

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 9일 (09.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/039028 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/009168
- (22) 국제출원일: 2015년 9월 1일 (01.09.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 기창석 (KI, Chang-Seok); 13532 경기도 성남시 분당구 판교역로 백현마을아파트 701-501, Gyeonggi-do (KR). 김덕경 (KIM, Duk-Kyung); 05553 서울시 송파구 올림픽로 212 갤러리아펠리스 A동 3902호, Seoul (KR). 기창원 (KEE, Chang Won); 06279 서울시 강남구 삼성로 57길 45, 대치삼성 2차 아파트 201-302, Seoul (KR). 장미애 (JANG, Mi-Ae); 06337 서울시 강남구 개포로 110길 43 한신아파트 102-106, Seoul (KR). 김은경 (KIM, Eun Kyoung); 05792 서울시 송파구 충민로 188 송파파인타운 103-701, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, KR, 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).

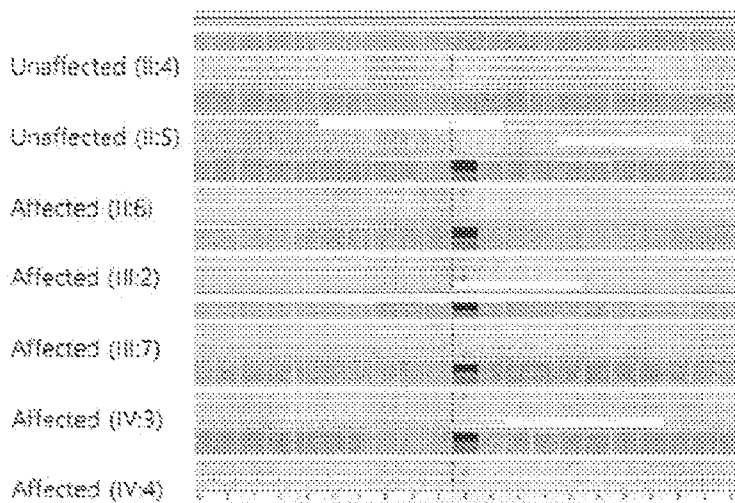
공개:

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

(54) Title: DDX58 MUTANT GENE AS CAUSATIVE GENE FOR CONGENITAL GLAUCOMA, HEREDITARY VASCULAR CALCIFICATION OR SKELETAL ABNORMALITIES, AND METHOD AND COMPOSITION FOR DIAGNOSING DISEASES USING SAME

(54) 발명의 명칭: 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 원인 유전자로서의 DDX58 돌연변이 유전자 및 이를 이용한 상기 질병의 진단방법 및 진단용 조성물

도 4a



(57) Abstract: The present invention establishes a novel missense mutation identified from DDX58 gene as a gene mutation responsible for congenital glaucoma, hereditary vascular calcification, or skeletal abnormalities, and provides the DDX58 mutant gene and proteins coded from the same as diagnostic markers for congenital glaucoma, hereditary vascular calcification, or skeletal abnormalities. Also, provided are a composition, a kit, and a method for diagnosing congenital glaucoma, hereditary vascular calcification, or skeletal abnormalities using the DDX58 mutant gene and proteins. According to the present invention, an accurate and early diagnosis can be conducted through a simple gene test regarding congenital glaucoma, hereditary vascular calcification, or skeletal abnormalities, thereby enabling targeted therapies based on accurate causes of disease according to accurate diagnosing.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 DDX58 유전자에서 동정된 신규 미스센스 돌연변이가 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 원인이 되는 유전자 돌연변이임을 규명하고, 이 DDX58 돌연변이 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질을 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단 마커로서 제공한다. 본 발명에서는 상기 DDX58 돌연변이 유전자 및 단백질을 이용하여 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단을 위한 조성물, 키트 및 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대하여 간단한 유전자 검사를 통해 정확한 조기 진단이 가능하며, 정확한 진단에 따라 정확한 병인에 따른 맞춤치료가 가능하게 한다.

명세서

발명의 명칭: 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 원인 유전자로서의 DDX58 돌연변이 유전자 및 이를 이용한 상기 질병의 진단방법 및 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 원인 유전자로서의 DDX58 돌연변이 유전자 및 이를 이용한 상기 질병의 진단방법 및 진단용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 녹내장, 혈관 석회화, 골격 이상증은 다양한 원인에 의해 발생할 수 있다. 출생 후 특별한 원인이 없이 발생하는 녹내장을 선천성 녹내장이라 하는데, 유전적 원인이 중요한 것으로 알려져 있고 CYP11B1, MYOC, LTBP2 유전자 등이 원인 유전자로 밝혀졌다. 그러나, 선천성 녹내장 환자 중 세 가지 유전자의 이상이 발견되는 비율은 민족과 인종에 따라 다르지만 대략 20-50% 정도에 불과하며, 따라서 또 다른 원인 유전자가 존재함을 시사한다. 선천성 녹내장은 출생 후 조기 진단이 되지 않을 경우 시력을 상실하게 되는 치명적인 질환이지만, 소아의 특성상 증세를 발견하고 진단하기까지 오랜 시일이 걸리는 경우가 많아서 유전자 검사 등을 이용한 조기 진단이 매우 중요하다.
- [4] 혈관 석회화는 다양한 질환에서 관찰되며, 혈관염 등 염증성 질환과 관련된 경우가 빈번하다. 선천성 혈관 석회화는 뚜렷한 선행 질환이 없이 발생하며, 특별한 증상이 없다가 매우 심해져서 혈관 및 심장 판막 등의 기능에 이상이 발생한 후에 진단될 수 있으므로, 조기 진단이 매우 중요한 질환이다.
- [5] 골격 이상증은 유전적 혹은 후천적 원인에 의해 발생할 수 있는데, 현재까지 수많은 원인 유전자가 밝혀져 있고, 각 유전형별로 침범하는 골격의 종류와 이상의 형태가 매우 다양하다. 따라서, 이상의 형태에 따른 원인 유전자를 밝혀야만 진단을 위한 유전자 검사가 용이하다.
- [6]
- [7] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 확정 진단, 증상 발생 진단 및 산전 진단을 위한 진단 마커를 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, DDX58 유전자에서 동정된 신규 미스센스 돌연변이가 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 원인이 되는 유전자 돌연변이임을 발견하고, 이 DDX58 돌연변이 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질이 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단 마커가 될 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [10] 따라서, 본 발명의 목적은 DDX58 돌연변이 유전자를 제공하는 데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 DDX58 돌연변이 단백질을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트를 제공하는 데 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 데 있다.
- [15]
- [16] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.
- [17]

과제 해결 수단

- [18] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단마커로서 서열목록 제1서열로 기재되는 염기서열에서 1118번째 염기인 아데닌이 시토신으로 치환 또는 803번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 DDX58 돌연변이 유전자를 제공한다.
- [19] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단마커로서 DDX58 돌연변이 유전자로부터 암호화되는 DDX58 돌연변이 단백질을 제공한다.
- [20]
- [21] 본 발명자들은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 확정 진단, 증상 발생 진단 및 산전 진단을 위한 진단 마커를 개발하기 위해 연구 노력하였고 그 결과, DDX58 유전자에서 동정된 신규 미스센스 돌연변이가 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 원인이 되는 유전자 돌연변이임을 발견하고, 이 DDX58 돌연변이 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질을 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단 마커가 될 수 있음을 규명하였다.
- [22] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 증상을 전부 또는 일부 나타내는 환자에서 서열목록 제1서열의

염기서열에서 1118번째 염기인 아데닌이 시토신으로 치환 또는/및 803번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환되는 돌연변이가 나타나며, 상기 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열에서 373번째 아미노산인 글루탐산이 알라닌으로 치환 또는/및 268번째 아미노산인 시스테인이 페닐알라닌으로 치환된다.

- [23] 본 발명은 상기 DDX58 돌연변이 유전자 및 이로부터 암호화되는 DDX58 돌연변이 단백질이 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단마커로 이용될 수 있다는 것을 규명하였다.
- [24] 본 발명에서 선천성 녹내장은 출생시 안압 상승으로 증상이 나타나는 녹내장의 형태로 대부분의 경우에 방수가 빠져 나가는 부위인 전방각의 발육 정지 때문에 발생하며 원발성 선천녹내장, 원발성 연소녹내장, 선천 이상을 동반하는 발육이상녹내장 등이 포함되나 대개는 원발성 선천녹내장을 의미한다. 증상으로는 눈물 흘림, 눈부심, 눈꺼풀 떨림 등이 나타나고, 검은눈동자(각막)가 뿌옇게 흐려지며 안압이 높기 때문에 검은 눈동자가 계속적으로 커지며, 3세 이후에는 안구 확장 등의 증상 없이 진행성 근시로 나타나기도 한다.
- [25] 본 발명에서 혈관 석회화는 혈관에 칼슘이 쌓여 혈관이 딱딱하게 굳어지는 현상을 의미하며, 본 발명에서는 특히 유전적인 원인에 의하여 발생하는 것을 말한다.
- [26] 본 발명에서 골격 이상증은 골격 성장 질환을 말하며, 비정상적으로 뼈가 성장하고 발달하여 골격이 비정상적인 크기 및 모양을 보이는 것을 의미한다.
- [27] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 개체 시료로부터 DDX58 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물을 제공한다.
- [28] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 진단용 조성물을 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트를 제공한다.
- [29] 본 명세서에서 표현 “선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트”는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트”는 “선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다.
- [30] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를

포함한다.

