



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0097139  
(43) 공개일자 2010년09월02일

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/68* (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7012586

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년11월10일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년06월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/083014

(87) 국제공개번호 WO 2009/062166  
국제공개일자 2009년05월14일(30) 우선권주장  
60/986,576 2007년11월08일 미국(US)

(71) 출원인

유니버시티 오브 워싱턴

미국 98105 워싱턴주 시애틀 스위트 500 11번 애비뉴 노스이스트 4311

(72) 발명자

그레이스만, 하비 에이.

미국 98040 워싱턴 머서 아일랜드 사우스이스트 82 애브뉴 6511

(74) 대리인

남상선

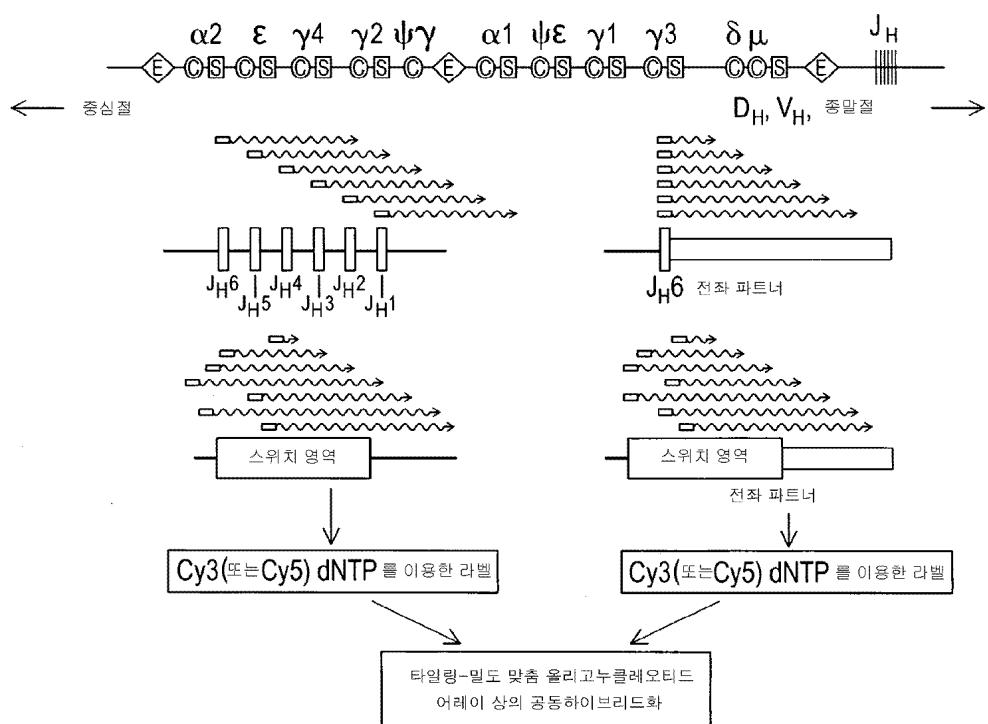
전체 청구항 수 : 총 89 항

(54) 균형성 전좌 중지점의 DNA 마이크로어레이 기반의 확인 및 맵핑

### (57) 요약

본 발명은 비교 유전체 하이브리드화를 이용하여 다양한 질병과 관련된 염색체 재배열을 검출하고 맵핑(mapping)하기 위한 방법을 기재한다. 본 발명에는 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너를 확인하고, 전좌 중지점(breakpoint)을 결정하기 위한 방법이 포함된다. 이러한 방법은 염색체 재배열을 포함하는 질병에 대한 소인의 예측, 진단 및 결정에 사용될 수 있다.

### 대 표 도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;
- (b) 공지된 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭(linear amplification) 및 라벨링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계;
- (c) 상기 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및
- (d) 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도에 대해 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 공지된 유전체 유전자좌의 염색체 재배열(chromosomal rearrangement)을 결정하는 방법으로서,

상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화가 상기 세포 내 공지된 유전체 유전자좌와 제 2 유전체 유전자좌의 재배열을 나타내는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 재배열이 염색체 전좌(chromosomal translocation)인 방법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 동안 통합되는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 후에 통합되는 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 형광성 라벨인 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 형광성 라벨이 Cy3 및 Cy5인 방법.

### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 DNA 마이크로어레이가 타일링(tiling) 밀도 DNA 마이크로어레이인 방법.

### 청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자에 해당하는 방법.

### 청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 시험 샘플의 세포가 종양 세포이고, 상기 참조 세포가 정상 세포인 방법.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 종양 세포가 림프종 또는 백혈병 세포인 방법.

**청구항 11**

- (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;
- (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계;
- (c) 라벨링되고 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및
- (d) 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도에 대해 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 공지된 유전체 유전자좌의 염색체 재배열 파트너를 확인하는 방법으로서,

상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화가 상기 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 파트너로서 상기 DNA 마이크로어레이의 요소를 확인하는 방법.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 재배열이 염색체 전좌인 방법.

**청구항 13**

제 11항에 있어서, 상기 증폭된 DNA 생성물에 하이브리드되는 상기 공지된 유전체 유전자좌의 선형 서열에 해당하는 일련의 요소에서 마지막 요소를 결정함으로써, 상기 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 중지점 (rearrangement breakpoint)의 추정(approximate) 위치를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 14**

제 11항에 있어서, 상기 증폭된 DNA 생성물에 하이브리드되는 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는, 제 2 유전체 유전자좌의 선형 서열에 해당하는 일련의 요소 중의 제 1 요소를 결정함으로써, 상기 재배열 파트너의 재배열 중지점의 추정 위치를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 15**

제 11항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 동안 통합되는 방법.

**청구항 16**

제 11항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 후에 통합되는 방법.

**청구항 17**

제 11항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 형광성 라벨인 방법.

**청구항 18**

제 17항에 있어서, 상기 형광성 라벨이 Cy3 및 Cy5인 방법.

**청구항 19**

제 11항에 있어서, 상기 DNA 마이크로어레이가 타일링 밀도 DNA 마이크로어레이인 방법.

**청구항 20**

제 11항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자에 해당하는 방법.

**청구항 21**

제 11항에 있어서, 상기 시험 샘플의 세포가 종양 세포이고, 상기 참조 세포가 정상 세포인 방법.

**청구항 22**

제 21항에 있어서, 상기 종양 세포가 림프종 또는 백혈병 세포인 방법.

**청구항 23**

(a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;

(b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 시험 유전체 DNA 및 프라이머 특이적인 증폭된 시험 DNA 생성물을 혼합물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 샘플 내의 공지된 DNA 서열에 대해 동일한 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 참조 유전체 DNA 및 프라이머 특이적인 증폭된 참조 DNA 생성물을 혼합물을 생성시키는 단계;

(c) 올리고누클레오티드 프라이밍되는 중합효소 매개 신장(polymerase mediated extension)을 통해 시험 및 참조 샘플 혼합물을 추가로 증폭시키고 라벨링시키는 단계;

(d) 라벨링되고 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및

(e) 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도를 비교하는 단계를 포함하는, 시험 샘플의 공지된 유전체 유전자좌의 염색체 전좌를 포함하는 염색체 재배열을 동시에 결정하는 방법으로서,

(i) 증폭된 시험 DNA 생성물 및 증폭된 참조 DNA 생성물 둘 모두가 DNA 마이크로어레이의 요소에 하이브리드되는 경우 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화의 정도에 비해 더 큰 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 시험 DNA 생성물의 하이브리드화 정도가 상기 시험 샘플 내의 마이크로어레이의 요소에 의해 제공되는 DNA 서열의 증폭을 나타내고;

(ii) 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 시험 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화가 상기 시험 샘플 내의 마이크로어레이의 요소에 의해 제공되는 DNA 서열의 결실을 나타내고;

(iii) 상기 DNA 어레이 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 상이한 DNA 어레이 요소로의 상기 증폭된 시험 DNA 생성물의 하이브리드화가 상기 세포 내에서 공지된 유전체 유전자좌와 제 2 유전체 유전자좌의 전좌를 나타내는 방법.

**청구항 24**

제 23항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 동안 통합되는 방법.

**청구항 25**

제 23항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 증폭 후에 통합되는 방법.

**청구항 26**

제 23항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 형광성 라벨인 방법.

**청구항 27**

제 26항에 있어서, 상기 형광성 라벨이 Cy3 및 Cy5인 방법.

**청구항 28**

제 23항에 있어서, 상기 DNA 마이크로어레이가 타일링 밀도 DNA 마이크로어레이인 방법.

**청구항 29**

제 23항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자에 해당하는 방법.

**청구항 30**

제 23항에 있어서, 상기 시험 샘플의 세포가 종양 세포이고, 상기 참조 세포가 정상 세포인 방법.

**청구항 31**

제 30항에 있어서, 상기 종양 세포가 림프종 또는 백혈병 세포인 방법.

**청구항 32**

제 23항에 있어서, 상기 시험 및 참조 샘플이 동일한 유전체 DNA를 포함하고, 상기 시험 샘플이 단계 (b)의 선형 증폭 단계에 적용되나, 참조 샘플은 상기 선형 증폭 단계에 적용되지 않는 방법.

**청구항 33**

제 1항, 제 11항 또는 제 23항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨이 동일하고, 상기 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물의 하이브리드화가 별개이나 동일한 마이크로어레이로의 하이브리드화이거나, 동일한 마이크로어레이로의 연속적 하이브리드화인 방법.

**청구항 34**

(a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;

(b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 증폭된 시험 DNA 생성물 ( $T^+$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 증폭된 참조 DNA 생성물 ( $N^+$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 모의(mock) 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 시험 DNA 생성물 ( $T^-$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 참조 DNA 생성물 ( $N^-$ )를 생성시키는 단계;

(c)  $T^+$ ,  $N^+$ ,  $T^-$  및  $N^-$  각각을 무작위 프라이머를 이용하는 프라이머 신장에 의해 상이한 검출가능한 라벨로 라벨링시키는 단계;

(d)  $T^+$  및  $N^+$ 를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 1 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계;

(e)  $T^-$  및  $N^-$ 를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 2 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계;

(f) 상기 제 1 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도를 상기 제 2 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도와 비교하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 염색체 재배열을 결정하는 방법으로서,

상기 제 2 마이크로어레이로부터의 유사한 패턴의 부재하에서 상기 제 1 마이크로어레이로부터의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도(scatter plot) 상의 하이브리드화 신호의 직각삼각형 패턴이 염색체 전좌를 나타내고, 직각변(vertical leg)의 염색체 위치가 염색체 전좌 중지점을 나타내고,

상기 제 1 마이크로어레이 및 상기 제 2 마이크로어레이로부터의 동일한 위치의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도에 대한 하이브리드화 신호의 직사각형 패턴이 염색체 중복(duplication) 또는 결실을 나타내고, 직각변의 염색체 위치가 중복되거나 결실된 유전체 영역의 2개의 말단 지점을 나타냄으로써,

시험 샘플 내의 염색체 재배열의 결정을 제공하는 방법.

**청구항 35**

제 34항에 있어서,  $T^-$  및  $N^-$ 를 생성시키기 위한 상기 모의 증폭이 증폭을 포함하지 않는 방법.

**청구항 36**

제 34항에 있어서, 상기 염색체 재배열이 염색체 전좌인 방법.

**청구항 37**

제 34항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 형광성 라벨인 방법.

**청구항 38**

제 34항에 있어서, 상기 DNA 마이크로어레이가 타일링 밀도 DNA 마이크로어레이인 방법.

**청구항 39**

제 34항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자에 해당하는 방법.

**청구항 40**

제 34항에 있어서, 상기 시험 샘플의 세포가 종양 세포이고, 상기 참조 세포가 정상 세포인 방법.

**청구항 41**

제 40항에 있어서, 상기 종양 세포가 림프종 또는 백혈병 세포인 방법.

**청구항 42**

(a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;

(b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 증폭된 시험 DNA 생성물 ( $T^+$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 증폭된 참조 DNA 생성물 ( $N^+$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 시험 DNA 생성물 ( $T^-$ )를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 참조 DNA 생성물 ( $N^-$ )를 생성시키는 단계;

(c)  $T^+$ ,  $N^+$ ,  $T^-$  및  $N^-$  각각을 무작위 프라이머를 이용하는 프라이머 신장에 의해 상이한 검출가능한 라벨로 라벨링시키는 단계;

(d)  $T^+$  및  $T^-$ 를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 1 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계;

(e)  $N^+$  및  $N^-$ 를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 2 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계;

(f) 상기 제 1 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도를 상기 제 2 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도와 비교하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 염색체 재배열을 결정하는 방법으로서,

상기 제 2 마이크로어레이로부터의 유사한 패턴의 부재하에서 상기 제 1 마이크로어레이로부터의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도 상의 하이브리드화 신호의 직각삼각형 패턴이 염색체 전좌를 나타내고, 직각변(vertical leg)의 염색체 위치가 염색체 전좌 중지점을 나타내고,

상기 제 1 마이크로어레이 및 상기 제 2 마이크로어레이 둘 모두에 대해 공통적인 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도 상의 하이브리드화 신호의 패턴이 위-중지점(pseudo-breakpoint)을 나타냄으로써,

시험 샘플 내의 염색체 재배열의 결정을 제공하는 방법.

**청구항 43**

제 42항에 있어서, 상기 재배열이 전좌인 방법.

**청구항 44**

제 42항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 형광성 라벨인 방법.

#### 청구항 45

제 42항에 있어서, 상기 DNA 마이크로어레이가 타일링 밀도 DNA 마이크로어레이인 방법.

#### 청구항 46

제 42항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자에 해당하는 방법.

#### 청구항 47

제 42항에 있어서, 상기 시험 샘플의 세포가 종양 세포이고, 상기 참조 세포가 정상 세포인 방법.

#### 청구항 48

제 47항에 있어서, 상기 종양 세포가 림프종 또는 백혈병 세포인 방법.

#### 청구항 49

(a) 피검체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계;

(b) 생물학적 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계;

(c) 염색체 재배열로부터 발생하는 질병과 관련된 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계;

(d) 상기 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및

(e) DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화의 패턴 및 정도에 대해 증폭된 시험 DNA 생성물과 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계를 포함하는, 피검체에서 염색체 재배열로부터 발생하는 질병을 진단하는 방법으로서,

상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화가 상기 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 파트너로서 상기 DNA 마이크로어레이의 요소를 확인하고, 상기 재배열 파트너의 확인이 상기 피검체에서의 상기 질병의 진단을 제공하는 방법.

#### 청구항 50

제 49항에 있어서, 상기 재배열이 전좌인 방법.

#### 청구항 51

제 49항에 있어서, 상기 질병이 암인 방법.

#### 청구항 52

제 51항에 있어서, 상기 암이 림프종 또는 백혈병인 방법.

#### 청구항 53

제 50항에 있어서, 상기 공지된 유전체 유전자좌가 면역글로불린 유전자인 방법.

#### 청구항 54

제 50항에 있어서, 상기 재배열 파트너가 MYC인 방법.

**청구항 55**

제 52항에 있어서, 상기 림프종이 베킷 림프종(Burkitt's lymphoma)인 방법.

**청구항 56**

- (a) 표적 유전체 유전자좌를 증폭시키는 단계;
- (b) 상기 증폭된 생성물을 핵산 어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및
- (c) 상기 하이브리드화 패턴을 참조와 비교하는 단계를 포함하는, 염색체 재배열을 검출하는 방법으로서,

상기 증폭이 선형 증폭이고, 상기 참조에 비교되는 상기 증폭된 유전체 유전자좌의 차별적 하이브리드화가 유전체 재배열의 존재를 나타내는 방법.

**청구항 57**

제 56항에 있어서, 상기 염색체 재배열이 균형성 염색체 재배열(balanced chromosomal rearrangement)인 방법.

**청구항 58**

- (a) 표적 유전체 유전자좌를 증폭시키는 단계;
- (b) 상기 증폭된 생성물을 핵산 어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및
- (c) 상기 하이브리드화 패턴을 참조와 비교하는 단계를 포함하는, 균형성 염색체 전좌를 검출하는 방법으로서,

상기 증폭이 선형 증폭이고, 직각삼각형 하이브리드화 패턴의 존재가 균형성 염색체 전좌의 존재를 나타내는 방법.

**청구항 59**

제 56항에 있어서, 상기 방법이 다중 선형 증폭(multiplex linear amplification)을 포함하는 방법.

**청구항 60**

제 56항 내지 제 59항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 유전체 유전자좌가 단일 검정에서 검사되는 방법.

**청구항 61**

제 56항 내지 제 60항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 선형 증폭 프라이머가 사용되는 방법.

**청구항 62**

제 61항에 있어서, 상기 다수의 프라이머가 질병과 관련된 균형성 전좌와 연관된 유전자좌의 증폭을 위한 프라이머를 포함하는 방법.

**청구항 63**

제 62항에 있어서, 상기 질병이 암인 방법.

**청구항 64**

제 62항에 있어서, 상기 암이 림프종 또는 백혈병인 방법.

**청구항 65**

제 61항에 있어서, 상기 다수의 프라이머가 MPM 믹스(Mix), 821 믹스, P1/P7 믹스, 및 다수의 D<sub>H</sub> 프라이머로부터 선택되는 방법.

**청구항 66**

제 56항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 어레이가 다수의 유전체 유전자좌에 대한 프로브를

포함하는 고밀도의 타일링(tiling)된 어레이인 방법.

#### 청구항 67

제 66항에 있어서, 상기 다수의 유전체 유전자좌 중 하나 이상이 질병과 관련된 유전자좌인 방법.

#### 청구항 68

제 67항에 있어서, 상기 질병이 암인 방법.

#### 청구항 69

제 68항에 있어서, 상기 암이 텁프종 또는 백혈병인 방법.

#### 청구항 70

제 56항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어레이가 AML 파일럿(pilot) 어레이인 방법.

#### 청구항 71

제 56항 내지 제 70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 제 2의 염색체 재배열의 검출을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 72

제 71항에 있어서, 상기 제 2의 염색체 재배열이 중복, 증폭, 결실, 역위, 균형성 전좌, 및 불균형성 전좌로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 73

제 56항 내지 제 72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 전좌의 둘 모두의 파트너 유전자좌의 검출을 포함하는 방법.

#### 청구항 74

개체로부터의 생물학적 샘플 중에서의 IgH 전좌의 검출을 포함하는, 개체에서 텁프종을 진단하거나 예후를 제공하는 방법으로서, 상기 IgH 파트너 염색체 중지점이 본 발명의 상세한 설명의 표 2에 나열된 것으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 75

제 74항에 있어서, 상기 전좌가 균형성 전좌인 방법.

#### 청구항 76

제 74항 또는 제 75항에 있어서, 상기 검출이 중합효소 연쇄반응(PCR), 서열분석, 질량분광법, 하이브리드화 또는 전좌 비교 유전체 하이브리드화(translocation comparative genomic hybridization, tCGH) 분석에 의한 것인 방법.

#### 청구항 77

- (a) 전좌와 관련된 유전체 유전자좌의 선형 증폭을 위한 프라이머; 및
- (b) 상기 프라이머에 의해 증폭된 생성물의 검출을 위한 어레이를 포함하는,  
균형성 염색체 전좌를 검출하는데 사용하기 위한 키트.

#### 청구항 78

제 77항에 있어서, 상기 키트가 전좌와 관련된 유전자좌의 선형 증폭을 위한 다수의 프라이머를 포함하는 키트.

#### 청구항 79

제 77항 또는 제 78항에 있어서, 상기 유전체 유전자좌가 질병과 관련된 것인 키트.

#### 청구항 80

제 79항에 있어서, 상기 질병이 암인 키트.

#### 청구항 81

제 80항에 있어서, 상기 암이 림프종 또는 백혈병인 키트.

#### 청구항 82

질병과 관련된 염색체 재배열의 tCGH 분석을 위한 어레이.

#### 청구항 83

제 82항에 있어서, 상기 어레이가 2개 이상의 유전자좌에 특이적인 다수의 프로브를 포함하고, 상기 유전자좌가 질병과 관련된 염색체 재배열과 연관된 어레이.

#### 청구항 84

제 82항 또는 제 83항에 있어서, 질병과 관련된 하나 이상의 재배열이 균형성 전좌인 어레이.

#### 청구항 85

제 82항 내지 제 84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질병이 림프종 또는 백혈병인 어레이.

#### 청구항 86

제 82항 내지 제 85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어레이에 의해 검출되는 하나 이상의 유전자좌가 본 발명의 상세한 설명의 표 2 및 표 4에서 발견되는 것으로부터 선택되는 어레이.

#### 청구항 87

제 86항에 있어서, 상기 어레이가 본 발명의 상세한 설명의 표 2에서 발견되는 유전자좌에 대한 프로브를 포함하는 어레이.

#### 청구항 88

제 86항에 있어서, 상기 어레이가 본 발명의 상세한 설명의 표 4에서 발견되는 유전자좌에 대한 프로브를 포함하는 어레이.

#### 청구항 89

컴퓨터 프로그램 타일(Title)에서 사용되는 올리고누클레오티드 선택 알고리듬.

### 명세서

#### 기술분야

[0001]

관련 출원에 대한 교차 참조

[0002]

해당 무

[0003]

정부 지원 연구 및 개발 하에 이루어진 발명에 대한 권리에 대한 성명

[0004]

본 출원은 NCI 승인 번호 5P30 CA015704 하에 정부 지원하에 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정한 권리 를 갖는다.

[0005]

컴팩트 디스크로 제출되는 "서열 목록", 표 또는 컴퓨터 프로그램 부록에 대한 참조

[0006]

해당 무

## 배경기술

[0007]

### 발명의 배경

[0008]

균형성 재배열(balanced rearrangement)(전좌 및 역위) 및 유전체 불균형(결실, 중복 및 증폭)을 포함하는 대규모 유전체 이상은 암에서 통상적이며, 종양발생에서 중추적 역할을 한다. 유전체 결실은 통상적으로 종양 억제제 유전자 기능의 상실, 원종양유전자의 과다발현을 갖는 증폭, 및 신규한 발암성 유전자 융합체의 생성 또는 통제가 해제된 종양유전자 발현을 갖는 전좌와 관련된다. 역사적으로, 균형성 전좌 및 유전자 융합체가 육종, 백혈병 및 립프종을 포함하는 혈액 및 중간엽 종양에서 현저하게 관찰되고(Rabbits, *Nature* 372(6502):143 (1994)), 암종과 같은 상피 종양에서는 통상적으로 덜 관찰되었다. 더욱 최근에, 종양발생 유전자 융합체가 전립선(Tomlins, Rhodes, et al., *Science* 310(5748):644-648 (2005)), 갑상선(Bongarzone, Butti et al., *Cancer Res.* 54(11):2979-2985 (1994); Kroll, Sarraf, et al., *Science* 289(5483):1357-1360 (2000)), 및 폐(Soda, Choi, et al., *Nature* 448(7153):561 (2007))의 암종에서 확인되었고, 이는 상기 종양발생 유전자 융합체가 기준에 평가되는 것 보다 암종에서 더욱 흔한 것을 암시하는데, 이는 상기 종양의 세포유전학적 복잡성 또는 다른 기술적 이유로 인한 것일 수 있다(Mitelman, Johansson, et al., *Nat Genet* 36(4):331 (2004)).

[0009]

대규모 이상의 분석은 신규한 원종양유전자, 종양 억제제 유전자 및 종양원성 유전자 융합체의 확인을 통해 우리의 종양발생의 이해를 변화시켰다. 마이크로어레이 기반의 비교 유전체 하이브리드화(어레이-CGH / aCGH) 기술의 발전은 암에서의 유전체 불균형에 대한 데이터의 기하급수적인 축적을 유도하였고, 상기 유전체 불균형은 증가하는 해상도로 맵핑(mapping)될 수 있다. 소수의 전좌는 어레이CGH(arrayCGH)에 의해 확인될 수 있는 하나 또는 둘 모두의 중지점에서 작은 결실을 갖는다. 그러나, 이러한 불균형은 보통 검출가능하지 않고, 존재시에도, 이들은 다른 파트너 유전자의 존재를 나타내지 않는다.

[0010]

구조적 변화는 이제 인간 집단에 걸친 유전적 변화의 중요한 원인으로 인지되고 있다(Bansal, Bashir, et al., *Genome Research* 17(2):219-230 (2007); Korbel, Urban, et al., *Science* 318(5849):420-426 (2007); Hurles, Dermitzakis, et al., *Trends in Genetics* 24(5):238-245 (2008); Kidd, Cooper, et al., *Nature* 453(7191):56-64 (2008)). 염색체 결실 또는 분절 중복(segmental duplication)과 같은 복제수 변화(CNV)는 지금까지 보고된 가장 흔한 구조적 변화이고, 이는 인간 질병 또는 질병에 대한 소인과 관련되어 있다(Gonzalez, Kulkarni, et al., *Science* 30(5714):1434-1440 (2005); Hollox, Huffmeier, et al., *Nat Genet* 40(1):23 (2008)). 균형성 염색체 재배열을 확인하기 위한 방법은 CNV를 검출하기 위한 방법에 뒤떨어져 있으나, 염색체 역위 및 더욱 복잡한 재배열이 구조적 및 기능적 변화의 중요한 원인으로 인지되는 것이 증가하고 있으며, 이는 또한 인간 질병과 관련이 있다(Feuk, MacDonald, et al., *PLoS Genetics* 1(4):e56 (2005); Turner, Shendure, et al., *Nat Meth* 3(6):439 (2006); Bansal, Bashir, et al., *Genome Research* 17(2):219-230 (2007); Flores, Morales, et al., *PNAS* 104(15):6099-6106 (2007); Kidd, Cooper, et al., *Nature* 453(7191):56-64 (2008)).

[0011]

현재, 균형성 재배열을 검출하기 위해 설계된 방법은 유전체 불균형을 검출하기 위해 이용가능한 방법과 비교하는 경우에 제한적이다. 전통적인 세포유전학적 분석 및 다색(또는 스펙트럼) 핵형분석은 대규모 유전체 이상을 확인하기 위한 강력한 유전체-범주 기술이나, 이러한 방법은 고된 일이며, 배양 방식의 세포 성장을 필요로 하며, 제한된 해상도(~5백만 bp)를 갖는다. 형광 인 시츄 하이브리드화(Fluorescence in situ hybridization, FISH)가 보다 높은 해상도(통상적으로, 100-1000kb)로 유전체 유전자좌의 적은 수를 분석하는데 사용될 수 있으나, FISH는 용이하게 확장될 수 없고, 융합 파트너의 기존의 지식을 필요로 한다. 어레이 페인팅(array painting)(Fiegler, Gribble, et al., *J Med Genet* 40(9):664-670 (2003))에서, DNA는 유동-분류된 비정상 염색체로부터 증폭되고 CGH 어레이에 하이브리드되어, 전좌 중지점이 높은 해상도로 맵핑될 수 있다(Gribble, Kalaitzopoulos, et al., *J Med Genet* 44(1):51-58 (2007)). 그러나, 이러한 기술은 널리 이용가능하지 않고, 배양 상태로 성장될 수 있는 세포에 제한된다.

[0012]

염색체 전좌의 확인 및 특성규명을 더욱 복잡하게 하는 것은 전좌와 관련된 유전자가, 점점 더 이들이 다양한 전좌 및 다양한 유형의 종양에서 다양한 파트너 유전자에 융합된 것으로 발견되어 "복잡한(promiscuous)" 것으로 인지된다는 사실이다(Cleary, *N Engl J Med* 329(13):958-959 (1993)). 두드러진 예는 혼합계열백혈병(mixed lineage leukemia, MLL) 유전자(Meyer, Schneider, et al., *Leukemia* 20(5):777(2006)), 면역글로불린 중쇄(IgH) 유전자좌(Willis and Dyer, *Blood* 96(3):808-822 (2000)), 및 ETV6(Bohlander, *Seminars in Cancer Biology* 15(3): 162-174 (2005))을 포함하고, 이를 각각은 다양한 전좌에서 20개 이상의 상이한 유전체 유전자 좌와 파트너를 이룰 수 있다. 결과적으로, 파트너 중 하나가 공지되거나 추측될 수 있는 경우 균형성 전좌에서

공지되지 않은 융합 파트너 유전자를 확인하기 위한 다양한 분자적 방법이 개발되었다. 이러한 기술은 cDNA 말단의 신속한 증폭(RACE)(Frohman, Dush, et al., *PNAS* 85(23):8998-9002 (1988)), 장거리 역위(long-distance inverse, LDI) PCR(Ochman, Gerber, et al., *Genetics* 120(3):621-623 (1988); Willis, Jadayel, et al., *Blood* 90(6):2456-2464 (1997)) 및 융합 전사체의 어레이 기반의 검출(Nasedkina, Domer, et al., *Haematologica* 87(4):363-72 (2002); Maroc, Morel, et al., *Leukemia* 18(9): 1522-30 (2004))을 포함한다. 또한, 이러한 기술은 모두 고된 일이며, 제한된 처리량을 갖고, 임상 샘플의 통상적인 분석에 적합하지 않다.

[0013] 따라서, 염색체 이상, 특히 균형성 전좌의 통상적인 검출을 가능케 하는 개선된 방법이 필요하다. 본 발명은 상기 필요성 및 기타 필요성을 충족시킨다.

### 발명의 내용

#### 발명의 개요

[0015] 비교 유전체 하이브리드화(CGH) 방법이 염색체 불균형의 검출에 강력한 것으로 판명되었으나, 기존의 CGH 방법은 일반적으로 기타 종양 중에서 특히 림프종 및 백혈병을 포함하는 다양한 암의 발병기전 및 진단에서 현저한 역할을 하는 상호 전좌와 같은 균형성 유전체 재배열을 검출할 수 없다. 균형성 전좌를 검출하기 위한 기존의 CGH 방법의 무능력은 적어도 부분적으로 상기 방법이 시험 샘플과 참조 샘플 사이의 상대적 차이의 검출에 의존하나, 균형성 전좌는 염색체 물질의 알짜 손실 또는 증가를 발생시키지 않고, 이에 따라 동일한 상대량이 유지된다는 사실에 기인한다.

[0016] 상기 제한을 극복하고, 검출될 수 있는 염색체 이상의 범위를 확대시키기 위해, 본 발명자는 초고해상도로 균형성 전좌 중지점을 확인할 수 있는 방법인 전좌 CGH(tCGH)를 개발하였다. 본 발명은 공지된 유전체 유전자좌 및 전좌 파트너의 서열에 걸친 프로브를 생성시키기 위해 선형 증폭(linear amplification) 반응에서 공지된 유전체 유전자좌 내의 서열에 특이적인 프라이머의 사용을 부분적으로 기초로 한다. 참조 샘플로부터 유래된 유사한 프로브의 하이브리드화와 비교된 시험 샘플로부터 생성된 프로브의 하이브리드화의 패턴 및 정도는 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너의 확인을 가능케 한다. 고밀도 마이크로어레이, 예를 들어, 타일링(tiling) 밀도 마이크로어레이의 사용은 전좌의 중지점의 고해상도 맵핑을 가능케 한다.

[0017] 하기에 보다 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명자는 연결( $J_H$ ) 분절 및 반복성 스위치 재조합( $S_H$ ) 영역 내에서 발생하는 것을 포함하는 IgH 전좌의 가장 흔한 유형을 검출하는 tCGH의 능력을 입증하였다. BCL2, BCL6, 사이클린(cyclin) D1(CCND1), 및 MYC 전좌 뿐만 아니라 복합 및 잠재 IgH 재배열 포함 상기 유전자좌를 포함하여, 분석되는 각각의 세포주에서 공지된 전좌 중지점이 확인되었다. tCGH의 유용성은 현재까지 보고된 가장 큰 시리즈인 5개의 외투 세포 및 전립프구성 림프종에서 신규한 CCND1 중지점을 맵핑하고 클로닝함으로써 추가로 입증된다. 추가로, 다중 tCGH 분석이 다양한 골수성 백혈병과 관련된 여러 흔한 전좌를 검출하기 위해 사용된다.

[0018] 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은, (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계; (c) 상기 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (d) 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도에 대해 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계에 의해, 시험 샘플 내의 공지된 유전체 유전자자의 염색체 재배열을 결정하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화는 상기 세포 내에서 공지된 유전체 유전자좌와 제 2 유전체 유전자좌의 재배열을 나타낸다.

[0019] 두번째 구체예에서, 본 발명은, (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계; (c) 라벨링되고 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서

열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (d) 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도에 대해 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계에 의해, 시험 샘플 내의 공지된 유전체 유전자좌의 염색체 재배열 파트너를 확인하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화는 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 파트너로서 DNA 마이크로어레이의 요소를 확인한다.

