

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0005845

(43) 공개일자 2023년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)**C12Q 2523/125** (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7037904

(22) 출원일자(국제) 2021년05월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년10월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/030635

(87) 국제공개번호 WO 2021/226071

국제공개일자 2021년11월11일

(30) 우선권주장

63/019,751 2020년05월04일 미국(US)

(71) 출원인

**메이오 파운데이션 포 메디칼 에듀케이션 앤드 리
써치**미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트
에스.더블유. 200

(72) 발명자

알퀴스트, 데이비드 에이.미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트
에스.더블유. 200 **메이오 파운데이션 포 메디칼
에듀케이션 앤드 리써치 내****키시엘, 존 비.**미국 55905 미네소타주 록체스터 퍼스트 스트리트
에스.더블유. 200 **메이오 파운데이션 포 메디칼
에듀케이션 앤드 리써치 내**

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 111 항

(54) 발명의 명칭 **췌장 신경내분비 종양 검출****(57) 요약**

췌장 신경내분비 종양 스크리닝을 위한 기술, 특히 췌장 신경내분비 종양의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2537/164 (2013.01)

C12Q 2600/154 (2013.01)

(72) 발명자

테일러, 윌리엄 알.

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

마호니, 더글라스 더블유.

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

마점더, 쇼우낙

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

명세서

청구범위

청구항 1

방법으로서,

이하를 통해 인간 개체의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 유전자에 대한 메틸화 수준을 측정하는 단계

상기 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시키는 시약으로 처리하는 것;

선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 처리된 게놈 DNA를 증폭시키는 것; 및

폴리머라제 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석, 메틸화-특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 및 표적 포획에 의해 상기 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 결정하는 것;

상기 하나 이상의 유전자는 표 1 및 표 3으로부터 선택되는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419-2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 DNA는 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시키는 시약으로 처리되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 시약은 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 DNA를 바이설파이트 시약으로 처리하여 바이설파이트 처리된 DNA를 생성하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 측정은 다중 증폭을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 적어도 하나의 메틸화 마커 유전자의 양을 측정하는 것은 메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 특이적 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이설파이트 파이로시퀀싱(quantitative bisulfite pyrosequencing), 플랩 엔도뉴클레아제 검정(flap endonuclease assay), PCR-플랩 검정 및 바이설파이트 게놈 시퀀싱 PCR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 샘플은 혈장 샘플, 혈액 샘플, 또는 조직 샘플(예를 들어, 체장 조직) 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트가 표 5에 열거된 것인, 방법.

청구항 12

샘플을 특성화하는 방법으로서:

- 상기 샘플로부터의 DNA에서 적어도 하나의 메틸화 마커 유전자의 양을 측정하는 단계 - 상기 적어도 하나의 메틸화 마커 유전자는 표1 및 3으로부터 선택된 하나 이상의 유전자인 -;
- 상기 DNA에서 적어도 하나의 참조 마커의 양을 측정하는 단계; 및
- 상기 DNA에서 측정된 참조 마커 유전자의 양에 대한 백분율로서 상기 DNA에서 측정된 적어도 하나의 메틸화 마커 유전자의 양에 대한 값을 계산하는 단계 - 상기 값은 상기 샘플에서 측정된 상기 적어도 하나의 메틸화된 마커 DNA의 양을 나타냄 - 를 포함하는, 샘플 특성화 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419-2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMA2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 적어도 하나의 참조 마커는 *B3GALT6* DNA, *ZDHHC1* DNA, β -액틴 DNA, 및 비암성 DNA로부터 선택된 하나 이상의 참조 마커를 포함하는, 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 샘플은 혈장 샘플, 혈액 샘플, 또는 조직 샘플(예를 들어, 체장 조직) 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 DNA는 상기 샘플에서 추출되는, 방법.

청구항 19

제12항에 있어서, 상기 DNA는 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시키는 시약으로 처리되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 시약은 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약 중 하

나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 DNA는 바이설파이트 시약으로 처리되어 바이설파이트 처리된 DNA를 생성하는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 변형된 DNA는 상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 증폭되는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트는 표 5에 인용되어 있는, 방법.

청구항 24

제12항에 있어서, 메틸화 마커 유전자의 양을 측정하는 단계는 중합효소 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 및 표적 포획 중 하나 이상을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 측정은 다중 증폭을 포함하는, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 적어도 하나의 메틸화 마커 유전자의 양을 측정하는 단계는 메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 특이적 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이설파이트 파이로시퀀싱, 플랩 엔도뉴클레아제 검정, PCR-플랩 검정 및 바이설파이트 게놈 시퀀싱 PCR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 27

생물학적 샘플을 특성화하는 방법으로서,

(a) 하기를 통해 인간 개체의 생물학적 샘플에서 표 1 및 표 3으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;

상기 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 것;

상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이설파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것; 및

메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이설파이트 파이로시퀀싱 또는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 결정하는 것;

(b) 상기 메틸화 수준을 PNET가 없는 대조군 샘플에서 상응하는 유전자 세트의 메틸화 수준과 비교하는 단계; 및

(c) 상기 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 각 대조군 샘플에서 측정된 메틸화 수준보다 높을 때 상기 개체가 PNET를 갖는지 결정하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUND3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B,

CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트는 표 5에 인용되어 있는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 32

제27항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈장 샘플, 혈액 샘플 또는 조직 샘플(예를 들어, 채장 조직)인 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 33

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 표 1 및 표 3에 나타난 게놈 좌표에 의해 설명되는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 34

제27항에 있어서, 상기 CpG 부위는 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 35

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 상기 CpG 부위의 메틸화 점수의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 결정을 포함하는 것인, 생물학적 샘플의 특성화 방법.

청구항 36

방법에 있어서,

(a) 표 1 및 표 3으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을

인간 개체의 생물학적 샘플에서

상기 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 바이셀파이트로 처리하는 것;

상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 상기 바이셀파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것; 및

메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이셀파이트 파이로시퀀싱 또는 바이셀파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 CpG 부위의 메틸화 수준을 결정하는 것을 통해 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A,

SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머의 세트는 표 1 및 표 3에 인용되어 있는, 방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈장 샘플, 혈액 샘플, 또는 조직 샘플 (예를 들어, 체장 조직)인, 방법.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 표 5에 나타난 계층 좌표에 의해 설명되는, 방법.

청구항 43

제36항에 있어서,

상기 생물학적 샘플이 조직 샘플이면 상기 하나 이상의 유전자는:

- ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B;

- SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A; 그리고

- SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되고;

상기 생물학적 샘플이 혈장 샘플이면 상기 하나 이상의 유전자는:

- ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B; 그리고

SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 44

제36항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 상기 CpG 부위의 메틸화 점수의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

청구항 45

대상체로부터 얻은 샘플에서 PNET를 스크리닝하는 방법으로서,

1) 표 1 및 표 3에 인용된 주석을 갖는 염색체 영역을 포함하는 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 분석하는 단계,

2) 상기 마커의 메틸화 상태가 PNET가 없는 대상체에서 검정된 마커의 메틸화 상태와 다른 경우 상기 대상체를 PNET를 갖는 것으로 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 복수의 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제45항에 있어서, 상기 마커가 높은 CpG 밀도 프로모터에 있는, 방법.

청구항 51

제45항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 체장 조직 샘플, 혈장 샘플, 또는 소변 샘플인, 방법.

청구항 52

제45항에 있어서, 상기 검정은 메틸화 특이적 증합효소 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 또는 표적 포획을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 53

제45항에 있어서, 상기 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 54

제45항에 있어서,

상기 생물학적 샘플이 조직 샘플인 경우, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되고;

상기 생물학적 샘플이 혈장 샘플인 경우, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 55

하기를 포함하는 인간 환자의 샘플을 특성화하는 방법으로서,

a) 인간 환자의 샘플에서 DNA를 수득하는 단계;

b) 표 1 및 표 3에 인용된 주석을 갖는 염색체 영역을 포함하는 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계;

c) 상기 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 검정된 메틸화 상태를 PNET이 없는 인간 환자에 대한 하나 이상의 DNA 메틸화 마커에 대한 메틸화 수준 참조와 비교하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMA2, 및 MOBKL2A로부터 선택되는, 방법.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 하나 이상의 유전자는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 체장 조직 샘플, 혈장 샘플, 또는 소변 샘플인, 방법.

청구항 60

제55항에 있어서, 복수의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 61

제55항에 있어서,

상기 생물학적 샘플이 조직 샘플인 경우, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되고;

상기 생물학적 샘플이 혈장 샘플인 경우, 상기 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 62

제55항에 있어서, 상기 검정이 메틸화 특이적 증합효소 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 또는 표적 포획을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 63

제55항에 있어서, 상기 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드는 표 5에 인용된 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트로부터 선택되는, 방법.

청구항 65

DMR을 포함하는 핵산을 바이설파이트 시약과 반응시켜 바이설파이트 반응된 핵산을 생성하는 단계; 상기 바이설파이트 반응된 핵산을 시퀀싱하여 상기 바이설파이트 반응된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 단계; 상

기 바이설파이트 반응된 핵산의 상기 뉴클레오타이드 서열을 PNET가 없는 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 두 서열의 차이를 확인하는 단계를 포함하는, 인간 대상체로부터 수득된 샘플을 특성화하는 방법.

청구항 66

샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 상기 샘플의 메틸화 상태를 데이터베이스에 기록된 대조군 샘플 또는 참조 샘플 메틸화 상태와 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합에 기초하여 단일 값을 결정하고 PNET 연관 메틸화 상태를 사용자에게 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함하는, 인간 대상체로부터 얻은 샘플을 특성화하기 위한 시스템.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함하는, 시스템.

청구항 68

제66항에 있어서, 핵산을 분리하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 69

제66항에 있어서, 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 70

제66항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 체장 조직 샘플, 혈장 샘플, 또는 소변 샘플인, 시스템.

청구항 71

제66항에 있어서, 상기 데이터베이스는 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 72

제66항에 있어서, 상기 데이터베이스는 PNET가 없는 대상체로부터의 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 73

키트로서,

- 1) 바이설파이트 시약; 및
- 2) 표 1 및 표 3의 DMR 1-198로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR의 서열을 포함하고, PNET가 없는 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조군 핵산을 포함하는, 키트.

청구항 74

바이설파이트 시약 및 서열 번호 1-66에 따른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

청구항 75

키트로서, 대상체로부터 샘플을 얻기 위한 샘플 수집기; 상기 샘플로부터 핵산을 분리하기 위한 시약; 바이설파이트 시약; 및 서열 번호 1-66에 따른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 체장 조직 샘플, 혈장 샘플, 또는 소변 샘플인, 키트.

청구항 77

DMR 및 바이설파이트 시약을 포함하는 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 78

DMR 및 서열 번호 1-66에 따른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 79

DMR 및 메틸화 민감성 제한 효소를 포함하는 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 80

DMR 및 중합효소를 포함하는 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 81

DMR을 포함하는 핵산을 바이섀플라이트 시약과 반응시켜 바이섀플라이트 반응된 핵산을 생성하는 단계; 상기 바이섀플라이트 반응된 핵산을 시퀀싱하여 상기 바이섀플라이트 반응된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 단계; 상기 바이섀플라이트 반응된 핵산의 상기 뉴클레오타이드 서열을 PNET가 없는 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 두 서열의 차이를 확인하는 단계; 및 차이가 있을 때 대상체를 PNET를 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함하는, 대상체로부터 수득한 샘플에서 PNET를 스크리닝하기 위한 방법.

청구항 82

샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 상기 샘플의 메틸화 상태를 데이터베이스에 기록된 대조군 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태와 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합을 기반으로 단일 값을 결정하고 PNET 관련 메틸화 상태를 사용자에게 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함하는, 대상체로부터 수득된 샘플에서 PNET를 스크리닝하기 위한 시스템.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 샘플은 표 1 및 표 3의 DMR 1-198로 이루어진 군으로부터 선택된 차등적 메틸화 영역(differentially methylated region, DMR)에 염기를 포함하는 DNA 메틸화 마커를 포함하는 핵산을 포함하는, 시스템.

청구항 84

제82항에 있어서, 핵산을 분리하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 85

제82항에 있어서, 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 86

제82항에 있어서, 대변 샘플, 체장 조직 샘플 및/또는 혈장 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 87

제82항에 있어서, 상기 데이터베이스는 PNET가 없는 대상체로부터의 핵산 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 88

생물학적 샘플을 특성화하는 방법으로서,

하기를 통해 인간 개체의 생물학적 샘플에서 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A 중 하나 이상에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 이 단계는

상기 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 바이섀플라이트로 처리하는 것;

SRRM3에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머, HCN2에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머, SPTBN4에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머 및 TMC6_A에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머를 사용하여 상기 바이섀플라이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것,

상기 SRRM3에 특이적인 프라이머는 서열 번호 39 및 40에 의해 결합된 앰플리콘에 결합할 수 있고, 상기 서열

번호 39 및 40에 의해 결합된 앰플리콘은 염색체 7 좌표 75896582-75896785를 포함하는 유전 영역의 적어도 일부이고,

상기 HCN2 에 특이적인 프라이머는 서열 번호 13 및 14에 의해 결합된 앰플리콘에 결합할 수 있고, 상기 서열 번호 13 및 14에 의해 결합된 앰플리콘은 염색체 19 좌표 591692-591781를 포함하는 유전 영역의 적어도 일부이며,

상기 SPTBN4에 특이적인 프라이머는 서열 번호 37 및 38에 의해 결합된 앰플리콘에 결합할 수 있고, 상기 서열 번호 37 및 38에 의해 결합된 앰플리콘은 염색체 19 좌표 41060185-41060270를 포함하는 유전 영역의 적어도 일부이고,

상기 TMC6_A에 특이적인 프라이머는 서열 번호 43 및 44에 의해 결합된 앰플리콘에 결합할 수 있고, 상기 서열 번호 43 및 44에 의해 결합된 앰플리콘은 염색체 17 좌표 76123640-76123768를 포함하는 유전 영역의 적어도 일부이고,

메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이셀파이트 파이로시퀀싱 또는 바이셀파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A 중 하나 이상에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 결정하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈장 샘플 또는 체장 조직 샘플인, 방법.

청구항 90

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

청구항 91

제88항에 있어서, 상기 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A 중 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 상기 CpG 부위의 메틸화 점수의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 결정을 포함하는, 방법.

청구항 92

생물학적 샘플을 특성화하는 방법으로서,

하기를 통해 인간 개체의 생물학적 샘플에서 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMA2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택된 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 이 단계는

상기 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 바이셀파이트로 처리하는 것;

상기 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머를 사용하여 바이셀파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것,

상기 각각의 마커에 특이적인 프라이머는 표 5에 인용된 각각의 프라이머 서열에 의해 결합된 앰플리콘에 결합할 수 있고, 상기 각각의 프라이머 서열에 의해 결합된 앰플리콘은 표 1 또는 표 3에 인용된 각각의 염색체 영역을 포함하는 유전 영역의 적어도 일부이며;

메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이셀파이트 파이로시퀀싱 또는 바이셀파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 상기 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 결정하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈장 샘플 또는 체장 조직 샘플인, 방법.

청구항 94

제92항에 있어서, 상기 CpG 부위는 코딩 영역 또는 조절 영역에 존재하는, 방법.

청구항 95

제92항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 상기 CpG 부위의 메틸화 점수의 결정 및 상기 CpG 부위의 메틸화 빈도의 결정으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 결정을 포함하는, 방법.

청구항 96

하나 이상의 염색체 이상과 관련된 하나 이상의 유전자 좌를 분석하는데 유용한 인간 개체의 생물학적 샘플로부터 데옥시리보핵산(DNA) 분획을 제조하는 방법으로서,

(a) 인간 개체의 생물학적 샘플에서 게놈 DNA를 추출하는 단계;

(b) 하기를 통해, 추출된 게놈 DNA의 분획을 생성하는 단계:

(i) 추출된 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 것,

(ii) 표 1 및 표 3에 인용된 상기 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위에 특이적인 별도의 프라이머를 사용하여 바이설파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것;

(c) 상기 하나 이상의 마커 각각에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하여 상기 추출된 게놈 DNA의 생성된 분획에서 하나 이상의 유전자 좌를 분석하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커 각각에 대한 CpG의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 또는 정량 바이설파이트 파이로시퀀싱 PCR에 의해 결정되는, 방법.

청구항 98

제96항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커 각각에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머를 사용하여 바이설파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 단계는, 표 1 및/또는 표 3에서 나타낸 바와 같이 마커에 대한 유전자 영역의 적어도 일부에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트인, 방법.

청구항 99

제96항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 장기 분비 샘플, CSF 샘플, 타액 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 방법.

청구항 100

제96항에 있어서, 각각의 분석된 하나 이상의 유전자 좌는 PNET과 연관되는, 방법.

청구항 101

제96항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 102

제96항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758-77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A1로부터 선택되는, 방법.

청구항 103

제96항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

청구항 104

하나 이상의 염색체 이상과 관련된 하나 이상의 DNA 분획을 분석하는데 유용한 인간 개체의 생물학적 샘플로부터 데옥시리보핵산(DNA) 분획을 제조하는 방법으로서,

- (a) 인간 개체의 생물학적 샘플에서 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 하기를 통해, 추출된 게놈 DNA의 분획을 생성하는 단계:
 - (i) 추출된 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하는 것,
 - (ii) 표 1 및 표 3에 인용된 상기 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위에 특이적인 별도의 프라이머를 사용하여 바이설파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 것;
- (c) 상기 하나 이상의 마커 각각에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하여 상기 추출된 게놈 DNA의 생성된 분획에서 하나 이상의 DNA 분획을 분석하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 각각의 하나 이상의 마커에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 또는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 결정되는, 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커 각각에 대한 CpG 부위에 특이적인 프라이머를 사용하여 바이설파이트 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 단계는, 표 1 및/또는 표 3에서 나타낸 바와 같이 마커에 대한 유전자 영역의 적어도 일부에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트인, 방법.

청구항 107

제104항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 장기 분비 샘플, CSF 샘플, 타액 샘플, 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 소변 샘플인, 방법.

청구항 108

제104항에 있어서, 각각의 분석된 DNA 분획은 PNET과 연관되는, 방법.

청구항 109

제104항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택되는, 방법.

청구항 110

제104항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FBNP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A1로부터 선택되는, 방법.

청구항 111

제104항에 있어서, 상기 하나 이상의 마커는 SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2020년 5월 4일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/019,751호를 우선권 주장하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 췌장 신경내분비 종양(pancreatic neuroendocrine tumor)을 스크리닝하기 위한 기술, 특히 췌장 신경내분비 종양의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물 및 관련 용도가 본원에 제공된다.

배경 기술

[0005] 췌장 신경내분비 종양(PNET)은 발전하는(enhancing) 고형 췌장 병변의 특징적인 방사선학적 외관에 근거하여 의심되며, 진단은 일반적으로 EUS 유도 생검으로 확인된다. PNET은 때때로 양성일 수 있으며, 다른 췌장 양성 병변을 모방하여 진단적 불확실성을 초래할 수 있다. 현재 PNET 진단을 위한 혈액 기반 또는 낭포액 바이오마커는 존재하지 않는다. 우연히 진단된 PNET은 췌장 절제술이 상당한 위험을 수반하기 때문에 치료적 딜레마로 이어지며, PNET이 일반적으로 천천히 성장하여 선택된 경우에 치료 없이 주의 깊은 대기 및 주기적인 감시 영상 관찰을 허용하지만, 생물학적 거동은 예측할 수 없고 크기 독립적일 수 있다.

[0006] 현재, 세계보건기구(WHO)는 췌장 조직에서 평가된 유사분열 계수와 증식 지수(Ki-67)를 기반으로 모든 PNET들을 낮은 등급(G1), 중간 등급(G2), 높은 등급(G3) 범주로 분류하고 있다. 등급을 결정하기 위한 비침습적 마커가 존재하지 않고, 이러한 이유로 환자 집단이 관찰하기에 안전한지에 대한 명확한 합의가 부족하다. 췌장 절제술을 받은 환자에서, 재발은 드문 일이 아니며 수술 후 몇 년 후에 재발할 수 있다. 또한, 전이성 질환이 있는 환자에서 현재 약물 요법은 종양 억제성이 있으며, 치료 중 질병 활성을 모니터링하는 바이오마커가 없다.

[0007] 따라서, 진단, 병기결정 및 감시를 위해 낭종액과 혈액 모두에 적용할 수 있는 정확한 PNET 바이오마커에 대한 임상적 요구(clinical need)가 존재한다.

[0008] 본 발명은 이러한 요구를 다룬다. 실제로, 본 발명은 다양한 생물학적 샘플(예를 들어, 조직, 혈액) 내에서 PNET의 경우를 구별하는 신규한 메틸화된 DNA 마커를 제공한다.

발명의 내용

[0009] 메틸화 DNA는 대부분의 종양 유형 조직에서 잠재적인 바이오마커 부류로 연구되었다. 많은 경우, DNA 메틸트랜스퍼라제는 유전자 발현의 후성 제어로서 사이토신-포스페이트-구아닌(CpG) 섬 부위의 DNA에 메틸 그룹을 부가한다. 생물학적으로 매력적인 메커니즘에서, 종양 억제 유전자의 프로모터 영역에서 획득된 메틸화 이벤트는 발현을 침묵시키는 것으로 생각되며, 따라서 종양 발생에 기여한다. DNA 메틸화는 RNA 또는 단백질 발현보다 화학적 및 생물학적으로 더 안정적인 진단 도구일 수 있다(Laird (2010) Nat Rev Genet 11: 191-203). 또한 산발성 결장암과 같은 다른 암에서 메틸화 마커는 탁월한 특이성을 제공하며 개별 DNA 돌연변이보다 더 광범위하게 정보를 제공하고 민감하다(Zou et al (2007) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 2686-96).

[0010] CpG 섬의 분석은 동물 모델과 인간 세포주에 적용될 때 중요한 발견을 가져 왔다. 예를 들어, Zhang과 동료들은 동일한 CpG 섬의 다른 부분으로부터의 앰플리콘(amplicon)이 다른 수준의 메틸화를 가질 수 있음을 발견했다(Zhang et al. (2009) PLoS Genet 5: e1000438). 또한, 메틸화 수준은 고도로 메틸화된 서열과 메틸화되지 않은 서열 사이에 이중 모드로 분포되어 DNA 메틸트랜스퍼라제 활성의 이원 스위치 유사 패턴을 추가로 지원한다(Zhang et al. (2009) PLoS Genet 5: e1000438). 생체 내 무린 조직 및 시험관 내 세포주의 분석은 고 CpG 밀도 프로모터(HCP, 300 염기쌍 영역 내에서 >7% CpG 서열을 갖는 것으로 정의됨)의 약 0.3%만이 메틸화된 반면 저 CpG 밀도 영역(LCP, 300 염기쌍 영역 내에서 <5% CpG 서열을 갖는 것으로 정의됨)은 동적 조직 특이적 패턴으로 자주 메틸화되는 경향이 있다는 것을 입증하였다(Meissner 등 (2008) Nature 454: 766-70). HCP에는 유비쿼터스 하우스키핑 유전자와 고도로 조절된 발달 유전자에 대한 프로모터가 포함된다. >50%로 메틸화된 HCP 부위 중에는 Wnt 2, NDRG2, SFRP2 및 BMP3와 같은 여러 확립된 마커가 있다(Meissner et al. (2008) Nature 454: 766-70).

[0011] DNA 메틸트랜스퍼라제에 의한 사이토신-포스페이트-구아닌(CpG) 섬 부위에서 DNA의 후성 메틸화는 대부분의 종양 유형의 조직에서 잠재적인 바이오마커 부류로 연구되었다.

- [0012] 새로운 메틸화 마커를 검색하기 위해 여러 가지 방법을 사용할 수 있다. CpG 메틸화의 마이크로어레이 기반 심문은 합리적이고 높은 처리량 접근 방식이지만, 이 전략은 알려진 관심 영역, 주로 확립된 종양 억제 프로모터 쪽으로 편향된다. 게놈 차원의 DNA 메틸화 분석을 위한 대체 방법이 지난 10년 동안 개발되었다. 4가지 기본 접근 방식이 있다. 첫 번째 방법은 특정 메틸화 부위를 인식하는 제한 효소에 의한 DNA 분해를 사용한 다음, 정량화 단계에서 DNA를 증폭하는 데 사용되는 프라이머(primer) 또는 효소 인식 부위로 제한된 메틸화 데이터를 제공하는 몇 가지 가능한 분석 기술(예컨대 메틸화 특이적 PCR; MSP)이다. 두 번째 접근법은 메틸-사이토신 또는 기타 메틸화 특이적 결합 도메인에 대한 항체를 사용하여 게놈 DNA의 메틸화 분석을 강화한 다음 마이크로어레이 분석 또는 시퀀싱을 통해 단편을 기준 게놈에 매핑한다. 이 접근법은 단편 내 모든 메틸화 부위의 단일 뉴클레오타이드 분해능을 제공하지 않는다. 세 번째 접근법은 DNA의 바이설파이트 처리로 시작하여 모든 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 전환한 다음 제한 효소 분해 및 어댑터 리간드에 결합한 후 모든 단편의 완전한 시퀀싱을 수행한다. 제한 효소의 선택은 CpG 밀집 영역에 대한 단편을 풍부하게 하여 분석 중에 여러 유전자 위치에 매핑될 수 있는 중복 서열의 수를 줄일 수 있다. 네 번째 접근법은 변형되지 않은 시토신에 영향을 미치지 않고 5-메틸시토신 및 5-히드록시메틸시토신의 비파괴적이고 직접적인 검출을 위해 바이설파이트가 없고 염기 분해능 시퀀싱 방법인 TET 보조 피리딘 보란 시퀀싱(TAPS)을 설명하는 DNA의 바이설파이트가 없는 처리를 포함한다(Liu et al., 2019, Nat Biotechnol. 37, pp. 424-429 참조). 일부 실시형태에서, 특정 효소적 전환 접근법과 무관하게, 메틸화된 시토신만이 전환된다.
- [0013] RRBS(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)는 모든 CpG 섬의 80-90%의 단일 뉴클레오타이드 분해능에서 CpG 메틸화 상태 데이터를 생성하고 중간 내지 높은 관독 범위에서 종양 억제 프로모터의 대부분을 생성한다. 암 사례-대조군 연구에서 이러한 관독 값을 분석하면 차등적 메틸화 영역(DMR)이 식별된다. 췌장암 표본에 대한 이전의 RRBS 분석에서 수백 개의 DMR이 발견되었는데, 그 중 다수는 발암과 관련이 없었으며 그 중 다수는 애너테이션(annotation)이 없었다. 독립 조직 샘플 세트에 대한 추가 검증 연구는 성능면에서 100% 민감하고 특이적인 마커 CpG를 확인했다.
- [0014] PNET은 췌장 종양의 작지만 중요한 부분을 차지하며 고형 또는 낭성 췌장 덩어리로 나타날 수 있다. 미국에서 PNET의 유병률은 주로 고화질 복부 영상의 광범위한 진단 사용을 통한 우발적인 검출로 인해 지난 10년 동안 증가했다(Dasari A, et al., JAMA oncology 2017;3(10):1335-42; Hallet J, et al., Cancer. 2015;121(4):589-97 참조). 대다수의 PNET은 기능하지 않으며 호르몬 과잉 생산의 임상 증후군을 나타내지 않는다. 임상적으로 침묵함에도 불구하고, PNET은 조직학적으로 높은 등급일 수 있으며, 종종 원발성 병변의 크기에 관계없이 초기 검출 시점에 전이성 질환으로 나타날 수 있다. PNET을 정확하게 검출하기 위한 비침습적 바이오마커는 현재 존재하지 않으며, 진단은 조직 샘플링에 의존하는데 이는 불량한 진단 조직 수율 및 췌장염의 관련 위험으로 인해 작은 병변에서는 종종 어렵다. 또한, NET은 췌장 외부의 여러 다른 장기(폐, 소장)에서 발생할 수 있으므로, 혈액 기반 분자 진단 테스트에서 원발성 암의 부위를 알아내는 것은 매우 유용할 것이다.
- [0015] 본 발명은 PNET의 진단 및 관리의 중요한 격차, 즉 정확한 바이오마커의 부재를 해결한다. 새로운 메틸화 DNA 마커(MDM)의 전체 메틸률 발견 및 검증은 건강한 대조군과 PDAC를 정확하게 구별할 수 있는 췌장 낭종액, 체액 및 혈액에서 MDM 패널의 식별로 이어지는 조직에서 췌관 선암종(PDAC)을 검출하기 위해 사전에 수행되었다(Kisiel JB, et al., Clin Cancer Res. 2015;21(19):4473-81; Majumder S, Gastroenterology.150(4):S120-S1; Majumder S, et al., Gastroenterology.152(5):S148 참조).
- [0016] 실제로, 실시예 I에 기술된 바와 같이, 본 발명에 대한 실시형태를 식별하기 위한 과정 동안 수행된 실험은 비종양성 대조군 DNA로부터 PNET 유래 DNA를 구별하기 위한 새로운 세트의 차등적 메틸화 영역(DMR)을 확인했다.
- [0017] 이러한 실험은 PNET 조직을 양성 조직과 구별하는 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커를 나열하고 설명한다(표 1, 2, 3, 4, 6, 7 및 9 및 실시예 I 참조).
- [0018] 이 198개의 신규 DNA 메틸화 마커에서, 추가 실험을 통해 양성 조직으로부터 PNET 조직(예를 들어, 낭포성 PNET 조직, 고형 PNET 조직, 전이성 PNET 조직)을 구별할 수 있는 다음 마커 및/또는 마커 패널이 확인되었다.
- [0019] · ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSP0, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B (표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조);
- [0020] · SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2,

MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A (표 9, 실시예 I 참조); 및

[0021] · SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A(표 9, 실시예 I 참조).

[0022] 이러한 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커로부터, 추가 실험을 통해 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 PNET을 검출하기 위한 다음 마커 및/또는 마커 패널을 확인했다:

[0023] · ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B (표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조); 및

[0024] · SRRM3, HCN2, SPTBN4 및 TMC6_A(표 9, 실시예 I 참조).

[0025] 이러한 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커로부터, 추가 실험을 통해 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 전이성 PNET를 검출하기 위한 다음 마커 및/또는 마커 패널을 확인했다:

[0026] · SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A (표 9, 실시예 I 참조).

[0027] 이러한 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커로부터 추가 실험을 통해 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 폐 신경내분비 종양(NET)을 검출하기 위한 다음 마커 및/또는 마커 패널을 확인했다:

[0028] · SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A (표 9, 실시예 I 참조).

[0029] 이러한 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커로부터, 추가 실험을 통해 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 소장 신경내분비 종양(NET)을 검출하기 위한 다음 마커 및/또는 마커 패널을 확인했다:

[0030] · SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A (표 9, 실시예 I 참조).

[0031] 본원에 기술된 바와 같이, 이 기술은 PNET 전체 및 다양한 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)에 대해 높은 차별성을 갖는 다수의 메틸화 DNA 마커 및 이의 서브세트(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 마커 세트)를 제공한다. 실험은 PNET 스크리닝 또는 진단을 위한 높은 특이성을 제공하기 위해 높은 신호 대 잡음 비율 및 낮은 배경 수준을 제공하는 마커를 식별하기 위해 후보 마커에 선택 필터를 적용했다.

[0032] 일부 실시형태에서, 이 기술은 생물학적 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플, 혈액 샘플)에서 본원에서 식별된 하나 이상의 마커의 존재 및 메틸화 상태를 평가하는 것과 관련된다. 이들 마커는, 예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같이 본원에서 논의된 바와 같은 하나 이상의 메틸화 영역(DMR)을 포함한다. 메틸화 상태는 본 기술의 실시형태에서 평가된다. 따라서 본원에서 제공하는 기술은 유전자의 메틸화 상태를 측정하는 방법에 제한이 없다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 메틸화 상태는 게놈 스캐닝 방법에 의해 측정된다. 예를 들어, 한 가지 방법은 제한 랜드마크 게놈 스캔(Kawai et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 7421-7427)을 포함하고, 다른 예는 메틸화 민감성 임의의 프라이밍 PCR(Gonzalzo et al. (1997) *Cancer Res.* 57 : 594-599)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 특정 CpG 부위에서 메틸화 패턴의 변화는 메틸화 민감성 제한 효소로 게놈 DNA를 분해한 후 관심 영역의 서던 분석(Southern analysis)(분해-서던 방법(digestion-Southern method))에 의해 모니터링된다. 일부 실시형태에서, 메틸화 패턴의 변화를 분석하는 것은 PCR 증폭 전에 메틸화 민감성 제한 효소 또는 메틸화 의존성 제한 효소로 게놈 DNA를 분해하는 것을 포함하는 PCR 기반 프로세스를 포함한다(Singer-

Sam et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 687). 또한 메틸화 분석의 시작점으로 DNA의 바이섀플라이트 처리를 활용하는 다른 기술이 보고되었다. 여기에는 메틸화 특이적 PCR(MSP)(Herman et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826) 및 바이섀플라이트 변환 DNA로부터 증폭된 PCR 산물의 제한 효소 분해(Sadri and Hornsby (1996) Nucl. Acids Res. 24: 5058-5059; 및 Xiong and Laird (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2532-2534)가 포함된다. PCR 기술이 유전자 돌연변이의 검출(Kuppuswamy et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1143-1147) 및 대립 유전자 특이 발현의 정량화(Szabo and Mann (1995) Genes Dev. 9: 3097-3108; and Singer-Sam et al. (1992) PCR Methods Appl. 1: 160-163)를 위해 개발되었다. 이러한 기술은 PCR 생성된 템플릿(template)에 어닐링하고 검정할 단일 뉴클레오타이드의 5'를 즉시 종료하는 내부 프라이머를 사용한다. 미국 특허 제7,037,650호에 설명된 바와 같은 "정량 Ms-SNuPE 검정"을 사용하는 방법이 일부 실시형태에서 사용된다.

