



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132564
(43) 공개일자 2018년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

C12Q 2600/106 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0063631

(22) 출원일자 2018년06월01일

심사청구일자 2018년06월01일

(30) 우선권주장

1020170069106 2017년06월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

송규영

서울특별시 강남구 압구정로 151, 114동 204호 (압구정동, 현대아파트)

양석균

서울특별시 강남구 연주로30길 26, G동 810호 (도곡동, 타워팰리스)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

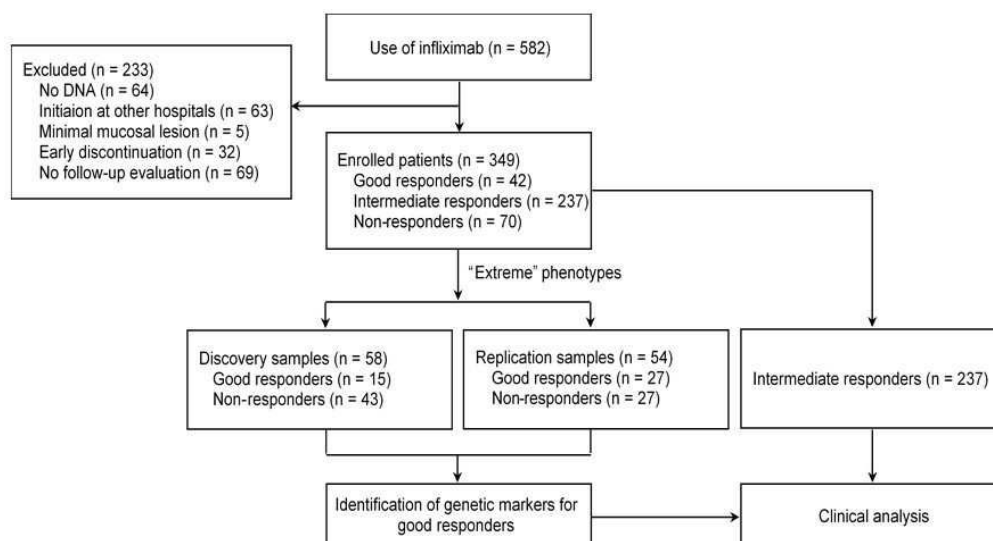
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 단일염기다형성 마커 조성물 및 이를 이용한 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 단일염기다형성 마커 조성물 및 이를 이용한 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 총 349명의 CD 등록 환자 중, IFX에 대해 42명의 환자가 좋은 반응군, 70명의 환자가 비-반응군 및 237명의 환자가 중간 반응군으로 분류되었고, 연관 분석을 통해 총 112명의 환자를 분석하였는데, 발굴 분석에서 58명 환자(15명 좋은 반응군 및 43명 비-반응군) 및 재현 분석에서 54명의 환자(27명 좋은 반응군 및 27명 비-반응군)를 분석하였다. 분석 결과, IFX 치료에 대한 좋은 반응과 관련되어 있는 rs2158962 SNP의 변이를 확인하였으며, "A" allele가 좋은 반응군에서 높게 나타났다. 이에, 본 발명은 CD 환자의 IFX 치료에 있어, 치료 전략을 수립하고 환자 맞춤 치료를 진행하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

박상형

서울특별시 강동구 올림픽로92길 61, 102동 1104호
(천호동, 브라운스톤암사아파트)

예병덕

서울특별시 강남구 삼성로 150, 108동 608호 (대치동, 한보미도맨션)

홍명희

서울특별시 송파구 강동대로7길 7, 203호

백지원

서울특별시 송파구 토성로19길 9, 304호 (풍납동, 은빈하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A09005824

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업

연구과제명 전유전체연관검색 데이터 분석을 이용한 한국인 염증성장질환 유전자발굴

기 여 율 50/100

주관기관 울산대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0130010017

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 한국인 크론병의 임상특성, 예후인자 및 유전체 바이오마커 발굴

기 여 율 50/100

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.04.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 대립유전자형은 A/G인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염 또는 건선인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 5

TNF- α 관련 질환 환자의 분리된 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 유전자형을 확인하는 단계; 및

상기 확인된 유전자형으로 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성을 예측하는 단계를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성을 예측하는 단계는 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 유전자형이 AA 동형접합체인 경우, TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성이 좋은 반응인 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염 또는 건선인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트.

청구항 10

제10항에 있어서, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염 또는 건선인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)인 것을 특징으로 하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 단일염기다형성 마커 조성물 및 이를 이용한 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 크론병(Crohn's disease; CD)은 장내 만성 재발성 염증 질환이다. 전염증 사이토카인 종양 괴사 인자- α (tumor necrosis factor- α ; TNF)는 CD 면역발병(immunopathogenesis)에 있어 중요한 역할을 한다. 현재, 인플릭시맵(infliximab; IFX)과 같은 항-TNF 제제는 중등도(moderate) 내지 중증(severe) CD 환자를 회복시키고, 이를 유지하는 치료에 있어 중추적인 역할을 한다. 이러한 임상 효과에도 불구하고, 환자의 약 1/3 정도는 항-TNF 제제 치료에 반응하지 않고, 연간 초기 반응 환자의 20% 이상이 치료에 대해 반응을 나타내지 않는다. 항-TNF 제제는 높은 비용과, 악성 종양 또는 기회 감염(opportunistic infections) 위험성 등의 추가적인 우려도 있다.

