

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020 년 1 월 2 일 (02.01.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/004802 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6881* (2018.01) *G16B 25/00* (2019.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/005046

(22) 국제출원일: 2019 년 4 월 26 일 (26.04.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2018-0075364 2018 년 6 월 29 일 (29.06.2018) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (**KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80, Daegu (KR).

(72) 발명자: 원동일 (**WON, Dong Il**); 42011 대구시 수성구 상록로 69, 104동 805호, Daegu (KR).

(74) 대리인: 특허법인 피씨알 (**PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06194 서울시 강남구 선릉로90길 70 인텔빌딩 6층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR FINAL HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN TYPING ASSIGNMENT IN HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN TYPING THROUGH SEQUENCE-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBE ASSAY

(54) 발명의 명칭: 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브 방법에 의한 인간백혈구항원 형별 검사에서 인간백혈구항원의 최종 형별 판정 방법

[illegible]

(57) Abstract: The present invention relates to filtering and scoring (FnS), which is an analysis method capable of rapid and accurate final typing assignment in human leukocyte antigen (HLA) typing using a sequence-specific oligonucleotide probe. The use of the method allows the rapid and accurate HLA typing assignment regardless of race of subjects.

(57) 요약서: 본 발명은 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용한 인간백혈구항원(Human Leukocyte Antigen, HLA) 형별 검사에서 인간백혈구항원의 최종 형별을 신속, 정확하게 판정할 수 있는 분석 방법인 필터링 및 스코어링(Filtering and Scoring, FnS)에 관한 것으로, 상기 방법을 이용하면 피검자의 인종과 무관하게 신속 정확한 HLA 형별판정이 가능하다.

WO 2020/004802 A1

명세서

발명의 명칭: 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브 방법에 의한 인간백혈구항원 형별 검사에서 인간백혈구항원의 최종 형별 판정 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브(sequence-specific oligonucleotide probe)를 이용한 인간백혈구항원(Human Leukocyte Antigen) 형별 검사에서 인간백혈구항원의 최종 형별을 신속, 정확하게 판정할 수 있는 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 사람의 주조직적합성항원 복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC)의 일종인 인간백혈구항원(Human Leukocyte Antigen, HLA)은 조혈모세포(골수) 및 장기 등의 이식에서 거부 반응을 일으키는 주요 인자를 생성하는 면역 반응 조절 유전자이다. 타인의 골수 세포나 바이러스 등 외래 물질이 신체에 들어올 경우 사람의 신체는 자신을 보호하기 위하여 이를 제거하기 위한 행동을 취하게 되며, 이때, 그 물질이 자기 자신과 같은 것인지 여부의 판단에서 중요한 역할을 하는 것이 HLA이다.
- [3] 골수나 장기 이식 성공률을 높이기 위해서는 환자와 공여자의 HLA 형별이 일치되어야 한다. 만약 HLA가 불일치할 경우 이식된 조혈모세포가 환자로부터 이물질로 간주되어 공격을 당하는 거부 반응이 일어나거나 또는 반대로 공여자의 T-림프구가 환자를 이물질로 간주하고 환자를 공격하는 이식편대숙주 질환이 발생하여 피부 질환, 설사, 간 기능 이상 등의 증상이 유발되고 심할 경우는 사망을 초래할 수 있다. 두 경우 모두 조혈모세포나 장기 이식을 실패로 만드는 요인이기 때문에 HLA 형별 검사는 장기 및 조혈모세포 이식 전 필수적인 검사로 시행되고 있다.
- [4] 현재 시행되고 있는 HLA 검사 방법으로는 검사의 해상도(resolution)에 따라 저해상도(low resolution), 중해상도(middle/intermediate resolution), 고해상도(high resolution)로 분류된다. 저해상도 분석인 혈청학적 방법은 고도의 숙련된 기술과 경험이 요구되며, DNA 검사법들과 비교하여 불일치하는 결과가 보고되면서, 점차 소규모 검사실에서도 쉽게 수행할 수 있는 DNA 검사법이 기존의 혈청학적 검사 방법을 급속히 대체하고 있다.
- [5] 중해상도 분석을 위해 이용되는 SSOP(sequence specific oligonucleotide probe)

