

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 8월 29일 (29.08.2024) WIPO | PCT



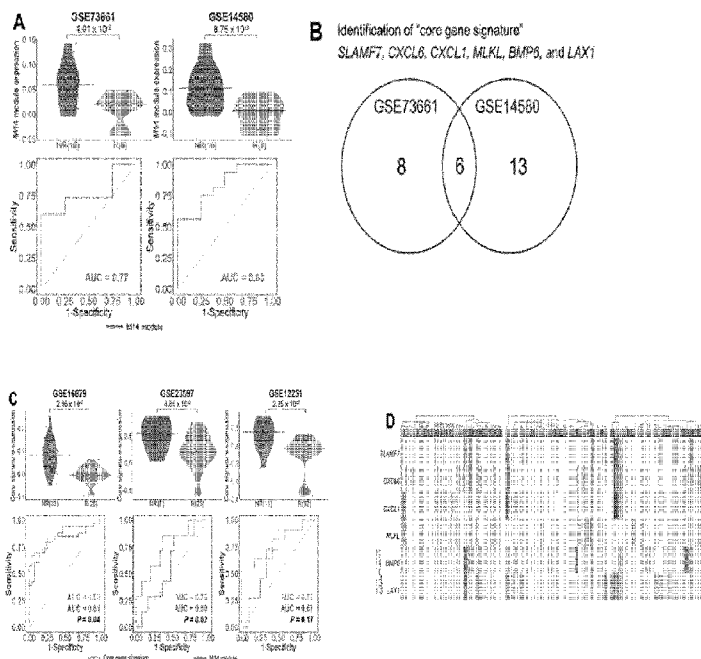
(10) 국제공개번호
WO 2024/177256 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6883* (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/021189
- (22) 국제출원일: 2023년 12월 21일 (21.12.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0021961 2023년 2월 20일 (20.02.2023) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이호수 (LEE, Ho-Su); 05627 서울특별시 송파구 위례성대로6길 10, 나-201, Seoul (KR). 예병덕 (YE, Byong Duk); 06278 서울특별시 강남구 선릉로 222, 109-1501, Seoul (KR). 윤용식 (YUN, Yong Sik); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 206-3102, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동,한라원엔원타워), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

(54) Title: COMPANION DIAGNOSTIC BIOMARKER COMPOSITION FOR PREDICTING ANTI-TNF TREATMENT RESPONSIVENESS TO CROHN'S DISEASE

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

[도 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a companion diagnostic biomarker composition for predicting anti-TNF treatment responsiveness to Crohn's disease. The present invention can be effectively used as a companion diagnostic biomarker composition for predicting anti-TNF treatment responsiveness to Crohn's disease by confirming that the expression of specific genes (SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6, and LAX1) is increased in a patient group having low or no anti-TNF treatment responsiveness to Crohn's disease.

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

[다음 쪽 계속]



WO 2024/177256 A1



MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,
ME, 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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물

기술분야

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

배경기술

- [2] 크론병(Crohn's disease)은 소화관의 임의의 부위에 궤양 등이 비연속적으로 발생하는 질환으로, 일시적으로 증상이 좋아지다가 재발하는 경우가 많고, 궤양성 대장염과 함께 염증성 장 질환으로 통칭하기도 한다. 복통, 설사, 체중 감소, 발열, 혈변, 빈혈 등의 증상을 동반하고, 인종별로 유대인과 코카시안에서 발생이 많고, 동양인에는 상대적으로 발병 빈도는 드물었으나, 최근 남유럽, 우리나라를 포함하는 아시아 국가, 다른 개발도상국 등에서도 발병률이 증가하고 있다.
- [3] 병의 원인으로 유전적 요인, 면역 이상, 식사 등의 환경인자가 관여한다는 보고가 있으나, 아직까지 불분명하고, 이에 따라 근본적 치료법도 아직 확립되어 있지 않다. 크론병 진단의 경우, 임상증상, X선 조영, 내시경 검사, 병리학적 검사 등을 조합해서 행해지고 있으나, 상기 방법들은 경험과 숙련된 기술을 요하며, 특히 발병 초기에 있어서, 크론병 감별이 곤란한 증례가 많다. 크론병 치료의 경우, 증상은 완화시키고, 이러한 상태를 장기간 유지하는 약제를 사용하고 있고, 아미노살라실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제, 항-TNF 제제 등이 대표적이다. 그러나 상기 약제들도 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통 등의 부작용이 다수 존재하고, 환자에 따라 치료 반응성도 천차만별이라는 문제가 있다. 이에, 크론병의 효과적인 진단, 치료, 치료반응성 예측 등을 위한 연구가 활발히 진행 중인 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

