



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0165746
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 10/02 (2006.01) A61B 10/00 (2006.01)
A61B 5/00 (2021.01) A61B 5/15 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61B 10/0233 (2013.01)
A61B 10/0045 (2019.05)
(21) 출원번호 10-2023-7022106
(22) 출원일자(국제) 2021년11월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/061033
(87) 국제공개번호 WO 2022/115714
국제공개일자 2022년06월02일
(30) 우선권주장
63/119,511 2020년11월30일 미국(US)

(71) 출원인
민데라 코포레이션
미국 92123 캘리포니아주 샌 디에고 커니 빌라 로드 5795
(72) 발명자
디커슨 토빈
미국 92123 캘리포니아주 샌 디에고 커니 빌라 로드 5795
태프트 브래드포드
미국 92123 캘리포니아주 샌 디에고 커니 빌라 로드 5795
리 병-인
미국 92123 캘리포니아주 샌 디에고 커니 빌라 로드 5795
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 129 항

(54) 발명의 명칭 마이크로니들 디바이스 및 방법, 및 피부 병태 어세이

(57) 요약

본 개시내용은 조직으로부터 바이오마커를 추출하는 마이크로니들 디바이스 및 키트를 제공한다. 본 개시내용은 자가면역 질환에 대한 치료제를 선택하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 치료제에 대한 환자의 반응을 전향적으로 예측하기 위한 핵산 분석 방법도 제공한다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61B 5/150022 (2013.01)

A61B 5/150984 (2013.01)

A61B 5/685 (2013.01)

A61B 2010/008 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a. (i) 제1 베이스 기판 표면 및 제2 베이스 기판 표면을 포함하는 마이크로니들 베이스 기판으로서, 상기 제1 베이스 기판 표면 및 상기 제2 베이스 기판 표면이 마이크로니들 베이스 기판의 반대쪽에 위치하는 것인 마이크로니들 베이스 기판, 및 (ii) 상기 제1 베이스 기판 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 포함하는 마이크로니들 영역; 및
- b. 마이크로니들 베이스 기판에 인접하고 마이크로니들 베이스 기판과 연결되거나 일체화되고 지지 기판 깊이를 포함하는 지지 기판으로서, 상기 지지 기판 깊이가 상기 제1 베이스 기판 표면과 상기 제2 베이스 기판 표면 사이의 최소 거리보다 더 큰 것인 지지 기판
- 을 포함하는 마이크로니들 디바이스.

청구항 2

- a. 제1 베이스 기판 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 가진 제1 베이스 기판 표면을 포함하는 마이크로니들 베이스 기판을 포함하는 마이크로니들 영역으로서, 마이크로니들 베이스 기판이 제1 베이스 기판 표면의 반대쪽에 제2 베이스 기판 표면을 또한 포함하고, 제2 베이스 기판 표면이 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부를 포함하는 것인 마이크로니들 영역; 및
- b. 마이크로니들 베이스 기판에 인접한 지지 기판으로서, 마이크로니들 베이스 기판과 연결되거나 일체화된 지지 기판
- 을 포함하는 마이크로니들 디바이스.

청구항 3

제1항에 있어서, 마이크로니들 베이스 기판의 제1 베이스 기판 표면과 제2 베이스 기판 표면 사이의 최소 거리가 지지 기판의 깊이보다 약 $1\ \mu\text{m}$ 내지 약 $500\ \mu\text{m}$ 더 작은 것인 디바이스.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 베이스 기판 표면과 제2 베이스 기판 표면 사이의 최소 거리가 $150\ \mu\text{m}$ 내지 약 $350\ \mu\text{m}$ 인 디바이스.

청구항 5

제1항에 있어서, (a) 제1 베이스 기판 표면과 제2 베이스 기판 표면 사이의 최소 거리와 (b) 지지 기판 깊이의 비가 적어도 1:5인 디바이스.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 마이크로니들 영역이 둘레를 포함하고 지지 기판이 둘레의 적어도 절반에 인접하는 것인 디바이스.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 지지 기판이 복수의 마이크로니들에 근접한 제1 지지 기판 표면, 및 복수의 마이크로니들의 원위에 있고 제1 지지 기판 표면의 반대쪽에 위치하는 제2 지지 기판 표면을 포함하고, 제2 베이스 기판 표면이 복수의 마이크로니들의 원위에 있는 제2 지지 기판 표면과 동일 평면이 아닌 것인 디바이스.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 베이스 기판 표면이 지지 기판의 표면과 동일 평면이 아닌 것인 디바이스.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들이 플라즈마 처리된 것인 디바이스.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 프로브가 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들에 커플링된 것인 디바이스.

청구항 11

제9항에 있어서, 복수의 프로브가 음전하를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들이 폴리올레핀 수지를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 13

제12항에 있어서, 폴리올레핀 수지가 Zeonor 1020R 또는 Zeonor 690R 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들이 비용해성인 디바이스.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들이 피라미드형인 디바이스.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들이 솔리드인 디바이스.

청구항 17

제15항에 있어서, 마이크로니들의 베이스와 마이크로니들 베이스 기관 사이의 각도가 약 60° 내지 약 90° 인 디바이스.

청구항 18

제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부가 기계식 어플리케이션의 폭보다 더 큰 폭을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 19

(a) 제2항의 디바이스; 및 (b) 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부 내에 피팅되는 기계식 어플리케이션을 포함하는 키트.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들 중 적어도 하나가 핵산 프로브에 커플링된 것인 디바이스.

청구항 21

제20항에 있어서, 핵산 프로브가 호모폴리머 서열을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 22

제21항에 있어서, 호모폴리머 서열이 타이민 또는 우라실을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 23

제20항에 있어서, 핵산 프로브가 DNA를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 24

제20항에 있어서, 핵산 프로브가 타이민을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 25

제20항에 있어서, 핵산 프로브가 타이미딘을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 26

제20항에 있어서, 핵산 프로브가 마이크로니들에 공유결합된 것인 디바이스.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 지지 기판이 기준 마커를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 마이크로니들 중 3개 이하의 마이크로니들이 길이가 600 μm 보다 더 작거나 길이가 1050 μm 보다 더 큰 것인 디바이스.

청구항 29

대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법으로서,

- a. 대상체의 피부를 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계;
- b. 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계; 및
- c. 대상체의 피부 내의 핵산이 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 마이크로니들 디바이스와 접촉하도록 허용하는 단계

를 포함하는, 대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 핵산을 추출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 핵산이 RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제27항 또는 제28항에 있어서, 핵산이 mRNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, mRNA를 cDNA로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 35

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 건선 또는 건선의 증상을 가진 것인 방법.

청구항 36

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 피부 병태 또는 피부 병태의 증상을 가진 것인 방법.

청구항 37

대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법으로서,

- a. 대상체의 피부를, 마이크로니들에 커플링된 복수의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계;
- b. 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계;
- c. 마이크로니들 디바이스가 10분 이하 동안 대상체의 피부를 침투하도록 허용하여, 상기 핵산 프로브에 하이브리드화된 리보핵산(RNA) 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 RNA 샘플이 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단 및 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단을 포함하고, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단에 대한 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단의 비가 1보다 더 큰 것인 단계; 및
- d. 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거하는 단계로서, 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거한 후 상기 마이크로니들 디바이스가 핵산 프로브에 하이브리드화된 RNA 샘플을 포함하는 것인 단계를 포함하는, 대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, RNA 샘플이 오염물질을 실질적으로 함유하지 않는 것인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 마이크로니들 디바이스가 약 5분 동안 대상체의 피부를 침투하도록 허용하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

피부의 자가면역 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서,

- a. 대상체로부터 피부 유래의 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계로서, 대상체는 RNA를 포함하는 샘플을 채취하기 전 7일 이내에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않은 것인 단계;
- b. 상기 RNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계;
- c. 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 기반으로, 피부의 자가면역 질환을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것을 80% 초과 양성 예측 값으로 예측하는 단계; 및
- d. (c)에서의 예측을 기반으로, 대상체를 자가면역 치료 약물로 치료하는 단계를 포함하는, 피부의 자가면역 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, PPV가 90%보다 더 큰 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 100명 초과 환자를 가진 코호트의 경우 PPV가 95%보다 더 큰 것인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 생물제제인 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 또는 TNF α 매개 치료제인

방법.

청구항 46

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 에타너셉트(etanercept), 인플릭시맙(infliximab), 아달리무맙(adalimumab), 세르톨리주맙(certolizumab), 우스테키누맙(ustekinumab), 세큐키누맙(secukinumab), 익세키주맙(ixekizumab), 브로달루맙(brodalumab), 구셀쿠맙(guselkumab), 틸드라키주맙(tildrakizumab) 및 리산키주맙(risankizumab)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물인 방법.

청구항 47

제40항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 적어도 5개의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제40항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 6으로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제40항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 12로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제40항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제40항에 있어서, 자가면역 장애가 건선인 방법.

청구항 52

제40항에 있어서, 대상체가 8 초과의 PASI를 가진 것인 방법.

청구항 53

제40항에 있어서, 대상체가 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진 것인 방법.

청구항 54

제40항에 있어서, RNA가 mRNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제40항에 있어서, RNA가 microRNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제40항에 있어서, 대상체로부터 피부 유래의 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계가 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계를 포함하고, 상기 마이크로니들 디바이스가 핵산 프로브에 접합된 마이크로니들을 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제40항에 있어서, RNA를 cDNA로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 58

제40항에 있어서, cDNA의 차세대 시퀀싱을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 59

제40항에 있어서, 훈련된 알고리즘을 cDNA의 차세대 시퀀싱에 의해 생성된 데이터에 적용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 60

제40항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않는 적어도 2개의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제40항에 있어서, 알고리즘이 IL-17 매개 치료제, TNF-알파 매개 치료제 및 IL-23 매개 치료제로 구성된 군으로부터 선택된 단일 유형의 약물을 투여받은 환자의 샘플을 사용하여 훈련된 것인 방법.

청구항 62

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 IL-17 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자가 IL-17 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 IL-23 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자가 IL-23 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제40항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 TNF- α 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자가 TNF- α 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- 대상체로부터 피부 유래의 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계로서, 대상체가 RNA를 포함하는 샘플을 채취하기 전 7일 이내에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않은 것인 단계;
- 상기 RNA를 cDNA로 전환시키는 단계;
- cDNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현을 결정하는 단계; 및
- 피부 병변을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 80% 초과인 양성 예측 값으로 예측하는 단계

를 포함하는, 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, PPV가 90%보다 더 큰 것인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 100명 초과인 환자를 가진 코호트의 경우 PPV가 95%보다 더 큰 것인 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 생물제제인 방법.

청구항 69

제65항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제65항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 또는 TNF α 매개 치료제인 방법.

청구항 71

제65항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 에타너셉트, 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙, 우스테키누맙, 세큐키누맙, 익세키주맙, 브로달루맙, 구셀쿠맙, 틸드라키주맙 및 리산키주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물인 방법.

청구항 72

제65항에 있어서, 자가면역 치료 약물이 세르톨리주맙, 우스테키누맙, 세큐키누맙, 익세키주맙, 브로달루맙, 구셀쿠맙, 틸드라키주맙 및 리산키주맙으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물인 방법.

청구항 73

제65항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 적어도 5개의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제65항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 6으로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제65항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 12로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제65항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제65항에 있어서, 자가면역 장애가 건선인 방법.

청구항 78

제65항에 있어서, 대상체가 8 초과의 PASI를 가진 것인 방법.

청구항 79

제65항에 있어서, 대상체가 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진 것인 방법.

청구항 80

제65항에 있어서, RNA가 mRNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제65항에 있어서, RNA가 microRNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제65항에 있어서, 대상체의 피부로부터 RNA를 추출하는 단계가 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계를 포함하고, 상기 마이크로니들 디바이스가 핵산 프로브에 접합된 마이크로니들을 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제65항에 있어서, cDNA의 차세대 시퀀싱을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 84

제65항에 있어서, 훈련된 알고리즘을 cDNA의 차세대 시퀀싱에 의해 생성된 데이터에 적용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 85

대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- a. 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계;
 - b. 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계;
 - c. 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드(read)를 생성하는 단계;
 - d. 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및
 - e. 자가면역 질환 치료 약물에 대한 반응을 예측하는 데 있어서 80% 초과와 양성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계
- 를 포함하는, 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 86

대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- a. 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계;
 - b. 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계;
 - c. 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계;
 - d. 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계;
 - e. 상기 정렬된 서열 리드를 사용하여 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준을 결정하는 단계; 및
 - f. 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 임의의 조합에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준에 적용하는 단계
- 를 포함하는, 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 대상체가 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 및 TNF α 매개 치료제에 반응하는 것인 방법.

청구항 88

제86항에 있어서, RNA를 cDNA로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제86항에 있어서, 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준이 표 6으로부터의 적어도 하나의 유전자의 발현에 상응하는 것인 방법.

청구항 90

제86항에 있어서, 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준이 표 12로부터의 적어도 하나의 유전자의 발현에 상응하는 것인 방법.

청구항 91

제86항에 있어서, 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준이 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자의 발현에 상응하는 것인 방법.

청구항 92

제86항에 있어서, 단계 (b)가

- i) RNA 바이오마커에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계;
- ii) 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를, 추천된 치료제에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및
- iii) 추천된 치료제에 대한 양성 반응을 예측하는 데 있어서 50% 초과 양성 예측 값을 포함하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 추천된 치료제에 양성으로 반응할 가능성을 가지는 것으로 대상체를 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 훈련된 알고리즘이 50% 초과 양성 예측 값을 가진 것인 방법.

청구항 94

제92항에 있어서, 추천된 치료제가 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 자가면역 질환 또는 병태가 건선인 방법.

청구항 96

제92항에 있어서, RNA 바이오마커가 표 6으로부터 적어도 하나의 유전자로부터 전사된 것인 방법.

청구항 97

제92항에 있어서, RNA 바이오마커가 표 12로부터 적어도 하나의 유전자로부터 전사된 것인 방법.

청구항 98

제92항에 있어서, RNA 바이오마커가 표 13으로부터 적어도 하나의 유전자로부터 전사된 것인 방법.

청구항 99

제92항에 있어서, 추천된 치료제가 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵, 리산키주맵 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제92항에 있어서, 하나 이상의 치료 약물이 자가면역 질환 또는 병태에 대한 자가면역 치료 약물을 포함하는 것인 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 자가면역 질환 또는 병태가 건선인 방법.

청구항 102

피부의 자가면역 장애를 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- a. 대상체의 피부로부터 mRNA를 추출하는 단계;
- b. 대상체의 피부로부터 mRNA를 시퀀싱하는 단계; 및
- c. 자가면역 장애를 가진 대상체가 에타너셉트, 아달리무맵, 인플릭시맵, 세르톨리주맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵에 반응할 것인지를 80% 초과 양성 예측 값으로 예측하는 단계

를 포함하는, 피부의 자가면역 장애를 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 103

대상체의 피부 병변이 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- a. 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 대상체의 피부를, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계;
- b. 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계;
- c. 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계;
- d. 상기 서열 리드를, 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및
- e. 피부 병변을 가진 대상체가 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계로서, 상기 정렬된 서열 리드가 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 단계

를 포함하는, 대상체의 피부 병변이 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 104

대상체의 피부 병변이 IL-17, IL-23 또는 TNF-알파 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서,

- a. 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 대상체의 피부를, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계;
- b. 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계;
- c. 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계;
- d. 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및
- e. 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, TNF-알파 매개 치료제 또는 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계로서, 상기 정렬된 서열 리드가 표 6, 12 또는 13으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 단계

를 포함하는, 대상체의 피부 병변이 IL-17, IL-23 또는 TNF-알파 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 대상체를 TNF-알파 매개 치료제로 치료하는 단계를 추가로 포함하고, 정렬된 서열 리드가 표 6으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 대상체를 IL-17 매개 치료제로 치료하는 단계를 추가로 포함하고, 정렬된 서열 리드가 표 12로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 방법.

청구항 107

제104항에 있어서, 대상체를 IL-23 매개 치료제로 치료하는 단계를 추가로 포함하고, 정렬된 서열 리드가 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 방법.

청구항 108

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7 및 PPIG로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 109

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7 및 PPIG로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 110

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PCDH7, PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 111

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 CNFN, CTSC, GBAP1 및 CRABP2로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자 또는 4개의 유전자인 방법.

청구항 112

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자 또는 4개의 유전자인 방법.

청구항 113

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PCDH7, PPIG, RAB31 및 C3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자 또는 4개의 유전자인 방법.

청구항 114

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 GBAP1, CRABP2, PCDH7 및 PPIG로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자 또는 4개의 유전자인 방법.

청구항 115

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 KRT6A, SPRR1A, CD36, IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 116

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 CD36, IL4R, S100A7A, SERPINB4, MX1 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 117

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 LCN2, IFI27, DEFB4A, IL36G, CD24 및 PI3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 118

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 119

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PI3, IFI27 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 120

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 IL4R, S100A7A 및 MX1로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 121

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 CD36, LCN2 및 SERPINB4로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 122

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 MTCO1P12, MTATP6P1, CLSTN1, PDPN, LDLRAD2 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 123

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 AL158847.1, DAD1, LDLRAD2, ZNF395, MGMT 및 AL136982.4로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 124

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 NREP, PPIF, PRIM1, AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 125

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PDPN, TXNRD1, GSTM3, GPSM1, GLRX 및 USP2로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자인 방법.

청구항 126

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 MTCO1P12, CLSTN1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 127

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 NREP, PPIF 및 PRIM1로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 128

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

청구항 129

제40항, 제65항, 제86항, 제92항 및 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 유전자가 PDPN, TXNRD1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터 선택된 3개의 유전자인 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] 상호참조

[0002] 본원은 2020년 11월 30일에 출원된 미국 가출원 제63/119,511호의 우선권 이익을 주장하고, 이의 내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0003] 배경기술

[0004] 세계 인구의 거의 4%가 80종 이상의 공지된 자가면역 질환들 중 하나에 의해 영향을 받는다. 미국에서만 2,400만 명이 자가면역 질환을 앓고 있다. 미국에서 자가면역 질환 치료의 비용은 연간 1000억 달러보다 더 많은 것으로 추정된다. 자가면역 질환은 단일 조직 또는 장기에 영향을 미칠 수 있거나 많은 조직 또는 장기에 동시에 영향을 미칠 수 있는 매우 다양한 상이한 질환 및 병태를 포괄할 수 있다. 일부 자가면역 질환은 특히 피부를 표적화한다. 임의의 특정 자가면역 질환의 병인은 종종 알려져 있지 않지만, 면역 조절의 불균형이 종종 관련되어 있다.

[0005] 예를 들어, 건선은 비정상적인 피부의 융기된 부위를 특징으로 하는 만성 자가면역 질환이다. 이것은 두꺼운 비늘 모양의 패치 또는 플라크가 피부에 형성될 수 있게 하는 만성 병태이다. 미국에서 800만 명 이상의 사람들이 건선을 갖고 있는 것으로 추정된다. 현재, 증상을 조절하는 데 이용될 수 있는 치료제는 있지만, 건선에 대한 치유법은 없다.

[0006] 때때로 마이크로니들 또는 미세핀으로서 지칭되는 비교적 작은 구조물의 어레이를 포함하는 마이크로니들 디바이스는 피부 및 다른 표면을 통한 치료제 및 다른 물질의 전달과 관련하여 사용될 수 있다. 자가면역 질환에 대한 치료제는 존재하지만, 환자 반응은 가변적이다. 자가면역 질환을 가진 대상체가 치료 약물에 반응할 확률을 측정하기 위한 새로운 전략이 필요하다.

[0007] 대상체의 자가면역 질환을 치료하기 위해, 의사는 특정 면역계 생화학적 경로를 억제하거나 차단하여 증상을 관리하는 것을 목표로 하는 치료제를 처방할 수 있다. 불행하게도, 자가면역 질환을 가진 대상체의 유전적 가변성으로 인해, 단일 치료제는 유사한 자가면역 질환을 가진 2명의 대상체를 위한 이상적인 후보가 아닐 수 있다. 대상체의 유전적 프로파일 사이의 이 가변성은 치료제 처방에 대한 시행착오 방법론으로 이어져, 종종 소정의 대상체를 치료하는 데 비효과적인 것으로 입증될 수 있는 치료제를 투여하는 데 몇 개월을 필요로 한다. 이 접근법은 보험 지불자에게 많은 비용이 들게 하고 대상체의 삶의 질에 상당한 영향을 미칠 수 있는 자가면역 질환을 관리하는 비효과적인 경로이다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용의 한 측면은 a) (i) 제1 베이스(base) 기관 표면 및 제2 베이스 기관 표면을 포함하는 마이크로니들 베이스 기관, 및 (ii) 상기 제1 베이스 기관 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 포함하는 마이크로니들 영역; 및 b) 마이크로니들 베이스 기관에 인접하고 마이크로니들 베이스 기관과 연결되거나 일체화되거나 지지 기관 깊이를 포함하는 지지 기관을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 제공하는 것으로, 이때 상기 제1 베이스 기관 표면 및 상기 제2 베이스 기관 표면은 마이크로니들 베이스 기관의 반대쪽에 위치하고, 상기 지지 기관 깊이는 제1 베이스 기관 표면과 제2 베이스 기관 표면 사이의 최소 거리보다 더 크다.

[0009] 본 개시내용의 또 다른 측면은 a) 제1 베이스 기관 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 가진 제1 베이스 기관 표면을 포함하고 제1 베이스 기관 표면의 반대쪽에 제2 베이스 기관 표면도 포함하는 마이크로니들 베이스 기관을 포함하는 마이크로니들 영역; 및 b) 마이크로니들 베이스 기관에 인접하고 마이크로니들 베이스 기관과 연결되거나 일체화된 지지 기관을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 제공하는 것으로, 이때 제2 베이스 기관 표면은 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부(recess)를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 제1 베이스 기관 표면과 제2 베이스 기관 표면 사이의 최소 거리는 지지 기관의 깊이보다 약 $1\ \mu\text{m}$ 내지 약 $500\ \mu\text{m}$ 더 작다. 일부 실시양태에서, 제1 베이스 기관 표면과 제2 베이스 기관 표면 사이의 최소 거리는 $150\ \mu\text{m}$ 내지 약 $350\ \mu\text{m}$ 이다. 일부 실시양태에서, (a) 제1 베이스 기관 표면과 제2 베이스 기관 표면 사이의 최소 거리와 (b) 지지 기관 깊이 사이의 비는 적어도 1:5이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 영역은 둘레(perimeter)를 포함하고 지지 기관은 둘레의 적어도 절반에 인접한다. 일부 실시양태에서, 지지 기관은 복수의 마이크로니들에 근접한 제1 지지 기관 표면(본원에서 종종 "지지 기관 표면의 전면"으로서 지칭됨), 및 복수의 마이크로니들의 원위에 있고 제1 지지 기관 표면의 반대쪽에 위치하는 제2

지지 기관 표면(본원에서 종종 "지지 기관 표면의 후면"으로서 지칭됨)을 포함하고, 제2 베이스 기관 표면은 복수의 마이크로니들의 원위에 있는 제2 지지 기관 표면과 동일 평면이 아니다. 일부 실시양태에서, 제1 베이스 기관 표면은 지지 기관의 표면과 동일 평면이 아니다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들은 플라즈마 처리된다. 일부 실시양태에서, 복수의 프로브는 복수의 마이크로니들 중 한 마이크로니들에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 복수의 프로브는 음전하를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들은 폴리올레핀 수지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리올레핀 수지는 Zeonor 1020R 또는 Zeonor 690R 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 비용해성이다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 피라미드형이다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 솔리드(solid)이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들의 베이스와 마이크로니들 베이스 기관 사이의 각도는 약 60° 내지 약 90° 이다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부는 기계식 어플리케이터(applicator)의 폭보다 더 큰 폭을 포함한다.

[0011] 본 개시내용의 또 다른 측면은 a) 제1 베이스 기관 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 가진 제1 베이스 기관 표면을 포함하고 제1 베이스 기관 표면의 반대쪽에 제2 베이스 기관 표면도 포함하는 마이크로니들 베이스 기관을 포함하는 마이크로니들 영역, 및 b) 마이크로니들 베이스 기관에 인접하고 마이크로니들 베이스 기관과 연결되거나 일체화된 지지 기관을 포함하는 마이크로니들 디바이스로서, 제2 베이스 기관 표면이 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부를 포함하는 것인 마이크로니들 디바이스; 및 c) 복수의 마이크로니들의 적어도 일부와 정렬된 오목부 내에 피팅되는 기계식 어플리케이터를 포함하는 키트를 제공한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들 중 적어도 하나는 핵산 프로브에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 핵산 프로브는 호모폴리머 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 호모폴리머 서열은 타이민 또는 우라실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 프로브는 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 프로브는 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 프로브는 타이미딘을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 프로브는 마이크로니들에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 지지 기관은 기준 마커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들 중 3개 이하의 마이크로니들은 길이가 600 μm 보다 더 작거나 1050 μm 보다 더 크다.

[0013] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법으로서, 대상체의 피부를 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스 중 어느 한 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계, 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계; 및 대상체의 피부 내의 핵산이 마이크로니들 디바이스와 접촉하도록 허용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 예를 들어, RNA, mRNA를 포함하는 핵산을 추출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 mRNA를 cDNA로 전환시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 건선 또는 건선의 증상을 가진다. 일부 실시양태에서, 대상체는 피부 병태 또는 피부 병태의 증상을 가진다.

[0014] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법으로서, a) 대상체의 피부를, 마이크로니들에 커플링된 복수의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계; b) 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계; c) 마이크로니들 디바이스가 10분 이하 동안 대상체의 피부를 침투하도록 허용하여, 상기 핵산 프로브에 하이브리드화된 리보핵산(RNA) 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 RNA 샘플이 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단 및 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단을 포함하고, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단에 대한 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단의 비가 1보다 더 큰 것인 단계; 및 d) 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거하는 단계로서, 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거한 후 상기 마이크로니들 디바이스가 핵산 프로브에 하이브리드화된 RNA 샘플을 포함하는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, RNA 샘플은 오염물질을 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 디바이스는 약 5분 동안 대상체의 피부를 침투하도록 허용된다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 디바이스는 60분 미만, 45분 미만, 40분 미만, 30분 미만, 15분 미만, 10분 미만, 5분 미만, 3분 미만, 2분 미만 또는 1분 미만 동안 대상체의 피부를 침투한다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 디바이스는 30초 초과, 45초 초과, 1분 초과, 5분 초과, 10분 초과 또는 30분 초과 동안 대상체의 피부를 침투한다.

[0015] 본 개시내용의 또 다른 측면은 피부의 자가면역 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, a) RNA를 포함하는 샘플을 채취하기 전 7일 이내에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않은 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계; b) RNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; c) 적어도

하나의 유전자의 발현 수준을 기반으로, 피부의 자가면역 질환을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 80% 초과 양성 예측 값으로 예측하는 단계; 및 d) c)에서의 예측을 기반으로, 대상체를 자가면역 치료 약물로 치료하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 일부 경우, PPV는 90%보다 더 크다. 일부 경우, 100명 초과 환자를 가진 코호트의 경우 PPV는 95%보다 더 크다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 생물제제이거나 항체를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 또는 TNF α 매개 치료제이다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 에타너셉트(etanercept), 인플릭시맵(infliximab), 아달리무맵(adalimumab), 세르톨리주맵(certolizumab), 우스테키누맵(ustekinumab), 세큐키누맵(secukinumab), 익세키주맵(ixekizumab), 브로달루맵(brodalumab), 구셀쿠맵(guselkumab), 틸드라키주맵(tildrakizumab) 및 리산키주맵(risankizumab)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자 또는 5개의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터의 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자, 6개의 유전자, 7개의 유전자, 8개의 유전자, 9개의 유전자 또는 10개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않는 적어도 2개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 장애는 건선이다. 일부 경우, 대상체는 8 초과 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진다. 일부 경우, RNA는 mRNA 또는 microRNA를 포함하고 cDNA로 전환된 후 차세대 시퀀싱을 이용함으로써 시퀀싱된다. 일부 경우, 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계를 포함하고, 이때 마이크로니들 디바이스는 핵산 프로브에 접합된 마이크로니들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 cDNA의 차세대 시퀀싱에 의해 생성된 데이터에 적용된다. 일부 실시양태에서, 알고리즘은 IL-17 매개 치료제, TNF- α 매개 치료제 및 IL-23 매개 치료제로 구성된 군으로부터 선택된 단일 유형의 약물을 투여받은 환자의 샘플을 사용함으로써 훈련되었다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 IL-17 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 IL-17 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 IL-23 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 IL-23 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 TNF- α 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 TNF- α 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다.

[0016] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, RNA를 포함하는 샘플을 채취하기 전 7일 이내에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않은 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계; RNA를 cDNA로 전환시키는 단계; cDNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현을 결정하는 단계; 및 피부 병변을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 80% 초과 양성 예측 값으로 예측하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 일부 경우, PPV는 90%보다 더 크다. 일부 경우, 100명 초과 환자를 가진 코호트의 경우 PPV는 95%보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 생물제제이거나 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 또는 TNF α 매개 치료제이다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물이다. 일부 실시양태에서, 자가면역 치료 약물은 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 약물이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자 또는 5개의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터의 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자, 6개의 유전자, 7개의 유전자, 8개의 유전자, 9개의 유전자 또는 10개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않는 적어도 2개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 질환은 건선이다. 일부 경우, 대상체는 8 초과 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진다. 일부 경우, RNA는 mRNA 또는 microRNA를 포함하고 cDNA로 전환된 후 차세대 시퀀싱을 이용함으로써 시퀀싱된다. 일부 경우, 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계를 포함하고, 이때 마이크로니들 디바이스는 핵산 프로브에 접합된 마이크로니들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 cDNA의 차세대 시퀀싱에 의해 생성된 데이터에 적용된다. 일부 실시양태에서, 알고리즘은 IL-17 매개 치료제, TNF- α 매개 치료제 및 IL-23 매개 치료제로 구성된 군으로부터 선택된 단일 유형의 약물을 투여받은 환자의 샘플을 사용함으로써 훈련되었다.

[0017] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로

서, 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계; 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드(read)를 생성하는 단계; 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 자가면역 질환 치료 약물에 대한 반응을 예측하는 데 있어서 80% 초과 양성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계; 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계; 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 상기 정렬된 서열 리드를 사용하여 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준을 결정하는 단계; 및 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 임의의 조합에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 상기 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준에 적용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 및 TNF α 매개 치료제에 반응할 것이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자 또는 5개의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터의 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자, 6개의 유전자, 7개의 유전자, 8개의 유전자, 9개의 유전자 또는 10개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않는 적어도 2개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 장애는 건선이다. 일부 경우, 대상체는 8 초과 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진다. 일부 경우, RNA는 mRNA 또는 microRNA를 포함하고 cDNA로 전환된 후 차세대 시퀀싱을 이용함으로써 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵, 리산키주맵 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 RNA 바이오마커에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계; 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를, 추천된 치료제에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 추천된 치료제에 대한 양성 반응을 예측하는 데 있어서 50% 초과 양성 예측 값을 포함하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 추천된 치료제에 양성으로 반응할 가능성을 가진 대상체를 분류하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 50% 초과 음성 예측 값을 가진다.

[0020] 본 개시내용의 또 다른 측면은 피부의 자가면역 장애를 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 대상체의 피부로부터 mRNA를 추출하는 단계; 대상체의 피부로부터 mRNA를 시퀀싱하는 단계; 및 자가면역 장애를 가진 대상체가 에타너셉트, 아달리무맵, 인플릭시맵, 세르톨리주맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵에 반응할 것인지를 80% 초과 양성 예측 값으로 예측하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 대상체의 피부를, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계; 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계; 상기 서열 리드를, 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 피부 병변을 가진 대상체가 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계로서, 상기 정렬된 서열 리드가 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 IL-17, IL-23 또는 TNF-알파 매개 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 대상체의 피부를, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계; 대상체의

피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계; 상기 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, TNF-알파 매개 치료제 또는 IL-23 매개 치료제에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용하는 단계로서, 상기 정렬된 서열 리드가 표 6, 12 또는 13으로부터의 적어도 하나의 유전자에 상응하는 것인 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 IL-17 매개 치료제로 치료되고, 이때 정렬된 서열 리드는 표 12로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자에 상응한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 TNF-알파 매개 치료제로 치료되고, 이때 정렬된 서열 리드는 표 6으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자에 상응한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 IL-23 매개 치료제로 치료되고, 이때 정렬된 서열 리드는 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자에 상응한다.

[0023] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7, PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7 및 PPIG로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PCDH7, PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0024] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1 및 CRABP2로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PCDH7, PPIG, RAB31 및 C3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 GBAP1, CRABP2, PCDH7, PPIG로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0025] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 SERPINB3, SERPINB4, S100A7A, PI3, KRT6A, LCN2, DEFB4A, DEFB4B, SPRR1A, IL36G, MX1, IFI27, CD36, CD24 및 IL4R로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 KRT6A, SPRR1A, CD36, IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CD36, IL4R, S100A7A, SERPINB4, MX1 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 LCN2, IFI27, DEFB4A, IL36G, CD24 및 PI3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0026] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PI3, IFI27 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 IL4R, S100A7A 및 MX1로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CD36, LCN2 및 SERPINB4로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0027] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 MTCO1P12, MTATP6P1, CLSTN1, PDPN, LDLRAD2 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 AL158847.1, DAD1, LDLRAD2, ZNF395, MGMT 및 AL136982.4로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 NREP, PPIF, PRIM1, AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PDPN, TXNRD1, GSTM3, GPSM1, GLRX 및 USP2로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0028] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 MTCO1P12, CLSTN1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의

유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 NREP, PPIF 및 PRIM1로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PDPN, TXNRD1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0029] 본원은 대상체의 자가면역 질환, 및 대상체가 상기 대상체의 자가면역 질환을 치료하기 위해 주어진 치료제에 양성으로 반응할 가능성을 특징규명하는 마이크로니들 디바이스, 방법 및 시스템도 제공한다.

[0030] 본 발명의 한 측면은 (i) 마이크로니들 베이스 기관의 전면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들, (ii) 상기 마이크로니들 베이스 기관의 후면, 및 (iii) 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 최소 거리를 포함하는 마이크로니들 영역; 및 상기 마이크로니들 베이스 기관의 적어도 한 측면에 인접하고 상기 마이크로니들 베이스 기관과 연결되거나 일체화되고 지지 기관 깊이를 포함하는 지지 기관을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 포함하고, 이때 상기 지지 기관 깊이는 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리보다 더 크다.

