(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0037202
(43) 공개일자 2022년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0119870
(22) 출원일자 2020년09월17일
심사청구일자 2020년09월17일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허준영
대전광역시 유성구 상대로 17, 303동 1901호(상대동, 도안신도시 한라비발디 아파트)
오응석
대전광역시 중구 평촌로 93, 107동 1804호(태평동, 쌍용예가아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

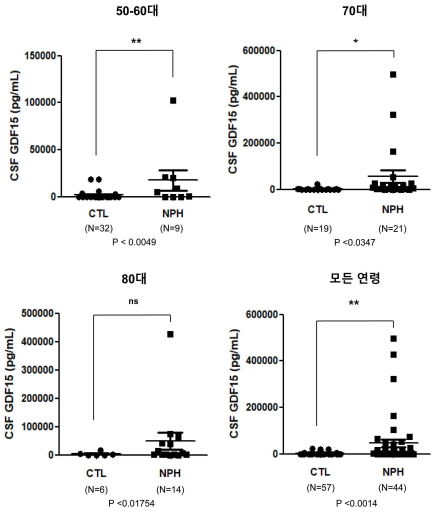
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **정상압 수두증의 진단 또는 예측용 GDF15 유전자 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 *GDF15* 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 정상압 수두증 의심 환자의 뇌척수액 내 *GDF15* 유전자 또는 이의 단백질의 발현 수준을 분석함으로써 정상압 수두증의 진단 또는 예측이나 정상압 수두증 치료제의 스크리닝에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/2814 (2013.01)

(72) 발명자
김수정
대전광역시 중구 동서대로1303번길 29, 403호(오류동)

장희진
대전광역시 유성구 관평1로 12, 701동 1801호(관평동, 대덕테크노밸리7단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711111501
과제번호 2017R1A5A2015385
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104528
과제번호 2019M3E5D1A02068575
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명 노화에 따른 감염 감수성 증가 제어를 위한 미토콘드리아 기반 신소재개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711103705
과제번호 2019R1F1A1059586
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 시상하부 특이적 미토콘드리아 미접힘 단백 반응 조절 통한 비만 제어 기전 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711111462
과제번호 2017R1C1B5076595
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 성인 뇌수종에서 미토콘드리아 손상과 혈액뇌장벽 기능과의 연관성
기 여 율 25/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

GDF15(growth differentiation factor-15) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 정상압 수두증(normal pressure hydrocephalus)의 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 3

제1항이 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머를 포함하는 것인 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 키트.

청구항 6

(1) 정상압 수두증 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

(2) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

(3) 상기 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우에 정상압 수두증으로 판단하는 단계;를 포함하는 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 Fazeka 척도(scale) 분석 결과를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

정상압 수두증을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 9

정상압 수두증의 수술적치료 혹은 배액술 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증에 대한 비약물적 중재(non-medical intervention)에 대한 효과 판정 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 *GDF15* 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뇌에는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)이라는 맑은 체액이 뇌의 안과 밖을 채운 채 순환하고 있는데, 뇌실(cerebral ventricles)과 지주막하(subarachnoid) 공간에 뇌척수액이 비정상적으로 축적된 상태를 수두증이라 한다. 그런데 뇌척수액이 증가하여 뇌실이 넓어졌음에도 불구하고 뇌척수액의 압력이 정상범위에 있는 것을 정상압 수두증(normal pressure hydrocephalus, NPH)이라 한다.

[0003] 정상압 수두증은 보행장애, 인지장애 및 배뇨장애의 증상이 나타나는데, 세 가지 증상이 각각 또는 따로 나타나기도 하기 때문에 처음에는 다른 질병의 증상으로 오인하여 정상압 수두증을 의심하지 못하는 경우도 있다. 특히 이 세가지 증상은 노인들에게 있어 매우 흔한 증상이며 수많은 다른 원인을 가질 수 있다는 점에서 진단 기준 설정에 따라 위양성 혹은 위음성으로 진단될 가능성이 높다. 또한 뇌실의 크기는 나이에 비례하여 크기가 증가하고 알츠하이머병 등의 퇴행성 뇌질환이 동반되면 정상인에 비해 뇌위축으로 인해 상대적으로 뇌실이 증가하기 때문에, 이 세 가지 주요 증상과 뇌실 크기의 증가를 진단기준으로 하는 현재의 정상압 수두증 진단기준으로는 과도하게 많은 환자가 정상압 수두증으로 진단될 가능성이 높다. 실제 임상적으로 정상압 수두증의 진단이 쉽지 않은 경우가 많아 환자의 임상소견, 요추천자에 대한 반응 및 뇌영상 소견 등을 종합하여 진단 및 치료방향을 결정하기도 한다. 따라서 정상압 수두증을 조기에 예측 또는 진단할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다.