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

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

과제 해결 수단

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

발명의 효과

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

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 크론병 환자 유래 검체와 대조군 간의 유전체 발현 비교 및 연관 기능적 경로 분석을 시행한 과정을 대략적으로 나타낸 개요도이다.
- [14] 도 2는 식별된 모듈이 치료 결과와 관련이 있는지 여부를 확인하기 위해 접근 가능한 유전자 발현 분석이 있는 코호트(163명의 환자에 대한 GSE73661,

GSE14580, GSE16879, GSE23597, GSE12251)에서 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[16]

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

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

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

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

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

[22]

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

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

[25] 본 발명에서 "프라이머(primer)"란 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사

효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티 센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [26] 본 발명에서 “프로브(probe)”란 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 miRNA의 존재 유무 및 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [27]
- [28] 또한, 본 발명은 상기 동반진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트를 제공한다.
- [29] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7, CXCL1, MLKL, BMP6 및 LAX1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하여 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하는 데 사용될 수 있다.
- [30] 또한, 상기 키트는 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl₂를 포함할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [31] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시 뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [32]
- [33] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계) 및 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2

단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

- [34] 상기 제1단계는 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [35] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 상기 단백질 발현수준은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 상기 유전자 발현수준은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [38] 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.

[39]

[실시예 1] 차등발현유전자 분석

- [40]
- [41] RNA 자료 필터링 및 정규화 단계는 R(버전 4.1.1)의 "DESeq2"(버전 1.34.0) 패키지를 사용하여 수행하였다. 상기 패키지를 사용하여 각 그룹의 차등 발현을 추정하였고, $|\log_2\text{fold-change}| > 1.2$ 및 FDR(False Discovery Rate) < 0.01 을 사용하여 차등발현유전자(Differentially Expressed Gene; DEG)를 정의하였다.

[42]

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

- [43]
- [44] 공동 발현된 유전자의 모듈을 확인하기 위해, R에서 WGCNA(Weighted Gene Correlation Network Analysis, 버전 1.71)를 수행하였다. DEG 분석 결과를 기반으로 각 환자 내에서 전체 유전자 발현 패턴을 분석하고, 유전자 간의 Pearson 상관관계 매트릭스를 계산하여 공동 유전자 발현 모듈을 구성하였다.

[45]

[46] [실시예 3] 독립적인 데이터 세트에서 발굴 모듈 정량화

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

[48]

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

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

[51]

[표1]

번호	유전자	발굴 코호트				
		GSE73661		GSE14580		Rank sum_discovery
		AUC	AUC 순위	AUC	AUC 순위	
1	SLAMF7	0.84	2	0.90	2	4
2	CXCL6	0.79	7	0.91	1	8

3	CXCL1	0.82	5	0.84	6	11
4	MLKL	0.79	9	0.83	8	17
5	BMP6	0.76	15	0.84	5	20
6	LAX1	0.77	14	0.81	13	27

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

[53] [표2]

번호	유전자	검증 코호트		
		AUC		
		GSE16879	GSE23597	GSE12251
1	SLA MF7	0.81	0.66	0.59
2	CXCL6	0.92	0.68	0.75
3	CXCL1	0.77	0.71	0.73
4	MLKL	0.74	0.67	0.77
5	BMP6	0.71	0.82	0.86
6	LAX1	0.76	0.61	0.64

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

[55] [표3]

AUROC						
번호	유전자 조합	코호트				
		GSE73661	GSE14580	GSE16879	GSE23597	GSE12251
1	A	0.84	0.90	0.81	0.66	0.59
2	B	0.82	0.91	0.89	0.71	0.74
3	C	0.86	0.91	0.88	0.71	0.69
4	D	0.89	0.94	0.86	0.75	0.75

5	E	0.88	0.93	0.86	0.80	0.80
6	F	0.86	0.91	0.86	0.75	0.78
A : SLAMF7 B : SLAMF7 + CXCL6 C : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 D : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL E : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL + BMP6 F : SLAMF7 + CXCL6 + CXCL1 + MLKL + BMP6 + LAX1						

