

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 9월 20일 (20.09.2018) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2018/169333 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/003063

(22) 국제출원일: 2018년 3월 15일 (15.03.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0032519 2017년 3월 15일 (15.03.2017) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 중로구 대학로 101, Seoul (KR).

(72) 발명자: 최병윤 (CHOI, Byung Yoon); 06218 서울시 강남구 선릉로69길 19, 107동 302호, Seoul (KR). 오두이 (OH, Doo Yi); 05575 서울시 송파구 도곡로64길 34, Seoul (KR).

(74) 대리인: 리앤록 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

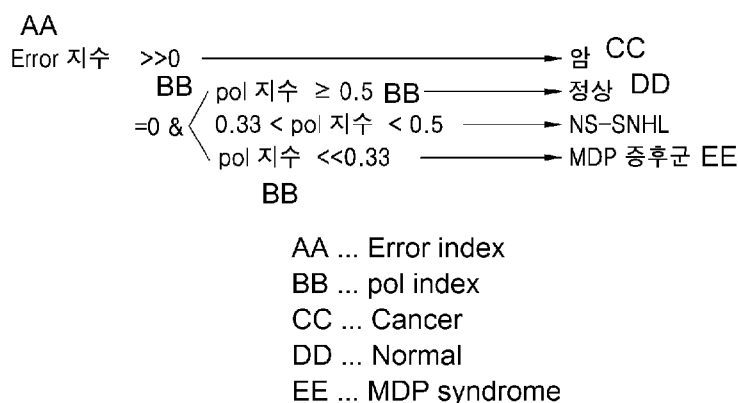
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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 제21조(3))

(54) Title: POLD1 EXHIBITING GENETIC PLEIOTROPY AND METHOD FOR DIAGNOSING DISEASES BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1 및 그를 이용한 질병 진단 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a kit for diagnosing cancer, MDP syndrome and sensorineural hearing loss by using POLD1 exhibiting genetic pleiotropy, and a method for providing information for the diagnosis. The phenotypes of POLD1 mutation are expressed in cancer, MDP syndrome, and sensorineural hearing loss according to the genotypes, and thus the activity of DNA polymerases and exonucleases of POLD1 active domains according to one aspect are measured such that cancer, MDP syndrome, and sensorineural hearing loss can be simultaneously identified, thereby enabling early diagnosis of diseases and personalized treatment.

(57) 요약서: 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1을 이용하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 키트, 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, POLD1 돌연변이의 유전자형에 따라 표현형이 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청으로 나타나므로, 일 양상에 따른 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정함으로써 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 동시에 감별하여 질병의 조기 진단과 맞춤 치료가 가능하다.



WO 2018/169333 A1

명세서

발명의 명칭: 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1 및 그를 이용한 질병 진단 방법

기술분야

- [1] 본 출원은 2017년 3월 15일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2017-0032519호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1을 이용하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 키트, 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 선천성 난청 (Congenital hearing loss)은 신생아 1,000명 중 3명 정도의 빈도로 발생하며, 50% 이상이 유전적 요인에 의한 것으로 알려져 있다. 유전성 난청은 선천성으로 출생 후부터 나타나는데 난청 형태는 여러 종류이나 이 중 감각신경성난청 (Sensorineural Hearing Loss)이 가장 흔하다.
- [4] 감각신경성 난청은 달팽이관의 소리를 감지하는 기능에 이상이 생기거나 소리에 의한 자극을 뇌로 전달하는 청신경 또는 중추신경계의 이상으로 발생하는 난청을 말한다. 감각신경성 난청은 증상에 따라서 증후군과 비증후군으로 분류되는데, 증후군 감각신경성 난청은 내이 기능 이상에 의한 것 이외의 다른 기관의 임상적 증상 또는 증후를 가지고 있는 경우를 의미한다. 이는 유전성 난청의 30%를 차지하고, 현재까지 300종류 이상의 증후군 난청이 보고되어 있다. 특징적인 증상이나 기형으로 쉽게 분류되므로 같은 원인을 갖는 환자들에서 원인 유전자를 용이하게 추적할 수 있다. 비증후군 감각신경성 난청은 내이 기능 이상 이외의 다른 기관의 이상 증상 또는 증후를 보이지 않는 경우를 의미하는 것으로 청각장애만을 나타낸다. 유전성 난청의 70%를 차지하고, 원인 유전자가 다양하여 난청의 유형, 유전 형태 등의 임상적 정보들을 토대로 전략적인 유전 진단이 요구된다. 비증후군 난청은 유전 형태에 의해서 80%가 열성유전, 17%가 우성유전, 2-3%가 X-linked 그리고 1%가 미토콘드리아 유전으로 발생하게 되며, 특히 이러한 비증후군 선천성 난청의 원인 중 20%가 GJB2(Gap Junction Beta 2) 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 알려져 있다.
- [5] 난청 유전자들은 다양한 표현성(variable expressivity)을 나타내는 경우가 있는데, 한 가지 난청 유전자의 이상이 돌연변이 종류에 의한 유전자 표현성에 따라 증후군 난청 또는 비증후군 난청으로 발현되기도 하고 한 가지 난청 유전자의 돌연변이가 돌연변이의 종류에 따라 열성 유전 또는 우성 유전방식으로 발현되기도 하는 것이 그 예이다.
- [6] 한편, 표현형 다면발현(Genetic Pleiotropy)은 한 유전자의 다른 돌연변이가 전혀

관계 없어 보이는 여러 표현형을 나타내는 현상을 의미하는 것으로, 다양한 표현성의 극단적인 형태이다. 예를 들어 한 유전자의 다른 돌연변이가 전혀 다른 기관의 이상을 나타내는 표현형으로 발현되는 경우이다. 표현형 다면발현의 기전으로 한 유전자의 서로 다른 특정 돌연변이가 단백질에 다른 영향을 미치는 기전과 한 유전자의 서로 다른 특정 돌연변이가 기능적으로 온전한 한 단백질의 총량에 영향을 주어 다른 표현형을 나타내는 기전이 제시되고 있다.

- [7] 현재까지 일부 난청 유전자와 관련된 다양한 표현형이 연구된 바 있으며, 예컨대 GJB2, MYO7A, TMC1 유전자 등은 동일 유전자가 상염색체 열성 또는 우성 감각신경성 난청으로 발현되는 난청 유전자로 알려져 있다. 그러나 다양한 표현성을 넘어서 표현형 다면발현을 나타내는 난청 유전자에 대해서는 알려진 바가 없다. 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 표현형 다면발현을 나타내는 새로운 난청 유전자를 찾기 위해 노력한 결과, *POLD1* 변이가 현재까지 제시된 기전과 다른 기전으로 돌연변이의 위치와 유전 방식에 따라 전혀 다른 3개의 질환을 상호 배제적으로 일으키는 것을 확인하고 이를 이용하여 질병을 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 일 양상은 *POLD1*의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하고, 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 것인, 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 키트를 제공한다.
- [9] 다른 양상은 *POLD1*의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 조성물을 제공한다.
- [10] 다른 양상은 *POLD1*의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 조성물의 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 용도를 제공한다.
- [11] 다른 양상은 *POLD1*의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [12] 다른 양상은 *POLD1*의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상

대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하여 치료하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [13] 일 양상은 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하고, 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 것인, 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 키트를 제공한다.
- [14] 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하는 것이다. 본 발명에서의 진단은 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청의 존재 및/또는 그 정도를 확인하는 것이다.
- [15] POLD1은 DNA 폴리머라아제 텔타 1(DNA polymerase delta 1)으로서, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI(National Center for Biotechnical Information) NCBI 유전자 은행과 같은 공지의 데이터베이스를 통하여 용이하게 확인 할 수 있으며, 그 예로 NCBI 유전자 은행의 Accession No. NG_033800인 POLD1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [16] 본 발명에서 "MDP 증후군(MDP syndrome)"은 하악골발육부전증, 난청 및 조로증을 나타내는 대사성 질환을 의미한다.
- [17] 상기 암은 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 구체적으로는 대장암일 수 있다.
- [18] 본 발명에서 POLD1에서 c.584_585delGA 뉴클레오티드 또는 c.G3298A 뉴클레오티드 변이의 유전자형에 따라 감각신경성 난청, 암, 및 MDP 증후군으로 표현형이 매우 상이하게 나타나므로 POLD1이 비증후군성 난청을 포함하는 표현형 다면발현을 나타내는 유전자임을 최초로 확인하였다. POLD1 단백질 내의 두 도메인, 예컨대 DNA 폴리머라아제 활성 도메인 및 엑소뉴클리아제 도메인의 기능의 활성 비율에 의하여 표현형 다면발현이 나타남을 최초로 규명하였다. 따라서, POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하고, 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정함으로써 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단할 수 있다. 구체적으로, 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성이 0.7 미만인 경우 암으로 진단하고, 상기 정상 대조군 대비 DNA 폴리머라아제의 활성이 25% 초과 및 50% 미만인 경우 감각신경성 난청으로 진단하고, 25% 미만인 경우 MDP 증후군으로 진단하고, 50% 초과인 경우 정상으로 진단할 수 있다.
- [19] 또는 폴리머라아제/엑소뉴클리아제의 상대적 활성을 측정함으로써 pol

지수(pol index), error 지수(error index)를 계산하여 error 지수가 0보다 큰 경우는 압, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.5 이상인 경우는 정상, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 초과인 경우는 비증후군 감각신경성 난청, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 이하인 경우는 MDP 증후군으로 진단할 수 있다. 여기서, 상기 error 지수는 '상대적 프라이머 신장 효율 $\times$ (1-상대적 엑소뉴클리아제 활성)'으로 나타낼 수 있고, error 지수와 pol 지수는 상대적 프라이머 신장 효율 및 상대적 엑소뉴클리아제 활성을 측정한 실험 결과에 근거하여 계산할 수 있다.