- [31] 본 발명의 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물에서 mRNA 발현을 검출할 수 있는 제제는 DDX58 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브이다.
- [32] 본 발명에서 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증을 진단하기 위하여 사용되는 표현“mRNA 발현 검출”은 생물학적 시료에서 본원 발명의 DDX58 돌연변이 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 폴리뉴클레오타이드의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [33] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 mRNA 검출은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다.
- [34] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 멀티플렉스 PCR(McPherson and Moller, 2000), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification, TMA; WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication; WO 90/06995), 타겟 폴리 뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences; 미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction, CP-PCR; 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭 (nucleic acid sequence based amplification, NASBA; 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loopmediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794호, 제5,494,810호, 제4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.
- [35] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이

개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 멀티플렉스 PCR, 실-시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

- [36] 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 분석 대상(예컨대, 객체 유래 시료)에서 타겟 유전자를 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명은 시료에서 추출한 DNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다. 시료에서 DNA를 추출하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)).
- [37] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [38] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [39] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 이렇게 증폭된 타겟 유전자(구체적으로는, DDX58 유전자)를 적합한 방법으로 분석하여 시료

내에서 DDX58 돌연변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 형광 측정을 통해 스캐닝하여 형성되는 밴드의 패턴을 관찰 및 분석함으로써 타겟 유전자를 선택적으로 검출할 수 있다.

[40] 따라서, 본 발명의 방법을 DNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) DDX58 돌연변이 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 프라이머 쌍 및 프로브를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 산물을 형광을 통해 분석하는 단계를 포함하며 이를 통해 시료로부터 추출한 DNA에서 DDX58 돌연변이의 발생 및 존재 유무를 종합적으로 검출 또는 정량할 수 있다.

[41] 본 명세서의 용어 “혼성화(hybridization)”는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다. 용어 “어닐링”과 “혼성화”는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다. 본 발명에서 이용되는 타겟 핵산은 특별하게 제한되지 않으며, DNA(gDNA 또는 cDNA) 또는 RNA 분자를 모두 포함하며, 보다 바람직하게는 gDNA이다. 타겟 핵산이 RNA 분자인 경우에는 cDNA로 역전사 하여 사용한다.

[42] 타겟 핵산을 연장 프라이머 및 프로브에 어닐링 또는 혼성화 시키는 방법은 당업계에 공지된 혼성화 방법에 의해 실시할 수 있다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 반응 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

[43] 본 발명에 이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 5' → 3' 뉴클레아제 활성을 가지는 효소이다. 본 발명에 이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 바람직하게는 DNA 중합효소이다. 통상적으로 DNA 중합효소들은 5' → 3' 뉴클레아제 활성을 가지고 있다. 본 발명에 이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 *E. coli* DNA 중합효소 I, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 구체적으로는, 주형-의존성 핵산 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(*Taq*), *Thermus thermophilus*(*Tth*), *Thermus filiformis*, *Thermis*

flavus, Thermococcus literalis, Pyrococcus furiosus(*Pfu*), Thermus antranikianii, Thermus caldophilus, Thermus chliarophilus, Thermus flavus, Thermus igniterrae, Thermus lacteus, Thermus oshimai, Thermus ruber, Thermus rubens, Thermus scotoductus, Thermus silvanus, Thermus species Z05, Thermus species sps 17, Thermus thermophilus, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana 및 Thermosipho africanus의 DNA 중합효소를 포함한다. 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 촉매되는 “주형-의존성 연장반응”은 주형의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 합성하는 반응을 의미한다.

- [44] 본 발명의 진단용 조성물에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 상기 DDX58 돌연변이 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 폴리뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다.
- [45] 본 발명의 “프라이머”는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 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 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [46] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.
- [47] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며,

올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.

- [48] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [49] 본 발명의 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물에서 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제는 DDX58 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체이다.
- [50] 본 발명에서 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증을 진단하는데 있어서 사용되는 표현 “단백질 발현 검출”은 생물학적 시료에서 상기 돌연변이 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 바람직하게는, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 상기 예에 의해 본 발명의 분석방법이 제한되는 것은 아니다.
- [51] 본 발명에서 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 예를 들어, 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 애포타머(aptamer)이다.
- [52] 본 발명에서 “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [53] 상기한 바와 같이 새로운 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여

항체를 생성하는 것은 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

- [54] 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에서 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.
- [55] 단일클론 항체는 당업계에서 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [56] 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [57] 본 발명에서 마커 단백질에 결합하는 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [58] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증을 진단하기 위하여 상기 단백질과 각각 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하며, 보다 바람직하게는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 키메라 항체이고, 보다 더 바람직하게는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체이며, 가장 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [59] 본 발명에서, 상기 항체는 미소입자(micro particle)와 접합된 항체(conjugated antibody)인 것이 바람직하다. 또한 상기 미소입자는 착색된 라텍스(colored latex) 또는 콜로이드성 금 입자(colloidal gold particle)인 것이 바람직하다.
- [60] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 진단용 키트는 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 면역분석(immunoassay)용 키트이다.
- [61] 상기 면역분석용 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트이다.
- [62] 상기 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 엘라이자 키트는

상기 단백질에 대한 다클론 항체 및 단일클론 항체, 그리고 표지물질이 결합된 상기 다클론 항체와 단일클론 항체에 대한 2차 항체를 포함한다.

[63] 본 발명에서 키트의 종류의 예로는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, 엘라이자 키트, 또는 면역학적 도트 키트등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 키트의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[64] 상기 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 추가적으로 포함할 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[65] 또한, 상기 키트는 복합마커를 동시에 분석하기 위하여 단백질 마이크로어레이를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 추가적으로 포함할 수 있다. 마이크로어레이 키트는 고체상에 결합된 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 단백질 마이크로어레이 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 단백질 마이크로어레이 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단, 효소(예: 항체와 융합됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 단백질 마이크로어레이를 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

[66] 루미넥스 어세이(Luminex Assay)는 소량(10-20 μl)의 환자 시료를 전 처리하지 않은 상태에서 최대 100종류의 어널라이트(analyte)를 동시에 측정할 수 있는 고용량(high-throughput) 정량분석방법으로서 감도가 좋고(pg 단위), 빠른 시간내에 정량이 가능하여(3-4시간), 기존의 엘라이자(ELISA)나 엘리스팟(ELISPOT)을 대체할 수 있는 분석방법이다. 상기 루미넥스 어세이(Luminex Assay)는 96-웰 플레이트(well plate)에 있는 각각의 웰에서 100가지 이상의 생물학적 시료를 동시에 분석할 수 있는 멀티플렉스 형광 마이크로플레이트 (multiplexed fluorescent microplate) 분석방법으로 두 종류의 레이저 감지기(laser detector)를 사용하여 실시간으로 신호전달을 진행시킴으로 100개 이상의 다른 색깔 군의 폴리스티렌 비드(polystyrene bead)를 구별하여

정량한다. 상기 100개의 비드는 다음과 같은 방법으로 구별되도록 구성된다. 한쪽은 붉은 형광 비드(red fluorescence bead)가 열 단계 이상으로 나뉘어 있고, 다른 한 쪽은 오렌지 형광 비드(orange fluorescence bead)가 열 단계로 나뉘어 강도(intensity)의 차이를 보이며 그 사이의 비드(bead)들은 레드(red)와 오렌지(orange)의 비율(ratio)이 각각 다른 비율로 섞여 있어 전체적으로 100개의 색-코드 비드 세트(color-coded bead set)를 구성하고 있다. 또한 각각의 비드에는 분석하고자 하는 단백질의 항체가 부착되어 있어 이를 이용한 면역항체반응으로 단백질 정량이 가능하다. 이 시료는 두개의 레이저(laser)를 사용하여 분석하는데, 하나의 레이저(laser)는 비드(bead)를 감지(detection)하여 비드 고유번호를 알아내고, 다른 레이저는 비드에 붙어 있는 항체와 반응한 시료 속의 단백질을 감지하게 된다. 따라서 한 웰에서 동시에 100가지의 생체 내 단백질 분석이 가능하다. 이 분석은 15 μ l 정도의 적은 시료로도 감지가 가능한 장점이 있다.

- [67] 본 발명의 루미넥스(Luminex) 어세이를 수행할 수 있는 루미넥스(Luminex) 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 루미넥스 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 루미넥스 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단, 효소(예: 항체와 접합됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 상기 항체는 미소입자(micro particle)와 접합된 항체(conjugated antibody)일 수 있으며, 또한 상기 미소입자는 착색된 라텍스(colored latex) 또는 콜로이드성 금 입자(colloidal gold particle)일 수 있다.
- [68] 본 발명의 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트에서, 상기 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 면역크로마토그래피 스트립을 포함하는 키트는, 5분내 분석결과를 알 수 있는 래피드 테스트(Rapid test)를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. 상기 면역크로마토그래피 스트립은 (a) 시료가 흡수되는 샘플패드(sample pad); (b) 시료 내의 상기 유전자의 단백질과 결합하는 결합 패드(conjugate pad); (c) 상기 유전자의 단백질에 대한 단일클론 항체를 포함하는 반응선(test line) 및 대조선(control line)이 처리되어 있는 반응막(test membrane); (d) 잔량의 시료가 흡수되는 흡수패드(absorption pad); 및 (e) 지지체를 포함하는 것이 바람직하다. 또한 면역크로마토그래피 스트립(Immunochromatographic strip)을 포함하는 래피드 테스트 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 테스트 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 테스트 키트는 결합된

항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 나이트로셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수 패드와 샘플 패드 등 진단에 필요한 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

