(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0089586
(43) 공개일자 2025년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2531/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0178281
(22) 출원일자 2023년12월11일
심사청구일자 2023년12월11일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
유도현
경상남도 진주시 새평거로 111, 312동 1501호 (평거동, 평거휴먼시아3단지)
배현아
경상남도 진주시 내동로348번길 5-6, 301호 (가좌동)
김재민
경상남도 진주시 소호로19번길 11, 111동 1602호 (충무공동, 진주혁신도시 중흥에스-클래스 더프라임)
(74) 대리인
위병갑

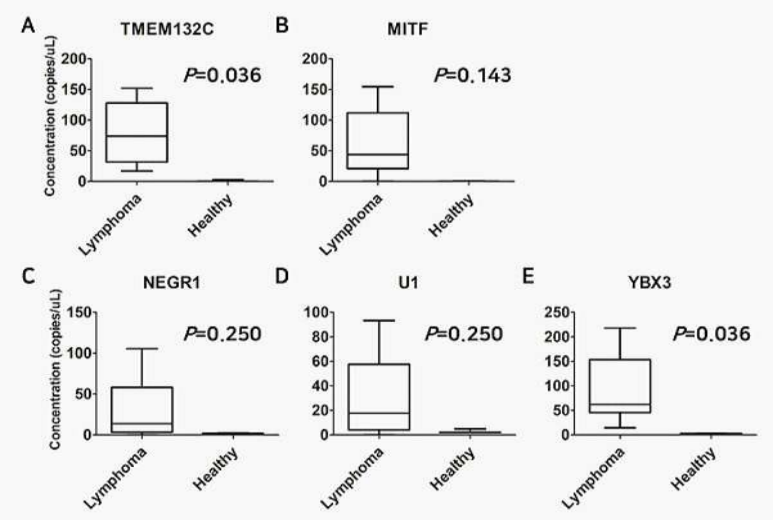
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **ctDNA 단일염기변이를 이용한 반려견의 종양 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 ctDNA SNV를 이용하여 개의 종양을 진단할 수 있는 키트 및 마이크로어레이에 관한 것으로, 본 발명에 따른 기술은 개의 ctDNA SNV를 이용하여 종양이 발생한 개에 대하여 쉽고 정확하게 발생 여부를 확인하는데 사용될 수 있으며, 나아가 종양이 발생한 개의 생존율을 높일 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	322092042
과제번호	HD030613821165300000
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	반려동물전주기산업화기술개발
연구과제명	악성종양 환견에서 CAR- NK 세포치료제 암치료 효능평가 임상시험 및 효과, 예후판정을 위한 바이오마커 확립
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

염색체 26의 3569926위치에서 의 단일염기변이;

염색체 20의 21913972위치에서의 단일염기변이;

염색체 6의 74358898위치에서의 단일염기변이;

염색체 17의 59902300위치에서의 단일염기변이; 및

염색체 27의 35337791위치에서의 단일염기변이로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단일염기변이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제제는

염색체 26의 3569926위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 20의 21913972위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 6의 74358898위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 17의 59902300위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드; 및

염색체 27의 35337791위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 프로브인 것을 특징으로 하는, 개의 종양 진단, 치료 반응, 및 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제제는

염색체 26의 3569926위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 20의 21913972위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 6의 74358898위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드;

염색체 17의 59902300위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드; 및

염색체 27의 35337791위치에서의 단일염기변이를 포함하는 10 내지 100개의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있는 프라이머인 것을 특징으로 하는, 개의 종양 진단, 치료 반응, 및 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제1항, 제2항, 또는 제3항에 따른 조성물을 포함하는, 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 키트.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 포함하는, 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 마이크로어레이.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 반려견의 종양 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 ctDNA의 단일염기변이를 이용한 반려견 종양의 진단 등에 이용할 수 있는 키트 또는 마이크로어레이 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2022년 말 기준 국내 반려동물 양육가구는 552만 가구로, 전체 가구의 25.7%를 차지하는 것으로 추정되며, 또한 반려동물 양육가구의 75.6%가 "개"를 기르고 있다. 반려견 양육가구는 2021년 대비 5.2% 증가한 것이며, 해가 거듭할수록 증가하는 추세를 보이고 있다.