[0020] 세번째 구체예에서, 본 발명은, (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 시험 유전체 DNA 및 프라이머 특이적인 증폭된 시험 DNA 생성물의 혼합물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 샘플 내의 공지된 DNA 서열에 대해 동일한 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 참조 유전체 DNA 및 프라이머 특이적인 증폭된 참조 DNA 생성물의 혼합물을 생성시키는 단계; (c) 올리고누클레오티드 프라이밍되는 중합효소 매개 신장(polymerase mediated extension)을 통해 시험 및 참조 샘플 혼합물을 추가로 증폭시키고 라벨링시키는 단계; (d) 라벨링되고 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (e) 상기 증폭된 시험 DNA 생성물과 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 상기 DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화 패턴 및 정도를 비교하는 단계에 의해, 시험 샘플의 공지된 유전체 유전자좌의 염색체 재배열 뿐만 아니라 염색체 전좌를 동시에 결정하는 방법을 제공하며, 여기서 (i) 증폭된 시험 DNA 생성물 및 증폭된 참조 DNA 생성물 둘 모두가 DNA 마이크로어레이의 요소에 하이브리드되는 경우 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화의 정도에 비해 더 큰 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 시험 DNA 생성물의 하이브리드화 정도는 상기 시험 샘플 내의 마이크로어레이의 요소에 의해 제공되는 DNA 서열의 증폭을 나타내고; (ii) 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 DNA 마이크로어레이의 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화는 상기 시험 샘플 내의 마이크로어레이의 요소에 의해 제공되는 DNA 서열의 결실을 나타내고; (iii) 상기 DNA 어레이 요소로의 상기 증폭된 참조 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 상이한 DNA 어레이 요소로의 상기 증폭된 시험 DNA 생성물의 하이브리드화는 상기 세포 내에서 공지된 유전체 유전자좌와 제 2 유전체 유전자좌의 전좌를 나타낸다.

[0021] 상기 구체예의 한 양태에서, 상기 방법은 증폭된 DNA 생성물에 하이브리드되는 공지된 유전체 유전자좌의 선형 서열에 해당하는 일련의 요소에서 마지막 요소를 결정함으로써, 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 중지점(rearrangement breakpoint)의 추정(approximate) 위치를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0022] 상기 구체예의 또 다른 양태에서, 상기 방법은 증폭된 DNA 생성물에 하이브리드되는 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는, 제 2 유전체 유전자좌의 선형 서열에 해당하는 일련의 요소 중의 제 1 요소를 결정함으로써, 재배열 파트너의 재배열 중지점의 추정 위치를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 상기 구체예의 추가 양태에서, 상기 시험 및 참조 샘플은 동일한 유전체 DNA를 포함하고, 시험 샘플은 단계 (b)의 선형 증폭 단계에 적용되나, 참조 샘플은 상기 선형 증폭 단계에 적용되지 않는다.

[0024] 상기 구체예의 추가 양태에서, 상기 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨은 동일하고, 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물의 하이브리드화는 별개이나 동일한 마이크로어레이로의 하이브리드화이거나, 동일한 마이크로어레이로의 연속적인 하이브리드화이다.

[0025] 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 이후에 소정의 참조 판독 또는 검출과 비교되는 제 1 샘플 DNA만의 증폭 및 검출을 포함한다.

[0026] 네번째 구체예에서, 본 발명은, (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 증폭된 시험 DNA 생성물 (T+)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라벨링을 수행하여 증폭된 참조 DNA 생성물 (N+)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 모의(mock) 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 시험 DNA 생성물 (T-)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 참조 DNA 생성

물 (N-)를 생성시키는 단계; (c) T+, N+, T- 및 N- 각각을 무작위 프라이머를 이용하는 프라이머 신장에 의해 상이한 검출가능한 라벨로 라밸링시키는 단계; (d) T+ 및 N+를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 1 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계; (e) T- 및 N-를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 2 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계; (f) 상기 제 1 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도를 상기 제 2 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도와 비교하는 단계에 의해 시험 샘플 내의 염색체 재배열을 결정하는 방법을 제공하며, 상기 제 2 마이크로어레이로부터의 유사한 패턴의 부재하에서 상기 제 1 마이크로어레이로부터의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도(scatter plot) 상의 하이브리드화 신호의 직각삼각형 패턴은 염색체 전좌를 나타내고, 직각변(vertical leg)은 염색체 전좌 중지점을 나타내고, 상기 제 1 마이크로어레이 및 상기 제 2 마이크로어레이로부터의 동일한 위치의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도에 대한 하이브리드화 신호의 직사각형 패턴은 염색체 중복(duplication) 또는 결실을 나타내고, 직각변은 중복되거나 결실된 유전체 영역의 2개의 말단 지점을 나타냄으로써, 시험 샘플 내의 염색체 재배열의 결정을 제공한다.

[0027]

다섯번째 구체예에서, 본 발명은, (a) 시험 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (b) 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭을 수행하여 증폭된 시험 DNA 생성물 (T+)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라밸링을 수행하여 증폭된 참조 DNA 생성물 (N+)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 시험 DNA 생성물 (T-)를 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 생략시켜 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 모의 선형 증폭을 수행하여 모의-증폭된 참조 DNA 생성물 (N-)를 생성시키는 단계; (c) T+, N+, T- 및 N- 각각을 무작위 프라이머를 이용하는 프라이머 신장에 의해 상이한 검출가능한 라벨로 라밸링시키는 단계; (d) T+ 및 T-를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 1 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계; (e) N+ 및 N-를 유전체 DNA 서열을 포함하는 제 2 DNA 마이크로어레이에 공동-하이브리드화시키는 단계; (f) 상기 제 1 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도를 상기 제 2 DNA 마이크로어레이에 대한 하이브리드화 신호의 패턴 및 정도와 비교하는 단계에 의해 시험 샘플 내의 염색체 재배열을 결정하는 방법을 제공하며, 상기 제 2 마이크로어레이로부터의 유사한 패턴의 부재하에서 상기 제 1 마이크로어레이로부터의 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도 상의 하이브리드화 신호의 직각삼각형 패턴은 염색체 전좌를 나타내고, 직각변(vertical leg)은 염색체 전좌 중지점을 나타내고, 상기 제 1 마이크로어레이 및 상기 제 2 마이크로어레이 둘 모두에 대해 공통적인 염색체 위치에 대해 작도된 하이브리드화 신호의 산포도 상의 하이브리드화 신호의 패턴은 위-중지점(pseudo-breakpoint)을 나타냄으로써, 시험 샘플 내의 염색체 재배열의 결정을 제공한다.

[0028]

여섯번째 구체예에서, 본 발명은, (a) 피검체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플의 세포로부터 제 1 유전체 DNA를 분리시키고, 참조 샘플의 세포로부터 제 2 유전체 DNA를 분리시키는 단계; (c) 염색체 재배열로부터 발생하는 질병과 관련된 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 1 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라밸링을 수행하여 제 1 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 시험 DNA 생성물을 생성시키고; 공지된 유전체 유전자좌 내의 공지된 DNA 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 상기 제 2 유전체 DNA 샘플의 선형 증폭 및 라밸링을 수행하여 제 2 검출가능한 라벨을 포함하는 증폭된 참조 DNA 생성물을 생성시키는 단계; (d) 상기 증폭된 시험 및 참조 DNA 생성물을 유전체 DNA 서열을 포함하는 DNA 마이크로어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (e) DNA 마이크로어레이로의 하이브리드화의 패턴 및 정도에 대해 증폭된 시험 DNA 생성물과 증폭된 참조 DNA 생성물을 비교하는 단계에 의해, 피검체에서 염색체 재배열로부터 발생하는 질병을 진단하는 방법을 제공하며, 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 상기 공지된 유전체 유전자좌의 요소와 구별되는 DNA 마이크로어레이 요소로의 상기 선형 증폭된 참조 샘플 DNA 생성물의 하이브리드화를 초과하는 상기 선형 증폭된 시험 샘플 DNA 생성물의 과다 하이브리드화는 공지된 유전체 유전자좌의 재배열 파트너로서 상기 DNA 마이크로어레이의 요소를 확인하고, 상기 재배열 파트너의 확인은 상기 피검체에서의 상기 질병의 진단을 제공한다.

[0029]

상기 구체예의 몇몇 양태에서, 염색체 재배열은 전좌이다. 상기 구체예의 다른 양태에서, 염색체 재배열은 하나의 염색체 유전자좌로부터 유래된 DNA 단편의 제 2의 다른 염색체 유전자좌로의 삽입 또는 염색체 역위이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 방법은 결실, 중복, 증폭 및 역위로부터 선택된 염색체 이상의 검출을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 염색체 이상의 하나 이상의 유형의 검출이 동시에 수행된다. 다른 구체예에서,

염색체 이상의 하나 이상의 유형의 검출은 연속적으로 수행된다.

[0030] 상기 구체예의 다른 양태에서, 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨은 종종 동안 통합되거나, 그렇지 않으면 종종 후에 통합된다.

[0031] 상기 구체예의 다른 양태에서, 제 1 및 제 2 검출가능한 라벨은 Cy3 및 Cy5를 포함할 수 있는 형광성 라벨이다.

[0032] 상기 구체예의 추가 양태에서, DNA 마이크로어레이는 타일링 밀도 DNA 마이크로어레이이다.

[0033] 상기 구체예의 또 다른 양태에서, 공지된 유전체 유전자좌는 면역글로불린 유전자에 해당한다.

[0034] 본 발명의 방법의 또 다른 구체예에서, 공지된 유전체 유전자좌는 특정 질병 또는 질병 상태와 관련된 유전자좌에 해당한다. 특정 구체예에서, 상기 질병은 암이다. 한 특정 구체예에서, 암은 백혈병, 예를 들어, 골수성 백혈병이다.

[0035] 상기 구체예의 몇몇 양태에서, 시험 샘플의 세포는 종양 세포이고, 참조 샘플의 세포는 정상 세포이며, 상기 종양 세포는 림프종 또는 백혈병 세포이다.

[0036] 상기 구체예의 몇몇 양태에서, 시험 샘플의 세포는 하나의 개체로부터의 정상 또는 이상 세포이고, 참조 샘플은 제 2의 개체로부터의 정상 또는 이상 세포이고, 염색체 재배열은 전좌, 역위, 결실, 중복, 삽입, 또는 시험 샘플에는 존재하나 참조 샘플에는 존재하지 않거나, 참조 샘플에는 존재하나 시험 샘플에는 존재하지 않는 다른 복합 재배열이다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 (a) J<sub>H</sub> 및 스위치 반복 영역(switch repeat region)을 나타내는 IgH 유전자좌; (b) J<sub>H</sub> 프라이머를 이용한 선형 증폭; (c) S<sub>5</sub>(S<sub>v<sub>a</sub></sub>) 프라이머를 이용한 선형 증폭; (d) 통상적인 전좌 CGH(tCGH) 실험의 개요를 예시한다.

[0039] 도 2는 공지된 IgH 전좌 중지점을 갖는 세포주에 대한 tCGH 데이터를 예시한다. (a) DHL16 세포주에서의 J<sub>H</sub>-BCL2 중지점(마이너 클러스터 영역); (b) MC116 세포주에서의 J<sub>H</sub>-MYC 중지점; (c) U266 세포주에서의 S<sub>a</sub>-CCND1 중지점; (d) OCI-Ly8 세포주에서의 S<sub>v</sub>-BCL6 중지점.

[0040] 도 3은 (a) RL7 세포주에서의 J<sub>H</sub>-BCL2 중지점 및 BCL2 결실의 분석을 예시한다: (i) RL7 +J<sub>H</sub> (Cy3) / 정상 +J<sub>H</sub> (Cy5) - 중지점 및 결실; (ii) RL7-J<sub>H</sub> (Cy3) / 정상 -J<sub>H</sub> (Cy5) - 결실 단독; (iii) RL7 +J<sub>H</sub> (Cy3) / RL7 -J<sub>H</sub> (Cy5) - 중지점 단독. 부분 (b)는 상기 모든 3개의 실험에 대한 RL7/BCL2 어레이 데이터의 오버레이를 예시한다. 부분 (c)는 M02058 세포주에서의 J<sub>H</sub>-CCND1 중지점 및 CCND1 중복/결실의 분석을 예시한다: (i) M02058 +J<sub>H</sub> (Cy3) / 정상 +J<sub>H</sub> (Cy5) - 중지점 및 중복/결실; (ii) M02058 -J<sub>H</sub> (Cy3) / 정상 -J<sub>H</sub> (Cy5) - 중복/결실 단독; (iii) M02058 +J<sub>H</sub> (Cy3) / Granta -JH (Cy5) - 중지점 단독. 부분 (d)는 상기 모든 3개의 실험에 대한 M02058/CCND1 어레이의 오버레이를 예시한다.

[0041] 도 4는 OCI-Ly8 세포주에서 확인된 다중 IgH 중지점을 예시한다: (a) J<sub>H</sub>- BCL2 - "der(14)" 중지점; (b) S<sub>v3</sub>-BCL6 - S<sub>v</sub>R 프라이머를 이용하여 확인된 "der(3)" 중지점; (c) S<sub>v</sub>-MYC - S<sub>v</sub>R 프라이머를 이용하여 확인된 "der(8)" 중지점; (d) S<sub>v</sub>-BCL6 - S<sub>v</sub>F 프라이머를 이용하여 확인된 "der(14)" 중지점.

[0042] 도 5는 6분(밝은 색의 선) 대 10분(어두운 색의 선)의 선형 증폭 신장 시간의 중지점 프로파일에 대한 효과를 예시한다. 부분 (a)는 OCI-Ly8 세포주에서의 S<sub>v</sub>-BCL6 중지점을 예시하고; 부분 (b)는 OCI-Ly8 세포주에서의 S<sub>v</sub>-BCL6 중지점을 예시한다.

[0043] 도 6은 다양한 J<sub>H</sub>-CCND1 중지점을 나타내는 5개의 원발성 외투세포 림프종의 tCGH 분석을 예시한다.

[0044] 도 7은 통상적인 전좌 CGH(tCGH) 실험의 개관을 제공한다.

[0045] 도 8은 다양한 B 세포 림프종 및 혈장 세포 골수종 내의 파트너 유전자좌를 포함하는 통상적인 IgH 전좌의 개관을 제공하며, 이는 tCGH 시스템의 확립 및 확인을 위한 모델 시스템으로서 사용되었다.

- [0046] 도 9는 der(14) 염색체 상에 IgH 중지점 및 다수의 D<sub>H</sub> 분절 내에 상호 중지점을 갖는 VDJ-관련 전좌의 tCGH 검출을 위한 구성을 예시한다.
- [0047] 도 10은 BCL2 마이너 전좌 클러스터에 대해 맵핑된 상호 J<sub>H</sub>-BCL2 (a) 및 BCL2-D<sub>H</sub> (b) 융합체의 tCGH 분석; OCI-Ly8 림프종 세포주 내에서 발견된 둘 모두의 상호 S<sub>y3</sub>-BCL6 융합체(c 및 d); 역위된 배향을 갖는 비-IgH BCL6 엑손 1 재배열 (e); 베키트 림프종 세포주 MC116 (f) 내의 IgH-MYC 융합체; 및 역위된 배향을 갖는 비-IgH MYC 재배열(i)을 포함하는 여러 다른 MYC 재배열(g-i)을 예시한다.
- [0048] 도 11은 다수의 상이한 선형 증폭 반응식을 이용한 BCL2의 큰(190 kb) 인트론 내의 신규한 167 kb 간극 결실의 복제수 변화의 tCGH 분석(a - e)을 예시한다.
- [0049] 도 12는 비-MTC 중지점을 갖는 5개의 원발성 MCL 경우로부터의, 원발성 림프종에서의 tCGH 분석에 의한 신규한 CCND1 중지점의 확인(a - e)을 예시한다.
- [0050] 도 13은 tCGH 분석에 의한 CCND1 유전자에 걸쳐 있는 중복, 및 M02058(a - c) 및 Granta(d - f) 둘 모두의 세포주에서의 각각의 JH-CCND1 중지점 접합(junction)에 대한 정확한 범위의 확인을 예시한다.
- [0051] 도 14는 tCGH 분석에 의한 OCI-Ly8 림프종 세포주 내의 IgH-BCL2 중지점에서의 약 6 kb 결실의 확인을 예시한다.
- [0052] 도 15는 tCGH 분석에 의한, S<sub>y</sub>R (a) 및 SPF (b) 프라이밍된 선형 증폭을 이용한, S<sub>a1</sub> 내지 S<sub>y4</sub>에 걸쳐있고 3' a 1 인핸서를 포함하는 ~ 100 kb의 IgH 불변 영역 분절의 CCND1 유전자좌로의 신규한 잠재(cryptic) 삽입의 확인을 예시한다. 모의 증폭된 종양 DNA가 하이브리드화 대조군으로 사용되고(c), 정상 유전체 DNA가 분석되는 경우(d)의 예상 전좌 중지점으로부터 떨어진 서열의 탈-표적(Off-target) 증폭이 예시된다.
- [0053] 도 16은 모의 증폭된 종양 DNA가 하이브리드화 대조군으로 사용되는 경우의 M02058 (a) 및 Granta (b) 세포주에서의 예상 전좌 중지점에서 떨어진 서열의 탈-표적 증폭을 예시한다. 정상 유전체 DNA가 분석되는 경우에 유사한 결과가 관찰된다(c - f).
- [0054] 도 17은 DHL16, RL7 및 Granta 519 유전체 DNA의 동등한 양의 혼합("33% 희석"으로 명명됨)에 의한 tCGH 분석의 분석 민감성의 결정을 예시하고; 20% 및 15% 희석 샘플은 정상 유전체 DNA와의 혼합에 의해 생성되었다. 이후, 샘플은 J<sub>H</sub> 프라이머를 이용하여 12 또는 20 주기 동안 증폭되었고, 유사하게 증폭된 정상 유전체 DNA에 공동 하이브리드화되었다.
- [0055] 도 18은 골수성 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용하여 BCR-ABL 균형성 전좌 t(22;9)를 특징으로 하는 3개의 만성 골수성 백혈병 세포주의 다중 선형 증폭 및 tCGH 분석의 결과를 예시한다.
- [0056] 도 19는 골수성 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한, PML-RARA 균형성 전좌 t(15;21)를 특징으로 하는 2개의 급성 전골수구성 백혈병(APL) 세포주(상부 패널), 및 염색체 역위 inv(16)에 의해 야기된 MYH11-CBFB 융합체를 특징으로 하는 2개의 급성 골수단핵세포성 백혈병/호산구증가증 세포주의 다중 선형 증폭 및 tCGH 분석의 결과를 예시한다.
- [0057] 도 20은 P1/P7 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한 AF9-MLL 균형성 전좌 t(9;11)을 특징으로 하는 MLL 백혈병 세포주(상부 패널), 및 821 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한 ETO-AML1 균형성 전좌 t(8;21)을 특징으로 하는 카스미(Kasumi) 급성 골수성 백혈병 세포주(하부 패널)의 다중 선형 증폭 및 tCGH 분석의 결과를 예시한다.
- [0058] **발명의 상세한 설명**
- [0059] 어레이 기반의 비교 유전체 하이브리드화(CGH)는 염색체 불균형의 연구를 혁신화시켰으나, 이는 일반적으로 림프종, 백혈병 및 다른 종양의 발병기전 및 진단에서 중추적인 역할을 하는 상호 전좌와 같은 균형성 유전체 재배열을 검출할 수 없다. 예를 들어, 면역글로불린 중쇄(IgH) 전좌 파트너의 정확한 확인은 B 세포 림프종의 분류 및 다발골수종과 같은 혈장 세포 신생물에서의 예후 예측에 필수적이다.
- [0060] 균형성 유전체 재배열을 위한 모델로서 IgH 전좌를 이용하여, 본 발명자는 IgH 전좌 파트너의 신속한 확인 및 선례가 없는 해상도의 전좌 관련 중지점의 정확한 맵핑을 가능하게 하는 전좌-CGH(tCGH)로 명명한 어레이 CGH 방법을 개발하였다. 하기에 보다 상세하게 기재되는 바와 같이, CGH 어레이에서 IgH 전좌가 검출 가능하도록 하

기 위해, 시험 및 참조 샘플로부터의 유전체 DNA는 단일 IgH 연결( $J_{\text{H}}$ ) 또는 스위치( $S\mu/S\alpha/S\epsilon$ ) 영역 프라이머를 이용하는 효소적 선형 증폭 반응에서의 어레이 하이브리드화 전에 변형되어, IgH 프라이머의 다운스트림이 삽입(전좌 또는 다른 재배열을 통함)될 수 있는 임의의 융합 파트너 서열의 특정 증폭을 발생시킨다. MYC, BCL2 및 CCND1(사이클린 D1)와 같은 흔한 IgH 파트너 유전자좌를 제시하는 단일 타일링-밀도 올리고누클레오티드 어레이를 이용하여, tCGH는 MO2058 및 Granta 519 세포주(외투세포 림프종)에서의  $J_{\text{H}}\text{-CCND1}$  중지점, U266(골수종)에서의 세포유전학적 잠재  $S\alpha\text{-CCND1}$  융합체, MC116 및 Raji(버카트 림프종)에서의  $J_{\text{H}}\text{-MYC}$  및  $S\mu\text{-MYC}$  중지점, 및 DHL16(거대세포 림프종; 마이너 클러스터 영역) 및 소포 림프종(메이저 중지점 영역)의 기록 케이스에서의  $J_{\text{H}}\text{-BCL2}$  중지점을 포함하는 다양한 세포주 및 원발성 림프종에서의 공지된 IgH 융합 중지점의 분류를 성공적으로 확인하고, ~100bp의 해상도로 맵핑하였다.

[0061] 이후, 본 발명자는 외투세포 림프종의 4개의 기록 케이스 및 B 세포 전립프구성 백혈병의 하나의  $t(11;14)$ -양성 케이스를 분석하기 위해 tCGH를 이용하였고, 상기 케이스 모두는 CCND1 메이저 전좌 클러스터(MTC)에서 PCR-검출가능한 전좌 중지점이 결핍되었다. 5개의 신규한 CCND1 전좌 중지점이 확인되었고, ~100bp의 해상도로 맵핑되어, 예측 중지점의 증폭, 서열분석 및 확인을 위한 환자 특이적 PCR 프라이머의 신속한 설계가 가능하였다. 하나의 중지점이 MTC의 500bp 내로 맵핑되었고, 다른 4개는 MTC의 측면에 존재하는 ~150kb 영역에 걸쳐 산재되어 있었다. 본 발명자가 아는 바로는, 이는 현재까지 보고된 비-MTC 외투세포 림프종 중지점 서열의 가장 큰 시리즈이다. 이러한 결과는 또한 tCGH가 매우 큰 유전체 영역에 걸쳐 분산된 기존의 미확인의 IgH 전좌 중지점의 신속한 클로닝을 촉진할 수 있는 방법을 예시한다. tCGH는 단지 유전체 DNA만을 필요로 하고, 동일한 어레이 상에서 초고해상도로 균형성 IgH 전좌 및 유전체 불균형 둘 모두를 동시에 검출할 수 있으므로, 이는 B 세포 및 혈장 세포 신생물의 임상 시험을 위한 분자 세포유전학 방법(예를 들어, FISH)에 대한 유용한 대안이 될 수 있다. tCGH는 또한 최소 잔여 질병을 검출하기 위한 고도로 민감한 중지점 특이적 PCR 검정의 개발을 촉진할 것이다. 최종적으로, 선형 증폭 반응에 사용되는 프라이머는 충분히 맞춤화 가능하므로, 융합 파트너중 하나가 공지되어 있는 경우 tCGH는 비-IgH 유전자좌를 포함하는 다른 균형성 전좌(또는 보다 복잡한 유전체 융합)를 확인하고 맵핑하기 위해 용이하게 적합화될 수 있다.

[0062] 한 구체예에서, 본 발명은, (a) 표적 유전체 유전자좌를 증폭시키는 단계; (b) 상기 증폭된 생성물을 핵산 어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (c) 상기 하이브리드화 패턴을 참조와 비교하는 단계를 포함하는, 염색체 재배열을 검출하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 증폭은 선형 증폭이고, 상기 참조에 비교되는 상기 증폭된 유전체 유전자좌의 차별적 하이브리드화는 유전체 재배열의 존재를 나타낸다. 특정 구체예에서, 유전체 재배열은 균형성 재배열, 예를 들어, 균형성 전좌 또는 역위이다.

[0063] 한 구체예에서, 본 발명은 균형성 염색체 전좌를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은, (a) 표적 유전체 유전자좌를 증폭하는 단계; (b) 상기 증폭된 생성물을 핵산 어레이에 하이브리드화시키는 단계; 및 (3) 상기 하이브리드화 패턴을 참조와 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 증폭은 선형 증폭이고, 직각삼각형 하이브리드화 패턴의 존재는 균형성 염색체 전좌의 존재를 나타낸다. 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 직각삼각형 하이브리드화 패턴은 비대칭 하이브리드화 패턴을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 염색체 전좌와 관련된 둘 모두의 파트너 유전자좌 내의 중지점의 검출 및/또는 맵핑을 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 균형성 전좌가 아닌 염색체 재배열의 검출을 포함한다.

[0064] 상기 제공된 방법의 특정 구체예에서, 하나 이상의 앰플리콘을 증폭시키기 위해 다중 선형 증폭이 사용된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 하나 이상의 유전체 유전자좌의 동시 검사를 포함한다.

[0065] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에 다수의 증폭 프라이머가 사용된다. 상기 다수의 증폭 프라이머는 질병과 관련된 균형성 전좌와 연관된 유전자좌의 증폭을 위한 프라이머를 포함할 수 있다. 균형성 염색체 전좌와 관련된 임의의 질병은 본 발명의 방법에 의해 검출될 수 있다. 본 발명의 한 특정 구체예에서, 질병은 암, 예를 들어, 림프종 또는 백혈병이다. 본 발명의 특정 구체예에서, MPM 믹스(mix), 821 믹스, P1/P7 믹스, 및 다수의  $D_{\text{H}}$  프라이머로부터 선택된 다수의 프라이머가 본원에 제공된 방법에 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 특정 구체예에서, 선형 증폭의 생성물을 검출하는데 사용되는 어레이는 마이크로어레이 또는 고밀도의 타일링(tiling)된 어레이를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상기 어레이에는 다수의 유전체 유전자좌에 대한 프로브를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 어레이 상의 프로브에 상응하는 하나 이상의 유전체 유전자좌는 질병과 관련될 수 있다. 특정 구체예에서, 질병은 암, 예를 들어, 림프종 또는 백혈병일 수 있다. 한 특정 구체예에서, 상기 어레이에는 AML 과일럿 어레이를 포함할 수 있다.

- [0067] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 중복, 증폭, 결실, 역위, 균형성 전좌, 및 불균형성 전좌로부터 선택된 제 2의 염색체 재배열의 검출을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 제 1 재배열 및 제 2 재배열의 검출은 연속적이거나 동시일 수 있다. 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 균형성 재배열 및 불균형성 재배열 둘 모두의 동시 검출을 포함한다. 상기 균형성 및 불균형성 재배열은 동일한 유전체 유전자좌 또는 상이한 유전체 유전자좌에 존재할 수 있다.
- [0068] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 균형성 염색체 전좌의 검출에 사용하기 위한 신규한 키트를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 키트는 전좌와 연관된 유전자좌의 선형 증폭을 위한 프라이머를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 키트는 전좌와 연관된 유전자좌로부터의 선형 증폭 생성물의 검출을 위한 어레이를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 키트는 전좌와 연관된 유전자좌의 증폭을 위한 다수의 프라이머를 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 키트는 염색체 전좌와 관련된 질병의 진단 또는 예후에 사용될 수 있다. 한 특정 구체예에서, 질병은 암, 예를 들어, 림프종 또는 백혈병일 수 있다.
- [0069] 1. 정의
- [0070] 용어 "염색체 재배열" 또는 "염색체 이상"은 일반적으로 야생형 또는 정상 세포에서 발견되지 않는 방식의 염색체 물질의 분절의 이상 연결을 의미한다. 염색체 재배열의 예는 결실, 증폭, 역위 또는 전좌를 포함한다. 염색체 재배열은 염색체에서 발생하는 자발적인 절단 후에 발생할 수 있다. 절단 또는 절단들이 염색체 단편의 손실을 발생시키는 경우, 결실이 발생한다. 염색체 분절이 꺾여 끊어지는 경우의 역위 결과는 뒤집어지고(역위 되고), 이는 이의 본래의 위치로 다시 삽입된다. 하나의 염색체 단편이 또 다른 염색체로부터의 단편과 교환되는 경우, 전좌가 발생한다. 증폭은 염색체의 특정 영역의 다중 복제를 발생시킨다. 염색체 재배열은 또한 상기의 조합을 포함할 수 있다.
- [0071] 용어 "전좌" 또는 "염색체 전좌"는 일반적으로 동등하거나 동등하지 않은 양의 동일하거나 상이한 염색체 사이의 염색체 물질의 교환을 의미한다. 종종, 상기 교환은 비상동 염색체 사이에서 발생한다.
- [0072] "균형성" 전좌는 일반적으로 유전 물질의 알짜 손실 또는 증가가 존재하지 않는 염색체 물질의 교환을 의미한다.
- [0073] "불균형성" 전좌는 일반적으로 염색체 물질을 남기거나 손실하는 염색체 물질의 동등하지 않은 교환을 의미한다.
- [0074] "핵산 어레이" 또는 "핵산 마이크로어레이"는 다수의 핵산 요소이며, 이를 각각은 프로브 핵산이 하이브리드되는 고체 표면 상에 고정된 하나 이상의 표적 핵산 분자를 포함한다. 상기 고체 지지체 상에 고정될 수 있는 핵산 분자는 올리고누클레오티드, cDNA 및 유전체 DNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 상황에서, 유전체 핵산의 다양한 분절에 해당하는 서열을 함유하는 마이크로어레이가 사용된다. 마이크로어레이의 유전체 요소는 유기체의 전체 유전체를 제시할 수 있거나, 그렇지 않은 경우 유전체의 소정의 영역, 예를 들어, 특정 유전체 또는 이의 연속 분절을 제시할 수 있다.
- [0075] 유전체 타일링 마이크로어레이에는 전체 관심 유전체 영역의 완전한 또는 거의 완전한 제시를 제공하도록 설계된 중첩 올리고누클레오티드를 포함한다.
- [0076] 비교 유전체 하이브리드화(CGH)는 일반적으로 제공된 피검체 DNA의 DNA 내용물 및 종종 종양 세포에서의 복제수 변화(증가/손실)의 분석을 위한 분자-세포유전학적 방법을 의미한다. 암의 상황에서, 상기 방법은 정상 인간 유사분열 중기 제조물에 대한 라벨링된 종양 DNA(종종 형광 라벨로 라벨링됨) 및 정상 DNA(종종 제 2의 상이한 형광 라벨로 라벨링됨)의 하이브리드화를 기초로 한다. 낙사형광 현미경(epifluorescence microscopy) 및 정량 영상 분석(quantitative image analysis)을 이용하여, 대조군 DNA에 대비한 증가/손실의 형광 비의 영역적 차이가 검출될 수 있고, 이는 유전체 내의 이상 영역을 확인하는데 사용될 수 있다. CGH는 일반적으로 불균형 염색체 변화만 검출할 것이다. 구조적 염색체 이상, 예를 들어, 균형성 상호 전좌 또는 역위는 검출될 수 없는데, 이들은 복제수가 변하지 않기 때문이다. 문헌[Kallioniemi et al., *Science* 258: 818-821 (1992)] 참조.
- [0077] "염색체 마이크로어레이 분석(CMA)" 또는 "어레이CGH"로 언급되는 CGH의 변화에서, 피검체 조직 및 정상 대조 조직(참조)로부터의 DNA는 차별적으로 라벨링된다(예를 들어, 상이한 형광 라벨로 라벨링됨). 피검체 및 참조 DNA를 반복성 DNA 서열을 억제하기 위한 라벨링되지 않은 인간 cot 1 DNA와 혼합한 후, 상기 혼합물을 일반적으로 정상 참조 세포로부터의 다수의 소정의 DNA 프로브를 함유하는 슬라이드에 하이브리드된다. 미국 특허 제 5,830,645호; 제 6,562,565호 참조. 마이크로어레이 상의 요소로서 올리고누클레오티드가 사용되는 경우,

100kb의 해상도를 가능케하는 BAC 어레이의 사용과 비교하여 통상적으로 20-80개의 염기쌍의 해상도가 수득될 수 있다. 어레이의 요소에 따른 (형광) 색 비가 피검체 샘플 내의 DNA 증가 또는 손실 영역을 평가하는데 사용된다.

