



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0053743  
(43) 공개일자 2018년05월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6858 (2018.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6858 (2018.05)  
C12Q 1/6886 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2018-7011263
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월22일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년04월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/072605
- (87) 국제공개번호 WO 2017/050934  
국제공개일자 2017년03월30일
- (30) 우선권주장  
15186341.2 2015년09월22일  
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
비오까르띠 엔브이  
벨기에, 메헬렌 2800, 제네랄 드 비틀란 11 비3
- (72) 발명자  
클레스, 바트  
벨기에, 2800 메헬렌, 제네랄 드 비틀란 11 비3  
로사유, 루디  
벨기에, 2800 메헬렌, 제네랄 드 비틀란 11 비3
- (74) 대리인  
김순용

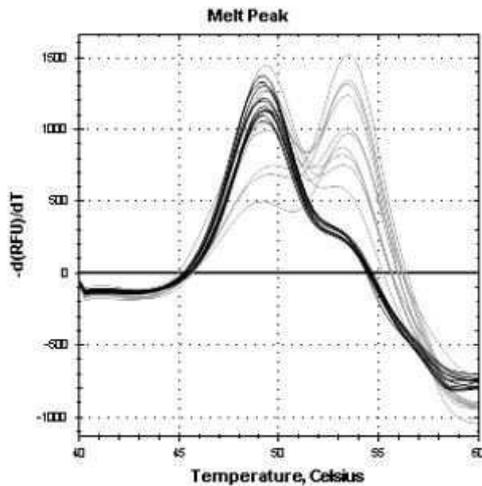
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 짧은 호모폴리머릭 핵산 반복서열의 개선된 검출법

(57) 요약

본 발명은, 짧은 호모폴리머릭 핵산 반복서열의 뉴클레오티드 수 변화의 검출에 관한 것으로, 특히 짧은 호모폴리머릭 미소부수체(microsatellite), 예를 들면, 종양에서의 미소부수체 불안정성(MSI)을 진단 및 / 또는 미스매치 수리(MMR-) 결핍을 진단하기 위한 목적에 관한 것이다. 따라서, 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복서열의 뉴클레오티드 수 변화를 검출하는 방법뿐 아니라 상기 변화를 검출하는 자동화된 카트리지 및 키트를 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*C12Q 2527/107* (2013.01)

*C12Q 2537/143* (2013.01)

*C12Q 2565/1025* (2013.01)

*C12Q 2565/107* (2013.01)

*C12Q 2600/158* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열(homopolymeric nucleotide repeat sequence)에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함하는 방법 :

- 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계;
- 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 적어도 하나의 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 프로브에 의해 생성된 신호 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계; 및
- 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열은 표적 호모폴리머릭 반복 서열에서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함하는 돌연변이 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 분자 비콘(molecular beacon) 올리고뉴클레오티드 프로브인 것인, 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 제1 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브와 상이하게 표지된 적어도 제2 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하고, 상기 제2 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열과는 상이한 제2 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제2 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열은 상기 제2 표적 호모폴리머릭 반복 서열에서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함하는 돌연변이 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앰플리콘을 생성하는 단계는 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소를 포함하는 PCR에서 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 적어도 하나의 신호-발생 표지 올리고뉴클레오티드 프로브는 상기 프로브를 중합효소의 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성으로부터 보호하는 구조적 특징 또는 변형을 포함하고, 상기 구조적 특징 또는 변형은 바람직하게는 하기에서 선택된 것인, 방법:

- 프로브의 3' 말단에서 역전된 dT;
- 프로브의 3' 말단에서 마지막 3 개 뉴클레오티드 중 어느 하나 앞에 위치하는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 서열-특이적 프로브는 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브이고, 상기 구조적 특징 또는 변형은 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성 저항성 줄기(stem)인 것인, 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계들이 자동화된 시스템에서 수행되는 것인, 방법.

- 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭함으로써 앰플리콘을 생성시키는 단계;
- 적어도 하나의 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 신호의 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계; 및
- 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 방법은:

- 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산 소스를 제공하는 단계로, 상기 소스는 바람직하게는 생물학적 샘플인 것인;
- 상기 핵산 소스 유래의 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계; 중 임의의 단계가 선행하고;

적어도 다음의 단계들이 자동화된 시스템에서 수행되는 것인, 방법:

- 핵산 소스 유래의 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 적어도 다음의 단계들이 자동화된 시스템과 결합 가능한 카트리지 내에서 수행되는 것인, 방법:

- 핵산 소스로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계;

- 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계; 및
- 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 신호 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계는 상기 용융 곡선의 1차 도함수의 적어도 하나의 피크의 위치 또는 상대적인 위치를 평가함으로써 수행되고, 바람직하게는 자동화된 방식으로 수행되는 것인, 방법.

**청구항 13**

길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하기 위한 키트로서, 상기 키트는 적어도 하나의, 바람직하게는 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하며, 각각은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 상이한 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열을 포함하는 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 것이고, 바람직하게는 상기 키트는 교정용 중합효소를 더 포함하는 것인, 키트.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 적어도 하나의, 바람직하게는 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브 및 바람직하게는 교정용 중합효소 또한 자동화된 시스템과 결합 가능한 카트리지로 제공되는 것인, 키트.

**청구항 15**

미소부수체 불안정성 (microsatellite instability) (MSI), 바람직하게는 암으로 진단된 또는 암에 걸린 것으로 예상되는 환자로부터 수득한 샘플에서 미소부수체 불안정성을 검출하기 위한 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 방법 및 / 또는 제13항 또는 제14항에 따른 키트의 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은, 짧은 호모폴리머릭 핵산 반복서열의 뉴클레오티드 수 변화의 검출에 관한 것으로, 특히 짧은 호모폴리머릭 미소부수체(microsatellite), 예를 들면, 종양에서의 미소부수체 불안정성(MSI)을 진단 및 / 또는 미스매치 수리(MMR-) 결핍을 진단하기 위한 목적에 관한 것이다. 따라서, 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복서열의 뉴클레오티드 수 변화를 검출하는 방법뿐 아니라 상기 변화를 검출하는 자동화된 카트리지와 키트를 제공한다.

**배경 기술**

[0002] DNA 미스매치 수리 (MMR)는 복제 또는 재조합 중 또는 일부 형태의 DNA 손상 수리 중에 발생할 수 있는 유전체로의 염기의 잘못된 삽입 또는 결실 ("인텔")을 인식하고 수리하기 위한 다양한 요소를 가진 진화적으로 보존된 시스템이다. 상기과 같은 MMR의 손상은 유전체 불안정성과 상관관계가 있으며, 따라서 암 진행과 관련이 있다는 증거가 있다.

[0003] 실제로, MMR-결핍은 백혈병, 난소, 췌장 또는 위의 암을 포함하는 몇몇 암 유형에서 기술되어 왔고, 모든 자궁내막 (EM) 또는 대장(CRC) 암의 2 내지 5 %를 차지하는 린치 암- 감수성 증후군(Lynch cancer-susceptibility syndrome)의 원인이라고 알려져 왔다(Jiricny, 2006). 중요하게, MMR-결핍 증양은 표준 암 치료법에 따라 각각

상이한 예후와 치료 결과를 나타낸다(Ng and Schrag, 2010). 예를 들어, CRC 환자의 MMR-결핍 증양은 CRC의 첫 번째-선택 화학요법인 5-플루오로우라실-기반 화학요법에 치료효과가 없는 것으로 나타났다(Fischer et al., 2007). 또한, MMR-결핍 증양은 EM 암 치료에서 자주 사용되는 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)에 내성인 경향이 나타난다(Hewish et al., 2010). 마지막으로, 이들 증양은 상대적으로 빠르게 표적 치료법에 대한 저항성이 나타나고, 이는 아마도 증가된 돌연변이 가능성과 다른 항암 방어에 잠재적으로 영향을 줄 수 있는 2차 돌연변이의 획득이 용이하기 때문으로 여겨진다.

[0004] MMR-결핍이 암 치료에 대한 환자의 반응에 영향을 미치는 것으로 나타났기 때문에, 상기 MMR-결핍의 효과적인 검출은 잠재적으로 환자에 대한 효과적인 치료방법 및 생존에 중요한 결과를 가져올 수 있다. MMR 경로에 영향을 미치는 돌연변이의 복잡성으로 인해, 임상 실습에서 MLH1, MSH2, MSH6 또는 PMS2와 같은 MMR 유전자의 선택된 돌연변이에 대한 상세한 스크리닝을 수행하는 것보다 DNA 복제의 오류라는 직접적인 결과를 스크리닝하여 MMR-결핍을 검사하는 것이 일반적이다(Peltomaki, 1997). DNA 복제에서의 이러한 오류는 미소부수체라 하는 짧은 tandem 반복 서열에서 길이 변이의 변화인 미소부수체(microsatellite) 불안정성 또는 MSI 라 불리는 현상에서 가장 잘 나타난다.

