

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 9월 20일 (20.09.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/169332 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/003062

(22) 국제출원일:

2018년 3월 15일 (15.03.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0032518 2017년 3월 15일 (15.03.2017) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 중

로구 대학로 101, Seoul (KR).

(72) 발명자: 최병윤 (CHOI, Byung Yoon); 06218 서울시 강남구 선릉로69길 19, 107동 302호, Seoul (KR). 오두

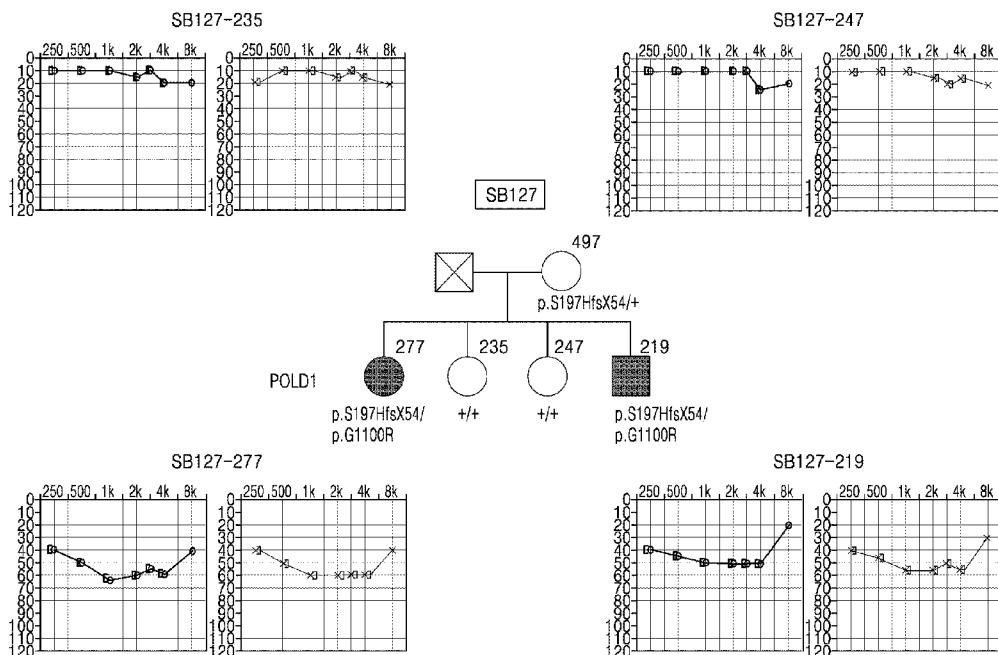
이 (OH, Doo Yi); 05575 서울시 송파구 도곡로64길 34, Seoul (KR).

(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.

(54) Title: MARKER POLD1 FOR DIAGNOSIS OF SENSORINEURAL HEARING LOSS AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 감각신경성 난청 진단을 위한 마커 POLD1 및 그의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to marker POLD1 for diagnosis of sensorineural hearing loss and the use thereof and, more particularly, to a kit and a composition for diagnosing a sensorineural hearing loss disease, comprising a polynucleotide including a consecutive nucleotide sequence selected from the nucleotide sequence of an exon region of a POLD1 gene, or a complementary polynucleotide thereto, which is used to detect a mutation of the POLD1 gene, and a method for detecting a mutation of genomic DNA to provide information on diagnosis. A kit or composition according to an embodiment can be used to analyze a mutation of the POLD1 gene at high sensitivity and accuracy, and sensorineural hearing loss can be effectively diagnosed on the basis of the analysis result.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/169332 A1

(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 제21조(3))

(57) 요약서: 감각신경성 난청 진단을 위한 마커 POLD1 및 그의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 키트, 진단용 조성물, 및 진단에 관한 정보를 제공하기 위하여 유전체 DNA 의 변이를 검출하는 방법에 관한 것으로, 일양상에 따른 키트 또는 조성물을 이용하여 POLD1 유전자의 변이를 높은 민감도와 정확도로 분석할 수 있으며, 이러한 분석 결과를 바탕으로 감각신경성 난청을 효율적으로 진단할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 감각신경성 난청 진단을 위한 마커 POLD1 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 2017년 3월 15일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2017-0032518호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 감각신경성 난청 진단을 위한 마커 POLD1 및 그의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 키트, 진단용 조성물, 및 진단에 관한 정보를 제공하기 위하여 유전체 DNA의 변이를 검출하는 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 중후군과 비중후군으로 분류되는데, 중후군 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 중후군 난청이 보고되어 있다. 특징적인 증상이나 기형으로 쉽게 분류되므로 같은 원인을 갖는 환자들에서 원인 유전자를 용이하게 추적할 수 있다. 비중후군 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. 비중후군 난청은 유전 형태에 의해서 80%가 열성유전, 17%가 우성유전, 2-3%가 X-linked 그리고 1%가 미토콘드리아 유전으로 발생하게 되며, 특히 이러한 비중후군 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 중후군 난청 또는 비중후군 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 유전자가 연구되었으나, *POLD1*의 변이와 감각신경성 난청과의 관계에 대하여는 보고된 바가 전혀 없다. 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 마커를 찾기 위해 노력한 결과, *POLD1*의 변이를 이용하여 감각신경성 난청을 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 일 양상은 *POLD1* 유전자의 변이를 검출하기 위하여 *POLD1* 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [9] 다른 양상은 *POLD1* 유전자의 변이를 검출하기 위하여 *POLD1* 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [10] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단에 관한 정보를 제공하기 위하여 유전체 DNA의 변이를 검출하는 방법을 제공한다.
- [11] 다른 양상은 *POLD1* 유전자의 변이를 검출하기 위하여 *POLD1* 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물의 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 용도를 제공한다.
- [12] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는

