



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0035094
(43) 공개일자 2021년03월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 2561/113 (2019.08)
- (21) 출원번호 10-2020-7037127
- (22) 출원일자(국제) 2019년05월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년12월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/033831
- (87) 국제공개번호 WO 2019/226942
국제공개일자 2019년11월28일
- (30) 우선권주장
201810502359.7 2018년05월23일 중국(CN)
201810502387.9 2018년05월23일 중국(CN)

- (71) 출원인
항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘티디.
중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
헤 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1
- (72) 발명자
리, 쿤야오
중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
헤 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코.
엘티디. 내
리, 후이
중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
헤 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코.
엘티디. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

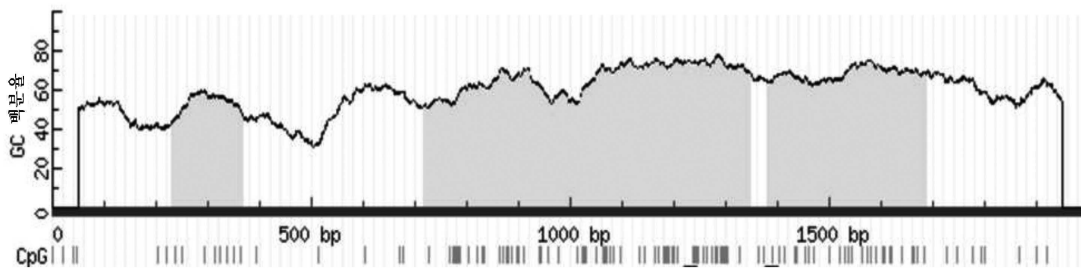
전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **결장직장암 및 진행성 선종을 스크리닝하기 위한 키트 및 그의 적용**

(57) 요약

본 발명은 BMP3 유전자 및 NDRG4 유전자의 메틸화 상태 및 수준의 결정을 필요로 하는 환자에서 BMP3 유전자 및 NDRG4 유전자의 메틸화 상태 및 수준을 결정하는데 사용될 수 있는 정량적 PCR을 수행하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합을 제공하며, 이는 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 진단을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 진단하기 위한 놀랍게도 높은 진단 특이도 및 민감도를 유발한다. 진단을 수행하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

C12Q 2600/166 (2013.01)

(72) 발명자

쟡, 웨이시안

중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
혜 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘
티디. 내

양, 지아오

중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
혜 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘
티디. 내

리우, 강

중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
혜 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘
티디. 내

루, 닝

중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
혜 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘
티디. 내

첸, 이요우

중국 310052 제지양 항저우 빈지양 디스트릭트 창
혜 스트리트 지안저 로드 넘버 400 헤루이 인터내
셔널 사이언스 앤 테크놀로지 플라자 플로어
에스1-1 항저우 뉴 호리즌 헬스 테크놀로지 코. 엘
티디. 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 키트:

- a) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브로서, 이들 각각이, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1과 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함하는 것인 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브,
- b) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브로서, 이들 각각이, 서열식별번호: 2와 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함하는 것인 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

- i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
- ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
- iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브;

제2 제1 프라이머 쌍 및 제2 프로브가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트:

- iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
- v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
- vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 3

제1항에 있어서, 하기를 포함하는 키트:

- i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및
- ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브.

청구항 4

제1항에 있어서, 하기를 포함하는 키트:

- i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는

수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및

ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.

청구항 5

제1항에 있어서, 하기를 포함하는 키트:

i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및

ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다가 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함하는 것인 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브가 택맨(TAQMAN)® 프로브인 키트.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 추가로 포함하는 키트:

- (1) 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단; 및
- (2) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단.

청구항 9

제8항에 있어서, 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단이 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에서 KRAS 유전자의 엑손 12 및/또는 엑손 13 영역을 증폭시킬 수 있는 적어도 하나의 프라이머 쌍을 포함하는 것인 키트.

청구항 10

제8항에 있어서, 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단이 항-헤모글로빈 항체를 포함하는 것인 키트.

청구항 11

제9항에 있어서, 프라이머가 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함하는 KRAS 유전자 영역을 증폭시킬 수 있는 것인 키트.

청구항 12

제10항에 있어서, 항체가 콜로이드성 금-접합 항체인 키트.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 정량화를 위해 참조 유전자를 증폭시키기 위한 수단을 추가로 포함하는 키트.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 키트를 사용하여 획득된 검사 결과의 사용 및/또는 해석에 대한 지침서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 15

제10항에 있어서, 생물학적 샘플에서 항체 및 헤모글로빈에 의해 형성된 복합체를 검출하기 위한 수단을 추가로 포함하는 키트.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 환자로부터 획득된 생물학적 샘플이 분변 샘플인 키트.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 비술파이트 시약, 및 비술파이트 시약과 환자의 생물학적 샘플, 또는 생물학적 샘플로부터 획득된 폴리뉴클레오티드를 혼합하기에 적합한 컨테이너를 추가로 포함하는 키트.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 메틸화 민감성 제한 효소 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 추가로 포함하는 키트:

- (1) 생물학적 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및
- (2) 생물학적 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준.

청구항 20

제19항에 있어서,

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
 AAAATATTCCGGTTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACG
 GCGTTCGTAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTATTTGT
 TAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTCGTTGTATTCGGTCGC
 GTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67);

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
 AAAATATTTGGGTTATATATGTTGTGATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGATGG
 TGTTTGTAGTGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTATTTGTTA
 GGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTTGTGATTTGGTTGTGT
 TTTGGGTTTTGTGTGTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTT
 TCGTTCGTTTTTTCGTTTCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCG
 CGAGGGATCGCGTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTTCGAGC
 GTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGCGGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID
 NO.: 69);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 키트:

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTT
TTGTTTGTTTTTTTGTTTGTATTGGGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGT
GAGGGATTGTGGTTTGTGGGATTAGTTTATAGGTTTGGTATTGTTTGTGGGTTGAGTGT
TTATATTTGTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTATTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.:
70).

청구항 21

제13항에 있어서, 내부 대조군 유전자를 증폭시키기 위한 수단이 양성 대조군 유전자 및/또는 음성 대조군 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머를 포함하는 것인 키트.

청구항 22

하기 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법:

- a) 환자의 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를 획득하는 단계;
- b) a)의 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시키는 단계;
- c) 처리된 게놈 DNA 또는 그의 처리된 단편을 환자에서 골 형태발생 단백질 3 (BMP3)을 코딩하는 유전자의 메틸화 부위의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 제1 프라이머 쌍, 및 환자에서 NDRG 패밀리 구성원 4 단백질 (NDRG4)을 코딩하는 유전자의 메틸화 부위의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 제2 프라이머 쌍과 접촉시키며, 여기서 제1 프라이머 쌍은 서열식별번호: 1과 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 9개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함하고, 여기서 제2 프라이머 쌍은 서열식별번호: 2와 상보적이거나 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 9개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함하고, 여기서 처리된 게놈 DNA 또는 그의 단편은 제1 프라이머 쌍 또는 제2 프라이머 쌍에 의해 적어도 하나의 증폭물을 생산하도록 증폭되거나, 또는 증폭되지 않는 것인 단계; 및
- d) 상기 증폭물의 존재 또는 부재, 환자에서의 BMP3 유전자 및 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준에 기반하여 환자에서 CRC 또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되고:

- i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
 - ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
 - iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브;
- 제2 제1 프라이머 쌍 및 제2 프로브가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법:
- iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
 - v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
 - vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 24

제22항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및

ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브.

청구항 25

제22항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및

ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.

청구항 26

제22항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및

ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다가 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브가 택맨® 프로브인 방법.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하는 단계, 및 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하는 단계가 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에서 KRAS 유전자의 엑손 12 및/또는 엑손 13 영역을 증폭시킬 수 있는 적어도 하나의 프라이머 쌍을 사용하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하는 단계가 항-헤모글로빈 항체를 사용하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 프라이머가 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함하는 KRAS 유전자 영역을 증폭시킬 수 있는 것인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 항체가 콜로이드성 금-접합 항체인 방법.

청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, BMP3 유전자의 증폭이 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법이 BMP3 증폭의 Ct 값을 $\Delta Ct1$ 로 결정하기 위해 제1 참조 유전자를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, NDRG4 유전자의 증폭이 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법이 NDRG4 증폭의 Ct 값을 $\Delta Ct2$ 로 결정하기 위해 제2 참조 유전자를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이체 KRAS 유전자의 증폭이 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법이 돌연변이체 KRAS 증폭의 Ct 값을 $\Delta Ct3$ 으로 결정하기 위해 제3 참조 유전자를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제34항 또는 제35항에 있어서, 제1 및 제2 참조 유전자가 동일한 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 동일한 참조 유전자가 B2M 유전자인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 돌연변이체 KRAS 유전자가 G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A 및 G13R로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 돌연변이체 KRAS 유전자가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍에 의해 증폭되고:

- (1) 서열식별번호: 35를 포함하는 정방향 프라이머 G12D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (2) 서열식별번호: 36을 포함하는 정방향 프라이머 G13D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (3) 서열식별번호: 37을 포함하는 정방향 프라이머 G12V-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (4) 서열식별번호: 38을 포함하는 정방향 프라이머 G12C-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (5) 서열식별번호: 39를 포함하는 정방향 프라이머 G12S-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (6) 서열식별번호: 40을 포함하는 정방향 프라이머 G12A-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R; 및

(7) 서열식별번호: 41을 포함하는 정방향 프라이머 G12R-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R,

여기서 qPCR을 위한 KRAS 프로브가 서열식별번호: 46을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 제3 참조 유전자가 ACTB 유전자인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, ACTB 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR 프라이머가 서열식별번호: 43 및 44를 포함하고, 프로브가 서열식별번호: 46을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제22항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

- (1) 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및
- (2) 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준.

청구항 44

제43항에 있어서,

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
 AAAATATTCGGGTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACG
 GCGTTCGIAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTTGT
 TAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTCGTTGTATTCGGTCGC
 GTTTCGGGTTTTCGTGCCTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67);

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
 AAAATATTTGGGTTATATATGTTGTGATTATAGTTTTTTTTTAGTGTGGAGTGGAGATGG
 TGTTTGTAGTGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTTGTTA
 GGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTGTTGTATTGGTTGTGT
 TTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

TGAGAAGTTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTT
 TCGTTCGTTTTTCGTTTCGTTTATCGGATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCG
 CGAGGGATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTTCGAGC
 GTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGTACGTTTTTCGCGGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID
 NO.: 69);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법:

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTTAGGTTTTGTGTGTGGTTT
 TTGTTGTTTTTTTTGTTTGTATTGGGATTTTTAGTTGTGTAGAAAGGTGGAAGTTATGTGT
 GAGGGATTGTGGTTTGTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTTGAGTGT
 TTATATTTGTTAAATTTATGTGGGATGTTTTTGTGGTGTATTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.:
 70).

청구항 45

제22항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 품질 제어 표준을 증폭시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 46

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 키트를 사용하는 것을 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.

청구항 47

하기 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법:

- a) 환자의 분변 샘플로부터 미처리된 게놈 DNA를 획득하는 단계;
- b) a)의 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시키는 단계;
- c) b)의 처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하고, 환자에서의 BMP3 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct1$ 로 결정하는 단계;
- d) b)의 처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 qPCR을 수행하고, 환자에서의 NDRG4 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct2$ 로 결정하는 단계;
- e) 미처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 qPCR을 수행하고, 환자에서의 돌연변이체 KRAS 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct3$ 으로 결정하는 단계;
- f) 분변 샘플에서 헤모글로빈 단백질의 분변 면역화학적 검사를 수행하고 스코어를 FIT로 결정하는 단계;
- g) K의 값을 결정하며, 여기서 $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$, 여기서 a, b, c, d, X는 임상 상수인 단계; 및
- h) 종합 지수 P의 값을 결정하며, 여기서 $P = e^K / (1 + e^K)$, 여기서 e는 자연 상수이며, 여기서 P가 미리 결정된 임계치 이상인 경우, 환자는 CRC 및/또는 AA를 갖는 것으로 결정되고, 여기서 P가 임계치 미만인 경우, 환자는 건강한 것으로 결정되는 것인 단계.

청구항 48

제47항에 있어서, BMP3 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR이 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브를 포함하며, 여기서 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브가 하기로 이루어진 균으로부터 선택되고:

- i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
 - ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
 - iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브;
- NDRG4 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR이 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브를 포함하며, 여기서 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브가 하기로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인 방법:
- iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
 - v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
 - vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식

별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 49

제47항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

- i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열 식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및
- ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브.

청구항 50

제47항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

- i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열 식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및
- ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.

청구항 51

제47항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

- i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열 식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및
- ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다가 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브가 택맨® 프로브인 방법.

청구항 54

제47항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이체 KRAS 유전자가 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제47항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 분변 면역화학적 검사가 콜로이드성 금-접합 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제47항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c) 및 단계 d)가 참조 유전자로서 B2M 유전자를 사용하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 돌연변이체 KRAS 유전자가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍에 의해 증폭되고:

- (1) 서열식별번호: 35를 포함하는 정방향 프라이머 G12D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (2) 서열식별번호: 36을 포함하는 정방향 프라이머 G13D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (3) 서열식별번호: 37을 포함하는 정방향 프라이머 G12V-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (4) 서열식별번호: 38을 포함하는 정방향 프라이머 G12C-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (5) 서열식별번호: 39를 포함하는 정방향 프라이머 G12S-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- (6) 서열식별번호: 40을 포함하는 정방향 프라이머 G12A-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R; 및
- (7) 서열식별번호: 41을 포함하는 정방향 프라이머 G12R-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R,

여기서 qPCR을 위한 KRAS 프로브가 서열식별번호: 46을 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, ACTB 유전자가 돌연변이체 KRAS 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR에서 참조 유전자로서 사용되는 것인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, ACTB 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR 프라이머가 서열식별번호: 43 및 44를 포함하고, ACTB 유전자를 위한 qPCR 프로브가 서열식별번호: 46을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제47항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 사용하는 것을 포함하는 방법:

- (1) 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및
- (2) 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준.

청구항 61

제60항에 있어서,

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

```
GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
AAAATATTCGGTTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGACG
GCGTTCGTAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTTGT
TAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTTTCGTTGTATTCGGTCGC
GTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67);
```

BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTG
 AAAATATTTGGGTTATATATGTTGTGATTATAGTTTTTTTTAGTGTGGAGTGGAGATGG
 TGTGTGAGTGTGTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTTGTTA
 GGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTGTTGTATTGGTTGTGT
 TTTGGGTTTTGTGTGTTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고:

TGAGAAGTCGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTTT
 TCGTTCGTTTTTCGTTTCGTTTATCGGGTATTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGCG
 CGAGGGATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTCGAGC
 GTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGCGGCGTATCGTTTTTAGTT (SEQ ID
 NO.: 69);

NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준이 하기의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법:

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTT
 TTGTTTGTTTTTTGTGTTTATTGGGTATTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTGT
 GAGGGATTGTGGTTTGTGTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGTTGAGTGT
 TTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTATTGTTTTTAGTT (SEQ ID NO.:
 70).

청구항 62

제47항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c) 및 단계 d)에서 품질 제어 표준을 증폭시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 63

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 키트를 사용하여 환자에서 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 환자에서의 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재에 의존하여 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 진단 및 치료를 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)을 진단 및 치료하는 방법.

청구항 64

제22항 내지 제62항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 환자에서 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 환자에서의 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재에 의존하여 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 진단 및 치료를 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)을 진단 및 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2018년 5월 23일에 출원된 중국 특허 출원 일련 번호 201810502359.7, 및 2018년 5월 23일에 출원된 201810502387.9를 우선권 주장하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 결장직장암 및 진행성 선종을 스크리닝하기 위한 조성물 및 방법, 및 다른 적용에 관한 것이다.

[0005] 전자적으로 제출된 텍스트 파일에 대한 설명

[0006] 본원과 함께 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형식 사본 (파일명: NEWH-017_01WO_SeqList_ST25.txt, 기록 일자: 2019년 5월 22일, 파일 크기: 22 킬로바이트).

배경 기술

[0007] 결장직장암 (CRC)은 폐암, 간암 및 위암에 비해서만 사망률이 낮은 세계에서 네 번째로 흔한 암이다. CRC로 인한 연간 사망자는 거의 700,000명이다. CRC는 개발 도상국과 비교하여 선진국에서 발병률이 더 높은 "현대화된" 질환이다. 미국에서는 결장직장암이 두 번째 주요 사망 원인으로 남아 있다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976). 사람들의 생활 수준이 개선됨에 따라 2000년 이후 중국에서 CRC의 발병률 및 사망률이 증가하고 있다 (CA CANCER J CLIN 2016; 66:115-132). 초기 편재화 질환 (I기 및 II기)을 갖는 환자의 5년 생존율은 90%에 육박하는 반면, 말기 CRC를 갖는 환자의 생존율은 오직 13.1%이다. 말기 CRC를 갖는 환자의 치료 비용은 종종 막대하며, 오직 질병의 증상을 경감시킬 수 있다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976).

[0008] CRC의 발달은 일반적으로 무증상이며 종양이 몇 센티미터 크기로 성장할 때까지 초기 단계에서 검출하기 어려운 느린 과정으로, 분변의 통과를 차단하고 경련, 통증 또는 가시적인 출혈을 초래할 수 있다. CRC의 발달은 시간 경과에 따라 축적되는 일련의 조직학적, 형태학적 및 유전적 변화를 포함하는 다단계 과정을 거쳤다: 즉, 건강, 과다형성, 작은 폴립, 큰 폴립 및 선암종에서 암으로. 폴립은 장 점막 내에서 국소적으로 성장하거나 축적되는 비정상적인 세포이다. 폴립에서 분열하는 세포는 장 벽을 침투하여 결국 CRC로 진화하도록 충분한 유전적 변화를 축적할 수 있다. 그러나, 10년 이상의 발달 후에 오직 소수의 폴립만이 CRC로 진화하였다. 악성 잠재적 폴립의 두 가지 주요 유형은 선종 및 무경성 틱니형 폴립 (SSP)이며, 각각은 상이한 위험을 갖는 CRC로 발달하였다. 선종이 CRC로 발달할 위험은 그의 크기와 관련된다. 일반적으로, 선종은 크기가 더 크며, CRC로 발달할 더 큰 잠재력을 갖는다. 진행성 선종 (AA)은 크기 ≥ 1 cm 또는 $\geq 25\%$ 용모 성분 또는 임의의 크기의 고등급 이형성증을 의미한다. 대부분의 AA의 약 10%만이 암성으로 되지만, CRC의 60%-70%는 선종으로부터 발생하고, CRC의 나머지 25%-35%는 SSP로부터 발생한다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976). 따라서, CRC 및 AA의 조기 발견 및 병변의 제거는 CRC의 진행을 효과적으로 차단하여 환자의 생명을 구하고 환자의 5년 생존율을 유의하게 개선시키고 CRC의 말기에 고가의 치료 비용을 감소시킬 수 있으며, 이는 가족과 사회의 경제적 부담을 크게 감소시킨다.

[0009] 현재, 주로 대장내시경검사, S상 결장 내시경검사, CT 대장조영술, 분변 잠혈 검사 (FOBT) 및 분변 면역화학적 검사 (FIT)를 포함하는 CRC 검출을 위한 여러 검사가 있다.

[0010] CRC를 검출하기 위한 대장내시경검사의 민감도는 $>95\%$ 이다. 그의 스크리닝 간격은 매 10년이다. 대장내시경검사의 이점은 높은 민감도이며, 이는 전체 결장을 검사하면서 동시에 병변을 제거할 수 있다. 그러나, 그의 단점은 침습적 검사라는 것이며, 장 정결은 불편감을 가져올 것이고, 환자는 진정되어야 할 필요가 있다. 대장내시경검사 동안 장 천공 및 출혈의 위험이 있다. 이들 제한은 대장내시경검사 스크리닝에 대한 낮은 순응도에 기여한다.

[0011] 원위 결장을 검출하기 위한 S상 결장 내시경검사의 민감도는 95%보다 크다. S상 결장 내시경검사를 사용한 CRC의 스크리닝 간격은 FOBT와 조합하여 매 5년이다. S상 결장 내시경검사로 CRC를 스크리닝하는 이점은 높은 민감도이고, 전신 진정이 필요하지 않으며, 병변은 검사 동안 동시에 제거될 수 있다. 그의 단점은 반침습적 검사이며, 검사 동안 불편감을 쉽게 유발하고 검사 비용이 높다.

[0012] CT 대장조영술은 방사선을 사용하여 결장을 시각화하며, 민감도는 $>90\%$ 이고 5년마다 수행된다. 그 이점은 매우 높은 민감도로 전체 결장을 관찰할 수 있고, 진정이 필요하지 않다는 것이다. 단점은 검정이 반침습적 검사이므로 환자가 스크리닝 과정 동안 쉽게 불편함을 느낄 수 있다는 것이다. 또한, 병변을 동시에 제거할 수 없으며 방사선 안전을 고려할 필요가 있다.

[0013] 개괄적으로, 영상화에 기반하여 CRC를 검출하기 위한 상기 검사는 높은 민감도를 갖지만, 고가이고 장 정결이 불편감 및 기타 부작용을 유발하기 쉽다. 결과적으로 환자 순응도가 낮다. 또한, 이들 검정은 전문 장비, 및 전문 기술과 풍부한 경험을 가진 의사를 필요로 하지만, 이용가능하지 않을 수 있다. 그 결과, 전반적인 스크리닝/검출률이 낮다. 또한, 일부 환자는 이들 검정에 적합하지 않다. 예를 들어, 당뇨병 환자는 장 정결 성공률이 더 낮고 부작용 위험이 더 높다 (J Gastrointest Liver Dis 2010; 19: 369-372, World J Gastrointest Endosc 2013; 5: 39-46).

- [0014] FOBT 및 FIT는 각각 효소 반응 및 면역화학적 방법에 의해 환자의 분변에서 헤모글로빈을 검출하며, 민감도는 CRC 검출에 대해 각각 33%-75% 및 60%-85%이고, 검사는 1년마다 수행된다. FOBT 및 FIT는 대중화하기 쉽고, 비침습적이고 비용이 낮지만, 전암성 병변의 검출률은 낮다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976).
- [0015] 폴립이 CRC로 발달하는 동안, 일부 유전자, 예컨대 APC, KRAS, p53, BRAF, NDRG4, BMP3 등에서 돌연변이 및 메틸화 변화가 축적된다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976). 따라서, 이들 돌연변이 또는 메틸화 변화의 검출은 CRC 및 전암성 병변을 검출하는데 도움이 된다.
- [0016] 주(Zou) 등 (Clinical Chemistry 2012; 58: 2375-383)은 조직 샘플에서 BMP3, NDRG4, VIM, 및 TFPI2 유전자의 메틸화 수준을 검출하기 위해 메틸화 qPCR을 사용하였다. 총 37건의 CRC 조직 샘플에서, 25개의 선종 조직 샘플 및 29개의 건강한 인간 조직 샘플을 검사하였다. 특이도가 95%인 경우, CRC 검출에 대한 BMP3, NDRG4, VIM 및 TFPI2 유전자의 민감도는 각각 84%, 92%, 86% 및 92%였고, 선종 검출에 대한 민감도는 각각 68%, 76%, 76% 및 88%였다. 결장암 조직에서 유전자 메틸화의 검출은 높은 민감도 및 특이도를 갖는 것으로 나타났다. 그러나, 조직 샘플링 방법은 샘플링 과정이 환자의 신체에 특정 손상을 유발하기 때문에 널리 사용되기가 어렵다. 따라서, 이는 일반 집단에서 CRC 및 전암성 병변을 스크리닝하기에 적합하지 않다.
- [0017] 다중표적 대변 DNA (mt-sDNA) 검사는 대변 샘플에서 종양 박리 세포의 메틸화 및 돌연변이 검출 및 헤모글로빈 검출을 포함하며, 이는 3년마다 스크리닝되며, 높은 민감도, 비침습성 및 대중화 용이성의 이점을 갖는다 (Clinical Interventions In Aging 2016;11:967-976). 스크리닝 방법으로서, mt-sDNA는 CRC 및 AA를 초기에 검출하여 환자 생존율을 크게 개선시킬 수 있다. 임페리알레(Imperiale) 등 (N Engl J Med 2014; 370:1287-97)은 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 검출, KRAS 유전자의 점 돌연변이 검출 및 분변 헤모글로빈 검출을 위한 mt-sDNA에 기반한 시스템을 확립한 다음, 로지스틱 회귀 공식에 따라 CRC 및 AA의 위험을 평가하였다. CRC 및 AA 검출의 민감도는 각각 92.3% 및 42.4%였고, 특이도는 86.6%였다.
- [0018] mt-sDNA는 대장내시경검사와 비교하여 비침습적이고 FOBT 및 FIT와 비교하여 더 민감하다는 이점을 갖고 산발성 CRC 및 AA를 스크리닝하는데 적용되지만, AA 검출의 민감도는 여전히 CRC보다 훨씬 더 낮다 (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976).
- [0019] 현재, CRC 또는 AA를 검출하기 위한 mt-sDNA에 기반한 제품, 예컨대 콜로가드(Cologuard)[®]는 주로 유럽인 및 미국인 집단을 위해 개발된다. 아시아인 집단에서 CRC 및 AA 검출을 위한 제품은 이용가능하지 않다. 특히, 미국 식품의약국에서 발행한 콜로가드[®]의 "안전성 및 효과 데이터의 요약(Summary of safety and effectiveness data (SSED))"에 따라 (www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/P130017b.pdf), 백인 집단 및 아프리카계 미국인 집단에서 콜로가드[®]를 사용한 AA 검출의 민감도는 각각 42.3% 및 42.4%이지만, 아시아인 집단에서 동일한 제품을 사용한 AA 검출의 민감도는 오직 30.8%이다. 따라서, 현재 아시아 국가에서 결장직장암의 발병률 및 사망률이 증가함에 따라 아시아인 집단에서 CRC 및/또는 AA 검출을 위한 효과적인 시스템을 개발할 필요가 있다.
- [0020] CRC 및 AA를 갖는 환자로부터의 대변 샘플에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화를 검출하는 방법에 대한 많은 연구가 있었지만, 아시아인 집단의 BMP3 및 NDRG4 유전자에서 과메틸화된 CpG 부위에 대한 상세하고 종합적인 연구는 없다 (ONCOLOGY LETTERS 2014;8:1751-1756; ONCOLOGY LETTERS 2015;9:1383-1387). 더욱이, 제한된 샘플 크기로 인해, 아시아인 환자에서 BMP3 및 NDRG4 유전자 메틸화의 이전 연구는 CRC 및 AA와 가장 관련이 있는 메틸화 부위를 확인하는데 도움이 되지 않았다. 따라서, 아시아인 집단에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 과메틸화된 CpG 부위의 정확한 위치를 결정하고 이들 메틸화된 CpG 부위에 기반하여 키트를 설계하고 최적화하여 AA 검출을 보다 민감하게 만드는 것이 여전히 필요하다.

발명의 내용

- [0021] 본 개시내용은 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 과메틸화된 CpG 부위를 포함하는 DNA 서열을 제공한다.
- [0022] 본 개시내용은 또한 BMP3 또는 NDRG4 유전자의 메틸화를 검출하기 위한 바람직한 프라이머 및 프로브, 및 BMP3 및 NDRG4 유전자 둘 다의 메틸화를 검출하기 위한 이들의 조합을 제공한다.
- [0023] 본 개시내용은 아시아인 집단의 CRC 및 AA를 검출하기 위한 키트를 추가로 제공한다. BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 과메틸화된 CpG 부위를 포함하는 DNA 서열은 아시아인 집단에서 CRC 및/또는 AA 검출을 위한

마커로서 사용될 수 있다.