[0004] 바이오마커는 DNA, RNA, 대사 물질, 단백질 및 단백질 조각 등에서 유래된 분자적 정보를 토대로 질병의 발생 등으로 유발된 신체의 변화를 감지할 수 있는 지표이다. 바이오 마커는 질병의 발생 및 진행과 관련되어 새로운 약물의 개발과 체외에서 질병을 조기에 발견하고 그 예후를 관찰하는 체외 분자진단 기술, 특정 약물에 반응하는 바이오마커의 개인별 특성을 반영하는 개인별 맞춤 의료 기술, 환자 편의적인 진료환경을 구축하기 위한 유비쿼터스 헬스 케어 시스템 등의 개발에 폭넓게 핵심적으로 이용되고 있다. 질병의 병태생리학적 기전에 대한 지식 증가와 유전자 분석 기술의 발달로 바이오마커는 점차 그 범위가 넓어지고 있다. 현재 바이오마커는 유전자와 그로 인한 RNA, 단백질, 대사물질 발현의 차이를 모두 포함하는 분자적, 생물학적 지표로 정의되고 있다. 바이오마커는 생명체에서 질병의 종류 및 발생과 진행에 따라 다르게 나타나기 때문에 특정 질환 여부나 약물반응 상태 등을 객관적으로 측정할 수 있게 해주는 혈액이나 체액 내에 있는 지표가 되는 물질이며, 이 혈액이나 체액을 분석하는 것만으로 질병을 조기에 판단할 수 있도록 해줄 수 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1945348호에 '혈액 내 CHI3L1 발현 수준을 이용한 정상압 수두증 진단용 조성물과 진단 마커 검출 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1544085호에 '공복 혈당 장애 진단용 마커로서 GDF15 및 이를 포함하는 공복 혈당 장애 진단키트'가 개시되어 있으나, 본 발명의 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 *GDF15* 유전자 마커 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 정상압 수두증(normal pressure hydrocephalus) 환자와 정상 대조군의 뇌척수액을 대상으로 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 GDF15(GDF15 growth differentiation factor-15) 농도를 분석한 결과, 정상 대조군에 비해 정상압 수두증 환자의 뇌척수액에서 GDF15의 농도가 증가한 것을 확인하였고, 이를 통해 정상압 수두증 진단 또는 예측을 위한 바이오마커로 GDF15 단백질 또는 이의 유전자의 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *GDF15*(growth differentiation factor-15) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 정상압 수두증(normal pressure hydrocephalus)의 진단 또는 예측용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 (1) 정상압 수두증 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우에 정상압 수두증으로 판단하는 단계;를 포

함하는 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 정상압 수두증을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 정상압 수두증의 수술적치료 혹은 배액술 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증에 대한 비약물적 중재(non-medical intervention)에 대한 효과 판정 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 *GDF15* 유전자 또는 이의 단백질은 정상압 수두증의 진단 또는 예측을 위한 신규한 바이오마커로, *GDF15* 유전자 또는 이의 단백질의 발현 수준을 분석함으로써 정상압 수두증의 진단 또는 예측 등에 활용하거나 정상압 수두증 치료제의 스크리닝에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 50~80대의 대조군 환자(CTL)와 정상압 수두증 환자군(normal pressure hydrocephalus, NPH)의 뇌척수액을 대상으로 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay)을 수행하여 GDF15 농도를 측정한 결과이다.

도 2는 Fazeka scale에 따라 분류된 대조군 환자와 정상압 수두증 환자의 뇌척수액 내 GDF15 농도를 측정한 결과이다. PV: 뇌실 주변(periventricular), WM: 백색질(white matter).

