



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2021년07월19일  
(11) 등록번호 10-2278401  
(24) 등록일자 2021년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2018.05)  
C12Q 2521/101 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7015966(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2015년08월24일  
심사청구일자 2020년08월06일  
(85) 번역문제출일자 2019년06월03일  
(65) 공개번호 10-2019-0065479  
(43) 공개일자 2019년06월11일  
(62) 원출원 특허 10-2017-7007188  
원출원일자(국제) 2015년08월24일  
심사청구일자 2017년03월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/046519  
(87) 국제공개번호 WO 2016/032947  
국제공개일자 2016년03월03일  
(30) 우선권주장  
62/041,197 2014년08월25일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
Acta Neuropathol. Commun., Vol. 2, No. 58  
(2014.06.02.)\*  
Oncotarget, Vol. 5, No. 6, pp. 1515-1525  
(2014.01.28.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
듀크 유니버시티  
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 스위트 406,  
2812 에르윈 로드  
(72) 발명자  
안, 하이  
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083,  
스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티  
내.  
해, 이평  
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083,  
스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티  
내.  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김순웅

전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **빈발 돌연변이의 신속도 및 민감도 검출 방법**

**(57) 요약**

IDH1/2 및 TERT 프로모터에서 신속하게, 민감하게, 그리고 특이적으로 돌연변이를 검출하는 방법은 빈번하게, 그리고 정교하게 국소화된 돌연변이를 경험하는 유전자의 특정 부분의 증폭을 사용한다. 단지 하나의 뉴클레오티드 만큼 상이한, 그리고 매우 낮은 비율로 존재할 수 있는 서열 사이를 식별하는 능력은 이러한 검정에 필수적이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2525/117 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2600/166 (2013.01)

(72) 발명자

**양, 루이**

미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083, 스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티 내.

**디플라스, 빌 헤이치.**

미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083, 스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티 내.

**한센, 랜던**

미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083, 스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티 내.

**비그너, 다렐**

미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 박스 90083, 스위트 306, 에르윈 로드 2812, 듀크 유니버시티 내.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

종양을 가진 인간의 신체 샘플의 시험 방법으로서,

대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트로 상기 인간의 신체 샘플의 종양 DNA를 증폭시키는 단계로, 상기 프라이머 세트는 서열 번호: 2, 5, 8 및 12 서열을 포함하고, 상기 프라이머는 TERT C228 또는 TERT C250; IDH1 R132; 및 IDH2 R172 영역을 증폭하는 프라이머인 것을 특징으로 하며, 신체 샘플에 상보적인 주형이 존재하는 경우 TERT 프로모터, IDH1 및 IDH2 서열을 포함하는 증폭 생성물을 생성시키며, 상기 프라이머들은 각각 3' 말단에 LNA-변형 뉴클레오티드를 포함하고 상기 증폭은 정량적 PCR 로서 수행되는 단계; 및

상기 종양 DNA의 증폭 생성물을 검출하는 단계;를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 서열 번호: 15 내지 21 서열을 포함하는 증폭 프라이머의 세트로 상기 신체 샘플에서 종양 DNA를 증폭하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 종양 DNA가 게놈 DNA인, 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 종양 DNA가 사전-증폭 처리되는 게놈 DNA인, 방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 증폭 주기의 적어도 일부가 66°C 이상에서 수행되는, 방법.

#### 청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 증폭의 상기 주기의 일부가 60°C 이하에서 수행되는, 방법.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 신체 샘플의 상기 종양 DNA의 분리된 분액이 하기를 포함한 프라이머의 세트로 증폭되는, 방법: (a) 서열 번호: 1 내지 3; (b) 서열 번호: 4 내지 6; (c) 서열 번호: 3 및 6; (d) 서열 번호: 7 내지 9; (e) 서열 번호: 9 및 10; (f) 서열 번호: 11 내지 13; (g) 서열 번호: 13 내지 14.

#### 청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 사전-증폭이 고충실도(high fidelity) DNA 폴리머라아제를 사용하는, 방법.

#### 청구항 9

제 4 항에 있어서, 상기 사전-증폭이 66°C 이상의 어닐링 온도를 사용하는, 방법.

#### 청구항 10

제 4 항에 있어서, 상기 사전-증폭이 68°C 이상의 어닐링 온도를 사용하는, 방법.

#### 청구항 11

제 4 항에 있어서, 상기 사전-증폭이 멀티플렉스 반응으로서 수행되는, 방법.

#### 청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 신체 샘플이 뇌 척수액 (CSF), 혈액, 림프, 혈청, 혈장, 소변, 타액, 점액, 및 눈물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 13**

제 1 항에 있어서, 상기 신체 샘플이 생검 샘플인, 방법.

**청구항 14**

제 1 항에 있어서, 상기 신체 샘플이 침상 흡인(needle aspirate)인, 방법.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서, 상기 각 프라이머 3' 말단의 LNA-변형 뉴클레오티드는 표적 변이 뉴클레오티드에 상보적인 것인, 방법.

**청구항 16**

제 2 항에 있어서, 서열 번호: 15 내지 21의 프라이머 중 하나 이상의 프라이머는 이의 3' 말단에 LNA-변형 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

**청구항 17**

제 2 항에 있어서, 서열 번호: 15 내지 21의 상기 프라이머의 각각이 이의 3' 말단에 LNA-변형 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

**청구항 18**

제 1 항에 있어서, 태그 서열이 상기 프라이머의 하나 이상의 상기 5' 말단에 부착되는, 방법.

**청구항 19**

제 2 항에 있어서, 태그 서열이 상기 프라이머의 하나 이상의 상기 5' 말단에 부착되는, 방법.

**청구항 20**

제 1 항에 있어서, 상기 방법은

(a) *TERT* C228T 절편 및 *TERT* C250T 절편, 및 (b) *IDH1* R132H 절편 및 *IDH1* 야생형 절편을 포함하는 *TERT/IDH1* 용 이형접합체 칼리브레이터 플라스미드의 DNA를 상기 증폭 프라이머 세트에 증폭하는 단계; 및

이형접합체 칼리브레이터 플라스미드 증폭 산물을 검출하는 단계; 를 더 포함하며,

여기서 *TERT* 프로모터 및 *IDH1* 서열을 포함하는 증폭산물을 생성하기 위하여 각각의 상기 *TERT* 절편이 동등한 양 및 크기로 존재하고, 그리고 각각의 상기 *IDH1* 절편이 동등한 양 및 크기로 존재하는 것을 특징으로 하는,

*TERT* 프로모터, *IDH1* 및 *IDH2* 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는, 방법.

**청구항 21**

종양을 가진 인간의 신체 샘플의 시험 방법으로서,

대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트에 상기 인간의 신체 샘플의 종양 DNA를 증폭시키는 단계로, 상기 프라이머 세트는 각각 3' 말단에 LNA-변형 뉴클레오티드를 포함하는 서열 번호: 2, 5, 8 및 12 서열을 포함하고, 상기 프라이머는 *TERT* C228 또는 *TERT* C250; *IDH1* R132; 및 *IDH2* R172 영역을 증폭하는 프라이머인 것을 특징으로 하며, 신체 샘플에 상보적인 주형이 존재하는 경우 *TERT* 프로모터, *IDH1* 및 *IDH2* 서열을 포함하는 증폭 생성물을 생성시키고 상기 증폭은 정량적 PCR로서 수행되는 것인 단계; 및

상기 종양 DNA의 증폭 생성물을 검출하는 단계로서, 여기서 야생형 복사본 중 0.1 % 돌연변이 게놈 DNA 복사본이 검출되며, 상기 0.1 % 돌연변이 게놈 복사본은 0 % 돌연변이 게놈 복사본과 구별되는 것인 단계;를

포함하는, 방법.

#### 청구항 22

제 1 항에 있어서, 상기 증폭 주기의 적어도 일부는 66 °C 이상에서 수행되고, 그 다음 증폭 주기의 일부는 60 °C 이하에서 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 23

제1항에 있어서, 상기 증폭시키는 단계는

서열번호: 1, 4, 7 및 11 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는 야생형 증폭 프라이머 세트를 추가로 이용하는 것이며, 상기 야생형 증폭 프라이머는 3' 말단에 LNA-변형 뉴클로티드를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 24

제1항에 있어서, 상기 증폭시키는 단계는

서열번호: 3, 6, 9, 10, 13 및 14 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는 공통의 프라이머 세트를 추가로 이용하는 것인, 방법.

#### 청구항 25

제21항에 있어서, 상기 증폭시키는 단계는

서열번호: 1, 4, 7 및 11 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는 야생형 증폭 프라이머 세트를 추가로 이용하는 것인, 방법.

#### 청구항 26

제21항에 있어서, 상기 증폭시키는 단계는

서열번호: 3, 6, 9, 10, 13 및 14 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는 공통의 프라이머 세트를 추가로 이용하는 것인, 방법.

#### 청구항 27

제21항에 있어서, 상기 종양 DNA 는 사전-증폭 처리되는 게놈 DNA 인 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 사전-증폭이 66°C 이상의 어닐링 온도를 사용하는, 방법.

#### 청구항 29

제27항에 있어서, 상기 사전-증폭이 68°C 이상의 어닐링 온도를 사용하는, 방법.

**청구항 30**

제21항에 있어서, 상기 신체 샘플이 뇌 척수액 (CSF), 혈액, 림프, 혈청, 혈장, 타액, 점액 및 눈물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 31**

제21항에 있어서, 상기 신체 샘플이 생검 샘플인 방법.

**청구항 32**

제21항에 있어서, 상기 신체 샘플이 침상 흡인 (needle aspirate) 인, 방법.

**청구항 33**

제21항에 있어서, 신체 샘플 내 종양 DNA 를 서열번호: 15 내지 21 의 서열을 포함하는 증폭 프라이머 세트로 증폭시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 서열번호: 15 내지 21의 상기 프라이머는 각각 3' 말단에 LNA-변형을 포함하는, 방법.

**청구항 35**

제1항에 있어서, 상기 대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트는 각각 서열번호: 2, 5, 8 및 12 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는, 방법.

**청구항 36**

제1항에 있어서, 상기 대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트는 증폭시키는 단계에 사용되는 서열번호: 1 내지 14 의 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 37**

제21항에 있어서, 상기 대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트는 각각 서열번호: 2, 5, 8 및 12 서열로 표시되는 프라이머들을 포함하는 방법.

**청구항 38**

제21항에 있어서, 상기 대립유전자 특이적 증폭 프라이머 세트는 증폭시키는 단계에 사용되는 서열번호: 1 내지 14 의 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 39**

삭제

청구항 40

제1항에 있어서, 야생형 복사본 중 0.1 % 돌연변이 게놈 DNA 복사본이 검출되며, 상기 0.1 % 돌연변이 게놈 복사본은 0 % 돌연변이 게놈 복사본과 구별되는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 유전자 및 생화학 분석의 분야에 관한 것이다. 특히, 신생물 샘플 및 이의 성분의 분석에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 악성 신경교종은 2012<sup>2</sup>년에 미국에서 >14,000 사망의 원인인, 성인에서 가장 흔한 1차 중추신경계 (CNS) 악성종양이다. 세계보건기구 (WHO)는, 악성종양의 그 정도를 나타내는, 신경교종을 다양한 하위유형으로 분류하고 이들을 I 내지 IV로 등급화하기 위해 사용된 수많은 조직학적 및 임상 기준을 확립시켜 왔다. 별아교세포종, 희소돌기아교세포종, 희소돌기별아교세포종, 및 교모세포종 (GBM)<sup>3</sup>을 포함하는, 확산 신경교종 (WHO 등급 II-IV)은 이들이 모든 1차 악성 뇌종양의 80%를 차지함에 따라 특정한 임상 중요성이 있다. 이들 종양은 확산되어 침투성이어서, 이는 치유적인 수술 절제를 불가능하게 한다. 추가로, 등급 II-III 확산 신경교종은 또한 더 높은 WHO 등급 IV GBM으로 발전시키는 능력을 갖는다. GBM은 성인에서 가장 흔한 악성 뇌 종양이고 최악의 생존 (중앙 전체 생존율 12-15 개월)<sup>4</sup>을 갖는다. 추가로, 동일한 조직학을 갖는 독립체 중에서, 환자 결과는 실질적으로 다양할 수 있다. 이는 1차 GBM에 의해 가장 잘 나타날 수 있어서, 더 낮은 등급으로부터 발전하는, 2차 GBM과 비교 시 새롭게 발생한다. 양쪽 종양이 조직학적으로 구별할 수 없지만, 그러나 2차 GBM의 환자 생존이 1차 GBM<sup>5</sup>의 거의 2배이기 때문에, 유전자 상으로 및 임상적으로 이들 질환은 상이하다.