- [20] 용어 "POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제"란 개체에서 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제 유전자의 mRNA 수준을 확인함으로써 마커의 검출 및/또는 정량에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 일 구현예에 따르면 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [21] 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 일 구현예에 따르면 유전자의 mRNA에 대해 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이며, POLD1 유전자의 mRNA 핵산서열이 알려져 있으므로, 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 mRNA에 대해 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다. 또한, 이러한 디자인에 있어 일정 정도 변형이 가능하다. 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 98%의 상동성이 유지되는 서열 역시 사용할 수 있다.
- [22] 용어 "mRNA 발현수준 측정"이란 POLD1 유전자의 mRNA의 존재여부와 발현정도를 확인하는 과정으로서 mRNA양의 측정하며, 본 발명의 일 구현예에 따르면 mRNA에 대한 프라이머 또는 프로브를 이용하여 측정할 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), DNA 칩, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [23] 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형과 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 폴리머라아제 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.
- [24] 용어 "프로브"란 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며

라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 함량(발현량)을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 POLD1 폴리뉴클레오타이드의 mRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 방사선 피폭 여부 및 정도를 측정할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

- [25] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 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, 시그날 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 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.
- [26] 일 구체예에서, 상기 "표현형 다면발현을 나타내는 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성 측정"은 프라이머 신장 분석법(primer extension assay)에 의하여 측정될 수 있다.
- [27] 상기 키트는 난청, 암, 또는 MDP 증후군의 발병이 의심되는 개체의 시료로부터 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성 수준을 측정함으로써 난청, 암, 및 MDP 증후군을 진단하는데 사용 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 POLD1의 활성 도메인의 활성을 측정하기 위한 프라이머 또는 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수도 있다.
- [28] 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [29] 상기 감각신경성 난청은 비증후군 감각신경성 난청(Non Syndromal sensorineural hearing loss: NS-SNHL)일 수 있다. 감각신경성 난청은 달팽이관의 소리를 감지하는 기능에 이상이 생기거나 소리에 의한 자극을 뇌로 전달하는

청신경 또는 중추신경계의 이상으로 발생하는 난청을 말하고, 비증후군 감각신경성 난청은 난청은 내이 기능 이상 이외의 다른 기관의 이상 증상 또는 증후를 보이지 않는 난청을 지칭한다.

[30]

[31] 다른 양상은 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[32] 상기 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제, 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청의 진단은 전술한 바와 같다.

[33]

[34] 다른 양상은 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 조성물의 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 용도를 제공한다.

[35] 상기 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제, 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청의 진단은 전술한 바와 같다.

[36]

[37] 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[38] 상기 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정, 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[39] 상기 방법은 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성이 0.7 미만인 경우 암으로 판정하고, 상기 정상 대조군 대비 DNA 폴리머라아제의 활성이 25% 초과 및 50% 미만인 경우 감각신경성 난청으로 판정하고, 25% 미만인 경우 MDP 증후군으로 판정하고, 50% 초과인 경우 정상으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[40] 또한, 상기 방법은 폴리머라아제/엑소뉴클리아제의 상대적 활성을 측정함으로써 pol 지수(pol index), error 지수(error index)를 계산하여 error 지수가 0보다 큰 경우는 암, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.5 이상인 경우는 정상, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 초과인 경우는 비증후군 감각신경성 난청, error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 이하인 경우는 MDP 증후군으로 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 error 지수는 '상대적 프라이머 신장

효율x(1-상대적 엑소뉴클리아제 활성)'으로 나타낼 수 있고, error 지수와 pol 지수는 상대적 프라이머 신장 효율 및 상대적 엑소뉴클리아제 활성을 측정된 실험 결과에 근거하여 계산할 수 있다.

[41]

[42] 다른 양상은 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하여 치료하는 방법을 제공한다.

[43]

[44] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.

발명의 효과

[45] POLD1 돌연변이의 유전자형에 따라 표현형이 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청으로 나타나므로, 일 양상에 따른 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정함으로써 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 동시에 감별하여 질병의 조기 진단과 맞춤 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[46] 도 1은 본 발명의 실험 대상인 코호트(SB127)의 구성원인 SB127-497, SB127-277, SB127-235, SB127-247, 및 SB127-219가 속한 가계도이다. 또한 SB127-235, SB127-247, SB-127-277, 및 SB127-219의 청력을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[47] 도 2a는 정상 개체인 SB127-247에서 p.S197HfsX54 및 c.G3298A에 대한 생거 시퀀싱 추적 결과를 나타낸 도이다.

[48] 도 2b는 발단자인 SB127-219에서 p.S197HfsX54 및 c.G3298A에 대한 생거 시퀀싱 추적 결과를 나타낸 도이다.

[49] 도 2c는 POLD1의 올소로그와 파라로그에서 보존을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[50] 도 3a는 야생형(WT) Pol δ 또는 돌연변이 Pol δ 의 폴리머라아제 활성 확인을 프라이머 신장 분석법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[51] 도 3b는 두 개의 독립적 시료에서 유래한 Pol δ 야생형 또는 p.G1100R 돌연변이의 프라이머 신장 결과를 나타낸 도이다.

[52] 도 3c는 50, 100, 및 200 fmol에서 전체 프라이머 기질 중 완전히 신장된 산물의 퍼센트로서 나타낸 중합 활성 확인 결과를 나타낸 도이다.

[53] 도 3d는 야생형(WT) Pol δ 또는 돌연변이 Pol δ 의 엑소뉴클리아제 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

- [54] 도 4는 프라이머/주형 DNA에 대한 p.G1100R 돌연변이 Pol δ 와 야생형 Pol δ 의 부착성을 면역블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [55] 도 5는 환자(SB127-235, SB127-219, SB127-284, 및 SB127-291) 유래 림프아구세포주에서 POLD1의 세포수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [56] 도 6은 돌연변이 Pol δ 및 정상 대조군 세포주에서 유래한 전체 세포 추출물의 DNA 폴리머라아제 합성 활성을 나타낸 결과이다.
- [57] 도 7은 마우스 내이에서 POLD1의 발현을 형광 현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다(스케일바, 50 μ m).
- [58] 도 8은 표현형 다면발현을 나타내는 POLD1 유전자를 이용한 질병 진단 방법의 모식도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [60]
- [61] **실시예 1: 실험 개체 선택**
- [62] 본 발명에서 실험은 분당 서울대학교 병원(SNUBH) (IRB-B-1007-105-402)의 기관 검토위원회와 분당 서울대학교 병원(SNUH) (IRBYH-0905-041-281)에 의해 승인을 받아 수행하였다.
- [63] 청각 장애가 있는 한국인 개체에서 돌연변이의 유병률을 측정하기 위해서, 상염색체 열성 방식으로 또는 산발적으로 분리된 비증후군 감각신경성 난청(nonsyndromic sensorineural hearing loss: NS-SNHL)을 갖는 개체를 찾기 위하여, 내이 이상과 같은 증후군성 특징 또는 방사선학적 마커를 배제하였다. 다음으로, *GJB2*(gap junction protein beta 2)의 서열 결정을 공지된 방법에 의해 수행하였다. 마지막으로, 2010년 5월부터 2012년 4월까지 SNUH 및 SNUBH의 이비인후과에서 51개의 연관되지 않은 가계에서 음성 *GJB2* 돌연변이를 갖는 51명의 발단자(코호트)를 선택하였다.
- [64] 청력 상실의 발현 시기에 따라, 언어습득 전 청각 장애와 언어습득 후 청각 장애로 상기 코호트를 분류하였다. 본 발명에서 언어습득 전 청각 장애는 보통 말하기가 발달되는 나이인 3세 이전에 청력 상실이 시작되는 것을 지칭한다. 반면, 언어습득 전 청각 장애는 말하기 발달의 시작 이후의 청력 상실을 지칭하는데, 본 발명에서는 언어습득 후 청각 장애를 갖는 발단자에 주목하였다. 분류 결과, 상기 코호트는 언어습득 전 청각 장애로 분류된 37명의 발단자와 언어습득 후 청각 장애로 분류된 14명의 발단자로 구성된 것을 확인하였다. 환자/보호자와 그 친척들을 인터뷰하여 포괄적인 임상 기록으로부터 비유전적인 청력 상실을 유도할 수 있는 주산기, 내이신경독성, 감염성, 및 외상성 요인을 배제하였다.

[65]

[66] 실시예 2: 분자 유전 스크리닝

[67] 분자 유전 스크리닝에 의하여 감각신경성 난청과 연관된 후보 변이를 스크리닝하기 위하여, 다음과 같이 수행하였다.

[68] 발달 장애를 나타내지 않는 중증도 감각신경성 난청(sensinaural hearing loss: SNHL)을 보인 발단자인 SB127-219로부터 전혈을 추출하고, SureSelect Human All Exon Kit V3 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 전체 엑솜 시퀀싱(Whole exome sequencing: WES)을 수행하였다. 또한 101 염기쌍 말단 판독을 갖는 HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 시퀀싱하였고, 바이오인포매틱스 분석은 Whole-exome sequencing reveals diverse modes of inheritance in sporadic mild to moderate sensorineural hearing loss in a pediatric population. Genet Med 17: 901-911에 기재된 바와 같이 수행하였다. 시퀀싱 판독은 BWA v 0.7.5 및 SAMTOOLS v 0.1.18을 이용하여 인간 게놈 레퍼런스(hg19)와 정렬하였고 CATK v 2.4-7 및 Picard v 1.93을 정렬, 색인화, 재배치, 및 중복 판독 표시에 사용하였다. GATK Unified Genotyper를 이용하여 변이를 명명하였고, 변이를 재측정하였다. ANNOVAR를 이용하여 변이를 어노테이션하였다.

[69] WES 데이터로부터 918991개의 변이를 선택한 뒤, 이 중에서 엑손 및 스플라이싱 변이(SNVs 및 InDels) 24279개를 선택하였다. 이들 중 동일한 SNV를 삭제하였다. 이후 NHLBI-ESP 6500, 1000 Genome Project, 및 1020명의 한국인 개체로 구성된 정상 한국인 데이터베이스에서 < 1%의 대립유전자 빈도를 보인 희귀 변이 970개를 확인하였다. 이후 병을 일으키지 않는 것으로 이전에 보고된 단일염기이형성(dbSNP) 변이들은 배제하되 임상적으로 의미가 있는 것으로 보고된 flagged SNP는 배제하지 않고 포함시켜 407개의 변이를 스크리닝하였다. 이후 유전 패턴에 따라 12개의 변이를 스크리닝하였고, 이를 하기 표 1에 나타내었다.