- [0024] 다른 프라이머 및 프로브와 비교하여, BMP3 및/또는 NDRG4 유전자의 메틸화 수준을 검출하기 위한 바람직한 프라이머 및 프로브 쌍은 중앙 조직, 예컨대 CRC 및 AA, 및 특히 AA를 검출하기 위해 놀랍게도 더 높은 민감도 및 특이도를 갖는다. 또한, 본 개시내용의 이들 바람직한 프라이머 및 프로브의 조합은 또한 중앙 조직, 예컨대 CRC 및 AA, 및 특히 AA를 검출하기 위해 놀랍게도 더 높은 민감도 및 특이도를 달성한다.
- [0025] 상기 바람직한 프라이머 및 프로브 조합에 기반하여 아시아인 집단의 CRC 및 AA를 검출하기 위한 키트가 또한 제공된다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 키트는 (1) 프라이머 쌍 및 프로브의 바람직한 조합 및 상응하는 qPCR 시약; (2) KRAS 유전자의 코딩 영역에서 7개의 돌연변이 ()를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브 및 상응하는 qPCR 시약; (3) 분변에서 헤모글로빈을 검출하기 위한 시약을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 키트를 사용하여 검정으로부터 수득된 결과는 로지스틱 회귀 공식에 따라 보정되고 분석된다. 일부 실시양태에서, 공식은 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 값을 계산하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 공식은 $P = e^k / (1 + e^k)$ 이며, 여기서 P는 종합 지수이고, $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$, 여기서 e는 자연 상수이고, a, b, c, d, X는 임상 상수이다. 일부 실시양태에서, P 값이 미리 결정된 임계치 이상인 경우, 결과는 환자에서 CRC 및/또는 AA의 양성 검출을 나타낸다. 일부 실시양태에서, P 값이 임계치 미만인 경우, 결과는 환자에서 CRC 및/또는 AA의 음성 검출을 나타내고, 환자는 건강한 것으로 결정된다.
- [0028] 본 개시내용은 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 키트를 제공한다. 이를 필요로 하는 환자는 CRC 및/또는 AA를 갖는 것으로 의심되는 환자, 예컨대 CRC 및/또는 AA 발병의 적어도 하나의 징후를 갖는 환자, 또는 CRC 및/또는 AA 발병의 위험을 갖는 환자, 또는 정기 건강 검진을 받았지만 달리 징후 또는 위험을 갖지 않는 대상체이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 키트는 a) 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브는 각각 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1과 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 키트는 b) 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브는 각각 서열식별번호: 2와 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 인접 서열을 포함한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0032] i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
- [0033] ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
- [0034] iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브.
- [0035] 일부 실시양태에서, 여기서 제2 제1 프라이머 쌍 및 제2 프로브는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0036] iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
- [0037] v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
- [0038] vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.

- [0039] 일부 실시양태에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0040] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및
- [0041] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브.
- [0042] 일부 실시양태에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0043] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및
- [0044] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.
- [0045] 일부 실시양태에서, 키트는 하기를 포함한다:
- [0046] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및
- [0047] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.
- [0048] 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다는 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함한다.
- [0049] 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브는 택맨(TAQMAN)[®] 프로브이다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 키트는 하기를 추가로 포함한다:
- [0051] (1) 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단; 및
- [0052] (2) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단.
- [0053] 일부 실시양태에서, 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에서 KRAS 유전자의 엑손 12 및/또는 엑손 13 영역을 증폭시킬 수 있는 적어도 하나의 프라이머 쌍을 포함한다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 수단은 항-헤모글로빈 항체를 포함한다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 프라이머는 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함하는 KRAS 유전자 영역을 증폭시킬 수 있다.
- [0056] 일부 실시양태에서, 항체는 콜로이드성 금-접합 항체이다.
- [0057] 일부 실시양태에서, 키트는 내부 품질 제어 유전자를 증폭시키기 위한 수단을 추가로 포함한다. 내부 대조군은 (1) 샘플 또는 추출 방법으로부터의 오염 억제, (2) 기기 오작동 검출, (3) 화학 실패 (예를 들어, 만료되거나 분해된 키트 또는 구성성분, 또는 시약의 잘못된 조합), 및 (4) 인간 오류를 검출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 내부 대조군 유전자는 양성 대조군, 예컨대 메틸화를 갖는 것으로 결정된 양성 대조군 샘플에서의 유전자이다. 일부 실시양태에서, 내부 대조군 유전자는 음성 대조군, 예컨대 메틸화를 갖지 않는 것으로 결정된 음성 대조군 샘플에서의 유전자이다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 키트는 키트를 사용하여 취득된 검사 결과의 사용 및/또는 해석에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

- [0059] 일부 실시양태에서, 키트는 생물학적 샘플에서 항체 및 헤모글로빈에 의해 형성된 복합체를 검출하기 위한 수단을 추가로 포함한다.
- [0060] 일부 실시양태에서, 환자로부터 취득된 생물학적 샘플은 분변 샘플이다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 키트는 비술파이트 시약, 및 비술파이트 시약과 환자의 생물학적 샘플, 또는 생물학적 샘플로부터 취득된 폴리뉴클레오티드를 혼합하기에 적합한 컨테이너를 추가로 포함한다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 비술파이트를 사용하는 대신에, 키트는 메틸화 민감성 제한 효소 시약을 추가로 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 키트는 하기를 추가로 포함한다: (1) 생물학적 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및 (2) 생물학적 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준.
- [0064] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTT
 GAAAATATTCGGTTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGA
 CGGCGTTCGTAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATT
 TGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTCGTTGTATTTCGG
 TCGCGTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67);
- [0065] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTT
 GAAAATATTTGGGTTATATATGTTGTGATTTATAGTTTTTTTTAGTGTGGAGTGGAGA
 TGGTGTTTGTAGTGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTT
 GTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTGTGTATTTGGT
 TGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68);
- [0066] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTT
 TTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACG
 CGCGAGGGATCGCGGTTTCGTTTCGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTGC
 AGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGCGCGTATCGTTTTTAGTT
 (SEQ ID NO.: 69).
- [0067] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTT
 TTGTTTGTTTTTTTGTTTGTATTGGGTATTTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTG
 TGAGGGATTGTGTTTGTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTTGAGT
 GTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTATTGTTTTTAGTT (SEQ ID
 NO.: 70).
- [0070] 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법이 또한 제공된다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 방법은 a) 환자의 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를 취득하는 단계를 포함한다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 방법은 b) a)의 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 방법은 c) 처리된 게놈 DNA 또는 그의 처리된 단편을 환자에서 골 형태발생 단백질 3

(BMP3)을 코딩하는 유전자의 메틸화 부위의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 제1 프라이머 쌍과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 처리된 게놈 DNA 또는 그의 단편을 환자에서 NDRG 패밀리 구성원 4 단백질 (NDRG4)을 코딩하는 유전자의 메틸화 부위의 존재 또는 부재 검출하기 위한 제2 프라이머 쌍과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.

- [0076] 일부 실시양태에서, 제1 프라이머 쌍은 서열식별번호: 1과 동일하거나, 그와 상보적이거나, 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 9개의 뉴클레오타이드의 인접 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프라이머 쌍은 서열식별번호: 2와 상보적이거나 또는 엄격한 혼성화 조건 하에서 그에 혼성화하는 적어도 9개의 뉴클레오타이드의 인접 서열을 포함한다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 처리된 게놈 DNA 또는 그의 단편은 제1 프라이머 쌍 또는 제2 프라이머 쌍에 의해 적어도 하나의 증폭물을 생산하도록 증폭되거나, 또는 증폭되지 않는다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 방법은 d) 상기 증폭물의 존재 또는 부재, 환자에서의 BMP3 유전자 및 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 상태 또는 수준에 기반하여 환자에서 CRC 또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 정량적 PCR은 샘플에서 메틸화된 BMP3 유전자를 증폭시키는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 정량적 PCR은 샘플에서 메틸화된 NDRG4 유전자를 증폭시키는데 사용된다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 방법은 또한 참조 유전자 (정규화군, 하우스키핑 유전자, 또는 내인성 대조군이라고도 함)를 증폭시키기 위한 프라이머를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 정량적 PCR은 샘플에서 참조 유전자를 증폭시키는데 사용된다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0082] i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
- [0083] ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
- [0084] iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브.
- [0085] 일부 실시양태에서, 제2 제1 프라이머 쌍 및 제2 프로브는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0086] iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
- [0087] v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
- [0088] vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.
- [0089] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0090] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및
- [0091] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브.
- [0092] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0093] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및

- [0094] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.
- [0095] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0096] i) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및
- [0097] ii) 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.
- [0098] 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다는 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브는 택맨® 프로브이다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터 취득된 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 헤모글로빈의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 항-헤모글로빈 항체를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 콜로이드성 금-접합 항체이다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 환자에서 KRAS 유전자에서의 적어도 하나의 돌연변이의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에서 KRAS 유전자의 엑손 12 및/또는 엑손 13 영역을 증폭시킬 수 있는 적어도 하나의 프라이머 쌍을 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함하는 KRAS 유전자 영역을 증폭시킬 수 있다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 KRAS 유전자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍에 의해 증폭된다:
- [0103] (1) 서열식별번호: 35를 포함하는 정방향 프라이머 G12D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- [0104] (2) 서열식별번호: 36을 포함하는 정방향 프라이머 G13D-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- [0105] (3) 서열식별번호: 37을 포함하는 정방향 프라이머 G12V-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- [0106] (4) 서열식별번호: 38을 포함하는 정방향 프라이머 G12C-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- [0107] (5) 서열식별번호: 39를 포함하는 정방향 프라이머 G12S-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R;
- [0108] (6) 서열식별번호: 40을 포함하는 정방향 프라이머 G12A-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R; 및
- [0109] (7) 서열식별번호: 41을 포함하는 정방향 프라이머 G12R-F, 및 서열식별번호: 42를 포함하는 역방향 프라이머 Kras-R.
- [0110] 일부 실시양태에서, qPCR을 위한 KRAS 프로브는 서열식별번호: 46을 포함한다.
- [0111] 일부 실시양태에서, BMP3 유전자의 증폭은 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법은 BMP3 증폭의 Ct 값을 ΔCt_1 로 결정하기 위해 제1 참조 유전자 (즉, 제1 참조 유전자)를 증폭시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0112] 일부 실시양태에서, NDRG4 유전자의 증폭은 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법은 NDRG4 증폭의 Ct 값을 ΔCt_2 로 결정하기 위해 제2 참조 유전자 (즉, 제2 참조 유전자)를 증폭시키는 단계를 추가로 포함한다.

- [0113] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 KRAS 유전자의 증폭은 정량적 PCR (qPCR)에서 수행되고, 방법은 돌연변이체 KRAS 증폭의 Ct 값을 $\Delta Ct3$ 으로 결정하기 위해 제3 참조 유전자 (즉, 제3 참조 유전자)를 증폭시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 참조 유전자는 동일하다. 일부 실시양태에서, 동일한 참조 유전자는 B2M 유전자이다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 제3 참조 유전자는 ACTB 유전자이다. 일부 실시양태에서, ACTB 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR 프라이머는 서열식별번호: 43 및 44를 포함하고, 프로브는 서열식별번호: 46을 포함한다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 방법은 (1) 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및 (2) 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준을 사용하는 것을 포함한다.
- [0117] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTT
GAAAAATATTCGGGTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGA
CGGCGTTCGTAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTATT
TGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTTTCGTTGTATTTCGG
TCGCGTTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67);
- [0118]
- [0119] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTT
GAAAAATATTTGGGTATATATGTTGTGATTTATAGTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGA
TGTTGTTTGTAGTGTGTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTTATTT
GTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTTGTGTTATTTGGT
TGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68);
- [0120]
- [0121] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTT
TTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACG
CGCGAGGATCGCGTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTTCG
AGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGCGGCATCGTTTTTAGTT
(SEQ ID NO.: 69).
- [0122]
- [0123] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:
- TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTT
TTGTTTTTTTTTTGTTTGTGTTTATTGGGTATTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTG
TGAGGGATTGTGTTTGTGTTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGGTTGAGT
GTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTGTGGTGTATTGTTTTAGTT (SEQ ID
NO.: 70).
- [0124]
- [0125] 일부 실시양태에서, 방법은 품질 제어 표준을 증폭시키는 것을 포함한다.
- [0126] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 키트를 사용하는 것을 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.
- [0127] 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재의 검출을 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 또는 진행성 선종 (AA)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 추가로 포함

한다:

- [0128] a) 환자의 분변 샘플로부터 미처리된 게놈 DNA를 획득하는 단계;
- [0129] b) a)의 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시키는 단계;
- [0130] c) b)의 처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하고, 환자에서의 BMP3 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct1$ 로 결정하는 단계;
- [0131] d) b)의 처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 qPCR을 수행하고, 환자에서의 NDRG4 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct2$ 로 결정하는 단계;
- [0132] e) 미처리된 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 qPCR을 수행하고, 환자에서의 돌연변이체 KRAS 유전자의 Ct 값을 $\Delta Ct3$ 으로 결정하는 단계;
- [0133] f) 분변 샘플에서 헤모글로빈 단백질의 분변 면역화학적 검사를 수행하고 스코어를 FIT로 결정하는 단계;
- [0134] g) K의 값을 결정하며, 여기서 $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$, 여기서 a, b, c, d, X는 임상 상수인 단계; 및
- [0135] h) 종합 지수 P의 값을 결정하며, 여기서 $P = e^K / (1 + e^K)$, 여기서 e는 자연 상수인 단계.
- [0136] 임상 상수 a, b, c, d 및 X는 환자 집단 간의 임상 데이터 분포를 분석함으로써 결정될 수 있다.
- [0137] 일부 실시양태에서, P가 미리 결정된 임계값 이상인 경우, 환자는 CRC 및/또는 AA를 갖는 것으로 결정되고, P가 미리 결정된 임계값 미만인 경우, 환자는 건강한 것으로 결정된다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 미리 결정된 임계값은 임상 데이터 분포, 예컨대 CRC 및/또는 AA를 갖는 것으로 결정된 환자, 및 CRC 및/또는 AA를 갖지 않는 것으로 결정된 환자로부터 획득된 임상 데이터로부터 계산된다.
- [0139] 일부 실시양태에서, BMP3 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR은 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브를 포함하며, 여기서 제1 프라이머 쌍 및 제1 프로브는 하기로 이루어진 균으로부터 선택된다:
- [0140] i) 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브;
- [0141] ii) 서열식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브; 및
- [0142] iii) 서열식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브.
- [0143] 일부 실시양태에서, NDRG4 유전자를 증폭시키기 위한 qPCR은 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브를 포함하며, 여기서 제2 프라이머 쌍 및 제2 프로브는 하기로 이루어진 균으로부터 선택된다:
- [0144] iv) 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8을 포함하는 프로브;
- [0145] v) 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브; 및
- [0146] vi) 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.
- [0147] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0148] i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 3을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 4를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 5를 포함하는 프로브, 및
- [0149] ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오티드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 6을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 7을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 8

을 포함하는 프로브.

- [0150] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0151] i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열 식별번호: 9를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 10을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 프로브, 및
- [0152] ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 12를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 13을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 14를 포함하는 프로브.
- [0153] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0154] i) 샘플에서 BMP3 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열 식별번호: 15를 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 16을 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 17을 포함하는 프로브, 및
- [0155] ii) 샘플에서 NDRG4 유전자의 적어도 하나의 CpG 디뉴클레오타드의 메틸화 상태 또는 수준을 검출하기 위한, 서열식별번호: 18을 포함하는 정방향 프라이머, 서열식별번호: 19를 포함하는 역방향 프라이머, 및 서열식별번호: 20을 포함하는 프로브.
- [0156] 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브 둘 다는 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및 제2 프로브는 택맨® 프로브이다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 KRAS 유전자는 G12D, G12V, G12C, G13D, G12A, G12R, G12S 및 G13C로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 KRAS 돌연변이를 포함한다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 분변 면역화학적 검사는 콜로이드성 금-접합 항체를 포함한다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 방법의 단계 c) 및 단계 d)는 참조 유전자로서 B2M 유전자를 사용하는 것을 포함한다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 방법은 하기를 사용하는 것을 포함한다:
- [0161] (1) 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준, 및
- [0162] (2) 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준 및 음성 표준.
- [0163] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오타드 서열을 포함한다:
 GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAAAATAAAGCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTT
 GAAAATATTCGGTTATATACGTCGCGATTTATAGTTTTTTTTTAGCGTTGGAGTGGAGA
 CGGCGTTCGTAGCGTTTTGCGCGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATT
 TGTTAGGTTGCGTTGGGTTAGCGTAGTAAGTGGGGTTGGTCGTTATTCGTTGTATTCGG
 TCGCGTTTCGGGTTTCGTGCGTTTTTCGTTTTAG (SEQ ID NO: 67).
- [0164]
- [0165] 일부 실시양태에서, BMP3 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오타드 서열을 포함한다:
 GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAAAATAAAGTGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTTT
 GAAAATATTTGGGTTATATATGTTGTGATTTATAGTTTTTTTTTAGTGTTGGAGTGGAGA
 TGGTGTGTTAGTGTGTTTTGTGTGGGTGAGGTTTGTGTAGTTGTTGGGGAAGAGTTATTT
 GTTAGGTTGTGTTGGGTTAGTGTAGTAAGTGGGGTTGGTTGTTATTTGTTGTATTTGGT
 TGTGTTTTGGGTTTTGTGTGTTTTGTTTTAG (SEQ ID NO: 68).
- [0166]

[0167] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 양성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

TGAGAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTCGCGTCGCGGTT
 TTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACG
 CGCGAGGGATCGCGGTTTCGTTTCGGGATTAGTTTTAGGTTTCGGTATCGTTTCGCGGGTCG
 AGCGTTTATATTCGTTAAATTTACGCGGGTACGTTTTTCGCGCGTATCGTTTTTAGTT
 (SEQ ID NO.: 69).

[0168]

[0169] 일부 실시양태에서, NDRG4 메틸화를 검출하기 위한 음성 표준은 하기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

TGAGAAGTTGGTGGGGGTGTGGATTGATTGGGGTGTTTTTTAGGTTTTGTGTTGTGGTTT
 TTGTTTGTTTTTTTGTTTGTATTGGGTATTTAGTTGTGTAGAAGGTGGAAGTTATGTG
 TGAGGGATTGTGGTTTGTGGGATTAGTTTTAGGTTTGGTATTGTTTTGTGGTTGAGT
 GTTTATATTTGTTAAATTTATGTGGGTATGTTTTTGTGGTGTATTGTTTTTAGTT (SEQ ID
 NO.: 70).

[0170]

[0171] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 c) 및 단계 d)에서 품질 제어 표준을 증폭시키는 것을 포함한다.

[0172]

본 개시내용의 키트를 사용하여 환자에서 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 환자에서의 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재에 의존하여 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 진단 및 치료를 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)을 진단 및 치료하는 방법이 또한 제공된다.

[0173]

본원에 기재된 방법을 사용하여 환자에서 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 환자에서의 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재에 의존하여 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)의 진단 및 치료를 필요로 하는 환자에서 결장직장암 (CRC) 및/또는 진행성 선종 (AA)을 진단 및 치료하는 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0174]

도 1a 내지 도 1d는 두 BMP3 및 NDRG4 유전자의 앰플리콘의 상대적 위치 및 CpG 섬 예측의 결과를 도시한다. "Y", "R"은 축중성 염기이다. 도 1a - BMP3 유전자의 프로모터 영역의 CpG 섬 예측의 결과; 도 1b - BMP3 유전자의 앰플리콘의 상대적 위치; 도 1c - NDRG4 유전자의 프로모터 영역의 CpG 섬 예측의 결과; 도 1d - NDRG4 유전자의 앰플리콘의 상대적 위치.

도 2a는 백인 및 아시아인 집단에서 BMP의 메틸화 CpG 부위의 차이를 도시한다. 도 2b는 백인 및 아시아인 집단에서 NDRG4 유전자의 메틸화 CpG 부위의 차이를 도시한다.

도 3a는 바람직한 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3b는 바람직한 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3c는 바람직한 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3d는 바람직한 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3e는 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3f는 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3g는 비교 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3h는 비교 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3i는 비교 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3j는 비교 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3k는 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다. 도 3l은 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선을 도시한다.

도 4a는 바람직한 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4b는 바람직한 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4c는 바람직한 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4d는 바람직한

그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4e는 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4f는 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4g는 비교 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4h는 비교 그룹 1에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4i는 비교 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4j는 비교 그룹 2에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4k는 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 BMP3의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다. 도 4l은 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선을 도시한다.

도 5a 내지 도 5c는 임상 샘플에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위해 각각 바람직한 그룹 1, 바람직한 그룹 2 및 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 증폭 곡선을 도시한다. 도 5d 내지 도 5f는 동일한 검정에서 BMP3 메틸화를 검출하기 위해 각각 비교 그룹 1, 비교 그룹 2 및 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 증폭 곡선을 도시한다.

도 6a 내지 도 6c는 임상 샘플에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위해 각각 바람직한 그룹 1, 바람직한 그룹 2 및 바람직한 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 증폭 곡선을 도시한다. 도 6d 내지 도 6f는 동일한 검정에서 NDRG4 메틸화를 검출하기 위해 각각 비교 그룹 1, 비교 그룹 2 및 비교 그룹 3에서 프라이머 및 프로브를 사용한 증폭 곡선을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0175] 정의
- [0176] "한 실시양태", "실시양태", "한 예", 및 "예"에 대한 언급은 그렇게 기재된 실시양태(들) 또는 예(들)가 특정한 특색, 구조, 특징, 특성, 요소 또는 제한을 포함할 수 있지만, 모든 실시양태 또는 예가 반드시 해당 특정한 특색, 구조, 특징, 특성, 요소 또는 제한을 포함하는 것은 아님을 나타낸다. 또한, 문구 "한 실시양태에서"의 반복된 사용이 반드시 동일한 실시양태를 지칭하는 것은 아니지만, 그럴수도 있다.
- [0177] 본원에 사용된 바와 같은 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 함께 공유결합으로 연결된 적어도 2개의 뉴클레오티드를 의미한다. 단일 가닥의 도시는 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 그러므로, 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보적 가닥을 포함한다. 핵산의 많은 변이체가 주어진 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 그러므로, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 그의 보체를 포함한다. 단일 가닥은 엄격한 혼성화 조건 하에서 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 그러므로, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 이중 가닥 및 단일 가닥 서열 둘 다의 일부를 함유할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 둘 다, RNA, 또는 하이브리드일 수 있으며, 여기서 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오티드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 크산틴 하이포크산틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함하는 염기의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법에 의해 획득될 수 있다.
- [0178] 본원에 사용된 바와 같은 문구 "이를 필요로 하는 대상체"는 암을 가진, 암에 걸릴 위험이 있는 것으로 공지된 동물 또는 인간 대상체 (예를 들어, 유전적으로 소인이 있는 대상체, 암의 의학적 및/또는 가족력이 있는 대상체, 발암물질, 직업적 위험, 환경적 위험에 노출된 대상체) 및/또는 암의 의심스러운 임상 징후 (예를 들어, 대변 또는 흑색변에서의 혈액, 설명할 수 없는 통증, 발한, 설명할 수 없는 열, 식욕감퇴까지의 설명할 수 없는 체중 감소, 배변 습관의 변화 (변비 및/또는 설사), 이급후증 (특히 직장암의 경우에 불완전한 배변감), 빈혈 및/또는 전반적인 쇠약)를 나타내는 대상체를 지칭한다. 추가적으로 또는 대안적으로, 이를 필요로 하는 대상체는 정기 건강 검진을 받는 건강한 인간 대상체일 수 있다.
- [0179] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0180] 문구 "본질적으로 이루어진"은 조성물 또는 방법이 추가 성분 및/또는 단계를 포함할 수 있지만, 추가 성분 및/또는 단계가 청구된 조성물 또는 방법의 기본적이고 신규한 특징을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0181] 본원에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수 언급을 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하여 복수의 화합물들을 포함할 수

있다.

- [0182] 본원에 사용된 바와 같은 "엄격한 혼성화 조건"은 제1 핵산 서열 (예를 들어, 프로브)이 예컨대 핵산의 복합체 혼합물에서 제2 핵산 서열 (예를 들어, 표적)에 혼성화할 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고, 상이한 상황에서 상이할 것이다. 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열 용점 (T_m)보다 약 5-10°C 낮도록 선택될 수 있다. T_m 은 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형 상태에서 표적 서열에 혼성화하는 온도 (정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에서)일 수 있다 (표적 서열이 T_m 에서 과량으로 존재하므로, 프로브의 50%가 평형 상태에서 점유됨). 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온, 예컨대 약 0.01-1.0 M 나트륨 이온 농도 (또는 다른 염)이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들어, 약 10-50개의 뉴클레오티드)의 경우에 적어도 약 30°C 및 긴 프로브 (예를 들어, 약 50개 초과 뉴클레오티드)의 경우에 적어도 약 60°C인 조건일 수 있다. 엄격한 조건은 또한 불안정화제, 예컨대 포름아미드의 첨가로 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화의 경우, 양성 신호는 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인 엄격한 혼성화 조건은 하기를 포함한다: 50% 포름아미드, 5×SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 인큐베이션, 또는, 5×SSC, 1% SDS, 65°C에서 인큐베이션, 0.2×SSC에서 세척, 및 65°C에서 0.1% SDS.
- [0183] 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 상보적인"은 제1 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100개 이상의 뉴클레오티드의 영역에 걸쳐 제2 서열의 보체와 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 두 서열이 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화함을 의미한다.
- [0184] 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100개 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 영역에 걸쳐 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 또는 핵산과 관련하여, 제1 서열이 제2 서열의 보체에 실질적으로 상보적인 경우를 의미한다.
- [0185] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "진단"은 병리 또는 증상의 분류, 병리의 중증도 (예를 들어, 등급 또는 단계)의 결정, 병리 진행의 모니터링, 병리의 결과 및/또는 회수 가능성의 예측을 지칭한다.
- [0186] 문구 "로 본질적으로 이루어진"은 조성물 또는 방법이 추가 성분 및/또는 단계를 포함할 수 있지만, 추가 성분 및/또는 단계가 청구된 조성물 또는 방법의 기본적인 신규한 특징을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0187] **1. CRC 및 AA의 중국인 집단에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 과메틸화된 CpG 부위를 포함하는 DNA 서열**
- [0188] 본 발명은 아시아인 집단 (예를 들어, 중국인 집단)에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 상세한 과메틸화된 CpG 부위를 포함하는 DNA 서열을 제공하며, 이는 CRC 및 AA 검출을 위한 마커로서 사용될 수 있다.
- [0189] 일부 실시양태에서, 하기와 같은 BMP3 유전자의 천연 서열이 제공되며 (5'에서 3'로), 위치자 "m"으로 표시된 잠재적으로 메틸화된 부위를 나타낸다:

```
GCCAGTTTGGCmCGGGTGTCCAAAAATAAAGmCGAGGAGGGAAGGTACAGACAGAT
CTTGAAAAACACCmCGGGCCACACAmCGCmCGmCGACCTACAGCTCTTTCTCAGmCGTTGG
AGTGAGGAmCGGmCGCCCGCAGmCGCCCTGmCGmCGGGTGAGGTCmCGmCGCAGCTGCTG
GGGAAGAGCCCACCTGTCAGGCTGmCGCTGGGTGTCAGmCGCAGCAAGTGGGGCTGGCmCG
CTATCTmCGCTGCACCCGGCmCGmCGTCCmCGGGCTCmCGTGmCGCCCTmCGCCCCAG(SEQ
ID NO.: 65).
```
- [0190]
- [0191] 일부 실시양태에서, 하기와 같은 NDRG4 유전자의 천연 서열이 제공되며 (5'에서 3'로), 위치자 "m"으로 표시된 잠재적으로 메틸화된 부위를 나타낸다:

TGAGAAGT^mCGG^mCGGGGG^mCG^mCGGAT^mCGAC^mCGGGGTGTCCCCAGGCTC^mCG^mCGT^m
^mCG^mCGGTCCC^mCGCT^mCGCCCTCC^mCGCC^mCGCCCAC^mCGGGCACCCCAGC^mCG^mCGCAG^m
 AAGG^mCGGAAGCCA^mCG^mCG^mCGAGGGAC^mCG^mCGGTC^mCGTC^mCGGGACTAGCCCCAGG^m
 CC^mCGGCAC^mCGCCC^mCG^mCGGGC^mCGAG^mCGCCCACACC^mCGCCAAACCCA^mCG^mCGGG^m
 CA^mCGCCCC^mCG^mCGG^mCGCAC^mCGCCCCCAGCC(SEQ ID NO.: 66).

