



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/011210
- (22) 국제출원일: 2015년 10월 22일 (22.10.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0141671 2015년 10월 8일 (08.10.2015) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 송규영 (SONG, Kyu-Young); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 114 동 204 호, Seoul (KR). 백지원 (BAEK, Jiwon); 05531 서울시 송파구 토성로 19길 9, 304 호, Seoul (KR). 김경모 (KIM, Kyung Mo); 06288 서울시 강남구 삼성로 150, 106 동 608 호, Seoul (KR). 오석희 (OH, Seak Hee); 05378 서울시 강동구 천호대로 1006, 1203 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노폴lex 1 차 601 호, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

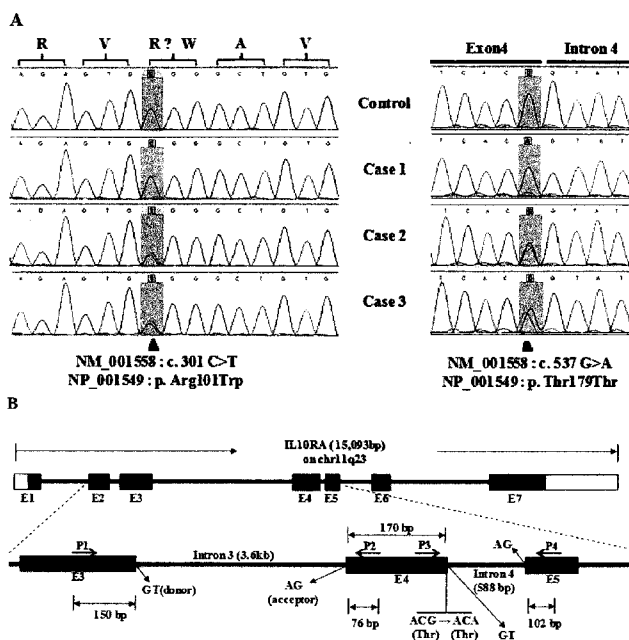
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING REFRACTORY INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN PEDIATRIC PATIENTS, COMPRISING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM MARKER IN IL10RA GENE

(54) 발명의 명칭: IL10RA 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 소아 난치성 염증성장질환 진단용 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosing refractory inflammatory bowel disease in pediatric patients, comprising a single nucleotide polymorphism marker within an IL10RA gene. Specifically, the present invention has confirmed that a mutant (T179T) that does not induce an amino acid change in IL10RA known as a gene for refractory inflammatory bowel disease in pediatric patients affects RNA splicing, resulting in a protein product lacking 448 amino acids in IL10RA, and the protein product paralyzes IL10 signal transduction, causing refractory inflammatory bowel disease. The frequency of the mutation in a normal Korean population is 0.035%, but the mutation can be used as a biomarker for prenatal diagnosis.

(57) 요약서: 본 발명은 IL10RA 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 소아 난치성 염증성장질환 진단용 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는, 소아 난치성 염증성장질환의 유전자로 알려진 IL10RA에서 아미노산의 변화를 유도하지 않는 변이(T179T)가 RNA 스플라이싱(splicing)에 영향을 주어 IL10RA에서 448 개의 아미노산이 결여된 단백질을 만들며, 이렇게 만들어진 단백질은 IL10 신호전달을 마비시켜 난치성 염증성장질환의 원인이 되는 것을 확인한 것으로, 이 돌연변이의 정상 한국인에서의 빈도는 0.035%이지만, 산전 진단용 바이오마커로 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: IL10RA 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 소아 난치성 염증성장질환 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 인터루킨-10 수용체 알파(interleukin-10 receptor alpha; *IL10RA*) 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 소아 난치성 염증성장질환 진단용 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 사이토카인 인터루킨-10(interleukin-10; IL-10)은 점막 지혈에 있어 항염증작용에 중요한 역할을 한다. IL-10을 코딩하는 유전자에서의 삭제 돌연변이(deleterious mutations) 및 이의 수용체들은 유아 염증성장질환(inflammatory bowel disease; IBD)을 일으키는 것으로 나타났다. IL-10 경로의 결핍에 의해 야기되는 단성 IBD는 매우 공격적이며, 보고된 케이스들에서는 1세 미만에서 발병되었다. 아자티오프린(azathioprine), 인플릭시맙(infliximab), 항생제 및 수술과 같은 IBD의 통상적인 치료에 대해 이들의 임상적 표현형은 주로 심한 대장염, 재발성 감염 및 난치성 항문 질병으로 나타난다. IL-10 경로의 결핍에 의해 야기되는 IBD의 발병 과정은 성인에서 복잡한 형질로 나타나는 IBD 보다는, 멘델 형태의 1차 면역 결핍증(primary immune deficiencies; PID) 중 하나로 나타나는 장질환으로 인한 것으로 추정된다.
- [3] 최근, 유아 IBD를 가진 어린이를 유전적으로 진단하기 위해서, IBD 연구자들 사이에서는 전체 엑솜 서열분석(whole exome sequencing; WES)이 추천된다. 어린이에게서 나타나는 단성 IBD에 의해 야기되는 유전적 돌연변이 수가 50개 이상으로 증가하였으므로, 모든 돌연변이들에 대해 전통적인 생거(Sanger) 서열분석은 좋은 방법이 아니다. WES를 사용하여, *XIAP* 및 *TTC7A*에서의 기능 상실이 유아 IBD를 야기하는 것으로 최근 보고되었다. 하지만, WES의 분석 방법은 여전히 논란이 있으며, 개발 중에 있다. 우선, 다양한 삭제 돌연변이(deleterious mutations)에 대한 기본적인 검증을 위한 기능 연구가 임상에서 필요할 것으로 보인다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 *IL10RA* 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [5] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 *IL10RA* 유전자 내의 단일염기다형성 마커의 대립유전자형을 확인하는 단계를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

