(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0129293
(43) 공개일자 2024년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0021961
(22) 출원일자 2023년02월20일
심사청구일자 2023년02월20일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이호수
서울특별시 송파구 위례성대로6길 10, 나동 201호 (방이동)
예병덕
서울특별시 강남구 선릉로 222, 109동 1501호 (대치동, 대치아이파크아파트)
윤용식
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 206동 3102호 (신천동, 파크리오)
(74) 대리인
특허법인태백

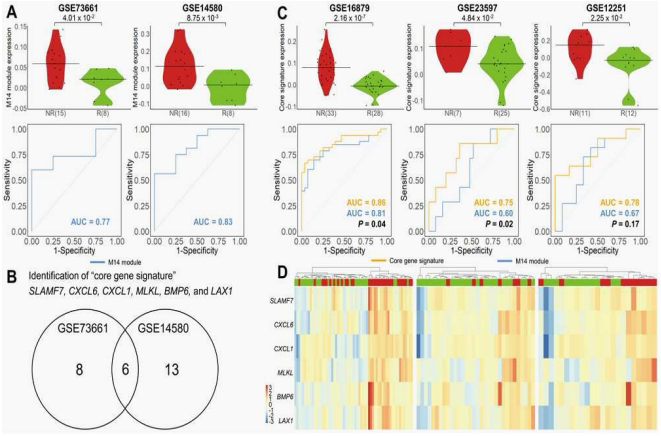
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 낮거나 없는 환자군에서 특정 유전자(SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6 및 LAX1)의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/065 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711165215
과제번호 2021R1F1A1060823
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 자가면역질환인 궤양성대장염의 중증도 및 약물 반응 예측을 위한 유전체 분석
기 여 율 25/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465037223
과제번호 HI22C1721000022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 공익적 의료기술연구사업
연구과제명 크론병에 의한 난치성 궤양 재생 치료를 위한 장 오가노이드 치료제 개발 및 임상시험 진입
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2022.07.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465036299
과제번호 HR21C0198030022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성 R&D
연구과제명 치료표적 발굴 특화 인공지능 기반의 개방형 신약개발 지원
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155119
과제번호 2018R1A5A2020732
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 줄기세포 면역제어 연구센터
기 여 율 25/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군에 비해 치료 반응성이 없는 비반응군에서 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 4

SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 확인할 수 있는 제제를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 발현수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 동반진단용 조성물.

청구항 6

청구항 4 또는 청구항 5의 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트.

청구항 7

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계); 및

크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 제1단계는 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루

어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 단백질 발현수준은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 상기 유전자 발현수준은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 크론병(Crohn's disease)은 소화관의 임의의 부위에 궤양 등이 비연속적으로 발생하는 질환으로, 일시적으로 증상이 좋아지다가 재발하는 경우가 많고, 궤양성 대장염과 함께 염증성 장 질환으로 통칭하기도 한다. 복통, 설사, 체중 감소, 발열, 혈변, 빈혈 등의 증상을 동반하고, 인종별로 유태인과 코카시안에서 발생이 많고, 동양인에는 상대적으로 발병 빈도는 드물었으나, 최근 남유럽, 우리나라를 포함하는 아시아 국가, 다른 개발도상국 등에서도 발병률이 증가하고 있다.

[0003] 병의 원인으로 유전적 요인, 면역 이상, 식사 등의 환경인자가 관여한다는 보고가 있으나, 아직까지 불분명하고, 이에 따라 근본적 치료법도 아직 확립되어 있지 않다. 크론병 진단의 경우, 임상증상, X선 조영, 내시경 검사, 병리학적 검사 등을 조합해서 행해지고 있으나, 상기 방법들은 경험과 숙련된 기술을 요하며, 특히 발병 초기에 있어서, 크론병 감별이 곤란한 증례가 많다. 크론병 치료의 경우, 증상은 완화시키고, 이러한 상태를 장기간 유지하는 약제를 사용하고 있고, 아미노살라실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제, 항-TNF 제제 등이 대표적이다. 그러나 상기 약제들도 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통 등의 부작용이 다수 존재하고, 환자에 따라 치료 반응성도 천차만별이라는 문제가 있다. 이에, 크론병의 효과적인 진단, 치료, 치료반응성 예측 등을 위한 연구가 활발히 진행 중인 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1874632호(2016.09.26. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물을 제공하

는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 확인할 수 있는 제제를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동반진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계); 및 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 확인할 수 있는 제제를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 동반진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계); 및 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 낮거나 없는 환자군에서 특정 유전자(SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6 및 LAX1)의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 크론병 환자 유래 검체와 대조군 간의 유전체 발현 비교 및 연관 기능적 경로 분석을 시행한 과정을 대략적으로 나타낸 개요도이다.

