

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 8일 (08.09.2017)



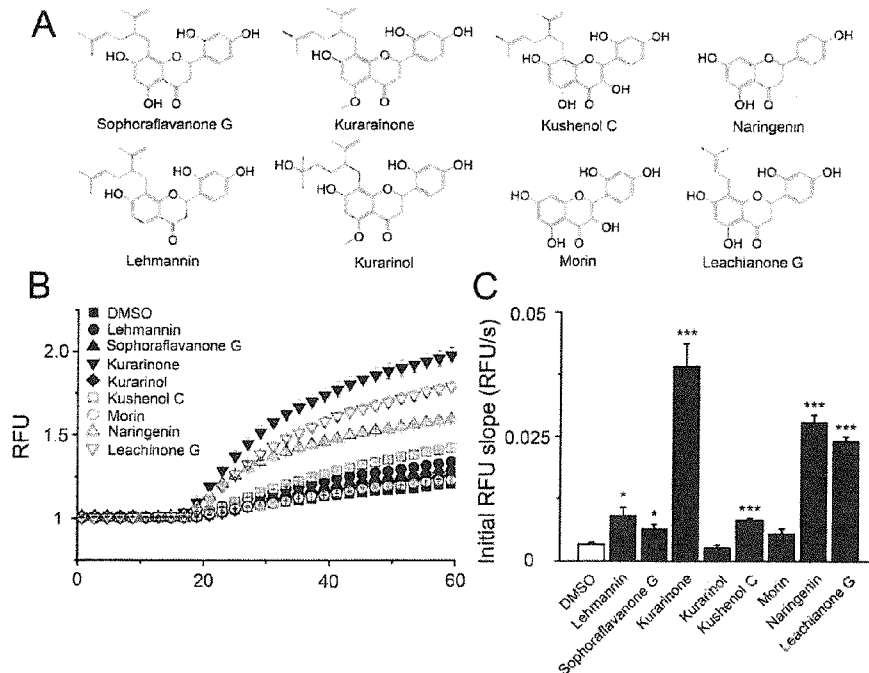
(10) 국제공개번호
WO 2017/150927 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/352 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002291
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 2일 (02.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0025327 2016년 3월 2일 (02.03.2016) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박철승 (PARK, Chul Seung); 62254 광주광역시 광산구 첨단중앙로 181번길 42-4, 101동 501호, Gwangju (KR). 이소정 (LEE, So Jung); 01308 서울특별시 도봉구 도봉로 795-21, Seoul (KR). 최재수 (CHOI, Jae Sue); 48594 부산시 남구 오륙도로 85, 109동 204호, Busan (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 대아 (DAE-A INTELLECTUAL PROPERTY CONSULTING); 06243 서울특별시 강남구 역삼로 123 한양빌딩 3층, 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, 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, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR BKCA CHANNEL ACTIVATION

(54) 발명의 명칭 : BKCA 채널 활성화용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to novel compounds capable of activating BKCa channels. The use of a composition of the present invention can effectively activate the BKCa channels, and can be used for prevention or treatment of various diseases caused by the deactivation of BKCa channels or the degradation of BKCa channel activity.

(57) 요약서: 본 발명은 본 발명은 BKCa 채널을 활성화시킬 수 있는 신규 화합물들에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 이용하면, BKCa 채널을 효과적으로 활성화시킬 수 있고, BKCa 채널 비 활성화 또는 활성 저하에 따라 발생하는 다양한 질병의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

WO 2017/150927 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, —
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: BKCA 채널 활성화용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 BK_{Ca} 채널을 활성화 시킬 수 있는 신규 화합물들에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 큰 전도도 Ca²⁺-활동성 K⁺채널(BK_{Ca} 채널)은 막 분극 및/또는 세포내 Ca²⁺에 의해 활성화 되고, K⁺ 이온을 세포 막을 가로질러 통과시킨다(Cui et al. 2009; Yang et al. 2015). BK_{Ca} 채널은 다양한 타입의 흥분성 세포(excitable cell) 및 비흥분성 세포(nonexcitable cell)에서 널리 발현되며, 신경전달물질 방출(Raffaelli et al. 2006), 평활근의 수축(Brenner et al. 2000; Herrera et al. 2000), 및 주기성 행동 리듬(Meredith et al. 2006)을 포함하는 몇몇 중요한 생리학적 과정의 조절에 관계된다. BK_{Ca} 채널의 기능장애는 간질(epilepsy)(Lorenz et al. 2007; Du et al. 2005), 발기 부전(erectile dysfunction)(Werner et al. 2005) 및 과민성 방광(overactive bladder; OAB)(Meredith et al. 2004)과 같은 몇몇 질병의 원인으로 알려져 있다.
- [3] OAB는 일반적으로 증가된 낮 또는 밤 시간 빈도를 갖는 요의절박(urinary urgency)의 존재에 의해 특징지워진다(Cerruto et al. 2012). OAB는 약 17%의 서방 세계 인구, 남성 및 여성 모두에 영향을 미치며, 연령과 함께 증가한다(Coyne et al. 2013). 항 무스카린제, 혼합-작용 약물(mixed-action drug) 및 β -아드레날린 수용체 작용제를 포함하는, 방광 내의 다른 리셉터를 타겟팅하는 OAB에 대한 약물들의 몇몇 클래스가 있다(Abraham et al. 2015). 비록 OAB 치료의 중심이 항무스카린 약리학이지만, 부작용 및 감소하는 효능이 장기간 순응 문제(long-term compliance problem)의 원인이 된다(Jayarajan et al. 2013). 그러므로 직접적으로 방광 평활근(urinary bladder smooth muscle; UBSM)를 타겟팅하고 부작용이 적은 OAB에 대한 신규 치료학적 처치가 크게 요구된다. OAB에 대하여 부상중인 치료학적 타겟 중에서, 방광 K⁺ 채널은 전임상 실험에서 큰 가능성을 보였다. 그러나 지금까지는 임상적으로 연구된 K⁺ 채널의 활성화 또는 개시자는 실망스러운 결과들은 얻었다(Andersson et al. 2013).
- [4] BK_{Ca} 채널은 가장 생리학적으로 중요한 K⁺ 채널 중의 하나이고, 건강 및 질병에서의 UBSM 기능을 조절한다(Petkov et al. 2014). BK_{Ca} 채널은 UBSM에서 고 발현된다(Hristov et al. 2011). 막 분극 및 세포 내 Ca²⁺ 모두에 의해 독특하게 활성화된 것에 의해, BK_{Ca} 채널 활성화는 안정막 전위의 유지 및 UBSM 상동성 수축(phasic contraction)을 촉발하는 자발적 활동 전위의 최초 재분극 단계의 기저가 된다. 더욱이 일련의 연구들은 BK_{Ca} 채널이 콜린성 및 푸린성-유도된 수축성(contractility) 감소에 대해 중요한 역할을 한다는 것을 보고하였고, BK_{Ca} 채널 발현 또는 기능의 변경이 OAB 발생에 기여할 수 있다는 것을

보여주었다(Werner ME et al 2007). 그러므로, 내인성 BK_{Ca} 채널의 화학적 활성화에 의한 UBSM 완화 유도가 가능하다. 사실 BK_{Ca} 채널의 몇몇 활성화 화합물이 그들의 방광 이완 효과에 대하여 보고되어 왔고(dela Pena et al. 2009; Layne et al. 2010; Ahn et al. 2011; La Fuente et al; Park et al. 2014), 더욱이 OAB 신드롬에 대한 치료 타겟으로서 그 가능성이 제시되었다. 그러나 BK_{Ca} 채널 활성화의 효능 및 특이도(specificity)는 그들의 임상적 이용에 대한 문제로서 남아 있었다(Nardi et al. 2006; Bentzen et al. 2014). 그러므로 높은 특이도를 갖고 더 나은 효능을 갖는 신규한 BK_{Ca} 채널 활성자를 발굴할 필요가 있다.

- [5] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[6]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 천연 화합물 라이브러리를 이용하여 BK_{Ca} 채널 활성화 효능이 있는 신규 화합물을 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 유사한 구조를 갖는 플라바논 유도체 중에서도 특징의 치환기를 갖는 화합물들이 크게 증가된 BK_{Ca} 채널 활성화능을 갖는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는 상태(diseases, disorders or conditions) 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

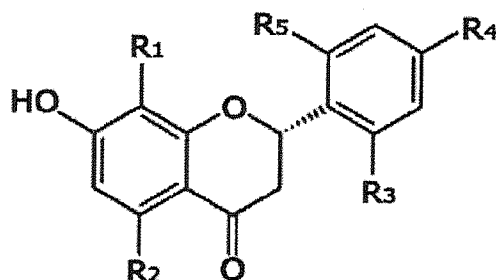
[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 1로 표시되는 플라바논 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 BK_{Ca} 채널 활성화용 약제학적 조성물을 제공한다:

[12] 일반식 1

[13]



- [14] 상기 일반식 1에 있어서, R₁은 수소 및 직쇄 또는 분지쇄형의 C₁-C₁₅ 알킬 또는 알케닐로 구성된 군으로부터 선택되는 소수성 치환기이고;
- [15] 상기 R₁이 C₆-C₁₅의 알킬 또는 알케닐인 경우 R₂는 C₁-C₄의 알콕시이며, 상기 R₁이 수소 또는 C₁-C₅ 알킬 또는 알케닐인 경우 R₂는 히드록시이고;
- [16] R₃, R₄ 및 R₅는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시이며, 단 R₃, R₄ 및 R₅ 중 적어도 하나는 히드록시이다.
- [17] 본 발명자들은 천연 화합물 라이브러리를 이용하여 BK_{Ca} 채널 활성화 효능이 있는 신규 화합물을 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 유사한 구조를 갖는 플라바논 유도체 중에서도 특정의 치환기를 갖는 화합물들이 크게 증가된 BK_{Ca} 채널 활성화능을 갖는 것을 규명하였다.
- [18] 본 발명자들은 BK_{Ca} 채널의 신규한 천연 활성자를 새롭게 개발된 세포-기반 분석을 이용하여 탐색하였다. 본 분석에서 이용된 돌연변이 BK_{Ca} 채널이 매우 크게 향상된 Ca²⁺ 민감도를 나타내므로, 채널 활성화를 위해 추가적으로 세포내 Ca²⁺를 증가시키는 것은 필요치 않았다(Lee et al. 2013). 그러므로, 본 발명자들은 전압 활동성 K⁺ 채널에 대해 상업적으로 이용가능한 탈륨(Tl⁺)-기반 형광 분석을 이용할 수 있었다. 천연 화합물의 라이브러리를 스크리닝함으로써, 본 발명자들은 플라바논 골격을 갖는 BKCa 채널 활성자인 화합물들을 발굴할 수 있었다.
- [19] 본 명세서 상의 용어 "알킬"은 직쇄 또는 분지쇄형의 포화 탄화수소기를 의미한다. C₁-C₁₅의 알킬은 탄소수 1 내지 15의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미한다. 본 명세서 상의 용어 "알케닐"은 탄소-탄소 이중결합을 하나 이상 포함하는 직쇄 또는 분지쇄형의 탄화수소기를 의미한다. C₁-C₁₅의 알케닐은 탄소수 1 내지 15의 알케닐 유니트를 가지는 알케닐기를 의미한다.
- [20] 본 발명의 R₁은 상술한 바와 같이 수소 및 직쇄 또는 분지쇄형의 C₁-C₁₅ 알킬 또는 알케닐로 구성된 군으로부터 선택되는 소수성 치환기로서, 히드록시기와 같이 친수성을 부여하는 치환기로 치환되어 있지 않은 상태의 것이다. 본 발명자들은 구체적인 일례로서, 쿠라리논(kurarinone) 화합물과 쿠라리논의 라반듀릴 치환기가 히드록시기(-OH)에 의해 치환되어 있는 외에 화학 구조식이 동일한 쿠라리놀(kurarinol)(참조: 도 3) 화합물의 BKCa 채널 활성의 비교를 통해 이를 확인하였다.
- [21] 또한 상술한 바와 같이 본 발명의 R₁이 C₆-C₁₅의 알킬 또는 알케닐인 경우 R₂는 C₁-C₄의 알콕시이며, 본 발명의 R₁이 수소 또는 C₁-C₅ 알킬 또는 알케닐인 경우 R₂는 히드록시이다. 본 명세서에서 용어 "알콕시"는 알킬기와 단일결합에 의해 결합된 산소 치환기를 의미하며, 히드록시기의 수소가 알킬기로 치환된 형태를 의미한다. C₁-C₄의 알콕시는 탄소수 1 내지 4의 알킬기가 히드록시기의 수소를 치환하여 산소에 결합되어 있는 알콕시를 의미한다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 R₁이 C₆-C₁₅의 알킬 또는 알케닐인 경우 R₂는 메톡시이다.

