



공개특허 10-2025-0006325



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006325  
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/6886* (2018.01) *C12Q 1/6827* (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12Q 1/6886* (2022.01)  
*C12Q 1/6827* (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2024-7042357(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2018년02월27일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2019-7025327  
원출원일자(국제) 2018년02월27일  
심사청구일자 2021년02월22일  
(85) 번역문제출일자 2024년12월20일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/019982  
(87) 국제공개번호 WO 2018/160576  
국제공개일자 2018년09월07일  
(30) 우선권주장  
62/464,800 2017년02월28일 미국(US)

(71) 출원인  
메이오 파운데이션 포 메디칼 에쥬케이션 앤드 리  
씨치  
미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200  
이그잭트 사이언시즈 코포레이션  
미국 위스콘신 53719 메디슨 인데비 레인 5505  
(72) 발명자  
알퀴스트, 데이비드 에이.  
미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼  
에쥬케이션 앤드 리씨치 내  
테일러, 윌리엄 알.  
미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼  
에쥬케이션 앤드 리씨치 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 105 항

(54) 발명의 명칭 전립선 암의 검출

### (57) 요 약

전립선 암 스크리닝 기술, 및 특히, 비배타적으로, 상기 전립선 암의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

**키셀, 존 비.**

미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼 에  
쥬케이션 앤드 리씨치 내

**앱, 트레이시 씨.**

미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼 에  
쥬케이션 앤드 리씨치 내

**마호니, 더글라스 더블유.**

미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼 에  
쥬케이션 앤드 리씨치 내

---

**듀케, 브라이언 에이.**

미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼 에  
쥬케이션 앤드 리씨치 내

**게트먼, 메튜 티.**

미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트  
에스.더블유. 200 메이오 파운데이션 포 메디칼 에  
쥬케이션 앤드 리씨치 내

**알라위, 하림 티.**

미국 위스콘신 53719 매디슨 차머니 드라이브 441  
이그젝트 싸이언스 디블롭먼트 컴팩니, 엘엘씨 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 환자의 샘플을 특징화하는 방법으로서,

- a) 인간 환자의 샘플로부터 DNA를 수득하는 단계;
- b) 표 1 또는 표 13의 DMR 1-140으로 이루어진 군으로부터 선택된 차별적 메틸화 영역 (differentially methylated region: DMR) 내에 염기를 포함하는 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정(assay)하는 단계;
- c) 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 검정된 메틸화 상태를, 전립선 암을 갖지 않은 인간 환자를 위한 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 수준 기준과 비교하는 단계를 포함하는, 인간 환자의 샘플을 특징화하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 샘플이 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 샘플이 전립선 조직 샘플이고, 상기 DMR이 DMR 번호 63, 3, 64, 70, 7, 39, 8, 10, 11, 12, 14, 41, 81, 16, 17, 18, 20, 21, 44, 25, 및 47로부터 선택되거나: 또는

상기 샘플이 혈장 샘플이고 상기 DMR이 DMR 번호 17, 12, 45 및 47로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 복수 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 2 내지 11 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 12 내지 140 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 샘플 내의 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계가 1개 염기의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 샘플 내의 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계가 복수 개의 염기

의 메틸화 정도를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 순방향 가닥(forward strand)의 메틸화 상태를 결정하는 단계 또는 역방향(reverse strand) 가닥의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 100 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 500 개 이하의 염기 영역인 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 1000 개 이하의 염기 영역인 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 5000 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 1개의 염기인, 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, 상기 DNA 메틸화 마커가 높은 CpG 밀도의 프로모터 내에 있는, 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 상기 결정 단계가 메틸화 특이적 폴리머라제 연쇄반응, 핵산 서열분석, 질량분광분석, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량-기반 분리, 또는 표적 포획을 이용하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 결정 단계가 서열 번호 1-234로부터 선택된 메틸화 특이적 올리고뉴클레오티드의 사용을 포함하는, 방법.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석(annotation)을 갖는 염색체 영역이 상기 DNA 메틸화 마커를 포함하는, 방법: ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6,

HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.7278028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11 및 TPM4\_8047.

### 청구항 19

제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역이 상기 DNA 메틸화 마커를 포함하는 것인 방법: SERPINB9\_3479, FL0T1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487.

### 청구항 20

제1항에 있어서, max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역이 상기 DNA 메틸화 마커를 포함하는, 방법.

### 청구항 21

인간 환자로부터 수득된 샘플을 특징화하는 방법으로서,

- 제 1 및 제 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR 내에 염기를 포함하는 샘플 내에 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계;
- 상기 환자 샘플의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를, 전립선 암을 갖지 않은 인간 대상체의 정상 대조 샘플의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태와 비교하는 단계;
- 상기 인간 환자 및 상기 정상 대조 샘플의 메틸화 상태의 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함하는, 인간 환자로부터 수득된 샘플을 특징화하는 방법:

### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고, 상기 p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 또는 0.0001인, 방법.

### 청구항 23

인간 대상체로부터 수득된 샘플을 특징화하는 방법으로서, 상기 방법은, DMR을 포함하는 핵산과 바이설파이트 시약을 반응시켜, 바이설파이트-반응된 핵산을 생성시키는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산을 서열분석하여, 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 제공하는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열과, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오티드 서열을 비교하여 상기 2개의 서열의 차이를 동정하는 단계를 포함하는, 인간 대상체로부터 수득된 샘플을 특징화하는 방법.

### 청구항 24

인간 대상체로부터 수득된 샘플을 특징화하는 시스템으로서, 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 상기 샘플의 메틸화 상태와, 대조 샘플 또는 데이터베이스에 보고된 기준 샘플 메틸화 상태를 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합에 기반하여 단일 값을 결정하고 전립선 암-관련 메틸화 상태의 사용자를 경고하도록 구성된 경보 구성요소를 포함하는, 인간 대상체로부터 수득된 샘플을 특징화하는 시스템.

### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함하는, 시스템.

### 청구항 26

제24항에 있어서, 핵산을 단리하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

### 청구항 27

제24항에 있어서, 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

### 청구항 28

제24항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 시스템.

### 청구항 29

제24항에 있어서, 상기 데이터베이스는 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

### 청구항 30

제24항에 있어서, 상기 데이터베이스는 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

### 청구항 31

대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 방법으로서, 상기 방법은

- 1) 대상체로부터 수득된 샘플 내의 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계; 및
- 2) 상기 마커의 메틸화 상태가 전립선 암을 갖지 않은 대상체에서 검정된 상기 마커의 메틸화 상태와 상이할 때 상기 대상체가 전립선 암을 갖는 것으로 동정하는 단계를 포함하고,  
상기 마커가 표 1 또는 표 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 차별적 메틸화 영역 (DMR) 내에 염기 를 포함하는, 대상체로부터 수득한 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 방법.

### 청구항 32

제31항에 있어서, 복수 종의 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 33

제31항에 있어서, 상기 샘플 내의 상기 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계가 1개 염기의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 34

제31항에 있어서, 상기 샘플 내의 상기 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계가 복수개의 염기에서 메틸화 정도를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 35

제31항에 있어서, 상기 마커의 메틸화 상태가 상기 마커의 정상 메틸화 상태에 대해 상기 마커의 증가된 또는 감소된 메틸화를 포함하는, 방법.

#### 청구항 36

제31항에 있어서, 상기 마커의 메틸화 상태는 상기 마커의 정상 메틸화 상태에 대해 상기 마커의 메틸화의 상이한 패턴을 포함하는, 방법.

#### 청구항 37

제31항에 있어서, 순방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하는 단계 또는 역방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 38

제31항에 있어서, 상기 마커가 100 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 39

제31항에 있어서, 상기 마커가 500 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 40

제31항에 있어서, 상기 마커가 1000 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 41

제31항에 있어서, 상기 마커가 5000 개 이하의 염기 영역인, 방법.

#### 청구항 42

제31항에 있어서, 상기 마커가 1개 염기인, 방법.

#### 청구항 43

제31항에 있어서, 상기 마커가 높은 CpG 밀도의 프로모터 내에 있는, 방법.

#### 청구항 44

제31항에 있어서, 상기 샘플이 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 방법.

#### 청구항 45

제31항에 있어서, 상기 검정 단계는 메틸화 특이적 폴리머라제연쇄반응, 혼산 서열분석, 질량분광분석, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량-기반 분리, 또는 표적 포획을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

#### 청구항 46

제31항에 있어서, 상기 검정이 서열번호 1-234로 이루어진 군으로부터 선택된 메틸화 특이적 올리고뉴클레오티드의 사용을 포함하는, 방법.

#### 청구항 47

제31항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역이 상기 마커를 포함하는, 방법: ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047.

#### 청구항 48

제31항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역이 상기 마커를 포함하는, 방법: SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487.

#### 청구항 49

제31항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역이 상기 마커를 포함하는, 방법: max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047.

#### 청구항 50

키트로서,

- 1) 바이설파이트 시약; 및
- 2) 표 1 및 표 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR의 서열을 포함하고 전립선 암을 갖지 않은 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조 혼산을 포함하는, 키트.

#### 청구항 51

키트로서, 바이설파이트 시약 및 제47항에 따른 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 키트.

#### 청구항 52

키트로서, 대상체로부터 샘플을 수득하기 위한 샘플 수집기; 상기 샘플로부터 핵산을 단리하기 위한 시약; 바이설파이 시약; 및 제47항에 따른 올리고뉴클레오티드;를 포함하는, 키트.

### 청구항 53

제52항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 키트.

### 청구항 54

조성물로서, DMR을 포함하는 핵산 및 바이설파이트 시약을 포함하는, 조성물.

### 청구항 55

조성물로서, DMR을 포함하는 핵산 및 제47항에 따른 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

### 청구항 56

조성물로서, DMR을 포함하는 핵산 및 메틸화-민감성 제한 효소를 포함하는, 조성물.

### 청구항 57

조성물로서, DMR을 포함하는 핵산 및 폴리머라제를 포함하는, 조성물.

### 청구항 58

대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 방법으로서, 상기 방법은,

- a) 표 1및 표 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR내에 엔기를 포함하는 샘플 내의 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계;
- b) 상기 대상체 샘플의 상기 마커의 메틸화 상태를, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 정상 대조 샘플의 마커의 메틸화 상태와 비교하는 단계;
- c) 상기 대상체 샘플 및 상기 정상 대조 샘플의 메틸화 상태의 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 59

제58항에 있어서, 상기 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고, 상기 p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 또는 0.0001인, 방법.

### 청구항 60

대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 방법으로서, 상기 방법은 DMR을 포함하는 핵산을 바이설파이트 시약과 반응시켜 바이설파이트-반응된 핵산을 생성시키는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산을 서열분석하여 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 제공하는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열을, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오티드 서열과 비교

하여 상기 2개의 서열의 차이를 동정하는 단계; 및 차이가 존재할 때 상기 대상체가 전립선 암을 갖는 것으로 동정하는 단계를 포함하는, 대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 방법.

#### 청구항 61

대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 시스템으로서, 상기 시스템은 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 상기 샘플의 메틸화 상태를, 데이터베이스에 보고된 대조 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태와 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합에 기반하여 단일 값을 결정하고 전립선 암-관련 메틸화 상태를 사용자에게 경고하도록 구성된 경보 구성요소를 포함하는, 대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암의 스크리닝 시스템.

#### 청구항 62

제61항에 있어서, 상기 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함하는, 시스템.

#### 청구항 63

제61항에 있어서, 핵산을 단리하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

#### 청구항 64

제61항에 있어서, 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

#### 청구항 65

제61항에 있어서, 대변 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플 및/또는 혈장 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

#### 청구항 66

제61항에 있어서, 상기 데이터베이스는 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

#### 청구항 67

제61항에 있어서, 상기 데이터베이스는 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

#### 청구항 68

단리된 핵산 세트로서, 각각의 핵산이 DMR을 포함하는 서열을 갖는, 단리된 핵산 세트.

#### 청구항 69

제68항에 있어서, 각각의 핵산이 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 서열을 갖는, 핵산 세트.

**청구항 70**

제68항 또는 제69항에 따른 핵산 세트 및 상기 핵산 세트와 관련된 핵산 서열의 데이터베이스를 포함하는, 시스템.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 바이설파이트 시약을 추가로 포함하는, 시스템.

**청구항 72**

제70항에 있어서, 핵산 서열분석기를 추가로 포함하는, 시스템.

**청구항 73**

생물학적 샘플을 특징화하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) 인간 개체의 생물학적 샘플 내의 ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11 및 TPM4\_8047로부터 선택된 2 개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계로, 상기 측정이 상기 생물학적 샘플 내의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리;

상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 하기 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA를 증폭:

ACOXL의 경우에 서열번호 93 및 94로 이루어진 프라이머 세트,

AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 27 및 28로 이루어진 프라이머 세트,

ANXA2의 경우에 서열번호 89 및 90으로 이루어진 프라이머 세트,

CHST11\_2206의 경우에 서열번호 85 및 86으로 이루어진 프라이머 세트,

FLJ45983의 경우에 서열번호 31 및 32로 이루어진 프라이머 세트,

GAS6의 경우에 서열번호 117 및 118로 이루어진 프라이머 세트,

GRASP의 경우에 서열번호 33 및 34로 이루어진 프라이머 세트,

HAPLN3의 경우에 서열번호 37 및 38로 이루어진 프라이머 세트,

HCG4P6의 경우에 서열번호 39 및 40으로 이루어진 프라이머 세트,

HES5\_0822의 경우에 서열번호 41 및 42로 이루어진 프라이머 세트,

ITPRIPL1의 경우에 서열번호 45 및 46으로 이루어진 프라이머 세트,

KCNK4의 경우에 서열번호 125 및 126으로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr1.61519554-61519667의 경우에 서열번호 91 및 92로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr2.97193166-97193253의 경우에 서열번호 49 및 50으로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr3.193의 경우에 서열번호 51 및 52로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr3.72788028-72788112의 경우에 서열번호 53 및 54로 이루어진 프라이머 세트,

RAI1\_7469의 경우에 서열번호 55 및 56으로 이루어진 프라이머 세트,

RASSF2의 경우에 서열번호 57 및 58로 이루어진 프라이머 세트,

SERPINB9\_3389의 경우에 서열번호 129 및 130으로 이루어진 프라이머 세트,

SLC4A11의 경우에 서열번호 59 및 60으로 이루어진 프라이머 세트, 및 TPM4\_8047 의 경우에 서열번호 123 및 124로 이루어진 프라이머 세트; 및

메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화-민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량적 바이설파이트 파이로서열분석, 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준의 결정에 의한, 단계;

(b) 상기 메틸화 수준을, 전립선 암을 갖지 않은 대조 샘플 내의 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및

(c) 상기 2개 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 각각의 대조 샘플에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 전립선 암을 갖는 것으로 결정하는 단계.

#### 청구항 74

제73항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 혈액 샘플 또는 조직 샘플인, 방법.

#### 청구항 75

제74항에 있어서, 상기 조직이 전립선 조직인, 방법.

#### 청구항 76

제73항에 있어서, 상기 CpG 부위는 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

#### 청구항 77

제73항에 있어서, 2개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 상기 단계가 상기 CpG 부위의 메틸화 스코어의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

#### 청구항 78

혈장 샘플을 특징화하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) 인간 개체의 혈장 샘플 내의 max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047 로부터 선택되는 2 개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계로, 상기 측정이,

상기 생물학적 샘플 내의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리;

상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 하기 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA를 증폭:

max.chr3.193의 경우에 서열번호 174 및 175로 이루어진 프라이머 세트,

HES5의 경우에 서열번호 180 및 181로 이루어진 프라이머 세트,

SLC03A1의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트, 및

TPM4\_8047의 경우에 서열번호 189 및 190로 이루어진 프라이머 세트;

메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화-민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량적 바이설파이트 파이로서열분석, 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준의 결정에 의한 것인 단계;

- (b) 상기 메틸화 수준을, 전립선 암을 갖지 않은 대조 샘플 내의 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 2개 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 각각의 대조 샘플에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 전립선 암을 갖는 것으로 결정하는 단계.

### 청구항 79

제78항에 있어서, 상기 CpG 부위가 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

### 청구항 80

제78항에 있어서, 2개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 상기 단계가 상기 CpG 부위의 메틸화 스코어의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

### 청구항 81

생물학적 샘플을 특징화하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

2개 이상의 유전자에 대해 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하되, 상기 2개 이상의 유전자는

상기 생물학적 샘플이 인간 개체의 전립선 조직 샘플인 경우에는 상기 인간 개체의 생물학적 샘플 내의 ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택되거나, 또는

상기 생물학적 샘플이 인간 개체의 혈장 샘플인 경우에는 상기 인간 개체의 생물학적 샘플 내의 max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로부터 선택되고,

상기 측정은,

상기 생물학적 샘플 내의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리;

상기 선택된 2 개 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA의 증폭; 및

메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화-민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량적 바이설파이트 파이로서열분석, 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의한 상기 CpG 부위의 메틸화 수준의 결정에 의하는 것인 단계.

### 청구항 82

제81항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하는, 방법:

상기 메틸화 수준을, 전립선 암을 갖지 않은 대조 샘플 내의 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및

상기 2 개 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 상기 각각의 대조 샘플에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 전립선 암을 갖는 것으로 결정하는 단계.

### 청구항 83

제81항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 조직 샘플인 경우, 상기 선택된 2 개 이상의 유전자에 대하여 하기 프

라이머 세트가 사용되는, 방법:

ACOXL의 경우에 서열번호 93 및 94로 이루어진 프라이머 세트,

AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 27 및 28로 이루어진 프라이머 세트,

ANXA2의 경우에 서열번호 89 및 90으로 이루어진 프라이머 세트,

CHST11\_2206의 경우에 서열번호 85 및 86으로 이루어진 프라이머 세트,

FLJ45983의 경우에 서열번호 31 및 32로 이루어진 프라이머 세트,

GAS6의 경우에 서열번호 117 및 118로 이루어진 프라이머 세트,

GRASP의 경우에 서열번호 33 및 34로 이루어진 프라이머 세트,

HAPLN3의 경우에 서열번호 37 및 38로 이루어진 프라이머 세트,

HCG4P6의 경우에 서열번호 39 및 40으로 이루어진 프라이머 세트,

HES5\_0822의 경우에 서열번호 41 및 42로 이루어진 프라이머 세트,

ITPRIPL1의 경우에 서열번호 45 및 46으로 이루어진 프라이머 세트,

KCNK4의 경우에 서열번호 125 및 126으로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr1.61519554-61519667의 경우에 서열번호 91 및 92로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr2.97193166-97193253의 경우에 서열번호 49 및 50으로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr3.193의 경우에 서열번호 51 및 52로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr3.72788028-72788112의 경우에 서열번호 53 및 54로 이루어진 프라이머 세트,

RAI1\_7469의 경우에 서열번호 55 및 56으로 이루어진 프라이머 세트, RASSF2의 경우에 서열번호 57 및 58로 이루어진 프라이머 세트,

SERPINB9\_3389의 경우에 서열번호 129 및 130으로 이루어진 프라이머 세트,

SLC4A11의 경우에 서열번호 59 및 60으로 이루어진 프라이머 세트, 및 TPM4\_8047의 경우에 서열번호 123 및 124로 이루어진 프라이머 세트.

#### 청구항 84

제81항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 혈장 샘플인 경우, 상기 선택된 2 개 이상의 유전자에 대하여 하기 프라이머 세트가 사용되는, 방법:

max.chr3.193의 경우에 서열번호 174 및 175로 이루어진 프라이머 세트,

HES5의 경우에 서열번호 180 및 181로 이루어진 프라이머 세트,

SLC03A1의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트, 및

TPM4\_8047의 경우에 서열번호 189 및 190로 이루어진 프라이머 세트.

#### 청구항 85

제81항에 있어서, 상기 조직 샘플이 전립선 조직 샘플인, 방법.

#### 청구항 86

제81항에 있어서, 상기 CpG 부위는 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

### 청구항 87

제81항에 있어서, 2개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 상기 단계가 상기 CpG 부위의 메틸화 스코어의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

### 청구항 88

생물학적 샘플을 특징화하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

(a) 인간 개체의 생물학적 샘플 내의 SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계로, 상기 측정이,

상기 생물학적 샘플 내의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리;

상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 하기 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA의 증폭; 및

메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화-민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량적 바이설파이트 파이로세열분석, 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준의 결정에 의한 단계;

(b) 상기 메틸화 수준을, 전립선 암을 갖지 않은 대조 샘플 내의 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및

(c) 상기 2개 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 각각의 대조 샘플에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 전립선 암을 갖는 것으로 결정하는 단계.

### 청구항 89

제88항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 혈액 샘플 또는 조직 샘플인, 방법.

### 청구항 90

제89항에 있어서, 상기 조직이 전립선 조직인, 방법.

### 청구항 91

제88항에 있어서, 상기 CpG 부위는 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

### 청구항 92

제88항에 있어서, 2개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 상기 단계가 상기 CpG 부위의 메틸화 스코어의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

### 청구항 93

제88항에 있어서, 상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트가 하기로부터 선택되는, 방법:  
 MAX. chr3.727\_8028의 경우에 서열번호 177과 178 또는 177과 219로 이루어진 프라이머 세트,  
 RASGRF2\_6325의 경우에 서열번호 220 및 221로 이루어진 프라이머 세트,  
 ZNF655\_6075의 경우에 서열번호 210 및 211로 이루어진 프라이머 세트,  
 PAMR1\_7364의 경우에 서열번호 223 및 224로 이루어진 프라이머 세트,  
 ST6GALNAC2\_1113의 경우에 서열번호 216 및 217로 이루어진 프라이머 세트,  
 CCN JL\_9070의 경우에 서열번호 229 및 230으로 이루어진 프라이머 세트,  
 KCNB2\_9128의 경우에 서열번호 213 및 214로 이루어진 프라이머 세트,  
 IGFBP7\_6412의 경우에 서열번호 226 및 227로 이루어진 프라이머 세트,  
 WNT3A\_5487의 경우에 서열번호 232 및 233로 이루어진 프라이머 세트,  
 SERPINB9\_3479의 경우에 서열번호 147 및 148로 이루어진 프라이머 세트,  
 FL OT1\_1665의 경우에 서열번호 150 및 151로 이루어진 프라이머 세트,  
 HCG4P6\_4618의 경우에 서열번호 153 및 154로 이루어진 프라이머 세트,  
 CHST11\_2206의 경우에 서열번호 156 및 157로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr12.485의 경우에 서열번호 159 및 160으로 이루어진 프라이머 세트,  
 GRASP\_0932의 경우에 서열번호 162 및 163으로 이루어진 프라이머 세트,  
 GAS6\_6425의 경우에 서열번호 165 및 166으로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr3.193의 경우에 서열번호 174 및 175로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr2.971의 경우에 서열번호 198 및 199로 이루어진 프라이머 세트,  
 HES5\_0840의 경우에 서열번호 180 및 181로 이루어진 프라이머 세트,  
 TPM4\_8037의 경우에 서열번호 189 및 190으로 이루어진 프라이머 세트,  
 SLC03A1\_6187의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트,  
 ITPRIPL1\_1244의 경우에 서열번호 195 및 196로 이루어진 프라이머 세트, 및  
 AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 201 및 202로 이루어진 프라이머 세트.

### 청구항 94

암성 전립선 조직을 특징화하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

인간 개체의 생물학적 샘플 내의 SERPINB9\_3479, GRASP\_0932, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계로, 상기 측정이, 상기 생물학적 샘플 내의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리;

상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대해 하기 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA의 증폭; 및

메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화-민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량적 바이설파이트 파이로서열분석, 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준의 결정에 의한 단

계;

(b) 상기 메틸화 수준을, 글리슨(Gleason) 스코어 6을 갖는 전립선 암 조직으로부터의 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및

(c) 상기 2개 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 글리슨 스코어 6을 갖는 전립선 암 조직으로부터의 상응하는 유전자 세트에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 글리슨 스코어 7 초과를 갖는 전립선 암 조직을 갖는 것으로 결정하는 단계.

### 청구항 95

제94항에 있어서, 상기 CpG 부위가 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

### 청구항 96

제94항에 있어서, 2개 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계가 상기 CpG 부위의 메틸화 스코어의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 군으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

### 청구항 97

제94항에 있어서, 상기 선택된 2개 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트가 하기로부터 선택되는, 방법:

SERPINB9\_3479의 경우에 서열번호 147 및 148로 이루어진 프라이머 세트,

GRASP\_0932의 경우에 서열번호 162 및 163으로 이루어진 프라이머 세트,

SLC03A1\_6187의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트,

ITPRIPL1\_1244의 경우에 서열번호 195 및 196로 이루어진 프라이머 세트,

AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 201 및 202로 이루어진 프라이머 세트,

RASGRF2\_6325의 경우에 서열번호 220 및 221로 이루어진 프라이머 세트,

ZNF655\_6075의 경우에 서열번호 210 및 211로 이루어진 프라이머 세트,

PAMR1\_7364의 경우에 서열번호 223 및 224로 이루어진 프라이머 세트,

ST6GALNAC2\_1113의 경우에 서열번호 216 및 217로 이루어진 프라이머 세트,

CCN JL\_9070의 경우에 서열번호 229 및 230으로 이루어진 프라이머 세트,

KCNB2\_9128의 경우에 서열번호 213 및 214로 이루어진 프라이머 세트,

IGFBP7\_6412의 경우에 서열번호 226 및 227로 이루어진 프라이머 세트, 및

WNT3A\_5487의 경우에 서열번호 232 및 233으로 이루어진 프라이머 세트.

### 청구항 98

SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:

a) 전립선 암을 갖는 것으로 의심되거나 또는 전립선 암을 갖는 인간 개체의 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를

추출하는 단계;

- b) 상기 추출된 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 단계,
- c) SERPINB9\_3479, FL0T1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 유전자에서 상기 1개 이상의 CpG 부위에 대해 특이적인 프라이머 쌍으로 구성된 프라이머를 사용하여, 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA를 증폭시키는 단계, 및
- d) 메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해, SERPINB9\_3479, FL0T1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계.

### 청구항 99

제98항에 있어서, 상기 샘플이 전립선 조직 샘플인 것인 방법.

### 청구항 100

제98항에 있어서, SERPINB9\_3479, FL0T1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487에 대한 특이적인 프라이머 쌍이 하기로 이루어지는 것인 방법:

MAX.chr3.727\_8028의 경우에 서열번호 177과 178 또는 177과 219로 이루어진 프라이머 세트,

RASGRF2\_6325의 경우에 서열번호 220 및 221로 이루어진 프라이머 세트,

ZNF655\_6075의 경우에 서열번호 210 및 211로 이루어진 프라이머 세트,

PAMR1\_7364의 경우에 서열번호 223 및 224로 이루어진 프라이머 세트,

ST6GALNAC2\_1113의 경우에 서열번호 216 및 217로 이루어진 프라이머 세트,

CCN JL\_9070의 경우에 서열번호 229 및 230으로 이루어진 프라이머 세트,

KCNB2\_9128의 경우에 서열번호 213 및 214로 이루어진 프라이머 세트,

IGFBP7\_6412의 경우에 서열번호 226 및 227로 이루어진 프라이머 세트,

WNT3A\_5487의 경우에 서열번호 232 및 233로 이루어진 프라이머 세트,

SERPINB9\_3479의 경우에 서열번호 147 및 148로 이루어진 프라이머 세트,

FL0T1\_1665의 경우에 서열번호 150 및 151로 이루어진 프라이머 세트,

HCG4P6\_4618의 경우에 서열번호 153 및 154로 이루어진 프라이머 세트,

CHST11\_2206의 경우에 서열번호 156 및 157로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr12.485의 경우에 서열번호 159 및 160으로 이루어진 프라이머 세트,

GRASP\_0932의 경우에 서열번호 162 및 163으로 이루어진 프라이머 세트,

GAS6\_6425의 경우에 서열번호 165 및 166으로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr3.193의 경우에 서열번호 174 및 175로 이루어진 프라이머 세트,

MAX.chr2.971의 경우에 서열번호 198 및 199로 이루어진 프라이머 세트,  
 HES5\_0840의 경우에 서열번호 180 및 181로 이루어진 프라이머 세트,  
 TPM4\_8037의 경우에 서열번호 189 및 190으로 이루어진 프라이머 세트,  
 SLC03A1\_6187의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트,  
 ITPRIPL1\_1244의 경우에 서열번호 195 및 196로 이루어진 프라이머 세트, 및  
 AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 201 및 202로 이루어진 프라이머 세트.

### 청구항 101

ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047에서 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

- a) 전립선 암을 갖는 것으로 의심되거나 또는 전립선 암을 갖는 인간 개체의 생물학적 샘플로부터 계놈 DNA를 추출하는 단계;
- b) 상기 추출된 계놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 단계,
- c) ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위에 대해 특이적인 프라이머 쌍으로 이루어진 프라이머를 사용하여, 상기 바이설파이트-처리된 계놈 DNA를 증폭시키는 단계, 및
- d) 메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석 또는 바이설파이트 계놈 서열분석 PCR에 의해, ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계.

### 청구항 102

제101항에 있어서, 상기 샘플은 전립선 조직 샘플인 것인 방법.

### 청구항 103

제101항에 있어서, ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047에 대해 특이적인 프라이머 쌍이 하기로 이루어진 것인 방법:

ACOXL의 경우에 서열번호 93 및 94로 이루어진 프라이머 세트,  
 AKR1B1\_3644의 경우에 서열번호 27 및 28로 이루어진 프라이머 세트,  
 ANXA2의 경우에 서열번호 89 및 90으로 이루어진 프라이머 세트,  
 CHST11\_2206의 경우에 서열번호 85 및 86으로 이루어진 프라이머 세트,  
 FLJ45983의 경우에 서열번호 31 및 32로 이루어진 프라이머 세트,

GAS6의 경우에 서열번호 117 및 118로 이루어진 프라이머 세트,  
 GRASP의 경우에 서열번호 33 및 34로 이루어진 프라이머 세트,  
 HAPLN3의 경우에 서열번호 37 및 38로 이루어진 프라이머 세트,  
 HCG4P6의 경우에 서열번호 39 및 40으로 이루어진 프라이머 세트,  
 HES5\_0822의 경우에 서열번호 41 및 42로 이루어진 프라이머 세트,  
 ITPRIPL1의 경우에 서열번호 45 및 46으로 이루어진 프라이머 세트,  
 KCNK4의 경우에 서열번호 125 및 126으로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr1.61519554-61519667의 경우에 서열번호 91 및 92로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr2.97193166-97193253의 경우에 서열번호 49 및 50으로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr3.193의 경우에 서열번호 51 및 52로 이루어진 프라이머 세트,  
 MAX.chr3.72788028-72788112의 경우에 서열번호 53 및 54로 이루어진 프라이머 세트,  
 RAI1\_7469의 경우에 서열번호 55 및 56으로 이루어진 프라이머 세트, RASSF2의 경우에 서열번호 57 및 58로 이루어진 프라이머 세트,  
 SERPINB9\_3389의 경우에 서열번호 129 및 130으로 이루어진 프라이머 세트,  
 SLC4A11 의 경우에 서열번호 59 및 60으로 이루어진 프라이머 세트, 및 TPM4\_8047 의 경우에 서열번호 123 및 124로 이루어진 프라이머 세트.

#### 청구항 104

max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 유전자에서, 하기 단계를 포함하여, 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는, 방법:

- 전립선 암을 갖는 것으로 의심되거나 또는 전립선 암을 갖는 인간 개체의 혈장 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계,
- 상기 추출된 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 단계,
- max.chr3.193, HES5, SLC03A1, and TPM4\_8047로부터 선택된 유전자에서 상기 1개 이상의 CpG 부위에 대해 특이적인 프라이머 쌍으로 이루어진 프라이머를 사용하여, 상기 바이설파이트-처리된 게놈 DNA를 증폭시키는 단계, 및
- 메틸화-특이적 PCR, 정량적 메틸화-특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석 또는 바이설파이트 게놈 서열분석 PCR에 의해, max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 유전자에서 1개 이상의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계.

#### 청구항 105

제98항에 있어서, max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047에 대해 특이적인 프라이머 쌍이 하기로 이루어지는, 방법:

max.chr3.193의 경우에 서열번호 174 및 175로 이루어진 프라이머 세트,  
 HES5의 경우에 서열번호 180 및 181로 이루어진 프라이머 세트,  
 SLC03A1의 경우에 서열번호 171 및 172로 이루어진 프라이머 세트, 및  
 TPM4\_8047의 경우에 서열번호 189 및 190로 이루어진 프라이머 세트.

#### 발명의 설명

## 기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2017년 2월 28일자로 출원된 미국 가특허출원 제62/464,800 호의 우선권을 주장하며, 그 내용은 전체적으로 참고 문헌으로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 전립선 암 스크리닝 기술, 및 특히, 비배타적으로, 상기 전립선 암의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다.

## 배경 기술

- [0005] 전립선 암(Prostate cancer, PCa)은 2008년에 전세계적으로 903,000건의 새로운 사례와 258,000 건의 사망을 나타내는, 남성에서 두 번째로 흔하게 진단되는 암이다. PCA가 흔하지만, 이 질환은 또한 임상적 거동에서 이질적이다. 6명의 미국인 남성 중 약 1명이 PCA로 진단될 것으로 추측되지만, 미국인 남성의 PCA 사망률은 단지 2.8% (36명 중 1명)에 불과하다 (예를 들어, 문헌[Strand SH, et al., Int J Mol Sci 2014;15: 16544-16576] 참조).
- [0006] PCA 생존율은 많은 요인에 따라 좌우된다. 진행이 덜 된 질환이 초기 진단되는 경우에, 대부분의 남성은 요법적 치료(curative treatment)에서 가장 높은 가능성을 갖는다. 실제로, 초기 PCA 진단은 전립선 특이항원(PSA) 테스트를 사용하여 용이해졌다. PSA 테스트 시기에, PCA의 단계 및 등급 이동이 발생하였으며, 근치적 치료(definitive treatment)가 보다 효과적으로 작용하는 질환으로 확인되었다. PSA가 PCA의 진단 및 관리에 유익하지만, PSA에 의한 스크리닝은 또한 논란의 여지가 있는 것으로 보여왔다. PSA에 의한 스크리닝은 보다 무통성(indolent)이고 위험도가 낮은 종양을 진단할 수 있게 하지만, 후속적인 과다 치료는 남성의 삶의 질에 불필요한 손해(발기 부전, 요실금)를 발생시킬 수 있다. 따라서 PCA의 진단을 돋기 위한 신규한 바이오마커가 필요하다. 암에 관해 향상된 예후 정보를 남성에게 제공하는 신규한 테스트가 또한 필요하다.
- [0007] 본 발명은 이러한 필요성을 해결한다.

## 발명의 내용

- [0008] 메틸화된 DNA는 대부분의 종양 유형의 조직에서 잠재적인 바이오마커 종류로 연구되어 왔다. 많은 경우에, DNA 메틸트랜스퍼라제는 유전자 발현의 후성적 제어로서 시토신-포스페이트-구아닌 (CpG) 섬 부위에서 DNA에 메틸기를 부가한다. 생물학적으로 매력적인 메커니즘에서, 종양 억제유전자의 프로모터 영역에서 획득 메틸화 사건은 발현을 침묵시키고, 따라서, 종양발생에 기여하는 것으로 생각된다. DNA 메틸화는 RNA 또는 단백질 발현보다 화학적 및 생물학적으로 보다 안정한 진단 도구일 수 있다 (문헌[Laird (2010) Nat Rev Genet 11:191-203]). 또한, 산발적 대장암과 같은 다른 암에서, 메틸화 마커는 우수한 특이도를 제공하며, 개개의 DNA 돌연변이보다 더 광범위한 정보를 제공하고 더 민감하다 (문헌[Zou et al (2007) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 2686-96]).
- [0009] CpG 섬의 분석은 동물 모델과 인간 세포주에 적용될 때 중요한 발견을 제공하였다. 예를 들어, Zhang과 동료들은 동일한 CpG 섬의 다른 부분으로부터의 앰플리콘(amplicon)이 상이한 메틸화 수준을 가질 수 있음을 발견하였다 (문헌[Zhang et al. (2009) PLoS Genet 5: e1000438]). 또한, 메틸화 수준은 고도로 메틸화된 서열과 미메틸화된 서열 사이에서 바이-모드로 분포되었으며, DNA 메틸트랜스퍼라제 활성의 2진수 전환-유사한 패턴을 더 뒷받침한다 (문헌[Zhang et al. (2009) PLoS Genet 5: e1 000438]). 생체내 쥐(murine) 조직 및 시험관내 세포주의 분석은 높은 CpG 밀도 프로모터의 단지 약 0.3% (HCP, 300 염기쌍 영역 내에서 7% 초과의 CpG 서열을 갖는 것으로 정의됨)만이 메틸화되는 반면, 낮은 CpG 밀도 영역(LCP, 300 염기쌍 영역 내에서 5% 미만의 CpG 서열을 갖는 것으로 정의됨)은 동적 조직-특이적 패턴에서 빈번하게 메틸화되는 경향이 있음을 증명하였다(문헌[Meissner et al. (2008) Nature 454: 766-70]). HCP는 유비쿼터스 하우스키핑 유전자에 대한 프로모터 및 고도로 규제된 발달 유전자를 함유한다. 50% 초과로 메틸화된 HCP 부위 중에는 Wnt2, NDRG2, SFRP2 및 BMP3과 같은 몇몇 기존 마커가 있다 (문헌[Meissner et al. (2008) Nature 454: 766-70]).

- [0010] DNA 메틸트랜스퍼라제에 의한 시토신-포스페이트-구아닌 (CpG) 섬 부위에서 DNA의 후성적 메틸화는 대부분의 종양 유형의 조직에서 잠재적인 바이오마커 종류로서 연구되어왔다. 생물학적으로 매력적인 메커니즘에서, 종양 억제유전자의 프로모터 영역에서 획득 메틸화 사건은 발현을 침묵시키고, 따라서, 종양발생에 기여하는 것으로

생각된다. DNA 메틸화는 RNA 또는 단백질 발현보다 화학적 및 생물학적으로 보다 안정한 전단 도구일 수 있다. 또한, 산발적 대장암과 같은 다른 암에서, 비정상적인 메틸화 마커는 우수한 특이도를 제공하며, 개개의 DNA 돌연변이보다 더 광범위한 정보를 제공하고 더 민감하며, 우수한 특이도를 제공한다.

[0011] 몇몇 방법이 신규한 메틸화 마커를 검색하기 위해 이용될 수 있다. CpG 메틸화의 마이크로-검정에 기반한 조사가 합리적이고 높은-처리량의 접근법인 반면, 이 전략은 관심대상인 공지 영역, 주로 기존 종양 억제유전자 프로모터에 편향되어 있다. 지난 10년간 DNA 메틸화의 계놈 차원의 분석을 위한 대안적인 방법이 개발되었다. 3가지 기본적인 접근법이 있다. 첫 번째는, 특정 메틸화된 부위를 인식하는 제한 효소에 의한 DNA 분해, 이어서, 상기 효소 인식 부위에 제한된 메틸화 데이터 또는 (메틸화-특이적 PCR: MSP와 같은) 정량화 단계에서 상기 DNA를 증폭하는데 사용되는 프라이머를 제공하는 여러 가능한 분석 기술을 이용한다. 두 번째 접근법은, 메틸-시토신 또는 다른 메틸화-특이적 결합 도메인에 관한항체를 사용하여 계놈 DNA의 메틸화된 단편을 풍부하게 하고, 이어서 마이크로검정 분석 또는 서열분석하여 기준 계놈에 상기 단편을 맵핑(mapping)한다. 이 접근법은 상기 단편 내의 모든 메틸화 부위의 단일 뉴클레오티드 레솔루션을 제공하지 않는다. 세번째 접근법은, 상기 DNA를 바이설파이트로 처리하는 것으로부터 시작하여, 모든 미메틸화된 시토신을 우라실로 전환시키고, 이어서 제한 효소 분해하고 어댑터 리간드에 커플링시킨 후에 모든 단편을 완전하게 서열분석한다. 제한 효소의 선택은 CpG 조밀 영역에 대한 단편을 풍부하게 할 수 있고, 분석동안 동의 유전자(multiple gene) 위치에 맵핑될 수 있는 불필요한 서열 갯수를 감소시킬 수 있다.