- [6] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 *IL10RA* 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단 키트를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물을 제공한다,
- [8] 또한, 본 발명은 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형으로 난치성 염증성장질환을 확인하는 단계를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 537번째 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 포함하는 난치성 염증성장질환 진단 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명은 *IL10RA* 유전자 내의 단일염기다형성 마커를 포함하는 소아 난치성 염증성장질환 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 소아 난치성 염증성장질환의 유전자로 알려진 *IL10RA*에서 아미노산의 변화를 유도하지 않는 변이(T179T)가 RNA 스플라이싱(splicing)에 영향을 주어 *IL10RA*에서 448개의 아미노산이 결여된 단백산물을 만들며, 이렇게 만들어진 단백산물은 IL10 신호전달을 마비시켜 난치성 염증성장질환의 원인이 되는 것을 확인한 것으로, 이 돌연변이의 정상 한국인에서의 빈도는 0.035%이지만, 산전 진단용 바이오마커로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 *IL10RA* 돌연변이의 확인 결과를 나타낸다. (A) 3명의 환자 및 건강한 대조군에서의 *IL10RA* R101W (c. C301T) 및 T179T (c. G537A) 돌연변이 확인 결과를 나타낸다. (B) T179T 돌연변이의 위치를 나타낸다.
- [12] 도 2는 *IL10RA* T179T 돌연변이에 의해 야기되는 스플라이싱 에러(splicing error) 확인 결과를 나타낸다. (A) 환자, 그의 부모 및 건강한 대조군으로부터 분리된 RNA에 대한 *IL10RA* (엑손 3-5)의 RT-PCR 결과. (B) 제1 케이스, 제3 케이스 및 건강한 대조군에 대한 엑손 3 (lane 1, 4, 7), 엑손 4 (lane 2, 5, 8) 및 엑손 3-5 (lane 3, 6, 9)의 RT-PCR 결과. (C) 절단된 RT-PCR 산물인 252 bp 서열은 조기 정지 코돈에 의해 야기되는 엑손 3의 결핍을 보여준다. (D) T179T 돌연변이에

의해 변경되는 단백질의 예측 구조를 나타낸다. 신호전달 펩타이드(Signaling peptide; SP), 피브로넥틴 3(fibronectin 3; FN3) 및 트랜스멤브레인(transmembrane; TM) 도메인을 나타낸다.

[13] 도 3은 T179T에 대한 제1 케이스 동형접합체에서 IL-6 신호전달 대비 결핍된 IL-10 신호전달을 나타낸다. 제1 케이스 및 건강한 대조군 유래 말초혈액단핵구세포(PBMC)에 있어서, IL-10 및 IL-6 유도된 STAT3 인산화에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다.

[14] 도 4는 T179T에 대한 제1 케이스 동형접합체에서 결핍된 IL-10 신호전달을 나타낸다. 제1 케이스, 그의 부모 및 건강한 대조군 유래 말초혈액단핵구세포(PBMC)에 있어서, IL-10 유도된 STAT3 인산화에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 본 발명자들은 가족-기반 WES를 통해 확인된, 심한 IBD를 가진 3명의 어린이에서의 *IL10RA* 유전자형에 대해 연구하였다. 이는 *IL10RA*에서 스플라이싱 에러(splicing error)를 유발하여 IL-10 경로를 결핍시키는, 동의(synonymous) 돌연변이 T179T에 대해 최초로 보고하고, 본 발명을 완성하였다.

[16]

[17] 본 발명은 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 난치성 염증성장질환은 유아 또는 소아에서 발병할 수 있다. 상세하게는, 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형은 A/A 또는 A/G일 수 있으며, 상기 조성물은 산전 검사에 이용할 수 있다.

[18] 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드는 chr11q23 상의 *IL10RA* 내에 존재하며, 대립유전자형은 G>A이다. 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드는 다중염기기재 방식에 따라 작성하였는데, A 또는 G일 수 있으므로 "r"이라고 기재하였다.

[19] 상기 *IL10RA* 단백질은 NCBI accession no. NP_001549이다. 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드가 G 또는 A로 변경되어도, *IL10RA* 단백질의 179번째 아미노산은 트레오닌(threonine; Thr)으로서 아미노산 변화는 유도하지 않는 동의(synonymous) 변이 (T179T)를 나타낸다.

[20]

[21] 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.

[22]

[23] 또한, 본 발명은 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형으로 난치성 염증성장질환을 확인하는 단계를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 난치성 염증성장질환은 유아 또는 소아에서 발병할 수 있다. 또한, 상기 방법은 산전 검사에 이용할 수 있다.

[24] 상세하게는, 상기 난치성 염증성장질환을 확인하는 단계는 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형이 A/A 또는 A/G인 경우, 난치성 염증성장질환으로 확인할 수 있다.

[25] 보다 상세하게는, 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형이 A/A 또는 A/G인 경우, RNA 스플라이싱(splicing)에 영향을 미쳐 절단된 IL10RA 단백질을 생산한다. 상기 절단된 단백질은 IL10 신호전달을 마비시켜 난치성 염증성장질환의 원인이 될 수 있다.

[26]

[27] 상기 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.

[28] 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.

[29]

[30] 또한, 본 발명은 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형으로 난치성 염증성장질환을 진단하는 단계를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단 방법을 제공한다. 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형이 A/A 또는 A/G인 경우, 난치성

염증성장질환으로 진단할 수 있다.

[31]

[32] 또한, 본 발명은 난치성 염증성장질환의 진단을 위한 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공한다.

[33]

[34] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 537번째 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 포함하는 난치성 염증성장질환 진단 키트를 제공한다. 상기 키트는 PCR 키트 또는 DNA 칩 키트가 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35]

상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 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, 이중쇄DNA(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.

[36]

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 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[37]

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.

[38]

[39] <실험예>

[40]

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

[41]

[42] **1. 실험 대상**[43] **1) 제1 케이스**

[44] 제1 케이스 환자는 같은 혈족이 아닌 한국 부모로부터 41주 만에 태어났고, 출생 몸무게가 3.2 kg인 여아이며, 6세에 대장염의 재발성 상태가 발병하기 전까지 건강하였다. 상기 환자는 9세에 재발성 복부통의 초기 발병과 설사를 갖는 크론병(CD)으로 진단받았다. 내시경을 통해 상기 환자의 전체 대장에서 심한 대장염이 관찰되었다. 초기 치료는 식이요법으로 진행하였으나, 실패하였다. 상기 환자의 질병은 스테로이드 의존성을 나타내었으며 그 후 스테로이드 불응성을 나타내었다. 상기 환자의 대장염은 아자티오프린(azathioprine), 인플릭시맙(infliximab) 및 아달리무맙(adalimumab)에는 어떠한 반응도 나타내지 않았다. 한편, 상기 환자는 후속조치 8개월 동안 심한 위장 감염의 5개 증상으로 고통받았다. 10세에 루프 회장루술을 시행하여 증상이 완화되었으며, 15개월 후 대장에서 심한 협착을 나타내었다. 12세에 끝 회장루 형성술과 함께 복강경 대장절제술을 시행하였다. 상기 환자는 결코 항문 주변 문제를 겪지 않았다.

