



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월23일  
(11) 등록번호 10-2481242  
(24) 등록일자 2022년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6827 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6827 (2018.05)  
C12Q 2521/301 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7019088  
(22) 출원일자(국제) 2017년11월30일  
심사청구일자 2020년11월27일  
(85) 번역문제출일자 2019년07월01일  
(65) 공개번호 10-2019-0086569  
(43) 공개일자 2019년07월22일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2017/053615  
(87) 국제공개번호 WO 2018/100381  
국제공개일자 2018년06월07일  
(30) 우선권주장  
62/428,893 2016년12월01일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2012159025 A2\*  
WO2010036323 A1  
JP2011521633 A  
KR1020150034209 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
옥스포드 바이오다이나믹스 피엘씨  
영국, 옥스퍼드 2더블유비 옥스퍼드, 옥스퍼드 비  
즈니스 파크, 빌딩 3140  
(72) 발명자  
그랜드, 프란시스 헥터  
영국, 옥스포드 옥스포드셔 옥스1 2엔피, 보몬  
트 스트리트 26, 옥스포드 바이오다이나믹스 리미  
티드 내  
라마다스, 어로울 셀람  
영국, 옥스포드 옥스포드셔 옥스1 2엔피, 보몬  
트 스트리트 26, 옥스포드 바이오다이나믹스 리미  
티드 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 8 항

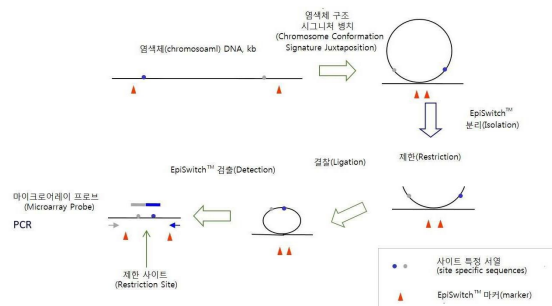
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 암 진단에서 후생적 염색체 상호 작용의 적용

(57) 요약

본 발명은 암에 대한 예후 동반 후생적 검사와 관련하여 후생적 염색체 상호작용을 결정하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/501 (2013.01)

C12Q 2523/101 (2013.01)

C12Q 2565/501 (2019.08)

(72) 발명자

**아쿨리츠체프, 알렉산드르**

영국, 옥스포드 옥스포드셔 오엑스1 2엔피, 보몬트  
스트리트 26, 옥스포드 바이오다이나믹스 리미티드  
내

**헌터, 이완**

영국, 옥스포드 옥스포드셔 오엑스1 2엔피, 보몬트  
스트리트 26, 옥스포드 바이오다이나믹스 리미티드  
내

## 명세서

## 청구범위

## 청구항 1

암에 대한 티로신 키나아제 억제제 치료(tyrosine kinase inhibitor therapy) 반응성에 관한 예후를 결정하는데 유용한 정보를 제공하기 위해, 유전자 FIP1L1, PDGFRA, Flt3, ABL1, FGFR1, cKIT 및 브루톤 티로신 키나아제(Bruton tyrosine kinase)중 하나 이상과 관련된 적어도 하나의 후생적 염색체 상호 작용의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서, 상기 염색체 상호 작용은 하기의 (i) 프로브 중 하나 또는 (ii) 프라이머 쌍 중 하나에 의해 정의되는 상호 작용으로부터 선택되는 방법:

(i) 하기 프로브 중 하나:

- (a) 5' -CTTATAGCCTGTCTCTTGTGATCGAGGTGCAACGAGCTGAGATTGC-3'
- (b) 5' -GGGCCAAGTGTGACTCTCAGGTTTTTCGACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGT-3'
- (c) 5' -TTGAGGACAAGGACCTCGAGATACTGCCGAGAAATCC-3'
- (d) 5' -TCACCCAGAATAAGGCTTCTCGATTCTAAGTTCTACAAGA-3'
- (e) 5' -AAACCCAGCAGCCCTGCCCAAGTCGAGGGAGCAGCTCCCCACCCAGCCC-3'
- (f) 5' -TATGCTTGTGGGACATCGACAAAAGCAATTATGC-3'
- (g) 5' -CCTCGGCGACAGAGTGAGACTCTGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'
- (h) 5' -ACTTTACTGTGTCCCATCACGTGTCGACAGAGTCTCACTCTGTCGCCGA-3'
- (i) 5' -GAGTTTCAGAAACCAAGAATGAGATCGAGTGATTGCTAGGTGATGGACCT-3'
- (j) 5' -GCTGGAGGATTGCTTGAGCTTGGGAGGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'
- (k) 5' -TCAGCAAGGACCTCGAAAAGATAAAACA-3'
- (l) 5' - ATTTATTCGAAAACCTGGGACCC-3'

또는

(ii) 하기 프라이머 쌍 중 하나:

- (m) TTCCACGTGGCCTACACAG 및 CAGCTGCGAGGTTTTCTTTT
- (n) TGGGAGTGGGTGGAGTGAGA 및 ACGGACTGACATCTTTAGCTTCC
- (o) GCAGCTGCGAGGTTTTCTTT 및 GCCATGTGGCTTGGGCATAC
- (p) AGTACTTCCTCTCCCTCCCA 및 GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTT
- (q) CCTCTCCACACAAACCTGCTA 및 ACATGGAGCACACATACAAGCTAC
- (r) AAATGATGAGGCACGGGTGAA 및 CATGGAGCACACATACAAGCTAC.

## 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 후생적 염색체 상호작용의 존재 또는 부존재를 검출하는 방법은 하기 단계를 포함하는 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 가교-결합된 핵산을 형성하기 위해 염색체 상호작용에 함께 모인 염색체 영역의 시험관 내(in vitro)에서 가교-결합하는 단계;
- (ii) 효소를 사용하여 상기 가교-결합된 산을 제한 소화 절단(restriction digestion cleavage)하는 단계;

- (iii) 상기 가교-결합 및 절단된 핵산 말단을 결합시켜 결합된 생성물을 형성하는 단계; 및
- (iv) 상기 결합된 생성물의 검출로, 상기 염색체 상호 작용의 존재 또는 부존재를 결정하는 단계.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 결합된 생성물은,

- 10 내지 1000 뉴클레오타이드 염기,
- 10 내지 800 뉴클레오타이드 염기,
- 10 내지 500 뉴클레오타이드 염기,
- 10 내지 100 뉴클레오타이드 염기,
- 10 내지 400 뉴클레오타이드 염기,
- 10 내지 500 뉴클레오타이드 염기,
- 200 내지 600 뉴클레오타이드 염기,
- 200 내지 800 뉴클레오타이드 염기, 또는
- 200 내지 1000 뉴클레오타이드 염기 길이의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 검출하는 단계는 정량적 PCR(quantitative PCR, qPCR) 동안 결합 부위(ligation site)에 결합하는 프로브 및 결합된 생성물을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 사용하는 정량적 PCR로 결합된 생성물의 특정 검출을 포함하며, 상기 프로브는 염색체 상호작용에서 함께 모인 각각의 염색체 영역으로부터 서열에 상보적인 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프로브는,

상기 결합된 생성물에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하고:

상기 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 공유결합으로 부착된 형광단(fluorophore),

상기 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 공유결합으로 부착된 소광제(quencher), 또는

상기 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 공유결합으로 부착된 형광단(fluorophore) 및 상기 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 공유결합으로 부착된 소광제(quencher)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제4항에 있어서, 상기 프로브는 10 내지 40 뉴클레오타이드 염기길이의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 암은 하기 기재된 것 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 특발성 호산구 증가증(idiopathic hypereosinophilic syndrome, iHES),
- (b) 만성 및 급성 호산성 백혈병(eosinophilic leukemias),
- (c) 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML)
- (d) PDGFRA 양성 비-소세포성 폐암(PDGFRA positive non-small cell lung carcinoma),
- (e) 다형성 신경 교아종(glioblastoma multiforme) 및 별아교세포종(astrocytoma)을 포함하는 교모세포종(glioblastoma).
- (f) 전립선암(prostate Cancer),
- (g) 진행성 난소암(advanced ovarian cancer),
- (h) 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumour, GIST).

#### 청구항 8

제4항에 있어서, PCR 반응 동안 활성화할 때 검출할 수 있는 프로브를 사용하여 결찰된 생성물을 정량적으로 검출하는 방법으로서,

상기 방법은 PCR 동안 상기 프로브에 상기 결찰된 서열을 접촉시키는 단계, 및 상기 프로브의 활성화 정도를 검출하는 단계를 포함하고,

상기 프로브는 상기 결찰 부위에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

## 청구항 18

삭제

## 청구항 19

삭제

## 청구항 20

삭제

## 청구항 21

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 염색체 상호작용 검출에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 세계 인구는 기술의 모든 양상, 특히 의학 분야에서 빨리 진행되고 효과적인 서비스를 기대할 정도로 성장하였다. 맞춤 치료법(personalised therapy)의 개선은 종종 단백질, mRNA, 항체 및 SNP 마커와 같은 바이오마커(biomarker)의 사용에 의존한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0003] 본 발명자들은 암의 예후에서 염색체 상호작용의 역할을 조사하였다. 이의 작업은 특정 염색체 상호작용이 치료법에 대한 반응과 같이 특별한 결과와 관련되어 있다는 것을 나타낸다. 이러한 작업의 한 부분으로서, 본 발명자들은 염색체 상호작용을 검출하는 과정에서 생성된, 결합된 핵산(ligated nucleic acids)의 검출에 특히 적합한 새로운 후생적 검사 분석(epigenetic test assay)을 또한 개발하였다.

[0004] 따라서, 본 발명은 서브 그룹들 사이를 구별하는 암에 대한 예후 동반 후생적 검사와 관련되는 후생적 염색체 상호작용을 결정하는 방법을 제공하는 것으로서, 서브 그룹으로부터 제1 핵산 세트를 염색체 상호작용의 인덱스 개체군을 나타내는 제2 핵산 세트와 접촉시키는 단계 및 상보적인 서열을 하이브리드화하도록 하는 단계를 포함하며, 상기 제1 핵산 세트 및 제2 핵산 세트에서의 핵산은 후생적 염색체 상호 작용에 함께 모인 염색체 영역의 두 가지 모두로부터의 서열을 포함하는 결합된 생성물(ligated product)을 나타내고, 상기 제1 핵산 세트 및 제2 핵산 세트 사이에서 하이브리드화의 패턴은 후생적 염색체 상호작용이 상기 개체군 내의 서브 그룹에 특이적 인지를 결정할 수 있게 하며, 상기 서브 그룹은 예후와 관련된 적어도 하나 이상의 특성이 상이하다. 전형적으로, 상기 서브그룹은 티로신 키나아제 치료법에 대한 반응성이 상이하고/하거나, 상기 암은 키나아제 유전자 및/또는 티로신 키나아제 수용체 유전자의 비-정상적 발현과 관련되어 있고/있거나, 상기 암은 하기 유전자 중 하나 이상에서 유전적 또는 후생적 유전자 변화와 관련되어 있다: FIP1L1, PDGFRA, Flt3, ABL1, FGFR1 및 cKIT.

[0005] 본 발명은 암의 예후를 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 (a) 상기의 방법으로 확인된 염색체 상호작용을 타이핑하는 단계, 및/또는 (b) (i) 티로신 키나아제 억제제 치료법에 대한 반응성, 및/또는 (ii) 키나아제 유전자 및/또는 티로신 키나아제 수용체 유전자로부터 비정상적인 발현, 및/또는 (iii) FIP1L1, PDGFRA, Flt3, ABL1, FGFR1, cKIT 중 하나 이상의 유전자에 관련한 적어도 하나 이상의 후생적 염색체 상호작용의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0006] 본 발명은 PCR 반응 동안 활성화시 검출가능한 프로브를 사용하여 염색체 상호작용과 관련하여 결합된 서열을 정량적으로 검출하는 방법을 추가로 제공하며, 상기 결합된 서열은 후생적 염색체 상호작용에서 함께 모인 두 개 염색체 영역으로부터 서열을 포함하고, 상기 방법은 PCR 반응 동안 상기 프로브에 결합된 서열을 접촉시키는 단계, 및 상기 프로브의 활성 정도를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 프로브는 상기 결합 사이트에 결합한다.

상기 방법은 이중 라벨링된 형광 가수분해 프로브를 사용하는 MIQE 준수 방식으로 특정 상호작용을 검출할 수 있다.

[0007] 본원의 작업은 종양학적 상황에서 예후를 결정하기 위한 MIQE 준수 염색체 구조(MIQE compliant chromosome conformation, 3C) 분석을 첫 번째로 업계에 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 특정한 이상 프로세스, 특히 강력한 정량 검사(robust quantitative test)를 확인하는 것에 관한 것이다.

[0009] 본 발명은 몇 가지 상이한 양태를 가지며, 다음을 포함한다:

[0010] - 상이한 서브그룹에 관한 후생적 염색체 상호작용을 확인하는 방법

[0011] - 개체의 서브그룹을 확인하는 방법

[0012] - 염색체 상호작용에 관련된 결찰된 서열을 정량적으로 검출하는 방법

[0013] - 프로브가 결찰된 핵산의 결찰 사이트에 결합하는 곳에서 PCR 반응 동안 활성화 검출할 수 있는 가수분해 프로브

[0014] - PCR 반응에서 사용하기 위한 프로브 및 프라이머를 선택하는 방법

[0015] - 암을 치료하는 방법

[0016] - 암을 치료하는데 사용하기 위한 핵산

[0017] - 치료제를 확인하는 방법.

### 본 발명과 관련된 암

[0019] 본 발명은 암, 예를 들어, 효소(DNA의 디메틸화(demethylation)에 책임이 있는 것을 포함)에서 돌연변이와 같은 상이한 유전적 메커니즘에 의해 야기되거나, 다른 유전자 스플라이싱(splicing) 또는 중단점 돌연변이(break point mutation)로 야기되는 암과 관련된 후생적 상호작용에 관한 것이다. 상기 암은 수용체의 상향 조절에 의해 야기될 수 있다. 상기 암은 키나아제 유전자 및/또는 티로신 키나아제 수용체 유전자, 예를 들어 세포질 키나아제 유전자 및/또는 세린/트레오닌 키나아제 유전자로부터 비정상적인 발현에 관한 것일 수 있다. 상기 암은 FIP1L1, PDGFRA, Flt3, ABL1, FGFR1 및 cKIT. 유전자 중 하나 이상에서 유전적 또는 후생적 변화와 관련될 수 있다. 상기 암은 ATP 모방체(mimetics), 선택적으로는 ABL1, 브루톤의 티로신 키나아제(Bruton's Tyrosine Kinase), cKIT, FGFR1, PDGFRA 및 PDGFRB와 같은 티로신 키나아제 유전자에 민감한 단백질에서 유전적 후생적 변화와 관련될 수 있다. 티로신 키나아제 유전자(ABL1, Brutons, cKIT, FGFR1, 및 PDGFRA)는 기능적으로 발현될 때 '종양유전자(oncogene)'로 빈번하게 분류된다. ATP 모방체에 민감한 단백질에서 유전적 또는 후생적 변화는 ATP 모방체에 민감한 단백질의 상향조절을 야기하는 유전자의 발현에서 변화를 야기할 수 있다. 예를 들어, FIP1L1은 PDGFRA mRNA 발현을 직접적으로 상향 조절한다고 생각된다.

[0020] 상기 암은 백혈병, 골수증식성 신생물(myeloproliferative neoplasm), 종양, 폐암 또는 난소암일 수 있다. 상기 암은 호산구 과다 증후군(idiopathic hypereosinophilic syndrome, iHES), 만성 및 급성 호산구 백혈병(eosinophilic leukemias), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 급성 림프구성 백혈병(Acute Lymphocytic Leukemia, ALL), PDGFRA-양성 비-소세포성 폐암(PDGFRA-positive non-small cell lung carcinoma (NSCLC)), 교모세포종(glioblastoma) (다형성 신경 교아종(glioblastoma multiforme) 및 별아교세포종(astrocytoma) 포함), 전립선암(prostate cancer), 진행성 난소암(advanced ovarian cancer), 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumour, GIST) 및 신장암(renal cell carcinoma)으로부터 선택될 수 있다.

### 타이핑된(typed) 염색체 상호작용

[0022] 본 발명은 염색체 상호작용의 타이핑, 예를 들어 암 및/또는 티로신 키나아제 억제제 치료법에 대한 반응성과 관련된 것에 관한 것이다. 상기 염색체 상호작용은 본원에 기재된 임의의 질환 조건 중, 질환의 양상에 영향을 미치거나 관련될 수 있다. 상기 염색체 상호작용은 질환에 대한 감수성, 치료법에 대한 반응성 또는 재발 가능성에 영향을 미치거나 관련될 수 있다. 상기 염색체 상호작용은 환자에 대한 예후 및/또는 환자의 서브그룹에

대한 예후에 영향을 미치거나 관련될 수 있다. 특정 염색체 상호작용, 유전자 및 영역이 본원에 기재되며, 하나의 실시양태에서, 이들 염색체 상호작용 또는 이들 유전자 및 영역에서 염색체 상호작용은 타이핑될 수 있다. 바람직한 영역은 표 1a의 범위로 기재되어 있다. 특정 결찰된 서열이 본원에 기재되어 있다. 상기 염색체 상호작용의 타이핑은 결찰된 서열 또는 동족체(homologues) 및/또는 이의 단편의 검출을 요구할 수 있다.

[0023] 바람직한 염색체 상호작용, 유전자 및 영역(게놈 위치)은 표 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 및 14를 포함하는 표에 나타난다. 또한 바람직한 염색체 상호작용은 본원에 기재된 임의의 핵산, 예를 들어 프로브 또는 프라이머 쌍을 사용하여 정의되거나 검출될 수 있다.

[0024] 타이핑된 염색체 상호작용은 유전자(코딩 서열을 포함) 및 프로모터(promoter)와 같은 이의 조절 영역 사이에서 발생하는 것일 수 있거나 아닐 수도 있다.

[0025] 염색체 상호작용은 유전자의 조절 억제(deregulation), 예를 들어 인핸서(enhancer)에서의 활성의 변화(증가 또는 감소)와 관련될 수 있다. 상기 염색체 상호작용은 융합 게놈(염색체) 생성물(변경된 활성을 갖는 융합 단백질의 발현을 야기할 수 있거나 야기하지 않을 수도 있음)을 야기하는 중단점 돌연변이 (breakpoint mutation)와 같은 돌연변이와 관련될 수 있다.

[0026] 상기 중단점 돌연변이는 다음과 같을 수 있다:

[0027] - 본원에 기재된 임의의 돌연변이,

[0028] - 본원에 기재된 임의의 유전자 내에, 유전자에 걸쳐서(spanning) 또는 유전자를 포함하는 돌연변이, 또는

[0029] - 암과 관련되거나 유발하는 중단점 돌연변이.

[0030] 상기 중단점 돌연변이는 적어도 1,000개 이상의 뉴클레오티드, 10,000개 이상의 뉴클레오티드, 50,000개 이상의 뉴클레오티드, 500,000개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어 적어도 800,000개 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 이는 결실된 단편의 길이를 나타낸다.

#### [0031] 예후(Prognosis)

[0032] 본원에서 사용된 예후는 하나 이상의 결과와 같이, 의학적 상태의 가능성 있는 경로를 예측하는 것에 관련한 것이다. 예후 인자(prognostic factor)는 객관적으로 측정할 수 있고, 예를 들어 치료받거나 치료받지 않은 개체에서 암 질환의 가능성 있는 결과에 대한 정보를 제공하는 임상적 또는 생물학적 특성이다. 예측 인자(predictive factor)는 치료(treatment)로부터 가능성 있는 이점(예를 들어, 종양 수축(shrinkage) 또는 생존에 관한 것)에 대한 정보를 제공할 수 있다. 그러한 예측 인자는 주어진 치료법으로부터 가장 가능성 있는 이점인 환자의 서브개체군을 확인하는데 사용될 수 있다. 마커(marker)는 예후와 관련된 특성을 가질 수 있을 뿐만 아니라 치료로부터 가능성 있는 이점을 예측할 수 있다.

#### [0033] 키나아제(Kinases)

[0034] 본 발명은 키나아제 유전자 또는 키나아제 수용체 유전자의 변화, 예를 들어, 발현의 변화 및/또는 후생적 형성의 변화 및/또는 유전적(게놈 서열) 변화와 관련될 수 있으며, 이는 암과 관련되어 있고/있거나 암을 유발할 수 있다. 그러므로, 전형적으로 상기 암은 키나아제 유전자 및/또는 티로신 키나아제 수용체의 비정상적인 발현과 관련될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 암은 세포질 티로신 키나아제(예를 들어, ABL1) 및/또는 세포질 키나아제(예를 들어, 세린/트레오닌 키나아제)의 비정상적인 발현과 관련된다. 상기 용어 ‘비정상적인 발현(abnormal expression)’은 상향-조절(up-regulation) 또는 하향-조절(down-regulation)을 포함할 수 있거나 다른 단백질의 발현을 포함할 수 있다.

[0035] 이 문맥에서 ‘키나아제(kinase)’는 ATP가 다른 단백질, 핵, 세포질 또는 세포막, 또는 세포외 위치를 포함하는 임의의 다른 세포 위치로 전달되는 동안 구조적 변화를 겪는 것과 같이 기능적으로 정의될 수 있다. 상기 키나아제 패밀리(kinase family)의 예는 세포 표면에 있는 수용체 티로신 키나아제(예를 들어, PDGFRA), 및 세포질 티로신 키나아제(예를 들어, ABL1) 및 세린/트레오닌 키나아제와 같은 비-수용체 키나아제(non-receptor kinases)를 포함하는 것과 관련이 있다.

#### [0036] 후생적 상호작용(Epigenetic Interactions)

[0037] 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어 ‘후생적(epigenetic)’ 상호작용은 전형적으로 염색체 상에서 말단 영역(distal region) 사이에서 상호작용을 의미하며, 하나의 실시양태에서 상기 상호작용은 역동적이고 염색체의



영역의 상태에 따라 변형(altering), 형성(forming), 또는 파괴(breaking)된다.

[0038] 특히 본 발명의 방법에서, 염색체 상호작용은 상호작용의 부분인 염색체의 두 개 영역으로부터의 서열을 포함하는 결합된 핵산을 먼저 형성함으로써 검출된다. 이러한 방법에서, 상기 영역은 임의의 적절한 수단에 의해 가교-결합될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 상호작용은 포름알데히드를 사용하여 가교-결합되나, 임의의 알데하이드 또는 D-바이오틴노일-e-아미노카프로익 산-N-하이드록시숙신이미드 에스테르(D-Biotinoyl-e-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester) 또는 디고옥시제닌-3-O-메틸카르보닐-e-아미노카프로익 산-N-하이드록시숙신이미드 에스테르(Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-e-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester)에 의해 가교-결합될 수 있다. 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)가 사용될 수 있으며 4 옹스트롬(Angstroms) 떨어진 DNA 사슬을 가교 결합시킬 수 있다.

[0039] 염색체 상호작용은 예를 들어, 생리학적 조건의 변화에 반응하여 전사되거나 억제되는 경우에 상기 염색체의 영역의 상태를 반영할 수 있다. 본원에 정의된 바와 같이 서브그룹에 특이적인 염색체 상호작용은 안정적인 것으로 밝혀졌으며, 따라서 상기 두 개 서브그룹 사이의 차이점을 측정하는 것의 신뢰할 수 있는 수단을 제공한다.

[0040] 또한, 특성(질병 조건과 같이)에 특이적인 염색체 상호작용은 예를 들어 메틸화 또는 히스톤 단백질에 결합에 대한 변화와 같은 다른 후생적 마커와 비교하여 일반적으로 생물학적 프로세스 초기에 발생한다. 따라서 본 발명의 방법은 생물학적 프로세스의 초기 단계를 검출할 수 있다. 이는 더 효과적인 결과일 수 있는 초기 개입(예를 들어, 치료)을 허용한다. 그러므로, 동일한 서브그룹 내에서 개체들 사이의 관련 염색체 상호작용에는 거의 변화가 없다.

#### [0041] 후생적 상호작용의 위치 및 원인

[0042] 후생적 염색체 상호작용은 인코딩 관련 또는 기재되지 않은 유전자를 나타내는 염색체의 영역을 포함하거나 중첩될 수 있으나, 동등하게 유전자 사이의 영역에 있을 수 있다. 본 발명에서 검출된 염색체 상호작용은 환경적인 요인, DNA 메틸화, 비-코딩 안티센스 RNA 전사체(non-coding antisense RNA transcripts), 비-돌연변이성 발암원(non-mutagenic carcinogens), 히스톤 변형, 염색질 재구성(chromatin remodelling) 및 특정 로컬 DNA 상호작용에 의하여, 근본적인 DNA 서열의 변화에 의해 야기될 수 있다. 동일한 염색체 상호작용은 상이한 대상(subject)에서 상이한 요인에 의해 유발될 수 있다. 예를 들어, 특정 염색체 상호작용은 예를 들어, 상기 상호작용이 관찰된 염색체의 상이한 영역에서 IDH의 돌연변이로 인한 DNA 메틸화의 변화에 의해 유발될 수 있다. 동일한 염색체 상호작용은 근본적인 서열의 변화, 예를 들어 상기 상호작용이 관찰된 염색체의 동일한 영역에서의 결실에 의해 유발될 수 있다.

[0043] 염색체 상호작용을 야기하는 변화는 근본적인 핵산 서열에 대한 변화에 의해 유발될 수 있으며, 그 자체가 유전자 생성물 또는 유전자 발현의 모드(mode)에 직접적으로 영향을 미치지 않는다. 그러한 변화는 예를 들어, 유전자의 내부 및/또는 외부의 SNP, 유전자 융합 및/또는 유전자 간 DNA, 마이크로 RNA, 및 비-코딩 RNA의 결실일 수 있다. 예를 들어, 이는 거의 20%의 SNP는 비-코딩 영역에 있는 것으로 알려져 있으므로, 상기 기재된 바와 같은 방법은 비-코딩 상황에서 또한 유용하다. 상기 상호작용을 형성하기 위해 모인 염색체의 영역은 동일한 염색체에서 5 kb, 3 kb, 1 kb, 500 염기쌍 또는 200 염기쌍 미만으로 떨어져 있을 수 있다. 상호 작용을 형성하기 위해 모인 염색체의 영역은 동일한 염색체에서 5 kb, 10 kb, 50 kb, 100 kb, 200kb, 500kb, 또는 800 kb 이상 떨어져 있을 수 있으며, 예를 들어 900 kb 내지 1,000 kb와 같이 800 kb 내지 1,200 kb 떨어져 있을 수 있다. 본원에 기재된 임의의 상기 값 및 범위는 정상 염색체(중단점 돌연변이 없음) 또는 중단점 돌연변이를 갖는 염색체를 의미할 수 있다.

[0044] 상기 검출된 염색체 상호작용은 바람직하게는 본원에 기재된 임의의 유전자 내에 존재한다. 그러나, 이는 상기 유전자의 상류 또는 하류, 예를 들어, 상기 유전자 또는 상기 코딩 서열로부터 최대 50,000, 최대 30,000, 최대 20,000, 최대 10,000 또는 최대 5,000 염기 상류 또는 하류에 있을 수 있다.

#### [0045] 임상적 상황의 유형(Types of Clinical Situation)

[0046] 본 발명의 목적은 개체군 내의 서브그룹을 정의하는 특성과 관련된 염색체 상호작용의 검출을 허용하는 것이다. 예를 들어 이러한 기술은 특이적 표현형(예를 들어, 임상적 조건과 관련됨)에 대한, 즉, 특정 염색체 형태 시그니처(chromosome conformation signature) 및/또는 특정 시그니처에서의 변화를 인식하는 것으로서 바이오마커를 기반으로 한 계층화(stratification)를 허용한다. 상기 서브그룹을 정의하는 특성은 암에 대한 예후와 관련이 있다. 본 발명의 방법은 치료에 대한 반응성, 가장 효과적인 치료법/약물의 식별, 질병 경과 모니터링, 질병 경향(predisposition)의 확인, 잔여 질병의 존재의 확인 및/또는 재발 가능성과 같은 질병에 관한 특이적 특

성의 문맥에서 사용될 수 있다. 그러므로, 상기 방법은 특이적 조건의 존재를 진단하기 위해 사용될 수 있거나 사용되지 않을 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 예를 들어 진행중인 방식으로 치료에 대한 반응을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 질병의 매커니즘이 알려지지 않은, 명백하지 않은 또는 복잡한 유전자 좌위를 타이핑하는데 사용될 수 있다. 염색체 상호작용의 검출은 조절의 상이한 수준에서 변화를 따르는 효과적인 방법을 제공하며, 그 중 몇몇은 복잡적이다. 예를 들어, 몇몇 케이스에서 약 37,000 비-코딩 RNA가 단일 충격(single impulse)에 의해 활성화될 수 있다.

[0047] **예후와 관련된 특성**

[0048] 특성은 티로신 키나아제 억제제 치료법에 대한 반응성일 수 있다. 상기 특성은 키나아제 유전자 및/또는 티로신 키나아제 유전자의 비정상적인 발현일 수 있고, 예를 들어 상기 특성은 티로신 키나아제 발현의 상향조절일 수 있다. 암의 예후와 관련이 있는 것으로 알려진 키나아제는 세포 표면에 존재하는 수용체 티로신 키나아제(예를 들어, PDGFRA), 비-수용체 키나아제, 세포질 티로신 키나아제(예를 들어, ABL1) 및 세린/트레오닌 키나아제를 포함한다. 상기 특성은 공지된 억제제, 예를 들어, 티로신 키나아제 억제제에 대해 반응하는 유전자 생성물에 반응하거나 인코딩하는 키나아제 유전자의 비정상적인 발현일 수 있다. 상기 특성은 티로신 키나아제 억제제에 대하여 반응하는 유전자 생성물에 반응하거나 인코딩하는 유전자에서 유전적 또는 후생적 변화일 수 있다. 상기 특성은 FIP1L1, PDGFRA, Flt3, ABL1, FGFR1 및 cKIT 중 하나 이상의 유전자에서 유전적 또는 후생적 변화일 수 있다.