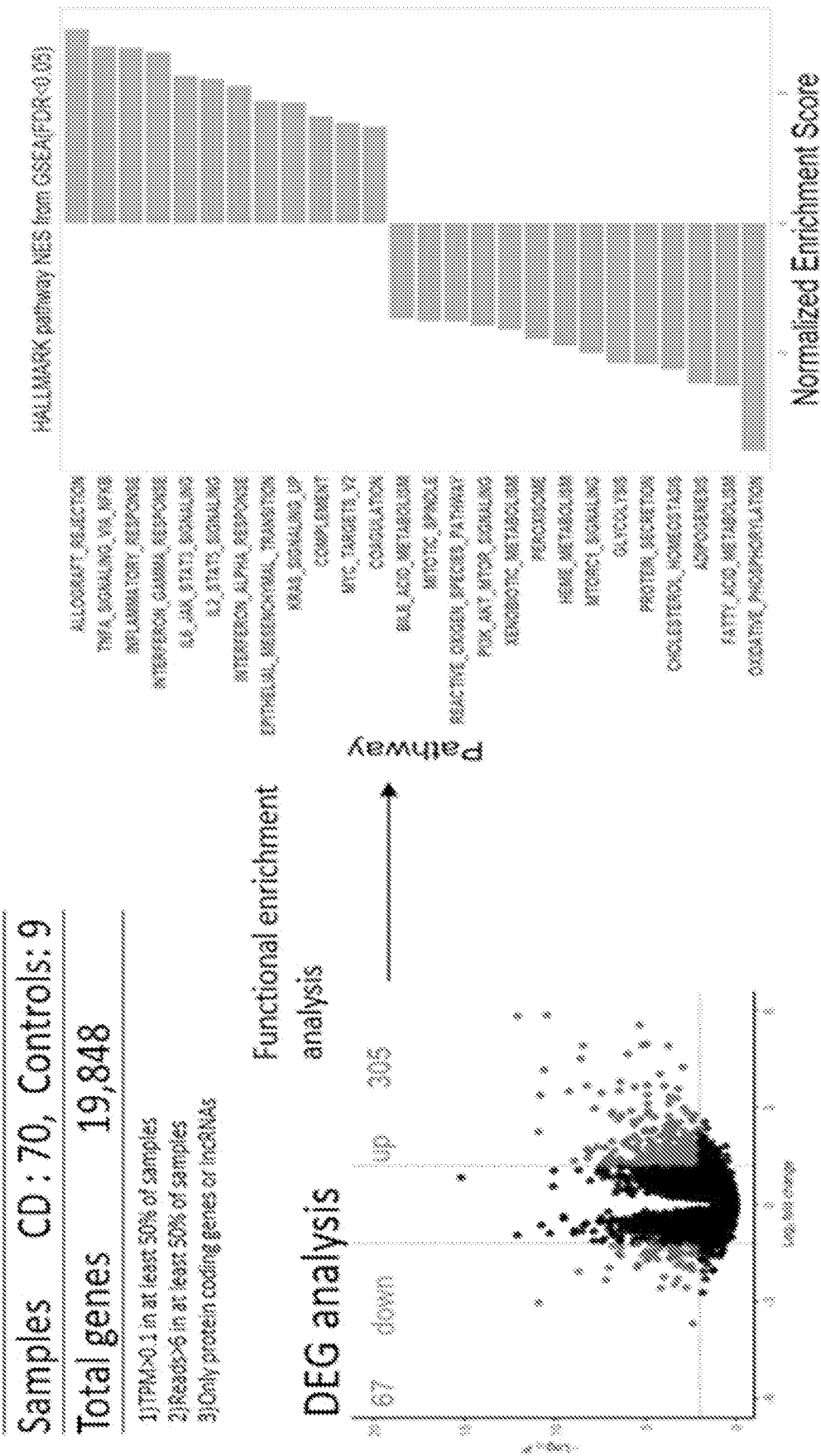
- [56] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