[70] [표1]

유 전 자	ExonicFu nc	Genba nk No	Ex on	뉴클레 오티드	단백질	생거 시퀀 싱	SB127- 219 (발병)	SB127- 235 (정상)	SB127- 247 (정상)	SB1 27-2 77(발병)
LY SM D3	nonsynony mous SNV	NM_1 98273	3	c.C569G	p.T190 R	Confi rmed	+	+	+	
LY SM D3	nonsynony mous SNV	NM_1 98273	3	c.T415G	p.S139 A	Confi rmed	+	+	+	
HI VE P1	nonsynony mous SNV	NM_0 02114	4	c.A778G	p.T260 A	Confi rmed	+	-	+	
HI VE P1	nonsynony mous SNV	NM_0 02114	4	c.A1570 G	p.N524 D	Confi rmed	+	-	+	
OR 2W 1	nonframes hift deletion	NM_0 30903	1	c.747_74 9delTAT	p.M25 0del	Confi rmed	+	+	-	
OR 2W 1	nonsynony mous SNV	NM_0 30903	1	c.C746A	p.S249 Y	Confi rmed	+	+	-	
RH OB TB 2	nonsynony mous SNV	NM_0 01160 037	5	c.G751T	p.V251 L	Confi rmed	+	+	-	
RH OB TB 2	nonsynony mous SNV	NM_0 01160 037	6	c.G1597 A	p.A533 T	Confi rmed	+	+	-	
AT AD 2	nonframes hift deletion	NM_0 14109	7	c.828_83 3delTG ATGA	p.D276 _D277 del	Confi rmed				

ATAD2	nonframeshift deletion	NM_014109	7	c.807_818del	p.D269_D272del	Failed				
POLD1	frameshift deletion	NM_001256849	5	c.584_585delGA	p.S197HfsX54	Confirmed	+	-	-	+
POLD1	nonsynonymous SNV	NM_001256849	27	c.G3298A	p.G1100R	Confirmed	+	+	-	+

[71]

[72] dbSNP 데이터베이스, 대립 유전자 빈도, 및 유전 패턴에 기초한 단계 I 필터링 과정 이후, *LYSMD3*, *HIVEP1*, *OR2W1*, *RHOBTB2*, *ATAD2*, 및 *POLD1*에서 12개의 변이가 복합이형접합자로 검출되었다. 상기 12개의 변이 중에서 다른 변이는 생거 시퀀싱에 의해서 확인되었지만, *ATAD2*의 변이에 대해서는 잘못된 양성 반응이 나타난 것으로 확인되어 *ATAD2*를 배제하였다. 다음, 두 명의 발병하지 않은 형제(SB127-235 및 247) 및 한 명의 발병한 자매(SB127-277)에서 변이의 가족 내 위상과 분리를 확인하고, 일치하는 경우 이를 변이 후보로 선택한 결과, 최종적으로 *POLD1*에서 c.584_585delGA 변이인 p.S197HfsX54 및 c.G3298A 변이인 p.G1100R을 선택하였다.

[73] 상기 기재된 *POLD1*에서 2개의 변이인 p.S197HfsX54 및 p.G1100R의 선택 과정을 하기 표 2에 나타내었다.

[74] [표2]

No	단계	변이의 수
1	Raw SNV	918991
2	Annotated variants	918991
3	Exonic and splicing variants	24279
4	After elimination of synonymous SNV	12567
5	With allele frequency of <1%	970
6	Not registered in dbSNP+ Flagged SNP	407 (404+3)
7	Inheritance pattern matched	12
8	Phase or segregation checked	2
9	No detection in normal hearing control subjects	2

[75] p.S197HfsX54 변이는 엄마(SB127-497)로부터 유전되었고, p.G1100R 변이는

사망한 아버지로부터 유전된 것으로 추정된다. 또한, 이러한 두 변이가 정상 청력을 갖는 한국인 대조군의 2040 대조군 염색체에서는 검출되지 않는 것을 확인하였다.

[76] 도 1은 본 발명의 실험 대상인 비증후군 난청 가계(SB127)의 구성원인 SB127-497, SB127-277, SB127-235, SB127-247, 및 SB127-219가 속한 가계도이다. 또한 SB127-235, SB127-247, SB-127-277, 및 SB127-219의 청력을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[77] SB127-497의 유전자형은 p.S197HfsX54/+, SB127-277의 유전자형은 p.S197HfsX54/p.G1100R, SB127-235의 유전자형은 +/p.G1100R, SB127-247의 유전자형은 +/+, SB127-219의 유전자형은 p.S197HfsX54/p.G1100R이다.

[78]

[79] 선택한 p.S197HfsX54 및 p.G1100R 변이에 대해 생거 시퀀싱을 수행하였고, POLD1의 올소로그와 파라로그 사이에서 이들의 보존 여부를 확인하였다. 그 결과를 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다.

[80] 도 2a는 정상 개체인 SB127-247에서 p.S197HfsX54 및 c.G3298A에 대한 생거 시퀀싱 추적 결과를 나타낸 도이다.

[81] 도 2b는 발단자인 SB127-219에서 p.S197HfsX54 및 c.G3298A에 대한 생거 시퀀싱 추적 결과를 나타낸 도이다.

[82] 도 2c는 POLD1의 올소로그와 파라로그에서 보존을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[83] 도 2c에 나타낸 바와 같이, POLD1의 올소로그에서 인간에서 제브라피쉬까지 POLD1의 2개의 아미노산 잔기인 p.S197 및 p.G1100가 매우 보존되어 있음을 확인하였고, 파라로그에서는 p.G1100 잔기만 일부에서 보존되어 있음을 확인하였다.

[84]

[85] 실시예 3: 대사적인 특성 검사

[86] POLD1 돌연변이를 갖는 개체에서 증후군성 특성을 배제하기 위해서, 발병한 발단자(SB127-219: 27세 남자) 및 또 다른 발병한 개체(SB127-277: 40세 여자)에서 대사적인 특성을 검사하였다. 증후군 난청, MPD 증후군의 가능성을 배제하기 위해서 신체 검사 및 몇몇 종류의 혈액 검사를 수행하였다.

[87] 구체적으로, POLD1 돌연변이를 갖는 개체의 일반적인 외형은 지방이상증(lipodystrophies), 골격 기형, 및 임의의 다른 병리학적 특성의 존재에 의해 평가하였다. 또한 개체에 대해 혈액 검사를 수행하였다. 혈액 검사는 혈청 트리글리세롤 및 콜레스테롤 수준을 측정하기 위한 리피드 패널을 포함한다. 또한, 기초 및 식후의 포도당, 인슐린 내성, 혈청 HbA1c 수준, 갑상선 기능(혈청 갑상선 자극 호르몬 및 자유 티록신[자유 T4]를 의미함), 및 간 기능(아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제를 의미함) 검사를 수행하였다. 지질 패널로 MDP 증후군에서 지방 세포 및

고트리글리세리드혈증의 결핍이 특성인 지방 이상증을 확인할 수 있다. 포도당 및 인슐린 저항성, 갑상선 기능 확인을 위한 HbA1c 수준, 및 간 기능 검사를 이용해서 MDP 증후군에서 대사 장애, 인슐린 저항성, 및 다른 가능한 대사 결함을 스크리닝하였다. 이와 같은 특징 검사를 SB127-219에 대해 수행한 혈액 검사 결과를 표 3에 나타내었다.

[88] [표3]

검사	수치	기준 수치
지질 패널		
트리글리세리드	90	<150mg/dL
콜레스테롤	140	<200mg/dL
HDL	36	>40mg/dL(M), >50mg/dL(F)
인슐린/포도당 저항성		
인슐린		
공복	6.8	4-16ulU/ml
포도당		
공복	70	<100mg/dL
식후 (2시간)	86	
HbA1C	5.1	3.5-6.4%
갑상선 기능 검사		
TSH	4.14	9-30ulU/ml
T4	1.13	0.7-1.9ng/dl
간 기능 검사		
AST	24	
ALT	23	0-40 U/L

[89] SB127-219 및 SB127-277는 예외적인 특징 없이 정상인 골격 형태, 얼굴 형태, 지방 분포 및 생식 기능을 나타내었다. 또한, 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, SB127-219는 정상 혈청 지질 프로파일과 정상 포도당 및 인슐린 수치를 나타내었다. 갑상선 및 간 기능 검사의 결과 또한 정상으로 확인되었다. SB127-219에서 정상 공복 인슐린 및 트리글리세리드 수치 또한 명확하게 정상인 것으로 관찰되었다.

[90] 따라서, 개체가 POLD1의 두 개의 돌연변이(p.S197HfsX54 및 p.G1100R)를 갖는 경우 증후군성 특징을 나타내지 않는 비증후군성 감각신경성 난청이 발병하는

것으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

[91]

[92] 실시예 4: 변이를 갖는 재조합 Pol δ의 생화학적 특징 확인

[93] 재조합 Pol δ 돌연변이 사이의 DNA 중합 활성을 비교하기 위해서, p.P327L, p.S478N, p.S605del, 및 p.G1100R에 돌연변이가 일어난 Pol δ를 사용하였다. 우선 복제 인자 C(replication factor C: RFC) 및 PCNA(processivity clamp proliferating cell nuclear antigen)의 존재 하에서 프라이머 신장 분석법을 수행하였다.

[94] p.P327L 및 p.S478N 돌연변이는 엑소뉴클리아제 도메인에 존재하는 돌연변이로, 모두 Pol δ의 엑소뉴클리아제 활성을 감소시키며 대장암 또는 자궁내막암과 관련된 것으로 알려져 있다. p.S605del 돌연변이는 MDP 증후군과 연관된 것으로 알려져 있다.

[95] Pol δ 홀로효소는 4개의 서브유닛을 갖는데, p125(Pol3), p55(Pol31), p40(Pol32), 및 p18(Cdm1)이다. 가장 큰 서브유닛인 p125는 POLD1에 의해서 암호화되고, 진핵생물 내에서 상당히 보존되어 있으며 폴리머라아제 활성 부위, 엑소뉴클리아제 활성 부위, C-말단 징크 핑거와 같은 단백질-단백질 상호작용 부위, PCNA(processivity clamp proliferating cell nuclear antigen)에 대한 결합 모티프와 같은 몇 개의 도메인을 갖는다. PCNA는 pol δ의 높은 생산성에 필수적인 것으로 보고된 바 있다. p.G1100R 돌연변이 Pol δ는 박테리아에서 검출된 다른 변이인 c.G3298A(p.G1100R)을 발현시킴으로써 제조하였다. POLD1 돌연변이를 p125 cDNA로 도입하기 위해서, 적절한 프라이머를 사용하는 PCR을 통해 부위 특이적 돌연변이 유도를 수행하였다. 재조합 인간 Pol δ의 발현 및 정제는 공지된 방법에 의하여 수행하였다.