[0012] RRBS는 모든 CpG 섬의 80-90% 및 종양 억제유전자 프로모터의 대다수의 단일 뉴클레오티드 레솔루션에서 중간 내지 높은 판독 커버리지로 CpG 메틸화 상태 데이터를 제공한다. 암 사례-대조군 연구에서, 이들 판독의 분석은 차별적 메틸화 영역(DMR)을 동정할 수 있게 한다. 췌장암 표본의 이전 RRBS 분석에서, 수백 개의 DMR이 밝혀졌으며, 이 중 다수가 발암과 관련이 없었으며, 이 중 다수가 주석을 갖지 않았다. 독립적인 조직 샘플 세트에 대한 추가적인 검증 연구에 의해, 성능 측면에서 100% 감도 및 특이도를 가진 마커 CpG가 동정되었다.

[0013] 전립선 암 스크리닝 기술, 및 특히, 비배타적으로, 상기 전립선 암의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다.

[0014] 실제로, 실시예 I-VIII에 기재된 바와 같이, 본 발명의 양태를 동정하기 위한 과정동안 수행된 실험에 의해, 전립선-유래 DNA의 암을, 비-신생물성 대조 DNA로부터 식별하기 위한 73 종의 차별적 메틸화 영역(DMR)의 신규 세트가 동정되었다. 또한, 정상 백혈구 DNA 샘플에서는 메틸화되지 않지만 전립선 상피 세포(암 및 정상)에서는 메틸 10 종의 신규 DMR이 동정되었다. CpG-풍부 바이설파이트로 전환된 종양 및 정상 DNA에 대한 차세대 서열분석 연구로부터 영역 세트 둘다가 동정되었다. 종양 샘플은 덜 공격성인 글리슨 6 및 보다 공격성인 글리슨 7+ 패턴을 함유하였다. DMR은 독점소유된 필터 및 분석 파이프 라인을 사용하여 선택되었고, 신규 메틸화-특이적 PCR(MSP) 검정을 사용하여 독립적인 조직 샘플 세트에서 검증되었다. 이들 73 종의 바이오마커 검정은 조직에서 우수한 검출력을 증명하였고, 광범위한 임상 특이성을 가졌다 - 일부는 많은 상이한 기관 부위에 걸친 암에 대해 특이성이고, 다른 일부는 전립선 암 단독에 특이성이다.

[0015] 이러한 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별하는 120종의 신규 DNA 메틸화 마커(표 1)를 열거하고 기재하다. 이들 120종의 신규 DNA 메틸화 마커로부터, 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 공격성 전립선 암 조직(예를 들어, 글리슨 스코어 7+)을 구별할 수 있는 73종의 마커를 동정하였다. 보다 구체적으로, 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있는 마커 및/또는 마커 패널(예: ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)이 동정되었다 (실시예 I-VI 참조).

[0016] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정 동안에 수행된 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있고 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있는 마커(예: SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPMM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487 으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)를 동정하는 것에 관한 것이었다 (실시예 VIII; 표 11 참조)

[0017] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정동안 수행된 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을

구별할 수 있고 덜 공격성인 전립선 암 조직(예: 글리슨 스코어 6)으로부터 공격성인 전립선 암 조직(예: 글리슨 스코어 7+)을 구별할 수 있는 마커(예: SERPINB9\_3479, GRASP\_0932, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)을 동정하는 것에 관한 것이었다(실시예 VIII; 표 11 참조).

[0018] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정동안 수행된 추가적인 실험은 혈액 샘플(예: 혈장 샘플) 내의 전립선 암의 존재 또는 부재를 검출할 수 있는 마커를 동정하는 것에 관한 것이었다. 실제로, 혈장 샘플 내의 전립선 암 조직의 존재 또는 부재를 검출할 수 있는 마커 및/또는 마커 패널(예: max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)이 동정되었다(실시예 I-VI 참조).

[0019] 본원에 기술된 바와 같이, 상기 기술은 전반적인 전립선 암에 대한 높은 식별성으로, 다수의 메틸화 DNA 마커 및 그의 서브세트(예: 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8종 마커의 세트)를 제공한다. 실험은 높은 신호 대 노이즈의 비 및 낮은 배경 수준을 제공하는 마커를 동정하기 위해 후보 마커에 선택 필터를 적용하여, 전립선 암 스크리닝 또는 진단 목적을 위한 높은 특이도를 제공하였다.

[0020] 일부 양태에서, 상기 기술은 생물학적 샘플(예: 전립선 조직, 혈장 샘플)에서 본원에서 동정된 1종 이상의 마커의 존재 및 그의 메틸화 상태를 평가하는 것과 관련된다. 이들 마커는 예를 들어 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은, 본원에 논의된 1종 이상의 차별적 메틸화 영역(DMR)을 포함한다. 메틸화 상태는 상기 기술의 양태에서 평가된다. 따라서, 본원에 제공된 기술은 유전자의 메틸화 상태를 측정하는 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 메틸화 상태는 게놈 스캐닝 방법에 의해 측정된다. 예를 들어, 하나의 방법은 제한효소 표시 게놈 스캐닝(restriction landmark genomic scanning) (문헌[Kawai et al. (1994) Mol/. Cell. Biol. 14: 7421-7427])을 포함하고, 또 다른 예는 메틸화-민감성 임의 프라임된 PCR (문헌[Gonzalgo et al. (1997) Cancer Res. 57: 594- 599]을 포함한다. 일부 양태에서, 특정 CpG 부위에서의 메틸화 패턴의 변화는 메틸화-민감성 제한 효소에 의한 게놈 DNA 분해, 이후에 관심대상 영역을 서던 분석하여 모니터링된다(분해-서던 방법). 일부 양태에서, 메틸화 패턴의 분석 변화는 PCR 증폭 이전에 메틸화-민감성 제한 효소에 의한 게놈 DNA 분해를 포함하는 PCR-기반의 공정을 포함한다 (문헌[Singer-Sam et al. 1990) Nucl. Acids Res. 18: 687]). 또한, 메틸화 분석을 위한 출발점으로 DNA의 바이설파이트 처리를 이용하는 다른 기술이 보고되었다. 이들은 메틸화-특이적 PCR (MSP) (문헌[Herman et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826]) 및 바이설파이트-전환된 DNA로부터 증폭된 PCR 생성물의 제한 효소 분해(문헌[Sadri and Hornsby (1996) Nucl.Acids Res. 24:5058-5059]; 및 [Xiong 및 Laird (1997) Nucl.Acids Res. 25: 2532-2534) 메틸화 상태를 평가하는데 있어서 용도를 갖는다. PCR 기술은 유전자 돌연변이의 검출(문헌[Kuppuswamy et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1143-1147]) 및 대립유전자-특이적 발현의 정량화 (문헌[Szabo and Mann (1995) Genes Dev. 9: 3097-3108]; 및 문헌[Singer-Sam et al. (1992) PCR Methods Appl. 1:160-163])를 위해 개발되었다. 이러한 기술은 내부 프라이머를 사용하고, PCR-발생된 주형에 어닐링되고, 검정할 단일 뉴클레오티드의 5'을 즉시 종결시킨다. 미국 특허 제7,037,650 호에 기재된 바와 같은 "정량적 Ms-SNuPE 검정"을 사용하는 방법이 일부 양태에서 사용된다.

[0021] 메틸화 상태를 평가할 때, 상기 메틸화 상태는 특정 부위를 포함하는 샘플 내의 DNA의 전체 개체군에 대하여 상기 특정 부위에서 (예: 단일 뉴클레오티드에서, 특정 영역 또는 유전자자리에서, 관심대상인 보다 긴 서열, 예컨대 DNA의 최대 약 100-bp, 200-bp, 500-bp, 1000-bp 서열 또는 그 이상)에서 메틸화되는 DNA 개별 가닥의 분율 또는 백분율로서 종종 표현된다. 전통적으로, 상기 미메틸화 핵산의 양은 캘리브레이터를 사용하여 PCR에 의해 결정된다. 이 후, 공지된 양의 DNA가 바이설파이트 처리되고, 생성된 메틸화-특이적인 서열이 실시간 PCR 또는 다른 지수적 증폭, 예를 들어 QuARTS 검정 (예를 들어, 본원에서 참고문헌으로 포함된 미국 특허 제8,361,720호; 및 미국 특허출원 공개번호 제2012/0122088호 및 제2012/0122106호에서 제공된 바와 같음, 본원에 참고문헌으로 포함됨)을 사용하여 결정된다.

[0022] 예를 들어, 일부 양태에서, 방법은 외부 표준물을 사용함으로써 미메틸화 표적을 위한 표준 곡선을 발생시키는 단계를 포함한다. 상기 표준 곡선은 적어도 2 지점으로부터 작성되고, 미메틸화 DNA를 위한 실시간 Ct 값을, 공지의 정량 표준값에 관련시킨다. 이 후, 상기 메틸화된 표적을 위한 두 번째 표준 곡선이 적어도 2지점 및 외부 표준값으로부터 작성된다. 이러한 두 번째 표준 곡선은 메틸화된 DNA를 위한 Ct를, 공지의 정량적 표준값에 관련시킨다. 그 다음에, 상기 테스트 샘플 Ct 값은 상기 메틸화 및 미메틸화된 개체군에 대해 결정되고, DNA의 게놈 등가물을 처음 두 단계에 의해 생성된 표준 곡선으로부터 계산된다. 관심대상인 부위에서의 메틸화 백분율은 상기 개체군 내의 DNA 총량에 대한 메틸화된 DNA의 양으로부터 계산된다, 즉 (메틸화된 DNA의 갯수)/(메틸화된

DNA의 갯수 + 미메틸화된 DNA의 갯수) x 100.

[0023] 또한, 상기 방법을 실시하기 위한 조성물 및 키트가 본원에 제공된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 1종 이상의 마커에 특이적인 시약(예: 프라이머, 프로브)이 단독으로 또는 세트로(예: 복수 종의 마커를 증폭시키기 위한 프라이머 쌍의 세트) 제공된다. 검출 검정을 수행하기 위한 추가적인 시약(예: QuARTS, PCR, 서열분석, 바이설 파이트 또는 다른 검정을 수행하기 위한 효소, 완충액, 양성 및 음성 대조군)이 또한 제공될 수 있다. 일부 양태에서, 방법을 수행하는데 필요한, 충분한 또는 유용한 1종 이상의 시약을 함유하는 키트가 제공된다. 또한, 상기 시약을 함유하는 반응 혼합물이 제공된다. 또한, 반응 혼합물을 완료하기 위해 서로에 및/또는 테스트 샘플에 추가될 수 있는 복수개의 시약을 함유하는 마스터 믹스 시약 세트가 제공된다.

[0024] 일부 양태에서, 본원에 기재된 기술은, 본원에 기재된 방법에 의해 제공되는 바와 같은 일련의 산술 또는 논리 연산을 수행하도록 설계된 프로그램가능한 기계와 관련된다. 예를 들어, 상기 기술의 일부 양태는 컴퓨터 소프트웨어 및/또는 컴퓨터 하드웨어와 관련된다(예를 들어, 이들에서 구현된다). 일 측면에서, 본 기술은 메모리 형태, 산술 및 논리 연산을 수행하기 위한 요소, 및 일련의 지시를 실행(예: 본원에 제공된 방법)하기 위한 프로세싱 요소(예를 들어, 마이크로프로세서)를 포함하여 데이터를 판독, 조작 및 저장하는 컴퓨터에 관한 것이다. 일부 양태에서, 마이크로프로세서는 (예: 1종 이상의 DMR, 예컨대, 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 DMR 1-140의) 메틸화 상태를 결정하고; (예: 1종 이상의 DMR, 예컨대, 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 DMR 1-140의) 메틸화 상태를 비교하고; 표준 곡선을 발생시키고; Ct 값을 결정하고; (예: 1종 이상의 DMR, 예컨대, 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 DMR 1-140의) 메틸화의 분율, 빈도 또는 백분율을 계산하고; CpG 섬을 동정하고; 검정 또는 마커의 특이도 및/또는 감도를 결정하고; ROC 곡선 및 관련 AUC를 계산하고; 서열 분석하기 위한 시스템의 일부이고, 모두는 본원에 기재된 바와 같거나 또는 당업계에 공지되어 있다.

[0025] 일부 양태에서, 마이크로프로세서 또는 컴퓨터는 알고리즘에서 메틸화 상태 데이터를 사용하여 암 부위를 예측한다.

[0026] 일부 양태에서, 소프트웨어 또는 하드웨어 구성요소는 다중 검정 결과를 수신하고, 상기 다중 검정 결과에 기반하여 암 위험도를 나타내는 단일 값 결과를 결정하여 사용자에게 보고한다(예: 다중 DMR의 메틸화 상태를 예를 들어 표 1과 표 3에 제공된 바와 같이 결정함). 관련 양태는 예를 들어, 다중 마커(예컨대, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 다중 DMF)의 메틸화 상태를 결정하는 것과 같은, 다중 검정으로부터의 결과의 수학적 조합(예를 들어, 가중치 조합, 선형 조합)에 기반하여 위험도 인자를 계산한다. 일부 양태에서, DMR의 메틸화 상태는 치수를 정의하고, 다차원 공간의 값을 가질 수 있으며, 다중 DMR의 메틸화 상태에 의해 정의된 좌표가 예를 들어 암 위험도와 관련하여, 예를 들어 사용자에게 보고되는 결과이다.

[0027] 일부 양태는 저장 매체 및 메모리 구성요소를 포함한다. 메모리 구성요소(예: 휘발성 및/또는 비휘발성 메모리)는 지시(예: 본원에 제공된 바와 같은 프로세스의 양태) 및/또는 데이터(예: 메틸화 측정, 서열 및 이와 관련된 통계적 설명과 같은 작업 정보)를 저장하는 용도를 갖는다. 일부 양태는 또한 하나 이상의 CPU, 그래픽 카드 및 사용자 인터페이스(예: 디스플레이와 같은 출력 장치 및 키보드와 같은 입력 장치를 포함)를 포함하는 시스템에 관한 것이다.

[0028] 상기 기술과 관련된 프로그램가능한 기계는 기존의 현존하는 기술 및 개발중인 기술 또는 이제개발될 기술(예: 양자 컴퓨터, 화학 컴퓨터, DNA 컴퓨터, 광학 컴퓨터, 스핀트로닉스 기반의 컴퓨터 등)을 포함하다.

[0029] 일부 양태에서, 상기 기술은 데이터를 전송하기 위한 유선(예: 금속 케이블, 광섬유) 또는 무선 전송 매체를 포함한다. 예를 들어, 일부 양태는 네트워크(예를 들어, 근거리 통신망(LAN), 광역 통신망(WAN), 애드-혹 네트워크, 인터넷 등)을 통한 데이터 전송에 관한 것이다. 일부 양태에서, 프로그램가능한 기계는 피어(peer)와 같은 상기 네트워크 상에 존재하고, 일부 양태에서는 상기 프로그램가능한 기계는 고객/서버 관계를 갖는다.

[0030] 일부 양태에서, 데이터는 하드 디스크, 플래시 메모리, 광 매체, 플로피 디스크 등과 같은 컴퓨터-판독가능한 저장 매체 상에 저장된다.

[0031] 일부 양태에서, 본원에 제공된 기술은 본원에 기재된 바와 같은 방법을 수행하기 위해 함께 작동하는 복수개의 프로그램 가능한 디바이스들과 관련된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 복수개의 컴퓨터(예: 네트워크에 의해 연결됨)는 클러스터 컴퓨팅 또는 그리드 컴퓨팅, 또는 인터넷, 광섬유와 같이 종래 네트워크 인터페이스 또는 무선 네트워크 기술에 의해 네트워크(개인, 공용 또는 인터넷)에 연결된 완전 컴퓨터(온보드 CPU, 저장, 전원 공급장치, 네트워크 인터페이스 등을 구비)에 의존하는 일부 다른 분산 컴퓨터 구조를 수행하는데 있어서, 데이터를 수집하고 처리하기 위해 동시에 작동할 수 있다.

- [0032] 예를 들어, 일부 양태는 컴퓨터-관독가능한 매체를 함유하는 컴퓨터를 제공한다. 상기 양태는 프로세서에 결합된 랜덤 액세스 메모리(RAM)를 함유한다. 상기 프로세서는 메모리에 저장된 컴퓨터-실행가능한 프로그램 지시를 실행한다. 이러한 프로세서는 마이크로프로세서, ASIC, 상태 머신 또는 기타 프로세서를 함유할 수 있으며, 임의의 수많은 컴퓨터 프로세서, 예컨대, 캘리포니아주 산타 클라라 소재의 인텔 코포레이션 및 일리노이즈 샤움버그 소재의 모토롤라 코포레이션의 프로세서일 수 있다. 이러한 프로세서는 매체, 예를 들어 컴퓨터-관독가능한 매체를 함유하거나 또는 상기 매체와 통신할 수 있는데, 상기 매체는 상기 프로세서에 의해 실행될 때 상기 프로세서가 본원에 기재된 단계들을 수행하도록 하는 지시를 저장한다.
- [0033] 컴퓨터-관독가능한 매체의 양태는 컴퓨터-관독가능한 지시를 프로세서에 제공할 수 있는 전자, 광학, 자기 또는 기타 저장 또는 전송 디바이스를 함유하지만, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 매체의 다른 예는 플로피 디스크, CD-ROM, DVD, 자기 디스크, 메모리 칩, ROM, RAM, ASIC, 구성된 프로세서, 모든 광 매체, 모든 자기 테이프 또는 기타 자기 매체, 또는 컴퓨터 프로세서가 지시를 관독할 수 있게 하는 임의의 기타 매체를 함유하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 다양한 다른 형태의 컴퓨터-관독가능한 매체는 라우터(router), 개인 또는 공용 네트워크, 또는 유선 및 무선 둘다인 기타 전송 장치 또는 채널을 비롯하여 컴퓨터로 지시를 전송 또는 전달할 수 있다. 상기 지시는 예를 들어 C, C++, C#, Visual Basic, Java, Python, Perl 및 JavaScript를 비롯한 임의의 적합한 컴퓨터-프로그래밍 언어의 코드를 포함할 수 있다.
- [0034] 일부 양태에서 컴퓨터는 네트워크에 연결된다. 컴퓨터는 또한 마우스, CD-ROM, DVD, 키보드, 디스플레이 또는 기타 입력 또는 출력 디바이스와 같은 다수의 외부 또는 내부 디바이스를 함유할 수 있다. 컴퓨터의 예는 개인용 컴퓨터, 디지털 보조장치, 개인용 정보 단말기, 휴대 전화, 모바일 폰, 스마트 폰, 호출기, 디지털 태블릿, 노트북 컴퓨터, 인터넷 정보기기 및 기타 프로세서-기반 디바이스이다. 일반적으로, 본원에 제공된 기술의 측면과 관련된 컴퓨터는 본원에 제공된 기술을 포함한 하나 이상의 프로그램을 서포트할 수 있는, Microsoft Windows, Linux, UNIX, Mac OS X 등과 같은 임의의 운영 시스템에서 작동하는 임의의 유형의 프로세서-기반의 플랫폼일 수 있다. 일부 양태는 다른 응용 프로그램(예를 들어, 애플리케이션)을 실행하는 개인용 컴퓨터를 포함한다. 상기 애플리케이션은 메모리에 함유될 수 있으며, 예를 들어 워드 프로세싱 애플리케이션, 스프레드시트 애플리케이션, 이메일 애플리케이션, 인스턴트 메신저 애플리케이션, 프리젠테이션 애플리케이션, 인터넷 브라우저 애플리케이션, 캘린더/오르거나이저 애플리케이션 및 고객 디바이스에 의해 실행될 수 있는 임의의 기타 애플리케이션을 함유할 수 있다.
- [0035] 상기 기술과 관련된 것으로 본원에 기재된 모든 상기한 구성요소, 컴퓨터 및 시스템은 논리적 또는 가상적일 수 있다.
- [0036] 따라서, 대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암을 스크리닝하는 방법에 관한 기술이 본원에 제공되며, 상기 방법은 대상체로부터 수득된 샘플(예: 전립선 조직)(예: 혈장 샘플) 내의 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계 및 상기 마커의 메틸화 상태가, 전립선 암을 갖지 않은 대상체에서 검정된 마커의 메틸화 상태와 다를 때 상기 대상체가 전립선 암을 갖는 것으로 동정하는 단계를 포함하고, 상기 마커는 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 차별적 메틸화 영역(DMR) 내의 염기를 포함한다.
- [0037] 상기 대상체로부터 수득된 샘플이 전립선 조직인 일부 양태에서, 상기 마커는 ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택된다.
- [0038] 상기 대상체로부터 수득된 샘플이 전립선 조직인 일부 양태에서, 상기 마커는 SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된다.
- [0039] 상기 대상체로부터 수득된 샘플이 혈장인 일부 양태에서, 상기 양태는 하기로부터 선택된다: max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047.
- [0040] 상기 기술은 전립선 암을 동정하고 식별하는 것과 관련된다. 일부 양태는 복수 종의 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 예를 들어, 2 내지 11 내지 100 또는 140 종의 마커를 검정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0041] 상기 기술은 평가된 메틸화 상태에 제한되지 않다. 일부 양태에서, 상기 샘플 내의 마커의 메틸화 상태를 평가

하는 단계는 1개 염기의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 샘플 내의 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계는 복수개의 염기에서의 메틸화 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 또한, 일부 양태에서, 상기 마커의 메틸화 상태는 상기 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 상기 마커의 증가된 메틸화를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 마커의 메틸화 상태는 상기 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 상기 마커의 감소된 메틸화를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 마커의 메틸화 상태는 상기 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 상기 마커의 상이한 메틸화 패턴을 포함한다.

[0042] 또한, 일부 양태에서, 상기 마커는 100개 이하의 염기 영역이거나, 상기 마커는 500개 이하의 염기 영역이거나, 상기 마커는 1000개 이하의 염기 영역이거나, 상기 마커는 5000개 이하의 염기 영역이거나, 또는 일부 양태에서, 상기 마커는 1개의 염기이다. 일부 양태에서, 상기 마커는 높은 CpG 밀도 프로모터 내에 있다.

[0043] 상기 기술은 샘플 유형에 의해 제한되지 않다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플(예: 전립선 조직 샘플), 혈액 샘플(예: 혈장, 혈청, 전혈), 배설물 또는 소변 샘플이다.

[0044] 또한, 상기 기술은 메틸화 상태를 결정하는데 사용되는 방법에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 상기 검정은 메틸화 특이적 폴리머라제연쇄 반응, 핵산 서열분석, 질량 분광분석, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량-기반 분리 또는 표적 포획을 이용하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오티드의 이용을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 기술은 메틸화 상태를 결정하기 위한 대량 병렬 서열분석(예: 차세대 서열분석), 예컨대, 합성에 의한 서열분석, 실시간(예를 들면, 단일 문자) 서열분석, 비드 앤 멀전 서열분석, 나노포어 서열분석(nanopore sequencing) 등을 이용한다.

[0045] 상기 기술은 DMR을 검출하기 위한 시약을 제공하며, 예를 들어 일부 양태에서 서열 번호 1-146 및/또는 서열번호 147-234에 의해 제공된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 세트가 제공된다. 일부 양태에서, DMR내에 염기 를 갖는 염색체 영역에 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 DMR의 메틸화 상태에 민감성인 올리고뉴클레오티드가 제공된다.

[0046] 상기 기술은 다양한 마커 패널을 제공하며, 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 마커는 ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047인 주석을 갖고 상기 마커를 포함하는 염색체 영역을 포함한다 (실시예 I-VI 참조).

[0047] 일부 양태에서, 상기 마커는 SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487인 주석을 갖고 상기 마커를 포함하는 염색체 영역을 포함한다 (실시예 VIII 참조).

[0048] 상기 수득된 샘플이 혈장 샘플인 일부 양태에서, 상기 마커는 max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047인 주석을 갖고 상기 마커를 포함하는 염색체 영역을 포함한다.

[0049] 키트 양태가 제공되며, 예를 들어 키트는 바이설파이트 시약; 및 DMR 1-140 (표 1 또는 표 13)로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR의 서열을 포함하고 전립선 암을 갖지 않은 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조 핵산을 포함한다. 일부 양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 바이설파이트 시약 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 양태에서, 키트는 바이설파이트 시약; 및 DMR 1-140 (표 1 또는 표 13)로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR의 서열을 포함하고 전립선 암을 갖는 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조 핵산을 포함한다. 일부 키트 양태는 대상체로부터의 샘플(예: 대변 샘플; 전립선 조직 샘플; 혈장 샘플)을 수득하기 위한 샘플 수집기; 상기 샘플로부터 핵산을 단리하기 위한 시약; 바이설파이트 시약; 및 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0050] 상기 기술은 조성물의 양태(예: 반응 혼합물)에 관련된다. 일부 양태에서 DMR을 포함하는 핵산 및 바이설파이트 시약을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 양태는 DMR을 포함하는 핵산 및 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 양태는 DMR을 포함하는 핵산 및 메틸화-민감성 제한 효소를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 양태는 DMR을 포함하는 핵산 및 폴리머라제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0051] 추가적인 관련 방법 양태가 대상체로부터 수득된 샘플(예: 전립선 조직 샘플, 혈장 샘플, 대변 샘플) 내의 전립선 암을 스크리닝하기 위해 제공되고, 예를 들어, 일 방법은 (표 1 또는 표 13으로부터의) 1종 이상의 DMR 1-

140인 DMR 내에 염기를 포함하는 샘플 내의 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 상기 대상체 샘플의 상기 마커의 메틸화 상태와, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 정상 대조 샘플의 마커의 메틸화 상태를 비교하는 단계; 및 상기 대상체 샘플 및 상기 정상 대조 샘플의 메틸화 상태의 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고 상기 p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 또는 0.0001이다. 방법의 일부 양태는 DMR을 포함하는 핵산과 바이설파이트 시약을 반응시켜 바이설파이트-반응된 핵산을 생성시키는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산을 서열분석하여 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 제공하는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열과, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오티드 서열을 비교하여 상기 2개 서열의 차이를 동정하는 단계; 및 차이가 존재할 때 전립선 암을 갖는 것으로 대상체를 동정하는 단계를 제공한다.

[0052]

대상체로부터 수득된 샘플 내의 전립선 암을 스크리닝하기 위한 시스템이 상기 기술에 의해 제공된다. 시스템의 예시적인 양태는 예를 들어, 대상체로부터 수득된 샘플(예: 전립선 조직 샘플, 혈장 샘플, 대변 샘플) 내의 전립선 암을 스크리닝하는 시스템을 함유하고, 상기 시스템은 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 상기 샘플의 메틸화 상태와, 데이터베이스에 보고된 대조 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태를 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 전립선-암-관련 메틸화 상태를 사용자에게 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함한다. 일부 양태에서 경고는 다중 검정으로부터의 결과(예: 예를 들어 표 1 또는 표 3에 제공된 바와 같은 다중 마커, 예를 들어 DMR의 메틸화 상태를 결정)를 수신하고 상기 다중 결과에 기반하여 보고하려는 값 또는 결과를 계산하는 소프트웨어 구성 요소에 의해 결정된다. 일부 양태는 사용자(예를 들어, 의사, 간호사, 임상의 등)에게 보고하려는 값 또는 결과 및/또는 경고를 계산하는데 사용하기 위해 본원에 제공된, 각각의 DMR과 관련된 가중 파라미터의 데이터베이스를 제공한다. 일부 양태에서, 다중 검정의 모든 결과가 보고되고, 일부 양태에서, 하나 이상의 결과가 이용되어, 대상체의 암 위험도를 나타내는 다중 검정의 하나 이상 결과 종합에 기반하여 스코어, 값, 또는 결과를 제공한다.

[0053]

시스템의 일부 양태에서, 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 시스템은 핵산을 단리하기 위한 구성요소, 대변 샘플을 수집하기 위한 구성요소와 같이 샘플 수집을 위한 구성요소를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 시스템은 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 데이터베이스는 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 핵산 서열을 포함한다. 또한, 핵산, 예를 들어 각각의 핵산이 DMR을 포함하는 서열을 갖는 것인 핵산 세트가 제공된다. 일부 양태에서, 각각의 핵산이 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 서열을 갖는 것인 핵산 세트. 관련 시스템 양태는 기재된 바와 같은 핵산 세트 및 상기 핵산 세트와 관련된 핵산 서열의 데이터베이스를 포함한다. 일부 양태는 바이설파이트 시약을 추가로 포함한다. 또한, 일부 양태는 핵산 서열분석기를 추가로 포함한다.

[0054]

일부 양태에서, 샘플을 특징화하는 방법이 제공되며, 상기 샘플은 인간 환자로부터의 샘플(예: 전립선 조직 샘플; 혈장 샘플; 대변 샘플)이다. 예를 들어, 일부 양태에서, 이들 양태는 인간 환자의 샘플로부터 DNA를 수득하는 단계; 표 1 또는 표 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 차별적 메틸화 영역(DMR) 내의 염기를 포함하는 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계; 및 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 검정된 메틸화 상태와, 전립선 암을 갖지 않은 인간 환자에 대한 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 수준 기준을 비교하는 단계를 포함한다.

[0055]

이러한 방법은 인간 환자로부터의 특정 샘플 유형에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 전립선 조직 샘플이다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 혈장 샘플이다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플 또는 소변 샘플이다.

[0056]

일부 양태에서, 상기 방법은 복수 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 2 내지 11 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 12 내지 140 종의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 상기 샘플 내의 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태의 검정이 1개 염기의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 상기 샘플 내의 1종 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태의 검정이 복수개의 염기에서의 메틸화 정도를 결정하는 단계를 포함하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 순방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하는 단계 또는 역방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하는 단계를 포함한다.

[0057]

일부 양태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 100 개 이하의 염기 영역이다. 일부 양태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 500 개 이하의 염기 영역이다. 일부 양태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 1000 개 이하의 염기 영역이다. 일부 양

태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 5000 개 이하의 염기 영역이다. 일부 양태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 1개의 염기이다. 일부 양태에서, 상기 DNA 메틸화 마커는 높은 CpG 밀도 프로모터 내에 있다.

[0058] 일부 양태에서, 상기 검정은 메틸화 특이적 폴리머라제연쇄 반응, 핵산 서열분석, 질량 분광분석, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량-기반 분리 또는 표적 포획을 이용하는 것을 포함한다.

[0059] 일부 양태에서, 상기 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오티드의 이용을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 메틸화 특이적 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1-146 및/또는 서열번호 147-234로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0060] 일부 양태에서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역: ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047 은 상기 DNA 메틸화 마커를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 DMR은 표 3 으로부터 비롯된다.

[0061] 일부 양태에서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역: SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNJL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487 은 상기 DNA 메틸화 마커를 포함한다.

[0062] 상기 수득된 샘플이 혈장 샘플인 일부 양태에서, 상기 마커는 max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047인 주석을 갖고 상기 마커를 포함하는 염색체 영역을 포함한다.

[0063] 일부 양태에서, 상기 방법은 2종의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 표 1 또는 표 3의 열(row)에 제공된 한 쌍의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계를 포함한다.

[0064] 특정 양태에서, 상기 기술은 인간 환자로부터 수득된 샘플을 특징화하기 위한 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 표 1 및 표 13의 DMR 1-140로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR 내의 염기를 포함하는 샘플 내의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 상기 환자 샘플로부터의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태와, 전립선 암을 갖지 않은 인간 대상체의 정상 대조 샘플로부터의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 비교하는 단계; 및 상기 인간 환자 및 정상 대조 샘플의 메틸화 상태의 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고 상기 p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 또는 0.0001이다.

[0065] 특정 양태에서, 상기 기술은 인간 대상체로부터 수득된 하기 샘플을 특징화하기 위한 방법을 제공하고: (예: 전립선 조직 샘플; 혈장 샘플; 대변 샘플), 상기 방법은 DMR을 포함하는 핵산과 바이설파이트 시약을 반응시켜 바이설파이트-반응된 핵산을 생성시키는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산을 서열분석하여 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 제공하는 단계; 상기 바이설파이트-반응된 핵산의 뉴클레오티드 서열과, 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오티드 서열을 비교하여 상기 2개 서열의 차이를 동정하는 단계를 포함한다.

[0066] 특정 양태에서, 상기 기술은 인간 대상체로부터 수득된 하기 샘플을 특징화하기 위한 시스템을 제공하고:(예: 전립선 조직 샘플, 혈장 샘플, 대변 샘플), 상기 시스템은 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성 요소, 상기 샘플의 메틸화 상태와, 데이터베이스에 보고된 대조 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태를 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합에 기반하여 단일 값을 결정하고 전립선 암-관련 메틸화 상태를 사용자에게 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함한다.

[0067] 일부 양태에서, 상기 시스템은 핵산을 단리하기 위한 구성요소를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 시스템은 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함한다.

[0068] 일부 양태에서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈액 샘플 또는 소변 샘플이다.

[0069] 일부 양태에서, 상기 데이터베이스는 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 데이터베이스는 전립선 암을 갖지 않은 대상체의 핵산 서열을 포함한다.

[0070] 추가적인 양태는 본원에 포함된 교시내용(teaching)에 기반하여 관련업계 숙련자에게 명백할 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 전립선 암 스크리닝 기술, 및 특히, 비배타적으로, 상기 전립선 암의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다. 상기 기술이 본원에 기재될 때, 사용된 섹션 제목은 단지 체계화 목적을 위한 것이고, 어떠한 방식으로도 본 발명의 청구대상을 한정하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0072] 다양한 양태의 상세한 설명에서, 설명 목적을 위해, 개시된 양태의 완전한 이해를 제공하기 위해 많은 특정 세부사항이 기재되어 있다. 그러나, 당업계 숙련자는 이들 다양한 양태가 상기 특정 세부사항을 이용하거나 또는 이용하지 않고 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 다른 예에서, 구조 및 디바이스는 블록 다이어그램 형태로 표시된다. 또한, 당업계 숙련자는, 방법이 제시되어 수행된 특정 서열이 예시적인 것이고 상기 서열이 변경될 수 있으며 본원에 개시된 다양한 양태의 취지 및 범위 내에 있는 것으로 고려된다는 것을 쉽게 인식할 것이다.

[0073] 특히, 특히 출원, 기사, 서적, 논문 및 인터넷 웹 페이지를 비제한적으로 포함하여 본 출원에 인용된 모든 문헌 및 유사한 자료가 모든 목적을 위해 전체적으로 참고문헌으로 명백하게 포함된다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본원에 기재된 다양한 양태가 속한 당업계의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 포함된 참고문헌 내의 용어 정의가 본원 교시내용에 제공된 정의와 다른 것으로 보일 때, 본원 교시내용에 제공된 정의가 우선한다.

[0074] 정의

[0075] 본원 기술의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 문구가 하기에 정의된다. 추가적인 정의가 상세한 설명 전반에 기재되어 있다.

[0076] 명세서 및 청구범위 전반에서, 문맥이 명백하게 다른 것으로 나타내지 않는 한, 하기 용어는 본원에 명시적으로 관련된 의미를 갖는다. 본원에서 사용될 때 "일 양태에서" 문구는 동일 양태를 의미할 수도 있으나 반드시 동일 양태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 본원에서 사용될 때 "또 다른 양태에서" 문구는 다른 양태일 수 있으나, 반드시 다른 양태일 필요는 없다. 따라서, 하기에 기재되는 바와 같이, 본 발명의 다양한 양태는 본 발명의 범위 또는 취지를 벗어나지 않고 용이하게 조합될 수 있다.

[0077] 또한, 본원에서 사용될 때 "또는" 용어는 포괄적인 "또는" 연산자이며, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, "및/또는" 용어와 동등하다. "기반한" 용어는 배타적인 것이 아니며, 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않는 한 기재되지 않은 추가적인 요소에 기반하는 것을 허용할 수 있다. 또한, 본 명세서 전반에서 "일(a, an)" 및 "상기(the)"의 의미는 복수 언급을 포함한다. "내의(in)"의 의미는 "내의"와 "에서"를 포함하다. "

[0078] 본원에서 사용될 때 "핵산" 또는 "핵산 분자"는 일반적으로 임의의 리보핵산 또는 데옥시리보핵산을 의미하고, 이들은 비변형된 또는 변형된 DNA 또는 RNA일 수 있다. "핵산"은 단일- 및 이중-가닥의 핵산을 제한없이 함유한다. 본원에서 사용될 때 "핵산" 용어는 또한 1개 이상의 변형된 염기를 함유하는 전술한 바와 같은 DNA를 함유한다. 따라서, 안정성 또는 다른 이유를 위해 변형된 주쇄를 갖는 DNA는 "핵산"이다. 본원에서 사용될 때 "핵산" 용어는 핵산의 상기 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태뿐만 아니라 예를 들어 단순 및 복합 세포를 비롯한 바이러스 및 세포의 DNA 특징을 갖는 화학적 형태를 포괄한다.

[0079] "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "뉴클레오티드" 또는 "핵산" 용어는 2 개 이상, 바람직하게는 3 개 초과, 및 일반적으로 10 개 초과의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 갖는 분자를 의미한다. 정확한 크기는 많은 요인에 따라 좌우되며, 상기 많은 요인은 또한 상기 올리고뉴클레오티드의 최종 기능 또는 용도에 따라 좌우된다. 상기 올리고뉴클레오티드는 화학적 합성, DNA 복제, 역전사 또는 이들의 조합을 비롯한 임의의 방식으로 발생될 수 있다. DNA를 위한 전형적인 데옥시리보뉴클레오티드는 티민, 아데닌, 시토신 및 구아닌이다. RNA를 위한 전형적인 리보뉴클레오티드는 우라실, 아데닌, 시토신 및 구아닌이다.

[0080] 본원에서 사용될 때 핵산의 "유전자자리" 또는 "영역" 용어는 핵산의 하위영역, 예를 들어 염색체상의 유전자, 단일 뉴클레오티드, CpG 섬 등을 의미한다.

[0081] "상보적" 및 "상보성" 용어는 염기-짝짓기 규칙에 관련된 뉴클레오티드(예를 들어, 1개의 뉴클레오티드) 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 뉴클레오티드 서열)를 의미한다. 예를 들어, 서열 5'-A-G-T-3'은 서열 3'-T-C-A-5'에 상보적이다. 상보성은 '부분적'일 수 있되, 상기 핵산 염기의 오직 일부만이 염기 짝짓기 규칙에 따라 매칭된다. 또는, 상기 핵산 사이에 "완전한" 또는 "전체적인" 상보성이 있을 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성

정도는 핵산 가닥 사이의 하이브리드화의 효율 및 강도에 영향을 준다. 이는 핵산 간의 결합에 좌우되는 중폭 반응 및 검출 방법에서 특히 중요하다.

[0082] "유전자" 용어는 RNA 또는 폴리펩티드 또는 그의 전구체의 생성에 필요한 코딩 서열을 포함하는 핵산(예: DNA 또는 RNA) 서열을 의미한다. 기능적 폴리펩티드는 폴리펩티드의 목적하는 활성 또는 기능적 특성(예: 효소 활성, 리간드 결합, 신호 형질도입 등)이 보유되는 한, 전장 코딩 서열에 의해 또는 상기 코딩 서열의 임의 부분에 의해 인코딩될 수 있다. "부분(portion)" 용어는 유전자와 관련하여 사용될 때 상기 유전자의 단편을 의미한다. 상기 단편의 크기는 몇 개의 뉴클레오티드 내지 전체 유전자 서열에서 1 개의 뉴클레오티드를 마이너스한 범위일 수 있다. 따라서, "유전자의 적어도 일부를 포함하는 뉴클레오티드"는 상기 유전자의 단편 또는 전체 유전자를 포함할 수 있다.

