



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011414
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 10일 (10.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0039319 2013년 4월 10일 (10.04.2013) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 500-712 광주 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박철승 (PARK, Chul-Seung); 500-712 광주 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학과, Gwangju (KR). 이병철 (LEE, Byoung-Cheol); 500-712 광주 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학과, Gwangju (KR). 김현주 (KIM, Hyun-Ju); 500-712 광주 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학과, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

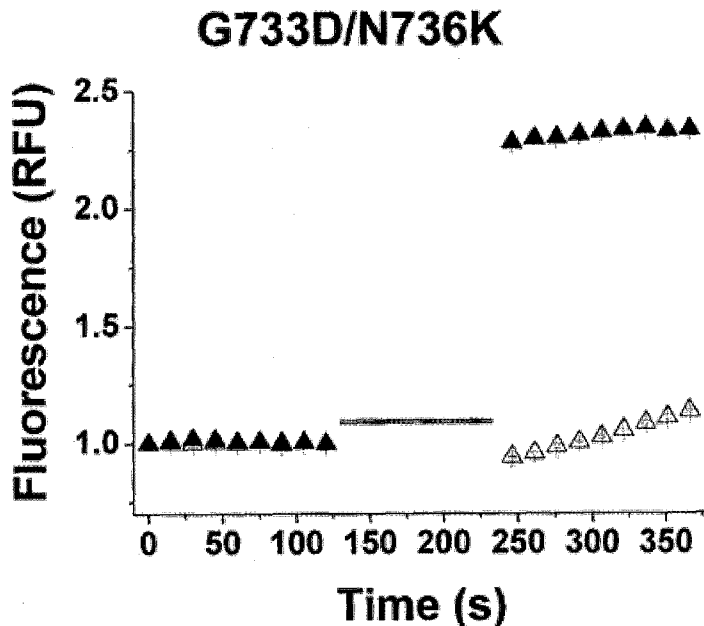
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: SCREENING METHOD FOR ION CHANNEL MODULATORS USING MUTATED BK_{Ca} CHANNEL

(54) 발명의 명칭: 돌연변이된 BK_{Ca} 채널을 이용한 이온 채널 조절인자의 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a doubly mutated BK_{Ca} channel construct and a novel cell-based screening system for ion channel modulators using same. A doubly mutated BK_{Ca} channel-comprising cell-based system of the present invention, when compared to a control group, shows remarkably increased fluorescence caused by membrane depolarization, regardless of whether there is a separate increase of [Ca²⁺]_i, and shows activity (movement in the negative direction of a G/V curve) that is further triggered by a known activator (for example, CTBIC). Therefore, compared to conventional methods (for example, an automated patch clamping method), the system of the present invention is capable of more effectively and far more accurately analyzing the activity of an ion channel, and thus can be effectively applied not only to the separation/identification of ion channel modulators but also to a screening for a therapeutic agent for a condition, disease or disorder related to the modulation of a BK_{Ca} channel.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널 컨스트럭트 및 이를 이용한 세포-기반된 신규한 이온 채널 조절인자의 스크리닝 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널-포함 세포-기반된 시스템은 대조군과 비교하여 별도의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가 유무와 관계 없이 막 탈분극에 의해 현저하게 증가된 형광을 나타내며, 알려진 활성인자(예컨대, CT-BIC)에 의해서 보다 촉발된 활성(G/V 곡선의 음적 방향으로의 이동)을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 시스템은 종래의 방법들(예컨대, 자동화된 패치 클램핑 방법)과 비교하여 보다 효과적이고 더욱 더 정밀하게 이온 채널의 활성 분석이 가능함으로써 이온 채널 조절인자들(modulators)의 분리/동정 뿐 아니라, $BKCa$ 채널의 조절과 관련된 질환, 질병 또는 장애의 치료제 스크리닝에 유용하게 적용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

돌연변이된 BK_{Ca} 채널을 이용한 이온 채널 조절인자의 스크리닝 방법

5 【기술분야】

본 발명은 대한민국 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 NN09570에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “도약연구(전략연구)지원사업”, 연구과제명은 “새로운 요실금 표적 이온채널 단백질의 도출 및 기능체어
10 연구”, 주관기관은 광주과학기술원, 연구기간은 2012.09.01 ~ 2013.08.31이다.

본 특허출원은 2013년 04월 10일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2013-0039319호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

15 본 발명은 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널 컨스트럭트 및 이를 이용한 세포-기반된 신규한 이온 채널 조절인자의 스크리닝 시스템에 관한 것이다.

【배경기술】

막 탈분극(membrane depolarization)과 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는
20 BK 또는 Maxi-K 채널로 알려진 큰 전도성을 가진 칼슘-활성화된 포타슘 채널(large-conductance calcium-activated potassium(BK_{Ca}) 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
25 중요한 생리학적 기능들을 수행한다(Brenner, *et al.*, 2000; Nelson, *et al.*, 1995; Fettiplace and Fuchs, 1999). BK_{Ca} 채널들은 동공-형성(pore-forming) α -서브유니트와 조절성 β -서브유니트로 구성된다. BK_{Ca} 채널의 α -서브유니트는 7개의 막통과 도메인들로 구성되며(Catterall, 1995) C-말단은 K^+ 전도성(K^+ conductance domain; RCK) 도메인을 조절하는 2개의
30 조절인자를 포함하는 데, 이들은 세포내 Ca^{2+} 농도에 반응하는 게이트 링(gating ring)을 형성한다(Jiang, *et al.*, 2001).

