(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0020649
(43) 공개일자 2019년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-7033017
(22) 출원일자(국제) 2017년04월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/027944
(87) 국제공개번호 WO 2017/181183
국제공개일자 2017년10월19일
(30) 우선권주장
62/322,982 2016년04월15일 미국(US)

(71) 출원인
엑소좀 디아그노스틱스, 인크.
미국 02451 매사추세츠주 월섬 2번 애비뉴 266 스위트 200
(72) 발명자
스코그 요한 칼 올로브
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 메모리얼 드라이브 840 스위트 3 엑소좀 디아그노스틱스 인크 내
노에르홀름 미켈
독일 82152 마르틴스리에트 암 클로퍼슈피츠 19아 엑소좀 디아그노스틱스 게엠베하 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **역형성 림프종 키나아제(ALK) 핵산 및 ALK 융합 전사물의 혈장 기반 검출 및 암의 진단 및 치료에 있어 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 바이오마커 분석 분야에 관한 것으로, 특히 혈장 샘플을 포함한 생물학적 샘플로부터 유전자 발현 시그니처를 결정하는 것에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2545/101 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
브린크만 카이
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 메모리얼 드라이브 840 스위트 3 엑소좀 디아그노스틱스 인크 내
카스텔라노스-리잘도스 엘레나
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 메모리얼 드라이브 840 스위트 3 엑소좀 디아그노스틱스 인크 내
헐리 제임스
미국 02139 매사추세츠주 케임브리지 메모리얼 드라이브 840 스위트 3 엑소좀 디아그노스틱스 인크 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

필요로 하는 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 진단, 예후, 모니터링 또는 치료 선택을 위한 방법으로서,

(a) 대상체로부터의 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

(b) 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 단계;

(c) 미세소포로부터 하나 이상의 핵산을 추출하는 단계; 및

(d) 추출된 핵산에서 ALK 융합 전사물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계

를 포함하고,

추출된 핵산에서 ALK 융합 전사물의 존재는 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 존재를 나타내거나 대상체가 질병 또는 다른 의학적 병태로 발전할 보다 높은 소인을 나타내는 것인 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 진단, 예후, 모니터링 또는 치료 선택을 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, ALK 융합 전사물이 EML4-ALK 융합 전사물인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, EML4-ALK 융합 전사물이 EML4-ALK v1, EML4-ALK v2, EML4-ALK v3a, EML4-ALK v3b, EML4-ALKv3c, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 체액인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈장 또는 혈청인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 질병 또는 다른 의학적 병태가 암인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 질병 또는 다른 의학적 병태가 폐암인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 질병 또는 다른 의학적 병태가 비소세포 폐암(NSCLC)인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)가 생물학적 샘플로부터 엑소좀 RNA의 단리를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 단계 (c)가 단리된 엑소좀 RNA의 역전사를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 대조 핵산 또는 대조 입자 또는 이들의 조합이 역전사 반응에 스파이크(spike)되는 것인

방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 단계 (c)가 단리된 엑소좀 RNA의 역전사에 이어 사전 증폭 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 사전 증폭 단계가 양성 증폭 대조의 사용을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 양성 증폭 대조가 EML4-ALK v1을 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v2를 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v3을 코딩하는 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 참조 RNA, 및 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합이 PCR 기반 방법을 사용하여 정량화되는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합이 qPCR을 사용하여 정량화되는 것인 방법.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 사전 증폭 단계가 음성 증폭 대조의 사용을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 음성 증폭 대조가 EML4-ALK v1을 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v2를 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v3을 코딩하는 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 참조 RNA, 및 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합이 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 PCR 기반 방법을 사용하여 정량화되는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합이 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 qPCR을 사용하여 정량화되는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (d)가 시퀀싱 기반 검출 기법을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 시퀀싱 기반 검출 기법이 PCR 기법 또는 차세대 시퀀싱 기법을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (d)가 하나 이상의 대조를 검출하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 대조가 하우스키핑 유전자인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 하우스키핑 유전자가 RPL4인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 대조가 단계 (c)의 추출에 스파이크된 Q베타의 발현 수준인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (d)로부터의 데이터를 분석하여 사이클 역치(CT) 값의 검출된 수준에 따라 샘플을 양성 또는 음성으로 계층화하는 단계 (e)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 단계 (d)는, EML4-ALK 변이체 1의 수준이 적어도 31 이하의 사이클 역치(CT)이고, EML4-ALK 변이체 2의 수준이 적어도 32 이하의 CT 값이며, EML4-ALK 변이체 3의 수준이 적어도 32 이하의 CT 값인 경우 생물학적 샘플을 양성으로서 확인하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 단계 (d)는, 하기의 사이클 역치(CT) 값: EML4-ALK 변이체 1의 수준이 적어도 31 이상의 CT 값, EML4-ALK 변이체 2의 수준이 적어도 32 이상의 CT 값, 및 EML4-ALK 변이체 3의 수준이 적어도 32 이상의 CT 값인 것 중 적어도 하나가 생물학적 샘플에서 검출되는 경우 생물학적 샘플을 음성으로서 확인하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 기계 학습 기반 모델링, 데이터 마이닝 방법, 및/또는 통계 분석을 사용하여 단계 (d)로부터의 데이터를 분석하는 단계 (e)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데이터를 분석하여 환자의 질병 결과를 확인하거나 예측하는 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데이터를 분석하여 환자 집단 내의 환자를 계층화하는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데이터를 분석하여 환자가 항암 요법에 의한 치료에 내성이 있는지 여부를 확인하거나 예측하는 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데이터를 분석하여 대상체의 무진행 생존 추이를 측정하는 것인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 데이터를 분석하여 EML4-ALK 전사물이 검출되는 경우의 대상체에 대한 치료 옵션을 선택하는 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 항암 요법을 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2016년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 제62/322,982호의 이익을 주장하며, 그 내용은 전문이 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 바이오마커 분석 분야에 관한 것으로, 특히 혈장 샘플을 포함한 생물학적 샘플로부터 유전자 발현 시그니처를 결정하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 암세포에서 발생하는 유전적 및 후성적 변화에 대한 지식의 증가는 종양 관련 핵산 서열 및 프로파일을 분석함으로써 종양을 검출, 특징규명 및 모니터링할 수 있는 기회를 제공한다. 이러한 변화는 다양한 암 관련 바이오마커 중 임의의 것을 검출함으로써 관찰될 수 있다. 이러한 바이오마커를 검출하고 환자, 의사, 임상의 및 연구자들에게 귀중한 정보를 제공하기 위해 다양한 분자 진단 검정이 사용된다. 지금까지, 이러한 검정은 주로 외과적으로 제거된 종양 조직 또는 생검으로 얻은 조직에서 유래된 암세포에서 수행되었다.

[0006] 그러나, 체액 샘플을 사용하여 이러한 시험을 수행하는 능력은 종종 환자 조직 샘플을 사용하는 것보다 더 바람직하다. 체액 샘플을 사용하는 덜 침습적인 접근법이 환자 복지, 종방향 질병 모니터링을 수행하는 능력 및 조직 세포에 쉽게 접근할 수 없는 경우에도 발현 프로파일을 얻을 수 있는 능력과 관련하여 광범위한 의미를 갖는다.

[0007] 따라서, 질병 또는 다른 의학적 병태에 대한 진단, 예후, 모니터링 또는 치료 선택을 보조하기 위해 바이오마커, 예를 들어 혈장 미세소포(microvesicle)의 바이오마커를 신뢰성 있게 검출하는 새로운 비침습적인 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 생명 공학의 기술 분야에 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 분자 생물학의 기술 분야에 있다.

[0009] 분자 생물학에서, 핵산과 같은 분자는 혈장 및 기타 생체 유체와 같은 인간의 샘플 재료로부터 분리될 수 있으며 광범위한 방법론으로 더 분석될 수 있다.

[0010] 인간의 생체 유체는 세포 및 또한 신체의 모든 세포에 의해 방출되는 분자의 무세포원(cell free source)을 함유한다. 무세포원은 세포외 소포(EV) 및 그 내부에 운반되는 분자(예컨대, RNA, DNA, 지질, 작은 대사산물 및 단백질) 및 또한 세포사멸성 및 괴사성 조직에서 유래할 가능성이 있는 무세포 DNA를 포함한다.

[0011] 엑소좀 및 다른 EV에 함유된 RNA(exoRNA), 엑소좀 및 다른 EV에 함유된 DNA(exoDNA), 자유 순환 또는 무세포 DNA(cfDNA)와 같은 무세포 핵산은 정상 체세포뿐만 아니라 비정상적인 암세포에 의해서도 방출되기 때문에, 인간의 혈액 샘플로부터의 엑소좀 핵산 및 DNA의 단리는 환자의 암세포의 존재 및 유형을 나타낼 수 있다.

[0012] 비소세포 폐암(NSCLC)은 모든 진단된 폐암의 ~85%를 구성한다. NSCLC에서 조직 생검을 얻는 것은 어려운 일이며, 환자의 30% 정도는 유전자의 분자 분석을 위한 조직이 없으며, 따라서 액체 생검으로서 혈액 중의 돌연변이를 모니터링하는 것이 유용하다는 것이 입증되었다. 본원에서 제공된 조성물 및 방법은 엑소좀 RNA(exoRNA) 방출과 같은 세포 생존 프로세스로부터 유래된 정보를 사용하며, 이는 매우 민감한 검정을 유도한다. 본원에서 제공된 실시예는 exoRNA의 단리를 입증하지만, 본원에서 제공된 방법 및 키트는 샘플에서 발견되는 엑소좀 핵산, 예를 들어, exoRNA 및/또는 exoDNA의 임의의 조합을 공-단리하는데 유용한 것으로 이해된다.

[0013] 환자에서 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물의 존재 및 양은 치료 옵션을 안내하거나 선택하는데 사용될 수 있다.

[0014] 여기서 본 출원인은, ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물을 고감도 및 특이성으로 검출하는, 인간의 생체 유체로부터 단리된 exoRNA에 대한 PCR-기반 검정의 적용을 기재한다.

[0015] 본 발명은 샘플 추출에서 엑소좀 RNA를 이용한 핵산 분석에 이르는 전체 작업 흐름이다. 최첨단 기계 학습 및 데이터 마이닝 기법은 실시간 장비로 생성된 qPCR 데이터에 적용되어 양성 및 음성 샘플을 구별하거나 양성 또

는 음성 샘플의 농도를 정량화한다.

[0016] 본 개시 내용은 예를 들면, 암과 같은 질병에 대한 진단, 예후, 모니터링, 또는 치료 선택을 보조하기 위해 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 방법 및 키트는 혈장 샘플로부터 하나 이상의 바이오마커를 검출하는데 유용하다. 본원에 제공된 방법 및 키트는 혈장 샘플의 미세소포 분획으로부터 하나 이상의 바이오마커를 검출하는데 유용하다.

[0017] 본원에 제공된 방법 및 키트는 생물학적 샘플에서 역형성 림프종 키나아제(ALK) 융합 전사물을 검출하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, ALK 융합 전사물은 EML-ALK 융합 전사물이다. 일부 실시양태에서, ALK 융합 전사물은 EML4-ALK 융합 전사물이다. 일부 실시양태에서, EML4-ALK 융합 전사물은 EML4-ALK v1, EML4-ALK v2, EML4-ALK v3, 및 이들의 임의의 조합이다.

[0018] 본 개시 내용은 생물학적 샘플에서 EML4-ALK 융합 전사물을 검출하는 방법 및 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈장이다.

[0019] 본 개시 내용은 EV를 포획 및 농축하고, 상응하는 핵산을 단리하며, ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물의 존재를 동시에 검출하도록 설계된 반응을 제공한다.

[0020] 일반적으로, 본 개시 내용의 방법 및 키트는 이하의 단계를 포함한다:

[0021] 1) 생체 유체 샘플로부터 exoRNA의 단리:

[0022] a. 미세소포 및 다른 세포외 소포(EV)의 컬럼 또는 비드에의 결합;

[0023] i. 일부 실시양태에서, 결합 단계는 PCT 출원 WO 2016/007755 및 WO 2014/107571에 기재된 방법을 사용하여 수행된다.

[0024] b. 용해 조건을 사용하여 매트릭스로부터 방출;

[0025] c. 실리카 컬럼 또는 비드를 사용하여 용해물로부터 총 핵산의 단리

[0026] i. 일부 실시양태에서, 단리 단계는 PCT 출원 WO 2016/007755 및 WO 2014/107571에 기재된 방법을 사용하여 수행된다;

[0027] 2) 하나 이상의 EML-ALK 융합 전사물(들)의 검출 및 정량화;

[0028] 3) 검출 및 정량화된 EML-ALK 융합 전사물(들)을 하기 과정을 사용하여 분석:

[0029] a. **단계 1:** 각 샘플에 대해 샘플 무결성 검사(Sample Integrity Control) 및 샘플 저해 검사(Sample Inhibition Control)에 대한 허용 기준을 통과하는지를 조사한다.

[0030] i. 일부 실시양태에서, 샘플 무결성 검사는 qPCR에 의해 시험되는 하우스키핑 유전자 RPL4의 발현 수준이다.

[0031] ii. RPL4의 경우 허용 기준은 사이클 역치(CT) 값≤28로 정의된다.

[0032] iii. 일부 실시양태에서, 샘플 저해 검사는, 각 샘플의 역전사 반응에 스파이크(spike)되고 qPCR에 의해 시험되는 Q베타 RNA의 발현 수준이다.

[0033] iv. Q베타 RNA의 경우, 허용 기준은 역전사 반응에 스파이크된 12,500 카피에 대해 CT 값≤34로 정의된다.

[0034] b. **단계 2**: 샘플의 각 작업량(run)에 대해, 병행하여 시험되는 한 세트의 양성 증폭 대조를 조사한다.

[0035] i. 일부 실시양태에서, 양성 증폭 대조는 EML4-ALK v1, v2 v3을 코딩하는 3개의 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 하나의 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 하나의 참조 RNA로 정의된다. 이들 참조 핵산은 qPCR 방법에 의해 정량화된다.

[0036] ii. EML4-ALK DNA의 경우, 허용 기준은 역전사 반응에 스파이크된 각 DNA의 50 카피에 대해 22-25의 CT 범위로 정의된다.

[0037] iii. RPL4 DNA의 경우, 허용 기준은 역전사 반응에 스파이크된 DNA의 125,000 카피에 대해 26-28의 CT 범위로 정의된다.

[0038] iv. Q베타 RNA의 경우, 허용 기준은 역전사 반응에 스파이크된 DNA의 12,500 카피에 대해 28-31의 CT 범위로 정의된다.

[0039] c. **단계 3**: 샘플의 각 작업량에 대해, 병행하여 시험되는 한 세트의 음성 증폭 대조를 조사한다.

[0040] i. 일부 실시양태에서, 음성 증폭 대조는 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 것을 제외하고는 양성 증폭 대조와 동일한 세트의 qPCR에 의해 정의된다.

[0041] ii. 허용 기준으로서, CT 값이 검출되지 않아야 한다.

[0042] iii. 모든 샘플-내부 및 외부 검사를 통과하면, 샘플에 대해 단계 4에서 EML4-ALK를 조사한다.

[0043] iv. 샘플-내부 또는 외부 검사를 통과하지 않으면, 샘플은 "**불확정**"으로 보고된다. 잔여 샘플 재료가 입수 가능하다면, 시험을 단계 1로부터 반복한다.

[0044] d. **단계 4**: 각 샘플에 대해 EML4-ALK 융합 변이체의 발현에 대한 허용 기준을 통과하는지에 대해 조사한다.

[0045] i. EML4-ALK 변이체 1의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 31이다.

[0046] ii. EML4-ALK 변이체 2의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 32이다.

[0047] iii. EML4-ALK 변이체 3의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 32이다.

[0048] iv. 샘플이 허용 기준을 통과하면, 이러한 EML4-ALK 변이체에 대해 "**양성**"으로서 보고된다. 변이체의 존재는 상호 배타적일 것으로 예상된다.

[0049] v. 샘플이 EML4-ALK에 대한 허용 기준을 통과하지 못하면, "**음성**"으로서 보고된다.

[0050] 일부 실시양태에서, 체액 샘플로부터 exoRNA의 단리는, 예를 들면, RT 효소 및 올리고뉴클레오티드의 단일 또는 블렌드를 사용한 제1 가닥 합성을 포함한 완전 단리된 총 exoRNA의 역전사; 저해의 대조, 외인성 RNA 스파이크의 사용; 및/또는 완전 단리된 및 역전사된 물질의 사전 증폭(pre-amplification)과 같은 하나 이상의 선택적인 단계를 포함할 수 있다.

[0051] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법은 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물의 검출 및 정량화의 추가 조작 및 분석을 이용한다. 일부 실시양태에서, 방법은 검출된 핵산을 추가 분석하기 위해 기계 학습 모델 및 통계 분석을 이용하는 단계를 더 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 키트는, 미세소포를 표면에 포획하고 그 후에 미세소포를 용해시켜 그 내부에 함유된 핵산, 특히 RNA를 방출시킴으로써 미세소포 분획을 단리한다.

[0053] 생물학적 샘플의 미세소포 분획으로부터 핵산을 단리 및 추출하는데 사용되는 기존의 절차는, 초원심분리의 사용, 예를 들어, 10,000 xg 미만에서 1-3시간 동안 스피닝에 이어, 상청액의 제거, 펠릿의 세척, 펠릿 용해 및 컬럼 상에서 핵산, 예를 들어, RNA의 정제에 의존했다. 이러한 기존의 방법들은 느리고, 지루하고, 배치들 사이에 변동성이 있으며, 확장성에 적합하지 않은 것과 같은 몇 가지 단점을 보여주었다. 본원에서 사용되는 단리 및 추출 방법은 이러한 단점을 극복하며 빠르고, 견고하며 대량으로 쉽게 확장할 수 있는 단리 및 추출을 위한 스핀 기반 컬럼을 제공한다.

[0054] 본 방법 및 키트는 PCT 공보 WO 2016/007755 및 WO 2014/107571에 기재된 이하의 추출 과정을 사용하여 생물학적 샘플로부터 핵산, 예를 들어, 엑소좀 RNA를 단리 및 추출하며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 기재된다. 간단히 설명하면, 미세소포 분획을 막 필터에 결합시키고, 필터를 세척한다. 이후, 시약을 사용하여 막상(on-membrane) 용해 및 핵산, 예를 들어, exoRNA의 방출을 수행한다. 이후 추출을 수행하고, 이어서 컨디셔닝한다. 이후, 핵산, 예를 들어, exoRNA를 실리카 컬럼에 결합시키고, 세척한 다음 용출시킨다.

[0055] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 체액이다. 체액은 대상체의 신체의 어느 부위, 예를 들면, 말초 위치로부터 단리된 유체일 수 있으며, 예를 들면, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 가래, 척수액, 뇌척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 호흡기, 장관, 및 비뇨생식기관의 유체, 눈물, 타액, 모유, 림프계로부터의 유체, 정액, 뇌척수액, 장기내 시스템 유체, 복수, 종양 낭액, 양수 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 체액은 소변, 혈액, 혈청, 또는 뇌척수액이다.

[0056] 본 개시 내용의 방법 및 키트는 인간 대상체로부터 유래한 샘플을 이용한 사용에 적합하다. 본 개시 내용의 방법 및 키트는, 예를 들면, 설치류, 비인간 영장류, 반려 동물(예를 들어, 고양이, 개, 말), 및/또는 가축(예를 들어, 닭)과 같은 비인간 대상체로부터 유래한 샘플을 이용한 사용에 적합하다.

[0057] 본원에 기재된 방법은 미세소포로부터 핵산의 추출을 제공한다. 일부 실시양태에서, 추출된 핵산은 RNA이다. 추

출된 RNA는 메신저 RNA, 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 스몰 RNA(비단백질 코딩 RNA, 비메신저 RNA), 마이크로 RNA, piRNA, exRNA, snRNA 및 snoRNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0058] 상기 방법들 중 임의의 방법에서, 핵산은 미세소포 분획으로부터 단리되거나 이와 달리 미세소포 분획으로부터 유래한다.

[0059] 상기 방법들 중 임의의 방법에서, 핵산은 무세포 핵산이며, 본원에서 순환 핵산으로도 지칭된다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 DNA 또는 RNA이다.

[0060] 일부 실시양태에서는, 미세소포 정제 및/또는 핵산 추출의 효율 또는 품질을 평가하기 위해 내부 대조로서 역할을 하도록 미세소포 단리 및/또는 핵산 추출 이전에 하나 이상의 대조 입자 또는 하나 이상의 핵산(들)이 샘플에 첨가될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 미세소포 분획과 함께 효율적인 단리 및 대조 핵산(들)을 제공한다. 이들 대조 핵산(들)은 Q-베타 박테리오파지로부터의 하나 이상의 핵산, 바이러스 입자로부터의 하나 이상의 핵산, 또는 자연 발생 또는 재조합 DNA 기법에 의해 조작될 수 있는 임의의 다른 대조 핵산(예를 들어, 적어도 하나의 대조 타겟 유전자)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대조 핵산(들)의 양은 샘플에의 첨가 전에 알려져 있다. 대조 타겟 유전자는 실시간 PCR 분석을 사용하여 정량화될 수 있다. 대조 타겟 유전자의 정량화는 미세소포 정제 또는 핵산 추출 프로세스의 효율 또는 품질을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0061] 일부 실시양태에서, 대조 핵산은 본원에서 "Q-베타 대조 핵산"으로 지칭되는, Q-베타 박테리오파지로부터의 핵산이다. 본원에 기재된 방법에 사용되는 Q-베타 대조 핵산은 자연 발생 바이러스 대조 핵산일 수 있거나 또는 재조합 또는 조작된 대조 핵산일 수 있다. Q-베타는, 4종의 바이러스 단백질: 코트 단백질, 성숙 단백질, 용해 단백질, 및 RNA 레플리카제를 코딩하는 3개의 유전자로 이루어진 선형의 단일 가닥 RNA 게놈을 특징으로 하는 레비바이러스과(*leviviridae* family)의 멤버이다. Q-베타 입자 자체가 대조로서 사용되는 경우, 평균 미세소포와 유사한 크기로 인해, Q-베타는 본원에 기재된 바와 같이 미세소포를 단리하는데 사용되는 동일한 정제 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터 용이하게 정제될 수 있다. 나아가, Q-베타 바이러스 단일 가닥 유전자 구조의 낮은 복잡성이 증폭 기반 핵산 검정에서 대조로서의 사용에 유리하다. Q-베타 입자는 샘플 중의 Q-베타 입자의 양의 정량을 위해 검출 또는 측정될 대조 타겟 유전자 또는 대조 타겟 서열을 함유한다. 예를 들면, 대조 타겟 유전자는 Q-베타 코트 단백질 유전자이다. Q-베타 입자 자체가 대조로서 사용되는 경우, 생물학적 샘플에 Q-베타 입자의 첨가 후, Q-베타 입자로부터의 핵산이 본원에 기재된 추출 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터의 핵산과 함께 추출된다. Q-베타로부터의 핵산, 예를 들면, Q-베타로부터의 RNA가 대조로서 사용되는 경우, Q-베타 핵산이 본원에 기재된 추출 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터의 핵산과 함께 추출된다. Q-베타 대조 타겟 유전자의 검출은, 예를 들면, 관심 있는 바이오마커(들)(예를 들어, ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물, 단독 또는 하나 이상의 추가 바이오마커 또는 다른 ALK 융합 전사물(들), 예를 들어, 다른 EML-ALK 융합 전사물(들)과 조합하여)와 동시에, RT-PCR 분석에 의해 결정될 수 있다. 대조 타겟 유전자의 10배 희석에서 적어도 2, 3 또는 4개의 공지된 농도의 표준 곡선을 사용하여 카피 수를 결정할 수 있다. 검출된 카피 수 및 첨가된 Q-베타 입자의 양 또는 검출된 카피 수 및 첨가된 Q-베타 핵산, 예를 들면, Q-베타 RNA의 양을 비교하여 단리 및/또는 추출 프로세스의 품질을 결정할 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, Q-베타 입자 또는 Q-베타 핵산, 예를 들면, Q-베타 RNA의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1,000 또는 5,000 카피가 체액 샘플에 첨가된다. 일부 실시양태에서, Q-베타 입자 또는 Q-베타 핵산, 예를 들면, Q-베타 RNA의 100 카피가 체액 샘플에 첨가된다. Q-베타 입자 자체가 대조로서 사용되는 경우, Q-베타 입자의 카피 수는 타겟 세포를 감염시키는 Q-베타 박테리오파지의 능력에 기초하여 계산될 수 있다. 따라서, Q-베타 입자의 카피 수는 Q-베타 박테리오파지의 콜로니 형성 단위와 상관 관계가 있다.