[0005] 미소부수체는 전형적으로 인접한(즉, tandem에서 반복된) 1 내지 5 개 뉴클레오타이드의 DNA 모티프가 5-내지-50회 반복된 지역이다. 미소부수체는 전체포유류 유전체에 널리 분포되어 있으며 비 암호화 부분에 가장 많이 위치한다. 이런 이유 때문에 많은 미소부수체는 생물학적으로 잠재(silent)되어 있으며 DNA 지문분석이나 다른 식별 목적으로 사용될 수 있는 세대에 걸친 무해한 돌연변이를 추적할 수 있다. 그러나, 주변 조직에서는 나타나지 않으나, 개인의 단일 조직에서 다수 미소부수체에서 하나 이상의 미소부수체 반복 단위의 클론의 결실 (삭제) 또는 증가(삽입)가 나타날 수 있는데, 이는 결합있는 복제의 특징이며 MMR 장애 및 암 발생의 경향을 강력하게 암시한다(Pinol et al., 2005).

[0006] 현재, MSI 분석의 황금 표준은 25 및 26 뉴클레오타이드 길이인 2 개의 모노- 또는 호모폴리머 (BAT25, BAT26) 및 3 개의 디뉴클레오타이드 반복체 (D2S123, D5S346, D17S250)를 포함하는 적어도 5 개의 미소부수체 마커 길이의 검출을 위한 PCR-기반 검사를 포함한다(Boland et al, 1998). 이 5 가지 MSI 마커의 패널은 메릴랜드 주 베데스다(Bethesda)에 있는 국립 암 연구소 연구 워크샵에서 처음 제안되었으며, 현재 베데스다 패널로 널리 알려져 있다. 샘플을 베데스다 패널로 검사하여 마커의 30 % 이상 (5 개 마커 패널에서 2 개 이상)이 불안정한 것으로 테스트되면 고-빈도의 MSI 또는 "MSI-H" 표현형으로 지정된다. 5 개 중 하나 (또는 암 표지 인자의 30 % 미만)가 MSI 양성인 경우, 샘플은 MSI-낮음 또는 "MSI-L"로 지정된다. 마지막으로 마커가 발견되지 않으면 샘플은 MSI-안정 또는 "MSS"로 간주된다(Boland et al, 1998).

[0007] 현재의 MSI검사가 표준임에도 불구하고, 베데스다 패널은 특히 대장암 이외의 초기의 암에 대한 민감도가 낮은 경향이 있다(Boland et al, 1998). 따라서, 대안 마커가 예를 들어 Murphy et al, 2006 및 Garcia-Alfonso 2012, 및 WO2013153130 문헌에 언급된 것을 포함하여 광범위하게 시험되고 있다.

[0008] 현재 알려진 치료방법의 또 다른 단점은 복잡함의 정도, 표준 실험실 열 순환장치를 넘어서는 특수기구의 필요성 및 자동화에 대한 제한된 실현 가능성이다. 현재 MSI에 대한 기존의 검출 기술은 다음 원리 중 하나를 적용한다 : (i) Bethesda 패널 마커를 검출하기 위한 형광 표지된 프라이머의 사용 후, 모세관 전기이동; (ii) dsDNA-끼어들기(intercalating) 염료를 사용한 5 Bethesda 패널 마커의 고-해상도 용융 곡선 분석; (iii) 상이한 길이의 대립 유전자 질량 분석 검출; 및 (iv) 큰 DNA 영역 (예를 들어, exome)의 차세대-시퀀싱 후, 돌연변이의 수를 세는 것.

[0009] 예를 들어, (i) 초기 PCR-기반 베데스다 스크리닝 전략은 효과적이고 직접적인 자동화를 불가능하게 하는 전문적인 관찰자의 해석을 필요로 한다. 다음으로, (ii) 긴 Bethesda 패널 마커를 사용하는 dsDNA-끼어들기(intercalating) 염료를 사용한 고-해상도 용융 곡선 분석은 표준 PCR 열 순환 장치에 기본적으로 적용할 수 있지만, 중복된 신호를 생성하지 않도록 각각의 마커 애플리콘의 용융 온도를 충분히 달리할 필요가 있기 때문에 한 번에 여러 가지 MSI 마커를 스크리닝하기 힘든 매우 제한적인 멀티플렉싱 능력을 가지고 있다. 또한, 이 전략은 정상 및 돌연변이 대립형질 사이의 이형2중가닥의 형성에 의존하기 때문에, 다른 대안에 비해 덜 민감하다. 다음으로, (iii) 질량 분석법 기반의 방법(Zhao et al, 2014)은 원칙적으로 자동화가 가능하지만 데이터 해석을 위해 특수 장비 및 고도로 숙련된 인력이 필요하다. 마지막으로, iv) 차세대-시퀀싱 (NGS)에 의한 MSI 상태 검출 및 관찰된 돌연변이의 수를 세는 것은 선택적인 마커만으로 유전체 또는 exome에서 MSI를 높은 민감도로 매우 많은 수의 영역을 관찰할 수 있다는 이점을 갖는다. 그러나, 이 방법은 원칙적으로 적어도 부분적인 자동화가 가능하지만 현재까지는 매우 비싸고 특수화된 NGS 장비가 필요하며 많은 양의 데이터가 생성되기

때문에 시간이 많이 걸리고 복잡하며 또한 이를 해석할 전문가가 필요하다.

[0010] 따라서, 현재 존재하는 MSI 상태를 검출하기 위한 모든 기술들은 제한된 검출 능력, 비용 및 처리 시간, 또는 특수화된 부가적인 장비 및 고도로 숙련된 전문가의 결과 해석에 대한 필요성과 관련된 단점을 갖는다. 본 발명은 임의의 표준 정량적 PCR 열 순환 장치에 의해 사용될 수 있는 짧은 호모폴리머릭 미소부수체에서 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하기 위한 고감도, 멀티플렉싱-적합성 및 완전히 자동화 가능한 방법을 제공함으로써 상기 문제점들을 해결한다. 본 발명의 상기 이점 및 다른 장점이 하기에 계속해서 제시된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명은 첨부된 독립항들로 정의된다. 바람직한 양태는 종속항들에서 정의된다. 특히, 본 발명은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열(homopolymeric nucleotide repeat sequence)에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하는 방법으로서,

[0012] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계;

[0013] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 적어도 하나의 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 프로브에 의해 생성된 신호의 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계; 및

[0014] - 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계;에 관한 것이다.

[0015] 특히 바람직한 양태로, 본 발명의 방법은 후-PCR 분석을 위한 추가 장비를 필요로 하지 않으면서 표준 정량적 PCR 열순환 장치에서 짧은 호모폴리머릭 반복 영역에서 길이 변화를 검출하는 형광-표지된 프로브를 사용한다. 따라서, 특히 바람직한 양태에서, 신호-발생 시약은 적어도 하나의 표지된 (즉, 신호-발생) 올리고뉴클레오티드 프로브, 바람직하게는 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 상보적인 서열 및 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서열 및 이의 특이적 측면 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 분자 비콘 프로브이다. 가장 바람직하게는, 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열은 야생형 형태 대비 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 있어서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함하는 돌연변이 형태의 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하기 위한 키트, 바람직하게는 카트리지 형태의 키트를 제공하며, 상기 키트는 적어도 하나의, 바람직하게는 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 각각은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 상이한 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하며; 바람직하게는 상기 키트는 또한 교정용 증합효소를 포함한다. 바람직하게는, 상기 분자 비콘 프로브 각각은 상이한 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 혼성화가 가능할 수 있고, 그리고 상기 상이한 표적 호모폴리머릭 반복 서열 각각의 적어도 단일 호모뉴클레오티드 결실 돌연변이 서열에 동일하거나 또는 상보적일 수 있는 서열을 포함한다.

[0017] 마지막으로, 본 발명은 특히 암 환자의 샘플에서 미소부수체 불안정성(MSI), 검출을 위하여 본 발명에 제공된 방법, 키트 및 / 또는 카트리지의 용도를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 본 발명의 본질에 대한 완전한 이해를 위해, 첨부된 도면과 관련하여 다음의 상세한 설명이 참조된다.

