(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0028417
(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0109391
(22) 출원일자 2020년08월28일
심사청구일자 2020년08월28일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
조호찬
대구광역시 수성구 지범로 21-3(두산동)
배윤위
대구광역시 달성군 다사읍 세천본길 45-11
박재형
대구광역시 수성구 들안로60길 7(수성동3가, 수성3가 화성파크드림 2단지)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 10 항

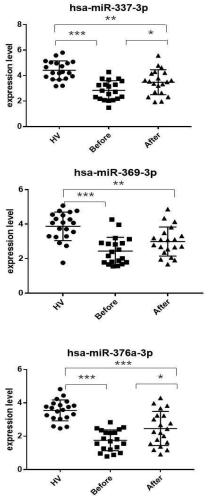
(54) 발명의 명칭 **당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 마이크로 RNA 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 마이크로 RNA 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에서는 정상군과 당뇨병 치료제인 SGLT2 억제제 투여 전후 당뇨병 환자군의 miRNA 프로파일을 비교하여 약물 반응성 예측 마커인 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p를 선별하였다. 선별된 마커들은 정상군과 당뇨병 환자군에서 발현패턴이 상이한 것으로 확인되었으나, 당뇨병 치료제인 SGLT2 억제제 복용에 의해 정상군과 유사하게 발현 패턴이 회복되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 마커는 당뇨치료제에 대한 약물 반응성 예측 마커로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031001
과제번호	HR18C0012
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성
연구과제명	다중진단칩 기반 당뇨병 및 당뇨병 합병증 이행예측
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 동산의료원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA)를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-337-3p는 서열번호 1의 염기서열로, miR-369-3p는 서열번호 2의 염기서열로, miR-376a-3p는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료제의 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제인 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료제의 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 바이오마커 조성물의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 발현수준을 측정하는 제제는 마이크로 RNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 바이오마커 조성물의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 진단키트.

청구항 8

(a) 당뇨병 치료제 투여 전후의 피검체 유래 생물학적 시료에서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 바이오마커 조성물의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 당뇨병 치료제 투여 전후의 마이크로 RNA 발현 수준을 비교하는 단계;

를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 당뇨병 치료제 투여 후, 상기 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 발현이 증가하면 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성이 우수하여 당뇨병 치료효과가 있는 것으로 것으로 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 마이크로 RNA(microRNA) 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측용 조성물 및 상기 바이오마커를 이용한 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨병(糖尿病; diabetes mellitus)은 인슐린 분비 또는 인슐린 작용의 결함에 의해 나타나는 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환으로 인슐린이 부족하거나 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과가 감소됨으로써 발생하게 되어 장기간 지속됨으로써 신부전과 같은 합병증을 동반하는 만성 퇴행성 질환이다.

[0004] 특히, 제2형 당뇨병은 운동부족, 비만 또는 스트레스 등에 의한 후천적 요인으로 인슐린의 분비 조절은 원활하나 인슐린이 제기능을 하지 못하여 혈당 조절이 실패하는 경우 발생한다.

[0005] 현재 급속한 경제발전에 따른 식생활의 변화로 당뇨병 유병율은 해마다 증가하여 국내의 경우 약 5 ~ 10%에 달하고 있으며, 2005년 통계 기준으로 당뇨병 환자는 400만 명을 넘어서 인구 100명 중 83명이며, 2025년에는 약 680만 명으로 늘어날 것으로 추산된다(대한당뇨정보센터, 2005년) 당뇨병은 전 세계적으로 3번째로 심각한 질병이며 우리나라에서도 사망원인 4위의 질병이고 다양한 합병증으로 인해 수명이 5 ~ 10년 정도 단축되게 된다.