[0033] 메틸화 상태를 평가할 때, 메틸화 상태는 종종 해당 특정 부위를 포함하는 샘플의 총 DNA 집단에 관한 특정 부위에서(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드, 특정 영역 또는 유전자 좌(locus)에서, 더 긴 관심 서열, 예를 들어, DNA의 최대 ~100-bp, 200-bp, 500-bp, 1000-bp 서브서열 또는 그 이상에서) 메틸화되는 DNA의 개별 가닥의 비율 또는 백분율로 표현된다. 통상적으로, 메틸화되지 않은 핵산의 양은 교정기(calibrator)를 사용하여 PCR에 의해 결정된다. 그런 다음, 알려진 양의 DNA가 바이섀플라이트 처리되고(또는 비-바이섀플라이트 처리되고(Liu et al., 2019, Nat Biotechnol. 37, pp. 424-429 참조)), 생성된 메틸화 특이적 서열이 실시간 PCR 또는 기타 지수 증폭, 예를 들어, QuARTS 검정을 사용하여 결정된다(예를 들어, 미국 특허 제8,361,720호; 제8,715,937호; 제8,916,344호; 및 제9,212,392호에 의해 제공됨).

[0034] 예를 들어, 일부 실시형태에서, 방법은 외부 표준을 사용하여 메틸화되지 않은 표적에 대한 표준 곡선을 생성하는 것을 포함한다. 표준 곡선은 적어도 두 지점에서 구성되며, 메틸화되지 않은 DNA에 대한 실시간 Ct 값을 알려진 정량 표준과 관련시킨다. 그런 다음, 메틸화 표적에 대한 두 번째 표준 곡선이 최소 두 지점과 외부 표준으로 구성된다. 이 두 번째 표준 곡선은 메틸화 DNA에 대한 Ct를 알려진 정량 표준과 관련시킨다. 다음으로, 메틸화 집단 및 메틸화되지 않은 집단에 대해 테스트 샘플 Ct 값이 결정되고 DNA의 계층 등가물은 처음 두 단계에서 생성된 표준 곡선에서 계산된다. 관심 부위의 메틸화 백분율은 집단의 총 DNA 양에 대한 메틸화 DNA의 양으로부터, 예를 들어, (메틸화 DNA 수)/(메틸화 DNA 수 + 메틸화되지 않은 DNA 수) X 100으로부터 계산된다.

[0035] 일부 실시형태에서, 복수의 상이한 표적 영역은 기준 표적 영역을 포함하고, 특정 바람직한 실시형태에서, 기준 표적 영역은 b-액틴 및/또는 ZDHHC1, 및/또는 B3GALT6을 포함한다.

[0036] 또한, 본원에는 상기 방법을 실행하기 위한 조성물 및 키트가 제공된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 하나 이상의 MDM에 특이적인 시약(예를 들어, 프라이머, 프로브(probe))이 단독으로 또는 세트(예를 들어, 복수의 마커를 증폭하기 위한 프라이머 쌍 세트)로 제공된다. 검출 검정을 수행하기 위한 추가 시약(예를 들어, 효소, 완충액, QuARTS, PCR, 시퀀싱, 바이섀플라이트, TET(Ten-Eleven Translocation) 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리놉시스 시네레아(CcTET)), 또는 이들의 변이체), 유기 보란 또는 기타 검정)이 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리놉시스 시네레아(CcTET), 또는 이들의 변이체), 유기 보란), 및/또는 본원에 기재된 단백질 마커의 증가된 수준을 검출할 수 있는 제제를 함유한다. 일부 실시형태에서, 방법을 수행하는 데 필요하거나 충분하거나 유용한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 제공된다. 시약을 함유하는 반응 혼합물도 제공된다. 추가로 반응 혼합물을 완성하기 위해 서로 및/또는 테스트 샘플에 첨가될 수 있는 복수의 시약을 함유하는 마스터 믹스 시약 세트가 제공된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 본원에 설명된 기술은 본원에 설명된 방법에 의해 제공되는 바와 같은 일련의 산술 또는 논리 연산을 수행하도록 설계된 프로그램 가능한 기계와 관련된다. 예를 들어, 상기 기술의 일부 실시형태는 컴퓨터 소프트웨어 및/또는 컴퓨터 하드웨어와 관련된다(예를 들어, 구현됨). 일 양태에서, 상기 기술은 메모리 형태, 산술 및 논리 연산을 수행하기 위한 부재, 및 데이터를 판독하고 조작하고 저장하기 위한 일련의 명령어(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 방법)를 실행하기 위한 처리 부재(예를 들어, 마이크로프로세서)를 포함하는 컴퓨터에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 마이크로프로세서는, 모두 본원에 기술되거나 당 업계에 공지된,(예를 들어, 하나 이상의 DMR, 예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 DMR 1-198의) 메틸화 상태의 결정;(예를 들어, 하나 이상의 DMR, 예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 DMR 1-198의) 메틸화 상태의 비교; 표준 곡선의 생성; Ct 값의 결정;(예를 들어, 하나 이상의 DMR, 예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 DMR

1-198의) 메틸화 비율, 빈도 또는 백분율의 계산; CpG 섬의 식별; 검정 또는 마커의 특이성 및/또는 민감도의 결정; ROC 곡선 및 관련 AUC의 계산고; 서열 분석을 위한 시스템의 일부이다.

- [0038] 일부 실시형태에서, 마이크로프로세서 또는 컴퓨터는 암 부위를 예측하기 위해 알고리즘에서 메틸화 상태 데이터를 사용한다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 소프트웨어 또는 하드웨어 구성요소는 다중 검정 결과를 수신하고 다중 검정(예를 들어, 다중 DMR, 예를 들어, 표 2 및 표 4에 제공된 바와 같은 다중 DMR의 메틸화 상태 결정) 결과를 기반으로 암 위험을 나타내는 사용자에게 보고할 단일 값 결과를 결정한다. 관련 실시형태는 다중 검정 결과, 예를 들어, 다중 마커(예를 들어, 다중 DMR, 예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같은 다중 DMR)의 메틸화 상태 결정 결과의 수학적 조합(예를 들어, 가중 조합, 선형 조합)을 기반으로 위험 인자를 계산한다. 일부 실시형태에서, DMR의 메틸화 상태는 차원을 정의하고 다차원 공간에서 값을 가질 수 있으며 다중 DMR의 메틸화 상태에 의해 정의된 좌표는, 예를 들어, 암 위험과 관련된 사용자에게 보고할 결과이다.
- [0040] 일부 실시형태는 저장 매체 및 메모리 구성요소를 포함한다. 메모리 구성요소(예를 들어, 휘발성 및/또는 비휘발성 메모리)는 명령어(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 프로세서의 실시형태) 및/또는 데이터(예를 들어, 메틸화 측정, 시퀀스 및 이와 관련된 통계적 설명과 같은 작업물)를 저장하는 데 사용된다. 일부 실시형태는 또한 CPU, 그래픽 카드 및 사용자 인터페이스 중 하나 이상을 포함하는(예를 들어, 디스플레이와 같은 출력 장치 및 키보드와 같은 입력 장치를 포함하는) 시스템에 관한 것이다.
- [0041] 이 기술과 관련된 프로그래밍 가능한 기계는 현존하는 종래 기술 및 개발 중이거나 아직 개발되지 않은 기술로 구성된다(예를 들어, 양자 컴퓨터, 화학 컴퓨터, DNA 컴퓨터, 광학 컴퓨터, 스핀트로닉스(spintronics) 기반 컴퓨터 등).
- [0042] 일부 실시형태에서, 상기 기술은 데이터를 전송하기 위한 유선(예를 들어, 금속 케이블, 광섬유) 또는 무선 전송 매체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태는 네트워크(예를 들어, 근거리 통신망(LAN), 광역 통신망(WAN), 애드혹 네트워크(ad-hoc network), 인터넷 등)를 통한 데이터 전송에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 프로그램 가능한 기계는 피어(peer)와 같은 네트워크 상에 존재하고, 일부 실시형태에서 프로그램 가능한 기계는 클라이언트/서버 관계를 갖는다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 데이터는 하드 디스크, 플래시 메모리, 광학 매체, 플로피 디스크 등과 같은 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체에 저장된다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 기술은 본원에 설명된 바와 같은 방법을 수행하기 위해 협력하여 동작하는 복수의 프로그램 가능한 장치와 관련된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, (예를 들어, 네트워크에 의해 연결된) 복수의 컴퓨터는 데이터를 수집하고 처리하기 위해 병렬로, 예를 들어, 클러스터 컴퓨팅 또는 그리드 컴퓨팅의 구현으로, 또는 이더넷(Ethernet), 광섬유와 같은 종래 네트워크 인터페이스를 통해 또는 무선 네트워크 기술을 통해 네트워크(개인, 공용 또는 인터넷)에 연결된 (온보드 CPU, 스토리지, 전원 공급 장치, 네트워크 인터페이스 등을 갖는) 완전한 컴퓨터에 의존하는 일부 다른 분산된 컴퓨터 구성(computer architecture)으로 작동할 수 있다.
- [0045] 예를 들어, 일부 실시형태는 컴퓨터 판독 가능한 매체를 포함하는 컴퓨터를 제공한다. 상기 실시형태는 프로세서에 결합된 랜덤 액세스 메모리(RAM)를 포함한다. 상기 프로세서는 메모리에 저장된 컴퓨터 실행 가능 프로그램 명령어를 실행한다. 이러한 프로세서는 마이크로프로세서, ASIC, 상태 머신 또는 기타 프로세서를 포함할 수 있으며, 인텔 코퍼레이션(Intel Corporation)(Santa Clara, California) 및 모토로라 코퍼레이션(Motorola Corporation)(Schaumburg, Illinois)의 프로세서와 같은 여러 컴퓨터 프로세서 중 임의의 것일 수 있다. 이러한 프로세서는 프로세서에 의해 실행될 때 프로세서가 본원에 설명된 단계를 수행하게 하는 명령어를 저장하는 컴퓨터 판독 가능한 매체와 같은 매체를 포함하거나 그와 통신할 수 있다.
- [0046] 컴퓨터 판독 가능한 매체의 실시형태는 컴퓨터 판독 가능한 명령어를 프로세서에 제공할 수 있는 전자, 광학, 자기 또는 기타 저장 또는 전송 장치를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 매체의 다른 예는 플로피 디스크, CD-ROM, DVD, 자기 디스크, 메모리 칩, ROM, RAM, ASIC, 환경 설정된 프로세서(configured processor), 모든 광학 매체, 모든 자기 테이프 또는 기타 자기 매체, 또는 컴퓨터 프로세서가 명령어를 판독할 수 있는 임의의 기타 매체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 다양한 다른 형태의 컴퓨터 판독 가능한 매체는 라우터, 개인 또는 공용 네트워크, 또는 유선 및 무선 둘 다의 기타 전송 장치 또는 채널을 포함하여 컴퓨터에 명령어를 전송하거나 전달할 수 있다. 명령어는, 예를 들어, C, C++, C#, Visual Basic, Java, Python, Perl 및

JavaScript를 포함하는 임의의 적절한 컴퓨터 프로그래밍 언어의 코드를 포함할 수 있다.

- [0047] 일부 실시형태에서 컴퓨터는 네트워크에 연결된다. 컴퓨터는 또한 마우스, CD-ROM, DVD, 키보드, 디스플레이 또는 기타 입력 또는 출력 장치와 같은 여러 외부 또는 내부 장치를 포함할 수 있다. 컴퓨터의 예로는 개인용 컴퓨터, 휴대 정보 단말기(digital assistant), 개인 휴대 정보 단말기(personal digital assistant), 휴대폰(cellular phone), 이동 전화(mobile phone), 스마트폰, 호출기, 디지털 태블릿(digital tablet), 랩톱 컴퓨터(laptop computer), 인터넷 기기 및 기타 프로세서 기반 장치가 있다. 일반적으로 본원에 제공된 기술의 측면과 관련된 컴퓨터는 본원에 제공된 기술을 포함하는 하나 이상의 프로그램을 지원할 수 있는 Microsoft Windows, Linux, UNIX, Mac OS X 등과 같은 임의의 운영 체제에서 작동하는 모든 유형의 프로세서 기반 플랫폼일 수 있다. 일부 실시형태는 다른 애플리케이션 프로그램(예를 들어, 애플리케이션)을 실행하는 개인용 컴퓨터를 포함한다. 응용 프로그램은 메모리에 함유될 수 있으며, 예를 들어, 워드 프로세싱 응용 프로그램, 스프레드시트 응용 프로그램, 이메일 응용 프로그램, 인스턴트 메신저 응용 프로그램, 프레젠테이션 응용 프로그램, 인터넷 브라우저 응용 프로그램, 달력/오거나이저 응용 프로그램 및 클라이언트 장치에서 실행할 수 있는 응용 프로그램을 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 기술과 관련하여 본원에 설명된 이러한 모든 구성요소, 컴퓨터 및 시스템은 논리적이거나 가상적일 수 있다.
- [0049] 따라서, 본원에서는 대상체로부터 수득된 샘플에서 PNET을 스크리닝하는 방법과 관련된 기술을 제공하는데, 상기 방법은 대상체(예를 들어, 체장 조직)로부터 수득한 샘플(예를 들어, 혈액 샘플)에서 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계 및 상기 마커의 메틸화 상태가 PNET이 없는 대상체에서 검정된 마커의 메틸화 상태와 다를 때 대상체가 PNET을 갖는 것으로 확인하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 마커는 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같이 DMR 1-198으로 이루어진 군으로부터 선택된 차등적 메틸화 영역(DMR)의 염기를 포함한다.
- [0050] 대상체로부터 수득된 샘플이 조직(예를 들어, 체장 조직)이고 하기 마커 중 하나 이상의 메틸화 상태는 PNET이 없는 대상체에서 검정된 하나 이상의 마커의 메틸화 상태와 상이한 일부 실시형태에서, 이는 대상체가 PNET: ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B(표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조)를 가지고 있음을 나타낸다.
- [0051] 대상체로부터 수득된 샘플이 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)이고 하기 마커 중 하나 이상의 메틸화 상태는 PNET이 없는 대상체에서 검정된 하나 이상의 마커의 메틸화 상태와 상이한 일부 실시형태에서, 이는 대상체가 PNET: ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B(표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조)를 가지고 있음을 나타낸다.
- [0052] 대상체로부터 수득된 샘플이 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)이고 하나 이상의 하기 마커의 메틸화 상태가 전이성 PNET이 없는 대상체에서 검정된 하나 이상의 마커의 메틸화 상태와 상이한 일부 실시형태에서, 이는 대상체가 전이성 PNET: SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A(표 9, 실시예 I 참조)를 가지고 있음을 나타낸다.
- [0053] 대상체로부터 수득된 샘플이 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)이고 하나 이상의 하기 마커의 메틸화 상태가 폐 NET이 없는 대상체에서 검정된 하나 이상의 마커의 메틸화 상태와 상이한 일부 실시형태에서, 이는 대상체가 폐 NET: SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A(표 9, 실시예 I 참조)를 가지고 있음을 나타낸다.
- [0054] 대상체로부터 수득된 샘플이 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)이고 하기 마커 중 하나 이상의 메틸화 상태가 소장 NET이 없는 대상체에서 검정된 하나 이상의 마커의 메틸화 상태와 상이한 일부 실시형태에서, 이는 대상체가 소장 NET: SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B,

CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A (표 9, 실시예 I 참조)을 가지고 있음을 나타낸다.

- [0055] 이 기술은, PNET 및/또는 다양한 형태의 NET(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)을 식별하는 것 및 구별하는 것에 관련된다. 일부 실시형태는 복수의 마커를 검정하는 것, 예를 들어, 2 내지 11 내지 100 또는 120 또는 198개의 마커(예를 들어, 1-4, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-18, 1-19, 1-20, 1-25, 1-50, 1-75, 1-100, 1-150, 1-198) (예를 들어, 2-4, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-25, 2-50, 2-75, 2-100, 2-198) (예를 들어, 3-4, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-25, 3-50, 3-75, 3-100, 3-198) (예를 들어, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18, 4-19, 4-20, 4-25, 4-50, 4-75, 4-100, 4-198) (예를 들어, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-11, 5-12, 5-13, 5-14, 5-15, 5-16, 5-17, 5-18, 5-19, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-198)를 검정하는 것을 포함한다.
- [0056] 이 기술은 평가된 메틸화 상태에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 샘플에서 마커의 메틸화 상태를 평가하는 것은 하나의 염기의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플에서 마커의 메틸화 상태를 검정하는 것은 복수의 염기에서 메틸화 정도를 결정하는 것을 포함한다. 더욱이, 일부 실시형태에서 마커의 메틸화 상태는 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 마커의 증가된 메틸화를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마커의 메틸화 상태는 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 마커의 감소된 메틸화를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마커의 메틸화 상태는 마커의 정상 메틸화 상태에 비해 마커의 다른 패턴의 메틸화를 포함한다.
- [0057] 또한, 일부 실시형태에서 마커는 100개 이하의 염기의 영역이고, 마커는 500개 이하의 염기의 영역이고, 마커는 1,000개 이하의 염기의 영역이고, 마커는 5,000개 이하의 염기의 영역이거나, 일부 실시형태에서, 마커는 하나의 염기이다. 일부 실시형태에서 마커는 높은 CpG 밀도 프로모터에 있다.
- [0058] 이 기술은 샘플 유형에 의해 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플(예를 들어, 채장 조직 샘플), 혈액 샘플(예를 들어, 혈장, 백혈구, 혈청, 전혈), 배설물 또는 소변 샘플이다.
- [0059] 또한, 이 기술은 메틸화 상태를 결정하는 데 사용되는 방법에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 검정은 메틸화 특이적 중합효소 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 또는 표적 포획을 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 기술은 메틸화 상태, 예를 들어, 합성에 의한 시퀀싱, 실시간(예를 들어, 단일 분자) 시퀀싱, 비드 에멀전 시퀀싱, 나노포어 시퀀싱 등을 결정하기 위해 대량 병렬 시퀀싱(massively parallel sequencing)(예를 들어, 차세대 시퀀싱)을 사용한다.
- [0060] 이 기술은 DMR을 검출하기 위한 시약을 제공하는데, 예를 들어, 일부 실시형태에서는 서열 식별 번호: 1-66에 의해 제공된 서열을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드 세트가 제공된다(표 5 참조). 일부 실시형태에서 DMR에서 염기를 갖는 염색체 영역에 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, DMR의 메틸화 상태에 민감한 올리고뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0061] 이 기술은 PNET을 식별하기 위해 사용되는 다양한 마커 패널을 제공하는데, 예를 들어, 일부 실시형태에서 마커는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B(표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조)인 주석을 갖는 염색체 영역을 포함한다.
- [0062] 키트 실시형태는, 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네클레리아 TET(NgTET), 코프리놉시스 시네레아(CcTET), 또는 이의 변이체), 유기 보란)을 포함하는 키트; DMR 1-198(표 1 및 3)로부터의 하나 이상의 서열을 포함하고 암이 없는 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조군 핵산이 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 설명된 바와 같은 바이설파이트 시약 및 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네클레리아 TET(NgTET), 코프리놉시스 시네레아(CcTET), 또는 이의 변이체), 유기 보란); 및/또는 DMR 1-198(표 1 및 3)로부터의 하나 이상의 서열을 포함하고 특정 유형의

암이 있는 대상체와 관련된 메틸화 상태를 갖는 대조군 핵산을 포함한다. 일부 키트 실시형태는, 대상체로부터의 샘플(예를 들어, 대변 샘플; 조직 샘플; 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전혈 샘플)을 수득하기 위한 샘플 수집기; 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존적 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리늄시스 시네레아(CcTET), 또는 그의 변이체), 유기 보란); 및 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0063] 이 기술은 조성물(예를 들어, 반응 혼합물)의 실시형태와 관련된다. 일부 실시형태에서, DMR 및 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리늄시스 시네레아(CcTET), 또는 그의 변이체), 유기 보란)을 포함하는 핵산을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시형태는 DMR을 포함하는 핵산 및 본원에 설명된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태는 DMR을 포함하는 핵산 및 메틸화 민감성 제한 효소를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태는 DMR을 포함하는 핵산 및 폴리머라제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0064] 대상체로부터 수득한 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 혈액 샘플; 대변 샘플)에서 PNET에 대한 스크리닝을 위한 추가 관련 방법 실시형태가 제공되는데, 예를 들어, 방법은 (표 1, 및 3로부터의) DMR 1-198 중 하나 이상인 DMR의 염기를 포함하는 샘플에서 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 대상체 샘플로부터의 마커의 메틸화 상태를 PNET이 없는 대상체로부터의 정상 대조군 샘플의 마커의 메틸화 상태와 비교하는 단계; 및 대상체 샘플의 메틸화 상태와 정상 대조군 샘플의 메틸화 상태 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고, p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 또는 0.0001이다. 방법의 일부 실시형태는 DMR을 포함하는 핵산을 메틸화 특이적 방식으로 핵산을 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리늄시스 시네레아(CcTET), 또는 그의 변이체), 유기 보란)과 반응시켜 예를 들어, 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산을 생산하는 단계; 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산을 시퀀싱하여 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 단계; 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 특정 유형의 암이 없는 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 두 서열의 차이를 확인하는 단계; 및 차이가 존재할 때 대상체가 PNET(예를 들어, PNET 및/또는 NET의 형태: 폐 NET, 소장 NET)을 갖는 것으로 식별하는 단계를 제공한다.

[0065] 대상체로부터 수득한 샘플에서 PNET를 스크리닝하기 위한 시스템이 상기 기술에 의해 제공된다. 시스템의 예시적인 실시형태는, 예를 들어, 대상체로부터 수득한 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 혈장 샘플; 대변 샘플)에서 PNET 및/또는 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)을 스크리닝하기 위한 시스템을 포함하며, 상기 시스템은 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 샘플의 메틸화 상태를 데이터베이스에 기록된 대조군 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태와 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 사용자에게 PNET 관련 메틸화 상태를 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함한다. 경고는 일부 실시형태에서 다중 검정(예를 들어, 표 1 및 표 3에 제공된 바와 같이 다중 마커, 예를 들어, DMR의 메틸화 상태 결정)으로부터 결과를 수신하고 여러 결과를 기반으로 보고하기 위한 값 또는 결과를 계산하는 소프트웨어 구성요소에 의해 결정된다. 일부 실시형태는 사용자(예를 들어, 의사, 간호사, 임상의 등)에게 보고하기 위한 값 또는 결과 및/또는 경고를 계산하는 데 사용하기 위해 본원에 제공된 각 DMR과 연관된 가중치 파라미터의 데이터베이스를 제공한다. 일부 실시형태에서 다중 검정으로부터의 모든 결과가 보고되고 일부 실시형태에서 하나 이상의 결과가 대상체에서 암 위험을 나타내는 다중 검정으로부터의 하나 이상의 결과의 복합에 기초하여 점수, 값 또는 결과를 제공하기 위해 사용된다.

[0066] 시스템의 일부 실시형태에서, 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시스템은 핵산을 분리하기 위한 구성요소, 샘플을 수집하기 위한 구성요소, 예컨대 대변 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 시스템은 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 데이터베이스는 PNET 및/또는 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)이 없는 대상체로부터의 핵산 서열을 포함한다. 또한, 핵산, 예를 들어, 핵산 세트가 제공되며, 각 핵산은 DMR을 포함하는 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산 세트는 그 각각의 핵산이 PNET 및/또는 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)이 없는 대상체로부터의 서열을 갖는다. 관련 시스템 실시형태는 설명된 바와 같은 핵산 세트 및 이 핵산 세트와 관련된 핵산 서열의 데이터베이스를 포함한다. 일부 실시형태는 메틸화-특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어,

메틸화-민감성 제한 효소, 메틸화-의존성 제한 효소, TET 효소(예를 들어, 인간 TET1, 인간 TET2, 인간 TET3, 쥐 TET1, 쥐 TET2, 쥐 TET3, 네글레리아 TET(NgTET), 코프리놉시스 시네레아(CcTET), 또는 이의 변이체), 유기 보란)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태는 핵산 시퀀서를 추가로 포함한다.

[0067] 특정 실시형태에서, 인간 환자의 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 혈액 샘플; 대변 샘플)을 특성화하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 이러한 실시형태는 인간 환자의 샘플로부터 DNA를 수득하는 단계; 표 1 및 3의 DMR 1-198으로 이루어진 군에서 선택된 차등적 메틸화 영역(DMR)의 염기를 포함하는 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 단계; 및 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 검정된 메틸화 상태를 PNET 및/또는 특정 유형의 NET(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)가 없는 인간 환자에 대한 하나 이상의 DNA 메틸화 마커에 대한 메틸화 수준 기준과 비교하는 단계를 포함한다.

[0068] 이러한 방법은 인간 환자의 특정 유형의 샘플로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 샘플은 체장 조직 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈장 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 자궁내막 조직 샘플, 혈액 샘플(예를 들어, 백혈구 샘플, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 혈청 샘플) 또는 소변 샘플이다.

[0069] 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 복수의 DNA 메틸화 마커(예를 들어, 1-4, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-18, 1-19, 1-20, 1-25, 1-50, 1-75, 1-100, 1-150, 1-198) (예를 들어, 2-4, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-25, 2-50, 2-75, 2-100, 2-198) (예를 들어, 3-4, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14, 3-15, 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-25, 3-50, 3-75, 3-100, 3-198) (예를 들어, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18, 4-19, 4-20, 4-25, 4-50, 4-75, 4-100, 4-198) (예를 들어, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-11, 5-12, 5-13, 5-14, 5-15, 5-16, 5-17, 5-18, 5-19, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 5-100, 5-198)를 검정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 2 내지 11개의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 12개 내지 120개의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 2 내지 198개의 DNA 메틸화 마커를 검정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 샘플에서 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 것을 포함하며, 하나의 염기의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 샘플에서 하나 이상의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 검정하는 것을 포함하며, 복수의 염기에서 메틸화 정도를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 순방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하거나 역방향 가닥의 메틸화 상태를 검정하는 것을 포함한다.

[0070] 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 100개 이하의 염기 영역이다. 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 500개 이하의 염기 영역이다. 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 1,000개 이하의 염기 영역이다. 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 5,000개 이하의 염기 영역이다. 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 하나의 염기이다. 일부 실시형태에서, DNA 메틸화 마커는 높은 CpG 밀도 프로모터에 있다.

[0071] 일부 실시형태에서, 검정은 메틸화 특이적 중합 효소 연쇄 반응, 핵산 서열 분석, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 또는 표적 포획을 사용하는 것을 포함한다.

[0072] 일부 실시형태에서, 검정은 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 메틸화 특이적 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 1-66(표 5)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0073] 일부 실시형태에서, ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B(표 6, 7 및 9, 실시예 I 참조)로 이루어진 군으로부터 선택된 주석을 갖는 염색체 영역은 DNA 메틸화 마커를 포함한다.

[0074] 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 2개의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 표 1 및 표 3의 행에 제공된 DNA 메틸화 마커 쌍의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함한다.

[0075] 특정 실시형태에서, 이 기술은 인간 환자로부터 수득한 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 백혈구 샘플; 혈장 샘플; 전혈 샘플; 혈청 샘플; 대변 샘플)을 특성화하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법은 표 1 및 표 3의 DMR 1-198으로 이루어진 군으로부터 선택된 DMR의 염기를 포함하는 샘플에서 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 환자 샘플의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태를 PNET 및/또는 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)이 없는 인간 대상체의 정상 대조군 샘플의 DNA 메틸화 마커의 메틸화 상태와 비교하는

단계; 및 인간 환자의 메틸화 상태와 정상 대조군 샘플의 메틸화 상태의 차이의 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 99.99%이고, p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 또는 0.0001이다.

[0076] 특정 실시형태에서, 이 기술은 인간 대상체로부터 수득한 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 혈액 샘플; 혈장 샘플; 전혈 샘플; 혈청 샘플; 대변 샘플)을 특성화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 DMR을 포함하는 핵산을 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약)과 반응시켜 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산을 생성하는 단계; 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산을 시퀀싱하여 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 단계; 메틸화 특이적 방식으로 변형된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 PNET가 없는 대상체의 DMR을 포함하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 두 서열의 차이를 확인하는 단계를 포함한다.

[0077] 특정 실시형태에서, 이 기술은 인간 대상체로부터 수득한 샘플(예를 들어, 체장 조직 샘플; 혈장 샘플; 대변 샘플)을 특성화하기 위한 시스템을 제공하며, 상기 시스템은 샘플의 메틸화 상태를 결정하도록 구성된 분석 구성요소, 샘플의 메틸화 상태를 데이터베이스에 기록된 대조군 샘플 또는 기준 샘플 메틸화 상태와 비교하도록 구성된 소프트웨어 구성요소, 및 메틸화 상태의 조합을 기반으로 단일 값을 결정하고 사용자에게 PNET 관련 메틸화 상태를 경고하도록 구성된 경고 구성요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 DMR을 포함하는 핵산을 포함한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 이러한 시스템은 핵산을 분리하기 위한 성분을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 시스템은 샘플을 수집하기 위한 구성요소를 추가로 포함한다.

[0079] 일부 실시형태에서, 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 자궁내막 조직 샘플, 혈액 샘플(예를 들어, 혈액 샘플, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 혈청 샘플) 또는 소변 샘플이다.

[0080] 일부 실시형태에서, 데이터베이스는 DMR을 포함하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 데이터베이스는 PNET이 없는 대상체로부터의 핵산 서열을 포함한다.

[0081] 추가 실시형태는 본원에 함유된 교시에 기초하여 관련 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 본 기술의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 어구가 하기에 정의된다. 추가 정의가 상세한 설명 전체에 명시되어 있다.

[0083] 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐, 다음 용어는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 본원에서 명시적으로 연관된 의미를 취한다. 본원에 사용된 "한 실시형태에서"라는 문구는 반드시 동일한 실시형태를 지칭하는 것은 아니지만, 그럴 수도 있다. 또한, 본원에 사용된 "다른 실시형태에서"라는 문구는 반드시 다른 실시형태를 지칭하는 것은 아니지만, 그럴 수도 있다. 따라서, 후술하는 바와 같이, 본 발명의 다양한 실시형태는 본 발명의 범위 또는 사상을 벗어나지 않고 쉽게 결합될 수 있다.

[0084] 또한, 본원에 사용된 용어 "또는"은 포괄적인 "또는" 연산자이며 문맥이 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"이라는 용어와 동일하다. "기반"이라는 용어는 배타적이지 않으며 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 설명되지 않은 추가 요소를 기반으로 할 수 있다. 또한, 명세서 전반에 걸쳐 "a", "an" 및 "the"의 의미는 복수형 인용을 포함한다. "~ 내에(in)"의 의미는 "~ 내에" 및 "~ 상에(on)"를 포함한다.

[0085] 본원의 청구범위에 사용된 연결구(transitional phrase) "본질적으로 이루어진"은, In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976)에 논의된 바와 같이, 청구범위를 특정 재료 또는 단계 "및 청구된 발명의 기본 및 신규 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들"로 제한한다. 예를 들어, 인용된 요소로 "본질적으로 이루어진" 조성물은 오염 물질이 비록 존재하더라도 순수한 조성물, 즉 인용된 요소로 "이루어진" 조성물과 비교하여 인용된 조성물의 기능을 변경하지 않는 수준으로 인용되지 않은 오염 물질을 함유할 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 "핵산" 또는 "핵산 분자"는 일반적으로 변형되지 않거나 변형된 DNA 또는 RNA일 수 있는 임의의 리보핵산 또는 데옥시리보핵산을 지칭한다. "핵산"은 제한 없이 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "핵산"은 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 상술한 바와 같은 DNA를 포함한다. 따라서 안정성이나 다른 이유로 변형된 백본을 가진 DNA는 "핵산"이다. 본원에 사용된 용어 "핵산"은 이러한 화학적으

로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태의 핵산뿐만 아니라, 예를 들어, 단순 및 복합 세포를 포함하는 바이러스 및 세포의 특징적인 DNA의 화학적 형태를 포함한다.

[0087] 용어 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상, 및 일반 적으로 10 개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 갖는 분자를 지칭한다. 정확한 크기는 많은 요인에 따라 달라지며, 이는 궁극적인 기능 또는 올리고뉴클레오타이드의 사용에 따라 달라진다. 올리고뉴클레오타이드는 화학적 합성, DNA 복제, 역전사 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 방식으로 생성될 수 있다. DNA의 전형적인 데옥시리보뉴클레오타이드는 티민, 아데닌, 사이토신 및 구아닌이다. RNA의 전형적인 리보뉴클레오타이드는 우라실, 아데닌, 사이토신 및 구아닌이다.