[0063] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 키트는 하나 이상의 인프로세스(in-process) 대조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인프로세스 대조는 혈장 품질을 지시하는 참조 유전자(즉, 혈장 샘플의 품질의 지시자)의 검출 및 분석이다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자(들)는 혈장 고유의 전사물이다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자(들)는 하기 유전자 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

EML4, RPL4, NDUFA1, 베타-액틴, EGFR의 엑손 7, ACADVL; PSEN1; ADSL; AGA; AGL; ALAD; ABCD1; ARSB; BCKDHB; BTD; CDK4; ERCC8; CLN3; CPOX; CST3; CSTB; DDB2; DLD; TOR1A; TAZ; EMD; ERCC3; ERCC5; ERCC6; ETFA; F8; FECH; FH; FXN; FUCA1; GAA; GALC; GALT; GBA; GBE1; GCDH; GPI; NR3C1; GSS; MSH6; GUSB; HADHA; HMBS; HMGCL; HPRT1; HPS1; SGSH; INSR; MEN1; MLH1; MSH2; MTM1; MTR; MUT; NAGLU; NF1; NF2; NPC1; OAT; OCRL;

[0064]

PCCA; PDHA1; PEPD; PEX12; PEX6; PEX7; PGK1; PHKA2; PHKB; PKD1; PLOD1; PMM2; CTSA; PPOX; PTEN; PTS; PEX2; PEX5; RB1; RPGR; ATXN1; ATXN7; STS; TCOF1; TPI1; TSC1; UROD; UROS; XPA; ALDH3A2; BLMH; CHM; TPP1; CYB5R3; ERCC2; EXT2; GM2A; HLCS; HSD17B1; HSD17B4; IFNGR1; KRT10; PAFAH1B1; NEU1; PAFAH2; PSEN2; RFX5; SOD1; STK11; SUOX; UBE3A; PEX1; APP; APRT; ARSA; ATRX; GALNS; GNAS; HEXA; HEXB; PCCB; PMS1; SMPD1; TAP2; TSC2; VHL; WRN; GPX1; SLC11A2; IFNAR1; GSR; ADH5; AHCY; ALDH2; ALDH9A1; BCKDHA; BLVRB; COMT; CRAT; CYP51A1; GART; GGCX; GRINA; GSTM4; GUK1; IGF2R; IMPDH2; NR3C2; NQO2; P4HA1; P4HB; PDHB; POLR2A; POLR2B; PRIM2; RPL4; RPL5; RPL6; RPL7A; RPL8; RPL11; RPL23; RPL19; RPL22; RPL23A; RPL17; RPL24; RPL26; RPL27; RPL30; RPL27A; RPL31; RPL32; RPL34; RPL35A; RPL37A; RPL36AL; ITSN1; PRKCSH; REEP3; NKIRAS2; TSR3; ZNF429; SMAD5; STX16; C16orf87; LSS; UBE2W; ATP2C1; HDGFRP2; UGP2; GRB10; GALK2; GGA1; TIMM50; MED8; ALKBH2; LYRM5; ZNF782; MAP3K15; MED11; C4orf3; RFWD2; TOMM5; C8orf82; PIM3; TTC3; PPARA; ATP5A1; ATP5C1; PLEKHA1; ATP5D; ATE1; USP16; EXOSC10; GMPR2; NT5C3; HCFC1R1; PUS1; ATP5G1; ECHDC1; ATP5G2; AFTPH; ANAPC11; ARL6IP4; LCLAT1; ATP5G3; CAPRIN2; ZFYVE27; MARCH8; EXOSC3; GOLGA7; NFU1; DNAJB12; SMC4; ZNF787; ZNF280D; BTBD7; THOC5; CBY1; PTRH1; TWISTNB; SMAD2; C11orf49; HMGXB4; UQCR10; SMAD1; MAD2L1BP; ZMAT5; BRPF1; ATP5J; RREB1; MTFP1; OSBPL8; ATP5J2; RECQL5; GLE1; ATP5H; STRADA; ERLIN2; NHP2L1; BICD2; ATP5S; HNRNPD; MED15; MANBAL; PARP3; OGDH; CAPNS1; NOMO2; ALG11; QSOX1; ZNF740; RNASEK; SREBF1; MAGED1; HNRNPL; DNM2; KDM2B; ZNF32; MTIF2; LRSAM1; YPEL2; NEURL4; SF3A1; MARCH2; PKP4; SF3B1; VPS54; NUMB; SUMO1; RYK; IP6K2; JMJD8; C3orf37; IP6K1; ERBB2IP; LRRC37A2; SIAH1; TSPAN17; MAPKAP1; WDR33; ARHGAP17; GTDC1; SLC25A25; WDR35; RPS6KA4; UHRF1BP1L; RPS4X; GOSR1; ALG8; SDCBP; KLHL5; ZNF182; ZNF37A; SCP2; ZNF484; L3MBTL3; DEPDC5; CACYBP; SPOP; METTL13; IFRD1; GEMIN7; EI24; RWDD1; TULP4; SMARCB1; LMBRD2; CSDE1; SS18; IRGQ; TFG; BUB3; CEPT1; COA5; CNOT4; TTC32; C18orf25; CISD2; CGGBP1; LAMTOR4; BCAP29; SLC41A3; SEPT2; TMEM64; MXI1; USP20; NUPL1; TPST2; PICALM; CCBL2; THAP7; TFIP11; C6orf1; PPP1CA; WDR89; ZNF121; FNIP1; C6orf226; CCT3; NIPA2; CUL4A; TCP1; STK16; RCHY1; CKAP5; RPS5; GEMIN2; CCT6A; PPP2CB; CCT7; VWA8; BRD9; KIAA0930;

[0065]

ZCCHC11; C12orf29; KIAA2018; VPS8; TMEM230; ANKRD16; SSBP3; ZNF655; C20orf194; FAM168B; DALRD3; SSBP4; KDM1A; RPS6; ZNF766; TTC7B; RNF187; IBA57; ERCC6L2; RAP1A; TNK2; RAP1B; GLT8D1; SPRTN; ATP11C; HERPUD1; RPS7; PDLIM5; FYTTD1; SEPT7; CDK5RAP2; TRAPPC2; PCGF6; CHCHD7; OLA1; NAA30; ARHGEF10L; BTBD1; RPS8; MSL1; MCRS1; ZNF302; CTNNBIP1; DNAJC21; AKTIP; FOXP4; SEC61G; U2AF2; CCDC66; GOSR2; CTBP1; MYPOP; SLC3A2; DCTD; ABI1; CTU2; RGMB; COA6; UBE2NL; C16orf88; RPS9; CCNC; KRIT1; SEH1L; FXR1; AGPHD1; ALG10B; C2orf68; GDPGP1; PTRHD1; SRRD; EIF2AK4; MAD1L1; EXOC7; SLTM; CXorf40B; EXOC6; SUPT20H; AKT1; CUTA; DBNL; CARS; USP21; DDX19B; ETFB; EMC6; ILK; FAM96A; TM9SF1; ZNF638; MRPL22; RPS11; FAM13A; MPG; DNAJC25; TAF9; RPS13; RFFL; SP3; TMCC1; ZNF2; MAEA; GOPC; SIRT3; ERMAP; C14orf28; ZHX1; C2orf76; CCDC58; OS9; RAB28; VMA21; C5orf45; OPA3; RPS15; SORBS3; TPM1; CMC4; VPS13A; POLR3H; BRCC3; SERBP1; CORO1B; FPGS; VPS13C; NARG2; GCOM1; POLR2M; FAHD1; SERF2; NME1-NME2; NME2; NAE1; HAX1; RPS16; PUM1; RPS20; ZSCAN26; ZNF805; IQCB1; RPS21; GPHN; ARF1; TM2D2; CANX; KALRN; LIN52; LRRC24; ZNF688; TNRC6B; CD82; ZNF197; CBWD5; EXOC1; MINK1; YIPF5; BRMS1; ARPC4; RPS23; RPS14; ABCF1; CSNK1A1; ADAR; U2AF1; AP2M1; IRAK1; TAF5L; DUT; RAB12; ANO6; NDEL1; ARFIP1; CELF1; VRK3; FAM108B1; RPS24; RPS25; CCM2; TCAIM; KCTD21; C6orf120; PLEKHG1; GLTPD1; WDR45; ZFAT; ZNF16; METTL17; ZNF181; AP2B1; AP1G1; ARHGAP5; COX19; ZNF451; RAB24; CTNS; SRSF7; TP53BP2; PLAA; PLD3; ELP6; ERGIC1; TRMT11; CCDC90A; INF2; CRELD1; DHRS12; ZNF613; DNAJB14; DDX59; C19orf12; MRI1; YTHDC1; FDX1L; TMEM150A; TIPRL; CSNK1G3; CPT1A; KLF10; TMPO; NR2C1; UBE2V1; SLC35A2; ZNF174; ZNF207; STK24; MINOS1; ZNF226; PQBP1; LCMT1; HNRNPH2; USP48; RRM1; RPAIN; FBXO7; TMEM259; CYFIP1; FAIM; GPR155; MTERFD3; AMD1; NGRN; PAIP2; SAR1B; WIPI2; CSTF1; BABAM1; PPM1B; PHF12; RHOT1; AMZ2; MYO19; ACOT9; BBS9; TRPT1; NOP2; TIAL1; UBA52; DMAP1; EIF2B4; NHP2; ITPRIPL2; RPL14; C18orf32; SRA1; UFD1L; VPS26A; BOLA3; SDHC; GTF3C2; HHLA3; EXOC4; AGAP1; FOXK1; ARL5A; GGPS1; EIF3B; THYN1; STAU1; USP14; RUFY3; GON4L; AGPAT3; SIL1; BTF3; PARL; EEF1B2; GATSL3; ZNF630; NPM1; NCKAP5L; HSD17B10; REV1; DIXDC1; SLC38A10; NARF; ALG13; ATP6V1E1; NDUFAF5; ATP6V0B; NPRL3; KIAA0317; ETNK1; DNAJB2; SEC14L1; CCNL2; PICK1; DPH2; USP9X; IAH1; CREBZF; PRMT5;

[0066]

ZMYM5; TIRAP; YIF1B; UNC45A; CHTF8; TYW5; SNAPC3; NBPF10; SDCCAG3; DEDD; C4orf29; CDC42; OXLD1; GPX4; STRN4; FKRP; ZNF808; C19orf55; ZNF674; ZNF384; INTS6; MLLT4; TCERG1; ARL16; MAPK3; FAM133B; MOSPD3; MLH3; NRF1; PQLC2; CEP44; H2AFY; C16orf13; FAM63A; PAPD5; DCUN1D4; PRDM15; U2AF1L4; HAGH; COA3; YARS2; PHF11; ASB1; MTMR12; RUFY1; SIDT2; RHBDD2; ERAP1; EFTUD1; TMEM70; LINS; CRCP; ACP1; ZXDC; METTL21D; PPAN-P2RY11; INCENP; UEVLD; ABCE1; TROVE2; PGP; CEP63; PPP4R1; CEP170; ANKZF1; PSPC1; WHSC1; ZNF205; FAM98B; CAST; TRAPPC5; TMEM80; PSAP; SUMF2; ABHD12; ACBD5; ZNF565; GEMIN8; DLGAP4; SMIM8; ZNF706; COASY; MINA; AGAP3; SLC9A6; MAZ; NCBP2; ATPAF1; FEZ2; NSL1; SMC2; TATDN3; FRS2; EIF4G2; CHD2; ENGASE; CRTC3; SNUPN; POT1; TTC14; KDM5A; XRN1; PIGY; PARP2; NGDN; TRAK1; MFSD12; SHPRH; ZSWIM7; GTPBP10; SEC24B; STAG2; TPM3; MSMP; SMAP1; ZNF557; NET1; DPH3; MUTYH; PHACTR4; HIPK3; CLCC1; SCYL1; UBL5; TNFRSF1A; TOP2B; ACSS2; TMUB2; CLTA; UBTF; QSER1; CDC14B; ATG9A; SREK1; SENP7; SEC31A; SPPL2B; RNF214; SLC25A45; NCOR2; ZFYVE19; RBM23; POMT1; DPH5; IRF2BP2; PNKD; BCLAF1; HNRNPC; PHF16; TSEN34; PPCS; SLC39A7; MTMR14; UBXN2B; APH1A; WTH3DI; URGCP; AGAP6; ALG9; MIER1; SRSF1; FAM127B; CDC16; TMEM134; UBN1; TBCE; MED24; FAM177A1; KTN1; PAICS; TRAPPC6B; HNRNPUL2; TMTC4; FNDC3A; KIAA1191; FKTN; TMEM183B; OCIAD1; CREBBP; TAX1BP1; BCS1L; CUL4B; KIAA1147; KIAA0146; U2SURP; ZNF629; UNK; FTO; WHAMM; SNED1; BEND3; GPR108; INTS1; ZNF697; PLEKHM3; USP45; USP6NL; ZNF823; TNRC18; RGP1; TMEM223; METTL23; SETD5; BAHCC1; UNC119B; MGA; CACTIN; TMEM218; C15orf57; DNLZ; COMMD5; JMJD6; NXF1; THOC2; CPSF4; PRKDC; ZNF623; ACD; TCTN1; PIH1D2; C11orf57; ZGPAT; CHMP1A; ZNF133; CEP57L1; RABEP1; TMEM214; NAA60; TMEM219; EARS2; RB1CC1; ZBTB40; ANKRD12; STRN3; DNAAF2; WBP1L; THADA; PLOD3; DDT; DDTL; MZT2A; C11orf83; NADKD1; CTNND1; FOXN3; MAP1LC3B2; MYSM1; C17orf89; AAMP; UQCRHL; TRAPPC13; FAM195B; TXNRD1; ACLY; RPP38; ACO2; HNRNPF; CTNNB1; LIG4; COPA; ZBTB21; ZNF621; DLG1; GRSF1; CRTC1; ZNF419; CHCHD4; DDX17; SGSM2; HTATIP2; CDK10; BAG6; USP5; TMBIM6; C1orf43; PCBP2; TMEM251; JKAMP; AKT1S1; C12orf44; RPP14; FAM89B; BET1L; MID1IP1; FAM160A2; FAM210A; INO80C; ATXN7L3;

[0067] ZNF862; CCDC43; ZNF506; TINF2; COMMD7; CCNK; KAT6A; POM121C; BCAS3;

ULK3; ZNF30; MTFR1L; ZNF146; FTSJD1; RPL22L1; GXYLT1; PTAR1; HIGD1A; C8orf59; EIF5AL1; REPIN1; WDR83; C4orf33; SYS1; IKBKG; C7orf25; SBNO2; IMMT; TMEM192; PDS5A; SENP6; DROSHA; C19orf60; SPATS2L; RAP1GDS1; RC3H2; KIAA0232; KDELR2; PLEKHB2; CENPN; ERLIN1; TMEM55B; MED7; PID1; MOB4; SLC9B1; PACS2; COMMD9; CXXC1; NRD1; ACOX3; PHF21A; FOXRED2; SIKE1; HNRNPR; TTI2; PCTP; ALPK1; ZFAND5; TBC1D8; PPAPDC1B; IFT43; SNX18; ZNF160; TUBGCP5; ZNF554; OTUD4; PSMA4; RRAS2; GIGYF2; RPP30; FAM118A; PCMTD2; ACVR1; FBRS; TMEM177; RUSC1; ASH2L; CORO1C; ARMC5; ZFYVE16; FAM135A; ZNF142; MYBBP1A; ZBTB10; UBE4B; KIF13A; NUDT19; FBXO45; NUDT7; HECTD4; ZNF250; C6orf136; ADAM10; TMEM87A; SLC35E2B; MECP2; NAA16; SUPT5H; UBE2K; DDX54; TLK2; ZSCAN30; FAM208A; FPGT-TNNI3K; BRD2; NACA; ECE1; TBC1D14; FANCI; FGGY; C17orf51; SEPT9; ARHGEF7; METTL15; ENTPD6; CDC27; THUMPD3; LSM14A; C17orf85; ELK1; NBEAL1; AEBP2; IRAK4; MTRF1L; CLCN7; PAPD4; DHX36; SZRD1; JMJD7; PLA2G4B; FANCL; LIN54; KANSL3; WDR26; GDI2; ADD1; LAMP2; HCCS; CCBL1; ABCD3; MICAL3; SET; GTF3C5; TTC13; NCOA7; BSCL2; BCKDK; SMEK2; ADK; ARIH2OS; MTO1; ZBTB1; PPP6C; PARK7; BCOR; ADPRH; HDGF; CASK; OSGIN2; POLG; THTPA; AP1B1; PIGG; CFLAR; CNBP; PCID2; HMOX2; SMARCAL1; ACSF3; POLD2; AURKAIP1; AUTS2; GPBP1; LRRC8A; TMEM129; UBAP2L; CBX5; MAD2L2; MED18; ZNF84; C14orf2; TSEN15; METTL21A; ERLEC1; CRY2; CRLS1; PAN2; SPRYD7; ASAH1; ING4; NMRK1; PEX26; MFN2; ATXN3; TMEM14B; STXBP5; SPG21; CEACAM19; AP4S1; RWDD3; TFRC; ORMDL1; VPS53; UBP1; NUDCD1; KCTD6; VGLL4; ZNF717; SLC39A13; DIS3; GNE; TPRN; LYRM1; LACC1; AP1AR; SMARCAD1; PSMG4; MAPKBP1; USP8; NUDT22; REPS1; LUZP6; DCAKD; SMARCA4; SRRT; GTPBP3; TOMM40; MARK3; INPP1; ENTPD4; NSDHL; TEX264; DNAJC2; KRBOX4; SYCE1L; KIAA1841; AES; GSPT1; ATP6V0A1; ZNF680; CLK3; ZNF562; SHC1; TBCEL; ATF7; MYO9B; EPN1; KARS; COL4A3BP; HSPBP1; FAM108A1; RFC5; SMARCC2; SPTAN1; SRP9; HRAS; SSFA2; HAUS2; THAP5; VRK2; ZNF195; AP1M1; SPAG9; CALU; EIF4E; STYX; C14orf93; LSM5; PSMB5; CCDC149; DNMT1; RTCA; AIFM1; CAB39; PPIP5K1; PWWP2A; SUGT1; ZNF720; TGFBR1; MEF2A; C7orf73; PLCD1; SUN1; HYOU1; FAM58A; PTPN12; SATB1; CIZ1; ATG10; ZCCHC9; SAP30L; ACP2; TMEM106B; EIF2AK1; PSMG3; MAP4; LRRFIP2;

[0068] NT5C2; CCNJ; TBC1D5; IQSEC1; ZDHHC4; C7orf50; TBCCD1; CDV3; AZI2; C3orf58;

GSE1; PARN; HS2ST1; TOMM6; TRMT10A; DERL1; FAM204A; DEK; ARFRP1; IPO11; CCDC152; FIP1L1; ELMOD3; PDHX; MFAP3; DCTN1; MAPK9; FAM160B1; FNDC3B; CRELD2; DNAJA3; NEDD1; ZNF397; ZDHHC3; AGFG1; FKBP2; GIT2; TAF12; LDHA; RBBP4; MKNK1; HDHD1; C12orf73; SMIM13; C5orf24; GDAP2; RPS27A; PPP1R21; PIP5K1A; INPP5K; DCTN4; FAM53C; PTPRK; EEF1E1; EIF2AK2; XPR1; MSRA; ATL2; C8orf40; VDAC3; YWHAZ; HMBOX1; NEIL2; ECD; RPN2; SPATA2; FDPS; RNF185; PHPT1; METTL20; SLC46A3; KIAA1432; MADD; URM1; UCK1; NDUFB11; RUSC2; ABL2; ATG7; PUF60; TRMT1; NIF3L1; CPSF7; PTGES3L-AARSD1; TMUB1; TPRA1; R3HCC1; FBXO28; FAM178A; RPL28; RPS6KC1; CMPK1; ATF6B; ZNF507; OTUD5; FASTKD2; TNPO2; FZR1; ISOC2; CCDC124; RCOR3; SEC13; SGMS2; ATXN7L3B; AKIRIN1; ANP32E; CISD3; ACAD10; APOL1; LYSMD1; TLK1; GPR107; LANCL1; LRRFIP1; MCTS1; ANAPC5; MEMO1; POLR1B; ANAPC7; ILF3; ATXN1L; BCAP31; TTLL11; CNST; TBL1X; TRAF3IP1; PRKRA; DAXX; ATP13A2; TP53BP1; RAB11FIP3; CLASP1; APLP2; RNASEH2B; ARCN1; SMC6; EMC8; MGRN1; LMAN2L; ARFGAP3; SQSTM1; GTF2H1; TXNL4B; DMTF1; THOC6; PPP3CB; ALG5; PNPLA4; CTIF; CD164; AIMP1; MORF4L2; MGEA5; EDC3; SPNS1; DKC1; ECSIT; C6orf203; INTS12; FLYWCH2; MON1A; SLC35B3; ADCK1; RPUSD3; ADCK4; RRNAD1; RAD51D; ZNF669; NFYC; ITPK1; CLP1; KIAA0141; EFTUD2; ULK2; EHBP1; TGFBRAP1; GHDC; TNRC6C; FBRSL1; SAR1A; HNRPLL; ATG13; CHID1; ERI2; C1orf122; IL11RA; C17orf49; EYS; API5; DAGLB; MPC2; GSTK1; DIS3L; EIF5A; ZNF438; CTDNEP1; SLC25A39; PPHLN1; TPCN1; ZBTB14; MAPRE2; NFRKB; TMEM106C; TCHP; WIBG; COPS2; BSDC1; C12orf65; TRAFD1; LOC729020; C15orf61; PSMA1; LEMD2; TMEM30A; C2orf74; TBC1D7; CDYL; TCTN3; PTPMT1; BANF1; WRAP53; AMFR; AGAP5; CTPS2; TMX2; NAT10; COPB1; UBAC2; DET1; DNAJC7; CD58; DENND4A; PHB2; IMPA1; SMCR7; C11orf95; MYL12B; DTWD1; NFKBIL1; MTHFD2L; ZNF814; CCDC85C; ITGAV; COG2; GPN1; SLC44A2; USP27X; COG6; ZNF619; SKIL; RRP12; MKRN1; AKD1; RELA; VPS37A; HBS1L; INTS9; DOHH; PRMT3; KIAA1671; LAMTOR2; SLC35C1; FAM185A; NGLY1; ETV3; DSN1; ZNF566; ZNF576; KDM8; IPP; MKLN1; CBWD1; SIN3A; ABHD11; ZNF652; OXSM; TSEN2; TEF; NONO; NFE2L2; SETDB1; TMEM205; C4orf52; PGAP2; SCAF4; SPECC1L; EHMT1; TCP11L1; RBM17; ZDHHC7; KIAA0226; GLG1; SAE1; HOMER3; XPC; MEF2BNB; SH2B1; MTFR1; SARS2; SCAPER; SLC12A4; RDH13; TJAP1; FCHO2; HSDL1; TDRD3; RPAP3; FAN1; PARP9; DIP2A; GSK3B; MOGS; TATDN1;