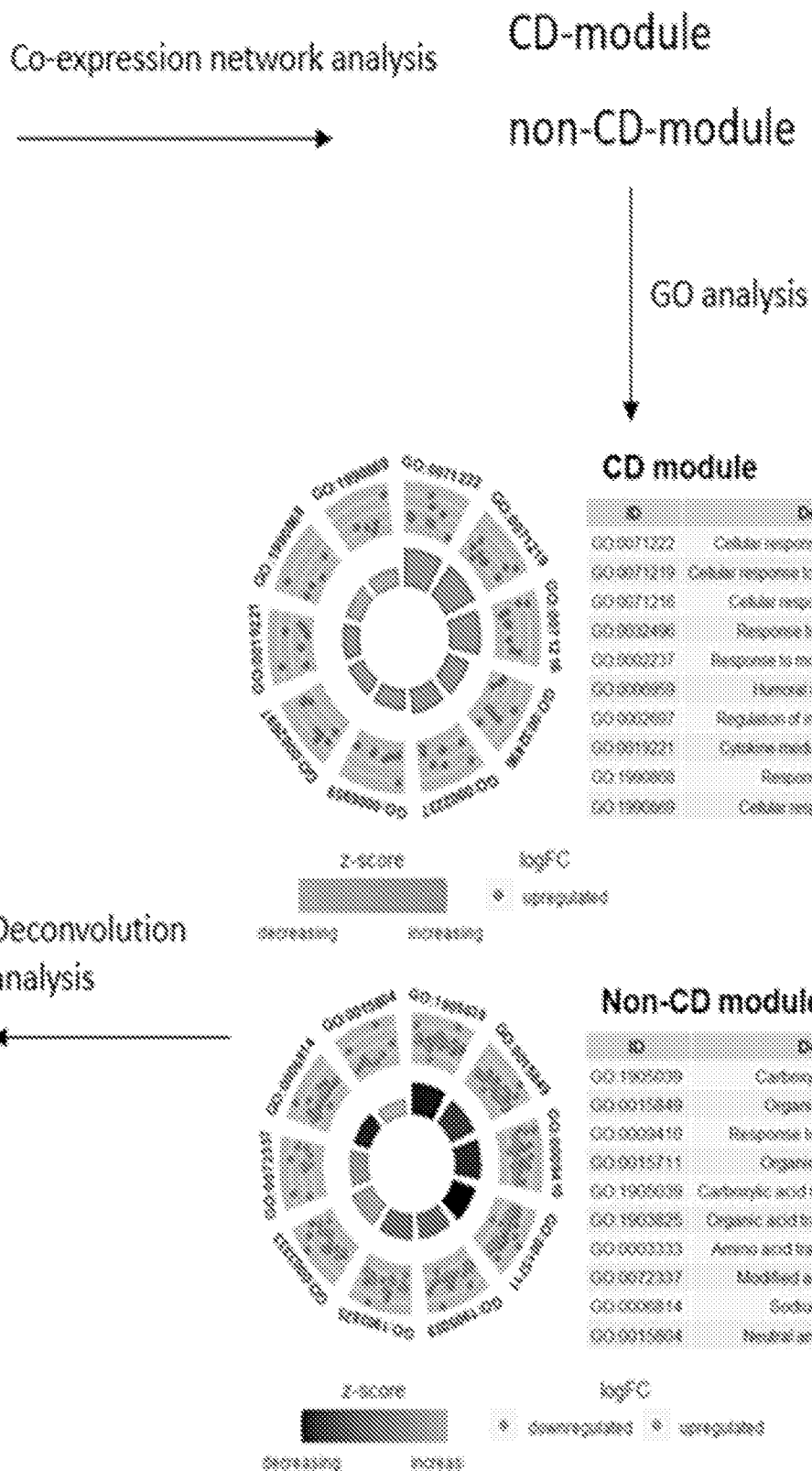
청구범위

- [청구항 1] SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군에 비해 치료 반응성이 없는 비반응군에서 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.
- [청구항 4] SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현수준을 확인할 수 있는 제제를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 발현수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 동반진단용 조성물.
- [청구항 6] 청구항 4 또는 청구항 5의 조성물을 유효성분으로 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단용 키트.
- [청구항 7] 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLAMF7(SLAM Family Member 7), CXCL1(C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase), BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 및 LAX1(Lymphocyte transmembrane adapter 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계(제1단계); 및
크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 있는 반응군과 비교하여 상기 발현수준이 증가하면 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성이 없을 것으로 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 크론병에 대한 항-TNF 치료 반응성을 예측하기 위한 동반진단을 위한 정보 제공 방법.