[0003] 확산 신경교종의 정확한 진단은 형태학적 특징 중에서 이종성, 침습력, 반응성 실질, 및 모호성 때문에 특히 도전적이다. 이들 진단 도전은 이들 기준의 임상 용도에서 보여진 고도의 관측자간 가변성에 의해 반영된다. 4명의 신경병리학자에 의해 독립적으로 검토된 244 신경교종의 연구에서, 일치율은 52%<sup>6</sup>만큼 낮았다. 확산 신경교종의 정확한 진단은 환자에 대하여 임상 의사결정에 결정적으로 중요하다. 상기 진단은 치료 레지멘을 결정하고, 그리고 특정한 하위유형은 특정한 화학요법에 증가된 치료 반응을 보인다고 공지된다 (예를 들면, 희소돌기아교세포종 치료에 대하여 프로카바진, CCNU, 및 빈크리스틴). 추가로, 조직학적 하위유형은 환자 예후를 구술한다. 객관적, 종양 특이적 마커는 신경교종 환자에 대한 개인화된 케어의 더욱 정확한 진단, 예측 및 전달을 위하여 명확히 필요하다.

[0004] 이들 필요성을 다루기 위해, 대규모 서열분석 연구는 확산 신경교종에서 밝혀진 유전적 변이를 프로파일링하였다. 기타 중에서, 많은 변경, 예컨대 이소시트레이트 탈수소효소 1 및 2 (*IDH1/2*)<sup>1</sup>, 텔로머라제 역전사효소 (*TERT*)<sup>7</sup>의 프로모터, 알파 지중해빈혈 정신 지체 증후군 X-연결된 (*ATRX*)<sup>8,9</sup>, 드로소필라 카피쿠아 (*CIC*)의 동족체, 파 업스트림 엘리먼트 결합 단백질 1 (*FUBP1*)<sup>10</sup>에서 빈번한 돌연변이가 주목되었다. 이들 발견은 신경교종의 선명한 객관적 분자 하위유형을 확립하는데 도움을 주었다. 진단에 대한 관련성 면에서, *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2*에서 변경은 특이적 게놈 유전자좌 ("빈발(hotspot)")에서 단일 뉴클레오티드 치환으로서 이의 빈도 및 이의 발생에 대부분 기인하여 가장 유망하다. 확산 신경교종에서, 이들 돌연변이가 공-발생하는 또는 배타적으로 발생하는 정도가 신경교종 하위유형을 정의하는 것을 찾아내었다: 예를 들면, *IDH1/2* 돌연변이는 2차 GBMs의 >50%에서 발생하지만 그러나 1차 GBMs (<5%)에서 드물고 (도 1), 반면에서 *TERT* 프로모터 돌연변이는 1차 GBMs의 >80%에서 뿐만 아니라 희소돌기아교세포종의 >70%에서 발견되었다 (도 2). 더욱이, *TERT/IDH* 상태에 의해 확립된 신경교종의 유전적 하위유형이, 조직학 단독에 의한 것보다 더 효과적으로, 상이한 예후의 하위유형으로 신경교종 환자를 효과적으로 계층화하여, 객관적 시험을 하는 의사에게 더욱 적절한 치료를 안내하도록 제공한다는 것을 알아내었다 (도 3). 예를 들어, *TERT* 프로모터 돌연변이를 갖는 신경교종의 환자는 11.5 개월의 중앙 전체 생존율 (OS)을 갖고, 반면에 양쪽 *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2* 돌연변이를 갖는 환자는 125 개월의 중앙 OS를 나타낸다. 추가로, 우리의 연구는, 조직학적 분류의 모호성을 대부분 유사하게 반영하는, "혼합된 조직학" 희소돌기별아교세포종이 정상세포 ( $TERT^{WT}IDH^{WT}$ ) 또는 희소돌기신경교 ( $TERT^{MT}IDH^{MT}$ ) 특징으로 유전자 상으로 계층화

하는 것을 드러내었다 (도 3). 우리는 이들 돌연변이의 연구를 수많은 다른 종양 유형까지 확장하였고 그리고 *TERT* 프로모터 돌연변이가 다른 암, 가장 현저히 간암 (44.2%), 방광암 (66%), 점액성 지방육종 (79.1%), 및 수 모세포종 (21%)에서 또한 빈번하고, 초기 진단, 재발 및 치료적 반응 모니터링이 결정적<sup>7,11</sup>임을 알아내었다 (도 2). 유사하게, *IDH1* 및 *IDH2* 돌연변이는, 연골육종 (56%)<sup>12</sup>, 내연골종 (87%), 방추 세포 혈관종 (70%)<sup>13,14</sup>, 급성 골수 백혈병 (15%)<sup>15</sup>, 및 간내 기원의 담관암종 (22-28%)<sup>16</sup>을 포함하여, 또한 암의 다른 유형에서 높은 빈도로 밝혀졌다.

[0005] 이들 신경교종 하위유형-특이적 및 크게 반복되는 돌연변이는 *IDH1/2* 및 *TERT* 프로모터에서 이들 돌연변이를 빠르게, 민감성으로, 및 특이적으로 검출할 수 있는 진단 분석을 요구한다. 상기 도구는 이들 도전적 진단에서 신경병리학자를 도울 것이고, 더욱 정확한 예측 정보를 환자에게 제공할 것이고, 의사가 환자 종양의 독특한 분자 특징에 요법을 맞추도록 할 것이다. 추가로, 이들 유전자좌에서 *IDH1/2* 및 *TERT* 프로모터내 빈번한 돌연변이를 갖는 많은 다른 상기 언급된 암 유형에 대하여, 상기 진단 도구는 또한 이들 돌연변이의 급속 및 민감도 검출에 일조할 것이다.

[0006] 돌연변이 검출에 대한 현재 진단 노력은 생거 서열분석에 기반되고, 이는 시간이 걸리고, 고비용이며, 그리고 가장 중요하게는 좋지 못한 민감도에 의해 제한된다 (검출 ~20% 돌연변이체 대립유전자의 제한)<sup>17</sup>. 낮은 종양 백분율의 샘플 (이형접합체 돌연변이에 대하여, <40% 종양은 <20% 돌연변이체 대립유전자를 암시한다)은 제한된 민감도 때문에 돌연변이 결핍으로서 오진될 수 있다 (도 4, 5). 낮은 종양 백분율의 상기 시나리오는 확산 신경교종 및 다른 악성종양의 맥락에서 매우 현실적이다. 확산 신경교종의 고유한 이종성 및 침습성 성질에 더하여, 종양 생김은 최소 종양 조직을 함유할 수 있어서, 좋지 못한 샘플링을 유도한다. 괴사는 사용가능한 조직을 또한 제한할 수 있는 많은 암에 공통인 특징이다. 이들 제한은 유의미한 진단적 및 예후적 의미를 갖고 잘못유도된 요법을 초래할 수 있어서, 임상 용도에 부적절하게 만든다.

[0007] 임상 분석을 더욱 빠르게, 더욱 민감도있게, 및 더욱 특이적으로 하기 위해 필요성이 계속된다.

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명의 일 측면에 따르면 종양을 갖는 인간의 신체 샘플의 시험 방법이 제공된다. 인간의 신체 샘플의 종양 DNA는 증폭 프라이머의 세트로 증폭된다. 각 증폭 프라이머는 서열 번호: 1-14로부터 선택된 서열을 포함한다. *TERT* 프로모터 및 *IDH1* 및 *IDH2* 서열을 포함한 증폭 생성물은 그렇게 함으로써 생성된다. 그 후에, 증폭 생성물은 검출된다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면 *TERT/IDH1*용 이형접합체 칼리브레이터 플라스미드(calibrator plasmid)가 제공된다. 플라스미드는 (a) *TERT* C228T 절편 및 *TERT* C250T 절편, 및 (b) *IDH1* R132H 절편 및 *IDH1* 야생형 절편을 포함하고, 여기에서 각각의 *TERT* 단편은 동등한 양 및 크기로 존재하고, 여기에서 각각의 *IDH1* 단편은 동등한 양 및 크기로 존재한다. 플라스미드는 당해 다른 유전자좌, 예컨대, 비제한적으로, 다른 *IDH1* 및 *IDH2* 돌연변이, 및 당해 다른 유전적 유전자좌의 선택적 선형화 및 부가를 가능하게 하는 각 절편 사이에서 제한 부위를 갖는다.

[0011] 본 발명의 한 측면은 하기 단계를 포함하는, 하기 단계로 이루어지는, 또는 하기 단계로 본질적으로 이루어지는 대상체내 *IDH1/2* 및/또는 *TERT* 프로모터에서 돌연변이의 검출 방법을 포함한다: (a) 대상체로부터 신체 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 샘플은 하나 이상의 종양 DNA를 포함하는, 단계; (b) 하나 이상의 핵산 프라이머를 샘플에 제공하는 단계; (c) 하나 이상의 프라이머를 이용한 하나 이상의 DNA 템플레이트의 증폭용 효소 및 시약을 제공하는 단계; (d) 하나 이상의 DNA 템플레이트의 증폭에 적합한 조건 하에서 샘플, 효소, 시약, 하나 이상의 프라이머를 인큐베이션하는 단계; (e) 증폭된 뉴클레오티드를 검출하는 단계; 및 (f) *IDH1/2* 및/또는 *TERT* 프로모터에서 돌연변이를 식별하는 단계.

[0012] 일부 구현예에서, 하나 이상의 프라이머는 표 1A, 표 1B 및 표 2, 및 이들의 조합에서 발견된 프라이머로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0013] 다른 구현예에서, 효소 및 시약은 표 4에서 발견된 것을 포함한다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 샘플은 표 3에 따른 조건 하에서 인큐베이션된다.

[0015] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 포유동물이다. 다른 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0016] 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 뇌 척수액 (CSF), 조직, 세포, 생검, 혈액, 림프, 혈청, 혈장, 소변, 타액, 점액, 및 눈물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 샘플은 조직 생검을 포함한다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 CSF를 포함한다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 소변을 포함한다. 일부 구현예에서 생물학적 샘플은 혈장을 포함한다.