- [0078] 용어 "하이브리드화의 직각삼각형 패턴" 또는 "직각삼각형 하이브리드화 패턴"은 일반적으로 (i) 재배열 중지 점을 나타내는 단일한 별개의 경계, 및 (ii) 중심절 또는 종말절의 방향에서 기준선에 대한 하이브리드화 신호(또는 이의 비 또는 log-비)의 점진적인 복귀(이는 별개가 아닌 제 2의 경계를 발생시킴)를 특징으로 하는 임의의 비대칭 하이브리드화 신호 패턴을 포함하는, 염색체 위치에 대한 하이브리드화 신호(또는 하이브리드화 신호 비 또는 이의 대수)의 플롯 상의 비대칭 패턴을 의미한다.
- [0079] 용어 "증폭" 또는 "증폭 반응"은 주형 핵산 서열의 증가된 복제수를 발생시키는 효소 반응을 포함하는 임의의 화학적 반응을 의미한다. 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 리가아제 연쇄 반응(LCR)(참조: 미국 특허 제 4,683,195호 및 제 4,683,202호; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.*, eds, 1990)), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification, SDA)(Walker, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1 (1993)), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification)(Phyffer, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 34:834 (1996); Vuorinen, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 33:1856 (1995)), 핵산 서열 기초 증폭(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)(Compton, *Nature* 350(6313):91 (1991), rolling circle amplification (RCA)(Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12(1):75 (1999)); Hatch *et al.*, *Genet. Anal.* 15(2):35 (1999)) 및 분지 DNA 신호 증폭(branched DNA signal amplification, bDNA)(참조: Iqbal *et al.*, *Mol Cell Probes* 13(4):315 (1999))을 포함한다.
- [0080] 선형 증폭은 DNA의 지수적 증폭을 발생시키지 않는 증폭 반응을 의미한다. DNA의 선형 증폭의 예는 본원에 기재된 바와 같이 단일 프라이머 만이 사용되는 경우의 PCR 방법에 의한 DNA의 증폭을 포함한다. 문헌[Liu, C. L., S. L. Schreiber, *et al.*, *BMC Genomics*, 4: Art. No. 19, May 9, 2003]을 참조하라. 다른 예는 등온 증폭 반응, 예를 들어, 특히 가닥 치환 증폭(SDA)(Walker, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 20(7): 1691 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1 (1993))을 포함한다.
- [0081] 증폭 반응에 사용된 시약은, 예를 들어, 올리고누클레오티드 프라이머; 봉산염, 인산염, 탄산염, 바르비탈, 트리스 등을 기반으로 하는 완충액(참조: 미국 특허 제 5,508,178호); 염, 예를 들어, 염화칼륨 또는 염화나트륨; 마그네슘; 데옥시누클레오티드 트리포스페이트(dNTPs); 핵산 중합효소, 예를 들어, Taq DNA 중합효소; 및 DMSO; 및 안정화제, 예를 들어, 젤라틴, 우혈청 알부민, 및 비이온성 세제(예를 들어, Tween-20)를 포함할 수 있다.
- [0082] 용어 "프로브"는 일반적으로 특정 관심 핵산 서열에 상보적인 핵산을 의미한다.
- [0083] 용어 "프라이머"는 증폭 반응에서 폴리누클레오티드의 합성을 프라이밍하는 핵산 서열을 의미한다. 통상적으로, 프라이머는 약 100개 미만의 누클레오티드를 포함하고, 바람직하게는 약 30개 미만의 누클레오티드를 포함한다. 예시적 프라이머는 약 5 내지 약 25개의 누클레오티드 범위이다.
- [0084] 용어 "표적" 또는 "표적 서열"은 증폭 반응에서 증폭되는 것으로 조사되는 단일 또는 이중 가닥의 폴리누클레오티드 서열을 의미한다.
- [0085] 구 "핵산" 또는 "폴리누클레오티드"는 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보노클레오티드 또는 리보누클레오티드 및 이의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지고, 참조 누클레오티드에 대해 유사한 방식으로 대사되는, 합성, 천연 발생 및 비천연 발생의 공지된 누클레오티드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합을 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보누클레오티드, 웨티드-핵산(PNAs)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0086] 2개의 핵산 서열 또는 폴리펩티드는, 상기 2개의 서열 내의 누클레오티드 또는 아미노산 잔기의 서열이 각각 하기 기재되는 바와 같이 최대 일치로 정렬되는 경우에 "동일"한 것으로 언급된다. 본원에서 사용되는 용어 "-에 상보적인"은 첫번째 서열 모두가 참조 폴리누클레오티드 서열의 적어도 일부에 상보적인 것을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0087] 구 "-에 선택적(또는 특이적)으로 하이브리드되는"은 특정 누클레오티드 서열이 복잡한 혼합물에 존재하는 경우에 엄격한 하이브리드화 조건하에서 상기 특정 누클레오티드 서열에만 문자가 결합하거나, 이중화되거나, 하이브리드되는 것을 의미한다.

[0088]

구 "엄격한 하이브리드화 조건"은 통상적으로 핵산의 복잡한 혼합물에서 프로브가 이의 표적 부분서열 (subsequence)에 하이브리드되나, 다른 서열에는 하이브리드되지 않는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열의존적이며, 이는 다양한 환경에서 다양할 것이다. 보다 긴 서열은 보다 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드된다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 지침은 문헌[Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에서 발견된다. 일반적으로, 엄격한 조건은 소정의 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열 용융점( $T_m$ )보다 약 5~10°C 낮게 선택된다.  $T_m$ 은 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형에서 표적 서열에 하이브리드(표적 서열이 과량으로 존재하고,  $T_m$ 에서 프로브의 50%가 평형에서 점유됨에 따름)되는 온도(소정의 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하)이다. 엄격한 조건은 pH 7.0 내지 8.3에서 염 농도가 약 1.0 M 나트륨 이온 미만이고, 통상적으로 약 0.01 내지 1.0 M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고, 상기 온도가 짧은 프로브(예를 들어, 10 내지 50개의 누클레오티드)에 대해 약 30°C 이상이고, 긴 프로브(예를 들어, 50개를 초과하는 누클레오티드)에 대해 약 60°C 이상인 조건일 것이다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 불안정화제(destabilizing agent)의 첨가와 함께 달성될 수 있다. 높은 엄격성의 하이브리드화를 위해, 양성 신호는 백그라운드의 적어도 2배, 바람직하게는 백그라운드 하이브리드화의 10배이다. 당업자는 유사한 엄격성의 조건을 발생시키기 위해 대안적 하이브리드화 및 세척 조건이 이용될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다.

[0089]

PCR을 위해, 약 36°C의 온도가 낮은 엄격성의 증폭에 통상적이나, 어닐링 온도는 프라이머 길이에 따라 약 32°C 내지 48°C로 다양할 수 있다. 높은 엄격성의 PCR 증폭을 위해, 약 62°C의 온도가 통상적이나, 높은 엄격성의 어닐링 온도는 프라이머 길이 및 특이성에 따라 약 50°C 내지 약 65°C의 범위일 수 있다. 높은 엄격성 및 낮은 엄격성의 증폭 둘 모두를 위한 통상적인 주기 조건은 30초 내지 2분 동안의 90°C 내지 95°C의 변성 단계, 30초 내지 2분간 지속되는 어닐링 단계, 및 1 내지 2분 동안의 약 72°C의 신장 단계를 포함한다.

[0090]

## 2. 전좌 CGH(tCGH)의 개관

[0091]

본 발명의 방법은 염색체 이상, 특히 염색체 전좌를 검출하고 맵핑하기 위해 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 시험 샘플, 예를 들어 환자 샘플로부터 수득된 유전체 핵산의 제 1 집단, 및 참조 샘플로부터 수득된 유전체 핵산의 제 2 집단을 이용한다. 참조 샘플은 개체로부터 수득된 본원에 제공된 임의의 세포, 조직 또는 유체, 또는 임의의 유전 이상을 함유하지 않는, 즉 모든 염색체의 정상 유전 보충물을 갖는 임의의 세포 배양물 또는 조직 배양물일 수 있다. 본 발명은 유전체 유전자좌에 의해 포함되고, 전좌쌍의 둘 모두의 일원을 포함하는 프로브 분자를 발생시키기 위해 전좌 파트너의 서열까지 걸친 서열의 선형 증폭을 수행하기 위한 특정 유전체 유전자좌에 특이적인 프라이머를 사용한다. 동시에, 참조 프로브는 또한 시험 샘플에 대해 기재된 방식으로 참조 세포로부터의 유전체 DNA의 선형 증폭을 이용하여 생성된다. 시험 및 참조 프로브는, 예를 들어, Cy3 및 Cy5를 이용하여 차별적으로 라벨링되나, 많은 적합한 형광 라벨쌍이 당 분야에 공지되어 있다. 차별적으로 라벨링된 프로브는 이후 유전체 DNA를 포함하는 마이크로어레이에 하이브리드된다. 일반적으로, 마이크로어레이의 유전체 DNA의 서열은 참조원, 예를 들어, 특정 유기체의 데이터베이스 서열, 예를 들어, 인간, 마우스 또는 래트 유전체의 완전한 데이터베이스로부터 유래된다. 참조 샘플로부터 유래된 유사한 프로브의 하이브리드화에 비한 시험 샘플 프로브의 하이브리드화의 패턴 및 정도는 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너의 확인을 가능케 한다. 고밀도 마이크로어레이, 예를 들어, 타일링 밀도 마이크로어레이의 사용은 전좌의 중지점의 고해상도 맵핑을 가능케 한다.

[0092]

따라서, 관심 유전체 유전자좌에 전좌가 존재하는 경우, 참조 세포로부터의 유전체 DNA 서열을 포함하는 마이크로어레이로의 시험 프로브의 하이브리드화는 공지된 유전체 유전자좌에 해당하는 요소와 관련된 신호 뿐만 아니라 또 다른 유전체 유전자좌와 관련된 마이크로어레이의 요소와 관련된 신호를 발생시킬 것이다. 다른 유전체 유전자좌와 관련된 신호는 상기 유전자좌가 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너인 것으로 확인한다. 대조적으로, 참조 프로브와의 마이크로어레이의 하이브리드화는 시험 프로브로 관찰된 바와 같은 또 다른 유전체 유전자좌와 관련된 하이브리드화 신호 없이, 공지된 유전자좌에 해당하는 마이크로어레이 요소와 관련된 하이브리드만을 발생시킬 것이다.

[0093]

고밀도 타일링 마이크로어레이가 사용되는 경우, 전좌의 중지점은 유전체 DNA의 연속 분절을 구현하는 일련의 마이크로어레이 요소에서 하이브리드화가 어디서 시작하고 종결되지는지 결정함으로써 확인될 수 있다. 따라서, 참조 프로브를 이용하는 시리즈에 따른 지속적인 하이브리드화와 함께, 시험 프로브를 이용하는 공지된 유전체 유전자좌에 해당하는 요소의 시리즈에 따른 특정 지점에서의 하이브리드화의 중지는 공지된 유전체 유전자좌에 대한 전좌 중지점인 하이브리드화가 중지하는 지점을 확인한다. 유사하게, 시험 프로브에 의한 하이브리드화가 공지된 유전체 유전자좌와 다른 유전자좌에 해당하는 일련의 요소에서 개시되고, 참조 프로브에 의한

하이브리드화에 대해 음성인 지점은 하이브리드화가 발생하는 첫번째 요소가 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너에 대한 중지점임을 나타낸다.

[0094] 특히, 본 발명의 방법의 2개의 일반적인 구체예가 하기 기재된다. 이러한 구체예 각각은 4개의 선형 증폭(LA) 반응의 수행을 포함한다:

[0095] (1) "T+": LA 프라이머(관심 유전체 유전자좌 내의 공지된 서열에 대한 프라이머)를 이용하여 시험(예를 들어, 종양) DNA를 증폭한다;

[0096] (2) "N+": LA 프라이머를 이용하여 정상 DNA를 증폭한다;

[0097] (3) "T-": 시험(예를 들어, 종양) DNA를 모의 증폭(즉, 프라이머는 존재하지 않음)한다;

[0098] (4) "N-": 정상 DNA를 모의 증폭(즉, 프라이머는 존재하지 않음)한다.

[0099] 각각의 구체예(하기의 라벨링된 유형 A 및 유형 B 실험)에서, 동일한 4개의 반응물이 2개의 별개의 2-색 어레이에 대해 상이한 쌍을 이룬 조합으로 공동 하이브리드화(라벨링 후)된다. 하기 기재되는 바와 같이, 2개의 (2-색) 어레이의 비교는 염색체 재배열 정보를 발생시키나, 수득된 정보는 실험 유형에 따라 상이하며: 유형 A 및 B 둘 모두는 전좌 중지점을 나타낸 반면, 유형 A 시험은 유전체 불균형도 나타내었다.

[0100] 유형 A 실험:

[0101] 단계 1: 하나의 어레이에 T+ 및 N+ 샘플을 공동 하이브리드화시킨다("T+/N+ 어레이"). 이러한 어레이는 전좌 중지점 및 유전체 불균형 둘 모두를 검출할 것이다.

[0102] 단계 2: 제 2 어레이에 T- 및 N- 샘플을 공동 하이브리드화시킨다("T-/N- 어레이"). 이러한 어레이는 유전체 불균형을 검출하나, 전좌 중지점은 검출하지 않을 것이다.

[0103] 단계 3: 하기와 같이 T+/N+ 및 T-/N- 어레이의 결과를 분석하고 비교한다:

[0104] a) 전좌 중지점은 T+/N+에서 관찰되나, T-/N- 어레이에서는 관찰되지 않는다. 통상적으로, 전좌 중지점은 직각 삼각형으로 보이고, 직각변은 중지점의 위치를 나타내고, 수평명(horizontal leg)은 중지점에서 떨어져 나타난다.

[0105] b) 유전체 불균형은 T+/N+ 및 T-/N- 어레이 둘 모두에서 관찰된다. 통상적으로, 불균형은 직사각형으로 보이고, 여기서 수직측은 중복되거나 결실된 유전체 영역의 2개의 말단을 나타낸다.

[0106] 유형 B 실험:

[0107] 단계 1: T+ 및 T- 샘플을 하나의 어레이에 공동 하이브리드화시킨다("T+/T- 어레이"). T+/T- 어레이는 실제 전좌 중지점 및 "위-중지점(pseudo-breakpoint)"을 검출하나, 유전체 불균형은 검출하지 않을 것이다. 유전체 전체에 걸친 다중 부위에서의 "비특이적" 프라이밍으로부터의 위-중지점 결과는 아마 프라이머 서열에 대한 이의 상동성을 기초로 할 것이다. 위-중지점 역시 직각삼각형 형태이다.

[0108] 단계 2: N+ 및 N- 샘플을 제 2 어레이에 공동 하이브리드화시킨다("N+/N- 어레이"). N+/N- 어레이는 "위-중지점"만을 검출하고, 실제 전좌 중지점 또는 유전체 불균형을 검출하지 않는다, 이는 N+ 및 N- 샘플 둘 모두가 정상 DNA를 이용하여 시작하기 때문이다.

[0109] 단계 3: 하기와 같이 T+/T- 및 N+/N- 어레이를 분석하고 비교한다:

[0110] a) 전좌 중지점은 T+/T- 어레이에서 관찰되고, N+/N- 어레이에서는 관찰되지 않는다.

[0111] b) 위-중지점은 T+/T- 및 N+/N- 어레이 둘 모두에서 관찰되고, 이는 무시된다.

### 3. 생물학적 샘플

[0113] 한 양태에서, 본 발명의 방법은 시험 샘플 내의 염색체 이상을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 시험 샘플은 환자로부터 수득된다. 시험 샘플은 염색체 또는 유전적 이상과 관련된 병리 또는 질환을 갖는 것으로 여겨지는 환자로부터 수득된 세포, 조직 또는 유체를 함유할 수 있다. 진단 또는 예후의 목적 상, 상기 병리 또는 질환은 일반적으로, 유전적 결함, 예를 들어, 유전체 핵산 염기 치환, 증폭, 결실 및/또는 전좌와 관련된다. 시험 샘플은 암성 세포 또는 이러한 세포로부터의 핵을 함유하는 것으로 여겨질 수 있다. 샘플은 양수, 생검, 혈액, 혈액 세포, 골수, 뇌척수액, 대변 샘플, 미세침 생검 샘플, 복수, 혈장, 흉수, 타액, 혈청,

담, 눈물, 조직 또는 조직 균질화물, 조직 배양 배지, 소변 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 샘플은 또한 조직의 절단, 분할, 정제 또는 세포 소기관 분리와 같이 가공될 수 있다.

[0114] 세포, 조직 또는 유체 샘플을 분리시키는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 흡출, 조직 절단, 혈액 또는 다른 유체의 채취, 외과적 생검 또는 바늘 생검 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 환자로부터 유래된 샘플은 조직학 목적을 위해 수행되는 동결 절단 또는 파라핀 절단을 포함할 수 있다. 샘플은 또한 상층액(세포 배양물의 상층액), 세포의 용해질, 염색체 이상 및 복제수를 포함하는 섞임증(mosaicism)의 수준을 검출하는 것이 요망될 수 있는 조직 배양물로부터의 세포로부터 유래될 수 있다.

[0115] 한 구체예에서, 암성 세포를 함유하는 것으로 여겨지는 샘플은 인간 환자로부터 수득된다. 샘플은 널리 공지된 기술, 예를 들어, 정맥천자, 요추천자, 타액 또는 소변과 같은 유체 샘플, 조직 생검 또는 바늘 생검 등을 이용하여 환자로부터 유래될 수 있다. 암성 세포를 함유하는 종양을 가질 것으로 여겨지는 환자에서, 샘플은, 예를 들어, 종양 생검, 미세침 흡출물, 또는 절제된 종양으로부터의 절단물을 포함하는 종양의 생검 또는 외과적 표본을 포함할 수 있다. 염수 세척을 이용하여 임의의 관심 영역, 예를 들어, 경부, 기관지, 방광 등으로부터 세척 표본이 제조될 수 있다. 환자 샘플은 또한 음주측정기(breathalyzer)로 채취되거나 기침 또는 재채기로부터 채취된 날숨 샘플을 포함할 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 조직 및/또는 혈액이 저장되는 세포 또는 혈액 은행으로부터 수득될 수 있거나, 시험관내 공급원, 예를 들어, 세포 배양물로부터 수득될 수 있다. 샘플 공급원으로 사용하기 위한 세포 배양물을 확립시키는 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0116] 다양한 질병과 관련된 것으로 공지된 전좌의 예는 t(2;5)(p23;q35) - 퇴행성 대세포 림프종; t(8;14) - 베키트 림프종(c-myc); t(9;22)(q34;q11) - 필라델피아 염색체, CML, ALL; t(11;14) - 외투세포 림프종(Bcl1-1); t(11;22)(q24;q11.2-12) - 유잉 육종; t(14;18)(q32;q21) - 소포림프종(Bcl-2); t(17;22) - 응기성 피부섬유육종; t(15;17) - 급성 전골수구성 백혈병; t(1;12)(q21;p13) - 급성 골수성 백혈병; t(9;12)(p24;p13) - CML, ALL(TEL-JAK2); t(X;18)(p11.2;q11.2) - 활막 육종; t(1;11)(q42.1;q14.3) - 정신분열병; t(12;15)(p13;q25) - (TEL-TrkC); 급성 골수성 백혈병, 선천성 섬유육종, 분비성 유방암종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0117] 따라서, 본 발명은 또한 염색체 전좌의 존재를 검출하고 전좌 파트너의 정체를 결정함으로써 염색체 재배열, 특히 염색체 전좌에 의해 야기되는 질병을 예측하거나, 진단하거나, 예후를 제공하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 베키트 림프종의 진단이 요망되는 경우, 적절한 면역글로불린 조절 유전자좌의 선형 증폭을 위한 프라이머가 인간 마이크로어레이로의 하이브리드화를 위한 프로브를 발생시키기 위해 사용될 것이다. 본 발명의 방법을 이용하여, 면역글로불린 유전자좌에 대한 전좌 파트너가 MYC에 대한 유전자로 확인되는 경우에 베키트 림프종의 진단이 확인될 것이다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 균형성 염색체 전좌와 관련된 암의 진단 또는 예후에 특히 적합하다.

[0118] 용어 "암"은 인간 암 및 암종, 백혈병, 육종, 샘암종, 림프종, 고형 및 림프양 암 등을 의미한다. 다양한 유형의 암의 예는 단핵구 백혈병, 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 급성 골수구성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 유방암, 위암, 방광암, 난소암, 갑상선암, 폐암, 전립선암, 자궁암, 고환암, 신경 모세포종, 두부, 경부, 자궁경부 및 질의 편평 세포 암종, 다발골수종, 연조직 육종 및 골육종, 결장직장암, 간암(즉, 간암종), 신장암(즉, 신장 세포 암종), 흉막암, 췌장암, 자궁경부암, 항문암, 담관암, 위장관 유암종 종양, 식도암, 담낭암, 소장암, 중추신경계의 암, 피부암, 용모막암종; 골육종, 섬유육종, 신경교종, 흑색종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 베키트 림프종, 소세포 림프종, 거대세포 림프종 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0119] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 태아에서 염색체 또는 유전적 이상을 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 태아의 태아기 진단은 염색체 또는 유전적 이상을 갖는 태아를 가진 위험이 증가된 여성에 대해 필요할 수 있다. 위험 요인은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 이는, 예를 들어, 고령 임신(advanced maternal age), 태아 스크리닝에서의 이상 모체 혈청 마커, 이전 출산한 아동에서의 염색체 이상, 물리적 이상 및 공지되지 않은 염색체 상태를 갖는 이전 출산한 아동, 모(parental) 염색체 이상, 및 습관성 유산(recurrent spontaneous abortion)을 포함한다.

[0120] 본 발명의 방법은 임의의 유형의 배아 또는 태아 세포를 이용하여 태아 진단을 수행하는데 사용될 수 있다. 태아 세포는 임신한 여성, 또는 태아의 샘플로부터 수득될 수 있다. 따라서, 태아 세포는 양수천자, 주사기에 의해 흡출된 용모막 용모, 경피 제대혈, 태아 피부 생검, 4-세포 내지 8-세포 단계의 태아(착상전)로부터의 할구, 또는 포배(착상전 또는 자궁 세척에 의함)로부터의 영양세포종 샘플에 의해 제공된다. 충분한 양의 유전체 핵산을 갖는 체액이 또한 사용될 수 있다.

- [0121] 한 구체예에서, 본 발명의 tCGH 방법은 염색체 전좌와 관련된 둘 모두의 파트너 유전자에서의 중지점의 검출 및 맵핑을 포함한다(예를 들어, 도 7의 유전자 A 및 B 참조). 전좌의 둘 모두의 파트너 유전자를 검출하는 경우, 예를 들어, 프라이머에 의해 표적화된 유전자인 유전자 A의 선형 증폭에 의해 생성된 앰플리콘은 하이브리드화의 "역위된" 직각삼각형 패턴을 발생시킬 것이다(예를 들어, BCL6 및 MYC 앰플리콘 대한 역위된 하이브리드화 패턴을 각각 나타내는 도 10e 및 10i 참조).
- [0122] 두번째 구체예에서, 본 발명은 하나 이상의 유전자좌의 염색체 재배열을 동시에 검출하기 위한 다중 선형 증폭을 포함하는 tCGH 분석 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 다중 증폭은 선형 증폭 프라이머의 혼합물을 이용하여 수행된다. 한 예에서, 7개의 D<sub>H</sub> 프라이머의 혼합물(표 3 참조)이 다중 D<sub>H</sub> 재배열을 포함시키기 위해 사용될 수 있다(van Dongen, Langerak *et al.*, *Leukemia* 17(12): 2257-317 (2003)). 또 다른 구체예에서, 골수성 백혈병과 관련된 유전자좌의 선형 증폭을 위한 5개 프라이머의 혼합물(MPM 믹스, 표 5 참조)이 3개의 상이한 골수성 백혈병 전좌를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다: (1) BCR-ABL 융합체 = CML(만성 골수구성 백혈병)에서 t(9;22), (2) PML-RARA 융합체 = 급성 전골수구성 백혈병에서 t(15;17), 및 (3) inv(16)/t(16;16)을 갖는 급성 골수성 백혈병(AML). 또 다른 구체예에서, 균형성 전좌의 tCGH 분석과 함께 다중 선형 증폭에 821 프라이머 믹스 또는 P1/P7 프라이머 믹스(표 5)가 사용될 수 있다.
- [0123] 세번째 구체예에서, 본 발명에 제공된 방법은 균형성 전좌가 아닌 염색체 재배열의 검출을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 염색체 재배열은 결실, 중복, 증폭, 역위, 또는 불균형성 전좌를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 11e는 tCGH 분석에 의한, 결실 중지점 전체에 걸친 증폭에 의한 인트론 간극 BCL2 결실의 검출을 도시한다. 유사하게, 도 19는 tCGH 분석에 의한, MYH11 및 CBFB 유전자 inv(16)를 융합시키는 염색체 역위의 검출(하부 패널)을 도시한다.
- [0124] 네번째 구체예에서, 본 발명은 균형성 재배열 및 불균형성 염색체 이상 둘 모두의 동시 검출을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 불균형에 대한 중지점이 균형성 재배열의 중지점과 일치하는 경우에 동시 검출을 가능케 한다. 예를 들어, 도 13은 IgH-CCND1 전좌 중지점에서 M02058 및 Granta 519 세포주 둘 모두에서의 균형성 전좌 및 염색체 중복의 동시 검출을 도시한다.
- [0125] 다섯번째 구체예에서, 본 발명은 염색체 재배열을 검출함으로써 개체 내의 질병을 진단하거나 상기 질병의 예후를 제공하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 개체에서 림프종을 진단하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 개체로부터의 샘플에서의 표 2에서 발견된 것으로부터 선택된 신규한 중지점의 검출을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 B 세포 림프종, 외투세포 림프종(MCL), 골수종, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 베키트 림프종, B 세포 림프종 및 여포 중심 림프종(Follicle Center Lymphoma, FCL)으로부터 선택된 질병의 검출을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 검출은 PCR 분석, 서열분석, 질량분광법, 하이브리드화 또는 tCGH 분석에 의해 수행된다. 표 2에 나열된 신규한 전좌의 PCR 분석 또는 서열분석에 적합한 프라이머는 서열 목록 번호: 27, 28, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 64의 서열, 및 이의 기능성 동등물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0126] 한 특정 구체예에서, 본 발명은 개체로부터의 생물학적 샘플 내에서 IgH-CCND1 전좌를 검출함으로써 개체에서의 B 세포 림프종 또는 외투세포 림프종(MCL)을 진단하거나, 이의 예후를 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 CCND1 중지점은 chr11:69,055,996, chr11:69,100,509, chr11:69,131,130, chr11:69,056,460, 68,989,831, chr11:69,082,854, chr11:69,059,199, 및 chr18:58,944,421로 구성된 군으로부터 선택된다. 두번째 특정 구체예에서, 본 발명은 개체로부터의 샘플 내에서 IgH-CCND1 전좌를 검출함으로써 개체에서의 골수종을 진단하거나, 이의 예후를 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 CCND1 중지점은 chr11:69,153,045 또는 chr11:69,153,019이다. 세번째 특정 구체예에서, 본 발명은 개체로부터의 생물학적 샘플 내에서 IgH-BCL2 전좌를 검출함으로써 개체에서의 DLBCL을 진단하거나, 이의 예후를 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 BCL2 중지점은 chr18:58,944,489, chr18:58,914,890, chr18:58,944,475 및 chr18:58,938,252로부터 선택된다. 네번째 특정 구체예에서, 본 발명은 개체로부터의 생물학적 샘플 내에서 IgH-BCL6 전좌를 검출함으로써 개체에서의 DLBCL을 진단하거나, 이의 예후를 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 BCL2 중지점은 chr3:188,945,670 또는 chr3:188,945,699이다. 다섯번째 특정 구체예에서, 본 발명은 개체로부터의 생물학적 샘플 내에서 IgH-MYC 전좌를 검출함으로써 개체에서의 B 세포 림프종을 진단하거나, 이의 예후를 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 MYC 중지점은 chr8:128,818,596, chr8:128,817,581 또는 chr8:128,816,104이다.
- [0127] 4. 균형성 전좌를 검출하기 위한 프로토콜 생성

- [0128] 전좌의 검출을 위해, 전좌의 잠재적 부위에 걸친 DNA의 선형 증폭을 발생시키는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 선형 증폭 방법의 예는 단일 프라이머를 이용하는 PCR 증폭을 포함한다. 문헌[Liu, C. L., S. L. Schreiber, et al., *BMC Genomics*, 4: Art. No. 19, May 9, 2003]을 참조하라.
- [0129] 선형 증폭을 위한 조건의 예시적 세트는 1 µg 유전체 DNA, 200mM dNTPs, 및 150nM 선형 증폭 프라이머를 함유하는 50 µl 부피의 반응물을 포함한다. 증폭은 어드밴티지(Advantage) 2 PCR 효소 시스템(Clontech)을 이용하여 다음과 같이 수행될 수 있다: 5분 동안 95°C에서의 변성 후, (95°C/15초, 60°C/15초 및 68°C/6 분)의 12 주기.
- [0130] 프로브는 선형 증폭의 과정 동안 또는 증폭이 발생한 후에 라벨링될 수 있다. 하기 개설되는 특정 예에서, 라벨은 DNA 중합효소를 이용하는 올리고누클레오티드(무작위 핵사마) 매개 프라이머 신장에 의한 선형 증폭 후에 별개의 단계로 통합된다. 이러한 프로토콜을 이용하여, 본래의 유전체 DNA 샘플 및 선형 증폭 생성물 둘 모두는 신호를 발생시키는 라벨링된 프로브를 발생시킬 것이다. 하이브리드화 후, 생성된 데이터는 정상 aCGH를 이용하여 관찰되는 바와 같이 차별적 유전체 DNA 신호로부터의 둘 모두의 염색체 이상에 대한 정보를 발생시키고, 선형 증폭 생성물로부터 발생하는 차별적 신호로부터 염색체 재배열을 나타낼 것이다. 라벨링된 dNTP가 선형 증폭 단계에서 포함되는 경우에 발생하는 것과 같이, 라벨이 단순히 선형 증폭 생성물에 통합되는 경우, 전좌만이 나타날 것이고, 증폭 및 결실과 같은 염색체 이상은 나타나지 않을 것이다. 유용한 라벨은, 예를 들어, 형광 염료(예를 들어, Cy5, Cy3, FITC, 로다민, 란타마이드 포스포르(lanthamide phosphor), 텍사스 레드(Texas red)),  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ , 전자 밀집 시약(electron-dense reagents)(예를 들어, 금), 효소, 예를 들어, ELISA에서 통상적으로 사용되는 효소(예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)), 비색 라벨(colorimetric label)(예를 들어, 콜로이드 금), 자기 라벨(예를 들어, 다이나비드(Dynabeads)), 비오틴, 디옥시게닌, 또는 합텐 및 항혈청 또는 모노클로날 항체가 이용 가능한 단백질을 포함한다. 라벨은 검출되는 핵산으로 직접 통합될 수 있거나, 이는 검출되는 핵산에 하이브리드되거나 결합되는 프로브(예를 들어, 올리고누클레오티드) 또는 항체에 부착될 수 있다. 검출 가능한 라벨은 핵산으로 통합되거나, 이와 결합되거나, 이에 컨쥬게이션될 수 있다. 핵산과 검출 가능한 라벨 사이의 결합은 공유성 또는 비공유성일 수 있다. 라벨은 다른 유용한 특성 또는 바람직한 특성에 대한 잠재적 입체구조적 방해 또는 영향을 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암(spacer arm)에 의해 부착될 수 있다.
- [0131] **5. 마이크로어레이**
- [0132] 예를 들어, 미국 특허 제 6,277,628호; 제 6,277,489호; 제 6,261,776호; 제 6,258,606호; 제 6,054,270호; 제 6,048,695호; 제 6,045,996호; 제 6,022,963호; 제 6,013,440호; 제 5,965,452호; 제 5,959,098호; 제 5,856,174호; 제 5,830,645호; 제 5,770,456호; 제 5,632,957호; 제 5,556,752호; 제 5,143,854호; 제 5,807,522호; 제 5,800,992호; 제 5,744,305호; 제 5,700,637호; 제 5,556,752호; 제 5,434,049호에 기재된 것과 같은 임의의 공지된 마이크로어레이 및/또는 마이크로어레이를 제조하거나 이용하는 방법이 본 발명의 실시에 이용될 수 있다; 예를 들어, 또한 WO 99/51773호; WO 99/09217호; WO 97/46313호; WO 96/17958호; 문헌[Johnston, Curr. Biol. 8:R171-R174, 1998; Schummer, Biotechniques 23:1087-1092, 1997; Kern, Biotechniques 23:120-124, 1997; Solinas-Toldo, Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407, 1997; Bowtell, Nature Genetics Supp. 21:25-32, 1999] 참조. 또한 공개된 미국 특허 출원 일련 번호 제 20010018642호; 제 20010019827호; 제 20010016322호; 제 20010014449호; 제 20010014448호; 제 20010012537호; 제 20010008765호를 참조하라.
- [0133] 본 발명의 tCGH 방법은 다양한 시판되는 CGH 어레이, 뿐만 아니라 상업적으로 제작될 수 있는 맞춤 설계된 어레이를 이용하여 수행될 수 있다. 시판되는 고밀도 어레이 및 키트의 예는 인간, 마우스 및 래트 유전체 분석을 위한 아질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)사에서 시판되는 것(예를 들어, G4411B 및 G4412A), 님블겐(Nimblegen)(Roche)사에서 제조되는 맞춤 타일링 어레이, 및 어피메트릭스(Affymetrix)사에서 제조되는 전체 유전체 타일링 어레이를 포함한다.
- [0134] 한 구체예에서, 본 발명은 백혈병과 관련된 균형성 전좌의 검출을 위한 신규한 고밀도 어레이를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 고밀도 어레이는 백혈병, 예를 들어, 골수성 백혈병 또는 램프종을 진단하거나, 이의 예후를 제공하거나, 이의 유전형을 결정하는데 유용하다. 한 특정 구체예에서, 본 발명은 표 1, 표 2 및/또는 표 4에서 발견되는 유전자좌를 검출하기 위한 어레이를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 어레이는 표 2에서 발견되는 신규한 중지점의 검출을 가능케 한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 어레이는 tCGH 분석을 위해

전좌에서의 둘 모두의 파트너 유전자의 검출을 가능케 한다. 한 특정 구체예에서, 본 발명은 표 4에 기술된 바와 같은 AML 고밀도 어레이를 제공한다.