[0049] 상기 특성은 ATP 모방체인 약물에 대한 반응성일 수 있다. 티로신 키나아제 유전자(예를 들어, ABL1, 브루톤(Bruton), cKIT, FGFR1, PDGFRA 및 PDGFRB)는 ATP 모방체에 민감성인 단백질을 인코딩한다.

[0050] 상기 특성은 특이적 치료 및/또는 예방(특히, 특이적 약학적 치료 및/또는 예방)에 대한 반응성일 수 있고, 예를 들어 티로신 키나아제 억제제, 선택적으로는 상기 약물은 수용체 티로신 키나아제, 예를 들어 PDGFRA, 바람직하게는 다사티닙(Dasatinib), 크레놀라닙(Crenolanib), 도비티닙(dovitinib) 및 이마티닙(Imatinib)을 포함하는 그룹으로부터 하나 이상을 표적으로 하는 것으로 공지되어 있다. 상기 티로신 키나아제 억제제는 세디라닙(Cediranib), 크레놀라닙(Crenolanib), 다사티닙(Dasatinib (Sprycel)); 도비티닙(Dovitinib), 이마티닙(Imatinib (Gleevec)); IMC-3G3 (올라라투맷(Olaratumab), LY3012207) 라트루보(Lartruvo)(PDGFRA); 마시티닙(Masitinib (AB1010)), 닐로티닙(Nilotinib (Tasigna)); 파조파닙(Pazopanib); PKC412 (미도스타우린(midostaurin), CGP41251); 퀴자티닙(Quizartinib); 레고라페닙(Regorafenib); 소라페닙(Sorafenib (Nexavar)); 서니티닙(Sunitinib (Sutent)); 바타라닙(Vatalanib); S116836일 수 있다. 상기 특성은 특이적 조건에 대한 경향, 선택적으로는 과다호산구증가증(hypereosinophilia)일 수 있다.

[0051] **서브그룹 및 개별적인 치료(Subgroups and Personalised Treatment)**

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, ‘서브그룹(subgroup)’은 바람직하게는 개체군 서브그룹(개체군에서 서브그룹), 보다 바람직하게는 특정 동물의 개체군, 예를 들어 특정 진핵생물 또는 포유동물(예를 들어, 인간, 비-인간, 비-인간 영장류, 또는 설치류, 예를 들어 마우스(mouse) 또는 랫(rat))을 의미한다. 가장 바람직하게는, ‘서브그룹(subgroup)’은 인간 개체군에서 서브그룹을 의미한다.

[0053] 본 발명은 개체군 내에서 특정 서브그룹을 검출하는 것 및 치료하는 것을 포함한다. 그러한 서브그룹 내에서, 본원에서 논의된 특성(치료에 대한 반응성과 같은)은 존재 또는 부존재일 것이다. 염색체 상에서 후생적 상호작용 차이점은 일반적으로 말하면, 계층 수준에서 존재하는 구조적인 차이이다. 본 발명은 주어진 개체군 내에서 부분 집합(예를 들어, 두 개 또는 적어도 두 개 이상의 부분 집합) 사이에서 상이하다는 것을 발견하였다. 이러한 차이점을 확인하는 것은 의사는 그들의 환자를 상기 방법에 기재된 바와 같이 개체군의 하나의 부분 집합의 부분으로서 분류할 수 있다. 본 발명은 의사가 환자의 후생적 염색체 상호작용을 기반으로 환자에 대하여 약을 개별화하는 방법을 제공하고, 대안적으로 특히 예후가 상기 서브그룹의 부분으로서 확인된 결과로 영향을 받는 환자의 서브그룹에 대하여 보다 효과적인 치료 요법을 제공한다.

[0054] 전형적으로 서브그룹은 개체군의 적어도 1%, 5%, 10%, 30%, 50% 또는 80% 이상일 수 있다. 상기 개체군은 일반적인 개체군일 수 있다.

[0055] 상기 개체군은 암 환자의 그룹일 수 있으며, 상기 암은 선택적으로 다음 암 중 임의의 하나일 수 있다: iHES, 만성 및 급성 호산성 백혈병(chronic and acute eosinophilic leukemias), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 급성 림프구성 백혈병(Acute Lymphocytic Leukemia, ALL), PDGFRA-양성 비-소세포성 폐암(PDGFRA-positive non-small cell lung carcinoma

(NSCLC)), 다형성 신경 교아종(glioblastoma multiforme) 및 별아교세포종(astrocytoma)을 포함하는 교모세포종(glioblastoma), 전립선암(prostate Cancer), 진행성 난소암(advanced ovarian cancer), 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumour, GIST) 및 신장암(renal cell carcinoma). 하나 이상의 서브그룹은 상기 열거된 암 중 임의의 것을 가질 수 있고, 암에 대한 예후를 결정하는 방법은 상기 암 중 임의의 것을 가진 대상에서 수행될 수 있다.

[0056] **결찰된 핵산 생산(Generating Ligated Nucleic Acids)**

[0057] 본 발명의 특정 실시양태는 결찰된 핵산, 특히 결찰된 DNA를 이용한다. 이들은 염색체 상호작용에서 함께 모인 영역 모두의 서열을 포함하므로, 상기 상호작용에 대한 정보를 제공한다. 본원에 기재된 EpiSwitch™ 방법은 염색체 상호작용을 검출하기 위해 그러한 결찰된 핵산의 생산을 사용한다.

[0058] 따라서, 본 발명의 방법은 결찰된 핵산(예를 들어, DNA)을 생성하는 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0059] (i) 염색체 유전자 좌위에 존재하는 후생적 염색체 상호작용의 생체 외(in vitro)에서 가교-결합하는 단계;

[0060] (ii) 상기 염색체 유전자 좌위로부터 선택적으로 상기 가교-결합된 DNA를 분리하는 단계;

[0061] (iii) 상기 가교-결합된 DNA를, 예를 들어 적어도 한번 이상 절단하는 효소(특히 상기 염색체 유전자 좌위 내에서 적어도 한번 이상 절단하는 효소)로 제한효소 분해(restriction digestion)에 의해 절단하는 단계;

[0062] (iv) 상기 가교-결합 및 절단된(cleaved) DNA 말단(특히 DNA 루프(loop)를 형성)을 결찰시키는 단계; 및

[0063] (v) 특히 PCR(polymerase chain reaction)과 같은 기술을 사용하여, 상기 결찰된 DNA 및/또는 상기 DNA 루프의 존재를 확인하여, 특이적 염색체 상호작용의 존재를 확인하는 단계.

[0064] PCR은 상기 결찰된 핵산을 검출 또는 확인하는데 사용될 수 있고, 예를 들어 상기 생성된 PCR 생성물의 크기는 존재하는 특이적 염색체 상호작용을 나타낼 수 있으며, 상기 유전자 좌위의 상태를 확인하는데 사용될 수 있다. 당업자는 관심 있는 염색체 유전자 좌위 내에서 DNA를 절단하는데 사용될 수 있는 수많은 제한 효소를 인식할 것이다. 상기 사용된 특정 효소는 상기 연구된 유전자 좌위 및 그 안에 위치한 DNA의 서열에 의존할 것이 명백할 것이다. 본 발명에 기재된 바와 같이 DNA를 절단하는데 사용될 수 있는 제한 효소의 비-제한적인 실시예는 Taq I 이다.

[0065] **EpiSwitch™ 기술과 같은 실시양태**

[0066] EpiSwitch™ 기술은 표현형에 대하여 특이적인 후생적 염색체 형태의 검출에서 마이크로 어레이 EpiSwitch™ 마커의 사용과 관련이 있다. 본원에 기재된 방식으로 결찰된 핵산을 이용하는 EpiSwitch™ 과 같은 실시양태는 몇 가지 장점을 갖는다. 예를 들어 본 발명의 제1 핵산 세트로부터의 핵산 서열은 제2 핵산 세트와 하이브리드화 또는 하이브리드화 실패로 인하여, 이들은 스토캐스틱 노이즈(stochastic noise)의 낮은 수준을 갖는다. 이것은 후생적 수준에서 복합 메커니즘을 측정하는 상대적으로 간단한 방법을 허용하는 바이너리 결과(binary result)를 제공한다. EpiSwitch™ 기술은 또한 빠른 프로세싱 시간 및 낮은 비용을 갖는다. 하나의 실시양태에서 상기 프로세싱 시간은 3 내지 6시간이다.

[0067] **샘플 및 샘플 치료**

[0068] 샘플은 상기 개체의 DNA를 함유한다. 이는 일반적으로 세포를 함유할 것이다. 하나의 실시양태에서, 샘플은 최소한으로 침습 수단으로 획득되며 예를 들어 혈액일 수 있다. DNA는 추출되어, 표준 제한 효소로 절단할 수 있다. 염색체 구조가 유지될 수 있고 EpiSwitch™ 플랫폼으로 검출될 수 있는 지를 미리 결정할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 샘플은 환자로부터 이전에 획득된 혈액 샘플이며, 상기 기재된 방법은 상기 절차가 최소한으로 침습이기 때문에 장점이다. 수평적 이동을 포함하는 조직 및 혈액 사이에서 염색체 상호작용의 동기화로 인해, 혈액 샘플은 질병에 관련된 조직과 같은 조직에서 염색체 상호작용을 검출하는데 사용될 수 있다. 암과 같은 특정 조건의 경우, 돌연변이로 인한 유전적 노이즈(genetic noise)는 관련 조직에서 상기 염색체 상호작용 ‘신호(signal)’에 영향을 미칠 수 있으며 혈액을 사용하는 것이 장점이다.

[0069] **본 발명에 관한 핵산의 특성(properties)**

[0070] 본 발명의 실시양태에서 제조되거나 검출된 핵산은 본원에서 언급된 제1 및 제2 핵산과 동일하거나 임의의 특성

을 가질 수 있다. 본 발명의 핵산은 전형적으로 상기 염색체 상호작용에서 함께 모이는 염색체의 두 개 영역 중 하나의 서열을 포함하는 각각 두 개 부위를 포함한다. 전형적으로 각 부위는 적어도 8개, 10개, 15개, 20개 또는 40개 이상의 뉴클레오티드 길이, 예를 들어 10 내지 40개 뉴클레오티드 길이이다. 바람직한 핵산은 임의의 표에 기재된 임의의 유전자의 서열을 포함한다. 바람직한 핵산은 본원에 기재된 임의의 특이적 프로브 또는 프라이머 서열을 결합시킨다. 바람직하게는, 상기 핵산은 DNA이다. 특이적 서열이 정의되는 경우, 본 발명은 특정 실시양태에서 요구된 바와 같이 상보적 서열을 사용할 수 있는 것으로 이해된다.

## [0071] 제2 핵산 세트 - '인덱스(Index)' 서열

[0072] 핵산 서열의 제2 세트는 인덱스(index) 서열 세트의 기능을 가지며, 필수적으로 서브 그룹 특이적 서열을 확인하는데 적절한 핵산 서열 세트이다. 그들은 '배경(background)' 염색체 상호작용을 나타낼 수 있으며 몇몇 방식으로 선택되거나 선택되지 않을 수 있다. 그들은 일반적으로 가능한 모든 염색체 상호작용의 부분 집합이다.

[0073] 상기 제2 핵산 세트는 임의의 적절한 방법에 의해 유도될 수 있다. 그들은 계산적으로 유도될 수 있거나 개체에서 염색체 상호작용을 기반으로 할 수 있다. 그들은 전형적으로 제1 핵산 세트보다 더 큰 개체군 그룹을 나타낸다. 하나의 특정 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 본원에 기재된 개체군에서 나타난 가능한 모든 후생적 염색체 상호작용의 큰 개체군을 나타낸다. 하나의 특정 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 적어도 20개, 50개, 100개 또는 500개 이상의 유전자, 예를 들어 20 내지 100개 유전자 또는 50 내지 500개 유전자에서 후생적 염색체 상호작용의 적어도 50% 이상 또는 적어도 80% 이상을 나타낸다.

[0074] 상기 제2 핵산 세트는 선택적으로 변경, 조절 또는 개체군에서 질병 상태/표현형을 임의의 방식으로 조정하는 적어도 100개 이상의 가능한 후생적 염색체 상호작용을 전형적으로 나타낸다. 상기 제2 핵산 세트는, 예를 들어, 사이토카인(cytokine), 키나아제(kinase)를 인코딩하는 핵산 서열 또는 임의의 질병 상태, 질병에 대한 경향 또는 질병 표현형과 관련 있는 조절제를 포함하는 종(species)에서 질병의 조건에 영향을 미치는 염색체 상호작용을 나타낼 수 있다. 상기 제2 핵산 세트는 전형적으로 상기 서브그룹을 정의하는 특성과 관련이 없거나 관련 있는 후생적 염색체를 나타내는 서열을 포함한다.

[0075] 하나의 특정 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 개체군에서 자연적으로 발생한 서열로부터 적어도 부분적으로 유도되며, 전형적으로 인 실리코(in silico) 방법으로 획득된다. 상기 핵산은 자연적으로 발생한 핵산에서 존재하는 핵산의 상응하는 부위와 비교하여 단일 또는 다중 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다. 돌연변이는 하나 이상의 뉴클레오티드 염기쌍의 결실(deletion), 치환(substitutions) 및/또는 첨가(addition)를 포함한다. 하나의 특정 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 자연적으로 발생하는 종에 존재하는 핵산의 상응하는 부위에 대하여 적어도 70% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 상동체(homologue) 및/또는 상동유전자(orthologue)를 나타내는 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정 실시양태에서, 자연적으로 발생하는 종에서 존재하는 핵산의 상응하는 부위와 적어도 80% 이상의 서열 동일성 또는 적어도 90% 이상의 서열 동일성이 제공된다.

## [0076] 제2 핵산 세트의 특징

[0077] 하나의 특정 실시양태에서, 제2 핵산 세트에서 적어도 100개 이상의 상이한 핵산 서열이 있고, 바람직하게는 적어도 1,000개, 2,000개 또는 5,000개 이상의 상이한 핵산 서열이 존재하며, 최대 100,000개, 1,000,000 또는 10,000,000개의 상이한 핵산 서열이 존재한다. 전형적인 수는 1,000 내지 100,000개의 상이한 핵산 서열과 같이, 100 내지 1,000,000개일 것이다. 이 중 모든 또는 적어도 90% 이상 또는 적어도 50% 이상이 상이한 염색체 상호작용에 상응할 것이다.

[0078] 하나의 특정 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 적어도 20개 이상의 상이한 유전자 좌위 또는 유전자, 바람직하게는 적어도 40개 이상의 유전자 좌위 또는 유전자, 및 보다 바람직하게는 100 내지 10,000개의 상이한 유전자 좌위 또는 유전자와 같이, 적어도 100개 이상, 적어도 500개 이상, 적어도 1,000개 이상 또는 적어도 5,000개 이상의 유전자 좌위 또는 유전자에서 염색체 상호작용을 나타낸다. 제2 핵산 세트의 길이는 제1 핵산 세트에 대한 왓슨-크릭 염기쌍(Watson Crick base pairing)에 따라 특이적으로 하이브리드화하여 서브그룹에 특이적인 염색체 상호작용을 확인하는데 적절하다. 전형적으로 상기 제2 핵산 세트는 상기 염색체 상호작용에 함께 모이는 두 가지 염색체 영역에 서열에 상응하는 두 개 부위를 포함할 것이다. 상기 제2 핵산 세트는 전형적으로, 적어도 10개 이상, 바람직하게는 20개 이상, 및 여전히 바람직하게는 20개 염기(뉴클레오티드)의 길이인 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 거의 500 염기쌍, 바람직하게는 거의 100개 염기쌍, 여전히 바람직하게는 거의 50개 염기쌍 길이일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 17 내지 25개 염기쌍의 핵산 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 제2 핵산 세트의 적어도 100% 이상, 80% 이상 또는



50% 이상의 핵산 서열은 상기 기재된 바와 같은 길이를 갖는다. 바람직하게는, 상기 상이한 핵산은 임의의 중첩 서열(overlapping sequence)을 갖지 않으며, 예를 들어 적어도 100% 이상, 90% 이상, 80% 이상 또는 50% 이상의 핵산은 적어도 5개 이상 지속적인 뉴클레오티드에 대해 동일한 서열을 갖지 않는다.

[0079] 제2 핵산 세트가 ‘인덱스’로서 작용할 때, 상기 동일한 제2 핵산 세트는 상이한 특성에 대한 서브그룹을 나타내는 상이한 제1 핵산 세트와 함께 사용될 수 있으며, 즉, 상기 제2 핵산 세트는 상이한 특성과 관련된 염색체 상호작용을 확인하는데 사용될 수 있는 핵산의 ‘보편적인(universal)’ 컬렉션(collection)을 나타낼 것이다.

## [0080] 제1 핵산 세트

[0081] 제1 핵산 세트는 일반적으로 본원에 기재된 임의의 그러한 특성과 같이, 예후 동반 후생적 검사와 관련한 특성의 존재 또는 부존재에 의해 정의된 두 개 이상의 개별 서브그룹에 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 제1 핵산은 본원에 기재된 제2 핵산 세트의 임의의 특성 및 특징을 가질 수 있다. 상기 제1 핵산 세트는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 치료 및 프로세스 단계, 특히 EpiSwitch™ 가교-결합하는 단계 및 절단하는 단계를 갖는 개체로부터의 샘플로부터 유래된다. 전형적으로 상기 제1 핵산 세트는 개체로부터 얻은 샘플에 존재하는 염색체 상호작용의 모든 또는 적어도 80% 이상 또는 50% 이상으로 존재한다.

[0082] 전형적으로, 상기 제1 핵산 세트는 상기 제2 핵산 세트에 의해 나타나는 염색체 상호작용과 비교하여, 제2 핵산 세트에 의해 나타나는 유전자 좌위 또는 유전자를 가로지르는 염색체 상호작용의 더 작은 개체군을 나타내며, 즉, 상기 제2 핵산 세트는 유전자 좌위 또는 유전자의 정의된 세트에서 상호작용의 배경 또는 인덱스 세트를 나타낸다.

[0083] 하나의 실시양태에서, 상기 제2 핵산 세트는 라벨링 되었고, 전형적으로 상이한 서브그룹으로부터의 핵산은 상이한 라벨로 라벨링되었다. 이는 검출 방법에서 이들을 구별할 수 있다.

## [0084] 핵산(Nucleic Acids)

[0085] 본원에 기재된 핵산은 ‘제2’ 핵산과 같이, 본 발명의 적어도 200개 이상, 적어도 500개 이상, 적어도 1,000개 이상, 적어도 5,000개 이상 또는 적어도 10,000개 이상의 상이한 핵산을 포함하는 핵산의 라이브러리(library) 형태일 수 있다. 본 발명은 전형적으로 적어도 200개 이상의 상이한 핵산을 포함하는 핵산의 특정 라이브러리를 제공한다. 상기 라이브러리는 어레이(array)에 결합된 핵산의 형태일 수 있다.

## [0086] 하이브리드화(Hybridisation)

[0087] 본 발명은 제1 핵산 세트 및 제2 핵산 세트로부터 전체적으로 또는 부분적으로 상보적인 핵산 서열이 하이브리드화되도록 하는 수단을 요구한다. 하나의 실시양태에서, 모든 제1 핵산 세트는 단일 분석, 즉, 단일 하이브리드화 단계에서 모든 제2 핵산 세트와 접촉한다. 그러나 임의의 적절한 분석을 사용할 수 있다.

## [0088] 라벨링된 핵산 및 하이브리드화의 패턴

[0089] 본원에 기재된 핵산은 라벨링될 수 있고, 바람직하게는 성공적인 하이브리드화의 검출을 돕는 형광 물질(형광 분자) 또는 방사성 라벨과 같은 독립적인 라벨을 사용하여 라벨링될 수 있다. 특정 라벨은 자외선(UV light)하에서 검출될 수 있다. 본원에 기재된 어레이 상의 하이브리드화 패턴은 두 개 서브그룹 사이에서 후생적 염색체 상호작용의 차이를 나타내며, 후생적 염색체 상호작용을 비교하는 방법 및 후생적 염색체 상호작용이 본 발명의 개체군 내의 서브그룹에 특이적인지를 결정하는 방법을 제공한다.

[0090] 상기 용어 ‘하이브리드화의 패턴(pattern of hybridisation)’은 제1 및 제2 핵산 세트 사이에서 하이브리드화의 존재 및 부존재를 포괄적으로 포함하며, 즉, 제1 세트로부터 특이적 핵산이 제2 세트로부터의 특이적 핵산과 하이브리드화 되고, 이는 제한되지 않으며 임의의 특정 분석 또는 기술, 또는 ‘패턴(pattern)’이 검출될 수 있는 표면 또는 어레이를 가질 필요성이 있다.

## [0091] 서브그룹의 특이적 조건 및 선택

[0092] 염색체 상호작용 및 염색체 상호작용의 변화에 초점을 맞추므로써, 본 발명자는 예를 들어, 종래의 진단을 사용하여 놓칠 수 있는 티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitors, TKI)를 사용하여 잠재적인 생명-구조 치료학적 진단 개입(life-saving therapeutic diagnostic interventions)에 반응할 수 있는 환자의 그룹을 확인하였다.

- [0093] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 티로신 키나아제 억제제 치료법, 예를 들어 ATP 모방체인 억제제에 대한 반응성을 검출한다. 바람직하게는 암의 티로신 키나아제 억제제 치료법에 대한 반응성은 예를 들어 호산구 증가된 환자에서 검출된다. 바람직하게는 상기 암은 iHES, 만성 및 급성 호산성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), PDGFRA 양성 비-소세포성 폐암, 다형성 신경 교아종 및 별아교세포종을 포함하는 교모세포종, 전립선암, 진행성 난소암 또는 위장관 기질 종양(GIST)이다. 이러한 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 특이적 상호작용과 같이(예를 들어 특이적 프라이머 및/또는 프로브를 참조), PDGFRA 및/또는 FIP1L1에서 염색체 상호작용의 검출이 바람직하다.
- [0094] 바람직하게는, 본원에 기재된 임의의 관련된 유전자, 예를 들어 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 유전자 내에서 임의의 염색체 상호작용의 존재 또는 부존재가 검출된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 임의의 특이적 프라이머 및/또는 프로브 서열에 의해 나타난 염색체 상호작용의 존재 또는 부존재가 상기 방법에서 결정된다. 이러한 유전자 또는 염색체 상호작용의 수는 본원에 기재된 임의의 상이한 실시양태에서 사용될 수 있다.
- [0095] 본 발명은 개체 내에서 특성의 존재 또는 부존재를 결정하기 위해서, 염색체 상호작용의 존재 또는 부존재, 전형적으로 1 내지 5, 또는 5 내지 20, 또는 5 내지 500 개의 그러한 상호작용을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 염색체 상호작용은 본원에 기재된 임의의 유전자에서의 상호작용이다.
- [0096] **3C 상호작용 및 암**
- [0097] 본 발명의 상이한 실시양태는 임의의 암 또는 본원에 기재된 유전자, 예를 들어 하기 열거된 암 또는 유전자에 관한 것일 수 있다.
- [0098] 본 발명자는 유방암, 난소암, 백혈병, 신경교종(glioma), 림프종(lymphomas), 암종(carcinomas)을 포함하는 암과 관련된 ABL1, 브루톤 티로신 키나아제(Bruton Tyrosine Kinase), cKIT, FGFR1, F1PL1, FLT3 및 PDGFRA에서 3C 상호작용을 발견하였다.
- [0099] 전형적으로 본원에 기재된 방법에 관련되거나 방법을 사용하여 확인된 상호작용은 임의의 다음의 조건과 관련된 다: 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(Chronic Lymphocytic Leukaemia, CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), CML-급성기(blast crisis), 위장관 기질 종양(GIST), 골수이형성 증후군(Myelodysplastic Syndromes, MDS), 골수증식성 질환(Myeloproliferative Disorders) (골수증식성 신생물(Myeloproliferative Neoplasms, MPN)), X-연결 무감마글로불린증(X-linked agammaglobulinemia, XLA), B 세포 악성 종양(B cell malignancy), NHL, 림프종(Lymphoma)(모든 분류), 골수종(Myeloma), 재발성 성숙 B-세포 신생물(Recurrent Mature B-Cell Neoplasms), 만성 이식 편대 숙주 반응(Chronic Graft Versus Host Disease), 재발된 털세포백혈병(Relapsed Hairy Cell Leukemia), 재발된 또는 난치성 고형 종양(Refractory Solid Tumors), 난치성 맨틀세포림프종(Refractory Mantle Cell Lymphoma), 증폭된 식도 위 암종(Oesophagogastric Carcinoma), 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 비만세포증(Mastocytosis), 비만세포 백혈병(Mast Cell Leukemia), 전립선 종양(Prostate Tumours), 진행성 흑색종(Advanced Melanoma), 돌연변이된 악성 흑색종(Malignant Melanoma), 2차 선(2nd Line), 절제 불가능 또는 전이성 위장관 기질 종양(GIST), 발현하는 악성중피종(Malignant Mesothelioma), 진행성(Advanced), 백금-난치성 난소암(Platinum-Refractory Ovarian Cancer), 재발된 난소 상피성(Relapsed Ovarian Epithelial), 나팔관(Fallopian Tube) 또는 원발성 복막암(Primary Peritoneal Cancer), 난소 낮은 악성 잠재적 종양(Ovarian Low Malignant Potential Tumor), 유두장액성 상피암(Uterine Papillary Serous Carcinoma), 확장-단계 소세포폐암(extensive-Stage Small Cell Lung Cancer), 국소적으로 진행된 비인두암(Nasopharyngeal Carcinoma), 재발된/난치성 비-호지킨 림프종(Non-Hodgkin's Lymphoma), 전이성 신장 세포 암(Metastatic Renal Cell Cancer), 전이성 위소장이자 신경 내분비 종양(Metastatic Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor), 재발성 난소 투명 세포 암종(recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma), 식도 편평 세포 암종(Esophageal Squamous Cell Carcinoma), 지속적인 자궁암(Persistent Uterine Cancer), 유방 종양(Breast tumours), 갑상선암(Thyroid cancer), 구강 선종(Oral adenoma), 급성 백혈병(Acute Leukaemia), 전립선 종양(Prostate Tumours), 전위된(Translocated) FGFR1-3, 돌연변이된(Mutated), 또는 증폭된(Amplified) 재발성 두경부암(Recurrent Head and Neck Cancer), FGFR-TACC 유전자 혼합을 발현하는 재발성 악성 신경 교종(Recurrent Malignant Glioma), 진행성 비-소세포성폐암(Advanced Non-Small Cell Lung Cancer).
- [0100] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 관련되거나 방법을 사용하여 확인된 상호작용은 임의의 다음의 조건과 관련된 다: iHES, 비-소세포성 폐암(NSCLC), 대장암(Colorectal Cancer), 전이성 흑색종(Metastatic Melanoma), 신장암(Renal Cell Cancer), 난치성 호지킨 림프종(Refractory Hodgkin's Lymphoma), 이전에 치료

된 난소암, 국소적으로 진행된 비인두암(Nasopharyngeal Carcinoma), 난치성 만성 림프구성 백혈병(Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia)/소림프구성 림프종(Small Lymphocytic Lymphoma)(CLL/SLL), 수미티닙(Sunitinib)-실패 위장관 기질 종양(GIST). 바람직한 조건은 신경교종, 급성 골수성 백혈병 및 유방암, iHES 및 만성 백혈병이다.

[0101] ABL1, 세포질 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 9q34에 위치한 유전자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: 급성 골수성 백혈병(AML) 만성 림프구성 백혈병(CLL), 유방암, GIST, 골수이형성증후군(MDS) 또는 골수증식성질환(골수증식성 신생물, MPN).

[0102] 브루톤 티로신 키나아제, 세포질 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 Xq22.1에 위치한 유전자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: X-연결 무감마글로불린증(XLA), B 세포 악성 종양, NHL, 림프종(모든 분류), 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 재발성 성숙 B-세포 신생물, 만성 이식 편대 숙주 반응, 재발성 털세포백혈병, 재발성 또는 난치성 고체 종양, 난치성 맨틀 세포 림프종, 증폭된 식도 위 암종 및 류마티스 관절염.

[0103] cKIT, 수용체 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 4q12에 위치한 유전자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: 비만세포증 및 비만세포 백혈병 및 전립선 종양, 진행성 흑색종, 돌연변이된 악성 흑색종, 2차 선(second line) 절제 불가능 또는 전이성 위장관 기질 종양(GIST), 발현하는 악성종괴종, 진행성, 백금-난치성 난소암, 재발된 난소 상피, 나팔관 또는 원발성 복막암, 난소 낮은 악성 잠재적 종양, 확장-단계 소세포폐암, 국소적으로 진행된 비인두암, 재발된/난치성 비-호지킨 림프종, 전이성 신장 세포 암, 전이성 위소장이자 신경 내분비 종양, 재발성 난소 투명 세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 지속적인 자궁암 및 유방 종양.

[0104] FGFR1, 수용체 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 8q11에 위치한 유전자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: 갑상선암, 구강 선종, 급성 백혈병, 전립선 종양 및 유방암, 전위된 FGFR1-3, 돌연변이된 또는 증폭된 재발성 두경부암, FGFR-TACC 유전자 혼합을 발현하는 재발성 악성 신경 교종, 진행성 비-소세포성 폐암.

[0105] FIP1L1, PDGFRA(예를 들어 4q12)에 빈번하게 융합되는 폴리아데닐화 특이성 인자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: iHES, 만성 백혈병.