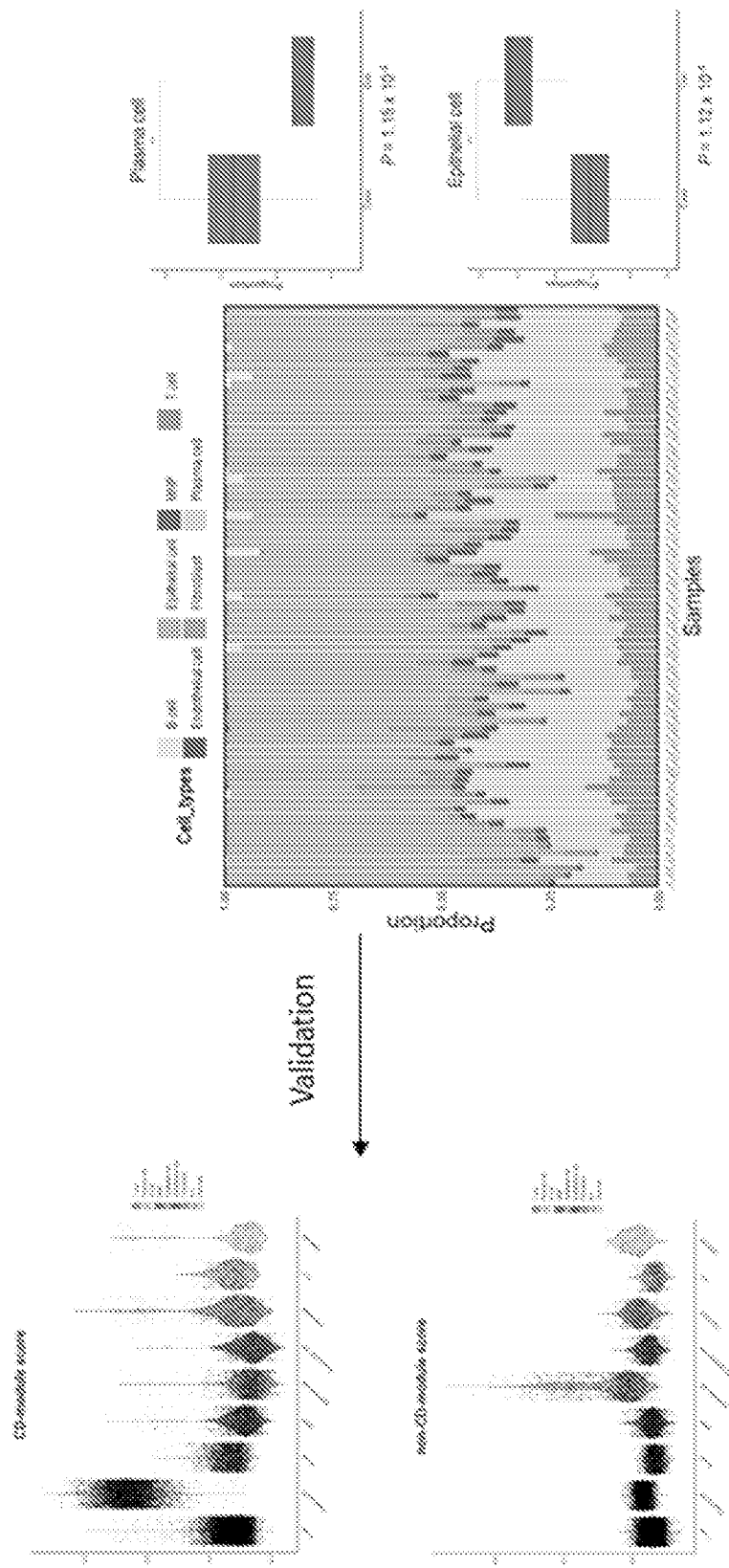
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 제1단계는 CXCL6(C-X-C Motif Chemokine Ligand 6) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.
- [청구항 10] 청구항 7에 있어서, 상기 단백질 발현수준은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.
- [청구항 11] 청구항 7에 있어서, 상기 유전자 발현수준은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

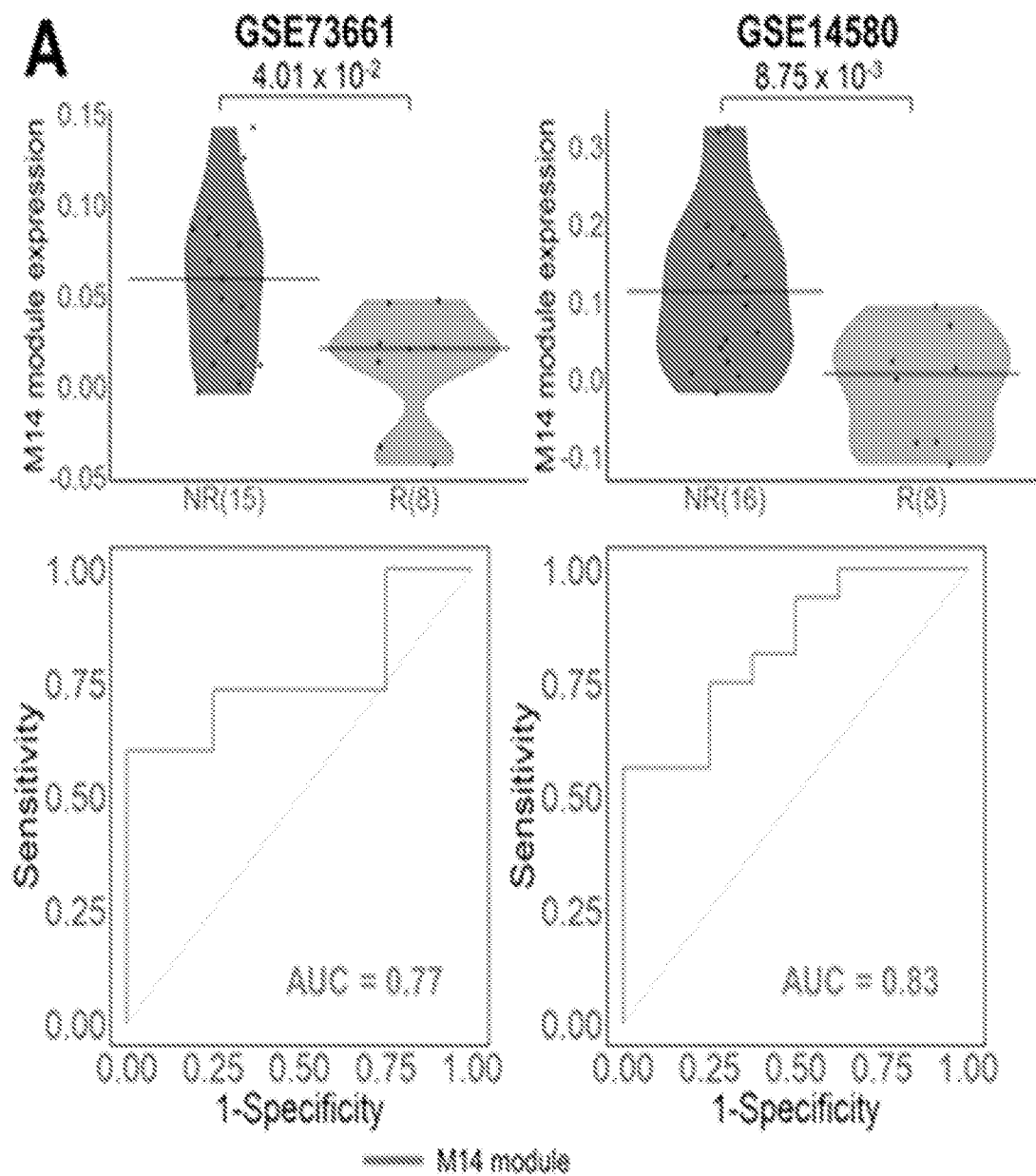
[도 1] (계속)





