

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2014년 4월 17일 (17.04.2014)



(10) 국제공개번호  
WO 2014/058254 A1

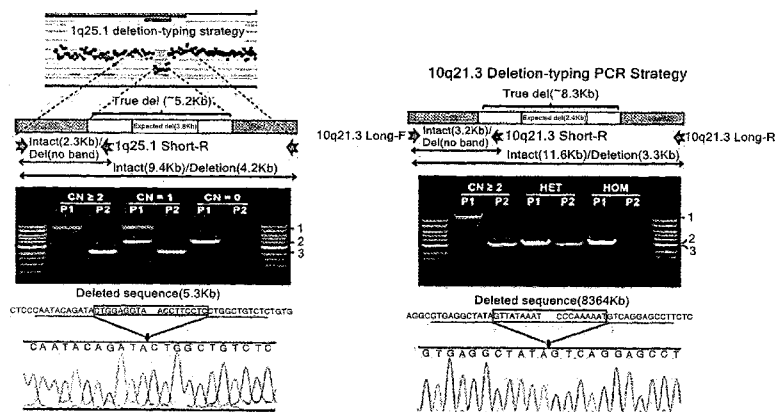
- (51) 국제특허분류: C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009074
- (22) 국제출원일: 2013년 10월 10일 (10.10.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0112495 2012년 10월 10일 (10.10.2012) KR  
10-2012-0144720 2012년 12월 12일 (12.12.2012) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정연준 (CHUNG, Yeun-Jun); 463-869 경기도 성남시 분당구 금곡동 208 삼라마이더스빌 1402 호, Gyeonggi-do (KR). 정승현 (JUNG, Seung-Hyun); 137-907 서울시 서초구 잠원동 64-8 신반포 5 차아파트 115-803, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이름 (ERUUM PATENT & LAW FIRM); 135-851 서울시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR ESTIMATING RISK OF ONSET OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, COMPRISING PRIMER FOR DETECTING DNA COPY NUMBER VARIATION IN 1Q25.1(RABGAP1L) LOCATION, 6P21.32 (C4) LOCATION AND 10.Q21.3 LOCATION

(54) 발명의 명칭 : 1 q 2 5 . 1 (RABGAP1L) 위치, 6P21.32 (C4) 위치 및 1 0 q 2 1 . 3 위치의 DNA 복제 수 변이 검출용 프라이머를 포함하는 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도 예측용 조성물

[Fig. 5]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for estimating the risk of onset of systemic lupus erythematosus, and more particularly, to a composition which determines an examinee as having a high risk of onset of systemic lupus erythematosus when a DNA copy number variation has occurred in the C4 region, 1q25.1 region and 10q21.3 region. The composition of the present invention may estimate the risk of onset of systemic lupus erythematosus using the fact that the copy number variation in C4 location, 1q25.1 location and 10q21.3 location has a synergistic effect in the occurrence of systemic lupus erythematosus. The composition of the present invention enables a clinically friendly method that may reduce an error of an analysis which might be caused by a newly purchased device or by technological limitations, by using PCR which is generally performed in most laboratories of hospital. Furthermore, the composition of the present invention has the advantages of being performed on an examinee using a non-invasive method. Thus, the composition of the present invention may estimate the risk of onset of systemic lupus erythematosus at an early stage, and thus can be used in preventing an aggravated state or in delaying the occurrence of the disease.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2014/058254 A1

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

본 발명은 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도 예측용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 C4 영역, 1q25.1 영역과 10q21.3 영역에 DNA 복제 수 변이가 발생한 경우 전신성 홍반성 루푸스 발병 고위험군으로 보는 것을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 C4 위치, 1q25.1 위치 및 10q21.3 위치의 복제 수 변이가 전신성 홍반성 루푸스 발병에 시너지 효과를 가짐을 이용하여 발병 위험을 예측 가능하게 하며, 대부분의 병원 검사실에서 보편적으로 행해지고 있는 PCR을 이용함으로써 기기를 새로 구입하거나 기술적 한계로 인해 발생할 수 있는 분석의 오차를 줄일 수 있는 임상친화적 방식이다. 또한 본 발명은 검사 대상자에 비침습적인 방법으로 수행할 수 있는 장점이 있다. 궁극적으로 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스 발병 가능성을 조기에 예측하여 상태 악화를 예방하거나 발병을 늦추는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 명세서

**발명의 명칭: 1 q 2 5 . 1 (RABGAP1L) 위치, 6P21.32 (C4) 위치 및 1 0 q 2 1 . 3 위치의 DNA 복제 수 변이 검출용 프라이머를 포함하는 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도 예측용 조성물 기술분야**

- [1] 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도 예측용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 1q25.1 (RABGAP1L) 영역, 6p21.32 (C4) 영역 및 10q21.3 위치에 DNA 복제 수 변이가 발생한 경우 전신성 홍반성 루푸스 발병 고위험군으로 보는 것을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 전신성 홍반성 루푸스(SLE)는 여러 장기에 동시에 영향을 주는 만성 자가면역 질환으로서, 주로 가임기의 젊은 여성에게 발병한다. SLE에서, 비정상적인 면역 반응으로 인해 병적인 자가 항체가 생산되고 면역 복합체가 다양한 장기에 축적되어 염증 및 장기 손상을 초래하게 된다. SLE 발병 기전은 아직 확실히 규명되지 않았으나, 일란성 쌍둥이에서 이란성 쌍둥이보다 동시 발병 위험이 높다는 점 및 가족력과 밀접한 관계가 있다는 점 등으로 미루어 볼 때 유전적 요소가 중요한 것으로 밝혀져 있다.
- [3] SLE는 만성 질환으로 증상의 호전과 악화를 반복하게 된다. SLE 환자는 특히 혈액이 잘 응고되어 혈전이 생기는 경향이 있어, 젊은 나이에 도 관상동맥질환을 일으킬 수 있고, 이로 인해 협심증이나 심근경색이 발생할 가능성이 높아진다. 임신 중인 경우 태아 사산의 위험도 있다. 또한 인플루엔자와 폐렴구균 등 호흡기 감염 원인균에 취약하다. 따라서 SLE의 발병위험을 미리 예측하여 발병을 늦추거나 예방하고, 발병된 경우 적절한 치료를 통해 증상을 경감시키고, 신장, 폐, 심장 등 주요 장기의 손상을 방지하는 것이 중요하다. SLE의 합병증은 인플루엔자와 폐렴구균에 대한 예방접종을 시행하고, 고혈압, 혈당, 지질대사장애 등 동맥경화와 연관된 인자들을 조절함으로써 예방할 수 있다.
- [4] 최근 genome-wise association studies(GWAS)를 통해 *HLA*, *IRF5*, *STAT4*, *TNFAIP3*, *PTPN22*, *BLK*, *BANK1*, *TNFSF4*, *ITGAM*, *KIAA1542*, *PXK* 등의 후보 유전자에서 밝혀진 다수의 SNP가 다양한 민족에서 SLE 발병 위험과 관계가 있는 것으로 보고되었다. SNP 뿐 아니라, DNA 복제 수 변이(DNA copy number variations, CNVs)도 유전적 혼란을 초래하고 유전자 재배열 현상을 일으켜 단백질 발현에 영향을 주어 SLE 발병에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 일 예로, *C4* 와 *FCGR3B*에서의 CNV는 백인에서 SLE 발병 위험을 높인다는 것이 밝혀져 있다. 그러나 다른 민족에서 이와 관련된 연구가 거의 없는 실정이다.
- [5] 이러한 배경에 기초하여, 본 발명자들은 SLE 발병 위험성을 조기에 진단할 수 있는 신규한 마커에 대하여 연구한 결과, 염색체의 1q25.1 및 10q21.3

좌위(locus)에서의 결실 돌연변이(deletion variant)가 있는 경우 SLE 발병 위험이 현저히 높아짐을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[6]

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

[7] 본 발명은 상기와 같은 배경에서 안출된 것으로, 1q25.1 위치, 6p21.32 (C4) 위치 및 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이 검출용 프라이머를 포함하는 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도 예측용 조성물 및 키트를 제공함을 목적으로 한다.

[8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[9]

#### 과제 해결 수단

[10] 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus) 발병 예측용 조성물로서, 상기 조성물은 검체의 염색체상의 C4 위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물을 제공한다.

[11] DNA 복제 수 변이의 범위는 결실 타입(deletion-type)일 수 있고 (0 또는 1 copy) 획득 타입 (gain-type)이 될 수 있으나 (>2 copy), 이에 제한되지 않는다.

[12] 1q25.1에 위치한 RABGAP1L(RAB GTPase activating protein 1-like) 유전자는 GTPase-activating protein을 코딩한다. 이 단백질은 phosphotyrosine 결합 도메인을 갖고 있어 신호전달 과정에서 작용하는 tyrosine-kinase일 것으로 생각되고 있으나, 세부적인 생물학적 작용이나 병인론에 관여하는지 여부는 밝혀져 있지 않다.

[13] 본 발명자들은 연구 과정에서 RABGAP1L 유전자의 intron 20에 위치한 5.2 Kb 크기의 결실 타입 CNVR을 발견하였으며, 이 CNVR이 선택적 재조합(alternative splicing) 또는 번역 후 변형(posttranslational modification)을 통하여 이 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있다는 사실을 발견하였다. 10q21.3 위치에서는 8.3 Kb 크기의 결실 타입 CNVR을 규명하였다. 10q21.3 영역은 코딩하는 유전자가 없으나, 다수의 GWAS 연구에서 비번역 부위도 다양한 표현형에 관련이 있다는 것이 밝혀진 바 있다. 또한 CD34+ 세포의 핵산분해효소 접근 가능 부위(nuclease accessible site, NAS)가 10q21.3 위치와 관련이 있다는 보고가 있다. NAS는 전사인자 결합 부위로 작용하며, 조혈모세포 분화에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 CD34+ 세포의 골수 분화와 SLE 발병 위험에 이 위치의 결실이 관여하는 것일 수 있다.

[14] GWAS discovery 단계에서 SLE와 관련이 있는 것으로 기존에 제시된 CNV 들 가운데, C4의 CNV 가 본 발명에서도 유의한 상관관계를 보였다.

