 본 명세서에서 cfDNA는 이중가닥을 가진다. 이때, 상기 cfDNA의 일부가 이중가닥이 풀려있을 수 있다. 또한, 상기 cfDNA는 암 세포의 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, cfDNA는 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 암세포에서 과발현되는 핵산 서열은 정상세포에는 적정 발현수준을 보이나, 특정 암세포에서 과발현되는 핵산 서열을 의미한다.

[536] 구체적으로, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준(cutoff)은 표지자를 이용한 흡광도(optical density)를 측정하였을 때, OD값이 0.010 이상인 경우일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 서열의 암세포에서 과발현되는 정도 또는 기준은 표지자를 이용한 흡광도를 측정하였을 때, OD값이 0.012 또는 0.015 이상인 경우일 수 있다. 이때, 상기 흡광도 측정을 위해 조사하는 파장은 표지자에 따라 적절히 정해질 수 있다. 상기 cfDNA는 이중가닥이 풀린 DNA(unwinding of DNA)일 수 있다. 또한, 목적에 따라

cfDNA는 적절히 정해질 수 있다.

[537] 또한, 상기 암세포에서 유래된 cfDNA는 i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나, ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[538] 또한, 상기 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 약 15머 내지 약 30머 프로브와 결합할 수 있다: i) 상온에서 약 1분 내지 약 120분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 약 1초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 1초 내지 약 5분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 30초 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 10분 내지 약 120분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; vii) DNase로 약 1분 내지 약 30분 처리하는 조건; 및 viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[539] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브(probe)"는 cfDNA를 검출하기 위한 DNA 또는 RNA를 의미한다. 프로브는 cfDNA에 상보적인 결합을 할 수 있도록 특정 서열을 가질 수 있다. 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 혈장에 존재하는 검출하기를 원하는 목적 이중가닥의 cfDNA에 상보적인 결합할 수 있는 핵산 서열을 갖는 프로브를 의미한다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴(biotin)이 결합된 것일 수 있다. 상기 프로브는 바이오틴 결합 단백질과 결합된 표지자와 결합될 수 있다.

[540] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자"는, cfDNA와 결합된 프로브를 검출하기 위해 이용되는 물질을 의미한다. 상기 표지자는 나노입자, 형광염료, 형광단백질 또는 효소일 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자는 양자점, HRP 및 형광단백질로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 일 구체예로는, 상기 표지자는 GFP(green fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(cyan fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 또는 HRP(horse radish peroxidase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[541] 상기 표지자는 바이오틴 결합 단백질이 결합된 것일 수 있다. 상기 바이오틴 결합 단백질은 아비딘(avidin) 계열 단백질인 스트렙타비딘, 트랩타비딘(traptavidin) 또는 뉴트라비딘(neutravidin)일 수 있으나, 바이오틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질이면 제한없이 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 상기 표지자는 스트렙타비딘이 결합된 것일 수 있다.

[542] 본 명세서에서 사용된 용어, "스트렙타비딘"은 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)로부터 분리되는 분자량 60 kDa의 4량체 바이오틴 결합 단백질이다. 상기 아비딘과는 매우 낮은 상동성을 가지나 그 구조는 매우 유사하다. 아비딘과 마찬가지로 항균활성을 가지며 바이오틴에 대해 매우 높은 결합력을 갖는다. 한편 아비딘과는 달리 탄수화물을 포함하지

않으며 산성 등전점(pI=5)을 나타내고 아비딘에 비해 현저히 낮은 용해도를 갖는다. 상업적으로 사용가능한 스트렙타비딘 예컨대, Thermo Scientific Pierce Streptavidin은 53 kDa의 분자량을 갖는 재조합 형태의 스트렙타비딘으로 중성에 가까운 등전점(pI=6.8 내지 7.5)를 갖는다. 스트렙타비딘의 당화결여 및 낮은 pI가 아비딘과 비교하여 낮은 수준의 비특이적 결합(특히, 렉틴결합)을 갖도록 한다. 이러한 스트렙타비딘의 특성이 많은 검출시스템에 이상적인 시약으로 선택될 수 있도록 한다.

[543] 본 명세서에서 사용된 용어, "트렙타비딘(traptavidin)"은 스트렙타비딘의 변이체(variant or mutein)를 지칭하는 용어로, 약 10배 가량 느린 바이오틴에 대한 해리속도를 나타내며, 기계적 강도가 증가되고, 열적 안정성이 향상된 단백질이다. 트렙타비딘 역시 바이오틴에 특이적으로 결합한다.

[544] 본 발명의 용어 "뉴트라비딘(neutravidin)"은 "탈당화아비딘"이라고도 하며 천연형의 아비딘과 스트렙타비딘의 주된 단점을 피하고자 제조된 것으로 이름에 나타난 바와 같이 아비딘을 탈당화하여 생성되는 것으로 아비딘에 비해 감소된 분자량(60 kDa)을 가지면서도 높은 바이오틴 결합력을 유지하는 단백질이다. 상기 아비딘의 탈당화는 검출되지 않는 수준으로 렉틴의 결합을 감소시키며 등전점을 낮추어(pI=6.3) 아비딘에 대한 비특이적인 결합의 주된 원인을 효과적으로 제거한다. 라이신 잔기는 사용가능한 채로 유지되므로 스트렙타비딘과 같이 용이하게 유도체화하거나 복합체화할 수 있다. 또한 높은 바이오틴 결합력 및 낮은 비특이적 결합을 나타나므로 이상적인 바이오틴 결합 단백질로 다양하게 이용될 수 있다.

[545] 본 명세서에서 사용된 용어, "표지자를 검출하는 단계"란, 프로브와 바이오틴-에비딘 반응을 통해 결합된 표지자를 검출하는 단계를 의미한다. 상기 표지자의 검출은 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 생물발광 여부, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 측정될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지자를 검출하는 방법은 사용한 표지자에 따라 다르게 수행될 수 있는데, 예를 들어, HRP를 표지자로 사용한 경우에는 과산화수소와 기질과의 반응을 통한 발색반응을 관찰하여 표지자를 검출할 수 있다. 또한, 표지자가 GFP와 같은 형광단백질일 경우에는 특정 파장의 빛을 조사한 후 나오는 검출되는 빛을 관찰하여 표지자의 존재 여부를 검출할 수 있다. 아울러, 표지자가 루시퍼레이즈일 경우 루시페린과 같은 기질을 첨가한 후 나타나는 생물발광을 생물발광계로 측정함으로써 표지자의 존재를 검출할 수 있다.

[546] 또한, 본 발명의 진단 방법은 cfDNA를 변성단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 변성단계는 정상적인 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킬 수 있도록 수행될 수 있다. 이를 위해, 상기 변성 단계의 조건은 약 50℃ 내지 약 100℃에서 약 0.1초 내지 약 5분간 수행될 수 있다. 변성 온도의 일 구체예는 약 95℃일 수 있으며, 변성시간은 통상 약 0.1초 내지 약 8분 정도 수행될 수 있다. 또한, 약 1초, 약 5초, 약 10초, 약 30초,

약 60초 또는 약 90초간 변성될 수 있다. 일 구체예에서 상기 cfDNA를 변성시키는 단계는 상기 c) 단계 전에 수행될 수 있다.

[547] 구체적으로, 상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 i) 상온에서 약 1분 내지 약 10분 방치하는 조건; ii) 약 90℃ 내지 약 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건; iii) 약 75℃ 내지 약 90℃에서 약 10초 내지 약 3분간 가열하는 조건; iv) 약 60℃ 내지 약 75℃에서 약 1분 내지 약 30분간 가열하는 조건; v) 약 25℃ 내지 약 40℃에서 약 5분 내지 약 60분간 가열하는 조건; vi) 프로테아제로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건; 및 vii) DNaseI로 약 1분 내지 약 10분 처리하는 조건으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 변성단계는 정상세포에서 유래한 이중가닥 cfDNA는 변성시키지 않으나, 암세포에서 유래한 cfDNA만을 선별적으로 변성시킴으로서, 프로부와의 결합을 더욱 용이하게 할 수 있다. 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 시료를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건은 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 수득한 후 수행할 수 있다. 또한, 상기 i) 내지 vii)의 변성 조건의 온도, 프로테아제 및 DNase 처리 시간은 안정한 cfDNA를 변성시키지 않는 한 적절히 조정될 수 있다.

[548] **암 진단 키트**

[549] 본 발명의 다른 측면은, 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브; 양전하를 띠는 물질; 아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및 설명서를 포함하는 암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[550] 이때, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279, CD274G* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[551] 또한, 상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 암을 진단할 수 있는 것으로 기재된 것일 수 있다: a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[552] 또한, NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, ß-HCG(CGB). CA19-9, PSA, PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

[553] 또한, 상기 프로브, 양전하를 띠는 물질 및 표지자는 상술한 바와 같다.

[554] **암 진단 장치**

[555] 본 발명의 다른 측면은, a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부; b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부; c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부; d) 표지자를 검출하는 검출부; 및 e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는, 상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을 진단하는 장치를 제공하는 것이다.

[556] 이때, 상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279* 및*CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[557] 또한, NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, ß-HCG(CGB). CA19-9, PSA, PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[558] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[559] **실험 방법 1. 종양 특이적 유전자에서 유래한 cfDNA 검출 방법**

[560] **1 단계 : 샘플 준비 및 나노와이어 추가**

[561] 환자의 혈장, 소변, 침 또는 가래 등을 받은 즉시 3000Xg에서 4℃, 10분간 원심분리하였다. 환자의 혈장, 소변, 침 또는 가래 등을 DPBS에 일정한 비율로 희석하였다. 혈장의 경우, 혈장 1 ㎕ 내지 30 ㎕를 150 ㎕ DW에 섞어서 스핀 컬럼(Spin column)(Type G 또는 Type Q)에 넣고 PEI/Ppy 나노와이어(150 μl)를 첨가하여 thermomixer를 이용하여 실온에서 1,200 rpm의 속도로 20분간 혼합하였다.

[562] **2 단계 : Vacuum/Washing/온도변성**

[563] 스핀 컬럼을 진공(vacuum) 흡입 장치에 장착한 후 550 mBar에서 석션을 수행하였다. 400 μl의 1x DPBS를 넣고 다시 석션을 하였다. 같은 과정을 1회 더 반복하였다. 2단계 스텝을 통하여 획득된 나노와이어-DNA 복합체만 스핀

컬럼에 걸렸다. 온도변성이 필요한 경우 95℃로 예열되어 있는 히트블럭(heating block)에 석션이 완료된 스핀 컬럼을 넣고, 95℃에서 1분간 인큐베이션한 후 바로 꺼냈다. 온도 변성 단계가 필요 없는 조건의 샘플들은 이 과정을 거치지 않았다.

[564] 자성 나노입자를 포함하지 않은 나노와이어를 사용한 스핀 컬럼(spin column)을 통해 cfDNA를 분리한 것을 보여주었다(도 85). 위 사진은 원심분리 전 스핀 컬럼의 SEM 이미지이며, 아래 사진은 원심분리 후 cfDNA가 분리된 스핀 컬럼의 SEM 이미지이다.

[565] **3 단계 : 프로브 및 HRP/STR NPs 추가**

[566] 실험에 맞는 프로브(200 μl) 및 HRP/STR NPs solution(200 ㎕)를 스핀 컬럼에 각각 넣어주었다. 써모믹서(Thermomixer)를 이용하여 실온에서 850 rpm 내지 1,000 rpm의 속도로 30분간 혼합하였다. 스핀 컬럼을 진공 장치에 장착한 후 석션을 수행하였다. 400 ㎕의 1x DPBS를 넣고 다시 석션을 수행 하였다. 같은 과정을 1회 더 반복하였다.

[567] **4 단계 : 유전자변이 검출을 위한 TMB 반응**

[568] 수거 튜브(collection tube)를 새 것으로 교체한 후, 스핀 컬럼에 200 ㎕ sodium acetate buffer(0.2 M, pH 7.0), 50 ㎕ H2O2(0.1 M)을 실린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 차례대로 스핀 컬럼에 첨가한 후 3분간 인큐베이션을 수행하였다. 인큐베이션이 끝나면, 스핀 컬럼을 3,500 rpm 내지 5,000 rpm 속도로 30초동안 원심분리하였다. 수거 튜브(collection tube)에 모인 용액을 200 ㎕씩 96 well로 옮긴 후, UV/VIS 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 500 nm 내지 850 nm 파장대의 흡광도를 측정하였다.

[569] **검출 방법 개요**

[570] 본 발명의 검출 단계를 도 84a 내지 도 85g에 도식화하였다. 도 84a는 폴리에틸렌이민(PEI)이 표면에 결합된 polypyrrole 나노와이어(PEI/Ppy NW)를 이용하여 환자의 체액으로부터 cfDNA를 수득한 후, 타겟 cfDNA에 상보적으로 결합하는 프로브 및 HRP/스트렙타비딘-나노입자(HRP/st-tagged NP)와의 반응을 통하여 암세포 유래의 유전자를 60분 이내에 분석하는 방법에 대한 모식도이다. 나노와이어, 프로브 및 HRP/스트렙타비딘 나노입자를 이용하여 암세포 유래의 cfDNA를 검출하는 방법을 도식화한 것이다(도 84b). 나노와이어를 사용하여 스핀 컬럼(spin column)을 통해 암세포 유래의 유전자를 검출하는 과정을 나타낸 도면이다(도 84c). 또한, 본 발명의 일 구체예에서 라이시스 버퍼를 처리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 혈액, 뇌척수액 또는 흉수와 같은 시료에서 암세포 유래의 cfDNA를 검출하기 위한 방법을 시계열적 흐름으로 나타난 것이다(도 84d). 소변과 같은 시료에서 암세포 유래의 cfDNA를 검출하기 위한 방법을 시계열적 흐름으로 나타난 것이다(도 84e). 혈액에서 취득한 cfDNA의 상태에 따른 변성 조건의 차이를 도식화한 것이다(도 84f). 소변, 타액 및 객담에서 취득한 cfDNA의 상태에 따른 변성 조건의 차이를 도식화한 것이다(도 84g).

[571] **제조예 1. 양이온성 고분자로 표면처리된 나노와이어의 제조**

[572] 도 1a에 나타낸 바와 같이, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)이 표면에 접합된 나노와이어를 제조하였다. 양극산화 알루미늄(anodic aluminium oxide, AAO)의 한 면을 Q150T 모듈러 코팅 시스템(Quorum Technologies, UK)을 사용하여 $5X10^{-3}$ mbar 및 50 mA에서 600초 동안 금(Au) 층(약 150 ㎚ 두께)으로 코팅하였다. 모든 전기화학적 실험은 금(Au) 코팅된 AAO 주형에서 백금 와이어 상대 전극과 Ag/AgCl(3.0 M NaCl type) 비교 전극을 구비한 potentiostat/galvanostat(BioLogic SP-150)를 사용하여 측정하였다.

[573] 양이온성 고분자로 표면 처리된 나노와이어(PEI/Ppy NW)의 제조를 위해 AAO 주형의 기공에 0.01 M 폴리(4-스티렌설폰산)(poly(4-styrene sulfonic acid)) 및 1 ㎎/㎖ 의 바이오틴(biotin)을 함유하는 0.01 M 피롤용액과 함께 1.0 V(vs. Ag/AgCl)에서 7분 동안 크로노암페로메트리(chronoamperometry)를 적용하여 전기화학적 증착을 수행하였다.

[574] 생성된 AAO 주형을 증류수로 여러 번 세척하고, 2 M의 수산화나트륨(NaOH) 용액에 3시간 동안 담근 후, 초음파 처리를 위해(Bioruptor UCD-200, Diagenode)에 넣어 바이오틴 분자가 도핑된 프리-스탠딩 폴리피롤 나노와이어(free-standing Ppy NWs)를 얻었다. 그 후, 생성된 나노와이어에 30 mM N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC) 및 6 mM N-hydroxysuccinimide(NHS)를 첨가하여 카복실산(-COOH, carboxylic acid)기를 활성화하였다. 이후, PEI 용액을 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 물로 세척하여, 폴리에틸렌이민이 표면에 접합된 나노구조체(PEI/Ppy NW)를 수득하였다. 수득된 나노구조체(PEI/Ppy NW)는 탈이온수에 분산시키고 사용할 때까지 실온에서 보관하였다.

[575] 이러한 제조방법으로 인해, AAO 주형이 선택적으로 용해된 후, 각각의 폴리피롤(Ppy) 나노와이어가 AAO 주형으로부터 방출되고, 나노와이어에 바이오틴-스트렙타비딘의 상호 작용을 통해 양이온성 분지형 폴리에틸렌이민(cationic branched PEI, 25 kDa)을 추가로 접합시켰다.

[576] **제조예 2. 양이온성 고분자로 표면처리된 나노와이어의 제조**

[577] 상기 제조예 1과 실질적으로 동일한 방법에 따라, 폴리에틸렌이민 대신에 폴리리신을 표면에 접합시킨 나노구조체 (PL/Ppy NW)를 얻었다.

[578] **제조예 3. HRP 및 스트렙타비딘이 표지된 폴리피롤 나노입자 제조**

[579] HRP 및 스트렙타비딘이 결합된 나노입자의 제조를 위해, 폴리비닐피롤(polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.5 g을 12.5 ㎖의 3차 증류수에 넣고 30분간 교반한 후, 65 ㎕의 피롤(pyrrole)을 넣고 10분간 더 교반하였다. 그 후, 0.75 g/㎖ 농도의 $FeCl_3$ 용액을 0.5 ㎖ 첨가하여 3시간 반응시켰다. 그 후, 히알루론산 수용액(400 ㎎/20 ㎖) 20 ㎖을 첨가하여 3시간 동안 교반시킴으로써 폴리피롤-히알루론산 나노입자(Ppy-HA-NPs)를 제조하였다.

[580] MWCO: 50,000 pore-size의 멤브레인을 이용하여 3차 증류수에 2일간 투석한다. 큰 사이즈의 particles aggregates를 1,200 rpm으로 3분간 원심분리하여 제거한 후 동결건조시켰다. 상기에서 제조된 200 ㎍의 Ppy-HA-NPs를 3차 증류수 1 ㎖에 넣은 후, 100 mM EDC/50 mM NHS 용액을 첨가하여 45분간 반응시켜 히알루론산의 카르복시 그룹을 활성화시켰다. 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하면서 세척을 2번씩 진행하였다. Ppy-HA-NPs에 1 ㎎의 HRP 및 1 ㎎의 스트렙타비딘을 첨가하여 4℃ 온도에서 혼합하였다. 이후, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3차 증류수에 보관하였다. HRP 및 스트렙타비딘이 표면에 접합된 나노입자(HRP/st-tagged NP)의 형태는 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다(도 1b).

[581] **제조예 4. 프로브 제작**

[582] 불안정한 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA를 검출하기 위하여 프로브를 제작하였다. 프로브 제작은 검출을 원하는 암종 cfDNA에 따라 다르게 제작되었다. 이때, 상기 프로브는 바이오틴을 결합시켰다. 상기 프로브의 구체적인 핵산서열 정보는 진단 대상 암종에 따라 표 1, 5, 9 및 11 내지 28에 나타난 바와 같다.

[583] **I. 암세포주 유래의 유전자 검출 정확도 확인**

[584] **실시예 1. 암세포주에서 발현 유전자 검출**

[585] **실시예 1.1. PD-L1 검출 정확도 확인**

[586] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 PD-L1 양성 암세포주로 알려진 MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9 및 H460 암세포주와 PD-L1 음성 암세포주로 알려진 A549, MDA-MB-468, HeLa 및 MCF7 암세포주를 이용하여 PD-L1 검출 정확도 확인하였다. 이때, PD-L1 양성 암세포주 및 PD-L1 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 PD-L1의 mRNA 레벨(mRNA level)을 기준으로 분류하였다.

[587] 구체적으로, 각각의 PD-L1 양성 암세포주 및 PD-L1 음성 암세포주에서 유전체(genomic) DNA를 추출한 후, 음파처리(sonication)하여 fDNA(fragmented DNA) 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리(isolation)하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 PD-L1 프로브(biotinylated PD-L1 probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 1에 나타내었다.

[588] [표1]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated PD-L1 probe 1(Exon5)	TGGGAGCCATCTTATTATGCC	1
biotinylated PD-L1 probe 2(Exon5)	CGGAAGATGAATGTCAGTGC	2
biotinylated PD-L1 probe 3(Exon2)	CCTACTGGCATTTGCTGAACG	3
biotinylated PD-L1 probe 4(Exon3)	ACCATAGCTGATCATGCAGCG	4

[589] 비색검출(Colorimetric detection)을 위해 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨(Sodium acetate) 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 PD-L1 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 두번의 반복실험에서 MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9 및 H460 암세포주의 fDNA에서만 명확한 PD-L1 DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.012)이 나타났다. 반면, A549, MDA-MB-461, HeLa, MCF7 암세포주에서는 2번의 반복실험에서 모두 PD-L1 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 4 및 도 5). 또한, 상기 각 암세포주들의 PD-L1 DNA 발현 결과와 CCLE(cancer cell line encyclopedia)로부터 얻은 각 암세포주의 PD-L1(CD274) mRNA 발현 결과를 비교하였다. 각 암세포주의 PD-L1(CD274) mRNA 값은 하기 표 2에 나타내었다.

[590] [표2]

암세포주	CD274
MDAMB231_BREAST	3.474506
HCC827_LUNG	3.426417
NCIH1975_LUNG	2.513606
PC9_LUNG	1.098854
NCIH460_LUNG	0.903786
A549_LUNG	0.735843
MDAMB468_BREAST	-0.38864
MCF7_BREAST	-4.06132

[591] 그 결과, MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9 및 H460 암세포주에서 높은 mRNA 발현을 보였다. 반면, A549, MDA-MB-461, HeLa 및 MCF7 암세포주에서는 mRNA 발현을 거의 보이지 않았다.

[592] **실시예 1.2. EpCAM 검출 정확도 확인**

[593] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 EpCAM 양성 암세포주로 알려진 MDA-MB468, HCC827, MCF7, H1975 및 MDA-MB-231 암세포주와 EpCAM 음성 암세포주로 알려진 A549, H460 및 Hela 암세포주를 이용하여 EpCAM 검출 정확도 확인하였다. 이때, EpCAM 양성 암세포주 및 EpCAM 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 EpCAM의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[594] 구체적으로, EpCAM 양성 암세포주 및 EpCAM 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 EpCAM 프로브(biotinylated EpCAM probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 3에 나타내었다.

[595] [표3]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated EpCAM probe 1(Exon1)	ACAGAGCGCTAGTC CTTCGGC	5
biotinylated EpCAM probe 2(Exon4)	AACCTTATGATAGT AAAAGTT	6
biotinylated EpCAM probe 3(Exon7)	GGTCTAAAAGCTGG TGTTATT	7
biotinylated EpCAM probe 4(Exon9)	GAAACTGGCTTTAC CAATCTT	8

[596] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 EpCAM 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 PC9, MDA-MB468, HCC827, MCF7, H1975 및 MDA-MB-231 암세포주의 fDNA에서만 명확한 EpCAM DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.012)이 나타났다. 반면, H460 및 Hela 암세포주에서는 2번의 반복실험에서 EpCAM DNA 발현이 나타나지 않았다(도 6 및 도 7). 또한, 상기 각 암세포주들의 EpCAM DNA 발현 결과와 CCLE(cancer cell line encyclopedia)로부터 얻은 각 암세포주의 EpCAM mRNA 발현 결과를 비교하였다. 각 암세포주의 EpCAM mRNA 값은 하기 표 4에 나타내었다.

[597] [표4]

유전자	EpCAM
MDAMB468_BREAST	7.391754
HCC827_LUNG	7.394143
MCF7_BREAST	7.506349
NCIH1975_LUNG	6.241641
MDAMB231_BREAST	3.334
A549_LUNG	1.727828
NCIH460_LUNG	-0.448733
HRLA_CERVIX	-0.00781

[598] 그 결과, PC9, MDA-MB468, HCC827, MCF7, H1975 및 MDA-MB-231 암세포주에서 높은 mRNA 발현을 보였다. 반면, H460 및 Hela 암세포주에서는 mRNA 발현을 거의 보이지 않았다.

[599] **실시예 1.3. FOLR1 검출 정확도 확인**

[600] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 FOLR1 양성 암세포주로 알려진 HeLa, MDA-MB-468, HCC827, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주와 FOLR1 음성 암세포주로 알려진 H460, PC9, H1975 및 A549 암세포주를 이용하여 FOLR1 검출 정확도 확인하였다. 이때, FOLR1 양성 암세포주 및 FOLR1 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 FOLR1의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[601] 구체적으로, FOLR1 양성 암세포주 및 FOLR1 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/$\mu\ell$ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 FOLR1 프로브(biotinylated FOLR1 probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 5에 나타내었다.

[602] [표5]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated FOLR1 probe 1(Exon4)	TGTTCTACCAACACCAGCCAG	9
biotinylated FOLR1 probe 2(Exon2)	ACTGAACCCAAAGGATCACCT	10
biotinylated FOLR1 probe 3(Exon1)	CCTAGGCCACTAAACCACAGC	11
biotinylated FOLR1 probe 4(Exon5)	GGCTGGGCCCTGGGCAGCCTG	12

[603] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨(Sodium acetate) 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 FOLR1 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 HeLa, MDA-MB468, HCC827, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주의 fDNA에서만 명확한 FOLR1 DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.012)이 나타났다. 반면, H460, PC9, H1975 및 A549 암세포에서는 2번의 반복실험에서 FOLR1 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 8 및 도 9). 또한, 상기 각 암세포주들의 FOLR1 DNA 발현 결과와 CCLE(cancer cell line encyclopedia)로부터 얻은 각 암세포주의 FOLR1 mRNA 결과를 비교하였다. 각 암세포주의 FOLR1 mRNA 값은 하기 표 6에 나타내었다.

[604] [표6]

암세포주	FOLR1
NCIH460_LUNG	-4.67303
A549_LUNG	-2.67569
NCIH1975_LUNG	-2.1258
PC9_LUNG	-1.3628
MDAMB231_BREAST	0.92787
MDAMB468_BREAST	1.029144
MCF7_BREAST	1.137905
HCC827_LUNG	2.13759
HRLA_CERVIX	6.756305

[605] 그 결과, HeLa, MDA-MB-468, HCC827, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주에서 높은 mRNA 발현을 보였다. 반면, H460, PC9, H1975 및 A549 암세포주에서는 mRNA 발현을 거의 보이지 않았다.

[606] **실시예 1.4. EGFR 검출 정확도 확인**

[607] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 EGFR 양성 암세포주로 알려진 HeLa, PC9, A549, H1975, H460, MDA-MB-468, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주와 EGFR 음성 암세포주로 알려진 MCF7 암세포주를 이용하여 EGFR 검출 정확도 확인하였다. 이때, EGFR 양성 암세포주 및 EGFR 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 EGFR의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[608] 구체적으로, EGFR 양성 암세포주 및 EGFR 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 EGFR 프로브(biotinylated EGFR probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 7에 나타내었다.

[609] [표7]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated EGFR probe 1(Exon1)	AACGCCACAACCACCG CGCAC	13
biotinylated EGFR probe 2(Exon21)	GGACCGTCGCTTGGTG CACCG	14
biotinylated EGFR probe 3(Exon19)	TCTGGACCCAGAAGGT GAGAA	15
biotinylated EGFR probe 4(Exon20)	TGCTGGGCATCTGCCTC ACCT	16

[610] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 EGFR 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 HCC827, PC9, MDA-MB468, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주의 fDNA에서만 명확한 EGFR DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.012)이 나타났다. 반면, MCF7 암세포주에서는 2번의 반복실험에서 EGFR DNA 발현이 나타나지 않았다(도 10 및 도 11). 또한, 상기 각 암세포주들의 EGFR DNA 발현 결과와 CCLE로부터 각 암세포주의 EGFR mRNA 발현 결과를 비교하였다. 각 암세포주의 EGFR mRNA 값은 하기 표 8에 나타내었다.

[611] [표8]

유전자	EGFR
MCF7_BREAST	-2.6082
NCIH460_LUNG	2.290725
HRLA_CERVIX	3.548315
NCIH1975_LUNG	4.722316
A549_LUNG	4.772873
MDAMB231_BREAST	5.060244
PC9_LUNG	6.4006
MDAMB468_BREAST	8.505156
HCC827_LUNG	8.98461

[612] 그 결과, HeLa, H460, PC9, H1975, MDA-MB-468, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주에서 높은 mRNA 발현을 보였다. 반면, MCF7 암세포주에서는 mRNA 발현을 거의 보이지 않았다.

[613] **실시예 1.5. ERBB2(HER2) 검출 정확도 확인**

[614] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 ERBB2 양성 암세포주로 알려진 MCF7, PC9, A549, H1975, H460, MDA-MB468, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주와 ERBB2 음성 암세포주로 알려진 H460 암세포주를 이용하여 ERBB2 검출 정확도 확인하였다. 이때, ERBB2 양성 암세포주 및 ERBB2 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 ERBB2의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[615] 구체적으로, ERBB2 양성 암세포주 및 ERBB2 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 ERBB2 프로브(biotinylated ERBB2 probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 9에 나타내었다.

[616] [표9]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated ERBB2 probe 1(Exon1)	TCGCAGCACCCCGCGCCCCGC	17
biotinylated ERBB2 probe 2(Exon5)	CCTGTTCTCCGATGTGTAAGG	18
biotinylated ERBB2 probe 3(Exon10)	CCGCTCCAGCCAGAGCAGCTC	19
biotinylated ERBB2 probe 4(Exon17)	AAGATCCGGAAGTACACGATG	20

[617] 비색 검출을 위해 TMB 및 H2O2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 ERBB2 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 MCF7, PC9, A549, H1975, MDA-MB468, MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주의 fDNA에서만 명확한 ERBB2 DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, H460 암세포주에서는 2번의 반복실험에서 ERBB2 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 12 및 도 13). 또한, 상기 각 암세포주들의 ERBB2 DNA 발현 결과와 CCLE로부터 각 암세포주의 ERBB2 mRNA 발현 결과를 비교하였다. 각 암세포주의 EGFR mRNA 값은 하기 표 10에 나타내었다.

[618] [표10]

유전자	ERBB2
MCF7_BREAST	4.64588
NCIH1975_LUNG	4.314726
HRLA_CERVIX	4.056006
HCC827_LUNG	4.077482
MDAMB231_BREAST	3.681573
MDAMB468_BREAST	3.576987
A549_LUNG	3.298639
NCIH460_LUNG	2.948514

[619] 그 결과, 실험에서 MCF7, PC9, A549, H1975, MDA-MB468, MCF7, H460 및 MDA-MB-231 암세포주에서 높은 mRNA 발현을 보였다.

[620] **실시예 1.6. OGT(O-linked ß-N-acetylglucosamine transferase) 검출 정확도 확인**

[621] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 OGT 양성 암세포주로 알려진 UMUC3, KU19-19, 253J, J82, T24, MBT2 암세포주와 OGT 음성 암세포주로 알려진 RT4, MDCK, HBL EpC, Jurkat 암세포주를 이용하여 OGT 검출 정확도 확인하였다. 이때, OGT 양성 암세포주 및 OGT 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 OGT의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[622] 구체적으로, OGT 양성 암세포주 및 OGT 음성 암세포주에서 유전체(genomic) DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 OGT 프로브(biotinylated OGT probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 11에 나타내었다.

[623] [표11]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated OGT(O-GlcNAc transferase) probe 1	ATGGCGTCTTCC GTGGGC	21
OGT_R biotinylated OGT(O-GlcNAc transferase) probe 2	TGCCCTGTGGCC ATGGAC	22

[624] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. OGT 양성 암세포주 및 OGT 음성 암세포주에서 추출한 fDNA를 제조예 1에서 제조한 나노와이어로 검출한 후, DNA 기반 OGT 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 UMUC3, KU19-19, 253J, J82, T24, MBT2 암세포주의 fDNA에서만 명확한 OGT DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 양성 방광암 세포주인 RT4 및 정상 방광암 세포주인 MDCK 및 HBL_EpC, 또는 Jurkat T-lymphocyte 세포들에서는 2번의 실험 모두에서 OGT DNA 발현이 나타나지 않았다(도 14 및 도 15).

[625] **II. 암세포주 유래의 종양 표지자 검출**

[626] **실시예 2. 암세포주 유래 바이오마커 검출**

[627] **실시예 2.1. CEA 검출**

[628] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 CEA 양성 암세포주로 알려진 LoVo, MKN45 및 SW1116 암세포주와 CEA 음성 암세포주로 알려진 HCT8, HCT15, HeLa 및 MDA-MB-231 암세포주를 이용하여 CEA를 검출하였다. 이때, CEA 양성 암세포주 및 CEA 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 CEA의 mRNA 레벨을 기준으로

분류하였다.

[629] 구체적으로, CEA 양성 암세포주 및 CEA 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 CEA 프로브(biotinylated CEA probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 12에 나타내었다.

[630] [표12]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26

[631] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 CEA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 3번의 반복실험에서 LoVo, MKN45 및 SW1116 암세포주의 fDNA에서만 명확한 CEA DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, HCT8, HCT15, HeLa 및 MDA-MB-231 암세포주에서는 3번의 실험 모두에서 CEA DNA 발현이 나타나지 않았다(도 16 내지 도 18).

[632] **실시예 2.2. PSA 검출**

[633] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 PSA 양성 암세포주로 알려진 LNE 및 LNCaP 암세포주와 PSA 음성 암세포주로 알려진 PC3, DU145 및 MCF7 암세포주를 이용하여 PSA를 검출하였다. 이때, PSA 양성 암세포주 및 PSA 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 PSA의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[634] 구체적으로, PSA 양성 암세포주 및 PSA 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 제조예 1에서 제조한 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 PSA 프로브(biotinylated PSA probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 13에 나타내었다.

[635] [표13]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated PSA(KLK3) probe 1	CAGTCTGCGGCGGTGTTCTGG	27
biotinylated PSA(KLK3) probe 2	GCAAGTTCACCCTCAGAAGGT	28
biotinylated PSA(KLK3) probe 3	GAGGTCCAGGGTTGCTAGGAA	29

[636] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 PSA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 LNE 및 LNCaP 암세포주의 fDNA에서만 명확한 PSA DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, PC3, DU145 및 MCF7 암세포주에서는 2번의 실험 모두에서 PSA DNA 발현이 나타나지 않았다(도 19 및 도 20).

[637] **실시예 2.3. CA19-9 검출**

[638] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 CA19-9 양성 암세포주로 알려진 Capan1, Capn2 및 AsPC1 암세포주와 CA19-9 음성 암세포주로 알려진 MIA-PaCa2 및 Panc1 암세포주를 이용하여 CA19-9를 검출하였다. 이때, CA19-9 양성 암세포주 및 CA19-9 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 CA19-9 의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[639] 구체적으로, CA19-9 양성 암세포주 및 CA19-9 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 CA19-9 프로브(biotinylated CA19-9 probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 14에 나타내었다.

[640] [표14]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 1	GATCATCACGGCACGGTC	30
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

[641] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 CA19-9 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 Capan1, Capn2 및 AsPC1 암세포주의 fDNA에서만 명확한 CA19-9 DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, MIA-PaCa2 및 Panc1 암세포주에서는 2번의 실험 모두에서 CA19-9 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 21 및 도 22).

[642] **실시예 2.4. CA125 검출**

[643] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 CA125 양성 암세포주로 알려진 A549 암세포주와 CA125 음성 암세포주로 알려진 A431 암세포주를 이용하여 CA125를 검출하였다. 이때, CA125 양성 암세포주 및 CA125 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 CA125의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[644] 구체적으로, CA125 양성 암세포주 및 CA125 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 CA125 프로브(biotinylated CA125 probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 15에 나타내었다.

[645] [표15]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 1	CTGGAACTGATTCTATCAACC	33
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 2	TGTGGCAGAAACCAGCTATCC	34
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 3	GAGGTCCTGAGGATGTGTCAT	35

[646] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 CA125 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 A549 암세포주의 fDNA에서만 명확한 CA125 DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, A431 암세포주에서는 2번의 실험 모두에서 CA125 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 23 및 도 24).

[647] **실시예 2.5. AFP 검출**

[648] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 AFP 양성 암세포주로 알려진 Huh7, HepG2, Hep3B 및 PLC 암세포주와 AFP 음성 암세포주로 알려진 SNU475, SNU387, SNU423, SNU449, SK Hep1 및 HeLa 암세포주를 이용하여 AFP를

검출하였다. 이때, AFP 양성 암세포주 및 AFP 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 AFP의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다.

[649] 구체적으로, AFP 양성 암세포주 및 AFP 음성 암세포주에서 유전체 DNA를 추출한 후, 음파처리하여 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 AFP 프로브(biotinylated AFP probe)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 16에 나타내었다.

[650] [표16]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated AFP probe 1	TGAGTCAGAAGTTTACCAAAG	36
biotinylated AFP probe 2	TGCAAACTGACCACGCTGGAA	37
biotinylated AFP probe 3	CTTGAATGCCAAGATAAAGGA	38

[651] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 검출 결과를 확인하였다. 각 암세포주의 DNA 기반 AFP 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2번의 반복실험에서 Huh7, HepG2, Hep3B 및 PLC 암세포주의 fDNA에서만 명확한 AFP DNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, SNU475, SNU387, SNU423, SNU449, SK Hep1 및 HeLa 암세포주에서는 2번의 실험 모두에서 AFP DNA 발현이 나타나지 않았다(도 25 및 도 26).

[652] **III. 암환자의 혈장 또는 소변을 이용한 바이오마커 검출 확인**

[653] **실시예 3. 암환자 유래 바이오마커 검출**

[654] **실시예 3.1. 전립선암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[655] 정상인 또는 전립선암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 PSA, PSMA, PAP, PCA3 전립선암 종양표지자를 검출하였다. 전립선암 표지자로써 PSA, PSMA, PAP, PAC3는 전립선암 환자에게서 높이 발현되며, 현재 암조직 및 혈액 검사를 통하여 전립선암 항원(PSA, PSMA, PAP, PAC3)의 수치를 확인함으로 전립선암 감별에 사용되고 있다.

[656] 구체적으로, 정상인 또는 전립선암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을

진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 17에 나타내었다.

[657] [표17]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated PSA(KLK3) probe 1	CAGTCTGCGGCGGTGTTCTGG	26
biotinylated PSA(KLK3) probe 2	GCAAGTTCACCCTCAGAAGGT	27
biotinylated PSA(KLK3) probe 3	GAGGTCCAGGGTTGCTAGGAA	28
biotinylated PSMA(FOLH1) probe 1	CATAGTGCTCCCTTTTGATTG	39
biotinylated PSMA(FOLH1) probe 2	AGTGGAAAGAATTTGGCCTGG	40
biotinylated PSMA(FOLH1) probe 3	ACCTAGAAGAACAATTTTGTT	41
biotinylated PAP(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	GCAGCATTATGAACTTGGAGA	42
biotinylated PAP(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	TCGGAATGAGACGCAGCACGA	43
biotinylated PCA3(Prostate cancer antigen 3; PCA3 gene) probe 1	CTTAGTGTTTCAATGAACACC	44
biotinylated PCA3(Prostate cancer antigen 3; PCA3 gene) probe 2	GCTTAGCCTTGTACTGAGGCT	45

[658] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 PSA, PSMA, PAP, PAC3의 발현을 확인하였다. PSA, PSMA, PAP, PAC3 ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 전립선암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 PSA, PSMA, PAP, PAC3 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.015)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우 모두 PSA, PSMA, PAP, PAC3 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.015)이 나타나지 않았다(도 27 내지 도 32).

[659] **실시예 3.2. 폐암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[660] 정상인 또는 폐암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA 폐암 종양표지자를 검출하였다. 폐암 표지자로써 NSE, SCC, CEA,

Cyfra21-1, TPA는 폐암 환자에게서 높이 발현되며, 현재 암조직 및 혈액 검사를 통하여 폐암 항원(NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA)의 수치를 확인함으로써 폐암 감별에 사용되고 있다.

[661] 구체적으로, 정상인 또는 폐암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 18에 나타내었다.

[662] [표18]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 1	CCATAGAGAAGATC TGGGCCC	46
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 2	GATCCTCCCAGTGG GAGCTGA	47
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 3	GGTCATGGTGAGTC ATCGCTC	48
biotinylated SCC(Squamous Cell Carcinoma Antigen; SART3 gene) probe 1	GCTGGAGTGGCTGC ATGACGA	49
biotinylated SCC(Squamous Cell Carcinoma Antigen; SART3 gene) probe 2	GCGCCCTGGTCGAG AACTGCC	50
biotinylated SCC(Squamous Cell Carcinoma Antigen; SART3 gene) probe 3	GTGGCTAGAGTATT ACAACCT	51
biotinylated SCC(Squamous Cell Carcinoma Antigen; SART3 gene) probe 4	TCGAGAACAGCATC CCTGCAG	52
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTC CTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCA GCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATT GATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCA AACCCGT	26
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 1	CTGGCCTCCTACCT GGACAA	53
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 2	GACCTGGAGATGCA GATCGAA	54
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 3	GTCGCTGGCCACAC GGAGCAG	55
biotinylated TPA(Tissue plasminogen activator; PLAT gene) probe 1	GCTGTGAAGCAATC ATGGATG	56
biotinylated TPA(Tissue plasminogen activator; PLAT gene) probe 2	GCACCTGCCAGCAG GCCCTGT	57

biotinylated TPA(Tissue plasminogen activator; PLAT gene) probe 3	ACTGGACGGAGTGT GAGCTCT	58

[663] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 2명의 폐암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에 NSE, SCC, CEA, Cyfra21-1, TPA ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 33 내지 도 35).

[664] **실시예 3.3. 갑상선암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[665] 정상인 또는 갑상선암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CEA, NSE, TG, CALCA 갑상선암 종양표지자를 검출하였다. 갑상선암 표지자로써 CEA, NSE, TG, CALCA는 갑상선암 환자에게서 높이 발현되며, 현재 암조직 및 혈액 검사를 통하여 갑상선암 항원(CEA, NSE, TG, CALCA)의 수치를 확인함으로 갑상선암 감별에 사용되고 있다.

[666] 구체적으로, 정상인 또는 갑상선암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(Biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 19에 나타내었다.

[667] [표19]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCC TGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCA GCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATT GATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCA AACCCGT	26
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 1	CCATAGAGAAGATC TGGGCCC	46
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 2	GATCCTCCCAGTGG GAGCTGA	47
biotinylated NSE(Neuron-Specific Enolase; ENO2 gene) probe 3	GGTCATGGTGAGTC ATCGCTC	48
biotinylated Thyroglobulin(TG gene) probe 1	CAACACCACAGACA TGATGAT	59
biotinylated Thyroglobulin(TG gene) probe 2	TGCGGCCTGGCTCG AGCAGCA	60
biotinylated Thyroglobulin(TG gene) probe 3	AATCAATCACTATC CAGCCAG	61
biotinylated Thyroglobulin(TG gene) probe 4	ACTCTCTGGAGCAC TCCACGG	62
biotinylated Calcitonin(Calcitonin Gene-Related Peptide; CALCA gene) probe 1	GAGGTGTCATGGGC TTCCAAA	63
biotinylated Calcitonin(Calcitonin Gene-Related Peptide; CALCA gene) probe 2	GTAATCTGAGTACTT GCATGC	64

[668] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CEA, NSE, TG, CALCA의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CEA, NSE, TG, CALCA ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 갑상선암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CEA, NSE, TG, CALCA ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에도 CEA, NSE, TG, CALCA

ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 36 내지 도 40).

[669] **실시예 3.4. 방광암 환자의 소변을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[670] 정상인 또는 방광암 환자로부터 수득한 소변으로부터 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1 방광암 종양표지자를 검출하였다. 방광암 표지자로써 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1는 방광암 환자의 소변에서 높은 수치를 보임에 따라, 방광암 감별에 사용될 수 있다.

[671] 구체적으로, 정상인 또는 방광암 환자로부터 소변을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 20에 나타내었다.

[672] [표20]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated OGT(O-GlcNAc transferase) probe 1	ATGGCGTCTTCCGTGGGC	21
biotinylated OGT(O-GlcNAc transferase) probe 2	TGCCCTGTGGCCATGGAC	22
biotinylated FGFR3 probe 1	AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG	65
biotinylated FGFR3 probe 2	CCCACAGCTTCTGCCCCCGA	66
biotinylated FGFR3 probe 3	GGGCATCCATGGGAGCC	67
biotinylated FGFR3 probe 4	CAGCGTGGGCCGAGGT	68
biotinylated FGFR3 probe 5	CCCTGAGATGCTGGGAGCAG	69
biotinylated FGFR3 probe 6	GTGTGGGAAGGCGGTGTTG	70
biotinylated TP53 probe 1	GCCCTGACTTTCAACTCTG	71
biotinylated TP53 probe 2	ACGACAGGGCTGGTTGCC	72
biotinylated TP53 probe 3	TCCCCAGGCCTCTGATTCC	73
biotinylated TP53 probe 4	CCTCCAGGTGAGCAGTAG	74
biotinylated TP53 probe 5	CTTGGGCCTGTGTTATCTC	75
biotinylated TP53 probe 6	CCCACCTCTTACCGATTT	76
biotinylated TP53 probe 7	ACAAGGGTGGTTGGGAGTAG	77
biotinylated TP53 probe 8	GGACAAGAAGCGGTGGAGG	78

biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 1	CTGGCCTCCTACCTGGACAA	53
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 2	GACCTGGAGATGCAGATCGAA	54
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 3	GTCGCTGGCCACACGGAGCAG	55
biotinylated NMP22(nuclear matrix protein-22; NUMA1 gene) probe 1	ATGGCACTGAAGAGGGACAGC	79
biotinylated NMP22(nuclear matrix protein-22; NUMA1 gene) probe 2	GCCAAGGAAGAGCTGGAGCAG	80
biotinylated NMP22(nuclear matrix protein-22; NUMA1 gene) probe 3	GAGCAGCTAGAGGTATTTCAG	81
biotinylated NMP22(nuclear matrix protein-22; NUMA1 gene) probe 4	AGGTAGAATCCCTGGAGAGTC	82

[673] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 방광암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인 및 방광염증 환자들에게서는 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에도 OGT, FGFR3, TP53, NMP22, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 41 내지 도 46).

[674] **실시예 3.5. 유방암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[675] 정상인 또는 유방암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CA27-29, CA15-3, CEA 유방암 종양표지자를 검출하였다. 유방암 표지자로써 CA27-29, CA15-3, CEA 는 유방암 환자에게서 높이 발현되며, 현재 암조직 및 혈액 검사를 통하여 유방암 항원(CA27-29, CA15-3, CEA)의 수치를 확인함으로 유방암 감별에 사용되고 있다.

[676] 구체적으로, 정상인 또는 유방암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 21에 나타내었다.

[677] [표21]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated CA27.29/CA15-3(Carcinoma Antigen 15-3; MUC1 gene) probe 1	GCGCCTGCCTGAATC TGTTCT	83
biotinylated CA27.29/CA15-3(Carcinoma Antigen 15-3; MUC1 gene) probe 2	TTCTGGGCCTCTCCA ATATTA	84
biotinylated CA27.29/CA15-3(Carcinoma Antigen 15-3; MUC1 gene) probe 3	GGATACCTACCATCC TATGAG	85
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCC TGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAG CAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATT GATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAA ACCCGT	26

[678] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CA27-29, CA15-3, CEA의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CA27-29, CA15-3, CEA ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 유방암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CA27-29, CA15-3, CEA ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에도 CA27-29, CA15-3, CEA ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 47 내지 도 50).

[679] **실시예 3.6. 대장암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[680] 정상인 또는 대장암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CEA, CA19-9 대장암 종양표지자를 검출하였다. 대장암 표지자로써 CEA, CA19-9는 대장암 환자에게서 높이 발현되며, 현재 암조직 및 혈액 검사를 통하여 대장암 항원(CEA, CA19-9)의 수치를 확인함으로 대장암 감별에 사용되고 있다.

[681] 구체적으로, 정상인 또는 대장암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더

반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 22에 나타내었다.

[682] [표22]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 1	GATCATCACGGCACGGTC	30
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

[683] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CEA, CA19-9의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CEA, CA19-9 ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 대장암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CEA, CA19-9 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에도 CEA, CA19-9 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 51 내지 도 55).

[684] **실시예 3.7. 담도암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[685] 정상인 또는 담도암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CEA, CA19-9, CA125 담도암 종양표지자를 검출하였다. 담도암 표지자로써 CA19-9, CA125, CEA 는 담도암 환자에게서 높이 발현되며, 혈액 검사를 통하여 담도암 항원(CA19-9, CA125, CEA)의 수치를 확인함으로 담도암 감별에 사용될 수 있다.

[686] 구체적으로, 정상인 또는 담도암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및

스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 23에 나타내었다.

[687] [표23]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 1	GATCATCACGGCACGGTC	30
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 1	CTGGAACTGATTCTATCAACC	33
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 2	TGTGGCAGAAACCAGCTATCC	34
biotinylated CA125(MUC16 gene) probe 3	GAGGTCCTGAGGATGTGTCAT	35

[688] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CEA, CA19-9, CA125의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CEA, CA19-9, CA125 ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 담도암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CEA, CA19-9, CA125 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에도 CEA, CA19-9, CA125 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 56 내지 도 58).

[689] **실시예 3.8. 위암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[690] 정상인 또는 위암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1 위암 종양표지자를 검출하였다. 위암 표지자로써 CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1는 위암 환자에게서 높이 발현되며, 혈액 검사를 통하여 위암

항원(CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1)의 수치를 확인함으로 위암 감별에 사용될 수 있다.

[691] 구체적으로, 정상인 또는 위암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 24에 나타내었다.

[692] [표24]

	서열정보(5'-> 3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 1	GATCATCACGGCACGGTC	30
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32
biotinylated Beta-HCG(human chorionic gonadotropin; CGB gene) probe 1	TGCTGAGCATGGGCGGGACAT	86
biotinylated Beta-HCG(human chorionic gonadotropin; CGB gene) probe 2	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTG	87
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 1	CTGGCCTCCTACCTGGACAA	53
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 2	GACCTGGAGATGCAGATCGAA	54
biotinylated Cyfra21-1(cytokeratin 19-fragments; KRT19 gene) probe 3	GTCGCTGGCCACACGGAGCAG	55

[693] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 위암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CEA, CA19-9, CGB, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에도 CEA,

CA19-9, CGB, Cyfra21-1 ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 59 내지 도 61).