[0083] "유전자" 용어는 또한 구조 유전자의 코딩 영역을 포함하고, 예를 들어 상기 유전자가 전장-길이의 mRNA (예: 코딩, 조절, 구조 및 기타 서열을 포함함)의 길이에 상응하도록, 예를 들어, 어느 하나의 단부에서 약 1kb의 거리에 대해, 5' 및 3' 단부 모두에 있는 코딩 영역에 인접하게 위치한 서열을 함유한다. 상기 코딩 영역의 5'에 위치하고 상기 mRNA 상에 존재하는 서열은 5' 비-번역 또는 미번역 서열로 지칭된다. 상기 코딩 영역의 3' 또는 다운스트림에 위치하며 상기 mRNA 상에 존재하는 서열은 3' 비-번역 또는 3' 미번역 서열로 지칭된다. "유전자" 용어는 유전자의 cDNA 및 게놈 형태를 모두 포함한다. 일부 유기체(예: 진핵 생물)에서, 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론" 또는 "개입 영역" 또는 "개입 서열"로 불리는 비-코딩 서열에 의해 인터럽트된 코딩 영역을 함유한다. 인트론은 핵 RNA (hnRNA)로 전사되는 유전자의 분절이다; 인트론은 인핸서(enhancer)와 같은 조절 요소를 함유할 수 있다. 인트론은 핵 또는 일차 전사체로부터 제거되거나 또는 "스플라이싱 아웃"된다; 따라서, 인트론은 상기 메신저 RNA (mRNA) 전사체에 존재하지 않는다. 상기 mRNA는 발생기 폴리펩티드(nascent polypeptide) 내의 아미노산의 서열 또는 순서를 특정하기 위해 번역 동안 기능한다.

[0084] 인트론을 함유하는 것 이외에, 유전자의 게놈 형태는 또한 상기 RNA 전사체 상에 존재하는 상기 서열의 5' 및 3' 말단 모두에 위치한 서열을 함유할 수 있다. 이들 서열은 "측접(flanking)" 서열 또는 영역으로 지칭된다(이들 측접 서열은 상기 mRNA 전사체 상에 존재하는 비-번역 서열에 대해 5' 또는 3'에 위치한다). 상기 5' 측접 영역은 상기 유전자의 전사를 제어하거나 영향을 주는 프로모터 및 인핸서와 같은 조절 서열을 함유할 수 있다. 상기 3' 측접 영역은 전사의 종결, 전사후 절단 및 폴리아데닐화를 지시하는 서열을 함유할 수 있다.

[0085] "야생형" 용어가 유전자와 관련될 때, 자연 발생 공급원으로부터 단리된 유전자의 특징을 갖는 유전자를 의미한다. "야생형" 용어가 유전자 생성물과 관련될 때, 자연 발생 공급원으로부터 단리된 유전자 생성물의 특징을 갖는 유전자 생성물을 의미한다. 대상에 적용될 때 "자연-발생" 용어는 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미하다. 예를 들어, 자연에서 공급원으로부터 단리될 수 있고 실험실에서 사람 손으로 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연-발생이다. 야생형 유전자는 종종 개체군에서 가장 빈번하게 관찰되는 유전자 또는 대립유전자이며, 따라서 임의적으로 상기 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형태로 지칭된다. 대조적으로, 유전자 또는 유전자 생성물과 관련하여 지칭될 때 "변형" 또는 "돌연변이" 용어는 상기 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교할 때 서열 및/또는 기능적 특성의 변형(예: 변형된 특징)을 나타내는 유전자 또는 유전자 생성물을 각각 의미한다. 자연-발생의 돌연변이는 단리될 수 있음을 유념한다; 이들은 상기 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교할 때 변형 특징을 갖는다는 사실에 의해 동정된다.

[0086] "대립유전자" 용어는 유전자의 변이를 의미한다; 상기 변이는 변이체 및 돌연변이체, 다형성 유전자자리, 및 단일 뉴클레오티드 다형성 유전자자리, 프레임이동 및 스플라이싱 돌연변이를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 대립유전자는 상기 개체군에서 자연 발생할 수 있거나 또는 상기 개체군의 임의의 특정 개체의 수명동안 발생할 수 있다.

[0087] 따라서, "변이체" 및 "돌연변이체" 용어는 뉴클레오티드 서열과 관련하여 사용될 때, 일반적으로 관련된 또 다른 뉴클레오티드 서열과 1개 이상의 뉴클레오티드가 차이나는 핵산 서열을 의미한다. "변이"는 2개의 상이한 뉴클레오티드 서열간의 차이이다; 전형적으로, 1개의 서열이 기준 서열이다.

[0088] "중폭"은 주형 특이성을 포함하는 핵산 복제의 특수 사례이다. 이는 비-특이적 주형 복제(예: 주형-의존적이지만 특정 주형에 의존하지 않는 복제)와 대조된다. 주형 특이성은 본원에서 복제정확도(예: 적절한 폴리뉴클레오티드 서열의 합성) 및 뉴클레오티드(리보- 또는 데옥시리보-) 특이성과 구별된다. 주형 특이성은 "표적" 특이성 관점에서 종종 기재된다. 표적 서열은 다른 핵산으로부터 분류되어야 하는 의미에서 "표적"이다. 중폭 기술은 일차적으로 상기 분류를 위해 설계되었다.

[0089]

핵산의 증폭은 전형적으로 소량의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 1개의 폴리뉴클레오티드 분자, 10 내지 100 카피의 폴리뉴클레오티드 분자이며, 이들은 완전히 동일하거나 동일하지 않을 수 있음)로부터 시작하는 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드 일부의 다중 카피의 생성물을 일반적으로 의미하고, 상기 증폭 생성물 또는 앰플리콘은 일반적으로 검출 가능하다. 폴리뉴클레오티드의 증폭은 다양한 화학적 및 효소적 프로세스를 포함한다. 폴리미라제연쇄 반응(PCR) 또는 리가제연쇄 반응(LCR; 예를 들어, 미국 특허 제5,494,810호 참조; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨)동안 표적 또는 주형 DNA 분자의 1 카피 또는 몇몇 카피로부터 다중 DNA 카피를 발생시키는 것이 증폭의 형태이다. 추가적인 증폭 유형은 대립유전자-특이적인 PCR(예를 들어, 미국 특허 제5,639,611호 참조; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 어셈블리 PCR(예를 들어, 미국 특허 제5,965,408호 참조; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 헬리카제-의존적인 증폭(Helicase-dependent amplification)(예를 들어, 미국 특허 제7,662,594호 참조; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 핫-스타트(Hot-start) PCR(예를 들어, 미국 특허 제5,773,258호 및 제5,338,671호 참고; 각각 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 서열간(intersequence)-특이적 PCR, 인버스(inverse) PCR(예를 들면, 문헌[Triglia, et al. (1988) Nucleic Acids Res., 16:8186] 참조; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 리게이션-매개된 PCR(예를 들어, 문헌[Guilfoyle, R. et al. (1988) Nucleic Acids Research, 25:1854-1858 (1997)] 참고; 미국 특허 제5,508,169호; 각각이 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 메틸화-특이적 PCR(예를 들어, 문헌[Herman, et al. (1996) PNAS 93(13) 9821-9826] 참고; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 미니프라이머(miniprimer) PCR, 멀티플렉스 리게이션-의존적 프로브 증폭(multiplex ligation-dependent probe amplification)(예를 들면, 문헌[Schouten, et al. (2002) Nucleic Acids Research 30(12): e57] 참고; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 멀티플렉스 PCR(예를 들면, 문헌[Chamberlain, et al. (1988) Nucleic Acids Research 16(23) 11141-11156]; [Ballabio, et al. (1990) Human Genetics 84(6) 571-573]; [Hayden, et al. (2008) BMC Genetics 9:80] 참고; 각각이 전체적으로 본원에서 참고 문헌으로 포함됨), 네스티드(nested) PCR, 오버랩-연장(overlap-extension) PCR(예를 들면, 문헌[Higuchi, et al. (1988) Nucleic Acids Research 16(15) 7351-7367] 참조; 본원에서 참고 문헌으로 전체적으로 포함됨), 실시간 PCR(예를 들어, 문헌[Higuchi, et al. (1992) Biotechnology 10:413-417]; [Higuchi, et al. (1993) Biotechnology 11:1026-1030] 참고; 각각이 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 역전사 PCR(예를 들면, 문헌[Bustin, S.A. (2000) J. Molecular Endocrinology 25:169-193] 참고; 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨), 고체상 PCR, 열적 비대칭 인터레이스된 PCR, 및 터치다운 PCR(예를 들면, 문헌[Don, et al. (1991) Nucleic Acids Research (1991) 19(14) 4008]; [Roux, K. (1994) Biotechniques 16 (5) 812-814]; [Hecker, et al. (1996) Biotechniques 20 (3) 478-485] 참고; 이들 각각은 본원에서 참고 문헌으로 전체적으로 포함됨)을 함유하지만, 이들에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오티드 증폭은 또한 디지털 PCR을 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kalinina, et al. (1999) Nucleic Acids Research 25: 1999-2004, (1997)]; [Vogelstein and Kinzler, Proc Natl Acad Sci USA. 96; 9236-41, (1999)]; 국제특허 공개공보 WO제05023091A2호; 미국 특허출원 공개공보 제20070202525호 참조; 이들 각각은 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함된다).

[0090]

"폴리미라제연쇄 반응(PCR)" 용어는 K. B. Mullis의 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,965,188호의 방법을 의미하고, 상기 문헌은 클로닝 또는 정제없이 계놈 DNA의 혼합물에서 표적 서열 분절의 농도를 증가시키는 방법을 기재한다 상기 표적 서열을 증폭시키는 상기 프로세스는 원하는 표적 서열을 함유하는 DNA 혼합물에 2 개의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 과도한 과량으로 도입하는 단계와, 이후에, DNA 폴리미라제의 존재 하에 열 사이클링의 정확한 서열을 따르는 단계로 이루어진다. 상기 2 개의 프라이머는 상기 이중 가닥의 표적 서열의 각각의 가닥에 상보적이다. 증폭을 수행하기 위해, 상기 혼합물은 변성되고, 이어서 상기 프라이머는 상기 표적 분자 내의 상보적인 서열에 어닐링된다. 어닐링 이후에, 상기 프라이머는 상보적 가닥의 새로운 쌍을 형성하도록 폴리미라제를 사용하여 연장된다. 변성, 프라이머 어닐링 및 폴리미라제연장의 단계는 원하는 표적 서열의 증폭된 분절을 고농도로 수득하기 위해 여러 번 반복될 수 있다(예: 변성, 어닐링 및 연장은 하나의 "사이클"을 구성한다; 수많은 "사이클들"이 있을 수 있다). 상기 원하는 표적 서열의 증폭된 분절의 길이는 서로에 대한 프라이머의 상대적 위치에 의해 결정되고, 따라서, 이 길이는 제어 가능한 파라미터이다. 상기 프로세스의 반복 측면으로 인해, 상기 방법은 "폴리미라제연쇄 반응(PCR)"으로 지칭된다. 상기 표적 서열의 원하는 증폭된 분절이 상기 혼합물 내에서 주된 서열(농도 관점)로 되기 때문에, 이들은 "PCR 증폭"된 것이라고 지칭되고 "PCR 생성물" 또는 "앰플리콘"이다.

[0091]

주형 특이성은 효소 선택에 의해 대부분의 증폭 기술에서 달성된다. 증폭 효소는 이들이 사용되는 조건 하에 핵산의 이중 혼합물에 있는 핵산의 특이적 서열만을 가공하는 효소이다. 예를 들어, Q-베타 레플리카제의 경우에,

MDV-1 RNA는 상기 레플리카제에 대해 특이적인 주형이다(문헌[Kacian et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 : 3038 [1972]]). 다른 핵산은 상기 증폭 효소에 의해 복제되지 않는다. 유사하게, T7 RNA 폴리머라제의 경우에, 상기 증폭 효소는 자체 프로모터에 대해 염격한 특이성을 갖는다 (문헌[Chamberlin et al, Nature, 228 : 227 [1970]]). T4 DNA 리가아제의 경우에, 상기 효소는 2개의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 리게이션하지 않으며, 상기 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 기재와 주형 사이에는 상기 리게이션 접합부에서 불일치가 있다(문헌[Wu and Wallace (1989) Genomics 4 : 560]). 최종적으로, 고온에서 기능하는 능력으로 인해 열안정성 주형-의존적 DNA 폴리머라제(예: Taq 및 Pfu DNA 폴리머라제)는, 결합되어 상기 프라이머에 의해 한정된 서열에 대해 높은 특이성을 나타내는 것으로 밝혀졌다; 상기 고온은 상기 표적 서열과의 프라이머 하이브리드화를 돋고 비-표적 서열과는 하이브리드화하지 않는 열역학적 조건을 초래한다 (문헌[H. A. Erlich (ed),PCR Technology, Stockton Press [1989]]).

[0092]

본원에서 사용될 때 "핵산 검출 검정" 용어는 관심대상인 핵산의 뉴클레오티드 조성을 결정하는 임의의 방법을 의미한다. 핵산 검출 검정은 DNA 서열분석 방법, 프로브 하이브리드화 방법, 구조 특이적 절단 검정(예: the INVADER assay, Hologic, Inc.)을 비제한적으로 함유하고, 이들은 예를 들어 미국특허 제5,846,717호, 제5,985,557호, 제5,994,069호, 제6,001,567호, 제6,090,543호 및 제6,872,816호; 문헌[Lyamichev et al., Nat. Biotech., 17: 292 (1999)], [Hall et al, PNAS, USA, 97: 8272 (2000)], 및 미국 제2009/0253142호; 효소 미스 매치 절단 방법 (예를 들어, Variagenics, U.S. 특허 제6,110,684호, 제5,958,692호, 제5,851,770호, 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨); 폴리머라제 연쇄 반응; 분지형 하이브리드화 방법 (예: Chiron, U.S. 특허 제5,849,481호, 제5,710,264호, 제5,124,246호 및 제5,624,802호, 본원에서 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨); 롤링 서클 복제(rolling circle replication) (예를 들어, 미국특허 제6,210,884호, 제6,183,960호 및 제6,235,502호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); NASBA (예를 들어, 미국 특허 제5,409,818호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); 문자 비콘(molecular beacon) 기술 (예를 들어, 미국 특허 제6,150,097호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); 이-센서 기술(Motorola, 미국특허 제6,248,229호, 제6,221,583호, 제6,013,170호 및 제6,063,573호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); 사이클링 프로브 기술 (예를 들어, 미국 특허 제5,403,711호, 제5,011,769호 및 제5,660,988호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); Dade Behring 신호 증폭 방법 (예를 들어, 미국 특허 제6,121,001호, 제6,110,677호, 제5,914,230호, 제5,882,867호 및 제5,792,614호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨); 리가아제연쇄 반응 (예를 들어, 문헌[Barnay Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 189-93 (1991)]); 및 샌드위치 하이브리드화 방법 (예를 들어, 미국 특허 제5,288,609호, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함됨)에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에서 모든 목적을 위해 전체적으로 참고문헌으로 포함된다).

[0093]

"증폭가능한 핵산" 용어는 임의의 증폭 방법에 의해 증폭될 수 있는 핵산을 의미한다. "증폭가능한 핵산"은 일반적으로 "샘플 주형"을 포함하는 것으로 고려된다. "

[0094]

"샘플 주형" 용어는 "표적(target)"(하기 정의됨)의 존재에 대해 분석되는 샘플로부터 유래된 핵산을 의미한다. 대조적으로, "배경 주형"은 샘플 내에 존재할 수 있는 또는 존재하지 않을 수 있는 샘플 주형 이외의 핵산과 관련하여 사용된다. 배경 주형은 거의 대개는 의도하지 않은 것이다. 이것은 캐리오버(carryover)의 결과일 수 있거나, 또는 상기 샘플에서 정제되어 제거되기를 원하는 핵산 오염물의 존재때문일 수도 있다. 예를 들어, 검출하려는 것 이외의 유기체 핵산이 테스트 샘플 내의 배경으로 존재할 수 있다.

[0095]

"프라이머" 용어는 핵산 가닥에 상보적인 프라이머 연장 생성물의 합성이 유도되는 조건 하에 놓일 때 합성 개시점으로 작용할 수 있는, 정제된 제한효소 분해에서와 같이 자연 발생되거나 또는 합성에 의해 생산될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다(예를 들어, DNA 폴리머라제와 같은 유도제 및 뉴클레오티드의 존재하에 적절한 온도 및 pH에서). 상기 프라이머는 최대 증폭 효율을 위해 바람직하게는 단일 가닥이지만, 대안적으로 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥일 경우에, 상기 프라이머는 연장 생성물을 제조하는데 사용하기 이전에 먼저 그의 가닥을 분리하도록 처리한다. 바람직하게, 상기 프라이머는 올리고데옥시리보뉴클레오티드이다. 상기 프라이머는 상기 유도제의 존재하에 연장 생성물의 합성을 프라이밍할 정도로 충분히 길어야 한다. 상기 프라이머의 정확한 길이는 온도, 프라이머 공급원 및 방법의 사용을 비롯한 많은 요인에 따라 좌우된다.

[0096]

"프로브" 용어는 관심대상인 또 다른 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화할 수 있는, 정제된 제한효소 분해에서와 같이 자연 발생된 또는 합성, 재조합 또는 PCR에 의해 생성된 올리고뉴클레오티드(예: 뉴클레오티드의 서열)를 의미한다. 프로브는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 프로브는 특정 유전자 서열 (예를 들어, "캡쳐 프로브")의 검출, 동정 및 단리에 유용하다. 본 발명에서 사용되는 임의의 프로브는 일부 양태에서 임의의 "리포터 문자"로 표지될 수 있어서, 효소 (예를 들어, ELISA뿐만 아니라 효소-기반의 조직화학적 검정법), 형광,

방사성 및 발광 시스템을 비제한적으로 포함하는 임의의 검출 시스템에서 검출될 수 있는 것으로 고려한다. 본 발명이 임의의 특정한 검출 시스템 또는 표지에 한정되는 것으로 고려하지 않는다.

[0097] 본원에서 사용될 때 "메틸화"는 시토신의 C5 또는 N4 위치, 아데닌의 N6 위치 또는 핵산 메틸화의 다른 유형에서의 시토신 메틸화를 의미한다. 시험관내 증폭된 DNA는 일반적으로 미메틸화되는데, 전형적인 시험관내 DNA 증폭 방법은 상기 증폭 주형의 메틸화 패턴을 유지하지 않기 때문이다. 그러나, "미메틸 DNA" 또는 "메틸화 DNA"는 또한 최초 주형이 각각 미메틸화 또는 메틸화된 증폭된 DNA를 의미할 수도 있다.

[0098] 따라서, 본원에서 사용될 때 "메틸화된 뉴클레오티드" 또는 "메틸화된 뉴클레오티드 염기"는 뉴클레오티드 염기 상의 메틸 잔기의 존재를 의미하며, 여기서 상기 메틸 잔기는 인식된 전형적인 뉴클레오티드 염기에는 존재하지 않는다. 예를 들어, 시토신은 그의 피리미딘 고리 상에 메틸 잔기를 함유하지 않지만, 5-메틸시토신은 그의 피리미딘 고리의 5 위치에서 메틸 잔기를 함유한다. 따라서, 시토신은 메틸화된 뉴클레오티드가 아니며, 5-메틸 시토신은 메틸화된 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시예에서, 티민은 그의 피리미딘 고리의 5위치에서 메틸 잔기를 함유한다; 그러나, 티민은 DNA의 전형적인 뉴클레오티드 염기이기 때문에, 본원 목적을 위해 티민은 DNA에 존재할 때 메틸화된 뉴클레오티드로 간주되지 않는다.

[0099] 본원에서 사용될 때 "메틸화된 핵산 문자"는 1개 이상의 메틸화된 뉴클레오티드를 함유하는 핵산 문자를 의미한다.

[0100] 본원에서 사용될 때 핵산 문자의 "메틸화 상태", "메틸화 프로파일" 및 "메틸화 상황"은 상기 핵산 문자 내의 1개 이상의 메틸화된 뉴클레오티드 염기의 부재 존재를 나타낸다. 예를 들어, 메틸화된 시토신을 함유하는 핵산 문자는 메틸화된 것으로 간주된다(예를 들어, 상기 핵산 문자의 메틸화 상태는 메틸화된다). 임의의 메틸화된 뉴클레오티드를 함유하지 않는 핵산 문자는 미메틸화로 간주된다.

[0101] 특정 핵산 서열(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 마커 또는 DNA 영역)의 메틸화 상태는 상기 서열 내의 모든 염기의 메틸화 상태를 나타낼 수 있거나 또는 상기 서열 내의 염기(예컨대, 1개 이상의 시토신)의 서브세트의 메틸화 상태를 나타낼 수 있거나, 또는 상기 메틸화가 일어나는 서열 내의 위치에 대한 정확한 정보를 제공하거나 제공하지 않으면서 상기 서열 내의 영역 메틸화 밀도에 관한 정보를 나타낼 수 있다.

[0102] 핵산 문자 내의 뉴클레오티드 유전자자리의 메틸화 상태는 상기 핵산 문자에 있는 특정 유전자자리에서 메틸화된 뉴클레오티드의 존재 또는 부재를 나타낸다. 예를 들어, 핵산 문자 내의 7 번째 뉴클레오티드에서 시토신의 메틸화 상태는 상기 핵산 문자 내의 7 번째 뉴클레오티드에 존재하는 뉴클레오티드가 5-메틸 시토신일 때 메틸화된다. 유사하게, 핵산 문자 내의 7 번째 뉴클레오티드에서 시토신의 메틸화 상태는 상기 핵산 문자 내의 7 번째 뉴클레오티드에 존재하는 뉴클레오티드가 시토신일 때(그리고 5-메틸시토신이 아닐 때) 미메틸화된다.

[0103] 상기 메틸화 상황은 선택적으로 "메틸화 값"(예를 들어, 메틸화 빈도, 분율, 비, 백분율 등을 나타냄)에 의해 표시되거나 나타낼 수 있다. 메틸화 값은 예를 들어 메틸화 의존적 제한 효소로 제한효소 분해 후에 존재하는 온전한(intact) 핵산의 양을 정량하거나 또는 바이설파이트 반응 후에 증폭 프로파일을 비교하거나 또는 바이설파이트-처리된 및 미처리된 핵산의 서열을 비교함으로써 발생될 수 있다. 따라서, 값, 예를 들어, 메틸화 값은 메틸화 상황을 표시하고, 유전자자리의 다중 카피에 걸쳐 메틸화 상황의 양적 지표로서 사용될 수 있다. 이는 샘플 내의 서열의 메틸화 상황을, 역치값 또는 기준값과 비교하는 것이 바람직할 때 특히 유용하다.

[0104] 본원에서 사용될 때 "메틸화 빈도" 또는 "메틸화 백분율(%)"은 문자 또는 유전자자리가 메틸화되지 않은 경우의 수에 대해 문자 또는 유전자자리가 메틸화된 경우의 수를 의미한다.

[0105] 이와 같이, 상기 메틸화 상태는 핵산(예를 들어, 게놈 서열)의 메틸화 상태를 기재한다. 또한, 상기 메틸화 상태는 메틸화와 관련된 특정 게놈 유전자자리에서의 핵산 분절의 특징을 의미한다. 이러한 특징은 상기 DNA 서열 내의 임의의 시토신(C) 잔기가 메틸화되었는지 여부, 메틸화된 C 잔기(들)의 위치, 핵산의 임의의 특정 영역 전반에서 메틸화된 C의 빈도 또는 백분율, 및 예를 들어 대립유전자의 기원 차이 등으로 인한 메틸화에서의 대립유전자 차이를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. "메틸화 상태", "메틸화 프로파일" 및 "메틸화 상황" 용어는 또한 생물학적 샘플에서 핵산의 임의의 특정 영역 전반에서 메틸화된 C 또는 미메틸화된 C의 상태 농도, 절대 농도 또는 패턴을 의미한다. 예를 들어, 핵산 서열 내의 시토신(C) 잔기(들)가 메틸화되는 경우에는 "과메틸화"로 지칭되거나 또는 "증가된 메틸화"를 갖는 것으로 지칭될 수 있는 반면, DNA 서열 내의 시토신(C) 잔기(들)가 메틸화되지 않는다면 "저메틸화"로 지칭될 수 있거나 또는 "감소된 메틸화"를 갖는 것으로 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 핵산 서열 내의 시토신(C) 잔기(들)가 또 다른 핵산 서열(예를 들면, 상이한 영역으로부터 또는 상이한 개체로부터 등)과 비교할 때 메틸화된다면, 상기 서열은 다른 핵산 서열과 비교하여 과메틸화되거나

나 또는 증가된 메틸화를 갖는 것으로 간주된다. 대안적으로, DNA 서열 내의 시토신 (C) 잔기(들)가 또 다른 핵산 서열(예를 들면, 상이한 영역으로부터 또는 상이한 개체로부터 등)과 비교할 때 메틸화되지 않았다면 상기 서열은 상기 다른 핵산 서열과 비교하여 저메틸화되거나 또는 감소된 메틸화를 갖는 것으로 간주된다. 부가하여, 본원에서 사용될 때 "메틸화 패턴" 용어는 핵산 영역에 걸친 메틸화된 및 미메틸화된 뉴클레오티드의 집합적인 부위를 의미한다. 2 개의 핵산은 동일하거나 유사한 메틸화 빈도 또는 메틸화 백분율을 가질 수 있지만, 메틸화된 및 미메틸화된 뉴클레오티드의 수는 상기 영역 전반에서 동일하거나 유사하지만, 메틸화된 및 미메틸화된 뉴클레오티드의 위치는 상이할 때 상이한 메틸화 패턴을 갖는다. 서열의 메틸화의 정도(예를 들어, 하나가 다른 것에 비해 증가된 또는 감소된 메틸화를 가짐), 빈도 또는 패턴이 상이할 때 서열이 "차별적으로 메틸화된" 것으로 또는 "메틸화 차이" 또는 "상이한 메틸화 상태"를 갖는 것이라고 한다. "차별적 메틸화" 용어는 암 음성 샘플(cancer negative sample) 내의 핵산 메틸화 수준 또는 패턴과 비교할 때 암 양성 샘플 내의 핵산 메틸화 수준 또는 패턴의 차이를 의미한다. 이는 또한 수술 후 암 재발이 있는 환자와 재발이 없는 환자 사이의 수준 또는 패턴 차이를 의미할 수 있다. DNA 메틸화의 차별적 메틸화 및 특이적 수준 또는 패턴은 예를 들어 일단 정확한 컷-오프 또는 예측 특성이 정의된다면 예후적 및 예측적 바이오마커이다.

[0106] 메틸화 상태 빈도는 개체의 개체군 또는 한 개체의 샘플을 기재하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 50%의 메틸화 상태 빈도를 갖는 뉴클레오티드 유전자자는 사례의 50%에서 메틸화되고 사례의 50%에서 메틸화되지 않는다. 이러한 빈도는 예를 들어, 뉴클레오티드 유전자자리 또는 핵산 영역이 개체의 개체군 또는 핵산 집합에서 메틸화되는 정도를 기재하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 제1 개체군 또는 핵산 문자 풀(pool)에서의 메틸화가 제2 개체군 또는 핵산 문자 풀에서의 메틸화와 다를 때, 상기 제1 개체군 또는 풀의 메틸화 상태 빈도는 제2 개체군 또는 풀의 메틸화 상태 빈도와 상이하다. 이러한 빈도는 또한 예를 들어 단일 개체에서 뉴클레오티드 유전자자리 또는 핵산 영역이 메틸화되는 정도를 기재하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 빈도는 조직 샘플의 세포 그룹이 뉴클레오티드 유전자자리 또는 핵산 영역에서 메틸화되거나 또는 미메틸화되는 정도를 기재하기 위해 사용될 수 있다.

[0107] 본원에서 사용될 때 "뉴클레오티드 유전자자리"는 핵산 문자 내의 뉴클레오티드의 위치를 의미한다. 메틸화된 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 유전자자리는 핵산 문자 내의 메틸화된 뉴클레오티드의 위치를 의미한다.

[0108] 전형적으로, 인간 DNA의 메틸화는 인접한 구아닌 및 시토신을 포함하는 디뉴클레오티드 서열 상에서 발생하며, 여기서 상기 시토신은 상기 구아닌(또한 CpG 디뉴클레오티드 서열이라고도 지칭됨)의 5'에 위치한다. 상기 CpG 디뉴클레오티드 내의 대부분의 시토신은 상기 인간 게놈에서 메틸화되지만, 일부는 CpG 섬으로 알려진 특정 CpG 디뉴클레오티드-풍부 게놈 영역에서 미메틸화된 채로 있다 (Antequera et al. (1990) Cell 62: 503-514 참조).

[0109] 본원에서 사용될 때 "CpG 섬"은 전체 게놈 DNA에 대해 증가된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 게놈 DNA의 G:C-풍부 영역을 의미한다. CpG 섬의 길이는 적어도 100개, 200개 또는 그 이상의 염기 쌍일 수 있으며, 상기 영역의 G:C 함량은 적어도 50%이고, 예상 빈도에 대해 관찰된 CpG 빈도의 비는 0.6이다; 일부 사례에서 CpG 섬의 길이는 적어도 500개의 염기 쌍일 수 있으며, 상기 영역의 G:C 함량은 적어도 55%이고) 예상 빈도에 대해 관찰된 CpG 빈도의 비는 0.65이다. 예상 빈도에 대해 관찰된 CpG 빈도는 문헌[Gardiner-Garden et al (1987) J. Mol. Biol. 196: 261- 281]에 제공된 방법에 따라 계산될 수 있다. 예를 들어, 예상 빈도에 대해 관찰된 CpG 빈도는 식  $R = (A \times B) / (C \times D)$ 에 따라 계산될 수 있으며, 여기서 R은 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도의 비이고, A는 분석된 서열 내의 CpG 디뉴클레오티드의 갯수이고, B는 상기 분석된 서열 내의 뉴클레오티드의 전체 갯수이며, C는 분석된 서열 내의 C 뉴클레오티드의 전체 갯수이고, D는 상기 분석된 서열 내의 G 뉴클레오티드의 전체 갯수이다. 메틸화 상태는 전형적으로 CpG 섬에서 결정되며, 예를 들어 프로모터 영역에서 결정된다. 인간 게놈 내의 다른 서열은 CpA 및 CpT와 같은 DNA 메틸화를 일으키기 쉬운 것임을 이해할 것이다(Ramsahoye (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5237-5242; Salmon and Kaye (1970) Biochim. Biophys. Acta 204:340-351; Graistrom (1985) Nucleic Acids Res. 13: 2827-2842; Nyce (1986) Nucleic Acids Res. 14: 4353-4367; Woodcock (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 888-894 참조).

[0110] 본원에서 사용될 때, 핵산 문자의 메틸화 상태의 기능으로서 상기 핵산 문자의 뉴클레오티드를 변형시키는 시약 또는 메틸화-특이적 시약은 상기 핵산 문자의 메틸화 상태를 반영하는 방식으로 핵산 문자의 뉴클레오티드 서열을 변화시킬 수 있는 화합물 또는 조성물 또는 다른 제제를 의미한다. 이러한 시약으로 핵산 문자를 처리하는 방법은 상기 핵산 문자를 상기 시약과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있으며, 핵산 서열의 원하는 변화를 달성하기 위해 필요하다면 부가적인 단계와 결합될 수 있다. 핵산 문자의 뉴클레오티드 서열의 이러한 변화는 각각의 메틸화된 뉴클레오티드가 상이한 뉴클레오티드로 변형되는 핵산 문자를 초래할 수 있다. 상기 핵산 뉴클레오티드 서열의 이러한 변화는 각각의 미메틸화된 뉴클레오티드가 상이한 뉴클레오티드로 변형된 핵산 문자를 초래할

수 있다. 상기 핵산 뉴클레오티드 서열의 이러한 변화는 미메틸화된 선택된 뉴클레오티드(예를 들어, 각각의 미메틸화된 시토신) 각각이 상이한 뉴클레오티드로 변형된 핵산 분자를 초래할 수 있다. 상기 핵산 뉴클레오티드 서열을 변화시키기 위한 상기 시약의 사용은 메틸화된 뉴클레오티드인 각각의 뉴클레오티드(예를 들어, 각각의 메틸화된 시토신)가 상이한 뉴클레오티드로 변형된 핵산 분자를 초래할 수 있다. 본원에서 사용될 때 선택된 뉴클레오티드를 변형시키는 시약의 사용은 핵산 분자(DNA의 경우에는 C, G, T 및 A 및 RNA의 경우에는 C, G, U 및 A) 내의 4 개의 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드 중 1개의 뉴클레오티드를 변형시키는 시약을 의미하고, 상기 시약은 다른 3개의 뉴클레오티드를 변형시키지 않으면서 1개의 뉴클레오티드를 변형시킨다. 하나의 예시적인 양태에서, 이러한 시약은 미메틸화된 선택된 뉴클레오티드를 변형시켜서, 상이한 뉴클레오티드를 생성한다. 또 다른 예시적인 양태에서, 이러한 시약은 미메틸화된 시토신 뉴클레오티드를 탈아민화할 수 있다. 예시적인 시약은 바이설파이트이다.

[0111] 본원에서 사용될 때 "바이설파이트 시약" 용어는 일부 양태에서 바이설파이트, 디설파이트, 하이드로겐 설파이트, 또는 이들의 조합을 포함하여, 메틸화된 및 비메틸화된 시티딘 사이를, 예를 들어 CpG 디뉴클레오티드 서열에서 구별화하는 시약을 의미한다.

[0112] "메틸화 검정" 용어는 핵산 서열 내의 1개 이상의 CpG 디뉴클레오티드 서열의 메틸화 상태를 결정하기 위한 임의의 검정을 의미한다.

[0113] "MS AP-PCR"(Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) 용어는 CpG 디뉴클레오티드를 함유할 가능성이 가장 높은 영역에 초점을 맞추는 CG-풍부한 프라이머를 사용하여 게놈을 전반적으로 스캔하도록 하는 당업계에 알려진 기술을 의미하고, Gonzalgo et al. (1997) Cancer Research 57: 594-599에 기재되어 있다.

[0114] "MethyLight™" 용어는 문헌[Eads et al. (1999) Cancer Res. 59: 2302-2306]에 기재된 당업계에 알려진 형광-기반의 실시간 PCR 기술을 의미한다.

[0115] "HeavyMethyl™" 용어는 증폭 프라이머 사이에 있는 혹은 상기 증폭 프라이머에 의해 커버되는 CpG 위치를 커버하는 메틸화 특이적 차단 프로브(본원에서 차단제로도 지칭됨)가 핵산 샘플의 메틸화-특이적 선택적인 증폭을 가능하게 하는 검정을 의미한다.

[0116] "HeavyMethyl™ MethyLight™" 검정 용어는 HeavyMethyl™ MethyLight™ 검정을 의미하며, 이는 MethyLight™ 검정의 변형으로, 상기 MethyLight™ 검정은 상기 증폭 프라이머 사이의 CpG 위치를 커버하는 메틸화 특이적 차단 프로브와 조합된다.

[0117] "Ms-SNuPE"(Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension) 용어는 문헌[Gonzalgo & Jones (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531]에 기재된 당업계에 알려진 검정을 의미한다.

[0118] "MSP"(Methylation-specific PCR) 용어는 문헌[Herman et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826] 및 미국 특허 제5,786,146호에 기재된 당업계에 알려진 메틸화 검정을 의미한다.

[0119] "COBRA"(Combined Bisulfite Restriction Analysis) 용어는 문헌[Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534]에 기재된 당업계에 알려진 메틸화 검정을 의미한다.

[0120] "MCA"(Methylated CpG Island Amplification) 용어는 문헌[Toyota et al. (1999) Cancer Res. 59: 2307-12] 및 WO 제00/26401A1호에 기재된 메틸화 검정을 의미한다.

[0121] 본원에서 사용될 때 "선택된 뉴클레오티드"는 핵산 분자 (DNA의 경우에 C, G, T 및 A, RNA의 경우에 C, G, U 및 A)에서 4개의 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드 중 1개의 뉴클레오티드를 의미하며, 상기 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드의 메틸화된 유도체(예를 들어, C가 선택된 뉴클레오티드일 때, 메틸화된 및 미메틸화된 C 모두가 선택된 뉴클레오티드의 의미에 포함됨)를 함유할 수 있는 반면, 메틸화된 선택된 뉴클레오티드는 메틸화된 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드를 특정하게 의미하고, 미메틸화된 선택된 뉴클레오티드는 미메틸화된 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드를 특정하게 의미한다.

[0122] "메틸화-특이적 제한 효소" 또는 "메틸화-민감성 제한 효소" 용어는 인식 부위의 메틸화 상태에 좌우되는 핵산을 선택적으로 분해하는 효소를 의미한다. 상기 인식 부위가 메틸화되지 않거나 헤미메틸화되는 경우에 특이적으로 절단하는 제한 효소의 경우에, 상기 절단은 일어나지 않거나 또는 상기 인식 부위가 메틸화된 경우에 유의미하게 감소된 효율로 발생하다. 상기 인식 부위가 메틸화된다면 특이적으로 절단하는 제한 효소의 경우에, 상기 절단은 일어나지 않거나 또는 상기 인식 부위가 메틸화되지 않는다면 유의미하게 감소된 효율로 발생하다.

메틸화-특이적 제한 효소가 바람직하며, 그의 인식 서열은 CG 디뉴클레오티드(예를 들어, CGCG 또는 CCCGGG와 같은 인식 서열)를 포함한다. 상기 디뉴클레오티드 내의 시토신이 탄소원자 C5에서 메틸화된다면 절단하지 않는 제한 효소가 일부 양태에서 더 바람직하다.

[0123] 본원에서 사용될 때 "상이한 뉴클레오티드" 용어는 선택된 뉴클레오티드와 화학적으로 상이한 뉴클레오티드를 의미하고, 전형적으로 상기 상이한 뉴클레오티드는 상기 선택된 뉴클레오티드와 상이한 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기-짝짓기 특성을 갖고, 그에 의해, 상기 선택된 뉴클레오티드에 상보적인 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드는 상기 상이한 뉴클레오티드에 상보적인 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드와 동일하지 않다. 예를 들어, C가 상기 선택된 뉴클레오티드일 때, U 또는 T는 상이한 뉴클레오티드일 수 있으며, 이는 G에 대한 C의 상보성 및 A에 대한 U 또는 T의 상보성에 의해 예시된다. 본원에서 사용될 때 상기 선택된 뉴클레오티드에 상보적인 또는 상기 상이한 뉴클레오티드에 상보적인 뉴클레오티드는 염격도가 높은 조건 하에서 상기 4 개의 전형적으로 발생하는 뉴클레오티드 중 3 개를 갖는 상보적인 뉴클레오티드 염기-짝짓기보다 더 높은 친화도를 갖는 상기 선택된 뉴클레오티드 또는 상이한 뉴클레오티드와 함께 염기-짝짓는 뉴클레오티드를 의미한다. 상보성의 예는 DNA (예: A-T 및 C-G) 및 RNA (예: A-U 및 C-G)에서 왓슨-크릭 염기 짝짓기이다. 따라서, 예를 들어, 염격도가 높은 조건 하에서, G가 G, A 또는 T에 대한 염기-짝짓기보다 C에 대해 높은 친화도를 갖고, 따라서 C가 상기 선택된 뉴클레오티드일 때 G는 상기 선택된 뉴클레오티드에 대해 상보적인 뉴클레오티드이다.