[96] 프라이머 신장 분석법은 다음과 같이 수행하였다. 93 nt 주형에 어닐링된³² P-표지된 41 nt 프라이머에 의해서 DNA 중합 활성을 측정하였다. 모든 프라이머 신장 반응은 37°C에서 15분 동안 200 fmol의 삼량체 PCNA 및 100 fmol의 RFC의 존재 하에서 수행하였다. 반응 후, 시료를 시퀀싱 겔 전기영동을 수행하였고 포스포이미저(phosphoimager)를 이용하여 검출하였다. 중합 활성을 반응에 사용된 총 프라이머 중 완전히 신장된 산물의 퍼센트로서 나타내었다.

[97]

[98] 도 3a는 도 3a는 야생형(WT) Pol δ 또는 돌연변이 Pol δ의 폴리머라아제 활성 확인을 프라이머 신장 분석법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[99] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 야생형과 네 개의 돌연변이 Pol δ를 비교한 실험 결과, 100 fmol에서 야생형 Pol δ에 대한 p.P327L, p.S478N, 및 p.G1100R 돌연변이 Pol δ의 상대적 활성은 각각 78%, 73%, 및 61%로 측정되었고, 300 fmol에서 활성은 포화된 것으로 확인하였다. 또한 MDP 증후군과 연관된 p.S605del 돌연변이 재조합 효소(S605Δ)는 완전히 중합 활성이 결핍되어 있음을 확인하였다.

[100] 즉, p.P327L 및 p.S478N 돌연변이를 가지고 있는 재조합 돌연변이 Pol δ가

야생형과 비슷한 수준의 중합 활성을 가지는 반면, p.G1100R 돌연변이를 갖는 Pol δ 는 야생형 및 p.P327L 및 p.S478N 돌연변이를 가지고 있는 재조합 돌연변이 Pol δ 에 비하여는 낮은 수준의 DNA 중합 활성을 나타내었다.

[101]

[102] p.G1100R 돌연변이 Pol δ 에 대하여 다음과 같은 추가적인 실험을 수행하였다. 두 개의 독립적인 시료(Prep1 및 Prep 2)에서 야생형(WT Prep 1 및 WT Prep 2) 및 p.G1100R 돌연변이 효소(G1100R Prep 1 및 G1100R Prep 2)를 발현시키고 이를 정제하여 이들의 중합 활성을 프라이머 신장 분석법에 의해 비교하였다.

[103] 도 3b는 두 개의 독립적 시료에서 유래한 Pol δ 야생형 또는 p.G1100R 돌연변이의 프라이머 신장 결과를 나타낸 도이다.

[104] 도 3c는 50, 100, 및 200 fmol에서 전체 프라이머 기질 중 완전히 신장된 산물의 퍼센트로서 나타낸 중합 활성 확인 결과를 나타낸 도이다.

[105] 도 3b 및 도 3c에 나타낸 바와 같이, p.G1100R 돌연변이의 경우 야생형에 비해 DNA 중합 활성이 30-40% 정도 감소하였음을 확인하였다. 또한 50, 100, 및 200 fmol에서 야생형 Pol δ 에 대한 p.G1100R 돌연변이 Pol δ 의 상대적 활성은 각각 48%, 60%, 및 69%로 확인하였다. 따라서, p.G1100R 돌연변이가 병원성이 있음을 확인하였다.

[106] 또한, 상기 재조합 돌연변이 Pol δ 의 3'→5' 엑소뉴클리아제 활성을 시험하였다. 엑소뉴클리아제 활성은 5'말단에서 ^{32} P로 표지된 40 nt 올리고뉴클레오티드 상에서 측정하였다. 상대적인 엑소뉴클리아제 활성은 각각의 분해된 기질의 강도 및 이동 거리의 곱의 총합으로서 계산하였고, 야생형 Pol δ 에 의해 표준화하였다. 엑소뉴클리아제 활성을 측정한 결과를 도 3d에 나타내었다. 3회의 반응으로부터 얻은 평균 활성 및 표준 편차를 오른쪽 패널에 나타내었다.

[107] 도 3d에 나타낸 바와 같이, G1100R 돌연변이 Pol δ 가 야생형과 유사한 수준의 엑소뉴클리아제 활성을 갖는 반면, p.P327L, p.S478N, 및 p.S605del 돌연변이 Pol δ 의 엑소뉴클리아제 활성은 각각 야생형의 ~30%, ~25%, 및 ~40%임을 확인하였다.

[108] 따라서, G1100R 돌연변이 Pol δ 를 제외한 다른 세 개의 돌연변이는 엑소뉴클리아제의 활성이 유의적으로 감소된 것을 확인하였으며, 특히 대장암과 관련된 p.P327L 및 p.S478N 돌연변이 Pol δ 는 MDP 증후군과 연관된 p.S605del 돌연변이 Pol δ 와 유사한 수준의 엑소뉴클리아제 활성을 나타내었다.

[109]

[110] 추가적으로, 프라이머/주형 DNA에 대한 p.G1100R 돌연변이 Pol δ 와 야생형 Pol δ 의 부착성을 시험하였다. DNA 결합 분석을 위해서, 프라이머/주형의 존재 또는 부존재 하에서 Pol δ 를 스트렙타비딘-접합된 마그네틱 비드에 포획하였다. 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% 트리톤 X-100, 2 mM ATP, 0.1 mg/ml BSA, 5 g의 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega; 사용 전 차단제인 Casein [Pierce]으로 차단됨), $\pm$ 1 pmol 프라이머/주형

(주형의 비오틴화된 5' 말단), ± 1 pmol RFC, ± 2.5 pmol 삼량체 PCNA, 10 pmol LacR, 및 1 pmol Pol δ 를 포함하는 40 μ l 완충액에서 반응을 수행하였다. 37°C에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 마그네틱 비드를 세척하고, 결합된 단백질에 대해 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 항-Pol δ 항원 및 ECL 기질(GE-Healthcare)로 면역블롯팅을 수행하였다. 결과를 도 4에 나타내었다.

- [111] 도 4에 나타낸 바와 같이, p.G1100R 돌연변이 Pol δ 가 야생형과 유사한 효율로 DNA 기질에 결합하는 것을 확인하였다. 따라서, p.G1100R 돌연변이 Pol δ 에서 관찰된 중합 활성 감소는 DNA 기질에 대한 돌연변이 효소의 감소된 접근성에 의한 것이 아니다. 이는 DNA 기질에 대한 정상적인 결합 활성을 유지하는 p.G1100R 돌연변이 Pol δ 가 야생형 Pol δ 와 경쟁함으로써, 정상 보인자 상태에서 우세한 음성 방식으로 Pol δ 중합 활성의 추가적인 감소를 가져올 가능성이 있음을 의미한다.

[112]

- [113] 실시예 5: 환자 유래 림프아구세포주에서 **POLD1**의 세포 수준 확인

- [114] 환자 유래 림프아구세포주에서 내인성 POLD1의 세포 수준을 측정하기 위해서, 1 M Tris-HCl(pH 8.0), 5 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% NP-40, 500 mM EDTA, 100 mM PMSF, 및 1000x 프로테아제 저해제를 포함하는 용해 완충액에 단백질을 모았다. 이후 BCA 단백질 분석 키트를 이용해서 단백질 양을 정량하였다. 동일한 양의 단백질 시료를 웰에 로딩하였다. 단백질을 8% SDS/폴리아크릴아미드 겔 상에 전기영동하였고 Immobilon-P 막으로 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼 후 일차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션 하였고 HRP-접합된 이차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 단백질을 ECL 셀렉트(GE Healthcare) 및 Lumina Crescendo(Millipore)에 의해서 시각화하였다.

- [115] 도 5는 환자(SB127-235, SB127-219, SB127-284, 및 SB127-291) 및 대조군(cont1, cont2) 유래 림프아구세포주에서 POLD1의 세포수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

- [116] 도 5에 나타낸 바와 같이, 절단 돌연변이를 갖는, 발병한 발단자인 SB127-219 유래의 세포주는, 다른 대조군 세포주에 비해서 거의 절반 수준의 POLD1 단백질 발현을 나타내는 것을 확인하였다. 한편, p.G1100R의 정상 보인자(SB127-235) 유래의 세포주는 야생형과 유사한 수준의 POLD1 단백질 수준을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 p.G1100R이 POLD1 단백질의 안정성에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

[117]

- [118] 실시예 6: 환자 유래 Pol δ 돌연변이 세포주로부터 얻은 추출물에서 DNA 폴리머라아제의 활성 측정

- [119] 환자 유래의 돌연변이 Pol δ 세포에서 Pol δ 의 폴리머라아제 활성을 측정하기 위해서, 세 가지 세포주(SB127-219, SB127-235, 및 정상 대조군 세포주)로부터

제조한 전체 세포 추출물 내 복제 효소의 DNA 합성 활성을 측정하였다. 재조합 RFC 및 PCNA가 첨가된 세포 추출물로 프라이머 신장 분석법을 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[120] 도 6은 돌연변이 Pol δ 및 정상 대조군 세포주에서 유래한 전체 세포 추출물의 DNA 폴리머라아제 합성 활성을 나타낸 결과이다.

[121] 실험에 사용된 전체 세포 추출물은 복제 및 비복제 효소를 포함하는, 몇몇 유형의 진핵 DNA 폴리머라아제를 포함하는 것으로 알려져 있다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 복제 B 패밀리 DNA 폴리머라아제 효소, Pol α , Pol δ , 및 Pol ϵ 이 아파디콜린에 반응성이 있으나, ddTTP에는 저항성이 있는 것으로 잘 알려져 있는 반면, 가장 많이 존재하는 비복제 효소인 Pol β 는 ddTTP에 반응성이 있으나, 아파디콜린에 반응성이 없었다. 프라이머 신장 분석법을 통해 Pol δ 가 RFC/PCNA를 필요로 하며 아파디콜린에 반응성이 있으나, ddTTP에 반응성이 없음을 확인하였다. 반대로, Pol β 는 RFC 및 PCNA 모두에 의해 저해되고 ddTTP에 반응성이 있으나, 아파디콜린에 반응성이 없음을 확인하였다.

