

|                                                                                                                                               |                                    |                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                              | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2014-0137871<br>(43) 공개일자 2014년12월03일                                                                                                                                                          |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2013-0059044<br>(22) 출원일자 2013년05월24일<br>심사청구일자 2013년05월24일 |                                    | (71) 출원인<br>이화여자대학교 산학협력단<br>서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)<br>(72) 발명자<br>최지하<br>서울 양천구 목동동로 430, 612동 802호 (목동, 목동6단지아파트)<br>정재용<br>서울 강남구 선릉로190길 124, 101동 302호 (청담동, 시티타운1차아파트)<br>(74) 대리인<br>이원희 |

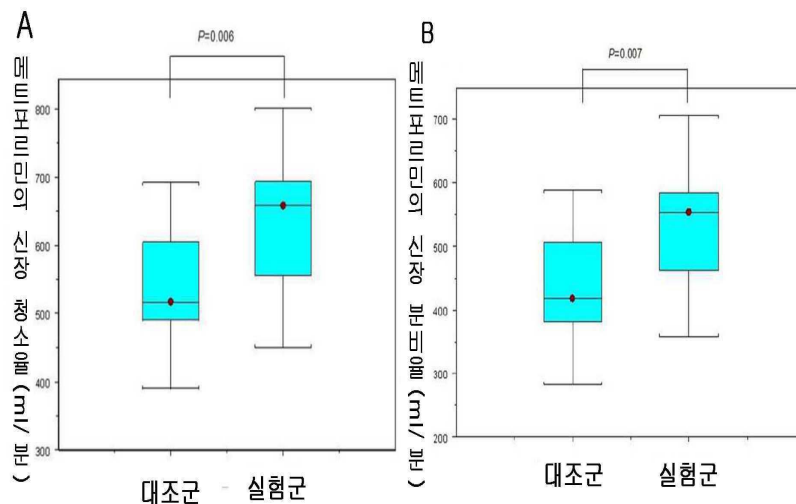
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **MATE2-K 유전자 내 단일염기다형성 및 이의 용도**

### (57) 요약

본 발명은 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) 유전자 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도에 관한 것으로, MATE2-K 유전자에 발생하는 변이를 확인하고, 상기 변이를 포함하는 반수체(haplotype)를 갖는 플라스미드를 제작하였으며, 그 중 프로모터 영역에 g.-130G>A, g.-609G>A 및 g.-396G>A 변이가 발생하였을 때, 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 45명의 피험자를 대상으로 상기 변이가 발생하였을 때, 메트포르민의 배출이 증가함을 확인함으로써, 본 발명의 MATE2-K 단일염기다형성(g.-130G>A; rs12943590, g.-609G>A; rs758427 및 g.-396G>A; rs34834489)이 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

### 대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111218-1111-1050300

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-차세대맞춤의료 유전체 사업단

연구과제명 양이온계 약물 SLC 수송단백 연구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2013.03.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 MATE2-K는 서열번호 11로 기재되는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 SNP를 포함하는 20 내지 100개의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 MATE2-K에 의해 수송되는 약물은 메트포르민(metformin), 시메티딘(cimetidine), 및 프로카인아미드(procainamide)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 키트는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 신장 배출에 대한 민감성을 측정하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 키트는 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 추가적으로 포함하여 혼성화하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 혼성화는 완충용액, 역전사효소(reverse transcriptase), dNTP, rNTP(사전혼합형 또는 분리공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

### 청구항 8

MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-

609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP로 구성된 반수체(haplotype)를 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

#### 청구항 9

MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트.

#### 청구항 10

- 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A), 609번째 염기가 A(g.-609G>A), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계를 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 머리카락, 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법.

#### 청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 단계 2)의 SNP 부위의 확인방법은 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적 탐침 혼성화(allele-specific hybridization), 대립유전자 특이적 증폭(allele-specific amplification), 서열분석(sequencing), 5' 뉴클라아제 분해(5' nuclease digestion), 분자 비콘어세이(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오티드 결합 어세이(oligonucleotide ligation assay), 크기분석(size analysis) 및 단일가닥 배좌 다형성(single-stranded conformation polymorphism)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법.

#### 청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 MATE2-K에 의해 수송되는 약물은 메트포르민, 시메티딘, 및 프로카인아미드로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법.

#### 청구항 14

제 10항에 있어서, 상기 단계 3)의 결과확인인 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-1975C>A), 609번째 염기가 A(g.-609G>A), 또는 396번째 염기가 A(g.-396G>A)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP가 존재하면 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 신장 배출에 대한 민감성이 증가하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) 유전자 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 MATE2-K 유전자의 프로모터 영역에 있는 SNP 인 g.-130G>A, g.-609G>A 및 g.-396G>A, 및 상기 SNP를 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 미국 국립보건연구소(National Institutes of Health; NIH)의 보고에 따르면 비만과 관련된 질환 중의 하나인 제 2형 당뇨병 환자가 약 1,570만 명에 이른다. 또한, 당뇨병 환자는 세계보건기구(WTO)에 의하면, 2025년에는 약 3억 명이 될 것으로 추정하고 있으며, 인슐린에 의한 혈당조절 기능을 상실한 제 2형 당뇨병 환자는 현재 미국 전체 인구의 약 5.9%에 달한다고 알려져 있다.

[0003] 당뇨병은 혈액 내의 고혈당 증상을 특징으로 하는 탄수화물 대사와 관련된 질병으로 제 1형 당뇨병(인슐린 의존형 당뇨병; 당뇨병자 중 약 10%) 및 제 2형 당뇨병(인슐린 비의존형 당뇨병; 당뇨병자 중 약 90%)으로 분류될 수 있다. 제 1형 당뇨병 환자는 선천성 또는 바이러스 침입이나 췌장의 심각한 손상으로 인해 췌장의 베타세포가 파괴되어 체내 생성 인슐린 분비 능력이 아주 적거나 없고, 극도의 고혈당증으로 진전되며 케톤증 및 케토산증으로 진행되기 쉽다. 주로 소아시기에 급성으로 발병하며, 인슐린 투여에 의한 혈당조절 치료법이 필수적이다. 반면, 제 2형 당뇨병 환자는 성인층에서 유전, 비만, 스트레스, 호르몬 분비 이상, 약물 복용 등의 요인에 의하여 발병하며, 인슐린 분비능력이 있으나 매우 낮은 수준이거나 글루카곤과 같은 역작용 호르몬의 과다 분비로 균형을 잃은 상태이다. 이는 기저상태와 자극에 대한 인슐린 분비장애, 간에서의 내인성 포도당 생성의 증가, 말초 조직에서의 당 이용도 저하로 나타나는 인슐린 저항성에 의해 발생하는 것으로 알려져 있고, 고혈당증으로 진전되지만 제 1형 당뇨병 환자만큼이나 케톤증이나 케토산증에 민감하지는 않다. 제 1형 당뇨의 경우 식사조절, 운동, 인슐린 투여로 혈당조절이 가능하지만, 제 2형 당뇨의 경우는 그 이외에도 추가적으로 혈당강화제를 함께 복용해야 한다.

[0004] 제 2형 당뇨병(인슐린 비의존형) 환자들에게 사용되는 혈당강화제들은 그 작용기전에 따라 세 그룹으로 나눌 수 있다. 첫 번째 군으로는 췌장의 베타세포를 자극하여 인슐린의 분비를 촉진시키는 것으로 설프닐요소(sulfonylurea)계와 메글리티나이드(meglitinide)계 약물이 있으며, 두 번째 군으로는 비구아니드(biguanide)계와 티아졸리딘다이온(thiazolidinedion)계 약물로 대표되는 인슐린 감응제가 있다. 세 번째 군의 약물로는 당의 분해를 저해하여 장내 당의 흡수를 억제하는 것으로 아카보스(acarbose), 미글리톨(miglitol) 등의 약물이 존재한다.