방법은 PCR 증폭 후에 스트립에 고정된 프로브와의 혼성화 반응 양상을 토대로 결과를 판정하는 방법이다. SSOP 방법은 혈청학적 검사법에서 흔히 보이는 교차 반응 및 약한 반응성 등으로 인해 모호한 결과가 보이는 현상이 적어 판독이 다소 용이하다는 점과 많은 양의 검체를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있다. 그러나 약 100개의 SSO 프로브와 피검자의 HLA 유전자 PCR 산물의 혼성화 여부에 따라 양성/음성을 할당하여 종합한 '측정 프로브 패턴'과 후보 대립유전자쌍들의 '예측 프로브 패턴'을 비교하여 가장 적합한 대립유전자쌍을 선택하므로 HLA 형별을 최종 판정하기까지 많은 시간이 소요된다. 따라서, SSOP 방법에 의한 HLA 형별검사에서 최종 HLA 형별판정을 위한 신속하고 정확한 데이터 분석 방법을 사용하는 것이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용한 인간백혈구항원 형별 검사에서 인간백혈구항원의 형별을 최종 판정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 양상은 하기 단계를 포함하는 개체의 인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA) 형별 판정 방법을 제공한다: (a) 개체의 HLA 대립유전자 증폭 산물과 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 혼성화시켜 측정 프로브 패턴을 얻는 단계; (b) HLA 대립유전자들 중에서 동일한 예측 프로브 패턴을 나타내는 것끼리 하나의 대립유전자군으로 그룹핑하는 단계; (c) 그룹핑한 후보 대립유전자군 리스트에서 확실한 음성 반응(예: 퍼센트편차(percent deviation)가 -60% 이하)인 프로브에 위배되는 대립유전자군을 후보 리스트에서 제거하는 단계; (d) 남아 있는 HLA 대립유전자군을 두 개씩 조합하여 대립유전자쌍을 만들고, 이 후보 대립유전자쌍 리스트에서 확실한 양성 반응(예: 퍼센트편차가 +60% 이상)인 프로브에 위배되는 대립유전자쌍을 후보 리스트에서 제거하는 단계; 및 (e) 후보 대립유전자쌍 리스트에 남아 있는 개별 대립유전자쌍의 예측 프로브 패턴과 피검자의 측정 프로브 패턴을 비교하여 일치 여부를 점수화하고, 최소 불일치를 보이는 대립유전자쌍을 피검자의 HLA 형별로 최종 선정하는 단계.
- [8] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 방법은 (c)에서 퍼센트편차가 하위 1/3에 속하는 프로브에 위배되는 대립유전자를 후보 대립유전자군 리스트에서 제거하는 것일 수 있다.
- [9] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 방법은 (d)에서 퍼센트편차가 상위 1/2에 속하는 프로브에 위배되는 대립유전자를 후보 대립유전자쌍 리스트에서 제거하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [10] 본 발명의 일 실시예에 따른 필터링 및 스코어링 (Filtering and Scoring, FnS) 방법(HLA 형별 판정 알고리즘)을 사용하면 인종과 무관하게 신속하고 정확하게 개체의 최종 인간백혈구항원 형별을 판정할 수 있으며, HLA 형별검사를 위한 상업용 검사키트와 함께 제공되는 분석 소프트웨어에 본 FnS 방법을 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1 및 도 2는 한 피검자의 HLA 형별검사에서 Lifecodes HLA-B typing kits를 이용하여 CRPoAPs(complete reaction pattern for all probes)를 얻은 결과를 나타낸다.
- [12] 도 3은 필터링 및 스코어링(Filtering and Scoring, FnS) 방법을 이용하여 개체의 HLA-B 형별을 판정하는 일 예를 나타낸다.
- [13] 도 4는 EPM (exact pattern matching) 및 FnS (Filtering and Scoring) 방법을 이용하여 HLA 형별을 분석하는 시간을 비교한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 하기 단계를 포함하는 개체의 인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA) 형별판정 방법인 "필터링 및 스코어링(Filtering and Scoring, FnS)"을 제공한다:
- [15] (a) 개체의 HLA 대립유전자 증폭 산물과 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 혼성화시켜 측정 프로브 패턴을 얻는 단계;
- [16] (b) HLA 대립유전자를 동일한 예측 프로브 패턴을 나타내는 대립유전자끼리 하나의 대립유전자군으로 그룹핑하는 단계;
- [17] (c) 그룹핑한 후보 대립유전자군 리스트에서 확실한 음성반응(예: 퍼센트편차(percent deviation)가 -60% 이하)인 프로브에 위배되는 대립유전자군을 제거하는 단계;
- [18] (d) 남아 있는 HLA 대립유전자군을 두 개씩 조합하여 대립유전자쌍을 만들고, 이렇게 만든 후보 대립유전자쌍 리스트에서 확실한 양성반응(예: 퍼센트편차가 +60% 이상)인 프로브에 위배되는 대립유전자쌍을 제거하는 단계; 및
- [19] (e) 후보 리스트에 남아 있는 개별 대립유전자쌍의 예측 프로브 패턴과 피검자의 측정 프로브 패턴을 비교하여 일치 여부를 점수화하고, 최소 불일치를 보이는 대립유전자쌍을 피검자의 HLA 형별로 최종 선정하는 단계.

[20]

- [21] 본 명세서에 사용된 용어, '인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA)'은 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex, MHC) 유전자에 의해 생성되는 당단백 분자로서, 모든 척추동물에 존재하며 사람의 MHC 유전자를 HLA 유전자, 이의 산물을 HLA라고 한다. HLA는 인체 내 모든 조직세포의 표면에 발현되며 백혈구, 혈소판 등 혈액세포에서도 발현된다. HLA는 자기(self) 및 비자기(non-self)의 인지, 항원 자극에 대한 면역반응, 세포성 면역과 체액성