[0192]

[0193]

천연 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 (예를 들어, 비숄파이트에 의해) 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시킨 후, BMP3 유전자의 전환된 서열은 하기와 같으며 (5'에서 3'로), 위첨자 "m"으로 표시된 잠재적으로 메틸화된 부위를 나타낸다:

GTTAGTTTGGT^mCGGGTGT^mTTTTAAAAATAAAG^mCGAGGAGGGAAGGTATAGATAGATTTT^m
 GAAAAATAT^mCGGGTTATATA^mCGT^mCG^mCGATTATAGTTTTTTTTTAG^mCGTTGGAGTGGGA^m
 GA^mCGG^mCGTT^mCGTAG^mCGTTTTG^mCG^mCGGGTGAGGTT^mCG^mCGTAGTTGTTGGGGAAG^m
 AGTTTATTTGTTAGGTTG^mCGTTGGGTTAG^mCGTAGTAAGTGGGGTTGGT^mCGTTATTT^mCG^m
 TTGTAT^mCGGT^mCG^mCGTT^mCGGGTTT^mCGTG^mCGTTTT^mCGTTTTAG (SEQ ID NO.:1).

[0194]

[0195]

천연 게놈 DNA 또는 그의 단편을 하나 이상의 시약으로 처리하여, 그의 비-메틸화된 시토신 염기를 우라실 (예를 들어, 비숄파이트에 의해) 또는 혼성화 특성의 관점에서 시토신과 검출가능하게 상이한 또 다른 염기로 전환시킨 후, NDRG4 유전자의 전환된 서열은 하기와 같으며 (5'에서 3'로), 위첨자 "m"으로 표시된 잠재적으로 메틸화된 부위를 나타낸다:

TGAGAAGT^mCGG^mCGGGGG^mCG^mCGGAT^mCGAT^mCGGGGTGTTTTTTAGGTTT^mCG^mCGT^mC^m
 G^mCGGT^mTTTT^mCGTT^mCGTTTTTT^mCGTT^mCGTTTAT^mCGGGTATTTTAGT^mCG^mCGTAGAAGG^m
^mCGGAAGTTA^mCG^mCG^mCGAGGGAT^mCG^mCGGTT^mCGTT^mCGGGATTAGTTTTAGGTT^mCGG^m
 TAT^mCGTTT^mCG^mCGGGT^mCGAG^mCGTTTATATT^mCGTTAAATTTA^mCG^mCGGGTA^mCGTTTT^m
 CG^mCGG^mCGTAT^mCGTTTTTAGTT(SEQ ID NO.:2).

[0196]

[0197]

본 개시내용의 아시아인 집단에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 상세한 과메틸화된 CpG 부위를 포함하는 DNA 서열은 아시아인 집단에서 CRC 및/또는 AA를 검출하는데 특히 유용하다. 예를 들어, 프라이머 및 프로브는 BMP3 및/또는 NDRG4 메틸화 상태 및 수준을 결정하기 위한 도구로서 BMP3 및/또는 NDRG4 유전자에서 하나 이상의 특이적 메틸화 부위를 표적화하여, 따라서 종양 상태의 결정을 필요로 하는 환자에서 종양 상태를 결정하도록 설계될 수 있다.

[0198]

2. BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화를 각각 검출하기 위한 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브 및 상응하는 시약

[0199]

본 발명은 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 수준을 각각 검출하기 위한 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 제공한다. 이들 프라이머 및 프로브는 아시아인 집단 (예를 들어, 중국인 집단)에서 고빈도 메틸화된 CpG 부위를 표적화하도록 설계된다.

[0200]

이들 특정 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브는 기존 상업용 제품, 예컨대 콜로가드[®]와 비교하여 아시아인 집단에서 CRC 및 AA를 검출하는데 있어서 특히 AA 검출에 대해 놀랍게도 더 높은 민감도 및 특이도를 갖는다.

[0201] 프라이머 및 프로브의 서열은 하기와 같다:

유전자	그룹	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3')
BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
		프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCAA
		프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
		프로브	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCACGCGACTAAAATACCCGAT
		프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTCGTTCTGTTTTTCGTTTCGT
	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
		프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTCGTT
	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCGTTTTTCG
		역방향 프라이머	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
		프로브	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

[0202]

[0203] 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 유리하게는 아시아인 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 BMP3 또는 NDRG4의 프로모터 영역에서 과메틸화된 CpG 부위의 극히 특이적 증폭을 허용한다.

[0204] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 3 내지 20의 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보적인 올리고뉴클레오티드가 제공된다.

[0205] 일부 실시양태에서, 프로브 서열, 예컨대 서열식별번호: 5, 11, 17, 8, 14 및 20과 비교하여 하나 이상의 변형을 갖는 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 변형은 서열식별번호: 5, 11, 17, 8, 14 및 20에 인용된 뉴클레오티드 서열 중 하나의 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 일어날 수 있다.

[0206] 그의 구조 상의 임의의 위치에서 뉴클레오티드를 변형시키는데 사용될 수 있는 변형된 염기 모이어티의 예는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 특히 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실퀘오신, 이노신, N-6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀘오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산, 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-S-옥시아세트산, 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실, 및 2,6-디아미노퓨린.

[0207] 그의 구조 상의 임의의 위치에서 뉴클레오티드를 변형시키는데 사용될 수 있는 변형된 당 모이어티의 예는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 크실로스, 및 헥소스, 또는 포스페이트 백본의 변형된 구성성분, 예컨대 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미도티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬 포스포트리에스테르, 또는 포름아세탈 또는 그의 유사체.

[0208] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 5, 11, 17, 8, 14 및 20의 서열에서 올리고뉴클레오티드는 비천연 뉴클레오티드, 예컨대 인공 핵산에 의해 대체된다. 인공 핵산은 펩티드 핵산 (PNA), 모르폴리노, 잠금 핵산 (LNA), 글리콜 핵산 (GNA) 및 트레오스-핵산 (TNA)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이들 각각은 분자의 백본에 대한 변화에 의해 자연 발생 DNA 또는 RNA와 구별된다.

[0209] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 프로브는 프로브의 5'에 표지를 포함한다.

[0210] 일부 실시양태에서, 프로브의 5'에 있는 표지는 형광 염료, 예컨대 형광단을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 형광단은 광 여기시 광을 재방출할 수 있는 형광 화학적 화합물이다. 형광단은 전형적으로 여러 개의 조합

된 방향족 기, 또는 여러 개의 π 결합을 갖는 평면 또는 시클릭 분자를 함유한다. 비-단백질 유기 형광단은 크산텐 유도체 (예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린, 예오신, 및 텍사스 레드); 시아닌 유도체 (예를 들어, 시아닌, 인도카르보시아닌, 옥사카르보시아닌, 티아카르보시아닌, 및 메로시아닌), 스쿠아라인 유도체 및 고리-치환된 스쿠아라인 (예를 들어, 세타, 세타우, 및 스퀘어 염료), 나프탈렌 유도체 (예를 들어, 단실 및 프로단 유도체), 쿠마린 유도체; 옥사디아졸 유도체 (예를 들어, 피리딜옥사졸, 니트로벤즈옥사디아졸 및 벤즈옥사디아졸); 안트라센 유도체 (예를 들어, DRAQ5, DRAQ7 및 CyTRAK 오렌지를 포함하는 안트라퀴논); 피렌 유도체 (캐스케이드 블루 등), 옥사진 유도체 (예를 들어, 나일 레드(Nile red), 나일 블루(Nile blue), 크레실 바이올렛, 옥사진 170 등); 아크리딘 유도체 (예를 들어, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 옐로우 등); 아틸메틴 유도체 (예를 들어, 아우라민, 크리스탈 바이올렛, 말라카이트 그린); 테트라피롤 유도체 (예를 들어, 포르핀, 프탈로시아닌, 빌리루빈)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정한 예는 VIC, PET, 텍사스 레드, Cy3, Cy5, FAM(6-카르복시플루오레세인), HEX (6-카르복시-2',4,4',5',7,7'-헥사클로로플루오레세인), ROX (5(6)-카르복시-X-로다민), JOE (6-카르복시-4',5'-디클로로-21,71-디메톡시플루오레세인), TET (5'-테트라클로로-플루오레세인 포스포아미다이트), NED (플루오레세인 벤즈옥산텐), TAMRA (6-카르복시-N,N,N,N-테트라메틸로다민), FITC (플루오레세인 이소티오시아네이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 프로브에서 사용될 수 있는 특정한 형광단의 예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 나자렌코(Nazarenko) 등의 미국 특허 번호 5,866,366에 제공된 것들, 예컨대 4-아세트아미도-4'-이소티오시아나토스틸벤-2,2'-디술포산; 아크리딘 및 유도체, 예컨대 아크리딘 및 아크리딘 이소티오시아네이트, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술포산 (EDANS), 4-아미노-N-[3-비닐술포닐]페닐]나프탈이미드-3,5 디술포네이트 (루시퍼 옐로우 (Lucifer Yellow) VS), N-(4-아닐리노-1-나프틸)말레이미드, 안트라닐아미드; 브릴리언트 옐로우(Brilliant Yellow); 쿠마린 및 유도체, 예컨대 쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린 (AMC, 쿠마린 120), 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿨루아린 (쿠마란(Coumaran) 151); 시아노신; 4',6-디아미니디노-2-페닐인돌 (DAPI); 5',5"-디브로모피로갈롤-술포프탈레인 (브로모피로갈롤 레드); 7-디에틸아미노-3-(4'-이소티오시아나토페닐)-4-메틸쿠마린; 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트; 4,4'-디이소티오시아나토타히드로-스틸벤-2,2'-디술포산; 4,4'-디이소티오시아나토스틸벤-2,2'-디술포산; 5-[디메틸아미노]나프탈렌-1-술포닐 클로라이드 (DNS, 단실 클로라이드); 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4'-이소티오시아네이트 (DABITC); 예오신 및 유도체, 예컨대 예오신 및 예오신 이소티오시아네이트; 에리트로신 및 유도체, 예컨대 에리트로신 B 및 에리트로신 이소티오시아네이트; 에티디움; 플루오레세인 및 유도체, 예컨대 5-카르복시플루오레세인 (FAM), 5-(4,6-디클로로트리아진-2-일)아미노플루오레세인 (DTAF), 2'7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인 (JOE), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), QFITC (XRITC), -6-카르복시-플루오레세인 (HEX), 및 TET (테트라메틸 플루오레세인); 플루오레사민; IR144; IR1446; 말라카이트 그린 이소티오시아네이트; 4-메틸엠펠리페론; 오르토 크레졸프탈레인; 니트로티로신; 파라로스아닐린; 페놀 레드; B-피코에리트린; o-프탈디알데히드; 피렌 및 유도체, 예컨대 피렌, 피렌 부티레이트 및 숙신이미드 1-피렌 부티레이트; 리액티브 레드(Reactive Red) 4 (시마크론(CIBACRON)™ 브릴리언트 레드 3B-A); 로다민 및 유도체, 예컨대 6-카르복시-X-로다민 (ROX), 6-카르복시로다민 (R6G), 리사민 로다민 B 술포닐 클로라이드, 로다민 (Rhod), 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민 (TAMRA), 테트라메틸 로다민, 및 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트 (트리 TC); 술포로다민 B; 술포로다민 101 및 술포로다민 101의 술포닐 클로라이드 유도체 (텍사스 레드); 리보플라빈; 로술산 및 테르븀 킬레이트 유도체; 라이트사이클러 레드(LightCycler Red) 640; Cy5.5; 및 Cy56-카르복시플루오레세인; 붕소 디피로메텐 디플루오라이드 (BODIPY); 아크리딘; 스틸벤; 6-카르복시-X-로다민 (ROX); Cy3; Cy3.5, Cy5, Cy5.5, VIC® (어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)); LC Red 640; LC Red 705; 오레곤그린(OregonGreen)™; CALRed™; Red640; 및 야키마 옐로우(Yakima yellow); 라이터사이클러 (LighterCycler)®Cyan500; 라이터사이클러®; Red610; 알렉사(Alexa) 647; 알렉사 555; 5-(2-아미노에틸)아미노-1-나프탈렌 술포산 (EDANS); 테트라메틸 로다민 (TMR); 테트라메틸 로다민 이소시아네이트 (TMRITC), 플루오레세인 이소시아네이트 (FITC), X-로다민, 그의 유도체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 더 많은 형광 염료는 미국 특허 번호 5866366, 6818431, 6056859, 9140688, 9581587, 6165765, 6485909, 8158358, 7625723, 7560236, 7867701, 9150912, 7960543, 6555383, 6881570, 8198026, 5625081, 8445291, 9194801, 8835110, 7893227, 9243289, 7427674, 9512493, 미국 특허 출원 공개 번호 20170152552, 20030170672, 20160281151, 20130084558, 20060281100, 20140234833, 20150072340, 20050089910, 20090081677, 2014002402220180171393, 20060188886, 20010018185, 20110151446, 및 WO/2000/017330A1, WO/2008/030071A1, WO/2013/049631A1, WO/2016/179090A1, WO/2016/123895A1, WO/2003/079022A1에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0211] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 프로브는 형광 공여자 및 수용자 형광단을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 수용자 형광단 (예를 들어, "형광 켄처")은 공여자 형광단으로부터 예를 들어 약 400 내지 900 nm 범위의 에너지를 흡수하는 형광단이다. 수용자 형광단은 일반적으로 공여자 형광단의 최대 흡광도 파장보다 통상적으로 적어도 10 nm 더 높은 (예컨대 적어도 20 nm 더 높은) 파장의 빛을 흡수한다. 수용자 형광단은 공여자 형광단의 방출과 중첩되는 여기 스펙트럼을 가지고 있어서, 공여자에 의해 방출된 에너지는 켄처를 여기시킬 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 수용자 형광단이 사용될 수 있다. 특정한 예에서, 수용자 형광단은 다크 켄처, 예컨대 다브실(Dabcyl), QSY7 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)), QSY9 (몰레큘라 프로브스), QSY21 (몰레큘라 프로브스), QSY33 (몰레큘라 프로브스), 블랙 홀 켄처(BLACK HOLE QUENCHER)TM (글렌 리써치 (Glen Research), 예를 들어 BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3), 이클립스(ECLIPSE)TM 다크 켄처 (에포크 바이오사이언시스 (Epoch Biosciences)), DDQ-I, DDQ-II, 다브실, 이클립스, 또는 아이오와 블랙(IOWA BLACK)TM (인테그레이티드 DNA 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies), 예를 들어 아이오와 블랙 FQ, 아이오와 블랙 RQ)이다. 더 많은 형광 켄처는 미국 특허 번호 9957546, US9274008, 미국 특허 공개 번호 20140295422, 20090042205, 20160281182, 20180142284, 20140147929, 및 WO/2009/009615A1, WO/2016/160572A1, WO/2016/178953A1, WO/2018/229663A1, WO/2010/051544A2, WO/2013/152220A2에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 켄처는 공여자 형광단의 방출을 감소시키거나 켄칭할 수 있다. 이러한 예에서, 공여자 형광단에 충분히 근접할 때 수용자 형광단으로부터의 방출 신호의 증가를 검출하는 대신에 (또는 공여자 형광단으로부터 상당한 거리에 있을 때 수용자 형광단으로부터의 방출 신호의 감소를 검출함), 공여자 형광단으로부터의 방출 신호의 증가는 켄처가 공여자 형광단으로부터 상당한 거리에 있을 때 검출될 수 있다 (또는 켄처 수용자 형광단에 충분히 근접할 때 공여자 형광단으로부터의 방출 신호의 감소).
- [0212] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 프라이머 및 프로브는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)에 기반한다. 앰플리콘을 검출하는데 사용될 수 있는 FRET를 사용하는 올리고뉴클레오티드의 예는 선형 올리고프로브, 예컨대 하이브 프로브(HybProbe), 5' 뉴클레아제 올리고프로브, 예컨대 택맨® 프로브, 헤어핀 올리고프로브, 예컨대 분자 비콘, 스크피온 프라이머 및 유니프라이머(UniPrimer), 마이너 그루브 결합 프로브, 및 자기-형광 앰플리콘, 예컨대 선라이즈 프라이머를 포함한다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 프라이머 및/또는 프로브는 다른 기능적 실체, 예컨대 비오틴, 합텐, 항원, 화학적 기, 방사성 물질, 효소 마커 등에 의해 표지된다. 표지된 증폭 산물의 검출은 예를 들어 형광 방법, 화학발광 방법, 밀도측정 방법, 광도측정 방법, 침전 반응, 효소적 강화 반응을 포함하는 효소적 반응, SPR ("표면 플라즈몬 공명") 방법, 타원편광 방법, 굴절률 측정, 반사율 측정, 및 유사한 방법을 사용하여 성취될 수 있다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프라이머 및 프로브는 환자에서 BMP3 및/또는 NDRG4 유전자에서의 메틸화 상태 및 수준을 결정하기 위해 정량적 PCR에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 참조 유전자를 증폭시키기 위해 추가 반응이 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자는 활성이 CRC 및 AA의 존재 또는 부재에 의해 영향을 받지 않고 BMP3 및 NDRG4의 메틸화 상태 및 수준에 의해 영향을 받지 않을 환자의 유전자이다. 일부 실시양태에서, 참조 유전자는 β -글로빈 (HBB), 텔로머라제 (TERT), 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제 (GAPDH), 알부민 (ALB), β -액틴 (ACTB), 베타 2 마이크로글로불린 (B2M), 및 T 세포 수용체 γ (TRG)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0215] 일부 실시양태에서, B2M 유전자는 BMP3/NDRG4의 메틸화 상태 및 수준을 검출하기 위한 정량적 PCR에서 참조 유전자로서 사용된다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 무주형 대조군 (시약 또는 장비 오염을 검출하고 양성 결과를 확인하기 위해); 무증폭 대조군 (분해된 표지된 프로브에 의해 생성된 배경 형광을 검출하기 위해), 및 양성 대조군 (억제제 또는 오작동을 검출하고, 시약 및 장비가 작동하는지 확인하기 위해)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 다른 대조군이 도입될 수 있다.
- [0217] 일부 실시양태에서, qPCR은 샘플에 메틸화된 BMP3 유전자 또는 메틸화된 NDRG4 유전자의 증폭이 있는지를 결정하기 위해 사용된다. BMP3 또는 NDRG4의 프로브로부터 검출된 신호는 표준 곡선을 참조하거나 Ct 값을 참조 유전자와 비교함으로써 정량된다. 하우스키핑 유전자의 분석은 종종 결과를 정규화하는데 사용된다. 사이클 임계치 (Ct)는 형광 신호가 미리 결정된 임계치를 교차하는데 필요한 사이클 수로 정의된다 (예를 들어, 배경 수준 초과, 예컨대 음성 대조군 샘플에서의 증폭 수준 초과). 일부 실시양태에서, 임계치는 qPCR 기기의 소프트웨어 또는 다른 적합한 방법에 의해 자동으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 임계치는 음성 대조군 샘플에서

말단 형광 값 바로 위로 (예를 들어, 약 0.01%, 0.1%, 1%, 5% 또는 10% 더 높게) 설정된다.

- [0218] 일부 실시양태에서, 검사 샘플에서 BMP3 또는 NDRG4 증폭과 연관된 Ct 값이 약 35, 34, 33, 32, 31, 30 이하 (\leq) 또는 그 미만인 경우, 샘플은 메틸화된 BMP3 또는 NDRG4를 함유하는 것으로 결정되고 환자는 CRC 및/또는 AA를 갖고 (양성 결과), 그렇지 않으면 샘플은 메틸화된 BMP3 또는 NDRG4를 함유하지 않는 것으로 결정되고 환자는 CRC 또는 AA를 갖지 않는다 (음성 결과). 참조 유전자 증폭의 경우, 샘플에서 대조군 유전자 증폭과 연관된 Ct 값이 약 34, 33, 32, 31, 30, 29 이하 (\leq) 또는 그 미만인 경우, 참조 유전자 증폭은 양성으로 결정되고, 그렇지 않으면 참조 유전자 증폭은 음성으로 결정된다. 참조 유전자 증폭이 음성으로 결정된 경우, 검사 결과는 무효화된다.
- [0219] 일부 실시양태에서, BMP3과 연관된 Ct 값 사이의 차이는 참조 유전자 증폭과 연관된 Ct 값과 비교되고 ($\Delta Ct = Ct_{\text{관심 유전자}} - Ct_{\text{참조 유전자}}$), $\Delta Ct1$ 로 지칭된다. 일부 실시양태에서, $\Delta Ct1$ 이 미리 결정된 임계값 이하인 경우 (\leq 임계값), 샘플은 BMP3 메틸화를 갖는 것으로 결정되고 (양성 결과), 환자는 CRC 또는 AA를 갖는 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, $\Delta Ct1$ 이 미리 결정된 임계값 초과인 경우 ($>$ 임계값), 샘플은 BMP3 메틸화를 갖지 않는 것으로 결정되고 (음성 결과), 환자는 건강한 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 임계값은 1%의 메틸화 비율 갖는 5 ng/μL 뉴클레오티드 서열을 포함하는 샘플에 대한 상응하는 ΔCt 값, 예컨대 약 8, 9 또는 10이다.
- [0220] 일부 실시양태에서, NDRG4와 연관된 Ct 값 사이의 차이는 참조 유전자 증폭과 연관된 Ct 값과 비교되고 ($\Delta Ct = Ct_{\text{관심 유전자}} - Ct_{\text{참조 유전자}}$), $\Delta Ct2$ 로 지칭된다. 일부 실시양태에서, $\Delta Ct2$ 가 미리 결정된 임계값 이하인 경우 (\leq 임계값), 샘플은 NDRG4 메틸화를 갖는 것으로 결정되고 (양성 결과), 환자는 CRC 또는 AA를 갖는 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, $\Delta Ct2$ 가 미리 결정된 임계값 초과인 경우 ($>$ 임계값), 샘플은 NDRG4 메틸화를 갖지 않는 것으로 결정되고 (음성 결과), 환자는 건강한 것으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 임계값은 1%의 메틸화 비율을 갖는 5 ng/μL 뉴클레오티드 서열을 포함하는 샘플에 대한 상응하는 ΔCt 값, 예컨대 약 8, 9 또는 10이다.
- [0221] 본 개시내용의 바람직한 프라이머 및 프로브는 기존 상업용 제품, 예컨대 콜로가드[®]와 비교하여 아시아인 집단에서 CRC 및 AA를 검출하는데 있어서 특히 AA 검출에 대해 놀랍게도 높은 민감도 및 특이도를 갖는다.
- [0222] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "민감도"는 주어진 집단에서 CRC 및/또는 AA를 실제로 갖는 환자가 올바르게 검출될 때의 비율을 의미한다. 일부 실시양태에서, 민감도는 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 초과, 또는 100%이다. 일부 실시양태에서, 집단의 크기는 적어도 약 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000 또는 그 초과이다.
- [0223] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이도"는 주어진 집단에서 CRC 및/또는 AA를 실제로 갖지 않는 환자가 상태를 갖지 않는 것으로 올바르게 진단될 때의 비율을 의미한다. 일부 실시양태에서, 특이도는 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 초과, 또는 100%이다. 일부 실시양태에서, 집단의 크기는 적어도 약 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000 또는 그 초과이다.
- [0224] 실시예에서 입증된 바와 같이, 바람직한 프라이머 및 프로브는 BMP3 및 NDRG4의 메틸화를 검출하는데 있어서 놀랍게도 높은 민감도 및 특이도를 제공하며, 따라서 CRC 및/또는 AA를 검출하는데 있어서 놀랍게도 높은 민감도 및 특이도를 유발한다. 예를 들어, BMP3 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 CRC 검출의 민감도는 적어도 85%이고; NDRG4 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 CRC 검출의 민감도는 적어도 90%이고; BMP3 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 AA 검출의 민감도는 적어도 66%이고; NDRG4 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 AA 검출의 민감도는 적어도 73%이다. 또한, BMP3 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 CRC 및 AA 검출의 특이도는 약 97%-100%이고 (예를 들어, 적어도 약 97.8%); NDRG4 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 CRC 및 AA 검출의 특이도는 또한 약 97%-100%이다 (예를 들어, 적어도 약 97.8%).

[0225] 3. 환자에서 CRC 및/또는 AA를 검출하기 위한 3개 세트의 바람직한 프라이머-프로브 조합

[0226] 본 개시내용은 또한 환자에서 CRC 또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 수준을 검출하기 위한 3개 세트의 바람직한 프라이머 및 프로브 조합을 제공한다. 이들 특이적 조합은 기존 상업용 제품, 예컨대 콜로가드®와 비교하여 아시아인 집단에서 CRC 및 AA를 검출하는데 있어서 특히 AA 검출에 대해 놀랍게도 더 높은 민감도 및 특이도를 갖는다.

[0227] 3개 세트의 바람직한 프라이머 및 프로브의 서열은 하기와 같다:

조합 번호	유전자	그룹	프라이머/ 프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3'로)
4	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGTGTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCAA
			프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGTGTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT

[0228]

[0229] 실시예에서 입증된 바와 같이, BMP3 및 NDRG4 프라이머-프로브 세트의 바람직한 조합은 BMP3 및 NDRG4의 메틸화를 검출하는데 있어서 놀랍게도 높은 민감도 및 특이도를 제공하며, 따라서 CRC 및/또는 AA를 검출하는데 있어서 놀랍게도 높은 민감도 및 특이도를 유발한다. 일부 실시양태에서, 이러한 민감도 및 특이도는 실시예 5에 설명된 바와 같이 동일한 검정이 또한 KRAS 유전자 분석 및 헤모글로빈 검사를 포함할 때 획득된다. 예를 들어, KRAS 유전자 분석 및 헤모글로빈 검사의 조합에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 3개의 바람직한 조합을 사용한 CRC 검출의 전체 민감도는 적어도 95%이고; KRAS 유전자 분석 및 헤모글로빈 검사의 조합에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 3개의 바람직한 조합을 사용한 AA 검출의 민감도는 적어도 93%이고; KRAS 유전자 분석 및 헤모글로빈 검사의 조합에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 3개의 바람직한 조합을 사용한 CRC + AA 검출의 민감도는 적어도 97%이고; KRAS 유전자 분석 및 헤모글로빈 검사의 조합에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 3개의 바람직한 조합을 사용한 CRC + AA 검출의 특이도는 적어도 97%이다.

[0230] 4. CRC 및 AA를 검출하기 위한 키트

[0231] 본 개시내용은 BMP3/NDRG4 메틸화 검출 및/또는 CRC/AA 검출을 필요로 하는 환자에서 BMP3/NDRG4 메틸화 검출 및/또는 CRC/AA 검출을 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 아시아인 환자, 예컨대 중국인 환자에게 특히 적합하다.

[0232] 일부 실시양태에서, 이 키트는 하기를 포함한다: (1) CRC 및 AA를 검출하기 위한 3개 세트의 바람직한 프라이머 및 프로브 조합 중 적어도 하나 (표 20에서 조합 번호 4, 5 및 7), 및 상응하는 qPCR 시약; (2) KRAS 유전자의 코딩 영역에서 7개의 돌연변이 (즉, G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A 및 G13R)를 검출하기 위한 수단, 예컨대 적합한 프라이머 및 프로브, 및 상응하는 qPCR 시약; (3) 대변 샘플에서 헤모글로빈을 검출하기 위한 수단, 예컨대 FIT 기술에 기반한 시약 (예를 들어, 항-헤모글로빈 항체, 및 대변 샘플에서 항체 및 헤모글로빈에 의해 형성된 복합체를 검출하기 위한 시약).