[0069]

ZNF414; ZNF407; TBC1D15; WRB; PIP4K2C; TCF7L2; SRP54; LEPRE1; C1orf86; PQLC1; KDM3A; KDM4C; RBM19; KDM5C; SLC25A5; ANXA4; SCOC; ANXA6; ANXA7; ANXA11; MTHFSD; BIVM; BOD1; SYNCRIP; PLBD2; BUD13; RIOK2; CANT1; MPND; EBNA1BP2; EVI5L; EPS15; TXNDC16; ACOT13; C15orf40; RNF170; SPG11; SETD6; SETDB2; TRAPPC9; POLR3B; NUDT2; ARMC10; CHFR; NPTN; NDFIP2; JMJD4; WDR25; COG5; TNIP2; RBM34; TEX10; DUS3L; PPP2R5C; CLK1; PDCD6IP; TMEM189; RBMXL1; COX11; TYW3; RPTOR; HTATSF1; EWSR1; FBXL17; RAB2B; ZSCAN12; ZNF580; MYEOV2; TBCK; ZNF746; DCAF11; DCAF4; GTF2I; WDR81; KCNMB3; C10orf2; COPS7A; CHAMP1; PPP6R3; GPR75-ASB3; PLIN3; DHX16; C1orf27; WDR46; TRAF3IP2; FLNB; BRD8; THAP4; GPN3; STAU2; MTF2; TMED7-TICAM2; EIF4ENIF1; C16orf52; ASXL1; ENDOV; ZFHX3; BCAT2; SLC25A26; RBMX; PET117; ACIN1; DCAF17; SMIM12; LYRM4; TMEM41B; DTYMK; TMEM14C; NFKB1; SLC25A11; CD320; MKS1; DAG1; STARD3; IDE; ELAC2; BIRC2; ECI2; ERCC1; NDUFV1; TADA2A; PNPLA6; RBM28; LCORL; NDUFS2; UTP14A; CEP120; C22orf39; FHIT; MTIF3; HAUS4; DHX40; PIGX; SHMT2; HDAC8; WDR13; MPP1; SLC16A1; EIF2B3; FAM122B; TRAPPC1; AFF1; FAM104B; XIAP; RBM6; XPNPEP1; RAB35; RHBDD1; LEMD3; ATXN10; LPP; VARS2; SMYD3; TMED5; NSMCE4A; ATP5SL; LHPP; ANKRD50; TIMM17B; TRMT2B; TBC1D17; NDUFB4; ME2; NSUN5; CUL7; SLC35A1; TSPAN3; ARMCX5; CNDP2; TMEM48; IFT46; TXLNG; TMEM135; FAM21C; SCO2; STIM2; TJP2; CDK16; CDK17; ATAD3A; PGAM5; CXorf56; CHD8; FUS; LPPR2; SRGAP2; LAS1L; ZNHIT6; MIB2; GPR137; PIN4; LCOR; MFSD5; ATRAID; ZFAND1; LARP4; RBM41; SMPD4; UBXN6; FAM3A; STRBP; PET100; CAMTA2; UBAP1; MCFD2; TRIQK; PAPD7; PPARD; FGFR1OP2; VPRBP; NUDT16; CXorf40A; KXD1; RBFA; SETD9; MASTL; VANGL1; BAG1; RAB3GAP1; RRM2B; GOLGA3; MCPH1; NEO1; TECPR2; TK2; RAB40C; ZNF668; ZNF347; ZNF764; ZNF641; TSFM; PPARGC1B; SLC38A6; GGA3; GOLGA4; SEC23B; DPY19L3; ZNF555; YTHDF2; TFCP2; AAAS; CRBN; NKRF; MRRF; DGCR2; BANP; BRD7; SMG7; POLL; NCOA3; PCBP4; ZBED6; ARL13B; RABEPK; SAMD8; ARL1; ABHD16A; PPP2R2A; SUCLG2; CINP; RIF1; IFT27; KLF11; RANGRF; SRPR; SYCP3; MNAT1; ECI1; SF1; ZC4H2; ZFX; SYNJ2; MINPP1; SUFU; ATP6AP1; ATR; HADH; TIPARP; PIGT; CTTN; ZBTB33; PAFAH1B2; ZNF408; UHMK1; VDAC2; PEX11B; ESYT1; TMLHE; UBR2; CD99L2; GNL3L; PRMT7; KLHDC4; FLAD1; FBXL20;

[0070] WDR44; PACSIN2; UQCC; NDUFS5; WNK1; NDUFC1; KIAA0430; RNF4; NCAPH2;

NDUFA2; ZDHHC8; ACOX1; ZCCHC6; ZNF75D; FMR1; ARHGDIA; NIT1; MYNN; PFDN6; BAK1; DNAJC19; C1D; ATG16L1; FBXO11; DGCR8; TAF6; NCOR1; IKBKB; ZNF317; NCK1; DHX35; SMAD7; MRPS35; ORC4; HYI; FAM193B; ZMYM2; YAF2; IL6ST; SRSF11; SLC33A1; IPO8; ARPC1A; BCL2L1; GSTO1; SRSF10; CTCF; TNPO3; PSMD1; SIRT5; EML2; MSL3; RBBP5; SIRT6; SIRT2; TMEM127; VIPAS39; C9orf3; MRPS18A; NUP62; EXD2; DIDO1; NDUFA11; UCKL1; PPP2R4; DDX3X; NSUN2; KANSL1; LIMS1; SLC1A4; REST; TTC27; SLC30A6; CHMP3; FAM65A; SCRN3; NEK4; FBXL5; ENY2; TUBD1; DHRS4L2; PEX19; POGZ; EIF4G1; MATR3; MEPCE; MR1; PPIE; TMEM184B; ANKRD28; PTP4A2; COG4; NASP; CCDC107; YIPF6; DENND1B; APTX; SERPINB6; USB1; RAB9A; SRSF2; MICU1; CHMP5; CLINT1; CAMTA1; DICER1; SEPHS1; ZNF865; TOPORS; MLLT10; VAPB; THAP3; HSDL2; ANKHD1; ZFP91; MLL; GCLC; IRF3; BCL7B; ORC3; GABPA; MCL1; HIRIP3; ARNT; OXR1; ATP6V0C; JMJD7-PLA2G4B; ARHGEF12; LEPROT; RBBP7; PI4KB; CUL2; POU2F1; ARPC4-TTLL3; ASCC1; EIF4G3; MSANTD3; MSANTD3-TMEFF1; RBM14; RBM12; CCT2; RBM4; RBM14-RBM4; CPNE1; CAPN1; ATP5J2-PTCD1; YY1AP1; ATP6V1F; ABCC10; RNF103; RNF103-CHMP3; TMEM110-MUSTN1; NFS1; DCTN5; CDIP1; C15orf38-AP3S2; NT5C1B-RDH14; TBC1D24; TRIM39-RPP21; RPP21; COPS3; TANK; AMMECR1L; KAT7; USP19; PSMC5; MLST8; CCNH; ARMC6; TBC1D23; AK2; GPANK1; TOR1AIP2; UCHL5; CABIN1; LRBA; UIMC1; CNOT2; BLOC1S5; FPGT; RPL17-C18orf32; GBF1; RNF145; NEK1; TRAF3; NIP7; PDCD2; ISY1; ZSCAN9; C20orf24; TGIF2-C20orf24; SUN2; PTK2; PMF1; PMF1-BGLAP; SLC4A2; DHX33; PPP2R5A; PSMA5; CPD; POC1B; PSMB2; INTS7; GGCT; MDP1; NEDD8-MDP1; SMURF1; DAP3; AK3; BCL2L2-PABPN1; KIF16B; MARK4; GLRX3; B4GALT3; HYPK; PDK2; PGM3; SIAE; SESN1; DOPEY1; SH3GL1; NDUFB5; UQCRB; NDUFB6; GCFC2; SAFB; HMGN3; RNF14; RNF7; ZNF778; GORASP2; ZNF513; C18orf21; EIF2D; CORO7-PAM16; PIGO; RBM15; PLRG1; SEC22C; ASB3; ASB6; AKR1A1; TRMT1L; PRDX1; C10orf137; ZMYND11; RPS10-NUDT3; UBE2E1; HSPE1-MOB4; UBE2G2; UBE2H; CTDP1; CUX1; SYNJ2BP-COX16; PIGV; CHURC1-FNTB; WBSCR22; MTA1; NDUFC2-KCTD14; IL17RC; NDUFC2; COMMD3-BMI1; CHURC1; UBE4A; COX16; PPT2; MBD1; SPHK2; MDM4; ZHX1-C8ORF76; SRP19; ZNF670; SCARB2; PPP5C; ZNF664; PRPS1; BIVM-ERCC5; CCPG1; PSMC2; RBAK; RBM10; EIF4A1; RBAK-LOC389458; KIFAP3; RFC1; ZNF587; LIPT1; ANO10;

[0071] TNFAIP8L2-SCNM1; SCNM1; TCEB1; URGCP-MRPS24; NPEPL1; BAG4; ISY1-

RAB43; BNIP1; TTF1; KLF9; USMG5; MAVS; CAPZB; POLR1D; CHTOP; AKIP1; SH3GLB1; IGSF8; PRKAG1; NSFL1C; GTF3C3; ARID4B; MAP2K5; KAT5; RAB11A; TGOLN2; STRADB; FAM115A; DHPS; HNRPDL; PTPN2; M6PR; RNF40; PRMT1; ATRN; BACE1; VWA9; BZW1; C1QBP; ZNF48; CAMK2D; CASP6; CASP7; CASP9; CCNT1; CCNT2; PITRM1; ATAD2B; ODF2; ANAPC13; TWF1; WDR20; PIK3R1; EIF1AD; ZSWIM8; MIF4GD; MFSD11; NCOA6; ANAPC16; MAP4K4; RIN2; TMEM147; RBM39; RAB2A; AHCYL1; LOC100289561; ZNF691; TRIM26; BRF1; NUP93; ZNF322; ZNF790; DEF8; RNF41; ARFGAP2; AP2A2; RNF146; ARFIP2; ELP2; CARKD; ZBTB17; ZKSCAN3; PPP6R2; AKAP1; MPPE1; ASCC2; ZFAND6; EIF3L; ZNF410; SNX1; AKT2; PLD2; NFKBIB; PDE8A; TAF1C; PIM1; INPP5F; HIP1; RANBP6; PES1; NARS2; TIGD6; HINFP; NUB1; CLCN3; GLRX2; CLEC16A; PDIK1L; MTMR2; CD2BP2; GFOD2; LETMD1; RAB6A; SETMAR; LAMTOR3; RGL2; C7orf49; POMGNT1; BTF3L4; CEP57; SMUG1; CHST12; TOB1; TRA2B; TPD52L2; HDLBP; PRPSAP2; PPP3CC; KIAA0586; APEX1; HBP1; TRRAP; C7orf55-LUC7L2; LUC7L2; IMMP2L; CHMP2B; STX5; GFPT1; RAD23B; TMEM126A; FOXP1; DLST; PRPF4; TXN; PPP1CC; SEL1L; CTAGE5; ASAP1; TRIM3; NUDT9; SP1; USP4; ASPSCR1; APPL2; SLC30A5; PAPOLA; RAB5B; RAB5C; TAOK2; PCMT1; USP15; AP4E1; LSM4; GEMIN5; SEC24A; CEBPG; NT5C; TNIP1; URI1; ACSS1; BBS4; CDC5L; RPL15; ZNF444; SLC52A2; GMDS; AP4B1; YME1L1; UXS1; MED27; TBC1D1; CYB5D2; CREB3L4; PNPLA8; PSMC3IP; PIK3CB; ANKRD26; C9orf72; ATF2; NAA10; TRIM65; CERS6; ARL8A; CSE1L; TMCO1; ZNF620; ANKRD11; SNX12; ARAF; ETS2; STK3; PTGES2; CHD1L; UBE2L3; MCMBP; LRRC39; NOL8; ELOVL1; SLMO2; KDM2A; LRRC42; RAB18; CPSF3L; KAT6B; WDR92; GOLGB1; MAN2C1; SSBP1; C9orf69; SLC25A1; NOP16; PCGF5; MPP5; PPFIBP2; RPL10; C1orf85; TUBGCP2; R3HCC1L; NR1H2; FAM193A; DPP3; STOML1; KIAA0391; CSNK2A3; PRDM11; ANAPC10; CCT4; USP39; CNOT10; TMEM161A; GAPDH; RIT1; PAF1; SMG6; LOC100862671; POLD1; BTRC; RNF34; SRI; DDX21; CLCN6; CCDC51; FBXW7; NDUFB3; COX14; ITCH; DDX56; POM121; DDX6; CUL3; DIS3L2; HNRNPH1; SCFD1; ABCG2; CD63; TRMT2A; CCDC132; ANKFY1; COPS4; SERINC4; POLR3E; HARS; MIS12; NDUFA12; SPATA20; IDH3B; FAM173B; SMS; TARS; FBXO18; FASTK; CDK8; WDR4; ZNF155; SLC9A8; RDX; SRP68; CDK9; CALCOCO2; NOL10; PSMD9; TSN; SFSWAP; DCTN2; LPIN1; AARSD1; ADAM15; NSRP1; PDPK1; AP3D1; TBRG4; BRE; MORF4L1; CNOT1; MZF1; LARP7; ARMC8;

[0072]

PSME3; SNX17; PEMT; PDCD6; EIF3C; TOR1AIP1; UBOX5; FAM189B; ITPA; SRP72; CCDC61; ARSG; ING1; IFT20; AMBRA1; PAAF1; ILF2; EIF6; SLC12A9; ZNF839; CLOCK; SLIRP; HSD11B1L; SHOC2; CHD1; TMEM254; ANKRD46; FAM73A; RXRB; MAP4K3; PSMD5; CDK2AP1; UBE3B; WWP2; MCM3; PPP2R5D; PSMB6; PSMD11; CAMKK2; TAF11; RPL13A; LATS1; DAAM1; MED23; STOM; RNF111; WTAP; MED4; JOSD2; MARCH6; MCU; ARHGAP12; BCL2L13; NTAN1; STRIP1; TFAM; MEAF6; HAUS6; TRAPPC6A; TRAPPC3; UCHL3; NOSIP; IST1; ZFAND2B; MAX; VPS72; PCED1A; RAP2C; FAM173A; TTC19; EMC1; C21orf2; PEX11A; DNAJC10; LOC100129361; PPME1; HERC3; STX10; PPP1R12C; RQCD1; ZNF138; MTCH1; NSA2; LOC441155; PYCR2; SLC35A3; ABCB7; MKRN2; FBXO38; COPZ1; APEX2; AP3B1; PSMD6; DYNC1I2; MED21; DCLRE1A; PRELID1; RSRC1; RCN2; IKZF5; ZNF700; CDK2AP2; RRAGC; GTF2H3; AAR2; CUEDC1; KHDRBS1; AAGAB; TARS2; SEC11A; CEP164; RMND1; MEGF8; SLC39A1; HSP90AB1; STK25; PUS3; RAB4A; DOCK7; EPC1; LRRC14; RPS6KB1; TRAP1; C16orf91; MRFAP1; SHISA5; ABHD10; QARS; USP10; STX4; CHD4; WDTC1; RGS3; MBD4; PPIP5K2; PRKAR1A; NISCH; PPP1R3E; YOD1; C18orf8; USF1; ESF1; UNKL; SEC16A; KPNB1; ELF2; LONP1; CHUK; CIRBP; TBCB; AP1S1; AP3S1; CLNS1A; CLPTM1; CREBL2; MAPK14; CSNK1G2; CSNK2B; CSTF3; CTSO; CTSZ; DAD1; DGKQ; DARS; DHX9; DHX15; DECR1; DNASE2; DYNC1H1; DPAGT1; DPH1; DRG2; DYRK1A; ECH1; EEF1G; EIF2B1; EIF2S3; EIF4B; ELAVL1; ENO1; EP300; FBL; EXTL3; XRCC6; BLOC1S1; GDI1; GTF2B; GTF2H4; GTF3C1; HDAC2; HSBP1; DNAJA1; NDST1; ICT1; IL13RA1; ING2; INPPL1; EIF3E; AARS; ACVR2A; PARP1; AKR1B1; APEH; TRIM23; ARF4; ARF5; ARF6; RHOA; ARVCF; ATF4; ATP5B; ATP5F1; ATP6V1C1; ATP5O; AUH; POLR3D; BPGM; BSG; CAT; CBFB; CDK7; CENPB; CENPC1; CLTB; SLC31A1; COX4I1; COX5B; COX6B1; COX7A2; COX7C; CSNK1D; CSNK2A1; CTNNA1; CTPS1; CTSB; CTSD; CYC1; DBT; DDB1; DLAT; DR1; DUSP7; E2F4; EEF2; EIF5; ELK4; STX2; ESD; ETV6; EYA3; FAU; FKBP3; FKBP4; FNTA; FNTB; FTH1; KDSR; GAB1; GABPB1; GARS; GCLM; GNAQ; GNB1; GNS; GOLGA1; GOT2; GTF2E2; GTF2F1; GTF3A; H2AFX; H2AFZ; HTT; HIVEP1; HMGB1; HNRNPA1; HNRNPA2B1; HNRNPK; HSPA4; HSPD1; HSPE1; IARS; ID2; ID3; ACO1; IRF2; ITGAE; ITGB1; ITPR2; JAK1; KPNA1; KPNA3; KPNA4; TNPO1; IPO5; LIG3; LRP1; LRP3; LRP6; LRPAP1; MAGOH; MAN2A1; CD46; MDM2; MAP3K3; MGAT2; MGMT; MIF; MAP3K11; MPI; MPV17; MSH3; MAP3K10; MTAP; MTRR; MTX1; MVD; NUBP1;

[0073]

NBN; NCBP1; NDUFA4; NDUFA6; NDUFS4; NDUFS8; NFX1; NFYA; NME3; NRAS; NTHL1; NUP88; NVL; TBC1D25; OAZ2; ODC1; OGG1; ORC5; OSBP; PEBP1; FURIN; PAK2; PBX2; PCNA; PDE6D; PER1; PEX10; PEX13; PFDN1; PFDN4; PFDN5; PFKL; PHB; SLC25A3; PHF1; PIGA; PIGC; PIGF; PIK3C2A; PIK3C3; PI4KA; PMM1; PNN; POLA2; POLR2E; POLR2G; PPAT; PPP1R7; PPP1R8; PPP1R10; PPP2CA; PPP4C; PREP; PRKACA; PRKCI; MAPK1; MAPK6; MAPK7; MAPK8; MAP2K1; MAP2K3; PRPSAP1; PSMA2; PSMA3; PSMA6; PSMA7; PSMB1; PSMB3; PSMB4; PSMB7; PSMC1; PSMC3; PSMC6; PSMD2; PSMD3; PSMD4; PSMD7; PSMD8; PSMD10; PSMD12; PSMD13; PSME2; PTBP1; PTPN1; PTPN11; PTPRA; RAD1; RAD17; RAD51C; RAF1; RALB; RANBP1; RANGAP1; RARS; RASA1; ARID4A; RCN1; NELFE; RECQL; UPF1; REV3L; RFC2; RFC4; RFNG; RFX1; RGS12; RING1; RNASEH1; RNH1; RORA; RPA1; RPA2; RPA3; MRPL12; RPN1; RXRA; SBF1; ATXN2; SDHB; SDHD; MAP2K4; SRSF3; SGTA; SKI; SMARCA2; SMARCC1; SMARCD1; SMARCE1; SNAPC1; SNAPC4; SNRNP70; SNRPB; SNRPB2; SNRPC; SNRPE; SNRPF; SNRPG; SNX2; SP2; UAP1; SPG7; SPTBN1; SRM; SRP14; SRPK1; SSB; SSR1; SSR2; SSRP1; STAT3; STIM1; STRN; SUPT4H1; SUPT6H; SUPV3L1; SURF1; SUV39H1; ADAM17; TAF2; TAF4; MAP3K7; TAPBP; TBCC; TCEB3; TCF12; TDG; TERF1; THOP1; SEC62; TRAPPC10; TOP1; TPP2; TPR; TPT1; NR2C2; TSPYL1; TSSC1; TSTA3; TTC1; TUFM; HIRA; TYK2; UBA1; UBE2A; UBE2B; UBE2D2; UBE2D3; UBE2G1; UBE2I; UBE2N; UBE2V2; UNG; UQCRC1; UQCRC2; USF2; UVRAG; VBP1; VDAC1; XPO1; XRCC4; YY1; YWHAB; ZNF7; ZNF35; ZNF45; ZNF76; ZNF91; ZNF131; ZNF134; ZKSCAN1; ZNF140; ZNF143; ZNF189; ZNF202; USP7; STAM; CUL5; MLL2; TAF15; NRIP1; TMEM187; AXIN1; HIST1H2BC; PIP4K2B; ULK1; EEA1; ANXA9; STX7; VAPA; ZNF282; DUSP11; CUL1; TTF2; SMARCA5; OFD1; PPM1D; RANBP3; PPFIA1; PARG; NDST2; IKBKAP; HAT1; DGKE; CAMK1; AGPS; BLZF1; MAPKAPK5; PRPF18; DEGS1; DENR; YARS; RRP1; KHSRP; AKR7A2; NOP14; RUVBL1; USO1; CDK13; RFXANK; SSNA1; NCOA1; TNKS; EIF3A; EIF3D; EIF3F; EIF3G; EIF3H; EIF3I; EIF3J; BECN1; MRPL40; B4GALT4; MBTPS1; EDF1; CTSF; SNX4; SNX3; EED; RNMT; RNGTT; GPAA1; RIPK1; CRADD; TNFSF12; ADAM9; CDS2; RIPK2; FADD; SNAP23; NAPG; NAPA; MTMR1; RIOK3; TNFRSF10B; DYRK4; SUCLG1; SUCLA2; CREG1; TRIM24; DPM1; DCAF5; DPM2; SAP30; CES2; TMEM11; HDAC3; KAT2B; SGPL1; FUBP1; ZNF259; MCM3AP; EIF2B5; EIF2S2; CPNE3; BUD31; PRPF4B; TIMELESS; HERC1; MBD3;

[0074]