[0006] 현재 알려진 제2형 당뇨병 치료제는 크게 4가지로 분류할 수 있는데, 인슐린의 분비를 유도하는 설포닐우레아(sulfonylureas)계 약물, 근육세포로 당을 이동시키고 간에서 당의 합성을 억제하는 효과를 나타내는 비구아니드(biguanides)계, 소장에서 포도당을 만드는 효소를 억제시키는 알파-글루코시다제(α-glucosidase) 저해제, 지방세포 분화에 관계되는 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptors)-γ를 활성화시키는 티아졸리디온(TZD, thiazolidinedione)계 약물 등이 있다 (Amir Babiker and Mohammed Al Dubayee et al., Sudan J Paediatr, 17(2): 11-20, 2017). 최근에는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제는 신장에서 포도당 재흡수를 억제해 소변으로 포도당을 배출시키는 방법으로 혈당을 조절하는 것으로 다른 다양한 당뇨병 약제와 작용 기전이 겹치지 않아 병용요법이 가능한 장점이 있다.

[0007] 그러나 이러한 경구용 혈당 강하제 약물은 저혈당증 유발(설포닐우레아계 약물), 신장독성(비구아니드계 약물), 유산증(비구아니드계 약물), 설사와 배탈(알파-글루코시다제저해제), 체중감소 등의 많은 부작용을 수반하는 문제점이 있다.

[0009] 이에, 본 발명에서는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성을 예측하여 약물의 부작용을 줄이고, 효과가 뛰어난 약물을 선별하여 치료할 수 있도록 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 바이오마커를 선별하고자 예의 노력한 결과, miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 마커를 선별하였다. 이들 마커는 정상군과 당뇨병 환자군에서 발현패턴이 상이한 것으로 확인되었으나, 당뇨병 치료제인 SGLT2 저해제 복용에 의해 정상군과 유사하게 발현 패턴이 회복되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 바이오마커를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측용 조성물 및 상기 바이오마커를 이용한 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오마커를 이용한 당뇨병 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상술한 목적을 달성하기 위해,

[0016] 본 발명은 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA)를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 miR-337-3p는 서열번호 1의 염기서열로, miR-369-3p는 서열번호 2의 염기서열로, miR-376a-3p는 서열번호 3의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0021] 다른 목적을 달성하기 위해,

[0022] 본 발명은 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 miR-337-3p는 서열번호 1의 염기서열로, miR-369-3p는 서열번호 2의 염기서열로, miR-376a-3p는 서열번호 3의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제일 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 발현수준을 측정하는 제제는 microRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물을 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 진단키트를 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 (a) 당뇨병 치료제 투여 전후의 피검체 유래 생물학적 시료에서 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 당뇨병 치료제 투여 전후의 microRNA 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 miR-337-3p는 서열번호 1의 염기서열로, miR-369-3p는 서열번호 2의 염기서열로, miR-376a-3p는 서열번호 3의 염기서열로 표시될 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 발현수준을 측정하는 제제는 microRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

[0032] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제일 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 당뇨병 치료제 투여 후, 상기 miR-337-3p, miR-369-3p 또는 miR-376a-3p 발현이 증가하면 당뇨병 치료제의 치료효과가 있는 것으로 정보를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에서는 정상군과 당뇨병 치료제인 SGLT2 억제제 투여 전후 당뇨병 환자군의 miRNA 프로파일을 비교하여 약물 반응성 예측 마커인 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p를 선별하였다. 선별된 마커들은 정상군과 당뇨병 환자군에서 발현패턴이 상이한 것으로 확인되었으나, 당뇨병 치료제인 SGLT2 억제제 복용에 의해 정상군과 유사하게 발현 패턴이 회복되는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 마커는 당뇨치료제에 대한 약물 반응성 예측 마커로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 정상군과 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군의 혈청에서 분리한 엑소좀 내 microRNA의 발현수준을 비교분석한 것으로, (A)는 정상군에 비해 당뇨병 환자군에서 유의적으로 2배 이상 발현이 감소 또는 증가한 microRNA의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, (B)는 정상군과 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군의 발현량 차이를 확인하기 위해 microRNA의 발현수준을 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 나타낸 결과이다.

도 2는 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군과 SGLT2 억제제 복용후 환자군의 혈청에서 분리한 엑소좀 내 microRNA의 발현수준을 비교분석한 것으로, (A)는 SGLT2 억제제 복용전 환자군에 비해 SGLT2 억제제 복용후 환자군에서 유의적으로 2배 이상 발현이 감소 또는 증가한 microRNA의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, (B)는 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군과 SGLT2 억제제 복용후 환자군의 발현량 차이를 확인하기 위해 microRNA의 발현수준을 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 나타낸 결과이다.