- [69] 본 발명에서 면역학적 도트 어세이에 의한 단백질 발현 수준의 측정은 (a) 막에 생물학적 시료를 점적(dotting)하는 단계; (b) 상기 유전자의 단백질에 특이적인 항체를 상기 점적된 막에 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 반응시킨 막에 표시체가 접합된 2차 항체를 첨가하고 발색시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 엘라이자 어세이는 (a) 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자의 단백질에 특이적인 항체 1을 고상체에 흡착시키는 단계; (b) 상기 고상체에 흡착된 항체 1과 의심 환자의 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성하는 단계; (c) 표지물질이 결합된 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 항체 2를 처리하여 상기 복합체와 결합시키는 단계; 및 (d) 상기 표지물질을 검출하여 단백질의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 샌드위치 엘라이자 어세이인 것이 바람직하며, 상기 단백질 마이크로어레이 어세이는 (a) 상기 마커 유전자의 단백질에 특이적인 다클론 항체를 칩에 고정시키는 단계; (b) 상기 고정된 다클론 항체 1을 의심 환자의 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성하는 단계; (c) 표지물질이 결합된 상기 마커에 대한 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적인 단일클론 항체를 처리하여 상기 복합체와 결합시키는 단계; 및 (d) 상기 표지물질을 검출하여 단백질의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [70] 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 의심 환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가 또는 발현 여부를 판단하여, 의심 환자의 실제 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [71] 본 발명에서 용어 “항원-항체 복합체”란 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [72] 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 펄록시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신,

이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, α -프탈테히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 포함되며 이로 제한되지 않는다.

- [73] 단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 여부 및 정도를 확인하여, 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 발병 여부를 확인할 수 있다.
- [74] 또한, 바람직하게는, 상기 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의한 단백질 생성 여부 또는 생성된 단백질의 양을 확인하여, 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현 여부 또는 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu g/ml$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.
- [75] 또한, 바람직하게는, 상기 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 조직 및 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증으로 의심되는 조직을 채취 및 고정된 후, 당업계에서 널리 공지된

방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다.

[76] 또한, 바람직하게는, 상기 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다.

단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 발병 여부를 확인할 수 있다.

[77] 본 발명에서의 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨를 의미하고, 바람직하게는 혈액 또는 혈청을 의미한다.

[78]

[79] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[80] (a) 개체 시료로부터 DDX58 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기

유전자로부터 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현을 검출하는 단계; 및

[81] (b) 개체 시료에서 DDX58 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현이 검출된 경우, 이 개체에서 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증이 발병할 가능성이 높은 것으로 판정하는 단계.

[82] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 mRNA 발현은 DDX58 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하여 측정한다.

[83] 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 방법은 시료 내에서 DDX58 돌연변이를 매우 효과적이고 간편하게 분리 검출할 수 있다.

[84] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 단백질 발현은 DDX58 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 측정한다.

[85]

발명의 효과

[86] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[87] (a) 본 발명은 DDX58 유전자에서 동정된 신규 미스센스 돌연변이가 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 원인이 되는 유전자 돌연변이를 규명하고, 이 DDX58 돌연변이 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질을 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단 마커로서

제공한다.

- [88] (b) 본 발명에서는 상기 DDX58 돌연변이 유전자 및 단백질을 이용하여 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증의 진단을 위한 조성물, 키트 및 방법을 제공한다.
- [89] (c) 본 발명에 따르면 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대하여 간단한 유전자 검사를 통해 정확한 조기 진단이 가능하며, 정확한 진단에 따라 정확한 병인에 따른 맞춤치료가 가능하게 한다.

[90]

도면의 간단한 설명

- [91] 도 1은 DDX58에 대하여 돌연변이를 가족의 가계도 및 신체 특징을 보여주는 도면이다.
- [92] (a) DDX58 p.E373 돌연변이를 갖는 가족 A의 가계도임. 정사각형, 남성; 원, 여성; 색칠된 정사각형 또는 원, 병에 걸림; 화살표, 발단자; 대각선, 사망; 물음표, 불분명한 질병 상태.
- [93] (b) DDX58 p.C268F 돌연변이를 갖는 가족 B의 가계도임.
- [94] (c) CTA(Computed tomographic angiography) 결과, 대동맥 석회화(검정색 화살촉) 및 대동맥 판막의 석회화(흰색 화살촉)가 가족 A의 II:6(좌측) 및 III:7(우측)에서 발견됨. (d) 가족 A의 II:6 및 III:7에 대한 파노라마 방사선 사진임. 경한 충치를 제외한 치아 이상은 발견되지 않음. (e) 가족 A III:7의 눈 사진임. 양안의 심한 시신경 함몰은 3세에 원발성 선천녹내장으로 진단됨(좌측 및 우측 상단). 양안에서 녹내장 필터링 수술을 받은 환자는 추가적으로 추후에 양안 녹내장 임플란트를 실시하였다.
- [95] (f) 손과 발의 골격을 촬영한 결과임. 가족 A(FA)의 33세 III:2 및 그의 8세 아들(IV:3)의 발 방사선 사진에서 지골 말단(distal phalanges)의 말단골용해(acro-osteolysis)가 확인되었으며, 그로 인해 엄지발가락은 삼각형 모양을 나타냄(화살표). 아들(IV:3) 및 딸(IV:4, 5세)의 손 방사선 사진에서 말단 터프트(terminal tufts)의 침식성 변화가 관찰되었으며, 그로 인해 모든 지골 말단에서 발육 부전이 발생하였음. 3-4세 경 측정한 결과, IV:3에서 팔목뼈 석회화가 지연됨. 손바닥뼈(metacarpals) 및 중족골(metatarsals)의 확장된 수강(medullary cavity)은 병에 걸린 가족 A 모두에서 발견되지 않음. 가족 B(FB)에서 61세 II:4의 발 방사선 사진은 엄지발가락의 염좌, 침식 및 지골 말단의 말단골용해가 발견되었고, 그로 인해 짧은 발가락을 갖게 됨(상단). 가족 B III:2는 더 낮은 정도의 지골 말단의 침식성 변화를 나타내는 것 외에 비슷하며, 엄지발가락은 삼각형 모양을 나타냄(상단, 화살표). 가족 B II:4 및 III:2의 손 방사선 사진에서 II:4는 심각한 지골 말단의 말단골용해 및 굴곡구축(flexion contractures)을 보였으며, III:2는 지골 말단의 경한 침식성 변화를 보였음. 손바닥뼈 및 중족골의 수강은 가족 B에서 넓어지지 않음.

- [96] 도 2는 신규한 DDX58 돌연변이의 오솔로그(ortholog) 보존 및 RIG-I 헬리카아제Protein Data Bank ID 3ZD7)의 분자구조를 나타낸 도면이다.
- [97] 단백질 도메인과 관련된 DDX58 돌연변이에 대한 모식도임. 척추동물의 RIG-I 단백질 서열과 얼라인먼트함. 미스센스 돌연변이에 해당하는 얼라인먼트 부위를 보여줌. 코돈 268에서 Cys (C) 및 코돈 373에서 Glu (E)는 모든 종에 걸쳐 잘 보존됨(오픈 박스). 본 발명에서 얼라인된 RIG-I 아미노산 서열에 대한 RefSeq 번호는 다음과 같다: 인간, HIT000390839; 침팬지, ENSPTRT000000038562; 오랑우탄, ENSPPYT000000022324; 마우스, AK128929; 랫트, ENSRNOT000000008465; 개, ENSCAFT000000002841; 말, ENSECAT000000023725; 소, XM_580928; 제브라피쉬, ENSDART000000058276. CARD(caspase activation recruitment domain);, Hel(helicase domain)-1 및 Hel-2는 두 개의 보존된 코어 헬리카아제 도메인이고, Hel-2i는 RIG-I-유사 헬리카아제 패밀리에서 보존된 삽입 도메인이며, P는 결합 dsRNA와 관련된 CTD(C-terminal domain)에 Hel-2를 연결시키는 브릿지 영역의 펜치(pincer)임.
- [98] 도 3은 HTM(human trabecular meshwork) 세포에서 DDX58 돌연변이에 의한 세포 독성을 측정한 결과이다.
- [99] (a) DDX58 돌연변이를 갖는 HTM 세포의 위상차 현미경 사진임. 스케일 바 = 100 μ m. (b) DAPI(파란색)과 중첩된 RIG-I의 FITC 형광(녹색)은 좌측 컬럼에 표시되며, DAPI와 중첩된 비멘틴 염색 Cy3 이미지(빨간색)는 우측 컬럼에 표시됨. 스케일 바 = 100 μ m. (c) 세포 생존능은 야생형과 비교하여 살아있는 세포의 비율로 표시함. 데이터는 평균 백분율 $\pm$ 표준편차로 나타냄. *은 야생형과 비교하여 $p < 0.01$ 인 것을 나타냄.
- [100] 도 4는 DDX58 유전자의 엑솜 시퀀싱 결과를 나타낸다.
- [101] (a) 엑솜 시퀀싱 데이터로부터 DDX58 유전자 영역의 IGV 브라우저 뷰를 보여주는 것으로 가족 A에서 병에 걸린 모든 사람들은 c.1118A>C (p.E373A) 돌연변이를 가짐(화살표). (b) 생어 시퀀싱으로 DDX58 돌연변이를 확인함(화살표). (c) 생어 시퀀싱 결과, 가족 B에서 병에 걸린 모든 사람은 c.803G>T (p.C268F) 돌연변이를 가짐(화살표).
- [102] **발명의 실시를 위한 형태**
- [103] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [104]
- [105] 실시예
- [106] 실험방법

[107] *병에 걸린 개인 및 가족*

[108] 가족 A에서 발단자(II:6) 및 그의 아들(III:7)은 선천성 녹내장, 혈관 석회화 및 골격 이상증을 가진 환자들이다. 다른 가족 구성원들은 대동맥 및 안과 시험 및/또는 골격 조사로 평가하였다. 가족 B에서 3명의 환자(II:4, III:2 및 IV:3)는 선천성 녹내장 및 골격 이상증을 가진 환자들이다. 각 개인의 허락 하에 말초혈액혈구로부터 gDNA(genomic DNA)를 추출하였다. 본 연구는 삼성서울병원 기관윤리심의위원회로부터 승인되었다(IRB# 2013-09-063).