[0088] 본원에 사용된, 핵산의 "유전자 좌" 또는 "영역"이라는 용어는 핵산의 하위 영역, 예를 들어, 염색체상의 유전자, 단일 뉴클레오타이드, CpG 섬 등을 지칭한다.

[0089] 용어 "상보적(complementary)" 및 "상보성(complementarity)"은 염기쌍 규칙에 의해 관련된 뉴클레오타이드(예를 들어, 1개의 뉴클레오타이드) 또는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 뉴클레오타이드 서열)를 지칭한다. 예를 들어, 서열 5'-A-G-T-3'는 서열 3'-T-C-A-5'에 상보적이다. 상보성은 염기쌍 규칙에 따라 핵산 염기의 일부만 일치하는 "부분적"일 수 있다. 또는, 핵산 사이에 "완전한" 또는 "전체" 상보성이 있을 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥 사이의 하이브리드화의 효율성과 강도에 영향을 미친다. 이것은 증폭 반응과 핵산 사이의 결합에 의존하는 검출 방법에서 특히 중요하다.

[0090] 용어 "유전자"는 RNA, 또는 폴리펩타이드 또는 이의 전구체의 생산에 필요한 코딩 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA) 서열을 지칭한다. 기능성 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 원하는 활성 또는 기능적 특성(예를 들어, 효소 활성, 리간드 결합, 신호 전달 등)이 유지되는 한 전장 코딩 서열 또는 코딩 서열의 임의의 부분(portion)에 의해 코딩될 수 있다. 유전자와 관련하여 사용될 때 용어 "부분"은 그 유전자의 단편을 의미한다. 단편은 몇 개의 뉴클레오타이드부터 전체 유전자 서열에서 하나의 뉴클레오타이드를 뺀 크기까지 다양하다. 따라서 "유전자의 적어도 일부를 포함하는 뉴클레오타이드"는 유전자의 단편 또는 전체 유전자를 포함할 수 있다.

[0091] 용어 "유전자"는 또한 구조적 유전자의 코딩 영역을 포괄하고 유전자가 전장 mRNA(예를 들어, 코딩, 조절, 구조 및 기타 서열 포함)의 길이에 해당하도록, 예를 들어, 양 말단에서 약 1kb의 거리에 대해 5' 및 3' 말단 모두에서 코딩 영역에 인접하여 위치하는 서열을 포함한다. 코딩 영역의 5'에 위치하고 mRNA에 존재하는 서열은 5' 비번역(non-translated) 또는 미번역(untranslated) 서열로 지칭된다. 코딩 영역의 3' 또는 다운스트림에 위치하고 mRNA에 존재하는 서열은 3' 비번역 또는 3' 미번역 서열로 지칭된다. 용어 "유전자"는 유전자의 cDNA 및 게놈 형태를 모두 포함한다. 일부 유기체(예를 들어, 진핵생물)에서, 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론(intron)" 또는 "개재 영역(intervening region)" 또는 "개재 서열(intervening sequence)"이라고 하는 비코딩 서열로 중단된 코딩 영역을 함유한다. 인트론은 핵 RNA(hnRNA)로 전사되는 유전자의 일부이다; 인트론은 인핸서(enhancer)와 같은 조절 요소를 함유할 수 있다. 인트론은 핵 또는 1차 성적표에서 제거되거나 "분리"된다. 따라서 인트론은 메신저 RNA(mRNA) 전사체에 없다. mRNA는 번역 중에 기능하여 초기(nascent) 폴리펩타이드에서 아미노산의 서열 또는 순서를 지정한다.

[0092] 인트론을 함유하는 것 외에도, 유전자의 게놈 형태는 RNA 전사체에 존재하는 서열의 5' 및 3' 말단 모두에 위치한 서열을 포함할 수도 있다. 이들 서열은 "플랭킹(flanking)" 서열 또는 영역으로 지칭된다(이들 플랭킹 서열은 mRNA 전사체에 존재하는 비번역 서열에 대해 5' 또는 3'에 위치함). 5' 플랭킹 영역은 유전자의 전사를 제어하거나 전사에 영향을 미치는 프로모터 및 인핸서와 같은 조절 서열을 함유할 수 있다. 3' 플랭킹 영역은 전사의 종결, 전사 후 절단 및 폴리아데닐화를 지시하는 서열을 함유할 수 있다.

[0093] 유전자를 인용할 때 용어 "야생형"은 자연 발생 공급원으로부터 분리된 유전자의 특성이 있는 유전자를 지칭한다. 유전자 산물을 인용할 때 용어 "야생형"은 자연 발생 공급원으로부터 분리된 유전자 산물의 특성이 있는 유전자 산물을 지칭한다. 대상물에 적용되는 용어 "자연 발생"은 대상물이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 분리될 수 있고 실험실에서 사람의 손에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열은 자연 발생인 것이다. 야생형 유전자는 종종 집단에서 가장 빈번하게 관찰되는 유전자 또는 대립 유전자이며, 따라서 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형태로 임의로 지정된다. 대조적으로, 유전자 또는 유전자 산물을 인용할 때 용어 "변형된" 또는 "돌연변이"는 야생형 유전자 또는 유전자 산물과 비교할 때 각각 서열 및/또는 기능적 특성(예를 들어, 변경된 특성)에서 변형을 나타내는 유전자 또는 유전자 산물을 지칭한다. 자연 발생 돌연변이는 분리될 수 있음을 주목

한다; 이들은 야생형 유전자 또는 유전자 산물과 비교할 때 특성이 변경되었다는 사실로 확인된다.

- [0094] 용어 "대립 유전자"는 유전자의 변이를 지칭하며; 변이는 변이체 및 돌연변이체, 다형성 유전자 좌, 및 단일 뉴클레오타이드 다형성 유전자 좌, 프레임시프트(frameshift) 및 스플라이스 돌연변이를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 대립 유전자는 집단에서 자연 발생하거나 집단의 임의의 특정 개체의 일생 동안 발생할 수 있다.
- [0095] 뉴클레오타이드 서열에 관하여 사용될 때 용어 "변이체" 및 "돌연변이체"는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 다른, 일반적으로 관련된 뉴클레오타이드 산 서열과 다른 핵산 서열을 지칭한다. "변이"는 2개의 다른 뉴클레오타이드 서열 간의 차이이다; 전형적으로 하나의 서열이 기준 서열이다.
- [0096] "증폭"은 템플릿 특이성을 포함하는 핵산 복제의 특별한 경우이다. 이는 비특이적 템플릿 복제(예를 들어, 템플릿에 따라 다르지만 특정 템플릿에 의존하지 않는 복제)와 대조된다. 여기서 템플릿 특이성은 복제 충실도(예를 들어, 적절한 폴리뉴클레오타이드 서열의 합성) 및 뉴클레오타이드(리보- 또는 데옥시리보-) 특이성과 구별된다. 템플릿 특이성은 "표적" 특이성 측면에서 자주 설명된다. 표적 서열은 다른 핵산으로부터 분류하고자 하는 의미에서 "표적"이다. 증폭 기술은 주로 이러한 분류를 위해 설계되었다.
- [0097] 핵산과 관련하여 용어 "증폭하는(amplifying)" 또는 "증폭(amplification)"은 전형적으로 소량의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 단일 폴리뉴클레오타이드 분자)로부터 시작하는 폴리뉴클레오타이드의 다중 카피 또는 폴리뉴클레오타이드의 일부의 생성을 의미하고, 여기서 증폭 산물 또는 앰플리콘이 일반적으로 검출될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 증폭은 다양한 화학적 및 효소적 과정을 포함한다. 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction, LCR; 예를 들어, 미국 특허 제5,494,810호 참조; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨) 동안 표적 또는 템플릿 DNA 분자의 하나 또는 몇 개의 카피로부터 다중 DNA 카피의 생성은 증폭의 형태이다. 추가 유형의 증폭은 대립 유전자 특이적 PCR(예를 들어, 미국 특허 제5,639,611호 참조; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 어셈블리 PCR(참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,965,408호; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 헬리카제 의존적 증폭(참조: 예를 들어, 미국 특허 제7,662,594호; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 핫-스타트 PCR(참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,773,258호 및 제5,338,671호; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 서열간 특이적 PCR, 역 PCR(참조: 예를 들어, Triglia, *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16: 8186; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 결합 매개된 PCR(참조: 예를 들어, Guilfoyle, R. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 25: 185-4-1858 (1997); 미국 특허 제5,508,169호; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 메틸화 특이적 PCR(참조: 예를 들어, Herman, *et al.*, (1996) *PNAS* 93(13) 9821-9826 참조; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 미니프라이머 PCR, 다중 결합 의존성 프로브 증폭(참조: 예를 들어, Schouten, *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Research* 30 (12): e57; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 다중 PCR(참조: 예를 들어, 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; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 네스티드(nested) PCR, 중첩-확장 PCR(참조: 예를 들어, Higuchi, *et al.*, (1988) *Nucleic Acids Research* 16 (15) 7351-7367; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 실시간 PCR(참조: 예를 들어, Higuchi, *et al.*, (1992) *Biotechnology* 10: 413 -417; Higuchi, *et al.*, (1993) *Biotechnology* 11: 1026-1030; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 역전사 PCR(참조: 예를 들어, Bustin, SA (2000) *J. Molecular Endocrinology* 25: 169-193 참조; 그 전체가 본원에 참조로 포함됨), 고체상 PCR, 열 비대칭 인터레이스(thermal asymmetric interlaced) PCR 및 터치다운(Touchdown) PCR(참조: 예를 들어, Don, *et al.*, *Nucleic Acids Research* (1991) 19(14) 4008; Roux, K. (1994) *Biotechniques* 16(5) 812-814; Hecker, *et al.*, (1996) *Biotechniques* 20(3) 478-485; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 증폭은 또한 디지털 PCR을 사용하여 수행할 수 있다(참조: 예를 들어, Kalinina, *et al.*, *Nucleic Acids Research*. 25; 1999-2004, (1997); Vogelstein and Kinzler, *Proc Natl Acad Sci USA*. 96; 9236-41, (1999); 국제 특허 공개 제W005023091A2호; 미국 특허출원공보 제20070202525호; 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).
- [0098] 용어 "중합효소 연쇄 반응"("PCR")은 클로닝 또는 정제 없이 게놈 또는 기타 DNA 또는 RNA의 혼합물에서 표적 서열의 세그먼트 농도를 증가시키는 방법을 설명하는 K.B. Mullis 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,965,188호의 방법을 지칭한다. 표적 서열을 증폭하기 위한 이 과정은 원하는 표적 서열을 함유하는 DNA 혼합물에 과량의 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 도입한 다음, DNA 중합효소의 존재하에 정확한 순서의 열 순환을 도입하는 것으로 구성된다. 상기 2개의 프라이머는 이중 가닥 표적 서열의 각 가닥에 대해 상보적이다. 증폭을 수행하기 위해, 상기 혼합물을 변성시키고 상기 프라이머를 표적 분자 내의 상보적 서열에 어닐링한다. 어닐링 후, 상기 프라이머는 새로운 쌍의 상보적 가닥을 형성하기 위해 중합효소로 확장된다. 변성, 프라이머 어닐링 및 중합효소 연장 단계를 여러 번 반복(즉, 변성, 어닐링 및 연장은 하나의 "주기"를 구성한다; 여러

"주기"가 있을 수 있다)하여 원하는 표적 서열의 고농도의 증폭된 세그먼트를 수득할 수 있다. 원하는 표적 서열의 증폭된 세그먼트의 길이는 서로에 대한 프라이머의 상대적 위치에 의해 결정되므로, 이 길이는 제어 가능한 매개변수이다. 공정의 반복적인 측면으로 인해, 이 방법은 "중합효소 연쇄 반응"("PCR")으로 지칭된다. 표적 서열의 원하는 증폭된 세그먼트가 상기 혼합물에서 우세한 서열(농도 측면)이 되기 때문에, 이들은 "PCR 증폭"이라고 하며 "PCR 산물" 또는 "앰플리콘"이다. 당해 분야의 기술자는 용어 "PCR"이, 예를 들어, 실시간 PCR, 중첩된 PCR, 역전사 PCR(RT-PCR), 단일 프라이머 및 임의로 프라이밍된 PCR 등을 사용하는 원래 기재된 방법의 많은 변이체를 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0099] 템플릿 특이성은 효소 선택에 의해 대부분의 증폭 기술에서 달성된다. 증폭 효소는 사용되는 조건에서 이중의 핵산 혼합물에서 특정 핵산 서열만 처리하는 효소이다. 예를 들어, Q-베타 복제효소(Q-beta replicase)의 경우 MDV-1 RNA는 상기 복제효소에 대한 특정 템플릿이다(Kacian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 3038 [1972]). 다른 핵산은 이 증폭 효소에 의해 복제되지 않는다. 유사하게, T7 RNA 중합효소의 경우, 이 증폭 효소는 자체 프로모터에 대해 엄격한 특이성을 가지고 있다(Chamberlin et al, Nature, 228: 227 [1970]). T4 DNA 리가아제의 경우, 이 효소는 결찰 접합부에서 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 기질과 템플릿 사이에 불일치가 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 결찰하지 않는다(Wu and Wallace (1989) Genomics 4: 560). 마지막으로, 고온에서 기능할 수 있는 능력으로 인해 내열성 템플릿 의존성 DNA 중합효소(예를 들어, Taq 및 Pfu DNA 중합효소)는 경계가 있는 서열에 대해 높은 특이성을 나타내므로 프라이머에 의해 정의된다; 상기 고온은 비표적 서열과의 혼성화가 아닌 표적 서열과의 프라이머 혼성화를 선호하는 열역학적 조건을 초래한다(H.A. Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press [1989]).

[0100] 본원에 사용된 용어 "핵산 검출 검정"은 관심 핵산의 뉴클레오타이드 조성을 결정하는 임의의 방법을 지칭한다. 핵산 검출 검정은 DNA 시퀀싱 방법, 프로브 혼성화 방법, 구조 특이적 절단 검정(예를 들어, INVADER 검정(Hologic, Inc.))이고, 예를 들어, 모든 목적을 위해 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제 5,846,717호, 제5,985,557호, 제5,994,069호, 제6,001,567호, 제6,090,543호 및 제6,872,816호; Lyamichev et al., Nat. Biotech., 17: 292 (1999), Hall et al., PNAS, USA, 97: 8272 (2000) 및 미국 특허 제9,096,893호에 기술되어 있음); 효소 불일치 절단 방법(예를 들어, Variagenics, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,110,684호, 제5,958,692호, 제5,851,770호); 상술한 중합효소 연쇄 반응(PCR); 분지형 혼성화 방법(예를 들어, Chiron, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,849,481호, 제5,710,264호, 제5,124,246호 및 제5,624,802호); 롤링 서클 복제(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,210,884호, 제6,183,960호 및 제6,235,502호); NASBA(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,409,818호); 분자 비콘(beacon) 기술(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,150,097호); E-센서 기술(Motorola, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,248,229호, 제6,221,583호, 제6,013,170호 및 제6,063,573호); 사이클링 프로브 기술(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,403,711호, 제5,011,769호 및 제5,660,988호); Dade Behring 신호 증폭 방법(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제6,121,001호, 제6,110,677호, 제5,914,230호, 제5,882,867호 및 제5,792,614호); 리가아제 연쇄 반응(예를 들어, Baranay Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 189-93 (1991)); 및 샌드위치 혼성화 방법(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제5,288,609호)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0101] 용어 "증폭 가능한 핵산"은 임의의 증폭 방법에 의해 증폭될 수 있는 핵산을 지칭한다. "증폭 가능한 핵산"은 일반적으로 "샘플 템플릿"을 포함하는 것으로 고려된다.

[0102] 용어 "샘플 템플릿"은 "표적"(아래 정의됨)의 존재에 대해 분석된 샘플에서 유래한 핵산을 의미한다. 대조적으로, "배경 템플릿"은 샘플에 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 샘플 템플릿 이외의 핵산과 관련하여 사용된다. 배경 템플릿은 대부분 우연에 의한 것이다. 이것은 캐리오버(carryover)의 결과이거나 샘플로부터 정제하려는 핵산 오염 물질의 존재 때문일 수 있다. 예를 들어, 검출되지 않은 유기체로부터의 핵산은 테스트 샘플에서 배경으로 존재할 수 있다.

[0103] 용어 "프라이머"는, 예를 들어, 제한 분해(restriction digest)로부터의 핵산 단편으로서 자연 발생하거나 합성적으로 생성되는 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며, 이는 핵산 템플릿 가닥에 상보적인 프라이머 확장 산물의 합성이 유도되는 조건하에(예를 들어, 뉴클레오타이드, 및 DNA 중합 효소와 같은 유도제의 존재하에 적절한 온도 및 pH에서) 배치될 때 합성 개시점으로서 작용할 수 있다. 프라이머는 증폭에서 최대 효율을 위해 바람직하게는 단일 가닥이지만, 대안적으로 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥이면, 프라이머는 확장 산물을 준비하는 데 사용되기 전에 먼저 그 가닥을 분리하기 위해 처리된다. 바람직하게는, 프라이머는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드이다. 프라이머는 유도제의 존재하에 연장 산물의 합성을 프라이밍하기에 충분히 길어야 한다. 프라이머의

정확한 길이는 온도, 프라이머 공급원 및 방법 사용을 포함한 여러 요인에 따라 달라진다.

[0104] 용어 "프로브"는 정제된 제한 분해에서와 같이 자연 발생하는 합성, 재조합 또는 PCR 증폭에 의해 생성되는 관계없이 다른 관심 올리고뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 뉴클레오타이드 서열)를 지칭한다. 프로브는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 프로브는 특정 유전자 서열의 검출, 식별 및 분리에 유용하다(예를 들어, "포획 프로브(capture probe)"). 본 발명에 사용되는 임의의 프로브는 일부 실시 형태에서 임의의 "리포터 분자(reporter molecule)"로 표지(label)될 수 있으며, 이에 제한되지는 않지만 효소(예를 들어, ELISA 뿐만 아니라 효소 기반 조직화학 검정), 형광, 방사성 및 발광 시스템을 포함하는 임의의 검출 시스템에서 검출될 수 있는 것으로 고려된다. 본 발명이 임의의 특정 검출 시스템 또는 표지로 제한되는 것은 아니다.

[0105] 본원에 사용된 용어 "표적"은, 예를 들어, 프로브 결합, 증폭, 분리, 포획 등에 의해 다른 핵산으로부터 분류하고자 하는 핵산을 지칭한다. 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응과 관련하여 사용될 때, "표적"은 중합효소 연쇄 반응에 사용되는 프라이머에 의해 결합된 핵산의 영역을 지칭하는 반면, 표적 DNA가 증폭되지 않은 검정에서 사용될 때, 예를 들어, 침습성 절단 검정의 일부 실시형태에서, 표적은 프로브 및 침습성 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, INVADER 올리고뉴클레오타이드)가 결합하여 침습성 절단 구조를 형성하여 표적 핵산의 존재가 검출될 수 있는 부위를 포함한다. "세그먼트"는 표적 서열 내의 핵산 영역으로 정의된다.

[0106] 따라서, 본원에 사용된 "비표적(non-target)"은 예를 들어 DNA와 같은 핵산을 설명하는 데 사용되는 것으로서 반응에 존재할 수 있지만 반응에 의한 검출 또는 특성화의 대상이 아닌 핵산을 의미한다. 일부 실시형태에서, 비-표적 핵산은 예를 들어, 표적 서열을 포함하지 않는 샘플에 존재하는 핵산을 지칭할 수 있는 반면, 일부 실시형태에서, 비-표적은 외인성 핵산, 즉, 표적 서열을 함유하지 않는 핵산을 지칭할 수 있다. 표적 핵산을 함유하거나 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 유래하지 않고, 예를 들어 반응에서 효소(예: 중합효소)의 활성을 정상화하여 반응에서 효소 성능의 가변성을 감소시키기 위해 반응에 추가됩니다. 본원에 사용된 "메틸화"는 사이토신의 C5 또는 N4 위치, 아데닌의 N6 위치, 또는 다른 유형의 핵산 메틸화에서의 사이토신 메틸화를 지칭한다. 일반적인 시험관 내 DNA 증폭 방법은 증폭 템플릿의 메틸화 패턴을 유지하지 않기 때문에 시험관 내 증폭된 DNA는 일반적으로 메틸화되지 않는다. 그러나, "메틸화되지 않은 DNA" 또는 "메틸화 DNA"는 또한 본래 템플릿이 각각 메틸화되지 않은 또는 메틸화된 증폭된 DNA를 지칭할 수 있다.

[0107] 본 명세서에 사용된 용어 "증폭 시약"은 프라이머, 핵산 주형 및 증폭 효소를 제외하고 증폭에 필요한 시약(테옥시리보뉴클레오타이드 삼인산, 완충액 등)을 의미한다. 통상적으로, 다른 반응 성분과 함께 증폭 시약이 반응 용기에 넣어져 포함된다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 검출 또는 분석과 관련하여 사용될 때 용어 "대조군"은 실험적 표적(예를 들어, 알려지지 않은 농도의 핵산)과 비교하여 사용하기 위한 알려진 특징(예를 들어, 알려진 서열, 셀 당 알려진 카피-번호)을 갖는 핵산을 지칭한다. 대조군은 검정에서 시험 또는 표적 핵산이 정규화될 수 있는 내인성, 바람직하게는 불변 유전자일 수 있다. 예를 들어, 샘플 프로세싱, 검정 효율성 등에서 발생할 수 있는 샘플 대 샘플 변동에 대한 이러한 정규화 대조는 정확한 샘플 대 샘플 데이터 비교를 허용한다. 인간 샘플에서 핵산 검출 검정을 표준화하기 위해 사용되는 유전자는 예를 들어 β -액틴, ZDHHC1 및 B3GALT6을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 출원 일련 번호 제14/966,617호 및 제62/364,082호 참조, 이들 각각은 본원에 참조로 포함됨).

[0109] 대조군은 외부에 있을 수도 있다. 예를 들어, qPCR, QuARTS 등과 같은 정량적 검정에서, "교정기" 또는 "교정 대조군"은 알려진 서열의 핵산, 예를 들어 실험 표적 핵산의 일부와 동일한 서열, 및 알려진 농도 또는 일련의 농도(예를 들어, 정량적 PCR에서 곡선의 교정 생성을 위한 연속 희석된 대조 표적)를 갖는 핵산이다. 통상적으로, 교정 대조군은 실험 DNA에 사용되는 것과 동일한 시약 및 반응 조건을 사용하여 분석된다. 특정 실시형태에서, 교정기의 측정은 실험 분석과 동시에, 예를 들어 동일한 열 순환기에서 수행된다. 바람직한 실시형태에서, 상이한 교정기 서열이 등물량으로 용이하게 제공되도록 다중 교정기가 단일 플라스미드에 포함될 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 플라스미드 교정기는, 예를 들어, 하나 이상의 제한 효소로 분해되어 플라스미드 벡터로부터 교정기 부분을 방출한다. 예를 들어, WO 제2015/066695호(본 명세서에 참고로 포함됨)를 참조한다.

[0110] 본원에 사용된 "ZDHHC1"은, Chr 16(16q22.1)의 인간 DNA에 위치되고 DHHC 팔미토일트랜스퍼라제 계열에 속하는, 징크 핑거, 1을 함유하는 DHHC 유형을 특징으로 하는 단백질을 인코딩하는 유전자를 지칭한다. 본원에 사용된 "메틸화"는 사이토신의 C5 또는 N4 위치, 아데닌의 N6 위치, 또는 다른 유형의 핵산 메틸화에서의 사이토신 메틸화를 지칭한다. 일반적인 시험관 내 DNA 증폭 방법은 증폭 템플릿의 메틸화 패턴을 유지하지 않기 때문에 시험관 내 증폭된 DNA는 일반적으로 메틸화되지 않는다. 그러나, "메틸화되지 않은 DNA" 또는 "메틸화 DNA"는 또

한 본래 템플릿이 각각 메틸화되지 않은 또는 메틸화된 증폭된 DNA를 지칭할 수 있다.

- [0111] 본원에 사용된 "메틸화"는 사이토신의 C5 또는 N4 위치, 아데닌의 N6 위치, 또는 다른 유형의 핵산 메틸화에서의 사이토신 메틸화를 지칭한다. 일반적인 시험관 내 DNA 증폭 방법은 증폭 템플릿의 메틸화 패턴을 유지하지 않기 때문에 시험관 내 증폭된 DNA는 일반적으로 메틸화되지 않는다. 그러나, "메틸화되지 않은 DNA" 또는 "메틸화 DNA"는 또한 본래 템플릿이 각각 메틸화되지 않은 또는 메틸화된 증폭된 DNA를 지칭할 수 있다.
- [0112] 따라서, 본원에 사용된 "메틸화 뉴클레오타이드" 또는 "메틸화 뉴클레오타이드 염기"는 뉴클레오타이드 염기상의 메틸 모이어티의 존재를 지칭하며, 여기서 메틸 모이어티는 인식된 전형적인 뉴클레오타이드 염기에 존재하지 않는다. 예를 들어, 사이토신은 피리미딘 고리에 메틸 모이어티를 함유하지 않지만 5-메틸사이토신은 피리미딘 고리의 5 위치에 메틸 모이어티를 함유한다. 따라서 사이토신은 메틸화 뉴클레오타이드가 아니며 5-메틸사이토신은 메틸화 뉴클레오타이드이다. 또 다른 예에서, 티민은 피리미딘 고리의 5 위치에 메틸 모이어티를 함유한다; 그러나, 본원의 목적상 티민은 DNA의 전형적인 뉴클레오타이드 염기이기 때문에 DNA에 존재할 때 메틸화 뉴클레오타이드로 간주되지 않는다.
- [0113] 본원에 사용된 "메틸화 핵산 분자"는 하나 이상의 메틸화 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산 분자를 지칭한다.
- [0114] 본원에 사용된, 핵산 분자의 "메틸화 상태(methylation state)", "메틸화 프로파일(methylation profile)" 및 "메틸화 정도(methylation status)"는 핵산 분자에 하나 이상의 메틸화 뉴클레오타이드 염기가 존재하지 않는 것을 지칭한다. 예를 들어, 메틸화 사이토신을 함유하는 핵산 분자는 메틸화된 것으로 간주된다(예를 들어, 핵산 분자의 메틸화 상태는 메틸화된). 메틸화 뉴클레오타이드를 함유하지 않는 핵산 분자는 메틸화되지 않은 것으로 간주된다.
- [0115] 특정 핵산 서열(예를 들어, 유전자 마커 또는 본원에 기술된 DNA 영역)의 메틸화 상태는 서열 내 모든 염기의 메틸화 상태를 나타낼 수 있거나, 서열 내 (예를 들어, 하나 이상의 사이토신의) 염기의 서브세트의 메틸화 상태를 나타낼 수 있거나, 메틸화가 발생하는 서열 내 위치에 대한 정확한 정보를 제공하거나 제공하지 않고 서열 내 국소적 메틸화 밀도에 관한 정보를 나타낼 수 있다.
- [0116] 핵산 분자에서 뉴클레오타이드 유전자 좌의 메틸화 상태는 핵산 분자의 특정 유전자 좌에서 메틸화 뉴클레오타이드의 존재 또는 부재를 의미한다. 예를 들어, 핵산 분자의 7번째 뉴클레오타이드에 존재하는 뉴클레오타이드가 5-메틸사이토신일 때, 핵산 분자의 7번째 뉴클레오타이드에서의 사이토신의 메틸화 상태는 메틸화된. 유사하게, 핵산 분자의 7번째 뉴클레오타이드에 존재하는 뉴클레오타이드가 사이토신(5-메틸사이토신이 아님)일 때, 핵산 분자의 7번째 뉴클레오타이드에서의 사이토신의 메틸화 상태는 메틸화되지 않는다.
- [0117] 메틸화 상태는 선택적으로 (예를 들어, 메틸화 빈도, 분율, 비율, 백분율 등을 나타내는) "메틸화 값"으로 표시되거나 나타낼 수 있다. 메틸화 값은, 예를 들어, 메틸화 의존성 제한 효소로 제한 분해 후 존재하는 온전한 핵산의 양을 정량화하여 또는 바이설파이트 반응 후 증폭 프로파일을 비교하여 또는 바이설파이트 처리된 핵산과 처리되지 않은 핵산의 서열을 비교하여 생성할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 메틸화 값과 같은 값은 메틸화 상태를 나타내므로 유전자 좌의 여러 카피에 걸쳐 메틸화 정도의 정량 지표로 사용될 수 있다. 이것은 샘플에서 서열의 메틸화 정도를 역치 또는 기준 값과 비교하는 것이 바람직한 경우에 특히 유용하다.
- [0118] 일부 실시형태에서, 샘플은 대변 샘플, 조직 샘플, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 혈청 샘플) 또는 소변 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 위 분비물, 체장액, 뇌척수액(CSF) 샘플, 위장 생검 샘플 및/또는 대변에서 회수된 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 샘플은 임파선, 유방, 간, 담관, 체장, 위, 결장, 직장, 식도, 소장, 충수, 십이지장, 폴립, 담낭, 항문 및/또는 복막의 세포, 분비물 또는 조직을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 세포액, 복수, 소변, 대변, 위 절편, 체장액, 내시경 검사 중에 얻은 체액, 혈액을 포함한다.
- [0119] 본원에 사용된 "메틸화 빈도" 또는 "메틸화 백분율(%)"은 분자 또는 유전자 좌가 메틸화되지 않은 경우의 수에 비해 분자 또는 유전자 좌가 메틸화되는 경우의 수를 의미한다.
- [0120] 따라서, 메틸화 상태는 핵산(예를 들어, 게놈 서열)의 메틸화 정도를 설명한다. 또한, 메틸화 상태는 메틸화와 관련된 특정 게놈 유전자 좌에서 핵산 세그먼트의 특성을 나타낸다. 이러한 특성에는 이 DNA 서열 내의 임의의 사이토신(C) 잔기가 메틸화되었는지 여부, 메틸화 C 잔기(들)의 위치, 핵산의 임의의 특정 영역 전체에 걸친 메틸화 C의 빈도 또는 백분율, 및, 예를 들어, 대립 유전자의 기원 차이로 인한 메틸화의 대립 유전자 차이가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 용어 "메틸화 상태", "메틸화 프로파일" 및 "메틸화 정도"는 또한 생물학적 샘플에서 핵산의 임의의 특정 영역에 걸친 메틸화 C 또는 비메틸화 C의 상대 농도, 절대 농도 또는 패턴을

지칭한다. 예를 들어, 핵산 서열 내의 사이토신(C) 잔기(들)가 메틸화되면 "과메틸화" 또는 "증가된 메틸화"로 지칭될 수 있는 반면, DNA 서열 내의 사이토신(C) 잔기(들)가 메틸화되지 않으면 "저메틸화" 또는 "감소된 메틸화"로 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 핵산 서열 내의 사이토신(C) 잔기(들)가 (예를 들어, 다른 영역 또는 다른 개체 등으로부터의) 다른 핵산 서열과 비교하여 메틸화되면, 그 서열은 다른 핵산 서열과 비교하여 과메틸화되거나 메틸화가 증가된 것으로 간주된다. 대안적으로, DNA 서열 내의 사이토신(C) 잔기(들)가 (예를 들어, 다른 영역 또는 다른 개체 등으로부터의) 다른 핵산 서열과 비교하여 메틸화되지 않으면, 그 서열은 다른 핵산 서열과 비교하여 저메틸화되거나 메틸화가 감소된 것으로 간주된다. 추가로, 본원에 사용된 용어 "메틸화 패턴"은 핵산 영역에 걸친 메틸화 및 비메틸화 뉴클레오타이드의 집합적 부위를 지칭한다. 메틸화 및 비메틸화 뉴클레오타이드의 수가 영역 전체에서 동일하거나 유사하지만 메틸화 및 비메틸화 뉴클레오타이드의 위치가 다를 때 2개의 핵산은 동일하거나 유사한 메틸화 빈도 또는 메틸화 백분율을 가질 수 있지만 다른 메틸화 패턴을 가질 수 있다. 서열은 정도(예를 들어, 하나가 다른 것에 비해 메틸화가 증가 또는 감소함), 빈도 또는 메틸화 패턴면에서 다를 때 "차등적으로 메틸화"된다고 하거나 "메틸화 차이" 또는 "다른 메틸화 상태"를 갖는다고 한다. 용어 "차등 메틸화"는 암 음성 샘플에서 핵산 메틸화의 수준 또는 패턴과 비교한 암 양성 샘플에서 핵산 메틸화의 수준 또는 패턴의 차이를 의미한다. 또한, 수술 후 암이 재발한 환자와 재발하지 않은 환자 간의 수준이나 패턴의 차이를 지칭할 수도 있다. 차등 메틸화 및 DNA 메틸화의 특정 수준 또는 패턴은, 예를 들어, 올바른 컷오프 (cut-off) 또는 예측 특성이 정의되면 예후 및 예측 바이오마커이다.

