



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098412
(43) 공개일자 2018년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01) C12Q 1/6806 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 1/6806 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-7023352
(22) 출원일자(국제) 2016년11월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년08월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/060835
(87) 국제공개번호 WO 2017/123316
국제공개일자 2017년07월20일
(30) 우선권주장
62/279,126 2016년01월15일 미국(US)
62/415,952 2016년11월01일 미국(US)

(71) 출원인
벤타나 메디컬 시스템즈, 인코포레이티드
미국, 애리조나주 85755, 투슨, 1910 이스트 이
노베이션 파크 드라이브
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌자체스트라체 124
(72) 발명자
알렉산더 벨슨
미국 85658 애리조나주 마라나 노스 비스타 랜치
플레이스 11440
버지스 다니엘
미국 53719 위스콘신주 매디슨 사우스 로사 로드
500
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

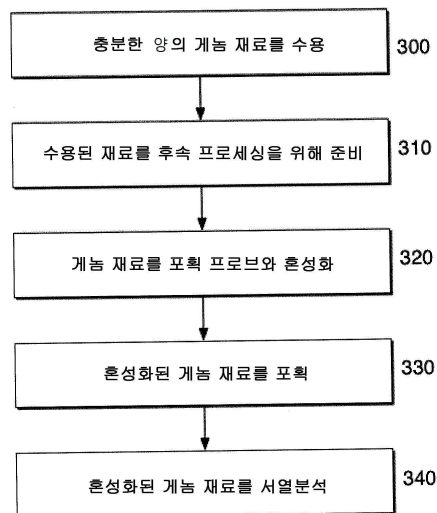
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **중량의 심층 서열분석 프로파일링**

(57) 요약

본 개시내용의 일 측면은 서열분석 이전에 증폭 주기가 최소로 이용되거나 또는 전혀 이용되지 않게 게놈 재료의 충분한 양을 포함하는 투입 샘플을 제공하는 표적화된 서열분석 작업흐름이다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/146 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

(72) 발명자

스타니슬라프 스테이시

미국 85742 애리조나주 투손 레브와 플레이스 9971

로젠바움 헤이디

미국 53562 위스콘신주 미들턴 메이우드 서클 2303

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내 게놈 재료를 서열분석하는 방법으로서, 종양 샘플 및/또는 림프절 샘플을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; 균질화된 샘플로부터 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 단리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈 재료를 제조하는 단계; 및 제조된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열분석 이전에 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계를 포함하고, 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계 동안 수행되는 증폭 주기의 총 횟수는 최대 4회 주기인, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 증폭 주기의 총 횟수가 3회인, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 증폭 주기의 총 횟수가 2회인, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈 재료를 제조하는 단계가 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함하는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 포획된 게놈 재료의 양이 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위인, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 1회 또는 2회의 증폭 주기가 포획된 게놈 재료에 대해 수행되는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 균질화된 샘플이 세포의 대표적인 샘플링 (sampling)을 포함하는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리되는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리되는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리되는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법.

청구항 13

샘플 내 DNA를 서열분석하는 방법으로서, 적어도 0.5 마이크로그램의 DNA를 혈액 샘플로부터 단리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 DNA를 제조하는 단계; 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 서열분석 이전에 0회의 증폭 단계를 포함하는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 DNA를 제조하는 단계가 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함하는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 포획된 게놈 재료의 양이 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위인, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 1회 또는 2회의 증폭 주기가 포획된 게놈 재료에 대해 수행되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 적어도 1 마이크로그램의 DNA가 혈액 샘플로부터 단리되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 19

표적화된 표상적 (representational) 서열분석 방법으로서, (i) 적어도 종양의 일부분, 하나 이상의 전체 또는 부분 림프절, 또는 이의 임의의 조합을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; (ii) 균질화된 샘플로부터 게놈 재료를 추출하는 단계; (iii) 추출된 게놈 재료를 비드 상에서 포획하는 단계; 및 (iv) 포획된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하고, 표적화된 표상적 서열분석이 포획된 게놈 재료의 서열분석 이전에 최대 4회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함하는, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 최대 4회의 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이전 또는 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 또는 이의 임의의 조합에서 수행될 수 있는, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 포획 전 증폭 주기가 수행되지 않는, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 포획된 게놈 재료의 양이 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위인, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 1회 내지 3회의 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 그러나 서열분석 이전에 수행되는, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 추출되는, 표적화된 표상적 서열 분석 방법.

청구항 25

제19항에 있어서, 4회 초과 증폭 주기를 요구하는 서열분석 방법에서 사용되는 투입 재료의 양과 비교하여, 적어도 100배 더 많은 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 유래되는, 표적화된 표상적 서열분석 방법.

청구항 26

샘플 내 DNA를 서열분석하는 방법으로서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 투입 샘플로부터 분리하는 단계 (투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플 또는 이의 임의 조합으로부터 유래됨); 서열분석을 위해 분리된 게놈 재료를 제조하는 단계; 및 제조된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하고, 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료가 다수의 조직학 및/또는 생검 표본으로부터 유래되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 종양 샘플로부터 유래되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 림프절 샘플로부터 유래되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료가 그것이 유래되는 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플의 대표적인 샘플링인, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 31

제26항에 있어서, 서열분석이 차세대 서열분석 방법을 사용하여 수행되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 32

제26항에 있어서, 서열분석이 합성 서열분석 방법론을 사용하여 수행되는, 샘플 내 DNA의 서열분석 방법.

청구항 33

서열분석 동안 PCR-도입된 돌연변이를 감소시키는 방법으로서, 게놈 재료의 충분한 양을 포함하는 샘플로부터 DNA를 분리하는 단계; 서열분석을 위해 분리된 DNA를 제조하는 단계; 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하고, 서열분석 이전에 최대 3회의 증폭 주기를 포함하는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 서열분석 이전에 1회 또는 2회의 증폭 주기를 포함하는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 투입 게놈 재료의 충분한 양이 포획 전 증폭 주기를 이용하지 않게 하는 양인, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 샘플이 암을 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 유래되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 37

제33항에 있어서, 샘플이 암으로 진단받은 환자로부터 유래되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 38

제33항에 있어서, 샘플이 암이 발생할 위험성이 있는 환자로부터 유래되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 39

제33항에 있어서, 샘플이 건강한 조직 샘플로부터 유래되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 40

제33항에 있어서, 약 0.5 마이크로그램의 DNA가 샘플로부터 분리되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 41

제33항에 있어서, 적어도 0.5 마이크로그램의 DNA가 샘플로부터 분리되는, PCR-도입된 돌연변이 감소 방법.

청구항 42

특정 처치 또는 활성 약학 성분에 반응하는 암 아형을 확인하여 암을 치료하는 방법으로서, 암 아형이 종양, 림프절, 또는 혈액의 대표적인 샘플링을 포함하는 투입 샘플을 서열분석하여 확인되고, 투입 샘플이 게놈 재료의 충분한 양을 포함하며, 최대 4회의 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행되는, 암 치료 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 최대 3회의 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행되는, 암 치료 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 최대 2회의 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행되는, 암 치료 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 최대 1회의 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행되는, 암 치료 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 0회의 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행되는, 암 치료 방법.

청구항 47

제42항에 있어서, 게놈 재료의 양이 적어도 0.5 마이크로그램인, 암 치료 방법.

청구항 48

제42항에 있어서, 게놈 재료의 양이 적어도 1 마이크로그램인, 암 치료 방법.

청구항 49

제42항에 있어서, 게놈 재료의 양이 적어도 5 마이크로그램인, 암 치료 방법.

청구항 50

제42항에 있어서, 게놈 재료의 양이 적어도 10 마이크로그램인, 암 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 교차 참조

[0001]

[0002] 본 출원은 2016년 11월 1일 출원된 미국 가출원 제62/415,952호의 출원일의 이득 및 2016년 1월 15일 출원된 미국 가출원 제62/279,126호의 출원일의 이득을 청구하며, 이의 개시내용은 이들 전문을 본 명세서에 참조로 포함한다.

[0003] **대상 개시내용의 분야**

[0004] 본 개시내용은 표적화된 표상적 (representational) 서열분석 작업흐름을 제공한다.

배경 기술

[0005] 현행 진단 종양학은 종양의 분획으로부터 얻어진 정보를 이용하고 종양은 이들 조성이 균일한 세포로 구성된다라는 가정 하에 예측된다. 많은 종양은, 조성이 균일하기보다는, 불균질하다. 실제로, 일부 고형 종양은 균일하기보다는, 다수의 유전적으로 구별되고, 공간적으로 분리된 암 세포의 개체군으로 구성된다고 보고되었다. 문헌 [Gerlinger et al., NEJM (2012) 366:883-92] 및 [Yachida et al. Nature (2010) 467(7319):1114-1117]을 참조한다. 통상적인 조직학적 방법론은 예를 들어 형태학 및 다른 특징을 기반으로, 분석을 위해 다수의 생검 샘플을 선택하여 이러한 불균질성을 해결한다. 예를 들어, 생검 샘플을 종양의 다수 영역에서 채취하며, 채취된 각 샘플은 약 0.1 입방 센티미터의 조직을 포함한다. 이들 방법은 더 많은 종양 조직 및 종양의 상이한 공간적 영역을 조사하지만, 이러한 방법을 사용하여 검정된 대량의 다수 종양은 샘플이 되지 못한 채로 남겨지게 된다. 유사하게, 통상의 방법은 암 환자로부터 림프절의 오직 적은 부분만이 샘플로 하며 그 조직의 대부분은 샘플이 되지 않는다. 또한 작은 크기의 이들 샘플은 서열분석과 같은 이용되는 추가의 진단 단계에서 제한될 수 있다.

[0006] 고형 종양은 3차원적 종양 덩어리 전체에 걸쳐 공간적으로 분리된 수백 내지 수천의 돌연변이체 대립유전자를 함유한다. 서열 포획을 위한 전통적인 방법은 도 2에 도시된 바와 같이, 포르말린 고정된, 파라핀 포매된 조직 절편 (예를 들어, 생검 표본 유래)으로부터 단리된 극도로 소량의 투입 DNA (약 5 내지 약 200 나노그램)를 이용한다. 전형적인 서열 포획 방법은 오늘날 임상 병리학 실험실에서 투입 DNA 요건을 맞추도록 진화되었다. 서열 포획 작업흐름의 몇몇 단계에서 DNA의 손실, 및 소량의 투입 DNA에 기인하여, DNA 단편은 증폭되어야만 하거나 또는 수행하려는 서열분석을 위한 포획 작업흐름의 종료시에 너무 적게 남겨질 것이다. 이러한 증폭은 일반적으로 2회 수행되는데, 특이적 프로브 포획 이전에 제1회, 및 선택된 표적의 특이적 프로브 포획 이후의 제2회이다 (도 1 및 2 참조). 이러한 증폭이 후속 프로토콜 단계에 이용할 수 있는 DNA의 절대 질량을 증가시키는데 유용하지만, 존재하는 정보의 양을 증가시키지는 않는다. 어느 정도, 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 상이한 DNA 단편의 개체군이 동일한 반응으로 증폭되는 경우 (즉, 멀티플렉스 PCR), 증폭 방법은 본래 샘플 내에 함유된 정보를 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 2종의 상이한 DNA 단편, A 및 B가 각각 하나의 카피 (1:1 수치 비율)로 샘플에 초기에 존재한다면, PCR은 1,000 카피의 DNA 단편 A 및 2,000 카피의 DNA 단편 B (1:2 수치 비율)를 함유하는 증폭된 샘플을 야기할 수 있다. 더 적은 수의 개별 분자가 증폭 방법의 투입물로서 사용되는 경우 및 증폭량이 증가되는 경우 (즉, 더 큰 횟수의 PCT 주기 적용), 본래 정보에 편향성이 도입될 위험성이 증가된다고 여겨진다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용의 일 측면은 충분한 양의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플이 제공되어, 서열분석 이전에 증폭 과정이 최소로 요구되거나 또는 전혀 요구되지 않는 표적화된 서열분석 작업흐름이다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 온전한 종양 또는 림프절로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 본 명세서에서 더욱 기술하는 바와 같이 환자 또는 포유동물 대상체로부터 수득된 하나 이상의 림프절 및/또는 온전한 종양 샘플 (전체 또는 일부분)의 균질화를 통해 수득된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 전혈 또는 이의 임의의 분획을 포함하는 충분한 양의 혈액으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암성 조직으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 전암성 조직으로부터 유래된다.

[0008] 일부 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나 이상의 증폭 단계 (예를 들어, 포획 전 증폭 단계, 포획 후 증폭 단계)를 포함하고, 서열분석 이전의 각각의 증폭 단계는 0 내지 3회의 증폭 주기를 포함하며, 서열분석 이전의 증폭 주기의 총 횟수는 4회를 넘지 않는다. 다른 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나 이상의 증폭 단계 (예를 들어, 포획 전 증폭 단계, 포획 후 증폭 단계)를 포함하고, 서열분석 이전의 각 증폭 단계는 0 내지 2회의 증폭 주기를 포함하며, 서열분석 이전 증폭 주기의 총 횟수는 3을 넘지 않는다. 또 다른 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나의 증폭 단계 (예를 들어, 포획 전 증폭 단계 또는 포획 후 증폭 단계)를 포함하고, 서열분석 이전의 단일 증폭 단계는

0 내지 3회의 증폭 주기를 포함한다. 추가의 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나의 증폭 단계를 포함하고, 서열분석 이전의 단일 증폭 단계는 1 내지 3회 주기를 포함한다. 역시 추가의 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나의 증폭 단계를 포함하고, 서열분석 이전의 단일 증폭 단계는 1회 주기를 포함한다. 보다 추가의 구체예에서, 표적화된 서열분석 작업흐름은 서열분석 이전에 하나의 증폭 단계를 포함하고, 서열분석 이전의 단일 증폭 단계는 2회의 주기를 포함한다. 일부 구체예에서, 서열분석 이전의 포획 전 증폭 단계 또는 포획 후 증폭 단계 중 하나 또는 둘 모두는 LM-PCR을 이용한다.

[0009] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플링 (sampling)을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암으로 진단된 환자 또는 포유동물 대상체 유래의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암을 갖는 것으로 의심되는 환자 또는 포유동물 대상체 유래의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암이 발생할 위험성이 있는 환자 또는 포유동물 대상체 유래의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암의 재발 또는 재출현이 알려지거나 또는 의심되는 환자 또는 포유동물 대상체 유래의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합 내 세포의 대표적인 샘플을 포함한다.

[0010] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플로부터 유래되는 세포의 불균질성 개체군을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플 내에서 유래되는 소수의 특정 종양 세포 개체군을 대표하는 서브클론 (즉, 종양 불안정성의 결과로서 발생하는 상이한 종양 세포 개체군)을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 희귀 게놈 변이체, 예컨대 투입 샘플 중 2% 미만의 대립유전자 빈도를 갖는 것을 검출 및/또는 서열분석할 수 있게 한다. 일부 구체예에서, 방법은 희귀 게놈 변이체, 예컨대 투입 샘플 중 1% 미만의 대립유전자 빈도를 갖는 것을 검출 및/또는 서열분석을 가능하게 한다.

[0011] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 예를 들어 다수의 조직학적 절편 및/또는 다수의 생검 샘플로부터 수득된, 충분한 양의 조직학적 절편 및/또는 생검 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 조직학적 절편 및/또는 생검 샘플로부터 유래된 투입 샘플은 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 다른 구체예에서, 조직학적 절편 및/또는 생검 샘플로부터 유래된 투입 샘플은 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 다른 구체예에서, 조직학적 절편 및/또는 생검 샘플로부터 유래된 투입 샘플은 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 다른 구체예에서, 조직학적 절편 및/또는 생검 샘플로부터 유래된 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다.

[0012] 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 10배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 100배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 250배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 500배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 1000배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법으로 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 약 1000배를 초과한다.

[0013] 본 개시내용의 다른 측면은 종양 샘플 및/또는 림프절 샘플을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; 균질화된 샘플로부터 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 단리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈 재료를 제조하는 단계; 및 제조된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내 게놈 재료의 서열분석 방법이다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 방법은 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계를 포함하고, 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계 동안 수행되는 증폭 주기의 총 횟수는 최대 4회 주기이다. 일부 구체예에서, 증폭 주기의 총 횟수는 3회이다. 일부 구체예에서, 증폭 주기의 총 횟수는 2회이다. 일부 구체예에서, 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈 재료를 제조하는 단계는 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함한다.

일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위이다. 일부 구체예에서, 1 또는 2 회 증폭 주기는 포획된 게놈 재료에 대해 수행된다. 일부 구체예에서, 균질화된 샘플은 세포의 대표적인 샘플링을 포함한다. 일부 구체예에서, 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리된다. 일부 구체예에서, 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리된다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 단리된다.

[0014] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 0.5 마이크로그램의 DNA를 혈액 샘플로부터 단리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 DNA를 제조하는 단계, 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는 샘플 내 DNA의 서열분석 방법이다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 0회의 증폭 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 서열분석을 위해 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 DNA를 제조하는 단계는 적어도 0.5 마이크로그램의 단리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위이다. 일부 구체예에서, 1 또는 2 회 증폭 주기가 포획된 게놈 재료에 대해 수행된다. 일부 구체예에서, 적어도 1 마이크로그램의 DNA가 혈액 샘플로부터 단리된다.

[0015] 본 개시내용의 다른 측면은 (i) 적어도 종양의 일부분, 하나 이상의 전체 또는 부분 림프절, 또는 이의 임의 조합을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; (ii) 균질화된 샘플로부터 게놈 재료를 추출하는 단계; (iii) 추출된 게놈 재료를 비드 상에서 포획하는 단계; 및 (iv) 포획된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 표적화된 표상적 서열분석 방법이고, 표적화된 표상적 서열분석은 포획된 게놈 재료의 서열분석 이전에 최대 4회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 최대 3회 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이전 또는 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 또는 이의 임의 조합에서 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 포획 전 증폭 주기가 수행되지 않는다. 일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng 범위이다. 일부 구체예에서, 1회 내지 3회의 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 그러나 서열분석 이전에 수행된다. 일부 구체예에서, 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 추출된다. 일부 구체예에서, 4회 초과 증폭 주기를 요구하는 서열분석 방법에서 사용되는 투입 재료의 양과 비교하여, 적어도 100배 더 많은 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 유래된다.