면역의 조절 및 질병에 대한 감수성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

- [22] HLA 유전자는 항원의 구조와 기능에 따라 클래스 I, II, III로 분류되며, 이중 클래스 I에는 HLA-A, B, C 등의 유전자가 포함되고, 클래스 II에는 HLA-DR, DQ, DP 유전자가 포함된다. HLA의 각 유전자좌(loci)에는 다수의 대립유전자(allele)가 존재하므로 사람이 가진 유전자중 가장 심한 다형성을 나타낸다. 상기 HLA 유전자들은 6번 염색체 위에 서로 근접해서 존재하므로 부모에서 자식으로 유전될 때 하나의 덩어리로 묶여서 유전되며, 이러한 대립유전자들의 조합을 HLA 일배체형(haplotype)이라고 한다.
- [23] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 (a)에서 HLA 대립유전자 증폭 산물은 당업계에 알려진 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의하여 생성될 수 있다. 또한, HLA 대립유전자를 증폭하여 프로브와 혼성화시키는 것은 상업적으로 판매되는 HLA 형별검사 키트를 이용할 수도 있다.
- [24] 본 명세서에 사용된 용어, '프로브(probe)'는 인간의 HLA 유전자 서열에 특이성을 나타내는 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 프로브는 Lifecodes HLA-SSO typing kits(Immucor, 미국)를 이용할 수 있다.
- [25] 본 명세서에 사용된 용어, '프로브 혼성화 패턴(probe hybridization pattern)'은 개체의 혈액에서 증폭한 HLA 대립유전자와 개별 프로브의 혼성화 여부에 따라 양성/음성을 할당하여 종합한 패턴을 의미하며, 측정 프로브 패턴 또는 CRPoAPs(complete reaction pattern for all probes)라고도 불리운다.
- [26] 본 명세서에 사용된 용어, '예측 프로브 패턴'은 개별 혹은 두 대립유전자쌍에 대하여 알려진 개별 프로브(약 100개)의 양성/음성 여부를 종합한 패턴으로, HLA 키트 제조원에서 이에 대한 정보를 제공한다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 HLA 형별 판정 방법은 (b)에서 확실한 음성 반응(절대 음성)으로 간주되는 프로브(예를 들어, 퍼센트편차가 -60% 이하인 프로브 또는 퍼센트편차가 하위 1/3에 속하는 프로브)에 위배되는 대립유전자를 후보 리스트에서 제거할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 HLA 형별 판정 방법은 (c)에서 확실한 양성 반응(절대 양성)으로 간주되는 프로브(예를 들어, 퍼센트편차가 +60% 이상인 프로브 또는 퍼센트편차가 상위 1/2에 속하는 프로브)에 위배되는 대립유전자쌍을 후보 리스트에서 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [29] 본 명세서에 사용된 용어, '퍼센트편차(percent deviation)'는 프로브 반응에 대한 측정치로서, 개별 프로브에 대하여 이 수치가 양수이면 양성, 음수이면 음성을 할당한다. 퍼센트편차는 보정된 MFI(median fluorescent intensity, 중간 형광 강도) 수치에서 컷오프 수치를 빼고, 이 값을 컷오프 수치로 나눈 후 백분율로 나타낸다(수학식 2).
- [30] 각 프로브의 보정된 MFI 수치는 원본 MFI 수치에서 대조군(control blank for probe)의 MFI 수치를 뺀 값을 컨센서스 프로브의 MFI 수치에서 대조군(control blank for consensus)의 MFI 수치를 뺀 값으로 나누어 산출할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [31] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [32]
- [33] 실험 방법
- [34] **1. HLA 타이핑 대상**
- [35] 경북대학교 병원에 내원한 신장 이식이 필요한 152명의 환자에 대한 507건의 HLA 타이핑(human leukocyte antigen typing, 조직적합성 검사; HLA-A 119건, HLA-B 124건, HLA-DR 130건 및 HLA-DQ 134건) 검사 결과를 이용하였다. HLA 타이핑 결과는 새로운 일련번호를 부여하여 익명으로 처리하였다.
- [36]
- [37] **2. 역방향 SSOP HLA 타이핑**
- [38] 중간 해상도의 역방향 SSOP HLA 타이핑(reverse sequence-specific oligonucleotide probe HLA typing)은 하기 방법으로 수행하였다. 말초 혈액(peripheral blood) 샘플로부터 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 이후 제조사의 프로토콜에 따라 Lifecodes HLA-SSO typing kits (Immucor)를 이용하여 HLA-A, -B, -DR 및 -DQB1 타이핑을 수행하였다. PCR 반응액은 Lifecodes Master Mix(Immucor) 15 μ l, 게놈 DNA 200 ng 및 Taq polymerase 2.5 U을 혼합한 뒤 최종 부피를 50 μ l로 맞추어 준비하였다. PCR은 변성 반응을 95°C에서 5분 수행하고, 증폭 단계는 95°C에서 30초, 60°C에서 45초 및 72°C에서 45초를 8 사이클 수행하고, 95°C에서 30초, 63°C에서 45초 및 72°C에서 45초를 32 사이클 수행한 후 72°C에서 15분 동안 신장 반응을 수행하였다. 혼성 반응(hybridization reaction)은 프로브 믹스 15 μ l와 PCR 결과물 5 μ l를 혼합하여 97°C에서 5분, 47°C에서 30분 및 56°C에서 10분 동안 수행하였다. 상기 혼성 반응물과 1:200으로 희석한 스트렙타아비딘-피코에리트린 용액(streptavidin-phycoerythrin solution) 170 μ l를 혼합한 후 Luminex 200 시스템(Luminex Corp.)으로 30분 이내에 분석하였다.
- [39] 분석 결과 데이터인 프로브의 CRO (complete reaction pattern)는 HLA-A, -B, -DR 및 -DQB1 유전자좌(loci)에서의 프로브에 기초한 양성/음성 여부로부터 구축되며, CRPoAPs (complete reaction pattern for all probes)는 프로브 히트 패턴(probe hit pattern), 측정 프로브 패턴으로도 불리운다.
- [40]
- [41] **3. HLA 타이핑을 위한 데이터 분석**
- [42] **3-1. 초기 공통 단계(Initial shared steps)**
- [43] 데이터 분석을 위한 공통 분석 단계는 Lifecodes의 소프트웨어인 EPM(exact pattern matching)과 실험실에서 개발한 소프트웨어인 FnS(Filtering and Scoring)를