[45]

[46] **2) 제2 케이스**

[47] 제2 케이스 환자는 같은 혈족이 아닌 한국 부모로부터 41주 만에 태어났고, 출생 몸무게가 2.6 kg인 여아이며, 2개월 때 직장 질루 및 치열로 인해 소아외과로 의뢰되었고, 그 후 재발성 열성 질환을 나타내었다. 상기 환자가 4개월 되었을 때, S상 루프 결장루술을 시행하였고, 성장 장애, 지속적인 빈혈 및 저알부민혈증을 나타내었다. 상기 환자가 9개월 되었을 때, 대장내시경을 수행하여 간 만곡부로부터 원위부 결장까지 크론병을 나타내었다. 상기 환자는 코르티코스테로이드에 대한 무반응으로 인해 10개월 때 누관 제어를 위해 인플릭시맙(infliximab) 및 아자티오프린(azathioprine)을 이용하였다. 13개월 때, 상기 환자는 수두에 감염되어 패혈증으로 사망하였다.

[48]

[49] **3) 제3 케이스**

[50] 제3 케이스 환자는 같은 혈족이 아닌 한국 부모로부터 39주 만에 태어났고, 출생 몸무게가 3.9 kg인 여아이며, 영아기 동안 재발성 열성 질환/감염과 구강 궤양을 나타내었다. 상기 환자는 10개월 때 항문주위 누공으로 인해 수술을 받았으며, 15개월 때 1개월 설사, 성장 장애 및 재발성 발열로 인해 병원에 의뢰되었고 패혈증과 항문주위 누공을 갖는 대장 전체의 크론병으로 진단되었다. 아자티오프린(azathioprine) 및 인플릭시맙(infliximab)의 사용이 환자의 증상을 일시적으로 경감시켰으나, 상기 환자는 복강 내 생긴 농양과 악화된 항문주위 누공으로 자주 고통받아 항생제 치료를 필요로 하였다. 58개월 때 아달리무맙(adalimumab) 치료를 시작하여 3년 동안 지속하였다. 60개월 때 끝

회장루 형성술을 포함한 전대장절제술을 권유받았으나, 환자의 부모가 후속 치료를 거부하였다. 90개월 때 상기 환자는 갑작스러운 패혈성 쇼크로 내원하였으며, 그로 인해 사망하였다.

- [51] 상기 제3 케이스의 유전자형은 22명의 극심한 소아 크론병 환자에 대한 WES의 이전 보고(publishing in the journal *Gut and liver*, 2015)에서 보고된 바 있으며, 제1 케이스, 제2 케이스 및 제3 케이스는 각각 발단자(proband) 1, 5 및 9로 나타났다. 유아기 발병과 제2 케이스와 제3 케이스와 같이 사망에 이르는 중증도로 인해 *IL10RA*에서 R101W의 이형 돌연변이를 갖는 것 외에 다른 알려지지 않은 PID-관련 돌연변이를 주목하게 되었다. 문헌에서 결함 있는 IL-10 경로의 보고된 케이스와 유사성으로 인해 본 발명자들은 제2 케이스, 제3 케이스, 그들의 부모 및 영향을 받지 않은 형제자매로부터 얻은 DNA에 대한 가족 근간 WES를 수행하였다.

[52]

[53] **2. *IL10RA* 돌연변이의 확인**

[54] **1) 게놈 DNA 준비 및 전체 엑솜 시퀀싱**

- [55] 가족 근간 WES 접근을 위해, 제2 케이스, 제3 케이스, 그들의 부모 및 형제자매의 총 8가지 발단자로부터 얻은 게놈 DNA는 연층(buffy coat)으로부터 QIAamp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 정제하였다. 엑솜 포획은 Sure Select Human All Exon 38Mb kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 수행하였다. 각 환자로부터 얻은 엑솜을 표적으로 하는 포획, 정제 및 증폭된 라이브러리를 IlluminaHiSeq2000 상에서 시퀀싱하였다. 포획 및 시퀀싱은 Macrogen(Seoul, Korea)에서 수행하였다. 염기 단편은 BWA v-0.7.5a를 이용하여 Hg19 레퍼런스 게놈에 대해 맵핑되었고, 변이체(SNVs 및 indels)는 Genome Analysis ToolKit (GATK) v2.7.2 Unified Genotyper를 이용하였고 GATK 'Best practices for variant calling v3'에 의해 추천받은 가이드라인에 따랐다. 다음의 철저한 필터가 적용되었다: "MQ0 >= 4 && ((MQ0 / (1.0 * DP)) > 0.1)", "QD < 2.0", "MQ < 40.0", "FS > 60.0", "HaplotypeScore > 13.0", "MQRankSum < -12.5", "ReadPosRankSum < -8.0", clusterWindowSize 8 for SNPs 및 "MQ0 >= 4 && ((MQ0 / (1.0 * DP)) > 0.1)", "QD < 2.0", "ReadPosRankSum < -20.0", "FS > 200.0", "SB >= -1.0" for 삽입-결실(indels). 이러한 8명 개체에서 GATK 필터를 통과한 총 44,092 (33,266 coding) 변이체를 확인하였다.

- [56] 1000개 게놈 개체와 엑솜 변이체 서버(EVS) 데이터베이스의 1% 이하로 존재하지 않거나 존재하는 3,129개의 희귀 코딩 변이체 (1,846 missense, 1,113 silent, 56 frameshifts, 49 splice-site, 46 nonsense, 11 amino acid deletions, and 8 amino acid insertions)를 분석하였다. 그 후, 각 가족에서 영향을 받은 자손에서의 신생아 또는 유전의 상염색체 열성 모드에서 분리된(영향을 받은 자손에서의 동형 또는 이종접합) 비동형(nonsynonymous) 돌연변이를 갖는 유전자에 대해

조사하였다.