[0003] CD에서의 항-TNF 치료에 대한 반응을 예측하기 위해, 흡연 및 C-반응성 단백질 상승과 같은 몇몇 임상 인자들이 제안되었지만, 상기 마커들은 환자군에서는 임상적 활용에 한계가 있다. 항-TNF 치료에 반응하는 유전적 마커들을 확인하기 위한 이전의 시도에서 일부 성공을 거두기도 했는데, 일부 후보 유전자를 분석하거나, 상기 약물의 약동학에 있어서 개체간 변동(inter-individual variation)과 같은 여러 교란인자들(confounding factors)을 적용하기도 했다. CD에서의 항-TNF 치료에 대한 반응과 관련된 유전적 인자들을 확인한 최근 면역칩 연관 연구에서는 비-반응 및 반응 지속을 예측하는 유전인자들은 확인하였으나, 비-반응 및 반응 지속에 공통되는 대립유전자(alleles)는 확인할 수 없었다고 보고하였는데, 이는 생물학적 기작과는 뚜렷한 차이를 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2010-0037590호(2010.04.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 rs2158962 단일염기다형성 마커를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 rs2158962 단일염기다형성 마커의 유전자형을 확인하는 단계를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 rs2158962 단일염기다형성 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 101번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함

하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 TNF- α 관련 질환 환자의 분리된 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 101번째 뉴클레오티드의 유전자형을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 유전자형으로 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성을 예측하는 단계를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 101번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 단일염기다형성 마커 조성물 및 이를 이용한 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 총 349명의 CD 등록 환자 중, IFX에 대해 42명의 환자가 좋은 반응군, 70명의 환자가 비-반응군 및 237명의 환자가 중간 반응군으로 분류되었고, 연관 분석을 통해 총 112명의 환자를 분석하였는데, 발굴 분석에서 58명 환자(15명 좋은 반응군 및 43명 비-반응군) 및 재현 분석에서 54명의 환자(27명 좋은 반응군 및 27명 비-반응군)를 분석하였다. 분석 결과, IFX 치료에 대한 좋은 반응과 관련되어 있는 rs2158962 SNP의 변이를 확인하였으며, "A" allele가 좋은 반응군에서 높게 나타났다. 이에, 본 발명은 CD 환자의 IFX 치료에 있어, 치료 전략을 수립하고 환자 맞춤 치료를 진행하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 실험 디자인을 나타내는 모식도이다. 좋은 반응군은 점막 치유가 관측되고, 주요 복부 수술(major abdominal surgery; MAS) 또는 투여량 증가 없이 5년 이상 IFX 치료를 유지하는 환자들로 정의하였다. 비-반응군은 IFX 투여 치료 후 대장내시경 및/또는 단층 촬영 상에서 병변의 개선 또는 진행에 아무런 변화를 보이지 않는 환자들로 정의하였다. 발굴 및 재현 분석은 "극단의(extreme)" 표현형에 초점을 맞추었다. 중간 표현형을 가진 환자들은 유전자형 연구에서 제외하였다($n = 237$; 67.9%). 유전자형 분석으로부터 확인된 SNPs가 등록된 모든 환자($n = 349$)에서 점막 치유를 예측할 수 있는지 평가하였다.

도 2는 rs2158962의 임상 재현성을 나타낸다. (A) 112명의 크론병 환자들 중에서, MAS 또는 투여량 증가 없이 IFX 치료를 유지하는 환자들의 rs2158962 유전자형에 따른 누적 생존율을 나타낸다($P = 0.004$, log-rank test). (B) 등록된 모든 환자($n = 349$)에서 *TRAP1* SNP rs2158962를 사용한 추가적인 점막 치유 예측 모델에 대한 수용자 반응 특성 곡선(Receiver operating characteristic curve)을 나타낸다. 곡선 하 면적은 0.631 (95% 신뢰 구간 = 0.58-0.68) 이었다. 전체 민감도는 71.8 이었고, 특이도는 48.1 이었다.

도 3은 텍스트란 설페이트 소듐(dextran sulfate sodium; DSS)-유도된 대장염 마우스에서의 인플릭시맵(infliximab; IFX)에 대한 효과를 나타낸다. (a) DSS 대장염 유도에 따른 몸무게-감소 곡선을 나타낸다. 식수에 녹인 5% DSS를 5일 동안 투여시, *TRAP1* 트랜스제닉(TG) 및 야생형(WT)-C57BL 마우스는 유사하게 초기 몸무게의 13%가 감소하였다. (b) IFX-처리 vs 미처리 그룹 간의 몸무게-감소 곡선을 나타낸다. IFX 투여 3일 및 4일 후, *TRAP1* TG 마우스는 몸무게 감소가 상당히 줄어들었다(WT-IFX vs TG-IFX: $P_{3\text{-day after IFX}} = 3.26 \times 10^{-4}$ 및 $P_{4\text{-day after IFX}} = 7.47 \times 10^{-3}$, two-tailed t-test). (c) H&E 염색된 결장 조직 절편의 대표적인 이미지를 4배율로 나타냈다. (d) 조직학적 점수를 나타낸다(WT-IFX vs TG-IFX: $P = 3.60 \times 10^{-3}$, two-tailed t-test). 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타났다. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ ($n=17$ IFX 처리하지 않은 WT 마우스, $n=17$ IFX 처리하지 않은 TG 마우스, $n=15$ IFX 처리한 WT 마우스 및 $n=16$ IFX 처리한 TG 마우스).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이에, IFX에 대한 부적절한 반응을 나타내는 여러 임상 인자 및 환경 인자 뿐만 아니라 유전인자를 기초로, 본 발명자들은 게놈-와이드 연관 연구를 통해 무-가설 방식으로, 좋은 반응을 나타내는 유전적 예측 마커를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