[122] 또한, p.G1100R 돌연변이를 가지며 정상 청력을 갖는 형제인 p.G1100R의 이형접합보인자인 SB127-235와 POLD1의 두 개의 돌연변이(p.S197HfsX54 및 p.G1100R) 대립유전자를 갖는 환자인 SB127-219 유래의 림프아구세포주에서 POLD1의 두 개의 돌연변이 대립유전자로부터 얻은 Pol δ 의 전체 효소 활성을 확인하였다. SB127-235 유래 세포주를 시험함으로써, p.G1100R 돌연변이 Pol δ 와 함께 발현된 POLD1 Pol δ 야생형의 잠재적 경쟁을 측정하기 위함이다.

[123] 도 6에 나타낸 바와 같이, SB127-219(발병된 개체)로부터 얻은 추출물은 정상 대조군 개체에 비해 상당히 낮은 폴리머라아제 활성($33\% \pm 2$)을 나타내었다. 이러한 결과로부터 상기 분석법이 제대로 작동하는 것을 확인하였고, 인간 세포주에서 p.G1100R 돌연변이가 Pol δ 의 복제 활성을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, SB127-235(p.G1100R의 이형접합보인자)로부터 얻은 추출물은 정상 대조군 개체에 비해 약 50%의 폴리머라아제 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[124] 동일한 분석법 시스템에서, 모든 세 가지 추출물에 의한 DNA 합성은 아파디콜린에 의해 저해되지만 ddTTP에 의해 저해되지는 않았는데, 이는 DNA 합성 활성이 대부분 복제 효소에 의해 촉매됨을 의미한다.

[125] 따라서, p.G1100R 돌연변이에 의해 Pol δ 의 복제 활성이 감소하는 것을 확인하였다.

[126]

[127] 실시예 7: POLD1의 내이 발현 확인

[128] POLD1의 내이 발현을 확인하기 위해서, 마우스 달팽이관에서 POLD1 발현. 항-POLD1 항체로 면역조직화학 염색을 수행하였다.

[129] 실험동물로는, 3주령 C57BL/6J 마우스를 SLC, Inc.(Shizuoka, Japan)로부터 구입하였다. 조직학 연구를 위한 동물 실험은 교토 대학교의 동물 실험에 관한

규정에 따라 수행하였다.

- [130] 래빗 항-POLD1 다클론 항체(pAb) 및 마우스 항- β -튜블린 단일클론 항체(mAb)를 각각 ATLAS ANTIBODIES (#HPA046524) 및 Covance(#MMS-435P)로부터 구입하였다. DAPI (#D1306), Alexa Fluor 546-phalloidin (#A22283), Alexa Fluor 488 염소 항-래빗 IgG pAb(#A11008), 및 Alexa Fluor 546 염소 항-마우스 IgG pAb(#A11030)를 Life Technologies로부터 구입하였다.
- [131] 마우스로부터 내이를 절개하고 상온(RT)에서 2시간 동안 PBS 내의 4% (w/v) 포름알데히드로 고정하였다. 고정 후, 상기 조직을 PBS로 세척하고, 10% (w/v) EDTA로 4°C에서 36시간 동안 석회를 제거하였고, 10-30% 수크로오스/PBS 용액으로 각각 4°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 시료를 액체 질소로 OCT 화합물(Sakura Finetek Japan, Inc.)을 이용하여 저온 보존하였다. 동결 절편을 10~12 μ m 두께로 절단하고 슬라이드 글라스에 고정시킨 후, 30분 동안 대기 건조시켰다. 시료를 PBS로 3회 세척하고 침투/차단을 위해서 0.2% 트리톤-X100+2% BSA/PBS에 담갔다. 이후 조직 절편을 4°C에서 밤새 일차 항체와 함께 인큐베이션 하였다. 이후 이를 PBS로 3회 세척한 후, 상온에서 이차 항체와 함께 2시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS로 3회 세척 후, Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL)에 임베딩하였다. 형광 이미지는 형광 현미경 및 레이저 공초점 현미경(모델 AF7000 및 SP8; Leica microsystems, Wetzlar, Germany)으로 얻었다.
- [132] 도 7은 마우스 내이에서 POLD1의 발현을 형광 현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다(스케일바, 50 μ m).
- [133] 도 7a 및 도 7b에서 POLD1의 발현을 녹색으로, 추가적인 항체 또는 대조 염색을 적색 또는 청색으로 나타내었다.
- [134] 내이에서 관찰되는 내림프는 라이너스너막(Reissner's membrane: RM), 혈관조(stria vascularis: SV), 나선이내(spiral Ligament: SL), 코르티기관(organ of Corti: OC), 및 덮개막(tectorial membrane: TM)으로 둘러싸여있다. 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, POLD1 면역반응은 RM, SL 내 세포의 핵, 및 OC에서 세포 부분(화살표)에서 발견되었다. 또한 SV 및 코르티 로드(rod)의 강한 비핵성 신호는 위양성인 것으로 보인다(도 7a에서 별표로 나타냄).
- [135] 도 7c 내지 도 7e는 도 7a에서 네모로 표시한 달팽이관 측부를 더 높은 배율로 관찰한 사진이다. 도 7c는 POLD1을, 도 7d는 DAPI를, 도 7e는 POLD1/DAPI를 나타낸다.
- [136] 도 7c 내지 도 7e에 나타낸 바와 같이, POLD1 발현은 SL 내 섬유세포의 핵 내에서 발견되었음을 확인하였다.
- [137] 도 7f 내지 도 7h는 선 신경절(spiral ganglion: SG), 달팽이관의 일차 감각 뉴런을 더 높은 배율로 관찰한 사진이다. 도 7f는 POLD1을, 도 7g는 β III-튜블린을, 도 7h는 DAPI/POLD1/ β III-튜블린을 나타낸다.

[138] 도 7f 내지 도 7h에 나타난 바와 같이, POLD1 발현은 β III-튜블린 양성 뉴런에서 발견되었음을 확인하였다.

[139]

[140] 실시예 8: 돌연변이와 연관된 표현형의 예측을 위한 폴리머라아제 및 프루프리딩 활성의 조절을 통한 제안된 가설 모델

[141] 상기 실시예 1 내지 7의 결과에 근거하여 POLD1 돌연변이 유전자형에 따라 표현형을 예측하기 위한 가설을 세우기 위해서, 폴리머라아제/엑소뉴클리아제 상대적 활성(pol/exo), pol 지수(pol index), error 지수(error index)를 도입하였다. 이는 상대적 프라이머 신장 효율 및 상대적 엑소뉴클리아제 활성을 측정한 실험 결과에 근거하여 계산하였다.

[142] 본 발명의 가설에 따라 POLD1 돌연변이와 관련된 유전자형으로부터 표현형을 예측하기 위해 계산한 결과를 표 4에 나타내었다.

[143] [표4]

유전자형	대립유전자 1			대립유전자 2			두 대립유전자의 평균		표현형
	[Pol]/[Exo] ^a	Pol 지수 ^b	Error 지수 ^c	[Pol]/[Exo]	Pol 지수	Error 지수	Pol 지수	Error 지수	
WT/WT	1.00/1.00	1	0	1/1	1	0	1	0	정상
p.P327L/WT	0.78/0.37	0.78	0.49	1/1	1	0	0.89	0.25	암
p.S478N/WT	0.74/0.30	0.74	0.52	1/1	1	0	0.87	0.26	암
p.S605del/WT	0/0.43	0	0	1/1	1	0	<0.5*	0	MDP 증후군*
p.G1100R/delGA ^d	0.65/1.23	0.65	0	0/0	0	0	0.33	0	NS-SN HL***
delGA/WT	0/0	0	0	1/1	1	0	0.5	0	정상
p.G1100R/WT	0.65/1.23	0.65	0	1/1	1	0	0.83	0	정상

[144] ^a [Pol]=상대적 프라이머 신장 효율. [Exo]=상대적 엑소뉴클리아제 활성, ^b Pol 지수 = [Pol]^c Error 지수 [Pol] x (1-[Exo])

- [145] ^d delGA=c.584_595delGA
- [146] * Considering the property of p.S605del which tends to stall replication forks (ref Weedon), the actual Pol index should be much lower than 0.5.
- [147] ** MDP 증후군: 하악골발육부전증, 난청 및 조로증을 나타내는 다중계통 질병
- [148] *** NS-SNHL: 비증후군 감각신경성 난청
- [149]
- [150] 상기 결과로부터 다음과 같은 예측 모델을 설계하였고, 이를 도 8에 나타내었다.
- [151] 도 8에 나타낸 바와 같이,
- [152] Error 지수가 0보다 큰 경우: 암
- [153] Error 지수가 0이고 pol 지수가 0.5 이상인 경우: 정상
- [154] Error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 초과인 경우: 비증후군 감각신경성 난청
- [155] Error 지수가 0이고 pol 지수가 0.33 이하인 경우: MDP 증후군
- [156] 으로 예측할 수 있다. 여기서, error 지수와 pol 지수는 POLD1의 두 가지 대립 유전자에 대해 error 지수와 pol 지수를 각각 계산한 후 두 대립 유전자의 평균을 내어 계산한다.
- [157] 따라서, POLD1에서 c.584_585delGA 뉴클레오티드 또는 c.G3298A 뉴클레오티드 변이의 유전자형에 따라 표현형이 감각신경성 난청, 암, 및 MDP 증후군으로 매우 상이하게 나타나므로 POLD1이 표현형 다면발현을 나타내는 유전자임을 확인하였다.
- [158] 또한, POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성, 즉 폴리머라아제의 DNA 중합 활성과 프루프리딩 활성을 측정하고 이들의 활성 비율을 계산함으로써 POLD1 돌연변이를 갖는 개체에서 어떤 질병이 발생할 지 여부를 예측할 수 있다.