[0031] 본 개시내용의 또 다른 측면은 마이크로니들 영역의 적어도 일부 바로 뒤에서 오목부를 포함하는 후면도 포함하는 마이크로니들 베이스 기관의 전면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 포함하는 마이크로니들 영역; 및 상기 마이크로니들 베이스 기관의 적어도 한 측면에 인접하고 상기 마이크로니들 베이스 기관과 연결되거나 일체화된 지지 기관을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리는 상기 지지 기관의 상기 깊이보다 약 1 μm 내지 약 500 μm 더 작다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리는 150 μm 내지 약 350 μm 이다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리와 상기 지지 기관 깊이는 약 1:5 비를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리와 상기 지지 기관 깊이는 적어도 약 0.1:5 비, 적어도 약 0.5:5 비, 적어도 약 1:5 비, 적어도 약 2:5 비, 적어도 3:5 비, 적어도 4:5 비, 적어도 1:1 비, 적어도 1:2 비, 적어도 1:3 비, 적어도 1:4 비, 적어도 약 1:10 비, 적어도 약 1:15 비, 적어도 약 1:20 비, 적어도 약 1:25 비 또는 적어도 약 1:50 비를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리와 상기 지지 기관 깊이는 최대 약 0.1:5 비, 최대 약 0.5:5 비, 최대 약 1:5 비, 최대 약 2:5 비, 최대 3:5 비, 최대 4:5 비, 최대 1:1 비, 최대 1:2 비, 최대 1:3 비, 최대 약 1:4 비, 최대 약 1:10 비, 최대 약 1:15 비, 최대 약 1:20 비, 최대 약 1:25 비 또는 최대 약 1:50 비를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리와 상기 지지 기관 깊이는 적어도 약 2:1 비, 적어도 약 3:1 비, 적어도 약 3:2 비, 적어도 약 4:1 비, 적어도 5:1 비, 적어도 5:3 비, 적어도 6:1 비, 적어도 7:1 비, 적어도 10:1 비, 적어도 15:1 비, 적어도 약 20:1 비, 적어도 약 25:1 비 또는 적어도 약 50:1 비를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면과 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면 사이의 상기 최소 거리와 상기 지지 기관 깊이는 최대 약 2:1 비, 최대 약 3:1 비, 최대 약 3:2 비, 최대 약 4:1비, 최대 5:1 비, 최대 5:3 비, 최대 약 6:1 비, 최대 7:1 비, 최대 10:1 비, 최대 15:1 비, 최대 약 20:1 비, 최대 약 25:1 비 또는 최대 약 50:1 비를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 영역은 둘레를 포함하고 상기 지지 기관은 상기 둘레의 적어도 절반에 인접한다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 후면은 상기 지지 기관의 후면과 동일 평면이 아니다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 베이스 기관의 상기 전면은 상기 지지 기관의 표면과 동일 평면이 아니다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들은 플라즈마 처리된다. 일부 실시양태에서, 복수의 프로브는 상기 복수의 마이크로니들 중 한 마이크로니들에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 프로브는 음전하를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들은 폴리올레핀 수지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리올레핀 수지는 Zeonor 1020R 또는 Zeonor 690R 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 비용해성이다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 피라미드형이다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들 중의 마이크로니들은 솔리드이다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들의 베이스와 상기 마이크로니들 베이스 기관 사이의 각도는 약 60° 내지 약 90°이다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로니들 영역의 상기 적어도 일부 바로 뒤에 있는 상기 오목부는 기계식 어플리케이션의 폭보다 더 큰 폭을 포함한다.

- [0032] 본 개시내용의 또 다른 측면은 (a) 본원에 기재된 일부 측면의 상기 디바이스; 및 (b) 상기 마이크로니들 영역의 상기 적어도 일부 바로 뒤에 있는 상기 오목부 내에 피팅되는 기계식 어플리케이터를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들 중 적어도 하나는 핵산 프로브에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산 프로브는 호모폴리머 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 호모폴리머 서열은 타이민 또는 우라실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산 프로브는 상기 마이크로니들에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 상기 지지 기판은 기준 마커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 마이크로니들 중 3개 이하의 마이크로니들은 길이가 600 μm 보다 더 작거나 1050 μm 보다 더 크다.
- [0033] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체로부터 생물학적 샘플을 준비하는 방법으로서, 상기 대상체의 피부를, 마이크로니들에 커플링된 복수의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계; 상기 마이크로니들 디바이스가 상기 대상체의 상기 피부를 침투하도록 압력을 상기 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계; 상기 마이크로니들 디바이스가 10분 이하 동안 상기 대상체의 상기 피부를 침투하도록 허용하여, 상기 핵산 프로브에 하이브리드화된 리보핵산(RNA) 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 RNA 샘플이 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단 및 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단을 포함하고, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 RNA 단편의 상기 집단에 대한 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 상기 집단의 비가 1보다 더 큰 것인 단계; 및 상기 대상체의 상기 피부로부터 상기 마이크로니들 디바이스를 제거하는 단계로서, 상기 대상체의 상기 피부로부터 상기 마이크로니들 디바이스를 제거한 후 상기 마이크로니들 디바이스가 상기 핵산 프로브에 하이브리드화된 상기 RNA 샘플을 포함하는 것인 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA 샘플은 오염물질을 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 마이크로니들 디바이스가 약 5분 동안 상기 대상체의 상기 피부를 침투하도록 허용하는 단계를 포함한다.
- [0034] 본 개시내용의 또 다른 측면은 치료제 선택을 최적화하기 위해 한 클래스의 생물체제 약물에 대한 개별 환자의 반응을 그 클래스의 작용제의 작용 기작으로 예측하는 방법을 포함한다. 기계 학습 접근법을 이용함으로써, 기준시점 전사체 바이오마커(예를 들어, 특정 유전자)를 사용하여 IL-17, IL-23 또는 TNF 클래스의 생물체제에 대한 환자의 반응을 높은 양성 예측 값으로 예측하도록 분류기를 훈련한다. 예를 들어, 기계 학습 유래 분류기를 이용함으로써, 높은 수준의 양성 예측 값으로 건전 환자에서 항-IL-17 및 항-IL-23 생물체제에 대한 반응을 예측한다.
- [0035] 본 개시내용의 또 다른 측면은 기준시점 전사체를 초기 치료 후, 예를 들어, 12주 후 생물체제 약물에 대한 임상 반응과 비교함으로써, 건전 환자의 치료에 사용되는 생물체제(예를 들어, 항-IL-17, 항-IL-23)에 대한 반응을 예측하는 알고리즘을 포함한다.
- [0036] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계; 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계; 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드를 포함하는 RNA 분자를 정량하여 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; 및 자가면역 질환 치료 약물에 대한 반응을 예측하는 데 있어서 80% 초과와 양성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 상기 발현 수준에 적용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0037] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계; 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 RNA 분자를 수득하는 단계; 상기 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성하는 단계; 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드를 포함하는 RNA 분자를 정량하여 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; 및 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 임의의 조합에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준에 적용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제 및 TNF α 매개 치료제에 반응할 것이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자 또는 5개의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터의 적어도 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자, 6개의 유전자, 7개의 유전자, 8개의 유전자, 9개의 유전자 또는 10개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않는 적어도 2개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 장애

는 건전이다. 일부 경우, 대상체는 8 초과 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 자가면역 치료 약물로 대상체를 치료한 후 적어도 75의 PASI를 가진다. 일부 경우, RNA는 mRNA 또는 microRNA를 포함하고 cDNA로 전환된 후 차세대 시퀀싱을 이용함으로써 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵, 리산키주맵 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 RNA 바이오마커에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계; 추천된 치료제에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처를 가진 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 포함하는 RNA 분자를 정량함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 추천된 치료제에 대한 양성 반응을 예측하는 데 있어서 50% 초과 양성 예측 값을 포함하는 훈련된 알고리즘을 상기 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 추천된 치료제에 양성으로 반응할 가능성을 가진 대상체를 분류하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 50% 초과 음성 예측 값을 가진다.

[0039] **참고에 의한 포함**

[0040] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적 및 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0041] 본 발명의 신규 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 장점은 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참고함으로써 더 잘 이해될 것이다:

도 1은 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스의 단면을 예시한다.

도 2는 도 1의 단면의 상세도를 예시한다.

도 3은 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스의 정면도를 예시한다.

도 4는 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스의 마이크로니들을 예시한다.

도 5a 내지 5c는 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스로 채취한 상이한 RNA 샘플의 품질을 예시한다 - 이 품질은 샘플에 함유된 RNA 단편의 길이로 측정된다. 도 5a는 분해되지 않은 샘플을 예시한다. 도 5b 및 5c는 분해된 샘플을 예시한다.

도 6a는 본원의 일부 실시양태에 기재된 바와 같이, 경증 또는 중증 형태의 피부 병태를 가진 하나 이상의 대상체를 치료하는 방법에 대한 예시적인 순서도를 예시한다.

도 6b는 본원의 일부 실시양태에 기재된 바와 같이, 생물학적 샘플을 준비하고 하나 이상의 대상체에 대해 하나 이상의 치료 약물을 확인하는 방법에 대한 예시적인 순서도를 보여준다.

도 6c는 대상체의 질환 또는 병태와 연관될 수 있는 하나 이상의 경로의 활성화를 확인하기 위한 예시적인 순서도를 보여준다.

도 7은 연구 환자 샘플 등록 및 분석 순서도를 보여준다.

도 8a 내지 8c는 독립적인 검증 데이터셋으로부터 건전 환자의 예측된 반응과 환자 12주 PASI 변화 사이의 상관관계를 보여준다. 도 8a: IL-23i로 치료받은 43명의 환자; 도 8b: IL-17i로 치료받은 31명의 환자; 도 8c: TNF αi로 치료받은 11명의 환자. X 축: 예측된 반응자 또는 비반응자; Y 축: 12주 PASI 변화. 적색 점: 중간 PASI 변화 값.

도 9는 연구에 등록된 환자에서 예측된 반응 출현율을 보여준다.

도 10은 RNA-Seq 분석의 개요를 보여준다.

도 11은 민데라(Mindera) 데이터베이스에서 66명의 환자들로부터의 민데라 패치 대 펀치 생검을 사용함으로써 비교된 병변 대 비병변 샘플을 보여준다.

도 12는 항-IL-17 생물제제 치료제에 대한 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확인된 17개의 유전자에 대한 발현 데이터로부터 생성된 히트맵(heatmap)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

개요

샘플 채취 과정 동안 통증을 최소화할 수 있는 특징을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 포함하는, 정밀하고 환자 친화적인 샘플 채취를 달성하는 특징을 포함하는 마이크로니들 디바이스가 본원에 기재된다. 본원에 기재된 디바이스는 확장 가능한 과정에 의해 제작될 수 있도록 특별히 설계될 수 있다. 본원에 기재된 디바이스의 상이한 영역의 다양한 두께와 같은 특징은 균일하고 정밀한 마이크로니들 디바이스를 생성할 수 있다. 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스의 특정 특징은 현재 최신 기술에 기재되지 않은 더 날카로운 마이크로니들을 생성할 수도 있다. 이 날카로운 마이크로니들은 향상된 사용자 또는 환자(예를 들어, 대상체) 경험을 가져올 수 있고, 이때 사용자는 현재 최신 기술의 마이크로니들 디바이스에 비해 훨씬 더 적은 통증을 경험할 수 있다. 마이크로니들 디바이스의 정밀도와 향상된 사용자 경험을 조합하여 생물학적 샘플(예를 들어, 사용자의 피부)을 더 정밀하고 정확하게 분석할 수 있다.

일반적으로, 본원에서 제공된 마이크로니들 정치는 마이크로니들에 부착된 프로브를 함유할 수 있다. 일부 경우, 이 프로브는 추가 분석을 위한 바이오마커의 추출을 허용하는 방식으로 대상체의 샘플 또는 조직(예를 들어, 피부) 내의 하나 이상의 바이오마커에 결합하도록 구성된다. 추출된 바이오마커를 단독으로 또는 함께 분석하여(예를 들어, 유전자 시그니처 또는 유전자 발현 프로파일을 생성함), 대상체에 대한 약물 또는 다른 치료적 치료제에 대한 반응의 진단 또는 예측을 제공할 수 있다.

본원은 대상체로부터 유전자 발현 프로파일을 결정하는 방법 및 시스템도 제공한다. 일부 경우, 유전자 발현 프로파일은 자가면역 질환에 대한 적절한 치료 요법을 결정하는 데 유용하다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 대상체의 질환의 특정 특성을 기반으로 치료제를 대상체에 맞게 조정하는 맞춤형 의학에 유용하다.

일부 실시양태에서, 본 개시내용은 마이크로니들 디바이스를 제공한다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 정치는 마이크로니들 영역 및 지지 기판을 포함한다. 마이크로니들 영역은 마이크로니들 베이스 기판의 전면 또는 제1 표면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들(110), 마이크로니들 베이스 기판의 후면(또는 제2 베이스 기판 표면)(160), 및 마이크로니들 베이스 기판의 전면과 마이크로니들 베이스 기판의 후면 사이의 최소 거리(170)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기판의 전면과 마이크로니들 베이스 기판의 후면 사이의 최소 거리(170)는 디바이스를 제작하는 일부 방법 동안 용융된 매질(예를 들어, 본원에 기재된 폴리올레핀 수지)이 디바이스의 다른 구획의 금형을 채우기 전에 마이크로니들의 금형을 채우도록 디바이스를 구성한다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기판의 전면과 마이크로니들 베이스 기판의 후면 사이의 최소 거리(170)는 디바이스가 균일하고/하거나 날카로운 마이크로니들을 포함하도록 디바이스를 구성한다. 일부 실시양태에서, 균일하고/하거나 날카로운 마이크로니들은 디바이스를 사용하는 대상체에 대한 사용자 경험을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 향상된 사용자 경험은 디바이스를 사용하는 대상체가 경험하는 감소된 통증을 포함한다.

본 개시내용은 제자리에서 대상체로부터 바이오마커를 검출하고 획득하는 마이크로니들 디바이스를 제공한다. 마이크로니들 기반 디바이스는 피부 또는 점막과 같은 생물학적 장벽을 뚫을 수 있는 하나 이상의 마이크로니들을 함유할 수 있다. 종종, 마이크로니들은 비침습적이거나 최소 침습적이다. 복수의 마이크로니들이 존재할 때, 상기 디바이스는 마이크로니들을 지지하는 평면 기판도 가질 수 있다. 이 기판은 마이크로니들의 재료와 동일한 재료로 만들어질 수 있다. 이 기판은 상이한 재료로 만들 수도 있다.

마이크로니들 디바이스

본 개시내용의 마이크로니들 디바이스는 마이크로니들 영역을 포함하는 베이스 기판 및 지지 기판을 포함할 수 있다. 도 1은 마이크로니들 베이스 기판(120) 상에 마이크로니들(110)을 포함하는 예시적인 마이크로니들 디바이스(100)의 측면도를 예시한다. 마이크로니들 베이스 기판은 전면(본원에서 용어 "제1 베이스 기판 표면"과 상호교환 가능하게 사용됨)(140) 및 후면(본원에서 용어 "제2 베이스 기판 표면"과 상호교환 가능하게 사용됨)(160)을 포함하고, 이때 마이크로니들(110)은 전면(또는 제1 베이스 기판 표면)으로부터 돌출된다. 디바이스는 내부 마이크로니들 베이스 기판(120)의 적어도 하나의 측면에 인접한 지지 기판(130)을 포함할 수 있고, 이 지지 기판은 마이크로니들 베이스 기판과 연결되거나 일체화된다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기판의 후면(160)과 인접 지지 기판(130) 사이에 각도가 형성된다.

- [0050] 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 후면(160)과 인접 지지 기관(130) 사이에 형성된 각도는 직각 또는 둔각, 예를 들어, 약 90° 내지 약 179° 이다. 마이크로니들 베이스 기관의 후면(160)과 인접 지지 기관(130) 사이에 형성된 각도(θ)는 일반적으로 디바이스 내부의 공간 영역에 걸쳐 있는 각도를 지칭하는 반면; 인접 지지 기관은 일반적으로 기관에 걸쳐 있는 상보각(α)을 포함하고 이것은 종종 예각(예를 들어, 1° 와 90° 사이)이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 후면과 인접 지지 기관 사이에 형성된 각도(θ)는 약 110° 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기재의 후면과 인접 지지 기관 사이에 형성된 각도(θ)는 약 90° 내지 약 100° , 약 90° 내지 약 110° , 약 90° 내지 약 120° , 90° 내지 약 130° , 약 90° 내지 약 140° , 약 90° 내지 약 150° , 약 90° 내지 약 160° , 약 90° 내지 약 170° , 약 90° 내지 약 179° , 약 100° 약 110° , 약 100° 내지 약 120° , 약 100° 내지 약 130° , 약 100° 내지 약 140° , 약 100° 내지 약 150° , 약 100° 내지 약 160° , 약 100° 내지 약 170° , 약 100° 내지 약 179° , 약 110° 내지 약 120° , 약 110° 내지 약 130° , 약 110° 내지 약 140° , 약 110° 내지 약 150° , 약 110° 내지 약 160° , 약 110° 내지 약 170° , 약 110° 내지 약 179° , 약 120° 내지 약 130° , 약 120° 내지 약 140° , 약 120° 내지 약 150° , 약 120° 내지 약 160° , 약 120° 내지 약 170° , 약 120° 내지 약 179° , 약 130° 내지 약 140° , 약 130° 내지 약 150° , 약 130° 내지 약 160° , 약 130° 내지 약 170° , 약 130° 약 179° , 약 140° 내지 약 150° , 약 140° 내지 약 160° , 약 140° 내지 약 170° , 약 140° 내지 약 179° , 약 150° 내지 약 160° , 약 150° 내지 약 170° , 약 150° 내지 약 179° , 약 160° 내지 약 170° , 약 160° 내지 약 179° , 또는 약 170° 내지 약 179° 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 후면과 인접 지지 기관 사이에 형성된 각도는 약 90° , 약 100° , 약 110° , 약 120° , 약 130° , 약 140° , 약 150° , 약 160° 또는 약 170° 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 후면과 인접 지지 기관 사이에 형성된 각도는 최대 약 100° , 약 110° , 약 120° , 약 130° , 약 140° , 약 150° , 약 160° , 약 170° 또는 약 179° 이다.
- [0051] 지지 기관(130)의 최종 모양도 디바이스의 제작 동안 디바이스의 구조와 유사한 구획 금형 내로의 폴리머 및/또는 수지의 유동 속도 및 균일성에 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지 기관(130)의 최종 모양은 원형이다. 일부 실시양태에서, 지지 기관(130)의 최종 모양은 선형이다.
- [0052] 일부 실시양태에서, 마이크로니들의 배열은 마이크로니들 구획의 반경이 약 0.95 mm 내지 약 4.15 mm인 원형 패턴이다. 일부 실시양태에서, 상기 반경은 약 4.0 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 반경은 약 0.95 mm 내지 약 1.4 mm, 약 0.95 mm 내지 약 1.75 mm, 약 0.95 mm 내지 약 2.15 mm, 약 0.95 mm 내지 약 2.55 mm, 약 0.95 mm 내지 약 2.95 mm, 약 0.95 mm 내지 약 3.35 mm, 약 0.95 mm 내지 약 3.75 mm, 약 0.95 mm 내지 약 4.15 mm, 약 1.4 mm 내지 약 1.75 mm, 약 1.4 mm 내지 약 2.15 mm, 약 1.4 mm 내지 약 2.55 mm, 약 1.4 mm 내지 약 2.95 mm, 약 1.4 mm 내지 약 3.35 mm, 약 1.4 mm 내지 약 3.75 mm, 약 1.4 mm 내지 약 4.15 mm, 약 1.75 mm 내지 약 2.15 mm, 약 1.75 mm 내지 약 2.55 mm, 약 1.75 mm 내지 약 2.95 mm, 약 1.75 mm 내지 약 3.35 mm, 약 1.75 mm 내지 약 3.75 mm, 약 1.75 mm 내지 약 4.15 mm, 약 2.15 mm 내지 약 2.55 mm, 약 2.15 mm 내지 약 2.95 mm, 약 2.15 mm 내지 약 3.35 mm, 약 2.15 mm 내지 약 3.75 mm, 약 2.15 mm 내지 약 4.15 mm, 약 2.55 mm 내지 약 2.95 mm, 약 2.55 mm 내지 약 3.35 mm, 약 2.55 mm 내지 약 3.75 mm, 약 2.55 mm 내지 약 4.15 mm, 약 2.95 mm 내지 약 3.35 mm, 약 2.95 mm 내지 약 3.75 mm, 약 2.95 mm 내지 약 4.15 mm, 약 3.35 mm 내지 약 3.75 mm, 약 3.35 mm 내지 약 4.15 mm, 또는 약 3.75 mm 내지 약 4.15 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 반경은 약 0.95 mm, 약 1.4 mm, 약 1.75 mm, 약 2.15 mm, 약 2.55 mm, 약 2.95 mm, 약 3.35 mm, 약 3.75 mm 또는 약 4.15 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 반경은 적어도 약 0.95 mm, 약 1.4 mm, 약 1.75 mm, 약 2.15 mm, 약 2.55 mm, 약 2.95 mm, 약 3.35 mm 또는 약 3.75 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 반경은 최대 약 1.4 mm, 약 1.75 mm, 약 2.15 mm, 약 2.55 mm, 약 2.95 mm, 약 3.35 mm, 약 3.75 mm 또는 약 4.15 mm이다.
- [0053] 일부 경우, 마이크로니들의 배열은 총 가장자리 길이가 약 2.14 mm 내지 약 9.34 mm인 선형 정사각형 패턴이다. 일부 실시양태에서, 상기 거리는 약 4.0 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 거리는 약 2.14 mm 내지 약 3.04 mm, 약 2.14 mm 내지 약 3.94 mm, 약 2.14 mm 내지 약 4.84 mm, 약 2.14 mm 내지 약 5.74 mm, 약 2.14 mm 내지 약 6.64 mm, 약 2.14 mm 내지 약 7.54 mm, 약 2.14 mm 내지 약 8.44 mm, 약 2.14 mm 내지 약 9.34 mm, 약 3.04 mm 내지 약 3.94 mm, 약 3.04 mm 내지 약 4.84 mm, 약 3.04 mm 내지 약 5.74 mm, 약 3.04 mm 내지 약 6.64 mm, 약 3.04 mm 내지 약 7.54 mm, 약 3.04 mm 내지 약 8.44 mm, 약 3.04 mm 내지 약 9.34 mm, 약 3.94 mm 내지 약 4.84 mm, 약 3.94 mm 내지 약 5.74 mm, 약 3.94 mm 내지 약 6.64 mm, 약 3.94 mm 내지 약 7.54 mm, 약 3.94 mm

내지 약 8.44 mm, 약 3.94 mm 내지 약 9.34 mm, 약 4.84 mm 내지 약 5.74 mm, 약 4.84 mm 내지 약 6.64 mm, 약 4.84 mm 내지 약 7.54 mm, 약 4.84 mm 내지 약 8.44 mm, 약 4.84 mm 내지 약 9.34 mm, 약 5.74 mm 내지 약 6.64 mm, 약 5.74 mm 내지 약 7.54 mm, 약 5.74 mm 내지 약 8.44 mm, 약 5.74 mm 내지 약 9.34 mm, 약 6.64 mm 내지 약 7.54 mm, 약 6.64 mm 내지 약 8.44 mm, 약 6.64 mm 내지 약 9.34 mm, 약 7.54 mm 내지 약 8.44 mm, 약 7.54 mm 내지 약 9.34 mm, 또는 약 8.44 mm 내지 약 9.34 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 거리는 약 2.14 mm, 약 3.04 mm, 약 3.94 mm, 약 4.84 mm, 약 5.74 mm, 약 6.64 mm, 약 7.54 mm, 약 8.44 mm 또는 약 9.34 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 거리는 적어도 약 2.14 mm, 약 3.04 mm, 약 3.94 mm, 약 4.84 mm, 약 5.74 mm, 약 6.64 mm, 약 7.54 mm 또는 약 8.44 mm이다. 일부 실시양태에서, 상기 거리는 최대 약 3.04 mm, 약 3.94 mm, 약 4.84 mm, 약 5.74 mm, 약 6.64 mm, 약 7.54 mm, 약 8.44 mm 또는 약 9.34 mm이다.

[0054] 일부 실시양태에서, 마이크로니들이 돌출하고 관심 있는 조직에 적용되는 표면은 바닥면 또는 전면으로서 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들이 돌출하는 표면의 반대쪽 표면(160)은 후면 또는 상면으로서 지칭될 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관(120)은 마이크로니들의 존재에 의해 정의된다. 마이크로니들 베이스 기관(120)은 지지 기관(130)보다 더 얇고/얇거나 더 좁을 수 있고, 예를 들어, 마이크로니들 베이스 기관의 전면(140)과 마이크로니들 베이스 기관의 후면(160) 사이의 거리(D_{BS} 로서 지칭됨)(도 1에서 170)는 지지 기관(130)의 각각의 인접 표면 사이의 거리(D_{SS} 로서 지칭됨)(도 1에서 180)보다 더 작다. 마이크로니들 베이스 기관(120)과 지지 기관(130) 사이의 깊이의 차이는 디바이스에서 마이크로니들 베이스 기관(120)에 인접하여 위치하는 오목부를 생성할 수 있다. 이 구조적 특징은 좁은 마이크로니들 베이스 기관(120)을 갖기 때문에 특히 유리하고, 디바이스를 제작하는 데 사용되는 폴리머/수지가 제작 동안 디바이스의 구조와 유사한 금형 내로 유동하고/하거나 침투하는 것을 개선하고, 구체적으로 마이크로니들에 상응하는 금형의 구획 내로의 폴리머/수지의 유동 및/또는 침투는 마이크로니들 베이스 기관(120)과 지지 기관(130) 사이의 깊이 차이라는 이 구조적 특징으로 인해 증가되어, 더 균일하고 더 날카로운 마이크로니들을 생성한다. 더 날카로운 마이크로니들은 삽입될 때 조직 손상을 덜 야기할 수 있으므로, 대상체에게 더 적은 통증을 초래할 수 있다. 보다 더 균일한 마이크로니들은 보다 더 표준적이고 확장 가능한 제작 방법이라는 결과를 가져온다.

[0056] 일부 실시양태에서, 디바이스가 피부 또는 다른 조직에 적용될 때 더 좁은 마이크로니들 베이스 기관은 마이크로니들을 통해 압력을 집중시킬 수도 있다. 일부 경우, 마이크로니들 베이스 기관의 전면(140)과 마이크로니들 베이스 기관의 후면(150) 사이의 최소 거리는 지지 기관의 전면부터 지지 기관의 후면까지의 거리보다 약 1 μm 내지 약 500 μm 더 작다.

[0057] 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 깊이(D_{BS})와 지지 기관의 깊이(D_{SS}) 사이의 차이는 약 1 μm 내지 약 550 μm 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 깊이(D_{BS})와 지지 기관의 깊이(D_{SS}) 사이의 차이는 약 250 μm 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 깊이(D_{BS})와 지지 기관의 깊이(D_{SS}) 사이의 차이는 약 1 μm 내지 약 50 μm , 약 1 μm 내지 약 100 μm , 약 1 μm 내지 약 150 μm , 약 1 μm 내지 약 200 μm , 약 1 μm 내지 약 250 μm , 약 1 μm 내지 약 300 μm , 약 1 μm 내지 약 350 μm , 약 1 μm 내지 약 400 μm , 약 1 μm 내지 약 450 μm , 약 1 μm 내지 약 500 μm , 약 50 μm 내지 약 100 μm , 약 50 μm 내지 약 150 μm , 약 50 μm 내지 약 200 μm , 약 50 μm 내지 약 250 μm , 약 50 μm 내지 약 300 μm , 약 50 μm 내지 약 350 μm , 약 50 μm 내지 약 400 μm , 약 50 μm 내지 약 450 μm , 약 50 μm 내지 약 500 μm , 약 50 μm 내지 약 550 μm , 약 100 μm 내지 약 150 μm , 약 100 μm 내지 약 200 μm , 약 100 μm 내지 약 250 μm , 약 100 μm 내지 약 300 μm , 약 100 μm 내지 약 350 μm , 약 100 μm 내지 약 400 μm , 약 100 μm 내지 약 450 μm , 약 100 μm 내지 약 500 μm , 약 100 μm 내지 약 550 μm , 약 150 μm 내지 약 200 μm , 약 150 μm 내지 약 250 μm , 약 150 μm 내지 약 300 μm , 약 150 μm 내지 약 350 μm , 약 150 μm 내지 약 400 μm , 약 150 μm 내지 약 450 μm , 약 150 μm 내지 약 500 μm , 약 150 μm 내지 약 550 μm , 약 200 μm 내지 약 250 μm , 약 200 μm 내지 약 300 μm , 약 200 μm 내지 약 350 μm , 약 200 μm 내지 약 400 μm , 약 200 μm 내지 약 450 μm , 약 200 μm 내지 약 500 μm , 약 200 μm 내지 약 550 μm , 약 250 μm 내지 약 300 μm , 약 250 μm 내지 약 350 μm , 약 250 μm 내지 약 400 μm , 약 250 μm 내지 약 450 μm , 약 250 μm 내지 약 500 μm , 약 250 μm 내지 약 550 μm , 약 300 μm 내지 약 350 μm , 약 300 μm 내지 약 400 μm , 약 300 μm 내지 약 450 μm , 약 300 μm 내지 약 500 μm , 약 300 μm 내지 약 550 μm , 약 350 μm 내지 약 400 μm , 약 350 μm 내지 약 450 μm , 약 350 μm 내지 약 500 μm , 약 350 μm 내지 약 550 μm , 약 400 μm 내지 약 450 μm , 약 400 μm 내지 약 500 μm , 약 400 μm 내지 약 550 μm , 약 450 μm 내지 약 500 μm , 약 450 μm 내지 약 550 μm , 또는 약 500 μm 내지 약 550 μm 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관과 지지 기관 사

이의 깊이 차이는 약 1 μm , 약 50 μm , 약 100 μm , 약 150 μm , 약 200 μm , 약 250 μm , 약 300 μm , 약 350 μm , 약 400 μm , 약 450 μm , 약 500 μm 또는 약 550 μm 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관의 깊이(D_{BS})와 지지 기관의 깊이(D_{SS}) 사이의 차이는 적어도 약 1 μm , 약 50 μm , 약 100 μm , 약 150 μm , 약 200 μm , 약 250 μm , 약 300 μm , 약 350 μm , 약 400 μm , 약 450 μm 또는 약 500 μm 이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들 베이스 기관과 지지 기관 사이의 깊이 차이는 최대 약 50 μm , 약 100 μm , 약 150 μm , 약 200 μm , 약 250 μm , 약 300 μm , 약 350 μm , 약 400 μm , 약 450 μm , 약 500 μm 또는 약 550 μm 이다.

[0058] 일부 경우, 마이크로니들 베이스 기관의 전면과 마이크로니들 베이스 기관의 후면 사이의 최소 거리(D_{BS})는 150 μm 내지 약 350 μm 이다. 일부 경우, 내부 구획의 전면과 후면 사이의 거리 대 주변 구획의 전면과 후면 사이의 거리의 비는 약 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10 비이다.

[0059] 일부 경우, 마이크로니들 구획 또는 영역은 둘레를 포함하고 주변 영역 또는 지지 기관은 둘레의 적어도 절반에 인접한다. 일부 경우, 마이크로니들 베이스 기관의 후면은 지지 기관의 후면과 동일 평면이 아니다. 일부 경우, 마이크로니들 베이스 기관의 전면은 지지 기관의 표면과 동일 평면이 아니다.

[0060] 도 2는 도 1의 원형 영역의 상세도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 내부 구획은 마이크로니들 영역을 둘러싸는 융기부(200)도 가질 수 있다. 융기부는 마이크로니들이 돌출하는 표면으로부터 돌출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 융기부의 높이 H_R (도 2에서 210)은 약 250 μm 일 수 있다. 일부 실시양태에서, 융기부의 높이 H_R 은 약 50 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm , 250 μm , 254 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm 또는 450 μm 일 수 있다. 일부 경우, 내부 구획을 둘러싸는 융기부는 디바이스가 조직에 적용될 때 피부와 같은 조직의 표면 장력을 증가시킬 수 있거나 유지할 수 있다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 약 5° 내지 약 85° 이다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 약 45° 이다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 약 5° 내지 약 10°, 약 5° 내지 약 20°, 약 5° 내지 약 30°, 약 5° 내지 약 40°, 약 5° 내지 약 50°, 약 5° 내지 약 60°, 약 5° 내지 약 70°, 약 5° 내지 약 80°, 약 5° 내지 약 85°, 약 10° 내지 약 20°, 약 10° 내지 약 30°, 약 10° 내지 약 40°, 약 10° 내지 약 50°, 약 10° 내지 약 60°, 약 10° 내지 약 70°, 약 10° 내지 약 80°, 약 10° 내지 약 85°, 약 20° 내지 약 30°, 약 20° 내지 약 40°, 약 20° 내지 약 50°, 약 20° 내지 약 60°, 약 20° 내지 약 70°, 약 20° 내지 약 80°, 약 20° 내지 약 85°, 약 30° 내지 약 40°, 약 30° 내지 약 50°, 약 30° 내지 약 60°, 약 30° 내지 약 70°, 약 30° 내지 약 80°, 약 30° 내지 약 85°, 약 40° 내지 약 50°, 약 40° 내지 약 60°, 약 40° 내지 약 70°, 약 40° 내지 약 80°, 약 40° 내지 약 85°, 약 50° 내지 약 60°, 약 50° 내지 약 70°, 약 50° 내지 약 80°, 약 50° 내지 약 85°, 약 60° 내지 약 70°, 약 60° 내지 약 80°, 약 60° 내지 약 85°, 약 70° 내지 약 80°, 약 70° 내지 약 85°, 또는 약 80° 내지 약 85° 이다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 약 5°, 약 10°, 약 20°, 약 30°, 약 40°, 약 50°, 약 60°, 약 70°, 약 80° 또는 약 85° 이다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 적어도 약 5°, 약 10°, 약 20°, 약 30°, 약 40°, 약 50°, 약 60°, 약 70°, 또는 약 80° 이다. 일부 경우, 융기부와 바닥면 사이에 형성된 각도는 최대 약 10°, 약 20°, 약 30°, 약 40°, 약 50°, 약 60°, 약 70°, 약 80° 또는 약 85° 이다.

[0061] 일부 실시양태에서, 마이크로니들 구획은 지지 기관의 바닥면보다 더 낮은 바닥면을 가질 수도 있고, 예를 들어, 마이크로니들 구획의 바닥면은 지지 기관의 바닥면에 비해 디바이스로부터 더 멀리 돌출할 수 있다. 일부 경우, 바닥면은 마이크로니들의 베이스와 중첩될 수 있다. 일부 경우, 내부 구획의 바닥면은 약 250 μm 까지 돌출할 수 있다. 일부 경우, 내부 구획의 바닥면은 약 0 μm , 50 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm , 250 μm , 300 μm , 350 μm , 400 μm 또는 450 μm 까지 돌출할 수 있다. 일부 경우, 내부 구획의 돌출 바닥면은 디바이스가 조직에 적용될 때 피부와 같은 조직의 표면 장력을 증가시킬 수 있거나 유지할 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 지지 기관(130)은 마이크로니들 구획 및 마이크로니들과 동일한 재료로 형성될 수 있다. 지지 기관은 내부 구획보다 더 두꺼울 수 있다. 일부 경우, 주변 구획은 기준 마커를 포함한다. 도 3은 기준 마커(310)를 가진 마이크로니들 디바이스(100)의 정면도를 제공한다.

[0063] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 금형을 사용함으로써 제작될 수 있다. 일부 경우, 디바이스는 수지(예를 들어, 폴리올레핀 수지)를 디바이스용 금형 내로 옮김으로써 제작될 수 있다. 금형은 복수의 마이크로니들을 형성하기 위한 복수의 캐비티(cavity), 복수의 마이크로니들을 포함하는 내부 구획을 형성하기 위한 캐비티, 및 상기 내부 구획에 인접한 하나 이상의 주변 구획을 형성하기 위한 하나 이상의 캐비티를 포함할 수 있고, 이때 상기 내부 구획의 폭은 상기 주변 구획의 폭보다 더 작다. 일부 경우, 폴리올레핀 수지는 내부 구획을

생성하기 전에 복수의 마이크로니들을 생성할 수 있다. 일부 경우, 성형된 수지는 표면을 변형시키기 위해 플라즈마 처리될 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 사출 성형을 이용함으로써 제작될 수 있다. 일부 경우, 디바이스는 가열된(예를 들어, 용융된) 재료(예를 들어, 본원에 기재된 폴리올레핀 수지)를 디바이스의 금형 내로 사출함으로써 제작될 수 있다. 금형은 복수의 마이크로니들을 형성하기 위한 복수의 캐비티, 복수의 마이크로니들을 포함하는 내부 구획을 형성하기 위한 캐비티, 및 내부 구획에 인접한 하나 이상의 주변 구획을 형성하기 위한 하나 이상의 캐비티를 포함할 수 있고, 이때 내부 구획의 폭(예를 들어, 깊이 및/또는 두께)은 주변 구획의 폭보다 더 작다. 일부 경우, 가열된 재료는 내부 또는 마이크로니들 구획을 생성하기 전에 복수의 마이크로니들을 생성할 수 있다.