[0124] 본원에서 사용될 때 주어진 마커의 "감도"는 신생물성 및 비-신생물성 샘플을 구별하는 역치값을 넘는 DNA 메틸화 값을 보고하는 샘플의 백분율을 의미한다. 일부 양태에서, 양성은 역치값(예를 들어, 질환에 관련된 범위)보다 높은 DNA 메틸화 값을 보고하는 조직학-확인된 신생물로 정의되고, 위 음성(false negative)은 역치값(예를 들어, 비질환에 관련된 범위)보다 낮은 DNA 메틸화 값을 보고하는 조직학-확인된 신생물로 정의된다. 따라서, 감도 값은 공지의 질병 샘플로부터 수득된 주어진 마커에 대한 DNA 메틸화 측정이 질병-관련 측정 범위에 있을 확률을 반영하다. 본원에서 정의될 때, 상기 계산된 감도 값의 임상 관련도는 주어진 마커가 임상 증상을 갖는 대상체에 적용될 때 임상 증상의 존재를 검출하는 확률의 추정치를 나타낸다.

[0125] 본원에서 사용될 때 주어진 마커의 "특이성"은 신생물과 비-신생물 샘플을 구별하는 역치값 미만의 DNA 메틸화 값을 보고하는 비-신생물 샘플의 백분율을 의미한다. 일부 양태에서, 음성은 역치값(예를 들어, 비질환에 관련된 범위)보다 낮은 DNA 메틸화 값을 보고하는 조직-확인된 비-신생물 샘플로 정의되고, 위 양성(false positive)은 역치값(예를 들어, 질환과 관련에 범위)보다 높은 DNA 메틸화 값을 보고하는 조직-확인된 비-신생물 샘플로 정의된다. 따라서, 특이성 값은 공지의 비-신생물 샘플로부터 수득된 주어진 마커를 위한 DNA 메틸화 측정이 비-질환 관련된 측정 범위에 있을 확률을 반영한다. 본원에서 정의될 때 상기 계산된 특이성 값의 임상 관련도는 주어진 마커가 임상 증상을 갖지 않는 환자에 적용될 때 임상 증상의 부재를 검출할 확률의 추정치를 나타낸다.

[0126] 본원에서 사용될 때 "AUC" 용어는 "곡선 아래의 면적"에 대한 약어이다. 특히 이는 Receiver Operating Characteristic (ROC) 곡선 아래의 면적을 의미한다. 상기 ROC 곡선은 진단 테스트의 상이한 가능한 컷 지점에 대한 위 양성에 대한 진성 양성률의 그래프이다. 상기 선택된 컷 지점에 따라 좌우되는 감도 및 특이도간의 트레이드-오프(trade-off) 관계를 보여준다(감도의 임의의 증가는 특이도의 감소를 수반하다). ROC 곡선 (AUC) 아래의 영역은 진단 테스트의 정확도에 대한 척도이다 (상기 영역이 클수록 좋다; 최적 값은 1이다; 무작위 테스트는 0.5의 영역을 갖고 대각선 상에 놓인 ROC 곡선을 가질 것이다; 참고: J. P. Egan. (1975) Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York).

[0127] 본원에서 사용될 ◎ "신생물" 용어는 "비정상적인 조직 덩어리로, 그의 증식이 정상 조직의 증식을 능가하여 정상 조직의 것과 조화를 이루지 않음"을 의미하고, 예를 들어, 문헌[Willis RA, " The Spread of Tumors in the Human Body" , London, Butterworth & Co, 1952]을 참고한다.

[0128] 본원에서 사용될 때 "샘종" 용어는 선상(glandular) 유래의 양성 종양을 의미한다. 이러한 증식은 양성이지만, 시간이 지남에 따라 악성으로 진행될 수 있다.

[0129] "전-암성" 또는 "전-신생물" 용어 및 이의 균등률은 악성 형질전환을 겪는 임의의 세포 증식 성 장애를 의미한다.

[0130] 신생물, 샘종, 암 등의 "부위"는 상기 신생물, 샘종, 암 등이 위치한 대상물 신체의 조직, 기관, 세포 유형, 해부학적 영역, 신체 부 분 등이다.

[0131] 본원에서 사용될 때 "진단" 테스트 적용은 대상체의 질병 상태 또는 증상의 검출 또는 동정, 대상체가 주어진

질병 또는 증상에 걸릴 가능성을 결정하는 것, 질병 또는 증상을 갖는 대상체가 치료에 반응할 가능성을 결정하는 것, 질병 또는 증상을 갖는 대상체의 예후(또는 그의 진행 또는 퇴행 가능성)를 결정하는 것, 및 질병 또는 증상을 갖는 대상체에 대해 치료 효과를 결정하는 것을 함유한다. 예를 들어, 진단은 신생물에 걸리는 대상체의 존재 또는 가능성 또는 대상체가 화합물(예를 들어, 약제, 예를 들어 약물) 또는 다른 치료에 호의적으로 반응할 가능성을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0132] 본원에 사용될 때 "마커" 용어는 예를 들어 메틸화 상태에 기반하여 정상 세포로부터 암종 세포를 구별함으로써 암을 진단할 수 있는 물질(예를 들어, 핵산 또는 핵산 영역)을 의미한다.

[0133] "단리된 올리고뉴클레오티드"에서와 같이 핵산과 관련하여 사용될 때 "단리된" 용어는 통상적으로 자연적 공급 원과 관련된 적어도 1종의 오염물 핵산으로부터 동정 및 분리되는 핵산 서열을 의미한다. 단리된 핵산은 자연에서 발견되는 것과는 다른 형태로 또는 환경에서 존재한다. 대조적으로 DNA 및 RNA와 같이 비-단리된 핵산은 자연에 존재하는 상태로 발견된다. 비-단리된 핵산의 예는 이웃 유전자에 근접한 숙주 세포 염색체에서 발견되는 주어진 DNA 서열 (예: 유전자); 다수의 단백질을 인코딩하는 다수의 다른 mRNA와의 혼합물로서 상기 세포에서 발견되는, 특이적 단백질을 인코딩하는 특이적 mRNA 서열과 같은 RNA 서열을 함유한다. 그러나, 특정 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산은 예로서 상기 단백질을 통상적으로 발현하는 세포 내의 핵산을 함유하되, 상기 핵산은 천연 세포의 것과는 상이한 염색체 위치에 있거나 또는 자연에서 발견되는 것과는 상이한 핵산 서열에 의해 측정되어 있다. 상기 단리된 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 또는 올리고뉴클레오티드가 단백질을 발현하기 위해 이용될 때, 상기 올리고뉴클레오티드는 최소한으로 센스 또는 코딩 가닥 (즉, 상기 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥일 수 있음)를 함유할 것이지만, 상기 센스 및 안티-센스 가닥(즉, 상기 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥일 수 있다) 모두를 함유할 수 있다. 단리된 핵산은 자연 또는 전형적인 환경으로부터 단리된 후에 다른 핵산 또는 분자와 조합될 수 있다. 예를 들어, 단리된 핵산은, 예를 들면 이종 발현을 위해 배치된 숙주 세포에 존재할 수 있다.

[0134] "정제된" 용어는 자연 환경으로부터 제거, 단리 또는 분리된 핵산 또는 아미노산 서열인 분자를 의미한다. 따라서, "단리된 핵산 서열"은 정제된 핵산 서열일 수 있다. "실질적으로 정제된" 분자는 자연적으로 회합된 다른 성분을 적어도 60% 갖지 않고, 바람직하게는 적어도 75% 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 적어도 90%를 갖지 않는다. 본원에서 사용될 때 "정제된" 또는 "정제될" 용어는 또한 샘플로부터 오염물의 제거를 의미한다. 오염 단백질의 제거는 상기 샘플 내의 관심대상인 폴리펩티드 또는 핵산의 백분율을 증가시킨다. 또 다른 실시예에서, 재조합 폴리펩티드는 식물, 박테리아, 효모 또는 포유동물 숙주 세포에서 발현되고, 상기 폴리펩티드는 숙주 세포 단백질의 제거에 의해 정제된다; 이에 의해, 재조합 폴리펩티드의 백분율이 상기 샘플에서 증가한다.

[0135] 주어진 폴리뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드를 "포함하는 조성물" 용어는 상기 주어진 폴리뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드를 함유하는 임의의 조성물을 광범위하게 의미한다. 상기 조성물은 염(예: NaCl), 세제(예: SDS), 및 다른 성분(예: 덴하트(Denhardt) 용액, 분유, 연어 정자 DNA 등)을 함유하는 수용액을 포함할 수 있다.

[0136] "샘플" 용어는 최광의 의미로 사용된다. 하나의 의미에서, 이는 동물 세포 또는 조직을 의미할 수 있다. 또 다른 의미에서, 이는 생물학적 및 환경적 샘플뿐만 아니라 임의의 공급원에서 수득된 표본 또는 배양물을 함유하는 것을 의미한다. 생물학적 샘플은 식물 또는 동물(인간 포함)로부터 수득될 수 있으며, 유체, 고체, 조직 및 가스를 포함하다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 혈장 샘플이다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 전립선 조직 샘플이다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 대변 샘플이다. 환경 샘플은 지표 물질, 토양, 물 및 산업용 샘플과 같은 환경 물질을 포함한다. 이를 실시예는 본 발명에 적용가능한 샘플 유형을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0137] 본원에서 사용될 때, 일부 문맥에서 사용되는 "원격 샘플"은 상기 샘플의 세포, 조직 또는 장기 공급원이 아닌 부위로부터 간접적으로 수집된 샘플을 의미한다. 예를 들어, 혀장 유래의 샘플 물질이 대변 샘플에서 평가될 때 (예를 들어, 전립선에서 직접 취한 샘플이 아님), 상기 샘플은 원격 샘플이다.

[0138] 본원에서 사용될 때 "환자" 또는 "대상체" 용어는 상기 기술에 의해 제공되는 다양한 테스트를 받을 유기체를 의미한다. "대상체" 용어는 동물, 바람직하게는 인간을 포함한 포유동물을 함유한다. 바람직한 양태에서, 상기 대상체는 영장류이다. 더 더욱 바람직한 양태에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0139] 본원에서 사용될 때 "키트" 용어는 물질을 전달하기 위한 임의의 전달 시스템을 의미한다. 반응 검정과 관련하여, 이러한 전달 시스템은 반응 시약(예: 적절한 용기에 있는 올리고뉴클레오티드, 효소 등) 및/또는 지지 물질(예: 완충액, 상기 검정을 수행하기 위해 서면 지침서)을 한 위치에서 다른 위치로 저장, 운반 또는 전달하도록

하는 시스템을 함유한다. 예를 들어, 키트는 관련 반응 시약 및/또는 지지 물질을 함유하는 하나 이상의 외장재 (예: 박스)를 함유한다. 본원에서 사용될 때 "분할된 키트" 용어는 전체 키트 성분의 서브부분을 각각 함유하는 둘 이상의 분리 용기를 포함하는 전달 시스템을 의미한다. 상기 용기는 대상 수령인에게 함께 또는 분리하여 전달될 수 있다. 예를 들어, 제1 용기는 검정에 사용하기 위한 효소를 함유할 수 있는 반면, 제2 용기는 올리고뉴클레오티드를 함유할 수 있다. "분할된 키트" 용어는 연방 식품 의약품 및 화장품 법의 520 (e)항에 따라 규제되는 분석물질 특이적 시약(ASR)을 함유하는 키트를 포함하도록 의도되지만 이에 제한되지 않는다. 실제로, 전체 키트 구성요소의 서브부분을 각각 함유하는 둘 이상의 개별 용기를 포함하는 임의의 전달 시스템은 "분할된 키트" 용어에 함유된다. 대조적으로, "조합된 키트"는 단일 용기 (예를 들어, 원하는 성분 각각을 담는 단일 박스)에서 반응 검정의 모든 구성요소를 함유하는 전달 시스템을 의미한다. "키트" 용어는 분할된 키트와 조합된 키트 모두를 함유하다.

#### [0140] 상기 기술의 양태

[0141] 전립선 암 스크리닝 기술, 및 특히, 비배타적으로, 상기 전립선 암의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다.

[0142] 실제로, 실시예 I-VI에 기재된 바와 같이, 본 발명의 양태를 동정하는 과정동안 수행된 실험은 전립선 유래 DNA의 암을, 비-신생물 대조 DNA로부터 식별하기 위한 73 종의 차별적 메틸화 영역 (DMR)의 신규 세트를 동정하였다. 또한, 정상 백혈구 DNA 샘플에서는 메틸화되지 않지만 전립선 상피 세포(암 및 정상)에서는 메틸 10 종의 신규 DMR이 동정되었다. CpG-풍부 바이설파이트로 전환된 종양 및 정상 DNA에 대한 차세대 서열분석 연구로부터 영역 세트 둘다가 동정되었다. 종양 샘플은 덜 공격성인 글리슨 6 및 보다 공격성인 글리슨 7+ 패턴을 함유하였다. DMR은 독점소유된 필터 및 분석 파이프 라인을 사용하여 선택되었고, 신규 메틸화-특이적 PCR(MSP) 검정을 사용하여 독립적인 조직 샘플 세트에서 검증되었다. 이들 73 종의 바이오마커 검정은 조직에서 우수한 검출력을 증명하였고, 광범위한 임상 특이성을 가졌다 - 일부는 많은 상이한 기관 부위에 걸친 암에 대해 특이성이고, 다른 일부는 전립선 암 단독에 특이성이다.

[0143] 이러한 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별하는 120종의 신규 DNA 메틸화 마커(표 1)를 열거하고 기재하다. 이들 120종의 신규 DNA 메틸화 마커로부터, 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 공격성 전립선 암 조직(예를 들어, 글리슨 스코어 7+)을 구별할 수 있는 73종의 마커를 동정하였다. 보다 구체적으로, 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있는 마커 및/또는 마커 패널(예: ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.72788028-72788112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)이 동정되었다 (실시예 I-VI 참조).

[0144] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정 동안에 수행된 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있고 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있는 마커(예: SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNXL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487 으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)를 동정하는 것에 관한 것이었다 (실시예 VIII; 표 11 참조)

[0145] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정동안 수행된 추가적인 실험은 양성 전립선 조직으로부터 전립선 암 조직을 구별할 수 있고 덜 공격성인 전립선 암 조직(예: 글리슨 스코어6)으로부터 공격성인 전립선 암 조직(예: 글리슨 스코어 7+)을 구별할 수 있는 마커(예: SERPINB9\_3479, GRASP\_0932, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNXL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)을 동정하는 것에 관한 것이었다(실시예 VIII; 표 11 참조).

[0146] 본 발명을 위한 양태를 개발하는 과정동안 수행된 추가적인 실험은 혈액 샘플(예: 혈장 샘플) 내의 전립선 암의 존재 또는 부재를 검출할 수 있는 마커를 동정하는 것에 관한 것이었다. 실제로, 혈장 샘플 내의 전립선 암 조직의 존재 또는 부재를 검출할 수 있는 마커 및/또는 마커 패널(예: max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역)이 동정되었다 (실시예 I-VI 참조).

- [0147] 본원 개시내용은 특정 예시된 양태를 의미하지만, 이를 양태는 제한이 아닌 실시예로 제시된다는 것을 이해해야 한다.
- [0148] 특정 측면에서, 본 기술은 전립선 암과 같은 암을 동정, 결정 및/또는 분류하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플(예: 대변 샘플, 전립선 조직 샘플, 혈장 샘플) 내의 적어도 1종의 메틸화 마커의 메틸화 상황을 결정하는 단계를 포함하되, 상기 마커의 메틸화 상태의 변화는 전립선 암의 존재, 분류 또는 부위를 나타낸다. 특정 양태는 전립선 암의 진단(예: 스크리닝)에 사용되는 차별적 메틸화 영역(DMR, 예: DMR 1-140, 표 1 및 표 13 참조)을 포함하는 마커에 관한 것이다.
- [0149] 본원에서 제공되고 표 1 또는 표 3에 열거된 DMR(예: DMR, 예: DMR 1-140)을 포함하는 적어도 1종의 마커, 마커 영역 또는 마커 염기의 메틸화 분석이 분석되는 양태에 부가하여, 상기 기술은 또한 암, 특히 전립선 암의 검출을 위한 유용성을 갖는 DMR을 포함하는 적어도 1종의 마커, 마커 영역 또는 마커 염기를 포함하는 마커 패널을 제공한다.
- [0150] 상기 기술의 일부 양태는 DMR을 포함하는 적어도 1종의 마커, 마커 영역 또는 마커 염기의 CpG 메틸화의 상황의 분석에 기반한다.
- [0151] 일부 양태에서, 본 기술은 DMR을 포함하는 적어도 1종의 마커 내에 CpG 디뉴클레오티드 서열의 메틸화 상황을 결정하는 1종 이상의 메틸화 검정과 조합하여 바이설파이트 기술을 사용하는 것을 제공한다(예: DMR 1-140, 표 1 및 표 13 참조). 계놈 CpG 디뉴클레오티드는 메틸화 또는 미메틸화될 수 있다(대안적으로 업- 및 다운-메틸화로 알려짐). 그러나, 본 발명의 방법은 원격 샘플(예: 혈액, 장기 유출물, 또는 대변)의 배경 내에서, 이종 성질의 생물학적 샘플, 예를 들어 저농도의 종양 세포 또는 그로부터의 생물학적 물질의 분석에 적합하다. 따라서, 이러한 샘플 내의 CpG 위치의 메틸화 상황을 분석할 때, 특정 CpG 위치에서의 메틸화의 수준(예: 백분율, 분율, 비, 비율 또는 정도)을 결정하기 위한 정량적 검정을 이용할 수 있다.
- [0152] 본 기술에 따르면, DMR을 포함하는 마커에서 CpG 디뉴클레오티드 서열의 메틸화 상황의 결정은 전립선 암과 같은 암의 진단 및 특징화 모두에서 유용성을 갖는다.
- [0153] 마커의 조합
- [0154] 일부 양태에서, 상기 기술은 표 1, 표 3 또는 표 13의 DMR을 포함하는 마커(예: DMR No. 1-140)의 조합의 메틸화 상태를 평가하는 것에 관련된다. 일부 양태에서, 1종보다 많은 마커의 메틸화 상태의 평가는 대상체 내의 신생물(예: 전립선 암)을 동정하기 위한 스크리닝 또는 진단의 특이도 및/또는 감도를 증가시킨다.
- [0155] 다양한 암은 예를 들어 예측의 특이도 및 감도와 관련된 통계법에 의해 동정되는 바와 같이 다양한 마커의 조합에 의해 예측된다. 상기 기술은 일부 암에 대한 예측 조합 및 검증된 예측 조합을 동정하는 방법을 제공하다.
- [0156] 메틸화 상태의 검정 방법
- [0157] 5-메틸 시토신의 존재를 위한 핵산의 분석에 가장 빈번하게 사용되는 방법은 DNA에서 5-메틸시토신의 검출을 위해 Frommer, et al.에 기재된 바이설파이트 방법 또는 그의 변형에 기반한다 (Frommer et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-31 모든 목적을 위해 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 명시적으로 포함됨) 5-메틸시토신을 맵핑하는 바이설파이트 방법은 5-메틸시토신이 아닌 시토신이 하이드로겐 설플라이트 이온(바이설파이트로도 알려져 있음)과 반응한다는 관측에 기반하다. 상기 반응은 일반적으로 하기 단계에 따라 수행된다: 먼저, 시토신은 하이드로겐 설플라이트와 반응하여 설폰화된 시토신을 형성하다. 다음으로, 상기 설폰화된 반응 중간물의 자발적 탈아민화는 설폰화된 우라실을 생성시킨다. 마지막으로, 상기 설폰화된 우라실은 알칼리 조건하에 탈설폰화(desulfonated)되어 우라실을 형성한다. 우라실은 아데닌과 염기 쌍을 형성하는 반면(따라서 티민처럼 행동함), 5-메틸시토신 염기는 구아닌과 쌍을 이루기 때문에(따라서 시토신처럼 행동함) 검출이 가능하다. 이것은 예컨대, 바이설파이트 계놈 서열분석(Grigg G, & Clark S, Bioessays (1994) 16: 431-36; Grigg G, DNA Seq. (1996) 6:189-98) 또는 예컨대, 미국특허 제5,786,146호에 기재된 바와 같은 메틸화-특이적 PCR(MSP)에 의해 비-메틸화된 시토신으로부터 메틸화된 시토신이 식별될 수 있도록 한다.
- [0158] 일부 종래의 기술은 아가로즈 매트릭스에서 분석될 DNA를 인클로징(enclosing)하는 단계, 이에 의해 상기 DNA의 확산 및 변성을 방지하는 단계(오직 바이설파이트만이 단일-가닥 DNA와 반응함), 및 침전 및 정제단계를 신속한 투석으로 교체하는 단계(Olek A, et al. (1996) "A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis" Nucleic Acids Res.24:5064-6)를 포함하는 방법에 관한 것이다. 이에 의해, 메틸화 상태에 대한 개별 세포를 분석할 수 있고, 상기 방법의 유용성 및 민감성을 설명할 수 있다. 5-메틸시토신

을 검출하기 위한 종래 방법의 개요가 문헌[Rein, T., et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26: 2255]에 제공되어 있다.

- [0159] 상기 바이설파이트 기술은 바이설파이트 처리 후에 공지의 핵산의 짧은 특이적 단편을 증폭시키고, 이어서 서열 분석에 의해 상기 생성물을 검정(Olek & Walter (1997) Nat. Genet. 17:275-6) 또는 프라이머 연장 반응(Gonzalgo & Jones (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2529-31; WO 제95/00669호; 미국 특허 제6,251,594호)하는 것을 전형적으로 포함하여, 개별 시토신 위치를 분석한다. 일부 방법은 효소 분해를 이용한다 (Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532-4). 하이브리드화에 의한 검출은 또한 당업계에 기재되어 있다 (Olek et al., WO 제99/28498호). 부가적으로, 개별 유전자와 관련한 메틸화 검출을 위한 바이설파이트 기술의 사용이 기재되어 있다 (Grigg & Clark (1994) Bioessays 16: 431-6, Zeschnick et al. (1997) Hum Mol Genet. 6: 387-95; Feil et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22: 695; Martin et al. (1995) Gene 157: 261-4; WO 제9746705호; WO 제9515373호).
- [0160] 다양한 메틸화 검정 절차가 당업계에 공지되어 있고, 본 기술에 따른 바이설파이트 처리와 함께 사용될 수 있다. 이들 검정은 핵산 서열 내의 1종 또는 복수 종의 CpG 디뉴클레오티드(예: CpG 섬)의 메틸화 상태를 결정할 수 있게 한다. 이러한 검정은, 다른 기술들 중에서도, 바이설파이트-처리된 핵산의 서열분석, PCR(서열 특이적 증폭을 위함), 서던 블로트 분석 및 메틸화-민감성 제한 효소의 사용을 포함한다.
- [0161] 예를 들어, 바이설파이트 처리를 사용함으로써 메틸화 패턴 및 5-메틸시토신 분포의 분석을 위해 게놈 서열분석을 단순화하였다(Frommer et al, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831). 부가적으로, 바이설파이트-전환된 DNA로부터 증폭된 PCR 생성물의 제한 효소 분해는 예를 들어, 문헌[Sadri & Hornsby (1997) Nucl. Acids Res. 24:5058-5059]에 기재된 바와 같이 또는 COBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis)로 공지된 방법에서 구현된 바와 같이(Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534) 메틸화 상태를 평가하는데 있어서 용도를 갖는다.
- [0162] COBRA™ 분석은 소량의 게놈 DNA내의 특정 유전자자리에서 DNA 메틸화 수준을 결정하는데 유용한 정량적 메틸화 검정이다 (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997). 요약하면, 제한 효소 분해는 소듐 바이설파이트-처리된 DNA의 PCR 생성물에서 메틸화-의존적인 서열 차이를 나타내기 위해 사용된다. 메틸화-의존적인 서열 차이는 문헌[Frommer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831, 1992)]에 기재된 절차에 따라 표준 바이설파이트 처리에 의해 상기 게놈 DNA에 먼저 도입된다. 이어서, 바이설파이트 전환된 DNA의 PCR 증폭은 관심대상인 CpG 섬에 특이적인 프라이머를 사용하여 수행되고, 이어서 제한 엔도뉴클레아제분해, 젤 전기영동, 및 특이적 표지된 하이브리드화 프로브를 사용한 검출이 수행된다. 최초 DNA 샘플 내의 메틸화 수준은 DNA 메틸화 수준의 다양한 스펙트럼에서 선형적 정량적인 방식으로 분해 및 미분해된 PCR 생성물의 상대적인 양으로 표시된다. 또한, 이 기술은 미세절개된(microdissected) 파라핀-포매된 조직 샘플로부터 수득된 DNA에 신뢰할 수 있게 적용될 수 있다.
- [0163] COBRA™ 분석을 위한 전형적인 시약(예: 전형적인 COBRA™ 기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 함유할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 특이적 유전자자리 (예: 특이적 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등.)을 위한 PCR 프라이머; 제한 효소 및 적절한 완충액; 유전자-하이브리드화 올리고뉴클레오티드; 대조 하이브리드화 올리고뉴클레오티드; 올리고뉴클레오티드 프로브용 키나아제표지 키트; 및 표지된 뉴클레오티드. 부가적으로, 바이설파이트 전환 시약은 하기를 포함할 수 있다:DNA 변성 완충액; 설포화 완충액; DNA 회수 시약 또는 키트(예: 침전, 한외여과, 친화성 컬럼); 탈설포화 완충액; 및 DNA 회수 구성요소.
- [0164] 바람직하게, "MethyLight™" (형광-기반의 실시간 PCR 기술) (Eads 등, Cancer Res. 59:2302-2306, 1999), MS-SNuPE™ (Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension) 반응 (Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997), 메틸화-특이적 PCR ("MSP"; Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; 미국 특허 제5,786,146호) 및 메틸화된 CpG 섬 증폭("MCA"; Toyota et al., Cancer Res. 59: 2307-12, 1999)과 같은 검정법이 단독으로 또는 이들 방법 중 하나 이상과 조합되어 사용된다.
- [0165] 상기 "HeavyMethy™" 검정 기술은 바이설파이트-처리된 DNA의 메틸화-특이적 증폭에 기반한 메틸화 차이를 평가하기 위한 정량적 방법이다. 상기 증폭 프라이머의 사이에 있는 또는 상기 증폭 프라이머에 의해 커버되는 CpG 위치를 커버하는 메틸화-특이적 차단 프로브("차단물")는 핵산 샘플의 메틸화-특이적 선택적 증폭을 가능하게 한다.

- [0166] "HeavyMethyl™ MethyLight™" 검정 용어는 HeavyMethyl™ MethyLight™ 검정을 의미하며, 이는 MethyLight™ 검정의 변형으로, 상기 MethyLight™ 검정은 상기 증폭 프라이머 사이의 CpG 위치를 커버하는 메틸화 특이적 차단 프로브와 조합된다. 상기 HeavyMethyl™ 검정은 또한 메틸화 특이적 증폭 프라이머와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0167] HeavyMethyl™ 분석을 위한 전형적인 시약(예: MethyLight™ 기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자자리(예: 특정 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬, 또는 바이설파이트 처리된 DNA 서열 또는 CpG 섬 등)용 PCR 프라이머; 차단 올리고뉴클레오티드; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오티드; 및 Taq 폴리머라제.
- [0168] MSP(메틸화-특이적 PCR)는 메틸화-민감성 제한 효소의 사용과 무관한, CpG 섬 내의 CpG 부위의 사실상 임의의 그룹의 메틸화 상황을 평가할 수 있게 한다(Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; 미국 특허 제5,786,146호). 요약하면, DNA는 소듐 바이설파이트에 의해 변형되고, 이는 미메틸화된 시토신을 우라실로 전환시키지만 메틸화된 시토신은 전환시키지 않고, 상기 생성물은 메틸화 대 미메틸화된 DNA에 특이적인 프라이머를 사용하여 후속적으로 증폭된다. MSP는 소량의 DNA 만을 필요로하고, 주어진 CpG 섬 유전자자리의 0.1% 메틸화된 대립유전자에 민감성이고, 파라핀-포매된 샘플로부터 추출된 DNA 상에서 수행될 수 있다. MSP 분석을 위한 전형적인 시약(예: 전형적인 MSP-기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 위한 메틸화 및 미메틸화된 PCR 프라이머: 특정 유전자자리 (예: 특이적 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등); 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오티드, 및 특이적 프로브를 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0169] 상기 MethyLight™ 검정은 상기 PCR 단계 이후에 추가적인 조작을 필요로 하지 않는 형광-기반의 실시간 PCR (예: TaqMan®)을 이용하는 고-처리량의 정량적 메틸화 검정이다(Eads et al, Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). 요약하면, 상기 MethyLight™ 프로세스는 표준 절차에 따라 소듐 바이설파이트 반응에서 메틸화-의존적인 서열 차이의 혼합 풀(mixed pool)로 전환되는 게놈 DNA의 혼합 샘플로 시작된다 (상기 바이설파이트 프로세스는 미메틸화된 시토신 잔기를 우라실로 변환시킴). 이어서, 형광-기반의 PCR이 예를 들어, 공지의 CpG 디뉴클레오티드와 중복된 PCR 프라이머를 사용하여 "편향된" 반응에서 수행된다. 서열 식별은 상기 증폭 프로세스의 수준 및 상기 형광 검출 프로세스의 수준 모두에서 발생한다.
- [0170] 상기 MethyLight™ 검정은 핵산, 예를 들어 게놈 DNA 샘플 내의 메틸화 패턴에 대한 정량적 테스트로서 사용되며, 여기서 서열 식별은 프로브 하이브리드화의 수준에서 발생한다. 정량적 버전에서, 상기 PCR 반응은 특정 추정 메틸화 부위와 중복되는 형광 프로브의 존재하에 메틸화 특이적 증폭을 제공한다. 입력 DNA의 양에 대한 비편향된 제어가, 프라이머 또는 프로브의 위에 임의의 CpG 디뉴클레오티드가 놓이지 않는 반응에 의해 제공된다. 대안적으로, 게놈 메틸화를 위한 정성적 테스트는 공지의 메틸화 부위를 커버하지 않는 대조 올리고뉴클레오티드(예: HeavyMethyl™의 형광-기반 버전 및 MSP 기술)를 사용하거나 또는 잠재적인 메틸화 부위를 커버하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 상기 편향된 PCR 풀을 프로브함으로써 달성된다.
- [0171] 상기 MethyLight™ 프로세스는 임의의 적절한 프로브(예: "TaqMan®" 프로브, Lightcycler® 프로브 등)와 함께 사용된다. 예를 들어, 일부 용도에서, 이중-가닥 게놈 DNA는 소듐 바이설파이트로 처리되고, TaqMan® 프로브를 사용하여, 예를 들어 MSP 프라이머 및/또는 HeavyMethyl 차단물 올리고뉴클레오티드 및 TaqMan® 프로브를 사용하여 PCR 반응의 두 세트 중 하나에 적용된다. 상기 TaqMan® 프로브는 형광 "리포터" 및 "소광 인자" 문자로 이중-표지되고, 상대적으로 높은 GC 함량 영역에 특이적이도록 설계되어 있어서, 순방향 또는 역방향 프라이머 보다 상기 PCR 사이클에서 약 10°C 더 높은 온도에서 용융된다. 이는 상기 PCR 어닐링/연장 단계동안 상기 TaqMan® 프로브를 완전 하이브리드화된 상태로 유지시킨다. 상기 Taq 폴리머라제가 PCR동안 새 가닥을 효소적으로 합성하기 때문에, 상기 어닐링된 TaqMan® 프로브에 결국에 도달하게 된다. 이 후, 상기 Taq 폴리머라제의 5'에서 3'으로의 엔도뉴클레아제활성은 분해에 의해 상기 TaqMan® 프로브를 교체하여, 실시간 형광 검출 시스템을 사용하여 현재 소광되지 않은 신호의 정량적 검출을 위한 상기 형광 리포터 문자를 방출시킨다.
- [0172] MethyLight™ 분석을 위한 전형적인 시약(예: 전형적인 MethyLight™ 기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 함유할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다: 특정 유전자자리(예: 특정 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트-처리된 DNA 서열, CpG 섬 등)용 PCR 프라이머; 상기 TaqMan® 또는 Lightcycler® 프로브; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오티드; 및 Taq 폴리머라제.
- [0173] 상기 QM™ (정량적 메틸화) 검정은 게놈 DNA 샘플의 메틸화 패턴을 위한 대안적인 정량적 테스트로서, 프로브

하이브리드화의 수준에서 서열 식별이 발생한다. 이러한 정량적 베전에서, 상기 PCR 반응은 특정 추정 메틸화 부위와 중복되는 형광 프로브의 존재 하에서 비편향된 증폭을 제공한다. 입력 DNA의 양에 대한 비편향된 제어가, 프라이머 또는 프로브의 위에 임의의 CpG 디뉴클레오티드가 놓이지 않는 반응에 의해 제공된다. 대안적으로, 게놈 메틸화를 위한 정성적 테스트는 공지의 메틸화 부위를 커버하지 않는 대조 올리고뉴클레오티드 (HeavyMethyl™의 형광-기반의 베전 및 MSP 기술)를 사용하거나 또는 잠재적인 메틸화 부위를 커버하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 상기 편향된 PCR 풀을 프로브함으로써 달성된다.

[0174] 상기 QM™ 프로세스는 상기 증폭 프로세스에서 임의의 적합한 프로브, 예를 들어, "TaqMan®" 프로브, Lightcycler® 프로브와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 이중-가닥의 게놈 DNA는 소듐 바이설파이트로 처리되고, 비편향된 프라이머 및 TaqMan® 프로브에 적용된다. 상기 TaqMan® 프로브는 형광성 "리포터" 및 "소광 인자" 분자로 이중-표지되고, 상대적으로 높은 GC 함량 영역에 특이적으로 되도록 설계되어, 상기 순방향 또는 역방향 프라이머보다 상기 PCR 사이클에서 약 10°C 더 높은 온도에서 용융된다. 이는 상기 PCR 어닐링/연장 단계 동안 상기 TaqMan® 프로브를 완전 하이브리드화된 상태로 유지시킨다. 상기 Taq 폴리머라제가 PCR동안 새 가닥을 효소적으로 합성하기 때문에, 상기 어닐링된 TaqMan® 프로브에 결국에 도달하게 된다. 이 후, 상기 Taq 폴리머라제의 5'에서 3'으로의 엔도뉴클레아제활성은 분해에 의해 상기 TaqMan® 프로브를 교체하여, 실시간 형광 검출 시스템을 사용하여 현재 소광되지 않은 신호의 정량적 검출을 위한 상기 형광 리포터 분자를 방출시킨다. QM™ 분석을 위한 전형적인 시약(예: 전형적인 QM™ 기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 상기 TaqMan® 또는 Lightcycler® 프로브; 최적화된 PCR 완충액 및 테옥시뉴클레오티드; 및 Taq 폴리머라제. 특정 유전자자리(예: 특정 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트-처리된 DNA 서열, CpG 섬 등)용 PCR 프라이머.

[0175] 상기 Ms-SNuPE™ 기술은 DNA의 바이설파이트 처리, 이어서 단일-뉴클레오티드 프라이머 연장에 기반한 특이적 CpG 부위에서의 메틸화 차이를 평가하는 정량적 방법이다(Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997). 요약하면, 게놈 DNA는 소듐 바이설파이트와 반응하여, 미메틸화된 시토신을 우라실로 전환시는 반면, 5-메틸시토신을 변화없이 둔다. 이후, 상기 원하는 표적 서열의 증폭은 바이설파이트-전환된 DNA에 특이적인 PCR 프라이머를 사용하여 수행되고, 생성된 생성물은 단리되고, 관심대상인 CpG 부위에서의 메틸화 분석을 위한 주형로 사용된다. 소량의 DNA가 분석될 수 있고(예를 들어, 미세절개된 병리학적 절편), CpG 부위에서의 메틸화 상태를 결정하기 위한 제한 효소의 이용을 피할 수 있다.

[0176] Ms-SNuPE™ 분석을 위한 전형적인 시약(예: 전형적인 Ms-SNuPE™ 기반의 키트에서 찾을 수 있음)은 하기를 함유할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 특정 유전자자리(예: 특정 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트-처리된 DNA 서열, CpG 섬 등)를 위한 PCR 프라이머; 최적화된 PCR 완충액 및 테옥시뉴클레오티드; 젤 추출 키트; 양성 대조 프라이머; 특정 유전자자리를 위한 Ms-SNuPE™ 프라이머; 반응 완충액 (상기 Ms-SNuPE 반응용); 및 표지된 뉴클레오티드. 부가적으로, 바이설파이트 전환 시약은 하기를 포함할 수 있다:DNA 변성 완충액; 세포화 완충액; DNA 회수 시약 또는 키트(예: 침전, 한외여과, 친화성 컬럼); 탈세포화 완충액; 및 DNA 회수 구성요소.

[0177] 감소된 표현 바이설파이트 서열분석 (RRBS)은 핵산의 바이설파이트 처리로 시작하여, 모든 미메틸화된 시토신을 우라실로 전환시키고, 이 후 제한 효소 분해(예: MspI과 같은 CG 서열을 비롯한 부위를 인식하는 효소에 의함)하고, 어댑터 리간드에 커플링된 후의 단편을 완전히 서열분석한다. 제한 효소의 선택은 CpG 조밀 영역에 대한 단편을 풍부하게 하고, 분석동안 다수의 유전자 위치에 맵핑될 수 있는 불필요한 서열의 갯수를 감소시킬 수 있다. 이로써, RRBS는 서열분석을 위한 제한 단편의 서브세트를 선택하여(예: 예비 젤 전기영동을 이용한 크기 선택에 의함) 핵산 샘플의 복잡도를 감소시킨다. 전체-게놈 바이설파이트 서열분석과는 달리, 상기 제한 효소 분해에 의해 생성된 모든 단편은 적어도 1종의 CpG 디뉴클레오티드를 위한 DNA 메틸화 정보를 함유하다. 이로써, RRBS는 프로모터, CpG 섬, 및 기타 게놈의 특징 영역에서 제한 효소 커팅 부위의 빈도가 높은 프로모터, CpG 섬, 및 기타 게놈 특징에 대하여 상기 샘플을 풍부하게 하고, 이로써 1개 이상의 게놈 유전자자리의 메틸화 상태를 평가하는 검정법을 제공한다.

[0178] RRBS를 위한 전형적인 프로토콜은 MspI와 같은 제한 효소를 사용하여 핵산 샘플을 분해하는 단계, 오버hang (overhangs) 및 A-테일링 (a-tailing)을 채우는 단계, 어댑터를 리게이션하는 단계, 바이설파이트 전환 단계 및 PCR 단계를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [et al. 등 (2005) "Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution" Nat Methods 7: 133-6; Meissner et al. (2005) "Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis"

Nucleic Acids Res.33: 5868-77]를 참고한다.

[0179] 일부 양태에서, 정량적 대립유전자-특이적 실시간 표적 및 신호 증폭(QuARTS) 검정법이 이용되어 메틸화 상태를 평가한다. 일차 반응에서 증폭(반응 1) 및 표적 프로브 절단(반응 2); 및 이차 반응에서 FRET 절단 및 형광 신호 발생 (반응 3)을 비롯한 3개의 반응이 각각의 QuARTS 검정에서 순차적으로 일어난다. 표적 핵산이 특정 프라이머에 의해 증폭될 때, 플랩 서열을 갖는 특정 검출 프로브는 상기 앰플리콘에 느슨하게 결합된다. 상기 표적 결합 부위에서 상기 특정 침입성 올리고뉴클레오티드의 존재는 상기 검출 프로브와 플랩 서열 사이를 커팅함으로써 클리바세(cleavase)가 상기 플랩 서열을 방출하도록 한다. 상기 플랩 서열은 상응하는 FRET 카세트의 논헤어핀(nonhairpin) 부분에 상보적이다. 따라서, 상기 플랩 서열은 상기 FRET 카세트 상에서 침입성 올리고뉴클레오티드로서 기능하고, 상기 FRET 카세트 형광체와 소광체 사이에서 절단을 일으켜서, 형광 신호를 생성시킨다. 상기 절단 반응은 표적마다 다수 프로브를 커팅할 수 있고, 따라서, 플랩마다 다수의 형광체를 방출하여, 지수 신호 증폭을 제공할 수 있다. QuARTS는 상이한 염료를 갖는 FRET 카세트를 사용함으로써 단일 반응 웰에서 다수의 타겟을 검출할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Zou et al. (2010) "Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology" Clin Chem 56: A199]; 미국 특허출원 일련번호 제12/946,737호, 제12/946,745호, 제12/946,752호 및 제61/548,639호를 참고한다.