[0017] 명세서 판독시 당해 분야의 숙련가에 명백할 이들 및 다른 구현예는 강력한, 급속한, 및 재생가능한 분석을 종래 기술에 제공한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

### 발명의 효과

#### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1. 상이한 종양 유형을 거친 IDH1 및 IDH2에서 돌연변이. IDH1 및 IDH2 돌연변이는 확산 신경교종 (WHO 등급 II-III) 및 2차 GBM (WHO 등급 IV)<sup>1</sup>에서 빈번하게 발생한다.
- 도 2. 종양 하위유형<sup>7</sup>의 큰 패널을 거친 TERT 프로모터 돌연변이의 빈도.
- 도 3. 확산 신경교종용 TERT/IDH 기반 유전적 분류. 우세한 유전적 특징은 하기를 포함한다: 조직학적 회소돌기 아교세포종으로 주로 구성된, TERT<sup>MUT</sup>IDH<sup>MUT</sup>; 진행성 별아교세포종으로 구성된, TERT<sup>WT</sup>IDH<sup>MUT</sup>; 1차 GBMs로 구성된, TERT<sup>MUT</sup>IDH<sup>WT</sup>; 및 GBMs로 구성된, TERT<sup>WT</sup>IDH<sup>WT</sup>. 적색은 C228T 또는 C250T에서 TERT 프로모터 돌연변이를 나타내고; 녹색은 IDH1의 R132 또는 IDH2의 R172에서 돌연변이를 나타낸다.
- 도 4. 암 환자로부터 샘플링 조직의 잠재적 사안. 위음성은 정상 조직의 배경에서 종양 세포의 낮은 백분율로부터 또는 다른 암 세포의 배경에서 아클론성 종양 세포 집단으로부터 비롯될 수 있다.
- 도 5. 명시된 돌연변이를 갖는 게놈 DNA의 회색에 관한 생거 서열분석 크로마토그램. <20% 돌연변이체 대립유전자 분획에서, 돌연변이체 대립유전자에 대한 피크는 임상 샘플용, 특히 불균질성 및 침습성인 확산 신경교종용 상기 접근법을 제한한, 배경으로부터 구별할 수 없게 된다.
- 도 6은 LNA 프라이머를 이용한 대립유전자-특이적 qPCR의 개요를 나타낸 도식이다.
- 도 7은 PGL3-enh 벡터에 기반된 TERT 프로모터 C228/C250T 및 IDH1 R132H 이형접합체 칼리브레이터 플라스미드를 보여준 개략도이다. TERT C228T, C250T 및 IDH1 R132H는 각 플라스미드에서 50%의 비로 존재하고, 각 표적의 300 bp는 pGL3-enh 플라스미드로 클로닝된다. 유전자좌는 서로 3kb 거리를 두어 프라이머의 반응성을 거쳐 제한한다. 당해 추가의 유전적 유전자좌는 돌연변이의 재생가능한 돌연변이체 대립유전자 분획을 발생시키기 위해 이들 단편과 함께 부가될 수 있다.
- 도 8. pgl3-enh 벡터에서 서로 ~3kb 떨어진 부위로 클로닝된, TERT 프로모터 C228T/C250T 및 IDH1 R132H 이형 접합체 칼리브레이터 플라스미드의 상세한 도식
- 도 9. 다양한 돌연변이체 대립유전자 분획 (10%, 1%, 0.1%)에 대한 표적 돌연변이의 회색. 이들 범위를 거쳐, 대립유전자-특이적 분석은 탁월한 선형성 ( $R^2 > 0.994$ )을 보여준다.
- 도 10. TERT/IDH 대립유전자-특이적 LNA qPCR 시험은 0.1% 돌연변이체 대립유전자 분획 (~15 돌연변이체 복사본)을 검출한다.
- 도 11. 템플레이트로서 사전-증폭된 gDNA의 단지 50 ng을 이용하는 동안, 내포된 포맷에서 TERT/IDH 대립유전자

-특이적 LNA qPCR은 높은 식별력을 보유한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 본 발명자들은 신속하게, 특이적으로, 및 민감성으로 *TERT* 프로모터, *IDH1/2* 빈발 돌연변이를 검출할 수 있는 고민감성 정량적 PCR (qPCR)-기반 분석을 개발하였다. 상기 qPCR-기반 진단 분석은, 예컨대 돌연변이체 DNA가 0.1% 돌연변이체 대립유전자만큼 낮은 경우, 정상 DNA의 높은 배경에서 돌연변이체 DNA를 검출할 수 있다. 이는 생거 서열분석에 기반된 전통적 방법보다 200-배 더 높은 민감도이다. 상기 검출 제한은 다른 비싼, 시간이 걸리는 및 복잡한 기술 예컨대 비밍(BEAMing)과 유사하지만, 그러나 qPCR 분석은, 단일 PCR 단계를 필요로 하는, 수 시간 동안 실시될 수 있다. 상기 분석의 민감도 때문에, 순환형 증양 DNA (ctDNA)에서 돌연변이 검출을 허용한다. ctDNAs는 암 환자의 혈액, 소변, 및 CSF에서 매우 제한된 양으로 종종 발견되지만, 그러나, 환자가 수술적 처치 없이 진단될 수 있음을 통해, "액체 생검"으로서 사용됨의 약속을 유지한다. 증양 재발 또는 약물 내성 개발은 이들 체액을 조사함으로써 모니터링될 수 있다. 분석은 비제한적으로 체액 이용이지만, 그러나, 더 많은 전통적 조직 및 생검 샘플 상에서 유사하게 사용될 수 있다.
- [0021] 상기 기술은, CSF, 혈장, 혈청, 소변, 및 다른 체액으로부터 추출된 DNA를 포함하여, 증양 조직으로부터 뿐만 아니라 "액체 생검" 샘플로부터 추출된 DNA에서 *IDH1*, *IDH2*, *TERT* 프로모터 돌연변이 중 빈발 돌연변이를 검출하기 위해 적용될 수 있다. 게다가, 이들 돌연변이의 식별은, 간 및 방광암, 피부암 (흑색종, 편평상피 및 기저세포 암종), 급성 골수 백혈병, 담관암종, 연조직 증양 (내연골종(echondroma), 연골육종, 방추 세포 혈관종, 점액성 지방육종, 비정형 섬유화색종, 점액성 지방육종) 및 갑상선암을 포함하여, 뇌종양 뿐만 아니라 이들 돌연변이가 빈번한 많은 다른 증양 유형에 관련된다.
- [0022] 신체 샘플은 증양 DNA를 함유한 신체의 임의의 편리한 및 확장가능한 부분일 수 있다. 이는, 혈청 또는 혈장, 소변 타액, 점액, 및 눈물을 포함하여, 증양 조직, 주변 조직, 생검 샘플, 전이성 샘플, 림프, 뇌 척수액, 혈액일 수 있다. 증양을 함유한 특정한 장기를 유출하는 다른 유체는 또한 샘플링 및 시험될 수 있다. DNA는 신체 샘플에서 시험될 수 있거나, 또는 당해 기술에서 공지된 기술을 이용하여 추출될 수 있다. DNA는 *TERT* 프로모터, *IDH1*, 및 *IDH2*에서 돌연변이를 위하여 시험하기 위해 증폭에 앞서 사전-증폭될 수 있다. DNA는 분석물의 더 큰 분율로 표적 서열을 만들기 위해 이질적인 서열이 결실될 수 있다. 시험되는 DNA는, 비제한적으로 미토콘드리아 DNA, 증폭된 DNA, 및 cDNA를 포함하여, 게놈 DNA일 수 있다.
- [0023] 분석의 일부로서, 증폭 주기는, 더 높은 수준의 엄격성 및 특이성을 도입하기 위해, PCR에 관례적인 고온에서 수행될 수 있다. 고온은, 예를 들어 적어도 66°C, 적어도 67°C, 적어도 68°C, 적어도 69°C, 적어도 70°C, 적어도 71°C, 적어도 72°C, 적어도 73°C, 적어도 74°C, 또는 적어도 75°C일 수 있다. 유사하게, 사전-증폭 단계를, 사용된다면, 상기 상승된 온도에서 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 저온 증폭 주기는 초기 고온 주기 이후 사용될 수 있다. 저온 주기는, 예를 들어 60 도, 60°C 미만, 59°C 미만, 58°C 미만, 57°C 미만, 56°C 미만, 55°C 미만, 54°C 미만, 53°C 미만, 52°C 미만, 또는 51°C 미만에서 수행될 수 있다.
- [0024] 멀티플렉스 반응은 분석에서 편리한 경우 특정한 환경에서 사용될 수 있다. 프라이머 쌍의 1 초과 세트의 멀티플렉스 환경은 동일한 반응 혼합물에서 동시에 사용된다. 일부 경우에서 소수의 프라이머 쌍을 이용하거나, 또는 단일 프라이머 쌍을 이용하여, 반응이 덜 복잡성하도록 증폭을 분리시키는 것이 바람직할 수 있다. 아래에서 기재된 바와 같이, 분석의 단일 반응은, 예를 들면, 야생형 및 돌연변이체 특이적 프라이머 및 공통의 프라이머를 갖는 프라이머 트리오를 이용할 수 있다. 이는 다중 상이한 게놈 단편의 멀티플렉스보다, 단일 반응으로 여겨질 수 있다.
- [0025] 분석에서 LNA-변형 뉴클레오티드는 특이성을 강화하기 위해 프라이머의 3' 말단에서 전형적으로 사용된다. 프라이머는 표적 게놈 단편에 상보적이지 않은 추가의 서열을 또한 가질 수 있다. 추가의 서열 또는 태그는 분석의 편의용으로 사용될 수 있다. 예로서, 및 이하에서 논의된 바와 같이, M13 서열은 프라이머를 이용하여 형성된 증폭산물의 서열분석을 촉진시키기 위해 프라이머의 5' 말단에 부가된다. 태그 서열은 식별 및/또는 정량화를 위하여 혼성화 태그로서 사용될 수 있다. 태그 서열은 임의의 추가의 기능성 또는 무 기능성을 위하여 사용될 수 있다. 표적에 대해 상보적인 추가의 뉴클레오티드는 민감도에 관한 최소 효과를 갖는 프라이머의 5' 말단에 또한 부가될 수 있다.
- [0026] 고충실도 폴리머라아제는 증폭 반응의 정확도에 기여하는데 사용될 수 있다. 많은 상기 폴리머라아제는 당해 기술에 공지되어 있고 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 예시적인 DNA 폴리머라아제는 하기를 포함한다: Fidelity™ DNA 폴리머라아제, Easy-A™ 고-충실도 PCR 클로닝 효소, Herculase® II 융합 DNA 폴리머라아제,

Herculase® 향상된 DNA 폴리머라아제, PfuUltra™ 고-충실도 DNA 폴리머라아제, ACCUZYME™ DNA 폴리머라아제, VELOCITY™ DNA 폴리머라아제, Vent™ (엑소-) DNA 폴리머라아제, KAPA HiFi HotStart™ DNA 폴리머라아제, 및 Pfx50™ DNA 폴리머라아제.

[0027] 분석의 표적인 돌연변이가 *TERT* C228T 및 C250T로 칭해지는 동안, 이들 지정의 보체는 상보적 뉴클레오티드를 평가하기 위해 동일한 위치에서 또한 분석될 수 있다. 비록 R132 및 R172가 전반에 걸쳐 언급되어도 IDH1/IDH2에 대하여 유사하게, 분석은 센스 가닥에 관한 명명된 돌연변이의 상보적 뉴클레오티드를 검출하기 위해 상보적 가닥 상에서 실시될 수 있다.

[0028] 상기 개시내용은 일반적으로 본 발명을 기재한다. 본원에서 개시된 모든 참조문헌은 참고로 명확히 편입된다. 더욱 완벽한 이해는 단지 실례의 목적을 위하여 본원에서 제공되는 하기 구체적인 예를 참고로 수득될 수 있고, 그리고 본 발명의 범위를 제한할 의도는 아니다.

[0029] 실시예

[0030] *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2* 빈발 돌연변이 AS LNA q-PCR 분석:

[0031] A. 배경:

[0032] 대립유전자-특이적 PCR은 당해 변화를 함유한 템플레이트의 선택적 증폭 및 따라서 SNP 유전형분석<sup>18</sup>용 방법을 위하여 사용된 DNA 템플레이트 증폭의 형태이다. 대부분의 방법은 당해 유전자형을 갖는 표적 서열에 대해 더 높은 상보성을 갖는 식별성 프라이머에 의존한다. 이는 돌연변이의 위치에 있도록 및 표적 변이체 또는 야생형 뉴클레오티드에만 상보적이도록 프라이머의 3'를 강제함으로써 가장 빈번하게 실시된다. 이런 식으로, PCR 효율은 프라이머가 선택적 증폭을 전달하는 비-표적 대립유전자에 결합하는 경우 감소된다 (도 6).

[0033] 상기 분야에서 주요 진전은 잠금 핵산 (LNA)으로서 공지된 이들 대립유전자-특이적 프라이머의 3' 말단에서 교대 핵산의 사용이 되어 왔다. LNA는 핵산의 2'-O와 4'-C 사이에서 메틸렌 가교를 갖는 핵산 유사체이고, 이는 C3'-말단 형태로 리보오스 모이어터를 잠금하는 바이사이클릭 구조를 발생시킨다. 상기 식별은 LNA 염기가 이의 보체로 혼성화하는 경우  $T_m$ 을 증가시켜, 이의 표적 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성에 대하여 프라이머의 특이성을 증가시킨다 (대부분의 공급원은 적어도 9 주기 더 큰 차이 LNA 대 DNA를 나타낸다)<sup>19</sup>. 상기 플랫폼은, 기타 적용 중에서, 박테리아 종<sup>20</sup>, 낭포성 섬유증 유전적 변이<sup>19</sup>, *BRAF* 돌연변이<sup>21</sup>, HBV 약물 내성 돌연변이<sup>22</sup>, 미토콘드리아 돌연변이 (MELAS 및 NARP에서)<sup>23</sup>의 식별의 맥락에서 대립유전자 식별력에 대하여 이용되어 왔다.

