(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월09일
(11) 등록번호 10-1836929
(24) 등록일자 2018년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/536* (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0122072
(22) 출원일자 2016년09월23일
심사청구일자 2016년09월23일
(56) 선행기술조사문헌
Growth Differentiation Factor 15 as a useful Biomarker for Mitochondrial Disorders (ANN NEUROL., (2015), 78, pp 814-823.)*
서열번호 1의 아미노산 서열 블라스트 결과 (GenBank : AAH00529.1)*
KR1020150004206 A*
US20080119909 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최진웅
대전광역시 유성구 대덕대로 598 (도룡동, 더포엠2) 302호
박용호
대전광역시 서구 둔산북로 175 (둔산동, 햇님아파트) 6-902
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

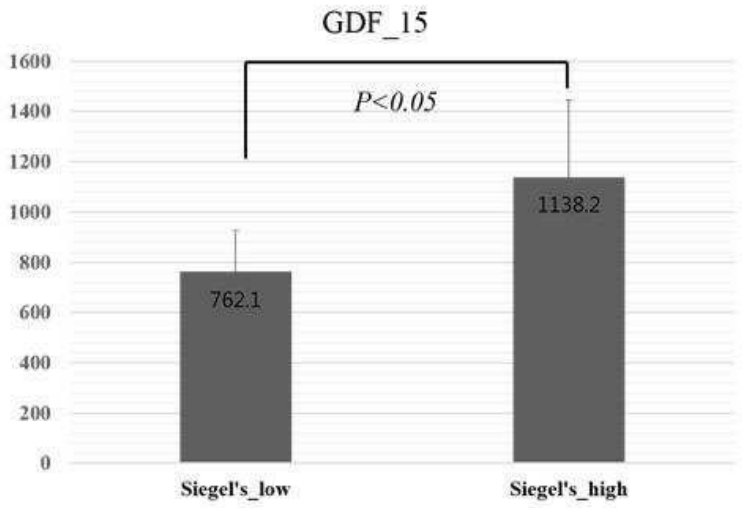
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **GDF15 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트**

(57) 요 약

본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 GDF15 단백질의 혈중 농도가 돌발성 난청 환자군에서 난청의 정도와 유의한 상관관계를 보이고, 돌발성 난청의 치료 결과(예후)와 비교하였을 때 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명의 GDF15 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트는 돌발성 난청 예후의 예측 및 평가에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/536 (2013.01)
G01N 33/577 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/14 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)
(72) 발명자
김군순
대전광역시 서구 관저로 83 (관저동, 신선마을 아파트) 211-1404

정효균
대전광역시 중구 수침로 122(태평동, 푸른뫼아파트) 101-602

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01060529
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분기초연구지원사업(기본연구)
연구과제명 골격근 유래 미토콘드리아 기능이상이 골대사에 미치는 영향에 연구
기 여 율 20/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2058889
부처명 교육부(한국연구재단)
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)
연구과제명 당뇨병 전환/진행에서 미토콘드리아 기능조절분석
기 여 율 20/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01018881
부처명 교육부(한국연구재단)
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구-지역대학우수과학자
연구과제명 당뇨질환에 동반되는 난청에 대한 분자기전적 연구
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.12 ~ 2018.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1A2A1A13000951
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업 ; 도약후속연구(전략연구)
연구과제명 미토콘드리아 OXPHOS 단백질의 번역조절기전을 기반으로 하는 당뇨병 제어
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 GDF15(growth differentiation factor 15)단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 진단 또는 치료 예후 분석용 키트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제제는 GDF15 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브, 또는 GDF15 단백질에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 돌발성 난청 진단 또는 치료예후 분석용 키트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항체는 다클론 항체 또는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 돌발성 난청 진단 또는 치료 예후 분석용 키트.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 키트는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, ELISA 키트 및 면역학적 도트 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 돌발성 난청 진단 또는 치료 예후 분석용 키트.