MBD2; ST13; FUBP3; TOP3B; WASL; ATP6V0E1; SLC25A14; RPS6KB2; RNF8; UBA3; UBE2M; BTAF1; AIP; CLK2; RHOB; ATIC; ATOX1; BYSL; CCNG1; CDKN1B; AP2S1; COX8A; CRY1; CS; TIMM8A; DUSP3; ECHS1; EIF2S1; EIF4EBP2; FDX1; FEN1; GMFB; GPS1; GTF2F2; HSPA9; IDH3G; IREB2; NDUFB7; NINJ1; OAZ1; PRKAR2A; RAB1A; RAB5A; SDHA; SNRPD3; TARBP2; UXT; PIGQ; FIBP; EBAG9; RAB11B; UBE2L6; MFHAS1; CYTH2; MED14; SOCS6; ZNF235; TRIP12; TRIP11; JMJD1C; MED17; MED20; PIGL; PMPCB; GTPBP1; NFE2L3; MTRF1; ACTL6A; ACVR1B; ARHGAP1; ARL3; ASNA1; BAD; BCL9; BNIP2; BPHL; BRAF; PTTG1IP; CAD; CALR; CASP3; CD81; CDC34; COX6C; COX15; CREB1; CTBS; DDX5; DDX10; DFFA; RCAN1; DVL2; DVL3; E4F1; PHC2; ENDOG; ENSA; EPRS; ERH; ESRRA; ACSL3; ACSL4; BPTF; FARSA; FDFT1; FLOT2; FRG1; GALNT2; GOLGA2; GPS2; ARHGAP35; GTF2A2; HNRNPAB; HNRNPU; HUS1; IDI1; FOXK2; MGST3; MOCS2; NARS; NDUFA1; NDUFA3; NDUFA10; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB10; NDUFS3; NDUFS6; NFATC3; YBX1; PARK2; PET112; PEX14; PIGH; PSPH; RABGGTA; RABGGTB; RPS6KA3; SCO1; SNRPA; SNRPD2; SREBF2; TAF1; TBCA; TOP3A; TRAF6; TTC4; RAB7A; PRRC2A; DDX39B; PABPN1; C21orf33; BAP1; CDC23; HERC2; PIAS2; MTMR6; MTMR4; ATP6V0D1; PRPF3; FAM50A; RRP9; PRKRIR; ATG12; PDCD5; HGS; NEMF; PCSK7; COX7A2L; SCAF11; AP4M1; ZW10; ETF1; MTA2; NOLC1; MAPKAPK2; ITGB1BP1; COPB2; ZNHIT3; MED1; B4GALT5; CNOT8; VAMP3; SNAP29; TXNL1; PPIG; KIF3B; TM9SF2; CIAO1; POLR2D; HS6ST1; NMT2; PEX16; SNRNP40; DDX23; SYMPK; EIF2AK3; SH3BP5; EIF4E2; ATG5; ROCK2; STX8; PIGB; CLTC; FXR2; MPDU1; TMEM59; CIR1; APBA3; ATP6V1G1; SPAG7; MRPL33; SEC22B; PRDX6; VPS9D1; SEC24C; ACTN4; MRPL49; DDX1; DHX8; MTOR; KRAS; MARS; MYO1E; NDUFA5; NDUFA7; NDUFA9; NDUFAB1; NDUFB8; NDUFB9; NUCB2; OXA1L; PCYT1A; PFN1; PGGT1B; PIK3R2; POLR2K; POLRMT; PPID; PRCP; PWP2; ABCD4; SFPQ; SIAH2; TLE1; TRIM25; NUP214; ZRSR2; SLC27A4; ZMYM4; RBM8A; OXSR1; WDR1; GOLGA5; MVP; THRAP3; MED12; MED13; NUP153; CCS; DOPEY2; THOC1; SART1; ABL1; ATF1; BMI1; CHKB; CRK; CRKL; DDOST; ERCC4; GAK; GFER; GLUD1; GNB2; RAPGEF1; PDIA3; HCFC1; HINT1; ZBTB48; HSPA5; JUND; SMAD4; NCL; NFIL3; NKTR; NUP98; PDCL; PHF2; RALA; ROCK1; SLC20A1; STAT2; YES1; CCDC6; MLF2; SMC3; ZRANB2; MED6; ACOT8; GNPDA1; MED16; PIGK; RANBP9; UBA2; CFL1; DMXL1; DOM3Z; GTF2E1; HSF1; DNAJC4; IDH3A; IFI35; IFNGR2; INPP5A; INPP5B;

[0075]

LAMP1; LMAN1; ALDH6A1; MRE11A; RBL2; RHEB; SRSF4; SOLH; SOS1; TAF13; TARBP1; ZNF354A; TCF20; TERF2; NELFA; EVI5; REEP5; TAF1B; SOX13; FARSB; ABCC5; DNM1L; ABCF2; COX17; SCAMP2; SCAMP3; ERAL1; TSSC4; PDCD7; GIPC1; ARPC3; ACTR3; PPIF; CTDSP2; ARPC2; RAD50; ACTR1B; ACTR1A; ZNF263; PDIA6; ARIH1; NAMPT; AKAP9; G3BP1; CEBPZ; TRIM28; ATP6AP2; LPCAT3; RCL1; CNIH; RBM5; LHFPL2; ALYREF; TXNDC9; MPHOSPH10; NME6; NUTF2; USPL1; EIF1; FLOT1; PSMD14; PRDX2; PRKD3; SLC35B1; DCAF7; AP3S2; MRPS31; POP7; SRRM1; STAM2; SF3B4; ZMPSTE24; AKAP8; PURA; STUB1; STAG1; SIGMAR1; CWC27; SAP18; SMNDC1; BCAS2; EIF1B; DNAJA2; APC2; KATNB1; ACAT2; CAPRIN1; NBR1; MCM7; MDH2; MAP3K4; MFAP1; MIPEP; MLLT1; MTHFD1; NAB1; HNRNPM; NAP1L4; PRCC; RNF6; TSPAN31; TBCD; TSNAX; UQCRFS1; UQCRH; CLPP; LAGE3; ARID1A; ALKBH1; CDC123; H1FX; PCNT; CDC42BPB; HDAC6; SNAPC5; DSCR3; SMYD5; RRAGB; AGFG2; TUBA1B; IK; IRF9; BPNT1; PIAS3; LUC7L3; TAB1; MAN2A2; TMEM50B; CAPZA2; DYNC1LI2; NEDD8; NFYB; NUCB1; NUMA1; ORC2; PA2G4; PCBP1; PCM1; PIK3CA; PIN1; PITPNA; POLE; POLR2H; POLR2I; POLR2J; PPP2R5B; PPP2R5E; PRKAA1; PRKAB1; PKN2; DNAJC3; PSME1; RAD21; RANBP2; DPF2; SRSF6; ITSN2; TAF10; TESK1; TSG101; VARS; XRCC1; ZKSCAN8; SHFM1; ANP32A; SMC1A; NPEPPS; PCGF3; CDIPT; PGRMC2; ARIH2; TUBGCP3; CFDP1; RAN; TIMM23; LYPLA1; EMG1; TIMM17A; ZER1; HMG20B; MERTK; SLC30A9; PIBF1; PPIH; ZNHIT1; TIMM44; ZBTB18; TADA3; UBE2E3; EIF3M; SEC23A; CREB3; LRRC41; VTI1B; ENOX2; APPBP2; CIB1; CHERP; IPO7; NOP56; SSSCA1; RNASEH2A; ANP32B; LAMTOR5; AGPAT1; SPTLC1; ARFGEF2; ARFGEF1; RABAC1; SLU7; SIVA1; MRPL28; NPC2; TXNRD2; DRAP1; DNPH1; PRPF8; PAIP1; TBL3; MXD4; HEXIM1; RBCK1; STAMBP; POLR3F; POLR3C; IVNS1ABP; TAF6L; ATP5L; GNAI3; LGALS8; POLH; PSMC4; TRIM27; RSC1A1; SARS; DYNLT1; DYNLT3; TFE3; SLBP; YEATS4; ELL; NCOA2; SPHAR; EXOC5; NPRL2; MTX2; YKT6; PMVK; FARS2; CGRRF1; RRAGA; DCTN6; GNA13; MAP4K5; GMEB1; CCT8; POLD3; HSPA8; SLC12A7; NUDC; PTGES3; MAP3K2; ZBTB6; POP4; VAMP5; ZNF460; RPP40; SDCCAG8; CLPX; SRCAP; JTB; MAN1A2; TXNL4A; NUDT3; GLO1; EHMT2; COPS8; RNPS1; SUB1; SMPDL3A; DIAPH2; PSKH1; SURF6; SYPL1; TALDO1; TCEA1; YWHAE; IFRD2; LZTR1; LMO4; DDX18; QKI; ZFPL1; WDR3; MALT1; RALBP1; PRDX3; AFG3L2; KDELR1; SF3A3; HNRNPA0; SEC61B; SERINC3; PNRC1;

[0076]

PSMF1; TMED2; STIP1; CKAP4; YWHAQ; TMED10; ASCC3; UQCR11; COPS6; GCN1L1; COPS5; METAP2; SF3B2; ILVBL; SNRNP27; TMED1; LIAS; CALM1; MYO9A; PPA2; RAC1; RBBP6; RNF5; RPE; SDF2; ST3GAL2; SKIV2L; SKP1; SUMO3; SNRPD1; SOS2; ZNF33A; ZNF33B; ZNF12; ZNF17; ZNF22; ZNF24; ZNF28; ZBTB25; RNF113A; NPM3; SLC35D2; ADRM1; NUDT21; CPSF6; RTN4; DDX52; WWP1; CYB561D2; TMEM115; DUSP14; TOPBP1; RER1; HNRNPUL1; KRR1; FAF1; POLR3A; CLASRP; KPTN; PWP1; CDC37; FICD; LSM6; ATP5I; RPL10A; UBL3; SSR3; TCEB2; TEP1; TFDP1; TMF1; TRIO; UTRN; VCP; ZNF41; VEZF1; ZNF175; ZXDA; ZXDB; SLMAP; ZMYM6; TESK2; NUP50; C14orf1; STRAP; CEP250; WBP4; ABCB8; SEC23IP; SUPT16H; POLI; PROSC; AKAP10; MRPL3; RPL35; PRAF2; SEC63; HPS5; RNF139; DCTN3; XPOT; CHP1; PXMP4; DUSP12; SNF8; ATXN2L; SYNRG; PNKP; B4GALT7; VPS45; LYPLA2; COPE; STXBP3; TUSC2; CBX3; EXOC3; GABARAP; RNF13; TWF2; GABARAPL2; STAT1; NUPL2; ZNF236; OGFR; ATF6; PAXIP1; CASC3; RALY; BRD3; DDX42; TARDBP; COMMD3; CCT5; DGAT1; ELL2; PGLS; ABCB10; MACF1; ADAT1; PRDX5; AP3M1; APPL1; CD3EAP; DNPEP; ARL2BP; AHSA1; CCRN4L; CD2AP; COPG2; FAM50B; AATF; SERGEF; CCNDBP1; FBXL3; FBXL4; FBXL6; FBXW2; FBXO22; FBXW8; FBXO3; FBXO8; FKBP8; TIMM10B; EIF2C1; GRHPR; GTF3C4; HNRNPH3; HARS2; MID2; NUBP2; MSRB2; POMZP3; PRDM2; RYBP; SCAP; SNW1; XRN2; ZNF212; HACL1; RHBDD3; ZNF346; FTSJ1; KEAP1; G3BP2; FBXW11; KIN; KPNA6; LETM1; PLA2G15; PIGN; DNAJB9; GTPBP4; NUFIP1; FBXO9; TTC33; BLOC1S6; PEF1; PFAS; PFDN2; CDK14; PITPNB; ANP32C; ICMT; PRDM4; ZMYND8; H2AFV; RAB3GAP2; RLF; RSU1; SF3B3; SEC22A; SNAPIN; STAT5B; TIMM10; TIMM13; TIMM8B; TIMM9; ATP6V0A2; PRPF6; TXN2; UCK2; WBP1; WBP2; YWHAG; ZNF281; EIF3K; DNAJC15; N6AMT1; C16orf80; VPS4A; HTRA2; NXT1; TBK1; SAP30BP; VPS51; MAT2B; POLM; GNL2; RBM15B; CPSF1; TRA2A; SAC3D1; CCDC106; EEF2K; SNX15; PRRC2B; UBIAD1; SNX8; SNX11; ATG4B; PAXBP1; NME7; GMPPB; GMPPA; SEC61A1; TIMM22; ALG6; TFPT; KCNJ14; NENF; CNOT7; ZNF225; ANAPC2; ANAPC4; ABT1; DPP7; PREB; NRBP1; FTSJ2; USP25; UBQLN1; STOML2; ST6GALNAC6; UBQLN2; BAZ1A; BAZ2A; BAZ2B; DHX38; CCDC22; SNRNP200; DEXI; SACM1L; MRPS28; WDR37; DCPS; OSTM1; ASF1A; SNX24; SPCS1; ANAPC15; UNC50; MRPS18B; C19orf53; MKL2; ACAD9; MRPL42; NOB1; NTMT1; ASTE1; FAM32A; MRPL13; ZNF770; C16orf72; ZC3H7A; ZBTB44; SETD2; MRPL18; NDUFAF4; CCDC59; METTL5;

[0077]

CHMP4A; GTPBP8; CRIPT; MRPL15; TIMM21; LGALSL; ORMDL2; DYNLRB1; CNIH4; TMEM208; SSU72; AP2A1; TMEM258; NDUFA8; PPP2R1A; VAMP2; HSD17B8; UBL4A; GNPAT; EIF2B2; RAPGEF2; RBX1; TMEM5; CNPY2; C11orf58; MGAT4B; DNAJC8; SUCO; EXOSC2; NOMO1; TRAM1; CAPN7; ETHE1; BRD4; ISCU; TGDS; C22orf28; TMEM50A; KLHDC2; PDSS1; PATZ1; EDC4; PPIL2; PISD; MTCH2; ZNF318; TBC1D22A; ZNF324; HIBCH; GNL3; FAM162A; AKAP8L; RNF11; ACAD8; DIEXF; PELP1; SND1; GHITM; VPS41; UQCRQ; ZBTB11; AFF4; INVS; SNX5; TUBGCP4; CHMP2A; RNF115; KLHL20; LSM1; LSM3; DIMT1; ZNF330; TNRC6A; GOLIM4; PRPF19; UTP20; RABGEF1; TOR1B; MCAT; CNOT3; ZNF232; TMOD3; ZKSCAN5; LATS2; BRD1; ERO1L; ZNRD1; DNTTIP2; MAGED2; PIK3R4; UBXN4; MDN1; FAM120A; FAF2; PSME4; ATP11B; ZNF592; SH3PXD2A; CTR9; TTC37; MDC1; SAFB2; SLC25A44; TTI1; PHF14; KDM4A; UBE3C; EMC2; KIAA0100; KIAA0355; AQR; TMEM63A; CEP104; SART3; USP34; SETD1A; LAPTM4A; SLK; MLL4; MLEC; KIAA0195; EIF4A3; TM9SF4; MTSS1; SPCS2; BMS1; PTDSS1; SERTAD2; MAML1; SNX19; TATDN2; MRPL19; TOMM20; EFCAB14; URB2; TSC22D2; ARHGEF11; ZBTB24; PLEKHM1; C2CD5; ZNF518A; EPM2AIP1; C2CD2L; FARP2; CEP350; LRIG2; PJA2; TOMM70A; SEC24D; FCHSD2; URB1; ZC3H11A; TOX4; DDX46; ZBTB39; OSBPL2; ZBED4; FIG4; KIAA0196; AP5Z1; DENND4B; SUPT7L; FAM20B; RNF10; ZBTB5; JOSD1; HELZ; KIAA0020; N4BP2L2; PDAP1; SCAF8; ZFP30; DOLK; AAK1; LMTK2; ICK; R3HDM2; ZNF510; PPP6R1; MLXIP; TRAPPC8; MON1B; MORC2; ZHX2; KIAA0907; BAHD1; DHX30; TCF25; PDCD11; PCNX; HMGXB3; RALGAPA1; WDFY3; RAB21; SPEN; FBXO21; EXOSC7; KDM4B; USP33; PHLPP2; ZNF292; XPO7; MON2; PDXDC1; FRYL; PDS5B; ZHX3; KIAA0754; PIKFYVE; ZNF609; TBC1D9B; GGA2; WAPAL; SETX; SETD1B; FTSJD2; ERP44; RRP1B; MYCBP2; AVL9; PPRC1; ZC3H13; SARM1; CDK12; MRPS27; CUL9; FAM179B; SMG1; TAB2; PLXND1; ATG2A; RAD54L2; SMC5; MAST2; ZZEF1; ANKLE2; ZC3H3; GRAMD4; CIC; TBC1D9; WDR43; SNX13; MPRIP; NUP205; EFR3A; RTF1; TTLL12; METAP1; ZCCHC14; CEP68; PHF3; LARP4B; RCOR1; FAM168A; PMPCA; PLEKHM2; ZC3H4; RRS1; PRRC2C; TBC1D12; DNAJC9; KIAA0556; RPRD2; ATP11A; DNMBP; POFUT2; CLUH; NUP160; CSTF2T; ATMIN; KIF13B; FKBP15; SIN3B; NCAPD3; DNAJC13; MAN2B2; KIAA1033; USP22; DPY19L1; SZT2; WDR7; VPS39; DNAJC16; KHNYN; ANGEL1; USP24; FNBP4;

[0078] KIAA1109; LARP1; PPP1R13B; PUM2; UFL1; RRP8; KIAA0947; SMG5; MAU2;

NCSTN; NUDCD3; MED13L; ZDHHC17; ADNP; LARS2; PPWD1; ZFYVE26; TMEM131; GLTSCR1L; POFUT1; SUZ12; SCRIB; MORC3; SKIV2L2; R3HDM1; ELP5; PANX1; VPS13D; SAMM50; HECTD1; NIPBL; YIPF3; TECPR1; DCAF12; ABHD14A; EP400; C3orf17; DCAF13; TMEM186; AASDHPPT; POLR1A; CCDC28A; AHCTF1; CAMSAP1; CNOT6; NELFB; ZDHHC5; MTMR9; ATL3; NOL11; PTPN23; NIPSNAP3A; HEATR5A; FAM98A; SLC22A23; KBTBD2; SYF2; PNISR; KIAA1429; NECAP1; DHRS7B; IBTK; TBC1D10B; RNF167; C2CD3; DAK; ZZZ3; RPAP1; LRIG1; UPF2; PTCD1; GLCE; OPA1; UBXN7; LTN1; POLDIP2; GPATCH4; HERC4; CCDC9; CCZ1; LDLRAP1; PRPF31; EPC2; GAPVD1; TRPC4AP; IRF2BP1; C10orf12; NAT9; ZNF337; NOC2L; RSL1D1; GTPBP5; SENP3; TRUB2; WWC3; ZNF777; BRPF3; COQ2; GPKOW; MMADHC; RRP7A; DESI1; SGSM3; GLTSCR1; DCAF8; WARS2; UBXN1; GTF2A1; ZNF593; AZIN1; MBTPS2; PCF11; CDC40; ZBTB7A; UBR5; EIF5B; TRIM33; LAP3; NBAS; WDPCP; TXNDC12; TXNDC11; POP5; RPS27L; POMP; TMA7; NOP58; NMD3; TRMT6; ATP6V1H; MTERFD1; SLC35C2; PELO; GET4; MRPL2; DERA; MRPL4; APIP; CUTC; FCF1; NDUFA13; ERGIC3; MRPS17; MRPS7; TAF9B; UBE2D4; HEBP1; ATP6V1D; ADIPOR1; UTP18; ABHD5; NDUFAF1; PHF20L1; TFB1M; UBE2J1; RBMX2; LACTB2; SUV420H1; TRAPPC12; RMDN1; MRPS2; COQ4; UTP11L; SBDS; C14orf166; DERL2; FAHD2A; EXOSC1; SF3B14; ISOC1; EMC9; MRPL11; MRPL48; TMBIM4; TPRKB; PPIL1; MED31; FAM96B; MRPS16; MRPS18C; FIS1; PAM16; MRPS23; MRPS33; GOLT1B; BOLA1; VPS36; PTRH2; TVP23B; GLOD4; CDK5RAP1; STYXL1; RBM7; RPL26L1; COMMD2; IER3IP1; NAA20; ZFR; TELO2; RLIM; TMEM66; COPG1; RAB10; INSIG2; CHCHD2; DYNC1LI1; HSD17B12; COMMD10; WDR83OS; TRAPPC4; RAB4B; PIAS1; NOL7; HEMK1; SDF4; MRTO4; LSM7; NAA38; PDGFC; CPSF3; VPS28; TRAPPC2L; TRIP4; DBR1; POLK; MAN1B1; DDX41; SNX9; VPS29; NLK; BIRC6; FAM8A1; NAGPA; TUBE1; SELT; TAOK3; HP1BP3; PCYOX1; HSPA14; RSL24D1; SS18L2; DNAJB11; POLR3K; ATPIF1; WBP11; RAB14; ZNF274; ZNF639; SRRM2; ZDHHC2; DDX47; TACO1; ACP6; WWOX; AKAP7; C9orf114; CTDSPL2; TRIAP1; C11orf73; CWC15; TRMT112; UFC1; RTFDC1; GLRX5; RNF141; GLTP; RTEL1; NCKIPSD; EMC4; TMEM9; CXXC5; ANKRD39; C20orf111; CCDC174; ZC3HC1; C9orf156; PDZD11; VTA1; TMEM69; MRPL37; RNF181; MRPL51; PBDC1; MRPL27; ZCCHC17; KBTBD4; SCLY; C9orf78; KLF3; TM7SF3; SCAND1; BFAR; COA4; BCCIP; ERGIC2; RSF1; TIMMDC1; KDM3B; ARMCX3; TDP2; KRCC1; ZNF644; MRPL35; WAC; MRPS30;

[0079]