이용하여 동일한 조건에서 수행하였다. 소프트웨어 실행 전, Luminex 200 및 이의 xPONENT 소프트웨어(Luminex Corp.)를 이용하여 각 웰에 있는 마이크로스피어(microsphere)의 형광을 측정함으로써 혼성화 패턴을 확인하고, csv(comma-separated values) 파일을 작성하였다. 상기 csv 파일은 각각의 데이터 분석 소프트웨어로 임포트(import)하여 이용하였다. 상기 csv 파일에는 각 프로브(마이크로스피어)에 대한 MFI(median fluorescent intensity, 중간 형광 강도) 수치가 포함되어 있다. 획득된 MFI 수치는 프로브의 양성 또는 음성 반응성 평가에 이용하였다. 품질 관리(quality control)를 위하여, 컨센서스(consensus) SSO 프로브의 MFI 수치는 패키지 인서트 시트(package insert sheet)에 정의된 역가 수치(threshold value)를 초과해야 한다. 이후 랏-특이적 백그라운드 대조군 수치(Lot-specific background control values)를 샘플의 원본 MFI 수치(raw MFI value)로부터 뺀 후 백그라운드-교정 데이터(background-corrected data)를 만들었다. 다음으로 하기 수학적 식 1에 따라 MFI 수치를 보정하여 정규화된 데이터(normalized data)를 생성하였다.

[44]

[45] [수식1]

$$\text{Adjusted value} = \frac{\text{MFI(Probe)} - \text{MFI(Control blank for probe)}}{\text{MFI(Consensus)} - \text{MFI(Control blank for consensus)}}$$

[46]

[47] 특정 프로브에 대한 퍼센트편차(percent deviation)는 하기 수학적 식 2에 따라 산출하였다.

[48]

[49] [수식2]

$$\% \text{deviation} = \frac{\text{Adjusted value} - \text{Cutoff value}}{\text{Cutoff value}} \times 100(\%)$$

[50]

[51] 도 1은 HLA 형별을 결정하고자 하는 개체에서 Lifecodes HLA-B typing kits를 이용하여 CRPoAPs를 확인한 결과를 보여준다.

[52] 도 1의 A는 동형 접합 대립유전자쌍의 예상 CRPoAP의 일부를 나타내는 대립유전자와 프로브 히트(probe hit) 결과를 나타낸다. 도 1의 B는 Match It! DNA 소프트웨어로 분석한 샘플의 CRPoAP 보정 수치와 프로브 이름의 관계를 나타낸다: 도 1의 B에서 녹색 그래프는 음성 프로브, 적색 그래프는 양성 프로브를 의미하고, 그리드 그래프는 양성 프로브로 조정된 프로브 및 검은색 점은 각 프로브에 대한 컷오프 수치를 나타낸다.

[53]

[54] **3-2. EPM with Match It! 소프트웨어를 이용한 분석**

[55] 샘플의 CRPoAPs는 대립유전자쌍(allele pairs)의 예상 CRPoAPs와 비교하였다. 상기 대립유전자쌍은 IPDIMG/HLA sequence database release 3.11.0에 기반한 모든 대립유전자 또는 CWD(common well-documented) 대립유전자의 조합이다. 정확히 일치하는 대립유전자를 찾기 위하여, 거짓 양성/음성 반응(false positive/negative reaction)을 나타내는 것으로 의심되는 프로브는 두 패턴을 비교하기 전에 변경하였다. 특정 프로브에 대하여, 절대 퍼센트편차가 낮을수록 거짓 반응을 일으킬 확률이 높아진다.

[56]

[57] **3-3. FnS 소프트웨어를 이용한 분석**

[58] FnS 방법을 기반으로 하는 전용 소프트웨어 프로그램은 Visual Basic version 6.0(Microsoft Co.)으로 제작하였다. 상기 소프트웨어는 스프레드시트(spreadsheet) 및 그리드 구성 요소로 Farpoint Spread version 3.0 (GrapeCity, Sendai, Japan)을 사용하고, Access(Microsoft Co.)에 한국인 HLA 데이터베이스를 구축하였다.

[59] 절대 양성 및 절대 음성 반응인 프로브는 샘플에 대한 측정 결과가 절대 퍼센트편차가 60% 이상인 프로브로 정의하였다: 절대 양성 프로브는 $>+60\%$ 및 절대 음성 프로브는 $<-60\%$. PRPwoDP(partial reaction pattern with only definite probes)는 하기 프로브로 구성되는 패턴으로 정의하였다: 절대 양성 프로브로 구성되는 양성 PRPwoDP 및 절대 음성 프로브로 구성되는 음성 PRPwoDP.