- [23] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 R1은 수소, 3-메틸-2-부텐-1-일(3-methyl-2-buten-1-yl) 또는 2-이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일(2-isopropenyl-5-methyl-4-hexen-1-yl)이다. 본 발명의 3-메틸-2-부텐-1-일 치환기는 프레닐(prenyl) 치환기로도 명명되며, 2-이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일 치환기는 라반듀릴(lavandulyl) 치환기로도 명명될 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 R1이 수소인 경우, 상기 R2는 히드록시이다.
- [25] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 R₁이 3-메틸-2-부텐-1-일인 경우, R2는 히드록시이다.
- [26] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 R₁이 2-이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일인 경우, R₂는 메톡시이다.
- [27] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 R₄는 히드록시이고, 상기 R3 및 R5는 각각 독립적으로 수소(-H) 또는 히드록시(-OH)이다.
- [28] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 R₃ 및 R₅ 중 적어도 어느 하나 이상은 수소이다.
- [29] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 일반식 1로 표시되는 플라바논 유도체는 쿠라리논(kurarinone), 나린제닌(naringenin) 및 리치아논 G(leachianone G)(참조: 도 3)로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물이다.
- [30] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 BKCa 채널의 전도도-전압(G-V) 상관관계를 음적 전압(negative voltage) 방향으로 이동시킨다. 전도도-전압 상관관계를 음적 전압 방향으로 이동시킨다는 것은 채널의 개방 형태를 안정화 시킴으로써 BKCa 채널을 활성화 시킨다는 것을 나타낸다.
- [31] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 조성물을 포함하는 BKCa 채널 활성 저하-관련 상태, 질환 또는 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [32] 본 명세서 상의 용어 "BK_{Ca} 채널 활성 저하-관련 상태, 질환 또는 질병"이란 BK_{Ca} 채널의 활성이 정상 수준에 비해 저하되어 있거나, 실질적으로 불활성화되어 있고, 이에 따라 BK_{Ca} 채널 활성화에 의해 제어되는 채널 신경세포의 흥분도(neuronal excitability), 신경전달물질 분비, 평활근세포의 수축 및 유모세포의 주파수 조정(frequency tuning) 등의 중요한 생리학적 기능이 저하된 상태, 이에 따라 발생하는 질환 또는 질병을 의미한다.
- [33] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 BK_{Ca} 채널 활성 저하-관련 상태, 질환 또는 질병은 심혈관질환(cardiovascular disease), 폐쇄 또는 염증 기도 질환, 하부 요로 질환(lower urinary tract disorders), 발기부전, 불안 및 불안-관련 상태, 간질 또는 동통을 포함한다.
- [34] 막 탈분극(membrane depolarization)과 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가는 BK 또는 Maxi-K 채널로 알려진 큰 전도성을 가진 칼슘-활성화된 포타슘 채널(large-conductance calcium-activated potassium(BKCa) channels)을

활성화시킨다(Salkoff, et al., 2006; Cui, et al., 2009). 상술한 채널들은 신경세포의 흥분도(neuronal excitability), 신경전달물질 분비, 평활근세포의 수축 및 유모세포의 주파수 조정(frequency tuning)에서 중요한 생리학적 기능들을 수행함이 알려져 있다(Brenner, et al., 2000; Nelson, et al., 1995; Fettiplace and Fuchs, 1999). BKCa 채널들은 동공-형성(pore-forming) α -서브유니트와 조절성 β -서브유니트로 구성된다. BKCa 채널의 α -서브유니트는 7개의 막통과 도메인들로 구성되며(Catterall, 1995) C-말단은 K⁺ 전도성(K⁺ conductance domain; RCK) 도메인을 조절하는 2개의 조절인자를 포함하는 데, 이들은 세포내 Ca²⁺ 농도에 반응하는 게이트 링(gating ring)을 형성한다(Jiang, et al., 2001). BKCa 채널은 고혈압, 관상 동맥 경련(coronary artery spasm), 요실금(urinary incontinence) 및 많은 신경학적 질환들과 밀접한 관련성을 갖는 치료 타겟임이 알려져 있다(Ghatta, et al., 2006). BKCa 채널이 결핍된 마우스는 요실금(incontinence), 과민성 방광(bladder overactivity) 및 발기 부전(erectile dysfunction) 같은 증상들을 나타내는 것이 알려져 있으며(Meredith, et al., 2004; Werner, et al., 2005) 이를 회복시키거나 활성화 시킴으로써 상기 질환들을 예방 또는 치료할 수 있음이 알려져 있다. 또한, BKCa 채널의 기능 장애는 소뇌성 운동 실조증(cerebellar ataxia) 및 발작성 이상운동질환(paroxysmal movement disorders)을 초래할 수 있다는 것이 알려져 있으며, 상기 질환들의 치료학적 타겟이 될 수 있다(Lee and Cui, 2010). BKCa 채널의 활성화는 K⁺ 유출을 증가시키고 과다분극을 야기함으로써 세포를 안정화시킨다. 따라서, BKCa 채널의 활성을 개방 또는 강화시키는 물질은 세포내 흥분성(excitability)을 감소시키고 평활근세포들의 긴장을 완화시키는 치료학적 이점들을 부여할 수 있다.

- [35] 본 명세서의 용어 "심혈관질환(cardiovascular disease)"은 심장, 심장 판막, 혈액 및 몸의 혈관구조(vasculature)에 영향을 미치는 수많은 상태를 분류하는데 이용되는 일반적인 용어로, 심장 또는 혈관에 영향을 미치는 질병들을 포함한다.
- [36] 본 발명의 심혈관질환은 죽상경화증, 죽상혈전증, 아테롬성 동맥경화증, 관상동맥질환, 허혈, 재관류 손상, 고혈압, 재협착증, 동맥 염증, 심근 허혈 또는 허혈성 심장 질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 울혈성 심부전, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥질환 및 말초혈관질환을 포함한다. 본 명세서의 용어 "말초혈관질환(peripheral vascular disease, PVD)"은 종종 사지 혈관의 협착시에 직면하는 심장 및 중추신경계 외측 혈관의 질환을 의미하며, 예를 들어 혈관에는 결함이 없지만 감기, 스트레스 또는 흡연과 같은 자극으로부터 발생하는 기능적 질환, 및 죽상경화증 병변, 국소 염증 또는 외상성 손상과 같은 혈관계의 구조적 결함으로부터 발생하는 기질적 질환으로 구분될 수 있다.
- [37] 본 발명의 폐쇄 또는 염증 기도 질환은 기도 과다반응, 진폐증, 알루미늄증, 탄분증, 석면증, 석폐증, 첩모탈락증(ptilosis), 철침착증(siderosis), 규폐증, 연초중독증, 면폐증(byssinosis), 사르코이드증(sarcoidosis), 베릴륨증, 폐기종, 급성

호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS), 급성 폐 손상(acute lung injury; ALI), 급성 또는 만성 감염성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 기관지염, 만성 기관지염, 색색거리는(wheezing) 기관지염, 기도 과다반응 또는 낭섬유증 악화, 또는 만성 기침을 포함하는 기침, 기도 과다반응의 악화, 폐 섬유증, 폐 고혈압, 염증성 폐질환, 및 급성 또는 만성 호흡 감염 질환을 포함한다.

- [38] 본 명세서의 용어 "하부 요로 질환"은 실뇨, 빈뇨, 급뇨, 및 야간뇨를 갖거나 또는 갖지 않는 과민성 방광에 의해서 특징되는 모든 하부 요로 질환을 포함한다. 따라서, 본 발명의 하부 요로 질환은 과민성 방광(overactive bladder), 과민성 배뇨근, 불안정성 방광(unstable bladder), 배뇨근과반사(detrusor hyperreflexia), 감각성 급뇨(sensory urgency) 및 배뇨근 과활동성의 증상 같은 과민성 방광(urinary bladder), 요실금 또는 긴박성 요실금(urge urinary incontinence), 스트레스성 요실금(urinary stress incontinence), 느린 배뇨, 배뇨 말기 적하(dribbling), 무뇨증 및/또는 허용 가능한 비율로 배뇨를 위한 압력을 가해야하는 필요와 같은 폐쇄성 배뇨 현상을 포함하는 하부 요로 질환 증상, 그리고 빈뇨 및/또는 급뇨와 같은 증상을 포함한다. 또한, 하부 요로 질환은 뇌졸중, 파킨슨 병(Parkinson's disease), 당뇨병, 다발성 경화증, 말초 신경병증, 또는 척수 손상을 포함하나, 이에 한정되지 않는 신경학적 손상의 결과로 발생하는 신경인성 방광을 포함할 수 있다. 또한, 하부 요로 질환은 전립선염, 간질성 방광염, 전립선 비대증, 및 척수 손상 환자의 경련성 방광(spastic bladder)을 포함할 수 있다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 하부 요로 질환은 과민성 방광, 불안정성 방광, 과민성 배뇨근, 배뇨근불안정(detrusor instability), 배뇨근과반사, 감각성 급뇨, 요실금, 긴박성 요실금, 스트레스성 요실금, 신경인성 요실금(reflex urinary incontinence), 느린 배뇨, 배뇨 말기 적하, 배뇨 장애(dysuria) 및 경련성 방광(spastic bladder)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [39] 본 명세서의 용어 "발기 부전(erection dysfunction)"은 성교 수행에 충분한 발기를 획득하거나 유지하는데 있어서 지속적인 불능 상태로, 이는 내피세포의 기능 이상(endothelial cell dysfunctions)과 밀접하게 연관되어 있다.

- [40] 본 발명의 BK_{Ca} 채널의 조절과 관련된 질환, 장애 또는 상태는 통증 장애(pain disorders); 범불안장애, 불안공황, 강박장애, 사회 공포증, 수행 불안(performance anxiety), 외상 후 스트레스 장애(posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 반응, 적응 장애(adjustment disorder), 건강염려성장애(hypochondriacal disorder), 분리 불안 장애, 광장공포증 및 특정 공포증(phobia) 같은 불안 및 불안-관련 상태; 및 단순 부분 발작, 복합체 부분 발작, 이차 전신 발작(secondary generalised seizure), 결신 발작(absence seizure), 근간대 발작(myoclonic seizure), 간대 발작(clonic seizure), 강직 발작(tonic seizure), 강직 간대 발작(tonic clonic seizure) 및 무동성 발작(atonic seizure)을 포함하는 전신 발작(generalised seizure) 같은 간질을

포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [41] 또한, 특정 공포증과 관련된 불안은 동물, 곤충, 폭풍우, 운전, 비행, 높이 또는 다리 건너기, 폐쇄 또는 좁은 공간, 물, 혈액 또는 상처뿐만 아니라, 주사 또는 외과적인 의료 및 치과 과정을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [42] 또한, 통증장애는 고통을 동반하는 장애로, 예를 들어 골격통증(musculoskeletal pain), 수술 후 통증(post operative pain) 및 수술 통증(surgical pain)과 같은 급성 통증; 만성 염증성 통증(예컨대, 류마티스 관절염 및 골관절염), 신경병증성 통증(예컨대, 대상포진 후 신경통(post herpetic neuralgia), 삼차신경병증(trigeminal neuralgia) 및 교감신경 유지 통증(sympathetically maintained pain)) 및 암과 연관된 통증 및 섬유근육통증(fibromyalgia)과 같은 만성 통증; 편두통과 연관된 통증; (만성 및 급성 모두) 통증, 및/또는 류머티즘열(rheumatic fever)과 같은 상태의 열 및/또는 감염; 인플루엔자(influenza) 또는 일반적인 감기와 같은 다른 바이러스 감염과 연관된 증상; 하부요통 및 경부통; 두통; 치통; 염좌(sprains) 및 좌상(strains); 근염(myositis); 신경통(neuralgia); 건막염(synovitis); 류마티스 관절염을 포함하는 관절염; 골관절염을 포함하는 퇴행성 관절증 (degenerative joint diseases); 통풍(gout) 및 강직성 척추염(ankylosing spondylitis); 건염(tendinitis); 윤활낭염(bursitis); 건선(psoriasis), 습진(eczema), 화상 및 피부염(dermatitis)과 같은 피부 관련 상태; 운동 손상(sports injuries); 및 수술 및 치과 과정으로 야기되는 손상과 같은 손상들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [43] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [44] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.
- [45] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

- [46] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 투여할 수 있고, 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용 액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제 인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [47] 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁 용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텍 솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [48] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 통상적인 제형이라 함은 예를 들면 경구(정제, 캡슐제, 분말제), 구강 내, 혀 밑, 직장 내, 질 내, 비강 내, 국소 또는 비경구(정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관 내를 포함) 투여 제형을 일컫는다. 예를 들면, 본 발명에 따른 화합물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다. 액체 제제는 현탁제(예를 들면, 메틸셀룰로오스, 위텍솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제조된다. 또한, 비경구적으로 예를 들면, 정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관내를 통하여 주사되는 경우 무균의 수용액 형태로서 사용하는 것이 가장 바람직하며, 이때 상기 용액은 혈액과의 등장성을 갖기 위하여 다른 물질들(예를 들면 염(salt) 또는 만니톨, 글루코오스와 같은 단당류)를 함유할 수도 있다.
- [49] 본 발명의 플라바논 유도체는 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및

알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만텔레이트를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [50] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 일반식 1의 플라바논 유도체를 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.
- [51] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다. 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 티에노피리미딘 유도체 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 입체이성질체 등을 모두 포함한다.