[0005] 두 종류의 MATE2(Human multidrug and toxin extrusion 2) 동형단백질(isoform)이 동정되었고, MATE2-K가 그 중 하나로 신장에서 막 수송역할을 하는 것으로 확인되었다. MATE2-K는 많은 양이온성 약물(cationic drug) 및 내생의 합성물(endogenous compound)을 포함하는 구조적으로 구분이 되는 합성물의 수송에 관여하고, 지금까지 몇몇의 유전적 변이(genetic variant)가 확인되었다. 기존에 보고된 두 개의 비유사(nonsynonymous) 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)인 p.K64N 및 p.G211V 변이는 모두 MATE2-K의 수송능력을 감소시키고, 특히, p.G211V 변이는 세포 표면막(surface membrane)에 있는 단백질 발현의 변화로 MATE2-K의 수송능력을 완전히 잃게 하는 것을 확인하였다. 따라서, MATE2-K의 유전적 변이에 의한 발현 및 활성 수준의 변화가 MATE2-K의 기질로 사용되는 약물의 수준을 변화시키는 결과를 야기할 수 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성을 확인하는 방법을 개발하기 위해 노력하던 중, MATE2-K 유전자에 발생하는 변이를 확인하고, 상기 변이를 포함하는 반수체(haplotype)를 갖는 플라스미드를 제

작하였으며, 그 중 프로모터 영역에 g.-130G>A, g.-609G>A 및 g.-396G>A 변이가 발생하였을 때, 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 45명의 피험자를 대상으로 상기 변이가 발생하였을 때, 메트포르민의 배출이 증가함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) 유전자 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 마커를 포함하는 키트 및 이를 이용한 확인방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP로 구성된 반수체(haplotype)를 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법을 제공한다:

[0012] 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;

[0013] 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A), 609번째 염기가 A(g.-609G>A), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및

[0014] 3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명의 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130C>A), 609번째 염기가 A(g.-609G>A), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)인 경우 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인함으로써 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1A는 619 bp의 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) 프로모터 영역(promoter region)을 포함하는 벡터의 프로모터 활성이 현저히 증가하는 것을 나타내는 도이다.

도 1B는 MATE2-K에 g.-130C>A 변이를 갖는 반수체, 및 g.-609G>A 및 g.-396G>A의 변이를 갖는 반수체를 포함하

는 벡터의 프로모터 활성이 현저히 증가함을 나타내는 도이다.

H1: g.-130C>A 변이,

H2: g.-609G>A 및 g.-396G>A의 변이,

H3(Ref3): 619 bp의 프로모터 영역(대조군), 및

H4: g.-609G>A의 변이.

도 2A는 MATE2-K 변이에 의해서 메트포르민(metformin)의 신장 청소율(renal clearance)이 증가하는 것을 나타내는 도이다.

도 2B는 MATE2-K 변이에 의해서 메트포르민의 신장 분비율(renal secretion)이 증가하는 것을 나타내는 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명에 사용된 용어를 상세히 설명한다.

[0018]

본 명세서에서 사용된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)은 개인과 개인 간의 DNA에 존재하는 한 염기쌍(single base-pair variation)의 차이로 DNA 서열 다형성(polymorphism) 중에서 가장 많이 존재하는 형태(약 1개/1 kb)를 말한다.

[0019]

본 명세서에서 사용된 SNP의 진뱅크 등록번호(GeneBank Accession number)는 NCBI dbSNP의 확인번호(identification number)를 의미하는 것으로 상기 각 SNP의 서열 및 그 위치를 나타내는 것이다. 당업자라면 상기 등록번호를 이용하여 SNP의 위치 및 서열을 용이하게 확인할 수 있다. 또한, NCBI에 등록되어 있는 SNP의 rs 번호에 해당하는 구체적인 서열은 시간이 지남에 따라 약간 변경될 수 있으나, 본 발명의 범위가 상기 변경된 서열에도 미치는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0020]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021]

본 발명은 MATE2-K(Human multidrug and toxin extrusion 2) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0022]

상기 MATE2-K mRNA는 진뱅크 넘버 NM\_001099646이거나, 본 명세서에 서열번호 11로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 SNP를 구성하는 SNP의 폴리뉴클레오티드는 10 개 이상의 연속적인 폴리뉴클레오티드인 것이 바람직하고, 10 내지 100 개의 연속적인 폴리뉴클레오티드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0023]

상기 MATE2-K에 의해 수송되는 약물은 메트포르민(metformin), 시메티딘(cimetidine), 및 프로카인아미드(procainamide)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 메트포르민인 것이 가장 바람직하다.

[0024]

상기 키트는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 신장 배출에 대한 민감성을 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0025]

또한, 상기 키트는 상기 폴리뉴클레오티드를 프라이머로서 포함하는 동시에 증폭에 필요한 시약을 포함할 수 있고, 이를 위하여 핵산의 증폭에 필요한 시약을 더 포함할 수 있으며, 이때, 상기 핵산은 검출가능한 표지로 표시될 수 있다. 또한, 상기 검출가능한 표지로는 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 추가적으로 포함하여 혼성화하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 혼성화는 완충용액, 역전사효소(reverse transcriptase), dNTP, rNTP(사전혼합형 또는 분리공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것이

바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 프라이머는 표적 부위인 상기 SNP를 증폭할 수 있고, 크기 및 주형에 결합하는 위치가 제한되지 않으며, 당업자라면 통상의 프라이머 선정용 소프트웨어를 이용하여 용이하게 프라이머의 고안이 가능할 수 있다.

[0026] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명자들은 48개의 DNA 샘플로부터 MATE2-K 프로모터 영역의 변이체를 발견하였고(표 1 참조), 상기 변이를 포함하는 반수체의 빈도를 확인하였다(표 2 참조). 또한, 619 bp 벡터의 경우 프로모터 활성이 가장 높음을 확인한 후(도 1A 참조), 상기 벡터를 주형으로 프로모터 활성변화를 확인하기 위한 MATE2-K 프로모터 반수체를 포함하는 플라스미드를 제작하였고, g.-130G>A, g.-609G>A 또는 g.-396G>A 변이가 발생하였을 때 프로모터 활성이 현저히 증가함을 확인하였다(도 1B 참조). 또한, 45 명의 피험자를 모집하여 메트포르민의 약동학(pharmacokinetics)에 있어서 MATE2-K 유전적 변이의 영향을 확인한 결과 메트포르민(metformin)의 신장청소율(renal clearance) 및 신장 분비율(renal secretion)이 증가함을 확인하였다(표 5 및 도 2 참조).

[0027] 따라서, 본 발명의 MATE2-K g.-130G>A, g.-609G>A 또는 g.-396G>A 변이체가 프로모터의 활성을 증가시켜, MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0028] 본 발명은 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP로 구성된 반수체(haplotype)를 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0029] 본 발명은 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 반응성 확인용 키트를 제공한다.

[0030] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 MATE2-K에 의해 수송되는 약물에 대한 반응성 확인방법을 제공한다:

[0031] 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;

[0032] 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A), 609번째 염기가 A(g.-609G>A), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및

[0033] 3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계.