[0003] 코로나 이후로 지속되는 경기 침체로 대부분의 분야가 매출 하락세를 보이는 반면, 반려동물 시장은 지속적인 매출 상승을 그리고 있다. 농촌경제연구원에 따르면 2020년 3조 4000억 원이던 국내 반려동물 시장은 2027년에 6조 원대까지 성장할 전망이다. 이에 수반하여, 반려동물 의료시장 규모는 2022년 1조 7,400억 원으로 추계되었으며, 2023년 1억 9,800억 원, 및 2027년 3조 2,969억 원으로 예상된다.

[0004] 상승하는 반려동물 의료시장 규모에 반해, 대부분의 반려견은 품종 개량, 운동 부족 등으로 손쉽게 질환에 노출되는 경향이 있으며, 특히 반려견 종양질환의 경우, 일반적인 동물병원에서 조직검사 등의 정밀검사를 실시하는데 어려움이 있으며, 그에 따라 적절한 치료를 위한 빠르고 정확한 진단 및 예후 예측 등에 어려움이 있는 실정이다.

[0005] 한편, cfDNA(cell-free DNA)는 세포 바깥에서 떠다니는 분절화된 DNA 조각으로, 혈액, 소변, 뇌척수액, 및 흉막액 등의 체액에 주로 존재하며, DNA가 유래된 세포의 유전 정보를 포함한다. 상기 cfDNA는 세포자멸사(apoptosis), 괴사(necrosis), 및 활성 분비(active release)에 의해 주로 생성되며, 뉴클레아제 활성, 신장 배설, 및 비장과 간 흡수 등을 통해 제거된다. 암환자에서 종양세포는 세포자멸사와 괴사가 활발히 일어나, 더 많은 DNA를 방출시키는데, 상기 종양세포에서 유래한 cfDNA를 ctDNA(circulating tumor DNA)라 한다. 상기 ctDNA는 정상 세포에서 유래한 cfDNA보다 그 길이가 짧으며(Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. Sci Transl Med 2018;10:eaat4921.), 체세포 돌연변이 검출을 통해 확인할 수 있다. 상기 ctDNA는 반감기가 짧기 때문에 검사 당시의 종양 부담(tumor burden)을 실시간으로 반영할 수 있다.

[0006] 상기 ctDNA는 검출되는 경우, 암 환자의 병기를 예측할 수 있다고 알려져 있으며(Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med 2014;6:224ra24.), 암의 종류에 따라 검출되는 ctDNA의 종류가 다른지 여부를 확인하는 연구 또한 진행 중이나, 아직 적응증별로 ctDNA를 달리함을 확인하여 종양의 조기검진, 진단 및 예후 예측 등에 사용하는 연구 결과에 대해서는 알려진 바 없다.

[0007] 단일 뉴클레오티드 변이(Single Nucleotide Variant, SNV)는 가장 일반적인 유전 변이체 중 하나로, 한 집단의 DNA 서열 또는 게놈에 있는 단일 뉴클레오티드의 변이이며, 생식세포 및 체세포 모두에서 발생할 수 있다. 상기 SNV는 종양에서 발생하는 다양한 변이 중 가장 흔하게 확인되고, 단백질 코딩 서열에서만 발생하는 것이 아니며, 비코딩 영역 또는 두 유전자 사이의 영역에서도 발생할 수 있다. 이에 따라 유전자 발현 조절 영역에서 발생한 SNV는 전사 수준을 조절하는데 중요한 역할을 하는 바, 최근 이러한 변이 유전자좌를 확인하여 질병을 진단, 예방, 및 치료하는데 이용하는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0008] 그러나 아직까지 종양 바이오마커로서 SNV를 활용한 ctDNA의 수의학적 연구는 그 수요에 비해 거의 진행되지 않은 바, 본 발명자들은 개의 종양을 진단 및 예후를 예측하기 위해, 종양이 발생한 개에서 종양의 SNV를 확인하고, 높은 농도로 검출되는 ctDNA를 확인함으로써 이를 개의 종양을 진단하는 바이오마커로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은, 단일염기변이(Single Nucleotide Variant, SNV)를 이용한 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 단일염기변이(Single Nucleotide Variant, SNV)를 이용한 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염색체 26의 3569926위치에서의 단일염기변이;

[0012] 염색체 20의 21913972위치에서의 단일염기변이;

[0013] 염색체 6의 74358898위치에서의 단일염기변이;

[0014] 염색체 17의 59902300위치에서의 단일염기변이; 및

[0015] 염색체 27의 35337791위치에서의 단일염기변이를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 개의 종양 진단, 및 예후 예측용 조성물을 포함하는, 키트 및 마이크로어레이를 제공한다.