[52]

발명의 효과

[53] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[54] (a) 본 발명은 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는 상태(diseases, disorders or

conditions) 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [55] (b) 본 발명의 조성물을 이용하면, BK_{Ca} 채널을 효과적으로 활성화 시킬 수 있고, BK_{Ca} 채널 비 활성화 또는 활성 저하에 따라 발생하는 다양한 질병의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

[56]

도면의 간단한 설명

- [57] 도 1은 세포-기반 형광 분석을 이용한 BK_{Ca} 채널 활성화자의 스크리닝 결과를 나타낸다. 신규 BK_{Ca} 채널 활성화자 발굴을 위해 천연 화합물들의 라이브러리를 스크리닝하였다. 과활성 돌연변이 BK_{Ca} 채널(G803D/N806K)을 안정적으로 발현하는 AD293 세포를 TI⁺-기반 형광(FluxORTM)분석에 이용하였다. 형광 변화의 대표 트레이스를 상대적 형광 유닛(relative fluorescence unit, RFU)으로서 5가지 다른 화합물들에 대해 나타내었다. 각각의 화합물을 실험 전에 5 μ M 최종 농도로 각각의 테스트-웰로 운반하였고, 자극 버퍼(stimulus buffer)를 120초에 추가하였다. DMSO(■, 1%, 비히클) 및 쿠라리논(●)을 채워진 기호로서 강조하였다. 240초에서 얻은 RFU 값(B) 및 DMSO와 비교한 증가배율(fold-increase) (C)를 14가지 다른 화합물들에 대해 나타내었다. 쿠라리논은 회색으로 강조하였다.
- [58] 도 2는 쿠라리논의 처리 후의 형광 신호의 농도-의존 증가를 나타낸다. 안정적으로 돌연변이 BK 채널을 발현하는 AD293 세포를 다른 농도의 쿠라리논으로 처리하였다. 도 2의 A는 대표 형광 트레이스를 나타낸다. 20초 동안 기준 선을 얻은 후에, TI⁺-함유 자극 버퍼를 처리하였다. 세포들을 비히클로서의 1% DMSO(□) 또는 다른 농도의 쿠라리논(■: 3 μ M, ●: 5 μ M, ▲: 10 μ M, ▼: 30 μ M)의 존재하에서 배양시켰다. 세포들을 또한 쿠라리논(5 μ M)과 함께 BKCa 채널 차단제인 팍실린(paxilline) 1 μ M 로 배양시켰다(◆). 도 2의 B는 다른 농도의 쿠라리논에서의 최초 RFU 증가를 나타낸다. 에러 바(S.E.M.)를 나타내었다. 삽입도는 쿠라리논의 화학구조를 나타낸다.
- [59] 도 3은 플라보노이드 유도체들의 구조-활성 관계 연구결과를 나타낸다. 도 3의 A는 본 발명에서 이용된 플라보노이드의 구조를 나타낸다. 도 3의 B는 10 μ M로 처리한 각 화합물들의 RFU의 대표 트레이스를 나타낸다. 도 3의 C는 각 화합물 10 μ M의 존재 하에서의 최초 RFU 증가를 나타낸다.
- [60] 도 4는 거시적 BK_{Ca} 채널 전류의 쿠라리논에 의한 가역적 강화를 나타낸다. BK_{Ca} 채널에 의해 유발된 테일 전류의 대표 다이어리-플랏을 연속 기록으로서 나타내었다. 이온 전류를 -100 mV의 보유(holding) 전압으로부터 100 mV의 50-ms 스텝-펄스로 매초마다 기록하였다. 전류를 특정의 포인트(100 mV 전압 펄스 후 0.8 ms)에서 얻었다. 각각의 대표 전류 트레이스(a-d)는 화살표로 표시한 포인트에서의 전류를 나타낸다.
- [61] 도 5는 거시적 BK_{Ca} 채널 전류의 전류-전압 및 전도도-전압 관계 상의

쿠라리논의 효과를 나타낸다. 도 5의 A는 다른 쿠라리논 농도에서의 $3 \mu\text{M}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 에서의 BK_{Ca} 채널 전류의 대표 트레이스를 나타낸다. 이온 전류를 100-ms 전압 스텝-펄스로 유발시켰다. 전류를 -80 mV에서 200 mV까지 10 mV 증분으로 기록하였다. 보유 전압은 -100 mV였다. 도 5의 B는 전도도-전압($G-V$) 관계 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 전도도는 피크-테일 전류로부터 얻었다. 전류는 비히클 트레이스의 최대 전류에 의해 정규화시켰다. 각각의 기호들은 다른 쿠라리논 농도에서의 전도도를 나타낸다: 비히클(■, $n=12$), $3 \mu\text{M}$ (●, $n=8$), $5 \mu\text{M}$ (▲, $n=12$), $10 \mu\text{M}$ (▼, $n=8$) 및 $20 \mu\text{M}$ (◆, $n=4$). 도 5의 C는 절반-최대 전압($V_{1/2}$) 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 그래프 상의 각각의 기호들은 $V_{1/2}$ 의 S.E.M 및 평균을 나타낸다. 결과값들은 모든 독립 데이터 세트를 볼츠만 함수(Boltzmann function)($P_0=[1/(1+\exp\{(V_{1/2}-V)/k\})]$)를 이용하여 피팅함으로써 얻었다.

- [62] 도 6은 거시적 BKCa 전류의 활성화 및 비활성화 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 도 6의 A 및 B는 비히클(검정) 또는 $20 \mu\text{M}$ 의 쿠라리논(회색)으로 처리하였을 때 활성화(A) 및 비활성화(B)의 대표 트레이스를 나타낸다. 100 mV에서 얻은 전류 트레이스를 비교하였다. 도 6의 C 및 D는 다른 농도의 쿠라리논에서의 활성화 및 비활성화 시간-상수 값(τ)을 나타낸다. 기호들은 비히클(□, $n=12$), $3 \mu\text{M}$ (■, $n=8$), $5 \mu\text{M}$ (●, $n=12$), $10 \mu\text{M}$ (▲, $n=8$) 및 $20 \mu\text{M}$ (◆, $n=4$)을 나타낸다. 시간-상수 값은 Clampfit 프로그램을 이용한 지수 표준 함수($y(t)=A_1\exp(-t/\tau_1)+C$)를 이용하여 모든 독립 데이터 세트를 피팅하는 것으로부터 얻었다.
- [63] 도 7은 단일 BKCa 채널 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 도 7의 A의 각각의 그래프는 다른 막 전압에서의 BKCa 채널의 전형적인 단일-채널 전류 기록을 나타낸다. 세포 내부 Ca^{2+} 의 농도(피펫 Ca^{2+} 농도)를 $10 \mu\text{M}$ 로 고정시켰다. 전류를 다른 전압에서 쿠라리논의 부재하에 최초로 기록하였고, 이어서 쿠라리논($5 \mu\text{M}$)의 존재하에서 기록하였다. 쿠라리논 용액을 세포외부 측 상에 살포하였다. 실선은 단일 BK_{Ca} 채널의 닫힌 수준을 나타내고, 점선은 열린 수준을 나타낸다. 도 7의 B는 단일-채널 전도도 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 채널의 노(urinary) 전류-진폭을 $10 \mu\text{M}$ 세포 내 Ca^{2+} 용액에서 측정하였다. 쿠라리논(○)의 부재 하에서 채널 전류를 최초로 기록한 뒤, $5 \mu\text{M}$ 의 쿠라리논(●)을 살포하였다. 막 전압은 각각 75 mV($n=4$), 50 mV($n=5$), 25 mV($n=5$), -25 mV($n=3$), 및 -50 mV($n=2$)였다. 그래프 상에 프리셋팅된 각 데이터를 가우시안 함수(Gaussian function)를 이용하여 피팅된 모든 포인트 진폭 히스토그램으로부터 얻었다. 단일 채널의 전도도를 선형 함수로 피팅된 슬로프를 이용하여 추측하였다. 도 7의 C는 단일 BK_{Ca} 채널의 전압-의존 개방-가능성(P_0) 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 개방 가능성을 도 7의 B에서와 같은 트레이스를 이용하여 측정하였다. 단일 BK_{Ca} 채널의 세포막 의존적 개방확률의 증가를 쿠라리논이 없는 상태(○)와 $5 \mu\text{M}$ 쿠라리논을 처리한

상태에서 (●) 측정하고, 그 데이터 포인트를 볼츠만 함수(Boltzmann function)($P_0 = [1/(1+\exp\{(V_{1/2}-V)/k\})]$)에 의해 피팅시켰다. 도 7의 D는 50 mV에서의 5 μ M 쿠라리논의 부존재(상단 트레이스) 및 존재(하단 트레이스)상의 BKCa 채널의 대표 단일-채널 전류를 나타낸다. 도 7의 E는 50 mV에서의 5 μ M 쿠라리논의 부존재(빈 막대) 및 존재(채워진 막대) 상에서의 단일 BKCa 채널의 평균 개방-시간 및 평균 폐쇄-시간 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 각각의 막대 그래프는 평균 $\pm$ SEM(n=5)를 나타낸다.

[64] 도 8은 분리한 래트 방광 스트립에 있어서의 ACh에 의해 유도된 수축에 대한 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 도 8의 A는 쿠라리논의 예비 배양(preincubation) 유무에 따른 ACh에 의하여 유도된 대표 수축 트레이스를 나타낸다. 도 8의 B는 ACh-유도된 수축 상의 쿠라리논에 의해 유도된 이완 퍼센트 비율을 나타낸다. 각각의 막대 그래프는 6회 실험의 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. 검정은 대조구, 흰색은 쿠라리논 처리 실험을 나타낸다.

[65] 도 9는 래트의 배뇨 행동 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 도 9의 A는 쿠라리논(0.5 및 5 mg/kg)의 복강 내 주입 후의 WKY 및 SHR의 배뇨 빈도 상의 쿠라리논의 효과를 나타낸다. 배뇨 빈도를 3시간 동안 관찰하였다. 도 9의 B는 배뇨 총 횟수를 나타낸다. 각각의 기호 또는 막대는 5(WKY) 또는 7(SHR) 동물의 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다(***P<0.001).

[66]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[67] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[68] 실시예

[69] 실시예 1: 실험재료

[70] 794 천연 화합물을 함유하는 화학 라이브러리를 한국 화학 연구원(Korea Research Institute of Chemical Technology, KRICT; www.chembank.org)으로부터 얻었다. 추가적인 쿠라리논 및 이의 유도체는 *Sophora Flavescens*의 건조된 뿌리인 고삼(Kushen)으로부터 정제하였다(Jung et al. 2008). 쿠라리논 및 다른 화합물들은 스톡 용액으로서의 DMSO(dimethyl sulfoxide)(Sigma-Aldrich)에 용해시켰다.

4-클로로-7-(트리플루오로메틸)-10H-벤조퓨로[3,2-b]인돌-1-카복실산(CTBIC) 또한 DMSO 내에 용해시켰다.

[71] 실시예 2: 세포 배양

[72] 돌연변이 BKCa 채널을 발현하는, 개질된 HEK293 세포인 AD-293 세포(Lee et

al., 2013)를 10% 태아소혈청 및 항생제인 1 mg/ml 게네티신(Gibco)이 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)에 두었다. 37°C, 5% CO₂의 가습 조건에서 세포들을 배양하였다.

[73] 실시예 3: 형광 분석 및 데이터 분석

[74] 돌연변이 BKCa 채널(G803D/N806K)을 안정적으로 발현하는 AD-293 세포를 세포-기반 분석에 이용하였다(Lee et al., 2013). 대략 20000 세포/웰을 96-웰 클리어-바텀(clear-bottom)인, 폴리-D-라이신(Sigma-Aldrich)으로 코팅된 블랙-웰 분석 플레이트(black-wall assay plate)(Corning Incorporated) 상에 접종하였다. 화합물 라이브러리의 최초 스크리닝 및 후보 화합물의 추가적인 분석에 FluxORTM 칼슘 채널 분석(Invitrogen)을 이용하였다. 제조자의 다음 지침에 따라 실험들을 수행하였다: 성장 배지는 FluxORTM 형광 염료를 함유하는 로딩 버퍼 80 µl/웰로 교체하였고, 빛이 없는 조건에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 로딩 버퍼를 다양한 농도의 관심있는 화합물들을 함유하는 분석 버퍼(assay buffer) 100 µl/웰로 치환한 후 20분에서 30분 동안 배양하였다. DMSO(1%)는 비히클이며, 이를 모든 테스트 화합물에 이용하였다. BK_{Ca} 채널의 활성화로서 종래 확인된 CTBIC(Cormemis et al. 2005; Lee et al. 2012)를 양성 대조구조로서 이용하였다. 형광 측정을 위해, 최초 스크리닝에 시너지 TM H1 하이브리드 멀티-모드 마이크로플레이트 리더(BioTek Instrument Inc., Winnski, VT) 및 Cen5 소프트웨어를 이용하였고, 추가적인 분석에 Flexstation 3 멀티-모드 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices) 및 SoftMax®Pro 소프트웨어를 각각 이용하였다. 형광 시그널을 485 nm의 여기 파장 및 528 nm의 방출 파장에서 얻었다. 탈륨 이온을 함유하는 자극 버퍼(stimulus buffer)에 의해 막 분극화가 발생하였다. 형광 시그널을 두 상태에서 측정하였다: 자극 버퍼를 처리하기 전 2분 동안 매 10초 및 그 후 시너지 H1에 대한 자극 버퍼를 추가 후 3분간 매 10초마다, 그리고 자극 버퍼 처리 전 20초 간 매 2초 및 그 후 FlexStation 3에 대한 자극 버퍼를 추가 후 160초 동안 매 2초마다.

