



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0069431  
(43) 공개일자 2021년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6886 (2018.01) C12Q 1/6851 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6886 (2018.05)  
C12Q 1/6851 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0159246  
(22) 출원일자 2019년12월03일  
심사청구일자 2019년12월03일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
이승태  
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세의료원  
(74) 대리인  
과도특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 16 항

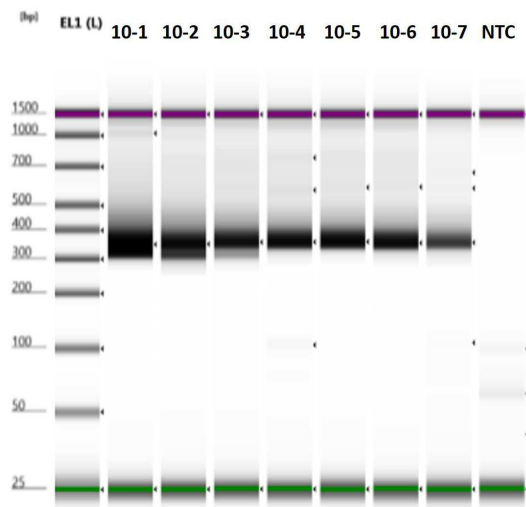
(54) 발명의 명칭 백혈병 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 백혈병 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 현재 기술의 한계를 극복하기 위해 차세대 염기서열 분석 기법(Next-Generation Sequencing)을 사용하여 BCR-ABL1 융합 유전자를 보다 민감도 있게 정량적으로 분석하기 위한 백혈병 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 백혈병 진단 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프라이머 세트를 이용한 진단 방법은 기존의 검사 방법들에 비하여 표준화된 프로토콜을 제공함으로써 정밀도(precision)와 민감도(sensitivity)가 개선된 데 현저한 효과가 있으므로, 임상적으로 백혈병이 예상되는 환자의 진단, 예후 판정 및 치료 방향 결정에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711080708
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	과학기술일자리진흥원
연구사업명	공공연구성과기술사업화지원사업
연구과제명	다중 복합 PCR 검사를 위한 다중반응용 반응조 및 파쇄가능형 필름
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교의료원산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열로 표시되는, 프라이머.

#### 청구항 2

서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는, 프라이머.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열은 BCR-ABL(Breakpoint cluster region-Abelson) 융합 유전자를 증폭하기 위한 것인, 프라이머.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 서열번호 2 또는 서열번호 3은 정방향 프라이머(forward primer)이고,

상기 서열번호 1은 역방향 프라이머(reverse primer)인, 프라이머.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 서열번호 4 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열은 ABL(Abelson) 유전자를 증폭하기 위한 것인, 프라이머.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 서열번호 5, 서열번호 6, 또는 서열번호 7은 정방향 프라이머(forward primer)이고,

상기 서열번호 4는 역방향 프라이머(reverse primer)인, 프라이머.

#### 청구항 7

제 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프라이머는 차세대 염기서열 분석(Next-Generation Sequencing, NGS)을 위한 것인, 프라이머.

#### 청구항 8

제 1항의 프라이머, 및 PCR 증폭 반응 혼합물을 포함하는, BCR-ABL 융합 유전자 증폭용 조성물.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 증폭 반응 혼합물은 데옥시뉴클레오타이드, Taq 폴리머레이스, 및 역전사 효소를 포함하는 것인, BCR-ABL 융합 유전자 증폭용 조성물.

#### 청구항 10

제 8항의 조성물을 포함하는, BCR-ABL 융합 유전자 검출용 키트.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 키트는 차세대 염기서열 분석(NGS)을 위한 것인, BCR-ABL 융합 유전자 검출용 키트.

#### 청구항 12

(a) 생물학적 시료로부터 mRNA를 수득하는 단계;

(b) 상기 mRNA 및 제 1항의 프라이머를 사용하여 BCR-ABL 융합 유전자 또는 ABL유전자를 순차적으로 증폭시켜 정제 산물을 제조하는 단계;

(c) 상기 (b)단계의 정제 산물을 2차 증폭하여 최종 정제 산물을 제조하는 단계; 및

(d) 상기 (c)단계의 최종 정제 산물의 염기서열을 표준 물질을 이용하여 분석하는 단계;를 포함하는, BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법.

#### 청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 증폭은 RT-PCR(reverse transcriptase PCR), RQ-PCR(real time quantitative PCR) 및 실시간 PCR(real time PCR)로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행하는 것인, BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법.

#### 청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 증폭은,

mRNA를

i) 93 내지 97℃에서 pre-변성(pre-denaturation)시키는 단계;

ii) 95 내지 98℃에서 45초 변성(Denaturation), 58 내지 62℃에서 60초 결합(Annealing), 70 내지 74℃에서 60초 신장(Elongation)을 1주기로 하여 24 내지 28번 반복하는 단계; 및,

iii) 70 내지 74℃에서 최종 신장하는 단계;

를 2 내지 3번 반복하여 수행하는 것인, BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법.

#### 청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 표준 물질은 BCR/ABL 융합 유전자 및 ABL 유전자의 염기서열을 포함하는 것인, BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법.

#### 청구항 16

제 12항의 방법으로 검출된 BCR-ABL 융합 유전자와 대조 유전자(control gene)인 ABL1 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하는 단계를 포함하는, 차세대 염기서열 분석(NGS)에 기반하여 BCR-ABL 융합 유전자를 정량 분석하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 백혈병에서 관찰되는 유전자 이상을 민감도 있게 검출하는 차세대 염기서열 분석을 위한 백혈병 진단

[0001]

용 프라이머 세트 및 이를 이용한 백혈병 진단 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 급성 골수성 백혈병(Acute Myeloid Leukaemia, AML)은 대체로 연간 10만명에 다섯 명 꼴로 환자가 발생한다. 2017년 12월 보건복지부 "중앙 암 등록 본부" 자료에 따르면 우리나라는 골수성 백혈병 발생률이 전체 암 발생 가운데 1.0%를 차지하며, 10만명 중 약 4.4명의 빈도로 집계되고 있다. AML은 남녀노소 모든 연령대에서 생길 수 있는 공격적인 암으로 골수에서 빠르게 증식한 암세포가 정상적인 혈액 세포의 생성을 막아 치명적인 감염과 출혈을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한, 분자생물학적 연구와 표적항암제 개발의 가장 상징적인 혈액암으로 인식되고 있는 만성 골수성 백혈병(Chronic Myeloid Leukemia, CML)의 경우는 전체 성인 백혈병의 약 10 내지 15%를 차지하며, 매년 10만명 중 약 0.5명의 빈도로 발병하며 현재 우리나라에는 약 4,000명 정도의 만성 골수성 백혈병 환자가 있는 것으로 추정되며 치료 효과가 매년 치료를 받고 있는 환자수는 급속히 증가하고 있다. 만성 골수성 백혈병의 발병 기전은 22번 염색체와 9번 염색체 사이의 전위로 인해 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)가 생성되면서 항상 활성화 상태인 BCR-ABL1 티로신키나아제(Tyrosine kinase)로 인해 각종 혈구 세포의 이상 증식이 지속되는 것으로 확인되고 있다(Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2343-55.).
- [0003] 한편, 바이오 마커란 정상적인 생물학적 과정, 질병 진행 상황, 치료방법에 대한 약물의 반응성을 객관적으로 측정하고 평가할 수 있는 지표를 말하며, BCR-ABL 융합 유전자(Breakpoint cluster region-Abelson fusion oncogene)는 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 등에서 관찰되는 유전자 이상으로서 바이오 마커의 역할을 한다. 이 융합 유전자가 만들어내는 단백질을 가지고 있는지의 여부로 백혈병을 진단 및 예측하게 된다. 이렇듯 BCR-ABL1 융합 유전자는 백혈병 진단에 있어 중요한 예후 예측 값을 가지며, 더욱 정밀하게 예측할 수 있는 진단 키트 개발이 활발히 이루어 지고 있다. 예컨대, FISH(Fluorescent in situ hybridization)를 이용한 방법, 초기 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 방법, RT-PCR(Reverse transcriptase PCR)을 이용한 방법 및 네스티드 PCR(nested PCR)을 이용한 방법, RQ-PCR(real time quantitative PCR)을 이용한 방법 등이 개발된 바 있다. 최근에는 주로 RT-PCR 검사법이 많이 사용되고 있다.
- [0004] 그러나 백혈병을 진단하는 상기 종래 방법들의 경우, 백혈병의 초기에는 검출이 어려운 단점이 있으며, BCR/ABL1 융합 유전자 검사로 최근 일반적으로 사용되고 있는 RT-PCR 법은 BCR/ABL1 융합 유전자와 정상 ABL1 유전자의 실시간(real-time) PCR 효율을 비교하여 양을 측정하는 방식으로 민감도가 떨어지는 문제점이 존재한다. 한국등록특허 제 1325322호의 경우, 융합 유전자의 정량분석을 통해 융합 유전자의 발현량을 기존 PCR보다 간편하고 정확하게 측정하기 위한 기술을 기술하고 있지만, 차세대 염기서열 분석법을 기반으로 하는 것이 아니며, RT-PCR 검사법의 민감도는  $10^{-3}$  내지  $10^{-5}$  복제수(Copies)정도로 임상적으로 더 미세한 양의 유전자 이상을 검출할 수 있는 검사법이 요구되고 있는 실정이다.
- [0005] 따라서 일반적으로 백혈병의 진단 및 치료 과정 중 질환 관련 특이유전자의 양을 정확하게 측정하는 것은 매우 중요한 만큼 임상적으로 미세한 양의 유전자 이상을 검출하기 어려운 기존의 방법보다 용이하게 더 미세한 양의 BCR-ABL 융합 유전자도 정확하게 정량하고 진단할 수 있는 새로운 검사법의 개발이 필요한 실정이다.
- [0006] 특히 백혈병의 경우, 질환 관련 특이 유전자들을 가진 백혈구의 수가 진단 초기에는 상대적으로 낮아 이들의 존재 여부 및 존재량을 측정하여 질환을 진단하기에는 많은 어려움이 있으므로, 정확도가 개선된 본 발명의 백혈병 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 백혈병 진단 방법을 이용하면, 백혈병 환자의 조기 진단, 예후 판정, 치료 방향의 결정 또는 치료 후 모니터링에 다방면으로 기여할 수 있을 것으로 기대된다.
- ## 발명의 내용
- ### 해결하려는 과제
- [0007] 본 발명은 차세대 시퀀싱 기술(Next-Generation Sequencing)을 이용하여 유전자 이상을 민감도 있게 검출하는 프라이머 세트와 이를 이용한 키트에 관한 것이다.
- [0008] 본 발명의 일 목적은 백혈병 진단에 있어 BCR/ABL1 융합 유전자의 이상을 보다 민감하게 검출하기 위한 프라이머 세트를 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 키트를 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키트를 이용하여 백혈병 환자의 예후 판정, 치료의 방향 결정 및 치료 후 모니