[0017] 또한 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개 종양의 발병가능성을 예측하거나 발병을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 염색체 26, 염색체 20, 염색체 6, 염색체 17, 및 염색체 27의 SNV는 종양이 발병된 개에서만 발견되는 바, 개의 혈장으로부터 분리된 ctDNA를 이용하여 개의 종양, 구체적으로는 림프종의 빠르고 정확한 진단이 가능하며, 이에 따라 적합한 치료를 가능하게 하고, 또한 이러한 기술은 추가적인 표식자 발굴 및 SNV의 수의학적 이용에 관한 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 맞춤형 TaqMan SNP 유전형 분석(Assays-by-Design)을 이용하여 ddPCR을 실시하여, 각 대립유전자 특이적 MGB프로브를 형광 리포터 염료(mutant-type, FAM; wild-type, VIC)로 표지함으로써 TMEM132C, MITF, NEGR1, U1, 및 YBX3 유전자를 개의 종양과 관련된 ctDNA SNV로 이용할 수 있음을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 TMEM132C, MITF, NEGR1, U1, 및 YBX3의 ctDNA SNV농도가 림프종견과 대조군견 간에 유의하게 차이남으로써 상기 5개 ctDNA가 개의 종양에 관한 임상병리학적 진단 및 예후 인자와 유의하게 연관되어 있음을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0022] 본 발명에서 어떤 구성요소를 “포함”한다는 것은, 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명자들은 개의 종양을 신속하고 정확하게 진단 및 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위한 연구를 진행하던 중, 종양샘플과 control 샘플의 reference genome 및 alternative allele matching을 통해 종양 발생

여부에 따라 단일염기변이의 발생 여부가 달라지는 유전자를 탐색하여, 그 다형성 바이오마커를 선정하였고, 선정된 바이오마커의 이용가부를 개의 말초혈액을 이용한 PCR을 실시하여 확인한 결과, TMEM132C, MITF, NEGR1, U1, 및 YBX3 유전자의 단일염기변이가 개의 종양 발생여부와 유의한 관련성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0024] 본 발명의 "TMEM132C"는 "transmembrane protein 132C"의 약자로, membrane 필수 구성요소인 막관통 단백질로서(Alliance of Genome Resources, 2022.04.), 염색체 26의 NC_051830.1 위치(3142914 내지 3343063)에 존재하는 유전자이며, 서열번호 1로 표시된다. 본 발명에서는 개의 lymphoma 발병 여부에 따라 상기 염색체 26의 3569926 위치에서 염기 A 또는 G를 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다.

[0025] 본 발명의 "MITF"는 "Melanocyte inducing transcription factor(멜라닌 세포 유도 전사인자)"의 약자로, 염색체 20의 NC_051824.1 위치(21883312 내지 22101930)에 존재하는 유전자이며, 서열번호 2로 표시된다. 본 발명에서는 개의 lymphoma 발병 여부에 따라 상기 염색체 20의 21913972 위치에서 염기 C 또는 T를 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다.

[0026] 본 발명의 "NEGR1"은 "neuronal growth regulator 1"의 약자로, 염색체 6의 NC_051810.1 위치(74414385 내지 75225455)에 존재하는 유전자이며, 서열번호 3으로 표시된다. 본 발명에서는 개의 lymphoma 발병 여부에 따라 상기 염색체 6의 74358898 위치에서 염기 C 또는 T를 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다.

[0027] 본 발명의 "U1"은 염색체 17의 NC_051821.1(59857649 내지 59857810)에 존재하는 유전자이며, 서열번호 4로 표시된다. 본 발명에서는 개의 lymphoma 발병 여부에 따라 상기 염색체 17의 59902300 위치에서 염기 G 또는 T를 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다.

[0028] 본 발명의 "YBX3"은 "Y-box binding protein 3"의 약자로, 염색체 27의 NC_051831.1 위치 (35383798 내지 35411218)에 존재하는 유전자이며, 서열번호 5로 표시된다. 본 발명에서는 개의 lymphoma 발병 여부에 따라 상기 염색체 27의 35337791 위치에서 염기 G 또는 A를 가짐을 확인하여 발명을 완성하였다.