- [15] 한편 본 발명은 한국인 여성을 대상으로 하여 완성한 것이나, 이러한 복제 수 변이는 민족에 관계없이 발생할 가능성이 높다. 예를 들어서, Yang et al.의 논문에서 서양인에서 C4의 복제수가 작으면 SLE 발병 위험이 높고, 크면 SLE 발병 위험이 낮다고 보고하고 있고, 한족 중국인의 경우에도 동일한 결과가 나타난다고 보고된 바 있다. 그런데 이러한 결과는 본 발명에 대한 실험에서도 밝혀졌다. 구체적으로는 C4의 복제수가 높으면 발병 위험이 낮았다(OR=0.40, 95% CI=0.16-1.03, P=0.057). 따라서 검체는 한국인 여성에 한정되지 않고 어떤 민족도 가능하다.
- [16] 또한 검체의 염색체는 구강 상피, 머리카락 등에서 유래된 검체의 세포로부터 얻을 수 있으며, 세포의 출처는 이에 제한되지 않는다.
- [17] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 1q25.1 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 1 및 2의 DNA 서열을 포함하는 genomic quantitative PCR 용 프라이머 쌍인 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 3 및 4의 DNA 서열을 포함하는 genomic quantitative PCR 용 프라이머 쌍인 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 1q25.1 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 5 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 deletion-typing PCR 용 프라이머임을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 9 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 deletion-typing PCR 용 프라이머임을 특징으로 한다.
- [21] 또한 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus) 발병 위험도 예측용 키트로서, 상기 키트는 검체의 염색체상의 C4 위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트를 제공한다. 본 발명의 용어 '키트'는 바이오마커를 포함하고 그 외 각종 전처리에 필요한 물질 및 분석에 필요한 물질 등을 모두 포함하는 구성으로 상용화할 수 있는 세트를 의미한다.
- [22] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 키트는 서열번호 1 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명은
- [24] A) 검체의 염색체상의 6p21.32 (C4) 위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치에 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)를 검체 DNA 시료에 첨가하여 PCR을 수행하는 단계; 및

- [25] B) 상기 수행된 PCR 결과로부터 검체가 C4 위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치에 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation)를 가지고 있는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명의 일 구현에로서,
- [27] 상기 A)단계의 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 genomic quantitative PCR 용 프라이머임을 특징으로 한다.
- [28] 본 발명의 다른 구현에로서,
- [29] 상기 A)단계의 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출, 크기측정 및 경계측정용 프라이머(primer)는 서열번호 5 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 deletion-typing PCR 용 프라이머임을 특징으로 한다.
- [30] 본 발명의 다른 구현에로서,
- [31] 상기 방법은 1q25.1 (RABGAP1L), 6p21.32 (C4) 및 10q21.3 세 위치 모두에서 결실이 있는 개체의 경우 (OR=5.52), 세 위치 중 두 위치에서 결실이 있는 경우 (OR=1.78), 세 위치 중 한 위치에서 결실이 있는 경우 (OR=1.43) 및 세 위치 모두에서 결실이 없는 경우 (OR=1) 순서로 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험이 높은 것으로 진단하는 것을 특징으로 한다. 결실의 수에 따른 OR은 농도 의존적 증가 양상을 보였다( $r^2=0.965$ ).

[32]

### 발명의 효과

- [33] 본 발명의 조성물은 C4 위치, 1q25.1 위치 및 10q21.3 위치의 복제 수 변이가 전신성 홍반성 루푸스 발병에 시너지 효과를 가짐을 이용하여 발병 위험을 예측 가능하게 하며, 대부분의 병원 검사실에서 보편적으로 행해지고 있는 PCR을 이용함으로써 기기를 새로 구입하거나 기술적 한계로 인해 발생할 수 있는 분석의 오차를 줄일 수 있는 임상친화적 방식이다. 또한 본 발명은 검사 대상자에 비침습적인 방법으로 수행할 수 있는 장점이 있다. 궁극적으로 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스 발병 가능성을 조기에 예측하여 상태 악화를 예방하거나 발병을 늦추는 데 중요하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

[34]

### 도면의 간단한 설명

- [35] 도 1은 genome-wide CNV discovery에서 독립적 복제에 이르는 분석 과정을 나타낸 도이다.
- [36] 도 2는 극히 적은 수의 CNV가 포함되어 있는 영역은 CNVR로 보지 않음을 표현한 모식도이다.

- [37] 도 3은 1q25.1에서의 *RABGAP1L* CNV의 대립유전자 강도와 qPCR 확인 결과를 나타낸 도이다.
- [38] 도 4는 1q25.2(*RABGAP1L*)과 10q21.3의 SLE에 대한 OR을 복제 수별로 나타낸 것으로 이 도에서의 복제 수는 qPCR로 검출된 복제 수를 의미한다. 독립적 복제실험 결과 1q25.1 및 10q21.3 CNV 영역의 결실이 루푸스 리스크와 연관 있는 반면 복제수가 상대적으로 많은 경우는 루푸스 위험이 낮아지는 결과를 나타낸 도이다.
- [39] 도 5는 결실 타이핑 PCR과 결실-CNVR 경계를 결정한 전략을 나타낸 모식도이다. 하얀 박스는 결실된 영역을 나타낸다. 결실이 있을 것으로 예상되는 부분의 주위 부분(flanking region)의 파란 화살표는 결실을 탐색하기 위한 프라이머 세트를 나타낸다. 결실된 부위 내에 빨간 화살표는 HOM과 HET을 구별하기 위한 세트를 나타낸다. 상단 도는 두 CNVR에 대한 전략모식도이고, 중간 도는 각각의 전략에 따라 실시한 deletion-typing PCR 산물의 전기영동 결과를 나타내며, 하단 도는 DNA 염기서열 분석을 통해 결실 중지점(화살표가 가리키는 부분)을 보여주는 모식도이다.
- [40] 도 6은 qPCR로 규명된 전체 C4, C4A 및 C4B 유전자에 대한 복제 수 분포를 나타낸 것이다. 검은색 막대는 환자군, 회색 막대는 대조군을 나타낸다.
- [41] 도 7은 SLE 감수성에 대한 OR의 농도 의존적 경향을 나타낸다. 본 발명자들은 결실의 정도가 클수록 SLE 발병 위험도가 기준보다 높아질 것으로 예상하였다.

[42]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 본 발명자들은 400명의 한국인 SLE 환자와 200명의 건강한 한국인의 genome-wide CNV 프로파일을 SNP array를 이용해 분석함으로써 SLE와 관련된 CNV를 규명하고자 하였다. 이를 위하여, 1단계로 genome-wide CNV 분석을 통해 18,266개의 CNV를 찾았고 이를 바탕으로 2544개의 CNVR을 정의하였으며 이 중 빈도가 5%이상인 144개의 CNVR을 대상으로 연관성 통계분석을 실시하였다. 144개의 common CNVR중에서, 1q25.1, 8q23.3, 10q21.3이 가장 SLE와 관련이 높은 것으로 GWAS 분석 결과 밝혀졌다 (각각 OR=2.28, P=4.4 x 10<sup>-3</sup>; OR=0.37, P=5.2 x 10<sup>-4</sup>, OR=1.62, P=0.039).
- [44] 이 3개의 후보 CNVR 구역에 특이적인 프라이머를 디자인하고 1단계의 실험군-대조군 세트보다 더 큰 규모의 독립적 실험군-대조군 세트에 대해 target-specific qPCR을 실시하여 1단계의 결과를 복제한 결과, 1q25.1의 CNV 및 10q21.3의 결실이 성공적으로 복제되었다(각각 OR=1.30, P=0.038; OR=1.90, P=3.6 x 10<sup>-5</sup>).
- [45] 3개의 후보 CNVR 구역 외에 C4 유전자 구역의 CNVR도 GWAS 발굴 단계에서 SLE와 관련성이 높은 것으로 파악되었기에 qPCR 방식으로 C4에 대한 독립적 검증을 실시한 결과 SLE 발병 위험도가 유의하게 높았다(OR=1.88, P=0.01).

따라서 C4 CNVR도 SLE 발병위험도 예측 모델에 포함시켰다. 그 결과 세 부위 모두에서 결실이 있는 경우 세곳 모두에서 결실이 없는 경우보다 SLE 발병 위험이 현저히 높았다(OR=5.52, P=3.9 x 10<sup>-4</sup>).

- [46] 이들의 관계는 결실 타이핑 PCR로 다시 확인하였다. Genomic qPCR 방식으로 성공적으로 복제가 확인된 두 해당 CNVR 구역에 대해 직접적으로 결실의 존재 여부, 크기, 경계를 확인할 수 있는 특이적인 프라이머를 디자인하고 이를 이용한 deletion-typing PCR을 수행하여, 결실된 영역의 정확한 크기(1q25.1의 경우 5.2Kb, 10q24.3의 경우 8.3Kb)와 결실 중지점(deletion breakpoint)을 규명하였다. Deletion-typing PCR을 이용한 복제실험에서도 qPCR에서와 마찬가지로 1q25.1 및 10q21.3의 결실과 SLE 위험도간의 연관성이 성공적으로 복제되었다(각각 OR=1.38, P=0.009, OR=1.40, P=0.011).
- [47] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[48]

[49] **[실시예]**

[50] **실시예 1. 연구 대상 및 통계적 분석 방법**

[51] **1-1. 연구 대상**

[52] 모든 연구 대상은 한국인 민족으로 구성되었다.

[53] CNV-GWAS 분석을 위해, 400명의 SLE 환자(전원 여성, 평균 연령 31±10.0세)를 한양대 병원(대한민국, 서울 소재)의 류머티즘성 질환 부서의 BAE 루푸스 집단으로부터 모집하였다. 이 환자들은 1997 American College of Rheumatology classification criteria에 의해 SLE로 진단된 환자들에 해당한다. 대조군으로, 동일 병원에서 SLE 환자가 아닌 200명의 사람들을 모집하였다(전원 여성, 평균 연령 33±9.2세).

[54] 독립적 복제를 위해서는, 환자 564명과 511명의 대조군(총 1075명)을 동일 병원에서 모집하였다.

[55] 이 연구는 institutional review board(CUMC11U199)의 승인 하에 수행되었다.

[56]

[57] **1-2. 통계적 분석**

[58] 통계적 분석은 Stata software(version 10.0; Stata Corporation, College station, TX)와 SPSS for Windows(version 11.5; SPSS, Chicago, IL)을 이용하여 수행하였다. P value가 0.05 이상인 경우 유의성이 있는 것으로 보았다.

[59]

[60] **실시예 2. 전체 genome SNP 유전자형(genotype) 분석**

[61] Illumina사의 Human 610s Quad-Bead Chip platform(620,901 SNP 마커 포함)을 이용해 전체 genome SNP에 대한 유전자형(genotype) 분석을 수행하였다. 공지된 CNV 당 프로브의 평균 숫자는 37.7이다. 샘플당 약 750ng의 genomic DNA가

유전자형 분석에 사용되었다. 본 발명자들이 사용한 샘플은  $99.89 \pm 0.16\%$ 의 평균 SNP call rate를 보였다. plate or batch effect를 최소화하기 위해서, 동일한 기간 동안 동일 환경에서 모든 과정을 수행하였다.

[62]

[63] **실시예 3. 품질 검증 및 복제 수 변이(CNV) 규명**

[64] Illumina 사의 GenomeStudio software를 이용하여 신호 강도(signal intensity)(log R ratio:LRR)와 대립 유전자 강도(allele intensity)(B 대립유전자 빈도)를 포함하는 실험 데이터를 얻었다.