[0121] 메틸화 상태 빈도는 개체 집단 또는 단일 개체의 샘플을 설명하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 메틸화 상태 빈도가 50%인 뉴클레오타이드 유전자 좌는 사례의 50%가 메틸화되고 사례의 50%는 메틸화되지 않는다. 이러한 빈도는, 예를 들어, 뉴클레오타이드 유전자 좌 또는 핵산 영역이 개체 집단 또는 핵산 집합에서 메틸화되는 정도를 설명하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 핵산 분자의 첫 번째 집단 또는 풀의 메틸화가 핵산 분자의 두 번째 집단 또는 풀의 메틸화와 다를 때, 첫 번째 집단 또는 풀의 메틸화 상태 빈도는 두 번째 집단 또는 풀의 메틸화 상태 빈도와 다를 것이다. 이러한 빈도는 또한, 예를 들어, 단일 개체에서 뉴클레오타이드 유전자 좌 또는 핵산 영역이 메틸화되는 정도를 설명하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 빈도는 조직 샘플의 세포 그룹이 뉴클레오타이드 유전자 좌 또는 핵산 영역에서 메틸화되거나 메틸화되지 않는 정도를 설명하는 데 사용될 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 "뉴클레오타이드 유전자 좌"는 핵산 분자에서 뉴클레오타이드의 위치를 의미한다. 메틸화 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 유전자 좌는 핵산 분자에서 메틸화 뉴클레오타이드의 위치를 의미한다.

[0123] 전형적으로, 인간 DNA의 메틸화는 인접한 구아닌 및 사이토신을 포함하는 디 뉴클레오타이드 서열에서 발생하며, 여기서 사이토신은 구아닌의 5'에 위치한다(CpG 디뉴클레오타이드 서열이라고도 함). CpG 디뉴클레오타이드 내의 대부분의 사이토신은 인간 게놈에서 메틸화되지만, 일부는 CpG 섬으로 알려진 특정 CpG 디뉴클레오타이드가 풍부한 게놈 영역에서 메틸화되지 않은 채로 남아 있다(참조: 예를 들어, Antequera et al. (1990) *Cell* **62** : 503-514).

[0124] 본원에 사용된 "CpG 섬"은 전체 게놈 DNA에 비해 증가된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 함유하는 게놈 DNA의 G:C가 풍부한 영역을 지칭한다. CpG 섬은 길이가 적어도 100개, 200개 또는 그 이상의 염기쌍일 수 있으며, 여기서 상기 영역의 G:C 함량은 적어도 50%이고 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도의 비율은 0.6이다; 일부 사례에서 CpG 섬은 길이가 적어도 500개의 염기쌍일 수 있으며, 여기서 상기 영역의 G:C 함량은 55% 이상이고 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도의 비율은 0.65이다. 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도는 Gardiner-Garden et al (1987) *J. Mol. Biol.* **196**: 261-281에 제공된 방법에 따라 계산할 수 있다. 예를 들어, 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도는 공식 $R = (A \times B) / (C \times D)$ 에 따라 계산할 수 있는데, 여기서 R은 예상 빈도에 대한 관찰된 CpG 빈도의 비율이고, A는 분석된 서열의 CpG 디뉴클레오타이드의 수이고, B는 분석된 서열의 총 뉴클레오타이드 수이고, C는 분석된 서열의 총 C 뉴클레오타이드 수이고, D는 분석된 서열의 총 G 뉴클레오타이드 수이다. 메틸화 상태는 일반적으로, 예를 들어, 프로모터 영역의 CpG 섬으로 결정된다. 인간 게놈의 다른 서열은 CpA 및 CpT와 같은 DNA 메틸화에 취약하다는 것을 알 수 있을 것이다(참조: Ramsahoye (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5237-5242; Salmon 및 Kaye (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* **204**: 340-351; Grafstrom (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**: 2827-2842; Nyce (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**: 4353-4367; Woodcock (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **145**: 888-894).

[0125] 본원에 사용된 "메틸화 특이적 시약"은 핵산 분자의 메틸화 상태의 함수로서 핵산 분자의 뉴클레오타이드를 변형하는 시약을 지칭하거나, 메틸화 특이적 시약을 지칭하고, 핵산 분자의 메틸화 상태를 반영하는 방식으로 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 변경할 수 있는 화합물 또는 조성물 또는 다른 제제를 지칭한다. 핵산 분자를

그러한 시약으로 처리하는 방법은, 원하는 경우, 뉴클레오타이드 서열의 원하는 변화를 달성하기 위해 추가 단계와 함께 핵산 분자를 상기 시약과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 메틸화되지 않은 뉴클레오타이드(예를 들어, 각각의 메틸화되지 않은 사이토신)가 다른 뉴클레오타이드로 변형되는 방식으로 적용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이러한 시약은 메틸화되지 않은 사이토신 뉴클레오타이드를 탈아미노화하여 데옥시 우라실 잔기를 생성할 수 있다. 이러한 시약의 예는 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [0126] 메틸화 특이적 시약에 의한 핵산 뉴클레오타이드 서열의 변화는 각각의 메틸화 뉴클레오타이드가 다른 뉴클레오타이드로 변형되는 핵산 분자를 생성할 수도 있다.
- [0127] 본원에 사용된 용어 "화학선택성 군으로 변형된 UDP 글루코스"는 클릭 화학(click chemistry)을 통해 친화성 태그와 반응할 수 있는 작용기로 특히 6-하이드록실 위치에서 작용화된 우리딘 디포스포글루코스 분자를 지칭한다.
- [0128] 용어 "산화된 5-메틸시토신"은 5-위치에서 산화된 산화 5-메틸시토신 잔기를 지칭한다. 따라서, 산화된 5-메틸시토신 잔기는 5-히드록시메틸시토신, 5-포르밀시토신 및 5-카르복시메틸시토신을 포함한다. 본 발명의 일 실시형태에 따라 유기 보란과 반응하는 산화 5-메틸시토신 잔기는 5-포르밀시토신 및 5-카르복시메틸시토신이다.
- [0129] 용어 "메틸화 검정"은 핵산 서열 내에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드 서열의 메틸화 상태를 결정하기 위한 임의의 검정을 지칭한다.
- [0130] 용어 "MS AP-PCR"(Methylation-Sensitive Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction)은 CG가 풍부한 프라이머를 사용하여 게놈을 전체적으로 스캔하여 CpG 디뉴클레오타이드를 함유할 가능성이 가장 큰 영역에 초점을 맞출 수 있고 Gonzalgo et al. (1997) *Cancer Research* **57**: 594-599에 기술되어 있는 당해 분야에서 인식된 기술을 말한다.
- [0131] 용어 "MethyLight™"는 Eads et al. (1999) *Cancer Res.* **59**: 2302-2306에 의해 기술된 당해 분야에서 인식된 형광 기반 실시간 PCR 기술을 의미한다.
- [0132] 용어 "HeavyMethyl™"은 증폭 프라이머 사이의 CpG 위치를 커버하거나 증폭 프라이머에 의해 커버되는 CpG 위치를 덮는 메틸화 특이적 차단 프로브(본원에서는 차단제로도 지칭됨)가 핵산 샘플의 메틸화 특이적 선택적 증폭을 가능하게 하는 검정을 지칭한다.
- [0133] 용어 "HeavyMethyl™ MethyLight™" 검정은 MethyLight™ 검정의 변형인 HeavyMethyl™ MethyLight™ 검정을 지칭하며, 여기서 MethyLight™ 검정은 증폭 프라이머 사이의 CpG 위치를 덮는 메틸화 특이적 차단 프로브와 결합된다.
- [0134] 용어 "Ms-SNuPE"(Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension)는 Gonzalgo & Jones (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**: 2529-2531에 기술된 당해 분야에서 인식된 검정을 지칭한다.
- [0135] 용어 "MSP"(Methylation-specific PCR)는 Herman et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9821-9826) 및 미국 특허 제5,786,146 호에 기술된 당해 분야에서 인식된 메틸화 검정을 지칭한다.
- [0136] 용어 "COBRA"(Combined Bisulfite Restriction Analysis)는 Xiong & Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**: 2532-2534에 기술된 당해 분야에서 인식된 메틸화 검정을 지칭한다.
- [0137] 용어 "MCA"(Methylated CpG Island Amplification)는 Toyota et al. (1999) *Cancer Res.* **59**: 2307-12 및 WO 00/26401A1에 기술된 메틸화 검정을 지칭한다.
- [0138] 본원에 사용된 "선택된 뉴클레오타이드"는 핵산 분자(DNA의 경우 C, G, T 및 A, RNA의 경우 C, G, U 및 A)에서 전형적으로 발생하는 4개의 뉴클레오타이드 중 하나의 뉴클레오타이드를 지칭하며, 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드의 메틸화 유도체를 포함하고(예를 들어, C가 선택된 뉴클레오타이드일 때, 메틸화 C와 메틸화되지 않은 C는 모두 선택된 뉴클레오타이드의 의미에 포함됨), 반면 메틸화된 선택된 뉴클레오타이드는 특히 메틸화된 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드를 지칭하고 메틸화되지 않은 선택된 뉴클레오타이드는 특히 메틸화되지 않은 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0139] 용어 "메틸화 특이적 제한 효소"는 인식 부위의 메틸화 상태에 따라 핵산을 선택적으로 분해하는 제한 효소를

지칭한다. 인식 부위가 메틸화되지 않았거나 반메틸화되면 특별히 절단하는 제한 효소(메틸화 민감성 효소)의 경우, 인식 부위가 한 가닥 또는 두 가닥 모두에서 메틸화되면 절단은 일어나지 않을 것이다(또는 현저히 감소된 효율성으로 발생한다). 인식 부위가 메틸화될 때만 특별히 절단하는 제한 효소(메틸화 의존성 효소)의 경우, 인식 부위가 메틸화되지 않으면 절단은 일어나지 않을 것이다(또는 현저히 감소된 효율성으로 발생한다). 바람직한 것은 인식 서열이 CG 디뉴클레오타이드(예를 들어, CGCG 또는 CCCGGG와 같은 인식 서열)를 함유하는 메틸화 특이적 제한 효소이다. 일부 실시형태에 대해 추가로 바람직한 것은 이 디뉴클레오타이드의 사이토신이 탄소 원자 C5에서 메틸화되면 절단되지 않는 제한 효소이다.

[0140] 본원에서 사용된 "다른 뉴클레오타이드"는 선택된 뉴클레오타이드와 화학적으로 다른 뉴클레오타이드를 지칭하며, 전형적으로 다른 뉴클레오타이드는 선택된 뉴클레오타이드와 다른 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 특성을 가지며, 이에 따라 선택된 뉴클레오타이드에 상보적인 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드는 다른 뉴클레오타이드에 상보적인 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드와 동일하지 않다. 예를 들어, C가 선택된 뉴클레오타이드일 때, U 또는 T는 다른 뉴클레오타이드일 수 있는데, 이는 G에 대한 C의 상보성 및 A에 대한 U 또는 T의 상보성에 의해 예시된다. 본원에 사용된 바와 같이, 선택된 뉴클레오타이드에 상보적이거나 다른 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드는 높은 엄격성 조건하에서 4개의 전형적으로 발생하는 뉴클레오타이드 중 3개와의 상보적 뉴클레오타이드의 염기쌍보다 더 높은 친화도로 선택된 뉴클레오타이드 또는 다른 뉴클레오타이드와 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 상보성의 예는 DNA(예를 들어, A-T 및 C-G) 및 RNA(예를 들어, A-U 및 C-G)의 왓슨-크릭 염기쌍이다. 따라서, 예를 들어, 높은 엄격성 조건하에서 G, A 또는 T와 G 염기쌍보다 C와 G 염기쌍이 더 높은 친화성을 갖고, 따라서 C가 선택된 뉴클레오타이드일 때, G는 선택된 뉴클레오타이드에 대해 상보적인 뉴클레오타이드이다.

[0141] 본원에 사용된, 주어진 마커(또는 함께 사용된 마커 세트)의 "민감도"는 신생물 샘플과 비신생물 샘플을 구별하는 역치를 초과하는 DNA 메틸화 값을 보고하는 샘플의 백분율을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 양성 역치를 초과하는 DNA 메틸화 값(예를 들어, 질병과 관련된 범위)을 보고하는 조직학 확인된 신생물로 정의되고, 위음성(false negative)은 역치를 미만의 DNA 메틸화 값(예를 들어, 질병과 관련 없는 범위)을 보고하는 조직학 확인된 신생물로 정의된다. 따라서 민감도 값은 알려진 질병 샘플에서 수득한 주어진 마커에 대한 DNA 메틸화 측정이 질병 관련 측정 범위에 있을 확률을 반영한다. 본원에 정의된 바와 같이, 계산된 민감도 값의 임상 관련성은 주어진 마커가 해당 상태를 가진 대상체에게 적용될 때 임상 상태의 존재를 감지할 확률의 추정을 나타낸다.

[0142] 본원에 사용된, 주어진 마커(또는 함께 사용된 마커 세트)의 "특이성"은 신생물 샘플과 비신생물 샘플을 구별하는 역치 미만의 DNA 메틸화 값을 보고하는 비신생물 샘플의 백분율을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 음성은 역치 미만의 DNA 메틸화 값(예를 들어, 질병과 관련 없는 범위)을 보고하는 조직학 확인된 비신생물 샘플로 정의되고, 위양성(false positive)은 역치를 초과하는 DNA 메틸화 값(예를 들어, 질병과 관련된 범위)을 보고하는 조직학 확인된 비신생물 샘플로 정의된다. 따라서 특이성 값은 알려진 비신생물 샘플에서 수득한 주어진 마커에 대한 DNA 메틸화 측정이 질환 관련이 아닌 측정 범위에 있을 확률을 반영한다. 본원에 정의된 바와 같이, 계산된 특이성 값의 임상 관련성은 주어진 마커가 해당 상태가 없는 환자에게 적용될 때 임상 상태의 부재를 감지할 확률의 추정을 나타낸다.

[0143] 본원에 사용된 용어 "AUC"는 "곡선 아래 면적(area under a curve)"의 약어이다. 특히 수신자 작동 특성(Receiver Operating Characteristic, ROC) 곡선 아래 면적을 나타낸다. ROC 곡선은 진단 테스트의 여러 가능한 컷 포인트에 대한 위양성 비율에 대한 참양성(true positive) 비율의 플롯이다. 선택한 컷 포인트에 따라 민감도와 특이성 사이의 균형을 보여준다(민감도의 임의의 증가는 특이성의 감소를 동반한다). ROC 곡선 아래 면적(AUC)은 진단 테스트의 정확도에 대한 척도이다(면적이 클수록 좋다; 최적 값은 1이다; 무작위 테스트는 0.5 면적의 대각선에 ROC 곡선을 배치한다; 참고: J.P. Egan, (1975) *Signal Detection Theory and ROC Analysis*, Academic Press, New York).

[0144] 본원에 사용된 용어 "신생물"은 조직의 임의의 새로운 비정상 성장을 지칭한다. 따라서 신생물은 전악성 신생물(premalignant neoplasm) 또는 악성 신생물일 수 있다.

[0145] 본원에 사용된 용어 "신생물 특이적 마커"는 신생물의 존재를 표시하기 위해 사용될 수 있는 임의의 생물학적 물질 또는 요소를 지칭한다. 생물학적 물질의 예는 제한 없이 핵산, 폴리펩타이드, 탄수화물, 지방산, 세포 성분(예를 들어, 세포막 및 미토콘드리아) 및 전체 세포를 포함한다. 일부 예에서, 마커는 특정 핵산 영역(예를 들어, 유전자, 유전자 내 영역, 특정 유전자 좌 등)이다. 마커인 핵산 영역은, 예를 들어, "마커 유전자", "마커 영역", "마커 서열", "마커 유전자 좌" 등으로 지칭될 수 있다.

- [0146] 본원에 사용된 용어 "선종(adenoma)"은 선 기원(glandular origin)의 양성 종양을 지칭한다. 이러한 성장은 양성이지만 시간이 지남에 따라 악성으로 진행될 수 있다.
- [0147] 용어 "전암성(pre-cancerous)" 또는 "전신생물성(pre-neoplastic)" 및 이의 등가물은 악성 형질전환을 겪고 있는 임의의 세포 증식성 장애를 지칭한다.
- [0148] 신생물, 선종, 암 등의 "부위"는 신생물, 선종, 암 등이 있는 대상체의 신체의 조직, 기관, 세포 유형, 해부학적 영역, 신체 부위 등이다.
- [0149] 본원에 사용된 "진단" 테스트 애플리케이션은 대상체의 질병 상태 또는 병태의 검출 또는 식별, 대상체가 주어진 질병 또는 상태에 걸릴 가능성 결정, 질병 또는 병태가 있는 대상체가 치료에 반응할 가능성 결정, 질병 또는 병태(또는 이의 가능성이 있는 진행 또는 퇴행)가 있는 대상체의 예후 결정, 및 질병 또는 병태가 있는 대상체에 대한 치료 효과 결정을 포함한다. 예를 들어, 진단은 신생물에 걸린 대상체의 존재 또는 가능성, 또는 그러한 대상체가 화합물(예를 들어, 약제, 예를 들어, 약물) 또는 다른 치료에 유리하게 반응할 가능성을 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0150] "단리된 올리고뉴클레오타이드"에서와 같이 핵산과 관련하여 사용될 때 용어 "단리된"은 천연 공급원에서 통상적으로 결합되는 적어도 하나의 오염 핵산으로부터 확인 및 분리된 핵산 서열을 지칭한다. 단리된 핵산은 자연에서 발견되는 것과 다른 형태 또는 설정으로 존재한다. 반대로, DNA 및 RNA와 같은 단리되지 않은 핵산은 자연에 존재하는 상태로 발견된다. 단리되지 않은 핵산의 예는 다음을 포함한다: 인접 유전자에 근접한 숙주 세포 염색체에서 발견되는 주어진 DNA 서열(예를 들어, 유전자); 다수의 단백질을 코딩하는 수많은 다른 mRNA와의 혼합물로 세포에서 발견되는 특정 단백질을 코딩하는 특정 mRNA 서열과 같은 RNA 서열. 그러나 특정 단백질을 코딩하는 단리된 핵산은, 예를 들어, 일반적으로 단백질을 발현하는 세포의 핵산을 포함하는데, 여기서 상기 핵산은 자연 세포와 다른 염색체 위치에 있거나 자연에서 발견되는 것과 다른 핵산이 옆에 있다. 단리된 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드가 단백질을 발현하는 데 사용되는 경우, 올리고뉴클레오타이드는 최소한 센스 또는 코딩 가닥을 포함하지만(즉, 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥일 수 있음) 센스 및 안티센스 가닥 둘 다를 포함할 수 있다(즉, 올리고뉴클레오타이드는 이중 가닥일 수 있음). 단리된 핵산은 자연적 또는 전형적 환경으로부터 분리된 후 다른 핵산 또는 분자와 결합될 수 있다. 예를 들어, 단리된 핵산은, 예를 들어, 이중 발현을 위해 그것이 배치된 숙주 세포에 존재할 수 있다.
- [0151] 용어 "정제된"은 자연 환경에서 제거되거나 단리되거나 분리된 핵산 또는 아미노산 서열인 분자를 의미한다. 따라서 "단리된 핵산 서열"은 정제된 핵산 서열일 수 있다. "실질적으로 정제된" 분자는 자연적으로 결합된 다른 성분이 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%가 없다. 본원에 사용된 용어 "정제된" 또는 "정제하다"는 또한 샘플에서 오염 물질을 제거하는 것을 지칭한다. 오염 단백질을 제거하면 샘플에서 관심 폴리펩타이드 또는 핵산의 비율이 증가한다. 또 다른 예에서, 재조합 폴리펩타이드는 식물, 박테리아, 효모 또는 포유류 숙주 세포에서 발현되고 폴리펩타이드는 숙주 세포 단백질의 제거에 의해 정제된다; 이에 의해 재조합 폴리펩타이드의 비율이 샘플에서 증가한다.
- [0152] 주어진 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩타이드를 "포함하는 조성물" 용어는 광범위하게 주어진 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩타이드를 함유하는 임의의 조성물을 지칭한다. 상기 조성물은 염(예를 들어, NaCl), 세제(예를 들어, SDS) 및 기타 성분(예를 들어, 덴하르트 용액(Denhardt's solution), 분유, 연어 정자 DNA 등)을 함유하는 수용액을 포함할 수 있다.
- [0153] 용어 "샘플"은 가장 넓은 의미로 사용된다. 어떤 의미에서 이것은 동물 세포 또는 조직을 나타낼 수 있다. 다른 의미에서 이것은 생물학 및 환경 샘플뿐만 아니라 임의의 공급원에서 수득한 표본 또는 배양물을 의미한다. 생물학적 샘플은 식물이나 동물(인간 포함)에서 수득할 수 있으며 체액, 고체, 조직 및 가스를 포함한다. 환경 샘플은 표면 물질, 토양, 물 및 산업 샘플과 같은 환경 재료가 포함된다. 이러한 예는 본 발명에 적용 가능한 샘플 유형을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0154] 본원에 사용된, 일부 상황에서 사용되는 "원격 샘플(remote sample)"은 세포, 조직 또는 기관 공급원 샘플이 아닌 현장에서 수집된 샘플과 관련된다.
- [0155] 본원에 사용된 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본 기술에 의해 제공되는 다양한 테스트를 받을 유기체를 지칭한다. 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 인간을 포함한 포유동물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 영장류이다. 더욱더 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 또한 진단 방법과 관련하여, 바람직

한 대상체는 척추동물 대상체이다. 바람직한 척추동물은 온혈동물이다. 바람직한 온혈 척추동물은 포유동물이다. 바람직한 포유동물은 가장 바람직하게는 인간이다. 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 동물 대상체를 모두 포함한다. 따라서 수의학적 치료 용도가 본원에서 제공된다. 따라서 본 기술은 인간과 같은 포유동물뿐만 아니라 시베리아 호랑이와 같이 멸종 위기에 처한 중요한 포유동물; 인간에 의해 소비되기 위해 농장에서 자란 동물과 같이 경제적으로 중요한 포유동물; 및/또는 인간에게 사회적으로 중요한 동물, 예를 들어, 애완동물 또는 동물원에 기르는 동물의 진단을 제공한다. 그러한 동물의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 고양이 및 개와 같은 육식 동물; 돼지(pig), 거세돼지(hog) 및 멧돼지(wild boar)를 포함한 돼지(swine); 소, 황소, 양, 기린, 사슴, 염소, 들소 및 낙타와 같은 반추 동물 및/또는 유제류(ungulate); 기각류(pinniped); 및 말. 따라서, 사육된 돼지, 반추 동물, 유제류, 말(경주마 포함) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 가축의 진단 및 치료도 제공된다. 지금 개시되는 주제는 대상체의 폐암을 진단하기 위한 시스템을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 시스템은 생물학적 샘플을 수집한 대상체의 폐암 위험을 스크리닝하거나 폐암을 진단하는 데 사용할 수 있는 상용 키트로서 제공될 수 있다. 본 기술에 따라 제공되는 예시적인 시스템은 본원에 기술된 마커의 메틸화 상태를 평가하는 것을 포함한다.

[0156] 본원에 사용된 용어 "키트"는 물질을 전달하기 위한 임의의 전달 시스템을 지칭한다. 반응 검정의 맥락에서, 이러한 전달 시스템은 반응 시약(예를 들어, 적절한 용기 내 올리고뉴클레오타이드, 효소 등) 및/또는 보조물(supporting materials)(예를 들어, 완충액, 검정 등을 수행하기 위한 서면 설명서)을 한 위치에서 다른 위치로 저장, 운반 또는 전달하는 시스템을 포함한다. 예를 들어, 키트는 관련 반응 시약 및/또는 보조물이 들어있는 하나 이상의 인클로저(enclosure)(예를 들어, 상자)를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "프래그먼트 키트(fragmented kit)"는 각각 전체 키트 구성요소의 일부를 함유하는 2개 이상의 개별 용기를 포함하는 전달 시스템을 지칭한다. 상기 용기는 의도된 수령인에게 함께 또는 별도로 전달될 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 용기에는 검정에 사용하기 위한 효소가 들어있을 수 있는 반면, 두 번째 용기에는 올리고뉴클레오타이드가 들어 있다. 용어 "프래그먼트 키트"는 연방 식품, 의약품 및 화장품법(Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)의 섹션 520(e)에 따라 규제되는 분석물 특정 시약(Analyte specific reagents, ASR)을 함유하는 키트를 포함하는 것으로 의도되나 이에 제한되지 않는다. 실제로, 각각 전체 키트 구성요소의 일부를 함유하는 2개 이상의 개별 용기를 포함하는 전달 시스템은 용어 "프래그먼트 키트"에 포함된다. 대조적으로, "통합 키트(combined kit)"는 단일 용기(예를 들어, 각각의 원하는 구성요소를 수용하는 단일 박스)에 모든 반응 검정 구성요소를 포함하는 전달 시스템을 지칭한다. 용어 "키트"는 단편화된 키트 및 조합된 키트 모두를 포함한다.

[0157] 본원에 사용된 용어 "정보"는 사실 또는 데이터의 임의의 수집물을 지칭한다. 인터넷을 포함하되 이에 제한되지 않는 컴퓨터 시스템(들)을 사용하여 저장 또는 처리되는 정보와 관련하여, 이 용어는 임의의 형식(예를 들어, 아날로그, 디지털, 광학 등)으로 저장된 임의의 데이터를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "대상체와 관련된 정보"는 대상체(예를 들어, 인간, 식물 또는 동물)에 관한 사실 또는 데이터를 지칭한다. 용어 "게놈 정보"는 핵산 서열, 유전자, 메틸화 백분율, 대립 유전자 빈도, RNA 발현 수준, 단백질 발현, 유전자형과 관련된 표현형 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 게놈에 관한 정보를 지칭한다. "대립 유전자 빈도 정보"는 대립 유전자 신원, 대립 유전자의 존재와 대상체(예를 들어, 인간 대상체)의 특성 사이의 통계적 상관 관계, 개체 또는 집단에서 대립 유전자의 존재 또는 부재, 하나 이상의 특정한 특징을 갖는 개체에게 대립 유전자가 존재할 가능성의 백분율 등을 포함하되 이에 제한되지 않는 대립 유전자 빈도와 관련된 사실 또는 데이터를 지칭한다.

[0158] 상세한 설명

[0159] 다양한 실시형태의 이 상세한 설명에서, 설명의 목적으로, 개시된 실시형태의 완전한 이해를 제공하기 위해 다수의 특정 세부 사항이 제시된다. 그러나 당해 분야의 기술자는 이러한 다양한 실시형태가 이러한 특정 세부 사항을 포함하거나 포함하지 않고 실시될 수 있음을 인식할 것이다. 다른 경우에는 구조와 장치가 블록 다이어그램 형식으로 표시된다. 또한, 당해 분야의 기술자는 방법이 제시되고 수행되는 특정 순서가 예시적이라는 것을 쉽게 인식할 수 있으며, 그 순서가 변경될 수 있으며 본원에 개시된 다양한 실시형태의 사상 및 범위 내에 여전히 남아 있는 것으로 생각된다.

[0160] 본원에는 PNET 스크리닝하기 위한 기술, 특히 PNET 및/또는 관련 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)의 존재를 검출하기 위한 방법, 조성물, 및 관련 용도에 대한 기술이 제공된다. 상기 기술이 본원에 설명되어 있으므로, 사용된 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되며 어떤 방식으로든 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0161] 실제로, 실시예 I에 기술된 바와 같이, 본 발명에 대한 실시형태를 확인하기 위한 과정 동안 수행된 실험은 비

종양 대조군 DNA에서 PNET 유래 DNA를 구별하기 위한 198개의 차등적 메틸화 영역(DMR)의 새로운 세트를 확인하였다. 이러한 198개의 새로운 DNA 메틸화 마커로부터, 추가 실험을 통해 정상 체장 조직과 PNET를 구별하고 혈액에서 PNET를 검출할 수 있는 마커를 확인했다.

[0162] 본원의 개시내용이 특정 예시된 실시형태를 인용하지만, 이들 실시형태는 제한이 아닌 예로서 제시된다는 것을 이해해야 한다.

[0163] 특정 측면에서, 본 기술은 PNET와 같은 암을 식별, 결정 및/또는 분류하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플(예를 들어, 대변 샘플, 체장 조직 샘플, 혈액 샘플)에서 적어도 하나의 메틸화 마커의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함하며, 여기서 마커의 메틸화 상태의 변화는 PNET의 존재, 부류 또는 부위를 나타낸다. 특정 실시형태는 PNET 및 다양한 NET 유형(예를 들어, 폐 NET, 소장 NET)의 진단(예를 들어, 스크리닝)에 사용되는 차등적 메틸화 영역(DMR, 예를 들어, DMR 1-198, 표 1 및 3 참조)을 포함하는 마커에 관한 것이다.

[0164] 본원에 제공되고 표 1 및 3에 열거된 DMR(예를 들어, DMR 1-198과 같은 DMR)을 포함하는 적어도 하나의 마커, 마커 영역 또는 마커의 염기의 메틸화 분석이 분석되는 실시형태에 추가하여, 본 기술은 또한 암, 특히 PNET의 검출에 유용한 DMR을 포함하는 적어도 하나의 마커, 마커 영역, 또는 마커의 염기를 포함하는 마커 패널을 제공한다.

[0165] 본 기술의 일부 실시형태는 DMR을 포함하는 적어도 하나의 마커, 마커 영역 또는 마커의 염기의 CpG 메틸화 정도의 분석을 기반으로 한다.

[0166] 일부 실시형태에서, 본 기술은 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시키는 시약(예를 들어, 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약)과 DMR(예를 들어, DMR 1-198, 표 1 및 3 참조)을 포함하는 적어도 하나의 마커 내에서 CpG 디뉴클레오타이드 서열의 메틸화 상태를 결정하기 위한 하나 이상의 메틸화 검정과의 조합 사용을 제공한다. 게놈 CpG 디뉴클레오타이드는 메틸화되거나 메틸화되지 않을 수 있다(대안으로 각각 업- 및 다운-메틸화라고도 함). 그러나 본 발명의 방법은 원격 샘플(예를 들어, 혈액, 기관 유출물 또는 대변)의 배경 내에서 이중 특성의 생물학적 샘플, 예를 들어, 저농도 종양 세포 또는 그로부터 유래된 생물학적 물질의 분석에 적합하다. 따라서 이러한 샘플 내 CpG 위치의 메틸화 상태를 분석할 때 특정 CpG 위치에서 메틸화 수준(예를 들어, 백분율, 분율, 비, 비율 또는 정도)을 결정하기 위해 정량 검정을 사용할 수 있다.

[0167] 본 기술에 따르면, DMR을 포함하는 마커에서 CpG 디뉴클레오타이드 서열의 메틸화 상태의 결정은 PNET와 같은 암의 진단 및 특성화 모두에 유용하다.

[0168] 마커 조합

[0169] 5-메틸사이토신의 존재에 대해 핵산을 분석하는 데 자주 사용되는 방법은 DNA에서 5-메틸사이토신의 검출을 위해 Frommer 등에 의해 설명된 바이설파이트 방법 또는 이의 변형을 기반으로 한다(Frommer et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1827-31; 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 본원에 명시적으로 포함됨). 5-메틸사이토신을 매핑하는 바이설파이트 방법은 5-메틸사이토신이 아닌 사이토신이 아황산수소 이온(바이설파이트라고도 알려짐)과 반응한다는 관찰을 기반으로 한다. 상기 반응은 일반적으로 다음 단계에 따라 수행된다; 첫째, 사이토신이 아황산수소와 반응하여 설폰화 사이토신을 형성한다. 다음으로, 설폰화 반응 중간체의 자발적 탈아미노화로 설폰화 우라실을 생성한다. 마지막으로, 설폰화 우라실이 알칼리 조건에서 탈설폰화되어 우라실을 형성한다. 우라실 염기가 아데닌과 쌍을 이루고(따라서 티민처럼 행동함), 5-메틸사이토신 염기가 구아닌과 쌍을 이루어(따라서 사이토신처럼 행동함) 검출이 가능하다. 이것은, 예를 들어, 바이설파이트 게놈 시퀀싱(Grigg G, & Clark S, *Bioessays* (1994) 16: 431-36; Grigg G, *DNA Seq.* (1996) 6: 189-98), 예를 들어, 미국 특허 제5,786,146호에 개시된 바와 같은 메틸화 특이적 PCR(MSP)에 의해, 또는 서열 특이적 프로브 절단을 포함하는 분석, 예를 들어, QuARTS 플랩 엔도뉴클레아제 분석(예를 들어, Zou et al. (2010) "새로운 메틸화 특이적 기술을 통한 메틸화 마커의 민감한 정량화" *Clin Chem* 56: A199; 및 미국 특허 제8,361,720호; 제8,715,937호; 제8,916,344호; 및 제9,212,392호 참조)을 사용하여 메틸화 사이토신을 비메틸화 사이토신과 구별할 수 있게 한다.

[0170] 일부 기존 기술은 분석할 DNA를 아가로스 매트릭스에 둘러싸서 DNA의 확산 및 재생을 방지하고(바이설파이트는 단일 가닥 DNA와만 반응함) 침전 및 정제 단계를 빠른 투석으로 대체하는 방법과 관련이 있다(Olek A, et al. (1996) "A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis" *Nucleic Acids Res.* 24: 5064-6). 따라서 메틸화 상태에 대해 개별 세포를 분석하여 방법의 유용성과 민감도를 설명할

수 있다. 5-메틸사이토신 검출을 위한 통상적인 방법의 개요는 Rein, T., et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26: 2255에 의해 제공된다.