[0029] 본 발명에서 상기 "TMEM132C", "MITF", "NEGR1", "U1" 및 "YBX3"은 *Canis lupus familiaris* (dog)에서 발현되는 유전자를 말한다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명은 개에서 발생하는 종양의 재발 (Recurrence), 진행 (progression), 전이 (metastasis) 등을 예측하는 것을 포함한다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "예후"는 림프종과 같은 신생물 질환의 예를 들어 발병, 재발, 전이성 확산, 및 약물내성을 비롯한 림프종-기인성 사망 또는 진행의 가능성 등의 병의 경과 및 완치 여부를 의미한다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "예측"이란 개에서 종양, 구체적으로는 림프종이 발병할 가능성이 있는지를 판별하고, 화학요법 또는 방사선 치료 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 치료, 예를 들어 특정 치료제, 및/또는 원발성 종양의 수술로 제거, 및/또는 재발없이 특정 시기 동안 화학요법으로 치료된 후 생존할 여부 및/또는 가능성과 관련된다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "단일염기변이(Single Nucleotide Variant, SNV)"란 DNA 서열에서 단일 뉴클레오티드(예: A, T, C 또는 G)의 변이를 말하며, 통상적으로 인구에서 적당히 높은 빈도(>1%)로 존재하는 경우 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism)으로 분류되기도 한다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "대립 유전자 (allele)" 또는 "대립형질"이란 상동 염색체의 동일한 유전자 좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 말한다. 대립 유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNV는 두 종류의 대립 인자 (biallele)를 갖는다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "키트"는 개의 종양 진단 및 예후 예측용 마커인, 단일염기변이를 확인함으로써 개의 종양을 진단 및 예후를 예측하는 데 사용될 수 있으며, 상기 단일염기변이를 확인하기 위한 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함할 수 있고, 더욱이 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등과 같은, PCR을 수행하기 위해 필요한 다른 구성을 더 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "생물학적 시료"는 액체 생검을 할 수 있는 액체 형태의 시료라면 제한 없이 사용

할 수 있으며, 구체적으로는 혈액, 눈물, 소변, 타액 또는 땀일 수 있고, 예를 들어 말초 혈액일 수 있다. 또한 상기 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어 “핵산분자”는 뉴클레오티드 단위체로 구성된 생체분자로, DNA와 RNA를 모두 포함하며, 본 발명의 목적상 상기 핵산분자는 무세포 DNA (Cell-free circulating DNA; cfDNA), 순환 종양 세포 DNA (circulating tumor cell DNA; ctcDNA) 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 cfDNA 및 ctDNA는 혈액으로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어 "유전자형 (genotype)"이란 세포 또는 조직 샘플에서 특정 유전자의 특이적 대립유전자를 지칭한다.

[0039] 본 발명의 SNV 유전자형의 확인은 시퀀싱 분석, 자동염기서열분석기를 사용한 시퀀싱 분석, 파이로시퀀싱 (pyrosequencing), 마이크로어레이에 의한 혼성화, PCR-RELP법 (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP법 (single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법 (specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO (allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqManPCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법 (rolling circle amplification), HRM (high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법에 의하여 수행될 수 있다.

[0040] 본 발명의 SNV 다형성의 결과들은 당업계에서 일반적으로 사용되는 통계학적 분석 방법을 이용하여 통계 처리할 수 있으며, 예를 들면, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 테스트(Chi-square test), 선형 회귀 선분석(linear regression line analysis), 다변량 로지스틱 회귀분석(multiple logistic regression analysis) 등을 통해 얻은 연속 변수(continuous variables), 절대 변수(categorical variables), 대응비(odds ratio) 및 95% 신뢰구간(confidence interval) 등의 변수를 이용하여 분석할 수 있다.

[0042] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0043] 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일뿐, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] **<실시예 1> 실험 방법**

[0046] **<1.1> 연구 대상 선정**

[0047] 림프종 진단된 41마리의 개로부터 EDTA 혈장을 포함한 혈액 샘플을 채취하였고, 유세포 분석, 조직병리학 및 면역조직화학을 통해 진단 당시 림프종 이외 기저 질환이 없는 B세포 림프종으로 진단된 개 2마리를 연구 대상으로 선정하였다. 상기 2마리로부터 얻은 림프절 조직으로 전체 게놈 서열 분석(WGS분석)을 실시하였다.