도 3은 정상군과 SGLT2 억제제 복용후 환자군의 혈청에서 분리한 엑소좀 내 microRNA의 발현수준을 비교분석한 것으로, (A)는 정상군에 비해 SGLT2 억제제 복용후 환자군에서 유의적으로 2배 이상 발현이 감소 또는 증가한 microRNA의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, (B)는 정상군과 SGLT2 억제제 복용후 환자군의 발현량 차이를 확인하기 위해 microRNA의 발현수준을 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 나타낸 결과이다.

도 4는 정상군(HV), SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군(Before)과 SGLT2 억제제 복용후 환자군(After) 간의 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p의 발현수준을 측정하여 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0041] 본 발명은 일관점에서, miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA)를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물반응성 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 miR-337-3p는 서열번호 1의 염기서열로 표시될수 있으며, 서열번호 1로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0044] 상기 miR-369-3p는 서열번호 2의 염기서열로 표시될 수 있으며, 서열번호 2로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 miR-376a-3p는 서열번호 3의 염기서열로 표시될 수 있으며, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제일 수 있다.

[0048] 본 발명의 구체적인 일구현예에서는, 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측을 위한 마커를 선별하고자 하였으며, 당뇨병 치료제로는 SGLT2 억제제를 이용하였으며, 정상군, SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 및 SGLT2 억제제 복용 후 당뇨병 환자군 각각의 혈청에서 분리한 엑소좀 내 microRNA의 발현수준을 확인하였다.

[0049] 약물 반응성 예측용 microRNA 마커를 선별하기 위해, 도 1 내지 도 3에 나타난 바와 같이, 정상군 및 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군; SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 및 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군; 정상군 및 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군으로 나누어 유의적으로 2배 이상 발현이 감소 또는 증가한 microRNA의 발현수준을 히트맵으로 시각화하고 볼케이노 플롯(volcano plot)으로 분석을 수행하였다.

[0050] 그 결과, 표 2와 같이, 정상군 및 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자 사이에서 발현 수준이 상이하며, SGLT2 억제제 복용에 의해 발현 패턴이 정상군과 유사한 수준으로 회복되는 microRNA를 최종선별하였다.

[0051] 선별된 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p의 발현 수준을 정상군(HV), SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군(Before) 및 SGLT2 억제제 복용후 환자군(After)으로 나누어 분석한 결과, miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 모두 정상군 및 당뇨병 치료제 복용전 당뇨병 환자군 사이에 현저한 발현 수준 차이가 관찰되었으며, SGLT2 억제제 복용으로 정상군과 유사하게 발현수준이 회복되는 것을 확인하였다.

[0052] 따라서, 본 발명에서 선별된 마커들은 당뇨치료제에 대한 약물 반응성 예측 마커, 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측용 조성물 및 당뇨병 치료제의 약물 반응성에 대한 정보제공 방법에 활용할 수 있다.

[0053] 나아가, 본 발명의 microRNA 마커는 정상군 및 당뇨환자군 사이에 현저한 발현수준 차이를 보이는 것으로 확인되었으므로, 약물 반응성 예측 마커뿐만 아니라 당뇨병 진단 마커로도 활용할 수 있다.

[0055] 본 발명은 다른 관점에서, miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 마이크로 RNA(microRNA)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물에 관한 것이다.

[0056] 상기 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물은 본 발명의 당뇨치료제에 대한 약물 반응성 예측 마커의 발현 수준을 확인하는 것으로, 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 발현수준을 측정하는 제제는 microRNA에 상보적으로 결합하는 프라이머쌍, 또는 프로브일 수 있다.

[0058] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머

쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다.

[0059] 본 발명에서 사용된 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다.

[0061] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 조성물을 포함하는 당뇨병 치료제에 대한 약물반응성 예측용 진단키트에 관한 것이다.