[0065] 일부 경우, 전체 디바이스를 플라즈마 처리할 수 있는 반면, 다른 경우 디바이스의 일부, 예를 들어, 마이크로니들을 플라즈마 처리한다. 일부 경우, 디바이스 또는 이의 일부를 플라즈마 처리하는 방법은 디바이스 또는 이의 일부를 제공하는 단계, 디바이스 또는 이의 일부를 플라즈마 진공 챔버에 배치하는 단계, 플라즈마 진공 챔버를 닫아 충분한 진공 밀봉을 생성하는 단계, 챔버에 존재하는 모든 기체를 배기하는 단계, 원하는 압력으로 플라즈마 처리 기체를 플라즈마 진공 챔버 내로 펌핑하는 단계, 원하는 전력에서 원하는 시간 동안 기체 플라즈마를 생성할 수 있게 하는 단계, 플라즈마 처리된 기체의 챔버를 배기하는 단계 및 디바이스 또는 이의 일부를 제거하는 단계를 포함한다.

[0066] 일부 경우, 전체 디바이스를 엑시머(excimer) 레이저 처리할 수 있는 반면, 다른 경우 디바이스의 일부, 예를 들어, 마이크로니들을 엑시머 레이저 처리할 수 있다. 일부 경우, 디바이스 또는 이의 일부를 엑시머 레이저 처리하는 방법은 디바이스 또는 이의 일부를 제공하는 단계, 디바이스 또는 이의 일부를 엑시머 레이저 처리 챔버에 배치하는 단계, 엑시머 레이저 처리 챔버를 닫는 단계, 챔버에 존재하는 모든 기체를 배기하는 단계, 적절한 엑시머 레이저 처리 기체를 엑시머 레이저 처리 챔버 내로 펌핑하여, 디바이스 또는 이의 일부에 의한 방사 레이저 에너지의 충분한 흡수를 제공하는 단계, 원하는 전력에서 원하는 시간 동안 엑시머 레이저의 방사 방출을 가능하게 하는 단계, 엑시머 레이저 처리 기체를 배기하는 단계 및 디바이스 또는 이의 일부를 제거하는 단계를 포함한다.

[0067] 일부 경우, 복수의 프로브 중 하나 이상의 프로브가 복수의 마이크로니들 중 하나 이상의 마이크로니들에 부착된다. 프로브는 공유부착될 수 있거나 비공유부착될 수 있다. 일부 경우, 프로브는 링커 또는 스페이서를 통해 부착된다. 일부 경우, 프로브는 마이크로니들의 표면에서 최대 패키징 밀도를 달성하도록 마이크로니들에 부착된다.

[0068] 프로브

[0069] 일부 실시양태에서, 마이크로니들은 조직으로부터의 바이오마커에 결합하고 이 바이오마커를 추출할 수 있는 프로브를 포함한다. 복수의 프로브가 본 개시내용의 마이크로니들에 부착될 수 있다. 일부 경우, 프로브는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA, RNA, cDNA, crRNA 등)를 포함한다. 종종, 폴리뉴클레오타이드 프로브는 특정 폴리뉴클레오타이드 바이오마커에 결합하거나 하이브리드화하도록 설계된다. 본 개시내용은 펩티드 또는 단백질 바이오마커를 검출하는 방법 및 디바이스도 제공한다. 이들 실시양태에서, 마이크로니들에 부착된 프로브는 관심 있는 표적 펩티드 또는 단백질을 특이적으로 인식하고 이에 결합할 수 있다. 프로브는 특정 펩타이드 또는 단백질 바이오마커에 결합할 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 이들은 예를 들어, 단백질(예를 들어, 항체, 항원 또는 이의 단편), 탄수화물 또는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 상보적 서열을 가짐으로써 바이오마커에 대한 서열 특이성을 가질 수 있다.

[0070] 일부 실시양태에서, 사용될 프로브는 종종 검출될 바이오마커 또는 바이오마커들에 의존한다. 따라서, 검출될 바이오마커의 성질 및 수에 따라, 마이크로니들에 고정된 프로브의 수는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상일 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들에 고정된 프로브의 총 수는 약 1개의 프로브 내지 약 1,000개의 프로브, 약 1개의 프로브 내지 약 10,000개의 프로브, 약 1개의 프로브 내지 약 100,000개의 프로브, 약 1개의 프로브 내지 약 1,000,000개의 프로브, 약 1개의 프로브 내지 약 10,000,000개의 프로브, 약 1개의 프로브 내지 약 100,000,000개의 프로브, 약 1,000개의 프로브 내지 약 100,000,000개의 프로브, 약 10,000개의 프로브 내지 약 100,000,000개의 프로브, 또는 약 10,000,000개의 프로브 내지 약 100,000 00,000개의 프로브일 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들 내의 프로브의 총 수는 적어도 약 10개, 약 20개, 약 50개, 약 100개, 약 500개, 약 1000개, 약 10000개, 약 100000개, 약 1,000,000개, 약 10,000,000개 또는 약 100,000,000개의 프로브이다. 일부 경우, 마이크로니들 내의 프로브의 총 수는 약 10개, 약 100개, 약 1000개,

약 10000개, 약 100000개, 약 1,000,000개, 약 10,000,000개 또는 약 100,000,000개 미만의 프로브이다.

- [0071] 일부 실시양태에서, 바이오마커에 대한 프로브는 본원에 더 기재된 바와 같이, 특히 저농도의 바이오마커의 검출을 위해 본 개시내용의 디바이스의 다수의 마이크로니들에 고정될 수 있다. 일부 경우, 단일 마이크로니들은 동일한 바이오마커에 결합할 수 있거나 동일한 바이오마커를 검출할 수 있는 다수의 상이한 프로브를 포함한다. 일부 경우, 단일 마이크로니들은 적어도 2개의 상이한 프로브, 적어도 3개의 상이한 프로브, 적어도 4개의 상이한 프로브, 적어도 6개의 상이한 프로브, 적어도 8개의 상이한 프로브, 적어도 10개의 상이한 프로브, 적어도 15개의 상이한 프로브, 적어도 20개의 상이한 프로브 또는 적어도 50개의 상이한 프로브를 포함한다. 일부 경우, 동일한 마이크로니들은 동일한 바이오마커에 대해 50개 이상의 상이한 유형의 프로브를 포함한다.
- [0072] 일부 경우, 동일한 마이크로니들은 복수의 상이한 프로브를 포함한다. 상이한 프로브는 동일한 바이오마커 또는 상이한 바이오마커에 대해 특이적일 수 있다. 마이크로니들은 적어도 2개의 상이한 프로브, 적어도 10개의 상이한 프로브, 적어도 100개의 상이한 프로브, 적어도 200개의 상이한 프로브, 적어도 500개의 상이한 프로브, 적어도 1,000개의 상이한 프로브, 적어도 5,000개의 상이한 프로브, 또는 적어도 10,000개의 상이한 프로브를 포함할 수 있다.
- [0073] 일부 경우, 복수의 프로브의 개별 프로브는 동일하다(예를 들어, 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 항체의 동일한 카피). 일부 실시양태에서, 마이크로니들은 동일한 프로브의 다수의 카피(예를 들어, 동일한 프로브의 2개, 5개, 10개, 50개, 100개, 1000개, 5000개, 7500개, 10000개 또는 50000개 초과 카피)와 회합될 수 있다. 예를 들어, 마이크로니들은 동일한 다형성 또는 바이오마커에 하이브리드화하도록 설계된 폴리뉴클레오타이드 프로브의 복수의 카피를 포함할 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들은 동일한 에피토프에 결합하도록 설계된 항체 프로브의 복수의 카피를 포함할 수 있다.
- [0074] 일부 경우, 프로브는 한 부류의 바이오마커, 예를 들어, mRNA에 결합할 수 있다. mRNA에 결합하는 프로브는 호모폴리머 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드, 또는 호모폴리머 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 경우, 프로브는 하나 이상의 타이민 잔기를 포함한다. 예를 들어, 일부 경우, 프로브는 적어도 1개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 100개 또는 적어도 200개의 타이민 잔기(예를 들어, 타이미딘 잔기)를 포함한다. 일부 경우, 프로브는 mRNA 분자의 폴리 A 꼬리에 결합한다. 일부 경우, 프로브는 호모폴리머 서열을 포함한다. 이 경우, 호모폴리머 서열은 상보적 호모폴리머 서열에 결합하도록 구성된다. 일부 경우, 프로브는 mRNA의 폴리 A 꼬리에 결합하는 타이민의 서열을 포함한다. 프로브는 연속 타이민의 서열의 임의의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 250개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 200개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 150개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 100개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 50개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연속 타이민의 서열은 약 50개 내지 250개의 연속 타이민을 포함한다. 일부 경우, 프로브는 다른 염기가 산재된 타이민을 포함할 수 있다.
- [0075] 일부 경우, 마이크로니들은 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함한다. 프로브는 동일한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 상이한 바이오마커(예를 들어, 핵산 분자, 단백질)를 검출하도록 설계될 수 있다. 일부 경우, 제1 프로브는 질환과 관련된 다형성(예를 들어, DNA 다형성, RNA 다형성)을 인식할 수 있고, 제2 프로브는 동일한 질환과 관련된 상이한 다형성을 인식할 수 있다. 예를 들어, 마이크로니들의 제1 핵산 프로브는 피부 병태인 사상충증과 관련된 RNA 바이오마커의 제1 다형성을 검출하도록 설계될 수 있다. 마이크로니들의 제2 핵산 프로브는 사상충증과 관련된 RNA 바이오마커의 제2 다형성을 검출하도록 설계될 수 있다. 다형성은 예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)일 수 있다. 유전적 변이 및 게놈 변이는 단일 SNP 또는 복수의 SNP를 포함할 수 있다. SNP는 단일 유전자좌 또는 많은 유전자좌에서 발생할 수 있다. 하나의 유전자좌에서 하나의 대립유전자에 대한 특정 SNP를 가진 개체는 예측 가능하게 다른 유전자좌에서 추가 SNP를 가질 수 있다. SNP의 상관관계는 개체를 질환 또는 병태에 취약하게 만드는 대립유전자 사이의 연관성을 제공할 수 있다. 일부 경우, 상이한 폴리뉴클레오타이드 프로브는 상이한 병태와 관련된 상이한 바이오마커를 검출하도록 설계된다. 예를 들어, 하나의 프로브는 질환의 바이오마커(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드)를 검출할 수 있는 반면, 다른 프로브는 하우스킥핑 유전자 또는 유전자 생성물(예를 들어, 폴리펩티드)을 검출할 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들은 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오타이드와 폴리펩티드의 혼합물에 부착된다. 일부 경우, 프로브는 음전하를 포함할 수 있다. 일부 경우, 복수의 프로브는 잔류 음전하를 포함할 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 디바이스의 마이크로니들은 마이크로니들에 대한 최대 팩킹 밀도로 프로브에 의해 팩킹된다. 최대 팩킹된 마이크로니들로부터 생성된 잔류 음전하는 팩킹된 프로브가 관심 없는 바이오마커에 비특이적으로 결합하는 것을 방지할

만큼 충분히 강할 수 있다.

[0076] 일부 경우, 마이크로니들은 복수의 상이한 단백질 또는 항체 프로브와 회합될 수도 있다. 예를 들어, 마이크로니들의 제1 항체 프로브는 예를 들어, 피부암과 관련된 항원의 제1 에피토프를 검출하도록 설계될 수 있다. 제2 항체 프로브는 항원과 관련된 제2 에피토프를 검출하도록 설계될 수 있다. 또는, 일부 경우, 제2 항체 프로브는 상이한 피부 병태 및/또는 상이한 항원과 관련된 에피토프를 검출할 수 있다.

[0077] 일부 경우, 본 개시내용은 마이크로니들 세트를 포함하는 마이크로니들 디바이스를 제공하는 것으로, 이때 상기 세트의 각각의 마이크로니들은 동일한 프로브 또는 프로브 세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동일한 프로브가 디바이스의 복수의 마이크로니들에 부착된다. 예를 들어, 동일한 프로브가 약 1%의 마이크로니들, 약 5%의 마이크로니들, 약 10%의 마이크로니들, 약 50%의 마이크로니들, 약 90%의 마이크로니들, 약 95%의 마이크로니들 또는 약 100%의 마이크로니들에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 프로브가 5% 이하의 마이크로니들, 10% 이하의 마이크로니들, 25% 이하의 마이크로니들, 50% 이하의 마이크로니들, 95% 이하의 마이크로니들 또는 99% 이하의 마이크로니들에 부착된다.

[0078] 일부 경우, 복수의 마이크로니들은 제1 프로브에 부착된 적어도 하나의 마이크로니들 및 제1 프로브와 상이한 제2 프로브에 부착된 적어도 하나의 마이크로니들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 제1 프로브는 질환 또는 장애의 바이오마커에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항체, 단백질)일 수 있고, 제2 프로브는 동일한 질환 또는 장애와 관련된 상이한 바이오마커에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 일부 경우, 제1 프로브는 질환 또는 장애의 바이오마커에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드(예를 들어, 항체, 단백질)일 수 있고 제2 프로브는 상이한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 상이한 바이오마커에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 경우, 상이한 질환, 병태 또는 장애는 동일한 장기와 관련된다. 예를 들어, 제1 프로브는 피부와 관련된 제1 질환, 장애 또는 병태와 관련될 수 있고; 제2 프로브는 피부 또는 눈과 관련된 제2 질환, 장애 또는 병태와 관련될 수 있다. 일부 경우, 디바이스는 마이크로니들 어레이를 포함할 수 있으며, 이때 각각의 마이크로니들은 동일한 장기와 관련된 상이한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 바이오마커를 검출하는 프로브를 포함한다. 마이크로니들 어레이는 상이한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 500개 또는 1000개 초과 마이크로니들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 상이한 질환, 장애 또는 병태는 상이한 장기(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개 또는 20개 초과 장기)와 관련되어 있다.

[0079] 일부 경우, 마이크로니들 디바이스는 복수의 마이크로니들 어레이를 포함하고; 종종, 복수의 마이크로니들 어레이는 다중화 반응에 적합하다. 일부 경우, 복수의 어레이는 2개 이상의 마이크로니들 어레이를 포함하고, 이때 어레이는 상이한 바이오마커를 검출하도록 설계된다. 일부 경우, 제1 마이크로니들 어레이는 질환, 장애 또는 병태와 관련된 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있고, 제2 마이크로니들 어레이는 동일한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 상이한 바이오마커를 검출하도록 설계된다. 일부 경우, 제1 마이크로니들 어레이는 질환, 장애 또는 병태와 관련된 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있고, 제2 마이크로니들 어레이는 상이한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 상이한 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있다. 일부 경우, 제1 마이크로니들 어레이는 질환, 장애 또는 병태와 관련된 복수의 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있고; 제2 마이크로니들 어레이는 상이한 질환, 장애 또는 병태와 관련된 복수의 바이오마커를 검출하도록 설계될 수 있다. 일부 경우, 제2 마이크로니들 어레이는 양성 대조군 또는 음성 대조군인 대조군 바이오마커(예를 들어, 하우스킥핑 유전자)를 검출하도록 설계될 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 프로브는 마이크로니들에 공유부착된다. 일부 실시양태에서, 프로브는 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 최대 팩킹 밀도로 마이크로니들에 부착된다. 최대 팩킹 밀도는 마이크로니들 표면의 화학 구조에 의해 결정될 수 있다. 일부 경우, 고밀도의 프로브는 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 고밀도의 폴리뉴클레오타이드 프로브는 잔류 음전하로 인해 비특이적 폴리뉴클레오타이드 결합을 방해할 것이다. 일부 경우, 마이크로니들은 고밀도의 프로브 부착을 용이하게 하도록 처리될 수 있다. 예를 들어, 마이크로니들은 플라즈마 처리될 수 있다. 플라즈마 처리는 표면을 변형시키기 위해 산소, 질소 또는 이산화탄소 플라즈마로 처리하는 것을 포함할 수 있다.

[0081] **마이크로니들**

[0082] 마이크로니들은 복수의 모양을 가질 수 있고, 예를 들어, 마이크로니들은 원형, 원추형, 삼각형, 정사각형, 직사각형, 오각형, 육각형, 칠각형, 팔각형, 피라미드형 또는 임의의 다른 적합한 모양을 가질 수 있다. 마이크로

니들은 날카로운 마이크로니들, 무딘 마이크로니들 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 복수의 날카로운 마이크로니들을 포함하는 본 개시내용의 디바이스는 대상체의 피부를 침투함으로써, 마이크로니들의 프로브(들)를 예를 들어, 바이오마커와 접촉시키는 데 사용될 수 있다. 날카로운 마이크로니들은 생물학적 샘플, 예컨대, 세포 층 또는 세포 외막의 조직을 파괴하는 데 사용될 수 있다. 무딘 마이크로니들은 대상체의 피부의 표면과 접촉함으로써, 마이크로니들을 예를 들어, 피부의 세포 표면 바이오마커와 접촉시키는 데 사용될 수 있다. 일부 경우, 본 개시내용은 상이한 모양을 가진 마이크로니들(예를 들어, 날카로운 마이크로니들 및 무딘 마이크로니들)을 포함하는 마이크로니들 디바이스를 제공한다. 일부 경우, 마이크로니들은 속이 비어 있기 보다는 오히려 단단할 수 있다.

[0083] 일부 경우, 본 개시내용은 모든 니들(바늘)이 동일한 모양을 가진 마이크로니들 디바이스를 제공한다. 일부 경우, 디바이스의 모든 마이크로니들은 5%, 4%, 3%, 2%, 1.5%, 1%, 0.75%, 0.5% 또는 0.25% 오차 내에서 동일한 모양과 치수를 가진다. 일부 경우, 복수의 마이크로니들 중 3개 이하의 마이크로니들은 높이 허용오차를 충족하지 못한다. 예를 들어, 원하는 마이크로니들 높이가 950 μm 인 경우, 높이 허용오차는 길이 600 μm 이상 내지 길이 1050 μm 이하일 수 있다.

[0084] 일부 실시양태서, 마이크로니들은 마이크로니들이 피부로부터 빠져나올 때 비특이적으로 결합된 물질이 니들로부터 제거될 수 있게 하는 모양을 가질 수 있다. 일부 경우, 비특이적으로 결합된 물질은 마이크로니들이 피부를 관통하여 당겨질 때 생성된 전단력을 통해 제거될 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 바늘 모양 마이크로니들은 끝이 뾰족한 물체일 수 있지만, 이 마이크로니들은 바람직하게는 끝이 날카로운 물체이다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들은 일반적으로 10 μm 내지 500 μm 의 범위, 바람직하게는 20 μm 내지 200 μm 의 범위 내의 베이스 직경을 가진 원형 원추 구조를 가진다. 도 4는 베이스 직경의 폭이 10 mm 미만인 복수의 마이크로니들을 가진 본 개시내용의 디바이스의 표면을 예시한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 마이크로니들은 복수의 상이한 직경 또는 베이스 폭을 포함할 수 있다. 마이크로니들의 베이스의 모양은 예를 들어, 원형, 직사각형, 삼각형, 정사각형, 오각형, 육각형, 칠각형 또는 다른 기하학적 모양일 수 있다. 본 개시내용의 마이크로니들은 500 μm 이하, 400 μm 이하, 300 μm 이하, 200 μm 이하, 100 μm 이하, 50 μm 이하, 40 μm 이하, 30 μm 이하, 20 μm 이하, 10 μm 이하, 1000 nm 이하, 900 nm 이하, 800 nm 이하, 700 nm 이하, 600 nm 이하, 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 200 nm 이하 또는 100 nm 이하인 직경 또는 베이스 폭을 가질 수 있다.

[0087] 일부 경우, 원형 원추 구조를 가진 마이크로니들은 원추의 베이스에 대한 원추의 가장자리의 각도가 70° 내지 약 90°, 71° 내지 89°, 72° 내지 88°, 73° 내지 86°, 73° 내지 84°, 73° 내지 80°, 74° 내지 78°, 74° 내지 76°, 또는 75.5° 내지 76° 일 수 있다. 일부 경우, 원형 원추 구조를 가진 마이크로니들은 원추의 베이스에 대한 원추의 가장자리의 각도가 약 73°, 73.25°, 73.5°, 73.75°, 74°, 74.25°, 74.5°, 74.75°, 75°, 75.25°, 75.5°, 75.75°, 76°, 76.25°, 76.5°, 76.75° 또는 77° 일 수 있다. 일부 경우, 원형 원추 구조를 가진 마이크로니들은 베이스에 대한 원추의 가장자리의 각도가 73°, 73.25°, 73.5°, 73.75°, 74°, 74.25°, 74.5°, 74.75°, 75°, 75.25°, 75.5°, 75.75°, 76°, 76.25°, 76.5°, 76.75° 또는 77° 미만일 수 있다.

[0088] 일부 실시양태에서, 어레이의 기판 및 마이크로니들은 다양한 생분해성 또는 비생분해성 재료로 제조될 수 있다. 마이크로니들 또는 기판을 위한 재료의 예는 폴리(메틸 메타크릴레이트), 규소, 이산화규소, 세라믹, 금속(예컨대, 스테인리스 스틸, 티타늄, 니켈, 몰리브덴, 크롬 및 코발트), 및 합성 또는 천연 수지 재료를 포함한다. 일부 실시양태는 생분해성 폴리머, 예컨대, 폴리젓산, 폴리글리콜라이드, 폴리젓산-코-폴리글리콜라이드, 폴루란, 카프로락톤, 폴리우레탄 또는 폴리무수물을 사용한다. 일부 다른 실시양태에서, 비분해성 재료, 예를 들어, 폴리머 폴리카르보네이트, 합성 또는 천연 수지 재료, 예컨대, 폴리메타크릴산, 에틸렌비닐아세테이트, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리설폰 또는 폴리옥시메틸렌이 마이크로니들 어레이를 제작하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 마이크로니들은 용해되지 않을 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들은 열가소성 폴리머로 제작된다.

[0089] 일부 실시양태에서, 어레이의 기판 및 마이크로니들은 다양한 열가소성 폴리머로 제조될 수 있다. 열가소성 폴리머의 비제한적 예는 아크릴 폴리머, 예컨대, 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA), 나일론, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 테플론을 포함한다. 일부 경우, 본 개시내용의 디바이스는 폴리카르보네이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌으로 구성된 군으로부터 선택된 열가소성 폴리머로 제작된다.

- [0090] 비분해성 폴리머의 비제한적 예는 예를 들어, 실리콘, 하이드로겔, 예컨대, 가교결합된 폴리(비닐 알코올) 및 폴리(하이드록시 에틸메타크릴레이트), 에틸렌-비닐 아세테이트, 아실 치환된 셀룰로스 아세테이트 및 이의 알킬 유도체, 부분적으로 가수분해된 알킬렌-비닐 아세테이트 및 완전히 가수분해된 알킬렌-비닐 아세테이트 코폴리머, 가소화되지 않은 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 아세테이트의 가교결합된 호모폴리머 및 코폴리머, 아크릴산 및/또는 메타크릴산의 가교결합된 폴리에스테르, 폴리비닐 알킬 에테르, 폴리비닐 플루오라이드, 폴리카르보네이트, 폴리우레탄, 폴리아미드, 폴리설폰, 스티렌 아크릴로니트릴 코폴리머, 가교결합된 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(알킬렌), 폴리(비닐 이미다졸), 폴리(에스테르), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리포스파젠 및 클로로설폰화된 폴리올레핀, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리머는 에틸렌 비닐 아세테이트를 포함한다.
- [0091] 생분해성 폴리머의 추가 비제한적 예는 폴리에스테르, 예컨대, 3-하이드록시프로피오네이트, 3-하이드록시부티레이트, 3-하이드록시발레레이트, 3-하이드록시카프로에이트, 3-하이드록시헵타노에이트, 3-하이드록시옥타노에이트, 3-하이드록시노나노에이트, 3-하이드록시데카노에이트, 3-하이드록시운데카노에이트, 3-하이드록시도데카노에이트, 4-하이드록시부티레이트, 5-하이드록시발레레이트, 폴리락티드, 또는 폴리(d-젯산), 폴리(1-젯산) 및 폴리(d,l-젯산)를 포함하는 폴리젯산, 폴리글리콜산 및 폴리글리콜라이드, 폴리(젯산-코-글리콜산), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드), 폴리(ϵ -카프로락톤) 및 폴리디옥사논을 포함한다. 전분, 글리코젠, 셀룰로스 및 키틴을 포함한 다당류도 생분해성 재료로서 사용될 수 있다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 어레이의 기판 및 마이크로니들은 폴리올레핀 수지로 제조될 수 있다. 폴리올레핀 수지의 예는 열가소성 폴리올레핀인 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리메틸펜텐(PMP) 및 폴리부텐-1(PB-1)을 포함한다. 폴리올레핀 수지의 추가 예는 폴리올레핀 엘라스토머(POE)인 폴리이소부틸렌(PIB), 에틸렌 프로필렌 고무(EPR) 및 에틸렌 프로필렌 디엔 단량체(M-클래스) 고무(EPDM 고무)를 포함한다. 일부 경우, 폴리올레핀 수지는 Zeonor 또는 Zeonex와 같은 사이클로 올레핀 폴리머일 수 있다. 일부 경우, Zeonor는 Zeonor 1020R, Zeonar 690R 또는 Zeonor 1060R이다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 사용된 마이크로니들은 전형적으로 20 μm 내지 1 mm의 범위, 바람직하게는 50 μm 내지 500 μm 의 범위 내에 있는 길이(높이)를 가진다. 니들의 높이는 약 400 μm 내지 약 1000 μm 일 수 있다.
- [0094] 본 개시내용의 마이크로니들 디바이스는 임의의 수의 마이크로니들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 적어도 1개의 마이크로니들, 적어도 100개의 마이크로니들, 적어도 200개의 마이크로니들, 적어도 300개의 마이크로니들, 적어도 400개의 마이크로니들, 적어도 500개의 마이크로니들, 적어도 1000개의 마이크로니들, 적어도 3000개의 마이크로니들 또는 적어도 5000개의 마이크로니들을 포함한다.
- [0095] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 최대 10000개의 마이크로니들, 최대 5000개의 마이크로니들, 최대 2500개의 마이크로니들, 최대 2000개의 마이크로니들, 최대 1000개의 마이크로니들, 최대 500개의 마이크로니들, 최대 400개의 마이크로니들, 최대 300개의 마이크로니들, 최대 100개의 마이크로니들, 최대 90개의 마이크로니들, 최대 50개의 마이크로니들, 최대 40개의 마이크로니들, 최대 30개의 마이크로니들, 최대 20개의 마이크로니들, 최대 15개의 마이크로니들, 최대 10개의 마이크로니들, 최대 9개의 마이크로니들, 최대 8개의 마이크로니들, 최대 7개의 마이크로니들, 최대 6개의 마이크로니들, 최대 5개의 마이크로니들, 최대 4개의 마이크로니들, 최대 3개의 마이크로니들, 최대 2개의 마이크로니들, 또는 1개의 마이크로니들을 포함한다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 약 1개의 마이크로니들 내지 약 100개의 마이크로니들, 약 1개의 마이크로니들 내지 약 200개의 마이크로니들, 약 1개의 마이크로니들 내지 약 1000개의 마이크로니들, 약 10개의 마이크로니들 내지 약 200개의 마이크로니들, 약 50개의 마이크로니들 내지 약 150개의 마이크로니들, 또는 약 1개의 마이크로니들 내지 약 5000개의 마이크로니들을 포함한다.
- [0097] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 100개의 마이크로니들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 90개 내지 110개의 마이크로니들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 80개 내지 120개의 마이크로니들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스는 50개 내지 150개의 마이크로니들을 포함한다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 복수의 마이크로니들을 포함하는 디바이스의 경우, 마이크로니들은 디바이스에 행으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 행은 행으로 정렬된 니들의 공간과 사실상 동일한 간격으로 이격될 수 있다. 일부 실시양태에서, 행은 불규칙한 간격으로 이격될 수 있다.

- [0099] 일부 실시양태에서, 디바이스 내의 마이크로니들의 밀도는 적어도 약 $10/\text{cm}^2$, 약 $15/\text{cm}^2$, 약 $20/\text{cm}^2$, 약 $25/\text{cm}^2$, 약 $30/\text{cm}^2$, 약 $35/\text{cm}^2$, 약 $40/\text{cm}^2$, 약 $45/\text{cm}^2$, 약 $50/\text{cm}^2$, 약 $55/\text{cm}^2$, 약 $60/\text{cm}^2$, 약 $65/\text{cm}^2$, 약 $70/\text{cm}^2$, 약 $75/\text{cm}^2$, 약 $80/\text{cm}^2$, 약 $85/\text{cm}^2$, 약 $90/\text{cm}^2$, 약 $95/\text{cm}^2$, 약 $100/\text{cm}^2$, 약 $110/\text{cm}^2$, 약 $120/\text{cm}^2$, 약 $130/\text{cm}^2$, 약 $140/\text{cm}^2$, 약 $150/\text{cm}^2$ 또는 약 $200/\text{cm}^2$ 일 수 있다. 일부 실시양태에서, 디바이스 내의 마이크로니들의 밀도는 약 $10/\text{cm}^2$, 약 $15/\text{cm}^2$, 약 $20/\text{cm}^2$, 약 $25/\text{cm}^2$, 약 $30/\text{cm}^2$, 약 $35/\text{cm}^2$, 약 $40/\text{cm}^2$, 약 $45/\text{cm}^2$, 약 $50/\text{cm}^2$, 약 $55/\text{cm}^2$, 약 $60/\text{cm}^2$, 약 $65/\text{cm}^2$, 약 $70/\text{cm}^2$, 약 $75/\text{cm}^2$, 약 $80/\text{cm}^2$, 약 $85/\text{cm}^2$, 약 $90/\text{cm}^2$, 약 $95/\text{cm}^2$, 약 $100/\text{cm}^2$, 약 $110/\text{cm}^2$, 약 $120/\text{cm}^2$, 약 $130/\text{cm}^2$, 약 $140/\text{cm}^2$, 약 $150/\text{cm}^2$ 또는 약 $200/\text{cm}^2$ 미만일 수 있다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 디바이스에서 2개의 마이크로니들의 중심 사이의 거리를 계산하여 디바이스 내의 마이크로니들의 밀도를 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 마이크로니들 사이의 중심-대-중심 거리는 $1000\ \mu\text{m}$ 미만, $900\ \mu\text{m}$ 미만, $800\ \mu\text{m}$ 미만, $700\ \mu\text{m}$ 미만, $600\ \mu\text{m}$ 미만, $500\ \mu\text{m}$ 미만, $400\ \mu\text{m}$ 미만, $300\ \mu\text{m}$ 미만, $200\ \mu\text{m}$ 미만 또는 $100\ \mu\text{m}$ 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 마이크로니들 사이의 중심-대-중심 거리는 $100\ \mu\text{m}$ 이하, $200\ \mu\text{m}$ 이하, $300\ \mu\text{m}$ 이하, $400\ \mu\text{m}$ 이하, $500\ \mu\text{m}$ 이하, $600\ \mu\text{m}$ 이하, $700\ \mu\text{m}$ 이하, $800\ \mu\text{m}$ 이하, $900\ \mu\text{m}$ 이하 또는 $1000\ \mu\text{m}$ 이하일 수 있다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 마이크로니들은 복수의 상이한 직경 또는 베이스 폭을 포함할 수 있다. 마이크로니들 베이스의 모양은 예를 들어, 원형, 직사각형, 삼각형, 정사각형, 오각형, 육각형, 칠각형 또는 다른 기하학적 모양일 수 있다. 본 개시내용의 마이크로니들은 $500\ \mu\text{m}$ 이하, $400\ \mu\text{m}$ 이하, $300\ \mu\text{m}$ 이하, $200\ \mu\text{m}$ 이하, $100\ \mu\text{m}$ 이하, $50\ \mu\text{m}$ 이하, $40\ \mu\text{m}$ 이하, $30\ \mu\text{m}$ 이하, $20\ \mu\text{m}$ 이하, $10\ \mu\text{m}$ 이하, $1000\ \text{nm}$ 이하, $900\ \text{nm}$ 이하, $800\ \text{nm}$ 이하, $700\ \text{nm}$ 이하, $600\ \text{nm}$ 이하, $500\ \text{nm}$ 이하, $400\ \text{nm}$ 이하, $300\ \text{nm}$ 이하, $200\ \text{nm}$ 이하 또는 $100\ \text{nm}$ 이하인 직경 또는 베이스 폭을 가질 수 있다.
- [0102] **키트**
- [0103] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 경우, 키트는 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스를 포함할 수 있고, 이때 상기 마이크로니들 디바이스는 마이크로니들 영역 뒤의 오목부 및 오목부 내에 피팅되는 어플리케이션터를 포함한다. 일부 경우, 어플리케이션터는 기계식 어플리케이션터이다. 일부 경우, 마이크로니들 디바이스는 마이크로니들 영역의 적어도 일부 바로 뒤에 있는 오목부를 포함하는 후면도 포함하는 마이크로니들 베이스 기판의 전면으로부터 돌출하는 복수의 마이크로니들을 포함하는 마이크로니들 영역; 및 상기 마이크로니들 베이스 기판의 적어도 하나의 측면에 인접하고 상기 마이크로니들 베이스 기판과 연결되거나 일체화된 지지 기판을 포함한다.
- [0104] **방법**
- [0105] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체의 피부와 같은 조직으로부터 생물학적 샘플을 수득하는 방법을 제공한다. 대상체는 임의의 연령의 대상체일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 노인, 성인, 청소년, 미성년자, 아동, 유아 또는 영아일 수 있다. 대상체는 포유동물, 조류, 어류, 파충류 또는 양서류일 수 있다. 대상체의 비제한적 예는 인간, 영장류, 개, 고양이, 말, 돼지 및 마우스를 포함한다. 대상체는 환자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0106] 일부 경우, 상기 방법은 본 개시내용의 디바이스를 대상체의 조직과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 대상체는 예를 들어, 디바이스를 그의 피부에 적용함으로써 디바이스를 그의 조직과 접촉시킬 수 있다. 일부 경우, 다른 누군가가 디바이스를 대상체의 조직에 적용할 수 있다. 일부 경우, 조직은 피부일 수 있으며, 피부는 디바이스의 적용 전에 세정될 수 있다.
- [0107] 일부 경우, 상기 방법은 본 개시내용의 디바이스를 대상체의 피부와 같은 조직과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 조직은 제자리 조직이다. 일부 경우, 조직은 생검이다. 일부 경우, 조직은 피부 조직이다. 압력을 디바이스에 인가함으로써, 마이크로니들이 조직을 침투하게 한다. 일부 경우, 압력은 손, 예컨대, 엄지손가락 압력에 의해 인가된다. 다른 경우, 압력은 어플리케이션터에 의해 인가될 수 있다. 압력은 약 $1\ \text{N/mm}^2$, $5\ \text{N/mm}^2$, $10\ \text{N/mm}^2$, $50\ \text{N/mm}^2$, $100\ \text{N/mm}^2$, $200\ \text{N/mm}^2$ 또는 $200\ \text{N/mm}^2$ 미만일 수 있거나 약 $1\ \text{N/mm}^2$ 내지 약 $200\ \text{N/mm}^2$ 의 범위 내에 있을 수 있다. 어플리케이션터는 수동 어플리케이션터, 또는 균일한 압력을 제공하는 기계식 또는 전자식 어플리케이션터일 수 있다. 일부 경우, 어플리케이션터의 한 단부는 마이크로니들 구획 뒤에 있는 오목부의 폭보다 더 작은 폭을 가진다. 마이크로니들의 원위에 있는 디바이스 표면은 후면으로서 지칭될 수 있다. 압력은 전체

후면에 인가될 수 있거나, 디바이스(120)의 내부 구획의 후면에 집중될 수 있다.

[0108]

일부 실시양태에서, 마이크로니들 디바이스는 최대 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 12분, 14분, 16분, 18분, 20분, 22분, 24분, 26분, 28분 또는 30분 동안 조직에서 유지될 수 있다. 조직 내부에서의 마이크로니들의 체류 시간은 프로브가 조직 내의 바이오마커, 예를 들어, 핵산 분자와 접촉하고 결합할 수 있게 한다. 일부 경우, 조직 내부에서의 마이크로니들의 체류 시간은 특정 조직, 바이오마커 또는 프로브에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들어, RNA 바이오마커와 같은 바이오마커는 소정의 시간 후에 분해되기 시작할 수 있으므로, 결합을 허용할 만큼 충분히 길지만 분해를 최소화할 정도로 충분히 짧은 체류 시간이 바람직할 것이다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 1분 내지 약 10분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 5분 미만의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 10분 이하의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 2분 내지 약 9분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 3분 내지 약 8분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 4분 내지 약 7분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분 내지 약 6분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분 내지 약 7분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분 내지 약 8분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분 내지 약 9분의 체류 시간이 바람직할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 약 5분 내지 약 10분의 체류 시간이 바람직할 수 있다.