도 3 간이정신상태검사(Mini-Mental State Examination, MMSE)에 따라 분류된 치매 환자의 중증도에 따라 GDF15 농도를 측정한 결과이다. 0: Normal(정상), 1: Mild(경증), 2: Moderate(중증도), 3: Severe(중증).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *GDF15*(growth differentiation factor-15) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 정상압 수두증(normal pressure hydrocephalus)의 진단 또는 예측용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 *GDF15* 유전자의 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록(GenBank accession No: NM_004864.4)되어 있으나, *GDF15* 유전자와 정상압 수두증과의 연관성은 기존에는 전혀 알려지지 않았다.

[0016] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 정상압 수두증은 정상압 수두증 및 정상압 수두증의 주 증상(보행장애, 인지장애, 배뇨장애)을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 정상압 수두증의 모든 단계 및 유사 증상들을 포괄적으로 포함한다.

[0017] 본 발명의 상기 *GDF15* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, GDF15 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명에서, 용어 '진단(diagnosis)'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 정상압 수두증 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0019] 본 발명에서 'mRNA 발현 수준 측정'은, 정상압 수두증 진단 또는 예측을 위해 생물학적 시료에서 정상압 수두증 마커 유전자(*GDF15*)의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에서 상기 *GDF15* 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있고, 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 *GDF15* 유전자의 염기서열(GenBank accession No: NM_004864.4)을 참고하여, 당업계의 통상의 실시자가 공지된 방법, 프로그램 또는 툴을 이용하여 디자인할 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상

보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 *GDF15* 유전자의 염기서열에 결합할 수 있는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 정상압 수두증을 진단 또는 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중연쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 *GDF15* 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 정상압 수두증을 진단 또는 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에서 '단백질의 발현 수준 측정'은, 정상압 수두증 진단 또는 예측을 위해 생물학적 시료에서의 정상압 수두증 마커 유전자(*GDF15*)에서 발현되는 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 통상적으로 단백질의 양을 확인함으로써 수행될 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 웨스턴 블랏(Western blot), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에서 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 GDF15 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있다.

[0025] 본 발명에서, 용어 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 GDF15 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 GDF15 항체는, *GDF15* 유전자의 전장 혹은 일부를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 *GDF15* 유전자의 전장 혹은 일부에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질을 면역원(항원)으로 사용하여 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 기능적인 단편도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 ScFv 등이 있다.

[0026] 본 발명에서, 용어 "압타머(aptamer)"는 안정된 삼차구조를 유지하면서 특정 분자에 특이적으로 강하게 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 특이적 결합을 하는 기능 때문에 항체와 비교되며 항체의 대체 기술로 평가되고 있다.

[0027] 본 발명은 또한, 상기 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 조성물을 포함하는 정상압 수두증의 진단 또는 예측용 키트를 제공한다.

[0028] 본 발명의 키트는 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 검출여부를 확인함으로써 정상압 수두증을 진단 또는 예측할 수 있다. 본 발명의 정상압 수두증을 진단 또는 예측하기 위한 키트에는 *GDF15* 유전자의 발현 수준을 검출하기 위한 제제(예컨대, 프라이머 또는 프로브) 또는 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제(예컨대, 항체 또는 압타머) 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 *GDF15* 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 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(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단 또는 예측용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로

브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 키트가 GDF15 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 키트일 경우, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC(Fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine B isothiocyanate) 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한,

[0033] (1) 정상압 수두증 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0034] (2) 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