터링을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 사용한 후 2차 PCR을 하여 차세대 염기서열 분석(NGS)을 통해 대조 유전자(control gene)인 ABL1 유전자 대비 BCR/ABL1 융합 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하여 정량하는 방법을 제공하고자 한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0014] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에서 "백혈병(leukemia)"이란, 혈액 또는 골수 속에 종양 세포(백혈병 세포)가 출현하는 질병으로 혈액 세포, 특히 백혈구가 이상 증식하는 혈액 종양의 일종이다. 제대로 성숙하지 못한 백혈구가 대량으로 혈액 속에 존재할 경우 백혈병이라 한다. 백혈구의 비정상적인 증식에 비해, 정상적인 혈구 세포의 수는 극히 적어지게 되어 면역기능은 물론 산소 운반이나 영양 공급과 같은 기본적인 혈액의 기능을 수행할 수 없게 된다. 또한 비정상적인 백혈구는 자가 면역 질환과 유사한 반응을 일으켜 정상 조직을 파괴하기도 한다. 방사성 물질을 가까이할 경우 걸릴 가능성이 높아 지는 것으로 알려져 있으며, 임상 소견과 검사 소견 그리고 경과에 따라 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 구분되며, 급성 골수성 백혈병(Acute myeloid leukemia, AML), 만성 골수성 백혈병(Chronic myeloid leukemia, CML), 급성 림프모구 백혈병(Acute lymphocytic leukemia, ALL), 만성 림프모구 백혈병(Chronic lymphocytic leukemia, CLL) 등이 있다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서 "급성 골수성 백혈병"이란, 치료하지 않으면 1년 내에 90%가 사망하는 치명적인 질환으로 2018년에 발표된 중앙 암 등록 본부 자료에 의하면 2016년에 우리 나라에서는 229,180건의 암이 새로이 발생했는데, 그중 골수성 백혈병(C92-C94)은 2,286건으로 전체 암 발생의 1%를 차지하는 것으로 조사되었다. 급성 골수성 백혈병 환자의 증상은 대부분 말초 혈액의 빈혈, 백혈구 수 증가 또는 감소와 혈소판 수의 감소로 기인하는 것으로 알려져 있다. 급성 골수성 백혈병은 병기를 나누지는 않고 치료 예후 변수에 따라서 고위험군, 중간위험군, 저위험군 등으로 구분하며, 세포 유전학적 검사상 5번 염색체가 쌍으로 있지 않고 1개만 존재하는 경우, 7번 염색체 1개가 소실된 경우, 전체 숫자에는 변화가 없으나 5번 또는 7번 염색체의 부분이 소실된 경우, 3번 염색체의 부분에 변화가 있는 경우와 그 외 t(6;9), t(9;22)와 같이 각 염색체간 교환이 이루어진 경우 고위험군으로 보고 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서 "만성 골수성 백혈병"이란, 골수구계 세포가 백혈구를 만드는 과정에서 생긴 악성 혈액 질환으로 환자의 90% 이상에서 특징적인 유전자의 이상(필라델피아 염색체의 출현)으로 혈액 세포가 과다하게 증식하여 백혈구와 혈소판 등이 증가하며, 만성적인 경과를 보이는 혈액암의 일종이다. 천천히 진행되지만 치료하지 않고 방치하면 점차 진행되어 급성 백혈병으로 진행이 되기에 조기에 진단하는 것이 요구되지만, 초기에 증상이 뚜렷하지 않아 진단하기 어려운 질병으로 보고 있다. 만성 골수성 백혈병(CML)의 특징은 조혈 줄기 세포에서 t(9;22) 상호 염색체 전위에 의해 형성되는 필라델피아(Philadelphia) 염색체(Ph)이다. 발생 기전으로 대부분 9번 염색체와 22번 염색체의 일부 유전자가 서로 자리바꿈을 하면서 특징적인 필라델피아 염색체 유전자의 부산물인 BCR-ABL 단백질이 나타나며 티로신키나아제라는 효소의 활성화를 통해 암 세포의 성장이 이루어지고 혈액암이 발생하는 것으로 알려져 있다.



- [0019] 본 발명의 일 구체예에서 "림프구성 백혈병"이란, 림프구계아구의 단클론성의 증식으로 발병하는 악성 종양 질환으로 림프구계 백혈구가 악성 세포로 변하여 골수에서 증식하고 말초 혈액으로 퍼지는데 간, 비장, 림프계, 대뇌, 소뇌, 척수 등을 침범한다. 대개 골수나 말초 혈액에 림프아세포가 20% 이상 차지하는 경우를 림프구성 백혈병으로 정의하고 있다. 2018년에 발표된 중앙 암 등록 본부 자료에 의하면 2016년에 우리 나라에서는 229,180건의 암이 새로이 발생했는데, 그중 림프구성 백혈병(C91)은 861건으로 전체 암 발생의 0.4%를 차지하는 것으로 조사된 바 있다. 백혈구는 골수구 세포와 림프구 세포로 나뉘는데, 림프구 세포는 전체 백혈구의 35 내지 45%를 차지한다. 림프구는 우리 몸의 필터와 배수의 역할을 담당하며 림프관은 림프의 통로로서, 몸의 특정 부위에서 발생한 악성 종양이 다른 부위로 옮겨가는 전이의 통로 역할도 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 림프구성 백혈병에서 흔하게 나타나는 염색체 전좌로는 B-세포계열인 t(9;22), t(1;19), t(4;11), t(12;21), t(17;19), t(5;14), t(8;14), 또는 t(8;22)와 T-세포 계열인 t(1;14), t(8;14), t(11;14), t(7;10), 또는 t(7;9) 등이 존재한다. 급성 림프구성 백혈병(ALL)에 특이적인 염색체전좌형이 존재하고 융합 유전자를 형성하는 유전자와 그렇지 않은 것이 있다. 융합 유전자를 형성하는 염색체전좌형으로서는 t(9;22) (p34;q11), t(4;11), (q21;q23), t(1;19)(q23;p13) 등이 있다. 그중 t(9;22)(p34;q11)는 통상 만성 골수성 백혈병(CML)에서 볼 수 있는 필라델피아 염색체(Ph1)에서 소아 ALL의 5% 미만, 성인 ALL의 약 25%의 증례에서 나타나는 것으로 알려져 있다. 만성 림프구성 백혈병(CLL)은 초기인 약 20% 진행기에서 약 70% 정도의 염색체 이상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 14번 염색체 이상이 가장 고빈도로 나타나며, t(11;14)(q13;q32), (18q21), t(14;19)(q32;q13), inv(14)(q11;q32) 등의 염색체 이상이 존재한다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서, "브레이크포인트 클러스터 영역 단백질(Breakpoint Cluster Region protein, BCR)"이란 신장 암의 항원인 NY-REN-26으로도 알려져 있으며, BCR 유전자에 의해 인코딩되는 단백질을 의미한다. BCR은 전체 길이가 130kb로 BCR 유전자의 제 11 내지 14 발현 부위와 그 사이의 비발현 부위를 포함한다. 상기 BCR은 인간 22번 염색체 상에 존재하며, BCR/ABL 복합체를 이루는 하나의 유전자로 필라델피아 염색체(philadelphia chromosome, PhI)와 관련이 있다. 제 12, 13 비발현 부위에 절단점(breakpoint)이 집중된다. 제 9 염색체측의 절단점은 ABL 유전자내에 있어 PhI 염색체상에서 BCR/ABL 융합 유전자를 형성한다. 또한 일부 급성 림프성 백혈병에서도 PhI 염색체가 나타난다. 이 경우의 절단점의 반은 BCR 내에 있고, 나머지 반은 BCR 유전자의 긴 제 1 비발현부위의 3' 측에 거의 굳어져 있다. 여기서 이 영역을 minor-BCR(m-BCR), 전술한 BCR을 major-BCR(M-BCR)라고 불러 구별하는 경우가 많다. BCR을 코딩하는 부분에는 소중합체형성능이 있는데, 이는 융합 유전자의 발암성에 필요하다. BCR/ABL 융합 단백질이 광범위하게 연구된 반면, BCR 유전자의 기능은 아직 명확하지 않다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에서, "아벨손 쥐 백혈병 바이러스성 종양 유전자 상동체 1(Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1, ABL1)"이란 인간 9번 염색체 상에 위치한 ABL1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. 그 유전자산물은 분자량 145kDa의 비수용체형 티로신 인산화효소 단백질이며, N 말단이 엑손 1a에서 코드된 Abl 단백질은 핵에 존재하고 엑손 1b에서 코드된 경우에는 N 말단의 글리신 잔기가 미리 스티ل화하여 세포막에 존재한다. Abl 단백질은 Src 유사 제어 영역 SH2와 SH3이 있고, 티로신 인산화효소 영역 및 C 말단에는 세포 주기에 의존하여 DNA에 결합하는 영역이 존재한다. BCR/ABL 복합체를 이루는 하나의 유전자로 필라델피아 염색체와 관련이 있다. ABL 단백질은 비수용체형 티로신키나아제이지만, BCR 단백질과 융합하는 것으로서 티로신키나아제의 활성을 높이며 백혈병화에 작용하는 것으로 알려져 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에서, "BCR-ABL1 융합 유전자(fusion gene)"란, 9번 염색체와 22번 염색체 사이의 전좌에 의해 발생하는 것으로 BCR/ABL 키메라 유전자(BCR/ABL chimera gene)라고도 하며, 주로 만성 골수성 백혈병(CML)에 있어 특징적인 필라델피아 염색체상에서 형성되는 암 유전자이다. t(9;22)(q34;q11) 상호 전좌에 의해 제 22 염색체상의 BCR 유전자가 절단되어 제 9 염색체상의 ABL 유전자와 융합하는 결과가 된다. 약 8.5kb인 mRNA에 전사되지만 BCR 유전자와 절단 부위에 의해 210kDa 또는 185kDa인 융합 단백질이 형성된다. 전자는 만성 골수성 백혈병(CML) 전부와 급성 림프구성 백혈병(ALL)의 일부에 나타나고, 후자는 ALL의 일부에 나타난다. 융합 유전자에는 높은 티로신 인산화효소 활성이 있어, Ras경로 등을 활성화하는 것으로서 CML 발생의 근본적인 원인이 되는 것으로 알려져 있다. BCR 유전자와의 결합 위치의 차이로 2종류의 융합 단백질 p210(210kDa)과 p190(190kDa)이 생성되지만 그 차는 BCR 유전자에 코드되는 영역의 길이에 따른다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에서, "필라델피아 염색체(philadelphia chromosome, PhI)"란, 9번 염색체와 22번 염색체 사이에 전좌가 생겨 합쳐진 돌연변이 염색체이다. 보다 구체적으로는 22번 염색체의 말단이 그보다 크기가 작은 9번 염색체 말단과 바뀐 것이다. 필라델피아 염색체는 1960년 만성 골수성 백혈병 환자의 백혈구에서 발견된 비정상적인 염색체로, 염색체 9와 22 사이에서의 전좌 결과, 9번 염색체의 ABL1 유전자와 22번 염색체의 BCR 유전