[0062] 상기 키트는 당업계에 알려져 있는 통상의 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 키트는 예를 들면, 동결 건조 형태의 항체와 완충액, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0063] 상기 키트는 검출 가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 용어 "검출 가능한 표지"는 표지가 없는 동일한 종류의 분자들 중에서 표지를 포함하는 분자를 특이적으로 검출하도록 하는 원자 또는 분자를 의미한다. 상기 검출 가능한 표지는 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자, 또는 압타머에 부착된 것일 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 방사종(radionuclide), 형광원(fluorophore), 효소(enzyme)를 포함할 수 있다.

[0064] 상기 키트는 microRNA 발현 수준을 분석하기 위해 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray) 등의 방법에 따라 이용될 수 있다.

[0065] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl2를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0066] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 당뇨병 치료제 투여 전후의 피검체 유래 생물학적 시료에서 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[0069] (b) 당뇨병 치료제 투여 전후의 microRNA 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병 치료제의 약물 반응성 예측에 대한 정보제공 방법에 관한 것이다.

[0070] 상기 방법에서 "생물학적 시료(biological sample)"란 당뇨 발병에 의해 microRNA 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장 또는 혈청, 더 바람직하게는 혈청에 포함된 엑소좀을 의미한다.

[0071] 상기 (a) 단계의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0072] 상기 방법에 있어서, 당뇨병 치료제 투여 후, 상기 miR-337-3p, miR-369-3p 또는 miR-376a-3p 발현이 증가하면 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성이 우수하여 당뇨병 치료효과가 있는 것으로 정보를 제공할 수 있다. 바람직하게는 당뇨병 치료제로 SGLT2 억제제를 투여하는 경우, SGLT2 억제제 투여에 의해 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 발현이 증가하면 SGLT2 억제제에 대한 약물 반응성이 우수한 것으로 정보를 제공할 수 있다.

[0073] 구체적으로, 당뇨병 치료제 투여전 당뇨 환자군에 비해 당뇨병 치료제 투여후 당뇨 환자군에서, miR-337-3p 발현 수준이 2 내지 3배 증가, 바람직하게는 2.2 내지 2.5배 증가; miR-369-3p 발현 수준이 1.5 내지 2.5배 증가, 바람직하게는 2 내지 2.4배 증가; 또는 miR-376a-3p 발현 수준이 2.5 내지 3.5배 증가, 바람직하게는 3 내지 3.4배 증가하면 약물에 의한 당뇨병 치료효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

[0075] 또한, 목적에 따라서 환자에게 직접 약물을 투여하기 전에 환자 조직 유래 세포, 바람직하게는 당뇨병과 관련된 세포를 분리한후, 분리된 세포에 약물을 처리한 다음, microRNA 발현수준 변화를 확인하여 환자에게 보다 적합하고, 약물 반응성이 우수한 당뇨병 치료제를 선별할 수 있다.

[0077] 나아가, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 당뇨병 환자 유래 생물학적 시료에서 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[0078] (b) 정상대조군의 microRNA 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 당뇨병 치료제 투여 여부에 대한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0079] 상기 당뇨병 치료제는 SGLT2(sodium glucose cotransporter 2) 억제제일 수 있으며, 정상대조군에 비해 당뇨병 환자의 miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 발현이 감소하면 SGLT2 억제제를 투여하는 것으로 정보를 제공할 수 있다.

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0082] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0084] **환자 선정 및 서열분석 수행**

[0085] 1-1 : 환자 선정

[0086] 본 발명에서는 당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측용 바이오마커를 선별하기 위해 정상인 20명, 이전에 SGLT2 억제제 복용한 적이 없는 당뇨병 환자 중에서 SGLT2 억제제 투여에 의해 당뇨 증상이 개선된 당뇨병 환자 20명(SLGT2 inh 복용그룹)을 선별하였으며, SLGT2 inh 복용그룹은 SGLT2 억제제 복용 전후 혈청 샘플을 채취하여 분석을 수행하였다.

[0087] 환자의 임상적 특징은 하기 표 1에 나타내었으며, 괄호안의 숫자는 표본 수를 의미한다.

