



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0116548  
(43) 공개일자 2019년10월14일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><b>C12Q 1/6841</b> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><b>C12Q 1/6841</b> (2018.05)<br/><b>C12Q 2565/101</b> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 <b>10-2019-7028974(분할)</b></p> <p>(22) 출원일자(국제) <b>2016년06월23일</b><br/>심사청구일자 <b>없음</b></p> <p>(62) 원출원 <b>특허 10-2017-7035975</b><br/>원출원일자(국제) <b>2016년06월23일</b><br/>심사청구일자 <b>2017년12월13일</b></p> <p>(85) 번역문제출일자 <b>2019년10월02일</b></p> <p>(86) 국제출원번호 <b>PCT/EP2016/064631</b></p> <p>(87) 국제공개번호 <b>WO 2016/207325</b><br/>국제공개일자 <b>2016년12월29일</b></p> <p>(30) 우선권주장<br/>15001845.5 2015년06월23일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)<br/>(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인<br/><b>지토비전 게엠베하</b><br/>독일 브레머하펜 피슈카이 1 (우: 27572)</p> <p>(72) 발명자<br/><b>마르그라프-로갈라, 피에르</b><br/>독일 28816 스투어 미텔슈트라쎄 11<br/><b>하우케, 스벤</b><br/>독일 28203 브레멘 바그트슈트라쎄 18아</p> <p>(74) 대리인<br/><b>특허법인 남앤남</b></p> |
|--|--|

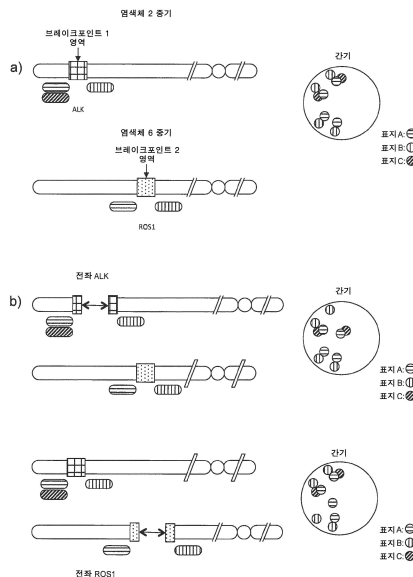
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **염색체 이상의 검출 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵 속에서 염색체 및/또는 DNA 영역을 검출함으로써 반응계내 하이브리드화를 사용하여 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 및 바람직하게는 구조적 염색체 이상을 확인하는 방법에 관한 것이다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류  
C12Q 2565/102 (2013.01)

(30) 우선권주장  
15002075.8 2015년07월13일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
15002200.2 2015년07월24일  
유럽특허청(EPO)(EP)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

반응계내 하이브리드화가 간기(interphase)/반응계내 하이브리드화로서 수행되고,

반응계내 하이브리드화가 서로 상이하고 각각의 예에서 제1의 검출 표지로 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들로 수행되며, 여기서 특히 적어도 하나의 혼합된 시그날의 생성의 경우, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나는 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로 하여, 제1의 검출 표지와 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시됨으로써, 시그날 양식이 생성되며,

존재하는 염색체 이상(chromosome abnormality)들은 시그날 양식을 사용하여 확인하고/하거나 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 지정함을 특징으로 하는,

반응계내 하이브리드화(*in situ* hybridization)에 의해, 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 핵/핵들 속에서 염색체 영역들 및/또는 DNA 영역들의 검출에 의해, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상의 검출 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 제1의 검출 표지들이 각각의 예에서 서로 동일하거나 상이하고/하거나;

상기 염색체 이상들이 서로 독립적인 염색체 이상들이고/이거나 상기 염색체 이상들이 상호적이고/이거나 상기 염색체 이상들이 상호적인 염색체 이상들 및/또는 서로 의존적인 염색체 이상들과 관련되지 않고/않거나 관련되고/되거나;

서로 상이한 적어도 하나, 특히 다수의 염색체 이상들이 샘플 속의 다수의 가능한 염색체 이상들 중에서 검출되고/되거나 측정되고/되거나, 여기서 서로 상이한 적어도 2개, 특히 다수의 염색체 이상들이 샘플 속에서 동일한 시간에, 특히 동시에 다수의 가능한 염색체 이상들 중에서 검출되고/되거나 측정되고/되거나, 상기 방법이 서로 상이한 다수의 염색체 이상들의 동시 검출을 위한 멀티플렉스 방법(multiplex method)으로서 수행되는, 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

염색체 이상들이 적어도 하나의 혼합된 시그날, 특히 다수의 혼합된 시그날들에 의해 시그날 양식으로 확인되고/되거나 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 지정되고/되거나;

추가 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들을 표시하는 것이 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 일어나며, 여기서 추가의 검출 표지들로 표시된 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 각각의 예에서, 시그날 양식으로, 서로 상이한 혼합된 시그날들을 생성하고/하거나, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 추가 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들을 표시하는 것이 일어나며, 여기서 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 특이적인 혼합된 시그날은 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 시그날 양식으로 모든 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 생성되고/되거나, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 추가 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 것이 일어나며, 이러한 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역은 특이적인 혼합된 시그날을 사용하여, 시그날 양식으로 검출될 모든 염색체 이상에 대해 지정되고/되거나;

적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 우선적으로 적어도 5개, 특히 우선적으로 적어도 6개, 매우 특히 우선적으로 적어도 7개의 추가 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 첫번째 것보다 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되고/되거나, 여기서 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 특이적인 혼합된 시그날은 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 우선적으로 적어도 5개, 특히 우선적으로 적어도 6개, 매우 특히 우선적으로 적어도 7개의 추가 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들에 의해

시그널 양식으로 생성되는, 방법.

**청구항 4**

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서,

각각의 예에서, 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역 (breakpoint region)을 플랭크하고, 여기서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 유전자 자리-특이적인 하이브리드화 프로브들은 서로 상이한 검출 표지들로 표시됨으로써, 융합 시그널이 각각의 예에서, 특히 염색체 이상이 존재하지 않는 경우에, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 시그널 양식으로 생성되고;

특히 첫번째 것과 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브가 특히 염색체 이상이 존재하지 않는 경우에, 염색체 단편, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브와 함께, 혼합된 시그널 및 융합 시그널을 시그널 양식으로 생성하고/하거나,

특히 첫번째 것과 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 상기 하이브리드화 프로브, 및 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 각각의 예에서, 단일의 시그널을 시그널 양식으로 생성하고, 특히 여기서 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 상기 하이브리드화 프로브는 특히 염색체 이상이 존재하는 경우에, 혼합된 시그널을 시그널 양식으로 생성하고/하거나,

특히 상기 시그널 양식에서, 염색체 이상들이 혼합된 시그널에 의해, 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역 및/또는 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역에 대해 지정되는, 방법.

**청구항 5**

청구항 4에 있어서,

적어도 6개, 바람직하게는 적어도 8개, 우선적으로 적어도 10개, 특히 우선적으로 적어도 12개, 심지어 보다 우선적으로 적어도 14개의 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 사용되며, 여기서 각각의 예에서 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들은 각각의 예에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하고/하거나, 최대 24개의 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 사용되고, 여기서 각각의 예에서, 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들은 각각의 예에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하고/하거나,

추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들을 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시하는 것이 시그널 양식으로, 검출될 각각의 플랭크된 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역, 및/또는 검출될 각각의 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이 융합 시그널 및 혼합된 시그널을 사용하여, 확인되고/되거나 지정될 수 있는 방식으로 일어나는, 방법.

**청구항 6**

청구항 4 또는 청구항 5에 있어서,

(a) 검출 표지 A로 표시된 제1의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 및 검출 표지 B로 표시된 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하고, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 A-B를 생성하며,

(b) 2 내지 12개의 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 6개 이하의 추가의 염색체 분절들, 특히 브레이크포인트 영역들을 플랭크하며, 여기서 또한, 각각의 예에서,

염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 하나가 검출 표지 A로 표시되고, 각각의 예에서, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 하나가 검출 표지 B로 표시됨으로써, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 각각의 예에서, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식의 융합 시그널 A-B를 생성하며,

(c) 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나, 바람직하게는 다수의 것들이 적어도 하

나의 추가의 검출 표지 X로 표시됨으로써, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널들 및 혼합된 시그널들 A-B/X를 생성하며,

여기서, 염색체 이상들에서 상기 융합 시그널들 및 혼합된 시그널들 A-B/X가 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 혼합된 시그널 A/X 및/또는 B/X로 변화되고/되거나,

여기서, 염색체 이상들에서 상기 융합 시그널들 A-B가 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 단일의 시그널들 A 및/또는 B로 변화됨으로써,

염색체 이상들이 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식을 사용하여, 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들에 의해 플랭크된, 염색체 영역 및/또는 DNA 영역 및/또는 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역에 지정되고;

특히 여기서 상기 검출 표지 X가 단일의 검출 표지, 특히 검출 표지  $X_1$ 에 의해 형성되고/되거나,

특히 여기서 상기 검출 표지 X가 서로 상이하고, 바람직하게는 검출 표지들  $X_1, X_2, \dots$  및/또는  $X_n$ (여기서, 지수 "n"은 1 내지 20, 특히 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 5로부터의 자연수를 나타낸다)의 그룹으로부터 선택된 다수의 검출 표지들에 의해 형성되며, 특히 여기서 상기 검출 표지  $X_1, X_2, \dots$  및/또는  $X_n$ 가 서로 상이한 혼합된 시그널들, 특히 서로 상이한 비들의 특이적인 혼합된 시그널들을 생성하기 위해 사용되고/되거나,

특히 여기서, 상기 검출 표지 X가 서로 상이하고, 바람직하게는 검출 표지들  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5$  및/또는  $X_6$ 의 그룹으로부터 선택된 다수의 검출 표지들에 의해 형성되며, 특히 여기서 상기 검출 표지들  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5$  및/또는  $X_6$ 가 서로 상이한 혼합된 시그널들, 특히 서로 상이한 비들의 특이적인 혼합된 시그널들을 생성하기 위해 사용되고/되거나,

여기서 제1 단계에서, 상기 제1의 검출 표지들에 의해 생성된 융합 시그널들이 검출되고/되거나 분석되고, 후속적인 단계에서, 단일의 시그널들이 발생하는 경우, 상기 혼합된 시그널들의 검출 및/또는 분석 및 검출된 염색체 영역들 및/또는 DNA 영역들에 대한 이들의 지정이 일어나고/나거나, 여기서 상기 시그널 양식의 검출이 컴퓨터-보조된 분석에 의해 일어나는, 방법.

### 청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중의 어느 한 항에 있어서,

단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출될 상기 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이, 5Mbp 미만, 특히 2Mbp 미만, 바람직하게는 1Mbp 미만, 우선적으로 750kbp 미만, 특히 우선적으로 500kbp 미만의 길이를 갖고/갖거나, 여기서 단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출될 상기 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이 적어도 500bp, 특히 적어도 1kbp, 바람직하게는 적어도 5kbp, 우선적으로 적어도 10kbp를 가지고/가지거나 여기서 단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이 500bp 내지 5Mbp의 범위, 특히 1kbp 내지 2Mbp의 범위, 바람직하게는 5kbp 내지 1Mbp의 범위, 우선적으로 10kbp 내지 750kbp의 범위, 특히 우선적으로 10kbp 내지 500kbp의 범위의 길이를 갖고/갖거나;

상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 핵산 단편들의 형태, 특히 폴리뉴클레오타이드들, 변형된 폴리뉴클레오타이드들, 변형된 핵산 단편들, 올리고뉴클레오타이드들 및/또는 올리고뉴클레오타이드들의 형태로 존재하고/하거나 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 각각의 예에서 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역을 포함하는, 단일의 핵산 단편에 의해, 각각의 예에서 형성되고/되거나;

상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 각각의 예에서, 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역을 각각 포함하는, 다수의 핵산 단편들("프로브 단편들")에 의해 형성되고, 특히 여기서 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 상기 개개의 핵산 단편들("프로브 단편들")이 5 내지 2,000bp의 범위, 특히 10 내지 1,500bp의 범위, 바람직하게는 50 내지 1,000bp의 범위의 길이를 갖고/갖거나;

혼합된 시그널들의 생성을 위해, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편들("프로브 단편들")이 제1의 검출 표지와 함께, 당해 제1의 검출 표지와는 상이한 추가의 검출 표지로 표시되고/되거나;

혼합된 시그널들의 생성을 위해, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편들("프로브 단편들")이

제1의 검출 표지와 함께, 당해 제1의 검출 표지와는 상이한 다수의, 특히 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10 개, 우선적으로 2 내지 5개의 검출 표지들로 표시되는, 방법.

**청구항 8**

청구항 1 내지 청구항 7 중의 어느 한 항에 있어서,

(i) 하이브리드화-특이적인 프로브의 개개의 핵산 단편들이 단지 하나의 검출 표지로 표시되고, 특히 여기서 이는 제1의 검출 표지 및/또는 모든 추가의 검출 표지로 이루어질 수 있고/있거나,

(ii) 하이브리드화-특이적인 프로브의 개개의 핵산 단편들이 서로 상이한 다수의 검출 표지들로 표시되고, 특히 여기서 이는 제1의 검출 표지 및/또는 어떠한 추가의 검출 표지로 이루어질 수 있으며,

특히 여기서 또한 가능성들 (i) 및 (ii)의 조합들은 혼합된 시그널들을 초래하고/하거나

특히 심지어 최대 3Mbps, 특히 최대 2.5Mbps, 바람직하게는 최대 2Mbps, 우선적으로 최대 1Mbps, 특히 우선적으로 최대 500kb, 심지어 보다 우선적으로 최대 200kb의 거리에서, 혼합된 시그널들이 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 개개의 하이브리드화된 핵산 단편들을 사용하여 생성되고/되거나,

특히 여기서 서로 구별될 수 있는 혼합된 시그널들이 서로 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들에서, 서로 상이한 양 비들로 동일한 검출 표지들을 사용함에 의해 생성될 수 있는, 방법.

**청구항 9**

청구항 1 내지 청구항 8 중의 어느 한 항에 있어서,

검출 표지가 다음 염료들: 염료 기질들, 화학발광성 염료들, 특히 아크리디늄; 방사성동위원소들; 회전 표지들; 효소들, 특히 알칼린 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 대두 퍼옥시다제 및/또는 베타-갈락토시다제; 합텐들, 특히 디콕시게닌, 바이오틴, 2,4-디니트로페놀, 5(6)-카복시플루오레세인, 로다민, 브롬 데옥시우리딘, 아세틸아미노플루오렌, 트리니트로페놀, 트리니트로페놀 유도체들, 에스트라디올 및/또는 2,4-디니트로페놀; 양자점(Quantum Dot)들; 비드들; 아미노핵실렌; 페렌들; 및/또는 플루오레세인 염료들, 특히 플루오레세인, 플루오레세인 유도체, 5(6)-카복시플루오레세인, 코우마린, 코우마린 유도체, 로다민, 로다민 유도체, 테트라메틸 로다민, 리싸민, 텍사스 레드(Texas Red), AMCA, TRITC, IR 염료, 알렉사 염료(Alexa dye), 다이오믹스 염료(Dyomics dye), 피코에리트린들, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 퍼시픽 블루(Pacific Blue) 및/또는 로다민 그린(Rhodamine Green)의 그룹으로부터 선택되고/되거나;

상기 반응계내 하이브리드화가 특히 형광성 반응계내 하이브리드화(FISH)에 의해, 하이브리드화 프로브들의 직접적인 표시로 일어나고/나거나, 상기 반응계내 하이브리드화가 특히 가시성의, 적외선 및/또는 자외선 방출들 범위, 바람직하게는 방출들 영역들 그린, 오렌지/적색, 적색, 금색 및/또는 청색용 형광성 염료들을 사용한 상기 하이브리드화 프로브들의 표시로 일어나고/나거나 여기서 상기 반응계내 하이브리드화가 특히 명-시야/반응계내 하이브리드화(BrISH)에 의해, 하이브리드화 프로브들의 직접적인 표시로 일어나고/나거나 여기서 상기 반응계내 하이브리드화가 합텐들, 특히 바이오틴, 디콕시게닌 및/또는 DNP를 사용한 하이브리드화 프로브들의 표시, 및 항체-커플링된 알칼린 포스파타제, 항체-커플링된 퍼옥시다제 및/또는 항체-커플링된 베타-갈락토시다제에 의한 후속적인 검출로 일어나고/나거나;

상기 염색체 이상들이 전좌들, 역위들, 분절 중복들(segmental duplications), 결실들, 삽입들, 중복들, 이수성들 및 증폭들, 특히 전좌들 및/또는 역위들이고/이거나;

상기 염색체 이상들이 질병들, 특히 악성 종양들, 바람직하게는 암종들, 육종들 및/또는 백혈병들과 관련되어 있고/있거나;

상기 염색체 이상들이 유전자들 ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B, TGF, BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1, RUNX1T1, EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6, WT1, HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS 및/또는 VHL 중의 하나 이상에서 존재하는, 방법.

**청구항 10**

서로 상이하고 각각의 예에서, 제1의 검출 표지로 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들을 포함하며, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나는 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로 하여, 첫번째 것과는 상이한, 추가의 검출 표지로 표시된, 염색체 이상들, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상들, 바람직하게는 구조적 염색체 이상들을, 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속의 염색체 영역들 및/또는 DNA 영역들의 검출에 의해, 특히 청구항 1 내지 청구항 9 중의 어느 한 항에 따른 방법에 의해 검출하기 위한 조성물.

**청구항 11**

염색체 이상들, 특히 악성 종양들, 바람직하게는 암종들, 육종들 및/또는 백혈병들, 특히 우선적으로 폐 종양들, 림프종들, 백혈병들, 육종들, 유방 암종들 및/또는 결장 암과 관련된 질병들의 예방학적 및/또는 치료학적 치료 및/또는 진단 및/또는 예후시 사용하기 위한 조성물로서,

여기서 상기 조성물은 서로 상이하고 각각의 예에서, 제1의 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 하이브리드화 프로브들을 포함하고, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나는 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로 하여, 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되는, 조성물.

**청구항 12**

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 청구항 10에 따라 구성되고/되거나 청구항 1 내지 청구항 9 중의 어느 한 항에 따른 방법을 수행하기 위해 의도되고/되거나 사용된, 조성물.

**청구항 13**

반응계내 하이브리드화에 의한, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속에서 염색체 영역들 및/또는 DNA 영역들의 검출에 의한, 특히 청구항 1 내지 청구항 9 중의 어느 한 항에 따른 방법에 의한, 염색체 이상들, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상들, 바람직하게는 구조적 염색체 이상들의 검출을 위한, 조성물, 특히 청구항 10 내지 청구항 12 중의 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

**청구항 14**

염색체 이상들, 특히 악성종양들, 바람직하게는 암종들, 육종들 및/또는 백혈병들, 특히 우선적으로 폐 종양들, 림프종들, 백혈병들, 육종들, 유방 암종들 및/또는 결장 암과 관련된 질병들의 진단 및/또는 예방을 위한, 서로 상이하고, 제1의 검출 표지로 각각 표시된, 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들의 용도로서, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나는 바람직하게는 청구항 1 내지 청구항 9 중의 어느 한 항에 따른 방법의 영역 내에서, 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로 하여, 첫번째 것과 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되는 용도.

**청구항 15**

서로 상이하고 제1의 검출 표지로 각각 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들을 포함하는, 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속에서 염색체 영역들 및/또는 DNA 영역들의 검출에 의해, 염색체 이상들, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상들, 바람직하게는 구조적 염색체 이상들을 검출하기 위한 키트(부분들 또는 세트의 키트)로서, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들 중 적어도 하나는 각각의 하이브리드화 프로브를 참고로 하여, 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되고,

특히 여기서 상기 키트는 청구항 1 내지 청구항 9 중의 어느 한 항에 따른 방법을 수행하기 위해 의도되고/되거나 사용되며, 특히 여기서, 서로 상이한 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 일반적인 조성물, 특히 청구항 10에 따른 조성물 속에 존재하거나, 여기서

서로 상이한 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브들이 별도의 조성물들 속에 존재하여, 서로 분리되는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

**배경**

[0002] 본 발명은 염색체 기형 또는 염색체 이상에 대한 검출 방법의 기술 분야에 관한 것이다.

[0003] 특히, 본 발명은 반응계내 하이브리드화(*in situ* hybridization)에 의한 염색체 이상의 검출 방법에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 염색체 이상의 검출에 적합한 조성물, 및 본 발명에 따른 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 검출 표지(detection label)로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브(locus-specific hybridization probe)의 용도이다. 최종적으로, 염색체 이상의 검출용 키트(kit)가 본 발명의 목적이다.

**배경 기술**

[0004] 많은 중앙 질병은 전좌(translocation), 역위(inversion), 분절 중복(segmental duplication), 결실, 삽입, 중복, 이수성(aneuploidy), 및 증폭과 같은 구조적 및 수치적 염색체 돌연변이를 기반으로 한다. 예측적이거나, 예후적이거나 차등적인-진단 마커로서 이들 변화의 검출은 일반적으로 반응계내 하이브리드화(ISH)에 의해 일어난다.

[0005] 반응계내 하이브리드화는 핵산 단일 쇠, 특히 DNA 단일 쇠의 상보성 염기의 하이브리드화 또는 쌍형성(pairing)을 기반으로 하므로, 샘플, 특히 조직 또는 세포 제체 속에서 특이적인 핵산 서열이 검출될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 직접 또는 간접적으로 표시된, 합성적으로 생산된 프로브는 샘플의 핵산 단일 쇠와 하이브리드화된 후 검출된다.

[0006] 검출 목적을 위해, 형광성-표시된 핵산 단편 또는 형광성-표시된 하이브리드화 프로브(fluorescent ISH: FISH)가 사용될 수 있다. 더욱이, 항원-표시된 프로브, 특히 합텐(hapten)-표시된 프로브가 사용될 수 있으며, 이는 색 반응에 의해, 항체를 사용하여 후속적으로 가시성으로 되므로, 광학 현미경 분석이 가능하다((명 시야 ISH(BrISH), 색소생산성 ISH(CISH), 은 ISH(SISH)).

[0007] FISH의 장점은, 다수의 계놈 반응이 동시에 검출될 수 있으므로 다른 것로부터 구별될 수 있다는 것이다. 이러한 목적을 위해, 상이한 계놈 영역에 초점을 맞추거나 이들에 대해 특이적인 핵산 단편이 표시되거나 각각의 예에서, 이들의 흡수 스펙트럼 및/또는 방출 스펙트럼의 측면에서 서로 상이한, 상이한 형광성 염료와 커플링된다. 별도의, 상이한 단일 프로브를 포함하는, 이러한 다수의-색상 프로브가 중기(metaphase)-염색체 제조에서 또는 간기(interphase) 세포 핵 제조시 사용되는 경우, 개개의 색상은 제체 위에 정밀하게 정의된 과장 범위의 광을 수행하여 염료를 여기시키고, 또한 염료에 의해 방출된 정밀하게 정의된 과장 범위의 광을 평가기(evaluator)(단일 밴드패스 여과기 세트로 불림)에 대해 수행하는, 특수한 현미경 필터의 사용에 의해 서로 별도로 나타낼 수 있다. 더욱이, 상이한 형광성 염료의 동시 묘사 및 이에 의한 다수의 핵산 단편의 동시 묘사를 허용하는 필터 및 필터 세트들이 또한 존재한다. 2개의 상이한 형광성 염료의 경우에, 예를 들면, 이중-밴드패스 필터 세트가 언급된다.