[0016] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 0.5 마이크로그램의 투입 게놈 재료, 적어도 0.5 마이크로그램의, 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플로부터 유래된 게놈 재료를 제공하는 단계, 투입 게놈 샘플로부터 DNA를 단리하는 단계, 서열분석을 위해 단리된 DNA를 제조하는 단계, 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는 샘플 내 DNA의 서열분석 방법이고, 방법은 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 적어도 0.5 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 다수의 조직학 및/또는 생검 표본으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 0.5 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 균질화된 종양 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 0.5 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 균질화된 림프절 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 0.5 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 유래된 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플의 대표적인 샘플링이다. 일부 구체예에서, 서열분석은 차세대 서열분석 방법을 사용하여 수행된다. 일부 구체예에서, 서열분석은 합성 서열분석 방법론을 사용하여 수행된다.

[0017] 본 개시내용의 다른 측면은 충분한 양의 게놈 재료를 포함하는 샘플로부터 DNA를 단리하는 단계; 서열분석을 위해 단리된 DNA를 제조하는 단계; 및 제조된 DNA를 분석하는 단계를 포함하는, 서열분석 동안 PCR-도입된 돌연변이를 감소시키는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 최대 3회의 증폭 주기를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 1회 또는 2회의 증폭 주기를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 게놈 재료의 충분한 양은 포획 전 증폭 주기가 이용되지 않게 하는 양이다. 일부 구체예에서, 샘플은 암을 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 암으로 진단된 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 암이 발생할 위험성이 있는 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 건강한 조직 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 0.5 마이크로그램의 DNA가 샘플로부터 단리된다. 일부 구체예에서, 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료가 샘플로부터 단리된다. 일부 구체예에서, 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료가 샘플로부터 단리된다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료가 샘플로부터 단리된다.

[0018] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 감소되는 서열분석 방법이고, 이 서열분석 방법은 적어도 0.05 마이크로그램의 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 서열분석 이전에 0 내지 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 0회의 증폭 주기가 수행된다. 다른 구체예에서, 1회의 증폭 주기가 수

행된다. 또 다른 구체예에서, 2회의 증폭 주기가 수행된다.

- [0019] 본 개시내용의 다른 측면은 게놈 내용물의 비례적인 표상 (representation) 내 PCR-도입된 편향성이 감소되는 서열 포획 방법이고, 이 서열분석 방법은 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제공하는 단계를 포함하고, 서열 포획 방법은 서열분석 이전에 0 내지 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 0회 증폭 주기가 수행된다. 다른 구체예에서, 1회의 증폭 주기가 수행된다. 또 다른 구체예에서, 2회의 증폭 주기가 수행된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다.
- [0020] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 제거된 서열 포획 방법이고, 서열 포획 방법은 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다.
- [0021] 본 개시내용의 다른 측면은 서열분석 이전에 PCR-중복 판독치를 제거하는 단계가 제거된 서열 포획 방법이고, 서열 포획 방법은 적어도 0.5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 1 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 5 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함한다.
- [0022] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 사실상 제거된 서열분석 방법이고, 이 서열분석 방법은 적어도 0.05 마이크로그램의 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 약 0.05 마이크로그램의 게놈 재료는 게놈 재료의 포획 이후에 제공된다. 일부 구체예에서, 1회 또는 2회의 포획 후 증폭 주기가 서열분석 이전에 수행된다.
- [0023] 본 개시내용의 다른 측면은 특정 처치 또는 활성 약학 성분에 반응하는 암 아형을 확인하여 암을 치료하는 방법이고, 암 아형은 종양, 림프절, 또는 혈액의 대표적인 샘플링을 포함하는 투입 샘플을 서열분석하여 확인되며; 투입 샘플은 충분한 양의 게놈 재료를 포함하고, 서열분석 단계는 최대 3회의 증폭 주기를 요구한다.
- [0024] 본 명세서에서 언급하는 바와 같이, 전통적인 서열분석 작업흐름은 특정 편향성을 도입시킬 수 있다. 일례에서, 증폭된 DNA 샘플의 정보 내용 중 PCR-도입된 편향성은, 샘플을 차세대 서열분석 (NGS) 방법을 사용하여 서열분석할 때 유지될 수 있다. 따라서 증폭된 DNA 단편의 개체군에 대한 NGS의 적용은 2가지 단점을 초래하는데, 즉 (1) 다수의 서열분석 판독치가 동일한 본래 단편의 카피의 중복 서열분석에 소비되어, 비용 효율적이지 않고, (2) 증폭 과정에 의해 도입된 수치적 편향성은 본래의 미증폭된 샘플에 존재하는 정보의 부실표시를 초래할 수 있고, 이는 표적화 서열분석 검정의 주요 목적이 샘플 중 상이한 DNA 서열의 존재 및 상대적 빈도를 정확하게 결정하기 위한 것인 경우에 특히 중요하다. NGS 이전에 DNA 단편의 PCR 증폭에 의한 추가적인 단점은 PCR 과정이 본래 단편을 카피하면서 서열 오류를 생성시킬 수 있다는 것이고, 이들은 이후에 본래 샘플에 존재했던 것으로 해석될 수 있다.
- [0025] 출원인은 (i) 서열분석 이전에 이용되는 증폭 주기의 횟수를 최소화시키거나, 또는 (ii) 서열분석 이전에 완전히 증폭 단계를 방지함으로써 상기에 언급된 단점을 개선시키거나 또는 완화시킨 서열 포획 작업흐름을 개발하였다. 본 명세서에서 제시하는 종양의 표적화된 표상적 서열분석을 위한 방법은 작업흐름 동안 그 DNA를 증폭시킬 필요를 제거하거나 또는 상당히 감소시키기 위해, 충분한 양의 투입 게놈 DNA, 및/또는 효율적인 효소적 단편화-기반 라이브러리 제조를 이용한다 (도 3a, 3b, 및 4 참조). 이후에 이것은 샘플의 비용 효율적인 특징규명을 용이하게 하고 (서열분석 판독치가 증폭된 DNA 단편의 서열분석으로 낭비되지 않기 때문), 출력 서열 데이터에 증폭 유도된 편향성의 기회를 감소시키고, 및/또는 서열분석 데이터에 위양성을 초래하는 PCR 유도된 오차의 기회를 감소시킨다고 여겨진다. 실제로, 출원인은 작업흐름으로부터 포획 전 및 포획 후 PCR의 감소 또는 제거가 (i) 표적화된 서열분석의 비용을 절감하고 (PCR 프라이머, PCR 반응 완충액, 및 PCR 효소에 대한 비용 제거); (ii) 검정 시간을 단축하고; (iii) 샘플 대 샘플 오염의 위험성 (PCR 과정의 잘 알려진 위험성)을 감소시키고; (iv) 표적화된 단편의 차등적 증폭에 기인한 서열분석 데이터 내 표상적인 편향성의 위험성을 감소 또는 완화시키고; (v) PCR 증폭 동안 중합효소 오류에 의해 야기되는 위양성 서열 변이의 위험성을 제거 또는 완화시키고; 및/또는 (vi) 보다 단순하고, 더 신속하고, 및/또는 적은 오류 가능성의 데이터 분석 및 해석을 용이하게 한다는 것을 예상치 않게 발견하였다.

[0026] 출원인은 또한 본 명세서에 개시된 방법이 도 1에 예시된 방법을 통해 도입될 수 있는 것과 같이, 증폭을 통해 달리 도입될 수도 있는 서열 포괄범위 (coverage) 중 대립유전자 및 유전자와 편향성을 예상치 않게 감소시키거나 또는 방지한다는 것을 추가로 제안한다. 따라서, 출원인은 지금 개시되는 방법이 암 유전체학에서 대립유전자 빈도 및 카피수 변이를 측정하는 우수한 방법 (즉, 보다 정확한 방법)을 제공한다고 믿는다. 출원인은 또한 본 명세서에 개시된 방법이, 서열 데이터의 분석에서 불필요한 서열 판독치를 확인하고 제거할 필요성이 감소된 서열분석을 가능하게 한다고 제안한다. 이러한 인자들은 암 환자의 게놈 DNA에 존재하는 체세포 대립유전자 빈도 및 카피수 변이의 정확한 측정을 위해 특히 중요하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 비제한적이고 비배타적인 구체예를 하기 도면을 참조하여 설명한다.

도 1은 2회의 증폭 단계를 도입하는 서열 포획 작업흐름을 기재한다.

도 2는 개시된 서열 포획 방법과 비교한 전통적인 서열 포획 방법의 비교를 제공한다.

도 3a는 개시된 서열 포획 방법의 단계들을 예시하는 흐름도를 기재하고, 특히 증폭 단계가 서열분석 이전에 수행되지 않는다.

도 3b는 개시된 서열 포획 방법의 단계들을 예시하는 흐름도를 기재하고, 특히 선택적 증폭 단계가 서열분석 이전에 수행될 수 있다.

도 4는 개시된 표적화된 표상적 서열분석 작업흐름과 비교하여 전통적인 표적화된 서열분석 작업흐름의 추가 비교를 제공한다. 현행의 표적화된 서열분석 프로토콜 (좌측 컬럼), 예컨대 바이오틴화된 포획 올리고뉴클레오타이드와의 혼성화에 의존적인 것들은 작업흐름 동안 샘플 DNA 질량을 증가시키기 위해 많은 PCR 증폭 주기 (이 예에서는 총 21회 주기)를 도입한다. 표적화된 표상적 서열분석 작업흐름 (우측 컬럼)은 본 명세서의 다른 구체예에 도시되거나 (0-2회의 증폭 주기) 또는 기술된 바와 같은 작업흐름 동안 전체 증폭을 감소시킨다. 작업흐름에서 PCR 증폭 단계는 흰색 박스로 표시된다.

도 5는 기본 SeqCap EZ 서열 포획 데이터 분석 작업흐름의 개략도를 도시한다. 서열 포획 실험으로부터의 서열분석 판독치는 광범위하게 사용되는 "FASTQ" 파일 형식으로 체계화된다. 서열 판독 품질은 데이터가 분석을 계속하는데 충분한 품질인지를 결정하기 위해 프로그램 "FastQC"를 사용하여 평가한다. 임의의 서열분석 어댑터 및 불충분한 품질 판독치는 나머지 판독치를 프로그램 "BWA mem"을 사용하여 기준 게놈에 대해 효율적으로 지도화시킬 수 있도록 프로그램 "Trimmomatic"을 사용하여 필터링된다. "SAMtools fixmate" 프로그램은 쌍형성된 양쪽 판독치에 대해 일관적인 정보가 보이도록 보장한다. "SAMtools sort" 프로그램이 이후에 사용되어 게놈 분류 순서에 따라서 출력 파일을 정리한다. 지도화 이후, "Picard MarkDuplicates" 명령을 사용하여 변이체 호출 중 대립유전자 증폭 편향성을 방지하기 위해 PCR 중복을 제거하거나 또는 표시한다. 증폭 연관된 중복이 제거된 지도화된 판독치를 이후에 후속 분석을 위해 "BAM" 형식으로 전환시킨다. 서열 포괄범위 및 포획 통계를 프로그램 "BEDtools", "Picard", 및 "GATK"를 사용하여 생성시키면서 게놈 서열 변이체를 "SAMtools" 및 "BCFtools"를 사용하여 호출하고 필터링한다. 이들 방법의 상세한 설명은 "How to Evaluate NimbleGen SeqCap EZ Target Enrichment Data"라는 명칭의 Roche 기술 노트 문서에 기술되어 있다 (8월 25일, 이 개시내용은 그 전문을 본 명세서에 참조로 포함함).

도 6은 게놈에 대해 지도화되고 포획 표적 ("표적 상 (On-target)")에 대해 정렬되거나, 또는 포획 표적의 100 염기쌍 이내 ("표적 근처 (Near Target)")에 위치한 모든 비중복 서열분석된 염기의 백분율이 0, 1, 2, 4, 6, 10 또는 14회 주기의 포획 후 증폭을 이용했는지에 따라 실질적으로 상이하지 않다는 것을 보여준다. 도시된 어떠한 실험도 포획 전 증폭 단계를 포함하지 않았다. 표적 상 또는 표적 근처에 있는 서열분석된 염기를 사용하여 포획 실험에서 서열 변이체를 확인하였다. 실험에서 표적 상 또는 표적 근처 염기의 백분율의 감소는 서열 변이체를 확인하기 위해 유용한 데이터의 동일한 절대량을 획득하기 위해 값비싼 추가의 보충적인 서열분석이 필요할 수 있다. 증폭을 명시하는 프로토콜과 비교하여, 양호한 표적 상 비율을 유지하기 위한 증폭-비포함 포획 프로토콜의 예상치않은 수용력은, 보충적인 서열분석에 대한 비용 상승의 발생 없이 증폭 단계에 대한 비용 절감 및 시간 절약을 촉진할 것이라는 것을 시사한다.

도 7은 일부 최소 판독 심도 (≥ 1 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , 및 ≥ 50)로 포괄되는 포획 표적을 포함하는 모든 염기의 백분율은 실험이 0, 1, 2, 4, 6, 10 또는 14회 주기의 포획 후 증폭을 이용하는지 간에 실질적으로 상이하지 않았음을 보여준다. 서열 심도 포괄 분포는 전체 포획 표적 전체에서 서열 변이체를 검출하기 위

한 검정의 감도의 핵심 결정인자이다. 따라서, 데이터는 증폭-비포함 포획 프로토콜이 증폭을 명시하는 포획 프로토콜과 유사하게 서열 변이체를 검출하는 감도를 가져야한다는 것을 시사한다.

도 8은 반수체 게놈 크기 (~3,000,000,000 염기쌍)를 포획 표적 크기 (4,571,289 염기쌍)로 나누고 포획 표적 내에 지도화된 서열분석된 염기의 백분율을 곱해서 계산된 (전체 7회 실험의 평균 = 0.667), 전체 기준 게놈에 대한 포획 표적 중 서열의 농축 배수를 도시한다.

도 9는 기준 게놈의 서열 대비, 도 5에 기술된 데이터 분석 파이프라인에 의해 호출된 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)의 총 개수를 도시한다. 데이터는 증폭-비포함 포획 프로토콜이 증폭을 명시하는 포획 프로토콜과 비교하여 유사한 개수의 SNP를 생성시켰음을 시사한다.

도 10은 수행한 포획 실험에서 확인된 이러한 특정 DNA 샘플 (NA1281, 국제 HapMap 프로젝트에 의해 이전에 유전자형 분석됨)의 포획 표적에 존재하는 것으로 알려진 SNP의 백분율을 보여준다. 0.903 내지 0.919 범위의 감도가 모든 7회 실험 중에서 계산되었고, PCR-비포함 포획 프로토콜의 감도는 0.911로 계산되어, 다른 것들 중에서 중간이었다.

도 11은 7회 포획 실험에서 SNP 분류의 특이성을 도시한다. 샘플 (NA12891)에서 검출된 공지된 변이체들의 경우, SNP 분류의 특이성은 올바른 집합성 (동형집합 대 이형집합)을 갖는 백분율로서 정의된다. SNP 분류의 특이성의 감소는 증폭-관련 대립유전자 편향성의 예측 결과이다 (예를 들어, 이형집합 유전자형이 아마도 더 동형집합 유전자형으로서 나타날 수 있음). 증폭-비포함 포획 프로토콜은 정의상, 증폭-관련 대립유전자 편향성의 부재와 일관되게, 증폭을 명시하는 포획 프로토콜과 유사하거나 또는 그를 초과하는 SNP 분류의 특이성을 입증하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 일반적으로, 본 개시내용은 증폭 주기의 횟수가 전통적인 서열분석 방법과 비교하여 적어도 최소화된 표적화된 표상적 서열분석 작업흐름을 제공한다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 서열분석 이전에 포획된 및/또는 포획 후 PCR 증폭 주기의 횟수를 감소시키는 한가지 방식은 본 명세서에서 더욱 개시하는 바와 같이, 시스템으로 제공되는 투입 DNA의 양을 증가시키는 것이라고 여겨진다. 출원인은 본 서열분석 작업흐름이 (i) 고유한 낮은 비율의 뉴클레오타이드의 오펜입 (mis-incorporation)에 기인한 돌연변이의 도입, 및 (ii) PCR 증폭 편향성에 기인한 표적 서열의 변경된 표상 (representation)의 위험성을 감소시킨다고 제안한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 단어 용어 "한", "하나", 및 "그"는 달리 명확하게 내용에서 표시하지 않으면 다수 지시 대상을 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은 달리 내용에서 명확하게 표시하지 않으면 "및"을 포함하고자 한다.
- [0030] 용어 "포함하는", "포괄하는", "가지는" 등은 상호교환적으로 사용되고 동일한 의미를 갖는다. 유사하게, "포함하다", "포괄하다", "가지다" 등은 상호교환적으로 사용되고 동일한 의미를 갖는다. 특히, 각각의 용어는 "포함하는"의 일반 미국 특허법 정의와 일관되게 정의되며 따라서 "적어도 다음의 것"을 의미하는 열린 용어로 해석되어야 하고, 또한 추가적인 특성, 제한, 측면 등을 배제하는 것으로 해석되지 않는다. 따라서, 예를 들어 "성분 a, b, 및 c를 가지는 장치"는 그 장치가 적어도 성분 a, b 및 c를 포함하는 것을 의미한다. 유사하게, 어구 "단계 a, b, 및 c"를 포함하는 방법"은 그 방법이 적어도 단계 a, b, 및 c를 포함한다는 의미이다. 더욱이, 단계 및 방법이 특정 순서로 본 명세서에서 요약될 수 있지만, 당업자는 순서화된 단계 및 방법이 가변적일 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "증폭"은 본래 핵산의 더 많은 양을 얻기 위해서 핵산 주형의 본래 양을 배가시키는 과정을 의미한다.
- [0032] 유사하게, 용어 "증폭시키는"은 핵산의 일부분을 예를 들어 임의의 광범위한 프라이머 연장 반응을 사용하여 복제하는 과정을 의미한다. 예시적인 프라이머 연장 반응은 제한없이, 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction) (PCR)을 포함한다. 달리 특별히 명시하지 않으면, "증폭시키는"은 산술적, 대수적 또는 지수적 증폭, 또는 단일 복제를 의미한다. 일반적으로, PCR은 클로닝 또는 정제없이 게놈 DNA의 혼합물 중 표적 서열의 절편의 농도를 증가시키기 위한 방법이다. 표적 서열을 증폭시키기 위한 이러한 방법은 바람직한 표적 서열을 함유하는 DNA 혼합물에 과량의 2중 올리고뉴클레오타이드 프라이머 도입 후, DNA 중합효소의 존재 하에서 정확한 배열의 열적 순환으로 이루어진다. 2중의 프라이머는 그들의 이중 가닥 표적 서열의 개별 가닥에 상보적이다. 증폭을 실시하기 위해서, 혼합물을 변성시키고 이후에 프라이머를 표적 분자 내 그들 상보적 서

열에 어닐링시킨다. 어닐링 이후, 프라이머는 새로운 쌍의 상보성 가닥을 형성하도록 중합효소 (예를 들어, DNA 중합효소)로 연장된다. 변성, 프라이머 어닐링 및 중합효소 연장의 단계들은 바람직한 표적 서열의 증폭된 절편 (애플리콘)을 고농도로 수득하도록 수회 반복될 수 있다 (즉, 변성, 어닐링 및 연장 단계는 하나의 "주기"로 구성되고, 수많은 "주기들"이 존재할 수 있음). 바람직한 표적 서열의 증폭된 절편의 길이는 서로에 대한 프라이머의 상대적 위치에 의해 결정되므로, 이 길이는 제어가능한 변수이다. 중합효소 연쇄 반응 ("PCR")은 예를 들어, 미국 특허 제4,683,202호; 미국 특허 제4,683,195호; 미국 특허 제4,000,159호; 미국 특허 제4,965,188호; 미국 특허 제5,176,995호에 기술되어 있고, 이들 각각의 개시내용은 그들 전문을 본 명세서에서 참조로 포함한다.