단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

- [13] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하여 감각신경성 난청 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [14] 일 양상은 POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [15] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 임의의 길이를 지닌 뉴클레오티드 폴리머를 의미하는 것으로, 본 명세서에서 폴리뉴클레오티드는 핵산, 또는 올리고뉴클레오티드와 상호교환적으로 사용할 수 있다.
- [16] 용어 "유전자"는 유전정보를 결정하는 구조단위를 의미하는 것으로, 단백질의 아미노산 서열 또는 기능 RNA(tRNA, rRNA 등)의 염기 배열을 결정하는 정보를 가지는 구조 유전자, 및/또는 구조유전자의 발현을 제어하는 조절유전자 (예를 들면, 프로모터, 억제자(repressor), 작동유전자(operator) 등)를 포함한다. 본 명세서에서 용어 "유전자"는 유전자의 산물을 생성하기 위해 전사되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일가닥 쪽을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들면 "유전자의 뉴클레오티드 서열"은 유전자의 산물을 생성하기 위해 전사되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일가닥에 포함된 기능을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및/또는 구조유전자의 발현을 제어하는 뉴클레오티드 서열을 의미할 수 있다.
- [17] 용어 "연속 뉴클레오티드 서열 (contiguous nucleotide sequence)"은 인접한 2개 이상의 뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [18] 용어 "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 상기 용어 "상보적"은 실질적 상보적(substantially complementary) 및 완전 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄할 수 있으며, 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미할 수 있다.
- [19] 용어 "엑손"은 DNA 서열 중 단백질의 합성 정보를 담고 있는 영역으로, 예를

- 들면 발현된 단백질의 일부 또는 전부를 인코딩하는 핵산 분자를 의미한다.
- [20] 상기 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 변이를 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 유전자의 카피 수의 변이 또는 뉴클레오티드 서열의 변이를 포함할 수 있다. 상기 유전자의 카피수의 변이는 예를 들면 복제수변이(Copy Number Variation: CNV)일 수 있다. 상기 뉴클레오티드 서열의 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 치환, 삽입, 결실, 또는 전좌를 포함할 수 있다. 상기 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 치환은 예를 들면 단일 뉴클레오티드 변이(Single Nucleotide Variation: SNV)일 수 있다. 또한 상기 뉴클레오티드 서열의 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 치환, 삽입, 결실, 또는 전좌를 포함하는 것일 수 있다.
- [21] 용어 "단일 뉴클레오티드 변이 (Single Nucleotide Variation: SNV)"는 단일 뉴클레오티드 다형성(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)이 하나의 종 내 다수의 집단에서 나타나는 단일염기의 차이를 말하는 것에 비해, 하나의 서열 또는 종 내 소수의 집단에서 나타나는 단일염기의 차이를 의미하는 것으로, 예를 들면 시퀀싱 데이터에서 나타나는 표준염기서열과의 차이를 의미할 수 있다.
- [22] 용어 "복제수 변이(Copy Number Variation: CNV)"는 특정 염색체의 상대적으로 큰 영역이 결손되거나 증폭되어 반복적으로 나타나는 유전체 DNA의 변이를 의미하는 것으로, 예를 들면 1kB 이상의 DNA 조각이 증첩되어 존재하거나 일부가 결실되는 변이일 수 있다.
- [23] 상기 변이는 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 변이가 아닐 수 있으며, 열성 변이일 수 있다.
- [24] 상기 변이는 예를 들면 p.S197HfsX54 또는 p.G1100R 변이일 수 있다. 본 발명에서 p.S197HfsX54는 *POLD1*에서 c.584_585delGA 변이를 지칭하고, p.G1100R은 c.G3298A 변이를 지칭한다. 상기 c.584_585delGA 변이는 *POLD1* 유전자에서 584 내지 585 뉴클레오티드인 구아닌, 아데닌이 결실된 변이를 지칭하고, 상기 c.G3298A 변이는 *POLD1* 유전자에서 3298번째 뉴클레오티드인 구아닌이 아데닌으로 치환된 변이를 지칭한다.
- [25] 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 10 내지 100개의 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드가 10개 이하의 크기를 가질 경우 표적 영역을 캡처에 대한 정확도가 낮으며, 100개 이상의 크기를 가질 경우 합성비용이 증가하는 단점을 갖는다. 따라서 상기 폴리뉴클레오티드는 경제적이면서 유전체 DNA의 변이 검출에 최적화된 크기를 갖는다.
- [26] 상기 감각신경성 난청은 비증후군성 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.