BK_{Ca} 채널은 매력적인 치료 타겟인데, 이는 이들이 고혈압, 관상 동맥 경련(coronary artery spasm), 요실금(urinary incontinence) 및 많은 신경학적 질환들과 밀접한 관련성을 가지기 때문이다(Ghatta, *et al.*, 2006). BK_{Ca} 채널이 결핍된 마우스는 요실금(incontinence), 과민성 방광(bladder overactivity) 및 발기 부전(erectile dysfunction) 같은 증상들을 나타낸다(Meredith, *et al.*, 2004; Werner, *et al.*, 2005). 또한, BK_{Ca} 채널의 기능 장애는 소뇌성 운동 실조증(cerebellar ataxia) 및 발작성 이상운동질환(paroxysmal movement disorders)을 초래할 수 있다(Lee and Cui, 2010). BK_{Ca} 채널의 활성화는 K⁺ 유출을 증가시키고 과다분극을 야기함으로써 세포를 안정화시킨다. 따라서, BK_{Ca} 채널의 활성을 개방 또는 강화시키는 물질은 세포내 흥분성(excitability)를 감소시키고 평활근세포들의 긴장을 완화시키는 치료학적 이점들을 부여할 수 있다.

현재까지, 종래의 패치 클램프 분석이 이온 채널 조절인자들(modulators)의 발견을 위한 가장 신뢰할만한 기법으로 간주되고 있다. 하지만, 매뉴얼 패치 클램핑(patch clamping)은 매우 낮은 처리능력(low-throughput)을 나타내며 높은 수준의 기술적 전문 지식을 요구한다. 따라서, 플럭스 어세이(flux assays), 방사성리간드 결합 어세이(radioligand binding assays), 형광-기반된 어세이 및 자동화된 패치 클램핑 같은 더 높은 처리능력을 요구하는 많은 대체 방법들이 개발되어 왔다(Zheng, *et al.*, 2004). 그럼에도 불구하고, 상술한 더 높은 처리능력을 가진 방법들과 합치되는 BK_{Ca} 채널들의 분석을 위한 세포-기반된 어세이들을 확립하는 것이 어려운 실정이었다.

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.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 이온 채널 조절인자들(modulators)의 동정 및 연구를 위한 세포-기반된 효과적인 고속(high-throughput) 스크리닝 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된

5 과다활성(hyperactive) BK_{Ca} 채널을 제조하고 상기 BK_{Ca} 채널이 낮은 Ca²⁺의 농도에서도 전압 펄스에 의해 활성화되며 세포-기반된 어세이 플랫폼에서 BK_{Ca} 채널 활성인자(예컨대, CTBIC)에 의해 활성 촉진(potentiation)된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 이온 채널 조절인자(modulators)의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 돌연변이된 BK_{Ca} 채널 단백질을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

15 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는 상태(diseases, disorders or conditions)의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

20

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

25 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 이온 채널 조절인자(modulators)의 스크리닝 방법을 제공한다:

(a) 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

30 (b) 상기 세포에서 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 분석하는 단계로, 상기 시험물질이 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 촉진시키면

이온 채널 활성화제(activators)로 판단하고 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 억제시키면 이온 채널 억제제(inhibitors)로 판단하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열목록 제4서열의 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 BK_{Ca} 채널 단백질을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터; 및 (c) 터미네이터(terminator)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명자들은 이온 채널 조절인자들의 동정 및 연구를 위한 세포-기반된 효과적인 고속 스크리닝 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 과다활성 BK_{Ca} 채널을 제조하고 상기 BK_{Ca} 채널이 Ca^{2+} 의 농도의 증가 없이 전압 펄스에 의해 활성화되며 세포-기반된 어세이 플랫폼에서 BK_{Ca} 채널 활성화인자(예컨대, CTBIC)에 의해 활성 촉진된다는 것을 확인하였다.

세포 내 2차 전달물질인 칼슘의 농도 증가에 따라 다양한 K^+ 이온 채널의 활성화를 통해 세포가 전기적으로 안정화된다. 세포내 칼슘 농도는 세포외로부터의 유입(예컨대, 전압-의존성 칼슘 채널) 또는 세포내 저장소로부터의 배출(예컨대, ER)에 의해 순간적으로 증가된다. 이에 따라 K^+ 이온 채널이 활성화된다. K^+ 이온 채널은 단위시간 당 통과시키는 K^+ 이온의 양에 따라 큰 전도성을 가진 채널(BK_{Ca}), 중간 전도성을 가진 채널(IK_{Ca} ; intermediate conductance calcium-activated potassium channel) 및 작은 전도성을 가진 채널(SK_{Ca} ; small conductance calcium-activated potassium channel)로 구분할 수 있다.

BK_{Ca} 채널은 세포막을 가로지르는 K^+ 이온의 큰 전도성으로 특징화할 수 있는 이온 채널로, Maxi-K 또는 $slol$ 으로도 불리운다. BK_{Ca} 채널은 막 전위(membrane electrical potential)의 변화 및/또는 세포내 칼슘 이온의

농도($[Ca^{2+}]_i$) 증가에 의해 활성화(개방)된다. 그 결과, 세포내 K^+ 이온은 세포 외로 방출됨에 따라 전기화학적 농도의 변화를 야기하여 세포막 과다분극(세포막을 가로지르는 전위의 증가) 및 세포 흥분성의 감소(세포가 활동 전위를 전도할 가능성의 감소)를 초래한다.