[0106] FLT3, 수용체 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 13q11-12.2에 위치한 유전자의 상호작용은 다음의 질병과 관련이 있다: 만성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 유방암, iHES, 만성 백혈병, 비-소세포성 폐암(NSCLC), 대장암, 전이성 흑색종 또는 신장암, 신경 교종, 난치성 호지킨 림프종, 이전에 치료된 난소암, 국소적으로 진행된 비인두암, 난치성 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 수미티닙-실패 위장관 기질 종양(GIST).

[0107] PDGFRA, 수용체 티로신 키나아제 유전자, 예를 들어 4q12에 위치한 유전자의 상호작용은 다음 질병에 관련이 있다: 신경 교종, 만성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 유방암, iHES.

#### [0108] 검사된 개체

[0109] 검사된 개체는 본원에 기재된 임의의 질환 조건 또는 특성이 임의의 증상을 갖거나 갖지 않는다. 상기 개체는 임의의 그러한 조건 또는 특성의 위험할 수 있다. 상기 개체는 상기 특성으로 인하여 위험할 수 있다. 상기 개체는 상기 특성 때문에 더 나쁜 예후를 가질 수 있고 상기 특성에 대한 특이적 치료법을 요구할 수 있다. 상기 개체는 회복될 수 있거나, 상기 조건 또는 특성으로부터 회복되는 중일 수 있다. 상기 개체는 바람직하게는 영장류, 인가, 비-인간 포유동물 또는 설치류와 같은 포유동물일 수 있다. 상기 개체는 남성 또는 여성일 수 있다. 상기 개체는 30세 이상일 수 있다. 상기 개체는 29세 이하일 수 있다.

[0110] 본원에 기재된 임의의 유전자, 유전자 좌위, 영역 및 핵산은 본원에 기재된 개체의 임의의 유형으로부터 또는 유형일 수 있다.

#### [0111] 바람직한 유전자 영역, 유전자 좌위, 유전자 및 염색체 상호작용

[0112] 본 발명의 모든 양태에 있어서, 바람직한 유전자 영역, 유전자 좌위, 유전자 및 염색체 상호작용은 본원에 기재되어 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법에서 염색체 상호작용은 본원에 열거된 유전자와 관련하여 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상으로부터 검출된다. 바람직하게는 본원에 기재된 프라이머 및/또는 프로브 서열에 의해 나타나는 관련된 특이적 염색체 상호작용의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 존재 또는 부존재가 검출된다.

[0113] 상기 영역은 본원에 기재된 임의의 유전자의 상류 또는 하류, 예를 들어 코딩 서열로부터 50kb 상류 또는 20kb

하류일 수 있다.

[0114] 하나의 실시양태에서, 상기 검출된 염색체 상호작용은 표에 나타난 임의의 위치(position) 또는 임의의 영역에서 존재한다. 결찰된 생성물이 상기 방법으로 검출되는 경우, 본원에 기재된 임의의 프라이머 또는 프로브 서열에 나타난 서열을 검출할 수 있다. 따라서, 전형적으로 결찰된 생성물의 두 영역(즉, 염색체 상호작용의 두 사이트)으로부터 서열이 검출될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 프라이머 및/또는 프로브는 본원에 기재된 프라이머 및/또는 프로브에 대한 동일하거나 상보적인 서열을 포함하고 구성되는 상기 방법에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 프라이머 및/또는 프로브는 본원에 나타난 임의의 프라이머 및/또는 프로브에 대한 동종체인 서열을 포함하여 사용된다.

[0115] **정량적 PCT(Quantitative PCR, qPCR)에 의해 결찰된 생성물의 검출**

[0116] 하나의 실시양태에서, 염색체 상호작용과 관련된 결찰된 서열은, 예를 들어 형광 검출을 사용하여 정량적으로 검출된다. 이 실시양태는 본원에 기재된 임의의 결찰된 서열상에서 수행될 수 있거나, 본원에 기재된 타이핑(typing)/검출 방법과 관련되나, 상기 서열 또는 방법에 제한되지 않는다. 따라서 상기 qPCR과 관련된 실시양태는 임의의 염색체 상호작용에서 함께 가져온 염색체의 영역으로부터 서열을 포함하는 임의의 결찰된 서열을 검출하기 위해 수행될 수 있으며, 본원에 기재된 임의의 특성을 가질 수 있다.

[0117] 따라서, 본 발명은 PCR 반응 동안 활성화할 때 검출할 수 있는 프로브를 사용하여 염색체 상호작용과 관련있는 결찰된 서열을 정량적으로 검출하기 위한 방법을 제공하며, 상기 결찰된 서열은 후생적 염색체 상호작용에서 함께 모이는 두 개 염색체 영역으로부터의 서열을 포함하며, 상기 방법은 PCR 반응 동안 프로브에 결찰된 서열을 접촉시키는 단계 및 프로브의 활성화의 정도를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 프로브는 상기 결찰 사이트에 결합한다.

[0118] 상기 프라이머 및 프로브 서열은 기재된 임의의 그러한 특이적 서열 또는 상기 특이적 서열의 동족체 및/또는 단편일 수 있다. 상기 프라이머 서열은 전형적으로 3C 또는 EpiSwitch™ 방법, 예를 들어 본원에 기재된 그러한 방법 또는 결찰된 생성물과 같은 염색체 상호작용을 검출하는 프로세스로 만들어진 상기 결찰된 생성물을 증폭시킬 수 있다. 상기 프라이머는 전형적으로 단일방향이다. 선택적으로 상기 프라이머 서열은 문제에서 3C 상호작용의 결찰된 생성물에 대하여 유일하도록 디자인되었다. 상기 프로브는 전형적으로 결찰 사이트를 포함하는 결찰된 생성물에서 특이적으로 서열을 결합할 수 있다. 상기 프로브는 전형적으로 하나 이상의 모이어티가 상기 PCR 반응 동안 라벨을 활성화시키기 위해 절단/방출시킬 수 있는 ‘가수분해(hydrolysis)’ 프로브이다.

[0119] 상기 결찰된 서열은 핵산의 샘플을 가교결합시키는 것 다음에, 상기 핵산을 더 작은 조각으로 깨는 것, 예를 들어 효소 분해 또는 물리적 전단 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 이어서 결찰 단계가 수행된다. 상기 결찰된 서열은 전형적으로 본원에 기재된 바와 같이 치료 및 프로세싱, 특히 상기 EpiSwitch™ 가교-결합 및 절단하는 단계를 거친 개체 또는 세포주의 샘플로부터 유도된다. 상기 결찰된 서열은 임의의 상기 방법으로 정의되거나 만들어진 결찰된 생성물일 수 있다. 상기 결찰된 서열의 결찰 사이트는 가교-결합된 핵산을 절단하는데 사용된 제한 효소의 제한 효소 인식 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 제한 효소는 Taq I 또는 Taq I (예를 들어 동일한 제한효소 인식부위를 인식함)의 임의의 변경된 형태이다. 상기 결찰된 DNA 분자는 10 내지 100개 뉴클레오타이드 염기 또는 10 내지 400개 뉴클레오타이드 염기 또는 10 내지 500개 뉴클레오타이드 염기 또는 200 내지 600개 뉴클레오타이드 염기 또는 200 내지 800개 뉴클레오타이드 염기 또는 200 내지 1,000개 뉴클레오타이드 염기 길이의 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0120] 바람직하게는 단 하나의 프라이머 세트(즉, 함께 증폭할 수 있는 2개 PCR 프라이머)를 검출에 사용되며, 하나 이상의 프라이머 세트를 갖는 중첩된 PCR(nested PCR)은 수행되지 않는다. 바람직하게는 상기 프라이머는 단일 방향이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 프라이머 서열은 문제에서 3C 상호작용에 대한 유일하도록 선택된다. 하나의 실시양태에서, 상기 검출 방법은 증폭되지 않고/않거나 상기 프로브가 결합하지 않는 다른 핵산(다른 결찰된 생성물과 같이)의 존재에서 수행된다. 전형적으로 다른 핵산(결찰된 생성물과 같이)은 존재하는 상기 핵산 또는 결찰된 생성물의 적어도 10%, 30% 이상 또는 적어도 50% 이상을 나타낼 수 있다.

[0121] **qPCR에 의해 검출된 상황**

[0122] 본원에 기재된 상기 qPCR 방법은 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 상황과 관련된 임의의 상황에서의 염색체 상호작용을 검출하는데 사용될 수 있다. 이는 전형적으로 예를 들어 본원에 정의된 바와 같이, 서브그룹과 관련된 염색체 상호작용을 검출하는데 사용될 것이다. 이는 염색체 상호작용에서의 변화 및/또는 돌연변이, 유전자 발



현의 변화 또는 유전자의 조절 억제와 관련된 염색체 상호작용의 변화를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0123] 본원에 기재된 상기 qPCR 방법은 염색체에서 적어도 1,000 염기쌍, 적어도 10,000 염기쌍 또는 적어도 100,000 염기쌍 떨어져 있는 후생적 염색체 상호작용에서 두 개 염색체 영역으로부터의 서열인 염색체 상호작용을 검출하는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 상기 qPCR 방법은 100,000 염기쌍 초과로 떨어져 있는 후생적 염색체 상호작용에서 두 개 염색체 영역으로부터의 서열인 긴 범위 염색체 상호작용(long range chromosome interactions)을 검출하는데 사용될 수 있으며, 상기 상호작용은 100 Kb(kilobase) 초과, 선택적으로 500 kb 초과, 바람직하게는 900 kb 초과 DNA 루프를 생산한다. 본원에 기재된 상기 qPCR 방법은 PDGFRA와 같은 티로신 키나아제 억제제 치료법에 반응하는 유전자에서 유전적 또는 후생적 변화와 연관된 긴 범위 염색체 상호작용을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0124] **qPCR 프로브의 디자인/구조**

[0125] 상기 qPCR 반응에서 사용하기 위한 프로브는 결합 사이트를 포함하는 상기 결합된 DNA 분자상의 사이트에서, 상기 결합 사이트의 부근에서 결합된 DNA 분자에 특이적으로 결합하도록 디자인될 수 있으며, 선택적으로 상기 각각의 염색체 영역으로부터의 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 상기 프로브는 두 개 단편의 접합(junction)에 걸쳐있고, 예를 들어 적어도 5, 10 또는 20개 이상의 뉴클레오티드 염기 5' 및 3' 을 상기 결합 사이트에 결합시킨 서열을 갖는다. 상기 프로브는 10 내지 40개 뉴클레오티드 염기 길이의 핵산 서열, 또는 바람직하게는 10 내지 35개 뉴클레오티드 염기 길이의 핵산 서열, 또는 보다 바람직하게는 20 내지 30개 뉴클레오티드 염기 길이의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 프로브는 본원에 정의된 바와 같이 상기 결합된 DNA 분자 또는 다른 수준의 동일성의 서열에 대하여 적어도 70% 이상의 상동성/동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0126] **qPCR 프로브의 라벨링(Labeling)**

[0127] 상기 프로브는 일반적으로 불활성 및 활성 상태를 갖는 검출 가능한 라벨로 라벨링되어, 활성화될 때만 검출된다. 활성의 정도는 PCR 반응에서 존재하는 템플릿(결합 생성물)의 정도와 관련될 것이다. 검출은 PCR의 전부 또는 일부 동안, 예를 들어, 적어도 50% 이상 또는 80% 이상의 PCR 사이클 동안 수행될 수 있다.

[0128] 상기 프로브는 형광단(fluorophore)은 올리고뉴클레오티드의 하나의 말단에 공유 결합되고, 소광제(quencher)는 상기 뉴클레오티드의 다른 말단에 부착되는 것을 포함할 수 있어, 상기 형광단의 형광물질은 소광제에 의해 퀸칭된다. 하나의 실시양태에서, 상기 형광단은 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 부착되며, 상기 소광제는 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 공유결합으로 부착된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 형광단은 FAM, TET, JOE, Yakima Yellow, HEX, Cyanine3, ATTO 550, TAMRA, ROX, Texas Red, Cyanine 3.5, LC610, LC 640, ATTO 647N, Cyanine 5, Cyanine 5.5 및 ATTO 680을 포함한다. 적절한 형광단과 함께 사용될 수 있는 소광제는 TAM, BHQ1, DAB, Eclip, BHQ2 및 BBQ650을 포함하며, 선택적으로 상기 형광단은 HEX, Texas Red 및 FAM으로부터 선택된다. 형광단 및 소광제의 바람직한 조합은 BHQ1과 FAM 및 BHQ2와 Texas Red를 포함한다. 다른 바람직한 조합은 표 3에 나타내었다.

[0129] **qPCR 분석에서 프로브의 사용**

[0130] 본 발명의 가수분해 프로브는 전형적으로 농도가 일치하는 음성 대조군으로 온도 구배가 최적화된다. 바람직하게는 단일-단계 PCR(single-step PCR) 반응이 최적화된다. 보다 바람직하게는 표준 곡선이 계산된다. 상기 결합된 서열의 접합을 가로질러 결합하는 특이적 프로브를 사용하는 것의 장점은 증폭된 PCR 접근법을 사용하더라도 상기 결합된 서열에 대한 특이성이 달성될 수 있다는 것이다. 본원에 기재된 상기 방법은 낮은 카피 수 표적의 정밀하고 정확한 정량화를 허용한다. 상기 표적 결합된 서열(target ligated sequence)은 온도 구배 최적화 전에 정제, 예를 들어 겔-정제(gel-purified)될 수 있다. 상기 표적 결합된 서열은 서열화될 수 있다. 바람직하게는 PCR 반응은 약 10 ng, 5 내지 10 ng, 10 내지 20 ng, 10 내지 50 ng, 10 내지 200 ng 템플릿 DNA를 사용하여 수행된다. 정방향(Forward) 및 역방향(reverse) 프라이머는 하나의 프라이머가 결합된 DNA 서열에 나타난 염색체 영역 중 하나의 서열에 결합하고, 다른 프라이머가 상기 결합된 DNA 서열에 나타난 다른 염색체 영역에 결합, 예를 들어 상기 서열에 상보적이도록 디자인되었다.

[0131] **결합된 DNA 표적의 선택**

[0132] 본 발명은 상기 결합된 서열에 결합 및 증폭시키는 능력에 기초하여 프라이머를 선택하는 단계, 및 특히 상기 표적 서열의 곡물에 결합될 상기 표적 서열의 특성을 기초로 하는 프로브를 선택하는 단계를 포함하는, 본원에 정의된 바와 같이 PCR 방법에 사용하기 위한 프라이머 및 프로브를 선택하는 방법을 제공한다.

- [0133] 프로브는 전형적으로 상기 제한효소 인식부위에 걸쳐서 병치된 제한효소 인식 단편인 결합된 서열에 결합하도록 디자인/선택된다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 특정 염색체 상호작용에 관련하여 가능한 결합된 서열의 예측된 곡률은, 예를 들어 본원에 참고된 특이적 알고리즘을 사용하여 계산된다. 상기 곡률은 나선형 회전(helical turn) 당 각도, 예를 들어 나선형 회전당  $10.5^\circ$  로 표현될 수 있다. 결합된 서열은 나선형 회전 당 적어도  $5^\circ$  이상, 전형적으로 적어도 나선형 회전 당  $10^\circ$ ,  $15^\circ$  또는  $20^\circ$  이상, 예를 들어 나선형 회전 당  $5^\circ$  내지  $20^\circ$  의 곡률 성향 피크 점수(curvature propensity peak score)를 갖는 결합된 서열을 표적화 하는데 선택된다. 바람직하게는 상기 나선형 회전 당 곡률 성향 점수는 적어도 20, 50, 100, 200 또는 400개 이상의 염기, 20 내지 400개 염기와 같이 상기 결합 사이트의 상류 및/또는 하류에 대해 계산된다. 따라서 하나의 실시양태에서, 상기 결합된 생성물에서 표적 서열은 임의의 이러한 수준의 곡률을 갖는다. 표적 서열은 또한 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지를 기초로 하여 선택될 수 있다.
- [0134] **샘플 제조(Sample preparation) 및 염색체 상호작용 검출을 위한 바람직한 실시양태**
- [0135] 샘플 제조 및 염색체 상호작용 검출 방법은 본원에 기재되어 있다. 예를 들어 이 섹션에서 기재된 바와 같이, 이러한 방법의 최적화된(일반적이지 않음) 버전이 사용될 수 있다.
- [0136] 전형적으로 상기 샘플은 적어도  $2 \times 10^5$  이상의 세포를 함유한다. 상기 샘플은 최대  $5 \times 10^5$  세포를 함유할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 샘플은  $2 \times 10^5$  내지  $5.5 \times 10^5$  세포를 함유한다.
- [0137] 상기 염색체 유전자 좌위에 존재하는 후생적 염색체 상호작용의 가교결합은 본원에 기재되어 있다. 이는 세포 용해(cell lysis)가 일어나기 전에 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 용해는 적어도 5 분 이상 및 10 분 미만 동안 수행된다.
- [0138] 제한 효소로 DNA를 분해하는 것은 본원에 기재되어 있다. 전형적으로, DNA 제한효소 분해는 약 20분과 같이, 약 10 내지 30분의 기간 동안 약  $65^\circ\text{C}$ 와 같이, 약  $55^\circ\text{C}$  내지 약  $70^\circ\text{C}$ 에서 수행된다.
- [0139] 바람직하게는, 빈번한 커터 제한 효소(frequent cutter restriction enzyme)를 사용하여 최대 4,000개 염기쌍의 평균 단편 크기를 갖는 결합된 DNA의 단편을 야기한다. 선택적으로, 상기 제한 효소는 약 256개 염기쌍과 같이, 약 200 내지 300 염기쌍의 평균 단편 크기를 갖는 결합된 DNA의 단편을 야기한다. 하나의 실시양태에서, 상기 전형적인 단편 크기는 약 200 염기쌍 내지 4,000 염기쌍, 400 내지 2,000 염기쌍 또는 500 내지 1,000 염기쌍이다.
- [0140] EpiSwitch 방법의 하나의 실시양태에서, DNA 침전 단계(DNA precipitation step)는 DNA 제한효소 분해 단계(DNA restriction digest step) 및 DNA 결합 단계(DNA ligation step) 사이에서 수행되지 않는다.
- [0141] DNA 결합(DNA ligation)은 본원에 기재되어 있다. 전형적으로, 상기 DNA 결합은 약 10분과 같이, 5 내지 30분 동안 수행된다.
- [0142] 상기 샘플 중의 단백질은 예를 들어, 단백질 분해효소(proteinase), 선택적으로 프로테아제 K(Proteinase K)를 사용하여 효소적으로 분해될 수 있다. 상기 단백질은 약 30분 내지 1시간의 기간, 예를 들어 약 40분 동안 효소적으로 분해될 수 있다. 상기 단백질의 분해, 예를 들어, 프로테아제 K 분해 후 하나의 실시양태에서, 가교-결합 반전(cross-link reversal) 또는 페놀(phenol) DNA 추출 단계는 없다.
- [0143] 하나의 실시양태에서, PCR 검출은 결합된 핵산의 단일 카피, 바람직하게는 상기 결합된 핵산의 존재/부존재에 대한 바이너리 판독(binary read-out)으로 검출할 수 있다.
- [0144] **치료법(therapy) 및 치료용 제제(therapeutic agent)의 확인**
- [0145] 본 발명자는 어떻게 암의 치료에 사용된 화합물이 또한 3C 염색체 구조 상에서 직접적으로 작용하는지를 포함하여, 어떻게 염색체 상호작용이 암의 치료법과 관련되는지를 발견하였다. 예를 들어, 활성화된 티로신 키나아제에 직접적으로 작용하는 것으로 알려진, 상기 ATP 모방체 이마티닙은 cKIT와 같은 이마티닙 반응성 유전자에서 3C 염색체 구조에 직접적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다.
- [0146] 공지된 치료용 제제의 표적과 연관된 염색체 상호작용에서 변화를 확인하거나 모니터링하는 것은 구조에서 동일한 변화를 야기하고 동일한 치료용 제제를 갖는 화합물을 확인하는데 사용될 수 있다. 공지된 치료용 제제의 표적과 연관된 염색체 상호작용에서 변화를 확인하거나 모니터링하는 것은 염색체 구조에서도 변화를 야기할 수 있는 다른 치료용 제제 또는 치료용 제제에 의한 치료에 예민한 대상, 또는 세포를 확인하는데 사용될 수 있다.

- [0147] 추가로, 본 발명은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, 관련 염색체 상호작용을 변경함으로써 암을 예방(prevent) 또는 치료(treat)하는데 사용될 수 있는 치료용 핵산을 제공한다. 그러한 핵산은 DNA 또는 RNA 일 수 있으며, RNAi와 같은 '간섭(interference)'에 의한 기능일 수 있다.
- [0148] **동족체(Homologues) 및 단편(fragment)**
- [0149] 본 발명은, 본원에 기재된 특이적 서열을 포함하는, 본원에 기재된 핵산의 동족체(homologues) 및/또는 단편(fragment)의 사용을 포함한다. 그러한 동족체 및/또는 단편은 원래의 핵산과 동일한 결합 특성을 가질 수 있으며, 예를 들어 상기 관련 결합된 생성물에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0150] 폴리뉴클레오티드/핵산(예를 들어, DNA)의 동족체는 전형적으로, 예를 들어 적어도 10, 13, 20, 30, 100 개 또는 그 이상의 연속적인 뉴클레오티드의 부위에 걸쳐 또는 상기 염색체 상호작용에 관여하는 상기 염색체의 부위로부터 유래된 상기 핵산의 부분을 가로지르는, 적어도 70% 이상의 상동성(homology), 바람직하게는 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상, 적어도 97% 이상, 적어도 98% 이상 또는 적어도 99% 이상의 상동성을 가진다. 상기 상동성은 뉴클레오티드 동일성(때로는 '경질 상동성(hard homology)'으로 지칭됨)에 기초하여 계산될 수 있다.
- [0151] 예를 들어, UWGCG 패키지(Package)는 상동성 및/또는 % 서열 동일성을 계산하는데 사용될 수 있는(예를 들어, 디폴트 설정에서 사용됨) BESTFIT 프로그램을 제공한다(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). PILEUP 및 BLAST 알고리즘은 예를 들어, Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. 에 기재된 바와 같이, 상동성 및/또는 % 서열 동일성 및/또는 라인 업 서열(line up sequence)을 계산하는데(동등하거나 상응하는 서열(전형적으로 그들의 디폴트 설정에서)을 확인하는 것) 사용될 수 있다.
- [0152] BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information을 통해 공식적으로 이용할 수 있다. 이 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어로 정렬될 때 몇몇 양성-값 임계 점수(positive-valued threshold score) T와 일치 또는 만족하는 쿼리 서열(query sequence)에서 길이 W인 짧은 단어를 확인하는 것에 의한 첫 번째 높은 점수 서열 쌍(high scoring sequence pair, HSPs)을 확인하는 단계를 포함한다. T는 인접 단어 점수 임계 값(neighbourhood word score threshold)을 의미한다(Altschul et al, supra). 이러한 초기 인접 단어는 그들을 함유하는 HSPs를 찾기 위하여 검색을 시작하기 위한 씨앗(seed)으로서 활용된다. 상기 단어 히트(word hit)는 누적 정렬 점수(cumulative alignment score)를 증가시킬 수 있는 한, 각 서열을 따라 양 방향으로 확장된다. 각 방향의 단어 히트에 대한 확장(extension)은 다음의 경우에 중단된다: 상기 누적 정렬 점수는 최대 달성 값으로부터 정량 X만큼 떨어지는 경우; 상기 누적 점수는 하나 이상의 음성-점수 잔기 정렬(negative-scoring residue alignments)의 누적으로 인해 0 이하가 되는 경우; 또는 두 개 서열 중 말단에 도달하는 경우. 상기 BLAST 알고리즘 파라미터 W5 T 및 X는 상기 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. 상기 BLAST 프로그램은 11의 단어 길이(word length, W), 50의 BLOSUM62 점수 매트릭스 정렬(B)(Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 참조), 10의 기댓값(expectation, E), M=5, N=4 및 두 개 스트랜드(strand)의 비교값을 디폴트로서 사용한다.
- [0153] 상기 BLAST 알고리즘은 두 개 서열 사이에서 유사성에 대한 통계 분석을 수행한다(Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 참조). 상기 BLAST 알고리즘에 의하여 제공되는 유사성의 하나의 측정은 두 개 폴리뉴클레오티드 서열의 일치이 우연히 발생할 수 있는 확률의 지표로 제공하는 가장 작은 합계 확률(sum probability, P(N))이다. 예를 들어, 제1 서열과 제2 서열의 비교에서 가장 작은 합계 확률이 약 1 미만, 바람직하게는 약 0.1 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우에 서열은 다른 서열과 유사하다고 고려된다.
- [0154] 상기 동족체 서열은 전형적으로 10, 14 또는 20개 미만의 염기와 같이, 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 염기로 서로 상이하다(뉴클레오티드의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있음). 이러한 변화는 동족체 및/또는 % 서열 동일성의 계산과 관련하여 상기 기재된 임의의 영역을 가로질러 측정될 수 있다.
- [0155] 단편은 전형적으로 원래 서열의 적어도 90%, 80% 또는 50% 이상인 길이를 갖는다. 이들은 5' 및/또는 3' 말단으로부터 적어도 5, 8 또는 10개 이상의 뉴클레오티드의 절단(truncation)을 가질 수 있다.
- [0156] **어레이(Array)**
- [0157] 상기 제2 핵산 세트는 어레이에 결합될 수 있고, 하나의 실시양태에서 어레이에 결합한 적어도 15,000, 45,000,

100,000 or 250,000개 이상의 상이한 제2 핵산 세트가 있으며, 바람직하게는 적어도 300, 900, 2000 또는 5000 개 이상의 유전자 좌위를 나타낸다. 하나의 실시양태에서, 제2 핵산의 하나 또는 그 이상, 또는 모든 상이한 개체군은 상기 어레이의 하나 이상의 별개의 영역에 결합하며, 실제로 어레이상에서 반복되어 오류 검출을 허용한다. 상기 어레이는 Agilent SurePrint G3 Custom CGH 마이크로어레이 플랫폼을 기반으로 할 수 있다. 어레이에 제1 핵산의 결합의 검출은 이중 컬러 시스템(dual colour system)에 의해 수행될 수 있다.

[0158] **치료용 제제(therapeutic agents)**

[0159] 치료용 제제는 본원에 기재되어 있다. 본 발명은 관련 조건의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 이는 이를 필요로 하는 개체에 치료학적 유효량의 제제를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 치료를 위해 개체를 선택하는데 사용될 수 있다.

[0160] 본 발명의 방법, 및 특히 예후 동반 후생적 테스트를 수행하기 위한 방법은 치료 단계를 포함할 수 있고, 그 다음 상기 방법에 의해 확인된 사람은 관련된 조건을 예방 또는 치료하는 제제. 예를 들어 티로신 키나아제 억제제, 바람직하게는 세디라닙(Cediranib), 크레놀라닙(Crenolanib), 다사티닙(Dasatinib)(스프리셀(Sprycel)); 도비티닙(Dovitinib), 이마티닙(Imatinib)(글리벡(Gleevec)); IMC-3G3 (올라라투맷(Olaratumab), LY3012207) 라르투보(Lartruvo) (PDGFR); 마시티닙(Masitinib, AB1010), 닐로티닙(Nilotinib)(타시그나(Tasigna)); 파조파닙(Pazopanib); PKC412 (미도스타우린(midostaurin), CGP41251); 퀴자르티닙(Quizartinib); 레고라페닙(Regorafenib); 소라페닙(Sorafenib)(넥사바르(Nexavar)); 서니티닙(Sunitinib)(수텐트(Sutent)); 바탈라닙(Vatalanib); S116836를 포함하는 공지된 티로신 키나아제 억제제의 그룹으로부터 하나, 보다 바람직하게는 다사티닙, 크레놀라닙, 도비티닙 및 이마티닙을 포함하는 그룹으로부터 하나 이상의 티로신 키나아제 억제제로 투여될 수 있다.

[0161] 상기 제제의 제형은 상기 제제의 본질에 따를 것이다. 상기 제제는 상기 제제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 함유하는 약학적 조성물의 형태로 제공될 것이다. 적절한 담체 및 희석제는 등장성 식염수, 예를 들어 인산염-완충 식염수(phosphate-buffered saline)를 포함한다. 전형적으로 경구 투여 조성물은 태블릿(tablet), 캡슐(capsules). 액체 용액 및 액체 현탁액을 포함한다. 상기 제제는 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 경피 또는 경구 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0162] 제제의 투여량은 다양한 파라미터에 따라, 특히 사용된 기질; 치료받을 개체의 연령, 체중 및 상태; 투여 경로; 및 요구한 요법에 따라 결정될 수 있다. 의사는 임의의 특정 제제에 대하여 요구된 투여 경로 및 투여량을 결정할 수 있다. 그러나 적절한 투여량은 0.1 내지 100 mg/kg 체중, 1 내지 40 mg/kg 체중일 수 있으며, 예를 들어 1일 1 내지 3회 복용하는 것이 바람직하다.

[0163] **본원에 기재된 기질(Substance)의 형태**

[0164] 본원에 기재된 임의의 기질은 정제되거나 분리된 형태일 수 있다. 이는 자연에서 발견되는 것과 상이한 형태일 수 있으며, 예를 들어 자연에서 발생하지 않는 다른 기질과 조합하여 존재할 수 있다. 상기 핵산(본원에 정의된 서열의 부위를 포함)은 자연에서 발견된 것과 상이한 서열, 예를 들어, 상동성에 대한 섹션에 기재된 바와 같은 서열에서 적어도 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 변화를 갖는 서열을 가질 수 있다. 상기 핵산은 5' 또는 3' 말단에서 이중 서열을 가질 수 있다. 상기 핵산은 자연에서 발견된 것으로부터 화학적으로 상이할 수 있으며, 예를 들어 몇몇 방식으로 변형될 수 있으나, 바람직하게는 여전히 왓슨-크릭 염기쌍(Watson-Crick base pairing)일 수 있다. 적절하게 상기 핵산은 이중 스트랜드 또는 단일 스트랜드 형태로 제공될 것이다. 본 발명은 단일 또는 이중 스트랜드 형태로 본원에 기재된 모든 특이적 핵산 서열을 제공하며, 기재된 임의의 서열에 대한 상보적 스트랜드를 포함한다.