청구항 6

1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 GDF15(growth differentiation factor 15) 단백질의 농도를 측정하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 GDF15 단백질의 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, 돌발성 난청의 치료 예후가 좋지 않은 것으로 판정하는 단계를 포함하는 돌발성 난청의 정보를 제공하기 위한 시료 내 GDF15 단백질의 농도 측정 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 돌발성 난청의 정보를 제공하기 위한 시료 내 GDF15 단백질의 농도 측정 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 단계 2)의 측정은 GDF15 단백질에 특이적인 항체 및 시료 내 GDF15 단백질의 항원-항체 반응을 측정하는 방법 또는 항원-항체 복합체에 검출제를 처리한 후 검출체의 양을 측정하는 방법으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 돌발성 난청의 정보를 제공하기 위한 시료 내 GDF15 단백질의 농도 측정 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 단계 2)의 측정은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역염색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 돌발성 난청의 정보를 제공하기 위한 시료 내 GDF15 단백질의 농도 측정 방법.

청구항 11

1) 시험관 내(*In vitro*)에서 피검시료를 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 GDF15(growth differentiation factor 15) 단백질에 처리하는 단계; 및

2) 상기 GDF15 단백질을 분해시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 12

1) 피검시료를 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 GDF15(growth differentiation factor 15) 단백질을 발현하는 세포에 처리하는 단계; 및

2) 상기 세포에서 GDF15 단백질 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 GDF15(growth differentiation factor 15)단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 진단 및 치료 예후 분석용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] GDF15 (growth differentiation factor 15)단백질은 형질전환 생장인자(transforming growth factor ß(TGF-ß))의 상과(上科(superfamily))에 속하는 사이토카인(cytokine)으로써, 다른 이름으로 macrophage inhibitory cytokine 1, placental TGF-ß, prostate-derived factor (PDF) 및 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activator gene 등으로 불리기도 한다. GDF15 단백질은 뇌, 대장, 골수 등의 조직에서는 낮게 발현되지만, 태반에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있고, 위암, 유방암, 대장암, 전립선암 등에서도 발현량이 높은 것으로 보고되었다.

[0003] 이렇듯 GDF15 단백질의 발현은 다양하지만, 정확한 작용기전이 알려진 바는 아직 많이 없다. 최근의 연구에 따르면, GDF15 단백질이 류마티스 관절염과 같은 만성 염증상태에서 농도가 상승되어 있었으며, 심장에서 PI3K-Akt 신호전달에서의 항-아팝토시스(anti-apoptotic)효과 및 SMAD 2/3 신호전달을 통한 항-비대(anti-hypertrophic)효과 등에도 GDF15 단백질이 연관이 있다는 보고가 있다. 또한, 암과 관련해서는 두 가지의 상반된 연구 결과가 존재하여, 암의 진행과 연관되어 있다는 보고 및 암 억제 경로(tumor suppressor pathway)인 p53과 GSK-3ß의 신호경로에 관여한다는 보고가 있다. 게다가, 신장에서 CCl4를 쥐에게 투여한 후나 허혈/재관

류(ischemia/reperfusion), 저산소증(hypoxia), 염증 및 자외선 노출 등 생체 대사의 스트레스(stress)후에 GDF15 단백질 농도가 급상승한다는 연구 결과도 보고된 바 있다.

[0004] 한편, 내이(inner ear)에는 코르티 기관이라는 청각 기관이 있어 내이질환이 있는 경우에 난청(hearing loss)이 발생한다. 이중 돌발성 난청(sudden sensorineural hearing loss)은 연속되는 3주파수에서 적어도 30dB 이상의 청력감소가 3일 이내에 갑자기 발생하는 것으로 인구 10만명 당 5 내지 20명 정도에서 발생하는 응급 내이질환 중 하나이며, 바이러스 감염 및 혈류 장애 등을 포함한 다양한 원인에 의해 발생할 수 있다.

[0005] 돌발성 난청청(sudden sensorineural hearing loss)은 특수 감각기관의 손상에 의해 발생하므로 다른 여러 질환들에 비해 예후(prognosis)가 불량하다. 치료의 시작이 늦거나 또는 환자가 고령이거나 소아의 경우 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다. 그러나 그 정확한 치료 시작시기 및 연령의 기준 등이 확립되어 있지 않아 환자마다 예후를 예측하는 데 큰 제한점이 있다. 또한 돌발성 난청의 발생 당시, 난청의 정도가 또한 예후인자로 작용할 수 있다고 알려져 있으나, 이 또한 청력감소의 기준이나 정도에 대해 정확히 통일된 기준이 존재하지 않아 실질적 적용에는 한계가 있는 실정이다.