5 BK_{Ca} 채널은 다양한 생리학적 과정들(예컨대, 평활근의 수축, 신경세포의 흥분성, 달팽이관 내 유모세포의 전기적 튜닝, 등)의 조절에 핵심적인 기능을 가진다. BK_{Ca} 채널은 동공-형성 α -서브유닛과 조절성 β -서브유닛으로 구성된다. 보다 상세하게는, BK_{Ca} 채널의 α -서브유닛은 독특한 막통과 도메인인 S0, 전압 센싱 도메인인 S1-S4, K^+ 채널 동공
10 도메인인 S5 및 S6, 그리고 한쌍의 RCK 도메인으로 구성된 세포질 C-말단 도메인(cytoplasmic C-terminal domain, CTD; 두 번째 RCK 도메인 내에 '칼슘 볼(calcium bowls)'로 불리는 칼슘 이온 결합 부위 존재)으로 구성된다.

이온 채널 조절인자들의 동정 및 연구를 위해 패치 클램프 방법이
15 통상적으로 이용되어 왔지만, 매우 낮은 효율을 가진다는 커다란 단점을 가진다. 이를 극복하기 위해, 다양한 대체 방법들(예컨대, 자동화된 패치 클램핑, 플럭스 어세이, 형광-기반된 어세이, 등)이 제시되고 실행되어 왔으나 보다 효과적이고 용이한 채널 분석 방법이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

20 본 발명은 세포-기반된 이온 채널 조절인자의 신규한 스크리닝 방법을 제공한다. 더욱이, 본 발명의 방법은 상업적으로 이용가능한 형광 어세이 방법을 통해 이온 채널의 활성 변화를 매우 간편하고 정교하게 검출할 수 있다는 장점을 가진다.

먼저, 본 발명의 방법은 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널(G733D/N736K)을
25 제조한다(pre-(a) 단계).

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널(G733D/N736K)의 제조에 이용되는 재조합 벡터는 (a) 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터;
30 및 (c) 터미네이터(terminator)를 포함하는 재조합 벡터이다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 재조합 벡터는 (i) 상술한 본 발명의 서열목록

제3서열의 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 동물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 동물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3' -말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3' -비-해독화 부위를 포함하는 재조합 벡터를 포함한다. 야생형 BK_{Ca} 채널의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열에 기재되어 있다.

본 명세서에서 용어 “프로모터”는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 벡터에서 목적 뉴클레오타이드 서열은 상기 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된(operatively linked)”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 재조합 벡터가 진핵세포(예컨대, AD-293 세포)에 적용되는 경우, 이용될 수 있는 프로모터는, 본 발명의 서열목록 제4서열의 아미노산 서열-코딩 뉴클레오타이드 서열의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 및 효모 세포에서 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 프로모터, 효모(*S. cerevisiae*) GAL1 내지 GAL10 프로모터 및 효모(*Pichia pastoris*) AOX1 또는 AOX2 프로모터를 포함하나, 이에

한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는, CMV 프로모터이다.

또한, 본 발명에 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함한다(예: 소성장 호르몬 터미네이터(BGH pA) 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).

5 또한, 본 발명의 벡터는 선택마커를 추가적으로 포함한다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 네오마이신, 제네티신, 암피실린, 카나마이신, 하이그로마이신, 스트렙토마이신, 페니실린, 클로람페니콜, 겐타마이신, 카베니실린 및 테트라사이클린에 대한 내성
10 유전자를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이용할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110-2114(1972)), 하나한 방법(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166: 557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, *et al.*, Nucleic. Acids Res., 16: 6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있으며, 진핵세포인 경우, 리포펙션(lipofection), 전기동공법(electroporation), 리포솜-매개 전이방법(Wong, *et al.*, Gene, 10: 87-94(1980)) 및 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., *et al.*, (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, J.J. *et al.*, (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110), 마이크로인젝션, 유전자총(particle bombardment), YAC에서 이용되는 효모 구형질체/세포 융합, 식물세포에서 이용되는 아그로박테리움-매개된 형질전환 등을 이용하여 실시할 수 있으며, 보다 구체적으로는 리포펙션 방법으로 실시한다.

이후, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 세포에 시험물질을 접촉시킨다. 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포는 특별하게
30 제한되지 않으며, 구체적으로는 AD-293 세포를 포함한다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 이중

돌연변이된 BK_{Ca} 채널 단백질의 활성도에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질이 화학물질인 경우, 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는

방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험물질은 당업계에

공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의

합성 방법은, DeWitt, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann, *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop, *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

본 발명에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건,

바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 타겟(예컨대, BK_{Ca} 채널 단백질의 활성화에 영향을 미치는 유전자)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, 5 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 보다 구체적으로는 8 내지 60 염기이고, 가장 구체적으로는 10 내지 40 염기이다.

10 본 발명에서 용어 “siRNA”는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서는 또는 유전자 치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 15 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, *et al.*, 2002; Degot S, *et al.*, 2004; Ballut L, *et al.*, 2005).