- [0014] 본 발명은 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0015] 상세하게는, 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 대립유전자형은 A/G일 수 있다.
- [0016] 상세하게는, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염 또는 건선일 수 있으며, 보다 상세하게는 크론병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 상세하게는, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에서 다형성 SNP 변이는 rs2158962로 표시하여 기재할 수 있다. 상기 rs2158962는 Chromosome 16 상의 TNF 수용체-연관 단백질 1(TNF receptor-associated protein 1; *TRAF1*)의 intron 3 내에 존재하며, 대립유전자형은 A/G이다. 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드는 다중염기다형성 방식에 따라 작성하였는데, A 또는 G일 수 있으므로 "r"이라고 기재하였다.
- [0019] 본 발명의 "다형성(polymorphism)"은 단일 유전자 좌위에 두 가지 이상의 대립 유전자가 존재하는 경우를 의미하며, '다형성부위(polymorphic site)'란 상기 대립 유전자가 존재하는 유전자 좌위를 의미한다. 다형성 부위 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 상이한 것을 '단일염기다형성', 즉 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 TNF- α 관련 질환 환자의 분리된 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 유전자형을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 유전자형으로 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성을 예측하는 단계를 포함하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0021] 상세하게는, 상기 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성을 예측하는 단계는 상기 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 유전자형이 AA 동형접합체인 경우, TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성이 좋은 반응인 것으로 예측할 수 있다.
- [0022] 상세하게는, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염 또는 건선일 수 있으며, 보다 상세하게는 크론병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 한편, 상기 TNF- α 관련 질환이 크론병인 경우, 크론병 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성이 좋은 반응인 것으로 예측하는 것은 크론병 환자의 항-TNF 제제 치료시 점막이 치유되고, 주요 복부 수술(major abdominal surgery; MAS) 없이도 높은 생존율을 나타낼 것으로 예측할 수 있다.
- [0024] 상세하게는, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 분리된 시료로부터 DNA를 추출하는 단계에서, DNA는 대상의 혈액, 피부세포, 점막 세포 및 모발 등 모든 세포로부터 분리될 수 있다. 해당 세포로부터 DNA를 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 기술 또는 시판되고 있는 DNA 추출용 키트를 사용할 수 있다.
- [0026] 상기 유전자형을 확인하는 단계에서는 유전자 서열 분석이 수행될 수 있다. 서열분석은 당업계에 공지된 방법을 모두 이용할 수 있으며, 구체적으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 자동염기서열분석기를 사용하거나, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), PCR-RELP법(restriction fragment length polymorphism), PCRSSCP법(single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법(specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법(rolling circle amplification), HRM(high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법 및 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법 중 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 101번째 뉴클레오타이드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 TNF- α 관련 질환 환자의 항-TNF 제제에 대한 반응성 예측 키트를 제공한다. 상기 키트는 PCR 키트 또는 DNA 칩 키트가 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상세하게는, 상기 TNF- α 관련 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염

또는 건설킬 수 있으며, 보다 상세하게는 크론병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 상세하게는, 상기 항-TNF 제제는 인플릭시맵(infliximab; IFX)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0031] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] <실험예>

[0034] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0035] 1. 실험 대상

[0036] 본 발명자들은 서울 내 3차 병원인 서울아산병원의 염증성 장질환(inflammatory bowel disease; IBD) 등록부를 사용하였다. IBD 등록부는 1997년부터 작성되었으며, 환자 기초 특성, 병증 상태 또는 위치, 합병증 정도, 약물 사용 패턴 및 수술 형태와 날짜를 포함하는 임상 정보는 정기적으로 데이터베이스에 업데이트 되고 있다. CD는 종래의 임상, 방사선, 내시경 및 조직병리학적 기준을 기초로 진단하였다. IFX 치료를 받은 CD 환자 총 582명을 IBD 등록부로부터 확인하였다. 각 환자들은 치료를 위해 6주 동안 IFX를 3번 투여받았다(일반적으로 0, 2 및 6 주째). 이후, 환자들의 임상적 반응에 따라, 환자들은 유지 치료를 위해 보통 8주 간격으로 투여 횟수를 달리하여 투여받았다. 582명의 환자 중, 233명의 환자는 본 발명에서 제외되었는데, 제외 사유는 다음과 같다. (a) DNA 샘플 없음 (n=64), (b) 외부 병원에서 IFX 투여 시작 (n=63), (c) 심각한 점막 궤양 확인 불가 (n=5), (d) 부작용, 감염 또는 암의 동시 발병 및 보험 문제와 같이 무반응 이외의 다른 사유로 IFX 치료 초기 중단 (n=32), 또는 (e) 추적 평가 없음 (n=69). 본 발명은 서울아산병원의 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)를 통해 승인받았으며, 모든 참가자로부터 서면 동의서를 받았다.

[0037] 2. 임상 표현형

[0038] 본 발명 환자군의 인구 통계학적 및 임상적 특성은 표 1에 나타났다. 성별, CD 진단시 나이, IFX 치료 시작시 나이, IFX 치료 시작 전 투병 기간, CD 진단시 흡연 상태, CD 진단시 항문주위누관(perianal fistula) 존재 여부, IFX 치료 시작시 Montreal classification에 의해 정의된 병증 위치[(L1, 회장(ileum); L2, 결장(colon); L3, 회장결장(ileocolon)], IFX 치료 시작시 Montreal classification에 의해 정의된 병증 상태[B1, 비협착형(nonstricturing) 비관통형(nonpenetrating); B2, 협착형(stricturing); 및 B3, 관통형(penetrating)], IFX 치료 시작 전 주요 복부 수술(major abdominal surgery; MAS) 이력, IFX 치료 시작시 면역조절제 동시 사용 여부(azathioprine/6-mercaptopurine 또는 methotrexate), 기본 CD 활성 인덱스 및 C-반응성 단백질의 기본 수준을 포함하는 정보는 IBD 등록부에서 얻었다.

표 1

	Good responders	Non-responders	<i>P</i> value ^a	Intermediate responders	<i>P</i> value ^b
No. of samples	42	70		237	
Men (%)	32 (76.2)	36 (51.4)	0.009	158 (66.7)	0.016
Mean age at diagnosis, years ± SD	22.3 ± 6.4	24.3 ± 9.0	0.222	23.6 ± 7.4	0.428
Mean age at IFX initiation, years ± SD	26.5 ± 8.2	31.6 ± 9.7	0.005	29.7 ± 8.6	0.012
Mean duration of disease prior to first IFX, years ± SD	4.2 ± 3.7	7.4 ± 4.6	1.55 × 10 ⁻⁴	6.1 ± 4.8	0.002
Smoking status at diagnosis (%)			0.430		0.476
Current/Ex-smoker	15 (35.7)	20 (28.6)		63 (26.6)	
Never smoker	27 (64.3)	50 (71.4)		174 (73.4)	
Perianal fistula at diagnosis (%)	17 (40.5)	31 (44.3)	0.693	115 (48.5)	0.567
Disease location at IFX initiation (%)			0.936		0.897
L1 (Ileum)	7 (16.7)	10 (14.3)		44 (18.6)	
L2 (Colon)	1 (2.4)	2 (2.9)		9 (3.8)	
L3 (Ileocolon)	34 (81.0)	58 (82.9)		184 (77.6)	
Disease behavior at IFX initiation (%)			0.001		0.004
B1 (nonstricturing nonpenetrating)	28 (66.7)	22 (31.4)		93 (39.2)	
B2 (stricturing)	5 (11.9)	13 (18.6)		48 (20.3)	
B3 (penetrating)	9 (21.4)	35 (50.0)		96 (40.5)	
Concomitant immunomodulators at first IFX (%)	25 (59.5)	52 (74.3)	0.103	178 (75.1)	0.107
Previous major abdominal surgery prior to first IFX (%)	11 (26.2)	31 (44.3)	0.055	91 (38.4)	0.160
Mean CDAI at first IFX ± SD	254.1 ± 88.5	257.6 ± 56.3	0.821	242.2 ± 78.6	0.272
Mean CRP at first IFX, mg/dl ± SD	3.5 ± 3.4	2.4 ± 2.4	0.054	2.2 ± 2.4	0.009

CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; IFX, infliximab; SD, standard deviation.

^aComparison of the categorical data between good responders and non-responders was performed using Pearson chi-squared test and continuous variables were compared using two-tailed t-test.

^bComparison of the categorical data between good responders, non-responders, and intermediate responders was performed using Pearson chi-squared test and continuous variables were compared using ANOVA test.

3. 결과 및 정의

본 발명의 목적은 IFX 치료에 대한 좋은 반응과 연관된 유전자 좌위(genetic loci)를 밝혀내는 것이다. 이를 위해, 본 발명자들은 우선 IFX에 대한 반응을 비교하여 양 극단에 있는 환자를 확인하였다(도 1). 좋은 반응군은 대장내시경(ileocolonoscopy) 및 단층 촬영(cross-sectional imaging)을 통해 점막 치유가 관측되고, MAS 또는 투여량 증가 없이 5년 이상 좋은 반응을 유지하는 환자들로 정의하였다. 비-반응군은 IFX 투여 치료 후 대장내시경 및/또는 단층 촬영 상에서 병변의 개선 또는 진행에 아무런 변화를 보이지 않는 환자들로 정의하였다. 중간 반응군은 좋은 반응군 또는 비-반응군 기준에 적합하지 않은 환자들로 정의하였다. 이들은 초기에는 점막 치유가 확인되었으나, 반응 또는 추적 기간이 5년 미만이고, IFX에 대해 초기에 부분적으로 반응을 나타내는 환자들로 구성되었다. 대장내시경 상에서 점막 치유는 종종 발생하는 소화양(aphthae), 잔여 표층 미란(superficial erosion) 또는 주름 비후(thickened folds)를 제외하고는 모든 활성 염증 및 궤양 병변이 사라진 경우로 정의하였다. 단층 촬영 상에서 점막 치유는 영상 진단을 통해 이미 발견된 활성 장 염증이 완전히 해소되거나, 장 염증 소견이 현저히 감소된 후, 다른 활성 염증 이미징 소견을 동반하지 않는, 경도의 벽 비후(mural thickening) 또는 조영증강(hyperenhancement)이 나타나는 경우로 정의하였다.

4. 유전형 및 연관 분석

발굴 코호트 내 CD 환자 중 15명의 좋은 반응군 및 43명의 비-반응군은 IBD의 선행 GWAS를 통해 일부 유전자형 분석되었다. 기존 연구에서 품질 관리 기준에 적합하지 않았던 샘플 및 단일염기다형성(single-nucleotide polymorphisms; SNPs)은 제외하였다. SNP 및 샘플 품질 관리 분석 후, 본 발명자들은 GWAS 분석에서 522,285 SNPs의 유전자형 데이터를 사용하였다. 케이스 및 대조군이 잘 비교되었는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 환자 및 건강한 대조군을 포함하여 주성분 분석(principal component analysis)을 수행하였다. 2개의 주요 변이 주성분에 따라 대조군, 좋은 반응군 및 비-반응군의 HapMap 분포를 확인하였으며, 2개의 주요 주성분(PC1, PC2) 및 3개의 주요 주성분(PC1, PC3)에서도 이상치는 확인되지 않았습니다. 재현 시험에 있어서, 27명의 좋은 반응군 및 27명의 비-반응군의 재현 코호트에서 연관성이 있는 것으로 제시되는 8개 유전자좌(loci)의 상위 SNPs (*P*

$< 1 \times 10^{-5}$)에 대해 TaqMan SNP genotyping assays를 사용하여 유전자형을 분석하였다(도 1 및 표 2).

표 2

SNP	Chr	Position	Gene	Minor allele	Major allele	Discovery (n=58)				Replication (n=54)				Combined analysis (n=112)			
						MAF in good responders	MAF in non-responders	OR	P value ^a	Corrected P value ^b	MAF in good responders	MAF in non-responders	OR	P value ^a	95% CI	Combined P value ^c	P _{BD} ^d
rs928799	3	37,550,382	<i>ITG49</i>	A	G	0.27	0.00	NA	6.94×10^{-7}	2.27×10^{-6}	0.11	0.15	0.72	0.567	2.39	1.03-5.33	6.37×10^{-2}
rs2158962	16	3,738,027	<i>TRAP1</i>	A	G	0.67	0.20	8.12	2.08×10^{-6}	6.17×10^{-6}	0.46	0.20	3.37	0.004	4.94	$2.65-9.24$	1.35×10^{-7}
rs17020780	3	28,049,709	<i>23kb 5' of CMC1</i>	A	G	0.63	0.19	7.56	4.31×10^{-6}	1.20×10^{-5}	0.26	0.38	0.56	0.167	1.73	0.98-3.05	2.27×10^{-3}
rs17426641	12	116,588,803	<i>MEZD13L</i>	C	T	0.40	0.06	10.80	5.15×10^{-6}	1.41×10^{-5}	0.04	0.12	0.29	0.127	2.49	1.12-5.51	8.78×10^{-3}
rs730679	8	91,434,040	<i>200kb 3' of TMEM64</i>	A	G	0.13	0.62	0.10	5.22×10^{-6}	1.43×10^{-5}	0.48	0.57	0.69	0.335	0.34	0.19-0.60	1.70×10^{-4}
rs12240122	1	181,033,591	<i>2.5kb 3' of MRL</i>	C	T	0.27	0.01	30.91	6.92×10^{-6}	1.84×10^{-5}	0.11	0.08	1.50	0.547	4.29	$1.58-11.7$	0.009
rs834822	7	135,896,926	<i>235kb 5' of MTPN</i>	C	T	0.27	0.01	30.91	6.92×10^{-6}	1.84×10^{-5}	0.09	0.02	5.41	0.093	12.9	$2.85-58.6$	1.06×10^{-5}
rs12385913	14	69,866,838	<i>SLC39A9</i>	A	G	0.27	0.01	30.18	8.92×10^{-6}	2.32×10^{-5}	0.06	0.06	1.00	1.000	4.50	1.50-13.5	0.006