[0135] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 질병, 예를 들어, 암과 관련된 균형성 전좌의 검출에 유용한 프라이머 혼합물을 제공한다. 한 특정 구체예에서, 암은 백혈병 또는 골수성 백혈병이다. 특정 구체예에서, 본 발명에 의해 제공된 프라이머 믹스는 질병에 걸린 개체에서 균형성 전좌와 통상적으로 관련되는 유전체 유전자좌의 선형 증폭에 유용하다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 프라이머 믹스는 다중 선형 증폭 및 다중 tCGH 분석에 유용하다. 본 발명의 특정 구체예에서, 프라이머 믹스는 골수성 프라이머 믹스(MPM), 821 믹스 및 P1/P7 믹스로부터 선택된다.

[0136] 어레이 기반 CGH의 해상도는 전체 유전체에 걸쳐 있을 수 있는 어레이 내의 핵산 요소의 수, 크기 및 맵 위치에 주로 좌우된다. 본 발명의 한 특히 이로운 구체예에서, 타일링 밀도로 마이크로어레이를 형성시키기 위해 올리고누클레오티드 핵산 요소가 사용된다. 예를 들어, 문헌[Mockler, T. C. and J. R. Ecker, *Genomics* 85:1 (2005); Bertone, P., M. Gerstein, et al., *Chromosome Research*, 13: 259 (2005)]을 참조하라.

## 6. 마이크로어레이의 하이브리드화

[0138] 미국 특허 제 6,197,501호; 제 6,159,685호; 제 5,976,790호; 제 5,965,362호; 제 5,856,097호; 제 5,830,645호; 제 5,721,098호; 제 5,665,549호; 제 5,635,351호; 문헌[Diago, Am. J. Pathol. 158:1623-1631, 2001; Theillet, Bull. Cancer 88:261-268, 2001; Werner, Pharmacogenomics 2:25-36, 2001; Jain, Pharmacogenomics 1:289-307, 2000]에 기재된 것과 같은 비교 유전체 하이브리드화를 수행하기 위한 기준에 기재된 다수의 방법 중 임의의 방법이 본 발명의 실시에 사용될 수 있다.

[0139] 몇몇 예에서, 특정 관심 프로브의 하이브리드화 전에, 반복 서열을 차단하는 것이 요망된다. 반복 서열로의 하이브리드화를 제거하고/하거나 차단하는 다수의 방법이 공지되어 있다(예를 들어, WO 93/18186호 참조). 예로서, Alu 서열과 같은 고도로 반복된 서열로의 하이브리드화를 차단하는 것이 요망될 수 있다. 상기를 달성하기 위한 한 방법은 상보적 서열의 하이브리드화 속도가 이의 농도가 증가함에 따라 증가한다는 사실을 이용한다. 따라서, 일반적으로 높은 농도로 존재하는 반복 서열은 하이브리드화 조건하에서의 변성 및 인큐베이션 후에 다른 것보다 신속하게 이중 가닥이 될 것이다. 이후, 이중 가닥의 핵산이 제거되고, 나머지가 하이브리드화에 사용된다. 이중 가닥 서열로부터 단일 가닥 서열을 분리시키는 방법은 히드록시아파타이트 또는 고체 지지체 등에 부착된 고정된 상보적 핵산을 이용하는 것을 포함한다. 대안적으로, 부분적으로 하이브리드화된 혼합물이 사용될 수 있고, 이중 가닥의 서열은 표적에 하이브리드화될 수 없을 것이다.

[0140] 또한, 차단되는 것으로 조사된 서열에 상보적인 라벨링되지 않은 서열이 하이브리드화 혼합물에 첨가될 수 있다. 이러한 방법은 반복 서열 뿐만 아니라 다른 서열의 하이브리드화를 억제하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, Cot-1 DNA가 샘플 내의 반복 서열의 하이브리드화를 선택적으로 억제하기 위해 사용될 수 있다. Cot-1 DNA를 제조하기 위해, DNA는 추출되고, 전단되고, 변성되고, 탈변성된다. 고도로 반복성인 서열은 더욱 신속히 채어닐링되므로, 생성된 하이브리드는 상기 서열에 대해 고도로 부화된다. 나머지 단일 가닥의 DNA(즉, 단일 복제 서열)는 S1 누클레아제로 분해되고, 이중 가닥의 Cot-1 DNA는 정제되고, 샘플 내의 반복 서열의 하이브리드화를 차단하는데 사용된다. Cot-1 DNA는 상기 기재된 바와 같이 제조될 수 있으나, 이는 또한 시판된다(BRL).

[0141] 본 발명의 방법에서의 핵산에 대한 하이브리드화 조건은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 하이브리드화 조건은 높은 염격성, 중간의 염격성 또는 낮은 염격성 조건일 수 있다. 이상적으로, 핵산은 상보적인 핵산에만 하이브리드될 것이며, 샘플 내의 다른 비상보적인 핵산에는 하이브리드되지 않을 것이다. 당 분야에 공지된 바와 같이 하이브리드화의 염격함의 정도를 변경시키고 백그라운드 신호를 감소시키기 위해 하이브리드화 조건이 변경될 수 있다. 예를 들어, 하이브리드화 조건이 높은 염격성 조건인 경우, 핵산은 매우 높은 정도의 상보성으로 핵산 표적 서열에만 결합할 것이다. 낮은 염격성의 하이브리드화 조건은 약간의 정도의 서열 상이에도 서열의 하이브리드화를 가능케 할 것이다. 하이브리드화 조건은 생물학적 샘플, 핵산의 유형 및 서열에 따라 다양할 것이다. 당업자는 본 발명의 방법을 실시하기 위해 하이브리드화 조건을 최적화시키는 방법을 알 것이다.

[0142] 예시적 하이브리드화 조건은 다음과 같다. 높은 염격성은 일반적으로 65°C에서 0.018M NaCl에서 안정적인 하이브리드를 형성하는 핵산 서열만의 하이브리드화를 가능케 하는 조건을 의미한다. 높은 염격성의 조건은, 예를 들어, 42°C에서의 50% 포름아미드, 5 x 텐하르트 용액(Denhardt's solution), 5 x SSC(염수 시트르산 나트륨), 0.2% SDS(소듐 도데실 술페이트) 중에서의 하이브리드화 후, 65°C에서의 0.1 x SSC 및 0.1% SDS에서의 세척에

의해 제공될 수 있다. 중간의 염격성은 42°C에서의 50% 포름아미드, 5 x 텐하르트 용액, 5 x SSC, 0.2% SDS에서의 하이브리드화 후, 65°C에서의 0.2 x SSC 및 0.2% SDS에서의 세척에 상당하는 조건을 의미한다. 낮은 염격성은 10% 포름아미드, 5 x 텐하르트 용액, 6 x SSC, 0.2% SDS에서의 하이브리드화 후, 50°C에서의 1 x SSC 및 0.2% SDS에서의 세척에 상당하는 조건을 의미한다.

#### [0143] tCGH 검정의 판독 및 해석

공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너의 확인 및 전좌 중지점의 결정은 마이크로어레이의 하나 이상의 핵산 요소로의 라벨링된 프로브의 하이브리드화의 패턴 및 강도의 결정을 기초로 한다. 통상적으로, 샘플 또는 시험 프로브 및 참조 프로브와 결합된 검출가능한 라벨에 의해 생성된 어레이에서의 하이브리드화 신호의 위치, 하이브리드화 신호 강도, 및 강도의 비가 결정된다. 샘플 또는 시험 프로브에는 하이브리드되나 참조 프로브에는 하이브리드되지 않는 요소의 결정은 공지된 유전체 유전자좌의 전좌 파트너로서 요소 내에 함유된 서열을 확인한다. 시험 프로브와 참조 프로브 사이의 동일한 하이브리드화 패턴은 시험 샘플이 공지된 유전체 유전자좌에서 전좌를 함유하지 않는 것을 나타낸다. 타일링 밀도 마이크로어레이가 사용되는 경우, 전좌 중지점은 연속된 유전체 분절을 제시하는 일련의 마이크로어레이 요소에서 하이브리드화가 개시되거나 중단되는 위치를 확인함으로써 결정될 수 있다. 따라서, 균형성 전좌의 경우, 하이브리드화는 공지된 유전체 유전자좌와 다른 유전자 내의 특정 DNA 서열에서 시작할 것이다. 별개의 유전자의 연속된 서열 내의 제 1 요소에 의해 구현된 서열은 상기 서열이 제 2 유전자 내의 중지점을 제시하는 것으로 확인된다. 반대로, 공지된 유전체 유전자와 관련하여, 하이브리드화가 중지되는 연속된 서열 내의 요소는, 이러한 요소가 공지된 유전체 유전자좌 내의 전좌 중지점을 제시하는 것을 나타낸다.

[0145] 또한, 통상적으로, 표적 핵산 분절에 대한 신호 강도의 비가 클수록, 요소에 결합하는 2개의 샘플 내의 서열의 복제수 비가 커진다. 따라서, 표적 핵산 분절에서의 신호 강도 비의 비교는 2개의 샘플의 유전체 핵산 내의 상이한 서열의 복제수 비의 비교를 가능케 한다.

[0146] 일반적으로, 어레이-고정된 핵산 분절로 결합하는 핵산과 결합된 측정가능한 라벨을 검출하는데 사용될 수 있는 임의의 장치 또는 방법이 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 다중 형광단의 검출을 위한 장치 및 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,539,517호; 제 6,049,380호; 제 6,054,279호; 제 6,055,325호; 및 제 6,294,331호 참조. 어레이 판독 또는 "스캐닝" 장치, 예를 들어, 스캐닝 및 분석 다색 형광 이미지를 포함하는, 임의의 공지된 장치 또는 방법, 또는 이의 변형이 본 발명의 방법을 실시하는데 사용되거나 이에 적합화될 수 있다; 예를 들어, 미국 특허 제 6,294,331호; 제 6,261,776호; 제 6,252,664호; 제 6,191,425호; 제 6,143,495호; 제 6,140,044호; 제 6,066,459호; 제 5,943,129호; 제 5,922,617호; 제 5,880,473호; 제 5,846,708호; 제 5,790,727호; 및 본원에서 어레이의 논의에 언급된 특허문헌을 참조하라. 또한, 공개된 미국 특허 출원 일련 번호 제 20010018514호; 제 20010007747호; 및 공개된 국제 특허 출원 번호 WO0146467 A호; W09960163 A호; W00009650 A호; W00026412 A호; W00042222A호; W00047600A호; 및 W0101144A호를 참조하라.

#### [0147] 7. 본 발명의 키트

[0148] 본 발명은 또한 본원에 제공된 tCGH 방법을 촉진하고/하거나 표준화시키기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 다양한 방법을 실시하기 위한 재료 및 시약이 상기 방법을 촉진시키기 위한 키트에 제공될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "키트"는 방법, 검정, 분석, 진단, 예후 또는 조작을 촉진하는 물품의 조합을 의미한다.

[0149] 한 구체예에서, 본 발명에 의해 제공된 키트는 균형성 전좌와 관련된 유전체 유전자좌의 선형 증폭을 위한 핵산 프라이머를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 키트는 다중 유전체 유전자좌의 다중 선형 증폭을 위한 프라이머 믹스를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 키트는 균형성 염색체 전좌의 tCGH 분석에 사용하기 위한 고밀도 타일링 어레이를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명은 균형성 전좌를 특징으로 하는 질병의 진단 또는 예후에 유용한 키트를 제공한다. 특정 구체예에서, 상기 질병은 암, 예를 들어, 림프종 또는 백혈병이다.

[0150] 한 특정 구체예에서, 본 발명은 골수성 백혈병과 관련된 균형성 전좌의 검출을 위한 고밀도 타일링 어레이를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 골수성 백혈병과 관련된 균형성 전좌와 관련된 유전체 유전자좌의 다중 선형 증폭을 위한 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있다. 한 특이적 구체예에서, 타일링 어레이는 AML 파일럿 어레이일 수 있고, 프라이머 믹스는 MPM 믹스, 821 믹스 또는 P1/P7 믹스로부터 선택될 수 있다.

[0151] 하기 실시예는 예시를 위해 제공되며, 청구된 본 발명을 제한하고자 함이 아니다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0152]

### 실시예

[0153]

#### 실시예 1: J<sub>H</sub>-관련 전좌 중지점의 확인

[0154]

유전체 불균형을 검출하나 균형성 유전체 재배열을 검출하지 않는 어레이CGH를 설계하였다. 이에 따라, 본 발명자는 표준 CGH 어레이 상에 균형성 전좌 부위를 나타내기 위해 합성 유전체 불균형을 생성시키는 수단을 조사하였다. 모델 시스템으로서 림프종 세포주 내의 균형성 면역글로불린 전좌를 이용하여, 본 발명자는 형광 라벨링 및 마이크로어레이 하이브리드화 전에 표적화된 선형 증폭 단계에서 유전체 DNA를 간단히 변형시킴으로써 어레이 CGH에 의해 균형성 전좌가 검출 가능하도록 하는 효소 선형 증폭 반응을 개발하였다. 도 1에 개설된 바와 같이, J<sub>H</sub> 콘센서스(consensus) 프라이머를 이용하여 J<sub>H</sub>-관련 전좌 중지점을 효소적으로 증폭하여(van Dongen, 2003), 전좌 파트너 유전자좌로의 중지점 접합 전체에 걸쳐 선형 증폭을 발생시켰다. 단일 프라이머의 사용은 IgH 파트너 유전자의 확인과 상관 없이 J<sub>H</sub>-관련 전좌의 증폭을 가능케 하였다.

[0155]

통상적인 tCGH 실험에서, 림프종 및 정상 대조군으로부터의 유전체 DNA를 선형 증폭시키고, Cy3(림프종) 또는 Cy5(대조군)으로 형광 라벨링한 후, 조합시키고, 통상적인 IgH 융합 파트너 유전자좌를 제시하는 맞춤 올리고누클레오티드 어레이에 타일링 밀도로 하이브리드화시켰다(도 1). BCL2 및 MYC 유전자좌를 포함하는 J<sub>H</sub>-관련 전좌는 도 2a 및 2b에 예시되어 있다. 비-IgH 유전자좌 내에 중지점의 유전체 위치를 나타내는 직각변을 갖는 특징적인 직각삼각형 형태에 의해 tCGH 어레이에서 중지점을 확인하였다. 직각변의 높이는 J<sub>H</sub>-관련 선형 증폭의 정도를 나타낸다. 이러한 삼각형 형태는 다양한 크기의 DNA 단편을 생성시키는 선형 증폭 단계, 및 J<sub>H</sub> 프라이머로부터 거리 증가에 따른 증폭 강도의 점진적인 감소와 일치하였다. 이러한 중지점 프로파일의 형태는 증폭 조건에 좌우되며, 신장 시간이 증가하면 tCGH 어레이에서 보다 넓은 프로파일이 생성되었다(도 6).

[0156]

하이브리드화 대조군으로서의 정상적인 유전체 DNA의 사용은 동일한 어레이에서 균형성 전좌 및 염색체 불균형들 모두가 검출되는 것을 가능케 한다. 예를 들어, RL7(Lipford, 1987)(도 3a, 상부 패널) 및 OCI-Ly8(Tweeddale, 1987) 세포주(도 4a)가 BCL2 인트론 2에서 J<sub>H</sub>-BCL2 전좌 및 큰 결실을 갖는 것이 밝혀졌다. OCI-Ly8에서 J<sub>H</sub>-BCL2 중지점에 인접한 작은 결실은 상기 전좌와 관련하여 발생한 것으로 보인다. M02058 외투 세포 림프종(MCL) 세포주(Meeker, 1991)(도 3c)에서, J<sub>H</sub> 중지점에 대해 종말절인 CCND1 유전자좌의 중복 및 CCND1 3'UTR 내에 작은 결실이 있었다. 균형성 전좌와 관련된 어레이 프로파일의 비대칭 형태는 일반적으로 균형성 전좌가 tCGH 어레이에서 유전체 불균형으로부터 용이하게 구별되도록 한다. 이는 통상적인 어레이CGH에서와 같이, 유전체 불균형만이 확인되는 모의 증폭 실험에 대한 tCGH 결과의 비교에 의해 예시된다(도 3a 및 3c, 중간 패널). tCGH는 또한 대조 표본으로서 선형으로 증폭되는 정상 DNA 대신 모의 증폭되는 시험 DNA를 이용함으로써 독립적으로(유전체 불균형 검출 없음) 불균형 전좌를 확인하는데 사용될 수 있다(도 3a 및 3c, 하부 패널). 상기 방식으로 수행된 tCGH 실험은 통상적인 tCGH 실험에서 증폭되는 정상 DNA의 사용에 의해 최소화되는 인공물인, 다중 위치에서의 "위-중지점"을 나타내었다(보충 데이터, 나타내지 않음).

[0157]

#### 실시예 2: IgH 스위치(S<sub>H</sub>)-관련 전좌 중지점의 확인

[0158]

이후, IgH 스위치(S<sub>H</sub>) 영역을 포함하는 전좌를 확인하기 위해 선형 증폭 프라이머를 설계하였다. 인간 S<sub>H</sub> 영역은 특징적인 반복 서열 단위의 다수의 텐덤(tandem) 반복부를 함유하고: S<sub>μ</sub>, S<sub>a</sub> 및 S<sub>e</sub>E 영역에서, 반복 단위는 축퇴성 오합체 서열 G(A/G)GCT인 반면, S<sub>v</sub> 영역에서, 반복 단위는 80-90 nt 길이이고, 보다 복잡하다(Max, 1982; Mills, 1990; Mills, 1995). S<sub>H</sub>-관련 전좌 중지점은 상기 반복 영역 전체에 걸쳐 분포되어 있다. 상기 다양한 중지점의 검출을 촉진하기 위해, 상기 반복 단위를 인지하고, S<sub>μ</sub>/S<sub>a</sub>/S<sub>e</sub> 영역(S<sub>5</sub> 프라이머) 또는 S<sub>v</sub> 반복 영역(S<sub>v</sub> 프라이머) 내의 다수의 위치에서의 합성을 프라이밍하기 위해 선형 증폭 프라이머를 설계하였다. 베키트 림프종 세포주 Raji(Dyson, 1985)(나타내지 않음)에서의 S<sub>μ</sub>-MYC 전좌 및 다발골수종 세포주 U-266(Gabrea, 1999)(도 2c)에서의 잡재 S<sub>a</sub>-CCND1 융합체를 확인하기 위해 J<sub>H</sub>를 사용하는 대신 S<sub>5</sub> 프라이머를 이용하여 tCGH를 수행하였다.

[0159]

거대 세포 림프종 세포주 OCI-Ly8(Tweeddale, Lim, et al., *Blood* 69(5):1307-1314 (1987))는 MYC 재배열 외에

$J_H$ -BCL2 및  $S_{\gamma 3}$ -BCL6 융합체를 갖는 것으로 공지되어 있다(Farrugia, Duan, et al., *Blood* 83(1): 191-198 (1994); Chang, Blondal, et al., *Leuk Lymphoma* 19(1-2):165-71 (1995); Ye, Chaganti, et al., *EMBO* 14(24):6209-17 (1995)). 분자 세포유전학 연구는 염색체 3, 8, 14 및 18의 복잡한 재배열의 존재를 확인하였으나(Chaganti, Rao, et al., *Genes, Chromosomes and Cancer* 23(4):328-336 (1998); Mehra, Messner, et al., *Genes, Chromosomes and Cancer* 33(3):225-234 (2002); Sanchez-Izquierdo, Buchonnet, et al., *Blood* 101(11):4539-4546 (2003)), MYC 재배열의 상세사항은 완전히 확립되지 않았다.  $J_H$  프라이머와 함께 tCGH를 이용하여, 본 발명자는  $J_H$ -BCL2 융합체를 확인하였다. 흥미롭게도, RL7 세포주에서 확인된 것과 유사한 BCL2 인트론 내의 큰 결실 뿐만 아니라 작은 중지점 관련 결실이 우연히 확인되었다. 이후, 본 발명자는  $S_{\gamma}R$ (여기서, R은 프라이머의 3' 말단이 14q 중심절로 향하는 것을 나타내는 "역방향" 배향을 의미함)로 명명한 모든  $S_{\gamma}$  반복부를 인지하기 위해 콘센서스 선형 증폭 프라이머를 설계하였다(도 9).  $S_{\gamma}R$  프라이머를 이용하여 수행된 tCGH는  $S_{\gamma 3}$ -BCL6 융합체를 성공적으로 확인하였고(도 4b), MYC 유전자의 5' 말단을 포함하는 기준에 확인되지 않은  $S_{\gamma}$ -MYC 융합체를 우연히 검출하였다(도 4c).  $S_{\gamma}F$  선형 증폭 프라이머(F는 3' 말단이 14q 종말절을 향하는 것을 나타내는 "정방향" 배향을 나타냄)를 이용한 tCGH는 상호  $S_{\gamma}$ -BCL6 융합체를 성공적으로 확인하였다(도 4d). 그러나, 상호  $S_{\gamma}$ -MYC 융합체는  $S_{\gamma}F$ ,  $S_{\gamma}R$ ,  $J_H$  또는  $D_H$  선형 증폭 프라이머를 이용하여 수행된 tCGH에 의해 확인될 수 없었다.

#### [0160] 실시예 3: 공지되지 않은 전좌 중지점을 확인

tCGH가 원발성 종양에서 신규한 중지점을 확인할 수 있는 것을 입증하기 위해, 본 발명자는  $J_H$ -CCND1 전좌를 갖는 것으로 추정되는 일련의 림프종을 연구하였다. 외투세포 림프종(MCL, 문현(J ares, 2007)에 개관됨)은  $J_H$ -CCND1 유전자 융합체 및 CCND1 단백질의 과다발현을 발생시키는 전좌인 t(11;14)(q13;q32)를 특징으로 하는 성숙 B 세포 림프종이다. MO2058 세포주를 포함하는 MCL 케이스의 약 40-50%(도 3c)가 주요 전좌 클러스터(major translocation cluster, MTC)에 군집을 이룬 중지점을 갖고, 대부분의 MCL 중지점은 CCND1에 대해 중심절 ~400kb에 위치된 CCND1 및 MYEV 유전자 사이의 큰 유전자간 영역 전체에 걸쳐 산재되어 있다. tCGH가 아직 확인되지 않은 전좌 중지점을 검출할 수 있는지 입증하기 위해, 본 발명자는 MTC-관련 중지점을 갖지 않는 MCL 케이스에서  $J_H$ -CCND1 전좌를 확인하고 맵핑하기 위해 tCGH를 이용하였다. 도 6은 4개의 상기 MCL 케이스 및 하나의 t(11;14)-양성 B 세포 전립프구성 백혈병(B-PLL)을 연구하기 위한  $J_H$  프라이머를 이용한 tCGH의 결과를 도시한다. 각각의 케이스에서, 독특한  $J_H$ -CCND1 융합체의 증폭 및 서열분석을 위한 PCR 프라이머의 즉각적인 설계를 가능케 하기에 충분한 해상도로 독특한 중지점을 예측하였다. 중지점은 MTC의 바로 바깥쪽에 중지점을 갖는 하나의 케이스(B-PLL)를 포함하여 CCND1 중지점 영역의 ~140kb 분절에 걸쳐 산재되어 있다(Vaandrager, 1996).

#### [0162] 실시예 4: 방법 및 재료

유전체 DNA 제조 및 하이브리드화: IgH 유전자좌를 표적으로 하는 하나 이상의  $J_H$ ,  $D_H$  또는  $S_H$  프라이머, 상기 유전자좌에서의 재배열을 표적으로 하는 MYC, BCL2 또는 BCL6 프라이머, 또는 BCR, MYH11, MLL, PML 또는 AML/RUNX1 유전자좌를 포함하는 재배열을 표적으로 하는 하나 이상의 프라이머를 이용하여 시험 및 참조 DNA를 각각 선형 증폭시켰다(표 3 및 5 참조). 증폭된 DNA를 초음파처리에 의해 단편화시키고, 본원에 기재된 바와 같이 시아닌-3-dUTP 및 시아닌-5-dUTP(Agilent Genomic DNA Labeling Kit)로 차별적으로 라벨링시켰다. 라벨링된 시험 및 참조 DNA 샘플을 본질적으로 제조업체에 의해 권고(Agilent Publications No. G4410-90010 및 G4427-90010)된 바와 같이 아질린트 커스텀(Agilent Custom) HD-CGH 8x15K 마이크로어레(Produkt Number G4427A)에 공동 하이브리드화시켰다. 어레이 데이터를 아질린트 피쳐 익스트랙터(Agilent Feature Extractor) 소프트웨어(버전 9) 및 아질린트 CGHAnalytics 소프트웨어(버전 3.4 또는 3.5)를 이용하여 분석하였다.

선형 증폭: 0.5  $\mu$ g 내지 2  $\mu$ g 유전체 DNA, 200mM dNTP 및 150nM 선형 증폭 프라이머를 함유하는 선형 증폭 반응물(50  $\mu$ l)을 클론텍 어드밴티지(ClonTech Advantage) 2 PCR 효소 시스템을 이용하여 증폭시켰다. 다중 반응물은 75nM의 각각의 개별적 선형 증폭 프라이머를 함유하였다. 통상적인 반응 조건은 5분 동안 95°C에서의 변성 후, 12주기의 95°C/15초의 변성, 60°C/15초의 어닐링 및 68°C/6분의 신장이었으나, 2분 내지 18분의 신장 시간이 또한 성공적으로 사용되었으며, 실험을 선택하기 위해 20회 이하의 증폭 주기를 수행하였다(예를 들어, 도 17 참조). 선형 증폭 후, 생성된 DNA 혼합물을 얼음 상에서 3분 동안 400  $\mu$ l의 TE pH 8.0 중에서 미소닉스

(Misonix) 431A 컵 혼(cup horn)이 장비된 퍼셔 모델 550 소닉 디스멤브레이터(Fisher Model 550 Sonic Dismembrator)를 이용하여 초음파 처리하여 단편화시킨 후,  $32 \mu\text{l}$ 의 최종 부피로 농축(Microcon Y30)시켰다. 제한 절단 또는 전체 유전체 증폭을 수행하지 않은 것을 제외하고는 본질적으로 제조업체에 의해 권고된 바에 따라 아질런트 유전체 DNA 라벨링 키트 PLUS(Cat # 5188-5309)를 이용하여 형광 라벨링 및 하이브리드화를 수행하였다. 일반적으로, 라벨링된 dNTP의 존재하에서 DNA 중합효소를 이용하는 무작위 프라이머 매개 신장에 의해 라벨링을 수행하였다. 이는 샘플에서 선형 증폭된 생성물 뿐만 아니라 유전체 DNA 둘 모두의 라벨링을 발생시켰다. 그러나, 선형 증폭 반응의 생성물은 증폭 반응에서 라벨링된 dNTP의 포함에 의해 단독으로 라벨링될 수 있다. 프로메가(Promega)(Cat# G1471(남성) 및 G1521(여성))사로부터 대조군 인간 유전체 DNA를 구입하였다.

[0165] 어레이 계획: 프로브 길이, 예측 용융 온도 및 프로브 간격 및 밀도와 같은 파라미터를 최적화시키기 위해 설계된 알고리듬을 이용하여 선택된 맞춤 올리고누클레오티드 프로브에 의해 IgH 또는 골수종 백혈병(AML) 중지점-관련 유전체 영역을 아질런트 DNA 마이크로어레이(G4427A) 상에 타일링 밀도로 제시시켰다. 맞춤 프로브에 의한 고밀도 제시를 위해 선택된 유전체 영역을 고도로 보존된 반복 서열 요소를 마스킹(masking)시키기 위해 리피트마스커(RepeatMasker) (<http://repeatmasker.org/cgi-bin/AnnotationRequest>)를 이용하여 먼저 여과시켰다. 유전체 범위를 최대화시키기 위해, 고도로 분기성인 반복부(>15% 분기성(divergent))를 마스킹시키지 않았는데, 이는 독특한 올리고누클레오티드 프로브가 상기 영역에서 확인될 수 있기 때문이다. 프로그램 타일(Tile)(하기 참조)을 이용하여 각각의 반복부 마스킹된 유전체 분절에 걸쳐 프로브의 균일한 공간적 분포를 발생시켰다. IgH 전좌 어레이는 IgH 전좌에 통상적으로 제시되는 BCL2, BCL6, CCND1, MLT1 및 MYC의 5개의 유전체 유전자좌를 제시하는 전체 11,852개의 프로브를 함유하였다(하기 표 1 참조). 또한, 아질런트 프로브 라이브러리(<http://earray.chem.agilent.com/earray/>)로부터 낮은 밀도로 추가의 23개의 유전체 유전자좌를 제시하는 2410개의 대조군 프로브를 선택하였다. AML 어레이(하기 표 4 참조)는 BCR, ABL, ETO (RUNX1T1), AML1, RARA, PML, CBFβ, MYH11, MLL, AF9, IKZF1(Ikaros)과 같은 유전체 유전자좌를 제시하는 전체 14,262개의 프로브를 함유하였다.

[0166] 타일(N. Hoffman and H. Greisman, 공개되지 않음)은 용융 온도( $T_m$ ), GC 함량, 및 파라미터를 특정하기 위해 가능한 한 밀접한 누클레오티드 길이를 갖는 올리고누클레오티드의 균일한 공간적 분포를 발생시키기 위해 간단한 알고리듬을 이용한다. 투입값은 올리고누클레오티드 서열의 목록이며, 이를 각각은 관심 유전체 분절 내의 시작 및 종결 위치 및 용융 온도와 관련된다. 상기 실험에 사용되는 어레이를 위해, 후보 올리고누클레오티드는 관심 영역에 걸친 모든 가능한 N-머(N-mer)를 포함시켰고, 여기서 N은 25 내지 60(IgH 어레이에 대해) 또는 35 내지 60(AML 어레이)의 범위였다. 올리고누클레오티드 선택 기준에 사용된 파라미터는 다음과 같이 정의된다:

[0167]  $D_{\max}$ ,  $D_{\min}$ ,  $D_{opt}$  - 시작 위치로부터의 최대, 최소 및 최적 거리

[0168]  $Tm_{\max}$ ,  $Tm_{\min}$ ,  $Tm_{opt}$  - 최대, 최소 및 최적  $T_m$

[0169]  $Tm_{\max}$ ,  $Tm_{\min}$ ,  $Tm_{opt}$  - 최대, 최소 및 최적  $T_m$

[0170] 올리고누클레오티드 선택 알고리듬을 서열 영역 내의 누클레오티드 위치  $P_0$ 에서 시작하여 다음과 같이 반복적으로 진행시켰다:

[0171] 1. 누클레오티드 위치  $P_0 + D_{\min}$  내지  $P_0 + D_{\max}$  사이의 올리고누클레오티드 세트를 그룹으로 간주하였다.