도 2는 식별된 모듈이 치료 결과와 관련이 있는지 여부를 확인하기 위해 접근 가능한 유전자 발현 분석이 있는 코호트(163명의 환자에 대한 GSE73661, GSE14580, GSE16879, GSE23597, GSE12251)에서 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명은 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수

있다.

[0019] 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군에 비해 치료 반응성이 없는 비반응군에서 발현이 증가할 수 있다.

[0020] 본 발명에서, "동반진단(Companion Diagnosis)"이란 환자의 특정 약물치료에 대한 반응성을 미리 예측하기 위한 진단 기법을 의미한다.

[0021] 본 발명에서, "동반진단용 바이오마커"란 환자의 특정 약물치료에 대한 반응성을 미리 예측하기 위한 지표로서 단백질, DNA, RNA, 대사 물질 등을 포함할 수 있다. 즉 특정 질환에 대해서, 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료 반응을 예측할 수 있고 객관적으로 측정할 수 있는 표지자를 의미한다.

[0023] 또한, 본 발명은 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 확인할 수 있는 제제를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 발현수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에서 “프라이머(primer)”란 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 “프로브(probe)”란 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 miRNA의 존재 유무 및 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 동반진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트를 제공한다.

[0029] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7, CXCL1, MLKL, BMP6 및 LAX1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하여 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하는 데 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 키트는 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$를 포함할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계) 및 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0034] 상기 제1단계는 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 단백질 발현수준은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 유전자 발현수준은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] **[실시예 1] 차등발현유전자 분석**

[0042] RNA 자료 필터링 및 정규화 단계는 R(버전 4.1.1)의 "DESeq2"(버전 1.34.0) 패키지를 사용하여 수행하였다. 상기 패키지를 사용하여 각 그룹의 차등 발현을 추정하였고, |log2fold-change|>1.2 및 FDR(False Discovery Rate) <0.01을 사용하여 차등발현유전자(Differentially Expressed Gene; DEG)를 정의하였다.

[0044] **[실시예 2] 공동 표현 네트워크 분석(Co-expression network analysis)**

[0045] 공동 발현된 유전자의 모듈을 확인하기 위해, R에서 WGCNA(Weighted Gene Correlation Network Analysis, 버전 1.71)를 수행하였다. DEG 분석 결과를 기반으로 각 환자 내에서 전체 유전자 발현 패턴을 분석하고, 유전자 간의 Pearson 상관관계 매트릭스를 계산하여 공동 유전자 발현 모듈을 구성하였다.

[0047] **[실시예 3] 독립적인 데이터 세트에서 발굴 모듈 정량화**

[0048] 식별된 모듈이 치료 결과와 관련이 있는지 여부를 확인하기 위해, 접근 가능한 유전자 발현 분석이 있는 코호트(163명의 환자에 대한 GSE73661, GSE14580, GSE16879, GSE23597 및 GSE12251)에서 항-TNF 요법에 대한 반응에 미치는 영향을 분석하였다. 공개적으로 이용 가능한 마이크로어레이 데이터(GSE73661, GSE14580, GSE16879, GSE23597 및 GSE12251)를 유전자 발현 옴니버스에서 다운받아서 활용하였다. R에서 "moduleEigengenes" 기능을 사용하여 고유 유전자(eigengenes)를 생성하여 분석하였다. 약물의 치료 시작 전에 확보한 조직의 전사 자료(transcriptional data)를 기반으로, 항-TNF 요법의 반응군 및 비반응군 간의 구별을 위한 모듈 점수의 예측 값은 AUROC(Receiver Operator Curve) 아래 영역을 사용하여 평가하였다. 각 유전자 모듈에 대한 AUROC 값은

"multipleROC" 패키지의 로지스틱 회귀 모델에서 생성된 예측에 적용하여 수치화하였다.