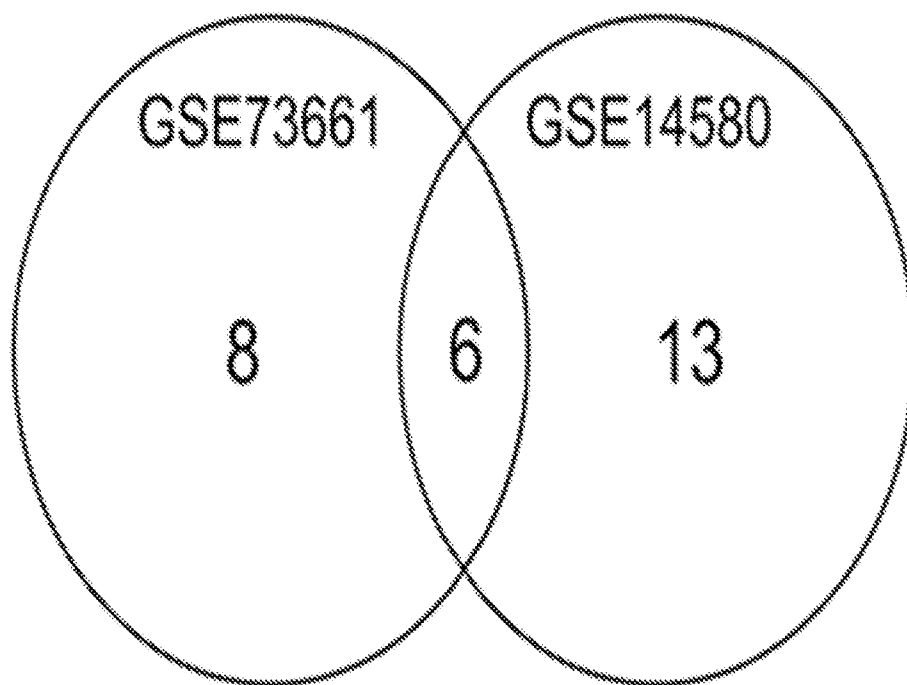
[도 1]