[0172] 2.  $[Tm_{\max}, Tm_{\min}]$  범위 밖의  $T_m$ 을 갖는 올리고누클레오티드를 제거하였다.

[0173] 3. 위치  $P_i$ 에서의 각각의 올리고누클레오티드  $i$ 에 대해, 다음과 같은 값을 계산하였다:

[0174] a.  $D_i = |P_0 + D_{opt} - P_i|$

[0175] 따라서, 보다 작은 값은 서열 영역에 대한 최적 거리에 보다 가까운 위치에 해당한다.  $D_i$ 는 가장 가까운  $D_{bin}$  누클레오티드로 라운딩(rounding)될 수 있다(통상적으로, 5의 값이 사용됨).

[0176] b.  $dTm_i = |Tm_i - Tm_{opt}|$

[0177] 따라서,  $dTm_i$ 의 보다 작은 값은 최적  $T_m$ 에 보다 가까운 용융 온도에 해당한다.  $dTm_i$ 는 가장 가까운  $dTm_{round}$  도

(degree)로 라운딩될 수 있다(통상적으로 1도의 값이 사용됨).

[0178] c.  $-L_i = -1 * (\text{올리고 길이})$

[0179] 따라서, 보다 작은 수는 보다 긴 올리고누클레오티드에 해당한다.

[0180] d.  $GC_i = 100*(G+C)/\text{길이}$

[0181] 따라서, 보다 작은 수는 보다 낮은 G+C 함량에 해당한다.  $GC_i$ 를 가장 가까운 백분율로 라운딩시켰다.

[0182] 4. 각각의 올리고누클레오티드  $i$ 에 대해,  $D_i$ ,  $dTm_i$ ,  $-L_i$  및  $GC_i$  중 일부 또는 전부로 구성된 튜플(tuple) 목록을 생성시켰다.

[0183] 5. 상기 값의 목록을 오름차순으로 분류시켰다. 튜플에서의  $D_i$ ,  $dTm_i$ ,  $-L_i$  및  $GC_i$ 의 각각의 상대 위치는 상기 파라미터의 상대 중량을 결정하였다(즉,  $D_i$ 가  $GC_i$ 를 선행하는 경우, 올리고누클레오티드 길이는 GC 함량보다 많은 중량이 제공됨).

[0184] 6. 분류된 목록 내의 첫번째 튜플에 해당하는 위치  $x$ 에서의 올리고누클레오티드를 선택하였다.

[0185] 7.  $P_0$ 를  $P_x$ 로 리셋시키고, 상기 과정을 반복하였다.

[0186] 알고리듬은 또한 팜심 서열에 걸친 후보 올리고누클레오티드의 범위 내의 불연속 영역을 다룬다. 상기 범위  $[P_0+D_{\min}, P_0+D_{\max}]$ 에 걸친 서열 영역, 및 상기 영역  $[P_{\text{gapstart}}, P_{\text{gapstop}}]$ 에 걸친 "캡(gap)"(즉, 후보 올리고누클레오티드를 함유하지 않는 서열 영역)을 고려하였다.  $P_{\text{gapstart}} < P_0+D_{\max}$ 인 경우, 이러한 반복에서, 올리고누클레오티드는 상기 범위  $[P_0+D_{\min}, P_{\text{gapstart}}]$ 으로부터 선택될 것이다. 다음 반복에서, 올리고누클레오티드 선택은 캡 후에 시작할 것이고,  $P_0$ 는 후보 올리고누클레오티드의 범위가 점유되는 지점에 보다 가까운 올리고누클레오티드를 고려하도록 ( $P_{\text{gapstop}} - D_{\text{opt}}$ )로 설정된다.

[0187] 최적 프로브 길이는 60개의 염기였고, 프로브 사이의 최적 거리는 50 내지 100개의 염기였고, 허용가능한 GC 함량은 20% 내지 80%였고, 최적  $T_m$ 은 74.5°C였고, 이는 EMBOSS 소프트웨어 슈트(suite)(<http://emboss.sourceforge.net>)의 프로그램 Dan을 이용하여 계산하였다.

#### 표 1

유전자좌	밴드	영역 간격	영역 길이	# 프로브	간격
CCND1	11q13.3	chr11:68808198-69188422	380,225	5,597	68
BCL2	18q21.33	chr18:58880000-59157593	277,594	4,213	66
MYC	8q24.21	chr8:128782854-128832853	50,000	728	69
BCL6	3q27.3	chr3:188921902-188975181	53,280	847	63
MLT1	18q21.31	chr18:54468326-54501528	33,203	467	71

[0189] [0190] 신규한 중지점을 확인:

[0191] PCR 증폭 및 생거(Sanger) 서열분석에 의해 모든 5 MCL 케이스에서의  $J_H$ -CCND1 융합체, 하나의 소포립프종(FCL) 케이스 및 DHL16에서의  $J_H$ -BCL2 융합체, 및 OCI-Ly8에서의 모든 4개의 신규한 IgH 융합체( $J_H$ -BCL2,  $D_H$ -BCL2,  $S_{\gamma 2}$ -MYC 및  $S_{\gamma 3}$ -BCL6)를 포함하는 신규한 전좌 및 결실 중지점을 모두 확인하였다. 파트너 중지점은 표 2에 제공되며, 서열은 하기에 제공된다. 또한, RL7(chr18:58,954,729-59,122,208) 및 OCI-Ly8(chr18:58,998,604-59,133,954)에서의 신규한 인트론 BCL2 결실을 각각 증폭시키고, 각각의 결실의 측면에 존재하는 특정 BCL2 프라이머를 이용하여 서열 분석하였다. 하기 참조.

[0192]

## 표 2

세포주 / 케이스	IgH 프라이머	IgH 중지점	파트너	파트너 중지점 (hg17)	진단
MO2058	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 4	CCND1	chr11:69,055,996	MCL
Granta 519	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 4	CCND1	chr11:69,100,509	MCL
U-266	SpF (Sp)	Sα1	CCND1	chr11:69,153,045	골수종
U-266	SyR	Sy2	CCND1	chr11:69,153,019	골수종
RL7	J <sub>H</sub>		BCL2	chr18:58,944,489	DLBCL
DHL16	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 6	BCL2	chr18:58,914,890	DLBCL
OCI-Ly8	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 6	BCL2	chr18:58,944,475	DLBCL
OCI-Ly8	D <sub>H</sub>	D <sub>H</sub> 3-10	BCL2	chr18:58,938,252	DLBCL
OCI-Ly8	SyR	Sy3	BCL6	chr3:188,945,670	DLBCL
OCI-Ly8	SyF	Sy3	BCL6	chr3:188,945,699	DLBCL
OCI-Ly8	SyR	Near Sy2	MYC	chr8:128,818,596	DLBCL
MC116	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 4-J <sub>H</sub> 5	MYC	chr8:128,817,581	MYC
Raji	SpF (Sp)		MYC	chr8:128,816,104	MYC
MCL1	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 4	CCND1	chr11:69,131,130	MCL
MCL2	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 6	CCND1	chr11:69,059,199	MCL
MCL3	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 5	CCND1	chr11:68,989,831	MCL
MCL4	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 5	CCND1	chr11:69,082,854	MCL
MCL5	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 4	CCND1	chr11:69,056,460	MCL
FCL	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub> 6	BCL2	chr18:58,944,421	FCL

[0193]

[0194] MCL1 J<sub>H</sub>-CCND1 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-GACCCAGCACCCCTATTTC-3' (IgH) (SEQ ID NO:27)  
 5'-GATCACAGTCTTGCTGCCTGT-3' (CCND1) (SEQ ID NO:28)  
 CAGTTTAGAGTTGTTGTGGCAGGAAAGTTACTTTGCCAGAATTGGAAGTTG  
 GAAGGGTGTGCAGCTATTGCTATAGCAAATGTGTTCTCCATCCTGATCAGTAAAGA  
 GGATAAAAAGCAATTATCATTAGATAGGAAGGATATTACAATCTCACTCCAG  
 ATCTATGTTATAATAACTCCTGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG (SEQ ID NO:29)

[0195]

[0196] MCL2 J<sub>H</sub>-CCND1 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CCAGGCTCAGTTACTCCATCAG-3' (IgH) (SEQ ID NO:30)  
 5'-CACTCTGGAACATTCTGCATTG -3' (CCND1) (SEQ ID NO:31)  
 TGTAATCCCCAGCACTTGGGAGGCTGATACGGGAGAATCACTTAGCCCCAGAG  
 AAGTTCCAAGAACAGCCTGGGCATCATACATAGCGAGACTCGTTCTCTAAAAAA  
 TACAAAAAAATTAGCTGGGTGTGGCACGTGCCTGTAGTCACAGCTACTTGGG  
 AGGCTGTGATGGGAGGATCACTGGAGCCAGGAACCTCAGGCTGTAGTGAAC  
 TGATCATGCCACTGCTCCAGCCTGGGTGACAGTGTGAGACCCTGCTCTGATAAT  
 AACATATAATTATTAGTAGAGTCGTTTCTTTCTTTCAATTCTTTAATTAA  
 TGTTTGTCAGGACAAGTTTCGCTATTGCCCAGGCTAGTCTGAACTCCTGGC  
 CTCAACCGATCCTCCTGCCTCAGCCTCCAAAGCACTGGGATTACAGGCAAGAAC  
 CACCGCACCCGGCCCAAACATTTCATTTTATATTCAAGTACTTGATTAATT  
 ATTGTGCAAGTTCTTGCAAAGCTAGAAGAAGAGGTCTACAGAATTGGT  
 CGGTTTTAAGCAATTACACCATATAAAACTACTACTACCGGTATGGACGTCT  
 GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC (SEQ ID NO:32)

[0197]

[0198] MCL3 J<sub>H</sub>-CCND1 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-AGAGGCTCCCAGATCCTCAAG-3' (IgH) (SEQ ID NO:33)  
 5'-AACACAGTGCATGAAACCA-3' (CCND1) (SEQ ID NO:34)  
 AACACTAGATCTGGAAAATAGGGTTCATGGCCCAGAGTTGGGAACCGGGCA  
 CGAGAGCTGAGTCAGCATCTTGGCTGTGAAAAATCTCTGCTTAATGTTGGCTGC  
 CACGGGCTCCACAGCCTCTTGCATGGCATATCTCTGGCGTGCACACTGACTCA  
 CACCATCATGAAATGAGGCCATGCAGAACACAATCTGGGGAAAAGCTTATCT  
 AAGGAATAAAATTACAGGTCCAGATCACTTATAAATCTGGCGCTTAGAAGAAGA  
 GCCCACCCACATTATTTTGAGGACCCCCATGGCTGATGGTGAACCCCTGCTCT  
 GAGGTGGGTTGGCTTCCCTCAGCCCCACGGCTTGTGGGGGCACCCCTCACCCA  
 GCTGTCGCCTGGGTAAGGCTCCCCACGGAGGCCACCGAAATGAATCTGGTTCG  
 ACCCTGGGCCAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCCTCACCAACC  
 CCCTCTGAGTCCACTAGGGAGACTCAGCTTGCCAGGGCTCAGGGTCAGAGT  
 CTTGGAGGCATTTGGAGGTCAAGGAAAGAAA (SEQ ID NO:35)

[0199] MCL4 J<sub>H</sub>-CCND1 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CCAGGCTCAGTTACTCCATCAG-3' (IgH) (SEQ ID NO:36)  
 5'-CTGTGACCACTTCCCTGACCA-3' (CCND1) (SEQ ID NO:37)  
 CTTAGGTACACGGATGGAGGTCTGCTGGCGAGGCTGGCATTGCACACTCAT  
 TGCAGCACTGGAGAAACTGAGTCTTCTTACTCAATTTCATAGAAATAGGCAC  
 ATTCCCCATCCCTCCCTCGCCCCACAACCCCTGACGCTCAGCATCCAGGGCT  
 GATCTGAGAGGGACCCGGAGGCAGAGAAACCCCAGAGCCGTCATTCCAGAT  
 GTGGCATTATGTGTGAGCCTAGGTTGTCTTTAACGGCACCAATAAACCC  
 CAGTCCTCCAAACTGGTTCGACCCCTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC  
 TCAGGTGAGTCCTCACCAACCCCTCTGAGTCCACTAGGGAGACTCAGCTTGC  
 CAGGGTCTCAGGGTCAGAGTCTGGAGGCATTGGAGGTCAAGGAAAGAAAGCC  
 GGGGAGAGGGACCCCTCGAATGGGAACCCAGCCTGTCCTCCCCAAGTCGGCCA  
 CAGATGTCGGCAGCTGGGGGCTCCTCGGCTGGTCTGGGTGACCTCTCCGC  
 TTCACCTGGAGCATTCTCAGGGGCTGTCGTGATGATTGCGTGGTGGACTCTGTC  
 CCGCTCCAAGGCACCCGCTCTG (SEQ ID NO:38)

[0200] MCL5 J<sub>H</sub>-CCND1 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-GACCCAGCACCCATTATTCC-3' (IgH) (SEQ ID NO:39)  
 5'-ACCACACCTGGCCTCTATTGTA-3' (CCND1) (SEQ ID NO:40)  
 TGTCTAATGCCCTGTATCCCCATTAAACATCATACAAAGAGTTCACTGCCCTAA  
 AAATCTGTCTCCACCTGTTACCCCTCTCCAAATCCTGGCAACCACTGATTGT  
 TTACTTTCTCTGTAGTTTGTCTTCTAGAATGTCAAAGAGTTGGACTCATACG  
 GTAACGGAGAGACCAGCATACTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG  
 TCTCTCAGGTGAGTCCTCACACCTCTCCTGCTTAACTCTGAAGGGTTTG  
 TGCAATTGGGGGAAATAAGGGCTGGTC (SEQ ID NO:41)

[0201] FCL J<sub>H</sub>-BCL2 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGACC-3' (IgH) (SEQ ID NO:42)  
 5'-CGGGAATTCTTGACCTTAGAGAGTTGCTT-3' (BCL2) (SEQ ID NO:43)  
 TTTCCAAGGCATCGGAAATCCACAGAGGGCTCCAGATCCTCAAGGCACCCAGT  
 GCCCGTCCCCCTCTGGCCAGTCCGCCAGGTCCCCTCGGAACATGCCCGAGGAC  
 CAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCCACAGGCAGTAGCAGAAAACAAAGGCCCTA  
 GAGTGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAGACGT  
 CCATCACCGGGCCCCGCCGGGAGGTCTGGCTTCATACCCACAGGTTCTGCTTT  
 CTTGGTGGAGCGTAAGCACCCTGCATTCAGGAAGACCCCTGAAGGGACAGCCAT  
 GAGAAAGCCCCCGCGAAGGAGGGCAGGAGGGCTGGGTGGGTCTGTGTTGAA  
 ACAGGCCACGTAAAGCAACTCTAAAGGTCAA (SEQ ID NO:44)

[0206] DHL16 J<sub>H</sub>-BCL2 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CCAGGCTCAGTTACTCCATCAG-3' (IgH) (SEQ ID NO:45)  
 5'-CGGGAATTCTCAGTCTGGGGAGGAGTGG-3' (BCL2) (SEQ ID NO:46)  
 ACAGGCAGTAGCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGTGGCCATTCTTACCTGAGGAGA  
 CGGTGACCGTGGTCCCCCTGGCCCCAGACGTCCATATTAATATTGGCGAGACAGA  
 GAATACCACAAAGAAGTGGATAGATGGCAGATGACACATGCGAGACCCAAGT  
 GCTAATTCTCTGAATATAACAAAGAGCTTACAAGTTAATCAAAGACAAATAAC  
 TCAATGAAGTAATGGGCTTGCCTATGTTATGAATATTTCATCTGGTATGACAT  
 TTACTCTTGATTTGATTTCATTATTTTGTGATTTCATAGGCTTGTATTTATGTAGTCA  
 AATCTCTATGTCTTCTATCACTTTGTGTTAGAAGGACGTTCCCTCTGAAG  
 TACACATATTGATTTGGATTTGAGATGGCATTCTGATCCATCTATAAAG  
 TTTTGGTGTGGTAAAGGTAAGGTAAGACTCACATTCTCTAAATAATTAGC  
 CAGTTGTTCCAGCTCCATTATTGAGTGGCTTCCCTTCCCAACTGATGCGCGGT  
 GTAACCTTATCATATATTAAATACTCATGTGTGCTAAAAATAAAAGTCATTTC  
 AGTTGAGTGCTG (SEQ ID NO:47)

[0207]

OCI-Ly8 J<sub>H</sub>-BCL2 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CCAGGCTCAGTTACTCCATCAG-3'(IgH) (SEQ ID NO:48)  
 5'-CGGGAATTCTTGACCTTGTGAGAGAGTTGCTT-3' (BCL2) (SEQ ID NO:49)  
 TTTCCAAGGCATCGGAAATCCACAGAGGCTCCAGATCCTCAAGGCACCCAGT  
 GCCCGTCCCCCTCGGCCAGTCGGCCCAGGTCCCCCTCGGAACATGCCCGAGGAC  
 CAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCACAGGCAGTAGCAGAAAACAAAGGCCCTA  
 GAGTGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCCAGACGT  
 CCATACCGTATTTCATCCCATTGCAACACAGGGGTAACGGGGCGCCGGTAAG  
 CACCACTGCATTCAGGAAGACCCCTGAAGGACAGCCATGAGAAAGCCCCCGCGG  
 AAGGAGGGCAGGAGGGCTGGGTGGGTCTGTGAAACAGGCCACGTAAAGC  
 AACTCTCTAAAGGTCAAAGAACATCCCAGA (SEQ ID NO:50)

[0209]

OCI-Ly8 D<sub>H</sub>-BCL2 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CTGGAGCACTTCAACAGCAG-3' (BCL2) (SEQ ID NO:51)  
 5'-GTGGCCCTGGGAATATAAAA-3' (IgH) (SEQ ID NO:52)  
 ATTTGTGGGCACTTATGAACCCGAAAGGACATGGCCATGGGGTGGGTAGGGACA  
 TAGGGACAGATGCCAGCCTGAGGTGGAGCCTCAGGACACAGGTGGCACGGACA  
 CTATCCACATAAGCGAGGGATAGACCCGAGTAGTGTCCCCACAGCAGACCTGAGAGC  
 GCTGGGCCACAGCCTCCCTCAGAGCCTGCTGCTCTCCGGTCAGCCCTGGA  
 CATCCCAGGTTCCCCAGGCCTGGCGGTAGGTTAGAATGAGGTCTGTCACTG  
 TGGTATTACGATAATTGACTGGTTATTATAACCACAGTGTACAGAGTCCATCA  
 AAAACCCATGCCTGGAAAGCTTCCGCCACAGCCCTCCCATGGGGCCTGCTGCC  
 TCCTCAGGTCAAGCCCCGGACATCCCAGGTTCCCTCAGGCTGGCGGTAGGTTGG  
 GGTGAGGTCTGTCACTGTGGTATTACTATGGTTGGGAGTTGACGGCCCTG  
 ATACTTAGCTTCAATTGTATACATTTAAAGTGTATAAAACAAATCTGGTTGTG  
 ATTCCATATCAACATAGGCATGAGCCACTGCGCTCAGCCCTTTGTGCTGCTG  
 GTTCTTGTGAAAGTCTGCTGTTGA (SEQ ID NO:53)

[0211]

OCI-Ly8 S γ 2-MYC 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-GGTCGGACATTCTGCTTTA-3' (MYC) (SEQ ID NO:54)  
 5'-CCCAGAAGGAGCAAGATGG-3' (IgH) (SEQ ID NO:55)  
 GGGTTTGGGGGCTGGGGTTGCTTGCCTGGCAGAAAGCCCTTGATCCTG  
 AGCTCCTTGGAGTAGGGACCGCATATCGCCTGTGTGAGGCCAGATTGCTCCGCAGC  
 CGCTGACTTGTCCCCGTCTCCGGAGGGCATTTAAATTCTGGCTCACCGCATTCT  
 GACAGCCGGAGACGGACACTGCGCGCGTCCCGCCCTGCCCCGCGCAAG  
 GTCCCTGTTGGCTCAACCCAGGCCAGCATATGTAGGAGCCTGTATGGCC  
 CTCCCCACCCCTCGCTGGTGCAGGACCCCCAGGCCACAGGGAGGCCATTTCTC  
 TCTGCCGCTGGCCAGTGGCCCTGGAGTCCCACCTCACGTGGGGTGTGCCCTGA  
 CTTCTGAGGAACCTAAAGTGCCTGCCCTCAGCCAGGCCATCCCTTGCTCAGAG  
 GGCCCCGCTCACCAACCCCTCCCTCACCTGCAGCACAGACTCTGGCTATTCTG  
 CCCAGGCCCTGAATGGGCCCTCTGGCAGCCGTCTGGCTACACTGCC (SEQ ID  
 NO:56)

[0213]

[0214]

OCI-Ly8 S γ 2-BCL6(S γ F) 융합체에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CCTGCCTCCCAGTGTCTGCATTACTTCTG-3' (IgH) (SEQ ID NO:57)  
 5'-GCAGTGGTAAAGTCCGAAGC-3' (BCL6) (SEQ ID NO:58)  
 ACTGGGGTTCTAAAGTGGTGATGCAAGAAGTTCTAGGAAAGGCCGGACACCA  
 GGTGATTATTGCTGTTGCTGCCCGCTGCTGCTACTGCCGCCGCCGCT  
 GTTGGCGCTGGTGCCTGCCGCCGCTGCTCATGATCATATTACCTTTA  
 ATTCTTTTTTTCGCTCTGCCGAGTGCCTGGCTCCAAGTTCTATGTGTATC  
 TATTGATATAAATGTATATATTATTTCTAGGTGGAGCTCARAGAGCCGGGG  
 AARATCATCGGTAGGTGAGCAGGGCTGGAAAGCAGGAGGAGCAAGGGGC  
 AGCTCATGGAGCTCAGAGGACCAGGGAAAGAGCACAGGTGAACAGGGCA  
 GGTGGGCGGCAGAATGAGCAGGGCAACTCCTGGAGCTCAGGGACAAGGGCA  
 GAGCAGCCATAGGCAAACAGGAGCAGGGTCAGGGACAGGAGGAGCAGGGGC  
 AGTTCTGGAGTTAGGGGACCAGGGCAGAGCCGCTGCAGGTGAGCAGGGCAG  
 GTGGGGGGCAGGAGGAGCAGGGGCATCTCCTGGAGCTCAGAGCACCAGGGCA  
 GAGCAGCCACAGGTGAGCAGGGACGGTGGAGGCAGCACGCAGCTCTAGACTT  
 TGGCAGGAGCTGGTAGTTGCCGGCACCAAGACAGCTGAGGGCTGGTAAAGTGC  
 AGTGCAGCCTCCTGGTG (SEQ ID NO:59)

[0215]

[0216]

OCI-Ly8 인트론 BCL2 결실에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-TCAGACACCAAGCTCCCTAGC-3' (SEQ ID NO:60)  
 5'-GAAGCACAGATGGTGATGG-3' (SEQ ID NO:61)  
 AGGAAGTCTGCTCTCAGAAAAACTGCAGCAGGAATCCCTAAATGCCTAAAA  
 TGACTTTAGATTAATAATGCACATTGAAATGATAGGCAAATCATTGATCATCATT  
 TCAAACACTACCACCTTTATTCCAAAGTGCCTATGAGTGCATTCTGGTATATA  
 TATATATTTCTCTAAATTCTTGTGTTCTATATAGTCACCATCTATGCATTG  
 TTCTGAAAGCTATTACATATTACCATCAACC (SEQ ID NO:62)

[0217]

[0218]

RL7 인트론 BCL2 결실에 대한 PCR/서열분석 프라이머 및 중지점 서열:

5'-CTCATGCCCATATTCAA-3' (SEQ ID NO:63)  
 5'-AGGGCATGTTACTGCAAGTCA-3' (SEQ ID NO:64)  
 ATTTGTTACTGAAAGAGCCTACTCTGGCCAATCATTGTTCTAGGGCTGGAG  
 CTGTAACAGAAAACATGACAGGTTAAGAACTCTCCATCTCTGTGAATCCCACA  
 TTGTGAGGAAGTCAGAAAAGTAAACAACCTAAAATTAACAAATATAACATAAGG  
 GCCACAAAGTAATGAAAACAGGGCAATGCAGTGCAAGGGTGTGATGGGACAAT  
 ATTAACCTTCCTGGTCTTGAGATTTCAAGCAGTACTACAAGTTACACAG  
 AGGAGATTTAATGGGTTTCTTCATTAATAGTTGAAAACATTATAAGACAAA  
 TAATAATTTGTCTAGGGTCTGTTCTAACGGAGTCTAACCTATGCCATGGGAT  
 TTACTGTTGAATGAATATGGGCATGAG (SEQ ID NO:65)

[0219]

실시예 5: 면역글로불린 중쇄(IgH) 전좌의 확인

[0220]

균형성 재배열이 올리고누클레오티드 어레이에서 검출가능하도록 하기 위해, 중지점-관련 유전체 DNA 서열을 DNA 라벨링 및 어레이 하이브리드화 전에 효소적으로 증폭시켰다. 이러한 선형 증폭 단계는 하나의 유전체 유전자좌에서 시작하고, 전좌 중지점에 걸쳐 파트너 유전자좌까지 미치는 하이브리드 DNA 단편의 합성을 비대칭적으로 프라이밍시키기 위해 단일한 올리고 프라이머를 이용한다(도 7). 파트너 유전자좌를 제시하도록 설계된 타일링 밀도 올리고 어레이로의 증폭 및 라벨링된 유전체 DNA의 하이브리드화는 전좌 파트너가 확인되고 유전체 중지점이 고해상도로 맵핑되는 것을 가능케 한다(도 7). 파트너 유전자좌를 표적으로 하는 제 2의 프라이머가 증폭에 필요하지 않으므로, tCGH는 단일 어레이를 이용하여 큰 유전체 영역에 걸쳐 산재되고, 다중 파트너 유전자좌 내에 존재하는 전좌 중지점을 검출할 수 있다. 증폭된 정상 유전체 DNA가 어레이 하이브리드화를 위한 참조 샘플로 사용되므로, tCGH는 동일한 어레이에서 유전체 불균형 및 균형성 전좌를 검출할 수 있다.

[0221]

본 실시예에서, 면역글로불린 중쇄(IgH) 전좌를 연구하였고, 이는 tCGH를 개발하고 확인하기 위한 모델 시스템으로서 다양한 B 세포 립프종 및 혈장 세포 골수종에서 다양한 파트너 유전자좌를 포함할 수 있다. 특정 립프종 또는 골수종에서의 특정 IgH 파트너 유전자좌의 확인은 정확한 진단 및 분류, 및 임상 결과 및 예후 예측에 필수적이다. IgH 전좌가 이상 VDJ의 부산물 또는 클래스 스위치 재조합(CSR)으로서 발생하고, 통상적으로 보존된 IgH 조절 영역으로 종양유전자의 전체 코딩 영역을 융합시키는 것으로 생각되므로, IgH 유전자좌 내의 중지점은 보존된 연결( $J_H$ ), 다양성( $D_H$ ) 또는 스위치( $S_H$ ) 분절에 위치되는 경향이 있는 반면(도 8), 다양한 IgH 파트너 유전자좌 내의 중지점은 수백개의 수천개의 염기의 유전체 서열에 걸쳐 산재될 수 있다. IgH 전좌의 이러한

특징을 보존된 IgH 중지점 영역 모두를 검출하고, 타일링 밀도로 다중 IgH 파트너 유전자좌를 제시하는 고해상도 맞춤 올리고누클레오티드 어레이를 설계할 수 있는 선형 증폭 프라이머의 작은 세트를 설계함으로써 연구하였다. 본원에 기재된 파일럿 어레이는 CCND1 및 BCL2 중지점 영역 및 MYC 및 BCL6 중지점 영역의 일부를 포함하는 전체 약 1Mb의 유전체 서열을 제시한다. IgH 유전자좌는 최근의 유전학적 중복을 특징으로 하고(Ravetch, Siebenlist *et al.*, *Cell* 27(3, Part 2): 583-591; Matsuda, Ishii *et al.*, *J. Exp. Med.* 188(11) 2151-2162 (1998)), 이에 따라 상기 파일럿 어레이에 제시되지 않았다.

[0223]

BCL2, BCL6, MYC 및 CCND1 유전자좌를 포함하는 널리 특성규명된 IgH 전좌를 갖는 8개의 림프종 및 골수종 세포주의 패널을 tCGH를 시험하고 확인하기 위해 사용하였다. 모든 9개의 공지된 IgH 전좌를 고해상도로 확인하고 맵핑하였고, IgH 파트너 유전자좌에서 기준의 공지되지 않은 IgH-MYC 재배열 및 다수의 복제수 이상이 있었다. VDJ-관련 전좌에서, der(14) 염색체 상의 IgH 중지점은 통상적으로 6개의 J<sub>H</sub> 분절 중 하나로 맵핑된 반면, 상호 염색체 상의 중지점은 27개의 D<sub>H</sub> 분절 중 하나로 맵핑되었다(van Dongen, Langerak *et al.*, *Leukemia* 17(12): 2257-317 (2003)). J<sub>H</sub> 중지점 및 이의 상호 D<sub>H</sub> 대응물을 단일 콘센서스 J<sub>H</sub> 프라이머 또는 7개의 콘센서스 D<sub>H</sub> 프라이머의 등 몇 혼합물을 이용하는 선형 증폭에 의해 독립적으로 확인하였다(도 9). 예를 들어, 림프종 세포주 DHL16에서의 통상적인 균형성 IgH-BCL2 전좌(Hecht, Epstein *et al.*, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 14(3-4):205 (1985))의 tCGH 분석은 BCL2 마이너 전좌 클러스터(van Dongen, Langerak *et al.*, *Leukemia* 17(12): 2257-317 (2003))에 대해 맵핑되는 상호 J<sub>H</sub>-BCL2 및 BCL2-D<sub>H</sub> 융합체(도 10a 및 10b 각각)를 나타낸다. J<sub>H</sub> 및 D<sub>H</sub> 융합체는 고해상도로 전좌 중지점을 정확하게 나타내는 단일한 별개의 경계를 갖는 비대칭 위-앤플리콘으로서 형광 log-비 플롯 상에 나타났다. 이러한 앤플리콘의 폭은 중지점으로부터의 유전체 거리가 증가할수록 점차 감소하고, 수천개의 염기의 스팬(span)에 걸쳐 기준선으로 복귀한다. 각각의 앤플리콘의 배향은 증폭의 방향에 좌우되고: J<sub>H</sub> 프라이머에 대해서는 종말절로 향하고(도 10b), D<sub>H</sub> 프라이머에 대해서는 중심절로 향한다(도 10b). 대조적으로, 개별적 앤플리콘의 넓이, 폭 및 형태는 선형 증폭 프라이머, 증폭 조건, 및 가능하게는 국소적 유전체 서열을 포함하는 외인성 파라이머에 따라 다양한 것으로 보인다.

[0224]

버키트 림프종 세포주 MC116에서의 IgH-MYC 융합체(도 10f)를 맵핑하고, 외투세포 림프종 세포주 M02058 및 Granta 519에서의 IgH-CCND1 융합체(도 13a, 13d)를 맵핑하기 위해 J<sub>H</sub> 및 D<sub>H</sub> 프라이머를 또한 사용하였다. tCGH의 분석 민감성을 동등한 양의 DHL16, RL7 및 Granta 519 유전체 DNA를 혼합("33% 희석"으로 명명됨)함으로써 결정하였고; 20% 및 15% 희석 샘플을 정상 유전체 DNA와 혼합함으로써 생성시켰다. 이러한 희석물을 J<sub>H</sub> 프라이머를 이용하여 12 또는 20 주기 동안 증폭시키고, 유사하게 증폭된 정상 유전체 DNA에 공동 하이브리드화 시켰다. 도 17에 도시된 바와 같이, 모든 3개의 중지점이 각각의 샘플에서 검출가능하였으나, 15% 희석물에 대한 신호는 20주기에 비해 12주기 동안 증폭되는 경우에 약했다.