[0050] **[실시예 4] 항-TNF 요법에 대한 반응 예측을 위한 핵심 유전자 발굴**

[0051] M14 모듈의 발현은 항-TNF 요법에 대한 비반응자를 구별하는 유망한 가능성을 보여주었다(AUROC≥0.6). 상기 결과로부터, 치료 전 유전자 발현에서 낮은 M14 모듈 점수를 가진 환자가 항-TNF 치료로 혜택을 볼 수 있음을 확인하였다. 이에 항-TNF 요법에 대한 반응을 예측하는 핵심 유전자를 분석하였다. 항-TNF에 대한 무반응과 관련된 핵심 유전자를 확인하기 위해, M14 모듈의 62개 유전자 중, GSE14580 및 GSE73661에서 무반응자와 반응자 사이에 유의미한 발현 차이가 있는 유전자를 발굴하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, GSE14580 및 GSE73661 데이터 세트에서 M14 모듈의 62개 유전자 중 6개의 핵심 유전자[SLAMF7(NCBI Gene ID : 57823), CXCL6(NCBI Gene ID : 6372), CXCL1(NCBI Gene ID : 2919), MLKL(NCBI Gene ID : 197259), BMP6(NCBI Gene ID : 654) 및 LAX1(NCBI Gene ID : 54900)]를 발견하였고, 각 코호트마다 AUC 순위를 계산하여 AUC 순위를 합산했을 때, SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6 및 LAX1 순으로 항-TNF 치료 반응성(무반응군) 예측 효과가 우수한 것을 확인하였다.

표 1

[0052]

번호	유전자	발굴 코호트				
		GSE73661		GSE14580		Rank sum_discovery
		AUC	AUC 순위	AUC	AUC 순위	
1	SLAMF7	0.84	2	0.90	2	4
2	CXCL6	0.79	7	0.91	1	8
3	CXCL1	0.82	5	0.84	6	11
4	MLKL	0.79	9	0.83	8	17
5	BMP6	0.76	15	0.84	5	20
6	LAX1	0.77	14	0.81	13	27

[0053] 또한, 상기 6개의 핵심 유전자를 원래 분석에 포함되지 않은 116명의 환자로 구성된 3개의 독립적인 코호트(GSE16879, GSE23597 및 GSE12251)를 사용하여 검증하였다. 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 검증 코호트에서도 상기 6개의 유전자의 AUC 값이 높게 나타나 항-TNF 치료 반응성(무반응군) 예측 효과가 우수한 것을 확인하였다.

표 2

[0054]

번호	유전자	검증 코호트		
		AUC		
		GSE16879	GSE23597	GES12251
1	SLAMF7	0.81	0.66	0.59
2	CXCL6	0.92	0.68	0.75
3	CXCL1	0.77	0.71	0.73
4	MLKL	0.74	0.67	0.77
5	BMP6	0.71	0.82	0.86
6	LAX1	0.76	0.61	0.64

[0055] 또한, 상기 6개의 핵심 유전자를 조합했을 때의 AUROC 값을 분석하였다. 유전자 조합은 가장 예측 효과가 우수한 SLAMF7를 중심으로 유전자를 하나씩 추가하여 AUROC 값을 비교하였다. 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 전반적으로 조합되는 유전자 개수가 증가할수록 항-TNF 치료 반응성(무반응군) 예측 효과가 우수한 것을 확인하였다.