자가 합쳐져 융합 유전자인 BCR-ABL1 유전자가 되는 경우 만성 골수성 백혈병에 걸리기 쉬운 것으로 알려져 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서, “차세대 염기서열 분석법(Next Generation Sequencing, NGS)”이란 멘델성 유전 질환과 희귀 질환, 또는 암 등의 질병을 초래하는 원인 유전자를 찾아 이를 이용한 진단 및 예후 예측이 가능하도록 하는 분석법이다. 질병의 원인 유전자를 찾기 위하여 전장유전체(Whole-genome)를 시퀀싱(Whole Genome Sequencing, WGS)하거나 엑손 영역만(targeted resequencing)을 타겟으로 하여 시퀀싱(Whole Exome Sequencing, WES)하거나 임상적인 목적으로 질병 특이적인 타겟 패널 시퀀싱(Targeted panel Sequencing, TGS)을 할 수 있으며, 기존의 생어 염기서열 분석(Sanger sequencing)과 달리 많은 수(백만 개 이상)의 DNA 조각을 병렬로 처리하는 데 특징이 있다. 최근에 차세대 염기서열 분석의 등장으로 유전체 분석에 필요한 비용이 급격히 낮아져 많은 분야에서 다양하게 사용되고 있다. 게놈 시퀀싱과 달리 엑솜 시퀀싱을 포함하는 타겟 시퀀싱은 전체 유전체의 매우 적은 부분을 시퀀싱하는 방법으로 민감도와 특이도를 모두 높이기 위해 일반적으로 타겟 영역만 선택적으로 분리하여 증폭시키는 과정(Target enrichment)이 포함되어 있는 것이 특징이다. 원하는 해당 부위만 특이적으로 검출할 수 있는 최적의 라이브러리를 찾는다면 비용 측면이나 효율성 면에서 매우 유리하기에 추가적인 개발의 필요성이 요구된다.

[0025] 본 발명에서 상기 타겟 영역만 선택적으로 분리하여 증폭시키는 과정(Target enrichment)으로는 타겟 영역에 특이적인 캡처 프로브(capture probe)로 구성되어 원하는 부분만 캡처하는 방식인 하이브리드 캡처 방법(Hybrid capture)과, 프로브가 원형(circle) 형태로 결합하여 원하는 부위를 증폭한 후에 연결하는 방식인 선택적 순환 방법(Selective Circularization)과, 원하는 타겟 영역을 PCR로 증폭시켜서 분석하는 방식인 PCR 기반한 앰플리콘(Amplicon)방법이 존재한다.

[0026] 본 발명에서 상기 NGS는 대량의 단편의 핵산을 동시다발적으로 서열분석하는 기법으로서, 칩(chip) 기반 그리고 증합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR) 기반 쌍 말단(paired end) 형식으로 전장 유전체를 조각내고, 상기 조각을 혼성화 반응(hybridization)에 기초하여 초고속으로 서열분석을 수행하는 것일 수 있다. 상기 NGS는 예를 들면, 454 플랫폼(Roche), GS FLX 티타늄, Illumina MiSeq, Illumina HiSeq, Illumina HiSeq 2500, Illumina Genome Analyzer, Illumina NextSeq, Illumina NovaSeq, Illumina iSeq, Solexa platform, SOLiD System(Applied Biosystems), Ion Proton(Thermo Fisher Scientific), Ion Personal Genome Machine(Thermo Fisher Scientific), Ion S5 Complete Genomics(Thermo Fisher Scientific), Helicos Biosciences Heliscope, Oxford Nanopore, Pacific Biosciences의 단일 분자 실시간(SMRT<sup>TM</sup>) 기술 장비인 Sequel, 또는 이들의 조합에 의해 수행되는 것일 수 있다. 상기 핵산 서열분석은 관심 영역만을 분석하기 위한 핵산 서열분석법인 것일 수 있다. 상기 핵산 서열분석은, 예를 들면, NGS 기반의 표적 서열분석 (targeted sequencing), 표적 딥 서열분석 (targeted deep sequencing), 패널 서열분석 (panel sequencing) 또는 앰플리콘 서열분석(Amplicon sequencing)을 포함하는 것일 수 있다. 상기 표적 서열분석(Targeted sequencing)은 전체 유전체 염기서열 중 관심 부위(Target region)만을 분석하는 염기서열 분석기법을 말하며, 앰플리콘 서열분석(Amplicon sequencing)은 시퀀싱할 유전자 또는 기타 관심 부위의 복제수를 증가시키기 위해 한 쌍 또는 그 이상의 PCR 프라이머를 사용하여 표적 농축을 수행하는 방법으로 기존 PCR(방법)을 사용하여 획득한 DNA 단편의 초고속(대용량) 시퀀싱을 의미한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, NGS 방법을 이용한 BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법으로서 개체 유래물에서 추출한 생물 시료를 이용하여 라이브러리를 제작하는 전 처리 과정과 NGS 장비에서 염기서열 분석을 진행하는 과정으로 이루어지며, 보다 상세하게는 핵산을 분절화시키는 단계, PCR 증폭 단계, 혼성화 단계, PCR 산물 정제 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 환자의 골수로부터 생물 시료를 얻는 단계; 상기 생물 시료로부터 mRNA를 얻는 단계; 상기 mRNA 및 프라이머 세트를 사용하여 BCR-ABL 융합 유전자를 순차적으로 증폭시켜 정제 산물을 제조하는 단계; 상기 단계 산물의 증폭 후 제 2차 PCR을 수행하여 정제 산물을 제조하는 단계; 및 최종 정제 산물의 염기서열을 계단 희석(serial dilution)된 표준 물질을 이용하여 BCR-ABL 융합 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명에서 상기 "개체"는 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 백혈병이 발병하였거나 발병 가능성이 있는 환자로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있으나 환자의 유전자 정보를



확인할 수 있는 시료의 종류라면 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 시료로부터 수득한 핵산은 DNA 또는 RNA 일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구체예에서, “라이브러리”란 증폭에 필요한 프라이머 결합 염기서열을 DNA의 양 말단에 결합한 형태로 만드는데, 이를 일컫는다. 라이브러리는 분석하고자 하는 템플릿 DNA에 어댑터를 연결(ligation)시키거나, PCR을 통해 제작된다.

[0031] 본 발명에서 상기 “어댑터(Adaptors)”란 DNA/cDNA 단편의 양쪽 끝에 결합시키는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 해당 올리고뉴클레오타이드는 DNA/cDNA 단편을 시퀀싱하는데 사용되는 프라이머의 결합 부위를 제공하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서 상기 어댑터는 본 발명이 속하는 분야에 공지되고, 당 업계의 전문가들이 용이하게 이용 가능한 것이라면 이에 제한되지 않고 적용이 가능하다.

[0032] 본 발명의 일 구체예에서, “프라이머(Primer)”란 DNA 중합 효소와 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 같이 사용하여 목표 DNA와 상보적 결합을 하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명에서 상기 프라이머는 적합한 조건하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 BCR-ABL 및 ABL 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 되며 이에 제한되지 않는다. 보다 상세하게는 본 발명에 따른 프라이머 세트는 유전자 증폭 반응에 이용되는 것이 바람직하며, BCR-ABL 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 3 중에서 선택되는 프라이머일 수 있고, ABL 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 4 내지 서열번호 7 중에서 선택되는 프라이머일 수 있다. 보다 바람직하게는, BCR-ABL 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3은 정방향 프라이머(forward primer)이고, 서열번호 1은 역방향 프라이머(reverse primer)인 프라이머 세트일 수 있으며, ABL 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 5 내지 서열번호 7은 정방향 프라이머(forward primer)이고, 서열번호 4는 역방향 프라이머(reverse primer)인 프라이머 세트일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 구체예에서 “표적 유전자”란, 분석대상이 되는 시료 내의 유전자들 중 유전자형 분석에 유용한 변이가 존재하는 유전자로서, 예를 들어 유전자 감식이나 개체 식별에 사용되는 마커 유전자, 특정 질환의 진단에 사용되는 마커 유전자, 염색체 이상 내지는 유전자 이상을 나타내는 유전자, 유전학적으로 의미가 있는 돌연변이를 갖는 유전자, STR (short tandem repeat)을 갖는 유전자 및 단일염기다형성을 갖는 유전자 등을 의미한다. 본 발명의 표적 유전자는 BCR-ABL1 융합 유전자(fusion gene)로 특정하였으며, BCR-ABL 복합체를 이루는 관련 유전자라면 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 일 구체예에서 “대조군 유전자(control gene)”란, 표적 유전자의 정량적 발현량을 판별하기 위하여 검사의 기준이 되는 유전자를 의미한다. 본 발명에서의 대조군 유전자는 ABL 유전자로 특정하였으며, 상기 유전자는 일정 수준의 발현 정도를 유지하는 특성이 있으며, 백혈병 환자의 세포와 정상인의 세포에서의 발현 수준이 유사하며, 각 백혈병의 타입(AML, ALL 또는 CML)에서도 발현 수준에 큰 차이가 없는 점에 비추어, 내부표준 물질로 사용하기에 적합하다. 상기 ABL1 유전자는 차세대 염기서열 분석법(NGS)을 이용하여 ABL1 유전자 대비 BCR/ABL1 융합 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하여 정량하는 키트 또는 방법에 활용하였다.

[0035] 본 발명의 일 구체예에서 “유전자 이상”이란, 유전 정보의 변이 즉 돌연변이가 생긴 경우를 의미한다. 크게 구조 또는 기능에 영향을 미치는 돌연변이가 있으며, 구조에 영향을 미치는 돌연변이는 유전자가 생성하는 단백질이 변형된 결과 생물의 구조가 변형되는 것으로 뉴클레오타이드 수준에서 일어나는 돌연변이(소규모 돌연변이)와 염색체 수준에서 일어나는 돌연변이(대규모 돌연변이)가 있다. 본 발명의 유전자 이상은 염색체 수준에서 일어나는 돌연변이에 해당하며, 유전자 중복, 유전자 결실, 염색체 역위, 간질성 결실, 염색체 전위, 이형접합 소실로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 돌연변이 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 염색체 전위에 의한 유전자 이상을 말하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에서 상기 계단 희석(serial dilution)된 표준 물질은 BCR/ABL 융합 유전자 및 ABL 유전자의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 계단 희석 물질은 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 또는 1:1000000의 배율로 희석된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기의 BCR-ABL 융합 유전자 검출하는 방법으로 검출된 BCR-ABL 융합 유전자

와 대조 유전자(control gene)인 ABL1 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하는 단계를 추가로 포함하는 차세대 염기서열 분석(NGS)에 기반한 BCR-ABL 융합 유전자를 정량 분석하는 방법을 제공한다.