[0233] 일부 실시양태에서, 키트는 하기 적어도 하나의 세트의 바람직한 프라이머-프로브 조합을 포함한다:

[0234] (1) 3개 세트의 바람직한 프라이머 및 프로브 조합은 하기와 같다:

번호	유전자	그룹	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3')
4	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTCGTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTATATACGTCGCGA
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTCCCAAA
			프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTCGTTCGTTTTTCGTTTCGT

[0235]

[0236]

(2) BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 수준을 검출하기 위한 트리플렉스 정량적 PCR 시약.

[0237]

일부 실시양태에서, 키트는 BMP3 및 NDRG4의 메틸화를 동시에 검출하기 위한 멀티플렉스 PCR을 수행하기 위한 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 멀티플렉스 PCR은 정량적 PCR이다.

[0238]

일부 실시양태에서, 시약은 Taq DNA 폴리머라제를 포함한다. 일부 실시양태에서, Taq DNA 폴리머라제의 최종 농도는 약 2U/반응이다. 일부 실시양태에서, 시약은 MgCl₂를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응에서 MgCl₂의 최종 농도는 2 mM이다. 일부 실시양태에서, 시약은 dNTP를 포함한다. 일부 실시양태에서, dNTP는 0.2 mM의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약은 BMP3, NDRG4 및 참조 유전자를 증폭시키는 약 0.5 mM 내지 0.75 mM 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약은 BMP3, NDRG4 및 참조 유전자의 DNA 서열에 혼성화된 약 0.1 mM 내지 0.25 mM 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약은 PCR 버퍼, 예컨대 농축된 PCR 버퍼 (예를 들어, 5x 또는 10x)를 추가로 포함하며, 이는 1x의 최종 농도로 희석될 수 있다. 일부 실시양태에서, B2M은 참조 유전자이고, 정량적 PCR에서 품질 제어를 위해 증폭된다.

[0239]

(3) KRAS 유전자의 코딩 영역에서 7개의 돌연변이를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브.

[0240]

일부 실시양태에서, 키트는 KRAS 유전자에서 돌연변이를 검출하기 위한 수단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A 및 G13R인 KRAS 유전자의 오픈 리딩 영역에서 엑손 12 및 엑손 13에서 7개의 돌연변이체 핫스팟을 증폭시키고 검출하도록 설계된 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프라이머 및 프로브의 서열은 하기와 같다:

명칭	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3')
G12D-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:35	AACTTGTTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:36	AACTTGTTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:37	AACTTGTTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:38	AAACTTGTTGGTAGTTGGGGCTT
G12S-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:39	AAACTTGTTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:40	AACTTGTTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:41	AAACTTGTTGGTAGTTGGAGCTC
Kras-R	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:42	GAATGGTCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:43	AGGGCTCTTGTCTTTCCTT
ACTB-R	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	프로브	SEQ ID NO.:45	AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	프로브	SEQ ID NO.:46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

[0241]

[0242] (4) KRAS 유전자의 코돈 돌연변이를 검출하기 위한 멀티플렉스 정량적 PCR 시약.

[0243] KRAS 유전자의 모든 7개의 돌연변이를 검출하기 위한 멀티플렉스 정량적 PCR 시스템이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 멀티플렉스 정량적 PCR 반응은 2.5 U/반응의 최종 농도를 갖는 Taq DNA 폴리머라제, 1 mM의 최종 농도를 갖는 MgCl₂, 0.1 mM의 최종 농도를 갖는 dNTP, KRAS 및 ACTB 유전자를 증폭시키는 0.3-0.9 μM 프라이머, KRAS 및 ACTB 유전자의 DNA 서열에 혼성화된 0.05-0.1 μM 프로브, 및 1×PCR 버퍼를 포함한다. ACTB는 참조 유전자이고, 정량적 PCR에서 품질 제어를 위해 증폭된다.

[0244] (5) 분변에서 헤모글로빈을 검출하는 키트

[0245] 일부 실시양태에서, 키트는 헤모글로빈을 검출하기 위한 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 헤모글로빈은 효소-결합 면역 흡착 검정 (ELISA)에 의해 정성적으로 검사된다.

[0246] 5. 로지스틱 회귀 모델

[0247] 일부 실시양태에서, BMP3/NDRG4 메틸화 검사, KRAS 돌연변이 검사 및 헤모글로빈 검사의 결과를 수득한 후, 모든 결과를 컴파일하고, 환자에서 CRC 및/또는 AA의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 로지스틱 회귀 모델에 적용한다.

[0248] 일부 실시양태에서, 방법은 종합 암 지수 값 P의 값을 계산하는 것을 포함하며, 여기서 $P = e^k / (1 + e^k)$ 이며, 여기서 e는 자연 상수이다.

[0249] 일부 실시양태에서, K는 $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$ 인 것으로 정의되며, 여기서 a, b, c, d, X는 임상 상수이다. ΔCt1, ΔCt2 및 ΔCt3은 BMP3, NDRG4 및 KRAS의 Ct 값에서 참조 유전자의 값을 뺀 값이다.

[0250] 일부 실시양태에서, P 값이 미리 결정된 임계치 이상인 경우, 검사 결과는 양성이고, 그렇지 않으면 음성이다. 양성 결과는 그 사람이 CRC 또는 AA를 가질 수 있고 그렇지 않으면 건강하다는 것을 나타낸다.

[0251] 6. 치료 방법

[0252] 일부 실시양태에서 본 개시내용의 방법은 환자가 결장직장암 및/또는 선종을 갖는 것으로 분류된 후 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 면역요법, 완화 치료, 운동을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0253] 본원에 사용된 바와 같은 문구 "치료 레지멘"은 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 병리로 진단된 대상체)에게 제공되는 치료 유형, 투여량, 스케줄 및/또는 치료 지속기간을 특징하는 치료 계획을 지칭한다. 선택된 치료 레지멘은 최상의 임상 결과 (예를 들어, 병리의 완전한 치유)를 초래할 것으로 예상되는 공격적 레지멘 또는 병리의 증상을 완화시킬 수 있지만 병리의 불완전한 치유를 초래할 수 있는 보다 중등도의 레지멘일 수 있다. 특정 경우에 치료 레지멘은 대상체에 대한 약간의 불편감 또는 유해 부작용 (예를 들어, 건강한 세포 또는 조직에 대한 손상)과 연관될 수 있음이 이해될 것이다. 치료 유형은 외과적 개입 (예를 들어, 병변, 질환 세포, 조직 또는 장기의 제거), 세포 대체 요법, 국소 또는 전신 방식의 치료 약물 (예를 들어, 수용체 효능제, 길항제, 호르몬, 화학요법제)의 투여, 외부 공급원 (예를 들어, 외부 빔) 및/또는 내부 공급원 (예를 들어, 근접요법) 및/또는 이들의 임의의 조합을 사용한 방사선 요법에 대한 노출을 포함할 수 있다. 투여량, 스케줄 및 치료 지속기간은 병리의 중증도 및 선택된 치료 유형에 따라 달라질 수 있으며, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 투여량, 스케줄 및 치료 지속기간으로 치료 유형을 조정할 수 있다.

[0254] 일부 실시양태에서, 치료는 플루오로우라실, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 이리노테칸, UFT, 폴폭스(FOLFOX), 폴폭시리(FOLFOXIRI), 및 폴피리(FOLFIRI), 항혈관신생 약물, 예컨대 베바시주맙, 및 표피 성장 인자 수용체 억제제 (예를 들어, 세툽시맙 및 파니투무맙)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0255] 7. 본 발명의 이점

[0256] 어떤 특정한 이론에도 얽매이고 싶지는 않지만, 본 발명은 적어도 하기 이점을 갖는다:

[0257] (1) 중국인 집단에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역의 상세한 메틸화된 CpG 부위가 제공되며, CRC 및/또는 AA를 검출하기 위한 바이오마커일 수 있다.

[0258] (2) 키트는 mt-sDNA에 기반한 다른 유사한 제품, 예컨대 콜로가드[®]보다 중국인 집단에서 CRC 및 AA 검출에 더 적합하며, 이는 본 발명은 중국인 집단 특이적 메틸화 CpG 부위를 표적화하는 반면, 이전 제품은 백인 집단에

관한 것이기 때문이다.

[0259] (3) CRC 검출의 민감도 및 특이도는 mt-sDNA에 기반한 다른 유사한 제품과 비교하여 더 높다.

[0260] (4) AA 검출의 민감도 및 특이도는 mt-sDNA에 기반한 다른 유사한 제품과 비교하여 유의하게 개선된다.

[0261] (5) 방법은 비침습적이고 가정 샘플링에 용이하므로 양호한 환자 순응도를 초래하여, CRC 및 AA 스크리닝 방법으로 널리 사용될 수 있다. 방법은 아시아인 집단에서 CRC로 인한 발병률 및 사망률을 감소시킨다.

[0262] **실시예**

[0263] **실시예 1**

[0264] **중국인 CRC 및 AA 집단에서 각각 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 메틸화된 CpG 부위의 발견**

[0265] **(1) 샘플 수집**

[0266] 50개의 결장직장암 조직 및 49개의 쌍형성된 인접 정상 조직, 46개의 선종 암 조직 및 46개의 쌍형성된 인접 정상 조직을 포함하여 대장내시경검사에 의해 확인된 CRC 및 AA를 갖는 환자로부터 총 191개의 결장 FFPE 조직 샘플을 수집하였다.

[0267] **(2) DNA 추출**

[0268] 다카라(TaKaRa) MiniBEST FFPE DNA 추출 키트 (카탈로그 번호: 9782)를 사용하여 FFPE 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 상세한 작동 단계는 하기와 같이 기재되어 있다:

[0269] i. 멸균 스칼펠로 30 mg 파라핀 절편 조직을 스크랩핑하고, 과량의 파라핀을 제거하였다.

[0270] ii. 파라핀 절편 조직을 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣고, 500 µL의 버퍼 DP를 첨가하고, 물에서 80°C에서 1분 동안 인큐베이션한 다음, 10초 동안 볼텍싱하였다. 180 µL의 버퍼 GL을 첨가하고 볼텍싱하였다.

[0271] iii. 혼합물을 12,000 rpm에서 1분 동안 실온에서 원심분리한 다음, 용액을 2개의 층 (상부 오일 상, 하부 수성 상)으로 형성하였다. 20 µL의 프로테이나제 K (20 mg/mL) 및 10 µL의 RNase(10 mg/mL)를 하부 수성 상에 첨가하고, 피펫으로 위아래로 온화하게 완전히 혼합하였다. 층을 방해하지 않도록 주의한다. 이어서, 56°C에서 1시간 동안 수욕하였다.

[0272] iv. 이전 단계의 용액을 90°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 실온으로 냉각시킨다. 이어서, 200 µL의 버퍼 GB 및 200 µL의 100% 에탄올을 용액에 첨가하고, 10초 동안 볼텍싱하였다. 12,000 rpm에서 1분 동안 실온에서 원심분리하고, 용액을 2개의 층 (상부 오일 상, 하부 수성 상)으로 형성하였다.

[0273] v. 스핀 칼럼을 수집 튜브에 넣고, 이전 단계의 하부 수성 상을 스핀 칼럼에 첨가하였다. 층을 방해하지 않도록 주의하고, 12,000 rpm에서 2분 동안 실온에서 원심분리한 다음, 폐기물을 버렸다.

[0274] vi. 500 µL의 버퍼 WA를 스핀 칼럼에 첨가하고, 12,000 rpm에서 1분 동안 실온에서 원심분리한 다음, 폐기물을 버렸다.

[0275] vii. 500 µL의 버퍼 WB를 스핀 칼럼에 첨가하고, 12,000 rpm에서 1분 동안 실온에서 원심분리한 다음, 폐기물을 버렸다. 그리고, 1회 반복하였다.

[0276] viii. 스핀 칼럼을 수집 튜브에 넣고, 12,000 rpm에서 2분 동안 실온에서 원심분리하였다.

[0277] ix. 스핀 칼럼을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣고, 50-100 µL의 멸균수 또는 용리 버퍼를 스핀 칼럼 막의 중앙에 첨가한 다음, 실온에서 5분 동안 두었다.

[0278] x. 12,000 rpm에서 2분 동안 실온에서 원심분리하고, DNA를 용리시켰다.

[0279] xi. 용리된 DNA를 나노드롭(Nanodrop) 2000 형광계로 정량화하고, 사용을 위해 -20°C에서 저장하였다.

[0280] **(3) BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 CpG 섬의 예측 및 앰플리콘 시퀀싱을 위한 프라이머 설계.**

[0281] i. BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역의 CpG 섬의 예측.

[0282] 전사 출발 부위 (TSS) 및 5'UTR 영역으로부터 대략 1000-1500 bp 상류에 있는 DNA 서열을 포함하여 BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 서열을 다운로드하였다. 서열의 CpG 섬을 메트프라이머(MethPrimer) 소프트웨어 (www.urogene.org/methprimer/)로 예측하였다. 도 1a 내지 도 1d에 제시된 바와 같이, BMP3 유전자의 3개의

CpG 섬 중 2개의 더 큰 섬은 TSS 및 전체 5'UTR 영역으로부터 대략 400 bp 상류에 위치하고 (chr4: 81951752-81952760), NDRG4 유전자의 오직 1개의 CpG 섬은 TSS 및 부분 5'UTR 영역으로부터 대략 500 bp 상류에 위치하였다 (chr16:58497061-58497938). 인간 참조 게놈의 빌드는 GRCh37/hg19였다.

[0283] ii. BMP3 및 NDRG4 유전자의 예측된 CpG 섬의 서열을 증폭시키기 위한 프라이머 설계

[0284] 증폭될 서열의 길이 및 시퀀싱의 판독 길이에 기반하여, BMP3 및 NDRG4 유전자에 대해 각각 4개 및 5개의 프라이머 쌍을 설계하였다. 두 유전자의 CpG 섬이 완전히 시퀀싱될 수 있도록 인접한 앰플리콘 사이에 가능한 한 많은 중첩이 있다. 두 유전자의 프라이머는 표 1에 나열되어 있고, 두 유전자의 앰플리콘의 상대적 위치는 도 1a 내지 도 1d에 제시되어 있다.

[0285] 표 1 BMP3 및 NDRG4 유전자의 앰플리콘 시퀀싱을 위한 프라이머

유전자	앰플리콘	프라이머	서열 ID	서열 (5'에서 3'로)
BMP3	앰플리콘 1	정방향 프라이머 1	SEQ ID NO.:47	AGTTTGGTGTAAAGTAAAGAG
BMP3		역방향 프라이머 1	SEQ ID NO.:48	CTAACTCTATTTTAAACRCCA
BMP3	앰플리콘 2	정방향 프라이머 2	SEQ ID NO.:49	GTTTTAATTTTGGAAAAGGTAA
BMP3		역방향 프라이머 2	SEQ ID NO.:50	ACCTAACAAATAAACTCTTCC
BMP3	앰플리콘 3	정방향 프라이머 3	SEQ ID NO.:51	GAAGGTATAGATAGATTTTGAA
BMP3		역방향 프라이머 3	SEQ ID NO.:52	CACCTAACACAACCTTTACRAAACT
BMP3	앰플리콘 4	정방향 프라이머 4	SEQ ID NO.:53	GTATTTAGTTATGGTTGGGGYGAGTA
BMP3		역방향 프라이머 4	SEQ ID NO.:54	CTCACCTACTACTACCGCCCR
NDRG4	앰플리콘 1	정방향 프라이머 1	SEQ ID NO.:55	AGGTTTTTGAGTTTTTTGGTTTTTTT
NDRG4		역방향 프라이머 1	SEQ ID NO.:56	CCCTCCAAACCCCTATAAC
NDRG4	앰플리콘 2	정방향 프라이머 2	SEQ ID NO.:57	GGATGGGGATGTTTTGTAG
NDRG4		역방향 프라이머 2	SEQ ID NO.:58	RGRGAAACCTAAAAACACC
NDRG4	앰플리콘 3	정방향 프라이머 3	SEQ ID NO.:59	GYGGAGYGGGTGAGAAGT
NDRG4		역방향 프라이머 3	SEQ ID NO.:60	CRAACAACCAAAAAACCCCTC
NDRG4	앰플리콘 4	정방향 프라이머 4	SEQ ID NO.:61	GTTYGTTYGGGATTAGTTTTAGG
NDRG4		역방향 프라이머 4	SEQ ID NO.:62	CRCAAACRAAAAACRAAAC
NDRG4	앰플리콘 5	정방향 프라이머 5	SEQ ID NO.:63	GYGGYGTTTYTTTTTG
NDRG4		역방향 프라이머 5	SEQ ID NO.:64	CRACRACTAAAAATCCCAA

[0286] DNA 샘플을 하기 기재된 바와 같이 비숄파이트 처리에 적용하였다.
 [0287]

[0288] (4) 비숄파이트 처리

[0289] i. 추출된 DNA를 실온에서 두어 해동하고, DNA 농도를 20 ng/μL로 희석하였다. 40 μL의 희석된 DNA를 1.5 mL 원심분리 튜브에 첨가한 다음, 4 μL의 3M NaOH 용액을 첨가하고, 42°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다.

[0290] ii. 400 μL의 전환 용액을 첨가하고, 혼합하고, 50°C에서 16시간 동안 암실에서 인큐베이션하였다.

[0291] iii. 550 μL의 결합 용액을 첨가하고, 혼합하고, 용액을 DNA 정제 칼럼으로 옮겼다. 13,000 rpm에서 90초 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다. 3분 동안 다시 원심분리하고, 폐기물을 버렸다.

[0292] iv. 600 μL의 90% 에탄올을 DNA 정제 칼럼에 첨가하고, 13,000 rpm에서 90초 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다. 13,000 rpm에서 15초 동안 다시 원심분리하였다.

[0293] v. 300 μL의 탈황 용액 (90% 에탄올 용액의 0.3 M NaOH)을 DNA 정제에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 두었다. 13,000 rpm에서 90초 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다.

[0294] vi. 600 μL의 90% 에탄올을 첨가하고, 13,000 rpm에서 90초 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다. 이 단계를 1회 반복하고, 13,000 rpm에서 3분 동안 다시 원심분리하였다.

[0295] vii. DNA 정제 칼럼을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣고, 40 μL의 용리액을 첨가하였다. 튜브를 50°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 13,000 rpm에서 90초 동안 원심분리하였다. 사용을 위해 전환된 DNA 용액을 -20°C에서 저장하였다.

[0296] (5) 라이브러리 제조 및 앰플리콘 시퀀싱

[0297] (a) 멀티플렉스 PCR 증폭

[0298] i. PCR 마스터 혼합물을 하기와 같이 제조하였다:

[0299] 표 2

번호	시약	최종 농도
1	2 × 퀴아젠 멀티플렉스 PCR 마스터 믹스(퀴아젠, 카탈로그 번호: 206143)	1×
2	10×프라이머 믹스(각각 2μM)	0.2 μM
3	RNase-무함유 물	최대 40 μL

[0300]

[0301] ii. 혼합물을 온화하게 볼텍싱하고, 40 μL의 혼합물을 각 PCR 튜브에 피펫팅한 다음, 10 μL의 비술피이트 처리된 DNA를 첨가하였다.

[0302] iii. 온화하게 볼텍싱하고, PCR 증폭을 하기와 같이 수행하였다: 95℃에서 15분 동안 1회 사이클의 변성을 수행하고, 94℃에서 30초 동안 35회 사이클의 변성을 수행하고, 55℃에서 90초 동안 어닐링하고, 72℃에서 90초 동안 신장시키고, 72℃에서 10분 동안 1회 사이클의 신장을 수행하고, 최종적으로 4℃에서 영원히 유지하였다.

[0303] iv. 5 μL의 PCR 산물을 6X 로딩 버퍼 (다카라, 카탈로그 번호:9156)와 블렌딩하고, DL2000 DNA 마커 (다카라, 카탈로그 번호:3427Q)의 대조군과 함께 1% (w/v) 아가로스 겔에 로딩하고, 120 V에서 40분 동안 전기영동하였다.

[0304] v. 비특이적 증폭이 있는 경우, 키트 지침서 (퀴아젠(QIAGEN), 카탈로그 번호: 28704)에 따라 전기영동 후 나머지 45 μL의 PCR 산물을 회수할 필요가 있었다.

[0305] **(b) PCR 산물의 정제 및 정량화**

[0306] PCR 산물을 키트 지침서 (퀴아젠, 카탈로그 번호: 28004)에 따라 MinElute PCR 정제 키트로 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 큐비트(Qubit)TM dsDNA BR 검정 키트 (카탈로그 번호: Q32850)로 정량화하였다.

[0307] **(c) 어댑터 라이게이션**

[0308] 어댑터를 NEB넥스트 쿼크 라이게이션 모듈 (NEB, 카탈로그 번호: E6056L)을 사용하여 정제된 PCR 산물과 라이게이션하고, 반응 혼합물을 하기와 같이 제조하였다:

[0309] 표 3. 어댑터 라이게이션을 위한 반응 혼합물

번호	시약	부피 (μL)/반응
1	NEB넥스트 쿼크 라이게이션 반응 버퍼(5×)	10
2	어댑터	5
3	쿼크 T4 DNA 리가제	5
4	RNase-무함유 물	10

[0310]

[0311] 30 μL의 혼합물을 각 PCR 튜브에 첨가한 다음, 20 μL의 정제된 PCR 산물을 각각 첨가하였다. 용액을 온화하게 혼합하고, 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하고, 4℃에서 10분 동안 유지하였다.

[0312] **(d) 라이게이션 산물의 정제**

[0313] i. 사용을 위해 에이겐코트(Agencourt) AMPure XP 비드 (베크만(Beckman), 카탈로그 번호: A63882)를 실온에 두었다.

[0314] ii. PCR 튜브를 280 g에서 1분 동안 20℃에서 원심분리하고, 50 μL의 라이게이션 산물을 새로운 96-웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0315] iii. AMPure XP 비드를 30초 동안 볼텍싱하여 고르게 분산시키고, 56 μL의 비드를 PCR 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 10회 동안 온화하게 피펫팅하여 혼합하고, 실온에서 5분 동안 가만히 유지하였다.

[0316] iv. 96-웰 PCR 플레이트를 96-웰 자기 플레이트에 위치시키고, 상등액이 투명해질 때까지 2분 동안 가만히 유지하였다. 96 웰 PCR 플레이트를 96-웰 자기 플레이트에서 유지시키고, 상등액을 제거한 다음, 200 μL의 신선하

게 준비된 80% 에탄올을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 30초 동안 인큐베이션하고, 상등액을 제거하였다.

[0317] v. 96-웰 PCR 플레이트를 96-웰 자기 플레이트에서 유지시키고, 200 μ L의 신선하게 준비된 80% 에탄올을 각 웰에 첨가한다. 이어서, 실온에서 30초 동안 인큐베이션하였다. 상등액을 버리고, 잔류 에탄올을 10 μ L 피펫으로 제거하였다.

[0318] vi. 96-웰 PCR 플레이트를 자기 플레이트에서 유지시키고, 비드가 10분 동안 자연적으로 건조되도록 하였다.

[0319] vii. 자기 플레이트로부터 96-웰 PCR 플레이트를 제거하고, 27.5 μ L의 10 mM Tris (pH 8.5)를 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 비드가 완전히 분산될 때까지 위아래로 온화하게 피펫팅하여 10회 동안 비드 및 Tris를 혼합하였다. 플레이트를 실온에서 2분 동안 가만히 유지시켰다.

[0320] viii. 96-웰 PCR 플레이트를 자기 플레이트에 놓고, 상등액이 투명해질 때까지 2분 동안 가만히 놓았다. 25 μ L의 상등액을 새로운 PCR 튜브에 피펫팅하고, 사용을 위해 -20°C에서 저장하였다.

[0321] **(e) PCR 증폭 및 산물 정제**

[0322] PCR 마스터 혼합물을 하기와 같이 제조하고, 온화하게 혼합하였다. 40 μ L의 혼합물을 각 PCR 튜브에 첨가한 다음, 5 μ L의 정제된 라이게이션 산물을 첨가하였다.

[0323] 표 4. PCR 반응 혼합물

번호	시약	최종 농도
1	NEB넥스트 울트라 Q5 마스터 믹스 (NEB, 카탈로그 번호: M0544)	1×
2	정방향 프라이머(10 μ M)	1 μ M
3	역방향 프라이머(10 μ M)	1 μ M
4	뉴클레아제-무함유 물	최대 40 10 μ L

[0324] PCR 튜브를 온화하게 볼텍싱하고, 간단히 원심분리하고, 하기 조건으로 PCR 반응을 수행하였다: 98°C에서 30초 동안 1회 사이클의 변성을 수행하고, 98°C에서 10초 동안 8 내지 15회 사이클의 변성을 수행하고, 65°C에서 75초 동안 신장시키고, 65°C에서 5분 동안 1회 사이클의 변성을 수행하고, 최종적으로 4°C에서 유지하였다. (d) 라이게이션 산물의 정제에 따라 PCR 산물을 정제하였다.

[0326] **(f) 라이브러리의 검출 및 시퀀싱**

[0327] 정제된 PCR 산물의 농도 및 크기 분포를 각각 큐비트™ dsDNA BR 검정 키트 (카탈로그 번호: Q32850) 및 애질런트(Agilent) 2100 바이오애널리라이저(Bioanalyzer) 기기로 분석하였다. 라이브러리를 동일한 물 농도로 풀링하고, PE125의 판독 길이로 일루미나(Illumina) HiSeq2500에서 시퀀싱하였다.

[0328] **(g) 시퀀싱 데이터 분석**

[0329] 원시 데이터를 샘플 인덱스에 따라 역다중화하고, SHRiMP V2.04 소프트웨어를 사용하여 BMP3 및 NDRG4의 참조 유전자 서열에 시퀀싱 판독을 맵핑하였다. 메틸화된 CpG 부위를 맵핑 결과에 기반하여 확인하였다. 그리고 최종적으로, BMP3 및 NDRG4 유전자의 26개 및 39개 CpG 부위가 인접 정상 조직과 비교하여 CRC 및 AA 조직에서 과메틸화되었음이 밝혀졌고 ($p < 0.05$), 이는 이들 메틸화된 CpG 부위가 CRC 및 AA의 조기 진단을 위한 DNA 바이오마커가 될 수 있음을 나타내었다.

[0330] 표 5 CRC 조직 및 인접 정상 조직에서 BMP3 유전자의 CpG 부위의 메틸화 빈도.

CpG 부위	염색체 좌표 (hg19)	전사체 출발 부위에 대한 위치 (NM_001201.3)	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-CRC	메틸화 백분율-CRC	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-정상	메틸화 백분율-정상	P-값
#1	81952078	-41	34/50	0.68	2/49	0.04	<0.01
#2	81952099	-20	38/50	0.76	2/49	0.04	<0.01
#3	81952135	17	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#4	81952146	28	34/50	0.68	2/49	0.04	<0.01
#5	81952149	31	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#6	81952151	33	35/50	0.7	2/49	0.04	<0.01
#7	81952172	54	33/50	0.66	0/49	0.00	<0.01
#8	81952186	68	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#9	81952189	71	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#10	81952193	75	37/50	0.74	0/49	0.00	<0.01
#11	81952198	80	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#12	81952205	87	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#13	81952207	89	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#14	81952218	100	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#15	81952220	102	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#16	81952255	137	35/50	0.7	0/49	0.00	<0.01
#17	81952266	148	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#18	81952285	167	38/50	0.76	1/49	0.02	<0.01
#19	81952293	175	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#20	81952302	184	35/50	0.7	1/49	0.02	<0.01
#21	81952306	188	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#22	81952308	190	36/50	0.72	0/49	0.00	<0.01
#23	81952313	195	35/50	0.7	0/49	0.00	<0.01
#24	81952320	202	35/50	0.7	2/49	0.04	<0.01
#25	81952324	206	38/50	0.76	2/49	0.04	<0.01
#26	81952330	212	33/50	0.66	2/49	0.04	<0.01

[0331]

[0332] 표 6 AA 조직 및 인접 정상 조직에서 BMP3 유전자의 CpG 부위의 메틸화 빈도.