- [0171] 바이설파이트 기술은 전형적으로 바이설파이트 처리 후 알려진 핵산의 짧은 특정 단편을 증폭한 다음, 시퀀싱 (Olek & Walter (1997) *Nat. Genet.* 17: 275-6) 또는 프라이머 확장 반응(Gonzalzo & Jones (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 : 2529-31; WO 95/00669; 미국 특허 제6,251,594호)을 통해 생성물을 검정하여 개별 사이토신 위치를 분석하는 것을 포함한다. 일부 방법은 효소 분해를 사용한다(Xiong & Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-4). 혼성화에 의한 검출도 당해 분야에 기술되어 있다(Olek et al., WO 99/28498). 또한, 개별 유전자와 관련하여 메틸화 검출을 위한 바이설파이트 기술의 사용이 설명되었다(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 9746705; WO 9515373).
- [0172] 본 기술에 따른 바이설파이트 처리와 함께 다양한 메틸화 검정 절차를 사용할 수 있다. 이러한 검정은 핵산 서열 내에서 하나 또는 복수의 CpG 디뉴클레오타이드(예를 들어, CpG 섬)의 메틸화 상태를 결정할 수 있게 한다. 이러한 검정은 다른 기술 중에서도 바이설파이트 처리된 핵산의 시퀀싱, PCR(서열 특이적 증폭용), 서던 블롯 분석 및 메틸화 특이적 제한 효소, 예를 들어, 메틸화 민감성 또는 메틸화 의존성 효소의 사용을 포함한다.
- [0173] 예를 들어, 바이설파이트 처리를 사용함으로써 메틸화 패턴 및 5-메틸사이토신 분포 분석을 위해 게놈 시퀀싱이 단순화되었다(Frommer et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1827-1831). 또한, 바이설파이트 전환된 DNA에서 증폭된 PCR 산물의 제한 효소 분해는, 예를 들어, Sadri & Hornsby (1997) *Nucl. Acids Res.* 24: 5058-5059에 의해 기술된 바와 같이 또는 COBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis)(Xiong & Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-2534)로 알려진 방법으로 구현되는 바와 같이 메틸화 상태를 평가하는 데 사용된다.
- [0174] COBRA™ 분석은 소량의 게놈 DNA에서 특정 유전자 좌에서 DNA 메틸화 수준을 결정하는 데 유용한 정량 메틸화 검정이다(Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-2534, 1997). 간단히 말해서, 제한 효소 분해는 중아황산나트륨 처리된 DNA의 PCR 산물에서 메틸화 의존적 서열 차이를 밝히는 데 사용된다. 메틸화 의존적 서열 차이는 Frommer 등에 의해 설명된 절차에 따라 표준 바이설파이트 처리에 의해 먼저 게놈 DNA에 도입된다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831, 1992). 바이설파이트 변환된 DNA의 PCR 증폭은 관심 CpG 섬에 특이적인 프라이머의 사용에 이은 제한 엔도뉴클레아제 분해, 겔 전기영동 및 특정 표지된 혼성화 프로브를 사용한 검출을 사용하여 수행된다. 원래 DNA 샘플의 메틸화 수준은 광범위한 DNA 메틸화 수준에 걸쳐 선형 정량 방식으로 분해 및 분해되지 않은 PCR 산물의 상대적인 양으로 표시된다. 또한, 이 기술은 미세절개된(microdissected)과 관련된 봉입 조직 샘플에서 수득한 DNA에 안정적으로 적용될 수 있다.
- [0175] COBRA™ 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 COBRA™ 기반 키트에서 발견될 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자좌에 대한 PCR 프라이머(예를 들어, 특정 유전자, 마커, DMR, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등); 제한 효소 및 적절한 완충액; 유전자 혼성화 올리고뉴클레오타이드; 대조군 혼성화 올리고뉴클레오타이드; 올리고뉴클레오타이드 프로브용 키나제 라벨링 키트; 및 표지된 뉴클레오타이드. 추가로, 바이설파이트 전환 시약은 다음을 포함할 수 있다: DNA 변성 완충액; 설폰화 완충액; DNA 회수 시약 또는 키트(예를 들어, 침전, 한외 여과, 친화성 컬럼); 탈설폰화 완충액; 및 DNA 회수 성분.
- [0176] "MethyLight™"(형광 기반 실시간 PCR 기술)(Eads et al., *Cancer Res.* 59: 2302-2306, 1999), Ms-SNuPE™(메틸화 민감성 단일 뉴클레오타이드 프라이머 확장) 반응(Gonzalzo & 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 메틸화 CpG 섬 증폭("MCA"; Toyota et al., *Cancer Res.* 59: 2307-12, 1999)과 같은 분석은 단독으로 또는 이러한 방법 중 하나 이상과 함께 사용된다.
- [0177] "HeavyMethyl™" 검정 기술은 바이설파이트 처리된 DNA의 메틸화 특이적 증폭을 기반으로 메틸화 차이를 평가하는 정량 방법이다. 증폭 프라이머 사이에 CpG 위치를 덮는 또는 증폭 프라이머에 의해 덮이는 메틸화 특이적 차단 프로브("차단제")는 핵산 샘플의 메틸화 특이적 선택적 증폭을 가능하게 한다.
- [0178] 용어 "HeavyMethyl™ MethyLight™" 검정은 MethyLight™ 검정의 변형인 HeavyMethyl™ MethyLight™ 검정을 지칭

하며, 여기서 MethyLight™ 검정은 증폭 프라이머 사이의 CpG 위치를 덮는 메틸화 특이적 차단 프로브와 결합된 다. HeavyMethyl™ 검정은 또한 메틸화 특정 증폭 프라이머와 함께 사용할 수 있다.

- [0179] HeavyMethyl™ 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 MethyLight™ 기반 키트에서 발견될 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자 좌를 위한 PCR 프라이머(예를 들어, 특정 유전자, 마커, 유전자 영역, 마커 영역, 바이선헤이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬, 또는 바이선헤이트 처리된 DNA 서열 또는 CpG 섬 등); 차단 올리고뉴클레오타이드; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오타이드; 및 Taq 중합효소.
- [0180] MSP(메틸화 특이적 PCR)를 사용하면 메틸화 민감성 제한 효소의 사용과 관계없이 CpG 섬 내의 거의 모든 CpG 부위 그룹의 메틸화 상태를 평가할 수 있다(Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; 미국 특허 제5,786,146호). 간단히 말해서, DNA는 메틸화되지 않았지만 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 전환하는 중아황산나트륨에 의해 변형되고, 산물은 메틸화 DNA 대 메틸화되지 않은 DNA에 특이적인 프라이머로 증폭된다. MSP는 소량의 DNA만 필요하고 주어진 CpG 섬 유전자 좌의 0.1% 메틸화 대립 유전자에 민감하며 파라핀 봉입된 샘플에서 추출한 DNA에서 수행할 수 있다. MSP 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 MSP 기반 키트에서 발견될 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자 좌를 위한 PCR 프라이머(예를 들어, 특정 유전자, 마커, 유전자 영역, 마커 영역, 바이선헤이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등)에 대한 메틸화 및 메틸화되지 않은 PCR 프라이머; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오타이드, 및 특정 프로브.
- [0181] MethyLight™ 검정은 PCR 단계 후에 추가 조작이 필요하지 않은 형광 기반 실시간 PCR(예를 들어, TaqMan®)을 활용하는 고처리량 정량 메틸화 검정이다(Eads et al., Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999). 간단히 말해서 MethyLight™ 공정은 중아황산나트륨 반응에서 표준 절차에 따라 메틸화 의존적 서열 차이의 혼합 풀로 전환되는 게놈 DNA의 혼합 샘플로 시작된다(바이선헤이트 공정은 메틸화되지 않은 사이토신 잔기를 우라실로 전환한다). 형광 기반 PCR은, 예를 들어, 알려진 CpG 디뉴클레오타이드와 겹치는 PCR 프라이머를 사용하여 "편향된 (biased)" 반응으로 수행된다. 서열 식별은 증폭 과정 수준과 형광 검출 과정 수준 모두에서 발생한다.
- [0182] MethyLight™ 검정은 핵산, 예를 들어, 게놈 DNA 샘플에서 메틸화 패턴에 대한 정량 테스트로 사용되며, 프로브 혼성화 수준에서 서열 식별이 발생한다. 정량적 버전에서 PCR 반응은 특정 추정 메틸화 부위와 겹치는 형광 프로브의 존재하에 메틸화 특이적 증폭을 제공한다. 투입 DNA의 양에 대한 편향되지 않은 제어는 프라이머도 프로브도 어떠한 CpG 디뉴클레오타이드 위에도 놓이지 않는 반응에 의해 제공된다. 대안으로, 게놈 메틸화에 대한 정성 테스트는 알려진 메틸화 부위를 덮지 않는 대조군 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, HeavyMethyl™ 및 MSP 기술의 형광 기반 버전) 또는 잠재적인 메틸화 부위를 덮는 올리고뉴클레오타이드로 편향된 PCR 풀을 프로빙하여 달성된다.
- [0183] MethyLight™ 공정은 임의의 적합한 프로브(예를 들어, "TaqMan®" 프로브, Lightcycler® 프로브 등)와 함께 사용된다. 예를 들어, 일부 응용 분야에서는 이중 가닥 게놈 DNA를 중아황산나트륨으로 처리하고, 예를 들어, MSP 프라이머 및/또는 HeavyMethyl 차단제 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 TaqMan® 프로브, 및 TaqMan® 프로브를 사용하는 두 세트의 PCR 반응 중 하나에 적용한다. TaqMan® 프로브는 형광 "리포터" 및 "소광제 (quencher)" 분자로 이중 표지되어 있으며 상대적으로 높은 GC 함량 영역에 특이적으로 설계되어 정방향 또는 역방향 프라이머보다 PCR 사이클에서 약 10℃ 더 높은 온도에서 녹는다. 이를 통해 TaqMan® 프로브는 PCR 어닐링/확장 단계 동안 완전히 혼성화 상태를 유지할 수 있다. Taq 중합효소가 PCR 동안 새로운 가닥을 효소로 합성하면 결국 어닐링된 TaqMan® 프로브에 도달하게 된다. Taq 중합효소 5'→3'엔도뉴클레아제 활성은 TaqMan® 프로브를 분해하여 실시간 형광 검출 시스템을 사용하여 비소멸 신호의 정량 검출을 위해 형광 리포터 분자를 방출함으로써 이 프로브를 대체한다.
- [0184] MethyLight™ 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 MethyLight™ 기반 키트에서 발견될 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자 좌를 위한 PCR 프라이머(예를 들어, 특정 유전자, 마커, 유전자 영역, 마커 영역, 바이선헤이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등)에 대한 PCR 프라이머; TaqMan® 또는 Lightcycler® 프로브; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오타이드; 및 Taq 중합효소.

- [0185] QMTM(정량 메틸화) 검정은 게놈 DNA 샘플의 메틸화 패턴에 대한 대체 정량 테스트로, 프로브 혼성화 수준에서 서열 식별이 발생한다. 이 정량 버전에서 PCR 반응은 특정 추정 메틸화 부위와 겹치는 형광 프로브의 존재하에 편향되지 않은 증폭을 제공한다. 투입 DNA의 양에 대한 편향되지 않은 제어는 프라이머도 프로브도 어떠한 CpG 디뉴클레오타이드 위에도 놓이지 않는 반응에 의해 제공된다. 대안으로, 게놈 메틸화에 대한 정성 테스트는 알려진 메틸화 부위를 덮지 않는 대조군 올리고뉴클레오타이드(HeavyMethylTM 및 MSP 기술의 형광 기반 버전) 또는 잠재적인 메틸화 부위를 덮는 올리고뉴클레오타이드로 편향된 PCR 풀을 조사하여 달성된다.
- [0186] QMTM 프로세스는 증폭 프로세스에서 "TaqMan®" 프로브, Lightcycler® 프로브와 같은 적합한 프로브와 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 이중 가닥 게놈 DNA는 중아황산나트륨으로 처리되고 편향되지 않은 프라이머와 TaqMan® 프로브에 적용된다. TaqMan® 프로브는 형광 "리포터" 및 "소광제" 분자로 이중 표지되어 있으며 상대적으로 높은 GC 함량 영역에 특이적으로 설계되어 PCR 주기에서 정방향 또는 역방향 프라이머보다 약 10℃ 높은 온도에서 녹는다. 이를 통해 TaqMan® 프로브는 PCR 어닐링/확장 단계 동안 완전히 혼성화 상태를 유지할 수 있다. Taq 중합효소가 PCR 동안 새로운 가닥을 효소로 합성하면 결국 어닐링된 TaqMan® 프로브에 도달하게 된다. Taq 중합효소 3' 엔도뉴클레아제 활성은 TaqMan® 프로브를 분해하여 실시간 형광 검출 시스템을 사용하여 비소멸 신호의 정량 검출을 위해 형광 리포터 분자를 방출함으로써 이 프로브를 대체한다. QMTM 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 QMTM 기반 키트에서 찾을 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자 좌를 위한 PCR 프라이머(예를 들어, 특정 유전자, 마커, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등); TaqMan® 또는 Lightcycler® 프로브; 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오타이드; 및 Taq 중합효소.
- [0187] Ms-SNuPETM 기술은 DNA의 바이설파이트 처리 후 단일 뉴클레오타이드 프라이머 확장을 기반으로 특정 CpG 부위에서 메틸화 차이를 평가하는 정량 방법이다(Gonzalzo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997). 간단히 말해서, 게놈 DNA는 중아황산나트륨과 반응하여 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 변환하는 반면 5-메틸 사이토신은 변하지 않은 채로 둔다. 원하는 표적 서열의 증폭은 바이설파이트 변환된 DNA에 특이적인 PCR 프라이머를 사용하여 수행되며, 결과 산물은 분리되어 관심 CpG 부위에서 메틸화 분석을 위한 템플릿으로 사용된다. 소량의 DNA를 분석할 수 있으며(예를 들어, 미세절개된 병리학 절편) CpG 부위에서 메틸화 상태를 결정하기 위한 제한 효소의 사용을 피할 수 있다.
- [0188] Ms-SNuPETM 분석을 위한 전형적인 시약(예를 들어, 전형적인 Ms-SNuPETM 기반 키트에서 찾을 수 있는 것)은 다음을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다: 특정 유전자 좌(예를 들어, 특정 유전자, 마커, 유전자 영역, 마커 영역, 바이설파이트 처리된 DNA 서열, CpG 섬 등); 최적화된 PCR 완충액 및 데옥시뉴클레오타이드; 젤 추출 키트; 양성 대조군 프라이머; 특정 유전자 좌를 위한 Ms-SNuPETM 프라이머; 반응 완충액(Ms-SNuPE 반응용); 및 표지된 뉴클레오타이드. 추가로, 바이설파이트 변환 시약은 다음을 포함할 수 있다: DNA 변성 완충액; 설폰화 완충액; DNA 회수 시약 또는 키트(예를 들어, 침전, 한외여과, 친화성 컬럼); 탈설폰화 완충액; 및 DNA 회수 성분.
- [0189] 감소된 표현 바이설파이트 시퀀싱(Reduced Representation Bisulfite Sequencing, RRBS)은 모든 메틸화되지 않은 사이토신을 우라실로 변환하기 위한 핵산의 바이설파이트 처리로 시작하여 제한 효소 분해(예를 들어, MspI와 같은 CG 서열을 포함하는 부위를 인식하는 효소에 의함) 및 어댑터 리간드에 결합한 후 단편의 완전한 시퀀싱으로 시작된다. 제한 효소의 선택은 CpG 밀집 영역에 대한 단편을 풍부하게 하여 분석 중에 여러 유전자 위치에 매핑될 수 있는 중복 서열의 수를 줄인다. 이와 같이, RRBS는 시퀀싱을 위한 제한 단편의 서브세트(예를 들어, 분취 겔 전기영동을 사용한 크기 선택)를 선택함으로써 핵산 샘플의 복잡성을 줄인다. 전체 게놈 바이설파이트 시퀀싱과는 달리, 제한 효소 분해에 의해 생성되는 모든 단편은 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타이드에 대한 DNA 메틸화 정보를 함유한다. 따라서 RRBS는 이러한 영역에서 높은 빈도의 제한 효소 절단 부위를 사용하여 프로모터, CpG 섬 및 기타 게놈 특징에 대해 샘플을 풍부하게 하여 하나 이상의 게놈 유전자 좌의 메틸화 상태를 평가하는 검정을 제공한다.
- [0190] RRBS에 대한 전형적인 프로토콜은 MspI와 같은 제한 효소를 이용한 핵산 샘플 분해, 오버행 및 A-테일링 채우기, 어댑터 연결, 바이설파이트 전환 및 PCR 단계로 구성된다. 예를 들어, 문헌 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 참조.

- [0191] 일부 실시형태에서, 정량 대립 유전자 특이적 실시간 표적 및 신호 증폭(quantitative allele-specific real-time target and signal amplification, QuARTS) 검정을 사용하여 메틸화 상태를 평가한다. 1차 반응에서 증폭(반응 1) 및 표적 프로브 절단(반응 2); 및 2차 반응에서 FRET 절단 및 형광 신호 생성(반응 3)을 포함하여 각 QuARTS 분석에서 세 가지 반응이 순차적으로 발생한다. 표적 핵산이 특정 프라이머로 증폭되면 플랩 서열이 있는 특정 검출 프로브가 앰플리콘에 느슨하게 결합한다. 표적 결합 부위에 특이적인 침습성 올리고뉴클레오타이드의 존재는 5' 뉴클레오타이드, 예를 들어, FEN-1 엔도뉴클레아제가 검출 프로브와 플랩 서열 사이를 절단함으로써 플랩 서열을 방출하게 한다. 플랩 서열은 해당 FRET 카세트의 비헤어핀 부분(non-hairpin portion)에 상보적이다. 따라서 플랩 서열은 FRET 카세트에서 침습성 올리고뉴클레오타이드로서 기능하고 FRET 카세트 형광단과 형광 신호를 생성하는 소광제 사이의 절단에 영향을 미친다. 절단 반응은 표적당 여러 개의 프로브를 절단하여 플랩당 여러 개의 형광단을 방출함으로써 지수 신호 증폭을 제공할 수 있다. QuARTS는 다양한 염료가 포함된 FRET 카세트를 사용하여 단일 반응으로 여러 표적을 검출할 수 있다. 예를 들어, 각각 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된 Zou et al. (2010) "Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology" *Clin Chem* **56**: A199), 및 미국 특허 제8,361,720호; 제8,715,937호; 제8,916,344호; 및 제9,212,392호 참조.
- [0192] 용어 "바이설파이트 시약"은 메틸화 CpG 디뉴클레오타이드 서열과 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드 서열을 구별하기 위해 본원에 개시된 바와 같이 유용한 바이설파이트, 디설파이트, 아황산수소 또는 이들의 조합을 포함하는 시약을 지칭한다. 상기 치료 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 각각 그 전체가 참조로 포함된 PCT/EP2004/011715 및 WO 2013/116375). 일부 실시형태에서, 바이설파이트 처리는 n-알킬글리콜 또는 디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르(DME)와 같은 변성 용매의 존재하에, 또는 디옥산 또는 디옥산 유도체의 존재하에 수행된다. 일부 실시형태에서 변성 용매는 1% 내지 35%(v/v) 농도로 사용된다. 일부 실시형태에서, 바이설파이트 반응은 크로만 유도체, 예를 들어, 6-하이드록시-2, 5, 7, 8-테트라메틸크로만 2-카복실산 또는 트리하이드록시벤존산 및 그의 유도체, 예를 들어, 갈산과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 스캐빈저의 존재하에 수행된다(참조: 그 전체가 참조로 포함된 PCT/EP2004/011715). 특정 바람직한 실시형태에서, 바이설파이트 반응은, 예를 들어, WO 2013/116375에 기술된 바와 같이 아황산수소암모늄으로 처리하는 것을 포함한다.
- [0193] 일부 실시형태에서, 처리된 DNA의 단편은 본 발명에 따른 프라이머 올리고뉴클레오타이드 세트(예를 들어, 표 V 참조) 및 증폭 효소를 사용하여 증폭한다. 여러 DNA 세그먼트의 증폭은 하나의 동일한 반응 용기에서 동시에 수행될 수 있다. 일반적으로 증폭은 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 수행한다. 앰플리콘은 일반적으로 길이가 100 내지 2,000개인 염기쌍이다.
- [0194] 일부 실시형태에서, 본 기술은 표 1 및 3의 DMR(예를 들어, DMR 번호 1-198)을 포함하는 마커 조합의 메틸화 상태를 평가하는 것에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 하나 초과 마커의 메틸화 상태를 평가하는 것은 대상체에서 신생물(예를 들어, 본원에 설명된 PNET)을 확인하기 위한 스크리닝 또는 진단의 특이성 및/또는 민감도를 증가시킨다.
- [0195] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 무세포 DNA에서 산화 5-메틸시토신 잔기를 디히드로우라실 잔기로 전환시키는 방법을 제공한다(Liu et al., 2019, *Nat Biotechnol.* **37**, pp. 424-429; 미국 특허 출원 공개번호 202000370114 참조). 이 방법은 5-포르밀시토신(5fC), 5-카르복시메틸시토신(5caC) 및 이들의 조합에서 선택된 산화된 5mC 잔기를 유기 보란과 반응시키는 것을 포함한다. 산화 5mC 잔기는 자연적으로 발생하거나, 보다 일반적으로는 5mC 또는 5hmC 잔기의 사전 산화, 예를 들어 TET 계열 효소(예를 들어, TET1, TET2 또는 TET3)를 사용한 5mC 또는 5hmC의 산화, 또는 예를 들어, 과루텐산칼륨(KRuO₄) 또는 무기 퍼옥소 화합물 또는 조성물, 예컨대, 퍼옥소텅스테이트(예를 들어, Okamoto et al. (2011) *Chem. Commun.* **47**:11231-33 참조) 및 구리(II) 과염소산염/2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실(TEMPO) 조합(Matsushita et al.(2017) *Chem. Commun.* **53**:5756-59 참조)를 사용한 5mC 또는 5hmC의 화학적 산화의 결과일 수 있다.
- [0196] 유기 보란은 보란과 질소 헤테로사이클 및 3차 아민으로부터 선택된 질소-함유 화합물의 착물로서 특성화될 수 있다. 질소 헤테로사이클은 모노사이클릭, 바이사이클릭 또는 폴리사이클릭일 수 있지만, 통상적으로는 질소 헤테로원자 및 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가 헤테로원자를 함유하는 5- 또는 6-원 고리 형태의 모노사이클릭이다. 질소 헤테로사이클은 방향족 또는 지환족일 수 있다. 본원에서 바람직한 질소 헤테로사이클은 2-피롤린, 2H-피롤, 1H-피롤, 피라졸리딘, 이미다졸리딘, 2-피라졸린, 2-이미다졸린, 피라졸, 이미다졸, 1,2,4-트리아졸, 1,2,4-트리아졸, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 1,2,4-트리아진 및 1,3,5-트리아진을 포함하는데, 이들

중 임의의 것은 비치환되거나 하나 이상의 비수소 치환기로 치환될 수 있다. 통상적인 비수소 치환기는 알킬기, 특히 저급 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, t-부틸 등이다. 예시적인 화합물은 피리딘 보란, 2-메틸피리딘 보란(2-피콜린 보란이라고도 함), 및 5-에틸-2-피리딘을 포함한다.

[0197] 유기 보란과 무세포 DNA의 산화 5mC 잔기의 반응은 무독성 시약과 온화한 반응 조건을 사용할 수 있는 한 유리하며; 바이설파이트나 임의의 다른 잠재적인 DNA 분해 시약이 필요하지 않다. 또한, 유기 보란을 통해 산화 5mC 잔류물을 디하이드로우라실로 전환하는 것은 "one-pot" 또는 "one-tube" 반응에서 중간체를 분리할 필요 없이 수행될 수 있다. 이것은, 전환이 여러 단계, 즉 (1) 산화 5mC에서 C-4와 C-5를 연결하는 알켄 결합의 환원, (2) 탈아미노화, (3) 산화 5mC가 5caC인 경우 탈카르복실화, 또는 산화 5mC가 5fC인 경우 탈포르밀화를 수반한다.

[0198] 무세포 DNA에서 산화 5-메틸시토신 잔기를 디하이드로우라실 잔기로 전환시키는 방법에 더하여, 본 발명은 또한 전술한 방법과 관련된 반응 혼합물을 제공한다. 이 반응 혼합물은, 5caC, 5fC, 및 이들의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 산화 5-메틸시토신 잔기, 및 적어도 하나의 산화 5-메틸시토신 잔기를 환원, 탈아미노화 및 탈카르복실화 또는 탈포르밀화시키는데 효과적인 유기 보란을 함유하는 무세포 DNA의 샘플을 포함한다. 전술한 바와 같이, 유기 보란은 보란과 질소 헤테로사이클 및 3차 아민으로부터 선택된 질소-함유 화합물의 착물이다. 바람직한 실시형태에서, 반응 혼합물에는 바이설파이트가 실질적으로 없으며, 이는 바이설파이트 이온 및 바이설파이트 염이 실질적으로 없음을 의미한다. 이상적으로, 반응 혼합물은 바이설파이트를 함유하지 않는다.

[0199] 본 발명의 관련 양태에서, 무세포 DNA의 5mC 잔기를 디하이드로우라실 잔기로 전환하기 위한 키트가 제공되며, 여기서 키트는 5hmC 잔기를 차단하기 위한 시약, 5mC 잔기를 히드록시메틸화 이상으로 산화시켜 산화 5mC 잔기를 제공하기 위한 시약, 및 산화 5mC 잔기를 환원, 탈아미노화 및 탈카르복실화 또는 탈포르밀화시키는데 효과적인 유기 보란을 포함한다. 키트는 또한 구성요소를 사용하여 전술한 방법을 수행하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0200] 다른 실시형태에서, 전술한 산화 반응을 사용하는 방법이 제공된다. 이 방법은 무세포 DNA에서 5-메틸시토신 잔기의 존재 및 위치를 감지할 수 있으며 다음 단계를 포함한다:

[0201] (a) 단편화된 어댑터-결찰된 무세포 DNA에서 5hmC 잔기를 변형하여 그 위에 친화성 태그를 제공하는 단계, - 친화성 태그는 무세포 DNA로부터 변형된 5hmC-함유 DNA의 제거를 가능하게 함;

[0202] (b) 무세포 DNA로부터 변형된 5hmC 함유 DNA를 제거하여 변형되지 않은 5mC 잔기를 함유하는 DNA를 남기는 단계;

[0203] (c) 변형되지 않은 5mC 잔기를 산화시켜 5caC, 5fC 및 이들의 조합으로부터 선택된 산화 5mC 잔기를 함유하는 DNA를 제공하는 단계;

[0204] (d) 산화 5mC 잔기를 함유하는 DNA를 산화 5mC 잔기를 환원, 탈아미노화 및 탈카르복실화 또는 탈포르밀화시키는 데 효과적인 유기 보란과 접촉시켜 산화 5mC 잔기 대신에 디하이드로우라실 잔기를 함유하는 DNA를 제공하는 단계;

[0205] (e) 디하이드로우라실 잔기를 함유하는 DNA를 증폭 및 시퀀싱하는 단계;

[0206] (f) (e)의 시퀀싱 결과로부터 5-메틸화 패턴을 결정하는 단계.

[0207] 무세포 DNA는 대상체의 신체 샘플에서 추출되며, 여기서 신체 샘플은 통상적으로 전혈, 혈장 또는 혈청, 가장 통상적으로는 혈장이지만, 샘플은 소변, 타액, 점막 배설물, 가래, 대변 또는 눈물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 무세포 DNA는 종양으로부터 유래된다. 다른 실시형태에서, 무세포 DNA는 질병 또는 다른 병원성 상태를 가진 환자로부터의 것이다. 무세포 DNA는 종양에서 유래하거나 유래하지 않을 수 있다. 단계 (a)에서, 5hmC 잔기가 변형되어야 하는 무세포 DNA는 정제되고 단편화된 형태이며 어댑터-결찰된다는 점에 유의해야 한다. 이러한 맥락에서 DNA 정제는 당업자에게 공지되어 있고/있거나 관련 문헌에 기재된 임의의 적합한 방법을 사용하여 수행될 수 있으며, 무세포 DNA 자체가 고도로 단편화될 수 있지만, 종종 추가 단편화가 예를 들어 미국 특허 공개 번호 2017/0253924에 설명되어 있는 바와 같이 바람직할 수 있다. 무세포 DNA 단편은 통상적으로 약 20개 뉴클레오타이드 내지 약 500개 뉴클레오타이드의 크기 범위, 보다 통상적으로는 약 20개 뉴클레오타이드 내지 약 250개 뉴클레오타이드 범위이다. 단계 (a)에서 변형된 정제된 무세포 DNA 단편은, 단편이 각각의 3' 및 5' 말단에서 무딘 말단을 갖도록 통상적인 수단(예를 들어, 제한 효소)을 사용하여 말단 수리된다. WO 2017/176630에 기술된 바와 같은 바람직한 방법에서, 무딘 단편에는 Taq 폴리머라제와 같은 폴리머라제를 사용하여 단일 아데닌 잔기를 포함하는 3' 돌출부가 제공되어 있다. 이것은 선택된 범용 어댑터, 즉 무세포 DNA 단편의 양 말단에 결합되고 적어도 하나의 분자 바코드를 포함하는 Y-어댑터 또는 헤어핀 어댑터와 같은 어댑터의 후속 결합을 용이하게

한다. 어댑터를 사용하면 어댑터 결합 DNA 단편의 선택적 PCR 농축도 가능하다.