[0034] 상기 방법에 있어서, 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계는 당업계에 알려진 방법을 통해서 수행될 수 있다. 예컨대, 관심 DNA가 세포에 있을 때 순수한 DNA를 제조하기 위하여 먼저 세포 추출물을 제조한 다음, 차등 침강(differential precipitation), 칼럼 크로마토그래피, 유기용매 추출 등을 더 수행할 수 있고, 상기 추출물은 해당 기술분야의 표준기술에 의해서 제조될 수 있다. 상기와 같은 방법으로 세포 또는 조직으로부터 분리한 DNA는 직접적으로 정제하거나 PCR 또는 RT-PCT(real time PCR)과 같은 증폭 방법을 사용하여 특정 영역을 특이적으로 증폭하고 이를 분리함으로써 이루어질 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 DNA는 DNA뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함한다. 또한, PCR 또는 RT-PCR은 개체의 전체 DNA 서열에 대해 수행될 수도 있지만, 단일염기다형성으로 알려져 있는 부위 주변만에 대해서도 수행될 수 있다. 또한, 상기 시료는 머리카락, 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0035] 상기 방법에 있어서, 분리된 DNA의 염기서열의 결정은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디테옥시법에 의하여 직접적인 DNA의 뉴클레오타이드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나 단일염기다형성 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 상기 혼성화의 정도는 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA만을 특이적으로 검출함으로써 이루

어질 수 있으나, 그외 전기적 신호검출방법 등이 사용될 수 있다. 구체적으로, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적 탐침 혼성화(allele-specific hybridization), 대립유전자 특이적 증폭(allele-specific amplification), 서열분석(sequencing), 5' 뉴클라아제 분해(5' nuclease digestion), 분자 비콘어세이(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오티드 결합 어세이(oligonucleotide ligation assay), 크기 분석(size analysis) 및 단일가닥 배좌 다형성(single-stranded conformation polymorphism)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0036] 상기 방법에 있어서, DNA 서열 확인 결과 MATE2-K mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 130번째 염기가 A(g.-130G>A; rs12943590), 609번째 염기가 A(g.-609G>A; rs758427), 및 396번째 염기가 A(g.-396G>A; rs34834489)인 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 경우 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 신장 배출에 대한 민감성이 증가하여, 상기 MATE2-K에 의해 수송되는 약물의 체내 배출을 증가시키는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0037] 상기 MATE2-K에 의해 수송되는 약물은 메트포르민, 시메티딘, 및 프로카인아미드로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 메트포르민인 것이 가장 바람직하다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해서 상세히 설명한다.

[0039] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

#### [0040] <실시예 1> MATE2-K의 유전적 변이 동정

[0041] 한국인으로부터 수득한 48개의 DNA 샘플에 있어서 MATE2-K의 암호 영역(coding region) 및 프로모터 영역(promoter region) 서열의 유전적 변이를 동정하였다.

[0042] 구체적으로, 서울대학교(대한민국)에 있는 한국 약물유전체학 연구 네트워크(Korea Pharmacogenomics Research Network)의 DNA 은행으로부터 혈연관계가 아닌 피험자의 48개 DNA 샘플을 수집하였다. 모든 피험자로부터 사전에 동의서를 받았고, 일반적인 신체검사 및 임상검사(laboratory test)를 통해 각각의 건강 상태를 측정하였다. 또한, 상기 피험자들은 모두 동아시아 인종이었다. MATE2-K의 유전적 변이를 동정하기 위하여 자동화된 유전자 분석기(genetic analyzer, Life Technologies Corporation, 미국)를 사용하여 전체 MATE2-K의 암호 영역 및 측면 인트론 서열(flanking intronic sequence)을 분석하였다. MATE2-K 프로모터 영역의 유전적 변이를 동정하기 위하여, 증합효소 연쇄반응 조각(polymerase chain reaction fragment, 전사 시작위치로부터 -2265 내지 +22 bp)을 증폭하였고, 상기 자동화된 유전자 분석기를 사용하여 바로 서열을 분석하였다. 또한, 결합불균형(linkage disequilibrium)의 계산을 위한, 반수체형(haplotype)의 조립(assembly)은 Haploview 프로그램(4.2 버전, Broad Institute, 미국)을 사용하여 수행되었고, 뉴클레오티드 위치번호는 MATE2-K mRNA 서열(GenBank accession number NM\_001099646)에서 전사 시작 위치로부터 지정되었다.

[0043] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 1 개의 비유사(nonsynonymous) 및 3 개의 유사(synonymous) 변이가 동정되었고, 이들 중 3 개는 다형성(polymorphic)[소수의 대립유전자 빈도(minor allele frequency) > 1%]이었다. 프로모터 영역에서 9 개의 변이를 동정하였고, 이들 중 7 개는 다형성이었으며, 이들 중 4 개는 g.-2220G>T, g.-1887G>A, g.-1779A>G, 및 g.-1263G>A로서 본 연구에서 신규하게 발견되었다(표 1).

표 1

[0044]

| rs 번호     | 변이             | 가<br>닥 | 아미<br>노산<br>치환 | 소수의<br>대립<br>유전자<br>빈도 | rs 번호       | 변이                 | 가<br>닥 | 아미<br>노산<br>치환 | 소수의<br>대립<br>유전자<br>빈도 |
|-----------|----------------|--------|----------------|------------------------|-------------|--------------------|--------|----------------|------------------------|
| 암호 변이     |                |        |                |                        |             |                    |        |                |                        |
| -         | c.207<br>G>A   | -      | p.S69S         | 0.083                  | rs111060532 | c.533_534G<br>C>TT | -      | p.G211V        | 0.010                  |
| rs4924792 | c.345<br>C>A   | -      | p.G115G        | 0.438                  | rs4925042   | c.787<br>C>T       | -      | p.Y295Y        | 0.385                  |
| 프로모터 변이   |                |        |                |                        |             |                    |        |                |                        |
| -         | g.-2220<br>G>T | +      |                | 0.104                  | rs758426    | g.-756<br>A>T      | +      |                | 0.438                  |

|            |                 |   |  |       |             |                 |   |  |       |
|------------|-----------------|---|--|-------|-------------|-----------------|---|--|-------|
| rs74786588 | g.-2061<br>C>T  | + |  | 0.188 | rs758427    | g.-609<br>G>A   | + |  | 0.292 |
| -          | g.-1887<br>G>A  | + |  | 0.010 | rs34834489  | g.-396<br>G>A   | + |  | 0.271 |
| -          | g.-1779<br>A>G  | + |  | 0.271 | rs12943590  | g.-130<br>G>A   | + |  | 0.436 |
| -          | g.-1263<br>G>A  | + |  | 0.010 |             |                 |   |  |       |
| 비암호 변이     |                 |   |  |       |             |                 |   |  |       |
| rs75854637 | IVS1+19<br>G>T  | - |  | 0.010 | -           | IVS8+3<br>G>A   | - |  | 0.010 |
| -          | IVS1+22<br>G>A  | - |  | 0.052 | -           | IVS8+84<br>G>A  | - |  | 0.021 |
| -          | IVS2-4<br>C>T   | - |  | 0.010 | rs35263947  | IVS8-30<br>G>A  | - |  | 0.438 |
| rs9900497  | IVS3-107<br>A>C | - |  | 0.479 | rs129420065 | IVS9+14<br>C>G  | - |  | 0.021 |
| rs9897570  | IVS4-187<br>C/T | - |  | 0.479 | -           | IVS9+97<br>C>T  | - |  | 0.010 |
| -          | IVS4-95<br>C>T  | - |  | 0.083 | -           | IVS13+34<br>T>C | - |  | 0.083 |
| -          | IVS4-44<br>G>C  | - |  | 0.083 | -           | IVS16-4<br>G>A  | - |  | 0.052 |
| -          | IVS6+45<br>G>A  | - |  | 0.083 |             |                 |   |  |       |

[0045] 상기 결과는 혈연관계가 아닌 48개의 한국인 DNA 샘플로부터 얻었다.