SNP, single-nucleotide polymorphism; Chr, chromosome; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^aP value was calculated using allelic association test.

^bP values corrected for residual inflation by genome control ($\lambda_{GC} = 1.102$).

^cP value was calculated using the Cochran-Mantel-Haenszel test.

^dP value was calculated using the Breslow-Day test.

5. 마우스 및 DSS-유도 급성 대장염

동물 연구는 아산생명과학연구원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아(Project number: 2017-12-084), 실험 동물의 사용과 관리에 대한 가이드라인에 따라 수행하였다. 모든 마우스는 아산생명과학연구원의 동물 시설에서 특정 병원균-프리 조건에서 사육하고 유지하였다. C57BL/6 마우스는 Orientbio (한국)로부터 구입하였다. 종양 괴사 인자-관련 단백질 1(Tumor necrosis factor-associated protein 1; *TRAP1*) 트랜스제닉 마우스(C57BL/6NCrjBgi/pcDNA3.1-hTRAP1)는 Macrogen (서울, 한국)으로부터 구입하였다. 트랜스제닉 마우스의 새끼는 PCR을 통해 유전자형 분석하였다(포워드 프라이머 5' - GGGAGCTCAAAATGGAGGAC-3'; 리버스 프라이머 5' - GATGGTGATGGTGCCTTTCT-3'). 모든 마우스는 8-10 주령에서 사용하였고, 수컷 마우스를 본 발명에 사용하였다.

트랜스제닉 및 대조군 마우스는 실험에서 성별을 일치시켰다. 텍스트란 설페이트 소듐(dextran sulfate sodium; DSS)-유도 대장염 모델 제작을 위해, 마우스(8-10 주령)에게 5% DSS (MP Biomedicals, cat no. 160110, CA, USA)를 식수에 녹여 5일 동안 제공하였다. 5일째, 마우스를 2 그룹으로 나누었는데, 한 그룹은 IFX (5 mg/kg, 200ul) (Remicade, Janssen, USA)를 정맥주사하였고, 나머지 그룹은 물을 제공하였다. 또한, 야생형 C57BL 마우스에도 동일한 실험 세팅을 적용하였다. 동물들의 몸무게를 매일 측정하였고, 직장 출혈 뿐만 아니라 고통을 나타내는지 관측하였다. 마우스는 IFX 투여 4일 후, 희생시켰다. 그 후, 결장을 제거하였고, 결장 길이를 측정하였다. day0의 몸무게(기준)를 희생일의 몸무게로 나누어서 상대적 몸무게를 계산하였다.

6. RT-PCR 및 조직학

Qiagen RNeasy Mini kit을 사용하여 제조사의 지시에 따라(Qiagen, German), 전체 RNA를 결장 조직으로부터 분리하였다. Premium[®] reverse transcriptase (Thermo Scientific, MA, USA)을 사용하여, cDNA를 합성하였다. 결장 조직에서 hTRAP1 과발현을 확인하기 위한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)은 hTRAP1 프라이머로 수행하였다(포워드 프라이머 5' - CCGTCCATGTTTGATGTGAG -3' ; 리버스 프라이머 5' - CAGGGGAATGTCCTCACTGT -3'). 조직 분석을 위해, 마우스로부터 수집한 결장 조직의 3개 부위[상행(ascending), 횡행(transverse), 하행/구불(descending/sigmoid) 결장]을 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 포르말린 고정된 파라핀 포매 절편은 표준 프로토콜에 따라 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

자발적으로 발생하는 장 염증을 측정하기 위해, 이전에 개발된 세미-정량 조합 점수 시스템을 변형하여 5개의 조직학적 세부 점수를 합하여 계산하였다. 조직학적 세부 점수[각 파라미터: 0, 없음(absent); 1, 경도(mild); 2, 중등도(moderate); 3, 중증(severe)]: 단핵세포 침윤(mononuclear cell infiltrate; 0-3), 과립화(granulation; 0-3), 상피 손상/미란(epithelial injury/erosion; 0-3), 다형핵세포 침윤(polymorphonuclear cell infiltrates; 0-3) 및 전층성 염증[0, 없음(absent); 1, 점막하(submucosal); 2, 근층(muscularis) 및 장막(serosa) 내로 1개의 병소 확장; 근층(muscularis) 및 장막(serosa) 내로 3 내지 5개의 병소 확장; 4, 광범위(diffuse)]. 결장성 염증은 샘플의 실험 조건을 알지 못하는 내과 병리학 전문가(I. L.)에 의해 평가되었다.

7. 말초혈액에서의 TRAP1 발현

혈액 샘플은 나쁜 반응을 보이는 8명의 환자 및 좋은 반응을 보이는 4명의 환자로부터 수집하였다. PAXgene Blood RNA kit을 이용하여 제조사의 지시에 따라(Preanalytix, Switzerland), PAXgene blood RNA tube 보존 샘플로부터 RNA를 분리하였다. Premium[®] reverse transcriptase (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 말초혈액에서 TRAP1 발현을 확인하기 위해, 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 TRAP1에 대한 프라이머로 수행하였다(포워드 프라이머 5' - CCGTCCATGTTTGATGTGAG -3' ; 리버스 프라이머 5' - CAGGGGAATGTCCTCACTGT -3').