[0035] (3) 상기 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우에 정상압 수두증으로 판단하는 단계;를 포함하는 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료로부터 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준 측정은, 생물학적 시료로부터 유전자의 mRNA 또는 단백질을 분리하여 측정될 수 있고, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 분리 방법은 당업계의 공지의 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어 '생물학적 시료'란 뇌척수액, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 타액, 객담 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 상기 생물학적 시료는 조작하거나 조작하지 않은 상태로 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 정상압 수두증 의심 환자의 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서 측정된 *GDF15* 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준보다 높은 경우, 정상압 수두증 의심 환자를 정상압 수주증으로 진단할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에 따른 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 추가로 Fazeka 척도(scale)를 이용하여 정상압 수두증 의심 환자의 뇌 MRI(magnetic resonance imaging)의 FLAIR(fluid attenuated inversion recovery) 영상을 통해 뇌실주위 백질변성(periventricular hyperintensity, PVH)에 대해 Fazeka 0~1 단계(경도 이하)와 2~3단계(중증도 이상)로 분류하여 정상압 수두증 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 정상압 수두증 의심 환자의 생물학적 시료에서 *GDF15* 유전자 또는 이의 단백질의 농도가 높고, Fazeka 척도가 2~3단계일 경우 정상압 수두증으로 진단할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한, 정상압 수두증을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 후보 물질의 투여 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0041] 구체적으로, 정상압 수두증 치료 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 *GDF15* 유전자 또는 GDF15 단백질의 발현 수준의 변화(증가 또는 감소)를 비교하는 방법으로 정상압 수두증 치료제를 스크리닝할 수 있고, 바람직하게는 *GDF15* 유전자 또는 GDF15 단백질의 발현 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 정상압 수두증의 치료제로서 선택할 수 있다. 즉, 정상압 수두증 치료 후보 물질의 부재 하에 정상압 수두증 환자의 생물학적 시료에서 본 발명의 *GDF15* 유전자 또는 GDF15 단백질의 발현 수준을 측정하고, 또한 정상압 수두증 치료 후보 물질의 존재하에서 본 발명의 *GDF15* 유전자 또는 GDF15 단백질의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 정상압 수두증 치료 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 *GDF15* 유전자 또는 GDF15 단백질의 발현 수준이 정상압 수두증 치료 후보 물질의 부재 하에서의 발현 수준보다 감소시키는 물질을 정상압 수두증의 치료제로 예측할 수 있는 것이다.

[0042] 본 발명은 또한, 정상압 수두증의 수술적치료 혹은 배액술 후 *GDF15* 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 정상압 수두증에 대한 비약물적 중재(non-medical

intervention)에 대한 효과 판정 방법을 제공한다.

[0044] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **재료 및 방법**

[0047] **1. 환자 샘플**

[0048] 대조군 환자 59명의 샘플과 정상압 수두증 환자 53명의 샘플은 충남대학교병원에 방문한 환자들로부터 채취하였으며(표 1), 실험을 위해 대조군 환자와 정상압 수두증 환자의 뇌척수액을 1,000 Xg, 4℃에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 수득하여 사용하였다.

표 1

[0049] 환자 정보

대조군 환자	- 신경학적 징후가 없으며 뇌척수액 검사상 이상소견을 보이지 않은 환자 - 내과적인 질환(예: 혈압, 당뇨 등)을 동반할 수 있으나, NPH를 유발할만한 요인이나 과거력을 갖고 있지 않음
정상압 수두증 환자	- 보행장애, 인지기능장애, 소변장애 등 정상압 수두증의 임상증상을 가지고 있음 - 다른 이차적인 원인(뇌출혈, 뇌수막염 등)에 의해 유발된 경우가 아닌 특발성 NPH로 확인된 환자 - 내과적인 동반 질환들이 있기도 혹은 없기도 함

[0050] 본 발명은 충남대학교 생명윤리심의위원회의 승인을 받아 진행되었으며, 임상 설문 자료 수집 및 인체유래물 수집은 피험자의 서면 동의를 획득한 후에 진행하였다.

[0052] **2. 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay)**

[0053] Human GDF-15 Quantikine ELISA Kit(R&D Systems, DGD150)의 제조사의 방법에 따라 효소결합면역흡착검사를 수행하였다. 구체적으로 상기 수득한 뇌척수액 샘플을 1/4로 희석하여 분석버퍼와 섞은 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 워싱 버퍼로 4~5번의 세척 후 흡착 GDF15와 결합하도록 1시간 동안 반응시키고 다시 워싱하였다. 빛을 차단한 상태로 기질 용액을 넣어 30분 반응시킨 뒤 정지 용액을 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 흡광도값을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

[0055] **3. Fazeka scale 측정**

[0056] 대조군 59명과 정상압 수두증 환자군 53명의 뇌 MRI의 FLAIR(fluid-attenuated inversion recovery) 영상에서 뇌실 주변(periventricular)과 백색질(deep white matter)의 백색 변성을 0부터 3까지 4단계로 구분하였다. 0단계 또는 1단계는 백색 변성이 거의 없거나 경미한 수준이고, 3단계 또는 4단계는 중등도 및 고도임을 의미한다.