[109]

[110] *엑솜(exome) 시퀀싱*

[111] 가족 A의 5명의 환자(II:6, III:2, III:7, IV:3 및 IV:4) 및 정상인 2명(II:4 및 II:5)으로부터 추출한 gDNA 샘플에서 Agilent SureSelect Human All Exon v3(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 전체 엑솜을 수득하고, HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA) 시퀀싱 플랫폼을 이용하여 시퀀싱하였다. Burrows-Wheeler Aligner (BWA, version 0.6.2)를 이용하여 시퀀스 리드(raw sequence read)를 hg19 인간 참조서열(reference sequence)에 얼라인하였다. 중복된 리드는 Picard로 제거하였고, Genome Analysis Tool kit(GATK)로 로컬 얼라인먼트를 최적화하였다. 단일 뉴클레오타이드 변이 및 삽입-결실은 GATK Unified Genotyper 프로그램으로 콜(call) 하였고, 디코이 파라미터는 5,000으로 설정하였다. GATK는 다음의 조건에 따라 변이를 필터링하는데 사용되었다: 대립유전자 균형 > 0.8, 퀄리티 < 30, 리드 길이 < 25x, 길이에 의한 퀄리티 < 5, 및 균집화된 변이에 대한 윈도우 10.

[112]

[113] *생어(Sanger) 시퀀싱*

[114] DDX58 유전자의 코딩 엑손을 증폭하기 위해 프라이머를 디자인하였다(primers available upon request). 정제된 PCR 증폭 산물은 BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction kit(Applied Biosystems, Foster City, CA) 및 ABI 3730xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 시퀀싱하였다. 돌연변이에 대한 설명은 ATG 개시 코돈에서 첫 A로부터 시작하는 뉴클레오타이드 넘버링을 포함하는 참조 cDNA 서열 NM_014314.3에 기초한다.

[115]

[116] *HTM 세포에서 RIG-I 돌연변이의 효과*

[117] 27세 여성 기증자의 정상안(normal eyes)에서 유래한 HTM 세포는 Paul L. Kaufman(University of Wisconsin, Madison, WI)로부터 제공받았다. HTM 세포는 10% FBS 및 항생제를 포함하는 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂-95% 공기 습윤 조건으로 배양하였다. AdEasyTM XL adenoviral vector system(Agilent)을 이용하여 DDX58의 인간 야생형 및 돌연변이형 유전자를 운반하는 복제불능(replication-deficient) 재조합 아데노바이러스를 제조하였다. 검출 및

가시화를 용이하게 하기 위해, 모든 DDX58 유전자는 그의 N-말단에 FLAG 에피토프가 태깅된 융합 단백질로 발현되도록 디자인되었다. 바이러스의 증폭은 AD-293 세포(Agilent)에서 실시하였으며, 바이러스 타이터는 QuickTiter™ adenovirus titer ELISA kits(Cell Biolabs, San Diego, CA)를 이용하여 결정하였다. PCR을 통해 바이러스 컨스트럭트에 E1a 유전자가 존재하지 않는 것을 확인하였다. 바이러스 감염은 세포 당 10-100 pfu(plaque-forming units)의 MOI(multiplicity of infection)로 2시간 동안 실시하였으며, 감염 세포는 72시간 동안 더 배양하였다.

[118] 면역화학법을 실시하기 위해 감염된 HTM 세포를 PBS로 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 20분간 고정시킨 다음, 0.5% Triton X-100로 5분간 투과처리하였다. 2% 소 혈청 알부민으로 1시간 동안 세포를 블로킹한 다음, 200배 희석된 항-FLAG 항체(Santa Cruz Biotechnology) 또는 500배 희석된 Cy3-결합된 항-비멘틴 항체(Sigma-Aldrich)와 2시간 동안 반응시켰다. 세포를 세척한 다음, 500배 희석된 FITC-결합 2차 항체(Life Technologies)와 2시간 동안 반응시켰다. 핵을 DAPI(4', 6'-diamidino-2-phenylindole)로 20분 동안 대조염색한 후, 형광 현미경에서 적절한 필터 세트 및 200X 배율로 세포를 관찰하였다.

[119] 생존능 어세이(viability assay)를 위해 감염된 HTM 세포에 트립신을 처리한 다음, 떨어진 세포를 0.4% 트립판 블루와 혼합하였다. 5분 후, 일회용 혈구계산기를 이용하여 세포만을 계수하였다. 데이터는 ANOVA(One-way analysis of variance) 다음, Newman-Keuls 다중 비교 시험을 이용하여 통계학적으로 분석하였으며, $p < 0.05$ 는 유의한 것으로 판단하였다.

[120]

[121] 실험결과

[122] 최근, 본 발명자들은 대동맥 석회화, 녹내장 및 골격계 이상을 나타내는 한 가족(가족 A)을 발견하였다(도 1a). 질병 원인 유전자를 확인하기 위해, 환자 5명 및 정상인 2명에 대하여 엑스 시퀀싱을 실시하였다. 본 발명자들은 dbSNP(Nucleotide Polymorphism database) 버전 137에 기재된 공통적인 다형성(polymorphism)을 제외하고, 바이러스 RNA에 대한 IFN 반응 유도를 매개하는 세포질 헬리카아제를 코딩하는 DDX58 유전자에서 신규한 미스센스 변이(c.1118A>C; p.E373A)를 규명하였고(도 2 및 도 4a, b)(1), 이 변이를 생어 시퀀싱으로 확인하였다.

[123] 녹내장은 가족 A에서 질병에 대한 주요 징후 중 하나이기 때문에, 본 발명자들은 생어 시퀀싱 방법을 통해 100명의 선천성 녹내장(primary congenital glaucoma; PCG) 환자에 대해 DDX58 유전자에 대한 전체 코딩 엑손을 시퀀싱하였다. 본 발명자들은 여성 환자, 그녀의 어머니 및 외할머니(가족 B)에서 또 다른 신규 변이(c.803G>T; p.C268F)를 발견하였다(도 1b 및 도 4c). 상기 세 명은 모두 말단골용해(acro-osteolysis)를 나타냈으며, 어머니 및 할머니는 선천성 녹내장 때문에 실명하였다. 가족 B에서는 치아 이상 및 심장 석회화가

관찰되지 않았다. 가족 A 및 B의 상세한 임상적 특징은 표 1 및 도 1c-f에 기재되어 있다.

DDX58-관련 질환 표현형을 갖는 환자들의 임상학적 표현형

[illegible]

녹내장	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

[125]

[126] N/A, not available.

[127] *치아 문제는 가족 A의 두 명의 환자에서 파노라마 방사선 사진을 가지고 치과의사가 평가함. 다른 문제들은 신체검사를 통해 확인함.

[128]

[129] p.C268F 및 p.E373A의 잔기들(affected residues)이 제브라피쉬부터 인간까지의 생물군에 걸쳐 엄격히 보존되어 있고(도 2), p.C268F 및 p.E373A 변이들은 Sorting Intolerant From Tolerant(SIFT 1.9c) 및 Polymorphism Phenotyping v2(PolyPhen-2)를 이용한 생물정보학적 분석에 의해 유해한 것으로 예측되었기 때문에 상기 변이들은 병원성을 가질 것으로 여겨진다. 또한, 상기 변이는 500명의 한국인에서 발견되지 않았고, NHLBI(National Heart, Lung, and Blood Institute) 엑솜 시퀀싱 프로젝트 데이터베이스의 11,906개의 염색체에서도 발견되지 않았다.

[130] DDX58(Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 58)로도 알려져 있는 RIG-I은 825-잔기 세포질 바이러스 RNA 수용체이고 MDA5(melanoma differentiation associated gene 5) 및 LGP2(laboratory of genetics and physiology 2)와 함께 RLR(RIG-I-like receptor) 패밀리의 일부분이다(2). RIG-I은 여러 바이러스에 대한 중요한 세포내 센서이며, 바이러스 dsRNA를 인식하여 항바이러스 IFN 반응을 유발한다(1). RIG-I은 MAVS(mitochondrial antiviral signaling protein), 헬리카아제 및 C-말단 도메인을 활성화하는데 관여하는 N-말단 CARDs(caspase activation recruitment domains)를 포함한다(1). 헬리카아제 도메인으로의 ATP 및 RNA 기질의 협동결합(cooperative binding)은 형태 변화 및 CARD에 의한 MAVS 다운스트림 시그널링을 유도한다(3).