본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 센스 가닥(예를 들어, BK_{Ca} 채널 단백질의 활성화에 영향을 미치는 유전자 mRNA 서열에 20 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(예를 들어, BK_{Ca} 채널 단백질의 활성화에 영향을 미치는 유전자 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

25 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 전체 길이는 10 내지 100 염기, 보다 구체적으로는 15 내지 80 염기, 그리고 보다 더 구체적으로는 20 내지 30 70 염기이다.

본 발명에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin

RNA)” 는 견고한 헤어핀 턴을 만드는 RNA의 서열을 나타내며, 이는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 사일런스시키는 데 이용될 수 있다. shRNA는 세포 도입용 벡터를 이용하여 shRNA를 발현할 수 있는 U6 프로모터를 주로 이용한다. 이러한 벡터는 항상 딸세포로 전달되어 유전자 사일런싱이 유전될 수 있도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작(machinery)인 siRNA로 분해되어 RNA-유도 사일런싱 복합체(RNA-induced silencing complex)에 결합된다. 상술한 복합체는 이에 결합된 siRNA에 상응하는(matched) mRNA에 결합하여 분해시킨다. shRNA는 RNA 폴리머라제 III에 의해 전사되며, 포유동물 세포에서 shRNA 생산은 세포가 shRNA를 바이러스 공격으로 인식하여 방어 수단을 찾는 것처럼 인터페론 반응을 야기시킬 수도 있다. 또한, shRNA는 식물 및 다른 시스템에서도 이용될 수 있으며 U6 프로모터가 반드시 필요한 것은 아니다. 식물의 경우에는 매우 강력한 연속적인 발현 능력을 보유한 전통적인 프로모터인 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터가 이용될 수 있다.

본 명세서의 용어 “마이크로RNA(microRNA, miRNA)” 는 21-25개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 RNA 분자로서 mRNA(messengerRNA)의 3' -UTR에 결합하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 물질을 나타낸다(Bartel DP, *et al.*, Cell, 23;116(2): 281-297(2004)). miRNA의 생성은 Drosha(RNaseIII type 효소)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 miRNA(pre-miRNA)로 만들어지고, 세포질로 이동하여 다이스(Dicer)에 의해 절단되어 성숙한 miRNA로 만들어진다는[Kim VN, *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol., 6(5): 376-385(2005)]. 상술한 바와 같이 제조된 miRNA는 표적단백질의 발현을 조절함으로써 발생, 세포증식 및 사멸, 지방대사, 종양형성 등에 관여한다[Wienholds E, *et al.*, Science, 309(5732): 310-311(2005); Nelson P, *et al.*, Trends Biochem Sci., 28: 534-540(2003); Lee RC, *et al.*, Cell, 75: 843-854(1993); 및 Esquela-Kerscher A, *et al.*, Nat Rev Cancer, 6: 259-269(2006)].

본 명세서에서 용어 “펩타이드” 는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수

있다(Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54(1963); Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

마지막으로, 시험물질이 처리된 세포에서 BK_{Ca} 채널 단백질의
5 활성도를 분석한다. 활성의 측정은 하기 기재한 바와 같이 형광 측정을
통해 용이하게 실시할 수 있으며, 측정 결과, 상기 시험물질이 상기
돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성화를 촉진시키면 이온 채널
활성제(activators)로 판단하고 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성화를
억제시키면 이온 채널 억제제(blockers)로 판정될 수 있다.

10 본 명세서에서 사용되는 용어 “이온 채널 활성제(activators)”는
돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성화를(개방을) 촉진하는 물질을 의미하고, 본
명세서에서 사용되는 용어 “이온 채널 억제제(inhibitors)”는 돌연변이된
BK_{Ca} 채널의 활성화를(개방을) 억제하는 물질을 의미한다.

본 발명의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널은 과다활성화되어 있는 상태이기
15 때문에 야생형 BK_{Ca} 채널과 비교하여 낮은 농도의 $[Ca^{2+}]_i$ 하에서도 충분한
활성을 가지므로, 실험의 결과를 보다 명확하게 판단할 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널
활성의 분석은 Tl⁺ 이온 농도에 대한 형광 측정을 통해 이루어진다. 상기
Tl⁺ 이온 농도에 대한 형광 측정은 당업계에 잘 알려진 상업적으로
20 이용가능한 어세이 방법(예컨대, FluxOR™)을 이용한 표준
형광측정기(standard fluorometer)로 간단하고 용이하게 실시할 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널은
 $[Ca^{2+}]_i$ 에 관계없이 막 탈분극(membrane depolarization)에 의해 활성화된다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 막 탈분극은 -80 mV 내지
25 200 mV 범위의 전압 펄스(voltage pulses)에서 10 mV 전압 증가로
단계적으로 유도된다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의
전도성-전압 관계(conductance-voltage relationship, *G-I*)는 음적
전압(negative voltage) 방향으로 이동된다.

30 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 BK_{Ca} 채널의 활성은 10
μM의 CTBIC 자극에 의해 약 2.3배 정도 형광 시그널의 증가를

나타냈다(참고: 도 5c).

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는 상태(diseases, disorders or conditions)의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다:

(a) 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 세포에서 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 분석하는 단계로서, 상기 시험물질이 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 촉진시키면 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는 상태 치료제로 판단되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널로 형질전환된 세포를 유효성분으로 포함하기 때문에, 둘 사이에 중복된 내용은 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 BK_{Ca} 채널의 조절과 관련된 질환, 장애 또는 상태는 심혈관질환(cardiovascular diseases), 폐쇄 또는 염증 기도 질환(obstructive or inflammatory airway diseases), 하부 요로 질환(lower urinary tract disorders), 발기부전, 불안 및 불안-관련 상태, 간질 및 동통을 포함한다.