[0057]

[0058] **실시예 1. 정상압 수두증 환자에서 GDF15 발현량 분석**

[0059] 효소결합면역흡착검사를 통해 정상압 수두증 환자의 뇌척수액에서 GDF15의 농도를 분석한 결과, 50~60대 실험군에서 정상 대조군의 GDF15 평균값은 1695.475±4592.665 pg/㎖이고 환자군의 GDF15 평균값은 17584.459±33009.904 pg/㎖이며, 70대 실험군에서 정상 대조군의 GDF15 평균값은 1813.923±5195.315 pg/㎖이고 환자군의 GDF15 평균값은 56062.581±126244.205 pg/㎖이며, 80대 실험군에서 정상 대조군의 GDF15 평균값은 3796.469±6375.166 pg/㎖이고 환자군의 GDF15 평균값은 51842.029±115835.937 pg/㎖로, 모든 연령대를 종합하여 정상 대조군의 GDF15 평균값은 1956.115±4938.562 pg/㎖이고 환자군의 GDF15 평균값은 46733.040±108923.162 pg/

㎖임을 확인하였다(도 1).

[0060] 이를 통해, 50~70대의 정상압 수두증 환자의 뇌척수액에서 GDF15의 농도가 정상 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다.

[0062] **실시예 2. Fazeka scale 및 이에 따른 GDF15 농도를 이용한 정상압 수두증의 병변 평가**

[0063] 정상 대조군과 정상압 수두증 환자군의 뇌 MRI의 FLAIR 영상을 통해 정상압 수두증의 중증도에 따라 Fazeka scale을 0~3 단계로 평가한 결과, 정상 대조군의 대부분 환자들은 백색 변성이 거의 없거나 경미한 0단계와 1단계에 분포하였고, 정상압 수두증 환자군의 대부분 환자들은 백색 변성이 중등도 및 고도에 해당하는 2단계와 3단계에 분포하고 있음을 확인하였다. 또한, Fazeka scale별로 대조군 또는 NPH 환자의 뇌척수액을 대상으로 NPH 환자군에서 GDF15 농도가 현저히 높음을 확인하였다(표 2 및 도 2).

표 2

대조군 환자와 정상압 수두증 환자군에서 Fazeka scale 및 GDF15 농도 측정

		Control (n=51)	GDF15 (pg/ml)	NPH (n=42)	GDF15 (pg/ml)	P-value
Fazeka-PV (n, %)						
	0	9 (17.6)	454.401 ± 1004.518	0 (0)		
	1	24 (47.1)	3611.734 ± 7188.887	7 (16.7)	74399.923 ± 186655.289	0.422
	2	10 (19.6)	915.697 ± 1657.279	11 (26.2)	59030.029 ±131577.404	0.049
	3	8 (15.7)	1335.065 ± 1868.369	24 (57.1)	34326.956 ± 67387.011	0.004
Fazeka-WM (n, %)						
	0	18 (35.3)	2581.839 ± 5918.385	5 (11.9)	4221.539 ± 8971.157	0.456
	1	20 (39.2)	2562.903 ± 6051.540	13 (31.0)	99392.905 ±168892.689	0.002
	2	9 (17.6)	1252.393 ± 1768.134	20 (47.6)	28697.925 ± 71959.708	0.006
	3	4 (7.8)	401.500 ± 591.679	4 (9.5)	26700.693 ± 32274.514	0.248

PV : periventricular (뇌실주위)

WM : white matter (백질)

[0064]

[0066] 또한, 정상압 수두증의 임상 양상이 치매와 비슷한 부분이 많기 때문에 치매와 GDF15의 관계를 확인하기 위해, 간이정신상태검사(Mini-Mental State Examination, MMSE)를 통해 분류된 치매 환자를 대상으로 GDF15 농도를 측정한 결과, 치매의 중증도(normal, mild, moderate 및 severe)에 따라 GDF15 농도가 증가하지 않음을 확인하였다(표 3 및 도 3). 즉, 치매와 GDF15 간에 연관성이 없으므로, GDF15 단백질 및 이의 유전자가 치매 진단과 연관된 바이오 마커가 아님을 알 수 있었다.