- [0208] 그후, 단계 (a)에서, "정제된, 단편화된 무세포 DNA"는 어댑터-결합된 DNA 단편을 포함한다. 단계 (a)에 특정된 바와 같이 친화성 태그가 있는 이러한 무세포 DNA 단편에서 5hmC 잔기의 변형은 무세포 DNA로부터 변형된 5hmC-함유 DNA의 후속 제거를 가능하게 하기 위해 수행된다. 일 실시형태에서, 친화성 태그는 비오틴, 데스티오비오틴, 옥시비오틴, 2-이미노비오틴, 디아미노비오틴, 비오틴 설펍사이드, 바이오시틴 등과 같은 비오틴 모이어티를 포함한다. 비오틴 모이어티를 친화성 태그로 사용하면, 예를 들어, 스트렙타비딘 비드, 자기 스트렙타비딘 비드 등과 같은 스트렙타비딘으로 쉽게 제거할 수 있다.
- [0209] 비오틴 모이어티 또는 다른 친화성 태그로 5hmC 잔기에 태그를 지정하는 것은 DNA 단편의 5hmC 잔기에 화학선택성 기를 공유 부착함으로써 달성되며, 여기서 화학선택성 기는 친화성 태그를 5hmC 잔기에 연결하기 위해 기능화된 친화성 태그와 반응할 수 있다. 일 실시형태에서, 화학선택성 기는 Robertson et al. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 411(1):40-3, U.S. Pat. No. 8,741,567, 및 WO 2017/176630에 기재된 바와 같이, UDP 글루코스-6-아지드이며, 이는 알킨-기능화된 비오틴 모이어티와 자발적인 1,3-고리첨가 반응을 겪는다. 따라서, 알킨-기능화된 비오틴 모이어티를 추가하면 각 5hmC 잔기에 비오틴 모이어티가 공유 부착됨을 초래한다.
- [0210] 그 다음, 친화성 태그가 붙은 DNA 단편은 일 실시형태에서 스트렙타비딘 비드, 자기 스트렙타비딘 비드 등의 형태로 스트렙타비딘을 사용하여 단계 (b)에서 풀 다운될 수 있고, 원하는 경우 나중에 분석을 위해 따로 보관될 수 있다. 친화성 태그가 붙은 단편을 제거한 후 남은 상층액은 변형되지 않은 5mC 잔기를 갖거나 5hmC 잔기가 없는 DNA를 포함한다.
- [0211] 단계 (c)에서, 변형되지 않은 5mC 잔기는 임의의 적합한 수단을 사용하여 산화되어 5caC 잔기 및/또는 5fC 잔기를 제공한다. 산화제는 히드록시메틸화 이상으로 5mC 잔기를 산화시키도록, 즉, 5caC 및/또는 5fC 잔기를 제공하도록 선택된다. 산화는 촉매 활성 TET 계열 효소를 사용하여 효소적으로 수행될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "TET 계열 효소" 또는 "TET 효소"는 미국 특허 제9,115,386호에 개시된 바와 같이 촉매 활성 "TET 계열 단백질" 또는 "TET 촉매 활성 단편"을 지칭하며, 그 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 이러한 맥락에서 바람직한 TET 효소는 TET2이다; Ito et al. (2011) *Science* 333(6047):1300-1303 참조. 산화는 또한 이전 섹션에서 설명한 대로 화학적 산화제를 사용하여 화학적으로 수행될 수 있다. 적합한 산화제의 예는 비제한적으로, 금속 퍼루테네이트, 예를 들어 칼륨 퍼루테네이트(KRuO₄), 테트라알킬암모늄 퍼루테네이트, 예를 들어 테트라프로필암모늄 퍼루테네이트(TPAP) 및 테트라부틸암모늄 퍼루테네이트(TBAP), 및 폴리머 지지된 퍼루테네이트(PSP); 및 퍼옥소텅스테이트 또는 구리(II) 퍼클로레이트/TEMPO 조합과 같은 무기 퍼옥소 화합물 및 조성물을 포함하는 무기 또는 유기 퍼루테네이트 염 형태의 퍼루테네이트 음이온을 포함한다. 프로세스의 다음 단계에서 단계 (e)가 5fC 잔기와 5caC 잔기를 모두 디하이드로우라실(DHU)로 전환시키는 한, 이 시점에서 5fC 함유 단편을 5caC 함유 단편으로부터 분리할 필요는 없다.
- [0212] 일부 실시형태에서, 5-히드록시메틸시토신 잔기는 β-글루코실트랜스퍼라제(β 3GT)로 차단되는 반면, 5-메틸시토신 잔기는 5-포르밀시토신 및 5-카르복시메틸시토신의 혼합물을 제공하기에 효과적인 TET 효소로 산화된다. 이러한 산화 종을 모두 함유하는 혼합물은 2-피콜린 보란 또는 다른 유기 보란과 반응하여 디하이드로우라실을 생성할 수 있다. 이 실시형태의 변형에서, 5hmC-함유 단편은 단계 (b)에서 제거되지 않는다. 오히려, "TET-보조 피콜린 보란 시퀀싱(TAPS; TET-Assisted Picoline Borane Sequencing)", 5mC 함유 단편 및 5hmC 함유 단편이 함께 효소적으로 산화되어 5fC 및 5caC 함유 단편을 제공한다. 2-피콜린 보란과의 반응은 5mC 및 5hmC 잔기가 원래 존재했던 모든 곳에서 DHU 잔기를 생성한다. "화학 보조 피콜린 보란 시퀀싱(CAPS; Chemical Assisted Picoline Borane Sequencing)"은 5hmC 함유 단편을 과루텐산 칼륨으로 선택적으로 산화시키는 것을 수반하며 이는 5mC 잔류물을 변경되지 않은 상태로 남긴다.
- [0213] 이 실시형태의 방법에는: 바이설파이트가 불필요하고, 무독성 시약 및 반응물이 사용되며; 이 프로세스가 온화한 조건에서 진행되는, 수많은 장점이 존재한다. 또한, 임의의 중간체를 분리할 필요 없이 전체 프로세스가 단일 튜브에서 수행될 수 있다.
- [0214] 관련 실시형태에서, 상기 방법은 (g) 단계 (b)에서 무세포 DNA로부터 제거된 5hmC-함유 DNA에서 히드록시메틸화 패턴을 확인하는 단계의 추가 단계를 포함한다. 이는, WO 2017/176630에 자세히 설명된 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 프로세스는 일-튜브 방법에서 중간체의 제거 또는 분리 없이 수행될 수 있다. 예를 들어, 초기에 무세포 DNA 단편, 바람직하게는 어댑터-결합된 DNA 단편은 βGT-촉매화된 우리딘 디포스포글루코스 6-아지드로 기능화되고, 이어서 화학선택적 아지드 기를 통해 비오틴화된다. 이러한 절차는 각 5hmC 부위에서 공유 결합된 비오틴을 생성한다. 다음 단계에서, 비오틴화된 가닥과 변형되지 않은(네이티브) 5mC를 함유하는 가닥은 추가 프

로세싱을 위해 동시에 풀다운된다. 네이티브 5mC 함유 가닥은 당업계에 공지된 바와 같이 항-5mC 항체 또는 메틸-CpG-결합 도메인(MBD) 단백질을 사용하여 풀다운된다. 그 다음, 차단된 5hmC 잔기와 함께, 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 5mC를 5fC 및/또는 5caC로 전환하기 위한 임의의 적합한 기술을 사용하여 변형되지 않은 5mC 잔기를 선택적으로 산화시킨다.

- [0215] 증폭을 통해 수득된 단편은 직접 또는 간접적으로 검출가능한 표지를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 표지는 형광 표지, 방사성핵종(radionuclide) 또는 질량 분광계에서 검출될 수 있는 전형적인 질량을 갖는 분리 가능한 분자 단편이다. 상기 표지가 질량 표지인 경우, 일부 실시형태에서는 표지된 앰플리콘이 단일 양 또는 음의 순전하를 가져 질량 분석기에서 더 나은 편향성이 허용된다. 검출은, 예를 들어, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분석법(matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI) 또는 전자 분무 질량 분석법(electron spray mass spectrometry, ESI)을 사용하여 수행하고 시각화할 수 있다.
- [0216] 이들 분석 기술에 적합한 DNA를 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 특히, 일부 실시형태는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허출원 Ser. 제13/470,251호("Isolation of Nucleic Acids")에 기술된 바와 같은 핵산 단리를 포함한다.
- [0217] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 마커는 대변 샘플에 대해 수행된 QUARTS 검정에 사용된다. 일부 실시형태에서, DNA 샘플을 생성하는 방법, 특히 소량(예를 들어, 100마이크로리터 미만, 60마이크로리터 미만)의 고도로 정제된 소량의 핵산을 포함하고 DNA 샘플을 테스트하는 데 사용되는 검정(예를 들어, PCR, INVADER, QuARTS 검정 등)을 저해하는 물질이 실질적으로 및/또는 효과적으로 없는 방법이 제공된다. 이러한 DNA 샘플은 환자로부터 채취한 샘플에 존재하는 유전자, 유전자 변이체(예를 들어, 대립 유전자) 또는 유전자 변형(gene modification)(예를 들어, 메틸화)의 존재를 정성 검출하거나 그 활성, 발현 또는 양을 정량 측정하는 진단 검정에 사용된다. 예를 들어, 일부 암은 특정 돌연변이 대립 유전자 또는 특정 메틸화 상태의 존재와 상관관계가 있으며, 따라서 이러한 돌연변이 대립 유전자 또는 메틸화 상태를 검출 및/또는 정량화하면 암의 진단 및 치료에 예측 가치가 있다.
- [0218] 많은 귀중한 유전자 마커가 샘플에 극히 적은 양으로 존재하며 이러한 마커를 생성하는 많은 이벤트는 드물다. 결과적으로, PCR과 같은 민감한 검출 방법조차도 검정의 검출 임계값을 충족하거나 대체하기에 충분한 적은 양의 표적을 제공하기 위해 많은 양의 DNA가 필요하다. 더욱이, 이러한 적은 양의 억제 물질의 존재는 이러한 적은 양의 표적을 검출하기 위한 이러한 검정의 정확성과 정밀도를 손상시킨다. 따라서, 이러한 DNA 샘플을 생산하기 위해 부피 및 농도의 필수 관리를 제공하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0219] 일부 실시형태에서, 샘플은 대변, 조직 샘플(예를 들어, 체장 조직), 기관 분비물, CSF, 타액, 혈액 또는 소변을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 이러한 샘플은 당업자에게 명백한 바와 같이 당해 분야에 공지된 임의의 수의 수단에 의해 수득될 수 있다. 무세포 또는 실질적으로 무세포 샘플은 원심분리 및 여과를 포함하나 이에 제한되지 않는 당해 분야의 기술자에게 공지된 다양한 기술을 샘플에 적용함으로써 수득할 수 있다. 샘플을 수득하기 위해 침습적 기술을 사용하지 않는 것이 일반적으로 바람직하지만, 조직 균질물, 조직 절편 및 생검 표본과 같은 샘플을 수득하는 것이 여전히 바람직할 수 있다. 상기 기술은 샘플을 준비하고 테스트를 위한 핵산을 제공하는 데 사용되는 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, DNA는, 예를 들어, 미국 특허 제8,808,990호 및 제9,169,511호, 및 WO 2012/155072에 기술된 바와 같은 직접 유전자 포획을 이용하여 또는 관련 방법에 의해 대변 샘플에서 또는 혈액 또는 혈장 샘플에서 단리된다.
- [0220] 마커 분석은 하나의 테스트 샘플 내에서 추가 마커를 사용하여 개별적으로 또는 동시에 수행할 수 있다. 예를 들어, 여러 샘플을 효율적으로 처리하고 잠재적으로 더 큰 진단 및/또는 예후 정확도를 제공하기 위해 여러 마커를 하나의 테스트로 결합할 수 있다. 또한, 당업자는 동일한 대상체로부터 여러 샘플을(예를 들어, 연속적인 시점에서) 테스트하는 값을 인식할 것이다. 이러한 일련의 샘플 테스트를 통해 시간에 따른 마커 메틸화 상태의 변화를 확인할 수 있다. 메틸화 상태의 변화와 메틸화 상태의 변화 부재는 질병 상태에 대해 유용한 정보를 제공할 수 있는데, 는 이벤트 발생 후 대략적인 시간의 식별, 구제 가능한 조직의 존재 및 양, 약물 요법의 적절성, 다양한 요법의 효과 및 미래 이벤트의 위험을 포함하여 대상체의 결과 식별을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0221] 바이오마커 분석은 다양한 물리적 형식으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 마이크로타이터 플레이트 또는 자동화를 사용하여 많은 수의 테스트 샘플을 쉽게 처리할 수 있다. 대안으로, 단일 샘플 형식을 개발하여, 예를 들어, 외래 수송 또는 응급실 세팅과 같이 적시에 즉각적인 치료 및 진단을 수행할 수 있다.

- [0222] 상기 기술의 실시형태는 키트 형태로 제공되는 것이 고려된다. 키트는 본원에 기술된 조성물, 장치, 기구 등 의 실시 양태, 및 키트 사용 설명서를 포함한다. 이러한 설명서는 샘플에서 분석물을 준비하기 위해, 예를 들어, 샘플을 수집하고 샘플에서 핵산을 준비하기 위해 적절한 방법을 설명한다. 키트의 개별 구성요소는 적절한 용기 및 포장(예를 들어, 바이알, 상자, 블리스터 팩, 앰플, 병(jar), 병(bottle), 튜브 등)에 포장되고 구성요소는 편리한 보관, 배송 및/또는 키트 사용자에게 의한 사용을 위해 적절한 용기(예를 들어, 상자 또는 상자들)에 함께 포장된다. 액체 구성요소(예를 들어, 완충액)는 사용자에게 의해 재구성될 동결 건조된 형태로 제공될 수 있음을 이해한다. 키트는 키트의 성능을 평가, 검증 및/또는 보장하기 위한 대조군 또는 기준을 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플에 존재하는 핵산의 양을 검정하기 위한 키트는 비교를 위한 동일한 또는 다른 핵산의 알려진 농도를 포함하는 대조군과, 일부 실시형태에서는 대조군 핵산에 특이적인 검출 시약(예를 들어, 프라이머)을 포함할 수 있다. 키트는 임상 환경에서 사용하기에 적합하며, 일부 양태에서는 사용자의 집에서 사용하기에 적합하다. 키트의 구성요소는 일부 실시형태에서 샘플로부터 핵산 용액을 준비하기 위한 시스템의 기능을 제공한다. 일부 실시형태에서, 시스템의 특정 구성요소는 사용자에게 의해 제공된다.
- [0223] 예를 들어, 예측 특이성 및 민감도와 관련된 통계적 기술로 식별되는 것과 같이 다양한 마커 조합에 의해 다양한 암이 예측된다. 이 기술은 일부 암에 대한 예측 조합 및 검증된 예측 조합을 식별하는 방법을 제공한다.
- [0224] **방법**
- [0225] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0226] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 체장 조직에서 분리된 게놈 DNA)을 표 1에 인용된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화 CpG 디뉴클레오타이드와 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계; 및
- [0227] 2) PNET을 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0228] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0229] 1) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 체장 조직에서 분리된 게놈 DNA)을 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로 이루어진 군으로부터 선택된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0230] 2) PNET을 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0231] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0232] 1) 대상체로부터 수득한 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)로부터 분리된 게놈 DNA)을 표 3에 인용된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화 CpG 디뉴클레오타이드와 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계; 및
- [0233] 2) PNET을 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0234] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0235] 2) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 분리된 게놈 DNA)을 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로 이루어진 군으로부터 선택된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0236] 2) PNET을 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.

- [0237] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0238] 3) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 분리된 게놈 DNA)을 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로 이루어진 군으로부터 선택된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0239] 2) 전이성 PNET를 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0240] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0241] 4) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 분리된 게놈 DNA)을 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로 이루어진 군으로부터 선택된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0242] 2) 폐 NET를 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0243] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0244] 5) 대상체로부터 수득된 핵산(예를 들어, 게놈 DNA, 예를 들어, 혈액 샘플(예를 들어, 혈장 샘플, 전혈 샘플, 백혈구 샘플, 혈청 샘플)에서 분리된 게놈 DNA)을 SRRM3, HCN2, SPTBN4, TMC6_A, GP1BB_C, GP1BB_A, STX10_B, CACNA1C_A, CDHR2, PTPRN2, MAX.chr17.77788758.77788971, FBXL16_B, RTN2, HPCAL1, RASSF3, TSPO, RUNDC3A, SLC38A2, MAX.chr19.2478419.2478656, PDZD2, LOC100129726, CUX1, ANXA2, RXRA, S1PR4_A, FNBP1, FAM78A, IER2, PNMAL2, 및 MOBKL2A로 이루어진 군으로부터 선택된 애너테이션을 갖는 염색체 영역으로부터 선택된 적어도 하나의 마커 내에서 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약과 접촉시키는 단계, 및
- [0245] 2) 소장 NET을 검출(예를 들어, 80% 이상의 민감도와 80% 이상의 특이성으로 제공됨)하는 단계.
- [0246] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0247] 1) 생물학적 샘플에서의 게놈 DNA를 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시키는 시약(예를 들어, 시약은 바이셀 파이트 시약, 메틸화 민감성 제한 효소, 또는 메틸화 의존성 제한 효소)으로 처리하여 인간 개체의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 유전자에 대한 메틸화 수준을 측정하는 단계 - 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택됨;
- [0248] 2) 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 상기 처리된 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및
- [0249] 3) 중합효소 연쇄 반응, 핵산 시퀀싱, 질량 분석법, 메틸화 특이적 뉴클레아제, 질량 기반 분리 및 표적 포획에 의해 상기 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 결정하는 단계.
- [0250] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0251] 1) 샘플의 DNA에서 적어도 하나의 메틸화된 마커 유전자의 양을 측정하는 단계 - 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FNBP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택됨;
- [0252] 2) DNA에서 적어도 하나의 참조 마커의 양을 측정하는 단계; 및
- [0253] 3) DNA에서 측정된 참조 마커 유전자의 양에 대한 백분율로서 DNA에서 측정된 적어도 하나의 메틸화된 마커 유

전자의 양에 대한 값을 계산하는 단계로서, 상기 값은 샘플에서 측정된 적어도 하나의 메틸화된 마커 DNA의 양을 나타내는, 단계.

- [0254] 상기 기술의 일부 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 방법이 제공된다:
- [0255] 1) 인간 개체의 생물학적 샘플의 게놈 DNA를 메틸화 특이적 방식으로 DNA를 변형시킬 수 있는 시약(예를 들어, 메틸화 민감성 제한 효소, 메틸화 의존성 제한 효소 및 바이설파이트 시약)인 바이설파이트로 처리하여 인간 개체의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 유전자에 대한 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계;
- [0256] 2) 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 변형된 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및
- [0257] 3) 메틸화 특이적 PCR, 정량 메틸화 특이적 PCR, 메틸화 민감성 DNA 제한 효소 분석, 정량 바이설파이트 피로시퀀싱 또는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 PCR에 의해 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 결정하는 단계;
- [0258] 여기서, 하나 이상의 유전자는 ANXA2, CACNA1C_A, CDHR2, FBXL16_B, GP1BB_A, GP1BB_C, HCN2, HPCAL1, LOC100129726, MAX.chr17.77788758-77788971, PDZD2, PTPRN2, RASSF3, RTN2, RUNDC3A, RXRA, SLC38A2, SPTBN4, SRRM3, STX10_B, TMC6_A, TSPO, CUX1, FAM78A, FBNP1, IER2, MOBKL2A, PNMAL2, S1PR4_A, LGALS3, 및 MYO15B로부터 선택된다.
- [0259] 바람직하게는, 이러한 방법에 대한 민감도는 약 70% 내지 약 100%, 또는 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다. 바람직하게는, 특이성은 약 70% 내지 약 100%, 또는 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 80% 내지 약 85%이다.
- [0260] 게놈 DNA는 상업적으로 이용 가능한 키트의 사용을 포함하여 임의의 방법으로 분리할 수 있다. 간단히 말해서, 관심 DNA가 세포막에 의해 캡슐화되는 경우 생물학적 샘플은 효소적, 화학적 또는 기계적 수단에 의해 파괴되고 용해되어야 한다. 그런 다음 DNA 용액에서 단백질 및 기타 오염 물질을, 예를 들어, 단백질 분해 효소 K로 분해하여 제거할 수 있다. 그런 다음 게놈 DNA를 용액에서 회수한다. 이것은 염석, 유기 추출, 또는 고체상 지지체로의 DNA의 결합을 포함하는 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 방법의 선택은 시간, 비용 및 필요한 DNA 양을 포함하는 여러 요인의 영향을 받는다. 신생물 물질 또는 전종양 물질을 포함하는 모든 임상 샘플 유형, 예를 들어, 세포주, 조직학적 슬라이드, 생검, 파라핀 봉입된 조직, 체액, 대변, 유방 조직, 자궁내막 조직, 백혈구, 결장 유출물, 소변, 혈장, 혈청, 전혈, 분리된 혈액 세포, 혈액에서 분리된 세포 및 이들의 조합이 본 방법에 사용하기 적합하다.
- [0261] 상기 기술은 샘플을 준비하고 테스트를 위한 핵산을 제공하는 데 사용되는 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, DNA는, 예를 들어, 미국 특허출원 일련 번호 제61/485386호에 기술된 방법 또는 관련 방법과 같은 직접 유전자 포획을 이용하여 또는 관련 방법으로 대변 샘플에서 또는 혈액 또는 혈장 샘플에서 분리된다.
- [0262] 그런 다음 게놈 DNA 샘플은 DMR을 포함하는 하나 이상의 마커(예를 들어, DMR 1-198, 예를 들어, 표 1 및 3에 의해 제공되는 것) 내의 메틸화 CpG 디뉴클레오타이드와 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드를 구별하는 적어도 하나의 시약 또는 일련의 시약으로 처리된다.
- [0263] 일부 실시형태에서, 시약은 5' 위치에서 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 우라실, 티민, 또는 혼성화 거동 측면에서 사이토신과 유사한 또 다른 염기로 전환한다. 그러나 일부 실시형태에서, 시약은 메틸화 민감성 제한 효소일 수 있다.
- [0264] 일부 실시형태에서, 게놈 DNA 샘플은 5' 위치에서 메틸화되지 않은 사이토신 염기가 우라실, 티민, 또는 혼성화 거동 측면에서 사이토신과 유사하지 않은 또 다른 염기로 전환되는 방식으로 처리된다. 일부 실시형태에서, 이 처리는 바이설파이트(아황산수소, 디설파이트)를 이용한 다음 알칼리성 가수분해로 수행된다.
- [0265] 그런 다음 처리된 핵산을 분석하여 표적 유전자 서열(DMR, 예를 들어, DMR 1-198, 예를 들어, 표 1 및 3에 의해 제공되는 것)으로부터 선택된 적어도 하나의 DMR을 포함하는 마커로부터의 적어도 하나의 유전자, 게놈 서열 또는 뉴클레오타이드의 메틸화 상태를 결정한다. 분석 방법은 본원에 나열된 것들, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 QuARTS 및 MSP를 포함하여 당해 분야에 공지된 것들로부터 선택될 수 있다.
- [0266] 비정상적인 메틸화, 보다 구체적으로 DMR(예를 들어, DMR 1-66, 예를 들어, 표 5에 제공된 바와 같음)을 포함하는 마커의 과메틸화는 PNET와 연관된다.
- [0267] 상기 기술은 PNET와 관련된 모든 샘플의 분석에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 샘플은 환자로부터

수득한 조직 및/또는 생물학적 유체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 분비물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 위 분비물, 췌장액, 위장 생검 샘플, 유방 생검으로부터의 미세절개된 세포 및/또는 대변에서 회수된 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 췌장 조직을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 샘플은 자궁내막, 유방, 간, 담관, 췌장, 위, 결장, 직장, 식도, 소장, 충수, 십이지장, 폴립, 담낭, 항문 및/또는 복막의 세포, 분비물 또는 조직을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플은 세포액, 복수, 소변, 대변, 췌장액, 내시경 검사 중에 얻은 체액, 혈액, 점액 또는 타액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 대변 샘플이다. 일부 실시형태에서, 샘플은 췌장 조직 샘플이다.

[0268] 이러한 샘플은 당업자에게 명백한 바와 같이 당해 분야에 공지된 임의의 수의 수단에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 소변 및 대변 샘플은 쉽게 얻을 수 있는 반면, 혈액, 복수, 혈청 또는 췌장액 샘플은, 예를 들어, 바늘과 주사기를 사용하여 비경구로 얻을 수 있다. 무세포 또는 실질적으로 무세포 샘플은 원심분리 및 여과를 포함하나 이에 제한되지 않는 당해 분야의 기술자에게 공지된 다양한 기술을 샘플에 적용함으로써 수득할 수 있다. 일반적으로 샘플을 수득하기 위해 침습적 기술을 사용하지 않는 것이 바람직하지만, 조직 균질물, 조직 절편 및 생검 표본과 같은 샘플을 수득하는 것이 여전히 바람직할 수 있다.

[0269] 일부 실시형태에서, 본 기술은 환자(예를 들어, PNET을 앓고 있거나 초기 단계 PNET을 앓고 있거나 PNET가 생길 수 있는 환자)를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 DMR의 메틸화 상태를 결정하고 상기 메틸화 상태를 결정한 결과에 기초하여 상기 환자에게 치료를 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료는 약제학적 화합물, 백신의 투여, 면역요법, 수술 수행, 환자 영상화, 다른 검사 수행일 수 있다. 바람직하게는, 상기 용도는 임상 스크리닝 방법, 예후 평가 방법, 치료 결과 모니터링 방법, 특정 치료적 치료에 가장 반응할 가능성이 높은 환자를 식별하는 방법, 환자 또는 대상체를 영상화하는 방법 및 약물 스크리닝 및 개발 방법에 있다.

[0270] 본 기술의 일부 실시형태에서, 대상체의 PNET을 진단하는 방법이 제공된다. 본원에 사용된 용어 "진단하는" 및 "진단"은 숙련된 기술자가 대상체가 주어진 질병 또는 병태를 앓고 있는지, 또는 주어진 질병 또는 병태가 미래에 생길 수 있는지를 추정하고 결정할 수도 있는 방법을 지칭한다. 숙련된 기술자는 종종 하나 이상의 진단 지표, 예컨대 바이오마커(예를 들어, 본원에 개시된 DMR)에 기초하여 진단을 내리며, 이의 메틸화 상태는 병태의 존재, 중증도 또는 부재를 나타낸다.

[0271] 진단과 함께 임상 암 예후는 암의 공격성과 종양 재발 가능성을 결정하여 가장 효과적인 치료법을 계획하는 것과 관련이 있다. 더 정확한 예후를 만들 수 있거나 암 발병의 잠재적 위험을 평가할 수 있다면 적절한 치료법을 선택하고 어떤 경우에는 환자에게 덜 심각한 치료법을 선택할 수 있다. 암 바이오마커의 평가(예를 들어, 메틸화 상태 결정)는 치료가 필요하지 않거나 제한적인 치료가 필요하지 않은 암 발병 위험이 낮거나 예후가 좋은 대상체를 더 집중적인 치료의 혜택을 받는 암에 걸리거나 재발할 가능성이 높은 대상체와 구분하는 데 유용하다.

[0272] 이와 같이, 본원에 사용된 "진단하기" 또는 "진단"은 암 발병 위험을 결정하거나 예후를 결정하는 것을 추가로 포함하며, 이는 본원에 개시된 진단 바이오마커(예를 들어, DMR)의 측정에 기초하여 (의학적 치료 유무에 관계없이) 임상 결과의 예측, 적절한 치료(또는 치료가 효과적인지 여부), 또는 본 치료의 모니터링 및 잠재적으로 치료의 변경을 제공할 수 있다. 또한, 지금 개시되는 주제의 일부 실시형태에서, 진단 및/또는 예후를 용이하게 하기 위해 시간에 따른 바이오마커의 다중 결정이 이루어질 수 있다. 바이오마커의 시간적 변화는 임상 결과를 예측하고, PNET의 진행을 모니터링하고, 암에 대한 적절한 치료의 효능을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 실시형태에서, 효과적인 치료 과정 동안 시간 경과에 따라 생물학적 샘플에서 본원에 개시된 하나 이상의 바이오마커(예를 들어, DMR)(및 잠재적으로 모니터링되는 경우 하나 이상의 추가 바이오마커(들))의 메틸화 상태의 변화를 기대할 수 있다.

[0273] 지금 개시되는 주제는 일부 실시형태에서 대상체에서 암의 예방 또는 치료를 개시할지 또는 계속할지를 결정하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체로부터 일정 기간 일련의 생물학적 샘플을 제공하는 단계; 상기 일련의 생물학적 샘플을 분석하여 각각의 생물학적 샘플에서 본원에 개시된 적어도 하나의 바이오마커의 메틸화 상태를 결정하는 단계; 및 상기 각각의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 메틸화 상태의 임의의 측정 가능한 변화를 비교하는 단계를 포함한다. 일정 기간 동안 바이오마커의 메틸화 상태의 임의의 변화는 암 발병 위험을 예측하고, 임상 결과를 예측하고, 암 예방 또는 치료를 시작 또는 계속할지 및 본 치료가 암을 효과적으로 치료하고 있는지를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 시점은 치료 개시 전에 선택될 수 있고 제2 시점은 치료 개시 후 어느 시점에서 선택될 수 있다. 메틸화 상태는 서로 다른 시점에

서 채취한 각 샘플에서 측정할 수 있으며 정성 및/또는 정량 차이를 기록할 수 있다. 다른 샘플로부터의 바이오마커 수준의 메틸화 상태의 변화는 PNET 위험, 예후, 치료 효능 결정 및/또는 대상체에서 암의 진행과 상관될 수 있다.

[0274] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은, 예를 들어, 질병의 증상이 나타나기 전에 초기 단계에서 질병의 치료 또는 진단을 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 임상 단계에서 질병의 치료 또는 진단을 위한 것이다.

[0275] 인용된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 하나 이상의 진단 또는 예후 바이오마커의 다중 결정이 이루어질 수 있고, 마커의 시간적 변화가 진단 또는 예후를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 진단 마커는 처음에 결정될 수 있고 두 번째에 다시 결정될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 처음에서 두 번째 시간까지 마커의 증가는 암의 특정 유형 또는 중증도의 진단 또는 주어진 예후일 수 있다. 마찬가지로, 처음에서 두 번째 시간까지 마커의 감소는 암의 특정 유형 또는 중증도 또는 주어진 예후를 나타낼 수 있다. 또한, 하나 이상의 마커의 변화 정도는 암의 중증도 및 향후 부작용과 관련될 수 있다. 숙련된 기술자는 특정 실시형태에서 여러 시점에서 동일한 바이오마커로 비교 측정을 수행할 수 있지만, 한 시점에서 주어진 바이오마커를 측정할 수 있고, 두 번째 시점에서 두 번째 바이오마커를 측정할 수 있으며, 이들 마커를 비교하여 진단 정보를 제공할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0276] 본원에 사용된 "예후 결정"이라는 문구는 숙련된 기술자가 대상체에서 병태의 과정 또는 결과를 예측할 수 있는 방법을 의미한다. 용어 "예후"는 100% 정확도로 병태의 과정 또는 결과를 예측하는 능력을 의미하지 않으며, 심지어 주어진 과정 또는 결과가 바이오마커(예를 들어, DMR)의 메틸화 상태를 기반으로 어느 정도 예측 가능하게 발생할 가능성이 있음을 의미하지 않는다. 대신, 숙련된 기술자는 용어 "예후"가 특정 과정 또는 결과가 발생할 확률이 증가함을 의미한다는 것을 이해할 것이다; 즉, 해당 병태를 나타내지 않는 개체와 비교할 때 주어진 병태를 나타내는 대상체에서 특정 과정 또는 결과가 발생할 가능성이 더 크다. 예를 들어, 병태를 나타내지 않는(예를 들어, 하나 이상의 DMR의 정상 메틸화 상태를 갖는) 개체에서 주어진 결과(예를 들어, PNET를 앓고 있음)의 변화 가능성은 매우 작을 수 있다.

[0277] 일부 실시형태에서, 통계 분석은 예후 지표를 분리한 결과에 대한 소인과 연관시킨다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 암이 없는 환자로부터 수득한 정상 대조군 샘플에서와 다른 메틸화 상태는 통계적 유의 수준에 의해 결정된 대조군 샘플의 메틸화 상태와 더 유사한 수준을 갖는 대상체보다 암에 걸릴 가능성이 더 크다는 신호를 보낼 수 있다. 추가로, 기준선(예를 들어, "정상") 수준으로부터의 메틸화 상태의 변화는 대상 예후를 반영할 수 있고, 메틸화 상태의 변화 정도는 부작용의 심각성과 관련될 수 있다. 통계적 유의성은 종종 두 집단 이상을 비교하고 신뢰 구간 및/또는 p 값을 결정함으로써 결정된다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 Dowdy 및 Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983 참조. 본 주제의 예시적인 신뢰 구간은 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 및 99.99%이고, 예시적인 p 값은 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 및 0.0001이다.

[0278] 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 예후 또는 진단 바이오마커(예를 들어, DMR)의 메틸화 상태 변화의 역치 정도가 확립될 수 있고, 생물학적 샘플에서 바이오마커의 메틸화 상태의 변화 정도가 메틸화 상태 변화의 역치 정도와 간단히 비교된다. 본원에 제공된 바이오마커에 대한 메틸화 상태의 바람직한 역치 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 실시형태에서, "노모그램(nomogram)"이 확립될 수 있으며, 이에 의해 예후 또는 진단 지표(바이오마커 또는 바이오마커의 조합)의 메틸화 상태가 주어진 결과에 대해 연관된 배치와 직접 관련된다. 숙련된 기술자는 개별 샘플 측정이 집단 평균이 아니라 참조되기 때문에 이 측정의 불확실성이 마커 농도의 불확실성과 동일하다는 것을 포함하여 두 숫자 값을 관련시키기 위해 이러한 노모그램을 사용하는 것에 대해 잘 알고 있다.

[0279] 일부 실시형태에서, 대조군 샘플은 생물학적 샘플과 동시에 분석되어 생물학적 샘플에서 수득한 결과를 대조군 샘플에서 수득한 결과와 비교할 수 있다. 추가로, 생물학적 샘플에 대한 검정 결과를 비교할 수 있는 표준 곡선이 제공될 수 있음이 고려된다. 이러한 표준 곡선은 형광 표지가 사용되는 경우 검정 단위(예를 들어, 형광 신호 강도)의 함수로서 바이오마커의 메틸화 상태를 나타낸다. 여러 기증자로부터 채취한 샘플을 사용하여, 정상 조직에서 하나 이상의 바이오마커의 대조군 메틸화 상태에 대한 표준 곡선뿐만 아니라 화생(metaplasia) 또는 PNET을 가진 기증자로부터 채취한 조직 내 하나 이상의 바이오마커의 "위험" 수준에 대한 표준 곡선을 제공할 수 있다. 상기 방법의 특정 실시형태에서, 대상체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 본원에 제공된 하나 이상의 DMR의 비정상적인 메틸화 상태를 확인하면 대상체가 화생을 갖는 것으로 인정된다. 상기 방법의 다른 실시형태

에서, 대상체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 이러한 바이오마커 중 하나 이상의 비정상적인 메틸화 상태의 검출은 대상체가 암을 갖는 것으로 인정된다.

[0280] 마커 분석은 하나의 테스트 샘플 내에서 추가 마커를 사용하여 개별적으로 또는 동시에 수행할 수 있다. 예를 들어, 여러 마커를 하나의 테스트로 합하여 여러 샘플을 효율적으로 처리하고 잠재적으로 더 큰 진단 및/또는 예후 정확도를 제공할 수 있다. 또한, 당업자는 동일한 대상체로부터 여러 샘플을 (예를 들어, 연속적인 시점에서) 테스트하는 값을 인식할 것이다. 이러한 일련의 샘플 테스트를 통해 시간에 따른 마커 메틸화 상태의 변화를 확인할 수 있다. 메틸화 상태의 변화와 메틸화 상태의 변화 부재는 질병 상태에 대해 유용한 정보를 제공할 수 있는데, 는 이벤트 발생 후 대략적인 시간의 식별, 구체 가능한 조직의 존재 및 양, 약물 요법의 적절성, 다양한 요법의 효과 및 미래 이벤트의 위험을 포함하여 대상체의 결과 식별을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0281] 바이오마커 분석은 다양한 물리적 형식으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 마이크로타이터 플레이트 또는 자동화기를 사용하여 많은 수의 테스트 샘플을 쉽게 처리할 수 있다. 대안으로, 단일 샘플 형식을 개발하여, 예를 들어, 외래 수송 또는 응급실 세팅과 같이 적시에 즉각적인 치료 및 진단을 수행할 수 있다.

