

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391724 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.27

(51) Int. Cl. C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
C12Q 1/6804 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.29

(54) АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

(31) 63/131,722

(72) Изобретатель:

(32) 2020.12.29

Микаллеф Жакоб Винсен, Экклстон
Марк Эдвард, Памарт Дориан
Фернанд Франсуа, Эрцог Мариэлль
(BE)

(33) US

(86) PCT/EP2021/087813

(87) WO 2022/144407 2022.07.07

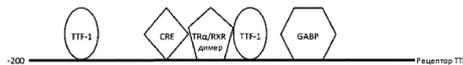
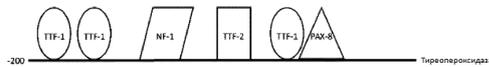
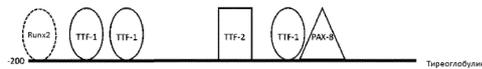
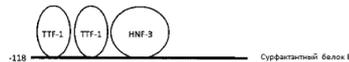
(71) Заявитель:

БЕЛЬДЖИАН ВОЛИШН СРЛ (BE)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Данное изобретение относится к способам выявления заболевания у субъекта с помощью минимально инвазивного анализа биологической жидкости для выявления циркулирующих фрагментов хроматина, которые включают в себя фактор транскрипции и ассоциированную последовательность ДНК, в качестве индикатора наличия заболевания у субъекта.



A1

202391724

202391724

A1

АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[1] Данное изобретение относится к способу выявления заболевания у субъекта с помощью минимально инвазивного анализа биологической жидкости. Данное изобретение также относится к измерению или выявлению циркулирующих фрагментов хроматина, которые включают в себя фактор транскрипции, в качестве индикатора наличия заболевания у субъекта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Рак является распространенным заболеванием с высокой смертностью. Считается, что биология данного заболевания включает в себя прогрессирующее от предракового состояния, приводящее к I, II, III и, в конечном счете, к IV стадии онкологического заболевания. При большинстве онкологических заболеваний смертность сильно варьирует в зависимости от того, обнаружено ли заболевание на ранней локализованной стадии, когда доступны эффективные варианты лечения, или на поздней стадии, когда заболевание может распространиться внутри пораженного органа или за его пределы, когда лечение более затруднительным. Симптомы онкологических заболеваний на поздней стадии разнообразны и включают в себя видимую кровь в стуле, кровь в моче, выделения крови при кашле, выделения крови из влагалища, необъяснимую потерю веса, постоянные необъяснимые образования (например, в груди), расстройство желудка, затруднение глотания, изменения в виде бородавок или родинок, а также многие другие возможные симптомы, зависящие от вида онкологического заболевания. Однако большинство видов онкологических заболеваний, диагностированных по таким симптомам, уже находятся на поздней стадии и трудно поддаются лечению. Большинство видов онкологических заболеваний на ранней стадии протекают бессимптомно или проявляются неспецифическими симптомами, которые не помогают в постановке диагноза. Поэтому в идеале онкологическое заболевание следует выявлять на ранней стадии с помощью анализов на онкологическое заболевание.

[3] Чтобы удовлетворить потребность в простых рутинных анализах крови на онкологическое заболевание, были исследованы многие переносимые кровью белки в качестве потенциальных биомаркеров онкологического заболевания, включительно с карциноэмбриональным антигеном (КЭА, англ. «CEA») для колоректального рака (КРР,

англ. «CRC»), альфа-фетопротеином (АФП, англ. «AFP») для рака печени, СА125 для рака яичников, СА19-9 для рака поджелудочной железы, СА15-3 для рака молочной железы и простатоспецифическим антигеном (ПСА, англ. «PSA») для рака предстательной железы. Однако их клиническая точность слишком низка для рутинного диагностического применения, и считается, что их лучше применять для мониторинга пациентов.

[4] Более недавно специалисты в данной области исследовали циркулирующую опухолевую ДНК (цоДНК, англ. «ctDNA») в качестве биомаркера крови для выявления рака. Бесклеточная ДНК (бкДНК, англ. «cfDNA») циркулирует в крови в виде фрагментов хроматина, которые, как полагают, ежедневно образуются в результате гибели огромного количества клеток, главным образом в результате апоптоза. В процессе апоптоза хроматин фрагментируется на мононуклеосомы и олигонуклеосомы, некоторые из которых высвобождаются из клеток и циркулируют как бесклеточные нуклеосомы. Каждая циркулирующая бесклеточная нуклеосома ассоциирована с небольшим фрагментом ДНК длиной меньше чем 200 пар оснований (п. о.). Подобным образом, из анализа способами фрагментомики был сделан вывод о наличии в циркуляции фрагментов бесклеточного хроматина, состоящих из связанных с ДНК факторов транскрипции или других негистоновых белков хроматина. Считается, что у здоровых субъектов циркулирующие фрагменты хроматина имеют гемопозитическое происхождение, и их уровни являются низкими. Повышенные уровни циркулирующих нуклеосом и, следовательно, фрагментов бкДНК обнаруживаются у субъектов с различными патологическими состояниями, включительно со многими видами онкологических заболеваний, аутоиммунными заболеваниями, воспалительными патологическими состояниями, инсультом и инфарктом миокарда (Holdenrieder & Stieber, 2009).

[5] Считается, что по меньшей мере часть бкДНК в крови пациентов с онкологическими заболеваниями образуется в результате высвобождения нуклеосом и других фрагментов хроматина в кровотоки из умирающих или мертвых раковых клеток (т.е. бкДНК включает в себя некоторое количество цоДНК). Исследование сопоставленных образцов крови и тканей от пациентов с онкологическими заболеваниями показывает, что связанные с онкологическими заболеваниями мутации, присутствующие в опухоли пациента (но не в его/ее здоровых клетках), также присутствуют в бкДНК в образцах крови, взятых у того же пациента (Newman *et al*, 2014). Подобным образом, последовательности ДНК, которые дифференциально метилированы (эпигенетически изменены путем

метиляции остатков цитозина) в раковых клетках, также могут выявляться как метилированные последовательности в бкДНК в кровотоке. В дополнение к этому, доля циркулирующей бкДНК, которая состоит из цоДНК, связана с опухолевой нагрузкой, поэтому прогрессирование заболевания можно мониторировать как количественно по доле присутствующей цоДНК, так и качественно по ее генетическому и/или эпигенетическому составу. Анализ цоДНК может предоставить очень полезные и клинически точные данные касательно ДНК, происходящей из всех или многих различных клонов внутри опухоли, и которая, следовательно, пространственно объединяет опухолевые клоны. Более того, повторный забор крови с течением времени является гораздо более практичным и экономичным вариантом, чем, например, повторная биопсия ткани. Анализ цоДНК потенциально может произвести революцию в выявлении и мониторинге опухолей, а также в выявлении рецидивов и приобретенной устойчивости к лекарственным препаратам на ранней стадии для выбора способов лечения опухолей путем исследования опухолевой ДНК без инвазивных процедур биопсии тканей. Такие анализы цоДНК можно применять для исследования всех типов аномалий ДНК, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (например, точечных мутаций, состояния модификации нуклеотидов, транслокаций, числа копий гена, микросателлитных аномалий и целостности цепей ДНК), и могут быть применимы для рутинного скрининга онкологических заболеваний, регулярного и более частого мониторинга, и регулярной проверки оптимальных схем лечения (Zhou *et al*, 2017).

[6] Плазму крови широко используют в качестве субстрата для анализов на цоДНК. Фрагменты бкДНК (включительно с любой цоДНК) извлекают из плазмы (и, следовательно, удаляют из связывания с нуклеосомами, факторами транскрипции или другими белками) и анализируют на предмет последовательности нуклеотидных оснований. Можно применять любой способ анализа ДНК, но, как правило, анализ выполняется путем глубокого секвенирования с использованием устройств для секвенирования нового поколения.

[7] Поскольку аномалии ДНК характерны для всех онкологических заболеваний, а цоДНК наблюдалась при всех онкологических заболеваниях, при которых она была исследована, анализы цоДНК применимы при всех онкологических заболеваниях. Исследованные виды онкологических заболеваний включают в себя, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, меланому, яичника,

предстательной железы, легкого, печени, эндометрия, яичников, лимфомы, полости рта, лейкозы, рак головы и шеи и остеосаркомы (Crowley *et al*, 2013; Zhou *et al*, 2017; Jung *et al*, 2010).

[8] Один из иллюстративных способов анализа бкДНК включает в себя идентификацию ткани или клеток, из которых происходят фрагменты бкДНК субъекта. Основой данного подхода является то, что все фрагменты бкДНК, присутствующие в циркуляции, избежали расщепления нуклеазами во время гибели клеток или в процессе циркуляции, поскольку они защищены от действия нуклеаз посредством белкового связывания внутри нуклеосом. Данный подход включает в себя определение паттерна фрагментации нуклеосом бкДНК в образце крови, взятом у субъекта, и определение геномного положения фрагментов бкДНК в референсном геноме. Паттерн фрагментации различается для разных типов клеток и может использоваться для идентификации клеток, из которых происходит бкДНК субъекта.

[9] Данный подход включает в себя извлечение бкДНК (включительно с любой цоДНК) из образца плазмы крови и полногеномное секвенирование ДНК для выявления паттерна ДНК, связанной с нуклеосомами, отображаемого фрагментами бкДНК. Итоговые последовательности фрагментов бкДНК определяются по их геномному положению в референсном геноме или геномах с использованием биоинформатики путем компьютерного анализа. Геномное расположение итоговых бкДНК в пределах референсного генома обеспечивает картирование защищенного нуклеосомами покрытия бкДНК генома.

[10] Пропорциональный вклад различных типов клеток или тканей в бкДНК у субъекта также можно определить путем сравнения паттернов фрагментации нуклеосом субъекта с калибровочными образцами, содержащими известное относительное содержание бкДНК из различных клеточных источников, с использованием биоинформатики путем компьютерного анализа, как описано в WO2017012592.

[11] Фрагменты бкДНК, ассоциированные с фрагментами хроматина, содержащими нуклеосомы, как правило, имеют длину 120-200 п. о. Однако связывание белков и защита бкДНК не ограничиваются связыванием гистонов бкДНК в нуклеосомах. Другие фрагменты бкДНК, включительно с последовательностями активных промоторов генов,

связываются факторами транскрипции, кофакторами или другими негистоновыми белками хроматина либо в дополнение к нуклеосоме, либо в отсутствие какой-либо нуклеосомы. В отсутствие нуклеосомы эти белки часто связывают и защищают более короткие фрагменты бкДНК в диапазоне 35-80 п. о. Однако эти более короткие фрагменты бкДНК наблюдаются экспериментально только в том случае, если используемый способ получения библиотеки фрагментов ДНК подходит для выделения, амплификации и секвенирования коротких фрагментов ДНК длиной меньше чем 100 пар оснований (Snyder *et al*, 2016).

[12] Паттерн белкового связывания ДНК по всему геному в живых клетках варьирует в зависимости от типа клетки, поскольку разные последовательности ДНК, включительно с разными промоторными последовательностями и последовательностями генов, активны в разных клетках. Паттерн белкового связывания ДНК в любом типе клеток можно определить путем картирования сайтов, доступных нуклеазе, путем расщепления хроматина, извлеченного из клетки, с помощью фермента нуклеазы и секвенирования нерасщепленной ДНК в полученных фрагментах хроматина, защищенных белком. Следовательно, если рассматривать фрагменты бкДНК в крови как продукт расщепления нуклеазой *in vivo*, то обнаруженные последовательности бкДНК должны соответствовать связанным с белком последовательностям ДНК в клетке, из которой произошла бкДНК. То есть, по своему принципу, структура последовательностей фрагментов бкДНК в крови должна быть аналогична структуре последовательностей фрагментов хроматина, генерируемых с помощью картирования сайтов, доступных нуклеазе, в исходных клетках. Следовательно, паттерн фрагментации последовательностей бкДНК, определенный из образца крови, можно сравнить с использованием методов биоинформатики с известными паттернами фрагментации ДНК, полученными с помощью анализа доступных нуклеазе участков клеток известной ткани или типа рака, для определения ткани, из которой происходит данная бкДНК. Результаты, полученные из образцов, взятых у здоровых субъектов, указывают на то, что клетки, из которых происходит бкДНК, являются гемопоэтическими. Результаты данного подхода, полученные из образцов, взятых у пациентов с онкологическими заболеваниями, указывают на то, что бкДНК и цоДНК происходят из смеси клеток, включающей в себя гемопоэтические клетки и другие клетки. Во многих случаях указанный тип негемопоэтических клеток коррелирует с тканью онкологического заболевания пациента (Snyder *et al*, 2016).

[13] Другие исследователи применяли подобный подход к конечному анализу

фрагментов бкДНК, включающему в себя полногеномное секвенирование бкДНК (включительно с любой цоДНК), но сосредоточили биоинформационный компьютерный анализ на последовательностях сайтов связывания факторов транскрипции (ССФТ, англ. «TFBS»). Целью данного подхода является определение доступности ССФТ и идентификация последовательностей ДНК ССФТ с измененной доступностью в образцах плазмы крови, взятых у пациентов с онкологическими заболеваниями (Ulz *et al*, 2019). При данном подходе у субъекта берут образец плазмы крови, и бкДНК экстрагируют и амплифицируют с использованием способа получения библиотеки ДНК, подходящего для небольших фрагментов ДНК длиной меньше чем 100 п. о. Библиотеку ДНК секвенируют с использованием способа секвенирования нового поколения. Данные секвенирования используют для идентификации паттерна фрагментации бкДНК в области генома вблизи ССФТ с использованием способов биоинформатики. Данный анализ включает в себя определение профиля расположения нуклеосом фрагментов бкДНК в ССФТ и их фланкирующих последовательностях в последовательности промотора гена, чтобы определить, был ли ССФТ связан с фактором транскрипции во фрагментах хроматина, из которых состоит бкДНК. Данный способ сложен, но его можно резюмировать следующим образом:

[14] если паттерн фрагментации бкДНК, наблюдаемый в последовательностях ДНК, охватывающих ССФТ и фланкирующие последовательности в геноме, демонстрирует периодичность в около 200 п. о., это относится к чередованию более сильной защиты белкового связывания (в центре положения связывания с нуклеосомой) и более слабой защиты белкового связывания (между нуклеосомами, где ДНК несвязана и незащищена) ДНК от деградации. В данном случае предполагается, что ССФТ и фланкирующие последовательности были нуклеосомами, покрытыми фрагментами хроматина, которые составляли бкДНК в образце плазмы крови.

[15] Если присутствующий паттерн фрагментации бкДНК дополнительно демонстрирует защиту белкового связывания для ССФТ и его фланкирующих последовательностей, но без (или с ослабленной) периодичностью, связанной с нуклеосомами, это относится к связыванию белка, регулирующего транскрипцию, с ССФТ и его фланкирующими последовательностями. В таком случае предполагается, что ССФТ были связаны с одним или большим числом факторов транскрипции и/или других регуляторных белков во фрагментах хроматина, которые составляли бкДНК в образце

плазмы крови.

[16] У здоровых субъектов обнаруженный паттерн фрагментации бкДНК обычно коррелирует с паттерном, полученным в экспериментах с сайтами, доступными для нуклеазы, на гемопоэтических клетках. Следовательно, последовательности ССФТ, которые связаны с фактором транскрипции или покрыты нуклеосомами в бкДНК, коррелируют с факторами транскрипции, которые экспрессируются или не экспрессируются в гемопоэтических клетках. У пациентов с онкологическими заболеваниями этот паттерн связан со смесью типов клеток, в которых ССФТ могут быть фактором транскрипции, связанным в данном типе раковых клеток, и нуклеосомой, связанной в данном типе гемопоэтических клеток. Поскольку большая часть бкДНК происходит из гемопоэтических клеток и лишь небольшое количество происходит из раковых клеток, сигнал фрагментации, полученный при онкологическом заболевании, является слабым по сравнению с таковым от гемопоэтических клеток. Однако во фрагментации были разработаны способы биоинформатики, позволяющие отделить слабый сигнал фрагмента ССФТ, защищенного фактором транскрипции, присутствующий в цоДНК, от гораздо более сильного сигнала наложенной периодичности нуклеосом, присутствующего в компоненте бкДНК, полученном из гемопоэтических клеток. Анализ способами фрагментации показывает, что смешанный паттерн включает в себя последовательности ССФТ бкДНК, которые являются фактором транскрипции, связанным с факторами транскрипции, которые не экспрессируются в гемопоэтических клетках, но экспрессируются в раковой ткани.

[17] Иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием ассоциированной с хроматином ДНК (ChIP-Seq) представляет собой аналитический способ, используемый для картирования геномного местоположения белков клеточного хроматина. Иллюстративный способ включает в себя извлечение хроматина из клетки с последующим расщеплением хроматина на мононуклеосомы или другие фрагменты хроматина путем физического разрушения (например, обработки ультразвуком) или с использованием фермента нуклеазы, которая расщепляет ДНК (например, ДНКазы или микрококковой нуклеазы). Фрагментированный хроматин затем подвергают воздействию твердофазного носителя, покрытого антителом, направленным на связывание с конкретным белком хроматина, представляющим интерес, например, с конкретным модифицированным гистоном. Фрагменты хроматина, содержащие определенную структуру, адсорбируются

(иммунопреципитируют) на твердой фазе. ДНК, ассоциированную с адсорбированным хроматином, затем извлекают из твердой фазы и амплифицируют способом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Библиотеку амплифицированных фрагментов ДНК секвенируют для определения местоположений в геноме, где был связан белок хроматина, представляющий интерес. Способы ChIP с использованием антител против факторов транскрипции также применяют для идентификации геномных местоположений сайтов связывания факторов транскрипции (ССФТ) конкретного фактора транскрипции или для определения того, занят ли конкретный ССФТ определенным фактором транскрипции в различных типах клеток.

[18] Авторы данного изобретения ранее описали тесты иммуноанализа циркулирующих бесклеточных нуклеосом, содержащих определенные эпигенетические сигналы, включающие в себя определенные посттрансляционные модификации, изоформы гистонов, модифицированные нуклеотиды и негистоновые белки хроматина, для выявления онкологических и других заболеваний (как указано в WO2005019826, WO2013030577, WO2013030579 и WO2013084002). Авторы данного изобретения также описали иммуноферментные тесты на фрагменты хроматина, включительно с ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, для выявления онкологических заболеваний (как указано в WO2017162755).

[19] Теперь авторы данного изобретения описывают способы, обладающие превосходящей аналитической и клинической специфичностью и чувствительностью, для выделения, прямого анализа и измерения циркулирующих фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих один или большее число факторов транскрипции вместе с ассоциированным фрагментом ДНК. Выделение комплексов фактор транскрипции – ДНК из гораздо более многочисленных фрагментов нуклеосом упрощает анализ и устраняет необходимость отделять сигналы от ССФТ, покрытых фактором транскрипции, от доминирующих сигналов периодичности нуклеосом. Данные способы можно применять в образцах крови в качестве неинвазивных или минимально инвазивных анализов крови на предмет заболевания, включительно с онкологическими, аутоиммунными и воспалительными заболеваниями.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[20] В соответствии с первым аспектом в данном изобретении представлен способ

выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выявление или измерение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[21] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выявление или измерение ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у субъекта.

[22] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления ткани, пораженной заболеванием, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) секвенирование ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения у субъекта ткани, пораженной заболеванием.

[23] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ оценки субъекта-животного или субъекта-человека на предмет подходящего

медицинского лечения, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта; и
- (ii) применение уровня ассоциированной ДНК и/или последовательности, выявленных на этапе (i), в качестве параметра для выбора подходящего лечения для субъекта.

[24] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ мониторинга лечения субъекта-животного или субъекта-человека, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта;
- (ii) повторение выявления, измерения или секвенирования ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта, в одном или большем числе случаев; и
- (iii) применение любых изменений в уровне ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК, выявленных на этапе (i), по сравнению с этапом (ii) в качестве параметра любых изменений в состоянии субъекта.

[25] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен набор для выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в качестве комбинированного биомаркера, который содержит лиганд или агент связывания для фактора транскрипции, необязательно вместе с реагентами для амплификации и/или секвенирования ДНК, ассоциированной с указанным фактором транскрипции, и/или лиганд или агент связывания для нуклеосом, и/или инструкции по использованию набора в соответствии со способом, определенным в данном документе.

[26] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает в себя следующие этапы:

- (a) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который

связывается с фактором транскрипции;

- (b) выявление, измерение или секвенирование фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
- (c) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве индикатора наличия онкологического заболевания у субъекта; и
- (d) осуществление лечения, если на этапе (c) субъект определен как имеющий онкологическое заболевание.

[27] Способ выявления заболевания у плода человека или животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) получение образца биологической жидкости от беременного субъекта-человека или субъекта-животного;
- (ii) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (iii) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iv) применение присутствия, последовательности или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у плода.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[28] **Фиг. 1:** графическое изображение совместного связывания различных факторов транскрипции в промоторных сайтах генов сурфактантного белка В, тиреоглобулина, тиреопероксидазы и рецептора тиреотропина (рецептора ТТГ). CRE: элемент ответа на циклический аденозинмонофосфат; GABP: GA-связывающий белок; HNF-3: ядерный фактор гепатоцитов 3; NF-1: ядерный фактор 1; PAX-8: парный бокс-ген 8; Runx2: связанный с Runt транскрипционный фактор 2; димер TR α /RXR: рецептор тиреоидного гормона α / димер ретиноидного рецептора X; TTF-1: тиреоидный фактор транскрипции 1 (также известный как гомеобокс NK2 1, NKX2-1); TTF-2: тиреоидный фактор транскрипции 2.

[29] **Фиг 2:** графическое изображение примера структуры петли ДНК комплекса транскрипции, иллюстрирующее совместное связывание некоторых из различных регуляторных белков, вовлеченных в комплекс транскрипции, включающих в себя, но не ограничивающихся ими, общие факторы транскрипции (GTF), геноспецифические

факторы транскрипции (TF), кофакторы, активаторы, репрессоры, медиаторы, белки, изгибающие ДНК, и РНК-полимеразу. Регуляторные белки связаны с регуляторными последовательностями ДНК, расположенными вблизи гена, а также с регуляторными последовательностями, удаленными от гена, включительно с промоторными последовательностями, последовательностями ТАТА-бокса, энхансерными последовательностями и репрессорными последовательностями. Возможны другие регуляторные белки (например, хроматин-ремоделлирующие белки), а также другие регуляторные последовательности.

[30] **Фиг. 3:** анализ способом вестерн-блота для рекомбинантных мононуклеосом, адсорбированных на магнитных гранулах, покрытых антителом, направленным на связывание с гистоном H3. Данные результаты демонстрируют дозозависимую адсорбцию мононуклеосом.

[31] **Фиг. 4:** результаты ТИФА для нуклеосом из образцов плазмы крови человека и растворов рекомбинантных мононуклеосом после иммунопреципитации нуклеосом с использованием магнитных гранул без покрытия или магнитных гранул, покрытых антителом, направленным на связывание с гистоном H3. Данные результаты демонстрируют, что как циркулирующие естественные нуклеосомы человека, так и рекомбинантные нуклеосомы в растворе не подвергались воздействию магнитных гранул без покрытия, но количественно удалялись иммунопреципитацией с использованием магнитных гранул, покрытых антителом, направленным на связывание с гистоном H3.

[32] **Фиг. 5:** уровни ER α , измеренные у женщин с диагнозом ER-отрицательного рака молочной железы (ER- BC), рака яичников или ER-положительного рака молочной железы (ER+ BC) с оценкой ER, равной 7 или 8.

[33] **Фиг 6:** эффект промывки магнитных полистироловых частиц, подвергнутых воздействию образца плазмы крови, полученного от пациента с онкологическим заболеванием, промывки обычным промывочным буфером с одним детергентом, содержащим 0,1% Твина (0,1%), или сильным промывочным буфером, содержащим смесь детергентов с общим содержанием 1,2% детергентов (1,2%). Частицы, покрытые неспецифическим IgG, показали большее снижение фонового связывания при использовании промывки сильным детергентом (полосы 4 и 5) без разрушения

специфических белков, связанных с антителами (смесь парилированных белков) (дорожки 6 и 7).

[34] Фиг. 7: анализ способом вестерн-блота для фрагментов хроматина, иммунопреципитированных из 4 объединенных образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА, взятых у пациентов с диагнозом КРР, с помощью ChIP с использованием антитела мыши против CTCF, иммобилизованного на магнитных полистироловых гранулах, промытых с использованием сильного 1,2%-ного промывочного буфера из смеси детергентов. Все 4 образца плазмы продемонстрировали полосу около 140 кДа, соответствующую белку CTCF (против CTCF; дорожки 3, 5, 7 и 9). Эксперименты с отрицательным контролем с использованием неспецифического IgG мыши не продемонстрировали полосу, соответствующую CTCF (НСП-IgG; дорожки 2, 4, 6 и 8). Данный эксперимент продемонстрировал, что белок CTCF был выделен из образцов плазмы крови и что использование сильного промывочного буфера привело к получению относительно чистого экстракта CTCF из плазмы крови.

[35] Фиг. 8: электрофореграммы, показывающие анализ библиотеки амплифицированных фрагментов бкДНК, лигированных с адаптером, полученной с помощью ChIP фрагментов хроматина CTCF в образце перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА, взятом у пациента. Острый пик при около 140 п. о. отображает димер адаптера, поэтому связанные с адаптером фрагменты размером в 175-220 п. о. отображают фрагменты бкДНК размером в 35-80 п. о. (указаны на электрофореграммах). (a) Специфическая библиотека ChIP CTCF содержала небольшие фрагменты бкДНК с пиком флуоресценции около 1000 единиц флуоресценции (ЕФ) в диапазоне 35-80 п. о. (b) Неспецифическая библиотека контрольного IgG также содержала небольшие фрагменты бкДНК с пиком флуоресценции около 80 ЕФ.

[36] Фиг. 9: нормализованный охват 9780 опубликованных локусов ССФТ CTCF фрагментами бкДНК, связанными фактором транскрипции (35-80 п. о.) или связанными нуклеосомами (135-155 п. о. или 156-180 п. о.). (a) Специфический охват CTCF библиотекой последовательностей бкДНК, полученной для пациента с КРР. (b) Неспецифический охват библиотекой последовательностей бкДНК, полученной из фрагментов хроматина, неспецифически связанных с частицами, покрытыми IgG мыши. Данные результаты показывают, что пик специфического охвата бкДНК, происходящей из

циркулирующих в плазме крови комплексов CTCF-ДНК, коррелирует с опубликованными локусами ССФТ CTCF. Ожидаемый колеблющийся паттерн охвата, обусловленный связыванием с нуклеосомами, минимален на исследованном интервале в 5 т. п. о. В контрольном образце не наблюдался пик охвата бкДНК в локусах связывания CTCF.

[37] **Фиг. 10:** нормализованный охват 1041 опубликованного локуса ССФТ CTCF, занятого CTCF в раковых клетках, но не в нормальных клетках. Охват показан для фрагментов бкДНК, связанных фактором транскрипции (35-80 п. о.) или связанных нуклеосомами (135-155 п. о. или 156-180 п. о.). (а) CTCF-занятость локусов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, библиотекой последовательностей бкДНК, полученной для пациента с КРР. Данные результаты показывают охват в диапазоне размеров от 35-80 п. о., подтверждающий CTCF-занятость некоторых или всех из данных 1041 сайтов, следовательно, указывающий на онкологическое заболевание у субъекта, у которого был взят образец. (б) В неспецифическом контрольном эксперименте не наблюдался пик CTCF-занятости.

[38] **Фиг. 11.** анализ способом вестерн-блота для фрагментов хроматина, иммунопреципитированных из 8 объединенных образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА с помощью ChIP с использованием антитела мыши против AR, иммобилизованного на магнитных полистироловых гранулах, промытых с использованием сильного 1,2%-ного промывочного буфера из смеси детергентов. Все 8 образцов плазмы крови (S1-S8; дорожки 2-9) продемонстрировали полосу около 140 кДа, соответствующую белку AR. Полосы наибольшей плотности наблюдались для образцов S1 и S2. Дорожка 10 представляет собой положительный контроль с использованием фрагментированного хроматина из клеток рака предстательной железы LnCAP.

[39] **Фиг. 12.** электрофореграммы, показывающие анализ библиотеки амплифицированных фрагментов бкДНК, лигированных с адаптером, полученной с помощью ChIP фрагментов хроматина AR в образцах перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА, взятых у 8 пациентов, имеющих рак предстательной железы (S1-S8). Острый пик при около 140 п. о. отображает димер адаптера, поэтому связанные с адаптером фрагменты размером 175-220 п. о. отображают фрагменты бкДНК размером 35-80 п. о. Также показана электрофореграмма для отрицательного контроля (контр.).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[40] Факторы транскрипции вовлечены в развитие онкологических заболеваний и составляют около 20% всех известных онкогенов (Lambert *et al*, 2018). Авторы данного изобретения ранее описали применение фрагмента хроматина, содержащего тканеспецифический фактор транскрипции, в качестве биомаркера в сыворотке крови для выявления или диагностики онкологических заболеваний у субъекта. Тканевую специфичность фактора транскрипции можно применять для индикации ткани, из которой происходит онкологическое заболевание. Например, сообщается, что фактор транскрипции TTF-1 экспрессируется в ткани щитовидной железы и легких, но не в других тканях. Следовательно, присутствие циркулирующих фрагментов хроматина, содержащих TTF-1, указывает на то, что тканью происхождения является легкое или щитовидная железа. Авторы данного изобретения также описали способы иммуноанализа для измерения циркулирующих фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих факторы транскрипции. Этот иммуноанализ включает в себя способ двойного антитела (или другого связывающего агента), при котором одно антитело направлено на связывание с фактором транскрипции, а другое – на связывание с ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, или с компонентом нуклеосомы, включенным во фрагмент хроматина. В одном варианте осуществления связывающий агент, предназначенный для связывания с фактором транскрипции, иммобилизован на твердой фазе для выделения фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции (т. е. для иммунопреципитации фрагмента хроматина). Затем выделенный фрагмент хроматина выявляют с помощью второго связывающего агента, предназначенного для связывания с ДНК. Данный способ иммуноанализа является простым, недорогим и неинвазивным.

[41] ChIP-Seq представляет собой способ, обычно применяемый к экстрактам клеточного хроматина после фрагментации ферментативным расщеплением нуклеазой или обработкой ультразвуком. Имеется несколько сообщений о применении способов ChIP-Seq в плазме крови с ЭДТА. Поскольку хроматин в плазме крови уже фрагментирован, расщепление нуклеазой или обработка образца ультразвуком не требуются. Сообщения о ChIP-Seq в плазме крови связаны с выделением гистоновых белков из плазмы крови с ЭДТА с использованием антител против гистонов с последующими экстракцией, амплификацией и секвенированием фрагментов ДНК, ассоциированных с гистонами (Deligezer *et al*, 2008, Mansson *et al*, 2021, Sadeh *et al*, 2021, Vad-Nielsen *et al*, 2020).

[42] Насколько известно авторам данного изобретения, в литературе не описаны способы ChIP-Seq для прямого выделения, анализа или картирования интактных циркулирующих фрагментов хроматина фактор транскрипции – ДНК и ассоциированных с ними последовательностей ДНК ССФТ. Вместо этого специалисты в данной сфере разработали не прямые способы, основанные на анализе фрагментов ДНК.

[43] Фрагментомика является одним из таких не прямых способов, при котором глубокое секвенирование бкДНК, выделенной из плазмы крови с ЭДТА, анализируют способами биоинформатики для выявления паттернов фрагментации ДНК, которые указывают на связывание фактора транскрипции – ДНК в исходном образце (Snyder *et al*, 2016, Ulz *et al*, 2019). Это не прямой способ, поскольку первым этапом во фрагментомике является выделение всей ДНК из исследуемого образца, и это обязательно включает в себя разрушение всех присутствующих комплексов фактор транскрипции – ДНК. Это уничтожает всю информацию, непосредственно связывающую любой фрагмент ДНК или последовательность с любым фактором транскрипции или другим белком хроматина в образце. О занятости ССФТ судят по наличию коротких фрагментов бкДНК (35-80 п. о.) соответствующей последовательности в выделенной библиотеке ДНК. Однако характеристика белка хроматина, который был присоединен к фрагменту ДНК (до выделения ДНК), не может быть известна, в частности, поскольку многие белки могут быть связаны в непосредственной близости к сайту, представляющему интерес, как показано на фиг. 1 и 2. Следовательно, одним из недостатков способов фрагментомики является то, что связывание любого конкретного фактора транскрипции в любом конкретном ССФТ может подразумеваться, но не может быть установлено.

[44] Другой недавно разработанный не прямой способ включает в себя нуклеосомный ChIP-Seq в плазме крови с ЭДТА для прямого картирования местоположений бесклеточных нуклеосом и использование данных о местоположениях нуклеосом для не прямого определения местоположения фактора транскрипции (Sadeh *et al*, 2021).