도 1 : TMEM65 호모폴리머릭 반복 서열에서 상이한 호모뉴클레오티드 수를 가지는 3 개의 표적 서열에 혼성화하는 TMEM65-특이적 분자 비콘 프로브에 대한 온도 함수에서의 혼성화 동역학을 특징으로 하는 용융 곡선 (도 A) 및 용융 피크 (도 B)를 나타내었다;

도 2 : 10 개의 야생형 (WT) 샘플과 미소부수체 안정성 (MSS) 샘플 (검정색 곡선, TMEM65 반복 길이 11) 및 10 개의 미소부수체 불안정성 (MSI-High [MSI-H]) 샘플 (회색 곡선, TMEM65 반복 길이 10)에서 TMEM65 미소부수체 안정성 상태를 특징으로 하는 용융 피크를 나타내었다;

도 3 : 임의로 선택된 2 개의 MSS 샘플 MSS1 및 MSS2에 대한 Tmem65 프로브의 용융 피크를 나타내었다;

도 4 : 무작위로 선택된 3 개의 MSI-H 샘플 (MSI-H 1-3)에 대한 Tmem65 프로브의 용융 피크를 나타내며, MSS 1 샘플의 MSI-안정성으로부터 얻은 Tmem65 프로브 용융 피크를 각각 나타내었다;

도 5 : Q5 중합효소의 엑소뉴클레아제 활성에 내성인 줄기(도 A) 또는 Q5 중합효소가 분해하는 줄기 (도 B)를 포함하는 ABAT-마커-특이적 분자 비콘 프로브의 용융 피크를 나타내었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0019] 본 발명은 적어도 10 개의 뉴클레오티드, 즉, 베테스다(Bethesda) 패널 마커 BAT25 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열보다 짧은 뉴클레오티드에서 존재하는 뉴클레오티드 수(예컨대, +/- 1 nt)의 매우 미세한 변화를 검출하기 위한 새로운 방법, 키트 및 카트리지에 관한 것뿐 아니라 그것들의 용도에 관한 것이다. 이와 동일하게, 본 발명은 예를 들어 W02013153130 호에 기재된 일 예와 같은 짧은(<15 bp, 바람직하게는 <12bp) 호모폴리머릭 미소부수체 마커의 불안정성을 검출하기 위한 방법, 키트 및 카트리지만 아니라 그의 용도를 제공한다.
- [0020] 특히, 본 발명은 길이가 15bp, 바람직하게는 12bp와 동일하거나 그보다 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하는 방법에 관한 것으로, 다음의 단계를 포함한 방법에 관한 것이다:
- [0021] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계;
- [0022] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하는 적어도 하나의 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 프로브에 의해 생성된 신호의 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계; 및
- [0023] - 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계.
- [0024] 본 발명에서 제공한 방법은 임의의 표준 정량적 PCR 열 순환 장치에 완벽하게 자동화 및 적용시킬 수 있다는 이점을 가지고 있어, 통상의 실험실 직원이 특별한 훈련 필요 없이 수행할 수 있다. 이외에, 상기 방법은 매우 민감하고, 멀티플렉싱-적합하며, 검출된 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열 및 그의 변이체의 상대적 양의 추정치를 제공할 수 있다.
- [0025] 현재 존재하는 MSI 검출을 위한 방법들은 다음과 같은 단점을 갖는다 :
- [0026] (a) 반복 길이를 결정하기 위하여 후-PCR 분석을 수행하기 위한 추가적인 특수 장비의 필요성 및 / 또는 분석이 일반적으로 고도로 숙련된 전문가에 의해 해석될 필요성; 또는
- [0027] (b) dsDNA-끼어들기 염료를 이용한 고해상도 용융 곡선의 경우, 상이한 앰플리콘으로부터 용융 신호 중복을 피하기 위한 멀티플렉싱 능력이 매우 제한되어 있고, 또한, 불안정한 서열(돌연변이)과 안정한 서열(야생형)의 상대적 양을 수량화할 수 있는 능력이 제공되지 않는 단점.
- [0028] 본 출원은 각 마커를 상이한 형광 채널에서 검출할 수 있어, 돌연변이체에 고감도인 형광 표지된 프로브를 사용하여 용융 곡선 분석을 수행함으로써 상기와 같은 결점을 극복한다. 그 감수성 구현 예로서 특히 바람직한 경우, 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 프로브 내 서열은 표적 호모폴리머릭 반복 서열의 돌연변이 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하고, 상기 돌연변이는 야생형(즉, 예상된) 형태 대비 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함한다.
- [0029] 상기와 같이, 바람직한 구현 예에서, 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열(homopolymeric nucleotide repeat sequence)에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화를 검출하는 방법을 제공하며, 이 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0030] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열 및 이의 특이적 측면 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계;
- [0031] - 호모폴리머릭 반복 서열 및 이의 측면 서열에 특이적으로 혼성화하는 프로브에 의해 생성된 신호를 검출하는 단계; 및
- [0032] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계.

- [0033] 상기 방법은 상기 프로브가 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서열의 돌연변이 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 돌연변이 서열은 예상되는 야생형 형태의 표적 호모폴리머릭 반복 서열 대비 표적 호모폴리머릭 반복 서열 내에 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함한다.
- [0034] 본원에 사용된 용어 "핵산" 및 이의 등가 "폴리뉴클레오티드"는 본 명세서에서 뉴클레오티드 서브 유닛 사이의 인산디에스테르 결합을 포함하는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 핵산은 DNA 및 RNA, 예를 들면, 유전체 DNA(genomic DNA), 미토콘드리아 DNA 또는 meDNA, cDNA, mRNA, rRNA, tRNA, hnRNA, 마이크로 RNA, lncRNA, 및 이들의 다양한 변형된 형태를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 핵산은 여러 종류의 생물체에서 수득한 생물학적 샘플과 같은 천연 소스로부터 일반적으로 수득할 수 있다. 한편, 핵산은 공지된 임의의 인간이-고안한 방법 (예를 들어, PCR) 중 임의의 방법으로 합성, 재조합 또는 상이하게 생산할 수 있다.
- [0035] 당연히, 바람직한 구체 예에서, 증폭을 바람직하게는 중합 효소 연쇄 반응 또는 예를 들어 열 순환 장치와 같은 PCR을 수행하기 위한 수단을 사용해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 보다 나은 자동화 목적을 위해, PCR은 신호 생성 시약으로부터 생성된 신호의 용이한 모니터링을 제공하기 위해 qPCR을 수행하는 수단을 사용할 수 있다.
- [0036] 용어 "정량적 PCR" 또는 간단하게 "qPCR"은 표적 DNA 분자를 증폭하고 동시에 검출 또는 정량화하는데 사용하는 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)에 기초를 둔 실험실 기술로 본 명세서에서 정의하였다. 반응 생성물이 반응의 후반부, 즉 열 순환이 완료된 후에서 검출되는 표준 PCR과 달리, qPCR의 핵심 특징은 반응이 "실시간"으로 진행됨에 따라 열이 순환되는 동안 DNA 생성물이 검출된다는 것이다; 따라서, qPCR을 대체하는 이름은 "실시간 PCR"이다. 현재 많은 종류의 qPCR이 존재한다. 예를 들어, 역전사(RT) 단계를 시작할 때, qPCR을 전령 RNA(messenger RNA)의 수를 정량화하기 위하여 사용할 수 있으며, 이를 역전사 효소(reverse transcriptase) qPCR 또는 RT-qPCR이라고 한다. 본원에서 사용한 "정량적 PCR" 또는 간단히 "qPCR"이라는 용어는 자주 "RT-PCR"로 생략되는 역전사 PCR과의 혼란을 피하기 위하여 "실시간 PCR" 또는 "RT-PCR"용어 대신에 사용하였다. 대부분의 qPCR은 실시간으로 생성물 증폭을 검출하기 위하여 가장 일반적인 두 가지 방법 중 하나를 사용한다: (a) 임의의 이중 가닥 DNA에 비특이적 형광 염료를 삽입, 또는 (2) 표적 서열과 상보적인 프로브와 혼성화된 후에만 검출을 허용하는 형광 리포터로 표지된 올리고뉴클레오티드로 구성된 서열-특이적 DNA 프로브. 열순환하는 동안 생성된 형광 신호를 적절한 광학 검출 시스템을 통하여 검출하고, 반응이 역치 값을 넘어선 순간부터 반응이 안정기에 도달할 때까지 관측한다. 표적 서열의 카피 수는 상대적인 또는 절대적 정량화 전략을 사용하여, 일반적으로 수득된 증폭 곡선의 형태를 분석함으로써 (표준 곡선 전략) 또는 신호가 어떤 역치 값 (중종 Ct 값, 중종 또한 Cp 값 또는 Cq 값으로 불린다) 이상으로 상승할 때를 측정함으로써 추정될 수 있다. 상대적인 정량화에서, Ct 또는 표준 곡선 분석을 사용하여 주어진 샘플에서 추정된 표적 핵산 수준을 또 다른 기준 샘플, 예를 들어 미처리 대조군 샘플에서 동일한 표적에 대해 수득된 값에 비례하여 나타내었다. 반대로, 절대적 정량화에서 qPCR 신호는 표준 곡선을 사용하여 입력한 카피 수와 관련되어 있으며, 이는 보다 최근의 디지털 PCR 방법에 따라 계산될 수 있다. 현재까지, 첫 번째 전략이 여전히 더 널리 활용되며, 이는 이전에 작성한 표준 곡선과 얻어진 값을 비교하여 표적 DNA 양을 추정하는 것을 기초로 한다. 상기 및 다른 qPCR 정량화 전략은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 상기 값의 계산은 주어진 응용 프로그램 및 qPCR 시스템에 따라 더 작거나 더 커질 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용된, "정량적 PCR을 수행하기 위한 수단"이라는 용어는 qPCR을 수행하기 위한 시약 및 요건의 최소 필요 조건을 의미한다. 상기 수단은 보통 실시간 PCR 열순환에서 핵산 소스로부터 수득한 핵산 주형을 검출할 수 있도록 하는 모든 시약을 포함한다. 상기 시약은 qPCR의 유형에 의존하지만, PCR-등급 중합효소, 적어도 하나의 프라이머 세트, 검출 가능한 염료 또는 프로브, dNTPs, PCR 완충액 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, "정량적 PCR을 수행하기 위한 수단"은 알려진 업계 최소 부품의 조합을 포함할 수 있고, 다음을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: (1) 실시간으로 검출 가능한 열 순환이 일어나는 적절한 구획 ("열순환 qPCR 구획"으로 추가적으로 지칭됨). 상기 구획은 예를 들어, 핵산 증폭에 적합한 챔버로 형성될 수 있으며, 즉 적절한 재료로 제조되고, 내부 온도 조절을 충분하게 제공하고, 또한 증폭하는 동안 발생된 신호의 실시간 검출을 가능하게 하는 적어도 하나의 벽, 예를 들어 빛이 투과되는 벽을 또한 포함한다. 또한, (2) 기존의 다양한 열순환 기계로부터 널리 알려진, 상기 챔버 또는 다른 구획에서 온도를 변화시키는 수단. 다음으로, (3) 컴퓨터 등에 결합된 광 검출기와 같은, qPCR 열순환 동안 생성된 신호를 검출하는 수단. 요약하면, 상기 최소 조합은 열순환 qPCR 구획에서 열순환 반응을 개시 및 유지하고, 안정한 열 순환 조건 등을 보장하기 위해 온도를 조절 및 조정할 수 있는 시스템 또는 임의의 당업계에 공지된 시스템을 포함할 수 있다.; 또한, 적절한 검출 장치 또는 데이터 처리 수단 장치(예 : 데이터베이스에 연결된 컴퓨터의 대안) 및 실시간으로 qPCR 반응의 열 순환을 읽고 모니터링 할 수 있는 출력 시스템(예 : 적절한 그래픽 사용자 인터페이스에서 반응의 진행을 표시하는 컴퓨터