[0165] 본 발명은 또한 특정 서브그룹과 연관된 염색체 상호작용의 검출을 포함하는 본 발명의 임의의 프로세스를 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 본 발명의 프로세스에 의해 생산된 결합된 핵산을 검출할 수 있는 제제로서 관련 염색체 상호작용을 검출할 수 있는 특이적 결합 제제를 포함할 수 있다. 상기 키트에 존재하는 바람직한 제제는, 예를 들어, PCR 반응 또는 qPCR 반응에서 상기 결합된 핵산을 증폭시킬 수 있으며, 본원에 기재된 바와 같이 가수분해 가능한 프로브와 같이, 상기 결합된 핵산에 대해 하이브리드화 할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함한다.

[0166] 본 발명은 또한 상기 관련 염색체 상호작용을 검출할 수 있는 장치(device)를 제공한다. 상기 장치는 바람직하게는 본원에 기재된 임의의 제제, 프로브 또는 프라이머 쌍과 같이, 임의의 특정 결합 제제, 염색체 상호작용을 검출할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함한다.



- [0167] 본원에 기재된 상기 핵산은 DNA의 형태일 수 있다.
- [0168] **특정 실시양태**
- [0169] 상기 EpiSwitch™ 플랫폼 기술은 유전자 좌위(loci)에서 정상 및 비정상 조건 사이의 조절 변화에 대한 후생적 조절 시그니처(epigenetic regulatory signatures)를 검출한다. 상기 EpiSwitch™ 플랫폼은 염색체 구조 시그니처(chromosome conformation signatures)로 알려진 인간 염색체의 조절 고차원 구조(regulatory high order structures)와 연관된 유전자 조절의 근본적인 후생적 수준을 확인하고 모니터링한다. 염색체 시그니처는 다량의 유전자 조절 완화에서 명백한 주요한 단계이다.
- [0170] 이들은 DNA 메틸화(methylation) 및 RNA 프로파일링(profiling)과 같은 후발 후생적 및 유전자 발현 바이오마커를 사용하는 바이오마커 플랫폼에 대한 고유한 장점을 가진 고차원 바이오마커이다.
- [0171] **EpiSwitch™ 어레이 분석(array assay)**
- [0172] 맞춤형 EpiSwitch™ 어레이-스크리닝 플랫폼은 15K, 45K, 100K, 및 250K의 4가지 밀도의 고유한 염색체 형태(chromosome conformation)로 제공되며, 각 키메라 단편(chimeric fragment)은 어레이에서 4번 반복되어 각각 60K, 180K, 400K 및 1 백만(Million)의 효과적인 밀도를 만든다.
- [0173] **맞춤 디자인된 EpiSwitch™ 어레이**
- [0174] 15K EpiSwitch™ 어레이는 EpiSwitch™ 바이오마커 발견 기술로 조사된 약 300개 유전자 좌위를 포함하는 전체 게놈을 스크리닝할 수 있다. 상기 EpiSwitch™ 어레이는 Agilent SurePrint G3 Custom CGH 마이크로 어레이 플랫폼 상에서 건설되었으며, 이 기술은 4가지 밀도, 60K, 180K, 400K 및 1백만 프로브를 제공한다. 각 EpiSwitch™ 프로브가 4 중으로 표시되는 것으로, 상기 어레이 당 밀도는 각 15K, 45K, 100K 및 250K로 감소하였으므로, 재현성의 통계적 평가가 허용된다. 유전적 유전자 좌위 당 잠재적인 EpiSwitch™ 마커의 평균 수는 50이며; 조사할 수 있는 유전자 좌위의 수는 300, 900, 2,000 및 5,000이다.
- [0175] **EpiSwitch™ 맞춤 어레이 파이프라인(Custom Array Pipeline)**
- [0176] EpiSwitch™ 어레이는 EpiSwitch™ 어레이 생산 후에, Cy5로 라벨링된 하나의 샘플 세트 및 Cy3로 라벨링된 비교/분석될 다른 샘플(대조군)을 갖는 이중 칼라 시스템(dual colour system)이다. 상기 어레이는 Agilent SureScan Scanner를 사용하여 스캔하였고, 결과적 특징(resultant features)은 Agilent Feature Extraction 소프트웨어를 사용하여 추출하였다. 그 다음 상기 데이터는 R에서 EpiSwitch™ 어레이 프로세싱 스크립트를 사용하여 처리되었다. 상기 어레이는 R: Limma\*에서 Bioconductor에서 표준 이중 칼라 패키지를 사용하여 처리되었다. 상기 어레이의 정규화는 Limma\*에서 정규화된 어레이 기능을 사용하여 수행되며, 이는 온 칩 (on chip) Agilent 양성 대조군 및 EpiSwitch™ 양성 대조군으로 수행된다. 상기 데이터는 Agilent Flag 호출을 기반으로 필터링되고, 상기 Agilent 대조군 프로브가 제거되고 상기 기술 복제 프로브는 Limma\*를 사용하여 분석되도록 평균화된다. 상기 프로브는 2개 시나리오 사이의 차이점을 기반으로 모델링 되어 False Discovery Rate를 사용하여 비교되고 수정된다. 변이 계수(Coefficient of Variation, CV)  $\leq 30\%$ 인 프로브는  $\leq 1.1$  또는  $\geq 1.1$ 이며,  $p \leq 0.1$  FDR p-값을 통과하면 추가 스크리닝에 사용된다. 프로브 세트를 감소시키기 위해 R에서 FactorMineR 패키지를 사용하여 다중 인자 분석(Multiple Factor Analysis)을 추가로 수행하였다.
- [0177] \*참고: LIMMA는 마이크로어레이 실험(Microarray Experiments)에서 상이한 발현을 평가(Assessing Differential Expression)하기 위한 선형 모델(Linear Model) 및 실증적 베이스 프로세스(Empirical Bayes Processes)이다. Limma는 마이크로어레이 또는 RNA-Seq로부터 발생하는 유전자 발현 데이터의 분석을 위한 R 패키지이다.
- [0178] 프로브의 풀(pool)은 조정된 p-값, FC 및  $CV < 30\%$ (임의적 컷 오프 포인트(cut off point)), 최종 피킹(picking)을 위한 파라미터를 기반으로 초기에 선택된다. 추가 분석 및 최종 리스트는 처음 두 개 파라미터(adj. p-value; FC)만을 기반으로 작성되었다.
- [0179] **통계 파이프라인(Statistical Pipeline)**
- [0180] EpiSwitch™ PCR 플랫폼 상에서 번역을 위해 높은 값의 EpiSwitch™ 마커를 선택하기 위하여, EpiSwitch™ 스크리닝 어레이는 R에서 EpiSwitch™ 분석 패키지(Analytical Package)를 사용하여 처리된다.
- [0181] 1 단계

- [0182] 프로브는 변형된 선형 회귀 모델(linear regression model)의 생성물인 수정된 p-값(False Discovery Rate, FDR)을 기반으로 선택된다. p-값이  $\leq 0.1$ 인 프로브를 선택하고, 후생적 비율(Epigenetic ratio, ER)에 의해 감소되면, 프로브 ER은 추가 분석으로 선택되기 위해  $\leq -1.1$  또는  $\geq 1.1$ 를 갖는다. 마지막 필터는 변이 계수(CV)dla, 프로브는  $\leq 0.3$ 을 갖는다.
- [0183] 2 단계
- [0184] 통계 리스트의 상위 40개 마커는 PCR 번역을 위한 마커로서 선택하기 위해 ER을 기준으로 선택된다. 가장 높은 음성 ER 로드(load)를 갖는 상위 20개 마커 및 가장 높은 양성 ER 로드를 갖는 상위 20개 마커가 리스트를 형성한다.
- [0185] 3 단계
- [0186] 1 단계의 결과 마커, 상기 통계적으로 유의한 프로브는 초고속 농축(hypergeometric enrichment, HE)을 사용하여 농축 분석의 기초를 형성한다. 이 분석은 상기 유의한 프로브 리스트에서 마커를 감소시킬 수 있으며, 2단계로부터의 마커를 따라 EpiSwitch™ PCR 플랫폼으로 번역된 프로브의 리스트를 형성한다.
- [0187] 상기 통계적 프로브는 유전적 위치(genetic locations)가 후생적 차이의 허브(hub)인 것을 나타내는 통계적으로 유의한 프로브의 농축을 갖는 유전적 위치를 결정하도록 HE에 의해 처리되었다.
- [0188] 가장 유의하게 수정된 p-값을 기반으로 농축된 유전자 좌위는 프로브 목록 생산을 위해 선택된다. p-값이 0.3 또는 0.2 이하인 유전적 위치가 선택된다. 2 단계의 마커와 함께 이러한 유전적 위치에 매핑되는 통계적 프로브는 EpiSwitch™ PCR 번역을 위해 높은 값의 마커를 형성한다.
- [0189] **어레이 디자인 및 프로세싱(Array design and processing)**
- [0190] 1. 유전적 유전자 좌위(genetic loci)는 SII 소프트웨어(현재 v3.2)를 사용하여 다음과 같이 처리된다.
- [0191] a. 이러한 특이적 유전적 유전자 좌위(50kb 상류 및 20kb 하류를 갖는 유전자 서열)에서 게놈의 서열을 끌어냄.
- [0192] b. 이 영역 내에서 서열이 CC' s에 관여할 가능성을 정의.
- [0193] c. 특이적 RE(제한효소)를 사용하여 서열을 절단.
- [0194] d. 특정 방향(specific orientation)에서 상호작용할 것 같은 제한효소 절단 단편을 결정.
- [0195] e. 서로 다른 CC가 상호작용할 가능성을 랭크(Rank)함.
- [0196] 2. 어레이 크기 및 사용가능한 프로브 위치의 수(X)를 결정한다.
- [0197] 3. X/4 상호작용을 끌어낸다.
- [0198] 4. 각 상호작용에 대해 파트 1로부터 제한효소 인식부위에 대한 30bp 및 파트 2의 제한효소 인식부위에 30bp의 서열을 정의한다. 제외된 경우에, 그러한 영역이 반복이 아닌지 확인하고 리스트에서 다음 상호작용을 실행한다. 모든 30bp에 연결하여 프로브를 정의한다.
- [0199] 5. X/4 프로브 + 정의된 대조군 프로브의 리스트를 형성하고 4번 복제하여 어레이에서 생성될 리스트를 형성한다.
- [0200] 6. 맞춤 CGH 어레이에 대한 Agilent Sure 디자인 웹사이트에 프로브 리스트를 업로드한다.
- [0201] 7. 프로브 그룹을 사용하여 Agilent 맞춤 CGH 어레이를 디자인한다.
- [0202] **어레이 프로세싱(Array Processing)**
- [0203] 1. 템플릿 생성물을 위한 EpiSwitch™ SOP를 사용하여 샘플을 처리한다.
- [0204] 2. 어레이 프로세싱 실험실에 의해 에탄올 침전법으로 깨끗하게 한다.
- [0205] 3. 혈액, 세포 또는 조직에 게놈 DNA 분석 효소 라벨링(Genomic DNA Analysis Enzymatic labelling)을 위한 CGH를 기반으로 하는 Agilent SureTag 완전한 DNA 라벨링 키트 -Agilent Oligonucleotide Array- 당 샘플을 처리한다.

[0206] 4. Agilent feature extraction 소프트웨어를 사용, Agilent C Scanner를 사용하여 스캔한다.

[0207] **간행물(Publications)**

[0208] 본원에 기재된 모든 간행물의 내용은 본 명세서에 참고로 포함되며, 본 발명과 관련된 특징을 추가로 정의하는데 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0209] 도 1은 3C 프로세스의 개략도이다. 3C는 염색질 구조 캡처(chromatin conformation capture) 또는 염색체 구조 캡처(chromosome conformation capture)를 의미한다.

도 2는 결찰된 서열 1에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 9의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성 형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 4 내지 6.5의 스케일). 0 내지 500 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 3은 결찰된 서열 2에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 12의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성 형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 3 내지 6.5의 스케일). 0 내지 700 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 4는 결찰된 서열 3에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 9의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 4 내지 6의 스케일). 0 내지 450 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 5는 결찰된 서열 4에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 10의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성 형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 3 내지 7의 스케일). 0 내지 500 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 6은 결찰된 서열 5에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 9의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성 형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 3 내지 6.5의 스케일). 0 내지 700 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 7은 결찰된 서열 6에 대하여 서열 위치에 대한 굴곡 및 굽힘성 형성(bendability)의 그래프이다. 10.5 bp 나선형 회전 당 각도로 예측되는 곡률은 검정색으로 나타냈고(왼쪽 Y-축에 0 내지 12의 스케일(scale)), a.u.에서 굽힘성 형성은 회색으로 나타냈다(오른쪽 Y-축의 3 내지 6.5의 스케일). 0 내지 600 염기쌍의 서열번호는 X 축에 나타냈다.

도 8 및 도 9는 치료학적 실시양태에 관한 데이터를 나타냈다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0210] **실시예 1. 암에서 염색체 상호작용의 분석**

[0211] **서론**

[0212] 게놈 DNA를 기준으로 하는 현재의 종양학 진단 방법은 비싸고, 세미-정량적이며, 모든 중단점 변이체(all breakpoint variants)를 캡처하는데 실패한다. 증폭된 RT-PCR(nested RT-PCR)을 기준으로 하는 진단 방법은 살아있는 세포를 요구하고, 다른 방법을 사용하여 확인되어야 하며 복잡한 RNA 프로세싱 단계를 갖는다. 본 발명에서 개발된 상기 방법은 모든 중단점 변이체를 캡처하고, 정량적이며, RNA 안정성 문제가 없고, 적은 샘플 부피를 사용하며 빠른 프로세싱 시간을 갖는다. 따라서, 상기 방법은 잘못된 진단의 가능성 및 잘못된 치료법을 제공하는 것을 감소시킨다.

[0213] 본 연구는 또한 티로신 키나아제 저해제에 치료적으로 반응하는 3C 상호작용을 확인한다. 이는 티로신 키나아제 저해제로 치료될 수 있는 환자를 검출하는데 사용될 수 있는 예후 테스트의 기초를 형성한다. 현재 테스트는 예

를 들어 중단점 변형으로 인해 정확 또는 민감하지 않다. 잘못된 진단은 환자에 티로신 키나아제 저해제 치료를 받지 않는 것을 야기할 수 있으며, 대신에 그들이 반응하지 않는 스테로이드를 투여한다. 예를 들어 치료를 받지 않은 iHES 환자의 예후는 좋지 않다.

[0214] 암에 관하여 후생적 상호작용 및 티로신 키나아제 저해제 치료법을 위한 환자의 계층화(stratification)의 유용성에 대하여 조사하였다. 고-해상도 염색체-구조 캡처 또는 EpiSwitch™ 및 정량적 PCR로 알려진 3C 분석 플랫폼을 사용하여, IDH 돌연변이가 없거나 있는 신경교종 세포주(glioma-cell line)에서 FIP1L1 및 PDGFRA 사이의 구조적인 병렬을 매핑, 평가 및 정량화하였다. 4q12에서 중간 결실(interstitial deletion)에 의한 PDGFRA의 조절 억제(deregulation) 및 만성 호산구 백혈병과 관련이 있는 FIP1L1과의 융합(fusion)이 우리 그룹을 자극하여, 동일한 염색체 구조 상호작용이 EOL-1 및 다른 백혈병 세포주에 존재하는지를 조사하였다.

[0215] 고-해상도 염색체-구조 캡처 또는 EpiSwitch™로 알려진 3C 분석 플랫폼을 사용하는 것으로, 돌연변이와 관련된 3C 후생적-상호작용의 선택을 확인하였다. 상기 프라이머를 최적화하기 위해, Qiagen QIAgility 고-정밀 자동화된 PCR 시스템으로 96 웰 플레이트 상의 온도 구배를 사용하였고, 36 개별 온도 구배 PCR(separate temperature gradient PCR)에서 72 프라이머를 검사하였다. 전체 20 개의 개별적인 OBD 예측된 3C 상호작용을 스크리닝하였다. 각각의 예측된 상호작용에 대한 다중 프라이머 세트는 가능한 경우에 사용되었다. 두 개의 AML 세포주 EOL-1 및 HL-60으로부터 10 ng의 표적-3C 템플릿(target-3C template)을 사용하여 단일 단계 PCR(single step PCR)을 최적화하였다. SYBR 검출 및 농도가 일치하는 음성 대조군을 사용하여 PCR 증폭(상기 표적의)을 실행하였다. 상기 음성 대조군은 3C 샘플(소화 및 결찰 포함)로서 프로세싱된 포름알데하이드가 없는 EOL-1 및 정상 게놈 DNA를 포함하였다. 모든 PCR 생성물은 LapChip에서 실행되었다. 상기 예상된 크기의 PCR 생성물은 겔(Invitrogen)을 사용하여 정제하였고 정방향 및 역방향 프라이머 배향으로 서열화되었다. 프라이머는 반응당 3.2 pmol/μL에서 100bp 당 1ng/μL의 템플릿 농도로 사용되었다. 상기 예측된 3C 단편과 100% 상동성을 나타내는 생성물은 qPCR 디자인을 위해 발전되었다.

[0216] IDH1 SNP rs11554137 및 IDH1 R132H 돌연변이를 스크리닝하기 위하여, 10 ng의 3C 템플릿은 학회지로부터 유래된 종래의 IDH1 게놈 프라이머로 사용되었다; 이러한 프라이머 서열은 외부적으로 디자인되었으며 본원에는 포함되어 있지 않다.

[0217] 단일 단계 qPCR은 농도가 일치하는 음성 대조군을 갖는 qPCR을 기준으로 가수분해-프로브를 사용하여 실행되었다. 그 다음, 상기 B7 462bp 상호작용의 검출은 표적화된 3C DNA 단편의 접합 영역(junction region)에 대하여 디자인된 가수 분해 프로브를 사용하여 최적화되었다. 상기 qPCR에서 사용된 프로브는 3C DNA 단편에 특이적이다. EOL-1 템플릿(10 ng)은 온도 구배 기반 qPCR (58-68°C)에서 프로브를 최적화하는데 사용되었다. 프라이머는 가수분해 qPCR 분석법 개발을 위해 선택되었다. B7 생성물은 3C 단편 특정 qPCR을 디자인 하는데 사용되었다. 5' -FAM/BHQ1-3' 또는 5' Texas Red/BHQ2-3' 으로 라벨링된 이중 라벨 가수분해 프로브는 상기 서열화된 상호작용을 검출하는데 사용되었다. 상기 프로브는 상기 3C 단편의 접합 영역을 포괄하도록 디자인되었으므로, 상기 3C 생성물의 검출은 FIP1L1 및 PDGFRA 상호작용에 대해 특이적이라는 것을 보장한다. qPCR 표준 곡선( $10^{-6}$  카피(copy))은 상기 서열화된 생성물로부터 생산되었다.

[0218] 이중 라벨 5' FAM-BHQ1-3' 라벨링된 가수분해 프로브는 상기 서열화된 상호작용을 검출하는데 사용되었다. 모든 샘플은 20 ng에서 스크리닝되고 MMP1 카피수를 기록하였다. 상기 서열화된 PCR 생성물 B7은 qPCR 스크리닝을 위한 표준 곡선을 생산하는데 사용되었다. 20ng의 3C 라이브러리 DNA(library DNA로 조정된 상기 qPCR 템플릿은 농도-일치된 음성 대조군(concentration-matched negative control)과 함께 사용되었다. 대조군은 지방 생검(adipose biopsies) 및 정상 혈액으로부터 유래된 3C 라이브러리를 포함하였다. 추가적인 음성 대조군은 포름알데하이드 고정 없이 세포주 물질, 소화 및 결찰된 라이브러리 물질 및 정상 게놈 DNA를 포함하였다. 이 연구는 American Society of Hematology의 지침에 따라 실행되었다. 세포주는 ATCC에 의해 제공되었다. 윤리적 동의의 얻은 환자의 자료는 Tissue Solutions (Oxford BioDynamics TSD-OB2273)에서 제공받았다.

[0219] 상기 6개 FIP1L1-PDGFRA 3C 서열 방향의 확인된 서열 중, 2 가지가 재발하였다(표 1). 특히, GBA461GB\_GBA496A6으로 라벨링된 게놈 서열은 4번 확인하였다. 게놈 서열 FH147946\_FH149AA7는 2번 확인하였다. 단일-단계 PCR을 사용하여, 이러한 6 가지 상호작용은 AML 세포주 EOL-1에서 증폭시켰다. 상기 FIP1L1 PDGFRA 3C B7 상호작용은 단일 단계 PCR을 사용하여 AMP 세포주(급성 골수성 호산구 백혈구(acute myeloid eosinophilic leukemia)) EOL-1(n=2, 가수분해 프로브 분석)에서 재현성있게 발견되었다. EOL-1에서 FIP1L1 및 PDGFRA 사이의 위상학적 인슐레이션(topological insulation)의 손실은 부분적으로 결실에 의해 매



개될 수 있다.

- [0220] 상기 462 염기쌍 B7 상호작용은 2가지 이마티닙(imatinib)-민감성 세포주인 GDM-1(n=1) 및 HL-60(n=2)에서 증폭되었다. FIP1L1 및 PDGFRA 유전자 사이의 상기 위상학적 인슐레이션 손실 메커니즘은 알려져 있지 않으나, 두 가지 세포주 모두 이마티닙에 반응한다. 교아종 세포주 DBTRG-05MG(n=2, qPCR 방법) 및 U373(n=1, qPCR 방법)은 또한 상기 B7 상호작용에 양성이다. DBTRG-05MG에서 발견된 최대 카피수는 29.89 카피(20ng의 템플릿, 표2)였다. 확인되지 않은 IDH1 돌연변이 또는 SNP rs 11554137을 가진 하나의 신경교종(glioma) 샘플은 FIP1L1-PDGFRA 3C 단편의 1.19(20 ng 당)를 갖는다. 확인된 IDH1 R132H 돌연변이를 갖는 두 개의 신경교종 샘플은 FIP1L1-PDGFRA 3C 단편에 대해 양성이었다.
- [0221] qPCR 표준 곡선( $10^{-6}$  카피)은 서열화된 PCR 생성물로부터 생산되었다. 상기 qPCR 데이터의 분석은 CFX 매니저 소프트웨어(CFX manager software, BioRad)를 사용하여 수행되었다. 정규화는 MMP1에서 안정적인 3C 상호작용으로 수행되었다. 상기 표준 곡선은 단일 단계 qPCR을 사용하여 AML 및 교아종 샘플에서 B7 상호작용의 선택적인 증폭을 나타냈다.
- [0222] 염색체 형태(chromosome conformation)의 사용은 교아종 세포주 및 AML-세포주에서 FIP1L1 및 PDGFRA 사이에서 인슐레이터(isulator) 기능의 손실에 관한 DNA 서열을 성공적으로 검출하였다. FIP1L1 및 PDGFRA 유전자 사이에서 인슐레이션의 손실은 qPCR을 사용하여 AML 및 교아종세포에서 검출가능한 3C 변경을 야기한다. 이러한 상호작용은 관습적인 서열 방법론(conventional sequencing methodology)을 사용하여 검출할 수 없다.
- [0223] 실시예 2. 정량적 PCR 분석법의 개발
- [0224] MIQE 지침에 쓰여진 qPCR의 데이터 및 기술적 요구를 준수하기 위해, qPCR을 사용하여 3C의 증폭 및 검출을 위한 새로운 기술을 개발하였다. 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)은 표적 샘플에서 높은 민감성으로 DNA 카피수의 확인을 허용한다. 이는 염색체 상호작용의 검출에 관하여 핵산 생성물의 분석 요구에 적합하다는 것을 발견하였다.
- [0225] MIQE 지침은 관련성, 정확성, 올바른 해석 및 반복성을 보장하기 위해 qPCR 실험에 대하여 보고되어야 하는 최소 정보에 대한 설명서를 제공한다. MIQE (정량적 실시간 PCR 실험의 출판을 위한 최소 정보(Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments))는 DNA 마이크로어레이 분석, 프로테오믹스 실험, 게놈 서열 설명서, 및 RNA 간섭 작업 및 대사체학을 위한 논의 하의 것들에 대한 유사한 지침을 모델로 하고 있으며, 이 모든 것은 MIBBI(생물학 및 생물 의학 연구를 위한 최소 정보(Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations))의 산하에 조절된 조약이다.
- [0226] 통상적으로, 형광 기반 PCR 접근법이 사용되는 경우 3C 분석에서 다중 프라이머 세트는 상기 3C 단편의 복합 DNA의 특정된 ‘일정한’ 영역에서 설계된다. 그러나, 이러한 접근법은 qPCR에 대한 MIQE 원리를 고수하지 않으며, 기술적으로 중첩된 PCR을 유도한다. 이러한 접근법은 상호작용의 적어도 1/2 이상이 알려지도록 요구한다.
- [0227] 종래의 검출 기술에서, DNA 중합효소는 공지된 DNA 표적에 하이브리드화되고 상기 역방향 PCR 프라이머가 동일한 3C 라이브러리 단편에 결합하는 경우에만 프로브를 절단한다. 형광 증가는 상기 표적이 프로브에 상보적이고 PCR 동안 증폭되는 경우에만 발생한다. 이러한 요구 때문에 비-특이적 증폭은 검출되지 않는다.
- [0228] 결찰 생성물을 검출하는데 요구된 게놈 DNA의 양으로부터, 일부 유전자 좌위-특이적 결찰(locus-specific ligation) 사건이 1/2,000 내지 1/20,000 포유 동물 세포에서만 발생할 수 있다고 추정하였다. 그러므로, 종래의 접근법으로 결찰 생성물의 믿을만한 정량화는 많은 양의 DNA(즉, 많은 게놈 동등물)이 종래의 기술로 각 PCR에 첨가되는 경우에만 가능하다. 그러나, 본 연구자들이 개발한 새로운 기술로 PCR 당 3C 템플릿의 20-100 ng( $\sim 3.2 \times 10^4$ - $1.6 \times 10^5$  게놈 동등물)을 일상적으로 사용한다. 본 기술은 상기 결찰 3C 가수분해성 프로브가 결찰 접합(ligation junction)위에 결합하는 것을 요구한다. 이는 또한 마이크로어레이 분석은 PCR 분석과 호환될 수 있다.
- [0229] 종래의 기술을 사용하여 기존 기술이 작동하지 않는 이유는? 3C 카피수의 검출 및 정량화의 특이성에 관한 기술적 문제
- [0230] 상기 종래의 접근법은 2개 프라이머 세트 및 2회 PCR을 요구한다. 기술적으로 이는 형광 기반 검출을 가진 중첩된 PCR의 파생물이다. 다른 접근법은 이를 모방하나, 1개 프라이머 세트 및 40 내지 50 사이클의 PCR을 사용한다. 샘플 사이에 차이점이 있을 수 있는 반면, 상기 접근법은 정량적이라고 기재될 수 없고 여러 가지 심각한

기술적 문제를 함유한다:

- [0231] (a) 증첩된 PCR은 비-정량적으로 받아들여지며, 일부 반응에서 프라이머 세트와 고조기(plateau phase)에 도달하는 PCR 사이의 효율성 차이점은 낮은 카피수의 정밀하고 정확한 정량화를 불가능하게 만든다.
- [0232] (b) 비-특이적 생성물은 증첩된 프라이머로 증폭될 수 있다.
- [0233] (c) 상기 분석법은 종종 서열화되지 않는다.
- [0234] (d) 2회 PCR 접근법은 ‘참(true)’ 이 아니기 때문에, 상기 데이터로부터 카피 수에 관련하여 절대적인 정량화를 수득할 수 있다.
- [0235] (e) 표준 곡선이 형성되지 않아(1회 PCR이 요구됨), 낮은 카피수의 정밀하고 정확한 정량화를 불가능하게 만든다.
- [0236] (f) 기존 키트는 안전한 임상 qPCR 분석을 위해 설정된 지침을 준수하지 않는다.
- [0237] (g) TaqMan PCR은 흔하게 상기 생성물의 특이성과 관련하여 심각한 기술적 문제를 일으키는 다중 PCR 생성물을 증폭시킨다.
- [0238] (h) 포인트 (g)의 3C의 검출을 위한 가수분해 프로브의 사용과 관련하여, 상기 프로브는 ‘불변 영역(constant region)’ 에 위치한다.
- [0239] (i) 상기 불변 영역은 3C 단편 또는 Taq I 사이트 모두에 대하여 서열 특이적 부위(area)가 아니며, 가수분해 프로브로 검출된 PCR 생성물은 3C 단편이라는 임의의 특성이 모호하다.
- [0240] 종래의 접근법은 하기의 대조군을 사용한다:
- [0241] 대조군 1. 동등한 양으로 모든 결찰 생성물을 함유하는 대조군 템플릿을 만든다. 프라이머 효율성의 차이점을 정규화하기 위해 이 템플릿을 사용한다.
- [0242] 대조군 2. 랜덤 상호작용의 빈도를 측정하기 위해 게놈 거리를 증가시켜 분리된 사이트 간의 상호작용을 결정한다. 좋은 시작점은 0 내지 100 kb 범위의 게놈 거리로 분리된 사이트 사이의 약 12개 상호작용을 테스트하는 것이다.
- [0243] 대조군 3. 두 가지 상이한 세포 유형 또는 두 가지 상이한 조건을 비교할 때, 두 가지 케이스에서 유사한 형태를 갖는 것으로 가정되는 게놈 영역에서의 상호작용을 결정한다. 정규화를 위한 이 데이터 세트(dataset)를 사용하여, 관심 있는 영역에서 수득한 데이터는 정량적으로 비교할 수 있다.
- [0244] 프라이머 효율성에 대한 정규화 후(대조군 1), 상호작용 빈도의 국소적 피크(local peak)가 관찰될 때(대조군 2), 특이적 상호작용이 검출된다. 관련되지 않은 게놈 영역의 분석(대조군 3)은 상이한 세포 또는 세포 상태를 비교하여 특정 상호작용이 유전자 좌위의 전사와 같은 생물학적 활성과 관련되는지 여부를 확립하는데 사용될 수 있다.
- [0245] 그러나 본 연구원들이 개발한 상기 기술은 그러한 대조군을 요구하지 않는다. 특이적 증폭 및 검출은 상기 프라이머 및 프로브의 결합 표적의 선택으로 인해 달성되며, 형광 소광제 표지화 시스템(fluorescence quencher labelling system)의 사용으로 결합된다. 예를 들어, 표 3은 몇몇 적절한 형광 프로브 및 소광제가 기재되어 있다.
- [0246] 실시예 3. 표적 서열의 특성
- [0247] EpiSwitch™ qPCR 기술은 결찰된 병치DNA 단편(juxtaposed DNA fragment)에서 Taq I 제한효소 인식부위에 걸친 표적 가수분해 프로브의 검출을 위해 독특하게 사용된다(표 4). 일반적으로, 가수분해 프로브로 검출하기 위해 선택된 상기 사이트는 프로브에 대한 하이브리드화의 효율성 및 2차 구조의 형태를 위한 성향 및 폴딩(folding) 및 벤딩 특성(bending properties) 및 최소 자유 에너지 레벨을 포함하는 프로브 하이브리드화 프로세스를 방해할 수 있는 다른 생리학적 특성을 위해 선택된다. 이는, 지금까지, 3C 검출의 문맥에서 가수분해 프로브의 임의의 사용은 상기 결찰 단편의 한 부분 내에서 상기 프로브를 표적하였고, 둘다 겹치지 않는 이유를 설명한다. 상기 표적 서열 내에서 모든 결찰 및 결찰되지 않은 생성물에 비해 결찰된 생성물에 대해서만 검출의 특이성을 강하게 약화시킨다.
- [0248] Taq I 제한효소 인식부위 주위의 Check Point Charlie (CC) 사이트의 결찰된 병치에서 DNA의 공률 및 최소 자유

에너지 레벨은 가수분해 프로브 하이브리드화를 위한 통상적인 표적 서열을 구별하는 2차 구조 형태를 나타낸다. 프로브는 제한효소 인식부위에 걸친 병치된 Taq I 단편으로 디자인되었다. 상기 DNA의 곡률은 디뉴클리오티드(dinucleotide) 기하학의 롤(roll), 틸트(tilt) 및 트위스트(twist) 각도를 합산하여 BEND 알고리즘<sup>1</sup>으로 계산된다. 상기 곡률은 나선형 회전 당 각도, 예를 들어 나선형 회전 또는 염기쌍 당 10.5°로 표시된다. 상기 Taq I 제한효소 인식부위에서 최소 에너지, ΔG는 가장 근접한 에너지 파라미터를 사용하여 에너지 최소화의 평가와 함께 Zuker<sup>2</sup> 알고리즘으로 계산되었다<sup>3</sup>.