[0109]

일부 경우, 조직 내부에서의 마이크로니들의 최적 체류 시간은 표적 바이오마커의 검출을 위한 주기 역치(Ct)에 의해 결정된다. 일부 경우, RNA 바이오마커의 경우, Ct는 약 5분에서 가장 낮다. 일부 경우, RNA 바이오마커의 경우, 10분의 체류 시간 후에 채취된 샘플의 Ct는 5분의 체류 시간 후에 채취된 샘플의 Ct보다 더 높다. 일부 경우, 최소 Ct로부터의 Ct 증가는 샘플의 분해가 발생할 수 있음을 표시한다.

[0110]

일부 경우, 최적 체류 시간은 고품질 바이오마커 샘플을 생성한다. 일부 경우, RNA 바이오마커의 경우, RNA 샘플의 품질은 RNA 샘플에 포함된 큰 RNA 단편(예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편) 대 RNA 샘플에 포함된 작은 RNA 단편(예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편)의 비에 의해 결정된다. 일부 경우, 10분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 9분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 8분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 7분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 6분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 5분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 4분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예

를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 3분 이하의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다. 일부 경우, 약 5분의 체류 시간은 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편의 집단, 및 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단을 포함하는 RNA 샘플을 생성하고, 이때 큰 RNA 단편, 예를 들어, 약 700개 이상의 염기를 포함하는 RNA 단편과 작은 RNA 단편, 예를 들어, 약 150개의 염기 내지 약 200개의 염기를 포함하는 단편의 집단 비는 1보다 더 크다.

[0111] 일부 실시양태에서, 프로브가 바이오마커와 접촉하고 결합하는 시간을 허용한 후, 디바이스를 조직으로부터 제거한다. 조직으로부터의 마이크로니들의 제거는 마이크로니들로부터 비특이적으로 결합된 오염물질을 제거하는 전단 압력을 생성할 수 있다. 일부 경우, 오염물질은 추가 계층 분석을 위한 것이 아닌 임의의 화합물을 포함한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 일단 디바이스가 피부로부터 제거되면, 추출된 RNA 바이오마커를 저장 완충제, 수송 완충제 또는 분석 완충제에 넣을 수 있다. 디바이스 및 추출된 RNA 바이오마커를 -80℃, -20℃, -4℃, 4℃ 또는 실온에서 저장할 수 있다. 대안적으로, 추출된 RNA 바이오마커를 디바이스로부터 해리하기 위해 디바이스를 완충제에 넣을 수 있고, 추출된 RNA 바이오마커를 -80℃, -20℃, -4℃, 4℃ 또는 실온에서 저장할 수 있다. 추출된 RNA 바이오마커(디바이스 유무에 관계없음)는 추가 분석을 위해 실험실로 보내질 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 계층 또는 전사체 분석을 위한 샘플을 준비하는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 개시내용의 디바이스를 대상체의 피부와 접촉시키는 단계, 피부로부터 핵산 바이오마커를 디바이스로 추출하는 단계, 및 디바이스로부터 핵산 바이오마커를 세척하여 샘플 용액을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 샘플 용액의 핵산은 중합효소 연쇄 반응에 의해 분석될 수 있다. 일부 경우, 샘플 용액의 추출된 핵산은 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 증폭되고 분석될 수 있다. 추출된 mRNA의 NGS는 대상체의 접촉된 피부에서의 유전자 발현을 확인할 수 있게 한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 피부 병변을 앓고 있는 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 생물학적 샘플을 준비하고 대상체를 위한 하나 이상의 자가면역 질환 치료 약물을 확인하는 방법으로서, 대상체의 피부를, 솔리드 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계, 및 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 대상체로부터 추출된 리보핵산(RNA) 분자는 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써 수득될 수 있다. 추출된 RNA 분자에 대한 고처리율 시퀀싱의 수행은 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬될 수 있는, 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득할 수 있고; 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 자가면역 질환 치료 약물에 대한 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과 양성 반응 확률을 가진 대상체를 분류하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우, 훈련된 알고리즘은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과 양성 예측 값 또는 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과 음성 예측 값을 가진다. 상기 자가면역 질환 치료 약물은 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 방법은 전술된 바와 같이 mRNA를 추출하고 시퀀싱하는 단계, 및 훈련된 알고리즘을 사용하여 병변의 유전자 시그니처를 공지된 유전자 발현 시그니처와 비교하거나, 훈련된 알고리즘을 사용하여 병변의 유전자 시그니처를 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 훈련된 알고리즘은 자가면역 질환 치료 약물에 대한 50% 초과 양성 반응 확률을 예측하기 위해 50% 초과 양성 예측 값 또는 50% 초과 음성 예측 값을 가질 수 있다. 유전자 발현 시그니처의 비교는 접촉된 피부 병변을 치료제에 반응할 가능성이 높은 병변으로서 분류할 수 있게 하고, 이때 치료제는 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 조합이다. 자가면역 질환 치료제의 예는 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵을 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 자가면역 질환을 가진 대상체가 자가면역 질환에 대한 치료 약물에 반응할 확률을 결정하는 방법으로서, 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 생물학적 샘플로부터 하나 이상의 핵산 분자를 추출하는 단계; 상기 핵산 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서

열 리드를 생성하는 단계; 및 상기 서열 리드에 대해 게놈 분석을 수행하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 게놈 분석은 서열 리드에 의해 코딩된 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; 이 발현 수준을 자가면역 질환에 대한 치료제에 특이적인 공지된 양성 반응 유전자 시그니처와 비교하는 단계; 및 비교로부터 치료 점수를 생성하는 단계를 포함할 수 있고, 이때 치료 점수는 환자에서 치료제에 대한 반응에 특이적이다.

[0116] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체의 피부 병변을 치료하는 방법으로서, 피부 병변을 본원에 기재된 디바이스와 접촉시키는 단계, 피부 병변으로부터 mRNA를 추출하는 단계, NGS를 이용하여 유전자 발현 시그니처를 확인하는 단계, 이 시그니처를 공지된 시그니처와 비교하거나 훈련된 알고리즘을 사용하여 대상체를 위한 치료제를 선택하는 단계, 및 선택된 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 경우, 치료제를 선택하는 단계는 자가면역 질환에 대한 치료제에 특이적인 공지된 양성 반응 유전자 시그니처의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함한다.

[0117] 본 개시내용은 질환 진단 또는 안내된 임상 중재를 위한 대상체 특이적 데이터셋을 제공하는 비침습적 및/또는 최소 침습적 디바이스, 방법 및 시스템을 제공한다. 마이크로니들 디바이스 및 이를 사용하는 방법과 시스템도 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 방법은 하나 이상의 대상체에 대한 유전자 발현 프로파일의 확인, 질환 또는 병태의 정밀한 분류, 질환 또는 병태에 대한 전향적 안내 요법 및/또는 임상 중재, 과거 치료의 후향적 분석 및 모델링, 질환 또는 병태에 대한 활성화된 경로의 확인 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스는 특히 전술된 방법에서 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 다운스트림 분석에 사용될 수 있는 정밀한 최소 침습적 및/또는 비침습적 샘플 채취를 제공할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 대상체의 질환의 특성(예를 들어, 질환을 앓고 있는 대상체의 유전자 발현 프로파일)을 기반으로 치료제를 대상체에 맞게 조정하는 맞춤형 의학을 실시하는 수단을 제공하는 데 유용하다.

[0118] 일반적으로, 마이크로니들 디바이스는 추가 분석을 위해 제자리에서 대상체의 생물학적 샘플을 채취하는 것을 용이하게 할 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들 디바이스는 대상체의 피부 또는 점막을 천공하도록 구성된 하나 이상의 마이크로니들 특징을 포함할 수 있다. 일부 경우, 점막은 구강 점막, 눈 점막 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 복수의 마이크로니들이 존재하는 경우, 디바이스는 마이크로니들을 지지하는 평면 기판을 포함할 수 있다. 기판은 마이크로니들의 재료와 동일한 재료로 만들어질 수 있다. 기판은 상이한 재료로 만들어질 수도 있다. 일부 경우, 마이크로니들은 마이크로니들에 부착된 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 이 프로브는 추가 분석을 위해 바이오마커의 추출을 허용하는 방식으로 대상체의 샘플 또는 조직(예를 들어, 피부) 내의 하나 이상의 바이오마커에 결합하도록 구성될 수 있다. 추출된 바이오마커는 대상체에 대한 약물 또는 다른 치료적 치료제에 대한 반응의 진단 또는 예측을 제공하기 위해 단독으로 또는 함께 분석될 수 있다(예를 들어, 유전자 시그니처 또는 유전자 발현 프로파일을 생성함).

[0119] **경증, 중등도 또는 중증 형태의 피부 병태에 대한 대상체의 치료**

[0120] 일부 경우, 공지된 질환에 대한 공지된 치료제는 대안적 형태의 동일한 질환에 비해 특정 형태의 질환에 대해 효과적이지 않을 수 있다. 질환의 형태 사이의 차이는 각각의 특정 형태로부터의 상이한 유전자 시그니처의 결과로서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 특정 형태의 공지된 질환을 앓고 있는 대상체를 위해 표적화되거나, 전문화되거나, 맞춤화되거나 다른 방식으로 매우 효과적인 치료제 또는 치료제 추천을 제공할 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 도 6에서 확인되는 바와 같이 피부 병태를 앓고 있는 대상체의 경증, 중등도 또는 중증 형태의 피부 병태가 추천된 치료제(600)에 반응할 것인지를 확인하는 방법을 제공한다. 일부 경우, 피부 병태를 앓고 있는 대상체의 피부 병태가 추천된 치료제에 반응할 것인지를 확인하는 방법은 (a) (본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이) 대상체로부터 리보핵산(RNA) 바이오마커를 수득하는 단계(602); (b) 피부 병태가 공지된 형태의 피부 병태에 대해 50% 이하의 총 효능률을 포함하는 추천된 치료제에 반응할 확률을 결정하는 단계(604); 및 (c) 추천된 치료제로 대상체를 치료하는 단계(606)를 포함할 수 있다.

[0122] 일부 경우, 결정하는 단계(즉, 상기 단계 (b))는 (i) RNA 바이오마커에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계; (ii) 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 추천된 치료제에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계; 및 (iii) 추천된 치료제에 대한 50% 초과 양성 반응 확률을 예측하기 위해 50% 초과 양성 예측 값을 포함하는 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 추천된 치료제에 대한 50% 초과 양성 반응 확률을 가진 대상체를 분류하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, RNA 바이오마커는 RNA 분자를 포함할 수

있다. 일부 경우, RNA 바이오마커는 표 6, 표 12 또는 표 13에 나열된 하기 유전자들 중 하나 이상으로부터 전사된다.

[0123] 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 추천된 치료제에 대한 50% 초과와 양성 반응 확률을 예측하기 위해 50% 초과와 음성 예측 값을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 양성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%보다 더 클 수 있다. 일부 경우, 음성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상일 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함할 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환 또는 병태는 건선일 수 있다. 일부 경우, 추천된 치료제는 에타너셉트, 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르톨리주맙, 우스테키누맙, 세큐키누맙, 익세키주맙, 브로달루맙, 구셀쿠맙, 틸드라키주맙, 리산키주맙 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0125] **양성 예측 값에 의한 치료제의 추천**

[0126] 일부 경우, 유사한 질환 또는 병태를 앓고 있는 하나 이상의 대상체가 다양한 효능으로 치료제에 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 효능은 반응자, 비반응자 또는 불리한 반응자를 포함할 수 있다. 특히, 유사한 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체들 사이의 유전적 가변성은 일반적인 형태의 질환 또는 병태를 광범위하게 치료하기 위한 치료제의 다양한 효능을 더 계층화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 개시내용의 측면은 도 6b에서 볼 수 있는 바와 같이, 생물학적 샘플을 준비하고 하나 이상의 치료 약물을 확인하여 대상체의 질환 또는 병태의 특정 유전적 변이체에 대한 치료제를 효과적으로 조정하는 방법을 포함한다(608).

[0127] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 피부의 자가면역 질환(예를 들어, 건선)을 가진 대상체를 치료하거나 이러한 대상체에게 치료제를 추천하는 방법으로서, 상기 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. RNA 샘플의 이러한 채취는 마이크로니들 디바이스의 사용을 수반할 수 있거나, 조직 생검 또는 세포 샘플의 용해 및 RNA 추출 프로토콜을 이용한 핵산(예를 들어, RNA)의 추출을 수반할 수 있다. 일부 경우, 대상체는 샘플 채취 전에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않았다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 대상체는 대상체로부터 샘플을 채취하기 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 15일 또는 20일 초과 전에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않았다. 일부 경우, 상기 방법은 RNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 기반으로, 피부의 자가면역 질환을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 70% 초과와 양성 예측 값, 75% 초과와 양성 예측 값, 80% 초과와 양성 예측 값, 85% 초과와 양성 예측 값, 90% 초과와 양성 예측 값 또는 95% 초과와 양성 예측 값으로 예측하는 단계; 및/또는 이 예측을 기반으로, 대상체를 자가면역 치료 약물로 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 양성 예측 값은 특정 크기의 코호트를 사용함으로써 결정된다. 예를 들어, 상기 방법은 5명, 10명, 25명, 50명, 100명, 150명, 200명, 250명, 500명 또는 1000명 초과와 환자들의 코호트에서 평가될 때 본원에서 제공된 양성 예측 값을 가질 수 있다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 대상체의 피부로부터 유래한 RNA를 포함하는 샘플을 채취하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. RNA 샘플의 이러한 채취는 마이크로니들 디바이스의 사용을 수반할 수 있거나, 조직 생검 또는 세포 샘플의 용해 및 RNA 추출 프로토콜을 이용한 핵산(예를 들어, RNA)의 추출을 수반할 수 있다. 일부 경우, 대상체는 샘플 채취 전에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않았다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 대상체는 대상체로부터 샘플을 채취하기 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 15일 또는 20일 초과 전에 자가면역 치료 약물을 투여받지 않았다. 일부 경우, 상기 방법은 RNA를 cDNA로 전환시키는 단계 및 cDNA를 기반으로 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 상기 방법은 적어도 하나의 유전자의 발현 수준을 기반으로, 피부 병변을 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 70% 초과와 양성 예측 값, 75% 초과와 양성 예측 값, 80% 초과와 양성 예측 값, 85% 초과와 양성 예측 값, 90% 초과와 양성 예측 값 또는 95% 초과와 양성 예측 값으로 예측하는 단계; 및/또는 이 예측을 기반으로, 대상체를 자가면역 치료 약물로 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 양성 예측 값은 특정 크기의 코호트를 사용함으로써 결정된다. 예를 들어, 상기 방법은 5명, 10명, 25명, 50명, 100명, 150명, 200명, 250명, 500명 또는 1000명 초과와 환자들의 코호트에서 평가될 때 본원에서 제공된 양성 예측 값을 가질 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체의 피부 병변이 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스로 대상체의 피부를 침투하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. RNA 분자는 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써 대상체로부터 획득된다. 일부 경우, RNA 분자에 대한 고처리율 시퀀싱을 수행하여 서열 리드를 생성한다.

다. 서열 리드를 자가면역 질환 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 시그니처와 정렬하여, 정렬된 서열 리드를 수득한다. 자가면역 질환 치료 약물에 대한 반응을 예측하는 데 있어서 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과와 양성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용한다. 일부 경우, 정렬된 서열 리드를 사용하여 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준을 결정하고; 피부 병변을 가진 대상체가 IL-17 매개 치료제, IL-23 매개 치료제, TNF α 매개 치료제 또는 이들의 임의의 조합에 반응할 것인지를 예측하는 훈련된 알고리즘을 적어도 하나의 RNA 분자의 발현 수준에 적용한다. 일부 경우, RNA 바이오마커에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성한다. 하나 이상의 서열 리드를 추천된 치료제에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득한다. 대상체는 추천된 치료제에 대한 양성 반응을 예측하는 데 있어서 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과와 양성 예측 값을 포함하는 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용함으로써 추천된 치료제에 양성으로 반응할 가능성을 가진 대상체로서 분류된다. 일부 경우, 훈련된 알고리즘은 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과와 음성 예측 값도 가진다. 일부 경우, 추천된 치료제는 예를 들어, 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵을 포함하는, 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함한다. 일부 경우, 자가면역 질환 또는 병태는 건선, 여드름, 아토피성 피부염(즉, 습진), 레이노 현상, 주사비, 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종) 또는 백반증이다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 피부의 자가면역 장애를 가진 대상체가 자가면역 치료 약물에 반응할 것인지를 확인하는 방법으로서, 대상체의 피부로부터 mRNA를 추출하는 단계, 대상체의 피부로부터 mRNA를 시퀀싱하는 단계; 및 자가면역 장애를 가진 대상체가 에타너셉트, 아달리무맵, 인플릭시맵, 세르톨리주맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵 및 리산키주맵에 반응할 것인지를 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과와 양성 예측 값으로 예측하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0131] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 하나의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 2개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 4개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 5개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 10개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 15개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 20개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 25개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 표 6, 표 12 및/또는 표 13으로부터의 적어도 50개의 유전자이다.

[0132] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7, PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1, CRABP2, PCDH7 및 PPIG로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PCDH7, PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0133] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CNFN, CTSC, GBAP1 및 CRABP2로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PPIG, RAB31, C3 및 EGR로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PCDH7, PPIG, RAB31 및 C3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 GBAP1, CRABP2, PCDH7, PPIG로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0134] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 SERPINB3, SERPINB4, S100A7A, PI3, KRT6A, LCN2, DEFB4A, DEFB4B, SPRR1A, IL36G, MX1, IFI27, CD36, CD24 및 IL4R로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 KRT6A, SPRR1A, CD36, IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CD36, IL4R,

S100A7A, SERPINB4, MX1 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 LCN2, IFI27, DEFB4A, IL36G, CD24 및 PI3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0135] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 IL4R, LCN2 및 IFI27로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PI3, IFI27 및 SERPINB3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 IL4R, S100A7A 및 MX1로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 CD36, LCN2 및 SERPINB4로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0136] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 MTC01P12, MTATP6P1, CLSTN1, PDPN, LDLRAD2 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 AL158847.1, DAD1, LDLRAD2, ZNF395, MGMT 및 AL136982.4로 구성된 군으로부터 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 NREP, PPIF, PRIM1, AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PDPN, TXNRD1, GSTM3, GPSM1, GLRX 및 USP2로 구성된 군으로부터 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자, 3개의 유전자, 4개의 유전자, 5개의 유전자 또는 6개의 유전자이다.

[0137] 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 MTCO1P12, CLSTN1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 NREP, PPIF 및 PRIM1로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 AL136982.5, MTATP6P1 및 SMPD3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 PDPN, TXNRD1 및 GSTM3으로 구성된 군으로부터의 적어도 하나의 유전자, 2개의 유전자 또는 3개의 유전자이다.

[0138] 일부 경우, 치료제에 대한 반응을 검출하기 위해 사용되는 유전자 또는 유전자들은 IL-17 매개 경로, TNF-알파 경로 또는 IL-23 경로와 같은 공통 경로에 관여할 수 있다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 공통 업스트림 조절인자를 공유하지 않거나 공통 경로를 공유하지 않는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 10개, 15개 또는 20개의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 유전자는 추천된 치료제와 어느 정도 관계를 가진다. 예를 들어, 유전자는 특정 경로(예를 들어, IL-17, IL-23 또는 TNF-알파 매개 경로)에 관여할 수 있다. 일부 경우, 적어도 하나의 유전자는 추천된 치료제와 공지된 관계를 갖지 않는다. 예를 들어, 특정 치료제에 대한 치료 반응을 평가하는 데 사용되는 유전자는 치료제에 의해 표적화된 경로에 관여하지 않을 수 있다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 IL-17 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 IL-17 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 IL-23 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 IL-23 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 자가면역 치료 약물은 TNF-알파 매개 치료제이고 적어도 하나의 유전자는 TNF-알파 매개 경로에 관여하지 않는 적어도 하나의 유전자를 포함한다.

[0139] 일부 경우, 대상체가 치료제에 반응할 확률을 예측하기 위해 훈련된 알고리즘을 적어도 하나의 유전자의 발현 수준에 적용한다. 일부 경우, 단일 유형의 약물을 투여받은 환자의 샘플을 사용하여 알고리즘을 훈련한다. 예를 들어, 환자는 IL-17 매개 치료제, TNF-알파 매개 치료제 또는 IL-23 매개 치료제를 투여받았을 수 있다.

[0140] 일부 경우, 방법은 마이크로니들 디바이스의 사용을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플을 준비하고 하나 이상의 치료 약물을 확인하는 방법은 (a) 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 대상체의 피부를, 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계(610); (b) 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계(612); (c) 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써, 대상체로부터 추출된 RNA 분자를 수득하는 단계(614); (d) 추출된 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여, 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계(616); (e) 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 하나 이상의 치료 약물에 대한 양성 반응과 관련된 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬함으로써, 정렬된 서열 리드를 수득하는 단계(618); 및 70% 초과,의 양성 예측 값, 75% 초과,의 양성 예측 값, 80% 초과,의 양성 예측 값, 85% 초과,의 양성 예측 값, 90% 초과,의 양성 예측 값 또는 95% 초과,의 양성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용함으로써 하나 이상의 치료 약물

양성으로 반응할 가능성을 가진 대상체를 분류하는 단계(620)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플을 준비하고 하나 이상의 치료 약물을 확인하는 방법은 하나 이상의 치료 약물을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환 또는 병태는 건선이다.

[0141] 일부 경우, 대상체는 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15의 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 적어도 8의 PASI, 및 추천된 약물을 사용한 치료 후 적어도 PASI 75, 80, 90, 95 또는 100을 가진다. 일부 경우, 대상체는 적어도 10의 PASI, 및 치료 후 PASI 75, 80, 90, 95 또는 100을 가진다. 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 하나 이상의 치료 약물에 대한 50% 초과 양성 반응 확률을 예측하기 위해 50% 초과 음성 예측 값을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 양성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%보다 더 클 수 있다. 일부 경우, 음성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추출된 RNA 분자는 표 6, 표 12 또는 표 13에 나열된 하기 유전자들 중 하나 이상으로부터 전사될 수 있다. 일부 실시양태에서, 추천된 치료제는 자가면역 질환 또는 병태에 대한 하나 이상의 자가면역 치료 약물을 포함할 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환 또는 병태는 건선일 수 있다. 일부 경우, 추천된 치료제는 에타너셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵, 우스테키누맵, 세큐키누맵, 익세키주맵, 브로달루맵, 구셀쿠맵, 틸드라키주맵, 리산키주맵 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0142] **치료제에 대한 반응**

[0143] 일부 경우, 하나 이상의 대상체 사이의 유전자 발현의 가변성은 질환 또는 병태, 특히 건선에 대한 특정 치료제의 반응을 예측할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 본 발명의 측면은 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체에서 질환 또는 병태에 대한 치료제에 대한 반응을 확인하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 점수에 특이적인 추가 치료제를 추천하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 경우, 상기 방법은 치료제 또는 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 핵산 분자는 데옥시리보핵산(DNA) 분자를 포함할 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 핵산 분자는 RNA 분자를 포함한다. 일부 경우, RNA 분자는 메신저 RNA(mRNA) 분자를 포함할 수 있다.

[0144] 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 자가면역 질환일 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환은 건선일 수 있다.

[0145] **공지된 질환 또는 병태의 경증, 중등도 또는 중증 형태의 확인**

[0146] 일부 경우, 질환의 특정 형태(예를 들어, 중증, 중등도, 정상 등)는 상이한 유전자 시그니처를 포함할 수 있다. 공지된 질환 또는 병태에 대한 특정 공지된 치료제는 포함할 수 있는 동일한 질환의 대안적 형태에 비해 질환의 특정 형태에 대해 효과적이지 않다. 일부 경우, 방법은 점수에 특이적인 치료제를 추천하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 방법은 이 치료제를 대상체에게 투여하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 경우, 질환 또는 병태는 자가면역 질환일 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환은 건선일 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 핵산 분자는 DNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 핵산 분자는 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 경우, RNA 분자는 mRNA 분자를 포함할 수 있다.

[0147] 일부 실시양태에서, 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터 적어도 5개의 유전자는 하나 이상의 경로와 관련된 유전자를 포함할 수 있다. 일부 경우, 표 6, 표 12 또는 표 13으로부터 적어도 5개의 유전자는 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 적어도 2개의 유전자를 포함할 수 있다.

[0148] **질환 또는 병태와 관련된 생물학적 경로의 활성화 확인**

[0149] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 측면은 도 6c에서 볼 수 있는 바와 같이 대상체의 질환 또는 병태와 관련될 수 있는 하나 이상의 경로의 활성화를 확인하는 방법을 제공한다(642). 일부 실시양태에서, 대상체의 질환 또는 병태와 관련될 수 있는 하나 이상의 경로의 활성화를 확인하는 방법은 (a) 대상체의 피부를, 마이크로니들에 커플링된 하나 이상의 핵산 프로브를 포함하는 마이크로니들 디바이스와 접촉시키는 단계(644); (b) 마이크로니들 디바이스가 대상체의 피부를 침투하도록 압력을 마이크로니들 디바이스에 인가하는 단계(646); (c) 대상체의 피부로부터 마이크로니들 디바이스를 제거함으로써 대상체로부터 추출된 RNA 분자를 수득하는 단계(648); (d) 추출된 RNA 분자에 대해 고처리율 시퀀싱을 수행하여 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 생성하는 단계(650); (e) 대상체에 대한 하나 이상의 서열 리드를 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 경로의 활성화와 관련될 수 있는 서열 리드의 공지된 시그니처와 정렬하는 단계(652); 및 (f) 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 질환을 발생시킬 50% 초과 확률을 예측하기 위해 50% 초과 양성 예측 값 또는 50% 초과 음성 예측 값을 가진 훈련된 알고리즘을 정렬된 서열 리드에 적용함으로써, 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 발생시킬 50% 초과 확률을 가진 대상체를 분류하는 단계(654)를 포함할 수 있다. 일부 경우, 상기 방법

은 하나 이상의 경로의 활성화에 특이적인 치료제를 추천하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 상기 방법은 하나 이상의 경로의 활성화에 특이적인 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 마이크로니들은 솔리드 마이크로니들일 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 훈련된 알고리즘은 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 발생시킬 50% 초과 확률의 확률을 예측하기 위해 50% 초과 확률의 음성 예측 값을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 양성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%보다 더 클 수 있다. 일부 경우, 음성 예측 값은 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상일 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 자가면역 질환 또는 병태일 수 있다. 일부 경우, 자가면역 질환 또는 병태는 건선일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추출된 RNA 분자는 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 적어도 하나의 유전자를 포함하는 하나 이상의 유전자로부터 전사될 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 유전자는 하나 이상의 경로의 활성화와 관련된 적어도 2개의 유전자를 포함할 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 유전자는 표 6, 표 12 또는 표 13에 나열된 유전자들 중 어느 한 유전자를 포함할 수 있다.

[0152] 대상체

[0153] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 포유동물 및 비포유동물, 예를 들어, 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 붉은털원숭이, 게잡이원숭이, 밀둥꼬리원숭이, 돼지꼬리원숭이, 다람쥐원숭이, 부엉이원숭이, 개코원숭이, 침팬지, 마모셋, 거미원숭이 등), 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 기니피그 등), 개, 고양이, 돼지 등을 포함하는 임의의 동물을 지칭한다. 일부 경우, 대상체는 인간 대상체이다.

[0154] 일부 실시양태에서, 대상체는 피부 병태를 경험할 수 있거나 피부 병태의 증상을 가질 수 있다. 본원에서 제공된 방법 및 디바이스에 의해 검출될 수 있고/있거나 치료될 수 있는 피부 병태의 예는 건선, 여드름, 아토피성 피부염(즉, 습진), 레이노 현상, 주사비, 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종) 및 백반증을 포함한다. 일부 경우, 대상체는 하나 이상의 피부 병태, 예를 들어, 건선 및 아토피성 피부염을 갖거나 이의 증상을 가진다. 일부 경우, 대상체는 상이한 정도의 피부 병태, 예를 들어, 경증, 중등도, 중증 및 매우 중증을 경험할 수 있다. 건선의 증상의 예는 두꺼운 은빛 인설로 덮인 피부의 붉은 패치; 작은 인설 반점; 출혈이 있을 수 있으나 가려울 수 있는 건조하고 갈라진 피부; 가려움증, 작열감 또는 쓰라림; 두꺼워지거나 움푹 파이거나 융기된 손톱; 팽윤되고 뻣뻣한 관절을 포함한다.

[0155] 건선 면적 및 중증도 지수(PASI) 점수

[0156] 건선 면적 및 중증도 지수(PASI) 점수는 이 플라크의 변색, 두께, 인설 및 커버리지를 측정하는 데 통상적으로 사용된다. 의료인(예를 들어, 의사, 간호사, 간호 보조사, 의사 보조사 등)은 PASI 점수를 사용하여 건선의 중증도와 정도를 측정하고 건선 치료제의 효과를 관찰할 수 있다. 또한 이 수단의 사용은 의료인이 병태의 진행을 모니터링하고 치료제의 효과를 평가할 수 있게 한다.

[0157] 점수화는 건선의 증상을 전혀 없음부터 매우 심각함까지 등급화하는 단계, 및 이들이 영향을 미치는 신체의 퍼센트를 추정하는 단계를 포함한다. 연구자들은 또한 PASI 점수를 사용하여 임상시험에서 건선 의약의 효과를 측정한다.

[0158] 절대 PASI 점수의 범위는 0 내지 72이고, 이때 더 높은 점수는 건선의 더 큰 중증도를 표시한다. 0점은 건선 없음을 표시하는 반면, 10점보다 더 높은 점수는 중증 건선을 암시한다. 점수화 시스템은 강도에 대한 구획 및 신체 커버리지에 대한 또 다른 구획을 포함한다. 점수의 강도 구획은 1) 변색(즉, 발적), 2) 두께 및 3) 인설을 측정한다. 면적 구획은 건선이 1) 머리와 목, 2) 상지, 3) 몸통, 및 4) 하지에 영향을 미치는 정도를 보여준다.

[0159] PASI 점수는 다음과 같이 계산될 수 있다:

A 점수	4 개의 신체 부위 각각에 대해 3 개의 강도 점수(변색, 두께 및 인설)를 합산하여 4 개의 A 점수를 얻는다. 증상의 증중도를 기반으로 각각의 강도 점수를 제공할 수 있다: 0: 증상 없음; 1: 경중 증상; 2: 중등도 증상; 3: 중증 증상; 4: 매우 중증 증상.
B 점수	4 개의 신체 부위 각각에 대해 B 점수를 배정한다: 0: 증상 없음, 1: 1% 내지 9% 커버리지, 2: 10% 내지 29% 커버리지, 3: 30% 내지 49% 커버리지, 4: 50% 내지 69% 커버리지, 5: 70% 내지 89% 커버리지, 6: 90% 내지 100% 커버리지.
C 점수	A 점수를 각각의 신체 부위에 대한 B 점수와 곱하여 4 개의 C 점수를 얻는다.
D 점수	각각의 C 점수를 해당 부위가 나타내는 신체 표면적의 양과 곱한다. 이 양은 머리와 목의 경우 0.1, 팔의 경우 0.2, 몸통의 경우 0.3, 다리의 경우 0.4 이다. 이것은 4 개의 D 점수를 제공한다.
PASI 점수	4 개의 D 점수를 합산한다.

[0160]

[0161] 임상 연구자들은 종종 PASI 퍼센트 반응률을 사용하여 치료 결과를 표시한다. 예를 들어, PASI75는 사람의 PASI 점수가 기준으로부터 75% 감소하였음을 의미하고, 이것은 병태의 유의미한 개선을 표시한다. 통상적인 치료 목표는 PASI 75를 달성하는 것이었다. 그러나, PASI90 또는 PASI100(즉, 각각 PASI 점수의 90% 또는 100% 감소)이 더 바람직하다.

[0162]

일부 경우, 본원에서 제공된 대상체는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 또는 적어도 15의 PASI를 가진다. 일부 경우, 대상체는 중등도 내지 중증 건선 및 10 이상의 기준 PASI를 가진다. 일부 경우, 본원에서 제공된 방법은 대상체가 특정 치료제에 반응할 것인지에 대한 예측을 제공한다. 일부 경우, 추천된 치료제로 치료받은 후, 대상체는 치료제에 반응하고 PASI 점수의 감소를 가진다. 일부 경우, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료 후 16주째 날 특정 반응, 예컨대, 16주 PASI60, 16주 PASI75, 16주 PASI80, 16주 PASI80, 16주 PASI90, 16주 PASI95, 16주 PASI99 또는 16주 PASI100일 수 있다. 일부 경우, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료 후 12주째 날 특정 반응, 예컨대, 12주 PASI60, 12주 PASI75, 12주 PASI80, 12주 PASI80, 12주 PASI90, 12주 PASI95, 12주 PASI99 또는 12주 PASI100일 수 있다. 일부 경우, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료 후 8주째 날 반응, 예컨대, 8주 PASI60, 8주 PASI75, 8주 PASI80, 8주 PASI80, 8주 PASI90, 8주 PASI95, 8주 PASI99 또는 8주 PASI100이다. 일부 경우, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료 후 4주째 날 반응, 예컨대, 4주 PASI60, 4주 PASI75, 4주 PASI80, 4주 PASI80, 4주 PASI90, 4주 PASI95, 4주 PASI99 또는 4주 PASI100이다. 일부 실시양태에서, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료한 지 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 8주, 적어도 12주, 적어도 16주, 적어도 20주 또는 적어도 24주 후에 평가된다. 일부 실시양태에서, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료한 지 최대 2주, 최대 3주, 최대 4주, 최대 8주, 최대 12주, 최대 16주, 최대 20주, 최대 24주 또는 최대 50주 후에 평가된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 치료제에 대한 대상체의 반응은 치료한 지 8주 내지 12주 후, 치료한 지 4주 내지 12주 후, 및/또는 치료한 지 8주 내지 16주 후에 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자의 PASI 반응은 치료 후 임의의 기간 동안 적어도 PASI60, 적어도 PASI70, 적어도 PASI80, 적어도 PASI90, 적어도 PASI95, 적어도 PASI99 또는 PASI100일 수 있다.

[0163]

샘플 준비

[0164]

핵산은 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스를 이용함으로써 샘플로부터 추출될 수 있거나, 마이크로니들 디바이스의 이용을 수반하는 방법 이외의 추출 방법을 이용함으로써 샘플(예를 들어, 생검 샘플)로부터 직접 추출될 수 있다. 추출될 수 있는 핵산의 유형은 예를 들어, 메신저 RNA(mRNA), microRNA, DNA(예를 들어, 핵 DNA 또는 미토콘드리아 DNA), mRNA와 DNA의 혼합물, 짧은 RNA, 단리된 RNA 및 단리된 DNA를 포함하는, 유전 정보를 코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 핵산 추출에 사용될 수 있는 생검 샘플은 신체의 임의의 부분, 예를 들어, 신체 표면(예를 들어, 피부, 모발, 두피, 표면 피부, 손발톱, 피부 파편, 모낭); 또는 신체 내부(예를 들어, 뇌, 심장, 폐, 췌장, 신장, 간, 장, 근육, 결합 조직, 뼈, 연골 또는 혈액)로부터 제거된 임의의 조직을 포함할 수 있다. 생검 샘플은 침습적, 비침습적 또는 최소 침습적으로 취득될 수 있다. 일부 경우, 생검 샘플은 하나 이상의 활성 병변, 휴면 병변 또는 정상 조직으로부터 취득된다.