[0033] 어구 "게놈 내용물의 비례적인 표상 내 편향성"은 중합효소가 카피하는 것이 더욱 어려운 부분들과 같이, 증폭 이후에 게놈의 일부분이 적게 표시되는 (underrepresented) 경향을 의미한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "혼성화"는 DNA의 4개의 천연 핵염기 (아데닌, 구아닌, 티민 및 시토신) 중 하나와 보편적인 핵염기의 쌍형성 또는 왓슨 (Watson) 및 크릭 (Crick)의 염기 쌍형성을 통해 이중 가닥 분자를 형성하도록 DNA 및 RNA 중 각각 하나, 또는 DNA의 2개의 상보성 가닥을 연결하는 과정을 의미한다.

[0035] 용어 "차세대 서열분석 (next generation sequencing) (NGS)"은 전통적인 생어 (Sanger) 및 모세관 전기영동 기반 접근법과 비교하여 고수율 서열분석을 구비한 서열분석 기술을 의미하며, 여기서 서열분석 과정은 동시에 수행되어, 예를 들어 한번에 수천 또는 수백만의 비교적 적은 서열 판독치를 생성한다. 차세대 서열분석 기술의 일부 예는 제한없이, 합성에 의한 서열분석, 결찰 (ligation)에 의한 서열분석, 및 혼성화에 의한 서열분석을 포함한다. 이들 기술은 보다 짧은 판독치 (어디든지 25 내지 500 bp)이지만 비교적 짧은 기간 내에 수십만 또는 수백만 판독치를 생성시킨다. 용어 "차세대 서열분석"은 Illumina, Life Technologies, 및 Roche 등이 현재 이용하는 소위 병행되는 합성에 의한 서열분석 또는 결찰에 의한 서열분석 플랫폼을 의미한다.

차세대 서열분석 방법은 또한 Life Technologies가 상품화시킨 이온 토렌트 기술 (Ion Torrent technology)과 같은 나노포어 서열분석 방법 또는 전자-검출 기반 방법을 포함할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "핵산"은 유전자 정보를 전달하는 뉴클레오타이드 사슬로 구성된 고분자량 생화학적 거대분자를 의미한다. 가장 일반적인 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA)이다. 핵산을 구성하는 단량체는 뉴클레오타이드라고 한다. 각각의 뉴클레오타이드는 3개의 성분들, 즉 질소성 헤테로시클릭 염기, 포린 또는 피리미딘 (핵염기라고도 알려짐), 및 펜토스 당으로 이루어진다. 상이한 핵산 유형은 이들 뉴클레오타이드 내 당의 구조가 상이한데, DNA는 2-데옥시리보스를 함유하는데 반해 RNA는 리보스를 함유한다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "중합효소"는 핵산의 복제 과정을 촉매하는 효소를 의미한다. 보다 구체적으로, DNA 중합효소는 DNA 중합효소가 "판독"하고 주형으로서 사용하는, DNA 가닥을 따라서 데옥시리보뉴클레오타이드의 중합반응을 촉매한다. 새롭게 중합된 분자는 주형 가닥에 상보적이며 주형의 파트너 가닥과 동일하다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "서열분석" 또는 "DNA 서열분석"은 DNA 올리고뉴클레오타이드 내에서 뉴클레오타이드 염기, 아데닌, 구아닌, 시토신, 및 티민의 순서를 결정하기 위한 생화학적 방법을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어로서 서열분석은 제한없이, 동시 서열분석 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 서열분석 방법, 예를 들어, 사슬-종결 방법, 급속 DNA 서열분석 방법, 윈더링-스팟 (wandering-spot) 분석, 맥심-길버트 (Maxam-Gilbert) 서열분석, 염료-말단인자 서열분석, 또는 임의의 다른 현대적 자동화 DNA 서열분석 장비의 사용을 포함한다.

[0039] 용어 "서열분석 라이브러리"는 균등한 NGS를 위해 일정 길이로 전단되어 양쪽 말단 상에 어댑터 및 인덱스 서열이 첨가된, 게놈 유래의 핵산 단편의 컬렉션을 의미한다.

[0040] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 어구 "표적 서열"은 증폭하거나, 검출하거나, 또는 아니면 분석하려는 핵산의 영역을 의미한다.

[0041] **투입 샘플**

[0042] 일반적으로, 본 명세서에서 개시되는 서열분석 작업흐름의 일부로서 이용되는 투입 샘플은 종양 샘플, 예를 들어 온전한 종양, 및/또는 림프절로부터 유래되거나 또는 그로부터 제조된다. 용어 "종양 샘플"은 종양, 또는 암 세포를 잠재적으로 포함하거나 또는 포함할 것으로 의심되거나, 또는 암 세포의 잠재적 존재에 대해 시험하려는 샘플, 예컨대 림프절로부터 제조된 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 본 명세서에서

더욱 기술하는 바와 같이 환자 또는 포유동물 대상체로부터 수득된 하나 이상의 림프절 및/또는 종양 샘플 (전체 또는 일부분)을 (본 명세서에 기술한 바와 같이) 균질화하여 유래된다. 다른 구체예에서, 투입 샘플은 혈액, 예를 들어 전혈 또는 전혈의 구성 성분 일부로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 조직학적 절편 또는 생검 샘플, 예를 들어 다수의 조직학적 절편 또는 다수의 생검 샘플로부터 유래된다.

[0043] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 (예를 들어, 종양 샘플), 림프절, 또는 혈액 내 세포의 대표적인 샘플링이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "대표적인 샘플" 및 "대표적인 샘플링"은 전체의 성분을 정확하게 반영하는 샘플 (또는 샘플의 서브셋)을 의미하고, 따라서 샘플은 전체 개체군의 편향되지 않은 지표이다. 일반적으로, 이것은 대표적인 샘플 또는 이의 일부분 내 상이한 유형의 세포 및 그들의 상대적인 비율 또는 백분율이 전체 조직 표본, 일반적으로 고형 종양 또는 이의 일부분 내 이들 세포 유형의 상대적 비율 또는 백분율을 본질적으로 정확하게 반영하거나 또는 모방한다는 것을 의미한다. 샘플링은 후속 분석을 위해 대상의 일부분을 확보하는 작업이다. 대표적인 샘플은 연구되는 대상의 타당하게 근접한 지식을 수득할 수 있는 방식으로 생성된다. 대조적으로, 통상의 무작위 샘플링 방법은 일반적으로, "대표적인 샘플"을 발생시키지 않는다. 보다 큰 샘플로부터 보다 작은 개별 하위샘플의 선택이 선택되는 영역을 기반으로 편향될 수 있지만, 거대 샘플, 예를 들어 전체 종양 또는 림프절을 균질화하여 그 결과 공간적으로 분리된 성분들이 샘플 전반에서 균질하게 분산된다.

[0044] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암으로 진단받은 환자 또는 포유동물 대상체로부터의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암을 갖는 것으로 의심되는 환자 또는 포유동물 대상체로부터의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암이 발생할 위험성에 있는 환자 또는 포유동물 대상체로부터의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합으로부터 유래된 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암의 재발 또는 재출현이 알려져 있거나 또는 의심되는 환자 또는 포유동물 대상체로부터의 종양 샘플, 림프절 샘플, 혈액 샘플, 또는 이의 임의의 조합 내 세포의 대표적인 샘플을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 암이 발생할 위험성에 있는 환자로부터의 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플 내 세포의 대표적인 샘플링을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 건강한 환자로부터의 조직 샘플 또는 혈액 샘플 내 세포의 대표적인 샘플링을 포함한다. 일부 구체예에서 투입 샘플은 요구량의 DNA를 정제하기 위해 충분한 다수의 조직학적 절편을 포함한다.

[0045] 일 구체예에서, 본 명세서에 개시된 대표적인 예는 대상체로부터 수득된 거대 부피 또는 양의 종양 샘플 (예컨대 임상적 종양 샘플) 또는 림프절의 균질화에 의해 수득된다. 예를 들어, 전체 종양 또는 이의 실질적인 부분이 대표적인 샘플이 생성되는 투입 재료로서 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 종양 또는 림프절 (또는 다른 진단 검사의 수행을 위해 일부분의 제거, 예컨대 통상의 FFPE 샘플의 제조를 위해 이용가능한 부분의 제거 이후 잔존하는 이의 일부분)의 적어도 40%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 50%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 60%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 70%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 80%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 90%가 균질화에 이용된다. 다른 구체예에서, 종양 또는 림프절의 적어도 95%가 균질화에 이용된다. 또 다른 구체예에서, 전체 종양, 전체 림프절, 또는 림프절의 전체 개체군 (또는 다른 진단 검사의 수행을 위해 일부의 제거, 예컨대 통상적인 FFPE 샘플의 제조를 위해 이용가능한 일부분의 제거 이후 잔존하는 이의 일부분)이 균질화에 사용된다.

[0046] 대표적인 샘플은 고형 종양 유래의 온전한 종양 생검 샘플로부터 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, 생검 샘플은 적어도 약 100 내지 200개 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 생검 샘플은 적어도 약 200 내지 1,000개 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 생검 샘플은 적어도 약 1,000 내지 5,000개 세포를 포함한다. 추가의 구체예에서, 생검 샘플은 적어도 약 10,000 내지 100,000개 세포를 포함한다. 보다 추가의 구체예에서, 생검 샘플은 적어도 약 100,000 내지 1,000,000개 또는 그 이상의 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 종양의 공간적으로 구별되는 영역으로부터 수득된다. 다른 구체예에서, 본 명세서에 개시된 대표적인 예는 예를 들어, 유전자 돌연변이 또는 이전의 암 때문에 암이 발생할 위험성이 있는 것을 포함하여, 암이 발생할 위험성이 있는 환자 또는 포유동물 대상체로부터 유래된, 하나 이상의 추정 정상 조직 표본의 균질화에 의해 수득된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "공간적으로 구별되는"은 상이한 공간 영역에 분포되는 성분들을 의미한다. 일 구체예에서, 대표적인 샘플을 생성시키기 위해 사용되는 종양 생검 샘플은

종양 샘플의 상이한 영역으로부터 채취된다. 예를 들어, 전체 종양 내에서 다양성을 포획하기 위한 시도로서, 종양의 근부 대 원부 영역, 종양의 상이한 면, 종양의 상이한 층 등이다.

[0047] 용어 "균질화하는" 또는 "균질화"는 생물학적 샘플이, 샘플의 모든 분획이 조성이 균등하게 되는 상태가 되게 하는 과정 (예컨대 기계적 과정 및/또는 생화학적 과정)을 의미한다. 대표적인 샘플 (상기에 정의된 바와 같음)은 균질화된 샘플의 일부분의 제거에 의해 제조될 수 있다. 균질화된 샘플 ("균질물")은 샘플의 일부분 (분취액)의 제거가 남아있는 샘플의 전체 구성을 실질적으로 변경시키지 않으며 제거된 분취액의 성분이 남아있는 샘플의 성분과 실질적으로 동일하도록 충분히 혼합된다. 본 개시내용에서, "균질화"는 일반적으로, 샘플 내 대부분의 세포의 무결성을 보존하게 되며, 예를 들어, 샘플 중 세포의 적어도 50%가 균질화 과정의 결과로서 용해되거나 또는 파열되지 않을 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 80%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 85%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 90%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 95%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 96%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 97%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 98%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 99%의 무결성을 보존할 것이다. 다른 구체예에서, 균질화는 샘플 중 세포의 적어도 99.9%의 무결성을 보존할 것이다. 균질물은 개별 세포 (또는 세포의 클러스터)로 실질적으로 해리될 수 있고 최종 균질물 또는 균질물들은 실질적으로 균질하다 (전체적으로 균일하거나 또는 유사한 성분으로 이루어지거나 또는 구성됨).

[0048] 일부 구체예에서, 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 다른 조직 샘플은 기계적 전단 장치, 예를 들어 블렌더 또는 초음파기에 샘플을 위치시킴으로써 균질화된다. 균질화는 각각, 아마도 정상 분포로 맞춰진, 수천 내지 수백개의 세포 유래의 일정 범위의 조직 단편을 생성시킨다. 조직 단편 크기의 중간값은 블렌더 (또는 다른 적합한 장치)의 에너지에 반비례적으로 상관관계가 있어, 고에너지에서 조직 단편이 매우 작다. 블렌더 에너지와 가장 상관되는 조직의 성분은 콜라겐 함량인데, 피부가 완전한 해리에 상당한 에너지를 요구하기 때문이다. 블렌딩 시간이 또한 중요하지만, 가장 효과적인 임상적 적용분야에는 전체 종양이 수 분 내에 해리되는 것이 요구된다. 블렌딩 시간이 고정되면, 바람직한 시간 제한 하에서 종양 해리에 도달하는데 요구되는 에너지를 쉽게 결정할 수 있다. 종양 샘플 또는 림프절 샘플을 제조하는 다른 방법은 공개류중인 미국 가출원, 즉 가출원 제62/252,153호 (2015년 11월 6일 출원), 62/279,405 (2016년 1월 15일 출원) 및 62/354,622 (2016년 6월 24일 출원) (각각 Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ)에 양도됨)에 개시되어 있고, 이들의 개시내용은 그들 전문 각각을 참조로 본 명세서에 포함한다. 시험 샘플은 본 명세서에 기술된 서열분석 작업흐름에서 사용을 위해, 즉 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플로서, 균질화된 샘플로부터 채취될 수 있다.

[0049] 종양, 림프절, 또는 다른 조직 샘플을 해리시키기 위한 충분한 기계적 전단 이후, 본래 공간적으로 분리된 종양 세포의 하위개체군의 전부는 새롭게 균질화된 샘플 전체로 분포된다. 즉, 종양 샘플의 균질화 (또는 림프절의 균질화) 결과로서, 종양 내 세포의 임의의 불균질성은 생성 균질물 또는 이의 일부분 또는 분획 내에서 실질적으로 균질하게 (균일하게) 분포되어, 균질물 (또는 이의 임의 분획)이 투입물인 종양 생검 샘플의 불균질성을 실질적으로 균질하게 발현시킨다. 이의 전체로 종양을 대표하는 샘플 (또는 균질물)을 생성시키기 위해 종양 또는 림프절을 균질화하여, 종양의 풍경 (예컨대 불균질성)을 특징구명하고/하거나 전체적으로 함유된 상이한 게놈 하위개체군 각각을 서열분석하는 것이 가능하다.

[0050] 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플로부터 유래된 세포의 불균질 개체군을 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플 내에서 유래된 소수의 일정 종양 세포 개체군을 대표하는 서브클론 (즉, 종양 불안정성의 결과로서 발생된 상이한 종양 세포 개체군)을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 회귀 게놈 변이체, 예컨대 투입 샘플 중 2% 미만의 대립유전자 빈도를 갖는 것을 검출 및/또는 서열분석할 수 있게 한다. 일부 구체예에서, 방법은 회귀 게놈 변이체, 예컨대 투입 샘플 중 1% 미만의 대립유전자 빈도를 갖는 것을 검출 및/또는 서열분석할 수 있게 한다.

[0051] 일부 구체예에서, 균질화된 샘플은 예컨대 세포 또는 게놈 재료를 분리하여, 서열분석 작업흐름에서 사용하기 이전에 추가 가공된다. 일부 구체예에서, 균질화된 샘플은 먼저 여과된다.