[45] Причина, по которой не сообщалось о прямых способах ChIP для комплексов фактор транскрипции – ДНК, заключается в том, что существуют значительные технические трудности или препятствия, которые до сих пор не были устранены. Такие технические трудности включают в себя: (i) признание того, что некоторые комплексы фактор транскрипции – ДНК стабильно ассоциированы в плазме крови, в то время как

другие комплексы фактора транскрипции – ДНК, которые динамически ассоциируются *in vivo*, будут диссоциированы в крови или других биологических жидкостях, (ii) признание того, что наиболее распространенный класс комплексов фактора транскрипции – ДНК диссоциирован в плазме крови с ЭДТА, но это можно предотвратить, (iii) ядерные экстракты из клеточного или тканевого материала представляют собой относительно чистые препараты хроматина, которые могут быть получены в количествах мкг или мг. Напротив, кровь, сыворотка крови или плазма крови содержат очень низкие уровни очень нечистого хроматина, «загрязненного» высокими уровнями других циркулирующих белков, (iv) существует по меньшей мере много сотен факторов транскрипции, и любой конкретный комплекс фактора транскрипции – ДНК будет лишь одним из многих тысяч различных комплексов фактора транскрипции – ДНК, присутствующим в плазме крови. В свою очередь, общая доля фактора транскрипции – ДНК в бкДНК составляет небольшую долю от общей бкДНК (большая часть которой состоит из фрагментов нуклеосом), а доля бкДНК, происходящая из раковых клеток, составляет небольшую долю от общей бкДНК. Следовательно, комплексы фактора транскрипции – ДНК, включающие в себя любой конкретный фактор транскрипции, представляют собой малую долю от малой доли, загрязненную высоким содержанием других белков и других соединений. Одним из следствий этого является то, что специфический сигнал фактора транскрипции – ДНК, генерируемый в плазме крови способом ChIP-Seq, будет низким (ниже фонового сигнала), что делает эффективный анализ данных проблематичным.

[46] Далее авторы данного изобретения представляют способы выявления циркулирующих фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих комплекс фактора транскрипции – ДНК, с превосходной аналитической чувствительностью и превосходной тканевой специфичностью. Данные способы также расширяют использование применимых факторов транскрипции, охватывая большинство или все факторы транскрипции.

[47] Авторы данного изобретения представляют применение комбинированного биомаркера, состоящего из фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции, в комбинации с последовательностью фрагмента ДНК, ассоциированного с указанным фактором транскрипции, для выявления заболевания. Данный комбинированный биомаркер дополнительно обладает очень высокой тканевой специфичностью и может применяться в качестве биомаркера онкологических заболеваний.

[48] Аналитическая чувствительность важна для циркулирующих фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих факторы транскрипции, которые встречаются в низких количествах, близких к пределам выявления посредством иммуноанализа, или ниже таковых. Аналитический предел выявления посредством иммуноанализов варьирует в зависимости от плана анализа и аффинности используемого связывающего агента (как правило, антитела), но может находиться в диапазоне пиколярных концентраций. Однако аналитическая чувствительность выявления ДНК способом полимеразной цепной реакции (ПЦР) – на порядки ниже. Цифровая ПЦР может выявлять концентрации всего нескольких отдельных молекул в образце. Следовательно, применение способа ПЦР-амплификации для выявления ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции, а не использование антитела, направленного на связывание с ДНК (или с эпитопом нуклеосомы), позволяет выявлять циркулирующие фрагменты хроматина, содержащие фактор транскрипции, в чрезвычайно низких концентрациях.

[49] Помимо повышенной чувствительности за счет применения ПЦР для выявления, анализ фрагментов хроматина, содержащих факторы транскрипции, основанный на содержании ассоциированной с ними ДНК, приводит также к высокой аналитической чувствительности за счет обращения к большому пулу факторов транскрипции, которые не содержат ассоциированную нуклеосому.

[50] Следовательно, в соответствии с первым аспектом в данном изобретении представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выявление или измерение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[51] В одном варианте осуществления антитело или другой агент, связывающий фактор транскрипции, используемый на этапе (i), иммобилизован на твердой фазе для

выделения фактора транскрипции из образца.

[52] В одном варианте осуществления способ включает в себя выделение фактора транскрипции, связанного на этапе (i), т. е. из оставшегося образца биологической жидкости, до выявления фрагмента ассоциированной ДНК. Например, к факторам транскрипции в образце, связанным с (твердофазным) связывающим агентом, на этапе (i) можно применять промывочный буфер для удаления оставшегося образца, который не связан со связывающим агентом.

[53] В одном варианте осуществления фрагменты ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции, выделяют из фактора транскрипции для выявления, измерения или секвенирования фрагмента ДНК на этапе (ii).

[54] В одном варианте осуществления ДНК выявляют или измеряют с использованием общего ДНК-связывающего агента, такого как антитело против ДНК или ДНК-хелатирующие либо ДНК-интеркалирующие агенты, например, с использованием бромида этидия и цианиновых красителей, таких как SYBR green и SYBR gold.

[55] В одном варианте осуществления этап (ii) включает в себя секвенирование фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции. Способы секвенирования хорошо известны в данной области техники.

[56] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выявление или измерение фрагмента ДНК на этапе (ii) выполняют путем амплификации фрагмента ДНК, например, с использованием способа количественной ПЦР, для определения присутствия и/или количества фрагмента ДНК. Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) амплификацию ДНК; и

(iv) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры присутствия или количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[57] В одном варианте осуществления амплифицированную ДНК выявляют или измеряют с помощью способа гибридизации ДНК.

[58] В дополнительном варианте осуществления амплификацию фрагмента ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, выполняют после лигирования адаптерных олигонуклеотидов к фрагменту ДНК. Адаптерные олигонуклеотиды могут включать в себя последовательности праймеров для облегчения амплификации фрагментов ДНК способом ПЦР, или последовательности праймеров могут быть добавлены впоследствии. Способы, включающие в себя адаптерные олигонуклеотиды, хорошо известны в данной области техники и рутинно применяются для подготовки библиотек для секвенирования нового поколения. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) лигирование адаптерного олигонуклеотида к выделенной ДНК;
- (iv) амплификацию ДНК; и
- (v) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[59] В одном варианте осуществления амплификацию фрагмента ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, выполняют с использованием олигонуклеотидных ПЦР-праймеров определенной (-ых) последовательности (-ей), предназначенных для амплификации фрагментов ДНК, включающих в себя определенную (-ые) последовательность (-и). Данный вариант осуществления облегчает амплификацию выбранных фрагментов ДНК, включительно с последовательностью (-ями) ССФТ и/или

фланкирующей (-ими) последовательностью (-ями). Данный вариант осуществления является также быстрым, недорогим, легко автоматизируемым для высокой производительности, который можно выполнять в любой ПЦР-лаборатории и, в дополнение к этому, еще больше повышает специфичность здоровой или пораженной заболеванием ткани, из которой происходит бкДНК, за счет сочетания тканевой специфичности экспрессии фактора транскрипции со специфичностью определения местоположения его связывания в геноме посредством анализа последовательности ССФТ и/или фланкирующих последовательностей ассоциированной ДНК во фрагменте хроматина. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) амплификацию ДНК с использованием последовательность-специфического олигонуклеотидного ПЦР-праймера; и
- (iv) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[60] В одном варианте осуществления способ включает в себя выделение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции. В дополнительном варианте осуществления способ включает в себя амплификацию выделенного фрагмента ДНК. Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение связанного фактора транскрипции;
- (iii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iv) амплификацию выделенной ДНК;

- (v) выявление амплифицированной выделенной ДНК; и
- (vi) применение присутствия или количества ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.

[61] В предпочтительных вариантах осуществления амплификацию ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, выполняют с помощью ПЦР. В данной области техники известно множество способов ПЦР, включающих в себя, но не ограничивающихся ими, количественную ПЦР, ПЦР в реальном времени, ПЦР с обратной транскриптазой, вложенную ПЦР, цифровую ПЦР, мультиплексную ПЦР, ПЦР с произвольным праймированием, холодную ПЦР (ПЦР с совместной амплификацией при более низкой температуре денатурации). В некоторых вариантах осуществления способ амплификации включает в себя количественное определение ДНК.

[62] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выявление или измерение ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у субъекта.

[63] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) приведение ДНК в контакт с ДНК-связывающим агентом;
- (iv) выявление ДНК-связывающего агента; и
- (v) применение присутствия или количества ДНК-связывающего агента в качестве индикатора присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[64] Для использования в данном изобретении может быть пригоден любой ДНК-связывающий агент, включительно с антителами. ДНК-связывающий агент может быть напрямую или непрямо (например, посредством линкерной системы, такой как биотин/авидин или глутатион) помечен выявляемым фрагментом, таким как флуоресцентный, ферментативный или радиоактивный фрагмент.

[65] В другом аспекте данного изобретения представлен способ для определения геномных местоположений ССФТ, занятых конкретным фактором транскрипции (и, следовательно, также для определения того, какие гены регулировались), путем выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ассоциированной ДНК, при этом фрагмент ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции, секвенируют для определения геномного местоположения, в котором был связан фактор транскрипции. Следовательно, в другом аспекте в данном изобретении представлен способ определения геномного местоположения, в котором связывается фактор транскрипции, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение связанного фактора транскрипции;
- (iii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iv) амплификацию выделенной ДНК;
- (v) секвенирование амплифицированной выделенной ДНК; и
- (vi) применение последовательности выделенной ДНК для определения геномного местоположения ССФТ.

[66] Данное изобретение находит особое применение при анализе небольших фрагментов ДНК, связанных факторами транскрипции, как правило, в диапазоне размеров 35-80 п. о. Следовательно, в одном варианте осуществления выделенная секвенируемая ДНК относится к небольшим фрагментам ДНК, таким как фрагменты ДНК длиной меньше чем около 100 п. о., такие как длиной меньше чем около 80 п. о., в частности, меньше чем около 60 п. о. Следует отметить, что данные размеры фрагментов ДНК относятся к фрагментам ДНК без/до лигирования с адаптером. В одном варианте осуществления выделенная секвенируемая ДНК содержит фрагменты ДНК в диапазоне размеров меньше чем 100 п. о., такие как длиной 35-80 п. о. (без/до лигирования с адаптером). В одном

варианте осуществления выделенная секвенируемая ДНК содержит множество диапазонов размеров ДНК, которые затем сравниваются, например, как показано на фиг. 10 и 11.

[67] В предпочтительных вариантах осуществления образец представляет собой образец биологической жидкости. В дополнительном варианте осуществления образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки крови или плазмы крови.

[68] В предпочтительных вариантах осуществления используемый связывающий агент представляет собой антитело, направленное на связывание с определенным фактором транскрипции. Следовательно, в одном варианте осуществления связывающий агент, который связывается с фактором транскрипции, представляет собой антитело или его фрагмент (т. е. связывающий фрагмент).

[69] В предпочтительных вариантах осуществления антитело иммобилизовано на твердой фазе для облегчения выделения связанных с антителом комплексов фактор транскрипции – ДНК или фрагмента хроматина.

[70] Присутствие фактора транскрипции вместе с ассоциированным фрагментом ДНК последовательности, которая, как известно, соответствует фактору транскрипции *in vivo*, в циркулирующем фрагменте хроматина является дополнительным подтверждением идентификации вида как фактора транскрипции, так и фрагмента ДНК. Данная комбинация фактора транскрипции вместе с последовательностью ассоциированного фрагмента ДНК является мощной комбинацией биомаркеров для диагностики или оценки широкого спектра болезненных состояний. Кроме того, многие факторы транскрипции, которые присутствуют у здоровых субъектов, связаны с различным набором ССФТ в разных тканях, поэтому идентификация местоположений ССФТ, связанных фактором транскрипции, через присутствующую ассоциированную ДНК идентифицирует ткань, из которой происходят фрагменты хроматина. Более того, это же применимо и к болезненным состояниям. Следовательно, наличие болезненного состояния можно идентифицировать по набору ССФТ, связанных с широко экспрессируемым фактором транскрипции (даже если сам фактор транскрипции экспрессируется во многих или всех тканях). Например, широко экспрессируемый фактор транскрипции CTCF связывается с больше чем тысячей специфических местоположений генома в иммортализованных раковых клетках, но не в

других, нераковых клетках (Wang *et al*, 2012, Liu *et al*, 2017). Следовательно, идентификация присутствия циркулирующего комплекса CTCF-ДНК, при которой связанный фрагмент ДНК секвенирован и наблюдается, что его последовательность соответствует одному из специфических для рака местоположений ССФТ для CTCF, указывает на онкологическое заболевание у субъекта, от которого был получен данный образец. Следовательно, в высоко предпочтительном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления болезненного состояния у субъекта посредством выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, которые вместе образуют комбинированный биомаркер, который идентифицирует, что фактор транскрипции занимал местоположение ССФТ в геноме, которое соответствует болезненному состоянию или конкретной ткани, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта-человека или субъекта-животного, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение связанного фактора транскрипции;
- (iii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iv) амплификацию выделенной ДНК;
- (v) секвенирование амплифицированной выделенной ДНК; и
- (vi) применение последовательности ассоциированных фрагментов ДНК в качестве индикатора ткани, из которой происходят фрагменты хроматина, или состояния заболевания субъекта.

[71] Определение болезненного состояния субъекта может включать в себя, например, выявление, диагностику, выбор лечения, мониторинг или прогноз заболевания.

[72] В одном варианте осуществления способ включает в себя применение фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия заболевания у субъекта. Термин «биомаркер» означает отличительный биологический или полученный биологическим путем индикатор процесса, события или состояния. Биомаркеры могут применяться в способах диагностики, например, клиническом скрининге, и оценке прогноза, а также в мониторинге результатов терапии, выявлении субъектов с наибольшей вероятностью клинического ответа на конкретное терапевтическое лечение, скрининге и разработке лекарственных средств.

Такие биомаркеры включают в себя, например, присутствие (например, последовательность), уровень, концентрацию или количество ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции. В данном документе ссылки на «комбинированный биомаркер» относятся к биомаркеру, который включает в себя больше чем один биологический или биологически производный индикатор, например, фактор транскрипции и ассоциированную ДНК, в частности уровень, концентрацию или количество фактора транскрипции, ассоциированного с конкретной последовательностью, или последовательностями, ДНК.

[73] Тканевая специфичность важна, поскольку большинство факторов транскрипции не обладают идеальной специфичностью экспрессии (для единственного типа клеток). Тканевая специфичность иммуноанализа для циркулирующих фрагментов хроматина, содержащих фактор транскрипции, ограничена как аналитической специфичностью используемого антитела, так и тканевой специфичностью используемого фактора транскрипции или используемой панели факторов транскрипции. Следовательно, тканевая специфичность может быть улучшена путем комбинирования конкретного фрагмента фактора транскрипции с последовательностью фрагмента бкДНК, с которым он связан.

[74] Причина этого заключается в том, что факторы транскрипции связываются с разными последовательностями ДНК в геноме в разных клетках. Экспрессия генов регулируется специфическим связыванием факторов транскрипции с короткими последовательностями ДНК ССФТ, также называемыми элементами ответа или связывающими мотивами. ССФТ обычно, но не обязательно, расположены в области промотора гена вблизи сайта начала транскрипции регулируемого гена. Факторы транскрипции связываются с ССФТ последовательность-специфическим образом посредством ДНК-связывающего домена (ДСД, англ. «DBD»). Как правило, последовательность ССФТ имеет длину 5-15 п. о. в промоторе своего целевого гена, и белок фактора транскрипции, как правило, может связываться с набором сходных последовательностей ДНК с различной степенью аффинности связывания. Длина фрагментов ДНК, ассоциированных с циркулирующими фрагментами хроматина, содержащими факторы транскрипции, будет варьировать в зависимости от того, включает ли в себя данный фрагмент также другие защищенные последовательности ДНК, связанные другими факторами транскрипции, кофакторами, нуклеосомами или другими белками

хроматина. Сообщается, что многие такие фрагменты хроматина встречаются в диапазоне 35-80 п. о. (Snyder *et al*, 2016). Кроме того, авторы данного изобретения отмечают, что это согласуется с диапазоном размеров фрагментов хроматина, образующихся при нуклеазном расщеплении хроматина, выделенного из клеток пациентов с онкологическими заболеваниями, и что этот небольшой диапазон фрагментов, около 35-80 п. о., содержит долю всех фрагментов хроматина большую, чем фрагменты, связанные с нуклеосомами (Corces *et al*, 2018). Авторы данного изобретения пришли к выводу, что эти ассоциированные фрагменты ДНК длиннее, чем типичные ДНК-элементы ответа, и поэтому включают в себя фланкирующие последовательности ДНК. Однако размер фрагмента ДНК, ассоциированного с нуклеосомой, как правило, превышает 100 п. о. ДНК. Следовательно, авторы данного изобретения приходят к выводу, что диапазон фрагментов ДНК в 35-80 п. о. не включает в себя интактные фрагменты нуклеосомной ДНК.

[75] Элемент ответа, или последовательности ССФТ, фактора транскрипции могут многократно встречаться во многих местоположениях генома, а для некоторых факторов транскрипции встречается в тысячах местоположений. Следовательно, существует вероятность того, что один и тот же фактор транскрипции может быть связан в очень многих местоположениях внутри хроматина клетки. Это означает, что гибель одной клетки может, в принципе, привести к образованию большого числа циркулирующих фрагментов хроматина, содержащих один и тот же фактор транскрипции.

[76] Более того, факторы транскрипции, как правило, действуют не сами по себе, а совместно с другими факторами транскрипции, кофакторами или другими фрагментами, которые необходимы для регуляции конкретного гена. Следовательно, фактор транскрипции может связываться с элементом ответа в промоторах большого числа различных генов, каждый из которых взаимодействует с различными факторами транскрипции. Следовательно, фланкирующая последовательность ДНК, окружающая одну и ту же последовательность ССФТ или элемент ответа для одного и того же фактора транскрипции, различается у промоторов разных генов, поскольку она включает в себя мотивы связывания для разных комбинаций факторов транскрипции. Это применимо ко всем или большинству факторов транскрипции.

[77] В дополнение к этому, последовательность связывания самого элемента ответа может быть вырожденной, так что фактор транскрипции может связываться со множеством

различных последовательностей мотива. Например, фактор транскрипции TTF-1 экспрессируется тканеспецифическим образом в здоровой ткани легких и здоровой ткани щитовидной железы. В легких два белковых фактора TTF-1 связываются с промоторной областью гена сурфактантного белка В (SPB), специфического для легких. ДНК-связывающая последовательность, или мотив связывания, TTF-1 в промоторе SPB представляет собой GCNCTNNAG (SEQ ID NO: 1) (где А, С, G и Т обозначают азотистые основания ДНК – аденин, цитозин, гуанин и тимин, соответственно, и N обозначает любое из этих азотистых оснований). Более широкая консенсусная последовательность промоторной ДНК, окружающей связывание TTF-1, представляет собой (-118)GATCAAGCACCTGGAGGGCTCTTCAGAGCAAAGACAAACACTGAGGTCGCTGCSA(-64) (SEQ ID NO: 2), где (-64) обозначает расстояние в п. о. от сайта начала транскрипции SPB. В промоторе SPB в легочной ткани TTF-1 связывается совместно с фактором транскрипции ядерного фактора гепатоцитов 3 (HNF3), как показано на фиг. 1 (Matys *et al*, 2006; и Bohinski *et al*, 1994).

[78] В щитовидной железе TTF-1 регулирует ряд генов, включающий в себя тиреоглобулин, рецептор тиреотропного гормона и тиреопероксидазу. Консенсусная последовательность связывания для TTF-1 в промоторной области гена тиреоглобулина отличается от таковой в легких и описывается как TGGCCACACGAGTGCCCTCA (SEQ ID NO: 3). В промоторе гена тиреоглобулина TTF-1 совместно связывается с факторами транскрипции TTF-2, PAX8 и Runx2, и более широкая последовательность, включающая в себя фланкирующие последовательности длиной 50 п. о. на 5'- и 3'-концах, представляет собой

CCCACCCCGTTCTGTTCCCCACAGTTTAGACAAGATCCTCATGCTCCACTGGCCACACGAGTGCCCTCAGGAGGAGTAGACACAGGTGGAGGGAGCTCCTTTTGACCAGCAGAGAAAAC (SEQ ID NO: 4). Подобным образом, TTF-1 также связывается с промоторными областями рецептора тиреотропного гормона и генами тиреопероксидазы совместно с различными взаимодействующими факторами транскрипции в каждом конкретном случае. Следовательно, различается не только последовательность ДНК, окружающая сайт связывания TTF-1 в промоторной последовательности генов, регулируемых в ткани щитовидной железы или легкого, но и кофакторы, ассоциированные с TTF-1, и, следовательно, окружающая последовательность ДНК, также различаются для связывания с разными генами в одной и той же ткани, как показано на фиг. 1 (Matys *et al*, 2006; и Maenhaut *et al*, 2015). Это демонстрирует, что комбинации циркулирующего фрагмента

хроматина, содержащего TTF-1, вместе со знанием последовательности ДНК, ассоциированной с фрагментом хроматина, достаточно для идентификации фрагмента хроматина как происходящего из легких или из щитовидной железы.

[79] Считается, что существует около 1000-3000 факторов транскрипции человека, каждый из которых связывает специфические местоположения в геноме, что приводит к динамическим изменениям транскрипции, которые управляют широким спектром клеточных процессов. Авторы данного изобретения проиллюстрировали принцип данного изобретения применительно к TTF-1 в качестве одного примера. Однако в способах согласно данному изобретению в принципе можно использовать любой фактор транскрипции. Даже факторы транскрипции, которые повсеместно экспрессируются во многих типах клеток и связывают дискретные последовательности ДНК, например, факторы транскрипции белка Нох, взаимодействуют с кофакторами, чтобы уникальным образом связываться с разными последовательностями для регуляции разными генов в разных тканях (Merabet and Mann, 2016, Mann *et al*, 2009). Это означает, что все или большинство факторов транскрипции вместе с их последовательностями ССФТ (необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями) можно применять в качестве комбинированных биомаркеров для способов согласно данному изобретению. Например, фактор транскрипции рецептора эстрогена- α (ER α) связывается с больше чем тысячей сайтов связывания или элементов ответа на эстроген (ERE) в геноме человека совместно с комбинациями по меньшей мере 60 других факторов транскрипции в различных местоположениях генома (Lin *et al*, 2007). Подобным образом, рецептор андрогена (AR) связывает элемент ответа андрогена (ARE), ассоциированный с тысячами генов, совместно с другими взаимодействующими факторами транскрипции в тысячах различных последовательностей локусов. Следовательно, способы согласно данному изобретению могут идентифицировать ткань, из которой происходит фрагмент хроматина, содержащий ER α или AR, по последовательности ассоциированной ДНК, даже если эти факторы транскрипции экспрессируются во множестве тканей.

[80] Более того, при онкологических заболеваниях перепрограммируется общегеномное связывание транскрипционных факторов с локусами ДНК, и экспрессируемые факторы транскрипции и ССФТ, с которыми они связываются в раковых клетках, отличаются от тех, с которыми они связываются в здоровых клетках той же ткани, поэтому идентификация в циркуляции фрагмента хроматина, содержащего фактор

транскрипции, в комбинации с данными о последовательности ассоциированной фрагмента ДНК позволяют как идентифицировать субъекта с онкологическим заболеванием, так и идентифицировать тип онкологического заболевания, например, как рак предстательной железы или рак легкого и т. д. (Pomerantz *et al*, 2015). Это возможно благодаря тому, что хроматин ремоделируется во время онкогенеза, и это ремоделирование включает в себя повышение уровней белков, ассоциированных с опухолью, посредством паттернов связывания ремоделированных факторов транскрипции в раковой клетке. Из-за этого экспрессия многих факторов транскрипции усилена в раковых клетках. Это широкое явление, но его можно проиллюстрировать несколькими неограничивающими примерами. Например, хорошо известные факторы транскрипции, ассоциированные с онкологическими заболеваниями, с-Мус и p53, повышены при большинстве видов онкологических заболеваний. Последовательности сайтов связывания, связанные AR, сильно изменены при раке предстательной железы (Pomerantz *et al* 2015). Подобным образом, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП, англ. «EMT») в раковых клетках, который ассоциирован с метастазированием и устойчивостью к терапии, включает в себя повышенные уровни факторов транскрипции семейства Jun/Fos, включительно с Fos11, Fosb, Fos и Junb. Также было обнаружено, что семейство факторов транскрипции ETS (специфичных для трансформации E26), а также факторы транскрипции Runx1, Tead и Nfkb высоко обогащены в открытом хроматине опухолевых клеток. В дополнение к этому сообщается, что в опухолевых клетках повышены уровни p63, Klf, Grhl и Serpa, а их сайты связывания обогащены в открытых областях хроматина. Факторы транскрипции Klf5 и p63 ассоциированы с карциномами и действуют как движущие силы при карциномах легких, головы и шеи. Другие факторы транскрипции, ассоциированные с ЭМП, включают в себя bHLH, Runx, Nfat, Tbx1, Tcf7l1 и Smad2 (Latil *et al*, 2017).

[81] Регуляция транскрипции эукариотических генов включает в себя множество регуляторных белков, связанных со множеством регуляторных последовательностей ДНК, расположенных как вблизи сайта начала транскрипции (СНТ, англ. «TSS») гена, так и дистальнее СНТ в геноме в транскрипционном комплексе, например, как показано на фиг. 2. Дистальные регуляторные последовательности в ДНК могут располагаться на расстоянии от нескольких сотен до больше чем миллиона оснований от СНТ, или могут быть более удаленными. Комплекс транскрипции, как правило, включает в себя петлю ДНК, которая может включать в себя белок, изгибающий ДНК, при этом более дистальные регуляторные последовательности, а также связанные с ними регуляторные белки

приводятся в контакт с белками, которые связаны с регуляторными последовательностями, расположенными ближе к СНТ, например, как также проиллюстрировано на фиг. 2. ТАТА-бокс назван так потому, что он содержит последовательность повторяющихся тиминовых/адениновых нуклеотидов, которые связываются с общими факторами транскрипции, необходимыми для транскрипции. Для экспрессии конкретного гена также требуются дополнительные, геноспецифические факторы транскрипции (например, факторы транскрипции, необходимые для экспрессии сурфактантного белка В, тиреоглобулина, тиреопероксидазы и генов рецептора ТТГ, как показано на фиг. 1). В дополнение к этому, необходимо множество других белков, включающее в себя, но не ограничивающееся ими, например, кофакторы, медиаторы, активаторы, коактиваторы, репрессоры, корепрессоры, белки, ремоделирующие хроматин, белки, изгибающие ДНК, изоляторы, РНК-полимеразные фрагменты, факторы элонгации, факторы ремоделирования хроматина, фрагменты STAT или цитокиновые факторы, или цитокин-родственные факторы, связанные с фрагментом STAT, вышестоящий связывающий фактор (UBF) или любые другие фрагменты, ассоциированные с таким комплексом регуляции гена или транскрипции. Такие комплексы могут также включать в себя участки ДНК, защищенной нуклеосомами. Комплексы транскрипции могут быть стабильными для облегчения транскрипции в больших объемах. Следовательно, циркулирующие фрагменты хроматина здорового и/или болезнетворного происхождения могут включать в себя крупные комплексы белок/ДНК, которые включают в себя множество белков, которые могут быть устойчивы к нуклеазной активности. Некоторые крупные комплексы транскрипции, включающие в себя ближние и дистальные регуляторные последовательности, как проиллюстрировано на фиг. 2, называются суперэнхансерами. Суперэнхансеры представляют собой крупные кластеры с высокими уровнями связывания факторов транскрипции и играют центральную роль в регуляции экспрессии генов, участвующих в контроле идентификационных характеристик клеток. Суперэнхансеры также играют центральную роль в стимуляции транскрипции онкогенов при онкологических заболеваниях. Раковые клетки приобретают суперэнхансеры, а раковые фенотипы зависят от аномальной транскрипции, управляемой суперэнхансерами. Следовательно, выявление присутствия фрагментов хроматина, включающих в себя все или части комплексов суперэнхансеров и/или комбинаций последовательностей фрагментов бкДНК, которые соответствуют ближним и дистальным регуляторным последовательностям суперэнхансеров, способами, описанными в данном документе, обеспечивает способ идентификации клеточного происхождения фрагментов хроматина, включительно с

происхождением из раковых клеток. Авторы данного изобретения также полагают, что по своей природе суперэнхансерные комплексы, вероятно, содержат стабильно связанные, а не временно связанные факторы транскрипции.

[82] Петля ДНК в таком фрагменте хроматина, полученном из транскрипционного комплекса, в принципе может быть либо интактной, либо может расщепляться в одном или большем числе местоположений, в результате чего образуются либо (i) два циркулирующих фрагмента хроматина, соответствующих ближней и дистальной регуляторным последовательностям; либо (ii) крупный фрагмент хроматина, который содержит два фрагмента ДНК. Следовательно, бкДНК может включать в себя небольшие фрагменты ДНК, которые соответствуют как ближним, так и дистальным регуляторным последовательностям гена.

[83] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) определение последовательности одного или большего числа фрагментов ДНК, ассоциированных с фактором транскрипции; и
- (iii) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[84] Следует понимать, что любой негистоновый белок хроматина, который связывается с ДНК и чей паттерн связывания бкДНК отличается у здоровых и больных субъектов, будет пригоден для использования в способах согласно данному изобретению, включительно с факторами транскрипции, а также другими негистоновыми белками хроматина, включительно с хроматин-модифицирующими белками, генетическим и эпигенетическим считыванием, записывающими и удаляющими белками, белками, участвующими в транскрипции РНК (например, молекулами РНК-полимеразы) и архитектурными или структурными белками хроматина (например, белками, изгибающими ДНК).

[85] Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с негистоновым белком хроматина;
- (ii) определение последовательности одного или большего числа фрагментов ДНК, ассоциированных с негистоновым белком хроматина; и
- (iii) применение присутствия негистонового белка хроматина и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[86] В предпочтительном варианте осуществления негистоновый белок хроматина представляет собой РНК-полимеразу, в частности – РНК-полимеразу II. РНК-полимераза II представляет собой ДНК-связывающий фермент, который отвечает за транскрибирование ДНК-последовательности гена для получения РНК-копии. РНК-копия может представлять собой молекулу матричной РНК (мРНК), приводящую к выработке соответствующего белка рибосомами, или может представлять собой молекулу *некодирующей РНК* (нкРНК), которая не транслируется в белок. Следовательно, присутствие РНК-полимеразы II в циркулирующем фрагменте хроматина указывает на то, что данный фрагмент происходит от гена, который был активен в клетках, из которых он произошел. Следовательно, библиотека последовательностей фрагментов ДНК, полученных из фрагментов хроматина, ассоциированных с РНК-полимеразой II, обеспечивает библиотеку активных динамических генов, присутствующих в образце. У здорового человека эта библиотека соответствует в основном активным генам, присутствующим в гемопозитических тканях. У больного человека библиотека дополнительно включает в себя гены, активные в ткани (-ях), пораженной (-ых) заболеванием. Это может быть любая ткань, пораженная заболеванием. Например, гены, активные в клетках печени или почек, могут быть представлены в библиотеке РНК-полимеразы II, полученной из образцов, взятых у пациентов с заболеваниями печени или почек, при этом такие гены отсутствуют в библиотеке здорового человека. Подобным образом, гены, уровень которых повышен при онкологическом заболевании, могут быть представлены в библиотеке РНК-полимеразы II, полученной из образцов, взятых у пациентов с онкологическим заболеванием, при этом такие гены

отсутствуют в библиотеке здорового человека. Применение РНК-полимеразы II в данном аспекте данного изобретения позволяет идентифицировать активные динамические гены, представленные в образце. Это позволяет выявлять онкологические заболевания, а также определять ткань (-и), пораженную (-ые) онкологическим заболеванием.

[87] Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с РНК-полимеразой;
- (ii) определение последовательности одного или большего числа фрагментов ДНК, ассоциированных с РНК-полимеразой; и
- (iii) применение присутствия РНК-полимеразы и фрагмента ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[88] В одном варианте осуществления заболевание выбрано из онкологического заболевания, аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания. В дополнительном варианте осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В дополнительном варианте осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из следующих: системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит. В дополнительном варианте осуществления воспалительное заболевание выбрано из следующих: болезнь Крона, колит, эндометриоз и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

[89] В предпочтительных вариантах осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В дополнительном варианте осуществления онкологическое заболевание выбрано из следующих: рак молочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак кожи (такой как меланома), рак яичников, рак предстательной железы, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак кишечника, рак печени, рак эндометрия, лимфома, рак полости рта, рак головы и шеи, лейкоз и остеосаркома.