8. 통계 분석

연속변수는 표준편차가 표시된 평균으로 나타났다. 분리 데이터는 숫자 및 백분율로 나타났다. 그룹 간 카테고리 데이터의 비교는 Pearson's chi-squared test를 이용하여 수행하였다. 연속 변수는 two-tailed t-test 또는 ANOVA test를 적절하게 사용하여 비교하였다. 단변량 분석에 따른 유의성 있는 모든 항목은 다변량 분석을 위한 이원 로지스틱 회귀 모델에 포함시켰다. $P < 0.05$ 의 모든 변수들은 모델에 포함되었으며, $P < 0.05$ 의 변수들은 모델에서 유지되었다. 상기 결과들은 95% 신뢰 구간을 갖는 오즈비(odds ratios; ORs)로 나타났다.

모든 유전적 연관 분석은 PLINK version 1.07 (see URLs)을 사용하여 연관 기초 실험을 통해 수행하였다. 발굴 연관 분석 및 잠재 개체군 계층의 전체적인 유의성을 평가하기 위해서, R version 3.23을 사용하여 quantile-quantile plot을 작성하였다. 추가적으로, 개체군 계층의 영향을 평가하기 위해서, 유전체 조절 팽창 계수를 계산하였다. 본 발명의 유전체 조절 수치(genomic control value; λ_{GC})인 1.102가 연관 P 수치의 보정에 사용되었다. 보정 후, 재현 샘플에서 검증된 SNP를 포함하는, 2개의 유전자좌(loci)가 연관성이 있는 것으로 제시되었다($P < 1 \times 10^{-5}$)(표 2). Haploview version 4.2를 통한 연관 P 수치를 사용하여, Manhattan plot을 작성하였다. 재현 분석은 독립적인 샘플을 사용하여 연관 분석을 수행하였다. 마지막으로, 조합 분석은 Cochran-Mantel-Haenszel test를 사용하여 수행하였다. 발굴 및 재현 샘플 간의 OR 측정 이질성(heterogeneity)을 분석하기 위

해서 Breslow-Day test를 사용하였다.

[0056] <실시예 1> 극단의 표현형(Extreme phenotypes) 분석

[0057] IFX 치료 결과와 연관된 유전적 변이를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 "극단의 표현형(extremes of phenotype)" 접근법을 적용하였다. 우선, 본 발명자들은 IFX 반응에 대한 반대편 극단의 환자, 즉 좋은 반응군(점막 치유가 관측되고, MAS 또는 투여량 증가 없이 5년 이상 IFX에 대한 좋은 반응을 유지하는 환자들로 정의) 및 비-반응군(IFX 투여 치료 후 대장내시경 및/또는 단층 촬영 상에서 병변의 개선 또는 진행에 아무런 변화를 보이지 않는 환자들로 정의)을 확인하였다.

[0058] 총 349명의 등록 환자 중, IFX에 대해 42명의 환자가 좋은 반응군, 70명의 환자가 비-반응군 및 237명의 환자가 중간 반응군으로 분류되었다(도 1). 349명 환자에 대한 인구 통계학적 및 임상적 특성은 표 1에 나타났다. 좋은 반응군 및 비-반응군은 진단시 나이, 흡연 상태, 병증 위치, 진단시 항문주위누관(perianal fistula), 면역조절제 동시 사용 여부 또는 MAS 이력에 있어 유사했다. 하지만, 비-반응군은 IFX 치료 시작 전 투병 기간이 더 길었고(7.4 vs 4.2 년), IFX 치료 시작시 나이가 더 많았으며(31.6 vs 26.5 년), 더 낮은 남성 비율(51.4% vs 76.2%)을 나타냈다. 관통형 상태는 좋은 반응군(21.4%) 보다 비-반응군(50%)이 더 흔하게 나타났다.

[0059] <실시예 2> 게놈-와이드 연관 분석

[0060] 연관 분석을 통해 총 112명의 환자를 분석하였다: 발굴 분석에서 58명 환자(15명 좋은 반응군 및 43명 비-반응군) 및 재현 분석에서 54명의 환자(27명 좋은 반응군 및 27명 비-반응군)(도 1). 15명의 좋은 반응군 및 43명의 비-반응군에서 522,285 SNPs의 게놈-와이드 연관 분석 결과는 Manhattan plot으로 작성하였다. 재현을 위한 후보로 확인된 8개의 유전자좌(loci) 중 ($P < 10^{-5}$ 로 정의, 표 2), 재현 코호트에서 TNF 수용체-연관 단백질 1(TNF receptor-associated protein 1; *TRAP1*)의 intron 3 내에 존재하는 rs2158962가 재현되었는데($P = 0.004$), "A" allele가 좋은 반응군에서 높게 나타났다(OR = 4.94; 95% 신뢰 구간 = 2.65-9.24; 조합 $P = 1.35 \times 10^{-7}$)(표 3). 임상 결과에 있어 rs2158962의 영향을 추가적으로 분석한 결과, 112명의 CD 환자 중에서, MAS 또는 투여량 증가 없이 IFX 치료를 유지하며 높은 누적 생존율을 나타내는 환자에서 유의성 있는 연관성을 나타냈다($P = 0.004$)(도 2A). TRAP1은 미토콘드리아 투과성 전이 기공(mitochondrial permeability transition pore)의 조절 뿐만 아니라, 산화스트레스 및 세포사멸에 대한 보호 기작에 관여하는 미토콘드리아-특이적 Hsp90 샤페론이다. 궤양성 대장염 환자 유래 이형성 샘플에서 TRAP1은 결장 염증 정도와 양성의 연관성을 나타냈다.