[0034] 비록 다른 접근법이, TaqMan LNA 프로브<sup>24</sup>, 고해상도 용융 곡선 분석 (전통적<sup>25</sup> 및 FRET-기반<sup>26</sup>), SNaPshot<sup>27,28</sup>, 파이로서열분석<sup>29</sup>, COLD PCR HRM<sup>30</sup>, 및 SafeSeq<sup>31</sup>를 포함하여, 생거 서열분석에 대한 대안으로서 *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2*에서 돌연변이 검출용으로 사용되어 왔지만, 이들 기술은 자원 집중적이거나 또는 민감성 부족이므로 진정한 임상 진단으로서 실제적이지 않다.

[0035] B. *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2* 빈발 돌연변이 AS LNA q-PCR 분석:

[0036] 프라이머 설계

[0037] 우리는 양쪽 *TERT* 프로모터 및 *IDH1/2* 뿐만 아니라 증폭에 필요한 이의 비-대립유전자 특이적 대향하는 프라이머에서 가장 빈번한 돌연변이의 검출용 진단으로서 사용하기 위하여 수많은 대립유전자-특이적 프라이머를 설계하고 시험하여 왔다 (표 1A). 특히, 이들 고성능, 대립유전자-특이적 (AS) 프라이머를 확립하기 위해 우리는 가변 길이를 갖는 10개가 넘는 상이한 후보자 AS 프라이머를 설계하였고, 도입된 미스매치 (3'-1 및 -2 위치)를 강제하였고, 그리고 이들 프라이머의 식별력을 개선하기 위한 시도로 LNA의 위치를 가변시켰다. 상기 식별력 능력을 시험하기 위해, 우리는 최저 15 복사본 또는 0.1% 정상 DNA의 배경에서 종양 DNA의 표준 희석을 사용하였고 여전히 특이적 생성물을 생산하면서 qPCR에 관해 최고  $\Delta Ct$ 를 갖는 프라이머를 평가하였다. 또한, 우리는 *TERT* 프로모터의 상기 영역을 특이적으로 증폭시키는 및 단편화된 DNA 공급원 (즉, 포매된 포름알데하이드 고정 파라핀 (FFPE), ctDNA)을 증폭시킬 수 있는 작은 충분한 증폭산물 (<160 bp)을 생성하는 배경 없이 PCR 생성물을 생산하기 위해 다시 20개 넘는 상이한 후보자 대향하는 프라이머를 시험하였다. 다른 대향하는 프라이머는 또한 후보자 AS 프라이머와 함께 작동하지만, 그러나 우리는 qPCR을 촉진시키기 위해 최소 증폭산물을 선택하였다 (표 1, 2). 마지막으로 우리는 극도로 드문 *IDH1* R132 돌연변이 R132C,G,S,L) 및 *IDH2* R172 돌연변이

(R172M,W,G)를 위하여 유사한 대립유전자-특이적 프라이머를 또한 개발하였지만 그러나 비록 이들이, 신경교종에서 적용을 위하여, 사용될 수 있어도, IDH1 R132H 프라이머 세트는 가장 많이 사용된다.

**표 1A:** 가장 공통 TERT 프로모터 (C228T, C250T), IDH1 (R132H), 및 IDH2 (R172K) 핫스팟 돌연변이의 검출 및 정량화용 고성능 대립유전자-특이적 프라이머 (\*주석: + 나타냄). M13 태그 (TGTAACGACGCGCCAGT; 서열 식별 번호: 28) 및 CAG GAA ACA GCT ATG ACC; 서열 식별 번호: 29)는 시퀀싱을 촉진시키기 위해 공통 프라이머의 5' 말단에 추가되었다.

서열 식별 번호:	프라이머 명칭	프라이머 서열 (5'→3')	길이
1	TERT C228 AS LNA WT	CTGGGAGGGCCCGGA+G	16
2	TERT C228T AS LNA MUT	CTGGGAGGGCCCGGA+A	16
3	TERT C228 공통	GTCCTGCCCTTCACCTTC	19
4	TERT C250 AS LNA WT	CCCGTCCCGACCCCT+C	16
5	TERT C250T AS LNA MUT	CCCGTCCCGACCCCT+T	16
6	TERT C250 공통 2	CAGCGCTGCCTGAAACTC	18
7	IDH1 R132 AS LNA WT	GGGTAACCTATCATCATAGGTC+G	25
8	IDH1 R132H AS LNA MUT	GGGTAACCTATCATCATAGGTC+A	25
9	IDH1 R132 공통	AACATGCAAAATCACATTATTGCC	24
10	IDH1 R132 공통 2	ATCCCCGGCTTGTGAGT	18
11	IDH2 R172 AS LNA WT	AAGCCCATCACCATTGGCA+G	20
12	IDH2 R172K AS LNA MUT	AAGCCCATCACCATTGGCA+A	20
13	IDH2 R172 공통	AGGTCAGTGGATCCCCTCTC	20
14	IDH2 R172 공통 2	GGACCAAGCCCATCACCATT	20

[0038]

**표 1B:** 희귀 IDH1 및 IDH2 돌연변이용 고성능 대립유전자-특이적 프라이머 (주석 상기 프라이머 세트는 1A 에서와 같이 동일한 반대 공통 프라이머를 사용한다).

서열 식별 번호:	프라이머 명칭	프라이머 서열 (5'→3')	길이
15	IDH1 R132C AS LNA MUT	GGGTAACCTATCATCATAGGT+T	24
16	IDH1 R132G AS LNA MUT	GGGTAACCTATCATCATAGGT+G	24
17	IDH1 R132S AS LNA MUT	GGGTAACCTATCATCATAGGT+A	24
18	IDH1 R132L AS LNA MUT	GGGTAACCTATCATCATAGGTC+T	25
19	IDH2 R172M AS LNA MUT	AAGCCCATCACCATTGGCA+T	20
20	IDH2 R172W AS LNA MUT	AAGCCCATCACCATTGGC+G	19
21	IDH2 R172G AS LNA MUT	AAGCCCATCACCATTGGC+T	19

[0039]

**표 2:** TERT 프로모터 및 IDH1/2 유전자형화용 대립유전자-특이적 qPCR 검정을 위한 프라이머 세트

**TERT: C228 및 C250**

프라이머 1	프라이머 2	표적 크기	앰플리콘 크기*	목적
TERT C228 AS LNA WT 또는 C228T AS LNA MUT	TERT C228 공통	101 bp	119 bp	WT/MUT TERT C228 검출
TERT C250 AS LNA WT 또는 C250T AS LNA MUT	TERT C250 공통 2	115 bp	133 bp	WT/MUT TERT C250 검출
TERT C228 공통	TERT C250 공통 2	163 bp	199 bp	TERT 프로모터 복제 수/정규화. TERT 프로모터의 사전-증폭.

**IDH1: R132**

프라이머 1	프라이머 2	표적 크기	앰플리콘 크기*	목적
IDH1 R132 AS LNA WT 또는 R132H AS LNA MUT	IDH1 R132 공통	80 bp	98 bp	WT/MUT R132 검출
IDH1 R132 공통 2	IDH1 R132 공통	102 bp	138 bp	IDH1 엑손 4 복제 수/정규화. IDH1의 사전-증폭.

**IDH2: R172**

프라이머 1	프라이머 2	표적 크기	앰플리콘 크기*	목적
IDH2 R172 AS LNA WT 또는 R172K AS LNA MUT	IDH2 R172 공통	72 bp	90 bp	WT/MUT R172 검출
IDH2 R172 공통 2	IDH2 R172 공통	77 bp	113 bp	IDH2 엑손 4 복제 수/정규화. IDH2의 사전-증폭.

\*주석 증폭된 표적 영역은 부가된 M13 서열 태그 때문에 AS 앰플리콘에

대하여 18 bp 더 짧고 비-AS 앰플리콘에 대하여 36 bp 더 짧다

[0040]

[0041]

C. 고성능 PCR 프로그램 및 시약

[0042]

PCR 프로그램 및 시약은 효율적으로 양쪽 대립유전자-특이적 및 비-AS 방식으로 및 2개의 상이한 문맥으로 TERT 프로모터 및 IDH1/2 엑손 4를 증폭시킨다: (1) 게놈 DNA의 PCR 및 (2) 사전-증폭된 게놈 DNA의 내포된 PCR. 돌연변이 상태가 빠르게 필요한 및 복제를 갖는 PCR을 수행하기 위해 충분한 샘플이 있는 적용을 위하여, 제1 프로그램이 권고된다. 제한된 DNA가 있는 또는 DNA가 좋지 못한 품질인 적용을 위하여, 제2 프로그램이 권고된다.

[0043]

a. TERT/IDH 상태를 위한 게놈 DNA의 1-단계 AS-LNA qPCR

[0044]

프라이머의 위치에서 제한 때문에 특히 효율적인 대립유전자-특이적 PCR을 허용하기 위해 PCR 프로그램을 창출하는 것이 도전적이다. TERT 프로모터는 이의 높은 GC 함량 (당해 영역을 통해 > 80% 및 C228 내지 C250 신장에서 88%) 및 반복적인 서열 (당해 영역에서 4G의 10회 운영) 때문에 증폭시키는데 악명높게 도전적이다. 야생형과 돌연변이체 대립유전자 사이에서 최대 식별력을 위하여, 우리가 사용한 증폭 프로그램은 높은 어닐링 온도 (>66°C)에서 증폭의 초기 상 그 다음 더 낮은 어닐링 온도 (<=60°C)에서 증폭의 제2 상을 이용한다. 경사 속도 5 °C/sec를 갖는 써모사이클러 상에서 상기 프로그램은 용융 곡선을 배제하여 < 1 시간 걸린다 (표 3). 이는 더욱 더 급속 검출을 촉진시키기 위해 고온 (예를 들면, 98°C에서 1 분)을 이용한 더 짧은 변성 및 더 짧은 어닐링 시간으로 조정될 수 있고, 이는 수술중 진단의 시나리오에서 적용될 수 있다. 우리는, 더 높은 어닐링 온도 (temperatures) (>66°C)에서 최상으로 작동하는, 전통적 단일 어닐링 온도 프로그램을 또한 사용하였지만, 그러나 이들은 덜 민감성이다. 아래에서 우리는 모든 프라이머 세트에 대하여 최상으로 작동하는 최대 식별력을 위

한 프로그램을 열거하였다. 대립유전자-특이적 (AS) 프라이머는 이중 HPLC 정제 처리되는 맞춤형 올리고뉴클레오티드로서 Exiqon (Woburn, MA, USA)으로부터 구매되었다. 비-AS 프라이머는 표준 정제를 이용한 맞춤형 올리고뉴클레오티드로서 IDT (Coralville, Iowa, USA)로부터 구매되었다.

표 3. AS-qPCR 기반된 유전자형에 대한 PCR 프로그램 1

	단계	온도	지속기간	주기
단계 1	초기 변성	95 °C	180 s	1x
단계 2	변성	95 °C	15 s	19x
단계 3	어닐링 #1	68 °C	20 s	
단계 4	변성	95 °C	15 s	20-30x
단계 5	어닐링 #2	57.6 °C	20 s	
단계 6	용융 곡선	65 °C - 95 °C	증가 0.5°C/ 5 s	

주석: 플레이트 판독은 단계 5 및 단계 6에서 발생한다(FAM)

[0045]

[0046]

상기 PCR용 반응 조건은 표 4에서 보여준다. 많은 GC-풍부 키트 및 다른 폴리머라아제가 사용되었고 특히 TERT 프로모터를 이용한 어려움을 가졌다. 우리의 분석용 판독 출력은 KAPA SYBR Fast 2X MasterMix (KK4600, Boston, MA, USA)를 이용한 SYBR 녹색 신호이다. 프라이머 농도는 다양하였고 농도의 큰 범위를 거쳐 작동한다. 추가로, 입력>50 ng은 사용될 수 있지만, 그러나 반응을 저해하기 시작한다.