[75] 형광 시그널의 변화를 상대 형광 단위(relative fluorescence unit)(RFU 또는 F/F₀, 여기서 F₀는 각 형광 트레이스의 최소 형광 값이다). 쿠라린 및 이의 유도체의 활성화 효과들을 정량적으로 비교하기 위해, 최초 형광 증가를 자극 버퍼로 처리 후의 첫 세 포인트를 이용하여 계산하였고, 선형 슬로프를 OriginPro 9.1(OriginLab Corp., Northampton, MA)을 이용하여 예측하였다.

[76] 실시예 4: *Xenopus* 난모 세포 내에서의 복제된 BKCa 채널의 기능성 발현

[77] BKCa 채널 α -서브유닛(Slo1)를 이종 발현하는(heterologously expressing) *Xenopus laevis* 난모 세포를 전기 생리(electrophysiological) 기록에 이용하였다. 난모세포 발현 벡터 pNBC1.0을 이용한 래트(rat) BKCa 채널 α -서브유닛의 서브클로닝 및 기능성 발현은 종래 보고되었다(Ha et al., 2000). 본 발명에서 이용된 Slo1의 서열 정보는 GenBank에 발현 번호 AF135265로 공개되어 있다. 플라스미드 DNA는 NotI 제한 효소를 이용하여 선형화시켰고 상보적인

RNA(cRNA)를 mMessage Machine(Ambion)을 이용하여 DNA의 선형 형태로부터 뉴클레오시드 삼인산 및 캡 아날로그 m7G(5')ppp(5')G의 존재하에서 T7 RNA 중합효소를 이용하여 합성하였다.

- [78] 마취시킨 *X. laevis*(*Xenopus* I, Dexter, MI)의 난소 부엽(ovarian lobes)으로부터 스테이지 V 내지 VI의 난모세포를 외과적으로 제거하였다. 제거한 난모세포를 Ca^{2+} -프리 난모세포 링거(oocyte Ringer's)(OR) 배양 배지(86 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 및 10 mM HEPES, pH 7.6)로 이동시켰다. 난모세포를 3 mg/ml 콜라겐 분해효소(Worthington Biochemicals)를 함유하는 Ca^{2+} -프리 OR 배지 내에서 1시간 30분 내지 2시간 동안 배양하는 것에 의해 난모세포의 난포 세포(follicular cell) 층을 제거하였다. 그런 뒤 난모세포를 Ca^{2+} -프리 OR 배지 및 ND-96 배지(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 및 50 g/ml 겐타마이신, pH 7.6)로 광범위하게 세척하였다. 세척한 난모세포를 ND-96 배지에서 18°C로 보관하였다. 난모세포를 사용 전 적어도 하루동안 안정화(stabilization) 시켰다. 안정화 후, 각각의 난모세포에 대해, 거시적 전류 기록을 위한 50 nl 뉴클레아제-프리 물 내의 합성된 cRNA 대략 50 ng 및 마이크로디스펜서(Drummond Scientific, Broomall, PA)를 이용한 단일-채널 기록을 위한 1 ng(50 nl 뉴클레아제-프리 물 내에서의)을 주입하였다. cRNA 주입된 난모세포를 18°C에서 1 내지 3일간 ND-96 배지에서 배양시켰다. 패치-클램프 실험 직전에, 난모세포의 난황막(vitelline membrane)을 미세-검자(fine forceps)로 수동으로 제거하였다.

- [79] 실시예 5: 전기생리학적 기록 및 데이터 분석

- [80] 종래 알려진대로(Ha et al., 2000) 아웃사이드-아웃 배열 내에서 기가옴-셀 패치-클램프(gigaohm-seal patch-clamp) 방법을 이용하여 모든 거시적 전류 기록 및 단일-채널 기록을 수행하였다. 패치 피펫들을 붕규산염(borosilicate) 유리(WPI, Sarasota, FL)로부터 제조하였고, 패치 기록을 위해 2 내지 4 MΩ의 저항으로 불-광택 처리(fire-polished)하였다. 단일-채널 기록을 위해, 패치 피펫들을 또한 4 내지 8 MΩ 저항으로 불-광택 처리하였고, 전기적 노이즈를 감소시키기 위해 밀랍(beeswax)으로 코팅하였다. Axopatch 200B 증폭기(Axon Instruments)를 이용하여 채널 전류를 증폭시켰고, 4-극 베셀 필터(four-pole Bessel filter)를 이용하여 1 kHz에서 저주파-통과 필터링시켰으며(low-pass filtered), Digidata 1200A(Axon Instruments)를 이용하여 10 포인트/ms 비율로 디지털화시켰다.

- [81] 고농도의 세포 내 Ca^{2+} 에서, 100 mV로 간단히 전달된 막 전위에 의해, 단일 BKC_a 채널을 용이하게 활성화시켰다. 단일-채널 분석을 위해, 폐쇄 및 개방 상태 사이의 전환을, 절반의 단일 전류 진폭(unitary current amplitude)에서의 역가를 세팅하는 것에 의해 결정하였다. 발현된 채널의 단일-채널 전도도를 결정하기 위해, 가우스 분포(Gaussian distributions)로 피팅된 히스토그램으로부터 채널 전류의 평균 진폭을 얻었고, 막통과 전압에 대해 평균 전류를 도출하였다.

슬로프-전도도 값을 선형 회귀로부터 얻었다. 발현된 BKCa 채널의 거시적 전류를 -100 mV의 보유 전위(holding potential)로부터 전달된 전압-클램프 펄스에 의해 10 mV 증분(increment)으로 대개 -80 내지 200 mV 범위의 막 전위까지 활성화시켰다. 단일 BKCa 채널에 대해 기록된 개방 및 폐쇄 이벤트의 드웰-타임(dwell-time)은 선형 히스토그램 방법을 이용하여 분석하였다. 상기 드웰-타임 분포는 심플렉스-리스트-스퀘어 피팅 방법(simplex-least-squares fitting methods)(Clampfit, Axon Instruments)을 이용하여 단일 지수로 피팅시켰다. 드웰-타임 분포에서의 피크는 지수 성분의 시간-상수에 위치하였다.

- [82] 내인성 칼슘-활성화 클로라이드 채널의 활성화를 방지하기 위해, 단일 및 거시적 채널 기록을 위한 용액들은 비삼투성(nonpermeant) 음이온으로서 글루코네이트를 함유하였다. 세포내 및 세포외 용액들은 달리 명시하지 않는 한 다음의 성분들을 함유하였다: 120 mM 칼슘 글루코네이트, 10 mM MHEPES, 4 mM KCl, 및 5 mM MEGTA, pH 7.2. 요구되는 프리 $[Ca^{2+}]_i$ 를 제공하기 위해, 세포내 용액으로 첨가할 적절한 양의 총 Ca^{2+} 는 프로그램 MaxChelator(Patton et al., 2004; <http://maxchelator.stanford.edu/>)를 이용하여 계산하였다. 채널 특성들을 정확하게 비교하기 위해, 세포내 용액의 동일한 세트를 전체 실험들에 걸쳐 이용하였다. 상업적인 소프트웨어 패키지, 예컨대 Clampex 8.0 또는 8.1(Axon Instruments) 및 Origin 9.1(OriginLab Corp., Northampton, MA)를 단일-채널 및 거시적 기록 데이터 양쪽을 얻고 분석하는데 이용하였다. 데이터를 평균 $\pm$ SE(n=독립 기록의 수)로서 요약하였고, 짝지어진 스튜던트 t-검정(paired Student's t-test)를 이용하여 비교하였다. 0.05이하의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

- [83] 실시예 6: 방광 평활근의 등척성 장력(isometric tension) 기록

- [84] UBSM 실험의 등척성 장력 기록을 종래 알려진 방법으로 수행하였다(dela Pe ò a et al. 2009; Kullmann et al. 2014). 요컨대, 수컷 Sprague-Dawley 래트(300-350 g)를 CO₂ 질식으로 안락사시켰다. 그런 뒤, 방광을 절제하고, 네 개의 스트립으로 길이 방향으로 분할하였다(대략 2×8 mm). 분리된 스트립을 정적 마운트 및 힘-변위 변환기(force-displacement transducer) 사이에 클리핑시켰고, 10 ml의 크랩 용액(Krebs solution)((mM): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25.0 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 및 12.2 글루코오스; pH 7.35-7.40)을 함유하는 온도-제어된(37°C) 장기(organ) 배스(bath) 내에 현탁시켰다. 상기 장기 배스를 혼합물 95% O₂ 및 5% CO₂의 혼합물을 이용하여 지속적으로 거품발생시켰다. 각각의 UBSM 스트립을 1.0 g의 최적의 등척성 장력까지 신장시켰고, 60분간 평형(equilibration)시켰다. 평형 동안, 조직을 신선한 크랩 용액(Krebs solution)으로 매 15분마다 세척하였고, 기저 장력을 1.0 g까지 조정하였다. 평형 후 스트립을 지속적인 반응이 기록될 때까지 아세틸클로린(1 μ M)의 반복된 적용에 의해 안정화시켰다. 쿠라리논의 완화 효과를 조사하기 위해, 아세틸폴린의 첨가에 앞서 쿠라리논으로 조직을 30분간

전-배양시켰고(pre-incubated), 그런 뒤 쿠라리논의 존재하세엿
아세틸콜린-유도의 수축 반응이 반복되었다. 아세틸콜린-유도의 수축으로부터
기인한 장력에 있어서의 퍼센트 감소로서 이완(relaxation)을 표현하였다. 각
시리즈에서의 하나의 스트립을 시간 대조구로서 할당하였다. 등척성
장력에서의 변화를 Lab Chart Software(Version 7, AD Instruments)로 인스톨시킨
컴퓨터에 결부된 Power Lab Data Acquisition System(ADInstruments)을 이용하여
기록하였다. 데이터를 평균 $\pm$ SE(n=DSM 스트립의 수)로서 요약하였고, 짝지은
스튜던트 t-검정을 이용하여 비교하였다. 0.05 이하의 p-값을 통계적으로 유의한
것으로 간주하였다.

[85] **결과**

[86] **1. 탈륨-형광 분석을 이용한 BKCa 채널 활성화의 확인**

[87] 신규 BKCa 채널 활성화들을 확인하기 위해, 천연 원천들로부터 정제된 총 794
단일 화합물들을 Ti^+ 형광을 채용한 세포-기반 분석을 이용하여
스크리닝하였다. 5 μM 최종 농도에서, Ti^+ 형광이 증가된 몇몇 화합물들은
비히클(1% DMSO)과 유의하게 비교되었다(참조: 도 1A). 화합물들 가운데, 가장
강한 형광 증가는, *Sophora flavescens*로부터의 플라바논 화합물인 쿠라리논의
처리로부터 얻었다(참조: 도 2). 쿠라리논은 용량-의존 방식으로 Ti^+ 형광이
증가되었고(참조: 도 2A), 형광 증가는 선택적인 BKCa 채널 억제자인 1 μM
팍실린의 공동-처리에 의해 완전히 차단되었다. 다른 농도의 쿠라리논에 의해
유발된 최초의 RFU 증가를 도 2B(n=4)에서 정량하였다.

[88] 쿠라리논이 천연 플라바논 화합물이기 때문에, 플라보노이드의 몇몇 관련
화합물들을 시험하였다. 10 μM 농도(n=4)로 처리하였고, 상기 화합물들은 Ti^+
-형광 증가 상의 차별적 효과를 나타내었다. 쿠라리논, 리치아논 G, 및
나린제닌이 강함 형광 증가를 보인 반면에, 쿠라리놀을 포함한 다른 유도체들은
더욱 약한 효과를 나타내었다. 단지 플라바논 백분의 8번 위치에서의 지방족
체인 내의 추가적인 히드록실 그룹을 함유하는 쿠라리놀이 그 효능에서 극적인
감소를 보인다는 것은 주목할만 하다. 시험된 것들 중, 최초 Ti^+ -기반 형광 분석에
있어서 쿠라리논이 가장 강한 증가를 보였기 때문에, 이어지는 기능적 연구들은
본 화합물을 이용하여 수행하였다.