표 3

Chr	SNP	Position (hg19)	Candidate gene	Minor allele	Study	No. of subjects		MAF		OR (95% CI)	P^a	P_{BD}^b
						Good responders	Non-responders	Good responders	Non-responders			
16p13	rs2158962	3,738,027	TRAP1	A	Discovery	15	43	0.67	0.20	8.12 (3.22-20.5)	2.08×10^{-6}	
					Replication	27	27	0.46	0.20	3.37 (1.44-7.90)	0.004	
					Combined	42	70	0.54	0.20	4.94 (2.65-9.24)	1.35×10^{-7}	

The odds ratio is presented with respect to the minor allele of good-responder to infliximab. Chr, chromosome; Position, chromosome position; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^a P value was calculated using allelic association test. Combined P value was calculated using the Cochran-Mantel-Haenszel test.

^b P_{BD} was calculated using the Breslow-Day test.

[0061]

[0062]

<실시예 3> TRAP1 트랜스제닉 마우스에서의 인플릭시맙 치료

[0063]

다음으로, 본 발명자들은 인간 TRAP1 트랜스제닉 마우스를 사용하여, TRAP1 발현 증가가 인플릭시맙에 대해 더 좋은 반응을 일으키는지 확인하고자 하였다. TRAP1 트랜스제닉 마우스에서 인간 TRAP1의 결장 내 발현은 야생형 마우스보다 더 좋게 나타났다. 급성 대장염을 유도하기 위해서, TRAP1 트랜스제닉 및 야생형 마우스에게 식수에 녹인 5% DSS를 5일 동안 제공한 후, IFX를 정맥주사로 투여하였다. 급성 대장염 유도 후, 야생형 및 TRAP1 트랜스제닉 마우스의 상대 몸무게 곡선은 유사하게 변화하였다(도 3a). 하지만, 야생형 마우스와 비교하여 TRAP1 트랜스제닉 마우스에서, 대장염 회복된 마우스의 몸무게가 유의성 있게 높았다(IFX 투여 3일 후 $P = 3.26 \times 10^{-4}$ 및 IFX 투여 4일 후 $P = 7.47 \times 10^{-3}$)(도 3b). 또한, IFX 치료 후 조직학적 기준에 기초한 미세 장염도 TRAP1 트랜스제닉 마우스 및 야생형 마우스 사이에 유의성 있는 차이를 나타냈는데, 이는 TRAP1이 IFX에 대한 좋은 반

응과 연관되어 있다는 것을 뒷받침한다(도 3c 및 도 3d).

[0064] <실시예 4> rs2158962에 따른 임상 결과

[0065] rs2158962가 극단의 케이스에서 점막 치유를 예측하는데 사용될 수 있는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 등록된 모든 환자들(n = 349)에서 점막 치유율을 측정하였다. 점막 치유율은 동형접합체(homozygotes; AA)에서 46.7% (21/45), 이형접합체(heterozygotes; AG)에서 26.1% (40/153) 및 비-보인자(non-carriers; GG)에서 15.9% (24/151) 였다. 누적 생존율은 비-보인자(GG) 보다 동형접합체(AA)에서 상당히 높아졌다: 93.8% vs 41.6% at 3 years, 87.5% vs 31.4% at 5 years 및 80.8% vs 31.4% at 10 years (도 2A). rs2158962 "A" allele가 존재하면, 0.631의 곡선 수치 하의 면적은 점막 치유에 있어, 71.8% 민감도(61/85) 및 48.1% 특이도(127/264)를 나타냈다(도 2B). 349명 환자에 대해서, 임상 변수(성별, IFX 치료 시작시 나이, IFX 치료 시작 전 투병 기간, IFX 치료 시작시 병증 상태 및 IFX 치료 시작 전 MAS 이력) 및 *TRAP1* risk allele를 사용한 다변량 분석 결과, 비-보인자(GG)에 비해 동형접합체(AA)에서 점막 치유율이 5.5 배 높아졌다(표 4).

표 4

	Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Sex						
Women	Reference			Reference		
Men	1.77	1.03–3.06	0.039	1.63	0.88–3.02	0.119
Age at diagnosis (years ± SD)	0.96	0.92–0.99	0.020	Not included		
Age at IFX initiation (years ± SD)	0.92	0.89–0.95	4.00×10^{-5}	0.95	0.91–0.99	0.010
Duration of disease prior to first IFX (years ± SD)	0.83	0.77–0.90	6.58×10^{-7}	0.88	0.81–0.96	0.005
Smoking status at diagnosis						
Never smoker	Reference			Not included		
Current/Ex-smoker	1.09	0.64–1.87	0.753			
Perianal fistula at diagnosis						
No	Reference			Not included		
Yes	0.74	0.45–1.22	0.241			
Disease location at IFX initiation						
L1 (Ileum)	Reference			Not included		
L2 (Colon)	1.41	0.37–5.31	0.615			
L3 (Ileocolon)	0.87	0.46–1.63	0.658			
Disease behavior at IFX initiation						
B1 (nonstricturing nonpenetrating)	Reference			Reference		
B2 (stricturing)	0.32	0.15–0.66	0.002	0.30	0.11–0.79	0.015
B3 (penetrating)	0.25	0.14–0.45	4.00×10^{-5}	0.13	0.05–0.38	1.36×10^{-4}
Concomitant immunomodulators at first IFX						
No	Reference			Not included		
Yes	0.92	0.53–1.58	0.756			
Previous major abdominal surgery prior to first IFX						
No	Reference			Reference		
Yes	0.56	0.33–0.95	0.032	0.23	0.08–0.63	0.004
CRP at first IFX (mg/dl ± SD)	1.10	1.00–1.20	0.052	Not included		
rs2158962						
Non-carrier (GG)	Reference			Reference		
Heterozygote (AG)	1.87	1.06–3.30	0.030	2.04	1.10–3.80	0.024
Homozygote (AA)	4.63	2.23–9.61	3.90×10^{-5}	5.52	2.39–12.7	6.10×10^{-5}