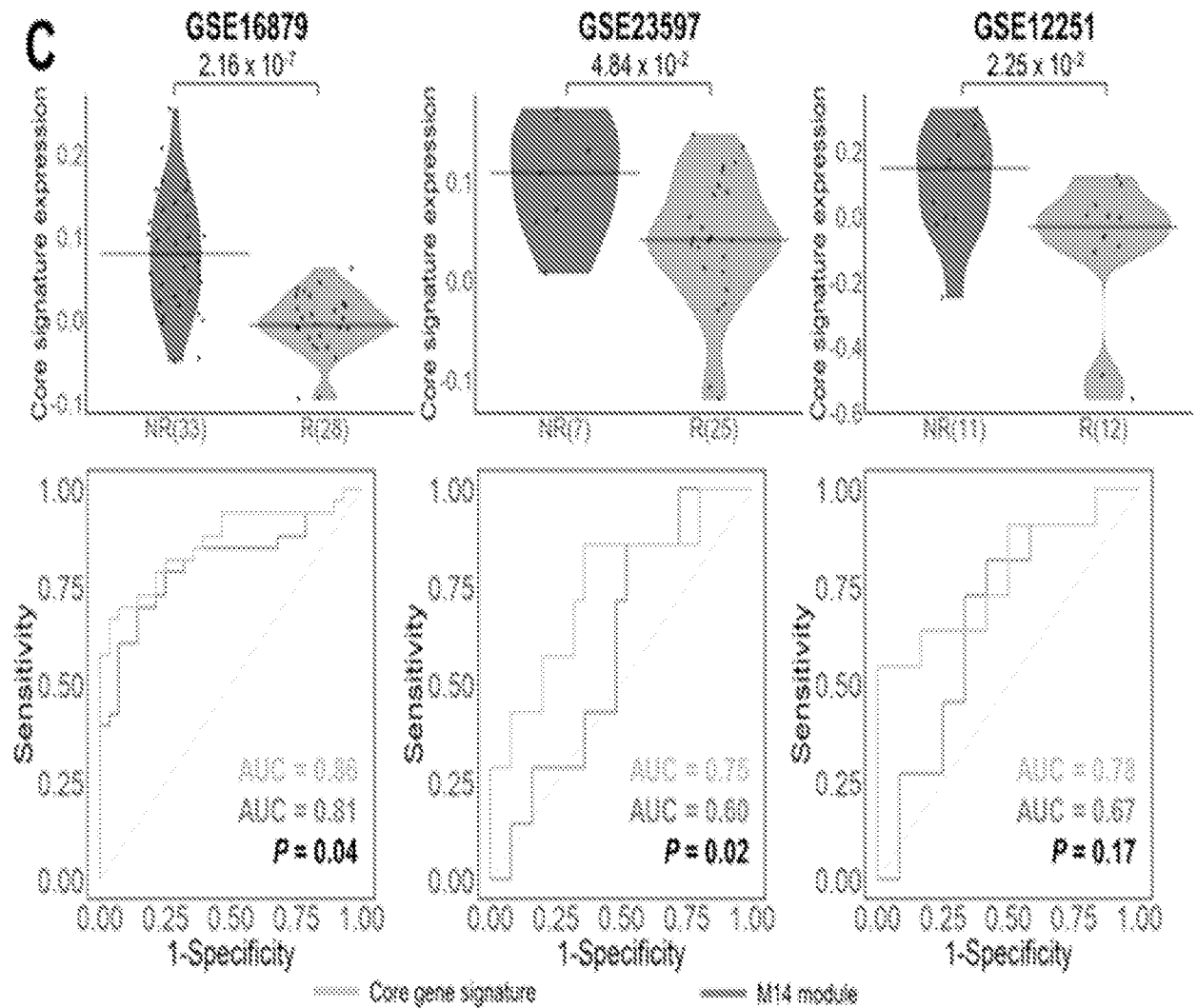
[도 2] (계속)

[도 2] (계속)

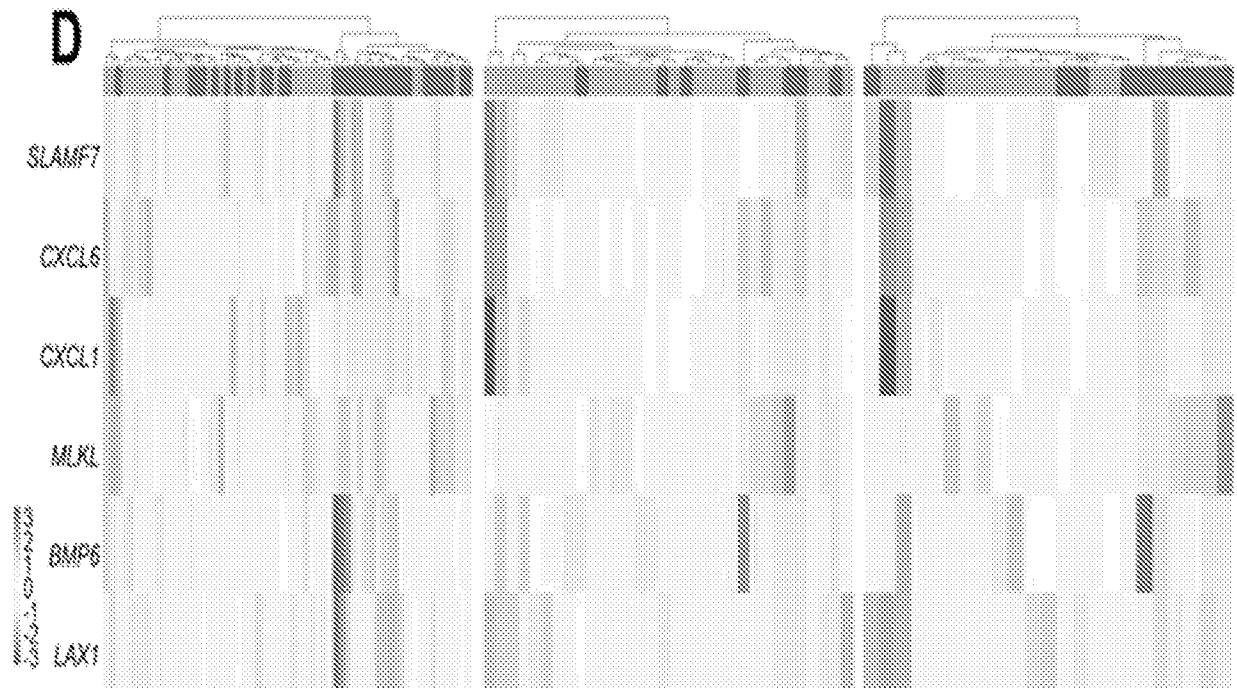
B Identification of "core gene signature"
SLAMF7, CXCL6, CXCL1, MLKL, BMP6, and LAX1