표 3

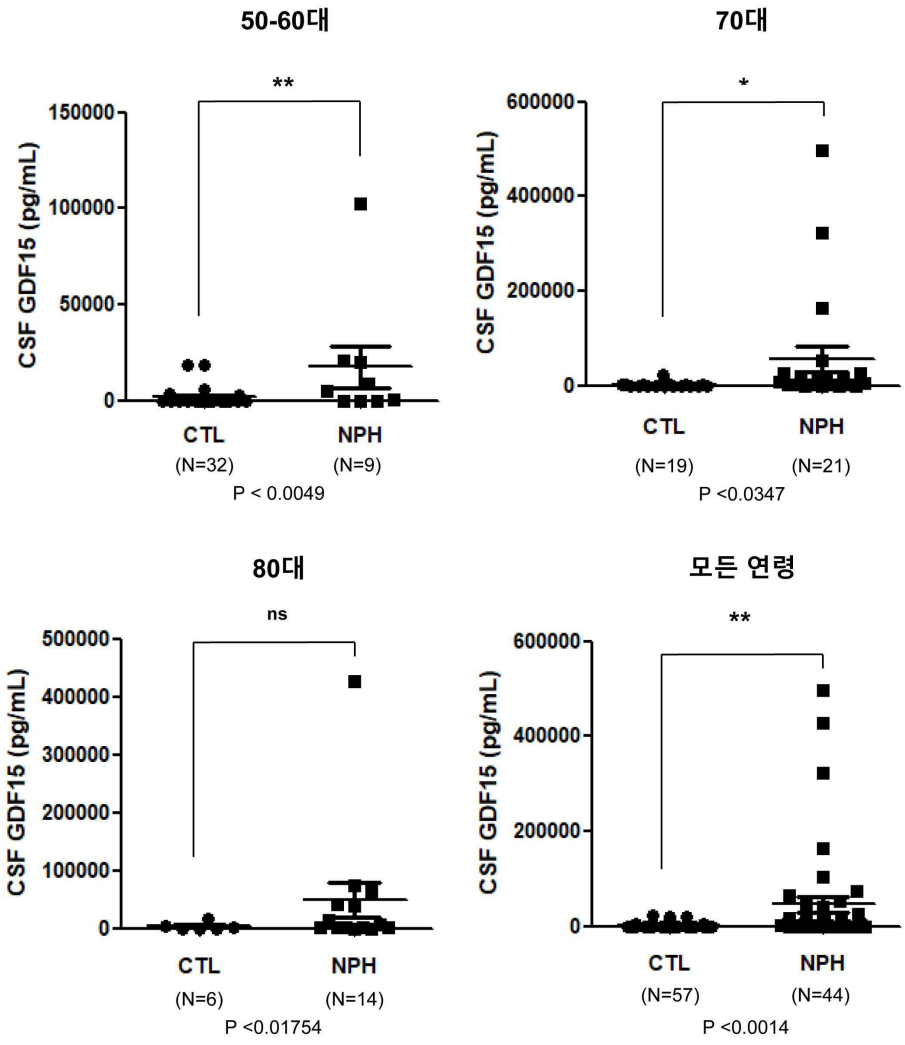
[0067] 간이정신상태검사(MMSE)를 통해 분류된 치매 중증도에 따른 GDF15 농도 측정

	Normal(n=22)	Mild(n=10)	Moderate(n=7)	Severe(n=3)	P
GDF15(pg/㎖)	61855.001± 135998.791	9267.955± 12444.088	55851.737± 119205.097	30511.333± 32247.601	0.860

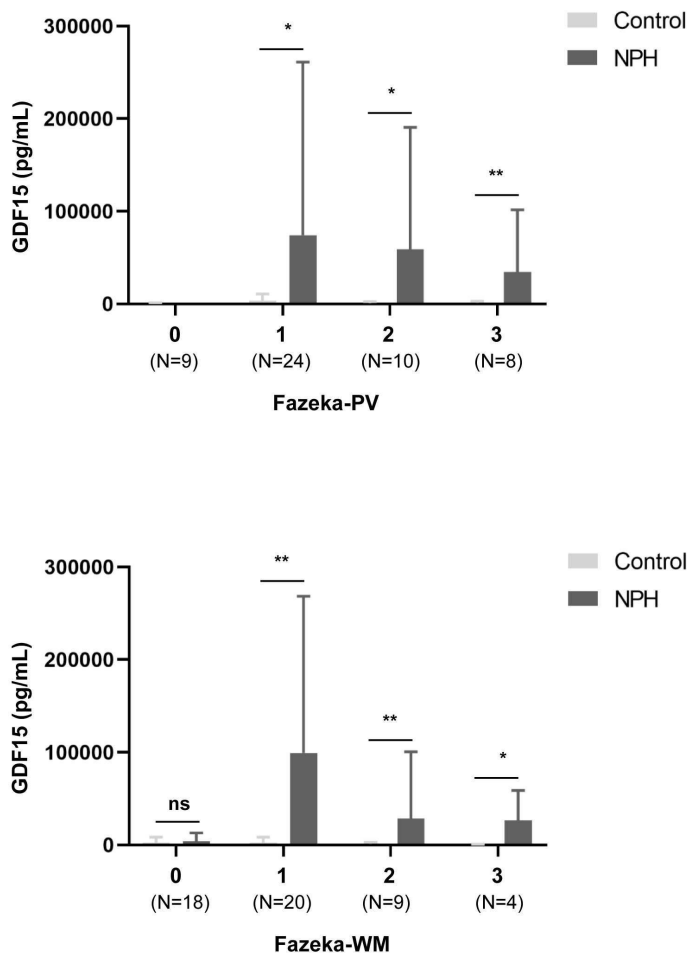
[0068] Normal(정상), Mild(경증), Moderate(중증도), Severe(중증)