[65]

[66] **3-1. 품질 검증**

[67] 먼저 이 데이터의 품질을 검증하는 과정을 거쳤다. 성공적인 SNP 추출 비율(SNP call rate)이 90% 미만이거나, LRR 표준 편차가 0.24를 초과하는 경우, B 접합자 빈도 부동(drift)이 0.01을 초과하는 경우, wave factor가 0.05 미만인 경우에 해당 개체들은 실험 결과에서 제외하였다.

[68]

[69] **3-2. CNV 추출**

[70] 본 발명자들은 신호 강도(signal intensity)(log R ratio:LRR)와 대립 유전자 강도(allele intensity)(B 대립유전자 빈도) 자료를 기초로, PennCNV 알고리즘을 기본 세팅 상태로 사용하여 CNV를 추출했다.

[71]

PennCNV 알고리즘은 HMM을 사용하므로 연속적으로 존재하는 CNV(consecutive CNV)의 최소 숫자에 한계값(threshold)이 있지는 않았으나, 이 과정에서 밝혀진 모든 SNP는 3개 이상의 연속적으로 존재하는 SNP(3-1988개에 다다른 숫자의 SNP가 발견되었다. CNV당 평균 프로브의 개수는 13.42였고, 중앙값은 7이었다)를 포함하고 있었다. 각 CNV의 경계는 첫 SNP 프로브의 선형 위치에서 마지막 프로브(hg18)에 이르는 길이로 결정된다. CNV의 일반적인 특징에 대해서는 하기 표 1에 나타내었다.

[72]

[73] 표 1

[Table 1]

Parameters	Case (n=382)	Control(n=191 )	Total(n=573)	Mann-WhitneyP- value
Total number of CNVs	12,287	5,979	18,266	
Avg. CNVs per sample (Median)	30.8 (30)	30.2 (30)	30.6 (30)	0.906
Gain	13.4 (11)	12.0 (11)	12.9 (11)	0.153
Loss	17.9 (17)	18.3 (18)	18.0 (18)	0.096
Avg. of Size (kb) (Median)	49.2 (20.4)	54.1 (21.1)	52.5 (21.0)	0.012
Gain	70.1 (30.1)	71.4 (29.3)	70.5 (29.8)	0.107
Loss	42.4 (13.2)	34.8 (13.2)	39.8 (13.2)	0.548
Ratio (Loss/Gain)	1.4	1.5	1.4	

[74]

[75]

각 CNV의 경계(boundaries)는 첫 번째 SNP probe로부터 마지막 SNP 프로브(hg18)까지의 직선 거리로 결정했다.

[76]

1사분위수(*first quartile*) -  $1.5 * IQR < N < 3$ 사분위수(*third quartile*) +  $1.5 * IQR$ 의 공식에 따라 계산하여, 지나치게 적거나 많은 CNV를 포함하는 샘플은 실험 결과에서 제외시켰다. 여기서 N은 각 샘플에서 검출된 CNV의 숫자를 의미하며, IQR은 600명의 연구 대상에서 검출된 CNV 추출 세트로부터 계산된 사분위수 범위(*inter-quartile range*)를 의미한다. 마지막으로, 총 573개의 샘플(382명의 환자 및 191명의 대조군)을 분석에 포함시켰다.

[77]

[78]

#### 실시예 4. CNV 영역(region) 규명 및 통계적 분석

[79]

본 발명자들은 각 프로브에 대한 CNV 데이터를 만들고 정상(2X), 결실(동형접합 결실=0X; 반접합 결실=1X), 획득( $\geq 3X$ )으로 구성된 복제 수 상태(status)에 기초해 CNV를 구별했다. 573명의 개체로부터 CNV를 확인하고, Redon et al.에 기재된 방법대로 CNVRuler software를 사용하여 CNV간에 겹치는 부분을 합쳐서 CNV의 일반적인 영역(CNV region, CNVR)을 규명하였다. 이 방법은 직접적으로 CNVR을 규명할 수 있다는 장점이 있으나, CNVR에 포함된 CNV 중 크기가 특별히 큰 CNV가 있는 경우에 CNVR의 크기가 실제보다 크게 산출될 수 있다는 단점이 있다. 또한 모든 CNV 추출이 포함된 경우라도, CNVR의 빈도가 싱글턴(singleton)이나 극히 드문 CNV가 포함되어 있다면 CNVR의 크기가 실제보다 크게 산출될 수 있다(도 2 참조). 이러한 가능성을

최소화하기 위해서, 극히 적은 수의 CNV(전체 CNV의 10%미만)가 포함되어 있는 영역은 CNVR로 보지 않았다.

[80] 총 18,266 CNV를 573개의 샘플에서 규명하였다. 개인의 CNV 수의 중간값은 30(1~285의 범위)이었고, CNV의 중간 크기는 21.0kb(14bp~18Mbp의 범위)였다. copy number-loss CNV는 copy number-gain CNV보다 1.4배 더 빈도가 높게 나타났다.

[81] 18,266개의 CNV로부터 2,544개의 CNVR을 규명하였다. 그 중 144 CNVR이 5% 이상의 개체들에서 나타났다.

[82] 하기 표 2에는 5% 이상의 개체에서 발견된 144 개의 CNVR을 나타내었다.

[83]

[84] 표 2

[Table 2]

CNVR	Chr	Start(bp)	End(bp)	Length (Kb)	G/L	RefSeq gene annotation
cnve1	1	1,610,720	1,626,497	15.7	G/L	MMP23A, CDK11B, CDK11A
cnve2	1	12,777,429	12,841,261	63.8	G/L	PRAMEF11, LOC649330, HNRNPCL1, PRAMEF2
cnve3	1	17,085,956	17,140,083	54.1	G/L	CROCC
cnve4	1	76,124,315	76,124,567	0.25	G/L	MSH4
cnve5	1	147,292,384	147,637,598	345.2	G/L	LOC388692, FCGR1C
cnve6	1	173064490	173068262	3.7	G/L	RABGAP1L
cnve7	1	246,837,884	246,852,068	14.,1	G/L	-
cnve8	2	24,456,463	24,459,556	3.1	L	-
cnve9	2	36,263,684	36,264,490	0.8	G/L	-
cnve10	2	41,092,148	41,101,972	9.8	G/L	-
cnve11	2	52,613,957	52,637,176	23.2	G/L	-
cnve12	2	89731562	89885025	153.4	G/L	-
cnve13	2	132,485,521	132,588,945	103.4	G/L	-
cnve14	3	1,652,400	1,666,090	13.7	L	-
cnve15	3	37,954,886	37,961,253	6.4	L	CTDSPL
cnve16	3	53,003,023	53,013,826	10.8	L	SFMBT1

cnve17	3	65,166,887	65,187,636	20.8	L	-
cnve18	3	90,421,209	90,576,572	155.4	G/L	-
cnve19	3	150,446,085	150,450,025	3.9	L	-
cnve20	3	163,699,360	163,712,278	12.9	G/L	-
cnve21	3	164,004,033	164,101,579	97.5	G/L	-
cnve22	3	191,220,845	191,221,750	0.9	G/L	LEPREL1
cnve23	4	8,980,214	9,097,760	117.5	G/L	DEFB131, LOC650293
cnve24	4	10,006,425	10,009,254	2.8	L	-
cnve25	4	20,982,707	20,984,915	2.2	L	KCNIP4
cnve26	4	34,469,747	34,499,424	29.7	L	-
cnve27	4	58,417,022	58,418,605	1.6	G/L	-
cnve28	4	63,352,170	63,367,714	15.5	G/L	-
cnve29	4	64,380,191	64,392,223	12	G/L	-
cnve30	4	69,064,675	69,163,188	98.5	G/L	UGT2B17
cnve31	4	70,164,518	70,257,471	92.9	G/L	UGT2B28
cnve32	4	115,398,433	115,401,739	3.3	G/L	-
cnve33	4	116,387,607	116,393,377	5.8	L	-
cnve34	4	122,504,713	122,508,095	3.4	L	QRFPR
cnve35	4	138,312,400	138,316,899	4.5	L	-

cnve36	4	162,083,343	162,146,977	63.6	G/L	-
cnve37	5	783,022	873,185	90.2	G/L	ZDHHC11
cnve38	5	27,462,485	27,462,654	0.17	G/L	-
cnve39	5	32,142,841	32,202,977	60.1	G	PDZD2, GOLPH3
cnve40	5	70,210,770	70,415,222	204.4	G/L	GTF2H2, GTF2H2B, GTF2H2D, GTF2H2C, SERF1B, SERF1A, SMN1, SMN2, NAIP, OCLN , LOC647859
cnve41	5	151,495,149	151,499,003	3.9	L	-
cnve42	5	180,327,250	180,363,775	36.5	G/L	BTNL3
cnve43	6	219,847	306,547	86.7	G/L	DUSP22
cnve44	6	29,965,065	30,003,207	38.1	G/L	HCG2P7, HCG4P6, HLA-H
cnve45	6	31388080	31406722	18.6	G/L	-
cnve46	6	31,445,794	31,449,319	3.5	G/L	-
cnve47	6	31,465,370	31,561,597	96.2	G/L	MICA, HCP5, HCG26, MICA
cnve48	6	31,979,464	31,986,474	7	L	C2
cnve49	6	32058245	32110823	52.6	G/L	STK19, STK19, TNXA, C4A, C4B
cnve50	6	32,563,460	32,600,286	36.8	G/L	HLA-DRB5
cnve51	6	32,608,853	32,629,229	20.4	G/L	HLA-DRB6

cnve52	6	32,630,503	32,666,924	36.4	G/L	HLA-DRB1, HLA-DRB6
cnve53	6	32,672,677	32,672,762	0.086	G/L	-
cnve54	6	32,746,293	32,756,221	9.9	G/L	-
cnve55	6	57,482,074	57,503,129	21.1	G	PRIM2
cnve56	6	62,241,860	62,281,216	39.4	G/L	-
cnve57	6	77,074,879	77,081,385	6.5	L	-
cnve58	6	79,029,649	79,090,197	60.5	L	-
cnve59	6	81,341,226	81,346,109	4.9	G/L	-
cnve60	6	162,655,871	162,659,755	3.9	G/L	PARK2
cnve61	6	169,248,365	169,262,485	14.1	L	-
cnve62	6	170,222,030	170,223,555	1.5	G/L	-
cnve63	7	136,005	164,003	27.9	G/L	-
cnve64	7	61,256,909	61,311,414	54.5	G/L	-
cnve65	7	101,931,221	102,109,692	178.5	G/L	POLR2J3, SPDYE2, SPDYE2L, POLR2J2, UPK3BL, RASA4
cnve66	7	141,419,097	141,441,259	22.2	G/L	MGAM
cnve67	8	3,773,951	3,777,675	3.7	G/L	CSMD1
cnve68	8	5,583,199	5,592,495	9.3	G/L	-
cnve69	8	7,242,915	7,459,302	216.4	G/L	DEFB families,