청구범위

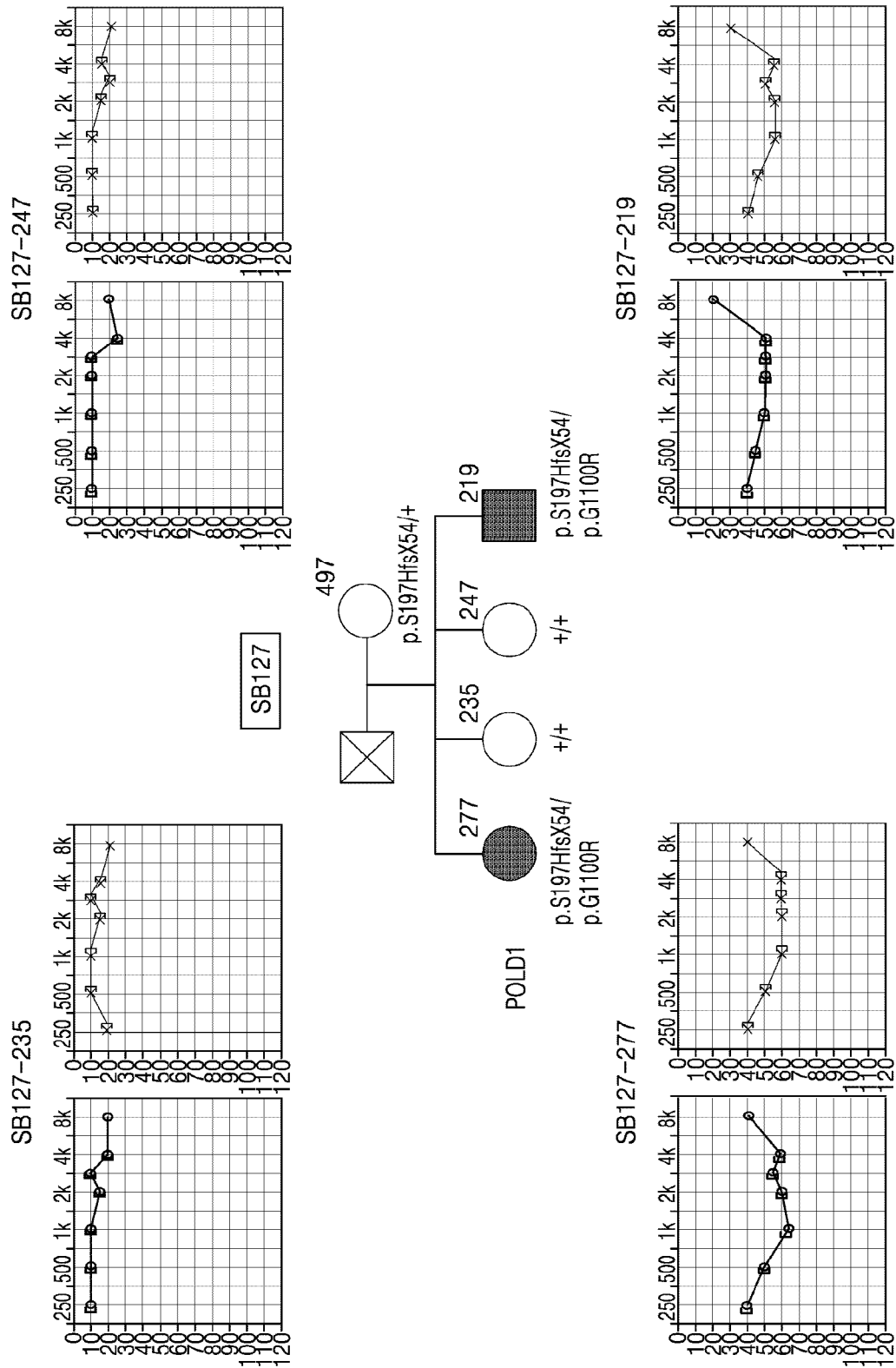
- [청구항 1] POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하고, 상기 DNA 폴리머라아제 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 것인, 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 키트.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제는 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제인 것인 키트.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 키트.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인 키트.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 감각신경성 난청은 비증후군 감각신경성 난청(Non Syndromal sensorineural hearing loss: NS-SNHL)인 것인 키트.
- [청구항 6] 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 활성 수준은 유전자의 mRNA 발현 수준인 것인 방법.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인 방법.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준 측정은 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것인 방법.
- [청구항 10] POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의

활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 조성물.

[청구항 11] POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하기 위한 제제를 포함하는 조성물의 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하기 위한 용도.

[청구항 12] POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제 및 엑소뉴클리아제의 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 DNA 폴리머라아제 활성 대비 엑소뉴클레아제의 활성을 측정하거나, 또는 정상 대조군 대비 상기 DNA 폴리머라아제의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 암, MDP 증후군, 및 감각신경성 난청을 진단하여 치료하는 방법.

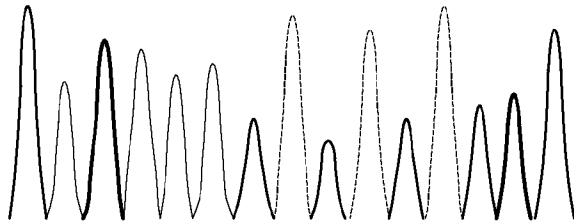
[도1]



[도2a]

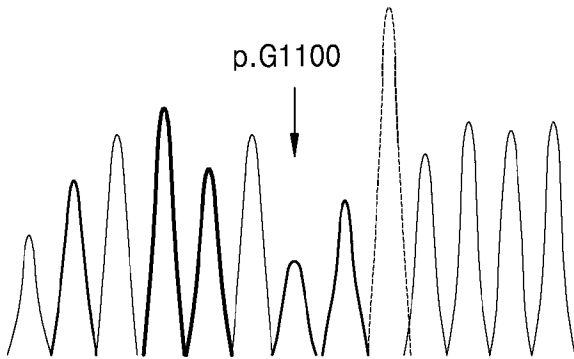
G C T C C C G A G A G A G T G

c.584_585GA



C G C T T C G G A C C C C

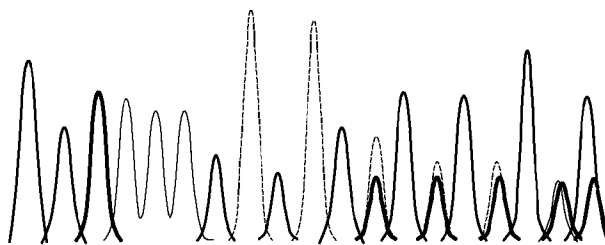
p.G1100



[도2b]

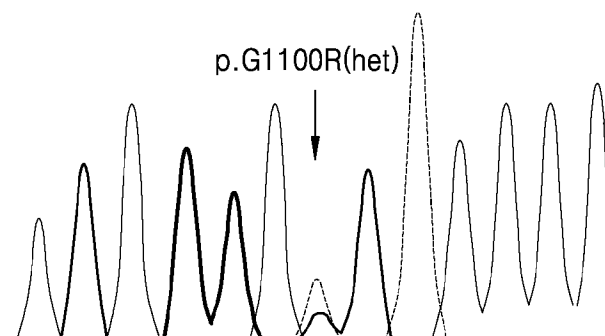
G C T C C C G A G A G A G A G T G T G

c.584_585delGA(het)