- [27] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 표적 유전자의 서열과 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 특이적 결합 특성을 이용하여, 혼합 시료로부터 표적 유전자 또는 그의 단편을 효과적으로 혼합물로부터 분리할 수 있다. 따라서 상기 폴리뉴클레오티드를 프로브로 명명할 수 있다. 용어 "프로브"는 특정 물질, 부위, 상태 등을 특이적으로 검출하는 물질을 의미한다.
- [28] 상기 키트는 상기 폴리뉴클레오티드가 유전체 핵산과 혼성화하는데 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 핵산의 혼성화에 필요한 시약, 버퍼, 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 또한 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 상기 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명 의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 표적핵산을 증폭하기 위하여 사용하기 위한 설명서를 더 포함할 수 있으며, 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [29]
- [30] 다른 양상은 POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [31] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [32]
- [33] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단에 관한 정보를 제공하기 위하여 유전체 DNA의 변이를 검출하는 방법을 제공한다.
- [34] 상기 검출방법에서 상기 조성물은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [35] 상기 유전체 DNA 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 유전자의 카피 수의 변이 또는 뉴클레오티드 서열의 변이를 포함할 수 있고, 상기에서 설명한 바와 같다.
- [36] 상기 유전체 DNA 변이는 구체적으로 단일 뉴클레오티드 변이, 삽입-결실 변이, 복제수 변이 및 전좌 중 하나 이상일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 단일 뉴클레오티드 변이, 삽입-결실변이, 복제수 변이 및 전좌를 모두 포함할 수 있다.
- [37] 용어 "삽입-결실 변이(Indel)"는 유전자의 핵산 개수를 변화시킬 수 있는 염기 서열이 삽입 또는 결실된 것을 의미한다.

- [38] 용어 "전좌(translocation)"는 염색체의 일부분에 절단이 일어나, 그 단편이 동일 염색체의 다른 부분 또는 다른 염색체에 결합하여 염색체의 형태를 바꾸는 현상을 의미한다.
- [39] 상기 검출방법에서 개체로부터 분리된 유전체 DNA는 생물학적 시료로부터 분리된 유전체 DNA 또는 그의 단편일 수 있다. 예를 들면, 상기 시료는 혈액, 타액, 뇨, 분변, 조직, 세포 및 생검물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 시료는 보관된 생물학적 시료 또는 그로부터 분리된 유전체 DNA를 포함하는 것일 수 있다. 상기 보관은 알려진 방법에 의하여 보관된 것일 수 있다. 상기 유전체 DNA는 냉동 보관 또는 포르말린 고정된 파라핀 임베드된 조직을 상온에서 보관한 조직으로부터 유래된 DNA 또는 RNA일 수 있다. 생물학적 시료로부터 유전체 DNA를 분리하는 방법은 잘 알려져 있다. 상기 암 세포는 암 환자로부터 분리된 것일 수 있다. 따라서 상기 시료는 난청 환자의 세포, 조직, 기관, 체액으로부터 분리한 것일 수 있으며, 이 경우, 상기 시료는 통상적인 방법, 예를 들면, 관련 의학 기법에서 당업자에 의해 잘 공지된 방법을 이용하는 생검에 의해 획득될 수 있다.
- [40] 일 구체예에서, 상기 시료에 포함된 유전체 DNA는 임의의 크기로 단편화(fragmentation)된 것일 수 있다. 상기 단편화는 당업자에게 잘 알려져 있는 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면 초음파의 사용에 의해 유전체 DNA를 단편화할 수 있다. 상기 검출방법은 상기 유전체 DNA의 단편화 후, 단편화된 유전체 DNA의 양 말단에 증폭을 위한 서열을 라이게이션(ligation)시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 증폭을 위한 서열 (예를 들면, paired-end tag, universal tag)의 라이게이션 방법은 통상의 기술자가 공지된 기술을 적절히 선택하여 수행할 수 있다.
- [41] 상기 검출방법에서, 상기 혼성화는 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 핵산의 혼성화에 적절한 것으로 알려진 버퍼 중에서 상기 폴리뉴클레오티드와 유전체 DNA를 인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. 혼성화는 적절한 온도에서 수행될 수 있다. 혼성화에 적절한 온도는 예를 들면, 40 내지 80°C, 50 내지 75°C, 60 내지 70°C, 또는 62 내지 67°C일 수 있다. 또한 혼성화 온도는 이에 제한되지 않고, 조성물에 포함된 폴리뉴클레오티드의 서열 및 길이에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 혼성화 시간은 예를 들면, 1 시간 내지 12시간 (밤새) 동안일 수 있다. 일 구체예에서 상기 조성물에 포함되는 폴리뉴클레오티드는 표적으로 하는 유전자들의 서열을 갖는 유전체 DNA의 단편과 혼성화된다.
- [42] 상기 방법은 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계 전에, 접촉시키는 단계에서 얻어진 접촉 산물로부터 상기 유전체 DNA와 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 분리는 폴리뉴클레오티드에 부착된 분리 또는 정제를 위한 모이어티를 이용하는 것일 수 있다. 상기 분리 또는 정제는 모이어티에