도면

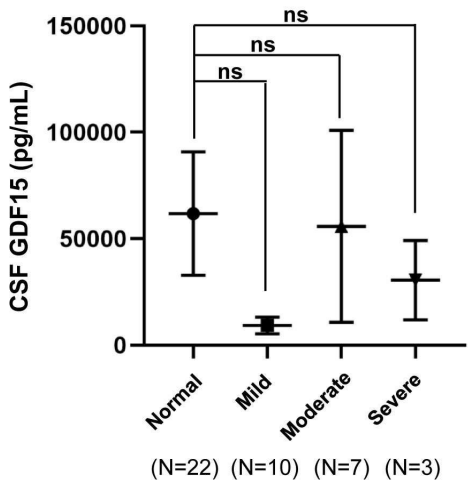
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> GDF15 gene marker for diagnosis or prediction of normal pressure hydrocephalus and uses thereof

<130> PN20206

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 927

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcccgggc aagaactcag gacggtgaat ggctctcaga tgctcctggt gttgctggtg 60

ctctcgtggc tgccgcatgg gggcgccctg tctctggccg aggcgagccg cgcaagtttc 120

ccgggaccct cagagttgca ctccgaagac tccagattcc gagagttgcg gaaacgctac 180

gaggacctgc taaccaggct gcgggccaac cagagctggg aagattcgaa caccgacctc 240

gtcccggccc ctgcagtccg gatactcacg ccagaagtgc ggctgggatc cggcggccac 300

ctgcacctgc gtatctctcg ggccgccctt cccgaggggc tccccgaggc ctcccgcctt 360

caccgggctc tgttccggct gtccccgacg gcgtcaaggt cgtgggacgt gacacgaccg 420

ctgcggcgtc agctcagcct tgcaagaccc caggcgcccg cgctgcacct gcgactgtcg 480

ccgccgccgt cgcagtcgga ccaactgctg gcagaatctt cgtccgcacg gccccagctg 540

gagttgcact tgcggccgca agccgccagg gggcgccgca gagcgcgtgc gcgcaacggg 600

gaccactgtc cgctcgggcc cgggcgttgc tgccgtctgc acacggtccg cgcgtcgctg 660

gaagacctgg gctgggccga ttgggtgctg tcgccacggg aggtgcaagt gaccatgtgc 720

atcggcgcgt gcccgagcca gttccgggcg gcaaacatgc acgcgcagat caagacgagc 780

ctgcaccgcc tgaagcccga cacggtgcca gcgccctgct gcgtgcccgc cagctacaat 840

cccatggtgc tcattcaaaa gaccgacacc ggggtgtcgc tccagaccta tgatgacttg 900

ttagccaaag actgccactg catatga 927

<210> 2

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu

1 5 10 15

Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu

20 25 30

Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser

35 40 45

Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu

50 55 60

Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu

65 70 75 80

Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly

85 90 95

Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu

100 105 110

Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser

115 120 125

Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln

130 135 140

Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser

145 150 155 160

Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala

165 170 175

Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg

180 185 190

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly

195 200 205

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly

210 215 220

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys

225 230 235 240

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln

245 250 255

Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro

260 265 270

Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr

275 280 285

Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp

290 295 300

Cys His Cys Ile

305