[0052] 일부 구체예에서, 균질화된 샘플, 또는 여과된 균질화된 샘플 내 세포를 용해시켜, 세포 성분들을 방출시킨다. 예를 들어, 세포는 프렌치 프레스 또는 유사한 유형의 용해 장치, 미세유동화기, 그라인딩, 밀링, 화학적 또

는 효소적 용해를 사용하고/하거나, 당분야에 공지된 다른 기술을 사용하여 용해될 수 있다. 일부 구체예에서, 막 지질 및 단백질 (히스톤 포함)은 (예를 들어, 계면활성제 또는 효소 (프로테아제)의 첨가에 의해) 세포 성분을 함유하는 샘플로부터 제거된다. 또한, RNA는 (예를 들어, 효소 예컨대 RNase의 사용에 의해) 세포 성분을 함유하는 샘플로부터 제거될 수 있다.

[0053] 일부 구체예에서, DNA는 당업자에게 공지된 수단에 의해 분리되거나, 추출되거나, 또는 정제될 수 있다. 예를 들어, DNA는 에탄올 침전 또는 페놀-클로로포름 추출을 통해 추출된 후 펠렛을 형성하도록 원심분리될 수 있다. 일부 구체예에서, DNA는 고체상 컬럼 상에서 분리되거나 또는 추출될 수 있다. 일부 구체예에서, DNA는 핵산-결합 비드를 사용하여 분리되거나 또는 추출될 수 있다. 일부 구체예에서, DNA는 물리적, 화학적 또는 전기적 특성을 기반으로, 다공성 매트릭스를 통한 선택적 통과에 의해 분리되거나 또는 추출될 수 있다.

[0054] 추출된 DNA (게놈 재료)는 완충액, 예를 들어 알칼리 완충액에 용해될 수 있고, 본 명세서에서 더욱 설명하는 바와 같이, 서열분석을 위한 투입 샘플로서 도입될 수 있다.

[0055] 서열분석 작업흐름

[0056] 도 3a 및 3b를 참조하여, 본 개시내용의 서열분석 방법에 따른 제1 단계는 상기 기재된 바와 같이, 예컨대 투입 샘플 유래의, 게놈 재료 (300)를 수용하는 것이다. 일부 구체예에서, 본 개시내용은 서열분석 이전에 증폭 주기의 횟수가 최소화되도록 게놈 재료의 충분한 양을 포함하는 투입 샘플을 제공하는 서열분석 작업흐름을 제공한다. 일부 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 임의의 포획 전 증폭 주기없이 서열분석 작업흐름이 진행될 수 있게 하는 양이다. 다른 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 1 또는 2회의 포획 전 증폭 주기로 서열분석 작업흐름이 진행될 수 있게 하는 양이다. 또 다른 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 서열분석 이전에 포획 전 증폭 주기는 없고 포획 후 증폭 주기는 오직 최소 횟수로 서열분석 작업흐름을 진행할 수 있게 하는 양이다. 또 다른 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 서열분석 이전에 포획 전 증폭 주기는 없고 포획 후 증폭 주기는 약 1 내지 약 4회로 서열분석 작업흐름을 진행할 수 있게 하는 양이다. 추가의 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 서열분석 이전에 포획 전 증폭 주기는 없고 포획 후 증폭 주기는 약 1 내지 약 2회로 서열분석 작업흐름을 진행할 수 있게 하는 양이다. 일부 구체예에서, 재료의 "충분한 양"은 포획 전 증폭 주기가 없고 포획 후 증폭 주기도 없이 서열분석 작업흐름을 진행할 수 있게 하는 양이다.

[0057] 일부 구체예에서, 임의의 투입 샘플의 양은 적어도 약 0.5 마이크로그램이다. 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 1 마이크로그램이다. 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 2.5 마이크로그램이다. 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 5 마이크로그램이다. 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 7.5 마이크로그램이다. 일부 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 9 마이크로그램이다. 일부 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 10 마이크로그램이다. 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 적어도 약 50 마이크로그램이다. 또 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 약 10 마이크로그램 내지 약 100 마이크로그램 범위이다. 또 다른 구체예에서, 투입 샘플의 양은 약 10 마이크로그램 내지 약 250 마이크로그램 범위이다. 추가의 구체예에서, 투입 샘플의 양은 약 100 마이크로그램 내지 약 250 마이크로그램 범위이다.

[0058] 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 5배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 10배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 100배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 250배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 500배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 1000배를 초과한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 게놈 재료의 양은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 약 1000배를 초과한다.

[0059] 다시 도 3a 및 3b를 참조하여, 게놈 재료 (300)의 수용 이후에, 표적 핵산 분자를 포함하는 게놈 재료를 더욱 가공할 수 있다 (310). 일부 구체예에서, 게놈 재료를 단편화하여, 단편화된 게놈 샘플을 제공한다. 일

부 구체예에서, 투입 샘플은 예를 들어 초음파처리, 또는 핵산을 단편화할 수 있는 다른 방법에 의해 단편화된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 약 100 bp 내지 약 500 bp의 평균 크기로 단편화된다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 약 500 bp 내지 약 1,000 bp의 평균 크기로 단편화된다. 다른 구체예에서, 투입 샘플은 약 1,000 bp 내지 약 10,000 bp의 평균 크기로 단편화된다.

[0060] 일부 구체예에서, 게놈 재료의 단편화 이후에 단편화된 게놈 재료의 말단을 복구하거나 또는 "연마"하는 것이 후속된다. 이를 달성하기 위해서, 게놈 재료 내 이중 가닥 표적 분자는, 예를 들어 dNTP의 존재 하에서 DNA 중합효소 예컨대 T4 DNA 중합효소 또는 클레노우 (Klenow) 중합효소에 의한 채움 (fill-in) 반응 처리되어, 그 결과로 블런트 말단의 표적 분자가 생성된다. 또한, 단편의 말단은 어댑터의 결합 이전에 단편의 5' 말단에 포스페이트 기를 첨가하기 위해 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 및 당엽자에게 공지된 방법을 사용하여 인산화된다 (예를 들어, 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Eds. Sambrook et al., Cold Spring Harbour Press]을 참조하고, 이 전문을 참조로 본 명세서에 포함함). 연마되고, 인산화된 표적 DNA 상에서의 어댑터 (예를 들어, 약 3 내지 20 염기쌍의 짧은 이중 가닥 블런트 말단 DNA 올리고뉴클레오타이드)의 후속 결합은 당분야에 공지된 임의의 방법에 따라서, 예를 들어 T4 DNA 리가제 반응에 의해 수행될 수 있다.

[0061] 일 특정 구체예에서, 단편화된 게놈 재료의 말단을 연마하기 위한 반응은 단편화된 게놈 재료, T4 DNA 중합효소, T4 DNA 중합효소 반응 믹스, 및 물을 포함한다. 일부 구체예에서, 반응물은 일정 기간 (예를 들어, 20분 내지 60분) 동안 인큐베이션되게 한다. 게놈 재료는 이후에 예컨대 페놀/클로로포름에 의한 추출과 에탄올 침전을 후속하여, 혼합물로부터 회수된다.

[0062] 일부 구체예에서, 단편화된 핵산 샘플 (예를 들어, 단편화된 게놈 DNA, cDNA 등)은 5' 및 3' 말단 중 하나 또는 둘 모두 상의 어댑터에 결합시켜 변형된다. 일부 구체예에서, 한가지 유형의 어댑터 분자 (예를 들어, 어댑터 분자 A)는 결합되어 그 결과 단편의 양쪽 말단에서 동일한 말단 서열을 갖는 단편의 개체군을 생성시킨다. 다른 구체예에서, 2가지 유형의 어댑터 분자, A 및 B가 사용된다. 이 결과로 3가지 상이한 유형, 즉 (i) 한 말단에 하나의 어댑터 (A) 및 다른 말단에 다른 어댑터 (B)를 갖는 단편, (ii) 양쪽 말단에 어댑터 (A)를 갖는 단편, 및 (iii) 양쪽 말단에 어댑터 (B)를 갖는 단편으로 구성된 분자의 개체군이 생성된다. 다른 구체예에서, 어댑터는 그들이 단편화된 핵산 샘플에 결합된 후, 핵산 단편의 각각의 개별 가닥이 한쪽 말단에 하나의 어댑터 (A) 및 다른 말단에 다른 어댑터 (B)를 갖게 되도록 구축된다.

[0063] 일 특정 구체예에서, 링커와의 결합은 단편화 (및 말단 복구) 게놈 재료를 링커, T4 DNA 리가제, 결합 완충액, 및 물과 반응시켜 수행된다. 이후 게놈 재료는 당엽자에게 공지된 방법에 의해 정제 및 또는 크기-선택될 수 있다.

[0064] 도 1, 2 및 4에 도시된 바와 같이, 전통적인 서열분석 방법과 비교하여, 본 발명의 방법은 증폭이 어댑터의 도입 이후 및 혼성화 이전에 필요하지 않거나 (예를 들어, 도 3a 참조), 또는 어댑터의 도입 이후 및 혼성화 이전에 최소 횟수의 증폭 주기가 필요하도록 (예를 들어, 도 3b 참조), 투입 샘플 중 게놈 재료의 더 높은 양을 활용한다. 일부 구체예에서, 선택적인 포획 전 증폭 단계가 도입되고, 여기서 포획 전 증폭 단계는 1 내지 3 회의 증폭 주기를 포함한다. 다른 구체예에서, 선택적 포획 전 증폭 단계가 도입되고, 이 경우 포획 전 증폭 단계는 1 또는 2회 증폭 주기를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 선택적 포획 전 증폭 단계가 도입되고, 이 경우 포획 전 증폭 단계는 1회 증폭 주기를 포함한다. 보다 추가의 구체예에서, 증폭 주기가 포획 전에 수행되지 않는다.

[0065] 이후에 게놈 재료는 당엽자에게 공지된 절차에 따라서 상보성 DNA 가닥을 분리하도록 변성된다. 변성된 게놈 재료에 대해 이어서 혼성화 반응 (320)이 수행되며, 혼성화 반응 혼합물은 예를 들어, 게놈 재료 내 표적에 대한 핵산 서열에 상보적인 DNA 포획 프로브, Cot1 분획 차단 DNA (비특이적 혼성화를 차단하기 위함), 및 차단 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. DNA 포획 프로브는 스트랩타비딘 코팅된 비드 또는 표면을 사용하여 후속 고정화를 위해 바이오틴화될 수 있거나, 또는 고정 지지체 예컨대 마이크로어레이에 직접 고정될 수 있다. 혼성화 (320) 이후에, 비표적화 및 미결합 핵산은 고정 지지체로부터 세척되고, 결합된 표적화 핵산은 당분야에 공지된 프로토콜에 따라서 마이크로어레이 또는 포획 비드 또는 포획 표면으로부터 용리된다. 일부 구체예에서, 혼성화 단계 (320)는 Roche SeqCap EZ 프로브 풀을 이용한다. Roche SeqCap EZ 프로브 풀은 개별 올리고뉴클레오타이드의 길이가 약 50개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드의 범위일 수 있고 전형적인 크기는 약 75개 뉴클레오타이드인, 각각 특이적 서열을 갖는, 용액 중 수십개 내지 수백만개의 상이한 바이오틴화된 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로 이루어진다. Roche SeqCap EZ 프로브 풀은 DNA 서열분석 라이브러리의 표적화된 상보성 단편과 혼성화시키고 따라서 서열분석 이전에 동일한 DNA 서열분석 라이브러리의

비표적화된 단편에 비해 그들을 포획하여 농축시키기 위해 서열 포획 실험에서 사용될 수 있다. DNA 서열분석 라이브러리는 게놈 분석을 위해 게놈 DNA로부터, 또는 전사체 분석을 위해 RNA 또는 mRNA로부터 제조된 cDNA로부터 구축될 수 있으며, 이들 핵산이 추출될 수 있는 임의의 유기체 종의 DNA 또는 cDNA로부터 구축될 수 있다.

[0066] 일부 구체예에서, 혼성화는 고정 지지체 상에서 일어난다. 일부 구체예에서, 고정 지지체는 비드를 포함하는 반면, 비드는 예를 들어 튜브 또는 다른 이러한 용기 중 용액에 존재하거나, 또는 예를 들어 검정 플레이트의 웰 (예를 들어, 12웰, 24웰, 96웰, 384웰 등)에 분취된다.

[0067] 일부 구체예에서, 바이오틴화된 DNA 포획 프로브와 게놈 재료의 혼성화 (320) 이후에, 스트렙타비딘 코팅된 비드를 혼성화된 게놈 재료와 인큐베이션하여 혼성화된 게놈 재료는 스트렙타비딘-바이오틴 결합을 통해 고정되고 임의의 비표적화 게놈 재료는 세척에 의해 제거된다 (비드 포획, 330) (도 3a, 3b, 및 4 참조). 이후에 포획된 게놈 재료는 용리되어 서열분석에 제공되거나 또는 포획된 게놈 재료는 서열분석 이전에 먼저 증폭된다.

[0068] 일부 구체예에서, 도 1에서 확인되는 절차와 대조적으로, 비드 포획 이후 및 서열분석 이전에 게놈 재료의 용리 이후에 추가의 증폭 단계가 수행되지 않는다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, 단계 (300)에서 투입 게놈 재료의 충분한 양을 제공하여, 단계 (330) 및/또는 (340)에서 존재하는 포획된 재료의 양은, 전통적인 방법에 의해 제공되는 것과 유사한 양이다 (이러한 전통적인 방법에 따르면, 2회의 별개의 증폭 단계가 게놈 재료의 양을 증가시키는데 필요함) (도 2 및 또한 도 1에 기재된 비교 참조). 본 명세서에 개시된 방법의 혁신, 예를 들어 대표적인 샘플링의 제조는 PCR의 필요성을 제거하는 것으로 여겨지나, 단 재료의 충분한 양이 초기에 제공되고, 재료의 충분한 양이 개시된 서열분석 방법의 각 단계를 통해 전파되는 것을 전제로 한다.

[0069] 대안적으로, 최소 횟수의 증폭 주기 (예를 들어, 1 내지 4회 증폭 주기, 또는 1 내지 3회 증폭 주기)가 포획 후 및 서열분석 이전에 수행되고 (도 3b 및 4 참조), 이러한 최소 주기는 전통적인 서열분석 작업흐름과 대략 동일한 양의 재료를 제공하도록 포획 후 이용할 수 있는 재료의 양을 더욱 증가시킬 수 있다 (도 2 참조). 일부 구체예에서, 1 또는 2회의 증폭 주기는 포획 후, 그러나 서열분석 이전에 수행된다. 다른 구체예에서, 1회 증폭 주기가 포획 후, 그러나 서열분석 이전에 수행된다. 또 다른 구체예에서, 2회 증폭 주기가 포획 후, 그러나 서열분석 이전에 수행된다.

[0070] 하나 이상의 증폭 과정 또는 단계 (포획 전 또는 포획 후)가 본 개시내용의 작업흐름에 포함되는 경우, 증폭 주기의 총 횟수, 즉 포획 전 증폭 주기 및 포획 후 증폭 주기 (그러나 서열분석 이전)의 합은 4회 주기를 넘지 않는다. 예를 들어, 1회 증폭 주기가 포획 전에 수행될 수 있고 2회 증폭 주기가 포획 후에 수행될 수 있다. 다른 구체예에서, 서열분석 이전의 증폭 주기의 총 횟수는 3회 주기를 넘지 않는다. 또 다른 구체예에서, 서열분석 이전의 증폭 주기의 총 횟수는 2회 주기를 넘지 않는다. 또 추가의 구체예에서, 오직 단일 증폭 주기가 서열분석 이전에 작업흐름에 포함된다.

[0071] 일부 구체예에서, 게놈 재료 내 표적 핵산은 게놈의 특이적 영역 또는 특이적 영역들에 대한 분포된 핵산 프로브를 포함하는 마이크로어레이에 대해 표적 핵산 샘플을 혼성화하여 농축된다. 혼성화 이후에, 게놈 샘플에 존재하는 표적 핵산 서열은 어레이를 세척하고 어레이로부터 혼성화된 게놈 핵산을 용리하여 농축된다. 다른 구체예에서, 본 개시내용은 표적 핵산 분자를 제공하는 단계, 고정된 핵산 프로브와 다수의 표적 핵산 서열 간 혼성화를 지원하기 위한 조건 하에서 고정된 핵산 프로브를 포함하는 지지체와 샘플을 혼성화시키는 단계 (상기 고정된 핵산 프로브는 상기 다수의 표적 핵산 서열에 상보적이고, 상기 고정된 핵산 프로브는 상기 다수의 표적 핵산 서열 중에 균일한 혼성화를 제공함), 및 비혼성화된 핵산 서열을 혼성화된 표적 핵산 서열로부터 분리하여 투입 샘플 중 핵산 분자의 개체군을 농축시키는 단계를 포함하는, 게놈 재료의 샘플 내 표적 핵산 분자의 개체군의 균일한 농축을 위한 방법을 포함한다.

[0072] 서열분석 (340)은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 따라 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 서열분석 방법은 생어 (Sanger) 서열분석 및 염료-말단인자 서열분석을 비롯하여, 차세대 서열분석 기술 예컨대 파이로서열분석, 나노포어 서열분석, 마이크로포어-기반 서열분석, 나노볼 서열분석, MPSS, SOLiD, Illumina, Ion Torrent, Starlite, SMRT, tSMS, 합성에 의한 서열분석, 결합에 의한 서열분석, 질량 분광법 서열분석, 중합효소 서열분석, RNA 중합효소 (RNAP) 서열분석, 현미경-기반 서열분석, 미세유동학적 생어 서열분석, 현미경-기반 서열분석, RNAP 서열분석, 터널링 전류 DNA 서열분석, 및 시험관내 바이러스 서열분석을 포함한다. WO2014144478, WO2015058093, WO2014106076 및 WO2013068528을 참조하고, 이들 각각은 그 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다.