GDE1; CRNKL1; STX18; POLA1; RWDD2B; SEPSECS; USP18; NUP54; PTOV1; CPSF2; POLE3; CHRAC1; MRPL39; TMED9; HAUS7; ARID1B; MPHOSPH8; POGK; CNOT11; FOXRED1; MIER2; INO80; ZRANB1; UBE2Q1; TRIM44; WDR5; ZC3H7B; MED29; BMP2K; VEZT; ZCCHC8; RNPC3; ALKBH4; C17orf59; CNNM3; CDKN2AIP; KCTD9; KLHL24; TRIT1; FTSJ3; CNNM2; DYM; KLHL28; GATAD2A; ANKRD10; ZCCHC10; OTUB1; TRPM7; GIN1; MCM9; FBXL12; ANKRD49; WDR55; PGPEP1; TASP1; ZNF3; CC2D1A; TMEM104; QRICH1; THUMPD1; ZCCHC2; DPP8; ST7L; CWC25; UHRF1BP1; ALKBH5; PNRC2; MTMR10; SLC39A4; LRRC40; PXK; TBC1D22B; CDKAL1; CHD7; FAM208B; FOCAD; BTBD2; YTHDF1; HEATR2; OSGEP; ZSCAN32; UBE2R2; CHCHD3; IMPAD1; RAB20; WRAP73; TRMT10C; EXD3; KANSL2; MARCH5; ADPRHL2; COMMD4; CECR5; FAM206A; MRPL16; SDHAF2; SLC48A1; TRNAU1AP; FAM120C; C1orf109; PARP16; SSH3; INTS8; C4orf27; THG1L; SLC25A38; SLC35F6; ZNF416; CLN6; PINX1; C1orf123; VPS13B; PRPF40A; DDX27; GID8; HIF1AN; TMCO3; PAK1IP1; LAMTOR1; ZNF446; TRMT61B; CDC37L1; C19orf24; PIH1D1; PPP2R3C; STX17; NPLOC4; PRPF39; C14orf119; DENND4C; GPATCH2L; PHIP; USP47; PTCD3; TRMT12; VPS37C; IWS1; NRDE2; MRPL20; RUFY2; SCYL2; TMEM248; RNF31; TRMU; ARGLU1; C10orf118; MED9; YEATS2; WDYHV1; GPATCH1; SAMD4B; WDR6; LUC7L; WDR70; ATG2B; GPATCH2; SLFN12; AGGF1; RBM22; MAGOHB; PLEKHJ1; MANSC1; WDR60; VAC14; TMEM39B; IARS2; PRPF38B; AKIRIN2; GPN2; ARHGEF40; HEATR1; TRIM68; CCDC94; LARP1B; SRBD1; IPO9; ELP3; WDR74; GSPT2; NLE1; THAP1; MTPAP; LMBR1L; SDAD1; WDR11; ARMC1; DARS2; TMEM33; TSR1; PNPO; SHQ1; MRPS10; INTS10; RMDN3; RNMTL1; SMG8; RNF220; RIC8B; SLC4A1AP; NADSYN1; DNAJC17; ASUN; RPRD1A; MAP1S; N4BP2; GOLPH3L; ATF7IP; DHX32; ARL8B; ZFP64; DNAJC11; HMG20A; TBC1D13; TMEM57; VPS35; ARFGAP1; PANK4; USP40; COA1; SMU1; UBA6; AP5M1; NUP133; SLC38A7; OGFOD1; CCAR1; AGK; TMEM184C; CCDC25; WDR12; TTC17; TYW1; TMEM39A; WDR41; ADI1; THNSL2; TMEM19; NUDT15; IMP3; PHF10; QRSL1; ZNF654; CWF19L1; EXOC2; BRF2; PBRM1; CCDC91; RNF121; BRIX1; DDX19A; RFK; C6orf70; RSAD1; FGD6; TMA16; C5orf22; ABCF3; UFSP2; LIN7C; RSBN1; BLOC1S4; LMBRD1; SYNJ2BP; LSG1; METTL2B; DCP1A; COPRS; ST7; PI4K2A; TMEM63B; RRN3; UTP6; BDP1; RNF130; FBXO6; IMPACT; VIMP; EMC3; CAND1; UBAP2; TMEM242; EAPP;

[0080] PPP2R2D; BRK1; ITFG2; CISD1; PLGRKT; USE1; TEX2; ZC3H15; TMEM165;

ACTR10; ASH1L; TMCO6; LRRC59; KIAA1704; CSGALNACT2; WSB2; NOP10; SLC35E3; ZNF395; VPS33B; RNF114; CMAS; BIN3; FAM114A2; DHTKD1; COG1; MAML3; TRPV1; SLC25A40; MKKS; PCDHGB5; CLN8; NANS; UBB; DAZAP1; BRWD1; TERF2IP; SLC38A2; YIPF1; GAR1; SSH1; RBM27; KCTD5; FBXO42; MRPS21; FBXW5; ETAA1; ANKIB1; MIOS; SMCR7L; TOLLIP; TMX3; HEATR5B; DHX29; EXOSC4; ELP4; PUS7; CCDC93; ASNSD1; MRPL50; FAM35A; TOMM7; WDR5B; DDX49; ING3; TRMT13; VSIG10; GTPBP2; LIN37; C19orf10; SMG9; ALG1; UBFD1; TMEM234; PPP1R37; MOSPD1; YLPM1; RNF20; GPCPD1; FAM214A; WDR45B; METTL3; GSK3A; CHST7; DIABLO; INPP5E; POLE4; LARS; UGGT1; UGGT2; KCMF1; TM9SF3; UBQLN4; WRNIP1; GRIPAP1; BDH2; TMEM167B; PNO1; SH3GLB2; STARD7; EMC7; C1GALT1; EXOSC5; MCCC1; NCLN; FEM1C; DUSP22; CMC2; MRPS22; YAE1D1; C11orf30; MFF; SDR39U1; XAB2; CCDC47; C5orf15; NIT2; OTUD7B; PARP6; RNPEP; FAM20C; PRDM10; PPAN; PSMG2; ADPRM; MRPL1; TOMM22; CHPT1; CCNL1; MNT; CIAPIN1; C16orf62; ANKMY2; RARS2; RALGAPB; ZMIZ1; RALGAPA2; NKIRAS1; ENTPD7; PCNP; PITHD1; PARP11; UTP3; AVEN; C12orf4; C12orf5; MAN1C1; PDSS2; SETD8; REXO4; NUP107; MRPL47; ATP13A1; DDX24; SCYL3; SEPN1; ATP10D; TUBGCP6; LYRM2; SNX14; YIF1A; GALNT1; MCOLN1; CSRP2BP; TMEM9B; MRS2; CLK4; RAB22A; ANKHD1-EIF4EBP3; REXO1; KIAA1143; GATAD2B; LRRC47; ZNF512B; ZNF490; USP31; PRR12; ATXN7L1; NLN; ESYT2; KIDINS220; MTA3; AARS2; INTS2; XPO5; ARHGAP31; SERINC1; UBR4; NUFIP2; MIB1; ZNF398; KLHL42; PDP2; USP35; KLHL8; TMEM181; ARHGAP21; CRAMP1L; KIAA1430; WDFY1; ZNF687; WDR48; FNIP2; PITPNM2; SLAIN2; RANBP10; KIAA1468; VPS18; ZBTB2; SH3RF1; PHRF1; RDH14; FLYWCH1; ALS2; ZSWIM6; KIAA1586; DDX55; CWC22; GBA2; DENND1A; KIAA1609; ANO8; METTL14; EPG5; NCOA5; PPM1A; DHRS4; DEAF1; UBC; RAP2A; ZNFX1; MBNL1; ZNF253; NDUFV2; KAT2A; NMT1; ZNF8; MTMR3; MRPS12; POLR2L; PPA1; PPIA; MRPL23; TNFAIP1; TRAF2; KDM6A; XRCC5; ZNF273; TMX4; GATAD1; KIAA1967; LSM2; CCNB1IP1; C6orf47; SLC30A1; SRPRB; ENOPH1; RPRD1B; ZNF77; PRUNE; SCAF1; SELK; RBM25; WIZ; RRAGD; SNX6; TRIM39; C21orf59; ZFYVE1; SENP2; PDLIM2; KLHL12; GPBP1L1; C12orf10; UTP14C; ZNF500; VPS11; SAV1; CCDC90B; FASTKD5; GUF1; SPCS3; RINT1; RIC8A; MIIP; EEFSEC; TRAPPC11; ZFAND3; SRR; PPP1R11; ZNF148; POLR2F; ZNF277; ITM2B; TIA1; FBXW4; ABHD4; MRPL17; UBE2O; HEATR6; NSUN3; CERS2; GPATCH3;

[0081]

HPS4; GALNT11; ZNF335; MRPS14; PCIF1; FKBPL; RBM26; GOLPH3; MCCC2; SNX16; MAGEF1; TMBIM1; DUS1L; MRPL46; XYLT2; EIF4H; C11orf24; ZFYVE20; PDF; C17orf75; OSGEPL1; MMS19; DNAJC1; TFB2M; TOR3A; HERPUD2; NOC3L; RNF25; NSD1; LMBR1; XPO4; HS1BP3; IKZF4; ZMAT3; KLHL25; GZF1; C5orf28; TMEM168; ATG3; POLR1E; SUDS3; TTC31; NARFL; ZDHHC6; PCNXL4; ACTR6; MRPS25; DNMT3A; VPS52; GIGYF1; VPS16; ANAPC1; SNRNP35; DGCR14; COPS7B; NUCKS1; ACBD3; TNS3; FAM160B2; PARP12; ZNF574; SFXN1; IPPK; CCDC14; C6orf106; C11orf1; RMND5B; CERK; LMF1; OSBPL11; RMND5A; MPHOSPH9; ARV1; NMNAT1; MAP1LC3B; PORCN; MARCH7; YTHDC2; TUT1; MRPS11; RFX7; PAPOLG; C12orf43; ACTR8; CASD1; CCDC71; MRPL44; VPS33A; NOL6; KRI1; UPF3B; UPF3A; RSRC2; INTS3; FRY; ANKRA2; SPATS2; ZNF649; SELRC1; UBE2Z; C8orf33; CAPN10; ZNF747; FUNDC2; DDRGK1; MRPS34; MRPL34; CDK11A; MRP63; YIPF2; PRR14; C19orf43; CUEDC2; METRN; DDX50; DDA1; NUP37; SPATA5L1; PDCL3; ERI3; C7orf26; NABP2; SECISBP2; NOC4L; METTL16; FASTKD3; TMEM109; C2orf49; ASB8; DCTPP1; C1orf50; CCDC86; C11orf48; WDR18; WDR77; SLC25A23; SMIM7; ALG12; C9orf16; TAF1D; DHX58; TMEM185B; FAM134A; PHF23; PPDPF; DHRS11; GNPTAB; NOL12; LENG1; C1orf35; RBM42; ZNF343; FBXL15; DCAF10; NDUFS7; PGS1; IRF2BPL; LRFN3; HAUS3; CYP2R1; PAGR1; C2orf47; GCC1; ATP13A3; ABHD8; NKAP; CDC73; CARS2; MRPL24; C10orf76; MUL1; RNF219; ADIPOR2; FAM118B; TANGO6; SNRNP25; C6orf211; OCEL1; ARMC7; OSBPL9; ROGDI; CHMP6; SRD5A3; PANK3; HECTD3; NLRX1; FN3KRP; C22orf29; ZDHHC14; MSANTD2; NAA35; YRDC; MANEA; OGFOD3; BBS1; PRKRIP1; NOL9; TBL1XR1; ZNF768; THAP9; PALB2; TEFM; AAMDC; BBS10; SNIP1; ASB13; ASB7; KATNBL1; TXNDC15; CCDC82; KLHL36; FBXO31; HPS6; TTC21B; PTCD2; CAMKMT; METTL8; ZMYM1; GEMIN6; NHEJ1; ZBTB3; TMEM180; CSPP1; RPAP2; CBLL1; RABEP2; UBA5; TGS1; GGNBP2; ZNF672; NUP85; EIF2C3; PYROXD1; ACTR5; MRM1; KIAA0319L; SLC35E1; OBFC1; ZCCHC4; C10orf88; RMI1; FAM192A; PHC3; WWC2; NAA25; UBTD1; TMEM62; PANK2; FBXL18; GFM1; KLHL18; ZNF606; MZT2B; VCPIP1; RPF1; THOC7; CENPT; USP36; CTC1; MUS81; WDR19; CHD9; PROSER1; CCDC92; TM2D3; NAA50; COQ10B; ACSF2; C17orf70; SIK3; SLC35F5; FAM214B; C16orf70; EDEM3; ITPKC; GRPEL1; MED28; DNAJC5; WDR82; WDR61; TNKS2; THUMPD2; NDFIP1; CYB5B; ZNF34; WDR59; KLHL15; INTS5; EEPD1; DUSP16; SH3BP5L; SETD7; ACAP3;

[0082]

KIAA1715; MAP2K2; RAI1; TMX1; ILKAP; SLC25A32; CLPTM1L; PTDSS2; HM13; ITFG1; SGPP1; WBSCR16; C1orf21; CSRNP2; MRPS26; ANKRD13C; CCDC130; PLA2G12A; CTNNBL1; APOL2; TRIM8; SNX27; C6orf62; ISCA1; TRIM56; SBF2; MED25; SHARPIN; ARPC5L; RAB1B; QTRT1; SLC25A28; HDHD3; NECAB3; MRPS15; SF3B5; INO80B; RAB33B; HUWE1; MRPL9; RILP; COG3; GUCD1; ZMIZ2; FAM103A1; SELO; RIOK1; GRWD1; L3MBTL2; LONP2; RBM4B; BBS2; GORASP1; MRPS5; MRPL32; FRMD8; ATAD3B; TAF3; RSPH3; TMEM120A; SNX25; MRPS24; RNF26; STK40; C10orf11; EIF2A; TM2D1; ITFG3; SRSF8; MRPL14; MRPL43; RBM48; MAGT1; HDHD2; TMEM222; SLC10A7; KBTBD7; ANKRD27; ENKD1; CEP192; PCBD2; ZNF394; ATRIP; WDR75; USP42; TOMM40L; UTP15; PHAX; SLC7A6OS; FAM175B; KAT8; RNASEH2C; RPF2; SON; ANKRD17; CHD6; PCNXL3; ZCCHC7; SETD3; SGK196; TMEM117; WDR24; ZNRF1; TRAF7; MAF1; MED10; SLC37A3; DCUN1D5; POLR3GL; C9orf64; CHCHD5; C9orf89; POLDIP3; YIPF4; NOA1; COQ5; NICN1; PRADC1; BTBD10; TMEM79; NTPCR; TMEM175; ZDHHC16; ING5; UTP23; LLPH; MIEN1; MNF1; PDCD2L; MRPL45; BRMS1L; VPS25; LSMD1; ACBD6; DNAJC14; LZIC; APOPT1; TMEM101; ELOF1; GFM2; COG8; HPS3; C5orf4; MKI67IP; BAZ1B; PINK1; HOOK3; MSANTD4; SYVN1; ZNF333; FAM120B; CC2D1B; ZNF527; PPIL3; MRPS6; MRPL41; MRPL38; MRPL36; C14orf142; JAGN1; ZC3H8; MAK16; GNPTG; USP38; HIATL1; SMEK1; GLYR1; DPY30; FAM126A; USP32; HINT2; MCEE; LOXL3; USP30; FUT10; PCGF1; MPV17L2; TUBA1C; MFSD9; TXNDC17; LMNB2; PHF5A; LRCH3; KLHL22; CCDC142; CBR4; ZC3H10; PARP10; ZBTB45; SYAP1; SPPL2A; ADO; GTDC2; FAM73B; ATAD1; TBRG1; NFATC2IP; CEP89; ZNF341; FAM136A; TMEM87B; CIRH1A; PPP1R15B; FIZ1; DIRC2; SPRYD3; TMEM209; C8orf76; C12orf52; ATG4C; MUM1; WDR73; LACTB; ABHD13; LTV1; SERAC1; TIGD5; PRPF38A; ALKBH6; LSM10; ATG4D; PPP1R16A; PYURF; UBL7; TMEM128; TMEM141; TMEM60; C9orf37; POLR2C; CSRNP1; HIAT1; SYNE1; SARNP; EAF1; ALG2; ZCCHC3; PNPT1; RRP36; ZCRB1; NEK9; RBM18; SURF4; PIGS; LMF2; PPP1R3F; PURB; DGCR6L; BTBD6; MRPS36; C22orf32; MICALL1; KIAA1731; ZNF622; IMP4; METTL18; PGAP3; C9orf123; CDK11B; TPGS1; MFN1; INTS4; TRIM41; TP53RK; N4BP2L1; MMAB; CCDC97; GADD45GIP1; ADCK2; ZNF830; RFT1; MGME1; VPS26B; NACC1; MBD6; ESCO1; SMYD4; ATG4A; WDFY2; DNTTIP1; RBM33; TMEM203; EGLN2; MRPL53; SNAP47; TADA1; THEM4; GLMN; ANKH; KLHDC3; NAA15; TSR2; UBE2J2; LOH12CR1; SMIM11; FAM207A;

[0083]

RPUSD1; ZNF354B; MYO18A; SLC36A1; SCAMP4; PIGU; SLC44A1; ZSWIM1; B3GALT6; MED30; TMEM41A; CDKN2AIPNL; SLC35A4; DYNLL2; UBE2F; SRXN1; B3GAT2; ROMO1; DTD1; FAM210B; OVCA2; SPSB3; SOCS4; PRRC1; ELMO2; LRPPRC; WIPF2; RSPRY1; ZNF526; ZNF721; SAT2; HELQ; MED22; RAD52; NUP35; SPTSSA; PYGO2; FAM122A; KLC4; KIAA2013; FAM105B; SAMD1; C19orf52; CEP95; PRMT10; TTC5; OXNAD1; MTG1; G6PC3; TMEM183A; MARS2; NOM1; MVB12A; GTF3C6; KTI12; FAM195A; SAAL1; CASC4; C12orf57; MFSD3; MALSU1; ACYP2; BATF2; NUS1; GLI4; CDAN1; CYHR1; TECR; HINT3; TAF8; HAS3; PPP1R14B; MPLKIP; NDNL2; RHOT2; SLC25A46; ALKBH8; WDR85; ZNF653; GINM1; LEO1; ANKRD54; MITD1; TAMM41; HIGD2A; MSI2; SPPL3; PPIL4; ALKBH3; FGD4; MTFMT; PPM1L; TSTD2; EHD4; ORMDL3; WDR36; PPTC7; RPIA; SLC39A3; ANGEL2; HN1L; MAPK1IP1L; L3HYPDH; TEX261; LRRC28; FOPNL; ZC3H18; FLCN; CYB5D1; TBC1D20; TMEM42; NACC2; FAM76B; ZNF18; ZNF480; ZNF420; ZNF558; ZNF570; BROX; LSM14B; PUS10; SEPT10; CCDC12; SPICE1; THAP6; ZMAT2; APOA1BP; MBNL2; FAM91A1; DENND5B; ZNF564; IMMP1L; ZFC3H1; LRRC45; TSNARE1; CCNY; UBLCP1; UPRT; FUK; ZUFSP; OARD1; NSMCE1; FAM200A; ZSCAN25; SFT2D1; MAP2K7; NAPRT1; CSNK1A1L; VTI1A; MRPL30; OMA1; FRA10AC1; UBALD1; MRPL10; CCDC127; NUDCD2; C6orf57; ZBTB49; SLC15A4; ATPAF2; KIFC2; ABTB2; ZNF511; MTPN; CRYZL1; ZNF23; ZSCAN21; ZNRF2; SGMS1; RPP25L; SVIP; RPUSD2; C12orf23; CHMP7; ZNF585B; ARRDC1; ORAI3; ZNF561; TADA2B; TRMT61A; SLC36A4; ARL14EP; C12orf45; TARSL2; SPATA2L; LSM12; ZNF491; ZNF440; C1orf131; KCTD18; METTL6; GRPEL2; ZNF786; NDUFAF6; TMEM68; HGSNAT; ARHGAP42; KBTBD3; CWF19L2; C12orf66; LYSMD4; ZSCAN29; ZNF785; TMEM199; ZNF417; C19orf25; B3GALNT2; ZNF362; MROH8; COMMD1; KANSL1L; XXYLT1; SCFD2; TRMT44; SRFBP1; SNRNP48; ZNF579; ZNF383; SDE2; RNF168; MIER3; TCEANC; ARID2; UBE2E2; NANP; DENND6A; RWDD4; CCDC111; HIPK1; SENP5; STT3A; PATL1; EFHA1; CPNE2; NT5DC1; C6orf89; HIBADH; BRAT1; RICTOR; YTHDF3; TMEM256; MFSD8; D2HGDH; TAB3; TMEM18; UHRF2; TANGO2; N4BP1; TCEANC2; EID2; NPHP3; ZNF461; LRRC57; CNEP1R1; PUSL1; TMEM161B; ZNF791; TAPT1; KIAA1919; LNX2; AGXT2L2; MED19; COG7; CRYBG3; CPNE8; PIGP; ZFP1; C2orf69; ZNF367; AAED1; KDELC2; TTL; CACUL1; ZFPM1; MLL3; MLX; C11orf31; PGBD3; TRIM35; HSCB; CBWD2; RC3H1; TNFSF12-TNFSF13; SUGP1; MMAA; MRPL54; PSENEN;

[0084]

RUNDC1; FAM149B1; MMGT1; DCUN1D3; CCDC117; ZNF584; KCTD20; PRR14L; ANKRD52; DIP2B; INO80E; HEXDC; RTTN; ZNF776; SLC9A9; C3orf33; DCBLD1; NSMCE2; PDZD8; BLOC1S2; TTC9C; FAM126B; C3orf38; RABL3; COX18; SREK1IP1; KRTCAP2; NDUFAF2; PPP4R2; CCDC50; TMEM167A; NOP9; UBR1; ADCK5; N6AMT2; GPATCH11; ZNF575; EMC10; DDX51; UBR7; TXLNA; EXOC8; ZADH2; CRIPAK; C5orf51; CDK5RAP3; CHMP4B; ZNF800; GATC; INADL; NR2C2AP; MIDN; NUDT14; CYP20A1; P4HTM; PDE12; PPM1G; TUBB; GGT7; ERC1; FAM134C; SLC35B2; ZNF598; MRPL52; GMCL1; DRAM2; PIGW; ZNF616; ZBTB8OS; ZNF678; ZDHHC21; MTDH; ARL5B; AGPAT6; STT3B; GPR180; ZACN; MRPL55; GCC2; ZNF445; EXOSC8; MRPL21; AUP1; C17orf58; OGT; QSOX2; LYRM7; DNAJC24; BCDIN3D; GRASP; UBXN2A; CRTC2; METTL2A; TMTC3; DPY19L4; AASDH; TMED7; ZSCAN22; ZSCAN2; COQ6; USP12; ZNF227; ZNF428; MTERFD2; C9orf85; CMC1; ZNF595; NSUN6; TMED4; BRICD5; PDDC1; C15orf38; MRPS9; TPRG1L; TRNT1; TICAM1; HEATR3; ZNF326; CYP2U1; C9orf142; ARRDC4; HNRNPA3; DND1; ISCA2; SPTY2D1; RPS19BP1; PHLPP1; RNF126; C7orf55; TSC22D3; GNPNAT1; COX20; C1orf52; CCZ1B; GANC; ARSK; E2F6; LYSMD3; GANAB; APOOL; RSBN1L; C19orf54; RPL7L1; CCDC84; FAM174A; NHLRC2; ZNF710; HDDC3; ATP9B; ZNF773; MIA3; TMEM110; ACACA; FAM120AOS; NUP43; SS18L1; DHX57; NELFCD; NSUN4; NDUFAF3; CARM1; TMEM189-UBE2V1; CCDC137; NACA2; PHF17; FAHD2B; TMEM179B; CCDC23; FAM86A; SLC25A35; RP9; POLR1C; CHCHD1; RAPH1; TMEM81; RBM12B; MBLAC1; MRFAP1L1; COMMD6; C19orf70; CLYBL; MRAP; RNF216; GTF2H5; FAM199X; ERICH1; ZDHHC24; TSEN54; CYP4V2; C1orf174; BLOC1S3; METTL10; ZNF543; ZNF789; ZNF517; SFXN4.

[0085]

[0086] 일부 실시양태에서는, 참조 유전자(들)가 추가 qPCR에 의해 분석된다.