스크린); 게다가 기계 조작 및 / 또는 수득한 결과의 해석 및 표시에 적합한 임의의 소프트웨어 패키지를 포함할 수 있다.

- [0038] 원칙적으로, 가능한 양태로, 용융 곡선 분석을 수행하기에 적합한 임의의 표적-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브를 본 발명의 방법에서 사용할 수 있다. 바람직한 공지된 프로브는 형광단 및 소광제로 구성된 한 쌍을 포함할 수 있으며, 루프 또는 헤어핀과 같은 2차 구조를 유리하게 형성할 수 있다.
- [0039] 바람직한 일 양태에서, 적어도 하나의 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브는 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브이다. 분자 비콘 프로브, 또는 분자 비콘은 표적 핵산 서열에 결합할 때 형광이 복원되는 내부적으로 소광된 형광단을 갖는 헤어핀 형태의 분자이다. 이러한 이유로, 분자 비콘은 중합효소의 작용에 의해 분해되지 않으며 용융 곡선 콜링을 통해 그들의 표적에 대한 혼성화 동력학을 연구하는데 사용될 수 있다. 전형적인 분자 비콘 프로브는 약 25 개의 뉴클레오티드 길이지만, 더 길 수도 있다. 보통, 중간 15개 뉴클레오티드가 핵산 표적과 상보적인 반면, 각 말단의 5개 뉴클레오티드는 서로 상보적이기 때문에 비콘은 루프 또는 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 표적에 혼성화되지 않은 분자 비콘은 4 개의 구조적 부분으로 나눌 수 있다 : (1) 표적 서열에 상보적이고 혼성화하는 18-30 bp 영역의 루프; (2) 상보적으로 서로 결합된 루프 양 끝의 5-7 뉴클레오티드 말단으로 형성된 줄기(stem); (3) 분자 비콘의 5' 말단에 공유 결합된 형광단; (4) 분자 비콘의 3' 말단에 공유 결합된 소광제. 비콘이 그의 표적에 혼성화되지 않고 헤어핀 구조로 폐쇄될 때, 상기 구조는 소광제가 염료의 형광 방출을 차단하여 신호가 생성되지 않도록 만든다. 그러나 혼성화가 일어나면, 표적 핵산과 분자 비콘의 루프 사이에 이중가닥이 형성되어 헤어핀 구조를 파괴하고, 염료에서 소광제를 제거하며 궁극적으로 형광 신호를 생성한다.
- [0040] 상기 실시 양태의 바람직한 실시 양태에서, 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브는 표적 호모폴리머릭 반복 서열에서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함하는 호모폴리머릭 반복 서열 돌연변이와 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다. 상기 분자 비콘 설계는 중합효소 미끄러짐 오류(polymerase slippage errors)가 발생하였으나, 반면 동시에 적어도 하나의 호모뉴클레오티드가 더 긴 반복 서열을 갖는 야생형 (즉, 예상된) 마커 형태에 충분히 민감성을 유지하는, 고감도의 선택된 MSI 마커를 특이적으로 검출할 수 있도록 한다. "표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열"이란 용어는 MSI가 존재하지 않는 예상된 조건의 야생형 또는 기준 호모폴리머릭 반복 서열임을 의미한다. 반대로, "돌연변이 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열"은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 삽입 또는 결실을 포함하는 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열을 의미한다.
- [0041] 주어진 분자 비콘 프로브의 하나의 호모폴리머릭 반복 마커 및 그의 불안정한 (돌연변이) 변이체에 대하여 부여된 특이성으로 인해, 적어도 2 개의 분자 비콘 프로브가 하나의 반응 튜브 또는 구획에서 사용되도록 멀티플렉싱 분석의 설계가 가능하다.
- [0042] 따라서, 특히 바람직한 실시 양태에서, 제1 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브와 다르게 표지된 적어도 제2 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하고, 상기 제2 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열과는 상이한 제2 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열과 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다.
- [0043] 특히 바람직하게는 특이적 분자 비콘 프로브를 사용한다. 따라서, 바람직한 실시 양태에서, 제2 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열은 상기 제2 표적 호모폴리머릭 반복 서열에서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드의 결실을 포함하는 돌연변이 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0044] 호모폴리머릭 반복 영역을 증폭하는 동안, 중합효소 미끄러짐이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이것은 반복 뉴클레오티드의 본래의 수를 복제하는데 있어서 증폭된 PCR 산물에 인공적인 결실 또는 삽입의 축적을 야기하여 실수를 일으킨다. 따라서, 본 발명의 방법의 다른 바람직한 실시 양태에서, 앰플리콘을 생성하는 단계는 교정용 중합효소, 즉 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소를 포함하는 PCR로 수행한다. 공지된 상업적으로 이용 가능한 다수의 PCR-등급의 중합효소를 사용한다. 예로는 Q5, Pfx, Pfu, Ex Taq 등과 같은 중합 효소를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0045] 상기 양태의 또 다른 예로, 교정용 중합 효소의 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성이 야기할 수 있는 잠재적 위협으로부터 올리고뉴클레오티드 프로브를 보호하기 위해, 그들이 분해되지 않도록 비콘을 구조적으로 변형시키는 것이 유리하다. 따라서, 본 발명의 방법의 특히 바람직한 실시 양태에서, 특히 분석 안정성 관점에서, 적어도 하나의 신호-생성 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브는 3'-5' 엑소뉴클레아제에서 상기 프로브를 보호하는 구조적 특징

또는 변형을 포함하며, 상기 구조적 특징 또는 변형은 바람직하게는 하기에서 선택될 수 있다:

- [0046] - 프로브의 3' 말단에서 역전된 dT;
- [0047] - 프로브의 3' 말단에서 마지막 3 개 뉴클레오티드 중 어느 하나 앞에 위치하는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합.
- [0048] 교정용 중합효소에 따라, 일부 교정용 중합효소는 특정 서열로 제조된 줄기를 가진 특정 분자 비콘을 분해하지 않는 것을 확인하였다. 이러한 예상치 못한 발견은 분자 비콘 줄기가 그들의 시퀀스에 따라 상이한 3D 구조를 갖기 때문에 발생한다. 따라서, 일부 교정용 중합효소는 교정용 중합효소의 촉매 중심과 비친화적인 구조인 분자 비콘 줄기 구조를 공격할 수 없다는 가설을 세울 수 있다. 상기 메커니즘에 관계없이, 우리는 어떤 유형의 분자 비콘 줄기의 제공은 그들이 특정 교정용 중합효소의 3'-5' 엑소뉴클레아제의 활성화에 완전히 영향을 받지 않을 수 있도록 만든다는 것을 확인하였다. 상기과 동일하게, 대안적인 실시 양태에서, 서열-특이적 프로브가 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브이고, 보호 구조의 특징 또는 변형은 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성 저항성 줄기인 것인 방법이 제공된다. 상기 줄기는 당업계에 공지된 임의의 클로닝 또는 핵산 재결합 기술에 의해 원하는 분자 표지에 용이하게 삽입할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 방법의 주요 장점 중 하나는, 특히 공지된 표준 qPCR 시스템에 대하여 간단히 자동화 및 적용하는 것이다. 따라서, 특히 바람직한 실시 양태에서, 하기의 단계의 본 발명의 방법은 자동화된 시스템으로 제공된다 :
- [0050] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계;
- [0051] - 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 신호의 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계; 및
- [0052] - 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계.
- [0053] 이러한 자동화를 위한 특히 적합한 시스템은 Biocartis Idylla 플랫폼으로, 샘플 처리의 자동화를 추가로 제공한다.
- [0054] 바람직하게는, 본 발명의 상술된 양태에 따른 방법이 제공될 수 있으며, 상기 방법은 :
- [0055] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산 소스를 제공하는 단계로, 상기 소스는 바람직하게는 생물학적 샘플인 것인;
- [0056] - 상기 핵산 소스 유래의 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- [0057] - 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계; 중 임의의 단계가 선행된다;
- [0058] 적어도 다음의 단계들이 자동화된 시스템에서 수행된다:
- [0059] - 핵산 소스 유래의 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- [0060] - 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계.
- [0061] 추가적으로, 상기 양태에서 특히 바람직하고 필요한 최소한의 취급방법 및 기술 준비 양태로 적어도 다음의 단계들의 방법들이 상기 자동화된 시스템과 결합 가능한 카트리지 내에서 수행되는 방법들을 제공할 수 있다 :
- [0062] - 핵산 소스로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 핵산을 유리 및 / 또는 분리하는 단계;
- [0063] - 앰플리콘을 생성하는 단계에 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 잠재적으로 포함하는 상기 유리된 및 / 또는 정제된 핵산을 제공하는 단계;
- [0064] - 표적 호모폴리머릭 반복 서열을 포함하는 핵산 서열을 증폭시킴으로써 앰플리콘을 생성하는 단계; 및
- [0065] - 신호-발생 올리고뉴클레오티드 프로브의 존재하에 생성된 앰플리콘을 가열하고, 온도 함수로 상기 신호 강도의 변화를 검출하여 적어도 하나의 용융 곡선을 얻는 단계.

- [0066] 본원에 사용한, 용어 "카트리지"는 챔버 및 / 또는 채널의 자체-포함 조립체를 의미하며, 이는 상기 카트리지를 받아들이거나 연결하는데 적합한 큰 기구의 내부 또는 외부 하나의 부품으로서 이송되거나 이동될 수 있는 단일 물체로 이루어진다. 카트리지에 포함된 일부 부품은 단단히 연결될 수 있는 반면, 다른 부품은 카트리지의 다른 구성 요소에 대해 유연하게 연결되고 이동이 가능할 수 있다. 유사하게, 본원에서 사용한 "유체 카트리지"라는 용어는 유체, 바람직하게는 액체의 처리, 공정, 배출 또는 분석에 적합한 적어도 하나의 챔버 또는 채널을 포함하는 카트리지를 의미한다. 상기 카트리지의 예는 W02007004103에 개시되어 있다. 바람직하게는, 유체 카트리지 는 미소유체(microfluidic) 카트리지 일 수 있다. 유체 카트리지와 관련하여 "하류" 및 "상류"라는 용어는 상기 카트리지에서 유체가 흐르는 방향과 관련하여 정의할 수 있다. 즉, 유체가 동일한 카트리지 내의 제 2 섹션을 향하여 흐르는 카트리지 내의 유체 경로의 섹션은 유체가 후자보다 상류 측에 위치하는 것으로 해석한다. 유사하게, 유체가 나중에 도착하는 섹션은 유체가 앞서 통과한 섹션에 대해 하류에 위치한다.
- [0067] 일반적으로, 본원에서 사용되는 용어 "유체" 또는 때로는 "미소유체"는 기하학적으로 작은, 보통 적어도 하나 또는 두 개의 치수(예 : 너비 및 높이 또는 채널)가 서브-밀리미터-스케일로 제한된 유체의 움직임, 제어 및 조 작을 다루는 시스템 및 장치를 지칭한다. 상기 소량의 유체는 작은 크기 및 낮은 에너지 소비를 요구하는 마이크로 스케일에서 이동, 혼합, 분리 또는 이와 다른 방식으로 처리된다. 미소유체 시스템은 미세 공압 시스템 (압력 공급원, 액체 펌프, 마이크로 밸브 등) 및 마이크로, 나노 및 피코 리터 체적(미소유체 채널 등)을 처리 하기 위한 미세유체 구조물과 같은 구조를 포함한다. 예시적인 유체 시스템은 EP1896180, EP1904234 및 EP2419705에 기재되어 있으며, 따라서 본 발명의 특정 구현 양태로 적용할 수 있다.
- [0068] 진술한 양태에 따른 특히 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 방법의 결과의 해석을 간소화하고 용이하게 하기 위해, 용융 곡선에 대한 분석을 또한 컴퓨터로-구현된 소프트웨어의 수단에 의하여 자동화된 방법으로 수행할 수 있다. 상기 소프트웨어를 특정 표적에 대한 특정 프로브의 혼성화를 특징으로 하는 정의된 용융 피크(또는 변곡점)의 특징적인 위치를 인식하도록 지시할 수 있고, 이는 상기 프로브 및 표적 쌍에 대해 얻어진 용융 곡선의 음의 1차 도함수를 플로팅함으로써 획득할 수 있다. 따라서, 또 다른 바람직한 실시 양태에서, 적어도 하나의 용융 곡선으로부터 표적 호모폴리머릭 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 추론하는 단계는 상기 용 융 곡선의 1차 도함수의 적어도 하나의 피크의 위치 또는 상대적인 위치를 평가함으로써 수행할 수 있으며, 그 리고 가장 바람직하게는 완전히 자동화된 방식으로 수행할 수 있다.
- [0069] 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 특히, 본 발명은 길 이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드 수 의 변화를 검출하기 위한 키트를 제공하며, 상기 키트는 적어도 하나의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브, 바람직하게는 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 각각은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하 거나 또는 짧은 상이한 표적 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 혼성화 할 수 있는 서열을 포함하며, 바람 직하게는 고정용 증합효소를 또한 포함한다. 바람직하게는, 상기 복수의 분자 비콘 프로브 각각은 특정 표적 호 모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열(바람직하게는 다른 분자 비콘에 의해 표적화된 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열과 상이한)에 혼성화할 수 있는 서열을 포함하고, 야생형 형태 대비 상기 표적 호모폴리머릭 반복 서 열에 있어서 적어도 하나의 호모뉴클레오티드를 빠뜨리는 형태의 돌연변이 형태 (즉, 결실)의 서열과 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다.
- [0070] 바람직한 실시 양태에서, 카트리지의 형태의 키트를 제공한다. 따라서, 바람직하게, 본 발명의 키트는 적어도 하나의, 바람직하게 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브 및 바람직하게는 또한 고정용 증합효소를 제 공하고, 그리고 자동화 시스템과 결합 가능한 카트리지를 제공한다. 진술한 바와 같이, 카트리지 및 자동화된 시스템과 결합할 수 있는 카트리지의 적절한 예는 Biocartis Idylla 플랫폼이다. 이에 대한 상세한 내용 및 본 발명 시스템과 유사하게 적용 가능한 시스템은 W02007004103, EP1896180, EP1904234 및 EP2419705에서 찾을 수 있다. 본원에 인용된 문헌으로부터 알 수 있는 바와 같이, 바람직한 카트리지는 PCR을 수행하기 위한 수단을 포 함할 뿐만 아니라 핵산 또는 샘플 소스를 직접 받아들일 수 있도록 설계하고, 상기 핵산 소스로부터 핵산을 유 리시키고, 이후의 PCR-기반의 분석을 위해 유리된 핵산을 제공(예를 들어 펌핑함으로써)할 수 있다.
- [0071] 본원에서 사용한 용어 "핵산 소스"는 액체 또는 고체인지 여부를 불문한 핵산을 포함하거나 포함할 것으로 예상 되는 임의의 물질을 의미한다. 핵산 소스는 결찰(ligation) 생성물, 전기영동 마커 (소위 "사다리 (ladder)", 프라이머 스톡 (primer stock) 등을 포함하는 많은 다른 종류의 용액과 같이 합성물 또는 재조합 핵산을 포함하 는 인위적으로 제조된 용액일 수 있다. 그러나 가장 일반적으로 핵산소스는 생물체 또는 세포 형태 또는 그들의 유도체로부터 수득한 생물학적 샘플일 수 있고, 바람직하게는 환자로부터 수득한 임상 샘플일 수 있다.