[0006] 또한, 현재 난청의 치료 방법으로 보청기, 인공중이 및 인공와우 등을 활용한 다양한 청각재활의 방법이 있다. 성공적인 청각재활을 위해서는 양측의 청력 상태, 난청의 유형 및 난청의 유병기간 등이 중요한 고려사항인데, 특히 일측성 (unilateral)난청을 갖고 있던 환자가 나머지 다른 한쪽에 돌발성 난청이 발생하는 경우에, 그 회복 여부에 따라 청각재활의 방법 또한 달라져야 하기 때문에, 돌발성 난청 후 난청 회복의 여부를 미리 예측하는 것은 난청의 유병기간 및 청각재활 시기를 단축할 수 있다는 점에서 매우 중요하며, 또한 청각재활 방법의 선택에 있어서도 큰 도움을 준다.

[0007] 그러므로, 임상적으로 적절한 청각재활의 시기 및 방법을 선택함에 있어 돌발성 난청의 예후를 예측할 수 있는 마커(marker)의 개발이 절실하나, 현재까지는 돌발성 난청의 예후를 예측할 수 있는 객관적인 마커가 존재하지 않는 실정이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 돌발성 난청의 예후인자 및 질병의 심화 정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여 노력하던 중, GDF15(growth differentiation factor 15) 단백질의 농도가 기존에 돌발성 난청의 예후 인자로 알려진 '발병당시 의 난청의 정도'와 유의한 상관관계를 보이고, 3개월 후의 추적검사에서 GDF15 단백질의 농도가 '발병당시의 난청의 정도'보다 청력 회복율(예후)과 더 높은 민감성 및 특이성을 가짐을 최종 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 GDF15(Growth differentiation factor 15)단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 진단 또는 치료 예후 분석용 키트를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15)단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은,

[0012] 1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 GDF15 단백질의 농도를 측정하는 단계; 및

[0013] 2) 상기 단계 1)의 GDF15 단백질의 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, 돌발성 난청의 위험 정도가 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은,

[0015] 1) 시험관 내(*In vitro*)에서 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및

[0016] 2) 상기 GDF15 단백질을 저감시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은,

[0018] 1) 피검시료를 GDF15 단백질 발현 세포에 처리하는 단계; 및

[0019] 2) 상기 세포에서 GDF15 단백질 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트에 관한 것으로, 구체적으로는 GDF15 단백질의 혈중 농도가 돌발성 난청 환자군에서 난청의 정도와 유의한 상관관계를 보이고, 돌발성 난청의 치료 결과(예후)와 비교하였을 때 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명의 GDF15 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트는 돌발성 난청의 예후 평가에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 연구에 포함된 돌발성 난청 환자들의 나이, 성별, 돌발성 난청 방향, 발병 당시 측정된 평균 청력 및 치료 후 3개월이 경과되어 측정된 평균 청력의 값을 나타낸 도이다(dB HL: decibel hearing level/hearing threshold average):

M: 남자 (male);

F: 여자 (female);

R: 우측 (right); 및

L: 좌측 (left).

도 2는 돌발성 난청환자들과 정상 대조군에서의 GDF15 단백질 혈중 농도 평균 수치를 나타낸 도이다($p < 0.05$).

도 3은 돌발성 난청의 치료 후 예후가 좋은 군 및 나쁜 군에서의 GDF15 단백질 혈중 농도의 평균값을 비교한 후 통계적인 유의성을 나타낸 도이다($p < 0.05$):

Siegel's low(Siegel's Criteria Low): 돌발성 난청 치료의 예후가 좋은 군 (완전회복 및 부분회복을 보인 군); 및

Siegel's high(Siegel's Criteria High): 돌발성 난청 치료의 예후가 나쁜 군 (약간의 회복 및 회복을 보이지 않은 군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 진단 또는 치료 예후 분석용 키트를 제공한다.