[0087] 일부 실시양태에서, 인프로세스 대조는 역전사효소 및/또는 PCR 성능에 대한 인프로세스 대조이다. 이러한 인프로세스 대조는, 비제한적인 예로서, RNA 단리 이후 및 역전사 이전에 스파이크되는 참조 RNA(본원에서 ref.RNA로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, ref.RNA는 Q베타와 같은 대조이다. 일부 실시양태에서, ref.RNA는 추가 PCR에 의해 분석된다.

[0088] 일부 실시양태에서, 추출된 핵산, 예를 들어, exoRNA는 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물의 검출에 기초하여 추가 분석된다.

[0089] 일부 실시양태에서, 추가 분석은 기계 학습 기반 모델링, 데이터 마이닝 방법, 및/또는 통계 분석을 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자의 질병 결과를 확인하거나 예측하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자 집단 내의 환자를 계층화하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자가 치료에 내성인지 여부를 확인하거나 예측하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 대상체의 무진행 생존 추이를 측정하기 위해 분석된다.

[0090] 일부 실시양태에서, 데이터는 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML-ALK 융합 전사물이 검출될 때에 대상체에 대한 치료 옵션을 선택하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 크리조티닙(Xalkori)을 이용한 치료이다. 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 크리조티닙이 기능을 하지 않거나 또는 충분히 용인되지 않는다면 세리티닙(Zykadia) 또는 알렉티닙(Alecensa)을 이용한 치료이다. 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 치료법들의 병용 치료이다.

[0091] 본 발명의 다양한 양태들 및 실시양태들이 지금부터 상세히 설명될 것이다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 세부 사항들의 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 추가로, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형은 복수형을 포함하고 복수형 용어는 단수를 포함한다.

[0092] 확인된 모든 특허, 특허 출원 및 공보는 예를 들어 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 그러한 공보에 기재된 방법론을 기술하고 개시하기 위한 목적으로 본원에 인용에 의해 명시적으로 포함된다. 이들 공보는 본 출원의 출원일 이전에 그 개시에 대해서만 제공된다. 이와 관련하여 발명자가 선행 발명으로서 또는 기타 다른 이유로

그러한 개시에 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 이들 문서의 내용에 대한 날짜 또는 제시에 관한 모든 진술은 출원인이 입수 가능한 정보를 기반으로 하며 이러한 문서의 날짜 또는 내용의 정확성을 인정하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 비소세포 폐암(NSCLC)에서 EML4-ALK 변이체의 분포를 도시한 그래프이다. 이 도면은 ALK-재배열된 비소세포 폐암의 치료를 위한 Ou 등의 크리조티닙으로부터 적합화되었다: 종양학에서 분자 표적 치료의 제2의 10년을 알리는 성공 사례, The Oncologist, vol. 17(11): 1351-75 (2012).

도 2는 혈장으로부터의 EML4-ALK 융합 전사물의 검출을 위한 EXO501a 작업 흐름의 개략적인 도면이다.

도 3은 조직-상관 NSCLC 혈장 샘플의 EXO501a 분석을 도시한 그래프이다.

도 4a, 4b, 및 4c는 각 EML4-ALK 변이체(도 4a: v1; 도 4b: v2; 및 도 4c: v3a,b,c)의 검출을 위한 EXO501a 표준 곡선을 도시한 일련의 그래프이다.

도 5는 세포주-유래 EML4-ALK v1 융합 전사물의 검출을 위한 EXO501a 검정의 2가지 다른 테스트와의 비교를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 본 개시 내용은 예를 들면, 암과 같은 질병의 진단, 예후, 모니터링, 또는 치료 선택을 보조하기 위해 생물학적 샘플에서 ALK 융합 전사물과 같은 하나 이상의 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암(NSCLC)이다.

[0095] 본원에 제공된 방법 및 키트는 혈장 샘플에서 EML-ALK 융합 전사물을 검출하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, ALK 융합 전사물은 EML4-ALK 융합 전사물이다. 일부 실시양태에서, EML4-ALK 융합 전사물은 EML4-ALK v1, EML4-ALK v2, EML4-ALK v3, 및 이들의 임의의 조합이다.

[0096] EML4-ALK 전좌는 비소세포 폐암(NSCLC)에서 예측 드라이버 돌연변이이다. EML4-ALK 전좌는 몇몇 변이체를 포함하며, 이의 임상적 대다수는 v1, v2, 및 v3이다 (도 1). 이러한 전좌의 존재가 EGFR 억제제에 대한 내성과 FDA 승인 ALK 키나아제 억제제의 약효성(druggability)을 결정하기 때문에, 각 융합 전사물의 분자 프로파일링은 치료의 중요한 전제 조건이다. 진행중인 임상 시험 및 맞춤 치료를 위한 새로운 ALK 억제제의 개발은 견고한 진단법의 개발을 요구한다.

[0097] EML4-ALK 융합물의 현재의 결정은 조직 생검 및 미세 바늘 흡인(외과적 합병증, 조직의 이용 가능성 및 샘플 이질성에 의해 제약되는 기법)에 의존한다. 현재의 조직 기반 분자 프로파일링의 단점을 보완하고 NSCLC 환자의 진단 절차를 간소화하기 위해, 본원에 기재된 방법 및 키트는 단일 혈액 추출을 통해 융합 전사물을 신속하게 검출하기 위해 본원에서 "EXO501a"로 지칭되는 혈장 기반 검정을 제공한다. 이 액체 생검 진단은 EML4-ALK 양성 환자의 비수술적 치료 지도 및 종방향 모니터링에 가치있는 이점을 제공할 잠재력을 갖는다.

[0098] 현재의 폐암 진단은 병리학자들에 의해 행해지고, 종양 조직을 샘플링하는 것은 상당한 내재적 한계를 가지며, 예를 들어 종양 조직은 시간상의 단일 스냅샷이고, 종양 이질성에 기인한 선택 바이어스를 겪으며, 획득이 어려울 수 있다. 일부 경우에, 일부 환자에서는 충분한 종양 조직 샘플을 입수할 수 없고/거나 조직 샘플을 얻는 것은 기흉과 같은 합병증을 유발할 수 있다. 그러나, 지금까지, 환자 계층화를 위한 참조 비표준 방법은 조직 생검이었다.

[0099] 본원에 제공된 키트 및 방법은, 핵산(세포외 RNA 및 DNA)의 혈류로의 방출을 유도하는 여러 과정이 있기 때문에, 전체 질병 프로세스 및 종양 환경을 관찰하는 능력을 이용한다. 이들 프로세스 중, 예를 들면, 세포사멸 및 괴사가 있다. 세포사멸성 또는 괴사성 세포는 세포사멸성 소포에서 또는 순환 뉴클레오솜으로서 무세포 DNA(cfDNA)를 방출할 수 있다. 부가적으로, 엑소좀은, 원형질막으로부터 직접, 또는 RNA를 순환계(exoRNA)로 전달하는 다소포체 경로를 통해, 살아있는 세포에 의해 능동적으로 방출된다. 환자 샘플에서 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML4-ALK 융합 전사물을 검출하는 현행 방법과 대조적으로, 본원에 제공된 방법 및 키트는 종양 내에서 동시에 일어나는 모든 프로세스를 분석할 수 있다.

[0100] 이들 방법 및 키트는 신규하며: 엑소좀 RNA 분획에서 ALK 융합 전사물, 예를 들어, EML4-ALK 융합 전사물의 검출은 새롭다. 이들 방법 및 키트는, 진단 검정에 사용될 수 있는 종양 유래 RNA가 혈액에 들어 있다는 것이 단

지 최근에 이해되어졌기 때문에, 현행 방법에 비해 자명하지 않다.

[0101] 따라서, 본원에 기재된 방법 및 키트는 현재 입수 가능한 검출 방법 및 키트보다 다수의 이점을 제공한다. 액체 생검은, 조직과 달리, 기준선에서 NSCLC 환자의 혈장에서 예측 바이오마커 EML4-ALK를 검출하고 치료 도중 종방향으로 모니터링하는데 있어 비침습적이며 위험도가 낮은 방법이다. 또한, EXO501a 검정은 엑소좀 RNA에 대해 NSCLC 환자의 혈장으로부터의 개개 융합 변이체의 높은 특이성을 갖는 EML4-ALK를 검출한다. 게다가, qPCR-기반 액체 생검 검정의 세포 RNA에 대한 성능은 다른 시험 키트의 성능을 상회한다. 본원에서 제공된 실시예에 나타낸 바와 같이, EXO501a 검정은 EML4-ALK v1/v2/v3 변이체 각각의 개별 결정을 허용한다. 그러나, 시판중인 현행 키트는 이들 변이체의 개별 결정을 허용하지 않는다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 키트는 혈장으로부터 엑소좀 RNA(exoRNA)를 분리하고 분석하여 v1, v2, v3a, b, c로 지칭되는 5개의 별개의 EML4-ALK 융합 전사물에 대한 높은 특이성을 갖는 돌연변이의 검출을 제공하는 qPCR-기반 EML4-ALK 액체 생검 검정이다. 이들 5개의 융합 전사물은 공지된 EML4-ALK 융합물의 최대 85%를 차지한다. 융합 전사물의 동정은 표적 치료 선택을 알리는 데 점점 더 중요하다.

[0103] EML4-ALK는 NSCLC를 갖는 모든 환자의 대략 3 내지 5%에서 발견되는 유전자 융합물이다. EML4-ALK에 대한 현재의 시험 표준은 조직 생검으로부터의 FISH 또는 IHC이다. NSCLC 환자의 조직은 종종 입수 가능하지 않다. 따라서, 본원에 제공된 방법 및 키트는 다른 방법으로 시험될 수 없었던 그러한 집단에 공헌하는 것을 돕는다.

[0104] 이들 방법 및 키트는, 예를 들면, EML4-ALK 돌연변이를 검출하기 위한 안정되고 고품질의 exoRNA를 분석하는 능력; 치료 선택에 점차 중요성이 높아지고 있는 높은 특이성의 별개의 융합 전사물(v1, v2, v3a, b, c)을 검출하는 능력; 종방향 시험을 수행하는 능력; 조직 샘플을 필요로 하지 않고 분자 분석을 가능하게 하고 조직 희소성 및/또는 균질성의 결여와 같은 이슈를 피할 수 있는 능력; 및 대상체로부터 신선한 또는 냉동/보관된 혈장 샘플을 사용할 수 있는 유연성과 같은 다수의 주요 이점을 제공한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용은 (a) 피험체로부터의 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 단계; (c) 미세소포로부터 하나 이상의 핵산을 추출하는 단계; 및 (d) 추출된 핵산에서 ALK 융합 전사물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계에 의해 필요로 하는 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태에 대한 진단, 예후, 모니터링 또는 치료 선택을 위한 방법을 제공하며, 여기서 추출된 핵산에서 ALK 융합 전사물의 존재는 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 존재를 나타내거나 대상체가 질병 또는 다른 의학적 병태로 발전할 보다 높은 소인을 나타낸다.

[0106] 일부 실시양태에서, ALK 융합 전사물은 EML4-ALK 융합 전사물이다. 일부 실시양태에서, EML4-ALK 융합 전사물은 EML4-ALK v1, EML4-ALK v2, EML4-ALK v3a, EML4-ALK v3b, EML4-ALKv3c, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, EML4-ALK 융합 전사물은 하기의 EML4-ALK 융합 전사물: EML4-ALK v1, EML4-ALK v2, EML4-ALK v3a, EML4-ALK v3b, 및 EML4-ALKv3c의 조합이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 체액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈장 또는 혈청이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 암이다. 일부 실시양태에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 폐암이다. 일부 실시양태에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 비소세포 폐암(NSCLC)이다.

[0109] 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 생물학적 샘플로부터 엑소좀 RNA의 단리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 단리된 엑소좀 RNA의 역전사를 추가로 포함한다.

[0110] 일부 실시양태에서는, 대조 핵산 또는 대조 입자 또는 이들의 조합이 역전사 반응에 스파이크된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 단리된 엑소좀 RNA의 역전사 이후에 사전 증폭 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 사전 증폭 단계는 양성 증폭 대조의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양성 증폭 대조는 EML4-ALK v1을 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v2를 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v3을 코딩하는 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 참조 DNA, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합은 PCR 기반 방법을 사용하여 정량화된다. 일부 실시양태에서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합은 qPCR을 사용하여 정량화된다.

[0112] 일부 실시양태에서, 사전 증폭 단계는 음성 증폭 대조의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 음성 증폭 대조는 EML4-ALK v1을 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v2를 코딩하는 참조 DNA, EML4-ALK v3을 코딩하는 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 참조 DNA, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합은 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 PCR 기반 방법을 사용하여 정량화된다. 일부

실시양태에서, 참조 핵산 또는 참조 핵산들의 조합은 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 qPCR을 사용하여 정량화된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 시퀀싱 기반 검출 기법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 기반 검출 기법은 PCR 기법 또는 차세대 시퀀싱 기법을 포함한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 하나 이상의 대조를 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 대조는 하우스키핑 유전자이다. 일부 실시양태에서, 하우스키핑 유전자는 RPL4이다. 일부 실시양태에서, 대조는 단계 (c)의 추출에 스파이크된 Q베타의 발현 수준이다.

[0115] 일부 실시양태에서, 본 방법은 단계 (d)로부터의 데이터를 분석하여 사이클 역치(CT) 값의 검출된 수준에 따라 샘플을 양성 또는 음성으로 계층화하는 단계 (e)를 추가로 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 EML4-ALK 변이체 1의 수준이 적어도 31 이하의 사이클 역치(CT)이고, EML4-ALK 변이체 2의 수준이 적어도 32 이하의 CT 값이며, EML4-ALK 변이체 3의 수준이 적어도 32 이하의 CT 값인 경우 생물학적 샘플을 양성으로서 확인하는 것을 포함한다.

[0117] 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 하기의 사이클 역치(CT) 값: EML4-ALK 변이체 1의 수준이 적어도 31 이상의 CT 값, EML4-ALK 변이체 2의 수준이 적어도 32 이상의 CT 값, 및 EML4-ALK 변이체 3의 수준이 적어도 32 이상의 CT 값인 것 중 적어도 하나가 생물학적 샘플에서 검출되는 경우 생물학적 샘플을 음성으로서 확인하는 것을 포함한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 본 방법은 기계 학습 기반 모델링, 데이터 마이닝 방법, 및/또는 통계 분석을 사용하여 단계 (d)로부터의 데이터를 분석하는 단계 (e)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자의 질병 결과를 확인하거나 예측하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자 집단 내의 환자를 계층화하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 환자가 항암 요법을 이용한 치료에 내성인지를 확인하거나 예측하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는, 환자가, 비제한적인 예로서, EGFR 억제제를 이용한 치료와 같은 EGFR 요법을 이용한 치료에 내성인지를 확인하거나 예측하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 대상체의 무진행 생존 추이를 측정하기 위해 분석된다. 일부 실시양태에서, 데이터는 EML4-ALK 전사물이 검출될 때 대상체에 대한 치료 옵션을 선택하기 위해 분석된다.

[0119] 일부 실시양태에서, 본 방법은 대상체에 치료 유효량의 항암 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 치료법들의 병용 치료이다.

[0120] 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 크리조티닙(Xalkori)을 이용한 치료이다. 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 크리조티닙이 기능을 하지 않거나 또는 충분히 용인되지 않는다면 세리티닙(Zykadia) 또는 알렉티닙(Alecensa)을 이용한 치료이다.

[0121] 일부 실시양태에서, 치료 옵션은 EGFR 억제제를 이용한 치료이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 티로신 키나아제 억제제 또는 티로신 키나아제 억제제들의 조합이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 제1 세대 티로신 키나아제 억제제 또는 제1 세대 티로신 키나아제 억제제들의 조합이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 제2 세대 티로신 키나아제 억제제 또는 제2 세대 티로신 키나아제 억제제들의 조합이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 제3 세대 티로신 키나아제 억제제 또는 제3 세대 티로신 키나아제 억제제들의 조합이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 제1 세대 티로신 키나아제 억제제, 제2 세대 티로신 키나아제 억제제, 및/또는 제3 세대 티로신 키나아제 억제제의 조합이다. 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 엘로티닙, 제피티닙, 또 다른 티로신 키나아제 억제제, 또는 이들의 조합이다.

[0122] 본원에 기재된 방법 및 키트는 미세소포를 표면에 포획하고 그 후에 미세소포를 용해시켜 그 속에 함유된 핵산, 특히 RNA를 방출시킴으로써 미세소포를 단리한다. 미세소포는 세포 외부로, 진핵 세포에 의해 흘려지거나 또는 원형질막으로부터 출아된다. 이러한 막 소포는 크기가 불균일하며 직경이 약 10 nm 내지 약 5000 nm의 범위이다. 이러한 미세소포는 미세소포, 미세소포-유사 입자, 프로타솜(prostasome), 덱소솜(dexosome), 텍소솜(texosome), 엑토솜(ectosome), 온코솜(oncosome), 세포사멸체, 레트로바이러스-유사 입자, 및 인간의 내인성 레트로바이러스(HERV) 입자를 포함한다. 소포의 엑소시토시스에 의해 방출되는 작은 미세소포(직경이 대략 10 내지 5000 nm, 좀더 빈번하게는 30 내지 200 nm)가 당업계에서 "미세소포"로서 지칭된다.

[0123] 미세소포는 모든 세포에 의해 배설되고 모든 인간의 생체 유체 내에 존재하는 고품질 핵산의 풍부한 공급원이다. 미세소포의 RNA는 원발 종양, 전이 및 주변 미세 환경의 전사체의 스냅샷을 실시간으로 제공한다.

따라서, 검정에 의한 미세소포의 RNA 프로파일의 정확한 평가는 동반 진단 및 질병의 실시간 모니터링을 제공한다. 이 개발은 느리고, 지루하고, 가변적이며 진단 환경에 적합하지 않은 엑소 좀을 단리하는 현재의 표준에 의해 중단되었다.

[0124] 본원에 제공된 단리 및 추출 방법 및/또는 키트는 미세소포에 결합하는 친화성 막을 사용하는 스핀-컬럼 기반 정제 프로세스를 사용한다. 단리 및 추출 방법은 PCT 공보 번호 WO 2016/007755 및 WO 2014/107571에 추가적으로 기재되어 있으며, 각각의 내용은 그 전문이 본원에 기재된다. 본 개시 내용의 방법 및 키트는, 단일 컬럼 상에서 0.2 내지 최대 4 mL의 부피를 사용하여 다수의 임상 샘플을 병행 실행하는 역량을 허용한다. 단리된 RNA는 용해시까지 소포 막에 의해 보호되어 매우 순수하며, 온전한 소포가 막으로부터 용출될 수 있다. 단리 및 추출 과정은 모든 mRNA를 혈장 인풋으로부터 고갈시킬 수 있으며, 초원심분리 또는 직접 용해와 비교할 때 mRNA/miRNA 수율에 있어 대등하거나 더 우수하다. 이에 반해, 본원에 제공된 방법 및/또는 키트는 miRNA의 미세소포 결합 분획을 풍부하게 하며 대량의 인풋 물질로 쉽게 확장할 수 있다. 이러한 확장 능력은 흥미롭고, 풍부하지 않은 전사물에 대한 연구를 가능하게 한다. 다른 시판품과 비교해서, 본 개시 내용의 방법 및 키트는 본원에 제공된 실시예에 의해 입증된 독특한 능력을 제공한다.

[0125] 핵산의 추출 전 생물학적 샘플로부터 미세소포의 단리는 하기의 이유로 인해 유리하다: 1) 미세소포로부터 핵산을 추출하는 것은 유체 샘플 내의 다른 미세소포와는 별도로 질병 또는 종양 특이적 미세소포를 단리함으로써 얻어진 질병 또는 종양 특이적 핵산을 선택적으로 분석할 기회를 제공함; 2) 핵산 함유 미세소포는 미세소포를 우선 단리하지 않고 유체 샘플로부터 핵산을 직접 추출하여 수득 한 수율/무결성(온전성)과 비교하여 더 높은 무결성을 갖는 핵산 종의 상당히 더 높은 수율을 생성함; 3) 예를 들어, 낮은 수준으로 발현된 핵산을 검출하기 위한 확장성, 본원에 기재된 방법을 사용하여 보다 큰 부피의 샘플로부터 미세소포를 농축시킴으로써 민감성을 증가시킬 수 있음; 4) 생물학적 샘플 내에서 자연적으로 발견되는 단백질, 지질, 세포 파편, 세포 및 기타 잠재적인 오염 물질 및 PCR 억제제가 핵산 추출 단계 전에 제외된다는 점에서 추출된 핵산의 보다 순수하거나 더 높은 품질/무결성; 및 5) 단리된 미세소포 분획은 시작 샘플 부피보다 작은 부피를 가질 수 있으므로 핵산을 작은 부피의 컬럼 필터를 사용하여 이들 분획 또는 펠릿으로부터 핵산을 추출할 수 있으므로 핵산 추출 방법에서 더 많은 선택이 이용가능함.

[0126] 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 몇몇 방법이 당업계에 기재되어 있다. 예를 들면, 분획 원심분리의 방법은 Raposo 등의 논문(Raposo et al., 1996), Skog 등의 논문(Skog et al., 2008) 및 Nilsson 등의 논문(Nilsson et al., 2009)에 기재되어 있다. 이온 교환 및/또는 겔 침투 크로마토그래피의 방법은 미국 특허 번호 6,899,863 및 6,812,023에 기재되어 있다. 수크로스 밀도 구배 또는 세포 소기관 전기영동 방법이 미국 특허 번호 7,198,923에 기재되어 있다. 자기 활성화 세포 분류(MACS) 방법은 Taylor 및 Gercel Taylor의 논문(Taylor and Gercel-Taylor, 2008)에 기재되어 있다. 나노막 한외여과 농축 방법은 Cheruvanky 등의 논문(Cheruvanky et al., 2007)에 기재되어 있다. Percoll 구배 단리 방법은 Miranda 등에 의한 공보(Miranda et al., 2010)에 기재되어 있다. 나아가, 미세소포는 미세유체 디바이스에 의해 대상체의 체액으로부터 동정 및 단리될 수 있다(Chen et al., 2010). 핵산 바이오마커의 상업적 적용뿐 아니라 연구 및 개발에 있어서, 생물학적 샘플로부터 고품질의 핵산을 일관되고, 신뢰할 만하며, 실용적인 방식으로 추출하기를 원한다.

[0127] 핵산 추출

[0128] 본원에 개시된 방법은 상기 미세소포로부터 고품질 핵산의 추출을 위해 고도로 농축된 미세소포 분획을 사용한다. 본원에 개시된 방법에 의해 얻어진 핵산 추출물은 예를 들어, 암과 같은 질병 또는 의학적 병태의 진단, 예후 또는 모니터링에 사용하기 위한 것과 같이, 고품질의 핵산 추출이 요구되거나 바람직한 각종 적용 분야에 유용할 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 키트는 비소세포 폐암(NSCLC)의 진단을 위해 EML4-ALK 융합 전사물을 검출하는데 유용하다.