- [0073] 일부 구체예에서, 서열분석 (340)은 다수의 상이한 방법에 의해, 예컨대 합성 기술에 의한 서열분석을 적용하여 수행될 수 있다. 종래 기술에 따른 합성에 의한 서열분석은 서열분석 반응 동안 특이적 데옥시뉴클레오타이드-트리포스페이트의 도입시 부산물의 생성을 모니터링하는 임의의 서열분석 방법으로서 정의된다 (Hyman, 1988, Anal. Biochem. 174:423-436; Rhonaghi et al., 1998, Science 281:363-365). 합성 반응에 의한 서열분석의 한가지 중요한 구체예는 파이로포스페이트 서열분석 방법이다. 이 경우에서, 뉴클레오타이드 도입 동안 파이로포스페이트의 발생은 화학-발광 신호의 발생을 초래하는 효소 캐스캐이드에 의해 모니터링되고 (Roche Applied Science cat. No. 04 760 085 001), 합성에 의한 서열의 예는 파이로포스페이트 서열분석 기술을 기반으로 한다. 454 GS20 또는 454 FLX 장비 상에서의 서열분석의 경우, 평균 게놈 DNA 단편 크기는 제품 문헌에 기술된 바와 같이, 각각 200 bp 또는 600 bp 범위이다.
- [0074] 일부 구체예에서, 합성 반응에 의한 서열분석은 대안적으로 염료 말단인자 유형의 서열분석 반응을 기반으로 할 수 있다. 이 경우에서, 도입되는 염료 데옥시뉴클레오타이드-트리포스페이트 (ddNTP) 빌딩 블록은 바람직하게는, 초기 DNA 가닥의 추가 연장을 방지하는 형광발광성 표지인, 검출가능한 표지를 포함한다. 이후에 표지는 제거되고 예를 들어 3'-5' 엑소뉴클레아제 또는 프루프리딩 활성을 포함하는 DNA 중합효소를 사용하여 주형/프라임어 연장 하이브리드에 ddNTP 빌딩 블록 도입시 검출된다.
- [0075] 일부 구체예에서, 게놈 서열분석기 (Genome Sequencer) 작업흐름 (Roche Applied Science 카탈로그 번호 04 896 548 001)의 경우, 제1 단계에서, (클로날) 증폭이 에멀션 PCR에 의해 수행된다. 따라서, 증폭 단계가 에멀션 PCR 방법에 의해 수행되는 것은 또한 본 개시내용의 범주 내에 있다. 클로날 증폭된 표적 핵산을 보유하는 비드는 이후에 제조사의 프로토콜에 따라서 임의로 피코타이터 플레이트에 옮겨지게 되고 서열 결정을 위한 파이로포스페이트 서열분석 반응 처리된다.
- [0076] 일부 구체예에서, 서열분석은 Illumina, Inc.가 제공하는 것과 같은 차세대 서열분석 방법 ("Illumina Sequencing Method")을 사용하여 수행된다. 임의의 특정 이론에 국한하려는 것은 아니나, Illumina 차세대 서열분석 기술은 클로날 증폭, 및 합성에 의한 서열분석 (sequencing by synthesis) (SBS) 화학을 사용하여 신속하고, 정확한 서열분석이 가능하다. 이 방법은 핵산 사슬에 그들을 도입시키면서 DNA 염기를 동시에 확인한다. 각각의 염기는 성장하는 가닥에 첨가되면서 고유한 형광발광 신호를 방출하여, DNA 서열의 순서를 결정하는데 사용된다.
- [0077] 일부 구체예에서, 서열분석은 단일-분자 실시간 서열분석, 예컨대 Pacific Biosciences of California, Inc.에서 입수할 수 있는 PacBio를 사용하여 수행된다.
- [0078] **키트**
- [0079] 일 구체예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 용기, 및 표적 핵산 서열의 혼성화, 세척, 및 용리를 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 수행하기 위한 키트를 제공하는데, 여기서 상기 하나 이상의 용기는 고정된 핵산 프로브를 포함하는 고정 지지체를 포함하고, 상기 프로브는 다수의 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있는 다수의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 프로브는 상기 다수의 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 제공하며, 적어도 약 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 수용하고 처리하도록 각 키트 성분의 충분한 양이 제공된다.
- [0080] 다른 구체예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 용기, 및 표적 핵산 서열의 혼성화, 세척, 및 용리를 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 수행하기 위한 키트를 제공하는데, 여기서 상기 하나 이상의 용기는 고정된 핵산 프로브를 포함하는 고정 지지체를 포함하고, 상기 프로브는 다수의 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있는 다수의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 프로브는 상기 다수의 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 제공하고, 서열분석 이전에 수행되는 증폭 주기의 횟수가 최소화되도록 각 키트 성분의 충분한 양이 제공된다.
- [0081] 일 구체예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 용기, 및 표적 핵산 서열의 혼성화, 세척 및 용리를 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 수행하기 위한 키트를 제공하는데, 여기서 상기 하나 이상의 용기는 바이오틴화된 핵산 프로브를 포함하고, 상기 프로브는 다수의 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있는 다수의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 프로브는 상기 다수의 표적 핵산 서열의 균일한 농축을 제공하며, 적어도 약 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 수용하고 처리하도록 각 키트 성분의 충분한 양이 제공된다.
- [0082] 일부 구체예에서, 키트는 지시서 및/또는 종양 샘플 또는 림프절 샘플을 균질화하기 위한 다른 성분, 및/또는

임의의 생성 균질물의 정제를 위한 성분을 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 종양 샘플 또는 림프절로부터 유래된 균질물로부터 게놈 재료를 분리, 추출, 및/또는 정제하기 위한 성분을 포함한다.

[0083] 일부 구체예에서, 키트는 전체 혈액 샘플을 안정화 (예를 들어, 혈액의 응고를 방지)시키거나 또는 전혈 샘플로부터 게놈 재료를 추출하기 위한 성분을 포함한다.

[0084] 일부 구체예에서, 키트는 적어도 약 10 마이크로그램의 게놈 재료로부터 서열분석 라이브러리를 제조하기 위한 지시서를 포함한다.

[0085] 일부 구체예에서, 키트는 포획 전 및/또는 포획 후 증폭 (예를 들어, 결합-매개 PCR에 의함)을 수행할 수 있도록 프로브 및 프라이머를 포함한다.

[0086] 추가 구체예

[0087] 본 개시내용의 다른 측면은 종양 샘플 및/또는 림프절 샘플을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; 균질화된 샘플로부터 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 분리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 10 마이크로그램의 분리된 게놈 재료를 제조하는 단계; 및 제조된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 샘플 내 게놈 재료를 서열분석하는 방법이다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 방법은 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계를 포함하고, 적어도 하나의 포획 전 또는 포획 후 증폭 단계 동안 수행되는 증폭 주기의 총 횟수는 최대 4회 주기이다. 일부 구체예에서, 증폭 주기의 총 횟수는 3회이다. 일부 구체예에서, 증폭 주기의 총 횟수는 2회이다. 일부 구체예에서, 서열분석을 위해 적어도 10 마이크로그램의 분리된 게놈 재료를 제조하는 단계는 적어도 10 마이크로그램의 분리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng의 범위이다. 일부 구체예에서, 1회 또는 2회 증폭 주기가 포획된 게놈 재료에 대해 수행된다. 일부 구체예에서, 균질화된 샘플은 세포의 대표적인 샘플링을 포함한다.

[0088] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 10 마이크로그램의 DNA를 혈액 샘플로부터 분리하는 단계; 서열분석을 위해 적어도 10 마이크로그램의 분리된 DNA를 제조하는 단계, 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는 샘플 내 DNA를 서열분석하는 방법이다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 0회의 증폭 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 서열분석을 위해 적어도 10 마이크로그램의 분리된 DNA를 제조하는 단계는 적어도 10 마이크로그램의 분리된 게놈을 포획 프로브와 혼성화시키고 혼성화된 게놈 재료를 포획하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng의 범위이다. 일부 구체예에서, 1회 또는 2회 증폭 주기가 포획된 게놈 재료에 대해 수행된다.

[0089] 본 개시내용의 다른 측면은 (i) 적어도 종양의 일부분, 하나 이상의 전체 또는 부분 림프절, 또는 이의 임의 조합을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계; (ii) 균질화된 샘플로부터 게놈 재료를 추출하는 단계; (iii) 비드 상에서 추출된 게놈 재료를 포획하는 단계; 및 (iv) 포획된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 표적화된 표상적 서열분석 방법이고, 표적화된 표상적 서열분석은 포획된 게놈 재료의 서열분석 이전에 최대 4회 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 최대 3회 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이전 또는 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 또는 이의 임의 조합에서 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 포획 전 증폭 주기가 수행되지 않는다. 일부 구체예에서, 포획된 게놈 재료의 양은 약 90 ng 내지 약 900 ng의 범위이다. 일부 구체예에서, 1회 내지 3회의 증폭 주기가 추출된 게놈 재료의 포획 이후, 그러나 서열분석 이전에 수행된다. 일부 구체예에서, 적어도 9 마이크로그램의 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 추출된다. 일부 구체예에서, 4회 초과 증폭 주기를 요구하는 서열분석 방법에서 사용되는 투입 재료의 양과 비교하여 적어도 100배 더 많은 게놈 재료가 균질화된 샘플로부터 유래된다.

[0090] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 10 마이크로그램의 투입 게놈 재료 (적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료는 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액 샘플로부터 유래됨)를 제공하는 단계, 투입 게놈 샘플로부터 DNA를 분리하는 단계, 서열분석을 위해 분리된 DNA를 제조하는 단계, 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는 샘플 내 DNA를 서열분석하는 방법이고, 방법은 임의의 증폭 단계를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 다수의 조직학 및/또는 생검 표본으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 균질화된 종양 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 균질화된 림프절 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 투입 게놈 재료는 이것이 유래되는 종양 샘플, 림프절 샘플, 또는 혈액

샘플의 대표적인 샘플링이다. 일부 구체예에서, 서열분석은 차세대 서열분석 방법을 사용하여 수행된다. 일부 구체예에서, 서열분석은 합성 서열분석 방법론을 사용하여 수행된다.

- [0091] 본 개시내용의 다른 측면은 게놈 재료의 충분한 양을 포함하는 샘플로부터 DNA를 단리하는 단계; 서열분석을 위해 단리된 DNA를 제조하는 단계; 및 제조된 DNA를 서열분석하는 단계를 포함하는 서열분석 동안 PCR-도입된 돌연변이를 감소시키는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 최대 3회 증폭 주기를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 1회 또는 2회 증폭 주기를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 게놈 재료의 충분한 양은 포획 전 증폭 주기가 이용되지 않도록 하는 양이다. 일부 구체예에서, 샘플은 암을 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 암으로 진단된 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 암이 발생할 위험성이 있는 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 샘플은 건강한 조직 샘플로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 10 마이크로그램의 DNA가 샘플로부터 단리된다.
- [0092] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 감소된 서열분석 방법이고, 서열분석 방법은 적어도 0.05 마이크로그램의 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 서열분석 이전에 0 내지 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 0회의 증폭 주기가 수행된다. 다른 구체예에서, 1회의 증폭 주기가 수행된다. 또 다른 구체예에서, 2회의 증폭 주기가 수행된다.
- [0093] 본 개시내용의 다른 측면은 게놈 내용물의 비례적인 표상 내 PCR-도입된 편향성이 감소된 서열 포획 방법이고, 서열분석 방법은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제공하는 단계를 포함하고, 서열 포획 방법은 서열분석 이전에 0 내지 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 0회의 증폭 주기가 수행된다. 다른 구체예에서, 1회의 증폭 주기가 수행된다. 또 다른 구체예에서, 2회의 증폭 주기가 수행된다.
- [0094] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 제거된 서열 포획 방법이고, 서열 포획 방법은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0095] 본 개시내용의 다른 측면은 서열분석 이전에 PCR-중복 판독치를 제거하는 단계가 제거된 서열 포획 방법이고, 서열 포획 방법은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0096] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플이 제공되는 서열분석 작업흐름이고, 작업흐름은 서열분석 이전에 0 내지 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 게놈 재료의 양은 약 10 마이크로그램 내지 약 1,000 마이크로그램의 범위이다.
- [0097] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-도입된 돌연변이가 감소된 서열분석 방법이고, 서열분석 방법은 적어도 9 마이크로그램의 게놈 재료를 갖는 서열분석 라이브러리를 제조하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 서열분석 이전에 1 내지 3회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함하고, 증폭 주기는 포획 전, 포획 후, 또는 포획 전 및 포획 후 둘 모두에서 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 1 내지 3회의 증폭 주기가 포획 후에 수행된다.
- [0098] 본 개시내용의 다른 측면은 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플이 제공되는 서열 포획 작업흐름이고, 작업흐름은 서열분석 이전에 1 내지 3회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함하고, 증폭 주기는 포획 전, 포획 후, 또는 이의 임의 조합에서 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 1 내지 3회의 증폭 주기는 포획 후에 수행된다. 일부 구체예에서, 게놈 재료의 양은 약 10 마이크로그램 내지 약 1,000 마이크로그램의 범위이다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 약 10 마이크로그램의 재료를 포함한다.
- [0099] 본 개시내용의 다른 측면은 전체 또는 부분 종양 또는 림프절을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계, 균질화된 샘플로부터 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 포획된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 게놈 재료를 서열분석하는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 최대 4회의 증폭 주기를 요구한다. 일부 구체예에서, 방법은 포획 후, 그러나 서열분석 이전에, 1회 또는 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 약 10 내지 약 100 마이크로그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 150만개의 세포를 포함한다.
- [0100] 본 개시내용의 다른 측면은 전혈 또는 이의 분획의 샘플을 수득하는 단계, 샘플로부터 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 게놈 재료를 서열분석하는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 최대 4회의 증폭 주기를 요구한다. 일부 구체예에서, 방법은 포획 후, 그러나 서열분석 이전에 1회 또는 2회의 증폭 주기를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 약 10 내지 약 100 마이크로

그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 150만개의 세포를 포함한다.

- [0101] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-비포함 서열 포획 작업흐름이고, 여기서 투입 샘플은 게놈 재료의 충분한 양을 포함한다. 일부 구체예에서, 적어도 10 마이크로그램의 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플이 제공되고 서열분석 이전에 증폭 과정이 요구되지 않는다. 일부 구체예에서, 게놈 재료의 양은 약 10 마이크로그램 내지 약 1,000 마이크로그램의 범위이다.
- [0102] 본 개시내용의 다른 측면은 PCR-비포함 서열 포획 작업흐름이고, 투입 샘플은 전통적인 서열 포획 방법에서 사용하기 위한 투입 샘플 내 재료의 양보다 적어도 5배를 초과한다.
- [0103] 본 개시내용의 다른 측면은 전체 또는 부분 종양 또는 림프절을 균질화하여 균질화된 샘플을 제공하는 단계, 균질화된 샘플로부터 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 포획된 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 게놈 재료를 서열분석하는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 게놈 재료의 증폭을 요구하지 않는다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 150만개의 세포를 포함한다.
- [0104] 본 개시내용의 다른 측면은 전혈 또는 이의 분획의 샘플을 수득하여 투입 샘플을 제공하는 단계, 투입 샘플로부터 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 게놈 재료를 서열분석하는 방법이고, 방법은 서열분석 이전에 게놈 재료의 증폭을 요구하지 않는다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 10 마이크로그램의 재료를 포함한다. 일부 구체예에서, 투입 샘플은 적어도 150만개의 세포를 포함한다.
- [0105] 본 개시내용의 다른 측면은 게놈 재료를 포함하는 투입 샘플의 충분한 양을 수득하는 단계, 혼성화를 위해 게놈 재료를 제조하는 단계, 제조된 게놈 재료를 포획 프로브와 혼성화시키는 단계, 투입 샘플로부터 게놈 재료를 포획하는 단계, 및 게놈 재료를 서열분석하는 단계를 포함하는 게놈 재료를 서열분석하는 방법이고, 방법은 일부 특정한 증폭 형태 (예를 들어, Illumina 플로우셀 (flowcell) 상에서의 브릿지 PCR, 이온 토렌트 서열분석에서의 에멀션 PCR)가 서열 포획이 완료된 후 서열분석의 일부로서 또는 서열분석 장비 내에서 수행되는 경우를 제외하고, 작업흐름의 임의 단계에서 게놈 재료의 증폭을 요구하지 않는다. 일부 구체예에서, 적어도 약 10 마이크로그램의 게놈 재료가 혼성화에 제공된다.
- [0106] 본 개시내용의 다른 측면은 특정 처치 또는 활성 약학 성분에 반응하는 암 아형을 확인하여 암을 치료하는 방법이고, 암 아형은 종양, 림프절 또는 혈액의 대표적인 샘플링을 포함하는 투입 샘플을 서열분석하여 확인된다. 일부 구체예에서, 처치는 표적화 처치, 예를 들어 항체-기반 처치이다. 일부 구체예에서, 처치는 하나 이상의 활성 약학 성분을 사용하는 화학요법을 포함한다.
- [0107] **실시예**
- [0108] **표적화된 표상적 서열분석을 위한 프로토콜**
- [0109] 실시예 1 내지 5는 표적화된 표상적 서열분석을 위한 프로토콜을 기재한다. 실시예는 특정 실험실 장비 및/또는 소모품을 언급할 수 있다. 이러한 장비 및 소모품의 예를 적절한 경우, 공급처 및 카탈로그 번호와 함께, 표 1 및 2에 기재한다. 본 명세서에 기술된 방법에 따라서, 당업자는 실시예 4에 언급된 단계들이 선택적이라는 것을 이해할 것이다. 당업자는 본 명세서에 기술된 프로토콜이 기술된 것보다 적거나 또는 많은 게놈 DNA의 투입량을 수용하도록 조정될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 또한 추가의 포획 전 증폭 단계가 이 프로토콜에 포함될 수 있지만, 이러한 포획 전 증폭 단계는 본 명세서에서 언급하는 바와 같이 선택적이라는 것을 이해할 것이다.