[0249] EpiSwitch<sup>TM</sup> 기술에서, TaqI 사이트로부터 상류 및 하류 서열의 최대 400 염기를 스캔하고 상기 DNA의 곡률을 계산한다. 높은 2차 구조의 2 개의 CC를 함께 결합시킨 결과, 결합 사이트에서 표적된 서열은 가수 분해 프로브 하이브리드화에 대한 통상적인 표적 서열과 비교하여 곡률 성향에서 정량적인 차이를 나타낸다. 상기 기술은 나선형 회전당 > 5° 이상의 곡률 성향 피크 점수를 찾는다. 나선형 회전당 5° 미만의 인접 서열의 밸리(valley)와 비교한 값은 DNA가 곡선 형태를 적용할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0250] 또한, TaqI 제한효소 인식부위의 상류 및 하류 서열의 최대 20 염기를 스캔하고 Zuker 알고리즘에 설명된 올리고 보정(oligo correction)이 있는 0 mM Na<sup>+</sup> 및 4.5 mM Mg<sup>++</sup>의 이온 조건에서 60℃에서 선형 DNA의 최소 자유 에너지, ΔG를 계산한다. 60℃에서 <1.15 kcal / mol 미만의 자유 에너지 수준을 갖는 열역학적 구조를 가진 시퀀스가 프로브 디자인을 위해 선택된다.

[0251] 프로모터(promoter), 인트론(intron), 종결부위(terminator)와 같은 유전자의 조절 영역에 존재하는 이러한 서열은 곡률 및 자유 에너지 값을 계산함으로써 EpiSwitch<sup>TM</sup> 플랫폼에 의해 식별된 2차 구조 형태를 나타낸다. 프로브는 상기 설명된 곡률 성향 및 최소 자유 에너지 수준으로 선택된 서열상의 TaqI 제한효소 인식부위에 걸쳐 설계되었다.

[0252] 가수 분해 프로브의 종래의 사용은 EpiSwitch 프로세스 및 검출의 맥락에서 CC 사이트의 결합 접합에서 생물학적으로 제한된 서열을 표적화된 하이브리드화에 이용하지 않았지만, 비-특이적 대조군에 대한 카피수에 의해 결합된 생성물의 효율적이고 비례적인 검출을 입증하는 모든 qPCR 대조군에 TaqI 결합 사이트가 겹치도록 특별히 가수 분해 프로브를 사용할 수 있다. 이것은 효과적인 프로브 검출을 위한 온도 구배 검사에 기초하여 설계된 EpiSwitch 분석의 맥락에서 정당하게 수행된, 3C 오버랩을 표적으로 하는 가수분해 프로브의 첫 번째 실제적인 사용이다.

[0253] 하기 실시예는 방법론을 설명한다:

[0254] 서열번호 1

[0255] TTCCACGTGGCCTACCACAGCATGTGAGGCCTGGGGCAGAATCTTGCCATACTGTGCAGCCCAAATTTGAATGCCAAAGGCTTTCGTTTGTCTCTGGGGG  
CCACAGTCTAGGTCTAGTTCTGTGTCAGGAGTTGTAATATTTGCTCTTCTCTCCCTCCTCCAGCTCGCAGACCTCTGAAGAGAGTGCCATTGAGACGGGTCC  
AGCAGTTCCACCTTCATCAAGAGAGAGGACGAGACCATTGAAGACATCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGAAATAAAACCTCATACAC  
TTCTGGTGGGATTGTAATATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCTGGCCATTTTCTCAAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCTCCACCTTAGA  
GGAATGAAACATATTCAGACAAAACTGTACGTGAATATTCATAGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGGAAGAAAGAAACCTCGCAGCTG

[0256] 상기 시퀀스의 곡률 성향 프로파일(profile)이 아래에 표시되어 있다. 여기서 상기 프로파일은 50 내지 100 염기 사이의 5° 이상의 곡률 성향 규모(curvature propensity magnitude)와 낮은 점수의 밸리(valley)를 표시한다. 이는 상기 DNA의 곡률 형태를 나타낸다. TaqI 영역을 둘러싸는 서열의 DNA 접합 및 자유 에너지 추정치는 60℃, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 1.13 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다. 이 영역은 고도로 조절된 영역을 나타내는 PDGFRA 유전자의 3' 말단 및 FIP1L1의 인트론 영역에 상응한다. 이 병치된 TaqI 단편을 선택하였고 프로브를 제한 효소 부위에 걸쳐 디자인 하였다. 상기 염기 서열의 TaqI 제한효소 인식 부위는 검은 바탕에 흰색으로 표시하였다.

[0257] 서열번호 2

[0258] TGGGAGTGGGTGGAGTGAGAACCTGGGAGAAGGCCAGCCCTTTATATCCAGGCAGACAGCTCCAAGTGCCACCATGGATCAGCCAGTCTTGAGGGGTGATG  
CTATTACAGTACAGATGGCTTGATCCTGAGTCATTTCTTCTTTTCCATGCAGTGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGAACGTCCTCTGGCACAAGGAA  
AAATGTGAAGATCTGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGAAATAAAACCTCAT  
ACACTTCTGGTGGGATTGTAATATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCTGGCCATTTTCTCAAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCTCCACCT

TAGAGGAATGAAAACATATTCAGACAAAACTTGTACGTGAATATTCATAGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGAAAAAGAAAACCTCGCAGCTGCATCA  
ACTGATGAATGGATAGATTAAATGTGTATATCCATACAGCGGAATATTATTGGCAAGGACAATAAAATGAAGTACTGGTAGATGTTACAACACGGATGAA  
CCTTACAAATGTGGAAGCTAAAGATGTCAGTCCGT

[0259] 두 개의 병치된 단편 중 TaqI 주위 서열의 647 bp의 스캔은 낮은 점수의 밸리(valley)를 감싸고 있는 약 210 bp 위치에서 나선형 회전당 5° 이상의 곡률 성향 규모를 나타냈다. 210bp는 낮은 점수의 골짜기를 감싸고 있다. TaqI 영역을 둘러싼 44 bp 서열의 DNA 접힘 및 자유 에너지 추정은 60℃, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 0.78 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다.

[0260] 서열번호 3

[0261] GCAGCTGCGAGGTTTCTTTTCCACTTTCTATTAAGAATAATGCTGCTATGAATATTCACGTACAAGTTTTGTCTGAATATGTTTTCATTCCTCTAAGGT  
GGAGGACTCATGTTAACTCCATGTTTACCATTGAGAAAAATGGCCAGGCTGTTCTTCAAAGCAGCTGCACCATTTTACAATCCCACAGAAGTGTATGA  
GGGTTTTATTTCCTCATATCCTCACTAACACCTGTTTATCTTTTCGAGGTCCTTGCTGAACCTGGACCTATAAATGACGTCAATGATAGTGATCCCTACTG  
CAGAAATCTACAAGTGGCTATAAAGAACTCTGTAGGTAAGAAATCTGTAAGATCAGAAAGTACAATGAATTCACCTTCATAATAAATTACTTGGTGGACACC  
AAATGGGTGCTAAATTGATTGGGTAGAAGGAATTGTATGCCAAGCCACATGGC

[0262] TaqI 제한효소 인식부위의 상류와 하류에 걸친 462bp 서열의 스캔은 약 400 내지 450 bp, 나선형 회전당 5° 이하의 주변 서열 값을 갖는 나선형 회전당 5° 이상의 성향 규모를 나타낸다. TaqI 영역을 둘러싼 44 bp 서열의 DNA 접힘 및 자유 에너지 추정은 60℃, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 -0.93 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다.

[0263] 서열번호 4

[0264] AGTACTTCCTCTCCCTCCCATATTGTTAAAAATAGTTTACATTGCTTCCCAGGCTGGGCTGGTGGAGTTGGCAGAGATGTCAGAGGAACCTGAGTCATGC  
TCAGGCCAAGCCCTGTTGGCAGGCAGACCACTGCTTTCTGGCCTTCCGTGACTATCTGAAAAAATCGTGAATGGCTAGAGCTACTCTTCACTTGCTGAAC  
ATTTTCAAAAAGAATTGAGAACTTCTGGATTAAATGCCTTCTTCTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGAAAATAAAACCCTCATACAC  
TTCTGGTGGGATTGTAATGTTGACGTGCTTTGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCTCCACCTTAGA  
GGAATGAAAACATATTGAGACAAAACTGTACGTGAATATTCATAGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGAAAAAGAAAACCTCGCAGC

[0265] TaqI 제한효소 인식부위의 상류와 하류에 걸친 499bp 서열의 스캔은 약 160 내지 240 bp에서 두 개 곡률 성향 피크를 나타낸다. TaqI 영역을 둘러싼 44 bp 서열의 DNA 접힘 및 자유 에너지 추정은 60℃, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 1.14 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다.

[0266] 서열번호 5

[0267] CCTCTCCACACAAACCTGCTACTGAGTACCTTCGCTAACTTAACCATTTCACCTGGAAGACCACCTACTAGCAGAAGGATTCTTAACAAATGTAAAG  
AAAGTAAGGACTTTACACTAACAATACAAAATAAATCTCTCTTTGACAATTCAAAAACAAAAGATGTTGAACCTTTGACATTTACAGAATTAAATGTCAAA  
TGTGACACAATACCATCATCTGGCTAACTAACTCTTATGCTTTTTTTAGTAAGGAACAACCTTTGAGCCTCAATATCTTAATTCTTAAATGATAAAGAA  
CACTTAACTCAATTTGTTGAGATCAATAAGGTAATGTAAGTGGGATTTTTATTCTTACTTATTTATTCGAAAACCTGGGACCTTCCAGATGGGACTA  
ACTGGGGAAAGTGGACAAGTTACAAACAAAGAACTCAAAGGAAAGTCATTGGCACTGATCTCTAAGATGCTATCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTA  
ACAAATTATAAGCAAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAATAAGCAATTCACAGAACTACTTTTCATGTAGCTTGTATGTGTGCTCCATGT

[0268] TaqI 제한효소 인식부위의 상류와 하류에 걸친 609bp 서열의 스캔은 낮은 점수의 밸리를 가진 약 200 내지 500 bp에서 두 개 곡률 성향 피크를 나타낸다. TaqI 영역을 둘러싼 44 bp 서열의 DNA 접힘 및 자유 에너지 추정은 60℃, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 0.51 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다.

[0269] 서열번호 6

[0270] AAATGATGAGGCACGGGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAAATAATCCCTAAAGGTGATGGTTTTCTTTCCCTACAAATCCTACTT  
TCAGTTCTTTGTACATGGACCCAGAGTGAATGCTGGATCATATGATAATTCTATTTTAACTTCTTGATGGACCTCTGTTTTGTGTTTTTACAG  
AGGCTGCAACATTTTATTTCTACTAATAATGCACAGGGGTTGGATTCTCCACATCCTTGCCAACACTTGATATTTCTGGGTTTTTGTATAATGGCCA  
TCCTAATAGGTGTGGGACATGAGGTTTCAATATGCTTGTGGGACATCGAAAACCTGGGACCTTCCAGATGGGACTAACTGGGGAAAGTGGACAAGTTA  
CAAACAAAGAACTCAAAGGAAAGTCATTGGCACTGATCTCTAAGATGCTATCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTAACAAATTATAAGCAAAGTACTA  
CAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAATAAGCAATTCACAGAACTACTTTTTCATGTAGCTTGTATGTGTGCTCCATG

[0271] TaqI 제한효소 인식부위의 상류와 하류에 걸친 586bp 서열의 스캔은 낮은 점수의 밸리를 가진 약 300 내지 500

bp에서 두 개 곡물 성향 피크를 나타낸다. TaqI 영역을 둘러싼 44 bp 서열의 DNA 접힘 및 자유 에너지 추정은 60 °C, 4.5 mM Mg<sup>++</sup> 이온 조건에서 0.51 kcal/mol의 가장 낮은 열역학적 구조 자유 에너지, ΔG를 산출하였다.

[0272] 참고문헌

[0273] 1. Goodsell, D.S. and Dickerson, R.E. (1994) "Bending and curvature calculations in B-DNA" Nuc. Acids Res. 22, 5497-5503.

[0274] 2. Zuker (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nuc. Acids Res. 31, 3406-3415

[0275] 3. SantaLucia, Jr (1998) A unified view of polymer, dumbbell and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1460-1465

표 1

a.

웰 (Well)	크기 bp	ENSEMBL BLAT 포지션(position) FIP1L1	ENSEMBL BLAT 포지션 PDGFRA	단편 사이의 거리 (Distance(bp) between fragments)	프라이머(Primer) 1	프라이머 2
A1	501	4: 53379986- 53380174*	4: 54294960- 54295285 RF	914786	TTCCACGTGGCCTACACAG	CAGCTGCGAGGTTTCTTTT
A1	647	4: 53379986- 53380318	4: 54285685- 54285944 RF	905367	TGGGAGTGGGTGGAGTGAGA	ACGGACTGACATCTTTAGCTTCC
B1 and B7	462	4: 53379986- 53380176	4: 54278879- 54279091 RR	898703	GCAGCTGCGAGGTTTCTTT	GCCATGTGGCTTGGGGCATAC
C1	499	4: 53379986- 53380194	4: 54281532- 54281784 RF	901338	AGTACTTCCTCTCCCCTCCCA	GCAGCTGCGAGGTTTCTTTT
D7 and E7	609	4: 53361094- 53361416	4: 54281778- 54281990 FR	920362	CCTCTCCACACAAACCTGCTA	ACATGGAGCACACATACAAGCTAC
D7	586	4: 53369589- 53369898	4: 54281778- 54282010 FR	911880	AAATGATGAGGCACGGGTGAA	CATGGAGCACACATACAAGCTAC

\* 프라이머의 서열

[0276]

b. 6 개의 재발성 FIP1L1 및 PDGFRA 상호작용 및 염기쌍 (base pair, BP) 크기

번호	상호작용(Interaction)	웰 번호	염기쌍 크기
1	FIP1L1PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH15A743_FH161379_RF	A1	501
2	FIP1L1 and PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH149644_FH15A108_RFA1	A1	647
3	FIP1L1 and PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH145047_FH147946_RR	B1 and B7	B1: 462
4	FIP1L1 and PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH145047_FH147946_RF	C1	499
5	FIP1L1 and PDGFRA_4_GBAAA81A_GBAA7581_FH147946_FH149AA7_FR	D7 and E7	D7: 609
6	FIP1L1 and PDGFRA_4_GBA31931_GBA36063_FH147946_FH149AA7_FR	D7	586



c. 결합된 단편(ligated fragment)의 서열

번호	서열(Sequence)
1	TTCCACGTGGCCTACCAAGCATGTACGGCCTGGGGGAGAAATCTTGCCATACTGTGCAGCCCAAAATTTGAATGCCAAAGGCTTTGTTGTTCTCTGG GGGCCACAGTCTAGGCTAGTTCTGTGCAGAGTTGTAATTTTGCTTCTCTCCCTCCGAGCTCGAGACCTCTGAAGAGAGTGCCATTGAGA CGGGTTCCAGCAGTTCCACCTTCATCAAGAGAGGAGCAGACCATTTGAAGACATCGAAAGATTAACACAGGTGTAGTGAGGATATGGGAAATAA AACCTCATACACTTCTGGTGGGATGTAAATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCGCTGGCCATTTTCTCAATGGTGAACATGAGATTACCATGT GAGTCTCCACCTTAGAGGATGAAACATATTACAGACAAACCTTTAGCGAATATTCTATGACGATATTCTTAAATAGAAAGTGG
2	TGGAGTGGGTGGAGTGAGAACCTGGGAGAGGCCAGCCCTTTATATCCAGGCAGACAGCTCCAAAGTCCCAATGGATCAAGCCAGTCTTGCAGGG GTGATGCTATTCAGCTACAGATGGCTTGATCCTGAGTCAATTTCTCTTTCCATGCAGTGTGCCACCGTATCTGGCTGCTGCCAACGCTCCTCTG GCACAGGAAAAATTTGAGATCTGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCAATTTGAAAGATTAACACAGGTGTAGTGAGGATATGGGGA AATAAACCTCATACACTTCTGGTGGGATGTAAATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCGCTGGCCATTTTCTCAATGGTGAACATGAGATTAC ATGTAGTCTCCACCTTAGAGGATGAAACATATTACAGACAAACCTTTGACGTGAATATTCATAGCAGCATTTCTTAATAGAAAGTGGAAAAAGA AAACCTCGAGCTGCAACTGATGAATGGATAGATTAAATGTATTATCCATACAGCGGAATATTATTTGGCAAGGACAAATAAAATGAAGTACTGG TAGATGTTACAAACCGATGAACCTTACAATGTGAAGCTAAAGATGTCAGTCCGT
3	GCAGCTGCGAGGTTTCTTTCCACTTCTATTAGAATAATGCTGCTATGAATTTACGTACAGATCAAGTTTTTGTCTGAATATGTTTTCATTCCTCTAAGG TGGAGGACTCACATGGTAACCTCATGTTTACCATTTTGAAGAAATGGCAGGCTGTTCTTCAAGCAGCTGCACCATTTTACAATCCCAAGAGTGT ATGAGGGTTTTATTTCCCATATCCTCACTAACACCTGTTTTATCTTTTCGAGGTCTTCTGAACTGGACCTTAATAGCTCAATGATAGTATCC CTACTGCAGAAATCTACAAGTGGCTATAAGAACTCTGTAGTGAAGAAATCTGTAAAGATCAGAAAGTACAATGAATTCATTAATAAATTAATTGG TGGACACCAATGGGTGCTAAATTTGATGGGTAGAGGAAATTTGATGCCAAGCCACATGGC
4	AGTACTTCTCTCCCTCCCATATTGTAAAAATAGTTTACATTTGCTTCCAGGCTGGGCTGGAGTTGGCACGAGATGTCAGAGAACCTGAGTC ATGCTCAGGCCCAAGCCCTGTTGGCAGGCAGACCACTGCTTCTGGCTTCCGTGACTATCTGAAAAAATCGTGAATGGCTAGAGCTACTCTTCACT TGCTGAACATTTCAAAAAGATTTGAGAACTTCTGGATTAAATTTGCCCTTCTCTCGAAAAAGATAAACAGGTTAGTGAGGATATGGGGAATAAAGC CCTCATACACTTCTGGTGGGATTGAAAAATGGTGCAGCTGCTTTGAAAGAACAGCCCTGGCCATTTTCTCAATGGTGAACCATGGAGTTACCATGTGAG TCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAAACATTTACAGACAAAACTTTGACGTGAATATTCTATAGCAGCATTAATCTTAATAGAAAGTGGAAAAAGAACCTC GCAGC
5	CCTCTCCACACAAACCTGCTACTGATACCTTGGCTAACCTTAACCAATTCATTCACCTGGAAACCCACTACTAGCAGAAAGATTTCTTAACCAATGTA AAGAAAGTAAAGGACTTTACACTAAACATAACAACTAACTCTCTCTTTTGACAAATTCAAAAACAAAGATTTGAACTTTGACATTTACAGAAATTAATGT CAATGTGACACAAATACCATCACATCTGGCTACTACTACTCTTTTGTAGTAAAGAACAACTTTGAGCCTCAATATCTTAATCTTAAATGATA AAGAACCTTAACTCAATTTTGTGAGTCAAAATAGGTAATGTAAGTGGGATTTTATTTTACTTATTTATTCGAAACCCCTGGACCCCTCCAGATG GGACTAAGTGGGAAAGTGGACAAAGTTACAAACAAAGAACTCAAGGAAAGTCAATGGCAGTGAATCTAAAGTCTCAAGATGCTACATGATGATTGGTGGTT GATTTTATTAAACAAATTATAAGCAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAAATAAGCAATTCACAGAACTACTTTTTTCATGTAGCTGTATGTGTG CTCCATGT
6	AAATGATGGGCACGGGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAAAATATTTCCCTAAAGGTGATGGTTTTCTTCCCTACAAATCTTA CTTTCAGTTCTTTGTACATGGACCCAGAGTGGAAATGCTGGATCATATGATAATCTTATTTTAACTTCTTGATGACCTCTGTTTTTGTGTTTTTA CAGAGGCTGCAACATTTATCTCTACTAATAATGCACAGGGTTGGGATTTCTCCACATCCTTCCCAACACTTGATATTTCTGGGTTTTTGATAAT GGCATCCTTAATAGGTGGGGACATGAGGTTTTCAATATGCTTGGGACATCGAAACCCCTGGGACCTTCCAGATGGGACTAACTGGGGAAGT GGCAAGTTACAAACAAAGAACTCAAGGAAAGTCAATGGCACTGATCTCTAAGATGCTATCATCATGATGATTGGTGGTTGATTTTACAAATATA AGCAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAAATAAGCAATTCACAGAACTACTTTTTTCATGTAGCTGTATGTGTGCTCCATG

[0278]

표 2

표시(Indication)	세포주 또는 임상적 샘플	IDH1 SNP rs11554137 상태(status)	IDH1 R132H 상태	20 ng 에서 FIP1L1-PDGFR 3C DNA 카피(copies) (+/-)	20 ng 에서 MMP1 3C 카피
급성 골수성 백혈병 (Acute Myeloid Leukemia , AML)	AML-193	Wild-type	Wild-type	★ (0.04)	0.37
악성 림프관성세포종 (Anaplastic oligoastrocytoma)	BT-412	Wild-type	<b>R132H</b> **	Not in assay	
다형성 신경교아종 (Glioblastoma multiforme)	DBTRG-05MG	Wild-type	Wild-type	★ (0.05)	0.35
AML(호산성(Eosinophilic))	EOL-1	Wild-type	Wild-type	★ (0.03)	0
급성 골수단핵구 백혈병 (Acute Myelomonocytic Leukemia)	GDM-1	Wild-type	Wild-type	★ (1.99)	7.3
AML	<b>HL-60</b>	<b>rs11554137*</b>	Wild-type	★ (0.18)	1.24
AML	<b>KG-1</b>	<b>rs11554137</b>	Wild-type	— (0)	4.2
아교 모세포종 성상 세포종 (Glioblastoma Astrocytoma)	U-373	Wild-type	Wild-type	+ (2.01)	1.24
아교 모세포종 성상 세포종	U87	Wild-type	Wild-type	Not in assay	-
림프교종 (Oligodendroglioma)	47436	Wild-type	<b>R132H</b>	— (0)	1.89
림프교종	47679	Wild-type	Wild-type	★ (1.19)	2
림프교종	81600	Wild-type	<b>R132H</b>	— (0)	0.96
림프교종	174694	Wild-type	<b>R132H</b>	★ (0.04)	0.61
림프교종	184263	Wild-type	Wild-type	★ (0.06)	5.19
림프교종	30736	Wild-type	Wild-type	— (0)	1.12
지방 생검(Adipose Biopsy)	91013A	Wild-type	Wild-type	— (0)	6.05
정상 혈액(Normal Blood)	17153	Not analysed	Not analysed	— (0)	4.53
정상 혈액	17335	Wild-type	Wild-type	— (0)	2.18
정상 혈액	17353	Wild type	Wild-type	— (0)	3.09

\*01전의 양성(Previously positive), Dodémont et al .,2011    \*\*01전의 양성, Flavahan et al., 2016



표 3

형광단 (Fluorophore_)	Abs [nm]	Em [nm]	3' 소광제(Quencher)
FAM	495	520	TAM, BHQ1, DAB, Eclip
TET	521	536	TAM, BHQ1
JOE	520	548	TAM, BHQ1, BHQ2
Yakima Yellow	530	549	BHQ1, Eclip
HEX	535	556	TAM, BHQ1, BHQ2, Eclip, BBQ650
Cyanine3	552	570	BHQ1, BHQ2, BBQ650
ATTO 550	554	576	TAM, BHQ2
TAMRA	544	576	BHQ2
ROX	575	602	TAM, BHQ2, BBQ650
Texas Red	583	603	BHQ2, BBQ650
Cyanine3.5	588	604	BHQ2
LC 610	590	610	BHQ2
LC 640	625	640	BHQ2, BBQ650
ATTO 647N	644	669	BHQ2, BBQ650
Cyanine5	649	670	BHQ2, BBQ650
Cyanine5.5	675	694	BHQ2, BBQ650
ATTO 680	680	700	BBQ650

[0280]

표 4

프로브의 세부사항

프로브 명칭 (Probe Name)	4507FPRC	OBDHF010_03_FAM
프로브 서열 (Probe Sequence)	5'-Texas RED- TCAGCAAGGACCTCGAAAGATAAAACA-BHQ2-3'	5'-FAM-ATTATTTCGAAAAACCCTGGGACCC-BHQ1-3'
정방향 프라이머 (Forward Primer)	5'-GCAGCTGCGAGGTTTCTTT-3'	5'-CCTCTCCACACAAAACCTGCTA-3'
역방향 프라이머 (Reverse Primer)	5'-GCCATGTGGCTTGGGCATAC-3'	5'-ACATGGAGCACACATACAAAGCTAC-3'
상호작용 식별 (Interaction Identifier)	B7 462 bp, PCR 8.	D6/E7, 609 bp.
게놈 위치 (Genomic Location)	4:54278879-54279091	4:53361094-53361416
방향 (Orientation)	Forward	Forward
중복된 유전자 (Overlapping genes)	RP11-231C18.3, PDGFRA	FIP1L1, RP11-231C18.3
쿼리 시작-끝 (Query start-End)	188-400	1-191
길이(Length)	213	323
점수(Score)	413	620
E-값(E-val)	1.6E-115	6.5E-178
%ID	100.00	100.00

[0281]

[0282]

실시예 4. 추가 작업

[0283]

이소성 티로신 키나아제(ectopic tyrosine kinase) 활성의 검출은 현재 여러 표시(indications)에서 통상적인 진단 방법(예를 들어, 서열화)에는 제외되어 있다.

[0284]

티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 다사티닙, 이마티닙 및 이브루티닙(Ibrutinib)/임브루비카(Imbruvica)(Janssen-Cilag Ltd))는 수많은 악성 종양(만성) 및 헌법상의 질환(constitutional disorders)을 위해 개발중이다. 브루톤 티로신 키나아제(Bruton Tyrosine Kinase, BTK)에 대한 잠재적인 비-악성 종양 표지의 실시예는 관절염을 포함한다.

[0285]

임상의는 티로신 키나아제 억제제를 처방하기 전에 표적 티로신 키나아제에서 분자적 병변(molecular lesion)의 증거를 요구한다. 티로신 키나아제 억제제(TKI)를 사용하는 잠재적인 생명-구조 치료학적 진단 개입은 종래의 진단법을 사용하여 놓칠 수 있다.