- [57] 적어도 5개 염기 단편에 의해 둘러싸여 10점 이상의 SNP 퀄리티 스코어를 갖는 유일한 유전자형 조사 분석을 수행하였고, 모든 후보 질환 돌연변이는 integrative genomics viewer (<https://www.broadinstitute.org/igv/>) 상에서 좋은 염기 단편 배열로서 잘 관찰되었다. 그 후, 각 가족에서 영향을 받은 자손(제2 케이스, 제3 케이스)에서의 신생아 또는 유전의 상염색체 열성 모드에서 분리된(영향을 받은 자손에서의 동형 또는 이종접합) 돌연변이를 갖는 유전자에 대해 조사하였다. 제2 케이스 및 제3 케이스의 독특한 변이체 중에서 50개 단일 유전자 IBD 유전자의 포괄적인 패널이 변이체에 대한 추가적인 고객 필터링 동안 사용되었다.

[58]

[59] 2) 시퀀싱의 유효성 (게놈 DNA의 생거 시퀀싱 분석)

- [60] IL10RA의 표적 영역은 각 엑손 옆에 배치된 인트론 프라이머를 이용하여 증폭하였다[forward primer 5'-GGCCTCTTGGCTCTCCC-3'(서열번호 2) 및 reverse primer 5'-GCAGACATGGTGAGCTATGG-3'(서열번호 3) for R101W in exon 3; forward primer 5'-ATTCTGGAGGCAAAGTCTCG-3'(서열번호 4) 및 reverse primer 5'-AGTTCCCAATGGCACACAAG-3'(서열번호 5) for T179T in exon 4]. 이때 증폭 조건은 95°C-7분 동안 1주기, 95°C-30초, 56°C-30초, 72°C-1분 동안 30주기와 72°C-5분 동안 1주기로 수행하였다. 360 bp 및 348 bp의 증폭 산물은 아가로스겔 전기영동을 통해 확인하였고, Exo-SAP(10 : 1 U ratio mixture of Exo nuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase, Affymetrix, OH, USA)를 37°C에서 15분, 80°C에서 15분 및 4°C에서 유지하는 조건으로 처리하여 정제하였다. 시퀀싱은 ABI 3730XL sequencer(Cosmogenetech, Seoul, Korea)를 이용하여 수행하였다. 아미노산 넘버링은 미성숙 단백질(신호 펩타이드 포함)에서의 위치를 참조한다.

[61]

[62] 3) 총 RNA 분리 및 RT-PCR 분석

- [63] 제조자의 지침(Invitrogen, MA, USA)에 따라 Trizol®를 이용하여 혈액 버피코트로부터 RNA를 분리하였다. cDNA는 Premium reverse transcriptase (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 합성되었다. IL10RA의 엑손 3에서 엑손 5에 대한 프라이머 서열은 다음과 같다[forward primer in exon 3 5'-CCAAGTGTAGCCAGACCCTG -3'(서열번호 6; P1) 및 reverse primer in exon4 5'-GGCCTGGGTAGCTGAATCTT - 3' (서열번호 7; P2), forward primer in exon 4 5'-CCTCGGGAAGATTCAGCTAC-3'(서열번호 8; P3), 및 reverse primer in exon 5 5'- ACTTCGGGAAGCGACAGATG - 3'(서열번호 9; P4)]. 중합효소 연쇄반응(PCR)은 표준 프로토콜에 따라 수행되었고, 엑손 4-스키핑 이벤트를 나타내는 250 bp의 PCR 산물은 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 아가로스겔로부터 분리하였고, P1 및 P4 프라이머를 이용하여 ABI 3730XL sequencer에 의해 시퀀싱하였다.

[64]

[65] **3. T179T 대립유전자에 대한 동형접합적 환자에서의 기능적 IL-10 분석**

[66] IL-10R 결핍을 조사하기 위하여, 동의 변화 T179T의 기능성 연구를 수행하였다. 제조사의 지침에 따라 Ficoll-Paque PLUS[density = 1.077 ± 0.001 g/ml(GE healthcare, UK)]를 이용하여 T179T에 대한 동형접합적 환자와 건강한 환자로부터 말초혈액단핵구세포(PBMCs)를 분리하였다. 즉, 5 ml의 전혈을 동량 부피의 1X PBS로 희석하고, 상기 희석한 혈액 시료(10 ml)를 5 ml의 Ficoll-Paque PLUS 상에 층층이 조심스럽게 쌓았으며, 20°C에서 30분 동안 400 x g로 원심분리하였다. 세포계면층을 조심스럽게 모은 후, 10ml의 1X PBS (at 100 x g for 30 min)로 2회 세정하고 1X PBS로 재현탁하였다. 상기 세포(5×10^5 cells)는 실온에서 30분 동안 40 ng의 재조합 인간 IL-10(Peprotech, Inc, NJ, USA)으로 자극하였다. 세포성 추출물은 표준 프로토콜을 따라 준비하였다. 단백질 농도는 protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA)에 의해 측정하였고, 12% 소듐도데실설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 통해 100 μ g의 단백질을 분리하였고 멤브레인으로 전이시켰다. 상기 멤브레인을 마우스 항-STAT3(signal transducer and activator of transcription 3), 래빗 항-인산화 STAT3 항체(Cell Signaling technology, MA, USA)와 반응시킨 후 고트 항-마우스 및 동키 항-래빗 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 반응시켰다. 로딩 대조군으로서 β -Actin을 이용하였다. ECL 방법(Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 상기 멤브레인을 관찰하였다.

[67]

[68] **4. 2,885명 대조군에서 IL10RA의 유전형질 분석**

[69] TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 건강한 대조군의 유전형질을 분석하였다. 총 2,885명의 관련없는 건강한 대조군은 울산대학교 의과대학과 아산병원으로부터 618명, 서울대학교로부터 665명, 국가중앙인체자원은행으로부터 1,346명과 국가중앙인체자원은행의 멤버인 경상대학병원으로부터 256명의 건강한 대조군을 제공받았다. 모든 시료는 서면동의 하에 얻어졌고, 임상시험심사위원회에 의해 승인받아 진행되었다.