[60] 한국인 피검자의 표본 CRPoAP에 가장 적합한 대립유전자(best-fit allele)를 찾는 표준 방법은 하기와 같다: (1) 개별 대립유전자를 한국인 개체에서 이전에 확인된 대립유전자의 존재 유무에 기반하여 두번째 또는 세번째 해상도 수준(resolution level)으로 필터링한다; (2) 음성 PRPwoDP에 기초하여 개별 대립유전자를 필터링한다: 음성 PRPwoDP에 속하는 프로브에 대하여, 한 후보 대립유전자의 예측 반응이 양성이면, 후보 대립유전자 리스트에서 그 대립유전자를 제거한다; (3) 남은 대립유전자들을 두 개씩 조합하여 대립유전자쌍(allele pairs) 리스트를 얻는다; (4) 대립유전자쌍은 양성 PRPwoDP에 기초하여 필터링한다: 양성 PRPwoDP에 속하는 프로브에 대하여, 한 후보 대립유전자쌍의 예측 반응이 음성이면, 후보 대립유전자쌍 리스트에서 그 대립유전자쌍을 제거한다; (5) 피검자로부터 얻은 수정하지 않은 CRPoAP(raw sample CRPoAP)와 후보 대립유전자쌍 리스트에 남아 있는 개별 대립유전자쌍의 예상 CRPoAP를 비교하여 미스매치 스코어(mismatch score)를 얻는다.

[61] 대안 방법은 인종적으로 다양하거나 혼합된 인구 집단을 위해 고안하였다(표 1): 인종-기반 필터링 단계(ethnicity-based filtering step)는 개별 대립유전자를 동일한 프로브 히트 패턴(same probe hit pattern)에 따라 그룹핑(grouping)하는 단계로 대체하였다. 그룹핑 단계 및 인종-기반 필터링 단계는 소프트웨어의 데이터베이스에 새로운 랏(new lot)의 정보가 들어왔을 때, 데이터 분석 전 1회

수행하였다. 따라서, 상기 두 단계를 수행하는데 소요되는 시간은 데이터 분석 시간에 포함되지 않는다.

- [62] 미스매치 스코어는 샘플 CRPoAP 및 특정 후보 대립유전자쌍의 예상 CRPoAP에 대해 개별적으로 계산하였다. 미스매치 스코어는 미스매치 프로브의 수와 퍼센트편차의 합($\Sigma\%$ deviation)으로 이루어지며, 퍼센트편차의 합은 하기 수식 3에 따라 계산하였다:

- [63] [수식3]

$$\sum \% \text{deviation} = \text{sum of the absolute values of the } \% \text{ deviations of all mismatched probes}$$

- [64]

- [65] 이러한 스코어링을 남아있는 모든 유전자쌍에 대하여 반복하고, 미스매치 스코어 중에서 가장 작은 값을 갖는 대립유전자쌍을 가장 적합한 대립유전자쌍으로 선택하였다. 최종 HLA 형별 선정은 CWD 대립유전자를 모두 포함하는 대립유전자쌍에 우선순위를 두어 결정하였다. 미스매치된 프로브의 수가 3 이상일 경우 HLA 타이핑의 정확도를 확인하기 위하여, 동일한 방법 및 HLA-SBT를 사용하여 테스트를 반복하였다.

- [66] 도 2는 대안 방법(필터링 및 스코어링 방법)을 이용하여 HLA-B 형별을 타이핑하는 일 예를 보여준다. 도 2에서 노란색으로 표시된 대립유전자는 CWD 대립유전자를 의미한다.

- [67] 하기 표 1에 HLA 형별 타이핑에 대한 표준 방법과 대안 방법을 비교하였다.

- [68]

[69] [표1]

단 계	설 명	표준 방법		대안 방법	
		개별 대립유전 자	대립유전자 쌍	개별 대립유전 자	대립유전자 쌍
1	초기 공통 단계	3,958	7,834,861	3,958	7,834,861
2	동일한 프로브 히트 패턴을 갖는 대립유전자끼리 그룹핑하는 단계	NA	NA	1,771	1,569,106
3	한국인에서 확인되는 대립유전자의 존재 여부에 따라 필터링하는 단계	239	28,680	NA	NA
4	음성 PRPwoDP에 기반하여 필터링하는 단계(퍼센트편차가 <-60%인 절대 음성 프로브)	16	-	135	-
5	남아 있는 대립유전자들을 대립유전자쌍으로 조합하는 단계	-	136	-	9,180
6	양성 PRPwoDP에 기반하여 필터링하는 단계(퍼센트편차가 >+60%인 절대 양성 프로브)	-	10	-	92
7	피검자 샘플의 원본 CRPoAP와 잔여 후보 대립유전자쌍의 예상 CRPoAP 사이에서 미스매치 스코어를 계산하는 단계	-	1	-	1

[70]

[71] **3-4. 역방향 SSOP HLA 타이핑에 대한 결과 분석 시간의 비교**

[72] 데이터 분석에 필요한 시간을 EPM(Match It! DNA) 및 FnS 소프트웨어 사이에서 비교하였으며, 분석 시간은 샘플 분석을 위한 클리로부터 최종 타이핑 결정까지 소요되는 시간(분:초)으로 정의하였다.

[73] 총 507건의 HLA 타이핑 테스트의 절반에 대하여 두 명의 전문가가 서로 다른 방법을 사용하여 동시에 데이터 분석을 수행하였다. 나머지 절반에 대해서는 서로 방법을 바꾸어 데이터 분석을 수행하였다. 최종 HLA 형별 결정의 정확도(correctness)는 다음 기준에 따라 결정하였다: 가장 작은 미스매치 스코어를 갖는 모든 후보 CWD 대립유전자쌍을 최종 HLA 형별 또는 주어진 HLA 유전자좌의 형별로 결정하였다.