표 1

[0089] 환자의 임상정보

	정상 (20)	SLGT2 inh 복용그룹 (20)
gender(m/f)	0/20	12/8
age	53.00±4.24	56.20±10.62
height	157.68±5.55	164.43±9.84
weight	54.26±6.00	73.09±10.62
BMI	21.75±1.38	27.02±2.96
waist	72.91±4.05	92.45±10.21
FBS	86.90±3.73	147.05±30.89
HbA1c	5.27±0.22	7.60±0.86
WBC	5.74±1.29(10)	6.89±1.49(19)
AST	23.05±5.37	24.89±10.59(19)
ALT	15.05±6.80	26.68±13.29(19)

BUN	14.38±3.70(8)	13.68±3.77(19)
Creatinie	0.66±0.10	0.80±0.20(19)
LDL	116.96±30.48	113.60±40.39(18)
M/C ratio	-(0)	36.78±68.74(18)
eGFR	93.46±16.20(18)	93.78±20.72(19)
HOMA-IR	0.32±0.36	3.09±3.30(15)
SBP	118.60±17.55	126.50±20.69
DBP	75.15±7.81	80.05±16.70

[0091] 1-2 혈청으로부터 RNA 분리 및 서열분석 수행

[0092] 상기 실시예 1-1에서 선별된 정상군 및 SLGT2 inh 복용그룹의 혈청으로 부터 RNA를 분리하여 분석을 수행하였으며, SLGT2 inh 복용그룹은 SGLT2 억제제 복용 전후 혈청 샘플을 채취하여 분석을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 정상군, SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 및 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군으로부터 채취한 혈청 샘플에 대하여 Exoquick(SBI, 미국)을 사용해 엑소좀(exosome)을 분리하였고, 상기 분리된 엑소좀으로부터 Qiagen miRNeasy kit을 이용하여 총 RNA를 추출하였으며, 추출된 총 RNA의 질은 Agilent RNA Bioanalyzer를 이용해 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 이후 상기 분리된 RNA를 이용하여 마크로젠사에서 Takara SMARTer smRNA for illumina kit을 사용하여 라이브러리를 제작한 후 Hiseq 2500으로 차세대 염기서열 분석(NGS)을 실시하여 microRNA를 검출하였다.

실 시 예 2

[0095] **당뇨병 치료제에 대한 약물 반응성 예측용 바이오마커 선별**

[0096] 2-1 : 정상군 vs SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군의 발현수준에 차이가 있는 microRNA 분석

[0097] 먼저, 본 발명자들은 상기 정상군 20 명과 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 20 명의 혈액 유래 엑소좀에서 발현수준의 차이가 나는 microRNA(miRNA)를 동정하기 위하여, 상기 실시예 1-2의 방법에 따라 각 대상자들에서 채취한 혈청으로부터 엑소좀을 분리하고 추출된 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 523 개의 miRNA가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNAs의 발현수준을 비교하였다.

[0098] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이 523 개의 miRNA 중에 정상군(HV)에 비해 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군(Before)에서 2배 이상($p < 005$) 발현이 감소하는 miRNA가 105개, 발현이 증가하는 miRNA가 75개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNAs의 발현수준에 따른 볼케이노 플롯(volcano plot) 결과를 도 1b에 나타내었다.

[0100] 2-2 : SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 vs SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군의 발현수준에 차이가 있는 microRNA 분석

[0101] 본 발명자들은 상기 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군 20 명과 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군 20 명의 혈액 유래 엑소좀에서 발현수준의 차이가 나는 miRNA를 동정하기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 얻은 엑소좀 내 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 523 개의 miRNA가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNA의 발현수준을 비교하였다.

[0102] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 523 개의 miRNA 중에 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군(Before)에 비해 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군(After)에서 2배 이상($p < 005$) 발현이 감소하는 miRNA가 14개, 발현이 증가하는 miRNA가 28개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNA의 발현수준에 따른 볼케이노 플롯(volcano plot) 결과를 도 2b에 나타내었다.

[0104] 2-3 : 정상군 vs SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군의 발현수준에 차이가 있는 microRNA 분석

[0105] 본 발명자들은 상기 정상군 20 명과 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군 20 명의 혈액 유래 엑소좀에서 발현수준의 차이가 나는 miRNA를 동정하기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 얻은 엑소좀 내 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 523 개의 miRNA가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNA의 발현수준을 비교하였다.