[70]

[71] <실시예 1> IL10RA 돌연변이의 확인

[72] 제2 케이스의 가족에 대한 가족-기반 WES 분석 결과, 제2 케이스는 1개의 디노보(de novo) 변이, 2개의 열성 동형접합(recessive homozygous) 변이 및 복합 이형접합(compound heterozygous) 변이를 가진 6개의 유전자가 나타났다(표 1). 제3 케이스의 가족에 대해서도 동일한 분석을 수행한 결과, 복합 이형접합(compound heterozygous) 변이를 가진 3개의 유전자가 나타났을 뿐, 어떠한 디노보(de novo) 또는 열성 동형접합(recessive homozygous) 변이도 나타나지 않았다. 제2 케이스 및 제3 케이스 모두에서 복합 이형접합 변이를

가진 유일한 유전자가 *IL10RA*이며, 각 케이스에서 유전자 내 한 개의 미스센스 돌연변이(missense mutation) (R101W)와 1개의 동의(synonymous) 아미노산 변화 (T179T)를 나타냈다(표 2). 상기 2개의 변이는 생거(Sanger) 서열분석에 의해 확인되었다(도 1A).

[73]

[74] [Table 1]

제2 케이스 및 제 3케이스의 가족-기반 엑솜 서열분석의 분석 단계

Analytic pipeline	Family 1	Family 2	Commons in Two Family
All coding variants	35,088	34,580	26,202
Filtering by quality	26,656	26,346	19,743
Filtering by 1000 genomes(< 1 %)	1,872	1,773	520
Filtering by family data			
de novo	1	0	0
simple recessive	2	0	0
compound heterozygote	12(6)*	6(3)*	2(1)*

[75] * 유전자 수

[76]

[77] [Table 2]

*IL10RA*의 변이 프로파일

Location	Exon 3	Exon 4
Chromosome position	chr11 : 117,860,269	chr11 : 117,864,125
SNP	rs368287711	NA
Change of nucleotide	C301T	G537A
Change of amino acid	R101W	T179T
Case 1	C/C	A/A
Case 2	C/T	A/G
Case 3	C/T	A/G

[78]

[79] 제2 케이스는 엄마로부터 미스센스 돌연변이(R101W)를 물려받았고, 아빠로부터 동의 아미노산 변화(T179T)를 물려받았다. 생거(Sanger) 서열분석을 통해, 그녀의 형제 자매는 단지 미스센스 돌연변이(R101W)만 공유하는 것으로

밝혀졌다. 제3 케이스는 아빠로부터 미스센스 돌연변이(R101W)를 물려받았고, 엄마로부터 동의 아미노산 변화(T179T)를 물려받았으나, 그녀의 형제 자매는 동의 아미노산 변화(T179T)만 공유하는 것으로 밝혀졌다. 여기에서, 본 발명자들은 22명의 소아 크론병(CD) 환자에 대한 이전 WES 데이터를 다시 분석하였고, 제1 케이스가 T179T 동형접합체(homozygote)라는 것을 확인하였다. IL10RA 결핍의 전형적인 표현형과는 달리, 제1 케이스의 질병은 유아기에 시작되지 않았고, 항문주위 질병을 나타내지 않았다.

- [80] *IL10RA*의 미스센스 돌연변이(R101W)는 난치성 유아 IBD의 동형접합 상태에서 원인이 되는 대립형질(allele)로서 보고되었다. 이는 IL-10을 촉진시키고 STAT3 인산화를 결핍시켜, IL-10-유도 신호전달을 마비시키는 것으로 알려졌다. 하지만, T179T는 보고된 적이 없다. 동의 아미노산 변화(T179T)는 엑손/인트론 경계에서 나타났는데(도 1B), 이는 인트론 4의 스플라이스 공여 부위(splice donor) 전 엑손 4의 한 개의 염기에서 G→A 전이가 일어난다. 상기 염기 치환은 스플라이싱 에러를 유도하여 단백질 절단을 나타낼 수도 있다. 동의 아미노산 변화 대립형질(allele)의 임상적 관련성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 제1 케이스 및 그의 무증상 부모의 혈액 세포 mRNA를 이용하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. RT-PCR은 엑손 4 측면의 엑손에 대해 프라이머를 사용하여 수행하였다: forward, CCAACTGTAGCCAGACCCTG (서열번호 6; P1); 및 reverse, ACTTCGGGAAGCGACAGATG (서열번호 9; P4). 예상되는 전장 길이 RT-PCR 산물은 422 bp였으나, 엑손 4을 제외한 mRNA로부터의 예상 산물은 252 bp였다. 건강한 공여자에서 야생형 *IL10RA*를 사용한 RT-PCR 결과, 단지 422-bp 단편만 나타난 반면, 환자 부모의 mRNA로 동일한 반응을 수행한 결과, 전장 길이 및 절단된 단편이 모두 나타났다(도 2A). 환자에서는 절단된 단편이 주요 산물로 나타났으나, 422-bp에서 희미한 밴드도 함께 관측되었다. 환자의 mRNA가 정상적인 스플라이싱을 할 수 있는지 확인하기 위해서, *IL10RA* 전사체 내에 엑손 4가 존재하는지 RT-PCR을 통해 분석하였다. 다음의 프라이머를 사용하였다: forward CCAACTGTAGCCAGACCCTG (서열번호 6; P1) in exon 3 및 reverse GGCCTGGGTAGCTGAATCTT (서열번호 7; P2) in exon 4, forward CCTCGGGAAGATTTCAGCTAC (서열번호 8; P3) in exon 4 및 reverse ACTTCGGGAAGCGACAGATG (서열번호 9; P4) in exon 5. 각각에 대해 예상되는 전장 길이 RT-PCR 산물은 226 bp (엑손 3-4) 및 223 bp (엑손 4-5)이다. 도 2B에 나타난 바와 같이, 제1 케이스에서는 엑손 3-4 및 엑손 4-5에서 예상되는 RT-PCR 산물이 관측되었는데, 이는 제1 케이스에서도 정상적인 스플라이싱이 일어날 가능성이 있음을 나타낸다. 252 bp 단편이 엑손 4-절단된 단편임을 보여주기 위해서, 본 발명자들은 상기 단편을 분리하였고, 양 방향으로 서열분석하였다. 상기 서열에는 예상되는 *IL10RA* 엑손 3 및 엑손 5 사이의 스플라이스 접합(splice junction)이 포함되어 있다(도 2C). 엑손 3의 3' 말단은

코돈 123의 첫번째 및 두번째 위치 사이에서 끝나고, 엑손 5의 5' 말단은 코돈 180으로 시작된다. 엑손 3 및 엑손 5 사이의 스플라이스 접합(splice junction)의 프레임은 코돈 123의 3' 말단에 7개의 새로운 코돈이 추가되고, 그 뒤에 정지 코돈이 추가되는 것으로 예측되었다. IL10RA 단백질의 카르복시 말단으로부터 448개의 야생형 아미노산이 절단되어 제거되는 것으로 예측되었다. 짤어진 mRNA는 엑손 5에서 조기 정지 코돈을 유발하고, 이는 2개의 피브로넥틴 타입 III 중 하나, 트랜스멤브레인 및 IL-10 수용체의 세포 내 도메인을 결실시킨다(도 2D).