[0180] "바이설파이트 시약" 용어는 메틸화 및 미메틸화된 CpG 디뉴클레오티드 서열을 구별하기 위해 본원에 개시된 바와 같이 유용한 바이설파이트, 디설파이트, 하이드로겐 설파이트, 또는 이들의 조합물을 포함하는 시약을 의미한다. 상기 처리의 방법이 당업계에 알려져 있다(예: PCT/EP2004/011715, 이는 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨). 상기 바이설파이트 처리는 변성 용매, 비제한적으로 예를 들어 n-알킬렌글리콜 또는 디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르(DME)의 존재하에, 또는 디옥산 또는 디옥산 유도체의 존재하에 수행되는 것이 바람직하다. 일부 양태에서, 상기 변성 용매는 1% 내지 35% 농도(v/v)로 사용된다. 일부 양태에서, 상기 바이설파이트 반응은 스캐빈저, 비제한적으로 예를 들면 크로만 유도체, 예컨대 6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만 2-카르복시산 또는 트리하이드록시벤존산 및 그 유도체, 예를 들어, 갈산 (참조: PCT/EP2004/011715, 이는 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨). 상기 바이설파이트 전환은 바람직하게는 30°C 내지 70°C의 반응 온도에서 수행되며, 상기 온도는 상기 반응동안 짧은 시간동안 85°C 이상까지 증가된다 (참조: PCT/EP2004/011715, 이는 전체적으로 참고 문헌으로 포함됨). 상기 바이설파이트 처리된 DNA는 바람직하게는 상기 정량화 이전에 정제된다. 이는 당업계에 공지된 임의의 수단, 비제한적으로 예를 들어 헌외여과에 의해, 예를 들어, Microcon<sup>TM</sup> 컬럼(Millipore<sup>TM</sup> 제조)에 의해 수행될 수 있다. 상기 정제는 변경된 제조업체 프로토콜에 따라 수행된다 (참조: 예를 들어 PCT/EP2004/011715, 이는 전체적으로 참고문헌으로 포함됨).

[0181] 일부 양태에서, 상기 처리된 DNA의 단편은 본 발명에 따른 프라이머 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 표 3 및/또는 표 5 참조) 및 증폭 효소의 세트를 사용하여 증폭된다. 여러 DNA 분절의 증폭은 하나의 동일 반응 용기에서 동시에 수행될 수 있다. 전형적으로, 상기 증폭은 폴리머라제연쇄 반응(PCR)을 사용하여 수행된다. 앰플리콘은 전형적으로 100 내지 2000개 염기쌍의 길이를 갖는다.

[0182] 상기 방법의 또 다른 양태에서, DMR(예를 들어, 표 1 및 표 13에 제공된 DMR 1-140)을 포함하는 마커의 내부 또는 근처에 있는 CpG 위치의 메틸화 상황은 메틸화-특이적 프라이머 올리고뉴클레오티드의 사용에 의해 검출될 수 있다. 이 기술 (MSP)은 허만에게 허여된 미국 특허 제6,265,171호에 기재되어 있다. 바이설파이트 처리된 DNA의 증폭을 위한 메틸화 상황 특이적 프라이머의 사용은 메틸화 및 미메틸화된 핵산의 차별을 가능하게 한다. MSP 프라이머 쌍은 바이설파이트로 처리된 CpG 디뉴클레오티드로 하이브리드화되는 적어도 1개의 프라이머를 함유한다. 따라서, 상기 프라이머의 서열은 적어도 1개의 CpG 디뉴클레오티드를 함유한다. 비-메틸화된 DNA에 특이적인 MSP 프라이머는 상기 CpG에서 상기 C 위치의 위치에서 "T"를 함유하다.

[0183] 상기 증폭에 의해 수득된 단편은 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 표지를 운반할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 표지는 질량 분광분석기에서 검출될 수 있는 전형적인 질량을 갖는 형광 표지, 방사성핵종 또는 탈착 가능한 분자 단편이다. 상기 표지가 질량 표지인 경우, 표지된 앰플리콘은 하나의 양 또는 음의 순전하를 가져서, 상기 질량 분광분석기에서 보다 우수한 검출력을 허용하는 일부 양태가 제공된다. 상기 검출은 예를 들어, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분광분석(MALDI)에 의해 또는 전자 분무 질량 분광분석(ESI)을 이용하여 수행되고 가시화될 수 있다.

[0184] 이들 검정 기술에 적합한 DNA의 단리 방법이 당업계에 공지되어 있다. 특히, 일부 양태는 미국 특허출원 일련번호 제13/470,251호 ("Isolation of Nucleic Acids")에 기재된 바와 같은 핵산의 단리를 포함하며, 상기 문헌은 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함된다

- [0185] 방법
- [0186] 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 기술, 방법이 제공된다:
- [0187] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예: 게놈 DNA, 예컨대, 대변 샘플 또는 전립선 조직 또는 혈장 샘플과 같은 체액으로부터 단리됨)을, DMR (예: 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 DMR 1-140)을 포함하는 적어도 1종의 마커 내의 메틸화 및 비-메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 1종의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계 및
- [0188] 2) 전립선 암을 검출하는 단계(예를 들어, 80% 이상의 감도 및 80% 이상의 특이도로 제공됨).
- [0189] 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 기술, 방법이 제공된다:
- [0190] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예: 게놈 DNA, 예컨대, 대변 샘플 또는 전립선 조직과 같은 체액으로부터 단리됨)을, ACOXL, AKR1B1\_3644, ANXA2, CHST11\_2206, FLJ45983, GAS6, GRASP, HAPLN3, HCG4P6, HES5\_0822, ITPRIPL1, KCNK4, MAX.chr1.61519554-61519667, MAX.chr2.97193166-97193253, MAX.chr3.193, MAX.chr3.7278028-7278112, RAI1\_7469, RASSF2, SERPINB9\_3389, SLC4A11, 및 TPM4\_8047로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 1종의 마커 내의 메틸화 및 비-메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 1종의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계 및
- [0191] 2) 전립선 암을 검출하는 단계(예를 들어, 80% 이상의 감도 및 80% 이상의 특이도로 제공됨).
- [0192] 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 기술, 방법이 제공된다:
- [0193] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예: 게놈 DNA, 예컨대, 대변 샘플 또는 전립선 조직과 같은 체액으로부터 단리됨)을, SERPINB9\_3479, FL0T1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCNKL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 1종의 마커 내의 메틸화 및 비-메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 1종의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0194] 2) 전립선 암을 검출하는 단계(예를 들어, 80% 이상의 감도 및 80% 이상의 특이도로 제공됨).
- [0195] 일부 양태에서, 하기 단계를 포함하는 기술, 방법이 제공된다:
- [0196] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예: 게놈 DNA, 예컨대, 혈장 샘플로부터 단리됨)을, max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 1종의 마커 내의 메틸화 및 비-메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 1종의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0197] 2) 전립선 암을 검출하는 단계(예를 들어, 80% 이상의 감도 및 80% 이상의 특이도로 제공됨).
- [0198] 바람직하게, 상기 감도는 약 70% 내지 약 100%, 또는 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다. 바람직하게, 상기 특이도는 약 70% 내지 약 100%, 또는 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다.
- [0199] 게놈 DNA는 시판되는 키트의 사용을 포함하여 임의의 수단에 의해 단리될 수 있다. 요약하면, 관심대상인 DNA가 세포막에 의해 캡슐화되는 경우, 상기 생물학적 샘플은 효소적, 화학적 또는 기계적 수단에 의해 파괴되고 용해되어야 한다. 이 후, 예를 들어 프로테이나제K를 사용한 분해에 의해 상기 DNA 용액으로부터 단백질 및 다른 오염물이 제거될 수 있다. 이 후, 상기 게놈 DNA는 상기 용액으로부터 회수된다. 이는 염석, 유기물 추출 또는 상기 DNA의 고상 지지체로의 결합을 비롯한 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 방법의 선택은 시간, 비용 및 DNA 필요량을 포함한 여러 요소에 의해 영향받는다. 신생물 물질 또는 전-신생물 물질을 포함하는 모든 임상 샘플 유형, 예컨대, 세포주, 조직 슬라이드, 생검, 파라핀-포매된 조직, 체액, 대변, 전립선 조직, 결장 유출물, 소변, 혈장, 혈청, 전혈, 단리된 혈액 세포, 혈액으로부터 단리된 세포 및 이들의 조합물은 본 방법에서 사용하기에 적합하다.
- [0200] 상기 기술은 테스트를 위해 상기 샘플을 준비하고 핵산을 제공하는데 사용되는 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 양태에서, DNA는 대변 샘플로부터 또는 혈액으로부터 또는 혈장 샘플로부터 예를 들어, 미국 특허출원 일련번호 제61/485386호에 상세히 기재된 바와 같은 직접 유전자 포획법을 이용하거나 또는 관련 방법에 의

해 단리된다.

- [0201] 이 후, 상기 계놈 DNA 샘플은 DMR (예를 들어, DMR 1-140, 예를 들어, 표 1 및 표 13에 제공됨)을 포함하는 적어도 1종의 마커 내의 메틸화 및 비-메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 1종의 시약 또는 일련의 시약으로 처리된다.
- [0202] 일부 양태에서, 상기 시약은 5'-위치에서 미메틸화된 시토신 염기를 우라실, 티민, 또는 하이브리드화 행동 관련하여 시토신과 상이한 또 다른 염기로 전환시킨다. 그러나, 일부 양태에서, 상기 시약은 메틸화 민감성 제한 효소일 수 있다.
- [0203] 일부 양태에서, 상기 계놈 DNA 샘플은, 5' 위치에서 미메틸화된 시토신 염기가 우라실, 티민, 또는 하이브리드화 행동 관련하여 시토신과 상이한 또 다른 염기로 전환되는 방식으로 처리된다. 일부 양태에서, 이 처리는 바이설파이트(하이드로겐 설파이트, 디설파이트)에 의해, 이어서 알칼리 가수 분해에 의해 수행된다.
- [0204] 이 후, 상기 처리된 핵산은 상기 표적 유전자 서열(DMR, 예를 들어, 표 1 및 표 13에 제공된 바와 같은 예를 들어 DMR 1-140으로부터 선택된 적어도 1종의 DMR을 포함하는 마커로부터 적어도 1종의 유전자, 계놈 서열, 또는 뉴클레오티드)의 메틸화 상태를 결정하도록 분석된다. 분석 방법은 본원에 열거된 것들을 포함하여 당업계에 공지된 것, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 QuARTS 및 MSP로부터 선택될 수 있다.
- [0205] DMR(예를 들어 표 1 및 표 13에 의해 제공된 바와 같은 예를 들어, DMR 1-140)을 포함하는 마커의 비정상적인(aberrant) 메틸화, 보다 구체적으로 과메틸화는 전립선 암과 관련된다.
- [0206] 상기 기술은 전립선 암과 관련된 임의의 샘플의 분석에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 샘플은 환자로부터 수득된 조직 및/또는 생물학적 유체를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 분비물을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 위액 분비물, 췌장액, 위장 생검 샘플, 전립선 생검으로부터의 미세절제된 세포, 및/또는 대변으로부터 회수된 전립선 세포를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 대상체는 인간이다. 상기 샘플은 전립선, 간, 담관, 췌장, 위, 결장, 직장, 식도, 소장, 맹장, 십이지장, 용종, 담낭, 항문 및/또는 복막의 세포, 분비물 또는 조직을 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 세포 유체, 복수(ascites), 소변, 대변, 췌장액, 내시경 검사동안 수득된 유체, 혈액, 점액 또는 타액을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 샘플은 대변 샘플이다.
- [0207] 이러한 샘플은 당업자에게 자명한 바와 같이 당업계에 공지된 많은 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 소변과 대변 샘플은 쉽게 얻을 수 있는 반면, 혈액, 복수, 혈청 또는 췌장액 샘플은 예를 들어 바늘과 주사기를 사용함으로써 비경구적으로 얻을 수 있다. 세포가 없는 또는 실질적으로 세포가 없는 샘플은 원심 분리 및 여과를 비제한적으로 함유하는, 당업계의 숙련자들에게 공지된 다양한 기술에 상기 샘플을 적용시킴으로써 수득될 수 있다. 상기 샘플을 얻기 위해 침습적 기술이 사용되지 않는 것이 일반적으로 바람직하지만, 그럼에도 불구하고 조직 균질 액, 조직 절편 및 생검 표본과 같은 샘플을 수득하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0208] 일부 양태에서, 상기 기술은 환자(예를 들어, 전립선 암 환자, 초기 전립선 암 환자 또는 전립선 암을 발현할 수 있는 환자)를 처치하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본원에 제공된 바와 같은 1종 이상의 DMR의 메틸화 상태를 결정하는 단계 및 상기 메틸화 상태를 결정한 결과에 기반하여 상기 환자에게 처치를 투입하는 단계를 포함한다. 상기 처치는 약학적 화합물, 백신의 투여, 수술 실시, 상기 환자의 영상화, 또 다른 테스트의 실시일 수 있다. 바람직하게, 상기 용도는 임상 스크리닝 방법, 예후 평가 방법, 치료 결과의 모니터링 방법, 특정 치료적 처치에 반응할 가능성이 가장 큰 환자의 동정 방법, 환자 또는 대상체의 영상화 방법 및 약물 스크리닝 및 발현을 위한 방법에 있다.
- [0209] 상기 기술의 일부 양태에서, 대상체에서 전립선 암을 진단하는 방법이 제공된다. 본원에서 사용될 ◎ "진단하는" 및 "진단" 용어는 대상체가 주어진 질병 또는 증상을 겪는지 여부 또는 주어진 질병 또는 증상을 향후 발병시킬 것인지 여부를 당업자가 추정 및 심지어는 결정할 수 있도록 하는 방법을 의미한다. 상기 당업자는 종종 1종 이상의 진단 지표, 예를 들어, 바이오마커(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 DMR)에 기반하여 진단을 내리는데, 상기 바이오마커의 메틸화 상태는 상기 증상의 존재, 중증도 또는 부재를 나타낸다.
- [0210] 진단과 함께, 임상적 암 예후는 가장 효과적인 치료법을 계획하기 위해 암 공격성 및 중양 재발 가능성 to 결정하는 것에 관련된다. 보다 정확한 예후가 이루질 수 있거나 또는 심지어는 암 발병의 잠재적 위험이 평가될 수 있다면, 적절한 치료법 및, 일부 경우에는 상기 환자에게 덜 가혹한 치료법이 선택될 수 있다. 암 바이오마커의 평가(예: 메틸화 상태의 결정)는 예후가 좋고/좋거나 암 발병 위험도가 낮아서 치료가 필요없거나 제한된 치료를 필요로 하는 대상체를, 암 발병 가능성이 보다 높거나 또는 암 재발을 겪어서 보다 집중적인 처치에서 이

득을 볼 수 있는 대상체로부터 분리시키기에 유용하다.

[0211] 이로써, 본원에서 사용될 때 "진단을 내리는" 또는 "진단하는"은 암 발병 위험도의 결정 또는 예후 결정을 더 포함하며, 이는 임상적 결과(의료적 처치가 있거나 또는 없음)를 예측할 수 있거나, 적절한 처치(또는 처치가 유효한지 여부)를 선택할 수 있거나, 또는 본원에 개시된 진단 바이오마커(예: DMR)의 측정에 기반하여 현재 처치를 모니터링하고 상기 처치를 잠재적으로 변경할 수 있다. 또한, 본원에 개시된 청구대상의 일부 양태에서, 진단 및/또는 예후를 용이하게하기 위해 경시적인 상기 바이오마커의 다중 결정이 이루어질 수 있다. 상기 바이오마커의 일시적인 변화는, 임상 결과를 예측하고 전립선 암의 진행을 모니터링하고/하거나 상기 암에 대한 적절한 치료법의 효능을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 양태에서, 예를 들어, 유효 치료의 과정 동안에 경시적으로 생물학적 샘플 내의 본원에 개시된 1종 이상의 바이오마커(예: DMR)(및 모니터링되는 경우, 잠재적으로는 1종 이상의 추가적인 바이오마커(들))의 메틸화 상태의 변화를 보는 것을 예측할 수 있다.

[0212] 본원에서 개시된 청구대상은 또한 일부 양태에서 대상체의 암의 예방 또는 처치를 개시할지 또는 계속할지 여부를 결정하는 방법을 더 제공한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 상기 대상체로부터 일정 기간에 걸쳐 일련의 생물학적 샘플을 제공하는 단계; 일련의 생물학적 샘플을 분석하여 상기 생물학적 샘플 각각에서 본원에 개시된 1종 이상의 바이오마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 및 상기 생물학적 샘플 각각에서 1종 이상의 바이오마커의 메틸화 상태의 임의의 변화는 암 발병 위험도를 예측하고, 임상 결과를 예측하고, 상기 암의 예방 또는 치료의 시작 또는 유지의 여부와 현재 치료법이 상기 암을 치료하는데 유효한지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 시점은 상기 처치의 개시 이전에 선택될 수 있고 제2 시점은 상기 처치의 개시 이후의 일정 시점에서 선택될 수 있다. 메틸화 상태는 상이한 시점에서 취한 샘플 각각에서 측정될 수 있으며, 정성적 및/또는 정량적 차이가 기록된다. 상기 상이한 샘플로부터의 바이오마커 수준의 메틸화 상태의 변화는 전립선 암 위험도, 예후, 처치 효능의 결정 및/또는 상기 대상체에서의 암 진행과 관련될 수 있다.

[0213] 바람직한 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 초기 단계에서, 예를 들어 상기 질환의 징후가 나타나기 이전에, 질환의 처치 또는 진단을 위한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 임상 단계에서 질환의 처치 또는 진단을 위한 것이다.

[0214] 언급된 바와 같이, 일부 양태에서, 1종 이상의 진단 또는 예후 바이오마커의 다중 결정이 이루어질 수 있고, 상기 마커에서의 일시적 변화가 진단 또는 예후를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 진단 마커는 초기 시점에 결정될 수 있고, 제2 시점에 다시 결정될 수 있다. 이러한 양태에서, 상기 초기 시점에서 상기 제2시점 까지의 상기 마커의 증가는 일정 예후 또는 암의 특정 유형 또는 중증도의 진단일 수 있다. 마찬가지로, 상기 초기 시점에서 상기 제2시점까지의 상기 마커의 감소는 암의 특정 유형 또는 중증도 또는 일정 예후를 나타낼 수 있다. 또한, 1종 이상 마커의 변화의 정도는 상기 암의 중증도 및 향후 부작용과 관련될 수 있다. 당업자는 특정 양태에서 다수 시점에서의 동일 바이오마커를 비교 측정할 수 있는 반면, 하나의 시점에서 일정 바이오마커를 또한 측정할 수 있고, 제2 시점에서 제2 바이오마커를 측정할 수 있으며, 이들 마커의 비교가 진단 정보를 제공할 수 있음을 이해할 것이다.

[0215] 본원에 사용될 ◎ "예후를 결정하는" 문구는 숙련자가 대상체 증상의 경과 또는 결과를 예측하도록 할 수 있는 방법을 의미한다. "예후" 용어는 100% 정확도로 증상의 경과 또는 결과를 예측할 수 있음을 의미하지 않거나, 또는 심지어는 바이오마커(예: DMR)의 메틸화 상태에 기반하여 일정 경과 또는 결과가 다소 예측가능하게 발생할 수 있다. 대신에, 숙련자는 "예후" 용어가 특정 경과 또는 결과가 발생할 확률 증가를 의미한다는 것을 이해할 것이다; 즉, 상기 증상을 나타내지 않는 개체와 비교할 때 상기 경과 또는 결과는 일정 증상을 나타내는 대상체에서 발생할 가능성이 더 높다. 예를 들어, 상기 증상을 나타내지 않는 개체(예를 들어, 1개 이상의 DMR의 정상 메틸화 상태를 가짐)에서, 일정 결과(예를 들어, 전립선 암을 겪음)의 가능성은 매우 낮을 수 있다.

[0216] 일부 양태에서, 통계 분석은 예후 지표를, 부작용 결과에 걸리기 경향과 연관시킨다. 예를 들어, 일부 양태에서, 통계적 유의 수준에 의해 결정되는 바와 같이, 암을 갖지 않는 환자로부터 수득된 정상 대조 샘플 내의 메틸화 상태와 상이한 메틸화 상태는, 대상체가 상기 대조 샘플 내의 메틸화 상태와 보다 유사한 수준을 갖는 대상체보다 암을 겪을 가능성이 더 크다는 신호를 나타낼 수 있다. 부가적으로, 기준선(예: "정상") 수준으로부터 메틸화 상태의 변화는 환자 예후를 반영할 수 있고, 메틸화 상태의 변화 정도는 부작용의 중증도에 관련될 수 있다. 종종 통계적 유의도는 2 개 이상의 개체군을 비교하고 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정함으로써 결정된다. 예를 들어, 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 포함되는 문헌[Dowdy and Wearden, Research for Statistics, John Wiley & Sons, New York, 1983]을 참조한다. 본 청구대상의 예시적인 신뢰 구간은 90%, 95%,

97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 및 99.99%인 반면, 예시적인  $p$  값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 및 0.0001 이다.

[0217] 다른 양태에서, 본원에 개시된 예후 또는 진단 바이오마커(예를 들어, DMR)의 메틸화 상태 변화의 역치값 정도가 설정될 수 있고, 생물학적 샘플 내의 상기 바이오마커의 메틸화 상태의 변화 정도가 상기 메틸화 상태 변화의 역치값 정도와 단순 비교된다. 본원에 제공된 바이오마커에 대한 메틸화 상태의 바람직한 역치값 변화는 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 및 약 150%이다. 또 다른 양태에서, 예후 또는 진단 지표(바이오마커 또는 바이오마커들의 조합)의 메틸화 상태를 일정 결과에 대한 관련 성향에 직접 관련시키는 "노모그램 (nomogram)"이 설정될 수 있다. 개체군 평균이 아니라 개별 샘플 측정이 기준이 되기 때문에, 숙련자는 이 측정의 불확실성이 마커 농도의 불확실성과 동일하다는 점을 이해하면서 2개의 수치 값을 관련시키는 상기 노모그램의 이용을 알게 된다.

[0218] 일부 양태에서, 대조 샘플이 상기 생물학적 샘플과 동시에 분석되어, 상기 생물학적 샘플로부터 수득된 결과가 상기 대조 샘플로부터 수득된 결과와 비교될 수 있다. 부가적으로, 상기 생물학적 샘플에 대한 검정 결과가 비교될 수 있는 표준 곡선이 제공될 수 있는 것으로 고려된다. 이러한 표준 곡선은 바이오마커의 메틸화 상태를 검정 유닛의 함수로 제공하며, 예컨대 형광 표지가 사용되는 경우에는 형광 신호 강도로 제공한다. 다수의 기증자로부터 채취한 샘플을 사용하여, 정상 조직 내의 1종 이상의 바이오마커의 대조 메틸화 상태에 대해 표준 곡선이 제공될 뿐만 아니라 변질형성(metaplasia)을 갖는 기증자 또는 전립선 암을 가진 기증자로부터 채취된 조직 내의 1종 이상의 바이오마커의 "위험한" 수준에 대해 표준 곡선이 제공될 수 있다. 상기 방법의 일부 양태에서, 상기 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 본원에 제공된 1종 이상의 DMR의 비정상적인 메틸화 상태를 동정할 때 대상체가 변질형성을 갖는 것으로 동정된다. 상기 방법의 다른 양태에서, 상기 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 1종 이상의 상기 바이오마커의 비정상적인 메틸화 상태의 검출은 상기 대상체가 암을 갖는 것으로 동정되는 결과가 된다.

[0219] 마커 분석은 하나의 테스트 샘플 내의 추가적인 마커와 별도로 또는 동시에 수행될 수 있다. 예를 들어, 다수 샘플의 효율적인 프로세싱을 위해, 그리고 잠재적으로는 보다 높은 진단 및/또는 예후 정확도를 제공하기 위해 여러 마커가 하나의 테스트 내로 조합될 수 있다. 또한, 당업계 숙련자는 동일 대상체의 다수 샘플(예를 들어, 연속적인 시점에서)을 테스트하는 것의 가치를 인식할 것이다. 일련의 샘플의 이러한 테스트는 시간 경과에 따른 마커 메틸화 상태의 변화를 동정할 수 있게 한다. 메틸화 상태의 변화 및 메틸화 상태 변화의 부재는 질병 발현으로부터의 대략적인 시간, 구제 가능한 조직의 존재 및 양, 약물 요법의 적절성, 다양한 치료법의 유효성, 및 장래 발병을 포함하여 대상체 결과의 동정을 비제한적으로 포함하는 질병 상태에 대한 유용 정보를 제공할 수 있다.

[0220] 바이오마커의 분석은 다양한 물리적 형식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 미세적정 플레이트(microtiter plates) 또는 자동화의 사용은 많은 테스트 샘플의 프로세싱을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 이동간호 운송 또는 응급실 환경에서 적절한 방식으로 즉각적인 쳐치 및 진단을 용이하게 하기 위해 단일 샘플 포맷이 개발될 수 있다.

[0221] 일부 양태에서, 대조군 메틸화 상태와 비교될 때 상기 샘플 내의 적어도 1종의 바이오마커의 메틸화 상태에서 측정가능한 차이가 있다면, 상기 대상체는 전립선 암을 갖는 것으로 진단된다. 반대로, 상기 생물학적 샘플에서 메틸화 상태의 변화가 동정되지 않을 때, 상기 대상체는 전립선 암을 갖지 않거나, 상기 암의 위험이 없거나, 또는 상기 암의 위험이 낮은 것으로 동정될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 암 또는 그의 위험을 갖는 대상체는 암 또는 그의 위험을 낮게 갖거나 또는 실질적으로 갖지 않는 대상체와 구별될 수 있다. 전립선 암 발병 위험이 있는 대상체는 내시경 감시를 포함하여 보다 집중적인 및/또는 정기적인 스크리닝 일정을 부여받을 수 있다. 반면, 위험을 낮게 갖거나 실질적으로 위험을 갖지 않는 대상체는 향후 스크리닝, 예를 들어, 본 기술에 따라 수행된 스크리닝이 전립선 암 위험이 상기 대상체에서 나타났음을 나타낼 때까지 내시경검사를 받는 것을 피할 수 있다.

[0222] 전술한 바와 같이, 본 기술의 방법의 양태에 따라, 1종 이상의 바이오마커의 메틸화 상태의 변화를 검출하는 것은 정성적 결정일 수 있거나 또는 정량적 결정일 수 있다. 이로써, 대상체가 전립선 암을 갖거나 전립선 암 발병 위험을 갖는 것으로 진단하는 단계는 소정의 역치값 측정이 이루어짐, 예를 들어, 상기 생물학적 샘플 내의 1종 이상의 바이오마커의 메틸화 상태가 미리결정된 대조 메틸화 상태로부터 달라짐을 나타낸다. 상기 방법의 일부 양태에서, 상기 대조 메틸화 상태는 상기 바이오마커의 임의의 검출가능한 메틸화 상태이다. 대조 샘플이 생물학적 샘플과 동시에 테스트되는 방법의 다른 양태에서, 상기 미리결정된 메틸화 상태는 상기 대조 샘플의

메틸화 상태이다. 본 방법의 다른 양태에서, 상기 미리결정된 메틸화 상태는 표준 곡선에 기반하고/하거나 표준 곡선에 의해 동정된다. 본 방법의 다른 양태에서, 상기 미리결정된 메틸화 상태는 특이적 상태 또는 상태 범위이다. 이로써, 부분적으로 실시중인 방법의 양태 및 원하는 특이도 등에 기반하여 당업계 숙련자에게 명백한 허용가능한 한계 내에서 상기 미리결정된 메틸화 상태가 선택될 수 있다.

[0223] 또한, 진단 방법과 관련하여, 바람직한 대상체는 척추동물 대상체이다. 바람직한 척추동물은 온혈 동물이다; 바람직한 온혈 척추동물은 포유동물이다. 바람직한 포유동물은 가장 바람직하게는 인간이다. 본원에서 사용될 때 "대상체" 용어는 인간 및 동물 대상체를 모두 포함한다. 따라서, 수의학적 치료적 용도가 본원에서 제공된다. 따라서, 본 기술은 인간과 같은 포유동물 및 시베리아 호랑이와 같이 멸종 위기에 있어서 중요한 포유동물; 인간에 의한 소비를 위해 농장에서 자란 동물과 같은 경제적 중요성을 갖는 포유동물; 및/또는 애완 동물로서 또는 동물원에서 사는 동물과 같이 인간에게 사회적으로 중요한 동물의 진단을 제공한다. 이러한 동물의 예는 고양이 및 개와 같은 육식 동물; 돼지, 수퇘지 및 엣돼지를 포함한 돼지; 소, 황소, 양, 기린, 사슴, 염소, 들소 및 낙타와 같은 반추 동물 및/또는 유제류; 및 말을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 가축 돼지, 반추동물, 유제류, 말(경마용 말 포함) 등을 비제한적으로 포함하는 가축의 진단 및 처치가 또한 제공된다. 본원에 개시된 청구대상은 대상체 내의 전립선 암을 진단하기 위한 시스템을 추가로 포함한다. 상기 시스템은 예를 들어 생물학적 샘플이 수집되어지는 대상체에서 전립선 암 위험도를 스크리닝하거나 또는 전립선 암을 진단하기 위해 사용될 수 있는 상업적 키트로 제공될 수 있다. 본 기술에 따라 제공되는 예시적인 시스템은 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 DMR의 메틸화 상태를 평가하는 것을 포함한다.

[0224] 실시예

[0225] 실시예 I

[0226] 본 실시예는 실시예 II, III, IV, V 및 VI의 재료 및 방법을 제공한다.

[0227] 실시예 II, III, IV, V 및 VI은 메틸화된 DNA 마커가 비-전립선 조직(예: 백혈구 세포)으로부터 전립선 조직(예: 암성 전립선 조직 및/또는 비-암성 전립선 조직)을 식별할 수 있고, 메틸화된 DNA 마커가 비-암성 전립선 조직으로부터 암성 전립선 조직을 식별할 수 있으며, 메틸화된 DNA 마커가 공격적이 적은 암성 전립선 조직(예: 글리슨 스코어 7 미만 (예: 6)으로부터 매우 공격적인 암성 전립선 조직(예: 글리슨 스코어 7.0 이상(예: 7, 8, 9, 10)을 식별할 수 있고, 또한 메틸화된 DNA 마커가 혈액 샘플 내의 PCa를 검출할 수 있음을 증명한다.

[0228] 이 실험은 5 단계로 구성된다. 첫째, DNA 메틸화 마커 발견은 전립선 암(PCa) 조직(둘다 글리슨 스코어 6 및 7+)으로부터 추출된 DNA, 정상 전립선으로부터 추출된 DNA 및 건강한 지원자의 벼피 코트 샘플로부터 추출된 DNA 상의 감소된 표현 바이설파이트 서열분석(RRBS)을 사용하여 실시되었다:(참조, 예를 들어, Gu H, et al., Nat Methods 2010;7:133-6). 둘째, 판별 차별적 메틸화 부위 (DMR)는 염격한 여과 기준 및 실시간 메틸화 특이적 PCR 검정 (qMSP)을 개발하기 위해 사용되는 서열에 의해 동정되었다. 이 후, 이들 검정은 결과의 재현성을 확보하기 위해 최초 샘플 세트에 적용되었다(기술적 검증). 셋째, 독립적인 기록 케이스 및 대조 조직에서 추출된 DNA상의 qMSP 생물학적 검증을 위해 최고의 수행 후보 마커가 선정되었다. 넷째, 후보 마커 서열은 전-암 (pan-cancer) RRBS 서열분석 데이터 세트에서 인-실리코(in-silico) 비교하여, 각 마커의 부위 특이적 메틸화의 정도를 평가하였다. 다섯째, 임상 매체에서 PCa 검출을 평가하기 위해 맹검된 독립 혈장 샘플에서 테스트하기 위해 고성능 PCa 마커 세트가 선택되었다.

[0229] 연구 대상체 및 샘플

[0230] 본 연구는 the Mayo Clinic Institutional Review Board (Rochester, MN)에 의해 승인되었다. 신선한 냉동(FF) 조직, 혈장 및 벼피 코트 샘플은 IRB-승인된 환자 바이오뱅크에 의해 제공되었다. 진단을 확정하고 신생물 세포 질을 추정하기 위해 전문 GI 병리학자에 의해 종양 조직 절편이 재검토되었다. 이 후, 절편을 매크로-절개하였다. QiaAmp Mini 키트(Qiagen, Valencia CA)를 사용하여 계놈 DNA를 정제하였고, 이어서 AMPure XP 키트 (Beckman Coulter, Brea CA)로 재정제하였다.

[0231] 감소된 표현 바이설파이트 서열분석 라이브러리의 준비

[0232] 150 ng의 각 샘플의 DNA를 26 ul의 Te 완충액에 희석시켰다(5.77 ng/ul). 이것을 1X 최종 농도 CutSmart 완충 액 (New England Biolabs) 중 1ul(20 유닛)의 MspI에 의해 밤새 분해하였다. 0.6 ul 100 mM dATP, 0.06 ul 100 mM dCTP 및 0.06 ul dGTP의 혼합물과 2 ul (10 유닛)의 Klenow DNA 폴리머라제(New England Biolabs)를 사용하여 3' 오버행은 말단 수선되었고 A 꼬리화되었다. 생성물을 30도에서 20 분 동안, 37도에서 20 분동안 인큐베이

션하고, 4도로 유지하였다. 말단 수선 후에, 생성물을 2X Agencourt Ampure XP 비드(Beckman Coulter)로 정제하고, 70% EtOH로 2회 세척하고, 20ul의 물로 용리시켰다. 16도에서 밤새 인큐베이션한 IX T4 리가아제완충액 중 1ul T4 리가아제(400 유닛)를 사용하여 상기 생성물에 일루미나 어댑터를 리게이션하였다. 상기 생성물을 65도에서 20분 동안 처리하여, 상기 효소를 열 불활성화시켰다. 리게이션 후에, 생성물을 2X Agencourt Ampure XP 비드(Beckman Coulter)로 정제하고, 70% EtOH로 2회 세척하고, 47ul의 물로 용리시켰다. 45ul의 생성물은 그의 프로토콜에 기재된 바와 같이 EZ-96 DNA 메틸화 키트(Zymo Research)에 의해 바이설파이트 전환되었다. 전환된 생성물을 2X Agencourt Ampure XP 비드(Beckman Coulter)로 정제하고, 70% EtOH로 2회 세척하고, 22ul의 물로 용리시켰다. 50ul 전체 부피 중 16ul의 바이설파이트 전환된 생성물, 1ul (2.5 유닛)의 PfuTurbo Cx 핫스타트 DNA 폴리머라제, 0.5ul dNTPs (각각 25mM), 6ul 일루미나 지수(각각 2.5 uM) 및 1X PfuTurbo Cx 핫스타트 DNA 폴리머라제 완충액을 사용하여 PCR을 통해 일루미나 지수를 부가하였다. 생성물은, 0.7X에서 Ampure XP를 사용하고 상기 상충액을 수집함으로써 선택된 이중 크기인데 반하여, 이어서 1.2X에서의 Ampure XP 및 상기 비드에 결합된 것을 보유하였다. 최종 생성물은 40ul에서 용리되었다. DNA 질량 수율은 Pico Green(Molecular Probes)에 의해 결정하였고, Tecan 형광측정기 상에서 측정하였다. DNA 크기는 상기 Agilent 2100 (Agilent) 상에서 High Sensitivity DNA 침에 의해 결정하였다. 생성물의 몰 농도를 계산하였고, 샘플을 4개 샘플/풀에서 10nM까지 등몰량으로 풀링하였다(pooled).

#### [0233] 대량 병렬 서열분석 및 생물정보학

샘플을 무작위 레인 배정에 따라 플로우 셀(flow cell)에 로딩하였다. Illumina HiSeq 2000상의 the Mayo 클리닉 의료 계놈 설비에서의 차세대 서열분석 코어(Next Generation Sequencing Core)에 의해 서열분석을 수행하였다. 판독은 101 사이클동안 일 방향이었다. 각각의 플로우 셀 레인은, 정렬된 서열에 대해 30-50 배 서열분석 깊이의 중간 커버리지에 충분한 100-120 백만 판독을 발생시켰다. 표준 일루미나 파이프라인 소프트웨어는 베이스를 판단하여, fastq 포맷에서 판독물을 발생시켰다. SAAP-RRBS (감소된 표현 바이설파이트 서열분석을 위한 스트립라인 분석 및 주석 파이프라인)을 서열 판독물 측정 및 정화(clean-up), 기준 계놈으로의 정렬, 메틸화 상황 추출, 및 CpG 리포트 및 주석을 위해 사용하였다. 낮은 커버리지 ( $\leq 10$ )를 갖는 CpG는 배제시켰다. 3차 분석은 비-정보성 또는 낮은 샘플 커버리지 CpG를 제거하는 단계와 슬라이딩 100 bp 윈도우 내의 낮은 배경 및 조밀한 클러스터를 갖는 메틸화된 CpG 영역을 동정하는 단계로 구성되었다. 판독 깊이 기준은 사례와 대조군의 메틸화%에서 10% 차이를 검출하는 원하는 통계력에 기반하였다. 통계적 유의도는 판독 횟수에 기반하여 DMR 당 메틸화 백분율의 로지스틱 회귀에 의해 결정하였다. 개별 대상체에서 다양한 판독 깊이를 설명하기 위해, 과-분산된 로지스틱 회귀 모델을 사용하였고, 피팅 모델로부터 잔차의 Pearson Chi-square 통계를 사용하여 분산 매개 변수를 추정하였다. 대조군 내의 메틸화%가 암에서 1% 이하 10% 이상이라면, 유의 수준에 따라 순위매겨진 DMR이 추가로 고려되었다. 대부분의 기관 부위에서, 이는 수백 명의 잠재적 후보자를 발생시켰다. 이용된 부가적인 필터는 수신기 작동 특징 곡선하의 영역((AUC), 메틸화% 사례/대조군 배수 변화(FC), 및 상기 DMR(대조군에서는 결핍됨)을 통한 CpG의 샘플-대-샘플 동시-메틸화이었다.

#### [0235] 기술적 및 생물학적 조직 검증

메틸화 특이적 PCR (MSP) 마커 검정은 상기 열거된 기준에 의해 결정될 때 상기 PCa 발견 데이터 세트로부터 가장 가능성있는 DMR 중 120 종에 대해 개발되었다. 프라이머는 소프트웨어(Methprimer-University of California, 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)에 의해 또는 수동으로 설계되었다. 검정은 바이설파이트 전환된 (메틸화 및 미메틸화된 계놈 DNA), 비전환된 및 비-주형 대조군 상의 SYBR Green qPCR에 의해 엄격하게 테스트되고 최적화되었다. 음성 대조군과 교차-반응한 검정은 재설계되거나 또는 폐기되었다. 또한, 특이적 증폭이 일어나는 것을 확보하기 위해 용융 곡선 분석을 수행하였다. 기술 검증 단계에서, 상기 RRBS 발견에 사용된 것과 동일한 샘플을 qMSP에 의해 재테스트하였다. 메틸화 맹검이 되도록 설계된  $\beta$ -액틴 검정을 전체 DNA 카피를 나타내는 분모로 사용하였다. 상기 데이터는 로지스틱 회귀, 및 배경 결과에 대한 발견 값의 AUC 및 신호 비교에 의해 분석되었다. 상기 마커의 약 27%가 저조한 성능을 나타내었고, 제거되었다. 나머지(N = 72)는 독립적인 조직 샘플의 확장 세트 상에서 qMSP에 의해 테스트되었다. 상기 결과는 논리적으로 분석되었고, 결과 매트릭스는 AUC, FC 및 강력한 사례 샘플 메틸화%이었다.