[0008] 그러나, 하나의 표지 만이 특이적인 프로브에 의해 검출되는 계놈 영역 당 사용될 수 있으므로, 동시 묘사의 경우 명확한 한계가 설정된다. 더욱이, 염료의 흡수 및 방출 범위는 종종 서로 매우 근접하므로 이들은 현미경 필터 세트에 의해 서로 분리될 수 없다. 이러한 이유들로 인하여, 일반적으로 단지 2개의 색상(오렌지/적녹색) 또는 3개의 색상(청색 핵 대립-색상(DAPI)과 동시에 또는 함께 오렌지/적녹색)이 FISH에서 동시에 분석된다. 대략적으로 FISH에 대해 묘사될 수 있는 동일한 제한이 또한 BrISH에도 적용된다. 여기서, 당해 분야의 기술 상태는 바이오틴, 디니트로페닐(DNP), 및 디곡시게닌의 그룹으로부터 일반적으로 선택된 2개의 합텐, 및 2개의 항체-커플링된 효소, 일반적으로 알칼린 포스파타제 및 퍼옥시다제를 사용하는 것이다.

[0009] 동시 묘사 또는 분석에서 상기 제한은 유전자자리-특이적인 프로브로 불리는, 여기서 때때로, 반복 서열 프로브로 불리는 것 만을 사용하여 간기에 위치한 세포를 사용한 중앙의 진단을 수행할 수 있는, 구조적 및 수치적 염색체 이상 검출용 프로브의 조성(조성물) 또는 조화에 결정적인 영향을 미친다.

- [0010] 유전자자리-특이적인 프로브는 염색체의 선택된 DNA 분절(segment), 일반적으로 크기가 총 약 1,000kb 이하인, 개개 유전자 또는 근접한 유전자에 초점을 맞추는 것으로 이해되며, 유전자-특이적인 프로브 또는 "단일-카피" 프로브로서 언급된다. 반복된 서열-특이적인 프로브는 반복된 서열에 초점을 맞추므로 크기가 다수 1,000kb인 영역에 초점을 맞추는 프로브이다. 이들 프로브는 또한 예를 들면, 동원체 프로브(centromere probe) 또는 알파-위성 프로브(alpha-satellite probe)를 포함한다.
- [0011] 전좌 및 역위의 검출과 관련하여, 기본적으로 2개의 결정 기술 및 근본적인 프로브 조성물 또는 프로브 조성물이 존재한다: 한편으로는 융합 시그널의 발생 원리(이중-색상-이중-융합 시도로 불림)(WO 02/093130 A2) 및 다른 한편으로는 융합 시그널의 분리(이중-색상-브레이크-어파트(Dual-Color-Break-Apart) 또는 이중-색상-분열 시도(Dual-Color-Split approach)로 불림)의 발생 원리. 이들 2개의 원리의 하기 표시 및 유도된 시그널 양식에서, 정상 세포는 일반적으로 이배체임에, 즉 모든 대립형질이 이배체 속에 존재함에 주목하여야 한다. 일반적으로 2개의 대립형질 중 하나만이 이상(abnormality)에 의해 영향을 받으므로, 각각의 경우에, 이상에 의해 영향 받지 않은 대립형질의 정상 시그널이 또한 비정상 시그널과 함께 가시성으로 된다. 보다 잘 이해하기 위해, 정상 시그널의 단일 양식은 다음에서 항상 명쾌하게 기술되지 않을 것이다.
- [0012] 이중-색상-이중-융합 시도에서, 염색체의 제1의 브레이크포인트(breakpoint)의 영역은 동일한 색상(예를 들면, 오렌지색)의 핵산 단편에 의해 근접하게 및 멀리 플랭크(f flank)되며, 제2의 브레이크포인트의 영역, 즉, 상호간의 전좌 파트너는 제2의 색상(예를 들면, 녹색)의 핵산 단편에 의해 근접하게 및 멀리 플랭크된다. 이와 관련하여, 정상의 상황, 즉, 2개의 전좌 파트너의 영역내 염색체 브레이크가 없는 정상적인 상황은 녹색 및 공간적으로 분리된 오렌지색 시그널에 의해 특징화된다.
- [0013] 상호간의 전좌의 경우에, 브레이크는 전좌 파트너 둘 다의 브레이크포인트 내에서 발생하며, 하나의 전좌 파트너의 근접한 영역은 다른 파트너의 먼 영역과 융합되며 반대로도(vice versa) 융합된다. 따라서, 상이하게 착색된 시그널이 흔히 오버랩되므로, 융합 시그널로 또한 불리는 2개의 녹색/오렌지색 시그널 쌍이 발생한다. 이러한 프로브 기술의 단점은 2개의 전좌 파트너의 브레이크포인트가 각각의 표시된 핵산 단편의 영역 내에 놓여있는 경우에만 융합 시그널이 발생한다는 것이다. 2개의 파트너 중 하나에만 관련된 전좌의 경우에는 융합 시그널이 발생하지 않는다. 이와 관련하여, 전좌에 의해 영향받은 파트너에 대해 특징적인 시그널의 색상을 갖는 추가의 시그널의 형성 만이 발생한다. 이는, 전좌의 브레이크포인트가 녹색 형광단으로 표시된 핵산에 의해 포함된 영역에 놓인 경우에 추가의 녹색 시그널이 발생함을 의미한다. 이러한 프로브 조성물의 단점은, 동일한 전좌 또는 역위의 2개의 브레이크포인트 영역이 사용된 2개의 색상을 사용하여 표시되므로, 특이적인 전좌 또는 역위 만이 검출될 수 있다는 것이다.
- [0014] 이중-색상-브레이크-어파트 시도의 경우에, 브레이크포인트의 영역은 상이하게 표시되거나 색상-표시된 핵산 단편(예를 들면, 먼 오렌지색, 근접한 오렌지색)에 의해 근접하게 및 멀리 플랭크된다. 정상의 상황, 즉, 당해 영역내 염색체 브레이크가 없는 상황이, 이와 관련하여, 융합 시그널에 의해 특징화된다. 비정상적인 상황, 즉 염색체 브레이크가 프로브 단편들 사이에서 발생하는 상황에서는, 시그널이 서로 공간적으로 거의 분리되지 않는다. 따라서, 정상 상황과 비정상 상황 사이의 차이는 상이하게 착색된 시그널 사이의 거리에 의해 특징화된다. 관여하는 전좌 파트너와 관련한 설명은 당해 방법으로는 가능하지 않다. 이는 특이적인 염색체 재배열이 일어났다는 결론 만들 허용한다. 이러한 프로브 조성물의 단점은 하나의 브레이크포인트 영역 만이 및 따라서 하나의 특이적인 전좌 또는 역위 만이 사용된 2개의 색상으로 검출될 수 있다는 점이다.
- [0015] 결실, 이수성 및 증폭에 관한 한, 일반적으로 유전자자리-특이적인 프로브와 관련된, 일반적으로 하나의 결정 기술 및 근본적인 프로브 조성물 만이 사용된다. 그러나, 일부 상황에서, 유전자자리-특이적인 프로브는 또한 예를 들면, 동원체 프로브 또는 알파-위성 프로브와 같은 반복적인-서열-특이적인 프로브로 불리는 것으로 보충된다: 결실, 이수성, 및 증폭의 발생으로 생성되는 시그널의 획득 또는 손실의 검출 원리는 일반적으로 이중-색상-프로브 시도로 불리는 것으로 일어난다. 또한 하기 기술될, 이러한 원리에서, 및 이로부터 유도된 시그널 양식에서, 정상 세포는 일반적으로 이배체임에, 즉, 모든 대립형질이 2개 존재함에 주목하여야 한다.
- [0016] 이중-색상-프로브 시도에서, 2개의 상이한 염색체 영역은 상이하게 표시되거나 색상-표시된 핵산 단편(예를 들면, 오렌지색의 게놈 영역 1 또는 표적 영역 1, 녹색의 게놈 영역 2 또는 표적 영역 2)로 표시된다. 정상적인 상황, 즉, 이들 영역의 획득 또는 손실이 없는 상황은 2개의 오렌지색 및 2개의 녹색 시그널에 의해 특징화된다. 정상 상황에서, 즉, 표적 영역 1 및/또는 2에서 게놈 영역의 획득 또는 손실이 발생한 경우, 보다 적은 녹색 및/또는 오렌지색 시그널이 손실의 경우에 가시성이며, 획득의 경우에는 보다 많은 시그널이 가시성이다. 강력한 유전자 증폭 또는 게놈 영역의 증폭의 경우에, 많은 추가의 시그널이 가시성으로 될 수 있으며,

이는 또한 집단으로 묘사될 수 있다.

- [0017] 상술한 표준 방법 및 표준 조성물, 및 2개의 표준 시그널 또는 2개의 표준 색상의 사용과 관련하여, 따라서, 방법당 하나의(가능한) 이상 만이 구조적 변화의 경우에 검출될 수 있으며, 방법당 최대 2개의(가능한) 이상이 수치적인 염색체 돌연변이의 경우에 검출될 수 있다.
- [0018] 위에서 나열한 2개의 2-색상 적용과는 달리, 3-색상, 드물게는 4-색상 및 매우 드물게는 5-색상 프로브가 또한 FISH 분석에서 사용된다. 정의에 의해, 프로브를 표시하기 위한, 대립-착색없이, 적어도 3개의 상이한 리간드 또는 형광단을 동시 사용하는 방법은 다중색상-FISH 방법(mFISH 방법)이다. 이와 관련하여, 명확하게 보다 강력한 표준 형광성 색상인 오렌지색/적녹색 뿐만 아니라, 추가로 이용가능한 보다 약한 색상, 예를 들면, 금색 또는 금색/노란색 또는 금-착색된, 적색 또는 청색이 사용된다. 이러한 이유로, 일반적으로, 예를 들면, 4-색상 FISH 프로브는 여기서, 예를 들면, 프로브의 표시의 경우에, 청색 및 금색의 색상 강도의 증폭을 위한 반복된 서열로 되돌아가는 것이 가능하기 때문에, 결실 또는 증폭의 검출의 경우에만 사용된다. 이러한 방법은 다른 것들 중에서도 EP 1 035 215 B1, WO 2007/028031 A1, 및 EP 0 549 709B1에 기술되어 있다.
- [0019] 또한, 선행 기술에서, 3중 FISH 시도가 기술되어 있으며, 이는 염색체 영역내에서 다른 것의 바로 다음에 군집할 수 있는(즉, 서로 근처에 위치한 상이한 유전자가 관여되어 있음), 상이한 전좌 사건의 검출에 초점을 맞춘 FISH 시도가 기술되어 있다. 이와 관련하여, 각각의 경우에, 각각의 예에서 역할을 담당하지 않는 제3 색상을 사용하여 단일의 이상을 검출하는, 시그널 양식의 상응하는 평가를 위해, 2개의 색상 만이 분석된다. 3개의 상이한 유전자자리-특이적인 프로브가 사용되며, 이는 각각의 경우에 상이한 표지로 표시된다.
- [0020] 이와 관련하여, 선행 기술에서, 2개 이상의 색상을 사용하는 명-시야(BrISH)가 관여하는 한, 일반적으로 3개의 반복된 염색체 영역의 검출을 목표로 하는 반응계내 하이브리드화에 있어서, 색원체성 삼중자(triple)를 수행하는 것이 기술되어 있다. 당해 분야의 현재의 기술에 따르면, 전좌는, 2개의 합텐 및 따라서 2개의 염료를 사용하는 경우에만 BrISH에 의해 검출된다. 본 출원 WO 2012/150022 A1에서는, 역위의 검출을 위해, 3개의 상이한 색상을 생성하는 3개의 표지인 바이오틴, 디곡시게닌, 및 DNP를 사용하는, BrISH 방법에 의한 3개의 상이한 프로브의 사용을 개시하는 방법이 기술되어 있다.
- [0021] WO 2005/111235 A2는 검출 목적을 위한 3개의 색상의 사용을 포함하는 방법을 기술하고 있다. 그러나, 프로브의 제3 표지에 의해 표시된 염색체 영역은 변화에 의해 직접적으로 영향받지 않으므로, 염색체 구조 변화의 경우에, 제1 융합 시그널이 제거되므로, 새로운 스플릿 시그널(split 시그널) 및 새로운 융합 시그널이 발생한다. 당해 방법은 하나의 표지 만으로 각각 표시된 프로브를 사용한다. 더욱이, 당해 방법을 사용하여, 프로브들에 의해 예정된, 하나의 가능한 전좌 만이 검출될 수 있다.
- [0022] WO 02/093130 A3는 전좌에 관여하는 브레이크포인트 둘 다의 브레이크포인트들을 근접하게 또는 멀리 플랭크하는 2개 또는, 달리는, 4개의 표지 또는 염료를 사용하는, 염색체 전좌의 검출 방법을 개시하고 있다. 당해 방법은 프로브에 의해 플랭크되는 브레이크포인트 영역 내 하나 이상의 전좌를 검출할 가능성을 제공하지 않는다.
- [0023] 따라서, 전체적으로, 당해 분야의 기술로부터 공지된 방법을 사용하여서는 반응계내 하이브리드화에 의해, 세포 또는 조직 속에 존재하는, 다수의 염색체 이상을 동일한 시간에 또는 동시에 효율적으로 검출하는 것이 불가능하다.
- [0024] 반응계내 하이브리드화의 영역 내에서, 정의된 DNA 또는 염색체 영역의 동시 지정 또는 동일한 시간에서의 지정은 지금까지, 사람에서 약 50Mbp 내지 250Mbp의 크기를 갖는 전체 염색체, 또는 보다 큰 염색체 영역, 예를 들면, 염색체 아암(chromosome arm)을 "전체 염색체 페인팅 프로브(Whole Chromosome Painting Probe)"(WCP) 또는 "부분 염색체 페인팅 프로브(Partial Chromosome Painting Probe)"(PCP)라고 불리는 것을 사용하여 검출하는 방법의 경우에만 알려져 왔다. 근본적인 기술, 예를 들면, mFISH(멀티플렉스(multiplex) FISH), SKY-FISH(스펙트럼 핵형분석), 다중색상 FISH, COBRA-FISH(조합된 이원 비 표지 FISH) 또는 또한 24-색상 FISH로, 약 4 내지 7개의 상이한 형광성 염료를 사용하는 총 24개의 상이한 "염색체 쌍형성 프로브"를 표시하여 구별하는 것이 가능하다. 유사한 방법에서, 모든 염색체의 염색체-아암-특이적 프로브는 42개-색상-FISH로 불리는 것에서, 상이하게 표시될 수 있다. 그러나, 전술한 방법은 증기에 있는 세포의 경우에만 적합하다. 전술한 방법은 증기내 계놈/염색체 영역 만을 적어도 필수적으로 염색체 물질의 중첩없이, 이들에게서 사용된 프로브를 사용하여 평가할 수 있기 때문에, 단지 가능하다. 일반적으로 고품 종양의 유전 물질의 분석을 허용하는데 요구되는, 간기에서의 세포 분석은 이러한 방법을 사용하여서는 가능하지 않다. 더욱이, 이와 관련하여 사용된 프로브는, 이들이 큰 영역에 초점을 맞추고 있으므로 비교적 용이하게 검출될 수 있다. 이들 분석은 수동으로, 즉, 형광 현

미경 상에서 시그날의 관찰로는 평가될 수 없으며, 오히려 적합한 평가 소프트웨어를 사용한, 컴퓨터계 방식으로만 평가될 수 있다.

- [0025] 종양 또는 암 질병을 사용한, 구조적 및 수치적 염색체 돌연변이 또는 염색체 이상과 관련하여, 특히 당해 분야의 기술에서 공지된 방법 및 프로브 조성물과 관련하여, BrISH 및 FISH에 대한 방법 및 프로브 조성물은 특성의 단점들과 관련되어 있다. 예를 들면, 다수의 잠재적으로 상이한 구조적 및/또는 수치적 염색체 돌연변이 또는 염색체 이상의 신뢰가능하고, 단순하며, 신속한 검출 및 차별을 허용하는 유전자자리-특이적인 프로브의 조성물 및 방법은 존재하지 않는다.
- [0026] 특히 구조적 염색체 돌연변이의 경우에, 서로에 의존적이지 않은, 즉 어떠한 염색체 물질도 교환하지 않거나 상호적이지 않은, 다수의 상이한 염색체 돌연변이의 동시 분석, 또는 동일한 시간에서의 분석은 상호적이지 않거나, 전적으로 가능하지 않거나, 특히 근본적인 브레이크-어파트 시도에서, 단지 큰 곤란성을 갖고 가능하다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 염색체 돌연변이 또는 염색체 이상의 검출 및 분석에 적합한 이용가능한 방법 또는 조성물을 제조하는 업무를 기반으로 하는 것이며, 적어도 큰 정도까지, 상술한 바와 같은 선행 기술의 단점을 피하거나, 또는 이들을 적어도 약화시킨다.
- [0028] 특히, 본 발명은 특히 하나의 시도에서 서로 상이한 다수의 염색체 이상, 특히 서로 독립적인(즉, 상호적이지 않은) 염색체 이상을 가능한 신뢰가능하게 및 동시 검출하도록 하는 이용가능한 방법을 제조하는 업무를 기반으로 한다. 동일한 방식으로, 본 발명은 추가로 또한 염색체 이상을 특이적인 염색체 영역 또는 DNA 영역에 가능한 한 한 지정하는 이용가능한 방법을 제조하는 업무를 기반으로 한다.

**발명의 내용**

- [0029] 설명
- [0030] 상술한 업무를 달성하기 위하여, 본 발명은 청구항 1에 따른 방법을 목적으로 하며; 추가로 유리한 구현에는 이와 관련하여 종속항의 목적이다.
- [0031] 더욱이, 본 발명의 목적은 이와 관련하여 독립항에 따른 염색체 이상의 검출용 조성물, 또는 염색체 이상과 관련된 질병의 예방학적 또는 치료학적 치료시 또는 진단 또는 예후시 사용하기 위한 조성물이다.
- [0032] 본 발명의 여전히 다른 목적은 이와 관련하여 독립항에 따른 본 발명에 따른 조성물의 용도이다.
- [0033] 더욱이, 본 발명은 이와 관련하여, 독립항에 따라서, 서로 상이한, 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 용도에 관한 것이다.
- [0034] 더욱이, 본 발명의 목적은 이와 관련하여 독립항에 따라서, 적어도 2개의 검출 표지로 표시한 적어도 하나의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 용도이다.
- [0035] 최종적으로, 본 발명의 목적은 염색체 이상의 검출용 키트, 또는 부분 또는 세트의 키트이며; 또한, 유리한 특성은 이와 관련된 독립항의 목적이다.
- [0036] 다음에서, 본 발명의 제1 국면과 관련하여서만 기술되는, 구체적인 구조, 구현에 등은 이것이 명쾌하게 언급되지 않는 한, 본 발명의 다른 국면을 참고로 또한 유사하게 적용되는 것이 이해된다.
- [0037] 더욱이, 모든 비교 또는 퍼센트 양 정보, 특히 중량-관련된 양 정보의 경우에, 이러한 정보는 본 발명의 영역 내에서, 각각의 성분, 활성 물질, 첨가제 또는 보조 물질 등의 합이 항상 100% 이하 또는 100중량% 이하가 되도록 하는 방식으로, 당해 분야의 숙련가에 의해 선택되어야 한다. 하지만, 이것은 당해 분야의 숙련가에게는 분명하다.
- [0038] 더욱이, 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 영역으로부터 벗어남이 없이, 적용 또는 개개 경우에 의존하여, 하기 나열된 수치, 범위 또는 양 정보로부터 벗어날 수 있는 것이 사실이다.
- [0039] 더욱이, 하기 나타낸 모든 매개변수 정보 등은 자체로서, 표준화되거나 명쾌하게 나타낸 측정 방법을 사용하거나, 또는 당해 분야의 숙련가에게 친숙한 측정 방법을 사용하여 근본적으로 측정되거나 확립될 수 있는 것이 사실이다.
- [0040] 위에서 기술한 업무를 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 제1 국면에 따라서, 반응계내 하이브리드화에 의해, 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 내 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 내에서 염색체

영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의해, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 바람직하게는 구조적 염색체 이상의 검출 방법을 목적으로 하며, 여기서 반응계내 하이브리드화는 서로 상이하고, 각각 제1의 검출 표지로 표시된 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브로 수행되며, 여기서 특히 적어도 하나의 혼합된 시그날을 생성하기 위해, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중의 적어도 하나는 제1의 검출 표지와는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로, 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참조하여 표시됨으로써, 시그날 양식이 생성되며, 여기서 기존의 염색체 이상은 시그날 양식을 사용하여 확인하고/하거나 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 지정된다.