[81]

[82] <실시예 2> 결핍된 IL-10 경로의 기능적 검증

[83] 기능적 검증은 단지 제1 케이스에서만 수행하였는데(T179T 동형접합체), 이는 제2 케이스 및 제3 케이스는 WES 테스트 전에 이미 IBD로 사망하였기 때문이다. IL-10의 항염증 효과는 주로 STAT3을 통한 신호전달에 의해 매개된다. IL-10 매개 신호전달을 평가하기 위해서, 제1 케이스, 이의 부모 및 건강한 대조군의 말초혈액단핵구세포(PBMC)를 IL-10으로 촉진시켰고, 웨스턴 블랏 분석을 통해 타이로신(tyrosine) 705에서의 STAT3 인산화를 측정하였다. IL-10-유도된 STAT3 인산화는 제1 케이스에서는 결핍된 반면, IL-6-유도된 STAT3 인산화는 손상되지 않았다(도 3). 하지만, 부모 및 건강한 대조군에서는 IL-10이 STAT3 인산화를 유도하였다(도 4). 이는 IL10RA의 T179T가 IL-10 매개 신호전달의 결핍을 유도한다는 것을 뒷받침한다.

[84]

[85] <실시예 3> IL10RA T179T 변이의 TaqMan 유전형 분석

[86] 개체군에 있어 상기 대립형질(allele)이 얼마나 흔한지 확인하기 위해서, 2,885명의 건강한 대조군에서 IL10RA T179T 변이에 대한 유전형 분석을 TaqMan SNP 유전형 분석을 통해 수행하였다. 2,885명 중에서, 단지 2명만이 이형접합 T179T 변이를 나타냈다. T179T 변이의 소수 대립형질 빈도는 0.035%였다.

[87]

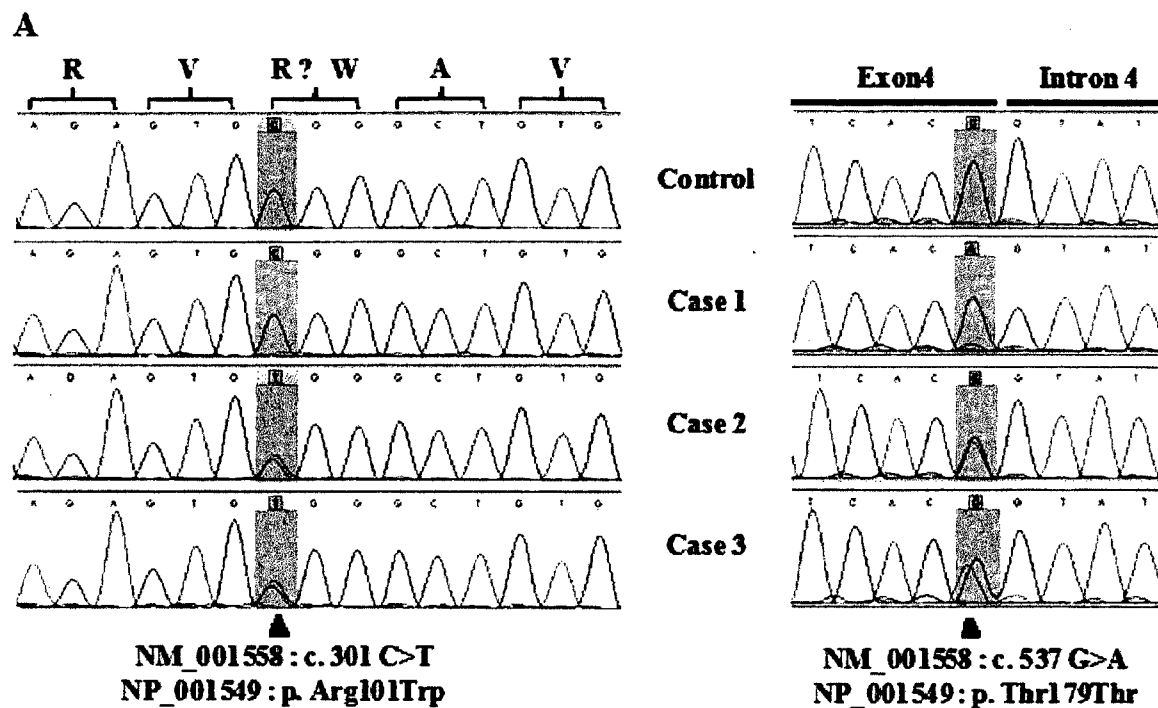
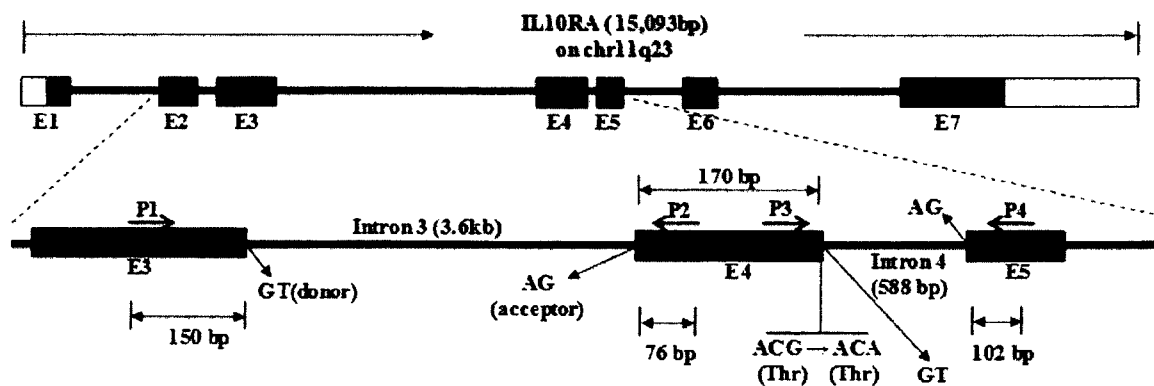
[88] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[89]