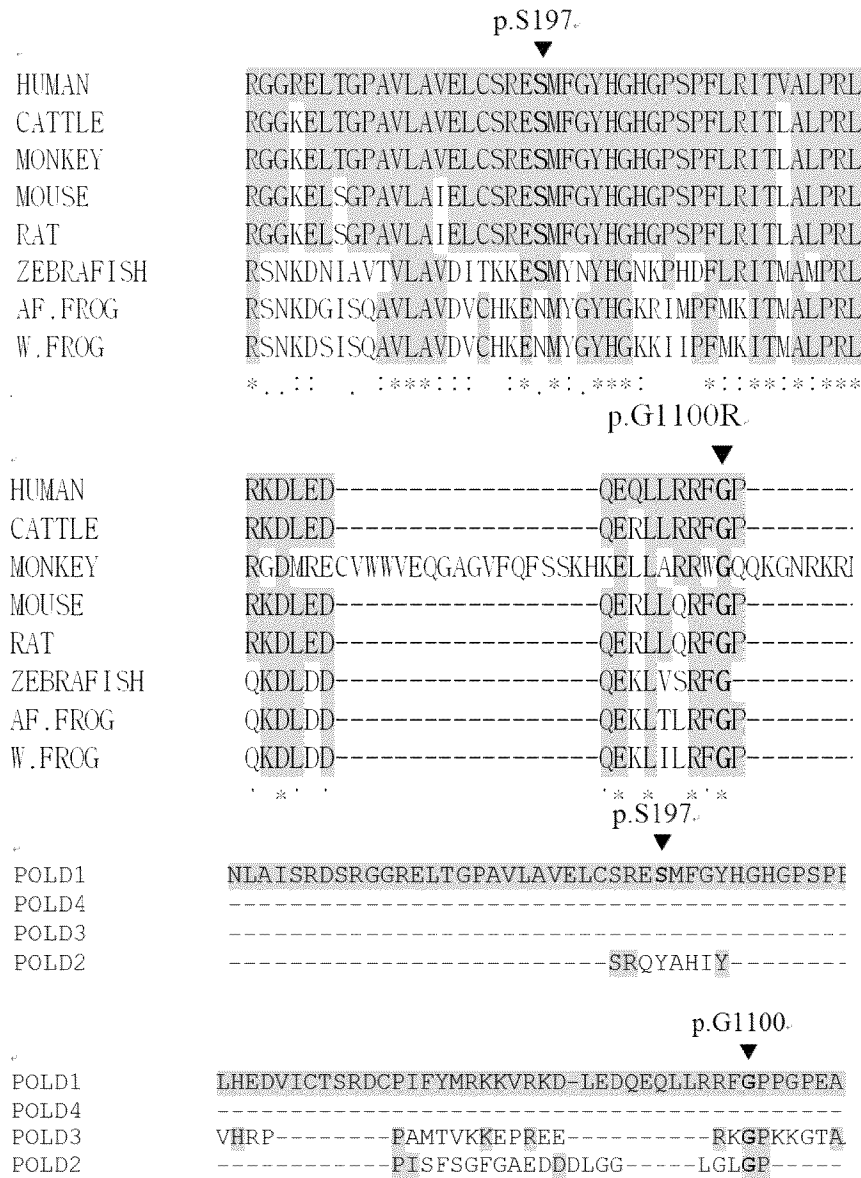


C G C T T C A G A C C C C

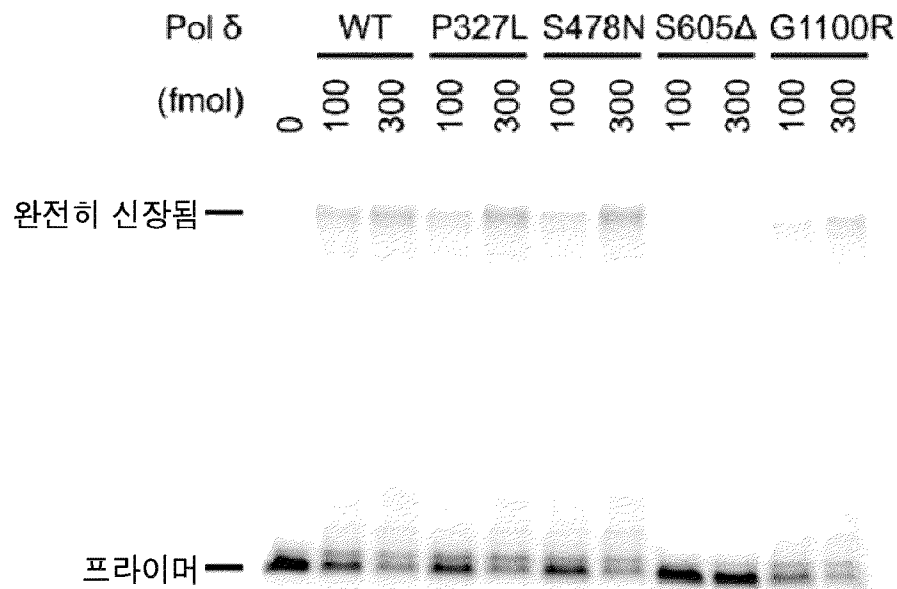
p.G1100R(het)



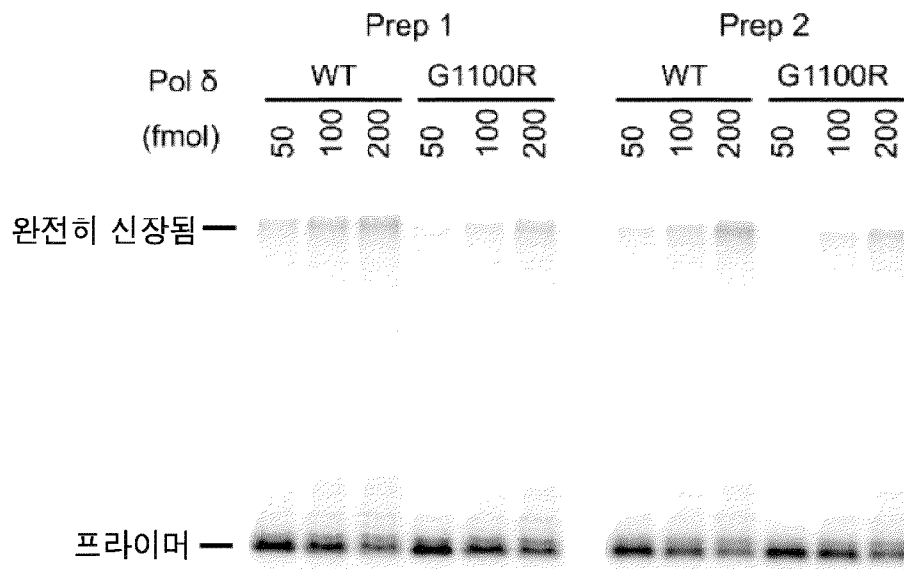
[도2c]



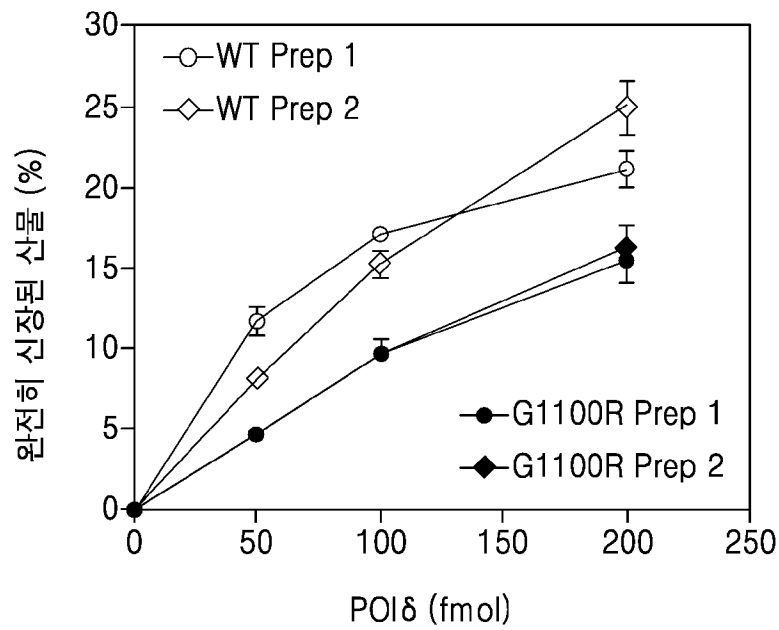
[도3a]



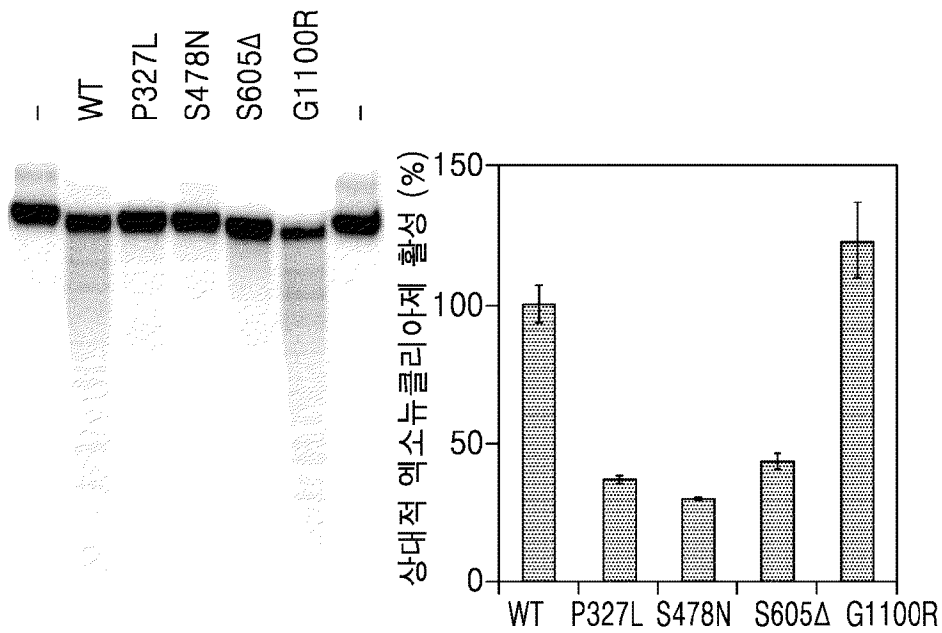
[도3b]



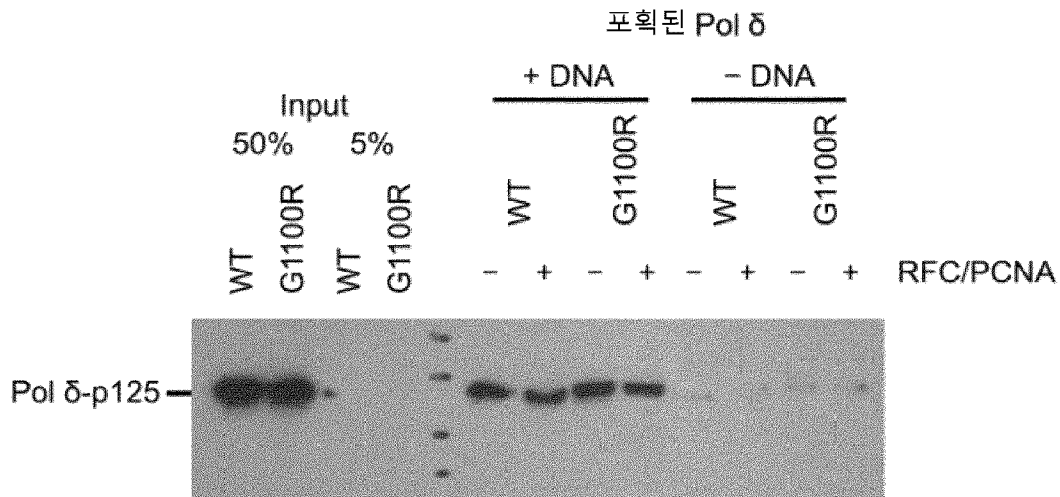
[도3c]



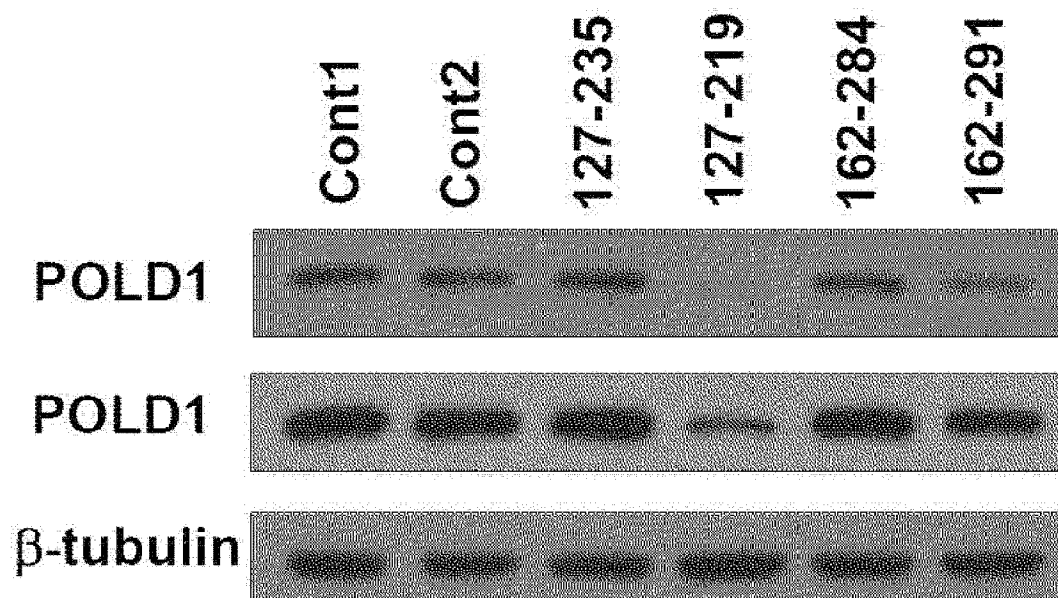
[도3d]