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. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 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 대동맥 질환 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.

5 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 폐쇄 또는 염증 기도 질환은 기도 과다반응, 진폐증, 알루미늄증, 탄분증, 석면증, 석폐증, 첩모탈락증(ptilosis), 철침착증(siderosis), 규폐증, 연초 중독증, 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(wheezy) 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.

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, 배뇨근과반사, 20 감각성 급뇨(sensory urgency) 및 배뇨근 과활동성의 증상 같은 과민성 방광(urinary bladder), 요실금 또는 긴박성 요실금, 스트레스성 요실금, 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 짜증나는 증상을 포함한다. 또한, 하부 요로 질환은 뇌졸중, 파킨슨 25 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 30 따르면, 본 발명의 하부 요로 질환은 과민성 방광(overactive bladder),

불안정성 방광(unstable bladder), 과민성 배뇨근, 배뇨근불안정(detrusor instability), 배뇨근과반사(detrusor hyperreflexia), 감각성 급뇨(sensory urgency), 요실금, 긴박성 요실금(urge urinary incontinence), 스트레스성 요실금(urinary stress incontinence),
 5 신경인성 요실금(reflex urinary incontinence), 느린 배뇨, 배뇨 말기 적하(dribbling), 배뇨 장애(dysuria) 및 경련성 방광(spastic bladder)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서의 용어 “발기 부전(erectile dysfunction)”은 성 수행에 충분한 발기를 획득하거나 유지하는데 있어서 지속적인 불능 상태로, 이는
 10 내피세포의 기능 이상(endothelial cell dysfunctions)과 밀접하게 연관되어 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 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
 15 후 스트레스 장애(posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 반응, 적응 장애(adjustment disorder), 건강염려성 장애(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),
 20 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.

또한, 특정 공포증과 관련된 불안은 동물, 곤충, 폭풍우, 운전, 비행,
 25 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.

또한, 통증장애는 고통을 동반하는 장애로, 예를 들어 골격통증(musculoskeletal pain), 수술 후 통증(postoperative pain) 및
 30 수술 통증(surgical pain)과 같은 급성 통증; 만성 염증성 통증(예를 들어, 류마티스 관절염 및 골관절염), 신경병증성 통증(예를 들어, 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 류머트즘열(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.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널 컨스트럭트 및 이를 이용한 세포-기반된 신규한 이온 채널 조절인자의 스크리닝 시스템에 관한 것이다.

(b) 본 발명의 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널-포함 세포-기반된 시스템은 대조군과 비교하여 별도의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가 유무와 관계 없이 막 탈분극에 의해 현저하게 증가된 형광을 나타낸다.

(c) 또한, 본 발명의 이중 돌연변이된 BK_{Ca} 채널-포함 세포-기반된 시스템은 알려진 활성인자(예컨대, CTBIC)에 의해서 보다 촉발된 활성(G/V 곡선의 음적 방향으로의 이동)을 나타낸다.

(d) 따라서, 본 발명의 시스템은 종래의 방법들(예컨대, 자동화된 패치 클램핑 방법)과 비교하여 보다 효과적이고 더욱 더 정밀하게 이온 채널의 활성 분석이 가능함으로써 이온 채널 조절인자들(modulators)의 분리/동정 뿐 아니라, BK_{Ca} 채널의 조절과 관련된 질환, 질병 또는 상태의 치료제 스크리닝에 유용하게 적용될 수 있다.

다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

5

【도면의 간단한 설명】

도 1은 과다활성 돌연변이 BK_{Ca} 채널의 제조 및 특성을 보여주는 결과이다. 도 1a는 본 연구에서 이용된 인간 BK_{Ca} 채널의 α -서브유니트를 도식적으로 보여주는 도면이다. RCK2 도메인 내 G733D 및 N736K 돌연변이 위치들이 파란색으로 지시되어 있다. 도 1b는 RCK1(노란색) 도메인과 RCK2(보라색) 도메인 간의 인터페이스의 결정 구조(Protein Data Bank ID: 3NAF)에서 돌연변이 위치들의 위치를 보여주는 도면이다. 도 1c는 WT 또는 G733D/N736K BK_{Ca} 채널 컨스트럭트로 일과성으로 트랜스펙션된 세포의 대표적인 거시적 전류 레코딩 결과이다.

10

15

도 2는 WT 또는 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 발현하는 안정적인 세포주의 규명을 보여주는 결과이다. 도 2a는 WT 또는 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 발현하는 안정적인 세포주의 면역블랏 분석 결과이다. 대조군 세포(Mock)는 pcDNA3.1 공벡터 컨스트럭트로 트랜스펙션되었다. 총 30 μ g의 세포용해물이 각 레인에 로딩되었으며, 막은 항-BK_{Ca} 채널 항체 또는 대조군인 항-GAPDH 항체와 반응시켰다. 도 2b는 100 nM [Ca²⁺]_i의 존재 하에서 안정적으로 발현된 WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 거시적 전류 레코딩에 대한 대표적인 결과를 나타낸다. 이온전류는 10 mV씩 증가시켜 -80 mV부터 100 mV까지의 범위에서 전압(potentials)을 테스트하기 위한 100 ms의 전압 단계들에 의해 촉발되었다. 고정전압은 -100 mV였다. 도 2c는 안정-상태(steady-state) WT(하얀색 원) 및 G733D/N736K(검은색 원) BK_{Ca} 채널 전류들의 표준화된 G-V 관계(G-V relationships)를 보여주는 결과이다. 막은 -100 mV에서 시작하였으며, 이후 -80 mV부터 200 mV까지의 범위에서 10 mV의 증가로 단계적으로 증가되었다. 채널 전류는 100 nM [Ca²⁺]_i의 존재 하에서 레코딩되었다. 전도성 값들은 정점 꼬리전류들(peak tail currents)로부터 얻어졌으며 CTBIC의 부존재 하에서 관찰된 최대 전도성에 대해 표준화되었다. 데이터 점들은 볼츠만 함수를