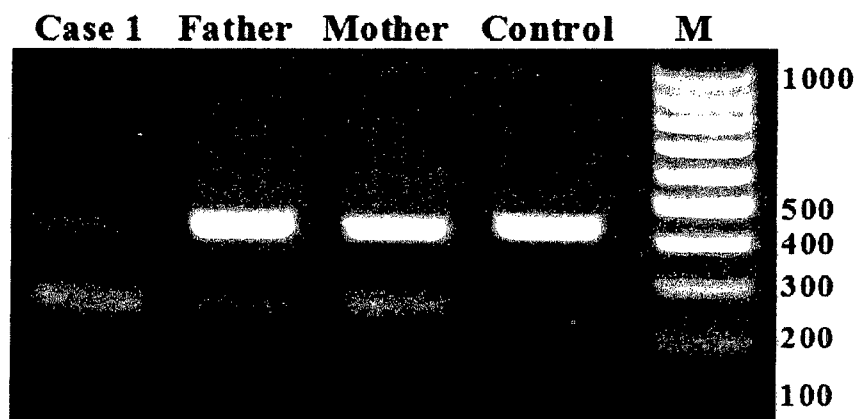
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 단일염기다형성(SNP) 마커를 포함하는 10-100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형은 A/A 또는 A/G인 것을 특징으로 하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 산전 검사에 이용하는 것을 특징으로 하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 난치성 염증성장질환은 유아 또는 소아에서 발병하는 것을 특징으로 하는 난치성 염증성장질환 진단용 조성물.
- [청구항 5] 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
상기 추출한 DNA로부터 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형을 확인하는 단계; 및
상기 확인된 대립유전자형으로 난치성 염증성장질환을 확인하는 단계를 포함하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 난치성 염증성장질환을 확인하는 단계는 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형이 A/A 또는 A/G인 경우, 난치성 염증성장질환으로 확인하는 것을 특징으로 하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 서열번호 1의 537번째 뉴클레오티드의 대립유전자형이 A/A 또는 A/G인 경우, RNA 스플라이싱(splicing)에 영향을 미쳐 절단된 IL10RA 단백질을 생산하는 것을 특징으로 하는 난치성 염증성장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 8] 서열번호 1의 537번째 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 포함하는 난치성 염증성장질환 진단 키트.

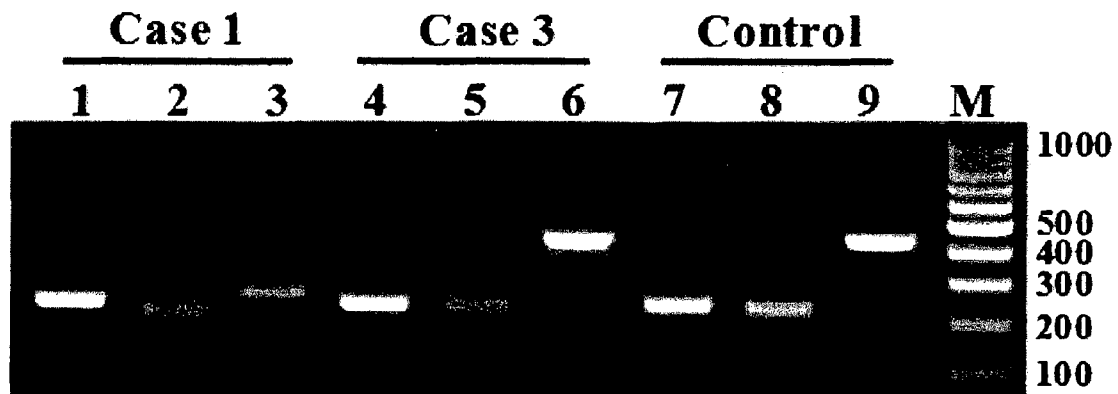
[Fig. 1]

**B**

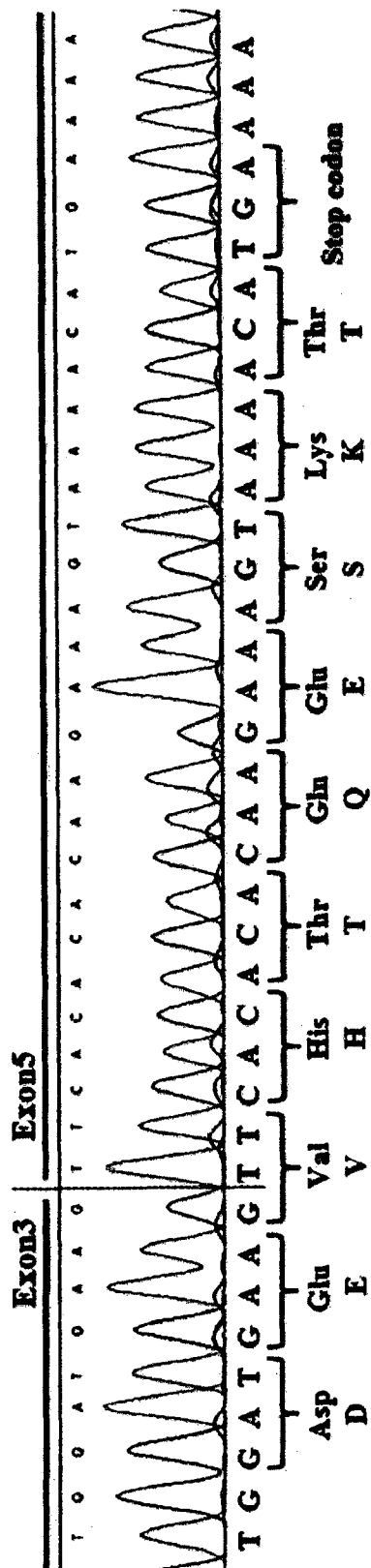
[Fig. 2a]