- [0038] 본 발명에서 상기 정량 분석 방법은, 454 플랫폼(Roche), GS FLX 티타늄, Illumina MiSeq, Illumina HiSeq, Illumina HiSeq 2500, Illumina Genome Analyzer, Illumina NextSeq, Illumina NovaSeq, Illumina iSeq, Solexa platform, SOLiD System(Applied Biosystems), Ion Proton(Thermo Fisher Scientific), Ion Personal Genome Machine(Thermo Fisher Scientific), Ion S5 Complete Genomics(Thermo Fisher Scientific), Complete Genomics, Oxford Nanopore, Helicos Biosciences Heliscope 또는 Pacific Bioscience Sequel 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 장비를 이용한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 MiSeq 장비(Illumina 사)를 이용한 것일 수 있으며, 소프트웨어를 이용하여 분석하고 판독 보고서작성이 가능한 장비라면 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 표준 플라스미드를 이용하여 백혈병의 예측 및 진단을 보다 정확하게 정량분석하기 위한 방법으로 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 방법을 사용할 수 있는데, RT-PCR(reverse transcriptase PCR), RQ-PCR(real time quantitative PCR) 및 실시간 PCR(real time PCR)로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행할 수 있으며, 변성(Denaturation) 단계, 결합 단계(Annealing), 및 신장(Elongation) 단계를 포함하는 PCR 방법을 이용한 응용 기술에 해당한다면 이에 제한되지는 않는다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서, "RQ-PCR"이란 증폭하고자 하는 표적 유전자의 염기서열에 대해 상보적인 탐식 유전자에 발광 물질을 부착하고, 유전자 증폭의 초기에 유리되어 발광하는 형광을 측정함으로써 보다 특이적으로 실시간에 증폭 유전자의 양을 정확하게 정량할 수 있는 방법이다.
- [0041] 본 발명의 일 구체예에서 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 진단은 유전자의 수적 또는 질적 이상이 의심되는 경우에 디지털 PCR을 수행한 결과로 해당하는 개체의 정상 또는 위험 상태를 판단하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에서, 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열로 표시되는 프라이머를 제공하고, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열은 BCR-ABL(Breakpoint cluster region-Abelson) 융합 유전자를 증폭하기 위한 것인 프라이머를 제공하고, 상기 서열번호 2 또는 서열번호 3은 정방향 프라이머(forward primer)이고, 상기 서열번호 1은 역방향 프라이머(reverse primer)인 프라이머를 제공하고, 상기 서열번호 4 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열은 ABL(Abelson) 유전자를 증폭하기 위한 것인 프라이머를 제공하고, 상기 서열번호 5, 서열번호 6, 또는 서열번호 7은 정방향 프라이머(forward primer)이고, 상기 서열번호 4는 역방향 프라이머(reverse primer)인 프라이머를 제공하며, 상기 프라이머는 차세대 염기서열 분석(Next-Generation Sequencing, NGS)을 위한 것인 프라이머를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 다른 구체예에서, 서열번호 1 내지 서열번호 7로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 염기서열로 표시되는 프라이머를 제공하며, 상기 프라이머는 차세대 염기서열 분석(Next-Generation Sequencing, NGS)을 위한 것인 프라이머를 제공한다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 프라이머, 및 PCR 증폭 반응 혼합물을 포함하는, BCR-ABL 융합 유전자 증폭용 조성물을 제공하며, 상기 증폭 반응 혼합물은 데옥시뉴클레오타이드, Taq 폴리머레이스, 및 역전사 효소를 포함하는 것인 BCR-ABL 융합 유전자 증폭용 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 조성물을 포함하는 BCR-ABL 융합 유전자 검출용 키트를 제공하며, 상기 키트는 차세대 염기서열 분석(NGS)을 위한 것인 BCR-ABL 융합 유전자 검출용 키트를 제공한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 구체예에서, (a) 생물학적 시료로부터 mRNA를 수득하는 단계; (b) 상기 mRNA 및 제 1항의 프라이머를 사용하여 BCR-ABL 융합 유전자 또는 ABL 유전자를 순차적으로 증폭시켜 정제 산물을 제조하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 정제 산물을 2차 증폭하여 최종 정제 산물을 제조하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 최종 정제 산물의 염기서열을 표준 물질을 이용하여 분석하는 단계;를 포함하는 BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법을 제공하고, 상기 증폭은 RT-PCR(reverse transcriptase PCR), RQ-PCR(real time quantitative PCR) 및 실시간 PCR(real time PCR)로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행하는 것인 BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법을 제공하고, 상기 증폭은, mRNA를 i) 93 내지 97℃에서 pre-변성(pre-denaturation)시키는 단계; ii) 95 내지 98℃에서 45초 변성(Denaturation), 58 내지 62℃에서 60초 결합(Annealing), 70 내지 74℃에서 60초 신장(Elongation)을 1주기로 하여 24 내지 28번 반복하는 단계; 및 iii) 70 내지 74℃에서 최종 신장하는 단계;를 2 내지 3번 반복하여 수행하는 것인 BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법을 제공하며, 상기 표준 물질은

BCR/ABL 융합 유전자 및 ABL 유전자의 염기서열을 포함하는 것인 BCR-ABL 융합 유전자 검출 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 방법으로 검출된 BCR-ABL 융합 유전자와 대조 유전자(control gene)인 ABL1 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하는 단계를 포함하는 차세대 염기서열 분석(NGS)에 기반하여 BCR-ABL 융합 유전자를 정량 분석하는 방법을 제공한다.

[0048] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

### 발명의 효과

[0049] 본 발명은 BCR/ABL1 융합 유전자의 융합 부위에 특이적인 프라이머 세트를 사용한 후 2차 PCR을 하는 차세대 염기서열 분석(next-generation sequencing, NGS)과정을 통해 대조 유전자(control gene)인 ABL1 유전자 대비 BCR/ABL1 융합 유전자의 염기서열 리드(read) 수를 비교하여 정량 분석하는 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명은 차세대 시퀀싱 기술을 이용하여 미세 잔존암을 민감도 있게 검출하는 백혈병 진단용 프라이머 세트와 이를 이용한 백혈병 진단 방법에 관한 것으로, 본 발명의 프라이머 세트와 이를 이용한 방법은 기존의 검사 방법들에 비하여 표준화된 프로토콜을 제시하기에 임상적으로 더 미세한 양의 유전자 이상을 보다 정밀하고, 민감도 있게 검출할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 차세대염기서열분석(next-generation sequencing, NGS)법을 이용하여 정량하는 방법을 위한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 비교예 1에서 표 1의 프라이머 세트 및 표 2의 PCR 조건의 조합으로 확인한 결과이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 비교예 2에서 표 3의 프라이머 세트 및 표 2의 PCR 조건의 조합으로 확인한 결과이다.

도 4a 내지 도 4e는 본 발명의 일 실시예에 따른, 비교예 2의 조건의 조합으로 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명에서 선별된 표 7의 프라이머 세트 및 표 8의 PCR 조건의 조합으로 확인한 결과이다.

도 6a 내지 도 6g는 본 발명의 일 실시예에 따른, 상기 최종 선별된 조건의 조합으로 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 계단 희석된 검체에서 BCR/ABL1 NGS 검사의 직선성 및 민감도를 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 기존 검사법(RQ-PCR)과 비교한 BCR/ABL1 NGS 검사의 상관성( $R^2$ )을 나타낸 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### [0054] 실시예 1: 환자 골수세포로부터 RNA 추출 및 cDNA 합성

[0055] 본 발명의 발명자들은 백혈병 환자로부터 분리된 골수액 시료로부터 버피 코트(백혈구 층)를 수집한 후, 제조사의 프로토콜에 따라 QIAamp RNA 혈액 미니 키트 (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 토탈 RNA 추출을 수행하였다. RNA 품질 및 수량 측정은 Agilent 4200 Tapestation (Agilent Technologies, CA, USA)으로 수행되었다. 1000ng의 토탈 RNA로부터의 역전사는 SuperScript IV VIL0 Master Mix RNA (Invitrogen, CA, USA)를 사용하였다.

[0057] **실시예 2: 차세대 염기서열 분석(NGS)용 cDNA 플라스미드의 제작**

[0058] 대조군 유전자(Abelson murine leukemia viral oncogene; ABL) 및 융합 유전자(Breakpoint cluster region-Abelson fusion oncogene; BCR-ABL)에 상응하는 cDNA의 서열을 함유하는 플라스미드 DNA 표준 샘플을 제작하기 위하여 ABL의 엑손 2 및 엑손 3과 BCR-ABL M-BCR의 중단점 영역을 커버하도록 하였다. BCR-ABL M-BCR 증폭하기 위해, 표준 플라스미드를 농도별로 희석하였으며, 5 µL 당  $10^3$  내지  $10^5$  카피의 범위로 3개 단위 희석된 ABL 표준 플라스미드와, 5 µL 당  $10^1$  내지  $10^5$  카피의 범위로 4개 단위 희석된 플라스미드를 준비하였다. 하기 실시예에서 ABL과 BCR-ABL M-BCR 플라스미드 DNA를 계단 희석하여 혼합한 플라스미드(copy numbers -1, -2, -3, -4, -5, -6 및 -7)를 사용하였다.

[0060] **실시예 3: 차세대 염기서열 분석(NGS)용 프라이머 세트 및 최적 실험 조건의 설계**

[0061] 종래 공지된 BCR/ABL1 융합 유전자 검출 방법은 백혈병 환자의 정확한 진단을 위해 미세한 양의 유전자를 정량적으로 측정하기에는 민감도가 떨어지는 문제점이 존재한다. 따라서 본 발명자들은 보다 정확하게 진단할 수 있는 키트를 개발하기 위하여 하기와 같이 여러 조건에서의 실험을 수행하였다.

[0063] 3.1 최적 프라이머 세트 및 최적 실험 조건의 설계

[0064] 기존 백혈병의 예측 및 진단을 위한 RT-PCR 검사법의 민감도는  $10^{-3}$  내지  $10^{-5}$  복제수(Copies; BCR-ABL copy / 정상 ABL copy)정도이고, 또한 현재 실험 조건의 표준화가 확립되지 않은 상태에 있기에, 하기의 실험 조건 하에 비교 실험을 통하여 정확한 검출이 가능하도록 하는 실험 조건을 확립하고자 하였다.