[90] В дополнительных вариантах осуществления заболевание представляет собой

фетальное заболевание или патологическое состояние. В данной области техники хорошо известно, что фрагменты хроматина фетального происхождения, например, содержащие последовательности ДНК Y-хромосомы, происходящие от плода мужского пола (XY), циркулируют в крови беременных матерей (XX) животных и человека. Сообщалось, что бкДНК, циркулирующая у беременных женщин, содержит как фрагменты бкДНК длиной, ожидаемой для фрагментов ДНК, защищенных нуклеосомами (около 160 п. о.), так и более короткие фрагменты бкДНК в диапазоне от 50 п. о. и выше. Более того, сообщалось, что фрагменты материнской бкДНК длиной меньше чем 140 п. о. обогащены бкДНК фетального происхождения (Hu *et al*; 2019). Следовательно, способы согласно данному изобретению применимы не только к болезненным состояниям субъекта, у которого был взят образец, но и к пренатальному исследованию или тестированию состояния плода в образцах материнской крови.

[91] Следовательно, в соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у плода человека или животного, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) получение образца биологической жидкости от беременного субъекта-человека или субъекта-животного;
- (ii) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (iii) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iv) применение присутствия, последовательности или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у плода.

[92] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления ткани, пораженной заболеванием, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) определение последовательности оснований ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции или фрагментом хроматина; и
- (iii) применение комбинированного биомаркера фактор транскрипции /

последовательность ДНК в качестве индикатора ткани, пораженной заболеванием, у субъекта.

[93] В предпочтительном варианте осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В другом варианте осуществления ткань, пораженная заболеванием, представляет собой орган происхождения, такой как орган происхождения онкологического заболевания.

[94] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) амплификацию выделенной ДНК способом ПЦР;
- (iv) определение последовательности амплифицированной ДНК; и
- (v) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[95] Специалистам в данной области техники также будет ясно, что можно получить множество последовательностей, соответствующих различным генным локусам, связанным с конкретным фактором транскрипции, и данные, касающиеся различных последовательностей, можно объединить для определения природы заболевания и/или ткани, пораженной заболеванием.

[96] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;

- (iii) амплификацию выделенной ДНК способом ПЦР, например, с использованием последовательность-специфических праймеров;
- (iv) выявление амплифицированной ДНК; и
- (v) применение присутствия, количества и/или последовательности амплифицированной ДНК в качестве индикатора присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[97] В одном варианте осуществления амплификацию выделенного фрагмента ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, выполняют после лигирования адаптерного олигонуклеотида к фрагменту ДНК. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) лигирование адаптерного олигонуклеотида к выделенной ДНК;
- (iv) амплификацию ДНК; и
- (v) применение присутствия, количества и/или последовательности фрагмента ДНК в качестве индикатора присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[98] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iii) амплификацию выделенной ДНК с использованием последовательность-специфических олигонуклеотидных праймеров;
- (iv) выявление амплифицированной ДНК; и
- (v) применение присутствия, количества и/или последовательности амплифицированной ДНК в качестве индикатора присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[99] В данном аспекте используется тканеспецифичность комбинированного биомаркера фактор транскрипции / последовательность ДНК согласно данному изобретению, устраняя при этом необходимость подготовки библиотеки адаптеров фрагментов ДНК и секвенирования ДНК нового поколения путем ПЦР-амплификации выбранных фрагментов ДНК, включающих в себя последовательность (-и) ССФТ и/или фланкирующую (-ие) последовательность (-и), представляющие интерес для целей биомаркера. Данный способ является быстрым, недорогим, легко автоматизируемым способом с высокой производительностью и может быть выполнен в любой ПЦР-лаборатории.

[100] Последовательности ДНК, выделенные на этапах (i) или (ii), можно амплифицировать любым известным в данной области способом. В некоторых вариантах осуществления выделенную ДНК амплифицируют с использованием способа ПЦР с использованием адаптеров, которые лигируются с фрагментами ДНК. В других вариантах осуществления для амплификации ДНК используют ПЦР-праймеры. Праймеры могут быть сконструированы для амплификации всех последовательностей ДНК, выделенных на этапах (i) или (ii), или могут быть сконструированы для амплификации специфических последовательностей ДНК, ассоциированных с последовательностью элемента ответа фактора транскрипции, необязательно также включающих в себя фланкирующие области.

[101] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение (и, необязательно, амплификацию) ДНК, ассоциированное с фактором транскрипции;
- (iii) выявление ДНК с помощью способа гибридизации; и
- (iv) применение присутствия, количества и/или последовательности гибридизованной ДНК в качестве индикатора присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[102] В данном аспекте используется тканеспецифичность комбинированного

биомаркера фактор транскрипции / последовательность ДНК согласно данному изобретению, устраняя при этом дорогостоящее секвенирование ДНК нового поколения путем селективной ДНК-гибридизации фрагментов ДНК, включающих в себя последовательность (-и) ССФТ и/или фланкирующую (-ие) последовательность (-и). Данный способ является недорогим и может быть выполнен в любой ПЦР-лаборатории.

[103] В предпочтительных вариантах осуществления выделенную ДНК амплифицируют до гибридизации. В предпочтительных вариантах осуществления способ гибридизации представляет собой способ ДНК-микрочипа (также известный как способ ДНК-чипа).

[104] Способ согласно данному изобретению также можно применять для измерения комбинированного биомаркера фактора транскрипции и ДНК, ассоциированной с последовательностью.

ВЫБОР ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

[105] Регуляция транскрипции генов в эукариотических организмах очень сложна и может включать в себя изгибание и петлеобразование ДНК для объединения множества регуляторных последовательностей ДНК, связанных множеством регуляторных белков, в регуляторный комплекс транскрипции, как показано на фиг. 2. Следовательно, при употреблении в контексте данного документа термин «фактор транскрипции» означает регуляторный белок, который напрямую или непрямо связывается с регуляторной последовательностью гена в геноме для регуляции транскрипции гена, включающий в себя, но не ограничивающийся ими, общие факторы транскрипции и специфические факторы транскрипции, ассоциированные с регуляцией конкретного (-ых) гена (-ов), а также энхансер, коэнхансер, репрессор, корепрессор, медиатор, активатор, коактиватор, репрессор, корепрессор, белок, ремоделирующий хроматин, белок, изгибающий ДНК, изолятор, РНК-полимеразный фрагмент, фактор элонгации, фрагмент STAT, цитокиновый фактор или цитокин-родственный фактор, связанный с фрагментом STAT, UBF или любые другие фрагменты, ассоциированные с таким комплексом регуляции гена или транскрипции. Подобным образом, при употреблении в контексте данного документа термин «сайт связывания фактора транскрипции» («ССФТ») означает сайт связывания ДНК для регуляторного белка, ассоциированный с регуляцией транскрипции гена, включающий в себя, но не ограничивающийся ими, дистальные или проксимальные энхансерные и

репрессорные последовательности, как показано на фиг. 2.

[106] Хорошо известно, что экспрессия факторов транскрипции изменяется при заболевании. Следовательно, способ согласно данному изобретению может относиться к фактору транскрипции, который усиленно экспрессируется при заболевании и/или ненормально экспрессируется в ткани, пораженной заболеванием, например, в раковой ткани, который при этом, как правило, невысоко экспрессируется в указанной (здоровой) ткани. Поэтому уровень фактора транскрипции, присутствующего в образце биологической жидкости, можно применять в качестве биомаркера заболевания.

[107] Также хорошо известно, что профиль занятости ССФТ факторами транскрипции изменяется в различных типах клеток и при заболеваниях (Wang *et al*, 2012). Следовательно, профиль занятости ССФТ фактором транскрипции, присутствующим в образце биологической жидкости, можно применять в качестве биомаркера заболевания.

[108] Фрагменты хроматина, присутствующие в кровотоке здоровых субъектов, преимущественно имеют гемопоэтическое происхождение. Следовательно, способ согласно данному изобретению также относится к выявлению ненормального присутствия фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции вместе с ассоциированной ДНК, который в норме не экспрессируется в гемопоэтических тканях (но может экспрессироваться в негемопоэтической ткани).

[109] Например, многие онкологические заболевания происходят из эпителиальных тканей. Эпителиальный фактор транскрипции GRHL2 экспрессируется во многих эпителиальных тканях, а также при многих онкологических заболеваниях, происходящих из эпителиальных тканей, но не экспрессируется в гемопоэтических тканях. Присутствие GRHL2 в кровотоке указывает на наличие онкологического заболевания эпителиального происхождения, например, рака толстой кишки, предстательной железы, легкого или молочной железы. Следовательно, способы согласно данному изобретению можно применять для выявления присутствия онкологического заболевания как такового, а также для идентификации органа происхождения онкологического заболевания с использованием факторов транскрипции, специфических в отношении линии происхождения, и/или комбинаций факторов транскрипции, специфических в отношении линии происхождения, с ассоциированными последовательностями ДНК. Поэтому любой фактор транскрипции

может быть пригоден в способах согласно данному изобретению. В предпочтительных вариантах осуществления уровень фрагментов хроматина, включающих в себя выбранный фактор транскрипции, повышен в биологической жидкости субъектов с заболеванием (по сравнению с уровнями, выявляемыми у других субъектов), частично или полностью специфически для ткани и/или заболевания, и/или имеет множественные элементы ответа в геноме.

[110] Следовательно, в одном варианте осуществления фактор транскрипции является специфическим для заболевания (т. е. уровень циркулирующих фрагментов хроматина, включающих в себя данный фактор транскрипции, повышается при заболевании). В одном варианте осуществления фактор транскрипции является тканеспецифическим. В одном варианте осуществления фактор транскрипции связывается больше чем с одним положением в геноме, например, больше чем с 5, больше чем с 10, больше чем с 100, больше чем с 1000 или больше чем с 10000 положений в геноме. Некоторые положения связывания фактора транскрипции заняты в одних типах тканей, но не в других. Некоторые положения связывания фактора транскрипции заняты в клетках, пораженных заболеванием, но не в здоровых клетках тех же тканей.

[111] Факторы транскрипции можно классифицировать по домену связывания (например, см. работу Vaquerizas *et al*, 2009, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления фактор транскрипции включает в себя ДНК-связывающий домен, выбранный из: доменов связывания гомеодомена, HLH, bZip, NHR, белков семейства Forkhead, P53, HMG, ETS, aPT/TIG, POU, MAD, SAND, IRF, TDP, DM, белков теплового шока, STAT, CP2, RFX, AP2 или доменов связывания цинковых пальцев (например, цинковых пальцев C₂H₂ или цинковых пальцев GATA). В одном варианте осуществления фактор транскрипции включает в себя ДНК-связывающий домен, не связывающий цинковые пальцы.

[112] Подходящие факторы транскрипции могут быть определены экспериментально, например, с использованием классических способов картирования сайтов с доступом нуклеаз, для идентификации представляющих интерес факторов транскрипции в представляющей (-их) интерес ткани (-ях). В иллюстративном эксперименте хроматин извлекают из представляющих интерес клеток (например, раковой клетки, здоровой клетки той же ткани и гемопоэтической клетки) и расщепляют с использованием подходящей

нуклеазы. Фрагменты хроматина, образующиеся в результате расщепления, подвергают воздействию антитела, которое связывается с фактором транскрипции, и связанные с антителом фрагменты ДНК выделяют и секвенируют для идентификации последовательности (-ей) ССФТ (необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями), связанной (-ых) фактором транскрипции. Полученные результаты могут быть использованы для выбора факторов транскрипции для применения в данном изобретении. Например, в способах согласно данному изобретению полезны комбинации факторов транскрипции и фактора транскрипции / ССФТ (необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями), уровни которых повышены в клетках, пораженных заболеванием, но низки или отсутствуют в гемопоэтических клетках. Классические способы обеспечения доступности для нуклеазы недавно были усовершенствованы, и теперь уровень техники включает в себя способы, например, CUT&RUN и другие способы, которые являются более простыми в исполнении и обеспечивают улучшенные результаты (Skene and Henikoff, 2017). Многие такие способы будут пригодны для применения при идентификации подходящих факторов транскрипции для применения в данном изобретении.

[113] Было выполнено множество таких и подобных экспериментов, и, следовательно, в данной области техники доступны подходящие факторы транскрипции. В литературе имеется множество публикаций о факторах транскрипции и онкологических заболеваниях, в которых перечисляются факторы транскрипции, применимые в способах согласно данному изобретению. Например, в работе Lambert *et al*, 2018, перечислены 294 известных онкогенных фактора и регулятора транскрипции. В работе Gurel *et al*, 2010, описан фактор транскрипции NKX3.1 как маркер рака предстательной железы. В работе Darnell, 2002, перечислен ряд онкогенных факторов транскрипции, включающий в себя STAT3, 5, STAT-STAT, GR, IRF, TCF/LEF, β -катенин, NF- κ B, NOTCH (NICD), GLI, c-JUN, белки bZip (включительно с c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF и семейством CREB-CREM), семейство cEBP, белки ETS и семейство MAD-box. В работе Vaquerizas *et al*, 2009, описан ряд тканеспецифичных факторов транскрипции, пригодных в способах согласно данному изобретению. В работе Ulz *et al*, 2019, описаны факторы транскрипции, такие как эпителиальный фактор транскрипции GRHL2, который присутствует во многих типах рака, но не в гематологических тканях, а также AR (рецептор андрогена), NKX3-1 и HOXB13. В работе Corces *et al*, 2018, описан ряд специфических для рака и тканеспецифических факторов транскрипции, включительно с NR5A1, TP63, GRHL1, FOXA1, GATA3, NFIC,

CDX2, RFX2, ASCL1, PAX2, HNF1A, NKX2.A, PNOX2B, DRGX, HOXB13, AR, MITF, HNF4 и POU5F1. С помощью ChIP-Seq Wang *et al*, 2012, идентифицировали 77811 различных сайтов связывания фактора транскрипции CTCF среди 19 различных типов клеток, включающих в себя 7 линий бессмертных раковых клеток и 12 типов нормальных клеток. Среди этих 77811 СФТ CTCF было обнаружено, что 1236 сайтов по-разному заняты в раковых клетках. Было обнаружено, что занятость 195 сайтов происходит в нормальных типах клеток, но не в раковых клетках. Было обнаружено, что занятость 1041 сайта происходит в раковых клетках, но не в клетках нормального типа (Liu *et al*, 2017). Обнаружение CTCF-ассоциированных фрагментов бкДНК, соответствующих специфическим для рака ССФТ, в биологической жидкости с помощью ChIP-Seq указывает на наличие онкологического заболевания у обследуемого субъекта и таким образом может применяться в качестве биомаркера. Указанные работы настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей полноте.

[114] Подходящие факторы транскрипции для использования в способе согласно данному изобретению также могут быть выбраны с использованием различных баз данных по факторам транскрипции, по онкологическим заболеваниям и геному, например, базы данных ENSEMBL, которая предоставляет аннотированную геномную последовательность для ряда видов, включительно с человеком, Энциклопедии элементов ДНК или базы данных ENCODE (<https://www.encodeproject.org>), базы данных факторов транскрипции (TRANSFAC) (Matys *et al*, 2006), базы данных регуляции транскрипции генов (GTRD) версии 18.01 (<http://gtrd.biouml.org>), базы данных факторов транскрипции человека версии 1.01 (<http://humantfs.cabr.utoronto.ca>), базы данных NIH Genomics Data Commons (<https://gdc.cancer.gov>), Атласа генома рака (TCGA) (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>), браузера UCSC Xena (<https://atacseq.xenahubs.net>) и базы данных Атласа белков человека (<https://www.proteinatlas.org>), который предоставляет данные о здоровых тканях, в которых экспрессируется фактор транскрипции, а также о его экспрессии при онкологических заболеваниях, а также с использованием других баз данных.

[115] Использование этих баз данных для характеристики факторов транскрипции и ассоциированных последовательностей ССФТ, и фланкирующих последовательностей, для использования в способах согласно данному изобретению можно проиллюстрировать со ссылкой на несколько из этих баз данных в качестве примера. База данных TRANSFAC

содержит данные о многих тысячах факторов транскрипции человека и других эукариот. Подробные сведения, предоставляемые для каждого фактора транскрипции, включают в себя число ССФТ, с которыми он связывается в геноме, перечни генов, транскрипцию которых он регулирует, последовательность и геномное местоположение ССФТ, ассоциированных с каждым регулируемым геном, подробные сведения о других факторах транскрипции, которые взаимодействуют с ним для регулирования транскрипции, консенсусные последовательности ДНК ССФТ, подробные сведения о ДСД и ассоциации с онкологическими заболеваниями. Использование этих данных в контексте данного изобретения проиллюстрировано ниже в качестве примера для факторов транскрипции CDX2 и c-JUN в иллюстративных целях. В базе данных TRANSFAC перечислены 48 ССФТ CDX2 человека, которые регулируют 26 конкретных генов. Приведены последовательности ССФТ CDX2, а также их геномное местоположение и гены, регулируемые каждым из них. Фланкирующие последовательности для каждого ССФТ CDX2 могут быть определены путем обращения к базе данных генома человека ENSEMBL касательно последовательности в каждом геномном местоположении. Также представлены консенсусные последовательности ССФТ CDX2. Подобным образом, в базе данных TRANSFAC перечислены 265 ССФТ c-JUN человека, которые регулируют 166 конкретных генов. Приведены последовательности ССФТ c-JUN, а также их геномное местоположение и гены, регулируемые каждым из них. Фланкирующие последовательности для каждого ССФТ c-JUN могут быть определены путем обращения к базе данных генома человека ENSEMBL касательно последовательности в каждом геномном местоположении. Также представлены консенсусные последовательности ССФТ c-JUN.

[116] Следовательно, фактор транскрипции и/или ССФТ могут быть выбраны экспериментально или из литературы, и/или из баз данных, таких как база данных Атлас белков человека, как пригодные в способах согласно данному изобретению. Фактор транскрипции можно охарактеризовать касательно: (i) здоровых и пораженных заболеванием тканей, в которых он экспрессируется, (ii) генов, регулируемых в данных клетках или тканях, (iii) последовательностей ССФТ (необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями), с которыми он связывается в данных тканях, и (iv) других факторов, с которыми он взаимодействует путем совместного связывания с ССФТ для регуляции транскрипции. Данную характеристику можно использовать для идентификации здоровых или пораженных заболеванием ткани или клеток, из которых происходят фрагменты хроматина и/или ассоциированные с фактором транскрипции

фрагменты бкДНК в образце биологической жидкости способами, описанными в данном документе.

[117] Подобным образом, экспериментальные данные, относящиеся к фрагментам хроматина и/или последовательностям бкДНК в образцах биологической жидкости, можно интерпретировать с использованием этих баз данных для идентификации всей последовательности ССФТ или ее части, необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями, включенными во фрагмент бкДНК. Затем эти данные можно использовать для идентификации ткани или клеток, из которых происходит фрагмент бкДНК.

[118] Существует три основные группы факторов транскрипции, которые в настоящее время признаны особенно значимыми при онкологических заболеваниях. Первая группа – это группа ядерных рецепторов гормонов, которая включает в себя рецептор эстрогена, рецептор андрогена, рецептор прогестерона, рецептор глюкокортикоидов, рецептор тиреоидных гормонов и рецептор ретиноевой кислоты. Группа факторов транскрипции, относящихся к ядерным рецепторам гормонов, представляет собой рецепторы клеточной поверхности, которые можно рассматривать как неактивные или латентные факторы транскрипции, которые могут быть активированы связыванием лиганда. Например, рецептор эстрогена активируется связыванием с эстрогеном. Связывание лиганда приводит к миграции ядерного рецептора гормонов в ядро, где он связывается с целевой последовательностью ДНК (например, рецептор эстрогена связывается с элементом ответа на эстроген) и осуществляет повышающую или понижающую регуляцию генов, ассоциированных с целевой последовательностью ДНК (например, генов, регулируемых эстрогеном).

[119] Вторая группа факторов транскрипции, которые, как известно, играют важную роль в инициации и развитии онкологических заболеваний, – это передатчики сигнала и активаторы транскрипции (STAT). Это латентные цитоплазматические факторы транскрипции, которые могут активироваться большим разнообразием молекулярных триггеров в цитоплазме и/или на поверхности клетки. Как правило, активация STAT включает в себя каскад биохимических событий в цитоплазме, таких как киназные реакции, реакции протеолиза и белок-белковые взаимодействия, которые приводят к проникновению в ядро белка или белкового комплекса, модулирующих транскрипцию

целевых генов. Часто биохимический каскад, приводящий к активации транскрипции, запускается посредством связывания лиганда с рецептором на поверхности клетки, включительно, например, со связыванием цитокинового фрагмента рецептором цитокина или связыванием фактора роста, такого как эпидермальный фактор роста или тромбоцитарный фактор роста, рецептором фактора роста, или посредством связывания пептида, или белка, с рецептором, сопряженным с G-белком.

[120] Третья группа факторов транскрипции, значимых при онкологических заболеваниях, – это резидентные ядерные белки, транскрипционные эффекты которых, как правило, активируются каскадом биохимических событий, включающих в себя серинкиназные реакции. Существуют сотни серинкиназных фрагментов и сотни ядерных белков, которые являются целями для серинкиназ.

[121] Специалистам в данной области техники будет ясно, что бесклеточные фрагменты хроматина, содержащие (т. е. включающие в себя или содержащие в себе) любой фактор транскрипции, вовлеченный в инициацию, развитие или поддержание онкологического заболевания, такие как факторы транскрипции из трех групп, описанных выше, будут полезны в способах согласно данному изобретению. Некоторые факторы транскрипции или семейства факторов транскрипции, играющие известную роль при онкологических заболеваниях, или, как известно, повышенные при онкологических заболеваниях, включают в себя, но не ограничиваются ими, например, STAT, в частности STAT3, STAT5 и димерные фрагменты STAT-STAT, NF- κ B, β -катенин, γ -катенин, Notch и внутриклеточный домен Notch (NICD), GLI, c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF, CREB-CREM, cEBP, ETS, MYC, N-MYC, MAX, E2F, регуляторный фактор интерферонов (IRF), Т-клеточные факторы (TCF), лимфоцитарные энхансерные факторы (LEF), EN2, GATA3, CDX2, PAX8, WT1, NKX3.1, P63 (TP63) или P40 и белки с мотивом спираль-петля-спираль (Darnell, 2002). Все такие факторы транскрипции являются применимыми в способах согласно данному изобретению.

[122] Было обнаружено, что многие факторы транскрипции являются специфическими для линии происхождения и ассоциированы с конкретными тканями и, следовательно, могут рассматриваться как тканеспецифические факторы транскрипции, т. е. фактор транскрипции, который всегда или обычно экспрессируется в конкретных тканях или при конкретных онкологических заболеваниях, в то время как редко или никогда не

экспрессируется в других тканях или при других онкологических заболеваниях. Способы согласно данному изобретению можно применять с тканеспецифическими факторами транскрипции, когда комбинированное выявление ассоциированной ДНК обеспечивает повышенную специфичность и/или чувствительность.

[123] Фактор транскрипции тиреоидных гормонов 1 (ТТФ-1) селективно экспрессируется во время эмбриогенеза в щитовидной железе, промежуточном мозге и в респираторном эпителии. ТТФ-1 экспрессируется в образцах тканей, взятых из нейроэндокринных и ненейроэндокринных карцином легких, но частота его экспрессии заметно варьирует среди различных гистологических подтипов. Следовательно, способы согласно данному изобретению можно также применять для идентификации типов и подтипов онкологических заболеваний путем измерения фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции и ассоциированную с ним последовательность ДНК.

[124] PAX8 представляет собой фактор транскрипции, участвующий в эмбриогенезе щитовидной железы, почек и мюллеровой системы. PAX8 демонстрирует высокий уровень экспрессии в образцах тканей, взятых из немучинозных карцином яичников, серозных, эндометриоидных, светлоклеточных и переходноклеточных карцином. PAX8 также экспрессируется в эндометриоидных аденокарциномах, серозных карциномах матки, светлоклеточных карциномах эндометрия, а также в тканях протоковой и дольковой карцином молочной железы.

[125] CDX2 представляет собой фактор транскрипции, специфический для линии происхождения, и играет ключевую роль в контроле пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток кишечника, и экспрессируется почти во всех образцах ткани колоректальной аденокарциномы.

[126] NKX3.1 необходим для нормального развития предстательной железы и является известным маркером, экспрессируемым почти при всех видах рака предстательной железы.

[127] GATA3 активен в транскрипции уже на четвертой неделе беременности человека. GATA3 высоко экспрессируется в образцах тканей, взятых из карцином молочной железы, особенно в образцах тканей рака молочной железы с положительным рецептором эстрогена, а также в уротелиальных карциномах и переходноклеточных

карциномах.

[128] WT1 играет важную роль в развитии эмбриона. WT1 является хорошим маркером ткани рака яичника и экспрессируется в очень ограниченном диапазоне здоровых тканей взрослого человека.

[129] EN2 играет важную роль в эмбриональном развитии и экспрессируется при ряде видов онкологических заболеваний, но в очень небольшом числе здоровых тканей взрослого человека. Присутствие EN2 в моче было использовано в качестве основы для анализа мочи для выявления рака предстательной железы.

[130] Другие факторы транскрипции могут быть применимыми в способах согласно данному изобретению. Например, UBF представляет собой фактор транскрипции, который связывается с промотором гена рибосомальной РНК и активирует транскрипцию, опосредованную РНК-полимеразой I. Известно, что экспрессия UBF повышена в тканях некоторых видов рака. Несомненно, существует множество других подобных примеров, которые представляют собой подходящие факторы транскрипции для использования со способами согласно данному изобретению. Более того, уровень РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы III также повышен при онкологических заболеваниях. Данные фрагменты отвечают за транскрипцию генов тРНК и рибосомальной РНК, обеспечивая клеточный механизм, необходимый для повышенного и быстрого производства белка, роста и клеточной репликации, характерных для раковых клеток и тканей. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения представлен способ для выявления или измерения бесклеточных фрагментов хроматина, содержащих UBF, РНК-полимеразу I или РНК-полимеразу III.

[131] В альтернативных вариантах осуществления фактор транскрипции не представляет собой тканеспецифический фактор транскрипции. Способы согласно данному изобретению также обладают способностью выявлять факторы транскрипции, которые экспрессируются широко, т. е. фактор транскрипции, который экспрессируется больше чем в 5, больше чем в 10, больше чем в 15, больше чем в 20 или больше чем в 30 типах тканей. Путем комбинирования выявления с последовательностью ассоциированной ДНК (т. е. комбинированный биомаркер), способы согласно данному изобретению могут выявлять широко экспрессируемый фактор транскрипции для обеспечения клинически полезного

результата. Примерами являются факторы транскрипции ядерных рецепторов гормонов. Как обсуждалось выше, CTCF также является примером, и исследован далее в данном документе.

[132] Факторы транскрипции связываются со своей целевой последовательностью ДНК в тесной кооперации со многими другими факторами, включающими в себя другие факторы транскрипции, кофакторы, коактиваторы, корепрессоры, РНК-полимеразные фрагменты, факторы элонгации, факторы ремоделирования хроматина, медиаторы, фрагменты STAT, UBF и другие. Это означает, что циркулирующие факторы транскрипции, выявленные с помощью данного изобретения, могут включать в себя другие фрагменты как часть более крупного комплекса регуляции генов, включающего в себя любые или все из следующих: нуклеосому с ассоциированной ДНК, ядерный рецептор гормона, стероид или другой гормон, связанный с ядерным рецептором гормона, другие факторы транскрипции, кофакторы, коактиваторы, корепрессоры, РНК-полимеразные фрагменты, факторы элонгации, факторы ремоделирования хроматина, медиаторы, фрагменты STAT или цитокиновые факторы, или цитокин-родственные факторы, связанные с фрагментом STAT, вышестоящий связывающий фактор (UBF) или любые другие фрагменты, ассоциированные с таким комплексом регуляции или транскрипции генов, который встречается в бесклеточном фрагменте хроматина.

[133] Бесклеточные фрагменты хроматина, содержащие фрагмент фактора транскрипции, могут также включать в себя, а могут и не включать в себя присутствие интактной нуклеосомы или любых гистоновых белков в комплексе. Все такие комплексы бесклеточного хроматина будут применимы и включены в данное изобретение.

[134] В предпочтительном варианте осуществления фактор транскрипции выбран из: STAT, NF- κ B, β -катенина, γ -катенина, Notch, внутриклеточного домена Notch (NICD), GLI, c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FRA, ATF, CREB-CREM, cEBP, ETS, MYC, MAX, E2F, фактора регуляции интерферонов (IRF), Т-клеточного фактора (TCF), лимфоцитарного энхансерного фактора (LEF) и белков с мотивом спираль-петля-спираль, белка HOX, EN2, GATA3, CDX2, TTF-1, PAX8, WT1, NKX3.1, P63 (или TP63), P40 или CTCF. В дополнительном варианте осуществления фактор транскрипции выбран из: EN2, CDX2 или TTF-1. В другом варианте осуществления фактор транскрипции представляет собой CTCF.

[135] Большинство из данных факторов транскрипции не являются на 100% тканеспецифическими, но могут экспрессироваться при нескольких видах онкологических заболеваний, а также в нескольких типах тканей взрослого человека. Выявление фрагментов хроматина, содержащих факторы транскрипции, в крови улучшается посредством применения аналитически чувствительных способов выявления фрагмента (-ов) ассоциированной ДНК. Специфичность способов в отношении заболевания и/или ткани повышается за счет комбинирования идентификационной характеристики фактора транскрипции с конкретной (-ыми) последовательностью (-ями) ДНК, ассоциированной (-ыми) с ним.

[136] В одном варианте осуществления образец биологической жидкости, полученной из тела субъекта, приводят в контакт с одним или большим числом агентов, связывающих фактор транскрипции, выбранных для исследования на предмет одного или большего числа болезненных состояний в мультиплексном анализе. Например, исследование на предмет множественных факторов транскрипции, каждый из которых является специфическим для одного или большего числа онкологических заболеваний, необязательно – в дополнение к факторам транскрипции, экспрессируемым при многих видах онкологических заболеваний, позволяет проводить исследование для выявления множества различных онкологических заболеваний в дополнение к идентификации раковой ткани в одном анализе крови. Способы мультиплексных анализов хорошо известны в данной области техники, например, но не ограничиваясь ею, можно использовать систему мультиплексных гранул от Luminex Corporation для выполнения большого числа мультиплексных анализов в одном образце (Dunbar, 2006).

[137] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со множеством связывающих агентов, которые связываются со множеством факторов транскрипции;
- (ii) анализ ДНК, ассоциированный с разными факторами транскрипции; и
- (iii) применение присутствия и/или количества и/или паттерна ДНК, связанной со множеством факторов транскрипции, для определения присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

[138] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт с двумя или большим числом (например, со множеством) связывающих агентов, которые связываются с двумя или большим числом (например, со множеством) факторов транскрипции;
- (ii) определение последовательности ДНК, ассоциированное с факторами транскрипции, связанными на этапе (i); и
- (iii) применение присутствия и/или количества и/или паттерна и/или последовательности (-ей) ДНК, связанной с факторами транскрипции, для определения присутствия и/или природы заболевания у субъекта.

В одном варианте осуществления каждый из множества факторов транскрипции прикреплен к отдельному твердофазному носителю, так что каждый фактор транскрипции можно выделить для анализа или секвенирования его ассоциированных фрагментов ДНК. Например, система мультиплексных гранул от Luminex состоит из множества типов гранул, каждый из которых может быть покрыт другим агентом связывания фактора транскрипции, которыми можно воздействовать на один образец и впоследствии разделять друг от друга для (раздельного) секвенирования ДНК, ассоциированной с каждым фактором транскрипции, независимо друг от друга.

ФРАГМЕНТЫ ХРОМАТИНА ДНК – ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ

[139] Фрагменты хроматина, присутствующие в кровотоке, происходят из множества источников. Одним из источников является высвобождение хроматина в кровотоки после гибели клеток, которые могут включать в себя клетки, пораженные заболеванием, например, раковые клетки. В некоторых случаях может наблюдаться активное высвобождение хроматина в кровотоки

[140] Главным источником фрагментов хроматина в кровотоке являются нейтрофилы, посредством образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в результате процесса, известного как нетоз. В ходе данного процесса нейтрофилы выбрасывают хроматиновый материал (НВЛ) во внеклеточный матрикс, чтобы улавливать и

нейтрализовывать патогены локально в очаге инфекции. НВЛ и их метаболиты состоят в основном из олигонуклеосом и моонуклеосом с компонентными фрагментами ДНК размером ≥ 150 п. о.

[141] Профилирование размеров бкДНК, выделенной из крови, показывает, что основным компонентом бкДНК являются моонуклеосомы с пиком распределения по размерам около 160-170 п. о., варьирующимся от около 130 до около 200 п. о., что соответствует моонуклеосомам с различной длиной ассоциированной линкерной ДНК. Могут быть дополнительные пики, соответствующие различным размерам олигонуклеосом, включающие в себя, например, динуклеосомы (около 340 п. о.), тринуклеосомы (510 п. о.) и так далее. В образцах под влиянием нетоза также могут наблюдаться широкие пики, относящиеся к крупным фрагментам хроматина длиной до нескольких тысяч п. о.