[0225]

S<sub>H</sub>-관련 전좌를 확인하기 위해, S<sub>μ</sub>, S<sub>a</sub> 및 S<sub>e</sub> 반복부를 표적으로 하는 상호 S<sub>p</sub>F 및 S<sub>p</sub>R 증폭 프라이머를 설계하였고, 이는 모두 오합체 서열(GRGCT)<sub>n</sub>(Mills, Brooker *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 18(24):7305-16 (1990)), 및 4개의 밀접하게 관련된 S<sub>v</sub> 반복부를 표적으로 하는 상호 S<sub>v</sub>F 및 S<sub>v</sub>R 프라이머를 함유한다(Mills, Mitchell *et al.*, *J. Immunol.* 155(6):3021-3036(1995))(표 3). OCI-Ly8 림프종 세포주의 S<sub>v</sub>F- 또는 S<sub>v</sub>R-프라이밍된 선형 증폭(Tweeddale, Lim *et al.*, *Blood* 69(5):1307-1314 (1987))은 둘 모두의 상호 S<sub>v3</sub>-BCL6 융합체를 확인하였고(도 10c 및 10d), 이중 하나는 기준에 확인되었고, 클로닝되었다(Ye, Chaganti *et al.*, *EMBO J.* 14(24) 6207-17 (1995)). 유사하게, 골수종 세포주 U266의 S<sub>p</sub>F- 및 S<sub>v</sub>R-프라이밍된 선형 증폭(도 15)은 S<sub>a1</sub>으로부터 S<sub>v4</sub>에 걸치고, 3' a1 인핸서를 포함하는 ~100 kb의 IgH 불변 영역 분절의 CCND1 유전자좌로의 잠재 삽입을 확인하였다(Gabrea, Bergsagel *et al.*, *Molecular Cell* 2(1):119 (1999)). J<sub>H</sub>-프라이밍된 앤플리콘과 유사하게, S<sub>p</sub>F 또는 S<sub>v</sub>F를 이용하여 증폭된 앤플리콘은 종말체로 배향되고, der(14)-엔코딩된 융합체에 해당하는 반면, S<sub>p</sub>R, S<sub>v</sub>R 또는 D<sub>H</sub>-프라이밍된 선형 증폭은 상호 유도 염색체 상의 융합체에 해당하는 중심절로 배향된 앤플리콘을 생성시켰다(도 9).

[0226]

## 표 3

프라이머명	서열	서열 목록 번호:	참조
JH	CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C	1	van Dongen, Langerak et al. 2003
SpF	GCY CAG CYC AGC YCA	2	본 연구
SpR	GRG CTG RGC TGR GCT	3	본 연구
S <sub>γ</sub> F	GGC TGC TCT GCC CTG GTC CCC TGA GCT CCA	4	본 연구
S <sub>γ</sub> R	TGG AGC TCA GGG GAC CAG GGC AGA GCA GCC	5	본 연구
DH1	GGC GGA ATG TGT GCA GGC	6	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH2	GCA CTG GGC TCA GAG TCC TCT	7	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH3	GTG GCC CTG GGA ATA TAA AA	8	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH4	AGA TCC CCA GGA CGC AGC A	9	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH5	CAG GGG GAC ACT GTG CAT GT	10	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH6	TGA CCC CAG CAA GGG AAG G	11	van Dongen, Langerak et al. 2003
DH7	CAC AGG CCC CCT ACC AGC	12	van Dongen, Langerak et al. 2003
Bcl6R	AGA ATT CCA GAG GCC GAG CTT TGC TAC AGC GAA GG	13	Akasaka, Akasaka et al. 2000
Bcl2F	CTC ATG CCC CAT ATT CAT TCA A	14	본 연구
MycF	GGT CGG ACA TTC CTG CTT TA	15	본 연구

[0227]

[0228]

놀랍게도, OCI-Ly8에서 공지된 S<sub>γ3</sub>-BCL6 전좌를 확인하는 것 외에, S<sub>γ</sub>R-프라이밍된 증폭은 또한 기존에 확인되지 않았던 S<sub>γ2</sub>-MYC 융합체를 예기치 않게 나타내었다(도 11e). OCI-Ly8의 기존의 세포유전학 및 분자 연구는 염색체 3, 8, 14 및 18 상에서 BCL6, MYC, IgH 및 BCL2 유전자좌를 포함하는 복합한 재배열을 나타내었으나 (Farrugia, Duan et al., *Blood* 83(1):191-198 (1994); Chang, Blondal et al., *Leuk Lymphoma* 19(1-2):165-71 (1995); Ye, Chaganti et al., *EMBO J.* 14(24) 6207-17 (1995); Changanti, Rao et al., *Genes Chromosomes and Cancer* 23(4):328-336 (1998); and Sanchez-Izquierdo, Siebert et al., *Leukemia* 15(9):1475-84 (2001)), 이러한 6개의 잠재적 IgH 융합 생성물 중 단지 1개가 클로닝되었고, 서열분석되었다 (Ye, Chaganti et al., *EMBO J.* 14(24) 6207-17 (1995)). tCGH는 균형성 S<sub>γ3</sub>-BCL6 전좌(도 10) 및 J<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-BCL2 전좌(하기 및 도 10 참조) 뿐만 아니라 명백한 균형성 S<sub>γ2</sub>-MYC 재배열(도 11e)의 둘 모두의 상호 융합 생성물을 포함하여 OCI-Ly8에서 전체 5개의 IgH 융합체를 확인하였다. 흥미롭게도, S<sub>γ3</sub> 스위치 반복 영역의 외부에 해당하고, 접합 미세상동성(microhomology)을 나타내는 IgH-MYC 중지점 및 IgH-BCL2 중지점(도 14)에서의 이상하게 큰 약 6 kb의 결실을 포함하는, OCI-Ly8에서의 전좌 중지점 서열의 여러 이상 특징은 비-통상적인 메커니즘을 기초로 하는 상기 재배열을 암시한다(Jager, Bocskor et al., *Blood* 95(11):3520-3529 (2000); Shou, Martelli et al., *PNAS* 97(1):228-233 (2000); Corneo, Wendland et al., *Nature* 449(7161):483-486 (2007); and Yan,

Boboila *et al.*, *Nature* 449(7161):478-482 (2007)). 또한,  $J_H$ ,  $D_H$  또는  $S_H$  선형 증폭 프라이머를 이용하여 상호 IgH-MYC 융합체를 확인하기 위한 이후의 시도는 성공적이지 못했고, 이는 비-정준 IgH 중지점 또는 비-IgH 파트너 유전자좌를 포함하는 보다 복잡한 재배열을 암시한다(Changanti, Rao *et al.*, *Genes Chromosomes and Cancer* 23(4):328-336 (1998)).

[0229] MYC 또는 BCL6 유전자 재배열의 서브셋은 IgH를 포함하지 않고, 대신 면역글로불린 카파 및 람다 경쇄 유전자좌 또는 다양한 다른 비-IgH 유전자좌를 포함하였다(Akasaka, Akasaka *et al.*, *Cancer Res.* 60(9):2335-2341 (2000); Shou, Martelli *et al.*, *PNAS* 97(1):228-233 (2000)). tCGH가 상기 유전자좌에서 비-IgH 재배열을 검출할 수 있는지 입증하기 위해, MYC 및 BCL6 액손 1 근처에 위치된 전좌 중지점 핫스팟(hotspot)을 표적화하도록 설계된 선형 증폭 프라이머를 사용하였다(Akasaka, Akasaka *et al.*, *Cancer Res.* 60(9):2335-2341 (2000); Busch, Keller *et al.*, *Leukemia* 21(8):1739 (2007)). log-비 플롯에서, 상기 재배열(도 10e, 10i)은 선형 증폭 프라이머와 동일한 유전자좌 내에서의 tCGH에 의해 확인된 중지점의 예견된 특징인 '역위된' 배향을 제외하고는 상기 기재된 IgH 재배열과 유사한 것으로 보인다(도 7에서 "유전자 A"). 상기 실험은 재배열 파트너가 공지되지 않거나 어레이에 제시되지 않는 경우에도, tCGH가 MYC 및 BCL6 재배열을 검출하고, 상기 유전자좌 내의 중지점을 확인할 수 있는 것을 확립하였다.

#### 실시예 6: 신규한 염색체 중복 및 결실의 확인

[0230] 종양 및 정상 유전체 DNA가 선형 증폭 및 라벨링 후에 동일한 어레이에 공동 하이브리드화되므로(도 7), tCGH가 균형성 재배열 외에 복제수 변화를 검출하는 것이 예상되었다. 또한, 동일한 유전자좌에서의 IgH 전좌와 관련된 BCL2 및 CCND1 유전자좌에서의 여러 기준의 인지되지 않았던 결실 및 중복이 확인되었다. 예를 들어, 공지된  $J_H$ -BCL2 전좌를 갖는 RL7 림프종 세포주에서, BCL2의 거대한(190 kb) 인트론 내의 신규한 167 kb의 간극 결실이 확인되었다(도 11a). 유사한 135 kb 인트론 BCL2 결실을 OCI-Ly8에서 확인하였고,  $J_H$ -BCL2 중지점 접합에서 명백한 6.2 kb의 결실이 존재하였다(도 13). 이러한 이상은 PCR 증폭 및 서열분석에 의해 각각 확인하였다. M02058 및 Granta 519 둘 모두에서, CCND1 유전자에 걸쳐있고 각각의  $J_H$ -CCND1 중지점 접합에 대해 정확히 걸쳐 있는 중복을 확인하였고, 이는 각각의 중복 사건이 der(14)t(11;14) 염색체에서 발생한 것을 암시한다(도 13). CCND1 3' 비번역 영역에서의 공지된 1852 nt의 결실(Withers, Harvey *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11(10):4846-4853 (1991))이 또한 M02058에서 확인되었다(도 13a). 최종적으로, 신규한 562 nt의 결실 다형태를 확인하였고, CCND1 유전자의 약 55 kb의 업스트림으로 특성규명되었다(도 12b). 복제수 변화의 tCGH 검출은 사용된 특정 선형 증폭에 독립적이었다(도 11a-c 및 도 14). 간극 결실의 중지점이 또한 결실 중지점에 걸친 선형 증폭에 의해 맵핑될 수 있었다(도 11 패널 a, d, e).

[0231] [0232] 상기 기재된 tCGH 실험에서, 선형으로 증폭된 종양 DNA를 유사하게 증폭된 정상 유전체 DNA와 함께 공동 하이브리드화시켰다(도 7). 증폭된 정상 DNA가 아닌 모의 증폭된 종양 DNA가 하이브리드화 대조군으로 사용되는 경우, tCGH는 균형성 재배열을 검출하나 복제수 변화는 검출하지 못하는 것으로 예상된다(도 11d 및 도 16a 및 16b). 그러나, 상기 조건하에서, 정상 유전체 DNA서 뿐만 아니라 예상된 전좌 중지점으로부터 떨어진 "탈-표적" 증폭이 또한 관찰되었다. 탈-표적 증폭 신호의 수 및 패턴은 선형 증폭 프라이머에 의존하고, 이는 반복성 스위치 서열을 표적으로 하는  $S_H$  프라이머에 대해 더욱 복잡한 것으로 보이나, 탈-표적 신호의 패턴은 임의의 제공된 프라이머에 대해 현저하게 재현적이었다(도 15 및 16). 종양 및 정상 DNA가 동일한 프라이머를 이용하여 증폭되고, 통상적 tCGH로서 공동 하이브리드화되는 경우(도 7), 2개의 샘플에 대한 탈-표적 신호는 완전히 일치하였고, 이에 따라 서로 효과적으로 마스킹되었으며, 표적화된 전좌 중지점만 나타내었다.

[0233] t(11;14) 및 관련된  $J_H$ -CCND1 융합체는 외투세포 림프종(MCL)에 대해 질병 특이적이다. MCL 케이스의 ~40%에서, CCND1 중지점은 ~100 nt 주요 전좌 클러스터(MTC) 내에 위치된 반면(van Dongen, Langerak *et al.*, *Leukemia* 17(12): 2257- 317 (2003)), MCL 케이스의 다른 ~60%는 MTC의 측면에 존재하는 ~400 kb의 영역에 걸쳐 산재된 비-MTC 중지점을 갖는다(Vaandrager, Schuurings *et al.*, *Blood* 88(4): 1177-1182 (1996)). 용이하게 클로닝되고 분석되는 MTC 중지점(Wetzel, Le *et al.*, *Cancer Res.* 61(4):1629-1636 (2001))과 대조적으로, 비-MTC 중지점은 클로닝하기에 더욱 어려운 것으로 증명되었고, 단지 희귀한 예가 서열 분석되었다(Meeker, Grimaldi *et al.*, *Blood* 74(5): 1801-1806 (1989); Meeker, Sellers *et al.*, *Leukemia* 5(9):733-7 (1991); Willis, Jadayel *et al.*, *Blood* 90(6):2456-2464 (1997)). tCGH가 원발성 림프종 샘플에서 신규한 중지점을 확인할 수 있는지 결정하기 위해, 본 발명자는 비-MTC 중지점을 갖는 5개의 원발성 MCL 케이스를 분석하였다. 신규한 CCND1 중지점은 각각 100 nt의 해상도로 맵핑되었고(도 12), 이는 중지점 접합의 신속한 확인 및 서열분

석을 가능하게 한다. 중지점은 MTC로부터 약 200 bp 떨어져 위치된 것을 포함하여 CCND1 유전자에 대해 약 150 kb의 중심절 영역에 걸쳐 산재되었다.

**[0234] 실시예 6: 골수종 백혈병에서의 균형성 전좌의 검출을 위한 tCGH 검정의 확립 및 확인**

본 실시예는 골수종 백혈병에서 흔한 균형성 전좌, 염색체 결실, 염색체 중복 및 염색체 역위와 같은 염색체 이상의 검출에 유용한 tCGH 어레이의 확립을 예시한다. 전좌 및 큰 결실과 같은 염색체 이상에 의해 흔히 중단되는 7개의 유전자를 포함하고, 83 nt의 평균 간격으로 1.1 Mbp에 걸쳐 포함되는 14,262개의 프로브 서열을 함유하는 마이크로어레이를 제작하였다(표 4). 이후, 다양한 골수종 백혈병 세포주로부터 분리된 염색체 DNA의 다중 선형 증폭에 프라이머 믹스(표 5)를 사용하였다. 표 4에 개설된 AML 파일럿 어레이로의 하이브리드화에 의해 증폭된 염색체 서열에 대해 tCGH 분석을 수행하였다.

**표 4: AML 파일럿 어레이에서의 하이브리드화 프로브에 의해 포함되는 유전자좌 및 유전체 영역의 확인.**

유전자좌	유전체 거리(hg17) +20kb	밴드	영역 길이	# 프로브	간격
BCR	chr22:21,837,106-21,992,698	22q11.23	155,592	2050	76
ABL	chr9:130,608,822-130,802,614	9q34.12	193,792	2279	85
ETO (RUNX1T1)	chr8:93,030,328-93,167,540	8q21	137,212	2021	68
AML1	chr21:35,118,575-35,163,745	21q22.12	45,170	700	65
RARA	chr17:35,708,972-35,777,420	17q21.2	68,448	880	78
PML	chr15:72,064,067-72,136,162	15q22	72,095	955	75
CBFB	chr16:65,610,551-65,702,457	16q22.1	91,906	973	94
MYH11	chr16:15,711,505-15,744,067	16p13.11	32,562	358	91
MLL	chr11:117,802,415-117,911,144	11q23	108,729	1374	79
AF9	chr9:20,324,968-20,457,000	9p21.3	132,032	1997	66
IKZF1 (Ikaros)	chr7:50,111,639-50,257,007	7p12.2	145,368	675	215
	AML 파일럿(pilot) 어레이 전체		1,182,906 nt	14,262	83 nt

**[0237]**

[0238]

**표 5:** 골수성 백혈병의 tCGH 분석에서의 염색체 DNA의 다중 선형 증폭을 위한 프라이머 믹스.

<b>MPM (골수성 프라이머 믹스)</b>		서열 목록 번호:	참조
BCR-b2-C	CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT	16	van Dongen <i>et al.</i> , Leukemia. 1999 Dec;13(12):1901-28.
MYH11-D1	TCC CTG TGA CGC TCT CAA CT	17	van Dongen <i>et al.</i> , Leukemia. 1999
MYH11-D2	CTT GAG CGC CTG CAT GTT	18	van Dongen <i>et al.</i> , Leukemia. 1999
PML-C1	TCA AGA TGG AGT CTG AGG AGG	19	van Dongen <i>et al.</i> , Leukemia. 1999
PML-C2	AGC GCG ACT ACG AGG AGA T	20	van Dongen <i>et al.</i> , Leukemia. 1999
<b>"821" = (821A6-R + 821A12-R + 821A18-R + 821A24-R)</b>			
821A6-R	GTC TTC ACA AAC CCA CCG CAA GTC G	21	Xiao <i>et al.</i> , Leukemia. 2001 Dec;15(12):1906-13
821A12-R	GCT GGT CAC AGG TGC CAG CAG TTG	22	Xiao <i>et al.</i> , Leukemia. 2001
821A18-R	CTG AGT CTC AGT GCC AGT TTC CCA GGA	23	Xiao <i>et al.</i> , Leukemia. 2001
821A24-R	CTG ATG AAA CAG CTG GAG GCA GAG GG	24	Xiao <i>et al.</i> , Leukemia. 2001
<b>"P1/P7" = (MLL-P1LR-F + MLL-P7LR-F)</b>			
MLL-P1LR-F	CCG CCT CAG CCA CCT ACT ACA GGA CCG	25	Langer <i>et al.</i> , Genes Chromosomes Cancer. 2003 Apr;36(4):393-401
MLL-P7LR-F	CAA CCC GAA AGT CCA TCT ATA GGG AGC ATG GG	26	Langer <i>et al.</i> , Genes Chromosomes Cancer. 2003

[0239]

[0240]

도 18은 MPM 프라이머 세트와 함께 AML 파일럿 어레이를 이용한 3개의 만성 골수종 백혈병 세포주, CML1, CML2 및 K562의 다중 tCGH 분석 결과를 도시한다. 전좌 중지점은 분석에서 명백하게 관찰된다. 또한, CML1 백혈병 세포주의 ikaros 유전자 내의 큰 염색체 결실이 상기 분석에 의해 예시된다. 이러한 실시예는 다중 tCGH 분석이 염색체 결실 및 증폭과 매우 관련된 만성 골수종 백혈병과 관련된 균형성 BCR-ABL 전좌의 유전형을 동시에 결정할 수 있음을 입증한다.

[0241]

도 19는 골수성 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한, RARA 유전자 내에 다양한 전좌 중지점을 갖는 PML-RARA 균형성 전좌 t(15;21)를 특징으로 하는 2개의 급성 전골수성 백혈병 세포주(APL1 및 APL2), 및 염색체 역위 inv(16)/t(16;16)에 의해 야기된 MYH11-CBFB 융합체를 특징으로 하는 2개의 급성 골수 단구성 백혈병/호산구증가증 세포주(M4Eo1 및 M4Eo2)의 AML 파일럿 어레이를 이용한 다중 tCGH 분석의 결과를 도시한다. 본 실시예에서 관찰될 수 있는 바와 같이, 다중 tCGH 분석은 균형성 전좌 및 염색체 역위와 같은 다양한 염색체 이상의 유전형을 동시에 결정할 수 있다.

[0242]

도 20은 P1/P7 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한, AF9-MLL 균형성 전좌 t(9;11)를 특징으로 하는 MLL 백혈병 세포주, 및 821 프라이머 믹스(MPM) 및 AML 파일럿 어레이를 이용한, ETO-AML1 균형성 전좌 t(8;21)를 특징으로 하는 카스미 급성 골수성 백혈병 세포주의 AML 파일럿 어레이를 이용한 다중 tCGH 분석의

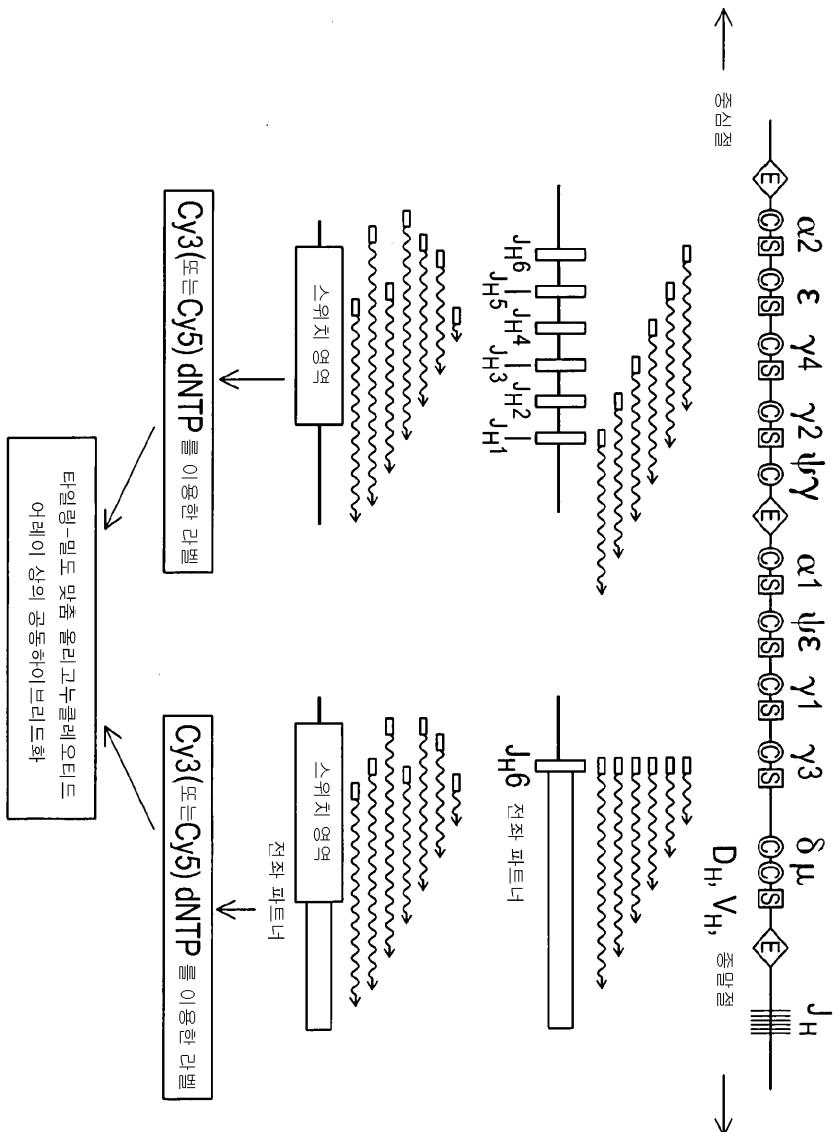
결과를 도시한다. 본 실시예는 다중 tCGH가 균형성 전좌, 염색체 결실, 염색체 중복 및 염색체 역위를 포함하는 광범위한 염색체 이상의 유전형 분석에 사용할 수 있음을 입증한다.

[0243]

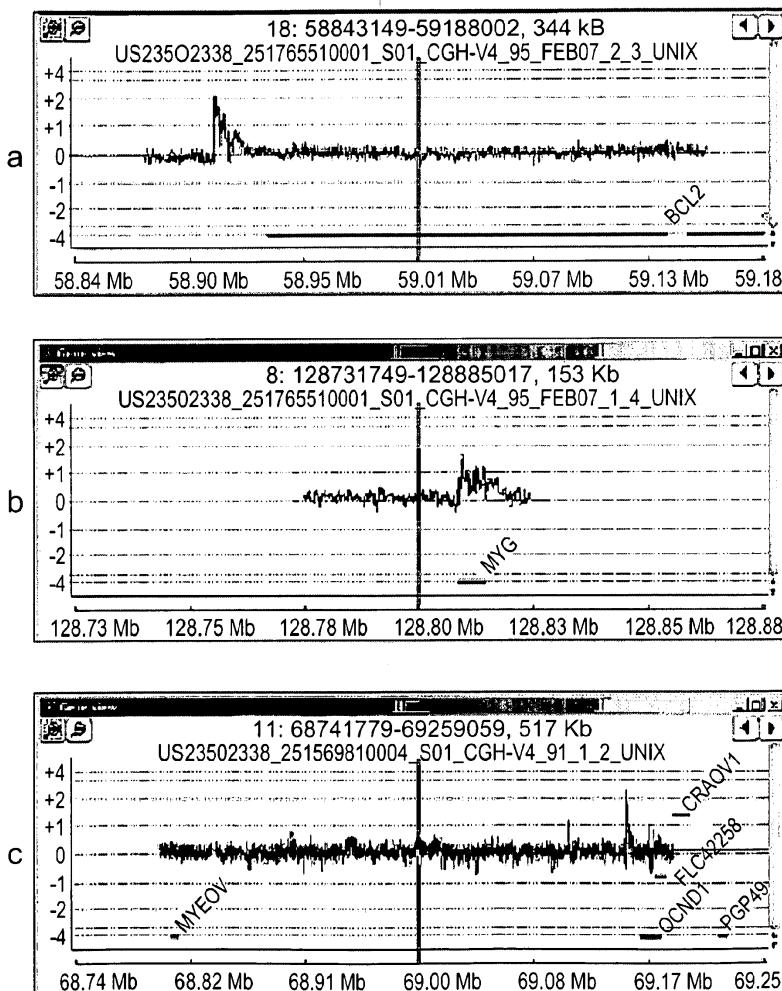
본원에 기재된 실시예 및 구체예는 단지 예시 목적이며, 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 암시되며, 이는 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되는 것이 이해된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히 및 특히 출원은 모든 목적상 이의 전체 내용이 참조로서 포함된다.