특이적으로 결합하는 물질 또는 자기장에 의해 이루어질 수 있다.

- [43] 또한 상기 방법은 상기 분리된 상기 혼성화 산물 또는 상기 유전체 DNA를 주형으로 하고, 상기 유전체 DNA 각각에 부착된 증폭을 위한 서열에 상보적인 universal primer를 프라이머로서 사용하여 PCR하여, 상기 유전체 DNA를 증폭하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 증폭된 유전체 DNA를 이용하여 뉴클레오티드 서열을 확인할 수 있다.
- [44] 상기 뉴클레오티드 서열의 확인은 예를 들면 시퀀싱(sequencing) 방법을 통해 확인할 수 있으며, 구체적으로는 차세대 염기서열분석법에 의해 확인할 수 있다. 용어 "차세대 염기서열분석법(next generation sequencing: NGS)은 칩(Chip)기반 그리고 PCR기반 페어드엔드(paired end)형식으로 전장유전체를 조각내고, 상기 조각을 화학적인 반응(hybridization)에 기초하여 초고속으로 시퀀싱을 수행하는 기술을 의미한다. 차세대 염기서열 분석법에 의해 짧은 시간 내에 분석대상이 되는 시료에 대해 대량의 염기서열 데이터를 생성할 수 있다.
- [45] 상기 방법은 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 염기서열과 비교하는 단계를 포함한다. 용어 "표준 뉴클레오티드 서열(reference nucleotide sequence)"은 변이 확인을 위해 참조가 되는, 변이를 포함하지 않는 인간 유전체 서열을 의미할 수 있다. 예를 들면 표준 염기서열로서 미국 국립보건원 산하 생물공학정보연구소(NCBI)의 데이터베이스에 게시된 인간 유전자 염기 서열, 구체적으로, NCBI37.1 또는 UCSC hg19(GRCh37)를 이용할 수 있다. 상기 유전체 DNA의 염기서열과 표준 염기서열 간의 비교는 공지된 다양한 서열 비교 분석프로그램, 예를 들면 Maq, Bowtie, SOAP, GSNAP 등을 이용하여 수행할 수 있다.
- [46] 용어, "개체"는 난청이 발병하거나 또는 발병한 것으로 의심되는 포유동물로서 분류된 모든 동물들을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들면, 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함할 수 있다. 구체적으로, 개체는 임의의 연령 또는 인종의 인간 남성 또는 여성이다. "개체" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [47] 상기 개체로부터 유전체 DNA를 획득하는 단계에서, 상기 유전체 DNA는 개체의 혈액, 또는 구강상피세포로부터 획득하는 것일 수 있다. 획득 방법은 조직 또는 세포로부터 유전체 DNA를 분리하는 당업자에게 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [48] 상기 방법을 통하여 POLD1 유전자에서 변이가 확인된 경우, 개체가 감각신경성 난청 질환을 갖는 것으로 진단할 수 있다. 상기 방법은 인 비트로 및 인 비보 조건에서 추가적인 실험 없이도, 개체에서 감각신경성 난청을 진단하는데 사용될 수 있다.
- [49] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.

[50]

[51] 다른 양상은 POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물의 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 용도를 제공한다.

[52]

[53] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[54] 상기 정보제공방법에서, 개체로부터 분리된 유전체 DNA에서 변이, 예를 들어 p.S197HfsX54 또는 p.G1100R 변이가 확인되면, 감각신경성 난청이 발병하거나 발병할 가능성이 있는 것으로 진단할 수 있다.

[55]

[56] 다른 양상은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계; 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및 상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하여 감각신경성 난청 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[57] 상기 치료하는 방법은 상기 조성물을 개체로부터 분리된 유전체의 DNA와 접촉시켜 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함한다. 상기 조성물 또는 변이에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[58] 일 양상에 따른 키트 또는 조성물을 이용하여 POLD1 유전자의 변이를 높은 민감도와 정확도로 분석할 수 있으며, 이러한 분석 결과를 바탕으로 감각신경성 난청을 효율적으로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[59] 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.