[0066] 비교예 1

[0067] 초기 디자인한 프라이머 세트의 농도 및 실험 조건은 비교예 1과 같다(표 1 및 표 2 참조). 실시예 1에서 추출된 시료에 하기 프라이머 세트와 PCR 조건 하에 증폭 반응을 수행하였다. 실험 결과,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  및  $10^{-6}$  앰플리콘 패턴을 확인할 수 있었다. 시퀀싱 결과 선형성(Linearity) 값이 일정하지 않고, 계속 변하는 결과가 나타나는 것을 확인하였다(도 2 참조). 따라서 스탠다드 물질을 교체하기에 이르렀다.

[0068] (1.1) 프라이머 세트 구성

**표 1**

프라이머	타겟 시퀀스	Ratio		최종 농도(µM)
BCR-MAJOR-R-C	ATCCGGGAGCAGCAGAA	10	3.0	0.2
BCR-MINOR-R-C	GCACTGCCCGGTTGTC	10	3.0	0.2
ABL-A2-F1-D	ATGCTACTGGCCGCTGAA	5	1.5	0.1
ABL-A2-F2-D	TGCTACTGGCCGCTGAA	5	1.5	0.1
ABL-A3-CONT-R-D	CTTGAGCCTCAGGGTCTG	10	3.0	0.2
ABL-A3-CONT-F1-D	CACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1	0.067
ABL-A3-CONT-F2-D	ACACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1	0.067
ABL-A3-CONT-F3-D	CACACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1	0.067
Total		50		1.000

[0070] (1.2) PCR 반응 조건

**표 2**

Bioneer Hotstar Premix(+Uracil)			
단계	온도	지속시간	사이클
Uracil activation	37°C	2min	1
Initial denaturation	95°C	5min	1

Denaturation	98℃	45sec	38
Annealing	58℃	1min	
Extension	72℃	1min	
Final extension	72℃	5min	1

[0073] 비교예 2

[0074] 스탠다드 물질을 교체한 이후 비교예 2와 같이 다시 실험을 수행하였다(표 3 및 표 2 참조). 하기 표 3과 같은 프라이머 세트와 상기 표 2와 같은 PCR 반응 조건으로 실험을 실시하였다. 이와 같은 조건 하에서 증폭이 되지 않는 것을 확인하였다.

[0075] (2.1) 프라이머 세트 구성

표 3

프라이머	타겟 시퀀스	Ratio		최종 농도( $\mu$ M)
BCR-MAJOR-R-C	ATCCGGGAGCAGCAGAA	2.5	1	0.25
ABL-A2-F1-D	ATGCTACTGGCCGCTGAA	2.5	1	0.25
ABL-A3-CONT-R-C	CTTTGAGCCTCAGGGTCTG	2.5	1	0.25
ABL-A3-CONT-F1-D	CACCATTCCCCATTGTGAT	2.5	1	0.25
Total		10	1	1.000

[0078] 비교예 3

[0079] 비교예 3과 같이 프라이머 재 디자인 후 다시 동일 실험을 수행하였다.

[0080] (3.1.1) 프라이머 세트 구성(1)

표 4

프라이머	타겟 시퀀스	Ratio		최종 농도( $\mu$ M)
BCR_e13_F	AGATGCTGACCAACTCGTG	10	1	0.3
ABL_e2_R	GGTCCAGCGAGAAGGTTTTTC	10	1	0.3

[0082] (3.1.2) 프라이머 세트 구성(2)

표 5

프라이머	타겟 시퀀스	Ratio		최종 농도( $\mu$ M)
BCR-MAJOR-R-C	ATCCGGGAGCAGCAGAA	10	1	0.3
ABL-A2-F1-D	ATGCTACTGGCCGCTGAA	10	1	0.3

[0085] 상기 표 4 및 표 5와 같은 프라이머 세트를 이용하여 상기 표 2의 PCR 반응조건에서 수행하였다. 정상적으로 증폭 산물이 생성되었는지 확인을 위해 전기영동을 수행하여 밴드를 확인한 결과는 도 3a와 같다. NTC에서 나타난 밴드와 동일 위치에 동일 패턴의 밴드가 확인된 것으로 보아 프라이머간 결합임을 확인할 수 있었다(도 3a 참조).

[0086] (3.2) PCR 반응 조건

표 6

[0087]

KAPA HIFI ready mix(+Uracil)/Takara LA taq/Takara Ex taq			
단계	온도	지속시간	사이클
Initial denaturation	95℃	5min	1
Denaturation	98℃	45sec	38
Annealing	56℃	1min	
Extension	72℃	1min	
Final extension	72℃	5min	1

[0089]

상기 표 4 및 표 5의 프라이머에 상기 표 6의 PCR 조건에서 증폭 산물을 생성되었는지 확인을 위해 전기영동을 수행하여 밴드를 확인한 결과이다(도 3b 참조). 상기 전기영동 결과를 살펴보면, 50 내지 100bp 사이에 생성된 다이머를 확인할 수 있다(도 3c 참조). 상기 앰플리콘 패턴을 보다 정밀하게 확인하기 위하여 Agilent사의 4200 TapeStation 장비로 정확한 사이즈 및 농도로 QC 체크를 진행하였다(도 4a 내지 도 4e 참조). 상기에서 생성된 다이머를 제거하기 위하여 사이클 수를 줄이거나, 비즈 클린업으로 다이머 제거 후 재측정하기로 하였다.

[0091]

3.2 선별된 최종적인 프라이머 세트 및 최적 실험 조건

[0092]

비교예 4

[0093]

(4.1) 프라이머 세트 구성

표 7

[0094]

프라이머	타겟 시퀀스	Ratio		최종 농도( $\mu$ M)
BCR-MAJOR-R-D70	AGATGCTGACCAACTCGTG	10	3.0	0.2
ABL-A2-F1-D50	ATGCTACTGGCCGCTGAA	5	1.5	0.1
ABL-A2-F2-D50	TGCTACTGGCCGCTGAA	5	1.5	0.1
ABL-A3-CONT-R-D70	CTTGAGCCTCAGGGTCTG	10	3.0	0.2
ABL-A3-CONT-F1-D50	CACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1.0	0.067
ABL-A3-CONT-F2-D50	ACACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1.0	0.067
ABL-A3-CONT-F3-D50	CACACCATTCCTCCATTGTGAT	3.3	1.0	0.067
Total		50		1.000

[0095]

(4.2) PCR 반응 조건

표 8

[0096]

KAPA Hotstart Premix(+Uracil)			
단계	온도	지속시간	사이클
Initial denaturation	95℃	5min	1
Denaturation	98℃	45sec	26
Annealing	60℃	1min	
Extension	72℃	1min	
Final extension	72℃	5min	1

[0098]

Ipsogen 플라스미드 DNA 스탠다드로 교체한 후 BCR-major 위치를 e12에서 e13으로 바꾸어 진행하였으며, Bioneer Hotstart(+UDG) 키트를 KAPA HiFi HotStart ReadyMix(+Uracil) 키트로 교체하고, 어닐링 온도(Ta)를 60℃로 하고, PCR 사이클 수를 26회 수행한 경우 비특이적인 밴드가 현저하게 제거되는 것을 확인하였다(도 5 참조). 상기 앰플리콘 패턴을 보다 정밀하게 확인하기 위하여 Agilent사의 4200 TapeStation 장비로 정확한 사



이즈 및 농도로 QC 체크를 진행하였다(도 6a 내지 도 6g 참조). 상기 비교예 3에 비하여 비교예 4에서 보다 개선된 효과를 확인하였다.

[0099] 최종적으로 선별된 프라이머 세트의 구성은 하기 표 9와 같다.

표 9

[0100]

프라이머	타겟 시퀀스	서열번호
BCR-MAJOR-R-D70	AGATGCTGACCAACTCGTG	서열번호 1
ABL-A2-F1-D50	ATGCTACTGGCCGCTGAA	서열번호 2
ABL-A2-F2-D50	TGCTACTGGCCGCTGAA	서열번호 3
ABL-A3-CONT-R-D70	CTTTGAGCCTCAGGGTCTG	서열번호 4
ABL-A3-CONT-F1-D50	CACCATTCCTCCATTGTGAT	서열번호 5
ABL-A3-CONT-F2-D50	ACACCATTCCTCCATTGTGAT	서열번호 6
ABL-A3-CONT-F3-D50	CACACCATTCCTCCATTGTGAT	서열번호 7

[0101] 상기와 같은 반복 실험을 통하여 본 발명자들은 최적의 프라이머 세트 및 PCR 반응 조건을 선별할 수 있었다. 이를 통해 표준화된 프로토콜로서의 최적의 NGS 실험 방법을 확립하였다.

#### [0103] 실시예 4: 차세대 염기서열 분석법(Next-generation Sequencing, NGS)에 기반한 BCR-ABL1 융합 유전자의 정량적 검출

[0104] 실시예 1의 추출(extraction) 과정을 통해 분리 정제된 DNA 앰플리콘 시료의 정량을 위해서 다음의 과정을 수행하였다. 역전사(Rreverse transcription)로 제 1 및 제 2가닥 상보성 cDNA를 합성한 후, 이중 가닥 cDNA를 실시예 3에서 선별한 표적 유전자 특이적 프라이머 세트에 증폭시켰다. PCR 반응 조건은 5분 동안 95℃의 초기 변성 단계(Initial denaturation) 1 사이클, 이어서 45초 동안 98℃ 변성(Denaturation), 1분 동안 60℃ 결합(Annealing) 및 1분 동안 72℃의 신장(Extension)의 단계를 거쳐 26 사이클을 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 5분 동안의 최종 신장 단계(Final extension)로 구성되었다. 전체 증폭을 위해서 최대 1시간 30분이 소요되었다. 앰플리콘 시료(라이브러리)를 Agencourt AMPure XP 비드 (Beckman Coulter, CA, USA)로 세척하였다. 이들 프라이머 각각은 공통 시퀀싱 어댑터로 말단에 태그를 달았으며, 이는 최초의 반기능 범용 어댑터(the rst half-functional universal adapter)와 함께 멀티 플렉싱을 위한 타겟 앰플리콘을 증폭시켰다. 앰플리콘을 복제 증폭시킨 후 서열 분석하였다. 라이브러리를 Qubit Fluorometric Quantification(Invitrogen)을 사용하여 정량화하고, 정규화시켜 제조업체의 지침에 따라 MiSeq 또는 NextSeq(Illumina, CA, USA)로 시퀀싱을 위해 시제품 시약으로 각각 처리하였다.