[0024] 상기 GDF15(Growth differentiation factor 15) 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0025] 상기 제제는 GDF15 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브, 또는 GDF15 단백질에 대한 항체인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0026] 상기 항체는 다클론항체 또는 단일클론항체인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0027] 다클론 항체는 당업자에 알려진 종래 방법에 따라 면역원(antigen)으로 GDF15 단백질 또는 그의 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 이러한 외부 숙주로는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 예로 들 수 있으며, 면역원은 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 근육내, 복강내 또는 피하 주사 등의 방법으로 투여되어 외부 숙주를 면역화시킨다. 면역화된 외부 숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정제하여 GDF15 단백질에 특이적인 다클론 항체를 제조할 수 있다.

[0028] 단클론 항체는 당업자에 알려진 융합(fusion)에 의한 불멸화된 세포주 생성방법(Kohler G et al., Nature, 256:495-497, 1975)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법을 간략히 설명하면, 먼저 순수한 GDF15 단백질 또는 그의 단편으로 마우스를 면역시키거나, 이의 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역시킨다. 면역이 된 마우스로부터 분리한 항체-생산 B 임파구를 인간 또는 마우스의 골수종세포와 융합하여 불멸화된 하이브리도마 세포를 생성한다. 이어, 효소면역분석법(ELISA; Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)으로 하이브리도마 세포의 단클론 항체의 생성 여부를 조사하여 양성 클론을 선발하고 이를 배양한 후 항체를 분리, 정제하거나 쥐의 복강에 주입한 후 복수를 채취하여 GDF15 단백질에 특이적인 단클론 항체를 제조할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 GDF15 단백질의 검출에 사용되는 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 결합능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등이 있다.

[0030] 상기 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지로 제작된 웰플레이트, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리비닐, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다. 또한, 개체로부터 수득된 시료를 고형 기질에 결합된 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 키트는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, ELISA(효소-면역화학검출법) 키트 및 면역학적 도트 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0032] 상기 발명의 키트는 추가로 상기 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 포함할 수 있다. 상기 검출체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등으로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 바람직하게는 상기 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체일 것이다. 예를 들어, 상기 발색효소는 퍼록시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)[예: 양고추냉이 퍼록시다제(horseradish peroxidase)]일 수 있고; 형광물질인 경우, 콜로이드 골드(Coloid gold), 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일,4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 등을 사용하는 것이 가능하나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 아울러, 본 발명의 키트는 상기 항원항체 복합체의 항원항체 반응을 측정하는 방법 또는 상기 항원항체 복합체에 검출체를 처리한 후 검출체의 양을 측정함으로써 돌발성 난청을 진단할 수 있다. 상기 항원항체 반응으로서 효소면역측정법 (ELISA), 면역침강법, 형광면역법, 효소기질발색법, 항원항체응집법 등을 들 수 있고, 검출체의 양 측정이나 존재 검출은 발색, 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통해 이루어질 수 있다.

[0034] 상기 검출체의 양을 탐색하는 방법으로는 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용하는 것이 바람직하고, 여기에는 검출체에 결합된 발색효소의 발색을 유도하는 기질을 처리하여 발색반응을 측정하는

방법; 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법; 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0035] 예를 들어 발색을 유도하는 기질은 발색효소에 따라 선택하여 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD (o-phenylenediamine) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색제 기질은 완충용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 검출체에 결합된 발색효소에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고 그 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 GDF15 단백질의 존재 유무를 검출한다. 또한, 상기 형광법은 형광 스캐너 프로그램을 이용하여 상기 형광물질로 라벨링된 검출체를 스포팅하여 신호를 확인하는 방법으로, 이 방법을 적용하여 결합 정도를 확인할 수 있다. 상기 SPR 시스템은 형광법과는 달리 시료를 형광물질로 표지할 필요가 없이 항체의 결합 정도를 실시간으로 분석하는 것이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다. SPRI의 경우에는 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있다.