[0129] 단리된 미세소포의 품질 또는 순도는 추출된 미세소포 핵산의 품질에 직접적으로 영향을 미칠 수 있으며, 이후 질병의 진단, 예후, 및/또는 모니터링을 위한 바이오마커 검정의 효율 및 감도에 직접적으로 영향을 미친다. 임상 분야에서 정확하고 민감한 진단 테스트의 중요성을 감안할 때, 생물학적 샘플로부터 고농축 미세소포 분획을 단리하는 방법이 필요하다. 이러한 요구를 해결하기 위해, 본 발명은 생물학적 샘플로부터 고품질 핵산의 추출을 위해 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 방법을 제공한다. 본원에 나타낸 바와 같이, 고농축 미세소포 분획은 본원에 기재된 방법에 의해 생물학적 샘플로부터 단리되며, 그 후 고품질 핵산이 고농축 미세소포 분획으로부터 추출된다. 이러한 고품질의 추출된 핵산은 질병 또는 다른 의학적 병태의 진단, 예후, 및/또는 모니터링을 보조하기 위한 바이오마커의 존재 또는 부재를 측정 또는 평가하는데 유용하다.

[0130] 본원에서 사용시, 용어 "생물학적 샘플"은 DNA, RNA 및 단백질과 같은 생물학적 재료를 함유한 샘플을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 적합하게는 대상체로부터의 체액을 포함할 수 있다. 체액은 대상체의 신체의 어느 부위, 예를 들면, 말초 위치로부터 단리된 유체일 수 있으며, 예를 들면, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 가래, 척수액, 뇌척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 호흡기, 장관, 및 비뇨생식기관의 유체, 눈물, 타액, 모유, 림프계로부터의 유체, 정액, 장기내 시스템 유체, 복수, 종양 낭액, 양수 및 세포 배양 상청액, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 체액은 혈장이다. 적합하게는 약 0.1 ml 내지 약 30 ml 유체의 샘플 부피가 사용될 수 있다. 유체의 부피는 몇몇 인자, 예를 들어, 사용되는 유체의 종류에 좌우될 수 있다. 예를 들면, 혈청 샘플의 부피는 약 0.1 ml 내지 약 4 ml, 예를 들면, 약 0.2 ml 내지 4 ml일 수 있다. 혈장 샘플의 부피는 약 0.1 ml 내지 약 4 ml, 예를 들면, 0.5 ml 내지 4 ml일 수 있다. 소변 샘플의 부피는 약 10 ml 내지 약 30 ml, 예를 들면, 약 20 ml일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 배설물 또는 맹장 샘플 또는 이로부터 단리된 상청액을 포함할 수 있다.

[0131] 용어 "대상체"는 핵산 함유 입자를 갖는 것으로 나타나거나 예상되는 모든 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 특정 실시양태들에서, 대상체는 포유류, 인간 또는 비인간 영장류, 개, 고양이, 말, 소, 다른 가축, 또는 설치류(예를 들어 마우스, 래트, 기니피그 등)이다. 인간 대상체는 질병과 같은 관찰 가능한 이상이 없는 정상적인 인간일 수 있다. 인간 대상체는 질병과 같은 관찰 가능한 이상이 있는 인간일 수 있다. 관찰 가능한 이상은 인간 자신에 의해 또는 의료 전문가에 의해 관찰될 수 있다. 용어 "대상체", "환자" 및 "개체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0132] 본원에서 사용시, 용어 "핵산"은 DNA 및 RNA를 지칭한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 경우에, 핵산은 DNA이다. 일부 경우에, 핵산은 RNA이다. RNA는 메신저 RNA, 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 비-코딩 RNA, 마이크로RNA, 및 HERV 요소를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0133] 일부 실시양태에서, 고품질 핵산 추출은 18S 및 28S rRNA를 검출할 수 있는 추출이다. 일부 실시양태에서, 추출된 18S 및 28S rRNA의 정량화는 핵산 추출의 품질을 결정하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 18S 및 28S rRNA의 정량화는 대략 1:1 내지 대략 1:2; 예를 들면, 대략 1:2의 비에 있다. 이상적으로, 본원에 기재된 방법에 의해 얻어진 고품질 핵산 추출물은 또한 저단백질 생물학적 샘플(예를 들어, 소변)의 경우 5 이상, 또는 고단백질 생물학적 샘플(예를 들어, 혈청)의 경우 3 이상의 RNA 무결성 수치, 및 20 ml 저단백질 생물학적 샘플 또는 1 ml 고단백질 생물학적 샘플로부터 50 pg/ml 이상의 핵산 수율을 가질 것이다.

[0134] RNA 분해는, 예컨대 유전자 발현 및 mRNA 분석에서뿐만 아니라, 스몰 RNA 및 마이크로RNA와 같은 비-코딩 RNA의 분석에서, 추출된 RNA의 다운스트림 평가에 악영향을 미칠 수 있기 때문에, 고품질 RNA 추출이 바람직하다. 본원에 기재된 신규의 방법은 미세소포 내의 핵산의 정확한 분석이 수행될 수 있도록 생물학적 샘플로부터 단리된 미세소포로부터 고품질 핵산의 추출을 가능하게 한다.

[0135] 생물학적 샘플로부터 미세소포의 단리 이후에, 핵산이 단리된 또는 농축된 미세소포 분획으로부터 추출될 수 있다. 이를 달성하기 위해, 일부 실시양태에서, 미세소포는 우선 용해될 수 있다. 미세소포의 용해 및 핵산의 추출은 PCT 공보 번호 WO 2016/007755 및 WO 2014/107571(각각의 내용은 전문이 인용에 의해 본원에 포함됨)에 기재된 것들을 포함한 당업계에 공지된 각종 방법으로 달성될 수 있다. 이러한 방법은 또한 미세소포 내에 함유된 핵산을 포획하기 위해 핵산 결합 컬럼을 사용할 수 있다. 일단 결합되면, 핵산은 핵산과 결합 컬럼 사이의 상호 작용을 방해하기에 적합한 완충제 또는 용액을 사용하여 용출되어 핵산을 성공적으로 용출시킬 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 핵산 추출 방법은 또한 생물학적 샘플로부터 고품질 핵산 추출을 방지하는 불리한 인자를 제거하거나 완화시키는 단계를 포함한다. 이러한 불리한 인자는 다른 생물학적 샘플이 다양한 종류의 불리한 인자를 내포할 수 있다는 점에서 이질적이다. 일부 생물학적 샘플에서, 과도한 DNA와 같은 인자는 그러한 샘플로부터의 핵산 추출의 품질에 영향을 미칠 수 있다. 다른 샘플에서는, 과도한 내인성 RNase와 같은 인자가 그러한 샘플로부터 핵산 추출의 품질에 영향을 미칠 수 있다. 다수의 작용제 및 방법이 이러한 불리한 인자를 제거하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법 및 작용제는 본원에서 집합적으로 "추출 촉진 조작"으로서 지칭된다. 일부 경우에, 추출 촉진 조작은 생물학적 샘플에 핵산 추출 촉진제의 첨가를 수반할 수 있다. 내인성 RNase와 같은 불리한 인자를 제거하기 위해, 본원에서 정의된 바와 같은 그러한 추출 촉진제는 RNase 억제제 예컨대 Superase-In(Ambion Inc.로부터 시판) 또는 RNaseINplus(Promega Corp.로부터 시판), 또는 유사한 방식으로 작용하는 다른 작용제; (RNase 억제제로서 작용할 수 있는) 프로테아제; DNase; 환원제; 디코이(decoy) 기질 예컨대 합성 RNA 및/또는 캐리어 RNA; RNase와 결합할 수 있는 가용성 수용체; 작은 간섭 RNA(siRNA); RNA 결합 분자, 예컨대 항-RNA 항체, 염기성 단백질 또는 샤페론 단백질; RNase 변성 물질, 예컨대 고 삼투압 용액, 세제, 또는 이

들의 조합을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0137] 예를 들면, 추출 촉진 조작은 핵산 추출 이전에 생물학적 샘플에, 및/또는 단리된 미세소포 분획에 RNase 억제제의 첨가를 포함할 수 있으며; 예를 들면, 일부 실시양태에서, RNase 억제제는 부피가 1 ㎕ 이상인 샘플의 경우 0.027 AU (1X) 초과의 농도를 가지고; 대안으로, 1 ㎕ 이상의 샘플의 경우 0.135 AU (5X) 이상의 농도를 가지며; 대안으로, 1 ㎕ 이상의 샘플의 경우 0.27 AU (10X) 이상의 농도를 가지고; 대안으로, 1 ㎕ 이상의 샘플의 경우 0.675 AU (25X) 이상의 농도를 가지며; 대안으로, 1 ㎕ 이상의 샘플의 경우 1.35 AU (50X) 이상의 농도를 가지고; 여기서 1X 농도는 1 ㎕ 이상의 체액에서 단리된 미세소포를 처리하기 위해 0.027 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소적 조건을 지칭하고, 5X 농도는 1 ㎕ 이상의 체액에서 단리된 미세소포를 처리하기 위해 0.135 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소적 조건을 지칭하며, 10X 프로테아제 농도는 1 ㎕ 이상의 체액에서 단리된 입자를 처리하기 위해 0.27 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소적 조건을 지칭하고, 25X 농도는 1 ㎕ 이상의 체액에서 단리된 미세소포를 처리하기 위해 0.675 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소적 조건을 지칭하며, 50X 프로테아제 농도는 1 ㎕ 이상의 체액에서 단리된 입자를 처리하기 위해 1.35 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소적 조건을 지칭한다. 일부 실시양태에서, RNase 억제제는 프로테아제이며, 이 경우, 1 AU는 분당 1 μmol 티로신에 상응하는 폴리(folin)-양성 아미노산 및 펩티드를 방출하는 프로테아제 활성이다.

[0138] 이들 촉진제는 다양한 방식으로, 예를 들어, RNase 활성을 저해함으로써(예를 들어, RNase 억제제), 단백질의 유비퀴터스 열화에 의해(예를 들어, 프로테아제), 또는 RNA에 결합하여 이를 보호하는 샤페론 단백질을 통해(예를 들어, RNA-결합 단백질) 자신의 기능을 발휘할 수 있다. 모든 경우에, 이러한 추출 촉진제는 단리된 입자로부터의 핵산의 고품질 추출을 방지하거나 방해할 수 있는 단리된 입자와 관련되거나 또는 생물학적 샘플 내의 불리한 인자의 일부 또는 전부를 제거하거나 적어도 완화시킨다.

[0139] 핵산 바이오마커의 검출

[0140] 단리된 입자에 존재하는 핵산의 분석은 정량적 및/또는 정성적이다. 정량적 분석의 경우, 단리된 입자 내에서 관심있는 특정 핵산의 (상대적 또는 절대적) 양(발현 수준)은 당업계에 공지된 방법(하기 기재됨)으로 측정된다. 정성적 분석의 경우, 단리된 미세소포 내의 관심있는 특정 핵산의 종이, 야생형이든 변이체든 상관없이, 당업계에 공지된 방법으로 동정된다.

[0141] 본 발명은 또한 (i) 대상체의 진단을 보조하거나, (ii) 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 진행 또는 재발을 모니터링하거나, 또는 (iii) 질병 또는 다른 의학적 병태에 대한 치료를 받고 있거나 고려하고 있는 대상체에 대한 치료 효능의 평가를 보조하기 위한 고품질 핵산 추출을 위해 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 신규 방법의 다양한 용도를 포함하며; 여기서 상기 방법으로부터 얻어진 핵산 추출물 중의 하나 이상의 바이오마커의 존재 또는 부재가 결정되고, 하나 이상의 바이오마커는 질병 또는 다른 의학적 병태의 진단, 진행 또는 재발, 또는 치료 효율 각각과 관련된다.

[0142] 일부 실시양태에서, 미세소포의 핵산을 분석하기 이전에 이를 증폭시키는 것이 유리하거나 바람직할 수 있다. 핵산의 증폭 방법은 통상적으로 사용되고 당업계에 일반적으로 알려져 있으며, 이의 다수의 예가 본원에 기재된다. 원한다면, 증폭은 정량적으로 수행될 수 있다. 정량적 증폭은 다양한 핵산의 상대적인 양을 정량적으로 결정하여 유전적 또는 발현 프로파일을 생성한다.

[0143] 일부 실시양태에서, 추출된 핵산은 RNA를 포함한다. 이 경우, RNA는 추가 증폭 이전에 상보적 DNA(cDNA)로 역전사된다. 이러한 역전사는 단독으로 또는 증폭 단계와 조합으로 수행될 수 있다. 역전사 및 증폭 단계를 조합하는 방법의 일례는, 정량적으로 추가 변형될 수 있는 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR), 예를 들어, 미국 특허 번호 5,639,606(이의 교시는 인용에 의해 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같은 정량적 RT-PCR이다. 이 방법의 또 다른 예는 별개의 두 단계: RNA를 cDNA로 전환하기 위해 역전사하는 제1 단계 및 정량적 PCR을 사용하여 cDNA의 양을 정량하는 제2 단계를 포함한다. 이하의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본원에 개시된 방법을 사용하여 핵산 함유 입자로부터 추출된 RNA는 리보솜 18S 및 28S rRNA, 마이크로RNA, 트랜스퍼 RNA, 질병 또는 의학적 병태와 연관된 전사물, 및 의학적 병태의 진단, 예후 및 모니터링에 중요한 바이오마커(이에 한정되지 않음)를 포함한 다수 종의 전사물을 포함한다.

[0144] 예를 들면, RT-PCR 분석은 각 반응에 대한 CT(사이클 역치) 값을 결정한다. RT-PCR에서, 양성 반응은 형광 신호의 축적에 의해 검출된다. CT 값은 형광 신호가 임계 값을 넘는(즉, 배경 레벨을 초과하는)데 필요한 사이클의 수로서 정의된다. CT 레벨은 샘플 중의 타겟 핵산, 또는 대조 핵산의 양에 반비례한다 (즉, CT 레벨이 낮을수록, 샘플 중의 대조 핵산의 양이 커진다).

[0145] 또 다른 실시양태에서, 대조 핵산의 카피 수는 RT-PCR(이에 한정되지 않음)을 포함한 당업계에 인지된 각종 기법 중 임의의 기법을 사용하여 측정될 수 있다. 대조 핵산의 카피 수는 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 예컨대 보정, 또는 표준 곡선을 생성 및 사용함으로써 결정될 수 있다.

[0146] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 바이오마커는 본원에서 핵산 함유 입자 내의 핵산 변이체뿐만 아니라 핵산 양을 나타내기 위해 사용되는 유전자 이상 중 하나 또는 이들의 집합일 수 있다. 구체적으로, 유전자 이상은 전사물 변이체, 유전자(예를 들어, 종양유전자) 또는 유전자의 패널의 과발현, 유전자(예를 들어, 종양 억제제 유전자 예컨대 p53 또는 RB) 또는 유전자의 패널의 과소 발현, 유전자 또는 유전자의 패널의 스플라이스 변이체의 대체 생산, 유전자 카피 수 변이체(CNV)(예를 들어, DNA 더블 미닛) (Hahn, 1993), 핵산 변형(예를 들어, 메틸화, 아세틸화 및 인산화), 단일 뉴클레오티드 다형(SNP), 염색체 재배열(예를 들어, 역전, 결실 및 중복), 및 유전자 또는 유전자의 패널의 돌연변이(삽입, 결실, 중복, 미스센스, 넌센스, 동의의 또는 임의의 다른 뉴클레오티드 변화)를 포함하지만 이에 한정되지 않고, 돌연변이는, 다수의 경우에, 궁극적으로 유전자 산물의 활성 및 기능에 영향을 미치고 다른 전사 스플라이스 변이체 및/또는 유전자 발현 수준의 변화를 일으키거나 또는 상기 것들의 조합일 수 있다.

[0147] 핵산 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) (미국 특허 번호 5,219,727) 및 이의 변형 예컨대 인시츄 폴리머라제 연쇄 반응(미국 특허 번호 5,538,871), 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(미국 특허 번호 5,219,727), 네스티드 폴리머라제 연쇄 반응(미국 특허 번호 5,556,773), 자립 서열 복제 및 이의 변형(Guatelli et al., 1990), 전사 증폭 시스템 및 이의 변형(Kwoh et al., 1989), Qb 레플리카제 및 이의 변형(Miele et al., 1983), 콜드-PCR(Li et al., 2008), BEAMing(Li et al., 2006) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않고, 이후에 당업자에게 익히 알려진 기법을 사용하여 증폭된 분자의 검출이 뒤따른다. 그러한 분자가 매우 적은 수로 존재하는 경우 핵산 분자의 검출을 위해 고안된 이러한 검출 스킴이 특히 유용하다. 상기 참고 문헌들은 이러한 방법의 교시에 대해 본원에 포함된다. 다른 실시양태에서는, 핵산 증폭 단계가 실시되지 않는다. 대신에, 추출된 핵산이 직접적으로 (예를 들어, 차세대 시퀀싱을 통해) 분석된다.

[0148] 이러한 유전자 이상의 결정은 숙련인에게 알려진 각종 기법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 핵산의 발현 수준, 대체 스플라이싱 변이체, 염색체 재배열 및 유전자 카피 수는 마이크로어레이 분석(예를 들어, 미국 특허 번호 6,913,879, 7,364,848, 7,378,245, 6,893,837 및 6,004,755 참조) 및 정량적 PCR에 의해 결정될 수 있다. 특히, 카피 수 변화는 Illumina Infinium II 전체 게놈 유전형질분석 검정 또는 Agilent Human Genome CGH 마이크로어레이(Steemers et al., 2006)로 검출될 수 있다. 핵산 변형은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,186,512 및 특허 공보 WO2003/023065에 기재된 방법에 의해 검정될 수 있다. 특히, 메틸화 프로파일은 Illumina DNA 메틸화 OMA003 암 패널에 의해 결정될 수 있다. SNP 및 돌연변이는 대립유전자 특이적 프로브를 이용한 혼성화, 효소적 돌연변이 검출, 미스매치된 헤테로이중쇄의 화학적 절단(Cotton et al., 1988), 미스매치된 염기의 리보뉴클레아제 절단(Myers et al., 1985), 질량 분석법(미국 특허 번호 6,994,960, 7,074,563, 및 7,198,893), 핵산 시퀀싱, 단일 가닥 형태 다형(SSCP)(Orita et al., 1989), 변성 구배 겔 전기영동(DGGE)(Fischer and Lerman, 1979a; Fischer and Lerman, 1979b), 온도 구배 겔 전기영동(TGGE)(Fischer and Lerman, 1979a; Fischer and Lerman, 1979b), 제한 단편 길이 다형(RFLP)(Kan and Dozy, 1978a; Kan and Dozy, 1978b), 올리고뉴클레오티드 라이게이션 검정(OLA), 대립유전자 특이적 PCR(ASPCR)(미국 특허 번호 5,639,611), 라이게이션 연쇄 반응(LCR) 및 이의 변형(Abravaya et al., 1995; Landegren et al., 1988; Nakazawa et al., 1994), 유동-세포계측 헤테로이중쇄 분석(WO/2006/113590) 및 이들의 조합/변형에 의해 검출될 수 있다. 특히, 유전자 발현 수준은 유전자 발현의 연속 분석(SAGE) 기법에 의해 결정될 수 있다(Velculescu et al., 1995). 일반적으로, 유전자 이상을 분석하는 방법은 다수의 공보(본원에 인용된 것에 한정되지 않음)에서 보고되고 있으며, 숙련된 실시자에 의해 입수 가능하다. 적절한 분석 방법은 분석의 특정 목적, 환자의 상태/병력, 및 검출, 모니터링 또는 치료될 특정 암(들), 질병 또는 다른 의학적 병태에 좌우될 것이다. 상기 참고 문헌들은 이러한 방법의 교시에 대해 본원에 포함된다.

[0149] 다수의 바이오마커는 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 존재 또는 부재와 연관된다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라, 단리된 입자로부터의 핵산 추출물에서 ELK4-AKL 융합 전사물의 존재 또는 부재의 검출은 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태 예컨대 NSCLC의 진단을 보조한다.

[0150] 추가로, 다수의 바이오마커는 대상체에서 질병 또는 의학적 상태의 모니터링을 도울 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라, 단리된 입자로부터의 핵산 추출물에서 이러한 바이오마커의 존재 또는 부재의 검출은 대상체에서 질병 또는 다른 의학적 병태의 진행 또는 재발을 모니터링하는 것을 보조할 수 있다.

[0151] 다수의 바이오마커는 또한 특정 환자에서 치료의 효과성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라, 단리된 입자로부터의 핵산 추출물에서 이러한 바이오마커의 존재 또는 부재의 검출은 정해진 환자에서 정해진 치료의 효능을 평가하는 것을 보조할 수 있다. 환자의 생물학적 샘플로부터 단리된 입자로부터 추출된 핵산에서 이들 바이오마커의 동정은 환자에 대한 치료의 선택을 가이드할 수 있다.

[0152] 본 발명의 상기 양태의 특정 실시양태들에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 신생물 질환 또는 병태(예를 들어, 암 또는 세포 증식성 장애)이다. 일부 실시양태에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 폐암이다. 일부 실시양태에서, 질병 또는 다른 의학적 병태는 비소세포 폐암(NSCLC)이다.

[0153] 생물학적 샘플로부터 미세소포를 단리하는 키트

[0154] 본 발명이 하나의 양태는 추가로 본원에 개시된 방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다. 키트는 생물학적 샘플에 또한 존재하는 원치 않은 입자, 파편, 및 소분자로부터 미세소포를 분리하기에 충분한 포획 표면 장치, 및 ELK4-ALK 융합 전사물 검출 수단을 포함한다. 본 발명은 또한 경우에 따라 단리 및 임의적인 차후의 핵산 추출 프로세스에서 상기 시약의 사용을 위한 설명서를 포함한다.

[0155] **실시예**

[0156] **실시예 1: EXO501a 검정 작업 흐름**

[0157] 도 2는 폐암 환자(NSCLC)의 혈장으로부터 EML4-ALK 융합 전사물을 검출하기 위한 EXO501a 검정의 작업 흐름을 도시한 흐름도이다. EXO501a 검정은 각종 EML4-ALK 융합 전사물 예컨대 v1 / v2 / v3 a,b,c의 변이체 특이적 검출을 허용하기 때문에 유리하다. 또한, 이 검정을 사용하여 ALK wt 또는 융합(ref.RNA를 기반으로 함)의 위양성 검출이 이루어지지 않았고, 2 ml 혈장 샘플에서 ref.RNA의 5 카피가 발견되었으므로 이 검정은 둘 모두 특이적이다.

[0158] EXO501a를 일관되게 그리고 재현가능하게 이용하여 EML4-ALK 융합물의 분석 및 정량화를 위한 NSCLC 환자 혈장 5 밀리리터로부터 고품질 미세소포 RNA(즉, 혈장 샘플의 미세소포 분획으로부터 추출된 RNA)를 충분한 양으로 단리했다.

[0159] 부가적으로, 일부 실시양태에서, EXO501a는 대조를 사용하여 실행될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 혈장 샘플은 혈장 품질의 지시자로서 사용되는 참조 유전자에 대해 분석된다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자(들)는 혈장 고유의 전사물이다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자(들)는 EML4, RPL4, NDUFA1, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자(들)는 추가 qPCR에 의해 분석된다.

[0160] EXO501a 검정에 사용될 수 있는 추가적인 대조는 역전사효소 및/또는 PCR 성능에 대한 인프로세스 대조를 포함한다. 이러한 인프로세스 대조는 RNA 단리 이후 및 역전사 이전에 스파이크되는 참조 RNA(본원에서 또한 ref.RNA로서 지칭됨)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, ref.RNA는 대조 예컨대 Q베타이다. 일부 실시양태에서, ref.RNA는 추가 PCR에 의해 분석된다.