[0286]

약물 치료에 관한 본 발명의 양태:

- [0287] (a) 이마티닙은 3C 구조를 치료학적으로 표적한다:
- [0288] 직접적으로 활성화된 티로신 키나아제에 작용하는 것으로 알려진 ATP 모방체 이마티닙은 또한 cKIT와 같은 이마티닙 반응성 유전자에서 3C 염색체 구조에 직접적으로 작용하는 것을 입증한다.
- [0289] (b) GSK는 3C 구조를 치료학적으로 표적한다:
- [0290] 이 약물이 다중 세포주에서 염색체 구조를 직접적으로 억제하는 것을 입증하는 IDH1 억제제 GSK864에 대한 데이터를 제공한다. 효과적인 치료를 위한 종양학 환자의 계층화는 티로신 키나아제 유전자에서 활성화 돌연변이를 확인하고, 다른 경로에서 변화를 획득한 것으로 수행될 수 있다. 이 방식으로 환자를 계층화하는데 도움이 되는 진단 절차는 매우 잠재적인 이점이다. FIP1L1 및 PDGFRA 인핸서(enhancer) 영역에 대한 구조적인 변화는 IDH1 R132H 돌연변이를 가진 신경교종 환자에서 PDGFRA 발현의 상향 조절한다. 이소성 PDGFRA 과발현은 이마티닙으로 치료할 수 있다.
- [0291] 다음 데이터는 3C 마커에 관한 것이고, 기능적 qPCR 분석에서 사용한다. ABL1과 cKIT는 비-악성 샘플 및 세포주 사이에서 바이너리 차이를 나타낸다.
- [0292] RC = 역방향 상보성(reverse complement). 진정한 역방향 프라이머 서열은 RC 서열에 인접해 있다.
- [0293] 3C 상호작용이 확인되고 다음과 연관된 상호작용에 대한 유전자:
- [0294] 1. ABL1, 세포질 티로신 키나아제 유전자는 9q34에 위치함: 질병 표시: 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프성 백혈병(CLL), 유방암, 만성 골수성 백혈병(CML) 및 CML-급성기 또는 위장관 기질 종양(GIST). 골수이형성증후군(MDS) 또는 골수증식성 질환(골수증식성 신생물, MPN).
- [0295] 2. 브루톤 티로신 키나아제, 세포질 티로신 키나아제 유전자는 Xq22.1에 위치함: 질병 표시:
- [0296] X-연관무감마글로불린증(XLA), B 세포 악성 종양, NHL, 림프종(모든 분류), 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 재발성 성숙 B-세포 신생물을 가진 환자, 만성 이식편대숙주병, 재발성 털세포백혈병, 재발성 또는 난치성 고체 종양, 난치성 맨틀 세포 림프종, 증폭된 식도 위 암종 및 류마티스 관절염.
- [0297] 3. cKIT, 수용체 티로신 키나아제 유전자는 4q12에 위치함: 질병 표시:
- [0298] 비만세포증 및 비만세포 백혈병 및 전립선 종양. 진행성 흑색종, 돌연변이된 악성 흑색종, 2차 선 절제 불가능 또는 전이성 위장관 기질 종양(GIST), 발현하는 악성중피종, 진행성, 백금-난치성 난소암, 재발된 난소 상피성, 나팔관 또는 원발성 복막암, 또는 난소 낮은 악성 잠재적 종양, 유두장액성 상피암을 가진 환자, 확장-단계 소세포폐암, 국소적으로 진행된 비인두암, 재발된/난치성 비-호지킨 림프종, 전이성 신장 세포암, 전이성 위소장 이자 신경 내분비 종양, 재발성 난소 투명 세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 지속적인 자궁암 및 유방 종양.
- [0299] 4. FGFR1, 수용체 티로신 키나아제 유전자는 8q11에 위치함: 질병 표시: 갑상선암, 구강 선종, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 전립선 종양 및 유방암. 전위된 FGFR1-3, 돌연변이된, 또는 증폭된 재발성 두경부암. FGFR-TACC 유전자 혼합을 발현하는 재발성 악성 신경 교종, 진행성 비-소세포성폐암을 가진 환자.
- [0300] 5. FIP1L1, PDGFRA(4q12)에 빈번하게 융합된 폴리아데닐화 특이적 인자. 상기 비-티로신 키나아제 유전자:iHES, 만성 백혈병(Chronic Leukaemia's).
- [0301] 6. FLT3, 수용체 티로신 키나아제 유전자는 13q11-12.2에 위치함: 질병 표시: 만성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 유방암, iHES, 만성 백혈병, 비-소세포성 폐암(NSCLC), 대장암, 전이성 흑색종 또는 신장암, 신경 교종, 난치성 호지킨 림프종, 이전에 치료된 난소암, 국소적으로 진행된 비인두암, 난치성 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 수미티닙-실패 위장관 기질 종양(GIST).
- [0302] 7. PDGFRA 수용체 티로신 키나아제 유전자는 4q12에 위치함: 질병 표시: 신경 교종, 만성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 유방암, iHES. 만성 백혈병.

표 5

ABL1 3C 상호작용 1								
상호작용의 명칭: ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_FR								
프로브의 선택된 서열. Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입.  5'-CTTATAGCCTGTCTCTCTTGCTGATCGAGGTTGCAACGAGCTGAGATTGC-3'								
정방향 프라이머(forward primer)의 서열: 5'-TTGGAGTTCAGGGTGATACTGTC-3'								
역방향 프라이머(reverse primer)의 서열: 5'-ACCAACGCTATTCTTGGCTTCCA-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성(true homologies)이라는 것을 유의할 것.								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
9:130719465-130719839	ABL1	Forward	96	470	375	715	2.00E-206	99.20
9:130702984-130703074	EXOSC2	Forward	5	95	91	172	6.00E-43	96.70
X:136026579-136026620	SLC9A6	Reverse	93	137	45	65	1.10E-10	93.33
말초 혈액 샘플(peripheral blood samples)을 사용하여 정상 및 악성 물질(CML, CML-BC, CLL, 유방암)을 구별하는 혈액 기반 테스트(blood based test). 상기 양성 대조군은 CML 급성기(blast crisis) 세포주 K562 이다.								
Cycle qPCR (W103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

[0303]

>ORF1\_9\_130700600\_130703071\_130719461\_130720884\_FR

GCAAGCTCCACCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGTGCCCC  
ACCATGCTCTGCTAATTTATCTATTTTATAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTCC  
TGACCTTGTGATCCACCCGCCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGACATGAGACACTGCACCCTGCCCCAT  
TCCTTTTAATCTCCCTTGAATTAGCTGTTTGGTTGATTTGGAGTTCAGGGTGATACTGTGTGAGTCATAAATG  
ATTTATTTGTGAATTTCTGTGGCTGGTCAAGTATTTTGGTCTGTTTGTATTTCCTTCCCTCTCTGTGTCTCC  
TTATAGCCTGTCTCTCTTGTCTGATCGAGGTTGCAACGAGCTGAGATTGCACGCCACTGCACTCCCAGCCTGGGCG  
ACGGAGTGAGACTCCATCTCANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGATGACAGCCCAACCTGTCA  
CTTTTTCAGATCCCTTTTATGAAAGAATTGCTTAAGTTGTGTCTGAAGACAAACCAATTTCTTTGGACCGTGT  
GGTATTCTTTTTCTAAGGGAATACCATGTTATTTTGTGTTACAGATTGTTTGCATCTTTCATAGGCTGATCTTT  
CTAGAGTTGGTTAATATCCATGTAGGTTAGATTGAAAACTTGAATTCAGAAATGTACGGTGTGGAGCAGACAT  
GGATCTGGAAGCCAAGAATAGCGTTGGTGTGTTGTTGATGGTGAATCTG

[0304]

[0305]

랩 칩(Lap Chip)데이터는 정상 물질(환자 375)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 만성 골수성 백혈병 급성기(blast crisis) 세포주 K562(68℃ 프라이머 어닐링 온도)에서는 증폭되지 않는다. 이러한 패턴은 어닐링 온도 67.5℃ 및 66.4℃에서도 발견되었다. 예상되는 생성물 크기: 515bp.

표 6

ABL 3C 상호작용 2

상호작용의 명칭: ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_RF								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입.								
5'-GGGCCAAGTGTGACTCTCAGGTTTTCGACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGT-3'								
정방향 프라이머의 서열: 5'-ATGCAGGAGGTAAAATGGAGGGT-3'								
역방향 프라이머의 서열: 5'-CAAAGAGACAGCTCCGTCAGAGA-3'								
PCR 서열 BLAT의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성(true homologies)이라는 것을 유의할 것.								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
9:130720517-130720886	ABL1	Reverse	256	625	370	724	4.40E-209	100.00
9:130700586-130700859	EXOSC2	Reverse	1	273	275	497	7.90E-141	97.82
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(CML, CML-BC, CLL, 유방암)을 구별하는 혈액 기반 테스트.								
Cycle qPCR (WI103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

>ORF1\_9\_130700600\_130703071\_130719461\_130720884\_RF

CCACTGCACCAGAGCAAAGAGCAAAGGAGAGATGCAGGAGCTAAAAATGGAGGGTGGGAAGAGAATGGCTGAAGG  
AGAGGGTGGCCTTATTGGCCCATTTCAAGGATTTTGACTTTGATTTCATATGATGTGGGAAGGCCTTGGAGAATTT  
TCCGAGGGGACTATACTATCTGATGTATGTTTCAGTATGAAATAGAATCTCTCTGGCTGCTATGATCTGAAGGAG  
GACAAGGGAGCAGGGATTCCACGGGGGCATTGATTGCACAGAGCCAGGTAAGAGTGATGATGCTTGGACCAAAGT  
GGTGGCACTGGGTGGAGGGTCAGAACCGACAAAGATTGCTCTCGGATTAGATGTGGGATATGGGGGTGTGAGAGG  
GGCCAAGTGTGACTCTCAGGTTTTCGACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGC  
ACCTGGCCTTCTGTCTGTATTTTAAAAAAAAGATATTCATGACAACCAAGGGGAGAGGTAAGGTCACAGTGATG  
TGCTCTGGGTCAAAGATTGTTGAGCCTGGACCATTTGGAGAGGGGAGGAAAAATGGAGGTGTGGGGTCAAGGGGA  
GAGGCTGCAGAGGACAGGACAGTGTGTGGCCAAGGCTGCTGTTTGTTCCTTCATCACCTGGCCAGGCTGAGGTC  
CAGGCAGTGTCTCTGACGGAGCTGTCTCTTTGCACACGAGGAGCCTGAAATATGGAAAAGTAAGTCGGGCTCTT  
GATGTTCTGTTTGTCTGACTGAGACTACAAGGCTATTTTGAATCCCAT

랩 칩 데이터는 정상 물질(환자 375)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 67.5°C에서 악성 물질(세포주 K562로부터 유래됨)에서는 증폭되지 않는다. 예상되는 생성물 크기: 676bp.



표 7

브루톤 티로신 키나아제 3C 상호작용 1

상호작용의 명칭: ORF2_X_101355470_101357976_101407183_101408846_FR										
프로브의 선택된 서열.										
5'-TTGAGGACAAGGACCTCGAGATACTGCCGAGAAATCC-3'										
정방향 프라이머의 서열. 5'-ATGTTGTCTAACCTGTATGTTCT-3'										
역방향 프라이머의 서열. 5'-CTTCCTCTGCCGGGTGCTAA-3'										
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것.										
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlap ping Gene(s))	방향 (Orie ntatio n)	쿼리 명칭 (Query name)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	쿼리 방향 (Quer y ori)	길이 (Leng th)	스코어 (Score)	E- 값 (E- val)	%ID
X:101407180-101407241 (3 bp)	RPL36A-HNRNPH 2, GLA	Reverse	Query_1	5	66	Forward	62	123	3.00E-25	100.00
X: (2 bp) 101357937-101357978	BTK	Reverse	Query_1	61	102	Forward	42	83.8	3.00E-13	100.00
5:154143558-154143584	MFAP3	Forward	Query_1	65	91	Forward	27	46.1	0.057	96.30
12:41941194-41941215		Reverse	Query_1	69	90	Forward	22	44.1	0.22	100.00
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(B-세포 백혈병)을 구별하는 혈액 기반 테스트. 양성 대조군은 세포주 RAMOS(버킷 림프종(Burkitt's lymphoma line))										
Cycle qPCR (WI103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.										

B 세포 악성종양(B cell malignancies)=브루톤 티로신 키나아제(Bruton Tyrosine kinase)가 관련된 것으로 여겨지는 임의의 악성 종양.

>ORF2\_X\_101355470\_101357976\_101407183\_101408846\_FR  
 ATGAGTCCTGAAACAGAGAGAGAGGGTCATGCTGTTGGTGTGGTGTAGGAGGTGGGATGCC  
 TCACACATCCTCACTTAAAGCCTCACACTTCCGGTGTGTATCTTTCTAGTACATTTTGAA  
 TCCCAGAAGACCTCCATGAACCCACATATTTCCAGAGGTTTCTCCTCTCACAAAATACTT  
 TTCAGGGACAAAAAAGAGAAAAATACTAATTGAAATACACTGCCTAACTGAATATATTTCCC  
 ACCTCCCAGCCCCAGGCTTAGCTCACATCCTACCTTCTTGATGAAGCTGTTCCCCCATATC  
 CATGCCCTCACTAATGTCTCAGTTTTTTAGAAATTTTACAGTGCTTATAAACTTTCTTTCTG  
 ATGTTGTCTAACCTGTATGTTCTTTGAGGACAAGGACCTCGAGATACTGCCGAGAAATCC  
 ACGACCCCAAAAGGAGAAAAAATGGCACGAATCTTAGTTCCCCATTCCTCCTACCCACCC  
 TAGATGTTCTAACGGTTAGCACCCGGCAGAGGAAGAGCAGAAGTTCACAAGAAGGGTCTG

랩 칩 데이터는 이 어닐링 온도에서만 세포주에서 3C 상호작용의 증폭을 나타낸다. 예상되는 생성물 크기: 155bp.



표 9

FGFR1 3C 상호작용 1:								
상호작용의 명칭: ORF4_8_38427499_38430449_38480545_38486034_FF								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입. 5'-AAACCCAGCAGCCCCCTGCCAAGTCGAGGGAGCAGCTCCCCACCCAGCCC-3'								
정방향 프라이머의 서열: 5'-AGAAAGAGGCAAAGTTAGGAAGCA-3'								
역방향 프라이머의 서열: 5'-AAAACAGCAACCTATTTCAGAGAGC-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
8:38430233-38430452	FGFR1	Forward	9	228	220	422	2.90E-118	97.27
8:38485833-38486036		Reverse	224	427	204	403	2.00E-112	100.00
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(갑상선 암, 구강 선종, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 전립선 종양 및 유방암)을 구별하는 혈액 기반 테스트. 양성 대조군은 세포주 CCL30(편평 세포 암종(squamous cell carcinoma))								
Cycle qPCR (WI103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

[0315]

>ORF4\_8\_38427499\_38430449\_38480545\_38486034\_FF (5)

GAGCCGCACCATCCTGGGCATCACTTACTGGAGGCTACTGAGCCAGGGCAGTGGGAATTGGAGCATGG  
GTCAGTGGGGAAAACAGCTGGCTGGCTGGGAACCCCCATCTCTTTTCCACCCCACTCCTCCAAAAGTC  
AAAGGAAGAAAGAGGGCAAAGTTAGGAAGCAAGCTGTAGCAGCATTAAAGCGCATTTTCATTTCCCCATCC  
TAAGGGGAAAGGTCGGCCCTCCCCAGGACTTCTTTGTGTCCGGAGTTGCCCTTCCCCAGATGCTCAG  
TTCTTTGCCAAGATTGCCTACTTGCCAGAGGAACACCCCAATTCTCTTTGGGATAGCTCAGCCTCACCCCT  
TCCCTAGCAACAGCTGAACAAACCCCGCCCTCAAACCCAGCAGCCCTGCCCAAGTCGAGGGAGC  
AGCTCCCCACCCAGCCCCAGGATCTGGGTCCAGCAGACCTGGAGAGTCTGCCCTGGCTGCACAGACCG  
TGGTGGGACTGCTGTGGCGGAACCTGTGTCTGGAGACAATGCAGCCCATGTGACAGGCCTTAATGAGTC  
CCTTCTGGAATCCACAATGGCCAAGTGGCACAGTCTCTCTGAATAGGTTGCTGTTTTCAGCAGTGG  
CAGGGGCTGTGTGTGGCAACCTCCTCTTATTCAACCTCCGGCATCTCTCTTTTCTTTCTTTCTTT  
CTTACCTTTGTCTTTTATCTACTTTAACTCTCCTGTTCCCTTTTGATCTCTTCTTCTCCTCCACCCCT  
CCTGATTTCTGTTGTTTCTTAGACACAAAATCGCCCTTCACTCCTGCCCTGT

[0316]

[0317] 랩 칩 데이터는 정상 물질(환자 375)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 68℃에서 악성 물질(세포주 CCL30)에 서는 증폭되지 않는다. 예상되는 생성물 크기: 460bp.



표 10

FIP1L1 3C 상호작용 1:

상호작용의 명칭: >FIP1L1PDGFRA_4_54231931_54236063_55143356_55145047_FR								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). 5'-TATGCTTGTGGGACATCGACAAAAGCAATTATGC-3'								
정방향 프라이머의 서열. 5'-TGGAAGTGACACATACAGATTTCAA-3'								
역방향 프라이머의 서열. 5'-CTTTCTGCACCGTAGCCAGC-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
4:53369634-53369898		Forward	10	274	265	517	3.00E-143	99.62
4:54277188-54277335	AC058822.1, PDGFRA	Forward	271	418	148	293	7.00E-76	100.00
10:61991285-61991356	ARID5B	Forward	123	194	72	87.7	8.00E-14	90.28
10:103537280-103537327	NEURL1	Forward	35	82	48	87.7	8.00E-14	97.92
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(급성 골수성 백혈병 )을 구별하는 혈액 기반 테스트. 양성 대조군은 세포주 EOL1 (호산구성 백혈병 세포주(Eosinophilic acute leukaemia line))								
Cycle qPCR (WI103).표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

[0318]

>FIP1L1PDGFRA\_4\_54231931\_54236063\_55143356\_55145047\_FR  
CAGCTAAAGACTACTTTTCCAAGCCTCTTGCAGCTAGCTATGGACAAATGATGAGGCACG  
GGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAATAAATCCCTAAAGGTGTAT  
GGTTTTCTTTCCCTACAAATCCTACTTTTCAGTTCTTTTGTACATGGACCCAGAGTGGAAT  
TGCTGGATCATATGATAATTCTATTTTAACTTCTTGATGGACCTCTGTTTTTGTGTTTGT  
TTTTTACAGAGGCTGCAACATTTTATATTCCTACTAATAATGCACAGGGGTTTCGGATTTC  
TCCACATCCTTGCCAACACTTGATATTTTCCTGGGTTTTTTGATAATGGCCATCCTAATAG  
GTGTGGGGACATGAGGTTTTCAATATGCTTGTGGGACATCGACAAAAGCAATTATGCTAA  
TTTCCTTCCCTGTGGGCTCAATTCCTTTTTTGACACGATGACTTGGAGGAGTCATTATGA  
TTACTCCAAACAGGAAAGACACTCGCCCAGCTGTCCGCCCGCAGAGAGCTGGCTACGGTG  
CAGAAAGCTGAGGAGGCGTCTGGAGTTTTTGGGTGTTAATGATTCTGCCTGCCACAGGT  
CGGGTCTTGGGGTCTGGAGCGTTTGGGAAGGTGGTTGAAGGAACAGCCTATGGATTAAGC  
CGGTCCCAACCTGTCATGAAAGTTGCAGTGAAGATGCTAAAACGTAAGTGCTCCTTCCTG  
GGGATTTTTTGAGCACGGGGATTTTTTGAGCATGGGGATATTAAGGAATTTCTCAAAAT  
CATGCAGCTAGTAAATAAGA

[0319]

표 11

FLT3 3C 상호작용 1:

예측된 상호작용의 명칭: ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RF								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입								
5'-CCTCGGCGACAGAGTGAGACTCTGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'								
정방향 프라이머의 서열: 5'-GGTATGTGCCTGTAGTCCCAACT-3'								
역방향 프라이머의 서열: 5'-GAAGGATGGTGAAACGCTTACGG-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
13:28025285-28025376	FLT3	Forward	81	172	92	174	1.50E-43	96.74
13:28117987-28118056		Forward	15	84	70	139	5.30E-33	100.00
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(급성 골수성 백혈병)을 구별하는 혈액 기반 테스트.								
Cycle qPCR (W103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

[0320]

>ORF5\_13\_28025286\_28026644\_28116701\_28118054\_RF

TAATTGCATCACTGCACTCCAGCCGGGGCAACAGTGAGAACTTGTCTTAAAGAAACAAAGCAGGTTCTTTCTCTCAGAAGCCCTCTCTCTTACTAGAGAGAGAGCTGTTCTCCTCTCTCTTTCTTCTATTAAACCTCCGCTCCTAAAAACACANNCCCTAAAAAACTAGCCTGGGCAACATGGTAAACCCCTGTCTCTACAAAAACACAAATAAACTAGCCAGGCCCTGGTGGTATGTGCCTGTAGTCCCAACTATTCAGGGAAGCTGAGGTGGGAGGTTTGCTTGAGACCGGGAAGTCCAGGCTGCAGTGAGCCGAGATGGCGCCACTGCACTCTAGCCTCGGCGACAGAGTGAGACTCTGTCTCATCTTTTGGTTTCTGAACTCAGCCCACTTTCCCTCACATAATACAGATCTTCCCGAGAGTCCGTAAGCGTTTCACCATCCTTCTTTTTCCAGTTTGCCTTTGTAAAGCTCATTTCTTTTACTGTGAAATTAATAAATAGCAATAATACAAATCTCTTTTAAGGTATATAAAAATTTCTTCCCTGAGGAGCTCTGTAGGAATTATAAGTAGATCACGATTCATTTATTTCTAATATACGAGTTTAACCAATTTACATTTACATATCTTTAGGAAATGGCTTCATGCTTTCAGACCACAAATATCCAAAAGGAATAATTCAGTGTATTTAATATCCAGTGAACAGAACGAATCAAAGGGCTAAGTACTGACCAGTGGATACTGGTCAC

[0321]

[0322] 랩 칩 데이터- B 행(row). 이는 정상 물질(환자 376)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 67.5℃에서 악성 물질(AML 환자 244로부터 유래됨)에서는 증폭되지 않는다. 예상되는 생성물 크기: 223bp.



표 13

FLT3 3C 상호작용 3:

상호작용의 명칭: ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RR								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입.								
5'-GAGTTCAGAAACCAAGAATGAGATCGAGTGATTGCTAGGTGATGGACCT-3'								
정방향 프라이머의 서열: 5'-GAAGGATGGTGAAACGCTTACGG-3'								
역방향 프라이머의 서열: 5'-TGCACCCCAACAGGAGTTTTCTA-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것.								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
13:28116700-28116784		Forward	50	134	85	164	1.40E-40	98.82
13:28025280-28025338	FLT3	Reverse	1	57	59	93	2.40E-19	96.61
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(급성 골수성 백혈병)을 구별하는 혈액 기반 테스트.								
Cycle qPCR (WI103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

>ORF5\_13\_28025286\_28026644\_28116701\_28118054\_RR  
 GTGACCAGTATCCACTGGTCAGTACTTAGCCCTTTGATTCGTTCTGTTCACTGGAATATTAAATACA  
 CTGAAATTATTCCTTTTGAATATTTGTGGTCTGAAAGCATGAAGCCATTTCCTAAAGATATGTAAAT  
 TGTAATTTGGGTTAACTCGTATATTAGAATAAATTGAATCGTGATCTACTTATAATTCTTACAGAGC  
 TCCTCAGGGAAGAATTTTATATACCTTAAAGAGATTTGTATTATTGCTATTTATTAATTTACAGT  
 AAAAAGAAATGAGCTTTACAAAGGCAAACTGGAAAAAAGGAGGATGGTGAAACGCTTACGGGACTCTC  
 GGGAAGATCTGTATTATGTGAGGGAAAGTGGGCTGAGTTCAGAAACCAAGAATGAGATCGAGTGATT  
 GCTAGGTGATGGACCTGTAGGGAGAGATCACATAGATGAGTTCAGGTGGTAAATAGAAAACCTCCTGTTG  
 GGGTGCACTGAGAGATGAAGGTAGTGAAATGAAAGGATGGGGATCAATTTTATATGAGGGCTTTAATT  
 TGAAATGGGAATTTGGTGATATTCTCAGAGCAGCACAAAGTTTTCATGCCATGGAAAAGCAGCAGGAAA  
 AATGTAAACCTTGCCAAATACACGGGAAAGTCTCCAAGGCTGCCAGTGACTTACTTGCCTATAAACA  
 AAGCCATTCCTGAGCACTTCTGGCTATGAAATTTCAAAATACATGTTTTAGAGAATTTTACTGACACT  
 TTTATGATTTTAGAGGATAATTTAGATTTTCATAAATTTTGTTCCTTCCTT

랩 칩 데이터는 정상 물질(환자 376)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 68.0℃에서 악성 물질(AML 환자 277로부터 유래됨)에서는 증폭되지 않는다. 예상되는 생성물 크기: 173bp.



표 14

FLT3 3C 상호작용 4:

상호작용의 명칭: ORF5_13_28009061_28014204_28025286_28026644_FR								
프로브의 선택된 서열(테스트 할 것). Taq I 접합부(junction)의 양쪽에 25bp 영역을 삽입								
5'-GCTGGAGGATTGCTTGAGCTTGGGAGGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'								
정방향 프라이머의 서열: 5'-GCTTCTGGAGGCCAGGGATTAT-3'								
역방향 프라이머의 서열: 5'-AGCCCCCTTGATTCTGTTCTGTTTC-3'								
PCR 서열 BLAT 의 포지션. 처음 두 줄은 참 상동성이라는 것을 유의할 것.								
게놈 위치 (Genomic Location)	중복 유전자 (Overlapping Gene(s))	방향 (Orientation)	쿼리 시작 (Query start)	쿼리 끝 (Query end)	길이 (Length)	스코어 (Score)	E-값 (E-val)	%ID
13:28025286-28025660	FLT3	Forward	325	699	375	723	6.80E-209	100.00
13:28013880-28014203	FLT3	Forward	1	324	324	627	6.70E-180	99.07
X:47532217-47532398		Reverse	132	313	182	267	1.10E-71	84.07
말초 혈액 샘플을 사용하여 정상 및 악성 물질(급성 골수성 백혈병)을 구별하는 혈액 기반 테스트.								
Cycle qPCR (WI103). 표준 곡선에 사용된 3C 분석 서열화된 생성물. 가수분해 프로브는 3C 단편의 접합부를 표적으로 함.								

[0329]

>ORF5\_13\_28009061\_28014204\_28025286\_28026644\_FR  
CACACTCATGCTTCATAAGAAAGGGCTAGTGCTTCTGGAGGCCAGGGATTATTTTATTTAGTTTTA  
TTTAGTTGTCTACTTCACTGCACTGAACCTTAAAGAGCTTTTAATTTATTAATCATTGGCTGAAATC  
AGGAAAGGTGTTTTTTTCCCTAAAAACATTTTATCAATATGTCTTAGGGCAGGCAGAGGAGCTCAT  
GCCCTGTGATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGGGAATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCA  
GCCTGGGCAATACAGTGATACCCTATTTCTACAAAAATAAAAACTAGCCTGGCGTGGTGTGCCCC  
TCCCATGGTCTAGCTACTTGAAGGCCGTGGCTGGAGGATTGCTTGAGCTTGGGAGGTCGATCTCAT  
TCTTTGGTTTCTGAACCTCAGCCCACTTTCCCTCACATAATACAGATCTTCCCGAGAGTCCCGTAAGCG  
TTTCACCATCCTTCTTTTTTCCAGTTTGCCTTTGTAAAGCTCATTTCTTTTACTGTGAAATTAATAA  
ATAGCAATAATACAAATCTCTTTAAGGTATATAAAAAATCTTCCCTGAGGAGCTCTGTAGGAATTAT  
AAGTAGATCACGATTCAATTTATTCTAATATACGAGTTTAACCCAATTTACAATTTACATATCTTTAG  
GAAATGGCTTCATGCTTTCAGACCACAAATATTCCAAAGGAATAATTTAGTGTATTTAATATTCCA  
GTGAACAGAACGAATCAAGGGGCTAAGTACTGACCAGTGATAGTGGTCAC

[0330]

[0331] 랩 칩 데이터는 정상 물질(환자 376)에서 3C 상호작용의 증폭을 나타내나, 68℃에서 악성 물질(AML 환자 277로부터 유래됨)에서는 증폭되지 않는다. 예상되는 생성물 크기: 742bp.

[0332] 추가적인 데이터

[0333] 온도 구배 데이터의 확인은 다음과 같이 제공된다. 알파벳 순서로 각 유전자에 대하여 선택된 상호작용은 하기에 나타내었으며, 20 ng(반응 당 = 96 웰 플레이트 당 하나의 웰)의 각 상호작용에 대한 평균 카피가 포함되었다.

[0334] 1. ABL1 ABL1-515 K562 세포주 및 정상 혈액(10ng/반응)으로부터 유래된 물질의 SYBR-기반 qPCR 분석.

[0335] 정상 혈액에서 20ng 당 33.24667, SD +/-35.04153 카피와 비교하여, K562는 20ng의 감소된 평균 카피 수(12.36333, SD +/- 15.67294)를 나타낸다(p = 0.143245 T 테스트).