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

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

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

발명의 실시를 위한 형태

[63] 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.

[64]

[65] 실시예 1: 실험 개체 선택

[66] 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.

[67] 청각 장애가 있는 한국인 개체에서 돌연변이의 유병률을 측정하기 위해서, 상염색체 열성 방식으로 또는 산발적으로 분리된 비중후군 감각신경성 난청(nonsyndromic sensorineural hearing loss: NS-SNHL)을 갖는 개체를 찾기 위하여, 나이 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.

[68] 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 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.

[69]

[70] 실시예 2: 분자 유전 스크리닝

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

[72] 발달 장애를 나타내지 않는 중증도 감각신경성 난청(sensorineural 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.

- [73] 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.

[74]

[75] [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)
<i>LYS</i> <i>MD</i> <i>3</i>	nonsynony mous SNV	NM_1 98273	3	c.C569G	p.T190 R	Confi rmed	+	+	+	
<i>LYS</i> <i>MD</i> <i>3</i>	nonsynony mous SNV	NM_1 98273	3	c.T415G	p.S139 A	Confi rmed	+	+	+	
<i>HIV</i> <i>EP</i> <i>1</i>	nonsynony mous SNV	NM_0 02114	4	c.A778G	p.T260 A	Confi rmed	+	-	+	
<i>HIV</i> <i>EP</i> <i>1</i>	nonsynony mous SNV	NM_0 02114	4	c.A1570 G	p.N524 D	Confi rmed	+	-	+	
<i>OR</i> <i>2W</i> <i>1</i>	nonframes hift deletion	NM_0 30903	1	c.747_74 9delTAT	p.M25 0del	Confi rmed	+	+	-	
<i>OR</i> <i>2W</i> <i>1</i>	nonsynony mous SNV	NM_0 30903	1	c.C746A	p.S249 Y	Confi rmed	+	+	-	
<i>RH</i> <i>OB</i> <i>TB2</i>	nonsynony mous SNV	NM_0 01160 037	5	c.G751T	p.V251 L	Confi rmed	+	+	-	
<i>RH</i> <i>OB</i> <i>TB2</i>	nonsynony mous SNV	NM_0 01160 037	6	c.G1597 A	p.A533 T	Confi rmed	+	+	-	
<i>AT</i> <i>AD</i> <i>2</i>	nonframes hift deletion	NM_0 14109	7	c.828_83 3delTG ATGA	p.D276 _D277 del	Confi rmed				

AT AD 2	nonframes hift deletion	NM_0 14109	7	c.807_81 8del	p.D269 _D272 del	Fail ed				
PO LD 1	frameshift deletion	NM_0 01256 849	5	c.584_58 5delGA	p.S197 HfsX5 4	Confir med	+	-	-	+
PO LD 1	nonsynony mous SNV	NM_0 01256 849	27	c.G3298 A	p.G110 0R	Confir med	+	+	-	+

[76] 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.

[77] 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.

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

[79] [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

[80] 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.

[81] 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.

[82] 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.

[83]

[84] 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.

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

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

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

[88] 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.

[89]

[90] **실시예 3: 대사적인 특성 검사**

[91] 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.

[92] 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.

[93] [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

[94] 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.

[95] 따라서, POLD1 유전자의 변이, 구체적으로 p.S197HfsX54 또는 p.G1100R 변이를 갖는 경우 증후군성 특징을 나타내지 않는 비증후군 감각신경성 난청이 발병하는 것으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