[0161] **실시예 2: 환자 샘플의 EXO501a 분석**

[0162] EXO501a 검정은 비소세포 폐암(NSCLC) 환자에서 유효성이 입증되었다. 예시적인 결과가 도 3에 제시된다. 개념의 증거로서, 조직-상관 혈장 샘플을 EML4-ALK v1/v2/v3 변이체 각각의 존재에 대해 분석했다.

[0163] 부가적으로, 양성 혈장 샘플은 증가된 ALK 발현에 대해 qPCR에 의해 확인되었다. 29명의 환자의 코호트에서, 위양성 샘플은 검출되지 않았으며; 진양성의 색인은 정해진 환자 샘플의 증가된 수에 기초하여 결정될 것이다.

[0164] **실시예 3: EXO501a 검정 성능의 평가**

[0165] EXO501a 검정의 재현성 및 감도를, 도 2에 도시된 작업 흐름의 RT 단계에서 건강한 환자 혈장으로 스파이크된 합성 참조 RNA를 적용함으로써 EML4-ALK 융합 전사물의 각 변이체에 대해 평가했다. 이 분석의 결과가 도 4에 도시된다.

[0166] 검출 한계(LOD)는 반응당 2.5 카피로서 결정되었다. 검정 특이성은 EML4-ALK의 변이체 특이적 검출에 대해 100%로서 확인되었으며, qPCR의 효율은 92-100% 범위이다.

[0167] 부가적으로, 다운스트림 분석 플랫폼으로서 EXO501a 검정의 성능을 평가하여 2가지 시판용 테스트와 비교하였다. EML4-ALK v1 발현 세포주의 총 RNA를 사용하여, EML4/ALK 검출을 위한 2가지 시판용 테스트: Amoy Diagnostics 및 Qiagen을 사용하여 EXO501a를 비교했다 (도 5). 검출 한계를 모니터링한 결과, EML4-ALK v1-특

이적 분석에 대해 경쟁자에 비해 보다 우수한 EXO501a 성능이 관찰되었다.

[0168] EXO501a 검정의 성능은, FISH(형광 인시츄 혼성화)와 같은 기법을 이용한 EXO501a 검정의 비교를 포함한 다수의 다른 방식으로 평가될 수 있다.

[0169] **실시예 4: EML4-ALK 융합 변이체의 검출을 위한 EXO501a qPCR**

[0170] EXO501a 검정을, EML4-ALK 융합물 v1, v2, v3(a,b,c) 각각의 변이체 특이적 검출을 위해 개발했다.

[0171] EML4-ALK 융합물은, EML4의 변이체-결정 서열에 결합하는 하나의 올리고뉴클레오티드 및 ALK 엑손 21-엑손 29의 서열에 특이적으로 결합하는 제2 올리고뉴클레오티드를 갖는 임의의 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 사용하는 qPCR 방법에 의해 검출될 수 있다. EML4-ALK 융합 변이체에 대한 타겟 영역은 하기 표 1에 제시된다.

표 1

표 1. 프라이머 설계 타겟

[0172]

융합 변이체	융합 중단점을 커버하는 엑손
EML4-ALK v1	*EML4 엑손13* / **ALK 엑손20**
EML4-ALK v2	*EML4 엑손20* / **ALK 엑손20**
EML4-ALK v3a	*EML4 엑손5-엑손6* / **ALK 엑손20**
EML4-ALK v3b	*EML4 엑손5-엑손6-인트론6(33nt 삽입)* / **ALK 엑손20**
EML4-ALK v3c	*EML4 엑손5-엑손6* / **ALK 인트론19(18nt 삽입)- 엑손20**

[0173] 각 변이체의 qPCR 검출을 위한 선택된 타겟 및 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 프로브가 표 2에 제시된다.

[0174] 일부 실시양태에서, EML4-ALK v1의 qPCR 검출은 표 2에 정의된 바와 같은 프라이머 #1, #8 및 프로브 #24의 조합을 사용하여 수행된다.

[0175] 일부 실시양태에서, EML4-ALK v2의 qPCR 검출은 표 2에 정의된 바와 같은 프라이머 #1, #9 및 프로브 #24의 조합을 사용하여 수행된다.

[0176] 일부 실시양태에서, EML4-ALK v3의 qPCR 검출은 표 2에 정의된 바와 같은 프라이머 #1, #10 및 프로브 #24의 조합을 사용하여 수행된다.

표 2

표 2. 프라이머의 타겟 영역

올리고뉴클레오티드 수#	뉴클레오티드 특징	EML4-ALK 상의 결합 부위	특이적인 EML4-ALK 융합 변이체의 검출
1	역방향 프라이머	ALK 엑손20	정방향 프라이머에 의해 정의됨
2	역방향 프라이머	ALK 엑손20	정방향 프라이머에 의해 정의됨
3	역방향 프라이머	ALK 엑손20	정방향 프라이머에 의해 정의됨
4	역방향 프라이머	ALK 엑손20	정방향 프라이머에 의해 정의됨
5	역방향 프라이머	ALK 엑손20	정방향 프라이머에 의해 정의됨
8	정방향 프라이머	EML4 엑손13	EML4-ALK v1
9	정방향 프라이머	EML4 엑손20	EML4-ALK v2
10	정방향 프라이머	EML4 엑손 5	EML4-AK v3
11	정방향 프라이머	EML4 엑손 13	EML4-ALK v1
12	정방향 프라이머	EML4 엑손5/6	EML4-AK v3
13	정방향 프라이머	EML4엑손6 ALK 엑손20	EML4-ALK v2
14	정방향 프라이머	EML4엑손13 ALK엑손20	EML4-ALK v2
15	정방향 프라이머	EML4엑손6 ALK 엑손20	EML4-ALK v2
16	정방향 프라이머	EML4엑손13 ALK 엑손20	EML4-ALK v2
17	정방향 프라이머	EML4 엑손13	EML4-ALK v1
18	정방향 프라이머	EML4 엑손20 ALK 엑손20	EML4-ALK v2
19	정방향 프라이머	EML4 엑손20	EML4-ALK v2
20	정방향 프라이머	EML4 엑손5/6	EML4-AK v3
21	정방향 프라이머	EML4 엑손5/6	EML4-AK v3
22	정방향 프라이머	EML4 엑손6	EML4-AK v3
23	프로브	ALK 엑손20	프라이머에 의해 정의됨
24	프로브	ALK 엑손20	프라이머에 의해 정의됨
25	프로브	ALK 엑손20	프라이머에 의해 정의됨
26	프로브	ALK 엑손20	프라이머에 의해 정의됨

[0177]

[0178] **실시예 5: 시험 결과의 정의를 위한 EXO501a 알고리즘**

[0179] EXO501a 검정은 EML4-ALK 융합 변이체 1, 2, 3(a,b,c) 각각의 존재/부재에 대한 결과를 확인하기 위해 정의된 알고리즘을 사용한다:

[0180] **단계 1:** 각 샘플에 대해, 샘플 무결성 검사 및 샘플 저해 검사에 대한 허용 기준을 통과하는지에 대해 조사한다.

[0181] 일부 실시양태에서, 샘플 무결성 검사는 qPCR에 의해 시험되는 하우스키핑 유전자 RPL4의 발현 수준이다.

[0182] RPL4의 경우 허용 기준은 CT 값 ≤ 28로 정의된다.

[0183] 일부 실시양태에서, 샘플 저해 검사는 각 샘플의 역전사 반응에 스파이크되고 qPCR에 의해 시험되는 Q베타 RNA의 발현 수준이다.

[0184] Q베타 RNA의 경우 허용 기준은 역전사 반응으로 스파이크된 12,500 카피에 대해 CT 값 ≤ 34로 정의된다.

[0185] **단계 2**: 샘플의 각 작업량에 대해, 병행하여 시험되는 한 세트의 양성 증폭 대조를 조사한다.

[0186] 일부 실시양태에서, 양성 증폭 대조는 EML4-ALK v1, v2 v3을 코딩하는 3개의 참조 DNA, RPL4를 코딩하는 1개의 참조 DNA, Q베타를 코딩하는 1개의 참조 RNA로 정의된다. 이들 참조 핵산은 qPCR 방법에 의해 정량화된다.

[0187] EML4-ALK DNA의 경우 허용 기준은 역전사 반응으로 스파이크되는 각 DNA의 50 카피에 대해 CT 범위 22-25로 정의된다.

[0188] RPL4 DNA의 경우 허용 기준은 역전사 반응으로 스파이크되는 DNA의 125,000 카피에 대해 CT 범위 26-28로 정의된다.

[0189] Q베타 RNA의 경우 허용 기준은 역전사 반응으로 스파이크되는 RNA 12,500 카피에 대해 CT 범위 28-31로 정의된다.

[0190] **단계 3**: 샘플의 각 작업량에 대해, 병행하여 시험되는 한 세트의 음성 증폭 대조를 조사한다.

[0191] 일부 실시양태에서, 음성 증폭 대조는 핵산 주형 대신에 물을 사용하는 것을 제외하고 양성 증폭 대조와 동일한

세트의 qPCR에 의해 정의된다.

[0192] 허용 기준으로서, CT 값이 검출되지 않아야 한다.

[0193] 모든 샘플-내부 및 외부 검사를 통과하면, 샘플에 대해 단계 4에서 EML4-ALK를 조사한다.

[0194] 샘플-내부 또는 외부 검사를 통과하지 않으면, 샘플은 "**불확정**"으로 보고된다. 잔여 샘플 재료가 입수 가능하다면, 시험을 단계 1로부터 반복한다.

[0195] **단계 4**: 각 샘플에 대해 EML4-ALK 융합 변이체의 발현에 대한 허용 기준을 통과하는지에 대해 조사한다.

[0196] EML4-ALK 변이체 1의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 31이다.

[0197] EML4-ALK 변이체 2의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 32이다.

[0198] EML4-ALK 변이체 3의 qPCR에 대해 허용 기준은 CT ≤ 32이다.

[0199] 샘플이 허용 기준을 통과하면, 이러한 EML4-ALK 변이체에 대해 "**양성**"으로서 보고된다. 변이체의 존재는 상호 배타적일 것으로 예상된다.

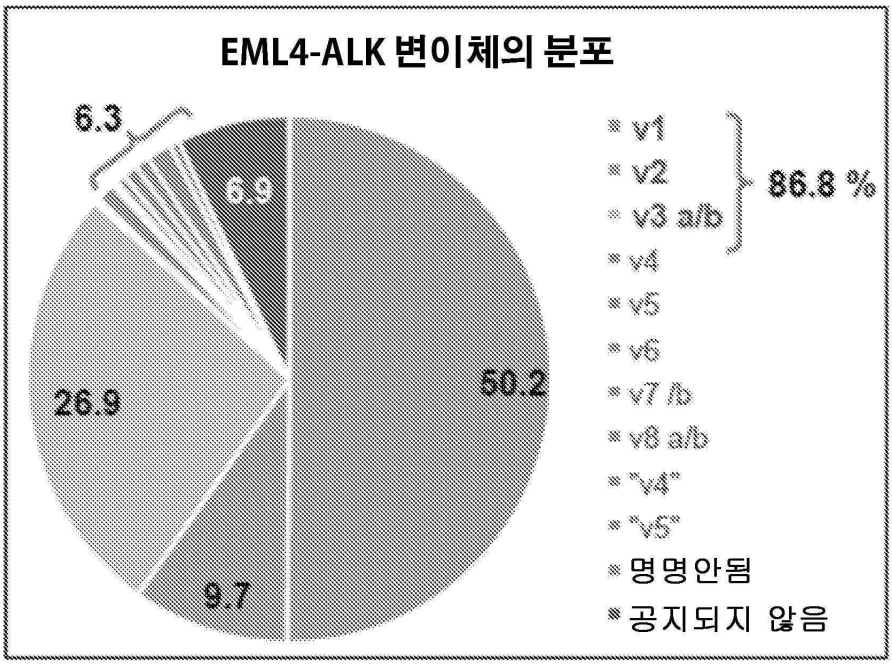
[0200] 샘플이 EML4-ALK에 대한 허용 기준을 통과하지 못하면, "**음성**"으로서 보고된다.

[0201] **다른 실시양태들**

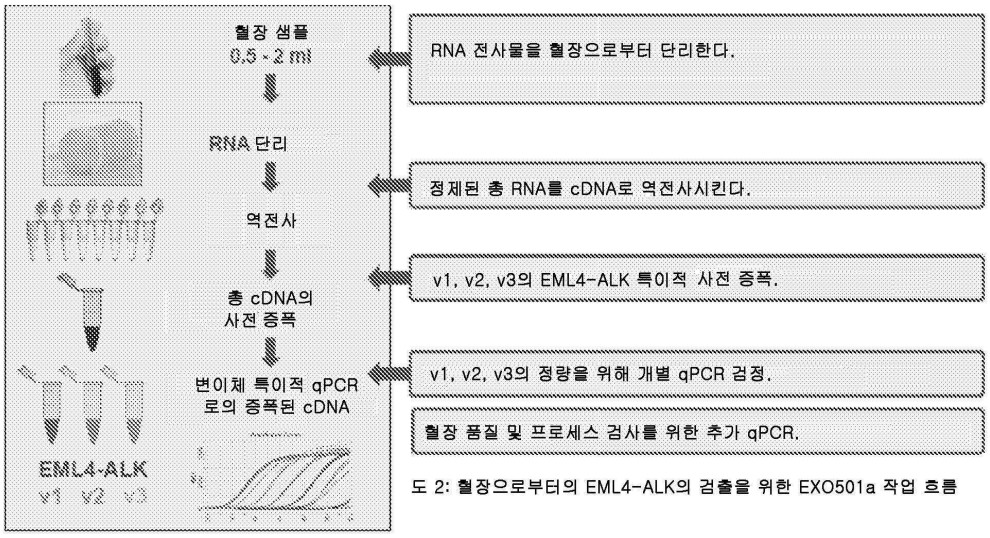
[0202] 본 발명이 그 상세한 설명과 연계하여 설명되었지만, 전술한 설명은 예시하기위한 것이며 첨부된 청구 범위의 범위에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다. 다른 양태, 이점, 및 변경이 본 발명의 범위 내에 포함된다.

도면

도면1

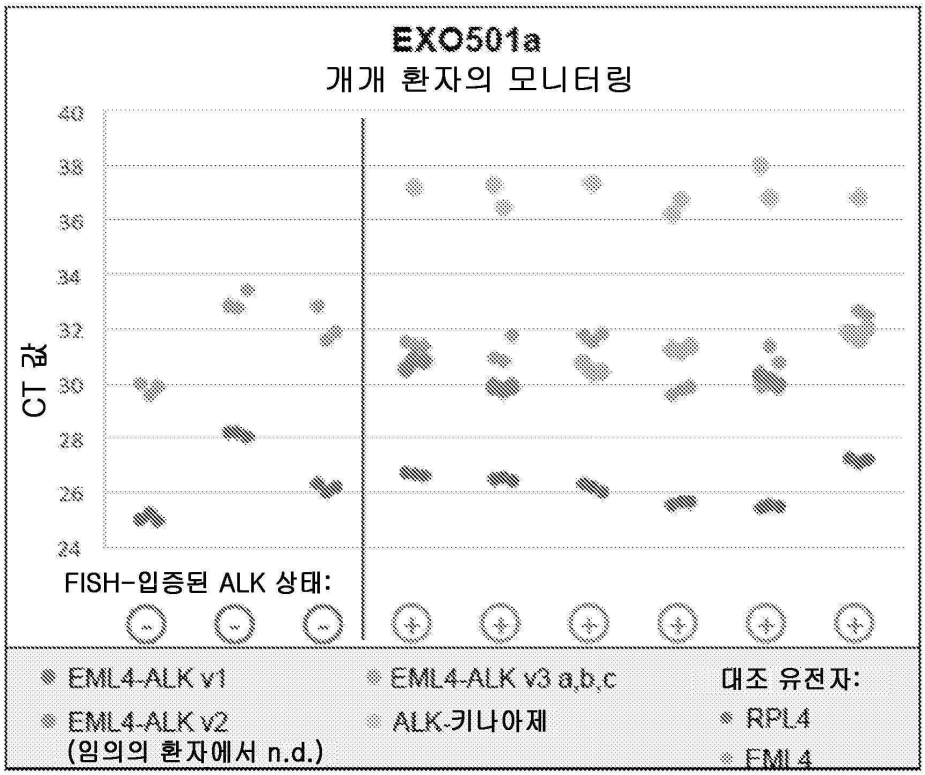


도면2

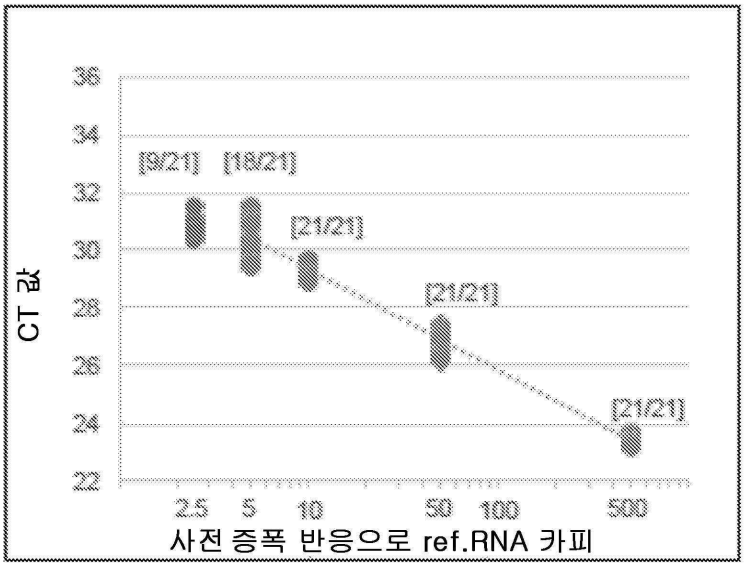


도 2: 혈장으로부터의 EML4-ALK의 검출을 위한 EXO501a 작업 흐름

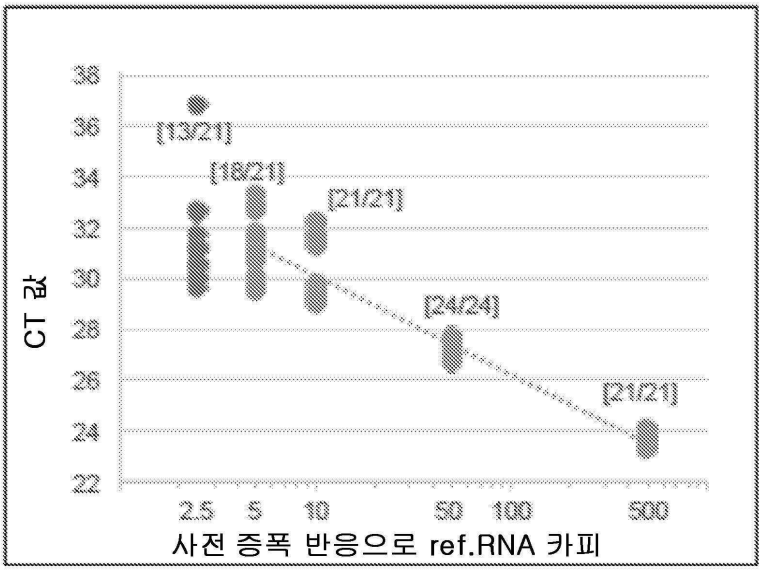
도면3



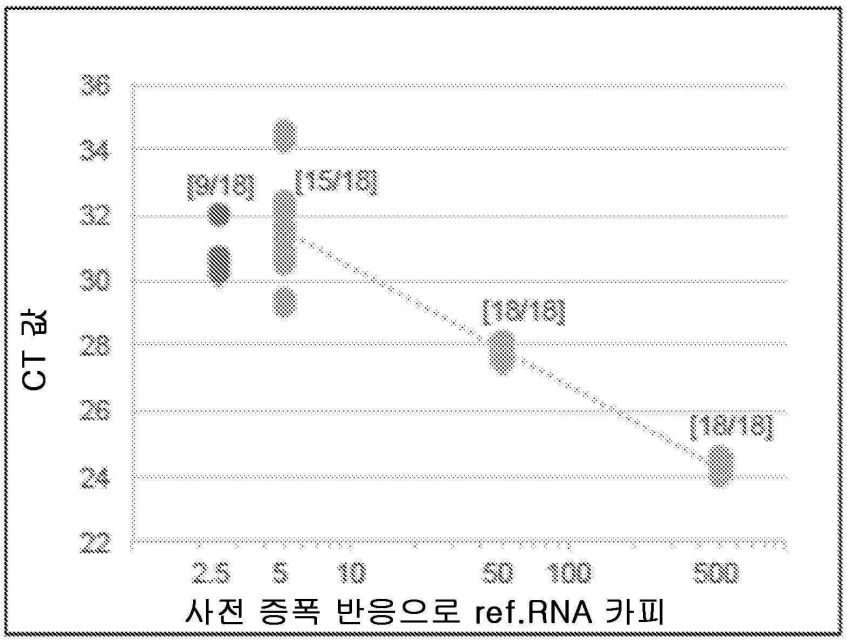
도면4a


36
34
32
30
28
26
24
22
CT 값
[9/21]
[18/21]
[21/21]
[21/21]
[21/21]
2.5
5
10
50
100
500
사전 증폭 반응으로 ref.RNA 카피

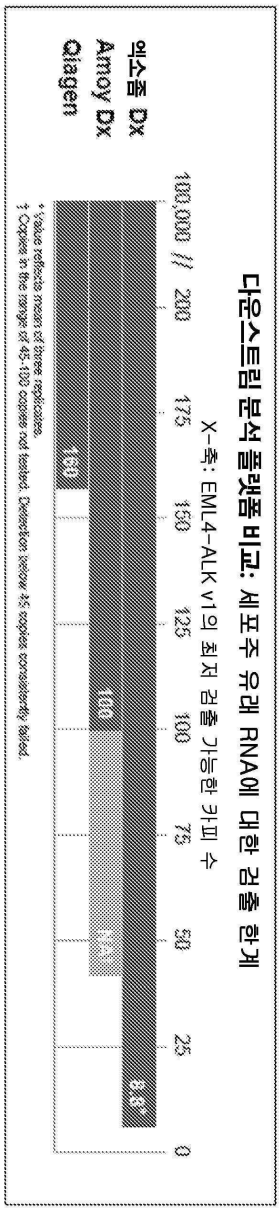
도면4b


38
36
34
32
30
28
26
24
22
CT 값
[13/21]
[18/21]
[21/21]
[24/24]
[21/21]
2.5
5
10
50
100
500
사전 증폭 반응으로 ref.RNA 카피

도면4c


36
34
32
30
28
26
24
22
CT 값
[9/18]
[15/18]
[18/18]
[18/18]
2.5
5
10
50
100
500
사전 증폭 반응으로 ref.RNA 카피

도면5


다운스트림 분석 플랫폼 비교: 세포주 유래 RNA에 대한 검출 한계
X-축: EML4-ALK v1의 최저 검출 가능한 카피 수
100,000
200
175
150
125
100
75
50
25
0
엑소좀 Dx
Amoy Dx
Qiagen
100
100
N/A
N/A
* Value reflects mean of three replicates.
† Copies in the range of 45-100 copies not tested. Detection below 45 copies consistently failed.