[0336] 2. 브루톤 티로신 키나아제(Bruton Tyrosine Kinase)



- [0337] ORF2\_X\_101355470\_101357976\_101407183\_101408846\_FR
- [0338] 정상 혈액에서 20ng 당 43.83277 SD +/- 72.808926 카피와 비교하여, 세포주(BT142, EOL1 및 HL60)는 20ng의 감소된 평균 카피 수(20.99338 SD +/- 43.413166)를 나타낸다(0.41426 T 테스트).
- [0339] 3. cKIT 실험: 매우 중요한 차이점
- [0340] ORF3\_4\_54711719\_54715167\_54736749\_54740853\_FR
- [0341] 정상 혈액에서 20ng 당 2.639932(SD +/- 1.742175) 카피와 비교하여, 악성 세포주(BT142, EOL1 및 HL60)는 20ng의 감소된 평균 카피 수 (0.205135SD +/- 0.453526)를 나타낸다(p = 0.001294 T 테스트). 이는 상기 세포주 및 비-악성 샘플 사이에서 매우 중요한 차이점이다.
- [0342] 4. FGFR1.
- [0343] ORF4\_8\_38427499\_38430449\_38480545\_38486034\_F
- [0344] 정상 혈액에서 20ng 당 1.242222, (SD +/- 1.715319) 카피와 비교하여, 악성 세포주 CCL30은 20ng의 감소된 평균 카피 수 2.05 (SD +/- 0.843267 )를 나타낸다(p = 0.314743 T 테스트).
- [0345] 5. FIP1L1 실험
- [0346] FIP1L1PDGFRA\_4\_54231931\_54236063\_55143356\_55145047\_FR
- [0347] 정상 혈액에서 20ng 당 32.61117 (SD +/- 38.58252) 카피와 비교하여, 악성 세포주(BT142, EOL1 및 HL60)는 20ng의 감소된 평균 카피 수 13.07325 (SD +/- 19.46042)를 나타낸다(p = 0.147896 T 테스트).
- [0348] 6. FLT3 실험
- [0349] ORF5\_13\_28009061\_28014204\_28025286\_28026644\_F: 중요한 차이점
- [0350] 정상 혈액에서 20ng 당 6.587778, SD +/- 7.672794 카피와 비교하여, 악성 환자 물질은 20ng의 감소된 평균 카피 수 0.427619(SD +/- 0.667599)를 나타낸다(p = 0.043238 T 테스트).
- [0351] 약물 민감성 및 이마티닙(Imatinib)
- [0352] 이마티닙(Glivec)은 ABL1, cKIT 및 PDGFRA를 포함하는 다중 티로신 키나아제에 대한 활성을 나타낸다. 만성 골수성 백혈병에서의 임상 시험의 성공은 약물 유전학적 전략의 확인을 위한 추진력을 제공하였다.
- [0353] 다음의 이마티닙 반응성 선택된 유전자에서 이마티닙의 활성에 관한 신규한 데이터의 실시예가 하기에 기재되어 있다. 20ng의 템플릿은 이마티닙으로 치료된 샘플에 대하여 각 웰에 첨가되었다.
- [0354] 상기 명명된 cKIT 상호작용((ORF3\_4\_54711719\_54715167\_54736749\_54740853\_FR) 및 이마티닙:
- [0355] cKIT의 예시적인 데이터. 상기 BT142 세포는 1µM의 이마티닙으로 치료되었다. 20ng의 템플릿은 각 웰 내에 로딩되었다. 상기 cKIT 3C 상호작용이 이마티닙 치료된 세포주에 완전히 부존재인 것을 유의한다(하기 참조).
- [0356] 웰 C1의 생성물은 상기 명명된 cKIT 상호작용(ORF3\_4\_54711719\_54715167\_54736749\_54740853\_FR)으로 확인되었다. 이 데이터는 cKIT 3C 염색체 형태에 대한 이마티닙의 직접적인 활성을 설명한다.
- [0357] BT142 세포주에서 MMP1 상호작용은 하기에 나타내었다. 이것은 샘플의 품질을 확인한다. 이것은 가수분해 프로브 기반 분석이다.

세포주(Cell line)	Cq	MMP1 카피 수 (copy number)
BT142 ctrl	37.29354288	12.16144613
BT142 ctrl	35.68147305	36.19699893
BT142 ctrl	36.33204621	23.30823893
BT142 이마티닙(Imatinib, IM) 1µM	35.6402365	37.2211193
BT142 1µM	36.14604001	26.43413752
BT142 1µM	35.88943195	31.44606744

- [0358]
- [0359] 세포주에 처리된 GSK864의 활성

[0360] 고정되지 않은 대조군 및 포르말데히드 처리된 샘플을 사용한 MMP-1 3C 정량분석. 본 명세서에 사용된 예시적인 세포주는:

[0361] (a) DBTRG-05MG (교모세포종(glioblastoma)),

[0362] (b) HL-60 (급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukaemia)) 이다.

[0363] 이러한 세포주는 24 시간 및 48 시간에 걸쳐 IDH1 억제제 GSK864로 처리되었다. 바이너리 차이점은 세포주 DBTRG에서 관찰되며, HL60에서 정량적 차이는 MMP1 염색체 확인에 대한 화합물의 직접적인 활성을 나타낸다(도 8 참조).

세포주	Cq	20 ng 에서 카피 수
DBTRG 24 hr Ctrl	39.91101	2.898388
DBTRG 24 hr Ctrl	38.34145	8.990504
DBTRG 24 hr Ctrl	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1um	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1um	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1um	NaN	NaN
NaN = 0 카피(copies)		

[0364]

[0365] 상기 HL60 세포주는 24 시간 및 48 시간에 걸쳐 IDH1 억제제 GSK864로 처리되었다. 바이너리 차이점은 3C MMP1 에서 관찰되며, HL60에서 카피 수는 MMP1 염색체 확인에 대한 화합물의 직접적인 활성을 나타낸다(도 9 참조).

세포주	Cq	20 ng 에서 카피 수
HL-60 48 hr Ctrl	35.94292	50.70651
HL-60 48 hr Ctrl	35.20558	86.30136
HL-60 48 hr Ctrl	36.69911	29.39049
HL-60 48hr GSK864	40.32569	2.149149
HL-60 48hr GSK864	37.49586	16.54413
HL-60 48hr GSK864	37.10877	21.87217
20 ng = 하나의 반응 웰(one reaction well)		

[0366]

[0367] 요약

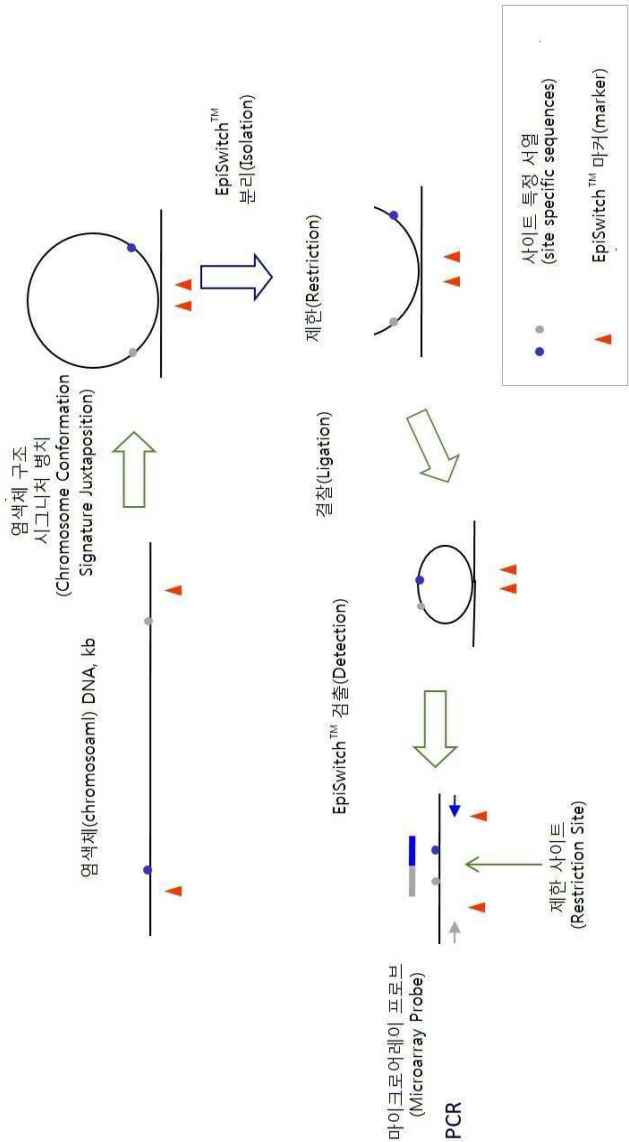
[0368] SYBR 녹색 검출법을 사용하는 이러한 단일 단계 분석은 정상 혈액 및 악성 물질(상기 표에 기재된 세포주 참조) 사이에서 구별한다. 상기 qPCR 3C 카피수는 정상 물질(예를 들어, cKIT 및 FLT3)과 비교할 때 또는 CCL30 FGFR1 세포주에서 획득할 때 악성 세포주에서 현저하게 감소될 수 있다.

[0369] 상기 약물 이마티닙(Glivec: Novartis PLC)은 BCR-ABL 단백질에 대하여 활성된다고 여겨진다. 유전자 cKIT에서 확인된 3C 형태 상호작용에 대한 이마티닙의 직접적인 신규 활성을 나타낸다. 상기 데이터는 3C 형태에서 이마티닙의 직접적인 치료 활성을 나타낸다.

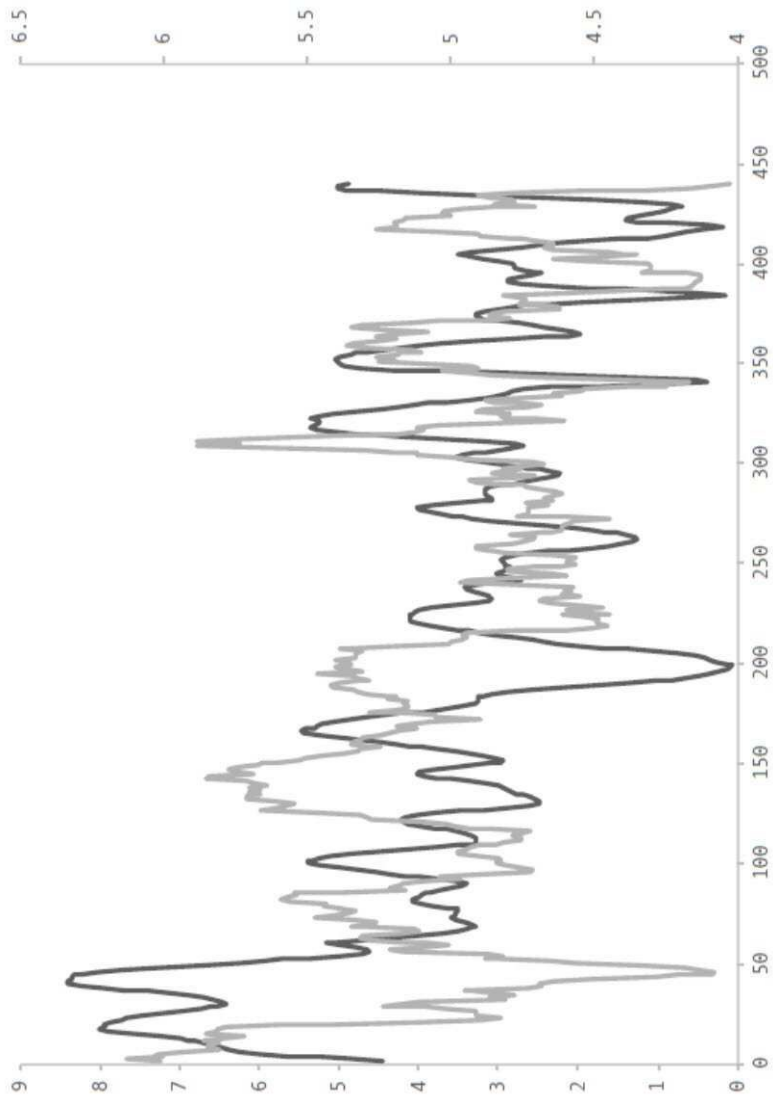
[0370] 또한, 상기 GSK864(IDH1 돌연변이 억제제)는 세포주 DBTRG 및 HL60에서 1 μm에서 3C MMP1 카피 수에서 직접적인 활성을 나타낸다.

도면

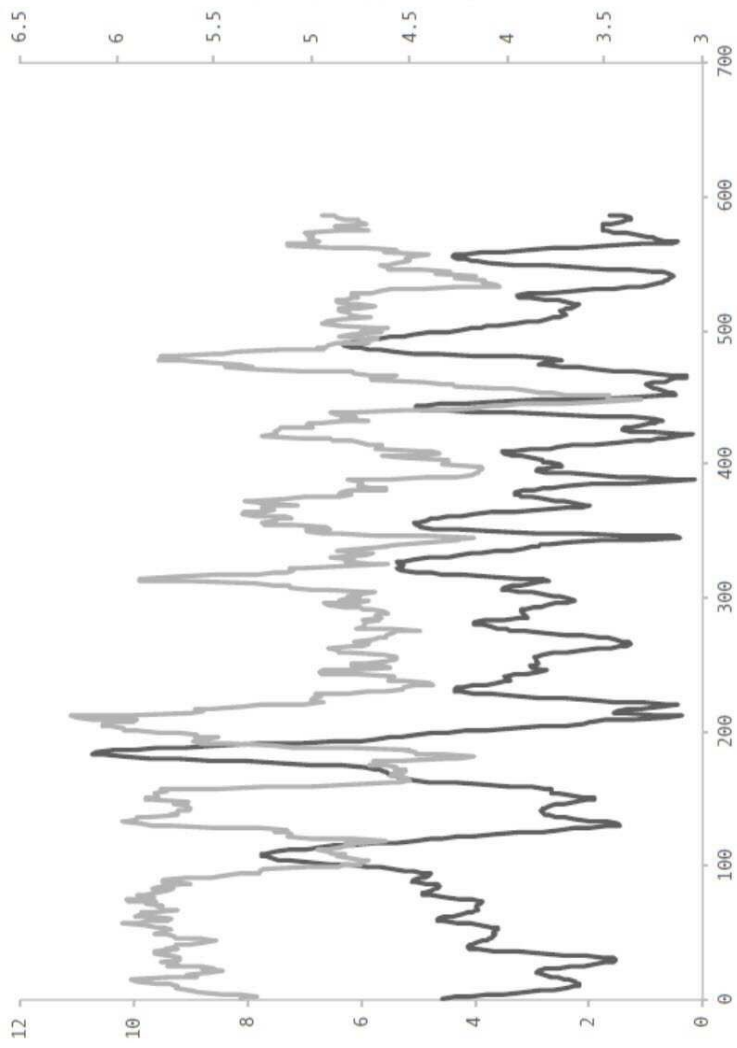
도면1



도면2

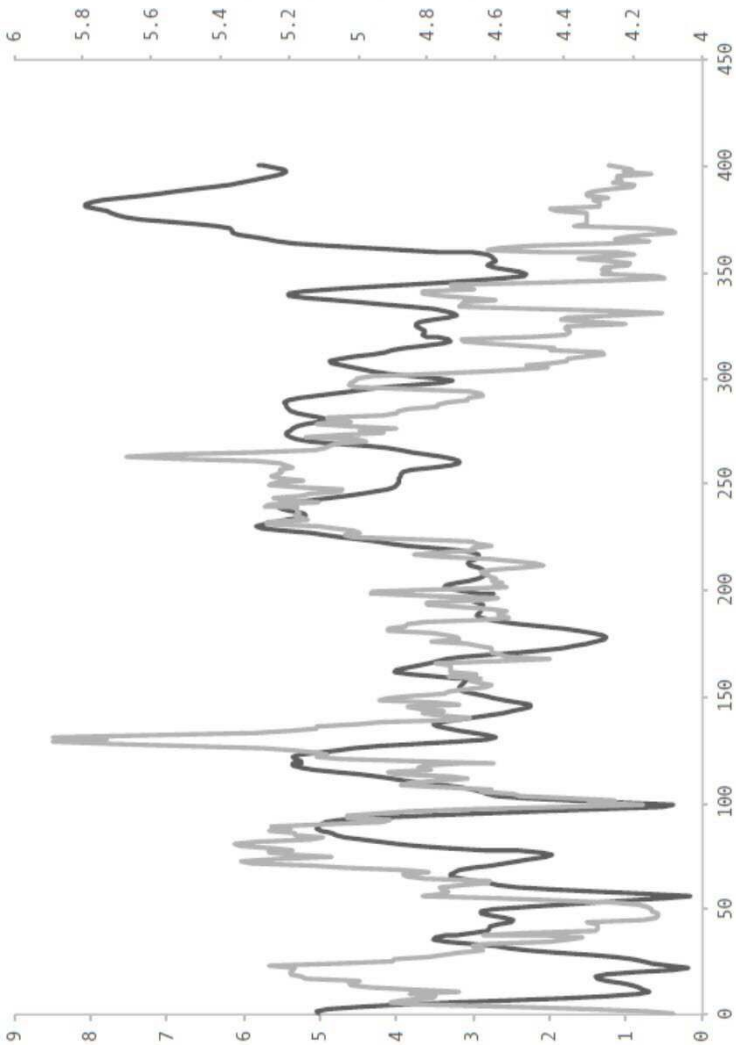


도면3

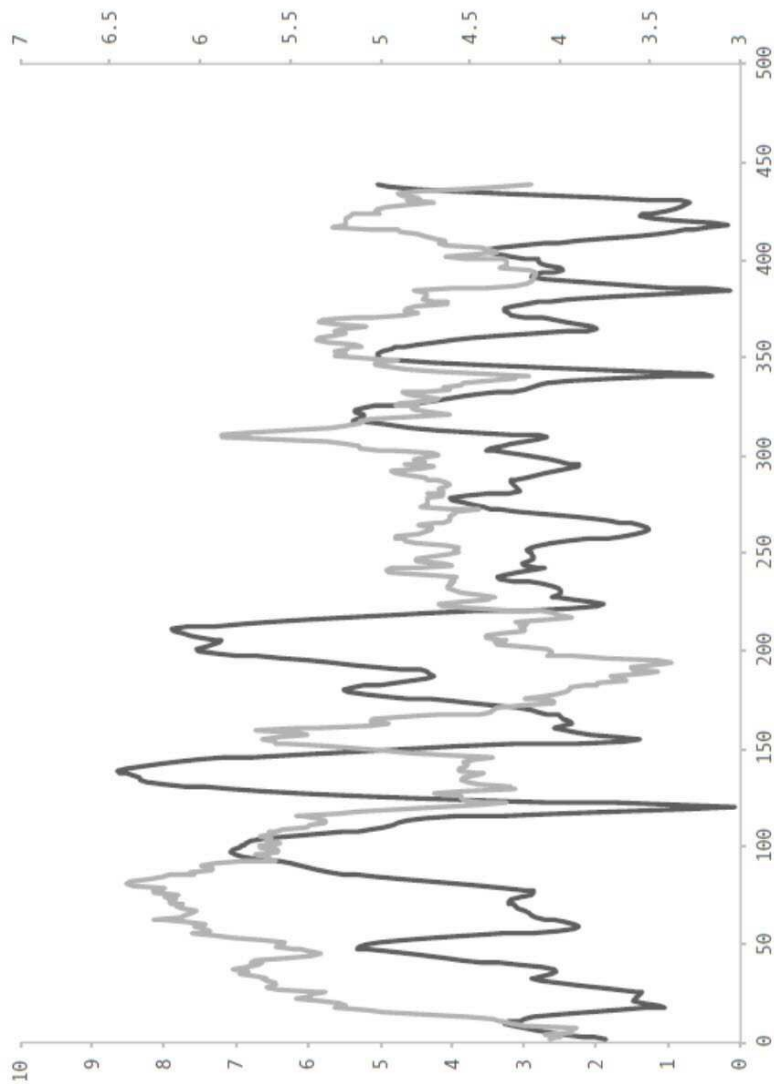




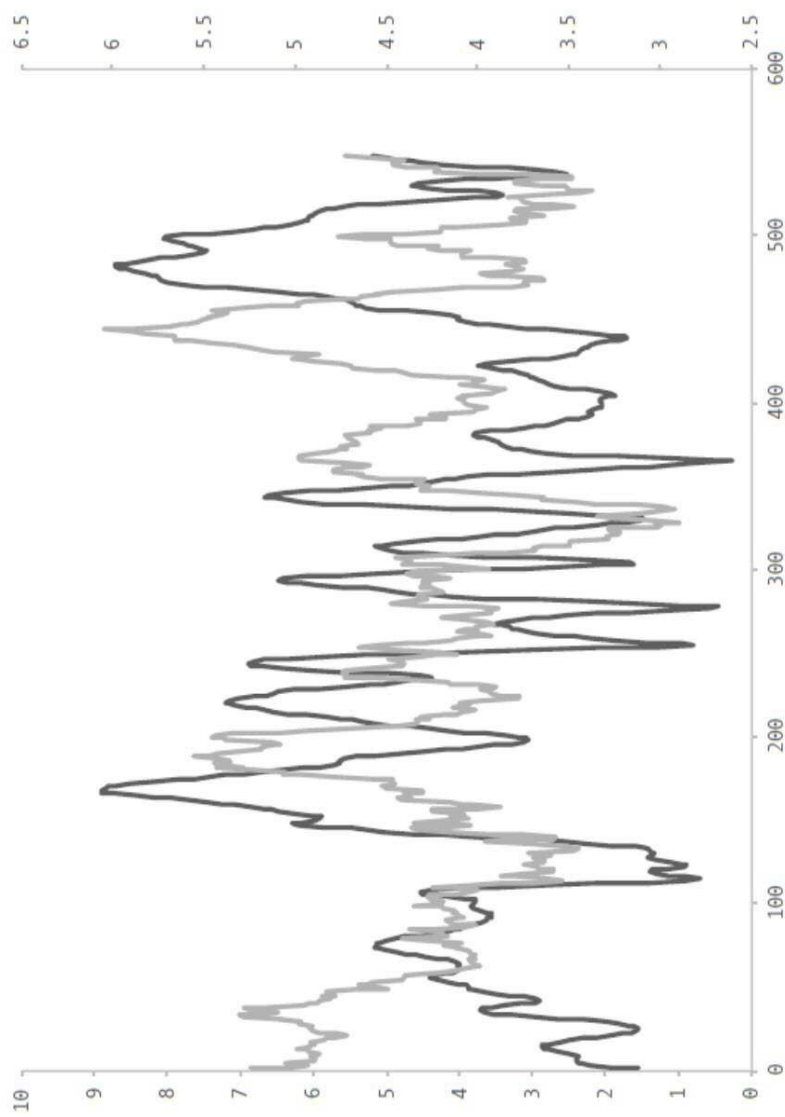
도면4



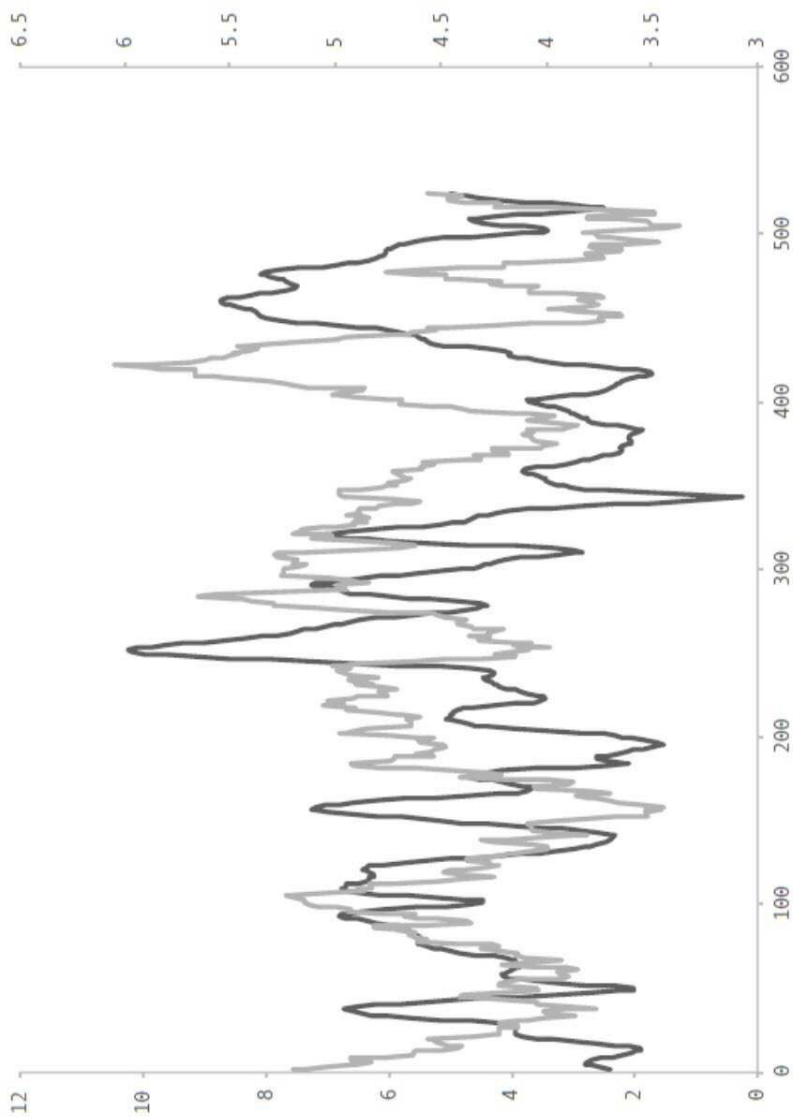
도면5



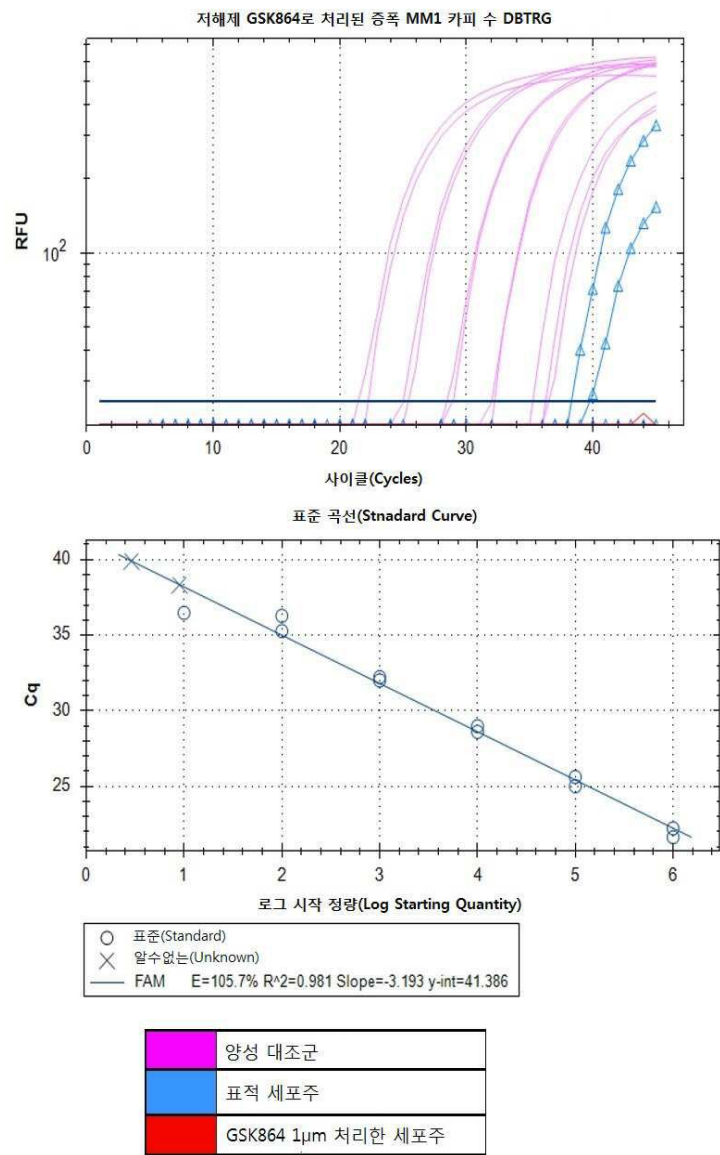
도면6



도면7

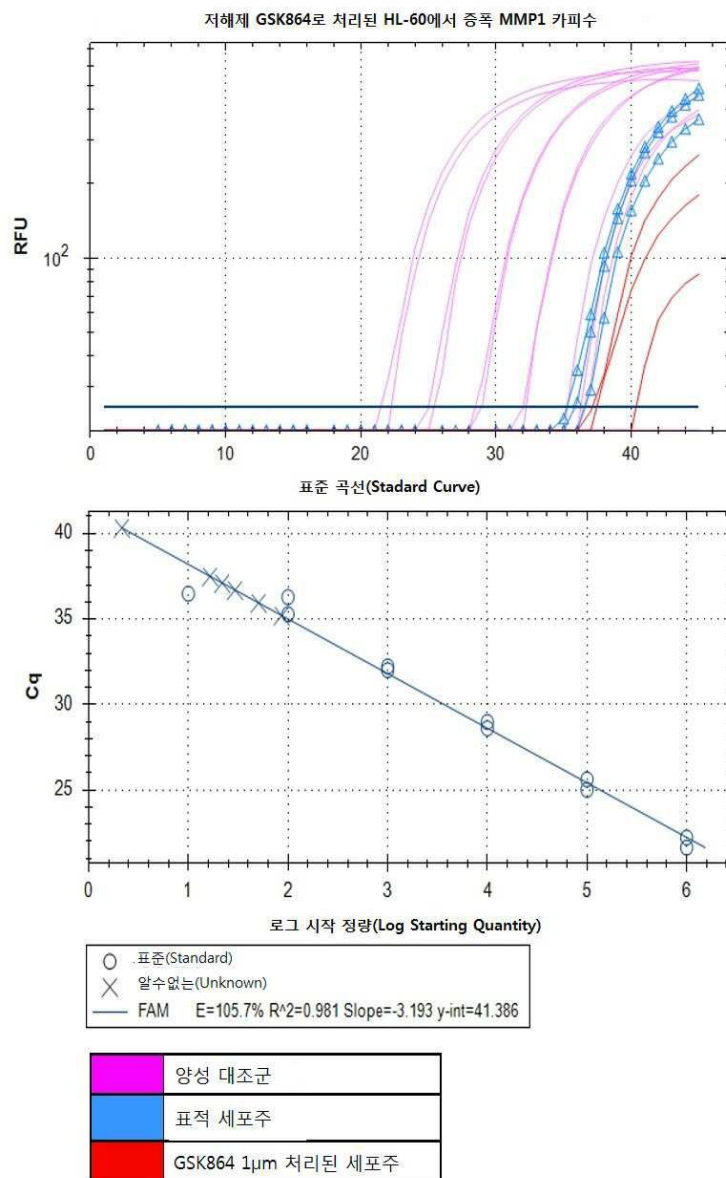


도면8





## 도면9



## 서열 목록

- <110> Oxford BioDynamics Limited
- <120> APPLICATION OF EPIGENETIC CHROMSOMAL INTERACTIONS IN CANCER  
DIAGNOSTICS
- <130> IP19-0021
- <150> US 62/428,893
- <151> 2016-12-01
- <150> PCT/GB 2017/053615
- <151> 2017-11-30
- <160> 72
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 501  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

ttccacgtgg cctaccacag catgtcaggc ctgggggcag aatcttgcca tactgtgcag 60  
 cccaaatttg aatgccaaag gctttcgttt gtctctgggg ggccacagtc taggtctagt 120

tctgtgcagg agttgtaata ttgtctcttc tctccctcct ccagctcgca gacctctgaa 180  
 gagagtgcc ttgagacggg ttccagcagc tccaccttca tcaagagaga ggacgagacc 240  
 attgaagaca tcgaaaagat aaaacagggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc 300  
 atacacttct ggtgggattg taaaatgggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt 360  
 tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcctcc accttagagg aatgaaaaca 420  
 tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg 480  
 aaaaagaaaa cctgcagct g 501