- [0041] 다시 말해서, 본 발명은 생물학적 시료 속에서 서로 상이한, 특히 서로 독립적인, 즉 상호 염색체 이상이 아닌, 다수의 염색체 이상을 동시 검출하거나 동일한 시간에 검출하도록 하는 기본 원리, 및 간기/반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그날 양식의 혼합된 시그날의 표적화된 시그날의 발생에 의한 검출된 염색체 영역 또는 DNA 영역에 대한 이들의 지정을 기반으로 한다.
- [0042] 따라서, 특히, 본 발명의 영역 내에서, 염색체 이상이 서로 독립적인 염색체 이상임을 제공할 수 있다. 다시 말해서, 본 발명에 따라서, 염색체 이상이 서로 의존적이지 아니라는 사실이 제공될 수 있다. 유사하게, 염색체 이상이 상호적이지 아니라는 사실이 제공될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 구현예에 따라서, 염색체 이상은 상호적으로 또는 서로 의존적인 염색체 이상과 관련되지 않거나 이들과 연합되는 것이 바람직하다.
- [0044] 본 발명은 비-제한적인 방식으로, 하기 논의된 다수의 장점 및 특수성과 관련되며, 본 발명의 특허성의 지표로서 평가되어야 한다.
- [0045] 본 발명의 영역 내에서, 완전히 놀라운 방식으로, 염색체 이상의 이용가능한 검출 방법을 제조하는 것이 가능하였으며, 이는 한편으로는 다수의 가능한 구조적 또는 수치적 염색체 이상의 명확한 검출을 허용하며, 다른 한편으로는, 간기/반응계내 하이브리드화의 영역 내에서, 이들 염색체 이상 사이의 명확한 구별 또는 단일 하이브리드화 시도로 구체적인 염색체 영역 또는 DNA 영역으로 검출된 염색체 이상의 명확한 지정을 허용한다. 특히, 염색체 이상은 서로 독립적인 염색체 이상일 수 있으며, 이는 서로 의존적이지 않고 상호적이지 않다. 이는 지금까지 당해 분야의 기술에서, 특히 간기/반응계내 하이브리드화의 영역 내에서 가능하지 않았다.
- [0046] 따라서, 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 샘플, 특히 염색체 이상에 대해 시험할 생물학적 샘플, 예를 들면, 조직, 특히 종양 조직의 단면을, 개개 샘플이 동시에, 다시 말해서 서로 상이한 다수의 염색체 이상의 경우, 하나의 시도에서 시험될 수 있으므로, 명확하게는 보다 신속하게 및 보다 효율적인 방식으로 분석하는 것이 가능하다. 더욱이, 검출된 어떠한 염색체 이상도 정의되거나 특수한 DNA 영역 또는 염색체 영역에 지정될 수 있다.
- [0047] 더욱이, 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 염색체 이상의 검출에 요구되는 샘플 양을 유의적으로 감소시킬 수 있다. 이는 특히 한편으로는 제한된 샘플 양을 취하는 것 만을 허용하는 미세한 침 생검(fine needle biopsy), 반면 보다 많은 양의 조직을 취하도록 하는 개방 생검(open biopsy)에 의해, 암 질병의 진단 또는 인식 또는 추가의 분석과 관련하여, 시험 목적용 조직의 제거가 매우 드물게 수행되는 근거로 특히 유리하다.
- [0048] 또한, 본 발명에 따른 방법의 큰 효능으로 인하여, 이들 중 일부가 비용 집약적일 수 있는, 효소, 형광성 염료 등과 같은 물질의 필요한 양이 반응계내 하이브리드화를 수행하기 위해 감소되므로, 상기 방법은 또한 경제적 및 환경적 측면에서 또한 유리하다.
- [0049] 본 발명을 보다 잘 이해하기 위해, 본 발명에 따르는 중심 용어 및 방법의 정의가 하기 정의될 것이다;
- [0050] 본 발명에 따라서, 염색체 기형과 동의어로 언급된 용어 염색체 이상은 특히 구조적 및 수치적 염색체 이상을 의미하는 것으로 이해된다. 구조적 염색체 이상의 경우에, 변화는 염색체 구조 내에 존재하므로, 이는 또한 염색체 돌연변이로 언급된다. 특히, 이는 역위, 전좌, 결실, 분절 중복, 삽입, 중복 또는 증폭을 포함할 수 있다. 대조적으로, 수치적 염색체 이상은 염색체 수에 있어서의 변화를 초래한다. 동의어로, 용어 게놈 돌연변이가 사용된다. 수치적 염색체 이상 또는 게놈 돌연변이의 경우에, 이들은 특히 이수성 또는 배수성(polyploidy)을 포함한다. 본 발명에 따른 방법은 특히 구조적 염색체 이상을 검출하는데 적합하다.
- [0051] 본 발명에 따라 사용된 반응계내 하이브리드화는 핵산 단일 쇠, 특히 DNA 단일쇄의 상보성 염기의 하이브리드화 또는 쌍형성을 기반으로 하므로, 특이적인 핵산 서열이 조직 또는 세포 제체와 같은 샘플 속에서 검출될 수 있다. 반응계내 하이브리드화의 영역 내에서, 직접 또는 간접적으로 표시된, 합성적으로 생산된, 특히 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 샘플의 핵산 단일쇄와 하이브리드화하여, 후속적으로 검출된다.

- [0052] 근본적으로, 반응계내 하이브리드화는 시험하는 세포 또는 세포 핵의 세포 주기의 상이한 단계에서 일어나거나 수행될 수 있으며, 염색체가 농축된 상태로 존재하는 경우, 중기 상에서 이를 수행하거나, 염색체가 탈-농축 상태로 존재하는 경우, 간기에서 자체적으로 확립되어 왔다. 반응계내 하이브리드화의 목표 또는 목적에 따라서, 중기에서, 특히 예를 들면, 염색체 이상에 대한 고휘 중앙의 세포의 실험에서 응축된 염색체에서 이를 수행하는 것이 항상 가능하지는 않다. 따라서, 본 발명에 따라서, 간기 상태에 있는 세포 또는 세포 핵에서 반응계내 하이브리드화를 수행하는 것이 제공된다.
- [0053] 본 발명의 영역 내에서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 특이적인 염색체 영역 또는 DNA 영역 또는 특정의 염색체 영역 또는 DNA 물질 또는 시험할 샘플 속의 유전 물질의 DNA 영역에 상보성인 프로브인 것으로 이해된다. 일반적으로, 본 발명에 따라 사용된 하이브리드화 프로브는 핵산 또는 핵산 단편을 기반으로 하며 검출될 염색체 영역 또는 DNA 영역에 특이적으로 결합하거나 이와 하이브리드화할 수 있다. 검출될 염색체 영역 또는 DNA 영역은 다양한 길이를 가질 수 있다. 특히, 검출된 염색체 영역 또는 DNA 영역은 전체적으로 또는 부분적으로 단일 또는 개개 유전자를 포함하는 것이 제공될 수 있다. 유사하게, 검출된 염색체 영역 또는 DNA 영역이 전체적으로 또는 부분적으로, 다수의 유전자, 바람직하게는 근접한 유전자, 바람직하게는 2개의 유전자를 포함하는 것이 또한 제공될 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따라서, 하이브리드화 프로브의 구조가 구체적으로 관련되는 한, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 전체적으로 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브로서 언급되는, 다수의, 특히 다수의 핵산 단편 (동어로서 또한 프로브 단편)을 기반으로 함이 특히 제공될 수 있다. 더욱이, 비록 거의 바람직하지는 않다고 해도, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 단일의 핵산 단편 만을 기반으로 하거나 단일의 핵산 단편에 의해 형성되는 것이 가능하다.
- [0055] 본 발명의 영역 내에서, 검출 표지는 측정 또는 검출 목적을 위한 핵산 또는 핵산 단편과 커플링된 물질 (material 또는 substance)을 말한다. 적합한 검출 표지의 선택은 당해 분야의 숙련가의 일반적인 능력 내에 있으며 당해 시점에서 어떠한 추가의 설명도 필요하지 않다. 반응계내 하이브리드화에 의해, 검출 표지로 표시되어 측정되거나 검출될 DNA 분절 또는 염색체 분절에 결합하거나 하이브리드화된 핵산 단편은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법의 수단으로 검출될 수 있으며 예를 들면, 형광 현미경에 의해 또는, 특히 효소 반응 또는 효소적으로 반응된 염료 기질에 의한 가시화 후, 명시야 현미경에 의해 직접 또는 간접적으로, 사용된 검출 표지에 대해 채택될 수 있다. 특히, 시그널 양식은 반응계내 하이브리드화의 영역내에서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에서 검출 표지에 의해 생성되며, 당해 시그널 양식은 가능한 염색체 이상에 대한 샘플의 시험을 위한 근거로서 제공된다.
- [0056] 또한, 본 발명에 따라 사용된 용어 "검출 표지"는 다음에서 검출 표지의 종류 또는 유형을 말하며 검출 표지 분자의 수치적인 수를 말하지 않는데, 즉, "적어도 하나의 검출 표지"와 같은 형식은 특정한 유형의 검출 표지 또는 검출 표지의 특정한 선택을 의미한다. 따라서, 용어 "다수의 검출 표지"는 또한 서로 상이한, 상이한 유형의 검출 표지의 선택에 관한 것이며 사용된 검출 표지 분자의 수에 관한 것이 아니다. 하이브리드화 프로브의 제조 영역 내에서, 이들이 일반적으로 하나 이상의 검출 표지 분자와 커플링된다는 것은 당해 분야의 숙련가에게 명백하다.
- [0057] 따라서, 본 발명에 따라 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브, 특히 프로브 단편 또는 핵산 단편은 샘플 속의 유전 물질의 선택된 DNA 영역 또는 염색체 영역과 특이적으로 하이브리드화하며, 커플링된 검출 표지를 기반으로 하여, 반응계내 하이브리드화 영역 내에서 시그널 양식을 생성한다. 본 발명의 영역내에서, 시그널 양식은 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 모든 시그널 전체인 것으로 이해된다.
- [0058] 이와 관련하여, 놀랍게도, 본 발명의 영역 내에서, 또한 다른 시그널과 잘 구별될 수 있는 잘 검출가능한 혼합된 시그널은 검출된 DNA 영역 또는 염색체 영역에 대해 발생된 염색체 이상의 지정을 허용하는, 서로 상이한 시그널 양식으로 적어도 2개의 검출 표지를 지닌 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 것에 의해 생성될 수 있음을 밝혀내었다. 따라서, 본 발명의 의미에서 혼합된 시그널은 서로 상이하고 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 위치한 적어도 2개, 그러나 또한 다수의 검출 표지에 의해 생성된 시그널이다. 혼합된 시그널은 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 적어도 2개, 특히 다수의 검출 표지에 의해 생성되므로, 이들은 염색체 이상의 경우에서도 반응계내 하이브리드화의 시그널 양식에서 가시성이며 심지어 염색체 이상의 경우에도 지속적으로 존재한다. 혼합된 시그널의 생성을 위한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 가능한 구현에 또는 구조는 하기에서 여전히 상세히 설명될 것이다.

- [0059] 본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현에는 하기 상세히 기술될 것이다:
- [0060] 본 발명의 제1 구현예에 따라서, 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 제1 검출 표지는 각각의 경우에 동일함이 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 제2의 동등하게 바람직한 구현예에 따라서, 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 예에서 서로 상이한 제1의 검출 표지로 표시된 것이 제공될 수 있다.
- [0061] 다시 말해서, 본 발명에 따라서, 예로서 및 제한적이지 않게 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 예를 들면, 제1의 검출 표지와 동일한 형광성 염료 또는 동일한 합텐을 갖는다.
- [0062] 유사하게, 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 예에서 제1 검출 표지로서, 서로 상이한 형광성 염료, 다시 예로서 및 비제한적으로, 서로 상이한 합텐을 가질 수 있다. 서로 상이한 제1의 검출 표지를 사용하여 표시하는 것은 전좌 또는 역위와 같은 염색체 브레이크와 함께 진행되는 염색체 이상의 검출과 관련하여 특히 유리한 것으로 입증되었다.
- [0063] 본 발명에 따라서, 염색체 이상의 검출이 또한 관련되는 한, 본 발명에 따라서, 서로 상이한 적어도 하나, 특히 다수의 염색체 이상을 샘플 속의 다수의 가능한 염색체 이상으로부터 검출하고/하거나 측정하는 것이 바람직하다.
- [0064] 유사하게, 서로 상이한, 적어도 2개, 특히 다수의 염색체 이상을 다수의 가능한 염색체 이상으로부터 동일한 시간에, 특히 동시에 샘플 속에서 검출하는 것이 제공될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 추가의 구현예에 따라서, 본 발명에 따른 방법이 서로 상이한 다수의 염색체 이상의 동시 검출용 멀티플렉스 방법으로서 수행하는 것이 제공될 수 있다.
- [0066] 따라서, 상기에서 이미 설명된 바와 같은, 선행 기술에 공지된 반응계내 하이브리드화에 의한 염색체 이상의 검출 방법과 비교하여 본 발명에 따른 방법의 특수한 장점은 본 발명에 이르러, 심지어 샘플, 특히 간기 상태에 있는 세포 또는 세포 핵을 기반으로, 단일의 하이브리드화 시도에서 특이적인 DNA 영역 또는 염색체 영역에 대해 이들 염색체 이상의 지정으로 다수의 가능한 염색체 이상에 대해 동시에 또는 동일한 시간에 시험할 수 있다는 사실에 있다.
- [0067] 이와 관련하여, 특히 염색체 이상이 적어도 하나의 혼합된 시그널, 특히 다수의 혼합된 시그널에 의해 단일 양식으로 확인되어, 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 지정될 수 있음이 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 특히 도 7을 참고하며, 여기서, 본 발명에 따른, 증폭 형태의 염색체 이상의 검출을 예로서 알 수 있다. 도 7에 따르면, 4개의 상이한 염색체 영역이 시험되며, 여기서 서로 상이하고, 이들 중 3개가 특이적인 혼합된 시그널을 생성하기 위한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된, 4개의 하이브리드화 프로브가 사용된다(참고: 도 7 a)). 특이적인 혼합된 시그널을 지닌 4개의 염색체 영역 중 3개를 표시하는 것을 근거로, 각각의 예에서, 시그널 양식으로 검출된 염색체 영역의 증폭에 의해 생성된 "클러스터"는 하이브리드화 프로브 또는 검출된 염색체 영역에 지정될 수 있다(참고: 도 7 b)).
- [0068] 따라서, 본 발명에 따라서, 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 지닌 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 것은 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 사용하여 표시한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 각각의 예에서, 서로 상이한 시그널 패턴으로 혼합된 시그널을 생성하는 방식으로 일어나는 것이 특히 제공될 수 있다.
- [0069] 유사하게, 특히 염색체 브레이크, 예를 들면, 증폭 또는 결실로부터 생성되지 않은 염색체 이상이 검출되는 것으로 추측되는 경우, 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 지닌 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 제조하는 것은 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 특이적인 혼합된 시그널이 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 모든 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의한 시그널 방식으로 생성되는 방식으로 일어나는 것이 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 따라서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출된 각각의 영역이 시그널 양식 내에서 특이적인 시그널, 특히 혼합된 시그널로 지정될 수 있는 경우, 이는 본 발명의 영역 내에 있는 것이 바람직하다.
- [0070] 더욱이, 본 발명에 따라서, 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 지닌 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 것이, 시그널 양식으로 검출된 각각의 염색체 이상이 특이적인 혼합된 시그널을 사용하여 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 지정되는 방식으로 일어나는 경우 바람직하다.
- [0071] 다수의 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 수에 관한 한,

당해 수는 가치가 있으며 특히 검출되거나 시험될 염색체 이상의 수에 의존한다.

- [0072] 본 발명에 따라서, 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 우선적으로 적어도 5개, 특히 우선적으로 적어도 6개, 매우 특히 우선적으로 적어도 7개의 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 첫 번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되는 경우 바람직하다. 유사하게, 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대해 특이적인 혼합된 시그널이 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개, 우선적으로 적어도 5개, 특히 우선적으로 적어도 6개, 매우 특히 우선적으로 적어도 7개의 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 시그널 양식으로 생성되는 것이 제공될 수 있다.
- [0073] 상기 기술한 과정의 당해 방법은 증폭 또는 결실과 같은 염색체 브레이크를 생성하지 않는 염색체 이상이 검출될 것으로 추측되는 경우에 특히 적합하다. 각각의 예에서, 적어도 하나의 추가의 검출 표지(당해 프로브는 개개의 혼합된 시그널을 생성한다), 바람직하게는 다수의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브의 수에 있어서의 증가를 기반으로, 동시에 검출되거나 측정될 염색체 이상의 수가 따라서 또한 증가될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 추가의, 구체적인 구현예에 따라서, 예를 들면, 전좌 또는 역위와 같은 염색체 브레이크로부터 생성되는 염색체 이상을 검출하여, 이들을 특이적인 염색체 영역 또는 DNA 영역에 대해 지정하는 것이 또한 가능하다.
- [0075] 본 발명에 따른 당해 구현예에 따라서, 각각의 예에서 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 것이 제공될 수 있으며, 여기서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 서로 상이한 검출 표지로 표시됨으로서, 융합 시그널이 각각의 예에서, 특히 염색체 이상이 존재하지 않는 경우에, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 단일 양식으로 생성된다.
- [0076] 이와 관련하여, "플랭크"는 바람직하게는 염색체 분절 또는 브레이크포인트 영역과 가장 근접한 하이브리드화 프로브의 특이적인 말단이 염색체 분절 또는 브레이크포인트 영역으로부터 0 내지 1Mbp의 거리, 특히 0 내지 500kb의 거리, 바람직하게는 0 내지 100kb의 거리, 우선적으로 0 내지 10,000bp의 거리, 및 특히 우선적으로 0 내지 1,000bp의 거리를 갖는 염기와 하이브리드화함을 의미한다.
- [0077] 다시 말해서, 본 발명의 당해 구현예에 따라서, 검출될 DNA 영역 또는 염색체 영역은 특이적으로 선택된 염색체 분절, 특히 염색체 상의 잠재적인 브레이크 영역에 대해 멀리 및 근접하여 위치한다. 이와 관련하여, 멀리 위치한 염색체 분절 또는 근접하게 위치한 염색체 분절은 제1의 검출 표지와는 상이한 검출 표지로 표시된 적어도 하나의 추가의 하이브리드화 프로브를 사용하여 검출되는 것이 특히 제공될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 영역 내에서, 브레이크포인트 영역은 염색체 브레이크에 의해 영향받을 수 있는 염색체의 이들 영역인 것으로 이해된다. 염색체 브레이크의 결과로서, 구조적 재배열을 기반으로 한 염색체 이상은 특히 전좌 또는 역위에 대해 올 수 있다. 염색체 이상은 다수의 질병에 대해 알려져 있으며, 이러한 이상은 각각의 예에서 질병-특이적이고, 염색체 브레이크, 특히 전좌 또는 역위를 기반으로 한다. 본 발명에 따르는 방법을 사용하는 경우, 다수의, 특히 공지된 브레이크포인트 영역은 염색체 이상의 존재에 대해 샘플, 특히 조직 샘플의 유전 물질에서 시험될 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 당해 구현예에서, 융합 시그널은 따라서 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 생산되며, 각각의 예에서, 상기 시그널은 특히 염색체 이상이 존재하지 않는 경우에, 서로 상이한 제1 및 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 2개의 검출 표지를 기반으로 생성된다.
- [0080] 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 상이한 검출 표지에 의해 생성된, 상기에 이미 기술된 혼합된 시그널과는 대조적으로, 융합 시그널은 서로 바로 근처에 존재하는, 서로 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 생성되어, 샘플 속의 유전 물질 또는 DNA 상에 하이브리드화된다.
- [0081] 다시 말해서, 본 발명에 따른 방법의 영역 내에서, 융합 시그널은 염색체 이상이 플랭크된 브레이크포인트에 존재하지 않고, 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 바로 근처에서 샘플 속의 유전 물질 또는 DNA와 하이브리드화하는 경우에 생성된다. 대조적으로, 염색체 이상이 영역 속에 존재하는 경우, 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 DNA 분절의 구조적 재배열을 기반으로 바로 근처에서 더 이상 결합할 수 없다. 융합 시그널 대신에, 바람직하게는 서로 상이한 2개의 개개 시그널(동의어로 또한 "스플릿 시그널")이 시그널 양식으로 검출된다.

- [0082] 더욱이, 제1의 검출 표지와는 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브는 제1의 검출 표지 및 각각의 하이브리드화 프로브의 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 기반으로 혼합된 시그널을 생성한다. 따라서, 이들은 염색체 이상이 존재하지 않는 경우, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 제2의 하이브리드화 프로브와 함께, 시그널 양식으로 혼합된 시그널 및 융합 시그널을 형성할 수 있다. 대조적으로, 염색체 이상의 경우에, 단일 시그널 및 또한 혼합된 시그널에 의해 동반된 단일 시그널이 정상 세포 또는 정상 세포 핵 속에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 하이브리드화 프로브를 기반으로, 시그널 양식으로 생성되며, 이들 프로브 중 하나는 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된다.
- [0083] 따라서, 본 발명의 영역 내에서, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로, 혼합된 시그널을 사용하여 정의된 염색체 이상을 브레이크포인트 영역 또는 검출된 염색체 영역 또는 DNA 영역에 대해 지정하는 것이 가능하다.
- [0084] 따라서, 본 발명에 따라서, 각각의 예에서, 첫번째 것과 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브는 특히 염색체 이상이 존재하지 않는 경우에, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역과 플랭크하는 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브와 함께 시그널 양식으로 혼합된 시그널 및 융합 시그널을 생성한다.
- [0085] 더욱이, 첫번째 것과 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브, 및 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 예에서 시그널 양식으로 단일 시그널을 생성하며, 특히 여기서 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 하이브리드화 프로브는 특히 염색체 이상이 존재하는 경우에, 시그널 양식으로 혼합된 시그널을 생성함이 제공될 수 있다.
- [0086] 따라서, 특히, 본 발명에 따른 방법 영역 내에서, 단일 양식으로, 염색체 이상이 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역 및/또는 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역에 대해, 혼합된 시그널에 의해 지정됨이 제공될 수 있다.
- [0087] 따라서, 본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현예에 따라서, 단일 샘플 속의 일련의 잠재적인 브레이크포인트 영역을 간기/반응계내 하이브리드화에 의해 동시에 묘사하거나 표시하는 것이 가능하다. 염색체 이상이 표시된 브레이크포인트에서 일어나지 않은 경우에, 융합 시그널이 시그널 양식으로 생성되는 반면, 단일 시그널 또는 스플릿 시그널의 발생은 염색체 이상의 존재를 나타낸다. 단일의 이상 시그널 또는 스플릿 시그널은 특이적인 하이브리드화 프로브에 지정될 수 있으므로 추가로 생성된 혼합된 시그널을 기반으로 특이적인 브레이크포인트 영역에 지정될 수 있다(참고; 초 1).
- [0088] 특히, 본 발명의 영역 내에서, 적어도 6개, 바람직하게는 적어도 8개, 우선적으로 적어도 10개, 특히 우선적으로 적어도 12개, 심지어 보다 우선적으로 적어도 14개의 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 사용되며, 여기서 각각의 예에서 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 예에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하며, 최대 24개의 상이한 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 사용되고, 여기서 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 예에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크한다.
- [0089] 또한, 본 발명에 따라서, 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시하는 것은 각각의 플랭크된 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역, 및/또는 검출될 각각의 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이 융합 시그널 및 혼합된 시그널을 사용하여, 시그널 양식으로 확인되고/되거나 지정될 수 있는 방식으로 일어난다.
- [0090] 이와 관련하여, 본 발명에 따라서, 실험될 제1의 브레이크포인트 영역이 각각의 예에서, 하나의 검출 표지를 갖는, 2개의 하이브리드화 프로브에 의해 플랭크됨으로써, 당해 브레이크포인트 영역이 융합 시그널 또는 2개의 단일 시그널 또는 스플릿 시그널에 의해서만 단일 양식으로 가시성이 되는 경우에 특히 바람직하다. 대조적으로, 특이적인 또는 개개의 혼합된 시그널은 시그널 양식으로 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 사용하여 2개의 플랭킹 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나를 표시하는 것에 의해, 실험할 각각의 추가의 브레이크포인트 영역에 지정됨으로써, 시그널 양식으로, 전체적으로 다수의 염색체 영역 또는 DNA 영역, 특히 브레이크포인트 영역이 구별가능한 방식으로 묘사될 수 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 방법의 특히 바람직한 구현예에 따라서,
- [0092] (a) 검출 표지 A로 표시된 제1의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 및 검출 표지 B로 표시된 제2의 유

전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하고 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 A-B를 생성하며,