CpG 부위	염색체 좌표 (hg19)	전사체 출발 부위에 대한 위치 (NM_001201.3)	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-AA	메틸화 백분율-AA	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-AA	메틸화 백분율-정상	P 값
#1	81952078	-41	30/50	0.60	2/49	0.04	<0.01
#2	81952099	-20	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#3	81952135	17	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#4	81952146	28	29/50	0.58	2/49	0.04	<0.01
#5	81952149	31	30/50	0.60	2/49	0.04	<0.01
#6	81952151	33	32/50	0.64	0/49	0.00	<0.01
#7	81952172	54	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#8	81952186	68	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#9	81952189	71	28/50	0.56	0/49	0.00	<0.01
#10	81952193	75	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#11	81952198	80	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#12	81952205	87	31/50	0.62	1/49	0.02	<0.01
#13	81952207	89	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#14	81952218	100	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#15	81952220	102	28/50	0.56	1/49	0.02	<0.01
#16	81952255	137	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#17	81952266	148	31/50	0.62	0/49	0.00	<0.01
#18	81952285	167	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#19	81952293	175	33/50	0.66	0/49	0.00	<0.01
#20	81952302	184	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#21	81952306	188	30/50	0.60	0/49	0.00	<0.01
#22	81952308	190	31/50	0.62	1/49	0.02	<0.01
#23	81952313	195	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#24	81952320	202	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#25	81952324	206	31/50	0.62	2/49	0.04	<0.01
#26	81952330	212	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01

[0333]

[0334] 표 7 CRC 조직 및 인접 정상 조직에서 NDRG4 유전자의 CpG 부위의 메틸화 빈도.

CpG 부위	염색체 좌표 (hg19)	전사체 출발 부위에 대한 위치 (NM_020465.3)	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수- CRC	메틸화 백분율- CRC	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수- 정상 조직	메틸화 백분율- 정상	P 값
#1	chr16:58497349	-200	38/50	0.75	1/49	0.02	<0.01
#2	chr16:58497352	-197	35/50	0.70	2/49	0.04	<0.01
#3	chr16:58497358	-191	35/50	0.70	2/49	0.04	<0.01
#4	chr16:58497360	-189	39/50	0.78	1/49	0.03	<0.01
#5	chr16:58497365	-184	39/50	0.78	1/49	0.03	<0.01
#6	chr16:58497369	-180	39/50	0.77	1/49	0.02	<0.01
#7	chr16:58497388	-161	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#8	chr16:58497390	-159	37/50	0.73	1/49	0.03	<0.01
#9	chr16:58497393	-156	40/50	0.79	1/49	0.03	<0.01
#10	chr16:58497395	-154	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#11	chr16:58497402	-147	38/50	0.76	1/49	0.03	<0.01
#12	chr16:58497406	-143	39/50	0.78	1/49	0.02	<0.01
#13	chr16:58497414	-135	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#14	chr16:58497418	-131	36/50	0.72	0/49	0.00	<0.01
#15	chr16:58497425	-124	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#16	chr16:58497438	-111	36/50	0.72	2/49	0.04	<0.01
#17	chr16:58497440	-109	36/50	0.71	1/49	0.02	<0.01
#18	chr16:58497449	-100	37/50	0.73	2/49	0.04	<0.01
#19	chr16:58497458	-91	39/50	0.77	2/49	0.04	<0.01
#20	chr16:58497460	-89	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#21	chr16:58497462	-87	38/50	0.75	1/49	0.03	<0.01
#22	chr16:58497470	-79	35/50	0.70	1/49	0.02	<0.01
#23	chr16:58497472	-77	36/50	0.71	2/49	0.04	<0.01
#24	chr16:58497477	-72	36/50	0.72	1/49	0.03	<0.01
#25	chr16:58497481	-68	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#26	chr16:58497499	-50	37/50	0.73	1/49	0.02	<0.01
#27	chr16:58497505	-44	40/50	0.79	2/49	0.04	<0.01
#28	chr16:58497510	-39	40/50	0.79	1/49	0.02	<0.01
#29	chr16:58497512	-37	40/50	0.79	2/49	0.04	<0.01
#30	chr16:58497517	-32	35/50	0.70	1/49	0.02	<0.01
#31	chr16:58497521	-28	39/50	0.77	1/49	0.02	<0.01
#32	chr16:58497531	-18	38/50	0.76	1/49	0.03	<0.01

[0335]

#33	chr16:58497542	-7	36/50	0.71	1/49	0.02	<0.01
#34	chr16:58497544	-5	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#35	chr16:58497550	2	37/50	0.74	0/49	0.00	<0.01
#36	chr16:58497556	8	38/50	0.75	1/49	0.03	<0.01
#37	chr16:58497558	10	39/50	0.78	2/49	0.04	<0.01
#38	chr16:58497561	13	36/50	0.71	2/49	0.04	<0.01
#39	chr16:58497566	18	35/50	0.70	1/49	0.03	<0.01

[0336]

[0337] 표 8 AA 조직 및 인접 정상 조직에서 NDRG4 유전자의 CpG 부위의 메틸화 빈도.

CpG 부위	염색체 좌표 (hg19)	전사체 출발 부위에 대한 위치 (NM_020465.3)	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-AA	메틸화 백분율-AA	총 샘플 수로 나눈 메틸화 샘플 수-정상 조직	메틸화 백분율-정상	P 값
#1	chr16:58497349	-200	28/46	0.60	1/46	0.02	<0.01
#2	chr16:58497352	-197	28/46	0.60	1/46	0.02	<0.01
#3	chr16:58497358	-191	27/46	0.59	1/46	0.03	<0.01
#4	chr16:58497360	-189	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#5	chr16:58497365	-184	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#6	chr16:58497369	-180	28/46	0.61	2/46	0.04	<0.01
#7	chr16:58497388	-161	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#8	chr16:58497390	-159	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#9	chr16:58497393	-156	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01
#10	chr16:58497395	-154	28/46	0.60	2/46	0.04	<0.01
#11	chr16:58497402	-147	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#12	chr16:58497406	-143	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#13	chr16:58497414	-135	28/46	0.61	1/46	0.02	<0.01
#14	chr16:58497418	-131	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01
#15	chr16:58497425	-124	29/46	0.64	2/46	0.04	<0.01
#16	chr16:58497438	-111	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#17	chr16:58497440	-109	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#18	chr16:58497449	-100	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#19	chr16:58497458	-91	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#20	chr16:58497460	-89	27/46	0.59	1/46	0.03	<0.01
#21	chr16:58497462	-87	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#22	chr16:58497470	-79	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#23	chr16:58497472	-77	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#24	chr16:58497477	-72	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#25	chr16:58497481	-68	28/46	0.60	2/46	0.04	<0.01
#26	chr16:58497499	-50	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#27	chr16:58497505	-44	28/46	0.61	1/46	0.02	<0.01
#28	chr16:58497510	-39	27/46	0.59	1/46	0.02	<0.01
#29	chr16:58497512	-37	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#30	chr16:58497517	-32	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#31	chr16:58497521	-28	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#32	chr16:58497531	-18	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#33	chr16:58497542	-7	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01

[0338]

#34	chr16:58497544	-5	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#35	chr16:58497550	2	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#36	chr16:58497556	8	28/46	0.61	1/46	0.03	<0.01
#37	chr16:58497558	10	30/46	0.65	1/46	0.03	<0.01
#38	chr16:58497561	13	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#39	chr16:58497566	18	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01

[0339]

[0340] 실시예 2

[0341] 상이한 인종 간의 CRC와 관련된 BMP3 및 NDRG4 유전자의 차등 메틸화 CpG 부위의 비교.

[0342] 본 발명자들은 TCGA 데이터베이스 (일루미나 인간 메틸화 450 데이터)에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 마이크로어레이 데이터를 분석하고, 백인 및 아시아인 집단 사이의 NDRG4 유전자의 프로모터 영역에서 5개의 유의하게 상이한 메틸화 CpG 부위가 있음을 발견하였다 (도 2 및 표 9). 차등 메틸화 CpG 부위를 추가로 확인하기 위해, 중국에서 106명의 CRC 및 AA 환자로부터 조직 및 혈액 샘플을 수집하였다. DNA를 추출하고, 비술피이트로 처리하였다. BMP3 및 NDRG4 유전자의 프로모터 영역을 증폭시키고 시퀀싱하였다. 본 발명자들은 시퀀싱 데이

터를 분석하고, 아시아인 집단의 과메틸화 CpG 부위가 TCGA 데이터베이스에서 백인과 상이하고, 과메틸화 CpG 부위가 CRC 및 AA 조직 샘플 간에 상이하다는 사실을 발견하였다. 이들 상이한 메틸화 CpG 부위에 따라, 본 발명자들은 특이적으로 아시아인 집단 (예를 들어 중국인 집단)에서 CRC 및 AA 스크리닝을 위한 검출 키트를 개발하였다.

[0343] 표 9 백인 및 아시아인 집단에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 CpG 부위의 차이.

번호	유전자	메틸화 부위	일원 분산분석	좌표 (hg19)	유전자 영역	메틸화 백분율(백인>아시아인)
1	BMP3	cg19675063	p = 0.001735, (f = 4.408)	81975265	엑손3	Y
2	NDRG4	cg27147718	p = 0.00004290, (f = 6.558)	58496542	프로모터	Y
3	NDRG4	cg04190807	p = 0.01761, (f = 3.036)	58497230	프로모터	N
4	NDRG4	cg00687686	p = 0.01657, (f = 3.072)	58497236	프로모터	N
5	NDRG4	cg04942472	p = 0.01955, (f = 2.973)	58497239	프로모터	N
6	NDRG4	cg01466678	p = 0.02327, (f = 2.867)	58497395	프로모터	N
7	NDRG4	cg05469759	p = 0.03612, (f = 2.599)	58498456	인트론1	N
8	NDRG4	cg00262031	p = 0.02585, (f = 2.803)	58498574	인트론1	N
9	NDRG4	cg06650115	p = 0.01221, (f = 3.256)	58498585	인트론1	N
10	NDRG4	cg04005075	p = 0.01938, (f = 2.978)	58498636	인트론1	N
11	NDRG4	cg09324514	p = 0.0004509, (f = 5.194)	58498710	인트론1	N
12	NDRG4	cg16812519	p = 0.01862, (f = 3.002)	58498754	인트론1	N
13	NDRG4	cg26824423	p = 0.007544, (f = 3.543)	58498818	인트론1	N
14	NDRG4	cg05333442	p = 0.003665, (f = 3.970)	58533743	인트론3	N
15	NDRG4	cg01343363	p = 0.01099, (f = 3.319)	58533808	인트론3	Y
16	NDRG4	cg27113419	p = 0.006302, (f = 3.649)	58533979	인트론3	Y
17	NDRG4	cg05725404	p = 0.01145, (f = 3.294)	58534157	인트론3	N

[0344]

실시예 3

[0345]

BMP3 및 NDRG4 유전자에 대한 프라이머 및 프로브의 스크리닝

[0346]

(1) BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 설계 및 선택.

[0347]

qPCR 프라이머 및 프로브를 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화된 CpG 부위에 기반하여 설계하였다. 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 확인하였다. 바람직한 프라이머 및 프로브를 양성 대조군 및 음성 대조군과 BMP3 및 NDRG4 유전자의 여러 다른 후보 프라이머 및 프로브와 비교하였다. 프라이머 및 프로브의 정보는 표 10에 제시되어 있다.

[0348]

[0349] 표 10 바람직한 및 나머지 프라이머 및 프로브의 정보

유전자	그룹	프라이머/프로브	프라이머/프로브 ID	서열 (5'에서 3')
BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
BMP3	바람직한 1	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACCTACGCGAA
BMP3	바람직한 1	프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGTGTTTTITAGTTC
NDRG4	바람직한 1	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
NDRG4	바람직한 1	프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTCGTTTTTCGTTCGT
BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AAIATTCGGGTATATACGTCGCGA
BMP3	바람직한 2	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTCCCAA
BMP3	바람직한 2	프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
NDRG4	바람직한 2	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
NDRG4	바람직한 2	프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
BMP3	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:15	AAIATTCGGGTATATACGTCGCGAAT
BMP3	바람직한 3	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	바람직한 3	프로브	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
NDRG4	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
NDRG4	바람직한 3	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
NDRG4	바람직한 3	프로브	SEQ ID NO.:20	TCGTTIATCGGGTATTTIAGTCGCGTAG
BMP3	대조군 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:21	GAGTGGAGACGGCGTTCGTA
BMP3	대조군 1	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:22	CCACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	대조군 1	프로브	SEQ ID NO.:23	CGGGTGAGGTCGCGTAGTTGTTGGG
NDRG4	대조군 1, 대조군 2, 대조군 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:24	GGGTGTTTTTITAGGTTTCGCGTC
NDRG4	대조군 1	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:25	CGTAACTCCGCCTTCTACGC
NDRG4	대조군 1, 대조군 2, 대조군 3	프로브	SEQ ID NO.:26	ACGCGACTAAAATACCCGATAAACGAACGAAA AACGAAC
BMP3	대조군 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:27	TTAGGTTGCGTTGGGTTAGCG
BMP3	대조군 2	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:28	ACTCCGAAAACGCAAAAAACCG
BMP3	대조군 2	프로브	SEQ ID NO.:29	ATTCGGTCGCGTTTCGGGTTTCGTGC
NDRG4	대조군 2	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:30	GACCCGCGAAACGATACCG
BMP3	대조군 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:31	TATTCGGGTATATACGTCGCG
BMP3	대조군 3	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:32	CTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	대조군 3	프로브	SEQ ID NO.:33	CCCAACAACCTACGCGAACCTCACCCG
NDRG4	대조군 3	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:34	TCGCGGTAACCTCCGCCTT

[0350]

[0351] (2) BMP3 및 NDRG4 유전자의 양성 및 음성 대조군과 함께 대조군과 바람직한 프라이머 및 프로브의 비교.

[0352] 양성 대조군 DNA를 상이한 비로 각각 BMP3 및 NDRG4 유전자의 음성 대조군 DNA에 스파이킹함으로써 상이한 메틸화 비율을 갖는 표준 샘플을 형성하였다 (표 11). 표준 샘플 DNA를 각각 BMP3 및 NDRG4 유전자의 바람직한 및 대조군 프라이머 및 프로브로 증폭시킴으로써 분석 민감도를 비교하였다. BMP3 및 NDRG4 유전자의 음성 대조군 DNA를 각각 BMP3 및 NDRG4 유전자의 바람직한 및 대조군 프라이머 및 프로브로 증폭시킴으로써 분석 특이도를 비교하였으며, 음성 대조군 DNA의 양은 반응당 10^4 카피, 10^5 카피, 10^6 카피, 10^7 카피 및 10^8 카피이다.

[0353] 표 11 BMP3 및 NDRG4 유전자의 표준 샘플

메틸화 비	메틸화 DNA의 카피 수	총 DNA의 카피 수
1	10^5	10^5
1/10	10^4	10^5
1/10 ²	10^3	10^5
1/10 ³	10^2	10^5
1/10 ⁴	10	10^5

[0354]

[0355] 마스터 혼합물을 표 5와 같이 제조하였으며, 정량적 PCR 반응 조건은 먼저 95°C에서 1분 동안 변성, 그 후 95°C

에서 20초 동안 변성의 50회 사이클 및 60℃에서 1분 동안 신장이었다.

[0356] 표 12 메틸화 qPCR의 시약의 최종 농도

번호	시약	최종 농도
1	10×PCR 버퍼	1×
2	MgCl ₂	2mM
3	dNTP	0.2mM
4	Taq DNA 폴리머라제	2U
5	각 프라이머	0.75mM
6	각 프로브	0.25 mM
7	DNA 주형	2 μL
8	조순수 물	최대 50μL

[0357]

[0358] 표 13 및 도 3a 내지 도 3l에 제시된 바와 같이, 1/10⁴ 메틸화 DNA는 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용하여 검출할 수 있지만, 3 쌍의 대조군은 검출할 수 없었다.

[0359] 표 13 및 도 3a 내지 도 3l에 제시된 바와 같이, 본 발명의 바람직한 3 쌍의 BMP3 및 NDRG4 프라이머 및 프로브는 1만분의 1만큼 낮은 메틸화 수준을 안정적으로 검출할 수 있는 반면, 3 쌍의 비교 프라이머 및 프로브는 1만분의 1의 메틸화 수준을 검출할 수 없다.

[0360] 표 13 BMP3 및 NDRG4 유전자의 바람직한 및 대조군 프라이머 및 프로브의 분석 민감도 비교.

유전자	메틸화 비	메틸화 DNA의 카피 수	총 DNA의 카피 수	바람직한 프라이머 및 프로브			대조군 프라이머 및 프로브		
				바람직한 1	바람직한 2	바람직한 3	대조군 1	대조군 2	대조군 3
BMP3	1	10 ⁵	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10 ⁴	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10 ³	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10 ²	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	N	N
	1/10 ⁴	10	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	N
NDRG4	1	10 ⁵	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10 ⁴	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10 ³	10 ⁵	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10 ²	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	Y
	1/10 ⁴	10	10 ⁵	Y	Y	Y	N	N	N

[0361]

[0362] Y: 검출됨, N: 미확인

[0363] BMP3 및 NDRG4의 분석 민감도 증폭 곡선은 대조군과 비교하여 각각의 바람직한 조합에 대해 도 3a 내지 도 3l에 제시되어 있다.

프라이머 및 프로브	BMP3	NDRG4
바람직한 1	도 3a	도 3b
바람직한 2	도 3c	도 3d
바람직한 3	도 3e	도 3f
대조군 1	도 3g	도 3h
대조군 2	도 3i	도 3j
대조군 3	도 3k	도 3l

[0364]

[0365] 표 14 및 도 4a 내지 도 4l에 나타난 바와 같이, BMP3 및 NDRG4 유전자에 대한 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프

로브는 상이한 농도의 비-메틸화 DNA에 대한 증폭 신호를 갖지 않는 반면, 비교 프라이머 및 프로브는 상이한 정도의 비특이적 증폭을 나타낸다.

[0366] 표 14 바람직한 및 대조군 프라이머 및 프로브 간의 분석 특이도의 비교.

BMP3 (반응당 카피)	NDRG4 (반응당 카피)	바람직한 프라이머 및 프로브			대조군 프라이머 및 프로브		
		바람직한 1	바람직한 2	바람직한 3	대조군 1	대조군 2	대조군 3
10 ⁸	10 ⁸	N	N	N	Y	Y	Y
10 ⁷	10 ⁷	N	N	N	N	Y	Y
10 ⁶	10 ⁶	N	N	N	N	N	N
10 ⁵	10 ⁵	N	N	N	N	N	N
10 ⁴	10 ⁴	N	N	N	N	N	N

[0367]

[0368] Y: 증폭 없음, N: 비특이적 증폭

[0369] BMP3 및 NDRG4의 분석 특이도 증폭 곡선

프라이머 및 프로브	BMP3	NDRG4
바람직한 1	도 4a	도 4b
바람직한 2	도 4c	도 4d
바람직한 3	도 4e	도 4f
대조군 1	도 4g	도 4h
대조군 2	도 4i	도 4i
대조군 3	도 4k	도 4l

[0370]

[0371] 실시예 4

[0372] 바람직한 및 비교 메틸화된 프라이머 및 프로브의 검증을 BMP3 및 NDRG4 유전자의 분변 샘플로 수행하였다.

[0373] 81개의 분변 샘플에서 BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 수준을 3 쌍의 바람직한 및 비교 프라이머 및 프로브로 검출하였다. 3개의 비교 프라이머 및 프로브는 하기와 같다:

[0374] 비교 1: BMP3 정방향 프라이머 서열식별번호: 21, BMP3 역방향 프라이머 서열식별번호: 22, 및 BMP3 프로브 서열식별번호: 23; NDRG4 정방향 프라이머 서열식별번호: 24, NDRG4 역방향 프라이머 서열식별번호: 25, 및 NDRG4 프로브 서열식별번호: 26;

[0375] 비교 2: BMP3 정방향 프라이머 서열식별번호: 27, BMP3 역방향 프라이머 서열식별번호: 28, 및 BMP3 프로브 서열식별번호: 29; NDRG4 정방향 프라이머 서열식별번호: 24, NDRG4 역방향 프라이머 서열식별번호: 30, 및 NDRG4 프로브 서열식별번호: 26;

[0376] 비교 3: BMP3 정방향 프라이머 서열식별번호: 31, BMP3 역방향 프라이머 서열식별번호: 32, 및 BMP3 프로브 서열식별번호: 33; NDRG4 정방향 프라이머 서열식별번호: 24, NDRG4 역방향 프라이머 서열식별번호: 34, 및 NDRG4 프로브 서열식별번호: 26.

[0377] 분변 샘플의 정보는 표 15에 제시되어 있다.

[0378] 표 15 81개의 분변 샘플의 통계

대장내시경검사	개수
정상	46
선종	15
결장직장암	20
총	81

[0379]

[0380] 하기 기재된 방법에 따라 샘플로부터 분변 DNA를 추출하였다.

- [0381] **(1) 분변 DNA의 추출**
- [0382] i. 40 mL의 용해물을 4-6 g 분변 샘플에 첨가하고, 완전히 볼텍싱한 다음, 50°C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0383] ii. 그 후, 5000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 전에 계량 저울에 주의하였다. 원심분리가 끝난 후, 원심분리 튜브를 조심스럽게 제거하고, 세계 흔들지 않았다.
- [0384] iii. 새로운 50 mL 원심분리 튜브에 9 mL의 상등액을 피펫팅한 다음, 1 mL의 추출 보조제, 60 µL의 자기 비드 및 10 mL의 이소프로판올을 첨가하였다. 10초 동안 볼텍싱하고, 65°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안 5분마다 1회 위아래로 혼합하였다.
- [0385] iv. 인큐베이션 후, 50 mL 원심분리 튜브를 자기 스탠드에 놓고, 상등액이 투명해질 때까지 3분 동안 안정되게 유지하고, 상등액을 버렸다.
- [0386] v. 자기 스탠드로부터 50 mL 원심분리 튜브를 제거하고, 12 mL의 세척 용액을 첨가하였다. 자기 비드가 튜브에서 잘 떨어질 때까지 볼텍싱하고, 3분 동안 안정되게 유지하고, 상등액이 투명해질 때까지 3분 동안 50 mL 원심분리 튜브를 다시 자기 스탠드에 놓고 상등액을 버렸다.
- [0387] vi. 15 mL의 80% 에탄올 용액을 첨가하고, 비드가 튜브에서 잘 떨어질 때까지 볼텍싱하고, 3분 동안 안정되게 유지하였다. 튜브를 다시 자기 스탠드에 놓고, 상등액이 투명해질 때까지 3분 동안 안정되게 유지하고 상등액을 버렸다.
- [0388] vii. 이전 단계를 1회 반복하였다.
- [0389] viii. 바닥의 잔류 액체를 피펫팅하고, 튜브를 열어 두고, 65°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 비드가 건조될 때까지 자기 스탠드로부터 튜브를 제거하고, 1.5 mL의 예열된 용리액 I을 첨가하였다. 1000 µL 피펫으로 웰로부터 용리액 I로 비드를 피펫팅하고, 혼합물을 2 mL 원심분리 튜브로 옮기고, 뚜껑을 닫은 다음, 65°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다.
- [0390] ix. 13000 rpm에서 3분 동안 원심분리하고, 600 µL의 상등액을 새로운 1.5 mL 튜브로 피펫팅한 다음, 600 µL의 결합 용액을 첨가하고, 완전히 볼텍싱하였다.
- [0391] x. 600 µL의 상기 혼합물을 DNA 정제 칼럼으로 옮기고, 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다.
- [0392] xi. 나머지 혼합물을 이전 단계와 같이 처리하고, 13,000에서 2분 동안 원심분리하였다.
- [0393] xii. 600 µL의 90% 에탄올 용액을 DNA 정제 칼럼에 첨가하고, 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 폐기물을 버렸다.
- [0394] xiii. 이전 단계를 2회 반복하였다.
- [0395] xiv. 13,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하고, DNA 정제 칼럼을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브에 놓았다. DNA 정제 칼럼을 열고, 65°C에서 5분 동안 인큐베이션하여 건조시켰다.
- [0396] xv. 100 µL의 예열된 용리액 II를 DNA 정제 칼럼의 중간에 떨어뜨리고, 뚜껑을 닫은 다음, 65°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 13,000 rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 용리된 DNA 용액을 수득하고, 사용을 위해 2-8°C에서 저장하였다. 장기간 저장은 -25°C 내지 -15°C에서 유지해야 하였다.
- [0397] **(2) 비술파이트 처리**
- [0398] 실시예 3에 따른 상세한 작동 단계.
- [0399] **(3) qPCR**
- [0400] qPCR 마스터 혼합물을 하기와 같이 제조하였다:

[0401] 표 16

번호	시약	최종 농도
1	10×PCR 버퍼	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP	0.2 mM
4	Taq DNA 폴리머라제	2 U
5	각 프라이머	0.75 μM
6	각 프로브	0.25 μM
7	DNA 주형	2 μL
8	초순수 물	최대 50 μL

[0402]

[0403] qPCR 반응 조건은 95℃에서 2분 동안 변성의 1회 사이클, 및 95℃에서 20초 동안 변성의 50회 사이클 및 95℃에서 1분 동안 신장이었다. B2M 유전자는 qPCR 반응의 품질 제어를 위한 참조 유전자이었다.

[0404] (4) 결과

[0405] 표 17에 제시된 바와 같이, BMP3 및 NDRG4 유전자의 3 쌍의 바람직한 프라이머 및 프로브를 사용한 81개의 분변 샘플에서 CRC 및 AA 검출의 민감도는 각각 최대 85.0%-95.0% (BMP3 메틸화에 의한 CRC), 66.7%-73.3% (BMP3 메틸화에 의한 AA), 및 90.0%-95.0% (NDRG4 메틸화에 의한 CRC) 및 73.3%-86.7% (NDRG4 메틸화에 의한 AA)였다. 또한, BMP3 메틸화 데이터 또는 NDRG4 메틸화 데이터를 사용한 CRC 및 AA 검출 특이도는 둘 다 약 97.8%-100.0%였다.

[0406] 그러나, BMP3 및 NDRG4 유전자의 3 쌍의 비교 프라이머 및 프로브를 사용한 81개의 분변 샘플에서 CRC 및 AA 검출의 민감도는 각각 85.0%-90.0% (BMP3 메틸화에 의한 CRC), 46.7%-60.0% (BMP3 메틸화에 의한 AA), 및 90.0%-95.0% (NDRG4 메틸화에 의한 CRC) 및 66.7%-73.3% (NDRG4 메틸화에 의한 AA)였다. 또한, BMP3 메틸화 데이터 또는 NDRG4 메틸화 데이터를 사용한 CRC 및 AA 검출의 전체 특이도는 각각 약 91.3%-93.5% 및 93.5%-95.7%였다.

[0407] 바람직한 프라이머 및 프로브는 임상 샘플의 검출, 특히 AA 검출에서 비교 프라이머 및 프로브보다 우수하다는 것을 알 수 있다.