[142] Факторы транскрипции связываются с короткими последовательностями ДНК, а комплексы фактор транскрипции – ДНК содержат гораздо более короткие фрагменты ДНК в диапазоне 35-80 п. о. (Snyder *et al*, 2016). На иллюстративной диаграмме профилей размеров библиотеки двухцепочечной плазматической бкДНК очень мало или отсутствует материал, соответствующий длинам фрагментов бкДНК < 100 п. о. Однако препараты одноцепочечной библиотеки содержат больше фрагментов бкДНК в диапазоне 35-80 п. о. (Snyder *et al*, 2016). Этот связанный с белком компонент бкДНК длиной 35-80 п. о. является минорным компонентом общего количества циркулирующих фрагментов хроматина.

[143] Другой важный аспект связывания фактора транскрипции – ДНК в контексте данного изобретения относится к кинетической стабильности связывания фактора транскрипции – ДНК. Некоторые факторы транскрипции стабильно связываются *in vivo* с ДНК в ССФТ. Другие факторы транскрипции кратковременно связываются *in vivo* с ССФТ, где они ассоциируют, диссоциируют и реассоциируют динамическим образом. В способах ChIP-Seq, использующих субстраты на клеточной и тканевой основе, это не является проблемой, поскольку и то, и другое может быть выявлено с помощью методик перекрестного сшивания. Динамически связанные факторы транскрипции естественным образом переходят между связанными и свободными формами, но при перекрестном сшивании они оказываются «захваченными» в связанной форме. Следовательно, использование короткого времени перекрестного сшивания приводит к высокому

выявлению стабильно связанных факторов транскрипции, но меньшему выявлению динамически связанных факторов транскрипции. Напротив, использование более длительного времени перекрестного сшивания приводит к повышенному выявлению динамически связанных факторов транскрипции, поскольку с течением времени большее их число оказывается «захваченным» в ассоциированной форме посредством перекрестного сшивания (Poogey *et al*, 2013).

[144] Однако, исходя из соображений кинетики, авторы данного изобретения пришли к выводу, что динамически связанные факторы транскрипции вряд ли присутствуют в циркулирующей крови или в других биологических жидкостях. В условиях *in vivo* наблюдается относительно высокая ядерная концентрация как хроматина, так и факторов транскрипции, что позволяет происходить ассоциации, диссоциации и реассоциации динамически связанного комплекса фактор транскрипции – ДНК. Однако уровень комплекса фактор транскрипции – ДНК в биологических жидкостях сильно разбавлен и присутствует в настолько низкой концентрации, что после диссоциации любые кратковременно или динамически связанные фактор транскрипции и компоненты ДНК вряд ли смогут реассоциировать. Следовательно, авторы данного изобретения пришли к выводу, что перекрестное связывание в плазме крови будет актуально только для стабильно связанных факторов транскрипции и, следовательно, всегда будет быстрым (поскольку более медленные перекрестные связывания кратковременно связанных факторов транскрипции будут диссоциированы и ими можно пренебречь). Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с кинетически стабильным комплексом фактор транскрипции – ДНК;
- (ii) определение последовательности одного или большего числа фрагментов ДНК, ассоциированных с фактором транскрипции, в указанном кинетически стабильном комплексе фактор транскрипции – ДНК; и
- (iii) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

[145] Факторы транскрипции можно классифицировать в соответствии с их ДНК-связывающим доменом (ДСД). В работе Vaquerizas *et al*, 2009, был исследован 1391 известный фактор транскрипции и идентифицированы больше чем 24 различных типа факторов транскрипции на основе ДСД. Наиболее часто встречающимися выявленными факторами транскрипции были факторы с ДСД с цинковыми пальцами, и на их долю пришлось почти половина (48,5%) всех факторов транскрипции.

[146] Предпочтительным типом образца для анализа бкДНК, цоДНК или нуклеосом является плазма крови с ЭДТА. Функция ЭДТА или цитрата в пробирке для сбора плазмы крови заключается в хелатировании и секвестрации ионов кальция из крови для предотвращения свертывания (каскад свертывания крови требует присутствия ионов кальция). Центрифугирование пробирки отделяет клеточный компонент крови от надосадочной жидкости плазмы крови, которую можно удалить и использовать в качестве матрицы для образцов во многих клинико-диагностических целях.

[147] Связывание факторов транскрипции, содержащих цинковые пальцы, с их ДНК ССФТ зависит от присутствия ионов цинка. Однако хелаторы кальция, используемые в пробирках для сбора плазмы крови, также хелатируют ионы цинка. Хелатирование и удаление ионов цинка из фактора транскрипции, содержащего цинковый палец, может привести к потере связывания фактора транскрипции с ДНК (Ralston, 2008). Взаимодействие агентов, хелатирующих цинк, и факторов транскрипции, содержащих цинковые пальцы, означает, что данное семейство факторов транскрипции ведет себя в плазме крови с ЭДТА иначе, чем факторы транскрипции, которые связывают ДНК с помощью других типов ДСД.

[148] Присутствие комплексов фактор транскрипции с цинковыми пальцами – ДНК в крови не было продемонстрировано напрямую. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что хотя такие комплексы существуют, они не были выделены, поскольку представляют собой малую долю от небольшого количества компонента циркулирующего фрагмента хроматина в крови (подавляющее большинство циркулирующих фрагментов хроматина представляют собой нуклеосомы) и, более того, диссоциированы в образцах плазмы крови, используемых специалистами в данной области. Как описано в данном документе, авторы данного изобретения рассмотрели эти две проблемы и продемонстрировали ChIP-Seq в плазме крови с CTCF, который является фактором

транскрипции цинковым пальцем.

АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

[149] Предпочтительные агенты, связывающие фактор транскрипции, включают в себя антитела, направленные на связывание с фактором транскрипции, или олигонуклеотиды, такие как последовательность ДНК ССФТ (необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями). Предпочтительные связывающие агенты обладают высокой аффинностью к фактору транскрипции, так что связывание будет происходить при низких концентрациях фактора транскрипции, а также высокой специфичностью связывания фактора транскрипции, так что неспецифическое связывание других белков является минимальным.

[150] Связывающий агент может быть нанесен на твердый носитель, такой как сефароза, сефадекс, пластиковые или магнитные гранулы. В одном варианте осуществления указанный твердый носитель содержит пористый материал. В другом варианте осуществления связывающий агент дериватизирован для включения метки или линкера, которые можно использовать для прикрепления связывающего агента к подходящему носителю, который был дериватизирован для связывания с меткой. Многие такие метки и носители известны в данной области техники (например, Sortag, клик-химия, биотин/стрептавидин, гистидиновая метка/никель или кобальт, метка GST/GSH, метки антител/эпитопов и многие другие). Выделение связывающего агента затем можно выполнять до, одновременно или после реакции связывающего агента с фактором транскрипции. Для простоты использования покрытый носитель может быть включен в устройство, например, микрожидкостное устройство. Множественные твердофазные связывающие агенты можно использовать в формате мультиплексного анализа для одновременного исследования на предмет наличия множества фрагментов хроматина, содержащих различные факторы транскрипции, в рамках одного анализа в одном образце биологической жидкости.

[151] В других вариантах осуществления связывающий агент добавляют в раствор и выделяют путем перекрестного сшивания и преципитации связанных нуклеосом с помощью агента преципитации, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Затем преципитированный осадок можно выделить в виде отдельной фазы, например, центрифугированием или фильтрацией. В данной области техники известны многие

способы иммунопреципитации, и любые такие способы могут быть применимыми в способах согласно данному изобретению.

[152] В некоторых вариантах осуществления ДНК, ассоциированная с фактором транскрипции, связывается ДНК-связывающим агентом. ДНК-связывающий агент может быть присоединен к твердой фазе (например, к пластиковым частицам, магнитным частицам, агарозе или многим другим). ДНК-связывающий агент может быть напрямую или непрямо (например, через линкерную систему, такую как биотин/авидин или глутатион) присоединен к твердой фазе.

[153] Авторы данного изобретения использовали коммерчески доступные антитела, направленные на связывание с факторами транскрипции. Для ChIP-Seq авторы данного изобретения иммобилизовали антитела на коммерчески доступных магнитных полистироловых частицах. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления агент, связывающий фактор транскрипции, представляет собой твердофазное антитело против фактора транскрипции (или его часть), иммобилизованное на магнитной полистироловой частице.

ПОЛУЧЕНИЕ БИБЛИОТЕКИ ДНК

[154] Некоторые варианты осуществления данного изобретения включают в себя получение библиотеки фрагментов бкДНК, ассоциированных с факторами транскрипции во фрагментах хроматина. Библиотеку можно амплифицировать для простоты выявления и секвенирования с использованием методов ПЦР. В принципе, любой способ подготовки библиотеки может быть применимым для использования со способами согласно данному изобретению.

[155] Способы получения библиотеки фрагментов ДНК хорошо известны в данной области техники и, как правило, включают в себя лигирование адаптерных олигонуклеотидов к фрагментам ДНК. Амплификацию библиотеки фрагментов ДНК, лигированных с адаптером, как правило выполняют способом ПЦР. Для амплификации ДНК можно также использовать ПЦР-праймеры, и они могут быть вырожденными для амплификации всех последовательностей, присутствующих в библиотеке, или могут быть сконструированы с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, для амплификации специфических последовательностей ДНК,

ассоциированных с последовательностью элемента ответа фактора транскрипции, необязательно также включающего в себя фланкирующие области.

[156] Способы получения библиотеки могут включать в себя одноцепочечное или двухцепочечное лигирование фрагментов бкДНК с адаптером. Предпочтительные способы получения библиотеки включают в себя одноцепочечное лигирование бкДНК с адаптером. Предпочтительные способы получения библиотек обладают высокой эффективностью для амплификации и выделения небольших фрагментов ДНК длиной меньше чем 100 п. о. В данной области техники известно множество таких способов получения библиотек, способов, включающих в себя, например: (i) набор для подготовки образцов ДНК TruSeq DNA Sample preparation Kit (Illumina), используемый в соответствии с протоколом производителя с 20-25 циклами ПЦР для 5-10 нг входной ДНК (Ulz *et al*, 2019), (ii) использование набора для выделения бкДНК MagMAX cfDNA Isolation Kit (Applied Biosystems) с последующей подготовкой библиотеки с использованием набора для подготовки библиотеки NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) (Ulz *et al*, 2019), или (iii) использование протокола анализа крови и биологических жидкостей для мини-набора Qiagen QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit с ПЦР-амплификацией с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit от Life technologies (Hu *et al*, 2019). Другие способы включают в себя те, которые описаны в работах Sanchez *et al*, 2018, Skene and Henikoff, 2017, Snyder *et al*, 2016, и Liu *et al*, 2019. В примерах, приведенных в данном документе, авторы данного изобретения использовали коммерчески доступный набор для подготовки библиотеки одноцепочечной ДНК (Claret Bio SRSLY NGS Library Prep Kit).

[157] Специалистам в данной области техники будет ясно, что в вариантах осуществления данного изобретения, в которых ПЦР-амплификацию ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции, выполняют (только) для повышения чувствительности выявления или количественного определения фактора транскрипции, достаточно амплификации только последовательности элемента ответа, без фланкирующих последовательностей.

ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ – ДНК

[158] Иммунопреципитация по своему принципу является простым процессом. В классическом способе антитело, направленное на специфическое связывание с белком, представляющим интерес, наносят на твердый носитель и подвергают воздействию

биологического образца, содержащего данный белок. Белок, представляющий интерес, связывается антителом и, следовательно, адсорбируется на поверхности твердой фазы, в то время как другие белки и другие вещества остаются в растворе. Твердую фазу выделяют из образца и промывают, оставляя чистый образец белка, представляющего интерес, прикрепленного к твердому носителю.

[159] Способы ChIP-Seq на основе клеток и тканей хорошо описаны в данной области техники. Как правило, в качестве субстрата используют 20-30 мкг расщепленного или обработанного ультразвуком хроматина, выделенного из ткани или культивируемых клеток. Поскольку хроматин состоит на около 40% из ДНК, это составляет около 8-24 мкг субстратной ДНК. Однако концентрация циркулирующей бкДНК является низкой и была измерена на уровне 30 ± 14 нг/мл у здоровых субъектов-людей и 71 ± 55 нг/мл у пациентов, имеющих рак желудка (Park *et al*, 2012). Следовательно, из образца плазмы крови объемом в 1 мл будет получено примерно в 200-500 раз меньше хроматинового материала, чем обычно используется в ChIP-Seq.

[160] Поскольку большинство циркулирующего бесклеточного хроматина состоит из нуклеосом, доступный материал циркулирующего бесклеточного фрагмента хроматина фактор транскрипции – ДНК присутствует в чрезвычайно малом количестве. Более того, доступный материал циркулирующего бесклеточного фрагмента хроматина фактор транскрипции – ДНК будет содержать тысячи факторов транскрипции. Следовательно, доступный субстратный материал для анализа способами согласно данному изобретению, представленный одним фактором транскрипции, будет представлять собой малую долю от небольшого количества циркулирующего бесклеточного материала фактор транскрипции – ДНК, присутствующего в кровотоке.

[161] В дополнение к этому, экстракты хроматина из клеток представляют собой относительно чистый хроматиновый материал. Напротив, биологические жидкости, такие как кровь, сыворотка крови или плазма крови, содержат небольшое количество хроматина, но более высокие концентрации огромного числа белков и других соединений, любое из которых может препятствовать способам согласно данному изобретению, неспецифически присоединяясь к антителу против фактора транскрипции на твердой фазе или к другому используемому связывающему агенту. Дополнительная сложность иммунопреципитации циркулирующих комплексов фактор транскрипции – ДНК из крови, сыворотки крови или

плазмы крови заключается в том, что фоновое неспецифическое связывание, следовательно, является высоким по отношению к малому количеству целевого фактора транскрипции, связанного со специфическим связывающим агентом на твердофазном носителе, и может затруднять его выявление.

[162] Из-за всех этих трудностей в литературе имеется мало сообщений о применении ChIP-Seq в плазме крови или других матрицах образцов крови. Там, где был описан ChIP-Seq в плазме крови, это касалось нуклеосом и нуклеосомальных гистонов, поскольку их уровень высок (по отношению к уровню одного фактора транскрипции).

[163] Авторы данного изобретения устранили эти трудности, используя антитела с высокой авидностью и снижая неспецифическое связывание других белков на твердофазном носителе до чрезвычайно низких уровней посредством использования соответствующего твердофазного носителя в сочетании с тщательной промывкой твердой фазы растворами, содержащими высокие концентрации сильных детергентов.

[164] Следовательно, комплекс фактор транскрипции – ДНК, связанный антителом, можно промывать сильным (например, имеющим концентрацию, составляющую по меньшей мере 1%, например, 1,2%) детергентом или смесью детергентов до выделения ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции. В одном варианте осуществления фактор транскрипции, связанный связывающим агентом на этапе (i), промывают буферным раствором, содержащим детергент в концентрации, составляющей по меньшей мере 1%, до выявления фрагмента ассоциированной ДНК. Существует очень большое число детергентов, которые можно использовать для этой цели. Несколько распространенных примеров включают в себя, но не ограничиваются ими, детергенты Triton (например, Triton X-100), детергенты Tween (например, Tween 20 и Tween 80), дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, октилфеноксиполиэтоксигликоль (IGEPAL CA-630), додециловый эфир трикозаэтиленгликоля (Brij), n-додецил-бета-мальтозозид, октил-бета-глюкозид, октилтиоглюкозид, 3-((3-холамидопропил)-диметиламмоний)-1-пропансульфонат (CHAPS) и многие другие.

[165] Авторы данного изобретения использовали магнитные полистироловые микрогранулы и многократно промывали (5 промывок) промывочным раствором, содержащим смесь 1% октилфеноксиполиэтоксигликоля, 0,1% дезоксихолата натрия и 0,1%

додецилсульфата натрия.

[166] В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения твердофазный носитель представляет собой полистироловую частицу, например, магнитную полистироловую частицу. Используемое антитело (или другой агент, связывающий фактор транскрипции) может быть напрямую или ненапрямую прикреплено к носителю.

[167] В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения связанный с твердой фазой комплекс фактор транскрипции – ДНК, выделенный на твердофазном носителе, промывают раствором, содержащим по меньшей мере 0,25% или по меньшей мере 0,5%, или по меньшей мере 1% детергента или сурфактанта. Используемый детергент может состоять из одного детергента или из смеси детергентов, как описано в данном документе.

[168] В одном варианте осуществления данного изобретения используемый твердофазный носитель, связывающий фактор транскрипции, включает в себя мультиплексную систему, например мультиплексную систему гранул (такую как система, предоставляемая Luminex Corporation). В данной системе твердого носителя каждое из множеств гранул, которые можно различить на основе флуоресценции, может быть покрыто другим связывающим агентом, специфическим в отношении конкретного фактора транскрипции, и использоваться одновременно для исследования множества комплексов фактор транскрипции – ДНК в одном образце (Dunbar, 2006).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК

[169] В данной области техники известно множество способов анализа, количественной оценки или идентификации последовательности ДНК, и любой способ анализа ДНК может применяться в способах согласно данному изобретению, включительно со следующими, но не ограничиваясь ими: способы секвенирования нового поколения, изотермическая амплификация ДНК, холодная ПЦР (ПЦР с совместной амплификацией при более низкой температуре денатурации), MAP (MIDI-активированный пирофосфоролиз), PARE (персонализированный анализ перестроенных концов), способы гибридизации ДНК (включительно со способами генных чипов и способами гибридизации *in situ*). В дополнение к этому, последовательность гена также можно анализировать на

предмет наличия эпигенетически измененных последовательностей ДНК с помощью анализа эпигенетического секвенирования ДНК (например, для последовательностей, содержащих 5-метилцитозин, с использованием бисульфитного превращения немодифицированного цитозина в урацил). Следовательно, в одном варианте осуществления ассоциированную ДНК анализируют с использованием секвенирования ДНК, например, способом секвенирования, выбранным из секвенирования нового поколения (нацеленного или полногеномного) и анализа секвенирования метилированной ДНК, способа BEAMing, ПЦР, включительно с цифровой ПЦР и холодной ПЦР (ПЦР с совместной амплификацией при более низкой температуре денатурации), изотермической амплификации, гибридизации, MIDI-активированного пирофосфоролиза (MAP) или персонализированного анализа перестроенных концов (PARE).

[170] В примерах, описанных в данном документе, применяли секвенирование Illumina NovaSeq. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения ДНК, выделенную из выделенного фактора транскрипции, анализируют с помощью секвенирования нового поколения.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

[171] Образец может представлять собой любую биологическую жидкость, в которой могут выявляться фрагменты хроматина. Известно, что фрагменты хроматина содержатся в крови, кале, моче и спинномозговой жидкости. Авторы данного изобретения выявили фрагменты хроматина также и в мокроте. В предпочтительных вариантах осуществления образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки крови или плазмы крови. Данные образцы можно использовать для измерения и анализа циркулирующих фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции и фрагмент ДНК.

[172] Если в способах согласно данному изобретению используют образцы крови, это может быть образец цельной крови, сыворотки крови или плазмы крови. Образцы цельной крови или сыворотки крови можно использовать в качестве субстратов для анализа любого (стабильно связанного) фрагмента хроматина фактор транскрипции – ДНК, включающего в себя фактор транскрипции с любым типом ДСД.

[173] Образцы плазмы крови, такие как образцы плазмы с ЭДТА, также можно

использовать в способах согласно данному изобретению. При классическом способе сбора образцов плазмы крови цельную кровь собирают в пробирку для сбора крови с цитратом или ЭДТА и центрифугируют в течение 2 часов. Полученную в результате надосадочную плазму крови можно использовать свежей или заморозить до анализа. Однако секвестраторы ионов кальция, используемые в качестве добавок к пробиркам для сбора крови для получения плазмы крови, вызывают диссоциацию циркулирующих комплексов фактор транскрипции с цинковыми пальцами – ДНК. Как отмечалось выше, наиболее распространенным классом факторов транскрипции являются факторы транскрипции с цинковыми пальцами.

[174] Существует ряд способов преодолеть эту трудность, включительно со следующими, но не ограничиваясь ими: (i) избегать использования факторов транскрипции с цинковыми пальцами и использовать факторы транскрипции с другими типами ДСД, (ii) использовать образцы сыворотки крови, (iii) использовать гепаринизированную плазму крови или другие типы образцов плазмы крови, в которых не используется связывание кальция, или (iv) предотвращать диссоциацию комплексов фактор транскрипции – ДНК, например, путем перекрестного сшивания белков и/или ДНК во фрагменте хроматина в образце крови.

[175] В одном варианте осуществления образец биологической жидкости представляет собой образец сыворотки крови. Считается, что сыворотка крови содержит материал, загрязняющий хроматин, происходящий из лейкоцитов (например, из нейтрофильных внеклеточных ловушек – НВЛ, англ. «NETs»). Это загрязнение мешает анализу бкДНК, и поэтому плазма крови является иллюстративной матрицей, наиболее часто используемой в способах бкДНК. Однако выделение фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции, из другого хроматинового материала, присутствующего до анализа ДНК, устраняет такие помехи. Более того, загрязнение сыворотки крови хроматиновым материалом является результатом образования клетками-нейтрофилами нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в образце крови, вызванного коагуляцией (известным индуктором нетоза). При условии своевременной обработки пробирки для сбора образцов сыворотки крови, содержащей цельную кровь, например, через 15-60 минут после венопункции, загрязняющий НВЛ-материал будет представлять собой крупный хроматин, а не мелкие фрагменты хроматина, и он не будет мешать анализу малых комплексов фактор транскрипции – ДНК. Следовательно, расширение спектра типов образцов, которые можно

использовать, является еще одним преимуществом данного изобретения.

[176] Присутствие загрязняющих НВЛ в сыворотке крови может быть дополнительно сведено к минимуму или устранено добавлением ингибитора нетоза в пробирку для сбора сыворотки крови. Это предотвращает нетоз и, следовательно, сводит к минимуму уровень фонового хроматина, присутствующего в образце сыворотки крови. В данной области техники известно множество ингибиторов нетоза. Предпочтительные ингибиторы включают в себя лекарственные средства класса антрациклинов, в частности доксорубицин. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в образце сыворотки крови, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) получение образца цельной крови от субъекта в пробирку для сбора цельной крови;
- (ii) приведение образца цельной крови в контакт с ингибитором нетоза;
- (iii) выделение образца сыворотки крови из образца цельной крови;
- (iv) приведение образца сыворотки крови в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (v) выявление или измерение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
- (vi) применение присутствия, или количества, или последовательности фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце сыворотки крови.

[177] Следует понимать, что данный вариант осуществления можно также применять для предоставления информации как индикатора болезненного состояния субъекта, как описано ранее в данном документе.

[178] В одном варианте осуществления образец биологической жидкости представляет собой любой образец плазмы крови, включительно с образцом плазмы крови, полученным с использованием секвестратора кальция, таким как плазма крови с ЭДТА или цитратная плазма крови, при этом образец плазмы крови получают путем приведения образца цельной крови в контакт с перекрестно-сшивающим агентом. Перекрестно-сшивающий агент можно приводить в контакт с цельной кровью на первом этапе процесса, включающего в себя: (1) приведение образца цельной крови в контакт с перекрестно-сшивающим агентом;

(2) приведение перекрестно-сшитого образца в контакт с агентом, хелатирующим ионы кальция; и (3) выделение плазмы крови из образца.

[179] Перекрестное сшивание является хорошо известным способом в данной области техники. Наиболее часто используемым перекрестно-сшивающим реагентом является формальдегид, который связывает белковые молекулы друг с другом и с ДНК. Однако избыточное перекрестное сшивание может привести к изменениям в структуре антителосвязывающих эпитопов в факторах транскрипции (и, следовательно, к потере связывания антител) и даже к перекрестному сшиванию факторов транскрипции с отдельными белковыми молекулами или комплексами. Для предотвращения этого перекрестное сшивание часто прекращают через несколько секунд или минут после добавления формальдегида, например, путем добавления избытка глицина или трис(гидроксиметил)аминометана (ТРИС), чтобы остановить дальнейшее перекрестное сшивание. Следовательно, в одном аспекте данного изобретения представлен способ выявления, анализа или измерения фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции и ассоциированный фрагмент ДНК, в образце крови, полученном из тела субъекта-человека или субъекта-животного, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с перекрестно-сшивающим агентом;
- (ii) необязательно – добавление гасящего реакцию агента для остановки дальнейшего перекрестного сшивания;
- (iii) приведение образца в контакт с агентом, хелатирующим ионы кальция;
- (iv) выделение плазмы крови из образца;
- (v) приведение образца плазмы крови в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (vi) выделение связанных фрагментов хроматина, содержащих фактор транскрипции; и
- (vii) анализ выделенных фрагментов хроматина (например, способами, описанными в данном документе).

[180] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с перекрестно-

сшивающим реагентом;

- (ii) необязательно – добавление гасящего реакцию агента для остановки дальнейшего перекрестного сшивания;
- (iii) приведение образца в контакт с агентом, хелатирующим ионы кальция;
- (iv) выделение плазмы крови из образца;
- (v) приведение образца плазмы крови в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (vi) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (vii) необязательно – амплификацию выделенной ДНК способом ПЦР;
- (viii) определение количества и/или последовательности ДНК; и
- (ix) применение присутствия фактора транскрипции и/или последовательности ассоциированной ДНК в качестве биомаркера для выявления статуса заболевания у субъекта.

[181] В предпочтительном варианте осуществления в качестве перекрестно-сшивающего агента используют формальдегид или формальдегид-высвобождающий агент. В одном варианте осуществления используют ЭДТА в качестве хелатора ионов кальция для предотвращения коагуляции. В предпочтительных вариантах осуществления формальдегид добавляют в цельную кровь сразу после взятия образца цельной крови, например, путем добавления образца цельной крови в пробирку, уже содержащую формальдегид. Пробирку оставляют на достаточное время для протекания реакции перекрестного сшивания, а затем реакцию останавливают добавлением гасителя для предотвращения избыточного перекрестного сшивания компонентов плазмы. Гаситель обычно представляет собой аминное соединение, такое как глицин или ТРИС, которое вступает в реакцию с формальдегидом. Гаситель можно добавлять вместе с ЭДТА, например, путем добавления раствора глицина и ЭДТА в ТРИС-буфере. Затем образец цельной крови центрифугируют и плазму, содержащую перекрестно-сшитые комплексы ДНК, связанные фактором транскрипции, выделяют для анализа способами согласно данному изобретению.

[182] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт с перекрестно-сшивающим реагентом;

- (ii) приведение образца цельной крови в контакт с гасящим реакцию реагентом и агентом, хелатирующим ионы кальция;
- (iii) выделение плазмы крови, полученной из образца на этапе (ii);
- (iv) приведение образца плазмы крови в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (v) выделение ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (vi) необязательно – амплификацию выделенной ДНК;
- (vii) определение количества и/или последовательности ДНК; и
- (viii) применение присутствия фактора транскрипции и/или последовательности ассоциированной ДНК в качестве биомаркера для выявления наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[183] Как обсуждалось выше, факторы транскрипции, присутствующие в кровотоке, вероятнее всего являются теми, которые стабильно связаны с ДНК, а не теми, которые кратковременно связываются с ДНК и диссоциируют динамическим образом. Для большинства стабильно связанных фрагментов циркулирующего хроматина с ДНК, включающих в себя факторы транскрипции, перекрестное сшивание с формальдегидом в цельных культивируемых клетках или образцах тканей происходит быстро и занимает меньше чем 1 или 2 минуты. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что хотя для диффузии и проникновения формальдегида в клетку с последующим проникновением в ядро и последующим перекрестным сшиванием хроматина может потребоваться 1 или 2 минуты, это время можно сократить в условиях цельной крови, где фрагменты хроматина находятся в свободном растворе и немедленно доступны для перекрестного сшивания. Используемым перекрестно-сшивающим реагентом может быть формальдегид или формальдегид-высвобождающий агент (также называемый агентом высвобождения формальдегида, донором формальдегида или консервантом, высвобождающим формальдегид). Формальдегид-высвобождающий агент представляет собой фрагмент, который медленно высвобождает формальдегид. Многие формальдегид-высвобождающие агенты известны в данной области техники и широко используются в качестве antimicrobial консервантов в косметической промышленности, например, в средствах по уходу за кожей и волосами, где высоких уровней формальдегида избегают из-за токсичности, но низкие защитные уровни поддерживаются за счет высвобождения. Следовательно, в одном варианте осуществления перекрестно-сшивающий агент может представлять собой формальдегид-высвобождающий агент.

[184] Авторы данного изобретения пришли к выводу, что перекрестное сшивание свободно циркулирующих комплексов фактор транскрипции – ДНК в цельной крови (в отличие от клеток или тканей) происходит быстро и может происходить быстрее, чем истощение цинком белков с цинковыми пальцами. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения перекрестно-сшивающий реагент можно добавлять одновременно с хелатором ионов кальция. Пробирки для сбора крови (ПСК, англ. «VCT»), содержащие как ЭДТА, так и формальдегид-высвобождающий агент, имеются в продаже, например, ПСК «VCT Cell-Free DNA», выпускаемая компанией Streck Inc. Цельная кровь, добавленная в такие пробирки, подвергается одновременному воздействию ЭДТА и перекрестно-сшивающего агента.

[185] Авторы данного изобретения провели ряд экспериментов с применением различных способов подготовки образцов с ЭДТА. Например, рецептор эстрогена (ER) является фактором транскрипции с цинковыми пальцами. Авторы данного изобретения измерили уровень ER, присутствующий в (обычных) образцах плазмы с ЭДТА, способом ТИФА. ER был выявляемым, как показано на фиг. 5. Авторы данного изобретения иммунопреципитировали ER из образцов плазмы крови с ЭДТА, экстрагировали ДНК, связанную с твердой фазой, и амплифицировали ДНК, присутствующую в экстракте. Однако в амплифицированных образцах не была выявлена ДНК. Авторы данного изобретения предположили, что это произошло потому, что комплексы ER-ДНК были диссоциированы в плазме крови с ЭДТА.

[186] CTCF (также называемый CCCTC-связывающим фактором) является эволюционно консервативным фактором транскрипции с цинковыми пальцами, который связывается посредством комбинации из 11 цинковых пальцев с большим числом сайтов в геноме и играет критическую роль в функционировании генома. Исследование сайтов связывания CTCF в геноме человека выявило 77811 различных сайтов связывания в 19 различных типах клеток (Wang *et al*, 2012). Было обнаружено, что 27662 из 77811 сайтов связывания заняты во всех 19 исследованных типах клеток. Связывание CTCF с остальными 50149 сайтами связывания проявляло тканеспецифичность. Исследованные 19 типов клеток включали в себя 12 нормальных типов клеток и 7 линий раковых клеток или EBV-иммortalизированных клеток, отображающих колоректальный рак (Caco-2), рак шейки матки (HeLa-S3), гепатоцеллюлярный рак (HepG2), нейробластома (SK-N-SH_RA),

ретинобластоме (WERI-RB-1) и EBV-трансформированный лимфоластоид (GM06990). Было обнаружено, что связывание CTCF в 1236 сайтах связывания является специфическим для линий раковых клеток, и наличие этих сайтов связывания отличает линии бессмертных и раковых клеток от нормальных клеток, включающих в себя эпителий, фибробласты и эндотелий (Liu *et al*, 2017).

[187] Авторы данного изобретения использовали антитело мыши против CTCF для иммунопреципитации CTCF-ДНК из 4 объединенных образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (собранных в ПСК Streck cfDNA), собранных у 18 субъектов, у которых было диагностировано онкологическое заболевание. Авторы данного изобретения выполнили анализ способом вестерн-блота для белка, выделенного способом ChIP на твердофазном носителе. Результаты, представленные на фиг. 7 показывают, что белковая полоса, соответствующая CTCF с молекулярной массой около 140 кДа, присутствовала во всех 4 объединенных образцах (но не в контрольных экспериментах с использованием неспецифического IgG мыши вместо антитела против CTCF). Полоса около 50 кДа соответствует связыванию меченого антитела против IgG мыши, используемого для вестерн-блота, с тяжелой цепью антитела мыши против CTCF, использованного для ChIP.

[188] Авторы данного изобретения затем повторили способ ChIP для иммунопреципитации комплексов CTCF-ДНК с использованием образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (собранных в ПСК Streck cfDNA), взятых у субъекта, у которого диагностирован рак молочной железы. Авторы данного изобретения выделили фрагменты бкДНК из твердофазных носителей, лигировали выделенные фрагменты ДНК с адаптерными олигонуклеотидами и амплифицировали присутствующую бкДНК. Амплифицированную библиотеку бкДНК анализировали с помощью электрофореза, и полученные электрофореграммы (фиг. 8) показали, что библиотека содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о. (что соответствует пику между 175-220 п. о. по оси x для учета фрагментов, лигированных с адаптером). Главный пик фрагментов бкДНК, лигированных с адаптером, наблюдался при длине около 50 п. о. (что соответствует пику при 190 п. о. по оси x, учитывающему длину фрагмента, лигированного с адаптером). Хотя библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о., не все эти фрагменты были связаны с CTCF в образце, поскольку небольшие фрагменты ДНК были также получены для амплифицированных экстрактов с твердых носителей, покрытых неспецифическим IgG мыши. Однако специфический пик,

полученный посредством ChIP с помощью специфического антитела против CTCF (1000 единиц флуоресценции (ЕФ)), был выше, чем пик неспецифического IgG (80 ЕФ).