20

25

30

이용하여 최적화되었다.

도 3은 WT 및 돌연변이 BK_{Ca} 채널의 전기생리학적 특성을 나타내는 도면이다. 도 3a는 WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 G-V 관계에 있어서 [Ca²⁺]_i의 변화에 따른 효과를 보여주는 결과이다. [Ca²⁺]_i의 농도는 0 μM(사각형), 0.1 μM(원), 1 μM (삼각형) 또는 10 μM(역삼각형)이었다. 막은 -100 mV에서 시작하였으며, 이후 -80 mV부터 200 mV까지의 범위에서 10 mV의 증가로 단계적으로 증가되었다. 전도성 값들은 정점 꼬리전류들로부터 얻어졌으며 최대 전도성에 대해 표준화되었다. 데이터 점들은 볼츠만 함수를 이용하여 최적화되었다. 도 3b는 다른 농도의 세포내 Ca²⁺에서 WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 반-활성화 전압(V_{1/2})을 보여주는 결과이다. 각 데이터 점은 다섯 개의 실험들에서 얻어진 평균값 ± 표준오차를 나타낸다. 도 3c는 WT(빈 사각형) 또는 G733D/N736K(채워진 사각형) BK_{Ca} 채널을 발현하는 안정적인 세포주들의 안정 막전압(resting membrane potential, RMP)을 의미하는 결과이다. 각 데이터 점은 33개의 실험들에서 얻어진 평균값 ± 표준오차로서 제시된다. 표시: **, 쌍 Student' s t-test에 의한 p < 0.001.

도 4는 BK_{Ca} 채널 활성화인에 의한 WT 및 G733D/N736K 채널의 활성화 촉발을 보여주는 결과이다. 도 4a 및 도 4b는 10 μM CTBIC의 부존재 및 존재 하에서 WT(4a) 및 G733D/N736K(4b) BK_{Ca} 채널의 거시적 전류 레코딩을 보여주는 대표적인 도면이다. [Ca²⁺]_i는 100 nM에서 고정되었으며, CTBIC는 막의 세포내 부위(side)에 적용되었다. 이온전류는 10 mV씩 증가시켜 -80 mV부터 140 mV까지의 범위에서 전압(potentials)을 테스트하기 위한 100 ms의 전압 단계들에 의해 촉발되었다. 고정전압은 -100 mV였다. 도 4c는 WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 안정-상태 전류들의 표준화된 G-V 관계를 보여주는 결과이다. 레코딩 전에 대조군인 운반체(vehicle; 사각형) 또는 10 μM CTBIC(원)이 막 패치에 적용되었다. 막은 -100 mV에서 시작하였으며, 이후 -80 mV부터 200 mV까지의 범위에서 10 mV의 증가로 단계적으로 증가되었다. 도 4d는 10 μM CTBIC에 의해 야기된 WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 반-활성화 전압(V_{1/2}) 상의 변화를 보여주는 결과이다. 각 데이터 점은 다섯 개의 실험들에서 얻어진 평균값 ± 표준오차를 나타낸다. 표시: *, 쌍 Student' s t-test에 의한 p <

0.001.

도 5a-5c는 형광-기반된 플랫폼을 이용한 고속 스크리닝에 있어서 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 발현하는 안정적인 세포주들의 적합성에 대한 분석을 실시한 결과이다. 모 AD-239 세포주(도 5a)로부터 얻어진 형광
5 시그널, 그리고 WT(도 5b) 또는 G733D/N736K(도 5c) BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포주로부터 얻어진 형광 시그널이 측정되었다. BK_{Ca} 채널 활성을 모니터링하기 위해, FluxOR™ 다이가 모 AD-239 세포주, WT 세포주 및 G733D/N736K 세포주에 로딩되었다. 형광 시그널을 판독하기 전에, 세포는 BK_{Ca} 채널 활성인자(10 μ M CTBIC; 채워진 심볼) 또는 운반체(DMSO; 빈 심볼)로 30분 동안 전-처리되었다. 기본 형광을 2분 동안 측정한 후,
10 세포에 10 mM 프리 K⁺을 포함하는 자극 완충액을 처리하여 세포막을 탈분극시켰다. Synergy™ H1 하이브리드 멀티-모드 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 형광 시그널을 측정하였다. 심볼(symbols): 0 μ M CTBIC, 빈 심볼; 및 10 μ M CTBIC, 채워진 심볼.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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
20 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

컨스트럭트, 돌연변이유발 및 안정적 세포주들의 구축

25 야생형(wild-type, WT) 인간 BK_{Ca} 채널-코딩 부위(GenBank accession number, NM002247 및 NP 002238.2)가 pcDNA3.1(+) 포유동물 발현 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 서브클로닝되었다. BK_{Ca} 채널의 돌연변이(G733D/N736K)는 QuikChange 위치-지정된 돌연변이유발
30 키트(Stratagene, Santa Clara, CA)를 이용하여 WT 플라스미드의 위치-지정된 돌연변이유발에 의해 획득되었다.