표 17 임상 샘플 검출의 결과 통계

BMP3											
항목	비람직한 1			비람직한 2			비람직한 3				
	CRC	AA	경상	CRC	AA	경상	CRC	AA	경상		
샘플 그룹화											
검출된 양성 샘플 수	19/20	11/15	0/46	18/20	11/15	1/46	17/20	10/15	1/46		
민감도	95.0%	73.3%	/	90.0%	73.3%	/	85.0%	66.7%	/		
특이도	100.0%			97.8%			97.8%				
중순양도 비율	93.8%			91.4%			88.9%				
증폭 곡선	도 5a			도 5b			도 5c				
										비교 1	
	샘플 그룹화	CRC	AA	경상	CRC	AA	경상	CRC	AA	경상	
	검출된 양성 샘플 수	18/20	9/15	3/46	17/20	8/15	4/46	17/20	7/15	4/46	
	민감도	90.0%	60.0%	/	85.0%	53.3%	/	85.0%	46.7%	/	
	특이도	93.5%			91.3%			91.3%			
	중순양도 비율	86.4%			82.7%			81.5%			
	도 5d			도 5e			도 5f				

[0408]

[0409]

NDRG4												
항목	비밀적한 1				비밀적한 2				비밀적한 3			
	CRC	AA	경상	경상	CRC	AA	경상	경상	CRC	AA	경상	경상
샘플 그룹화												
검출된 양성 샘플 수	19/20	13/15	0/46	0/46	19/20	12/15	0/46	0/46	18/20	11/15	1/46	1/46
민감도	95.0%	86.7%	/	/	95.0%	80.0%	/	/	90.0%	73.3%	/	/
특이도	100.0%				100.0%				97.8%			
총 순응도 비율	96.3%				95.1%				91.4%			
증폭 곡선	도 6a				도 6b				도 6c			
	비교 1				비교 2				비교 3			
샘플 그룹화	CRC	AA	경상	경상	CRC	AA	경상	경상	CRC	AA	경상	경상
검출된 양성 샘플 수	18/20	10/15	2/46	2/46	18/20	10/15	3/46	3/46	19/20	11/15	3/46	3/46
민감도	90.0%	66.7%	/	/	90.0%	66.7%	/	/	95.0%	73.3%	/	/
특이도	95.7%				93.5%				93.5%			
총 순응도 비율	88.9%				87.7%				90.1%			
증폭 곡선	도 6d				도 6e				도 6f			

표 18 81개의 본면 샘플의 검출 결과

원호	성별	연령	대장내시경검사	CIHAPP3									NDRG4					
				비교 포리아이머 및 포도브			비교 포리아이머 및 포도브			비교 포리아이머 및 포도브			비교 포리아이머 및 포도브					
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
1	남성	50	CRC-I기	33.9	32.1	37.5	32.7	33.8	36.2	U	33.6	35	33.9	38.8	40.1			
2	남성	51	CRC-II기	34.9	32.2	29.1	41.3	37.6	39.9	39.4	38.4	33.8	34	38.1	40.3			
3	여성	56	CRC-III기	35.1	33.1	31.4	34.9	41.2	35.1	30.7	30.4	33.2	34.2	42.6	35			
4	남성	72	CRC-I기	33.7	U	U	33.4	40.1	36	37.2	38.9	U	U	U	36.7			
5	여성	75	CRC-II기	31.9	36.6	32.7	37.9	36.3	34.5	35.4	37.4	34.5	36.4	33	40.5			
6	여성	55	CRC-II기	37.5	35.1	29.5	43	39.8	39.7	34.4	35.9	35.6	35.1	37.4	42			
7	여성	50	CRC-II기	36.2	32.2	38.8	39.7	37.2	37.3	33.6	37.4	38.8	42.3	36.4	37.5			
8	남성	62	CRC-IV기	U	U	U	U	U	U	36.1	34.5	39.9	41	41.8	40.4			
9	여성	74	CRC-I기	35.7	37.7	29.3	38	36	44	29.6	32.3	36.6	42.6	36.8	33			
10	여성	73	CRC-II기	31.7	29.7	33.9	32.6	42	32.1	36.5	35.7	39.7	39.3	33.5	31.8			
11	남성	52	CRC-II기	34	40	35.9	39.5	38.1	42.4	36.9	U	36.5	42.6	37.8	36.6			
12	여성	57	CRC-II기	34.5	29.1	29.3	34.6	42.6	41.3	37.7	31.8	35.6	42.3	39	42.6			
13	남성	51	CRC-I기	37.6	34	33.2	38.8	U	U	31.9	35.4	35.9	39.1	35.1	34.6			
14	남성	60	CRC-II기	36.2	31.7	35.6	40.1	42.2	33.1	29.6	31.7	29.1	33.8	36.4	36.5			
15	여성	49	CRC-III기	31.1	37	29.4	41.9	36.8	34.3	34.4	33.6	35.6	40.3	39.2	39			
16	남성	49	CRC-IV기	34	35.5	U	41.8	36.9	37.5	37.6	32.3	32.3	38.1	U	31.3			
17	남성	48	CRC-I기	38.1	37.1	35.8	39	40.7	38.3	29.4	30.7	U	U	37.1	U			
18	남성	54	CRC-II기	36.1	33.7	35.2	U	U	U	29.4	37	33.5	34.7	34	41.5			
19	여성	60	CRC-III기	29.2	36.4	33.6	38.4	36.5	33.7	32.9	30.1	35.1	33.5	38.5	41.3			
20	여성	62	CRC-IV기	36.4	34.7	38.5	39.5	37.9	38.9	36.4	29.4	33.1	35.8	43.1	42.8			
21	여성	50	AA	38.7	U	U	35.3	U	U	34.6	37	U	U	U	40.9			
22	여성	56	AA	U	35.6	30	40.9	38.6	35	34.6	U	29.3	42.7	33.4	U			

[0411]

[0412]

번호	성별	연령	대장내시경검사	CI BMR3						NDRG4					
				바람직한 포라이어 및 프로브			비교 포라이어 및 프로브			바람직한 포라이어 및 프로브			비교 포라이어 및 프로브		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
23	남성	58	AA	U	U	29.6	39.3	38	41.1	39.3	35.1	39.5	39.4	U	37.4
24	남성	67	AA	36.3	32.8	34.2	U	U	U	33.9	33	32.7	36	35.5	U
25	남성	51	AA	35.9	33.7	33.9	36.4	38	39	32.7	33.9	U	U	35.8	40.4
26	여성	71	AA	29.3	30	35.4	40.3	37.7	34.4	30.7	34.9	38.3	33.8	41.1	33
27	남성	65	AA	U	30.3	U	U	U	U	34.8	34	36.8	41.9	42.7	36.1
28	남성	62	AA	37.5	29.2	U	U	U	U	U	U	36.8	43.1	43.9	32.8
29	여성	45	AA	31	37.6	37.4	37.2	38.5	37.8	30.8	31.7	30.8	U	U	U
30	남성	67	AA	29.7	34.3	29.8	31.3	U	U	33.9	U	U	U	U	U
31	여성	53	AA	36.3	U	U	U	35.4	34.6	29.5	34.9	37.7	39.6	40	42.9
32	여성	68	AA	38.4	37.3	30.4	U	U	U	U	37.2	U	U	U	35.1
33	여성	50	AA	36.9	39	32.1	36.6	U	U	39.5	29.1	30.7	37.1	37.6	36.6
34	여성	48	AA	U	U	U	U	37.3	35.8	38.3	32.2	32.4	36.2	36	43.9
35	남성	50	AA	35.5	29.1	32.7	39.4	42.7	U	29.8	33.8	32.9	36.4	38.2	42
36	남성	45	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
37	여성	50	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
38	남성	59	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
39	남성	73	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
40	남성	47	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
41	남성	71	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
42	여성	45	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
43	여성	62	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
44	남성	55	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
45	여성	54	경상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
46	남성	63	경상	U	U	U	39.4	U	U	U	U	U	U	U	U

번호	성별	연령	대상내시경검사	CI BMP3						NDRG4					
				바람직한 프라이머 및 프로브			비교 프라이머 및 프로브			바람직한 프라이머 및 프로브			비교 프라이머 및 프로브		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
47	여성	53	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	41.2	U	U
48	남성	67	정상	U	U	U	U	37.2	41.2	U	U	U	U	U	U
49	남성	69	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
50	남성	54	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
51	남성	50	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
52	여성	65	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40.3	41
53	여성	56	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
54	남성	67	정상	U	35.6	U	U	41.3	U	U	U	U	U	U	U
55	남성	70	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
56	여성	75	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
57	여성	50	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
58	여성	66	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
59	남성	49	정상	U	U	U	U	U	41.6	U	U	U	U	U	U
60	남성	71	정상	U	U	U	40.8	U	U	U	U	U	U	U	U
61	남성	70	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40.5	U
62	남성	73	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
63	남성	48	정상	U	U	U	U	38.5	U	U	U	U	U	U	U
64	남성	52	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	39.6
65	남성	71	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
66	여성	60	정상	U	U	U	U	U	41.9	U	U	35.9	39.4	U	U
67	여성	65	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
68	여성	74	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
69	남성	71	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
70	여성	73	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

[0414]

번호	성별	연령	대장내시경검사	Ct BMP3						NDRG4					
				바람직한 프라이머 및 프로브			비교 프라이머 및 프로브			바람직한 프라이머 및 프로브			비교 프라이머 및 프로브		
71	남성	49	정상	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
72	여성	69	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
73	남성	59	정상	U	U	U	42.7	41.9	42.5	U	U	U	U	U	U
74	남성	71	정상	U	U	37.1	U	U	U	U	U	U	U	U	U
75	여성	54	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	38.9	36.2	U
76	남성	71	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
77	여성	63	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
78	남성	74	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
79	남성	62	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
80	여성	75	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
81	남성	48	정상	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

[0415]

[0416]

참고 U: 미확인

[0417]

실시예 5

[0418]

BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 프라이머 및 프로브 조합의 스크리닝

[0419]

(1) 분변 DNA 추출

[0420]

실시예 3의 프로토콜에 따라 분변 DNA를 추출하였다.

[0421]

(2) BMP3 및 NDRG4 유전자의 메틸화 검출

[0422]

BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 조합은 하기와 같이 제시되어 있다. 실시예 3의 단계에 따라 각 9개의 조합으로 qPCR을 수행하였다.

[0423] 표 19. 프라이머 및 프로브의 조합

조합 번호	BMP3	NDRG4
1	바람직한 3	바람직한 1
2	바람직한 3	바람직한 2
3	바람직한 3	바람직한 3
4	바람직한 1	바람직한 1
5	바람직한 1	바람직한 2
6	바람직한 1	바람직한 3
7	바람직한 2	바람직한 1
8	바람직한 2	바람직한 2
9	바람직한 2	바람직한 3

[0424]

[0425] BMP3 및 NDRG4 유전자의 9개의 조합의 프라이머 및 프로브의 서열은 하기와 같다:

[0426] 표 20. 조합에서 프라이머 및 프로브의 서열

조합 번호	유전자	그룹	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3')
1	BMP3	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			프로브	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGTGTTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
2	BMP3	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			프로브	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCTTCTACGC
			프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGTTTTTCGTT
3	BMP3	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			프로브	SEQ ID NO.:17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			프로브	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
4	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGTGTTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCTTCTACGC
			프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGTTTTTCGTT
6	BMP3	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:3	TTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:4	ATAAACTCTCCCAACAACACTACGCGAA
			프로브	SEQ ID NO.:5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			프로브	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

[0427]

조합 번호	유전자	그룹	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3')
7	BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTCCCAA
			프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	바람직한 1	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:6	ATCGATCGGGGTGTTTTAGGTTTC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			프로브	SEQ ID NO.:8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
8	BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTCCCAA
			프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			프로브	SEQ ID NO.:14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGT
9	BMP3	바람직한 2	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:10	GCAACCTAACAAATAAACTCTCCCAA
			프로브	SEQ ID NO.:11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	바람직한 3	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:18	CGGTTTTCGTTCGTTTTTCG
			역방향 프라이머	SEQ ID NO.:19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			프로브	SEQ ID NO.:20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

[0428]

[0429] 반응에서 사용된 QPCR 마스터 혼합물은 하기와 같다:

[0430] 표 21. BMP3/NDRG4를 위한 QPCR 마스터 혼합물

번호	시약	최종 농도
1	10× PCR 버퍼	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP	0.2 mM
4	Taq DNA 폴리머라제	2 U
5	각 프라이머	0.75 μM
6	각 프로브	0.25 μM
7	DNA 주형	2 μL
8	초순수 물	최대 50 μL

[0431]

[0432] qPCR 반응 조건은 95℃에서 2분 동안 변성의 1회 사이클, 및 95℃에서 20초 동안 변성의 50회 사이클 및 60℃에서 1분 동안 신장이었다.

[0433] (3) KRAS 유전자의 변이체 검출

[0434] KRAS 유전자의 코돈 12 및 13에서 7개의 돌연변이 핫스팟이 검출되었다. 7개의 돌연변이체는 G12D, G13D, G12V, G12C, G12S, G12A 및 G13R이고, 해당 프라이머 및 프로브의 서열은 표 22에 나타낸다.

[0435] 표 22 KRAS 유전자의 7개의 돌연변이를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브

프라이머 명칭	프라이머/프로브	서열 ID	서열 (5'에서 3'로)
G12D-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:35	AACTTGTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:36	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:37	AACTTGTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:38	AAACTTGTGGTAGTTGGGGCTT
G12S-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:39	AAACTTGTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:40	AACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:41	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTC
Kras-R	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:42	GAATGGTCCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	정방향 프라이머	SEQ ID NO.:43	AGGGCTTCTTGTCTTTCCTT
ACTB-R	역방향 프라이머	SEQ ID NO.:44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	프로브	SEQ ID NO.:45	AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	프로브	SEQ ID NO.:46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

[0436]

[0437] 반응에서 사용된 QPCR 마스터 혼합물은 하기와 같다:

[0438] 표 23. KRAS를 위한 QPCR 마스터 혼합물

번호	시약	최종 농도
1	G12A-F	0.72 μM
2	G12C-F	0.60 μM
3	G12D-F	0.72 μM
4	G12R-F	0.48 μM
5	G12S-F	0.90 μM
6	G12V-F	0.72 μM
7	G13D-F	0.48 μM
8	Kras-R	0.90 μM
9	Kras-P	0.10 μM
10	ACTB-F	0.30 μM
11	ACTB -R	0.30 μM
12	ACTB -P	0.05 μM
13	5×PCR 버퍼,-Mg ²⁺	1×
14	MgCl ₂	1.0 mM
15	dNTP	0.1 mM
16	Taq DNA 폴리머라제	2.5 U
17	DNA 주형	2 μL
18	초순수 물	최대 50 μL

[0439]

[0440] QPCR 반응 조건은 95°C에서 5분 동안 변성의 1회 사이클 및 95°C에서 15초 동안 변성의 45회 사이클, 71°C에서 60초 동안 어닐링, 및 그 후 55°C에서 50초 동안 신장이었다.

[0441] ACTB를 참조 유전자로서 사용하여 qPCR의 반응 품질 제어를 수행하였다.

[0442] (4) 분변 헤모글로빈 검사

[0443] 분변 면역화학적 검사 (FIT)로 분변 헤모글로빈을 검출하였고, 결과는 양성 또는 음성이었다.

[0444] (5) 공식으로 스코어 생성

[0445] BMP3, NDRG4 및 KRAS 유전자의 qPCR 검출의 Ct 값, 및 분변 헤모글로빈 검사의 양성 및 음성 결과를 하기와 같은 로지스틱 회귀 공식에 대입하였다:

[0446]
$$P=e^{\frac{K}{(1+e^K)}}$$

[0447] 여기서 P는 종합 지수이고, $K=a*\Delta Ct1+b*\Delta Ct2+c*\Delta Ct3+d*FIT+X$, 여기서 e는 자연 상수이고, a, b, c, d, X는 임상 상수이다. $\Delta Ct1$, $\Delta Ct2$ 및 $\Delta Ct3$ 은 참조 유전자의 Ct 값에서 표적 유전자의 Ct 값을 뺀 값이다.

[0448] P 값이 미리 결정된 임계치 이상인 경우, 검사 결과는 양성이고, 그렇지 않으면 음성이다. 양성 결과는 대상체가 CRC 또는 AA를 가질 가능성이 있음을 나타낸다.

[0449] (6) 검사 결과

[0450] 실시예 3의 81개의 분변 샘플을 검출하였고, BMP3 및 NDRG4 유전자의 프라이머 및 프로브의 상이한 조합의 결과는 표 24에 제시되어 있다.

[0451] 표 24 81개의 분변 샘플의 검출 결과

조합 번호	BMP3	NDRG4	민감도 (CRC+AA)	특이도 (CRC+AA)	CRC에서 양성으로 식별된 샘플 수	AA에서 양성으로 식별된 샘플 수	경장에서 양성으로 식별된 샘플 수	민감도 (CRC)	민감도 (AA)
1	바람직한 3	바람직한 1	94.3%	97.8%	19/20	14/15	45/46	95.0%	93.3%
2	바람직한 3	바람직한 2	91.4%	97.8%	18/20	14/15	45/46	90.0%	93.3%
3	바람직한 3	바람직한 3	80.0%	95.6%	16/20	12/15	44/46	80.0%	80.0%
4	바람직한 1	바람직한 1	97.1%	100.0%	20/20	14/15	46/46	100.0%	93.3%
5	바람직한 1	바람직한 2	97.1%	97.8%	20/20	14/15	45/46	100.0%	93.3%
6	바람직한 1	바람직한 3	88.6%	95.6%	19/20	12/15	44/46	95.0%	80.0%
7	바람직한 2	바람직한 1	97.1%	97.8%	19/20	15/15	45/46	95.0%	100.0%
8	바람직한 2	바람직한 2	94.3%	97.8%	19/20	14/15	45/46	95.0%	93.3%
9	바람직한 2	바람직한 3	85.7%	95.6%	19/20	11/15	44/46	95.0%	73.3%

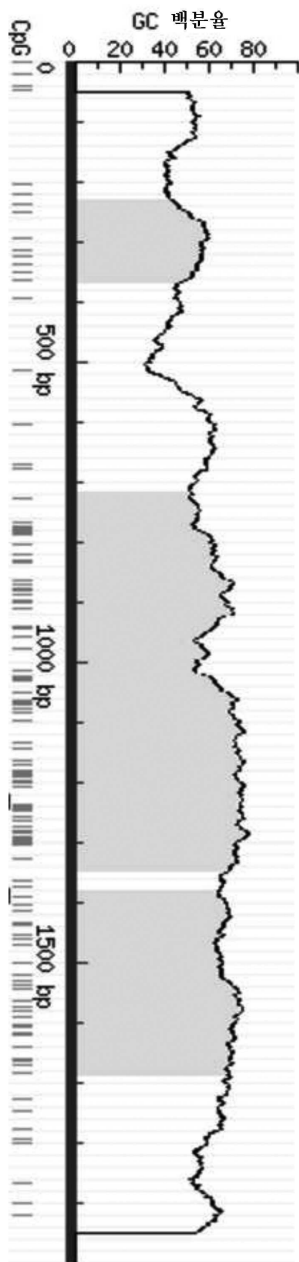
[0452]

[0453] 하기를 알 수 있다: (1) 조합 번호 4, 5 및 7은 다른 6개의 조합보다 우수하다. 모든 검사된 프라이머 및 프로브가 바람직한 것이고 다른 프라이머 및 프로브보다 우수하다는 점을 고려할 때 (실시예 3 참조), 3개의 특정한 조합은 BMP3 및 NDRG4 프라이머/프로브의 임의의 공지된 조합보다 우수하다. (2) BMP3, NDRG4, KRAS 유전자를 포함하는 CRC 및 AA 검출 및 분변 헤모글로빈 검출을 위한 키트의 민감도 및 특이도는 BMP3 또는 NDRG4 단일 유전자 메틸화 검출보다 유의하게 우수하다. (3) 아시아인 집단 (예를 들어, 중국인 집단)에서 CRC 검출을 위한 키트의 민감도 및 특이도는 기존 유사한 제품, 예컨대 콜로가드®보다 분명히 우수하다. (4) 아시아인 집단 (예를 들어, 중국인 집단)에서 AA 검출을 위한 키트의 민감도 및 특이도는 기존 유사한 제품, 예컨대 콜로가드®보다 유의하게 우수하다.

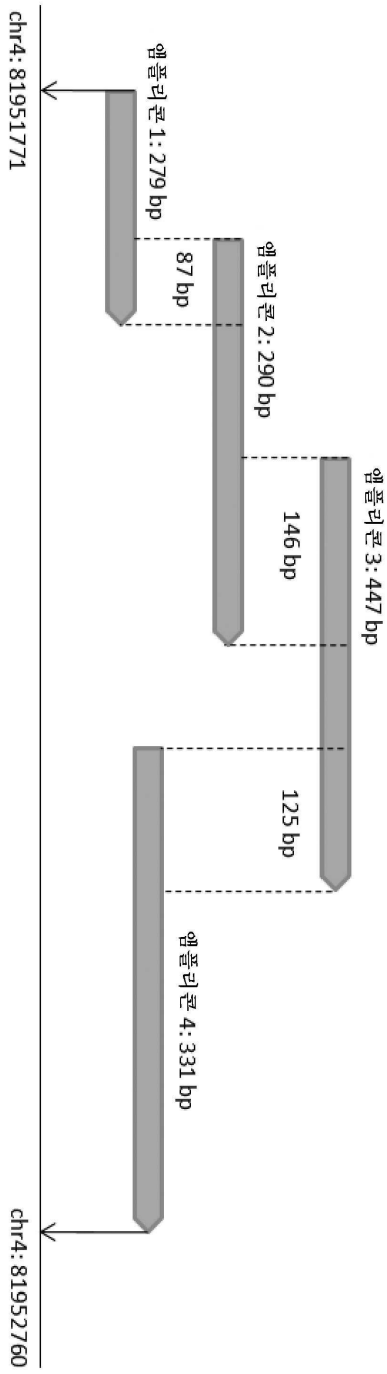
- [0454] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 청구범위, 그림 및/또는 도면을 포함하는 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0455] 달리 정의되지 않는 한, 본원의 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 검사에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 본원에 기재되어 있다. 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 공개는 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0456] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 개시를 위해서만 제공된다. 본원의 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명으로 인해 이러한 간행물보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0457] 본 발명이 그의 특정 실시양태와 관련하여 설명되었지만, 추가 변형이 가능하며 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리에 따라 본 발명의 임의의 변경, 사용 또는 적용을 포함하고, 본 발명이 속하는 기술 내에서 공지된 또는 관례적인 실행으로서 본 개시내용으로부터 벗어나는 것을 포함하고, 상기 기재된 및 하기와 같이 첨부된 청구범위의 범위 내의 본질적인 특색에 적용될 수 있는 것으로 의도된다는 것이 이해될 것이다.

도면

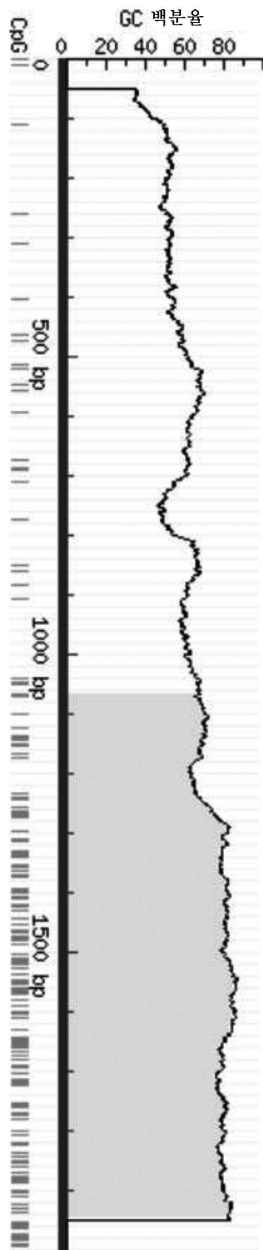
도면1a



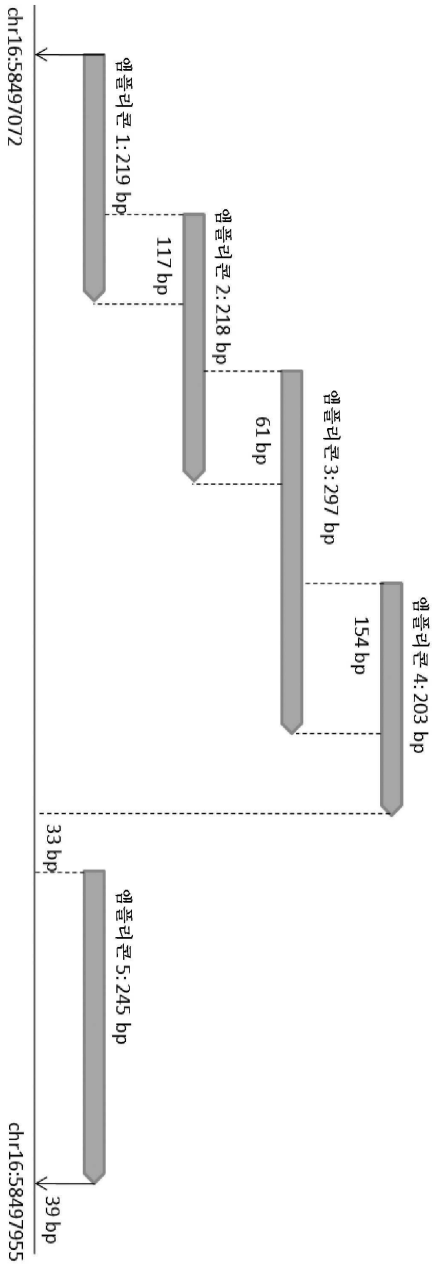
도면1b



도면1c

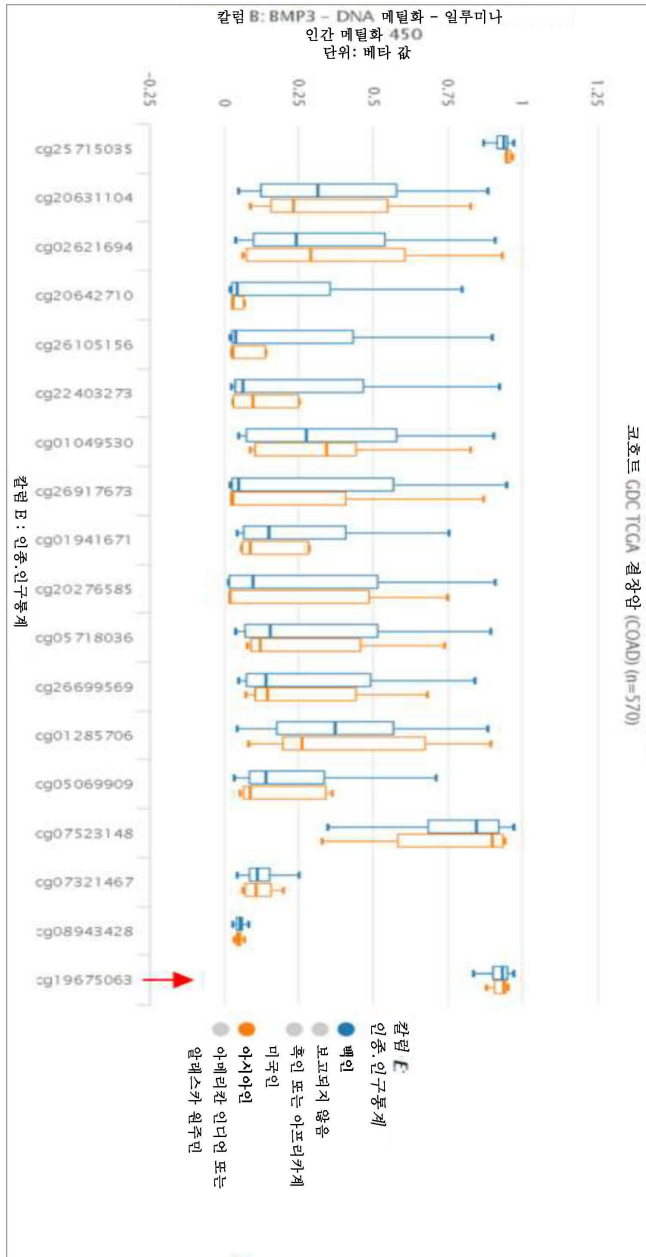


도면1d

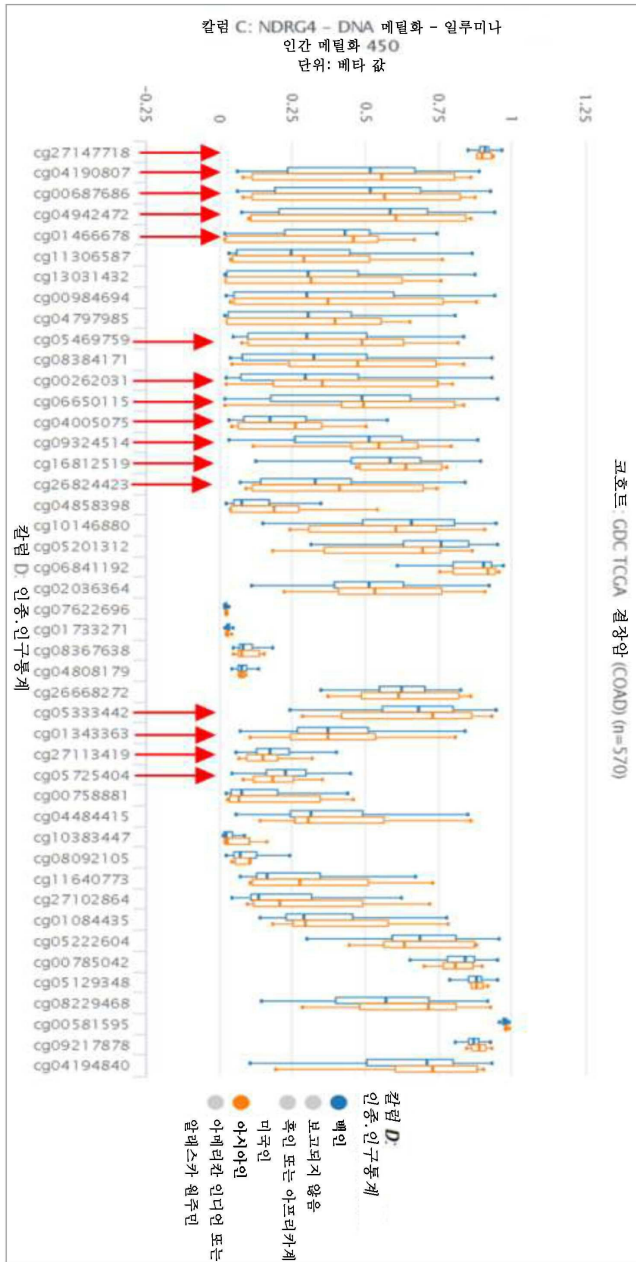


도면2a

백인 및 아시아인 집단에서 BMP3 유전자의 메틸화 CpG 부위의 차이.