- [0165] 일부 경우, 일단 피부로부터 제거되면, 디바이스 및 추출된 RNA 바이오마커를 저장 완충제, 수송 완충제 또는 분석 완충제에 넣을 수 있다. 디바이스 및 추출된 RNA 바이오마커를 -80℃, -20℃, -4℃, 4℃ 또는 실온에서 저장할 수 있다. 대안적으로, 추출된 RNA 바이오마커를 디바이스로부터 해리하기 위해 디바이스를 완충제에 넣을 수 있고, 추출된 RNA 바이오마커를 -80℃, -20℃, -4℃, 4℃ 또는 실온에서 저장할 수 있다. 추출된 RNA 바이오마커(디바이스 유무와 관계없이)는 추가 분석을 위해 실험실로 보내질 수 있다.
- [0166] 일부 경우, 샘플의 PCR 증폭 또는 화학적 표지부착을 필요로 하지 않으면서 단일 DNA 또는 RNA 분자를 시퀀싱할 수 있는 나노포어 시퀀싱을 이용하여 DNA를 시퀀싱한다. 일부 경우, 샘플의 추출된 핵산을 차세대 시퀀싱(NGS), 고처리량 시퀀싱, 대량 병렬 시퀀싱 또는 합성에 의한 시퀀싱으로 증폭하고 분석할 수 있다. 상이한 시퀀싱 접근법은 예를 들어, 파이로시퀀싱, 가역적 터미네이터 화학반응에 의한 시퀀싱, 리가제 효소에 의해 매개된 라이게이션에 의한 시퀀싱, 또는 인-연결된 형광 뉴클레오타이드 또는 실시간 시퀀싱을 포함할 수 있다. 게놈 분석을 수행하는 방법은 마이크로어레이 방법도 포함할 수 있다. 일부 경우, 게놈 분석은 본원의 다른 방법들 중 임의의 방법과 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 샘플을 수득하고 적절성에 대해 시험하고 분취액으로 나눌 수 있다. 그 다음, 하나 이상의 분취액을 본 발명의 세포학적 분석에 사용할 수 있고, 하나 이상을 본 발명의 유전자 발현 프로파일링 방법에 사용할 수 있으며, 하나 이상을 게놈 분석에 사용할 수 있다. 본 발명은 당업자가 본원에서 명시적으로 제공되지 않은 다른 분석을 생물학적 샘플에 대해 수행하기를 원할 수 있음을 예상한다는 것도 이해된다.
- [0167] 핵산 분자가 RNA인 일부 실시양태에서, 상기 방법은 포획된 RNA를, 시퀀싱(예를 들어, 합성에 의한 시퀀싱 또는 나노포어 시퀀싱)에 쉽게 이용될 수 있는 DNA(예를 들어, cDNA)로 전환시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, RNA 추출을 위해 RNeasy Mini 키트(Qiagen, 캘리포니아주 발렌시아)를 사용한다. RNAase 무함유 DNase 분해(Qiagen, 캘리포니아주 발렌시아)를 사용하여 RNA 제제로부터 게놈 DNA를 제거할 수 있다. Taqman 키트(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시티)를 역전사에 사용할 수 있다. 예를 들어, 200 ng의 총 mRNA를 20 μ l 역전사 반응에 첨가하고 혼합물을 25℃에서 5분, 48℃에서 30분, 그 다음 95℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 추가 사용을 위해 cDNA를 -20℃에서 저장하였다.
- [0168] 일부 경우, cDNA는 표준 절차에 따라 시판 회사(Psomagen, Inc., 메릴랜드주 록빌)에 의해 증폭된 후 시퀀싱될 수 있다. 제조업체의 설명서에 따라 일루미나 넥스테라(Illumina Nextera) DNA Flex 키트를 사용하여 라이브러리 제조를 달성할 수 있다. 샘플당 40 M 리드의 시퀀싱을 위해, 제조된 색인화 라이브러리를, 리드 길이가 150 PE인 NovaSeq6000 S4에 로딩할 수 있다. 시퀀싱 동안, 품질 점수(Q30)를 특정 수준, 예를 들어, 75% 이상으로 유지할 수 있다. 실행이 완료되었을 때, FASTQ 파일 품질을 FASTQC로 확인하고 Trim_galore 프로그램으로 트리밍할 수 있다. hisat2 프로그램을 사용하여 트리밍된 FASTQ를 인간 기준 게놈(예를 들어, GRCh38)에 정렬하고 맵핑할 수 있다. 일부 실시양태에서, FeatureCounts 프로그램 및 호모 사피엔스 GRCh38.84.gtf를 사용하여 각각의 앙상블(Ensemble) 유전자 ID에 대해 리드의 수를 센다. 일부 경우, 바이오컨덕터(Bioconductor) 팩키지 edgeR을 사용하여 RNA 발현 분석을 더 처리한다. logCPM(백만 리드당 카운트)을 계산하기 전에 filterByExpr를 사용하여 유전자를 여과할 수 있다. R에서 ggplot2 및 heatmap.2 함수로 도표를 만들 수 있다. 앙상블 유전자의 총 수에 대한 검출된 유전자(>0 카운트)의 비를 사용하여 검출된 유전자의 퍼센트를 측정할 수 있다.
- [0169] 유전자 발현 생성물 수준을 측정하는 일반적인 방법은 추가 세포학적 어세이, 특정 단백질 또는 효소 활성에 대한 어세이, 단백질 또는 RNA 또는 특정 RNA 스플라이스 변이체를 포함하는 특정 발현 생성물에 대한 어세이, 제자리 하이브리드화, 전체 또는 부분 게놈 발현 분석, 마이크로어레이 하이브리드화 어세이, SAGE, 효소 연결 면역흡광도 어세이, 질량 분광측정, 면역조직화학 또는 블롯팅 중 하나 이상을 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. 유전자 발현 생성물 수준은 글리세르알데하이드 3 포스페이트 데하이드로게나제(dehydrogenase) 또는 튜블린(tublin)을 포함하나 이들로 제한되지 않는 특정 유전자의 총 mRNA 또는 발현 수준과 같은 내부 표준으로 정규화될 수 있다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 마이크로어레이 분석은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 생물학적 샘플(예를 들어, 생검 또는 미세 니들 흡인물)로부터 핵산을 추출하고 정제하는 것으로 시작한다. 발현 분석을 위해, DNA로부터 RNA를 추출하고/하거나 정제하는 것이 유리할 수 있다. 다른 형태의 RNA, 예컨대, tRNA 및 rRNA로부터 mRNA를 추출하고/하거나 정제하는 것도 유리할 수 있다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 정제된 핵산은 예를 들어, 역전사, PCR, 라이게이션, 화학 반응 또는 다른 기법에 의해 형광, 방사성핵종 또는 화학적 표지, 예컨대, 비오틴 또는 디곡신에 의해 추가로 표지부착될 수 있다. 표지부착은 커플링 단계를 추가로 요구할 수 있는 직접적 또는 간접적 표지부착일 수 있다. 커플링 단계는 예를 들어, 아미

노알릴-UTP 및 NHS 아미노 반응성 염료(예컨대, 시아닌 염료)를 사용함으로써 하이브리드화 전에 일어날 수 있거나, 예를 들어, 비오틴 및 표지부착된 스트렙타비딘을 사용함으로써 하이브리드화 후에 일어날 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드(예를 들어, 1 aaUTP : 4 TTP 비)는 정상 뉴클레오타이드에 비해 낮은 비율, 전형적으로 (분광광도계에 의해 측정될 때) 60개 염기마다 1개 염기의 비율로 효소에 의해 첨가된다. 그 후, 예를 들어, 컬럼 또는 정용여과 디바이스로 aaDNA를 정제할 수 있다. 아미노알릴 기는 반응성 표지(예를 들어, 형광 염료)와 반응하는, 핵염기에 부착된 긴 링커의 아민 기이다.

[0172] 일부 실시양태에서, 표지부착된 샘플은 SDS, SSC, 텍스트란 설페이트, 차단제(예컨대, COT1 DNA, 연어 정자 DNA, 송아지 흉선 DNA, 폴리 A 또는 폴리 T), 덴하르트(Denhardt) 용액, 포름아민 또는 이들의 조합을 함유할 수 있는 하이브리드화 용액과 혼합될 수 있다. 하이브리드화 프로브는 프로브의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열(DNA 표적)의 존재를 DNA 또는 RNA 샘플에서 검출하는 데 사용되는 가변 길이의 DNA 또는 RNA 단편이다. 이로써, 프로브는 프로브와 표적 사이의 상보성으로 인해 프로브-표적 염기 페어링을 허용하는 염기 서열을 가진 단일 가닥 핵산(DNA 또는 RNA)에 하이브리드화한다. 표지부착된 프로브는 먼저 (가열에 의해 또는 알칼리 조건 하에서) 단일 DNA 가닥으로 변성된 후 표적 DNA에 하이브리드화된다.

[0173] 일부 실시양태에서, 프로브와 이의 표적 서열의 하이브리드화를 검출하기 위해, 프로브를 분자 마커로 태그(또는 표지)부착하고; 일반적으로 사용되는 마커는 ³²P, 또는 비방사성 항체 기반 마커인 디곡시게닌(Digoxigenin)이다. 그 다음, 자가방사선촬영 또는 다른 영상화 기법을 통해 하이브리드화된 프로브를 시각화함으로써, 프로브에 대한 중간 내지 높은 서열 유사성을 가진 DNA 서열 또는 RNA 전사체를 검출한다. 중간 또는 높은 유사성을 가진 서열의 검출은 얼마나 엄격한 하이브리드화 조건이 적용되었는지에 의해 좌우된다 - 높은 엄격도, 예컨대, 높은 하이브리드화 온도 및 하이브리드화 완충제의 낮은 염은 매우 유사한 핵산 서열 사이의 하이브리드화만을 허용하는 반면, 낮은 엄격도, 예컨대, 낮은 온도 및 높은 염은 서열이 덜 유사할 때 하이브리드화를 허용한다. DNA 마이크로어레이에 사용되는 하이브리드화 프로브는 불활성 표면, 예컨대, 코팅된 유리 슬라이드 또는 유전자 칩에 공유부착된 DNA를 지칭하고, 이 DNA에 이동성 cDNA 표적이 하이브리드화된다.

[0174] 일부 실시양태에서, 가열 또는 화학적 수단으로 혼합물을 변성하고 마이크로어레이의 개구에 첨가할 수 있다. 이어서, 개구를 밀봉하고, 마이크로어레이를 예를 들어, 마이크로어레이가 회전에 의해 혼합되는 하이브리드화 오븐 또는 혼합기에서 하이브리드화할 수 있다. 밤새 하이브리드화한 후, 비특이적 결합을 (예를 들어, SDS 및 SSC로) 씻어낼 수 있다. 그 다음, 마이크로어레이를 건조할 수 있고, 레이저가 염료를 여기시키고 검출기가 이의 방출을 측정하는 특수 기계에서 스캐닝할 수 있다. 영상을 주형 격자와 중첩시킬 수 있고, 특징의 강도(여러 픽셀이 특징을 만듦)를 정량할 수 있다.

[0175] 본 방법의 핵산 증폭 및 프로브 생성을 위해 다양한 키트를 사용할 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 키트의 예는 뉴젠(Nugen) 엑손(Exon) 모듈 및 프래그/라벨(Frag/Label) 모듈을 가진 cDNA 증폭 키트인 뉴젠 WT-Ovation FFPE 키트를 포함하나 이것으로 제한되지 않는다. NuGEN WT-Ovation™ FFPE 시스템 V2는 FFPE 샘플로부터 유래한 작은 분해된 RNA의 방대한 아카이브(archive)에 대한 전반적인 유전자 발현 분석을 수행할 수 있게 하는 전체 전사체 증폭 시스템이다. 이 시스템은 50 ng만큼 적은 총 FFPE RNA의 증폭에 필요한 시약과 프로토콜로 구성된다. 이 프로토콜은 qPCR, 샘플 보관, 단편화 및 표지부착에 이용될 수 있다. 증폭된 cDNA는 뉴젠의 FL-Ovation™ cDNA 비오틴 모듈 V2를 사용한 GeneChip® 3' 발현 어레이 분석을 위해 2시간 이내에 단편화되고 표지부착될 수 있다. 아피메트릭스(Affymetrix) GeneChip® 엑손 및 유전자 ST 어레이를 사용하는 분석을 위해, 증폭된 cDNA를 WT-Ovation 엑손 모듈과 함께 사용한 다음, FL-Ovation™ cDNA 비오틴 모듈 V2를 사용하여 단편화하고 표지부착할 수 있다. 아질런트(Agilent) 어레이에서 분석하기 위해, 뉴젠의 FL-Ovation™ cDNA 형광 모듈을 사용하여 증폭된 cDNA를 단편화하고 표지부착할 수 있다.

[0176] 일부 실시양태에서, Ambion WT 발현 키트가 사용될 수 있다. Ambion WT 발현 키트는 별도의 리보솜 RNA(rRNA) 고갈 단계 없이 총 RNA를 직접 증폭할 수 있게 한다. Ambion® WT 발현 키트를 사용하면, Affymetrix® GeneChip® 인간, 마우스 및 래트 엑손 및 유전자 1.0 ST 어레이에서 50 ng의 총 RNA만큼 적은 샘플을 분석할 수 있다. 보다 낮은 입력 RNA 요구 및 Affymetrix® 방법과 TaqMan® 실시간 PCR 데이터 사이의 높은 일치성 이외에, Ambion® WT 발현 키트는 민감성의 유의미한 증가를 제공한다. 예를 들어, Ambion® WT 발현 키트의 사용 시 배경 위에서 검출된 더 큰 수의 프로스 세트가 증가된 신호 대 노이즈 비의 결과로서 엑손 수준에서 수득될 수 있다. Ambion WT 발현 키트는 추가 아피메트릭스 표지부착 키트와 함께 사용될 수 있다.

[0177] 일부 실시양태에서, 앰프텍(AmpTec) 트리뉴클레오타이드 나노 mRNA 증폭 키트(6299-A15)를 본 방법에 사용할 수 있다. ExpressArt® 트리뉴클레오타이드 mRNA 증폭 나노 키트는 1 ng 내지 700 ng의 광범위한 입력 총 RNA에 적

합하다. 입력 총 RNA의 양과 필요한 aRNA 수율에 따라, 이것은 1 라운드(입력 >300 ng 총 RNA) 또는 2 라운드(최소 입력 양 1 ng 총 RNA)에 사용될 수 있고, 이때 aRNA 수율은 >10 μ g이다. 앰프텍의 전매특허 트리뉴클레오타이드 프라이밍 기술은 rRNA에 대한 선택과 조합된 우선적인 mRNA 증폭(보편적인 진핵생물 3'-폴리(A) 서열과 무관함)을 야기한다. 이 키트는 cDNA 전환 키트 및 아피메트릭스 표지부착 키트와 함께 사용될 수 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 배경 강도를 뺀 후 강도를 나누어, 각각의 채널의 특징의 총 강도를 동일하게 만들거나 기준 유전자의 강도를 만듦으로써 미가공 데이터를 정규화한 다음, 모든 강도에 대한 t-값을 계산할 수 있다. 보다 더 정교한 방법은 z-비, loess 및 lowess 회귀, 및 아피메트릭스 칩에 대한 RMA(강력한 멀티칩 분석)를 포함한다.

[0179] 일부 경우, 폴리 A 꼬리를 가진 mRNA를, 지지체의 표면에 커플링된 폴리 T DNA 포획 프로브 또는 프라이머와의 하이브리드화를 통해 지지체에 포획한다. 그 다음, 폴리 T 가닥을 역전사효소 중합효소로 연장하여, DNA:RNA 이중체를 포함하는 이중 가닥 분자를 만든다. 다음으로, 트랜스포존 복합체(예를 들어, 어댑터 서열 및 표면 증폭 프라이머에 상보적인 서열과 결합된 Tn5 전위효소)를 지지체에 첨가하고, 이것은 상기 이중체와 전위 반응을 하고 상기 이중체에 태그를 부착하여, DNA 어댑터 올리고를 RNA 가닥의 5' 말단에 라이게이션시킨다. 그 다음, 가닥 치환 중합효소(예를 들어, Bst 중합효소)를 사용하여 DNA 가닥의 3' 말단을 연장함으로써, 트랜스포존 복합체의 전달되지 않은 가닥을 치환하고 그의 5' DNA 키메라 말단에 대한 RNA 가닥을 복사할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 어댑터 올리고는 시퀀싱을 위해 구성된 기관 상의 앵커 프라이머에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 어댑터 올리고는 시퀀싱을 위한 시퀀싱 프라이머에 상보적인 서열을 포함한다. 이어서, 이중 가닥 분자를 증폭(예를 들어, 클러스터 증폭)하고 시퀀싱 프라이머로 시퀀싱할 수 있다. 프라이머는 부분적으로 어댑터 서열 및 업스트림 어댑터 서열을 포함한다. 대안적으로, 폴리 T 서열의 업스트림에서 어닐링하고 합성에 의한 시퀀싱(SBS) 화학반응의 주기를 시작하기 전에 천연 dATP 뉴클레오타이드에 의해 연장되는 프라이머로 분자의 다른 말단(폴리 T 말단)을 시퀀싱할 수 있다.

[0180] 일부 경우, RNA를 단편화하고 포스포타제로 처리한다. 단일 가닥 어댑터 분자를, 표면에 결합된 프라이머의 상보체를 포함하는 각각의 RNA 단편의 3' 말단에 라이게이션시킨다. 그 후, 단편을 지지체에 첨가하고 하이브리드화를 통해 포획한다. 역전사효소 중합효소를 사용하여 하이브리드화된 RNA 분자를 DNA:RNA 이중체로 전환시킨다. P5를 가진 ME의 전위효소와 어댑터 이중체(즉, 트랜스포존)를 포함하는 트랜스포존 복합체 또는 조성물을 사용하여 태그를 이중체에 부착시킨다. 가닥 치환 중합효소로 DNA 가닥을 말단까지 연장한 후 분자를 증폭(예를 들어, 클러스터 증폭)하고 시퀀싱할 수 있다.

[0181] 서열 리드의 생물정보학 분석

[0182] 본원에서 사용된 바와 같이, 양성 예측 값(PPV)은 양성으로 시험된 모든 대상체들 중에서 진짜 양성 퍼센트이다. 이것은 다음과 같이 계산될 수 있다: $PPV = TP / (TP + FP)$, 이때 TP 및 FP는 각각 진짜 양성 결과 및 가짜 양성 결과의 수이다.

[0183] 본원에서 사용된 바와 같이, 음성 예측 값(NPV)은 음성으로 시험된 모든 대상체들 중에서 진짜 음성의 퍼센트이다. 이것은 다음과 같이 계산될 수 있다: $NPV = TN / (TN + FN)$, 이때 TN 및 FN은 각각 진짜 음성 결과 및 가짜 음성 결과의 수이다.

[0184] 기준시점 전사체를 초기 치료한 지 12주 후 생물제제 약물에 대한 임상 반응과 비교함으로써, 건선 환자의 치료에 사용되는 생물제제(항-IL-17, 항-IL-23)에 대한 반응을 예측하기 위해 본원에서 알고리즘(Mind.Px)을 개발하였다. (75명의 환자들 중) 반응을 보인 62명의 환자들은 0.75 이상의 건선 면적 및 중증도 지수 변화를 가진 반면, 비반응자는 -0.2 내지 0.75의 건선 면적 및 중증도 지수(PASI) 변화를 가졌다. 선형 회귀 모델링을 사용한 교차검증은 분류기 성능을 평가하기 위한 컷오프로서 PASI75를 사용하여 0.71의 균형 잡힌 예측 정확도를 보여주었다. 0.95의 양성 예측 값이 달성되었다.

[0185] 일부 경우, 대상체로부터의 서열 리드를 양성 또는 음성 대조군으로부터의 서열 리드와 비교한다. 양성 대조군은 질환 또는 병태로 진단받은 대상체이다. 음성 대조군은 질환 또는 병태의 임의의 증상 또는 증상 이력을 갖지 않은 건강한 사람이다. 대안적으로, 음성 대조군은 치료 전 대상체에 대한 기준일 수 있다.

[0186] 생물제제

[0187] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물제제"는 유전 공학 기법에 의해 생성된 재조합 생물제제를 포함하는, 살아있는 유기체(예를 들어, 인간, 동물 또는 미생물)로부터 수득된 의약품을 의미한다. 예를 들어, 생물제제는 다른 단백질 및 세포 과정의 작용을 조절하는 단백질, 중요한 단백질의 생성을 조절하는 유전자, 변형된 인간

호르몬, 또는 면역계의 구성요소를 억제하거나 활성화시키는 물질을 생성하는 세포를 함유할 수 있다. 일부 경우, 생물체체는 항체(예를 들어, 단일클론 항체)이다. 일부 경우, 대상체는 다음 생물체체들 중 하나 이상으로 치료받는다: 종양 괴사 인자 억제제(예를 들어, 아달리무맙, 에타너셉트, 인플릭시맙, 골리무맙 및 세르톨리주맙 페골); IL-17 억제제(예를 들어, 세큐키누맙, 익세키주맙 및 브로달루맙); 및 IL-23 억제제(예를 들어, 틸드라키주맙, 구셀쿠맙, 우스테키누맙 및 리산키주맙).

[0188] 용어 "적어도", "초과" 또는 "이상"이 일련의 2개 이상의 수치 값에서 첫 번째 또는 마지막 수치 값 앞 또는 뒤에 올 때마다, 용어 "적어도", "초과" 또는 "이상"은 그 일련의 수치 값에서 각각의 수치 값에 적용된다. 예를 들어, 1, 2 또는 3 이상은 1 이상, 2 이상 또는 3 이상과 동등하다.

[0189] 용어 "보다 많지 않은", "미만" 또는 "이하"가 일련의 2개 이상의 수치 값에서 마지막 수치 값 뒤에 올 때마다, 용어 "보다 많지 않은", "미만" 또는 "이하"는 그 일련의 수치 값에서 각각의 수치 값에 적용된다. 예를 들어, 3, 2 또는 1 이하는 3 이하, 2 이하 또는 1 이하와 동등하다.

[0190] 본원에서 사용된 용어 "염기"는 뉴클레오타이드를 의미한다. 일부 경우, "염기"는 염기쌍("bp")을 의미할 수 있고, 예를 들어, 1개의 염기는 1개의 염기쌍과 동등하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "염기" 및 "염기쌍"은 상호교환 가능하게 사용된다.

[0191] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 소정의 값보다 10% 더 높거나 낮은 범위 내에 있음을 의미한다. 예를 들어, "약 10"은, 이 용어가 사용된 문맥에 의해 달리 표시되지 않는 한, 9 내지 11의 값을 포함할 것이다.

[0192] 하기 실시예는 본 발명의 이점 및 특징을 추가로 예시하기 위해 제공되지만, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 이들은 이용될 수 있는 전형적인 것이지만, 당업자에게 공지된 다른 절차, 방법론 또는 기법이 대안적으로 이용될 수 있다.

[0193] 실시예

[0194] 실시예 1: 디바이스의 제작

[0195] 사출 성형을 이용하여 본 개시내용의 디바이스를 제작한다. 본원에 개시된 특징에 따라, 가열된(예를 들어, 용융된) 재료, 예를 들어, 본원에 개시된 폴리올레핀 수지를 디바이스의 금형 내로 사출하여 이 디바이스를 제작한다. 상기 금형은 복수의 마이크로니들을 형성하기 위한 복수의 캐비티, 복수의 마이크로니들을 포함하는 내부 구획을 형성하기 위한 캐비티, 및 내부 구획에 인접한 하나 이상의 주변 구획을 형성하기 위한 하나 이상의 캐비티를 포함한다. 이 디바이스의 경우, 내부 구획의 폭은 주변 구획(들)의 폭보다 더 작다. 교차구획의 폭은 주변 구획(들)의 폭과 비교될 때 크기 비가 약 1:5이다.

[0196] 가열된 재료가 금형을 통해 사출됨에 따라, (주변 구획(들)에 비해) 내부 구획의 더 작은 폭은 가열된 재료가 하나 이상의 캐비티로 이동하는 것을 용이하게 하여, 내부 구획 및 주변 구획(들)의 생성 전에 복수의 마이크로니들을 생성한다.

[0197] 결과는 균일하고 날카로운 마이크로니들을 포함하는, 본원에 기재된 디바이스이다. 복수의 마이크로니들 중 3% 이하의 마이크로니들이 복수의 마이크로니들의 평균 마이크로니들 길이로부터 약 50 μm 이상 벗어난다(+/-).

[0198] 실시예 2: 프로브와 실시예 1의 디바이스의 결합

[0199] 실시예 1의 디바이스의 마이크로니들을 본원에 기재된 바와 같이 플라즈마 처리한다. 디바이스 또는 이의 일부를 플라즈마 진공 챔버에 넣고, 플라즈마 진공 챔버를 닫아 충분한 진공 밀봉을 생성하고, 챔버에 존재하는 모든 기존 기체를 배기하고, 플라즈마 처리 기체를 규정된 압력으로 플라즈마 진공 챔버 내로 펌핑하여, 기체 플라즈마가 생성될 수 있게 한다.

[0200] 기체 플라즈마는 디바이스의 가열된 재료(예를 들어, 본원에 기재된 폴리올레핀 수지)와 반응하고 재료가 더 용이하게 반응하여 본원에 기재된 프로브와 공유결합을 형성하게 만든다.

[0201] 실시예 3: mRNA 추출의 동역학

[0202] 다양한 시간 동안 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스를 건강한 대상체의 피부에 배치한 다음, 피부로부터 패치를 제거한 후, 증폭, cDNA 합성 및 qPCR 분석을 수행함으로써 mRNA 추출을 위한 최적 시간을 확인하였다. 디바이스를 20초, 1분, 5분 및 10분 동안 대상체에 배치하고, 각각의 체류 시간에 디바이스로부터 채취된 mRNA 샘플로부터 생성된 2개의 바이오마커인 *GAPDH*와 *KRT10*에 대한 주기 역치(C_t)를 측정하였다. 모든 측정을 3회 중복

하여 수행하였다.

[0203] 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 최적 추출은 5분의 피부 채취 시간에서 일어나고, 이때 분해는 10분의 피부 삽입에 의해 우세하기 시작한다.

표 1

mRNA 안정성의 시간 경과(주기 역치(Ct) 값)				
유전자	20 초 삽입	1 분 삽입	5 분 삽입	10 분 삽입
GAPDH	31.69	30.56	30.04	30.82
KRT10	28.49	27.45	25.98	27.07

[0204]

실시예 4: 추출된 mRNA의 품질검증

[0205]

[0206] 온전한 mRNA의 품질을 입증하기 위해, 본원에 기재된 마이크로니들 디바이스로부터 추출된 mRNA로 생물분석기 QC 및 qPCR 분석을 수행하였다.

[0207]

온전한/고품질 mRNA의 경우, 성공적인 cDNA 합성 및 증폭은 약 1,500 bp에서의 피크와 함께, 약 300 bp부터 약 10,000 bp까지 걸쳐 있는 뚜렷한 증폭 피크를 보여주었다(도 5a). 이 곡선 아래 면적의 정량은 1 초과의 보정된 면적 QC 비(큰 mRNA 단편(700 내지 20,000 bp)에 대한 보정된 면적/작은 mRNA 단편(150 내지 200 bp)에 대한 보정된 면적)을 산출하였다. 대조적으로, 증폭 피크는 부분적으로 분해된 샘플에서 100 내지 1,000의 더 작은 단편으로 분해된 mRNA에 의해 이동되었다(도 5b). 또한, 완전히 분해된 샘플에서는 1,500 bp 근처에서 피크가 더 이상 보이지 않았다(도 5c). 중요한 것은 이러한 부분적으로 분해된 샘플 및 완전히 분해된 샘플에서 보정된 면적 QC 비가 1 미만이었다는 점이다. 추가로, 이 샘플들에 대해 qPCR 분석을 수행하였다. 전형적인 유전자(B2M)의 사용 시, 분해된 RNA 샘플의 Ct 값은 대조군 샘플(온전한 RNA)에 대한 19.25의 Ct로부터 22.70까지 증가하였고; 이 3.45 Ct의 증가는 분해된 샘플에서 mRNA 양의 대략 11배 감소를 표시하였다.

[0208]

실시예 5: TNF α, IL-17 및 IL-23 억제제에 대한 개별 환자 반응의 전향적 예측

[0209]

예측 선형 분류기 모델링 접근법을 통해 특정 약물 클래스(예를 들어, TNF α, IL-17i 및 IL-23i 억제제)에 대한 건선 피부 질환 환자의 반응을 상기 약물 클래스의 투여 전에 전향적으로 확인하였다. 환자 반응을 확인하기 위해, 통증 없는 FDA 등록 클래스 I 피부 바이오마커 패치를 사용하여 피부 바이오마커 패치와 환자의 피부를 5분 동안 노출시켜 개별 환자의 전체 RNA 전사체를 추출하였다. 그 다음, 피부 바이오마커 패치를 처리하였고, 피부 바이오마커 패치에 부착된 RNA를 추출하고 차세대 시퀀싱을 이용하여 시퀀싱하였다. 그 다음, RNA 시퀀싱 판독값을 정렬하고, 유사한 질환 상태 RNA 유전자 프로파일 및 특정 약물 클래스에 대한 반응성 또는 비반응성을 가진 환자의 데이터베이스와 비교하였다. 예측 선형 분류기를 사용한 상기 RNA 시퀀싱 판독값과 상기 데이터베이스 사이의 비교는 특정 약물 또는 약물 클래스가 질환 상태의 치료에 대한 효과적인 반응을 제공할 가능성의 점수를 제공하였다.

[0210]

앞서 언급된 방법을 이용하여, TNF α i(PASI75 @ W12), IL-17i(PASI75 @ W12) 및 IL-23i(PASI150 @ W12) 약물 클래스에 대해 예측 선형 분류기의 양성 예측 값(PPV), 민감성 및 균형 잡힌 정확도를 평가하였다. TNF α i 억제제 약물 클래스를 34명 환자의 훈련 세트와 15명의 시험 세트에 대해 평가하였다. 선형 분류기에 대한 획득된 PPV, 민감성 및 균형 잡힌 정확도는 각각 89%, 80% 및 80%이었다. IL-17i 억제제 약물 클래스를 75명 환자의 훈련 세트와 6명의 시험 세트에 대해 평가하였다. 선형 분류기에 대한 획득된 PPV, 민감성 및 균형 잡힌 정확도는 각각 100%, 100% 및 100%이었다. IL-23i 억제제 약물 클래스를 17명 환자의 훈련 세트와 17명의 시험 세트에 대해 평가하였다. 선형 분류기에 대한 획득된 PPV, 민감성 및 균형 잡힌 정확도는 각각 90%, 82% 및 83%이었다. 상기 3종의 억제제 약물 클래스 PPV, 민감성 및 특이성의 평균은 95% PPV, 87% 민감성 및 88% 특이성인 것으로 계산되었다.

[0211]

실시예 6. 건선 생물제제에 대한 반응을 예측하기 위한 기계 학습 기반 시험

[0212]

이 연구는 건선 환자의 관리에 사용되는 가장 일반적인 생물제제 약물 클래스에 대한 환자 반응을 예측할 수 있

는 기계 학습 기반 알고리즘을 개발하고 전향적으로 검증하도록 설계되었다. 이 유형의 수단은 임상의로 하여금 소정의 환자가 특정 약물 클래스에 반응할 것이라는 더 큰 확신을 가질 수 있게 할 것이고, 이는 건강 결과 개선 및 낭비되는 의료 지출 감소로 이어질 수 있다.

[0213] 약물 노출 전 기준시점에서 진피 바이오마커 패치(DBP)를 적용한 후 노출한 지 12주 후에 임상 평가를 수행하는 두 가지 관찰 연구(STAMP 연구) 중 하나에 환자를 등록하였다. 임상 표현형에 대한 임상 반응을 평가하기 위해 기준시점 및 12주에서 PASI 측정을 수행하였다. 반응자는 12주에서 PASI75에 도달한 사람으로서 정의되었다. DBP로부터 수득된 전사체를 시퀀싱하고 분석하여 각각의 생물체제 클래스에 대한 분류기를 유도하고/하거나 검증한 후 조합하여, 모든 3종의 생물체제 약물 클래스(IL-23i, IL-17i 및 TNF α i)에 대한 예측 반응을 제공하였다.

[0214] IL-23i로 치료한 118명의 환자(49.6%), IL-17i로 치료한 79명의 환자(33.2%), TNF α i로 치료한 35명의 환자(14.7%) 및 IL-12/23i로 치료한 6명의 환자(2.5%)를 포함하는 총 242명의 건선 환자를 등록하였다. IL-23i 예측 분류기를 먼저 등록된 환자로부터 개발하였고 나중에 등록된 환자를 이용하여 독립적으로 검증하였다. 공개적으로 이용 가능한 데이터셋을 사용하여 IL-17i 및 TNF α i 예측 분류기를 개발하였고 STAMP 연구의 환자를 이용하여 독립적으로 검증하였다. 독립적인 검증에서, 3종의 분류기(IL-23i, IL-17i 및 TNF α i)에 대한 양성 예측 값은 각각 93.1%, 92.3% 및 85.7%이었다. 전체 코호트에 걸쳐, 환자의 99.5%가 적어도 하나의 약물 클래스에 반응할 것으로 예측되었다.

[0215] 이 연구는 약물 노출 전에 건선 생물체제의 예측에 적용되는 기준 피부 바이오마커 및 기계 학습 방법 이용의 힘을 입증한다. 이 시험의 이용 시, 환자, 의사 및 의료 시스템 모두가 상이한 방식으로 이익을 얻을 수 있다. 대부분의 환자들이 그들의 처방된 생물체제에 처음으로 반응할 가능성이 높기 때문에 개별 환자에 대한 정밀 의학을 실현할 수 있다. 의사는 증가된 확신으로 이 약물을 처방할 수 있으며, 의료 시스템은 값비싼 생물체제 치료제에 대한 초기 반응을 유의미하게 개선함으로써 순 비용을 낮출 뿐만 아니라 낭비되는 지출을 크게 감소시킬 것이다.

[0216] 건선은 미세한 인설과 함께 뚜렷한 홍반성 플라크 및 구진을 특징으로 하는 T 세포 매개 염증성 피부 질환이다. 전 세계적으로, 이것은 미국 인구의 약 2.8% 또는 750만 명의 사람들이 건선으로 진단받을 정도로 흔한 질환이다. 건선에 대한 현재 치료 패러다임은 경증 내지 중등도 환자를 위한 국소 의약 및/또는 광선요법, 및 중등도 내지 중증 질환으로서 분류된 환자를 위한 전신 의약에 의해 구별된다. 이 전신 작용제들 중 하나로서 생물체제 요법의 출현은 건선 환자의 관리 및 치료에 혁명을 일으켰으며 이 질환의 증가된 분자적 이해라는 직접적인 결과이다. 현재, 미국에서 건선 치료용으로 사용되도록 승인된 11종의 승인된 생물체제가 있고, 더 많은 작용제들이 개발 중이다. 그러나, 어떤 생물체제가 소정의 환자에게 효과적인지는 명확하지 않다.

[0217] 본원은 표피 및 상부 진피로부터의 mRNA 바이오마커를 포함하는 전체 전사체를 포획하기 위해 피부 바이오마커 패치를 이용하는 신규 바이오마커 포획 플랫폼을 개시한다. 이 플랫폼은 생검과의 우수한 일치성을 보였고 최소 침습적 방식으로 피부 바이오마커에 접근하는 확장 가능한 방법을 제공한다. 예비 기계 학습 분류기에서의 이 플랫폼의 사용은 IL-17 및 IL-23 억제제에 대한 반응 및 비반응의 예측을 구축할 것으로 생각된다. 본원은 3종의 약물 클래스 모두에 대해 건선 생물체제에 대한 환자 반응을 예측하기 위해 이 예비 연구를 실행 가능한 임상시험의 개발 및 전향적 검증까지 확장하는 것도 개시한다.

[0218] 방법

[0219] 피부 바이오마커 패치 플랫폼

[0220] 이 연구에 사용된 피부 바이오마커 패치(DBP)를 앞서 기재된 바와 같이 제작하고 변형시키고 제조업체의 설명서에 따라 사용하였다.