[0046] 변이의 위치는 전사 시작위치에 근거하였다.

[0047] 또한, MATE2-K의 공통적인 반수체 빈도 분포는 표 2에 나타내었다. g.-756A>T, g.-130G>A, p.G115G, p.Y295Y, 및 IVS13+34C>T의 5 개의 변이를 포함하는 반수체(haplotype a; Ha)가 가장 높은 빈도를 나타냈으며, 상기 표 1에 나타난 유전적 변이 중에서, 한 프로모터 단일염기다형성(rs758426), 한 인트론 단일염기다형성(rs35263947), 및 한 비유사 단일염기다형성(rs4924792)이 알려진 않은 기능적 변이 g.-130G>A와 연관불균형( $r^2 > 0.8$ )을 보였다.

표 2

[0048]

|             | Ha       | Hb       | Hc       | Hd       | He       | Hf       |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| g.-2220G>T  |          |          |          | <u>T</u> |          |          |
| g.-2061C>T  |          |          | <u>T</u> |          |          |          |
| g.-1887G>A  |          |          |          |          |          |          |
| g.-1779A>G  |          |          | <u>G</u> |          |          | <u>G</u> |
| g.-1263G>A  |          |          |          |          |          |          |
| g.-756A>T   | <u>T</u> |          |          | <u>T</u> |          |          |
| g.-609G>A   |          | <u>A</u> |          |          | <u>A</u> |          |
| g.-396G>A   |          | <u>A</u> |          |          | <u>A</u> |          |
| g.-130G>A   | <u>A</u> |          |          | <u>A</u> |          |          |
| IVS1+19G>T  |          |          |          |          |          |          |
| IVS1+22G>A  |          |          |          |          |          |          |
| p.S69S      |          |          |          |          |          | <u>A</u> |
| IVS2-4C>T   |          |          |          |          |          |          |
| IVS3-107A>C |          | <u>T</u> | <u>T</u> |          | <u>T</u> |          |
| p.G115G     | <u>A</u> |          |          | <u>A</u> |          |          |

|             |          |          |          |          |          |          |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| IVS4-187C>T |          | <u>T</u> | <u>T</u> |          | <u>T</u> |          |
| IVS4-95C>T  |          | <u>T</u> | <u>T</u> |          | <u>T</u> |          |
| IVS4-44G>C  |          |          |          |          |          | <u>C</u> |
| IVS6+45G>A  |          |          |          |          |          | <u>A</u> |
| p.G211V     |          |          |          |          |          |          |
| IVS8+3G>A   |          |          |          |          |          |          |
| IVS8+84G>A  |          |          |          |          |          |          |
| IVS8-30A>G  |          | <u>G</u> | <u>G</u> |          | <u>G</u> | <u>G</u> |
| IVS9+14C>G  |          |          |          |          |          |          |
| IVS9+97C>T  |          |          |          |          |          |          |
| p.Y295Y     | <u>T</u> |          |          | <u>T</u> | <u>T</u> | <u>T</u> |
| IVS3+34C>T  | <u>T</u> | <u>T</u> | <u>T</u> | <u>T</u> | <u>T</u> |          |
| IVS16-4G>A  |          |          |          |          |          | <u>A</u> |
| 빈도          | 0.322    | 0.154    | 0.123    | 0.194    | 0.072    | 0.052    |

[0049] 상기 결과는 혈연관계가 아닌 48개의 한국인 DNA 샘플로부터 얻었다.

[0050] 소수의 대립유전자(minor alleles)는 밑줄친 굵은 글씨로 표기하였다.

#### [0051] <실시예 2> 시험관 내에서 MATE2-K의 프로모터 활성 측정

##### [0052] <2-1> MATE2-K 플라스미드의 제작

[0053] MATE2-K 프로모터 변이의 기능적 영향을 확인하기 위하여 MATE2-K 프로모터 참조서열(reference sequence, NM\_001099646)의 다양한 범위를 포함하는 MATE2K-pGL4.11b[ *luc2*] 리포터 플라스미드(reporter plasmid)를 제작하였다.

[0054] 구체적으로, 프로모터 영역에 있어서 MATE2-K 참조 서열을 포함하는 리포터 플라스미드를 제작하기 위하여, MATE2-K 유전자의 2404-, 815-, 619-, 및 434-bp 영역을 제한효소로 KpnI 및 NheI의 인식부위(recognition site)를 포함하는 하기 표 3에 나타난 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 2404 bp 백터의 경우, 완전한 참조 서열은 위치선택적 돌연변이(site-directed mutagenesis) PCR 후에 수득하였고, 증폭된 산물(product)은 pGL4.11b[ *luc2*] 백터(Promega, 미국)에 삽입되었으며, DNA 서열은 서열분석을 통해 확인하였다.

표 3

| 프라이머 이름               | 서열(5'→3')                            | 서열번호 |
|-----------------------|--------------------------------------|------|
| Ref1(2404bp)Sense     | <u>GGTACCAAGGCAT</u> TGCCAGGAGACTA   | 1    |
| Ref1(2404bp)Antisense | <u>GCTAGCAAGGGCA</u> AAGAGAGTCCACA   | 2    |
| Ref2(815bp)Sense      | <u>GGTACCTTGGGAAGGT</u> GACAGAGGAC   | 3    |
| Ref2(815bp)Antisense  | <u>GCTAGCACTGTGTCCT</u> GGAGGCTGTC   | 4    |
| Ref3(619bp)Sense      | <u>GGTACCAGGTGTCCT</u> AGCTCCCATCC   | 5    |
| Ref3(619bp)Antisense  | <u>GCTAGCGCACTGGCT</u> ACCCTGCAC     | 6    |
| Ref4(434bp)Sense      | <u>GGTACCCACTGTGGG</u> CACCATCACG    | 7    |
| Ref4(434bp)Antisense  | <u>GCTAGCTCCTGGAGG</u> CTGTCCATTCC   | 8    |
| g.-396G>A             | GCGTCCTGTACCC <u>AGG</u> CGTGATGGTGC | 9    |
| g.-396A>G             | GCGTCCTGTACCC <u>G</u> GGCGTGATGGTGC | 10   |

[0056] 제한효소 인식부위는 밑줄친 굵은 글씨로 표기하였다.

[0057] 단일염기변이(single nucleotide polymorphism; SNP)는 밑줄친 굵은 글씨로 표기하였다.

##### [0058] <2-2> MATE2-K 프로모터의 활성 측정

[0059] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 제작된 MATE2-K 참조서열에서 프로모터 활성을 측정하기 위하여 Dual-Luciferase

Reporter Assay System(Promega, 미국)을 제조사의 사용설명서대로 사용하였고, 양을 측정하기 위하여 Glomax 96-well plate luminometer(Promega, 미국)를 사용하였다.

[0060] 구체적으로, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양한 HCT116 세포주(American type culture collection, 미국)를 96-웰 플레이트에 분주하고, 상기 제작된 MATE2-K 참조서열 및 이의 변이체를 Lipofectamine LTX 및 Plus reagents(Life Technologies, 미국)를 사용하여 제조사의 사용설명서대로 형질주입(transfection)하였고, 형질주입되는 플라스미드의 양은 pGL4.74 레닐라(renilla) 벡터를 사용하여 보정하였다. 형질주입 30시간 후, 루시퍼라제 활성을 측정하였고, 각각의 값은 대조군인 참조서열(H1)의 값으로 표준화(normalization)되었다.