#### [0237] 상기 전반에서의 검증

가장 우수한 메틸화 마커가 전립선 외부에서 어떻게 수행되는지 평가하기 위해, 이전에 서열분석된 다른 주요 암-결장, 췌장, 식도, 간 및 위와 비교하여 전립선 샘플에서 검증 DMR을 위한 서열분석 판독물을 사용하여 비교 CpG 메틸화% 매트릭스를 제작하였다. 마커의 최종 패널은 1) 생물학적 조직 검증 단계에서의 전체적인 성능 및

2) 다른 암에서의 상기 마커의 부위 특이적 특징에 기반한 혈장내 테스트를 위해 선택되었다. 비-PCa DNA의 과량을 감안하여 혈액에서 PCa를 가장 잘 검출하기 위해, 보편적인 및 전립선 특이적인 암 신호 모두를 나타내는 강력한 마커 패널이 선택되었다.

[0239] QuART 검정 설계 및 플라즈마 검증

[0240] 하기 자동화된 실리카 비드 방법에 의해 3 - 4 mL 의 은행에 냉동된 혈장으로부터 DNA를 추출하였다(참조: 예를 들어, 미국 특허출원 일련번호 제15/335,111호):

1	2 mL 의 Te 완충액(1mM Tris 0.1mM EDTA)
2	0.4 ng/μl 의 피쉬(Fish) DNA 희석액 중 100 μl 의 120 cp/μl 제브라 피쉬(Zebra fish)
3	7mL 의 혈장 용해 완충액 (4.3M GTC 10% IGEPAL)
4	2mL 의 혈장
5	55°C에서 1시간동안 인큐베이션한다.
6	200μl 의 결합 비드를 추가한다.
7	2.8mL 의 100% 이소프로판올을 추가한다.
8	30°C에서 30 분동안 인큐베이션한다.
9	상기 비드를 자화시키고, 상기 상청액을 제거한다.
10	750μl 3M GuHCl 56.8% EtOH을 추가하여, 결합 비드를 재현탁한다.
11	400 RPM에서 2 분동안 진탕시킨다.
12	비드를 결합시키고, 상청액을 흡인시켜 폐기한다.
13	1000μl 로 1 회 세척하고(80%ETOH), 30 °C에서 3 분동안 인큐베이션한다, 비드를 결합하고, 상청액을 흡인시켜 폐기한다.
14	500μl 로 1 회 세척하고(80%ETOH), 30 °C에서 3 분동안 인큐베이션한다, 비드를 결합하고, 상청액을 흡인시켜 폐기한다.
15	250μl 로 1 회 세척하고(80%ETOH), 30 °C에서 3 분동안 인큐베이션한다, 비드를 결합하고, 상청액을 흡인시켜 폐기한다.
16	250μl 로 1 회 세척하고(80%ETOH), 30 °C에서 3 분동안 인큐베이션한다, 비드를 결합하고, 상청액을 흡인시켜 폐기한다.
17	진탕시키면서 70 °C에서 15 분간 견조시킨다.
18	125 μl 의 Te 완충액(1 mM Tris 0.1 mM EDTA)을 추가하고, 진탕하면서 65 °C에서 25 분간 인큐베이션한다.
19	비드를 결합시키고, DNA를 함유한 상청액을 깨끗한 시험관으로 옮긴다.
20	사용 전까지 -20 °C로 보관한다.

[0241]

[0242]

이 후, 상기 DNA를 하기 방법을 사용하여 바이설파이트로 전환시키고 정제하였다:

1	5 ul 0.36 % BSA
2	70 ul 의 샘플
3	5 ul 의 1.6N NaOH
4	42 °C에서 20' 동안 인큐베이션(변성)한다.
5	8' 동안 냉각한다.
6	120 ul 의 암모늄 바이설파이트를 추가한다.
7	65°C로 75' 동안 인큐베이션(전환)한다 (3' 진탕).
8	750 ul 의 7M GuHCl 을 추가한다.
9	50 ul 의 결합 비드를 추가한다.
10	진탕하에 30°C에서 30'동안 인큐베이션한다.
11	상기 비드를 결합시킨다.
12	상청액을 흡인시켜 폐기한다.
13	1000 ul 의 80% ETOH 을 추가한다.
14	진탕하에 30°C에서 3'동안 인큐베이션한다.
15	상기 비드를 결합시킨다.
16	상청액을 흡인시켜 폐기한다.
17	200 ul 의 탈설포화 용액을 디스펜싱한다.
18	진탕하에 30°C에서 7'동안 인큐베이션한다.
19	상기 비드를 결합시킨다.
20	상청액을 흡인시켜 폐기한다.
21	250 ul 의 80% ETOH 을 추가한다.
22	진탕하에 30°C에서 3'동안 인큐베이션한다.
23	상기 비드를 결합시킨다.
24	상청액을 흡인시켜 폐기한다.
25	진탕하에 70°C로 15' 동안 비드를 건조시킨다.
26	80 ul 의 Te 완충액 (1mM Tris 0.1mM EDTA)을 추가한다.
27	진탕하에 25 분동안 65 °C로 인큐베이션한다.
28	비드를 결합시키고, DNA를 함유한 상청액을 깨끗한 시험관으로 옮긴다.
29	사용 전까지 -20 °C로 보관한다.

[0243]

이 후, 샘플(10 ul)을 ABI 실시간 PCR 장비 상에서 QuARTs-X (예컨대, 미국특허출원 일련번호 제15/335,096호를 참조한다) 포맷에서, 상기 DMR 서열로부터 개발된 프라이머 및 프로브를 사용하여 수행하였다. 관심대상인 상기 마커 서열을 함유하는 플라스미드를 Genscript로부터 수득하고, 15 ul 반응 당 1 카피의 공청 농도가 되도록 1 x QuARTs 시약 중에서 희석시켰다. 상기 반응 믹스를 96개 웰 각각에 분배하고, LightCycler 상에서 45회 사이클로 사이클링하고 데이터를 수집하였다. 웰은 샘플 함유 또는 샘플 비함유 중 하나로 지정되었다. 포아송 무작위 변수는 1로 설정되었고, 평균 성공률 값은 시행 착오에 의해 입력되고, 그 값에 대한 누적 확률을 계산하기 위해 사용되었다. 상기 누적 확률이 신호를 갖는 웰 백분율과 동일할 때, 이 사례의 카피 수에서 정확한 평균 성공률이 밝혀졌다. 이를 플라스미드를 희석하고 검정 표준물로 사용하였다.

[0245]

11회 증폭 사이클을 거치는 최대 12개 타겟을 위한 프라이머를 사용하여 수행된 샘플의 예비-증폭 플레이트를 먼저 생성시킴으로써 QuARTs-X를 수행하였다. 이 후, 이 생성물을 1:9로 희석하고, 삼중 반응에서 단 3 개의 표적만을 함유하는 후속 QuARTs 반응을 위한 주형로 사용하였다. 각 수를 계산하기 위해 사용된 표준물은 상기 예비-증폭을 거치지 않았다. 상기 샘플을 예비-증폭하지만 상기 표준물은 예비-증폭하지 않음으로써 상기 검정의 감도를 증가시켰다.

[0246]

결과를 회귀적 분할(regressive partitioning)(rPart)에 의해 분석하였다. 로지스틱 회귀분석을 이용하여 다수의 메틸화 마커를 단일 위험도 스코어로 결합시키는 것이 표준 기술이다. 그러나, 상기 로지스틱 모델 내의 마커간 고차원적 상호 작용을 발견하고/하거나 모델화하는 것은 어렵다. 이것은, 이러한 영향이 있을 때 마커 패널의 예측 가능성을 제한한다. 회귀적 분할 트리(rPart)는 마커 패널의 예측 정확도를 극대화하는 방식으로 상

기 마커간 고차원적 상호작용을 발견할 수 있는 의사결정 트리 접근법이다.

[0247] 실시예 II.

[0248] 본 실시예는 RRBS 결과 및 기술 검증 결과를 기재한다.

[0249] PCa는 식별가능한 다수의 DMR을 산출하였으며 이 중 다수는 이전에 동정되지 않았다. PCa 샘플의 메틸화를 정상 전립선과 비교하여, AUC  $>0.85$ , FC  $>20$ , 및  $p\text{-값} <0.05$  컷-오프를 충족하는 256 개 영역을 동정하였다. 이들 영역 중 22 개는 1의 AUC를 가졌다. PCa 및 정상 전립선 메틸화를 베페 코트 샘플의 결과 비교했을 때, 1895개 영역이 상기 컷-오프보다 높았고 827개는 완벽한 AUC 스코어를 가졌다. 두 비교에서의 FCs는 각각 수백 및 수천 개로 확장되었다. 글리슨 7+ PCa (공격적, 치치가 암을 나타냄) vs. 글리슨 6 PCa (대부분의 경우에 무통성, 치치가 보통 필요하지 않음)를 차별화한 가능성있는 DMR을 검색하였다. 129종의 DMR은 FC  $> 2$  (7+/6)로 관찰되었으며, 가장 높은 FC는 72이었다.

[0250] 상기 바이오마커 개발 프로세스에서의 제2단계는 초기 발견 단계에서 상대적으로 작은 샘플 크기에서 일어나는 불확실성을 해결하는 것이었다. 적은 수의 DMR 또는 마커 후보에 대해 상이한 기술 플랫폼을 사용한 동일 샘플의 재-테스트가 이 목적을 향한 첫 단계이었다. SYBR 그린(Green)을 이용한 실시간 또는 정량적인 메틸화 특이적인 PCR (qMSP)은 높은 분석 감도 및 특이도를 갖는 방법을 사용하기에 용이하다.

[0251] DMR은 관리 가능한 수의 영역( $N = 120$ )이 확보될 때까지 (표 1 참조) 컷-오프를 증가시킴으로써 모든 3가지 비교로부터 최고 후보자를 선정하여 DMR을 선택하였다.

[0252]

표 1

DMR 번호	유전자 주석	염색체 번호	염색체 상의 영역(개시 염기- 종결 염기)
1	ADCY9	16	4165628-4165833
2	AKR1B1_3298	7	134143071-134143542
3	AKR1B1_3644	7	134143644-134143716
4	ANKRD35	1	145562809-14562898
5	CLIP4	2	29338053-29338117
6	CYBA_7733	16	88717482-88717805
7	FLJ45983	10	8097100-8097859
8	GRASP	12	52400932-52401144
9	GSTP1	11	67351212-67351638
10	HAPLN3	15	89438198-89438734
11	HCG4P6	6	29894504-29894683
12	HES5_0822	1	2460822-2460998
13	HES5_1047	1	2461047-2461876
14	ITPRIPL1	2	96990982-96991303
15	LRRC4	7	127671395-127672250
16	MAX.chr2.97193166- 97193253	2	97193065-97193253
17	MAX.chr3.193	3	193776187-193776257
18	MAX.chr3.72788028- 72788112	3	72788028-72788206
19	PTPRN2	7	157361654-157361753
20	RAI1_7469	17	17627094-17628093
21	RASSF2	20	4803273-4803687
22	Septin9_0074	17	75370074-75370187
23	Septin9_0492	17	75370492-75370581
24	SLC43A3	11	57194414-57194645
25	SLC4A11	20	3218937-3219001
26	SMAD3	15	67413704-67413772
27	SSBP4	19	18539756-18540408
28	TJP2	9	71788646-71789457
29	ABLIM1	10	116391692-116391769
30	AOX1	2	201450664-201450868

[0253]

31	C3orf18	3	50604997-50605357
32	EIF5A2	3	170625931-170626391
33	EPSTI1	13	43566083-43566214
34	FBXO30	6	146136383-146136441
35	FLOT1_1586	6	30711586-30711681
36	FLOT1_1767	6	30711767-30711864
37	FLOT1_1904	6	30711904-30711966
38	FOSL1	11	65666866-65667056
39	GAS6	13	114566059-114566687
40	GSDMD	8	144640720-144640772
41	KCNK4	11	64059874-64059994
42	LOC100129726_1716	2	43451464-43452664
43	MAX.chr10.74079656-74079694	10	74079656-74079861
44	SERPINB9_3389	6	2903389-2903705
45	SLC03A1	15	92396091-92396343
46	TPM4_7473	19	16187401-16187514
47	TPM4_8047	19	16187580-16188154
48	AGPS_7349	2	178257349-178257413
49	AGPS_7497	2	178257497-178257568
50	AGPS_7696	2	178257696-178257732
51	AMPD3	11	10472267-10472338
52	CH25H	10	90967594-90967655
53	GALR3	22	38214733-38214808
54	HDAC7_6722	12	48206722-48206761
55	MAX.chr1.227976339-227976430	1	227976339-227976430
56	MAX.chr1.8014263-8014319	1	8014263-8014319
57	MAX.chr19.34311051-34311120	19	34311051-34311120
58	NCRNA00092_4149	9	98784149-98784195
59	ZNF655_6084	7	99156084-99156145
60	ZNF655_6545	7	99156545-99156606
61	ZNF655_6762	7	99156762-99156852
62	ABCB1	7	87229774-87229851

63	ACOXL	2	111875299-111875585
64	ANXA2	15	60690904-60690949
65	APBB1IP	10	26727818-26728120
66	ARPC1B_1906	7	98971906-98971950
67	ARPC1B_1967	7	98971967-98971997
68	ATP2B4	1	203598589-203598782
69	CHST11_2032	12	104852032-104852137
70	CHST11_2206	12	104852206-104852307
71	DOK1_2325	2	74782325-74782452
72	FLJ34208	3	194208259-194208471
73	HCG4P6	6	29894504-29894683
74	HEBP2	6	138724600-138724667
75	HEYL	1	40105264-40105646
76	KLF16	19	1855656-1855656
77	LAMA3	18	21269864-21270082
78	LIME1	20	62369129-62369383
79	LOC339674	22	42353799-42353881
80	LOC440925	2	171570371-171570463
81	MAX.chr1.61519554-61519667	1	61519406-61519667
82	MAX.chr1.61519679-61519759	1	61519679-61519759
83	MAX.chr12.48592041-48592162	12	48592041-48592162
84	MAX.chr17.77786640-77786733	17	77786640-77786733
85	PDE4D	5	58334709-58335864
86	PLCL2	3	16925808-16925889
87	SIM2	21	38119920-38120410
88	STX16	20	57224816-57225220
89	WNT3A	1	228225487-228225688
90	ABHD15	17	27893168-27893592
91	ADAP1	7	963082-963154
92	ADD3	10	111767345-111767579
93	AXIN1	16	374825-375308
94	BCL2L11_6887	2	111876440-111876914

[0255]

95	BCL2L11_6935	2	51717908-51718147
96	BIN2_7908	12	51717908-51717961
97	CCDC88C	14	91790497-91790556
98	CTBP1	4	1210660-1210752
99	DOK1_2096	2	74782096-74782223
100	DOK1_2234	2	74782234-74782302
101	DOK1_2475	2	74782475-74782572
102	FAM129C	19	17634139-17634203
103	FAM78A_1379	9	134151379-134151451
104	FAM78A_8684	9	134148528-134148765
105	FNBP1	9	132650777-132650834
106	GNG7_1972	19	2561972-2562075
107	GNG7_2119	19	2562119-2562198
108	HMHA1_9304	19	1069304-1069391
109	INPP5D	2	233925169-233925288
110	LYL1	19	13210124-13210498
111	MAX.chr15.95128172-95128228	15	95128172-95128228
112	MAX.chr16.11327022-11327151	16	11327022-11327292
113	MAX.chr16.50308415-50308535	16	50308415-50308535
114	MAX.chr4.1049805-1049912	4	1049805-1049912
115	MAX.chr9.134128109-134128241	9	134128109-134128241
116	NCOR2	12	124950727-124950905
117	OSM	22	30662704-30662800
118	S1PR4_0092	19	3180092-3180379
119	S1PR4_8637	19	3178410-3178763
120	S1PR4_9843	19	3179843-3180058

[0256]

DMR 서열은 또한 하나의 가닥 기준으로 상기 어드레싱된 CpGs 전반에서 유의한 공동-메틸화 또는 인접 메틸화를 나타내야만 하였다. 모든 어드레싱된 CpGs가 메틸화되고(사례의 경우) 미메틸화될 때(대조군의 경우) qMSP 및 기타 증폭-기반의 방법이 가장 잘 진행된 것이다. 표준물(바이설파이트 처리된 범용 메틸화된 게놈 DNA) 및 대조 샘플(바이설파이트 처리된 미메틸화 게놈 DNA, 비-전환된 게놈 DNA 등)에 대해 QC 테스트한 후에, 99 개의 영역은 충분한 선형성, 특이성 및 견고성을 갖고 수행되었으며, 상기 1 단계 샘플을 재-테스트하기 위해 사용하였다. 대부분의 검정을 위한 논리적 분석 결과는 상기 서열분석 단계로부터의 메틸화% 유래 수치에 필적하였다. 모든 샘플 내의 전체 DNA 가닥은 100 개를 초과하였고, 평균 약 1000 개이었다. 상기 Z- 마커(참조, 예를 들어, 미국 특허출원 일련번호 제14/966,617호)는 정상적인 베피 코트 샘플과 비교하여 1의 AUC 및 매우 높은 FCs를 계속 나타냈다. 상기 Z-마커 후보물의 경우에 암 대 양성의 비가 조사되었을 때, 약 절반은 1 대 1이었고, 나머지는 2와 10 사이의 비(중간-Z)를 가졌다. 상기 암 대 양성 마커 중에서, 34개는 0.95 내지 1 범위의 AUC를 가졌다. 모두는 베피 코트 샘플에 대해 음성이었다. 상기 1단계 결과에서 글리슨 6 암으로부터 글리슨 7+ 암을 차별화하는 마커는 일반적으로 그 성능을 유지하였으며, 상기 검증 테스트에서 26 개의 마커가 2를 초과하는 FC를 가졌고 가장 높은 값은 292이었다.

[0258]

표 2는 표 1에서 동정된 DMR에 대하여, 1) 글리슨 스코어 6 이상의 전립선 세포 vs. 양성 전립선 세포에서 상기 곡선 아래의 영역 (AUC), 2) 글리슨 스코어 6 이상의 전립선 세포 vs. 양성 전립선 세포에서 배수 변화 (FC), 및 3) 글리슨 스코어 6 이상의 전립선 세포 vs. 베피(정상)에서 배수 변화 (FC)를 보여준다.

[0259]

표 2

DMR 번호	유전자 주석	글리슨 6 이상의 전립선 세포 vs. 양성 전립선 세포의 AUC	글리슨 6 이상의 전립선 세포 vs. 양성 전립선 세포의 FC	글리슨 6 이상의 전립선 세포 vs. 비파(정상)의 FC
1	ADCY9	0.951	15.81	64.80
2	AKR1B1_3298	0.9857	24.80	108.96
3	AKR1B1_3644	0.9948	20.00	149.37
4	ANKRD35	0.9889	10.29	74.38
5	CLIP4	0.9905	14.31	68.96
6	CYBA_7733	0.9873	10.13	100.86
7	FLJ45983	0.9575	10.02	55.98
8	GRASP	1	65.34	54.18
9	GSTP1	1	29.28	54.11
10	HAPLN3	0.9984	27.21	83.77
11	HCG4P6	0.9531	18.31	69.37
12	HES5_0822	0.9698	13.91	74.47
13	HES5_1047	0.9714	18.20	63.37
14	ITPRIPL1	1	33.50	146.96
15	LRRC4	0.9802	244.30	23.20
16	MAX.chr2.97193166- 97193253	0.9968	14.23	94.29
17	MAX.chr3.193	0.9762	18.09	80.44
18	MAX.chr3.72788028- 72788112	0.981	19.72	64.91
19	PTPRN2	0.9841	28.83	57.62
20	RAI1_7469	0.9984	28.53	50.04
21	RASSF2	0.9921	12.47	163.35
22	Septin9_0074	0.9524	11.13	52.90
23	Septin9_0492	0.9627	29.96	58.55
24	SLC43A3	0.9546	10.74	62.40
25	SLC4A11	0.9921	12.12	57.37
26	SMAD3	1	17.07	87.91
27	SSBP4	0.9841	31.78	164.83

[0260]

28	TJP2	0.9849	26.83	79.08
29	ABLIM1	0.9873	13.10	11.21
30	AOX1	0.9889	56.18	27.46
31	C3orf18	0.9429	11.06	33.72
32	EIF5A2	0.9635	12.42	26.45
33	EPSTI1	0.9429	13.68	40.17
34	FBXO30	0.946	31.76	87.79
35	FLOT1_1586	0.9968	8.95	57.06
36	FLOT1_1767	0.981	12.92	31.67
37	FLOT1_1904	0.9984	15.87	36.70
38	FOSL1	0.9762	13.20	27.90
39	GAS6	1	31.31	41.78
40	GSDMD	0.9635	15.23	53.83
41	KCNK4	0.9905	9.67	17.52
42	LOC100129726_1716	0.9714	31.51	114.94
43	MAX.chr10.74079656-74079694	0.9603	16.06	52.28
44	SERPINB9_3389	0.9841	13.91	54.70
45	SLC03A1	0.9619	10.74	26.11
46	TPM4_7473	0.9832	36.60	269.51
47	TPM4_8047	0.9911	29.55	70.39
48	AGPS_7349		9.80	279.97
49	AGPS_7497		13.66	81.68
50	AGPS_7696		3.23	60.01
51	AMPD3	0.7757	29.14	115.79
52	CH25H	0.6771	6.67	311.57
53	GALR3	0.6818	5.85	50.02
54	HDAC7_6722	0.7411	10.06	50.66
55	MAX.chr1.227976339-227976430	0.7386	10.84	61.80
56	MAX.chr1.8014263-8014319	0.7556	17.68	449.60
57	MAX.chr19.34311051-34311120	0.6258	8.23	79.12
58	NCRNA00092_4149	0.6765	5.17	79.44
59	ZNF655_6084	0.8301	4.72	166.97
60	ZNF655_6545	0.8833	20.32	145.27

[0261]

61	ZNF655_6762	0.7778	6.34	68.68
62	ABCB1	1	6.76	81.06
63	ACOXL	1	3.52	117.30
64	ANXA2	1	12.61	152.60
65	APBB1IP	1	1.41	112.40
66	ARPC1B_1906	1	2.12	295.90
67	ARPC1B_1967	1	1.45	228.10
68	ATP2B4	1	4.67	117.80
69	CHST11_2032	1	18.64	228.90
70	CHST11_2206	1	29.27	201.70
71	DOK1_2325	1	2.03	99.53
72	FLJ34208	1	2.81	137.00
73	HCG4P6	1	4.27	160.20
74	HEBP2	1	3.99	72.73
75	HEYL	1	5.64	71.91
76	KLF16	1	0.97	92.50
77	LAMA3	1	8.87	41.75
78	LIME1	1	2.98	112.30
79	LOC339674	1	2.48	52.99
80	LOC440925	1	1.69	187.50
81	MAX.chr1.61519554-61519667	1	2.71	131.00
82	MAX.chr1.61519679-61519759	1	2.32	157.20
83	MAX.chr12.48592041-48592162	1	8.24	73.55
84	MAX.chr17.77786640-77786733	1	8.18	42.27
85	PDE4D	1	3.85	91.96
86	PLCL2	1	3.25	101.40
87	SIM2	1	2.45	72.63
88	STX16	1	1.76	63.07
89	WNT3A	1	2.26	55.46
90	ABHD15	1	1.18	262.70
91	ADAP1	1	1.23	251.70
92	ADD3	1	38.62	342.40
93	AXIN1	1	1.08	499.60

94	BCL2L11_6887	1	1.39	325.50
95	BCL2L11_6935	1	1.42	274.50
96	BIN2_7908	1	1.07	413.00
97	CCDC88C	1	1.42	404.30
98	CTBP1	1	1.16	606.10
99	DOK1_2096	1	2.84	272.00
100	DOK1_2234	1	2.30	280.80
101	DOK1_2475	1	1.39	280.00
102	FAM129C	1	0.97	255.10
103	FAM78A_1379	1	1.03	899.10
104	FAM78A_8684	1	1.00	524.10
105	FNBP1	1	1.01	537.80
106	GNG7_1972	1	1.09	689.20
107	GNG7_2119	1	1.11	1503.00
108	HMHA1_9304	1	0.91	261.30
109	INPP5D	1	1.01	526.70
110	LYL1	1	1.07	790.10
111	MAX.chr15.95128172-95128228	1	1.13	330.20
112	MAX.chr16.11327022-11327151	1	1.48	656.90
113	MAX.chr16.50308415-50308535	1	0.98	407.50
114	MAX.chr4.1049805-1049912	1	1.26	362.60
115	MAX.chr9.134128109-134128241	1	1.01	356.90
116	NCOR2	1	0.94	438.30
117	OSM	1	1.07	504.30
118	S1PR4_0092	1	1.00	453.00
119	S1PR4_8637	1	1.02	461.40
120	S1PR4_9843	1	1.03	575.00

[0263]

실시예 III

[0264]

독립 보관 케이스 및 대조 조직으로부터 추출된 DNA 상에서 qMSP 생물학적 검증을 위하여, 실시예 II에 기재된 실험을 통해 동정된 가장 우수한 성능을 나타내는 후보 마커를 선택하였다.

[0265]

전립선 조직 ( $N = 35$ 개의 정상 전립선, 19개의 글리슨 스코어 6, 31개의 글리슨 스코어 7+) 및 정상 벼피 코트 ( $N = 36$ ) 샘플의 독립적인 세트에 대해 수행하기 위한 제2 단계 연구에서부터, 73종의 마커를 선택하였다 (표 3 참조) 제거된 27종의 마커는 주로 암 대 양성 세트에서 0.85 이하(sub 0.85)의 AUC를 갖거나, 또는 상기 Z-마커 세트 내의 완벽한 양성 메틸화보다 적었다. 상기 글리슨 7+ 대 6 마커의 대부분은 순방향으로 운반되었다. 모든 샘플을 이전과 같이 qMSP에 의해 검정하였다. 상기 73종 검정을 위한 글리슨 스코어 7+ 전립선 조직 대 정상 양성 전립선 조직을 위한 DMR 계놈 좌표 및 AUC가 표 3에 나열되어 있으며, 각각의 프라이머 서열이 표 4에 제공되어 있다.

[0267]

표 3

마커	Chr	가닥	AUC (7+/정상)	DMR 번호
ABCB1	7	RS	0.91493	62
ABLIM1	10	FS	0.88976	29
ACOXL	2	FS	0.9592	63
ADCY9	16	RS	0.86372	1
ADD3	10	FS	0.92361	92
AGPS_7349	2	FS	0.69705	48
AGPS_7497	2	FS	0.6849	49
AGPS_7696	2	FS	0.75174	50
AKR1B1_3298	7	RS	0.92622	2
AKR1B1_3644	7	RS	0.96732	3
ANKRD35	1	FS	0.94618	4
ANXA2	15	RS	0.96962	64
ARPC1B_1906	7	FS	0.84028	66
ARPC1B_1967	7	FS	0.86024	67
AXIN1	16	RS	0.63411	93
BIN2_7908	12	RS	0.58854	96
CHST11_2206	12	RS	0.97861	70
CTBP1	4	FS	0.46007	98
EIF5A2	3	FS	0.92014	32
FAM78A_8684	9	RS	0.57813	104
FBXO30	6	FS	0.82899	34
FLJ45983	10	FS	0.99049	7
FLOT1_1586	6	FS	0.94355	35
FLOT1_1904	6	FS	0.92929	37
FNBP1	9	FS	0.61198	105
FOSL1	11	FS	0.89583	38
GALR3	22	RS	0.78559	53
GAS6	13	FS	0.98099	39
GNG7_2119	19	RS	0.75955	107
GRASP	12	RS	0.96732	8
GSDMD	8	FS	0.93576	40
GSTP1	11	FS	0.94792	9
HAPLN3	15	FS	0.95781	10
HCG4P6	6	FS	0.9836	11

[0268]

HDAC7_6722	12	RS	0.81858	54
HEBP2	6	RS	0.93403	74
HES5_0822	1	RS	0.95247	12
HES5_1047	1	RS	0.94097	13
ITPRIPL1	2	RS	0.96078	14
KCNK4	11	FS	0.9798	41
KLF16	19	RS	0.53993	76
LAMA3	18	RS	0.87413	77
LOC100129726_1				
716	2	RS	0.87153	42
LOC339674	22	FS	0.90885	79
LOC440925	2	FS	0.82726	80
LRRC4	7	RS	0.94593	15
LYL1	19	RS	0.56597	110
MAX.chr1.61519				
554-61519667	1	RS	0.95486	81
MAX.chr1.80142				
63-8014319	1	FS	0.80729	56
MAX.chr10.7407				
9656-74079694	10	RS	0.86372	43
MAX.chr12.4859				
2041-48592162	12	RS	0.9321	83
MAX.chr15.9512				
8172-95128228	15	FS	0.58681	111
MAX.chr16.1132				
7022-11327151	16	FS	0.81684	112
MAX.chr17.7778				
6640-77786733	17	RS	0.78125	84
MAX.chr2.97193				
166-97193253	2	FS	0.98099	16
MAX.chr3.193	3	FS	0.97683	17
MAX.chr3.72788				
028-72788112	3	FS	0.9798	18
NCRNA00092_414				
9	9	FS	0.84722	58
PDE4D	5	RS	0.8776	85

RAI1_7469	17	RS	0.97656	20
RASSF2	20		0.97861	21
S1PR4_9843	19	FS	0.52778	120
Septin9_0492	17	FS	0.93142	23
SERPINB9_3389	6	FS	0.96019	44
SIM2	21	RS	0.81343	87
SLC4A11	20	FS	0.95399	25
SLC03A1	15	FS	0.62448	45
SSBP4	19	FS	0.9401	27
STX16	20	FS	0.87153	88
TPM4_8047	19	RS	0.95722	47
WNT3A	1	FS	0.84462	89
ZNF655_6084	7	FS	0.94271	59
ZNF655_6545	7	FS	0.80339	60

[0270]

표 4

마커	프라이미 서열	DMR 번호
ABCB1	좌측 M 프라이미 TTGTTTTTGAGTTCGCGGGC (서열번호 99)	62
ABLIM1	우측 M 프라이미 ACCAATACGATTCTCCCTCCGAT (서열번호 100)	
ACOXL	좌측 M 프라이미 TTTCGACGAGTAGGATTGAAGAAGGAACG (서열번호 127)	29
ADCY9	우측 M 프라이미 GCGAATCTATCTACCGAAACGCGCT (서열번호 128)	
ADD3	좌측 M 프라이미 AGTTAAGTTAACGGGTGTGGCGG (서열번호 93)	63
	우측 M 프라이미 AAACGTCGATAAAACGAACGTCGTA (서열번호 94)	
	좌측 M 프라이미 TTTCGGGCGTTTAGGTTCGTTTC (서열번호 25)	1
	우측 M 프라이미 GACTCAACGATACTCCCACCGCC (서열번호 26)	
	좌측 M 프라이미 CGAGTTGTATAGTTAGAAGAGGACGT (서열번호 1)	92
	우측 M 프라이미 AACCGAAAAAACCTAATTGAAACG	

[0272]

	(서열번호 2)	
AGPS_7349	좌측 M 프라이머 GGGGTAGAGAATGTGAAGTTTAGACGT (서열번호 63)	48
	우측 M 프라이머 ACCCGCGACGACTTAACGACG (서열번호 64)	
AGPS_7497	좌측 M 프라이머 TTTTTTATTCGCGTTAGCGGTTTCG (서열번호 65)	49
	우측 M 프라이머 CCGCCATAACTACCGCCTATACTACCG (서열번호 66)	
AGPS_7696	좌측 M 프라이머 TTAATGAGTGTAAAGCGCGGAGAGTCG (서열번호 67)	50
	우측 M 프라이머 CGAAAATAACCGTAAACGCTACCGT (서열번호 68)	
AKR1B1_3298	좌측 M 프라이머 GATTCGGCGTAGATAGGGACGT (서열번호 143)	2
	우측 M 프라이머 ACAACCGAACTACAAATACCTCGAA (서열번호 144)	
AKR1B1_3644	좌측 M 프라이머 GGGGTTCGTTTATATTTTCGCGC (서열번호 27)	3
	우측 M 프라이머 CAAATCACTCGAAATCCCTCGCC (서열번호 28)	
ANKRD35	좌측 M 프라이머 GGGAGGTAGTTAGTTACGGTAATACGA (서열번호 29)	4
	우측 M primer CTAAACCACCAACGAACCCCGAA (서열번호 30)	
ANXA2	우측 M 프라이머 GGGTTAAAGTTATGGGTTTATTCGT (서열번호 89)	64
	우측 M 프라이머 TAAACATCTCTACCGCACCTCGTA (서열번호 90)	
ARPC1B_1906	우측 M 프라이머 AGGGAGTTTCGTTGGTTGTCGAC (서열번호 81)	66
	우측 M 프라이머 ATACTACGAACTCCCGCGCTCACACG (서열번호 82)	
ARPC1B_1967	우측 M 프라이머 AGGGAGTTTCGTTGGTTGTCGAC (서열번호 83)	67
	우측 M 프라이머 ATACTACGAACTCCCGCGCTCACACG (서열번호 84)	

[0273]

AXIN1	좌측 M 프라이머 GGGGTATTAGTTTTATGAGATTGCGT (서열번호 3)	93
	우측 M 프라이머 TAAAAAAATCCACCTATCGCTCGAA (서열번호 4)	
BIN2_7908	좌측 M 프라이머 TTGTTAATTGGGGTCGTCGT (서열번호 5)	96
	우측 M 프라이머 GAAAACCCGCACTCCTCCTCGA (서열번호 6)	
CHST11_2206	좌측 M 프라이머 TTTTTTAGTTAGATTTCGGACGT (서열번호 85)	70
	우측 M 프라이머 TAAAAATAACCCATTCCCTCCGAT (서열번호 86)	
CTBP1	좌측 M 프라이머 TATAGGATTAAAGTTCGCGAACGT (서열번호 7)	98
	우측 M 프라이머 TCAACCTACTCCTCCTATATAACGAT (서열번호 8)	
EIF5A2	좌측 M 프라이머 ATCGTTTATCGTAGAAGTCGGCGA (서열번호 135)	32
	우측 M 프라이머 TACGACCTAAACTAAATCCCCGCA (서열번호 136)	
FAM78A_8684	좌측 M 프라이머 GGAGTTAGAAGTTTTGGGAGGGC (서열번호 9)	104
	우측 M 프라이머 AACACGTAACCCCTCTACCCGAC (서열번호 10)	
FBXO30	좌측 M 프라이머 GTTTTTCGTCGGTTAATTAGCGT (서열번호 141)	34
	우측 M 프라이머 AAAATAACGAATCACACACCGTC (서열번호 142)	
FLJ45983	좌측 M 프라이머 TAGTCGAGGTTATGGAGGTGACGGC (서열번호 31)	7
	우측 M 프라이머 ACTACCCGTTAACACGACGAA (서열번호 32)	
FLOT1_1586	좌측 M 프라이머 TGTTTCGGAAGTTTAGTTGGGGATACGT (서열번호 121)	35
	우측 M 프라이머 AACACAAACGTACCTAATACGCGAA (서열번호 122)	
FLOT1_1904	좌측 M 프라이머 GTTATTAGGATTGGTAGAAGACGA1	37

	(서열번호 119)	
	우측 M 프라이머 AACTACCAATCGAAAAACCGAA (서열번호 120)	
FNBP1	좌측 M 프라이머 GCGTGATTGATGGGTGTATTACGT (서열번호 11) 우측 M 프라이머 ATAAACTCCGATCCCTACAACGAA (서열번호 12)	105
FOSL1	좌측 M 프라이머 GTTAGGAAGGGAGGGACGTTCGG (서열번호 131)	38
	우측 M 프라이머 CGAAAAACTACGAACACGTATCGAC (서열번호 132)	
GALR3	좌측 M 프라이머 TGTAGTAGGATACTGTTGAGTCGCGG (서열번호 69)	53
	우측 M 프라이머 GCGATAAAACTCCACGCCGTT (서열번호 70)	
GAS6	좌측 M 프라이머 TAGTTAGTAGAGGGAGGGTCGCGG (서열번호 117)	39
	우측 M 프라이머 CGCGAAAAACCGAAAATCCGTT (서열번호 118)	
GNG7_2119	좌측 M 프라이머 TAGTTTCGGGTTGCGGTGATTAC (서열번호 13)	107
	우측 M 프라이머 AAAATCCGAAACAAACATTACGCC (서열번호 14)	
GRASP	좌측 M 프라이머 TGTTTCCGGATACTGGCGAGC (서열번호 33) 우측 M 프라이머 ACGAACGAACTATACTGGCGACGCT (서열번호 34)	8
GSDMD	좌측 M 프라이머 GTTCGTTAGAAGGTTCGCGTCGTATAAC (서열번호 145)	40
	우측 M 프라이머 ACCTTTCCGAAACCTAAACTCCG (서열번호 146)	
GSTP1	좌측 M 프라이머 TCGTGATTAGTATTGGGGCGGAGC (서열번호 35)	9
	우측 M 프라이머 GAAACTCCAACGAAAACCTCGCGAC (서열번호 36)	
HAPLN3	좌측 M 프라이머 AAGCGGTAAGGGAGGAATTGGTTC	10

	(서열번호 37)	
	우측 M 프라이머 GACCCCCGAAACTCTAACCGTCG (서열번호 38)	
HCG4P6	좌측 M 프라이머 GGATCGGAGTATTGGGATCGGAGTATAC (서열번호 39)	11
	우측 M 프라이머 AACTCTAATAATAAACGACGCGAC (서열번호 40)	
HDAC7_6722	좌측 M 프라이머 GTAGTATTATTTATCGGGCGA (서열번호 71)	54
	우측 M 프라이머 AAAAATCACACCTCCTAACGCT (서열번호 72)	
HEBP2	좌측 M 프라이머 TTCGAGGTTTCGGGGCGAC (서열번호 103)	74
	우측 M 프라이머 CCCTCCTATCCGTTAACCTTCGCGTA (서열번호 104)	
HES5_0822	좌측 M 프라이머 GTGATTGGCGGGATTGCG (서열번호 41)	12
	우측 M 프라이머 GACGAAAAACGCTCCCTACAAACGA (서열번호 42)	
HES5_1047	좌측 M 프라이머 AAGAGTTGTATTAGGATTATAGCGA (서열번호 43)	13
	우측 M 프라이머 CGTAAAACGTCAAAACTACACGAC (서열번호 44)	
ITPRIPL1	좌측 M 프라이머 GGGATTAGGGTAGGTTATTTATCGT (서열번호 45)	14
	우측 M 프라이머 ACCCGCCTATCTCTTAAATCGTA (서열번호 46)	
KCNK4	좌측 M 프라이머 TTAGTTAGGAAGTAGGGCGAGGCAGA (서열번호 125)	41
	우측 M 프라이머 AAAACCGAACACGCAAAACGAA (서열번호 126)	
KLF16	좌측 M 프라이머 TGAGATTCGGTTAAAGGAAGGGGTC (서열번호 95)	76
	우측 M 프라이머 ACCTACCTATACGCCTCAAACGAT (서열번호 96)	
LAMA3	좌측 M 프라이머 GTTTTATTGGATGGTGTGGCGT (서열번호 115)	77