[694] **실시예 3.9. 췌장암 환자의 혈장을 이용한 종양 표지자 검출 확인**

[695] 정상인 또는 췌장암 환자로부터 수득한 혈장으로부터 CA19-9, CA125, CEA 췌장암 종양표지자를 검출하였다.

[696] 구체적으로, 정상인 또는 췌장암 환자로부터 혈장을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 25에 나타내었다.

[697] [표25]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
biotinylated CEA(Prostatic Acid Phosphatase; ACPP gene) probe 4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 1	GATCATCACGGCACGGTC	30
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
biotinylated CA19-9(FLU3 gene) probe 3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

[698] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 *CEA, CA19-9, CA125*의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 *CEA, CA19-9, CA125* ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 췌장암 환자에게서 온도변성이 없을 경우에 명확한 *CEA, CA19-9, CA125* ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우에 *CEA, CA19-9, CA125* ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 62 내지 도 69).

[699] **IV. 암 조기진단 및 예후예측을 위한 종양 표지자 검출 평가**

[700] **실시예 4. 암환자 유래 바이오마커 검출**

[701] **실시예 4.1. 암환자의 혈장 또는 소변을 이용한 CPT1A 검출**

[702] 정상인 또는 폐암 환자로부터 수득한 혈장 및 소변으로부터 CPT1A(Carnitine palmitoyltransferase 1A)을 검출하였다. 또한, 방광암 환자로부터 수득한 소변으로부터 CPTA1을 검출하였다. 암조직에서 CPT1A의 발현은 정상조직보다 현저하게 증가하는 것으로 알려져 있어 암의 진단표적으로 활용가능하다.

[703] 구체적으로, 상기 수득한 혈장 또는 소변을 수득한 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 ctDNA(Circulating tumor DNA)를 분리하였다. 이때, ctDNA는 나노와이어에 붙어 복합체를 이룬다. ctDNA와 나노와이어 복합체를 i) 온도변성 없이 27℃ 온도에서 사용하는 경우와 ii) 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에 사용하는 경우로 나누어 실험을 진행하였다. 그 후, 바이오틴이 표지된 각각의 프로브(biotinylated probe) 및 HRP 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 26에 나타내었다.

[704] [표26]

	서열정보(5'->3')	서열번호
biotinylated CPT1A probe 1	GAGCCATGAAGCTCTTAGACA	88
biotinylated CPT1A probe 2	CTTCCAGACATCGCTGCCTCG	89
biotinylated CPT1A probe 3	TGGACAATACCTCGGAGCCTC	90
biotinylated CPT1A probe 4	CATGACCCGGCTCTTCCGAGA	91

[705] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 CPT1A의 발현을 확인하였다. ctDNA 기반 CPT1A ctDNA 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 폐암 또는 방광암 환자에게서 온도변성이 없을 경우 또는 온도변성과정을 거친 경우에 명확한 CPT1A ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타났다. 반면, 정상인에게서는 온도변성이 없을 경우와 온도변성과정을 거친 경우에도 CPT1A ctDNA 발현(ΔOD; cutoff OD > 0.010)이 나타나지 않았다(도 70 내지 73).

[706] **실시예 4.2. 암세포주를 이용한 IFN-γ, IFN-γ receptor 및 PD-L1 발현 확인**

[707] ATCC 및 한국세포주은행으로부터 입수한 PD-L1 양성 암세포주로 알려진 MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9 및 H460 암세포주와 PD-L1 음성 암세포주로 알려진 A549, MDA-MB-461, HeLa 및 MCF7 암세포주를 이용하여

IFN-γ, IFN-γ receptor 및 PD-L1 검출 정확도를 평가하였다. 이때, PD-L1 양성 암세포주 및 PD-L1 음성 암세포주는 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)에서 제공하는 각 암세포주의 PD-L1의 mRNA 레벨을 기준으로 분류하였다. 100 ㎜ 디쉬에 $1x10^6$개의 같은 세포를 배양한 후에 한 디쉬는 10 nmol INF-γ를 추가하고, 다른 디쉬는 IFN-γ를 처리하지 않은채 하루동안 배양시킨 후, PD-L1 양성 암세포주 및 PD-L1 음성 암세포주에서 유전체(genomic) DNA를 추출하였다.

[708] 그 후, 음파처리하여 200 bp이하로 fDNA 형태로 만들었다. 50 ng/㎕ fDNA를 PBS에 넣은 후, 나노와이어를 추가하여 20분 동안 반응시켜 분리하였다. 그 후, 95℃ 온도에서 1분 동안 온도변성과정을 거친 후에, 바이오틴이 표지된 프로브(Biotinylated probe) 및 스트렙타비딘 표지된 폴리피롤 나노입자(HRP/st-tagged NPs)를 추가하여 20분 더 반응시켰다. 이때, 사용된 프로브는 하기 표 27에 나타내었다.

[709] [표27]

	서열정보(5'->3')	서열번호
Biotinylated PD-L1 probe 1	TGGGAGCCATCTTATTATGCC	1
Biotinylated PD-L1 probe 2	CGGAAGATGAATGTCAGTGC	2
Biotinylated PD-L1 probe 3	CCTACTGGCATTTGCTGAACG	3
Biotinylated PD-L1 probe 4	ACCATAGCTGATCATGCAGCG	4
Biotinylated IFN-γ probe 1	ATCGTATATTGGGAGTACCAG	92
Biotinylated IFN-γ probe 2	TAAATGGAGACGAGCAGGAAG	93
Biotinylated IFN-γ probe 3	TAGTGCTTAGCCTGGTATTCA	94
Biotinylated PD1 probe 1	GTACCGCATGAGCCCCAGCAA	95
Biotinylated PD1 probe 2	GTTCCAAACCCTGGTGGTTGG	96
Biotinylated PD1 probe 3	GAGCAGACGGAGTATGCCAC	97
Biotinylated IFN-γreceptor probe 1	ATCGTATATTGGGAGTACCAG	98
Biotinylated IFN-γ receptor probe 2	TAAATGGAGACGAGCAGGAAG	99
Biotinylated IFN-γ receptor probe 3	TAGTGCTTAGCCTGGTATTCA	100

[710] 비색 검출을 위해 TMB 및 H_2O_2를 아세트산 나트륨 버퍼에 추가한 용액을 처리하여 IFN-γ, IFN-γ receptor 및 PD-L1 검출 결과를 확인하였다. 먼저, IFN-γ를 추가하지 않은 암세포주들의 DNA 기반 PD-L1 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 3번의 실험 모두에게서 MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9, H460 암세포주의 경우에만 fDNA에서 명확한 PD-L1 DNA 발현(cutoff: OD > 0.6)이 나타났다. 반면, A549, MDA-MB-461, HeLa, MCF7 암세포주들에게서는 3번의 실험 모두에게서

PD_L1 DNA 발현이 나타나지 않았다(도 74 내지 도 76).그러나, IFN-γ를 추가한 경우에 암세포주들의 DNA 기반 PD-L1 발현(ΔOD)을 분석한 결과, 3번의 실험 모두에게서 MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9, H460 PD-L1 양성 암세포주뿐만 아니라, PD-L1 음성 암세포주, 즉 A549, MDA-MB-461, HeLa, MCF7들에게서도 fDNA 기반 명확한 PD-L1 DNA 발현(cutoff: OD > 0.6)이 나타났다(도 77). 또한, MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9, H460의 PD-L1 양성 암세포주 및 PD-L1 음성 암세포주, 즉 A549, MDA-MB-461, HeLa, MCF7들의 fDNA를 통해 IFN-γ및 IFN-γ receptor를 확인한 결과, 3번의 실험 모두에게서 IFN-γ를 추가 여부에 관계없이 IFN-γ는 확인되지 않았으며, IFN-γ receptor는 모든 세포주에서 확인되었다(도 78 및 도 79).

[711] 나아가, IFN-γ를 추가하지 않은 경우 및 IFN-γ를 추가한 경우에, MDA-MB-231, HCC827, H1975, PC9, H460의 PD-L1 양성 암세포주 및 A549, MDA-MB-461, HeLa, MCF7의 PD-L1 음성 암세포주들의 fDNA를 통해 PD-L1, IFN-γ및 IFN-γ receptor를 3번의 반복실험을 통하여 분석한 그래프에서 IFN-γ를 추가한 경우 PD-L1 음성 암세포주들에게서 높은 PD-L1 발현을 확인한 반면, IFN-γ 추가 여부에 관계없이 IFN-γ는 확인되지 않았으며, IFN-γ receptor는 모든 세포주에서 확인되었다(도 80 내지 도 83).

[712] PD-L1 양성 및 음성 암세포주에 IFN-γ를 추가하기 전 및 추가한 후에 암세포주들의 DNA 기반 PD-L1 발현(ΔOD)을 분석한 그래프를 나타내었다(도 80 내지 도 83).

[713] **V. 수득 방법에 따른 암 관련 cfDNA의 검출 가능성 확인**

[714] **실시예 5. 샘플 채취에 방법 따른 바이오마커 검출 확인**

[715] 상술한 방법과 동일한 방법으로 폐암 환자 및 정상인에서 cfDNA를 검출하였다. 다만, 채취 방법은 주사바늘을 이용하여 정맥혈에서 채취하고, 랜싯(Lancet)을 이용하여 모세혈에서 채취하였다. 사용한 나노와이어 및 프로브는 제조예 1과 제조예 3에 따라 제조한 것을 사용하였다. 주사바늘을 이용해 폐암환자로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 나타내었다(도 86). 또한, 랜싯을 이용해 폐암환자로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 나타내었다(도 87). 주사바늘을 이용해 정상인으로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 나타내었다(도 88). 또한, 랜싯을 이용해 정상인으로부터 수득한 혈액으로부터 AKL Fusion 및 PIK3CA 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 89). 그 결과, 정맥혈과 모세혈에서 동일하게 암 유래의 바이오마커를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[716] **VI. 폐암 관련 cfDNA의 검출 가능성 확인**

[717] **실시예 6. 폐암 세포주에서 돌연변이 바이오마커 검출 확인**

[718] 암 특이적 유전자에서 발생하는 돌연변이(snp)의 여부는 특정 치료방법에 대한

resistance 가 존재하는지 혹은 resistance를 갖게 되는 지의 여부를 확인하고, 그에 따라 적절한 치료방법을 찾는데 유용한 정보를 제공한다.

[719] 폐암 세포주의 돌연변이도 검출가능한지 확인하기 위하여 EML4-ALK 유전자를 분석하였다. 먼저, 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR로 EML4-ALK 유전자의 발현량을 확인하였다. EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인하였다(도 90). 또한, EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다(도 91). 또한, EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK의 발현 정도를 RT-PCR 및 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타내었다(도 92).

[720] 그 후, 본 명세서에서 기술한 fDNA를 이용한 방법으로 EML4-ALK를 검출하였다. 검출 방법은 상술한 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과, EML4-ALK도 fDNA 검출방법을 이용하여 검출 가능함을 확인하였다. EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK fusion var.1 또는 EML4-ALK fusion var.3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타내었다(도 93). 또한, EML4-ALK variant 3a/b positive cell(H2228) 및 EML4-ALK negative cell(A549, H1993, PC9, RT4) 암세포주의 cfDNA로부터 EML4-ALK fusion var.1 또는 EML4-ALK fusion var.3의 DNA 발현 정도를 측정하여 나타내었다(도 94).

[721] [표28]

EGFR	Probe sequences
KRAS exon2-probe	CP1: AAATGACTGAATATAAACTTG (서열번호 127)DP: GAGTGCCTTGACGATACAGCT (서열번호 128)
ALK-EML4 variant 1-probe	CP2: TAGAGCCCACACCTGGGAAA (서열번호 129)DP: CGGAGCTTGCTCAGCTTGTA (서열번호 130)
ALK-EML4 variant 3-probe	CP3: GCATAAAGATGTCATCATCAACCAAG (서열번호 131)DP: CGGAGCTTGCTCAGCTTGTA (서열번호 132)

[722] **실시예 7. 폐암 환자에서 돌연변이 바이오마커 검출 확인 : 약물 저항성**

[723] 상술한 방법과 동일하게 폐암 환자에서 다양한 돌연변이를 검출하였다. 이때, 폐암 환자의 cfDNA를 검출하기 위한 프로브는 상술한 폐암 바이오마커

유전자에 상보적으로 결합하는 핵산 서열을 이용하였다. 환자 정보 및 분석 유전자는 도면에 기술한 바와 같다.

[724] 구체적으로, 소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3, KRAS, SYP, NCAM1, NKX2-1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 95). 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않는다는 것을 알게되었다.

[725] 또한, 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 96). 그 결과, EML4-ALK fusion이 암 조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하여 partial response (PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[726] 또한, 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 97). 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않을 것이기 때문에, 처음부터 alectinib을 처방하여 환자의 반응을 기다리고 있다.

[727] 또한, 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.3, BRAFV800E, TP53 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 98). 그 결과, EML4-ALK fusion이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.1이 아닌 var.3임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하지 않는다는 것(PD)을 알게 되었다.

[728] 또한, 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 99). 그 결과, EML4-ALK fusion 이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI인 Crizotinib이 잘 반응하여 partial response (PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[729] 또한, 암 환자로부터 수득한 혈액으로부터 EML4-ALK fusion var.1 등의 암 관련 바이오 마커의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 100). 그 결과, EML4-ALK fusion 이 암조직과 혈액 내 ctDNA에서 동일하게 발견되고, ctDNA 결과로 EML4-ALK fusion이 var.3가 아닌 var.1임을 알게됨으로써, ALK TKI가 잘 반응하여 partial response(PR)의 환자 반응을 얻게 되었다.

[730] **VII. OGT 검출을 통한 방광암 진단 가능성 확인**

[731] **실시예 8. 암세포주 유래의 OGT에서 발현량 및 fDNA 검출 가능성 확인**

[732] 암 세포주에서 OGT의 발현량 및 환자 혈장에서 검출 가능성을 확인하기

위하여 상술한 방법과 동일한 방법으로 in vitro 실험 및 환자 혈액 샘플을 이용하여 실험하였다. 도 101에는 in vitro 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타내었다. 또한, 도 102에는 in vitro 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타내었다. 도 103에는 in vitro 상에서 각 암세포주의 cfDNA로부터 OGT의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타내었다. 도 104에는 in vitro 상에서 각 세포주의 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 측정한 결과를 나타내었다. 도 105에는 in vitro 상에서 각 세포주의 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 측정한 결과를 나타내었다. 도 106에는 in vitro 상에서 각 세포주로부터 OGT의 발현 정도를 웨스턴블랏, RT-PCR 및 cfDNA 검출을 통해 확인한 결과를 나타내었다. 도 107에는 in vitro 상에서 각 세포주로부터 자성 나노입자를 포함하지 않은 나노와이어에 검출된 OGT의 cfDNA를 촬영한 사진을 나타내었다.

[733] **실시예 9. OGT 유래 cfDNA 검출 확인**

[734] 상술한 바와 동일한 본 발명의 검출 방법을 이용하여 방광암 환자의 진단 가능성을 확인하였다. 그 결과는 도 108 내지 도 113에 나타내었다. 도 108에는 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA를 정량한 그래프를 나타내었다. 도 109에는 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 결과를 나타내었다. 도 110에는 정상인, 방광염 환자 및 방광암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 결과를 나타내었다. 도 111 내지 도 113에는 블라인드 테스트로 여러 암 환자의 소변으로부터 수득한 cfDNA로부터 OGT의 DNA 발현 정도를 분석한 결과를 나타내었다. 그 결과, 상술한 방법을 이용하여 OGT의 검출하여, 방광암을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[735] **VIII. 각종 암 진단 가능성 확인**

[736] **실시예 10. 갑상선암 진단 가능성 확인**

[737] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 환자의 cfDNA를 검출하여 갑상선암의 진단이 가능한지 확인하였다. 도 114 내지 도 116에는 갑상선암 환자의 조직으로부터 수득한 cfDNA로부터 BRAF V600E 및 TERT C250T의 DNA 발현 정도를 분석한 결과를 나타내었다. 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 갑상선암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[738] **실시예 11. 소세포폐암(SCLC) 진단 가능성 확인**

[739] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 SYP, CgA, NCAM1, NKX2-1 등의 암 관련 바이오 마커를 분석하였다(도 117 내지 도 121). 환자 정보 및 샘플 정보는 도면에 나타낸 바와 같다. 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 소세포폐암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[740] **실시예 12. 비소세포폐암(NSCLC) 진단 가능성 확인**

[741] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 비소세포폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해, SYP, CgA, NCAM1, NKX2-1의 바이오마커를 분석하였다(도 122). 환자 정보 및 샘플 정보는 도면에 나타낸 바와 같다. 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 비소세포폐암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[742] **실시예 13. 항암 치료 전후에 따른 바이오마커 검출 비교**

[743] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 항암 치료 전과 후의 폐암환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA의 DNA 발현 정도 및 환자의 예후를 나타낸 결과이다(도 123). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 암 치료 후 예후를 정확하게 확인할 수 있음을 확인하였다.

[744] **실시예 14. 폐암 진단 가능성 확인**

[745] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 폐암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 NSE, CEA 등의 암 관련 바이오 마커를 분석한 결과를 나타낸 것이다(도 124 내지 도 128). 또한, 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 NSE, CEA 등의 암 관련 바이오 마커를 분석한 결과를 나타낸 것이다(도 129 내지 도 133). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 폐암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[746] **실시예 15. 전립선암 진단 가능성 확인**

[747] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 전립선암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 PSA, PSMA, PAP, PCA3 등의 암 관련 바이오마커를 분석하였다(도 134). 또한, 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 PSA, PSMA, PAP, PCA3 등의 암 관련 바이오마커를 분석하였다(도 135). 또한, 전립선암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 TMPRSS2-ERG fusion의 바이오마커를 분석하였다(도 136). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 전립선암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[748] **실시예 16. 갑상선암 진단 가능성 확인**

[749] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 갑상선암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, NSE, TG(Thyroglobulin) 및 CALCA의 바이오마커를 분석한 결과이다(도 137은). 또한, 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, NSE, TG(Thyroglobulin) 및 CALCA의 분석하였다(도 138). 또한, 갑상선암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 BRAF mutation(V600E), TERT Promotor mutation(C228T, C250T)의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 139). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 갑상선암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[750] **실시예 17. 방광암 진단 가능성 확인**

[751] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 방광암 환자, 혈뇨환자 및 정상인으로부터 수득한 소변을 이용해 OGT, FGFR3, TP53, NMP22 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 140). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 방광암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[752] **실시예 18. 유방암 진단 가능성 확인**

[753] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 유방암 환자 및 정상인으로부터 수득한

혈액을 이용해 CA27-29 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 141). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 유방암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[754] **실시예 19. 대장암 진단 가능성 확인**

[755] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 대장암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA 및 CA19-9의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 142). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 대장암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[756] **실시예 20. 담도암 진단 가능성 확인**

[757] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 담도암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CA 19-9, CEA 및 CA123의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 143 및 도 144). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 담도암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[758] **실시예 21. 위암 진단 가능성 확인**

[759] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 위암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9, CGB 및 Cyfra21-1의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 145). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 위암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[760] **실시예 22. 난소암 진단 가능성 확인**

[761] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 난소암 환자 및 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CA125 및 CEA의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 146). 분석 결과, 본 발명의 분석법을 통해 난소암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[762] **실시예 23. 췌장암 진단 가능성 확인**

[763] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 췌장암 환자로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9 및 CA125의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 147). 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 CEA, CA19-9 및 CA125의 DNA 발현 정도를 측정하였다(도 148). 본 발명의 분석법을 통해 췌장암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[764] **실시예 24. 정상인 샘플에서 다양한 암 바이오마커 검출을 통한 cfDNA를 이용한 검출법의 정확도 확인**

[765] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 정상인으로부터 수득한 혈액을 이용해 암 관련 바이오마커의 DNA 발현 정도를 측정하는 것을 통해, 정상인에서는 암 관련 바이오마커가 검출되지 않는 것을 확인하였다(도 149 및 도 150)(PC: Positive control).

[766] **실시예 25. 자궁경부암 진단 가능성 확인**

[767] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, HPV 양성 자궁경부암 환자(HPV16(+) 및 HPV18(+)) 및 HPV 음성 건강 대조군(HPV-)의 소변에 존재하는 cfDNA와 HPV

18 또는 HPV 16에 특이적인 프로브의 결합 여부를 흡광도를 통하여 확인하였다(도 153). 또한, 자궁경부암 환자의 소변에서 분리한 cfDNA에 HPV 16, EGFR19 deletion, HPV 18, 및 EGFR 21 L858R에 특이적인 프로브를 순차적으로 반응시킨 후, cfDNA와 각 프로브의 결합여부를 확인하였다(도 154). 본 발명의 분석법을 통해 자궁경부암을 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[768] **실시예 26. 폐암 진단 가능성 확인**

[769] 상술한 바와 동일한 방법을 이용하여, 폐암 환자의 혈액을 이용하여 폐암 바이오마커를 검출하였다. 도 155는 151명의 폐암 환자들의 혈장으로부터 수득한 cfDNA를 이용하여 폐암 환자의 유전자 변이를 분석한 표이다. 또한, EGFR 변이가 없는 환자(Wild type), EGFR exon19 deletion이 있는 환자 및 EGFR exon 21 L858R을 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon19 Del에 특이적인 프로브를 혼합한 후, UV 스펙트럼의 흡광도(ΔOD, 500 nm 내지 650 nm) 값의 분석을 통하여 폐암 환자의 유전자 변이를 확인하였다(도 156).

[770] 또한, EGFR exon19 deletion이 있는 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon19 Del에 특이적인 프로브를 혼합한 후, 유전자 변이의 특이도와 민감도를 분석하였다(도 157). EGFR 변이가 없는 환자(Wild type), EGFR exon19 deletion이 있는 환자 및 EGFR exon 21 L858R을 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon21 L858R에 특이적인 프로브를 첨가한 후, UV 스펙트럼의 흡광도(ΔOD, 500 nm 내지 650 nm) 값의 분석을 통하여 환자의 유전자 변이를 확인하였다(도 158). 또한, EGFR exon 21 L858R이 있는 폐암 환자의 혈장으로부터 cfDNA를 수득한 후, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 추가한 후, 환자의 유전자 변이의 특이도와 민감도를 분석하였다(도 159).

[771] 또한, EGFR exon 19 deletion의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다(도 160). 본 연구에서는 CP_1 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다. 이때, CP는 변이가 있는 부분을 포함하거나 인접한 서열에 상보적으로 결합하도록 디자인한 프로브이며, DP는 변이 서열에서 이격된 부분에 상보적으로 결합하도록 디자인된 프로브를 의미한다.

[772] 또한, EGFR exon 20 T790M의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 CP2 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다(도 161).

[773] 또한, EGFR exon 21 L858R의 CP 및 DP의 서열을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 CP2 및 DP를 사용하여 폐암 환자의 cfDNA 유전자 변이를 분석하였다(도 162).

[774] 또한, EGFR exon 19 deletion 및 EGFR exon 20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA를 EGFR exon 19 deletion(Del19), EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 이용하여 반응시킨 후

HRP/스트렙타비딘 나노입자(다량의 HRP를 포함)를 첨가하여 cfDNA의 검출여부를 색깔 변화 및 UV 흡광도로 확인하였다(도 163).

[775] 또한, 도 164는 도 47과 동일한 EGFR exon 19 deletion 및 EGFR exon 20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA를 EGFR exon 19 deletion(Del19), EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브를 이용하여 반응시킨 후 HRP/스트렙타비딘 복합체(HRP와 스트렙타비딘이 1:1로 결합된 복합체)를 첨가하여 cfDNA의 검출여부를 색깔 변화 및 UV 흡광도로 확인한 것이다. HRP/스트렙타비딘 나노입자에 비해 HRP/스트렙타비딘 복합체의 경우 노이즈가 생성됨을 확인한 것이다.

[776] 또한, 도 165는 5명의 EGFR exon19 deletion 및 exon20 T790M 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장에서 cfDNA를 추출한 후 EGFR exon 19 Del, EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브 및 HRP/스트렙타비딘 나노입자(HRP/st-tagged NP)와 반응시킨 결과와 EGFR exon19 Del, EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R에 특이적인 프로브와 HRP/스트렙타비딘 복합체(HRP와 스트렙타비딘이 1:1로 결합)를 반응시킨 결과의 분석을 통하여 암조직과 유전형과의 일치성을 확인 및 비교한 것이다.

[777] 또한, 도 166은 EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L861Q 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 EGFR exon 19 deletion(19 Del), EGFR exon 20 T790M, EGFR exon 21 L858R 및 EGFR exon L861Q에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합한 결과 암조직과 동일하게 EGFR exon 20 T790M 및 EGFR exon 21 L861Q 에서만 유전자변이가 관찰됨을 UV 흡광도로 확인한 것이다.

[778] 또한, 도 167은 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(I1171N/T) 유전자 변이를 가진 폐암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(T1151, L1152P, L1152R, C1156Y, I1171N/T)에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합한 결과 암조직과 동일하게 ALK-EML4 fusion 및 ALK point mutation(I1171N/T) 유전형이 검출되는 것을 확인하였다.

[779] 또한, 도 168은 BRAF V600E 유전자 변이를 가진 갑상선암 환자의 혈장으로부터 수득된 cfDNA의 유전자 변이 검출을 위해 BRAF V600E에 특이적인 프로브 및 HRP/st-tagged NP을 한꺼번에 혼합하였다. 그 결과 BRAF V600E 유전자 변이가 환자의 유전형과 동일하게 검출되는 것을 확인하였다.

[780] **IX. 시료의 변성 조건에 따른 암 유래 cfDNA 검출**

[781] **실시예 27. 온도 조건에 따른 암 환자에서 수득한 시료 변성 후 cfDNA 검출**

[782] 시료 변성 조건에 따라 암 유래 cfDNA와 정상인 유래 cfDNA가 구분될 수 있는지를 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 구체적으로, EGFR 19 deletion을 검출할 수 있는 프로브를 이용하여, 정상인과 폐암환자(0208-343, 20190311_LC#1, Tissue 결과 : E19del)에서 채취한 혈장에 다양한 변성 조건을 준

후, 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA가 구분 가능한지 확인하였다.

[783] 프로브는 EGFR 엑손 19, deletion을 검출할 수 있는 프로브인 ggaattaaga gaagcaacat ctcc(서열번호 105)를 이용하였다. 이때, 프로브는 바이오틴이 결합된 것을 이용하였다. PEI/Ppy 나노와이어를 이용하였고, HRP/스트렙타비딘이 응집된 나노입자를 표지자로 이용하였다.

[784] 구체적으로, 나노와이어로 cfDNA를 분리하기 전에 샘플을 다음과 같이 다양한 조건으로 처리하였다. 시료를 30℃에서 15분 및 0분간 가열하였다. 또한, 60℃, 5분 및 0분간 가열하였다. 또한, 95℃, 1분 및 0분간 가열하였다. 다른 단계는 상술한 방법과 같이 수행하였다.

[785] 그 결과 EGFR 19 deletion 돌연변이가 없는 정상인에서는 어떠한 변성 조건에서 불안정한 cfDNA가 검출되지 않았다(도 169). 그러나, E19del 환자에서는 여러가지 변성 조건에서 모두 불안정한 cfDNA가 검출되었음을 확인하였다(도 170). 이러한 결과를 통해 불안정한 cfDNA의 존재 유무를 통해, 폐암환자가 E19del 변이가 있다는 정보를 제공할 수 있다.

[786] **실시예 28. 온도 조건에 따른 암세포주 유래의 cfDNA 검출**

[787] 인체에서 수득한 시료뿐 아니라, 세포주에 존재하는 변이 위치를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 구체적으로, HCC2279(Exon19Del), HCC827(Exon19Del), H1975(T790M, L858R) 및 A549(EGFR wildtype)에서 cfDNA와 유사한 크기를 가지는 fDNA를 수득하였다.

[788] 그 결과, 95℃, 1분 및 0분간 가열하는 변성조건에서, 불안정한 cfDNA만이 상보적으로 프로브와 결합하고, 표지자와 결합하여 검출되는 것을 확인하였다((도 171). 이러한 결과를 통해 세포주에서 수득한 시료에서도 불안정한 cfDNA의 존재 유무를 확인할 수 있음을 검증하였다.

[789] **실시예 29. DNase 처리에 따른 암유래 cfDNA 검출**

[790] 암세포 유래의 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA가 온도 조건뿐 아니라, DNA 분해 효소에 의해서도 차이가 나는지를 확인하기 위하여, 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA에 DNase 처리 후 프로브와의 반응성을 확인하였다. 이때, 시료는 고온을 이용한 변성을 수행하지 않았다.

[791] 구체적으로, HCC2279(Exon19Del), HCC827(Exon19Del), H1975(T790M, L858R) 및 A549(EGFR wildtype)에서 PEI/Ppy 나노와이어를 이용하여 수득한 fDNA를 PBS에 현탁시킨 후, DNase 1 ㎕를 처리하였다. 37℃, 60분을 처리한 결과, 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA는 프로브와 반응성에서 차이가 남을 확인하였다(도 172). 또한, DNase 처리 시간을 37℃, 60분으로 처리하였음에도 동일한 효과가 나타남을 확인하였다(도 173). 이러한 결과를 바탕으로, 안정한 cfDNA는 DNase 효소에 의해서 분해가 쉽게 일어나지 않는다는 점을 확인할 수 있었다.

[792] 그러나, 37℃, 120분간 DNase 1 ㎕ 또는 2 ㎕를 처리한 결과, 안정한 cfDNA도 처리 시간이 길어지거나, DNase 양이 증가할 경우, 프로브와 반응을 한다는 점을

확인하였다(도 174). 이러한 실험 결과를 통해, 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA의 안정성의 차이를 확인할 수 있었다.

[793] 또한, DNase의 활성에 따른 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA의 차이점을 확인하기 위하여, 24℃, 120분간, DNase 1 ㎕ 또는 2 ㎕를 처리한 결과를 도 60에 나타내었다. 그 결과 24℃에서는 효소의 활성이 저하되었음에도, 프로브 반응성 측면에서 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA이 차이가 남을 확인하였다(도 175).

[794] 또한, DNase의 활성에 따른 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA의 차이점을 확인하기 위하여, 3℃, 120분간, DNase 1 ㎕ 또는 2 ㎕를 처리한 결과를 도 58에 나타내었다. 그 결과 3℃에서는 효소의 활성이 저하되었음에도, 프로브 반응성 측면에서 불안정한 cfDNA와 안정한 cfDNA이 차이가 남을 확인하였다(도 176).

[795]

청구범위

[청구항 1] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 전립선암세포 유래의 유전자를 검출하여 전립선암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 전립선암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 전립선암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 전립선암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 전립선암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 전립선암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 30분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 30분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 전립선암세포에서 유래된 cfDNA는 전립선암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 전립선암 진단 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),

폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인
것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인,
전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인,
전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체,
알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느
하나인 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 전립선암을
진단하는 방법.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및
이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 전립선암을
진단하는 방법.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는
스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는
형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 18] 제1항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ACPP*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD274*, *FOLR1*, *EPCAM*, *OGT* 및 이의
조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터
유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 전립선암을 진단하는 방법.

[청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응
변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 전립선암을 진단하는
방법.

[청구항 20] 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는
바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 전립선암 진단 키트로서,

상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 전립선암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:

a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 21] 제20항에 있어서,

전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 22] 제20항에 있어서,

ACPP, *CPT1A*, *IFNG*, *CD274*, *FOLR1*, *EPCAM*, *OGT* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 23] 제20항에 있어서,

상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 24] 제23항에 있어서,

상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 25] 제24항에 있어서,

상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 26] 제24항에 있어서,

상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 27] 제20항에 있어서,

상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 28] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는

물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 상기 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 전립선암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 전립선암세포 유래의 유전자를 검출하여 전립선암을 진단하는 장치.

[청구항 29] 제28항에 있어서,
상기 전립선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *KLK3*, *FOLH1*, *PCA3*, *PDE4D7*, *SFMBT2*, *EFEMP1*, *RETN*, *ACADL*, *AGR2*, *COL1A1*, *FAM13C*, *GPX8*, *GRHL2*, *HNF1A*, *HOXB13*, *KLK2*, *MYBPC1*, *NR0B1*, *PITX2*, *SFRP4*, *SLCO1B3*, *TMEFF2*, *TMPRSS2-ERG* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 전립선암을 진단하는 장치.

[청구항 30] 제29항에 있어서,
ACPP, *CPT1A*, *IFNG*, *CD274, FOLR1, EPCAM, OGT* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 전립선암을 진단하는 장치.

[청구항 31] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 폐암세포 유래의 유전자를 검출하여 폐암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 폐암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 폐암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
폐암을 진단하는 방법.

[청구항 32] 제31항에 있어서,
상기 폐암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 33] 제31항에 있어서,
상기 폐암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 폐암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 30분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 30분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 34] 제31항에 있어서,
상기 폐암세포에서 유래된 cfDNA는 폐암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 35] 제34항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 36] 제31항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 폐암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;

vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 37] 제31항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 38] 제31항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 39] 제38항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 40] 제39항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 41] 제39항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 42] 제31항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 43] 제31항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 44] 제31항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 45] 제44항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 46] 제44항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 47] 제31항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 48] 제31항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ENO2, ACPP, KRT19, EGFR, KRAS, RET, ERBB2, MMP11, TOP2A, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 49] 제31항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 폐암을 진단하는 방법.

[청구항 50] 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 폐암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 폐암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 51] 제50항에 있어서,
상기 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 52] 제50항에 있어서,
ENO2, ACPP, KRT19, EGFR, KRAS, RET, ERBB2, MMP11, TOP2A, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에

상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 53] 제50항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 54] 제53항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 55] 제54항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 56] 제53항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 57] 제50항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 58] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 폐암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 폐암세포 유래의 유전자를 검출하여 폐암을 진단하는 장치.

[청구항 59] 제58항에 있어서,
상기 폐암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SART3, PLAT, ALK, ROS1, PI3K, S100P, CDCA7, S100A2, ETV4G* 및 이의 조합으로 구성된

군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 폐암을 진단하는 장치.

[청구항 60] 제59항에 있어서,
ENO2, *ACPP*, *KRT19*, *EGFR*, *KRAS*, *RET*, *ERBB2*, *MMP11*, *TOP2A*, *UBE2C*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD279*, *CD274*, *ERBB2*, *EGFR*, *FOLR1* 또는 *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 폐암을 진단하는 장치.

[청구항 61] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 갑상선암세포 유래의 유전자를 검출하여 갑상선암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 갑상선암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 갑상선암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 62] 제61항에 있어서,
상기 갑상선암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 63] 제61항에 있어서,
상기 갑상선암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;

vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 64] 제61항에 있어서,
상기 갑상선암세포에서 유래된 cfDNA는 갑상선암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 65] 제64항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 66] 제61항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 67] 제61항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 68] 제61항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 69] 제68항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 70] 제69항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 71] 제69항에 있어서,

상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 72] 제61항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 73] 제61항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 74] 제61항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 75] 제74항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 76] 제74항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 77] 제61항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 78] 제61항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ENO2, ACPP, TYRO3, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 79] 제61항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 갑상선암을 진단하는 방법.

[청구항 80] 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 갑상선암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 갑상선암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 81] 제80항에 있어서,
상기 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 82] 제80항에 있어서,
EENO2, *ACPP*, *TYRO3*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD279*, *CD274*, *ERBB2*, *EGFR*, *FOLR1*, *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 83] 제80항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 84] 제83항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 85] 제84항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 86] 제83항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 87] 제80항에 있어서,

상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 88] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 갑상선암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 갑상선암세포 유래의 유전자를 검출하여 갑상선암을 진단하는 장치.

[청구항 89] 제88항에 있어서,
상기 갑상선암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *TG*, *CALCA*, *APOC1*, *HIG2* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 갑상선암을 진단하는 장치.

[청구항 90] 제89항에 있어서,
ENO2, *ACPP*, *TYRO3*, *CPT1A*, *IFNG*, *CD279*, *CD274*, *ERBB2*, *EGFR*, *FOLR1* 또는 *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 갑상선암을 진단하는 장치.

[청구항 91] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 방광암세포 유래의 유전자를 검출하여 방광암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 방광암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 방광암 바이오마커로

알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
방광암을 진단하는 방법.

[청구항 92] 제91항에 있어서,
상기 방광암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 93] 제91항에 있어서,
상기 방광암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 방광암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 94] 제91항에 있어서,
상기 방광암세포에서 유래된 cfDNA는 방광암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 95] 제94항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 96] 제91항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 방광암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;

ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 97] 제91항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 98] 제91항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 99] 제98항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 100] 제99항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 101] 제99항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 102] 제91항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 103] 제91항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 104] 제91항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체,

알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 105] 제104항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 106] 제104항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 107] 제91항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 108] 제91항에 있어서,
상기 cfDNA는 *KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 109] 제91항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 방광암을 진단하는 방법.

[청구항 110] 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 방광암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 방광암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 111] 제110항에 있어서,
상기 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1,*

CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 112] 제110항에 있어서,
KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 113] 제110항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 114] 제113항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 115] 제114항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 116] 제113항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 117] 제110항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 118] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 방광암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보

처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 방광암세포 유래의 유전자를 검출하여 방광암을 진단하는 장치.

[청구항 119] 제118항에 있어서,
상기 방광암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *OGT, FGFR3, TP53, NUMA1, COCH, CELSR3, HMOX1, KIF1A, MGC17624, MTAP, PFKFB4, S100A8, RSPH9, FOXM1, FANCB, FANCC, FANCD2, RUSC1-AS1, CACNA1B, IMP-1, PDE3A, POU3F4, SOX3, DMC1, PLXDC2, ZNF312, SYCP2L, HOXA9, ISL1, ALDH1A3* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 방광암을 진단하는 장치.

[청구항 120] 제119항에 있어서,
KRT19, CCNB1, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 방광암을 진단하는 장치.

[청구항 121] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 유방암세포 유래의 유전자를 검출하여 유방암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 유방암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 유방암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
유방암을 진단하는 방법.

[청구항 122] 제121항에 있어서,
상기 유방암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 123] 제121항에 있어서,
상기 유방암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의

조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 유방암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 124] 제121항에 있어서,
상기 유방암세포에서 유래된 cfDNA는 유방암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 125] 제124항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 126] 제121항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 유방암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 127] 제121항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 128] 제1항에 있어서,

상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 129] 제128항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 130] 제129항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 131] 제129항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 132] 제121항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 133] 제121항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 134] 제121항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 135] 제134항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 136] 제134항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 137] 제121항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 138] 제121항에 있어서,
상기 cfDNA는 *MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 139] 제121항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 유방암을 진단하는 방법.

[청구항 140] 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 유방암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 유방암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 141] 제140항에 있어서,
상기 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 142] 제140항에 있어서,
MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 143] 제140항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 144] 제143항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 145] 제144항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 146] 제143항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 147] 제140항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 148] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 유방암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 유방암세포 유래의 유전자를 검출하여 유방암을 진단하는 장치.

[청구항 149] 제148항에 있어서,
상기 유방암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MEST, NR1D1, BIRC5, RACGAP1, DHCR7, STC2, AZGP1, RBBP8, IL6ST, MGP, TRBC1, MMP11, COL10A1, C10orf64, COL11A1, POTEG, FSIP1,HER2* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 유방암을 진단하는 장치.

[청구항 150] 제149항에 있어서,
MUC1, ACPP, TYRO3, UBE2C, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된

프로브를 추가적으로 포함하는, 유방암을 진단하는 장치.

[청구항 151] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 대장암세포 유래의 유전자를 검출하여 대장암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 대장암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 대장암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
대장암을 진단하는 방법.

[청구항 152] 제151항에 있어서,
상기 대장암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 153] 제151항에 있어서,
상기 대장암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 대장암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 154] 제151항에 있어서,
상기 대장암세포에서 유래된 cfDNA는 대장암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 155] 제154항에 있어서,

상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA0101* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 156] 제151항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 대장암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 157] 제151항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 158] 제151항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 159] 제158항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 160] 제159항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 161] 제159항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),

폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 162] 제151항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 163] 제151항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 164] 제151항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 165] 제164항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 166] 제164항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 167] 제151항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 168] 제151항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCA* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 169] 제151항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 대장암을 진단하는 방법.

[청구항 170] 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 대장암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 대장암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 171] 제170항에 있어서,
상기 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA0101* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 172] 제170항에 있어서,
ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 173] 제170항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 174] 제173항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 175] 제174항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 176] 제173항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),

폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인
것인, 진단 키트.

[청구항 177] 제170항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는
스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는
형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 178] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는
물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한
수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 대장암에 특이적으로
발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된
프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로
또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을
가지며, 대장암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보
처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 대장암세포 유래의 유전자를 검출하여
대장암을 진단하는 장치.

[청구항 179] 제178항에 있어서,
상기 대장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *NCKAP1, AUNIP, NOTUM, KRT5, TUBB, COL6A1, JUP, CDX2,* MELTF, *EFEMP2, DEFA5, CHEK1, MAD2L1, ENC1, CSE1L, RAD51AP1, ERICH3, SLC7A11, KRT23, PLAU, CDCA1, KLK6, DPEP1, CDH3, ANLN, CXCL1, CTHRC1, LCN2, HS6ST2, EGFL6, CXCL3, CA9, PROX1, SPP1, CST1, CXCL2, TSTA3, RRM2, MMP3, MMP7, MMP10, CXCL5, SERPINB5, TEAD4, BUB1, CDC2, CLDN2, HSPH1, LY6G6D, PRC1, PUS1, SQLE, TTK, ECT2, RNF183, FBXO39, TEX38, TTLL2, PRR7, CANP, KIAA0101* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는
적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된
프로브를 추가적으로 포함하는, 대장암을 진단하는 장치.

[청구항 180] 제179항에 있어서,
ACPP, FLU3,TYRO3, COTL1, CK7, CK20, MUC2, SDC2, ASB9, CCNB1, MELK, CKS2, IFITM1, CEACAM6, ATAD2, TOP2A, CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된

군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 대장암을 진단하는 장치.

[청구항 181] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 담도암세포 유래의 유전자를 검출하여 담도암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 담도암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 담도암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
담도암을 진단하는 방법.

[청구항 182] 제181항에 있어서,
상기 담도암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 183] 제181항에 있어서,
상기 담도암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 담도암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 184] 제181항에 있어서,
상기 담도암세포에서 유래된 cfDNA는 담도암에서 유래된 순환 종양

DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 185] 제184항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *MUC16,ASH1L, DOCK7* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 186] 제181항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 담도암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 187] 제181항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 188] 제181항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 189] 제188항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 190] 제189항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 191] 제189항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및

폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 192] 제181항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 193] 제181항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 194] 제181항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 195] 제194항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 196] 제194항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 197] 제181항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 198] 제181항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 199] 제181항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 담도암을 진단하는 방법.

[청구항 200] 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 담도암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 담도암을

유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 201] 제200항에 있어서,
상기 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MUC16,ASH1L, DOCK7* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 202] 제200항에 있어서,
ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 203] 제200항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 204] 제203항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 205] 제204항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 206] 제203항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 207] 제200항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 208] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;

c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 담도암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 담도암세포 유래의 유전자를 검출하여 담도암을 진단하는 장치.

[청구항 209] 제208항에 있어서,
상기 담도암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *MUC16,ASH1L, DOCK7* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 담도암을 진단하는 장치.

[청구항 210] 제209항에 있어서,
ACPP, FLU3,CPT1A, DSCC1, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1 또는 *EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 담도암을 진단하는 장치.

[청구항 211] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 위암세포 유래의 유전자를 검출하여 위암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 위암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 위암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
위암을 진단하는 방법.

[청구항 212] 제211항에 있어서,
상기 위암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지

않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 213] 제211항에 있어서,
상기 위암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 위암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 214] 제211항에 있어서,
상기 위암세포에서 유래된 cfDNA는 위암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 215] 제214항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 216] 제211항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 위암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 217] 제211항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 218] 제211항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 219] 제218항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 220] 제219항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 221] 제219항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 222] 제211항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 223] 제211항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 224] 제211항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 225] 제224항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 226] 제224항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 위암을

진단하는 방법.

[청구항 227] 제211항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 228] 제211항에 있어서,
상기 cfDNA는 *ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1, MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 229] 제211항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 위암을 진단하는 방법.

[청구항 230] 위암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 위암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 위암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 231] 제230항에 있어서,
상기 위암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 232] 제230항에 있어서,
ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1,

MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 233] 제230항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 234] 제233항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 235] 제234항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 236] 제233항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 237] 제230항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 238] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 위암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 위암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 위암세포 유래의 유전자를 검출하여 위암을 진단하는 장치.

[청구항 239] 제238항에 있어서,

상기 위암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CGB, PARP1, FOXO3A, MED30, CCNE1, MYC, TFF1, FABP1, LAMP5, MATN3, CLIP4, NOX4, ADRA2C, CSK, FZD9, GALR1, GRM6, INSR, LPHN1, LYN, MRGPRX3, ADCY3, HDAC2, CFL1, NRP2, ANXA10, TFF2, CDCA5, NUSAP1* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 위암을 진단하는 장치.

[청구항 240] 제239항에 있어서,
ACPP, FLU3,KRT19,ERBB2, EGFR, KRAS, DSCC1, CK20, MUC2, SDC2, COTL1, ATAD2, ASB9, MMP1, CEACAM6, DSCC1, CKS2, CST1, IFITM1, MELK, LGALS3BP, CPT1A, IFNG, CD279, CD274, ERBB2, EGFR, FOLR1, EPCAM 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 위암을 진단하는 장치.

[청구항 241] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 췌장암세포 유래의 유전자를 검출하여 췌장암을 진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 췌장암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 췌장암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 242] 제241항에 있어서,
상기 췌장암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 243] 제241항에 있어서,
상기 췌장암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 췌장암을 진단하는 방법:

i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 244] 제241항에 있어서,
상기 췌장암세포에서 유래된 cfDNA는 췌장암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 245] 제244항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 246] 제241항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 췌장암을 진단하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 247] 제241항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 248] 제241항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 249] 제248항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 췌장암을 진단하는

방법.

[청구항 250] 제249항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 251] 제249항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및
폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 252] 제241항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 253] 제241항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 254] 제241항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 255] 제254항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 256] 제254항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 257] 제241항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 258] 제241항에 있어서,
상기 cfDNA는 *KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5* 또는 *MUC16* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 췌장암을

진단하는 방법.

[청구항 259] 제241항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 췌장암을 진단하는 방법.

[청구항 260] 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 췌장암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 췌장암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 진단 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를 띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 261] 제260항에 있어서,
상기 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 진단 키트.

[청구항 262] 제260항에 있어서,
KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5, MUC16 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 진단 키트.

[청구항 263] 제260항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 진단 키트.

[청구항 264] 제263항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 265] 제264항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 진단 키트.

[청구항 266] 제263항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)),
폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)),
폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)),
폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)),
폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)),
폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및

폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 진단 키트.

[청구항 267] 제260항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 진단 키트.

[청구항 268] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 췌장암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 췌장암세포 유래의 유전자를 검출하여 췌장암을 진단하는 장치.

[청구항 269] 제268항에 있어서,
상기 췌장암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *SMAD4, APC, GNAS* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 췌장암을 진단하는 장치.

[청구항 270] 제269항에 있어서,
KRAS, MUC1, MSLN, CEACAM1, CEACAM5, MUC16 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 췌장암을 진단하는 장치.

[청구항 271] a) 세포유리 DNA(cell-free DNA, 이하 cfDNA)가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합하는 단계;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 분리하는 단계;
c) 상기 혼합물에 상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 표지자를 순차적으로 또는 동시에 혼합하는 단계;
d) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하는 단계; 및
e) 상기 표지자를 검출하는 단계를 포함하는,
상기 시료로부터, 증폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을

진단하는 방법으로서,
상기 cfDNA는 암세포에서 유래된 것이며,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 암 바이오마커로 알려진 유전자에 상보적으로 결합하는 것인,
암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 272] 제271항에 있어서,
상기 암세포에서 유래된 cfDNA는
i) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA에 비해 낮은 Tm 값을 갖거나,
ii) 정상 세포에서 유래된 이중 나선 구조를 가지는 cfDNA가 변성되지 않는 조건에서 변성이 되는 것을 특징으로 하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 273] 제271항에 있어서,
상기 암세포에서 유래된 cfDNA는 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 cfDNA 상보적으로 결합 가능한 15머 내지 30머 프로브와 결합할 수 있는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법:
i) 상온에서 1분 내지 120분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 3분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 1초 내지 5분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 30초 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 10분 내지 120분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 274] 제271항에 있어서,
상기 암세포에서 유래된 cfDNA는 암에서 유래된 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 275] 제274항에 있어서,
상기 cfDNA에 상보적인 서열을 갖는 프로브는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279,CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에서 상보적으로 결합하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 276] 제271항에 있어서,
상기 c) 단계 이전에 시료 또는 양전하를 띠는 물질에 결합된 cfDNA를 하기의 조건 중 어느 하나의 조건에서 변성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는

방법:
i) 상온에서 1분 내지 10분 방치하는 조건;
ii) 90℃ 내지 95℃에서 1초 내지 1분간 가열하는 조건;
iii) 75℃ 내지 90℃에서 10초 내지 3분간 가열하는 조건;
iv) 60℃ 내지 75℃에서 1분 내지 30분간 가열하는 조건;
v) 25℃ 내지 40℃에서 5분 내지 60분간 가열하는 조건;
vi) 프로테아제로 1분 내지 10분 처리하는 조건;
vii) DNase로 1분 내지 10분 처리하는 조건; 및
viii) 화학물질(예, 수산화나트륨, DMSO, 계면활성제 등)을 처리하는 조건.