[0061] 그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이 4 개의 테스트 벡터 중 619 bp의 MATE2-K 프로모터 영역을 포함하는 MATE2-K 참조 벡터 3(reference vector 3; Ref3)이 가장 높은 프로모터 활성을 나타내었고, 반면 MATE2-K 참조 벡터 1 및 2는 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다(도 1A).

#### [0062] <실시예 3> 시험관 내에서 MATE2-K 변이체의 프로모터 활성 측정

##### [0063] <3-1> MATE2-K 변이체의 제작

[0064] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 제작된 MATE2-K 참조 벡터 중, 619 bp의 MATE2-K 프로모터 영역을 포함하는 Ref 3에서 가장 높은 프로모터 활성을 확인하여, 상기 범위 내에 포함되는 유전자형 데이터를 사용하여 MATE2-K 프로모터 반수체를 제작하였다.

[0065] 구체적으로, MATE2-K의 변이를 포함하는 리포터 플라스미드를 제작하기 위해서, MATE2-K 유전자의 619 bp 단편은 하기 표 4에 나타난 MATE2-K 반수체 1, 2 및 3 각각의 게놈 DNA 샘플로부터 상기 표 3의 프라이머를 사용하여 증폭되었고, pGL4.11b[*luc2*] 벡터에 삽입되었다. 반수체 4의 리포터 벡터 또는 g.-396G>A 변이만을 포함하는 벡터는 QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies, 미국)를 사용하여, 반수체 2 또는 3의 플라스미드로부터 상기 표 3의 프라이머를 사용하여 증폭되었으며, 모든 DNA 서열은 서열분석을 통해 확인하였다.

표 4

| ID | g.-609G>A | g.-396G>A | g.-130G>A | 빈도      |
|----|-----------|-----------|-----------|---------|
| H1 | G         | G         | A         | 0.440   |
| H2 | A         | A         | G         | 0.271   |
| H3 | G         | G         | G         | 0.268   |
| H4 | A         | G         | G         | ID0.021 |

[0067] 상기 결과는 혈연관계가 아닌 48개의 한국인 DNA 샘플로부터 얻었다.

[0068] 소수의 대립유전자(minor alleles)는 밑줄친 굵은 글씨로 표기하였다.

##### [0069] <3-2> MATE2-K 프로모터 반수체의 활성 측정

[0070] 상기 실시예 <3-1>의 방법으로 제작된 프로모터 반수체 변이의 활성을 측정하기 위하여 상기 실시예 <2-2>의 방법으로, 대조군으로 MATE2-K 참조 벡터 3(Ref 3)을 사용하였다.

[0071] 그 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이 g.-130G>A만을 포함하는 반수체 1(haplotype 1; HA1)의 프로모터 활성이 대조군과 비교하여 46% 정도 증가하였고, 또한, g.-609G>A 및 g.-396G>A를 포함하는 반수체 2(HA2)의 경우도 대조군과 비교하여 67% 정도 증가하였다. 또한, g.-609G>A를 포함하는 반수체 4 및 g.-396G>A를 포함하는 벡터에서도 대조군과 비교하여 25% 정도 프로모터 활성이 증가한 것을 확인하였다(도 1B).

#### [0072] <실시예 4> 메트포르민(metformin) 약동학(pharmacokinetics)에 있어서 MATE2-K 유전적 변이의 영향 확인

##### [0073] <4-1> 피험자의 모집

[0074] 메트포르민 약동학 연구에 총 45명의 피험자가 모집되었고, 모든 피험자로부터 사전에 동의서를 받았고, 일반적인 신체검사 및 임상검사(laboratory test)를 통해 각각의 건강 상태를 측정하였다. 또한, 상기 피험자 중 빈혈(헤모글로빈 수치가 12 g/dl 미만), 약물 남용(drug abuse), 관상동맥 심장질환 증상(symptomatic coronary heart disease), 간 효소의 증가[아스파르트산 아미노기전달효소(aspartate aminotransferase; AST) 또는 알라닌 아미노기전달효소(alanine aminotransferase; ALT) 수치가 60 IU/L 초과], 혈청 크레아틴(serum creatinine) 수치가 1.5 mg/dl 초과, 대사증후군의 어떤 증상이 있는 경우, 일주일에 2 번 이상을 초과하는 알코올 음료를 섭취하는 경우, 하루에 10 개를 초과하여 흡연하는 경우, 약물 복용, 또는 임신한 경우에는 제외되었다.

[0075] <4-2> 메트포르민 약동학 연구 절차

[0076] 연구 프로토콜(protocol)은 연세대학교 세브란스 병원의 임상연구 심의위원회의 승인을 받았다(4-2010-0417, Clinicaltrial.gov: NCT01274130). 또한, 모든 단계는 국제 임상시험관리기준(International Conference on the Harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use-Good Clinical Practice; ICH-GCP)의 가이드라인의 의약품 등록을 위한 기술 요구사항의 조화에 관한 국제회의에 따라서 수행되었다.

[0077] 구체적으로, 피험자 45명을 대조군(n=33) 및 실험군(n=12)으로 나누었고, 실험군은 상기 실시예 <3-2>의 결과 프로모터 활성이 증가한 반수체 1 또는 2의 동형접합(homozygous)인 개체를 포함하고, 대조군에는 실험군이 아닌 피험자를 포함하였다. 모든 피험자들은 연구가 시작되기 적어도 5 일 전 정상적인 신체활동을 확인받았고, 하루에 200 내지 250 g의 탄수화물을 섭취할 수 있도록 영양학자가 식이요법을 조절하였으며, 연구 시작 3 일전부터 섭취한 음식일기를 작성하였다. 연구 시작 전날 마지막 식사는 세브란스 병원의 임상시험센터에서 제공되었다. 하루 금식 후, 아침 10시에 3-h 경구 포도당 내성 검사(oral glucose tolerance test; OGTT)가 수행되었고(1 일째), 또한, 피험자들은 약력학(pharmacodynamics)의 영향을 극대화하기 위하여 1,000 mg 및 750 mg의 메트포르민을 투여하였다. 먼저 첫째 날, 오후 8시에 1,000 mg의 메트포르민(Diabex Tab, 대웅제약, 대한민국)을 경구투여하고, 하룻밤 금식한 뒤 오전 8시에 750 mg의 메트포르민을 투여하였으며 오전 10시에 두 번째 OGTT를 수행하였다. 탄수화물-조절용 식사는 두 번째 투여 5시간 후에 제공되었다.

[0078] <4-3> 혈액 및 소변 샘플의 채취

[0079] OGTT를 위한 혈액 샘플은 포도당이 소화되기 전, 및 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 및 180 후에 채취되었다. 플라스마(plasma) 메트포르민 농도를 측정하기 위한 혈액 샘플은 2 차 투여 전, 및 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12, 및 24시간 후에 채취되었다. 2 차 메트포르민 투여 후, 모든 피험자는 소변 배출을 위해 4 시간마다 240 mL의 물을 섭취하였고, 0 내지 4, 4 내지 8, 8 내지 12, 및 12 내지 24 시간 간격 동안 첫 번째 배출된 소변을 제외한 소변을 채취하였다. 분석 전에 소변의 양을 측정하였고, 크레아틴 청소율(creatinine clearance;  $CL_{Cr}$ )을 계산하기 위하여 혈액 샘플로부터 혈청 크레아틴 수준을 측정하였다.

[0080] <4-4> 피험자의 유전자형 분석

[0081] 피험자의 MATE2-K 단일염기다형성(polymorphisms)을 분석하기 위하여 피험자의 게놈 DNA를 분석하였다.