- [0072] 본원에 사용한 용어 "생물학적 샘플" 또는 간단히 "샘플"은 생물체로부터 새로이 수득(즉, 갓 채취한 조직 샘플)했는지 또는 당업계에 공지된 임의의 방법 (예를 들어 FFPE 샘플)에 의해 보존한 것인지 여부에 관계없이 핵산 및 / 또는 세포 물질을 함유하는 다양한 생물학적 소스를 포함하는 것을 의미한다. 생물학적 샘플의 예로는 포유 동물 세포뿐만 아니라 진핵 세포 미생물, 체액, 체액 침전물, 세척 표본, 미세 바늘 흡인물, 생검 샘플, 조직 샘플, 암 세포, 환자로부터 얻은 상이한 유형의 세포, 질병 또는 감염으로 진단 받은 및 / 또는 치료를 받는 개인의 조직 또는 시험관내 배양 세포 또는 법의학 샘플을 포함한다. 체액 샘플의 비 제한적인 예는 전혈, 골수, 뇌척수액 (CSF), 복강액, 흉막액, 림프액, 혈청, 혈장, 소변, 유미, 대변, 정액, 가래, 수유관액, 타액, 면봉 표본, 세정액 또는 세척액 및 / 또는 브러시 표본을 포함한다.
- [0073] 생물학적 샘플을 시스템에 제공하거나 본 발명의 방법을 수행하는 동안, 핵산이 방출되는 용해물을 제공하기 위하여 통상적으로 조성물과 접촉시킨다. 본원에 사용한 "접촉"은 샘플과 조성물의 결합, 노출, 배양 또는 혼합을 의미한다. "방출"이란 가교-결합의 해제, 획득 및 / 또는 역전을 말한다. 샘플로부터 핵산을 유리시키기 위해, 조성물은 프로테아제 활성 및 pH-완충이 요구될 수 있다. 방출은 조사된 샘플에 존재하는 조성물 유래의 핵산 이외의 성분의 침전 및 고정제의 제거/용해의 잠재적인 활성이 필요할 수 있다. 방출은 가열이나 초강도초점성 초음파 (HIFU)와 같은 조건이 필요할 수 있다. 본 발명에 따른 일 양태에서, 생물학적 샘플은 진단 분석기와 같은 자동화 시스템과 호환 가능한 카트리지에 도입되며, 다양한 용액과의 접촉 및 핵산의 방출을 포함하는 샘플 처리 단계가 발생한다.
- [0074] 또한, 용어 "생물학적 샘플로부터 핵산을 유리 또는 정제하는 수단"은 세포 또는 생물학적 샘플의 다른 구조로부터 핵산을 유리시키는데 사용할 수 있는 것으로 알려진 당업계에 공지된 임의의 다수의 또는 화학적 시약 및 / 또는 물리적 요소인 것으로 의미하며, 그리고, 정제의 경우, 상기 핵산을 불필요한 샘플 파편으로부터 보통 수용액에서 수용 가능하게 순수한 형태 (상기 용어 "수용가능하게"는 상기 정제된 핵산의 추가적인 목적에 의존함)로 충분히 분리시키는 것을 의미한다. 상기 목적에 적합한 화학 시약은 예를 들어, 당업계에 공지된 세척제 및 / 또는 세척제를 포함하는 완충액, 카오트로픽시약(chaotropic agent), 뉴클레아제 저해제 등을 포함할 수 있고, 이들은 조직 또는 세포를 파괴 및 / 또는 액화시키는데 사용하여, 그 안에 포함된 핵산을 용액으로 방출시킬 수 있다. 유사하게, 핵산 방출 / 정제의 목적을 위한 다양한 샘플 처리 방법에 사용되는 당업계에 공지된 물리적 요소는 예를 들어, 스핀 컬럼의 레진과 같은 실리카 고체 지지체, 실리카 멤브레인, 비드 등을 포함하며; 추가로 기계적인 디스럽터 또는 초음파 분쇄기등과 같은 파괴할 수 있는 에너지를 생산하는 기계를 포함한다.
- [0075] 상기와 같이, 바람직하게는, 본 발명은 길이가 15 염기쌍(bp)과 동일하거나 또는 짧은 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드 수의 변화의 자동화된 검출을 위한 카트리지를 제공하며, 상기 카트리는 하기를 포함한다:
- [0076] - 생물학적 샘플을 수용하기 위한 샘플 구획;
- [0077] - 상기 샘플 구획에 수용된 생물학적 샘플로부터 핵산을 유리 또는 정제하기 위한 수단으로서, 상기 샘플 구획과 유체 전달을 시작할 수 있는 수단;
- [0078] - 샘플 구획 및 핵산을 유리 또는 정제하는 수단의 하류에 위치한, 그리고 유리화 또는 정제된 핵산의 적어도 일부 또는 라이브러리 구획에서 제조된 핵산 라이브러리의 적어도 일부를 수용하도록 형성된 PCR 구획, 상기 열순환 PCR 구획은 추가적으로 핵산을 증폭 및 상기 증폭하는 동안 또는 증폭 후 생성된 신호의 검출에 적합한 것으로,
- [0079] 상기 카트리는 적어도 하나의, 바람직하게는 상기 기재한 바와 같은 복수의 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브 및 교정용 중합효소를, 이를 바람직하게는 PCR 구획 내에서 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0080] 바람직한 실시 양태에서, 분자 비콘 올리고뉴클레오티드 프로브 및 / 또는 교정용 중합효소를 본 발명에 따른 상기 카트리의 저장-수명 증가에 기여하는 spotted format으로 상기 카트리지 내에 제공할 수 있다.
- [0081] 마지막으로, 본 발명의 목적은 바람직하게는 미소부수체 불안정성 (microsatellite instability) (MSI), 바람직하게는 암으로 진단된 또는 암에 걸린 것으로 예상되는 환자로부터 수득한 샘플에서 미소부수체 불안정성을 검출하기 위한 본 발명에 따른 방법, 키트 및 카트리의 용도를 제공하는 것이다.
- [0082] **1. TMEM65의 MSI 마커에 대한 분자 비콘 응용 곡선**
- [0083] 호모폴리머릭 뉴클레오티드 반복 서열에서 1nt 길이의 매우 미세한 변화조차 검출하는 바람직한 실시 양태에서

의 본원에 개시된 방법의 능력을 본원에서 Chr8 : 125325217에 위치하고, 11개의 아데닌 (A)의 호모폴리머릭 반복서열을 포함하는 인간 TMEM65 마커를 사용하여 증명하였다. 야생형 (WT) 호모폴리머릭 반복 서열 (굵은 글씨 및 밑줄친) 및 TMEM65의 그의 특정 주위 서열은 하기와 같다 :

[0084] TAAATAAAATTCACTAAATAAGATATAATGAGATTAGGAGTATGAATATGGGGTATTCAGACTTATTCCATTCAGATGAGAAGATGACATCTTTGGAGGGA  
AAAAAAAACCTTACCAAATAATATAAATTGTATCTCATTAATCTTTCAAACATCACTTCAACTTCATCATTTATACCATAAACCTTCTTGACAGTTC

[0085] TMEM65의 반복 서열에서 뉴클레오티드 변화를 검출하기 위해, CGCACGAGGGAAAAAAAAAACCTTACGTGCG의 서열을 갖는 분자 비콘 검출 프로브를 설계하였고, 형광 표지 분자로서 FAM를 사용하여 표지한 반면, dabcy1을 소광제로 사용하였다. 분자 비콘 프로브의 줄기 영역은 이탤릭체로 표시하고, 프로브 혼성화 영역은 굵은체로 표시하고, 11 대신에 10 개의 아데닌 반복을 포함하는 돌연변이 TMEM65 마커와 동일한 반복 서열은 굵은 글씨체로 밑줄을 그어 표시하였다).