cnve70	8	7,683,445	7,830,417	146.9	G/L	DEFB families
cnve71	8	12,570,457	12,603,846	33.4	G/L	-
cnve72	8	15,447,307	15,455,979	8.7	L	TUSC3
cnve73	8	25,129,632	25,130,278	0.64	G/L	DOCK5
cnve74	8	39,356,825	39,497,557	140.7	G/L	ADAM3A , ADAM5P
cnve75	8	115704806	115711712	6.9	G/L	-
cnve76	9	4,516,796	4,519,671	2.9	L	SLC1A1
cnve77	9	11,398,647	11,398,865	0.22	G/L	-
cnve78	9	11,786,468	12,110,085	323.6	L	-
cnve79	9	43,515,795	43,730,292	214.5	G/L	FAM75A6
cnve80	9	44,708,655	44,779,627	70.9	G/L	-
cnve81	9	45,757,243	45,837,067	79.8	G/L	-
cnve82	9	66,345,398	66,759,835	414.4	G/L	LOC100133920
cnve83	9	140,149,899	140,225,046	75.1	G	TUBBP5
cnve84	10	38,740,240	38,953,282	213	G/L	LOC399744
cnve85	10	41679826	41702521	22.7	G/L	-
cnve86	10	58,575,075	58,606,559	31.5	L	-
cnve87	10	66980652	66983043	2.4	G/L	-
cnve88	10	81,478,475	81,492,542	14.1	G/L	-

cnve89	11	4,217,831	4,333,781	115.9	G/L	-
cnve90	11	5,856,461	5,891,679	35.2	G	OR52E4
cnve91	11	48,689,789	48,868,236	178.4	G/L	-
cnve92	11	48,886,497	48,918,267	31.8	G/L	-
cnve93	11	50,470,172	50,687,058	216.9	G/L	-
cnve94	11	54,649,547	54,738,983	89.4	G/L	-
cnve95	11	55,124,465	55,209,499	85	G/L	OR4S2, OR4P4, OR4C11, OR4C6
cnve96	11	99,152,896	99,160,002	7.1	L	CNTN5
cnve97	12	9,526,879	9,607,393	80.5	G/L	-
cnve98	12	11,398,341	11,438,799	40.5	G/L	PRB1, PRB2
cnve99	12	31,202,075	31,237,140	35.1	G/L	-
cnve100	12	33,192,424	33,197,122	4.7	L	-
cnve101	12	36,270,798	36,667,312	396.5	G/L	-
cnve102	13	18,209,780	18,299,097	89.3	G/L	-
cnve103	13	49,238,624	49,271,799	33.2	G/L	KPNA3
cnve104	13	56,648,172	56,722,157	73.9	G/L	-
cnve105	14	18,312,221	18,373,017	60.8	G/L	-

cnve106	14	19,255,839	19,493,705	237.9	G/L	OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K1, OR4K5
cnve107	14	40,679,974	40,738,084	58.1	L	-
cnve108	14	43,574,960	43,600,472	25.5	L	-
cnve109	14	105,099,614	105,259,090	159.5	G/L	-
cnve110	15	18,822,301	18,883,654	61.3	G/L	HERC2P3
cnve111	15	19,095,051	19,545,168	450.1	G/L	NF1P1, BCL8, LOC646214, POTE8, CXADRP2
cnve112	15	19,768,826	20,093,116	324.3	G/L	LOC727924, REREP3, OR4N3P, OR4N4, OR4M2
cnve113	15	22,134,751	22,284,089	149.3	G/L	-
cnve114	15	30,272,117	30,302,218	30.1	G/L	-
cnve115	15	32,459,510	32,595,161	135.7	G/L	MIR1233-1, MIR1233-2, GOLGA8A
cnve116	15	54,579,805	54,582,930	3.1	L	-
cnve117	16	16,519,474	16,713,816	194.3	G/L	-
cnve118	16	22,538,900	22,617,264	78.4	G/L	-
cnve119	16	27,147,411	27,147,520	0.11	G/L	NSMCE1
cnve120	16	32,404,517	32,511,911	107.4	G/L	-
cnve121	16	33,778,130	33,820,307	42.2	G/L	-

cnve122	16	54,390,068	54,420,550	30.5	G/L	CES1
cnve123	16	68,715,069	68,753,813	38.7	G	PDPR
cnve124	17	14,984,724	14,998,961	14.2	G/L	-
cnve125	17	31,462,326	31,567,477	105.2	G/L	CCL3L1, CCL4L1, CCL4L2, CCL3L3, TBC1D3B
cnve126	17	41,780,482	41,922,658	142.2	G/L	NSFP1, ARL17B
cnve127	18	14,170,547	14,271,864	101.3	G/L	-
cnve128	18	64,897,188	64,906,488	9.3	G/L	-
cnve129	19	20,404,485	20,507,068	102.6	L	-
cnve130	19	32,470,668	32,730,547	259.9	G/L	-
cnve131	19	33,903,241	33,903,289	0.05	G/L	-
cnve132	19	46,041,879	46,064,315	22.4	G/L	CYP2A6
cnve133	19	47,997,996	48,235,556	237.6	G/L	PSG6, PSG1, LOC100289650, PSG10, PSG7, PSG11
cnve134	19	58,023,726	58,050,701	26.9	G/L	ZNF468
cnve135	20	26,235,048	28,107,200	1,872	G/L	-
cnve136	21	9,730,102	9,870,617	140.5	G/L	-
cnve137	22	22,619,365	22,728,586	109.2	G/L	GSTTP1, DDTL,

						GSTT2B, DDT, GSTT2, LOC391322, GSTT1, GSTTP2
cnve138	22	49,129,839	49,130,879	1	G/L	PPP6R2
cnve139	X	16,305,623	16,306,395	0.8	G/L	-
cnve140	X	58406597	58580762	174.2	G/L	-
cnve141	X	61660428	61815821	155.4	G/L	-
cnve142	X	93,289,757	93,290,555	0.8	G/L	-
cnve143	X	110,851,010	110,851,339	0.33	G/L	ALG13
cnve144	X	145712954	145717285	4.3	G/L	-

[85]

[86]

이 144개의 CNVR을 이용하여, 로지스틱 회귀 분석을 수행하였다. 이를 통해 연령대 및 실험군별 차이에 따라 실험 결과가 다르게 나타나는 것을 방지하였다. T 다중 비교의 문제를 해결하기 위해 false discovery rate(FDR) 방법을 사용하였다.  $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.1$ 인 CNVR은 유의성 있는 것으로 보였다. 그 결과 SLE 발병 위험과 가장 관련성이 높은 1q25.1, 8q23.3, 10q21에서의 3개의 CNVR을 발견하였다. 이에 대해서는 하기 표 3에 나타내었다.

[87]

[88]

표 3

[Table 3]

CNV RLo cation	Start* (bp)	End* (bp)	Lengt h (kb)	Typ e	Ge nes	GWAS Discovery <sup>1</sup> (382 cases vs 191controls)			Replication <sup>2</sup> (564 cases vs 511controls)			Replication <sup>3</sup> (564 cases vs 495controls)		
						P	FD R	OR (95 % CI)	P	FD R	OR (95 % CI)	P	FD R	OR (95 % CI)
1q25 .1	173,0 6.490	173,0 68.26	3.8	Loss	RA	4.40	0.02	2.28	0.0	0.0	1.30	0.00	0.01	1.38
					BG	E-0	4	(1.2	38	57	(1.02	9	1	(1.08
					AP	3		9-4.			-1.67			-1.77
					IL			01)			)			)
8q23 .3	115,7 04.81	115,7 11.71	6.9	Loss	-	5.20	0.04	0.37	0.2	0.2	0.85	ND	ND	ND
						E-0	4	(0.2	3	3	(0.65			
						4		1-0.			-1.11			
						65)		)			)			
10q2 1.3	66,98 0.65	66,98 3.04	2.4	Loss	-	0.03	0.06	1.62	3.6	1.1	1.90	0.01	0.01	1.40
						9	6	(1.0	0E-	0E-	(1.40	1	1	(1.08
								2-2.	05	04	-2.58			-1.81
								56)			)			)

[89]

[90] \*hg18;

[91] <sup>1</sup>Principal component analysis was performed to adjust population stratification.[92] <sup>2</sup>Replication by qPCR;[93] <sup>3</sup>Replication by deletion-typing PCR;

[94] † Adjusted for age; ND, not determined

[95] CNVR의 OR은 2n인 개체를 기준으로 하여 계산되었다. 결실 타이핑 PCR에 의한 복제에서, OR은  $\geq 2n$ 을 기준으로 하여 계산되었다. 연령대별 인구 분포의 효과를 보정하기 위해 principal componet analysis (PCA)를 수행하였다. 회귀 분석을 위해서는, PCA분석에서 도출된 상위 2개의 principal component 즉 PC1과 PC2를 covariate으로 사용하였으며 SNP-array batch 정보도 역시 회귀분석을 위한 covariate으로 사용되었다. FDR은 144 CNVR의 p-value로서 계산되었다.

[96] 상기한 3종의 CNVR외에 SLE와 관계가 있는 것으로 규명된 바 있는 CNVR 위치 중에서, C4(6p21.32)의 복제 수 결실이 SLE 환자군에서 더 높은 빈도로 나타났고, 획득 타입 CNVR은 오히려 SLE 발병을 막는 효과를 갖는 것으로

나타났다. 그러나 이 결과는 통계적 유의성을 갖는 정도에 이르지 못했다 (OR=2.35, 95% CI=0.64-8.57, P=0.197 for loss; OR=0.40, 95% CI=0.16-1.03, P=0.057 for gain).

[97]

[98] 실시예 5. genomic qPCR을 이용한 SLE와 관련이 있는 CNVR의 검증(validation)

[99] 본 발명자들은 genomic quantitative PCR(qPCR)을 위해 특이적인 증폭용 프라이머 세트를 디자인하였다. 이 프라이머 세트를 이용해 GWAS discovery 단계에서 SLE와 관련성이 높은 것으로 밝혀진 CNVR을 복제하여 확인하고자 하였다.

[100] 본 연구에서 사용한 모든 프라이머들이 복제 수 정량에 적합한 것으로 실험상 확인되었다. 이에 대한 정보는 하기 표 4에 표시하였다.