## 도면

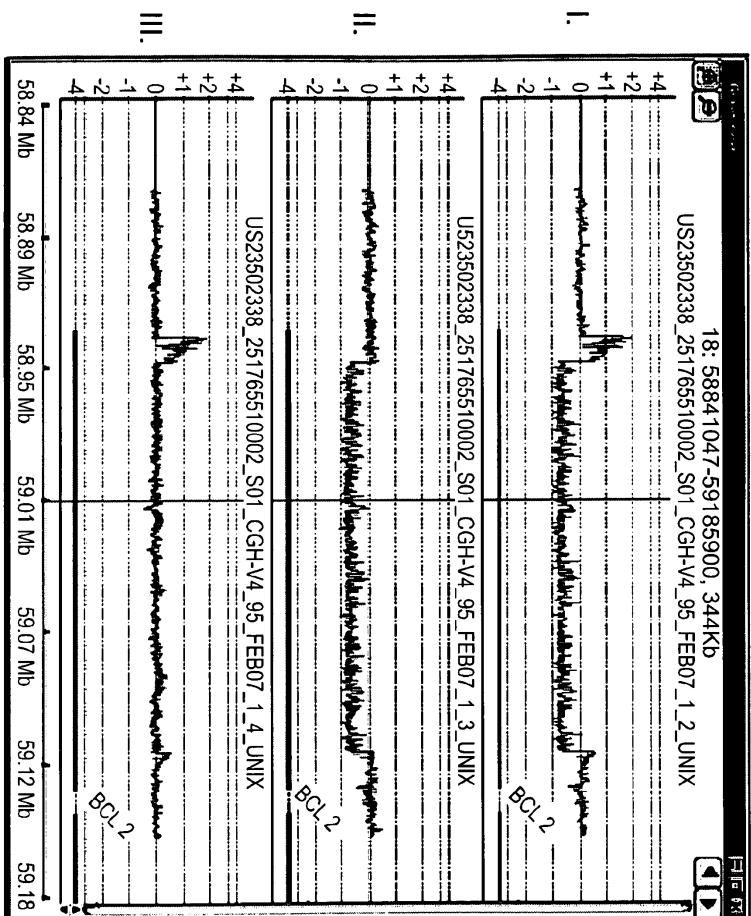
### 도면1



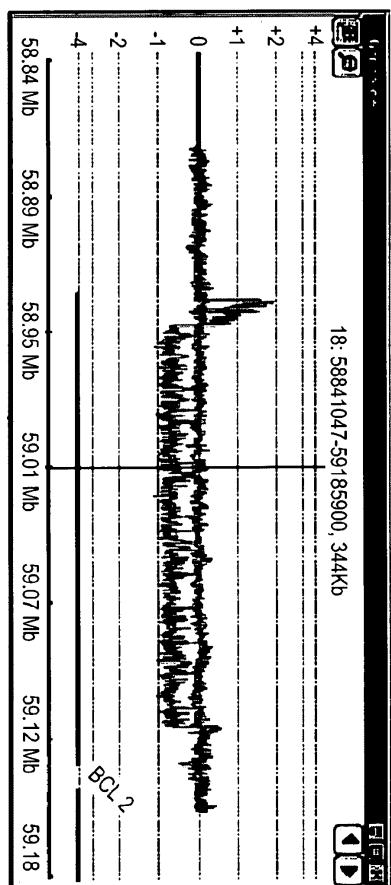
## 도면2



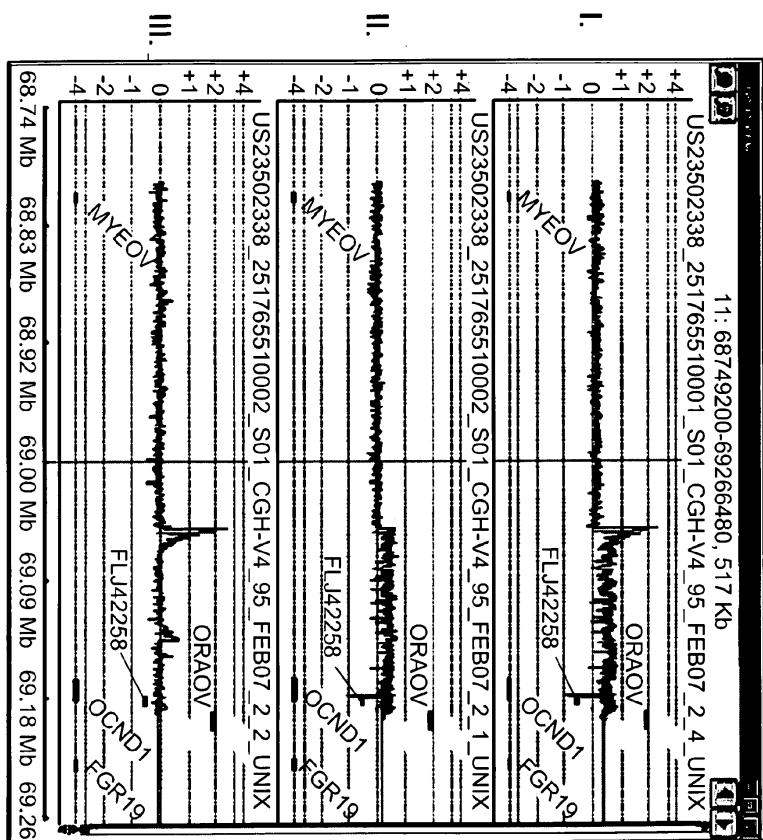
도면3a



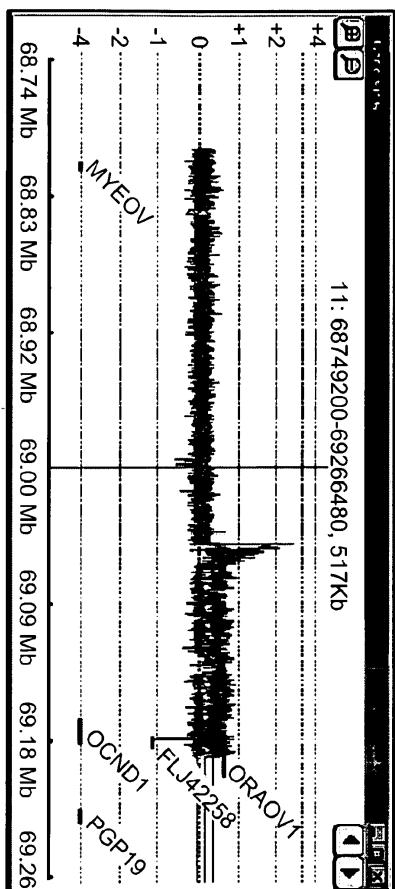
도면3b



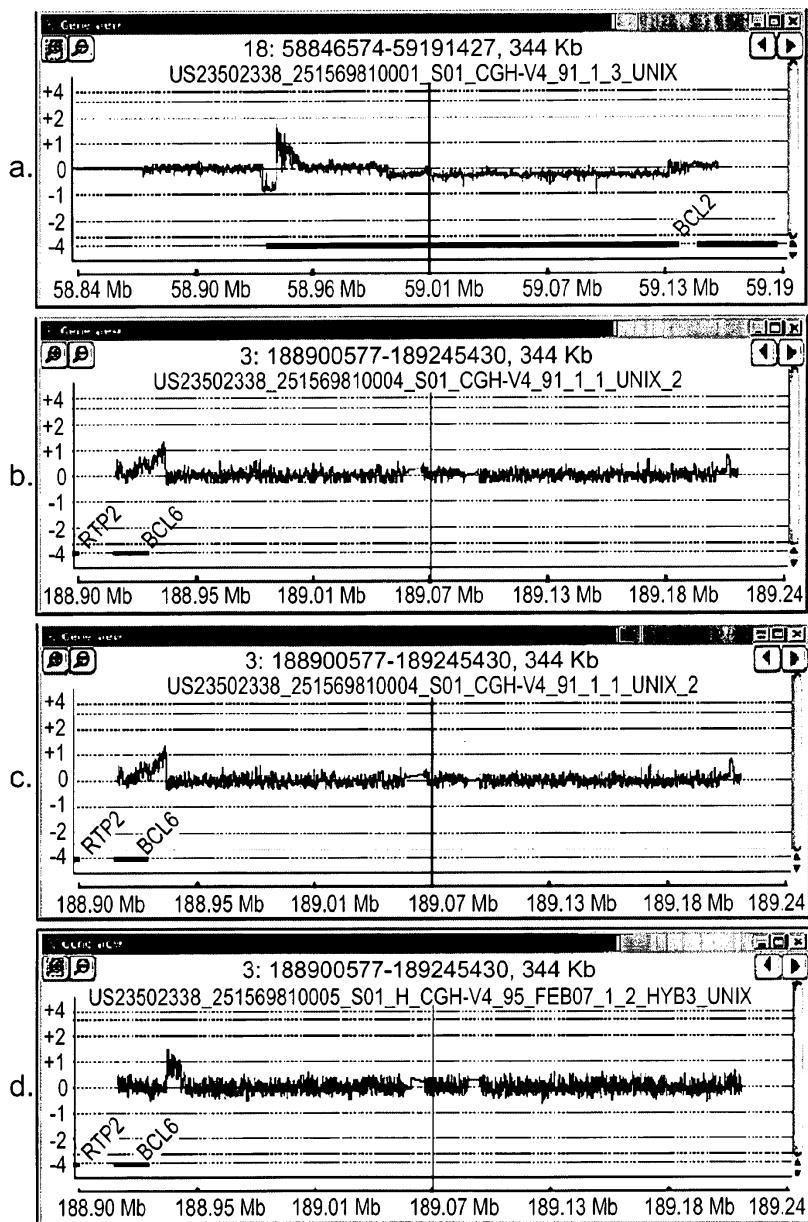
도면3c



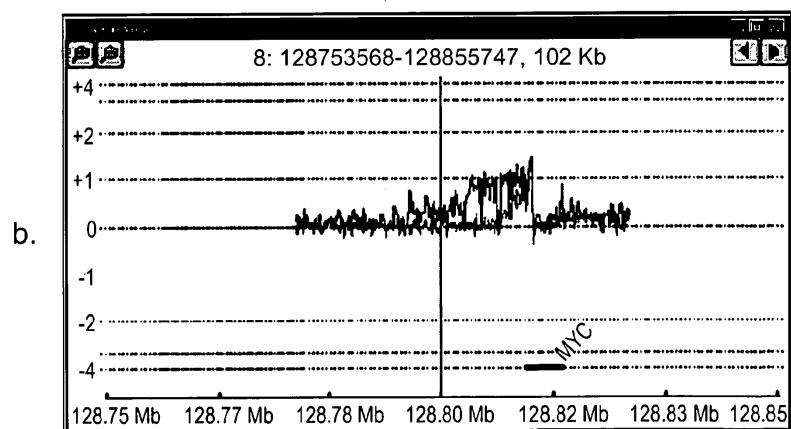
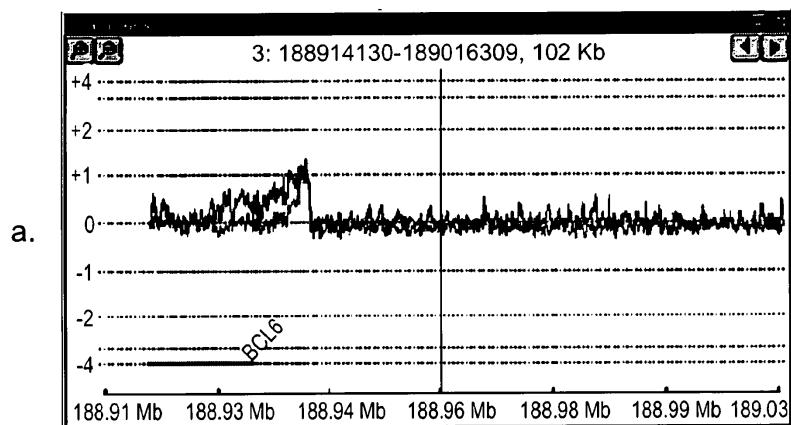
도면3d