[0036] 본 발명의 키트는 상기 항원항체 결합 반응 및 검출체의 결합반응 후, 남은 물질들을 제거하기 위한 세척액을 추가로 포함할 수 있다. 상기 세척액은 인산염 완충용액, NaCl 및 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20(Tween 20)으로 구성된 완충용액(PBST)이 더욱 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 세척액은 항원항체 결합반응 후 항원항체 결합체에 검출체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지용액은 바람직하게는 황산 용액(H2SO4)이 사용될 수 있으나, 이이 제한되지는 않는다.

[0037] 또한, 본 발명의 키트는 GDF15 단백질 표준 항원을 포함하는 양성 대조군과 상기 항원이 주입되지 않은 동물의 항혈청을 포함하는 음성 대조군을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예 및 실험예에서, 본 발명자들은 돌발성 난청 예후인자 및 질병심화의 정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여, 돌발성 난청 환자를 선별하여 발병 당시의 청력 감소 정도 및 치료 후의 청력 회복 정도를 측정하였고(도 1 참조), 돌발성 난청 환자의 혈액 내 GDF15 단백질 농도가 정상 대조군의 것과 비교하여 유의하게 증가되어 있음을 확인하였으며(도 2 참조), 또한 돌발성 난청 치료 후의 청력 회복 결과와 혈액 내 GDF15 단백질 농도 수치가 유의한 상관관계를 보임을 확인하였다(도 3 참조).

[0039] 따라서, 본 발명의 GDF15 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 돌발성 난청 예후 분석용 키트는 돌발성 난청의 예후 분석 및 치료 결과의 예측인자로 유용하게 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은,

[0041] 1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 GDF15 단백질의 농도를 측정하는 단계; 및

[0042] 2) 상기 단계 1)의 GDF15 단백질의 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, 돌발성 난청의 치료 예후가 좋지 않은 것으로 판정하는 단계를 포함하는 돌발성 난청의 정보를 제공하기 위한 시료 내 GDF15 단백질의 농도 측정 방법을 제공한다.

[0043] 상기의 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나, 이제 한정되지는 않는다.

[0044] 상기의 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] 상기 단계 2)의 측정은 GDF15 단백질에 특이적인 항체 및 시료 내 GDF15 단백질의 항원-항체 반응을 측정하는 방법 또는 항원-항체 복합체에 검출제를 처리한 후 검출체의 양을 측정하는 방법으로 이루어지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0046] 상기의 측정은 효소-면역화학검출법(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)), 비색법(colorimetric

method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역염색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0047] 또한, 본 발명은,

[0048] 1) 시험관 내(*In vitro*)에서 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및

[0049] 2) 상기 GDF15 단백질을 분해시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0050] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 피검시료는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 비펩티드성 화합물, 활성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액, 혈액, 혈장, 혈청,항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0051] 또한, 상기 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소-면역화학검출법(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 당업자에게 알려진 단백질의 발현량 및 활성 정도를 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다.

[0052] 아울러, 본 발명은,

[0053] 1) 피검시료를 GDF15 단백질 발현 세포에 처리하는 단계; 및

[0054] 2) 상기 세포에서 GDF15 단백질 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, 돌발성 난청의 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0055] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 피검시료는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 비펩티드성 화합물, 활성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액, 혈액, 혈장, 혈청,항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0056] 또한, 상기 단계 2)의 GDF15 단백질의 발현 정도는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합 효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏(western blotting), 효소면역화학검출법(ELISA)(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직 면역염색(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(FluorescenceActivated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 상기 유전자들의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합 효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명에서 시연 가능한 키트는 마이크로 어레이(micro array)를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 마이크로 어레이 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있으며, 본 발명의 유전자를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로 어레이를 제작하기 위해서, 상기 탐색된 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로 피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의

스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다. 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-Llysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 또한, 본 발명에서 시연 가능한 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<실시예 1> 돌발성 난청 환자의 선별 및 청력 검사 결과 추이 확인**

[0063] 본 발명자들은 돌발성 난청 예후인자 및 질병의 심화 정도를 확인하는 바이오 마커의 개발에 앞서, 진단을 통해 돌발성 난청 환자를 선별하여 기본 정보를 분석하고 청력 검사 결과의 추이를 알아보고자 하였다.