표 1: 실시예 1 내지 5에서 언급된 실험실 장비

장비	공급처	카탈로그 번호
DNA 진공 농축기 (1.5 ml 튜브)(선택적)	복수의 판매처	
Covaris 초음파처리기 (선택적)	Covaris	복수의 모델 (예: S220, E220)
DynaMag-2 마그네트 (16 x 0.2 ml 튜브 홀더)(선택적)	Thermo Fisher	12321D
DynaMag-96 사이드 마그네트	Thermo Fisher	12331D
미세원심분리기 (16,000 x g 수용능)	복수의 판매처	
분광광도계	NanoDrop	ND-1000
생물분석기 2100	Agilent	
써모사이클러 (+47°C 에서 16 - 20 시간 동안 유지가능; 프로그래밍가능한 가열된 덮개 추천)	복수의 판매처	
와류식 혼합기	복수의 판매처	

표 2: 실시예 1 내지 5에서 언급된 소모품

구성품	공급처	패키지 크기	카탈로그 번호
SeqCap 어댑터 키트 A 96	Roche	96 회 반응	07 141 530 001
SeqCap EZ 시약 키트 플러스 v2	Roche	24 회 반응	06 953 247 001
KAPA HyperPlus 라이브러리 제조 키트	Roche	24 회 반응	07 962 401 001
Agencourt AMPure XP 시약	Beckman Coulter	5 ml	A63880
Agilent DNA 1000 키트	Agilent	1 키트	5067-1504
용리 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)	복수의 판매처		
에탄올 (무수), 분자 생물학 용도	Sigma-Aldrich	500 ml	E7023-500ML
PCR 튜브 (0.2 ml)	복수의 판매처		
미세원심분리 튜브 (1.5 ml)	복수의 판매처		
물, PCR 등급	Sigma-Aldrich	4 x 25 ml	3315843001

실시예 1 — KAPA 하이퍼플러스 (HyperPlus) 라이브러리 제조물을 사용한 샘플 라이브러리 제조

1.1. 동결건조된 인덱스 어댑터를 재현탁한다 (어댑터 키트 A).

1.1.1. 간단히 내용물이 튜브 바닥에서 펠렛이 되도록, SeqCap 어댑터 키트 A 및/또는 B에 함유된, 동결건조된 인덱스 어댑터를 스피닝한다.

1.1.2. SeqCap 어댑터 키트 A 및/또는 B에서 'SeqCap 인덱스 어댑터'로 표지된 12개 튜브 각각에 50 마이크로리터의 차가운 PCR-등급의 물을 첨가한다. 어댑터를 얼음 상에 유지시킨다.

1.1.3. 간단히 PCR-등급의 물이 더해진 인덱스 어댑터를 와류시키고 재현탁된 인덱스 어댑터 튜브를 스핀 다운한다.

1.1.4. 재현탁된 인덱스 어댑터의 튜브는 -15 내지 -25°C에 보관해야한다.

1.2. 샘플 라이브러리를 제조한다.

1.2.1. 라이브러리 구축에 사용하려는 gDNA (약 100 ng 내지 약 1 마이크로그램)를 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 중에 35 마이크로리터의 총 부피로 0.2 ml 튜브 또는 PCR 플레이트의 웰 내에 희석시킨다.

[0122] 1.2.2. 표시된 순서로 성분들을 첨가하여 얼음 상에서 각 단편화 반응물을 합한다:

구성물	부피
100 ng gDNA	35 μ l
KAPA Frag 완충액 (10x)	5 μ l
KAPA Frag 효소	10 μ l
총량	50 μl

[0123]

[0124] 1.2.3. 단편화 반응물을 완전하게 혼합한다.

[0125] 1.2.4. 4°C에서 즉시 인큐베이션으로 설정된 사전 냉각된 써모사이클러에 위치시킨다. 다음으로 하기 개략된 프로그램을 사용하여 샘플을 인큐베이션한다:

[0126] 1.2.4.1. 단계 1: +37°C에서 20분.

[0127] 1.2.4.2. 단계 2: +4°C에서 유지.

[0128] 1.2.5. 반응물을 얼음에 옮기고 즉시 다음 단계로 진행한다.

[0129] 1.2.6. 다음과 같이 말단 복구 및 A-꼬리화 (tailing) 반응을 수행한다:

[0130] 1.2.6.1. 다음 시약들의 마스터 믹스를 제조한다:

말단 복구 마스터 믹스	개별 샘플 라이브러리 당
KAPA 말단 복구 & A-꼬리화 완충액	7 μ l
KAPA 말단 복구 & A-꼬리화 효소 믹스	3 μ l
총량	10 μl

[0131]

[0132] 1.2.6.2. 각각의 50 마이크로리터 단편화된 샘플에 10 마이크로리터의 말단 복구 및 A-꼬리화 마스터 믹스를 첨가한다.

[0133] 1.2.6.3. 말단 복구 및 A-꼬리화 반응물을 완전하게 혼합한다.

[0134] 1.2.6.4. 얼음 상 위치시키고 즉시 다음 단계로 진행한다.

[0135] 1.2.6.5. 다음의 프로그램을 사용하여 가열된 덮개가 구비된 써모사이클러에서 말단 복구 및 A-꼬리화 인큐베이션을 수행한다:

[0136] 1.2.6.5.1. 단계 1: +65°C에서 30분.

[0137] 1.2.6.5.2. 단계 2: +4°C에서 유지.

[0138] 1.2.6.6. 30분간 인큐베이션 후, 즉시 다음 단계로 진행한다.

[0139] 1.2.7. 어댑터 결합 반응 설정을 진행한다:

[0140] 1.2.7.1. 다음의 시약들의 마스터 믹스를 제조한다:

결찰 마스터 믹스	개별 샘플 라이브러리 당
PCR-등급 물	5 μ l
KAPA 결찰 완충액	30 μ l
KAPA DNA 리가제	10 μ l
총량	45 μl

[0141]

[0142] 1.2.7.2. 5 μ l의 SeqCap 라이브러리 어댑터 (바람직한 인덱스 포함)를 말단 복구 및 A-꼬리화 믹스와 DNA가 함유된 샘플 웰에 첨가한다. 각 샘플에 대해 사용된 인덱스를 반드시 기록한다.

[0143] 1.2.7.3. 65 마이크로리터의 말단 복구 및 A-꼬리화 믹스/DNA/어댑터를 함유하는 각 샘플 웰에, 45 마이크로리터의 결찰 마스터 믹스를 첨가하여, 그 결과 전체 부피가 110 마이크로리터가 되게 한다.

- [0144] 1.2.7.4. 결찰 반응물을 완전하게 혼합한다.
- [0145] 1.2.7.5. +20℃에서 15분 동안 결찰 반응물을 인큐베이션한다.
- [0146] 1.2.7.6. 인큐베이션 후, 즉시 다음 단계로 진행한다.
- [0147] 1.2.8. 다음과 같이 결찰 후 세정을 수행한다:
- [0148] 1.2.8.1. 각각의 결찰 반응물에, 완전하게 재현탁시킨 88 마이크로리터의 실온 AMPure XP 시약을 첨가한다.

제 1 결찰 후 세정	개별 샘플 라이브러리 당
결찰 반응물	110 μ l
AMPure XP 시약	88 μ l
총량	198 μl

- [0149]
- [0150] 1.2.8.2. 결찰 반응 생성물 및 AMPure XP 시약을 완전하게 혼합한다.
- [0151] 1.2.8.3. DNA가 비드에 결합할 수 있도록 5분 동안 실온에서 샘플을 인큐베이션한다.
- [0152] 1.2.8.4. 비드를 포획하기 위해서 자성 입자 수집기에 샘플을 위치시킨다. 액체가 투명해질 때까지 인큐베이션한다.
- [0153] 1.2.8.5. 상청액을 조심스럽게 제거하여 버린다.
- [0154] 1.2.8.6. 샘플을 자성 입자 수집기에 유지시키고, 200 마이크로리터의 신선하게 제조된 80% 에탄올을 첨가한다.
- [0155] 1.2.8.7. ≥ 30 초 동안 실온에서 샘플을 인큐베이션한다.
- [0156] 1.2.8.8. 에탄올을 조심스럽게 제거하여 버린다.
- [0157] 1.2.8.9. 샘플을 자성 입자 수집기에 유지시키고, 200 마이크로리터의 신선하게 제조된 80% 에탄올을 첨가한다.
- [0158] 1.2.8.10. ≥ 30 초 동안 실온에서 샘플을 인큐베이션한다.
- [0159] 1.2.8.11. 조심스럽게 에탄올을 제거하여 버린다. 비드를 방해하지 않고 모든 잔류 에탄올을 제거하도록 노력한다.
- [0160] 1.2.8.12. 모든 에탄올이 증발되도록 충분히, 실온에서 비드를 건조시킨다.
- [0161] 1.2.8.13. 자성 입자 수집기로부터 샘플을 제거한다.
- [0162] 1.2.8.14. 53 마이크로리터의 용리 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 중에 비드를 완전하게 재현탁시킨다.
- [0163] 1.2.8.15. DNA가 비드로부터 용리될 수 있도록 2분 동안 실온에서 샘플을 인큐베이션한다.
- [0164] 1.2.8.16. 비드를 포획하기 위해 자성 입자 수집기 상에 샘플을 위치시킨다. 액체가 투명해질 때까지 인큐베이션한다.
- [0165] 1.2.8.17. 50 마이크로리터 상청액을 새로운 튜브/웰에 옮긴다.

[0166] **실시예 2 - 샘플 및 SeqCap EZ 프로브 풀 혼성화**

- [0167] 2.1.1. AMPure XP 시약을 사용 전에 적어도 30분 동안 실온으로 가온시킨다.
- [0168] 2.1.2. SeqCap EZ 약세서리 키트 v2에 함유된, 5 마이크로리터의 COT 인간 DNA (1 mg/ml)를 새로운 튜브/웰에 첨가한다.
- [0169] 2.1.3. 3 μ g의 DNA 샘플 라이브러리를 5 마이크로리터의 COT 인간 DNA를 함유하는 샘플에 첨가한다. 동일한 샘플로부터 구축된 다수 라이브러리를 이 목적을 위해 모을 수 있다.
- [0170] 2.1.4. 2,000 pmol (또는 2 마이크로리터)의 혼성화 향상 올리고 (1 마이크로리터의 1,000 pmol SeqCap HE 유니버설 올리고 및 샘플 라이브러리 어댑터 인덱스와 일치되는 1 마이크로리터의 1,000 pmol SeqCap HE 인덱스 올리고)를 COT 인간 DNA가 더해진 DNA 샘플 라이브러리에 첨가한다.
- [0171] 2.1.5. COT 인간 DNA, DNA 샘플 라이브러리 풀, SeqCap HE 유니버설 올리고 및 SeqCap HE 인덱스 올리고 풀의

투입 부피를 첨가하여 상기 혼합물의 총 부피를 결정한다.

- [0172] 2.1.6. 상기 혼합물에 2 부피의 AMPure XP 시약 (실온으로 평형화시키고 완전하게 재현탁시킴)을 첨가한다. 완전하게 혼합한다.
- [0173] 2.1.7. 샘플을 실온에서 10분간 인큐베이션하여 샘플 라이브러리가 비드에 결합하도록 한다.
- [0174] 2.1.8. 샘플을 자성 입자 수집기에 위치시켜 비드를 포획한다. 용액이 투명하게 되도록 한다.
- [0175] 2.1.9. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심스럽게 상청액을 제거하여 버린다.
- [0176] 2.1.10. 비드-결합된 DNA 샘플을 함유하는 샘플에 190 마이크로리터의 80% 에탄올을 첨가한다. 샘플을 이 단계 동안 자성 입자 수집기 상에 남겨두어야 한다.
- [0177] 2.1.11. 실온에서 ≥ 30 초 동안 인큐베이션한다.
- [0178] 2.1.12. 조심스럽게 80% 에탄올을 제거하여 버린다. 비드를 방해하지 않고 모든 잔류 에탄올을 제거하도록 노력한다.
- [0179] 2.1.13. 튜브 덮개를 5분 동안 (또는 건조까지) 열어서 실온에서 비드를 건조시킨다.
- [0180] 2.1.14. 다음의 시약의 마스터 믹스를 제조하고, 포획 수를 반영하도록 확대한다:
- [0181] 2.1.14.1. 7.5 마이크로리터의 2X 혼성화 완충액 (바이알 5).
- [0182] 2.1.14.2. 3 마이크로리터의 혼성화 성분 A (바이알 6).
- [0183] 2.1.15. 이전 단계로부터의 10.5 마이크로리터의 혼성화 완충액/혼성화 성분 A 믹스를 비드-결합된 DNA 샘플에 첨가한다.
- [0184] 2.1.16. 자성 입자 수집기로부터 샘플을 제거하고 완전하게 혼합한다. 이 단계에서 충분한 혼합을 수행하여 균질한 혼합물이 산출되는 것이 중요하다.
- [0185] 2.1.17. 실온에서 2분간 정치시킨다.
- [0186] 2.1.18. 샘플을 자성 입자 수집기 상에 위치시킨다.
- [0187] 2.1.19. 액체가 투명해진 후, 10.5 마이크로리터의 상청액 (전체 부피)을 제거하여 4.5 ul의 SeqCap EZ 프로브 풀을 함유하는 새로운 튜브/웰에 위치시킨다. 완전하게 혼합한다.
- [0188] 2.1.20. 블록 온도보다 10°C 높게 설정된 가열된 덮개가 구비된 써모사이클러에서 다음의 프로그램을 사용하여 혼성화 인큐베이션을 수행한다:
- [0189] 2.1.20.1. 95°C에서 5 분.
- [0190] 2.1.20.2. 47°C에서 16 내지 20시간.
- [0191] 2.1.21. 47°C에서 16시간 내지 20시간 동안의 인큐베이션을 위해서, 써모사이클러의 가열된 덮개가 켜져 있고 혼성화 온도보다 10°C 높은 온도를 유지하도록 설정되는 것이 중요하다 (+57°C). 샘플은 단계 3.3에서 포획 비드로 전달될 때까지 47°C로 유지되어야만 한다.
- [0192] **실시예 3 - 세척하고 포획된 DNA 샘플 라이브러리 회수**
- [0193] 3.1. SeqCap 혼성화 및 세척 키트에 함유된, 10X 세척 완충액 (I, II, III 및 엄격) 및 2.5X 비드 세척 완충액을 희석하여 1X 작용 용액을 생성시킨다. 하기 열거된 부피가 1회 포획에 충분하다.

농축된 완충액	농축된 완충액의 부피	PCR-등급 물의 부피	1X 완충액*의 총 부피
10X 엄격 세척 완충액 (바이알 4)	40 μ l	360 μ l	400 μ l
10X 세척 완충액 I (바이알 1)	30 μ l	270 μ l	300 μ l
10X 세척 완충액 II (바이알 2)	20 μ l	180 μ l	200 μ l
10X 세척 완충액 III (바이알 3)	20 μ l	180 μ l	200 μ l
2.5X 비드 세척 완충액 (바이알 7)	200 μ l	300 μ l	500 μ l

[0194]

[0195]

3.2. 포획 비드를 제조한다.

[0196]

3.2.1. SeqCap 퓨어 포획 비드 키트에 함유된, 포획 비드를 사용 전에 30분간 실온으로 평형화되도록 한다.

[0197]

3.2.2. 비드의 균질한 혼합물이 보장되도록 사용전에 15초 동안 포획 비드를 와류시킨다.

[0198]

3.2.3. 각각의 포획을 위해 50 마이크로리터의 비드를 0.2 ml 또는 1.5 ml 튜브로 분취한다 (즉, 1회 포획 사용을 위해서는 50 마이크로리터의 비드, 및 4회 포획 사용을 위해서는 200 마이크로리터 비드 등). 2회 포획 및 12회 포획에 충분한 비드가 각각 단일한 0.2 ml 튜브 및 1.5 ml 튜브에 제조될 수 있다.

[0199]

3.2.4. 튜브를 자성 입자 수집기에 위치시킨다. 용액이 투명하게 되도록 한다 (5분 미만으로 걸려야 함).

[0200]

3.2.5. 비드를 방해하지 않도록 조심스럽게 상청액을 제거하여 버린다. 임의의 잔존하는 미량의 액체는 후속 세척 단계에서 제거할 것이다.

[0201]

3.2.6. 튜브가 자성 입자 수집기 상에 위치되는 동안, 비드의 초기 부피의 2배의 1X 비드 세척 완충액을 첨가한다 (즉, 1회 포획 사용을 위해서는 100 마이크로리터의 완충액, 및 4회 포획 사용을 위해서는 400 마이크로리터 완충액 등).

[0202]

3.2.7. 자성 입자 수집기로부터 튜브를 제거하고 와류 또는 상하 파이펫팅에 의해 완전하게 혼합한다.

[0203]

3.2.8. 비드를 결합시키기 위해 다시 튜브를 자성 입자 수집기에 위치시킨다.

[0204]

3.2.9. 투명해지면, 액체를 제거하여 버린다.

[0205]

3.2.10. 총 2회 세척 동안 단계 2.6 - 2.9를 반복한다.

[0206]

3.2.11. 제2 세척 후 완충액을 제거한 후, 비드의 초기 부피의 1X의 1X 비드 세척 완충액을 첨가한다 (즉, 포획당 50 마이크로리터 완충액).

[0207]

3.2.12. 자성 입자 수집기로부터 튜브를 제거하여 완전하게 혼합한다.

[0208]

3.2.13. 50 마이크로리터의 재현탁된 비드를 각 포획을 위해 새로운 튜브/웰 내에 분취한다.

[0209]

3.2.14. 비드를 결합시키기 위해 자성 입자 수집기 상에 튜브를 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 둔다.

[0210]

3.2.15. 투명해지면, 상청액을 제거하여 버린다.

[0211]

3.2.16. 포획 비드가 이제 포획된 DNA에 결합되도록 준비된다. 즉시 다음 단계로 진행한다.

[0212]

3.3. DNA를 포획 비드에 결합시킨다.

[0213]

3.3.1. 하나의 혼성화 샘플을 이전 단계로부터의 포획 비드의 단일한 제조된 튜브/웰에 옮긴다.

[0214]

3.3.2. 완전하게 혼합한다.