표 4. TERT/IDH 돌연변이 검출을 위하여 SYBR 을 이용한 1-단계 qPCR 용 PCR

시약

	최종 농도
<b>KAPA SYBR FAST 2X MasterMix</b>	1X
<b>dH2O</b>	최대 15 $\mu$ L
<b>프라이머 1 (10 <math>\mu</math>M)</b>	400 nM
<b>프라이머 2 (10 <math>\mu</math>M)</b>	400 nM
<b>템플레이트</b>	1 - 50 ng

총 15  $\mu$ L

[0047]

[0048]

[0049]

b. TERT/IDH 상태를 위한 사전-증폭된 DNA의 내포된 AS LNA qPCR

돌연변이 검출용 제2 접근법은 하기를 위하여 매우 양호하게 작동하는 내포된 qPCR 접근법이다: 낮은 품질 샘플 (즉, ctDNA, FFPE gDNA), 및 필요한 복제물 (즉, 미세 침상 생검)에 불충분한 낮은 분석물 양의 샘플. PCR 저해 및 프라이머 효율성에서 차이가 내포된 PCR 맥락에서 훨씬 덜 유의미함에 따라 상기 내포된 qPCR 분석은 또한 크게 신뢰할 수 있는 정량화를 갖는다. 상기 접근법을 이용하기 위해, 당해 유전자좌는, 높은 어닐링 온도 ( $\geq 66^{\circ}\text{C}$ ) (표 5, 6)에서 제한된 주기 수치 (<20 주기)용 고충실도 효소를 이용하여, 멀티플렉스 방식으로 TERT 프로모터, IDH1, 또는 IDH2, 또는 모든 3개에서 비-편향된 (NB) 프라이머 세트를 이용하여 증폭된다. 그 다음, 수득한 PCR 생성물은 (칼럼-기반 또는 비드-기반 접근법을 이용하여) 정제되고 희석되고 (보통 1:1000) 다음 라운드의 증폭용 템플레이트에서 작용하고, 이는 상기 기재된 대립유전자-특이적 LNA-변형된 프라이머를 이용하고 있다. 내포된 PCR은 최고 식별력 (표 7, 8)을 제공함에 따라 어닐링 온도  $\geq 66^{\circ}\text{C}$ 에서 수행된다. 상기 내포된 접근법의 이점은 1-50 ng의 gDNA로부터 모두 생성된 템플레이트의 훨씬 더 큰 공급이 있다는 것이고, 이는 다르게는 가능한 것보다 더 많은 돌연변이에 대하여 스크리닝될 수 있다. 아래에서 우리는 내포된 qPCR에 대하여 고성능 PCR 프로그램을 기재한다. 사전-증폭 반응을 다중 반응으로 분할하는 것이 유익하고 (예를 들면, 50  $\mu$ l를 5x10  $\mu$ l로 분할), 이는 그 다음 풀링될 수 있다. 상기 단계 이후, 칼럼 또는 비드-기반 접근법을 이용하여 PCR 생성물을 정제할 수 있다.

표 5. 고-충실도 사전-증폭용 PCR 프로그램

	단계	온도	지속기 간	주기
단계 1	초기 변성	95 °C	180 s	1x
단계 2	변성	98 °C	15 s	20x
단계 3	어닐링 #1	68 °C	20 s	
단계 4	팽창	72 °C	2 s	
단계 5	저장	4 °C	20 s	

표 6. TERT/IDH 유전자좌의 고-충실도 사전-증폭용 PCR 시약

	최종 농도
KAPA SYBR FAST	1X
KAPA HiFi HotStart DNA 폴리머라아제	1 유니트
10 mM dNTP mix	0.3 mM 각각
dH2O	최대 15 µL
프라이머 1 (10 µM)	200-500 nM
프라이머 2 (10 µM)	200-500 nM
템플레이트	1 - 50 ng

총 50 µL

[0050]

표 7. 비 편향 PCR 생성물의 내포된 대립유전자-특이적 qPCR 용 PCR 프로그램

	단계	온도	지속기간	주기
단계 1	초기 변성	95 °C	3 – 5 min	1x
단계 2	변성	95 °C	15 s	40-50x
단계 3	어닐링 #1	69 °C	20 s	
단계 4	팽창	72 °C	1 s	
단계 5	용융 곡선	65 °C - 95 °C	증가 0.5°C/ 5 s	단지 SYBR을 사용한 경우
플레이트 판독은 단계 3에서, 그리고 SYBR 및 용융 곡선을 이용한 경우, FAM/SYBR에 대하여 단계 5에서 발생한다				

표 8. LNA 변형 프라이머를 이용한 대립유전자-특이적 qPCR 용 PCR 시약

	최종 농도
KAPA SYBR Fast/KAPA PROBE Fast/KAPA PROBE FORCE, 모두 2X	1X
프로브 (10 μM) (프로브가 SYBR 대신 사용된 경우)	250 nM
프라이머 1 (10 μM)	500 nM
프라이머 2 (10 μM)	500 nM
dH2O	최대 25 μl
템플레이트	1 - 50 ng

총 25 μL

[0051]

[0052]

내포된 qPCR에서 검출용 프로브를 이용하면, 프로토콜은 표 8에서 언급된 2개의 프로브 혼합물 중 한쪽을 이용해야 하고 이들 프로브 중 한쪽은 TERT 또는 IDH1 검출: TERT 프로브: /56FAM/CGGGTCCCC/ZEN/GGCCAGC/3IaBkFQ/ (서열 번호: 22-23); IDH1 프로브: /56-FAM/ATGACTTAC/ZEN/TTGATCCCCATAAGCATGA/3IaBkFQ/ (서열 번호: 24-25)에 의존한다. TERT 프로브는 C228T와 C250T 사이에서 공통의 영역내에 설계되고, 반면에 IDH1 프로브는 대립유전자-특이적 프라이머와 공통의 프라이머 사이에서 영역내에 설계되고, 그대로 모든 대립유전자-특이적 IDH1 반응 (R132S, C, L, G 및 H)에 사용될 수 있다.

[0053]

D. 표준, 복제수 및 돌연변이 % 정량화

[0054]

AS TERT 및 IDH1/2 프라이머 세트와 함께, 우리는 비-대립유전자-특이적 방식으로 2개 돌연변이 (C228T 및 C250T) 주위의 TERT 프로모터 영역, R132H 돌연변이 주위의 IDH1 엑손 4를 증폭시키기 위한 프라이머, 및 또한 크게 반복적인 인간 라인-1 요소 (hline1Fwd: 5' TCACTCAAAGCCGCTCACTAC-3' (서열 번호: 26), hline1Rev: 5'-TCTGCCTTCATTTTCGTTATGTACC-3') (서열 번호: 27)을 증폭시키기 위해 설계된 프라이머를 사용한다. 상기 정보는 WT 또는 MUT 대립유전자를 증폭한 대립유전자-특이적 PCR로부터 Ct 값을 정상화하기 위해 및 돌연변이체 대립유전자 분획의 정량적 판독을 제공하기 위해 사용될 수 있고, 샘플의 교차 비교를 가능하게 한다. 섹션 E에서 언

급된 바와 같이, 샘플이 모두 동일한 농도이면 이는 필요하지 않다. 이에 더하여, 수많은 표준화된 샘플은, 샘플 예컨대: 50% 돌연변이체 샘플 (양성 대조군), 1% 돌연변이체 샘플 (낮은 돌연변이 양성 대조군), 0% 야생형 샘플 (음성 대조군), 및 무 템플레이트 대조군을 포함하여, 검증의 목적을 위하여 시험된 샘플과 함께 운영되었다. 이들 표준은 공지된 *TERT/IDH* 상태로 세포주로부터 게놈 DNA (gDNA)의 단리에 의해 생성되었다. 예로서, 우리는 하기 세포주로부터 gDNA를 이용한다: DAOY (C228T), A375 (C250T), HCT116 (야생형) 및 HCT116 IDH1 R132H knockin #2 (IDH1 R132H). 표적 유전자좌에서 gDNA 야생형을 이용한 이들 샘플의 희석은 1%를 수득하고 더 낮은 표준이 필요하였다. 표준의 또 다른 공급원은 표적 돌연변이를 갖는 플라스미드 DNA이고, 여기에서 우리는 TOPO 클로닝 (K4810-01, Life technologies)를 이용하여 "100% 표준"으로서 생성하였다. 우리는 당해 돌연변이를 갖는 종양 샘플로부터 *TERT* 프로모터/*IDH1/2*의 부분의 PCR 증폭에 의해 생성된 삽입물을 사용하였다. 추가로, 더 현실적인 정량적 대조군으로서 작용하기 위해, 양쪽 당해 *TERT* 및 *IDH1* 돌연변이 (참고 아래 세부사항, 도 7)를 갖는 완벽한 이형접합체 플라스미드를 생성하였고, 이는 이들 유전자좌를 동일한 플라스미드로 또는 유사한 방식에서 독립적인 플라스미드로 클로닝시킴으로써 다른 표적 돌연변이로 확장될 수 있다.

[0055] 각 프라이머 세트는 샘플 상에서 3부로 운행된다. *TERT* 및 *IDH1*용 돌연변이체 대립유전자 (즉, 가장 흔한 신경교종-관련된 돌연변이)의 검출용 예시 운행은 표 9에서 하기 프라이머 세트의 이용이다. 야생형 AS 프라이머 세트는 또한 더욱 정확한 정량화를 위하여 비-편향된 (NB) 증폭산물에 대한 대안으로서 사용될 수 있다. 비-편향된 증폭산물용 프라이머는 특정한 대립유전자 (돌연변이체 또는 야생형)에 대하여 특이성을 보이지 않고 모든 유형의 대립유전자를 동등하게 증폭시켜야 한다.

표 9. <i>TERT</i> 프로모터 C228T, C250T 및 <i>IDH1</i> R132H 에 대한 시험용 프라이머 조합			
프라이머 조합	순방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 명칭	목적
TERT AS 228 MUT	TERT C228T AS LNA MUT	TERT C228 공통	TERT 프로모터 C228T 검출 및 정량화
TERT AS 250 MUT	TERT C250T AS LNA MUT	TERT C250 공통 2	TERT 프로모터 C250T 검출 및 정량화
TERT NB	TERT C228 공통	TERT C250 공통 2	TERT 프로모터 유전자좌에서 복제수에 대한 참조
IDH1 R132H AS MUT	IDH1 R132H AS LNA MUT	IDH1 R132 공통	IDH1 R132H 검출 및 정량화
IDH1 NB	IDH1 R132 공통	IDH1 R132 공통 2	IDH1 에서 복제수에 대한 참조
hline1	hline1 순방향	hline1 역방향	라인 1 요소를 이용한 복제수에 대한 참조는 내포와 함께 사용하지 않는다

[0056]

[0057] 희석이 돌연변이체 및 야생형 대립유전자 분획의 상대 비를 단지 비슷하게 할 수 있음에 따라, 우리는 50% 돌연변이/50% WT 샘플로서 작용하기 위해 이형접합체 교정기를 설계하였다. 상기 표준은 앞서 언급된 내포된 PCR 접근법에 대한 표준으로서 최상으로 작동한다. 이형접합체 칼리브레이터 플라스미드는 단일 돌연변이, 예컨대 BRAF V600E 돌연변이<sup>32</sup>에 대하여 앞서 생성되었지만, 그러나 여기에서 다중 돌연변이: *IDH1* R132H 및 *TERT* C228T/C250T에 대하여 단일 교정기를 만들었고, 정량화 및 작업흐름 (도 7)을 크게 촉진시킨다. 2개의 표적 영역은 > 3100 bp 만큼 분리되고 각 돌연변이는 제한된 프라이머 간섭을 보장하기 위해 서로 거의 등거리이다. 이들 표준은, 서로 유전자좌를 분리하기 위한 경우에 (일부 저자들은 표준으로서 이의 성능 개선으로서 이를 인용한다) 각 유전자 단편을 분리한 합성 제한 효소 부위와 함께, pUC-57-ampR 플라스미드에서 *TERT* 프로모터 (the 228 및 250 유전자좌 +/- ~150 bp)의 부분 및 *IDH1* 엑손 4 (R132 또는 c.395G 유전자좌 +/- ~ 150 bp)의 부분인 GENEWIZ에 의해 합성용 유전자를 먼저 설계함으로써 생성되었다. "이형접합체"를 구성하는 2개의 *TERT-IDH* 블록이 최대로 분리되는 것을 확보하는, 서로 근위적으로 등거리인 클로닝 부위를 가짐에 따라 이들은 단지 사

용되는 벡터 pGL3-enh (Promega)로 클로닝되었다. 추가로 우리는 모든 유전자좌가 2개 복사본의 각 유전자 좌위를 갖는, 음성 대조군으로서 야생형인 등가 플라스미드를 생성하였다. 상기 시스템은 당해 다른 돌연변이, 예를 들어 더 희귀한 IDH1 돌연변이 및 IDH2 돌연변이까지 확장될 수 있다. 우리는 다른 유전자좌를 갖는 확장을 촉진시키기 위해 및 선택적 선형화를 가능하게 하기 위해 각 유전자좌 주위의 제한 효소 부위를 도입하였다.