표 3

[0056]

번호	유전자 조합	AUROC				
		코호트				
		GSE73661	GSE14580	GSE16879	GSE23597	GSE12251
1	A	0.84	0.90	0.81	0.66	0.59

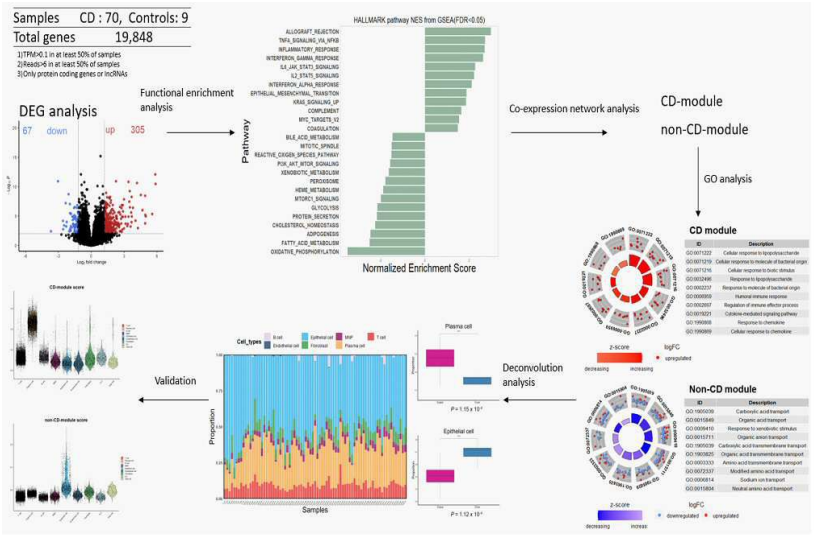
2	B	0.82	0.91	0.89	0.71	0.74
3	C	0.86	0.91	0.88	0.71	0.69
4	D	0.89	0.94	0.86	0.75	0.75
5	E	0.88	0.93	0.86	0.80	0.80
6	F	0.86	0.91	0.86	0.75	0.78

A : SLAMF7
B : SLAMF7 + CXCL6
C : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1
D : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL
E : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL + BMP6
F : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL + BMP6 + LAX1

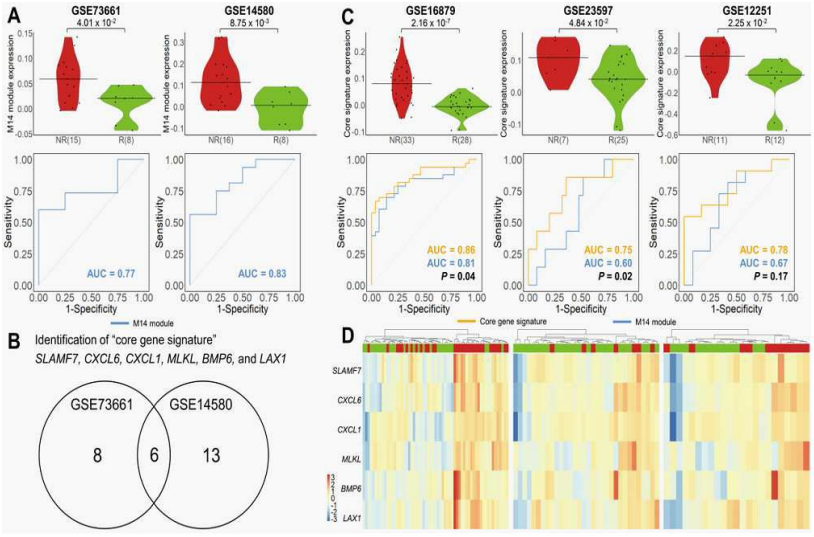
[0058] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

도면1



도면2


A
GSE73661
4.01 x 10-2
GSE14580
8.75 x 10-3
M14 module expression
NR(15)
R(8)
NR(16)
R(8)
Sensitivity
1-Specificity
AUC = 0.77
AUC = 0.83
M14 module
B
Identification of "core gene signature"
SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6, and LAX1
GSE73661
GSE14580
8
6
13
C
GSE16879
2.16 x 10-7
GSE23597
4.84 x 10-2
GSE12251
2.25 x 10-3
Core signature expression
NR(33)
R(28)
NR(7)
R(25)
NR(11)
R(12)
AUC = 0.86
AUC = 0.81
P = 0.04
AUC = 0.75
AUC = 0.60
P = 0.02
AUC = 0.78
AUC = 0.67
P = 0.17
Core gene signature
M14 module
D
SLAMF7
CXCL6
CXCL1
MLKL
BMP6
LAX1