[0082] 구체적으로, 게놈 DNA는 말초혈액(peripheral whole blood)로부터 QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN GmbH, 독일)를 사용하여 분리하였고, 서열분석을 위해서는 AB7300 Real-Time PCR System(Life Technologies, 대한민국)을 사용하여 TaqMan 대립 유전자 차별분석(TaqMan allelic discrimination assay)를 수행하였다. PCR 반응 혼합물은 전체 10  $\mu$ l에 2x TaqMan Genotyping Master Mix 5  $\mu$ l, 20x Drug Metabolism Genotyping Assay Mix 0.5  $\mu$ l, DNase-free water 3.5  $\mu$ l, 및 게놈 DNA 1  $\mu$ l를 첨가하여 제조하였고, MATE2-K rs758427(Assay ID: C\_2593949\_20), rs34834489(C\_2593950\_10, 및 rs12943590(C\_2593951\_10)(Life Technologies, 대한민국)을 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 반응 후에, 92°C 15초, 60°C 1분을 50회 반복하여 수행하였고, 대립 유전자 차별분석은 엔드-포인트 읽기(end-point read)를 수행하여 증폭 후(postamplification), AB Sequence Detection System 7300 SDS 소프트웨어 v.1.3.1(Life Technologies, 대한민국)을 사용하여 분석하였

다.

[0083] <4-5> 메트포르민의 농도 측정

[0084] 상기 실시예 <4-3>의 방법으로 채취된 플라스마 및 소변샘플로부터 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석기(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, API3200, Life Technologies, 대한민국)를 사용하여 플라스마 메트포르민의 농도를 측정하였다.

[0085] 구체적으로, 분석을 위한 샘플은 플라스마 또는 소변 시료를 나눠서 내부 표준 포모테롤(internal standard formoterol)이 있거나 없는 조건에서 아세토니트릴(acetonitrile)과 혼합하였다. 상기 혼합물을 5 분 동안 볼텍싱(vortexing)한 뒤, 10,000 rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 그리고나서, 상층액을 자동시료 주입기 바이알(autosampler vial)로 옮겨 나눠 담고, 10℃에서 컬럼에 1  $\mu$ l 주입하였다. 이동상(mobile phase)은 75% 아세토니트릴, 25% 2중-염균된 증류수, 및 5 mM 수성 포름산 암모늄 용액(ammonium formate aqueous solution)으로 수행되었고, 정량의 한계는 플라스마 10 ng/ml 및 소변 0.5  $\mu$ g/ml이었다.

[0086] <4-6> 메트포르민 약동학의 평가

[0087] 약동학 파라미터(parameter)는 Phoenix WinNonlin 6.1(Pharsight Corporation, 미국)을 사용하여 비-구분된 분석(non-compartmental analysis)에 의해 계산되었다.

[0088] 구체적으로, 최대 메트포르민 농도( $C_{max}$ ) 및 최대 농도의 시간( $T_{max}$ )은 관찰에 의해 결정되고, 이어지는 시간 동안의  $AUC_{met}$  값이 선형 사다리꼴 규칙(linear trapezoidal rule)에 의해서 계산되었다: 0 내지 1 시간, 0 내지 6 시간, 6 내지 24 시간, 및 0 내지 24 시간. 제거속도 상수(elimination rate constant;  $k_e$ )는 로그 변환농도-시간곡선(log-transformed concentration-time curve)의 선형회귀분석(linear regression analysis)에 의해 결정된 최적선(best-fit line)의 경사로부터 계산되었고, 제거 반감기(elimination half-life;  $t_{1/2}$ )는 하기 화학식 1로 계산되었다.

화학식 1

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_e}$$

[0089]

[0090] 또한, 메트포르민의 신장 청소율(renal clearance;  $CL_R$ )은 24 시간 동안 소변으로 배출된 메트포르민 전체 양을  $AUC_{met}$ 에 의해 나누어서 계산하였고,  $CL_{Cr}$ 은 콕크로프트-골트 식(Cockcroft-Gault equation)인 하기 화학식 2에 의해 계산되었다. 메트포르민 분비 청소율(secretion clearance;  $SrCL_R$ )은 메트포르민  $CL_R$ 에서  $CL_{Cr}$ 을 빼서 계산되었다.

화학식 2

$$\frac{(140 - \text{나이}) \times \text{몸무게}(kg) \times 0.85 (\text{여자일 경우})}{72 \times \text{혈청 크레아틴 수준}}$$

[0091]

[0092] 그 결과, 표 5 및 도 2에 나타난 바와 같이 MATE2-K 유전자형에 따른 메트포르민의 약동학적 파라미터가 대조군 및 실험군에서  $C_{max}$ 는 각각  $1615 \pm 391$  및  $1483 \pm 402$  ng/ml( $P = 0.088$ )이고, 또한, 0 내지 24시간 사이

( $AUC_{met(0-24)}$ )의 시간곡선에 대한 플라스마 메트포르민 농도는 각각  $9458 \pm 2425$  및  $8767 \pm 2034$  ng/ml · h( $P = 0.279$ )로 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 대조군 및 실험군의 메트포르민의  $CL_R$ 은  $539 \pm 76$  및  $633 \pm 102$  ml/분( $P = 0.006$ ), 및  $SrCL_R$ 은  $439 \pm 81$  및  $531 \pm 102$  ml/분( $P = 0.007$ )으로 각각 나타났으며(도 2), 결론적으로 메트포르민의  $CL_R$  및  $SrCL_R$ 은 대조군과 비교하여 실험군에서 각각 17.4% 및 21.0% 증가하였다.

[0093] <실시예 5> 메트포르민의 항-고혈당 효과에 있어서 MATE2-K 변이의 영향 확인

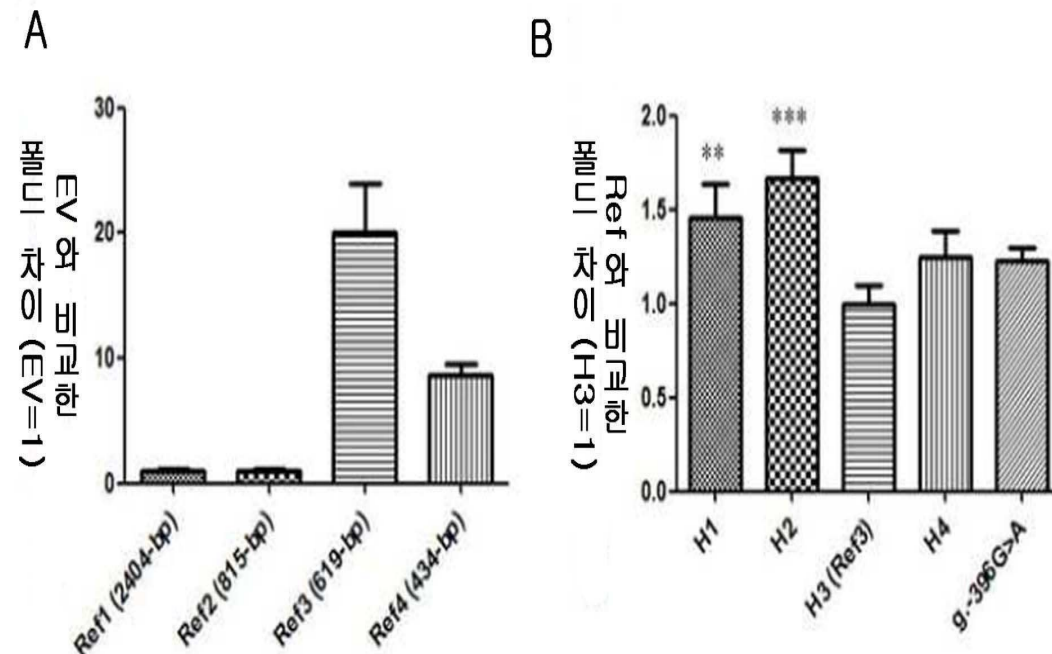
[0094] 피험자들은 첫째 날 및 둘째 날에 메트포르민을 투약하기 전후로 OGTT를 측정하였고, 이를 토대로 MATE2-K 유전자형에 따른 메트포르민의 항-고혈당 효과를 평가하였다.