#### [0106] 실시예 5: 기존 검사법인 RQ-PCR(real time Quantitative PCR)과의 비교 분석

##### [0107] 5.1 기존의 검사법인 RQ-PCR에 의한 방법

[0108] 골수 샘플의 BCR-ABL 발현에 대한 정량적 PCR 분석은 IPSOGEN 키트 및 프로토콜(Ipsogen, Marseille, France)을 이용하여 수행되었다. 상기 프로토콜은 실시간 TaqMan 방법을 사용하여 총 ABL 카피 수(copy numbers)에 대한 상대적 BCR-ABL 카피 수(copy numbers)를 정량화하였다. 25 µL PCR 반응에서 5 µL의 cDNA를 주형으로 사용하였다. 개별 CFU(colony-forming units)에 대한 BCR-ABL 및 ABL 유전자의 RT-PCR(real-time PCR)을 각각 2회 수행하였다. 사이클링 조건은 제조자에 의해 권장된 바와 같이 2분 동안 50℃에서 초기 변성(initial denaturation), 10분 동안 95℃에서, 15초 동안 95℃에서 50사이클로 증폭시킨 후 60℃에서 1분 동안 결합(annealing)시켰다. 샘플 분석으로부터 얻은 ct 값은 제조자에 의해 제공된 희석된 플라스미드 표준 곡선을 사용하여 절대적인 카피 수(copy number)로 변환하였다(BCR-ABL에 대한 단일 플라스미드 표준(5 µL 당 10<sup>1</sup> 내지 10<sup>6</sup> 카피 범위로 5개 계단 희석) 및 ABL(5 µL 당 10<sup>3</sup> 내지 10<sup>6</sup> 카피 범위로 4개 계단 희석)). 각각의 런은 2개의 NTC(No Template Control) 및 양성 대조군(mRNA)을 포함하였다. BCR-ABL 결과는 BCR-ABL 대 ABL 카피 수의 비로 보고되었으며, 각각은 샘플당 2번 기술적 반복으로 평균값을 나타내었으며, 정규화된 카피 수(NCN = BCR/ABL copy number/ABL copy number)로 표시하였다.

[0109] 5.2 NGS 시퀀싱 분석방법과 기존 방법(RQ-PCR)의 비교 검증

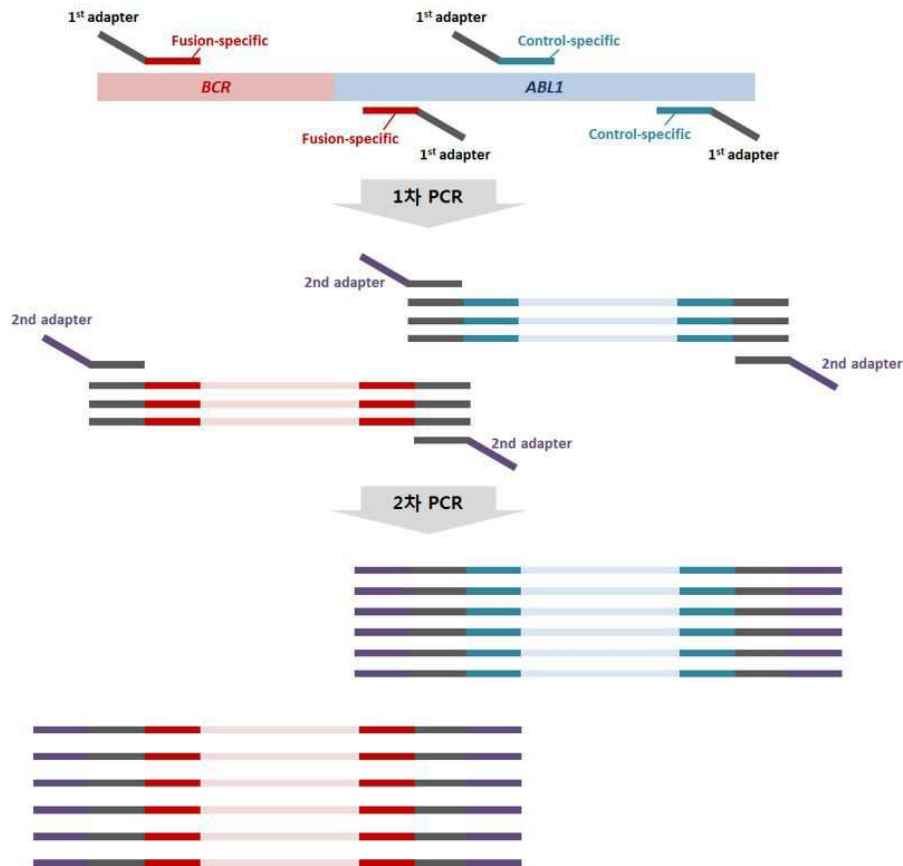
[0110] 계단 희석(Serial dilution)된 표준 물질을 이용하여 프라이머 세트에 증폭하여 NGS 시퀀싱을 수행하였다. BCR/ABL1 양성 RNA를 정상 RNA로 일정 배율로 희석하였다(예를 들면, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000). 시제품 시약으로 라이브러리 제작 후 MiSeq 장비(Illumina 사)로 염기서열 분석하였다(MiSeq® Reagent Kit v3(150cycle)). 샘플당 최소 100,000 리드(read) 이상 염기서열을 분석하였다. NCN(normalized copy number)은 융합 유전자/대조군 유전자 값을 퍼센티지로 나타낸 결과를 말하는데 계단 희석 검체로  $10^{-6}$  복제수(Copies; BCR-ABL copy / 정상 ABL copy)까지 검출 가능함을 확인하였으며, 기존에 출시된 RT-PCR 시약 대비 높은 민감도(sensitivity)를 가진다는 것을 확인하였다(도 7 참조). STAR alignment 소프트웨어를 이용하여 융합 유전자/대조군 유전자의 리드(fusion read/wild-type read) 비율을 계산하였으며, 기존 real-time quantitative PCR 키트(QIAGEN ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kits) 결과와 비교(comparison)한 결과 상관성( $R^2$ ) 값이 0.9 이상이 되는 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조). 상기  $R^2$ (Correlation coefficient) 값은 검량선의 직선성을 나타내며, 그 값이 1에 가까울수록 이상적인 값을 의미한다. 이렇듯 상기에서 확인한 두 개의 데이터를 기반으로 증폭 효율을 확인할 수 있었으며, 결과의 신뢰도 또한 평가할 수 있었다.

[0111] 따라서, 본 발명의 차세대 염기서열 분석법(NGS)을 이용한 표적 유전자의 검출 방법은 표준화된 프로토콜을 통해 한 번의 실험으로 보다 간편하게  $10^{-6}$  복제수(Copies; BCR-ABL copy / 정상 ABL copy)의 미세한 양의 유전자를 검출할 수 있어 보다 정밀하게 백혈병을 진단 및 예측하는 것이 가능한 장점이 있다.

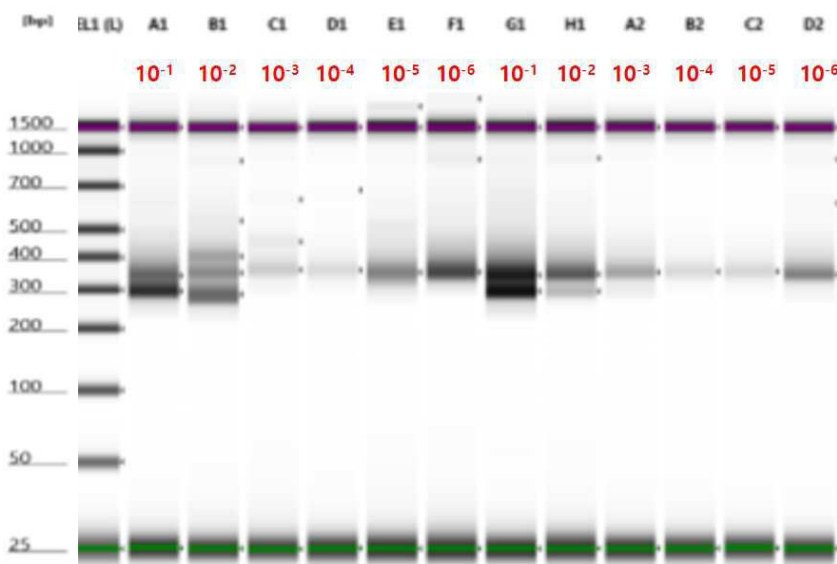
[0113] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