	우측 M 프라이머 CCCGAACCTCTACTACAAATTAATCGAA (서열번호 116)	
LOC100129726_1 716	좌측 M 프라이머 TACGTCGTCGTTATTTAGATTTATAATTTGTC (서열번호 133)	42
	우측 M 프라이머 CCAAACCCCTACTACTACTACTACTAACTACG (서열번호 134)	
LOC339674	좌측 M 프라이머 TGGTGGATCGCGATTTCGTAAGAC (서열번호 111)	79
	우측 M 프라이머 CGCCGAAAACCAAATTATCGCG (서열번호 112)	
LOC440925	좌측 M 프라이머 CGGTGAGTATTCGCGGTTTCGT (서열번호 87)	80
	우측 M 프라이머 AAATCGCCTCTCCGAACGC (서열번호 88)	
LRRC4	좌측 M 프라이머 TAATTCGCGAGGTAGGCGACGG (서열번호 47)	15
	우측 M 프라이머 CAATACTCTTATATATTAAACGCCGCT (서열번호 48)	
LYL1	좌측 M 프라이머 TGTTTCGTTAGTTATGAAGTATATCGG (서열번호 15)	110
	우측 M 프라이머 ACTTAATCGCGCAACAACCGCA (서열번호 16)	
MAX.chr1.61519 554-61519667	좌측 M 프라이머 GTCGCGTTTTTATTGTCGTTCGT (서열번호 91)	81
	우측 M 프라이머 ATAAAAATCGATTCTACCGCGTCGCC (서열번호 92)	
MAX.chr1.80142 63-8014319	좌측 M 프라이머 AATACGCGACGGTTCGTTATTGC (서열번호 73)	56
	우측 M 프라이머 CATAACGTAATCCACTCCGACGAC (서열번호 74)	
MAX.chr10.7407 9656-74079694	좌측 M 프라이머 GGTTGTAAGGGGGTTGGTACGC (서열번호 139)	43
	우측 M 프라이머 ATTCGAAAAAACGCCGATACGA (서열번호 140)	
MAX.chr12.4859	좌측 M 프라이머 TCGCGTTGACGGTTGTGACG	83

2041-48592162	(서열번호 101)	
	우측 M 프라이미 AACCCCGATCCGAAAAACCGAA (서열번호 102)	
MAX.chr15.9512 8172-95128228	좌측 M 프라이미 CGGTTATATTATAAGAAAAGGAAGTTTCGT (서열번호 17)	111
	우측 M 프라이미 GAAAACCCAAACTACACACCGCT (서열번호 18)	
MAX.chr16.1132 7022-11327151	좌측 M 프라이미 TTGGTTTTATTAAAGTTATGTGACGA (서열번호 19)	112
	우측 M 프라이미 TAAAATTCCAAAAAACGATAACGCT (서열번호 20)	
MAX.chr17.7778 6640-77786733	좌측 M 프라이미 GGGTGGATTTCGGCGTTATAAATC (서열번호 113)	84
	우측 M 프라이미 CAAAACGACTCCCCGCCGAA (서열번호 114)	
MAX.chr2.97193 166-97193253	좌측 M 프라이미 GGTTTAGGGAAATATCGCGT (서열번호 49)	16
	우측 M 프라이미 AACTCAAACCGAAAAATAATTGAT (서열번호 50)	
MAX.chr3.193	좌측 M 프라이미 AAAGGTTAGTTAAAGATGGAATCGT (서열번호 51)	17
	우측 M 프라이미 CTCGCGACGAAAAAACCGAA (서열번호 52)	
MAX.chr3.72788 028-72788112	좌측 M 프라이미 AGGATTGACGGAGTTATATTGCT (서열번호 53)	18
	우측 M 프라이미 TAACATAACCACCCAACCTCTCCCGAA (서열번호 54)	
NCRNA00092_414 9	좌측 M 프라이미 CGTTAGGGGTTCGAGCGTAGC (서열번호 75)	58
	우측 M 프라이미 CCCTAATTCCATCTAAACGAATCGAC (서열번호 76)	
PDE4D	좌측 M 프라이미 AATTTCGTAGGAAGTAGTCGGTCGT (서열번호 97)	85
	우측 M 프라이미 TACCCTCAAATTACCCAAACCGCT (서열번호 98)	
RAI1_7469	좌측 M 프라이미 TTATAGTAGTTCGTCGAAATATAAGTTCGTC (서열번호 20)	20

	55)	
	우측 M 프라이미어 CCGAAAAACCCAAAAAAACCG (서열번호 56)	
RASSF2	좌측 M 프라이미어 GTCGTTACGGTATTGTTCGTC (서열번호 57)	21
	우측 M 프라이미어 ATCGCTAAACCTAACCTAACGTC (서열번호 58)	
S1PR4_9843	좌측 M 프라이미어 TGAGGTTAAGGGATAGTTTCGCG (서열번호 21)	120
	우측 M 프라이미어 AACTACAACCTCAAATACTCCGACGCT (서열번호 22)	
Septin9_0492	좌측 M 프라이미어 GGTTTGCCTTGCCTCGC (서열번호 23)	23
	우측 M 프라이미어 CCATTATATAAACTTCCCTCGCC (서열번호 24)	
SERPINB9_3389	좌측 M 프라이미어 GGTTTATTATTCGGTGGTAGTCGG (서열번호 129)	44
	우측 M 프라이미어 ACACGAAAACGACGACAACGCT (서열번호 130)	
SIM2	좌측 M 프라이미어 GGTCGTAGTCGGAAAGTCGG (서열번호 105)	87
	우측 M 프라이미어 ATTGACGAAAACACCGCGC (서열번호 106)	
SLC4A11	좌측 M 프라이미어 TTCGGTTGTTGTGTTCTCGTGTGCG (서열번호 59)	25
	우측 M 프라이미어 CCGAATCTAAAAACGCTTCCTCTCGTA (서열번호 60)	
SLC03A1	좌측 M 프라이미어 GCGATTTGTAGCGTTGGATATCGA (서열번호 137)	45
	우측 M 프라이미어 GTCGAAAACCCCACGAACCGTT (서열번호 138)	
SSBP4	좌측 M 프라이미어 GTAGCGTCGGCGTAGAGCGTAGATC (서열번호 61)	27
	우측 M 프라이미어 ATAACGAATCCCCCGAAAATTCG (서열번호 62)	
STX16	좌측 M 프라이미어 CGGGAAATTTCGGAAAATATACGT	88

	(서열번호 107)	
	우측 M 프라이미 TACGAAATTCCAACAAAAACCGAA (서열번호 108)	
TPM4_8047	좌측 M 프라이미 TTTTTTATTTTTATTTCGTCGT (서열번호 123)	47
	우측 M 프라이미 GACTTCTACTTACTTCCCTAACCGTT (서열번호 124)	
WNT3A	좌측 M 프라이미 CGGGCGGTTTACGTTTCGCG (서열번호 109)	89
	우측 M 프라이미 AAAAAAAATCCCCATTCAAACGCT (서열번호 110)	
ZNF655_6084	좌측 M 프라이미 TTGCGAAAACGAGTTTCGAATTATGGAC (서열번호 77)	59
	우측 M 프라이미 CCCCCGAATATAAAATAACGACCCCGAA (서열번호 78)	
ZNF655_6545	좌측 M 프라이미 TTGGTTTATTTATTCGCGGATCGA (서열번호 79)	60
	우측 M 프라이미 AAAACACGATCGCCGACTCCTAACG (서열번호 80)	

[0280]

[0281] 전반적인 AUC는 우수하였으나, 초기 검증에서 다소 낮았으며, 이는 이러한 확장된 독립 세트에서 예상되었다. 표 3에 도시된 바와 같이, 20 개의 마커는 0.95-0.99 범위의 AUC 값 (글리슨 7+ 대 정상 전립선) 및 FC 17-164를 가졌다. 베피 코트 샘플 내의 메틸화%는 GRASP를 제외하고는 무시할 정도였으며, 이를 위해 단일 이상점 (single outlier)이 있었다.

[0282]

임상 후속 자료가 상기 전립선 사례에서 입수가능하였기 때문에, 후성적(epigenetic) 마커 후보의 예후 측면을 연구하기로 결정하였다. 상기 로지스틱 모델 내의 마커간 고차 상호작용을 발견 및/또는 모델화하기 위한 수학적 방법인 회귀 분할법(rPart)을 이용하여, 5종의 예후 마커 (FAM78A, WNT3A, GAS6, LOC100129726 및 MAX.chr3.727)를 선별하였다. 메틸화 DNA 마커에 의해 정의된 위험도. 그룹화는 글리슨 스코어( $p < 0.0001$ )에 대해 무진행(progression-free) 생존을 예측하는데 있어서 유의한 예후적 내용을 추가한 반면, 글리슨 스코어는 메틸화 DNA 마커 위험도 그룹화 ( $p = 0.2174$ )에 대해 값을 추가하지 않았다.

[0283] 실시예 IV.

[0284] 전립선 조직 내의 PCa 글리슨 스코어 7초과 대 글리슨 스코어 6을 구별할 수 있는 마커를 동정하기 위해 추가적인 실험을 수행하였다. 이러한 실험은 상기 QuARTs-X (정량적인 대립유전자 특이적인 실시간 표적 및 신호 검정)을 이용하였다 (예를 들어, 미국 특허출원 일련번호 제15/335,096호 참조). 표 5는 전립선 조직 내의 PCa 글리슨 7+ 대 글리슨 6의 100% 마커 감도 및 배수-변화를 나타낸다 (상기 올리고 서열은 표 6에 제공됨).

[0285]

표 5

DMR 번호	마커	전립선 조직 샘플에서 글리슨 7 초과 대 글리슨 6 의 감도	전립선 조직 샘플에서 글리슨 7 초과 대 글리슨 6 의 배수-변화
17	MAX.chr3.193	90%	1.26
12	HES5_0822	84%	1.5
45	SLC03A1	70%	2
47	TPM4_8047	68%	1.42
83	MAX.chr12.48592041- 48592162	86%	1.26
39	GAS6	86%	1.02
18	MAX.chr3.72788028- 72788112	78%	1.37
3	AKR1B1_3644	66%	1.18
87	SIM2	34%	1.7
11	HCG4P6	86%	0.99
70	CHST11_2206	88%	1.7
8	GRASP	82%	1.59
44	SERPINB9_3389	74%	1.49
85	PDE4D	62%	1.08
14	ITPRIPL1	76%	2.16
16	MAX.chr2.97193166- 97193253	82%	1.34
37	FLOT1_1904	86%	1.44

[0286]

[0287]

표 6

마커	올리고 유형	올리고 명칭	서열
SERPINB9	프라이머	SERPINB9_FP	TTTATTTAGTCGTGCGCG (서열번호 147)
	프라이머	SERPINB9_RP	ACCGCACACGAAAACGAC (서열번호 148)
	프로브	SERPINB9_Pb_A5	CCACGGACG CGACAAACGCTAA/3C6/ (서열번호 149)
FLOT1	프라이머	FLOT1_FP	GTTAGTGTGAGTTAAGTTGTTCTG (서열번호 150)
	프라이머	FLOT1_RP	AACACCAAACGTACCTAATACG (서열번호 151)
	프로브	FLOT1_Pb_A1	CGCCGAGG GCGAAAACGTAT/3C6/ (서열번호 152)
HCG4P6	프라이머	HCG4P6_FP	CGGAGTATACGGAATATTAGGTTCTG (서열번호 153)
	프라이머	HCG4P6_RP	AATAATAACGACGCGACATAAACAA (서열번호 154)
	프로브	HCG4P6_Pb_A5	CCACGGACG GCGTATAGATTG/3C6/ (서열번호 155)
CHST11_2206	프라이머	CHST11_2206_FP	GCGTCGAGGGCGTTTT (서열번호 156)
	프라이머	CHST11_2206_RP	AATCTAAACTAAAAAAACGAAACTCGT (서열번호 157)
	프로브	CHST11_2206_Pb_A1	CGCCGAGG TCGCTTCCTAAA/3C6/ (서열번호 158)
MAX.chr12.485	프라이머	MAX.chr12.485_FP	GAGGAAATAGGCGTGGTTCTG (서열번호 159)
	프라이머	MAX.chr12.485_RP	AAAACCGAAAAAAACTAATTCTGTCA (서열번호 160)
	프로브	MAX.chr12.485_Pb_A5	CCACGGACG GCGTTGACGGTT/3C6/ (서열번호 161)
GRASP	프라이머	GRASP_FP	CGCGCGGTATAGTTCTGG (서열번호 162)
	프라이머	GRASP_RP	ACCCCCAACGAAACGAAC (서열번호 163)
	프로브	GRASP_Pb_A1	CGCCGAGG CTATACGCGACG/3C6/ (서열번호 164)
GAS6	프라이머	GAS6_FP	GATTTGAGGTTAGGTTCTG (서열번호 165)

[0288]

	프라이머	GAS6_RP	GAAAAACAACGCTACTACCGC (서열번호 166)
		GAS6_Pb_A5	CCACGGACG GCGCGGAGTTGG/3C6/ (서열번호 167)
HAPLN3	프라이머	HAPLN3_FP	GTTCGTATATAGTTAGAAGTTAGCGA (서열번호 168)
	프라이머	HAPLN3_RP	CGTCGAAAACCTACCTAAAACGAT (서열번호 169)
	프로브	HAPLN3_Pb_A1	CGCCGAGG TAGTAACTTAA/3C6/ (서열번호 170)
SLC03A1	프라이머	SLC03A1_FP	CGATTTGTAGCGTTGGATATCG (서열번호 171)
	프라이머	SLC03A1_RP	TCGAAAACCCCACGAACC (서열번호 172)
	프로브	SLC03A1_Pb_A5	CCACGGACG CGTTAATACCCC/3C6/ (서열번호 173)
MAX.chr3.193	프라이머	MAX.chr3.193_FP	TTAAAGGTTAGTTAAAGATGGAATCGT (서열번호 174)
	프라이머	MAX.chr3.193_RP	CTCGCGACGAAAAAAACCC (서열번호 175)
	프로브	MAX.chr3.193_Pb_A1	CGCCGAGG CGAACTCCCAAC/3C6/ (서열번호 176)
MAX.chr3.727	프라이머	MAX.chr3.727_FP	GTGGTTTATTCGTTCGTTTCG (서열번호 177)
	프라이머	MAX.chr3.727_RP	AAACTAACGAATATAACTCCGTCGA (서열번호 178)
	프로브	MAX.chr3.727_Pb_A1	CGCCGAGG GCGACGTTGAG/3C6/ (서열번호 179)
HES5	프라이머	HES5_FP	GCGAGAGGAGTAGGTTCG (서열번호 180)
	프라이머	HES5_RP	AACCTACGAACGCGCGA (서열번호 181)
	프로브	HES5_Pb_A5	CCACGGACG ACCCGACGACCA/3C6/ (서열번호 182)
PDE4D	프라이머	PDE4D_FP	GCGTACGGTCGCGTATT (서열번호 183)
	프라이머	PDE4D_RP	CAATAACTCGACGAAACGCG (서열번호 184)
	프로브	PDE4D_Pb_A1	CGCCGAGG GCGAAATTCTAA/3C6/ (서열번호 185)
SIM2	프라이머	SIM2_FP	GTTCAGCGCGGTTTCG (서열번호

[0289]

			186)
	프라이머	SIM2_RP	CCCGAACTTCCCGAACT (서열번호 187)
	프로브	SIM2_Pb_A5	CCACGGACG GCGGTAGTGGTC/3C6/ (서열번호 188)
TPM4	프라이머	TPM4_FP	GGAGAAAGGCGGGCG GA (서열번호 189)
	프라이머	TPM4_RP	CGTTCCCAAAACCGCA (서열번호 190)
	프로브	TPM4_Pb_A1	CGCCGAGG ACGACGACGTAT/3C6/ (서열번호 191)
LRRC4_HCC	프라이머	LRRC4_HCC_FP	CGTCGTTCGTCTGG (서열번호 192)
	프라이머	LRRC4_HCC_RP	CCCCGGCCCCCTAAAC (서열번호 193)
	프로브	LRRC4_HCC_Pb_A5	CCACGGACG CGAACGAAACGA/3C6/ (서열번호 194)
ITPRIPL1	프라이머	ITPRIPL1_FP	GTTAGTGGCGGTTAGGTG (서열번호 195)
	프라이머	ITPRIPL1_RP	TCACCGTCAATATTAAATAAAAAACACGA (서열번호 196)
	프로브	ITPRIPL1_Pb_A1	CGCCGAGG GCGTTGTTTT/3C6/ (서열번호 197)
MAX.chr chr2.97193166- 97193253	프라이머	MAX.chr2. chr2.97193166- 97193253_FP	GCGAGGTTGCGGTTTG (서열번호 198)
	프라이머	MAX.chr2. chr2.97193166- 97193253_RP	CGAAAAAAATAATTGATTAACCAAAACGC (서열번호 199)
	프로브	MAX.chr2. chr2.97193166- 97193253_Pb_A5	CCACGGACG CCGATATTCCC/3C6/ (서열번호 200)
AKR1B1_3644	프라이머	AKR1B1_FP	GTTCGTTTATATTTCGCGCG (서열번호 201)
	프라이머	AKR1B1_RP	CCGAACGTCCGCGAAC (서열번호 202)
	프로브	AKR1B1_Pb_A1	CGCCGAGG CGAACTACTCAA/3C6/ (서열번호 203)
FLJ45983	프라이머	FLJ45983_FP	GGGCGCGAGTATAGTCG (서열번호 204)
	프라이머	FLJ45983_RP	CAACCGCGACTAACCGC (서열번호 205)
	프로브	FLJ45983_Pb_A1	CGCCGAGG CCGTCACCTCCA/3C6/ (서열번호 206)

[0290]

[0291] 실시예 V.

[0292] 각 마커에 대한 부위 특이적 메틸화의 정도를 측정하기 위해 후보 마커 서열을 전-암(pan-cancer) RRBS 서열분석 데이터 세트에서 인-실리코로 비교하는 실험을 수행하였다.

[0293] DNA 메틸화 시그니처는 인간 신체 내의 종양 부위를 정확히 예측하는 것으로 나타났다. 장기 부위-관련된 특이성을 보다 잘 정의하기 위해, 상기 다수의 암 및 장기 조직에 대한 상기 73종 DMR/마커 각각의 RRBS 유도된 메틸화 값의 인-실리코 CpG x 샘플 매트릭스를 제작하였다. 이들은 전립선, 간, 결장, 췌장, 폐, 식도, 위 및 담관 조직을 포함하였다. 상기 DMR 전반에서 인접 메틸화 정도(패턴 인식에 의해 정의됨) 뿐만 아니라 장기 부위 간 양적 메틸화 차이에 의해 위치 특이성을 모델화할 수 있다. 표 7에 도시된 바와 같이, 8종의 마커는 오직 전립선 암 특이성이고, 다른 극단에서는 11종의 마커가 모든 암 및 조직에 범용임을 보여주었다. 전립선/간, 전립선/결장/간 등과 같은 동일한 또는 상이한 정도에서의 특이성 클러스터가 그 사이에 있었다. 전립선 마커의 서브세트는 상기 다른 암의 정렬된 판독 내의 소실된 DMR 서열로 인해 정의되지 않은 채로 남아 있다.

[0294]

표 7

DMR 번호	마커	글리슨 7 초파의 전립선 조직 대 양성 전립선 조직의 AUC	글리슨 7 초파의 전립선 조직 대 양성 전립선 조직의 FC	글리슨 6 이상의 전립선 조직 대 버피의 FC	메틸화% (7+)	조직 특이적
62	ABCB1	0.91493	16	3496	15	전립선/폐
29	ABLIM1	0.88976	39	51	5	데이터 없음
63	ACOXL	0.9592	18	59094554	37	전립선/폐/ 췌장
1	ADCY9	0.86372	19	38	4	데이터 없음
92	ADD3	0.92361	2290	3075	20	전립선 특이적
48	AGPS_7349	0.69705	12	554	3	데이터 없음
49	AGPS_7497	0.6849	7	7534	2	데이터 없음
50	AGPS_7696	0.75174	58	52722	13	데이터 없음
2	AKR1B1_3298	0.92622	32	604	37	전립선/결장 /HCC
3	AKR1B1_3644	0.96732	128	6850	37	전립선/결장 /HCC
4	ANKRD35	0.94618	5	4184	48	범용
64	ANXA2	0.96962	34	36464	66	전립선/HCC
66	ARPC1B_1906	0.84028	5	45311	16	전립선 특이적
67	ARPC1B_1967	0.86024	8	5800	23	전립선 특이적
93	AXIN1	0.63411	1	16677	143	범용
96	BIN2_7908	0.58854	1	10778	90	범용
70	CHST11_2206	0.97861	145	41729	27	전립선 특이적
98	CTBP1	0.46007	1	1188	114	범용
32	EIF5A2	0.92014	32	7138	16	데이터 없음
104	FAM78A_8684	0.57813	1	8026	55	범용
34	FBXO30	0.82899	13	1726	19	데이터 없음
7	FLJ45983	0.99049	35	1480	54	전립선/가벼 운 범용
35	FLOT1_1586	0.94355	11	15687	64	전립선 특이적
37	FLOT1_1904	0.92929	65	322	38	전립선 특이적
105	FNBP1	0.61198	1	78760	97	범용
38	FOSL1	0.89583	69	481	5	데이터 없음
53	GALR3	0.78559	31	34071	15	데이터 없음

[0295]

39	GAS6	0.98099	75	62587	47	전립선 특이적
107	GNG7_2119	0.75955	1	19012	100	범용
8	GRASP	0.96732	78	37	30	전립선/결장 /HCC/폐
40	GSDMD	0.93576	28	14825	20	데이터 없음
9	GSTP1	0.94792	21	361117	77	전립선/HCC
10	HAPLN3	0.95781	60	969498	38	전립선 특이적
11	HCG4P6	0.9836	30	73301	58	전립선/가벼 운 범용
54	HDAC7_6722	0.81858	149	11130	12	데이터 없음
74	HEBP2	0.93403	14	10185	21	전립선 특이적
12	HES5_0822	0.95247	26	8884	29	전립선 특이적
13	HES5_1047	0.94097	13	12636	28	전립선 특이적
14	ITPR1PL1	0.96078	45	12163	19	전립선/결장 /HCC/폐
41	KCNK4	0.9798	34	682	29	데이터 없음
76	KLF16	0.53993	1	1155	21	전립선/HCC
77	LAMA3	0.87413	79	106	18	전립선 특이적
42	LOC100129726 _1716	0.87153	11	2594	16	데이터 없음
79	LOC339674	0.90885	14	447	29	전립선/HCC/ 폐 (스몰 셀만)
80	LOC440925	0.82726	3	2215	48	전립선/폐
15	LRRC4	0.94593	61	19639	48	전립선/결장 /폐/췌장
110	LYL1	0.56597	1	23253	59	데이터 없음
81	MAX.chr1.615 19554- 61519667	0.95486	5	5254	58	전립선/폐
56	MAX.chr1.801 4263-8014319	0.80729	25	1770	10	전립선/폐
43	MAX.chr10.74 079656- 74079694	0.86372	50	278757	14	데이터 없음
83	MAX.chr12.48 592041- 48592162	0.9321	26	364	63	전립선 특이적

111	MAX.chr15.95 128172- 95128228	0.58681	1	1363	104	범용
112	MAX.chr16.11 327022- 11327151	0.81684	3	31278	324	범용
84	MAX.chr17.77 786640- 77786733	0.78125	16	67	7	전립선/폐 (스몰 셀만)
16	MAX.chr2.971 93166- 97193253	0.98099	17	967	47	전립선/결장 /HCC/폐
17	MAX.chr3.193	0.97683	43	1605	66	전립선 특이적
18	MAX.chr3.727 88028- 72788112	0.9798	87	633	52	전립선/HCC
58	NCRNA00092_4 149	0.84722	11	1101	21	데이터 없음
85	PDE4D	0.8776	4	835	59	전립선 특이적
20	RAI1_7469	0.97656	28	320	56	범용
21	RASSF2	0.97861	24	1528628	44	전립선/결장 /HCC
120	S1PR4_9843	0.52778	1	722	86	범용
23	Septin9_0492	0.93142	21	3348	33	데이터 없음
44	SERPINB9_338 9	0.96019	164	3993	50	전립선 특이적
87	SIM2	0.81343	3	323	51	전립선 특이적
25	SLC4A11	0.95399	20	768	16	전립선/결장 /HCC
45	SLC03A1	0.62448	4	6712	71	데이터 없음
27	SSBP4	0.9401	34	1043	25	전립선/결장 /HCC
88	STX16	0.87153	4	279	34	전립선/결장
47	TPM4_8047	0.95722	23	2578	31	전립선 특이적
89	WNT3A	0.84462	5	2144	28	전립선/HCC
59	ZNF655_6084	0.94271	34 (분모에서 0)		11	데이터 없음
60	ZNF655_6545	0.80339	5	57988	14	데이터 없음

[0297]

## 실시예 VI

[0298]

맹검 독립 혈장 샘플에서 테스트하기 위한 고성능 PCa 마커 세트를 선택하여 임상 매질에서 PCa 검출을 평가하는 실험을 수행하였다.

[0300]

다른 암 혈장 분석과 함께 종종 사용되는 테스트 플랫폼인 다중 QuARTs-X (정량적 대립유전자 특이적 실시간 표적 및 신호 검정)를 개발하기 위해 복합 생물학적 매질 (예: 혈장) 내의 분석물 검출에 적합한 성능 메트릭스 (performance metrics)의 최상의 조합을 나타내는 25종의 DMR/마커 (표 8 참조)를 선택하였다. 상기 DMR 서열 독특성에 대한 초기 인-실리코 테스트, 필터 디자인, 및 폴(pool)의 혈장 대조군에 대한 QC 테스트 후에, 상기 Mayo 전립선 암 바이오뱅크로부터 후향적 수집된 냉동 혈장 샘플 테스트에 대하여 17개 디자인이 순방향으로 수행되었다. 9개의 삼중(triplex) 및 1개의 이중(duplex) 반응이 개발되었으며, 이들 각각은 메틸화에 의해 영향을 받지 않는 대조  $\beta$ -액틴 검정을 함유하였다. 2개의 부가적인 프로세스 대조군도 또한 테스트하였다. 상기 QuARTs-X 검정은 표 8에 열거되어 있다 (상기 프라이머 및 프로브 정보에 대해서는 표 6 참조). 최종 마커 가닥 (카피)를  $\beta$ -액틴 대조군으로 정규화하고, 메틸화%로 표기하였다. 상위 4개 마커는 max.chr3.193, HES5, SLC03A1, 및 TPM4\_8047이었다. rPart 모델화를 함께 사용할 때, 혈장 샘플에서 PCa를 검출하기 위한 민감도 및

특이도는 각각 78% 및 91%이었다.

[0301] 표 8

DMR 번호	마커	AUC	p-값
17	MAX.chr3.193	0.84539	0.1658
12	HES5_0822	0.76068	>0.0001
45	SLCO3A1	0.67209	0.7921
47	TPM4_8047	0.63612	0.227
	MAX.chr12.48592041-		
83	48592162	0.56359	0.037
39	GAS6	0.56073	0.0451
	MAX.chr3.72788028-		
18	72788112	0.53893	0.2411
3	AKR1B1_3644	0.52	0.0165
87	SIM2	0.5101	0.3577
11	HCG4P6	0.5067	0.2852
70	CHST11_2206	0.50524	0.1351
8	GRASP	0.50282	0.2477
44	SERPINB9_3389	0.49417	0.1046
85	PDE4D	0.48252	0.9368
14	ITPRIPL1	0.47	0.7214
	MAX.chr2.97193166-		
16	97193253	0.45301	0.7152
37	FLOT1_1904	0.42456	0.7204

[0302]

[0303] 실시예 VII

[0304]

전립선 암에 대한 치료 결정은 글리슨 등급에 의해 종종 가이드되는데, 상기 글리슨 등급은 주관적이고 정확성이 결여되어 있다. 발견 및 초기 검증시에, 메틸화된 DNA 마커(MDM)를 예후 관련하여 동정하였다 (실시예 1 참고). 급진적 전립선 절제술 (RP) 이후에 12년 넘게 추적 관찰한 독립 그룹으로부터의 기록된 조직을 사용하여 생화학적 재발을 예측하는데 있어서 신규한 MDM의 가치를 평가하기 위해 추가 실험을 수행하였다.

[0305]

2004년에 급진적 전립선 절제술(RP)을 시행한 737명 남성으로부터 446명을 무작위 선정하였고, 155명이 품질 기준에 부합하였다. 포르말린 고정된 파라핀 포매(FFPE)의 조직 블록을 이용하였다. 전문 병리학자는 거대-절개술을 위한 업데이트된 글리슨 기준 및 마킹된 종양을 사용하여 맹검 방식으로 모든 표본을 재검토하였다. 게놈 DNA는 QiaAmp FFPE 조직 키트(Qiagen)를 사용하여 정제하고 Picogreen 형광에 의해 정량화하였다. FFPE DNA가 고도로 분해될 수 있기 때문에, 100bp  $\beta$ -액틴 증폭 검정을 사용하여, 증폭가능한 게놈 등가물에 대하여 샘플을 또한 테스트하였다. 이 후, DNA를 소듐 바이설파이트로 처리하고 정제하였다 (Zymo Research).

[0306]

상기 샘플을 테스트하기 위해 23종의 MDM을 선택하였다. 73종의 MDM을 사용한 독립적인 조직 검증 결과에 대하여 반복분할분석(rPART)을 수행함으로써 상기 23종의 MDM에 도달하였다. 상기 연구(실시예 1)에 이용된 모든 환자는 그의 임상 기록에서 결과 데이터를 가지고 있었다. 구체적으로, 상기 실험은 1000 개의 부트 스트랩 샘플 rPART (인-실리코)를 수행하고, 상기 모델화 트리에서 가장 빈번하게 나타나는 MDM을 찾았다. 이 후, 이들을 빈도에 의해 순위매기고(높은 값에서 낮은 값으로), 상위 MDM을 선택하였다(표 10 참고). MSP 검정은 보편적인 메틸화 표준물 및 적절한 음성 및 양성 대조군의 회석에 대해 이전과 같이 맹검 수행하였다. 미가공 계수(raw count)는 상기 샘플 각각에 대한 전체  $\beta$ -액틴 계수로 정규화하였다. 재발은 PSA > 0.4 ng/mL로 정의하였다. 반복분할 트리 모델에 의해 상위 MDM을 선택하여, 재발 위험도를 할당하고 4가지 (M1 (최저) ~ M4 (최고))로 그룹화하였다. MDMs와 글리슨 등급 그룹 (GGG)의 예후 값은 사후 RP 결과와의 일치 여부를 기준으로 평가 및 비교하였다. 하기 마커는 재발률 WNT3A, LOC100129726, FNBP1, GSDMD, ITPRIPL1, Chr1.61519554 및 Chr17.77786040을

예측하기에 최적인 것으로 동정되었다.

표 10

유전자	모델 번호	
WNT3A	582	
LOC100129726	496	
FAM78A	476	
KCNK4	438	
KLF16_RS_FP	415	
CHST11_2206	413	
ARPC1B1906	387	
MAX.chr1.61519554	383	
ABCB1	377	
AGPS_7696	375	
LOC339674	368	
SLC03A1	368	
LAMA3	367	
MAX.chr17.77786640	366	
AGPS_7497	352	
MAX.chr3.727	351	
GSDMD	339	
GRASP	332	Top 25%
LOC440925	326	
SERPINB9_3389	319	
EIF5A2	318	
MAX.chr10.74079656	315	
MAX.chr15.95128172	311	
SLC4A11	311	
ADD3	309	
ABLIM1	307	
ACOXL	306	
ARPC1B_1967	294	
ANXA2	293	
FLCT1_1586	292	
AKR1B1	287	
HEBP2	287	
S1PR4_9843	287	
FOSL1	285	
MAX.chr3.193776187	282	

[0308]

HCG4P6	277	
ANKRD35	275	Top 50%
GAS6	270	
LYL1	267	
AGPS_7349	265	
PDE4D	264	
MAX.chr2.97193166	249	
RAI1_7469	237	
FBXO30	232	
STX16	232	
ZNF655_6084	231	
HAPLN3	228	
MAX.chr1.8014263	228	
FLOT1_1904	225	
TPM4_8047	219	
HDAC7_6722	218	
SIM2	216	
SSBP4	215	
RASSF2	214	
MAX.chr16.11327022	210	
GALR3	209	
AKR1B1_3644	208	
ITPRIPL1	204	
Septin9	200	
ADCY9	196	
AXIN1	188	
LRRC4	185	
GNG7_2119	182	
CTBP1	175	
ZNF655_6545	170	
FLJ45983	166	
HES5_1047	162	
NCRNA00092	156	
GSTP1	150	
HES5_0822	148	
FNBP1	132	
BIN2_7908	128	

[0309]

실시예 VIII.

[0310]

전립선 조직 내 PCa 글리슨 스코어 7 초과 대 글리슨 스코어 6; 및 2) PCa 글리슨 스코어 6 초과 대 비-암성 전립선 조직을 구별할 수 있는 마커를 동정하기 위해 부가적인 실험을 수행하였다. 이러한 실험은 상기 QuARTs-X (정량적인 대립유전자 특이적인 실시간 표적 및 신호 검정)을 이용하였다 (예를 들어, 미국 특허출원 일련번호 제15/335,096호 참조).

[0311]

DNA 추출

[0312]

공지의 임상 정보를 갖는 냉동 DNA 조직 샘플을 the Mayo Clinic 저장소에서 수득하였다. DNA는 제조업체 프로토콜에 따라 Qiagen의 DNeasy Blood & Tissue 키트를 이용하여 조직으로부터 추출하였다. 약 100 ng의 추출된 DNA를 바이설파이트 전환 반응으로 순방향 이동시켰다.

[0313]

DNA의 바이설파이트 전환 및 정제

[0315]

시약 준비:

구성성분 약어	명칭	배합
BIS SLN	바이설파이트 전환 용액	56.6% 암모늄 바이설파이트
DES SLN	탈설폰화 용액	70% 이소프로필 알코올, 0.1 N NaOH
BND BDS	결합 비드	Maxwell RNA 비드 (16 mg/mL), Promega
BND SLN	결합 용액	7 M 구아니딘 HCl
CNV WSH	전환 세척액	10 mM Tris-HCl, 80% 에탄올, 0.01% 소듐아지드
ELU BUF	용리 완충액	10mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0

[0316]

[0317]

블로킹 용액:

샘플 번호 (N)	NaOH (1.6 N) (uL)	BSA (350 ng/uL) (uL)
1	5	5
N		

[0318]

[0319] 바이설파이트 전환 및 DNA 정제를 위해 하기 절차를 수행하였다:

[0320] 1. 딥 웰 플레이트(deep well plate: DWP)의 각 웰에 10  $\mu$ L의 블로킹 용액을 첨가한다.[0321] 2. 80  $\mu$ L의 각 샘플을 상기 DWP에 첨가한다.[0322] 3. 30~40  $\mu$ L로 설정된 피펫으로 피펫팅하여 조심스럽게 혼합하여, 거품을 피한다.

[0323] 4. 밀봉하고 상기 DWP를 3000xg로 1 분간 원심 분리한다.

[0324] 5. 42°C로 20분 동안 인큐베이션한다.

[0325] 6. 120  $\mu$ L의 BIS SLN을 각 웰에 추가한다.

[0326] 7. 8분 냉각한다.

[0327] 8. 처음 3 분 동안 혼합하면서 65 °C에서 75분 동안 인큐베이션한다.

[0328] 9. 750  $\mu$ L의 BND SLN을 첨가한다.[0329] 10. 실리카 비드(BND BDS)를 예비-혼합하고, 50  $\mu$ L의 실리카 비드(BND BDS)를 상기 DWP 웰에 첨가한다.

[0330] 11. 히터 셰이커(heat shaker) 상에서 30 분동안 1,200 rpm으로 30 °C에서 혼합하다.

[0331] 12. 플레이트 자석 상에 5 분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.

[0332] 13. 1 mL의 세척 완충액(CNV WSH)을 추가한 다음, 상기 플레이트를 히터 셜커로 옮기고 1,200 rpm으로 3 분동안 혼합하다.

[0333] 14. 플레이트 자석 상에 5 분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.

[0334] 15. 0.25 mL의 세척 완충액(CNV WSH)을 추가한 다음, 상기 플레이트를 상기 히터 셜커로 옮기고 1,200 rpm으로 3 분동안 혼합하다.

[0335] 16. 상기 자석 상에 2 분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.

[0336] 17. 0.2 mL의 탈설폰화 완충액(DES SLN)을 추가하고, 1,200 rpm으로 7분 동안 30 °C에서 혼합한다.

[0337] 18. 상기 자석 상에 2분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.

[0338] 19. 0.25 mL의 세척 완충액 (CNV WSH)을 추가한 다음, 상기 플레이트를 상기 히터 셜커로 옮기고 1,200 rpm으로 3 분 동안 혼합하다.

- [0339] 20. 상기 자석 상에 2분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.
- [0340] 21. 0.25 mL의 세척 완충액 (CNV WSH)을 추가한 다음, 상기 플레이트를 상기 히터 셰이커로 옮기고 1,200 rpm으로 3 분동안 혼합하다.
- [0341] 22. 상기 자석 상에 2분 동안 비드 결합한 다음, 용액을 흡인하여 폐기한다.
- [0342] 23. 히터 셰이커로 옮기고 1,200 rpm으로 혼합하면서 70 °C에서 15분 동안 인큐베이션하여 플레이트가 건조되도록 한다.
- [0343] 24. 80 μL의 용리 완충액 (ELU BFR)을 DWP 내의 모든 시료에 첨가한다.
- [0344] 25. 1,200 rpm으로 혼합하면서 65 °C로 25 분동안 인큐베이션하였다.
- [0345] 26. 용리액을 96 웰 플레이트에 수동으로 옮기고, 호일 셀(foil seal)로 플레이트를 밀봉한 다음, -80 °C로 보관한다
- [0346] 27. 회수 가능한/이동 가능한 부피는 약 65 μL이다.
- [0347] 메틸화된 DNA 검출 및 정량화를 위한 QuARTS-X
- [0348] 다중 PCR (mPCR) 설정:
- [0349] 1-관심대상인 각각의 메틸화 마커를 위한 순방향 및 역방향 프라이머를 함유하는 10X 프라이머 혼합물을 각각 750 nM의 최종 농도로 준비한다. 희석액으로서 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA를 사용한다.
- [0350] 2- 100 mM MOPS, pH 7.5, 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.08% Tween 20, 0.08% IGEPAL CA-630, 2.5 mM dNTPs를 함유한 10X mPCR 완충액을 준비하다.
- [0351] 3- mPCR 마스터 믹스를 하기와 같이 준비한다:
- [0352] 구성성분

구성성분	반응 당 부피 (μL)
물	9.62
10X 프라이머 믹스 (각각 0.75 μM)	7.5
mPCR 완충액	7.5
GoTaq (5 units/μL)	0.38
전체 부피	25.0

- [0353]
- [0354] 4- DNA를 해동하고 플레이트를 스핀 다운한다.
- [0355] 5- 25 μL의 마스터 믹스를 96 웰 ABI Veriti 플레이트에 첨가한다.
- [0356] 6- 50 μL의 각 샘플을 각 웰로 옮기고, 각 샘플을 위아래로 여러 번 피펫팅하여 각 샘플을 혼합하다.
- [0357] 7- 알루미늄 호일 셀로 플레이트를 밀봉한다.
- [0358] 8- 가열된-리드 열 사이클러 내에 넣고, 하기 프로파일 "QX 12사이클"을 사용하여 사이클을 진행한다:

단계	온도 / 시간	사이클 횟수
예비-인큐베이션	95°C / 5 분	1
증폭 1	95°C / 30 초	12
	64°C / 60 초	
냉각	4°C / 유지	1

- [0359]
- [0360] 9- 인큐베이션을 완료한 후, 하기와 같이 앰플리콘의 1 내지 10 회석을 실시하였다:
- [0361] a. 딥 웰 플레이트를 수득하고, 각각의 웰에 180 μL의 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA를 옮겼다.
- [0362] b. 상기 증폭된 플레이트의 호일 셀에 96-웰 스템프로 조심스럽게 구멍을 뚫었다.
- [0363] c. 새로운 텁(tip) 및 50 μL로 설정된 200 μL 피펫터를 사용한 피펫팅 반복에 의해 75 μL의 증폭된 샘플을

혼합한다(에어로졸을 발생시키지 않음)(혼합을 위해 세이커를 사용하지 않음).