[189] Амплифицированную библиотеку бкДНК, выделенную с помощью иммунопреципитации против CTCF, секвенировали способами секвенирования нового поколения. Результаты для амплифицированной библиотеки, полученной из образца перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (собранного в ПСК Streck cfDNA), взятого у пациента с диагнозом КРР, представлены на фиг. 9. Авторы данного изобретения наблюдали обогащение связывания небольших фрагментов бкДНК с 9780 опубликованными последовательностями ССФТ CTCF (Kelly *et al*, 2012). Напротив, библиотека бкДНК, полученная для связывания с неспецифическим IgG мыши, не показала обогащения. Назначение пиков последовательностей фрагментов бкДНК по отношению к входному неспецифическому контролю привело к CTCF в качестве фактора транскрипции с большинством фрагментов последовательности ССФТ. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что способы согласно данному изобретению являются успешными для ChIP-Seq факторов транскрипции в плазме крови.

[190] Рецептор андрогена (AR) является фактором транскрипции с цинковыми пальцами, представляющим интерес при раке предстательной железы. Чтобы показать, что способ согласно данному изобретению можно применять к менее распространенному фактору транскрипции, чем CTCF, авторы данного изобретения применили тот же способ к AR. Авторы данного изобретения использовали антитело мыши против AR для иммунопреципитации AR из образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (собранных в ПСК Streck cfDNA), собранных у 8 субъектов, у которых был диагностирован рак предстательной железы. Авторы данного изобретения выполнили анализ способом вестерн-блота для белка, выделенного способом ChIP на твердофазном носителе, используя AR из клеток линии рака предстательной железы LnCAP в качестве положительного контроля. Результаты, представленные на фиг. 11 показывают, что белковая полоса, соответствующая AR с молекулярной массой около 10 кДа, присутствовала во всех 8 образцах и была особенно сильной в 2 образцах (дорожки 2 и 3 на фиг. 11). Полоса около 50 кДа соответствует связыванию меченого антитела против IgG мыши с тяжелой цепью антитела мыши против AR, использованного для ChIP. Затем авторы данного изобретения выделили ДНК из твердофазных носителей, лигировали выделенные фрагменты ДНК с адаптерными олигонуклеотидами и амплифицировали присутствующую ДНК. Результаты,

представленные на фиг. 12, показывают, что библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о. (как указано выше, пик показан при 175-220 п. о. для фрагментов, связанных с адаптером). Хотя библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о., не все эти фрагменты были связаны с AR в образце, поскольку небольшие фрагменты ДНК были также получены для амплифицированных экстрактов с твердых носителей, покрытых неспецифическим IgG мыши. Библиотеки амплифицированной бкДНК, полученные способом вестерн-блота для 2 образцов с наиболее высокими наблюдаемыми уровнями AR, затем секвенировали способом секвенирования нового поколения.

ДИССОЦИИРОВАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ – ДНК

[191] Предшествующие аспекты данного изобретения представляют собой способы для выявления, измерения или характеристики фрагмента хроматина, включающего в себя фактор транскрипции, напрямую или непрямою связанный с ДНК. В одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ для выявления фактора транскрипции, который не связан с ДНК (т. е. свободного или несвязанного фактора транскрипции) в образце биологической жидкости, взятом у субъекта. Выявление свободного фактора транскрипции можно выполнять с использованием олигонуклеотида, включающего в себя последовательность ДНК ССФТ фактора транскрипции, необязательно – включительно с фланкирующими последовательностями, в качестве связывающего агента для свободного фактора транскрипции. Затем связанный с олигонуклеотидом свободный фактор транскрипции можно выявить, например, с использованием меченого антитела против фактора транскрипции (например, см. *Active Motif*, 2006). Факторы транскрипции могут первоначально продуцироваться в неактивной форме, которая позже может быть активирована посттрансляционно, например, путем фосфорилирования. Активные формы факторов транскрипции связываются с олигонуклеотидом, который включает в себя последовательность их ССФТ. Неактивные формы факторов транскрипции не связываются с олигонуклеотидом, который включает в себя последовательность их ССФТ (Lee *et al*, 2007). Следовательно, активный, свободный фактор транскрипции можно выявлять в образце биологической жидкости с использованием анализа, включающего в себя связывание свободного фактора транскрипции с олигонуклеотидом, включающим в себя последовательность ДНК, с которой связывается фактор транскрипции, например, последовательность ССФТ фактора транскрипции, с последующим добавлением второго агента, связывающего фактор

транскрипции, например, антитела против фактора транскрипции, направленного на специфическое связывание с фактором транскрипции, с последующим применением присутствия или степени связывания антитела в качестве меры присутствия или количества активного свободного фактора транскрипции, присутствующего в образце. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления свободного фактора транскрипции у субъекта-человека или субъекта-животного, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт с олигонуклеотидом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение фактора транскрипции, связанного с олигонуклеотидом;
- (iii) приведение выделенного фактора транскрипции в контакт со вторым связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции; и
- (iv) применение присутствия или степени связывания второго связывающего агента с фактором транскрипции в качестве меры количества бесклеточного фактора транскрипции в образце.

[192] В предпочтительных вариантах осуществления олигонуклеотид, используемый для связывания со свободным фактором транскрипции, включает в себя последовательность ССФТ. В предпочтительных вариантах осуществления олигонуклеотид, используемый для связывания со свободным фактором транскрипции, прикреплен к твердофазному носителю. В предпочтительных вариантах осуществления второй связывающий агент представляет собой антитело. В предпочтительных вариантах осуществления второй связывающий агент является меченым, так что его связывание с твердой фазой, содержащей фактор транскрипции, связанный олигонуклеотидом, можно легко выявить и/или определить количественно.

[193] В одном варианте осуществления к образцу добавляют ионы цинка для облегчения связывания олигонуклеотидов с факторами транскрипции, содержащими цинковые пальцы. Ионы цинка могут быть добавлены одновременно с добавлением олигонуклеотида на этапе (i) или до этапа (i).

[194] В другом аспекте в данном изобретении представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя

следующие этапы:

- (i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт с олигонуклеотидом, который связывается с фактором транскрипции;
- (ii) выделение фактора транскрипции, связанного с олигонуклеотидом;
- (iii) приведение выделенного фактора транскрипции в контакт со вторым связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции; и
- (iv) применение присутствия или степени связывания второго связывающего агента с фактором транскрипции в качестве индикатора наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[195] В одном варианте осуществления образец биологической жидкости, взятый у субъекта, приводят в контакт с одним или большим числом олигонуклеотидов (например, последовательностей ССФТ, специфических для связывания с одним или большим числом факторов транскрипции) для идентификации наличия и/или природы заболевания. В дополнительном варианте осуществления способ выполняют с использованием мультиплексного анализа (т. е. содержащего больше чем один олигонуклеотид, предпочтительно при этом каждый олигонуклеотид является специфическим в отношении другого фактора транскрипции) для исследования на предмет одного или большего числа заболеваний. Например, исследование на предмет множественных факторов транскрипции, каждый из которых является специфическим для одного или большего числа онкологических заболеваний, необязательно – в дополнение к факторам транскрипции, экспрессируемым при многих видах онкологических заболеваний, позволяет проводить исследование для выявления множества различных онкологических заболеваний в дополнение к идентификации раковой ткани в одном анализе крови. Способы мультиплексных анализов хорошо известны в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, можно применять способы ДНК-микрочипов или использовать систему мультиплексных гранул от Luminex Corporation, с помощью которой можно выполнять большое число мультиплексных анализов в одном образце (Dunbar, 2006).

[196] В предпочтительных вариантах осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В дополнительном варианте осуществления природа заболевания заключается в ткани, пораженной раком.

[197] Рецептор эстрогена (ER) представляет собой активируемый лигандом ядерный рецептор гормонов, фактор транскрипции с цинковыми пальцами. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что циркулирующие в крови фрагменты хроматина, которые включают в себя факторы транскрипции с цинковыми пальцами и фрагмент ДНК, вероятно, будут разрушены в образцах плазмы с ЭДТА. Авторы данного изобретения выполнили твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА, англ. «ELISA») для определения свободного (т. е. не связанного с ДНК) рецептора эстрогена альфа (ER α) в образцах плазмы крови, взятых у пациенток с гинекологическими онкологическими заболеваниями, которые связаны со сверхэкспрессией рецептора эстрогена, а также у пациенток с ER-отрицательным раком молочной железы. ER участвует в регуляции транскрипции большого числа генов и высоко экспрессируется в женских репродуктивных тканях и тканях рака репродуктивной системы. ER экспрессируется на низких уровнях в гемопоэтических клетках, но высоко экспрессируется в ER-положительных клетках рака молочной железы и яичников. ER-положительные раковые клетки имеют рецепторы эстрогена, чувствительны к эстрогену, и их рост стимулируется эстрогеном. ER-отрицательные раковые клетки не имеют рецепторов к эстрогену и нечувствительны к эстрогену. Около 80% случаев рака яичников и молочной железы являются ER-положительными. ER-положительный рак связан с лучшим прогнозом, чем ER-отрицательный рак. Поскольку ER-положительные виды рака растут в ответ на эстроген, они поддаются гормональной терапии, включающей в себя тамоксифен и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют активацию рецептора эстрогена путем связывания с эстрогеном и, следовательно, предотвращают рост рака.

[198] ER-положительный или отрицательный статус рака определяют с помощью иммуногистохимических анализов хирургически удаленной раковой ткани. Как правило, меченое антитело, которое связывается с ER, инкубируют с раковыми клетками/тканью, и наблюдаемый уровень окрашивания антителами определяет статус. ER-положительным видам рака присваивают оценку ER. Измеряют долю раковых клеток, которые определяются как положительные в отношении рецепторов гормонов, а также интенсивность окрашивания. Данные два параметра комбинируют для оценки образца по шкале от 0 до 8. Образцам с большим числом рецепторов, которые видны при более высокой интенсивности, присваивают более высокую оценку.

[199] Поскольку ядерные рецепторы гормонов являются клеточными белками,

ожидается, что ER не будет присутствовать в кровообращении. Авторы данного изобретения выдвинул гипотезу, что любой свободный ER α , присутствующий в плазме крови, должен происходить из циркулирующих фрагментов хроматина, которые включали в себя ER α , но которые диссоциировали, высвобождая свободный ER α из связывания с ДНК при добавлении ЭДТА для получения плазмы крови. Авторы данного изобретения ожидали, что уровни таких фрагментов хроматина будут исчезающе низкими, и, следовательно, ожидали обнаружить, что уровень свободного ER α в плазме крови будет неопределяемым при применении способа ТИФА и ниже минимальной чувствительности применяемого ТИФА (0,8 пг/мл). Удивительно, но авторы данного изобретения обнаружили, что свободный ER α присутствует в плазме крови на уровнях вплоть до 20 пг/мл (фиг. 5). Чтобы представить это в контексте, интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли являются часто измеряемыми биомаркерами крови, нормальные диапазоны которых составляют около 5-15 пг/мл и вплоть до 8 пг/мл, соответственно. Более того, измеренные уровни ER α были более высокими при раке яичников и ER-положительном раке молочной железы, чем при ER-отрицательном раке молочной железы, что указывает на опухолевое происхождение ER α .

[200] Следовательно, в другом аспекте в данном изобретении представлен способ для выявления присутствия или для измерения уровня фактора транскрипции с цинковыми пальцами в биологическом образце, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца в контакт с реагентом, хелатирующим ионы цинка; и
- (ii) анализ образца на предмет присутствия или уровня вытесненного фактора транскрипции с цинковыми пальцами.

[201] В одном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец биологической жидкости, такой как кровь, сыворотка крови или плазма крови. В дополнительном варианте осуществления реагент, хелатирующий ионы цинка, представляет собой ЭДТА. ЭДТА можно добавлять к образцу биологической жидкости, чтобы нарушить связывание цинковых пальцев с ДНК.

[202] В предпочтительном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец цельной крови, а реагент, хелатирующий ионы цинка, представляет собой ЭДТА, который добавляют к образцу цельной крови, чтобы нарушить связывание цинковых пальцев с ДНК, а также чтобы предотвратить свертывание крови и,

следовательно, получить образец плазмы крови, содержащий свободный фактор транскрипции с цинковыми пальцами. Для анализа образца на предмет наличия фактора транскрипции можно применять любой способ. В предпочтительном варианте осуществления применяемый способ анализа представляет собой иммуноанализ и, в частности, 2-компонентный «сэндвич»-иммуноанализ. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления данного изобретения представлен способ для выявления присутствия или для измерения уровня циркулирующего фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции с цинковыми пальцами, в образце цельной крови, взятом у субъекта, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца цельной крови в контакт с ЭДТА для получения образца плазмы крови; и
- (ii) анализ образца плазмы крови на предмет присутствия или уровня фактора транскрипции с цинковыми пальцами с помощью способа иммуноанализа.

[203] Семейство факторов транскрипции с цинковыми пальцами является наиболее распространенным семейством факторов транскрипции. Следовательно, данный аспект данного изобретения можно применять для выявления большинства факторов транскрипции, представляющих интерес. Термин «фактор транскрипции с цинковыми пальцами» относится к любому фактору транскрипции, содержащему домен связывания цинковых пальцев.

[204] Циркулирующий фактор транскрипции с цинковыми пальцами можно использовать в качестве биомаркера для выявления заболевания, например, для выявления, диагностики, выбора лечения, мониторинга или прогнозирования гинекологического рака. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ для определения статуса заболевания субъекта, например, для выявления, диагностики, выбора лечения, мониторинга или прогноза заболевания у субъекта, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови;
- (ii) анализ образца плазмы крови на предмет присутствия или уровня фактора транскрипции с цинковыми пальцами; и
- (iii) применение присутствия или уровня фактора транскрипции с цинковыми пальцами в образце в качестве индикатора статуса заболевания у субъекта.

[205] Данный аспект данного изобретения также подходит для применения со способами культивирования клеток. Способы иммунопреципитации хроматина (ChIP) для факторов транскрипции являются сложными, трудоемкими, отнимающими много времени и ненадежными. Иллюстративный способ ChIP включает в себя выделение хроматинового материала из клетки, фрагментацию хроматина путем расщепления ДНК или с использованием физического способа, такого как обработка ультразвуком, выделение фрагментов хроматина с использованием антитела, выделение ДНК, связанной с антителом, и определение ДНК-последовательности выделенной ДНК. С помощью способа согласно данному изобретению присутствие или количество фактора транскрипции с цинковыми пальцами можно установить путем выделения хроматинового материала из клетки в жидкость, содержащую ЭДТА (или другой агент, хелатирующий цинк), и измерения свободного фактора транскрипции с цинковыми пальцами (например, способом ТИФА).

[206] Для анализа образца на наличие или количество фактора транскрипции с цинковыми пальцами можно применять любой способ, включительно, но не ограничиваясь ими, с масс-спектрометрией и любым иммунохимическим способом. В предпочтительных вариантах осуществления способ, применяемый для анализа образца на наличие или количество фактора транскрипции с цинковыми пальцами, представляет собой иммуноанализ.

[207] Поскольку авторы данного изобретения обнаружили, что добавление агентов, хелатирующих ион цинка, к образцам, содержащим фрагменты хроматина, включающие в себя фактор транскрипции с цинковыми пальцами, приводит к разрушению этих фрагментов хроматина с образованием свободных факторов транскрипции с цинковыми пальцами, а ЭДТА является сильным хелатором ионов цинка (а также кальция), будет ясно, что ДНК, связанную с фактором транскрипции с цинковыми пальцами, нельзя исследовать в образцах плазмы с ЭДТА с использованием способа, включающего в себя выделение фактора транскрипции с помощью антитела (или другого агента, связывающего фактор транскрипции) и анализ ДНК, ассоциированный с фактором транскрипции, поскольку ДНК больше не будет ассоциированной с фактором транскрипции.

[208] Следует понимать, что нарушение связывания фактора транскрипции,

содержащего цинковые пальцы, с ДНК приведет к образованию как свободного фактора транскрипции, содержащего цинковые пальцы, так и свободных фрагментов ДНК, включающих в себя последовательность ССФТ и фланкирующие ДНК-последовательности в геноме. Следовательно, в дополнительном аспекте данного изобретения представлен способ для идентификации присутствия циркулирующего фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции с цинковыми пальцами, или последовательности (-ей) фрагментов ДНК, связанных с фактором транскрипции с цинковыми пальцами, у субъекта, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови; и
- (ii) анализ образца плазмы крови на предмет присутствия или уровня свободных фрагментов ДНК, содержащих последовательность ДНК, включающую в себя последовательность сайта связывания фактора транскрипции или фланкирующую последовательность сайта связывания фактора транскрипции с цинковыми пальцами.

[209] Присутствие фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции и ассоциированные ССФТ, можно применять в клинических целях, включающих в себя выявление, мониторинг, прогноз или выбор лечения заболевания, как описано в данном документе. Следовательно, в одном аспекте данного изобретения представлен способ для определения статуса заболевания субъекта, например, для выявления, мониторинга, прогноза или выбора лечения заболевания, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови;
- (ii) анализ образца плазмы крови на предмет присутствия или уровня свободных фрагментов ДНК, содержащих последовательность ДНК, включающую в себя последовательность сайта связывания фактора транскрипции или фланкирующую последовательность сайта связывания фактора транскрипции с цинковыми пальцами; и
- (iii) применение присутствия и/или уровня и/или последовательности фрагментов ДНК в образце в качестве индикатора статуса заболевания у субъекта.

[210] Присутствие и/или последовательность свободных фрагментов ДНК среди нуклеосом или других белок-связанных фрагментов ДНК в плазме крови или другом образце можно определять рядом способов, включительно с использованием

комплементарных последовательностей ДНК для связывания фрагментов ДНК в образце. Этого можно достичь, например, посредством использования ДНК-чипов, которые облегчают зондирование образца на предмет нескольких последовательностей одновременно. Другой вариант осуществления данного изобретения включает в себя использование экзогенного фактора транскрипции с цинковыми пальцами в качестве специфического ДНК-связывающего агента. В данном способе агент, хелатирующий цинк, удаляют, чтобы облегчить связывание фактора транскрипции, содержащего цинковые пальцы, с ДНК. Это можно выполнять путем замены буфера, например, с помощью диализа или с использованием эксклюзионной хроматографии по размеру, например, с использованием колонки с сефадексом для эксклюзионной хроматографии по размеру. Фрагменты ДНК, содержащие ССФТ фактора транскрипции с цинковыми пальцами, можно выделять, например, с использованием связанного с твердой фазой фактора транскрипции в качестве агента связывания свободной ДНК, содержащей ССФТ. Выделенную ДНК можно анализировать на предмет последовательности и/или длины фрагмента ДНК. Для целей данного изобретения можно использовать рекомбинантные белки фактора транскрипции. Рекомбинантные белки фактора транскрипции с цинковыми пальцами могут быть связаны с твердофазным носителем или могут содержать линкерный фрагмент, и фактор транскрипции можно использовать в жидкой форме и выделять с помощью системы связывания. Многие такие связывающие образцы известны в данной области техники, например, фактор транскрипции с цинковыми пальцами можно биотинилировать и выделять с использованием твердофазного стрептавидина. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ для идентификации присутствия циркулирующего фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции с цинковыми пальцами, и/или последовательности (-ей) фрагментов ДНК, связанных с фактором транскрипции с цинковыми пальцами, у субъекта, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови;
- (ii) удаление агента, хелатирующего цинк, из образца;
- (iii) приведение образца в контакт с экзогенным фактором транскрипции с цинковыми пальцами; и
- (iv) анализ фрагментов ДНК, связанных экзогенным фактором транскрипции.

[211] В качестве альтернативы или дополнения, агент, хелатирующий цинк, можно

просто инактивировать в образце. В одном варианте осуществления данного изобретения агент, хелатирующий цинк, инактивируют путем добавления избытка ионов, предпочтительно – ионов цинка, до приведения в контакт с экзогенным фактором транскрипции. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ для идентификации присутствия циркулирующего фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции с цинковыми пальцами, и/или последовательности (-ей) фрагментов ДНК, связанных с фактором транскрипции с цинковыми пальцами, у субъекта, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови;
- (ii) инактивацию агента, хелатирующего цинк, в образце путем добавления избытка цинка или других ионов;
- (iii) приведение образца в контакт с экзогенным фактором транскрипции с цинковыми пальцами; и
- (iv) анализ фрагментов ДНК, связанных экзогенным фактором транскрипции.

[212] Присутствие фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции и ассоциированные ССФТ, можно применять в клинических целях, включающих в себя выявление, мониторинг, прогноз или выбор лечения заболевания, как описано в данном документе. Следовательно, в одном аспекте данного изобретения представлен способ для определения статуса заболевания субъекта, например, для выявления, мониторинга, прогноза или выбора лечения заболевания, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца крови, полученного от субъекта, в контакт с агентом, хелатирующим цинк, для получения образца плазмы крови;
- (ii) удаление или инактивация агента, хелатирующего цинк, в образце;
- (iii) приведение образца в контакт с экзогенным фактором транскрипции с цинковыми пальцами;
- (iv) анализ фрагментов ДНК, связанных экзогенным фактором транскрипции, и
- (v) применение присутствия и/или уровня и/или последовательности фрагментов ДНК в образце в качестве индикатора статуса заболевания у субъекта.

УДАЛЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕОСОМ

[213] Подготовка образца необязательно может также включать в себя этап

предварительной очистки для удаления большей части нуклеосом и связанной с нуклеосомами ДНК из образца до анализа. Это уменьшает фоновый сигнал, повышает эффективность выделения и амплификации представляющих интерес фрагментов ДНК, связанных с фактором транскрипции, и может повысить аналитическую и клиническую чувствительность способ согласно данному изобретению. Следовательно, в одном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя удаление бесклеточных нуклеосом из образца биологической жидкости. Фрагменты хроматина, содержащие нуклеосому, можно удалить из образца (необязательно – для отдельного анализа) перед применением способов согласно данному изобретению, описанных в данном документе. Целью этого подготовительного этапа является удаление основной массы фрагментов ДНК из образца, чтобы снизить любой фоновый сигнал, который они могут создать при анализе. Это можно выполнить, например, но не ограничиваясь им, путем приведения образца в контакт со связывающим агентом, который связывается с нуклеосомами, таким как твердофазный связывающий агент против нуклеосом, что включает в себя, например, антитело или белок, связывающий нуклеосомы, такой как белки, описанные в WO2021038010. Антитело может селективно связываться с гистоновым белком, например, с коровым гистоновым белком, таким как H2A, H2B, H3 или H4, или с линкерным гистоновым белком, таким как H1. Ссылки на гистоновые белки включают в себя посттрансляционные модификации гистонов и варианты или изоформы гистонов. Белок, связывающий нуклеосомы, может быть выбран из: белка, связывающего хроматин, который связывается с линкерной ДНК, или белка, который связывается с ассоциированной с нуклеосомой линкерной ДНК. Например, белок, связывающий хроматин, который связывается с линкерной ДНК, может быть выбран из: ДНК-связывающего белка хромодоменной геликазы (CHD); белка ДНК-(цитозин-5)-метилтрансферазы (DNMT); белка с боксом группы высокой подвижности (HMGB); белка поли-[АДФ-рибозо]-полимеразы (PARP); или белка метил-СрG-связывающего домена (MBD), такого как MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, или метил-СрG-связывающего белка 2 (MECP2). Белок, который связывается с ассоциированной с нуклеосомой линкерной ДНК, может быть выбран из гистона H1, макроH2A (mH2A) или его фрагмента или сконструированного аналога.

[214] Весь или большую часть нуклеосомного материала, присутствующего в образце, можно адсорбировать (например, на твердую фазу) и, следовательно, удалить из образца. Следовательно, в одном варианте осуществления способ включает в себя приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается

с нуклеосомами или их компонентом, и удаление образца, связанного со связывающим агентом, до приведения образца в контакт со агентом, связывающим фактор транскрипции.

[215] Сообщалось, что большая часть или большинство коротких фрагментов бкДНК длиной меньше чем 100 п. о. в плазме крови происходят не из фрагментов хроматина, включительно с регуляторными белками, а из ДНК, ассоциированной с нуклеосомами, которая надрезана или повреждена в одной или обеих цепях ДНК. В данном случае короткие фрагменты бкДНК могут представлять собой, например, фрагмент ДНК длиной 150 п. о., ассоциированный с нуклеосомой, который надрезан в одном или большем числе местоположений с образованием двух или большего числа меньших фрагментов бкДНК (например, двух фрагментов по 75 п. о.), а не одного фрагмента бкДНК длиной 150 п. о. (Sanchez *et al*, 2018). Следовательно, удаление нуклеосом из образца до воздействия на образец агента, связывающего фактор транскрипции, имеет дополнительное преимущество в виде удаления коротких фрагментов бкДНК длиной меньше чем 100 п. о., которые происходят из надрезанной ДНК, ассоциированной с нуклеосомами. Это дополнительно снижает фоновый сигнал бкДНК, ассоциированной с нуклеосомами, в образце, например, по сравнению с разделением выделенных фрагментов бкДНК по размерам способами гелевого разделения.

[216] Авторы данного изобретения продемонстрировали количественное удаление фрагментов хроматина, содержащих нуклеосомы, из образцов плазмы крови человека с использованием антитела против НЗ.

[217] В предпочтительном варианте осуществления в качестве твердофазного носителя используют магнитные гранулы, но можно использовать любой подходящий материал. Подобным образом, в качестве способа удаления нуклеосом можно использовать любой из способов связывания нуклеосом, описанных в WO2016067029, WO2017068371 и WO2021038010. Следовательно, в одном варианте осуществления образец, используемый в способах согласно данному изобретению, не содержит нуклеосом. В дополнительном варианте осуществления бесклеточный фрагмент хроматина, выявленный способами согласно данному изобретению, состоит из фактора транскрипции и фрагмента ДНК.

[218] В одном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в

себя следующие этапы:

- (i) удаление бесклеточной нуклеосомы из образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного;
- (ii) приведение образца в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (iii) изолирование ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции;
- (iv) амплификацию выделенной ДНК способом ПЦР;
- (v) определение последовательности амплифицированной ДНК; и
- (vi) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия и/или природы заболевания у субъекта.

[219] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения присутствие или последовательность фрагмента ДНК, ассоциированного с бесклеточным фактором транскрипции или фрагментом хроматина, можно определять без выделения ДНК. Это можно выполнять с помощью ряда способов, включающего в себя, но не ограничивающегося ими, способы амплификации, которые не требуют выделения ДНК.

[220] При употреблении в контексте данного документа термин «связывающий агент» относится к лигандам или связывающим веществам, таким как встречающиеся в природе или химически синтезированные соединения, способные специфически связываться с биомаркером (т. е. со специфическим фактором транскрипции). Лиганд или связывающий агент согласно данному изобретению может включать в себя пептид, антитело или его фрагмент, или синтетический лиганд, такой как пластиковое антитело, аптамер или олигонуклеотид, или поверхность или устройство с молекулярным отпечатком, способные специфически связываться с биомаркером. Антитело может представлять собой моноклональное антитело или его фрагмент, способные специфически связываться с целевой молекулой. К лиганду/связывающему агенту согласно данному изобретению можно присоединить метку – выявляемый маркер, такой как люминесцентный, флуоресцентный, ферментный или радиоактивный маркер; в качестве альтернативы или дополнения, к лиганду согласно данному изобретению можно присоединить аффинную метку, например, биотиновую, авидиновую, стрептавидиновую или гистидиновую (например, гексагистидиновую) метку. В одном варианте осуществления связывающий агент выбран из: антитела, фрагмента антитела или аптамера. В дополнительном варианте

осуществления используемый связывающий агент представляет собой антитело. Термины «антитело», «связывающий агент» или «связывающее вещество» употребляются в данном документе взаимозаменяемо.

[221] В одном варианте осуществления образец представляет собой биологическую жидкость (данный термин в данном документе употребляется взаимозаменяемо с термином «жидкость из организма»). Для данного изобретения можно использовать любой тип образца биологической жидкости, включающий в себя, но не ограничивающийся ими, кровь, плазму крови, менструальную кровь, жидкость эндометрия, кал, мочу, слюну, отделяемое слизистых оболочек, сперму и выдыхаемый воздух, например, в виде конденсированного выдыхаемого воздуха, или экстракт, или очищенную его часть, или их разбавление. Биологические образцы также включают в себя образцы, взятые у живого субъекта или взятые посмертно. Образцы можно подготавливать, например, при необходимости, разбавлять или концентрировать, и сохранять обычным способом. В предпочтительном варианте осуществления образец биологической жидкости выбран из крови, сыворотки крови или плазмы крови. Специалистам в данной области техники будет ясно, что выявление фрагментов хроматина в биологической жидкости имеет то преимущество, что является минимально инвазивным способом, который не требует биопсии.

[222] В одном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-млекопитающее. В дополнительном варианте осуществления субъект выбран из субъекта-человека или субъекта-животного (например, домашнего животного или мыши). В дополнительном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В одном варианте осуществления субъект-человек представляет собой незэмбрионального субъекта (т. е. человека на любой стадии развития, кроме эмбриона). В дополнительном варианте осуществления субъект-человек представляет собой взрослого субъекта, т. е. старше 16 лет или имеющего возраст, например, старше 18, 21 или 25 лет. В альтернативном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-животное. В дополнительном варианте осуществления субъект-животное выбран из субъекта – грызуна (например, мыши, крысы, хомяка, песчанки или бурундука), кошачьего (т. е. кошки), собачьего (т. е. собаки), лошадиного (т. е. лошади), свиного (т. е. свиньи) или бычьего (т. е. коровы) субъекта.

[223] Следует понимать, что применения и способы согласно данному изобретению может выполнять *in vitro* или *ex vivo*.

[224] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ для выявления или диагностики онкологического заболевания у субъекта-животного или субъекта-человека, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление или измерение ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта; и
- (ii) применение уровня ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК, выявленных на этапе (i), для идентификации статуса заболевания у субъекта.

[225] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ для выявления или диагностики воспалительного заболевания у субъекта-животного или субъекта-человека, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление или измерение ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта; и
- (ii) применение уровня ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК, выявленных на этапе (i), для идентификации статуса воспалительного заболевания у субъекта.

[226] В одном варианте осуществления данного изобретения присутствие в образце бесклеточного фрагмента хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, используют для определения оптимального режима лечения для субъекта, нуждающегося в таком лечении.

[227] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ оценки субъекта-животного или субъекта-человека на предмет подходящего медицинского лечения, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта; и
- (ii) применение уровня ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК,

выявленных на этапе (i), в качестве параметра для выбора подходящего лечения для субъекта.

[228] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ мониторинга лечения субъекта-животного или субъекта-человека, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта;
- (ii) повторение выявления, измерения или секвенирования ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в биологической жидкости субъекта, в одном или большем числе случаев; и
- (iii) применение любых изменений в уровне ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК, выявленных на этапе (i), по сравнению с этапом (ii) в качестве параметра любых изменений в состоянии субъекта.

[229] Изменение измеренного уровня ДНК и/или последовательности ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащей фактор транскрипции, выявленных в исследуемом образце, относительно уровня или последовательности, выявленных в предшествующем исследуемом образце, полученном ранее от того же исследуемого субъекта, может указывать на благоприятный эффект, например, стабилизацию или улучшение, от указанной терапии в отношении нарушения или предполагаемого нарушения. Кроме того, после завершения лечения способ согласно данному изобретению можно периодически повторять для мониторинга рецидива заболевания.

[230] Следует понимать, что данные аспекты данного изобретения можно применять в комбинации со способами, описанными в данном документе, например, этап (i) включает в себя приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции, и затем выявление или измерение ДНК, ассоциированной с указанным фактором транскрипции.

[231] В одном варианте осуществления фрагмент бесклеточного хроматина, содержащий фактор транскрипции и фрагмент ДНК (т. е. ДНК, ассоциированную с

фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции), выявляют или измеряют как один из показателей панели анализов. Например, в комбинации с другими маркерами фактора транскрипции бесклеточного хроматина или с любыми другими биомаркерами.

[232] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ для выявления, измерения или секвенирования фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, либо отдельно, либо как части панели анализов, для целей определения или оценки пригодности субъекта-животного или субъекта-человека для медицинского лечения, или для мониторинга лечения субъекта-животного или субъекта-человека, для применения у субъектов с фактическим или предполагаемым онкологическим заболеванием или доброкачественной опухолью.