HEK293 세포주의 파생물인 AD-293 세포(Stratagene)는 10%

FBS(fetal bovine serum; Thermo) 및 항생제가 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Thermo, Waltham, MA)에서 유지되었다. 세포들은 습도-유지된 5% CO₂ 환경 하에서 37°C로 배양되었다. 안정적인 세포-주들을 얻기 위해, WT BKCa 채널 또는 G733D/N736K 돌연변이

5 컨스트럭트를 가지는 pcDNA3.1 벡터들이 Polyfect reagent(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 AD-293 세포에 트랜스펙션되었다. 세포들은 1 mg/ml 제네티신(geneticin; Gibco-RRL, Carlsbad, CA)을 포함하는 배지에서 배양되었으며, 2일 마다 신선한 배지로 교체되었다.

10

면역블랏 분석(Immunoblot analysis)

세포는 20 mM HEPES(pH 7.5; Sigma), 120 mM NaCl(Sigma), 5 mM EDTA(Sigma), 1% Triton X-100(Sigma), 0.5 mM DTT(dithiothreitol; Sigma), 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma) 및 프로테아제 억제제

15 각테일(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)를 포함하는 완충액에서 용해되었다. 시료들이 30분 동안 얼음에서 유지된 후, 불용성 물질(insoluble material)을 침전시키기 위해 용해물은 12,500 rpm으로 25분 동안 원심분리시켰다. 5X SDS 젤 로딩 완충액(250 mM Tris-Cl(pH 6.8), 500 mM DTT, 10% SDS(Biorad), 0.5% bromophenol blue(Sigma) 및 50%

20 glycerol(USB product)을 첨가한 후, 혼합물은 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 단백질을 전기영동되어 PVDF 막(GE Healthcare Life Sciences)으로 블랏팅되었다. 상기 막은 3% BSA를 포함하는 1X TBS-T(1X Tris-buffered saline with Tween-20)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 교반하여 블락킹시키고 1X TBS-T로 세 번에 걸쳐서 세척한 후, 일차

25 항체(항-BK_{Ca} 항체, 1:250 희석; BD Biosciences, San Jose, CA); 또는 항-GAPDH 항체, 1:5000 희석; Young In Frontier, Seoul, Korea))를 포함하는 10 ml 1X TBS-T에서 하룻밤 동안 상온에서 반응시켰다. 이후, 상기 막은 1X TBS-T로 세 번에 걸쳐서 세척하고 이차 항체(1:10,000 희석; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 포함하는 5 ml 1X TBS-T와 45분 동안

30 반응시켰다. 최종적으로, 상기 막은 1X TBS-T로 세 번에 걸쳐서 세척하고 ECL 웨스턴 블랏팅 검출 시약(Amersham Biosciences, Little Chalfont,

Buckinghamshire, UK)에 담겨졌다. 상기 블랏들은 플라스틱 랩으로 감싸서 X-선 필름(Konica, Tokyo, Japan)에 노출시켰다.

전기생리학적 레코딩(electrophysiological recordings) 및 데이터 분석

5 거시적 전류 레코딩은 기가옴 셀 패치 클램프 방법(gigaohm seal patch clamp method)을 이용하여 실시하였다. 패치 파이펫은 붕규산 유리(WPI, Sarasota, FL)를 이용하여 제조된 후, 3-5 MΩ의 저항으로 파이어폴리쉬되었다. 채널 전류는 Axopatch 200B amplifier(Axon Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 증폭되고 4극(four-pole) 10 저역(low-pass) 베셀 필터(bessel filter)를 이용하여 1 또는 2 kHz에서 여과시킨 후, Digidata 1200A digitizer(Axon Instruments)를 이용하여 10 또는 20 포인트/ms의 속도로 디지털화시켰다. BK_{Ca} 채널의 이온전류(ionic current)는 -100 mV의 고정전압(holding potential)으로부터 -80에서 200 mV의 범위의 막전압(membrane potentials)으로 10 mV의 15 증가율(increments)로 운반된 전압-클램프 펄스(voltage-clamp pulses)에 의해 활성화되었다. 특별하게 언급되지 않는 한, 세포내 및 세포외 용액들은 116 mM KOH(Sigma), 4 mM KCl(Sigma), 10 mM HEPES 및 5 mM EGTA(Sigma)를 포함하였으며, MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)를 이용하여 pH 7.2로 적정되었다. 정확한 프리 [Ca²⁺]_i 양을 발생시키기 20 위해, 세포내 용액에 첨가될 적절한 양의 총 Ca²⁺이 MaxChelator software(Patton, *et al.*, 2004; <http://maxchelator.stanford.edu/>)을 이용하여 계산되었다.