- [0093] (b) 2 내지 12개의 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 6개 이하의 추가의 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하며, 여기서 또한, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 하나는 각각의 예에서 검출 표지 A로 표시되며, 각각의 예에서 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 하나는 검출 표지 B로 표시됨으로써, 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역을 플랭크하는 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식의 융합 시그널 A-B를 생성하며,
- [0094] (c) 적어도 하나, 바람직하게는 다수의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브(들)은 적어도 하나의 추가의 검출 표지 X로 표시됨으로써, 상기 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 및 혼합된 시그널 A-B/X를 생성하며,
- [0095] 여기서, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 융합 시그널 및 혼합된 시그널 A-B/X는 염색체 이상의 경우에 혼합된 시그널 A/X 및/또는 B/X로 변화하고/하거나,
- [0096] 여기서, 상기 융합 시그널 A-B는 염색체 이상의 경우에 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 단일의 시그널 A 및/또는 B로 변함으로써, 염색체 이상이 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식을 사용하여 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 플랭킹된, 염색체 영역 및/또는 DNA 영역 및/또는 염색체 분절, 특히 브레이크포인트 영역에 지정되는 것이 제공될 수 있다.
- [0097] 상기 기술된 구현예에서 제공된 검출 표지 X가 또한 관련되는 한, 이는 단일의 검출 표지, 특히 검출 표지 X<sub>1</sub>에 의해 형성될 수 있다.
- [0098] 또한, 검출 표지 X는 서로 상이하고, 바람직하게는 검출 표지 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ... 및/또는 X<sub>n</sub>(여기서, 지수 "n"은 1 내지 20, 특히 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 5의 자연수를 나타낸다)로부터 선택된 다수의 검출 표지에 의해 형성되는 것이 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 또한 검출 표지 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, ... 및/또는 X<sub>n</sub>가 서로 상이한 혼합된 시그널, 특히 서로 상이한 비의 특이적인 혼합된 시그널을 생성하도록 사용됨이 제공될 수 있다.
- [0099] 추가의 구현예에 따라서, 검출 표지 X가 서로 상이하고, 바람직하게는 검출 표지 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> 및/또는 X<sub>6</sub>의 그룹으로부터 선택된 다수의 검출 표지에 의해 형성되는 것이 또한 가능하다. 이와 관련하여, 검출 표지 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> 및/또는 X<sub>6</sub>가 서로 상이한 혼합된 시그널, 특히 서로 상이한 비의 특이적인 혼합된 시그널을 생성하기 위해 사용되는 것이 또한 제공될 수 있다.
- [0100] 따라서, 본 발명의 영역 내에서 혼합된 시그널을 생성하기 위하여, 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 지닌 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 혼합된 시그널의 생성을 위해 서로 상이한 다수의 검출 표지로 표시되어 있다는 점에서, 심지어 약간의 개개 검출 표지를 기반으로, 다수의 혼합된 시그널을 생성시키는 것이 놀랍게도 가능하였다.
- [0101] 특히, 본 발명에 따라서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 표시 영역 내에서 혼합된 시그널의 생성을 위해, 서로 상이한 다수, 특히 2 내지 6개의 검출 표지를 각각의 예에서 서로 상이한 (양)비로 사용되는 것이 제공될 수 있다. 예로서- 및 제한하지 않고- 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 제1의 검출 표지 외에, 3개의 추가의 검출 표지를 가질 수 있으며, 여기서 이와 관련하여, 3개의 추가의 검출 표지를 참고할 때, 제1의 검출 표지의 비는 20%까지의 양이고, 제2의 검출 표지의 비는 60%까지의 양이며, 제3의 검출 표지의 비는 20%까지의 양이다.
- [0102] 본 발명의 여전히 다른 구현예에 따라서,
- [0103] (a) 검출 표지 A로 표시된 제1의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 및 검출 표지 B로 표시된 제2의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 제1의 염색체 분절, 특히 제1의 브레이크포인트 영역을 플랭크하여, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 A-B를 생성하며,
- [0104] (b) 검출 표지 A로 표시된 제3의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 및 검출 표지 B로 표시된 제4의 유

전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 제2의 염색체 분절, 특히 제2의 브레이크포인트 영역을 플랭크하고, 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 A-B를 생성하며,

- [0105] (c) 제3의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 및/또는 제4의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 추가의 검출 표지  $X_1$ 로 표시되고 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 융합 시그널 및 혼합된 시그널  $A-B/X_1$ 을 생성하고,
- [0106] 여기서 시그널 양식에서, 제1의 염색체 분절, 특히 제1의 브레이크포인트 영역의 염색체 이상은 단일 시그널 A 및/또는 B에 의해 확인되고/되거나, 여기서 제2의 염색체 분절, 특히 제2의 브레이크포인트 영역의 염색체 이상은 혼합된 시그널  $A/X_1$  및/또는  $B/X_1$ 에 의해 확인되고/되거나 제2의 염색체 분절, 특히 제2의 브레이크포인트 영역에 지정되는 것이 추가로 제공될 수 있다.
- [0107] 반응계내 하이브리드화에 의해 생성된 시그널 양식으로 염색체 이상을 분석하기 위한 과정의 방법이 관련되는 한, 이는 제1 단계에서, 제1의 검출 표지에 의해 생성된 융합 시그널이 검출되고/되거나 분석되며, 후속적인 단계에서, 단일 시그널의 발생의 경우에, 혼합된 시그널의 검출 및/또는 분석 및 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역에 대한 이들의 지정이 일어나는 경우 특히 효과적이 입증되었다.
- [0108] 특히, 이는 시그널 양식의 분석 동안 첫번째로 일어날 수 있으며, 필터는 이에 의해 제 1의 검출 표지에 의해 생성된 시그널, 즉, 융합 시그널 또는 잠재적인 단일의 시그널이 가시성이 된다. 추가의 분석을 필요로 하는 염색체 이상은, 단일 시그널이 시그널 양식으로 발생하는 경우에만 존재하므로, 시그널 양식으로 융합 시그널 또는 단일 시그널의 위치와 함께 관찰되는, 이의 염색체 이상이 특이적인 염색체 영역 또는 DNA 영역에 지정될 수 있음을 기반으로 하여 혼합된 시그널이 또한 상이한 필터, 특히, 혼합된 시그널을 묘사하기에 적합한 필터에 의해 묘사된다.
- [0109] 또한, 본 발명에 따른 방법의 구체적인 구현예에 따라서, 시그널 양식의 검출이 컴퓨터-보조된 분석에 의해 일어나는 것이 제공될 수 있다. 이는 혼합된 시그널의 생성의 경우, 하이브리드화 프로브가 적어도 하나 이상의 추가의 검출 표지, 바람직하게는 적어도 2개의 추가의 표지, 바람직하게는 다수의 추가의 검출 표지로 서로에 대해 상이하거나 정의된 비로 표시되는 경우 특히 유리하다. 컴퓨터 보조된 분석은 또한 색 성분 또는 색상의 측정을 기반으로 하는 혼합된 시그널의 차등화를 허용하며, 이는 형광 현미경 하에서 이들을 보는 경우 육안으로 서로 구별하기에 가능하지 않을 수 있다.
- [0110] 따라서, 본 발명에 따라서, 전좌 또는 역위의 검출이 24개까지의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 사용하여 일어날 수 있음이 특히 제공될 수 있으며, 여기서 각각의 예에서, 2개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 각각의 브레이크포인트 영역을 멀리 및 근접하게 플랭크하며, 이들 프로브 쌍들의 개개 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 추가의 검출 표지로 동시에 표시된다. 따라서, 바람직하게는, 12개 까지의 상이한 브레이크포인트 영역이 12개까지의 전좌 또는 역위의 묘사를 위해, 12개 까지의 상이한 브레이크-어파트 시도를 사용하여, 하나의 시도로 시험될 수 있다. 특이적인 전좌의 검출은 프로브 쌍 또는 프로브 쌍의 융합 시그널의 분리의 확인에 의해서, 및 각각의 혼합된 색상 또는 혼합된 시그널을 사용하여 수행된다.
- [0111] 24개까지의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 사용하여 전좌 및 역위를 검출하는 것이 또한 가능하며, 여기서 각각의 예에서, 2개의 프로브는 각각의 브레이크포인트 영역에 멀리 및 근접하게 플랭크하며, 이들 프로브 쌍은 각각의 예에서 동일한 표지 A 및 B로 표시되고, 여기서 각각의 예에서, 하나의 프로브는 표지 A로 표시되고 다른 프로브는 표지 B로 표시되며, 이들 프로브 쌍의 개개 프로브는 추가의 검출 표지 X로 동시에 표시된다. 특이적인 전좌 및/또는 역위의 검출은 염색체 이상의 경우에 특이적인 융합 시그널 및 혼합된 시그널  $A-B/X$ 를 새로운 및 별개의 혼합된 시그널  $A/X$  및/또는  $B/X$ 로 변화시킴에 의해 수행된다. 이와 관련하여, 하나의 프로브 쌍의 경우에 추가의 표지 X를 사용하지 않는 것이 가능하므로, 일반적인 별개의 시그널 A 및/또는 B는 잠재하는 염색체 이상의 경우에 당해 프로브 쌍에 대해서만 발생한다.
- [0112] 따라서, 최초로, 다수의 상이한 잠재적으로 검출가능한 구조 염색체 돌연변이, 시그널 A 및 B 만의 제1 분석에서, 특이적인 필터 시스템, 예를 들면, 시그널 A 및 B만을 가시성이 되도록 하지만 추가의 표지 X는 가시성으로 되도록 하지 않는 시그널 A 및 B에 대한 이중 필터를 사용하여, 융합 시그널 A-B의 브레이크 어파트가 모두 일어났는지, 및 일반적으로, 전좌 또는 역위가 존재하는지의 여부에 대한 기술이 첫번째로 신속하게 이루어질 수 있다. 별개의 시그널 A 및/또는 B의 긍정적인 발생의 경우 만이 이후에 혼합된 시그널의 평가가 표지 X를 포함하여 일어남으로써, 잠재하는 전좌의 명확한 지정이 일어난다.

- [0113] 다음에서, 본 발명에 따른 방법의 추가의 특수성 또는 구현에 가능성이 또한 기술될 것이며, 이는 상기 기술한 바와 같은 본 발명에 따른 방법의 가능한 구현에 모두에 대해 동등하게 적용된다.
- [0114] 각각의 예에서, 단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출될 단일의 염색체 영역 또는 DNA 영역에 관한 한, 이들은 본 발명의 영역 내에서, 바람직하게는 5Mbp 미만, 특히 2Mbp 미만, 바람직하게는 1Mbp 미만, 우선적으로 750kbp 미만, 특히 우선적으로 500kbp 미만의 길이를 갖는다. 유사하게, 단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출된 염색체 영역 및/또는 DNA 영역이 적어도 500bp, 특히 적어도 1kbp, 바람직하게는 적어도 5kbp, 우선적으로 적어도 10kbp를 가지는 것이 제공될 수 있다. 최종적으로, 또한, 단일의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브에 의해 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역은 500bp 내지 5Mbp의 범위, 특히 1kbp 내지 2Mbp의 범위, 바람직하게는 5kbp 내지 1Mbp의 범위, 우선적으로 10kbp 내지 750kbp의 범위, 특히 우선적으로 10kbp 내지 500kbp의 범위의 길이를 갖는다.
- [0115] 또한, 본 발명에 따라서 사용된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 추가의 구현예에 관한 한, 이들은 바람직하게는 핵산 단편의 형태, 특히 폴리뉴클레오타이드, 변형된 폴리뉴클레오타이드, 변형된 핵산 단편, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드의 형태로 존재한다. 구체적으로, 변형된 핵산 단편에 관한 한, 이들은 특히 록크드 핵산(*locked nucleic acids*: LNA) 또는 펩타이드 핵산(PNA)일 수 있다.
- [0116] 본 발명의 제1의 구현예에 따라서, 각각의 예에서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 각각의 예에서 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역을 포함하는, 단일의 핵산 단편에 의해 형성됨이 추가로 제공될 수 있다.
- [0117] 본 발명의 다른 및 추가의 바람직한 구현예에 따라서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 각각의 예에서 검출될 염색체 영역 및/또는 DNA 영역을 포함하는, 다수의 핵산 단편("프로브 단편")에 의해 각각의 예에서 형성됨이 또한 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 개개의 핵산 단편("프로브 단편")이 5 내지 2,000bp의 범위, 특히 10 내지 1,500bp의 범위, 바람직하게는 50 내지 1,000bp의 범위의 길이를 갖는 경우 또한 바람직하다.
- [0118] 또한, 혼합된 시그널의 표적화된 생성을 위한, 제1의 검출 표지와는 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지를 지닌 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 제조함에 의한 혼합된 시그널의 생성에 관한 한, 이는 상이한 방법으로 일어날 수 있다:
- [0119] 본 발명의 제1의 구현예에 따라서, 이러한 관점에서, 혼합된 시그널의 생성을 위해, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편("프로브 단편")이 제1의 검출 표지에 따라, 제1의 검출 표지와는 상이한 추가의 검출 표지로 표시된다. 따라서, 당해 방식으로 표시된 하이브리드화 프로브는 혼합된 시그널을 생성하며, 이는 서로 상이한 2개의 검출 표지만을 기반으로 한다.
- [0120] 또한, 본 발명의 추가의 구현예에 따라서, 특히 특이적인 혼합된 시그널의 밴드폭을 증가시키거나 혼합된 시그널, 즉, 서로 상이할 수 있는 시그널의 수를 증가시키는 배경에 대해 - 혼합된 시그널의 생성을 위해, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편("프로브 단편")이 제1의 검출 표지, 제1의 검출 표지와는 상이한 다수, 특히 2 내지 20개, 바람직하게는 2 내지 10개, 우선적으로 2 내지 6개의 검출 표지로 표시되는 것이 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 검출 표지가 서로 상이한 양으로 사용되는 것이 특히 제공될 수 있다.
- [0121] 따라서, 본 발명에 따라서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 영역 내에서 혼합된 시그널의 생성을 위해, 서로 상이한 다수의 검출 표지가 각각의 예에서 서로 상이한 비로 사용된다. 예를 들면 및 제한하지 않고, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브는 제1의 검출 표지외에 3개의 추가의 검출 표지를 가질 수 있으며, 여기서 3개의 추가의 검출 표지를 참고로 제1의 검출 표지의 비는 20%까지의 양이고, 제2의 검출 표지의 비는 60%까지의 양이며, 제3의 검출 표지의 비는 20%까지의 양이다.
- [0122] 따라서, 당해 구현예에 따라서, 하이브리드화 프로브가 제1의 검출 표지를 따라, 서로 상이한 적어도 2개, 바람직하게는 다수의 검출 표지를 가지는 것이 제공될 수 있다. 서로 상이한 비의 상이한 검출 표지의 사용에 의해, 특이적인 혼합된 시그널, 특히 서로 구별될 수 있는 시그널이 전체적으로 증가될 수 있으며, 이는 궁극적으로 보다 큰 수의 검출가능한 염색체 이상의 검출이 가능하도록 할 수 있다.
- [0123] 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 표시하는 영역 내에서, 본 발명에 따라서, 하이브리드화-특이적인 프로브의 개개 핵산 단편이 단지 하나의 검출 표지로 표시되는 것이 또한 근본적으로 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 이는 제1의 검출 표지 및/또는 어떠한 추가의 검출 표지일 수 있다(참고: 도 2i)).
- [0124] 따라서, 이를 상이하게 기술하기 위해, 본 발명에 따라서, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단

편의 제1 부위는 제1의 검출 표지 만으로 표시되고, 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편의 추가의 부위는 각각의 예에서, 제1의 검출 표지와는 상이한 추가의 검출 표지로 표시된다. 따라서, 본 발명의 구현예에 따라서, 혼합된 시그날에 대해, 서로 상이한 검출 표지가 서로 상이한 하이브리드화-특이적인 프로브의 핵산 단편에 존재한다는 점에서, 혼합된 시그날의 생성이 일어날 수 있다(참고: 도 2i).

- [0125] 또한, 하이브리드화-특이적인 프로브의 개개 핵산 단편이 서로 상이한 다수의 검출 표지로 표시되는 것이 제공될 수 있으며, 특히 여기서 이는 제1의 검출 표지 및/또는 어떠한 추가의 검출 표지를 포함할 수 있다(참고: 도 2ii)).
- [0126] 따라서, 본 발명의 당해 구현예에 따라서, 혼합된 시그날을 형성하고 서로 상이한 검출 표지가 하이브리드화-특이적인 프로브의 동일한 핵산 단편에 존재하거나 하이브리드화-특이적인 프로브의 핵산 단편에 함께 존재("혼합된 프로브"로 명명됨)하는 것이 제공될 수 있다(참고: 도 2ii)).
- [0127] 또한, 당해 영역 내에서, 혼합된 시그날의 생성을 위한 2개의 전술한 구현예를 다른 것과 결합시키기 위해, 즉, 혼합된 시그날을 형성하는 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 핵산 단편의 하나의 부분을 단지 하나의 검출 표지로 표시하고, 하이브리드화-특이적인 프로브의 핵산 단편의 다수의 또는 추가의 부분(들)이 적어도 2개의 상이한 검출 표지로 표시되는 것이 또한 제공될 수 있다.
- [0128] 또한, 최대 3Mbp, 특히 최대 2.5Mbp, 바람직하게는 최대 2Mbp, 우선적으로 최대 1Mbp, 특히 우선적으로 최대 500kb, 심지어 보다 우선적으로 최대 200kb의 공간이 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 개개의 하이브리드화된 핵산 단편 사이에 존재하는 것이 또한 가능하다. 따라서, 이를 상이하게 기술하기 위해, 본 발명에 따라서, 최대 3Mbp, 특히 최대 2.5Mbp, 바람직하게는 최대 2Mbp, 우선적으로 최대 1Mbp, 특히 우선적으로 최대 500kb, 심지어 보다 우선적으로 최대 200kb의 "갭(gap)"이 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된, 하이브리드화된 상태의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 개개의 하이브리드화된 핵산 단편 사이에 존재하는 경우 혼합된 시그날을 생성하는 것이 또한 가능하다(참고: 도 2iii)).
- [0129] 따라서, 혼합된 시그날은 특히 단일 프로브의 "혼합된 표지"의 사용에 의해 생성될 수 있다. 특히, 염색체 영역 또는 게놈 분절에 대해 특이적인 혼합된 시그날의 생성을 위해, 임의로, i) 프로브의 모든 단편 또는 임의로 또한 프로브의 개개 단편 만이 다수의 표지로 표시되거나 II) 동일한 단편이 각각의 예에서 상이한 표지로 표시되거나, III) 교호하는 단편이 상이한 표지로 표시됨으로써, 여기서 또한, 최종적으로 하나의 혼합된 시그날만이 가시성이되거나 검출가능하게 되는 것이 가능하다(참고: 도 2i 내지 도 2iii)).
- [0130] 본 발명에 따른 방법의 의미에서 혼합된 표지 및 혼합된 시그날은 이와 관련하여, i) 내지 iii) 하에 앞서 언급된 개개의 단편 또는 단편 모두가 일부에서만 오버랩되는 경우 또한 발생할 수 있다.
- [0131] 혼합된 표지는 또한 본 발명에 따른 방법의 의미에서, 적어도 하나의 표지로 표시된 프로브의 개개의 단편 또는 단편 그룹, 및 적어도 하나의 추가의 표지로 표시된, 프로브의 다른 개개의 단편 또는 단편 그룹이 2Mbp, 임의로 1Mbp, 임의로 500kb, 및 임의로 200kb의 공간을 가지는 경우 일어날 수 있다.
- [0132] 따라서, 본 발명에 따른 방법의 의미에서 혼합된 표지 및 혼합된 시그날은 동일한 서열 또는 거의 동일한 서열을 가진 2개 이상의 프로브가 사용되는 경우, 즉, 2개 이상의 프로브가 동일한 특이적인 염색체 영역 또는 동일한 게놈 분절에 초점을 맞추지만, 상이한 표지로 표시되어 있는 경우에 또한 발생할 수 있으며, 여기서 상기 프로브는 또한 단지 95%, 임의로 90%, 임의로 80%, 임의로 70%, 임의로 60%, 임의로 50%까지 일치할 수 있으며, 여기서 차이는 근본적으로 유사한 서열의 서열 변이로 인해 또는 프로브의 개개의 영역 만의 부분적 오버랩으로 인하여 발생한다.
- [0133] 실행의 경우와 같이 적합한 검출 표지의 선택은 당해 분야의 숙련가의 일반적인 능력내에 있으며 반응계내 하이브리드화를 수행하는데 사용된 방법의 기능으로서 일어난다. 일반적으로, 하이브리드화 프로브의 직접적인 또는 간접적인 표시는 적합한 검출 표지의 선택에 의해 일어날 수 있다.
- [0134] 본 발명의 영역 내에서 검출 표지가 다음 염료의 그룹으로부터 선택되는 경우, 특히 우수한 결과가 수득된다: 염료 물질; 화학발광성 염료, 특히 아크리디늄; 방사성동위원소; 회전 표지; 효소, 특히 알칼린 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 대두 퍼옥시다제 및/또는 베타-갈락토시다제; 합텐, 특히 디곡시게닌, 바이오틴, 2,4-디니트로페놀, 5(6)-카복시플루오레세인, 로다민, 브롬 테옥시우리딘, 아세틸아미노플루오렌, 트리니트로페놀, 트리니트로페놀 유도체, 에스트라디올 및/또는 2,4-디니트로페놀; 양자 점(Quantum Dot); 비드; 아미노핵실렌; 페렌; 및/또는 형광성 염료, 특히 플루오레세인, 플루오레세인 유도체, 5(6)-카복시플루오레세인, 코우마린, 코

우마린 유도체, 로다민, 로다민 유도체, 테트라메틸 로다민, 리싸민, 텍사스 레드(Texas Red), AMCA, TRITC, IR 염료, 알렉사 염료(Alexa dye), 다이오믹스 염료(Dyomics dye), 피코에리트린, 캐스캐이드 블루(Cascade Blue), 오레곤 그린(Oregon 녹색) 488, 퍼시픽 블루(Pacific Blue) 및/또는 로다민 그린(Rhodamine Green).