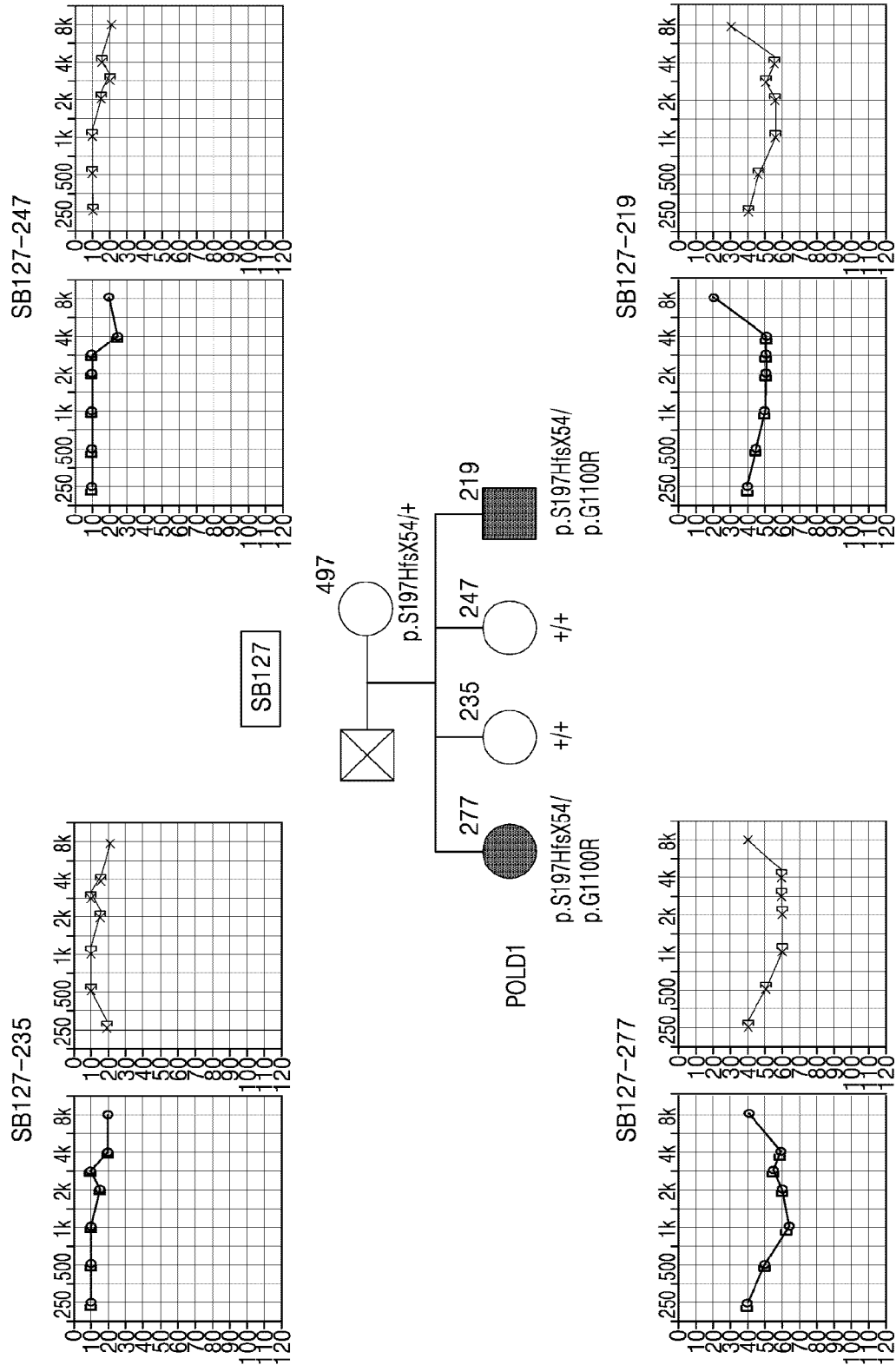
청구범위

- [청구항 1] POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 키트.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 유전자의 카피 수의 변이 또는 뉴클레오티드 서열의 변이를 포함하는 것인 진단용 키트.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열의 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 치환, 삽입, 결실, 또는 전좌를 포함하는 것인 진단용 키트.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 변이는 POLD1의 활성 도메인인 DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 엑소뉴클리아제(exonuclease)의 변이가 아닌 것인 진단용 키트.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 변이는 열성 변이인 것인 진단용 키트.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 변이는 p.S197HfsX54 또는 p.G1100R인 것인 진단용 키트.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 길이가 10 내지 100개의 뉴클레오티드인 것인 진단용 키트.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 감각신경성 난청은 비증후군성 감각신경성 난청(Non Syndromal sensorineural hearing loss: NS-SNHL)인 것인 진단용 키트.
- [청구항 9] POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단용 조성물.
- [청구항 10] 청구항 9의 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계;
상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및
상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환의 진단에 관한 정보를 제공하기 위하여 유전체 DNA의 변이를 검출하는 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 유전체 DNA의 변이는 표준 유전체 DNA에 대하여 유전자의 카피 수의 변이 또는 뉴클레오티드 서열의 변이를

포함하는 것인 방법.

- [청구항 12] 청구항 10에 있어서, 상기 유전체 DNA의 변이는 단일 뉴클레오티드 변이, 삽입-결실 변이, 복제수 변이 및 전좌로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 13] 청구항 10에 있어서, 상기 유전체 DNA의 변이는 p.S197HfsX54 또는 p.G1100R인 것인 방법.
- [청구항 14] 청구항 10에 있어서, 상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계 전에, 접촉시키는 단계에서 얻어진 접촉 산물로부터 상기 유전체 DNA와 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 분리하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.
- [청구항 15] POLD1 유전자의 변이를 검출하기 위하여 POLD1 유전자의 엑손 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물의 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 용도.
- [청구항 16] 청구항 9의 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계;
상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및
상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.
- [청구항 17] 청구항 9의 조성물을 개체로부터 분리된 유전체 DNA와 접촉시켜, 상기 유전체 DNA와 상기 조성물 중의 상기 폴리뉴클레오티드의 혼성화 산물을 얻는 단계;
상기 혼성화 산물 중의 상기 유전체 DNA의 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 및
상기 유전체 DNA의 확인된 뉴클레오티드 서열을 표준 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 상기 유전체 DNA의 변이를 확인하는 단계를 포함하는 감각신경성 난청 질환을 진단하여 감각신경성 난청 질환을 치료하는 방법.