[101]

[102] 표 4

[Table 4]

Chr	Start	End	Amplicon Size (bp)	Forward	Reverse	Efficiency (%)	R <sup>2</sup>
1	173064505	173064592	88	AGGTCAAA CATCACCT GCTCTGGA(서열번호 1)	TAACGCCA ACAGTGGT GCTCTAGT(서열번호 2)	104.7	0.99
8	115705632	115705728	97	ACAAGACC ATGTGGCC CTATGTGA	CAGCATCT TCTTGCCTA ACAGCCT	90.3	0.993
10	66981511	66981683	173	ACCCAGCC TCAGGTAT TCCTTTGT(서열번호 3)	AGGATTCT GGTGGTGT GGCTAGAA(서열번호 4)	91.7	0.998

[103]

[104] Viiia 7 system(Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용하여 genomic qPCR을 수행하였다.

[105] 1q25.1 및 10q21.3의 qPCR에 있어서는, genomic DNA를 20ng 포함하고 있는 반응 혼합물 20 $\mu$ l, SYBR Premix Ex Taq TM II(TaKaRaBio사), 1xROX, 및 프라이머 10 pmol을 사용하였다. 95°C에서 30초 동안 1 cycle을 수행한 후, 95°C에서 5초, 55°C에서 10초, 72°C에서 30초로 하여 45 cycle을 수행하였다.

- [106] C4 유전자의 경우(C4A 및 C4B), 복제 수는 C4A 및 C4B에 특이적으로 디자인된 2종의 Taqman assay(Hs07226349\_cn 및 Hs07226350\_cn(Life Technologies))를 이용하여 genomic qPCR을 수행하여 결정하였다. 10ng의 genomic DNA, TaqMan universal PCR master mix II(Life Technologies), C4A 또는 C4B TaqMan probe, 및 RNaseP TaqMan probe를 포함하는 총 10 $\mu$ l의 반응 혼합물을 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 1 cycle, 95°C에서 15초간 반응시킨 후 60°C에서 1분간 반응시키기를 40 cycle로 하여 수행하였다.
- [107] 전체 프라이머에 대한 PCR 효율(PCR efficiency, Ct value)은 standard curve over serial 1:5 dilution으로 결정하였다. Ct value는 reference gene이 standard curve의 역치에 도달하기 위해 요구되는 PCR cycle의 횟수로 결정된다. 각 타겟에 대한 복제 수 변이는  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 정의되었다. 여기서  $\Delta Ct$ 는 확인하고자 하는 샘플에서 reference gene(RNase P)와 calibrator DNA(개인/calibrator)로부터 얻은 수치에 대한 역치 사이클의 차이를 말한다. 그 후 비율 데이터는 가장 가까운 정수로 나눈다. 요약하자면, 본 발명자들은 511개의 정상인 대조군 샘플을 이배체(diploid)로 나누고, 모든 측정된 1q25.1과 10q21.3 qPCR 비율 수치를 2개의 복제물에 맞춰 조정하였다. 조정된 비율 수치는 가장 가까운 정수로 반올림하였다. 이 3개의 CNVR의 빈도 분포는 아래 표 (표 5)에 나타내었다. 좌측 컬럼은 CNVR GWAS 발굴 결과의 빈도분포이고, 중간 컬럼은 qPCR 검증 결과이며, 우측 컬럼은 결실 타이핑 PCR 검증결과이다.

[108]

[109] 표 5

[Table 5]

CNVR Location	GWAS Discovery <sup>1</sup>						Replication by qPCR <sup>2</sup>								Replication by deletion-typing PCR <sup>3</sup>							
	Case (n=382)			Control (n=191)			Case (n=564)				Control (n=511)				Case (n=564)			Control (n=495)				
	Loss	2n	Gain	Loss	CN=2	Gain	Loss	2n	Gain	ND	Loss	2n	Gain	ND	Loss	$\geq 2n$	ND	Loss	$\geq 2n$	ND		
1q25.1	72	309	1	18	0	173	302	249	13	0	220	236	55	0	52	248	259	5	27	194	264	10
8q23.3	37	345	0	34	156	1	185	311	68	0	177	253	81	0	-	-	-	-	-	-	-	-
10q21.3	135	243	4	40	150	1	205	161	197	1	128	191	192	0	145	247	170	2	107	193	182	13

- [110] SNP-array intensity signal로부터 array에서 나타났던 CNV의 92.8%가 genomic qPCR에서도 검출된다는 사실을 확인하였다. 1q25.1에서의 *RABGAP1L* CNV의 대립유전자 강도와 qPCR 확인 결과는 도 3에 나타내었다.

- [111] 도 3의 좌측 도는 Illumina사의 GenomeStudio software로 얻은 rs4480415 마커(173066744 위치, hg18)의 genoplot image이다. 이 위치에서의 신호 강도가 각각 2X(A/A, A/B/ B/B), 1X(A/-, B/-), 0X(-/-)의 6가지 뚜렷한 집단(cluster)을 이루는데, 이에 따라 복제 수 상태를 알 수 있다. 중앙의 도는 1q25.1 영역 주변의 신호 강도 비율을 나타낸 도이다. 도 3의 우측 도는 1q25.1 영역의 추정 복제 수를 genomic qPCR로 확인한 도이다. X축은 PennCNV에 의한 복제 수 상태를 나타내고, Y축은 qPCR에 의한 추정 DNA 복제 수이다.

- [112] Genomic qPCR을 이용한 독립적 코호트 검증 결과 1q25.1에서 *RABGAP1L*을

가로지르는 CNVR과 10q21.3 CNVR의 연관성이 독립적 검증 코호트군에서 성공적으로 복제되었다(표 3). 그러나 8q23.3 위치의 CNVR은 복제되지 않았다. 본 발명자들은 2n을 가진 개체를 SLE 발병 위험도 예측의 기준으로 삼았는데(OR=1.30, 95% CI 1.02-1.67, P=0.038), OR은 복제 수가 증가할수록 감소하는 추세를 보였다( $r^2=0.939$ )(도 4 좌측). 10q21.3 위치의 결실 타입 CNVR이 있는 개체들도 복제시 2n인 개체들보다 SLE 발병 위험이 높았으나(OR=1.90, 95% CI 1.40-2.58, P=3.6 x 10<sup>-5</sup>), 복제 수와 관련해서는 OR에서 어떤 일관된 경향이 나타나지 않았다( $r^2=0.528$ )(도 4 우측).

- [113] GWAS discovery 단계에서 C4 유전자에서의 CNVR도 SLE 발병 위험도와 관련이 있는 것으로 밝혀졌으므로, 이 CNVR도 독립적으로 복제하였다(308 명의 환자군 및 307명의 대조군). C4의 복제수를 측정하기 위해서는, 이 유전자에 대한 이배체 copy수를 가지고 있는 것으로 알려진 HeLa 세포의 DNA를 이배체 대조군으로 설정하고 이에 맞춰 조정하였다. 2n을 가진 개체를 기준으로 설정했을 때, C4A의 복제 수 결실이 있는 개체는 SLE 발병 위험도가 현저히 높게 나타났고(OR=1.83, 95% CI 0.19-0.49, P=3.6 x 10<sup>-6</sup>), C4A의 복제 수 획득이 있는 개체는 SLE 발병 위험도가 현저히 낮게 나타났다(OR=0.30, 95% CI 1.15-3.06, P=1.87 x 10<sup>-6</sup>). 그러나 C4B의 CNVR은 SLE 발병 위험도와 별 관련이 없는 것으로 나타났다. 전체 C4(C4A+C4B)의 복제 수 결실이 있는 개체 역시 4n이 있는 개체보다 SLE 발병 위험도가 현저히 높았다(OR=1.88, 95% CI 1.15-3.06, P=0.01).
- [114] C4를 가로지르는 CNVR인 6p21.32의 빈도 분포는 하기 표 6에 나타내었다. 표6의 위쪽표는 CNV GWAS 발굴 결과이고 아래표는 qPCR 검증실험 결과이다.
- [115]
- [116]

표 6

[Table 6]

GWAS(위)																
CNVR Location	Start* (bp)	End* (bp)	Length (kb)	GWAS Discovery												
				Case (n=382)						Control (n=191)						
				Loss	CN=2	Gain	Loss	CN=2	Gain							
6p21.32	32,058,245	32,110,823	53	14	359	9	3	176	12							

Replication by qPCR(아래)																		
CNVR Location	Replication by qPCR																	
	C4 Total						C4A						C4B					
	Case (n=308)			Control (n=307)			Case (n=308)			Control (n=307)			Case (n=308)		Control (n=307)			
	Loss	4n	Gain	Loss	4n	Gain	Loss	2n	Gain	Loss	2n	Gain	Loss	2n	Gain			
6p21.32	70	181	57	38	185	84	62	215	31	36	194	77	48	201	59	54	197	56

- [117]
- [118] 실시예 6. deletion-typing PCR을 이용한 CNV의 크기와 경계 확인
- [119] 6-1. CNV의 크기 및 경계 확인

- [120] 실시예 5의 결과, SLE와 유의한 연관성을 보인 두 영역(1q25.1 및 10q21.3)의 CNV의 정확한 크기와 경계를 확인하기 위해, 본 발명자들은 deletion-typing PCR을 수행하였다. 결실된 대립유전자들의 증폭물(amplicon)은 PCR-direct sequencing을 이용해 시퀀싱하였다. C4 구역의 경우 deletion-typing PCR 설계가 불가능하여 실시하지 않았다.
- [121] 1q25.1과 10q21.3의 정확한 크기와 경계를 파악하기 위해, 본 발명자들은 결실 타이핑 PCR 전략을 세웠다. 예상되는 결실 부위 주변의 flanking sequence와 결실 영역 내에서 프라이머 세트를 디자인하였다. 이에 대한 구체적인 정보는 표 7에 나타내었다. PCR은 하기의 조건으로 수행되었다. genomic DNA를 20ng, FX DNA polymerase(TOYOBO, Osaka, Japan)을 0.4 unit, 2% DMSO, 프라이머 6pmol을 포함하는 반응 혼합물을 20 $\mu$ l 준비하였다. PCR은 94°C에서 2분간 1 cycle, 98°C에서 10초간, 69°C에서 1분/Kb 동안 32 cycle을 수행하였다. PCR 반응 후에, 10 $\mu$ l의 PCR 산물을 0.5% 아가로스 젤에서 전기영동하였다. 결실된 allele는 PCR-direct sequencing 방법으로 시퀀싱하였다.
- [122]
- [123] 표 7
- [Table 7]

Target Region	Forward Primer (5'—3')	Reverse Primer (5'—3')
1q25.1_Lon g	AAGCGTCACGTTCTCATTG TGGCA(서열번호 5)	TCCCACCCATTCAAGCACTAAGG T(서열번호 6)
1q25.1_Shor t	AAGCGTCACGTTCTCATTG TGGCA(서열번호 7)	AGCTGCCAAGCAAGATTCACGTT C(서열번호 8)
10q21.3_Lo ng	GATGGTGGCAGCAAAGTC AACACA(서열번호 9)	CATTCTGCCAAACATGAAGGGCC A(서열번호 10)
10q23.1_Sh ort	GATGGTGGCAGCAAAGTC AACACA(서열번호 11)	TGACCAGGATACTGCAGATGGC AA(서열번호 12)

- [124]
- [125] 도 5의 실험 전략을 요약하면, 결실 예상구역을 포함하는 PCR을 시행하면 결실이 없는 경우 예상한 크기의 PCR 증폭물이 나타나는 반면, 결실이 존재하면 그 크기만큼 길이가 감소한 PCR 증폭산물이 나타나게 된다는 원리이다.
- [126] 본 발명자들이 디자인한 1q25.1 영역의 전체 대립유전자의 증폭 크기(amplicon size)는 9.4Kb였고, SNP의 시작-종결 위치(start-end position)에 기초한 1q25.1에서의 결실 영역의 예측된 크기는 3.8 Kb였다. 그러므로, 결실 대립유전자의 증폭 크기는 5.6 Kb로 계산되었다. 그러나 결실된 대립유전자의 실제 증폭 크기는 4.2 Kb 이하였으므로, 1q25.1 위치에서의 실제 결실 크기도 3.8

Kb가 아니라 5.2 Kb 이하일 것으로 계산되었다. 따라서 9.4Kb 밴드만을 나타내는 사람은 2n (diploid)로 해석할 수 있고 4.2Kb 밴드만을 나타내는 사람은 homozygous deletion (HOM)으로 해석되며 9.4Kb와 4.2Kb 밴드를 동시에 나타내는 사람은 heterozygous deletion (HET)로 해석된다.