[0215]

3.3.3. 15분간 +47°C로 설정된 써모사이클러에 샘플을 위치시켜, 비드에 포획된 샘플을 결합시킨다 (가열된 덮개는 +57°C로 설정).

[0216]

3.4. 비드-결합된 DNA가 더해진 포획 비드를 세척한다.

[0217]

3.4.1. 15분간 인큐베이션 이후, 써모사이클러로부터 샘플을 제거한다.

[0218]

3.4.2. 써모사이클러는 다음 단계를 위해 47°C로 유지되어야 한다 (가열된 덮개는 켜지고 +57°C를 유지하도록 설정됨).

- [0219] 3.4.3. 100 마이크로리터의 1X 세척 완충액 I을 15 마이크로리터의 비드-결합된 DNA가 더해진 포획 비드에 첨가한다.
- [0220] 3.4.4. 완전하게 혼합한다.
- [0221] 3.4.5. 비드를 포획하도록 자성 입자 수집기 상에 샘플을 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 한다.
- [0222] 3.4.6. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심스럽게 상청액을 제거하여 버린다.
- [0223] 3.4.7. 200 마이크로리터의 1X 엄격 세척 완충액을 각 샘플에 첨가한다.
- [0224] 3.4.8. 자성 입자 수집기로부터 샘플을 제거한다.
- [0225] 3.4.9. 상하로 파이펫팅하여 균질하게 혼합한다.
- [0226] 3.4.10. +47℃로 예열된 써모사이클러에 위치시키고, 덮개 (+57℃로 설정)를 덮고 5분 동안 인큐베이션한다.
- [0227] 3.4.11. 5분 동안 인큐베이션 후, 샘플을 써모사이클러로부터 제거하고 비드를 포획하기 위해 자성 입자 수집기 상에 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 한다.
- [0228] 3.4.12. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 제거하여 버린다.
- [0229] 3.4.13. 1X 엄격 세척 완충액을 사용하여 총 2회의 세척 동안 단계 4.6 - 4.11을 반복한다.
- [0230] 3.4.14. 200 마이크로리터의 실온 1X 세척 완충액 I을 첨가한다.
- [0231] 3.4.15. 10초 동안 와류 또는 10회 상하 파이펫팅에 의해 완전하게 혼합한다. 혼합물이 균질하도록 보장한다.
- [0232] 3.4.16. 1분 동안 실온에서 인큐베이션한다.
- [0233] 3.4.17. 비드를 포획하기 위해서 자성 입자 수집기 상에 샘플을 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 한다.
- [0234] 3.4.18. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 제거하여 버린다.
- [0235] 3.4.19. 200 마이크로리터의 실온 1X 세척 완충액 II를 첨가한다.
- [0236] 3.4.20. 10초 동안 와류 또는 10회 상하 파이펫팅에 의해 완전하게 혼합한다. 혼합물이 균질하도록 보장한다.
- [0237] 3.4.21. 1분 동안 실온에서 인큐베이션한다.
- [0238] 3.4.22. 비드를 포획하기 위해서 자성 입자 수집기 상에 샘플을 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 한다.
- [0239] 3.4.23. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 제거하여 버린다.
- [0240] 3.4.24. 200 마이크로리터의 실온 1X 세척 완충액 III을 첨가한다.
- [0241] 3.4.25. 10초 동안 와류 또는 10회 상하 파이펫팅에 의해 완전하게 혼합한다. 혼합물이 균질하도록 보장한다.
- [0242] 3.4.26. 실온에서 1분 동안 인큐베이션한다.
- [0243] 3.4.27. 비드를 포획하기 위해 자성 입자 수집기 상에 샘플을 위치시킨다. 용액이 투명해지도록 한다.
- [0244] 3.4.28. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 제거하여 버린다.
- [0245] 3.4.29. 자성 입자 수집기로부터 샘플을 제거한다.
- [0246] 3.4.30. 15 마이크로리터 PCR-등급의 물을 비드-결합된 DNA 샘플의 각 튜브/플레이트 웰에 첨가한다.
- [0247] **실시예 4 - 포획 전 결합-매개 PCR (LM-PCR)을 사용하여 포획된 샘플 라이브러리 증폭**
- [0248] 4.1. 후-LM-PCR 올리고를 재현탁시킨다.
- [0249] 4.1.1. 간략하게 SeqCap EZ 약세서리 키트 v2에 함유된, 동결건조된 후-LM-PCR 올리고 1 및 2를 스피닝하여 내용물이 튜브 바닥에 펠렛화되게 한다. 양쪽 올리고는 단일 튜브 내에 함유되도록 주의한다.

[0250] 4.1.2. 480 마이크로리터의 PCR-등급 물을 원심분리된 올리고의 튜브에 첨가한다.

[0251] 4.1.3. 간략하게 재현탁된 올리고를 와류시킨다.

[0252] 4.1.4. 내용물이 수집되도록 튜브를 스핀 다운시킨다.

[0253] 4.1.5. 재현탁된 올리고 튜브는 -15 내지 -25℃에 보관해야한다.

[0254] 4.2. 포획 후 LM-PCR 마스터 믹스를 제조한다.

[0255] 4.2.1. 다음의 시약들의 마스터 믹스를 제조한다.

포획 후 LM-PCR 마스터 믹스	개별 DNA 샘플 PCR 반응 당
KAPA HiFi 핫스타트 레디믹스 (2X)	25 μ l
후-LM-PCR 올리고 1 및 2, 5 μ M*	5 μ l
총량	30 μl

[0256]

[0257] 4.2.2. 30 마이크로리터의 포획 후 LM-PCR 마스터 믹스를 0.2 ml 튜브 또는 PCR 플레이트의 웰에 첨가한다.

[0258] 4.2.3. 단계 3.3으로부터의 비드-결합된 DNA를 완전하게 혼합한다.

[0259] 4.2.4. 20 마이크로리터의 주형으로서의 비드-결합된 DNA를 30 μ l의 포획 후 LM-PCR 마스터 믹스와 튜브/웰 내에 분취한다 (음성 대조군을 수행하는 경우, 20 μ l PCR-등급 물을 이 튜브/웰에 첨가함).

[0260] 4.2.5. 수 회 상하 파이펫팅에 의해 완전하게 혼합한다.

[0261] 4.3. 포획 후 PCR 증폭을 수행한다.

[0262] 4.3.1. 씨모사이클러 샘플을 위치시킨다. 증폭 단계 동안 인큐베이션 온도보다 +10℃ 초과를 추적하기 위해 씨모사이클러의 가열된 덮개를 설정하도록 권고된다.

[0263] 4.3.2. 다음의 추적 후 LM-PCR 프로그램을 사용하여 포획된 DNA를 증폭시킨다:

[0264] 4.3.2.1. 단계 1: +98℃에서 45초.

[0265] 4.3.2.2. 단계 2: +98℃에서 15초.

[0266] 4.3.2.3. 단계 3: +60℃에서 30초.

[0267] 4.3.2.4. 단계 4: +72℃에서 30초.

[0268] 4.3.2.5. 단계 5: 단계 2로 가서 0 또는 1회 반복 (총 1 또는 2회 주기에 대해).

[0269] 4.3.2.6. 단계 6: +72℃에서 1분.

[0270] 4.3.2.7. 단계 7: +4℃에서 유지.

[0271] 4.3.2.8. 최대 72시간까지 정제를 위해 준비될 때까지 +2 내지 +8℃에서 반응물을 보관한다.

[0272] 4.4. Agencourt AMPure XP 비드를 사용하여 증폭된 포획 DNA 샘플을 정제한다.

[0273] 4.4.1. SeqCap 퓨어 포획 비드 키트에 함유된 AMPure XP 비드를 사용 전 적어도 30분 동안 실온으로 가온시킨다.

[0274] 4.4.2. 비드의 균질한 혼합물을 보장하도록 사용 전에 10초 동안 AMPure XP 비드를 와류시킨다.

[0275] 4.4.3. 90 마이크로리터의 AMPure XP 비드를 50 마이크로리터의 증폭된 포획 DNA 샘플 라이브러리에 첨가한다.

[0276] 4.4.4. 다수 회 상하로 파이펫팅 또는 와류하여 완전하게 혼합한다.

[0277] 4.4.5. 5분 동안 실온에서 인큐베이션하여 포획된 샘플 라이브러리가 비드에 결합하도록 한다.

[0278] 4.4.6. 비드-결합된 DNA를 함유하는 샘플을 자성 입자 수집기 상에 위치시켜 비드를 포획한다. 용액이 투명해지도록 한다.

[0279] 4.4.7. 투명해지면, 비드를 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 제거하여 버린다.

- [0280] 4.4.8. 200 마이크로리터의 신선하게 제조된 80% 에탄올을 샘플 라이브러리와 비드를 함유하는 샘플에 첨가한다. 샘플은 이 단계 동안 자성 입자 수집기에 남아있어야 한다.
- [0281] 4.4.9. 실온에서 ≥ 30 초 동안 인큐베이션한다.
- [0282] 4.4.10. 80% 에탄올을 제거하여 버린다.
- [0283] 4.4.11. 샘플을 자성 입자 수집기 상에 유지시키고, 200 마이크로리터의 신선하게 제조된 80% 에탄올을 첨가한다.
- [0284] 4.4.12. 실온에서 ≥ 30 초 동안 샘플을 인큐베이션한다.
- [0285] 4.4.13. 조심스럽게 에탄올을 제거하여 버린다. 비드를 방해하지 않고 모든 잔류 에탄올을 제거하도록 노력한다.
- [0286] 4.4.14. 5분 동안 (또는 건조까지) 튜브 덮개를 열어서 실온에서 비드가 건조되도록 한다.
- [0287] 4.4.15. 자성 입자 수집기로부터 샘플을 제거한다.
- [0288] 4.4.16. 53 마이크로리터의 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 또는 PCR-등급의 물을 사용하여 DNA를 재현탁시킨다.
- [0289] 4.4.17. 모든 비드가 재현탁되도록 보장하기 위해 믹스를 10회 상하 파이펫팅한다.
- [0290] 4.4.18. 2분 동안 실온에서 인큐베이션한다.
- [0291] 4.4.19. 자성 입자 수집기 상에 다시 샘플을 위치시키고 용액이 투명해지도록 한다.
- [0292] 4.4.20. 이제 증폭된 포획 DNA 샘플 라이브러리 풀을 함유하는 50 마이크로리터의 상청액을 제거하여 새로운 튜브/웰에 옮긴다.
- [0293] 4.5. 증폭된 포획 DNA 샘플의 농도, 크기 분포, 및 품질을 결정한다.
- [0294] 4.5.1. DNA 농도를 정량하고 증폭된 포획 DNA 및 음성 대조군의 A260/A280 비율을 측정한다.
- [0295] 4.5.1.1. A260/A280 비율은 1.7 내지 2.0이어야 한다.
- [0296] 4.5.1.2. LM-PCR 수율은 대략 500 ng이어야 한다.
- [0297] 4.5.1.3. 음성 대조군은 오염을 의미할 수 있는, 상당한 증폭을 보이지 않아야 한다.
- [0298] 4.5.2. 1 마이크로리터의 증폭된 포획 DNA 샘플 및 음성 대조군을 Agilent Bioanalyzer DNA 1000 칩을 사용하여 실행시킨다. 제조사의 지시서에 따라 칩을 실행시킨다. 증폭된 포획 DNA는 150 내지 500 bp의 평균 단편 길이를 나타내야 한다.
- [0299] 4.5.3. 증폭된 포획 DNA는 서열분석을 위해 준비된다.
- [0300] **실시예 5 - 포획된 샘플 라이브러리 서열분석**
- [0301] 5.1. 제조사의 지시서에 따라서, Illumina 서열분석 장치를 사용하여 증폭된 포획 DNA를 서열분석한다.
- [0302] **실시예 6 - 표적화 서열분석에 대한 증폭 주기의 횟수 효과의 비교**
- [0303] 본 명세서의 실시예 1 내지 5에 기재된 프로토콜을 사용하여, 7회의 실험을 동일한 공급원 (세포주 인간 게놈 DNA, NA12891, Coriell Institutes)으로부터 수득된, 동일한 양의 투입 게놈 DNA (3 마이크로그램)를 사용하여 수행하였다. 실험에 사용된 바이오틴화된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 암에 연관된 578개 유전자의 엑손을 표적으로 하였고, 누적 포획 표적은 4,571,289 염기쌍이다 (Design ID: 120522_HG19_Onco_R_EZ, Roche NimbleGen, Inc.). 포획 전 PCR 증폭은 7회 실험 중 어디에서도 수행하지 않았지만, 포획 후 PCR 증폭 주기의 횟수는 0 내지 14회 (0, 1, 2, 4, 6, 10, 및 14회)로 다양하였다.
- [0304] 결과적으로 발생한 증폭된 포획 DNA는 제조사의 지시서에 따라서, 2 x 100 쌍형성 말단 서열분석으로, Illumina MiSeq 서열분석 장치를 사용하여 서열분석하였다. 7회 실험 각각에 대해, 결과적 판독치는 동량의 데이터를 사용하는 검정 성능의 비교를 용이하게 하기 위해서 175만 판독쌍 (3,500,000 판독치)으로 무작위하게 샘플링하였다. 데이터 분석은 "How to Evaluate NimbleGen SeqCap EZ Target Enrichment Data"라는 명칭의 Roche 기술 노트 문서 (2015년 8월, 이 개시내용은 그 전문을 참조로 본 명세서에 포함함)에 기술된 표준 생물정보학

방법을 사용하여 수행하였다. 분석 작업흐름의 개략도는 도 5에 도시하였다.

[0305]

실험 결과는 6종의 빈번하게 사용된 표적화 서열분석 검정 성능 매트릭스에 대해 도 6 내지 11에 나타내었다.

포획 표적 또는 포획 표적 근처로 지도화된 서열분석된 염기의 백분율에 대한 값 (도 6), 포획 표적에 걸친 서열 심도 포괄범위의 분포 (도 7), 게놈에 대한 표적화된 서열의 농축 배수 (도 8), 호출된 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)의 총 개수 (도 9), SNP 검출의 감도 (도 10), 및 SNP 분류의 특이성 (도 11)은 0, 1, 2, 4, 6, 10 또는 14회 주기의 PCR 증폭을 이용하는 실험간에 유사하였다. 바이오틴화된 올리고뉴클레오타이드 프로브와의 혼성화를 통한 표적화 서열분석을 위한 현행 방법은 작업흐름 내에서 다윗수 주기의 PCR 증폭의 사용을 요구하고, 전형적으로 4회 초과 증폭 주기를 요구한다 (도 1 및 4 참조). 여기에 제시된 결과들은 개시된 표적화된 표상적 서열분석 방법이 검정 성능에 임의의 두드러진 감소를 발생시키지 않고, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 최소의 증폭 주기로 또는 증폭 주기 없이 표적화 서열분석을 수행할 수 있게 한다는 것을 예상치 않게 입증하였다.

[0306]

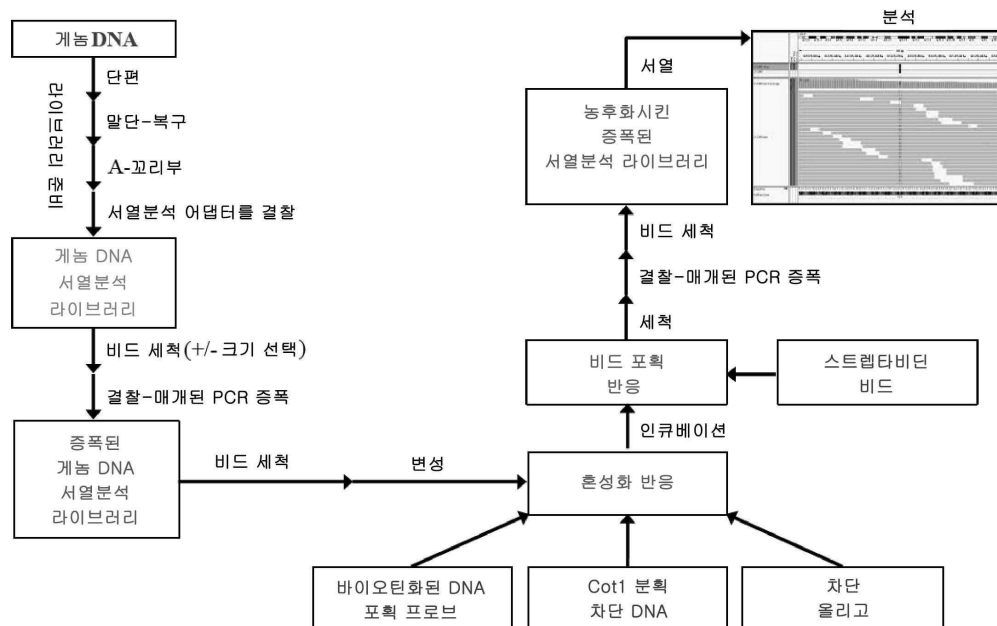
산업상 이용가능성에 관한 진술

[0307]

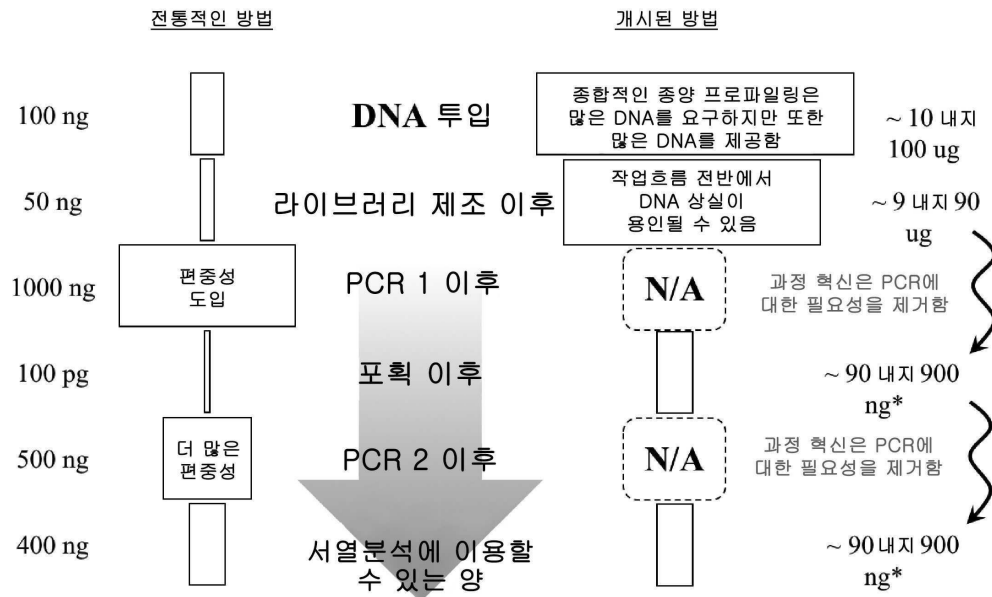
본 개시내용은 의학 및 진단학 분야에서 산업상 이용가능성을 갖는다.