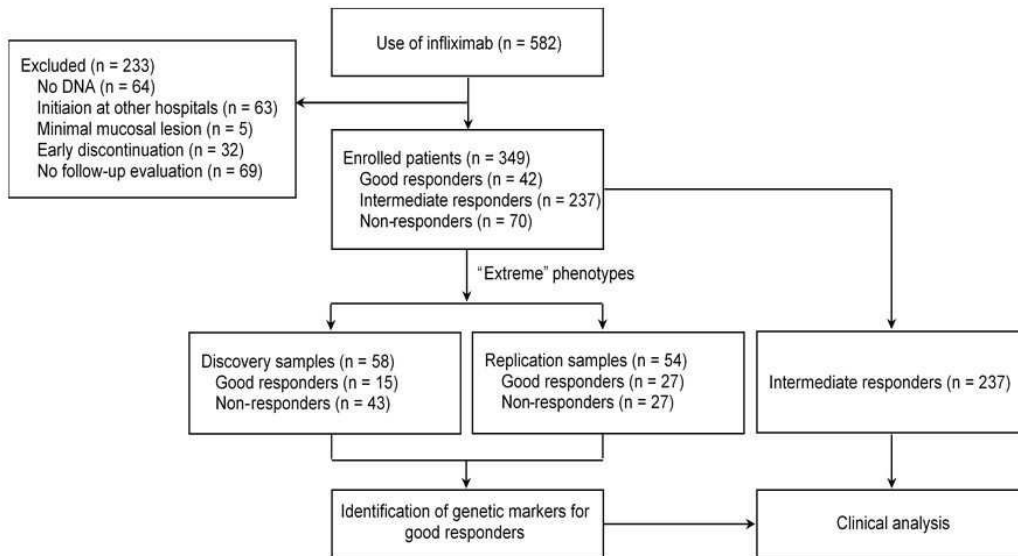
CI, confidence interval; CPR, C-reactive protein; IFX, infliximab; OR, odds ratio; SD, standard deviation.

[0066]

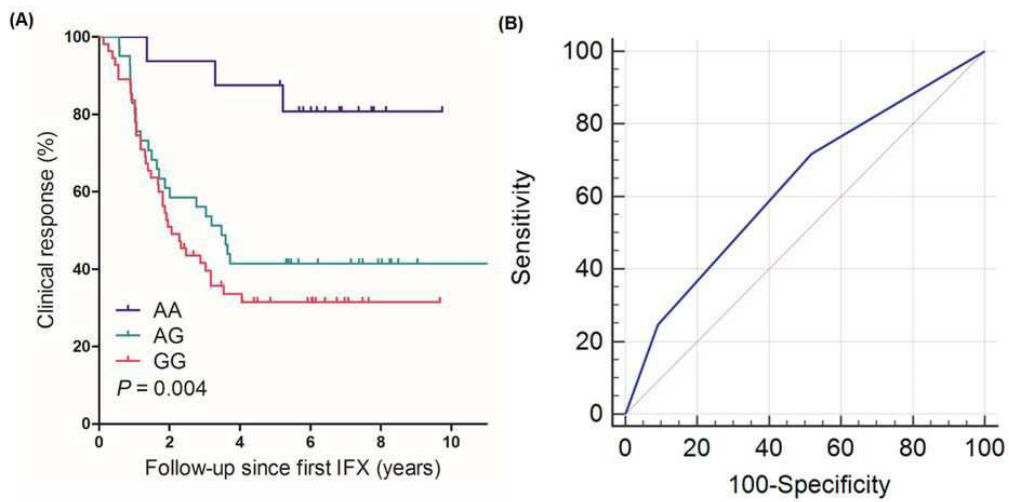
[0067] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

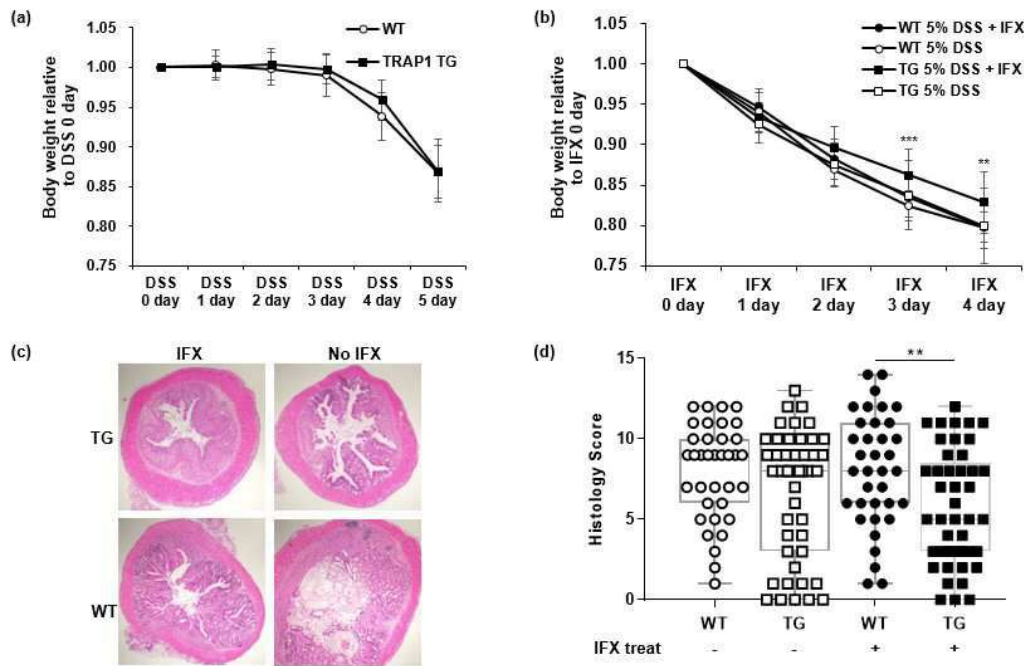
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

THE ASAN FOUNDATION

<120> Composition of single nucleotide polymorphism markers for predicting response to anti-TNF agents and method for predicting response to anti-TNF agents using the same

<130> ADP-2018-0170

<150> KR 10-2017-0069106

<151> 2017-06-02

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 201

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atagggtgaag aggaagcggg ggctgatctg ggcggaagct ggaggtcact gggagtcagg 60

aatgcagcac tcatcagtac gaaacccgga aacagtcct rgaagccct ctgagctttg 120

aaatctgctg ctttacaac tttcttcagg actctcctt gccttcagc aataatcagc 180

atgtcaacga tggtaggcctt c

201