[청구항 277] 제271항에 있어서,
상기 시료는 소변, 뇌척수액, 혈장, 혈액, 흉수, 복수, 타액, 객담 및 체액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 278] 제271항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 279] 제278항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 280] 제279항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 281] 제279항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 282] 제271항에 있어서,
상기 프로브는 15머 내지 30머의 뉴클레오티드로 구성된 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 283] 제271항에 있어서,
상기 프로브에 적어도 하나의 바이오틴(biotin)이 결합된 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 284] 제271항에 있어서,
상기 표지자는 양자점, HRP(horse-radish peroxidase), 형광단백질, 형광체, 알카라인포스파타제 및 루시퍼라제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 285] 제284항에 있어서,
상기 표지자에 아비딘(avidin) 계열 단백질이 결합된 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 286] 제284항에 있어서,
상기 아비딘 계열 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 287] 제271항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는 형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 288] 제271항에 있어서,
상기 cfDNA는 NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, β-HCG(CGB). CA19-9, PSA,PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자로부터 유래한 것을 추가적으로 더 포함하는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 289] 제271항에 있어서,
상기 e) 단계에서 상기 표지자는 색깔 변화, UV 흡광도 변화, 형광반응 변화, 또는 전기화학적 변화에 의해 검출되는 것인, 암을 조기진단 또는 암의 예후를 예측하는 방법.

[청구항 290] 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브;
양전하를 띠는 물질;
아비딘 계열의 단백질이 결합된 표지자 및
설명서를 포함하는 암 진단 키트로서,
상기 설명서는 상기 키트 구성이 하기와 같은 프로토콜에 의해 암을 유전자 증폭없이 진단할 수 있는 것으로 기재된 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트:
a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키트 내에 포함된 양전하를

띠는 물질을 이용하여 cfDNA를 분리하시오; b) 상기 분리된 cfDNA에 키트내에 포함된 바이오틴이 결합된 프로브 및 키트내에 포함된 표지자를 순차적 또는 동시에 혼합하시오; c) cfDNA에 결합하지 않은 프로브 및 표지자를 제거하시오; 및 d) 상기 표지자의 신호를 검출하시오.

[청구항 291] 제290항에 있어서,
상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279, CD274* 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자인 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 292] 제290항에 있어서,
NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, β-HCG(CGB). CA19-9, PSA,PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 293] 제290항에 있어서,
상기 양전하를 띠는 물질은 양전하를 띠는 나노와이어인 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 294] 제293항에 있어서,
상기 나노와이어는 전도성 고분자를 포함하는 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 295] 제294항에 있어서,
상기 나노와이어는 추가적으로 바이오틴을 더 포함하는 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 296] 제293항에 있어서,
상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌(poly(acetylene)), 폴리피롤(poly(pyrrole)), 폴리티오펜(poly(thiophene)), 폴리파라페닐렌(poly(para-phenylene)), 폴리(3,4-에틸렌디옥시테오펜(poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), 폴리페닐렌설파이드(poly(phenylene sulfide)), 폴리(파라-페닐렌비닐렌)(poly(para-phenylene vinylene)) 및 폴리아닐린(polyaniline)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 297] 제290항에 있어서,
상기 표지자는 전도성 고분자; 히알루론산; 아비딘(avidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin); 및 HRP(horse-radish peroxidase) 또는

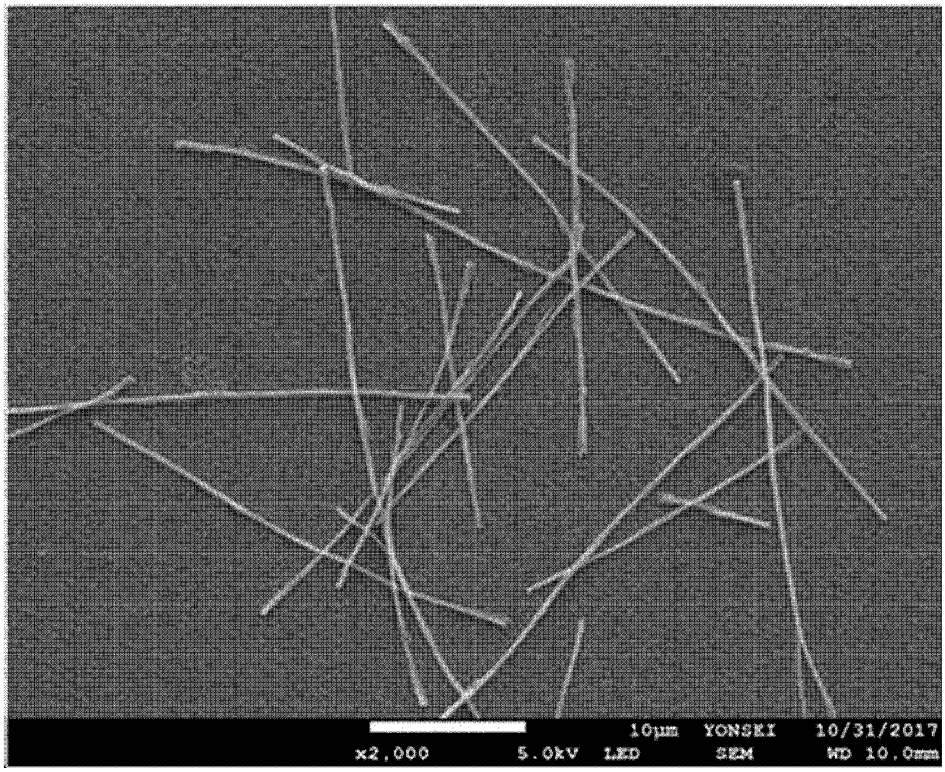
형광단백질;을 포함하는 나노입자인 것인, 암 조기진단 또는 암 예후예측용 키트.

[청구항 298] a) cfDNA가 포함된 개체로부터 분리된 생물학적 시료 및 양전하를 띠는 물질을 혼합시키는 혼합부;
b) cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질을 제외한 시료를 제거하기 위한 수득부;
c) 상기 cfDNA가 결합된 양전하를 띠는 물질에, 암에 특이적으로 발현하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 바이오틴이 결합된 프로브; 및 스트렙타비딘 및 표지자를 포함하는 나노입자를 순차적으로 또는 동시에 첨가시키는 반응부;
d) 표지자를 검출하는 검출부; 및
e) 표지자의 검출 여부에 따라 상기 시료에 프로브에 상보적인 서열을 가지며, 암에서 유래된 cfDNA가 존재한다고 결정하는 정보 처리부를 포함하는,
상기 시료로부터, 중폭없이, 암세포 유래의 유전자를 검출하여 암을 조기진단하거나 또는 암의 예후 예측을 위한 장치.

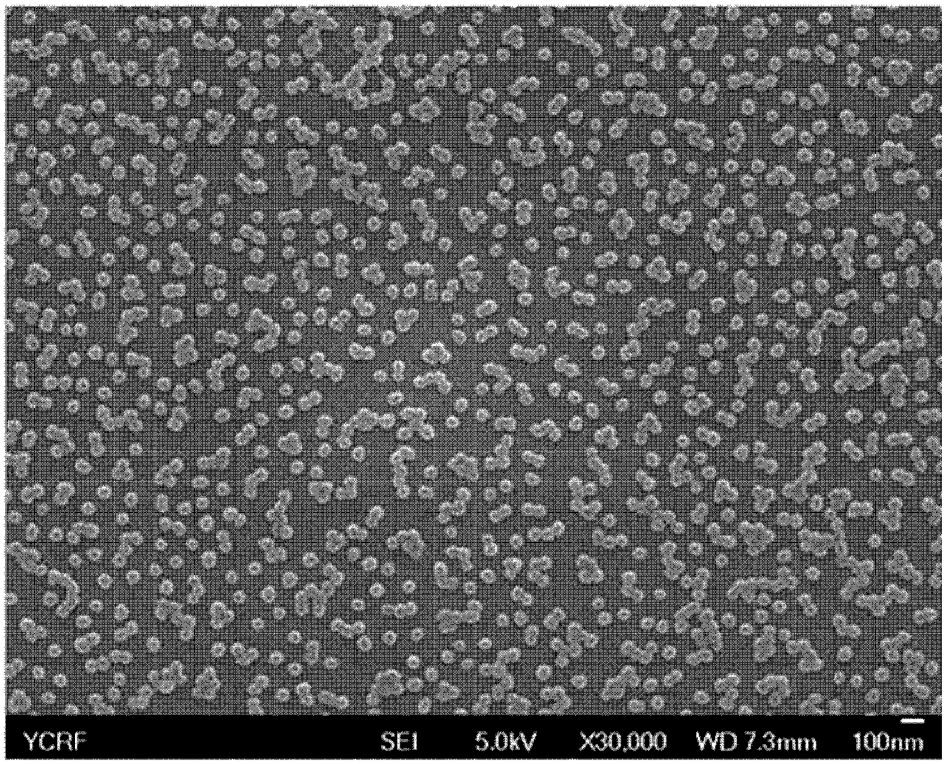
[청구항 299] 제298항에 있어서,
상기 암에 특이적으로 발현하는 유전자는 *CPT1A, IFNG, IFNGR1, CD279* 및*CD274* 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 암을 조기진단하거나 또는 암의 예후 예측을 위한 장치.

[청구항 300] 제299항에 있어서,
NSE, SCC, CEA, cyfra21-1, TPA, NMP22, OGT, Thyroglobulin(TG), Calcitonin(CALCA), BRAF V600E, TERT C228T/C250T, AFP, β-HCG(CGB). CA19-9, PSA,PSMA, PAP, PCA3, TMPRSS2-ERG, CA125, HIF-1a, VEGF, CA15-3, HER2, SCC(SART3), TOP2A, MCM2, p16INK4a(CDKN2A), Ki-67(MKI167), HE4(WEDC2) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나의 유전자에 상보적으로 결합하는 바이오틴이 결합된 프로브를 추가적으로 포함하는, 암을 조기진단하거나 또는 암의 예후 예측을 위한 장치.

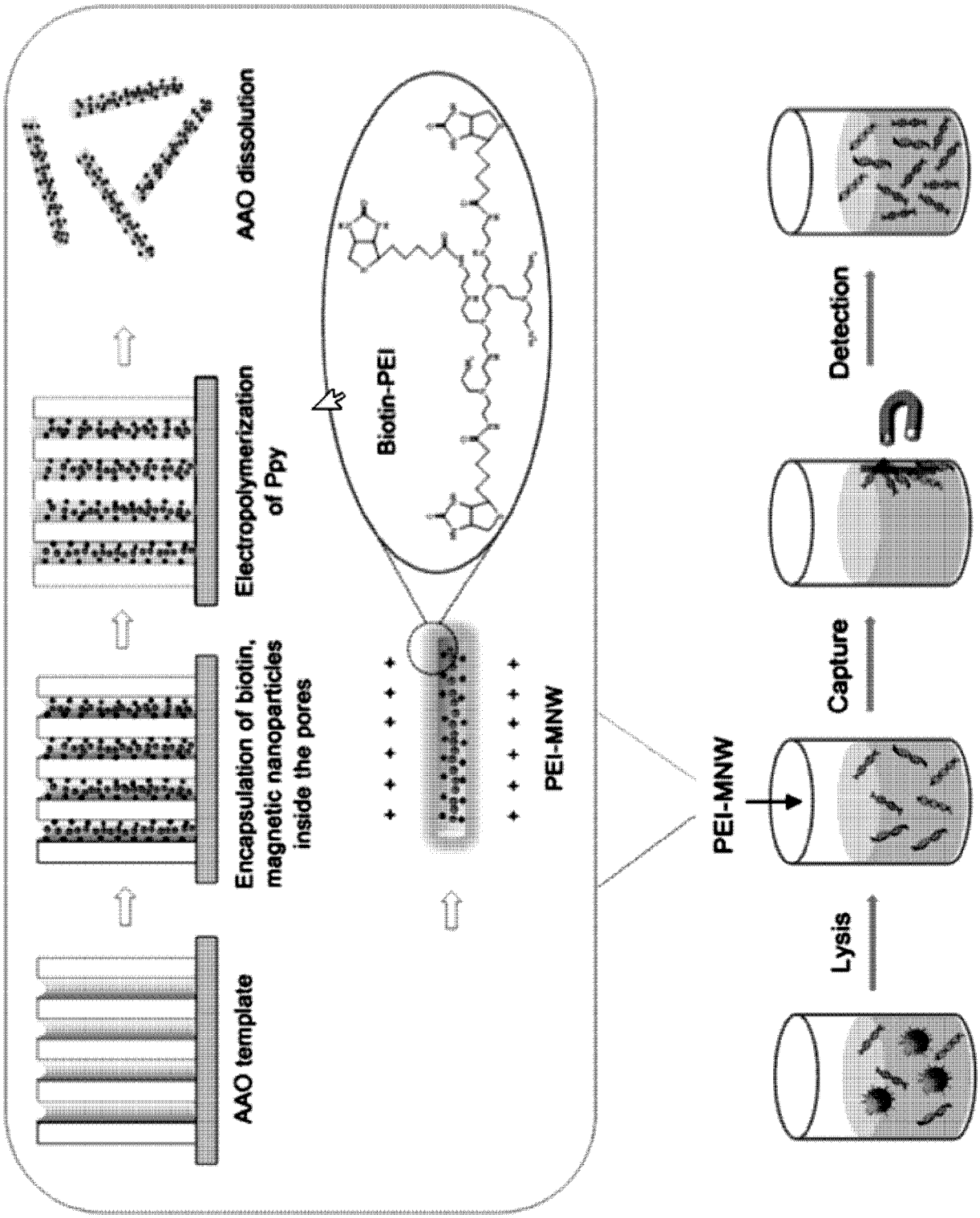
[도1a]


10μm YONSEI 10/31/2017
x2,000 5.0kV LED SEM WD 10.0mm

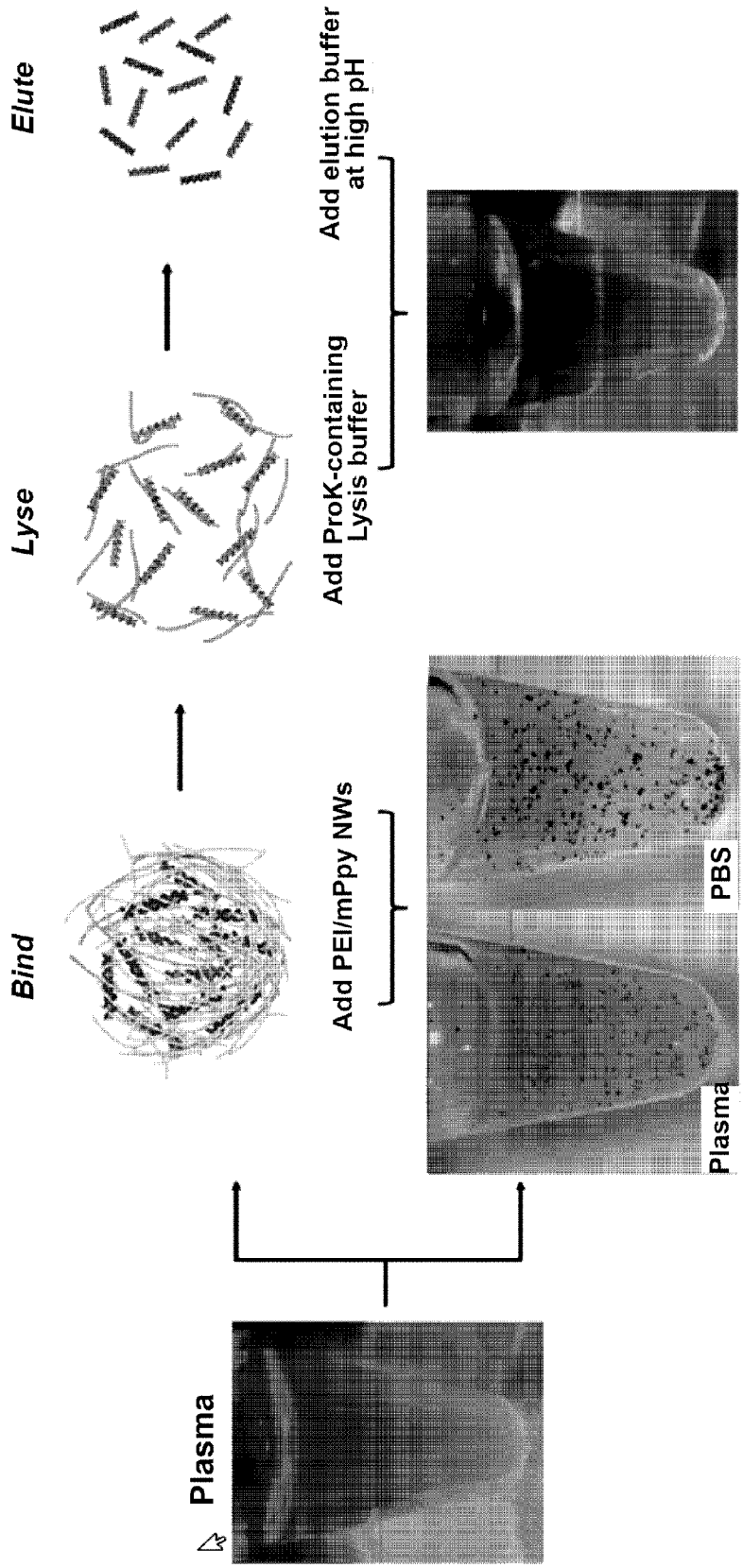
[도1b]


YCRF SEI 5.0kV X30,000 WD 7.3mm 100nm

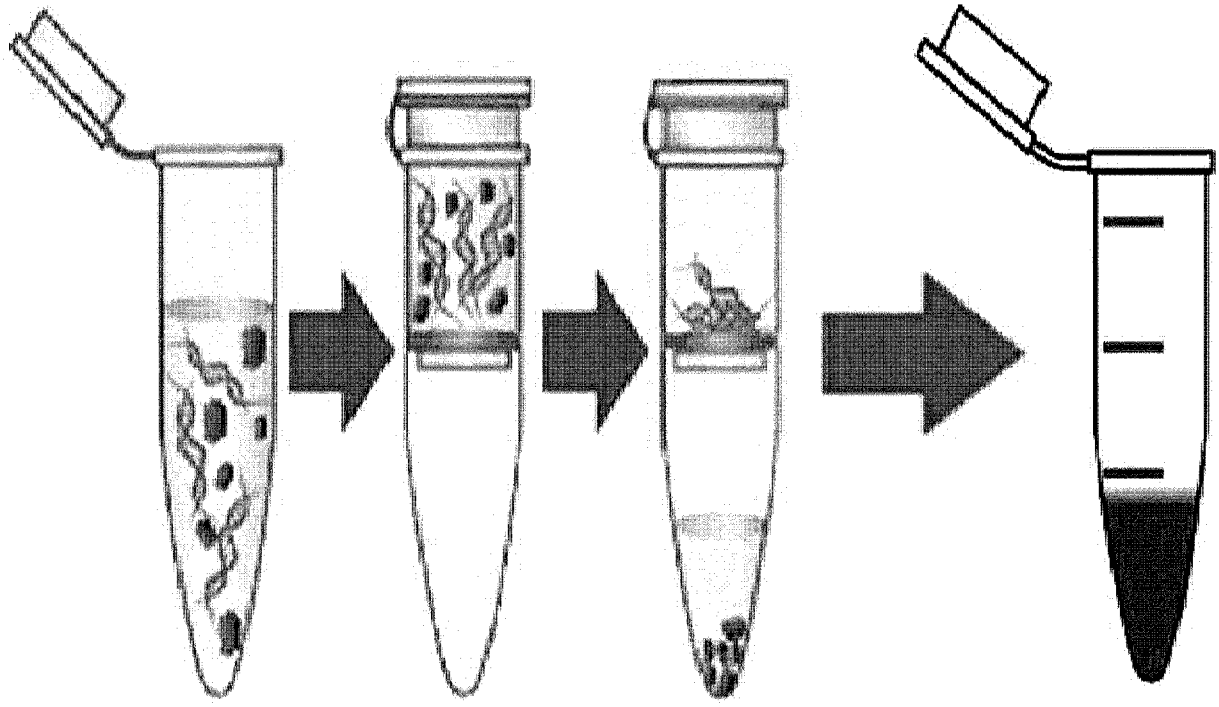
[도2a]


AAO dissolution
Electropolymerization of Ppy
Encapsulation of biotin, magnetic nanoparticles inside the pores
AAO template
Biotin-PEI
PEI-MNW
PEI-MNW
Capture
Detection
Lysis

[도2b]


Elute
Lyse
Bind
Add elution buffer at high pH
Add ProK-containing Lysis buffer
Add PEI/mPpy NWs
PBS
Plasma
Plasma

[도3]



[도4]

#1

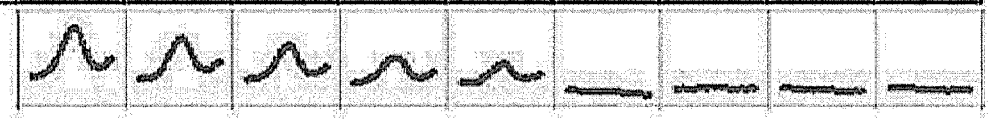
PD-L1 high expression | PD-L1 low expression

Wave length	MDA MB 231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA MB 468	HeLa	MCF7
500	0.052	0.049	0.047	0.046	0.045	0.038	0.039	0.039	0.04
650	0.105	0.096	0.085	0.079	0.066	0.037	0.041	0.037	0.038
PDL1 DNA expression (ΔOD)	0.053	0.047	0.038	0.033	0.021	-0.001	0.002	-0.002	-0.002
PDL1 mRNA expression (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
ΔOD graph									

[도5]

#2

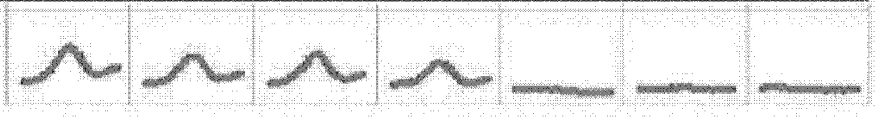
PD-L1 high expression | PD-L1 low expression

Wave length	MDA MB 231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA MB 468	HeLa	MCF7
500	0.05	0.047	0.046	0.044	0.044	0.038	0.039	0.04	0.04
650	0.09	0.081	0.075	0.066	0.059	0.037	0.04	0.038	0.038
PD-L1 DNA expression (ΔOD)	0.04	0.034	0.029	0.022	0.015	-0.001	0.001	-0.002	-0.002
PD-L1 mRNA expression (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
ΔOD graph									

[도6]

#1

High EpCAM expression | Low EpCAM expression

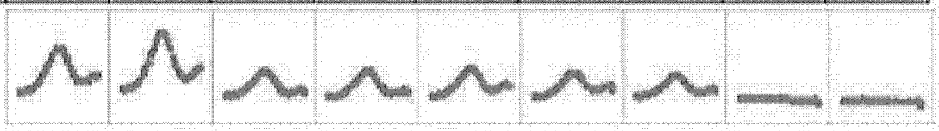
Wave length	HCC827	MCF7	H1975	MDA-MB-231	A549	H460	HeLa
500	0.046	0.044	0.044	0.044	0.04	0.04	0.04
650	0.079	0.07	0.073	0.064	0.038	0.041	0.04
EpCAM DNA expression (ΔOD)	0.033	0.026	0.029	0.02	-0.002	0.001	0
EpCAM mRNA expression (CCLE)	7.39	7.5	6.24	3.334	1.73	-0.48	-0.007
ΔOD graph							

[도7]

#2

High EpCAM expression

Low EpCAM expression

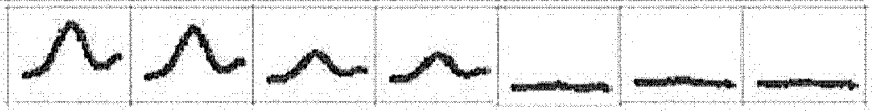
Wave length	PC9	MDA MB 468	HCC827	MCF7	H1975	MDA MB 231	A549	H460	HeLa
500	0.05	0.054	0.046	0.045	0.045	0.045	0.045	0.042	0.04
650	0.102	0.121	0.075	0.074	0.077	0.072	0.069	0.043	0.04
EpCAM DNA expression (ΔOD)	0.052	0.067	0.029	0.029	0.032	0.027	0.024	0.001	0
EpCAM mRNA expression (CCLE)	7.69	7.39	7.39	7.5	6.24	3.334	1.73	-0.48	-0.007
ΔOD graph									

[도8]

#1

FOLR1 high expression

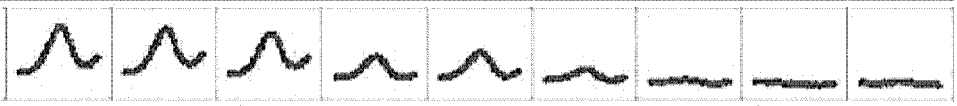
FOLR1 low expression

Wavelength	HeLa	HCC827	MCF7	MDA-MB-231	H1975	A549	H460
500	0.055	0.052	0.048	0.048	0.041	0.043	0.041
650	0.141	0.132	0.092	0.089	0.045	0.046	0.043
FOLR1 DNA expression (ΔOD)	0.086	0.08	0.044	0.041	0.004	0.003	0.002
FOLR1 mRNA expression (CCLE)	6.76	2.14	1.14	0.93	-2.13	-2.68	-4.67
ΔOD graph							

[도9]

#2

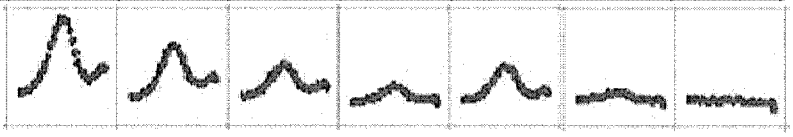
FOLR1 high expression | FOLR1 low expression

Wavelength	HeLa	HCC827	MCF7	MDA-MB-468	MDA-MB-231	PC9	H1975	A549	H460
500	0.049	0.049	0.047	0.044	0.044	0.042	0.04	0.04	0.04
650	0.089	0.086	0.082	0.062	0.066	0.051	0.042	0.039	0.041
FOLR1 DNA expression (ΔOD)	0.04	0.037	0.035	0.016	0.022	0.009	0.002	-0.001	0.001
FOLR1 mRNA expression (CCLE)	6.75	4.98	1.13	1.02	0.93	-1.36	-2.12	-2.67	-4.67
ΔOD graph									

[도10]

#1

EGFR high expression | EGFR low expression

Wavelength	HCC827	MDA-MB-231	A549	H1975	HeLa	H460	MCF7
500	0.048	0.045	0.046	0.041	0.043	0.043	0.043
650	0.098	0.079	0.067	0.052	0.066	0.048	0.043
EGFR DNA expression (ΔOD)	0.05	0.034	0.021	0.011	0.028	0.005	0
EGFR mRNA expression (CCLE)	8.98	5.06	4.77	4.72	3.54	2.29	-2.61
ΔOD graph							

[도11]

#2

EGFR high expression

EGFR low expression

Wavelength	HCC827	MDA-MB-468	PC9	MDA-MB-231	A549	H1975	HeLa	H460	MCF7
500	0.051	0.048	0.045	0.045	0.046	0.043	0.041	0.039	0.045
650	0.094	0.079	0.069	0.07	0.077	0.057	0.045	0.039	0.043
EGFR DNA expression (ΔOD)	0.043	0.031	0.024	0.025	0.031	0.014	0.004	0	-0.002
EGFR mRNA expression (CCLE)	8.98	8.51	6.75	5.05	4.77	4.72	3.54	2.29	-2.61
ΔOD graph									

[도12]

#1

ERBB2 High expression

Wavelength	MCF7	H1975	HeLa	HCC827	MDA-MB-231	A549	H460
500	0.049	0.047	0.047	0.045	0.044	0.041	0.041
650	0.098	0.088	0.086	0.076	0.069	0.054	0.047
ERBB2 DNA expression (ΔOD)	0.049	0.041	0.039	0.031	0.025	0.013	0.006
ERBB2 mRNA expression (CCLE)	4.65	4.31	4.06	4.08	3.68	3.29	2.95

[도13]

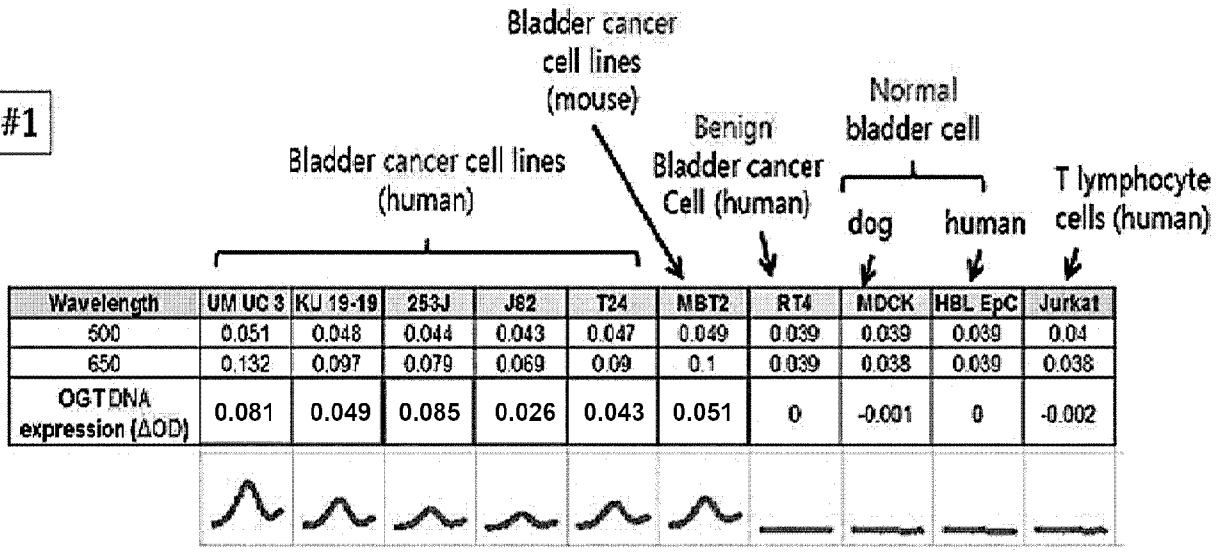
#2

ERBB2 High expression

Wavelength	MCF7	H1975	PC9	HeLa	HCC827	MDA MB468	MDA MB231	A549	H460
500	0.056	0.047	0.046	0.048	0.046	0.043	0.043	0.041	0.044
650	0.116	0.087	0.082	0.093	0.086	0.064	0.061	0.052	0.047
ERBB2 DNA expression (ΔOD)	0.06	0.04	0.036	0.045	0.04	0.021	0.018	0.011	0.003
ERBB2 mRNA expression (CCLE)	4.65	4.31	4.06	4.06	4.08	3.58	3.68	3.29	2.95

[도14]

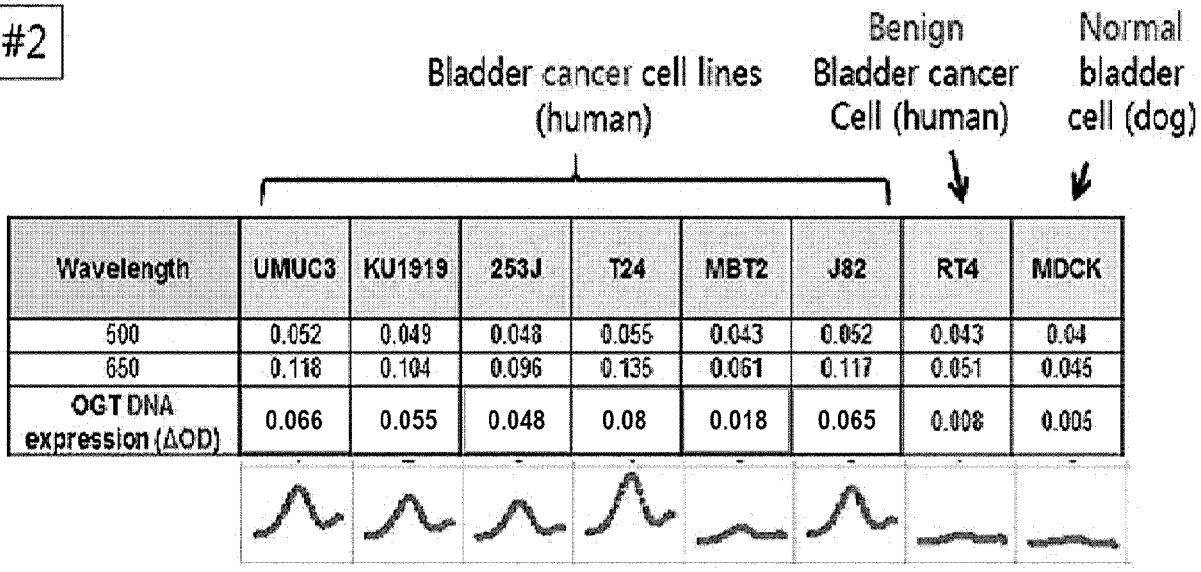
#1



Wavelength	UM UC 3	KU 19-19	253J	J82	T24	MBT2	RT4	MDCK	HBL EpC	Jurkat
500	0.051	0.048	0.044	0.043	0.047	0.049	0.039	0.039	0.039	0.04
650	0.132	0.097	0.079	0.069	0.09	0.1	0.039	0.038	0.039	0.038
OGT DNA expression (ΔOD)	0.081	0.049	0.085	0.026	0.043	0.051	0	-0.001	0	-0.002

[도15]

#2



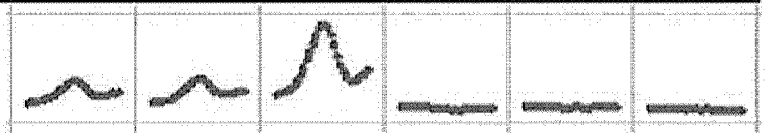
Wavelength	UMUC3	KU1919	253J	T24	MBT2	J82	RT4	MDCK
500	0.052	0.049	0.048	0.055	0.043	0.052	0.043	0.04
650	0.118	0.104	0.096	0.135	0.061	0.117	0.051	0.045
OGT DNA expression (ΔOD)	0.066	0.055	0.048	0.08	0.018	0.065	0.008	0.005

[도16]

#1

CEA-positive CEA-negative

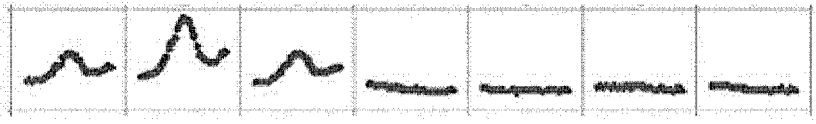
Wavelength	A549	LoVo,	MKN45	HCT8	HeLa	MDA MB 231
500	0.043	0.044	0.052	0.039	0.04	0.038
650	0.066	0.068	0.125	0.037	0.038	0.037
CEA DNA expression (ΔOD)	0.023	0.024	0.073	-0.002	-0.002	-0.001



[도17]

#2

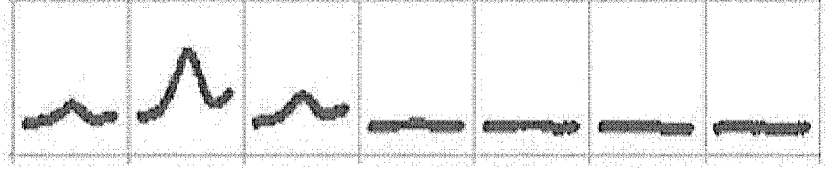
Wavelength	LoVo	MKN45	SW1116	HCT8	HCT15	HeLA	MDA MB 231
500	0.042	0.044	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
650	0.056	0.073	0.056	0.037	0.038	0.04	0.038
CEA DNA expression (ΔOD)	0.014	0.029	0.015	-0.003	0	0.001	-0.001



[도18]

#3

Wavelength	LoVo	MKN45	SW1116	HCT8	HCT15	HeLA	MDA MB231
500	0.043	0.05	0.044	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.061	0.115	0.071	0.043	0.042	0.04	0.039
CEA DNA expression (ΔOD)	0.018	0.085	0.027	0.004	0.003	0.001	0

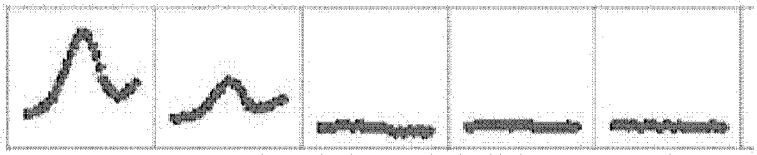


[도19]

#1

PSA-positive PSA-negative

Wavelength	LN3	LNCaP	PC3	DU145	MCF7
500	0.047	0.043	0.038	0.038	0.039
650	0.099	0.067	0.037	0.039	0.039
PSA DNA expression (ΔOD)	0.052	0.024	-0.001	0.001	0

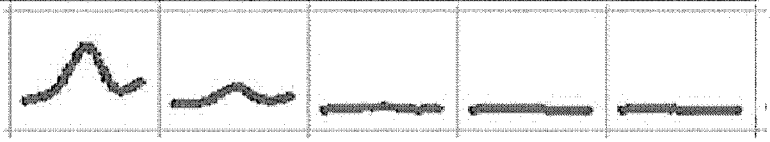


[도20]

#2

PSA-positive PSA-negative

Wavelength	LN3	LNcap	PC3	DU145	MCF 7
490	0.05	0.045	0.038	0.038	0.038
650	0.122	0.067	0.042	0.04	0.038
PSA DNA expression (ΔOD)	0.072	0.022	0.004	0.002	0

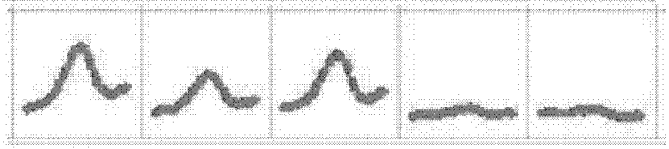


[도21]

#1

CA19-9 - positive CA19-9 - negative

Wavelength	Capan1	Capan2	AsPC1	MIA-PaCa2	Panc1
500	0.045	0.042	0.045	0.04	0.041
650	0.081	0.065	0.077	0.043	0.043
CA19-9 DNA expression (ΔOD)	0.036	0.023	0.032	0.003	0.002

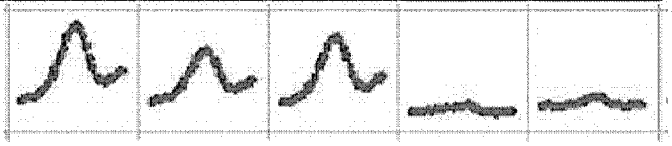


[도22]

#2

CA19-9 - positive CA19-9 - negative

Wavelength	Capan1	Capan2	AsPC1	MIA-PaCa2	Panc1
500	0.047	0.046	0.045	0.039	0.042
650	0.094	0.078	0.086	0.042	0.048
CA19-9 DNA expression (ΔOD)	0.047	0.032	0.041	0.003	0.006

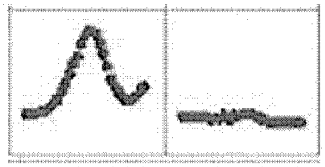


[도23]

#1

CA125 positive CA125 negative

Wavelength	A549	A431
500	0.048	0.047
650	0.093	0.047
CA125 DNA expression (ΔOD)	0.045	0

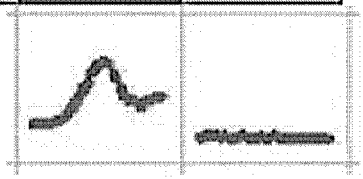


[도24]

#2

CA125 positive CA125 negative

Wavelength	A549	A431
500	0.046	0.04
650	0.078	0.039
CA125 DNA expression (ΔOD)	0.032	-0.001

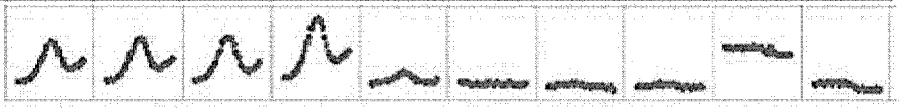


[도25]

#1

AFP-positive AFP-negative

Wavelength	Huh7	HepG2	Hep3B	PLC	SNU475	SNU387	SNU423	SNU449	SK Hep1	HeLa
500	0.042	0.043	0.043	0.044	0.041	0.042	0.039	0.039	0.061	0.041
650	0.063	0.065	0.066	0.076	0.047	0.051	0.041	0.041	0.06	0.041
AFP mRNA expression (CCLE)	12.3	10.8	5.51	2.4	-0.79	-0.69	-1.07	-1.88	-3.7	-1.0
AFP DNA expression (ΔOD)	0.021	0.022	0.023	0.032	0.006	-0.001	0.002	0.002	-0.001	0

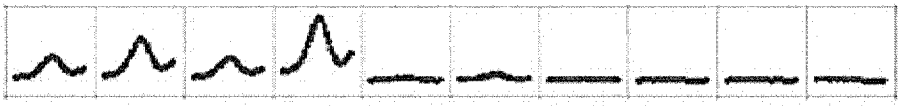


[도26]

#2

AFP-positive AFP-negative

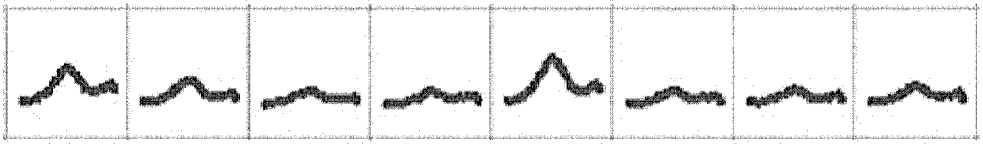
Wavelength	Huh7	HepG2	Hep3B	PLC	SNU475	SNU387	SNU423	SNU449	SK Hep1	HeLa
490	0.043	0.048	0.044	0.054	0.038	0.04	0.04	0.038	0.038	0.04
650	0.08	0.111	0.078	0.149	0.043	0.05	0.041	0.041	0.04	0.041
AFP mRNA expression (CCLE)	12.3	10.8	5.51	2.4	-0.79	-0.69	-1.07	-1.88	-3.7	-1.0
AFP DNA expression (ΔOD)	0.037	0.063	0.034	0.095	0.005	0.01	0.001	0.003	0.002	0.001



[도27]

PC#41 (Prostate cancer patient)

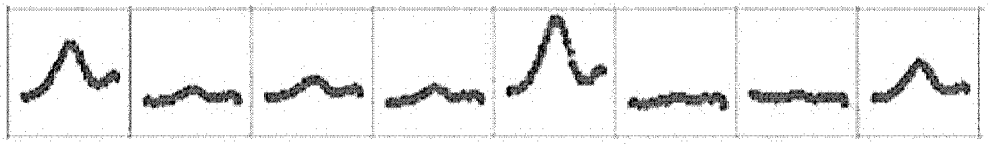
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.043	0.043	0.04	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042
650	0.069	0.06	0.051	0.051	0.076	0.052	0.052	0.055
ctDNA (ΔOD)	0.026	0.017	0.011	0.01	0.033	0.011	0.01	0.013



[도28]

PC#47 (Prostate cancer patient)

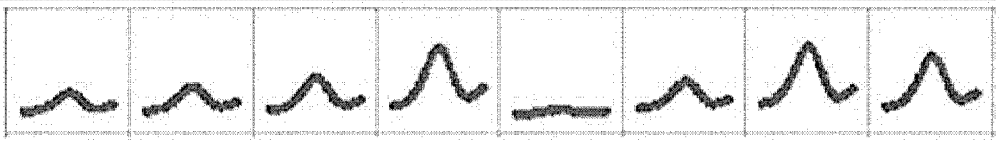
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.041	0.045	0.041	0.049	0.04	0.048	0.044
650	0.087	0.051	0.059	0.052	0.108	0.045	0.047	0.072
ctDNA (ΔOD)	0.042	0.01	0.014	0.011	0.059	0.005	-0.001	0.028



[도29]

PC#44 (Prostate cancer patient)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.046	0.048	0.056	0.04	0.051	0.059	0.053
650	0.078	0.09	0.106	0.16	0.049	0.099	0.162	0.144
ctDNA (ΔOD)	0.033	0.044	0.058	0.104	0.009	0.048	0.103	0.091

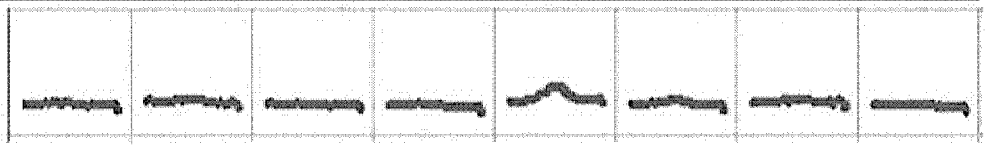


Cutoff>0.015

[도30]

Normal#1

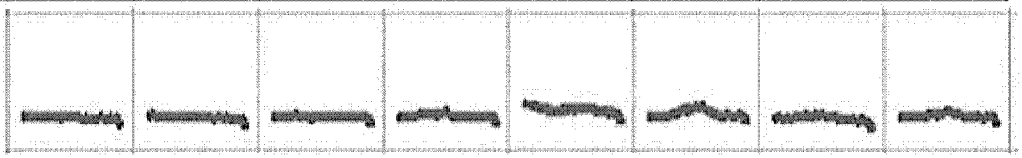
WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.042	0.04	0.038	0.041	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.039	0.039	0.054	0.042	0.044	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.001	-0.001	0.001	0.013	0.002	0.004	0.002



[도31]

Normal#2

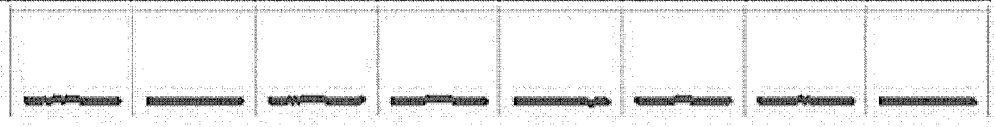
WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.04	0.039	0.038	0.049	0.039	0.038	0.038
650	0.039	0.04	0.039	0.042	0.045	0.047	0.04	0.042
ctDNA (ΔOD)	0	0	0	0.004	-0.004	0.008	0.002	0.004



[도32]

Normal#3

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.041	0.039	0.041	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.041	0.044	0.045	0.04	0.043	0.041	0.041
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.002	0.003	0.005	0.001	0.002	0.001	0.002

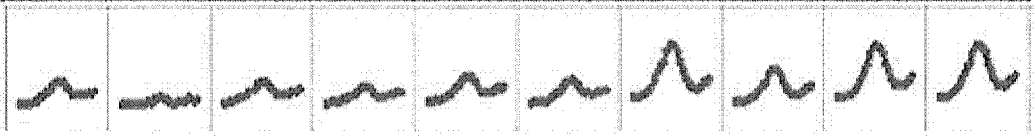


Cutoff>0.015

[도33]

Lung cancer patient #1

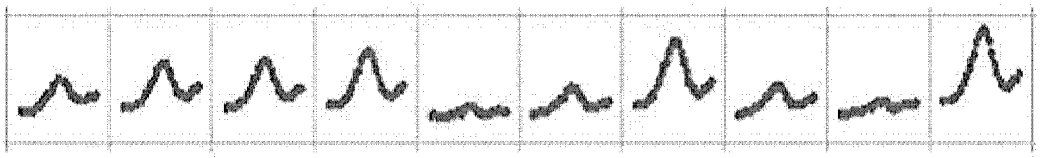
WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.042	0.045	0.042	0.045	0.045
650	0.053	0.045	0.053	0.051	0.056	0.053	0.074	0.06	0.073	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.012	0.004	0.011	0.01	0.013	0.011	0.029	0.018	0.028	0.029



[도34]

Lung cancer patient #2

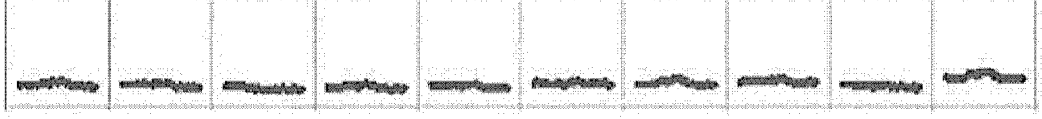
WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.043	0.045	0.044	0.046	0.04	0.041	0.046	0.041	0.041	0.048
650	0.06	0.068	0.069	0.074	0.045	0.055	0.08	0.056	0.048	0.086
ctDNA (ΔOD)	0.017	0.023	0.025	0.028	0.005	0.014	0.034	0.015	0.007	0.038



[도35]

Normal

WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.039	0.039	0.038	0.037	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039	0.043
650	0.04	0.04	0.036	0.04	0.039	0.041	0.042	0.042	0.039	0.047
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.001	-0.002	0.003	0	0.001	0.003	0.002	0	0.004

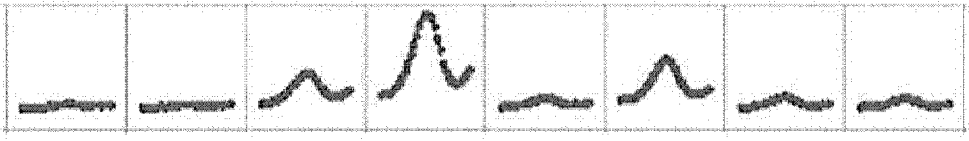


Cutoff>0.01

[도36]

Thyroid cancer patient #1

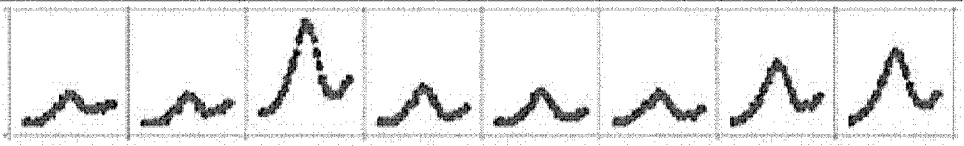
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.04	0.04	0.045	0.057	0.041	0.051	0.04	0.04
650	0.046	0.045	0.09	0.177	0.055	0.109	0.056	0.053
ctDNA (ΔOD)	0.006	0.005	0.045	0.12	0.014	0.058	0.016	0.013



[도37]