[89] **2. BKCa 채널의 거시적 전류 상의 플라바논 유도체의 효과**

[90] 비록 세포-기반의 Ti^+ -형광 분석이 고속-처리 스크리닝(high-throughput
screening)에 적합화 되었고, 최초의 BKCa 채널 활성화 후보들을 제공하였지만,
야생형 BKCa 채널을 이용한 전기 생리 각각의 화합물들의 활성을 입증하고
특성화할 필요가 있었다. 그러므로 *Xenopus* 난모 세포 상에 이중적으로 발현된
래트 BKCa 채널(rSlo1)의 α 서브유닛 상의 쿠라리논의 효과를 특성화하였다.
거시적 채널 전류 상의 시간-의존적 효과를, 3 μM 세포내 Ca^{2+} 의 존재하에서
아웃사이드-아웃 배열에 있어서의 절제된(excised) 막 패치들을 이용하여
조사하였다(참조: 도 4). 소 테일 전류(small tail current)가 각각의 시험 펄스에

의해 유발되는 반면에(참조: 도 4의 a), 세포외부 면에 대한 $5\text{ }\mu\text{M}$ 쿠라리논의 처리는 테일-전류를 시간-의존 방식으로 대단히 강화시킨다(참조: 도 4의 b 및 c). 쿠라리논의 제거 상에, 채널 전류는 기저 수준에 대해 점진적으로 탈-강화(de-potential)되었다(참조: 도 4의 d). 쿠라리논에 의한 BKCa 채널의 강화 및 탈-강화 모두가 두 상(two phases)을 보인다는 것을 주목할만하다: 몇 초 사이의 최초의 급속 증가, 및 몇분에 걸친 느리고 완만한 증가. 이중-지수 함수로 피팅될 때, 결합 시간-상수(association time-constant) 값은 고속 상(fast phase)(τ_{fast})에 대해 1.47 ± 0.34 초, 저속 상(τ_{slow})에 대해 64.9 ± 8.8 초로 각각 예상되었다. 비록 두 다른 상들이 명백하지만, BKCa 채널의 탈-강화는, 2.78 ± 0.95 초 및 90.06 ± 12.21 초로 각각 측정된 해리 시간-상수를 갖는 강화보다 더욱 길었다. 절제된 인사이드-아웃 패치 기록을 이용하여 쿠라리논을 세포 안쪽으로부터 처리하였을 때, BKCa 채널 전류의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 그러므로 이러한 결과들은 쿠라리논이 BKCa 채널의 활성을 세포 밖으로부터 직접적으로 및 가역적으로 강화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[91] **3. BKCa 채널의 거시적 전류 상의 플라마논 유도체의 농도 의존 효과**

[92] 다음으로 BKCa 채널의 플라마논 유도체-유도의 강화의 메커니즘을 연구하였다. 전압 펄스의 시리즈에 의해 BKCa 채널은 활성화 되었고, 활성화된 세포 외 쿠라리논의 증가된 농도 하에서 거시적 전류를 기록하였다. 쿠라리논 농도가 증가함에 따라, 채널 전류는 더 낮은 전압에서 활성화되고, 더욱 천천히 비활성화된다는 것이 명백하다(참조: 도 5A). 도 3B에서, 거시적 BKCa 채널 전류의 전압-의존 활성화는 전도도-전압(G - V) 관계로서 나타내었다. 쿠라리논은 점진적으로 G - V 커브를 좌측으로 이동시키고, 최대 전도도(G_{max})를 용량-의존 방식으로 증가시킨다. G - V 관계에서의 쿠라리논-의존 이동은 추가적으로 정량화시켰고, 도 5C에서 도시화 시켰다. $20\text{ }\mu\text{M}$ 쿠라리논의 존재하에서, 절반-활성 전압($V_{1/2}$)은 $107.4 \pm 2.2\text{ mV}$ 로부터 $27.7 \pm 3.0\text{ mV}$ 까지 음의 방향으로 대략 80 mV 이동된다. 쿠라리논은 또한 점진적으로 채널의 최대 전도도(G/G_{max})를 증가시켰다. G/G_{max} 는 $20\text{ }\mu\text{M}$ 쿠라리논에서 1.35로 예측되었고, 비히클 대조구에 비해 약 1.8배 더 높은 것이다. 그러므로 이러한 결과들은 쿠라리논이 더욱 음성인 막 전압에서 채널을 활성화 시킴으로써 BKCa 채널을 강화시키고, 채널의 최대 개방 가능성을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[93] **4. 활성화 및 비활성화 동역학 BKCa 채널 상의 플라마논 유도체의 효과**

[94] 도 5A의 거시적 전류 트레이스에 나타낸 바와 같이, BKCa 채널의 비활성화는 본 발명의 플라마논 유도체에 의해 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러므로 BKCa 채널의 개폐 운동 상의 쿠라리논의 효과를 조사하였다. 도 6에서, BKCa 채널의 활성화(또는 개방) 및 비활성화(또는 폐쇄) 절차를 분석하였다. $20\text{ }\mu\text{M}$ 의 존재 하에서 전류 레벨이 증가하는 반면에, 활성화율은 고려할만큼 달라지지 않았다(참조: 도 6A). 쿠라리논의 네 증가된 농도(0, 5, 10, $20\text{ }\mu\text{M}$)에서 활성화 시간-상수($\tau_{\text{activation}}$)는 유의하게 증가되지 않았다(참조: 도 6C). 반면에,

비활성화율은 쿠라리논에 의해 극적으로 감소하였다. 흥미롭게도, 채널이 더 높은 양의 전압에 의해 활성화되어져 왔을 때, 쿠라리논이 BKCa 채널의 폐쇄를 더욱 눈에 띄게 느리게 만든다는 점에서, 쿠라리논에 의한 비활성화의 감속(slowing)은 전압-의존적이었다. 종합적으로 이러한 결과들은 쿠라리논이 BKCa 채널의 개방 형태를 안정화 시키고, 쿠라리논의 결합친화도가 더 높은 전압에서의 채널 형태를 가지고 더욱 강해질 수 있다는 것을 보여준다.

[95] **5. BKCa 채널의 단일-채널 전류 상의 플라바논 유도체의 효과**

[96] 플라바논 유도체 작용의 메카니즘을 더 이해하기 위해, 그 효과를 단일-채널 레벨에서 조사하였다. 단일 BKCa 채널을 10 μ M 세포 내 Ca^{2+} 의 존재 하에서 아웃스탠드-아웃 패치에서 기록하였다. BKCa 채널을 활성화 시키기 위해, 막 전압을 80 mV 보다 더 높아질 때까지 최초로 탈분극시켰고, 패치 막 내의 채널의 수를 계수하였다. 오직 단일 채널을 함유하는 패치들만을 후속 실험들에 이용하였다. 5 μ M의 쿠라리논의 부재 또는 존재 하에서의 단일 채널의 대표 트레이스를 도 7A에 나타내었다. 채널의 개방은 예상대로 막 전압에 대해 크게 의존하였다. 그러나 개폐 행동은 세포 외측에 대한 5 μ M 쿠라리논의 적용에 의해 극적으로 변경되었다. BKCa 채널이 -25 mV 상의 대조구 용액에서 거의 개방되지 않는 반면, 채널의 더 잦은 개방이 명백하였다. 50 mV에서, 채널은 쿠라리논의 존재 하에서 연장된 기간동안 개방을 유지하였다. 채널 전도도 상의 쿠라리논의 효과를 시험하기 위해, 각 BKCa 채널의 단일 전류 진폭(unitary current amplitude)을 화합물의 존재 또는 부존재 상에서 다양한 막 전압에서 측정하였고, 단일-채널 전류-전압(I-V) 관계들을 도시하였다(참조: 도 7B). 단일-채널 전도도는 대조구에서 221.1 ± 16.4 , 쿠라리논에서 238.3 ± 8.7 pS로 각각 예상되었고, 화합물이 채널의 단일-채널 전도도를 유의하게 수정하지 못한다는 것을 나타낸다. 이후 단일 채널의 P0 상의 쿠라리논의 효과를 분석하였다. P0는 쿠라리논의 존재 및 부존재 상에서 몇몇 다른 전압으로 측정되었고, 볼츠만 함수(Boltzmann function)로 피팅시켰다(참조: 도 7C). 최대 개방의 절반이 요구되는 전압인 $V_{1/2}$ 은 절반-활성화 전압($V_{1/2}$)은 대조구에서 68.7 ± 3.7 mV, 5 μ M 쿠라리논의 존재하에서 43.7 ± 2.1 mV이었다(참조: 도 7D). 이러한 결과들은, 거시적 채널 전류에 있어서 이미 언급된 발견들과 잘 일치하여 단일 채널 전도도에 영향을 줌 없이, 쿠라리논이 채널의 개방 가능성을 증가시키는 것에 의해 BKCa 채널을 강화시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 그 후 쿠라리논의 존재 상의 단일 BKCa 채널들의 개폐 행동을 분석하였다. 쿠라리논이 단일 BKCa 채널의 P0를 매우 극적으로 증가시키기 때문에, 본 발명의 분석들을, 개방-폐쇄 전환이 합리적인 시간-스케일에서 비교될 수 있는 50 mV에서의 단일-채널 기록들로 제한하였다(참조: 도 7D). 평균 폐쇄-시간이 쿠라리논의 부존재 시 3.69 ± 0.80 ms이고 5 μ M의 쿠라리논의 존재 시 3.60 ± 4.1 ms로 측정되는 반면에, 평균 개방-시간은 각각 2.98 ± 0.34 ms 및 5.77 ± 0.90 ms으로 측정되었다(참조: 도 7E). 이러한 결과들은 쿠라리논의 결합이 개방 형태를 안정화시키고, 그럼으로써

채널의 폐쇄 비율을 채널의 개방 전환에 영향을 줌 없이 감소시킨다는 것을 나타내고, 나아가 거시적 전류 기록의 결과를 확증한다.

[97]

[98] **6. 래트 방광 조직에 대한 플라바논 유도체의 효과**

[99] 플라바논 유도체가 이형 시스템(heterologous system) 상에 발현된 복제 BKCa 채널을 강력하게 강화시키기 때문에, 플라바논 유도체 화합물이 또한 방광 평활근을 in vivo에서 이완시킬 수 있는지 확인코자 하였다. 아세틸콜린(ACh)-유발의 UBSM의 수축에 대한 쿠라리논의 효능을 확인하기 위해, 래트 배뇨근 스트립의 등척성 장력을 기록하였다. 1 μ M ACh이 피크 장력 및 이에 따른 상대적으로 안정적인 안정 레벨(plateau levles) 감소를 유발하는 반면에(참조: 도 8A), 쿠라리논을 이용한 조직의 전처리 는 유의하게 ACh-유발의 수축을 억제하였다. 이완 효과는 비히클 처리에 비하여 100 μ M 쿠라리논에서 $58.2 \pm 6.2\%$ 였다($p < 0.05$, $n=6$)(참조: 도 8B). 대조적으로 비히클 처리된 시간 매칭된 대조구 조직에서의 수축 반응에서는 유의한 변화가 없었다.

[100] **7. WKY 및 SHR의 배뇨 행동 상의 플라바논 유도체의 효과**

[101] 방광 이완 및 배뇨 활성 상의 플라바논 유도체의 효과를 추가적으로 입증하기 위해, 위스타 교토 래트(Wistar Kyoto rat, WKY) 및 자발성 고혈압 래트(spontaneous hypertensive rat, SHR)의 배뇨 행동을 조사하였다. 누적 배뇨 빈도를 쿠라리논을 경구 투여한 WKY 및 SHR에 대하여 도 9A에 나타내었다. 쿠라리논의 투여에 의해, 배뇨 빈도에서의 뚜렷한 차이점은 WKY 및 SHR 사이에서 명백하였다. 대조구 WKY의 배뇨 빈도가 5 mg/kg 용량 이상의 쿠라리논에 의해 영향을 받지 않은 반면, 화합물은 SHR에 대한 배뇨 빈도를 용량-의존 방식으로 감소시켰다. 3 시간 동안의 총 배뇨 빈도는 도 9B에 도시하였다. 5 mg/kg의 쿠라리논이 투여될 때, 배뇨 빈도에서의 유의한 감소가 SHR에서 관찰되었다(비히클에 대해 10.9 ± 1.4 및 쿠라리논에 대해 6.9 ± 0.8). WKY 대조구 래트에서는 상기와 같은 배뇨 빈도의 감소가 관찰되지 않았다. ex vivo 등척성 장력 기록과 함께, 상기 결과들은 추가적으로 쿠라리논이 배뇨근 근육 BKCa 채널을 강화하는 것에 의해 방광 이완 활성을 갖고, OAB 증상을 개선시키는 유효한 후보 화합물임을 보여준다.