[233] Следует понимать, что измерения или анализы, выполняемые способами согласно данному изобретению, могут включать в себя использование референсного материала в качестве калибранта или положительного контроля для обеспечения стандарта, с которым можно сравнивать или относительно которого можно калибровать выходные данные анализа, и/или для подтверждения или мониторинга правильного функционирования химии анализа. Подходящие референсные материалы могут включать в себя фрагменты хроматина биологического происхождения, содержащие факторы транскрипции, или рекомбинантные фрагменты хроматина, включающие в себя, но не ограничивающиеся ими, рекомбинантные комплексы фактор транскрипции – ДНК.

[234] Термины «выявление» или «диагностика», употребляемые в данном документе, охватывают собой идентификацию, подтверждение и/или характеристику болезненного состояния. Способы выявления, мониторинга и диагностики согласно данному изобретению полезны для подтверждения наличия заболевания, для мониторинга развития заболевания путем оценки начала и прогрессирования, или для оценки улучшения или регрессии заболевания. Способы выявления, мониторинга и диагностики также полезны в способах оценки клинического скрининга, прогноза, выбора терапии, оценки терапевтической пользы, т. е. для скрининга и разработки лекарственных средств.

[235] Следует понимать, что выявление и измерение включают в себя секвенирование. При употреблении в контексте данного документа термин «секвенирование» охватывает

собой определение последовательности оснований нуклеозидов (как правило – последовательности оснований аденина, гуанина, тимина и цитозина) всего фрагмента ДНК или его части.

[236] Эффективные способы диагностики и мониторинга обеспечивают очень эффективные «решения для пациентов» с потенциалом улучшения прогноза за счет постановки правильного диагноза, позволяющего быстро определить наиболее подходящее лечение (тем самым уменьшая ненужное воздействие вредных побочных эффектов лекарственных средств), и снижения частоты рецидивов.

[237] Следует понимать, что идентификацию, выявление и/или количественное определение можно выполнять любым способом, подходящим для идентификации присутствия и/или количества специфического белка или последовательности фрагмента ДНК в биологическом образце от пациента или в очищенном биологическом образце, или в экстрагированном биологическом образце, или в их разбавленном образце. В способах согласно данному изобретению количественное определение можно выполнять путем секвенирования или измерения концентрации биомаркера в образце или образцах. Биологические образцы, которые можно исследовать в способе согласно данному изобретению, включают в себя те, что были определены ранее в данном документе. Образцы можно подготавливать, например, при необходимости, разбавлять или концентрировать, и сохранять обычным способом.

[238] Идентификацию и/или количественное определение биомаркеров можно выполнять путем выявления биомаркера или его фрагмента, например, фрагмента с С-концевым усечением или с N-концевым усечением. Подходящие фрагменты имеют длину больше чем в 4 аминокислоты, например, длину в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[239] Биомаркер можно выявлять напрямую, например, с помощью SELDI или MALDI-TOF. В качестве альтернативы, биомаркер можно выявлять напрямую или ненапрямую посредством взаимодействия с лигандом или лигандами, такими как антитело или его фрагмент, связывающий биомаркер, или другой пептид, или лиганд, например, аптамер, или олигонуклеотид, способный специфически связывать биомаркер. Лиганд или связывающий агент может иметь выявляемую метку, такую как люминесцентная,

флуоресцентная или радиоактивная метка, и/или аффинная метка.

[240] Например, выявление и/или количественное определение может быть выполнено одним или большим числом способов, выбранных из группы, состоящей из следующего: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), 1-D анализ на основе геля, 2-D анализ на основе геля, масс-спектрометрия (МС), обращенно-фазовая (ОФ) жидкостная хроматография (ЖХ), фильтрация на основе размеров (гель-фильтрация), ионообменная хроматография, аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), сверхэффективная жидкостная хроматография (СЭЖХ) и другие методики на основе ЖХ или ЖХ-МС. Подходящие методики на основе ЖХ-МС включают в себя ICAT® (Applied Biosystems, Калифорния, США) или iTRAQ® (Applied Biosystems, Калифорния, США). Также можно применять жидкостную хроматографию (например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) или жидкостную хроматографию низкого давления (ЖХНД)), тонкослойную хроматографию, ЯМР-спектроскопию (спектроскопию ядерного магнитного резонанса).

[241] Следует понимать, что выявление и/или измерение ДНК может включать в себя, например, гибридизацию или секвенирование, как описано в данном документе.

[242] Способы диагностики или мониторинга согласно данному изобретению могут включать в себя анализ образца с помощью SELDI TOF или MALDI TOF для выявления присутствия или уровня биомаркера. Данные способы также подходят для клинического скрининга, прогнозирования, мониторинга результатов терапии, выявления пациентов, которые с наибольшей вероятностью ответят на конкретное терапевтическое лечение, для скрининга и разработки лекарственных средств, а также для определения новых целей для медикаментозного лечения.

[243] Идентификацию и/или количественное определение анализируемых биомаркеров можно выполнять с использованием иммунологического способа, включающего в себя антитело или его фрагмент, способный специфически связываться с биомаркером.

[244] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ для идентификации фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор

транскрипции и фрагмент ДНК, в качестве комбинированного биомаркера для выявления или диагностики заболевания у субъекта-животного или субъекта-человека, способ, который включает в себя следующие этапы:

- (i) выявление и/или измерение и/или секвенирование фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего комбинированный биомаркер фактора транскрипции и фрагмента ДНК, в образце биологической жидкости больного субъекта;
- (ii) выявление и/или измерение и/или секвенирование фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего комбинированный биомаркер фактора транскрипции и фрагмента ДНК, в образце биологической жидкости здорового субъекта или контрольного субъекта; и
- (iii) применение различия между уровнями и/или последовательностями ДНК, выявленными у больных и здоровых или контрольных субъектов, для идентификации того, полезен ли фрагмент бесклеточного хроматина, содержащий комбинированный биомаркер фактора транскрипции и фрагмента ДНК, в качестве биомаркера статуса заболевания.

[245] Следует понимать, что данный аспект данного изобретения можно комбинировать со способами, описанными в данном документе, т. е. этапы (i) и/или (ii) можно выполнять с использованием способа, как определено в данном документе.

[246] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлены биомаркер или комбинированный биомаркер, идентифицированные способом, описанным в данном документе.

[247] Для выполнения способов согласно данному изобретению в данном документе представлены наборы для диагностики или мониторинга. Такие наборы для выявления и/или количественного определения биомаркера или комбинированного биомаркера будут подходящим образом содержать лиганд или связывающий агент для фактора транскрипции и, необязательно, реагенты для амплификации и/или секвенирования ДНК, ассоциированной с указанным фактором транскрипции, и, необязательно, лиганд или связывающий агент для нуклеосом, необязательно – вместе с инструкциями по применению набора. Способы мониторинга биомаркера, биосенсоры и наборы также жизненно важны в качестве инструментов мониторинга пациента, позволяющих врачу определить, вызван ли рецидив обострением заболевания. Если фармакологическое лечение оценивается как недостаточное, то можно возобновить или усилить другой вид терапии; при необходимости можно назначить смену терапии. Поскольку биомаркеры

чувствительны к степени нарушения, они дают представление о воздействии медикаментозной терапии.

[248] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен набор для выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в качестве комбинированного биомаркера, который содержит лиганд или агент связывания для фактора транскрипции, необязательно – реагенты для амплификации и/или секвенирования ДНК, ассоциированной с указанным фактором транскрипции, и, необязательно, лиганд или агент связывания для нуклеосом, необязательно – вместе с инструкциями по применению набора в соответствии со способами, представленными в данном документе.

[249] Другим аспектом данного изобретения является набор для выявления наличия патологического состояния, содержащий биосенсор, способный выявлять и/или количественно определять один или большее число биомаркеров, как определено в данном документе.

[250] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлено применение набора, как описано в данном документе, для диагностики онкологического заболевания. В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлено применение набора, как описано в данном документе, для диагностики воспалительного заболевания. В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлено применение набора, как описано в данном документе, для диагностики пренатального заболевания.

[251] В соответствии с дополнительным аспектом представлен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает в себя следующие этапы:

- (a) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (b) выявление, измерение или секвенирование фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
- (c) применение присутствия, количества или последовательности фрагмента ДНК в

качестве индикатора наличия заболевания у субъекта; и

(d) осуществление лечения, если на этапе (c) субъект определен как имеющий заболевание.

[252] В одном варианте осуществления заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В альтернативном варианте осуществления заболевание представляет собой воспалительное заболевание. В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлено применение набора, как описано в данном документе, для диагностики пренатального заболевания у плода беременной пациентки.

[253] В одном варианте осуществления проводимое лечение выбрано из следующего: хирургическое лечение, лучевая терапия, химиотерапия, иммунотерапия, гормональная терапия и биологическая терапия.

[254] В соответствии с дополнительным аспектом в данном изобретении представлен способ лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает в себя следующие этапы:

(a) выявление или диагностирование онкологического заболевания у субъекта в соответствии со способом, описанным в данном документе; с последующим

(b) проведением противораковой терапии, хирургического вмешательства или введением лекарственного средства указанному индивидууму.

[255] В одном варианте осуществления субъект представляет собой субъекта-человека или субъекта-животное.

[256] Далее данное изобретение иллюстрируется нижеследующими примерами.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[257] Антитело, направленное на специфическое связывание с фактором транскрипции TTF-1 (также называемым NKX2-1), наносят на магнитные гранулы для биомагнитного разделения (например, коммерчески доступные гранулы Dynabeads). TTF-1 представляет собой фактор транскрипции с гомеобоксом мотива спираль-петля-спираль.

[258] Магнитные гранулы, покрытые антителом против TTF-1, добавляют к образцам плазмы крови с ЭДТА, полученным от субъектов с диагнозом рака легкого IV стадии, от субъектов с диагнозом рака щитовидной железы IV стадии и от здоровых субъектов. После инкубации (с мягким вращением для поддержания суспензии магнитных частиц) магнитные частицы удаляют из образцов плазмы крови и промывают буфером для анализа. Фрагменты ДНК, ассоциированные с TTF-1, выделяют из магнитной твердой фазы с помощью набора реактивов Qiagen QiaAMP Circulating Nucleic Acids kit. Адаптерные олигонуклеотиды лигируют с выделенными фрагментами ДНК для получения одноцепочечной ДНК-библиотеки последовательностей ДНК, ассоциированных с TTF-1, для каждого образца плазмы крови с помощью способа получения библиотек, описанного в работе Snyder *et al*, 2016, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки.

[259] Библиотеки фрагментов, созданные для каждого субъекта, амплифицируют с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Амплифицированные библиотеки секвенируют способами секвенирования нового поколения и сравнивают количества ДНК в каждой библиотеке и ассоциированные с ними последовательности. Охват локусов ССФТ TTF-1 небольшими фрагментами бкДНК в диапазоне 35-80 п. о. в образцах от здоровых субъектов будет низким, поскольку количества ДНК, ассоциированной с TTF-1, в образцах от здоровых субъектов будут низкими или невыявляемыми. Напротив, охват локусов ССФТ TTF-1 небольшими фрагментами бкДНК в диапазоне 35-80 п. о. в образцах от субъектов, имеющих онкологические заболевания, будет высоким, поскольку количества ДНК, ассоциированной с TTF-1, в образцах от пациентов, имеющих рак легкого IV стадии или рак щитовидной железы IV стадии, являются более высокими. Последовательности ассоциированной ДНК TTF-1, определенные в образцах рака щитовидной железы, будут коррелировать с известными последовательностями TTF-1-регулируемых генных промоторов в клетках щитовидной железы. Подобным образом, последовательности ассоциированной ДНК TTF-1, определенные в образцах рака легкого, будут коррелировать с известными последовательностями TTF-1-регулируемых генных промоторов в клетках щитовидной железы. Исходя из этого, большинство или все образцы, полученные от здоровых субъектов, полученные от субъектов, имеющих рак щитовидной железы, и полученные от субъектов, имеющих рак легкого, будут идентифицируемыми по данным, полученным в результате данного эксперимента.

ПРИМЕР 2

[260] Эксперимент, описанный в примере 1, повторяют, но перед инкубацией с магнитными частицами, покрытыми антителом против TTF1, к образцам плазмы крови добавляют магнитные гранулы, покрытые антителом против нуклеосом, для предварительной очистки образцов от нуклеосом и связанных с нуклеосомами фрагментов ДНК. После инкубации (с мягким вращением для поддержания суспензии магнитных частиц) магнитные частицы удаляют из образцов плазмы крови. Затем эксперимент завершают, как описано в примере 1, с использованием оставшегося образца, с аналогичными результатами, за исключением того, что фоновые уровни ДНК, выявленные в образцах от здоровых субъектов, будут даже ниже, чем описано для примера 1.

ПРИМЕР 3

[261] Магнитные гранулы, покрытые антителом против TTF-1, добавляют к образцам плазмы крови с ЭДТА, полученным от субъектов, имеющих рак легкого IV стадии, от субъектов, имеющих рак щитовидной железы IV стадии, и от здоровых субъектов. После инкубации (с мягким вращением для поддержания суспензии магнитных частиц) магнитные частицы удаляют из образцов плазмы крови и промывают буфером для анализа. Фрагменты ДНК, ассоциированные с TTF-1, экстрагируют из магнитной твердой фазы с помощью набора реактивов Qiagen QiaAMP Circulating Nucleic Acids kit. Праймеры специфических последовательностей разрабатывают с использованием типичного программного обеспечения, известного в области разработки праймеров, для амплификации фрагментов ДНК специфических последовательностей, ассоциированных с сайтами связывания TTF-1 в SPB, рецепторе тиреотропного гормона и промоторе гена тиреопероксидазы генома человека, плюс с фланкирующей ДНК. Праймеры используют для амплификации фрагментов ДНК способом количественной ПЦР в реальном времени. Количество присутствующей ДНК измеряют для каждой последовательности в каждом образце плазмы крови. Результаты для образцов, полученных от здоровых субъектов, будут низкими или невыявляемыми. Большинство образцов, полученных от пациентов, имеющих рак легкого, будут содержать выявляемые количества фрагментов ДНК промоторной последовательности гена SPB. Большинство образцов, полученных от пациентов, имеющих рак щитовидной железы, будут содержать выявляемые количества фрагментов ДНК промоторной последовательности гена рецептора тиреотропного гормона и/или гена тиреопероксидазы. Исходя из этого, большинство или все образцы, полученные от

здоровых субъектов, полученные от субъектов, имеющих рак щитовидной железы, и полученные от субъектов, имеющих рак легкого, будут идентифицируемыми по данным, полученным в результате данного эксперимента.

ПРИМЕР 4

[262] Эксперимент, описанный в примере 3, повторяют, но перед инкубацией с магнитными частицами, покрытыми антителом против TTF-1, к образцам плазмы крови добавляют магнитные гранулы, покрытые антителом против нуклеосом, для предварительной очистки образцов от нуклеосом и связанных с нуклеосомами фрагментов ДНК. После инкубации (с мягким вращением для поддержания суспензии магнитных частиц) магнитные частицы удаляют из образцов плазмы крови. Затем эксперимент завершают, как описано в примере 3, с использованием оставшегося образца, с аналогичными результатами, за исключением того, что фоновые уровни ДНК, выявленные в образцах от здоровых субъектов, будут даже ниже, чем описано для примера 3.

ПРИМЕР 5

[263] Эксперименты, подобные описанным в приведенных выше примерах, повторяют для фактора транскрипции с мотивом спираль-петля-спираль НКХ3.1 путем анализа образцов плазмы крови, полученных от здоровых мужчин и от мужчин с диагнозом рака предстательной железы IV стадии. Результаты для образцов, полученных от здоровых субъектов, будут низкими или невыявляемыми. Большинство образцов, полученных от пациентов, имеющих рак предстательной железы, будут содержать выявляемые количества фрагментов ДНК промоторной последовательности гена НКХ3.1 с размерами в диапазоне 35-80 п. о. Исходя из этого, большинство или все образцы, полученные от здоровых субъектов, и образцы, полученные от субъектов, имеющих рак предстательной железы, будут идентифицируемыми по данным, полученным в результате данного эксперимента.

ПРИМЕР 6

[264] Эксперименты, подобные описанным в приведенных выше примерах, повторяют для фактора транскрипции с цинковыми пальцами WT1 путем анализа образцов сыворотки крови, полученных от здоровых женщин и от женщин с диагнозом рака яичника IV стадии. Результатами для образцов, полученных от здоровых субъектов, будут низкий или невыявляемый охват локусов ССФТ WT1 фрагментами бкДНК, ассоциированными с WT1, в диапазоне размеров 35-80 п. о. у здоровых субъектов. Большинство образцов, взятых у

пациенток, имеющих рак яичника, покажут более высокий охват локусов ССФТ WT1 фрагментами бкДНК, ассоциированными с WT1, в диапазоне размеров 35-80 п. о., поскольку они содержат выявляемые количества фрагментов бкДНК промоторной последовательности гена WT1 с размерами 35-80 п. о. Исходя из этого, большинство или все образцы, полученные от здоровых субъектов, и образцы, полученные от субъектов, имеющих рак яичника, будут идентифицируемыми по данным, полученным в результате данного эксперимента.

ПРИМЕР 7

[265] Авторы данного изобретения покрыли магнитные гранулы Dynabeads M280 Tosylactivated антителом, направленным на связывание с эпитопом гистона H3, расположенным в аминокислотном положении 30-33. Данное антитело было выбрано из ряда протестированных антител, поскольку было обнаружено, что оно связывается как с нуклеосомами, содержащими полные гистоновые хвосты, так и с нуклеосомами с обрезанными гистоновыми хвостами.

[266] Авторы данного изобретения добавляли магнитные гранулы, покрытые антителом против H3 (1 мг), к растворам, содержащим рекомбинантные моноклеосомы различных концентраций (0,5 мл), приобретенные у Active Motif. Гранулы инкубировали с нуклеосомами при комнатной температуре в течение 1 часа с легким перекачиванием пробирок для поддержания гранул во взвешенном состоянии. Гранулы выделяли магнитным способом и промывали. Нуклеосомы, адсорбированные на гранулах, затем удаляли путем элюирования и анализировали способом вестерн-блота. Полученные результаты демонстрируют, что нуклеосомы адсорбировались из раствора магнитными гранулами дозозависимым образом, как показано на фиг. 3.

ПРИМЕР 8

[267] Магнитные гранулы, покрытые антителом против H3, подготавливали и использовали так, как описано в примере 7. Авторы данного изобретения добавляли магнитные гранулы, покрытые антителом против H3, а также гранулы без покрытия к 8 образцам плазмы крови человека с ЭДТА, а также к растворам, содержащим рекомбинантные моноклеосомы различных концентраций. Диапазон концентраций рекомбинантных моноклеосом был выбран так, чтобы включать в себя уровни, обычно наблюдаемые в клинических образцах человека.

[268] Авторы данного изобретения исследовали наличие нуклеосом, оставшихся в растворе после инкубации с магнитными гранулами, используя ТИФА для определения нуклеосом с измерением оптической плотности (OD). Результаты, представленные на фиг. 4, демонстрируют, что уровень рекомбинантных моонуклеосом, остающихся в растворе после адсорбции магнитными гранулами, покрытыми антителом против НЗ, был невыявляемым (имел OD, аналогичный контрольному раствору, который не содержал нуклеосомы), в то время как уровни в растворах, инкубированных с непокрытыми магнитными гранулами, оставались неизменными, приводя к нормальной кривой дозозависимости ТИФА. Подобным образом, уровень нуклеосом, остающихся в растворе в 8 исследованных образцах плазмы крови человека после адсорбции магнитными гранулами, покрытыми антителом против НЗ, также был низким или невыявляемым, но на него не повлияла инкубация с непокрытыми магнитными гранулами. Данные результаты демонстрируют количественное удаление нуклеосом из образцов плазмы крови человека.

ПРИМЕР 9

[269] Гранулы Luminex разных цветов покрывают антителами, направленными на связывание с факторами транскрипции TTF-1, NKX3.1, GATA-3, CDX-2 и GRHL2 в соответствии с протоколом производителя. Образцы плазмы крови, полученные от здоровых субъектов и от субъектов с различными диагностированными видами онкологических заболеваний, приводят в контакт со смесями всех гранул. Количество или охват бкДНК в диапазоне 35-80 п. о., охватывающий соответствующий ССФТ фактора транскрипции, связанный с каждым фактором транскрипции, связанным с гранулами, измеряют способом ПЦР или секвенированием нового поколения. Результаты покажут, что охват ССФТ NKX3.1 и GRHL2 фрагментами бкДНК размером 35-80 п. о., связанными с гранулами, покрытыми антителами, направленными на связывание NKX3.1 и GRHL2, повышен в образцах, взятых у пациентов, имеющих рак предстательной железы, в то время как связывание фактора транскрипции с другими гранулами (покрытыми антителом против TTF-1, против GATA-3 или против CDX-2) является низким. Подобным образом, количество коротких фрагментов бкДНК длиной 35-80 п. о., связанных с гранулами, покрытыми антителами, направленными на связывание TTF-1 и GRHL2, будет повышено в образцах, взятых у пациентов, имеющих рак легкого, в то время как связывание фактора транскрипции с другими гранулами (покрытыми антителом против NKX3.1, против GATA-3 или против CDX-2) является низким. Подобным образом, количество коротких

фрагментов бкДНК длиной 35-80 п. о., связанных с гранулами, покрытыми антителами, направленными на связывание GATA-3 и GRHL2, будет повышено в образцах, взятых у пациентов, имеющих рак молочной железы, в то время как связывание с другими гранулами (покрытыми антителом против TTF-1, против NKX3.1 или против CDX-2) является низким. Напротив, связывание коротких фрагментов бкДНК длиной 35-80 п. о. со всеми гранулами будет низким в образцах, полученных от здоровых субъектов.

ПРИМЕР 10

[270] Магнитные гранулы покрывают антителами, направленными на связывание с РНК-полимеразой II, в соответствии с протоколом производителя. Образцы плазмы крови, полученные от здоровых субъектов и от субъектов с различными диагностированными видами онкологических заболеваний, приводят в контакт с гранулами. Гранулы промывают для удаления несвязанных фрагментов хроматина.

[271] ДНК, связанную с гранулами, выделяют, связывают с адаптерными олигонуклеотидами, и библиотеку секвенируют, чтобы найти набор активных генов, присутствующих в образцах от субъектов. Результаты покажут, что активные гены, присутствующие в образцах, полученных от здоровых субъектов, являются репрезентативными для генов, активных в гемопоэтических клетках. Те же последовательности также присутствуют в образцах, полученных от пациентов, имеющих онкологическое заболевание, но обнаруживается, что эти образцы дополнительно содержат последовательности ДНК, ассоциированные с РНК-полимеразой II, репрезентативные для генов, которые не активны в гемопоэтических клетках, но активны в клетках ткани, пораженной заболеванием, включительно с генами, которые обычно активны в (здоровых или пораженных заболеванием) клетках соответствующей ткани и/или которые подвергаются повышающей регуляции в раковых клетках.

ПРИМЕР 11

[272] Магнитные гранулы покрывают антителами, направленными на связывание с РНК-полимеразой II, в соответствии с протоколом производителя. Образцы плазмы крови, полученные от здоровых субъектов и от субъектов с различными диагностированными видами онкологических заболеваний, приводят в контакт с гранулами. Гранулы промывают для удаления несвязанных фрагментов хроматина.

[273] ДНК, связанную с гранулами, анализируют на наличие специфической последовательности ДНК с использованием ПЦР-праймеров для амплификации последовательности. Последовательность, подлежащую анализу, выбирают так, чтобы она была специфически ассоциирована с колоректальным раком. Результаты покажут, что последовательность присутствует в образцах, полученных от субъектов с колоректальным раком, но не присутствует в образцах, полученных от здоровых субъектов или от субъектов с другими видами онкологических заболеваний.

ПРИМЕР 12

[274] Образцы плазмы крови с ЭДТА получали от 6 женщин с диагнозом рака яичника, от 2 женщин с диагнозом ER-отрицательного рака молочной железы и от 8 женщин с диагнозом ER-положительного рака молочной железы, из которых у 4 женщин была диагностирована оценка ER, равная 7, и у 4 женщин была диагностирована оценка ER, равная 8. Образцы плазмы крови с ЭДТА анализировали на предмет ER α с использованием коммерческого набора для ТИФА ER α . Диапазон количественного определения используемого набора для ТИФА составлял 3-200 пг/мл с нижним пределом обнаружения для ER α , составляющим 0,8 пг/мл. Средние измеренные уровни ER α были низкими у ER-отрицательных субъектов и более высокими у субъектов с диагнозом рака яичника или ER-положительного рака молочной железы. Более того, средний уровень, измеренный для субъектов с диагнозом ER-положительного рака молочной железы, был более высоким для женщин с более высокой оценкой ER (фиг. 5). Авторы данного изобретения пришли к выводу, что присутствие ER α в образцах плазмы крови с ЭДТА, приготовленных из образцов цельной крови, взятых у женщин, полезно в качестве биомаркера гинекологических заболеваний, включительно с гинекологическим раком.

ПРИМЕР 13

[275] Статус рецептора прогестерона при раке молочной железы как PR-положительный или PR-отрицательный также важен при диагностике и лечении гинекологического рака. Авторы данного изобретения также пришли к выводу, что измерение уровней рецептора прогестерона (PR) в образцах плазмы крови с ЭДТА, приготовленных из образцов цельной крови, взятых у женщин, также является применимым в качестве биомаркера гинекологических заболеваний, включительно с гинекологическим раком.

ПРИМЕР 14

[276] Статус рецептора андрогена при раке предстательной железы также важен при диагностике и лечении рака предстательной железы. Авторы данного изобретения также пришли к выводу, что измерение уровней рецептора андрогена (AR) в образцах плазмы крови с ЭДТА, приготовленных из образцов цельной крови, взятых у мужчин, также является применимым в качестве биомаркера заболеваний предстательной железы, включающих в себя и рак предстательной железы.

ПРИМЕР 15

[277] Фоновый уровень белков, адсорбированных из образца плазмы крови неспецифически (неспецифическим образом) на магнитные частицы, покрытые IgG мыши, оценивали способом вестерн-блота с использованием окрашивания Кумасси синим для проявления. Фон оценивали после 5 промывок частиц типичным иммунохимическим промывочным буфером, содержащим 0,1% детергента Tween 20, или промывочным буфером, содержащим высокий уровень 1,2%-й смеси детергентов, включающей в себя 1% детергента октилфеноксиполиэтоксигтанола, 0,1% дезоксихолата натрия и 0,1% додецилсульфата натрия. Результаты (фиг. 6) показывают, что фоновое окрашивание было значительно уменьшено при использовании сильных детергентов.

[278] Тот же эксперимент применяли к белкам, специфически адсорбированным на антителе мыши против polyADP (которое связывает парилированные белки любого размера). В данном случае влияние на окрашивание было менее выраженным, показывая, что промывка удаляет неспецифически связанные белки, но не влияет (или оказывает меньшее влияние) на специфически связанные белки, прикрепленные к антителу.

ПРИМЕР 16

[279] Авторы данного изобретения нанесли моноклональное антитело, направленное на специфическое связывание с фактором транскрипции CTCF, на магнитные гранулы (MyOne Tosyl Activated Dynabeads™) с использованием стандартных способов. Кратко, 0,86 мг моноклонального антитела инкубировали с 29 мг магнитных гранул (30 мкг антитела / мг гранул) в 2,9 мл 0,1 М боратного буфера, pH 9,5, содержащего 1 М сульфата аммония, в течение 18 часов при температуре 37°C во флаконе при перекачивании для поддержания гранул во взвешенном состоянии. Гранулы осаждали, а надосадочную жидкость сливали. Гранулы ресуспендировали и инкубировали в течение 1 часа при

температуре 37°C в 2,9 мл блокирующего буфера, состоящего из фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,4, содержащего 0,1% Tween 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Затем гранулы осаждали, дважды промывали в 3 мл ФСБ, содержащего 0,1% Tween 20 и 1% БСА, и хранили в 2,9 мл ФСБ, содержащем 0,1% Tween 20, 1% БСА и консервант. Неспецифический IgG мыши подобным образом наносили на магнитные гранулы в качестве неспецифического контрольного реагента.

[280] Иммунопреципитацию хроматина (ChIP) фрагментов CTCF-ДНК проводили в 4 объединенных образцах перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА, полученных от пациентов с онкологическими заболеваниями (1,6 мл, собранных в ПСК Streck Cell-Free DNA). Каждый объединенный образец разбавляли 0,4 мл коммерчески доступного буфера для радиоиммунопреципитационного анализа и добавляли 1 мг магнитных частиц, покрытых антителом против CTCF. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре при перекатывании для поддержания гранул во взвешенном состоянии. Затем гранулы осаждали и промывали 5 раз сильным промывочным раствором детергентов, содержащим смесь 1% детергента Triton X-100, 0,1% дезоксихолата натрия и 0,1% додецилсульфата натрия, и хранили в 0,1 мл буфера. Параллельно выполняли контрольный эксперимент путем инкубации 1,6 мл каждого объединенного образца плазмы крови с неспецифическими магнитными гранулами, покрытыми IgG мыши.

[281] После инкубации магнитных частиц с объединенными образцами плазмы крови белок, связанный с магнитными частицами, суспендировали в денатурирующем буфере с 1% додецилсульфата натрия (ДСН) и денатурированный белок анализировали способом вестерн-блота с использованием антител против CTCF и меченых антител против мыши для обнаружения. В экспериментах способом вестерн-блота на присутствие CTCF указывает наличие полосы при 130-140 кДа (Klenova *et al*, 1997). Результаты анализа способом вестерн-блота представлены на фиг. 7. Кратко, белковая полоса при около 140 кДа, соответствующая присутствию фактора транскрипции CTCF, была видна для всех 4 образцов, на которые воздействовали магнитными частицами, покрытыми антителом против CTCF (анти-CTCF). Напротив, ни для одного из тех же 4 образцов, подвергнутых воздействию магнитных частиц, покрытых неспецифическим IgG мыши (НСП-IgG), полоса видна не была. Это указывает на то, что примененный способ ChIP позволил селективно выделить циркулирующий фактор транскрипции CTCF из всех 4 исследованных объединенных образцов. Это также демонстрирует чистоту фона, получаемую при

примененном режиме промывки.

ПРИМЕР 17

[282] CTCF представляет собой фактор транскрипции с цинковыми пальцами. Иммунопреципитацию хроматина (ChIP) фрагментов CTCF-ДНК выполняли в образце перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (2,4 мл, собранной в ПСК Streck Cell-Free DNA), полученной от субъекта с диагнозом рака молочной железы. ChIP выполняли так, как описано выше в примере 16, за исключением того, что образец объемом 2,4 мл разбавляли 0,6 мл буфера для радиоиммунопреципитационного анализа и добавляли 1,5 мг магнитных частиц, покрытых антителом против CTCF. В параллельном контрольном эксперименте 2,4 мл образца перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА инкубировали с магнитными гранулами, покрытыми неспецифическим IgG мыши. Магнитные гранулы были разделены на 2 фракции. Одну фракцию использовали для анализа способом вестерн-блота, который подтвердил присутствие белка CTCF на гранулах с использованием фрагментированного хроматина из клеток рака молочной железы MCF7 в качестве положительного контроля.

[283] Вторую фракцию (тестируемых и контрольных) гранул использовали для выделения и анализа ДНК. Перекрестное сшивание фрагментов хроматина, ассоциированных с магнитными гранулами, с ассоциированной ДНК обращали вспять путем нагревания в течение 15 мин при температуре 95°C. Затем ДНК, ассоциированную с магнитными гранулами, выделяли с использованием коммерчески доступного набора для экстрагирования ДНК (Qiagen QIAamp DSP circulating NA kit) в соответствии с инструкциями производителя.

[284] Выделенную бкДНК амплифицировали для получения одноцепочечной библиотеки для секвенирования с использованием коммерчески доступного набора (Claret Bio SRSLY NGS Library Prep Kit) в соответствии с инструкциями производителя, с использованием 16 циклов амплификации. Библиотеки амплифицированных тестируемых и неспецифических фрагментов бкДНК анализировали способом электрофореза с использованием биоанализатора. Полученные результаты (фиг. 8) показывают, что амплифицированная библиотека бкДНК, полученная из магнитных частиц, покрытых специфическим антителом против CTCF, содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о. Обратите внимание, что острый пик на электрофореграмме при около 140 п. о.

отображает собой димер адаптера, поэтому связанные с адаптером фрагменты размером 175-220 п. о. отображают собой фрагменты бкДНК размером 35-80 п. о. Главный пик фрагментов бкДНК, лигированных с адаптером, наблюдался при около 190 п. о., что соответствует фрагментам бкДНК длиной около 50 п. о. Хотя библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о., не все эти фрагменты были связаны с CTCF в образце, поскольку небольшие фрагменты ДНК были также получены для амплифицированных экстрактов с твердых носителей, покрытых неспецифическим IgG мыши. Однако специфический пик, полученный посредством ChIP с помощью специфического антитела против CTCF (1000 единиц флуоресценции [ЕФ]) был выше, чем пик неспецифического IgG (80 ЕФ). Данный образец отправили на секвенирование.