[0058] E. 데이터 분석

[0059] 데이터 분석용 몇 개의 옵션이 있다. 가장 간단한 한 접근법은 모든 샘플이 돌연변이체 대립유전자 분획 (도 9)을 역산하기 위해 표준 세포주 DNA의 희석부터 다양한 돌연변이 백분율까지 생성된 추세선을 사용하고 동일 농도를 갖는 것을 보장하는 것이다. 이하에서 나타낸 바와 같이, 추세선은 탁월한 선형성 ( $R^2 > 0.994$ )을 갖는다.

[0060] 다양한 DNA 입력 양을 갖는 샘플의 사용을 위하여, 우리는 (비-편향/공통의 증폭산물 또는 hline1의 Ct 값을 이용한) 샘플의 복제수의 측정에 대해 Ct 값을 정규화하는, 및 돌연변이체 대립유전자 백분율 표준으로서 양성 대조군 샘플을 이용하는 접근법을 이용하였다. (Ct (주기 역치)는 역치를 횡단 (즉 배경 수준을 초과)하기 위해 형광성 신호에 대하여 요구된 주기의 수로서 정의된다). 상기 유형의 정규화된 계산은 추가로 프라이머 효율의 추정을 필요로 한다. 게놈 DNA의 희석에 기반하여, 우리는 각 프라이머 조합 (표 10)에 대하여 프라이머 효율성을 추정하였다.

프라이머 조합 명칭	효능
TERT C228T AS LNA MUT+ TERT C228 공통	106.5%
TERT C250T AS LNA MUT + TERT C250 공통 2	91.80%
TERT C228 공통 + TERT C250 공통 2	82.33%
IDH1 R132H AS LNA MUT + IDH1 R132 공통	105.8%
IDH1 R132 공통 + IDH1 R132 공통 2	91.05%

[0061] 3부 Ct 값은 각 프라이머 세트에 대하여 평균화되고 프라이머 효율 값에 의해 정규화된다. 각 샘플에 대하여, AS 돌연변이체 프라이머에 대하여 평균 Ct 값은 그 다음 각 공통의 (NB) 프라이머 세트에 대하여 평균 Ct 값에 의해 정규화된다.  $E_{AS}$ 가 AS 돌연변이체 프라이머 조합의 효율을 참조하는, 아래 방정식 (Pfaffl et al. 저)을 이용하여, 대조군은 공지된 돌연변이 백분율 (이 경우에 50%)의 양성 대조군에 대하여 평균 Ct 값을 참조하고, 샘플은 평가된 샘플에 대하여 평균 Ct 값을 참조한다. 동일한 정보는 분모에 있지만, 그러나 적합한 NB 프라이머 세트를 참조한 모두는 정규화 (예를 들면, TERT 공통, IDH1 공통, 라인1)를 위하여 사용된다. 더욱 정확한 값을 위하여, 우리는 비교(comparison)를 위하여 AS 돌연변이체 대 AS 야생형을 이용한 방정식 조정을 추천하였고, 이는 돌연변이체 대립유전자 분획 단독을 취득하기 위해 조정될 수 있는 돌연변이체:야생형 대립유전자 분획의 비를 취득한다.

$$\text{돌연변이체 대립유전자\%} = \frac{(E_{AS})^{\Delta C_t(50\% \text{ 대조군-샘플})}}{(E_{NB})^{\Delta C_t(50\% \text{ 대조군-샘플})}}$$

[0063] 이들 접근법은 양쪽 gDNA의 대립유전자-특이적 qPCR 및 사전-증폭된, 정제된 PCR 생성물의 내포된 qPCR에 대하여 작동한다. 내포된 qPCR의 맥락에서, 공지된 돌연변이 백분율의 사전-증폭된 게놈 DNA가 또한 사용될 수 있어도, 우리는 각 표적 돌연변이의 50%를 갖는 크게 정확한 표준으로서 사전-증폭된 이형접합체 칼리브레이터 플라스미드, 및 참조로서 이에 정규화를 추천하였다.

[0065] F. 성능

[0066] 상기 프라이머 세트 및 조건을 이용하여, 우리는 높은 수준의 배경에서 이들 프라이머의 검출의 한계를 시험하였고, 15,000 야생형 복사본 (0.1%)의 배경에서 최소 15 돌연변이체 게놈 DNA 복사본을 확실히 검출할 수 있고

이를 0% (야생형) 샘플 (도 10)과 식별할 수 있음을 알아내었다. 내포된 qPCR을 이용하여, 높은 식별력은 또한 대립유전자-특이적 PCR (도 11)로 달성될 수 있다.

[0067] G. qPCR 진단의 적용

[0068] 임상적으로 관련된 맥락에서 우리의 분석을 시험하기 위해, 우리는 생거 서열분석을 이용하여 앞서 유전자형화되는 및 TERT 프로모터 WT 및 IDH1 R132 WT로서 상기 방법을 이용하여 식별되는 43 신경교종 샘플로부터 DNA를 취하였다. 우리는 qPCR 분석을 사용하였고 TERT 프로모터 C228T 돌연변이를 갖는 9 샘플 및 IDH1 R132H 돌연변이를 갖는 3 샘플을 식별하였고, 총 12 샘플 또는 전체의 28%가 이고, 모두는 전통적 방법 (표 11)에 의해 앞서 검출불가능한 백분율 <10%를 갖는다. 또한, 상기 분석은 정량적 결과로 ~1 시간 이내에 완료되었고, 반면에 생거 서열분석은 PCR 이후 추가의 서열분석 단계를 포함한다.

표 11. 생거 시퀀싱 (위음성)이 아닌 qPCR에 의해 검출된 낮은 수준의 돌연변이를 갖는 사례.

사례 ID	TERT 생거	TERT qPCR	조직학
A	WT	C228T	GBM
B	WT	C228T	GBM
C	WT	C228T	GBM
D	WT	C228T	역행성 성상세포종
E	WT	C228T	GBM
F	WT	C228T	GBM
G	WT	C228T	GBM
사례 ID	IDH1 생거	IDH1 qPCR	조직학
H	WT	R132H	성상세포종
K	WT	R132H	성상세포종

[0069] .  
 [0070] 참고  
 [0071] 인용된 참고문헌의 각각의 개시내용이 본원에 명확하게 편입된다.

[0073] \*1. Yan, H. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765-73 (2009).

[0074] 2. Jansen, M., Yip, S. & Louis, D.N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol* **9**, 717-26 (2010).

[0075] 3. Louis, D.N., International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. & Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. *WHO classification of tumours of the central nervous system*, 309 p. (International Agency for Research on Cancer : Distributed by WHO Press, World Health Organization, Lyon Geneva, Switzerland, 2007).

[0076] 4. Ostrom, Q.T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol* **16 Suppl 4**, iv1-63 (2014).

[0077] 5. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer*

*Res* **19**, 764-72 (2013).

- [0078] 6. Coons, S.W., Johnson, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J. & Pearl, D.K. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* **79**, 1381-93 (1997).
- [0079] 7. Killela, P.J. *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6021-6 (2013).
- [0080] 8. Jiao, Y. *et al.* Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* **3**, 709-22 (2012).
- [0081] 9. Heaphy, C.M. *et al.* Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* **333**, 425 (2011).
- [0082] 10. Bettegowda, C. *et al.* Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* **333**, 1453-5 (2011).
- [0083] 11. Killela, P.J. *et al.* Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* (2014).
- [0084] 12. Amary, M.F. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* **224**, 334-43 (2011).
- [0085] 13. Pansuriya, T.C. *et al.* Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat Genet* **43**, 1256-61 (2011).
- [0086] 14. Kipp, B.R. *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* **43**, 1552-8 (2012).
- [0087] 15. Mardis, E.R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* **361**, 1058-66 (2009).
- [0088] 16. Borger, D.R. *et al.* Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* **17**, 72-9 (2012).
- [0089] 17. Davidson, C.J. *et al.* Improving the limit of detection for Sanger sequencing: A comparison of methodologies for KRAS variant detection. *Biotechniques* **2012**(2012).
- [0090] 18. Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K. & Wallace, R.B. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2757-60 (1989).
- [0091] 19. Latorra, D., Campbell, K., Wolter, A. & Hurley, J.M. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat* **22**, 79-85 (2003).
- [0092] 20. Rupp, J., Solbach, W. & Gieffers, J. Single-nucleotide-polymorphism-specific PCR for quantification and discrimination of *Chlamydia pneumoniae* genotypes by use of a "locked" nucleic acid. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3785-7 (2006).
- [0093] 21. Morandi, L. *et al.* Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS One* **7**, e36084 (2012).
- [0094] 22. Zeng, Y. *et al.* Establishment of real time allele specific locked nucleic acid quantitative PCR for detection of HBV YIDD (ATT) mutation and evaluation of its application. *PLoS One* **9**, e90029 (2014).
- [0095] 23. Strand, H., Ingebretsen, O.C. & Nilssen, O. Real-time detection and quantification of mitochondrial mutations with oligonucleotide primers containing locked nucleic acid. *Clin Chim Acta*

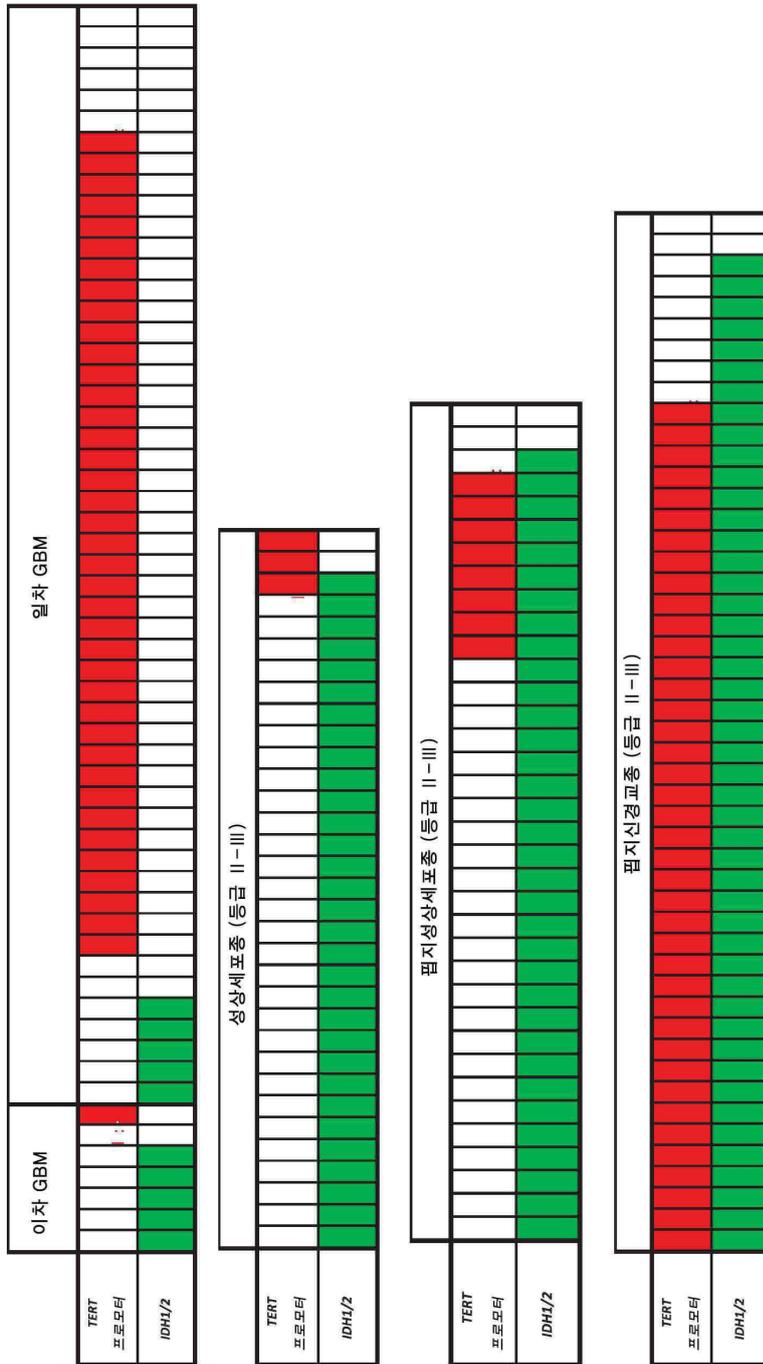
390, 126-33 (2008).