[0048] 대조군으로는 경상국립대학교 수의과대학 정기검진 또는 거세 및 난소자궁적출술을 위해 경상국립대학교 수의과병원에 내원한, 다른 질병의 임상증상이 없는 개 3마리를 설정하였다.

[0050] **<1.2> ctDNA 마커의 선별**

[0051] 림프종으로 진단된 개의 혈액샘플 및 실시예 1.1에서 진단시 수집한 혈액 샘플을 EDTA 튜브에 넣고, 5600rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액 EDTA 혈장만 추가 분석이 있을 때까지 -80℃에 냉동보관 하였다.

[0052] 상기 모든 EDTA 혈장으로부터, 상업용 DNA 추출 키트(NucleoSpin® cfDNA XS, MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany)를 이용하여 ctDNA를 추출하였다. 구체적으로는, 240 μL 의 EDTA 혈장을 미세원심분리 튜브에 첨가하고, 20 μL 의 Proteinase K를 함께 첨가해 혼합하였다. 이를 37 °C 에서 10분 동안 배양한 후 Buffer BB 360 μL 를 더 첨가하여 혼합하였다. 각 샘플에 대해 최대 600 μL 의 혼합물을 수집 튜브(2mL)에 배치된 NucleoSpin® cfDNA XS 컬럼에 로드한 후, 2,000 x g에서 30초 동안 원심분리 후 관류액이 포함된 수집 튜브를 버리고 500 μL 의 Western Blot 완충액을 NucleoSpin® cfDNA XS 컬럼에 추가하였다. 이를 11,000 x g에서 30초 동안 원심분리한 후 관류액이 포함된 수집 튜브를 버리고 250 μL 의 Western Blot 완충액을 NucleoSpin® cfDNA XS

컬럼에 추가하였다. 11,000 x g에서 3분 동안 원심분리한 후, 통과액이 있는 수집 튜브를 폐기했다. 이후 50 μL 의 Elution Buffer를 NucleoSpin® cfDNA XS 컬럼에 첨가하고 11,000 x g에서 30초 동안 원심분리하였고, 마지막으로 잔류 에탄올 제거를 위해 용출 분획을 뚜껑을 열고 90 ° C에서 8분간 배양하였다.

[0053] 이를 통해 수득한, 추출된 ctDNA를 분광광도계(NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 정량하였다.

[0055] **<실시예 2> 개의 종양과 관련된 유전자 SNV 선별**

[0056] 개의 종양과 관련된 ctDNA SNV의 프라이머 및 Tangman 프로브 서열 확인을 통해 개의 종양과 관련있는 cfDNA를 선별하고 야생형 및 돌연변이형 서열을 검출하기 위해, 실시예 1.2에서 정량한 ctDNA에 대해 정방향 및 역방향 프라이머와 TaqMan® MGB 프로브로 구성된 ddPCR 분석을 맞춤형 TaqMan SNP 유전형 분석(Assays-by-Design)을 이용하여 실시하였고, 각 대립유전자 특이적 MGB프로브를 형광 리포터 염료(mutant-type, FAM; wild-type, VIC)로 표지하였다. 이를 통해 도 1과 같이, lymphoma로 진단된 개 2마리와 이의 대조군 3마리를 이용하여, TMEM132C, MITF, NEGR1, U1, 및 YBX3 유전자의 해당 SNV의 cfDNA에서의 검출여부를 확인하였고, 상기 SNV들을 개의 종양과 관련된 ctDNA 바이오마커로 선별하였다.

[0058] **<실시예 3> ddPCR을 이용한 표적유전자 발현 수준 측정**

[0059] **<3.1> ddPCR 실시를 위한 droplets 준비**

[0060] ddPCR 반응 혼합물(22μL)은 각 well 당 프로브용 2 x ddPCR Supermix(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), 각 정방향 및 역방향 프라이머 900 nM, 돌연변이체 250 nM(5'-FAM) 및 야생형(5'-VIC) 유형의 프로브, 주형 DNA 농도가 66 ng 이상인 well의 경우에는 Mse I 제한효소 5단위(New England Biolabs, Ipswich, MA), 및 1μL 의 cfDNA를 포함하며, QX200 TM Auto DG TM ddPCR 시스템(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)을 사용하여 16,000 내지 20,000개 droplets의 에멀젼으로 분배하였다. 이후 droplets가 생성된 플레이트를 PX1 PCR Plate Sealer(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)로 밀봉한 후 C1000 열 순환기(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)로 옮겼다.