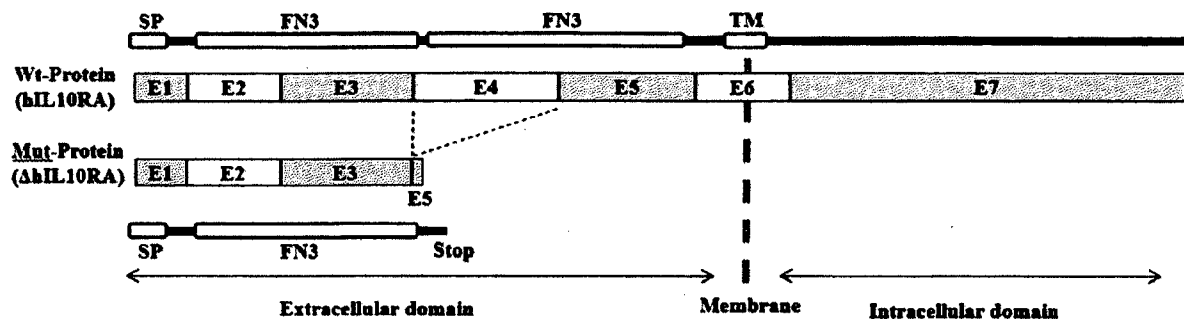
[Fig. 2b]



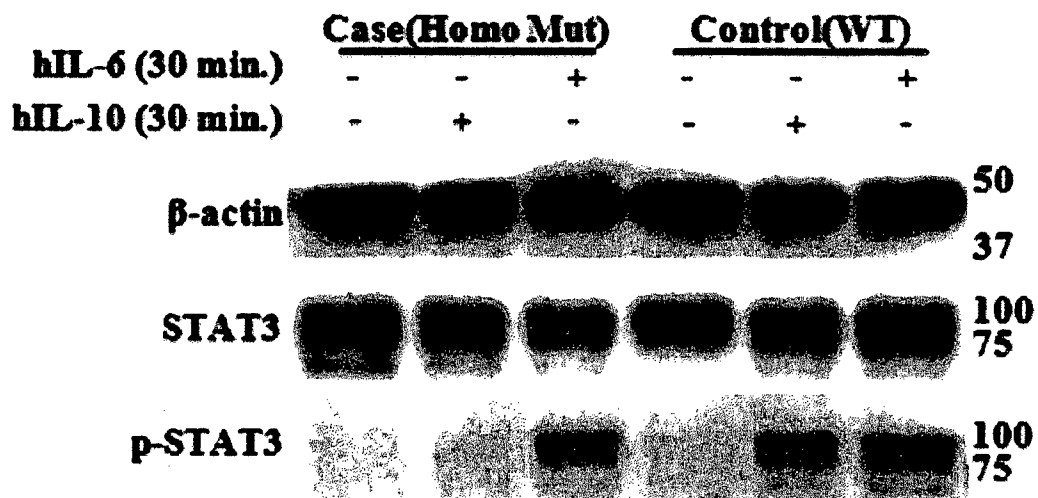
[Fig. 2c]



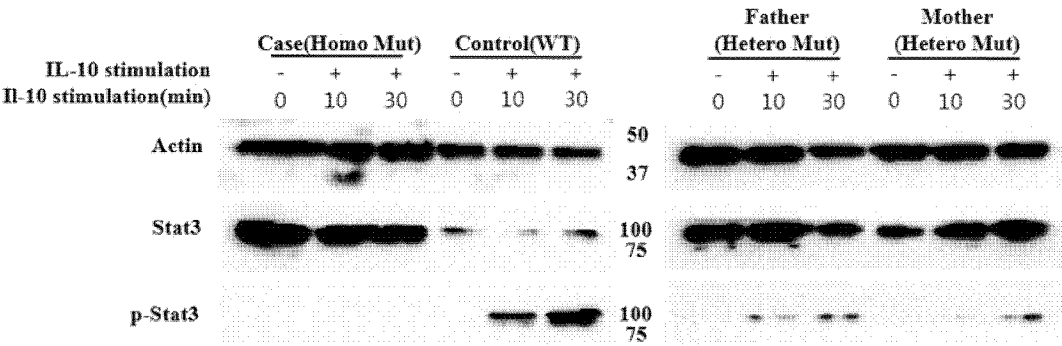
[Fig. 2d]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/011210**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; C07H 21/04; A61K 31/7088

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: inflammatory bowel disease, IL10R α , single nucleotide polymorphism, splicing**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011-0039918 A1 (VERSCHOOR et al.) 17 February 2011 See paragraph [0024] and claims 19-23.	1-8
A	NCBI, Genbank accession no. NM_001558.3 (02 July 2015) See the entire document.	1-8
A	DINWIDDIE et al., "Molecular Diagnosis of Infantile Onset Inflammatory Bowel Disease by Exome Sequencing", Genomics, vol. 102, pages 442-447 (31 August 2013) See abstract.	1-8
A	GALATOLA et al., "Synergistic Effect of Interleukin-10-receptor Variants in a Case of Early-onset Ulcerative Colitis", World Journal of Gastroenterology, vol. 19, no. 46, pages 8659-8670 (14 December 2013) See the entire document.	1-8
A	VERSCHOOR et al., "Polymorphisms in the Gene Encoding Bovine Interleukin-10 Receptor Alpha are Associated with Mycobacterium AviumSsp. Paratuberculosis Infection Atatus", BMC Genetics, vol. 11, poster no. 23, pages 1-9 (15 April 2010) See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 JULY 2016 (06.07.2016)

Date of mailing of the international search report

06 JULY 2016 (06.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/011210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0039918 A1	17/02/2011	US 2013-0189692 A1	25/07/2013
		US 8445656 B2	21/05/2013
		US 9133520 B2	15/09/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C07H 21/04; A61K 31/7088

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 염증성장질환, IL10R α, 단일염기다형성, 스플라이싱

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2011-0039918 A1 (VERSCHOOR 등) 2011.02.17 문단 [0024] 및 청구항 19-23 참조.	1-8
A	NCBI, Genbank accession no.NM_001558.3 (2015.07.02) 전체 문헌 참조.	1-8
A	DINWIDDIE 등, "Molecular diagnosis of infantile onset inflammatory bowel disease by exome sequencing", Genomics, 102권, 442-447 페이지 (2013.08.31) 요약 참조.	1-8
A	GALATOLA 등, "Synergistic effect of interleukin-10-receptor variants in a case of early-onset ulcerative colitis", World Journal of Gastroenterology, 19권, 46호, 8659-8670 페이지 (2013.12.14) 전체 문헌 참조.	1-8
A	VERSCHOOR 등, "Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection status", BMC Genetics, 11권, 문헌번호 23, 1-9 페이지 (2010.04.15) 전체 문헌 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 06일 (06.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 06일 (06.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2011-0039918 A1

2011/02/17

US 2013-0189692 A1

2013/07/25

US 8445656 B2

2013/05/21

US 9133520 B2

2015/09/15