Thyroid cancer patient #2

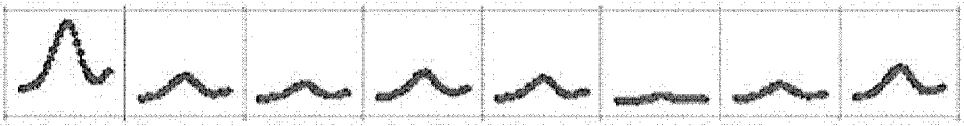
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.041	0.041	0.046	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043
650	0.054	0.054	0.084	0.056	0.053	0.054	0.067	0.073
ctDNA (ΔOD)	0.013	0.013	0.038	0.014	0.012	0.014	0.025	0.03



[도38]

Thyroid cancer

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.065	0.046	0.045	0.047	0.045	0.04	0.045	0.047
650	0.204	0.093	0.075	0.099	0.087	0.05	0.075	0.11
ctDNA (ΔOD)	0.139	0.047	0.03	0.052	0.042	0.01	0.03	0.063

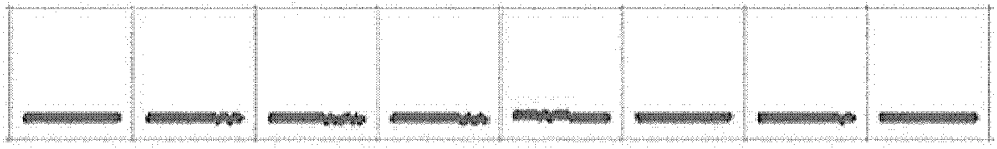


Cutoff>0.01

[도39]

Normal#1

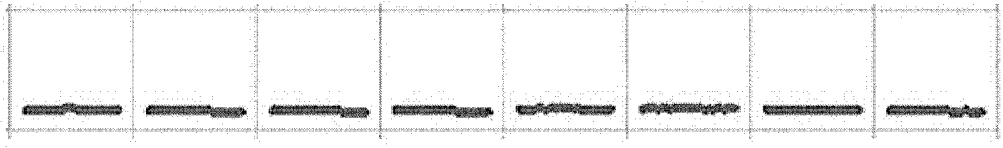
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.039	0.039
650	0.04	0.04	0.038	0.041	0.041	0.04	0.04	0.041
ctDNA (ΔOD)	0.002	0.001	-0.001	0.003	0	0	0.001	0.002



[도40]

Normal#2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.038	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.039	0.04	0.039	0.043	0.043	0.041	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.004	0.001	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.001

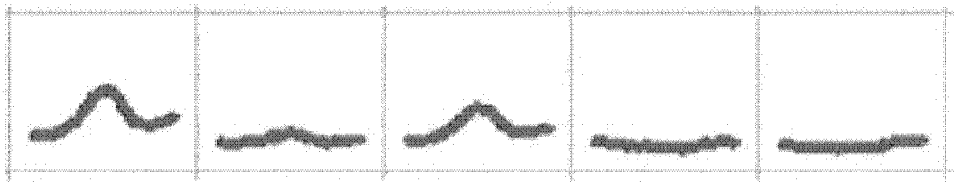


Cutoff>0.01

[도41]

Bladder cancer patient #1

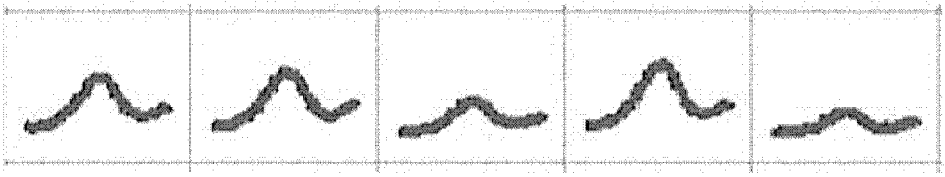
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.044	0.041	0.041	0.041	0.039
650	0.071	0.046	0.061	0.037	0.037
ctDNA (ΔOD)	0.027	0.005	0.02	-0.004	-0.002



[도42]

Bladder cancer patient

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.046	0.047	0.043	0.047	0.043
650	0.076	0.079	0.061	0.083	0.055
ctDNA (ΔOD)	0.03	0.032	0.018	0.036	0.012

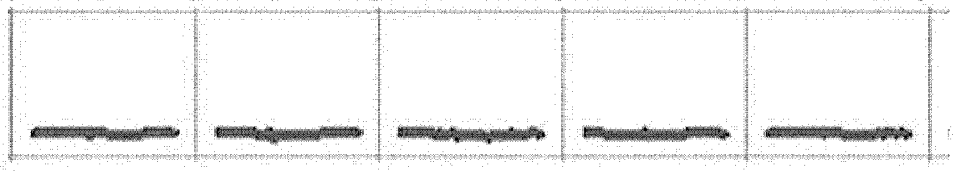


Cutoff>0.01

[도43]

Cystitis patient #1 (Hematuria)

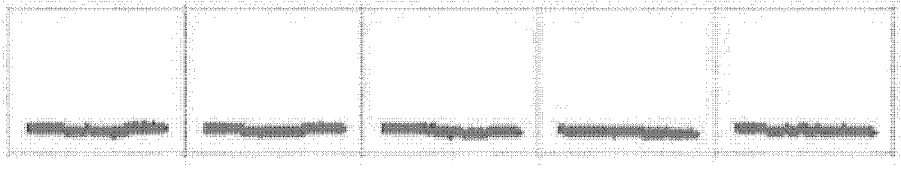
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039
650	0.039	0.038	0.037	0.038	0.039
ctDNA (ΔOD)	0	-0.002	-0.002	-0.002	0



[도44]

Cystitis patient #2 (Hematuria)

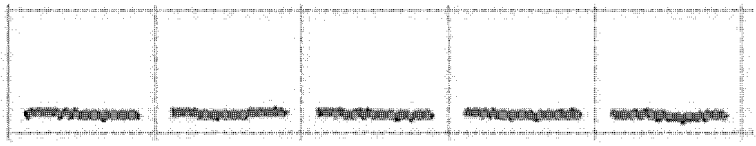
OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.04	0.04	0.039	0.039	0.04
0.038	0.038	0.037	0.037	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001



[도45]

Normal #1

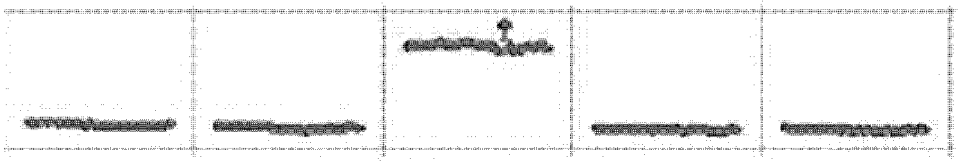
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.04	0.039	0.038
650	0.038	0.037	0.038	0.037	0.036
ctDNA (ΔOD)	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002



[도46]

Normal #2

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.042	0.04	0.092	0.038	0.039
0.04	0.037	0.094	0.037	0.037
-0.002	-0.003	0.002	-0.001	-0.002

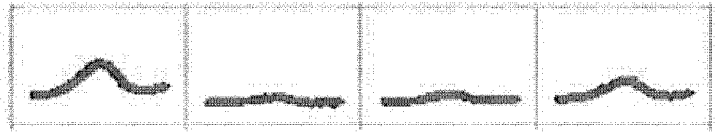


Cutoff>0.01

[도47]

Breast cancer patient #1

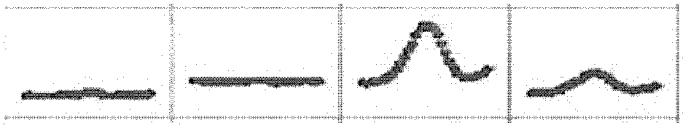
WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.049	0.039	0.041	0.044
650	0.092	0.045	0.051	0.069
ctDNA (ΔOD)	0.043	0.006	0.01	0.025



[도48]

Breat cancer patient #2

WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.042	0.064	0.061	0.045
650	0.045	0.064	0.143	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.003	0	0.082	0.029



[도49]

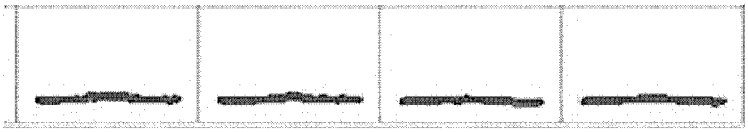
Normal #1

WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.037	0.038	0.038	0.039
650	0.037	0.038	0.04	0.04
ctDNA (ΔOD)	0	0	0.002	0.001

[도50]

Normal #2

WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.041	0.039	0.039
650	0.048	0.044	0.041	0.044
ctDNA (ΔOD)	0.008	0.003	0.002	0.005

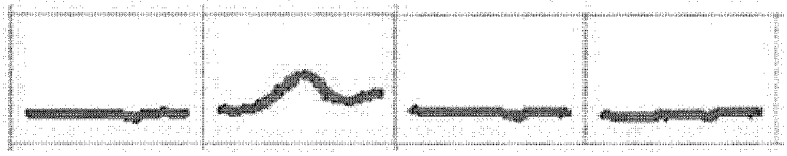


Cutoff>0.01

[도51]

Colorectal cancer patient #1

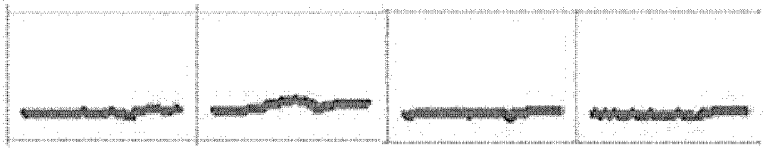
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.043	0.047	0.046	0.041
650	0.042	0.084	0.044	0.041
	-0.001	0.037	-0.002	0



[도52]

Colorectal cancer patient #2

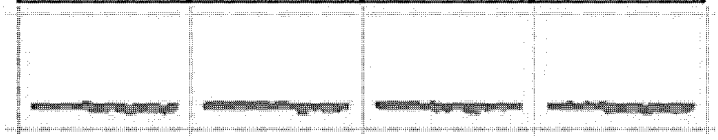
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.04	0.043	0.041	0.041
650	0.04	0.054	0.041	0.04
	0	0.011	0	-0.001



[도53]

Normal #1

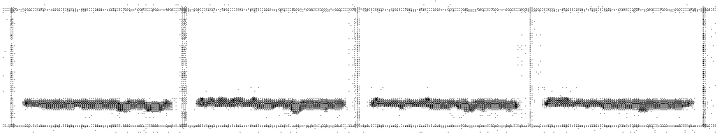
CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.038	0.039	0.039	0.038
0.037	0.039	0.038	0.037
-0.001	0	-0.001	-0.001



[도54]

Normal #2

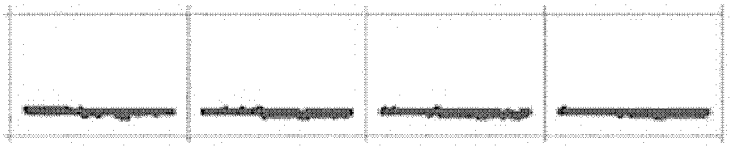
CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.04	0.038	0.039	0.038
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.003	-0.001	-0.002	-0.001



[도55]

Normal #3

CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.039	0.039	0.039	0.039
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002

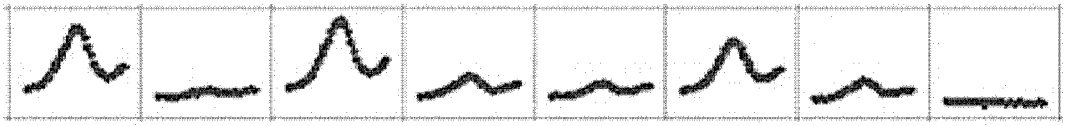


Cutoff>0.01

[도56]

Cholangiocarcinoma patient

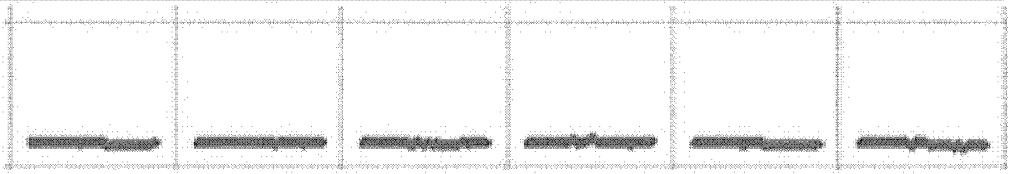
WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.049	0.042	0.049	0.042	0.042	0.047	0.04	0.038
650	0.099	0.047	0.105	0.059	0.053	0.088	0.055	0.038
ctDNA (ΔOD)	0.05	0.005	0.056	0.017	0.011	0.041	0.015	0



[도57]

Normal #1

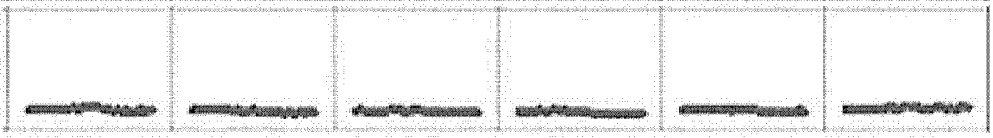
WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
ctDNA (ΔOD)	-0.001	0.001	0	0.002	0.001	0



[도58]

Normal #2

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.04
650	0.042	0.039	0.039	0.038	0.04	0.042
ctDNA (ΔOD)	0.003	0	0	0.001	0.001	0.002

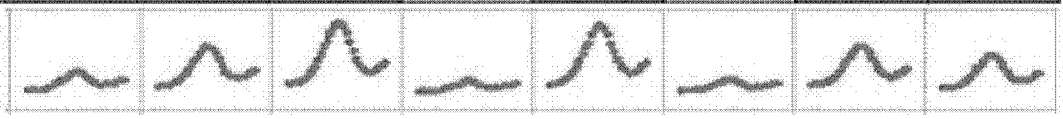


Cutoff>0.01

[도59]

Gastric cancer patient

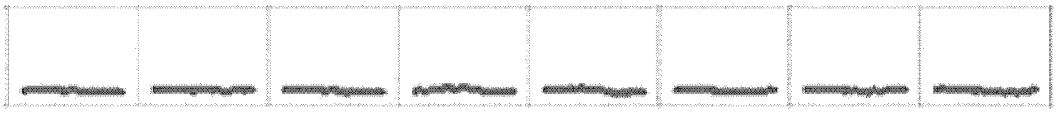
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 27
500	0.042	0.046	0.049	0.041	0.047	0.042	0.048	0.044
650	0.059	0.082	0.103	0.051	0.102	0.052	0.084	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.017	0.036	0.054	0.01	0.055	0.01	0.036	0.03



[도60]

Normal #1

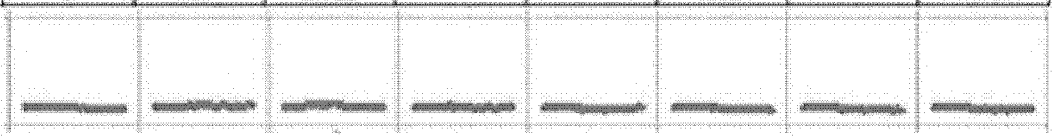
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
ctDNA (ΔOD)	0.001	0	0	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001



[도61]

Normal #2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 27
500	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.04	0.041	0.042	0.04	0.038	0.038	0.038	0.038
ctDNA (ΔOD)	0	0.031	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001

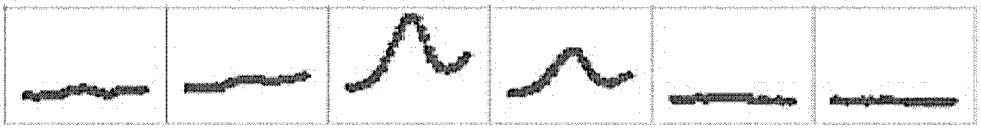


Cutoff>0.01

[도62]

Pancreatic cancer patient #1

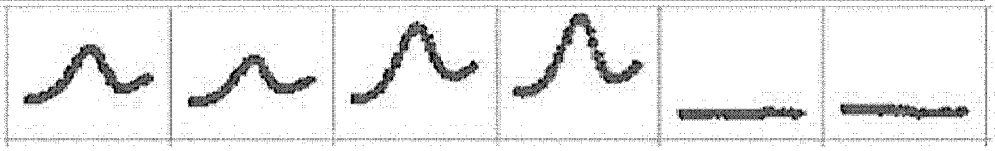
WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.046	0.047	0.043	0.04	0.039
650	0.046	0.052	0.089	0.068	0.041	0.039
	0.004	0.006	0.042	0.025	0.001	0
Int.	0.16	0.24	1.68	1	0.04	0



[도63]

Pancreatic cancer patient #2

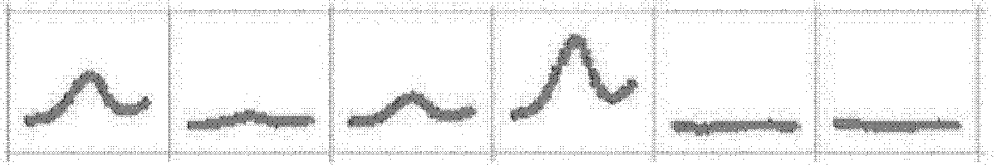
WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.044	0.046	0.05	0.039	0.042
650	0.072	0.067	0.084	0.088	0.038	0.04
	0.026	0.023	0.038	0.038	-0.001	-0.002
Int.	0.79	0.70	1.15	1.15	-0.03	-0.06



[도64]

Pancreatic cancer patient #3

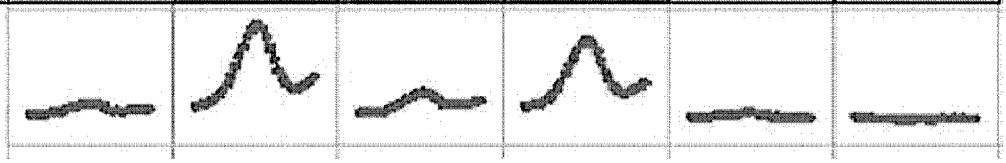
WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.04	0.044	0.053	0.039	0.043
650	0.097	0.051	0.073	0.137	0.04	0.039
	0.051	0.011	0.029	0.084	0.001	-0.004
Int.	1.55	0.33	0.88	2.55	0.03	-0.12



[도65]

Pancreatic cancer patient #4

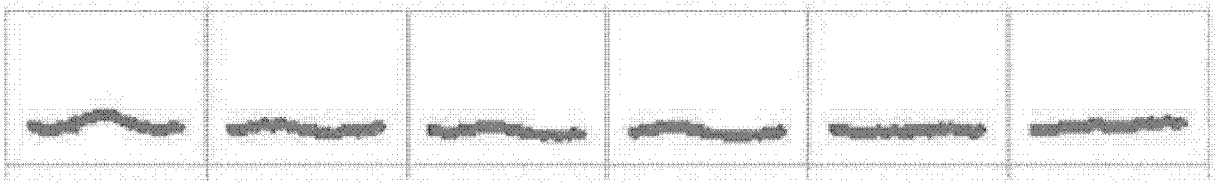
WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.051	0.044	0.05	0.04	0.039
650	0.054	0.134	0.064	0.117	0.044	0.037
	0.012	0.083	0.02	0.067	0.004	-0.002
Int.	0.46	3.19	0.77	2.58	0.15	-0.08



[도66]

Normal #1

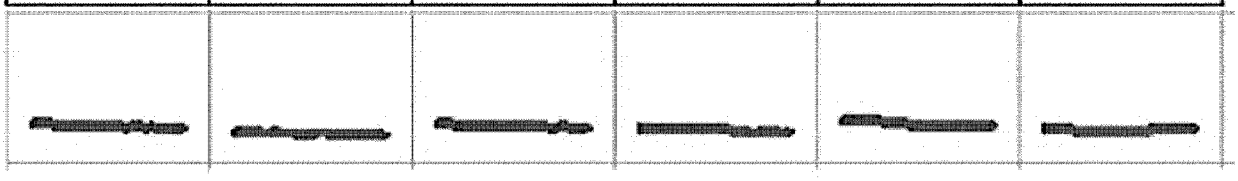
BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.043	0.041	0.041	0.04	0.042	0.041
0.048	0.042	0.041	0.039	0.041	0.043
0.005	0.001	0	-0.001	-0.001	0.002
0.2	0.04	0	-0.04	-0.04	0.08



[도67]

Normal #2

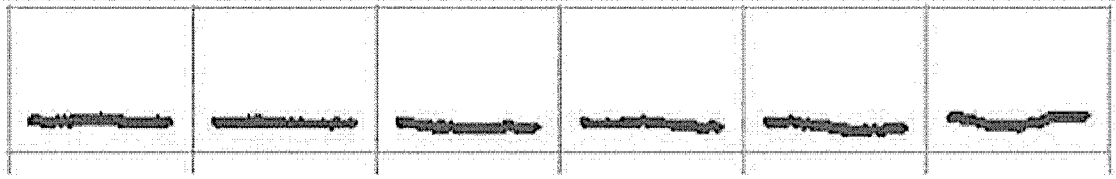
BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.046	0.039	0.047	0.042	0.049	0.042
0.044	0.037	0.045	0.041	0.045	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.004	-0.003
-0.08	-0.08	-0.08	-0.04	-0.15	-0.12



[도68]

Normal #3

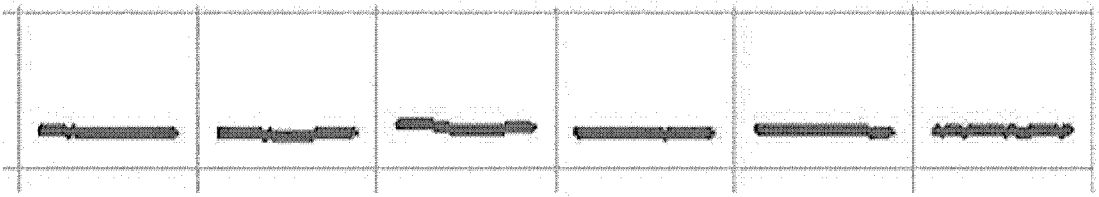
Nor(Cho), CEA	Nor(Cho), CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho), CA125	Nor(Cho), CA125
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.042
0.042	0.04	0.037	0.04	0.037	0.038
0.002	0	-0.003	0	-0.003	-0.004
0.08	0	-0.12	0	-0.12	-0.16



[도69]

Normal #4

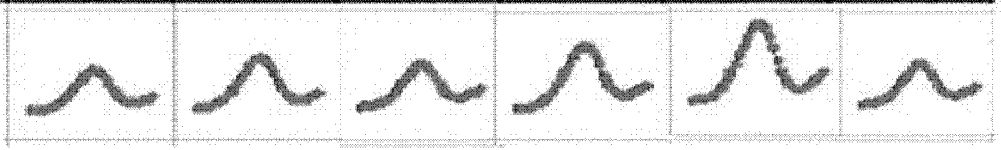
Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA125	Nor(Cho) CA125
0.044	0.042	0.049	0.043	0.046	0.043
0.042	0.039	0.045	0.042	0.045	0.044
-0.002	-0.003	-0.004	-0.001	-0.001	0.001
-0.08	-0.12	-0.15	-0.04	-0.04	0.04



[도70]

Blood samples from lung cancer patients

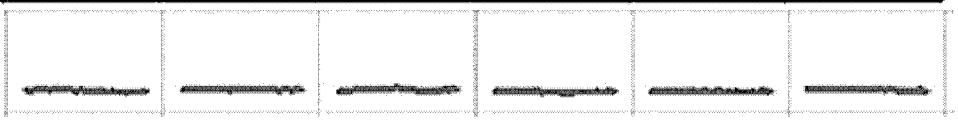
Wavelength	Patient #1, 27	Patient #1, 95	Patient #2, 27	Patient #2, 95	Patient #3, 27	Patient #3, 95
500	0.051	0.056	0.049	0.053	0.056	0.045
650	0.115	0.135	0.099	0.117	0.135	0.071
ctDNA (ΔOD)	0.064	0.079	0.05	0.064	0.079	0.026



[도71]

Blood samples from normal subjects

Wavelength	Normal #1, 27	Normal #1, 95	Normal #2, 27	Normal #2, 95	Normal#3, 27	Normal#3, 95
500	0.039	0.042	0.042	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.043	0.039	0.041	0.038	0.04
ctDNA (ΔOD)	0	0.001	-0.003	0.002	-0.002	0

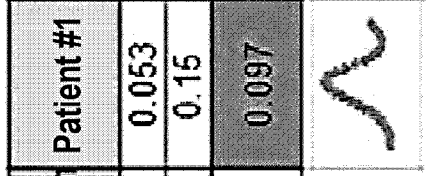


Cutoff>0.01

[도72]

Urine samples from bladder cancer patients

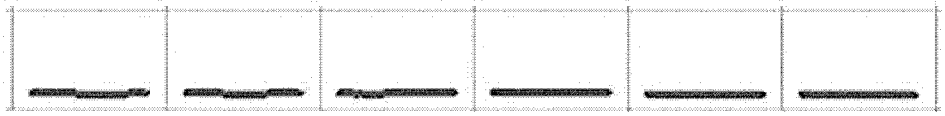
Wavelength	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4	Patient #5	Lung cancer patient #3	Lung cancer patient #3
500	0.053	0.049	0.049	0.053	0.049	0.051	0.049
650	0.15	0.123	0.12	0.147	0.102	0.11	0.101
ctDNA (ΔOD)	0.097	0.074	0.071	0.094	0.053	0.059	0.052



[도73]

Urine samples from normal subjects

Wavelength	Normal #1	Nornal #2	Normal #3	Normal #4	Normal #5	Normal #6
500	0.04	0.04	0.04	0.041	0.042	0.042
650	0.041	0.044	0.041	0.042	0.042	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.004	0.001	0.001	0	-0.002

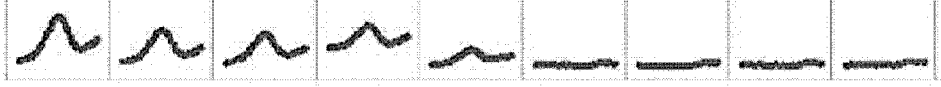


Cutoff>0.01

[도74]

PD-L1

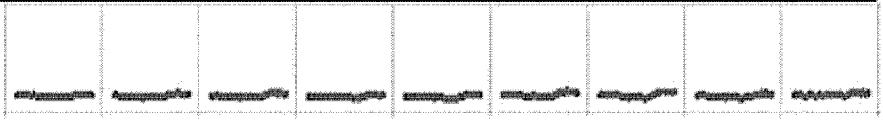
	PD-L1 expression					PD-L1 low expression			
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
500	0.044	0.043	0.042	0.059	0.04	0.04	0.04	0.04	0.039
650	0.091	0.076	0.073	0.083	0.057	0.039	0.039	0.039	0.04
OD	0.047	0.033	0.031	0.024	0.017	-0.001	-0.001	-0.001	0.001
Int.	1.679	1.179	1.107	0.857	0.607	-0.036	-0.036	-0.036	0.036
mRNA (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06



[도75]

Interferon-γ (IFNG)

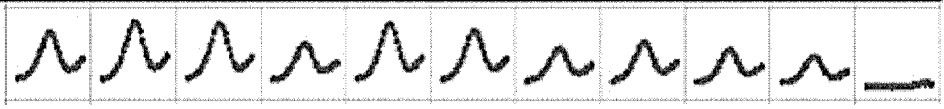
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
500	0.04	0.04	0.039	0.038	0.039	0.04	0.04	0.04	0.04
650	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041
OD	-0.002	-0.002	0	0	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	0.001
Int.	-0.071	-0.071	0.000	0.000	-0.036	-0.036	-0.036	-0.071	0.036



[도76]

Interferon-γ receptor1 (IFNGR1)

Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7	PC	NC
500	0.047	0.047	0.047	0.046	0.048	0.046	0.044	0.044	0.044	0.043	0.038
650	0.098	0.109	0.107	0.065	0.107	0.1	0.08	0.087	0.078	0.071	0.039
OD	0.051	0.062	0.06	0.039	0.059	0.054	0.036	0.043	0.034	0.028	0.001
Int.	1.821	2.214	2.143	1.393	2.107	1.929	1.286	1.536	1.214	1.000	0.036



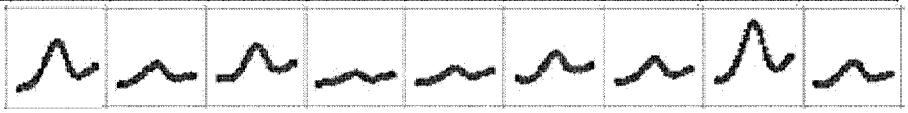
[도77]

PD-L1

PD-L1 expression

PD-L1 low/no expression

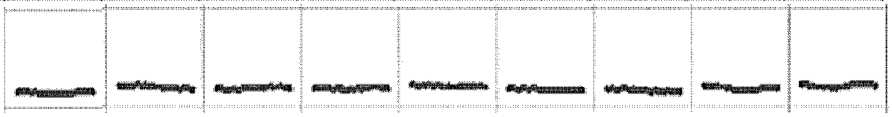
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.02	0.03	0.01	0.013	0.023	0.021	0.053	0.02
Int.	1.72	1.33	2.00	0.67	0.87	1.53	1.40	3.53	1.33



[도78]

Interferon-γ (IFNG)

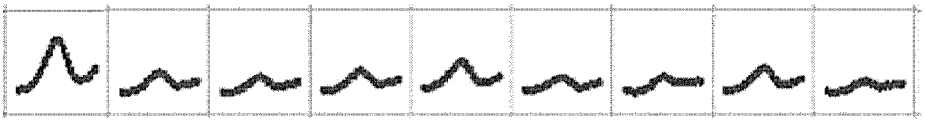
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.00	-0.001	0	-0.001	-0.001	-0.002	-0.002	-0.003	-0.003
Int.	0.08	-0.07	0.00	-0.07	-0.07	-0.13	-0.13	-0.20	-0.20



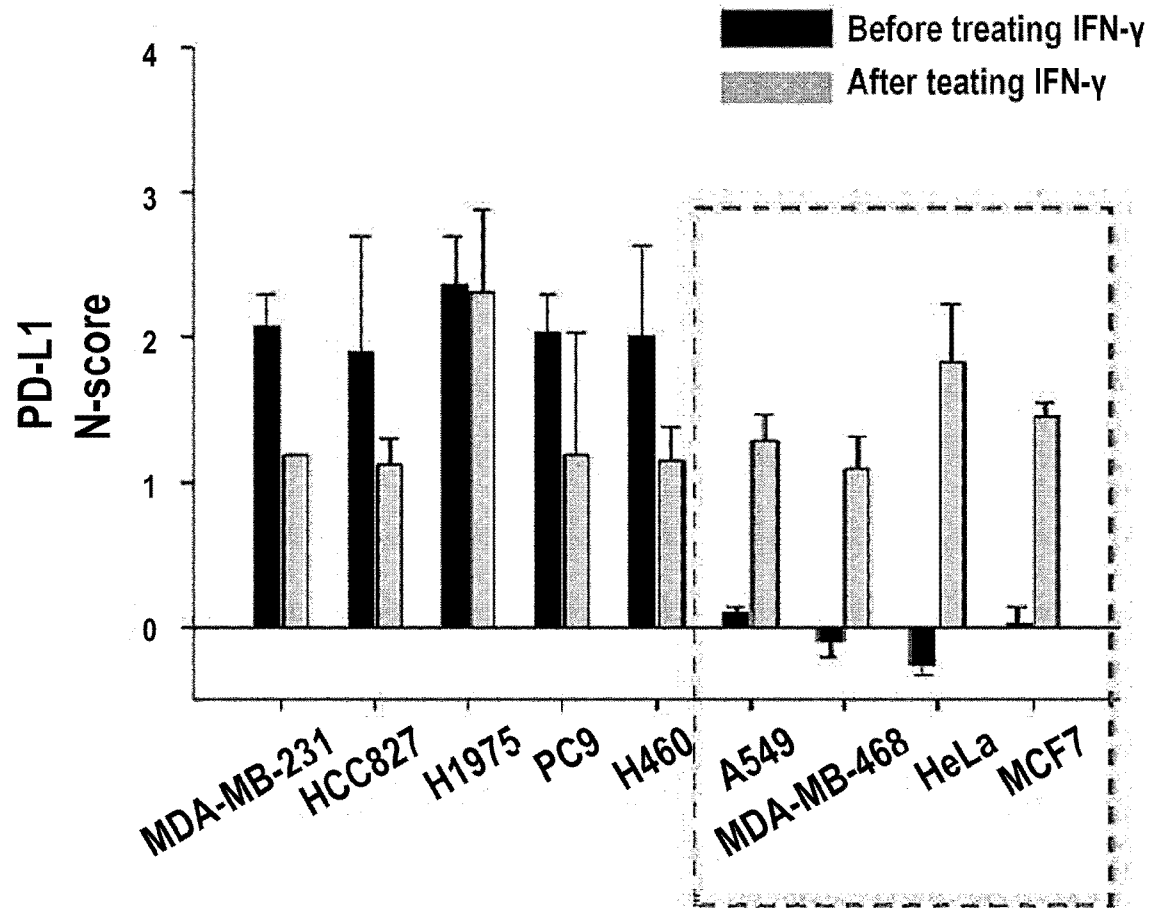
[도79]

Interferon-γ receptor1 (IFNGR1)

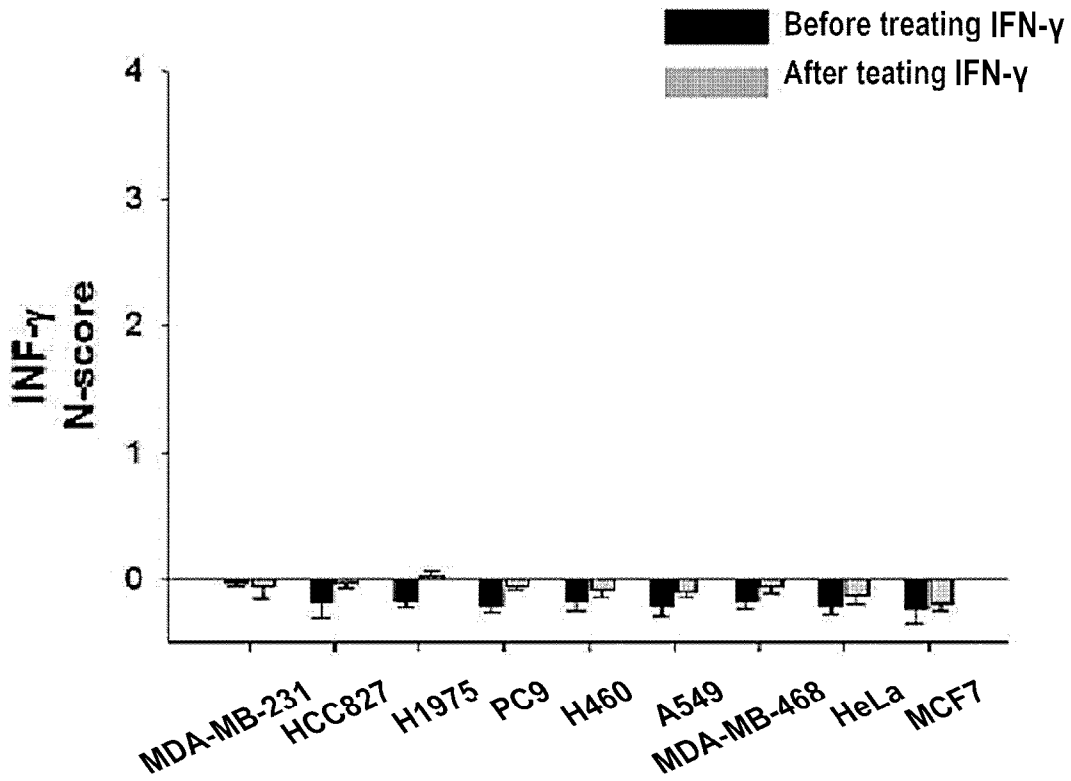
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.017	0.014	0.017	0.023	0.011	0.011	0.019	0.008
Int.	1.83	1.13	0.93	1.13	1.53	0.73	0.73	1.27	0.53



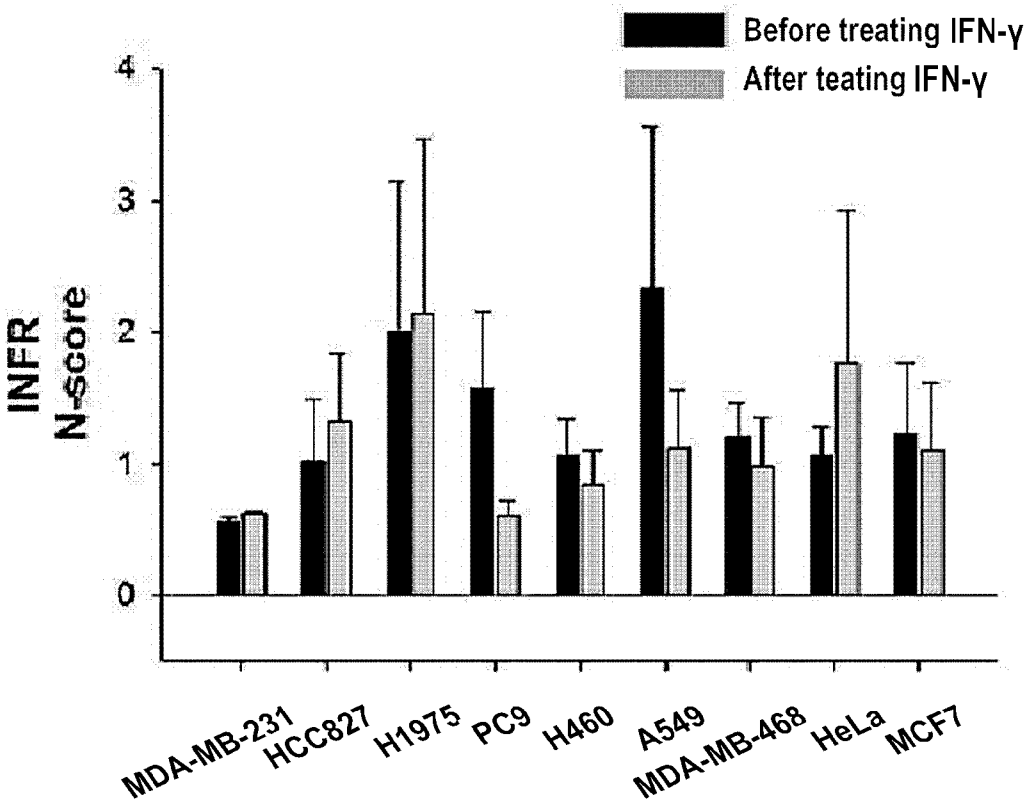
[도80]


Before treating IFN-γ
After teating IFN-γ
PD-L1
N-score
4
3
2
1
0
MDA-MB-231
HCC827
H1975
PC9
H460
A549
MDA-MB-468
HeLa
MCF7

[도81]


Before treating IFN-γ
After teating IFN-γ
INF-γ
N-score
4
3
2
1
0
MDA-MB-231
HCC827
H1975
PC9
H460
A549
MDA-MB-468
HeLa
MCF7

[도82]

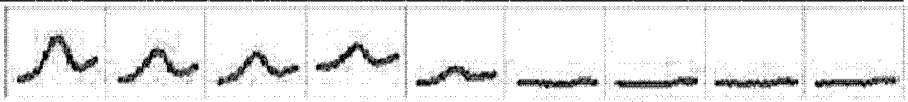


[도83]

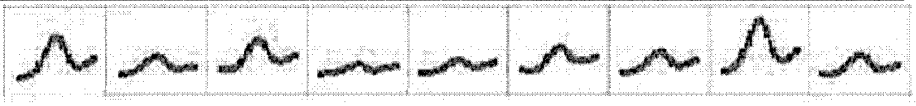
DNA-based PD-L1 detection

PD-L1 expression

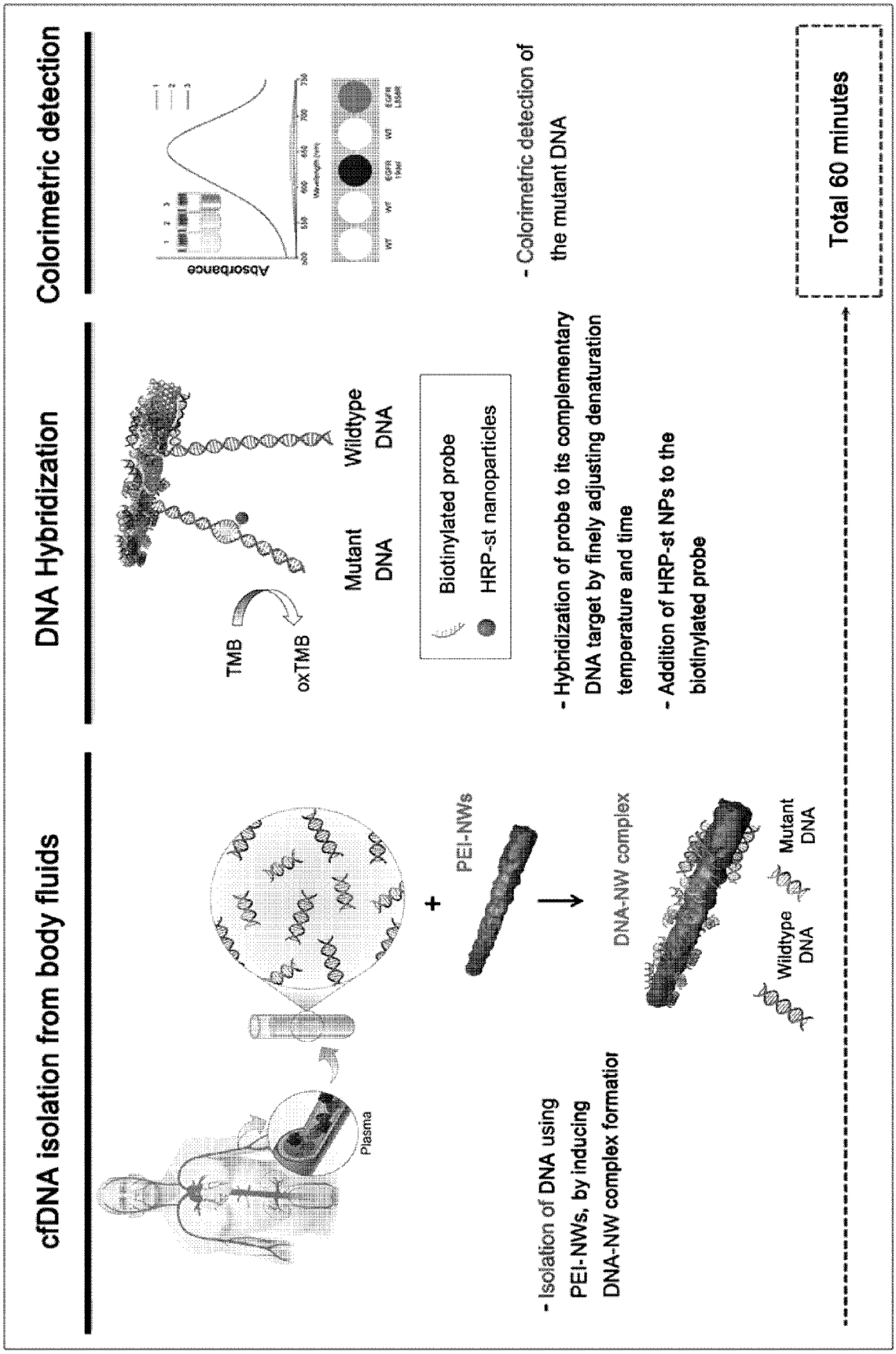
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
mRNA (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
OD	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Int.	1.72	1.28	1.13	1.04	0.73	-0.06	-0.06	-0.02	0.02



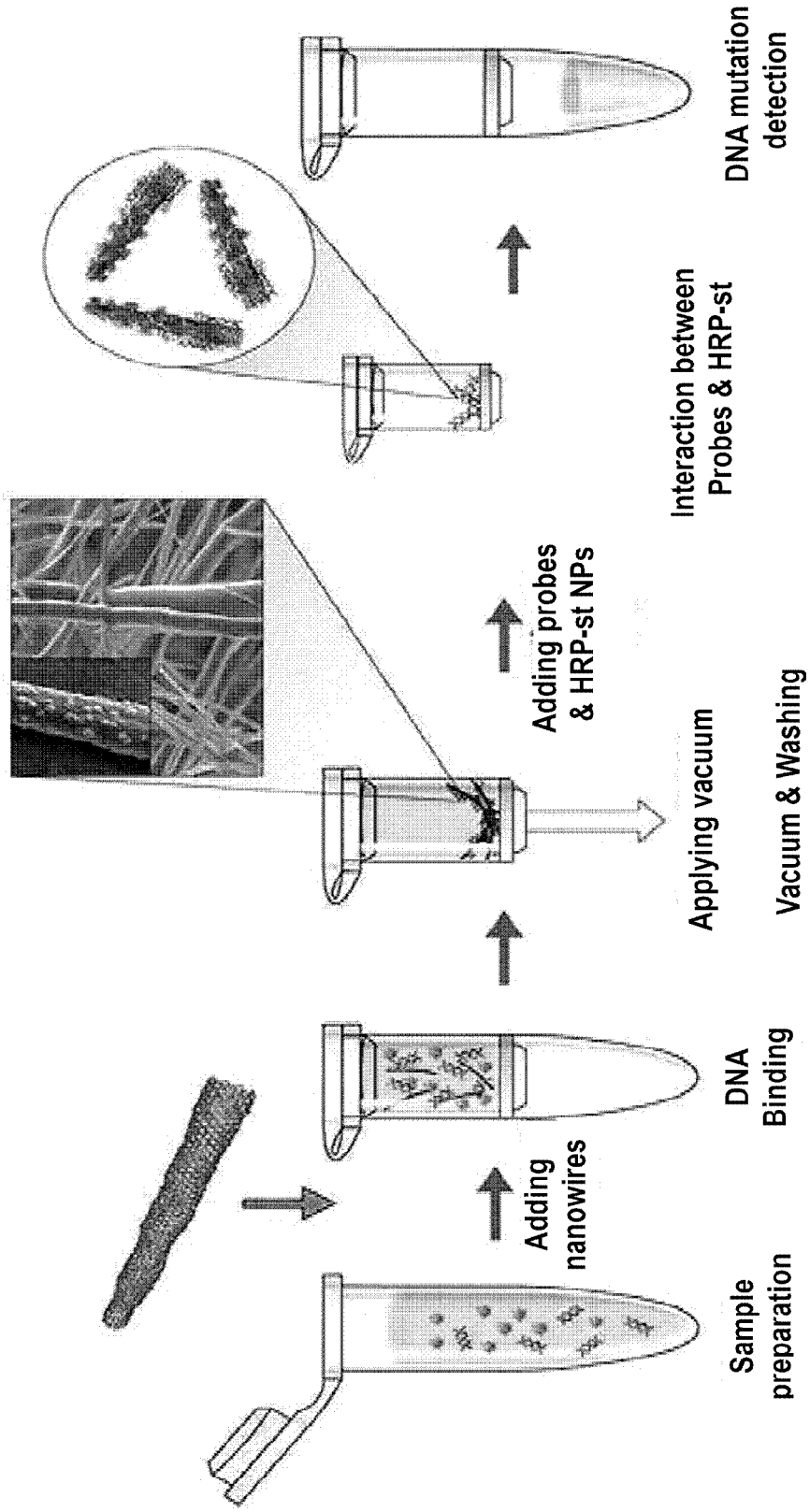
Results	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.02	0.03	0.01	0.013	0.023	0.021	0.053	0.02
Int.	1.72	1.33	2.00	0.67	0.87	1.53	1.40	3.53	1.33



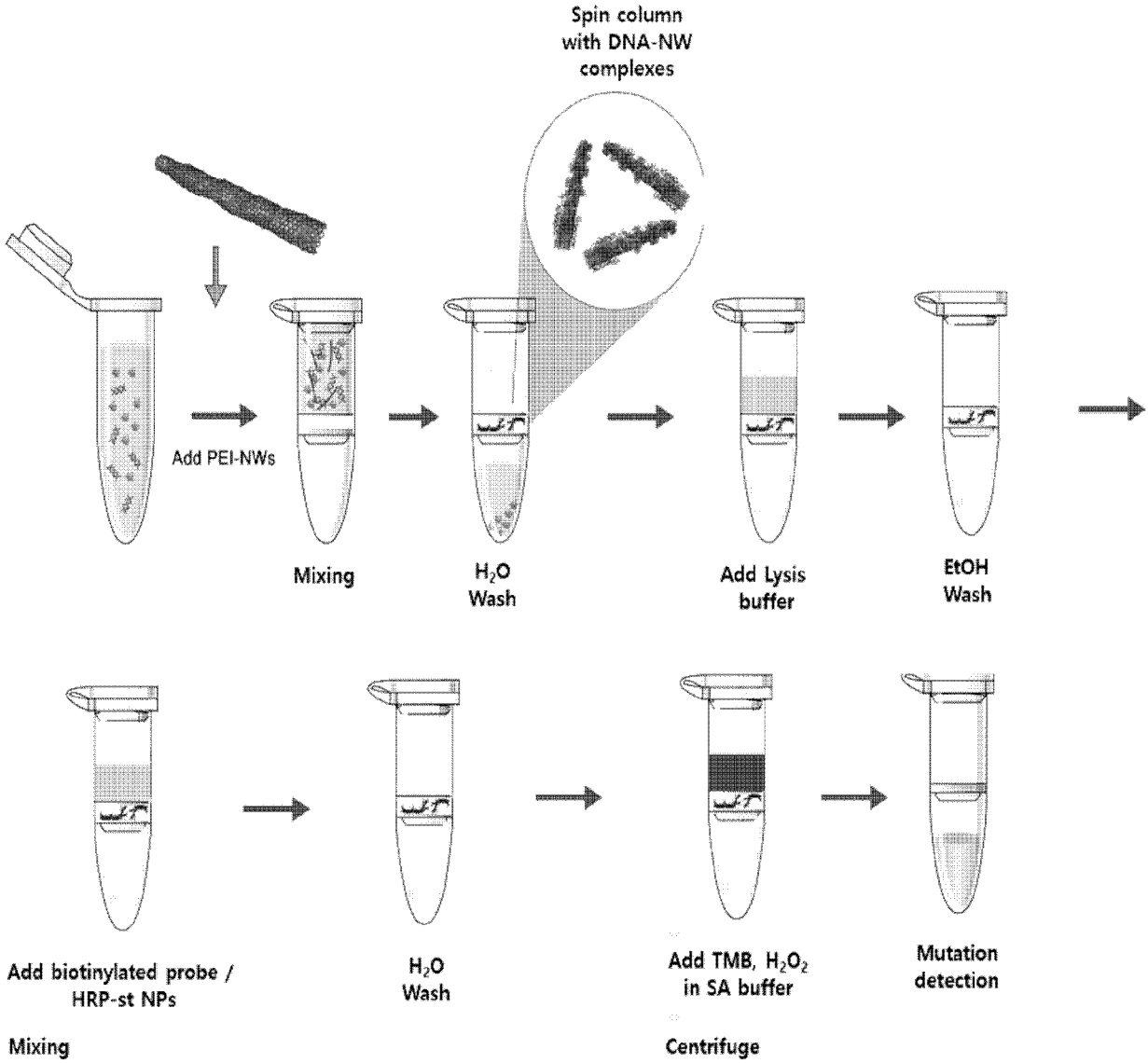
[도84a]


cfDNA isolation from body fluids
DNA Hybridization
Colorimetric detection
Plasma
PEI-NWs
DNA-NW complex
Wildtype DNA
Mutant DNA
TMB
oxTMB
Biotinylated probe
HRP-st nanoparticles
Absorbance
- Isolation of DNA using PEI- NWs, by inducing DNA-NW complex formation
- Hybridization of probe to its complementary DNA target by finely adjusting denaturation temperature and time
- Addition of HRP-st NPs to the biotinylated probe
- Colorimetric detection of the mutant DNA
Total 60 minutes