[0062] **<3.2> 프라이머와 프로브를 사용한 어닐링(annealing) 온도 최적화를 위한 Thermal gradient ddPCR**

[0063] 선별한 SNV에 대한 최적의 어닐링 온도를 결정하기 위해 56 °C ~ 66 °C 범위의 열 구배(56 °C, 56.8 °C, 58.1 °C, 60 °C, 62.2 °C, 64.1 °C, 65. 4 °C, 66 °C)에서 분석에 사용된 것과 동일한 양의 cfDNA(1 μL) 및 프라이머/프로브 농도(900 nM/250 nM)를 사용하여 C1000 열 순환기(Bio-Rad)에서 Thermal gradient ddPCR을 수행하였다. 이를 통해 최적의 어닐링 온도는 양성과 음성 사이의 가장 큰 형광 진폭 차이를 가져오고 비특이적 증폭을 피하는 온도인 56 °C - 58.1 °C로 설정하였다.

[0065] **<3.3> PCR 조건 설정 및 수행**

[0066] 95 °C에서 10분 동안 변성; 30초 동안 94 °C 및 60초 동안 56 °C ~64.1 °C 의 44사이클 ; 및 98 °C에서 10 분 동안의 조건을 설정하여, C1000 열 순환기(BioRad)에서 Real-time quantitative PCR을 수행하였다.

[0067] 각 SNV에 대해 어닐링 온도는 실시예 3.2에 따라 56 °C - 58.1 °C로 설정되었고, 램프 속도는 2.0 °C/초로 설정되었다. 실시예 1.1의 개 두 마리중 한 마리의 종양 조직 유래 cfDNA를 양성 샘플로 사용하고, 뉴클레아제가 없는 물을 음성 샘플로 사용하여(주형 대조 없음[NTC]), 모든 샘플을 이중으로 분석하였다.

[0069] **<3.4> 데이터 분석**

[0070] 실시예 3.3의 C1000 열 순환기(BioRad)에서 Real-time quantitative PCR 수행 후, 플레이트를 droplets 판독기(QX100TM; BioRad, Pleasanton, CA, USA)로 옮겼다. 각 샘플의 데이터 분석은 QuantaSoft v1.7.4.0917 소프트웨어 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행되었으며, 돌연변이 유형 서열의 농도는

Poisson 분포를 사용하여 계산하였다. 모든 샘플의 양성 droplets 농도는 해당 NTC에서 감지된 음성 클러스터를 기반으로 자동 배치된 형광 임계값을 사용하여 결정되었으며, 단일 샘플 내 표적 DNA 농도(복제수/μL) 및 절대 droplets 수를 정량적 결과 측정에 사용하였다. 허용되는 droplets 수가 15,000개 이상인 것으로 확인된 well의 결과만 연구에 포함되었으며, QuantaSoft 소프트웨어는 양성 droplets가 너무 많은 well(Poisson 통계를 적용하기에는 빈 droplets가 충분하지 않음), 품질 점수가 0.85 미만인 well, 및 droplets가 10,000개 미만인 well에 대해 "No Call"을 표시하였다.

[0072] **<실시예 4> 통계 분석**

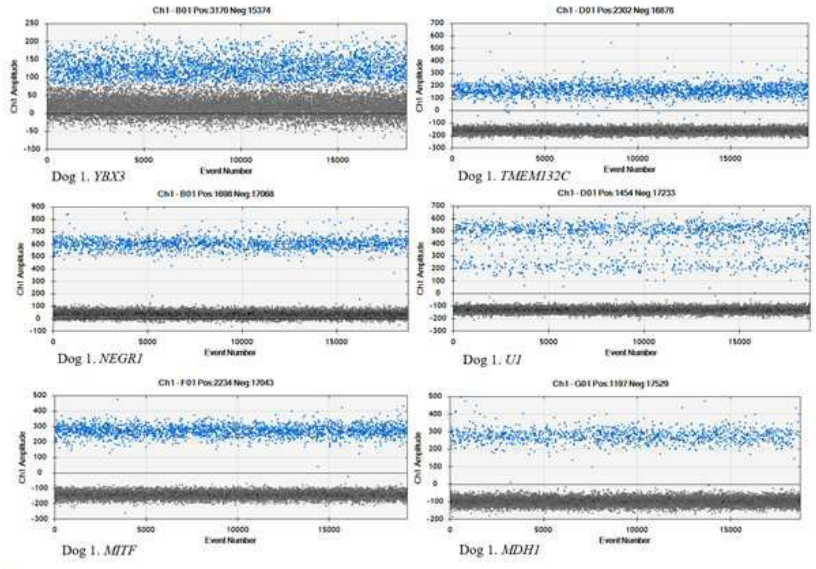
[0073] 실시예 2에서 선별된 ctDNA 바이오마커, 즉 ctDNA SNV의 농도와 개의 종양에 관한 임상병리학적 예후 인자 사이의 상관관계를 확인하기 위해 Spearman의 상관계수 분석을 사용하였다. 모든 통계 분석(Wilcoxon 부호 순위 테스트 및 Spearman의 상관 계수 분석)은 Windows용 SPSS Statistics 버전 27.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 모든 그래픽은 GraphPad Prism 5(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) 및 Microsoft PowerPoint 2019를 사용하여 처리되었다.