[0106] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이 523 개의 miRNA 중에 정상군(HV)에 비해 SGLT2 억제제 복용후 당뇨병 환자군(After)에서 2배 이상(p < 005) 발현이 감소하는 miRNA가 103개, 발현이 증가하는 miRNA가 77개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNA의 발현수준에 따른 볼케이노 플롯(volcano plot) 결과를 도 3b에 나타내었다.

[0108] 2-4 : 약물 반응성 예측용 바이오마커 선별

[0109] 도 1 내지 도 3의 결과를 참고로, 정상군 및 SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자 사이에서 발현 수준이 상이하며, SGLT2 억제제 복용에 의해 발현 패턴이 정상군과 유사한 수준으로 회복되는 microRNA를 최종선별하였으며, 선별된 마커 및 서열정보는 하기 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

[0110] 약물반응성 예측용 바이오마커

	fold change (+/-)			
Mature miRNA	Before/HV	After/Before	After/HV	ANOVA
hsa-miR-337-3p	-4.52	2.33	-1.94	***
hsa-miR-369-3p	-4.62	2.18	-2.12	***
hsa-miR-376a-3p	-7.48	3.28	-2.28	***

표 3

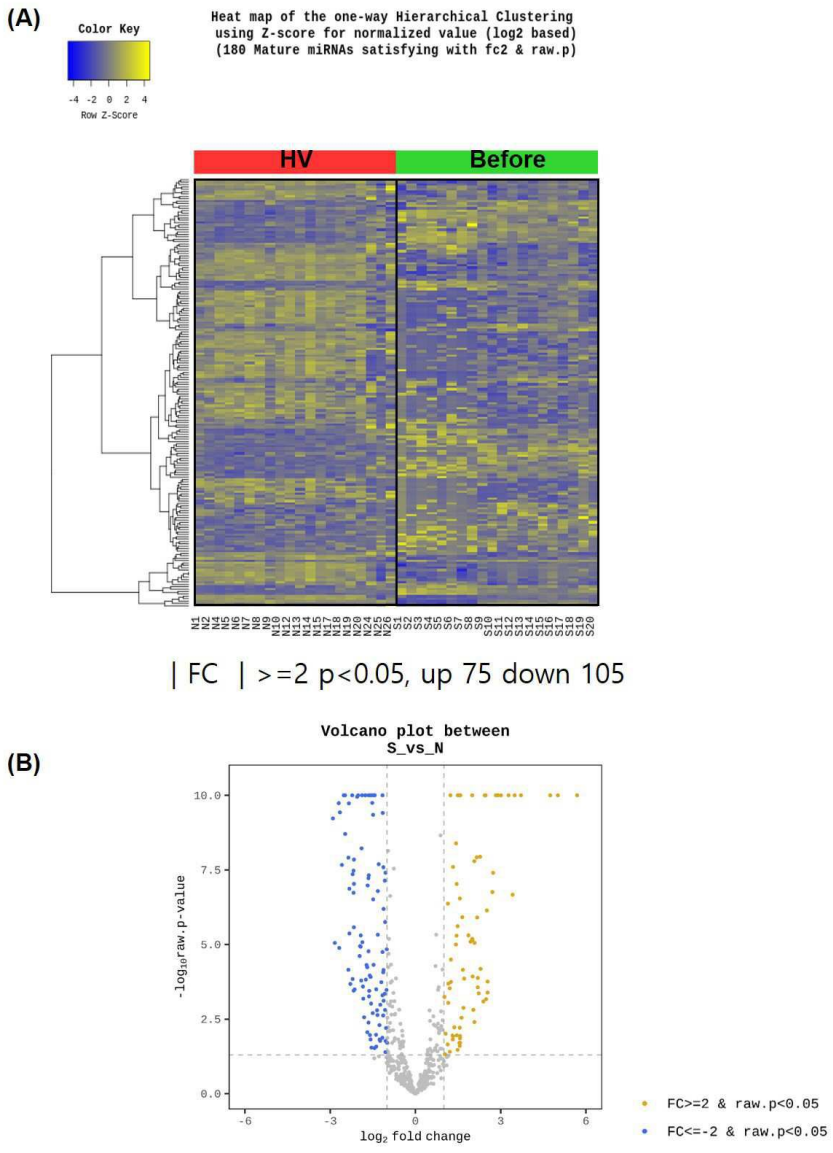
[0112] 마커 서열정보

Mature miRNA	sequence	서열번호
hsa-miR-337-3p	CUCCUAUAUGAUGCCUUUCUUC	1
hsa-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU	2
hsa-miR-376a-3p	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	3