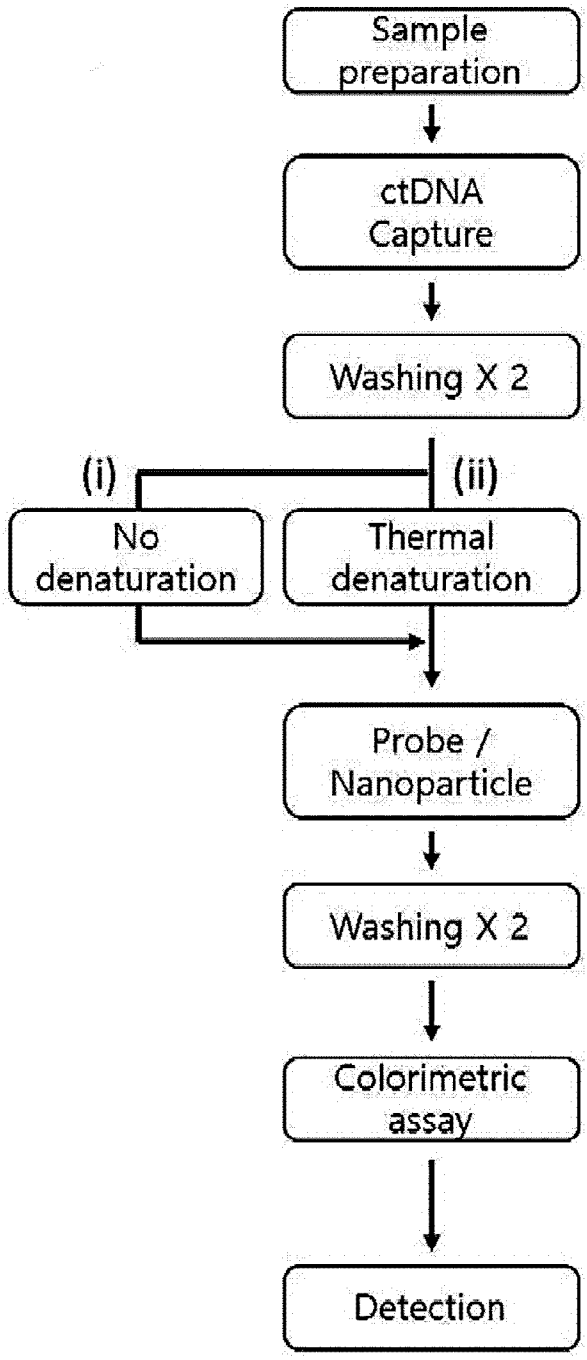
[도84b]


Sample preparation
Adding nanowires
DNA Binding
Vacuum & Washing
Applying vacuum
Adding probes & HRP-st NPs
Interaction between Probes & HRP-st
DNA mutation detection

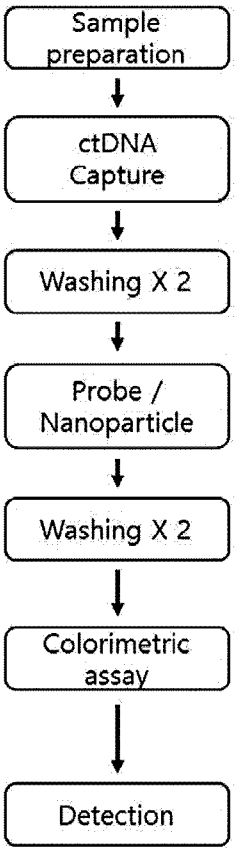
[도84c]


Spin column with DNA-NW complexes
Add PEI-NWs
Mixing
H_2O Wash
Add Lysis buffer
EtOH Wash
Add biotinylated probe / HRP-st NPs
Mixing
H_2O Wash
Add TMB, H_2O_2 in SA buffer
Centrifuge
Mutation detection

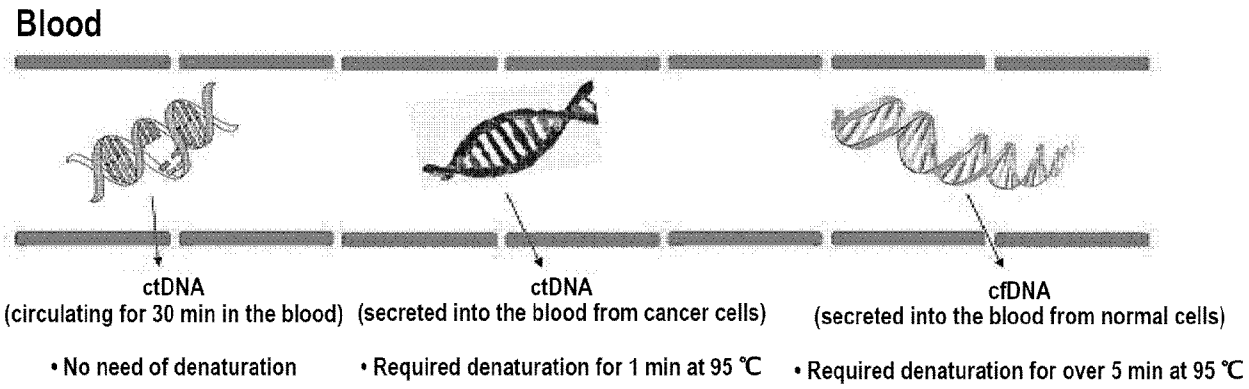
[도84d]


Sample preparation
ctDNA Capture
Washing X 2
(i)
(ii)
No denaturation
Thermal denaturation
Probe / Nanoparticle
Washing X 2
Colorimetric assay
Detection

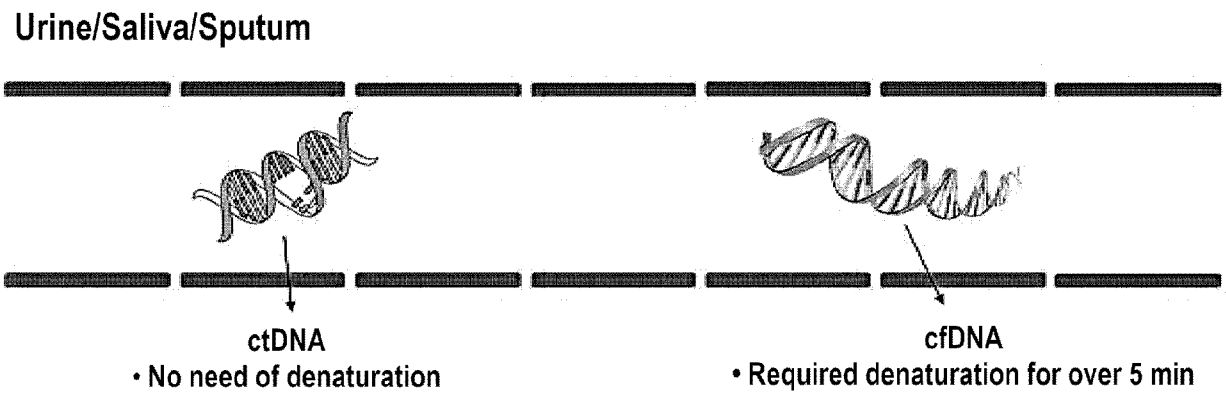
[도84e]



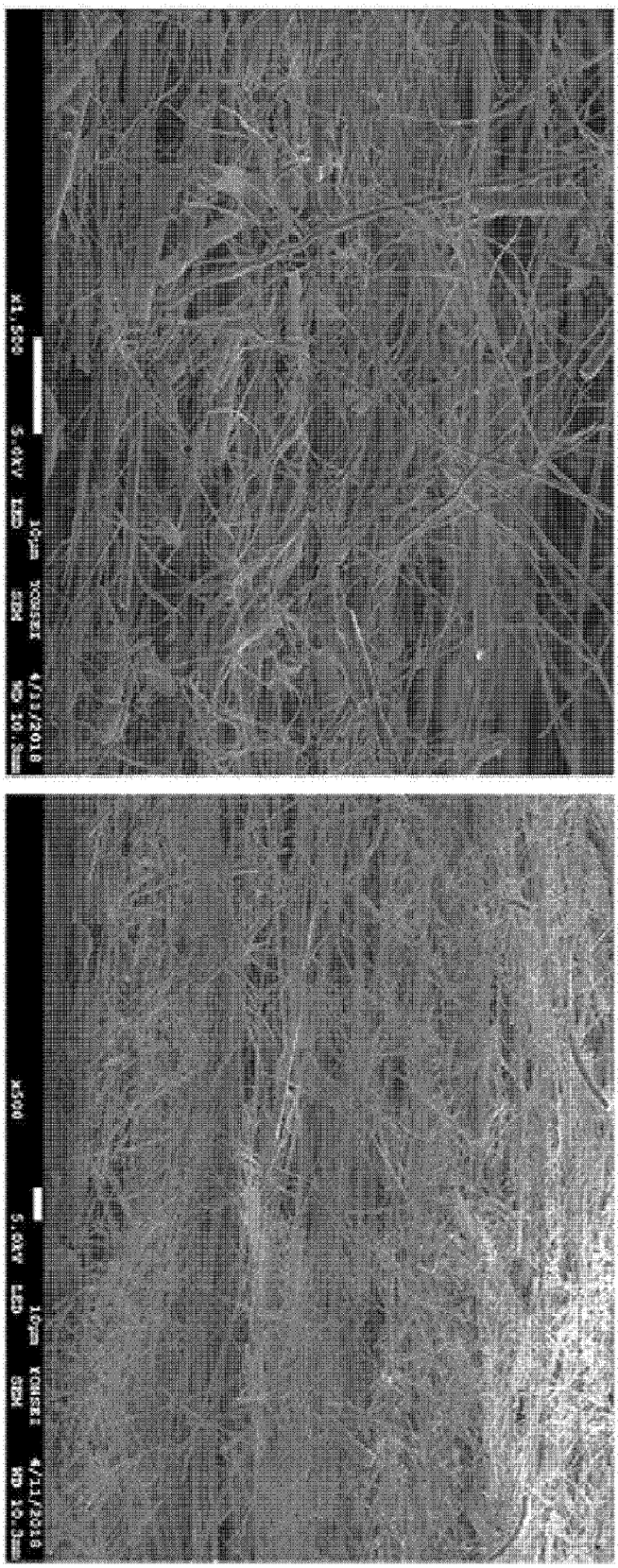
[도84f]



[도84g]



[도85]



[도86]

Amount of used plasma (Total 7 μL) Tissue NGS : PIK3CA (2019/01/29)

Venous blood from a lung cancer patient – collected by needle

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK Fusion	ALK Point Mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	OGT	PIK3CA	HER2	PC	NC
500	0.038	0.039	0.048	0.045	0.042	0.039	0.039	0.04	0.04	0.039	0.048	0.04	0.04	0.051	0.039	0.037	0.038	0.039	0.039	0.038	0.045	0.038	0.046	0.04
650	0.04	0.039	0.045	0.043	0.042	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.083	0.039	0.038	0.048	0.038	0.035	0.038	0.039	0.04	0.036	0.075	0.039	0.062	0.04
OD	0.002	0	-0.003	-0.002	0	0	0	-0.001	-0.001	0	0.035	-0.001	-0.002	-0.003	-0.001	-0.002	0	0	0.001	-0.002	0.03	0.001	0.016	0
N-Score	0.13	0.00	-0.19	-0.13	0.00	0.00	0.00	-0.06	-0.06	0.00	2.19	-0.06	-0.13	-0.19	-0.06	-0.13	0.00	0.00	0.06	-0.13	1.88	0.06	1.00	

[도87]

Capillary blood from a lung cancer patient – collected by lancet

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK Fusion	ALK Point Mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	OGT	PIK3CA	HER2	PC	NC
500	0.04	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.045	0.038	0.04	0.04	0.04	0.039	0.039	0.04	0.039	0.039	0.046	0.039	0.042	0.039
650	0.039	0.038	0.04	0.038	0.04	0.038	0.039	0.037	0.038	0.038	0.062	0.039	0.038	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.037	0.037	0.07	0.038	0.047	0.038
OD	-0.001	-0.002	0	-0.001	0.001	-0.001	0	-0.002	0	-0.001	0.017	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.001	0	-0.001	-0.002	-0.002	0.024	-0.001	0.005	-0.001
N-Score	-0.06	-0.13	0.00	-0.06	0.06	-0.06	0.00	-0.13	0.00	-0.06	1.06	0.06	-0.13	-0.06	-0.13	0.06	0.00	-0.06	-0.13	-0.13	1.50	-0.06		

[도88]

Venous blood from a normal subject – collected by needle

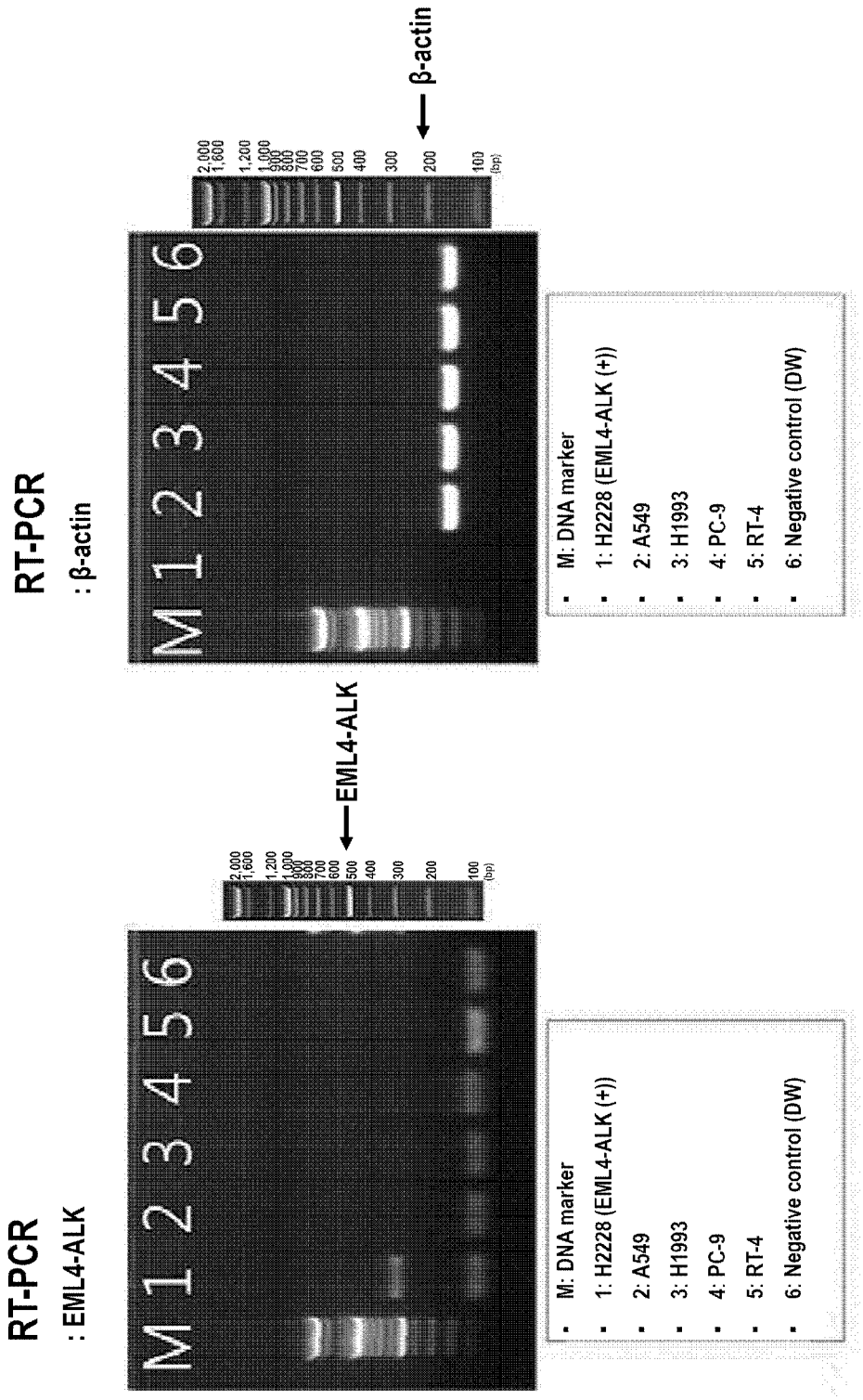
Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.042	0.043	0.047	0.042	0.046	0.048	0.048	0.044	0.043	0.043	0.044	0.043	0.042	0.042	0.044	0.043	0.042	0.045	0.043	0.044	0.042	0.042	0.047	0.043
650	0.043	0.043	0.048	0.042	0.044	0.046	0.047	0.047	0.044	0.043	0.042	0.043	0.039	0.044	0.045	0.042	0.042	0.051	0.043	0.043	0.041	0.042	0.059	0.043
O.D	0.001	0	0.001	0.000	-0.002	-0.002	-0.001	0.003	0.001	0	-0.002	0	-0.003	0.002	0.001	-0.001	0	0.006	0	-0.001	-0.001	0	0.012	0
N-Score	0.10	0.00	0.10	0.00	-0.20	-0.20	-0.10	0.30	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	0.20	0.10	-0.10	0.00	0.60	0.00	-0.10	-0.10	0.00	1.20	0.00

[도89]

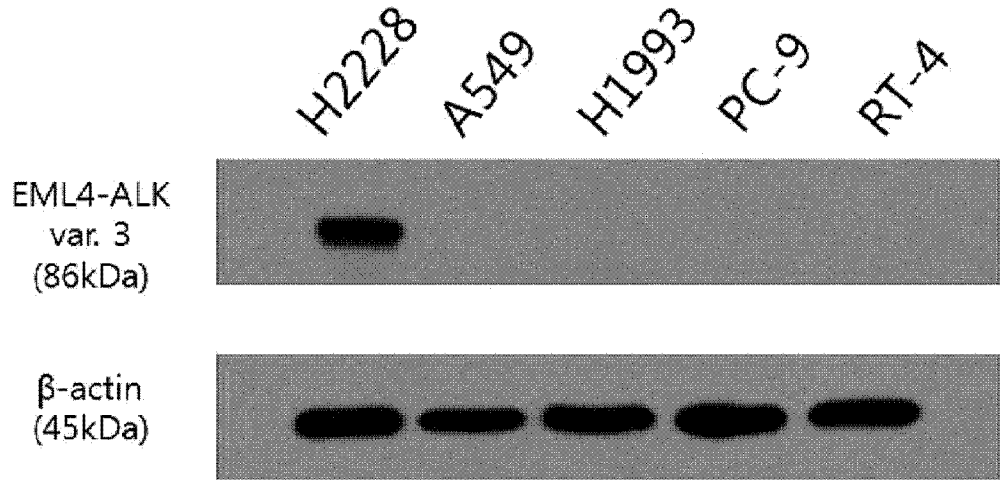
Capillary blood from a normal subject – collected by lancet

Wavelength	G719X	Exon 19 del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD_L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.04	0.041	0.05	0.045	0.046	0.044	0.041	0.043	0.041	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.043	0.045	0.042	0.043	0.042	0.044	0.049	0.043
650	0.042	0.041	0.047	0.043	0.047	0.044	0.04	0.041	0.041	0.043	0.039	0.042	0.039	0.043	0.039	0.045	0.041	0.044	0.042	0.042	0.041	0.042	0.07	0.045
OD	0.002	0	-0.003	-0.002	0.001	0	-0.001	-0.002	0	0	-0.003	0	-0.002	0.001	-0.002	0.003	-0.002	-0.001	0	-0.001	-0.001	-0.002	0.021	0.002
N-Score	0.20	0.00	-0.30	-0.20	0.10	0.00	-0.10	-0.20	0.00	0.00	-0.30	0.00	-0.20	0.10	-0.20	0.30	-0.20	-0.10	0.00	-0.10	-0.10	-0.20	2.10	0.20

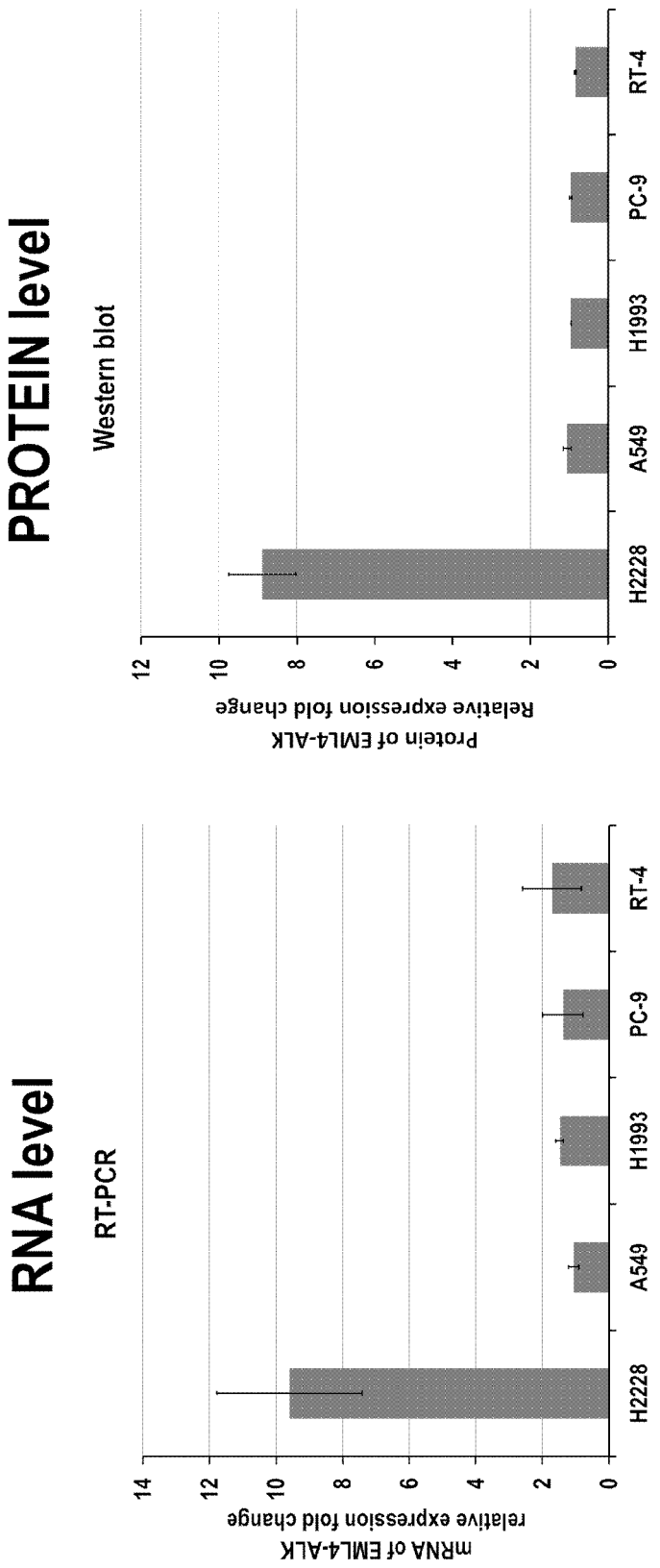
[도90]


RT-PCR
: EML4-ALK
M 1 2 3 4 5 6
2,000
1,600
1,200
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
(bp)
EML4-ALK
RT-PCR
: β-actin
M 1 2 3 4 5 6
β-actin
M: DNA marker
1: H2228 (EML4-ALK (+))
2: A549
3: H1993
4: PC-9
5: RT-4
6: Negative control (DW)

[도91]



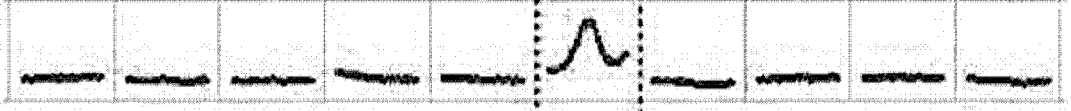
[도92]


PROTEIN level
Western blot
Protein of EML4-ALK
Relative expression fold change
0
2
4
6
8
10
12
H2228
A549
H1993
PC-9
RT-4
RNA level
RT-PCR
mRNA of EML4-ALK
relative expression fold change
0
2
4
6
8
10
12
14
H2228
A549
H1993
PC-9
RT-4

[도93]

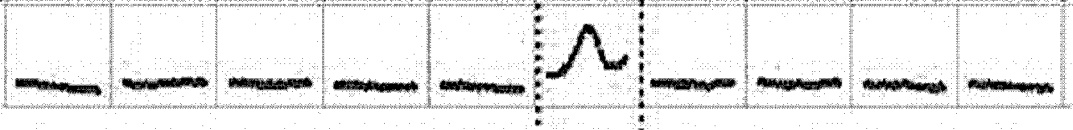
EML4-ALK var.1 probe EML4-ALK var.3 probe

Wavelength	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.042	0.042	0.041	0.048	0.043	0.05	0.041	0.042	0.043	0.042
650	0.044	0.042	0.043	0.042	0.042	0.087	0.04	0.044	0.045	0.042
	0.002	0	0.002	-0.006	-0.001	0.037	-0.001	0.002	0.002	0
	0.20	0.00	0.20	-0.60	-0.10	3.70	-0.10	0.20	0.20	0.00



EML4-ALK var.1 probe EML4-ALK var.3 probe

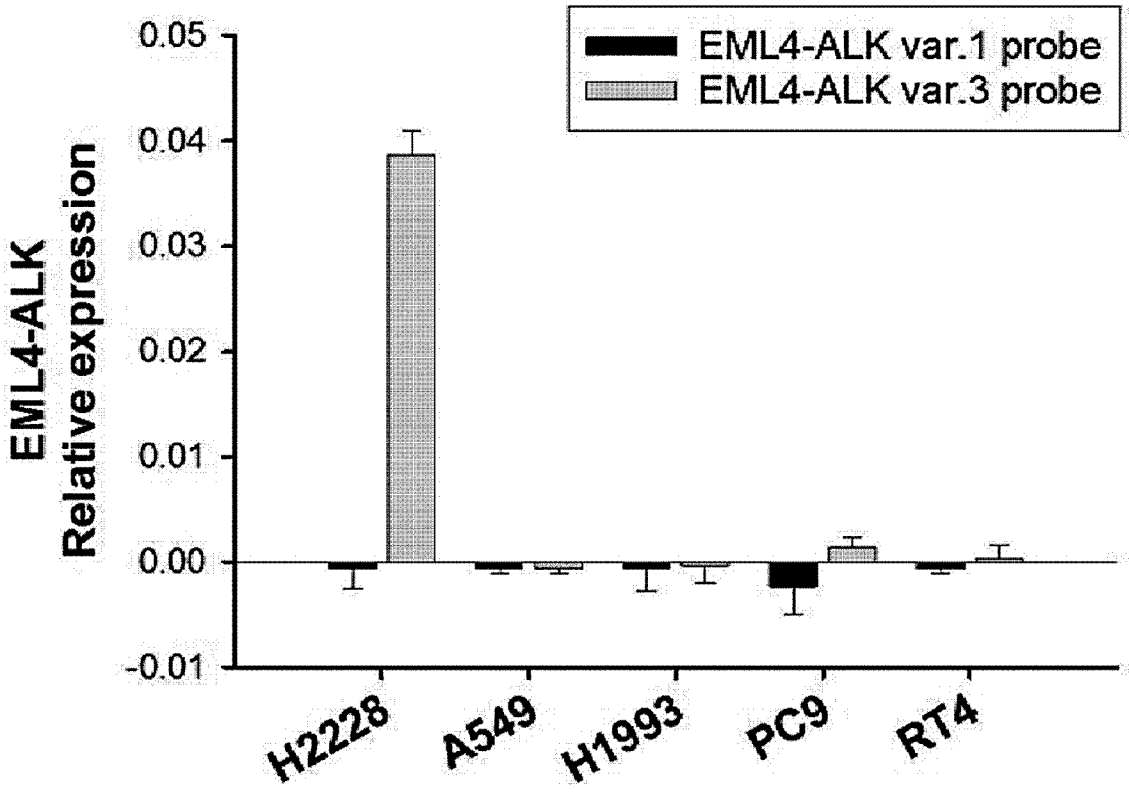
Wavelength	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.043	0.044	0.043	0.041	0.041	0.05	0.043	0.044	0.042	0.042
650	0.041	0.043	0.042	0.041	0.041	0.087	0.043	0.042	0.042	0.041
	-0.002	-0.001	-0.001	0	0	0.037	0	-0.002	0	-0.001
	-0.20	-0.10	-0.10	0.00	0.00	3.70	0.00	-0.20	0.00	-0.10



EML4-ALK var.1 probe EML4-ALK var.3 probe

Wavelength	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.04	0.043	0.041	0.04	0.04	0.052	0.043	0.045	0.041	0.042
650	0.038	0.042	0.038	0.039	0.039	0.094	0.042	0.044	0.043	0.044
	-0.002	-0.001	-0.003	-0.001	-0.001	0.042	-0.001	-0.001	0.002	0.002
	-0.20	-0.10	-0.30	-0.10	-0.10	4.20	-0.10	-0.10	0.20	0.20

[도94]


EML4-ALK var.1 probe
EML4-ALK var.3 probe
EML4-ALK
Relative expression
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
H2228
A549
H1993
PC9
RT4

[도95]

2019-08-16 0208-665(LC#5, Blood, Effusion), recurrent patient

Tissue : Wild Type / ALK fusion (FISH) /
small-cell-lung cancer (SCLC) (diagnosed with Korea Cancer Center Hospital) / prescribed with Crizotinib but no therapeutic effect
(if there was EML4-ALK fusion variant, no response to Crizotinib which is an ALK inhibitor was found)

SCLC markers

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.04	0.046	0.04	0.045	0.041	0.039	0.048	0.04	0.043	0.044	0.045	0.042	0.042	0.038
650	0.039	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.039	0.04	0.041	0.038	0.039	0.066	0.04	0.043	0.044	0.041	0.081	0.038	0.054	0.046	0.062	0.052	0.052	0.04
OD	0	0.001	0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	-0.001	0.020	0.000	-0.002	0.003	0.002	0.033	-0.002	0.011	0.002	0.017	0.01	0.01	0.002
N-Score (O.D/0.01)	0.00	0.10	0.10	0.20	-0.10	0.10	0.10	0.10	0.30	0.00	-0.10	2.00	0.00	-0.20	0.30	0.20	3.30	-0.20	1.10	0.20	1.70	1.00	1.00	0.20

[도96]

2019-05-13 0208-394(LC#1, Blood, Urine, Saliva, Sputum), recurrent patient

Tissue : Not detected (PANAGENE) / ALK fusion positive (FISH)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	PC
500	0.041	0.044	0.044	0.044	0.043	0.041	0.042	0.041	0.053	0.044	0.043	0.051
650	0.043	0.047	0.043	0.044	0.051	0.047	0.048	0.04	0.111	0.047	0.048	0.089
O.D	0.002	0.003	-0.001	0	0.008	0.006	0.006	-0.001	0.058	0.003	0.005	0.038
N-score (O.D/0.01)	0.20	0.30	-0.10	0.00	0.80	0.60	0.60	-0.10	5.80	0.30	0.50	3.80

[도97]

0208-573(33354151, 20190228 LC#2, Blood), new patient

Tissue : Not done / Wildtype / Fusion variant (ALK/EML4) (NGS)

#1

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.041	0.041	0.043	0.043	0.04	0.042	0.043	0.042	0.045	0.041	0.04	0.041	0.041	0.041	0.043	0.041	0.041	0.044	0.041	0.047	0.044
650	0.043	0.044	0.045	0.04	0.042	0.045	0.042	0.042	0.041	0.041	0.045	0.062	0.042	0.041	0.039	0.042	0.042	0.043	0.042	0.041	0.046	0.042	0.071	0.048
OD	0.002	0.002	0.004	-0.001	0.001	0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.002	0.003	0.017	0.001	0.001	-0.002	0.001	0.001	0	0.001	0	0.002	0.001	0.024	0.004
N-Score (/0.01)	0.20	0.20	0.40	-0.10	0.10	0.20	-0.10	0.20	-0.10	-0.20	0.30	1.70	0.10	0.10	-0.20	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.20	0.10	2.40	0.40

#2

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.044	0.046	0.043	0.043	0.044	0.042	0.042	0.042	0.042	0.044	0.041	0.042	0.044	0.041
650	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.045	0.042	0.044	0.064	0.04	0.044	0.042	0.041	0.044	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.061	0.044
OD	0.002	0	0.001	0.001	0	0.002	0.001	0.002	0.004	0	0	0.018	-0.003	0.001	-0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.001	-0.002	0.001	0.001	0.017	0.003
N-Score	0.20	0.00	0.10	0.10	0.00	0.20	0.10	0.20	0.40	0.00	0.00	1.80	-0.30	0.10	-0.20	-0.10	0.20	-0.10	-0.10	-0.20	0.10	0.10	1.70	0.30

[도98]

0208-450(3338237, 181031 LC#5, Effusion), recurrent patient

Tissue : Wildtype (Panagene); ALK FISH positive, BRAF mutation (c.1799T>A, p.V600E),TP53 mutation (c.159G>A, p.W53*) (NGS)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	TP53	PC	NC
500	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.037	0.042	0.041	0.038	0.039	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.043	0.039	0.042	0.04	0.039
650	0.043	0.04	0.042	0.04	0.044	0.041	0.04	0.04	0.041	0.04	0.045	0.056	0.042	0.04	0.039	0.048	0.039	0.043	0.041	0.061	0.041	0.06	0.059	0.043
OD	0.004	0.002	0.003	0.001	0.004	0.003	0.002	0.001	0.003	0.003	0.003	0.015	0.004	0.001	0.001	0.008	0.001	0.004	0.002	0.018	0.002	0.018	0.019	0.004
N-Score (/0.01)	0.40	0.20	0.30	0.10	0.40	0.30	0.20	0.10	0.30	0.30	0.30	1.50	0.40	0.10	0.10	0.80	0.10	0.40	0.20	1.80	0.20	1.80	1.90	0.40

[도99]

0208-394 (20180628_LC#2 Blood)

Tissue: not detected / Fusion variant (ALK/EML4) (NGS)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	NC
500	0.039	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.039	0.043	0.039	0.04	0.04
650	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.04	0.039	0.04	0.066	0.043	0.044	0.044
OD	0.004	0.003	0.001	0.002	0.003	0.001	0	0.001	0.023	0.004	0.004	0.004
N-Score (/0.01)	0.40	0.30	0.10	0.20	0.30	0.10	0.00	0.10	2.30	0.40	0.40	0.40

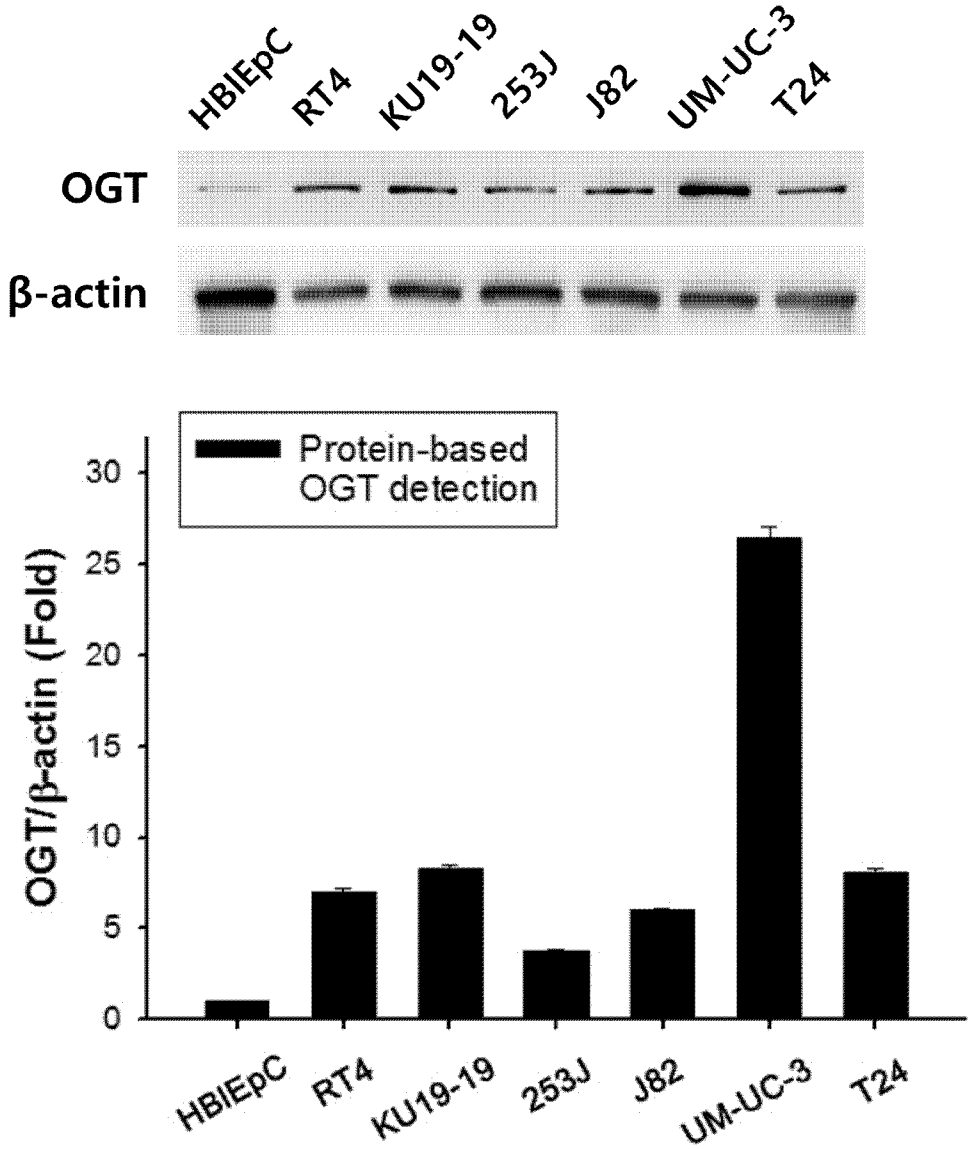
[도100]

0208-352 (20180427_LC#1 Blood)

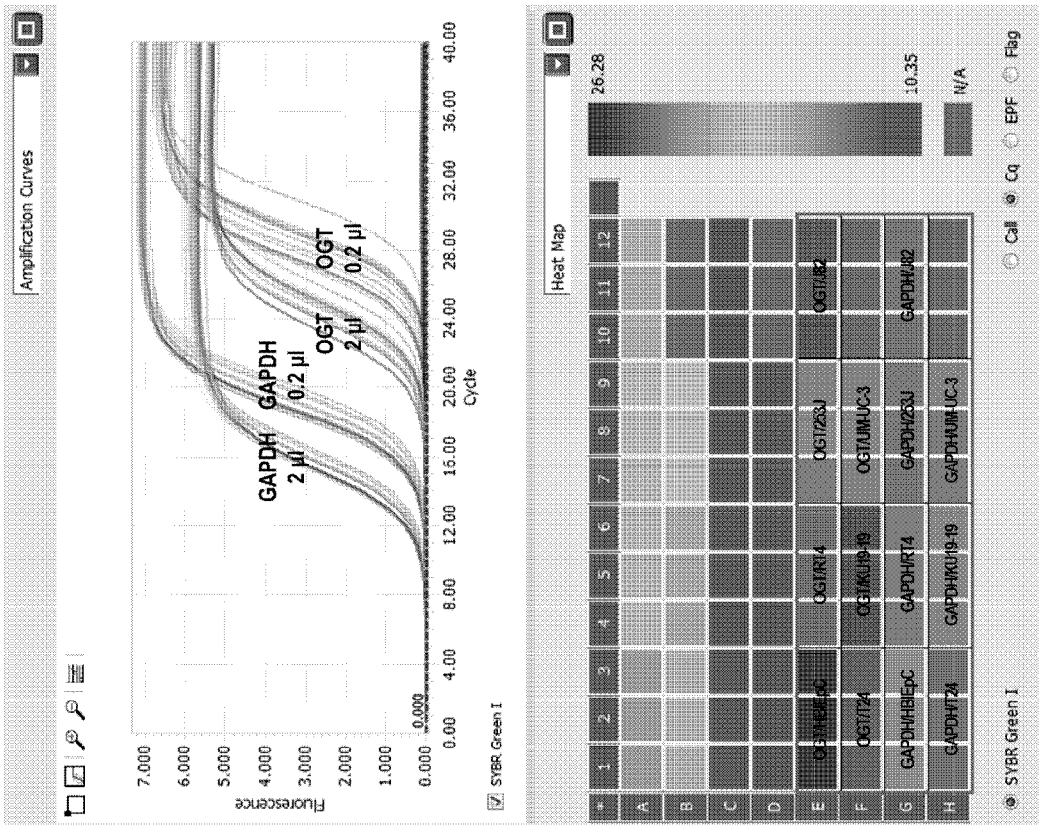
Tissue: not detected / ceritinib, alectinib PD status at blood collection time

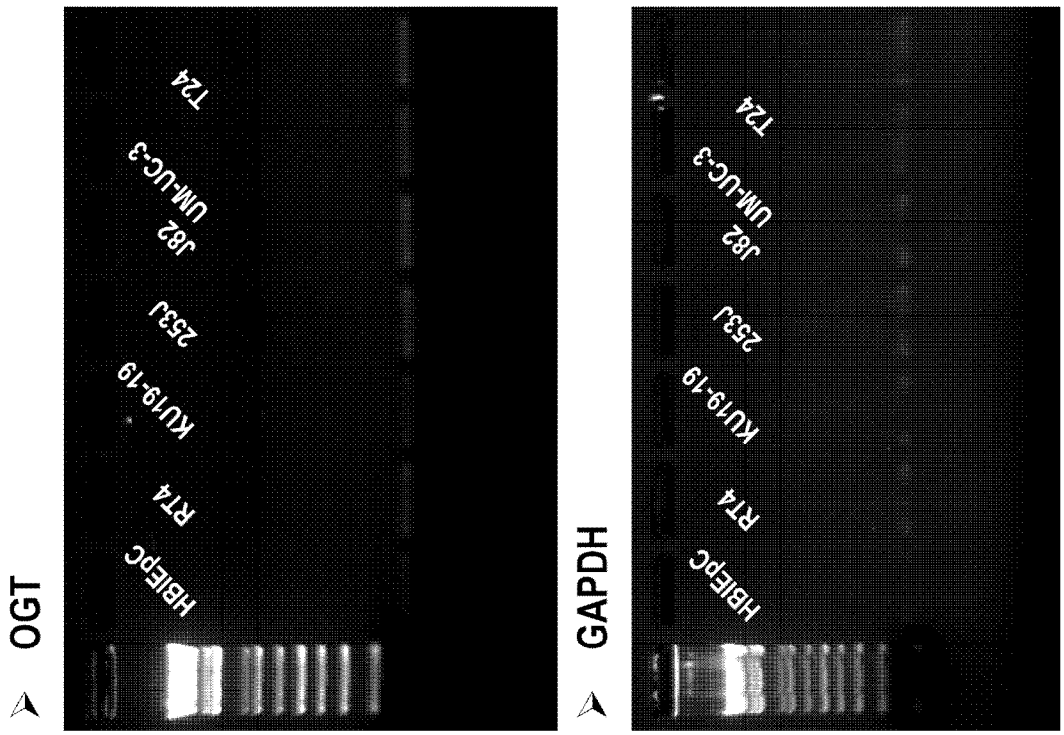
Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S7681	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK fusion var.1	EML4-ALK fusion var.3	ALK mutation	PC
500	0.04	0.041	0.043	0.042	0.042	0.042	0.044	0.043	0.05	0.042	0.043	0.046
650	0.038	0.043	0.043	0.04	0.041	0.042	0.042	0.042	0.092	0.045	0.044	0.07
OD	-0.002	0.002	0	-0.002	-0.001	0	-0.002	-0.001	0.042	0.003	0.001	0.024
N-Score (0.01)	-0.20	0.20	0.00	-0.20	-0.10	0.00	-0.20	-0.10	4.20	0.30	0.10	2.40

[도101]

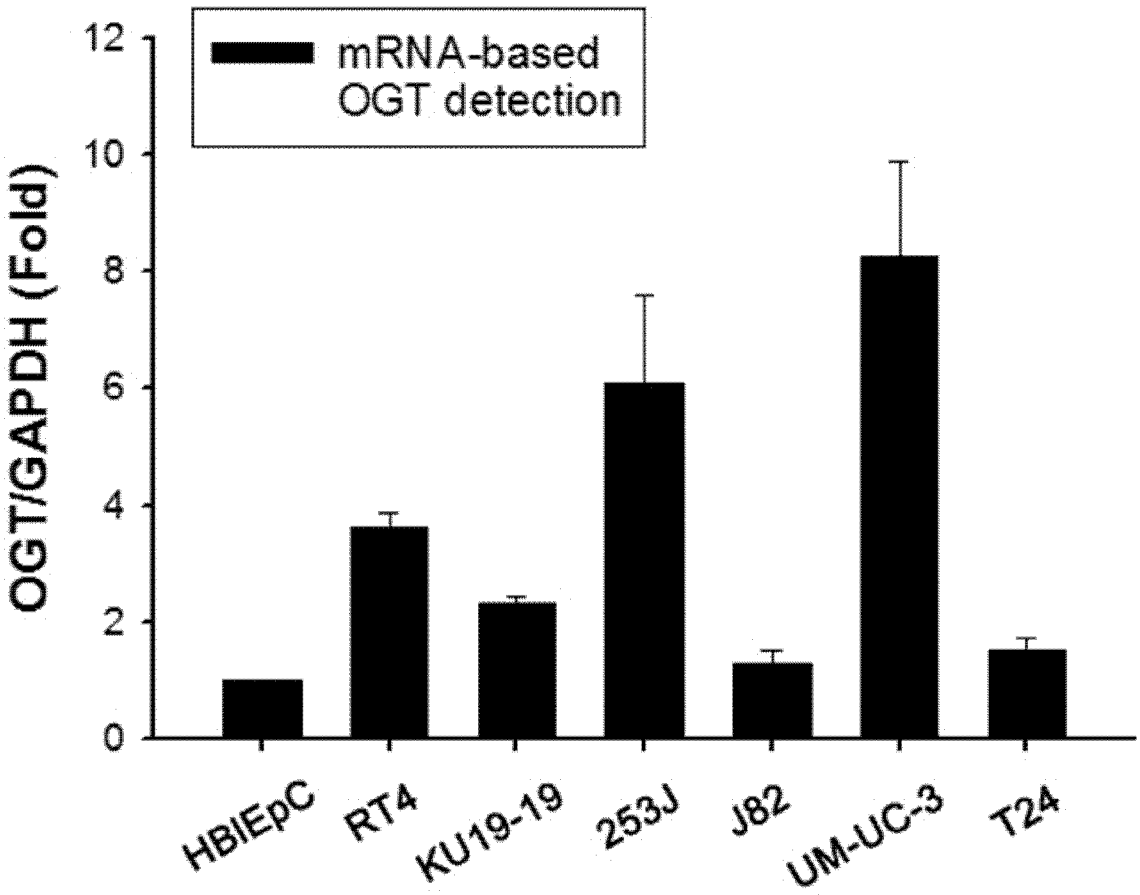

HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
OGT
β-actin
Protein-based
OGT detection
OGT/β-actin (Fold)
30
25
20
15
10
5
0
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

[도102]

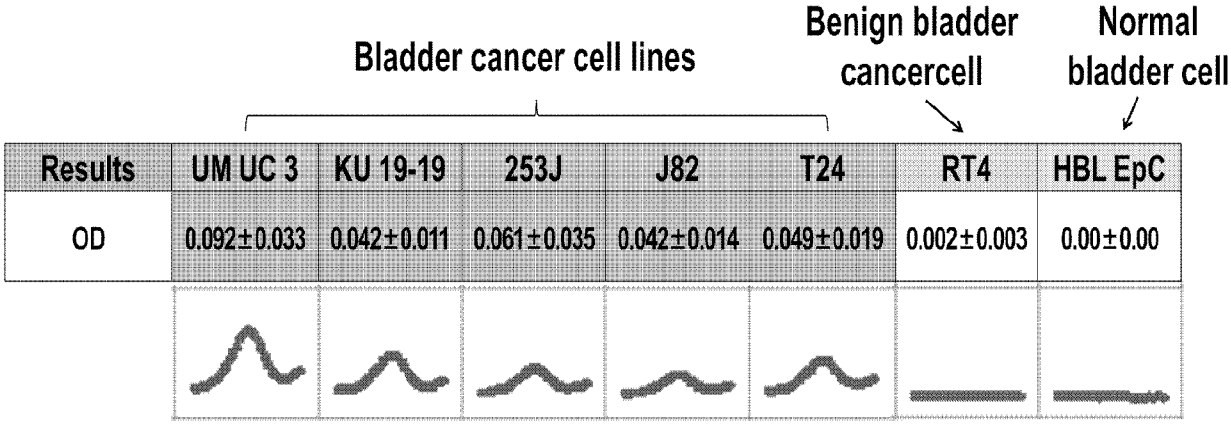

Amplification Curves
Fluorescence
Cycle
GAPDH 2 µl
GAPDH 0.2 µl
OGT 2 µl
OGT 0.2 µl
SYBR Green I
Heat Map
26.28
10.35
N/A
SYBR Green I
Call
Cq
EPF
Flag