- [0096] 24. Remke, M. *et al.* TERT promoter mutations are highly recurrent in SHH subgroup medulloblastoma. *Acta Neuropathol* **126**, 917-29 (2013).
- [0097] 25. Patel, K.P. *et al.* Diagnostic testing for IDH1 and IDH2 variants in acute myeloid leukemia an algorithmic approach using high-resolution melting curve analysis. *J Mol Diagn* **13**, 678-86 (2011).
- [0098] 26. Horbinski, C., Kelly, L., Nikiforov, Y.E., Durso, M.B. & Nikiforova, M.N. Detection of IDH1 and IDH2 mutations by fluorescence melting curve analysis as a diagnostic tool for brain biopsies. *J Mol Diagn* **12**, 487-92 (2010).
- [0099] 27. Hurst, C.D., Platt, F.M. & Knowles, M.A. Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *Eur Urol* **65**, 367-9 (2014).
- [0100] 28. Allory, Y. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol* **65**, 360-6 (2014).
- [0101] 29. Qu, Y. *et al.* Low frequency of TERT promoter mutations in a large cohort of gallbladder and gastric cancers. *Int J Cancer* **134**, 2993-4 (2014).
- [0102] 30. Boisselier, B. *et al.* COLD PCR HRM: a highly sensitive detection method for IDH1 mutations. *Hum Mutat* **31**, 1360-5 (2010).
- [0103] 31. Kinde, I. *et al.* TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Res* **73**, 7162-7 (2013).
- [0104] 32. Szankasi, P. *et al.* A quantitative allele-specific PCR test for the BRAF V600E mutation using a single heterozygous control plasmid for quantitation: a model for qPCR testing without standard curves. *J Mol Diagn* **15**, 248-54 (2013).





도면3

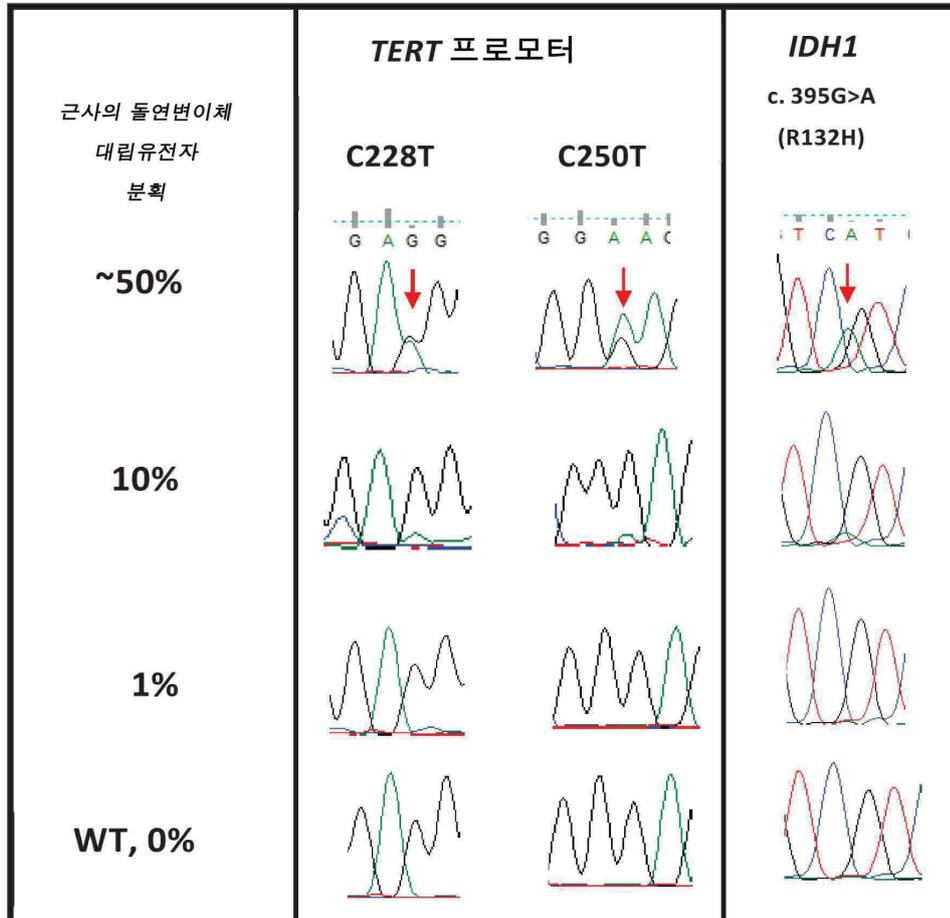


도면4

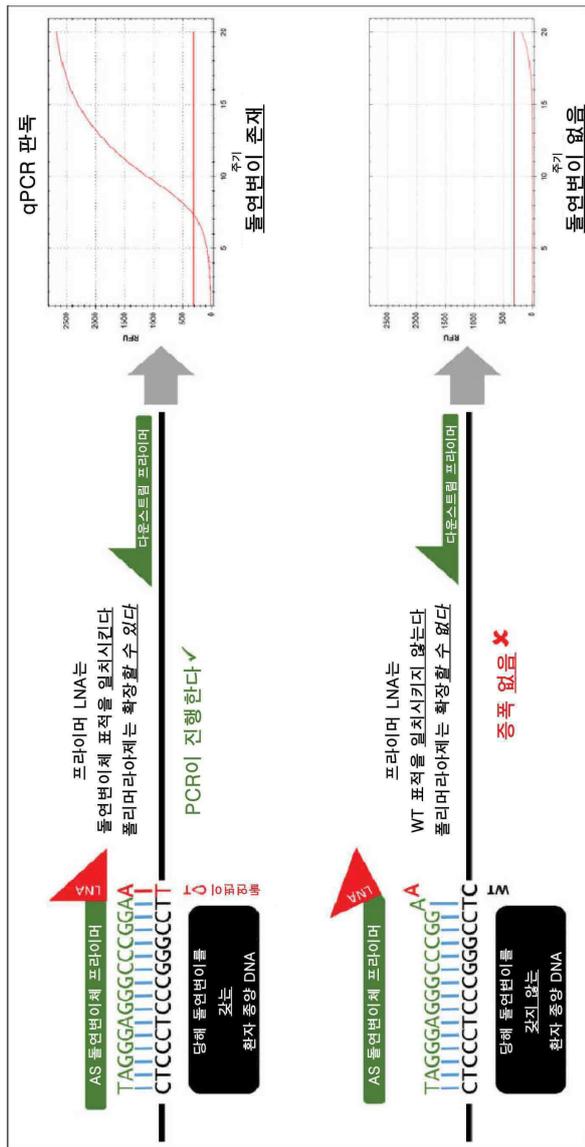
시나리오	시료	종양 %	시퀀싱 결과	실제 결과
고 종양 %		>90%	돌연변이	돌연변이
저 종양 % 고 정상 %		~30%	WT 위음성	돌연변이
고 종양 % 저 아클론성 %		>90%	1. 돌연변이 2. WT 위음성	1. 돌연변이 2. 돌연변이