[도 2] (계속)



[도 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/021189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(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 1/6883(2018.01); C07K 19/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01) 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: 크론병(crohn disease), 항-TNF 치료 반응성(anti-TNF therapeutic reactivity), SLAMF7, CXCL1, MLKL, BMB6, LAX1, 염증성장질환(inflammatory bowel disease)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARNHOORN, M. C. et al. Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Journal of Crohn's and Colitis. 2020, pp. 995-1009.	1-3
Y	See pages 995 and 997; and page 1000, right column.	4-11
Y	JP 2016-502400 A (EGIS PHARMACEUTICALS PUBLIC LIMITED COMPANY) 28 January 2016 (2016-01-28) See claims 1 and 9-11; and paragraphs [0057]-[0058] and [0060].	4-11
A	JANG, D.-I. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. International Journal of Molecular Sciences. 2021, vol. 22, thesis no.: 2719, pp. 1-16. See entire document.	1-11
A	SIMMONS, D. P. et al. SLAMF7 engagement super-activates macrophages in acute and chronic inflammation. bioRxiv preprint. 05 November 2020, pp. 1-45. See entire document.	1-11
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 24 May 2024		Date of mailing of the international search report 27 May 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KWAK, M. -S. et al. Uncovering Novel Pre-Treatment Molecular Biomarkers for Anti-TNF Therapeutic Response in Patients with Crohn's Disease. Journal of Functional Biomaterials. 2022, vol. 13, thesis no. 36, pp. 1-11. See entire document.	1-11

International application No.
PCT/KR2023/021189

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2016-502400	A	28 January 2016	EP	2909340	A2	26 August 2015
				EP	2909340	B1	02 August 2017
				US	2016-0194709	A1	07 July 2016
				WO	2014-060785	A2	24 April 2014
				WO	2014-060785	A3	12 June 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6883(2018.01); C07K 19/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)		
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: 크론병(crohn disease), 항-TNF 치료 반응성(anti-TNF therapeutic reactivity), SLAMF7, CXCL1, MLKL, BMB6, LAX1, 염증성장질환(inflammatory bowel disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	BARNHOORN, M. C. 등, "Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease", Journal of Crohn's and Colitis, 2020, 페이지 995-1009 페이지 995, 997; 페이지 1000, 오른쪽 컬럼	1-3 4-11
Y	JP 2016-502400 A (EGIS PHARMACEUTICALS PUBLIC LIMITED COMPANY) 2016.01.28 청구항 1, 9-11; 단락 [0057]-[0058], [0060]	4-11
A	JANG, D.-I. 등, "The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics", International Journal of Molecular Sciences, 2021, 제22권, 논문번호: 2719, 페이지 1-16 전체 문헌	1-11
A	SIMMONS, D. P. 등, "SLAMF7 engagement super-activates macrophages in acute and chronic inflammation", bioRxiv preprint, 2020.11.05, 페이지 1-45 전체 문헌	1-11
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년05월24일 (24.05.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년05월27일 (27.05.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KWAK, M. -S. 등, “Uncovering Novel Pre-Treatment Molecular Biomarkers for Anti-TNF Therapeutic Response in Patients with Crohn’s Disease”, Journal of Functional Biomaterials, 2022, 제13권, 논문번호 36, 페이지 1-11 전체 문헌	1-11

국제출원번호

PCT/KR2023/021189