[102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[103]

[104] **참고 문헌**

[105] 1. Abraham N, Goldman HB (2015) An update on the pharmacotherapy for lower urinary tract dysfunction. Expert Opin Pharmacother 16(1):79-93

- [106] 2. Ahn HS, dela Pena I, Kim YC, Cheong JH (2011) 4-Chloro-7-trifluoromethyl-10H- benzo[4,5]furo[3,2-b]indole-1 carboxylic acid (TBIC), a putative BKCa channel opener with uterine relaxant activities. *Pharmacology*, 87(5-6):331-40
- [107] 3. Andersson KE (2004) Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. *Lancel Neruol*3(1):46-53
- [108] 4. Andersson KE (1997) The overactive bladder: pharmacologic basis of drug treatment. *Urol* 50(6A suppl):74-84
- [109] 5. Andersson KE, Chapple CR, Cardozo L, Cruz F, Hashim H, Michel MC, et al. (2013) Pharmacological treatment of urinary incontinence. In: Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein AJ, editors. *Incontinence, 5th International Consultation on Incontinence*. [Paris]: ICUD-EAU; pp. 623-728
- [110] 6. Brading AF (1997) A myogenic basis for the overactive bladder. *Urol* 50(suppl6A):57-67
- [111] 7. Bentzen BH, Olesen SP, Rønn LC, Grunnet M (2014) BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol* 5:389
- [112] 8. Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT and Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876.
- [113] 9. Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muniz P (2010) Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric* 90(7):1238-44.
- [114] 10. Cerruto MA, Asimakopoulos AD, Artibani W, Del Popolo G, La Martina M, Carone R, Finazzi-Agrò E (2012) Insight into new potential targets for the treatment of overactive bladder and detrusor overactivity. *Urol Int.* 89(1):1-8.
- [115] 11. Coyne KS, Sexton CC, Bell JA, Thompson CL, Dmochowski R, Bavendam T, et al. (2013) The prevalence of lower urinary tract symptoms (LUTS) and overactive bladder (OAB) by racial/ethnic group and age: results from OAB-POLL. *Neurourol Urodyn.* 32:230-237.
- [116] 12. Cui J, Yang H and Lee US(2009) Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66, 852-75.
- [117] 13. De Groat WC(1997) A neurologic basis for the overactive bladder, *Urol*, 50(6A Suppl):36-52
- [118] 14. De Naeyer A, Vanden Berghe W, Pocock V, Milligan S, Haegeman G, De Keukeleire D (2004) Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a lavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. *J Nat Prod.* 67(11):1829-32.

- [119] 15. dela Pena IC, Yoon SY, Kim SM, Lee GS, Ryu JH, Park CS, Kim YC, Cheong JH (2009) Bladder-relaxant properties of the novel benzofuroindole analogue LDD175. *Pharmacology* 83(6):367-78
- [120] 16. Du G, Jin L, Han X, Song Z, Zhang H, Liang W (2009) Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Res* 69(7):3205-12.
- [121] 17. Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Luders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB and Wang QK(2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* 37, 733-738.
- [122] 18. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X and O'Rourke ST(2006) Large-conductance, calcium activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-16.
- [123] 19. Gormemis AE, Ha TS, Im I, Jung KY, Lee JY, Park CS, and Kim YC, 2005. Benzofuroindole analogues as potent BKCa channel openers. *Chembiochem* 6, 1745-1748.
- [124] 20. Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT(1997) Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C110-C117
- [125] 21. Herrera GM, Heppner TJ and Nelson MT(2000) Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 279:R60-R68
- [126] 22. Herrera GM, Etherton B, Nausch B, Nelson MT(2005) Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by KCa channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R402-R409
- [127] 23. Hristov KL, Chen M, Kellett WF, Rovner ES, Petkov GV (2011) Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human detrusor smooth muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C903- C912
- [128] 24. Jayarajan J, Radomski SB (2013) Pharmacotherapy of overactive bladder in adults: a review of efficacy, tolerability, and quality of life. *Res Rep Urol* 6:1-16
- [129] 25. Jensen, BS (2002) BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke. *CNS Drug Rev* 8(4), 353-360.
- [130] 26. Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP (2010) Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J Ethnopharmacol* 127(3):589-95.
- [131] 27. Jung HA, Jeong DM, Chung HY, Lim HA, Kim JY, Yoon NY, Choi JS (2008) Re-evaluation of the antioxidant prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull* 31(5):908-15

- [132] 28. Kim BH, Na KM, Oh I, Song IH, Lee YS, Shin J, Kim TY(2013) Kurarinone regulates immune responses through regulation of the JAK/STAT and TCR-mediated signaling pathways. *Biochem Pharmacol*85(8):1134-44.
- [133] 29. Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB 3rd, et al.(1994) Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33(19), 5819-5828.
- [134] 30. Kullmann FA, Daugherty SL, de Groat WC, Birder LA (2014) Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *J Vis Exp*18;(90):e51807.
- [135] 31. Layne JJ, Nausch B, Olesen SP, Nelson MT(2011) BK channel activation by NS11021 decreases excitability and contractility of urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(2):R378-84
- [136] 32. Lee BC, Lim HH, Kim S, Youn HS, Lee Y, Kim YC, Eom SH, Lee KW, Park CS (2012) Localization of a site of action for benzofuroindole-induced potentiation of BKCa channels. *Mol Pharmacol*82(2):143-55
- [137] 33. Lee BC, Kim HJ, Park SH, Phuong TT, Kang TM and Park CS (2013) Development of cell based assay system that utilizes a hyperactive channel mutant for high-throughput screening of BKCa channel modulators. *J Biotechnol* 167(1), 41-46
- [138] 34. Lee SW, Lee HS, Nam JY, Kwon OE, Baek JA, Chang JS, Rho MC, and Kim YK (2005) Kurarinone isolated from *Sophora flavescens* Ait inhibited MCP-1-induced chemotaxis. *J Ethnopharmacol* 97(3):515-9.
- [139] 35. Lorenz S, Heils A, Kasper JM, and Sander T(2007) Allelic association of a truncation mutation of the KCNMB3 gene with idiopathic generalized epilepsy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B, 10-13.
- [140] 36. Marty A(1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291, 497-500.
- [141] 37. Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo M (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci USA*97: 9579-9584.
- [142] 38. McMurry G, Casey JH, Naylor AM (2006) Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *Br J Pharmacol* 147:S62-S79.
- [143] 39. McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, and Leonard RJ (1995) Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14, 645- 650.
- [144] 40. Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, and Aldrich RW(2004)

- Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel. *J Biol Chem* 279, 36746-52.
- [145] 41. Meredith AL, Wiler SW, Miller BH, Takahashi JS, Fodor AA, Ruby NF and Aldrich RW (2006) BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat Neurosci* 9, 1041-1049.
- [146] 42. Nardi VC and Olesen SP (2006) Potassium channel openers: the case of BK channel activators. *Lett Drug Des Discov* 3: 210-218
- [147] 43. Park S, Regmi SC, Park SY, Lee EK, Chang JH, Ku SK, Kim DH, Kim JA (2014) Protective effect of 7-O-succinyl macrolactin A against intestinal inflammation is mediated through PI3-kinase/Akt/mTOR and NF-kappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol* 735C: 184-192
- [148] 44. Petkov GV (2014) Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. *Am J Physiology* 307(6):R571-R584
- [149] 45. Raffaelli G, Saviane C, Mohajerani MH, Pedarzani P and Cherubini E (2004) BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J Gen Physiol* 124, 147-157.
- [150] 46. Sanchez M, McManus OB (1996) Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 35(7), 963-968
- [151] 47. Seo OW, Kim JH, Lee KS, Lee KS, Kim JH, Won MH, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2012) Kurarinone promotes TRAIL-induced apoptosis by inhibiting NF- κ B-dependent cFLIP expression in HeLa cells. *Exp Mol Med* 44(11):653-64
- [152] 48. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52: 557-594.
- [153] 49. Sun, M., Han J, Duan J, Cui Y, Wang T, Zhang W, Liu W, Hong J, Yao M, Xiong S and Yan X. 2007, Novel antitumor activities of Kushen flavonoids in vitro and in vivo. *Phytother. Res.* 21(3):269-277
- [154] 50. Tang W, Eisenbrand G (1992) Chinese Drugs of Plant Origin. Springer-Verlag, pp. 931-943.
- [155] 51. Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW and Nelson MT (2005) Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol* 567, 545-56.
- [156] 52. Yang H, Zhang G, Cui J (2015) BK channels: multiple sensors, one activation gate, *Front. Physiol.* 6:29.
- [157] 53. Yilma AN, Singh SR, Morici L, Dennis VA (2013) Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for Chlamydia trachomatis inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013:102457.

- [158] 54. Zhou H, Lutterodt H, Cheng Z, Yu LL(2009) Anti-Inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. J Agric Food Chem. 57(11):4580-5.

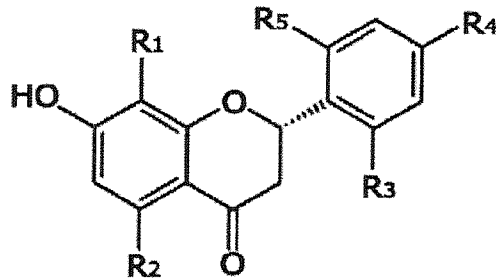
[159]

산업상 이용가능성

- [160] 본 발명은 본 발명은 BKCa 채널을 활성화 시킬 수 있는 신규 화합물들에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 이용하면, BKCa 채널을 효과적으로 활성화 시킬 수 있고, BKCa 채널 비 활성화 또는 활성 저하에 따라 발생하는 다양한 질병의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 일반식 1로 표시되는 플라바논 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 BKCa 채널 활성화용 조성물:
일반식 1

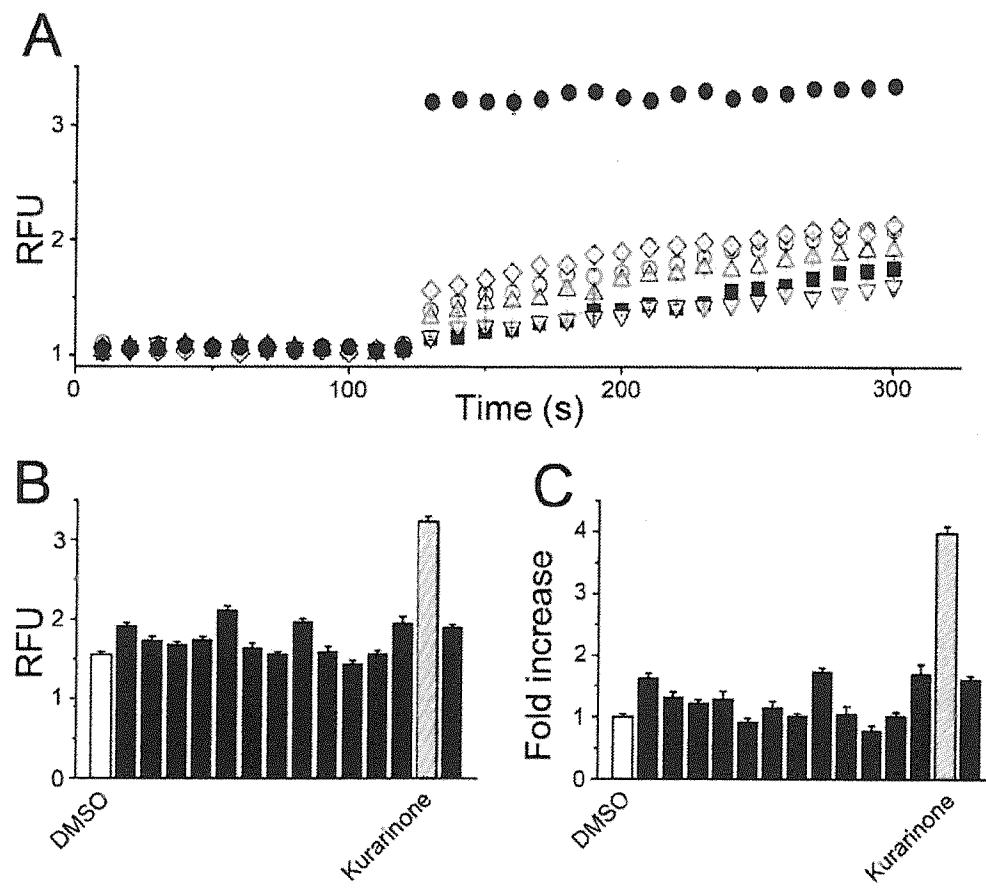


상기 일반식 1에 있어서, R1은 수소 및 직쇄 또는 분지쇄형의 C1-C15 알킬 또는 알케닐로 구성된 군으로부터 선택되는 소수성 치환기이고;
상기 R1이 C6-C15의 알킬 또는 알케닐인 경우 R2는 C1-C4의 알콕시이며,
상기 R1이 수소 또는 C1-C5 알킬 또는 알케닐인 경우 R2는 히드록시이고;
R3, R4 및 R5는 각각 독립적으로 수소 또는 히드록시이며, 단 R3, R4 및 R5 중 적어도 하나는 히드록시이다.

- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 R1이 C6-C15의 알킬 또는 알케닐인 경우 R2는 메톡시인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 R1은 수소,
3-메틸-2-부텐-1-일(3-methyl-2-buten-1-yl) 또는
2-이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일(2-isopropenyl-5-methyl-4-hexen-1-yl)
인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 R1이 수소인 경우, 상기 R2는 히드록시인 것을
특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 3 항에 있어서, 상기 R1이 3-메틸-2-부텐-1-일인 경우, R2는 히드록시인
것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 3 항에 있어서, 상기 R1이 2-이소프로페닐-5-메틸-4-헥센-1-일인 경우,
R2는 메톡시인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 R4는 히드록시이고, 상기 R3 및 R5는 각각
독립적으로 수소 또는 히드록시인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 R3 및 R5 중 적어도 어느 하나 이상은 수소인 것을
특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 일반식 1로 표시되는 플라바논 유도체는
쿠라리논, 나린제닌 및 리치아논 G로 구성된 군으로부터 선택되는
화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 BKCa 채널의 전도도-전압(G-V) 상관관계를 음적 전압(negative voltage) 방향으로 이동시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 BKCa 채널 활성 저하-관련 상태, 질환 또는 질병의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 BKCa 채널 활성 저하-관련 상태, 질환 또는 질병은 심혈관질환(cardiovascular disease), 폐쇄 또는 염증 기도 질환, 하부 요로 질환(lower urinary tract disorders), 발기부전, 불안 및 불안-관련 상태, 간질 또는 동통인 것을 특징으로 하는 조성물.

[도1]



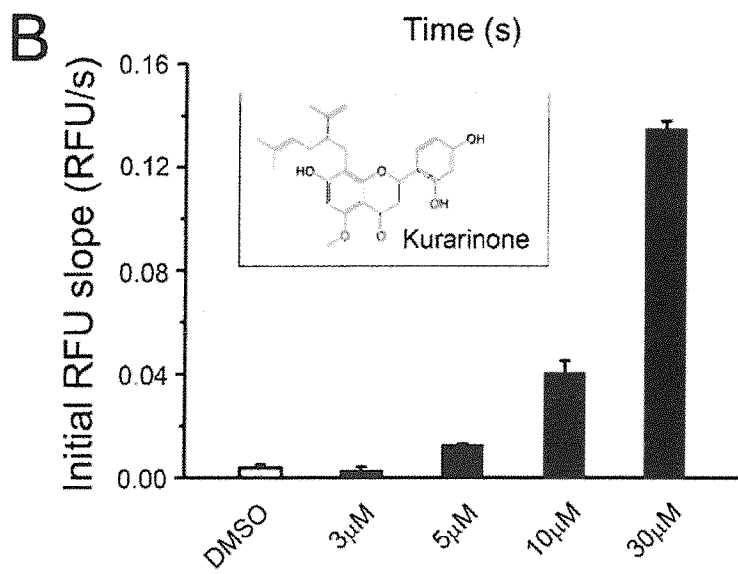
A

Fluorescence (RFU)

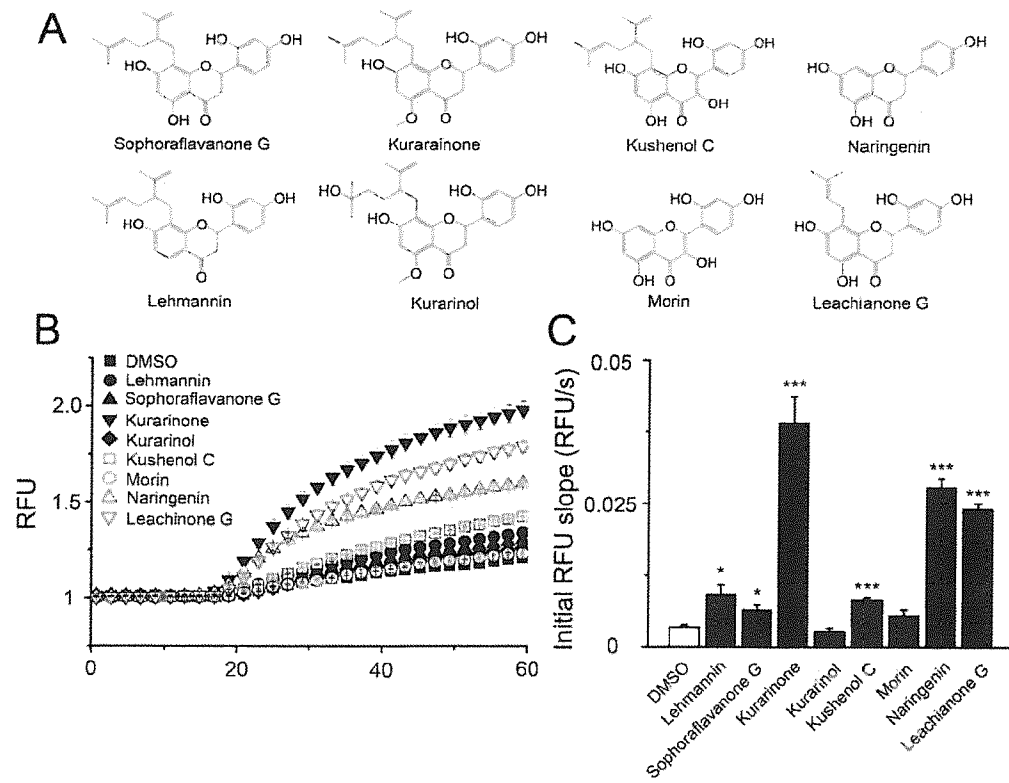
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0

0 20 40 60 80

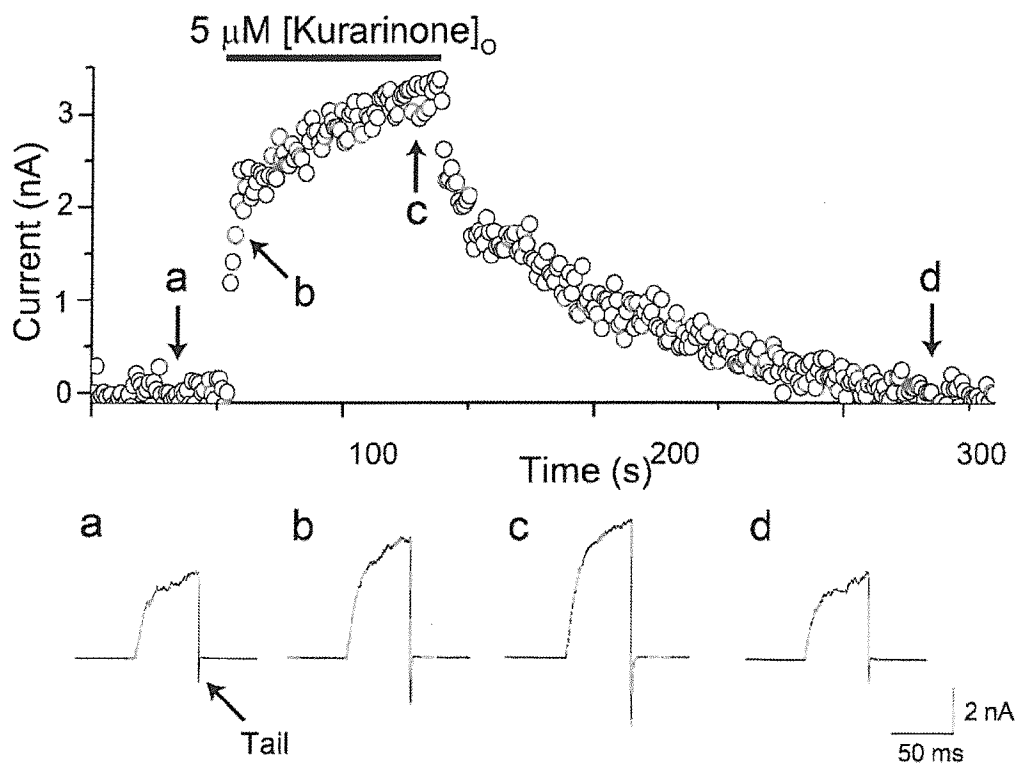
□ DMSO
 ■ 3 μ M
 ● 5 μ M
 ▲ 10 μ M
 ▼ 30 μ M
 ◆ Kurrarone 5 μ M + Paxilline 1 μ M



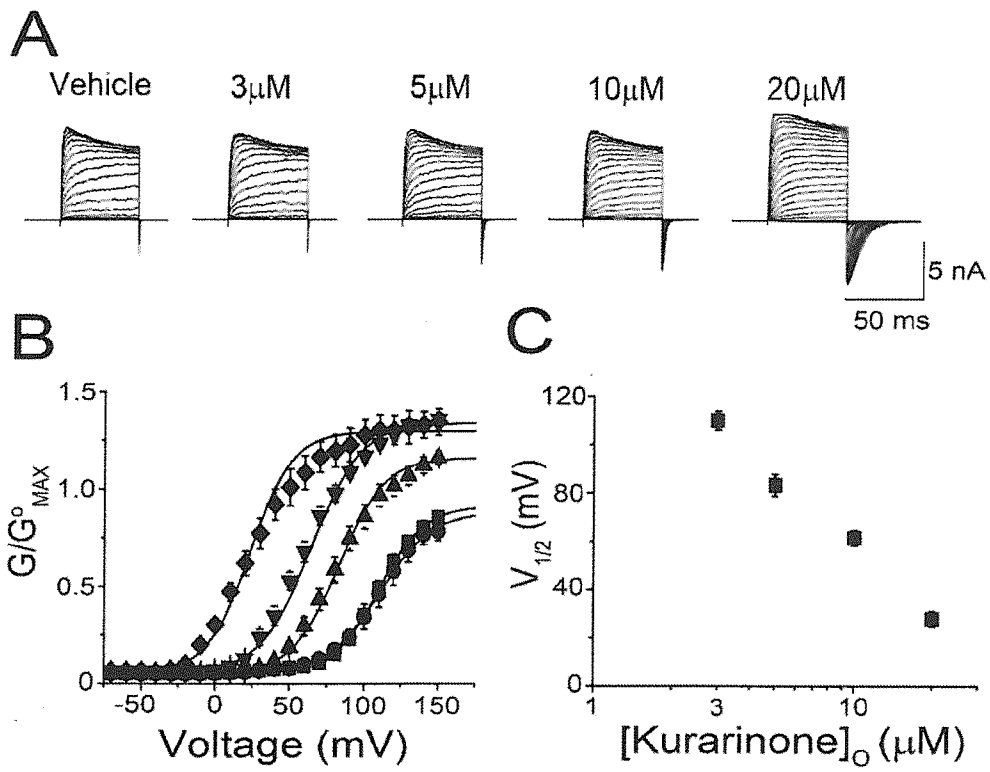
[도3]



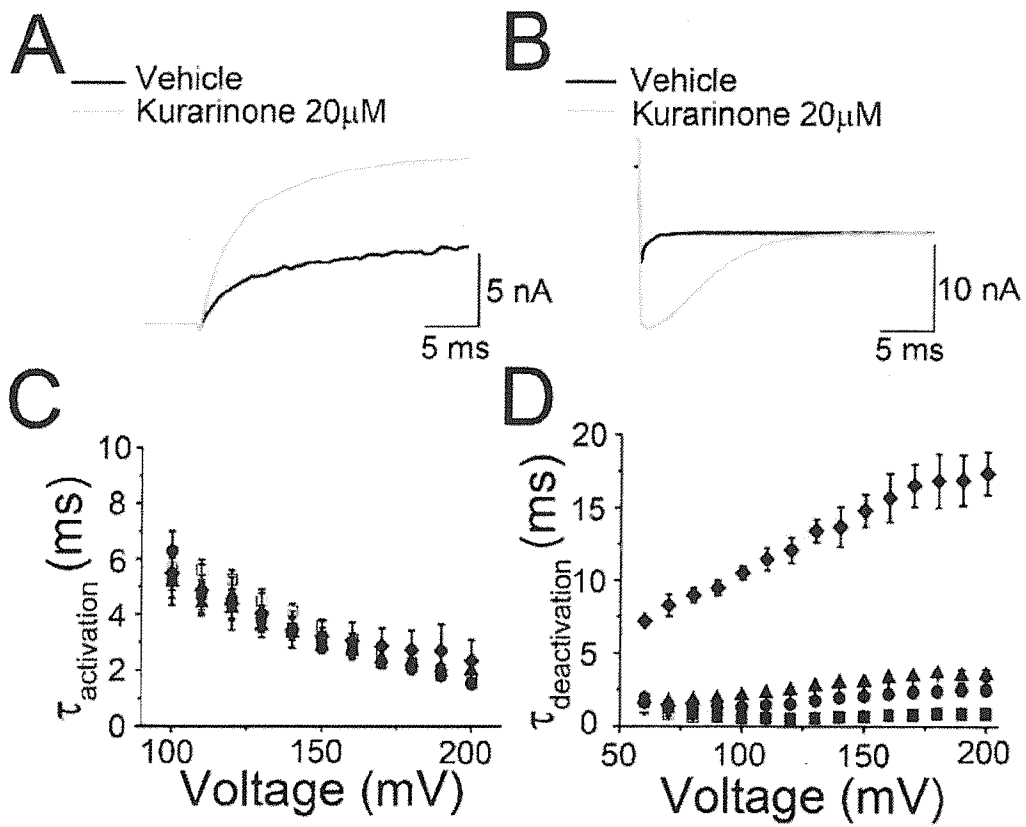
[도4]