[0282] 일부 실시형태에서, 대조군 메틸화 상태와 비교할 때 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 메틸화 상태에 측정 가능한 차이가 있는 경우 대상체는 PNET을 갖는 것으로 진단된다. 반대로, 생물학적 샘플에서 메틸화 상태의 변화가 확인되지 않으면 대상체는 PNET이 없거나 암 위험이 없거나 암 위험이 낮은 것으로 확인될 수 있다. 이와 관련하여, 암 또는 이의 위험이 있는 대상체는 암 또는 이의 위험이 낮거나 실질적으로 없는 대상체와 구별될 수 있다. PNET의 진행 위험이 있는 대상체는 내시경 감시(endoscopic surveillance)를 포함하여 더욱 집중적이고/거나 정기적인 스크리닝 일정에 배치될 수 있다. 반면에, 위험이 낮거나 실질적으로 없는 대상체는, 예를 들어, 본 기술에 따라 수행되는 스크리닝과 같은 향후 스크리닝이 해당 대상체에서 PNET 위험이 나타났음을 나타내는 시간까지 PNET에 대한 추가 테스트(예를 들어, 침습적 절차)를 피할 수 있다.

[0283] 위에서 인용한 바와 같이, 본 기술의 방법의 실시형태에 따라 하나 이상의 바이오마커의 메틸화 상태의 변화를 검출하는 것은 정성적 결정일 수도 있고 정량적 결정일 수도 있다. 이와 같이, PNET이 있거나 발병할 위험이 있는 대상체를 진단하는 단계는 특정 임계값 측정이 이루어짐을 나타내는데, 예를 들어, 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 메틸화 상태는 미리 결정된 대조군 메틸화 상태와 다르다. 상기 방법의 일부 실시형태에서, 대조군 메틸화 상태는 바이오마커의 임의의 검출 가능한 메틸화 상태이다. 대조군 샘플이 생물학적 샘플과 동시에 시험되는 방법의 다른 실시형태에서, 미리 결정된 메틸화 상태는 대조군 샘플의 메틸화 상태이다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 미리 결정된 메틸화 상태는 표준 곡선에 기초하고/거나 이에 의해 확인된다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 미리 결정된 메틸화 상태는 특정 병태 또는 병태 범위이다. 이와 같이, 미리 결정된 메틸화 상태는 실시되는 방법의 실시형태 및 원하는 특이성 등에 부분적으로 기초하여 당해 분야의 숙련자에게 명백할 허용 가능한 한계 내에서 선택될 수 있다.

[0284] 또한 진단 방법과 관련하여, 바람직한 대상체는 척추동물 대상체이다. 바람직한 척추동물은 온혈동물이다. 바람직한 온혈 척추동물은 포유동물이다. 바람직한 포유동물은 가장 바람직하게는 인간이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간 및 동물 대상체를 모두 포함한다. 따라서 수의학적 치료 용도가 본원에서 제공된다. 따라서 본 기술은 인간과 같은 포유동물뿐만 아니라 시베리아 호랑이와 같이 멸종 위기에 처한 중요한 포유동물; 인간에 의해 소비되기 위해 농장에서 자란 동물과 같이 경제적으로 중요한 포유동물; 및/또는 인간에게 사회적으로 중요한 동물, 예를 들어, 애완동물 또는 동물원에 기르는 동물의 진단을 제공한다. 그러한 동물의 예는 고양이와 개와 같은 육식 동물; 돼지(pig), 돼지(hog), 멧돼지를 포함한 돼지(swine); 소, 황소, 양, 기린, 사슴, 염소, 들소 및 낙타와 같은 반추 동물 및/또는 유제류; 및 말을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 사육된 돼지, 반추 동물, 유제류, 말(경주마 포함) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 가축의 진단 및 치료도 제공된다.

[0285] 지금 개시되는 주제는 대상체의 PNET을 진단하기 위한 시스템을 추가로 포함한다. 상기 시스템은, 예를 들어, 생물학적 샘플을 수집한 대상체에서 PNET 위험을 스크리닝하거나 PNET 암을 진단하는 데 사용할 수 있는 상용 키트로서 제공될 수 있다. 본 기술에 따라 제공된 예시적인 시스템은 표 1 및 3에 제공된 바와 같이 DMR의 메틸화 상태를 평가하는 것을 포함한다.

[0286] **실시예**

[0287] **예 I.**

[0288] 재료 및 방법

- [0289] 조직 및 혈액은 기관 IRB 감독하에 Mayo Clinic 생물 표본 저장소에서 수득하였다. 대상체 연구 승인 및 포함/제외 기준(연구 프로토콜에서 상세화됨)을 엄격하게 준수하여 샘플을 선택하였다. 사례는 28개의 고형 및 16개의 양성 체장 신경내분비 종양(PNET)으로 구성되었다. 대조군에는 13개의 비종양성 체장 조직과 암이 없는 환자의 18개의 버피 코트 샘플이 포함되었다. 체관 선암(PDAC)의 이전 병력이 있는 환자, 지난 6개월 동안 화학 요법 계열 약물을 받았거나 복부에 치료 방사선을 받은 환자의 조직 샘플은 연구에서 제외되었다. 조직은 거시-해부되었고, 전문 병리학자가 조직학을 검토하였다. 샘플은 연령 일치, 무작위, 맹검이었다. 조직 및 혈액 샘플의 DNA를 각각 Qiagen QIAmp FFPE 조직 키트 및 QIAamp DNA Blood Mini 키트(Qiagen, Valencia CA)를 사용하여 정제하였다. DNA는 AMPure XP 비드(Beckman-Coulter, Brea CA)로 재정제하고 PicoGreen(Thermo-Fisher, Waltham MA)으로 정량화하였다. DNA 무결성은 qPCR을 사용하여 평가하였다.
- [0290] 변형된 NuGEN Ovation RRBS Methyl-Seq 키트(Tecan Genomics, Redwood City, CA)를 사용하여 RRBS 시퀀싱 라이브러리가 준비되었다. 샘플은 4-플렉스 형식으로 합하고 Illumina HiSeq 4000 기기(Illumina, San Diego CA)로 Mayo Genomics Facility에서 시퀀싱하였다. 이미지 분석 및 염기 콜링을 위해 Illumina 파이프라인 모듈로 판독 처리하였다. 2차 분석은 Mayo가 개발한 생물 정보학 제품군인 SAAP-RRBS를 사용하여 수행하였다. 간단히 말해서, Trim-Galore를 사용하여 판독을 정리하고 BSMAP를 사용하여 GRCh37/hg19 기준 게놈 빌드로 정렬하였다. 메틸화 비율은 커버리지가 10X 이상이고 염기 품질 점수가 20 이상인 CpG에 대해 $C/(C + T)$ 를 계산하거나 반대로 역 가닥에 대한 판독 매핑의 경우 $G/(G + A)$ 를 계산하여 결정하였다.
- [0291] 개별 CpG는 과메틸화 비율, 즉 해당 부위의 총 사이토신 수에 대해 주어진 유전자 좌에서 메틸화된 사이토신의 수로 순위를 매겼다. 사례들에서, 비율은 ≥ 0.20 (20%); 조직 대조군의 경우, ≤ 0.05 (5%) 조직 대 조직 분석; ≥ 0.20 (20%) 조직 대 버피 코트, 버피 코트 대조군의 경우 ≤ 0.01 (1%)이어야 한다. CpG 과메틸화는 조직 대조군에서 $\leq 5\%$ 에 비해 사례에서 최소 20% 메틸화로 또는; 버피 코트 컨트롤의 경우 $\leq 1\%$ 로 정의되었다. 이러한 기준을 충족하지 않는 CpG는 폐기하였다. 그 후, 후보 CpG는 게놈 위치에 따라 영역당 최소 컷오프가 5개의 CpG인 약 40 - 220bp 범위의 DMR(차등적 메틸화 영역)로 비닝(binning)되었다. CpG 밀도가 지나치게 높은($>30\%$) DMR은 검증 단계에서 GC 관련 증폭 문제를 피하기 위해 제외하였다. PNET 조직 대 정상 조직 대조군 및 PNET 조직 대 버피 코트 대조군을 비교하는 두 가지 분석이 수행되었다. 회귀 분석 후, 두 세트의 DMR은 p 값, 수신자 조작 특성 곡선(receiver operating characteristic curve)(AUC) 아래 영역 및 사례와 모든 대조군 사이의 부분 메틸화 비율로 순위를 매겼다. 독립 검증이 사전에(a priori) 계획되었기 때문에 이 단계에서는 잘못된 발견에 대한 조정이 이루어지지 않았다.
- [0292] 각 후보 영역에 대해 샘플의 개별 CpG를 사례와 대조군 모두에 대한 샘플 방식과 비교하는 2-D 매트릭스를 생성하였다. 그런 다음 이러한 CpG 매트릭스를 기준 서열과 다시 비교하여 게놈적으로 인접한 메틸화 부위가 초기 필터링 동안 폐기되었는지를 평가하였다. 영역의 이 서브세트로부터, 최종 선택에는 각 샘플 수준에서 DMR 서열 전반에 걸쳐 개별 CpG의 조정되고 연속적인 과메틸화(경우에 따라)가 필요하였다. 반대로, 대조군 샘플은 사례보다 메틸화가 적어도 5배 적어야 하고 CpG 패턴은 더 무작위적이고 덜 조정되어야 한다. 암 샘플의 적어도 10%는 DMR 내 모든 CpG 부위에 대해 과메틸화 비율이 적어도 50%여야 한다.
- [0293] 별개이지만 보완적인 분석에서, 실험에는 CpG 뉴클레오타이드의 평균 메틸화 값을 기반으로 DMR을 도출하기 위해 독립 DMR 식별 파이프라인 및 회귀 패키지를 사용하였다. 평균 메틸화 비율의 차이는 PNET 사례, 조직 대조군 및 버피 코트 대조군간에 비교하였고; 각각의 매핑된 CpG의 100개의 염기쌍 내의 타일링된 판독 프레임(tiled reading frame)을 사용하여 대조군 메틸화가 $<5\%$ 인 DMR을 확인하였으며; DMR은 총 커버리지 깊이가 대상체당 평균 10회 판독이고 하위 그룹 간의 분산이 >0 인 경우에만 분석하였다.
- [0294] 회귀 분석 후, DMR은 p 값, 수신자 조작 특성 곡선(receiver operating characteristic curve)(AUC) 아래 영역 및 케이스와 모든 대조군 간의 배수 변화 차이로 순위를 매겼다. 독립 검증이 사전에(a priori) 계획되었기 때문에 이 단계에서는 잘못된 발견에 대한 조정이 이루어지지 않았다.
- [0295] 추가 진행을 위해 DMR의 하위 집합을 선택하였다. 기준은 주로 영역의 판별식 퍼텐셜(discriminant potential)에 대한 성능 평가를 제공하는 ROC 곡선 메트릭 아래의 로지스틱 유래 영역이었다. 0.90의 AUC가 컷오프로 선택되었다(사례 대 버피 코트 비교의 경우, 0.95). 또한, 메틸화 배수 변화 비율(평균 암 과메틸화 비율/평균 대조군 과메틸화 비율)을 계산하고 조직 대 조직 비교를 위해 5의 하한을 사용하고 조직 대 버피 코트 비교를 위해 100을 사용하였다. P 값은 0.01 미만이어야 했다. DMR은 평균 및 개별 CpG 선택 프로세스 모두에 나열되어야 했다. 정량 메틸화 특이적 PCR(qMSP) 프라이머는 MethPrimer(Li LC 및 Dahiya R의 Bioinformatics 2002 Nov;18(11):1427-31 참조)를 사용하여 후보 영역에 대해 설계되었고 QC는 양성 및 음성 게놈 메틸화 대조군

20ng(6250 당량)에 대해 체크하였다. 최적의 판별을 위해 다중 어닐링 온도를 테스트하였다. 검증은 두 단계의 qMSP로 수행하였다. 첫 번째는 시퀀싱된 DNA 샘플을 다시 테스트하는 것으로 구성되었다. 이는 DMR이 매우 큰 차세대 데이터 세트를 과도하게 피팅한 결과가 아니라 진정으로 판별적인지 확인하기 위해 수행되었다. 두 번째는 67개의 원발성 PNET(50개의 고형, 17개의 낭성), 25개의 전이성 PNET, 36개의 폐 및 36개의 소장 신경내분비 종양, 24개의 정상 체장 대조군 조직 및 36개의 정상 비피 코트 샘플과 같은 더 큰 독립 샘플 세트를 활용했다.

[0296] 조직은 전문적인 임상 및 병리학적 검토를 통해 이전과 같이 확인되었다. DNA 정제는 Qiagen QIAmp FFPE 조직 키트를 사용하여 수행되었다. 바이설파이트 전환 단계에는 EZ-96 DNA 메틸화 키트(Zymo Research, Irvine CA)를 사용하였다. 10ng의 전환된 DNA(마커당)는 Roche 480 LightCyclers(Roche, Basel Switzerland)에서 SYBR Green 검출을 사용하여 증폭하였다. 연속 희석된 범용 메틸화 계층 DNA(Zymo Research)를 정량 표준으로 사용하였다. CpG 애그노스틱(agnostic) ACTB(β -액틴) 검정은 입력 기준 및 정규화 제어로서 사용되었다. 결과는 ACTB의 메틸화 카피(특정 마커)/카피로 표현되었다.

[0297] 결과는 개별 MDM(메틸화 DNA 마커) 성능에 대해 논리적으로 분석되었다. 마커 조합의 경우 두 가지 기술이 사용되었다. 첫째, rPart 기술은 전체 MDM 세트에 적용되었고 3개의 MDM 조합으로 제한되었으며, rPart 예측 압 확률을 계산하였다. 두 번째 접근 방식은 무작위 포레스트 회귀(random forest regression)(rForest)를 사용하여 원본 데이터의 부트 스트랩 샘플(학습용 데이터의 약 2/3)에 적합하고 전체 MDM 패널의 교차 검증 오류(테스트용 데이터 중 1/3)를 추정하는 데 사용되며는 500개의 개별 rPart 모델을 생성하였고 500회 반복하여 실제 교차 검증 매트릭스를 과소평가 또는 과대평가하는 허위 분할(spurious split)을 방지하였다. 그런 다음, 결과는 500회 반복에 걸쳐 평균화되었다.

[0298] 결과

[0299] 샘플 제조, 시퀀싱, 분석 파이프라인 및 필터(방법에서 개략됨)의 독점 방법론을 사용하여 이들 부인과 암에 영향을 미치고 임상 시험 환경에서 떨어날 것으로 차등적 메틸화 영역(DMR)을 확인하고 좁혔다.

[0300] 조직 대 조직 분석에서, 72개의 과메틸화 DMR이 확인되었다(표 1 및 2). 이들은 PNET 특정 영역, 뿐만 아니라 보다 보편적인 암 스펙트럼을 표적으로 하는 영역이 포함되었다. 조직 대 백혈구(비피 코트) 분석은 WBC에서 노이즈가 1% 미만인 126개의 과메틸화된 조직 DMR을 산출하였다(표 3 및 4). 선택 기준을 충족하는 영역에 대한 개별 AUC의 범위는 0.90 - 1.00이며 대부분은 0.95를 초과한다. pNET 조직과 비피 코트 비교는 두 세포 유형의 특정 후성 유전적 특성과 특징으로 인해 메틸화 신호에서 가장 극적인 차이를 산출한 반면, 정상 체장과 pNET 조직을 비교하는 조직 분석은 그렇지 않았지만 여러 MDM이 두 그룹 모두에서 높은 차별을 받았고 후속 검증을 위해 선택되었다.

[0301] 조직 및 비피 마커 그룹에서, 33명의 후보자가 초기 파일럿을 위해 선택되었다. 메틸화 특이적 PCR 검정이 개발되었고 두 차례의 조직 샘플에 대해 테스트되었다; 시퀀싱된 것(동결) 및 더 큰 독립 코호트(FFPE)인 것들. 짧은 앰플리콘 프라이머(<150bp)는 DMR에서 가장 구별되는 CpG를 표적으로 하도록 설계되었으며 완전히 메틸화된 단편이 강력하고 선형 방식으로 증폭되었는지 확인하기 위해 대조군에서 테스트되었고; 메틸화되지 않은 및/또는 전환되지 않은 단편은 증폭되지 않는다. 66개의 프라이머 서열 및 어닐링 온도가 표 5에 나열되어 있다.

[0302] 1단계 검증의 결과를 논리적으로 분석하여 AUC 및 배수 변화를 결정하였다. 조직 및 비피 코트 대조군에 대한 분석은 별도로 수행되었다. 결과는 표 6에 강조 표시되어 있다. 파란색 음영은 AUC가 0.90을 초과하는 마커를 나타낸다. 많은 분석이 PNET에서 비피 코트 샘플과 100% 구별되었고, 다른 분석은 PNET 대 대조군 조직 분석에서 거의 완벽했다.

[0303] 이러한 결과는 독립적인 샘플 테스트를 수행할 수 있는 고성능 후보자에게 풍부한 소스를 제공하였다. 원래의 33개 검정 중, 31개가 선택되었다. 최종 PNET 테스트는 혈액 기반으로 계획되기 때문에, 이러한 MDM이 정상 백혈구 유래 cfDNA와 구별하는 능력이 가장 중요하다. 따라서, 선택은 비피 코트 샘플과 비교할 때 고성능 MDM에 대해 크게 가중되었다. 2개의 마커는, 그들의 AUC가 0.90 미만이었으므로 제외되었다. 나머지 31개는 AUC 범위 0.90 - 1.00에 속했다. 이러한 모든 검정은 높은 분석 성능 - 선형성, 효율성, 서열 특이성(용융 곡선 분석을 사용하여 평가) 및 강력한 증폭을 입증하였다.

[0304] 2차 검증에서, 이전 단계에서와 같이, 전체 샘플 및 마커 세트가 하나의 배치에서 실행되었다. 마커당 ~10ng의 FFPE 유래 샘플 DNA가 실행되었다(총 310개). 개별 MDM에 대한 PNET 대 정상 조직 및 비피 코트 결과는 표 5에 나열되어 있다. 표 7은 PNET 조직, 낭성 PNET 조직, 고체 PNET 조직, 전이성 PNET 조직 대 정상 체장 조직, 및 PNET 조직 대 전이성 PNET 조직에 대한 AUC를 보여준다. 표 8은 소장 신경내분비 조직(NET) 및 폐 NET 대 PNET

조직에 대한 AUC를 보여준다. 표 9는 전이성 PNET 조직, 폐 NET 및 소장 NET 대 버피 코트에 대한 AUC를 보여준다. 개별 마커 후보의 수신기 운영자 특성 분석에서, PNET 대 대조군 조직 비교에 가장 적합한 AUC는 0.51에서 0.98 사이였다. PNET 대 버피 코트 비교의 경우, AUC 범위는 0.91 - 1.0이다. 중앙값 AUC는 각각 0.88과 0.99였다. 4개의 MDM(*SRRM3*, *HCN2*, *SPTBN4* 및 *TMC6_A*)이 개별 교차 검증 AUC ≥ 0.95 를 달성했다(표 6). 이러한 MDM은 전이성 PNET 조직과 원발성 폐 및 소장 NET에서 유사하게 구별되었다. 이 4개 MDM 중 3개는 AUC가 1인 버피 코트에서 PNET 조직을 완벽하게 차별화했으며, 혈액 기반 분석의 추가 개발에 이상적으로 적합할 수 있다.

[0305] 요약하면, 전체 메틸롬 시퀀싱, 엄격한 필터링 기준 및 생물학적 검증은 췌장 신경 내분비 종양에 대한 뛰어난 후보 MDM을 산출했다. 또한, 이러한 MDM은 전이성 PNET을 정상 췌장 조직과 차별화했다.

표 1

[0306]

DMR 번호	유전자 주석	염색체 번호	DMR 시작 종료 위치 (GRCh37/hg19)
1	ADCY4	14	24808742-24808909
2	ANKHD1-EIF4EBP3	5	139927684-139927755
3	ANXA2	15	60690826-60690959
4	BTBD17	17	72352858-72353448
5	C7orf23	7	86848467-86848674
6	CACNA1C_A	12	2692333-2692493
7	CCDC102A	16	57571027-57571105
8	CDHR2	5	175969650-175969749
9	CTBP2	10	126850434-126850576
10	DIDO1	20	61560373-61560657
11	EEF1A2	20	62119620-62119812
12	ENO3	17	4853728-4853800
13	FBXL16_A	16	744986-745216
14	FBXL16_B	16	750628-750715
15	FLJ22184	19	7934721-7934770
16	FLOT1	6	30711524-30711803
17	GP1BB_A	22	19710945-19711074
18	GP1BB_B	22	19711446-19711516
19	GP1BB_C	22	19711681-19711850
20	HCN2	19	591692-591781
21	HPCAL1	2	10444412-10444495
22	IZUMO1	19	49250409-49250467
23	JSRP1_A	19	2252384-2252398
24	JSRP1_B	19	2253163-2253319
25	KCNH6	17	61615733-61615864
26	LGALS3	14	55595729-55595844
27	LIN28A	1	26735086-26735256
28	LMO4	1	87796247-87796350
29	LOC100129726	2	43452130-43452585
30	LTBP4	19	41116418-41116462
31	MAST1	19	12978384-12978558
32	MAX.chr11.518965-519004	11	518965-519004
33	MAX.chr14.69283008-69283105	14	69283008-69283105
34	MAX.chr15.76638902-76638974	15	76638902-76638974
35	MAX.chr17.2627804-2627879	17	2627804-2627879
36	MAX.chr17.2659373-2659452	17	2659373-2659452
37	MAX.chr17.42357220-42357323	17	42357220-42357323
38	MAX.chr17.77788758-77788971	17	77788758-77788971
39	MAX.chr19.13266472-13266581	19	13266472-13266581
40	MAX.chr19.2478419-2478656	19	2478419-2478656
41	MAX.chr22.25678201-25678290	22	25678201-25678290
42	MAX.chr3.127176070-127176139	3	127176070-127176139
43	MAX.chr9.137028591-137028864	9	137028591-137028864
44	MT1G	16	56701913-56702151

45	MYO15B	17	73584898-73585121
46	NCRNA00245	10	77164134-77164642
47	OCA2	15	28339873-28340223
48	PDE2A	11	72301460-72301582
49	PDZD2	5	31855237-31855491
50	PHLDB3	19	43979342-43979600
51	PPARGC1B	5	149111737-149111884
52	PTPRN2	7	157484509-157484663
53	RASSF3	12	65004980-65005539
54	RTN2	19	45996433-45996499
55	RUNDC3A	17	42392883-42393032
56	RXRA	9	137217099-137217558
57	SAMD11	1	861287-861369
58	SLC38A2	12	46767122-46767329
59	SLC38A3	3	50243435-50243504
60	SLC8A2	19	47933463-47933678
61	SPTBN4	19	41060185-41060270
62	SRRM3	7	75896582-75896785
63	STX10_A	19	13265725-13265813
64	STX10_B	19	13265939-13266255
65	SYT5	19	55684965-55685063
66	SYT7	11	61322823-61322904
67	TGIF2	20	35203463-35203676
68	TMC6_A	17	76123640-76123768
69	TMC6_B	17	76124136-76124298
70	TMEM145	19	42818005-42818094
71	TNKS1BP1	11	57078772-57078977
72	TSPO	22	43548112-43548218

표 2

[0307]

DMR 번호	유전자 주석	곡선 아래 면적	접기 변경	p-값
1	ADCY4	0.9156	6.628	0.0001779
2	ANKHD1-EIF4EBP3	0.9502	7.534	2.84E-06
3	ANXA2	0.9106	6.497	0.0002795
4	BTBD17	0.9356	13.09	1.42E-06
5	C7orf23	0.9606	44.2	0.00953
6	CACNA1C_A	0.9219	26.87	0.0006922
7	CCDC102A	0.9462	7.609	3.41E-05
8	CDHR2	0.9431	25.78	0.00822
9	CTBP2	0.9623	11.93	6.45E-06
10	DIDO1	0.9034	6.459	0.005633
11	EEF1A2	0.9811	23.6	1.08E-05
12	ENO3	0.937	12.57	5.35E-05
13	FBXL16_A	0.9577	10.56	1.54E-06
14	FBXL16_B	0.9528	36.61	1.39E-05
15	FLJ22184	0.927	10.86	3.43E-06
16	FLOT1	0.8974	19.06	0.0009995
17	GP1BB_A	0.9233	9.225	3.04E-05
18	GP1BB_B	0.8981	12.2	5.42E-06
19	GP1BB_C	0.9487	13.51	2.24E-06
20	HCN2	0.9583	48.06	4.15E-05
21	HPCAL1	0.9545	27.51	0.00094
22	IZUMO1	0.9484	13.03	9.94E-08
23	JSRP1_A	0.9122	7.722	8.39E-05
24	JSRP1_B	0.898	10.98	1.58E-05
25	KCNH6	0.9081	20.38	1.47E-06

26	LGALS3	0.9557	21.06	0.00266
27	LIN28A	0.9568	19.93	7.84E-07
28	LMO4	0.9744	35.78	9.11E-06
29	LOC100129726	0.9423	68.4	0.007458
30	LTBP4	0.8958	5.247	0.0002122
31	MAST1	0.9757	15.32	2.72E-07
32	MAX.chr11.518965-519004	0.8986	7.527	7.00E-05
33	MAX.chr14.69283008-69283105	0.9207	8.658	0.004686
34	MAX.chr15.76638902-76638974	0.9051	7.104	0.0001099
35	MAX.chr17.2627804-2627879	0.9649	12.9	9.25E-08
36	MAX.chr17.2659373-2659452	0.9475	28.74	0.000786
37	MAX.chr17.42357220-42357323	0.9628	15.42	3.36E-07
38	MAX.chr17.77788758-77788971	0.9286	30.46	0.001833
39	MAX.chr19.13266472-13266581	0.9235	67.09	0.002876
40	MAX.chr19.2478419-2478656	0.9306	16.61	5.56E-05
41	MAX.chr22.25678201-25678290	0.9118	13.14	3.83E-05
42	MAX.chr3.127176070-127176139	0.9183	6.631	3.78E-05
43	MAX.chr9.137028591-137028864	0.9514	12.79	4.75E-05
44	MT1G	0.926	8.244	7.36E-05
45	MYO15B	0.9069	24.67	0.0006389
46	NCRNA00245	0.9206	10.96	0.000104
47	OCA2	0.9137	14.03	0.0006256
48	PDE2A	0.9558	13.12	8.20E-06
49	PDZD2	0.9139	34.56	0.004131
50	PHLDB3	0.9494	39.41	1.43E-06
51	PPARGC1B	0.9028	10.56	0.0002482
52	PTPRN2	0.9938	20.81	1.32E-06
53	RASSF3	0.956	20.96	0.0003587
54	RTN2	0.9919	21.95	2.10E-09
55	RUNDC3A	0.937	33	0.0001732
56	RXRA	0.9206	27.38	0.00304
57	SAMD11	0.9792	13.05	0.0003039
58	SLC38A2	0.9524	43.57	0.002501
59	SLC38A3	0.941	15.42	6.02E-06
60	SLC8A2	0.9156	15.67	0.0002196
61	SPTBN4	0.9679	22.71	5.82E-07
62	SRRM3	0.9579	47.41	5.42E-05
63	STX10_A	0.9208	51.95	0.00188
64	STX10_B	0.9614	39.5	0.0002594
65	SYT5	0.9455	15.69	0.0006154
66	SYT7	0.9011	7.743	0.0001346
67	TGIF2	0.9425	27.97	2.25E-06
68	TMC6_A	0.9901	27.34	1.69E-07
69	TMC6_B	0.9557	14.43	3.50E-05
70	TMEM145	0.9486	14.52	3.66E-05
71	TNKS1BP1	0.9226	27.14	6.68E-05
72	TSPO	0.9667	9.424	3.38E-07

표 3

DMR 번호	유전자 주석	염색체 번호	DMR 시작 종료 위치 (GRCh37/hg19)
73	ABHD8	19	17403232-17403460
74	ACAP1	17	7240013-7240106
75	ARHGAP30	1	161039227-161039440
76	AXIN1	16	375199-375316
77	BCL9	1	147016991-147017127

[0308]

78	C1orf38	1	28195587-28195817
79	C2orf85	2	242810333-242810434
80	CACNA1C_B	12	2800272-2800464
81	CDK9	9	130545435-130545566
82	CRMP1	4	5868034-5868199
83	CSK	15	75069555-75069761
84	CTU2	16	88769741-88770116
85	CUX1	7	101500189-101500515
86	DEDD2	19	42703469-42703649
87	ELMO1	7	37392953-37393050
88	EPS15L1	19	16482561-16482712
89	FAM129C	19	17634027-17634213
90	FAM78A	9	134151363-134151474
91	FERMT3	11	63974772-63974955
92	FGF18	5	170878125-170878222
93	FHAD1	1	15672512-15672643
94	FNBP1	9	132650764-132651026
95	GMFG	19	39826176-39826273
96	GNG7	19	2561967-2562206
97	GRK6	5	176858662-176858774
98	HIVEP3	1	42204698-42204867
99	HMGA1	6	34203522-34203631
100	HMHA1_A	19	1069295-1069500
101	HMHA1_B	19	1074514-1074737
102	HPCAL1	2	10471174-10471748
103	IER2	19	13264692-13264807
104	IL17C	16	88700993-88701075
105	INPP5D	2	233925165-233925301
106	KIAA0195	17	73483829-73483938
107	KIAA0427	18	46361212-46361352
108	LMTK2	7	97831890-97832023
109	LOC100130872	4	1195670-1196131
110	LOC100507463	6	32813441-32813592
111	LOC285696	5	17130456-17130634
112	MAD1L1	7	1980049-1980132
113	MARK2	11	63637233-63637411
114	MAX.chr1.16488894-16489075	1	16488894-16489075
115	MAX.chr1.210426160-210426264	1	210426160-210426264
116	MAX.chr1.225655507-225655620	1	225655507-225655620
117	MAX.chr11.68049738-68049894	11	68049738-68049894
118	MAX.chr12.12163358-12163631	12	12163358-12163631
119	MAX.chr14.102188698-102188818	14	102188698-102188818
120	MAX.chr14.107253099-107253355	14	107253099-107253355
121	MAX.chr15.31727007-31727144	15	31727007-31727144
122	MAX.chr15.70550976-70551130	15	70550976-70551130
123	MAX.chr16.11327016-11327312	16	11327016-11327312
124	MAX.chr16.50300428-50300651	16	50300428-50300651
125	MAX.chr16.50308404-50308570	16	50308404-50308570
126	MAX.chr17.74994454-74994572	17	74994454-74994572
127	MAX.chr17.76339840-76340086	17	76339840-76340086
128	MAX.chr2.10169502-10169736	2	10169502-10169736
129	MAX.chr2.235355101-235355212	2	235355101-235355212
130	MAX.chr20.56008091-56008227	20	56008091-56008227
131	MAX.chr3.187676577-187676668	3	187676577-187676668
132	MAX.chr4.4765181-4765330	4	4765181-4765330
133	MAX.chr5.53942200-53942315	5	53942200-53942315
134	MAX.chr6.159519777-159519949	6	159519777-159519949
135	MAX.chr6.170580966-170581132	6	170580966-170581132

136	MAX.chr6.20024141-20024570	6	20024141-20024570
137	MAX.chr6.24936094-24936246	6	24936094-24936246
138	MAX.chr7.391295-391422	7	391295-391422
139	MAX.chr8.142046288-142046398	8	142046288-142046398
140	MAX.chr8.142216497-142216631	8	142216497-142216631
141	MAX.chr8.144217550-144217700	8	144217550-144217700
142	MAX.chr8.145900710-145901246	8	145900710-145901246
143	MAX.chr8.80804237-80804308	8	80804237-80804308
144	MAX.chr9.87904996-87905372	9	87904996-87905372
145	MBP	18	74818401-74818536
146	MGAT1	5	180230498-180230723
147	MIR200C	12	7068171-7068303
148	MOBK12A	19	2085442-2085612
149	NBEAL2	3	47029453-47029597
150	NCOR2_A	12	124941846-124941955
151	NCOR2_B	12	124950687-124950803
152	NELF	9	140356296-140356348
153	OSM_A	22	30662000-30662103
154	OSM_B	22	30662697-30662807
155	PARVG	22	44577550-44577908
156	PKN1	19	14551093-14551303
157	PNMAL2	19	46996516-46996606
158	PPP6R1	19	55765917-55766155
159	PRIC285	20	62199539-62199703
160	PRKAR1B	7	644126-644374
161	PTK2B	8	27221308-27221453
162	PTPRE	10	129845667-129845938
163	RAC2_A	22	37626189-37626295
164	RAC2_B	22	37637570-37637727
165	RAP1GAP2	17	2699553-2699729
166	RASSF1	3	50378492-50378750
167	RBM38	20	55964848-55965398
168	RHOF	12	122231058-122231184
169	S1PR4_A	19	3178378-3178781
170	S1PR4_B	19	3179828-3180413
171	SDK2	17	71587461-71587557
172	SEPTIN9_A	17	75449912-75450101
173	SEPTIN9_B	17	75461597-75461735
174	SH3BP2	4	2813867-2814151
175	SHANK3	22	51110972-51111091
176	SHISA5	3	48520645-48520772
177	SHROOM1	5	132161293-132161522
178	SKI	1	2232144-2232470
179	SNX20	16	50715181-50715339
180	STAT5A	17	40440733-40441156
181	SUCLG2	3	67706348-67706568
182	SUN2_A	22	39148139-39148300
183	SUN2_B	22	39152758-39152893
184	SUSD3	9	95821778-95821978
185	TCF3	19	1650722-1650865
186	TMC6_C	17	76127199-76127566
187	TMEM132E	17	32964651-32964776
188	TMEM163	2	135464600-135464735
189	TNFRSF10D	8	22961173-22961268
190	TNFRSF25	1	6526055-6526198
191	TRABD	22	50629316-50629609
192	TRAF3IP3	1	209943070-209943218
193	UHRF1	19	4916882-4916984