[127] 이와 마찬가지로, 10q21.3 영역에서 SNP의 시작-종결 위치(start-end position)에 기초한 결실 영역의 예측된 크기는 2.4 Kb였으며 디자인한 전체 대립유전자의 증폭 크기는 11.6 Kb였다. 따라서 9.2 Kb 크기의 결실 타이핑 PCR 증폭산물을 이 예상되나 실제 결실 대립유전자의 증폭산물의 크기는 3.3 Kb 이하였으므로, 10q21.3 영역에서의 실제 결실 대립유전자의 증폭 크기는 2.4 Kb가 아니라 8.3 Kb 이하일 것으로 계산되었다. 따라서 11.6Kb 밴드만을 나타내는 사람은 2n (diploid)로 해석할 수 있고 3.3 Kb 밴드만을 나타내는 사람은 homozygous deletion (HOM)으로 해석되며 11.6 Kb와 3.3 Kb 밴드를 동시에 나타내는 사람은 heterozygous deletion (HET)로 해석된다.

[128] 본 발명자들은 결실된 유전자의 증폭물을 시퀀싱하고 결실 서열의 정확한 크기와 중지점을 확인하였다.

[129] 도 5 중단은 deletion-typing PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸다.

[130] 도 5 중단 좌측 도에서, 1q25.1 영역은 Band 1, 9.4 Kb; Band 2, 4.2Kb; Band 3, 2.3 Kb로 나타났다. 도 5 중단 우측 도에서, 10q21.3 영역은 Band 1, 11.6Kb; Band 2, 3.3Kb; Band 3, 3.2 Kb로 나타났다. P1과 P2는 각각 프라이머 세트 1, 2를 의미한다.

[131] 도 5 하단은 1q25.1과 10q21.3의 결실 중지점(화살표가 가리키는 부분)을 보여주는 DNA 서열의 예시이다.

[132]

### [133] 6-2. 동형접합 결실 및 이형접합 결실의 비교

[134] 이형접합적으로 결실이 일어난 샘플에서는 두 종류 크기의 증폭물(전체 크기 및 결실이 일어난 크기)이 있어야 함에도 불구하고, 전체 크기의 증폭물은 두 CNVR 모두에서 작은 크기의 PCR에 대한 선호 현상(preference for small-sized PCR)으로 인해 나타나지 않을 수 있다. 따라서 결실 매핑(mapping) 데이터에 기초하여 동형접합 결실과 이형접합 결실을 구별하기 위해서, 본 발명자들은 결실된 서열 내에서 프라이머를 재 디자인하여 전체 대립유전자를 의미하는 짧은 증폭물의 존재를 검정하고자 하였다(도 5, 표 7). 샘플이 이형접합 결실을 갖는 경우, 전체 대립유전자는 예측된 크기(1q25.1에 대해서는 2.3 Kb, 10q21.3에 대해서는 3.2 Kb)의 증폭물을 생산할 것이고, 결실 대립유전자에서는 그렇지 않을 것으로 예상하였다. 샘플이 동형접합 결실을 갖고 있는 경우, PCR 증폭물이 생산되지 않을 것으로 예상하였다.

[135] 결과적으로, 본 발명자들은 결실 타입을 다음과 같이 해석하였다. 1q25.1에 대해서 homozygous 결실은 4.2 Kb 밴드 양성, 9.4 Kb 밴드 음성, 2.3 Kb 밴드 음성이고, heterozygous 결실에 대해서는 4.2 Kb 밴드 양성, 2.3 Kb 밴드 양성이고,

9.4 Kb 밴드는 양성이지만 나타나지 않을 수 있다. 2개 이상의 복제 수 변이가 있는 경우, 9.4 Kb 밴드 양성, 2.3 Kb 밴드 양성, 3.2 Kb 밴드 음성, 4.2 Kb 밴드 음성이다. 10q21.3에 대해서는, homozygous deletion은 3.3 Kb 밴드 양성, 3.2 Kb 밴드 음성, 11.6 Kb 밴드 음성일 것이고, heterozygous deletion은 3.3 Kb 밴드 양성, 3.2 Kb 밴드 양성일 것이고, 11.6 Kb는 양성이겠지만 나타나지 않을 수 있다. 2개 이상의 복제 수 변이가 있는 경우에는, 11.6 Kb 밴드 양성, 3.2 Kb 밴드 양성, 3.3 Kb 밴드 음성일 것이다(도 4).

- [136] 이 전략을 통해, HOM, HET,  $\geq 2n$ 을 정확하게 구별할 수 있었다(도 4B 및 4C). 결실된 allele의 복제물을 시퀀싱하여, 결실 부위의 정확한 크기 및 결실 중지점을 알아낼 수 있었다.
- [137] 본 발명자들은 설계한 결실 타이핑 PCR 전략을 독립적 검증 코호트 (564 cases and 495 controls)에 적용하여 결실 타이핑 PCR을 수행하였고, qPCR에 의해 규명된 결실의 95% 이하가 결실 타이핑 PCR 결과와 일치한다는 사실을 밝혔다. Deletion-typing PCR 결과에 기초해, 1q25.1에서 CNVR이 있는 사람은(HOM 및 HET)  $\geq 2n$ 에 비해 SLE 발병 확률이 크게 높게 나타났고(OR=1.38, 95% CI 1.08-1.77, P=0.0009), 10q21.3에서 결실이 있는 경우도 마찬가지였다(OR=1.40, 95% CI 1.08-1.81, P=0.011)(표 3). 1q24.1 또는 10q21.3 HOM은  $\geq 2n$ 에 비해 상당히 높은 SLE 발병 위험을 보였다(각각 OR=1.82, 95% CI 1.03-3.20, P=0.039; OR=1.46, 95% CI 1.01-2.10, P=0.044). GWAS discovery 및 결실 타이핑 PCR의 메타 분석 결과, CNVR의 상관 관계가 더욱 유의성 있는 자료임을 알 수 있었다(1q24.1의 경우 OR=1.51, 95% CI 1.20-1.89, P=4 x 10<sup>-4</sup>; 10q21.3의 경우, OR=1.46, 95% CI 1.01-2.10, P=8 x 10<sup>-4</sup>).
- [138] 또한 본 발명자들은 SLE 발병 위험도 예측에 있어서 3개의 중요 위치에서 동시에 결실 타입 CNVR이 발생한 경우의 효과에 대해 알고자 하였다. RABGAP1L 및 10q21.3의 결실 타입 PCR 결과와 C4에서의 qPCR 결과를 종합해 보았을 때, 세 위치 모두에서 결실이 있는 개체의 경우(본 연구의 환자군의 8.1% 및 대조군의 2.3%) 세 위치 모두에서  $\geq 2n$ 인 개체(본 연구의 환자군의 10.7% 및 대조군의 16.6%)에 비해 SLE 발병 위험도가 5.5배 높게 나타났다(OR=5.52, 95% CI 2.14-14.21, P=3.9 x 10<sup>-4</sup>). 1에서 3의 결실의 수에 따른 OR은 농도 의존적 증가 양상을 보였다( $r^2=0.965$ ).(도 7, 표 8)

[139]

[140] 표 8

[Table 8]

Type	Case (308)	Control (307)
Losses in all 3 loci	25 (8.1%)	7 (2.3%)
Losses in 2 loci	122 (39.6%)	106 (34.5%)
Loss in 1 locus	126 (40.9%)	136 (44.3%)
≥2n in all 3 loci	33 (10.7%)	51 (16.6%)
ND	2 (0.6%)	7 (2.3%)

[141]

[142] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[143]

### 산업상 이용가능성

[144] 본 발명의 조성물은, C4 위치, 1q25.1 위치 및 10q21.3 위치의 복제 수 변이가 전신성 홍반성 루푸스 발병에 시너지 효과를 가짐을 이용하여 발병 위험을 예측 가능하게 하며, 대부분의 병원 검사실에서 보편적으로 행해지고 있는 PCR을 이용함으로써 기기를 새로 구입하거나 기술적 한계로 인해 발생할 수 있는 분석의 오차를 줄일 수 있고, 검사 대상자에 비침습적인 방법으로 수행할 수 있는 장점이 있다. 즉 본 발명은 전신성 홍반성 루푸스 발병 가능성을 조기에 예측하여 상태 악화를 예방하거나 발병을 늦추는 데 중요하게 이용될 수 있다.