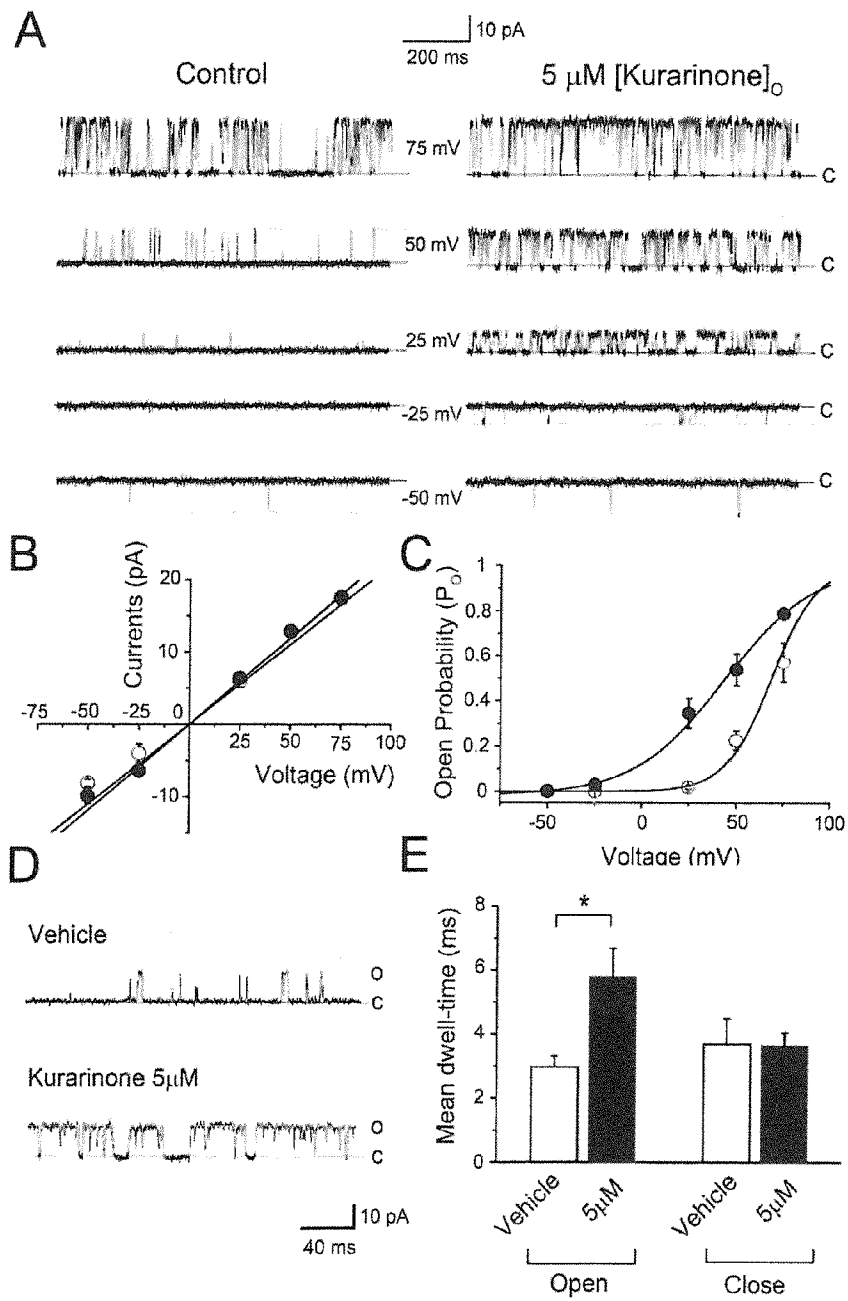
[도5]



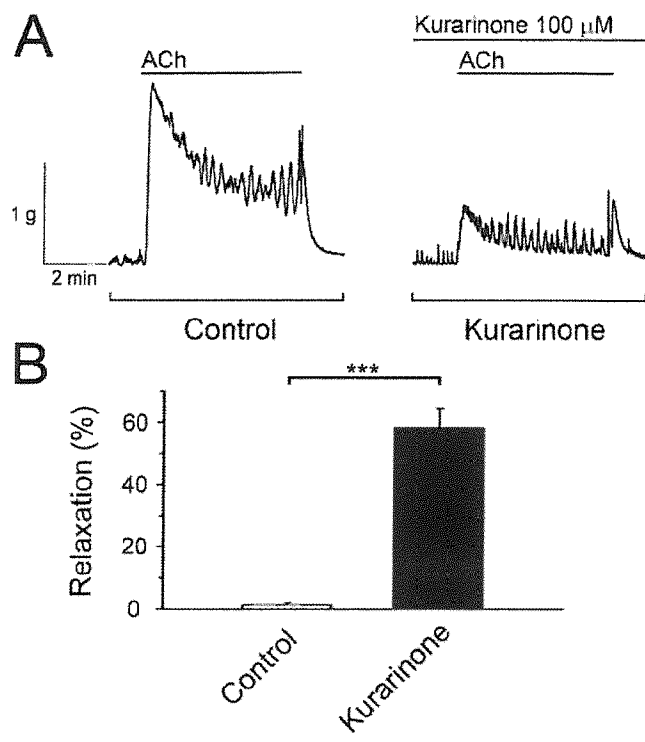
[도6]



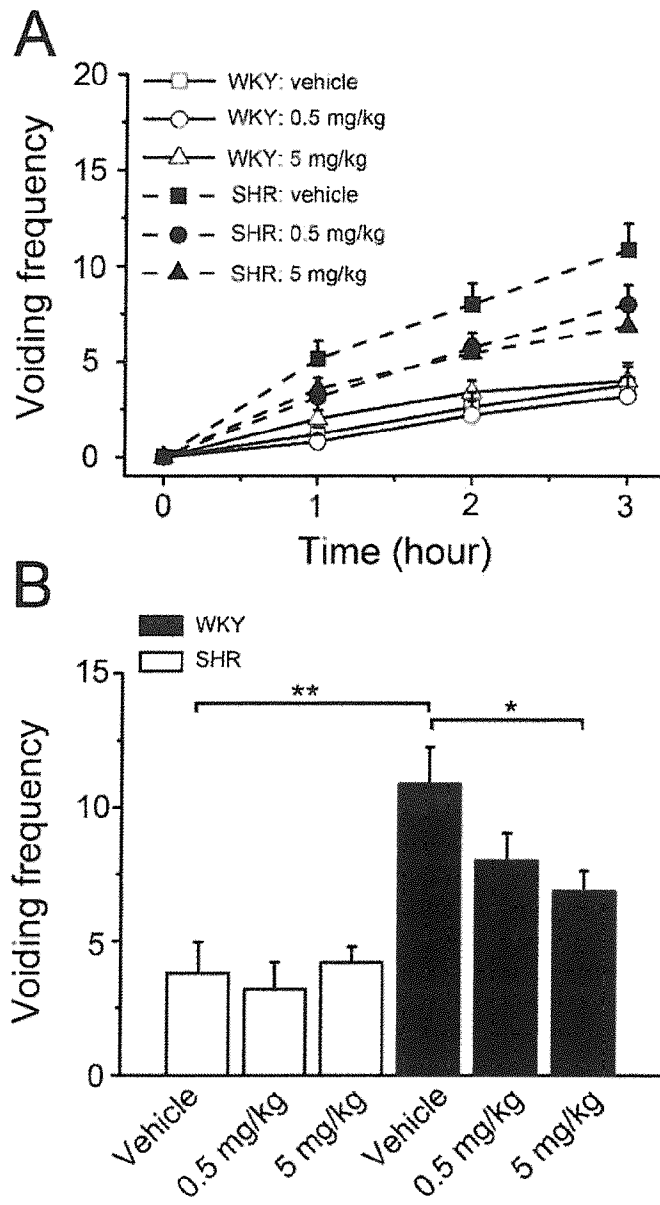
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/353(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/352; A61P 9/00; C07D 271/07; A61K 31/4245; A61K 31/4184; C07D 277/62; A61K 36/489; A61K 31/353; A61K 9/20; A61K 9/48

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), STN(Registry, CAplus), Google & Keywords: flavanone derivative, BKCa channel, kurarinone, naringenin, leachianone G

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAPONARA, S. et al., "(+/-)-Naringenin as Large Conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ (BKCa) Channel Opener in Vascular Smooth Muscle Cells", British Journal of Pharmacology, 2006, vol. 149, pages 1013-1021 See abstract; and figure 1.	1-12
X	KR 10-2009-0010504 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 30 January 2009 See claim 9; and table 1.	1-12
X	DONG, X. et al., "Synthesis, Biological Evaluation of Prenylflavonoids as Vasorelaxant and Neuroprotective Agents", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, vol. 19, pages 3196-3198 See abstract; and table 1.	1-12
A	KR 10-2008-0103106 A (NEUROSEARCH A/S.) 26 November 2008 See the entire document.	1-12
A	US 2004-0029937 A1 (TEUBER, L. et al.) 12 February 2004 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 JULY 2017 (06.07.2017)

Date of mailing of the international search report

06 JULY 2017 (06.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002291

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LEE, S. et al., "Urinary Bladder-relaxant Effect of Kurarinone Depending on Potentiation of Large-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels", Molecular Pharmacology, August 2016, vol. 90, no. 2, pages 140-150 See abstract; pages 147-149; and figures 3, 5, 6.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/002291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0010504 A	30/01/2009	NONE	
KR 10-2008-0103106 A	26/11/2008	AU 2007-224457 A1	20/09/2007
		CA 2646336 A1	20/09/2007
		CN 101384567 A	11/03/2009
		EP 1996190 A1	03/12/2008
		IL 192387 A	22/09/2009
		JP 2009-530238 A	27/08/2009
		MX 2008011409 A	22/09/2008
		NO 20084279 A	09/12/2008
		US 2009-0018172 A1	15/01/2009
		US 7985761 B2	26/07/2011
		WO 2007-104719 A1	20/09/2007
US 2004-0029937 A1	12/02/2004	AU 1549800 A	26/06/2000
		AU 760250 B2	08/05/2003
		CA 2349616 A1	15/06/2000
		CN 1177831 C	01/12/2004
		CN 1329601 A	02/01/2002
		EP 1144387 A1	17/10/2001
		JP 2002-531552 A	24/09/2002
		NZ 511334 A	30/06/2003
		US 2002-0055526 A1	09/05/2002
		US 6624186 B2	23/09/2003
		WO 00-34248 A1	15/06/2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/353(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61K 9/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/352; A61P 9/00; C07D 271/07; A61K 31/4245; A61K 31/4184; C07D 277/62; A61K 36/489; A61K 31/353; A61K 9/20; A61K 9/48

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), STN(Registry, CAplus), Google & 키워드: 플라바논 유도체, BKCa 채널, 쿠라리논, 나린제닌, 리치아논 G

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SAPONARA, S. 등, '(+/-)-Naringenin as large conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells', British Journal of Pharmacology, 2006, 149권, 페이지 1013-1021 초록; 및 도면 1 참조.	1-12
X	KR 10-2009-0010504 A (한국생명공학연구원) 2009.01.30 청구항 9; 및 표 1 참조.	1-12
X	DONG, X. 등, 'Synthesis, biological evaluation of prenylflavonoids as vasorelaxant and neuroprotective agents', Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19권, 페이지 3196-3198 초록; 및 표 1 참조.	1-12
A	KR 10-2008-0103106 A (뉴로서치 에이/에스) 2008.11.26 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 2004-0029937 A1 (TEUBER, L. 등) 2004.02.12 전체 문헌 참조.	1-12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 06일 (06.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 06일 (06.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	LEE, S. 등, `Urinary bladder-relaxant effect of kurarinone depending on potentiation of large-conductance Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channels`, Molecular Pharmacology, 2016.08, 90권, 2호, 페이지 140-150 초록; 페이지 147-149; 및 도면 3, 5, 6 참조.	1-12

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0010504 A	2009/01/30	없음	
KR 10-2008-0103106 A	2008/11/26	AU 2007-224457 A1 CA 2646336 A1 CN 101384567 A EP 1996190 A1 IL 192387 A JP 2009-530238 A MX 2008011409 A NO 20084279 A US 2009-0018172 A1 US 7985761 B2 WO 2007-104719 A1	2007/09/20 2007/09/20 2009/03/11 2008/12/03 2009/09/22 2009/08/27 2008/09/22 2008/12/09 2009/01/15 2011/07/26 2007/09/20
US 2004-0029937 A1	2004/02/12	AU 1549800 A AU 760250 B2 CA 2349616 A1 CN 1177831 C CN 1329601 A EP 1144387 A1 JP 2002-531552 A NZ 511334 A US 2002-0055526 A1 US 6624186 B2 WO 00-34248 A1	2000/06/26 2003/05/08 2000/06/15 2004/12/01 2002/01/02 2001/10/17 2002/09/24 2003/06/30 2002/05/09 2003/09/23 2000/06/15