OGT
HBIEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
GAPDH
HBIEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

[도103]

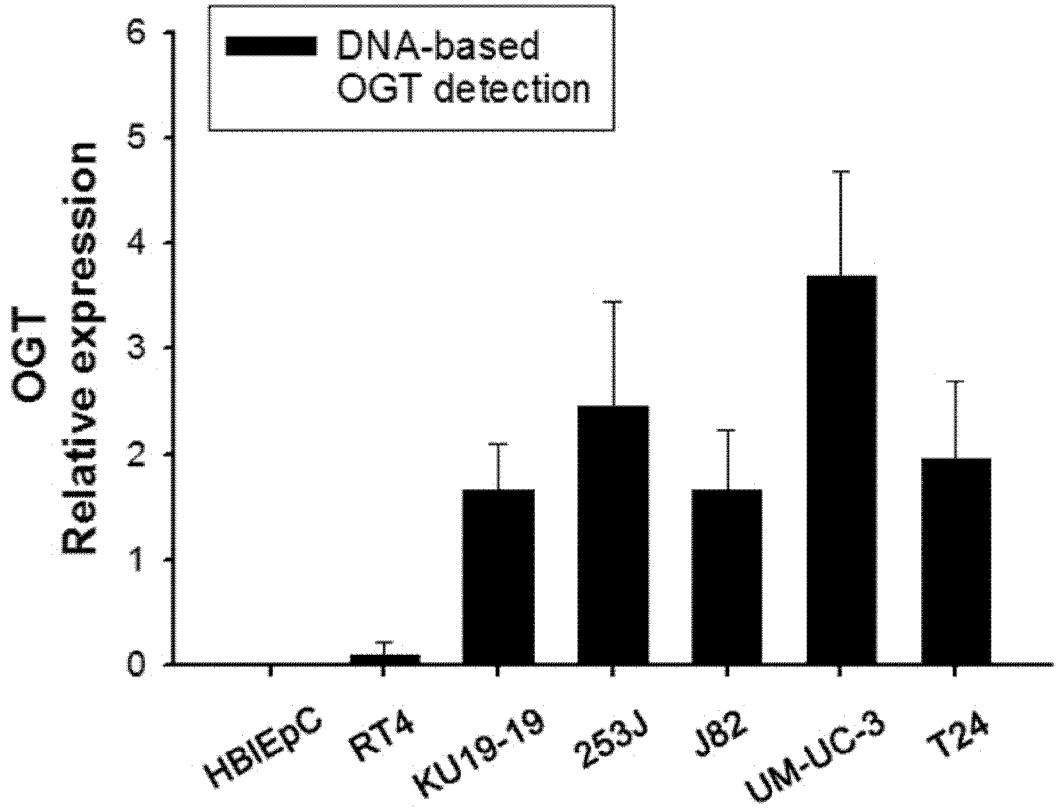


[도104]

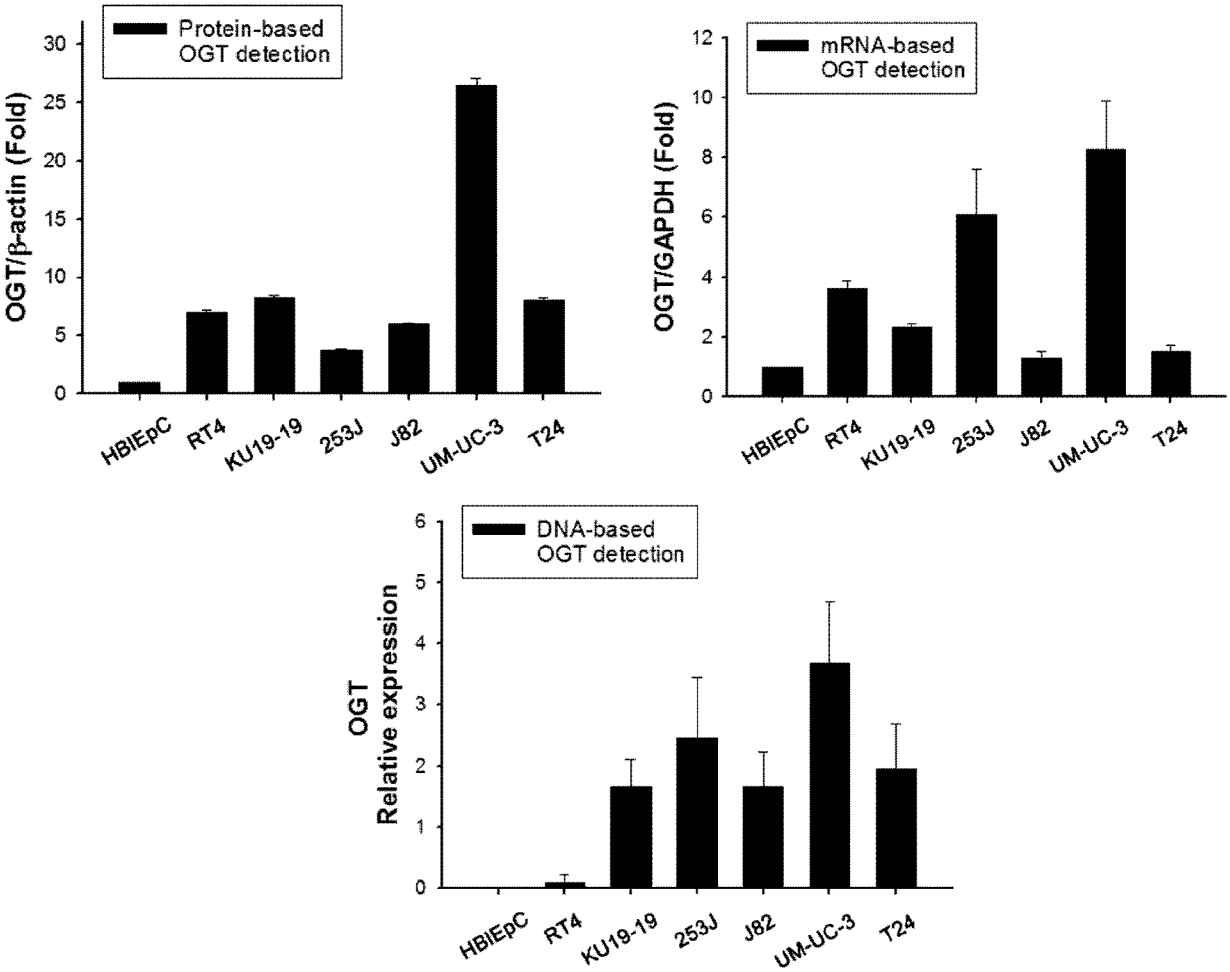


Results	UM UC 3	KU 19-19	253J	J82	T24	RT4	HBL EpC
OD	0.092±0.033	0.042±0.011	0.061±0.035	0.042±0.014	0.049±0.019	0.002±0.003	0.00±0.00

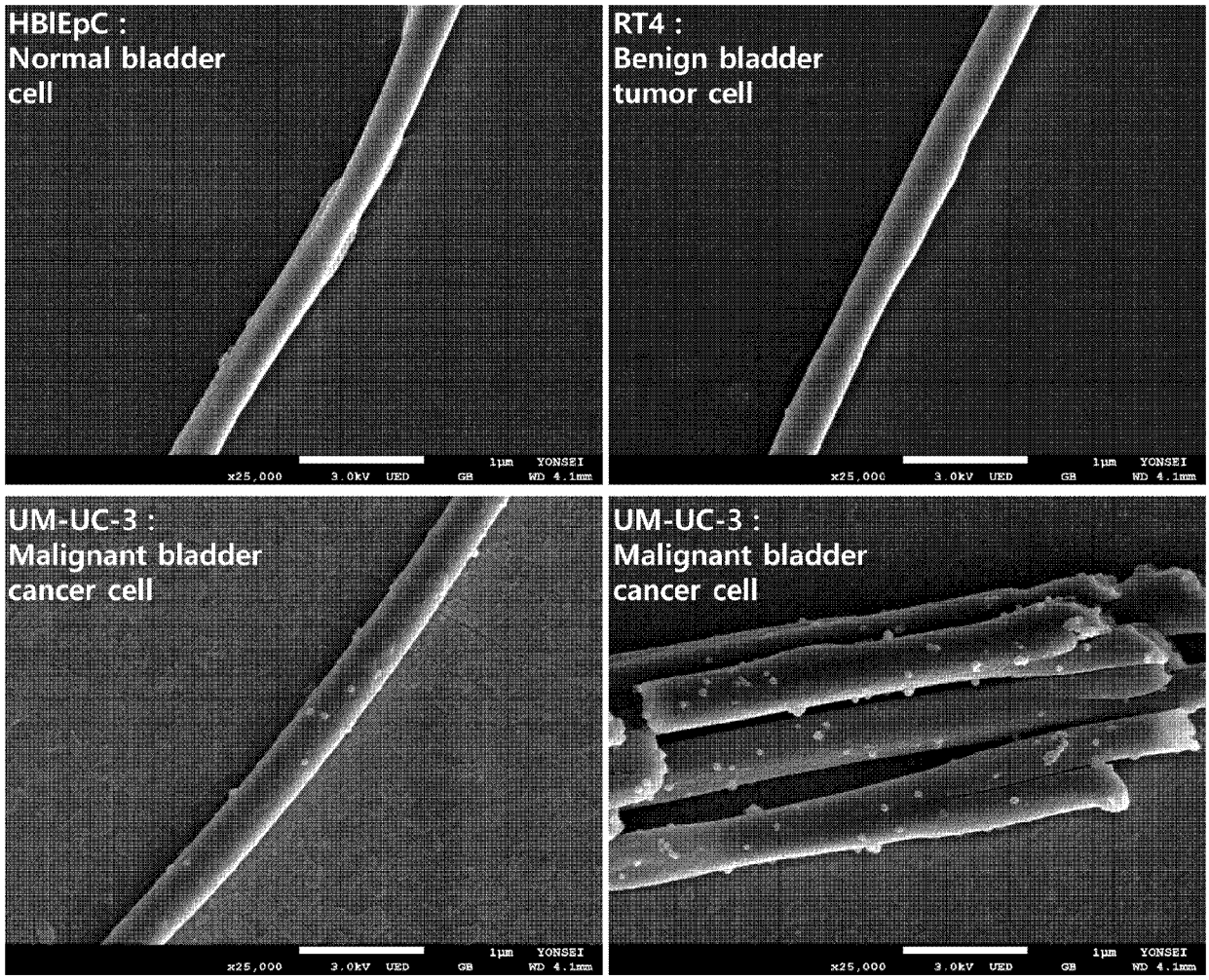
[도105]


DNA-based
OGT detection
OGT
Relative expression
0
1
2
3
4
5
6
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

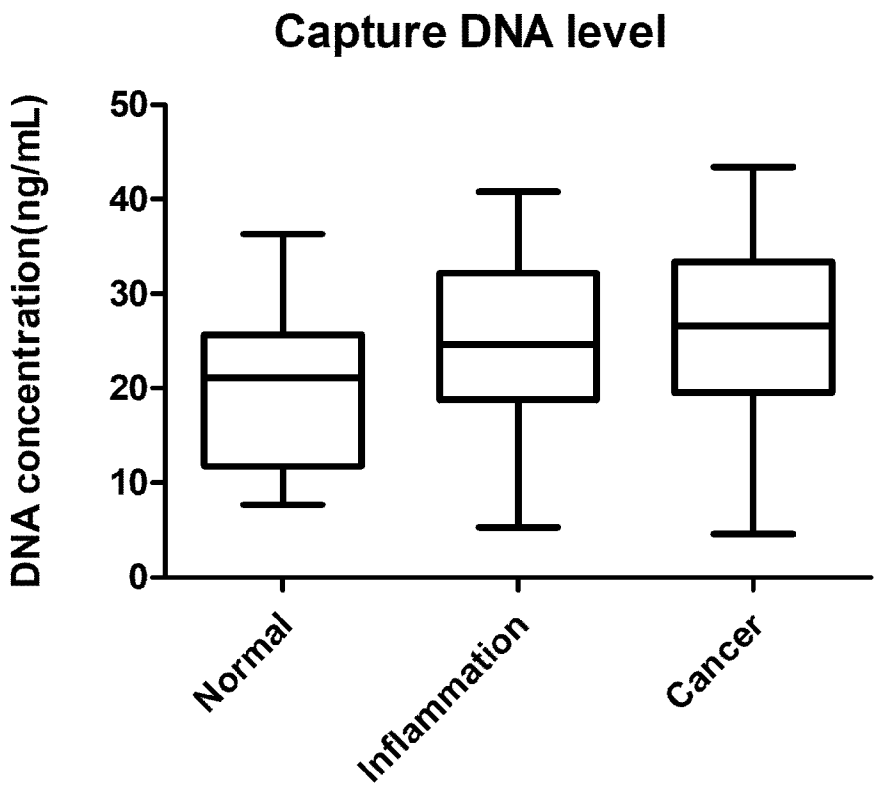
[도106]


Protein-based
OGT detection
OGT/β-actin (Fold)
0
5
10
15
20
25
30
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
mRNA-based
OGT detection
OGT/GAPDH (Fold)
0
2
4
6
8
10
12
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
DNA-based
OGT detection
OGT
Relative expression
0
1
2
3
4
5
6
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

[도107]

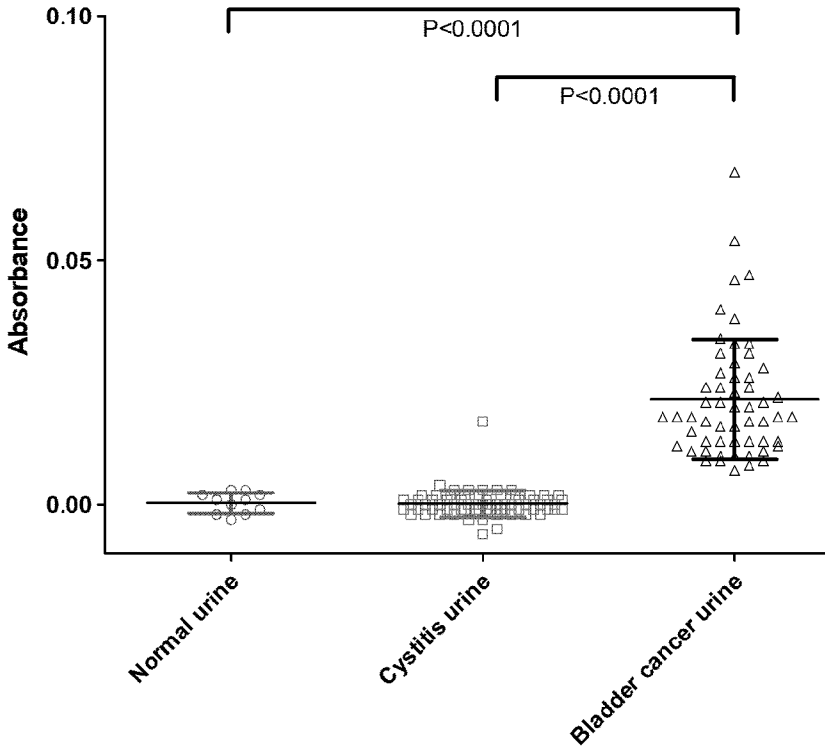

HBlEpC :
Normal bladder
cell
RT4 :
Benign bladder
tumor cell
UM-UC-3 :
Malignant bladder
cancer cell
UM-UC-3 :
Malignant bladder
cancer cell
x25,000 3.0kV UED 1μm YONSEI GB WD 4.1mm

[도108]

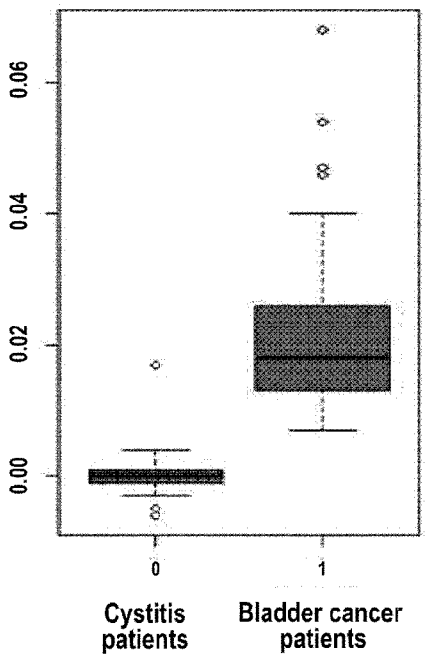


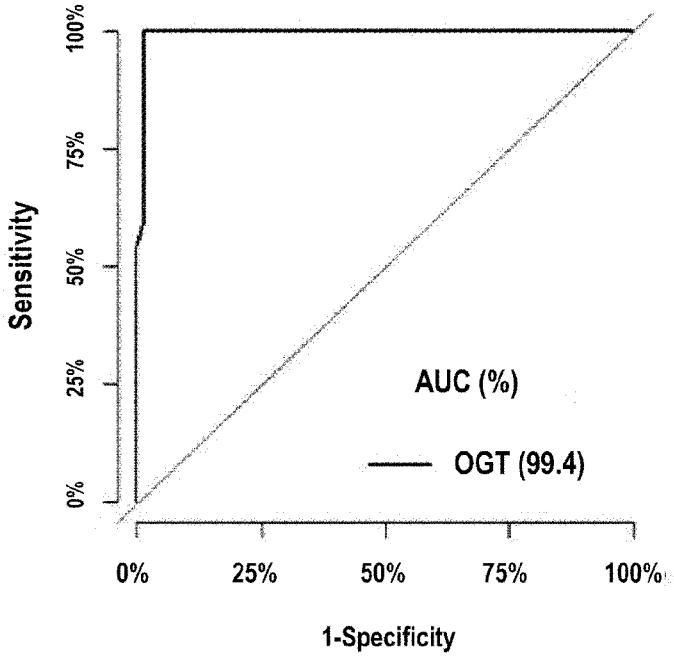
	Normal	Inflammation	Cancer
N	17	78	79

[도109]



[도110]


0.06
0.04
0.02
0.00
0
1
Cystitis patients
Bladder cancer patients


Sensitivity
100%
75%
50%
25%
0%
AUC (%)
OGT (99.4)
0%
25%
50%
75%
100%
1-Specificity

[도111]

OGT-001	OGT-002	OGT-003	OGT-004	OGT-005	OGT-006	OGT-007	OGT-008	OGT-009	OGT-010	OGT-012	OGT-013	OGT-014	OGT-015	OGT-016	OGT-017	OGT-018	OGT-019	OGT-020
bladder cancer	OAB / GHU	bladder cancer	bladder cancer	BPH	bladder cancer	Lt ureter cancer	BPH	renal stone, Rt	voiding problem / mHU / ovarian cancer	renal stone / breast cancer	BPH / prostate cancer	bladder cancer	GHU cervical cancer	GHU cystitis	nocturia cystitis	OAB, BPH / larynx cancer	GHU cystitis	GHU / cervical cancer
				No sample	No sample													

OGT-021	OGT-022	OGT-023	OGT-024	OGT-025	OGT-026	OGT-027	OGT-028	OGT-029	OGT-030	OGT-031	OGT-032	OGT-033	OGT-034	OGT-035	OGT-036	OGT-037	OGT-038	OGT-039	OGT-040
BPH parapelvic cyst, LT GHU	GHU BPO with high bladder neck	bladder cancer	BPH	mHU / breast cancer	GHU / nocturia	cystitis	GHU	bladder cancer / ureter cancer	mHU	GHU / rectal cancer	renal stone mHU	mHU	GHU / breast cancer	GHU / rectal cancer	mHU / gastric cancer	bladder cancer	mHU / renal cyst (max 3 cm sized)	bladder cancer	mHU

OGT-041	OGT-042	OGT-043	OGT-044	OGT-045	OGT-046	OGT-047	OGT-048	OGT-050	OGT-051	OGT-052	OGT-053	OGT-054	OGT-055	OGT-056	OGT-057	OGT-058	OGT-059	OGT-060
GHU / cervical cancer	mHU / BPH	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	GHU / Prostate cancer	BPH	Lt renal cyst BPH	cystitis / malignant neoplasm of liver cell carcinoma	GHU	GHU	mHU	bladder mass	mHU	GHU	GHU	GHU / cervical cancer	bladder cancer	bladder cancer Lt ureter cancer

GHU : gross hematuria
OAB : overactive bladder
BPH : benign prostate hyhperplasia
mHU : microscopic hematuria
Cystitis : bladder inflammation

[도112]

OGT-061	OGT-062	OGT-063	OGT-064	~~OGT-065~~	OGT-066	OGT-067	OGT-068	OGT-069	OGT-070	OGT-071	OGT-072	OGT-073	OGT-074	OGT-075	OGT-076	OGT-077	OGT-078	OGT-079	OGT-080
mHU / colon cancer	bladder cancer	Rt ureter stone, L4 level	bladder cancer	~~Ureter cancer, Lt Bladder Cancer~~	GHU / BPH	mHU / ovarian cancer	bladder cancer / prostate cancer	bladder cancer	GHU	mHU / breast cancer	GHU	mHU / breast cancer	GHU	mHU / breast cancer	mHU / cervical cancer	bladder cancer	GHU / HCC	mHU	BPH
				No sample															

OGT-081	OGT-082	OGT-083	OGT-084	OGT-085	OGT-086	OGT-087	OGT-088	OGT-089	OGT-090	OGT-091	OGT-092	OGT-093	OGT-094	OGT-095	OGT-096	OGT-097	OGT-098	OGT-099	OGT-100
bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	ureter cancer / transitional cell carcinoma (urothelial carcinoma)	GHU / cervical cancer	bladder cancer	mHU	GHU / cervical cancer	GHU / rectal cancer	GHU	GHU / cervical cancer / bladder invasion	GHU	bladder cancer	GHU	bladder cancer	GHU / prostate cancer	mHU	mHU	mHU

OGT-101	OGT-102	OGT-103	OGT-104	OGT-105	OGT-106	OGT-107	OGT-108	OGT-109	OGT-110	OGT-111	OGT-112	OGT-113	OGT-114	OGT-115	OGT-116	OGT-117	OGT-118	OGT-119	OGT-120
GHU, ureter stone	mHU / cystitis	mHU / cervical cancer / Bladder Invasion	MHU	bladder cancer	bladder mass (Leiomyoma)	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	bladder cancer	mHU	mHU	bladder cancer	bladder cancer	GHU / cervical cancer / w/o bladder invasion / RT cystitis mHU	mHU / cystitis / rec	mHU	mHU / cystitis

GHU : gross hematuria
BPH : benign prostatic hyperplasia
mHU : microscopic hematuria
Cystitis : bladder inflammation
HCC: hepatocellular carcinoma

[표113]

OGT-121	OGT-122	OGT-123	OGT-124	OGT-125	OGT-126	OGT-127	OGT-128	OGT-129	OGT-130	OGT-131	OGT-132	OGT-133	OGT-134	OGT-135	OGT-136	OGT-137	OGT-138	OGT-139	OGT-140
GHU	GHU	mHU	GHU	bladder cancer	bladder cancer	GHU	mHU	mHU	mHU	mHU / renal cell carcinoma	bladder cancer	bladder cancer	mHU	bladder cancer	bladder cancer	TCC bladder cancer	bladder cancer	GHU	bladder cancer
			No sample												No sample				No sample

OGT-141	OGT-142	OGT-143	OGT-144	OGT-145	OGT-146	OGT-147	OGT-148	OGT-149	OGT-150	OGT-151	OGT-152	OGT-153	OGT-154	OGT-155	OGT-156	OGT-157	OGT-158	~~OGT-159~~	OGT-160
mHU	mHU	mHU	bladder cancer	GHU / breast cancer	bladder cancer	bladder cancer	mHU	GHU / malignant carcinoid tumor rectum	mHU	bladder cancer	bladder cancer	bladder Cancer	bladder cancer	mHU / breast cancer / no bladder invasion	GHU / neuro-endocrine carcinoma (liver)	Lt renal pelvic tumor	GHU / lung cancer	N.Bladder /-gastric cancer	bladder cancer / lung cancer
		No sample											No sample					No sample	

OGT-161	OGT-162	OGT-163	OGT-164	~~OGT-165~~	OGT-166	OGT-167	OGT-168	OGT-169	OGT-170	OGT-171	OGT-172	OGT-173	OGT-174	OGT-175	OGT-176	OGT-177	OGT-178	OGT-179
GHU	Bladder cancer	cystitis	GHU	~~MHU~~	Bladder cancer	Bladder cancer	MHU / lung cancer	Bladder cancer	Renal stone	mHU /cervical cancer / no bladder invasion / RT cystitis both HUN due to distal ureteral orifice narrowing due to Rtx	cystitis / cervical cancer / no bladder invasion / Rtx cystitis at both lateral wall of bladder	GHU / urethritis	GHU / cervical cancer / SCC with bladder cancer invasion	mHU	mHU, prostatitis	bladder cancer (adeno-carcinoma)	bladder cancer	bladder cancer
				No sample														

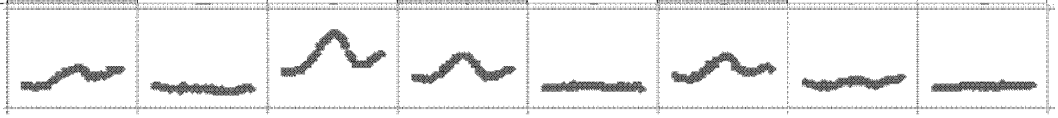
GHU : gross hematuria
mHU : microscopic hematuria
Cystitis : bladder inflammation

[도114]

Thyroid cancer patient #1
Tissue : BRAF V600E positive

TC#1

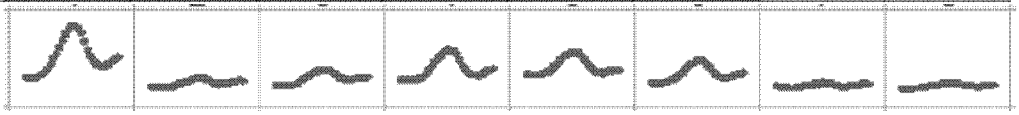
Wavelength	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.043	0.043	0.05	0.048	0.042	0.049	0.045	0.042
650	0.052	0.042	0.07	0.059	0.043	0.058	0.047	0.043
	0.009	-0.001	0.02	0.011	0.001	0.009	0.002	0.001
	0.90	-0.10	2.00	1.10	0.10	0.90	0.20	0.10



[도115]

Thyroid cancer patient #2
Tissue : BRAF V600E positive

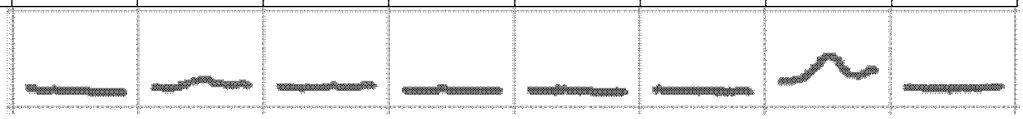
Wavelength	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.055	0.046	0.047	0.052	0.059	0.05	0.046	0.043
650	0.11	0.054	0.064	0.085	0.082	0.073	0.05	0.05
	0.055	0.008	0.017	0.033	0.023	0.023	0.004	0.007
	5.50	0.80	1.70	3.30	2.30	2.30	0.40	0.70



[도116]

Thyroid cancer patient #3
Tissue : BRAF V600E negative

Wavelength	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.043	0.045	0.045	0.042	0.042	0.042	0.05	0.044
650	0.041	0.052	0.045	0.042	0.04	0.04	0.078	0.042
	-0.002	0.007	0	0	-0.002	-0.002	0.028	-0.002
	-0.20	0.70	0.00	0.00	-0.20	-0.20	2.80	-0.20



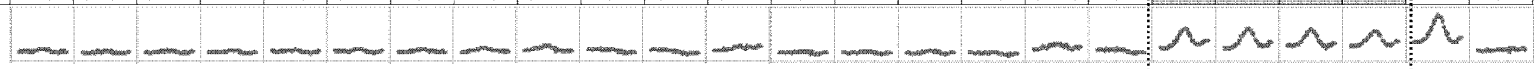
[5117]

0208-668 (LC#4, Effusion)

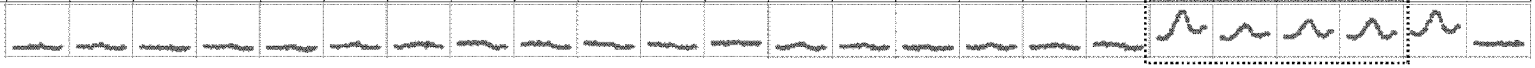
Tissue : SCLC patient
Request : all, SCLC

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Wavelength	G719X	E19del	E20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion	ALK mutation	c-MET	c-MET 14 skipping	PD-L1	KRAS	BRAF	FGFR	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.041	0.04	0.04	0.04	0.042	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043	0.043	0.042	0.04	0.04	0.04	0.04	0.044	0.043	0.045	0.045	0.047	0.046	0.05	0.043
650	0.044	0.042	0.041	0.042	0.043	0.044	0.043	0.044	0.046	0.044	0.042	0.045	0.042	0.042	0.042	0.04	0.049	0.043	0.062	0.063	0.062	0.06	0.077	0.043
O.D	0.003	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.004	0.004	0.001	-0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.000	0.005	0.000	0.017	0.018	0.015	0.014	0.027	0.000



Wavelength	G719X	E19del	E20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion	ALK point mutation	c-MET	c-MET 14 skipping	PD-L1	KRAS	BRAF	FGFR	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.041	0.04	0.041	0.04	0.041	0.041	0.043	0.042	0.044	0.043	0.044	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.043	0.048	0.049	0.05	0.05	0.053	0.044
650	0.04	0.042	0.04	0.041	0.041	0.043	0.043	0.044	0.043	0.042	0.042	0.044	0.043	0.042	0.041	0.043	0.041	0.043	0.071	0.06	0.063	0.064	0.071	0.044
O.D	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	-0.002	-0.001	0.000	0.002	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000	0.023	0.011	0.013	0.014	0.018	0.000



[도118]

2019-08-16 0208-674 (LC#3, Blood, Urine, Saliva, Sputum)

Tissue : Wild type / diagnosed with SCLC (2019.8) / Irinotecan-cisplatin (2019.8.29)
Request : all

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX	PC	NC
500	0.042	0.04	0.039	0.04	0.039	0.039	0.04	0.039	0.039	0.04	0.038	0.037	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.039	0.05	0.051	0.044	0.041	0.043	0.038
650	0.054	0.047	0.041	0.045	0.042	0.038	0.038	0.04	0.039	0.039	0.04	0.038	0.046	0.043	0.04	0.039	0.043	0.041	0.113	0.116	0.069	0.05	0.07	0.039
O.D	0.012	0.007	0.002	0.005	0.003	-0.001	-0.002	0.001	0	-0.001	0.002	0.001	0.006	0.003	0	-0.001	0.003	0.002	0.063	0.065	0.025	0.009	0.027	0.001

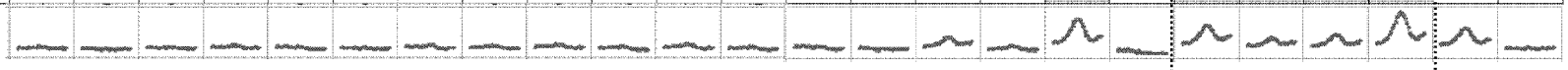
Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM-1	NKX2-1	PC	NC
500	0.05	0.051	0.053	0.051	0.048	0.044	0.048	0.042	0.045	0.044	0.043	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.045	0.05	0.052	0.051	0.052	0.043
650	0.053	0.053	0.053	0.049	0.048	0.043	0.053	0.05	0.047	0.042	0.044	0.043	0.046	0.048	0.046	0.041	0.041	0.043	0.059	0.078	0.067	0.074	0.09	0.044
OD	0.003	0.002	0	-0.002	0	-0.001	0.005	0.008	0.002	-0.002	0.001	0.001	0.003	0.005	0.004	-0.001	-0.002	0	0.014	0.028	0.015	0.023	0.038	0.001

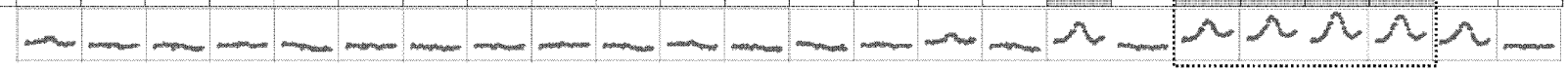
[도119]

2019-08-28 0208-685 (LC#2, Blood)

Tissue : SCLC
Request : all / SCLC

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.038	0.038	0.04	0.039	0.04	0.039	0.041	0.039	0.04	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.041	0.038	0.047	0.035	0.045	0.043	0.042	0.045	0.044	0.04
650	0.04	0.038	0.04	0.043	0.04	0.04	0.042	0.041	0.043	0.041	0.044	0.041	0.041	0.039	0.053	0.043	0.078	0.034	0.07	0.053	0.057	0.086	0.065	0.04
O.D	0.002	0	0	0.004	0	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.005	0.003	0	-0.001	0.012	0.005	0.031	-0.001	0.025	0.01	0.015	0.041	0.021	0
																								

Wavelength	G719X	Exon 19 del	Exon 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM-1	NKX2-1	PC	NC
500	0.04	0.038	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.041	0.039	0.041	0.038	0.041	0.039	0.043	0.044	0.042	0.042	0.041	0.038
650	0.044	0.04	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.039	0.04	0.039	0.042	0.038	0.039	0.04	0.047	0.04	0.057	0.038	0.058	0.061	0.064	0.062	0.056	0.038
OD	0.004	0.002	0	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002	0	-0.002	0.001	0.006	0.002	0.016	-0.001	0.015	0.017	0.022	0.02	0.015	0
																								

[도120]

2019-08-16 0208-665 (LC#5, Blood, Effusion), Recurrent patient

Tissue : Wild Type / ALK fusion (FISH) /
small-cell-lung cancer (SCLC) (diagnosed in Korea Cancer Center Hospital) / prescribed with Crizotinib but no therapeutic effect

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion var.1	ALK fusion var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.04	0.046	0.04	0.045	0.041	0.039	0.048	0.04	0.043	0.044	0.045	0.042	0.042	0.038
650	0.039	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.039	0.04	0.041	0.038	0.039	0.066	0.04	0.043	0.044	0.041	0.081	0.038	0.054	0.046	0.062	0.052	0.052	0.04
OD	0	0.001	0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	-0.001	0.020	0.000	-0.002	0.003	0.002	0.033	-0.002	0.011	0.002	0.017	0.01	0.01	0.002
N-Score (O.D/0.01)	0.00	0.10	0.10	0.20	-0.10	0.10	0.10	0.10	0.30	0.00	-0.10	2.00	0.00	-0.20	0.30	0.20	3.30	-0.20	1.10	0.20	1.70	1.00	1.00	0.20

[도121]

2019-10-04 0208-700 (LC#4, Blood), Recurrent patient

Tissue : SCLC
Request : all

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Wavelength	G719X	Exon 19del	Exon 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK fusion Var.1	ALK fusion Var.3	ALK mutation	c-MET	c-MET Exon 14 Skipping	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.041	0.039	0.04	0.04	0.04	0.041	0.039	0.038	0.039	0.04	0.038	0.038	0.039	0.039	0.039	0.049	0.038	0.039	0.042	0.049	0.044	0.051	0.046	0.04
650	0.043	0.04	0.039	0.039	0.042	0.05	0.04	0.04	0.041	0.043	0.036	0.039	0.039	0.039	0.041	0.097	0.039	0.045	0.058	0.083	0.068	0.115	0.075	0.04
OD	0.002	0.001	-0.001	-0.001	0.002	0.009	0.001	0.002	0.002	0.003	-0.002	0.001	0.000	0.000	0.002	0.048	0.001	0.006	0.016	0.034	0.024	0.064	0.029	0
N-Score (O.D/0.01)	0.20	0.10	-0.10	-0.10	0.20	0.90	0.10	0.20	0.20	0.30	-0.20	0.10	0.00	0.00	0.20	4.80	0.10	0.60	1.60	3.40	2.40	6.40	2.90	0.00

[도122]

SCLC marker : synaptophysin (SYP) / chromogranin (CgA) / CD56 (NCAM1) / Thyroid transcription factor 1 (NKX2-1)

Test #1

Sample	20190802 LC#4 Blood				20190805 LC#1 Blood				20190808 LC#1 Blood				20190809 LC#2 Blood				20190809 LC#3 Blood			
Wavelength	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1
500	0.041	0.04	0.04	0.042	0.041	0.041	0.042	0.04	0.04	0.042	0.042	0.04	0.04	0.042	0.04	0.04	0.04	0.041	0.041	0.041
650	0.039	0.039	0.042	0.041	0.04	0.04	0.041	0.04	0.037	0.039	0.041	0.04	0.042	0.043	0.04	0.04	0.039	0.04	0.039	0.041
OD	-0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.003	-0.003	-0.001	0.000	0.002	0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.002	0.000

Test #2

Sample	20190802 LC#4 Blood				20190805 LC#1 Blood				20190808 LC#1 Blood				20190809 LC#2 Blood				20190809 LC#3 Blood			
Wavelength	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1
500	0.04	0.04	0.04	0.042	0.042	0.042	0.041	0.041	0.041	0.043	0.042	0.042	0.041	0.043	0.04	0.041	0.043	0.042	0.04	0.04
650	0.04	0.041	0.042	0.043	0.043	0.043	0.039	0.043	0.04	0.041	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.041	0.045	0.043	0.039	0.04
O.D	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	-0.002	0.002	-0.001	-0.002	0.000	0.001	0.000	-0.001	0.002	0.000	0.002	0.001	-0.001	0.000

[도123]

Lung cancer

Site	Tumor marker	Sample type
Bronchial / Lung	NSE	Serum
	SCC	Serum
	CEA	Serum
	Cyfra 21-1	Serum
	TPA	Serum

Group	NSE (ng/mL)		CEA (ng/mL)	
	Mean	Sd	Mean	Sd
NSCLC (n=36)	32.0	16.7	51.6	68.3
BLD (n=32)	15.1	10.9	4.9	3.1

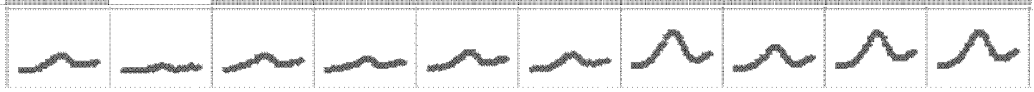
NSCLC: non-small cell lung cancer; BLD: benign lung disease; SD: Standard deviation

	CEA level (< 5.0 normal)	subject No.	Stage	T	N	M	sampling date	sample collection time	patient status	Qt
0185-008(33172242,LC#3)	2	0185-008	3A	1	2	0	2018-07-11	during PD	CCRT then PD	
0185-009(33315258, LC#1	3.2	0185-009	3A	2b	2	0	2018-01-22	after end of CCRT	CCRT then PD	
0185-009(33315258, LC#1)	1.8	0185-009	duplication				2018-12-18	during PD	PD	
0185-011(33206191, LC#1)	2.4	0185-011	1B	2a	0	0	2018-01-02	after end of OP	NED	
0185-013(33318303, LC#1)	5.4	0185-013	1A3	1c	0	0	2018-01-03	after end of OP	NED	
0185-014(33320070, LC#4)	1.5	0185-014	3A	3	1	0	2018-01-10	before OP	Dropped out because another cancer is found after surgery	
0185-014(33320070, LC#1)	1.5	0185-014	duplication				2018-02-13	after end of OP		
0185-015(33321414, LC#4)	0.7	0185-015	1B	2a	0	0	2018-01-17	after end of OP	Withdraw consent	
0185-016(33318406, LC#1)	2.4	0185-016	2B	3	0	0	2018-02-12	after end of OP / before Adj. CTx	Adj. CTx then PD	
0185-016(33318406, LC#1)	1.8	0185-016	duplication				2018-05-21	after end of Adj. CTx	PD	
0185-016(33318406, LC#1)	2.3	0185-016	duplication				2018-12-17	during PD	PD	
0185-017(33319768, LC#6)	7.7	0185-017	3B	3	2	0	2018-02-23	after end of OP / before Adj. CTx	NED	
0185-017 (33319768, LC#1)	3	0185-017	duplication				2018-06-04	after end of Adj. CTx	PD	
0185-018(33325866, LC#1)	5.6	0185-018	3B	3	2	0	2018-04-03	before CCRT	CCRT then FU	
0185-018(33325866, LC#3)	2.7	0185-018	duplication				2018-06-07	after end of CCRT	PD	
0185-019(33328233, LC#2)	13.8	0185-019	3B	3	2	0	2018-05-15	before CCR	CCRT then FU	
0185-019(33328233)	6.6	0185-019	duplication					after end of CCRT	PD	

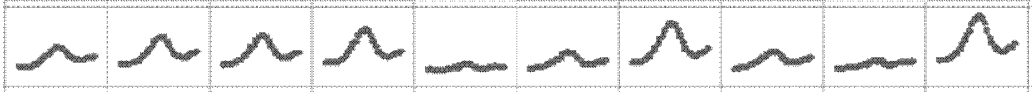
[도124]

➢ Lung cancer

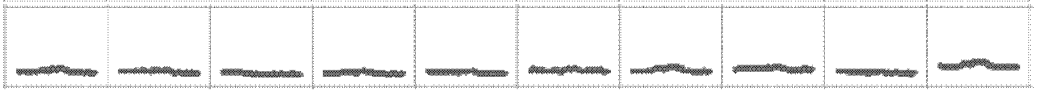
20180813 LC#3

WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.042	0.045	0.042	0.045	0.045
650	0.053	0.045	0.053	0.051	0.056	0.053	0.074	0.06	0.073	0.074
	0.012	0.004	0.011	0.01	0.013	0.011	0.029	0.018	0.028	0.029
										

20180817 LC#3

NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
0.043	0.045	0.044	0.046	0.04	0.041	0.046	0.041	0.041	0.048
0.06	0.068	0.069	0.074	0.045	0.055	0.08	0.056	0.048	0.086
0.017	0.023	0.025	0.028	0.005	0.014	0.034	0.015	0.007	0.038
									

Normal

NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
0.039	0.039	0.038	0.037	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039	0.043
0.04	0.04	0.036	0.04	0.039	0.041	0.042	0.042	0.039	0.047
0.001	0.001	-0.002	0.003	0	0.001	0.003	0.002	0	0.004
									

Cutoff > 0.01

[도125]

0208-009 (Blood)

0185-009	0185-009 (before operation)						0185-009 (after operation)						PC	NC
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA				
500	0.043	0.042	0.043	0.042	0.042	0.044	0.046	0.043	0.045	0.041	0.048	0.039		
650	0.051	0.05	0.055	0.048	0.052	0.058	0.06	0.06	0.06	0.044	0.074	0.041		
O.D	0.008	0.008	0.012	0.006	0.01	0.014	0.014	0.017	0.015	0.003	0.026	0.002		
N-Score	0.80	0.80	1.20	0.60	1.00	1.40	1.40	1.70	1.50	0.30	2.60	0.20		

0208-009 Clinical information

	CEA level (< 5.0 normal)	Subject No.	Stage	T	N	M	sample date	Sampling time	Patient's status
0185-009 (33315258, LC#1	3.2	0185-009	3A	2b	2	0	2018-01-22	After end of CCRT	CCRT then PD
0185-009 (33315258, LC#1)	1.8	0185-009	Duplication				2018-12-18	During PD	PD

[도126]

0208-017 (Blood)

0185-017	0185-017 (Before operation)						0185-017 (After operation)						PC	NC
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA		NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA			
500	0.044	0.043	0.043	0.043	0.045		0.045	0.044	0.043	0.044	0.048		0.051	0.043
650	0.053	0.049	0.053	0.05	0.056		0.05	0.05	0.049	0.048	0.065		0.075	0.043
O.D	0.009	0.006	0.01	0.007	0.011		0.005	0.006	0.006	0.004	0.017		0.024	0
N-Score	0.90	0.60	1.00	0.70	1.10		0.50	0.60	0.60	0.40	1.70		2.40	0.00

0208-017 Clinical information

	CEA level (< 5.0 normal)	Subject No.	Stage	T	N	M	sample date	Sampling time	Patient's status
0185-017(33319768, LC#6)	7.7	0185-017	3B	3	2	0	2018-02-23	After end of OP / before Adj CTx	NED
0185-017 (33319768, LC#1)	3	0185-017	Duplication				2018-06-04	After Adj. CTx	PD

[도127]

➢ Stage I lung cancer patient

0208-032 (Blood)

Wavelength	0185-032 befor operation					0185-032 after operation					PC	NC
	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA		
500	0.042	0.045	0.049	0.05	0.047	0.041	0.043	0.045	0.05	0.041	0.054	0.043
650	0.051	0.07	0.068	0.089	0.074	0.046	0.049	0.067	0.081	0.043	0.081	0.044
O.D	0.009	0.025	0.019	0.039	0.027	0.005	0.006	0.022	0.031	0.002	0.027	0.001
N-Score (O.D/0.015)	0.60	1.67	1.27	2.60	1.80	0.33	0.40	1.47	2.07	0.13	1.80	0.07

0208-032 Clinical information

	CEA level (< 5.0 normal)	subject No.	Stage	T	N	M	sampling date	sample collection time	patient's status
0185-032 (33345046, LC#1)	2.7	0185-032	1A3	1c	0	0	2018-11-30	before operation	NED
0185-032 (33345046, LC#2)	2.7	0185-032	duplication				2018-12-20	after operation	

[도128]

➢ Stage 1 lung cancer patient

0185-044 (Blood)

0185-44 (Before operation)						0185-44 (After operation)							
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.047	0.043	0.041	0.045	500	0.04	0.042	0.04	0.039	0.043	0.042	0.039
650	0.043	0.07	0.06	0.042	0.055	650	0.049	0.055	0.045	0.042	0.053	0.051	0.039
O.D	0.004	0.023	0.017	0.001	0.010	O.D	0.009	0.013	0.005	0.003	0.01	0.009	0.000

0208-044 Clinical information

	CEA level (< 5.0 normal)	subject No.	Stage	T	N	M	sample date	Sampling time	Patient's status
0185-044 (33349665, LC#5)	1.6	0185-044	1A3	1c	x	0	2019-01-24	Before operation	Planning for complete resection
0185-044 (33349665_LC#2)	1.4	0185-044	duplication				2019-02-25	After operation (incomplete resection)	

[도129]

20191014 Normal # 1 Kim (M/)

Kim

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.042	0.038	0.038	0.041
O.D	0.001	0.003	-0.001	-0.002	0.001

20191014 Normal # 2 Kim (F/)

Kim

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.038	0.038	0.039	0.038	0.045	0.038
650	0.042	0.039	0.039	0.041	0.039	0.061	0.037
O.D	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.016	-0.001

20191014 Normal # 3 Cho (F/)

Cho

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.04	0.041	0.04	0.039
650	0.039	0.04	0.041	0.041	0.038
O.D	0.000	0.000	0.000	0.001	-0.001

20191014 Normal # 4 Cho (F/)

Cho

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.041	0.038
650	0.04	0.037	0.037	0.038	0.039	0.052	0.039
O.D	0.001	-0.002	-0.002	0.000	0.000	0.011	0.001

[도130]

20191014 Normal # 5 Hong (M/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.043	0.038	0.04	0.038
650	0.038	0.043	0.04	0.038	0.036
O.D	-0.001	0.000	0.002	-0.002	-0.002

20191014 Normal # 6 Kim (F/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.039	0.039	0.04	0.04	0.042	0.04
650	0.04	0.037	0.038	0.038	0.04	0.052	0.042
O.D	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.000	0.010	0.002

20191014 Normal # 7 Lee (M/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039
650	0.037	0.038	0.039	0.039	0.039
O.D	-0.002	0.000	-0.001	0.000	0.000

20191014 Normal # 8 Woo (F/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.04	0.037	0.038	0.039	0.04
650	0.04	0.038	0.039	0.04	0.039
O.D	0.000	0.001	0.001	0.001	-0.001

[도131]

20191014 Normal # 10 Lee (M/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.037	0.037	0.037	0.039
650	0.04	0.039	0.038	0.039	0.04
O.D	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001

20191014 Normal # 9 Cho1 (M/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.04	0.04	0.04	0.039	0.043	0.042	0.04
650	0.04	0.038	0.039	0.04	0.041	0.055	0.042
O.D	0.000	-0.002	-0.001	0.001	-0.002	0.013	0.002

20191014 Normal # 11 Noh (M/)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.038	0.036	0.038	0.037	0.037	0.046	0.037
650	0.038	0.036	0.04	0.039	0.037	0.072	0.037
O.D	0.000	0.000	0.002	0.002	0.000	0.026	0

[도132]

20191015 Normal # 1 Shin (M/)

Shin (Capillary blood)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.037	0.037	0.039	0.038
650	0.042	0.037	0.037	0.04	0.04
O.D	0.004	0.000	0.000	0.001	0.002

Shin (Venous blood)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.037	0.038	0.039	0.037	0.037	0.043	0.037
650	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.06	0.037
O.D	0.002	0.001	0.002	0.004	0.003	0.017	0

20191015 Normal # 2 Lee (M/)

Lee (Capillary blood)

Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.038	0.037	0.037	0.037
650	0.038	0.038	0.038	0.038	0.039
O.D	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002

Lee (Venous blood)

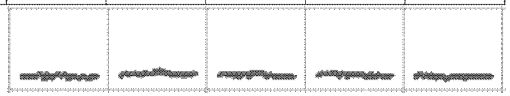
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.037	0.039	0.04	0.038	0.037	0.042	0.039
650	0.039	0.039	0.042	0.037	0.036	0.065	0.038
O.D	0.002	0.000	0.002	-0.001	-0.001	0.023	-0.001