[145]

## 청구범위

- [청구항 1] 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus) 발병 위험도 예측용 조성물로서, 상기 조성물은 검체의 염색체상의 C4, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 1q25.1 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 1 및 2의 DNA 서열을 포함하는 게놈 정량적 PCR(genomic quantitative PCR) 용 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 3 및 4의 DNA 서열을 포함하는 게놈 정량적 PCR(genomic quantitative PCR) 용 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 1q25.1 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 5 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 결실 타이핑 PCR(deletion-typing PCR) 용 프라이머임을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 9 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 결실 타이핑 PCR(deletion-typing PCR) 용 프라이머임을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus) 발병 위험도 예측용 키트로서, 상기 키트는 검체의 염색체상의 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 프라이머인 것을 특징으로 하는, 키트.
- [청구항 8] A) 검체의 염색체상의 C4위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치에 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용

프라이머(primer)를 검체 DNA 시료에 첨가하여 PCR을 수행하는 단계; 및

B) 상기 수행된 PCR 결과로부터 검체가 C4위치, 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치에 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation)를 가지고 있는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 전신성 홍반성 루푸스 발병 위험도를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 9]

제 8항에 있어서,

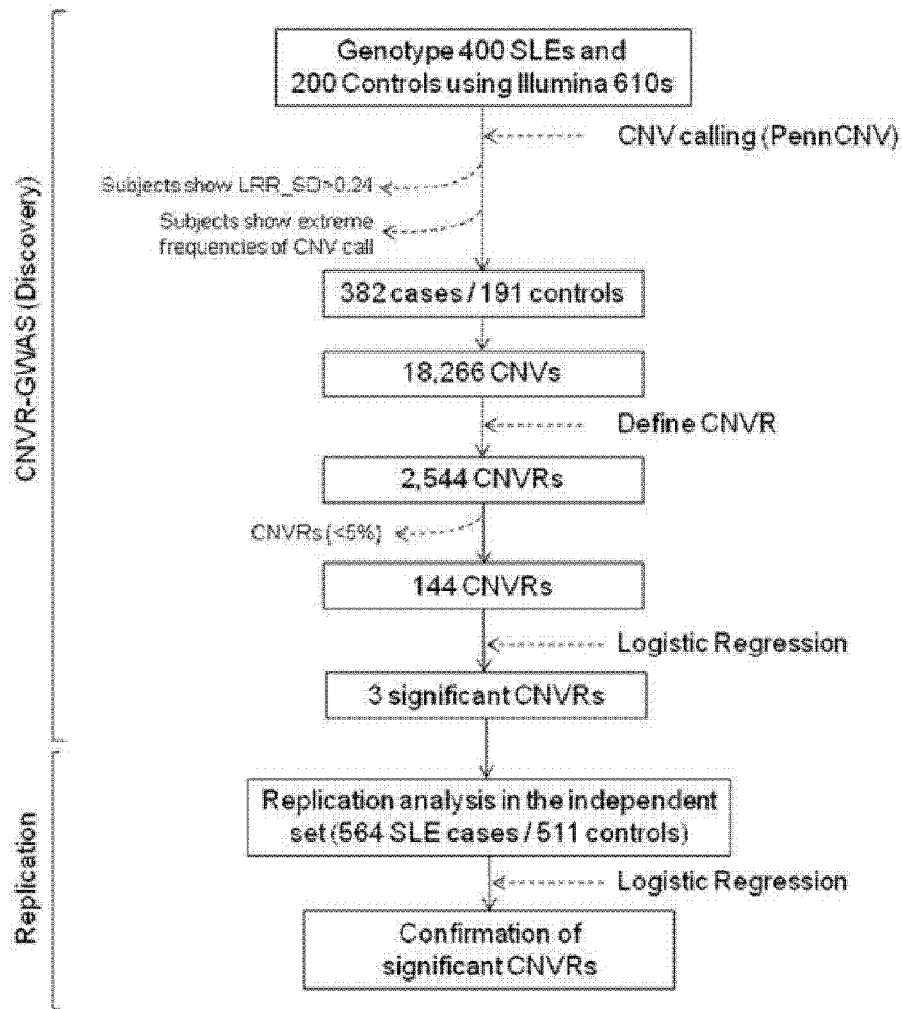
상기 A)단계의 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 게놈 정량적 PCR(genomic quantitative PCR) 용 프라이머임을 특징으로 하는, 방법.

[청구항 10]

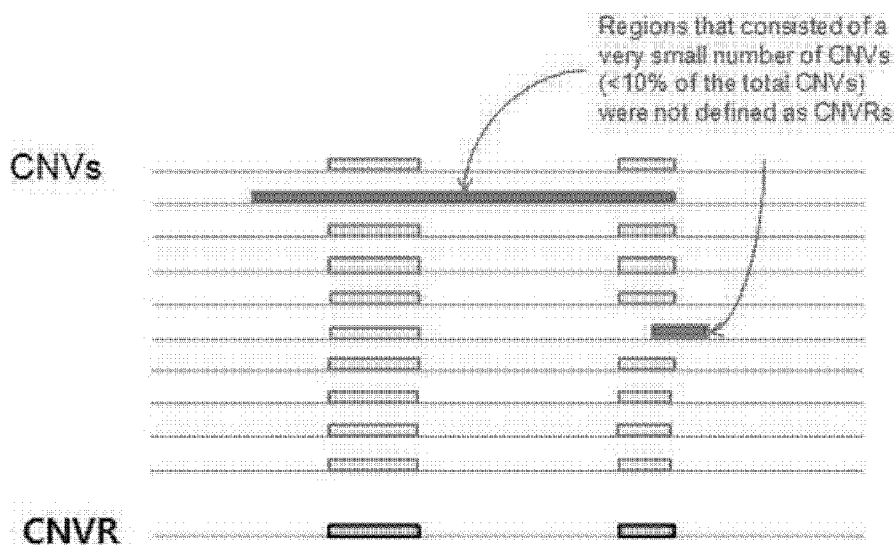
제 8항에 있어서,

상기 A)단계의 1q25.1 위치 및/또는 10q21.3 위치의 DNA 복제 수 변이(DNA copy number variation) 검출용 프라이머(primer)는 서열번호 5 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 결실 타이핑 PCR(deletion-typing PCR) 용 프라이머임을 특징으로 하는, 방법.

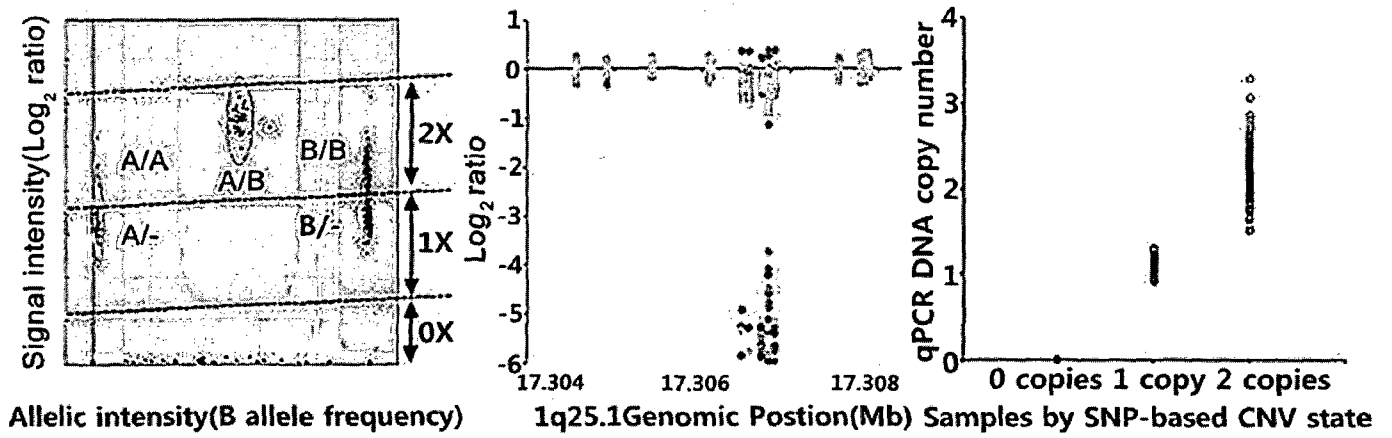
[Fig. 1]



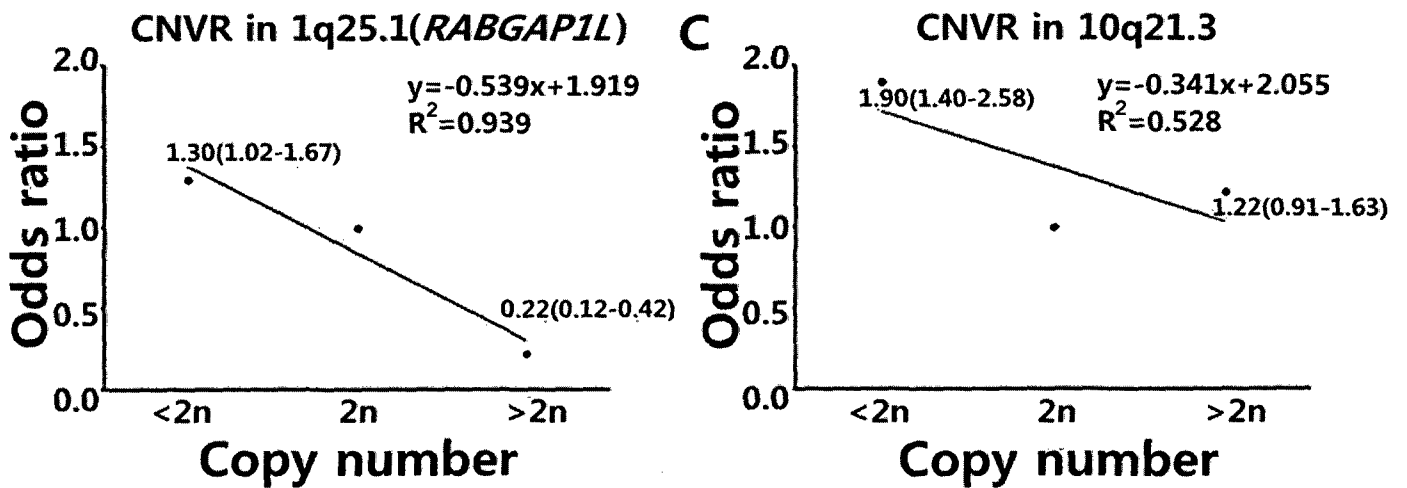
[Fig. 2]