[74]

[75] **3-5. 통계 분석**

[76] 통계 분석은 엑셀 2013을 이용하였으며, 두 방법은 paired *p*-test로 비교하였다. *P* 값이 0.05 이하인 경우($P < 0.05$) 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하고, 결과는 평균값(mean)으로 기재하였다.

[77]

[78] **실험 결과**[79] **1. 데이터 분석 시간**

[80] 하기 표 2에 기재된 바와 같이 FnS 방법에 대한 평균 분석 시간(분:초)은 00:21(00:08-01:47)로 나타나, 표준 분석 방법인 EPM 방법의 01:04(00:15-23:45)보다 짧은 것을 확인할 수 있었다($P < 0.05$).

[81]

[82] [표2]

분석시간(분:초)	미스매치 프로브의 수(샘플 수)								
	0 (334)	1 (98)	2 (49)	3 (11)	4 (10)	5 (3)	6 (1)	7 (1)	합계(507)
EPM	00:35(00:15-02:31)	01:06(00:15-04:23)	01:54(00:36-05:06)	02:54(00:35-05:29)	03:39(00:32-08:39)	11:02(01:36-23:45)	17:00	15:00	01:04(00:15-23:45)
FnS	00:19(00:08-01:01)	00:23(00:11-01:08)	00:27(00:09-01:34)	00:36(00:11-01:47)	00:41(00:25-01:30)	00:35(00:17-00:52)	00:38	00:43	00:21(00:08-01:47)

[83]

[84] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이 EPM 방법을 이용하면 미스매치 프로브의 수가 증가함에 따라 분석 시간이 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 반면, FnS 방법을 이용하면 미스매치 프로브의 수에 관계 없이 분석 시간이 상대적으로

일정한 것을 확인할 수 있었다.

[85]

[86] **2. HLA 타이핑의 정확도(accuracy)**

[87] 하기 표 3에 나타난 바와 같이 507개의 HLA 타이핑 샘플 중 4개 샘플에서 EPM 방법 및 FnS 방법의 결과가 불일치하였다. 한국인에서 나타나는 대립유전자 빈도, 불일치 프로브의 수 및 퍼센트편차의 합을 고려할 때, FnS 방법으로 HLA 타이핑을 수행한 것이 4개 샘플 모두에서 정확했다.

[88] 구체적으로 EPM 방법을 사용한 경우, 2개 샘플에서는 가장 작은 퍼센트편차의 합을 갖는 복수의 CWD 대립유전자쌍을 확인할 수 없었다. 다른 2개 샘플에서는 가장 작은 수의 미스매치 프로브를 갖거나 또는 가장 작은 퍼센트편차의 합을 갖는 단일 후보 CWD 대립유전자쌍을 확인할 수 없었다.

[89]

[90] [표3]

	HLA 유전자좌	EPM 방법		FnS 방법		HLA 최종 타이핑 방법
		지정된 대립유전자 쌍	미스매치 스코어	지정된 대립유전자 쌍	미스매치 스코어	
샘플 1	HLA-A	A*24:02, 24:02	0, 0	A*24:02, 24:02	0, 0	FnS
		A*24:02, 24:20	0, 0	A*24:20, 24:20	0, 0	
				A*24:20, 24:20	0, 0	
샘플 2	HLA-A	A*24:02, 24:02	0, 0	A*24:02, 24:20	0, 0	FnS
		A*24:02, 24:20	0, 0	A*24:20, 24:20	0, 0	
				A*24:20, 24:20	0, 0	
샘플 3	HLA-B	B*35:01, 55:01	2, 105	B*35:01, 55:02	1, 11	FnS
샘플 4	HLA-DQ	DQB1*04:01, 04:02	3, 73	DQB1*04:01, 04:01	2, 55	FnS

[91]

[92] 상기 실험 결과를 통하여 HLA 형별 타이핑시 FnS 방법을 이용하면, 분석

시간은 줄이면서 분석의 정확도를 높일 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, FnS 방법은 인종과 상관없이 개체의 HLA 형별을 타이핑할 수 있다.

[93]

[94] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 단계를 포함하는 개체의 인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA) 형별 판정 방법:
- (a) 개체의 HLA 대립유전자 증폭 산물과 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브를 혼성화시켜 측정 프로브 패턴을 얻는 단계;
 - (b) HLA 대립유전자들 중에서 동일한 예측 프로브 패턴을 나타내는 것끼리 하나의 대립유전자군으로 그룹핑하는 단계;
 - (c) 그룹핑한 후보 대립유전자군 리스트에서 확실한 음성 반응(예: 퍼센트편차(percent deviation)가 -60% 이하)인 프로브에 위배되는 대립유전자군을 후보 리스트에서 제거하는 단계;
 - (d) 남아 있는 HLA 대립유전자군을 두 개씩 조합하여 대립유전자쌍을 만들고, 이 후보 대립유전자쌍 리스트에서 확실한 양성 반응(예: 퍼센트편차가 +60% 이상)인 프로브에 위배되는 대립유전자쌍을 후보 리스트에서 제거하는 단계; 및
 - (e) 후보 대립유전자쌍 리스트에 남아 있는 개별 대립유전자쌍의 예측 프로브 패턴과 피검자의 측정 프로브 패턴을 비교하여 일치 여부를 점수화하고, 최소 불일치를 보이는 대립유전자쌍을 피검자의 HLA 형별로 최종 선정하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 방법은 (c)에서 퍼센트편차가 하위 1/3에 속하는 프로브에 위배되는 대립유전자를 후보 대립유전자군 리스트에서 제거하는 것인 개체의 HLA 형별 판정 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 방법은 (d)에서 퍼센트편차가 상위 1/2에 속하는 프로브에 위배되는 대립유전자를 후보 대립유전자쌍 리스트에서 제거하는 것인 개체의 HLA 형별 판정 방법.