194	VAV1	19	6772930-6773075
195	VILL	3	38035405-38035508
196	ZC3H12D	6	149803439-149803687
197	ZDHH18	1	27160118-27160221
198	ZFYVE28	4	2292779-2292933

표 4

[0309]

DMR 번호	유전자 주석	곡선 아래 면적	접기 변경	p-값
73	ABHD8	0.9967	257.2	1.39E-08
74	ACAP1	1	606.1	4.15E-06
75	ARHGAP30	1	678.3	2.03E-11
76	AXIN1	1	1146	5.59E-07
77	BCL9	1	506.8	7.00E-06
78	Clorf38	1	511.7	8.00E-07
79	C2orf85	1	104.7	8.46E-08
80	CACNA1C_B	1	359	3.44E-05
81	CDK9	1	6861	9.63E-05
82	CRMP1	1	573.6	7.98E-11
83	CSK	1	164.7	1.25E-09
84	CTU2	1	356.6	2.44E-18
85	CUX1	1	1511	0.0007766
86	DEDD2	1	686.5	5.75E-16
87	ELMO1	1	2199	1.61E-08
88	EPS15L1	1	100.3	3.76E-13
89	FAM129C	1	357	6.75E-10
90	FAM78A	1	2394	3.94E-09
91	FERMT3	1	6902	0.002545
92	FGF18	0.9782	103.7	0.0001005
93	FHAD1	1	460.7	7.58E-15
94	FBNP1	1	2139	2.36E-07
95	GMFG	1	445.8	2.66E-09
96	GNG7	1	562.4	1.13E-09
97	GRK6	1	1610	1.96E-10
98	HIVEP3	1	197	5.04E-14
99	HMGA1	1	418.8	0.0005092
100	HMHA1_A	1	619.7	0.0004255
101	HMHA1_B	1	212.2	3.57E-11
102	HPCAL1	1	373.2	5.45E-12
103	IER2	0.9806	508.5	0.009347
104	IL17C	1	828.8	1.33E-08
105	INPP5D	1	1836	8.39E-06
106	KIAA0195	1	260.1	2.58E-12
107	KIAA0427	0.9984	184.7	3.14E-11
108	LMTK2	1	1776	5.52E-07
109	LOC100130872	1	304.9	2.04E-14
110	LOC100507463	1	1204	4.42E-14
111	LOC285696	1	780.5	8.46E-12
112	MAD1L1	1	1757	5.89E-12
113	MARK2	1	246.7	3.90E-10
114	MAX.chr1.16488894-16489075	1	258.5	5.63E-10
115	MAX.chr1.210426160-210426264	0.9769	140.2	1.09E-05
116	MAX.chr1.225655507-225655620	1	714.1	3.91E-06
117	MAX.chr11.68049738-68049894	1	836.5	3.22E-07
118	MAX.chr12.12163358-12163631	1	427.7	1.01E-06
119	MAX.chr14.102188698-102188818	1	550	7.29E-06
120	MAX.chr14.107253099-107253355	1	183.3	1.10E-05

121	MAX.chr15.31727007-31727144	1	143.2	2.62E-13
122	MAX.chr15.70550976-70551130	1	283.2	3.68E-16
123	MAX.chr16.11327016-11327312	1	1448	8.67E-05
124	MAX.chr16.50300428-50300651	1	263.9	1.08E-07
125	MAX.chr16.50308404-50308570	1	1026	2.51E-11
126	MAX.chr17.74994454-74994572	1	340.1	5.73E-23
127	MAX.chr17.76339840-76340086	1	242.1	7.49E-18
128	MAX.chr2.10169502-10169736	1	344.5	3.21E-11
129	MAX.chr2.235355101-235355212	1	833.6	9.00E-14
130	MAX.chr20.56008091-56008227	1	1437	8.70E-10
131	MAX.chr3.187676577-187676668	1	605.6	5.73E-13
132	MAX.chr4.4765181-4765330	0.9984	121.1	9.86E-11
133	MAX.chr5.53942200-53942315	1	281.6	1.71E-15
134	MAX.chr6.159519777-159519949	1	140.7	6.66E-11
135	MAX.chr6.170580966-170581132	1	249.1	1.20E-12
136	MAX.chr6.20024141-20024570	1	324.6	9.02E-21
137	MAX.chr6.24936094-24936246	1	450.6	6.59E-07
138	MAX.chr7.391295-391422	0.9783	286.9	9.61E-11
139	MAX.chr8.142046288-142046398	1	1012	5.66E-06
140	MAX.chr8.142216497-142216631	1	197.9	7.42E-07
141	MAX.chr8.144217550-144217700	0.9581	146.4	7.12E-17
142	MAX.chr8.145900710-145901246	1	596.4	1.23E-30
143	MAX.chr8.80804237-80804308	1	296.9	1.15E-05
144	MAX.chr9.87904996-87905372	1	356.7	5.38E-18
145	MBP	1	486.8	3.78E-15
146	MGAT1	1	1066	4.04E-10
147	MIR200C	1	769.4	5.84E-11
148	MOBKL2A	1	3343	0.0004202
149	NBEAL2	1	2617	1.81E-07
150	NCOR2_A	1	304.9	5.69E-11
151	NCOR2_B	1	457.2	4.35E-11
152	NELF	1	905.7	3.88E-05
153	OSM_A	1	1317	1.07E-10
154	OSM_B	1	897.5	9.33E-09
155	PARVG	1	412.3	4.08E-06
156	PKN1	1	354.8	4.63E-14
157	PNMAL2	0.9984	154.4	1.24E-08
158	PPP6R1	1	544.1	1.65E-06
159	PRIC285	1	398.8	3.43E-21
160	PRKAR1B	1	517.4	1.87E-13
161	PTK2B	1	547.3	1.03E-10
162	PTPRE	1	1138	1.45E-05
163	RAC2_A	1	1953	0.0001195
164	RAC2_B	1	184.3	1.45E-11
165	RAP1GAP2	1	1875	3.91E-05
166	RASSF1	1	353.5	5.28E-13
167	RBM38	1	164.3	5.90E-15
168	RHOF	1	456.5	4.76E-07
169	S1PR4_A	1	3268	5.18E-09
170	S1PR4_B	1	1640	9.87E-14
171	SDK2	1	490.5	7.27E-09
172	SEPTIN9_A	1	358.4	2.80E-10
173	SEPTIN9_B	1	197.9	9.73E-12
174	SH3BP2	1	710.9	2.18E-06
175	SHANK3	1	123.4	1.56E-18
176	SHISA5	1	523.2	2.96E-13
177	SHROOM1	1	368.2	3.10E-25
178	SKI	1	198.5	6.16E-18

179	SNX20	1	965.2	2.45E-08
180	STAT5A	1	462.7	4.41E-12
181	SUCLG2	1	2193	7.49E-19
182	SUN2_A	1	4978	8.42E-06
183	SUN2_B	1	285.7	5.54E-09
184	SUSD3	1	646.6	5.09E-21
185	TCF3	1	108.9	8.36E-09
186	TMC6_C	1	1019	3.82E-22
187	TMEM132E	1	185.3	4.91E-09
188	TMEM163	1	584.1	8.19E-06
189	TNFRSF10D	1	579.4	1.64E-08
190	TNFRSF25	1	145.2	4.19E-09
191	TRABD	1	204.3	6.93E-08
192	TRAF3IP3	1	239.7	1.32E-10
193	UHRF1	1	884.8	4.78E-14
194	VAV1	1	610.6	2.89E-10
195	VILL	1	131.6	1.28E-09
196	ZC3H12D	1	165.9	4.91E-13
197	ZDHC18	1	1722	6.65E-13
198	ZFYVE28	1	388.5	2.58E-20

표 5

[0310]

DMR 번호	유전자 주석	서열 번호	정방향 프라이머 5'-3' 시퀀스	서열 번호	리버스 프라이머 5'-3' 시퀀스
3	ANXA2	1	AGGATTGTTTGTACGAGGTCGCGT	2	ACTATACTCCGCTTCTCTCCGCGCC
6	CACNA1C_A	3	GGTCGCGCGTTTGTTTAGAGGC	4	AACTCATCTCCCTCCGAAACGTC
8	CDHR2	5	CGAGTTTAGTGGTTTTAGGTAACGG	6	TACGAAATCCGAAAAAATCCGTA
14	FBXL16_B	7	TCGAGGCGGTAGTATTAGGTTACG	8	AATCTAAAAACGAAAAATCCCCGT
17	GP1BB_A	9	TTTATTTTGTAGCGGGAGGCGTAGGC	10	CTAAACTATTTCTAACCAACCGCA
19	GP1BB_C	11	TAGTAGAGCGGGTCGGAGCGTAAGC	12	CGCCTACTACCCTATCTAACGAAAACGAAC
20	HCN2	13	TTGGGAAGTTTGCAGTTTTTCGTT	14	AAAAATCCGTAATACTATCTAAACGCCC
21	HPCAL1	15	AGGATGTAGTTTAGTTCGTGGAGTTCGAG	16	GAAAAACGCCAATTTTACGCCGTAA
29	LOC100129726	17	GTGTAATTTGGGTCGCGTTTTTCGC	18	CGTACCTTTAACACGCGGATACGTT
38	MAX. chr17.77788758-77788971	19	TTAGGGTCGGGAAAGGATTTTATCGT	20	GAAACCGAACTCGAAATCCACGCG
40	MAX. chr19.2478419-2478656	21	GATTTTGGGTTGCGGTGGTCGT	22	AAACACATATAAAAAACATTTCAACGAA
49	PDZD2	23	AGTTATAGTTTCGGAGGCGCGGAGC	24	CCGAAAAACGAAAAAACAACGCT
52	PTPRN2	25	CGGGTTATAGTTATAGGTTGGGGTATTTCGG	26	ACTCTCGCCAACTCCGCGAA
53	RASSF3	27	GCGGTTTTTTGGTATTAGGAGTCGT	28	ATAAACGTAACCGAATTAACCCGAC
54	RTN2	29	TTTTATTGAAGTGGGTAATAATTTTCGAG	30	TCCGAATAAAAACTAAAAACACCGCTA
55	RUNDC3A	31	TTAGGGGTTAGGGTAGGTCGTGCGT	32	CGCGAAAAACGAAAACTAAAAACGTA
56	RXRA	33	CGTTTGTTTAGGAAGGTTGGGTTTGGC	34	GCGTCTCGAACGACTAAAAATTCGAA
58	SLC38A2	35	ACGGTTATGGAATTTGGATTAGCGG	36	CCAAACGACCTTAAAAACGCCGAA
61	SPTBN4	37	TCGGATTGCGGGAGGTTGTC	38	CACGTCGAAATAATACTACTCCACCTAAAACG
62	SRRM3	39	TCGTTTTAGCGGAACGCGG	40	GTACGTACATCGAACGACTATACGCCGAC
64	STX10_B	41	TTATAGTATTAGGTGGAGTTGAGCGG	42	AACGATTCTCGAAAAAATACGAA
68	TMC6_A	43	GTTTTGTTTGGGTTTTGGGTTTCGG	44	AAACAAAAACGACAAAACTCGCT
72	TSPO	45	TTTAGGTGCGTTGTAGTTAGACGG	46	AAACAAATCCCAAAAACTACTCGAC
85	CUX1 (v1)	47	GGAGAGGATTTGAAGGTTTCGT	48	CTCTAAATCTACCAACTCCGAT
85	CUX1 (v2)	49	CGTAGGTTTAAAGTGGTTTCGCGG	50	CCGATTCTATTCTATTTAAACGAA

90	FAM78A	51	GGGTGTTCCGGTAGCGGAGTATTACGTT	52	ATAAAAACCTCCATCGACCCCGTCC
94	FNBP1	53	GCGTGATTGATGGGTGTATTACGT	54	ATAAACTTCCGATCCCTACAACGAA
103	IER2	55	GTCGAATCGTCCGTTTCGAGGGC	56	TCTCCACGATTTTCGGAACGCT
148	MOBK2A	57	ATTTTGTTATTGTTTCGGGGATCGT	58	CACTCAAACTTATCTCTCAAACGCC
157	PNMAL2	59	GAGGAAAGAGAAGTGGGCGTTCGA	60	CCCAATCCTAATCCACTTAACGCGTC
169	S1PR4_A	61	GGTTGGAAGGGGTGTTTATTTCGA	62	GAAAACCCGCAAAAACCCCGAA
26	LGALS3	63	GCGTTACGGAATTTAACGGTGGTAGCG	64	CGACGAAAAAACGCGAACACTAAAAAC G
45	MYO15B	65	TTTCGAGGATAGTTCGCGGGTTTTTC	66	ATTATCGCTCGCGTCCTTAACCGAC

표 6

[0311]

DMR 번호	유전자 주석	AUC PNET 조직 대 양성 체장 조 직(정상)	AUC PNET 티슈 대 버퍼 코트
3	ANXA2	0.81119	1
6	CACNA1C_A	0.86888	0.99621
8	CDHR2	0.96329	0.99621
14	FBXL16_B	0.92657	0.98106
17	GP1BB_A	0.88986	1
19	GP1BB_C	0.95629	1
20	HCN2	0.96154	0.97917
21	HPCAL1	0.8951	0.97159
26	LGALS3	0.80944	0.87879
29	LOC100129726	0.76049	0.91098
38	MAX.chr 17.77788758-7778897 1	0.87325	0.9536
40	MAX.chr 19.2478419-2478656	0.84091	0.99242
45	MYO15B	0.88287	0.73011
49	PDZD2	0.89336	0.94318
52	PTPRN2	0.95105	0.97727
53	RASSF3	0.87762	0.93939
54	RTN2	0.94056	1
55	RUNDC3A	0.90909	0.95265
56	RXRA	0.72552	0.94886
58	SLC38A2	0.88287	0.99811
61	SPTBN4	0.98427	1
62	SRRM3	0.95717	0.98485
64	STX10_B	0.95105	1
68	TMC6_A	0.96503	1
72	TSPO	0.87238	0.97727
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 47 및 48 포함)	0.81643	1
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 49 및 50 포함)	0.78671	1
90	FAM78A	0.63112	1
94	FNBP1	0.50699	1
103	IER2	0.8007	0.93371
148	MOBK2A	0.56643	1
157	PNMAL2	0.52273	1
169	S1PR4_A	0.54545	1

표 7

[0312]

DMR 번호	유전자 주석	체장 신경내분비 종양(PNET) 조직 대 정상 체장 조직	남포성 PNET 조직 대 정상 조직	고형 PNET 조직 대 정상 조직	전이성 PNET 조직 대 정상 조직	PNET 조직 대 전이성 PNET 조직	
		AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	
62	SRRM3	0.96 (0.93-1)	0.96 (0.88-1.03)	0.97 (0.92-1.01)	0.94 (0.85-1.02)	0.49 (0.34-0.63)	
20	HCN2	0.96 (0.92-1)	0.91 (0.81-1.02)	0.97 (0.93-1.01)	0.89 (0.78-1)	0.4 (0.25-0.54)	
61	SPTBN4	0.96 (0.92-1)	0.86 (0.71-1.01)	0.99 (0.97-1)	0.99 (0.97-1.01)	0.39 (0.27-0.52)	
68	TMC6_A	0.95 (0.9-1)		0.94 (0.84-1.04)	0.95 (0.9-1)	0.89 (0.77-1)	0.37 (0.23-0.5)
19	GP1BB_C	0.93 (0.88-0.98)		0.93 (0.84-1.03)	0.93 (0.87-0.99)	0.76 (0.61-0.9)	0.43 (0.27-0.6)
17	GP1BB_A	0.93 (0.87-0.98)		0.96 (0.9-1.02)	0.91 (0.85-0.98)	0.78 (0.64-0.91)	0.34 (0.2-0.48)
64	STX10_B	0.92 (0.87-0.98)		0.88 (0.76-1.01)	0.93 (0.88-0.99)	0.86 (0.75-0.97)	0.36 (0.23-0.49)
6	CACNA1C_A	0.92 (0.86-0.98)		0.87 (0.74-1)	0.93 (0.88-0.99)	0.83 (0.7-0.96)	0.42 (0.28-0.56)
8	CDHR2	0.92 (0.86-0.98)		0.88 (0.74-1.02)	0.93 (0.86-0.99)	0.83 (0.7-0.96)	0.44 (0.3-0.58)
52	PTPRN2	0.91 (0.85-0.98)		0.9 (0.76-1.04)	0.92 (0.84-0.99)	0.93 (0.84-1.03)	0.53 (0.39-0.67)
38	MAX.chr17.77788758.77788971	0.91 (0.85-0.97)		0.92 (0.83-1.01)	0.9 (0.83-0.97)	0.92 (0.85-1)	0.58 (0.44-0.72)
14	FBXL16_B	0.9 (0.84-0.97)		0.89 (0.75-1.04)	0.91 (0.83-0.98)	0.77 (0.63-0.92)	0.38 (0.25-0.51)
54	RTN2	0.9 (0.84-0.96)		0.88 (0.74-1.02)	0.91 (0.84-0.98)	0.92 (0.84-1.01)	0.56 (0.43-0.69)
21	HPCAL1	0.86 (0.79-0.94)		0.95 (0.87-1.02)	0.84 (0.74-0.93)	0.89 (0.8-0.99)	0.49 (0.36-0.63)
53	RASSF3	0.85 (0.77-0.93)		0.9 (0.77-1.03)	0.84 (0.74-0.93)	0.82 (0.68-0.96)	0.42 (0.28-0.55)
72	TSP0	0.85 (0.77-0.93)		0.85 (0.7-0.99)	0.85 (0.76-0.94)	0.84 (0.72-0.97)	0.49 (0.34-0.63)
55	RUNDC3A	0.81 (0.72-0.9)		0.9 (0.76-1.04)	0.78 (0.67-0.89)	0.72 (0.56-0.88)	0.45 (0.3-0.59)
58	SLC38A2	0.78 (0.69-0.88)		0.83 (0.67-0.99)	0.77 (0.66-0.88)	0.79 (0.64-0.93)	0.47 (0.34-0.6)
40	MAX.chr19.2478419.2478656	0.77 (0.67-0.86)		0.75 (0.56-0.94)	0.77 (0.67-0.88)	0.68 (0.51-0.84)	0.43 (0.3-0.56)

49	PDZD2	0.76 (0.67-0.86)	0.69 (0.49-0.89)	0.79 (0.69-0.89)	0.66 (0.5-0.81)	0.37 (0.25-0.5)
29	LOC100129726	0.75 (0.66-0.85)	0.83 (0.68-0.99)	0.72 (0.61-0.84)	0.87 (0.76-0.99)	0.58 (0.45-0.71)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 47 및 48 포함)	0.67 (0.56-0.77)	0.61 (0.39-0.83)	0.69 (0.56-0.81)	0.48 (0.31-0.66)	0.38 (0.25-0.51)
3	ANXA2	0.66 (0.55-0.77)	0.57 (0.37-0.77)	0.69 (0.57-0.81)	0.73 (0.57-0.88)	0.56 (0.42-0.69)
56	RXRA	0.62 (0.51-0.73)	0.57 (0.35-0.78)	0.64 (0.52-0.77)	0.57 (0.39-0.74)	0.46 (0.33-0.6)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 49 및 50 포함)	0.62 (0.51-0.73)	0.56 (0.33-0.79)	0.64 (0.51-0.76)	0.44 (0.26-0.62)	0.39 (0.26-0.51)
169	S1PR4_A	0.6 (0.49-0.71)	0.73 (0.54-0.92)	0.56 (0.43-0.69)	0.43 (0.25-0.6)	0.38 (0.25-0.51)
94	FNBP1	0.51 (0.39-0.63)	0.68 (0.5-0.87)	0.45 (0.32-0.58)	0.29 (0.13-0.45)	0.36 (0.23-0.49)
90	FAM78A	0.5 (0.36-0.64)	0.64 (0.47-0.82)	0.45 (0.3-0.6)	0.4 (0.24-0.56)	0.39 (0.24-0.54)
103	IER2	0.49 (0.37-0.6)	0.42 (0.21-0.64)	0.51 (0.38-0.64)	0.57 (0.4-0.74)	0.59 (0.47-0.71)
157	PNMAL2	0.37 (0.24-0.51)	0.34 (0.17-0.51)	0.39 (0.25-0.53)	0.36 (0.21-0.52)	0.51 (0.38-0.64)
148	MOBK2A	0.33 (0.21-0.46)	0.42 (0.24-0.61)	0.3 (0.18-0.43)	0.22 (0.08-0.35)	0.39 (0.26-0.51)

표 8

[0313]

DMR 번호	유전자 주석	소장 신경내분비 종양(NET) 조직 대 PNET 조직	폐 NET 조직 대 PNET 조직
		AUC(95% CI)	AUC(95% CI)
62	SRRM3	0.37 (0.26-0.49)	0.44 (0.32-0.57)
20	HCN2	0.35 (0.23-0.47)	0.71 (0.6-0.81)
61	SPTBN4	0.45 (0.33-0.56)	0.62 (0.5-0.74)
68	TMC6_A	0.27 (0.17-0.38)	0.67 (0.56-0.78)
19	GP1BB_C	0.32 (0.21-0.43)	0.78 (0.69-0.88)
17	GP1BB_A	0.38 (0.27-0.5)	0.68 (0.57-0.79)
64	STX10_B	0.4 (0.29-0.51)	0.33 (0.22-0.45)
6	CACNA1C_A	0.3 (0.2-0.4)	0.26 (0.15-0.37)
8	CDHR2	0.33 (0.23-0.44)	0.65 (0.54-0.76)
52	PTPRN2	0.38 (0.27-0.49)	0.56 (0.44-0.68)
38	MAX. chr17.77788758.77788971	0.17 (0.08-0.25)	0.49 (0.38-0.6)
14	FBXL16_B	0.61 (0.5-0.72)	0.77 (0.66-0.87)
54	RTN2	0.4 (0.29-0.51)	0.58 (0.46-0.71)
21	HPCAL1	0.14 (0.07-0.22)	0.5 (0.39-0.62)
53	RASSF3	0.25 (0.15-0.35)	0.4 (0.29-0.52)
72	TSPO	0.36 (0.25-0.47)	0.65 (0.54-0.77)
55	RUNDCA3A	0.46 (0.34-0.57)	0.43 (0.31-0.55)
58	SLC38A2	0.18 (0.1-0.27)	0.41 (0.3-0.52)

40	MAX.chr19.2478419.2478656	0.2 (0.11-0.29)	0.35 (0.23-0.46)
49	PDZD2	0.17 (0.09-0.25)	0.14 (0.07-0.21)
29	LOC100129726v1	0.22 (0.12-0.31)	0.62 (0.5-0.75)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 47 및 48 포함)	0.39 (0.28-0.5)	0.38 (0.26-0.49)
3	ANXA2	0.31 (0.2-0.42)	0.57 (0.45-0.68)
56	RXRA	0.23 (0.13-0.32)	0.39 (0.27-0.5)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 49 및 50 포함)	0.42 (0.3-0.53)	0.41 (0.29-0.53)
169	S1PR4_A	0.52 (0.4-0.64)	0.61 (0.5-0.73)
94	FNBP1	0.59 (0.48-0.71)	0.49 (0.37-0.61)
90	FAM78A	0.48 (0.36-0.6)	0.71 (0.6-0.81)
103	IER2	0.66 (0.55-0.77)	0.49 (0.38-0.61)
157	PNMAL2	0.26 (0.16-0.36)	0.61 (0.49-0.72)
148	MOBK1.2A	0.63 (0.52-0.74)	0.71 (0.6-0.82)

표 9

[0314]

DMR 번호	유전자 주석	PNET 조직 대 버퍼 코트	전이성 PNET 조직 대 버퍼 코트	폐 NET 조직 대 버퍼 코트	소장 NET 조직 대 버퍼 코트
		AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	AUC(95% CI)	AUC(95% CI)
62	SRRM3	1 (1-1)	1 (1-1)	0.99 (0.99-1)	1 (0.99-1)
20	HCN2	1 (1-1)	0.99 (0.97-1.01)	1 (1-1)	1 (1-1)
61	SPTBN4	0.99 (0.98-1)	0.99 (0.97-1.01)	0.99 (0.98-1)	0.99 (0.98-1)
68	TMC6_A	1 (1-1)	0.99 (0.97-1.01)	1 (1-1)	0.98 (0.93-1.02)
19	GP1BB_C	1 (1-1)	0.99 (0.98-1.01)	1 (1-1)	1 (0.99-1)
17	GP1BB_A	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (0.99-1)
64	STX10_B	1 (1-1)	1 (0.99-1.01)	0.99 (0.98-1.01)	1 (1-1)
6	CACNA1C_A	1 (1-1)	1 (0.99-1)	0.98 (0.94-1.02)	1 (1-1)
8	CDHR2	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
52	PTPRN2	0.93 (0.88-0.98)	0.94 (0.87-1.01)	0.94 (0.89-1)	0.97 (0.93-1.01)
38	MAX.chr17.77788758.77788971	0.96 (0.93-0.99)	0.97 (0.93-1)	0.99 (0.97-1.01)	0.84 (0.74-0.94)
14	FBXL16_B	1 (1-1)	1 (0.99-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
54	RTN2	0.97 (0.95-1)	0.99 (0.96-1.01)	0.96 (0.93-1)	1 (0.99-1)
21	HPCAL1	0.84 (0.76-0.91)	0.84 (0.75-0.94)	0.87 (0.8-0.95)	0.56 (0.41-0.7)
53	RASSF3	0.91 (0.85-0.97)	0.9 (0.81-0.99)	0.95 (0.89-1)	0.77 (0.66-0.89)
72	TSPO	0.92 (0.86-0.97)	0.92 (0.85-0.99)	0.95 (0.9-1.01)	0.93 (0.87-0.98)
55	RUNDC3A	0.99 (0.98-1)	0.99 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)
58	SLC38A2	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	0.98 (0.96-1.01)
40	MAX.chr19.2478419.2478656	0.86 (0.79-0.94)	0.8 (0.66-0.94)	0.67 (0.53-0.81)	0.5 (0.36-0.65)
49	PDZD2	0.83 (0.75-0.91)	0.75 (0.62-0.88)	0.43 (0.29-0.56)	0.51 (0.37-0.64)
29	LOC100129726v1	0.99 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)	1 (0.99-1)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 47 및 48 포함)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
3	ANXA2	1 (1-1)	1 (0.99-1)	1 (1-1)	1 (1-1)

56	RXRA	0.91 (0.85-0.97)	0.9 (0.82-0.97)	0.86 (0.78-0.95)	0.8 (0.68-0.92)
85	CUX1(프라이머 서열 번호: 49 및 50 포함)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
169	SIPR4_A	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
94	FNBP1	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
90	FAM78A	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
103	IER2	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (0.99-1)	1 (1-1)
157	PNMAL2	0.98 (0.96-1.01)	0.98 (0.96-1.01)	0.99 (0.97-1.01)	0.96 (0.9-1.01)
148	MOBK2A	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)

[0315] **참조에 의한 통합**

[0316] 본원에 인용된 각각의 특허 문헌 및 과학 논문의 전체 개시는 모든 목적을 위해 참조로 포함된다.

[0317] **등가물**

[0318] 본 발명은 그 사상 또는 본질적인 특성을 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 그러므로 전술한 양태는 모든 면에서 본원에 기술된 본 발명을 제한하기보다는 예시적인 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 첨부된 청구범위에 의해 표시되며, 청구 범위의 의미 및 균등 범위 내에 있는 모든 변경은 그 안에 포함되도록 의도된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH

<120> DETECTING PANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMORS

<130> EXCTM-38385.601

<150> US 63/019,751

<151> 2020-05-04

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 1

aggattgttt gttacgaggt cgcgt

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 2
actataactcc gcttctctcc gcgcc 25

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 3
ggtcgcggcg tttgtttaga ggc 23

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 4
aactcatcct ccctcccgaa acgtc 25

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 5
cgagtttagt ggtttttagg taacgg 26

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 6
tacgaaatcc gaaaaaatc cgta 24

<210> 7
<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 7
 tcgaggcggg agtattaggt ttacg 25
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 8
 aatctaaaaa acgaaaatcc ccgct 25
 <210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 9
 tttatattgt agcgggaggc gtaggc 26
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 10
 ctaaactatt tctaaccaaa ccgca 25
 <210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 11
 tagtagagcg ggtcgggagc gtaagc 26

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 12
 cgccctactac cctatctaac cgaaaacgaa c 31
 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 13
 ttgggaagtt tgcggttttt tcggt 25
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 14
 aaaatccgta aaaactatcc taaaacgccc 30
 <210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 15
 aggatgtagt ttagttcgtg gagttcgag 29
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 16

gaaaaacgcc aattttacgc cgtaa	25
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 17	
gtgtaatttg ggtcgcggtt ttcgc	25
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 18	
cgtaccttta acacgcgcga tacgtt	26
<210> 19	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 19	
ttagggtcgg gaaaggattt tttatcgt	28
<210> 20	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 20	
gaaaccgaac tcgaaatcca cgcg	24
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic

<400> 21

gattttgggt tgcggtggtc gt 22

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 22

aaacacatat aaaaacattt caacgaa 27

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 23

agttatagtt tcggaggcgc ggagc 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 24

ccgaaaaacg aaaaaaaca acgct 25

<210> 25

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 25

cgggttatag ttataggttg gggtatttcg g 31

<210> 26

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 26
 actctcgcca actccgcgaa 20
 <210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 27
 gcgggttttt ggtattagga gtcgt 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 28
 ataaacgtaa ccgaattaac ccgac 25

 <210> 29
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 29
 ttttattgaa gtgggtaaaa ttttcgag 28
 <210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 30
 tccgaataaa aaactaaaa caccgcta 28
 <210> 31

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 31
 ttaggggtta ggtaggtcg tgcgt 25

<210> 32
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 32
 cgcgaaaaac gaaaactaaa aaacgta 27

<210> 33
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 33
 cgtttgttta ggaaggttgg gtttggc 27

<210> 34
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 34
 gccgtctcga acgactaaaa ttcgaa 26

<210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 35

acggttatgg aaattggatt agcgg	25
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 36	
ccaaacgacc ttaaaaacgc cgaa	24
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 37	
tcggattgcg ggaggttgc	20
<210> 38	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 38	
cacgtcgaaa taatactact ccacctaaaa aacg	34
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 39	
tcgttttagc ggaacggcgg	20
<210> 40	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	

<400> 40	
gtacgtacat cgaacgaact atacgccgaa c	31
<210> 41	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 41	
ttatagtatt aggtggagtt gagcgg	26
<210> 42	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 42	
aacgattcct cgaaaaaat acgaa	25
<210> 43	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 43	
gttttgtttg gggttttggg ttcgg	25
<210> 44	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic	
<400> 44	
aaacaaaaac cgacaaaact cgct	24
<210> 45	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 45
 tttaggtgcg ttgtagttta gacgg 25
 <210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 46
 aaacaaatcc caaaaactac tcgac 25
 <210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 47
 ggagaggatt tgaagggttt cgt 23
 <210> 48
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 48
 ctctaaaatc ctaccaact ccgat 25
 <210> 49
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 49
 cgtaggttta aaagtgggtc gcggc 25
 <210> 50

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 50
 ccgattccta tttctattaa aacgaa 26
 <210> 51
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 51
 ggggtgttcgg tagcggagta ttacgtt 27
 <210> 52
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 52
 ataaaaacct ccatcgaccc cgtcc 25

 <210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 53
 gcgtgattga tgggtgtatt acgt 24
 <210> 54
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 54
 ataaacttcc gatccctaca acgaa 25

<210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 55
 gtcgaatcgt cggttcgagg gc 22

<210> 56
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 56
 tctccacgat tttcggaac gct 23

<210> 57
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 57
 attttgttat tgttcgggg atcgt 25

<210> 58
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 58
 cactcaaac ttatctctca aacgcc 26

<210> 59
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 59
gaggaaagag aagtgggcgt tcga 24
<210> 60
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 60
cccaatccta atccacttaa cgcgtc 26
<210> 61
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 61
ggttggaag ggggtggttta ttctga 26

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 62
gaaaaccgc aaaaaacccc gaa 23
<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 63
gcgttacgga attaacggt ggtagcg 27
<210> 64
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 64

cgacgaaaaa aacgcgaaca ctaaaaaacg

30

<210> 65

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 65

tttcgaggat agttcgcggg tttttc

26

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 66

attatcgctc gcgtccttaa ccgac

25