[0074] 이를 통해 도 2와 같이, 림프종견과 대조군견 간의 TMEM132C, MITF, NEGR1, U1, 및 YBX3 각각의 ctDNA SNV 농도가 유의하게 차이남을 확인하였고, 상기 5개 상기 ctDNA SNV는 개의 종양에 관한 임상병리학적 진단과 유의하게 연관되어 있음을 확인하였다.

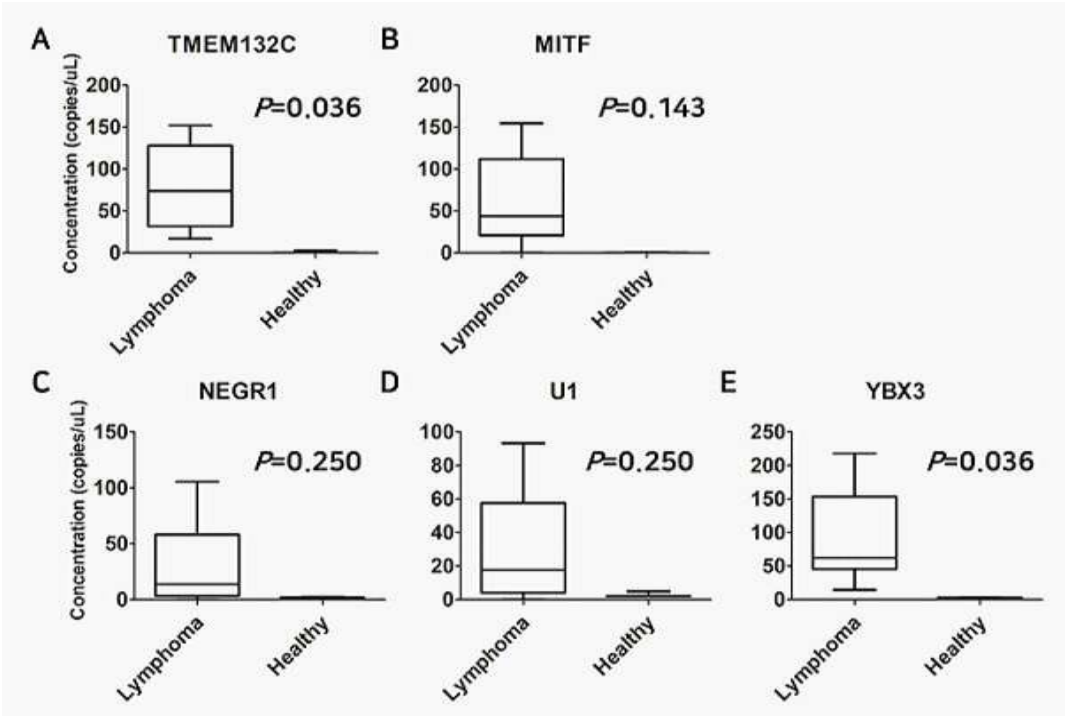
[0076] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위를 기준으로 하여야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2


A
TMEM132C
P=0.036
Concentration (copies/uL)
200
150
100
50
0
Lymphoma
Healthy
B
MITF
P=0.143
C
NEGR1
P=0.250
D
U1
P=0.250
100
80
60
40
20
E
YBX3
P=0.036
250

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.