[illegible]

Batch: 15-03-04-B / Sample ID: 3138

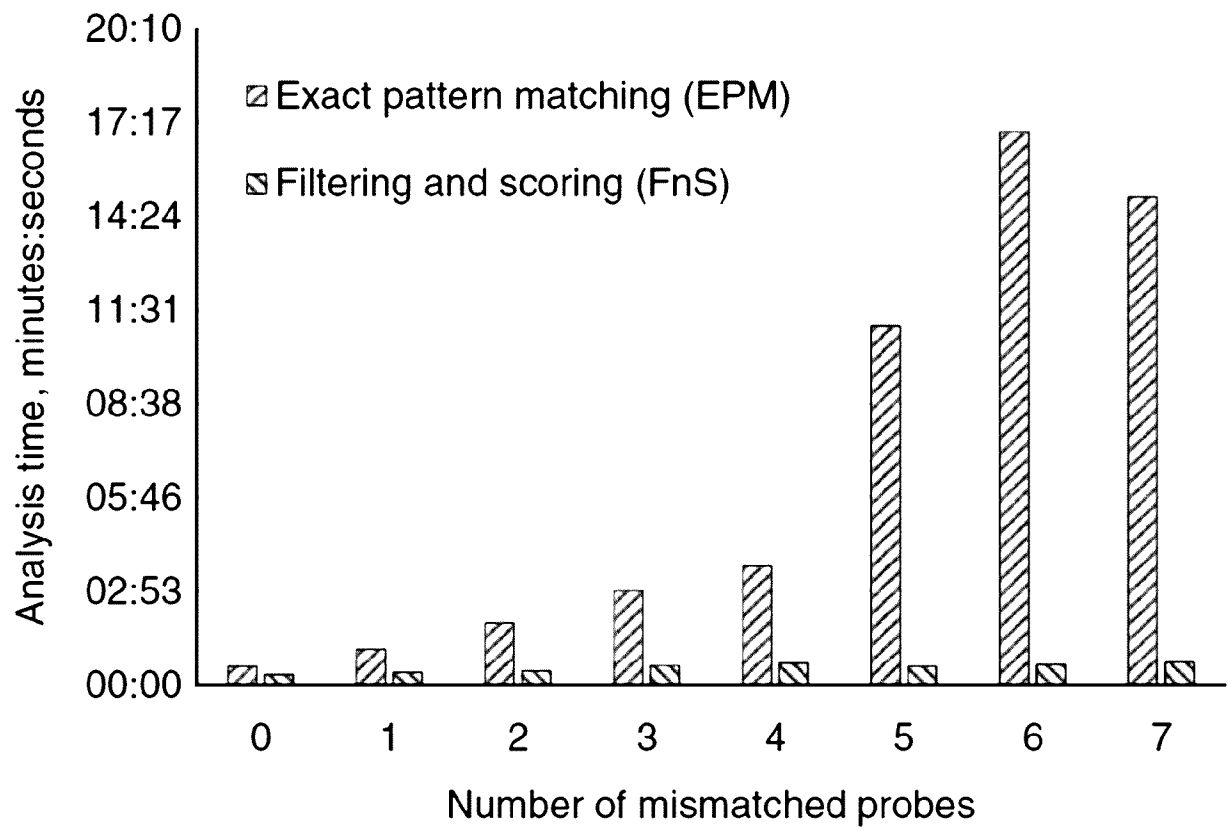
Adjusted Value

Probe Name

Allele pair combination			Expected reaction pattern								Σ%deviation	
	Allele 1	Allele 2								#	Σd	
1	B*44:02:01:01	B*44:02:01:01	1	0	0	0	1	0		1	14	2171
2	B*44:02:01:01	B*44:03:01	1	0	0	0	1	0		2	13	1978
3	B*44:02:01:01	B*44:03:02	1	0	0	0	1	0		3	13	1978
4	B*44:02:01:01	B*54:01:01	1	0	0	0	1	1		4	2	194
5	B*44:02:01:01	B*54:19	1	0	0	0	1	1		5	2	194
6	B*44:03:01	B*44:03:01	1	0	0	0	1	0		6	11	1784
7	B*44:03:01	B*44:03:02	1	0	0	0	1	0		7	11	1784
8	B*44:03:01	B*54:01:01	1	0	0	0	1	1		8	0	0
9	B*44:03:01	B*54:19	1	0	0	0	1	1		9	0	0
10	B*44:03:02	B*44:03:02	1	0	0	0	1	0		10	13	1901
11	B*44:03:02	B*54:01:01	1	0	0	0	1	1		11	2	117
12	B*44:03:02	B*54:19	1	0	0	0	1	1		12	2	117
13	B*54:01:01	B*54:01:01	1	0	0	0	0	1		13	12	1558
14	B*54:01:01	B*54:19	1	0	0	0	0	1		14	12	1558
15	B*54:19	B*54:19	1	0	0	0	0	1		15	12	1558
16										16		