[131] 본 발명자들은 또한 1차 HTM(human trabecular meshwork) 세포에서 RIG-I 돌연변이의 효과를 조사하였다. 종래 연구에서 마이오실린을 코딩하는 MYOC 유전자의 돌연변이는 녹내장의 원인이 되며, 마이오실린 돌연변이는 HTM 세포에서 세포독성을 야기할 수 있다는 것이 알려졌다(4-6). HTM 세포는 안구로부터 수양액(aqueous humor)을 배출시키는 역할을 하기 때문에 HTM 세포의 사멸은 녹내장을 초래하는 안압 상승의 기본 메커니즘이 될 수 있다(7). 본 발명자들은 HTM 세포에 WT, 2개의 양성(benign) SNP(p.I406T 및 p.S183I) 및 2개의 병원성 예상 변이(p.C268F 및 p.E373A)를 형질도입하고, 위상차 현미경으로 p.C268F 및 p.E373A 돌연변이의 세포 변성 효과를 확인하였다(도 3a). 면역조직화학염색 결과, 녹색 형광은 세포질 전체에 걸쳐 널리 분포된 반면, WT 및 두 개의 SNP를 형질도입한 HTM 세포와 비교하였을 때 p.C268F 또는 p.E373A 돌연변이를 형질도입한 HTM 세포에서는 비멘틴 발현

수축(shrinkage)(빨간색 형광)이 두드러졌다(도 3b). 비멘틴은 중간 필라멘트 단백질의 5개 주요 그룹 중 하나로 비멘틴 수축은 스트레스를 받은 세포가 형태학적으로 수축된 것을 나타낸다(8). 또한, 본 발명자들은 p.C268F 및 p.E373A를 형질도입한 세포에서 세포 수가 현저히 감소하는 것을 관찰하였다(도 3c). 이러한 발견은 MYOC 돌연변이와 같은 DDX58 돌연변이가 HTM 세포에서 세포독성 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

- [132] 타입 1 IFN 시스템은 인간 항바이러스 면역에 매우 중요하다. 그러나, 타입 1 IFN의 과도한 생성 또는 불완전한 음성조절(defective negative regulation)은 면역질환(9) 또는 자가면역질환(10) 발병과 연관될 수 있다. Gillian 등은 Aicardi-Goutie신드롬(AGS; MIM 225750) 환자에서 MDA5를 코딩하는 IFIH1에 돌연변이가 있음을 최근 발견하였고, 이러한 변이는 타입 1 IFN의 부적합한 자극을 유도한다는 것을 밝혔다(9). AGS는 뇌 및 피부에 영향을 미치는 면역 질환으로 IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2, 및 SIGLEC1과 같은 타입 I IFN에 의해 유도되는 유전자의 고발현이 일정하게 유지된다(9). Funabiki 등은 MDA5 기능 조절장애는 바이러스 감염없이 자가면역 질환을 유도한다고 보고하였다(10). 상기 연구에서 N-에틸-N-니트로소우레아 돌연변이 생성에 의해 발생된 IFIH1에서 단일 미스센스 돌연변이(p.G821S)를 갖는 돌연변이 마우스는 바이러스 감염없이 자연발생적으로 루푸스-유사 신염 및 전신자가면역 증상을 나타낸다(10). 이러한 발견은 IFIH1 돌연변이가 그에 대한 리간드가 존재하지 않는 다운스트림 시그널링을 활성화시킨다는 것을 의미하며, 역설적으로 리간드- 및 바이러스-유도 시그널링 없이 상기 돌연변이가 MDA5에서 형태 변화를 유도한다는 것을 나타낸다.

- [133] 본 발명자들은 DDX58 돌연변이를 갖는 환자의 임상적인 표현형이 AGS에서 IFIH1 돌연변이에 의한 MDA5의 기능획득처럼 RIG-I의 기능획득과 연관되어 있다고 가정하였다(9). 전신염증 관련 증상 또는 사인은 DDX58 돌연변이를 갖는 환자에서 분명하게 나타나지 않았으나, 선천성 녹내장은 한명을 제외한 모든 환자에서 중요한 징후였고, 상기 환자 중 3명(가족 A에서 II:6, 가족 B에서 II:4 및 III:2)은 완전히 실명하였다. 대동맥 및 혈관 석회화는 가족 A에서만 관찰되었으며, 말단골용해(acro-osteolysis)와 같은 골격계 이상은 가족 B에서 보다 두드러지게 나타났다.

- [134] DDX58 p.E373A 돌연변이를 갖는 가족 A에서 발견되는 대동맥 및 혈관 석회화의 발병 기전은 알려지지 않았다. 한 때 수동적 퇴행성 질환으로 여겨졌던 심장혈관 석회화는 현재 능동적 과정으로 인식되고 있다(11). RIG-I의 기능획득에 의해 유도된 프로-염증성 사이토카인의 생성 증가로 대표되는 만성 염증단계는 대동맥 및 판막의 석회작용(mineralization)을 유발하는 것으로 보인다. 염증은 혈관 석회화 발병의 주요 원인이며, 어느 정도의 혈관 염증은 대부분의 인간 동맥 석회화에서 발견된다(12). 대동맥의 심한 석회화는 타카야수 동맥염 또는 거대세포 동맥염과 같은 큰 혈관 맥관염 말기에서 특징적으로

나타난다. 실제로 석회화 맥관병의 당노 LDLR-/-젯과(murine) 모델에서 IL-6 및 TNF와 같은 면역 사이토카인이 대동맥 벽에서 증가되면 골형성 전사인자(Sox9, Runx2, Msx2, Osx)가 활성화된다(12, 15).

- [135] DDX58 돌연변이를 갖는 본 발명의 모든 환자에서는 치아 이상이 나타나지 않았다. DDX58 돌연변이가 전신염증 또는 자가면역 질환을 발생시키지 않는 이유는 잘 이해되지 않지만, 음성 조절 메커니즘이 활성화된 RLR-IFN 시그널링을 조절하는 역할을 할 것으로 생각된다. 이러한 유전자형-표현형간의 상관관계에 대한 정확한 메커니즘을 밝히는 추가적인 연구가 필요하다.
- [136] 결론적으로, 본 발명자들은 녹내장, 대동맥 석회화 및 치아 이상을 제외한 골격 이상을 포함하는 다양한 표현형을 갖는 DDX58 유전자에 대한 신규한 돌연변이를 규명하였다.

[137]

[138] 참고문헌

- [139] 1. Yoneyama, M. et al., *Nat Immunol* 5, 730-7 (2004).
- [140] 2. Liu, F. & Gu, J. *Protein Cell* 2, 351-7 (2011).
- [141] 3. Kowalinski, E. et al., *Cell* 147, 423-35 (2011).
- [142] 4. Joe, M.K. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 312, 592-600 (2003).
- [143] 5. Alward, W.L. et al., *N Engl J Med* 338, 1022-7 (1998).
- [144] 6. Stone, E.M. et al., *Science* 275, 668-70 (1997).
- [145] 7. Alvarado, J., Murphy, C. & Juster, R. *Ophthalmology* 91, 564-79 (1984).
- [146] 8. Minin, A.A. & Moldaver, M.V. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1453-66 (2008).
- [147] 9. Rice, G.I. et al., *Nat Genet* 46, 503-9 (2014).
- [148] 10. Funabiki, M. et al., *Immunity* 40, 199-212 (2014).
- [149] 11. New, S.E. & Aikawa, E. *Circ Res* 108, 1381-91 (2011).
- [150] 12. Shao, J.S., Cheng, S.L., Sadhu, J. & Towler, D.A. *Hypertension* 55, 579-92 (2010).
- [151] 13. Al-Aly, Z. et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2589-96 (2007).
- [152] 14. Kohlway, A., Luo, D., Rawling, D.C., Ding, S.C. & Pyle, A.M. *EMBO Rep* 14, 772-9 (2013).
- [153] 15. Brooks, B.R. et al., *J Comput Chem* 30, 1545-614 (2009).
- [154] 16. Im, W., Lee, M.S. & Brooks, C.L., *J Comput Chem* 24, 1691-702 (2003).
- [155]
- [156] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