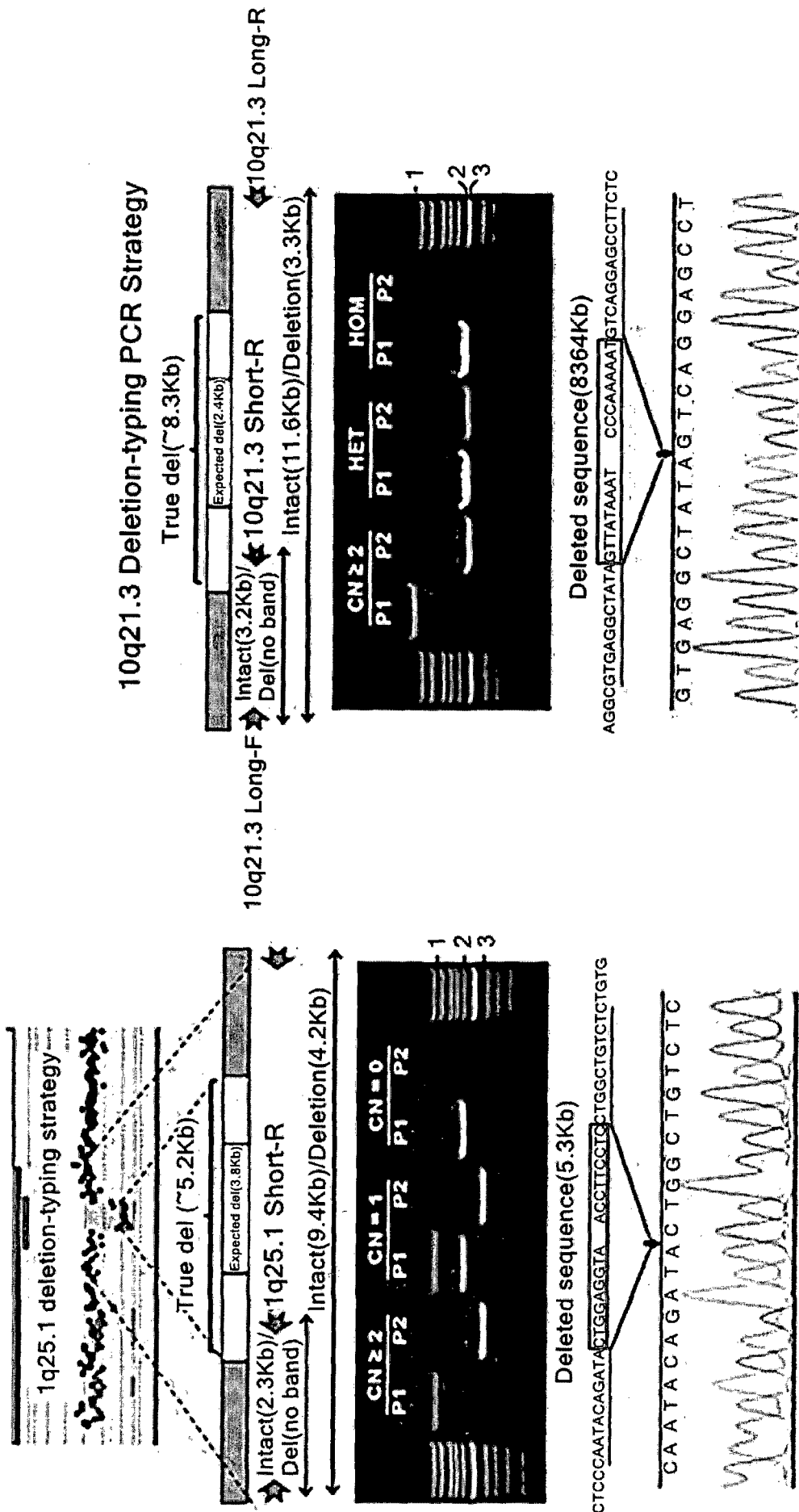
[Fig. 3]



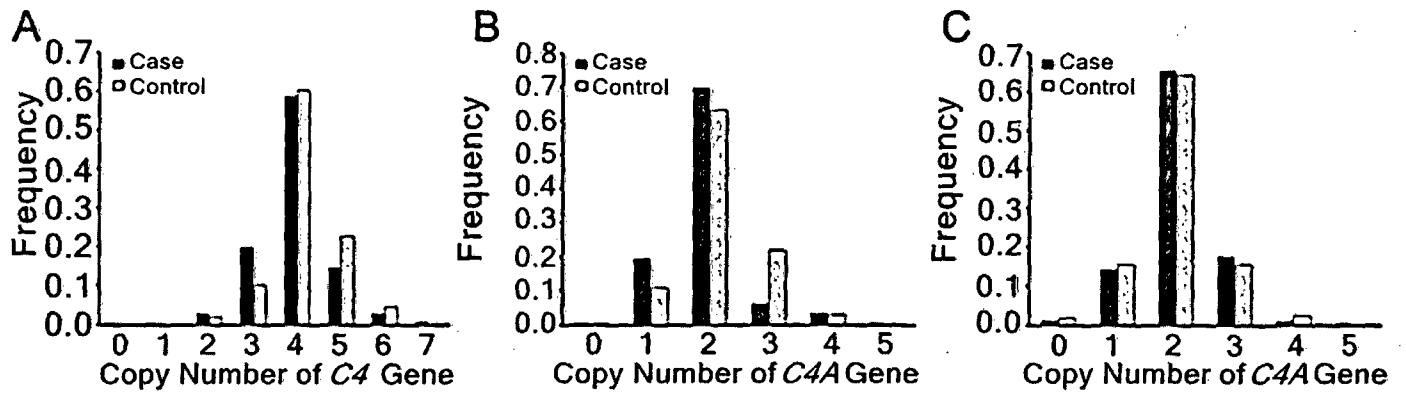
[Fig. 4]



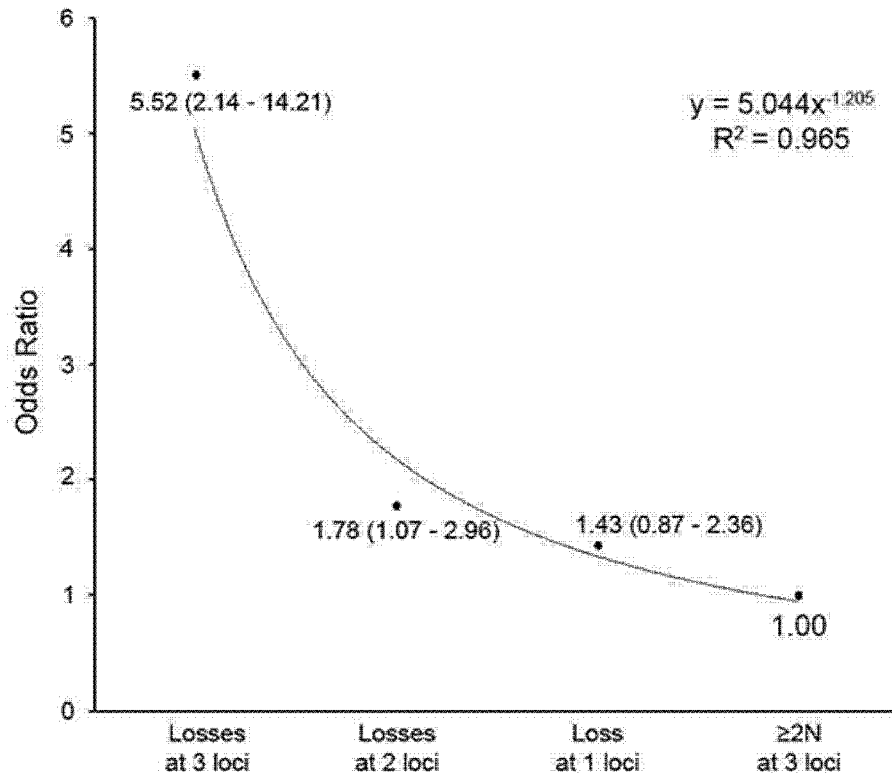
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2013/009074**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/11; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: systemic lupus erythematosus, C4, 1q25.1, 1q21.3, PCR, primer

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y.L. Wu et al., "Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations : complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus", Cytogenet Gonome Res., vol. 123, pages 131-141 (published in 2008) See abstract and page 137 PCR-based analysis of C4 CNVs	1,8
A		2-7,9-10
A	KR 10-2011-0081161 A (GENENTECH, INC.) 13 July 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2012-0100969 A (GENENTECH, INC.) 12 September 2012 See the entire document.	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 FEBRUARY 2014 (27.02.2014)

Date of mailing of the international search report

**28 FEBRUARY 2014 (28.02.2014)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2013/009074**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0081161 A	13/07/2011	AU 2009-296393 A1	01/04/2010
		AU 2009-296458 A1	01/04/2010
		CA 2736373 A1	01/04/2010
		CA 2738245 A1	01/04/2010
		CN102223876 A	19/10/2011
		CN102224258 A	19/10/2011
		EP 2344674 A2	20/07/2011
		EP 2349209 A2	03/08/2011
		JP 2012-503985A	16/02/2012
		JP 2012-504134A	16/02/2012
		US 2010-0092526 A1	15/04/2010
		US 2010-0099101 A1	22/04/2010
		US 2010-0203139 A1	12/08/2010
		WO 2010-036938 A2	01/04/2010
		WO 2010-036938 A3	10/06/2010
		WO 2010-036945 A2	01/04/2010
		WO 2010-036945 A3	20/05/2010
		WO 2010-036960 A2	01/04/2010
		WO 2010-036960 A3	30/09/2010
		WO 2010-036960 A8	01/04/2010
KR 10-2012-0100969 A	12/09/2012	CA 2777055 A1	14/04/2011
		CN102803509 A	28/11/2012
		EP 2486152 A1	15/08/2012
		JP 2013-507127A	04/03/2013
		US 2013-0034544 A1	07/02/2013
		WO 2011-044205 A1	14/04/2011

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/11; C12Q 1/68  조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 전신성 홍반성 루푸스, C4, 1q25.1, 10q21.3, PCR, 프라이머		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Y.L. Wu et al., 'Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations : complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus', Cytogenet Genom Res., Vol. 123, pages 131-141 (2008년 공개) 요약 및 137면 PCR-based analysis of C4 CNVs 참조	1,8
A		2-7,9-10
A	KR 10-2011-0081161 A (제넨테크, 인크.) 2011.07.13 전문 참조	1-10
A	KR 10-2012-0100969 A (제넨테크, 인크.) 2012.09.12 전문 참조	1-10
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 02월 27일 (27.02.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 02월 28일 (28.02.2014)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 정의준 전화번호 +82-42-481-8148	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0081161 A	2011/07/13	AU 2009-296393 A1 AU 2009-296458 A1 CA 2736373 A1 CA 2738245 A1 CN102223876 A CN102224258 A EP 2344674 A2 EP 2349209 A2 JP 2012-503985A JP 2012-504134A US 2010-0092526 A1 US 2010-0099101 A1 US 2010-0203139 A1 WO 2010-036938 A2 WO 2010-036938 A3 WO 2010-036945 A2 WO 2010-036945 A3 WO 2010-036960 A2 WO 2010-036960 A3 WO 2010-036960 A8	2010/04/01 2010/04/01 2010/04/01 2010/04/01 2011/10/19 2011/10/19 2011/07/20 2011/08/03 2012/02/16 2012/02/16 2010/04/15 2010/04/22 2010/08/12 2010/04/01 2010/06/10 2010/04/01 2010/05/20 2010/04/01 2010/09/30 2010/04/01
KR 10-2012-0100969 A	2012/09/12	CA 2777055 A1 CN102803509 A EP 2486152 A1 JP 2013-507127A US 2013-0034544 A1 WO 2011-044205 A1	2011/04/14 2012/11/28 2012/08/15 2013/03/04 2013/02/07 2011/04/14