[도133]

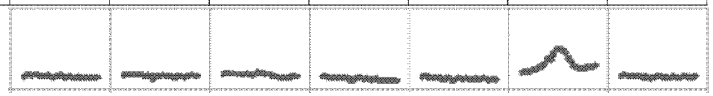
Blind test

20191015 Normal # 3 Roh (M/)

Roh (Capillary blood)					
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.039	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.041	0.04	0.038
O.D	0.002	0.004	0.001	0.000	0

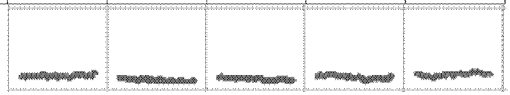


Roh (Venous blood)							
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.038	0.039	0.037	0.038	0.038	0.046	0.037
650	0.039	0.039	0.037	0.038	0.042	0.072	0.039
O.D	0.001	0.000	0.000	0.000	0.004	0.026	0.002



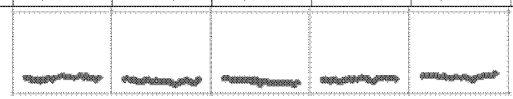
20191015 Normal # 4 Ryu (M/)

Ryu					
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.041	0.04	0.04	0.041	0.043
650	0.04	0.037	0.039	0.04	0.042
O.D	-0.001	-0.003	-0.001	-0.001	-0.001



20191015 Normal # 5 Kim (F/)

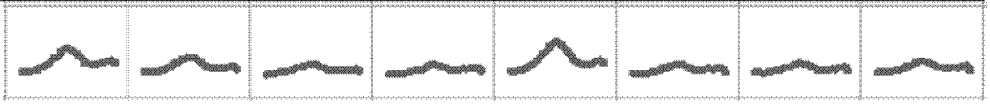
Kim							
Wavelength	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.042	0.041	0.042	0.041	0.043	0.045	0.041
650	0.044	0.04	0.038	0.042	0.043	0.057	0.038
O.D	0.002	-0.001	-0.004	0.001	0.000	0.012	-0.003



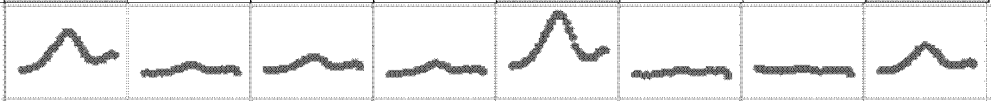
[도134]

➢ Prostate cancer

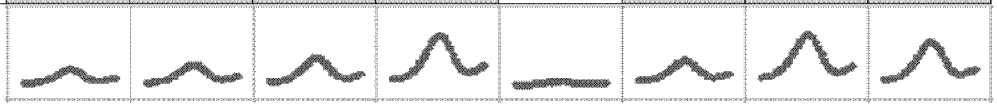
PC#41 (prostate cancer patient)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.043	0.043	0.04	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042
650	0.069	0.06	0.051	0.051	0.076	0.052	0.052	0.055
	0.026	0.017	0.011	0.01	0.033	0.011	0.01	0.013
								

PC#47 (prostate cancer patient)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.041	0.045	0.041	0.049	0.04	0.048	0.044
650	0.087	0.051	0.059	0.052	0.108	0.045	0.047	0.072
	0.042	0.01	0.014	0.011	0.059	0.005	-0.001	0.028
								

PC#44 (prostate cancer patient)

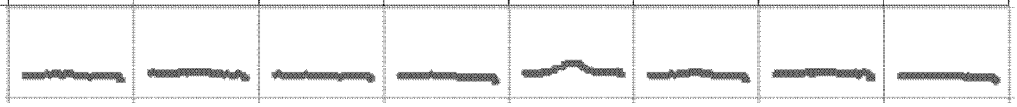
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.046	0.048	0.056	0.04	0.051	0.059	0.053
650	0.078	0.09	0.106	0.16	0.049	0.099	0.162	0.144
	0.033	0.044	0.058	0.104	0.009	0.048	0.103	0.091
								

Cutoff > 0.015

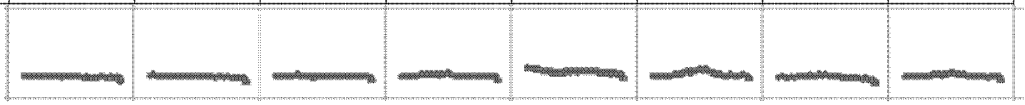
[도135]

➢ Prostate cancer

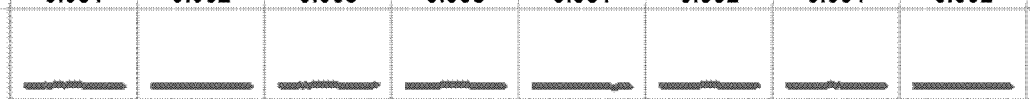
Normal #1

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.042	0.04	0.038	0.041	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.039	0.039	0.054	0.042	0.044	0.04
	0.001	0.001	-0.001	0.001	0.013	0.002	0.004	0.002
								

Normal(Cho)

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.04	0.039	0.038	0.049	0.039	0.038	0.038
650	0.039	0.04	0.039	0.042	0.045	0.047	0.04	0.042
	0	0	0	0.004	-0.004	0.008	0.002	0.004
								

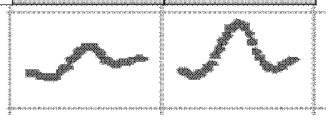
Normal #2

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.041	0.039	0.041	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.041	0.044	0.045	0.04	0.043	0.041	0.041
	0.001	0.002	0.003	0.005	0.001	0.002	0.001	0.002
								

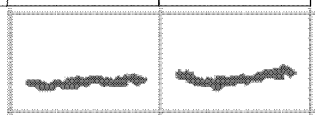
Cutoff > 0.015

[도136]

➢ Prostate cancer patient #1, 2

Wavelength	TMPRSS2-ERG fusion	TMPRSS2-ERG fusion
500	0.051	0.052
650	0.064	0.077
	0.013	0.025
	1.30	2.50
		

➢ Normal sub. #1, 2

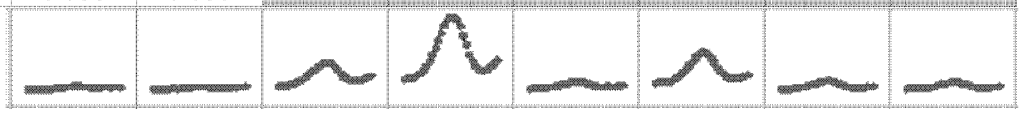
Wavelength	TMPRSS2-ERG fusion	TMPRSS2-ERG fusion
500	0.043	0.046
650	0.043	0.044
	0	-0.002
	0.00	-0.20
		

[도137]

➢ Thyroid cancer

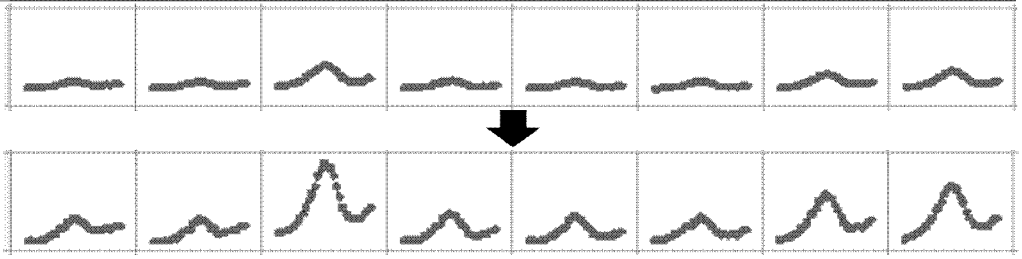
TC#42

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.04	0.04	0.045	0.057	0.041	0.051	0.04	0.04
650	0.046	0.045	0.09	0.177	0.055	0.109	0.056	0.053
	0.006	0.005	0.045	0.12	0.014	0.058	0.016	0.013



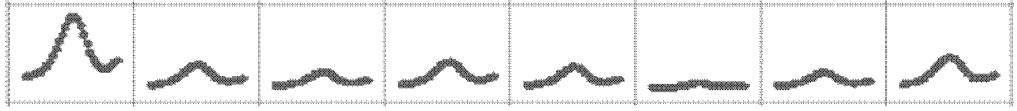
TC#43

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.041	0.041	0.046	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043
650	0.054	0.054	0.084	0.056	0.053	0.054	0.067	0.073
	0.013	0.013	0.038	0.014	0.012	0.014	0.025	0.03



TC#41

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.065	0.046	0.045	0.047	0.045	0.04	0.045	0.047
650	0.204	0.093	0.075	0.099	0.087	0.05	0.075	0.11
	0.139	0.047	0.03	0.052	0.042	0.01	0.03	0.063



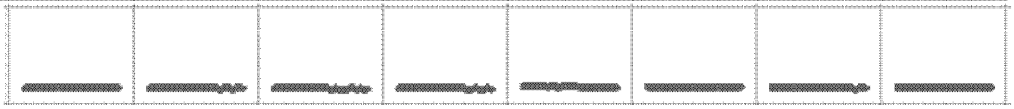
Cutoff > 0.01

[도138]

➢ Thyroid cancer

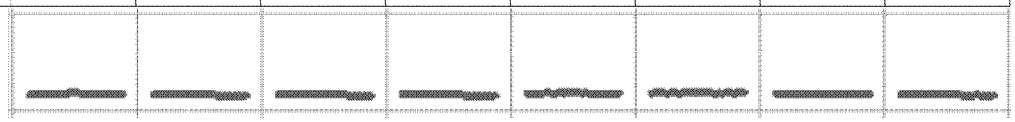
Normal #1

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.039	0.039
650	0.04	0.04	0.038	0.041	0.041	0.04	0.04	0.041
	0.002	0.001	-0.001	0.003	0	0	0.001	0.002



Normal #2

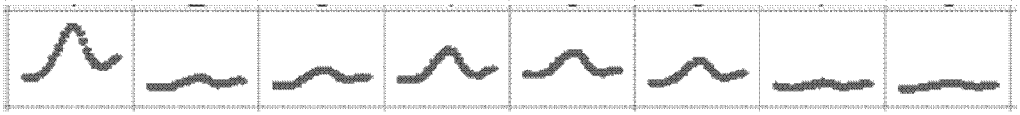
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.038	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.039	0.04	0.039	0.043	0.043	0.041	0.04
	0.004	0.001	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.001



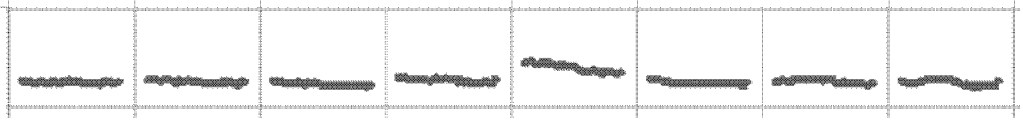
Cutoff > 0.01

[도139]

Thyroid cancer patient

Wavelength	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.055	0.046	0.047	0.052	0.059	0.05	0.046	0.043
650	0.11	0.054	0.064	0.085	0.082	0.073	0.05	0.05
O.D	0.055	0.008	0.017	0.033	0.023	0.023	0.004	0.007
N-Score (O.D/0.01)	5.50	0.80	1.70	3.30	2.30	2.30	0.40	0.70
								

Normal sub.

Wavelength	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.043	0.053	0.043	0.041	0.041
650	0.042	0.042	0.039	0.043	0.05	0.04	0.042	0.042
O.D	0.001	0.000	-0.002	0.000	-0.003	-0.003	0.001	0.001
N-Score (O.D/0.01)	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	-0.30	0.10	0.10
								

[도140]

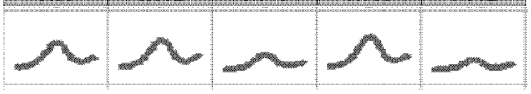
➢ Bladder cancer

BDC#92 (Bladder cancer patient)

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.044	0.041	0.041	0.041	0.039
650	0.071	0.046	0.061	0.037	0.037
	0.027	0.005	0.02	-0.004	-0.002

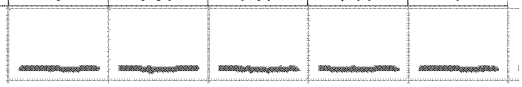
BDC#95 (Bladder cancer patient)

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.046	0.047	0.043	0.047	0.043
0.076	0.079	0.061	0.083	0.055
0.03	0.032	0.018	0.036	0.012



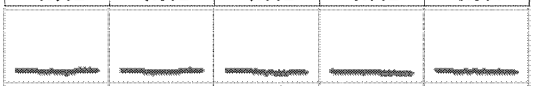
BDC#38 (Hematuria)

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039
650	0.039	0.038	0.037	0.038	0.039
	0	-0.002	-0.002	-0.002	0



BDC#88 (Hematuria)

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.04	0.04	0.039	0.039	0.04
0.038	0.038	0.037	0.037	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001

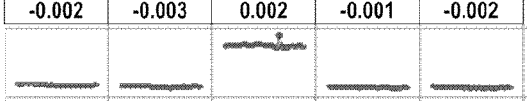


Normal #3

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.04	0.039	0.038
650	0.038	0.037	0.038	0.037	0.036
	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002

Normal #4

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.042	0.04	0.092	0.038	0.039
0.04	0.037	0.094	0.037	0.037
-0.002	-0.003	0.002	-0.001	-0.002



Cutoff > 0.01

[도141]

Breast cancer
BC #78
WAV.
CA27-29 (CA15-3), 27
CA27-29 (CA15-3), 95
CEA, 27
CEA, 95
500
0.049
0.039
0.041
0.044
650
0.092
0.045
0.051
0.069
0.043
0.006
0.01
0.025
BC #79
CA27-29 (CA15-3), 27
CA27-29 (CA15-3), 95
CEA, 27
CEA, 95
0.042
0.064
0.061
0.045
0.045
0.064
0.143
0.074
0.003
0
0.082
0.029
Normal (Cho)
CA27-29 (CA15-3), 27
CA27-29 (CA15-3), 95
CEA, 27
CEA, 95
0.037
0.038
0.038
0.039
0.037
0.038
0.04
0.04
0
0
0.002
0.001
Normal #1
CA27-29 (CA15-3), 27
CA27-29 (CA15-3), 95
CEA, 27
CEA, 95
0.04
0.041
0.039
0.039
0.048
0.044
0.041
0.044
0.008
0.003
0.002
0.005
Cutoff > 0.01

[도142]

Colon cancer)
CC #2
WAV.
CEA, 27
CEA, 95
CA19-9, 27
CA19-9, 95
500
650
0.043
0.047
0.046
0.041
0.042
0.084
0.044
0.041
-0.001
0.037
-0.002
0
CC #3
WAV.
CEA, 27
CEA, 95
CA19-9, 27
CA19-9, 95
500
650
0.04
0.043
0.041
0.041
0.04
0.054
0.041
0.04
0
0.011
0
-0.001
Normal (Cho)
CEA, 27
CEA, 95
CA19-9, 27
CA19-9, 95
0.038
0.039
0.039
0.038
0.037
0.039
0.038
0.037
-0.001
0
-0.001
-0.001
Normal #1
CEA, 27
CEA, 95
CA19-9, 27
CA19-9, 95
0.04
0.038
0.039
0.038
0.037
0.037
0.037
0.037
-0.003
-0.001
-0.002
-0.001
Normal #2
CEA, 27
CEA, 95
CA19-9, 27
CA19-9, 95
0.039
0.039
0.039
0.039
0.037
0.037
0.037
0.037
-0.002
-0.002
-0.002
-0.002
Cutoff > 0.01

[도143]

➢ Cholangiocarcinoma

Cholangiocarcinoma patient

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.049	0.042	0.049	0.042	0.042	0.047	0.04	0.038
650	0.099	0.047	0.105	0.059	0.053	0.088	0.055	0.038
	0.05	0.005	0.056	0.017	0.011	0.041	0.015	0
Int.	3.33	0.33	3.73	1.13	0.73	2.73	1.00	0.00

Normal #1

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
	-0.001	0.001	0	0.002	0.001	0
Int.	-0.07	0.07	0.00	0.13	0.07	0.00

Normal #2

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.04
650	0.042	0.039	0.039	0.038	0.04	0.042
	0.003	0	0	0.001	0.001	0.002
Int.	0.20	0.00	0.00	0.07	0.07	0.13

[도144]

➢ Cholangiocarcinoma

Cholangiocarcinoma patient

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.053	0.047	0.058	0.046	0.047	0.052	0.049	0.041
650	0.137	0.073	0.158	0.085	0.084	0.082	0.097	0.037
	0.084	0.026	0.1	0.039	0.037	0.03	0.048	-0.004
Int.	1.75	0.54	2.08	0.81	0.77	0.63	1.00	-0.08

Normal sub.

WAV.	Nor(Cho) CA125	Nor(Cho) CA125	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CEA	BC(Nor) CA125	BC(Nor) CA125	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CEA	BC(Nor) CEA
500	0.041	0.039	0.04	0.041	0.039	0.041	0.039	0.042	0.04	0.039	0.04	0.04
650	0.041	0.038	0.038	0.038	0.037	0.039	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.037
	0	-0.001	-0.002	-0.003	-0.002	-0.002	0	-0.003	-0.001	-0.002	-0.001	-0.003
Int.	0.00	-0.02	-0.04	-0.06	-0.04	-0.04	0.00	-0.06	-0.02	-0.04	-0.02	-0.06

[도145]

➢ Gastric cancer

Gastric cancer patient

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.042	0.046	0.049	0.041	0.047	0.042	0.048	0.044
650	0.059	0.082	0.103	0.051	0.102	0.052	0.084	0.074
	0.017	0.036	0.054	0.01	0.055	0.01	0.036	0.03
Int.	1.13	2.40	3.60	0.67	3.67	0.67	2.40	2.00

Normal #1

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
	0.001	0	0	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001
Int.	0.07	0.00	0.00	0.20	0.07	-0.07	-0.07	-0.07

Normal #2

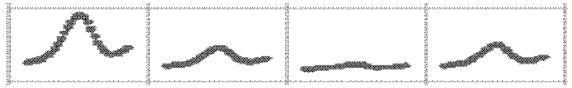
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.04	0.041	0.042	0.04	0.038	0.038	0.038	0.038
	0	0.001	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001
Int.	0.00	0.07	0.20	0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07

[도146]

➢ Ovarian cancer

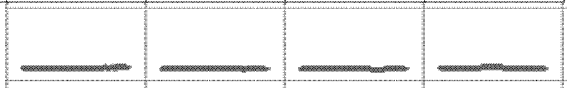
Ovarian cancer patient

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.061	0.05	0.042	0.05
650	0.193	0.102	0.053	0.109
	0.132	0.052	0.011	0.059
Int.	2.32	0.91	0.19	1.04



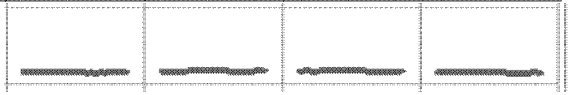
Normal #1 (Cho)

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.043	0.04	0.04	0.042
650	0.041	0.041	0.041	0.045
	-0.002	0.001	0.001	0.003
Int.	-0.04	0.02	0.02	0.05



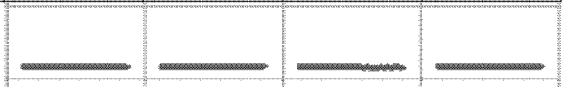
Normal #2

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.041	0.042	0.043	0.04
650	0.04	0.045	0.045	0.04
	-0.001	0.003	0.002	0
Int.	-0.02	0.05	0.04	0.00



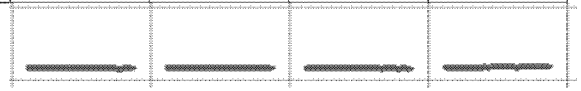
Normal #1 (Cho)

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.041	0.041	0.04	0.042
650	0.042	0.042	0.04	0.042
	0.001	0.001	0	0
Int.	0.02	0.02	0.00	0.00



Normal #2

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.041	0.04	0.043
650	0.042	0.041	0.04	0.044
	0.002	0	0	0.001
Int.	0.04	0.00	0.00	0.02



[도147]

➢ Pancreatic cancer

Pancreatic cancer patient #1

WAV.	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.046	0.047	0.043	0.04	0.039
650	0.046	0.052	0.089	0.068	0.041	0.039
	0.004	0.006	0.042	0.025	0.001	0
Int.	0.16	0.24	1.68	1	0.04	0

Pancreatic cancer patient #2

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.044	0.046	0.05	0.039	0.042
650	0.072	0.067	0.084	0.088	0.038	0.04
	0.026	0.023	0.038	0.038	-0.001	-0.002
Int.	0.79	0.70	1.15	1.15	-0.03	-0.06

Pancreatic cancer patient #3

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.04	0.044	0.053	0.039	0.043
650	0.097	0.051	0.073	0.137	0.04	0.039
	0.051	0.011	0.029	0.084	0.001	-0.004
Int.	1.55	0.33	0.88	2.55	0.03	-0.12

Pancreatic cancer patient #4

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.051	0.044	0.05	0.04	0.039
650	0.054	0.134	0.064	0.117	0.044	0.037
	0.012	0.083	0.02	0.067	0.004	-0.002
Int.	0.46	3.19	0.77	2.58	0.15	-0.08

[도148]

Pancreatic cancer

Normal sub. #1

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.043	0.041	0.041	0.04	0.042	0.041
0.048	0.042	0.041	0.039	0.041	0.043
0.005	0.001	0	-0.001	-0.001	0.002
0.2	0.04	0	-0.04	-0.04	0.08

Normal sub. #2

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.046	0.039	0.047	0.042	0.049	0.042
0.044	0.037	0.045	0.041	0.045	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.004	-0.003
-0.08	-0.08	-0.08	-0.04	-0.15	-0.12

Normal sub. #3

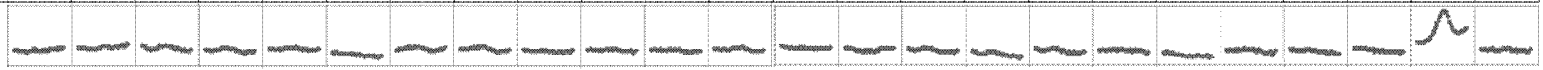
Nor(Cho), CEA	Nor(Cho), CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho), CA125	Nor(Cho), CA125
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.042
0.042	0.04	0.037	0.04	0.037	0.038
0.002	0	-0.003	0	-0.003	-0.004
0.08	0	-0.12	0	-0.12	-0.16

Normal sub. #4

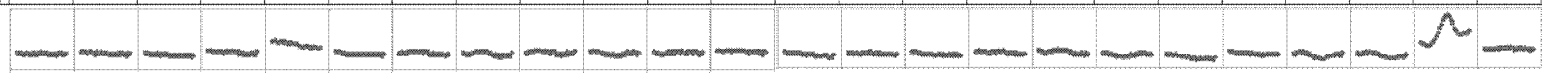
Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA125	Nor(Cho) CA125
0.044	0.042	0.049	0.043	0.046	0.043
0.042	0.039	0.045	0.042	0.045	0.044
-0.002	-0.003	-0.004	-0.001	-0.001	0.001
-0.08	-0.12	-0.15	-0.04	-0.04	0.04

[도149]

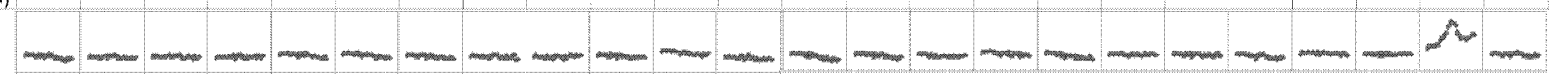
20191007 Normal sub. #1 (M/)

Wavelength	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V600E	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2-ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.041	0.044	0.045	0.041	0.043	0.038	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.043	0.045	0.043	0.041	0.04	0.042	0.041	0.038	0.04	0.041	0.042	0.049	0.041
650	0.041	0.046	0.045	0.043	0.044	0.037	0.044	0.045	0.04	0.042	0.041	0.043	0.043	0.04	0.041	0.038	0.04	0.041	0.035	0.041	0.041	0.04	0.078	0.042
O.D	0.000	0.002	0.000	0.002	0.001	-0.001	0.003	0.003	-0.001	0.000	-0.001	0.000	-0.002	-0.003	0.000	-0.002	-0.002	0.000	-0.003	0.001	0.000	-0.002	0.029	0.001
N-Score (O.D/0.01)	0.00	0.20	0.00	0.20	0.10	-0.10	0.30	0.30	-0.10	0.00	-0.10	0.00	-0.20	-0.30	0.00	-0.20	-0.20	0.00	-0.30	0.10	0.00	-0.20	2.90	0.10
																								

20191007 Normal sub. #2 (M/)

Wavelength	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V600E	TP53	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2-ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.043	0.053	0.043	0.041	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.04	0.039	0.042	0.04	0.039	0.049	0.044
650	0.042	0.042	0.039	0.043	0.05	0.04	0.042	0.042	0.042	0.04	0.043	0.044	0.039	0.04	0.039	0.042	0.043	0.037	0.034	0.039	0.036	0.037	0.077	0.045
O.D	0.001	0.000	-0.002	0.000	-0.003	-0.003	0.001	0.001	0.000	-0.003	0.001	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.001	0.001	-0.003	-0.005	-0.003	-0.004	-0.002	0.028	0.001
N-Score (O.D/0.01)	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	-0.30	0.10	0.10	0.00	-0.30	0.10	0.10	-0.20	-0.10	-0.20	0.10	0.10	-0.30	-0.50	-0.30	-0.40	-0.20	2.80	0.10
																								

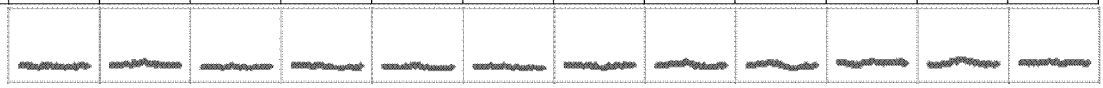
20191007 Normal sub. #3 (M/)

Wavelength	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V 600E	TP53	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2-ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.038	0.037	0.037	0.037	0.039	0.039	0.038	0.038	0.038	0.038	0.041	0.037	0.039	0.038	0.039	0.04	0.039	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.043	0.038
650	0.039	0.038	0.038	0.039	0.039	0.04	0.038	0.039	0.038	0.039	0.041	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.038	0.04	0.04	0.06	0.04
O.D	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.002	0.017	0.002
N-Score (O.D/0.01)	0.10	0.10	0.10	0.20	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.20	-0.10	-0.10	-0.10	0.00	-0.10	0.10	0.10	0.00	0.20	0.20	1.70	0.20
																								

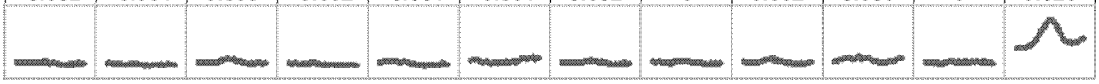
[도150]

Normal sub. #1 (F/)

Wavelength	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB
500	0.041	0.041	0.039	0.041	0.04	0.04	0.041	0.041	0.041	0.044	0.042	0.044
650	0.04	0.044	0.04	0.04	0.041	0.04	0.039	0.043	0.041	0.045	0.046	0.044
O.D	-0.001	0.003	0.001	-0.001	0.001	0	-0.002	0.002	0	0.001	0.004	0

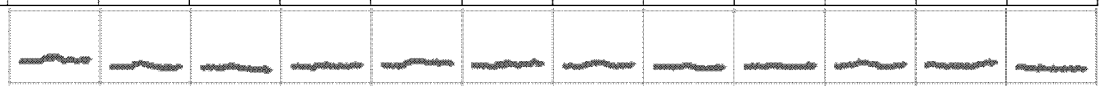


CA19-9	CA125	CA15-3	HER2	TOP2A	MCM2	CDKN2A	Ki-67	HE4	HIF-1a	VEGF	PC
0.042	0.04	0.041	0.041	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042	0.042	0.042	0.054
0.04	0.039	0.044	0.039	0.04	0.042	0.043	0.042	0.044	0.045	0.042	0.08
-0.002	-0.001	0.003	-0.002	-0.001	-0.001	0.002	0	0.002	0.003	0	0.026

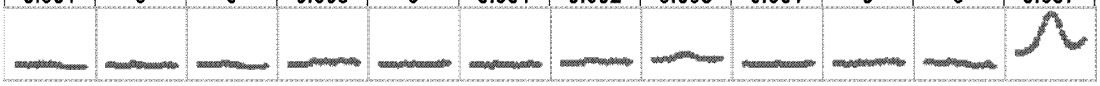


Normal sub. #2 (F/)

Wavelength	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB
500	0.046	0.041	0.04	0.042	0.043	0.043	0.042	0.041	0.041	0.042	0.043	0.041
650	0.05	0.044	0.042	0.043	0.047	0.045	0.045	0.043	0.042	0.044	0.043	0.039
O.D	0.004	0.003	0.002	0.001	0.004	0.002	0.003	0.002	0.001	0.002	0	-0.002



CA19-9	CA125	CA15-3	HER2	TOP2A	MCM2	CDKN2A	Ki-67	HE4	HIF-1a	VEGF	PC
0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.046	0.042	0.043	0.043	0.052
0.042	0.041	0.041	0.044	0.042	0.042	0.045	0.051	0.043	0.043	0.043	0.089
0.001	0	0	0.003	0	0.001	0.002	0.005	0.001	0	0	0.037



[도151]

	Cancer marker	Description
Lung cancer	NSE	Neuron-specific enolase
	SCC	Squamous cell carcinoma
	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	Cyfra21-1	Cytokeratin 19 fragment
	TPA	Tissue peptide antigen

	Cancer marker	Description
Bladder cancer	NMP22	Nuclear Matrix Protein 22
	Cyfra21-1	Cytokeratin 19 fragments
	OGT	O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
	CEA	Carcinoembryonic antigen

	Cancer marker	Description
Thyroid cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	NSE	Neuron-specific enolase
	Thyroglobulin (TG)	Thyroglobulin protein
	Calcitonin (CALCA)	Calcitonin protein
	BRAF V600E	A mutation of the *BRAF* gene
	TERT C228T, C250T	A mutation of the *TERT* gene

	Cancer marker	Description
Liver cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	AFP	Alpha-fetoprotein

	Cancer marker	Description
Gastric cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	Cyfra21-1	Cytokeratin 19 fragment
	β-HCG (CGB)	Human chorionic gonadotropin
	CA19-9	Carbohydrate antigen19-9

	Cancer marker	Description
Prostate cancer	PSA	Prostate specific antigen
	PSMA	Prostate specific membrane antigen
	PAP	Prostatic acid phosphatase
	PCA3	Prostate cancer antigen 3
	TMPRSS2-ERG	*TMPRSS2-ERG* gene fusions

	Cancer marker	Description
Kedney cancer	HIF-1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
	VEGF	Vascular endothelial growth factor

[도152]

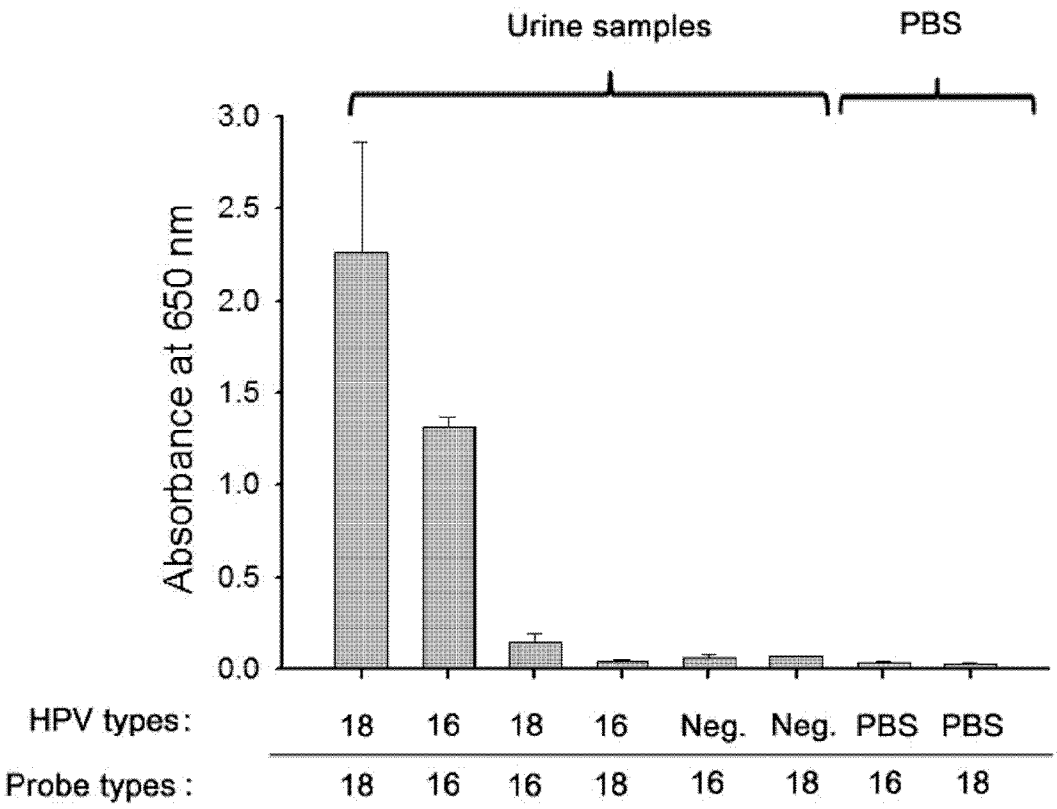
	Cancer marker	Description
Biliary cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	CA19-9	Carbohydrate antigen19-9
	CA125	Cancer antigen125
Conlon cancer / Pancreatic cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	CA19-9	Carbohydrate antigen19-9

	Cancer marker	Description
Ovarian cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	CA125	Cancer antigen125
	CA15-3	Cancer Antigen 15-3
	AFP	Human epidermal growth factor receptor 2
	HE4 (WFDC2)	Human Epididymis Protein 4

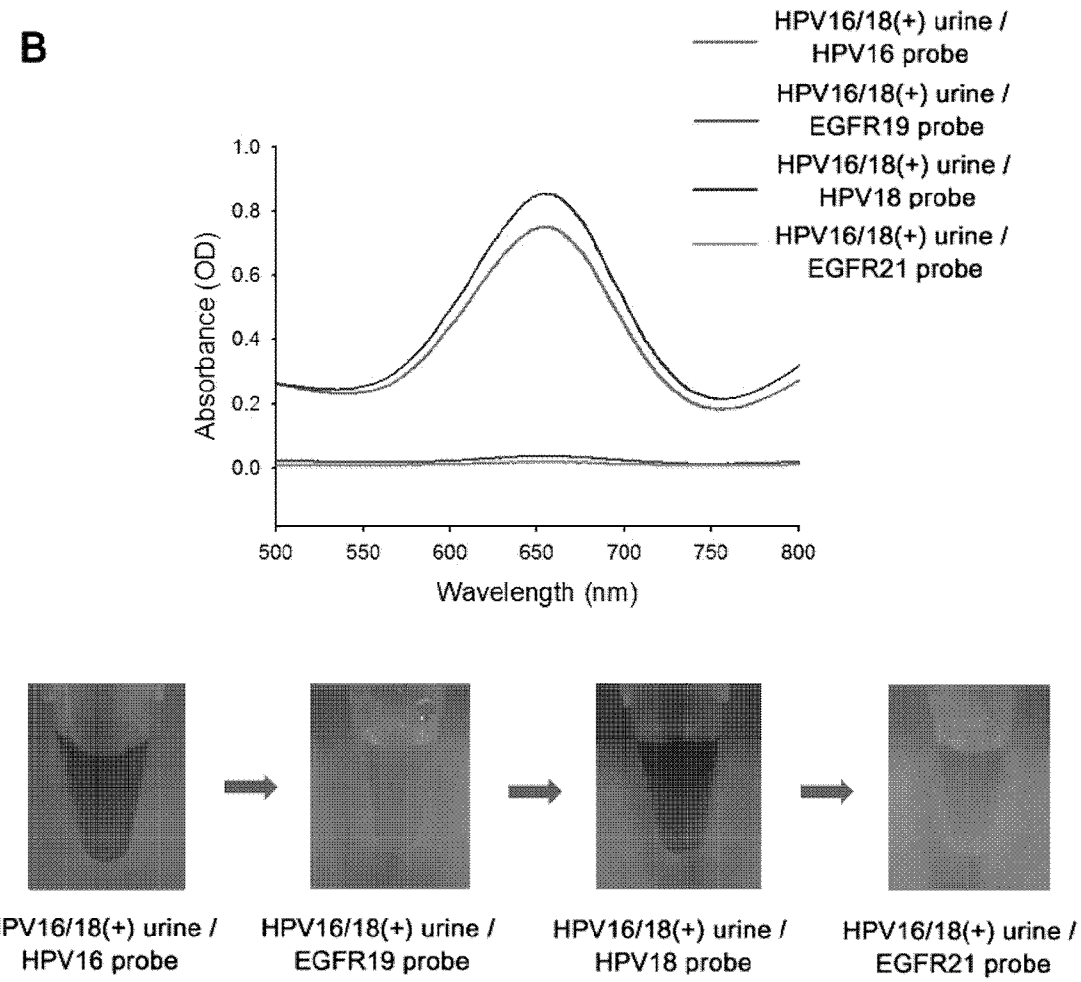
	Cancer marker	Description
Breast cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	CA125	Cancer antigen125
	CA15-3	Cancer Antigen 15-3
	HER2	Human epidermal growth factor receptor 2

	Cancer marker	Description
Cervical cancer	CEA	Carcinoembryoinic antigen
	SCC (SART3)	Squamous cell carcinoma
	TOP2A	Topoisomerase II alpha
	MCM2	Minichromosome maintenance protein 2
	p16INK4a (CDKN2A)	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
	Ki-67 (MKI67)	Antigen KI-67

[도153]


Urine samples
PBS
Absorbance at 650 nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
HPV types:
18 16 18 16 Neg. Neg. PBS PBS
Probe types :
18 16 16 18 16 18 16 18

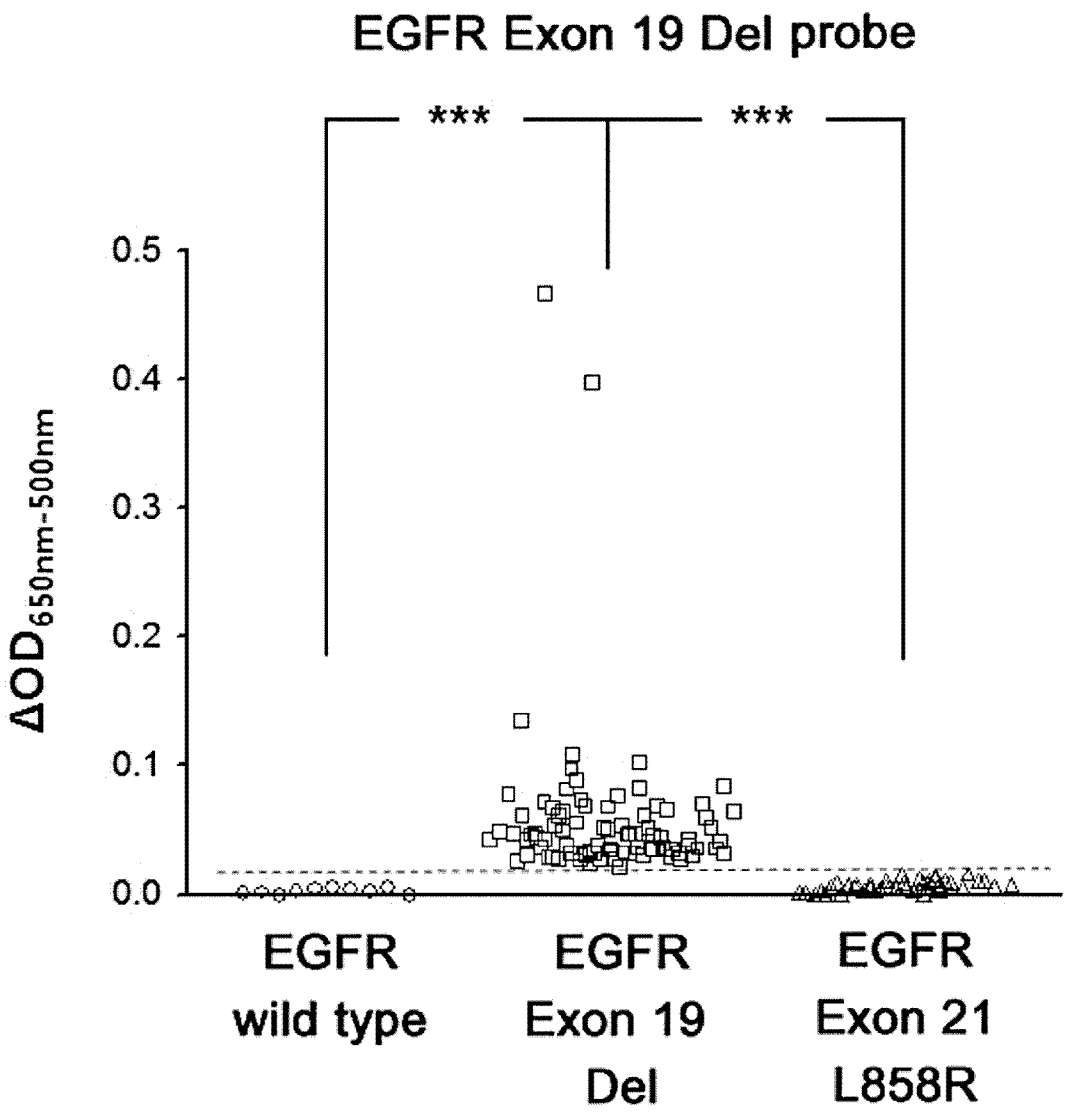
[도154]


B
HPV16/18(+) urine / HPV16 probe
HPV16/18(+) urine / EGFR19 probe
HPV16/18(+) urine / HPV18 probe
HPV16/18(+) urine / EGFR21 probe
Absorbance (OD)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
500 550 600 650 700 750 800
Wavelength (nm)
HPV16/18(+) urine / HPV16 probe
HPV16/18(+) urine / EGFR19 probe
HPV16/18(+) urine / HPV18 probe
HPV16/18(+) urine / EGFR21 probe

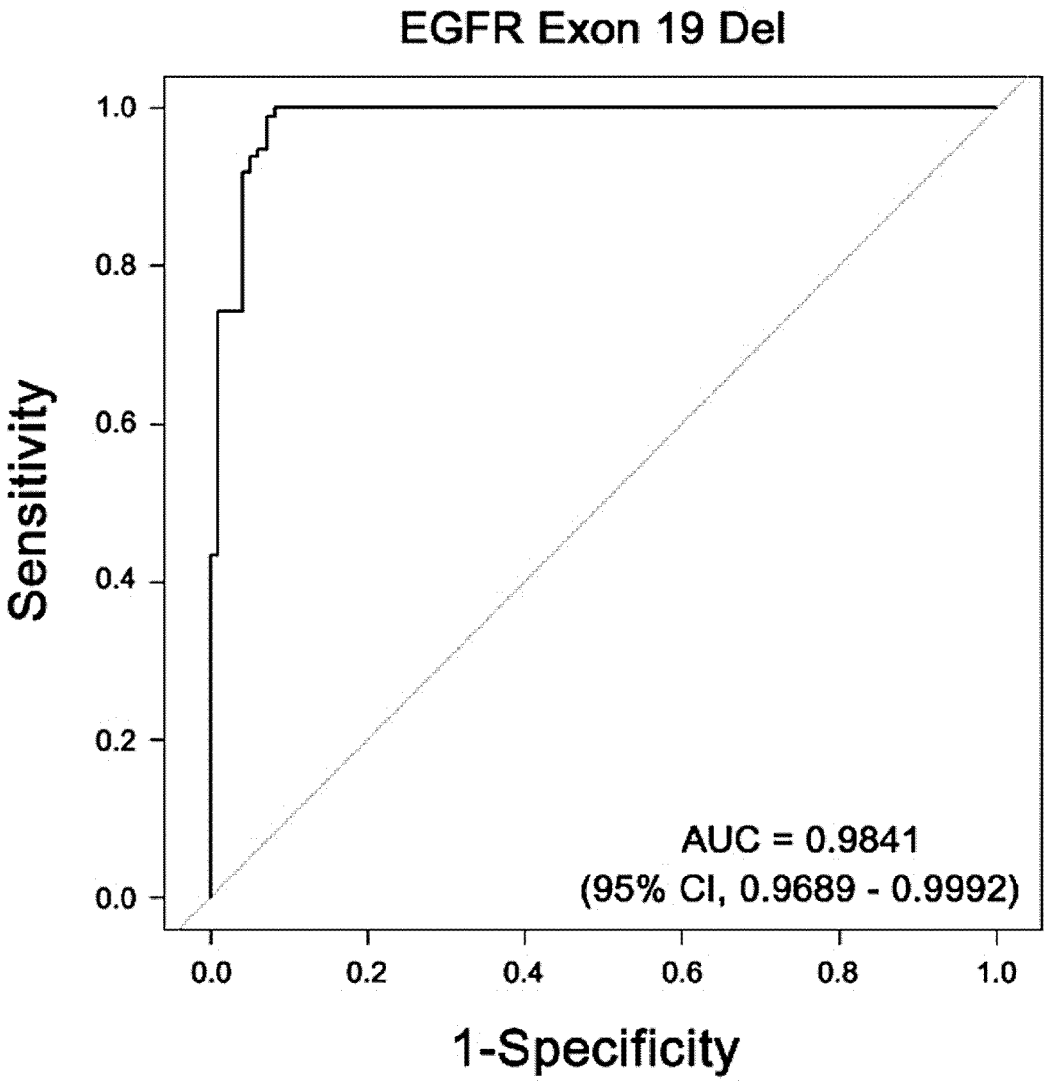
[도155]

	Total [N = 151], n (%)
Age, years:	
Mean	61
Range	38 - 84
Sex:	
Male	67 (44.4)
Female	84 (55.6)
Clinical stage:	
ⅡA - ⅢA	6 (4)
ⅢB - Ⅳ	145 (96)
EGFR mutant type:	
Wild-type	10 (6.6)
Exon 19 Del	92 (60.9)
Exon 21 L858R	49 (32.5)

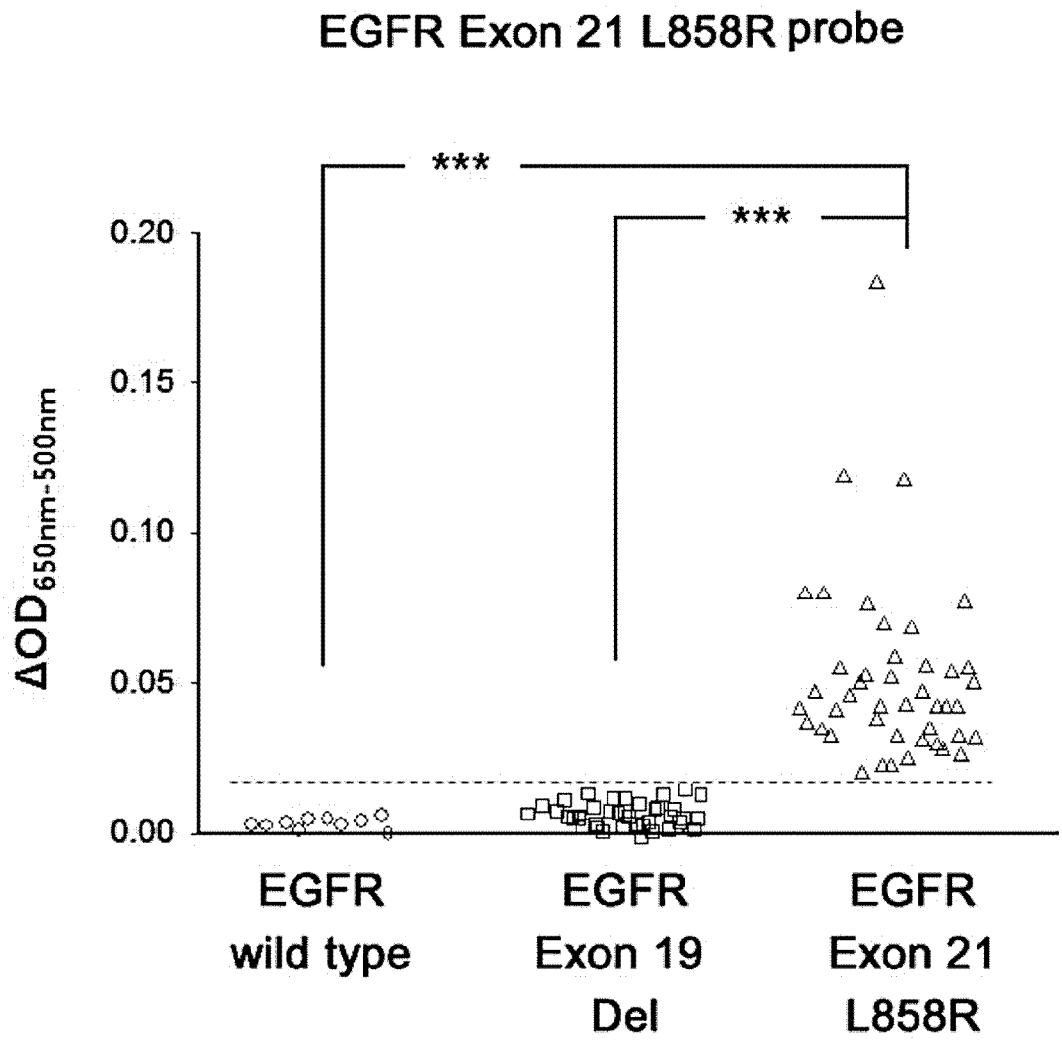
[도156]


EGFR Exon 19 Del probe
***
***
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ΔOD650nm-500nm
EGFR wild type
EGFR Exon 19 Del
EGFR Exon 21 L858R