[0221] 인간 대상체 모집 및 등록

[0222] STAMP 연구로서 지칭되는, 과거 및 진행 중인 관찰 다기관(20개 센터) 단일 아암(arm) 공개 표지 12주 연구로부터 데이터를 분석하였다. 이 연구에 대한 프로토콜은 현지 기관 윤리위원회의 승인을 받았고 우수 임상 실시(GCP)에 대한 헬싱키 선언 및 국제 조화위원회(ICH) 가이드라인의 조항을 준수한다. 치료를 받은 모든 환자들은 서면 동의서를 제공하였다. 연구 프로토콜의 1차 목적은 기준시점 또는 치료중 전사체를 사용하여 약물치료의 선택을 예측하고 약물 개발을 위한 새로운 치료 표적을 제공하는 데 도움을 줄 수 있는지를 조사하는 것이었다(표 2). 방문은 스크리닝, 기준시점, 1주, 4주, 8주 및 12주를 포함하였다. 스크리닝 방문을 제외한 모든 방문에서 PASI, PGA 및 BSA 점수화를 수행하였다. 스크리닝 방문을 제외한 모든 방문에서 피부 바이오마커 패치를

대상체에게 투여하였다. 대상체 병력, 신체검사 및 인구통계자료를 스크리닝 시 수집하였다.

표 2

STAMP 연구를 위한 활동 일정

방문 수	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4	방문 5	방문 6
연구 주	스크리닝 ³	기준시점 ³	1주	4주	8주	12주
서면 동의	X					
포함/제외 기준	X					
인구통계자료	X					
병력 ¹	X					
신체검사 ^{2,4}	X					
PASI ⁴	X	X		X		X
PGA ⁴	X	X		X		X
BSA ⁴	X	X		X		X
민테라 피부 바이오마커 패치 적용 ⁴	X	X	X	X	X	X
부작용	X	X	X	X	X	X
IP 책임		X	X	X	X	X

약어: BMI = 체질량 지수; IP = 조사 제품; PASI = 건선 부위 및 중증도 지수; PGA = 의사 종합 평가; BSA = 체표면적.

¹병력은 처방 의약 및 일반 의약 이력을 포함한다.

²스크리닝 전 30 일 이내에 류마티스 전문의 또는 피부과 전문의에 의해 검사받지 않은 대상체에만 적용될 수 있음. 신장, 체중 및 BMI 가 포함된다.

³스크리닝과 기준시점이 동일한 날에 발생하는 경우, 임상되는 대상체가 민테라 피부 바이오마커 패치를 적용하기 2 주 전에 임의의 국소 스테로이드 사용을 삼가했는지를 확인해야 한다.

⁴스크리닝/기준시점 평가의 경우, 신체검사, PASI, PGA, BSA 및/또는 민테라 피부 바이오마커 패치 적용은 스크리닝 방문 또는 기준시점 방문에서 완료될 수 있다(PASI, PGA 및 BSA 는 동일한 방문일 및 민테라 피부 바이오마커 패치 적용 전에 완료되어야 한다).

[0223]

[0224]

연구 집단

[0225]

이 연구는 연령이 18세 이상이고 류마티스 전문의 또는 피부과 전문의에 의해 적어도 하나의 직경 2 cm 이상의 식별 가능한 연구 병변을 가진 건선으로 진단되었고 일단 연구에 등록되면 IL-23 억제제(IL-23i), IL-17 억제제(IL-17i) 또는 TNF α 억제제(TNF α i) 요법을 사용한 치료에 대해 계획된 남성 및 여성 환자 둘 다를 등록하였다. 제외 기준은 기준시점 방문 전 2주 이내에 연구 병변에 대한 국소 스테로이드의 사용 및 플라쿠에닐(Plaquenil)의 동시 사용을 포함하였다. 모든 연구 참가자들은 또한 연구 치료가 끝날 때까지 연구 전반에 걸쳐 모든 국소 스테로이드의 사용을 삼가하도록 지시 받았다.

[0226]

피부 바이오마커 패치 적용

[0227]

DBP를 피부에 적용하기 위해, 주문제작된 스프링 로딩 어플리케이션을 이용하였다. 이 어플리케이션은 대상체 및 사용자 전체에 걸쳐 인가 압력을 표준화하는 역할을 하였다. 로딩된 어플리케이션을 피부에 대고 방아쇠를 눌러 패치를 피부에 적용하였다. 그 다음, 패치를 의료용 테이프의 고리로 5분 동안 피부에 대고 제자리에 고정하였다. 이 시간 후, 패치를 대상체로부터 제거하고 저장 완충제(LiCl, Triton X-100, Tris-EDTA)에 즉시 넣고 처리할 때까지 4°C에서 저장하였다.

[0228]

피부 바이오마커 패치 처리

[0229]

대상체로부터 채취한 지 96시간 이내에 피부 전사체를 처리하였다. 적용된 DBP를 냉각된 1X PBS로 세척한 다음 질소 스트림 하에서 건조하였다. PCR 등급 물(50 μ l, 95°C)을 DBP에 적용함으로써 패치로부터의 mRNA 추출을 수행하였다. 이어서, 패치를 95°C에서 1분 동안 가열하여 DBP로부터 결합된 mRNA를 용출하였다. 그 다음, 제조업체의 설명서에 따라 타카라(Takara) SMART-Seq® 단일 세포 키트를 사용하여 이 용출된 mRNA를 cDNA로 전환시켰다. 이어서, 증폭된 cDNA 샘플을 분석할 때까지 4°C에서 저장하였다.

[0230]

차세대 시퀀싱 절차

[0231]

증폭된 cDNA는 표준 절차에 따라 상업적 공급업체(Psomagen, Inc., 메릴랜드주 록빌)에 의해 시퀀싱되었다. 제

조업체의 설명서에 따라 일루미나 넥스테라 DNA Flex 키트를 사용하여 라이브러리 제조를 달성하였다. 이어서, 샘플당 40 M 리드의 시퀀싱을 위해, 제조된 색인화 라이브러리를 리드 길이가 150 PE인 NovaSeq6000 S4에 로딩하였다. 시퀀싱 동안, 품질 점수(Q30)를 75% 이상으로 유지하였다. 시퀀싱 실행이 완료되었을 때, FASTQ 파일 품질을 FASTQC로 확인하고 Trim_galore 프로그램으로 트리밍하였다. hisat2 프로그램을 사용하여 트리밍된 FASTQ 파일을 인간 기준 게놈 GRCh38에 정렬하고 맵핑하였다. FeatureCounts 프로그램 및 호모 사피엔스 GRCh38.84.gtf를 사용하여 각각의 양상별 유전자 ID에 대해 리드의 수를 세었다. 바이오컨터 팩키지 edgeR을 사용하여 RNA 발현 분석을 더 처리하였다. filterByExpr를 사용하여 유전자를 여과한 후, logCPM(백만 리드당 로그 카운트)을 유전자 발현 수준의 척도로서 계산하였다. 다운스트림 분류기 구축을 위해, logCPM 값을 사용하였다.

[0232] **IL-23 분류기 개발**

[0233] R 팩키지 caret(caret)을 사용하여 IL-23i 치료 하에서 반응자를 예측하기 위해 5개의 공통 분류기를 선택하고 적용하였다. 선택된 분류기는 예측 또는 예후 바이오마커의 탐색을 위해 의료 분야에서 자주 사용되고 있고 glmnet(라소(Lasso) 및 탄성망(Elastic-Net) 정규화 일반화 선형 모델), PAM(가장 가까운 수축 중심체), LM(선형 회귀 모델), SVM(서포트 벡터 머신) 및 RF(랜덤 포레스트)를 포함하였다.

[0234] 하기 실험 설계를 이용하여 5개의 분류기들의 예측 성능을 비교하였다: 1) 데이터셋을 10개의 계층화된 외부 폴드(outer fold)로 분할하였고; 2) 각각의 폴드에 대해, 특징 선택을 위해 데이터를 전처리하였다. 선형 회귀 모델을 사용하여 상위 20개, 50개 또는 200개의 차등적으로 발현된 유전자(특징)를 선택하였고; 3) 10배 교차검증을 통해 하이퍼파라미터를 훈련 세트에서 조정 한 후, 이 과정을 5회 반복하였고; 4) 선택된 하이퍼파라미터를 기반으로, 훈련 세트로부터 모델을 유도하고 시험 세트에 적용하였다. 그 다음, 시험 세트에 대한 성능 지표를 계산하였다. 이 과정을 각각의 분류기에 대해 5회 반복하였다.

[0235] STAMP 연구에서 가장 먼저 등록된 IL-23i 치료 환자를 IL-23i 분류기 훈련에 사용하였다. 기준시점 PASI 필터(없음, 6+, 8+ 및 10+)를 적용하여 분류기 성능에 대한 질환 중증도의 영향을 조사하였다. 앞서 언급된 기계 학습 접근법을 이용하여 분류기 훈련을 수행하였고 10배 교차검증을 이용하여 시험 성능을 평가하였다. IL-23i 분류기는 원하는 성능(> 85% PPV 및 > 85% 민감성)이 달성되면 잠겼다. 분류기 잠금 후 등록된 IL-23i 치료 환자를 독립적인 검증 세트로서 사용하였다.

[0236] **IL-17 분류기 개발**

[0237] 본원은 공개적으로 이용 가능한 데이터셋을 분석함으로써, IL-17i에 대한 건선 환자의 반응을 예측하는 17개 유전자의 목록을 개시한다. 요약하건대, 중등도 내지 중증 건선 환자(기준시점 PASI ≥ 10)를 브로달루맵으로 치료하였고 이 환자를 12주 동안 추적관찰하였다. PASI 측정을 기준시점 및 12주째 날에 수행하였고 12주 PASI75를 사용하여 환자의 치료 반응을 평가하였다. 병변 피부 생검 샘플 및 비병변 피부 생검 샘플을 기준시점 및 12주째 날에 채취하였다. 아피메트릭스 마이크로어레이 플랫폼을 이용하여 RNA 프로파일링을 수행하였다. 기준시점에서 채취된 병변 샘플을 예측 바이오마커 분석에 사용하였다.

[0238] 17개의 예측 유전자는 브로달루맵에 대한 환자의 반응과 음성 상관관계를 가졌다. 17개의 유전자는 STAMP 연구로부터의 RNASeq 데이터에 보고된 14개의 양상별 유전자 ID에 맵핑되었다. 14개 유전자 분류기를 STAMP 연구에서 검증하였다.

[0239] **TNF α i 분류기 개발**

[0240] NCBI 유전자 발현 오픈베이스(GEO) 데이터베이스(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 및 유럽 생물정보학 연구소(EMBL-EBI) 빅데이터 데이터베이스(<https://www.ebi.ac.uk/>)의 공개적으로 이용 가능한 데이터셋을 분류기 훈련 데이터셋으로서 사용하였다. 초기 데이터 선택을 위해, 생물체제 치료를 이용한 건선 환자 및 전사체 프로파일이라는 검색어를 사용하여 어레이 또는 시퀀싱 데이터를 식별하였다.

[0241] 하기 평가를 기반으로 유전자를 여과하기 위해 지도(supervised) 예측 바이오마커 선택을 개별 훈련 데이터에 적용하였다: 1) 유전자 발현과 환자 반응 사이의 상관관계; 2) 중간 유전자 발현 수준; 3) 유전자 발현 동적 범위; 4) 반응자와 비반응자의 평균 유전자 발현의 차이. TNF α i 반응자에서 하향조절된 유전자와 상향조절된 유전자의 비를 사용하여 TNF α i 치료 반응의 예측을 개발하였다.

[0242] **전향적 분류기 검증**

[0243] STAMP 연구에 등록된 환자를 이용하여 IL-23i, IL-17i 및 TNF α i 분류기를 독립적으로 검증하였다. 각각의 분류

기는 환자를 생물제제 클래스에 대한 반응자 또는 비반응자로서 구별되게 예측하였다. 반응은 12주째 날에 PASI75를 달성하는 것으로서 정의되었다. R 캐럿 팩키지의 confusionMatrix 함수를 이용하여 관련 통계자료와 함께 관찰된 클래스 및 예측된 클래스의 교차집계를 계산하였다.

(a) 연구 대상체의 특성

여전히 추적관찰 중인 38명의 환자를 포함하는 총 242명의 건선 환자를 데이터 잠금 시점에 STAMP 연구(도 7)에 등록하였다. STAMP는 건선 바이오마커 연구를 지원하기 위해 새로운 환자를 계속 등록하도록 설계된 적극적 모집 연구이다. 연구 대상체의 다양한 인구통계자료 및 임상 특징을 관찰하였다(표 3). 약물 클래스별로, 49.6%의 환자를 IL-23i로 치료하였고, 33.2%의 환자를 IL-17i로 치료하였고, 14.7%의 환자를 TNF α i로 치료하였고, 2.5%의 환자를 IL-12/23i로 치료하였다.

표 3

STAMP 연구 환자 인구통계자료 및 질환 특성

	환자 집단(N=242)
성별	242
남성	112 (46.3%)
여성	130 (53.7%)
인종	241
백인	193 (80.1%)
아시아인	19 (7.9%)
흑인 또는 아프리카계 미국인	16 (6.6%)
기타	13 (5.4%)
연령	241
	48.5 ± 13.7
체질량 지수	238
	31.9 ± 7.0
PASI	238
	11.1 ± 9.1
생물제제 클래스	238
IL-17 억제제	79 (33.2%)
IL-23 억제제	118 (49.6%)
IL-12/23 억제제	6 (2.5%)
TNFα 억제제	35 (14.7%)
건선 아형	239
플라크 건선	226 (94.6%)
건선성 관절염	9 (3.8%)
기타	4 (1.6%)
과거 생물제제 이력	214
생물제제 무경험	134 (62.6%)
지난 12 주 이내에 생물제제로 치료받음	50 (23.4%)
12 주 이상 전에 생물제제로 치료받음	30 (14.0%)

값은 환자의 n(%) 또는 평균 ± 표준편차이다.

[0247] 이 연구를 위해 처음에 식별된 242명의 환자들 중 185명의 환자들은 연구를 완료하였는데, 이때 연구 완료는 기준시점 및 12주 PASI 점수 둘 다가 수집되었음을 의미하고, 57명의 환자들은 스크리닝에 실패하였거나, 추적관찰 중에 사라졌거나, 여전히 추적관찰 중이었다. 185명의 환자들 중 177명의 환자들은 채취된 기준시점 DBP 샘플을 가진 반면, 8명의 환자들은 DBP 샘플 채취에 실패하였다. 이 서브세트의 167개의 샘플은 시퀀싱 데이터 QC 지표를 통과하였고 바이오마커 분석에 포함되었으며, 10개(5.4%, 10/177)의 샘플은 샘플 처리 또는 시퀀싱 데이터 QC에 실패하였다.

[0248] 환자 반응률은 전체 코호트에 대해 64.1%이었고 상이한 생물제제에 대해 47.6% 내지 72.5%이었다(표 4). 높은(기준시점 PASI ≥ 8) PASI 환자는 모든 약물 클래스에 걸쳐 낮은 PASI 환자보다 26.4% 더 높은 반응률을 가졌다.

표 4

건선 환자 반응률

생물제제	PASI 필터 없음	PASI ≥ 8	PASI < 8
모든 생물제제	64.1% (118/184)	74.3% (84/113)	47.9% (34/71)
IL-23i	64.1% (68/106)	70.8% (46/65)	53.7% (22/41)
IL-17i	72.5% (37/51)	84.8% (28/33)	50.0% (9/18)
TNF α i	47.6% (10/21)	63.6% (7/11)	30.0% (3/10)

[0249]

[0250] 높은(기준시점 PASI ≥ 8) PASI 환자를 예측 분류기 개발 및 검증에 사용하였다. IL-23i 치료 환자 집단을 2개의 서브세트로 나누고, 17명의 IL-23i 치료 환자들을 IL-23i 예측 분류기 훈련에 사용하였고 나머지 43명의 환자들을 전향적 검증에 사용하였다. 모든 높은 PASI IL-17i 및 TNF α i 환자들을 분류기 검증에 사용하였다.

[0251] (b) 훈련 세트에서 IL-23i 분류기 개발 및 성능

[0252] 9명의 반응자 및 8명의 비반응자를 포함하는 17명의 IL-23i 치료 높은 PASI(≥ 8) 환자의 서브세트를 IL-23i 예측 분류기 훈련에 사용하였다. 선형 회귀 모델에 의해 선택된 상위 50개의 특징을 사용하여 가장 성능이 좋은 모델을 glmnet에서 구축하였다. 시험 성능을 10배 교차검증으로 평가하였고, 양성 예측 값(PPV), 민감성 및 균형 잡힌 정확도는 각각 89.7%, 96.3% 및 91.9%이었다.

[0253] TNF α i 데이터 소스 및 예측 바이오마커 발견

[0254] 4개의 공개적으로 이용 가능한 데이터세트(표 5)를 확인하고 TNF α i 반응 분류기 개발에 사용하였다. 총 73명의 환자들 이 데이터세트에 포함되었고, 이들 중 58명의 환자들은 예측 바이오마커 발견을 위한 전사체 데이터 및 결과 평가 데이터 둘 다를 가졌다. 환자 결과를 12주 또는 16주 PASI75, 또는 조직학적 반응으로 평가하였다.

표 5

TNF α i 분류기 훈련을 위한 공개적으로 이용 가능한 데이터세트

ID	데이터세트 등록 #	공개된 년도	치료제	Pt 반응 기준	샘플 크기	전사체 프로파일링 플랫폼
#1	GSE85034	2017	아달리무맙	16 주 PASI75	14	일루미나 인간 HT-12 V4.0 발현 비드칩
#2	GSE11903	2009	에타너셉트	12 주에서의 조직학적 반응(표피 두께)	15	아피메트릭스 HG-U133A_2
#3	GSE117239	2019	에타너셉트	12 주 PASI75	34	아피메트릭스 HG- U133_Plus_2
#4	E-MTAB- 6556	2019	에타너셉트	12 주 PASI75	10	RNASeq

[0255]

[0256]

지도 예측 바이오마커 선택을 4개의 훈련 데이터세트에 적용하였다. 9개의 유전자가 적어도 2개의 데이터세트에서 TNF α i 반응을 예측하는 것으로서 확인되었다(표 6). 분류기의 결과물은 TNF α i 반응 예측 점수이었고; 이 점수화 시스템에서, 예측 점수가 낮을수록 환자가 TNF α i 치료에 반응할 가능성이 높아진다. 분류기 성능은 이 훈련 세트의 이용 시 각각 78.9%, 43.1% 및 63.7%의 PPV, 민감성 및 균형 잡힌 정확도를 보여주었다(표 7).

표 6

항- α 생물제제에 대한 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확인된 9 개 유전자의 목록

유전자 명칭	유전자 기호
코르네피에드(Cornefied) 외피 단백질 코르네필린(Cornefilin)	CNFN
카텝신 C	CTSC
글루코실세라미다제 베타 슈도유전자 1	GBAP1
세포 레티노산 결합 단백질 2	CRABP2
프로토키드헤린 7	PCDH7
웹티딜프롤릴 이소머라제 G	PPIG
Ras 관련 단백질 Rab-31	RAB31
보체 성분 3	C3
초기 성장 반응 1	EGR1

[0257]

표 7

훈련 세트에 대한 TNFai 분류기의 시험 성능

샘플 크기	58
반응자의 수	34
비반응자의 수	24
PPV	78.9%
NPV	51.3%
민감성	44.1%
특이성	83.3%
균형 잡힌 정확도	63.7%

[0258]

[0259] *Mind.Px* 분류기 검증

[0260] 전향적 검증에 포함된 95명의 환자들에 대한 환자 인구통계자료 및 질환 특성은 표 8에서 확인할 수 있다. 기준 시점 PASI≥8을 가진 환자만이 검증에 포함되었다. 3종의 분류기에 대한 양성 예측 값의 범위는 85.7% 내지 93.1%이었다(표 9). 관찰된 W12 PASI 변화와 예측된 약물 반응 사이의 상관관계를 평가하였다(도 8a 내지 8c).

표 8

분류기 검증 세트 환자 인구통계자료 및 질환 특성

	IL-23i 분류기 (N=43)	IL-17i 분류기 (N=31)	TNFai 분류기 (N=11)
성별			
남성	23 (53.5%)	21 (32.3%)	4 (36.4%)
여성	20 (46.5%)	10 (67.7%)	7 (63.6%)
인종			
백인	35 (81.4%)	23 (74.2%)	9 (81.8%)
기타	8 (18.6%)	8 (25.8%)	2 (18.2%)
연령			
	48.3 ± 16.9	48.9 ± 12.9	47.8 ± 13.4
체질량 지수			
	31.1 ± 7.5	32.1 ± 6.3	32.6 ± 5.2
PASI			
	15.9 ± 8.5	17.5 ± 12.6	14.8 ± 5.4
건선 아형			
플라크 건선	41 (97.6%)	31 (96.8%)	11 (100%)
기타	1 (2.4%)	1 (3.2%)	0 (0%)

[0261]

표 9

기준시점 PASI $\geq$ 8 을 가진 환자에 대한 3 종의 분류기의 분류기 검증 시험 성능

분류기	샘플 크기	반응자의 수	비반응자의 수	PPV	NPV	민감성	특이성	균형 잡힌 정확도
IL-23i 분류기	43	37	6	93.1%	28.6%	73.0%	66.7%	69.8%
IL-17i 분류기	31	26	5	92.3%	22.2%	46.2%	80.0%	63.1%
TNF α i 분류기	11	7	4	85.7%	75.0%	85.7%	75.0%	80.4%

[0262]

[0263]

66명의 중등도 내지 중증 질환 환자들(즉, PASI $\geq$ 10)에 대해 동일한 분석을 반복하였고, 이 더 작은 코호트에서 90% 내지 100%의 PPV와 함께 유사한 총 시험 성능을 관찰하였다(표 10).

표 10

기준시점 PASI $\geq$ 10 을 가진 환자에 대한 3 종의 분류기의 분류기 검증 시험 성능

분류기	샘플 크기	반응자의 수	비반응자의 수	PPV	NPV	민감성	특이성	균형 잡힌 정확도
IL-23i 분류기	35	30	5	95.7%	33.3%	73.3%	80.0%	76.7%
IL-17i 분류기	22	17	5	90.0%	33.3%	52.9%	80.0%	66.5%
TNF α i 분류기	9	7	2	100.0%	66.7%	85.7%	100.0%	92.9%

[0264]

[0265]

기준시점 PASI <8을 가진 환자도 분석하여 더 경미한 환자에서 분류기 성능을 측정하였다. 이 경우, 3종의 분류기에 대한 균형 잡힌 정확도는 44.4% 내지 52.8%이었고, 이는 개발된 분류기가 중등도 내지 중증 건선 환자에 최적화되었음을 시사한다.

[0266]

Mind.Px 예측 반응 출현율

[0267]

기준시점 DBP 샘플 및 완료된 RNASeq 시퀀싱 데이터를 가진 195명의 환자를 사용하여 모든 3종의 분류기(IL-23i, IL-17i 및 TNF α i)에 의한 환자의 예측 반응 출현율을 평가하였다(도 9 및 표 11). 개별적으로, 예측 반응 출현율은 IL-23i, IL-17i 및 TNF α i 분류기에 대해 각각 72.3%, 51.7% 및 67.1%이었다. 결정적으로, 99.5%(194/195)의 환자가 3종의 약물 클래스 중 적어도 하나에 대한 반응자로서 예측되었다. 3종의 약물 클래스의 모든 가능한 조합은 3종의 약물 클래스 모두에 대한 반응자로서 예측된 17.4%(34/195)의 환자, 3종의 약물 클래스 중 2종에 대한 반응자로서 예측된 56.9%(111/195)의 환자, 및 3종의 약물 클래스 중 1종에 대한 반응자로서 예측된 25.1%(49/195)의 환자로 표시되었다.

표 11

Mind.Px 는 STAMP 연구에 등록된 환자에서 반응 출현율을 예측하였다.

클래스	환자의 수	환자 퍼센트
모두에 반응하지 않음	1	0.5%
모두에 반응함	34	17.4%
IL17 & IL23 에 반응함	54	27.7%
IL17i & TNFai 에 반응함	10	5.1%
IL23i & TNFai 에 반응함	47	24.1%
IL23i 에만 반응함	6	3.1%
IL17i 에만 반응함	3	1.5%
TNFai 에만 반응함	40	20.5%

[0268]

[0269]

STAMP 연구 인구통계자료

[0270]

242명의 환자가 이 분석에 포함되었고, 이때 인구통계자료는 성별, 인종 및 연령에 관한 이전 연구와 대체로 일치하였다(표 3). 유사하게, 이 연구에서 평균 환자는 비만(BMI>30)이었고 평균 연령이 48.5세였다. 가장 흥미로운 점은 이 연구에서 대다수의 환자들(86%)이 생물제제 경험이 없거나 지난 12주 이내에 생물제제를 투여받지 않았다는 것이다. 많은 중등도 내지 중증 건선 환자들(생물제제에 노출되어 있다는 점을 고려할 때, 이 발견은 특히 놀라운 것이었지만, 생물제제 무경험 환자 대 생물제제 노출 환자의 분류기 반응의 분석은 이 환자 군들 중 어느 한 군에서 알고리즘의 예측 값 사이의 차이가 없음을 보여주었다.

[0271]

분류기 개발 및 검증

[0272]

STAMP 연구에 등록된 환자를 이용하여 최종 IL-23i 분류기를 개발하고 검증하였다. 총 IL-23i 등록 환자의 서브 세트를 훈련 세트로서 사용하였고 코호트의 나머지 환자를 분류기 검증에 사용하였다. 훈련 세트와 시험 세트는 동일한 방식으로 처리된 샘플 및 데이터를 사용한 동일한 연구로부터 유래하였기 때문에, 훈련 세트로 개발한 분류기는 추가 정규화에 대한 필요성 없이 시험 세트에 적용될 수 있다.

[0273]

IL-17i 및 TNF α i 분류기의 개발을 위한 전략은 IL-23i 분류기와 상이하였다. STAMP 연구에서 IL-17i 및 TNF α i 환자 샘플 크기는 IL-23i 환자보다 더 작았고 별도의 훈련 세트와 시험 세트로 나누기에 충분하지 않았으므로, 공개적으로 이용 가능한 데이터세트를 이 두 분류기의 훈련에 사용하였다. 공개 데이터로부터의 훈련 세트는 샘플 채취 방법(편치 생검 대 진피 패치), RNA 준비 프로토콜, 전사체 프로파일링 방법(어레이 대 시퀀싱 기반)을 포함하는 일부 측면에서 시험 세트와 유의미하게 상이하였다는 점을 주목하였다. 훈련 세트의 이러한 상이한 성질로 인해, 훈련 세트는 주로 특징 선택을 위해서만 사용되었다. 일단 예측 유전자가 확인되면, 유전자 발현 값 또는 유전자 발현 값의 비를 이용하는 단순화된 알고리즘을 예측 분류기로서 적용하였다. STAMP 환자의 예측 점수로부터 계산된 백분위수 데이터 값을 사용하여 검증 전에 컷오프를 사전설정하였고, 이것은 오버피팅(overfitting)의 위험을 최소화하면서 분류기 성능을 평가할 수 있게 하였다.

[0274]

여기서, 12주 PASI75가 환자 결과 측정치로서 사용되었다. 더 우수한 반응(예를 들어, PASI90 또는 PASI100)이 필요한 임상 환경에서, 분류기는 특정 임상 컷오프 조절을 이용하여 이 환자 군을 확인하는 데 잠재적으로 사용될 수 있다. "수퍼 반응자" 또는 "수퍼 비반응자"를 결정적으로 확인하기 위한 추가 분류기 개발이 진행 중이며 적절한 시기에 보고될 것이다.

[0275]

3종의 분류기 모두를 기준시점 PASI ≥ 8 환자에 대해 검증하였다. 그러나, 시작 PASI 점수가 낮은 환자에서 이 분류기들의 예측 값은 제한되었다. 이것은 각각의 생물제제에 대한 중추적 임상연구에 등록된 환자의 유형을 일치시키기 위해 PASI가 높은(≥ 10) 환자를 훈련 세트로서 사용하여 3종의 분류기를 개발하였기 때문일 수 있다. 경증 환자는 생물학적으로 상이한 전사체 바이오마커를 가질 가능성이 있다. 대안적으로, 시작 PASI 점수가 낮

은 환자에서, 반응 확인 측정치(PASI75)의 신뢰도는 이 측정치의 감소된 동적 범위를 고려할 때 낮다.

[0276] 다른 임상 변수는 건선 환자를 계층화하기 위해 이전에 사용되었거나 좋지 않은 결과와 상관관계를 가졌다. 특히, BMI 및 연령은 생물학적 치료 반응을 평가하는 데 있어서 임상 예측 값을 가진 것으로서 보고되었다. 분류기에서 가능한 오르토고날(orthogonal) 입력 변수로서 BMI 및 연령의 예측 유의성을 시험한다. 그러나, 예측 모델을 탐색할 때 이들 중 어느 한 변수를 공변량으로서 추가하였을 때, 예측 정확도 또는 양성 예측 값의 개선은 관찰되지 않았다.

[0277] 바이오마커 예측 반응의 출현율은 이 시험의 핵심 특징을 드러내었다. 시험된 환자들에서, 시험된 195명의 환자들 중 단 한 명의 환자만이 상기 3종의 생물제제 약물 클래스들 중 임의의 생물제제 약물 클래스에 반응하지 않을 것으로 예측되었다. 이 데이터는 건선의 치료 및 관리가 생물제제의 도입 이후 현저히 변화되었다는 널리 받아들여지는 임상 사실과 일치하고; 거의 모든 환자들(상기 3종의 생물제제 클래스 중 하나에 반응할 것이다). 그러나, 생물제제 처방 행위와 시험으로부터 예측된 생물제제 클래스 사이에 단절이 관찰되었다. 관찰 STAMP 연구의 등록자들 중 14.7%만이 TNF α i 생물제제를 처방받았지만(환자 코호트의 49.6%), 환자 집단의 67%는 이 클래스에 반응할 것으로 예측되었다.

[0278] 본원은 피부 바이오마커 패치 플랫폼을 기계 학습 방법과 조합함으로써, 생물제제(TNF α i, IL17i 또는 IL23i)에 대한 건선 환자 반응을 높은 양성 예측 값으로 예측할 수 있는 실행 가능한 기계 학습 기반 정밀 의학 시험을 개시한다. 흥미롭게도, 전체 환자 코호트를 조사하였을 때, 거의 모든 환자들(적어도 하나의 생물제제 클래스에 반응할 것으로 예측됨으로써, 건선 치료에 있어서 생물제제 약물의 엄청난 효능을 강조하였다. 기계 학습 알고리즘 개발과 조합된 기준 바이오마커를 사용하여 소정의 환자에 대한 적절한 생물제제를 처음으로 처방할 수 있다. 이 시험은 의료 시스템에 대한 막대한 비용 절감으로도 해석되면서 환자 결과 개선으로 이어질 수 있다. 이 시험은 건선의 생물제제 치료에 대한 시행착오 접근법을 효과적으로 최소화할 수 있고 건선 환자의 관리에 대한 맞춤형 의학을 제공하는 강력한 수단을 의사, 환자 및 비용지불자에게 제공할 수 있다고 생각된다.

[0279] 실시예 7. 기계 학습 분류기를 사용한 건선 생물제제에 대한 반응의 효율적인 예측

[0280] 미국에서, 건선은 인구의 3% 이상에 영향을 미치고 가장 빈번하게 사용되는 약물 사용 시 치료 비용이 연간 \$87,585 내지 \$366,645일 수 있다. 일반적으로, 치료에 대한 임상 반응이 유의미하기 위해서는 12주 내지 16주가 소요되며, 현재 이용 가능한 요법의 효능은 적어도 부분적으로는 특정 치료 요법에 대한 반응을 예측할 수 없기 때문에 30% 내지 80%이다.

[0281] 본원은 기준시점 전사체를 처음 치료한 지 12주 후 생물제제 약물에 대한 임상 반응과 비교함으로써, 건선 환자의 치료에 사용되는 생물제제(항-IL-17, 항-IL-23)에 대한 반응을 예측하는 알고리즘(Mind.Px)을 개발하였다. (75명의 환자들 중) 반응을 보인 62명의 환자들은 0.75 이상의 건선 면적 및 중증도 지수 변화를 가진 반면, 비반응자는 -0.2 내지 0.75의 건선 면적 및 중증도 지수(PASI) 변화를 가졌다. 선형 회귀 모델링을 이용한 교차검증은 분류기 성능을 평가하기 위한 컷오프로서 PASI75를 사용하여 0.71의 균형 잡힌 예측 정확도를 보여주었다. 0.95의 양성 예측 값이 달성되었다. 총 17개의 유전자(항-IL-17 생물제제에 대한 환자 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확정되었다. 대안적으로, 동일한 반응 기준(N=17)을 사용하여 항-IL-23 생물제제를 제공받은 환자를 사용하여 전향적 분류기를 구축하였다. 이 분류기에서 사용하기 위해 총 27개의 유전자를 확정하였고 분류기들 다에 대한 양성 예측 값(PPV)은 100%이었다.

[0282] 생물제제 예측을 위한 분류기는 주로 오르토고날 바이오마커를 활용하였고 높은 PPV를 달성하였다. Mind.Px의 사용은 건선 환자의 더 우수한 결과를 제공하고 의료 시스템에 대한 비용을 유의미하게 감소시켰다.

[0283] 인간 대상체 모집 및 등록

[0284] 활성 건선 및 직경 >2 cm의 병변을 가진 대상체를 등록하였다. 모든 절차는 독립적인 임상시험 심사위원회(Integreview, 텍사스주 오스틴)의 승인을 받았으며 연구 전에 모든 대상체들로부터 서면 동의서를 얻었다. 이 연구는 통계적 유의성을 확보하지 못하였다. 각각의 대상체에 대해, 하나의 민테라 피부 바이오마커 패치(DBP)를 병변 피부에 적용하였다. 샘플을 제조업체의 설명서에 따라 저장 완충제가 함유된 바이알에 즉시 넣고 처리할 때까지 4°C에서 보관하였다. 처리는 Mind.Px 키트 설명서에 따라 진행되었다.

[0285] 피부 바이오마커 패치 적용

[0286] 패치를 피부에 적용하기 위해, 주문제작된 스프링 로딩 어플리케이션을 사용하였다. 이 어플리케이션은 대상체 및 사용자 전체에 걸쳐 인가 압력을 표준화하는 역할을 하였다. 로딩된 어플리케이션을 피부에 대고 방아쇠를

눌러 패치를 피부에 적용하였다. 그 다음, 패치를 의료용 테이프의 고리로 5분 동안 피부에 대고 제자리에 고정하였다. 이 시간 후, 패치를 대상체로부터 제거하고 저장 완충제(LiCl, Triton X-100, Tris-EDTA)에 즉시 넣고 처리할 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0287] **피부 바이오마커 패치 처리**

[0288] 대상체로부터 채취한 지 72시간 이내에 피부 전사체를 처리하였다. 적용된 DBP를 냉각된 1X PBS로 세척한 다음, 상기 패치를 질소 스트립 하에서 건조함으로써 샘플을 준비하였다. 이어서, 건조된 DBP를 1분 동안 95℃로 사전 설정된 가열 블록 위에 배치한 후, 95℃로 미리 가열된 50 μ l의 PCR 등급 물을 1분 동안 마이크로니들 어레이에 적용하여 DBP로부터 결합된 mRNA를 용출하였다. 그 다음, 제조업체의 설명서에 따라 타카라 SMART-Seq® 단일 세포 키트를 사용하여 이 용출된 mRNA를 cDNA로 전환시켰다. 이어서, 증폭된 cDNA 샘플을 qPCR 또는 NGS 분석 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0289] **시퀀싱 절차**

[0290] 증폭된 cDNA는 표준 절차에 따라 상업적 공급업체(Psomagen, Inc., 메릴랜드주 록빌)에 의해 시퀀싱되었다. 제조업체의 설명서에 따라 일루미나 넥스테라 DNA Flex 키트를 사용하여 라이브러리 제조를 달성하였다. 이어서, 샘플당 40 M 리드의 시퀀싱을 위해, 제조된 색인화 라이브러리를 리드 길이가 150 PE인 NovaSeq6000 S4에 로딩하였다. 시퀀싱 동안, 품질 점수(Q30)를 75% 이상으로 유지하였다. 실행이 완료되었을 때, FASTQ 파일 품질을 FASTQC로 확인하고 Trim_galore 프로그램으로 트리밍하였다. hisat2 프로그램을 사용하여 트리밍된 FASTQ를 인간 기준 게놈 GRCh38에 정렬하고 맵핑하였다. FeatureCounts 프로그램 및 호모 사피엔스 GRCh38.84.gtf를 사용하여 각각의 양상블 유전자 ID에 대해 리드의 수를 세었다. 바이오컨덕터 패키지 edgeR을 사용하여 RNA 발현 분석을 더 처리하였다. filterByExpr를 사용하여 유전자를 여과한 후, logCPM(백만 리드당 카운트)을 계산하였다. R에서 ggplot2 및 heatmap.2 함수를 이용하여 도표를 만들었다. 양상블 유전자의 총 수에 대한 검출된 유전자의 비(>0 카운트)를 이용하여 검출된 유전자의 퍼센트를 측정하였다.