[0114] 표 2에 나타난 바와 같이, miR-337-3p, miR-369-3p 및 miR-376a-3p 마커를 최종 선별하였으며, 각 마커의 발현수준을 정상군(HV), SGLT2 억제제 복용전 당뇨병 환자군(Before) 및 SGLT2 억제제 복용후 환자군(After)으로 나누어 분석한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 모두 정상군 및 당뇨병 치료제 복용전 당뇨병 환자 사이에 발현수준의 현저한 차이가 관찰되었으며, SGLT2 억제제 복용으로 정상군과 유사하게 발현수준이 회복되는 것을 확인하였다.

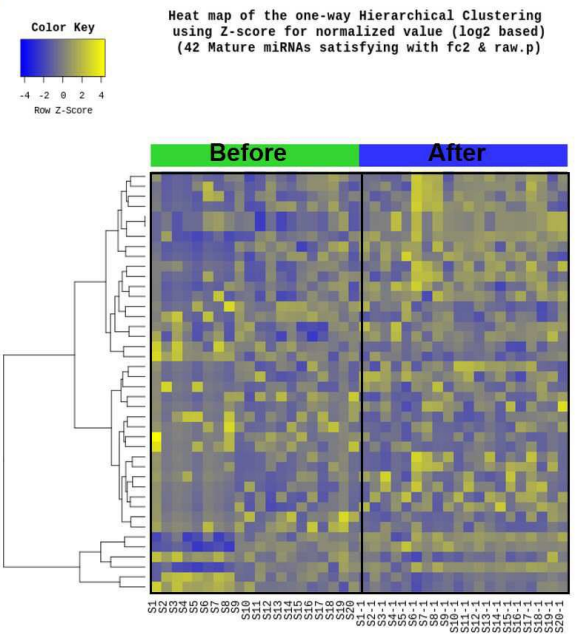
도면

도면1


(A)
Color Key
-4 -2 0 2 4
Row Z-Score
Heat map of the one-way Hierarchical Clustering
using Z-score for normalized value (log2 based)
(180 Mature miRNAs satisfying with fc2 & raw.p)
HV
Before
| FC | >=2 p<0.05, up 75 down 105
(B)
Volcano plot between
S_vs_N
-log10raw.p-value
log2 fold change
FC>=2 & raw.p<0.05
FC<=-2 & raw.p<0.05

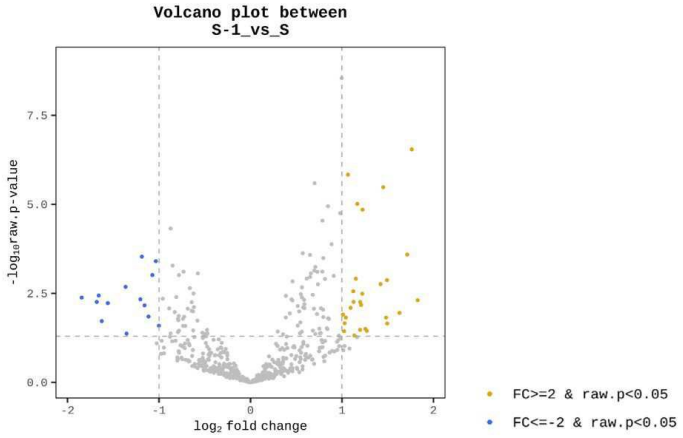
도면2

(A)