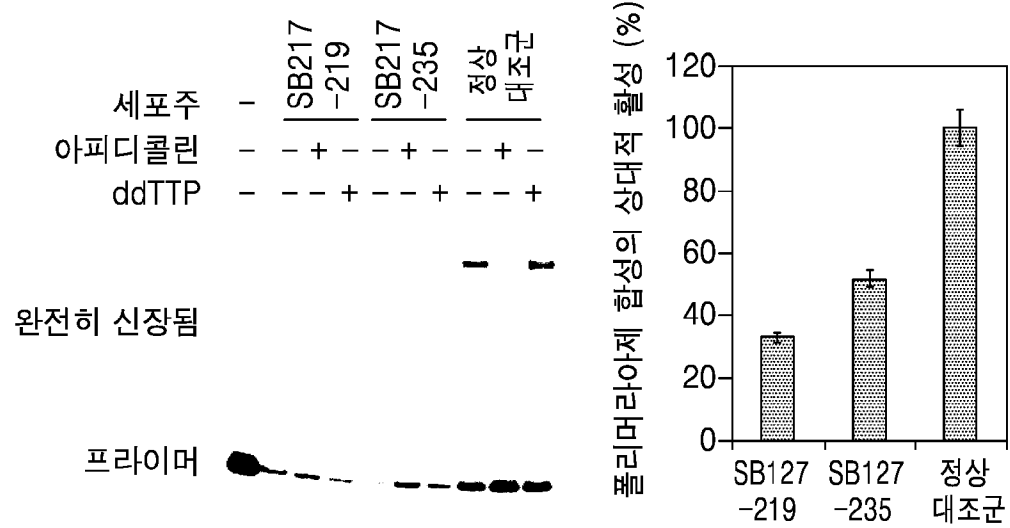
[도4]



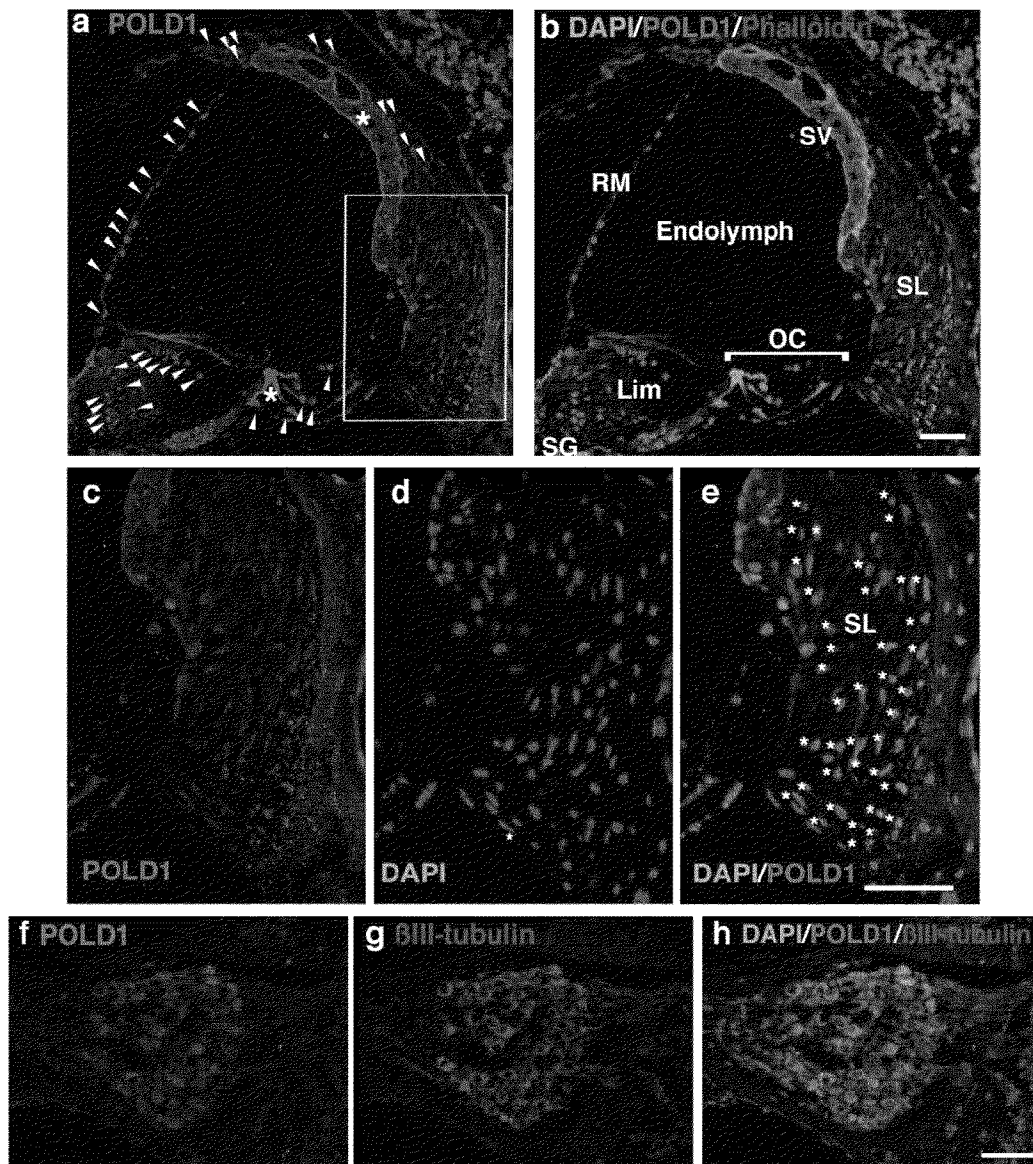
[도5]



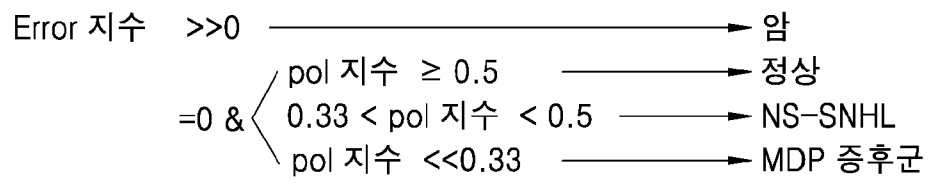
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/003063

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; C07H 21/04; C40B 40/06; C12N 15/113; A61K 31/713; C12Q 1/68; G01N 33/68

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: POLD1, DNA polymerase, exonuclease, cancer, MDP syndrome, sensorineural hearing loss

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEEDON, Michael N. et al., "An In-frame Deletion at the Polymerase Active Site of POLD1 Causes a Multisystem Disorder with Lipodystrophy", Nature Genetics, 2013, vol. 45, no. 8, pages 947-950 See abstract; figures 2-3; pages 948-949.	1-4,6-12
A		5
X	LESSEL, Davor et al., "POLD1 Germline Mutations in Patients Initially Diagnosed with Werner Syndrome", Human Mutation, 2015, vol. 36, no. 11, pages 1070-1079 See figure 1; pages 1071, 1075.	1-4,6-12
A	US 2016-0090597 A1 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 31 March 2016 See the entire document.	1-12
A	US 2012-0219944 A1 (CHOI, Byung-Ok et al.) 30 August 2012 See the entire document.	1-12
A	US 2009-0226920 A1 (LUCAS, Trevor et al.) 10 September 2009 See the entire document.	1-12



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 JUNE 2018 (11.06.2018)

Date of mailing of the international search report

11 JUNE 2018 (11.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/003063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0090597 A1	31/03/2016	US 9758781 B2	12/09/2017
US 2012-0219944 A1	30/08/2012	KR 10-1274276 B1	13/06/2013
		KR 10-2012-0097304 A	03/09/2012
US 2009-0226920 A1	10/09/2009	EP 2245185 A1	03/11/2010
		EP 2245185 B1	30/04/2014
		US 8119344 B2	21/02/2012
		WO 2009-105543 A1	27/08/2009

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; C07H 21/04; C40B 40/06; C12N 15/113; A61K 31/713; C12Q 1/68; G01N 33/68

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: POLD1, DNA 폴리머라아제, 엑소뉴클리아제, 암, MDP 증후군, 감각신경성 난청

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WEEDON, MICHAEL N. 등, 'An in-frame deletion at the polymerase active site of POLD1 causes a multisystem disorder with lipodystrophy' Nature Genetics, 2013, 45권, 8호, 페이지 947-950 요약; 도면 2-3; 페이지 948-949 참조.	1-4,6-12
A		5
X	LESSEL, DAVOR 등, 'POLD1 germline mutations in patients initially diagnosed with Werner syndrome' Human Mutation, 2015, 36권, 11호, 페이지 1070-1079 도면 1; 페이지 1071, 1075 참조.	1-4,6-12
A	US 2016-0090597 A1 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 2016.03.31 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2012-0219944 A1 (CHOI, BYUNG-OK 등) 2012.08.30 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2009-0226920 A1 (LUCAS, TREVOR 등) 2009.09.10 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 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

2018년 06월 11일 (11.06.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 06월 11일 (11.06.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



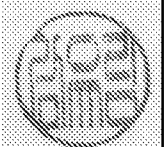
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0090597 A1	2016/03/31	US 9758781 B2	2017/09/12
US 2012-0219944 A1	2012/08/30	KR 10-1274276 B1	2013/06/13
		KR 10-2012-0097304 A	2012/09/03
US 2009-0226920 A1	2009/09/10	EP 2245185 A1	2010/11/03
		EP 2245185 B1	2014/04/30
		US 8119344 B2	2012/02/21
		WO 2009-105543 A1	2009/08/27