[0291] **생물정보학 절차**

[0292] DNA 시퀀싱 데이터에 대한 클라우드 기반 데이터 분석 및 관리 플랫폼인 DNAnexus® 시스템(캘리포니아주 마운틴뷰)에서 R-스크립트로서 Mind.Px 알고리즘을 실행하였다. 항-IL-17 및 항-IL-23 반응 예측에 대한 컷오프 점을 R-스크립트에서 정의하고 실행하였다.

[0293] 3종의 3상 무작위 임상시험: AMAGINE-1, AMAGINE-2 및 AMAGINE-3으로부터 데이터를 수집하였다. 종점은 12주째 날 PASI75이었다. 병변 부위로부터 생검 샘플을 채취하였다. 아피메트릭스 플랫폼을 이용하여 생검 샘플에 대해 전사체 분석을 수행하였다. 62명의 반응자(83%) 및 12명의 비반응자(16%)를 포함하는 총 75명의 환자들을 브로달루맵으로 치료하였다. 민데라 지원 STAMP(민데라 패치의 적용을 통한 연구) 시험에 등록된 총 17명의 환자들도 분석에 포함시켰다(STAMP는 민데라 코포레이션(Mindera Corp.)의 지원을 받는 진행 중인 임상시험이다). 등록명단은 항-IL-17 또는 항-IL-23 생물제제로 치료될 건선 환자를 포함하였다. 치료에 대한 환자 반응을 예측할 수 있는 분자 바이오마커를 확인하기 위해 치료 전과 치료 후 여러 번 환자의 피부로부터 RNA 샘플을 채취하였다. 기준시점 샘플을 모든 환자들로부터 채취하였다.

[0294] 시퀀싱 후, RNA-Seq FASTQ 파일을 Trim_galore 프로그램으로 트리밍한 다음, HISAT2 프로그램을 사용하여 인간 기준 게놈 GRCh38에 맵핑하였다. FeatureCounts 프로그램 및 인간 GRCh38.84.gtf를 사용하여 각각의 양상블 유전자 ID에 대한 리드의 수를 세었다. 바이오컨덕터 패키지 edgeR을 사용하여 RNA 발현 분석을 더 처리하였다. filterByExpr를 사용하여 유전자를 여과한 후, logCPM(백만 리드당 카운트)을 계산하였다. 표준 R 함수와 비교된 ggplot2 및 heatmap.2 함수로 도표를 만들었다. 검출된 유전자의 비(>0 카운트)를 양상블 유전자의 총 수로 나눈 값을 사용하여 검출된 유전자의 퍼센트를 측정하였다. RNA-Seq 분석의 개요는 도 12에 요약되어 있다.

[0295] **피부 바이오마커 패치 플랫폼 데이터**

[0296] 본원은 피부 바이오마커 패치를 사용하여 피부로부터 RNA를 간단히 신속하게 통증 없이 추출할 수 있게 하는 플랫폼을 개시한다. 추출된 RNA의 후속 차세대 시퀀싱은 본 발명자들로 하여금 시험의 정확한 순간에 피부의 유전자 및 전사체 스냅샷을 촬영할 수 있게 하였다. 그 다음, 이 풍부한 환자 특이적 데이터세트를 기계 학습 알고리즘으로 분석하여, 데이터의 정교한 질문을 할 수 있다(예를 들어, 치료제 선택 및 치료 전에 환자에 적절한 생물제제 약물을 예측함).

[0297] 민데라 데이터베이스에서 66명의 환자들로부터 민데라 패치 대 편치 생검을 사용하여 병변 샘플 대 비병변 샘플

을 비교하였다(도 13). 병변 피부와 비병변 피부 사이에 대응표본 t-검정을 수행한 후 가장 높은 분산(예를 들어, 군 사이의 가장 우수한 P 값)을 가진 데이터에 대한 히트맵을 작도함으로써 전체 전사체를 분석하였다. 중요한 것은 바이오마커 데이터가 민테라 패치 샘플과 펀치 생검 샘플 사이에 동등하였다는 것이다. 가장 높은 분산을 가진 30개의 유전자를 선택하였고, 시각화를 위해 비지도(unsupervised) 클러스터링을 수행하여, 동일한 환자에서 병변 피부와 비병변 피부의 현저한 구별을 보여주었다.

[0298] 본원은 건선 환자에서 생물제제(항-IL-17, 항-IL-23) 치료에 대한 반응을 예측하는 알고리즘도 개시한다. 토말린 연구진(Tomalín et al (2020))의 데이터셋을 사용하여, 건선 환자에서 항-IL-17 생물제제를 사용한 치료에 대한 반응과 상관관계를 가진 RNA 발현 수준을 가진 유전자를 확인하였다.

[0299] 이 코호트에서, (75명의 환자들 중) 반응을 보인 62명의 환자들은 0.75 이상의 PASI 변화를 가진 반면, 비반응자는 -0.2 내지 0.75의 PASI 변화를 가졌다. 오버피팅의 가능성을 최소화하기 위해 건선(병변 대 비병변)에 대해 차등적으로 발현된 유전자를 사용하여 데이터셋을 미리 여과하였다. 선형 회귀 모델링을 이용한 교차검증은 분류기 성능을 평가하기 위한 컷오프로서 PASI75를 사용하여 0.71의 균형 잡힌 예측 정확도를 보여주었다. 중요한 것은 0.95의 양성 예측 값이 달성되었다는 것이다. StepAIC(아카이케 정보 기준(Akaike Information Criteria)) 선형 회귀 모델링을 이용하여 총 17개의 유전자를 브로달루맵 치료에 대한 환자 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확정하였다(표 12). 아카이케 정보 기준은 샘플 외 예측 오류의 추정치이므로, 소정의 데이터셋에 대한 통계적 모델의 상대적 품질이다. 아카이케 정보 기준은 소정의 모델에 의해 손실된 정보의 상대적 양을 추정한다: 모델이 손실하는 정보가 적을수록 그 모델의 품질은 높아진다.

표 12

항-IL17 생물제제에 대한 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확인된 17 개 유전자의 목록

아피메트릭스 ID	유전자 명칭	유전자 기호
210413_x_at	서핀(serpin) 펩티다제 억제제, 분기군 B(오브알부민), 구성원 3 /// 서핀 펩티다제 억제제, 분기군 B(오브알부민), 구성원 4	SERPINB3 /// SERPINB4
232170_at	S100 칼슘 결합 단백질 A7A	S100A7A
209719_x_at	서핀 펩티다제 억제제, 분기군 B(오브알부민), 구성원 3	SERPINB3
203691_at	펩티다제 억제제 3, 피부 유래	PI3
209125_at	케라틴 6A	KRT6A
212531_at	리포칼린 2	LCN2
207356_at	데펜신(defensin), 베타 4A /// 데펜신, 베타 4B	DEFB4A // DEFB4B
214549_x_at	작은 프로린 풍부 단백질 1A	SPRR1A
220322_at	인터류킨 36, 감마	IL36G
202086_at	믹소바이러스(인플루엔자 바이러스) 내성 1, 인터페론 유도성 단백질 p78(마우스)	MX1
202411_at	인터페론, 알파 유도성 단백질 27	IFI27
206488_s_at	CD36 분자(트롬보스폰딘 수용체)	CD36
209555_s_at	CD36 분자(트롬보스폰딘 수용체)	CD36
208650_s_at	CD24 분자	CD24
208651_x_at	CD24 분자	CD24
266_s_at	CD24 분자	CD24
203233_at	인터류킨 4 수용체	IL4R

[0300]

[0301] 이들 17개의 유전자에 대한 발현 데이터로부터 히트맵을 생성하였다(도 14). 각각의 열은 환자로부터 채취된 기준시점 샘플이다. 왼쪽에서 오른쪽으로 환자들을 낮은 PASI 변화부터 높은 변화까지 분류하였다. 상단의 파란색 막대는 12명의 비반응자(W12 PASI 변화 <0.75)를 보여주고; 노란색 막대는 62명의 반응자(W12 PASI 변화 >0.75)를 보여준다. 히트맵에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응자 환자의 서브세트(맨 오른쪽)은 대다수의 유전자들의 강한 하향조절(파란색)을 가졌고, 이는 항-IL-17 치료에 대한 환자 반응을 예측하기 위해 이 17개의 유전자를 사용할 수 있음을 암시한다. 이 17개의 유전자의 하향조절은 치료에 대한 더 우수한 반응을 표시하는 반면, 상향조절은 더 나쁜 반응을 표시하였다.

[0302]

항-IL-23 생물제제를 제공받은 환자를 사용하여 동일한 분석을 전향적으로 수행하였다. 이 코호트는 민테라에 의해 수행된 STAMP 시험에 등록된 환자들로부터 유래하였다. 17명의 환자들로 이루어진 이 코호트에서, 5명의 환자들은 12주까지 PASI75 반응을 달성한 반면, 12명의 환자들은 이 수준의 반응을 달성하지 못하였다. 회귀 모델링을 이용한 교차검증은 분류기 성능을 평가하기 위한 컷오프로서 PASI75를 사용하여 0.70의 균형 잡힌 예측 정확도를 보여주었다. 중요한 것은 1.00의 양성 예측 값이 달성되었다는 것이다. 총 50개의 유전자가 항-IL-23 생물제제 치료에 대한 환자 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확인되었다(표 13).

표 13

항-IL23 생물제제에 대한 반응과 상관관계를 가진 것으로서 확인된 50 개 유전자의 목록

양상불 유전자 ID	유전자 기호
ENSG00000237973	MTCO1P12
ENSG00000248527	MTATP6P1
ENSG00000171603	CLSTN1
ENSG00000162493	PDPN
ENSG00000187942	LDLRAD2
ENSG00000241720	AL158847.1
ENSG00000134202	GSTM3
ENSG00000169509	CRCT1
ENSG00000235942	LCE6A
ENSG00000135916	ITM2C
ENSG00000170275	CRTAP
ENSG00000145040	UCN2
ENSG00000073282	TP63
ENSG00000124882	EREG
ENSG00000173221	GLRX
ENSG00000134986	NREP
ENSG00000197948	FCHSD1
ENSG00000151914	DST
ENSG00000078399	HOXA9
ENSG00000091136	LAMB1
ENSG00000101825	MXRA5
ENSG00000186918	ZNF395
ENSG0000019549	SNAI2
ENSG00000159899	NPR2
ENSG00000137098	SPAG8
ENSG00000160360	GPSM1
ENSG00000175274	TP53I11
ENSG00000165912	PACSIN3
ENSG00000077498	TYR
ENSG00000036672	USP2
ENSG00000108179	PPIF
ENSG00000271880	AGAP11
ENSG00000151303	AL136982.1

[0303]

ENSG00000261011	AL136982.4
ENSG00000229969	AL136982.2
ENSG00000271573	AL136982.5
ENSG00000170430	MGMT
ENSG00000197757	HOXC6
ENSG00000198056	PRIM1
ENSG00000139233	LLPH
ENSG00000084110	HAL
ENSG00000198431	TXNRD1
ENSG00000257732	AC089983.1
ENSG00000255150	EID3
ENSG00000165799	RNASE7
ENSG00000129562	DAD1
ENSG00000184916	JAG2
ENSG00000140859	KIFC3
ENSG00000103056	SMPD3
ENSG00000161714	PLCD3

[0304]

[0305]

본원은 몇 분 만에 건선 환자로부터 통증 없이 바이오마커 샘플을 채취하는 단순한 최소 침습적 패치를 이용하는 플랫폼을 개시한다. Mind.Px 시험은 환자 데이터를 대규모로 수집할 수 있는 능력을 갖고, 고정밀 분자 시험과 조합될 때 뛰어난 민감성 및 특이성을 가진 강력한 플랫폼을 생성한다. 이 플랫폼의 사용은 잠재적으로 특히 비싼 치료제에 대한 반응의 예측에 적용될 때 건선 치료에 대한 현재 시행착오 접근법을 효과적으로 제거함으로써 의료 시스템에 대한 막대한 비용 절감 효과를 가져올 수 있다.

[0306]

Mind.Px를 사용하여 포획한 바이오마커는 DNA, RNA, 단백질 및 소분자를 포함한다. 특히, 잘 특징규명된, 만성 피부 질환에서의 RNA의 역할은 환자의 유전 마커와, 상이한 약물 클래스에 대한 반응 사이에 누락된 예측 연결을 제공하는 데 이용되어 왔다. 환자의 건선 병변으로부터 RNA를 포획함으로써, 차세대 시퀀싱을 이용하여 시험 샘플당 7000개 이상의 바이오마커를 평가한다. 의료 제공자와 비용지불자는 이 바이오마커 분석의 결과를 사용하여, 생물체제 약물 클래스에 대한 개별 환자의 반응을 그 작용제 클래스의 작용 기작으로 예측함으로써 치료제 선택을 최적화할 수 있다. Mind.Px의 사용은 더 우수한 결과를 제공하고 의료 시스템에 대한 비용을 유의미하게 감소시켰다.

[0307]

이 연구에서 개발된 분류기의 분석은 환자가 초기 노출 전에 생물체제 약물에 반응할 것인지를 평가하는 데 있어서 높은 양성 예측 값을 입증하였다. 실제로, 분류기 둘 다에서 >90% 양성 예측 값이 달성될 수 있었고, 이는 의료 실무 및 건선 환자의 치료에 유의미한 영향을 미칠 수 있다. 흥미롭게도, 알고리즘들 사이의 바이오마커 세트의 비교는 약간의 중첩(항-IL-17 분류기와 항-IL-23 분류기 사이에 적어도 2개의 유전자 중첩)을 보여주었다.

[0308]

표 14는 건선을 치료하는 데 있어서 하나 이상의 생물체제의 효과를 확인하기 위한 분류기로서 사용될 수 있는 유전자의 목록을 보여준다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 건선을 앓고 있는 대상체가 IL-17, IL-23 또는 TNF α 매개 치료제에 양성으로 반응할 것인지를 확인하는 것에 관한 것으로, 표 14로부터 선택된 적어도 5개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 17개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 7개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 8개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 9개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 10개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 11개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 12개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 13개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 14개의 유전자, 표 14로부터 선택된 6개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 15개의 유전자, 표 14로부터

[illegible]

유전자, 표 14로부터 선택된 11개의 유전자, 표 14로부터 선택된 12개의 유전자, 표 14로부터 선택된 13개의 유전자, 표 14로부터 선택된 14개의 유전자, 표 14로부터 선택된 15개의 유전자, 표 14로부터 선택된 16개의 유전자 또는 표 14로부터 선택된 17개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 25개의 유전자, 표 14로부터 선택된 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 30개의 유전자, 표 14로부터 선택된 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 35개의 유전자, 표 14로부터 선택된 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 표 14로부터 선택된 20개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 30개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 35개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 35개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자, 표 14로부터 선택된 35개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 35개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 표 14로부터 선택된 35개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자, 표 14로부터 선택된 40개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 표 14로부터 선택된 40개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자, 또는 표 14로부터 선택된 45개의 유전자 내지 표 14로부터 선택된 50개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 20개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자, 표 14로부터 선택된 35개의 유전자, 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 45개의 유전자, 또는 표 14로부터 선택된 50개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표 14로부터 선택된 적어도 20개의 유전자, 표 14로부터 선택된 25개의 유전자, 표 14로부터 선택된 30개의 유전자, 표 14로부터 선택된 35개의 유전자, 표 14로부터 선택된 40개의 유전자, 표 14로부터 선택된 45개의 유전자 또는 표 14로부터 선택된 50개의 유전자의 존재, 부재 또는 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

표 14

아피메트릭스 ID	유전자 기호	공개 ID	양상불 유전자 ID	건선에서의 유전자 조절
1405_i_at	CCL5	M21121	ENSG00000271503	건선에서 상향조절됨
1552312_a_at	MFAP3	NM_005927	ENSG00000037749	건선에서 상향조절됨
1552378_s_at	RDH10	NM_172037	ENSG00000121039	건선에서 상향조절됨
1552480_s_at	PTPRC	NM_080923	ENSG00000081237	건선에서 상향조절됨
1552497_a_at	SLAMF6	NM_052931	ENSG00000162739	건선에서 상향조절됨
1552536_at	VTI1A	NM_145206	ENSG00000151532	건선에서 상향조절됨
1552639_at	KLHDC7B	NM_138433	ENSG00000130487	건선에서 상향조절됨
1552671_a_at	SLC9A7	NM_032591	ENSG00000065923	건선에서 상향조절됨
1552980_at	HAS3	NM_138612	ENSG00000103044	건선에서 상향조절됨
1553055_a_at	SLFN5	NM_144975	ENSG00000166750	건선에서 상향조절됨
1553081_at	WFDC12	NM_080869	ENSG00000168703	건선에서 상향조절됨
1553102_a_at	CCDC69	BC016647	ENSG00000198624	건선에서 상향조절됨
1553423_a_at	SLFN13	NM_144682	ENSG00000154760	건선에서 상향조절됨
1553514_a_at	VNN3	NM_078625	ENSG00000093134	건선에서 상향조절됨
1553589_a_at	PDZK1IP1	NM_005764	ENSG00000162366	건선에서 상향조절됨

[0309]

1553602_at	MUCL1	NM_058173	ENSG00000172551	건선에서 상향조절됨
1553695_a_at	NLRX1	NM_170722	ENSG00000160703	건선에서 상향조절됨
1553906_s_at	FGD2	NM_173558	ENSG00000146192	건선에서 상향조절됨
1554008_at	OSMR	BC010943	ENSG00000145623	건선에서 상향조절됨
1554016_a_at	USB1	BC006291	ENSG00000103005	건선에서 상향조절됨
1554079_at	GALNT18	BC037341	ENSG00000110328	건선에서 상향조절됨
1554119_at	USB1	BC010099	ENSG00000103005	건선에서 상향조절됨
1554240_a_at	ITGAL	BC008777	ENSG00000005844	건선에서 상향조절됨
1554406_a_at	CLEC7A	BC013385	ENSG00000172243	건선에서 상향조절됨
1554440_at	KIAA0513	BC030280	ENSG00000135709	건선에서 상향조절됨
1554452_a_at	HILPDA	BC001863	ENSG00000135245	건선에서 상향조절됨
1554462_a_at	DNAJB9	AF115512	ENSG00000128590	건선에서 상향조절됨
1554676_at	SRGN	BC022313	ENSG00000122862	건선에서 상향조절됨
1554707_at	SPATA6L	BC034293	ENSG00000106686	건선에서 상향조절됨
1554708_s_at	SPATA6L	BC034293	ENSG00000106686	건선에서 상향조절됨
1554724_at	SLC6A11	BC036083	ENSG00000132164	건선에서 상향조절됨
1554795_a_at	FBLIM1	BC019895	ENSG00000162458	건선에서 상향조절됨

[0310]

1554807_a_at	SPIRE1	BC016825	ENSG00000134278	건선에서 상향조절됨
1554822_at	PHTF2	BC022419	ENSG00000006576	건선에서 상향조절됨
1554899_s_at	FCER1G	BC020763	ENSG00000158869	건선에서 상향조절됨
1554903_at	FRMD8	BC033851	ENSG00000126391	건선에서 상향조절됨
1554905_x_at	FRMD8	BC033851	ENSG00000126391	건선에서 상향조절됨
1554906_a_at	MPHOSPH6	BC029395	ENSG00000135698	건선에서 상향조절됨
1554914_at	PLA2G4D	BC034571	ENSG00000159337	건선에서 상향조절됨
1554920_at	SCEL	BC020726	ENSG00000136155	건선에서 하향조절됨
1554921_a_at	SCEL	BC020726	ENSG00000136155	건선에서 하향조절됨
1555019_at	CDHR1	BC038799	ENSG00000148600	건선에서 하향조절됨
1555120_at	CD96	BC020749	ENSG00000153283	건선에서 상향조절됨
1555167_s_at	NAMPT	BC020691	ENSG00000105835	건선에서 상향조절됨
1555213_a_at	CLEC7A	AF400602	ENSG00000172243	건선에서 상향조절됨
1555214_a_at	CLEC7A	AF400602	ENSG00000172243	건선에서 상향조절됨
1555292_at	STRIP2	BC019064	ENSG00000128578	건선에서 상향조절됨
1555326_a_at	ADAM9	AF495383	ENSG00000168615	건선에서 상향조절됨

[0311]

1555407_s_at	FGD3	BC032232	ENSG00000127084	건선에서 상향조절됨
1555416_a_at	ALOX15B	AF468053	ENSG00000179593	건선에서 상향조절됨
1555464_at	IFIH1	BC046208	ENSG00000115267	건선에서 상향조절됨
1555480_a_at	FBLIM1	AF459643	ENSG00000162458	건선에서 상향조절됨
1555628_a_at	HAVCR2	BC020843	ENSG00000135077	건선에서 상향조절됨
1555638_a_at	SAMSN1	AF519621	ENSG00000155307	건선에서 상향조절됨
1555745_a_at	LYZ	U25677	ENSG00000090382	건선에서 상향조절됨
1555756_a_at	CLEC7A	AF400600	ENSG00000172243	건선에서 상향조절됨
1555759_a_at	CCL5	AF043341	ENSG00000271503	건선에서 상향조절됨
1555778_a_at	POSTN	AY140646	ENSG00000133110	건선에서 하향조절됨
1556122_at	RAB11B-AS1	CA431092	ENSG00000269386	건선에서 상향조절됨
1556123_a_at	RAB11B-AS1	CA431092	ENSG00000269386	건선에서 상향조절됨
1556263_s_at	PWRN1	AK058147	ENSG00000259905	건선에서 상향조절됨
1556346_at	COTL1	AJ227860	ENSG00000103187	건선에서 상향조절됨
1556606_at	NAV2	BU739339	ENSG00000166833	건선에서 상향조절됨
1557049_at	BTBD19	BQ183759	ENSG00000222009	건선에서 상향조절됨
1557078_at	SLFN5	AK054668	ENSG00000166750	건선에서 상향조절됨

[0312]

1557116_at	APOL6	BM980001	ENSG00000221963	건선에서 상향조절됨
1557236_at	APOL6	BF512806	ENSG00000221963	건선에서 상향조절됨
1557275_a_at	TLCD2	BF726849	ENSG00000185561	건선에서 상향조절됨
1557285_at	AREG	AI891075	ENSG00000109321	건선에서 상향조절됨
1557309_at	DENND1B	BC016588	ENSG00000213047	건선에서 상향조절됨
1557389_at	SH3PXD2A- AS1	AK056784	ENSG00000280693	건선에서 상향조절됨
1557458_s_at	SHB	BU685917	ENSG00000107338	건선에서 상향조절됨
1557609_s_at	TBC1D12	AW188458	ENSG00000108239	건선에서 상향조절됨
1557636_a_at	C7orf57	BC031107	ENSG00000164746	건선에서 상향조절됨
1557890_at	STXBP5-AS1	BC035182	ENSG00000233452	건선에서 상향조절됨
1558105_a_at	SLC9A7	AK096921	ENSG00000065923	건선에서 상향조절됨
1558201_s_at	SLC4A1AP	AI889922	ENSG00000163798	건선에서 상향조절됨
1558217_at	SLFN13	AK074465	ENSG00000154760	건선에서 상향조절됨
1558290_a_at	PVT1	BG200951	ENSG00000249859	건선에서 상향조절됨
1558393_at	KRT7	BC042076	ENSG00000135480	건선에서 상향조절됨
1558407_at	PLEKHG2	AK095957	ENSG00000090924	건선에서 상향조절됨

[0313]

1558549_s_at	VNN1	BG120535	ENSG00000112299	건선에서 상향조절됨
1558561_at	HM13	AK074686	ENSG00000101294	건선에서 상향조절됨
1558678_s_at	MALAT1	BE708432	ENSG00000251562	건선에서 상향조절됨
1558846_at	PNLIPRP3	AL833418	ENSG00000203837	건선에서 상향조절됨
1559018_at	PTPRE	AL832042	ENSG00000132334	건선에서 상향조절됨
1559263_s_at	ZC3H12D	BG397809	ENSG00000178199	건선에서 상향조절됨
1559268_at	ADAM23	AW022638	ENSG00000114948	건선에서 상향조절됨
1559501_at	CBR3-AS1	BC037580	ENSG00000236830	건선에서 상향조절됨
1559585_at	DDX60L	AK096369	ENSG00000181381	건선에서 상향조절됨
1559883_s_at	SAMHD1	AF147427	ENSG00000101347	건선에서 상향조절됨
1559917_a_at	CBR3-AS1	AB004851	ENSG00000236830	건선에서 상향조절됨
1561080_at	TXNRD1	BC042974	ENSG00000198431	건선에서 상향조절됨
1561336_at	DNASE1L3	CA449306	ENSG00000163687	건선에서 상향조절됨
1561948_at	COQ10B	AI793340	ENSG00000115520	건선에서 상향조절됨
1562364_at	GVINP1	AL833700	ENSG00000254838	건선에서 상향조절됨
1562460_at	CNDP2	BF512616	ENSG00000133313	건선에서 상향조절됨

[0314]

1564031_a_at	RELL2	AK054889	ENSG00000164620	건선에서 상향조절됨
1564573_at	IFITM10	BC036199	ENSG00000244242	건선에서 상향조절됨
1565657_at	CMTM6	BC042995	ENSG00000091317	건선에서 상향조절됨
1566901_at	TGIF1	AL832409	ENSG00000177426	건선에서 상향조절됨
1569003_at	VMP1	AL541655	ENSG00000062716	건선에서 상향조절됨
1569149_at	PDLIM7	BC023629	ENSG00000196923	건선에서 상향조절됨
1569150_x_at	PDLIM7	BC023629	ENSG00000196923	건선에서 상향조절됨
1569555_at	GDA	BC012859	ENSG00000119125	건선에서 상향조절됨
1569617_at	OSBP2	BC018025	ENSG00000184792	건선에서 상향조절됨
200628_s_at	WARS	M61715	ENSG00000140105	건선에서 상향조절됨
200629_at	WARS	NM_004184	ENSG00000140105	건선에서 상향조절됨
200648_s_at	GLUL	NM_002065	ENSG00000135821	건선에서 상향조절됨
200670_at	XBP1	NM_005080	ENSG00000100219	건선에서 상향조절됨
200708_at	GOT2	NM_002080	ENSG00000125166	건선에서 상향조절됨
200766_at	CTSD	NM_001909	ENSG00000117984	건선에서 상향조절됨
200776_s_at	BZW1	AL518328	ENSG00000082153	건선에서 상향조절됨
200777_s_at	BZW1	NM_014670	ENSG00000082153	건선에서 상향조절됨

[0315]

200790_at	ODC1	NM_002539	ENSG00000115758	건선에서 상향조절됨
200812_at	CCT7	NM_006429	ENSG00000135624	건선에서 상향조절됨
200831_s_at	SCD	AA678241	ENSG00000099194	건선에서 상향조절됨
200832_s_at	SCD	AB032261	ENSG00000099194	건선에서 상향조절됨
200886_s_at	PGAM1	NM_002629	ENSG00000171314	건선에서 상향조절됨
200887_s_at	STAT1	NM_007315	ENSG00000115415	건선에서 상향조절됨
200900_s_at	M6PR	AI583537	ENSG00000003056	건선에서 상향조절됨
200901_s_at	M6PR	NM_002355	ENSG00000003056	건선에서 상향조절됨
200923_at	LGALS3BP	NM_005567	ENSG00000108679	건선에서 상향조절됨
200935_at	CALR	NM_004343	ENSG00000179218	건선에서 상향조절됨
200989_at	HIF1A	NM_001530	ENSG00000100644	건선에서 상향조절됨
200998_s_at	CKAP4	AW029619	ENSG00000136026	건선에서 상향조절됨
200999_s_at	CKAP4	NM_006825	ENSG00000136026	건선에서 상향조절됨
201012_at	ANXA1	NM_000700	ENSG00000135046	건선에서 상향조절됨
201037_at	PFKP	NM_002627	ENSG00000067057	건선에서 상향조절됨
201118_at	PGD	NM_002631	ENSG00000142657	건선에서 상향조절됨

[0316]

201195_s_at	SLC7A5	AB018009	ENSG00000103257	건선에서 상향조절됨
201242_s_at	ATP1B1	BC000006	ENSG00000143153	건선에서 상향조절됨
201243_s_at	ATP1B1	NM_001677	ENSG00000143153	건선에서 상향조절됨
201252_at	PSMC4	NM_006503	ENSG00000013275	건선에서 상향조절됨
201266_at	TXNRD1	NM_003330	ENSG00000198431	건선에서 상향조절됨
201348_at	GPX3	NM_002084	ENSG00000211445	건선에서 상향조절됨
201435_s_at	EIF4E	AW268640	ENSG00000151247	건선에서 상향조절됨
201436_at	EIF4E	AI742789	ENSG00000151247	건선에서 상향조절됨
201437_s_at	EIF4E	NM_001968	ENSG00000151247	건선에서 상향조절됨
201469_s_at	SHC1	AI809967	ENSG00000160691	건선에서 상향조절됨
201482_at	QSOX1	NM_002826	ENSG00000116260	건선에서 상향조절됨
201483_s_at	SUPT4H1	BC002802	ENSG00000213246	건선에서 상향조절됨
201484_at	SUPT4H1	NM_003168	ENSG00000213246	건선에서 상향조절됨
201487_at	CTSC	NM_001814	ENSG00000109861	건선에서 상향조절됨
201489_at	PPIF	BC005020	ENSG00000108179	건선에서 상향조절됨
201490_s_at	PPIF	NM_005729	ENSG00000108179	건선에서 상향조절됨
201510_at	ELF3	AF017307	ENSG00000163435	건선에서 상향조절됨

[0317]

201531_at	ZFP36	NM_003407	ENSG00000128016	건선에서 상향조절됨
201564_s_at	FSCN1	NM_003088	ENSG00000075618	건선에서 상향조절됨
201594_s_at	PPP4R1	NM_005134	ENSG00000154845	건선에서 상향조절됨
201631_s_at	IER3	NM_003897	ENSG00000137331	건선에서 상향조절됨
201649_at	UBE2L6	NM_004223	ENSG00000156587	건선에서 상향조절됨
201695_s_at	PNP	NM_000270	ENSG00000198805	건선에서 상향조절됨
201739_at	SGK1	NM_005627	ENSG00000118515	건선에서 상향조절됨
201754_at	COX6C	NM_004374	ENSG00000164919	건선에서 상향조절됨
201858_s_at	SRGN	J03223	ENSG00000122862	건선에서 상향조절됨
201859_at	SRGN	NM_002727	ENSG00000122862	건선에서 상향조절됨
201860_s_at	PLAT	NM_000930	ENSG00000104368	건선에서 상향조절됨
201884_at	CEACAM5	NM_004363	ENSG00000105388	건선에서 상향조절됨
201890_at	RRM2	BE966236	ENSG00000171848	건선에서 상향조절됨
201945_at	FURIN	NM_002569	ENSG00000140564	건선에서 상향조절됨
201999_s_at	DYNLT1	NM_006519	ENSG00000146425	건선에서 상향조절됨
202081_at	IER2	NM_004907	ENSG00000160888	건선에서 상향조절됨

[0318]

202082_s_at	SEC14L1	AV748469	ENSG00000129657	건선에서 상향조절됨
202083_s_at	SEC14L1	AI017770	ENSG00000129657	건선에서 상향조절됨
202084_s_at	SEC14L1	NM_003003	ENSG00000129657	건선에서 상향조절됨
202086_at	MX1	NM_002462	ENSG00000157601	건선에서 상향조절됨
202100_at	RALB	BG169673	ENSG00000144118	건선에서 상향조절됨
202101_s_at	RALB	NM_002881	ENSG00000144118	건선에서 상향조절됨
202112_at	VWF	NM_000552	ENSG00000110799	건선에서 상향조절됨
202266_at	TDP2	NM_016614	ENSG00000111802	건선에서 상향조절됨
202269_x_at	GBP1	BC002666	ENSG00000117228	건선에서 상향조절됨
202270_at	GBP1	NM_002053	ENSG00000117228	건선에서 상향조절됨
202284_s_at	CDKN1A	NM_000389	ENSG00000124762	건선에서 상향조절됨
202345_s_at	FABP5	NM_001444	ENSG00000164687	건선에서 상향조절됨
202376_at	SERPINA3	NM_001085	ENSG00000196136	건선에서 상향조절됨
202381_at	ADAM9	NM_003816	ENSG00000168615	건선에서 상향조절됨
202391_at	BASP1	NM_006317	ENSG00000176788	건선에서 상향조절됨
202411_at	IFI27	NM_005532	ENSG00000165949	건선에서 상향조절됨
202430_s_at	PLSCR1	NM_021105	ENSG00000188313	건선에서 상향조절됨

[0319]

202446_s_at	PLSCR1	AI825926	ENSG00000188313	건선에서 상향조절됨
202459_s_at	LPIN2	U55968	ENSG00000101577	건선에서 상향조절됨
202460_s_at	LPIN2	NM_014646	ENSG00000101577	건선에서 상향조절됨
202497_x_at	SLC2A3	AI631159	ENSG00000059804	건선에서 상향조절됨
202498_s_at	SLC2A3	BE550486	ENSG00000059804	건선에서 상향조절됨
202499_s_at	SLC2A3	NM_006931	ENSG00000059804	건선에서 상향조절됨
202510_s_at	TNFAIP2	NM_006291	ENSG00000185215	건선에서 상향조절됨
202524_s_at	SPOCK2	NM_014767	ENSG00000107742	건선에서 상향조절됨
202525_at	PRSS8	NM_002773	ENSG00000052344	건선에서 상향조절됨
202531_at	IRF1	NM_002198	ENSG00000125347	건선에서 상향조절됨
202557_at	HSPA13	AI718418	ENSG00000155304	건선에서 상향조절됨
202558_s_at	HSPA13	NM_006948	ENSG00000155304	건선에서 상향조절됨
202575_at	CRABP2	NM_001878	ENSG00000143320	건선에서 상향조절됨
202594_at	LEPROTL1	NM_015344	ENSG00000104660	건선에서 상향조절됨
202595_s_at	LEPROTL1	AF161461	ENSG00000104660	건선에서 상향조절됨
202625_at	LYN	AI356412	ENSG00000254087	건선에서 상향조절됨

[0320]

202626_s_at	LYN	NM_002350	ENSG00000254087	건선에서 상향조절됨
202637_s_at	ICAM1	AI608725	ENSG00000090339	건선에서 상향조절됨
202638_s_at	ICAM1	NM_000201	ENSG00000090339	건선에서 상향조절됨
202655_at	MANF	NM_006010	ENSG00000145050	건선에서 상향조절됨
202687_s_at	TNFSF10	U57059	ENSG00000121858	건선에서 상향조절됨
202688_at	TNFSF10	NM_003810	ENSG00000121858	건선에서 상향조절됨
202728_s_at	LTBP1	AI986120	ENSG00000049323	건선에서 상향조절됨
202729_s_at	LTBP1	NM_000627	ENSG00000049323	건선에서 상향조절됨
202787_s_at	MAPKAPK3	U43784	ENSG00000114738	건선에서 상향조절됨
202788_at	MAPKAPK3	NM_004635	ENSG00000114738	건선에서 상향조절됨
202804_at	ABCC1	AI539710	ENSG00000103222	건선에서 상향조절됨
202805_s_at	ABCC1	NM_004996	ENSG00000103222	건선에서 상향조절됨
202831_at	GPX2	NM_002083	ENSG00000176153	건선에서 상향조절됨
202842_s_at	DNAJB9	AL080081	ENSG00000128590	건선에서 상향조절됨
202843_at	DNAJB9	NM_012328	ENSG00000128590	건선에서 상향조절됨
202859_x_at	CXCL8	NM_000584	ENSG00000169429	건선에서 상향조절됨
202869_at	OAS1	NM_016816	ENSG00000089127	건선에서 상향조절됨