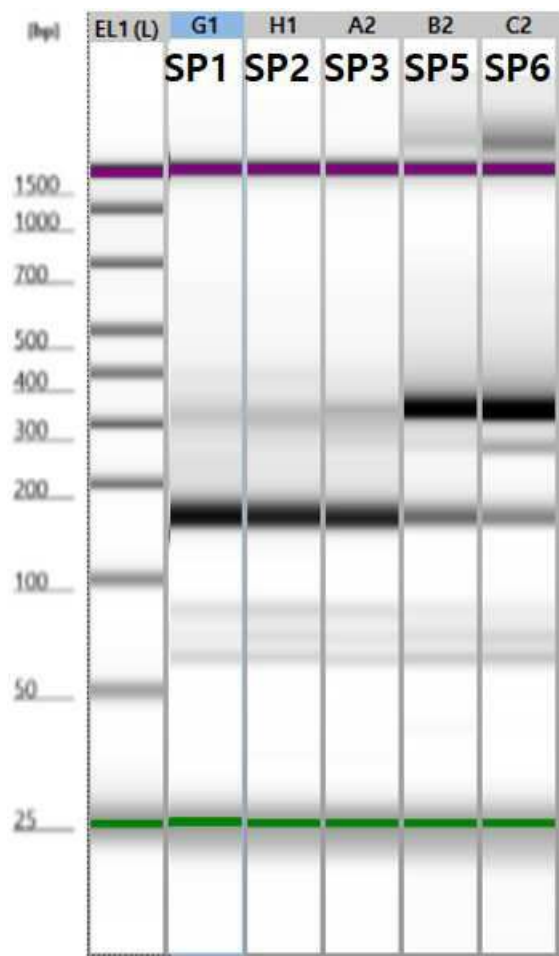
### 도면1



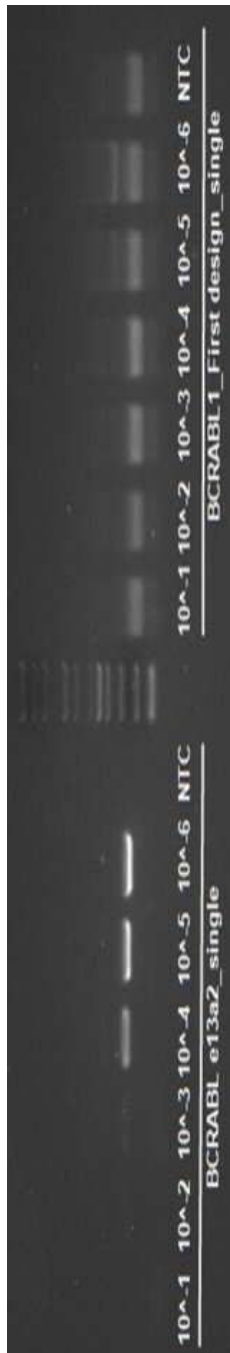
### 도면2



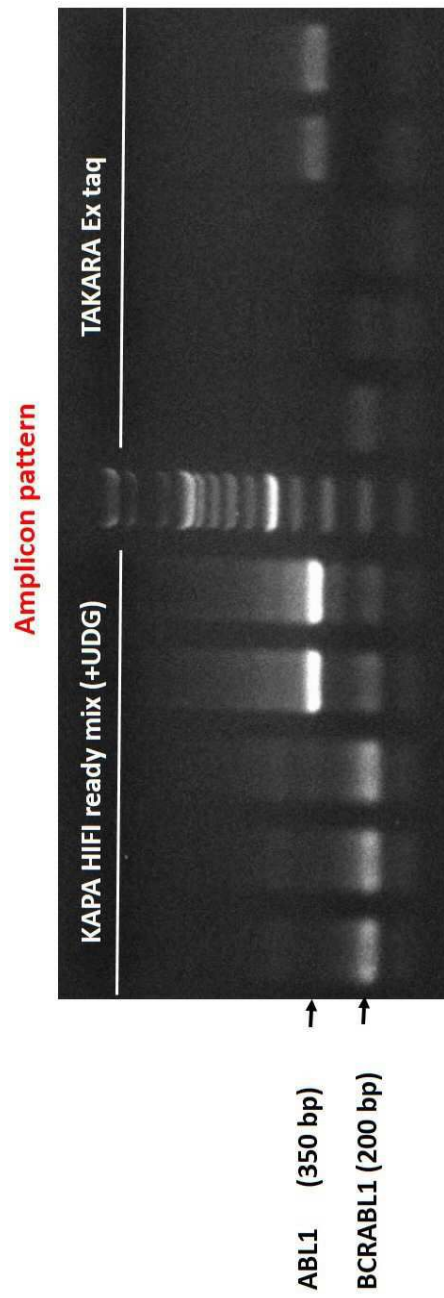
도면3a



도면3b

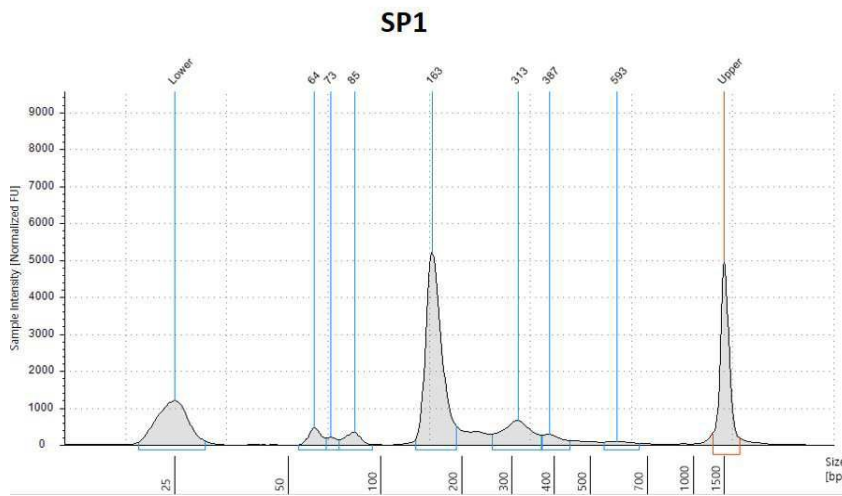


도면3c

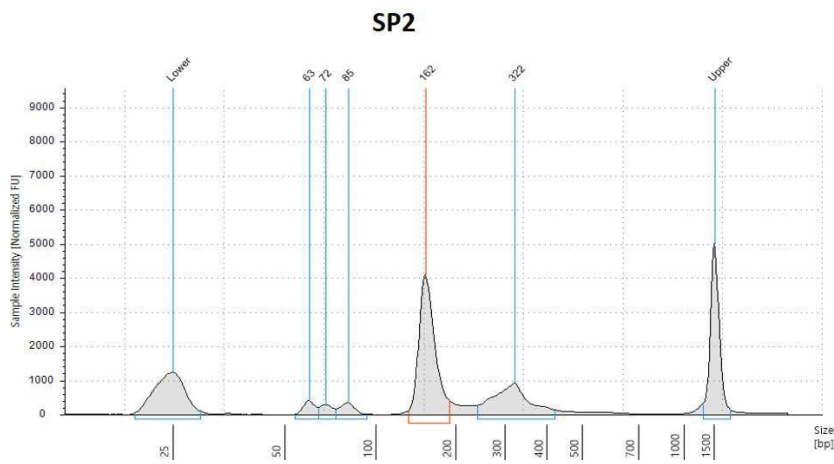




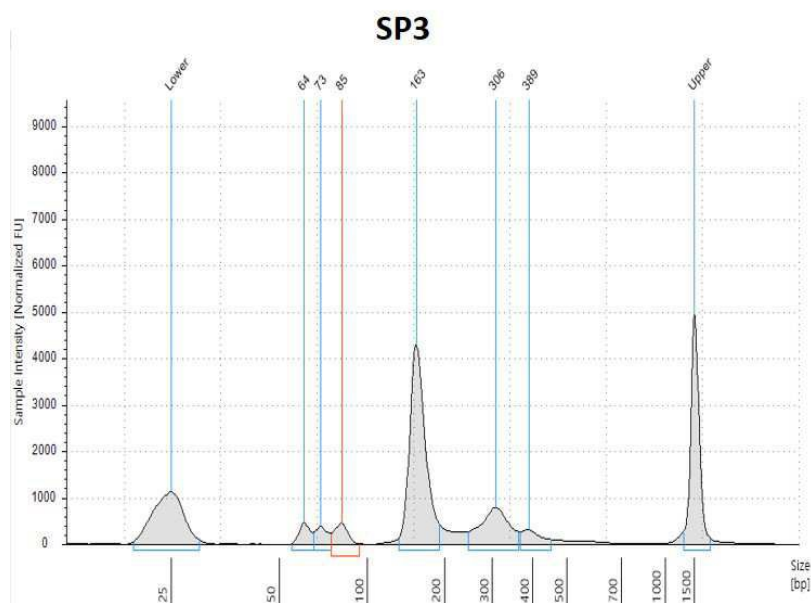
도면4a



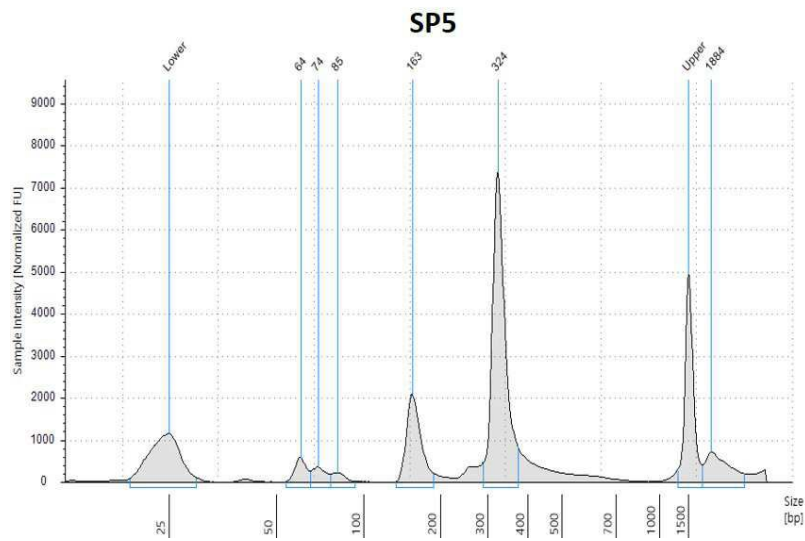
도면4b



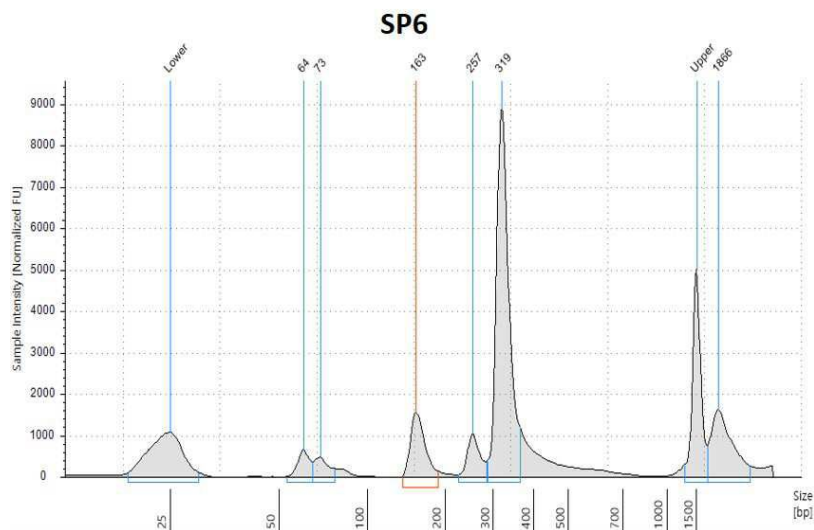
도면4c



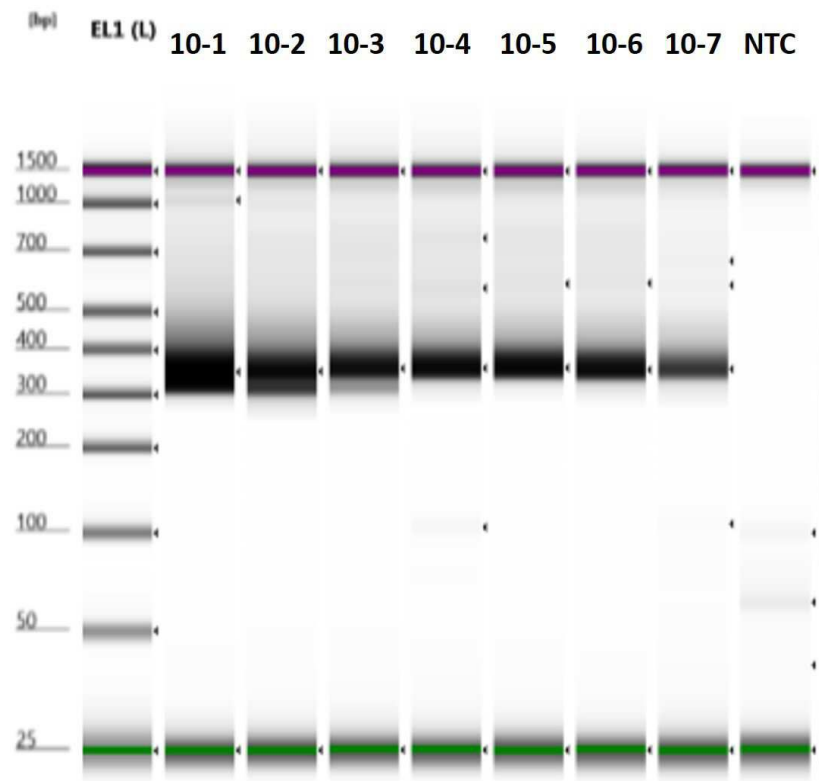
도면4d



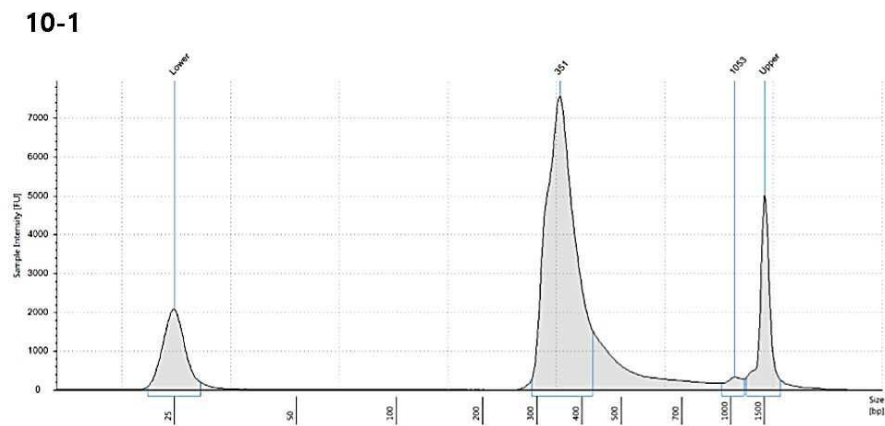
도면4e



도면5

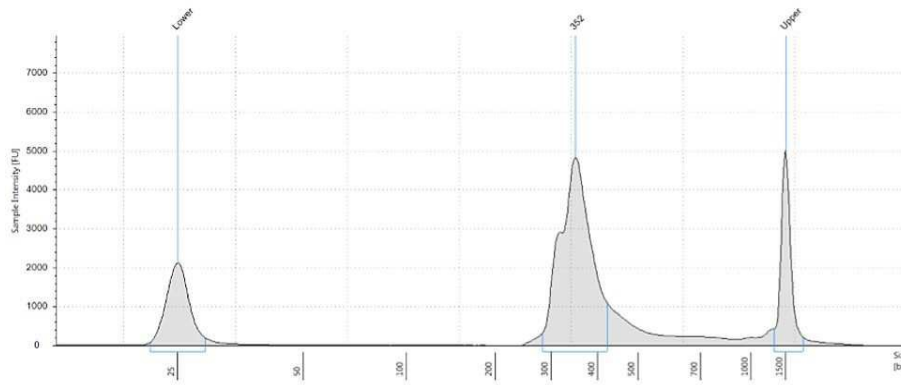


도면6a



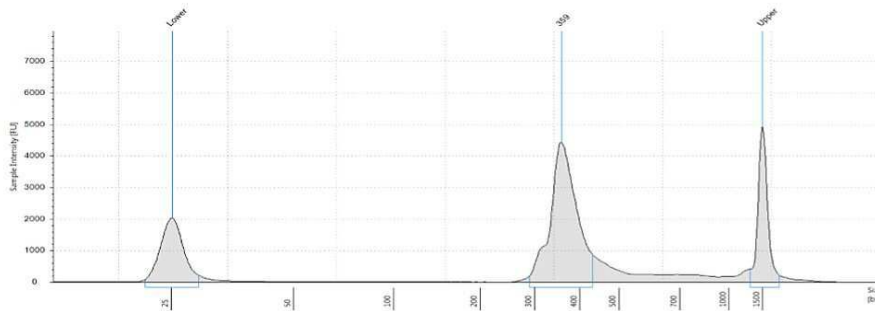
도면6b

10-2



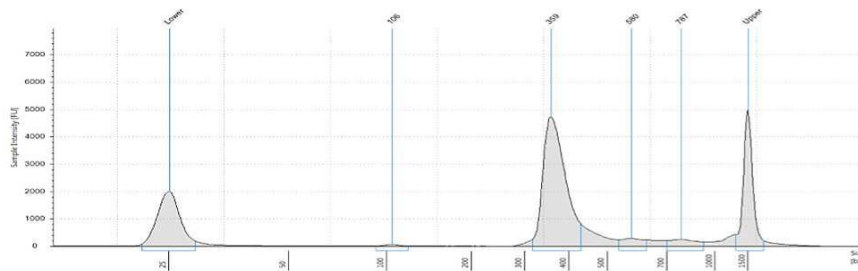
도면6c

10-3



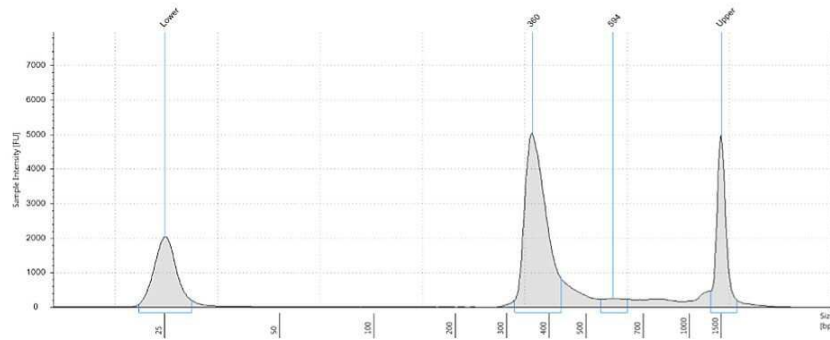
도면6d

10-4



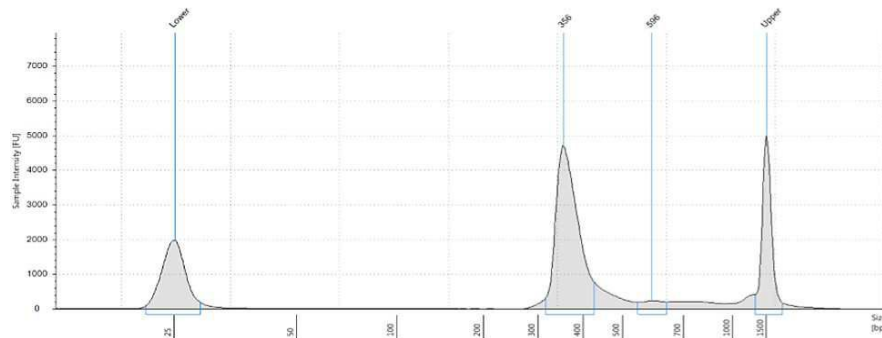
도면6e

10-5



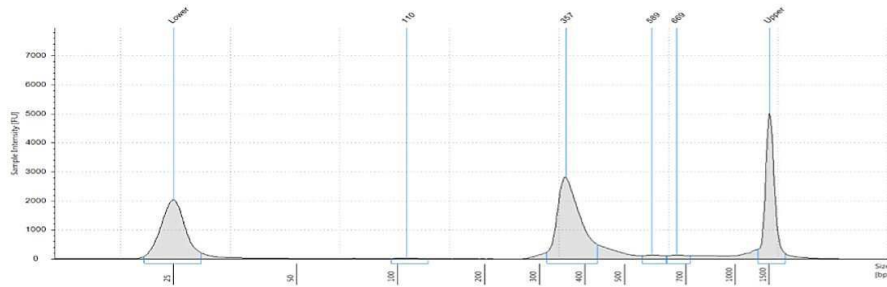
도면6f

10-6

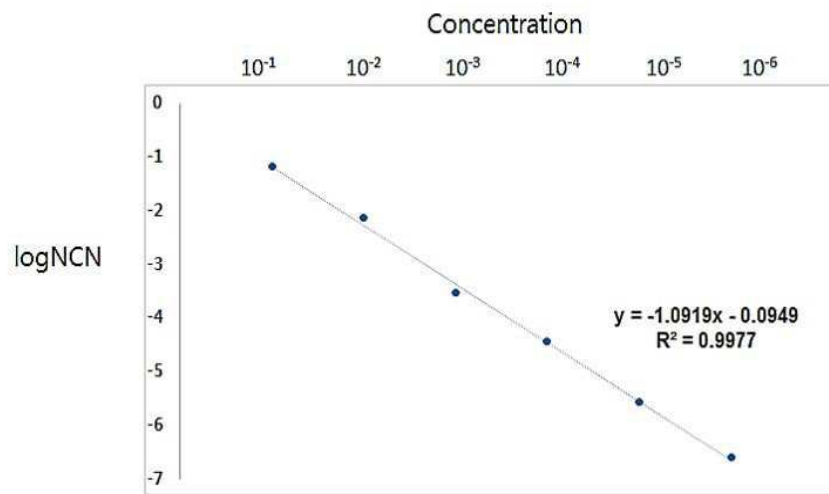


도면6g

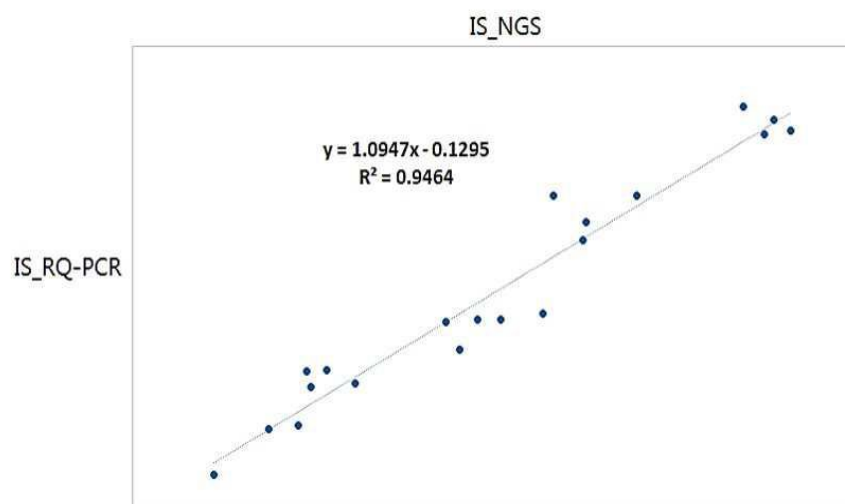
10-7



도면7



도면8



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Primers for diagnosis of Leukemia, and method for diagnosis of Leukemia using the same
- <130> PDPB194287
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220><223> BCR-MAJOR-R-D70

<400> 1

agatgctgac caactcgtg 19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> ABL-A2-F1-D50

<400> 2

atgctactgg ccgctgaa 18

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABL-A2-F2-D50

<400> 3

tgctactggc cgctgaa 17

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABL-A3-CONT-R-D70

<400> 4

ctttgagcct cagggtctg 19

<

210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABL-A3-CONT-F1-D50

<400> 5

caccattccc cattgtgat 19

<210> 6

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ABL-A3-CONT-F2-D50

<400> 6

acaccattcc ccattgtgat

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABL-A3-CONT-F3-D50

<400> 7

cacaccattc cccattgtga t

21