[0086] TMEM65-특이적 프로브가 WT TMEM65 마커 서열 및 하나의 호모뉴클레오티드가 결실 또는 삽입된 두 개의 상이한 돌연변이 대응물 모두에 대하여 결합 및 인식하는 능력을 시험하기 위해, 3 개의 TMEM65의 합성 표적을 3 개의 TMEM65 호모폴리머 반복의 다른 변이체를 갖도록 제조하였다. TMEM65-특이적 분자 비콘 프로브 (폴리-A 반복을 포함함)에 상보적인 DNA 가닥으로서 상기 변이체 가닥에 혼성화하는 3개의 변이체의 서열을 하기에 제시하였다. 상보적인 TMEM65 변이체 가닥 (폴리-T 반복체를 포함함)은 다음과 같다 :

[0087] **TMEM65\_T10 (1 bp 결실):**

[0088] AAATGATGAAGTTGAAGTGATGTTTGAAGATTAATGAGATACAATTTATATTATTTGGTAAGGTTTTTTTTTCCCTCCAAAGATGTCATCTTCTCATCTG  
 AATGGAATAAGTCTGAATAC

[0089] **TMEM65\_T11 (기준):**

[0090] AAATGATGAAGTTGAAGTGATGTTTGAAGATTAATGAGATACAATTTATATTATTTGGTAAGGTTTTTTTTTCCCTCCAAAGATGTCATCTTCTCATCT  
 GAATGGAATAAGTCTGAATAC

[0091] **TMEM65\_T12 (1 bp 삽입):**

[0092] AAATGATGAAGTTGAAGTGATGTTTGAAGATTAATGAGATACAATTTATATTATTTGGTAAGGTTTTTTTTTCCCTCCAAAGATGTCATCTTCTCATC  
 TGAATGGAATAAGTCTGAATAC

[0093] TMEM65-특이적 분자 비콘 프로브를 3 개의 개별 PCR 튜브에 200nM의 농도로 첨가하고, 표준 PCR 반응 완충액에 2500nM의 농도의 전술한 3가지 변이체 중 하나가 각각에 포함되도록 하였다. 혼합물을 Bio-Rad CFX96 장비에서 95 °C에서 2 분 동안 변성시킨 다음 15 분 동안 45 °C로 냉각시켜 분자 비콘 프로브가 표적에 혼성화되도록 충분한 시간으로 방치하였다. 그 후, 0.3 °C (사이클 당 5 초)의 단계로 혼합물을 75 °C까지 가열하여 용융 곡선 분석을 수행하고, 0.3 °C씩 상승시킬 때마다 형광을 측정하였다.

[0094] 용융 곡선 분석의 결과를 도 1에 나타내었으며, 상부 도면 A는 3 개의 표적에 대한 TMEM65-특이적 프로브의 용융 곡선을 나타내고(시간 경과에 따른 형광으로서), 하부 도면 B는 용융 피크 또는 A의 용융 곡선의 음의 1차 도함수를 나타내었다. 3 개의 용융 피크에 대한 T<sub>m</sub> 값은 다음과 같다: TMEM65\_T10의 경우 54.9 °C, TMEM65\_T11의 경우 51.3 °C, TMEM65\_T12의 경우 47.7 °C. 용융 피크의 델타 T<sub>m</sub> 값은 다음과 같다 :

[0095] TMEM65\_T10 - TMEM65\_T11 = 3.6°C

[0096] TMEM65\_T11 - TMEM65\_T12 = 3.6°C

[0097] TMEM65\_T10 - TMEM65\_T12 = 7.2°C

[0098] 이러한 결과에 기초하여, 기준 서열과 비교하여 단일 뉴클레오티드의 결실 또는 삽입이 기준 서열의 용융 피크의 T<sub>m</sub> 값과 비교(즉, T10 또는 T12 반복 대비 T11 기준 반복)할 때, 수 °C (섭씨 온도)의 용융 피크의 T<sub>m</sub> 값의 차이를 야기한다는 결론을 확인하였다. 따라서, TMEM65 유전자에서 상기 반복 서열의 길이는 상술된 분자 비콘 프로브를 그의 표적 영역에 혼성화함으로써 생성된 용융 피크의 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0099] **2. 암 환자 표본에서의 TMEM65 MSI 마커 상태 평가**

[0100] 대장암 환자 유래의 FFPE 샘플을 Biocartis Idylla 유체 카트리지에 처리하였다. 카트리지를 닫고 자동화된 PCR-기반 유전 분석을 위한 Biocartis Idylla 플랫폼에 넣은 후 자동 샘플 처리를 시작하였다. 처음으로, 환자의 DNA가 FFPE 샘플에서 방출된 후, 카트리지의 PCR 구획으로 펌핑하였다. 다음으로, TMEM65 호모폴리머 반복

서열을 둘러싸는 영역의 비대칭 PCR 증폭을 하기 프라이머를 사용하여 각 카트리지에서 수행하였다

- [0101] FWD : 5'-CAGACTTATTCATTCAGATGAGA-3' 및 REV : 5'-GAAGTGATGTTTGAAGATTAATGAGA-3'. PCR 증폭은 전술한 TMEM65-특이적 분자 비콘 프로브의 존재 하에서 수행하였다.
- [0102] PCR 후, PCR 산물을 카트리지에서 95 °C에서 2 분 동안 변성시킨 후, 45 °C에서 15 분 동안 냉각시켜 TMEM65-특이적 분자 비콘 프로브가 표적에 혼성화할 수 있을 충분한 시간으로 방치하였다. 다음으로, Idylla 시스템상에서 0.3 °C (1 사이클 당 5 초)의 단계로 40 °C에서 60 °C까지 혼합물을 가열하고 동시에 0.3 씩 상승시킬 때마다 형광 신호를 모니터링함으로써 용융 곡선 분석을 수행하였다. 용융 피크는 얻어진 용융 곡선의 1 차 도함수의 음의 값으로 계산되었다.
- [0103] 도 2에 미소부수체 안정성 (MSS)으로 여겨지는 10 개의 야생형 샘플 (흑색 곡선, TMEM65 반복 길이 11) 및 미소부수체 불안정성 (MSI-High [MSI-H])으로 여겨지는 10 개의 돌연변이체 샘플 (회색 곡선, TMEM65 반복 길이 10)으로부터 수득한 결과를 나타내었다. MSS 샘플에서 야생형 A11 피크 (± 49 °C에서)의 최고 높이는 일관되나, 반면 MSI-H 샘플에서 야생형 A11 피크와 돌연변이 A10 피크 (± 53 °C에서) 모두 높이가 가변적이다. 이것은 각 샘플에 존재하는 야생형과 돌연변이 대립 유전자의 가변 비율을 반영한다.
- [0104] 도 3 및 4에 각각 MSS 및 MSI-H FFPE 샘플의 대표적인 예를 나타내었다. 도 4 중, 3 개의 상이한 MSI-H 샘플을 도시하는 도 A 내지 C 각각에서, MSS 1은 야생형 기준을 나타내었다. 돌연변이 A10 피크 높이 (± 53 °C)가 야생형 A11 피크 높이 (± 49 °C)보다 낮기 때문에 샘플 MSI-H 1에는 야생형 대립 유전자보다 낮은 돌연변이가 포함되어 있다. 돌연변이 A10 피크 높이 (± 53 °C)가 야생형 A11 피크 높이 (± 49 °C)와 유사하기 때문에 샘플 MSI-H 2는 유사한 양의 돌연변이 및 야생형 대립 유전자를 포함한다. 돌연변이 A10 피크 높이 (± 53 °C)가 야생형 A11 피크 높이 (± 49 °C)보다 높기 때문에 샘플 MSI-H 3에는 야생형 대립 유전자보다 많은 양의 돌연변이가 포함되어 있다.
- [0105] 본원에서 제시된 결과는 본원에 기술된 바와 같이 분자 비콘 프로브를 사용하는 절차를 이용하면 대장암 FFPE 조직 생검 유래의 DNA에서 TMEM65 호모폴리머 반복 서열에 존재하는 뉴클레오티드의 수를 결정할 수 있음을 입증한다. 또한 상기 방법을 이용하면 종양 생검으로부터 DNA에 존재하는 야생형 및 돌연변이 TMEM65 반복 대립 유전자의 상대적 양을 추정할 수 있다.
- [0106] **3. 교정용 중합효소의 존재 하에서 상이한 분자 비콘 프로브의 성능**
- [0107] 기술된 방법에 있어서 보다 큰 민감도를 달성하기 위해, PCR 증폭 혼합물에 3'-5'엑소뉴클레아제 활성을 갖는 교정용 (즉, 오류 보정) 중합효소를 사용하는 것이 유용하다. 그러나, 혼합물 내의 많은 분자 비콘에 대해, 상이한 시험된 교정용 중합효소가 상이한 비콘을 분해할 수 있어, 이로 인해 신호의 부분적 또는 전체적 손실이 야기되어 신뢰성 있는 데이터 해석을 막거나 방해할 수 있다.
- [0108] 도 5에 상기 실시예를 나타내었다. 상부 도 A에 교정용 중합효소 Q5 및 MSI 마커 ABAT에서 잠재적 호모뉴클레오티드 결실을 검출하기 위해 설계된 CGCAGGAAGCTAAAAAAAAAACCCCTTCTGCG 서열을 가지는 분자 비콘 프로브 (Texas Red로 표지하고, Iowa Black FQ를 소광제로 사용)로 2 개의 임상 FFPE 샘플로부터 얻은 DNA의 용융 피크를 나타내었다. 연속적인 더 어두운 피크는 ABAT가 야생형이고 11 개의 아데닌 반복을 포함하는 MSS (안정한) 샘플에 상응한다. 동그라미가 있는 선은 곡선의 오른쪽에 더 높은 결실 피크와 왼쪽에 더 작은 WT 피크를 포함하는 MSI-H 샘플로부터 얻은 DNA의 이중 곡선을 나타낸다. WT 피크는 일반적으로 MSI-H 종양 샘플에서 관찰되는데, 이는 종양 주위 기질 유래의 WT DNA가 거의 항상 종양 조직으로 오염되기 때문이다.
- [0109] Q5 교정용 중합효소 및 전술한 ABAT-특이적 분자 비콘을 사용하는 경우, 임의의 추가적인 화학적 변형으로 상기 비콘을 추가로 보호할 필요 없이 다른 샘플을 사용하여 상기와 같은 안정한 결과를 반복적으로 얻을 수 있다. 이것은 Q5 중합효소에 결합하지 않고, 엑소뉴클레아제 활성 중심에 의해 분해되지 않는 상기 비콘 줄기의 3 차원 구조로부터 기인한다고 가정할 수 있다.
- [0110] 도 5의 하부 도면 B의 좌측에 나타난 완전히 상이한 용융 프로파일을 ABAT에 특이적이며 CCGTCCGAAGCTAAAAAAAAAACCCCTTGACGG (동일한 표지 및 소광제)의 서열을 갖는 또 다른 분자 비콘에 대한 Q5 중합효소에 의해 수득하였다. 상기 프로브는 PCR 동안 Q5 중합효소의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 효율적으로 그리고 반복적으로 분해될 수 있다. PCR 과정동안 비콘이 분해되었기 때문에 후-PCR 용융 곡선 분석하는 동안 신호를 수득할 수 없었다 (그래프는 평평하다). 도면 B의 우측은 비콘이 기능하고, PCR 동안 신호를 생성하는 것을 입증하는 동일한 프로브에 대한 qPCR 프로파일을 나타낸다. 신호가 PCR 후 용융에서 더 이상 존재하지 않지