[0064] 구체적으로, 2015년 12월 1일부터 2016년 3월 30일까지 청력 검사 및 측두골 영상촬영을 통해 특발성 돌발성 난청으로 진단된 환자들을 전향적으로 모집하였다. 포함된 모든 환자는 청력검사 후 외래 진료 당시에 인체자원의 제공에 대한 서면동의를 하였고, 충남대학교병원 임상시험심사위원회에 의하여 승인되었다. 환자의 나이, 성별, 과거력, 혈액 검사결과 및 청력검사는 의무기록을 통해 분석하였으며 치료 후 약 3개월 뒤의 최종 청력을 분석하고자 하였다. 특히, 청력검사는 ANSI (american national standards institute)의 표준에 따라 보정(calibration)된 순음 청력검사 기계를 이용하여 측정하였다.

[0065] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 환자의 연령은 평균 45.5 ± 15.2세였으며, 남성은 20명으로 66.7%를 차지하였다. 돌발성 난청의 방향은 우측 귀 및 좌측 귀가 각각 15 예로 같았다. 난청의 평균 역치는 4분법에 따라 치료 전 54.9 ± 32.7dB HL(decibel hearing level/hearing threshold average), 치료 후(치료 후 약 3개월 경과) 33.5 ± 31.8dB HL이었고, 6분법으로 계산을 했을 때는 치료 전 55.5 ± 32.7dB HL, 치료 후(치료 후 약 3개월 경과) 34.3 ± 32.4dB HL 이었다(도 1).

[0066] **<실험예 1> 돌발성 난청 환자와 정상 대조군의 혈중 GDF15 단백질 농도 비교**

[0067] 본 발명자들은 상기 <실시예 1>에서 선별한 돌발성 난청 환자군의 혈액 샘플을 확보하여 혈중 GDF15 단백질의 농도를 분석한 후 정상 대조군(정상 청력)에서의 결과와 비교하고자, 효소-면역화학검출법인 엘라이자(ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay))를 다음과 같이 수행하였다(충남대학교병원 IRB-2015-12-002, 돌발성 난청과 GDF15과의 상관관계 분석).

[0068] 2015년 12월 1일부터 2016년 3월 30일까지 청력 검사 및 측두골 영상촬영을 통해 특발성 돌발성 난청으로 진단된 환자들의 치료 전의 혈액을 채혈하였으며, 채취된 혈액샘플은 혈장 형태로 충남대학교 병원 인체자원은행 내에 있는 보관실에서 -70℃로 보관한 뒤 실험에 사용하였다.

[0069] 혈액 샘플 속 GDF15 단백질의 농도를 측정하기 위하여, 혈액 샘플은 원심분리 후 혈청을 분리하여 사용하였으며, 우선 GDF15 단백질에 특이적인 포집 항체를 96-웰 플레이트(well plate)에 24시간 처리하여 코팅하였다. 다음으로, 비특이적 결합을 억제하기 위하여 웰 당 200 ㎕의 블로킹 용액[0.1% BSA (Bovine serum albumin), 0.02% 티메로살(Thimerosal)이 포함된 PBS]을 상온에서 2시간 처리하였다. 2시간 후, 각 웰(well)을 워싱(washing)용액[0.02% Thimerosal, 0.05% 트윈-20(Tween-20)이 포함된 PBS]으로 5번 세척처리한 후, 항체가 코팅된 플레이트(plate)에 1차 항체 50 ㎕를 넣은 다음, 다시 세포배양 상층액을 50 ㎕ 넣고 실온에서 2시간 동안 방치하여 5번 세척처리하였다. 이어 streptavidine-HRP 용액 100 ㎕씩을 넣고 실온에서 30분간 방치한 다음 퍼옥시데이즈 발색을 위하여 3,3'-5,5' tetramethylbenzidine(TMB) 기질(substrate)용액 100 ㎕씩을 넣어 상

온에서 10분간 반응시킨 후, 정지용액을 넣어 450 nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다. 각 실험을 세 번 반복하여 평균치를 값으로 구한 뒤, 정상 대조군(정상 청력)에서의 평균값과 비교하였다.