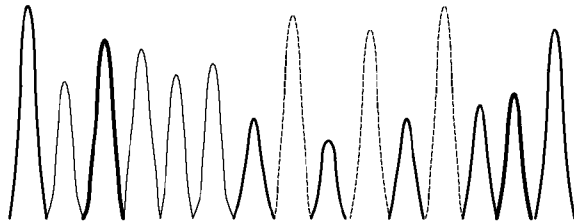
[도1]



[도2a]

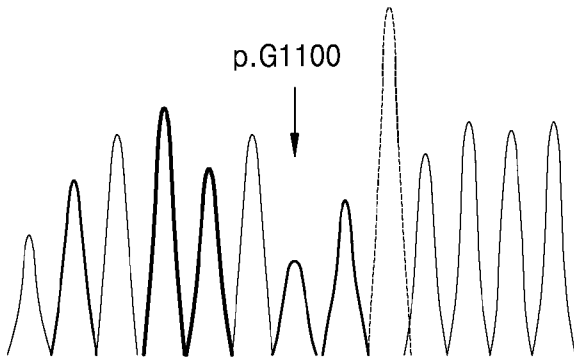
G C T C C C G A G A G A G T G

c.584_585GA



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

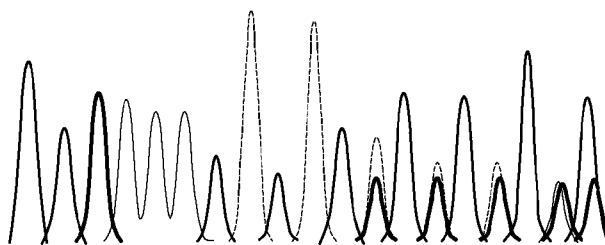
p.G1100



[도2b]

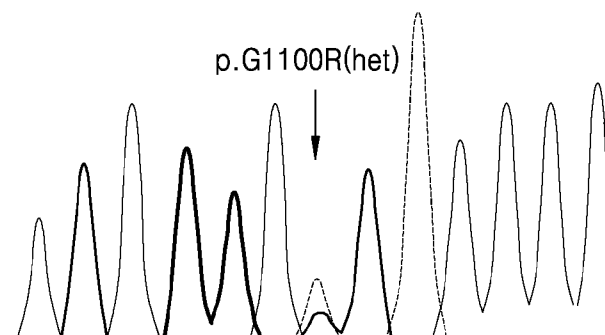
G C T C C C G A G A G A G A G T G T G

c.584_585delGA(het)