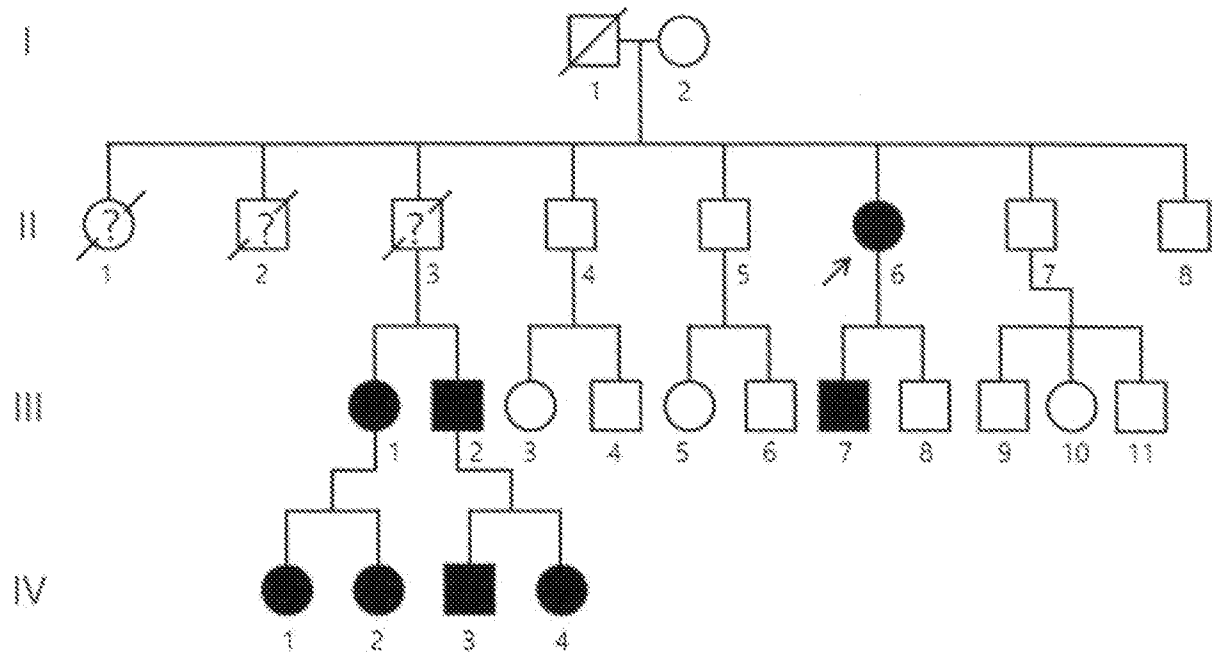
청구범위

- [청구항 1] 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단마커로서 서열목록 제1서열로 기재되는 염기서열에서 1118번째 염기인 아데닌이 시토신으로 치환 또는 803번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 DDX58 돌연변이 유전자.
- [청구항 2] 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단마커로서 제1항에 따른 DDX58 돌연변이 유전자로부터 암호화되는 DDX58 돌연변이 단백질.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열에서 373번째 아미노산인 글루탐산이 알라닌으로 치환 또는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열에서 268번째 아미노산인 시스테인이 페닐알라닌으로 치환된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DDX58 돌연변이 단백질.
- [청구항 4] 개체 시료로부터 제 1 항에 따른 DDX58 돌연변이 유전자의 gDNA, mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 gDNA 또는 mRNA 발현을 검출할 수 있는 제제는 DDX58 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서, 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제는 DDX58 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.
- [청구항 7] 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 진단용 키트.
- [청구항 8] 다음의 단계를 포함하는 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증에 대한 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법:
(a) 개체 시료로부터 DDX58 돌연변이 유전자의 gDNA, mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현을 검출하는 단계; 및
(b) 개체 시료에서 DDX58 돌연변이 유전자의 gDNA, mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 DDX58 돌연변이 단백질의 발현이 검출된 경우, 이 개체에서 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화 또는 골격 이상증이 발병할 가능성이 높은 것으로 판정하는 단계.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 단계 (a)에서 gDNA, mRNA 발현은 DDX58 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 8 항에 있어서, 단계 (a)에서 단백질 발현은 DDX58 돌연변이

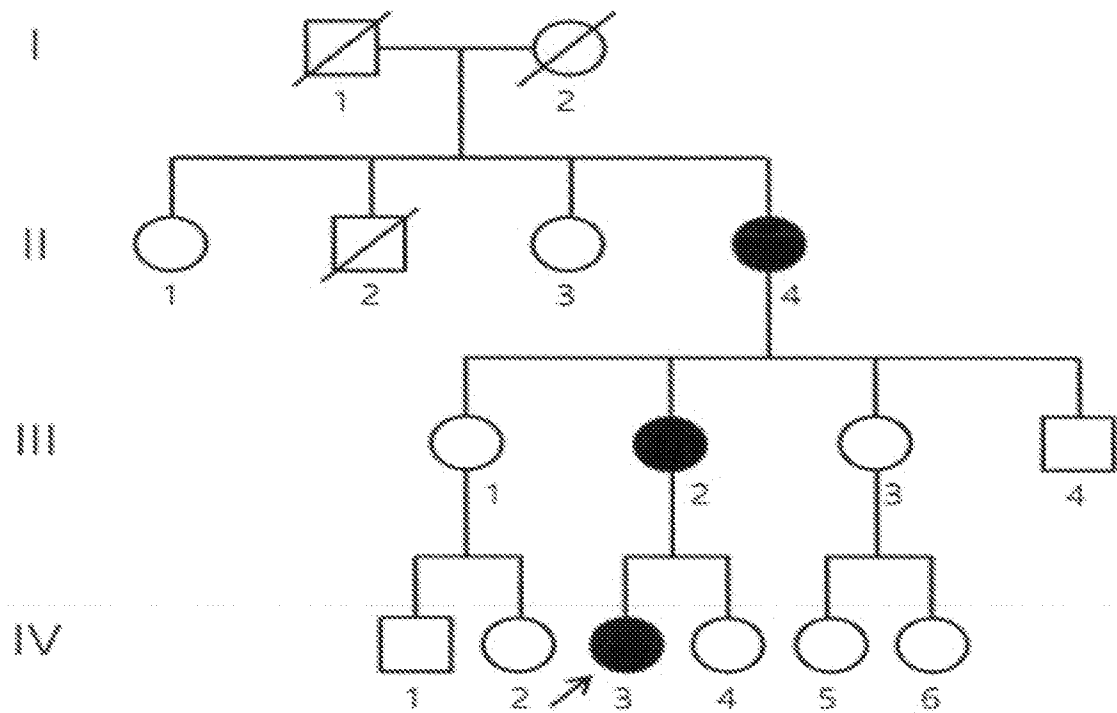
유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