[0070] 그 결과, 돌발성 난청 환자군(치료 전)의 경우, GDF15 단백질의 평균 혈중 농도가 902.4 ± 719.5 pg/ml이었고 정상 대조군인 정상 청력을 갖는 군에서의 GDF15 단백질 평균 혈중 농도는 443.3 ± 118.2 pg/ml으로, 도 2에 나타낸 바와 같이, 돌발성 난청 환자군에서 GDF15 단백질의 혈중 농도가 유의적으로 높게 나타남을 확인하였다(도 2)($p < 0.05$).

표 1

[0071]

서열번호	서열
GDF15 (서열번호 1)	RRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK PDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0072] **<실험예 2> 돌발성 난청 환자의 치료 결과(예후)와 GDF15 단백질 혈중 농도 의 상관관계 분석**

[0073] 본 발명자들은 돌발성 난청의 치료 결과(예후)와 혈중 GDF15 단백질 농도의 직접적인 상관관계를 알아보기 위해, 돌발성 난청의 치료 후 약 3개월 뒤에 다시 얻은 GDF15 단백질 혈중 농도 측정 결과 및 최종 청력 측정 데이터를 함께 분석하고자 하였다.

[0074] 이를 위하여, 상기 <실험예 1>의 돌발성 난청 환자군에서 난청 질환의 치료 후 약 3개월이 지났을 때, 혈액 샘플을 다시 채취하였으며, 이때 최종 청력 검사 를 동시에 수행하였다(실시예 1 참조). 혈중 GDF15 단백질의 농도는 상기 <실험예 1>에서와 같은 방법인 효소-면역화학검출법(ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay))를 통해 분석하였다.

[0075] 아울러, 돌발성 난청환자의 치료 결과(예후)에 따라, 치료 결과가 좋은 군과 치료결과가 나쁜 군 간의 GDF15 단백질의 혈중 농도 수치를 나누어 비교하고자 하였다. 치료 결과의 판정으로는 Siegel’s Criteria를 기준으로 하였다. Siegel’s Criteria에 따라 30dB 이상의 청력 호전이 있으면서 최종 청력이 25dB 이내인 군 (complete recovery)과 15dB 이상의 청력 호전을 보이면서 최종 청력이 25dB 이상 45dB 미만인 군(partial recovery)을 Siegel’s Criteria Low 군으로 선정하고, 15dB 이상의 청력호전을 보이지만 최종 청력이 45dB 이하인 경우(slight improvement)와 15dB 미만의 청력 호전을 보이거나 최종 청력이 75dB 보다 나쁜 경우(no improvement)를 Siegel’s Criteria High 군으로 선정하여 비교하였다.

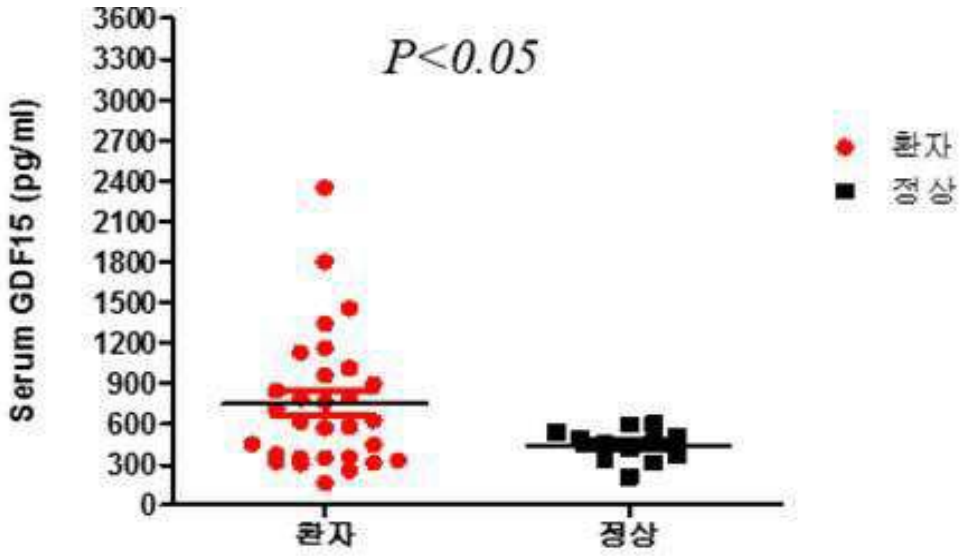
[0076] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 치료 결과가 좋은 군(Siegel’s Criteria Low)의 GDF15 단백질 혈중 농도는 762.1 ± 163.5 pg/ml 이었고 치료 결과가 나쁜 군(Siegel’s Criteria High)의 GDF15 단백질 혈중 농도는 1138.2 ± 306.3 pg/ml으로, 돌발성 난청의 치료 결과(예후)가 비교적 좋지 않은 그룹에서GDF15 단백질의 혈중 농도가 유의적으로 높게 나타남을 확인하였다(도 3)($p < 0.05$).