The best-fit allele pair

[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/005046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6881(2018.01)i, G16B 25/00(2019.01)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)

C12Q 1/6881; C07H 21/02; C07H 21/04; C12Q 1/68; G01N 33/53; G06F 19/18; G16B 25/00

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) & Keywords: sequence-specific oligonucleotide probes (SSOPs), human leukocyte antigen (HLA), test by type, EPM, filtering and scoring (FnS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ITOH, Y. et al. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. Immunogenetics. 2005, vol. 57, pages 717-729 See abstract; pages 720, 727, 728; tables 3, 4; and figure 2.	1-3
A	US 5883238 A (ANDRIEN, M. et al.) 16 March 1999 See the entire document.	1-3
A	KR 10-2004-0084790 A (BIOCORE CO., LTD. et al.) 06 October 2004 See the entire document.	1-3
A	WO 2012-083240 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 21 June 2012 See the entire document.	1-3
A	US 2016-0298185 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al.) 13 October 2016 See the entire document.	1-3
X	WON, D. I. A novel analysis strategy for HLA typing using a sequence-specific oligonucleotide probe method. HLA. 2017, vol. 90, pages 276-283 See the entire document.	1-3
	※ The above document is the published document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant	



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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 AUGUST 2019 (06.08.2019)

Date of mailing of the international search report

06 AUGUST 2019 (06.08.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/005046

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5883238 A	16/03/1999	AT 169682 T AU 6258594 A AU 688307 B2 CA 2158578 A1 CA 2158578 C DE 69412470 T2 DE 69412470 T3 DK 0689609 T3 DK 0689609 T4 EP 0689609 A1 EP 0689609 B1 EP 0689609 B2 ES 2123775 T3 ES 2123775 T5 JP 08-507690 A JP 4031028 B2 WO 94-21818 A1	15/08/1998 11/10/1994 12/03/1998 29/09/1994 26/05/2009 25/03/1999 20/07/2006 17/05/1999 25/07/2005 03/01/1996 12/08/1998 13/04/2005 16/01/1999 01/10/2005 20/08/1996 09/01/2008 29/09/1994
KR 10-2004-0084790 A	06/10/2004	KR 10-0581002 B1	17/05/2006
WO 2012-083240 A2	21/06/2012	US 2012-0264627 A1 US 8969254 B2 WO 2012-083240 A3	18/10/2012 03/03/2015 17/01/2013
US 2016-0298185 A1	13/10/2016	WO 2015-085147 A1	11/06/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6881(2018.01)i, G16B 25/00(2019.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6881; C07H 21/02; C07H 21/04; C12Q 1/68; G01N 33/53; G06F 19/18; G16B 25/00

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: 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브(sequence-specific oligonucleotide probes, SSOPs), 인간백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA), 형별검사(typing), EPM, 필터링 및 스코어링(filtering and scoring, FnS)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ITOH, Y. 등, 'High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population', Immunogenetics, 2005, 57권, 페이지 717-729 초록; 페이지 720, 727, 728; 표 3, 4; 및 도면 2 참조.	1-3
A	US 5883238 A (ANDRIEN, M. 등) 1999.03.16 전체 문헌 참조.	1-3
A	KR 10-2004-0084790 A (바이오코아 주식회사 등) 2004.10.06 전체 문헌 참조.	1-3
A	WO 2012-083240 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 2012.06.21 전체 문헌 참조.	1-3
A	US 2016-0298185 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. 등) 2016.10.13 전체 문헌 참조.	1-3
X	WON, D. I., 'A novel analysis strategy for HLA typing using a sequence-specific oligonucleotide probe method', HLA, 2017, 90권, 페이지 276-283 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-3

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 08월 06일 (06.08.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 08월 06일 (06.08.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



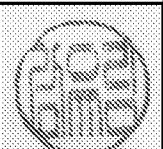
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5883238 A	1999/03/16	AT 169682 T AU 6258594 A AU 688307 B2 CA 2158578 A1 CA 2158578 C DE 69412470 T2 DE 69412470 T3 DK 0689609 T3 DK 0689609 T4 EP 0689609 A1 EP 0689609 B1 EP 0689609 B2 ES 2123775 T3 ES 2123775 T5 JP 08-507690 A JP 4031028 B2 WO 94-21818 A1	1998/08/15 1994/10/11 1998/03/12 1994/09/29 2009/05/26 1999/03/25 2006/07/20 1999/05/17 2005/07/25 1996/01/03 1998/08/12 2005/04/13 1999/01/16 2005/10/01 1996/08/20 2008/01/09 1994/09/29
KR 10-2004-0084790 A	2004/10/06	KR 10-0581002 B1	2006/05/17
WO 2012-083240 A2	2012/06/21	US 2012-0264627 A1 US 8969254 B2 WO 2012-083240 A3	2012/10/18 2015/03/03 2013/01/17
US 2016-0298185 A1	2016/10/13	WO 2015-085147 A1	2015/06/11