- [0135] 반응계내 하이브리드화 자체를 수행하는 것에 관한 한, 이는 상이한 방식으로 일어날 수 있다.
- [0136] 특히, 반응계내 하이브리드화의 제1의 바람직한 구현예에 따라서, 이것이 하이브리드화 프로브의 직접적인 표시로, 특히 형광성/반응계내 하이브리드화(FISH)에 의해 일어나는 것이 제공될 수 있다.
- [0137] 유사하게, 반응계내 하이브리드화는 하이브리드화 프로브를 특히 가시성의 적외선 및/또는 자외선 방출 범위, 바람직하게는 방출 영역 그린, 오렌지/적색, 금 및/또는 청색용 형광성 염료로 표시하여 발생시키는 것이 제공될 수 있다.
- [0138] 반응계내 하이브리드화의 추가의 바람직한 구현예에 따라서, 이것이 하이브리드화 프로브의 간접적인 표시, 특히 명-시아/반응계내 하이브리드화(BrISH)에 의해 일어나는 것이 또한 제공될 수 있다.
- [0139] 또한, 본 발명에 따라서, 반응계내 하이브리드화가 합텐, 특히 바이오틴, 디곡시게닌 및/또는 DNP를 사용한 하이브리드화 프로브의 표시, 및 항체-커플링된 알칼린 포스파타제, 항체-커플링된 퍼옥시다제 및/또는 항체-커플링된 베타-갈락토시다제에 의한 후속적인 검출로 일어나는 것을 제공할 수 있다.
- [0140] 형광성-계 반응계내 하이브리드화의 분석에 관한 한, 이는 바람직하게는 특히 융합 시그널 및 혼합된 시그널의 표적화된 묘사를 허용하는, 특이적인 개개의 또는 다중 필터 세트를 사용하여 일어난다.
- [0141] 더욱이, 이는 컴퓨터-보조된 분석에 의한 평가를 수행하기 위해, 특히 적어도 하나 이상의 추가의 검출 표지를 기반으로 혼합된 시그널의 생성시, 특히 서로 상이한 또는 정의된 비의 적어도 2개의 추가의, 바람직하게는 다수의 추가의 검출 표지를 기반으로 혼합된 표지의 생성시 유리할 수 있다. 더욱이, 이는 또한 특히 컴퓨터-보조된 분석에 의해 이용가능한 상이한 개개의 또는 다중 필터 세트의 시그널 양식의 묘사를 결합하도록 하는 겹쳐진 영상을 제조하기 위해 제공될 수 있으며, 상기 영상은 상이한 개개의 또는 다중 필터 세트의 시그널 양식의 묘사를 결합시킨다.
- [0142] 근본적으로, 본 발명에 따른 방법을 사용하여 염색체 이상의 다수의 상이한 유형을 검출하는 것이 가능하다. 특히, 본 발명에 따른 방법은 전좌, 역위, 분절 중복(segmental duplication), 결실, 삽입, 중복, 이수성 및 증폭, 특히 전좌 및/또는 역위의 검출에 사용될 수 있다.
- [0143] 이와 관련하여, 본 발명에 따른 방법의 영역 내에서, 염색체 이상은 질병, 특히 악성 종양, 바람직하게는 암종, 육종 및/또는 백혈병과 관련되어 있음이 제공될 수 있다.
- [0144] 잠재적인 염색체 이상에 대해 실험될 유전자는 바람직하게는 ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B, TGF, BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1, RUNX1T1, EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6, WT1, HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS 및/또는 VHL의 그룹으로부터 선택된다.
- [0145] 특히 우수한 결과가 본 발명에 따른 영역 내에서, 본 발명에 따른 방법이 역위 및/또는 전좌의 검출에 사용되는 경우, 특히 우수한 결과가 달성된다.
- [0146] 본 발명의 바람직한 구현예의 영역 내에서, 본 발명에 따른 방법은 특히 폐 종양에서 상이한 전좌 및/또는 역위의 검출에 사용되며, 여기서 특히 유전자 ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B 및/또는 TGF가 영향받는다.
- [0147] 또한, 본 발명에 따른 방법이 특히 림프종 및 백혈병에서 상이한 전좌 및/또는 역위의 검출에 사용되는 것이 제공될 수 있으며, 여기서 특히, 유전자 BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1 및/또는 RUNX1T1이 영향받는다.
- [0148] 본 발명의 추가의 바람직한 구현예에 따라서, 본 발명에 따른 방법은 특히 육종에서 상이한 전좌 및/또는 역위의 검출에 사용되며, 여기서 특히, 유전자 EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6 및/또는 WT1이 영향받는다.

- [0149] 본 발명에 따라서, 본 발명에 따른 방법이 전좌 및/또는 역위의 검출에 사용되는 것이 또한 제공될 수 있으며, 여기서 특히, 유전자 ALK 및 ROS1이 영향받는다.
- [0150] 또한, 본 발명의 영역 내에서, 탁월한 결과가 본 발명에 따른 방법이 증폭 및/또는 결실의 검출에 사용되는 경우 달성된다.
- [0151] 증폭 또는 결실의 검출을 위해, 24개까지의 상이한 유전자자리-특이적인 프로브가 사용될 수 있으며, 여기서 각각의 프로브는 각각의 게놈 영역에 초점을 맞추며, 여기서 상이한 프로브는 상이한 조합 및 비의 상이한 표지로 표시된다. 시그널 양식의 수득되는 혼합된 시그널을 기반으로, 상이한 유전자자리-특이적인 프로브가 서로 명확하게 구별될 수 있다. 따라서, 문제의 게놈 영역의 24개까지의 상이한 증폭 및/또는 결실 사건은 단일 방법을 사용하여 시험될 수 있다. 특이적인 증폭 또는 결실의 검출은 상이한 혼합된 시그널 또는 혼합된 색상을 계수함으로써 일어난다.
- [0152] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법은 특히 유방 종양, 결장 종양, 및 폐 종양에서 상이한 증폭 및 결실의 검출에 사용되며, 여기서, 특히, 유전자 HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS 및/또는 VHL이 영향받는다.
- [0153] 따라서, 전체적으로 본 발명의 영역 내에서, 혼합된 표지를 지닌 유전자자리-특이적인 프로브를 사용하는 경우, 잘 및 이들이 평가되도록 하는 방식으로 검출될 수 있는 혼합된 시그널이 발생하며, 당해 시그널은 이상 (abnormality)에 의해 영향받은 염색체 영역의 명확한 확인을 허용한다. 따라서, 본 발명에 다른 방법은 첫번째로 및 놀라운 방식으로, 다수의, 상이한 구조적 및/또는 수치적 염색체 돌연변이의 검출을 허용한다. 이는 당해 분야의 기술로는 가능하지 않다.
- [0154] 본 발명에 따른 제2 국면에 따라서, 본 발명의 추가의 목적은 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 바람직하게는 구조적 염색체 이상을, 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속의 염색체 영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의해, 특히 이후의 청구범위 중의 하나에 따른 방법에 의해 검출하기 위한 조성물이며, 여기서 당해 조성물은 서로 상이하고 각각 제1의 검출 표지로 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 포함하며, 여기서 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나는 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로, 첫번째 것과는 상이한, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시로 표시된다.
- [0155] 유사하게, 본 발명에 따른 당해 국면에 따라서, 염색체 이상, 특히 악성 종양, 바람직하게는 암종, 육종 및/또는 백혈병, 특히 바람직하게는 폐 종양, 림프종, 백혈병, 육종, 유방 암종 및/또는 결장 암과 관련된 질병의 예방학적 및/또는 치료학적 치료 및/또는 진단 및/또는 예후시 사용하기 위한 조성물이 본 발명의 목적이며, 여기서 상기 조성물은 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 서로 상이하고 제1의 검출 표지로 각각 표시된 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 포함하고, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나는 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로, 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된다.
- [0156] 이와 관련하여, 본 발명에 따른 조성물은 이것이 상기 기술된 바와 같은 방법을 수행하기 위해 의도되거나 사용되는 것이 특히 제공될 수 있다.
- [0157] 본 발명의 당해 국면에 따른 추가의 세부사항과 관련하여, 참고는 본 발명에 따른 다른 국면에 관한 상기 설명에 대해 이루어질 수 있으며, 이는 또한 본 발명의 당해 국면과 관련하여 유사하게 적용된다.
- [0158] 또한, 본 발명에 따른 제3 국면에 따른, 본 발명의 목적은 특히 반응계내 하이브리드화에 의한, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속에서 염색체 영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의한, 특히 상술된 방법에 의한, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 바람직하게는 구조적 염색체 이상의 검출을 위한, 특히 상술된 바와 같은, 조성물의 용도이다.
- [0159] 본 발명의 당해 국면에 관한 추가의 세부사항과 관련하여, 참고는 본 발명에 따른 다른 국면에 관한 상기 설명에 대해 이루어질 수 있으며, 이는 본 발명의 당해 국면에 대한 참고로 또한 유사하게 적용된다.
- [0160] 본 발명의 제4 국면에 따라서, 발명의 추가의 목적은 서로 상이하고 제1의 검출 표지로 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 용도이며, 여기서 상기

유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나는 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속의 염색체 영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의해, 바람직하게는 상기 기술된 방법에 의해, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상에 대해, 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로, 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된다.

- [0161] 유사하게, 본 발명의 당해 국면에 따른, 본 발명의 목적은 제1의 검출 표지로 각각 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 용도이며, 여기서 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나는 염색체 이상, 특히 악성종양, 바람직하게는 암종, 육종 및/또는 백혈병, 특히 우선적으로 폐 중앙, 림프종, 백혈병, 육종, 유방 암종 및/또는 결장 암과 관련된 질병의 진단 및/또는 예방시, 바람직하게는 본 발명에 따른 앞서 기술된 방법의 영역 내에서, 각각의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 참고로, 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시된다.
- [0162] 본 발명의 당해 국면에 관한 추가의 세부사항을 참고로, 본 발명에 따른 다른 국면에 관한 상기 설명에 대해 참고가 이루어질 수 있으며, 이는 본 발명의 당해 국면과 관련하여 또한 유사하게 적용된다.
- [0163] 또한, 본 발명에 따른 제5 국면에 따른 본 발명의 다른 목적은 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속에서 염색체 영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의해, 바람직하게는 상기 기술된 바와 같은 방법에 의해, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 바람직하게는 구조적 염색체 이상의 검출을 위해, 서로 상이하고 적어도 제1의 검출 표지로 각각 표시된 적어도 1개, 특히 적어도 2개, 바람직하게는 적어도 3개의 추가의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브와 함께 적어도 2개의 검출 표지로 표시된 적어도 하나의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브의 용도이다.
- [0164] 본 발명의 당해 국면에 관한 추가의 세부사항과 관련하여, 참고는 본 발명에 따른 다른 국면에 관한 상기 설명에 대해 이루어질 수 있으며, 이는 또한 본 발명의 당해 국면과 관련하여 유사하게 적용된다.
- [0165] 최종적으로, 본 발명에 따른 제6의 국면에 따라서, 본 발명의 목적은 서로 상이하고 제1의 검출 표지로 각각 표시된 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 포함하는, 반응계내 하이브리드화에 의해, 특히 생물학적 샘플, 바람직하게는 하나 이상의 세포(들) 및/또는 하나 이상의 세포 핵/핵들 속에서 염색체 영역 및/또는 DNA 영역의 검출에 의해, 염색체 이상, 특히 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상, 바람직하게는 구조적 염색체 이상을 검출하기 위한 키트 또는 부분 또는 세트의 키트이며, 여기서, 상기 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브 중 적어도 하나는 각각의 하이브리드화 프로브를 참고로, 첫번째 것과는 상이한 적어도 하나의 추가의 검출 표지로 표시되고, 특히 여기서 상기 키트는 상기 기술된 방법을 수행하기 위해 의도되고/되거나 사용된다.
- [0166] 이와 관련하여, 서로 상이한 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 일반적인 조성물, 특히 상술된 바와 같은 조성물 속에 존재하는 것이 특히 제공될 수 있다.
- [0167] 유사하게, 서로 상이한 적어도 2개, 특히 적어도 3개, 바람직하게는 적어도 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브가 서로 분리된, 별개의 조성물 속에 존재하는 것이 제공될 수 있다.
- [0168] 본 발명의 당해 국면에 관한 추가의 세부사항을 참고로, 본 발명에 따른 다른 국면에 관한 상기 설명에 대해 참고로 이루어질 수 있으며, 이는 또한 본 발명의 당해 국면과 관련하여 유사하게 적용된다.

**도면의 간단한 설명**

[0169] 다음에서, 본 발명은 도면 및 실시예를 사용하여 보다 상세히 기술될 것이다. 도면은 다음을 나타낸다:

- 도 1: 2개의 전좌의 검출을 위한 본 발명에 따른 방법의 개략도.
- 도 2: 혼합된 표지 및 혼합된 시그날의 묘사를 위한 다수의 표지의 사용에 관한, 본 발명에 따른 방법의 개략도.
- 도 3: ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH 프로브".
- 도 4: ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart single-Mix NG-

FISH 프로브"를 사용하는 경우 단일 양식의 개략도.

**도 5:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 6중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 & RET Break Apart single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용하는 경우 시그널 양식의 개략도.

**도 6:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 6중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 & RET Break Apart single-Mix II NG-FISH 프로브"를 사용하는 경우 시그널 양식의 개략도.

**도 7:** 4개의 수치 이상의 검출을 위한 본 발명에 따른 방법의 개략도.

**도 8:** 7개의 전좌 또는 증폭의 검출을 위한 본 발명에 따른 방법의 개략도.

**도 9:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용한, 6q22내 ROS1 영역의 전좌의 검출을 위한 FISH 분석.

**도 10:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 CISH 프로브 "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart single-MIX NG-FISH 프로브"를 사용한, 2q23내 ALK 영역의 전좌의 검출을 위한 CISH 분석.

**도 11:** ZytoVision 회사로부터의 4중 프로브 "Zytolight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브"를 사용한, ERBB2 영역의 증폭의 검출을 위한 FISH 분석.

**도면의 상세한 설명**

**도 1**은 4개의 프로브 및 3개의 표지를 사용한, 2개의 전좌의 검출을 위한 본 발명에 따른 방법의 개략도를 나타내며, 여기서 하나의 프로브는 2개의 표지로 동시 표시된다. 이는 정상 세포의 경우, 및 2q23내 ALK 유전자 또는 6q22내 ROS1 유전자의 전좌의 경우에 시그널 양식을 양식을 나타낸다.

2개의 브레이크포인트 영역(ALK 및 ROS1)은 4중 ISH 프로브의 표지 A 및 B에 의해 각각 플랭크되어 있으며, 각각의 경우에, 융합 시그널 A-B를 생성한다. ALK 브레이크포인트 영역의 한쪽 측면은 또한 표지 C로 플랭크됨으로써, 혼합된 표지 A/C가 발생한다.

정상 세포(ALK 또는 ROS1 이상이 없음)의 간기에서 ROS1 유전자 유전자자리는 융합 시그널 A-B로 표시되며, ALK 유전자 유전자자리는 융합 시그널 A-B로 표시되고, 이는 A/C 혼합된 시그널에 의해 동반된다. ALK 전좌에 의해 영향받은 세포의 간기에서, 전좌에 의해 영향받은 ALK 유전자는 표지 B 및 전자로부터 별도인 혼합된 시그널 A/C에 의해 표시된다. ROS1 전좌에 의해 영향받은 세포의 간기에서, ROS1 유전자는 표지 A의 별도의 시그널, 및 표지 B의 별도의 시그널에 의해 표시된다.

**도 2**는 혼합된 표지 및 혼합된 시그널을 나타내기 위한, 다수의 표지 사용과 관련된, 본 발명의 방법의 개략도를 나타낸다. 명확하게 하기 위해서, 2개의 표지만 나열한다. 유전자자리-특이적인 프로브 및 따라서 염색체 영역 또는 계놈 분절에 대해 특이적인 혼합된 시그널은 I) 프로브의 단편이 상이한 표지로 각각 표시되는 경우, 및/또는 II) 프로브의 모든 단편, 또는, 임의로, 프로브의 개개 단편 만이 다수의 표지로 표시되는 경우, 및/또는 III) 교호하는 단편이 상이한 표지로 표시됨으로써, 여기서, 최종적으로 혼합된 시그널 만이 가시성이 되거나 검출가능하게 되는 경우 발생할 수 있다. 이와 관련하여, I) 내지 III)에 따른 모든 또는 또한 개개 단편 만이 겹쳐질 수 있거나 오버랩될 수 있으며(나타내지 않음), 혼합된 표지는 I) 내지 III)에 따른 개개 단편 또는 단편 그룹이 예를 들면, 나타낸 "갭"내에서 2Mbp 이하의 공간을 갖는 경우에 발생할 수 있다.

**도 3**은 ZytoVision 회사로부터의 상응하는 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Dual-Mix NG-FISH 프로브"를 사용하는 경우 단일 양식의 개략도를 나타낸다. 상기 프로브는 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에 대해 지시되고, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에서 지시된, 녹색으로 표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀게 위치한 서열에 대해서, 및 6q22에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀게 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm에서 방출), 및 영역 2p23에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀게 및 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 이는 녹색/청색 및 오렌지색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 ROS1 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타난다.

정상 세포(ALK 또는 ROS1 이상이 없는)의 간기에서, 4개의 녹색-오렌지색 융합 시그널은 적합한 녹색-오렌지색 이중-밴드패스 필터 세트(green-orange dual-bandpass filter set)를 사용하는 경우 일어나며, 2개의 청색 시그널은 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 일어나고 2개의 녹색-오렌지색 융합 시그널 및 2개의 녹색-오렌지색/청색 융합 시그널 및 혼합된 시그널은 적합한 3중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 일어난다(참고; 도 3a).

ALK 전좌에 의해 영향받은 2p23 유전자자리는 별도의 녹색/청색 혼합된 시그널 및 별도의 오렌지색/청색 혼합된 시그널에 의해 특징화된다(참고; 도 3b).

ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널에 의해 특징화된다(참고; 도 3c).

녹색 및 오렌지색 시그널, 녹색 시그널, 및 이로부터의 별도의 오렌지색 시그널에 대해 적합한 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우, 따라서, 첫째로는 근본적으로, ALK 또는 ROS1 전좌가 존재하는 설명만을 허용한다. 이후에, ALK 또는 ROS1 전좌 사이의 진단적으로 가능한 관련된 구별은 청색 형광성 시그널을 포함하여 발생할 수 있다. 별도의 녹색 시그널 청색 시그널(녹색/청색의 혼합된 시그널)이 오버랩되거나, 별도의 오렌지색 시그널 청색 시그널(오렌지색/청색의 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 ALK 전좌를 나타낸다. 별도의 녹색 및 오렌지색 시그널이 청색 시그널과 오버랩되지 않는 경우, 이는 ROS1 전좌를 나타낸다.

**도 4**는 ZytoVision 회사로부터의 상응하는 4중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용하는 경우 시그널 양식의 개략도를 나타낸다. 당해 프로브는 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에 대해 지시되고, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에 대해 지시되는 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서 ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm에서 방출), 및 영역 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로 나타나며, 이는 녹색 및 오렌지색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 배열되지 않은 ROS1 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로 나타난다.

정상 세포(ALK 또는 ROS1 이상이 없음)의 간기에서, 4개의 녹색-오렌지색 융합 시그널은 적합한 녹색-오렌지색 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나며, 2개의 청색 시그널은 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나고, 2개의 녹색-오렌지색 융합 시그널 및 2개의 녹색-오렌지색/청색 융합 시그널 및 혼합된 시그널은 적합한 3중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타난다(참고; 도 4a).

ALK 전좌에 의해 영향받은 2p23 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색/청색 혼합된 시그널에 의해 특징화된다(참고; 도 4b).

ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널에 의해 특징화된다(참고; 도 4c).

녹색 및 오렌지색 시그널, 녹색 시그널, 및 이로부터 별도의 오렌지색 시그널에 대한 적합한 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우, 따라서, 첫째로는 근본적으로, ALK 또는 ROS1 전좌가 존재하는 기술만이 허용된다. 이후에, ALK 또는 ROS1 전좌 사이의 진단적으로 가능한 관련된 구별이 청색 형광성 시그널을 포함시켜 일어날 수 있다. 별도의 오렌지색 시그널 청색 시그널(오렌지색/청색 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 ALK 전좌를 나타낸다. 별도의 오렌지색 시그널이 청색 시그널과 오버랩되지 않는 경우, 이는 ROS1 전좌를 나타낸다.

**도 5**는 ZytoVision 회사로부터의 상응하는 6중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 & RET Break Apart Dual-Mix NG FISH 프로브"를 사용하는 경우 시그널 양식의 개략도를 나타낸다. 상기 프로브는 2p23 내에서 ALK 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에 대해, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해, 및, 10q11 내에서, RET 브레이크포인트 영역에 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 멀리 위치한 서열에 대해, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및, 10q11 내에서, RET 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm

에서 방출), 및 영역 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및, 10q11 내에서, RET 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널이 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 이는 녹색 및 오렌지색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 RET 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 이는 녹색/청색 혼합된 시그널 및 오렌지색 시그널로 구성된다. 배열되지 않은 ROS1 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타난다.

정상 세포(ALK, ROS1 또는 RET 이상이 없음)의 간기에서, 6개의 녹색-오렌지색 융합 시그널이 적합한 녹색-오렌지색 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나며, 4개의 청색 시그널이 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나고, 2개의 녹색-오렌지색 융합 시그널, 2개의 녹색-오렌지색/청색 융합 시그널 및 혼합된 시그널 및 2개의 녹색/청색-오렌지색 융합 시그널 및 혼합된 시그널이 적합한 삼중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타난다(참고: 도 5a).

ALK 전좌에 의해 영향받은 2p23 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색/청색 혼합된 시그널에 의해 특징화된다(참고: 도 5b).

ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널에 의해 특징화된다(참고: 도 5c).

RET 전좌에 의해 영향받은 10q11 유전자자리는 별도의 오렌지색 시그널 및 별도의 녹색/청색 혼합된 시그널에 의해 특징화된다(참고: 도 5d).

녹색 및 오렌지색 시그널, 녹색 시그널, 및 이로부터 별도의 오렌지색 시그널에 대해 적합한 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우에, 첫째로는 근본적으로, ALK, ROS1 또는 RET 전좌가 존재한다는 설명 만이 허용된다. 이후에, ALK, ROS1 또는 RET 전좌 사이의 진단적으로 가능한 관련된 구별이 청색 형광성 시그널을 포함시켜 일어날 수 있다. 별도의 오렌지색 시그널 청색 시그널(오렌지색/청색 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 ALK 전좌를 나타낸다. 별도의 녹색 시그널 청색 시그널(녹색/청색 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 RET 전좌를 나타낸다. 어떠한 별도의 오렌지색 시그널 또는 별도의 녹색 시그널도 청색 시그널과 오버랩되지 않는 경우, 이는 ROS1 전좌를 나타낸다.

**도 6**은 ZytoVision GmbH 회사로부터의 상응하는 6중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 & RET Break Apart Dual-Mix II NG-FISH 프로브"를 사용하는 경우 시그널 양식의 개략도를 나타낸다. 상기 프로브는 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및, 10q11 내에서, RET 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열, 및, 10q11 내에서, RET 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 적색-표시된 폴리뉴클레오타이드(580nm에서 흡수 및 599nm에서 방출), 영역 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출), 및 영역 10q11 내에서, RTE 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 금색-황색-표시된 폴리뉴클레오타이드(532nm에서 흡수 및 553nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-적색 형광성 융합 시그널로 나타나며, 이는 녹색 및 적색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 RET 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-적색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 이는 녹색/금색-황색 혼합된 시그널 및 적색 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 ROS1 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 녹색-적색 형광성 융합 시그널로서 나타난다.

정상 세포(ALK, ROS1 또는 RET 이상이 없음)의 간기에서, 6개의 녹색-적색 융합 시그널은 적합한 녹색-적색 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나며, 2개의 청색 시그널은 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타나고, 2개의 금색-황색 시그널은 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 나타난다(참고: 도 6a).

ALK 전좌에 의해 영향받은 2p23 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 적색/청색 혼합된 시그널에 의해

특징화된다(참고: 도 6b).

ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 적색 시그널에 의해 특징화된다(참고: 도 6c).

RET 전좌에 의해 영향받은 10q11 유전자자리는 별도의 적색 시그널 및 별도의 녹색/금색-황색 혼합된 시그널에 의해 특징화된다(참고: 도 6d).