<210> 2  
 <211> 647  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

tgggagtggg tggagtgaga acctgggaga aggccagccc tttatatcca ggcagacagc 60  
 tccaagtgcc accatggatc agccagtctt gcaggggtga tgctattcag ctacagatgg 120  
 ctgtatcctg agtcatttct tctttttcca tgcagtgtgt ccaccgtgat ctggctgctc 180  
 gcaacgtcct cctggcaca ggaaaaattg tgaagatctg tgactttggc ctggccagag 240  
 acatcatgca tgattcgaaa agataaaaca ggtgttagtg aggatatggg gaaataaaac 300  
 cctcatacac ttctggtggg attgtaaaat ggtgcagctg ctttgaagaa cagcctggcc 360

atcttctcaa atggtgaaac atggagttac catgtgagtc ctccacctta gaggaatgaa 420  
 aacatattca gacaaaaact tgtacgtgaa tattcatagc agcattattc ttaatagaaa 480  
 gtggaaaaag aaaacctgc agctgcatca actgatgaat ggatagatta aatgtgttat 540  
 atccatacag cggaatatta ttggcaagg acaataaaat gaagtactgg tagatgttac 600  
 aacacggatg aaccttaca atgtggaagc taaagatgac agtccgt 647

<210> 3  
 <211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gcagctgcga ggttttcttt ttccactttc tattaagaat aatgctgcta tgaatattca 60

cgtacaagtt tttgtctgaa tatgttttca ttctcttaag gtggaggact cacatggtaa 120

ctccatgttt caccatttga gaaaatggcc aggctgttct tcaaagcagc tgcaccattt 180

tacaatccca ccagaagtg atgagggttt tatttcccca taccctcact aacacctgtt 240

ttatcttttc gaggtccttg ctgaacctgg acctataaat gacgtcaatg atagtgatcc 300

ctactgcaga aatctacaag tggctataaa gaactctgta ggtaagaaat tctgtaagat 360

cagaaagtac aatgaattca cttcataata aattacttgg tggacaccaa atgggtgcta 420

aattgattgg gtagaaggaa ttgtatgccc aagccacatg gc 462

<210> 4

<211> 499

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agtacttctt ctccctccc atattgttaa aaatagttaa cattgcttcc caggtggggc 60

tgggtggagtt ggcacgagat gtcagaggaa cctgagtcac gctcaggccc aagccctgtt 120

ggcaggcaga ccaactgcttt ctggccttcc gtgactatct gaaaaaaatc gtgaatggct 180

agagctactc ttcaattgct gaacattttc aaaaagaatt gagaacttct ggattaaatt 240

gccttcttcc tcgaaaagat aaaacagggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc 300

atacacttct ggtgggattg taaaatggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt 360

tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcttcc accttagagg aatgaaaaca 420

tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg 480

aaaaagaaaa cctcgcagc 499

<210> 5

<211> 609

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cctctccac acaaacctgc tactgagtac cttcgctaac ttaaccattc attcacctg 60

gaagaccacc tactagcaga aggattctta acaaatgtaa agaaagtaag gactttacac 120

taacaataca aaactaactc tctctttgac aattcaaaaa acaaaagatg ttgaactttg	180
acatttacag aattaaatgt caaatgtgac acaataccat cacatctggc taactaactc	240
ttatgctttt tttagtaagg aacaactttt gaggctcaat atcttaattc ttaaaatgat	300
aaagaacact taactcaatt tgttgagatc aaataaggta atgtaaaagt gggattttta	360
tttttactta tttattcgaa aacctggga cccttcaga tgggactaac tggggaaagt	420
ggacaagtta caaacaaga aactcaaagg aaagtcattg gcactgatct ctaagatgct	480
atcacatgtg attgggtgtt gattttatta acaaattata agcaaagtac tacaagggtg	540
gctttaaaaa gaaaataaag caattcacag aaactacttt ttcattgtgc ttgtatgtgt	600
gctccatgt	609
<210> 6	
<211> 586	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
aatgatgag gcacgggtga ataagatagt tggaagtgc acatacagat ttcaaataat	60
tcctaaagg tgtatggttt tctttcccta caaatcctac tttcagttct tttgtacatg	120
gaccagagt ggaattgctg gatcatatga taattctatt ttttaacttct tgatggacct	180
ctgtttttgt ttgtttttt acagaggctg caacatttta tattcctact aataatgcac	240
aggggttcgg atttctccac atccttgcca acattgata tttcctgggt tttttgataa	300
tggccatcct aatagggtgtg gggacatgag gttttcaata tgcttgtggg acatcgaaaa	360
ccctgggacc ctccagatg ggactaactg gggaaagtgg acaagttaca aacaaagaaa	420
ctcaaaggaa agtcattggc actgatctct aagatgctat cacatgtgat tgggtggtga	480
ttttattaac aaattataag caaagtacta caaagggtgc tttaaaaaga aaataaagca	540
attcacagaa actacttttt catgtagctt gtatgtgtgc tccatg	586
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
ttccacgtgg cctaccacag	20
<210> 8	

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 cagctgcgag gttttctttt 20  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 tgggagtggg tggagtgaga 20  
 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 acggactgac atcttttagct tcc 23  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 gcagctgcga ggttttcttt 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 gccatgtggc ttgggcatac 20  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13



agtacttcct ctccccctcc a	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
gcagctgcga ggttttcttt t	21
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
cctctccac acaaacctgc ta	22
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
acatggagca cacatacaag ctac	24
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
aaatgatgag gcacgggtga a	21
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
catggagcac acatacaagc tac	23
<210> 19	
<211> 480	

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ttccacgtgg cctaccacag catgtcaggc ctgggggcag aatcttgcca tactgtgcag 60

cccaaatttg aatgccaaag gctttcgttt gtctctgggg ggccacagtc taggtctagt 120

tctgtgcagg agttgtaata tttgtctctt tctccctcct ccagctcgca gacctctgaa 180

gagagtgcga ttgagacggg ttccagcagt tccaccttca tcaagagaga ggacgagacc 240

attgaagaca tcgaaaagat aaaacaggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc 300

atacacttct ggtgggattg taaaatggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt 360

tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcctcc accttagagg aatgaaaaca 420

tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg 480

<210> 20

<211> 647

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tgggagtggg tggagtgaga acctgggaga aggccagccc tttatatcca ggcagacagc 60

tccaagtgcc accatggatc agccagtctt gcaggggtga tgctattcag ctacagatgg 120

cttgatcctg agtcatttct tccttttcca tgcagtgtgt ccaccgtgat ctggctgctc 180

gcaacgtcct cctggcacaa ggaaaaattg tgaagatctg tgactttggc ctggccagag 240

acatcatgca tgattcgaaa agataaaaca ggtgttagtg aggatatggg gaaataaaac 300

cctcatacac ttctggtggg attgtaaaat ggtgcagctg ctttgaagaa cagcctggcc 360

attttctcaa atggtgaaac atggagttac catgtgagtc ctccacctta gaggaatgaa 420

aacatattca gacaaaaact tgtacgtgaa taticatagc agcattatc ttaatagaaa 480

gtggaaaaag aaaacctcgc agctgcatca actgatgaat ggatagatta aatgtgttat 540

atccatacag cggaatatta ttggcaagg acaataaaat gaagtactgg tagatgttac 600

aacacggatg aaccttaca atgtggaagc taaagatgac agtccgt 647

<210> 21

<211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>	21	
gcagctgcga ggttttcttt ttccactttc tattaagaat aatgctgcta tgaatattca	60	
cgtacaagtt ttgtctgaa tatgttttca ttctcttaag gtggaggact cacatggtaa	120	
ctccatgttt caccatttga gaaaatggcc aggctgttct tcaaagcagc tgcaccattt	180	
tacaatccca ccagaagtgt atgagggttt tatttcccca tctctcact aacacctgtt	240	
ttatcttttc gaggtccttg ctgaacctgg acctataaat gacgtcaatg atagtgatec	300	
ctactgcaga aatctacaag tggctataaa gaactctgta ggtaagaaat tctgtaagat	360	
cagaaagtac aatgaattca cttcataata aattacttgg tggacaccaa atgggtgcta	420	
aattgattgg gtagaaggaa ttgtatgccc aagccacatg gc	462	
<210>	22	
<211>	499	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	22	
agtacttctt ctccccctcc atatigttaa aaatagttaa cattgcttcc caggctgggc	60	
tggtggagtt ggcacgagat gtcagaggaa cctgagtcac gctcaggccc aagccctgtt	120	
ggcaggcaga ccaactgctt ctggccttcc gtgactatct gaaaaaaatc gtgaatggct	180	
agagctactc ttcaattgct gaacattttc aaaaagaatt gagaacttct ggattaaatt	240	
gccttcttcc tcgaaaagat aaaacaggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc	300	
atacatttct ggtgggattg taaaatggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt	360	
tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcctcc accttagagg aatgaaaaca	420	
tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg	480	
aaaaagaaaa cctcgcagc	499	
<210>	23	
<211>	609	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	23	
cctctccac acaaacctgc tactgagtac ctctgctaac ttaaccattc attcacctg	60	
gaagaccacc tactagcaga aggattctta acaaatgtaa agaaagtaag gactttacac	120	
taacaatata aaactaactc tctctttgac aattcaaaaa acaaaagatg ttgaactttg	180	
acatttacag aattaaatgt caaatgtgac acaataccat cacatctggc taactaactc	240	

ttatgctttt ttiagtaagg aacaactttt gagcctcaat atcttaattc ttaaaatgat	300
aaagaacact taactcaatt tgttgagatc aaataaggta atgtaaaagt gggattttta	360
tttttactta tttattcgaa aacctggga cccttcaga tgggactaac tggggaaagt	420
ggacaagtta caacaaaga aactcaaagg aaagtcattg gcactgatct ctaagatgct	480
atcacatgtg attggtggtt gatthttatta acaattata agcaaagtac tacaaagggtg	540
gctttaaaaa gaaataaag caattcacag aaactacttt ttcattgtgc ttgtatgtgt	600
gctccatgt	609
<210> 24	
<211> 586	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
aatgatgag gcacgggtga ataagatagt tggaagtgc acatacagat ttcaaataat	60
tccctaaagg tgtatggttt tctttcccta caaatctac tttcagttct ttgtacatg	120
gaccagagt ggaattgctg gatcatatga taattctatt tttacttct tgatggacct	180
ctgtttttgt ttgtttttt acagaggctg caacatttta tttcctact aataatgcac	240
aggggttcgg atttctccac atccttgcca acattgata tttcctgggt tttttgataa	300
tggccatcct aatagggtgtg gggacatgag gttttcaata tgcttgtggg acatcgaaaa	360
ccctgggacc cttccagatg ggactaactg gggaaagtgg acaagttaca aacaaagaaa	420
ctcaaaggaa agtcattggc actgatctct aagatgctat cacatgtgat tggatggtga	480
ttttattaac aaattataag caaagtacta caaagggtgc tttaaaaaga aaataaagca	540
attcacagaa actacttttt catgtagctt gtatgtgtgc tccatg	586
<210> 25	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
tcagcaagga cctcgaaaag ataaaaa	28
<210> 26	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<400>	26	
atttattcga aaaccctggg accc		24
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	27	
gcagctgcga ggttttcttt		20
<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	28	
cctctccac acaaacctgc ta		22
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	29	
gccatgtggc ttgggcatac		20
<210>	30	
<211>	24	
<212>		
DNA		
<213>	Homo sapiens	
<400>	30	
acatggagca cacatacaag ctac		24
<210>	31	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	31	
cttatagcct gtctctcttg ctgatcgagg ttgcaacgag ctgagattgc		50
<210>	32	

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 32  
 ttggagttcc aggtgatac tgtc 24  
 <210> 33  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 33  
 accaacgcta ttcttgctt cca 23  
 <210> 34  
 <211> 800  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (472)..(504)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 34  
 gcaagctcca ctcctgggt tcaagtgatt ctcctgcctc agcctcctga gtagctggga 60  
 ttacaggtgt gccccacat gctctgctaa tttatctatt tttagtagag atggggtttc 120  
 accatgttgg tcaggctggt cttgaattcc tgacctgtg atccaccgc ctcggcctcc 180  
 caaagtgtg ggattacaga catgagacac tgcacctgc cccattcctt ttaatctccc 240  
 ttggaattag ctgtttggtt gatttggagt tccagggtga tactgtctga gtcataaatg 300  
 atttatttgt gaatttctgt ggctggtcac gtattttggt cctgtttgta ttcccttcc 360  
 cctctctgtg tctccttata gcctgtctct cttgtgatc gaggttgcaa cgagctgaga 420  
 ttgcacgcca ctgcactccc agcctgggcg acggagttag actccatctc annnnnnnnn 480  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntgatga cagcccaacc tgtcactttt ttcagatccc 540  
 tttttatgaa agaatttct taagttgtgt ctgaagacaa accaatttct ttggaccctg 600  
 ggtattcttt ttctaaggga ataccatgtt attttgtgt acagattgtt tgcgatcttt 660  
 cataggctga tctttctaga gttggttaat atccatgtag gttagattga aaaacttgaa 720  
 ttcagaaatg tacggtgttg gagcagacat ggatctggaa gccagaata gcgttggtgt 780



tgttgttgat ggtgaatctg	800
<210> 35	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
gggccaagtg tgactctcag gttttcgacc tgcctcagcc tcccaaagt	49
<210> 36	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 36	
atgcaggagg taaaatggag ggt	23
<210> 37	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 37	
caaagagaca gctccgtcag aga	23
<210> 38	
<211> 800	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 38	
ccactgcacc agagcaaaga gcaaaaggag agatgcagga ggtaaaatgg aggggtgggaa	60
gagaatggct gaaggagagg gtggccttat tggcccatTT caaggatttt gactttgatt	120
catatgatgt gggaaggcct tggagaattt tccgagggga ctatactatc tgatgtatgt	180
ttcagtatga aatagaatct ctctggctgc tatgatctga aggaggacaa gggagcaggg	240
attccacggg ggcatgtatt gcacagagcc aggtaaagat gatgatgctt ggaccaaagt	300
ggtggcactg ggtggagggt cagaaccgac aagatttgct ctcggattag atgtgggata	360
tgggggtgtg agagggggcca agtgtgactc tcaggttttc gacctgcctc agcctcccaa	420
agtgctggga ttacagggtg gagccaccgc acctggcctt ctgtctgtat ttttaaaaaa	480
aagatattca tgacaaccaa ggggagaggt aaggtcacag tgatgtgctc tgggtcaaag	540

attgttgagc ctggaccatt ggagagggga ggaaaagatg gaggtgtggg gtcaagggga 600  
gaggctgcag aggacaggac agtgtgtggc caaggctgct gttgttcct tcatcacct 660

ggccaggctg aggtccaggc agtgttctct gacggagctg tctctttgca cacgaggagc 720  
ctgaaatatg gaaaagtaag tcgggctctt gatgttcttg tttgctgact gagactacaa 780  
ggctatTTTT gaatcccat 800

<210> 39  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 39

ttgaggacaa ggacctcgag atactgccga gaaatcc 37

<210> 40  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 40

atgttgtcta acctgtatgt tct 23

<210> 41  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 41

cttcctctgc cgggtgctaa 20

<210> 42  
<211> 540  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 42

atgagtcctg aaacagagag agaggtcatg ctgttggtgt ggtgtaggag gtgggatgcc 60  
tcacacatcc tacttaag cctcacactt ccggtgtgta tctttctagt acattttgaa 120  
tcccagaaga cctccatgaa cccacatatt tccagaggtt tctcctctca caaaatactt 180  
ttcagggaca aaaaagagaa aatactaatt gaaatacact gcctaactga atatatccc 240

acctcccagc ccaggcttag ctacatcct accttcttga tgaagctgtt ccccatatc 300

catgccctca ctaatgtctc agtttttaga aattttacag tgcttataaa ctttcttctg 360

atgttgctta acctgtatgt tctttgagga caaggacctc gagatactgc cgagaaatcc 420

acgaccccaa aaggagaaaa aatggcacga atcttagttc cccattcttc ctaccacccc 480

tagatgttct aacggtttagc acccggcaga ggaagagcag aagttcaca gaagggtctg 540

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

tcaccagaa taaggcttct cgattctaag ttctacaaga 40

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

cagtgcggtg ggagtactgt 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

ttcagcaggt gcgtgttcag 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

agtgcggtgg gagtactgtg 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens  
 <400> 47  
 acatttcagc aggtgcgtgt 20  
 <210> 48  
 <211> 800  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48  
 tccccatttg aaagcttacc ctttaattgac gagcttcagc cagtgcgggtg ggagtactgt 60  
 gatcctcagc tgggtggtag ggggaggcag acattgagaa ctgaagggtt ccctttgatc 120  
 attagcctta cataggatgc ctttaattgt gagctagatt ggaagcccaa gtgactgctg 180  
 aagtgcacca aattaactca gaagtcacca atttactcc atttatggaa ggggtattaac 240  
 aggggggtga gaaacaattt aaggaaatgt taaataatgt attatttcca aatcactgca 300  
 tcatataatt aacatcctac ctgttgtag caattattta taggtcatac agtatacca 360  
 aatcagccaa agcaataaat caccagaat aaggcttctc gattctaagt tctacaagat 420  
 gatcaaggaa ggcttccgga tgctcagccc tgaacacgca cctgctgaaa tgtaagagcc 480  
 aaaaaatttt tcttttaggt caggttttcc cttttatttt tctttttaga gacagaaacc 540  
 cagatgttga gggttttcat aacacagttt gaaatgtcac ttggattctt tatgacacac 600  
 tgggtcaaag tcatttctgt agtttttttt cataatctct tgtcaccaaa aatacagaaa 660  
 gtttcagtaa tatttcatac atgcagtgtt ttatgttacc tatatgtcag tccatatgtc 720  
 cagttgcata gccctggaat tattactgaa gttgctggat gccatacat ttgaaaacaa 780  
 gctgagggca ttgaggaggg 800  
 <210> 49  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49  
 aaacccagc agccctgcc caagtcgagg gagcagctcc ccacccagcc c 51  
 <210> 50  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400>	50	
agaaagaggc aaagttagga agca		24
<210>	51	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	51	
aaaacagcaa cctattcaga gagc		24
<210>	52	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	52	
gagccgcacc atcctgggca tcacttactg gaggtactg agccagggca gtgggaattg		60
gagcatgggt cagtggggaa aacagctggc tgcctgggaa ccccatctc ttttcaccc		120
cactcctcca aaagtcaaag gaagaaagag gcaaagttag gaagcagctg tagcagcatt		180
aagcgcatTTT catttcccc atcctaaggg gaaaggtcgg cctccccag gacttctttg		240
tgtccggagt tgccccctcc ccagatgtc agttctttgc caagattgcc acttgccaga		300
ggaacacccc atttctttg ggatagctca gcctcacct tccctagcaa cagctgaaca		360
aaccgccccc ctcaaaaccc cagcagcccc tgcccaagtc gagggagcag ctccccaccc		420
agccccagga tctgggtcca gcagacctgg agagtctgcc ctggctgcac agaccgtggt		480
gggactgtct ggcggaactg ttgtctggag acaatgcagc ccatgtgaca ggccttaatg		540
agtcccttct ggaatccac aatggccaag tggcacaggc tctctgaata ggttgctgtt		600
tttcagcagt ggcaggggct gtgttggtgc aacctctct cttattcaac ctccggcatc		660
tctcttttt tcttttttt cttacctttg tcttttatct actttaactc tctgttccc		720
ttttgatctc ttctttctcc tccacctcc tgatttctgt tgtttcttag acacaaaatc		780
gcccttcact cctgccctgt		800
<210>	53	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	53	

tatgcttgtg ggacatcgac aaaagcaatt atgc	34
<210> 54	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 54	
tggaagtgac acatacagat ttcaa	25
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 55	
ctttctgcac cgtagccagc	20
<210> 56	
<211> 800	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 56	
cagctaaaga ctacttttcc aagcctcttg cagctagcta tggacaaatg atgaggcacg	60
ggtgaataag atagtggaa gtgacacata cagatttcaa ataattccct aaaggtgtat	120
ggttttcttt ccctacaaat cctactttca gttcttttgt acatggacc agagtggaat	180
tgctggatca tatgataatt ctatttttaa cttcttgatg gacctctgtt ttgttttgt	240
tttttacaga ggctgaaca ttttatattc ctactaataa tgcacagggg ttcggatttc	300
tccacatcct tgccaacact tgatatttcc tgggtttttt gataatggcc atcctaatag	360
gtgtggggac atgaggtttt caatatgctt gtgggacatc gacaaaagca attatgctaa	420
tttcttcc tgtgggctca attccttttt tgacacgatg acttggagga gtcattatga	480
ttactccaaa caggaaagac actcgcccag ctgtccgcc gcagagagct ggctacggtg	540
cagaaagctg aggaggcgtc tggagttttt ggggtttaat gattctgcct gcccacaggt	600
cgggtcttgg ggtctggagc gtttgggaag gtggttgaag gaacagccta tggattaagc	660
cggtcaccaac ctgtcatgaa agttgcagtg aagatgctaa aacgtaagtg ctccttcctg	720
gggatttttt gagcacgggg attttttgag catggggata ttaagggaat ttctcaaaat	780
catgcagcta gtaaataaga	800



<210> 57  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 57  
 cctcggcgac agagtgagac tctgtcgatc tcattctttg gtttctgaac 50  
  
 <210> 58  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 58  
 ggtatgtgcc ttagtccca act 23  
  
 <210> 59  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 59  
 gaaggatggt gaaacgctta cgg 23  
  
 <210> 60  
 <211> 800  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (156)..(191)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 60  
 taattgcatc actgcactcc agcctgggca acagtgagaa cttgtcttaa agaaacaaag 60  
  
 caggttcttt cctctcagaa gcccctctct cttactagag agagagctgt tctcctctct 120  
 ctttcttcta ttaaacctcc gctcctaaaa acacannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180  
 nnnnnnnnnn nccctaaaaa actagcctgg gcaacatggt aaaacctgt ctctacaaaa 240  
 aacacaaata aactagccag gcctgggtgt atgtgcctgt agtcccaact attcagggaa 300  
 gctgaggtgg gaggttttct tgagaccggg aagtccaggc tgcagtgagc cgagatggcg 360  
 ccactgcact ctagcctcgg cgacagagtg agactctgtc gatctcattc ttgtgtttct 420

```

gaactcagcc cactttccct cacataatac agatcttccc gagagtcccg taagcgtttc      480

accatccttc tttttccag ttgcttttg taaagctcat ttctttttac tgtgaaatta      540
ataaatagca ataatacaaa tctcttttaa ggtatataaa aattcttccc tgaggagctc      600
tgtaggaatt ataagtagat cagattcaa tttattctaa tatacgagtt taaccaatt      660
tacaatttac atatctttag gaaatggctt catgctttca gaccacaaat attccaaaag      720
gaataatttc agtgtattta atattccagt gaacagaacg aatcaaaggg gctaagtact      780
gaccagtgga tactggtcac      800

<210>    61
<211>    50
<212>    DNA

<213>    Homo sapiens
<400>    61
actttactgt gtcccatca cgtgtcgaca gagtctcact ctgtcgccga      50
<210>    62
<211>    23
<212>    DNA
<213>    Homo sapiens
<400>    62
caagcatctc tcaggatccc cat      23
<210>    63
<211>    23
<212>    DNA
<213>    Homo sapiens
<400>    63
actattcagg gaagctgagg tgg      23
<210>    64
<211>    800
<212>    DNA
<213>    Homo sapiens
<220><221
>    misc_feature
<222>    (1)..(128)
<223>    n is a, c, g, or t

```

<220><221> misc\_feature

<222> (610)..(645)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 64

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnaa gaatgctcca aggtcacaac aatgcctcca tcagaatgcc tgggaatcca 180

ttcagagaaa ggtgctacaa agccatgatg ctcaagtaat tagcaagaaa gttcaaggat 240

gaggaggaga tccagcaaac tcctacagcc ctcatattatg cccgctaaag caataaatcc 300

ctgcaggacc aagcatctct caggatcccc atggatgcgg aggataaaca cagagcagag 360

acaaggttac tgctacttta ctgtgtcccc atcacgtgc gacagagtct cactctgtcg 420

ccgaggctag agtgcagtgg cgccatctcg gctcactgca gcctggactt cccggctca 480

agcaaacctc ccacctcagc ttccctgaat agttgggact acaggcacat accaccaggc 540

ctggctagtt tatttgtgtt tttttagtag acagggtttt accatgttgc ccaggctagt 600

tttttaggnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntgtgt ttttaggagc 660

ggaggtttaa tagaagaaag agagaggaga acagctctct ctctagtaag agagaggggc 720

ttctgagagg aaagaacctg ctttgtttct ttaagacaag ttctcactgt tgcccagget 780

ggagtgcagt gatgcaatta 800

<210> 65

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

gagttcagaa accaaagaat gagatcgagt gattgctagg tgatggacct 50

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

gaaggatggt gaaacgctta cgg 23

<210> 67

<211> 23

<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	67	
tgccccca caggagtttt cta		23
<210>	68	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	68	
gtgaccagta tccactggtc agtacttagc ccttttgatt cgttctgttc actggaatat		60
taaatacact gaaattattc cttttggaat atttgtgttc tgaaagcatg aagccatttc		120
ctaaagatat gtaaattgta aattgggtta aactcgtata ttagaataaa ttgaatcgtg		180
atctacttat aattcctaca gagtcctca gggaagaatt tttatatacc ttaaaagaga		240
tttgtattat tgctatttat taatttcaca gtaaaaagaa atgagcttta caaaggcaaa		300
ctggaaaaaa gaaggatggg gaaacgctta cgggactctc gggaagatct gtattatgtg		360
agggaaagtg ggctgagttc agaaaccaa gaatgagatc gattgattgc taggtgatgg		420
acctgtaggg agagatcact agatgagttc aggtggtaaa tagaaaactc ctgttggggg		480
gcagtgagag atgaaggtag tgaaatgaaa ggatggggat caattttata tgagggcctt		540
aatttgaaat gggaatttgg tgatattctc agagcagcac aagttttcat gccatggaaa		600
agcagcagga aaaatgtaaa ctttgccaat aacacgggaa agtctccaag ggtgccccagt		660
gacttacttg cctataaaca aagccattcc tgagcacttc tggctatgaa atttcaaaat		720
acatgtttta gagaatttta ctgacacttt tatgatttta gaggataatt tagatttcat		780
aaattttgtt tccttcctt		800
<210>	69	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	69	
gctggaggat tgcttgagct tgggaggtcg atctcattct ttggtttctg aac		53
<210>	70	
<211>	22	
<212>	DNA	

<213>	Homo sapiens	
<400>	70	
	gcttctggag gccaggatt at	22
<210>	71	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	71	
	agcccccttg attcgttctg ttc	23
<210>	72	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	72	
	cacactcatg cttcataaga aagggctagt ggcttctgga ggccagggat tatTTTTatt	60
	tagTTTTatt tagttgtcta cttcactgca ctgaactctt aagagctttt aatttattaa	120
	tcatttggct gaaatcagga aagggtgttt ttttccctaa aaacatTTTT atcaatatgt	180
	cttagggcag gcagaggagc tcatgccctg tgatcccagc actttgggag gctgaggtagg	240
	gggaatcgct tgagcccagg agttcaagac cagcctgggc aatacagtga taccctattt	300
	ctacaaaaaa taaaaaactt agcctggcgt ggtgctgccc tcccatggtc ctagctactt	360
	ggaaggccgt ggctggagga ttgcttgagc ttgggaggtc gatctcattc ttTggtttct	420
	gaactcagcc cactttccct cacataatac agatcttccc gagagtcccg taagcgtttc	480
	accatccttc ttttttccag ttTgcctttg taaagctcat ttctttttac tgtgaaatta	540
	ataaatagca ataatacaaa tctcttttaa ggtatataaa aattcttccc tgaggagctc	600
	tgtaggaatt ataagtagat cagattcaa ttTattctaa tatacagatt taaccaatt	660
	tacaatttac atatctttag gaaatggctt catgctttca gaccacaaat attccaaaag	720
	gaataatttc agtgtattta atattccagt gaacagaacg aatcaaaggg gctaagtact	780
	gaccagtgga tactggtcac	800