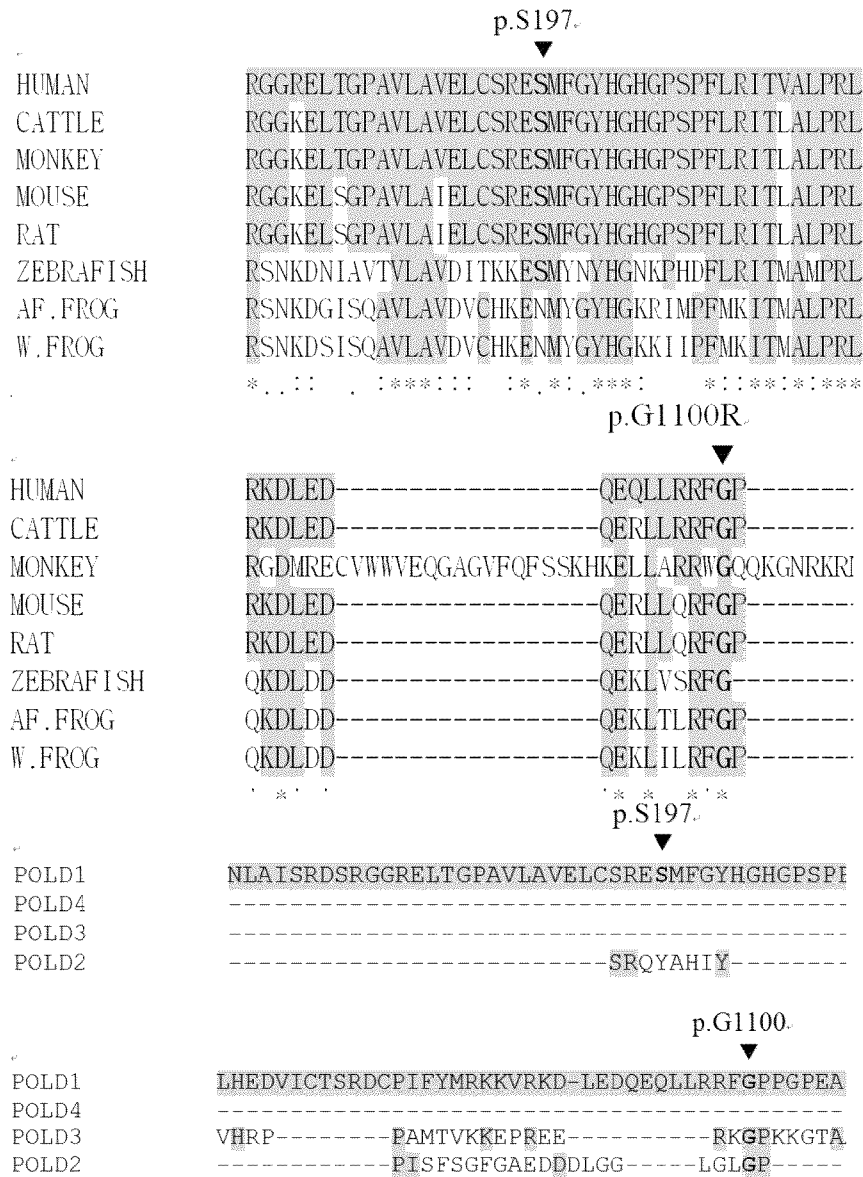


C G C T T C A G A C C C C

p.G1100R(het)



[도2c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/003062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)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

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 gene, sensorineural deafness disease, p.S197HfsX54, p.G1100R, diagnosis, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PELOSINI, Caterina et al., "Identification of a Novel Mutation in the Polymerase Delta 1 (POLD1) Gene in a Lipodystrophic Patient Affected by Mandibular Hypoplasia, Deafness, Progeroid Features (MDPL) Syndrome", Metabolism-Clinical and Experimental, 2014, vol. 63, pages 1385-1389 See abstract; page 1386; and figure 1.	1-5,7-12,14-17
A		6,13
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, August 2013, vol. 45, no. 8, pages 947-950 See abstract; pages 948-949; and figure 2.	1-5,7-12,14-17
A	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 abstract; pages 1075, 1077-1078; and figure 1.	1-17
A	NICOLAS, Emmanuelle et al., "POLD1: Central Mediator of DNA Replication and Repair, and Implication in Cancer and other Pathologies", Gene, 2016, vol. 590, pages 128-141 See abstract; pages 133-136; and figure 3.	1-17



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

29 JUNE 2018 (29.06.2018)

Date of mailing of the international search report

29 JUNE 2018 (29.06.2018)

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

International application No.

PCT/KR2018/003062

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PALLES, Claire et al., "Germline Mutations Affecting the Proofreading Domains of POLE and POLD1 Predispose to Colorectal Adenomas and Carcinomas", Nature Genetics, February 2013, vol. 45, no. 2, pages 136-144 See pages 136, 139-142; and figure 2.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/003062

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883

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 유전자, 감각신경성 난청 질환, p.S197HfsX54, p.G1100R, 진단, 키트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PELOSINI, CATERINA 등, 'Identification of a novel mutation in the polymerase delta 1 (POLD1) gene in a lipodystrophic patient affected by mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features (MDPL) syndrome', Metabolism-Clinical and Experimental, 2014, 63권, 페이지 1385-1389 요약; 페이지 1386; 및 도면 1 참조.	1-5, 7-12, 14-17
A		6, 13
X	WEEDON, MICHAEL N 등, 'An in-frame deletion at the polymerase active site of POLD1 causes a multisystem disorder with lipodystrophy', Nature Genetics, 2013.08, 45권, 8호, 페이지 947-950 요약; 페이지 948-949; 및 도면 2 참조.	1-5, 7-12, 14-17
A	LESSEL, DAVOR 등, 'POLD1 germline mutations in patients initially diagnosed with Werner syndrome', Human Mutation, 2015, 36권, 11호, 페이지 1070-1079 요약; 페이지 1075, 1077-1078; 및 도면 1 참조.	1-17
A	NICOLAS, EMMANUELLE 등, 'POLD1: Central mediator of DNA replication and repair, and implication in cancer and other pathologies', Gene, 2016, 590권, 페이지 128-141 요약; 페이지 133-136; 및 도면 3 참조.	1-17

☒ 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 29일 (29.06.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 06월 29일 (29.06.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

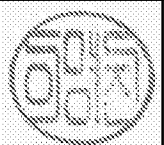
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이명진

전화번호 +82-42-481-8474



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PALLES, CLAIRE 등, ‘Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas’ , Nature Genetics, 2013.02, 45권, 2호, 페이지 136-144 페이지 136, 139-142; 및 도면 2 참조.	1-17

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음