[0095] 구체적으로, 피험자들은 실험이 시작되기 전 3일 동안 탄수화물-조절된 식이요법(200 내지 250 g/일)을 수행하였고, OGTT를 검사하기 전 14 시간 이상 금식하였다. OGTT 검사는 메트포르민 투여 전(1일 째)과 후(2일 째)로 두 번에 걸쳐서 진행하였다. 최대 포도당 수준( $G_{max}$ )은 관찰에 의해 결정하고, 혈중 포도당 농도에 대한 시간곡선의 아래 면적( $AUC_{gluc}$ )은 사다리꼴 규칙(trapezoidal rule)로 계산하였다. 상기  $AUC_{gluc60}$ 은 플라스마 포도당 농도가 증가하는 시기인 포도당 섭취 후 0 내지 60분 동안의 포도당 곡선(glucose curve) 아래 면적이고, 메트포르민의 혈당저하 작용(glucose-lowering action)은 메트포르민 투여 전과 후의  $G_{max}$  및  $AUC_{gluc}$  값의 차이에 의해 계산되었다.

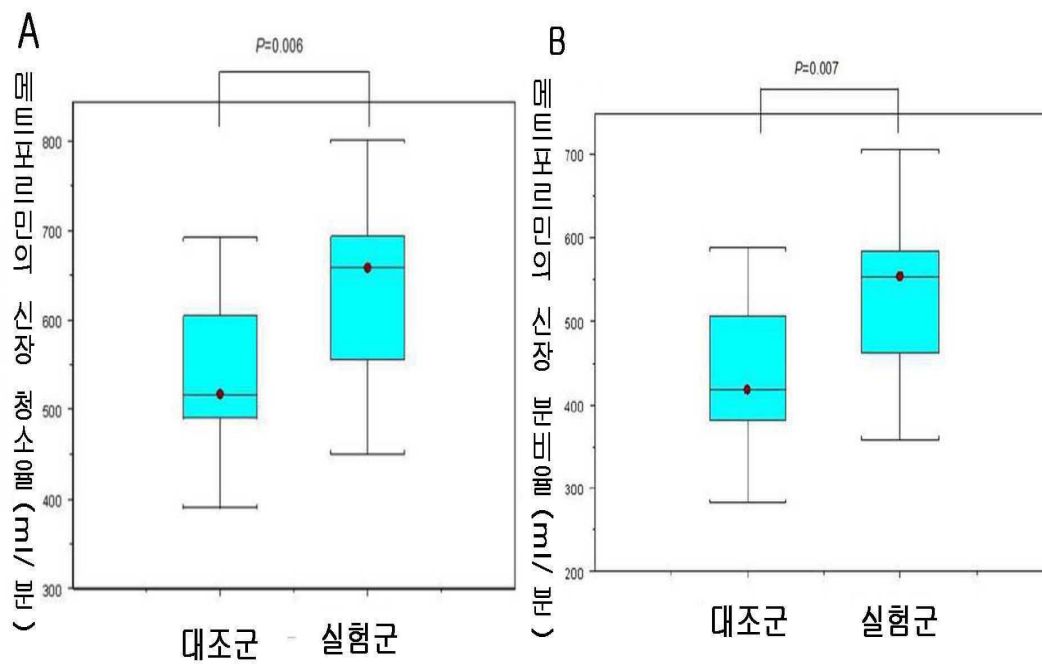
[0096] 그 결과, MATE2-K의 대조군 및 실험군 사이에서  $G_{max}$  및  $AUC_{gluc60}$  값은 차이를 나타내지 않았으며, 대조군 및 실험군에서  $G_{max}$ 는 각각  $32 \pm 15$  및  $37 \pm 14$  ml/dl( $P = 0.354$ ), 및  $AUC_{gluc60}$ 은 각각  $717 \pm 756$  및  $985 \pm 709$  ml/dl( $P = 0.502$ ), 또는  $AUC_{glu}$ 는  $1245 \pm 1661$  및  $1361 \pm 986$  ml/dl( $P = 0.3849$ )을 나타내었다.

도면

도면1



## 도면2



## 서열 목록

- <110> Ewha Womans University
- <120> Single nucleotide polymorphism of Human multidrug and toxin extrusion 2 gene and use thereof
- <130> 13P-03-51
- <160> 12
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Ref1(2404bp)Sense
- <400> 1
- ggtaccaagg cattgccagg agacta
- <210> 2
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

26

<220><223> Ref1(2404bp)Antisense

<400> 2

gctagcaagg gcaaagagag tccaca

26

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ref2(815bp)Sense

<400> 3

ggtaccttgg gaaggtgaca gaggac

26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ref2(815bp)Antisense

<400> 4

gctagcactg tgcctggag gctgtc

26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ref3(619bp)Sense

<400> 5

ggtaccaggt gtcctagctc ccatcc

26

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ref3(619bp)Antisense

<400> 6

gctagcgcac tggctaccct gcac

24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Ref4(434bp)Sense  
 <400> 7  
 ggtaccact gtggcacca tcacg 25

<210> 8  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Ref4(434bp)Antisense  
 <400> 8  
 gctagctcct ggaggctgtc cattcc 26

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> g.-396G>A  
 <400> 9  
 gcgtcctgta cccaggcgtg atggtgc 27

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> g.-396A>G  
 <400> 10  
 gcgtcctgta cccgggcgtg atggtgc 27

<210> 11  
 <211> 2247  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 agtgcctag gaggcagggc tcatccaca agttgcatg gtagccctc ctctgcccc 60  
 ttactcatca gccaggctgt accgacacgg gctgccagg caggggtgg ctgctggac 120