1/7

도 1a



도 1b

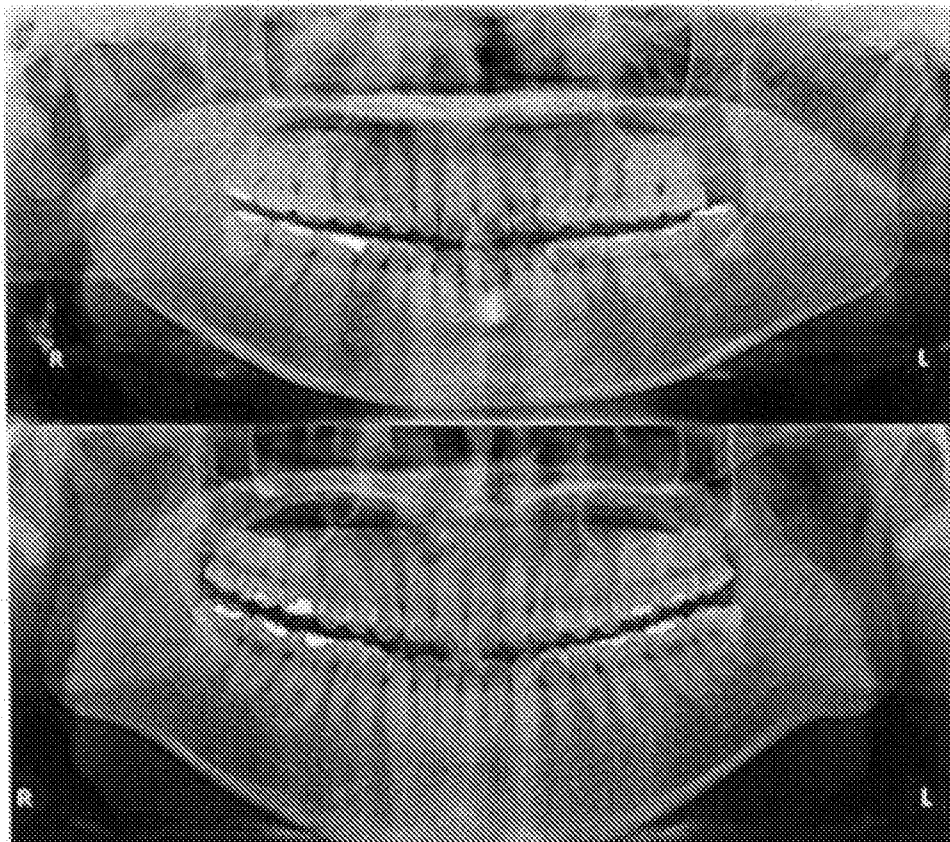


2/7

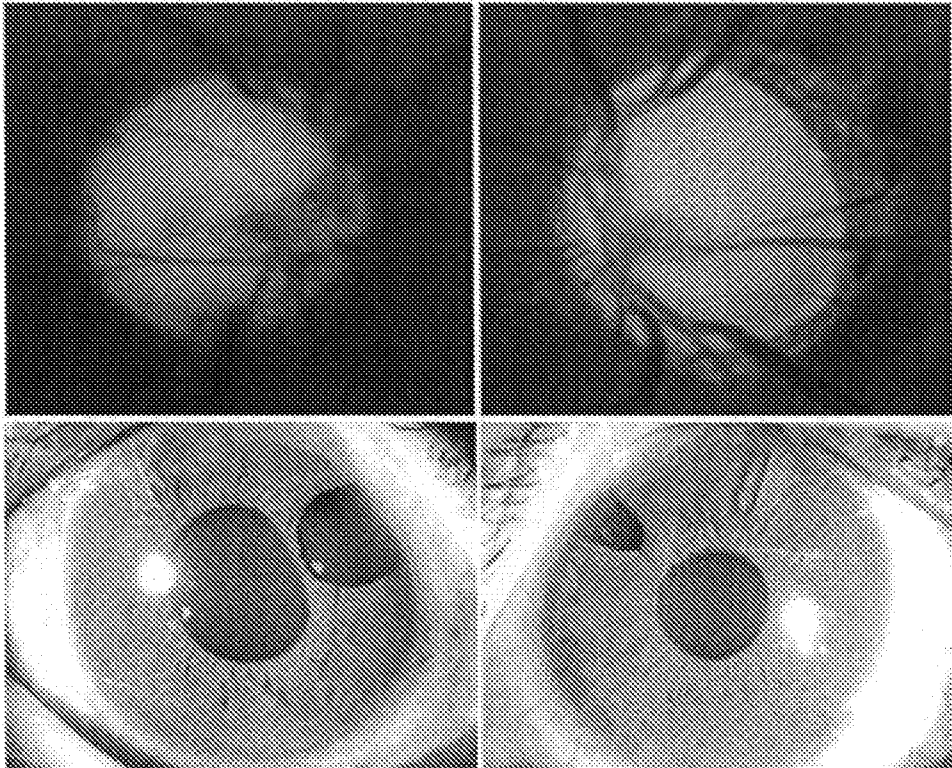
도 1c



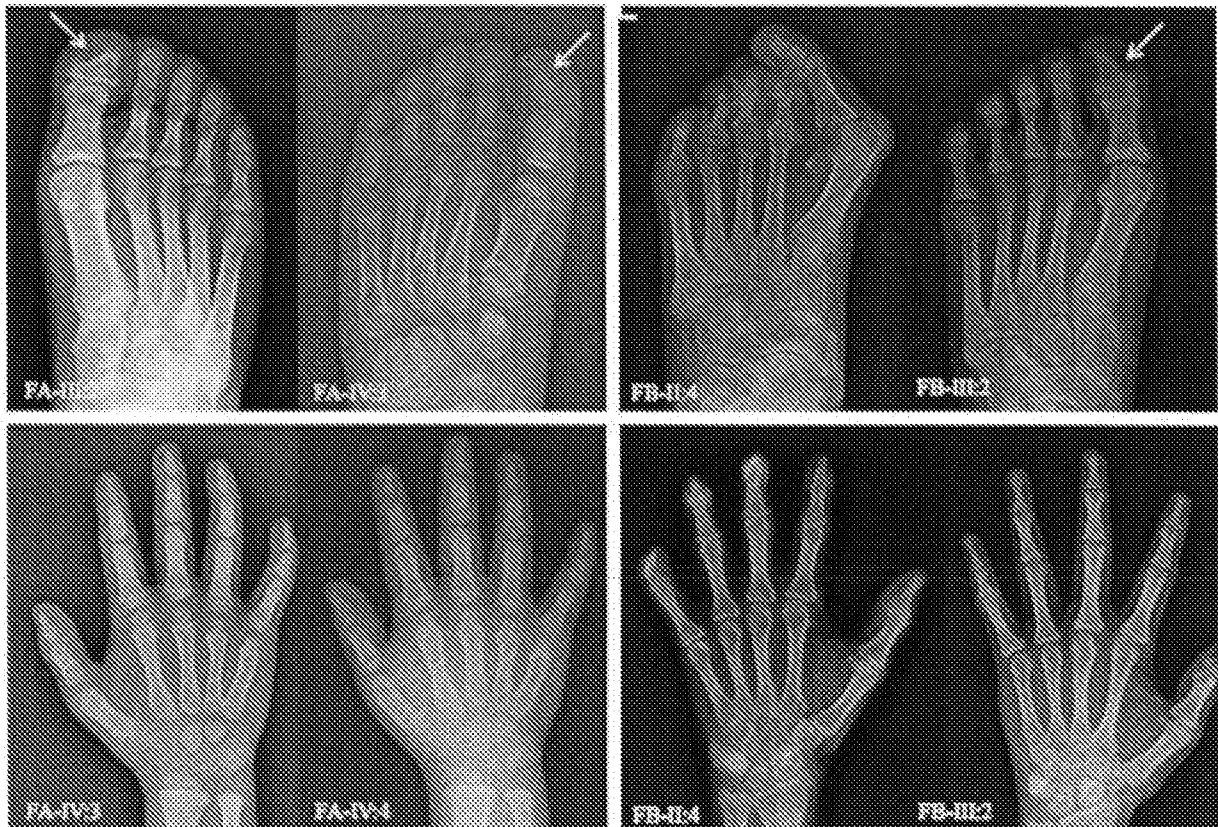
도 1d



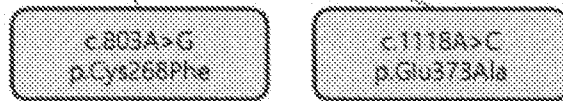
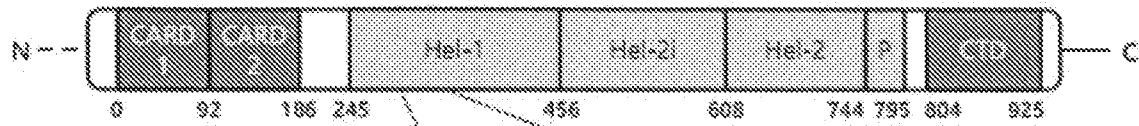
3/7
도 1e



도 1f

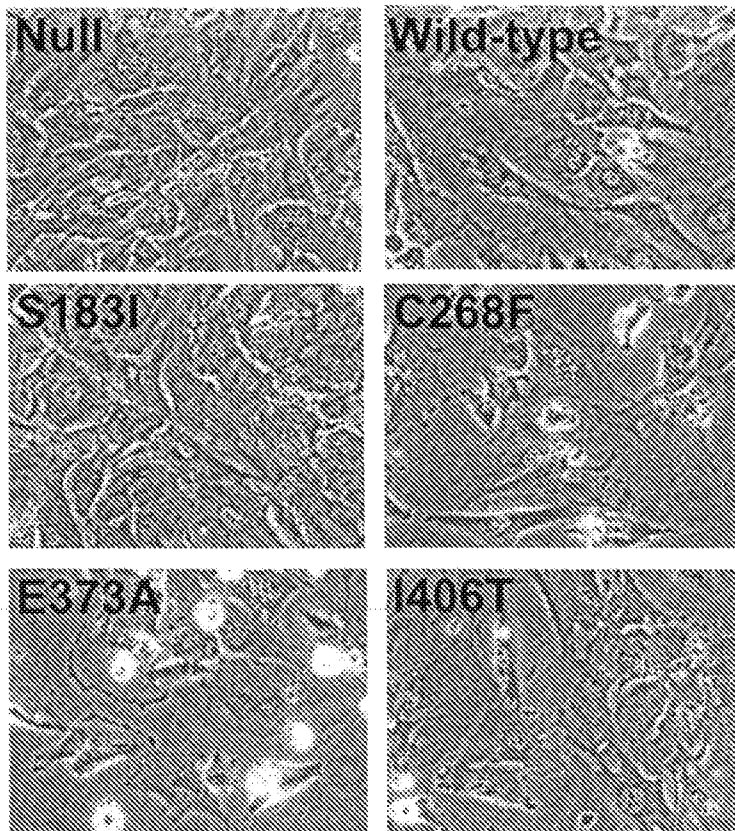


4/7
도 2



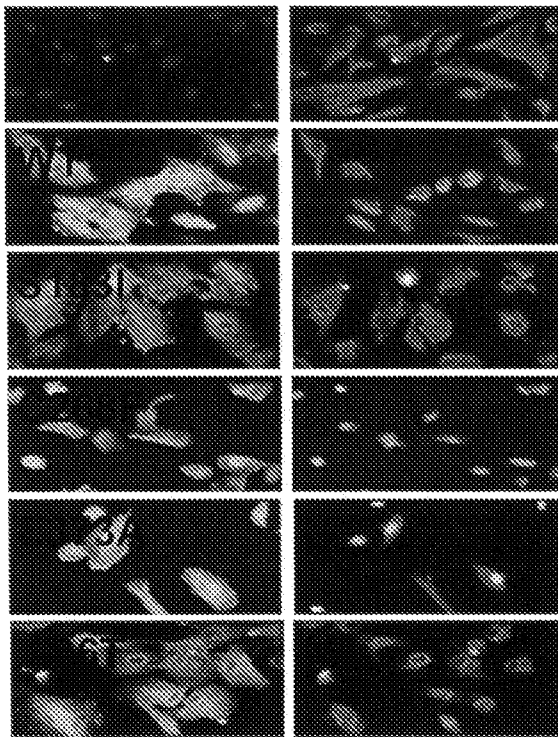
Human	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Chimpanzee	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Orangutan	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Mouse	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Rat	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Dog	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Horse	P	T	G	C	G	K	T	...	M	F	D	E	C	H	N
Cow	P	T	G	C	G	K	T	...	I	F	D	E	C	H	N
Zebrafish	P	T	A	C	L	D	S	...	L	L	D	E	C	H	N
	265				271		370					376			