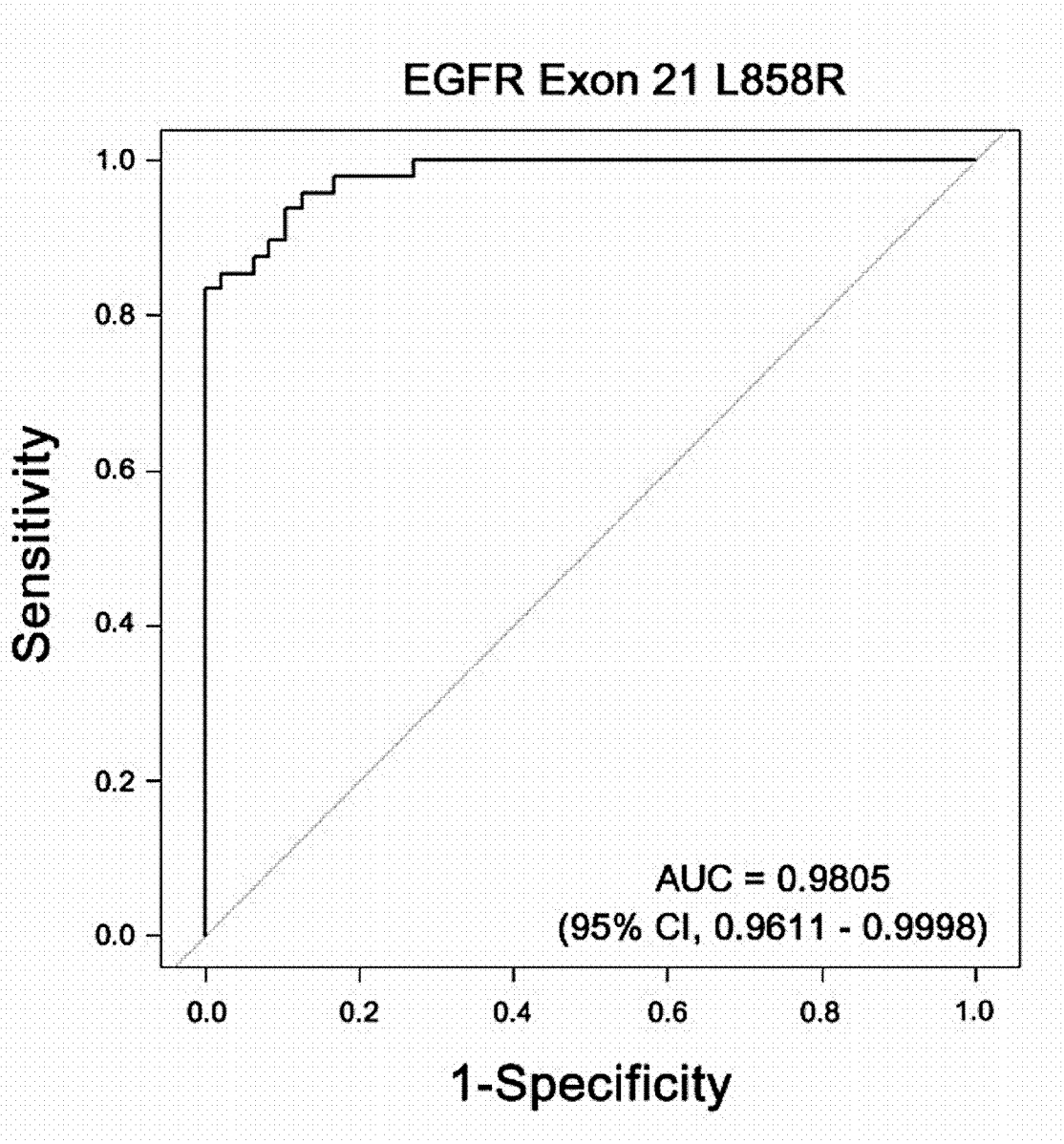
[도157]


EGFR Exon 19 Del
Sensitivity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1-Specificity
AUC = 0.9841
(95% CI, 0.9689 - 0.9992)

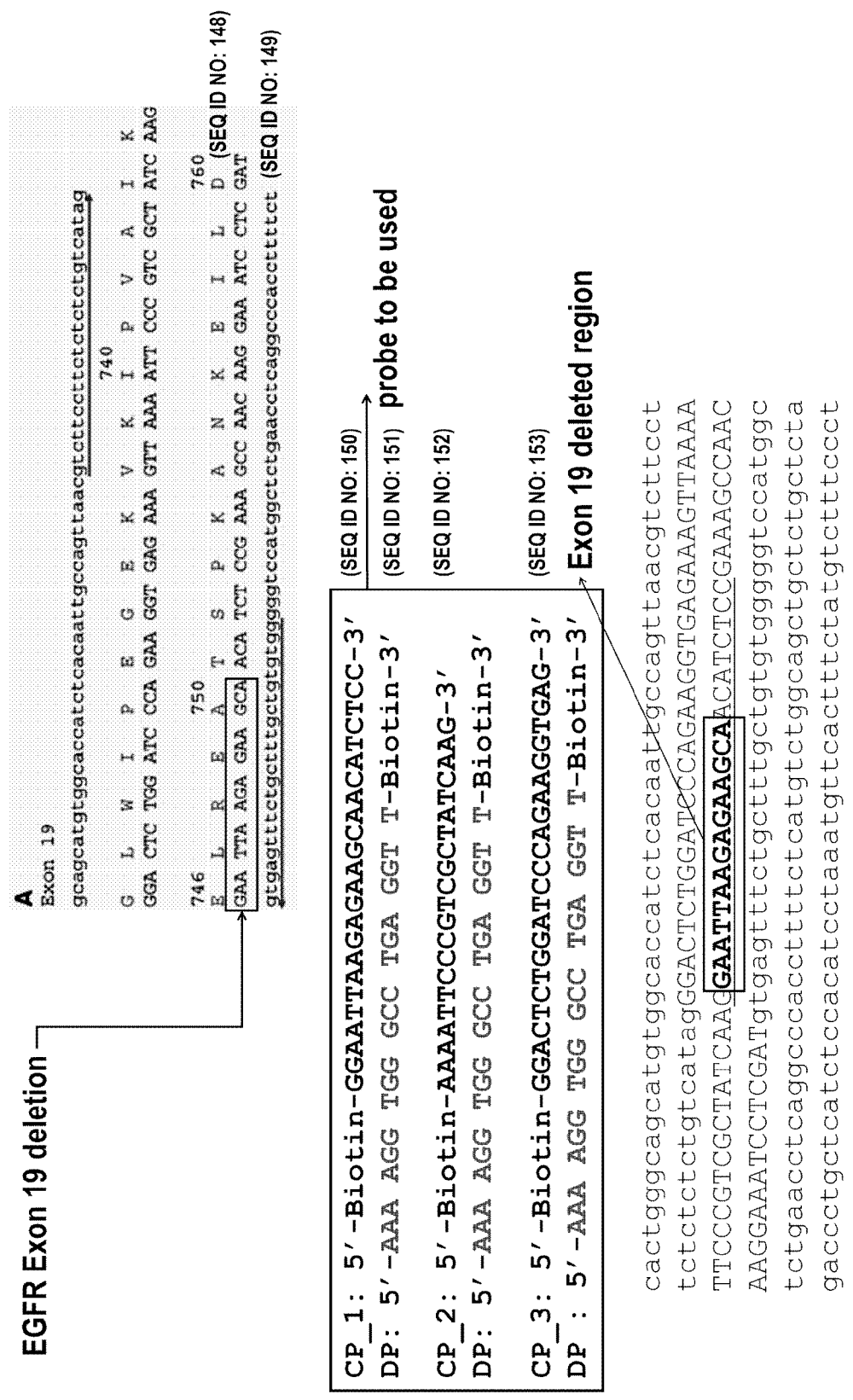
[도158]


EGFR Exon 21 L858R probe
***
***
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
ΔOD650nm-500nm
EGFR wild type
EGFR Exon 19 Del
EGFR Exon 21 L858R

[도159]


EGFR Exon 21 L858R
Sensitivity
1-Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AUC = 0.9805
(95% CI, 0.9611 - 0.9998)

[도160]


EGFR Exon 19 deletion
A
Exon 19
gcagcatggcaccatctcacaattgccagttaacgtcttcctctctctgtcatag
740
G L W I P E G E K V K I P V A I K
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG
746 750 760
E L R E A T S P K A N K E I L D (SEQ ID NO: 148)
GAA TTA AGA GAA GCA ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG GAA ATC CTC GAT
gtgagtttctgctttgctgtgggggtccatggctcctgaacctcaggcccaccttttct (SEQ ID NO: 149)
CP_1: 5′-Biotin-GGAATTAAGAGAAGCAACATCTCC-3′ (SEQ ID NO: 150)
DP: 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′ (SEQ ID NO: 151) probe to be used
CP_2: 5′-Biotin-AAAATTCCCGTCGCTATCAAG-3′ (SEQ ID NO: 152)
DP: 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′
CP_3: 5′-Biotin-GGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAG-3′ (SEQ ID NO: 153)
DP : 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′
Exon 19 deleted region
cactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgccagttaacgtcttcct
tctctctctgtcatagGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAA
TTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAC
AAGGAAATCCTCGATgtgagtttctgctttgctgtgtgggggtccatggc
tctgaacctcaggcccaccttttctcatgtctggcagctgctctgctcta
gaccctgctcatctcccacatcctaaatgttcacttttctatgtctttccct
tt (SEQ ID NO: 154)

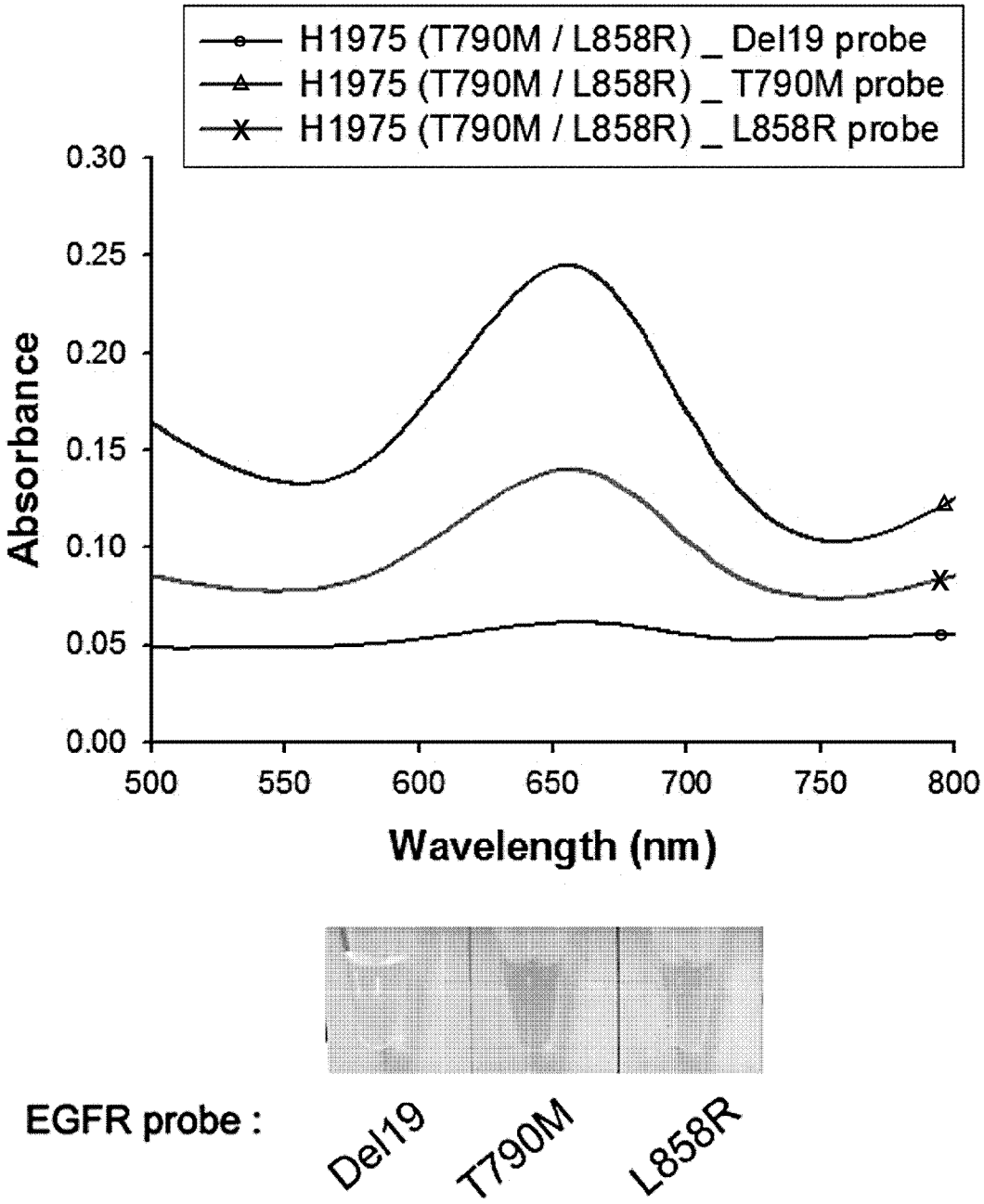
[도161]

EGFR Exon 20 T790M
ACG (WT, T)
ATG (T790M, M)
ccagatgcacccaggagggccctctcccactgcatctgtcacttcacag
ccctgcgtaaacgtccctgtgctaggtctttttgcaggcacagctttttcct
ccatgagtacgtatttgaaactcaagatcgcattcatgcgtcttcacct
ggaagggtccatgtgccccctcctctggccaccatgcgaagccacactg
acgtgccctctcccctcccag
GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCT
GGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCT
TCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCC
CAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG
gtaatcagggaagggagatacgggggagggagataaggagccaggatcct
cacatgcggtctgcgctcctgggatagcaagagtttgccatgggggatatg
tgtgtgcgtgcatgcagcacacacacattcctttatttttggattcaatca
agttgatcttcttgtgcacaaatcagtgcctgtcccatctgcatgtggaa
actctcatcaatcagctaccttttgaagaatttttctctttattgagtgctc
(SEQ ID NO: 155)
CP1: 5′-Biotin-CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC-3′ (SEQ ID NO: 156)
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-3′ (SEQ ID NO: 157)
CP2: 5′-Biotin-CCACCGTGCAGCTCATCATGCA-3′ (SEQ ID NO: 158)
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-3′
CP3: 5′-Biotin-GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGT-3′ (SEQ ID NO: 159)
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-3′
Probe to be used

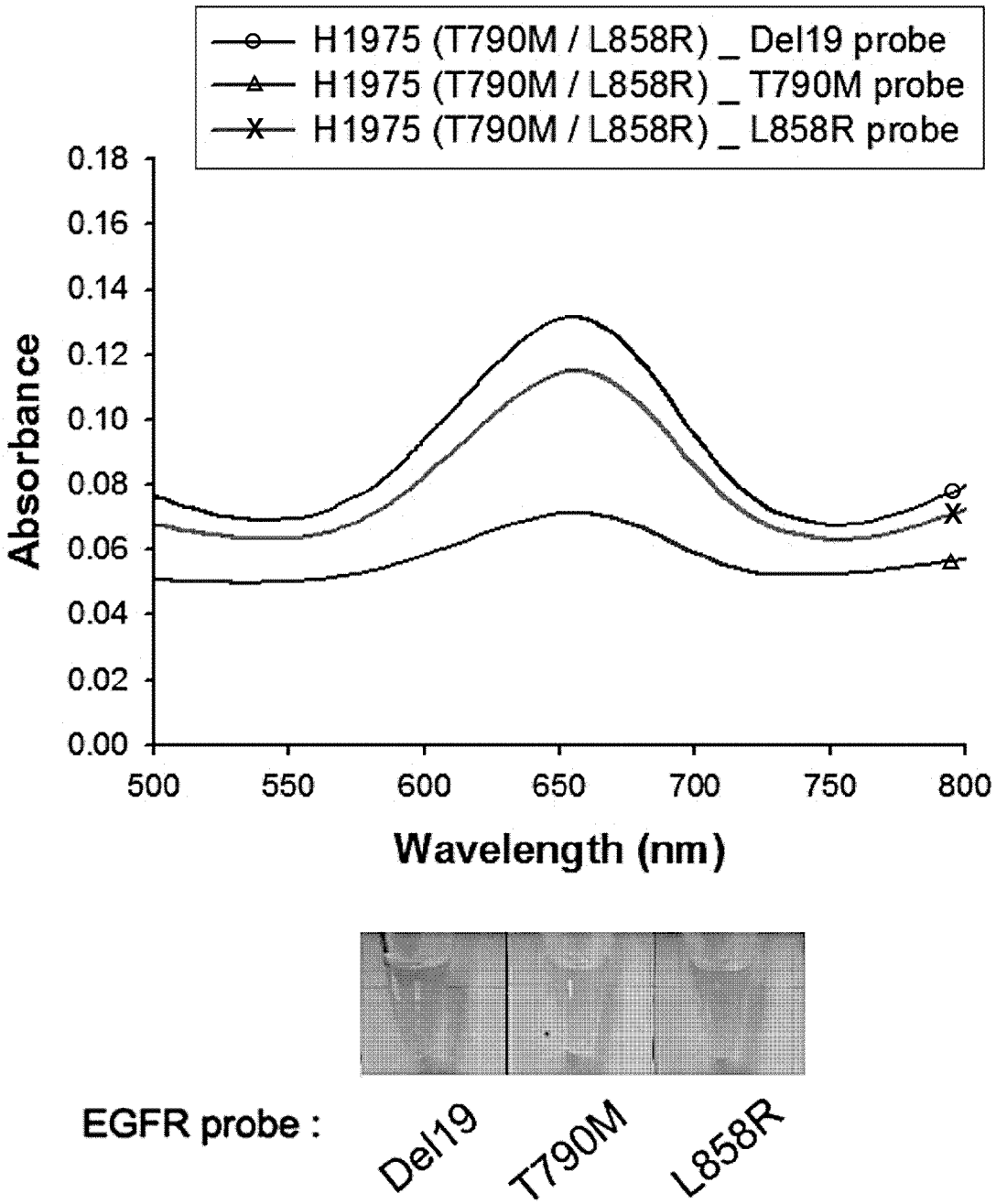
[도162]

EGFR Exon 21 L858R
CTG (WT, L)
CGG(L858R, R)
A
Exon 20
21
1858
22
Wild-type
mutation
GTC AAG ATC ACA GAT TTT GGG CTG GCC AAA CTG CTG
L
CTG
CGG
R
(SEQ ID NO: 160)
GGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACG
TACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCT
GGGTGCCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGA GGCAAA (SEQ ID NO: 161)
Cp1 : CCAGGAGCGTACTGGTGAAAA (SEQ ID NO: 162)
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA (SEQ ID NO: 163)
Cp2 : AAG ATC ACA GAT TTT GGG CGG G (SEQ ID NO: 164)
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA
Cp3 : GGC ATG AAC TAC TTG GAG GAC CGT (SEQ ID NO: 165)
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA
Probe to be used

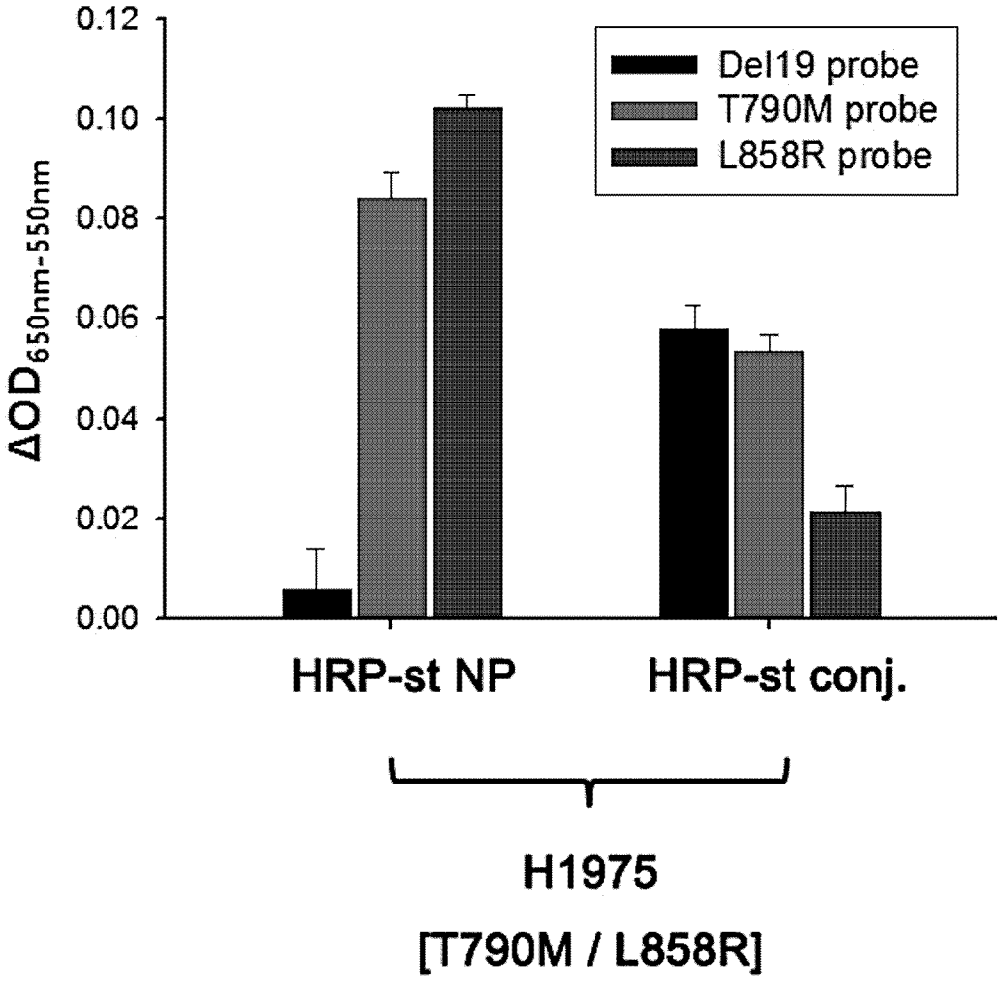
[도163]


H1975 (T790M / L858R) _ Del19 probe
H1975 (T790M / L858R) _ T790M probe
H1975 (T790M / L858R) _ L858R probe
Absorbance
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
500
550
600
650
700
750
800
Wavelength (nm)
EGFR probe :
Del19
T790M
L858R

[도164]


H1975 (T790M / L858R) _ Del19 probe
H1975 (T790M / L858R) _ T790M probe
H1975 (T790M / L858R) _ L858R probe
Absorbance
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
500
550
600
650
700
750
800
Wavelength (nm)
EGFR probe :
Del19
T790M
L858R

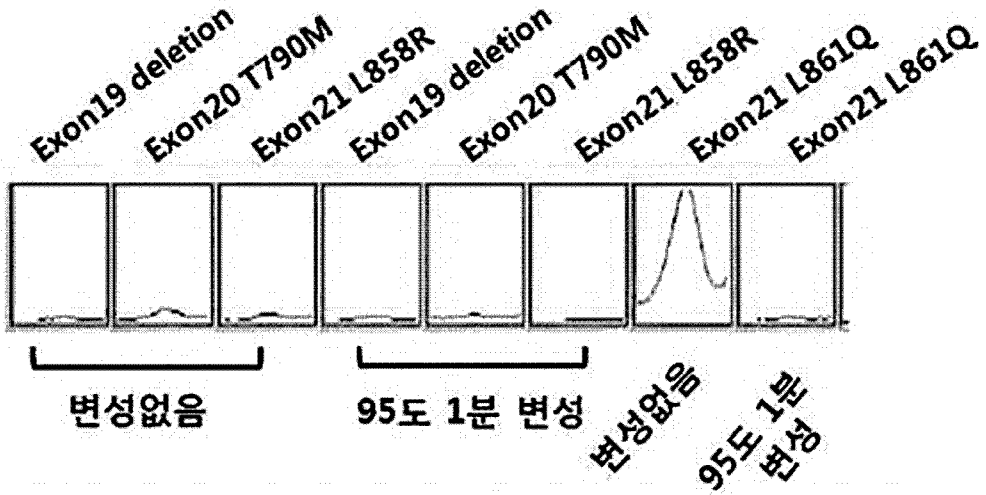
[도165]


0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
ΔOD650nm-550nm
Del19 probe
T790M probe
L858R probe
HRP-st NP
HRP-st conj.
H1975
[T790M / L858R]

[도166]

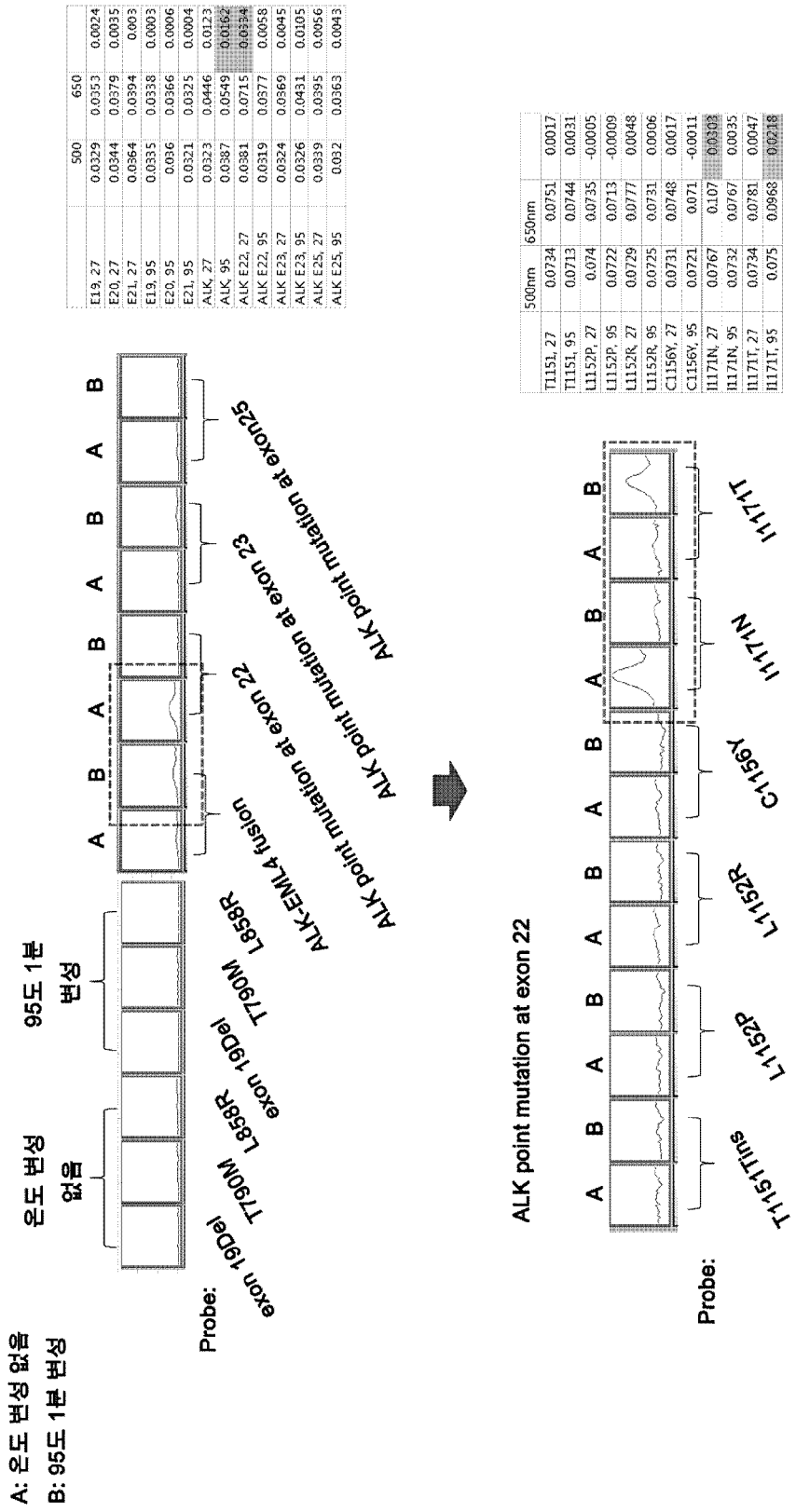
환자 Tissue biopsy : EGFR exon20 T790M / 21 L861Q

혈장 cfDNA 결과 : EGFR exon20 T790M / 21 L861Q



EGFR Mutation	Δ OD (650 nm – 500nm)
Exon19 deletion, 변성없음	0.0115
Exon20 T790M, 변성없음	0.0191
Exon21 L858R, 변성없음	0.0145
Exon19 deletion, 95도 1분 변성	0.0111
Exon20 T790M, 95도 1분 변성	0.0081
Exon21 L858R, 95도 1분 변성	0.0046
Exon21 L861Q, 변성없음	0.2189
Exon21 L861Q, 95도 1분 변성	0.0102

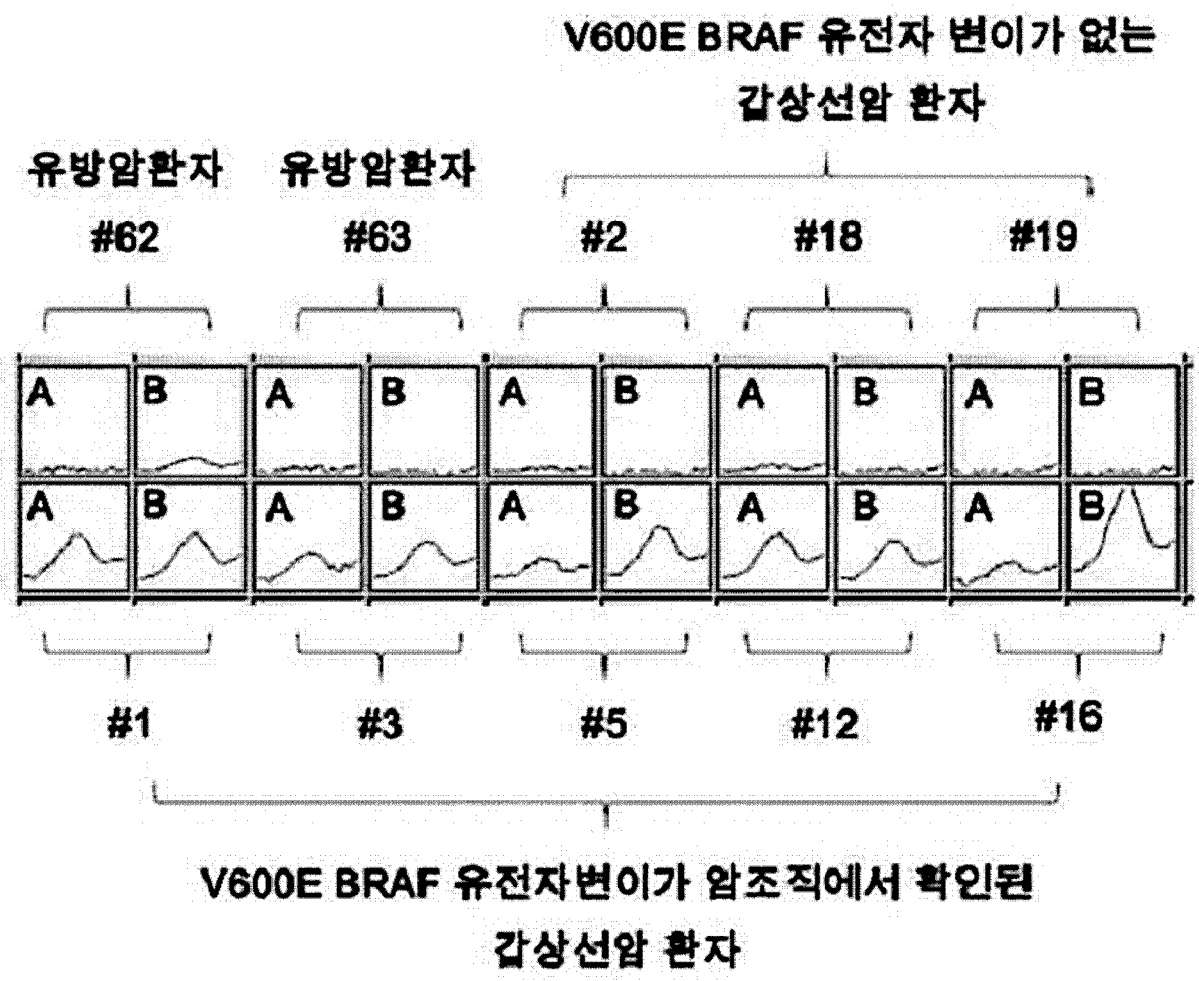
[도167]



	500	650	
E19, 27	0.0329	0.0353	0.0024
E20, 27	0.0344	0.0379	0.0035
E21, 27	0.0364	0.0394	0.003
E19, 95	0.0335	0.0338	0.0003
E20, 95	0.036	0.0366	0.0006
E21, 95	0.0321	0.0325	0.0004
ALK, 27	0.0323	0.0446	0.0123
ALK, 95	0.0387	0.0549	0.0162
ALK E22, 27	0.0381	0.0715	0.0334
ALK E22, 95	0.0319	0.0377	0.0058
ALK E23, 27	0.0324	0.0369	0.0045
ALK E23, 95	0.0326	0.0431	0.0105
ALK E25, 27	0.0339	0.0395	0.0056
ALK E25, 95	0.032	0.0363	0.0043

	500nm	650nm	
T1151, 27	0.0734	0.0751	0.0017
T1151, 95	0.0713	0.0744	0.0031
L1152P, 27	0.074	0.0735	-0.0005
L1152P, 95	0.0722	0.0713	-0.0009
L1152R, 27	0.0729	0.0777	0.0048
L1152R, 95	0.0725	0.0731	0.0006
C1156Y, 27	0.0731	0.0748	0.0017
C1156Y, 95	0.0721	0.071	-0.0011
I1171N, 27	0.0767	0.107	0.0303
I1171N, 95	0.0732	0.0767	0.0035
I1171T, 27	0.0734	0.0781	0.0047
I1171T, 95	0.075	0.0968	0.0218

[도168]



A: 온도변성 없음

B: 95도 1분 변성

[도169]

No denaturation

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039
Δ O.D.	0.001	-0.001	0	-0.001	-0.001
N-Score	0.03	-0.03	0	-0.03	-0.03

Denaturation for 5 min at 30°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.04	0.041	0.039	0.042	0.039
Δ O.D.	0.001	0.001	0.001	0.002	-0.001
N-Score	0.03	0.03	0.03	0.06	-0.03

Denaturation for 15 min at 30°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
650	0.041	0.04	0.041	0.038	0.041
Δ O.D.	0.003	0.002	0.003	0	0.003
N-Score	0.09	0.06	0.09	0.00	0.09

Denaturation for 1 min 30 sec at 60°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.04	0.038	0.038
650	0.039	0.042	0.04	0.039	0.039
Δ O.D.	0	0.002	0	0.001	0.001
N-Score	0.00	0.06	0.00	0.03	0.03

Denaturation for 5 min at 60°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.038	0.038
650	0.04	0.04	0.038	0.04	0.037
Δ O.D.	0.001	0	0	0.002	-0.001
N-Score	0.03	0.00	0.00	0.06	-0.03

Denaturation for 1 min at 95°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
Δ O.D.	0	-0.001	0	-0.001	-0.001
N-Score	0	-0.03	0	-0.03	-0.03

[도170]

No denaturation

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.047	0.039	0.04	0.039	0.039
650	0.107	0.04	0.042	0.04	0.04
Δ O.D.	0.06	0.001	0.002	0.001	0.001
N-Score	1.88	0.03	0.06	0.03	0.03

Denaturation for 5 min at 30°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.044	0.04	0.039	0.04	0.04
650	0.077	0.042	0.047	0.049	0.046
Δ O.D.	0.033	0.002	0.008	0.009	0.006
N-Score	1.03	0.06	0.25	0.28	0.19

Denaturation for 15 min at 30°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.046	0.04	0.04	0.04	0.039
650	0.083	0.047	0.044	0.047	0.045
Δ O.D.	0.037	0.007	0.004	0.007	0.006
N-Score	1.16	0.22	0.13	0.22	0.19

Denaturation for 1 min 30 sec at 60°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.042	0.039	0.039	0.039	0.04
650	0.071	0.049	0.045	0.043	0.044
Δ O.D.	0.029	0.01	0.006	0.004	0.004
N-Score	0.91	0.31	0.19	0.13	0.13

Denaturation for 5 min at 60°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.047	0.039	0.04	0.04	0.04
650	0.1	0.04	0.042	0.044	0.043
Δ O.D.	0.053	0.001	0.002	0.004	0.003
N-Score	1.66	0.03	0.06	0.13	0.09

Denaturation for 1 min at 95°C

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.042	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.069	0.04	0.04	0.04	0.04
Δ O.D.	0.027	0.001	0.001	0.001	0.001
N-Score	0.85	0.03	0.03	0.03	0.03

[도171]

HCC827 (Exon19Del)

	No denaturation			Denaturation for 1 min at 95°C			
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.042	0.042	0.044	0.042	0.041
	0.04	0.038	0.041	0.051	0.04	0.038
	0	-0.004	-0.001	0.007	-0.002	-0.003
N-score	0	-0.16	-0.04	0.28	-0.08	-0.12

A549 (EGFR wildtype)

	No denaturation			Denaturation for 1 min at 95°C		
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.043	0.04	0.044	0.04	0.042	0.042
	0.041	0.04	0.042	0.041	0.039	0.039
	-0.002	0	-0.002	0.001	-0.003	-0.003
N-score	-0.11	0.00	-0.11	0.06	-0.17	-0.17

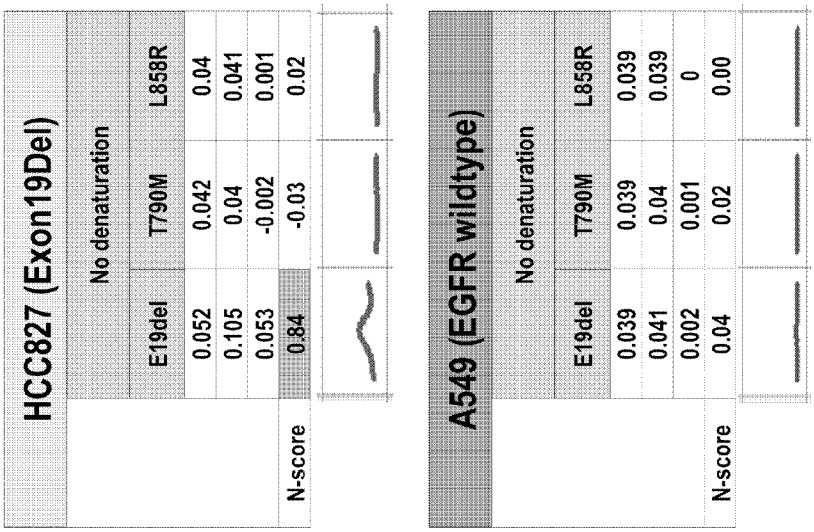
HCC2279 (Exon19Del)

	No denaturation			Denaturation for 1 min at 95°C			
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.043	0.044	0.05	0.046	0.048
	0.038	0.04	0.04	0.098	0.044	0.046
	-0.002	-0.003	-0.004	0.048	-0.002	-0.002
N-score	-0.08	-0.13	-0.17	2.00	-0.08	-0.08

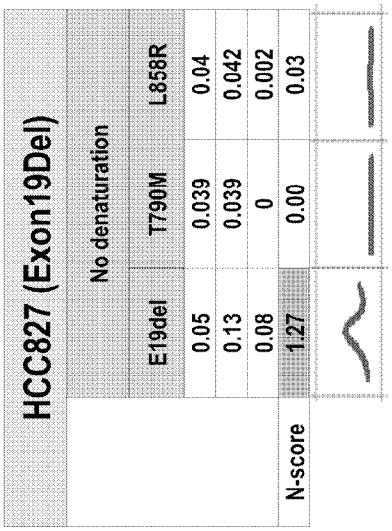
H1975 (T790M, L858R)

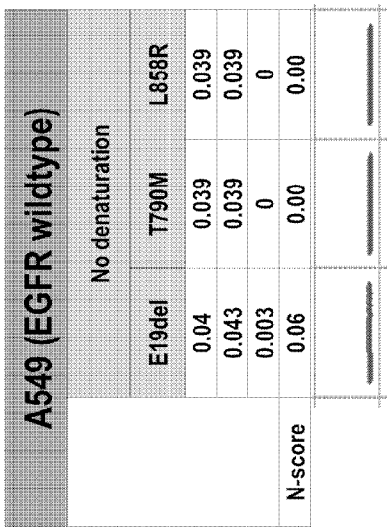
	No denaturation			Denaturation for 1 min at 95°C			
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.041	0.04	0.041	0.046	0.048	0.045
	0.039	0.038	0.041	0.045	0.07	0.061
	-0.002	-0.002	0	-0.001	0.022	0.016
N-score	-0.07	-0.07	0.00	-0.03	0.76	0.55

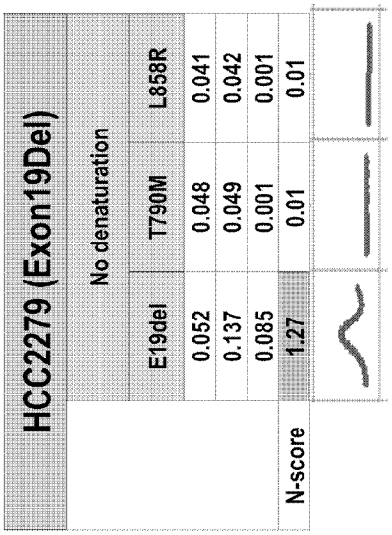
[도172]

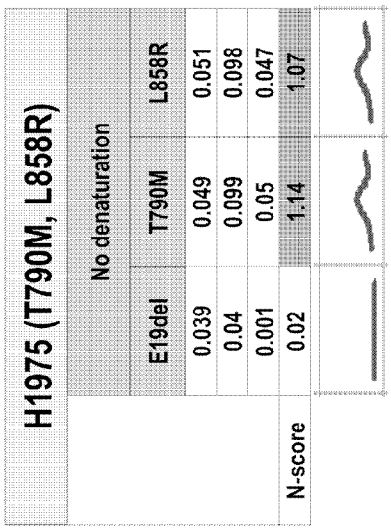

HCC827 (Exon19Del)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.052 0.042 0.04
0.105 0.04 0.041
0.053 -0.002 0.001
N-score 0.84 -0.03 0.02
A549 (EGFR wildtype)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.039 0.039 0.039
0.041 0.04 0.039
0.002 0.001 0
N-score 0.04 0.02 0.00
HCC2279 (Exon19Del)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.047 0.039 0.04
0.089 0.041 0.039
0.042 0.002 -0.001
N-score 0.63 0.03 -0.01
H1975 (T790M, L858R)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.04 0.048 0.058
0.046 0.111 0.209
0.006 0.063 0.151
N-score 0.14 1.43 3.43

[도173]


HCC827 (Exon19Del)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.05 0.039 0.04
0.13 0.039 0.042
0.08 0 0.002
N-score 1.27 0.00 0.03


A549 (EGFR wildtype)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.04 0.039 0.039
0.043 0.039 0.039
0.003 0 0
N-score 0.06 0.00 0.00


HCC2279 (Exon19Del)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.052 0.048 0.041
0.137 0.049 0.042
0.085 0.001 0.001
N-score 1.27 0.01 0.01


H1975 (T790M, L858R)
No denaturation
E19del T790M L858R
0.039 0.049 0.051
0.04 0.099 0.098
0.001 0.05 0.047
N-score 0.02 1.14 1.07

[도174]

HCC827 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.049	0.049	0.046	0.054	0.044	0.047
650	0.095	0.085	0.078	0.148	0.073	0.093
	0.046	0.036	0.032	0.094	0.029	0.046
N-score	0.75	0.59	0.52	1.54	0.48	0.75

A549 (EGFR Wildtype)

	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.063	0.045	0.048	0.052	0.049	0.052
650	0.071	0.083	0.112	0.147	0.088	0.093
	0.008	0.038	0.064	0.095	0.039	0.041
N-score	0.16	0.75	1.25	1.86	0.76	0.80

HCC2279 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.043	0.042	0.041	0.046	0.048	0.051
650	0.054	0.047	0.041	0.072	0.093	0.102
	0.011	0.005	0	0.026	0.045	0.051
N-score	0.22	0.10	0.00	0.51	0.88	1.00

H1975 (T790M, L858R)

	DNase 1μL, 37°C			DNase 2μL, 37°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.054	0.046	0.043	0.046	0.043	0.05
650	0.101	0.084	0.059	0.092	0.055	0.128
	0.047	0.038	0.016	0.046	0.012	0.078
N-score	0.87	0.70	0.30	0.85	0.22	1.44

[도175]

HCC827 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 24°C			DNase 2 μL, 24°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.055	0.041	0.04	0.045	0.04	0.039
650	0.175	0.042	0.044	0.073	0.042	0.038
	0.12	0.001	0.004	0.028	0.002	-0.001
N-score	1.97	0.02	0.07	0.46	0.03	-0.02

A549 (EGFR Wildtype)

	DNase 1μL, 24°C			DNase 2μL, 24°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.04	0.039	0.04	0.041	0.041	0.042
650	0.039	0.037	0.04	0.039	0.042	0.039
	-0.001	-0.002	0	-0.002	0.001	-0.003
N-score	-0.02	-0.04	0.00	-0.04	0.02	-0.06

HCC2279 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 24°C			DNase 2 μL, 24°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.048	0.04	0.041	0.044	0.042	0.04
650	0.072	0.039	0.042	0.068	0.043	0.04
	0.024	-0.001	0.001	0.024	0.001	0
N-score	0.47	-0.02	0.02	0.47	0.02	0.00

H1975 (T790M, L858R)

	DNase 1μL, 24°C			DNase 2μL, 24°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.04	0.043	0.044	0.043	0.05	0.045
650	0.041	0.054	0.056	0.04	0.097	0.063
	0.001	0.011	0.012	-0.003	0.047	0.018
N-score	0.02	0.20	0.22	-0.06	0.87	0.33

[도176]

HCC827 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.048	0.042	0.041	0.044	0.042	0.04
650	0.116	0.04	0.041	0.071	0.039	0.044
	0.068	-0.002	0	0.027	-0.003	0.004
N-score	1.11	-0.03	0.00	0.44	-0.05	0.07

A549 (EGFR Wildtype)

	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.039	0.039	0.04	0.041	0.042	0.042
650	0.038	0.038	0.038	0.041	0.038	0.042
	-0.001	-0.001	-0.002	0	-0.004	0
N-score	-0.02	-0.02	-0.04	0.00	-0.08	0.00

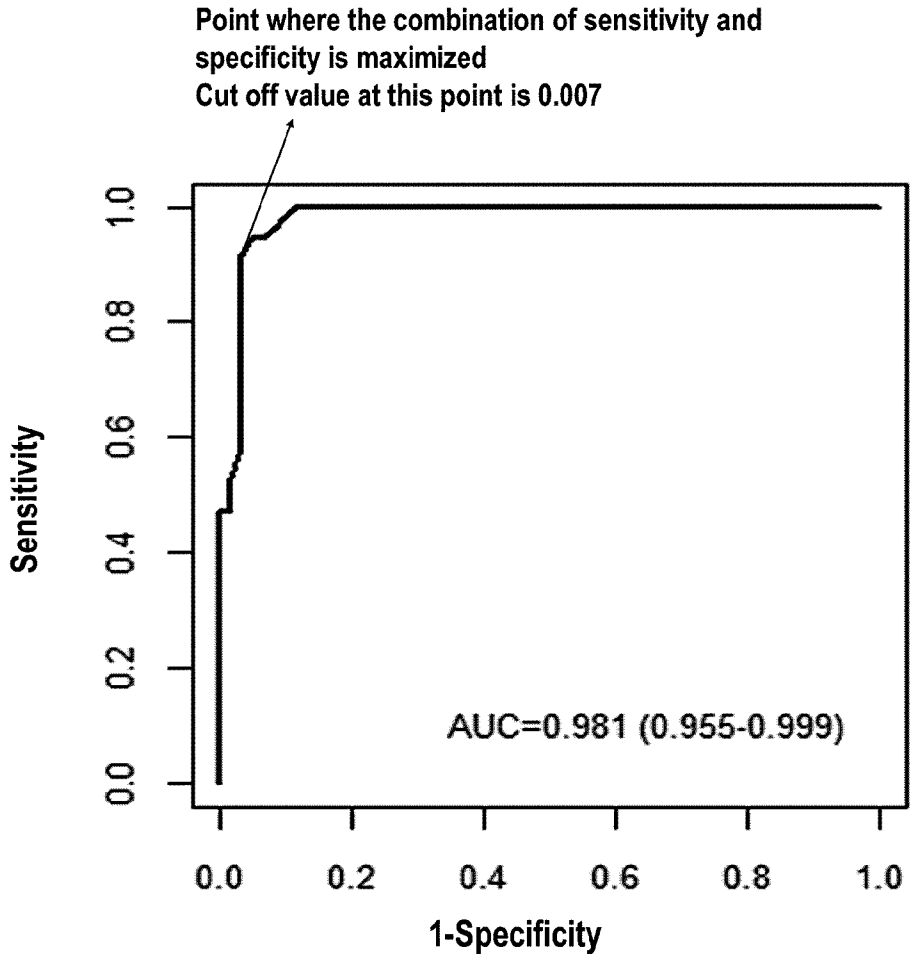
HCC2279 (Exon19Del)

	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.047	0.042	0.041	0.05	0.04	0.04
650	0.083	0.039	0.042	0.122	0.04	0.04
	0.036	-0.003	0.001	0.072	0	0
N-score	0.71	-0.06	0.02	1.41	0.00	0.00

H1975 (T790M, L858R)

	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
Wavelength	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.039	0.043	0.047	0.038	0.044	0.047
650	0.038	0.063	0.098	0.038	0.072	0.063
	-0.001	0.02	0.051	0	0.028	0.016
N-score	-0.02	0.37	0.94	0.00	0.52	0.30

[도177]


Point where the combination of sensitivity and specificity is maximized
Cut off value at this point is 0.007
Sensitivity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AUC=0.981 (0.955-0.999)
1-Specificity