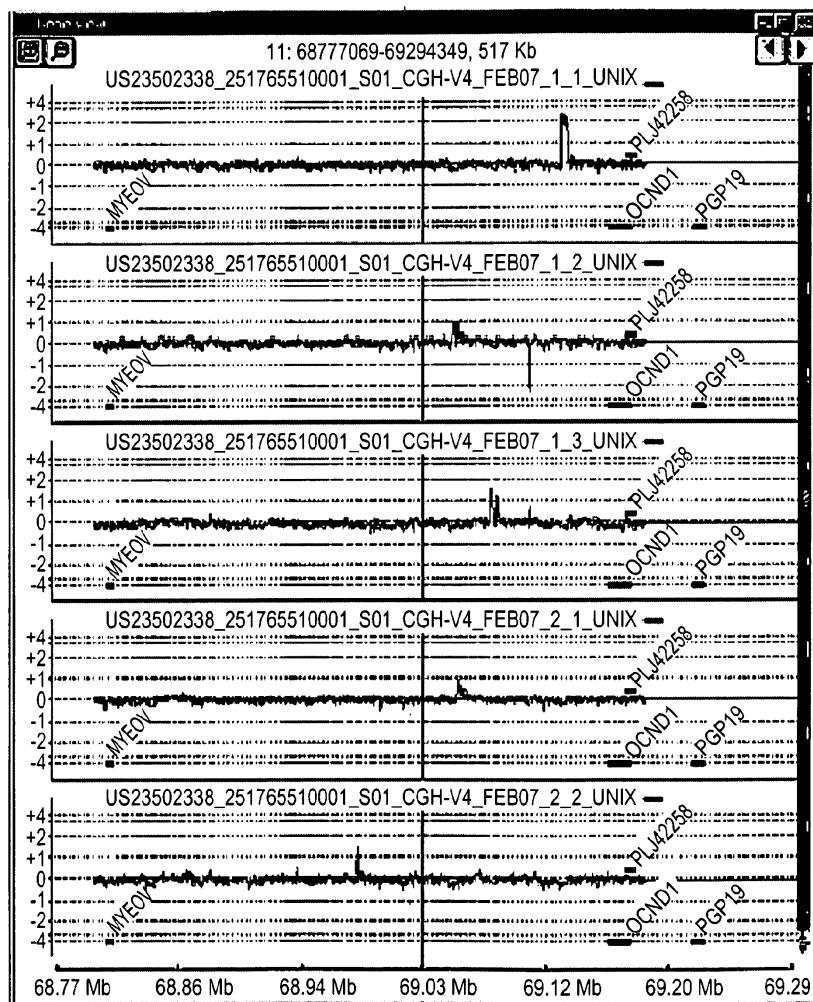
## 도면4



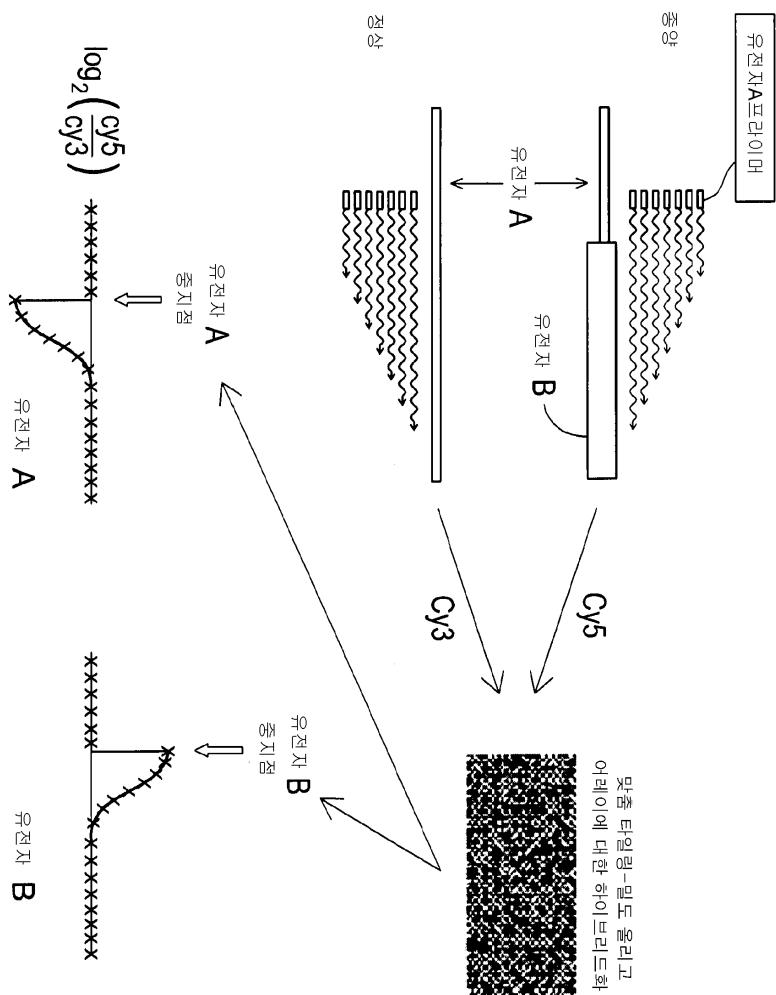
## 도면5



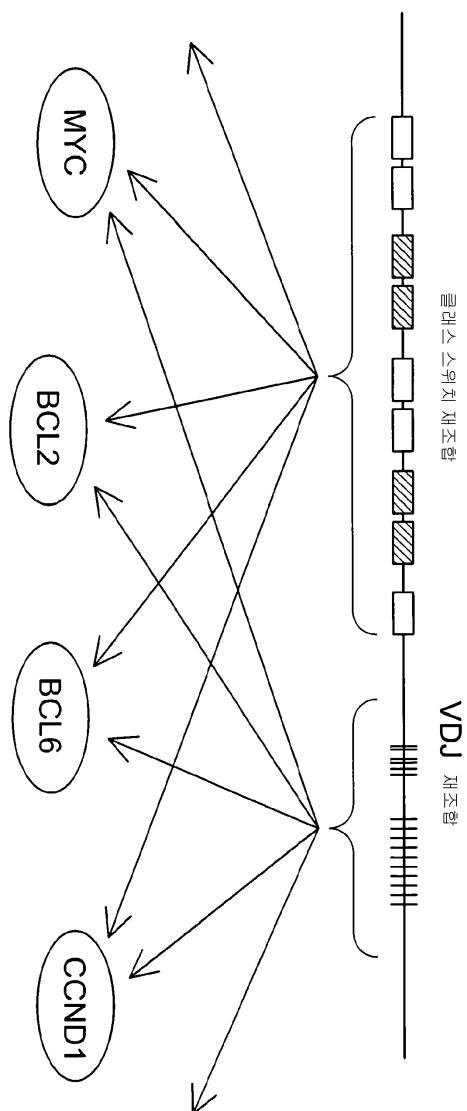
## 도면6



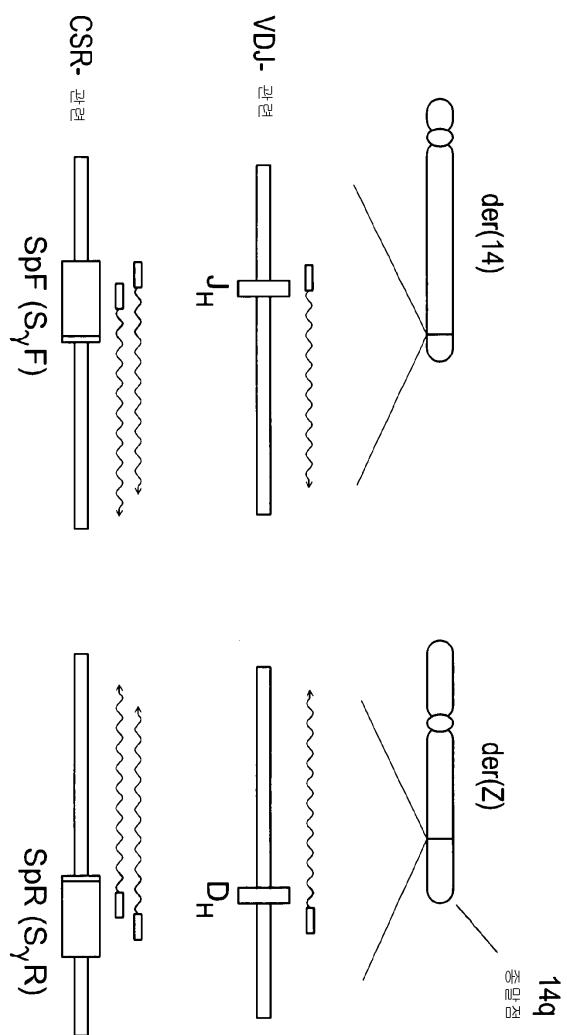
## 도면7



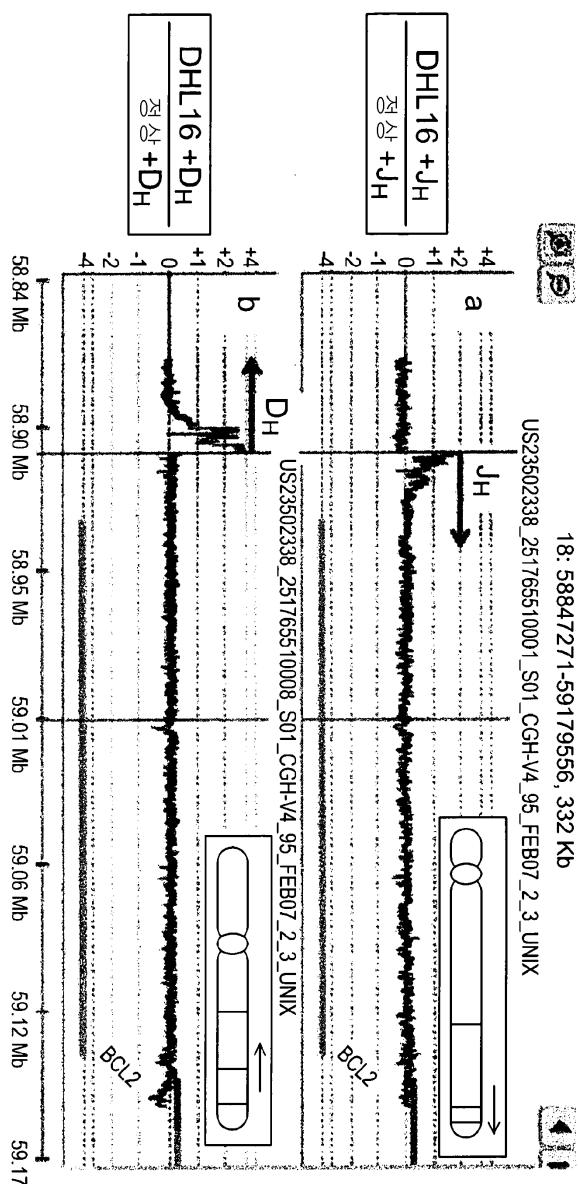
## 도면8



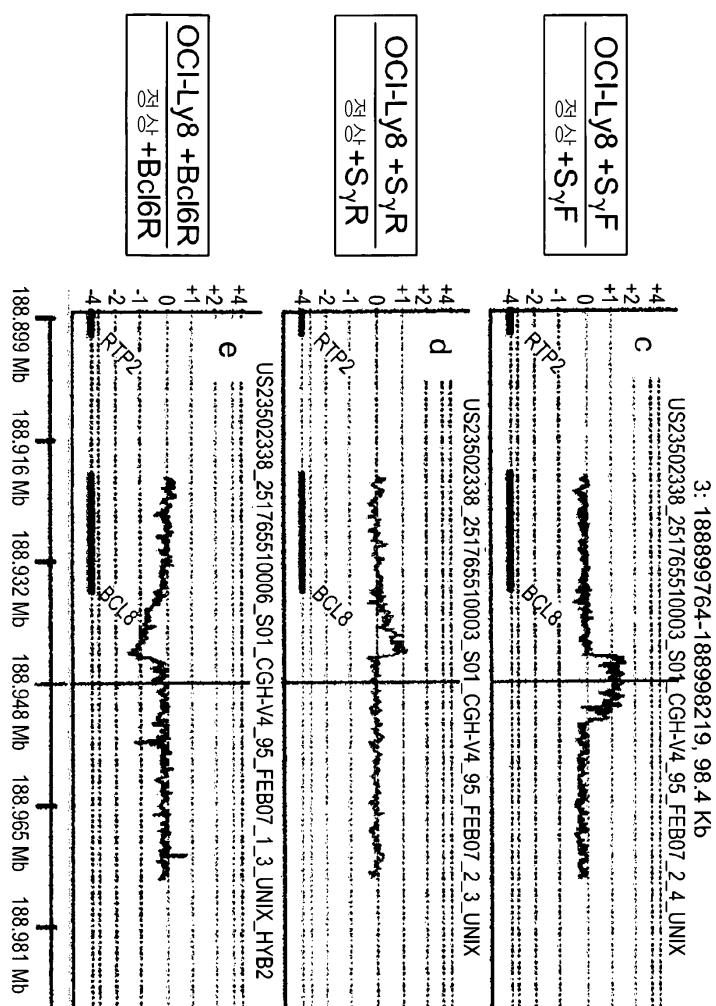
도면9



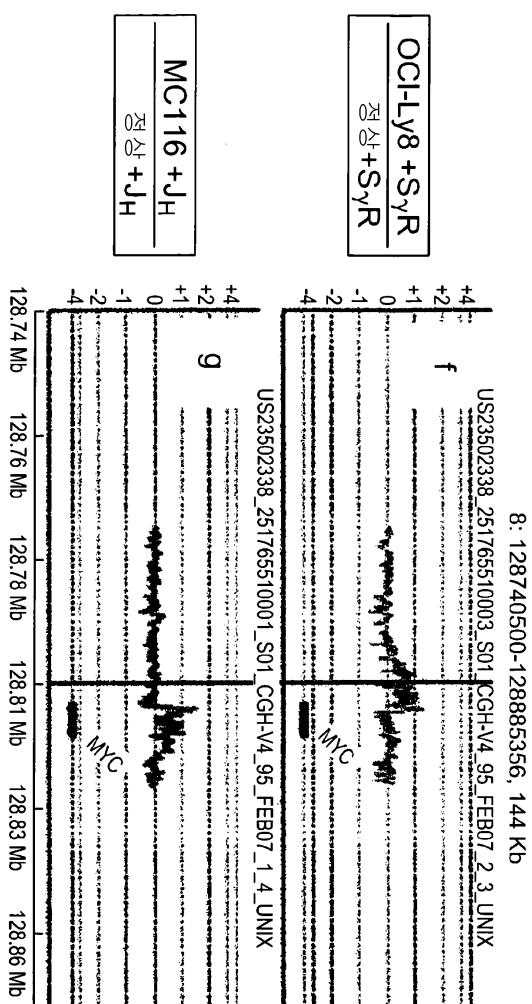
도면10a



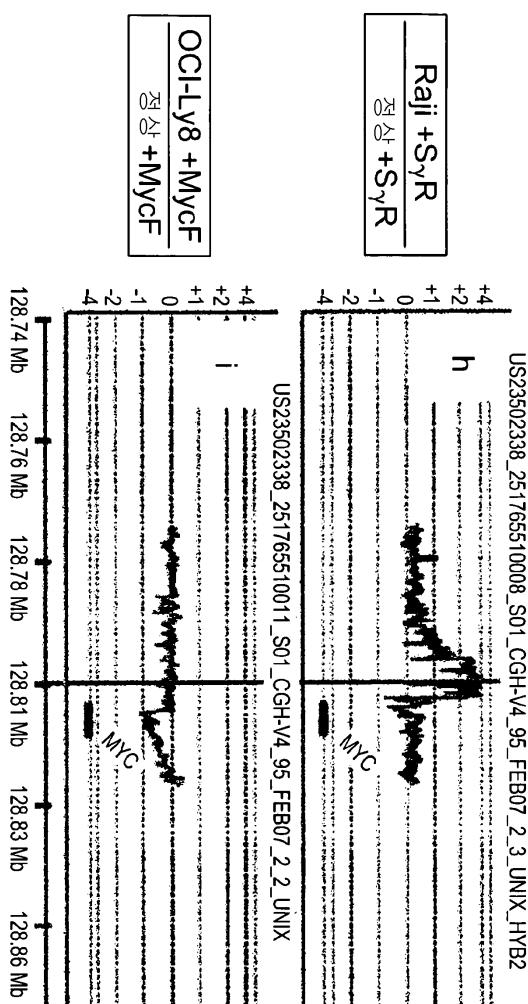
도면10b



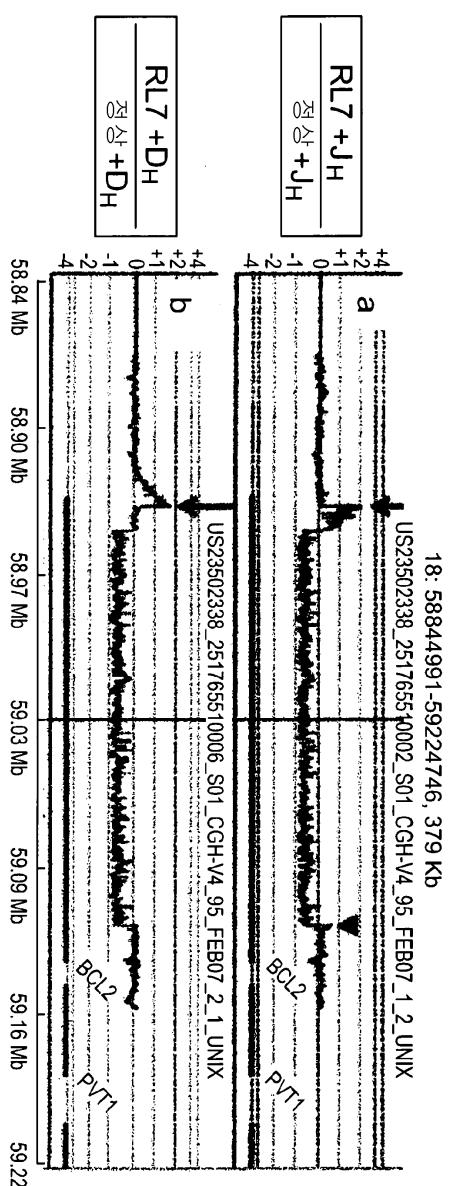
도면10c



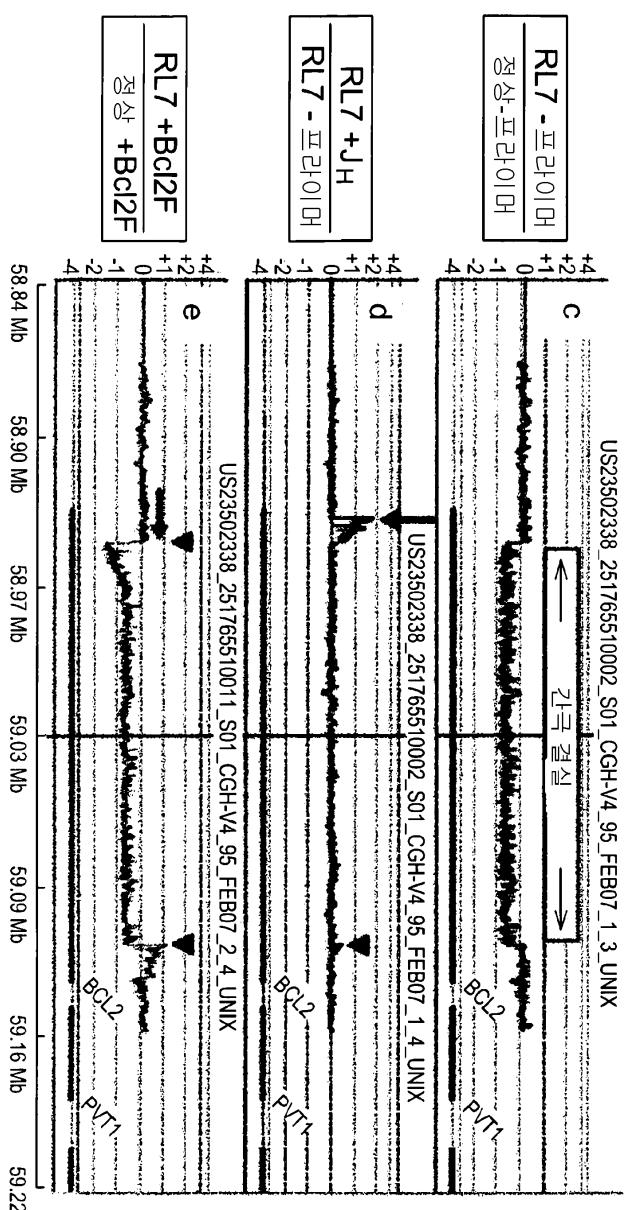
도면10d



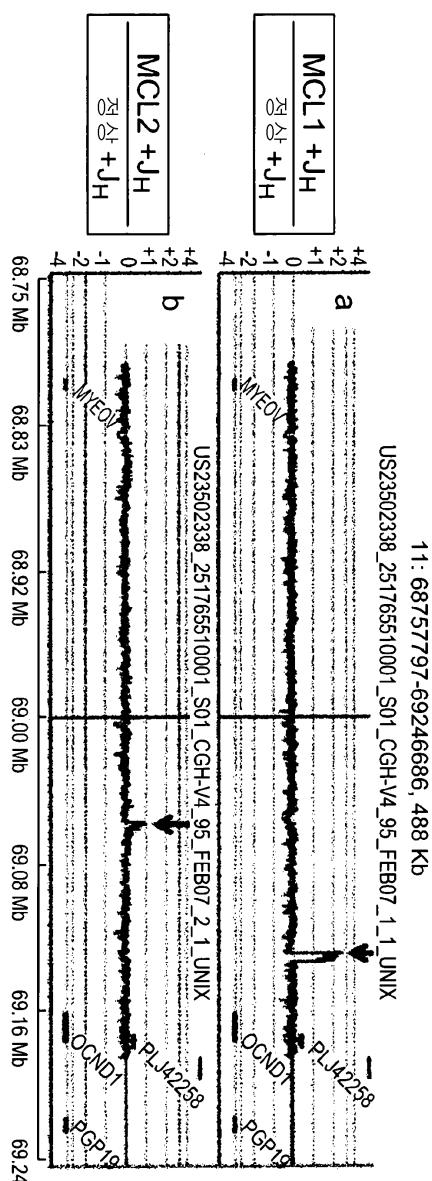
도면11a



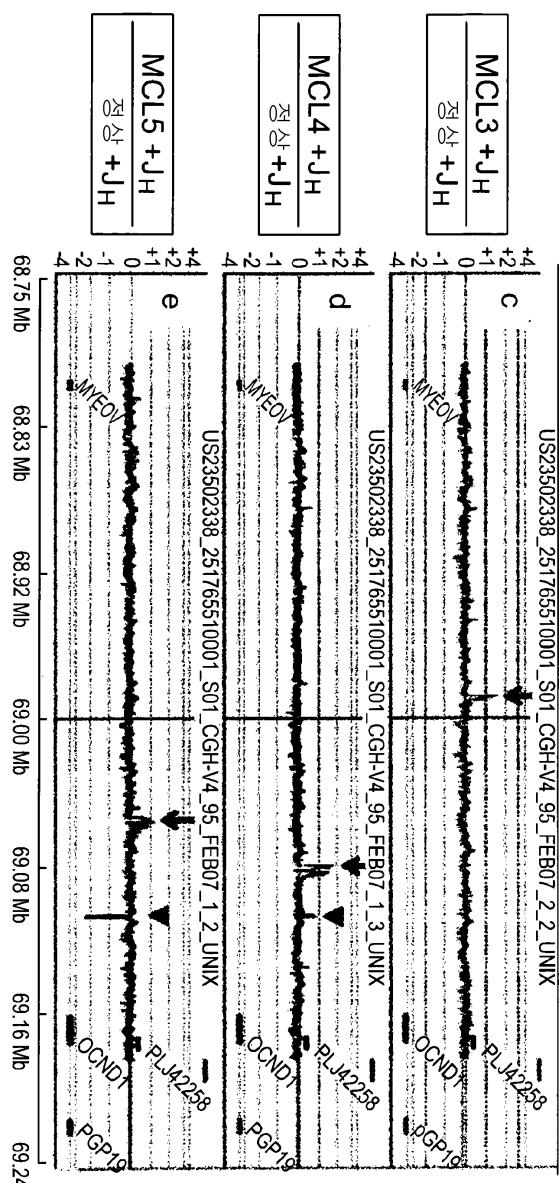
도면11b



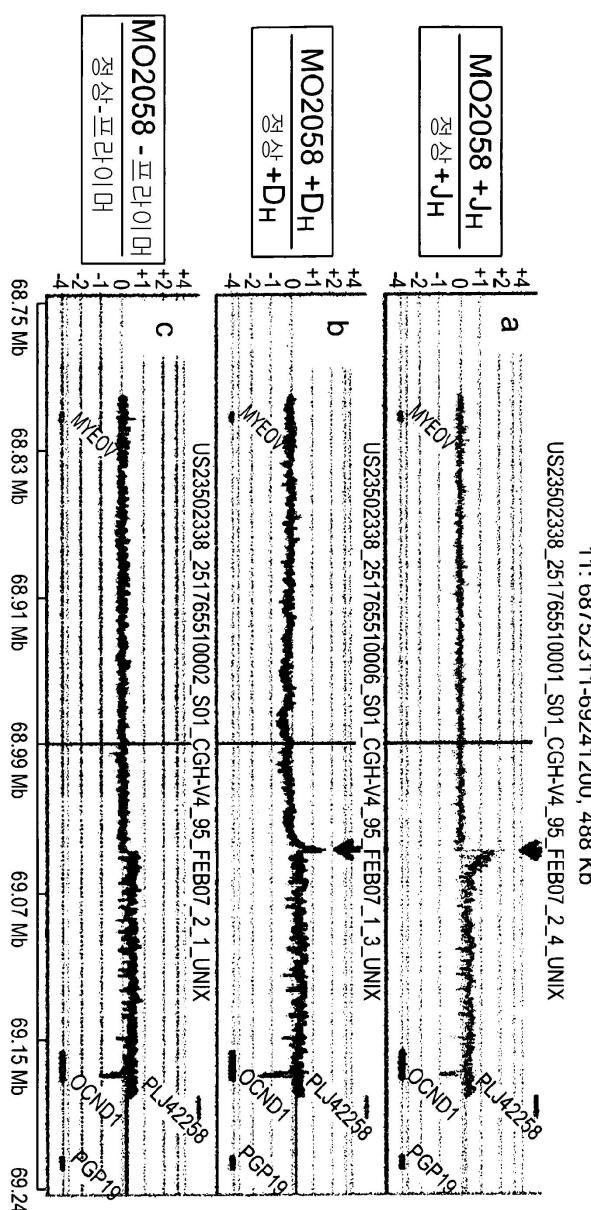
도면12a



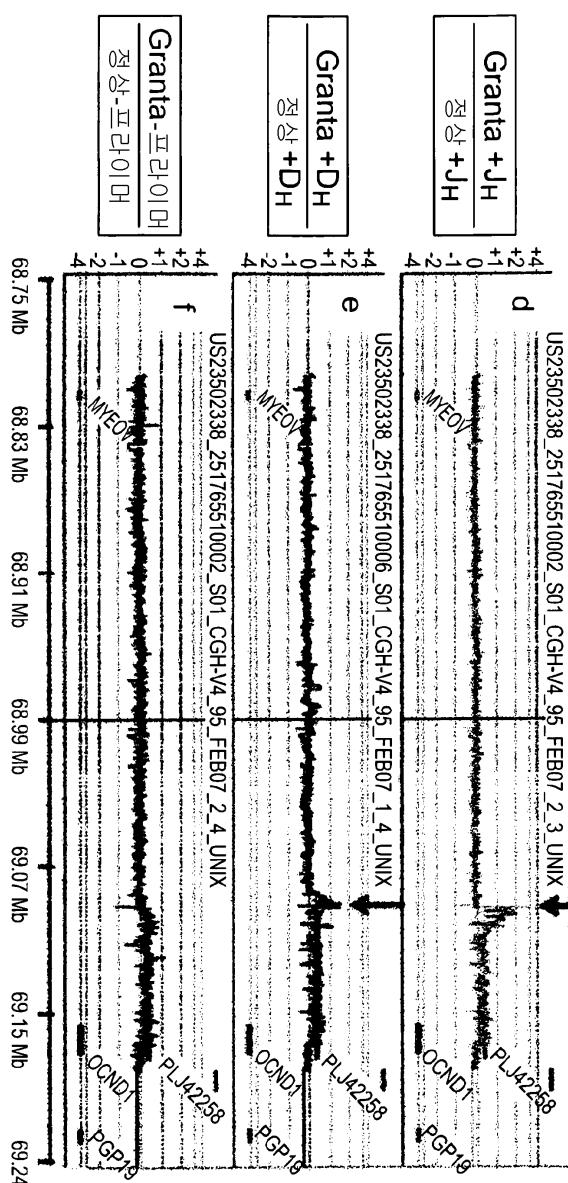
도면12b



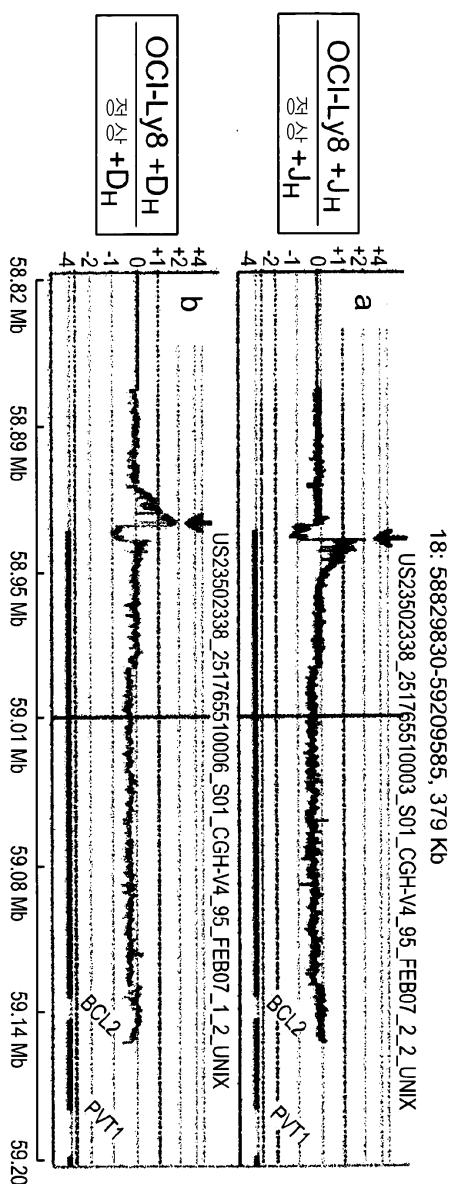
도면13a



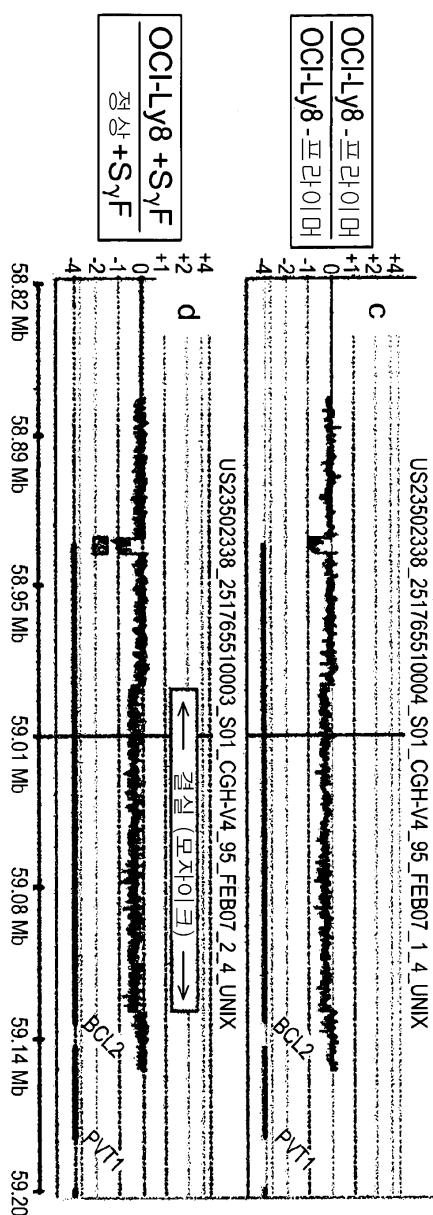
도면13b



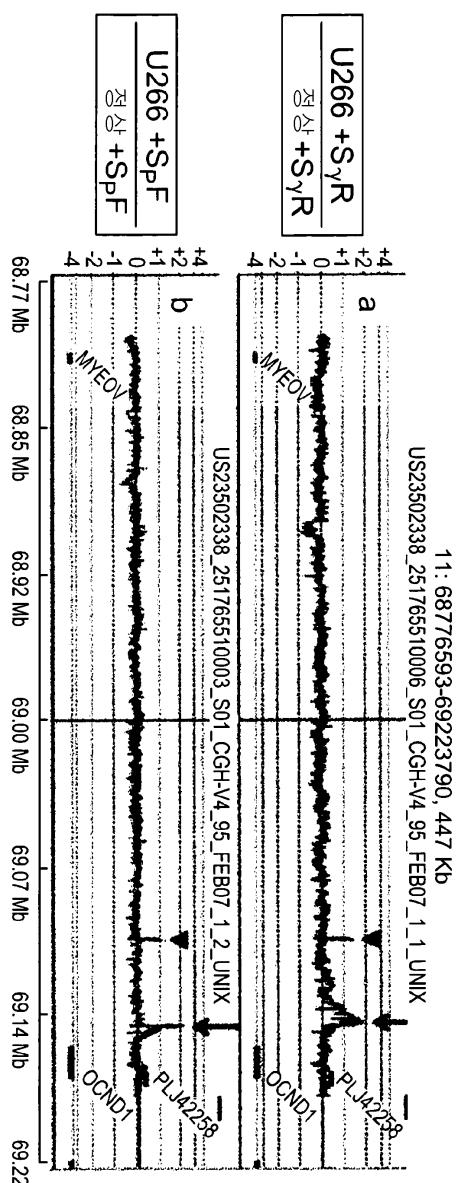
도면14a



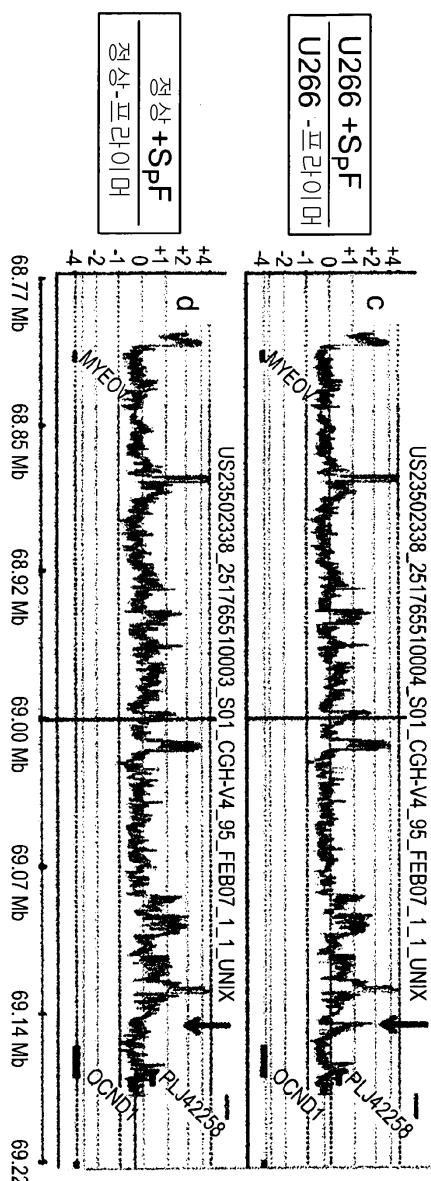
도면14b



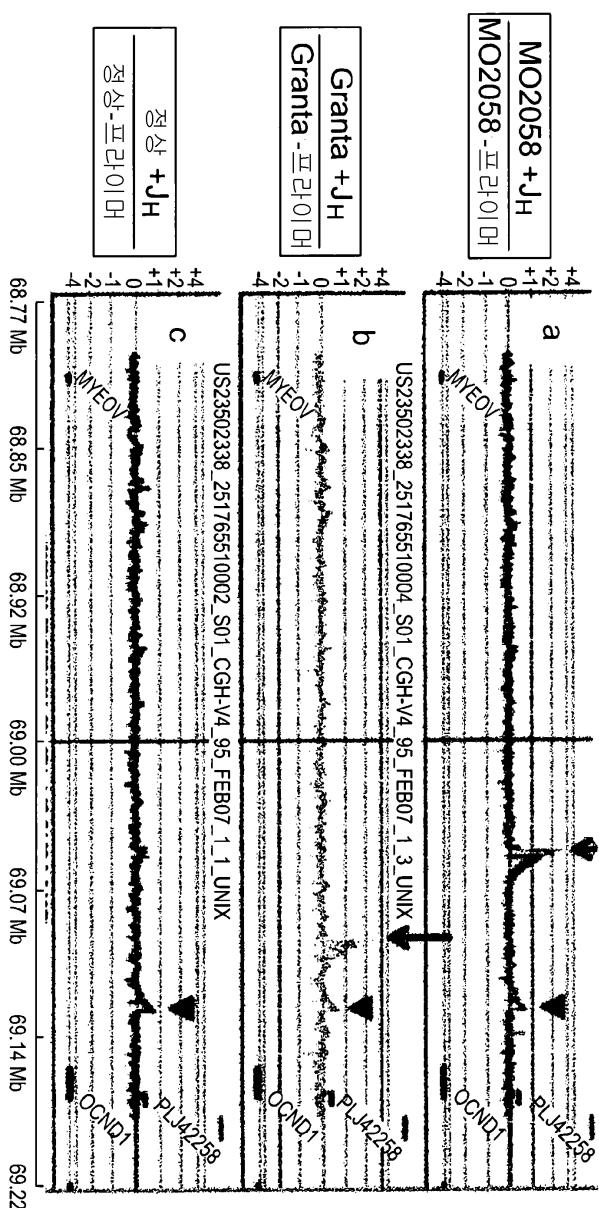
도면15a



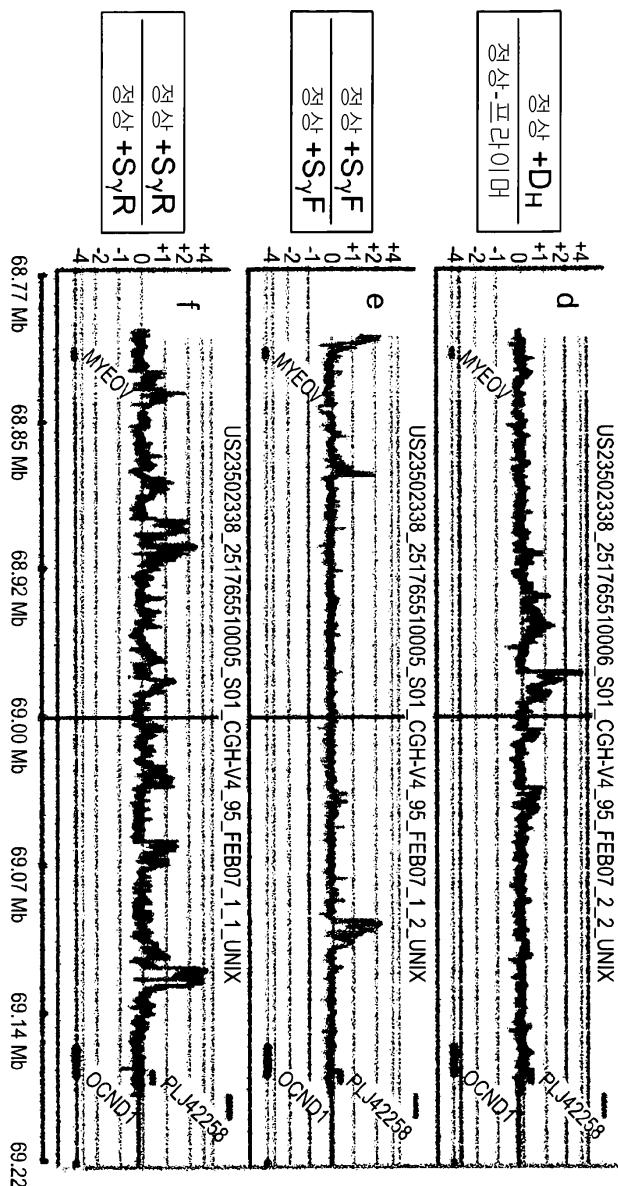
도면15b



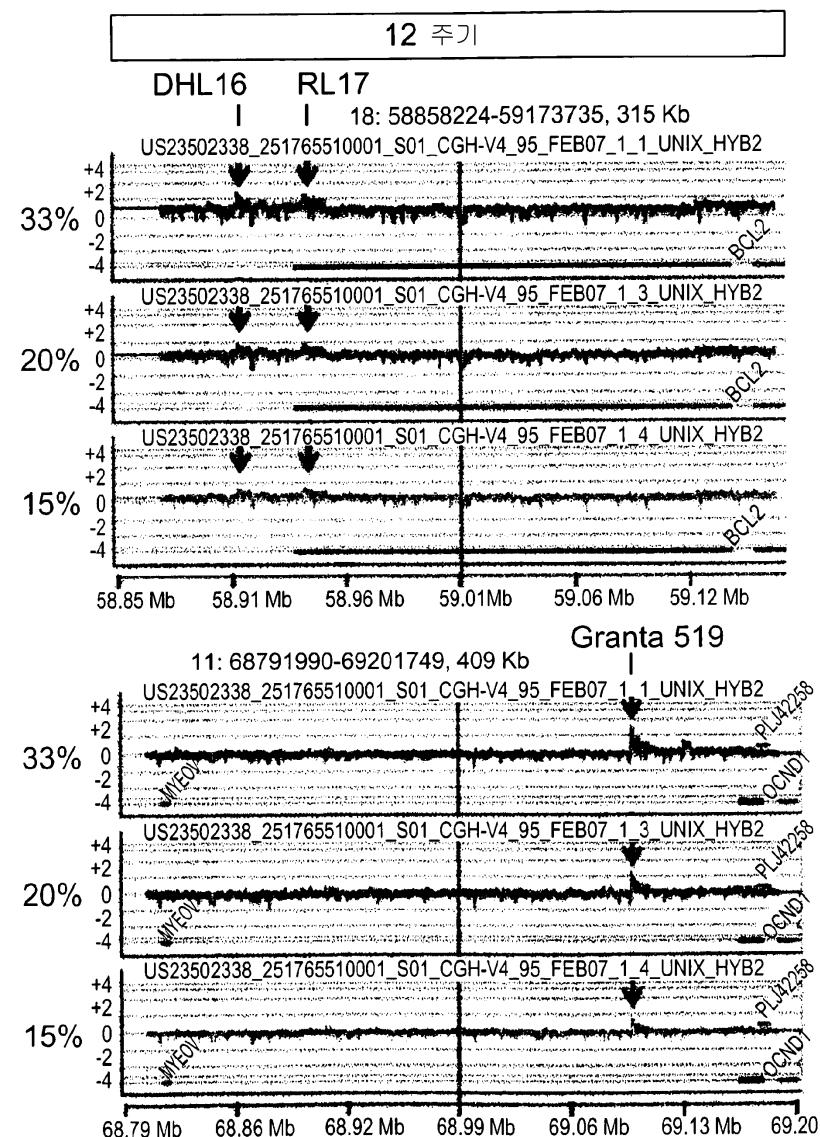
도면16a



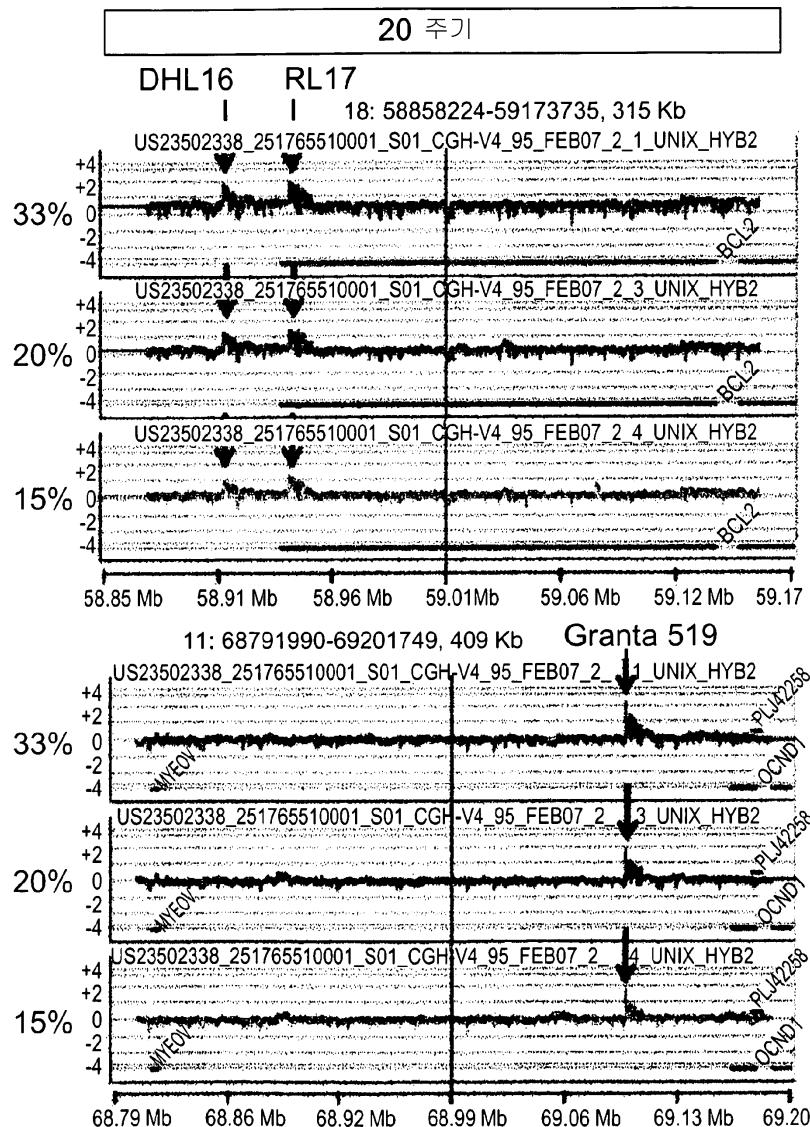
도면16b



## 도면17a

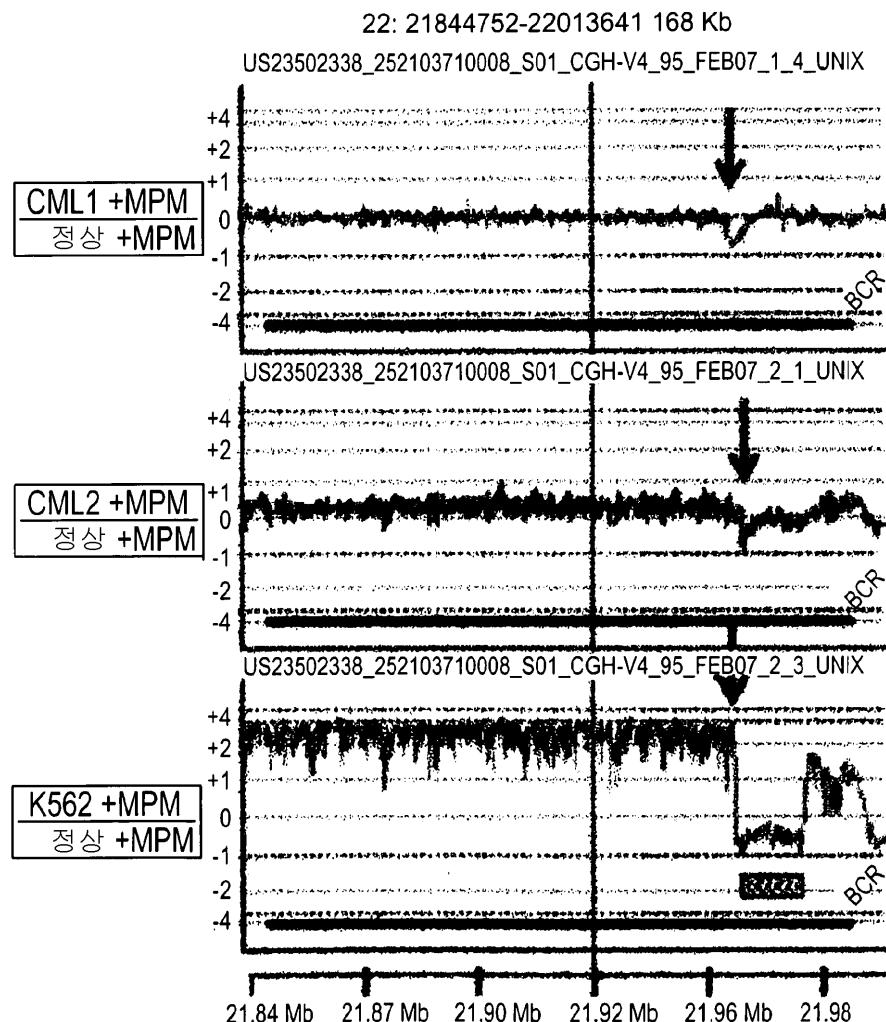


## 도면17b

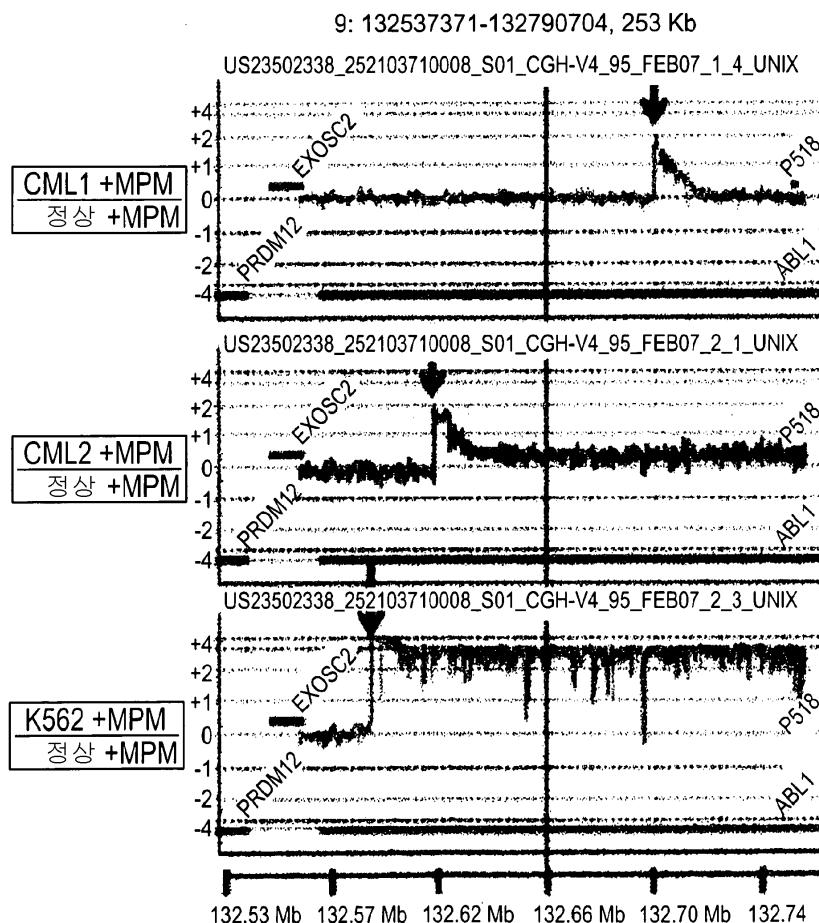


## 도면18a

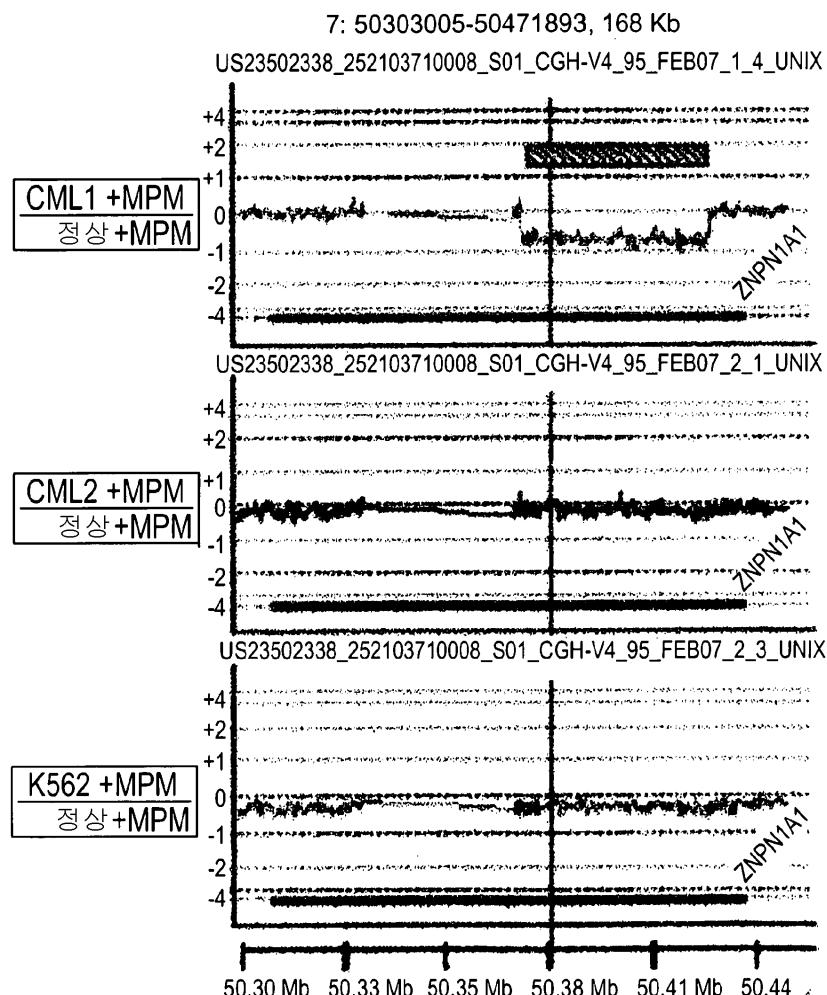
**t(9;22) / CML BCR (22q11) 에서의  
BCR-ABL 융합체**



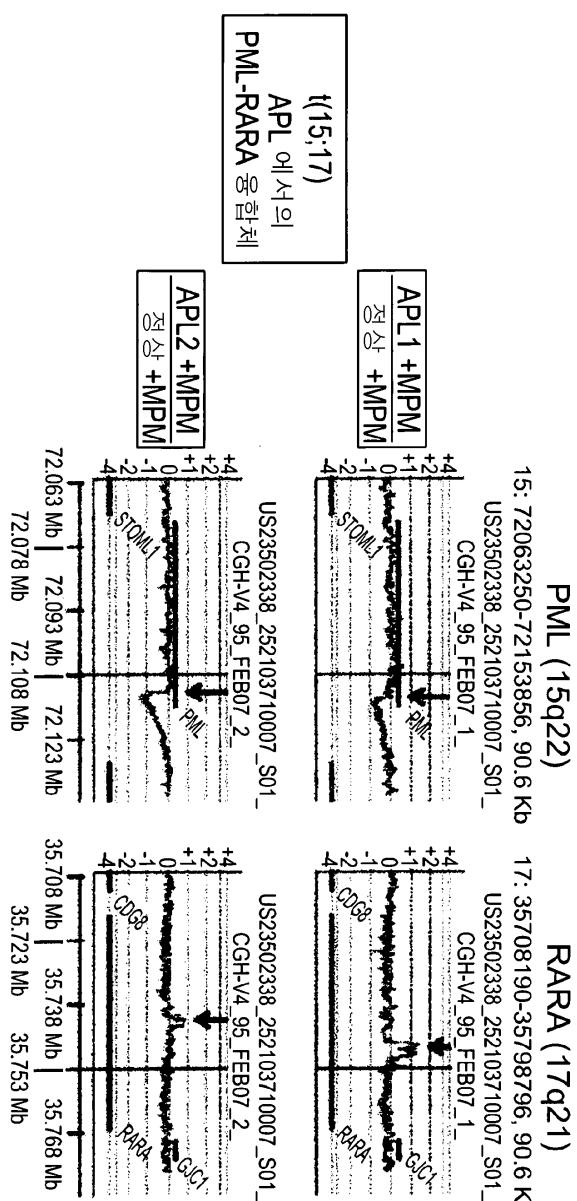
## 도면18b

t(9;22) / CML ABL (9q34) 에서의  
BCR-ABL 융합체

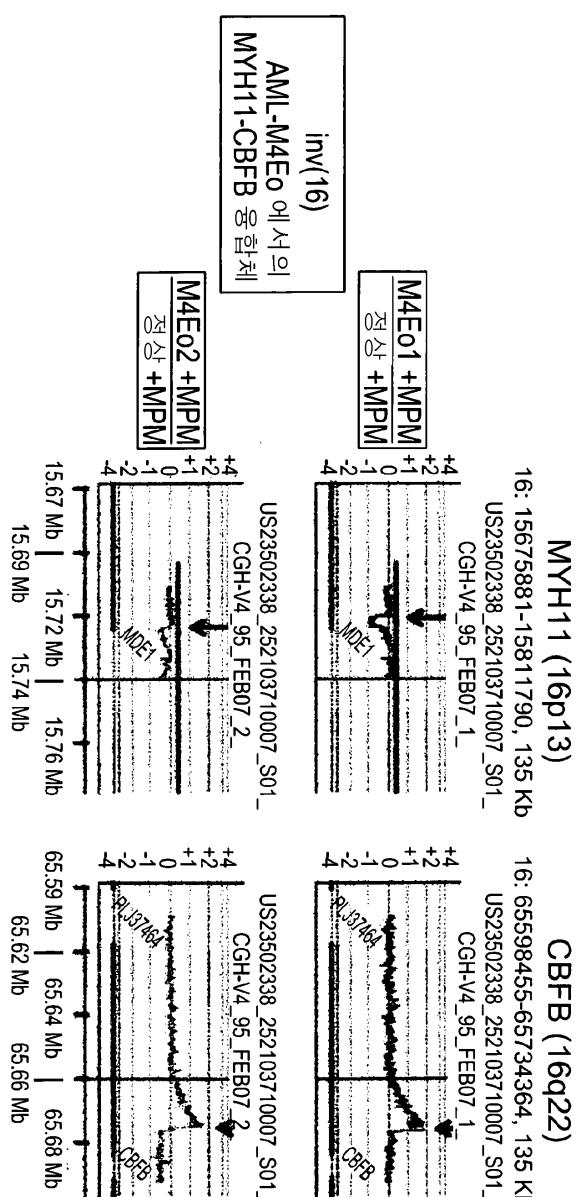
## 도면18c

t(9;22) / CML Ikaros (7p12) 에서의  
BCR-ABL fusions in 융합체

도면19a



도면19b



도면20