정상 세포    암 세포    돌연변이

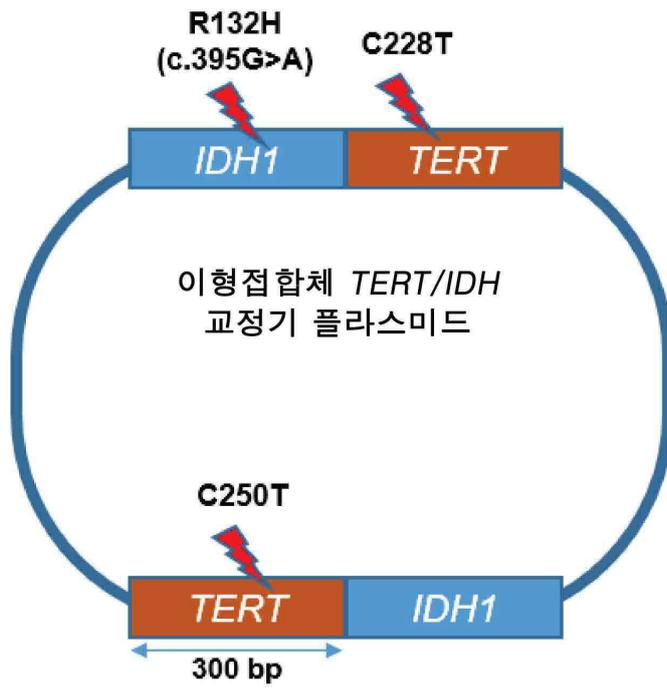
도면5



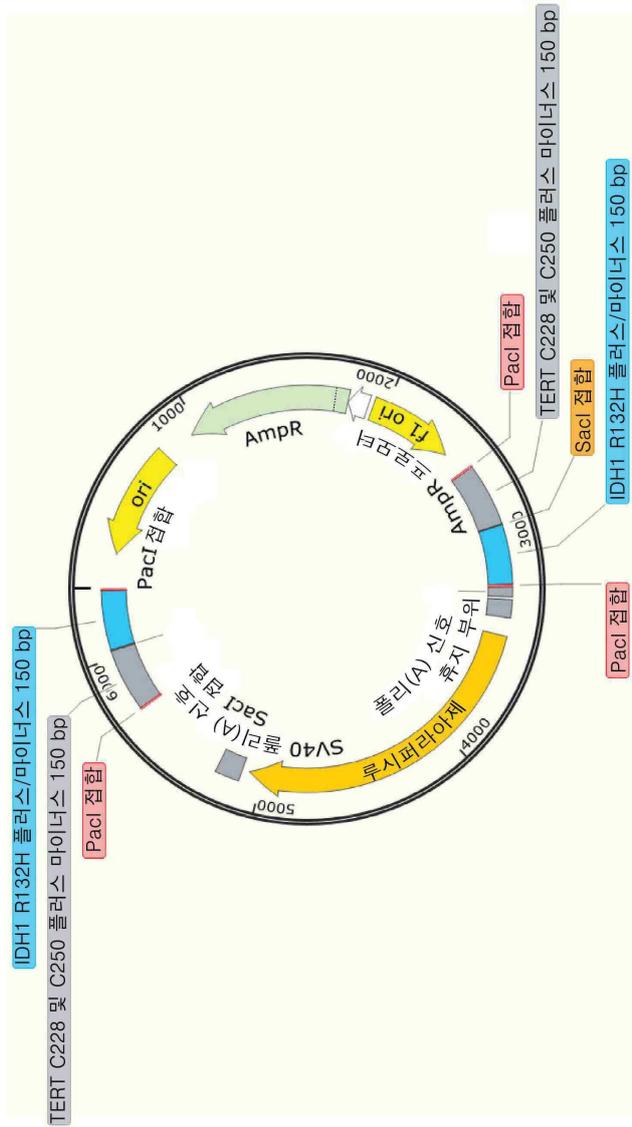
도면6



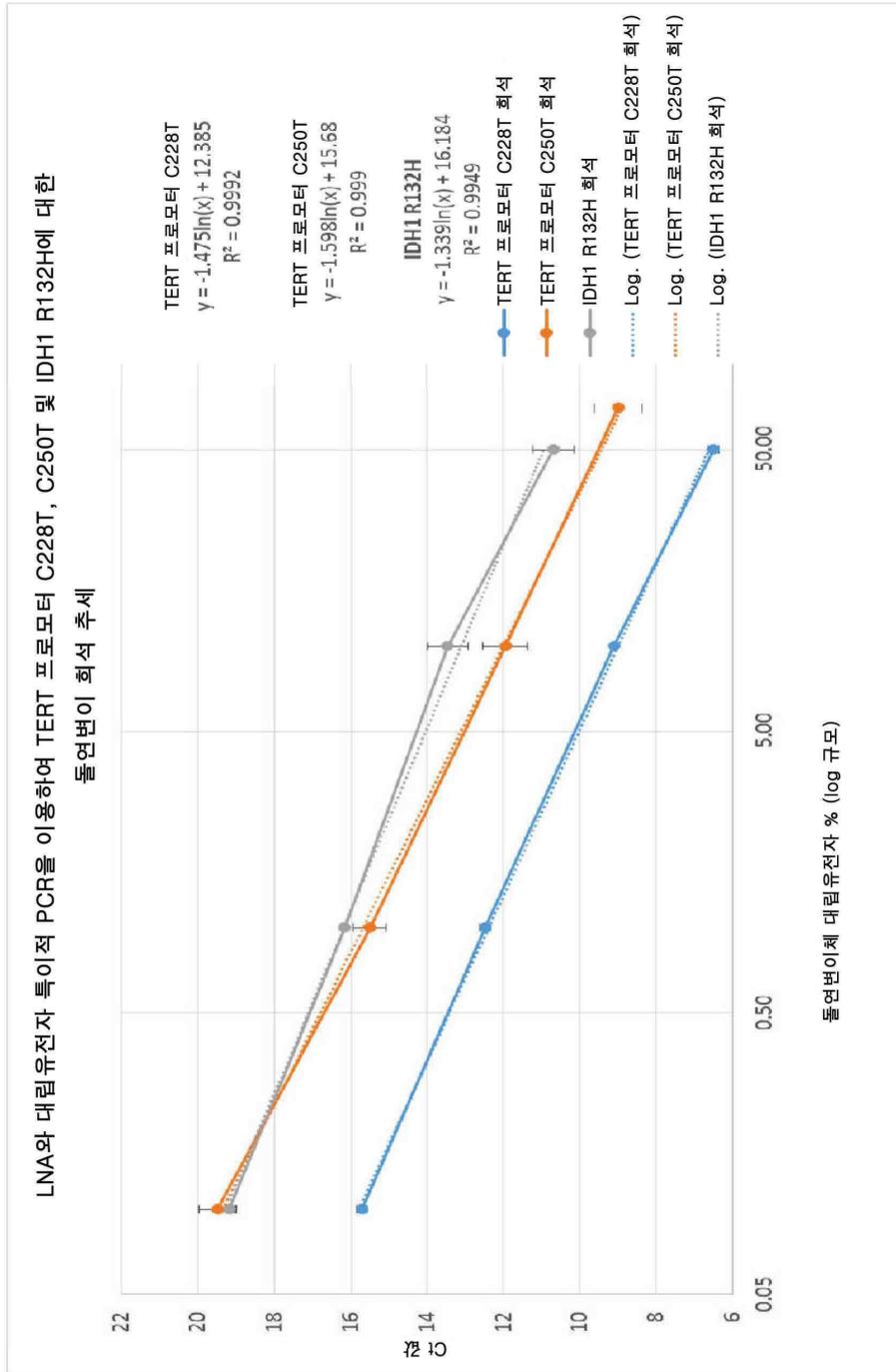
도면7



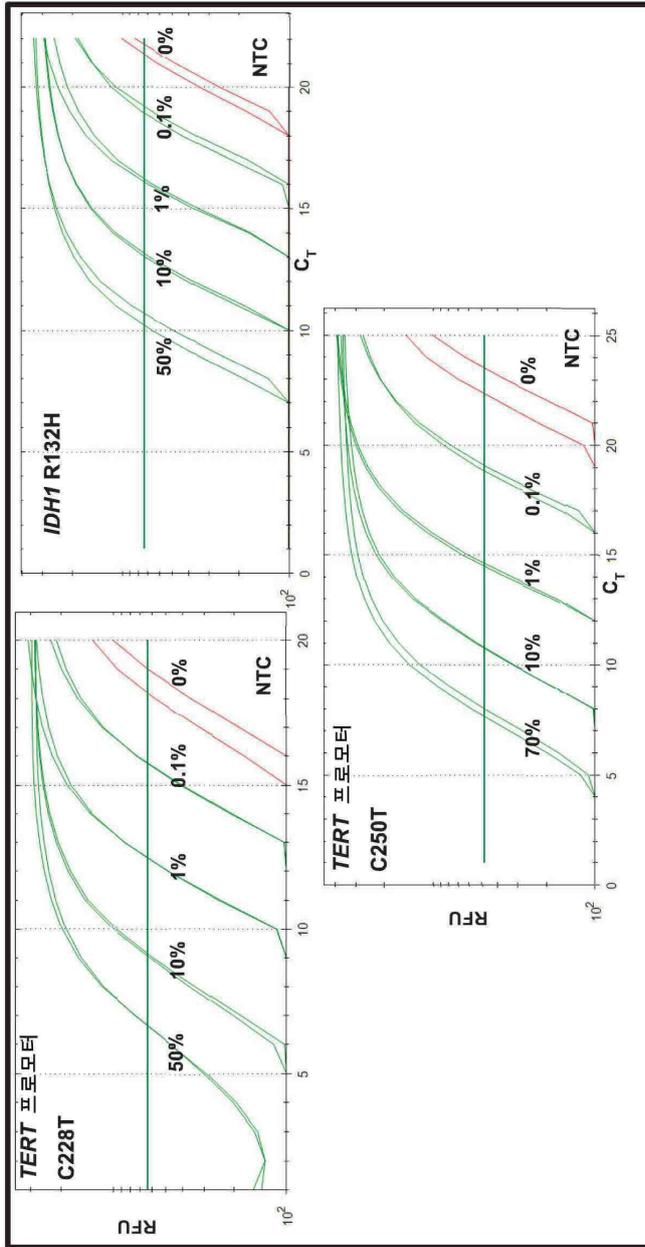
도면8



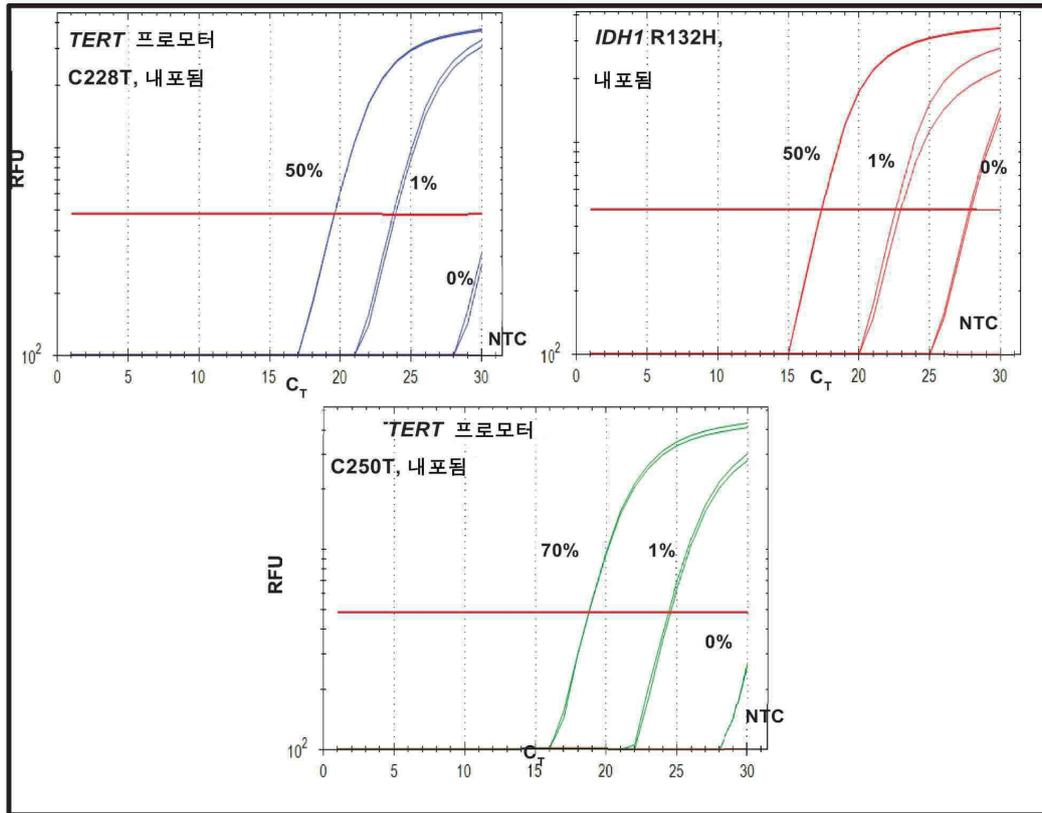
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> DUKE UNIVERSITY
- <120> methods for reapid and sensitive detection of hotspot mutations
- <130> IP-BAWI1702-1
- <140> 15-505,777-
- <141> 2017-02-22
- <150> 62/014197
- <151> 2014-08-24
- <150> pct/us/15/46519
- <151> 2015-08-24
- <150> KR 10-2017-7007188
- <151> 2017-03-15
- <160> 29
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer  
 <400> 1  
 ctgggagggc ccggag 16  
  
 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 2  
 ctgggagggc ccggaa 16  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 3  
 gtcctgcccc ttcaccttc 19  
 <210> 4  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 4  
 cccgtcccga ccctc 16  
  
 <210> 5  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 5  
 cccgtcccga ccctt 16  
 <210> 6  
 <211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 6  
 cagcgctgcc tgaactc 18  
 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 7  
 gggtaaaacc tatcatcata ggtcg 25  
  
 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 8  
 gggtaaaacc tatcatcata ggtca 25  
 <210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 9  
 aacatgcaaa atcacattat tgcc 24  
 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 10  
 atccccggc ttgtgagt 18

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 11  
 aagcccatca ccattggcag 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 12  
 aagcccatca ccattggcaa 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 13  
 aggtcagtgg atcccctctc 20  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 14  
 ggaccaagcc catcaccatt 20  
 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 15

gggtaaaacc tatcatcata ggtt	24
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 16	
gggtaaaacc tatcatcata ggtg	24
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 17	
gggtaaaacc tatcatcata ggta	24
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 18	
gggtaaaacc tatcatcata ggtct	25
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 19	
aagcccatca ccattggcat	20
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer  
 <400> 20  
 aagcccatca ccattggcg 19  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 21  
 aagcccatca ccattggct 19  
 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 22  
 cgggtcccc 9  
  
 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 23  
 ggcccagc 8  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <400> 24  
 atgacttac 9  
 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 25	
ttgatcccca taagcatga	19
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 26	
tcaactcaaag ccgctcaact ac	22
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 27	
tctgccttca tttcgttatg tacc	24
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Inovirus enterobacteria phage M13	
<400> 28	
tgtaaacga cggccagt	18
<210> 29	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Inovirus enterobacteria phage M13	
<400> 29	
caggaaacag ctatgacc	18