녹색 및 적색 시그널, 녹색 시그널, 및 이들과 별도의 적색 시그널에 대해 적합한 이중-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우 첫째로 근본적으로, ALK, ROS1 또는 RET 전좌가 존재한다는 설명 만이 허용된다. 이후에, ALK, ROS1 또는 RET 전좌 사이의 진단적으로 가능하게 관련된 구별이 청색 또는 금색-황색 형광성 시그널의 포함으로 일어날 수 있다. 별도의 적색 시그널 청색 시그널(적색/청색 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 ALK 전좌를 나타낸다. 별도의 녹색 시그널 금색-황색 시그널(녹색/금색-황색 혼합된 시그널)이 오버랩되는 경우, 이는 RET 전좌를 나타낸다. 별도의 적색 시그널 또는 별도의 녹색 시그널도 청색 또는 금색-황색 시그널과 오버랩되지 않는 경우, 이는 ROS1 전좌를 나타낸다.

도 7은 4개의 프로브 및 4개의 표지를 사용한, 4개의 수치적 이상의 검출을 위한 본 발명에 따른 방법의 개략도를 나타내며, 여기서 3개의 프로브는 각각의 예에서 2개의 표지로 동시 표시되고, 여기서 조합에 사용된 상기 표지는 이들 3개의 프로브의 경우에 서로 상이하다. 이는 정상 세포의 경우 및 7q31내 MET 유전자의 증폭이 있는 세포의 경우에 시그널 양식을 나타낸다. ERBB2 유전자의 영역 17q11.2-q12는 표지 A에 포함되고, EGFR 유전자의 영역 7p12는 표지 A에 포함되며 추가로 표지 D에 포함되므로, 혼합된 표지 A/D가 발생하며, FGFR1 유전자의 영역 8p11.23-p11.22는 표지 A 및 또한 표지 C에 포함되므로, 혼합된 표지 A/C가 발생하고, MET 유전자의 영역 7q31은 표지 A 및 추가로 표지 B에 포함되므로, 혼합된 표지 A/B가 발생한다.

정상 세포(수치적 ERBB2, EGFR, FGFR1 또는 MET 이상이 없음)의 간기에서, 모든 유전자자리는 표지 A의 시그널에 의해 표시된다. 표지 B의 시그널을 사용한 표지 A의 시그널의 동시-국제화는 혼합된 표지 A/B를 생성하고 MET 유전자 유전자자리를 표시한다. 따라서, 혼합된 표지 A/C는 FGFR1 유전자 유전자자리를 표시하고, 혼합된 표지 A/D는 EGFR 유전자 유전자자리를 표시한다. ERBB2 유전자 유전자자리는 다른 표지를 사용한 동시-국제화가 발생하지 않는다는 점에서 특징화된다. MET 유전자 증폭이 있는 세포의 간기에서, 표지 B의 시그널과 동시-국제화되는, 표지 A의 시그널에 있어서의 증가가 발생하므로, 혼합된 표지 A/B의 시그널에 있어서의 증가가 발생한다.

도 8은 각각의 예에서 14개의 프로브 및 5개의 표지를 사용한, 7개의 전좌 또는 증폭의 검출에 대한 본 발명에 따른 방법의 개략도를 나타내며, 여기서 프로브는 2개의 표지로 동시 표시되고, 양 비는 프로브당 2개의 표지를 구별한다. 프로브 각각은 도 8의 좌측 상부 및 우측 상부 부분에 나타난 바와 같이, 브레이크포인트 영역("브레이크포인트")를 플랭크하거나 증폭 영역("증폭"), 및 동일한 염색체 상의 추가의 영역(예를 들면, 중심체 영역)에 초점을 맞춘다. 염색체의 2개의 프로브는 2개의 상이한 표지 및 하나의 동일한 표지로 표시된다(예를 들면, 프로브 1: 25% 녹색, 75% 청색 및 프로브 2: 25% 황색 및 75% 청색). 따라서 브레이크포인트 영역을 각각 플랭크하는 2개의 프로브 각각은 전좌에 의해 영향받지 않은 세포 내에서 3개의 표지로부터의 융합 시그널 및 혼합된 시그널을 생산한다. 따라서, 각각 동일한 염색체에서 증폭 영역 및 추가의 영역에 초점을 맞추는 2개의 프로브 각각은 증폭에 의해 영향받지 않은 세포 내에서 별도의 혼합된 시그널을 생산한다(단, 2개의 프로브 사이의 거리는 경미하여 융합 시그널 및 혼합된 시그널이 발생한다). 상이한 혼합된 시그널은 이를 사용하여 프로브가 표시되는 2개의 표지 사이의 양 비를 변화시킴에 의해 생성되므로, 다수의 프로브가 동일한 표지(예를 들면, 나타난 실시예에서 브레이크포인트 영역 1 내지 4에 대한 4개의 프로브: 25% 내지 75%; 50% 내지 50%; 75% 내지 25%, 및 100% 내지 0%)를 사용하여, 구별가능한 방식으로 표시될 수 있다.

정상 세포(전좌가 없음)의 간기에서, 유전자의 브레이크포인트 영역은 혼합된 시그널 A-B 및 C-B에 의해 표시되며, 이는 합하여 A/B/C 융합 시그널을 형성한다. 정상 세포(증폭이 없음)의 간기에서, 유전자의 증폭 영역은 동일한 염색체 상의 혼합된 시그널 A-B, 및 추가의 영역에 의해 표시되며, 예를 들면, 중심체 영역은 혼합된 시그널 C-B에 의해 표시된다. 전좌에 의해 영향받은 세포의 간기에서, 전좌에 의해 영향받은 유전자는 표지 A-B의 별도의 시그널 및 이와 분리되는 혼합된 시그널 C-B에 의해 표시된다. 증폭에 의해 영향받은 세포의 간기에서, 증폭에 의해 영향받은 유전자는 표지 쌍, 예를 들면, A-B의 재생산된 혼합된 시그널에 의해 표시된다.

도 9는 ZytoVision 회사로부터의 4중 FISH-프로브 "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용하여, 6p22 내에서 ROS1 영역의 전좌의 검출을 위한 FISH 분석을 나타낸다. 상기 프로브는

2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm에서 방출), 및 영역 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 배열되지 않은 ROS1 및/또는 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널이 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 재배열된 ROS1 및/또는 ALK 유전자의 경우, 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널로 나타난다(참고: 녹색 및 오렌지색 형광성 시그널을 나타내는 도 9a). 이와 관련하여, ROS1-특이적인 녹색 시그널은 청색 형광성 시그널과 동시-국제화되므로(참고: 청색 형광성 시그널을 나타내는 도 9b), 재배열되지 않은 ROS1 유전자는 오렌지색 및 녹색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 청색 형광성 시그널을 지닌 혼합된 시그널이 없이, 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타난다. ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널에 의해 특징화된다(도 9a 및 9c에서 화살표). 이와 관련하여, 상기 별도의 녹색 시그널은 청색 시그널과 오버랩된다. 당해 녹색/청색 혼합된 시그널은 전좌에 의해 영향받은 유전자로서, ALK가 아닌, ROS1을 나타낸다(참고: 청색, 녹색, 및 오렌지색 형광성 시그널을 나타내는, 도 9c). 적합한 필터 세트를 사용하여, 시그널 양식을 용이하게 가시화하는 것이 가능하다.

**도 10**은 ZytoVision 회사로부터의 4중 CISH-프로브 "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-MIX NG-FISH 프로브"를 사용하여, 2p23 내에서 ALK 영역의 전좌의 검출을 위한 CISH 분석을 나타낸다. 상기 프로브는 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 디콕시게닌-표시된 폴리뉴클레오타이드, 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 DNP-표시된 폴리뉴클레오타이드, 및 영역 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 바이오틴-표시된 폴리뉴클레오타이드로 이루어진다. 표시의 검출은 제2의 중합된 효소-접합된 항체(HRP 중합체/AP 중합체/베타-GAL)에 의해 검출된, 1차(표시되지 않은) 항체(항-DIG/항-DNP/항-BIO), 및 예를 들면, 40x 무수 렌즈를 사용하여, 광학 현미경에 의해 묘사될 수 있는, 강력하고, 영구적인, 적색(R), 녹색(G), 및 청색(B) 시그널의 형성을 초래하는 기질(AP-RED/HRP-녹색/베타-GAL-청색)의 효소 반응에 의해 일어난다.

**도 11**은 ZytoVision 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브"를 사용하여, ERBB2 영역의 증폭의 검출을 위한 FISH 분석을 나타낸다. 상기 프로브는 ERBB2 유전자의 영역 17q11.2-q12, EGFR 유전자의 영역 7p12, EGFR1 유전자의 영역 8p11.23-p11.22, MET 유전자의 영역 7q31, 및 SOX2 유전자의 영역 3q26.3-q27에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 및 EGFR 유전자 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출), FGFR1 유전자의 영역에 대해 지시된 금색-황색-표시된 폴리뉴클레오타이드(532nm에서 흡수 및 553nm에서 방출), 및 MET 유전자 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된, 적색-표시된 폴리뉴클레오타이드(580nm에서 흡수 및 599nm에서 방출)로 이루어진다.

적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우, 9개의 개개의 녹색 시그널 및 녹색 시그널 집단을 관찰하는 것이 가능하며, 이는 다수의 개개 녹색 시그널의 표면 영역(참고: 도 11a), 4개의 청색 시그널(참고: 도 11b), 2개의 금색-황색 시그널(참고: 도 11c), 및 4개의 적색 시그널(참고: 도 11d)의 표면적을 차지한다.

영상의 중첩(참고: 도 11e)은 단일의 녹색 시그널 및 녹색 시그널 집단이 상이한 색상의 시그널(화살표)로 동시-국제화되지 않음을 나타낸다. 단일의 녹색 시그널은 증폭되지 않은 ERBB2 유전자이고; 녹색 시그널 집단은 ERBB2 유전자 증폭을 확인한다. 동시-국제화하는 녹색/청색 혼합된 시그널은 EGFR 유전자의 2개의 카피를 확인하고, 동시-국제화하는 녹색/금색-황색 혼합된 시그널은 FGFR1 유전자의 2개의 카피를 확인하여, 동시-국제화하는 녹색/적색 혼합된 시그널은 MET 유전자의 2개의 카피를 확인하고 동시-국제화하는 녹색/청색/적색 혼합된 시그널은 SOX2 유전자의 2개의 카피를 확인한다(참고: 도 11e).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**예시적인 구현예**

[0170]

- [0171] 본 발명에 따른 방법의 특성을 추가로 기록하기 위하여, 하기 기술된 반응계내 하이브리드화를 추가로 수행하였다:
- [0172] **실시예 1:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브"를 사용한, 상이한 세포 유형에서 다수의 수치적 이상의 검출을 위한 FISH 분석
- [0173] FISH를 수행하는 것은 두께가 3 내지 5 μm인 포르말린-고정된 파라핀-매립된(FFPE) 패 및 유방 암종 제제의 단면에서 이미 진단된 ERBB2 유전자 증폭의 존재 및 부재하에서 수행하였으며, 이를 피복된 유리 물체 캐리어 (glass object carrier)에 도포하고 58°C에서 밤새 구웠다.
- [0174] 파라핀을 제거하기 위해, 제제를 우선 핫플레이트(hotplate)에서 70°C에서 10분 동안 가열한 후 100% 크실렌 중 실온(RT)에서 매 10분 동안 2회 향온처리하였다. 이후에, 제제를 강하하는 에탄올 계열(96%, 96%, 90%, 70% 변성된 에탄올 속에서 RT에서 한번에 5분 동안) 및 초고순도의 물 속에서 향온처리(RT에서 매 2분 동안 2회)함으로써 탈수시켰다. 세포의 투과를 위해, 이는 열 예비처리 용액 시트릭(Heat Pretreatment Solution Citric)(ZytoVision GmbH) 속에서 98°C에서 15분 동안 열 예비처리에 이어 RT에서 초고순도 물 속에서 2분 동안 2회의 추가의 향온처리 단계를 수반한다. 단백질용해성 예비처리는 펩신 용액(Pepsin Solution, ZytoVision GmbH)을 제제 위에 드리핑(dripping)한 후 습윤 체임버 속에서 37°C에서 25분 동안 후속적인 향온처리함으로써 수행하였다. 세척 완충액(Wash Buffer) SSC(ZytoVision GmbH) 속에서 5분 동안 후속적인 향온처리한 후, 제제를 탈수(각각의 예에서, 초고순수 물, 70%, 90%, 96% 에탄올 속에서 RT로 1분)시켰다. 제제를 공기 건조시킨 후, 10 μl의 FISH 프로브 Zytolight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브(ZytoVision GmbH)를 피펫을 사용하여 단면에 직접 도포하였다.
- [0175] 상기 프로브는 5개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로 한 혼합물이었으며, 여기서 당해 혼합물은 ERBB2 유전자의 영역 17q11.2-q12, EGFR 유전자의 영역 7p12, FGFR1 유전자의 영역 8p11.23-p11.22, MET 유전자의 영역 7q31, 및 SOX2 유전자의 영역 3q26.3-q27에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드 (503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 및 EGFR 유전자의 영역 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출), FGFR1 유전자의 영역에 대해 지시된 금색-황색-표시된 폴리뉴클레오타이드(532nm에서 흡수 및 553nm에서 방출), 및 MET 유전자 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된 적색-표시된 폴리뉴클레오타이드(580nm에서 흡수 및 599nm에서 방출)로 이루어진다. 후속적으로, 유리 커버를 제공하여, 공기 거품을 제거하고, 가장자리를 픽소검(Fixogum)(Marabu)으로 밀봉하였다. 제제를 핫플레이트 위에서 75°C에서 10분 동안 변형시킨 후, 하이브리드화를 예비가열된 습윤 체임버 속에서 37°C에서, 가열 오븐 속에서 밤새(대략 16시간) 수행하였다.
- [0176] 하이브리드화 후, 픽소검(Fixogum)을 제거하고 제제를 유리 큐베트 속의 세척 완충액(1x 세척 완충액 A, ZytoVision GmbH) 속에서 37°C에서 3분 동안 향온처리하였다. 유리 커버를 제거한 후, 수렴제 세척(astringent washing)을 세척 완충액(1x 세척 완충액 A, ZytoVision GmbH) 속에서 37°C에서 5분 동안 2회 수행하였다. 후속적으로, 제제를 탈수시키고 상승하는 에탄올 계열 속에서 1분 동안, 각각의 예에서 70%, 90%, 96% 중 RT에서 건조시켰으며, 여기서 제제는 직접적인 광에 대해 보호하였다. 계수-염료(20 μl의 DAPI DuraTect 용액(ZytoVision GmbH))의 도포 후, 유리 커버를 도포하여, 공기 거품을 제거하고, 제제를 RT에서 적어도 30분 동안 향온처리하고, 광에 대해 보호하였다.
- [0177] 후속적으로, 형광 현미경을 사용한 평가를 적합한 필터 세트(Sp. 녹색 HC mFISH 필터 세트; Sp. 적색 HC mFISH 필터 세트; Sp. Aqua HC mFISH 필터 세트; Zy금색 HC mFISH 필터 세트(모두 AHF Analysentechnik AG))를 사용하여 수행하였다(광 단위 HXP 120 V를 지닌 Axio Scope.A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH).
- [0178] 이와 관련하여, 10개의 녹색 시그널이 각각의 예에서, 녹색 필터(또는 ERBB2 증폭의 경우, 보다 녹색인 시그널, 참고: 도 11a)를 사용하는 경우 ERBB2 증폭이 없는 제제에서 세포 핵 속에서 발견되었다. ZyGold 필터를 사용하여, 2개의 금색-황색 시그널이 세포 핵당 관찰되었으며, 각각의 예에서, 이의 공간 위치는 2개의 녹색 시그널의 것과 동일하였다(도 11c에서와 같음). 적색 필터를 사용하여, 4개의 적색 시그널이 세포 핵당 관찰되었으며, 각각의 예에서, 이의 공간 위치는 4개의 녹색 시그널의 것과 동일하였다(도 11d에서와 같음). 아쿠아 필터(aqua filter)를 사용하여, 4개의 아쿠아 시그널이 세포 핵당 관찰되었으며, 각각의 예에서, 이의 공간 위치는 4개 녹색 시그널의 것과 동일하였고, 2개의 시그널의 경우, 각각의 예에서, 또한 2개의 적색 시그널과 동일하였다(도 11d에서와 같음). 당해 시그널 양식은 다음과 같이 해석하는 것이 가능하였다: 다른 색상의 시그널의 공간적으로 동일한 국제화가 없는 2개의 녹색 시그널이 이배체 세포의 2개의 ERBB2 유전자 카피에서 확인되었다. 2

개의 아쿠아 시그널의 공간적으로 동일한 국제화를 갖는 2개의 녹색 시그널은 2개의 EGFR 유전자 카피를 확인하였으며, 2개의 금색-황색 시그널의 공간적으로 동일한 국제화를 지닌 2개의 녹색 시그널은 2개의 FGFR1 유전자 카피를 확인하였고, 2개의 적색 시그널의 공간적으로 동일한 국제화를 지닌 2개의 녹색 시그널은 2개의 MET 유전자 카피를 확인하였으며, 2개의 적색 시그널 및 2개의 아쿠아 시그널의 공간적으로 동일한 국제화를 지닌 2개의 녹색 시그널은 2개의 SOX2 유전자 카피를 확인하였다.

- [0179] ERBB2 증폭을 지닌 제제의 세포 핵에서, 상기 기술된 것과 비교가능한 시그널 양식이 발견되었으며, 예외적으로, 9개의 녹색 시그널과는 달리, 이들이 분리될 수 없는 함께 매우 근접하게 놓여있는 대략 15개의 시그널로 이루어진 녹색 시그널 집단 또는 시그널 양식이 관찰되었다(참고: 도 11a). 당해 녹색 시그널 양식은 상이한 색상의 시그널과 동시-국제화되지 않았으므로 ERBB2 유전자 증폭을 확인하였다.
- [0180] **실시예 2:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용한, 상이한 세포 유형에서 ALK 및 ROS1 영역의 전좌의 검출을 위한 FISH 분석.
- [0181] FISH를 수행하는 것은 세포주 HeLa(ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), HCC78(셴트하우스(Schildhaus) 박사에 의해 이용가능하게 제조됨, Göttingen), 및 H3122(셴트하우스 박사에 의해 이용가능하게 제조됨, Göttingen)의 포르말린으로 응고되고, 파라핀이 장입된(FPFE: formalin-fixed, paraffin-embedded) 세포의 두께가 3 내지 5 μm인 단면을 사용하여 수행하였으며, 이는 피복된 유리 물체 캐리어에 도포되어 58°C에서 밤새 구웠다.
- [0182] 파라핀을 제거하기 위해, 제제를 우선 핫플레이트에서 70°C에서 10분 동안 가열한 후 100% 크실렌 중 실온(RT)에서 매 10분 동안 2회 항온처리하였다. 이후에, 제제를 강하하는 에탄올 계열(96%, 96%, 90%, 70% 변성된 에탄올 속에서 RT에서 각각의 예에서 5분 동안) 및 초고순도의 물 속에서 항온처리(RT에서 2분 동안 2회)함으로써 탈수시켰다. 세포의 투과를 위해, 이는 열 예비처리 용액 시트릭(ZytoVision GmbH) 속에서 98°C에서 15분 동안 열 예비처리에 이어 RT에서 초고순도 물 속에서 2분 동안 2회의 추가의 항온처리 단계를 수반하였다. 단백질용해성 예비처리는 펩신 용액(Pepsin Solution, ZytoVision GmbH)을 제제 위에 드리핑한 후 습윤 챔버 속에서 37°C에서 25분 동안 후속적인 항온처리함으로써 수행하였다. 세척 완충액 SSC(ZytoVision GmbH) 속에서 5분 동안 후속적인 항온처리 후, 제제를 각각의 예에서, 초고순도 물, 70%, 90%, 96% 에탄올 속에서 RT로 1분 동안 탈수시켰다. 제제를 공기 건조시킨 후, 10 μl의 FISH 프로브 ZytoLight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH 프로브(ZytoVision GmbH)를 각각의 예에서 피펫을 사용하여 단면에 직접 도포하였다.
- [0183] 상기 프로브는 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로 한 혼합물이었으며, 여기서 당해 혼합물은 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm에서 방출), 및 영역 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어진다. 후속적으로, 유리 커버를 도포하여, 공기 거품을 제거하고, 가장자리를 픽소검(Marabu)으로 밀봉하였다. 제제를 핫플레이트 위에서 75°C에서 10분의 기간에 걸쳐 변형시킨 후, 하이브리드화를 예비가열된 습윤 챔버 속에서 37°C에서, 가열 오븐 속에서 밤새(대략 16시간) 수행하였다.
- [0184] 하이브리드화 후, 픽소검을 제거하고 제제를 유리 큐벳 속의 세척 완충액(1x 세척 완충액 A, ZytoVision GmbH) 속에서 37°C에서 3분 동안 항온처리하였다.
- [0185] 유리 커버를 제거한 후, 수렴계 세척을 세척 완충액(1x 세척 완충액 A, ZytoVision GmbH) 속에서 37°C에서 각각 5분 동안 2회 수행하였다. 후속적으로, 제제를 상승하는 에탄올 계열 속에서 (1분 동안, 각각의 예에서 70%, 90%, 96% 중 RT에서) 탈수시키고 공기-건조시켰으며, 여기서 샘플은 직접적인 광에 대해 보호하였다. 계수-염료(20 μl의 DAPI DuraTect 용액, ZytoVision GmbH)의 도포 후, 유리 커버를 도포하여, 공기 거품을 제거하고, 제제를 RT에서 적어도 30분 동안 항온처리하고, 광에 대해 보호하였다.
- [0186] 후속적으로, 형광 현미경(조명 장치 HXP 120 V가 구비된 Axio Scope.A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH)을 사용한 평가를 적합한 필터 세트(이중밴드 녹색/오렌지색-적색 필터 세트; AHF Analysentechnik; Sp. Aqua HC mFISH 필터 세트, AHF Analysentechnik AG))를 사용하여 수행하였다.
- [0187] 이와 관련하여, 오렌지색/녹색 이중 필터를 사용하는 경우, 6개의 오렌지색/녹색 융합 시그널이 각각의 예에서, HeLa 세포주의 세포 핵 내에서, 대부분의 분석된 핵 내에서 발견되었으며; 개개의 녹색 및/또는 오렌지색 시그

날은 관찰되지 않았다. 아쿠아 필터를 사용하여, 각각의 예에서, 세포 핵당 3개의 아쿠아 시그널이 관찰되었으며, 이의 공간 위치는 융합 시그널의 것과 동일하였다. 시그널 양식은 ALK 유전자의 3개의 카피 및 ROS1 유전자의 3개의 카피로서, 문헌과 일치하여, 해석되었다. ALK 또는 ROS1 전좌는 존재하지 않았다.

[0188] 이에 대해 ALK 유전자의 전좌가 문헌에 기술되어 있는, 세포주 H3122의 세포 핵에서, 대부분의 분석된 핵에서, 오렌지색/녹색 이중 필터를 사용하는 경우, 각각의 예에서 7개의 오렌지색/녹색 융합 시그널 및 단일의 오렌지색 시그널이 발견되었다. 아쿠아 필터를 사용하는 경우, 각각의 예에서, 세포 핵당 2개의 아쿠아 시그널이 관찰되었으며, 이의 공간 위치는 2개이 융합 시그널의 것과 동일하였다. 시그널 양식은 이들 중 하나가 전좌에 의해 영향받은, ALK 유전자의 6개 카피로서, 및 ROS1 유전자의 2개의 카피로서, 문헌과 일치하여 해석되었다.