도 3a

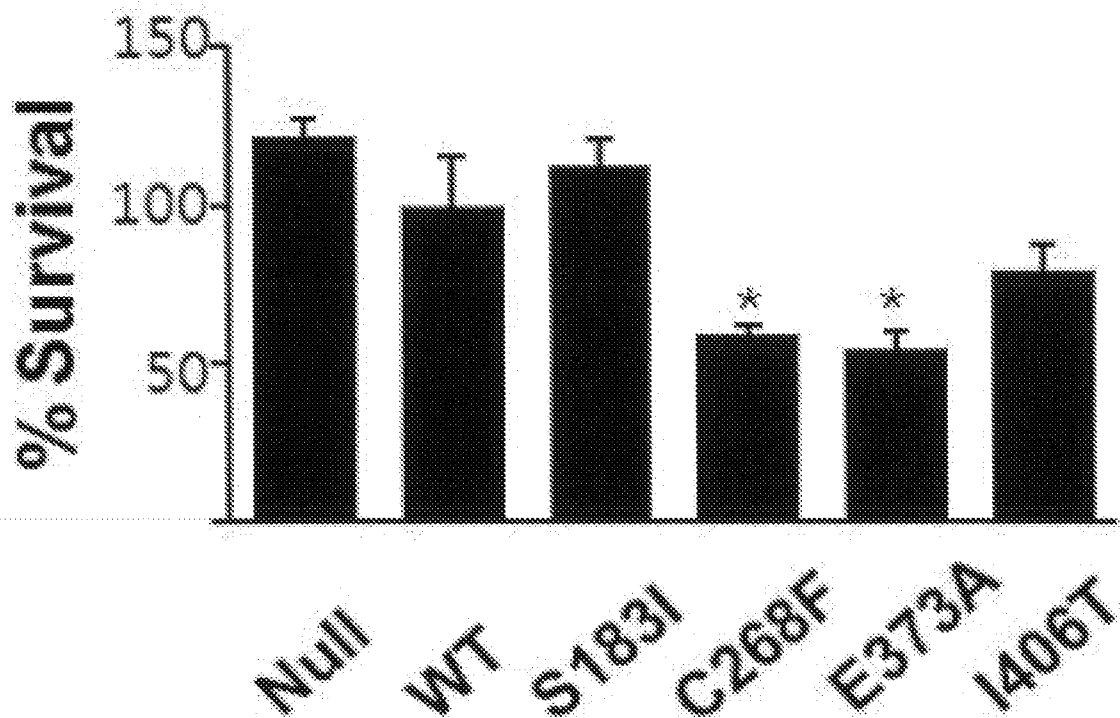


5/7

도 3b

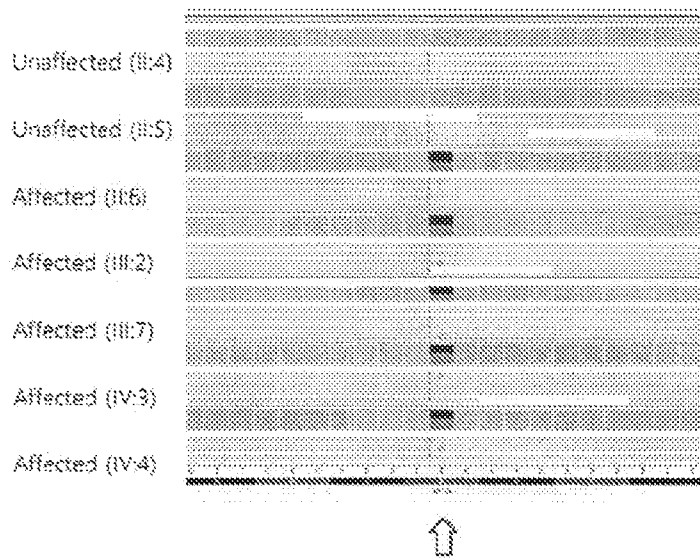


도 3c

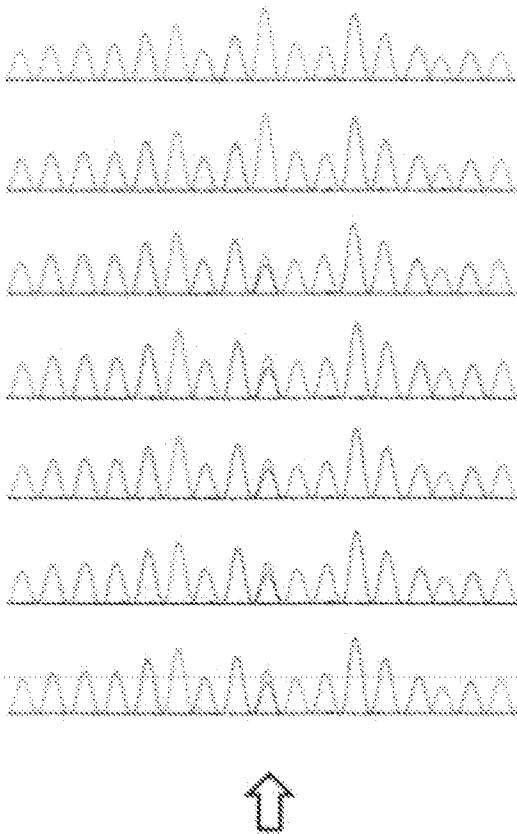


6/7

도 4a



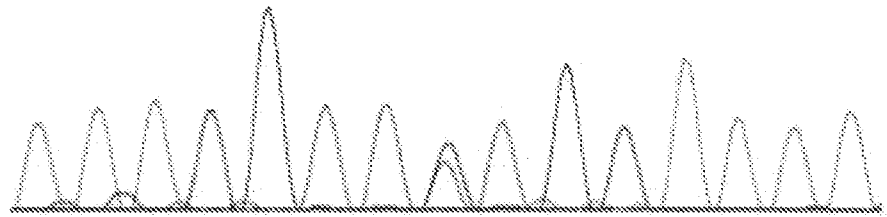
도 4b



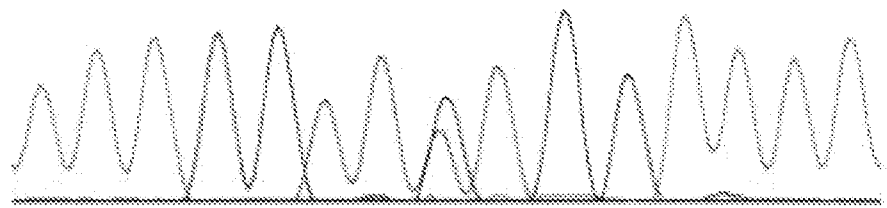
7/7

도 4c

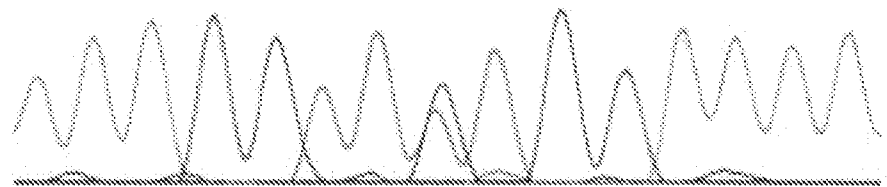
Affected (II:4)



Affected (III:2)



Affected (IV:3)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/009168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(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; A61K 38/20; G01N 33/53

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: primary congenital glaucoma, hereditary blood vessel calcification, skeletal anomaly, DDX58 mutant gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANG et al., "Mutations in DDX58, which Encodes RIG-I, Cause Atypical Singleton-Merten Syndrome", The American Journal of Human Genetics, vol. 96, Issue no. 2, pp. 266-274 (05 February 2015) See abstract; figures 2-4.	1-10
A	HU et al., "A Common Polymorphism in the Caspase Recruitment Domain of RIG-I Modifies the Innate Immune Response of Human Dendritic Cells", The Journal of Immunology, vol. 185, pp. 424-432 (2010) See the entire document.	1-10
A	FEIGENBAUM et al., "Singleton-Merten Syndrome: An Autosomal Dominant Disorder with Variable Expression", American Journal of Medical Genetics Part A, vol. 161, Issue no. 2, pp. 360-370 (2013) See the entire document.	1-10
A	US 2010-0311052 A1 (BENDTZEN et al.) 09 December 2010 See the entire document.	1-10
A	US 2013-0052160 A1 (ZITVOGEL et al.) 28 February 2013 See the entire document.	1-10



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

11 DECEMBER 2015 (11.12.2015)

Date of mailing of the international search report

14 DECEMBER 2015 (14.12.2015)

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/KR2015/009168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0311052 A1	09/12/2010	EP 2173896 A2	14/04/2010
		WO 2009-003905 A2	08/01/2009
		WO 2009-003905 A3	09/04/2009
US 2013-0052160 A1	28/02/2013	EP 2561088 A1	27/02/2013
		EP 2806034 A1	26/11/2014
		US 2013-0156790 A1	20/06/2013
		US 8828944 B2	09/09/2014
		US 8865653 B2	21/10/2014
		WO 2011-131246 A1	27/10/2011
		WO 2011-131472 A1	27/10/2011
		WO 2012-007783 A1	19/01/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 38/20; G01N 33/53

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: 선천성 녹내장, 유전성 혈관 석회화, 골격 이상증, DDX58 돌연변이 유전자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JANG 등, 'Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome' The American Journal of Human Genetics, Vol.96, Issue No.2, pp.266-274 (2015.02.05.) 요약; 도면 2-4 참조.	1-10
A	HU 등, 'A common polymorphism in the caspase recruitment domain of RIG-I modifies the innate immune response of human dendritic cells' The Journal of Immunology, Vol.185, pp.424-432 (2010) 전체 문헌 참조.	1-10
A	FEIGENBAUM 등, 'Singleton-Merten syndrome: An autosomal dominant disorder with variable expression' American Journal of Medical Genetics Part A, Vol.161, Issue No.2, pp.360-370 (2013) 전체 문헌 참조.	1-10
A	US 2010-0311052 A1 (BENDTZEN 등) 2010.12.09. 전체 문헌 참조.	1-10
A	US 2013-0052160 A1 (ZITVOGEL 등) 2013.02.28. 전체 문헌 참조.	1-10

☐ 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

2015년 12월 11일 (11.12.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 12월 14일 (14.12.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2010-0311052 A1	2010/12/09	EP 2173896 A2 WO 2009-003905 A2 WO 2009-003905 A3	2010/04/14 2009/01/08 2009/04/09
US 2013-0052160 A1	2013/02/28	EP 2561088 A1 EP 2806034 A1 US 2013-0156790 A1 US 8828944 B2 US 8865653 B2 WO 2011-131246 A1 WO 2011-131472 A1 WO 2012-007783 A1	2013/02/27 2014/11/26 2013/06/20 2014/09/09 2014/10/21 2011/10/27 2011/10/27 2012/01/19