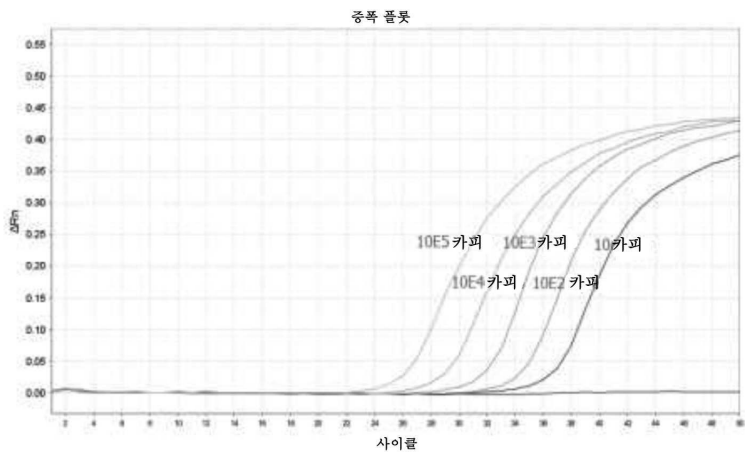


도면2b

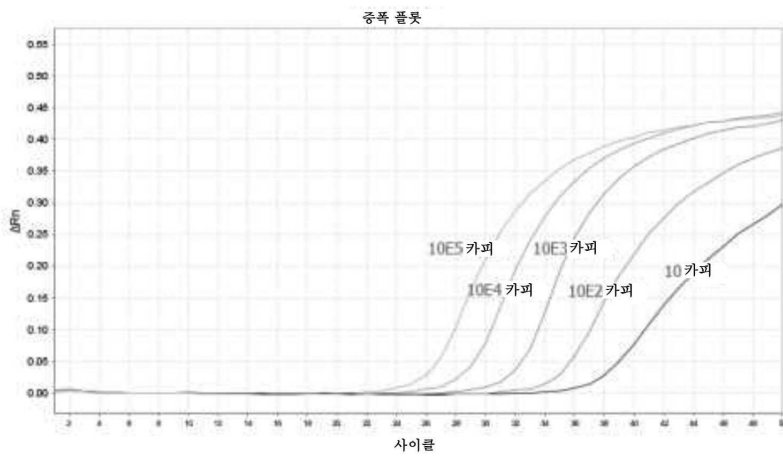


백인 및 아시안 집단에서 NDRG4 유전자의 메틸화 CpG 부위의 차이.