[0189] 이에 대한 ROS1 유전자의 전좌가 문헌에 기술되어 있는, 세포주 HCC78의 세포 핵에서, 각각의 예에서, 4개의 오렌지색/녹색 융합 시그널, 2개의 개개의 오렌지색 시그널, 및 즉 서로 별도로, 2개의 개개의 녹색 시그널이 대부분의 분석된 핵에서 오렌지색/녹색 이중 필터를 사용하는 경우 발견되었다. 아쿠아 필터를 사용하는 경우, 4개의 아쿠아 시그널이 각각의 예에서, 세포 핵 당 관찰되었으며, 이의 공간 위치는 2개의 융합 시그널 및 2개의 별도의 녹색 시그널과 동일하였다. 시그널 양식은 이들 중 2개가 전좌에 의해 영향받은, ROS1 유전자의 4개의 카피, 및 ALK 유전자의 2개의 카피로서 문헌과 일치하게, 해석되었다.

[0190] **실시예 3:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용한, 6q22 내에서 ROS1-영역의 전좌의 검출을 위한 FISH 분석

[0191] 6q22 내에서 ROS1-영역의 전좌의 검출을 위한 FISH 분석을 ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "Zytolight SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-Mix NG-FISH 프로브"를 사용하여 수행하였다. 당해 프로브는 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로 하는 혼합물이었으며, 여기서 당해 혼합물은 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출), 2p23내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및, 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 오렌지색-표시된 폴리뉴클레오타이드(547nm에서 흡수 및 572nm에서 방출), 및 영역 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출)로 이루어졌다.

[0192] 적합한 필터 세트를 사용하는 경우, 재배열되지 않은 ROS1 및/또는 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널이 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타나며, 재배열된 ROS1 및/또는 ALK 유전자의 경우, 별도의 녹색 및 별도의 오렌지색 시그널로서 나타난다. 이와 관련하여, ROS1-특이적인 녹색 시그널은 청색 형광성 시그널과 함께 동시-국재화되므로, 재배열되지 않은 ROS1 유전자는 오렌지색 및 녹색/청색 형광성 혼합된 시그널로 구성된다. 재배열되지 않은 ALK 유전자에 대한 하이브리드화 시그널은 청색 형광성 시그널과의 혼합된 시그널없이 녹색-오렌지색 형광성 융합 시그널로서 나타났다(도 9a). ROS1 전좌에 의해 영향받은 6q22 유전자자리는 별도의 녹색 시그널 및 별도의 오렌지색 시그널에 의해 특징화되었다(도 9a 화살표).

[0193] 이와 관련하여, 별도의 녹색 시그널은 청색 시그널과 오버랩되었다(청색 시그널, 도 9b). 당해 녹색/청색 혼합된 시그널은 전좌에 의해 영향받은 유전자로서, ALK가 아닌, ROS1을 나타내었다. 적합한 필터 세트를 사용하여, 시그널 양식을 용이하게 가시화하는 것이 가능하였다.

[0194] **실시예 4:** ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 CISH 프로브 "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-MIX NG-FISH 프로브"를 사용한, 2p23 내에서 ALK 영역의 전좌의 검출을 위한 CISH 분석

[0195] 또한, 2p23 내에서 ALK 영역의 전좌의 검출을 위한 CISH 분석을 ZytoVision GmbH 회사로부터의 4중 CISH 프로브 "ZytoDot SPEC ALK & ROS1 Break Apart Single-MIX NG-FISH 프로브"를 사용하여, 수행하였다. 당해 프로브는 4개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로 한 혼합물이었으며, 여기서 당해 혼합물은 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 근접하게 위치한 서열에 대해 지시된 디콕시제닌-표시된 폴리뉴클레오타이드, 2p23 내에서, ALK 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해, 및 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 DNP-표시된 폴리뉴클레오타이드, 및 영역 6q22 내에서, ROS1 브레이크포인트 영역에 대해 멀리 위치한 서열에 대해 지시된 바이오틴-표시된 폴리뉴클레오타이드로 이루어졌다. 표시의 검출은 제2의 중합된 효소-접합된 항체(HRP 중합체/AP 중합체/베타-GAL)에 의해 검출된, 1차(표시되지 않은) 항체(항-DIG/항-DNP/항-BIO), 및 예를 들면, 40x 무수 렌즈를 사용하여, 광학 현미경을 사용하여 묘사할 수 있었던, 강력하고,

연구적인, 적색, 녹색, 및 청색 시그널의 형성을 생성하는, 기질(AP-RED/HRP-녹색/베타-GAL-청색)의 효소 반응에 의해 수행되었다.

[0196] ALK 또는 ROS1 유전자의 재배열 또는 전좌가 없는 이배체 또는 이염색체 세포 핵은 2개의 시그널을 나타내었으며, 각각은 적색 시그널 및 녹색 시그널로 이루어지고, 이는, 이들이 분리될 수 없거나 부분적으로 오버랩될 수 없거나 혼합될 수 없도록 함께 매우 근접하게 놓여 있고, ALK 유전자의 2개의 카피에 대해 특이적이다(도 10). 또한, 2개의 시그널이 발견되었으며, 이들 각각은 각각의 예에서 적색 시그널, 녹색 시그널, 및 청색 시그널로 이루어졌고, 이들이 분리될 수 없거나, 부분적으로 오버랩될 수 없거나 혼합될 수 없도록 매우 근접하게 놓여있으며, ROS1 유전자의 2개의 카피에 대해 특이적이었다.

[0197] ALK 유전자의 재배열 또는 전좌를 지니지만, ROS1 대립형질의 것을 가지지 않은 이배체 또는 이염색체 세포 핵은 적색-녹색 시그널을 나타내었으며, 이는 재배열되지 않은 ALK 대립형질에 대해 특이적이었다(도 10). 또한, 이들은 전자와 별도의, 단일의 녹색 시그널 및 단일의 적색 시그널을 나타내었고, 이는 재배열된 ALK 대립형질에 대해 특이적이었다(도 10, 화살표 "G" = 녹색 및 "R" = 적색). 또한, 2개의 적색-녹색-청색 시그널이 발견되었으며, 이들은 ROS1 유전자의 2개의 카피에 대해 특이적이었다.

[0198] ROS1 유전자의 재배열 또는 전좌를 지니지만, ALK 대립형질의 것을 지니지 않은 이배체 또는 이염색체 세포 핵은 적색-녹색-청색 시그널을 나타내었으며, 이는 재배열되지 않은 ROS1 대립형질에 대해 특이적이었다. 또한, 이들은 재배열된 ROS1 대립형질의 경우, 전자와는 별도의 단일의 적색-청색 시그널, 및 ALK 유전자의 2개의 카피에 대해 특이적이었던, 2개의 적색-녹색 시그널을 나타내었다.

[0199] **실시예 5:** ZytoVision 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브"를 사용한, ERBB2 영역의 증폭의 검출을 위한 FISH 분석

[0200] 최종적으로, ERBB2 영역의 증폭의 검출을 위한 FISH 분석을 ZytoVision 회사로부터의 4중 FISH 프로브 "ZytoLight SPEC ERBB2, EGFR, FGFR1, MET & SOX2 FiveCheck™ NG-FISH 프로브"를 사용하여 수행하였다. 당해 프로브는 5개의 유전자자리-특이적인 하이브리드화 프로브를 기반으로 한 혼합물이었으며, 여기서 당해 혼합물은 ERBB2 유전자의 영역 17q11.2-q12에 대해, EGFR 유전자의 영역 7p12에 대해, FGFR1 유전자의 영역 8p11.23-p11.22에 대해, MET 유전자의 영역 7q31에 대해, 및 SOX2 유전자의 영역 3q26.3-q27에 대해 지시된, 녹색-표시된 폴리뉴클레오타이드(503nm에서 흡수 및 528nm에서 방출) 및 EGFR 유전자 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된, 청색-표시된 폴리뉴클레오타이드(426nm에서 흡수 및 480nm에서 방출), FGFR1 유전자의 영역에 대해 지시된 금색-황색-표시된 폴리뉴클레오타이드(532nm에서 흡수 및 553nm에서 방출) 및 MET 유전자 및 SOX2 유전자의 영역에 대해 지시된 적색-표시된 폴리뉴클레오타이드(580nm에서 흡수 및 599nm에서 방출)로 이루어졌다..

[0201] 적합한 단일-밴드패스 필터 세트를 사용하는 경우, 다수의 개개 녹색 시그널의 표면적에서 시작하는, 9개의 개개의 녹색 시그널 및 1개의 녹색 시그널 집단이, 4개의 청색 시그널, 2개의 금색-황색 시그널, 및 4개의 적색 시그널과 함께 발견되었다.

[0202] 영상의 증첩은, 단일의 녹색 시그널 및 녹색 시그널 집단이 다른 색상의 시그널과 동시-국제화하지 않았음을 나타낸다. 단일의 녹색 시그널은 증폭되지 않은 ERBB2 유전자를 포함하였으며; 녹색 시그널 집단은 ERBB2 유전자 증폭을 확인하였다. 녹색/청색 혼합된 시그널을 동시-국제화하는 것은 2개의 카피의 EGFR 유전자를 확인하였고, 동시-국제화하는 녹색/금색-황색 혼합된 시그널은 2개의 카피의 FGFR1 유전자를 확인하였으며, 동시-국제화하는 녹색/적색 혼합된 시그널은 2개의 카피의 MET 유전자를 확인하였고, 동시-국제화하는 녹색/청색/적색 혼합된 시그널은 2개의 카피의 SOX2 유전자를 확인하였다.

[0203] **본 발명의 추가의 국면**

[0204] 제1 국면: 제1 국면에 따라서, 본 발명은 4 내지 24개의 유전자자리-특이적인 프로브가 1 내지 24개의 상이한 표지로 각각 표시되고, 적어도 하나의 유전자자리-특이적인 프로브가 또한 적어도 하나의 추가의 표지(및 최대 6개의 추가의 표지)로 동시에 표시됨으로써, 혼합된 시그널이 이들 혼합된 표지의 방식으로 발생함을 특징으로 하는, 직접적으로 또는 간접적으로 표시된 핵산 단편(프로브)를 기반으로, (다수의) 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상의 검출(및 차별화)를 위한, 세포 내에서 다수의 상이한 염색체 영역 또는 DNA 영역의 검출 방법에 관한 것이며, 여기서, 임의로, 동일한 혼합된 표지를 지닌 개개의 프로브는 이로부터 생성될 수 있는 상이한 혼합된 시그널에 의해, 개개 표지의 상이한 비를 기반으로 차별화됨으로서, 염색체 이상의 경우에 비정상적인 시그널 양식이 영향받은 유전자자리에 명확하게 지정될 수 있고, 즉, 이상에 의해 영향받은 유전자자리가 혼합된 시그널 양식을 사용하여 확인될 수 있고, 여기서 혼합된 시그널은 모든 단편 또는 임의로 프로브의 개개의 단편

만이 a) 다수의 표지로 표시되고/되거나 b) 동일한 단편이 상이한 표지로 표시되고/되거나 c) 교호하는 단편이 상이한 표지로 표시되는 경우 발생할 수 있으며, 여기서 상술한 단편은 또한 중첩될 수 있거나 또는 게놈 영역 내에서 2Mbp까지의 거리를 또한 가질 수 있다.

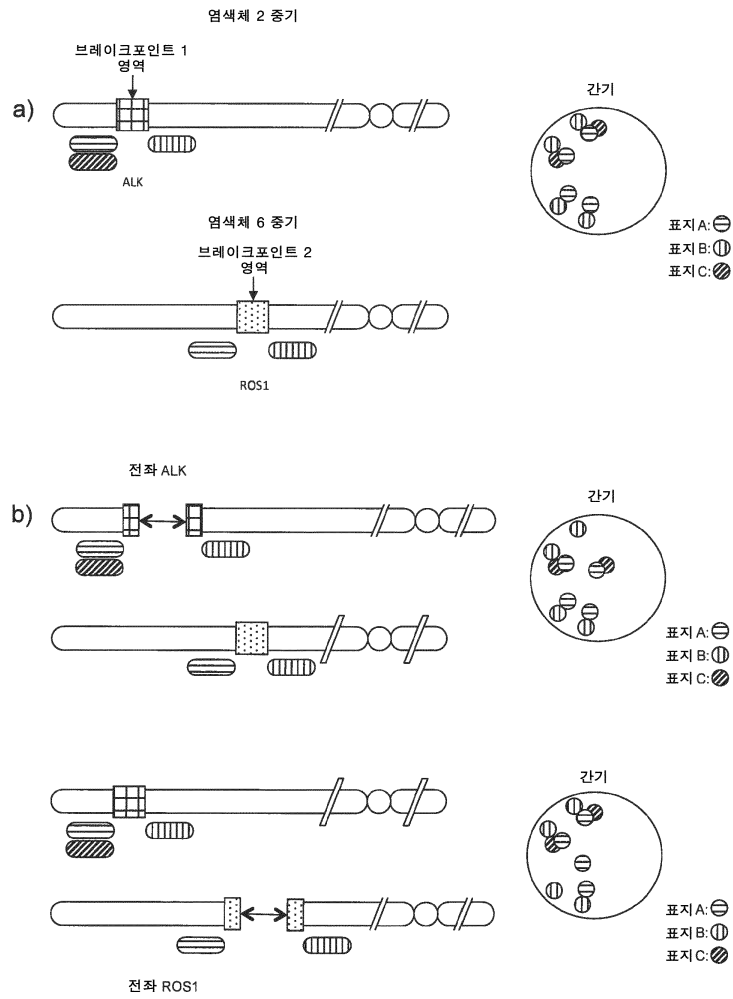
- [0205] 제2 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 적어도 2개, 임의로 3개, 임의로 4개, 임의로 5개, 임의로 6개, 임의로 7개, 임의로 8개, 임의로 9개, 및 임의로 10개의 유전자자리-특이적인 프로브가 적어도 하나의 추가의 표지 및 최대 6개의 추가의 표지로 표시됨으로써, 혼합된 시그날이 이들 혼합된 표지에 의해 발생하는, 제1 국면에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0206] 제3 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 적어도 5 내지 24개, 임의로 6 내지 24개, 임의로 7 내지 24개 및 임의로 8 내지 24개의 유전자자리-특이적인 프로브가 1 내지 24개의 상이한 표지 중의 하나로 각각 표시되는, 제1 국면에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0207] 제4 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은
- [0208] 표지 A로 표시된 제1 프로브(프로브 1) 및 표지 B로 표시된 제2 프로브(프로브 2)가 브레이크포인트 영역 1을 플랭크하고, 상기 프로브는 융합 시그날 A-B를 형성하며,
- [0209] 동일한 원리에 따라서, 2 내지 12개의 추가의 프로브(프로브 3 내지 14개)가 1 내지 6개의 추가의 브레이크포인트 영역(브레이크포인트 영역 2-7개)을 플랭크하고, 또한 각각의 예에서 융합 시그날 A-B를 형성하고,
- [0210] 추가의 프로브, 그러나 상술한 프로브 중 적어도 하나가 또한 추가의 표지, 특히 표지 C 내지 F로부터 선택된 추가의 표지, 또는 서로에 대해 이들 표지의 상이한 비로 동시 표시되고, 이에 의해 특이적인 융합 시그날 및 혼합된 시그날 A-B/X를 형성함을 특징으로 하는, 직접적으로 또는 간접적으로 표시된 핵산 단편(프로브)를 기반으로 하여, 구조적 염색체 이상을 검출하기 위한, 세포 내에서의 다수의 상이한 염색체 영역 또는 DNA 영역의 검출 방법에 관한 것이며, 여기서
- [0211] a) X 표지 C 및/또는 표지 D 및/또는 표지 E 및/또는 표지 F는 각각의 예에서 상이한 비로 존재할 수 있고, b) 특이적인 융합 시그날 및 혼합된 시그날 A-B/X는 염색체 이상에서 변화되어 새로운, 별도의 혼합된 시그날 A/X 또는 B/X를 형성하고, c) 임의로, 또한, 특이적인 융합 시그날은 새로운 별도의 시그날 A 또는 B(추가의 표지 X는 프로브 쌍에 사용되지 않는다)로 변화되고 d) 이들 변화된 시그날 양식을 기반으로, 영향받은 브레이크포인트 영역이 명확하게 검출될 수 있다.
- [0212] 제5 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은
- [0213] 표지 A로 표시된 제1 프로브(프로브 1) 및 표지 B로 표시된 제2 프로브(프로브 2)가 브레이크포인트 영역 1을 플랭크하고, 상기 프로브는 융합 시그날 A-B를 형성하며,
- [0214] 표지 A로 표시된 제3의 프로브(프로브 3) 및 표지 B로 표시된 제4 프로브(프로브 4)가 브레이크포인트 영역 2를 플랭크하며, 또한 융합 시그날 A-B를 형성하고, 프로브 3 및/또는 4는 추가의 표지 C로 또한 동시에 표시됨으로써, 융합 시그날 A-B/C를 형성하고, 여기서
- [0215] 상술한 시그날은 염색체 이상에서 변하여 별도의 시그날 A 및/또는 B(브레이크포인트 1) 또는 융합 시그날 A/C 및/또는 B/C(브레이크포인트 2)를 형성함을 특징으로 하는, 직접적으로 또는 간접적으로 표시된 핵산 단편(프로브)를 기반으로 하여, 구조적 염색체 이상을 검출하기 위한, 세포 내에서 다수의 상이한 염색체 영역 또는 DNA 영역의 검출 방법에 관한 것이다.
- [0216] 제6 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 첫째로, 시그날 A 및/또는 B 만이 적합한 필터의 사용을 기반으로 하여, 표지 A 및/또는 표지 B를 사용하여 고려되며, A 및/또는 B의 비정상적인 시그날 양식이 존재하는 경우에만, 추가의 표지 C 내지 F가 영향받은 염색체 영역의 명확한 측정을 위해 고려되는, 상술한 국면 중의 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0217] 제7 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 유전자자리-특이적인 프로브에 의해 검출된 게놈 영역이 5Mbp 보다 작고, 임의로 2Mbp보다 작으며, 임의로 1Mbp보다 작고, 임의로 750kb보다 작으며, 임의로 500kb보다 작고, 임의로 250kb보다 작으며, 임의로 100kb보다 작고, 임의로 10kb보다 작으며, 임의로 1kb보다 작은, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0218] 제8 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은, 프로브의 혼합된 표지 대신에, 상이한 표지를 지닌 동일한 프로브 중 다수의 것이 사용되고, 여기서 임의로, 동일한 프로브는 이들이 적어도 90%, 임의로 적어도 80%, 임의로

적어도 70%, 임의로 적어도 60%, 및 임의로 적어도 50% 일치하는 경우에 조차 동일한 것으로 고려되는, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

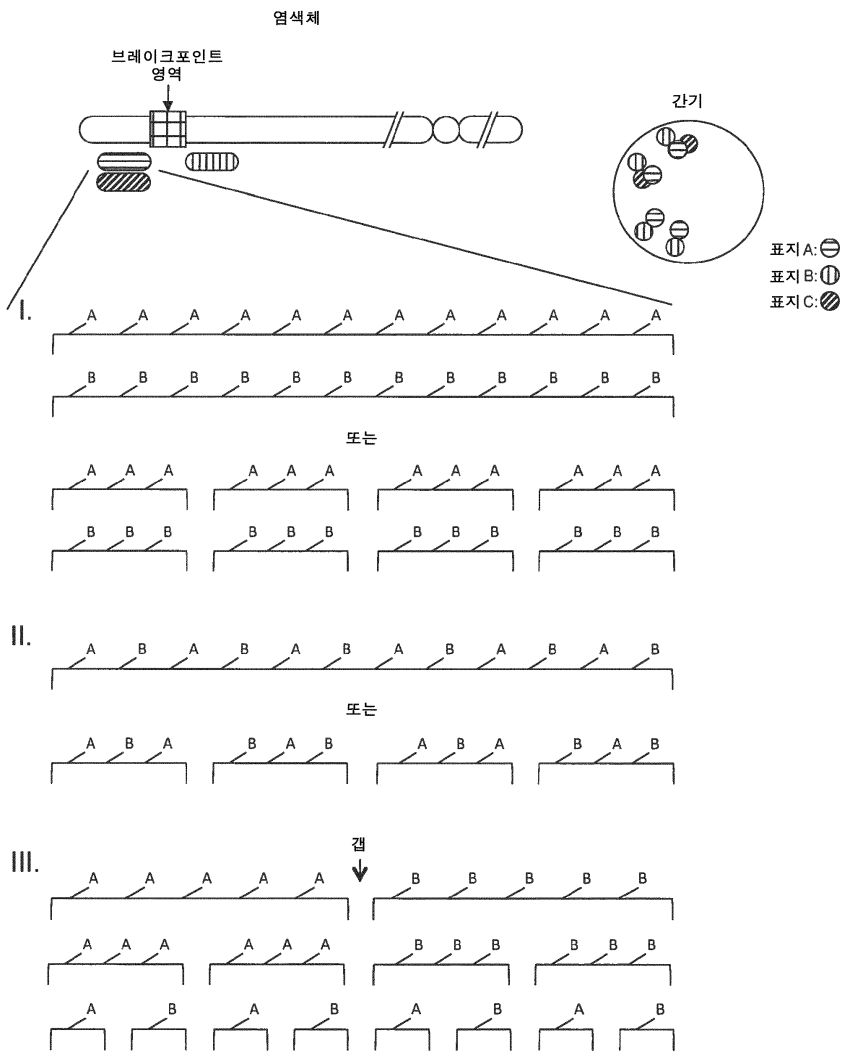
- [0219] 제9 국면: 추가의 국면에 따라서, 우선적으로, 염색체 이상이 암종, 우선적으로, 육종, 및 우선적으로 백혈병에서 검출될 수 있는, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0220] 제10 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 프로브가 폴리뉴클레오타이드, 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 변형된 핵산 단편 또는 올리고뉴클레오타이드 또는 변형된 올리고뉴클레오타이드인, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0221] 제11 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 상기 표지가 염료, 염료 물질, 화학발광성 염료(예를 들면, 아크리디늄), 방사성동위원소, 회전 표지, 효소(예를 들면, 알칼린 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 대두 퍼옥시다제 및/또는 베타-갈락토시다제), 합텐(예를 들면, 디곡시게닌, 바이오틴, 5(6)-카복시플루오레세인, 로다민, 브롬 테옥시우리딘, 아세틸아미노플루오렌, 트리니트로페놀, 트리니트로페놀 유도체, 에스트라디올 및/또는 DNP), 양자 점(Quantum Dot), 비드, 아미노핵심, 피렌 및 플루오레세인 염료(예를 들면, 플루오레세인, 플루오레세인 유도체, 5(6)-카복시플루오레세인, 코우마린, 코우마린 유도체, 로다민, 로다민 유도체, 테트라메틸 로다민, 리싸민, 텍사스 레드(Texas Red), AMCA, TRITC, IR 염료, 알렉사 염료, 다이오믹스 염료, 피코에리트린, 캐스케이드 블루, 오레곤 그린 488, 퍼시픽 블루 및/또는 로다민 그린을 포함하는 그룹으로부터 선택된, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0222] 제12 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 상기 방법을 전체 가시성, 적외선 및 자외선 방출 영역 및 우선적으로 방출 영역 녹색, 오렌지색/적색, 적색, 금색, 및 청색용의 직접적으로 빌트-인된 형광성 염료(built-in fluorescence dye)를 사용하는, FISH 방법으로 수행하는, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0223] 제13 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 항체-커플링된 알칼린 포스파타제, 항체-커플링된 퍼옥시다제 및 항체-커플링된 베타-갈락토시다제와 결합하는, 바이오틴, 디곡시게닌 및 DNP를 사용하는 BrISH 방법에 의해 수행되는, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0224] 제14 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 유전자 ALK, ROS1, RET, NRG1, NTRK1, CARS, EML4, FGFR2, FGFR3, KIF5B, TGF, BCR, ABL, ALK, BCL2, BCL6, BIRC3, CCND1, EGR1, ETV6, FGFR1, FGFR3, IGH, KMT2A, MYC, PML, RARA, RUNX1, RUNX1T1, EWSR1, CHOP, FUS, COL1A1, DDIT3, JAZF1, NR4A3, FOXO1, FUS, PAX3, PAX7, PDGFB, SS18, TFE3, USP6, WT1, HER2/ERBB2, FGFR1, ALK, CCND1, CDK4, CD274, PDCD1LG2, EGR1, EGFR, ESR1, ETV1, FGF3,4,19, FGFR2, FGFR3, FHIT (RCC), KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYB, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, SMARCB1, SOX2, TERT, TOP2A, TP53, TYMS 및/또는 VHL을 염색체 이상에 대해 시험하는, 상술한 국면 중 하나에 따른 방법에 관한 것이다.
- [0225] 제15 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 직접적으로 또는 간접적으로 표시된 핵산 단편(프로브)을 기반으로 하여, 바람직하게는 다수의 구조적 및/또는 수치적 염색체 이상의 검출 및 구별을 위한, 세포 내에서 다수의 상이한 염색체 영역 또는 DNA 영역의 검출용 제형에 관한 것이며,
- [0226] 여기서 4 내지 24개의 유전자자리-특이적인 프로브는 1 내지 24개의 상이한 표지로 각각 표시되고,
- [0227] 여기서 적어도 하나의 유전자자리-특이적인 프로브는 또한 적어도 하나의 추가의 표지 및 최대 6개의 추가의 표지로 표시됨으로써, 혼합된 시그널이 이들 혼합된 표지에 의해 발생하고, 여기서 임의로, 동일한 혼합된 표지를 지닌 단일의 프로브가 수득되는 상이한 혼합된 시그널에 의해 개개의 표지의 상이한 비를 기반으로 하여 구별될 수 있음으로써, 염색체 이상의 경우에 비정상적인 시그널 양식이 영향받은 유전자자리에 명확하게 지정되고/되거나 이상에 의해 영향받은 유전자자리가 혼합된 시그널 양식을 사용하여 확인될 수 있고, 여기서 혼합된 시그널은, 모든 단편 또는 임의로 또한 프로브의 개개 단편 만이 a) 다수의 표지로 표시되고/되거나 b) 동일한 단편이 상이한 표지로 표시되고/되거나 c) 달리는, 단편이 상이한 표지로 표시되는 경우 발생할 수 있으며, 여기서 상술한 단편은 또한 중첩될 수 있거나 또한 게놈 영역 내에서 2Mb까지의 거리를 갖는다.
- [0228] 제16 국면: 추가의 국면에 따라서, 본 발명은 제15 국면에 따른 제제에 관한 것이며, 여기서 상기 프로브는 제1 내지 제13 국면에 따라 구성된다.