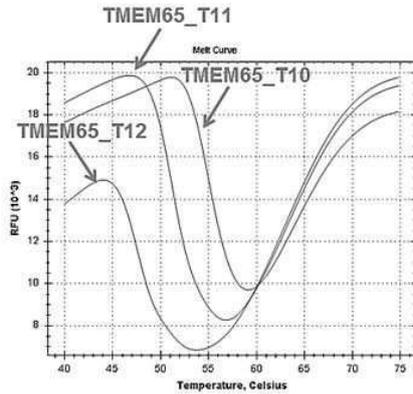
때문에 PCR 동안 생성된 신호가 비콘의 분해에 의하여 발생했음을 입증한다.

[0111]

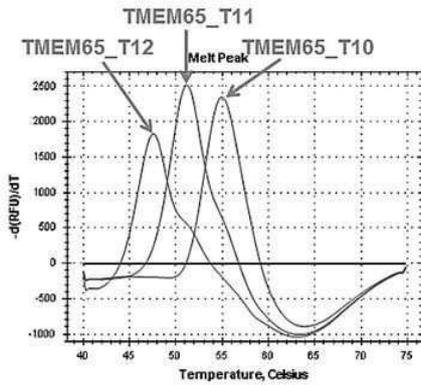
Q5 중합효소를 사용하지만 상이한 MSI 마커에 특이적인 또 다른 분자 비콘 프로브를 사용하여 PCR을 수행하는 경우에도, 주어진 비콘으로 상기 기술된 스텝 중 어느 것을 사용하는지에 따라서 2 개의 ABAT-특이적 프로브에서 나타나는 동일한 경향이 관찰될 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1

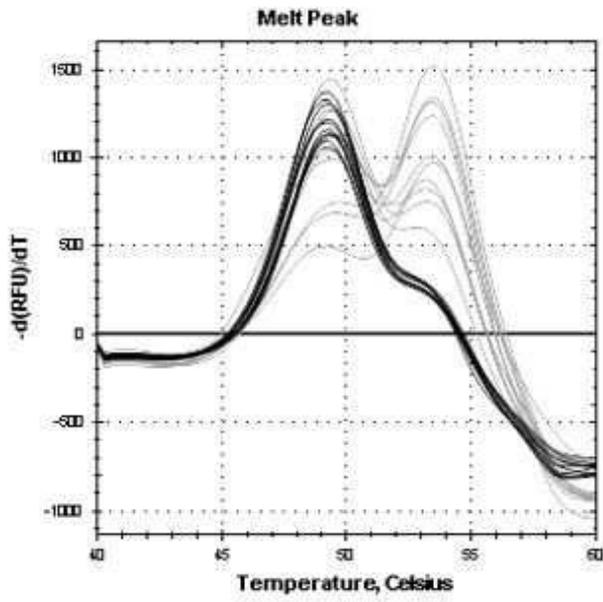


A

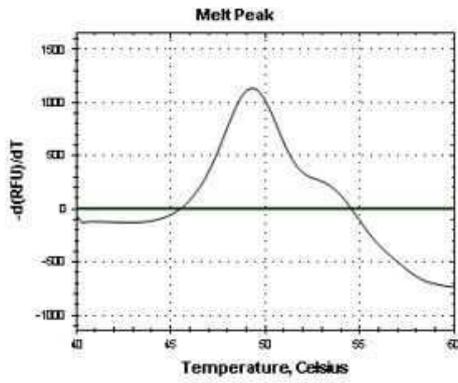


B

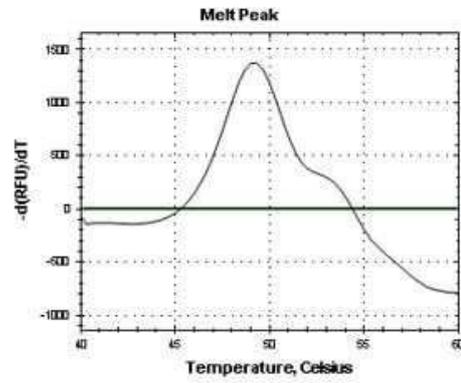
도면2



도면3

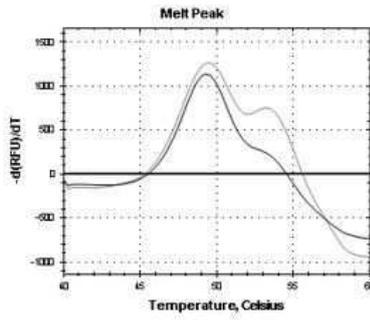


MSS 1

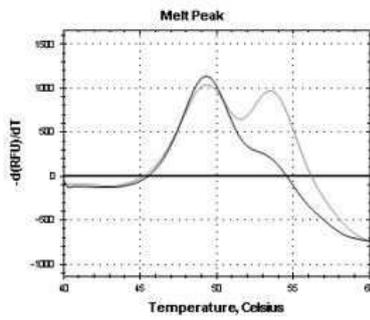


MSS 2

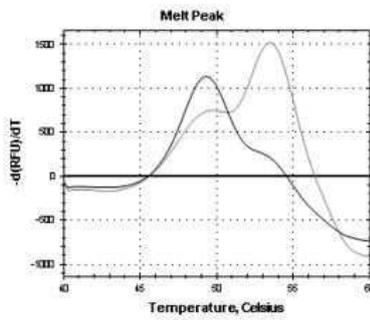
도면4



MSS 1 + MSI-H 1

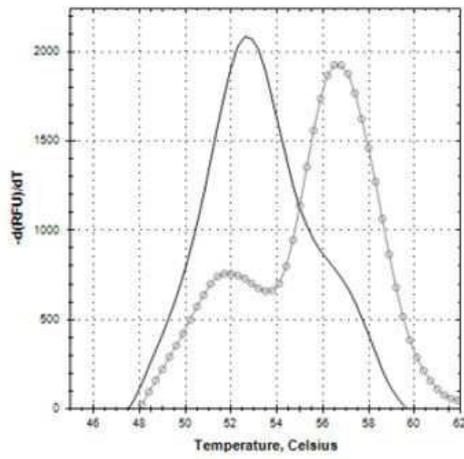


MSS 1 + MSI-H 2

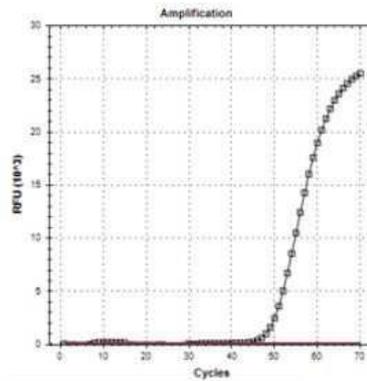
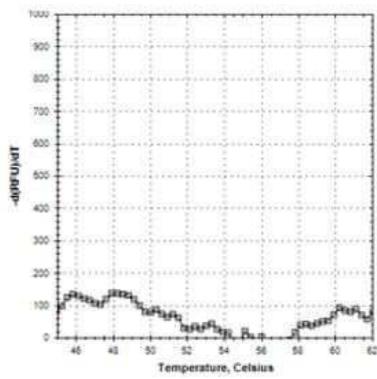


MSS 1 + MSI-H 2

도면5



A



B