[0321]

202887_s_at	DDIT4	NM_019058	ENSG00000168209	건선에서 상향조절됨
202888_s_at	ANPEP	NM_001150	ENSG00000166825	건선에서 상향조절됨
202901_x_at	CTSS	BC002642	ENSG00000163131	건선에서 상향조절됨
202902_s_at	CTSS	NM_004079	ENSG00000163131	건선에서 상향조절됨
202917_s_at	S100A8	NM_002964	ENSG00000143546	건선에서 상향조절됨
202934_at	HK2	AI761561	ENSG00000159399	건선에서 상향조절됨
202952_s_at	ADAM12	NM_003474	ENSG00000148848	건선에서 상향조절됨
202957_at	HCLS1	NM_005335	ENSG00000180353	건선에서 상향조절됨
202988_s_at	RGS1	NM_002922	ENSG00000090104	건선에서 상향조절됨
203002_at	AMOTL2	NM_016201	ENSG00000114019	건선에서 상향조절됨
203010_at	STAT5A	NM_003152	ENSG00000126561	건선에서 상향조절됨
203021_at	SLPI	NM_003064	ENSG00000124107	건선에서 상향조절됨
203132_at	RB1	NM_000321	ENSG00000139687	건선에서 상향조절됨
203153_at	IFIT1	NM_001548	ENSG00000185745	건선에서 상향조절됨
203180_at	ALDH1A3	NM_000693	ENSG00000184254	건선에서 상향조절됨
203201_at	PMM2	NM_000303	ENSG00000140650	건선에서 상향조절됨

[0322]

203233_at	IL4R	NM_000418	ENSG00000077238	건선에서 상향조절됨
203234_at	UPP1	NM_003364	ENSG00000183696	건선에서 상향조절됨
203252_at	CDK2AP2	NM_005851	ENSG00000167797	건선에서 상향조절됨
203256_at	CDH3	NM_001793	ENSG00000062038	건선에서 상향조절됨
203261_at	DCTN6	NM_006571	ENSG00000104671	건선에서 상향조절됨
203313_s_at	TGIF1	NM_003244	ENSG00000177426	건선에서 상향조절됨
203315_at	NCK2	BC000103	ENSG00000071051	건선에서 상향조절됨
203363_s_at	ATG13	AU153525	ENSG00000175224	건선에서 상향조절됨
203364_s_at	ATG13	NM_014741	ENSG00000175224	건선에서 상향조절됨
203367_at	DUSP14	NM_007026	ENSG00000276023	건선에서 상향조절됨
203369_x_at	PDLIM7	AI825846	ENSG00000196923	건선에서 상향조절됨
203370_s_at	PDLIM7	NM_005451	ENSG00000196923	건선에서 상향조절됨
203416_at	CD53	NM_000560	ENSG00000143119	건선에서 상향조절됨
203423_at	RBP1	NM_002899	ENSG00000114115	건선에서 상향조절됨
203470_s_at	PLEK	AI433595	ENSG00000115956	건선에서 상향조절됨
203471_s_at	PLEK	NM_002664	ENSG00000115956	건선에서 상향조절됨
203499_at	EPHA2	NM_004431	ENSG00000142627	건선에서 상향조절됨

[0323]

203507_at	CD68	NM_001251	ENSG00000129226	건선에서 상향조절됨
203535_at	S100A9	NM_002965	ENSG00000163220	건선에서 상향조절됨
203550_s_at	FAM189B	NM_006589	ENSG00000160767	건선에서 상향조절됨
203560_at	GGH	NM_003878	ENSG00000137563	건선에서 상향조절됨
203595_s_at	IFIT5	N47725	ENSG00000152778	건선에서 상향조절됨
203596_s_at	IFIT5	NM_012420	ENSG00000152778	건선에서 상향조절됨
203663_s_at	COX5A	NM_004255	ENSG00000178741	건선에서 상향조절됨
203665_at	HMOX1	NM_002133	ENSG00000100292	건선에서 상향조절됨
203691_at	PI3	NM_002638	ENSG00000124102	건선에서 상향조절됨
203710_at	ITPR1	NM_002222	ENSG00000150995	건선에서 상향조절됨
203740_at	MPHOSPH6	NM_005792	ENSG00000135698	건선에서 상향조절됨
203757_s_at	CEACAM6	BC005008	ENSG00000086548	건선에서 상향조절됨
203779_s_at	MPZL2	NM_005797	ENSG00000149573	건선에서 상향조절됨
203780_at	MPZL2	AF275945	ENSG00000149573	건선에서 상향조절됨
203797_at	VSNL1	AF039555	ENSG00000163032	건선에서 상향조절됨
203798_s_at	VSNL1	NM_003385	ENSG00000163032	건선에서 상향조절됨

[0324]

203821_at	HBEGF	NM_001945	ENSG00000113070	건선에서 상향조절됨
203858_s_at	COX10	NM_001303	ENSG00000006695	건선에서 상향조절됨
203894_at	TUBG2	NM_016437	ENSG00000037042	건선에서 상향조절됨
203897_at	LYRM1	BE963444	ENSG00000102897	건선에서 상향조절됨
203915_at	CXCL9	NM_002416	ENSG00000138755	건선에서 상향조절됨
203922_s_at	CYBB	AI308863	ENSG00000165168	건선에서 상향조절됨
203923_s_at	CYBB	NM_000397	ENSG00000165168	건선에서 상향조절됨
203978_at	NUBP1	NM_002484	ENSG00000103274	건선에서 상향조절됨
204014_at	DUSP4	NM_001394	ENSG00000120875	건선에서 상향조절됨
204015_s_at	DUSP4	BC002671	ENSG00000120875	건선에서 상향조절됨
204057_at	IRF8	AI073984	ENSG00000140968	건선에서 상향조절됨
204058_at	ME1	AL049699	ENSG00000065833	건선에서 상향조절됨
204059_s_at	ME1	NM_002395	ENSG00000065833	건선에서 상향조절됨
204094_s_at	TSC22D2	NM_014779	ENSG00000196428	건선에서 상향조절됨
204095_s_at	ELL	AL521391	ENSG00000105656	건선에서 상향조절됨
204096_s_at	ELL	AL136771	ENSG00000105656	건선에서 상향조절됨
204116_at	IL2RG	NM_000206	ENSG00000147168	건선에서 상향조절됨

[0325]

204137_at	GPR137B	NM_003272	ENSG00000077585	건선에서 상향조절됨
204153_s_at	MFNG	NM_002405	ENSG00000100060	건선에서 상향조절됨
204166_at	SBNO2	NM_014963	ENSG00000064932	건선에서 상향조절됨
204169_at	IMPDH1	NM_000883	ENSG00000106348	건선에서 상향조절됨
204174_at	ALOX5AP	NM_001629	ENSG00000132965	건선에서 상향조절됨
204205_at	APOBEC3G	NM_021822	ENSG00000239713	건선에서 상향조절됨
204232_at	FCER1G	NM_004106	ENSG00000158869	건선에서 상향조절됨
204351_at	S100P	NM_005980	ENSG00000163993	건선에서 상향조절됨
204357_s_at	LIMK1	NM_002314	ENSG00000106683	건선에서 상향조절됨
204385_at	KYNU	NM_003937	ENSG00000115919	건선에서 상향조절됨
204415_at	IFI6	NM_022873	ENSG00000126709	건선에서 상향조절됨
204420_at	FOSL1	BG251266	ENSG00000175592	건선에서 상향조절됨
204439_at	IFI44L	NM_006820	ENSG00000137959	건선에서 상향조절됨
204440_at	CD83	NM_004233	ENSG00000112149	건선에서 상향조절됨
204465_s_at	INA	NM_004692	ENSG00000148798	건선에서 상향조절됨
204470_at	CXCL1	NM_001511	ENSG00000163739	건선에서 상향조절됨

[0326]

204502_at	SAMHD1	NM_015474	ENSG00000101347	건선에서 상향조절됨
204529_s_at	TOX	AI961231	ENSG00000198846	건선에서 상향조절됨
204530_s_at	TOX	NM_014729	ENSG00000198846	건선에서 상향조절됨
204546_at	KIAA0513	NM_014732	ENSG00000135709	건선에서 상향조절됨
204580_at	MMP12	NM_002426	ENSG00000262406	건선에서 상향조절됨

[0327]

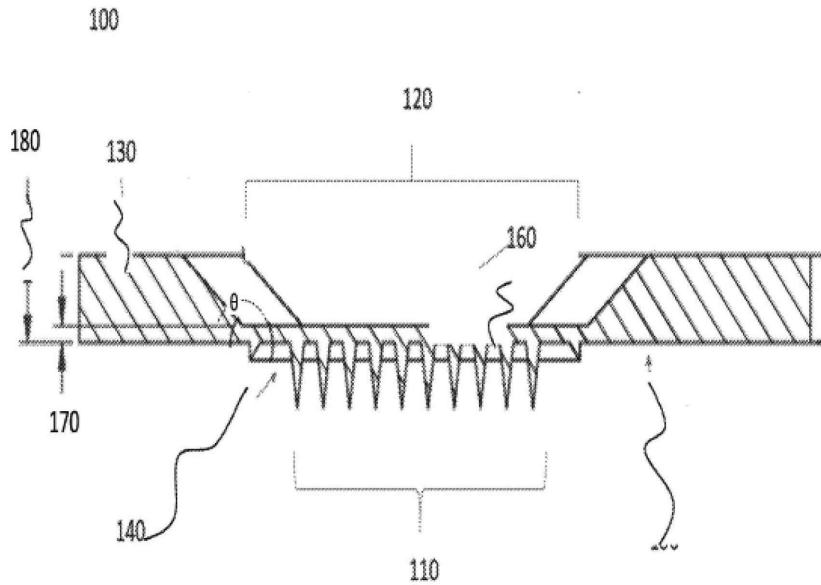
[0328]

본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에 제시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태가 단지 예로서 제공된다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명은 본 명세서 내에서 제공된 특정 예에 의해 제한되지 않는다. 본 발명은 전술된 명세서를 참조함으로써 설명되었지만, 본원에서 실시양태의 설명 및 예시는 제한하는 의미로 해석되어서는 안 된다. 비로소 본 발명을 벗어나지 않으면서 수많은 변경, 변화 및 치환이 당업자에게 인식될 것이다. 나아가, 본 발명의 모든 측면은 다양한 조건 및 변수에 의해 좌우되는, 본원에 제시된 특정 묘사, 구성 또는 상대

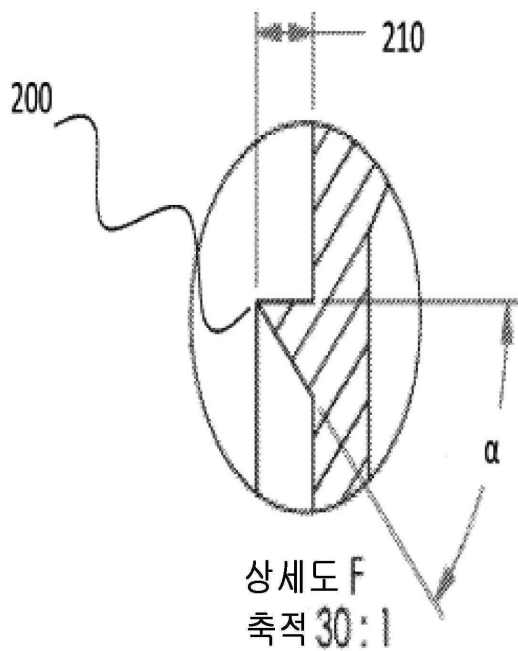
적 비율로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 임의의 이러한 대안, 변형, 변경 또는 등가물도 커버할 것으로 생각된다. 하기 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하고 이 청구범위 내의 방법과 구조 및 이들의 등가물은 이에 의해 커버된다.

도면

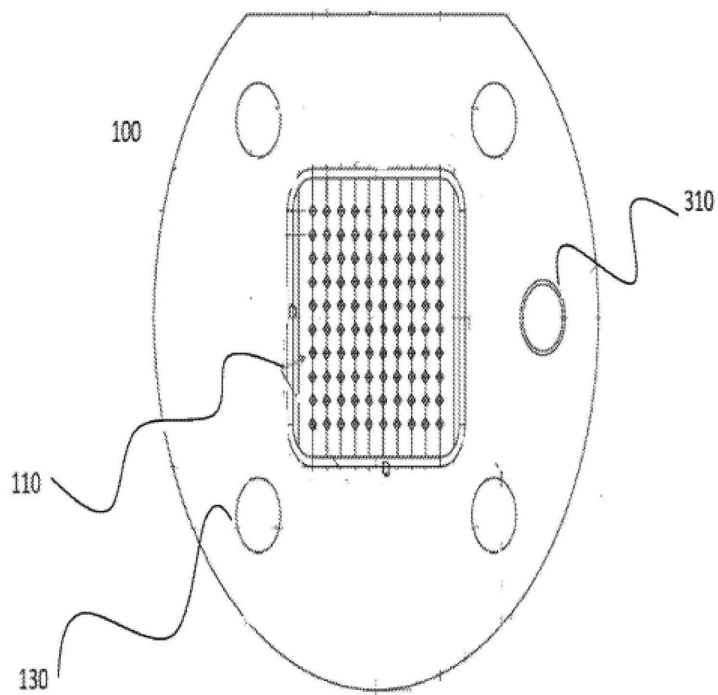
도면1



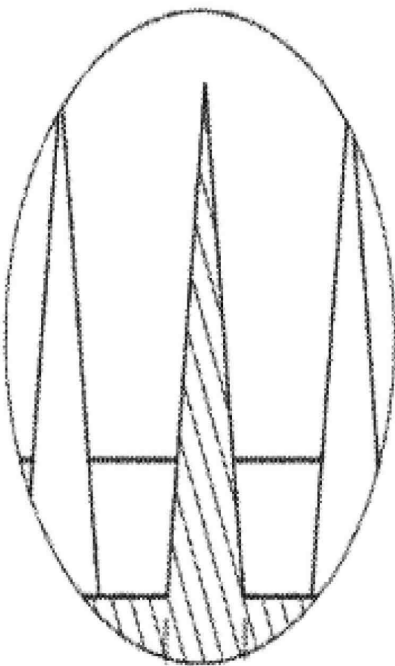
도면2



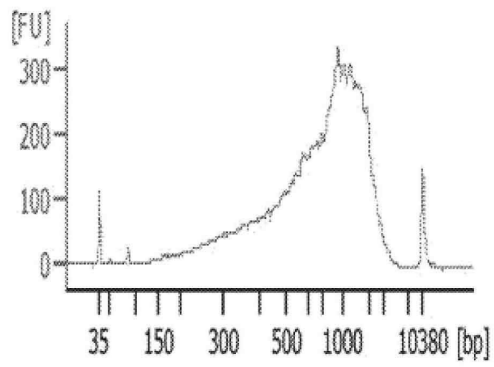
도면3



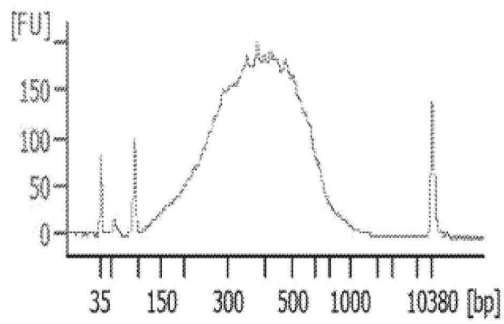
도면4



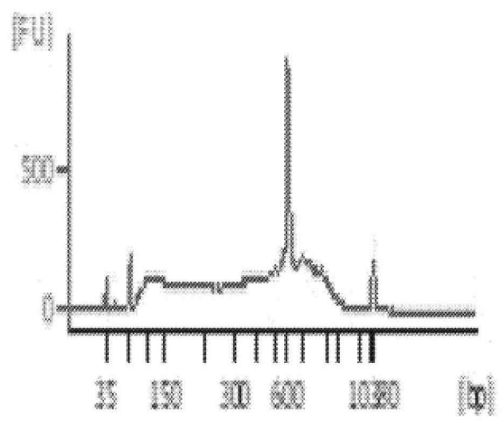
도면5a



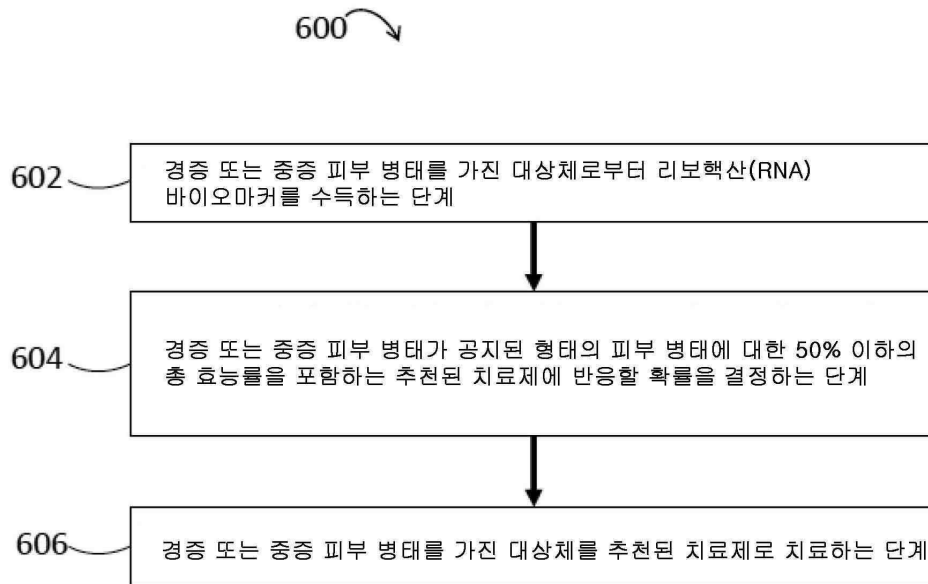
도면5b



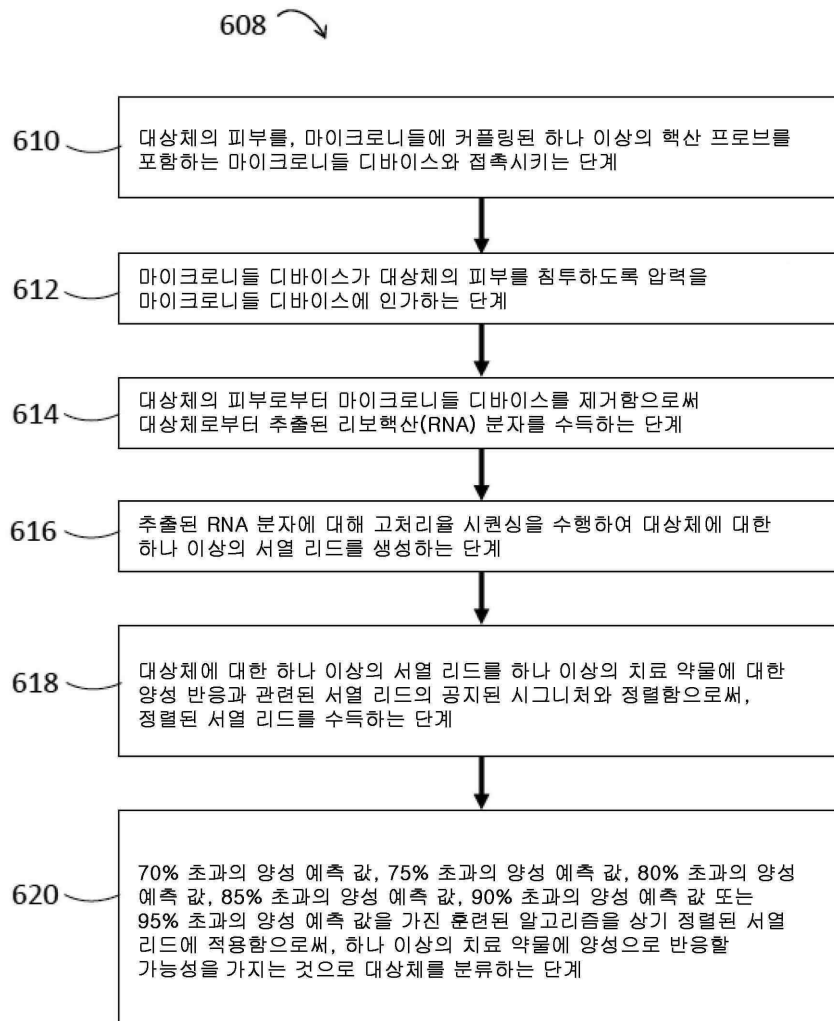
도면5c



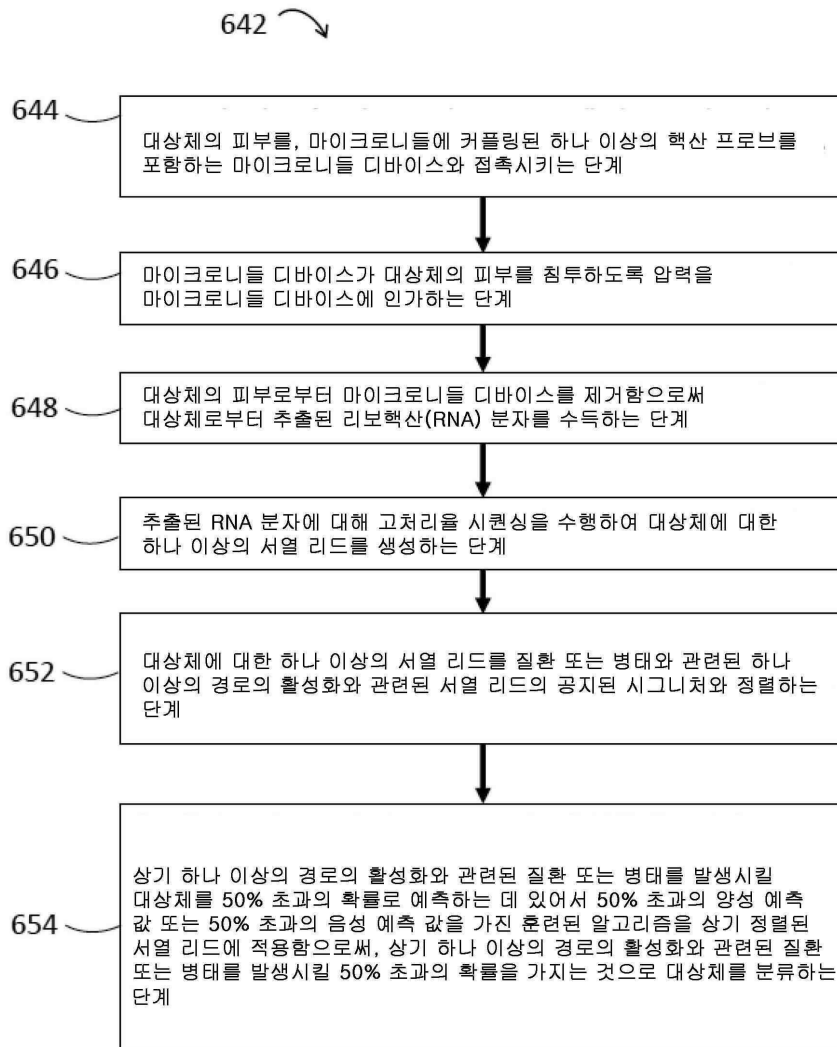
도면6a



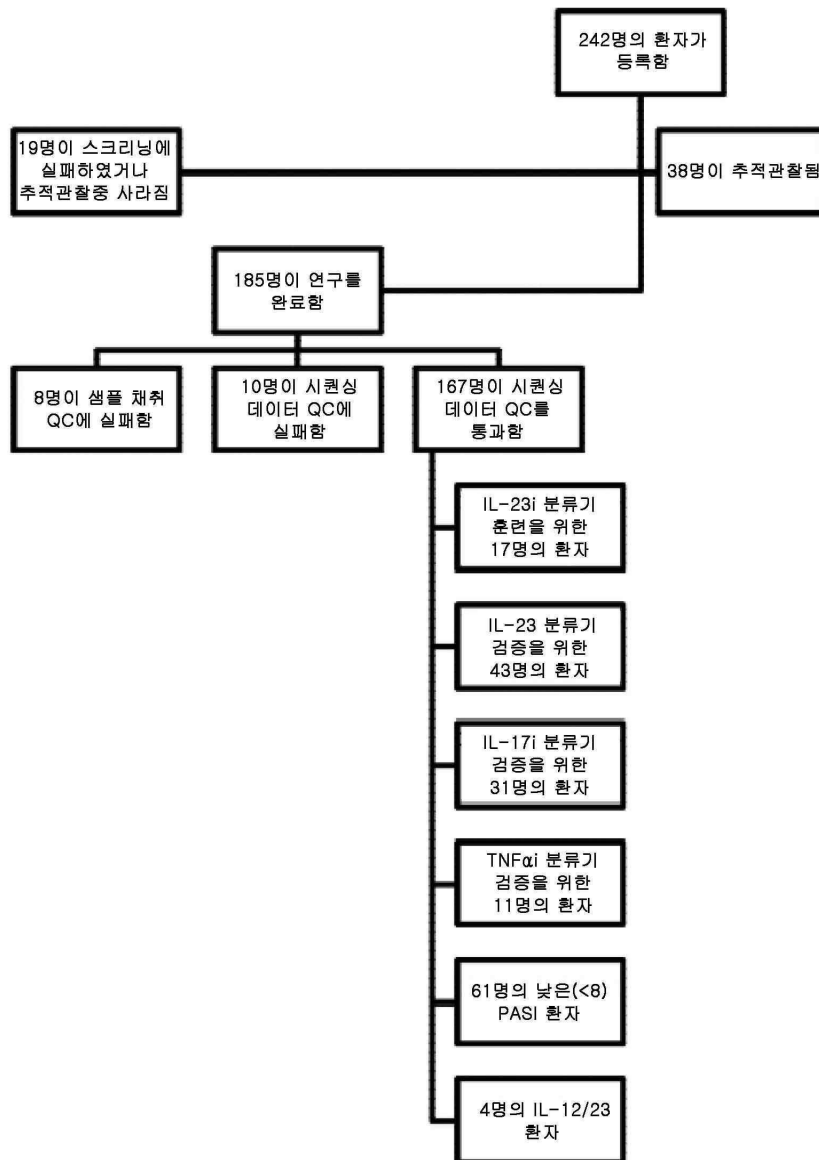
도면6b



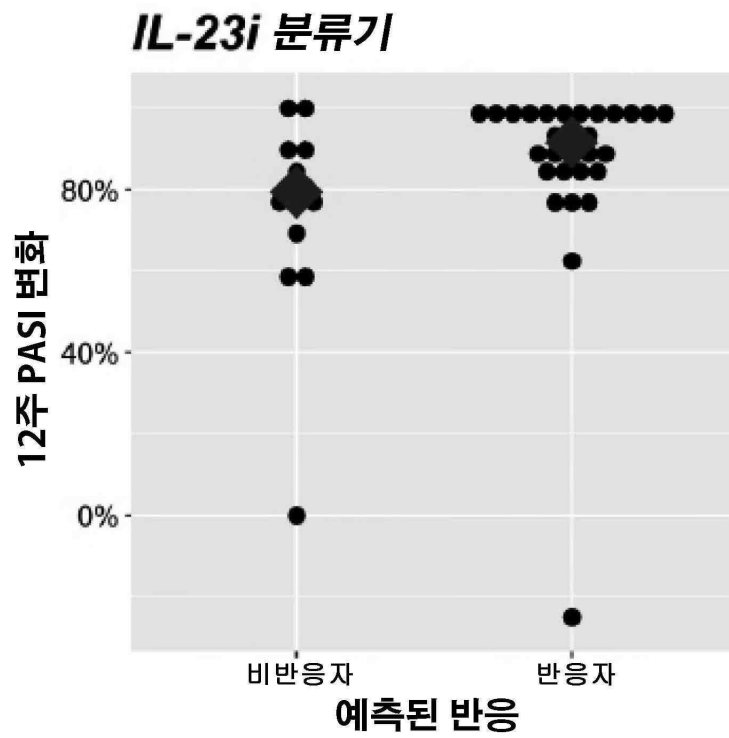
도면6c



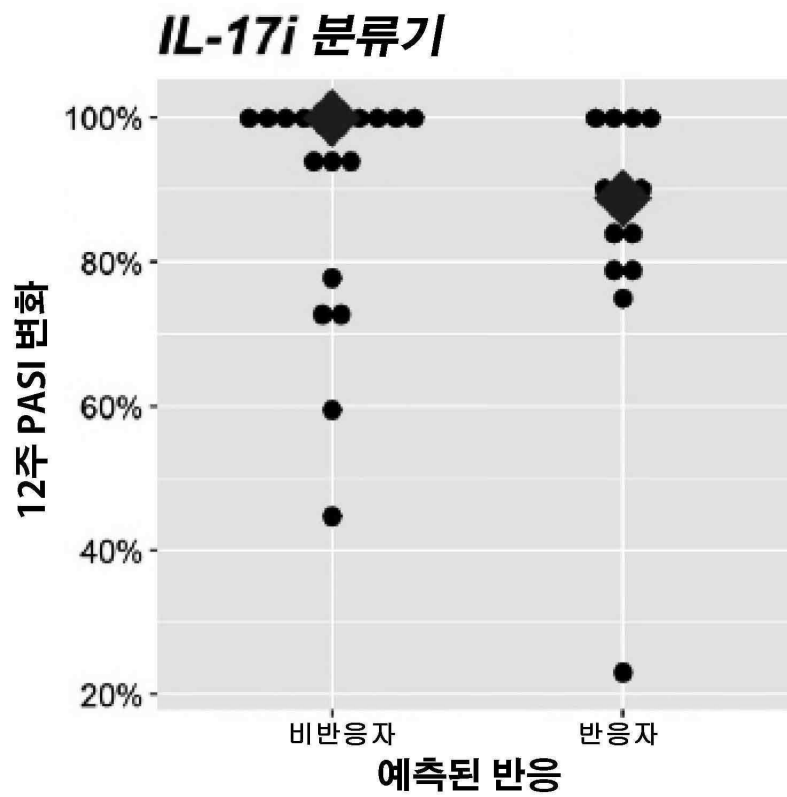
도면7



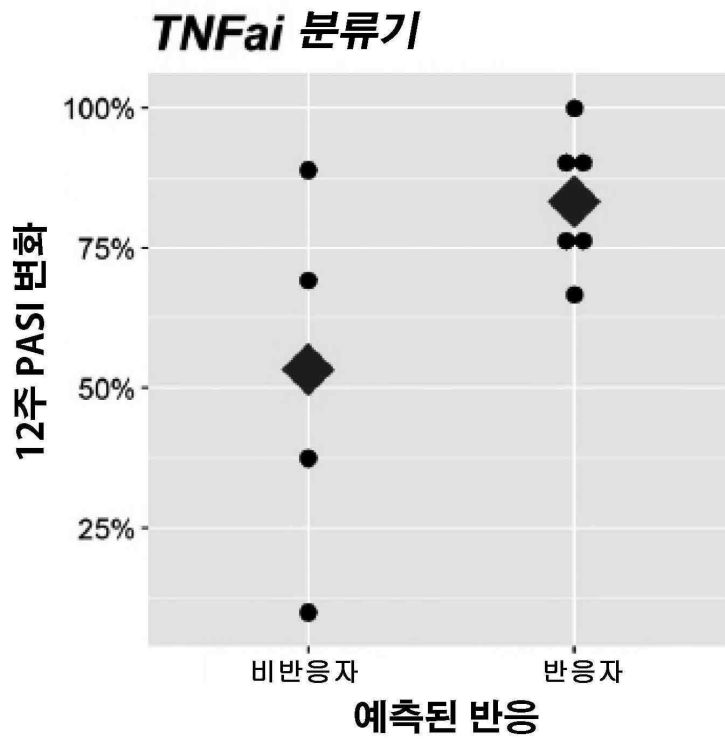
도면8a



도면8b



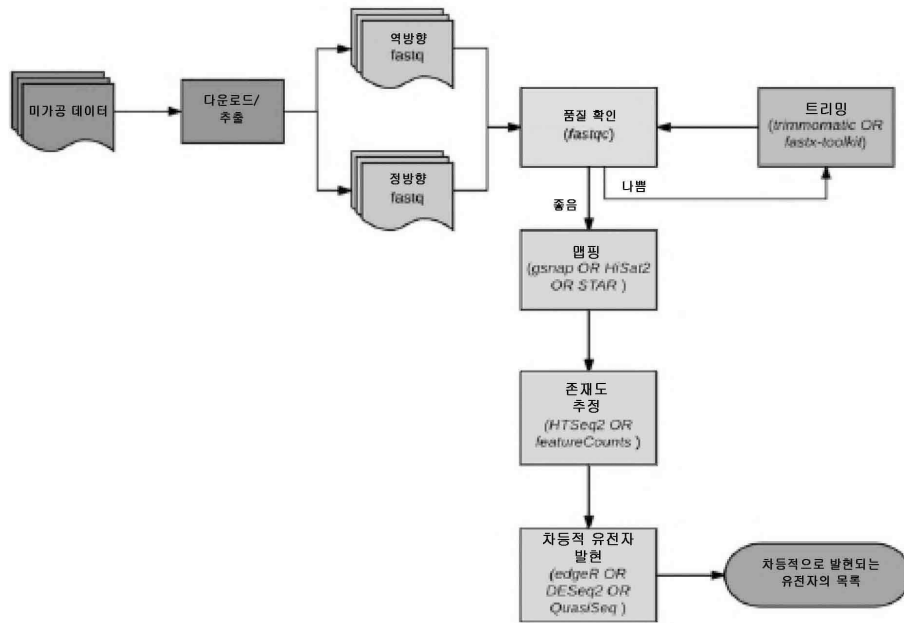
도면8c



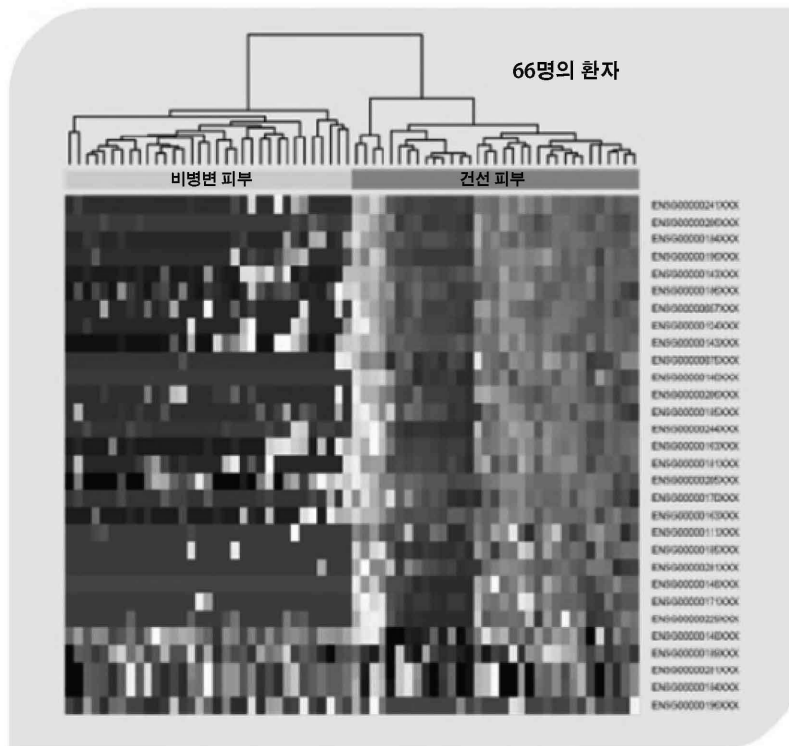
도면9



도면10



도면11



도면12