도면

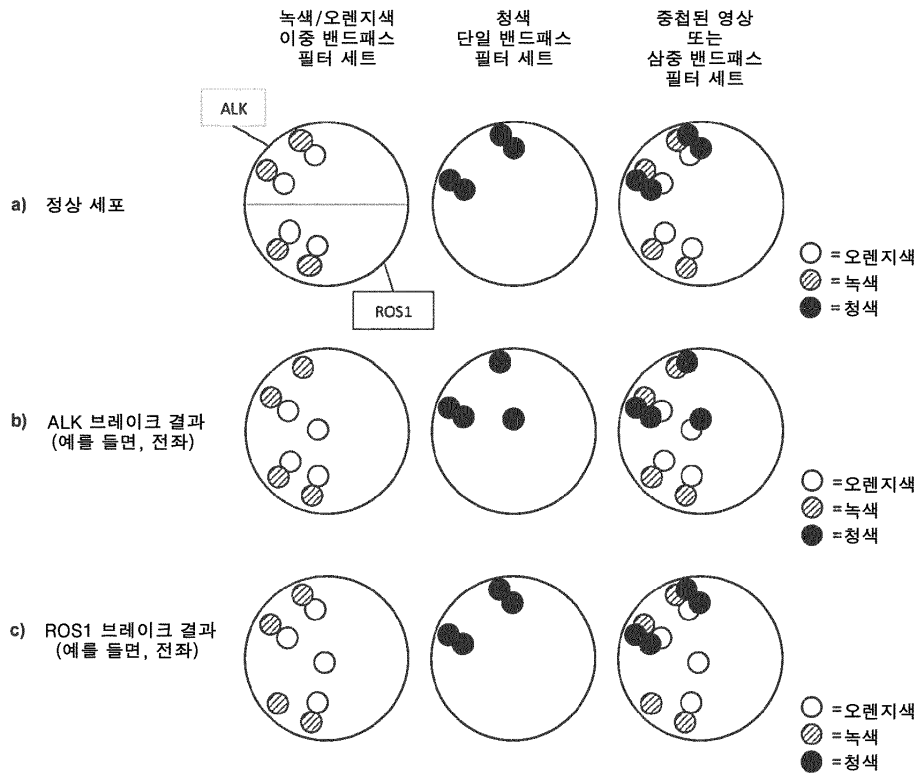
도면1



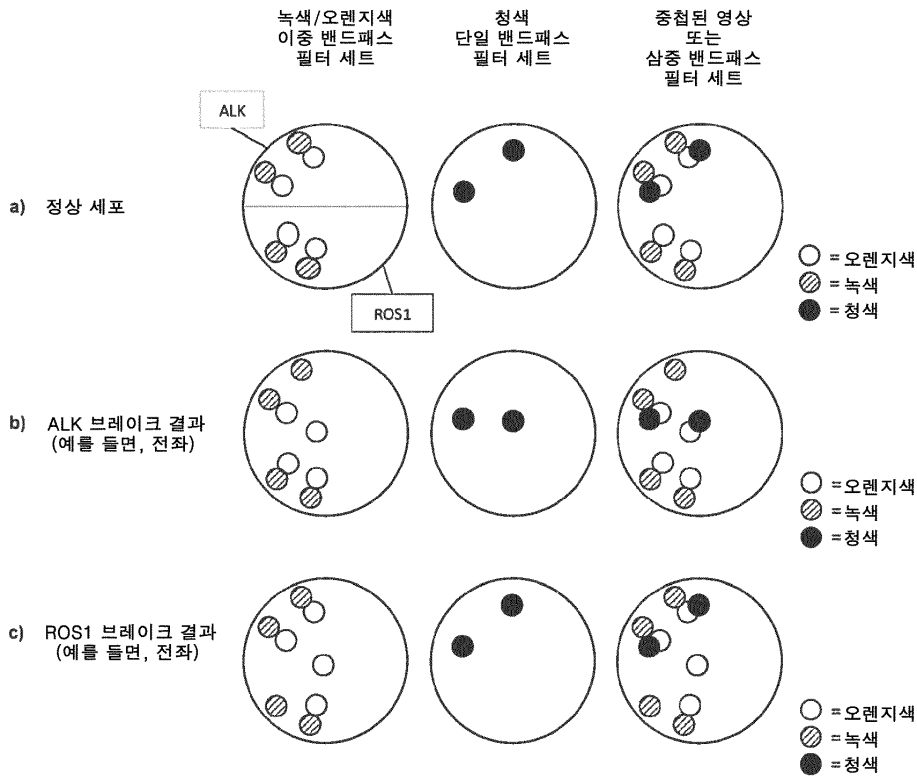
도면2



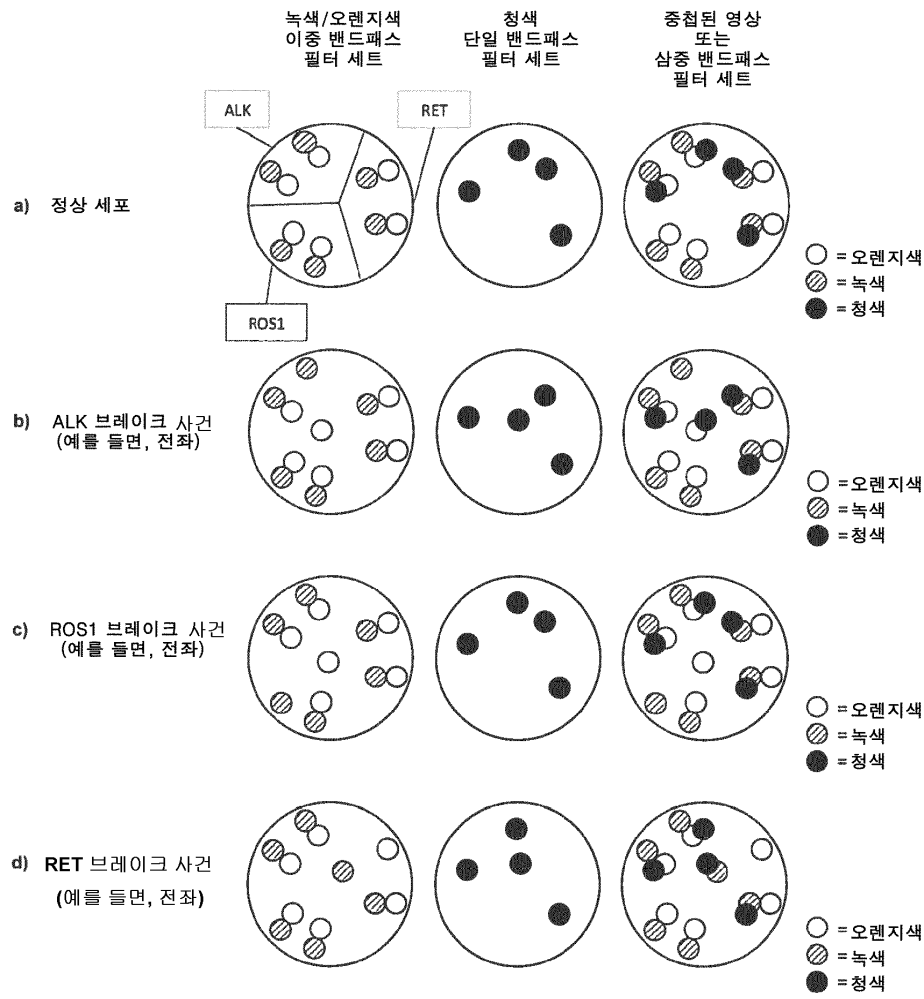
도면3



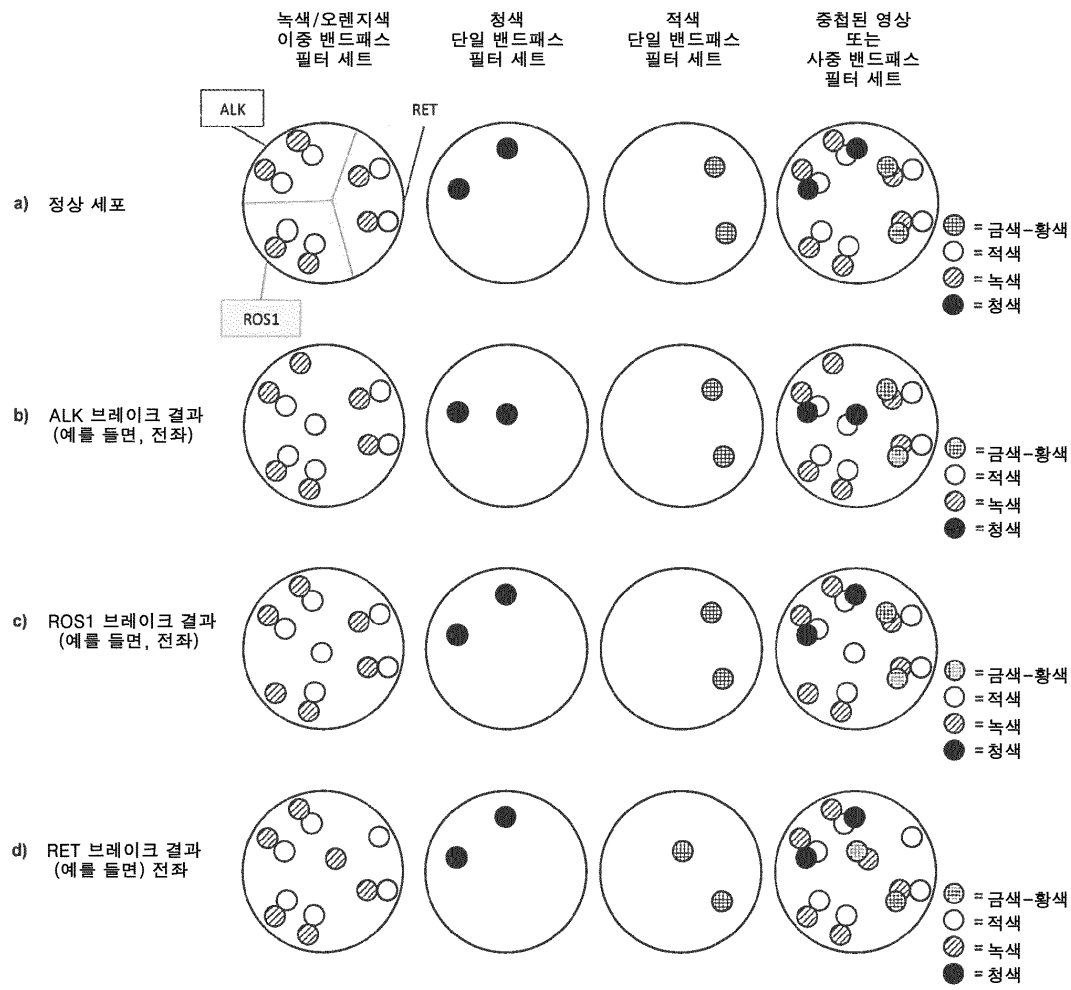
도면4



도면5

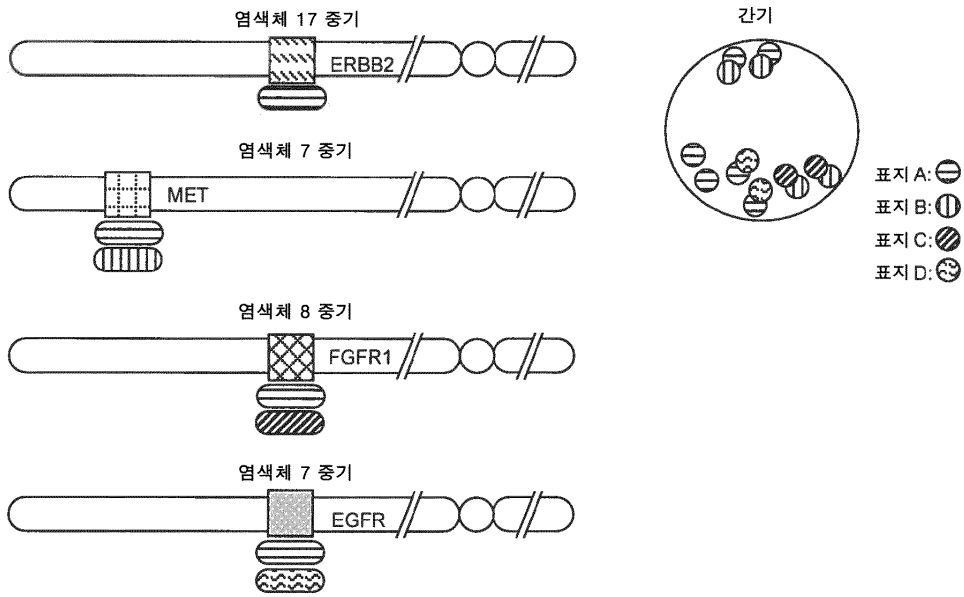


도면6

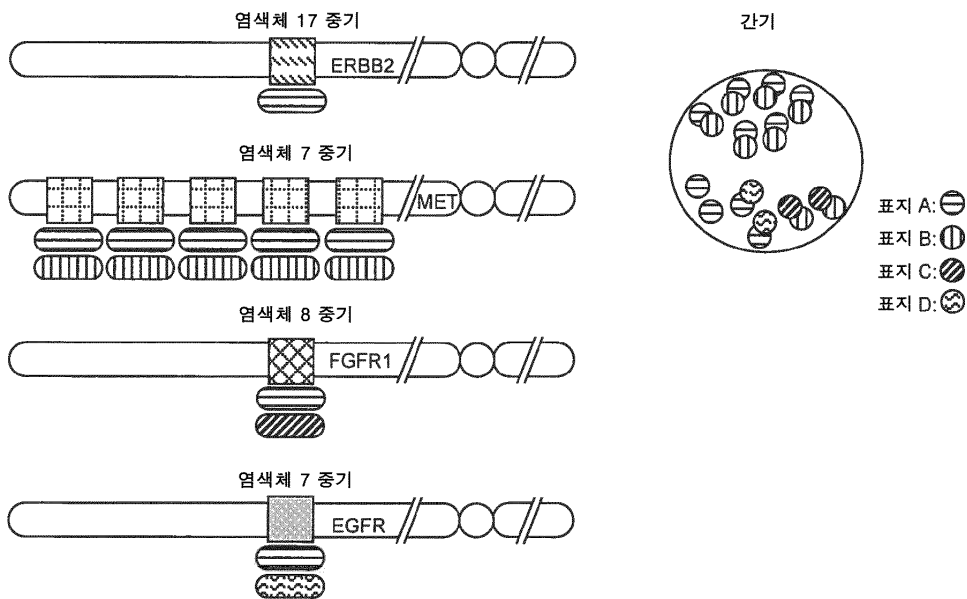


도면7

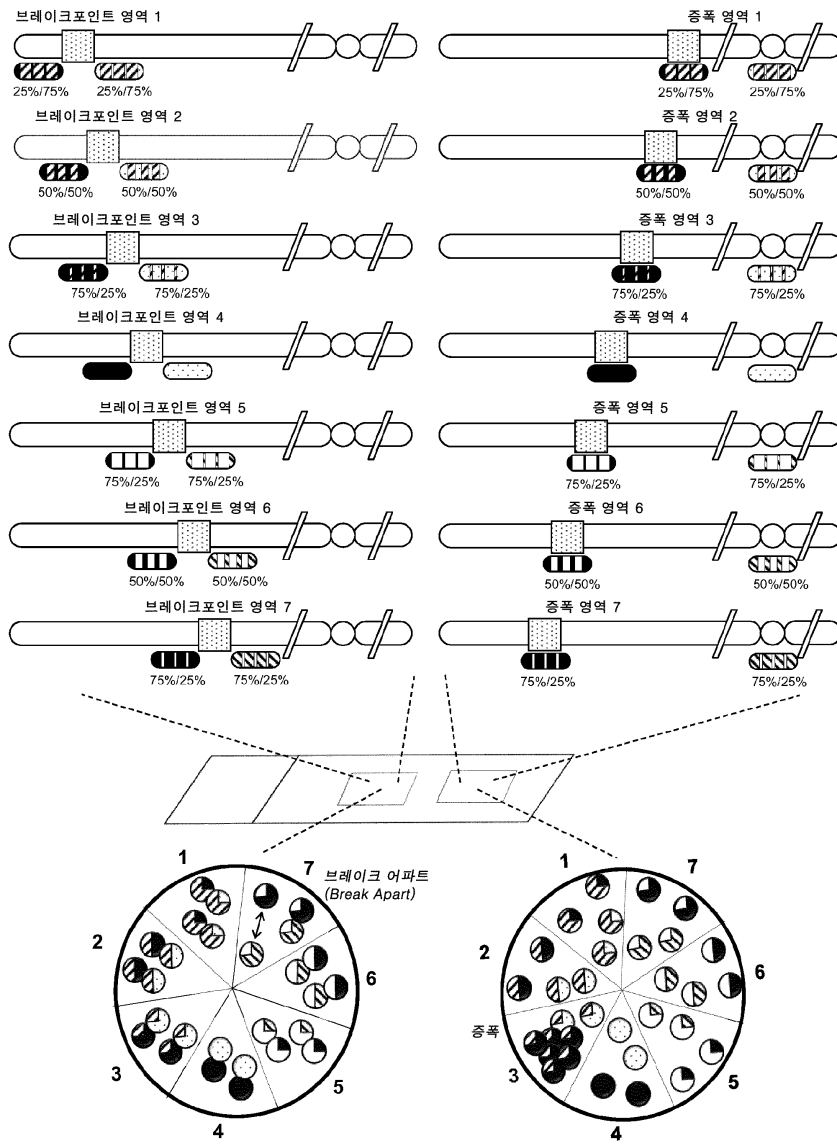
a) 이상 없음:



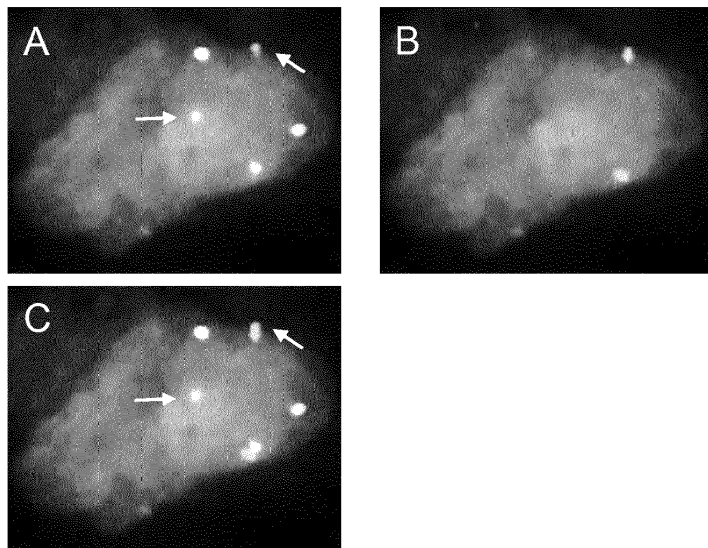
b) MET 증폭:



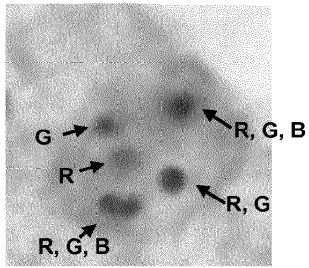
도면8



도면9



도면10



도면11