ПРИМЕР 18

[285] Амплифицированную библиотеку бкДНК получали из перекрестно-сшитого образца плазмы крови с ЭДТА (собранного в ПСК Streck cfDNA), полученного от пациента с диагностированным колоректальный раком (КРР), путем иммунопреципитации против CTCF, как описано в примере 17 выше. Амплифицированную библиотеку бкДНК, выделенную с помощью иммунопреципитации против CTCF, секвенировали способами секвенирования нового поколения Illumina NovaSeq.

[286] Секвенированные считывания, каждое из которых репрезентативно для фрагмента бкДНК, выравнивали с референсным геномом GRCh38/hg38 человека с использованием конвейера для биоинформатики Illumina DRAGEN Bioinformatics pipeline (<https://emea.illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html>). Любые невыравнивающиеся считывания отбрасывали. Полученные файлы выравнивания BAM использовали для создания подмножеств фрагментов разного размера (35-80 п. о., 135-155 п. о. и 156-180 п. о.) с помощью Sequence Alignment/Map SAMtools (Li *et al*, 2009). Охват считывания (число найденных фрагментов, охватывающих определенный локус гена) рассчитывали с использованием размера бина в 1 п. о. (максимально возможное разрешение). Охват считывания нормализовали к общему числу считываний, картированных с геномом человека, с помощью RPGC (число считываний на охват генома) с использованием deepTools bamCoverage. Графики профиля охвата (фиг. 9 и 10) генерировали для каждого размера фрагмента с использованием deepTools plotProfile (Ramírez *et al*, 2016).

[287] Результаты для охвата локусов 9780 опубликованных сайтов связывания CTCF (Kelly *et al*, 2012) короткими фрагментами размером 35-80 п. о., ассоциированными с CTCF, по сравнению с охватом более длинными фрагментами бкДНК, соответствующими размерам, ожидаемым для ассоциации циркулирующих мононуклеосом (135-155 п. о. и 156-180 п. о.), представлены на фиг. 9(a). Охват показан в диапазоне 5000 п. о., включающем в себя 2500 п. о. выше и ниже местоположения сайта связывания CTCF. Авторы данного изобретения наблюдали сильный пик охвата небольшим фрагментом бкДНК длиной 35-80 п. о., связывающимся точно в геномных положениях локусов ССФТ CTCF, о которых сообщается в работе Kelly *et al*, 2012. Поскольку секвенированная библиотека была получена непосредственно из бкДНК, прикрепленной к белку CTCF, выделенному на магнитных гранулах, покрытых антителом против CTCF, с низким фоном, данная библиотека бкДНК содержала мало нуклеосом, и сигнал позиционирования нуклеосом был низким. Данная функция обеспечивает четкий сигнал при 35-80 п. о. и устраняет необходимость в деконволюции конкурирующих сигналов в смешанных образцах (например, образцах, содержащих смешанные фрагменты бкДНК, происходящие из гемопоэтических и раковых тканей). Напротив, библиотека бкДНК, полученная для связывания с неспецифическим IgG мыши, не продемонстрировала пик в локусах ССФТ CTCF (фиг. 9(b)).

[288] Большое число белков может связываться с ССФТ или вблизи них, включительно с фактором транскрипции или любой комбинацией множества совместно связывающихся факторов транскрипции, энхансеров транскрипции, репрессоров или других регуляторных белков. Главным преимуществом способа согласно данному изобретению является то, что известно, что охват локусов ССФТ CTCF небольшими фрагментами бкДНК касается только фрагментов бкДНК, ассоциированных с CTCF. В отличие от этого способы, известные в данной области техники, например, способов фрагментации согласно Snyder *et al*, 2016, и Ulz *et al*, 2019, картируют все фрагменты бкДНК всех размеров, выделенные из плазмы крови с ЭДТА, и предоставляют данные о том, происходило или не происходило связывание белка в каком-либо конкретном местоположении генома. Какой белок был задействован, неизвестно, поскольку первым этапом всех подобных способов является извлечение бкДНК, что влечет за собой диссоциацию всех нуклеопротеиновых фрагментов хроматина (включительно с нуклеосомами и комплексами фактор транскрипции – ДНК) в образце и, следовательно,

уничтожает любую прямую информацию, связывающую какие-либо конкретные последовательности бкДНК с каким-либо конкретным фактором транскрипции или другим белком.

[289] Назначение пиков последовательностей фрагментов бкДНК по отношению к входному неспецифическому контролю привело к CTCF в качестве фактора транскрипции с большинством фрагментов последовательности ССФТ. Назначение пиков выполняли по файлам BAM с использованием узких пиков MACS2 (Zhang *et al*, 2008). Файлы пиков были использованы для обнаружения сайтов связывания фактора транскрипции с помощью инструмента findMotifGenome из пакета программного обеспечения Homer Software package (Heinz *et al*, 2010).

[290] Затем авторы данного изобретения повторили анализ для обогащения 1041 ССФТ CTCF, занятых в иммортализованных раковых клетках (Liu *et al*, 2017). Результаты, представленные на фиг. 10(a), демонстрируют, что наблюдался отчетливый пик связывания фрагмента бкДНК, ассоциированного с CTCF, размером 35-80 п. о. с 1041 специфической для онкологических заболеваний последовательностью ССФТ CTCF. В отличие от фрагментомики, фрагменты бкДНК, участвующие в анализе, происходят только из комплексов CTCF-ДНК, а не из других комплексов фактор транскрипции – ДНК или кофактор – ДНК, если они не включают в себя CTCF. Это демонстрирует занятость CTCF в специфических для онкологического заболевания локусах и, следовательно, также указывает на происхождение опухолевых клеток для тех фрагментов бкДНК и комплексов CTCF-ДНК, из которых они происходят. Пик для более длинных фрагментов бкДНК (размером с нуклеосому) отсутствовал. Библиотека бкДНК, полученная для связывания с неспецифическим IgG мыши, пик не продемонстрировала (фиг. 10(b)).

[291] Демонстрация того, что CTCF-ассоциированные фрагменты бкДНК были связаны со специфическим для рака локусом ССФТ, в биологической жидкости с помощью ChIP-Seq указывает на наличие онкологического заболевания у обследуемого субъекта и таким способом может применяться в качестве биомаркера. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что способы согласно данному изобретению являются успешными для ChIP-Seq факторов транскрипции в плазме крови и в качестве биомаркера заболевания.

ПРИМЕР 19

[292] Рецептор андрогена (AR) является фактором транскрипции с цинковыми пальцами, представляющим интерес при раке предстательной железы. Авторы данного изобретения применили к AR тот же способ, который описан для CTCF в примере 17. Авторы данного изобретения использовали антитело мыши против AR для иммунопреципитации AR из образцов перекрестно-сшитой плазмы крови с ЭДТА (собранных в ПСК Streck cfDNA), собранных у 8 субъектов, у которых был диагностирован рак предстательной железы. Авторы данного изобретения выполнили анализ способом вестерн-блота для белка, выделенного способом ChIP на твердофазном носителе, используя AR из клеток линии рака предстательной железы LnCAP в качестве положительного контроля. Результаты, представленные на фиг. 11 показывают, что белковая полоса, соответствующая AR с молекулярной массой около 100 кДа, присутствовала во всех 8 образцах и с высокими уровнями в 2 образцах (дорожки 2 и 3 на фиг. 11). Полоса около 50 кДа соответствует связыванию меченого антитела против IgG мыши с тяжелой цепью антитела мыши против AR, использованного для ChIP. Затем авторы данного изобретения выделили ДНК из твердофазных носителей, лигировали выделенные фрагменты ДНК с адаптерными олигонуклеотидами и амплифицировали присутствующую ДНК. Полученные результаты (фиг. 12) показывают, что библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о. (фрагменты, связанные с адаптерами, длиной 175-220 п. о.) для всех 8 образцов. Хотя библиотека амплифицированной бкДНК содержала небольшие фрагменты в диапазоне 35-80 п. о., не все эти фрагменты были связаны с AR в образце, поскольку небольшие фрагменты ДНК были также получены для амплифицированных экстрактов с твердых носителей, покрытых неспецифическим IgG мыши. Библиотеки амплифицированной бкДНК, полученные способом вестерн-блота для 2 образцов с наиболее высокими наблюдаемыми уровнями AR, затем секвенировали способом секвенирования нового поколения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Active Motif, *Nat. Methods* 3: 658 (2006), doi:10.1038/NMETH907
- Bohinski *et al.* *Molecular and Cellular Biology*, 14(9): 5671 (1994)
- Corces *et al.* *Science*, 362(6413): eaav1898 (2018), doi:10.1126/science.aav1898.
- Crowley *et al.* *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10: 472-484 (2013), doi:10.1038/nrclinonc.2013.110
- Darnell, *Nat. Rev. Cancer* 2: 740-749 (2002), doi:10.1038/nrc906
- Deligezer *et al.* *Clinical Chemistry* 54:7 1125–1131 (2008)
- Dunbar, *Clinica Chimica Acta* 363 (1-2) : 71-82 (2006), doi.org/10.1016/j.cccn.2005.06.023

- Gurel *et al.* Am J Surg Pathol, 34(8):1097-105 (2010), doi:10.1097/PAS.0b013e3181e6cbf3.
- Heinz *et al.* Mol. Cell 38(4): 576-89 (2010), doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.004.
- Holdenrieder & Stieber, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 46(1):1-24 (2009), doi:10.1080/10408360802485875
- Hu *et al.* J. Trans. Med. 17: 124 (2019), doi:10.1186/s12967-019-1871-x
- Jung *et al.* Clin. Chim. Acta 411(21-22): 1611-24 (2010), doi:10.1016/j.cca.2010.07.032
- Kelly *et al.* Genome Res. 22: 2497-2506 (2012), doi:10.1101/gr.143008.112.
- Klenova *et al.* Nucleic Acids Res. 25(3): 466–473 (1997), doi.org/10.1093/nar/25.3.466
- Lambert *et al.* Cell 172(4):650-665 (2018), doi:10.1016/j.cell.2018.01.029
- Latil *et al.* Cell Stem Cell 20(2): 191-204.e5 (2017), doi:10.1016/j.stem.2016.10.018.
- Lee *et al.* J. Mol. Med. (Berl). 85(12):1393-404 (2007), doi: 10.1007/s00109-007-0237-7
- Li *et al.* Bioinformatics 25(16): 2078–2079 (2009), doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Lin *et al.* PLoS Genet. 3(6):e87 (2007), doi:10.1371/journal.pgen.0030087.eor
- Liu *et al.* Oncotarget 8(69): 114183-114194 (2017), doi: 10.18632/oncotarget.23172
- Liu *et al.* EBioMedicine 41: 345-356 (2019), doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.010
- Maenhaut *et al.* 2015 In: Feingold, Anawalt, Boyce, et al., editors. Endotext. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285554/>
- Mann *et al.* Curr. Top Dev. Biol. 88: 63-101 (2009), doi:10.1016/S0070-2153(09)88003-4.
- Mansson *et al.* Mol. Oncol. 15(11): 2868-2876 (2021), doi:10.1002/1878-0261.13093
- Matys *et al.* Nucleic Acids Res. 34: D108–D110 (2006), doi:10.1093/nar/gkj143
- Merabet and Mann, Trends Genet. 32(6): 334-347 (2016), doi:10.1016/j.tig.2016.03.004.
- Newman *et al.* Nat. Med. 20(5): 548-54 (2014), doi:10.1038/nm.3519
- Park *et al.* Oncol. Lett. 3(4): 921-926 (2012), doi: 10.3892/ol.2012.592
- Pomerantz *et al.* Nat. Genet. 47(11): 1346-51 (2015), doi:10.1038/ng.3419.
- Poorey *et al.* Science 342(6156): 369-72 (2013), doi:10.1126/science.1242369.
- Ramírez *et al.* Nucleic Acids Res. 44(W1): W160-5 (2016), doi: 10.1093/nar/gkw257
- Ralston, Do transcription factors actually bind DNA? DNA footprinting and gel shift assays. Nature Education 1(1): 121 (2008)
- Sadeh *et al.* Nat. Biotechnol. 39: 586–598 (2021), doi.org/10.1038/s41587-020-00775-6
- Sanchez *et al.* NPJ Genom. Med. 3: 31 (2018), doi:10.1038/s41525-018-0069-0
- Skene and Henikoff, eLife 6:e21856 (2017), doi:10.7554/eLife.21856.002
- Snyder *et al.* Cell 164(1-2): 57-68 (2016), doi:10.1016/j.cell.2015.11.050
- Ulz *et al.* Nat. Commun. 10(1): 4666 (2019), doi:10.1038/s41467-019-12714-4
- Vad-Nielsen *et al.* Lung Cancer 147 : P244-251 (2020),

doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.07.023

Vaquerizas *et al.* *Nat. Rev. Genet.* 10(4): 252-63 (2009), doi:10.1038/nrg2538

Wang *et al.* *Genome Res.* 22(9): 1680-8 (2012), doi: 10.1101/gr.136101.111

Zhang *et al.* *Genome Biol.* 9(9): R137 (2008), doi: 10.1186/gb-2008-9-9-r137

Zhou *et al.* *BMC Genomics* 18(1):724 (2017), doi:10.1186/s12864-017-4115-6

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:
 - (i) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
 - (ii) выявление или измерение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и
 - (iii) применение присутствия или количества фрагмента ДНК в качестве меры количества фрагментов бесклеточного хроматина, содержащих фактор транскрипции, в образце.
2. Способ по п. 1, который включает в себя выделение фактора транскрипции, связанного на этапе (i), из оставшегося образца биологической жидкости до выявления ассоциированного фрагмента ДНК на этапе (ii).
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что этап (ii) включает в себя секвенирование фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции.
4. Способ по любому из пп. 1-3, который дополнительно включает в себя выделение фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции.
5. Способ по п. 4, который дополнительно включает в себя амплификацию выделенного фрагмента ДНК, например, посредством ПЦР.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что фрагмент ДНК, ассоциированный с фактором транскрипции, выявляют и/или измеряют с помощью ПЦР в реальном времени.
7. Способ по любому из пп. 1-6, который дополнительно включает в себя удаление бесклеточных нуклеосом из образца биологической жидкости.
8. Способ по п. 7, который включает в себя приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с нуклеосомами или их

компонентом, и удаление образца, связанного со связывающим агентом, до этапа (ii).

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что фрагмент бесклеточного хроматина состоит из фактора транскрипции и фрагмента ДНК.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что фактор транскрипции, связанный связывающим агентом на этапе (i), промывают буферным раствором, содержащим детергент в концентрации, составляющей по меньшей мере 1%, до выявления ассоциированного фрагмента ДНК на этапе (ii).

11. Способ выявления заболевания у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;

(ii) выявление или измерение ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и

(iii) применение присутствия или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у субъекта.

12. Способ по п. 11, который включает в себя применение фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения наличия заболевания у субъекта.

13. Способ выявления ткани, пораженной заболеванием, у субъекта-человека или субъекта-животного, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;

(ii) секвенирование ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и

(iii) применение присутствия фактора транскрипции и последовательности ассоциированной ДНК в качестве комбинированного биомаркера для определения у субъекта ткани, пораженной заболеванием.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что ткань, пораженная заболеванием, представляет собой орган происхождения.

15. Способ по любому из пп. 11-14, отличающийся тем, что заболевание представляет собой онкологическое заболевание или воспалительное заболевание.
16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что связывающий агент, который связывается с фактором транскрипции, представляет собой антитело или его фрагмент.
17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что образец биологической жидкости представляет собой образец крови, сыворотки крови или плазмы крови.
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что образец биологической жидкости представляет собой образец плазмы крови, полученный следующим образом: (1) приведением образца цельной крови в контакт с перекрестно-сшивающим агентом; (2) приведением перекрестно-сшитого образца в контакт с хелатирующим агентом, содержащим ионы кальция; и (3) выделением плазмы крови из образца.
19. Способ оценки субъекта-животного или субъекта-человека на предмет подходящего медицинского лечения, который включает в себя следующие этапы:
- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта; и
 - (ii) применение уровня ассоциированной ДНК и/или последовательности, выявленных на этапе (i), в качестве параметра для выбора подходящего лечения для субъекта.
20. Способ мониторинга лечения субъекта-животного или субъекта-человека, который включает в себя следующие этапы:
- (i) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта;
 - (ii) повторение выявления, измерения или секвенирования ДНК, ассоциированной с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, в образце биологической жидкости, полученном от субъекта, в одном или большем числе случаев; и
 - (iii) применение любых изменений в уровне ассоциированной ДНК и/или последовательности ДНК, выявленных на этапе (i), по сравнению с этапом (ii) в качестве параметра любых изменений в состоянии субъекта.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что лечение представляет собой лечение онкологического заболевания.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что ДНК, ассоциированную с фрагментом бесклеточного хроматина, содержащим фактор транскрипции, выявляют или измеряют как один из показателей панели анализов.

23. Набор для выявления фрагмента бесклеточного хроматина, содержащего фактор транскрипции и фрагмент ДНК в качестве комбинированного биомаркера, который содержит лиганд или агент связывания для фактора транскрипции, необязательно вместе с реагентами для амплификации и/или секвенирования ДНК, ассоциированной с указанным фактором транскрипции, и/или лиганд или агент связывания для нуклеосом, и/или инструкции по применению набора в соответствии со способом по любому из пп. 1-22.

24. Способ лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает в себя следующие этапы:

(a) приведение образца биологической жидкости, полученной из тела субъекта-человека или субъекта-животного, в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;

(b) выявление, измерение или секвенирование фрагмента ДНК, ассоциированного с фактором транскрипции; и

(c) применение присутствия, количества или последовательности фрагмента ДНК в качестве индикатора наличия онкологического заболевания у субъекта; и

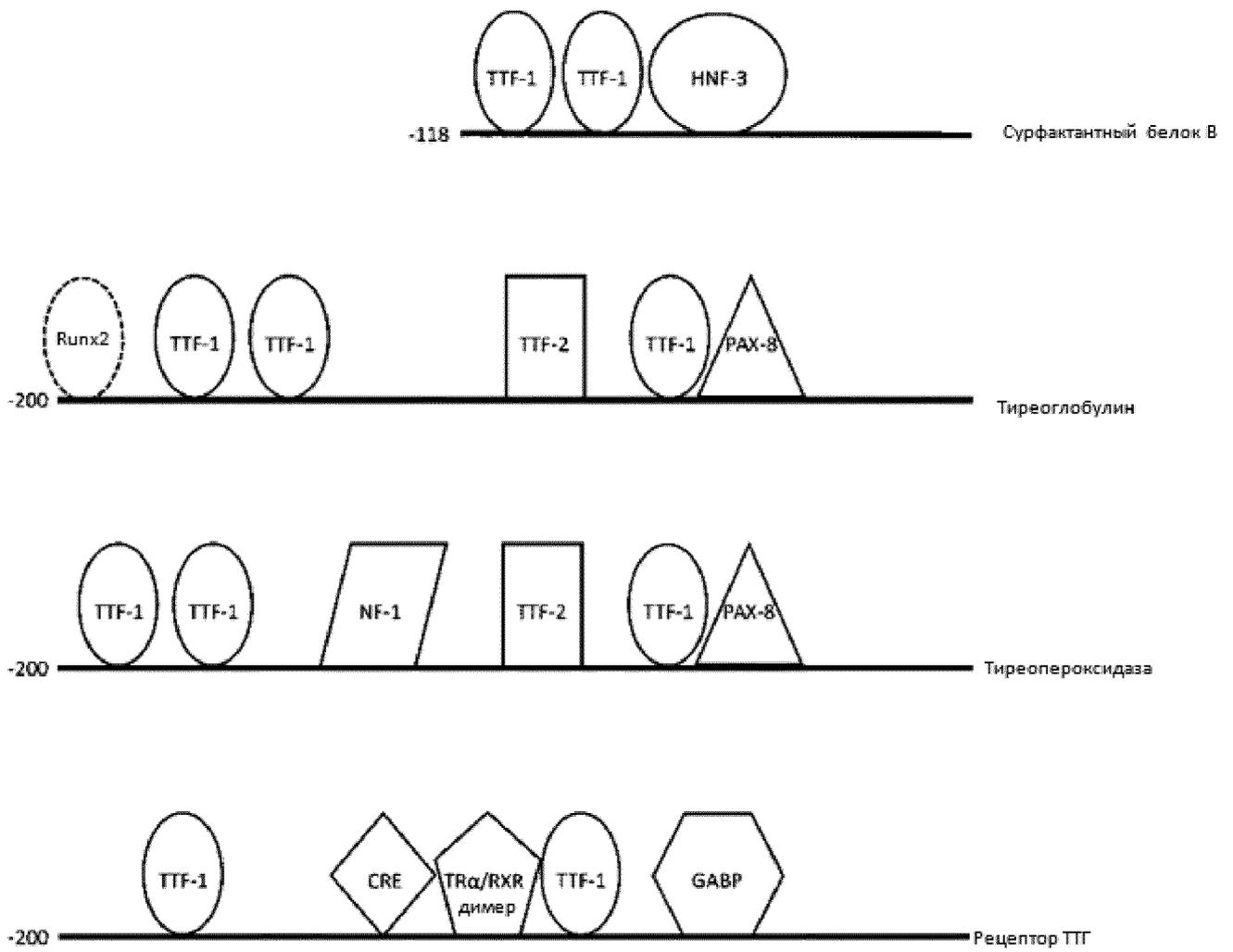
(d) осуществление лечения, если на этапе (c) субъект определен как имеющий онкологическое заболевание.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что лечение выбрано из: хирургического лечения, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и биологической терапии.

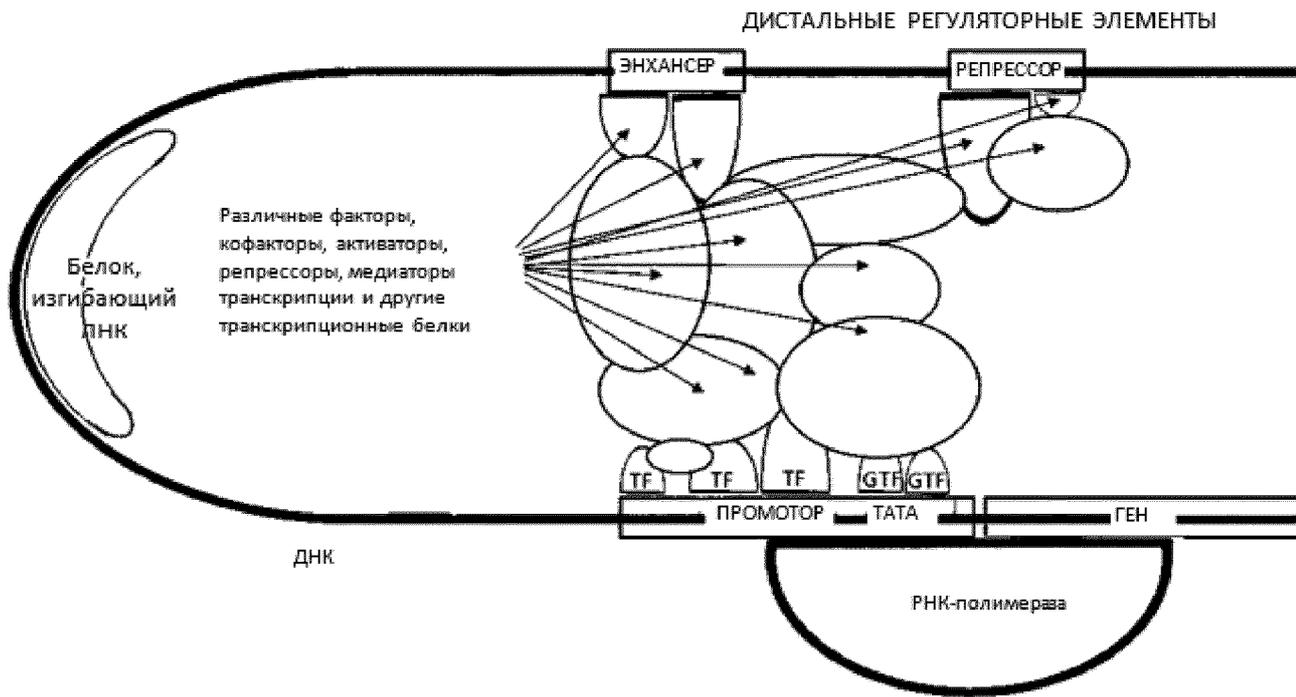
26. Способ выявления заболевания у плода человека или животного, который включает в себя следующие этапы:

(i) получение образца биологической жидкости от беременного субъекта-человека или субъекта-животного;

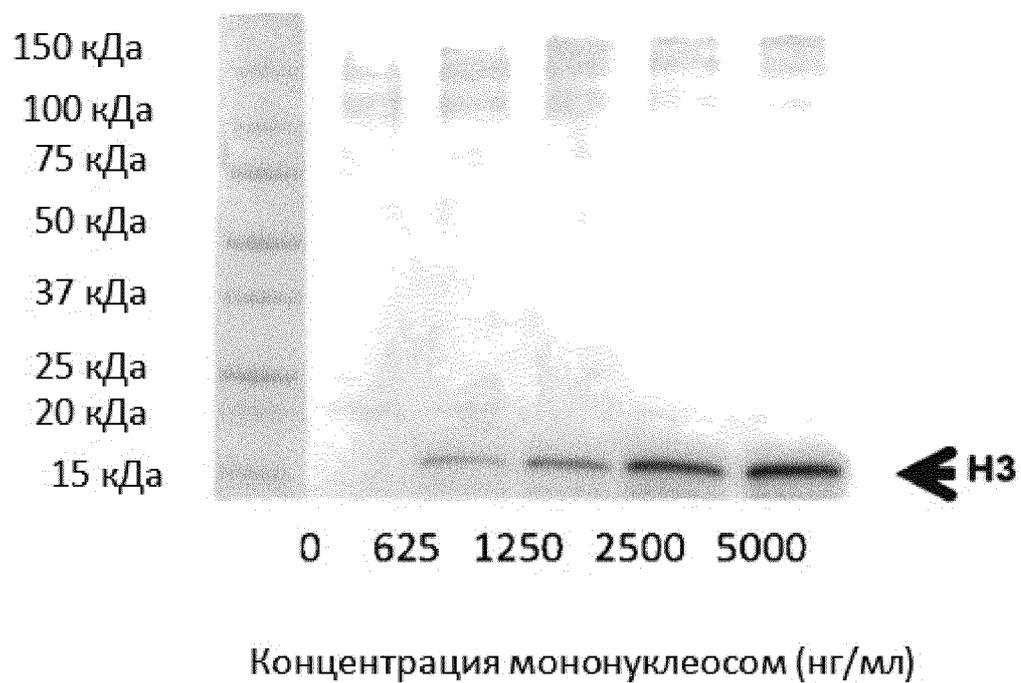
- (ii) приведение образца биологической жидкости в контакт со связывающим агентом, который связывается с фактором транскрипции;
- (iii) выявление, измерение или секвенирование ДНК, ассоциированной с фактором транскрипции; и
- (iv) применение присутствия, последовательности или количества ДНК в качестве индикатора наличия заболевания у плода.