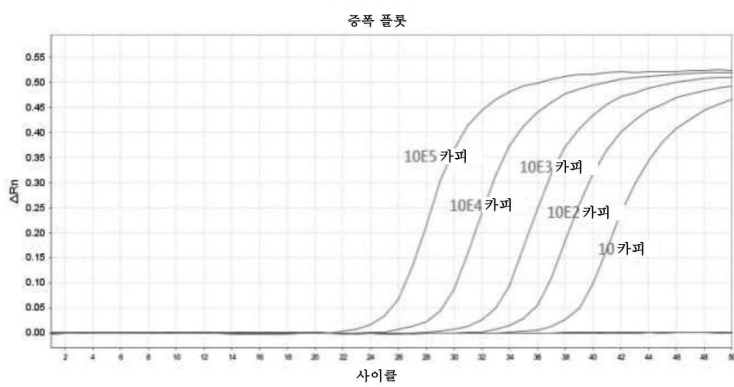
도면3a



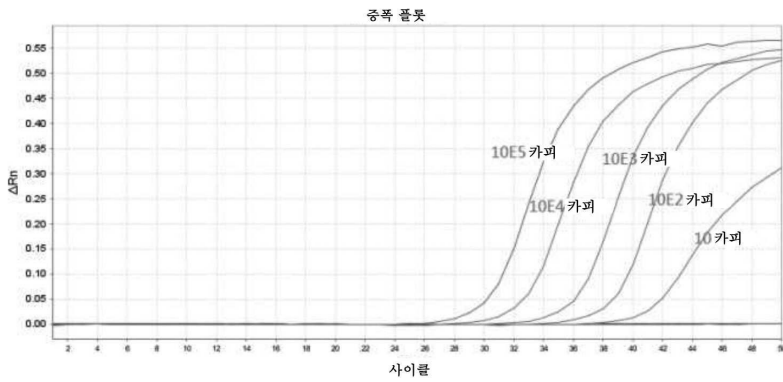
도면3b



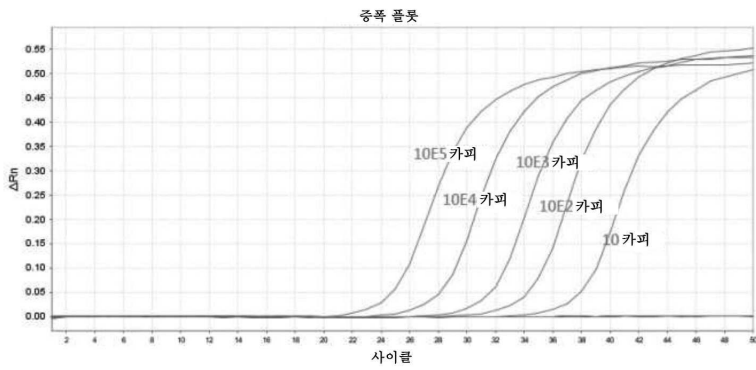
도면3c



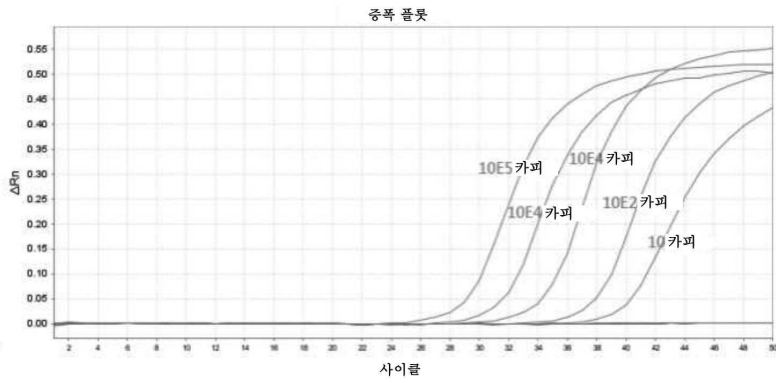
도면3d



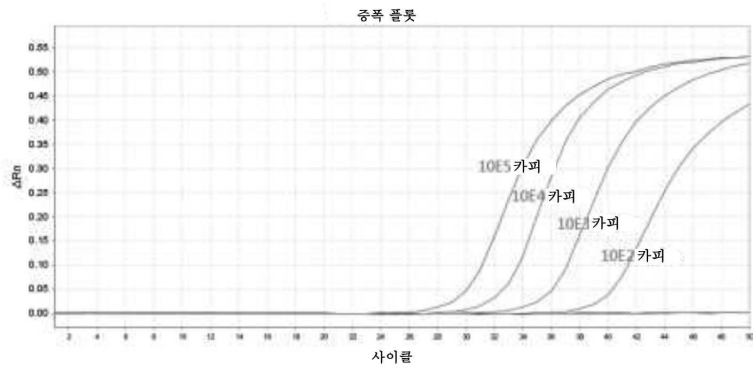
도면3e



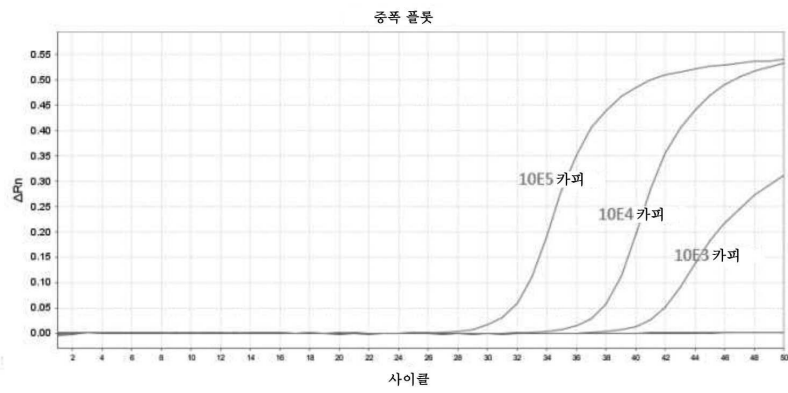
도면3f



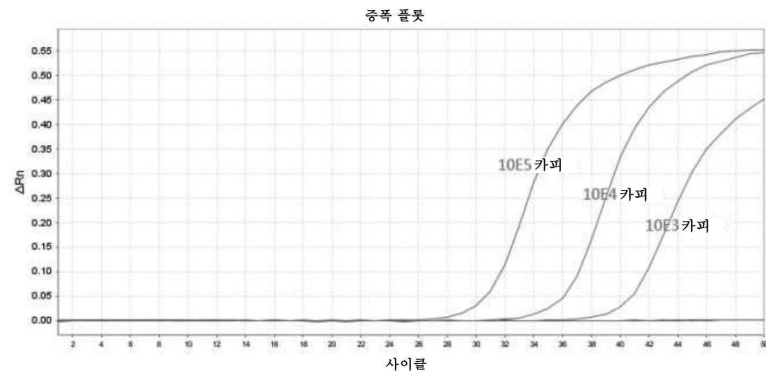
도면3g



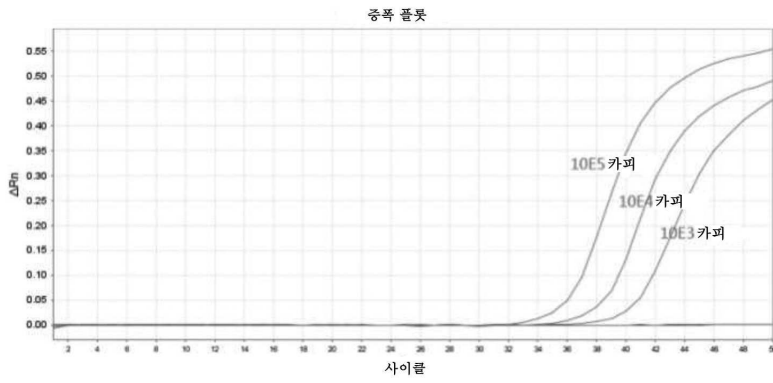
도면3h



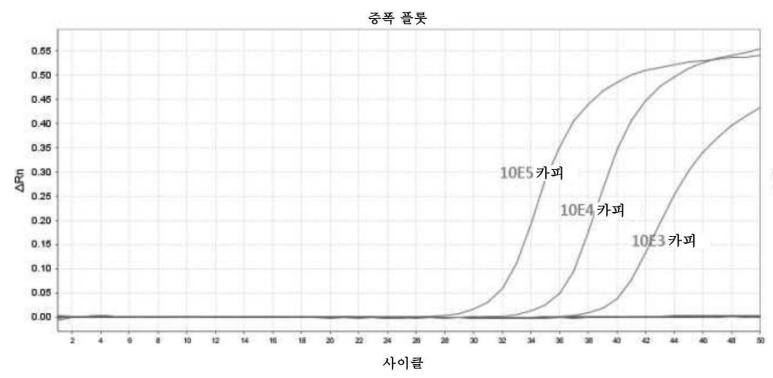
도면3i



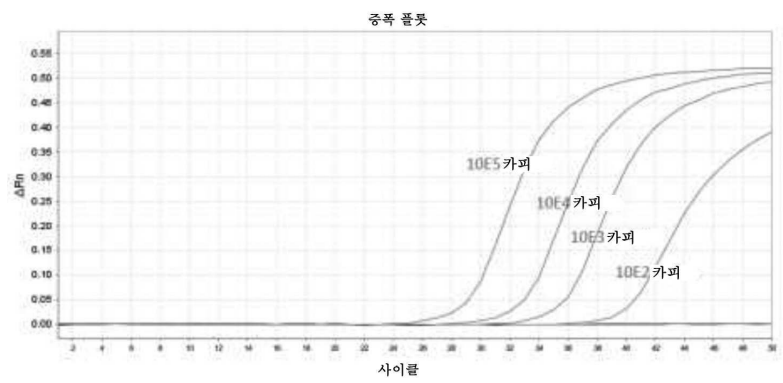
도면3j



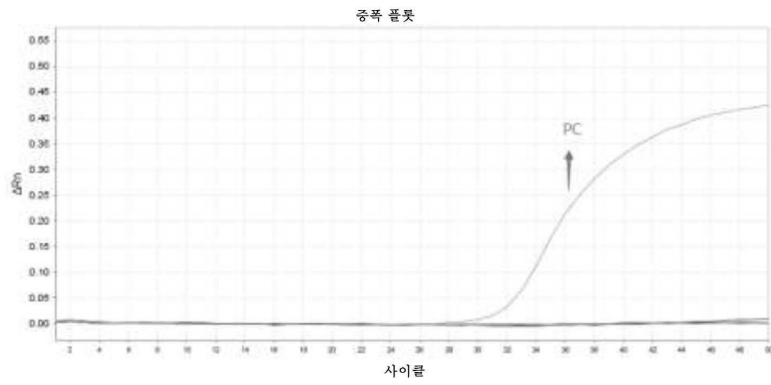
도면3k



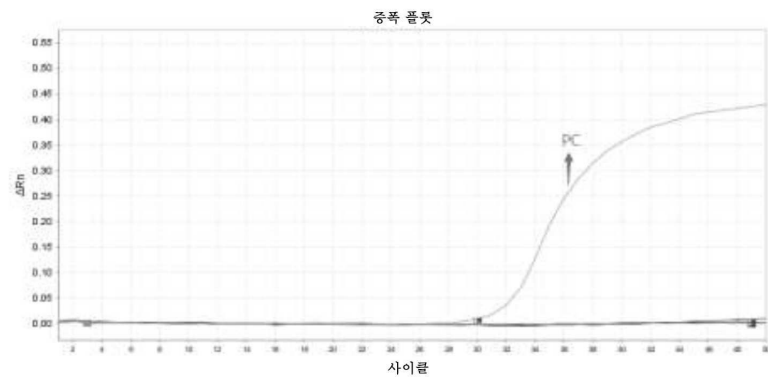
도면3l



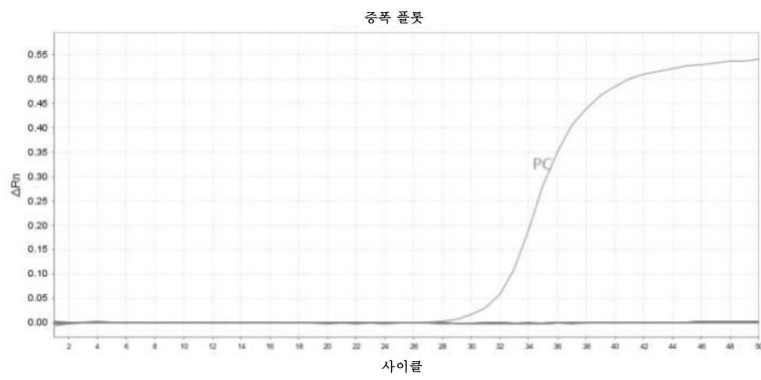
도면4a



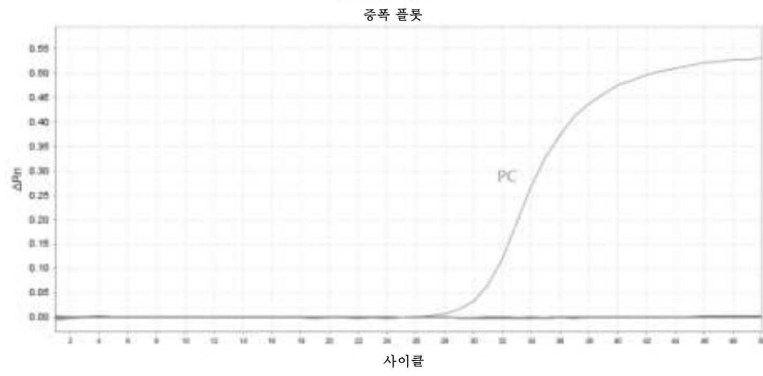
도면4b



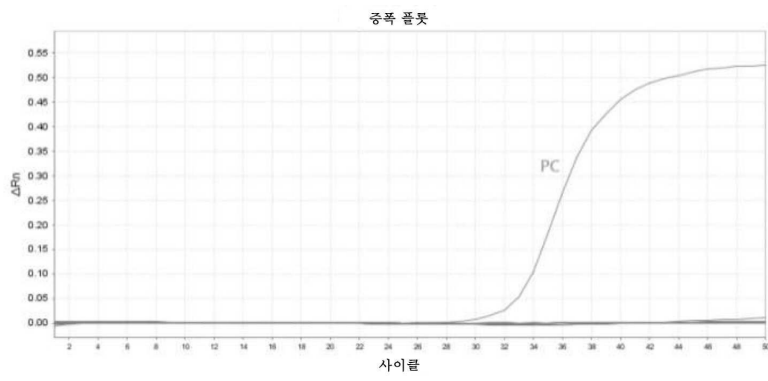
도면4c



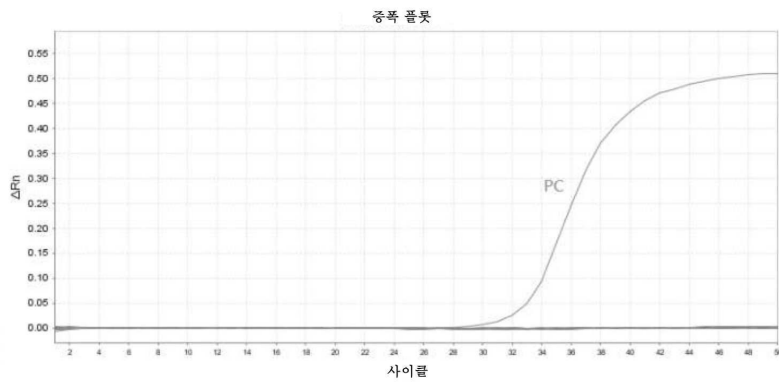
도면4d



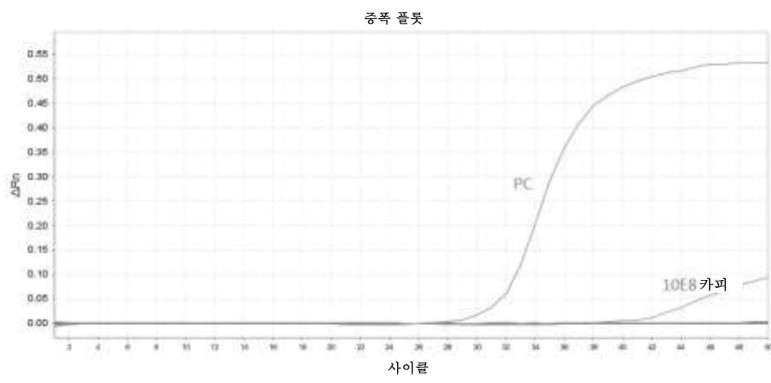
도면4e



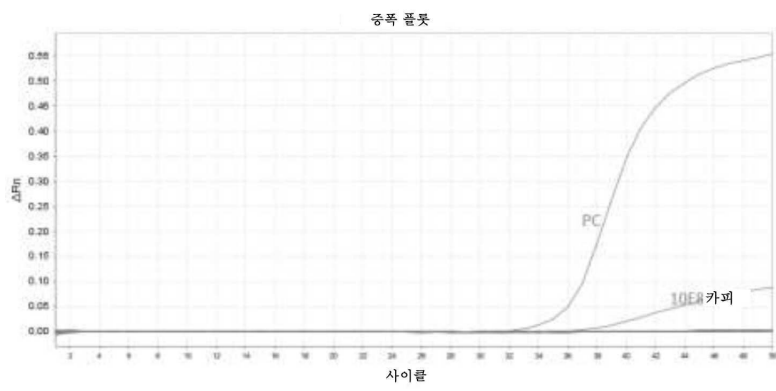
도면4f



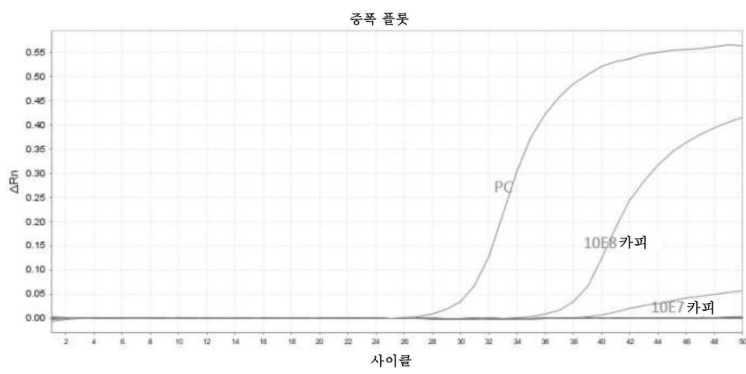
도면4g



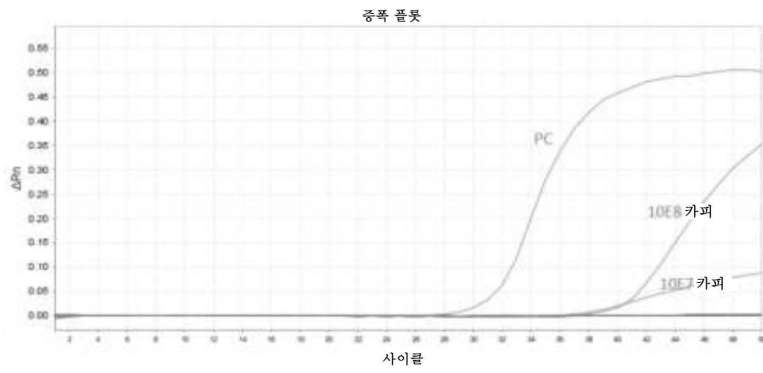
도면4h



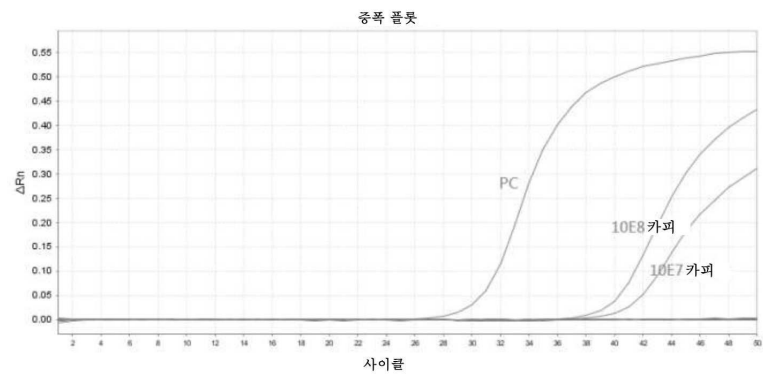
도면4i



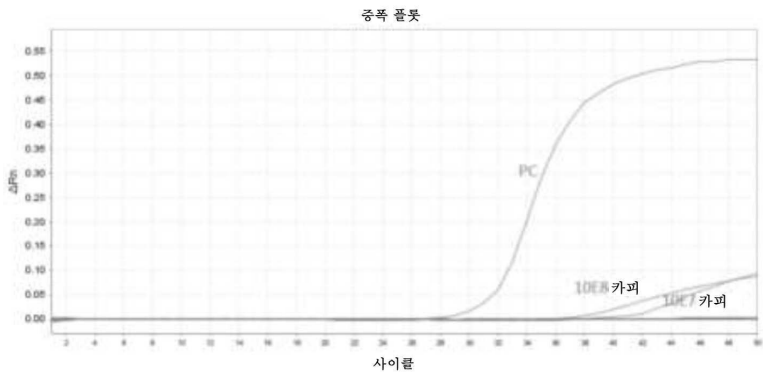
도면4j



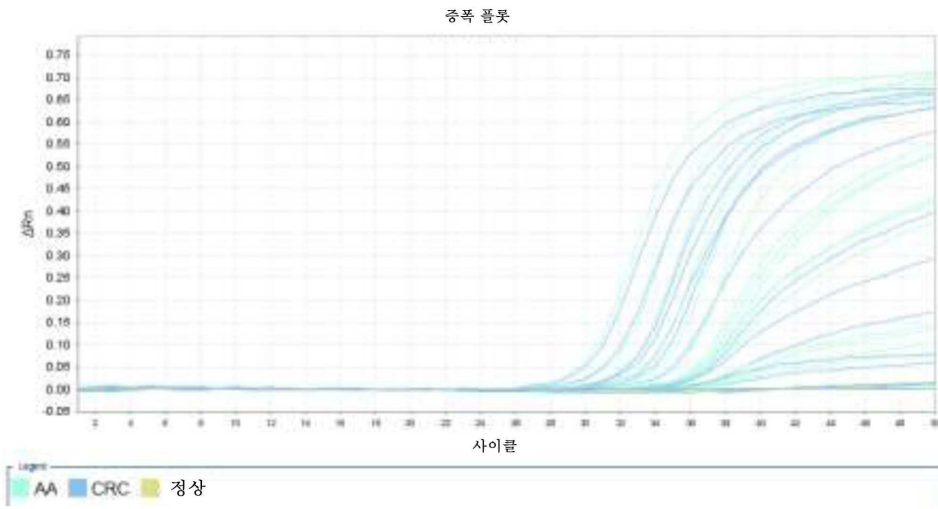
도면4k



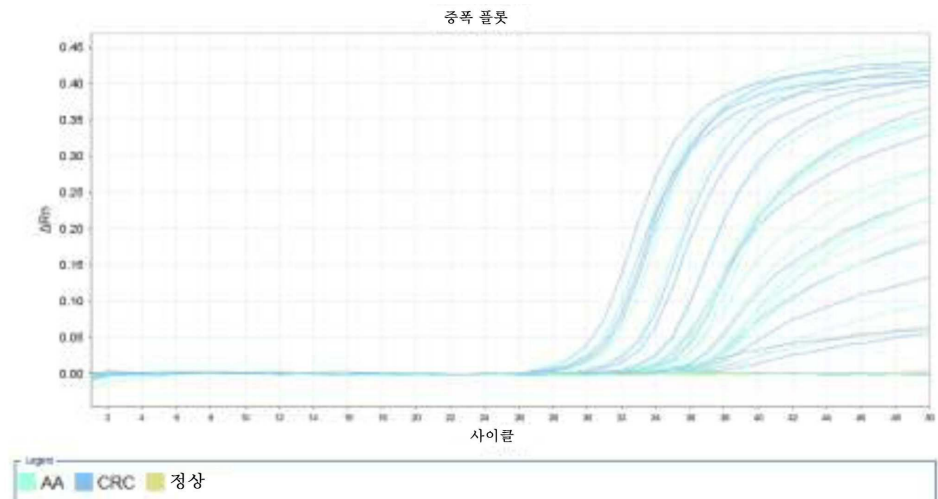
도면4l



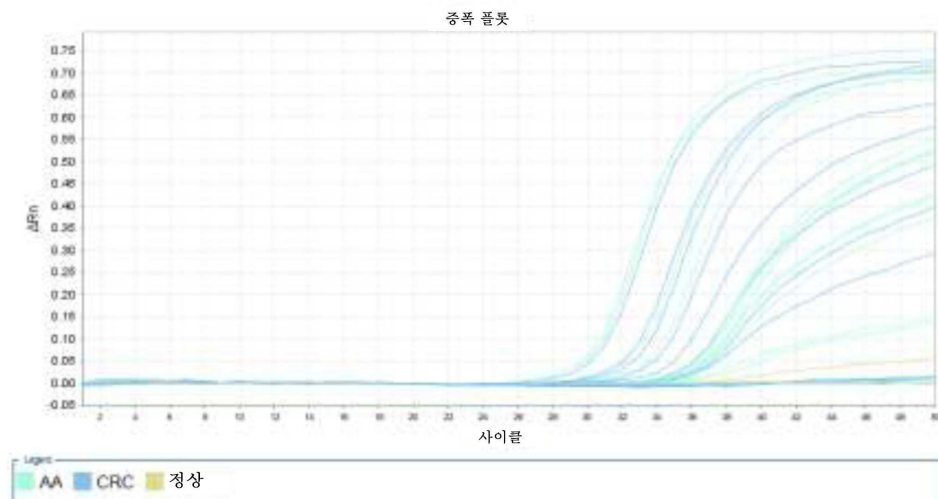
도면5a



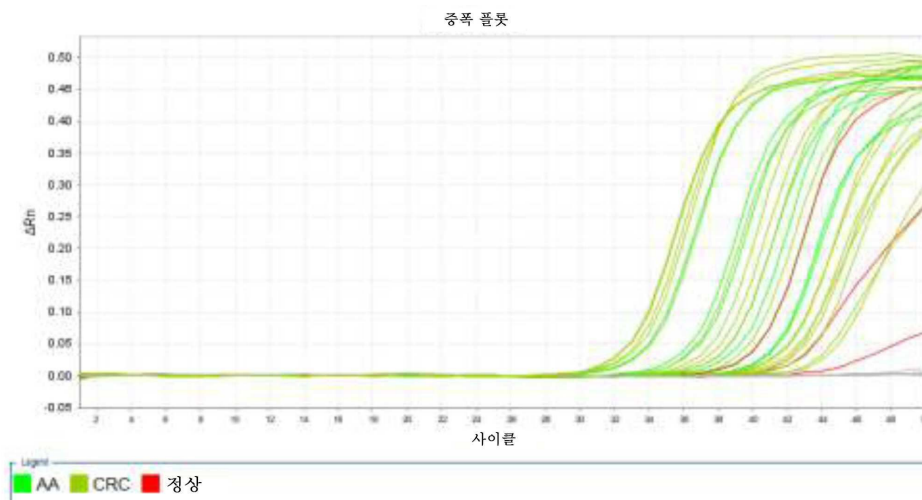
도면5b



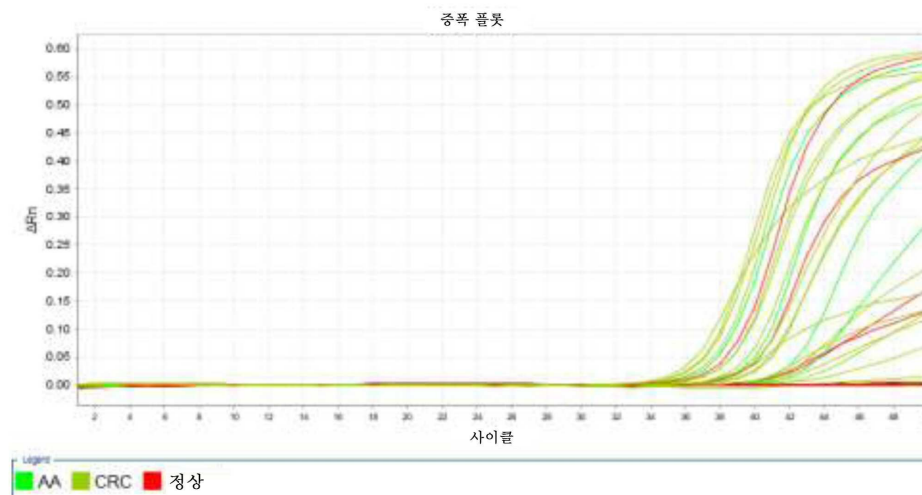
도면5c



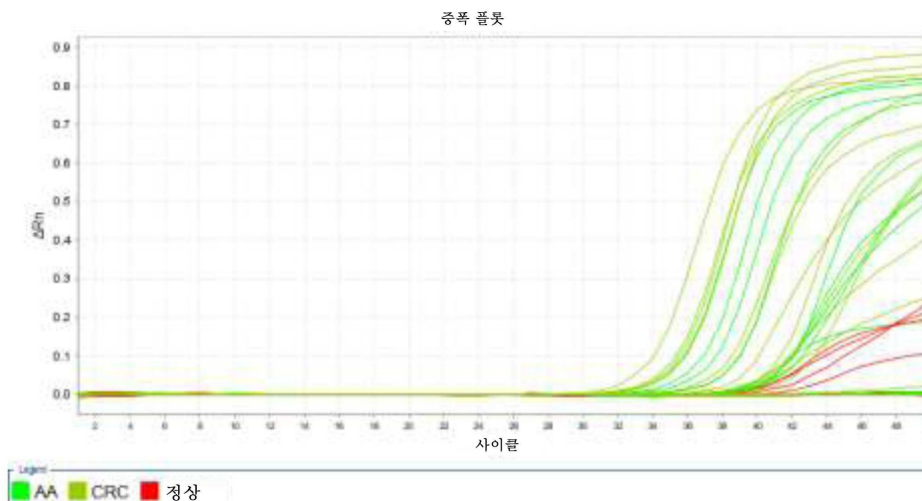
도면5d



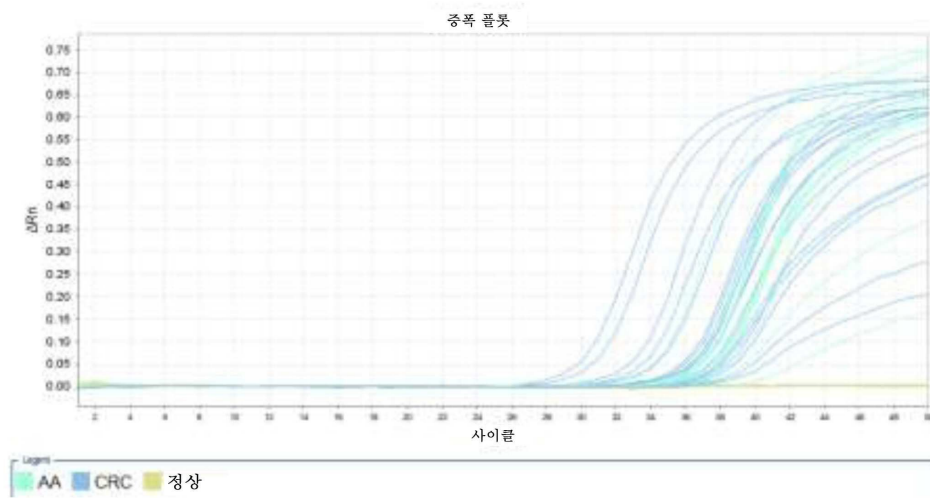
도면5e



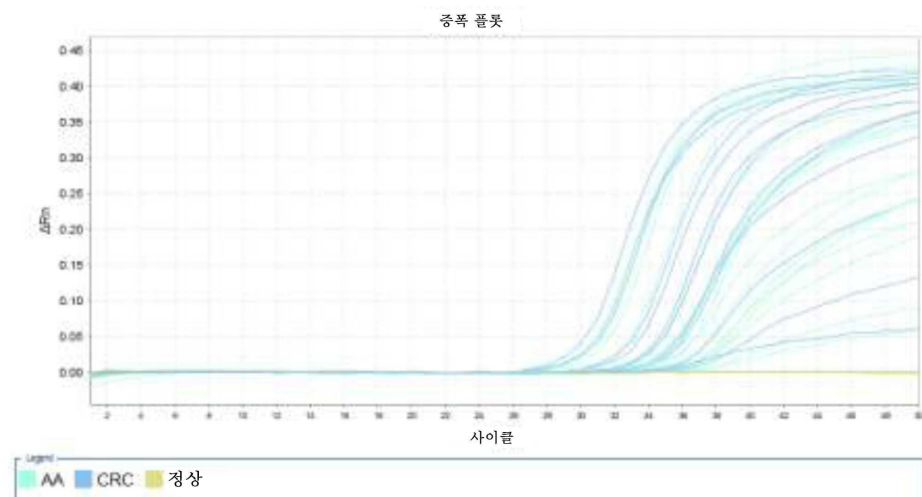
도면5f



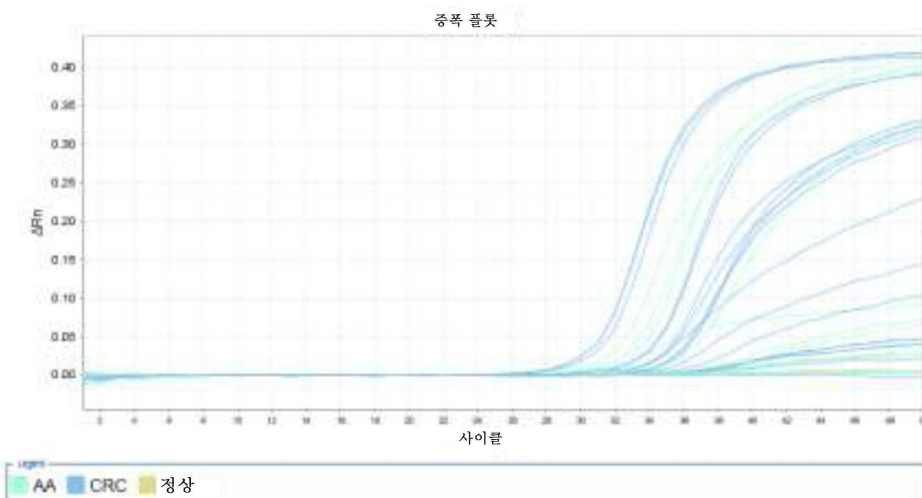
도면6a



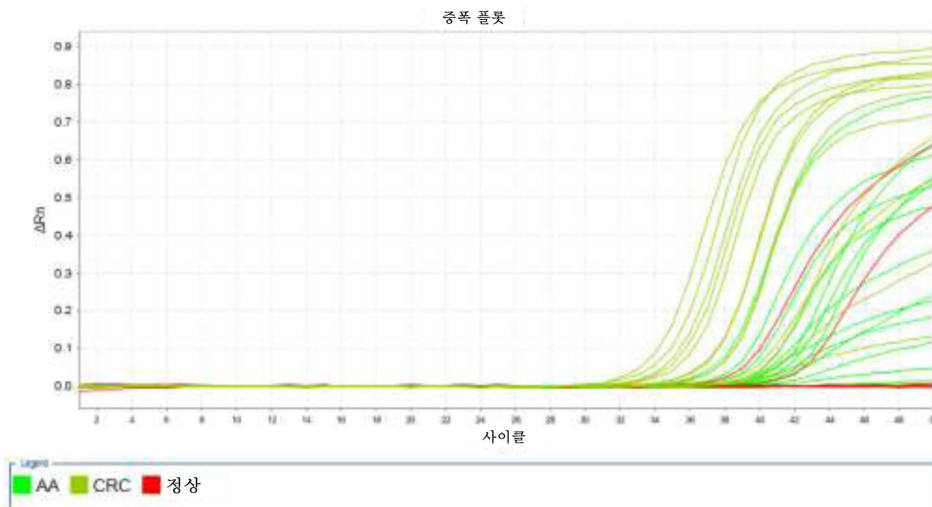
도면6b



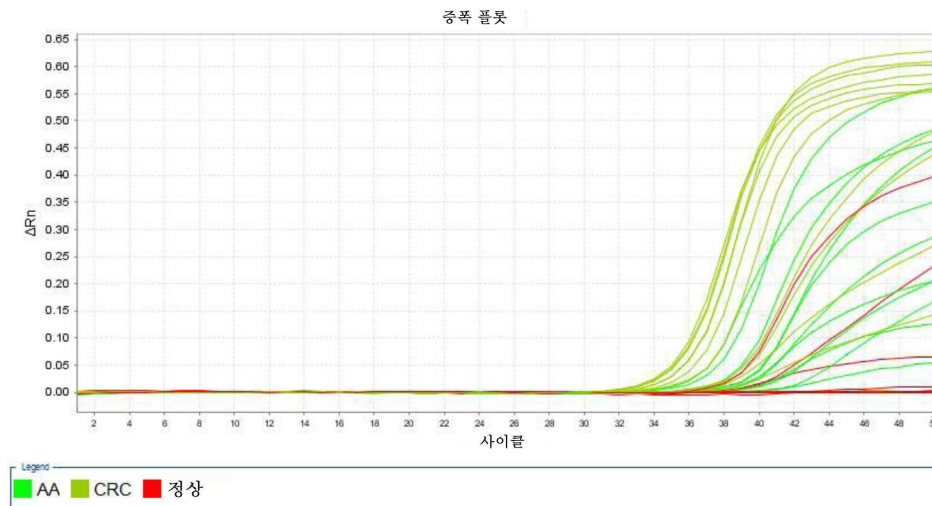
도면6c



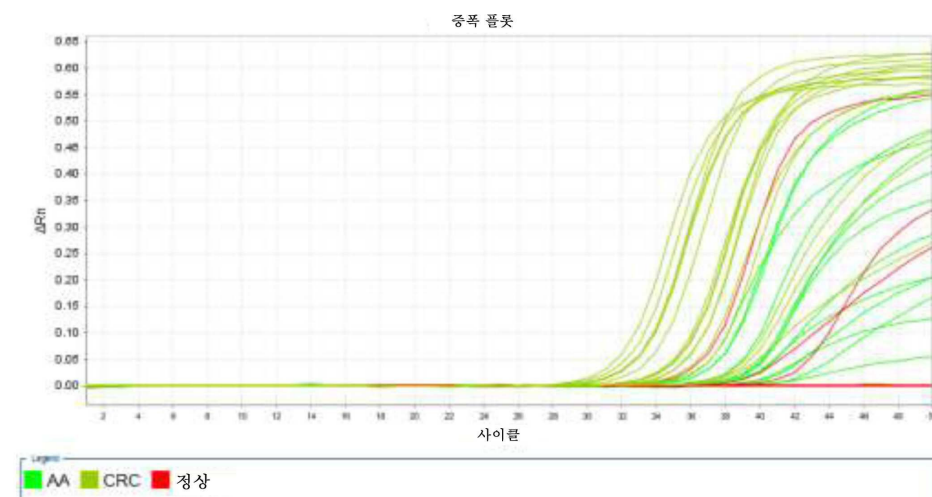
도면6d



도면6e



도면6f



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Hangzhou New Horizon Health Technology Co. Ltd.

Li, Hui

Li, Cunyao

Zheng, Weixian

Yang, Jiao

Liu, Gang

Lv, Ning

Chen, Yiyou

<120> THE KIT FOR SCREENING COLORECTAL CANCER AND ADVANCED ADENOMA AND
ITS APPLICATION

<130> NEWH-017/01WO 333709-2028

<150> CN 201810502387.9

<151> 2018-05-23

<150> CN 201810502359.7

<151> 2018-05-23

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (69)..(69)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (80)..(80)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (83)..(83)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (85)..(85)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (106)..(106)
<223> methylated

<220><221> modified_base
<222> (120)..(120)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (123)..(123)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (127)..(127)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (132)..(132)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (139)..(139)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (141)..(141)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (152)..(152)
<223> methylated
<220><221> modified_base

<222> (154)..(154)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (189)..(189)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (200)..(200)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (219)..(219)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (227)..(227)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (236)..(236)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (240)..(240)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (242)..(242)
<
223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (247)..(247)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (254)..(254)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (258)..(258)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (264)..(264)

<223> methylated
 <400> 1
 gttagtttgg tcgggtgttt ttaaaaataa agcgaggagg gaaggtatag atagattttg 60
 aaaatattcg ggtatatac gtcgcatatt atagtttttt ttttagcgttg gaggggagac 120
 ggcgttcgta gcgttttcgc cgggtgaggt tcgcgtagtt gttggggaag agtttatttg 180

 ttaggttcgc ttgggttagc gtagtaagtg gggttggtcg ttatttcgtt gtattcggtc 240
 gcgtttcggg tttcgtgcgt tttcgtttta g 271
 <210> 2
 <211> 236
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (20)..(20)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (25)..(25)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(29)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (48)..(48)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base

<222> (50)..(50)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (53)..(53)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (55)..(55)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (62)..(62)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (66)..(66)
 <223> methylated
 <
 220><221> modified_base
 <222> (74)..(74)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (78)..(78)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (85)..(85)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (98)..(98)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (100)..(100)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (109)..(109)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (118)..(118)

<223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222>
 > (120)..(120)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (122)..(122)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (130)..(130)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (132)..(132)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (137)..(137)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (141)..(141)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (159)..(159)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (165)..(165)
 <223>
 methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (170)..(170)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (172)..(172)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (177)..(177)

<223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (181)..(181)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (191)..(191)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (202)..(202)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (204)..(204)
 <223> methylated
 <220><221>
 > modified_base
 <222> (210)..(210)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (216)..(216)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (218)..(218)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (221)..(221)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (226)..(226)
 <223> methylated
 <400> 2
 tgagaagtcg gcggggcgc ggatcgatcg ggggttttt taggtttcgc gtcgcggttt 60
 tcgttcgttt tttcgttcgt ttatcgggta ttttagtcgc gtagaaggcg gaagttacgc 120
 gcgagggatc gcggttcggt cgggattagt tttaggttcg gtatcgtttc gcgggtcgag 180
 cgtttatatt cgttaaattt acgcgggtac gttttcgcgg cgtatcgttt ttagtt 236

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 ttgaaaata ttcgggttat atacgtgc 29
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 ataaactctt cccaacaac tacgcaa 28
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 agcgttggag tggagacggc gttcg 25
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 atcgatcggg gtgttttta ggtttc 26
 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 ccttctacgc gactaaaata cccgat 26
 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8	
cgtcgcggtt ttcgttcggt ttttcgttcg t	31
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
aatattcggg ttatatacgt cgcga	25
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
gcaacctaac aaataaactc ttcccaca	28
<210> 11	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
tggagtggag acggcgttcg tagcgt	26
<210> 12	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
gcgggtgaga agtcggc	17
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
gtaacttcg ccttctacgc	20
<210> 14	

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 taggtttcgc gtcgcggttt tcggt 25
 <210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 aatattcggg ttatatacgt cgcgatt 27
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 acttactacg ctaaccaac g 21

 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 tagcgttgga gtggagacgg cgttcgta 28
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 cggttttcgt tcgttttttc g 21
 <210> 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

aacctaaaac taatcccgaac cgaacc	26
<210> 20	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
tcgtttatcg ggtattttag tcgcgtag	28
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
gagtggagac ggcgttcgta	20
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
ccacttacta cgctaaccaca acg	23
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
cgggtgaggt tcgcgtagtt gttggg	26
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
gggtgttttt taggtttcgc gtc	23
<210> 25	
<211> 21	

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 cgtaacttcc gccttctacg c 21
 <210> 26
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 acgcgactaa aataccgat aaacgaacga aaaaacgaac 40
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

 ttaggttgcg ttgggttagc g 21
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 actccgaaaa cgcaaaaaac cg 22
 <210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 attcggtcgc gtttcgggtt tcgtgc 26
 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

gacccgcgaa acgataccg	19
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
tattcgggtt atatacgtcg c	21
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
cttactacgc taaccaacg	20
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
cccaacaact acgcgaacct cacccg	26
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
tcgcgcgtaa cttccgcctt	20
<210> 35	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
aacttgtggt agttggaggt ga	22
<210> 36	
<211> 25	

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 aacttgtggt agttggagct gggga 25
 <210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 aacttgtggt agttggagtt gt 22

 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 aaacttgtgg tagttggggc tt 22
 <210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 aaacttgtgg tagttggtgc ta 22
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 aacttgtggt agttggagca gc 22
 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

aaacttgtgg tagtggagc tc	22
<210> 42	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 42	
gaatggtcct gcaccagtaa tatg	24
<210> 43	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 43	
agggcttctt gtcttttct t	21
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 44	
cgtgctcgat ggggtacttc	20
<210> 45	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 45	
aggcaagagt gccttgacga tacagc	26
<210> 46	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 46	
cgtgatggtg ggcattgggtc agaagga	27
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Homo sapiens
 <400> 47
 agtttgggtg aagttaagag 20
 <210> 48
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

 ctaactctat ttaaacrcc a 21
 <210> 49
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 gttttaattt ttggaaaagg taa 23
 <210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 acctaacaaa taaactcttc c 21
 <210> 51
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 gaaggtatag atagatttg aa 22

 <210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 cacctaacac aactttacra aact 24

<210> 53
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 gtatttagtt atggttgggg ygagta 26
 <210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 ctcacctact actacegccc r 21
 <210> 55
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

 aggtttttga gtttttggtt ttttt 25
 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 ccctcaaac ccctataac 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 ggatgggat gttttttag 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 rrgaaacct aaaaacacc 20

<210> 59
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 gyggagyggg tgagaagt 18

<210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 craacaacca aaaaccctc 20

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 gtttygttygg gattagtttt agg 23

<210> 62
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 62

crcaaacraa aaacraaac 19

<210> 63
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 gyggygtttt ygtttttg 18

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

cracractaa aaatcccaaa

20

<210> 65

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (33)..(33)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (69)..(69)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (80)..(80)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (83)..(83)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (85)..(85)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (106)..(106)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (120)..(120)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (123)..(123)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (132)..(132)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (139)..(139)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (141)..(141)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (152)..(152)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (154)..(154)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (189)..(189)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (200)..(200)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (219)..(219)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (227)..(227)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (240)..(240)

<223> methylated

<220><221> modified_base

<222> (242)..(242)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (247)..(247)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (254)..(254)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (258)..(258)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (264)..(264)
 <
 223> methylated
 <400> 65
 gccagtttgg ccgggtgttc ccaaaaataa agcgaggagg gaaggtacag acagatcttg 60
 aaaacacccc ggccacacac gccgcgacct acagctcttt ctgagcgttg gaggggagac 120
 ggcgccccga ggcacctgcg cgggtgaggt ccgcgcagct gctggggaag agccccctg 180
 tcaggctgcg ctgggtcagc gcagcaagtg gggttgccg ctatctcgct gcacccggcc 240
 gcgtccccgg ctccgtgccc cctgccccca g 271
 <210> 66
 <211> 236
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (12)..(12)
 <223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (18)..(18)
 <223> methylated

<220><221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (48)..(48)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (50)..(50)
<223> methylated
<220><221> modified_base

<222> (53)..(53)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (55)..(55)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (62)..(62)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (66)..(66)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (74)..(74)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (78)..(78)
<223> methylated
<220><221> modified_base

<222> (85)..(85)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (98)..(98)
<223> methylated

<220><221> modified_base
<222> (100)..(100)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (109)..(109)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (118)..(118)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (120)..(120)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (122)..(122)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (130)..(130)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (132)..(132)
<223> methylated
<220><221> modified_base

<222> (137)..(137)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (141)..(141)
<223> methylated
<220><221> modified_base

<222> (159)..(159)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (165)..(165)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (170)..(170)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (172)..(172)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (177)..(177)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (181)..(181)
<
223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (191)..(191)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (202)..(202)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (204)..(204)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (210)..(210)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (216)..(216)
<223> methylated
<220><221> modified_base
<222> (218)..(218)

<223> methylated
 <220><221> modified_base
 <222> (221)..(221)
 <223> methylated
 <220>
 ><221> modified_base
 <222> (226)..(226)
 <223> methylated
 <400> 66
 tgagaagtcg gcgggggcgc ggatcgaccg ggggtgtccc caggctccgc gtcgcgggtcc 60
 ccgctcgccc tcccgccgc ccaccgggca cccagccgc gcagaaggcg gaagccacgc 120
 gcgagggacc gcggtccgtc cgggactagc cccagggccc gcaccgccc gggggccgag 180
 cgcccacacc cgccaaacc acgcgggcac gccccgcgg cgcaccgccc ccagcc 236
 <210> 67
 <211> 271
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 gttagtttg tccgggtgtt ttaaaaataa agcgaggagg gaaggtatag atagattttg 60

 aaaatattcg gttatatac gtcgcgattt atagttttt tttagcgttg gaggggagac 120
 ggcgttcgta gcgttttgcg cgggtgaggt tcgcgtagtt gttggggaag agtttatttg 180
 ttaggttgcg ttgggttagc gtagtaagtg gggttggtcg ttatttcgtt gtattcggtc 240
 gcgtttcggg tttcgtgct tttcgtttta g 271
 <210> 68
 <211> 271
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 gttagtttg ttgggtgtt ttaaaaataa agtgaggagg gaaggtatag atagattttg 60
 aaaatatttg gttatatac gttgtgattt atagttttt tttagtgttg gaggggagat 120

 ggtgtttgta gtgttttgcg tgggtgaggt ttgtgtagtt gttggggaag agtttatttg 180
 ttaggttgcg ttgggttagt gtagtaagtg gggttggttg ttattttggt gtatttggtt 240
 gtgttttggg tttgtgtgt tttgtttta g 271

<210> 69
 <211> 236
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 tgagaagtcg gcgggggcgc ggatcgatcg gggtgTTTT taggtttcgc gtcgcggttt 60
 tcgttcgttt tticgttcgt ttatcgggia ttttagtcgc gtagaaggcg gaagttacgc 120
 gcgagggatc gcggttcgtt cgggattagt tttaggttcg gtatcgttc gcgggtcgag 180

cgtttatatt cgtaaattt acgcgggtac gttttcggg cgtatcgttt ttagtt 236

<210> 70
 <211> 236
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 tgagaagtG gtgggggtgt ggattgattg gggtgTTTT taggttttgt gttgtggttt 60
 ttgtttgttt tttgtttgt ttattgggta ttttagttgt gtagaaggG gaagttatgt 120
 gtgagggatt gtggtttgtt tgggattagt tttaggtttg gtattgtttt gtgggttgag 180
 tgtttatatt tgtaaattt atgtgggtat gtttttGtgg tgtattgttt ttagtt 236