도면

도면1

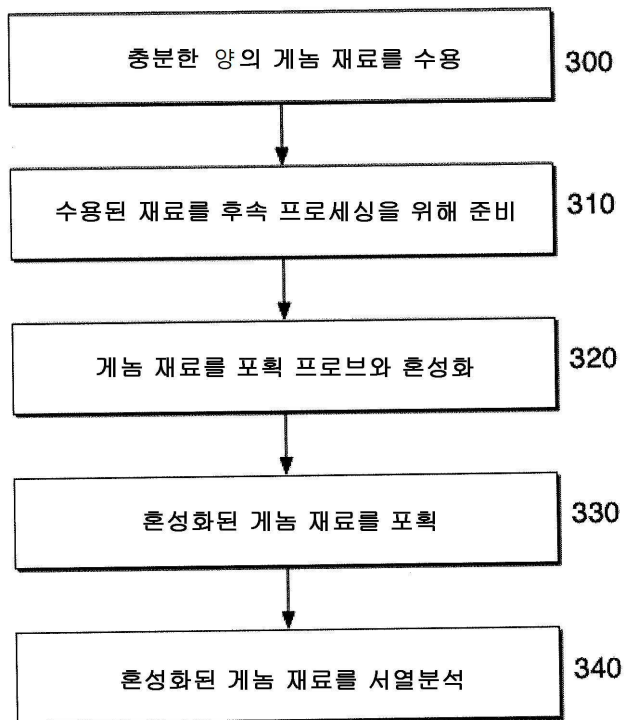


도면2

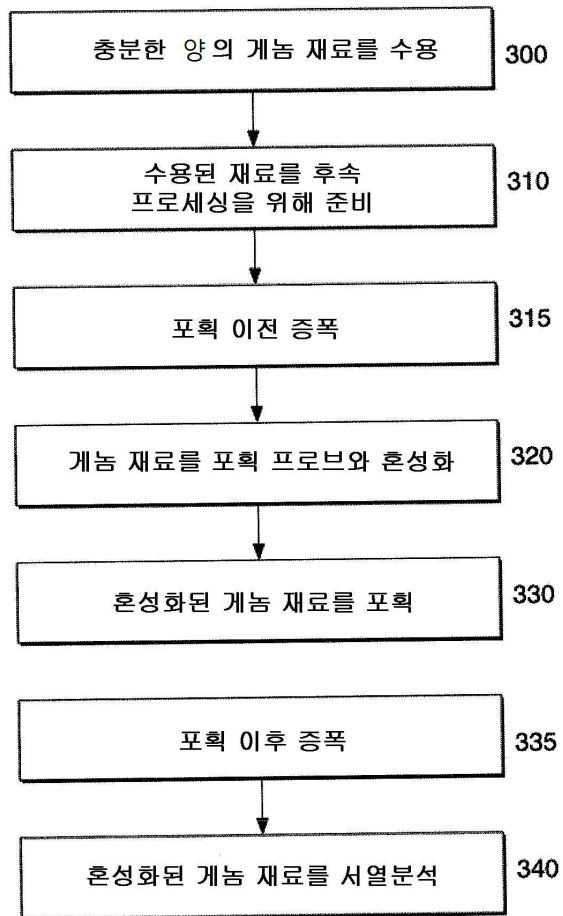


* = 표적 크기 및 포획 효율에 따라 추산

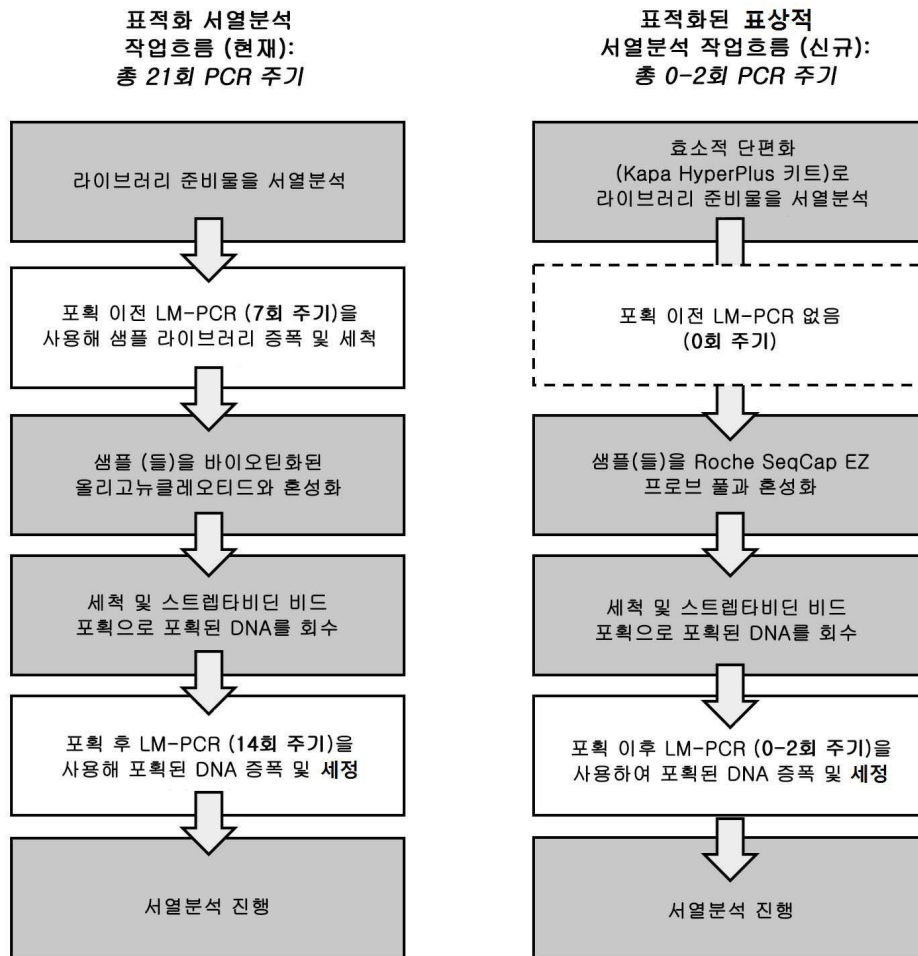
도면3a



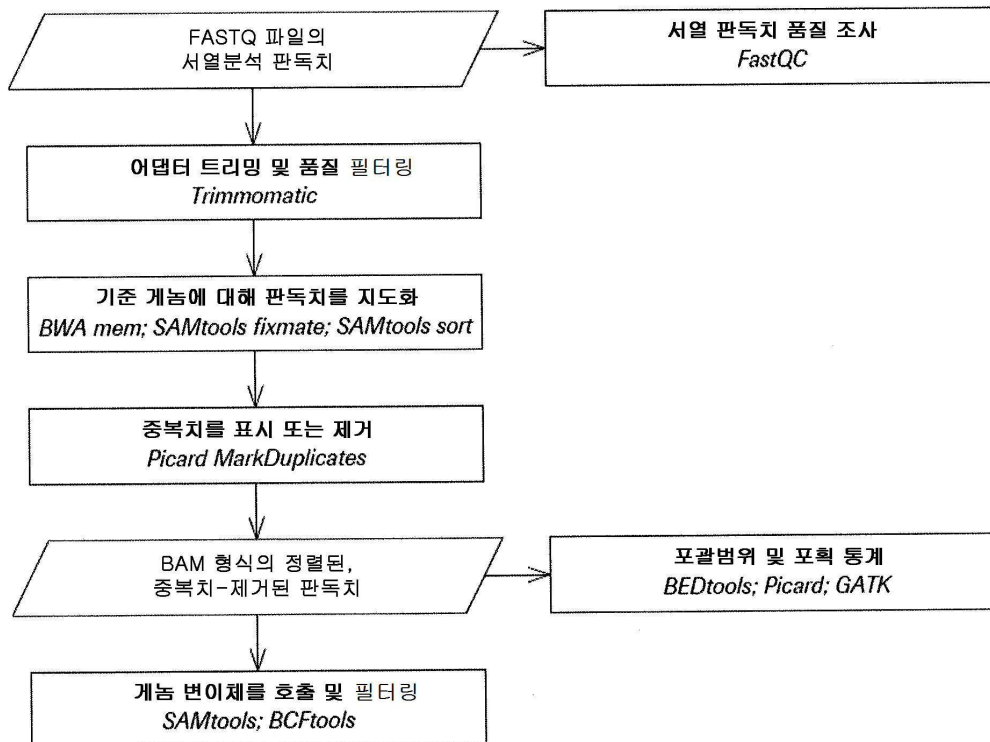
도면3b



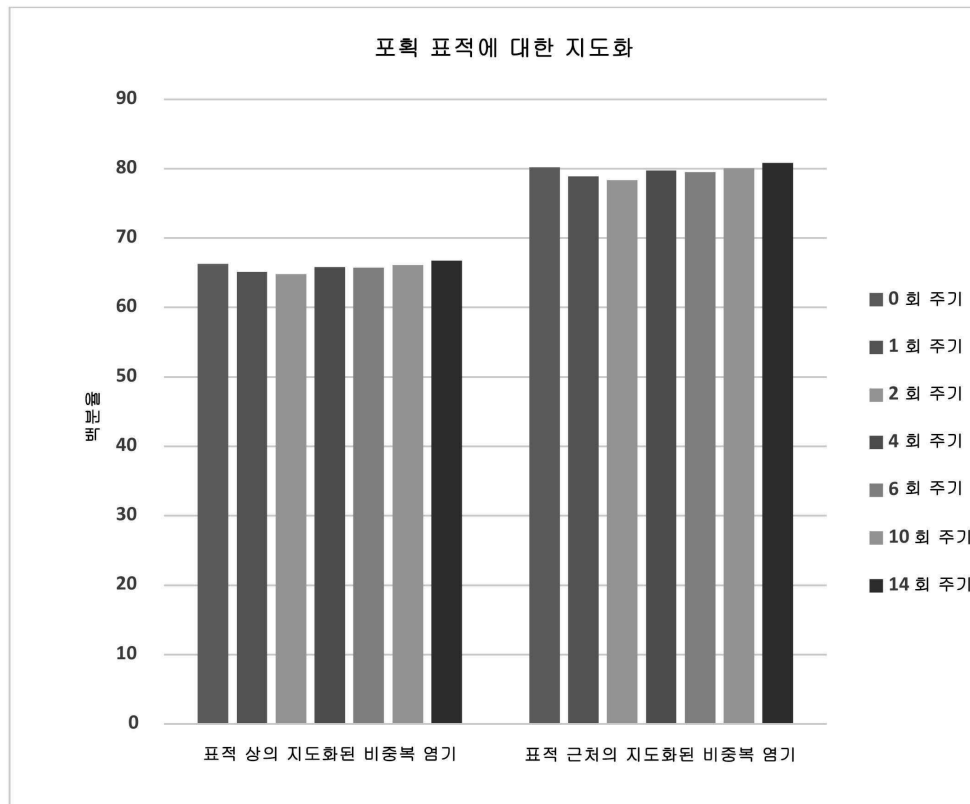
도면4



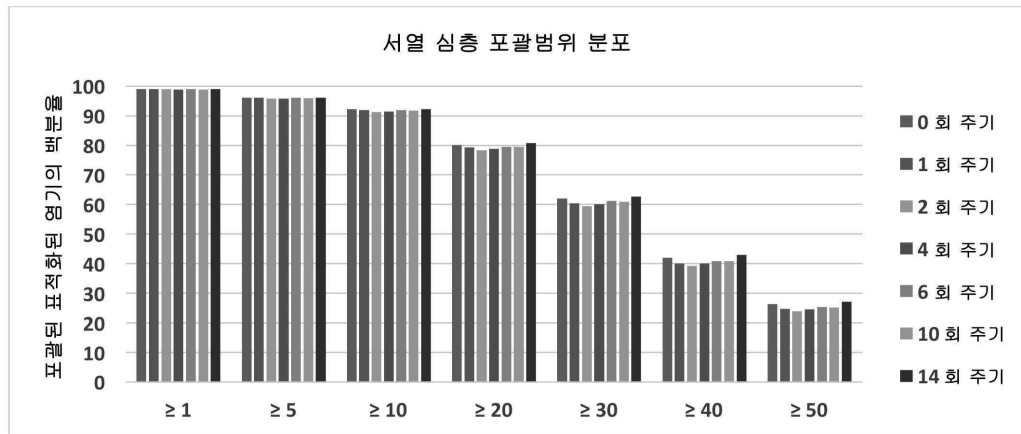
도면5



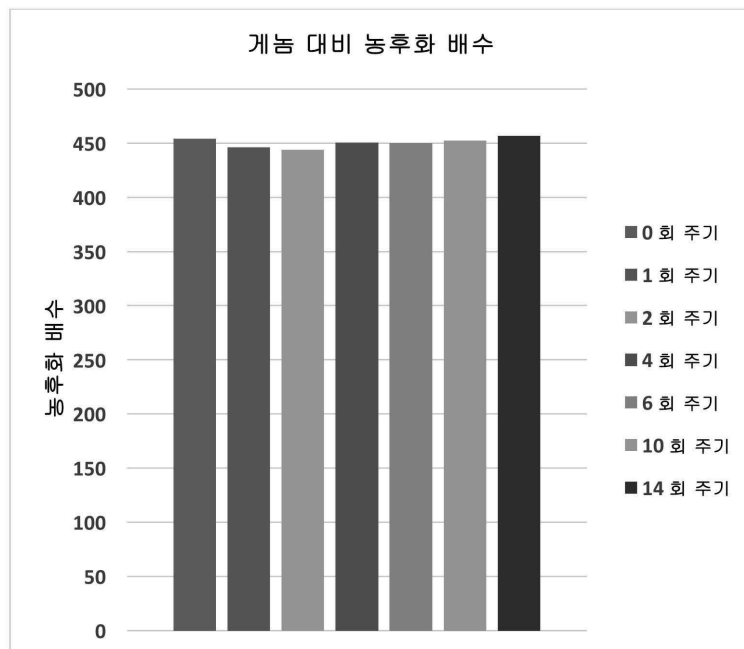
도면6



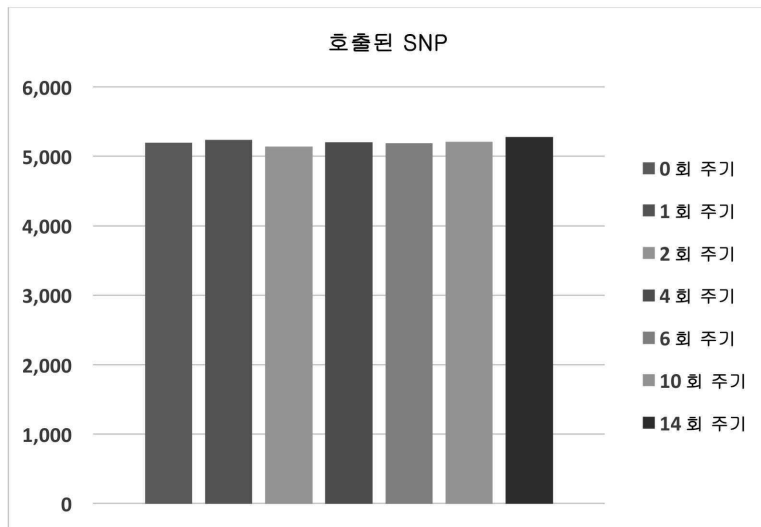
도면7



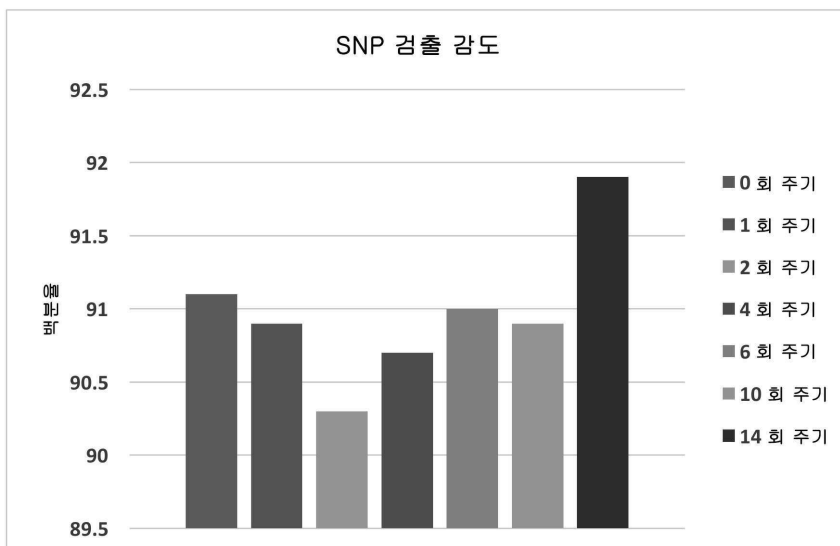
도면8



도면9



도면10



도면11