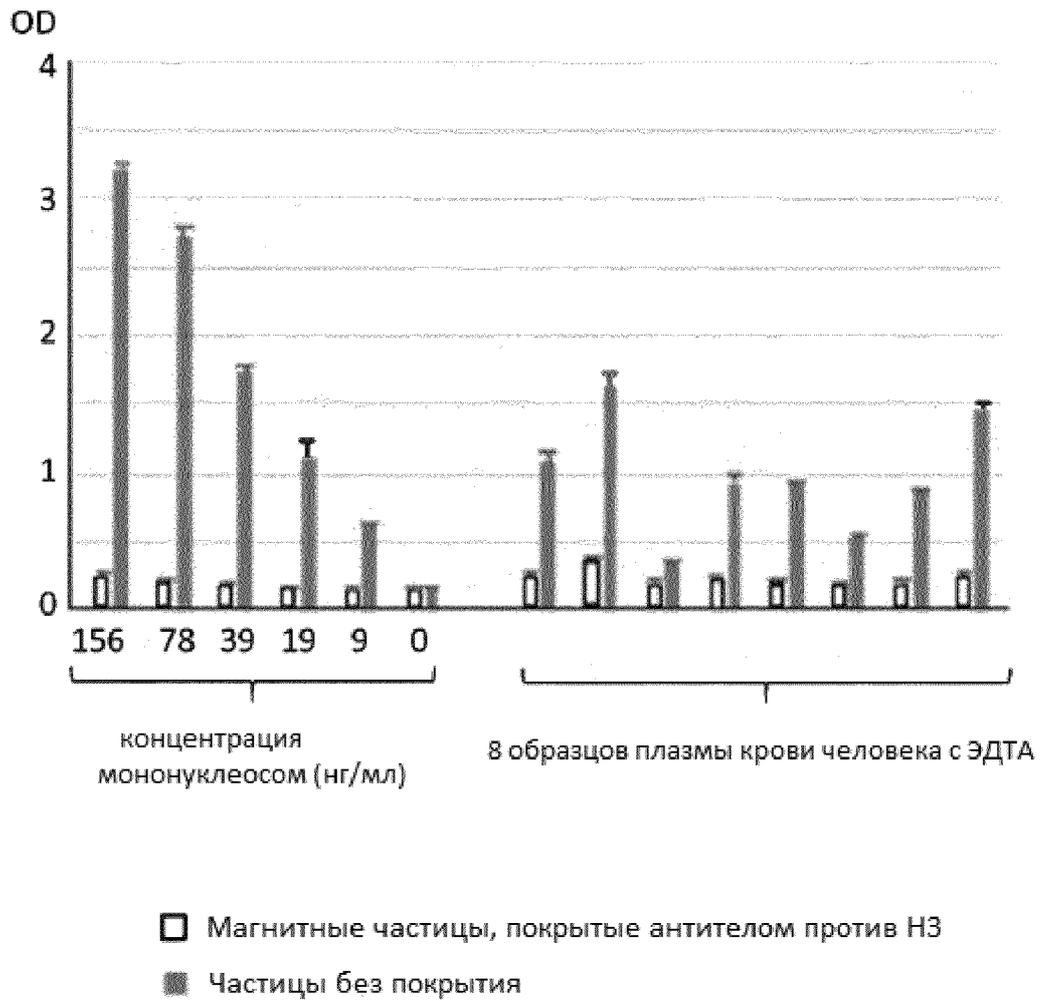
ФИГ. 1



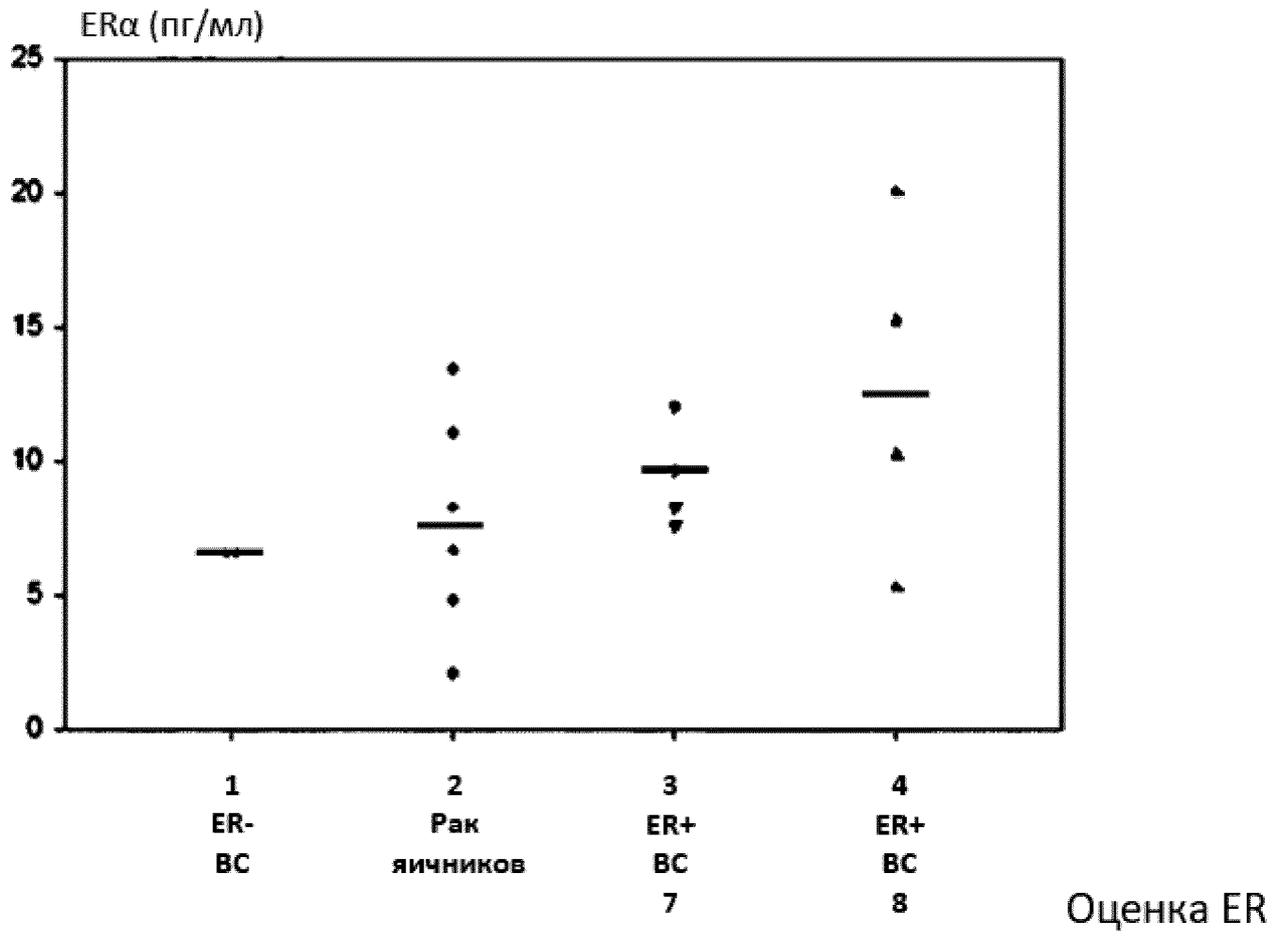
Фиг. 2



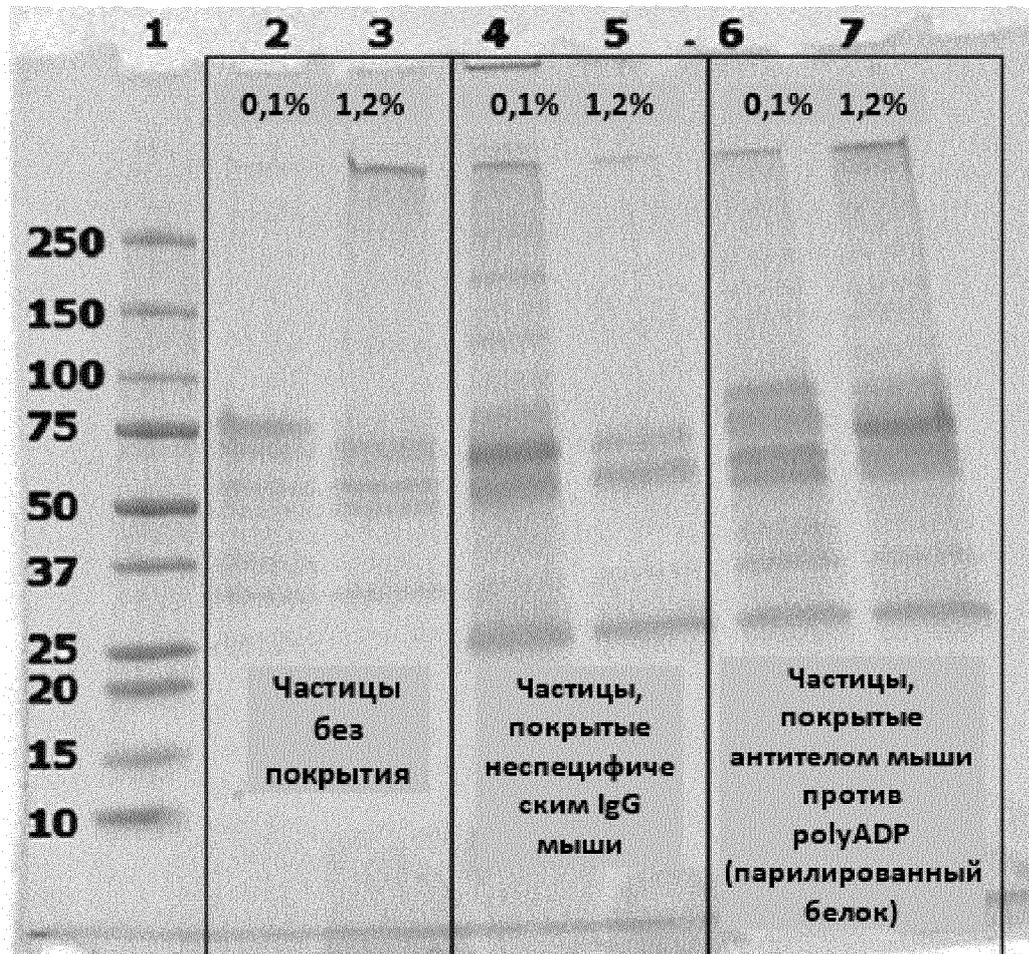
Фиг. 3



ФИГ. 4

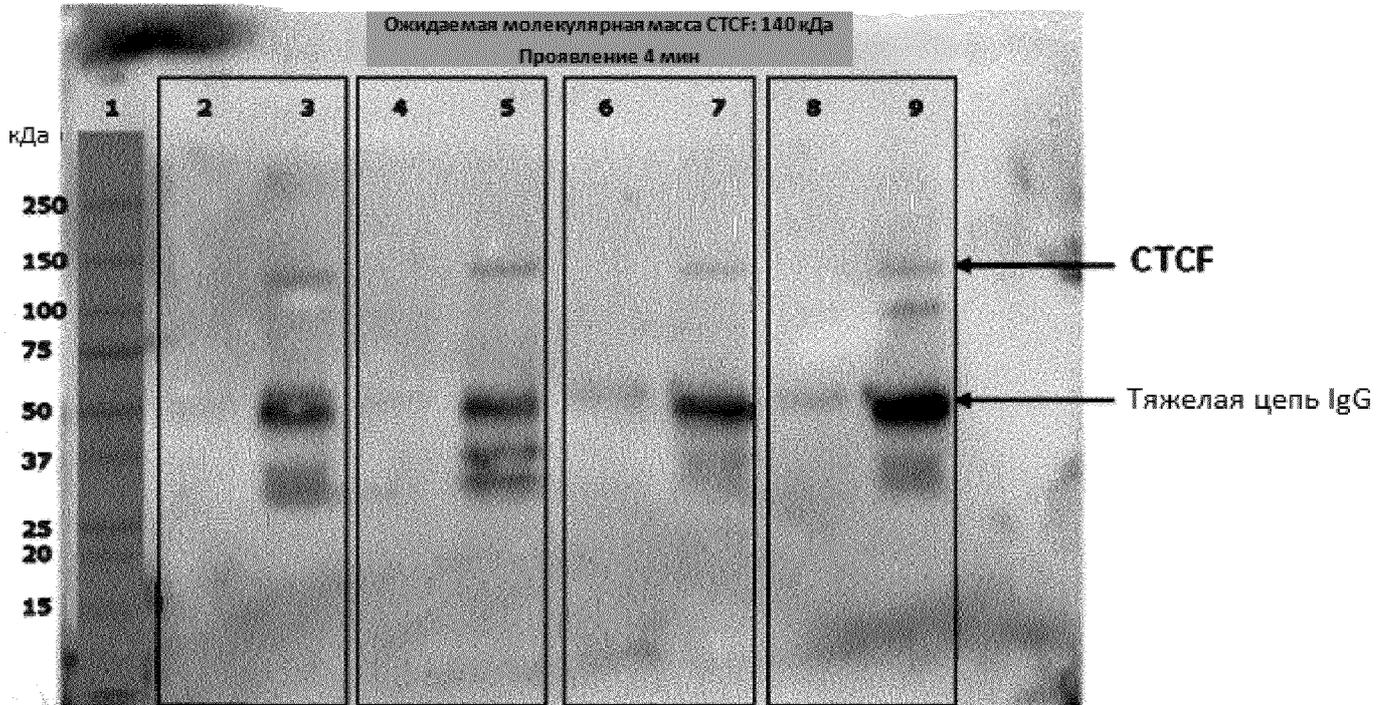


ФИГ. 5



ФИГ. 6

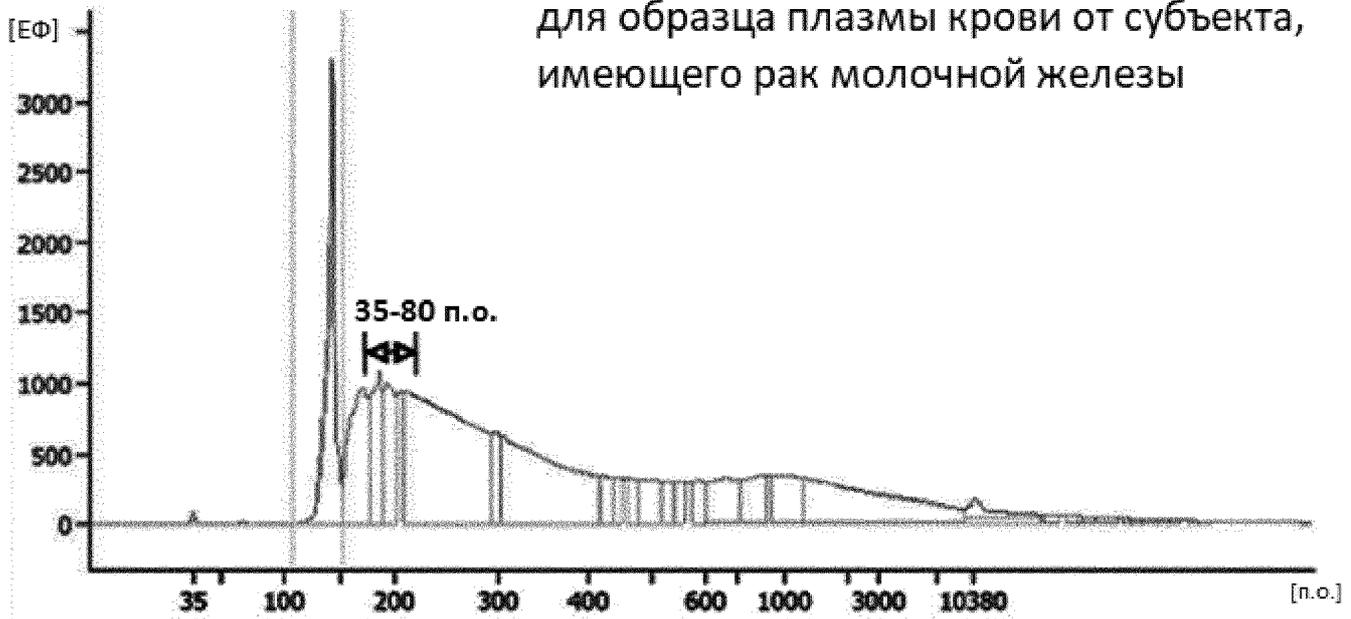
1	ОБРАЗЕЦ 1		ОБРАЗЕЦ 2		ОБРАЗЕЦ 3		ОБРАЗЕЦ 4	
ЛЕСТ НИЦА	НСП- IgG	Антитело против СТСФ	НСП- IgG	Антитело против СТСФ	НСП-IgG	Антитело против СТСФ	НСП- IgG	Антитело против СТСФ



ФИГ. 7

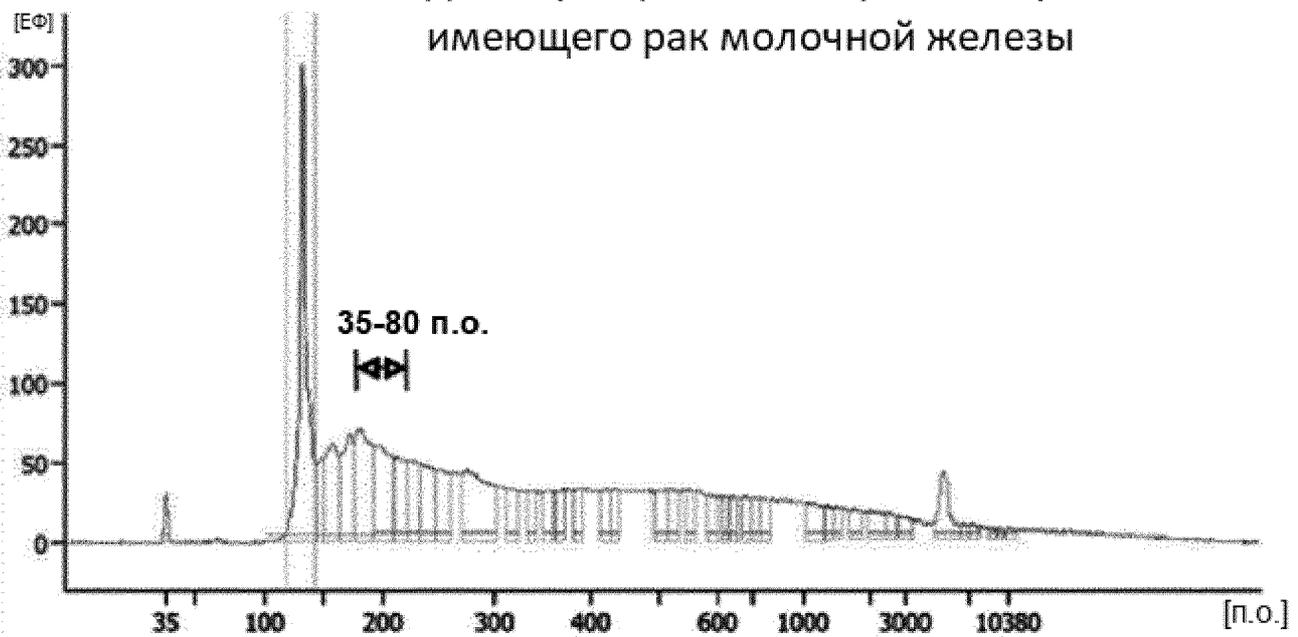
(a)

Электрофореграмма с антителом против СТСФ
для образца плазмы крови от субъекта,
имеющего рак молочной железы



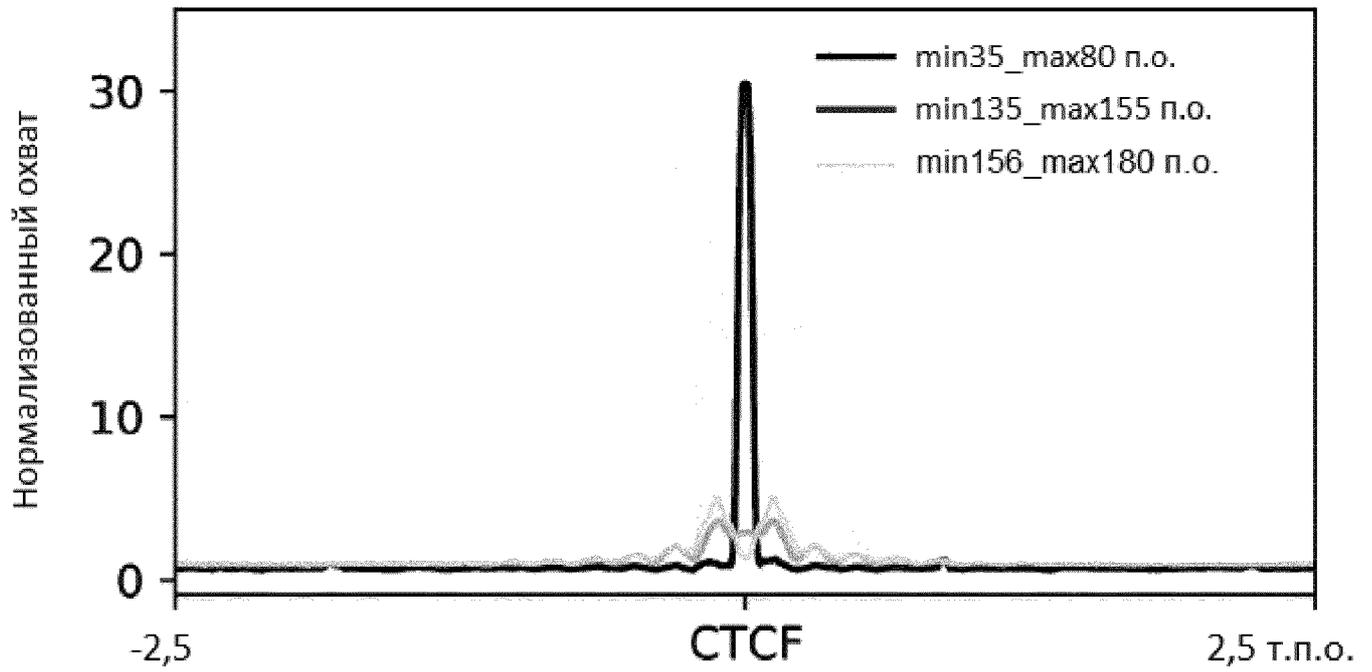
(b)

Электрофореграмма с неспецифическим IgG
для образца плазмы крови от субъекта,
имеющего рак молочной железы

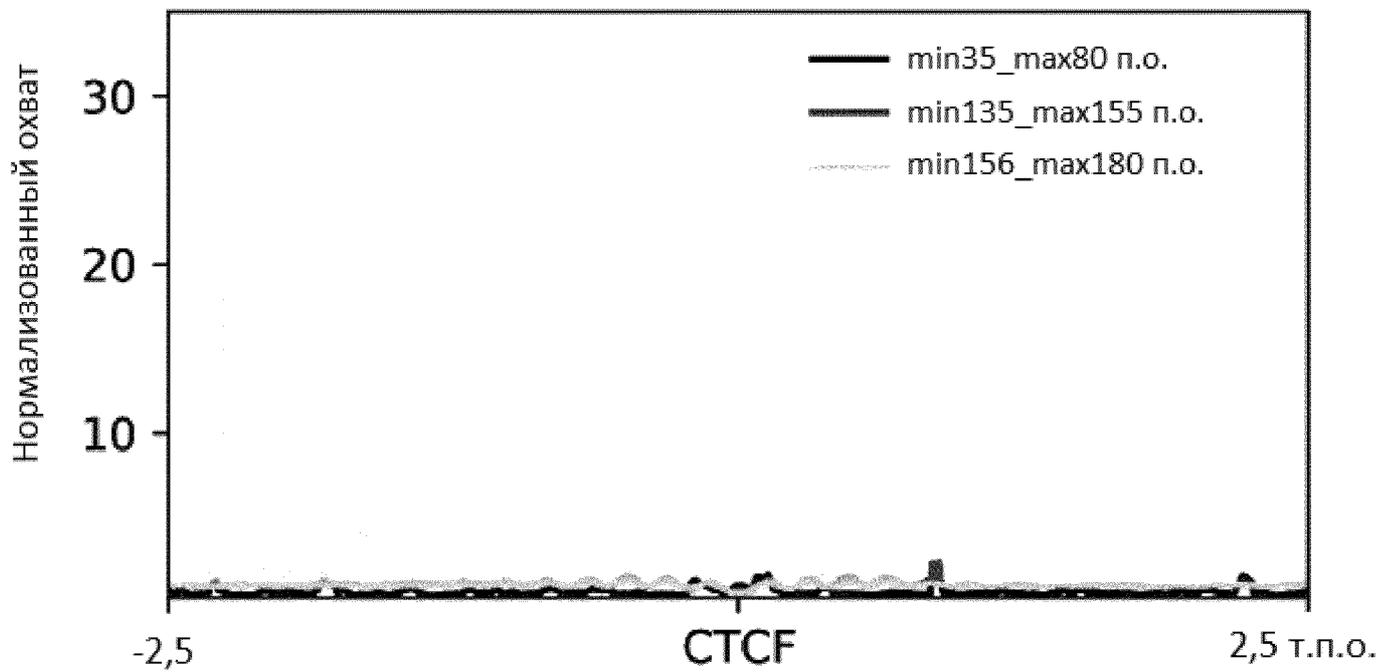


ФИГ. 8

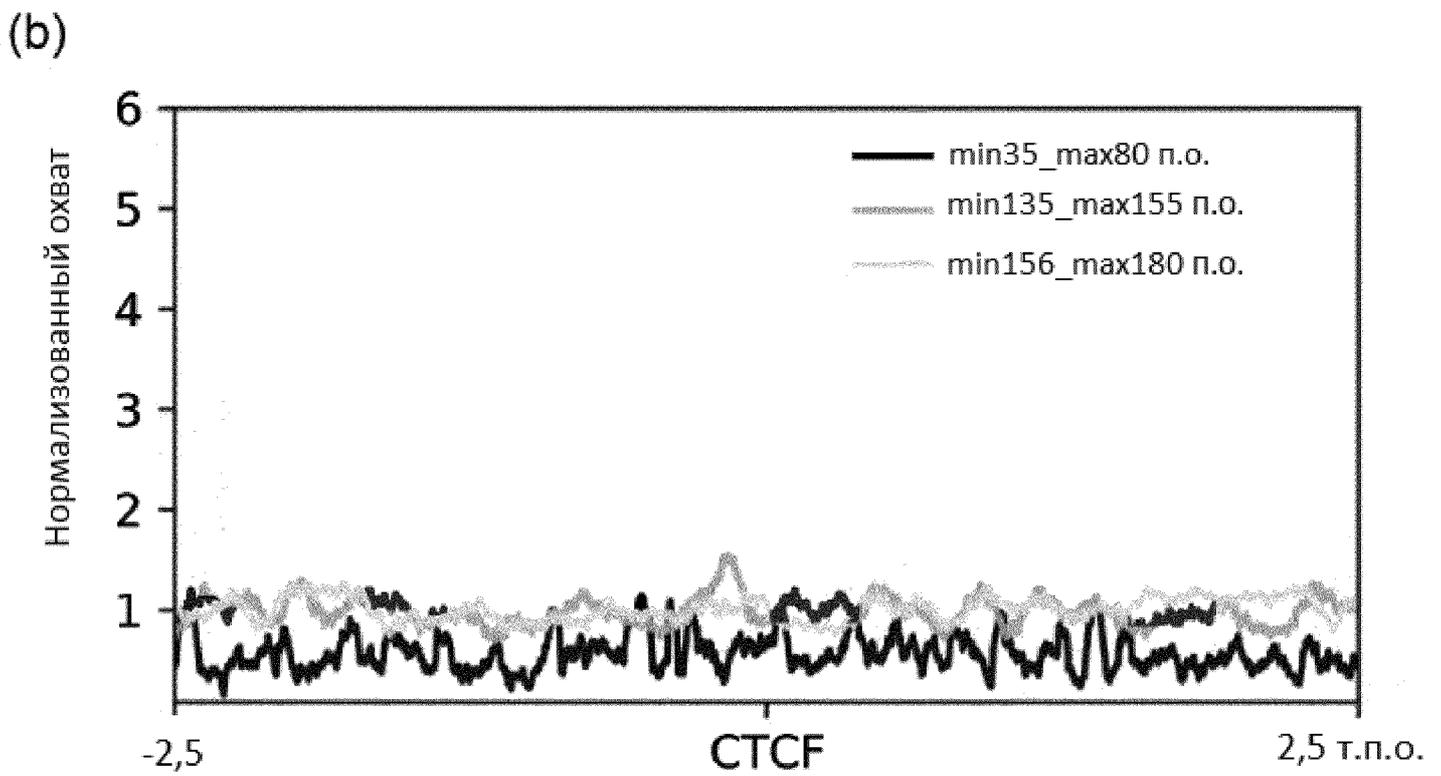
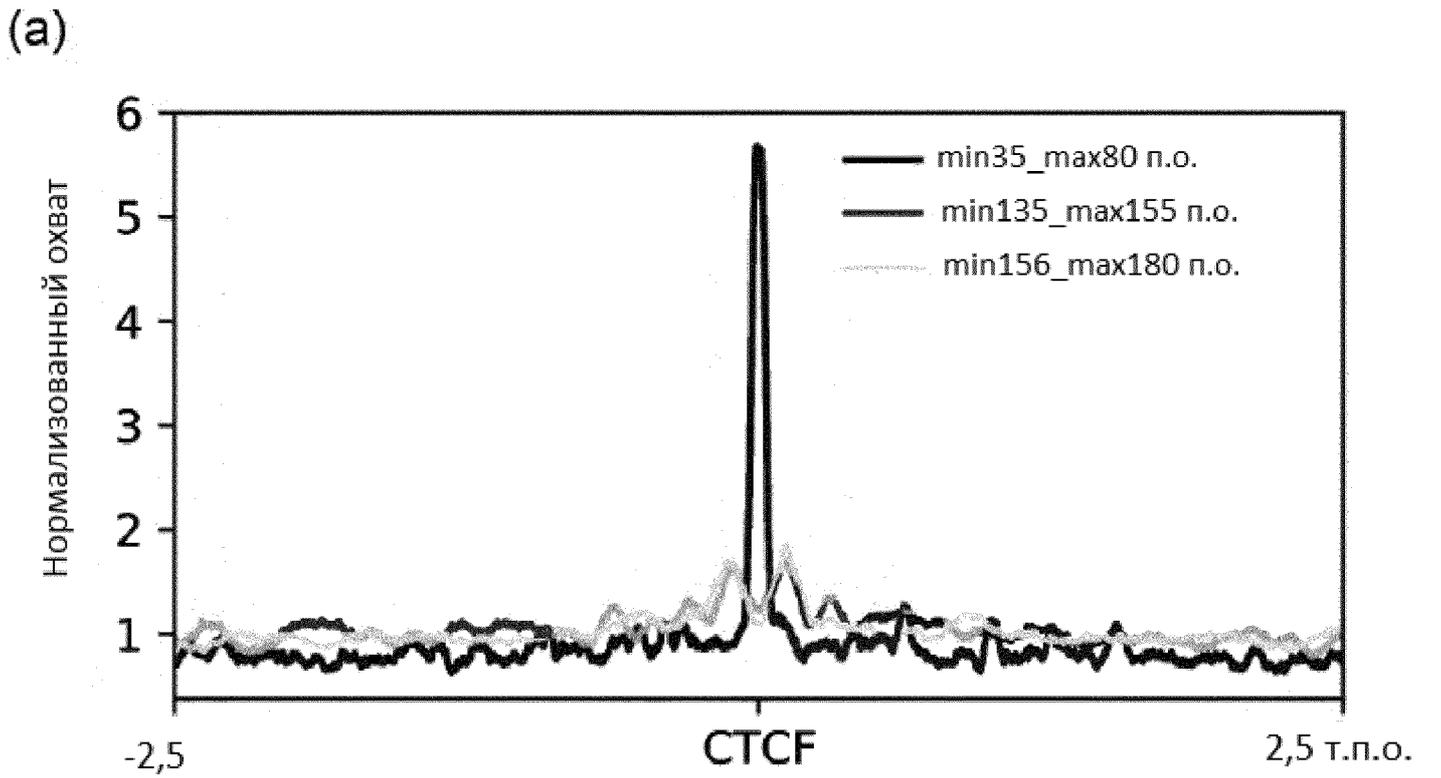
(a)



(b)



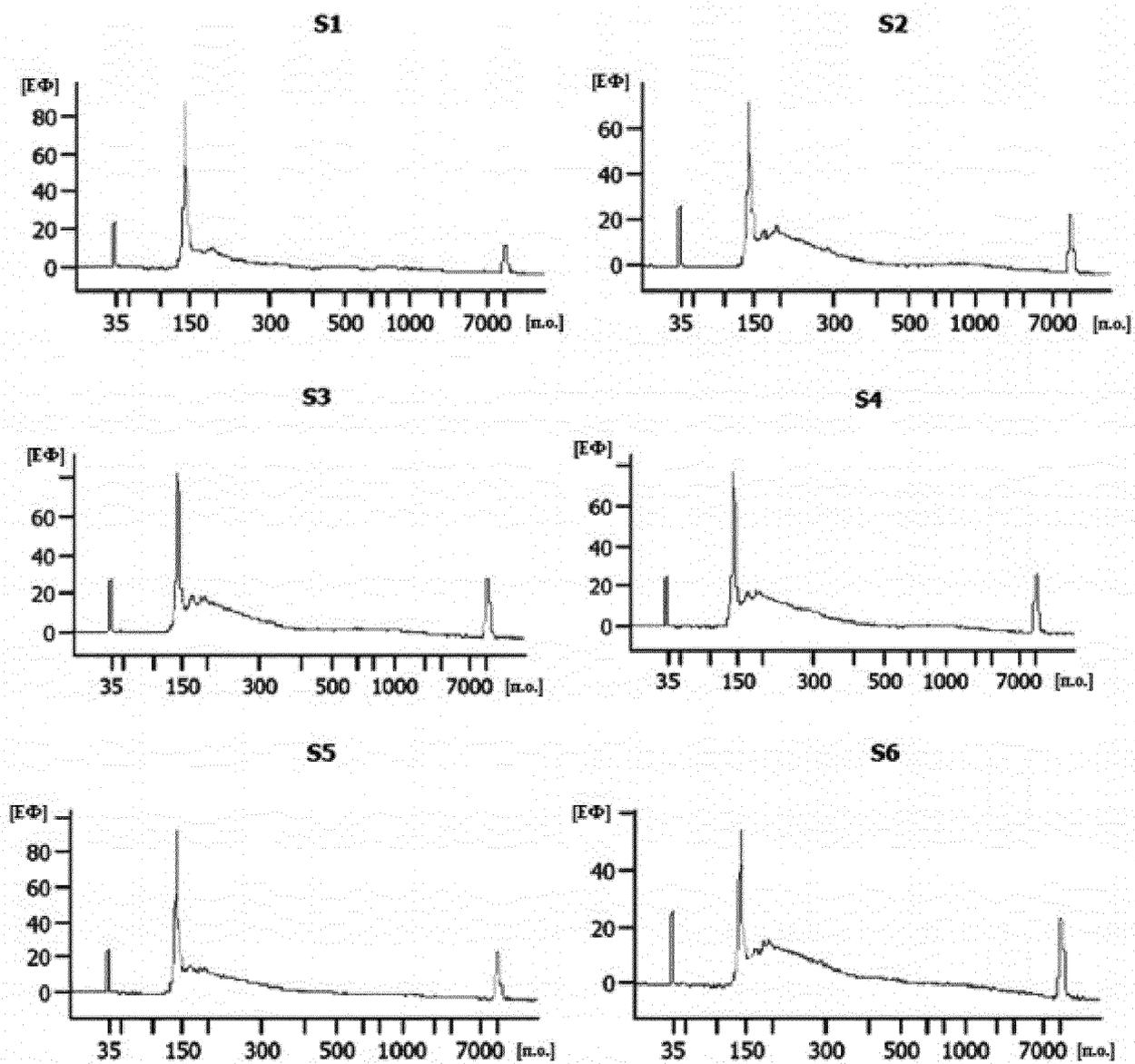
ФИГ. 9



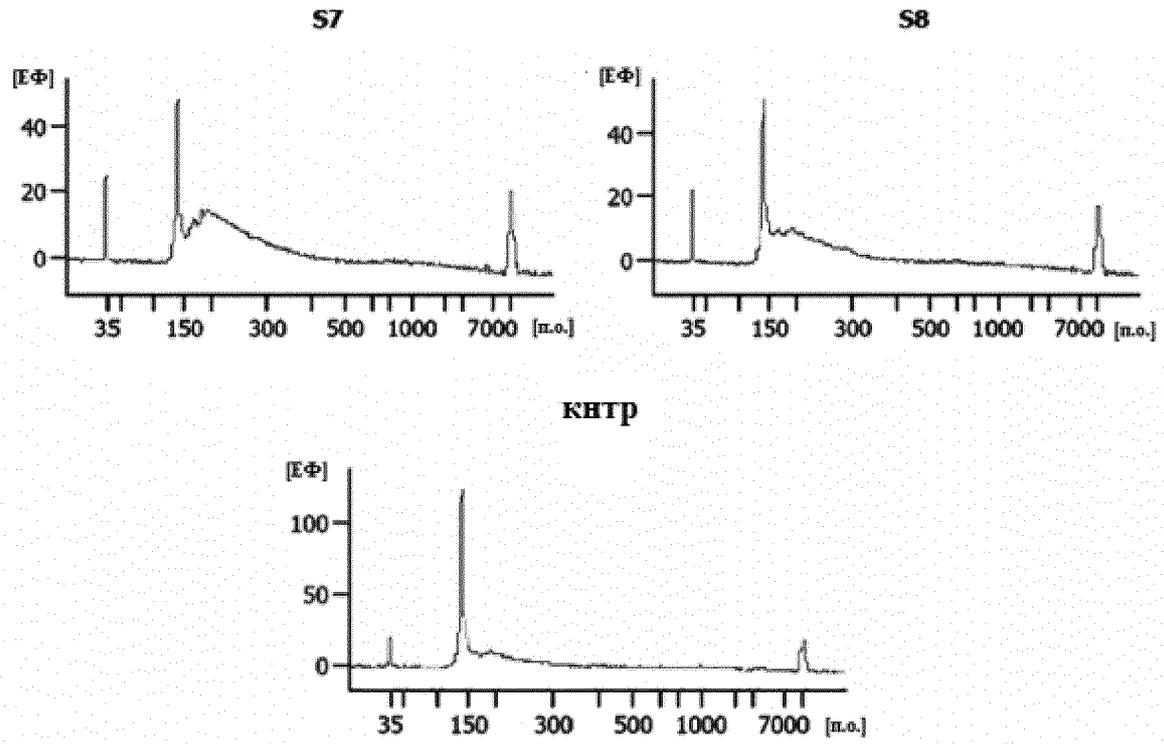
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



Фиг. 12 (продолжение)