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aaagctggcc gtgcaggcgc tcaggcgtgc agggtagcca gtgccccggc caggaatgga  | 180  |
| cagcctccag gacacagtgg ccctggacca tgggggctgc tgccctgccc tcagcaggct  | 240  |
| ggttcccaga ggctttggga ctgagatgtg gactctcttt gccctttctg gaccctgtt   | 300  |
| cctgttccag gtgctgactt ttatgatcia catcgtgagc actgtgttct gcgggcacct  | 360  |
| gggcaagggtg gagctggcat cggtgacct cgcggtggcc ttgtcaatg tctgcggagt   | 420  |
| ttctgtagga gttggtttgt cttcggcatg tgacaccttg atgtctcaga gcttcggcag  | 480  |
| ccccaaacag aagcacgtgg gcgtgatcct gcagcggggc gcgctggtcc tgctcctctg  | 540  |
| ctgcctccct tgctgggcgc tcttctctaa caccagcac atcctgctgc tcttcggca    | 600  |
| ggaccggac gtgtccagggt tgaccagga ctatgtaatg attttcattc caggacttcc   | 660  |
| ggtgattttt cttacaatc tgctggcaaa atatttgcaa aatcagaaga tcacctggcc   | 720  |
| ccaagtctc agtgggtgtg tgggcaactg tgtcaacggt gtggccaact atgcctggt    | 780  |
| ttctgtgctg aacctggggg tcaggggtc cgcctatgcc aacatcatct ccagtttgc    | 840  |
| acagaccgtc ttctccttc tctacattgt gctgaagaag ctgcacctgg agacgtgggc   | 900  |
| aggttggtec agccagtgc tgcaggactg gggcccttc ttctccctgg ctgtcccag     | 960  |
| catgctcatg atctgtgtg agtgggtggc ctatgagatc gggagcttcc tcatggggct   | 1020 |
| gctcagtgtg gtggatctct ctgccaggc tgtcatctac gaggtggcca ctgtgaccta   | 1080 |
| catgattccc ttggggctca gcatcggggt ctgtgtccga gtggggatgg ctctgggggc  | 1140 |
| tgcggatact gtgcaggcca agcgtcggc cgtctcgggc gtgctcagca tagttggcat   | 1200 |
| ttccctggtc ctgggcaccc tgataagcat cctgaaaaat cagctggggc atatttttac  | 1260 |
| caatgatgaa gatgtcattg ccctggtag ccaggtcttg ccggtttata gtgtctttca   | 1320 |
| cgtgttttag gccatctgtt gtgtctatgg cggagtcttg agaggaactg ggaagcaggc  | 1380 |
| ctttgggtgcc gctgtgaatg ccatcacata ttacatcacc ggctaccac tgggcatcct  | 1440 |
| tctgaccttt gtggtcagaa tgagaatcat gggcctctgg ctgggcatgc tggcctgtgt  | 1500 |
| cttctggca actgctgcct ttgttgctta tactgcccgg ctggactgga agcttctgc    | 1560 |
| agaggaggct aagaaacatt caggccggca gcagcagcag agagcagaga gcaactgcaac | 1620 |
| cagacctggg cctgagaaag cagtctatc ttcagtggct acaggcagtt cccctggcat   | 1680 |
| tacctgaca acgtattcaa ggtctgagt ccacgtggac ttcttcagga ctccagagga    | 1740 |
| ggcccacgcc ctttcagctc ctaccagcag actatcagt aaacagctgg tcatccgccg   | 1800 |
| tggggctgct ctgggggcgg cgtcagccac actgatggtg gggctcacgg tcaggatcct  | 1860 |
| agccaccagg cactagcaaa gaagcttggg aatagaaagc caggagtggc tgtccccagt  | 1920 |
| atgcaaacac accacggctc gccctgcaaa aacaccaatg gggtctagt cagggtggaca  | 1980 |

ctttgaacca ctctcaaaa aaagaacttt ggctgattcc ttgtggtgac actcagaggg 2040

gtctgaacag acttgacaat tctgttctgg tcaagctgga gttttcttct gtgacttgga 2100

ctgctctaca gaagacatca gccaaactgca cgagtcagag tccagggatt gtcactatta 2160

ttaataatgt aaatggcttc aaatgggaca ctgcagataa aatcacaaaa accactgtta 2220

tattaaagat tacacatttc ctgggca 2247

<210> 12

<211> 566

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asp Ser Leu Gln Asp Thr Val Ala Leu Asp His Gly Gly Cys Cys

1 5 10 15

Pro Ala Leu Ser Arg Leu Val Pro Arg Gly Phe Gly Thr Glu Met Trp

20 25 30

Thr Leu Phe Ala Leu Ser Gly Pro Leu Phe Leu Phe Gln Val Leu Thr

35 40 45

Phe Met Ile Tyr Ile Val Ser Thr Val Phe Cys Gly His Leu Gly Lys

50 55 60

Val Glu Leu Ala Ser Val Thr Leu Ala Val Ala Phe Val Asn Val Cys

65 70 75 80

Gly Val Ser Val Gly Val Gly Leu Ser Ser Ala Cys Asp Thr Leu Met

85 90 95

Ser Gln Ser Phe Gly Ser Pro Asn Lys Lys His Val Gly Val Ile Leu

100 105 110

Gln Arg Gly Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Cys Leu Pro Cys Trp Ala

115 120 125

Leu Phe Leu Asn Thr Gln His Ile Leu Leu Leu Phe Arg Gln Asp Pro

130 135 140

Asp Val Ser Arg Leu Thr Gln Asp Tyr Val Met Ile Phe Ile Pro Gly

145 150 155 160

Leu Pro Val Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Leu Ala Lys Tyr Leu Gln Asn

165                      170                      175  
 Gln Lys Ile Thr Trp Pro Gln Val Leu Ser Gly Val Val Gly Asn Cys  
 180                      185                      190  
 Val Asn Gly Val Ala Asn Tyr Ala Leu Val Ser Val Leu Asn Leu Gly  
 195                      200                      205  
 Val Arg Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Ile Ile Ser Gln Phe Ala Gln Thr  
 210                      215                      220  
 Val Phe Leu Leu Leu Tyr Ile Val Leu Lys Lys Leu His Leu Glu Thr  
  
 225                      230                      235                      240  
 Trp Ala Gly Trp Ser Ser Gln Cys Leu Gln Asp Trp Gly Pro Phe Phe  
 245                      250                      255  
 Ser Leu Ala Val Pro Ser Met Leu Met Ile Cys Val Glu Trp Trp Ala  
 260                      265                      270  
 Tyr Glu Ile Gly Ser Phe Leu Met Gly Leu Leu Ser Val Val Asp Leu  
 275                      280                      285  
 Ser Ala Gln Ala Val Ile Tyr Glu Val Ala Thr Val Thr Tyr Met Ile  
 290                      295                      300  
  
 Pro Leu Gly Leu Ser Ile Gly Val Cys Val Arg Val Gly Met Ala Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Gly Ala Ala Asp Thr Val Gln Ala Lys Arg Ser Ala Val Ser Gly Val  
 325                      330                      335  
 Leu Ser Ile Val Gly Ile Ser Leu Val Leu Gly Thr Leu Ile Ser Ile  
 340                      345                      350  
 Leu Lys Asn Gln Leu Gly His Ile Phe Thr Asn Asp Glu Asp Val Ile  
 355                      360                      365  
 Ala Leu Val Ser Gln Val Leu Pro Val Tyr Ser Val Phe His Val Phe  
  
 370                      375                      380  
 Glu Ala Ile Cys Cys Val Tyr Gly Gly Val Leu Arg Gly Thr Gly Lys  
 385                      390                      395                      400  
 Gln Ala Phe Gly Ala Ala Val Asn Ala Ile Thr Tyr Tyr Ile Ile Gly  
 405                      410                      415  
 Leu Pro Leu Gly Ile Leu Leu Thr Phe Val Val Arg Met Arg Ile Met

420                      425                      430  
 Gly Leu Trp Leu Gly Met Leu Ala Cys Val Phe Leu Ala Thr Ala Ala  
 435                      440                      445  
  
 Phe Val Ala Tyr Thr Ala Arg Leu Asp Trp Lys Leu Ala Ala Glu Glu  
 450                      455                      460  
 Ala Lys Lys His Ser Gly Arg Gln Gln Gln Gln Arg Ala Glu Ser Thr  
 465                      470                      475                      480  
 Ala Thr Arg Pro Gly Pro Glu Lys Ala Val Leu Ser Ser Val Ala Thr  
 485                      490                      495  
 Gly Ser Ser Pro Gly Ile Thr Leu Thr Thr Tyr Ser Arg Ser Glu Cys  
 500                      505                      510  
 His Val Asp Phe Phe Arg Thr Pro Glu Glu Ala His Ala Leu Ser Ala  
  
 515                      520                      525  
 Pro Thr Ser Arg Leu Ser Val Lys Gln Leu Val Ile Arg Arg Gly Ala  
 530                      535                      540  
 Ala Leu Gly Ala Ala Ser Ala Thr Leu Met Val Gly Leu Thr Val Arg  
 545                      550                      555                      560  
 Ile Leu Ala Thr Arg His  
 565