도면

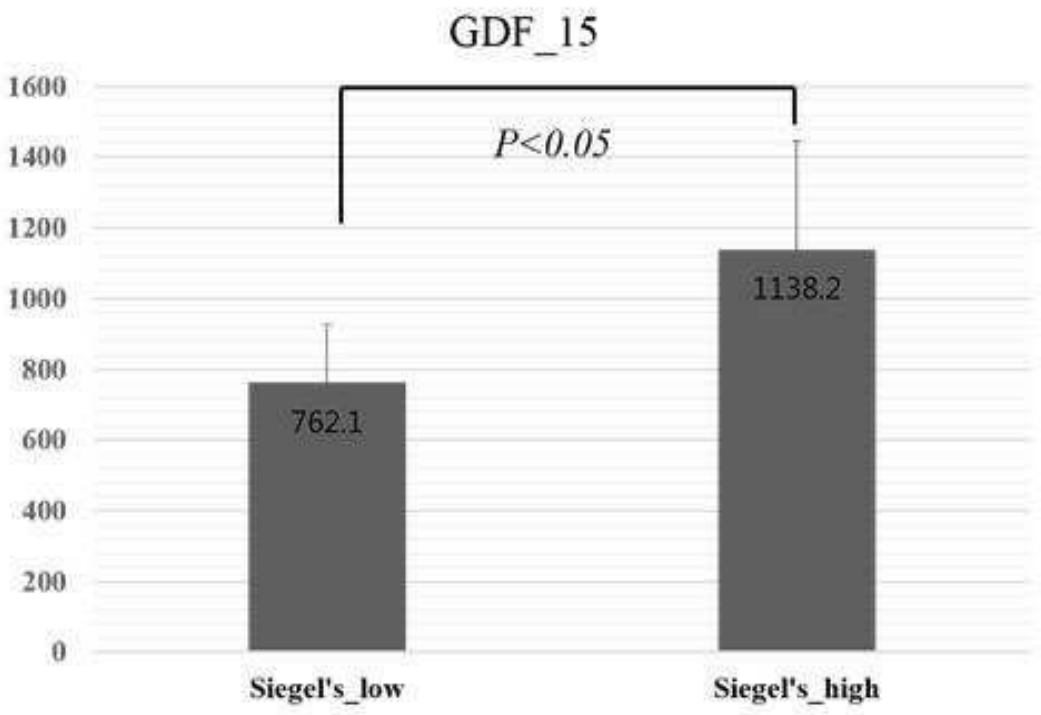
도면1

	N=30
Age (mean ± SD)	45.5 ± 15.2
Gender (M:F)	20 : 10
Side (R:L)	15 : 15
Hearing threshold average (dB HL) (4분법)	
Pre-treatment	54.9 ± 32.7
Post-treatment	33.5 ± 31.8
Hearing threshold average (dB HL) (6분법)	
Pre-treatment	55.5 ± 32.7
Post-treatment	34.3 ± 32.4

도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Chungnam National University - Industry Collaboration Foundation

<120> A kit for Prognostic Analysis of Sudden Sensorineural Hearing Loss, including agent measuring the GDF15 expression level

<130> 2016P-09-036

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GDF15

<400> 1

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
1 5 10 15

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Cys His Cys Ile

115