[0364] d. 신선한 텁 및 20  $\mu\text{L}$ 로 설정된 20  $\mu\text{L}$  피펫터를 사용하는 각각의 예비-충진된 웰에 20  $\mu\text{L}$ 의 증폭된 샘플을 추가한다 (에어로졸을 발생시키지 않음).

[0365] e. 신선한 텁 및 100  $\mu\text{L}$ 로 설정된 200  $\mu\text{L}$  피펫터를 사용하는 반복된 피펫팅에 의해 상기 희석된 샘플을 혼합한다 (혼합을 위해 세이커를 사용하지 않음).

[0366] f. 플라스틱 씰(plastic seal)로 상기 희석된 플레이트를 밀봉한다.

[0367] g. 상기 희석된 플레이트를 1,000 rpm으로 1 분간 원심 분리한다.

[0368] h. 밀봉용 새 알루미늄 호일로, 희석되지 않은 남은 모든 mPCR 생성물을 밀봉한다. -80  $^{\circ}\text{C}$ 에 둔다.

[0369] 매뉴얼 QuARTS 검정 설정:

[0370] 1-피쉬 DNA 희석액(20 ng/  $\mu\text{L}$ )을 해동하고, 상기 검정에 필요한 플라스미드 캘리브레이터를 희석하기 위해 사용한다. 하기 표를 희석 가이드로 사용한다:

초기 플라스미드 농도, $\mu\text{L}$ 당 카피	최종 플라스미드 농도, $\mu\text{L}$ 당 카피	추가할 플라스미드의 $\mu\text{L}$	추가할 희석액의 $\mu\text{L}$	전체 부피, $\mu\text{L}$
1.00E+05	1.00E+04	5	45	50
1.00E+04	1.00E+03	5	45	50
1.00E+03	1.00E+02	5	45	50
1.00E+02	1.00E+01	5	45	50

[0371]

[0372] 2- 마커 A, B 및 C에 대해 하기 표를 사용하여 10X 삼중 QuARTS 올리고 막스를 준비하다:

올리고	서열 (5'-3')	농도 ( $\mu\text{M}$ )
마커 A 순방향 프라이머	NA	2
마커 A 역방향 프라이머	NA	2
마커 A 프로브- Arm 1	NA	5
마커 B 순방향 프라이머	NA	2
마커 B 역방향 프라이머	NA	2
마커 B 프로브- Arm 5	NA	5
마커 C 순방향 프라이머	NA	2
마커 C 역방향 프라이머	NA	2
마커 C 프로브- Arm 3	NA	5
A1 HEX FRET	/HEX/ TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTCCGGCTGAGACCTCGCGC/3C6/ (서열번호 235)	5
A5 FAM FRET	/FAM/ TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTCCGGCTGAGACGTCCGTGG/3C6/ (서열번호 236)	5
A3 QUASAR-670 FRET	/Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTC/3C6/ (서열번호 237)	5
dNTP 막스		2500

[0373]

[0374] 3-하기 표를 이용하여 QuARTS 마스터 믹스를 준비한다:

구성성분	반응 당 부피 ( $\mu\text{L}$ )
물	15.5
10X 삼중 올리고 믹스	3.0
20X QuARTS 효소 믹스	1.5
전체 부피	20.0

\*20X 효소 믹스는 1 유닛/ $\mu\text{L}$  GoTaq 핫 개시(Hot Start) 폴리미라제 (Promega), 146 ng/ $\mu\text{L}$  클레바제(Cleavase) 2.0 (Hologic)을 함유한다.

- [0375] 4- 96 웰 ABI 플레이트를 사용하여, 각 웰에 20  $\mu\text{L}$ 의 QuARTS 마스터 믹스를 피펫으로 채운다.
- [0376] 5- 10  $\mu\text{L}$ 의 적절한 캘리브레이터 또는 희석된 mPCR 샘플을 첨가한다.
- [0377] 6- ABI 투명 플라스틱 셀로 플레이트를 밀봉한다.
- [0378] 7- 3000rpm을 이용하여 1 분간 상기 플레이트를 원심 분리한다.
- [0379] 8- 하기 열 프로토콜 "Quarts 5+40"을 수행하도록 프로그래밍된 ABI 열 순환 사이클러에 플레이트를 놓고, 상기 장비를 가동한다.

QuARTS 반응 사이클:				회복
단계	온도/시간	경사율 (ramp rate) (초당 $^{\circ}\text{C}$ )	사이클 횟수	
예비-인큐베이션	95 $^{\circ}\text{C}$ / 3 분	4.4	1	없음
증폭 1	95 $^{\circ}\text{C}$ / 20 초	4.4		없음
	63 $^{\circ}\text{C}$ / 30 초	2.2		없음
	70 $^{\circ}\text{C}$ / 30 초	4.4		없음
증폭 2	95 $^{\circ}\text{C}$ / 20 초	4.4	40	없음
	53 $^{\circ}\text{C}$ / 1 분	2.2		있음
	70 $^{\circ}\text{C}$ / 30 초	4.4		없음
냉각	40 $^{\circ}\text{C}$ / 30 초	2.2	1	없음

- [0380] [0381] A. 자동화된 QuARTS 설정:
- [0382] 1- 시험관의 피쉬 DNA 희석액 (20 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2시험관의 1.62X 올리고 믹스를 해동하고, 준비된 캘리브레이터 시리즈를 Hamilton STARlet 데크 상에 놓을 필요가 있다.
- [0383] 2- 상기 Hamilton STARlet 데크 상에 로딩하기 이전에 모든 시약을 볼텍스하고 원심분리하다.
- [0384] 3- 샘플을 함유한 딥 웰 플레이트를 상기 자기 상에 로딩한다.
- [0385] 4- 50  $\mu\text{L}$  CORE 팀의 전체 트레이를 하기 다이아그램에 나타난 바와 같이 데크 상에 놓는다.
- [0386] 5- 적어도 하나의 전체 열의 1000  $\mu\text{L}$  CORE 팀을 하기 다이아그램에 나타낸 바와 같이 상기 데크 상에 놓는다.
- [0387] 6- 빈 ABI 96-웰 플레이트를 상기 STARlet 데크에 로딩하되, 하기 다이아그램에 나타난 바와 같이 바코드가 기계 앞을 향하도록 로딩한다(A1 웰이 뒤쪽 좌측 코너에 있음).
- [0388] 7- 화면상의 데크 레이아웃 및 소프트웨어 지시에 따라, 지시된 캐리어 위치에 시약을 로딩한다 (하기 제2 다이아그램 참조).
- [0389] 8- 하기 다이아그램에 나타난 바와 같이 상기 데크 상에 뚜껑을 벗긴 바코드가 있는 빈 시험관을 로딩한다.
- [0390] 9- 상기 Hamilton 상에 "QuARTSONLYV4.0\_BA\_20160127" 방법을 실행한다.
- [0391] 10- 일단 상기 방법이 완료되면, 상기 96-웰 QuARTS 플레이트를 꺼내고, 투명 플라스틱 덮개로 밀봉한다.
- [0392] 11- 3000rpm을 이용하여 1 분간 상기 플레이트를 원심 분리한다.
- [0393] 12- 하기 열 프로토콜을 실행하도록 프로그래밍된 ABI 열 사이클러 내에 플레이트를 놓고, 이어서 하기 장비를 가동한다: "Quarts 5 + 40".

[0395]

결과

[0396]

이 실험은 하기를 결정하였다.

[0397]

1) 특이적 메틸화 DNA 마커 (SERPINB9\_3479, GRASP\_0932, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487)는 공격성이 높은 암성 전립선 조직(예: 글리슨 스코어 7.0 이상(예: 7, 8, 9, 10)을 공격성이 낮은 암성 전립선 조직(예: 글리슨 스코어 7 미만(예: 6)으로부터 식별하고,

[0398]

2) 특이적 메틸화 DNA 마커 (SERPINB9\_3479, FLOT1\_1665, HCG4P6\_4618, CHST11\_2206, MAX.chr12.485, GRASP\_0932, GAS6\_6425, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971\_3164, MAX.chr3.727\_8028, HES5\_0840, TPM4\_8037, SLC03A1\_6187, ITPRIPL1\_1244, AKR1B1\_3644, RASGRF2\_6325, ZNF655\_6075, PAMR1\_7364, ST6GALNAC2\_1113, CCN JL\_9070, KCNB2\_9128, IGFBP7\_6412, 및 WNT3A\_5487)는 암성 전립선 조직(예: 글리슨 스코어 6.0 이상(예: 6, 7, 8, 9, 10)을 비-암성 전립선 조직으로부터 식별한다.

[0399]

표 11은 정상 조직에 대한 메틸화%, 글리슨 스코어 6을 갖는 전립선 조직에 대한 메틸화%, 및 글리슨 스코어 7-10을 갖는 전립선 조직에 대한 메틸화%를 보여준다(상기 올리고 서열은 표 12에 제공되어 있고, 상기 DMR 정보는 표 13에 제공되어 있다).

[0400]

표 11

마커	메틸화% 정상 조직 (28 개 샘플)	메틸화% 글리슨 스코어 6 (24 개 샘플)	메틸화% 글리슨 스코어 7-10 (42 개 샘플)
SERPINB9_3479	0.42	12.77	19.45
FLOT1_1665	5.82	42.61	41.91
HCG4P6_4618	3.64	31.43	38.48
CHST11_2206	0.38	16.17	21.95
MAX.chr12.485	3.46	28.85	32.24
GRASP_0932	0.59	28.31	45.31
GAS6_6425	0.34	21.72	20.92
MAX.chr3.193	1.61	27.69	33.89
MAX.chr2.971_3164	2.08	19.89	24.66
MAX.chr3.727_8028	0.72	19.76	27.73
HES5_0840	0.76	13.81	15.08
TPM4_8037	0.16	3.19	2.90
SLC03A1_6187	0.10	3.77	7.18
ITPRIPL1_1244	0.18	8.77	17.76
AKR1B1_3644	0.10	5.82	8.32
JSRP1	0.09	2.16	7.61
RASGRF2_6325	0.02	0.61	3.07
ZNF655_6075	0.35	20.51	49.64
PAMR1_7364	0.03	0.40	1.79
ST6GALNAC2_1113	0.36	13.76	19.78
CCN JL_9070	0.15	3.33	7.85
KCNB2_9128	0.19	8.48	17.22
IGFBP7_6412	0.05	1.06	3.16
WNT3A_5487	11.52	19.60	37.38

[0401]

참고(note):

[0402]

1. 하기를 포함하는 글리슨 스코어 7-10

[0403]

a. 글리슨 스코어 7의 21개 샘플

[0404]

b. 글리슨 스코어 8의 6개 샘플

[0405]

c. 글리슨 스코어 9의 11개 샘플

[0406]

d. 글리슨 스코어 10의 4개 샘플

[0407]

2. 메틸화%는 [(가닥 마커의 갯수) X (가닥 액틴의 갯수)] X 100이다.

[0408]

이 데이터 상에서 ACTB에 대한 메틸화%의 로지스틱 회귀분석 적합도를 이용하고 100% 컷오프를 이용하며, 2종 마커, FLOT1 및 MAX.Chr3.193를 사용하여 98.5% 표준 감도로부터 AUC = 0.99에서 암을 예측하는 것이 허용되었다 6 대 6 + 예측의 경우 상기 데이터의 ACTB에 대한 9종 마커의 메틸화%의 로지스틱 회귀분석 적합도는 91.7%

의 특이도에서 92.8% 감도로 글리슨 6+를 예측하였다 (AUC = 0.96). 상기 마커는 하기와 같았다:GRASP, GAS6, MAX.chr3.193, MAX.chr2.971, TPM4, ITPRIPL2, AKR1B1, ZNF655, WNT3A.

표 12

마커	올리고 유형	올리고 명칭	서열
JSRP1	프라이머	JSRP1_FP	GGGTCGTAGGAGTGTTCG (서열번호 207)
	프라이머	JSRP1_RP	CCTCTCTAAAACCGCTAAC (서열번호 208)
	프로브	JSRP1_Pb_A5	CCACGGACG CTCGTAACGCC/3C6/ (서열번호 209)
ZNF655_6075	프라이머	ZNF655_6075_FP	AAGACGTGGAAAAGTTGCG (서열번호 210)
	프라이머	ZNF655_6075_RP	CCGCGCGTCCATAATTC (서열번호 211)
	프로브	ZNF655_6075_Pb_A1	CCACGGACG CGAAAACTCGTT/3C6/ (서열번호 212)
KCNB2_9128	프라이머	KCNB2_9128_FP	GTTAGGAGTGGTTGGCGC (서열번호 213)
	프라이머	KCNB2_9128_RP	CCCACACCTCGACGAAAT (서열번호 214)
	프로브	KCNB2_9128_Pb_A5	CCACGGACG CGCGGAAGTTGA/3C6/ (서열번호 215)
ST6GALNAC2_113	프라이머	ST6GALNAC2_1113_FP	GGAGGGAGAACCGGGATG (서열번호 216)
	프라이머	ST6GALNAC2_1113_RP	GCGATCCCGAAAAACG (서열번호 217)
	프로브	ST6GALNAC2_1113_Pb_A1	CCACGGACG GAACGCCGAAA/3C6/ (서열번호 218)
MAX.chr3.727_8028	프라이머	MAX.chr3.727_8028_FP	GTGGTTTATTCGTTCGTTTCG (서열번호 177)
	프라이머	MAX.chr3.727_8028_RP	AAACTAACGAATATAACTCCGTCGA (서열번호 178) 또는 CTAACTAAACTAACGAATATAACTCCGTC (서열번호 219)
		프로브	MAX.chr3.727_8028_Pb_A1

[0410]

[0411]

RASGRF2_6325	프라이머	RASGRF2_6325_FP	GTTAGGGCGGAGAGCGT (서열번호 220)	
	프라이머	RASGRF2_6325_RP	CGCGCGATAACAAAACG (서열번호 221)	
	프로브	RASGRF2_6325_Pb_A5	CGCCGAGG GCGAACTAAAAC/3C6/ (서열번호 222)	
PAMR1_7364	프라이머	PAMR1_7364_FP	ACGTTTGGAGATTCGCG (서열번호 223)	
	프라이머	PAMR1_7364_RP	CCCCCGCAACTTCCTT (서열번호 224)	
	프로브	PAMR1_7364_Pb_A5	CGCCGAGG GACGGCGGTGT/3C6/ (서열번호 225)	
IGFBP7_6412	프라이머	IGFBP7_6412_FP	GGGTCTGTAGGTGTTCGAA (서열번호 226)	
	프라이머	IGFBP7_6412_RP	GCGCCCTACTCCTCGAC (서열번호 227)	
	프로브	IGFBP7_6412_Pb_A5	CGCCGAGG CGCCGCTAAACT/3C6/ (서열번호 228)	
CCN JL_9070	프라이머	CCN JL_9070_FP	GGTATCGTAGTTTCGCGGA (서열번호 229)	
	프라이머	CCN JL_9070_RP	CTCCTACGCCGCTAAA (서열번호 230)	
	프로브	CCN JL_9070_Pb_A5	CGCCGAGG ATTAGAGGCGAT/3C6/ (서열번호 231)	
WNT3A_5487	프라이머	WNT3A_5487_FP	GTGTAAATGCGCGGGC (서열번호 232)	
	프라이머	WNT3A_5487_RP	CGCTTTAATTCAACACCGCG (서열번호 233)	
	프로브	WNT3A_5487_Pb_A5	CGCCGAGG CGGTTTATAACGT/3C6/ (서열번호 234)	
FLOT1_1665	프라이머	FLOT1_1665_FP	GTAGTGTGTTGAGTTAAGTTGTTCG (서열번호 150)	
	프라이머	FLOT1_1665_RP	AACACCAAACGTACCTAATACG (서열번호 151)	
	프로브	FLOT1_1665_Pb_A1	CGCCGAGG GCGAAAACGTAT/3C6/ (서열번호 152)	
[0412]	HCG4P6_4618	프라이머	HCG4P6_4618_FP	CGGAGTATACGGAATATTAGGTTCG

			(서열번호 153)
프라이머	HCG4P6_4618_RP	AATAATAACGACGGGACATAAACAA (서열번호 154)	
프로브	HCG4P6_4618_Pb_A5	CCACGGACG GCGTATAGATTG/3C6/ (서열번호 155)	
SERPINB9_3479	프라이머	SERPINB9_3479_FP	TTTATTTAGTCGTGCGCGG (서열번호 147)
	프라이머	SERPINB9_3479_RP	ACCGCACACGAAACGAC (서열번호 148)
	프로브	SERPINB9_3479_Pb_A5	CCACGGACG CGACAACGCTAA/3C6/ (서열번호 149)
CHST11_2206	프라이머	CHST11_2206_FP	GCGTCGAGGGCGTTTT (서열번호 156)
	프라이머	CHST11_2206_RP	AATCTAACTAAAAAAACGAAACTCGT (서열번호 157)
	프로브	CHST11_2206_Pb_A1	CGCCGAGG TCGCTCCTAAA/3C6/ (서열번호 158)
MAX.chr12.485	프라이머	MAX.chr12.485_FP	GAGGAAATAGGCGTGGTTCG (서열번호 159)
	프라이머	MAX.chr12.485_RP	AAAACCGAAAAAAACTAATTCTGCA (서열번호 160)
	프로브	MAX.chr12.485_Pb_A5	CCACGGACG GCGTTGACGGTT/3C6/ (서열번호 161)
GRASP_0932	프라이머	GRASP_0932_FP	CGCGCGGTATAGTCGG (서열번호 162)
	프라이머	GRASP_0932_RP	ACCCCCAACGAACGAAC (서열번호 163)
	프로브	GRASP_0932_Pb_A1	CGCCGAGG CTATACGCGACG/3C6/ (서열번호 164)
GAS6_6425	프라이머	GAS6_6425_FP	GATTTGAGGTTAGGTTTCGTCG (서열번호 165)
	프라이머	GAS6_6425_RP	GAAAAACAAACGCTACTACCGC (서열번호 166)
	프로브	GAS6_6425_Pb_A5	CCACGGACG GCGCGGAGTTGG/3C6/ (서열번호 167)
MAX.chr3.193	프라이머	MAX.chr3.193_FP	TTAAAGGTTAGTTAAAGATGGAATCGT (서열번호 174)
	프라이머	MAX.chr3.193_RP	CTCGCGACGAAAAAACCC (서열번호 175)
	프로브	MAX.chr3.193_Pb_	CGCCGAGG CGAACTCCCAAC/3C6/

		A1	(서열번호 176)
MAX.chr2.971	프라이머	MAX.chr2.971_FP	GCGAGGTTGCGGTTTG (서열번호 198)
	프라이머	MAX.chr2.971_RP	CGAAAAATAATTGATTAACCAAAACGC (서열번호 199)
	프로브	MAX.chr2.971_Pb_A5	CCACGGACG CCGATATTC/3C6/ (서열번호 200)
HES5_0840	프라이머	HES5_0840_FP	GCGAGAGGAGTAGGTTCG (서열번호 180)
	프라이머	HES5_0840_RP	AACCTACGAACGCGCGA (서열번호 181)
	프로브	HES5_0840_Pb_A5	CCACGGACG ACCCGACGACCA/3C6/ (서열번호 182)
TPM4_8037	프라이머	TPM4_8037_FP	GGAGAAAGGCAGGCG GA (서열번호 189)
	프라이머	TPM4_8037_RP	CGTTCCCAAAACGCGA (서열번호 190)
	프로브	TPM4_8037_Pb_A1	CGCCGAGG ACGACGACGTAT/3C6/ (서열번호 191)
SLC03A1_6187	프라이머	SLC03A1_6187_FP	CGATTGTTGAGCGTTGGATATCG (서열번호 171)
	프라이머	SLC03A1_6187_RP	TCGAAACCCACGAACC (서열번호 172)
	프로브	SLC03A1_6187_Pb_A5	CCACGGACG CGTTAATACCCC/3C6/ 서열번호 173)
ITPRIPL1_124 4	프라이머	ITPRIPL1_1244_FP	GTAGTGGCGGTTAGGTCG (서열번호 195)
	프라이머	ITPRIPL1_1244_RP	TCACCGTCAATATTAATAAAAAACACGA (서열번호 196)
	프로브	ITPRIPL1_1244_Pb_A1	CGCCGAGG GCGTTGTTTT/3C6/ (서열번호 197)
AKR1B1_3644	프라이머	AKR1B1_3644_FP	GTTCGTTTATATTTTCGCGCG (서열번호 201)
	프라이머	AKR1B1_3644_RP	CCGAACGTCCGCGAAC (서열번호 202)
	프로브	AKR1B1_3644_Pb_A1	CGCCGAGG CGAACTACTCAA/3C6/ (서열번호 203)

[0414]

[0415]

표 13

DMR 번호	유전자 주석	염색체 번호	염색체 상의 영역(개시 염기- 종결 염기)
121	WNT3A_5487	1	228225487-228225590
122	SERPINB9_3479	6	2903389-2903479
123	FLOT1_1665	6	30711586-30711665
124	HCG4P6_4618	6	29894618-29894693
125	GRASP_0932	12	52400932-52401020
126	GAS6_6425	13	114566425-114566518
127	SLC03A1_6187	15	92396091-92396187
128	MAX.chr3.727_8028	3	72788028-72788112
129	HES5_0840	1	2460840-2460903
130	TPM4_8037	19	16188037-16188154
131	ITPR1PL1_1244	2	96991244-96991312
132	MAX.chr2.971_3164	2	97193164-97193252
133	AKR1B1_3644	7	134143644-134143721
134	RASGRF2_6325	5	80256325-80256390
135	PAMR1_7364	11	35547364-35547423
136	ZNF655_6075	7	99156075-99156154
137	CCN JL_9070	5	159739070-159739148
138	ST6GALNAC2_1113	17	74581113-74581238
139	IGFBP7_6412	4	57976412-57976506
140	KCNB2_9128	8	73449128-73449208
17	MAX.chr3.193	3	193776187-193776257
70	CHST11_2206	12	104852206-104852307
83	MAX.chr12.485	12	48592041-48592162

[0416]

상기 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 모든 목적을 위해 본원에 전체적으로 참고문헌으로 포함된다. 기재된 바와 같은 상기 기술의 범위 및 취지를 벗어나지 않고 상기 기술의 기재된 조성물, 방법 및 용도의 다양한 변형 및 변화가 당업자에게 자명할 것이다. 상기 기술이 특정의 예시적인 양태와 관련하여 기재되었지만, 청구된 본 발명이 그러한 특정 양태에 부당하게 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 실제로, 약리학, 생화학, 의학 또는 관련 분야의 숙련자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기술된 방식의 다양한 변형이 하기 청구 범위의 범주내에 있는 것으로 의도된다.

## 서 열 목 록

### SEQUENCE LISTING

<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research

EXACT SCIENCES DEVELOPMENT COMPANY, LLC

<120> DETECTING PROSTATE CANCER

<130> EXCTM-35073/WO-1/ORD

<150> US 62/464,800

<151> 2017-02-28

<160> 237

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

cgagttgtat agttagaaga ggacgt 26

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

aaccgaaaaa acctaattcg aaacg 25

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

gggttattag ttttatga gattgcgt 28

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

taaaaaatc cacctatcgc tcgaa 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

ttgttaattt ttgggggtc gtcgt 25

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

gaaaacccgc acttcctcct cga 23

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

tataggattt taagttcgcg aacgt 25

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

tcaacctact tccttcctat ataacgt 28

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

ggagttagaa gtttttggg aggggc 26

<210> 10

<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 10	
aaacacgtaa accttctac ccgac	25
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 11	
gcgtgattga tgggtgtatt acgt	24
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 12	
ataaacttcc gatccctaca acgaa	25
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 13	
tagttcggg gttgcggtaa ttac	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213>	
Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 14	

aaaatcccaa acaaacattc acgcc	25
<210> 15	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 15	
tgttcgttt agttatgaag tatatcg	28
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 16	
acttaatcgc gcaacaaccg ca	22
<210> 17	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 17	
cggtatatt ataagaaaag gaagtttgc t	31
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 18	
gaaaacccaa actacacacc gct	23
<210> 19	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 19	
ttggttta ttaagttatg tgacga	26
<210> 20	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 20	
taaaattcca aaaaacgata acgct	25
<210> 21	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 21	
tgaggttaag ggatagttt cgcg	25
<210> 22	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 22	
aactacaact tcaaatactc cgcacgct	28
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 23	
gttttgcgt tttgcgttcg c	21
<210> 24	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 24	
ccattatata aactccct tcgccc	25
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 25	
ttcggcggttttaggttcg ttcc	24
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 26	
gactaacgatactccacc gccc	23
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 27	
ggggttcggtttatattttt cgcgc	25
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 28	
caaaatcaatcgaaatccct cgcc	24
<210> 29	

<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 29	
gggaggtagt tagttacgg taatacga	28
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 30	
ctaaaccacc aacgaacccc gaa	23
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 31	
tagtcgaggt tatggaggtg acggc	25
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 32	
actacccgtt aaacacgacg aa	22
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 33	
tgtttcgga tacggcgagc	20

<210> 34	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 34	
acgaacgaac tatacgac gct	23
<210> 35	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 35	
tcgtgattta gtattgggc ggagc	25
<210> 36	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 36	
gaaactccaa cgaaaacctc gcgac	25
<210> 37	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 37	
aagcgtaag ggaggaattc ggttc	25
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 38	
gaccggcgaa aactctaacc gtcg	24
<210> 39	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 39	
ggatcgaggat attggatcg gagtatac	28
<210> 40	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 40	
aactctaata ataataacga cgcgac	26
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 41	
gtgattcgcc gggatttgcg	20
<210> 42	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 42	
gacgaaaaaa cgcttcccta caaacga	27
<210> 43	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 43	
aagagtttgt attaggatta tagcga	26
<210> 44	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 44	
cgtaaaacgt caaaaactac acgac	25
<210> 45	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 45	
gggatttagg gtaggttat ttatcgt	27
<210> 46	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 46	
accgcgtat ctcttaaaa tcgta	25
<210> 47	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 47	
taatttcgca aggtaggcga cg	23
<210> 48	
<211> 26	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 48	
caatacttt atatattaac gccgct	26
<210> 49	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 49	
ggttttaggg aaatatcgcc gt	22
<210> 50	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 50	
aactcaaacc gaaaaataaa ttcgat	26
<210> 51	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 51	
aaaggtttag ttaaagatgg aatcgt	26
<210> 52	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 52	
ctcgcgacga aaaaaacccg aa	22

<210> 53	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 53	
aggattcgac ggagttatat tcgt	24
<210> 54	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 54	
taacataacc accaactct ccccgaa	27
<210> 55	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 55	
ttatagtagt tcgtcgaaaa tataaagttt cgtc	34
<210> 56	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 56	
ccgaaaaacc caaaaaaaaaac ccg	23
<210> 57	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 57	

gtcgttacg gtatggtt cgttc	25
<210> 58	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 58	
atcgctaaaa cctcaaccta acgtc	25
<210> 59	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 59	
ttcggttgtt tgtgttcgt tgtcg	25
<210> 60	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 60	
ccgaatctaa aaacgcttcc ctctcgta	28
<210> 61	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 61	
gtagcgtcgg cgttagagcgt agatc	25
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 62	
ataacgaatc cccgcgaaaa ttgc	24
<210> 63	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 63	
gggttagaga atgtgaagtt ttagacgt	28
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 64	
accgcgacga cttAACGACG	20
<210> 65	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 65	
tttttattc gcgttagcg gttcg	26
<210> 66	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 66	
ccgcccataac taccgcctt tactaccg	28
<210> 67	
<211> 27	
<212> DNA	



<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 72	
aaaaaaatcac acctccttca acgct	25
<210> 73	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 73	
aatacgcgac ggttcgttt attgc	25
<210> 74	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 74	
cataacgtaa atccacttcc gacgac	26
<210> 75	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 75	
cgttagggg gttcgagcg tagc	24
<210> 76	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 76	

cccttaattcc atcctaaacg aatcgac

27

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 77

ttgcgaaaac gagtttcga attatggac

29

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 78

ccccgaatat aaataacgac cccgaa

26

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 79

ttggtttatt tatttcgcgg atcga

25

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 80

aaaacacgat cggcgactcc taacg

25

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Synthetic	
<400> 81	
aggagagttt tcgttggttg tcgac	25
<210> 82	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 82	
atactacgaa ctccgcgctc acacg	25
<210> 83	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 83	
aggagagttt tcgttggttg tcgac	25
<210> 84	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 84	
atactacgaa ctccgcgctc acacg	25
<210> 85	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 85	
tttttttagt ttagatttcg gacgt	25
<210> 86	
<211> 25	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 86	
taaaaaataaa ccccatcct ccgat	25
<210> 87	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 87	
cggtgagtagat ttccgcgtt ttcggt	25
<210> 88	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 88	
aaatcgctc tcccgaaacgc	20
<210> 89	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 89	
gggttaaag ttatgggtt tatttcgt	28
<210> 90	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 90	
taaaacatct ctacgcgacc tcgtat	25
<210> 91	

<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 91	
gtcgcgttt ttatggc gttcgt	26
<210> 92	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 92	
ataaaaatcg attctaccgc gtcgcc	26
<210> 93	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 93	
agttaagttt taacgggtgt ggcgg	25
<210> 94	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 94	
aaacgtcgat aaaacgaacg tcgta	25
<210> 95	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 95	

tgagattcg gttaaggaa ggggtc	26
<210> 96	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 96	
acctacatat acgcctccaa acgat	25
<210> 97	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 97	
aatttcgtag gaagtatcg gtcgt	25
<210> 98	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 98	
taccctccaa attacccaaa ccgcct	25
<210> 99	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 99	
ttgttttg agttcgccgg c	21
<210> 100	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 100	
accaatacga ttctccctcc cgat	24
<210> 101	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 101	
tcgcgttgac ggtttgtac g	21
<210> 102	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 102	
aaccccgatc cgaaaaaccg aa	22
<210> 103	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 103	
ttcgaggttt ttcggggcga c	21
<210> 104	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 104	
ccctcctatac cgtaacttt cgctta	26
<210> 105	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 105	
ggtcgtatcggtttt cggaaatgtt cgg	22
<210> 106	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 106	
attcgacgaa aacaccgcgc	20
<210> 107	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 107	
cggaaattt tcggaaaata tatacgta	27
<210> 108	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 108	
tacgaaatttccaaacaaaaaaccgaa	25
<210> 109	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 109	
cggcggtttt atacgtttt cgc	23
<210> 110	

<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 110	
aaaaaaaaatc cccattcaaa cgct	24
<210> 111	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 111	
tggtggtatcg cgatttcgta aagac	25
<210> 112	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 112	
cgcgcggaaac caaattatcg cg	22
<210> 113	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 113	
gggtggatt tcggcgat taaatc	26
<210> 114	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 114	
caaaaacgact ccccgccgaa	20

<210> 115	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 115	
gtttttatggatggtggtcgat	25
<210> 116	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 116	
cccgaaactctactacaattaatcgaa	27
<210> 117	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 117	
tagtttagtgagggagggtcgcggt	25
<210> 118	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 118	
cgcggaaaaaaatccgtt	23
<210> 119	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 119	
gttatttagga tttggtagaa gacga	25
<210> 120	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 120	
aactaccaat cgaaaaaccg aa	22
<210> 121	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 121	
tgttcggaa gtttagttg gggatacgt	29
<210> 122	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 122	
aacaccaaac gtacctaata cgcgaa	26
<210> 123	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 123	
ttttttatt ttttattttt ttctgtcgt	28
<210> 124	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 124	
gacttctact tactcccta accgtt	26
<210> 125	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 125	
ttagtttagga agtagggcga ggcga	25
<210> 126	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 126	
aaaaccgaac aacgcaaaac gaa	23
<210> 127	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 127	
tttcgacgag taggattgaa gaaggaacg	29
<210> 128	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 128	
gcgaatctat ctaccgaaac gcgct	25
<210> 129	
<211> 25	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 129	
ggtttattatcgggtggta gtcgg	25
<210> 130	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 130	
acacgaaaac gacgacaacg ct	22
<210> 131	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 131	
gttaggaagg gagggacgtt tcgg	24
<210> 132	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 132	
cgaaaaacta cgaacacgta tcgac	25
<210> 133	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 133	
tacgtcggtc gtatattttttt tgtc	34

<210> 134	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 134	
ccaaacccta ctactactac tactactaac tacg	34
<210> 135	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 135	
atcgtttat cgtagaagtc ggcga	25
<210> 136	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 136	
tacgacctaa actaaatccc ccgca	25
<210> 137	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 137	
gcgattttgt agcgtttgaa tatcga	26
<210> 138	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 138	

gtcgaaaacc ccacgaaccg tt	22
<210> 139	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 139	
ggttgttaagg gggtttgggt acgc	24
<210> 140	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 140	
attcgaaaa aaacgcccga tacga	25
<210> 141	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 141	
gtttttcgt cggttaattt agcgt	25
<210> 142	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 142	
aaaaataacg aatcacaaca ccgtc	25
<210> 143	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 143	
gatttcggc gtagataggg acgt	24
<210> 144	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 144	
acaaccgaac tacaaatacc tcgaa	25
<210> 145	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 145	
gttcgttag aaggttcgc gtcgtatac	29
<210> 146	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 146	
accttcccg aaacctaaaa cttccg	26
<210> 147	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 147	
tttatttttag tcgtgcgcgg	20
<210> 148	
<211> 18	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 148	
acgcgacacg aaaaacgac	18
<210> 149	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 149	
ccacggacgc gacaacgcta ac	22
<210> 150	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 150	
gtatgtttt gagtttaagt tgtttcg	27
<210> 151	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 151	
aacaccaaac gtacctaata cg	22
<210> 152	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 152	
cggcgaggc gaaaacgtat c	21
<210> 153	

<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 153	
cgaggatatac ggaatattag gttcg	25
<210> 154	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 154	
aataataaacg acgcacata aaca	24
<210> 155	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 155	
ccacggacgg cgtatagatt gc	22
<210> 156	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 156	
gcgttcgagg gcgttt	17
<210> 157	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 157	

aatctaaact aaaaaaaaaa cgaaactcgt	30
<210> 158	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 158	
cgccgaggtc gttcctaaa c	21
<210> 159	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 159	
gagggaaatag gcgtggttcg	20
<210> 160	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 160	
aaaaccgaaa aaaactaatt cgtca	25
<210> 161	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 161	
ccacggacgg ctttacgg ttc	22
<210> 162	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 162	
cgcgccgtat agttcg	17
<210> 163	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 163	
ccccccaacg aacgaac	17
<210> 164	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 164	
cgcgaggct atacgcgacg c	21
<210> 165	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 165	
gatttgagg ttaggttcg tcg	23
<210> 166	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 166	
aaaaaacaac gctactaccg c	21
<210> 167	
<211> 22	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 167	
ccacggacgg cgccggatgg gc	22
<210> 168	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 168	
gttcgtat agtttagaa gtttagcga	29
<210> 169	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 169	
cgtcgaaaaa ctacctaaaa acgtat	25
<210> 170	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 170	
cgcgcgatgtat cgtaaacttaa c	21
<210> 171	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 171	
cgcattttgtat ggcgtttggat atcg	24
<210> 172	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 172	
tcgaaaaccc cacgaacc	18
<210> 173	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 173	
ccacggacgc gttaataccc cc	22
<210> 174	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 174	
ttaaaggttt agttaaagat ggaatcgt	28
<210> 175	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 175	
ctcgcgacga aaaaaaccc	19
<210> 176	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 176	

cgccgaggcg aactccaaac c	21
<210> 177	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 177	
gtggtttat ttcgttcgt ttcg	24
<210> 178	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 178	
aaactaacga atataactcc gtcga	25
<210> 179	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 179	
cggcgaggc gacgttcgag c	21
<210> 180	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 180	
gcgagaggag tagttcg	18
<210> 181	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 181	
aacctacaa cgcgca	17
<210> 182	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 182	
ccacggacga cccgacgacc ac	22
<210> 183	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 183	
gcgtacggtc gcgtatt	17
<210> 184	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 184	
caataactcg acgaaacgca	20
<210> 185	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 185	
cggcgaggc gaaattctaa c	21
<210> 186	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 186	
gttttagcgcg ggttttcg	19
<210> 187	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 187	
cccgaaacttc ccgaact	17
<210> 188	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 188	
ccacggacgg cggtatggc cc	22
<210> 189	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 189	
ggagaaaaggc gggcgga	17
<210> 190	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 190	
cgttcccaaa aacgcga	17
<210> 191	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 191	
cgccgaggac gacgacgtat c	21
<210> 192	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 192	
cgttcgttcg ttcgtttgg	20
<210> 193	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 193	
ccccggcccc tctaaac	17
<210> 194	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 194	
ccacggacgc gaacgaaacg ac	22
<210> 195	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 195	
gtagtggcggtt taggtcg	18

<210> 196	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 196	
tcaccgtcaa tattaataaa aacacga	
	27
<210> 197	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 197	
cgccgagggc gttgtttttt c	
	21
<210> 198	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 198	
gcgaggttgc gtttttgc	
	17
<210> 199	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 199	
cgaaaaata attcgattaa ccaaaacgc	
	29
<210> 200	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	

<400> 200	
ccacggacgc cgatattcc cc	22
<210> 201	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 201	
gttcgttta tattttcgc gcg	23
<210> 202	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 202	
ccgaacgtcc gcgaaac	17
<210> 203	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 203	
cggcgaggcg aactactcaa c	21
<210> 204	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 204	
ggcgcgagt atagtcg	17
<210> 205	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 205	
caacgcgact aatccgc	17
<210> 206	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 206	
cgccgaggcc gtcacctcca c	21
<210> 207	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 207	
gggtcgtagg agtgtttcg	20
<210> 208	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 208	
cctctctaaa aaccgctcaa c	21
<210> 209	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 209	
ccacggacgc tcgttaaacgc cc	22
<210> 210	
<211> 19	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 210	
aagacgtgga aaagttgcg	19
<210> 211	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 211	
ccgcgcgtcc ataattc	17
<210> 212	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 212	
ccacggacgc gaaaactcgt tc	22
<210> 213	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 213	
gtaggagtggttggcg	17
<210> 214	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 214	
cccacacccgttggcg	18

<210> 215	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 215	
ccacggacgc gcggaagttg ac	22
<210> 216	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 216	
ggaggagaac gcggatg	17
<210> 217	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 217	
gcgatccgca aaaaaacg	18
<210> 218	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 218	
ccacggacgg aacgccccaa ac	22
<210> 219	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 219	

ctaaactaac taacgaatat aactccgtc	29
<210> 220	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 220	
gttagggcgg agagcgt	17
<210> 221	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 221	
cgcgcgataa caaaaacg	18
<210> 222	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 222	
cgcgcgatcc gaaactaaaac c	21
<210> 223	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 223	
acgtttggag attcgccg	18
<210> 224	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic	
<400> 224	
cccccgcaac ttccctt	16
<210> 225	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 225	
cgccgaggga cggcggttgtt c	21
<210> 226	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 226	
gggtcgttagg tggttcgaa	18
<210> 227	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 227	
gcgcctact cctcgac	17
<210> 228	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 228	
cgccgaggcg ccgctaaact c	21
<210> 229	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 229	
ggtatcgtag ttttcgcgg a	21
<210> 230	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 230	
ctcctacgcc gctcaaa	17
<210> 231	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 231	
cgcgcaggat tagaggcgat c	21
<210> 232	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 232	
gtgttaatgc gcgggc	16
<210> 233	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 233	
cgcgtttaatt caacaccgcg	20
<210> 234	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 234	
cgccgaggcg gtttatacgt c	21
<210> 235	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 235	
agccggttt ccggctgaga cctcggcgc	29
<210> 236	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 236	
agccggttt ccggctgaga cgtccgtggc	30
<210> 237	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 237	
agccggttt ccggctgaga ctccgcgtcc	30