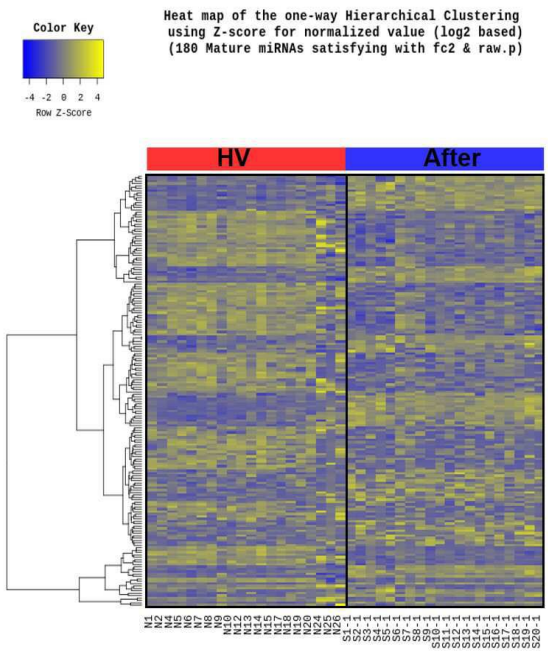
| FC | >=2 p<0.05, up 28 down 14

(B)



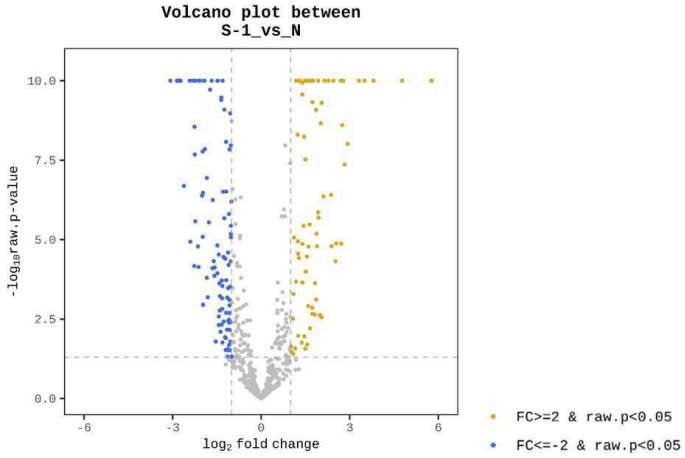
도면3

(A)

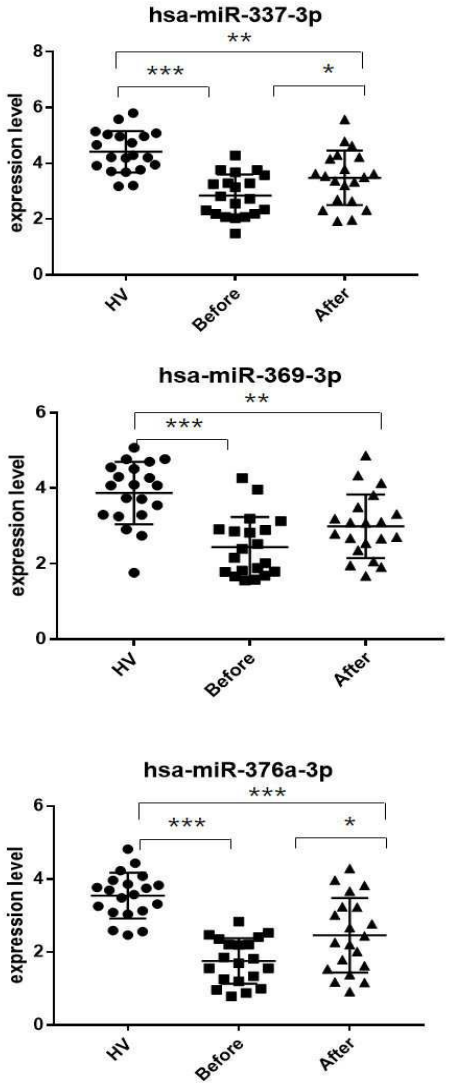


| FC | >=2 p<0.05, up 77 down 103

(B)



도면4



서 열 목 록

<110> Keimyung University

<120> MicroRNA biomarker for predicting drug response to diabetes treatment and use thereof

<130> 1067799

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-337-3p

<400> 1

cuccuauaug augccuuucu uc 22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-369-3p

<400> 2

aauaauacau gguugaucuu u 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-376a-3p

<400> 3

aucauagagg aaaauccacg u 21