안정 막전위(resting membrane potential; RMP)를 측정하기 위해, 세포내 용액은 pH 7.2로 맞추어졌고 5 mM NaCl, 140 mM KCl(Sigma), 3 mM 25 Mg-ATP(Sigma), 0.5 mM MgCl₂(Sigma), 0.33 mM CaCl₂(Sigma) 및 1 mM EGTA를 포함하였다. 세포외 용액은 pH 7.4로 맞추어졌고 145 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 5 mM 글루코오스(Sigma), 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 및 5 mM HEPES를 포함하였다. 세포내 및 세포외 용액의 요구된 pH 값은 각각 NMDG 및 NaOH를 이용하여 조정되었다. 막전압은 통상적인 전체-세포 형상(whole- 30 cell configuration)을 획득한 후 1분 동안 측정하였다. Clampex 8.0 또는 8.1(Axon Instruments) 및 Origin 6.1(OriginLab Corp., Northampton,

MA) 소프트웨어 패키지들이 레코딩 데이터의 측정 및 분석을 위해 이용되었다.

형광 측정

5 상업적으로 이용가능한 FluxOR™ 포타슘 이온 채널 어세이(Invitrogen)가 BK_{Ca} 채널의 형광-기반된 분석을 위해 사용되었다. WT 및 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 AD-293 세포들이 폴리-D-라이신(Sigma)-코팅된 96-웰 마이크로플레이트(Corning)(웰 당 5X10⁴ 세포)에 플레이팅되었다. 레코딩 전에, 세포들은 시험 화합물인 CTBIC(4-chloro-7-(trifluoromethyl)-10H-benzofuro[3,2-b]indole-1-carboxylic acid)로 30분 동안 전-배양되었다. 형광 시그널은 Gen5 소프트웨어를 이용하는 Synergy™ H1 하이브리드 멀티-모드 마이크로플레이트 판독기(BioTek Instrument, Inc., Winoski, VT)로 측정하였다. pcDNA3.1 공벡터 컨스트럭트로 트랜스펙션된 AD-293 세포도 대조군으로서 10 레코딩되었다. FluxOR™ 다이로부터 유래된 시그널은 각각 488 nm 및 525 nm의 여기 파장 및 방출 파장에서 획득하였다. BK_{Ca} 채널의 자극은 배양 배지에 10 mM 프리 K⁺를 첨가하여 실시하였다. 본원발명의 시스템이 표준 형광측정기(standard fluorometer)를 이용한 고속 스크리닝에 적합한 지 여부를 확인하기 위해, 상술한 마이크로플레이트는 15초 마다 판독되었다.

실험결과

과다활성(hyperactive) 돌연변이 BK_{Ca} 채널의 제조 및 특성 규명

본 발명자들은 BK_{Ca} 채널의 활성이 채널 내 2개의 RCK 도메인들 간의 유연성 인터페이스(flexible interface)에서 발생한 돌연변이들에 의해 25 강하게 영향받는다는 사실을 이전에 보고하였다(Kim, *et al.*, 2008). RCK2 내 돌연변이들은 음적 방향으로 전압 활성화 곡선(voltage activation curve)을 이동시켜 채널의 개방 형태(open conformation)를 안정화시킴으로써 BK_{Ca} 채널을 활성화시킨다(Kim, *et al.*, 2008). 이에, RCK2 도메인 내 2개의 아미노산 치환을 포함하는 BK_{Ca} 채널의 이중 30 돌연변이(G733D/N736K; 도 1a 및 도 1b)가 제조되어 이의 기능적 특성이 조사되었다. 본 발명자들은 AD-293 세포에 WT 인간 BK_{Ca} 채널 또는 인간

G733D/N736K 돌연변이 BK_{Ca} 채널을 포함하는 발현 플라스미드를 일과성으로 트랜스펙션시켰다. 세포내 Ca²⁺의 부존재 하에서, 상기 돌연변이 채널은 WT BK_{Ca} 채널보다 더욱 더 낮은 막 전압(membrane voltages)에 의해 활성화되었다(도 1c).

5 이후, 제네티신을 포함하는 배지에서 트랜스펙션된 세포를 3주 동안 선택함으로써 안정적인 세포주들을 확립하였다. 마우스 항-BK_{Ca} 채널 항체를 이용한 면역블랏 분석을 통해 BK_{Ca} 채널 단백질들의 안정적인 발현을 확인하였다(도 2a). 모 세포주에서는 어떠한 단백질 밴드들이 관찰되지 않았지만, 트랜스펙션된 세포에서 130 kDa 면역활성 밴드들이 관찰되었는데(도 2a), 이는 BK_{Ca} 채널의 예상된 크기와 일치한다. WT 및 10 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 발현 레벨이 비교될 만 하였다. 안정적으로 발현된 WT 및 돌연변이 BK_{Ca} 채널은 전기생리학적 방법들을 이용하여 더욱 조사되었다. 세포외(bath, 용액) 및 세포내(파이펫) 용액들은 동일한 농도의 K⁺(120 mM)을 포함하였지만, [Ca²⁺]_i는 각 용액에서 다양하였다. - 15 80 mV에서부터 200 mV까지의 범위의 전압 펄스가 -100 mV의 고정전압에 10 mV의 증가로 적용되었다. 막 탈분극 및 100 nM [Ca²⁺]_i 모두에 의해서 활성화되는 경우, WT 및 G733D/N736K 채널들은 K⁺ 전류를 촉발시켰다(도 2b). G733D/N736K 돌연변이는 음적 전압의 방향으로 전도성-전압(conductance-voltage, G-V) 관계를 현저하게 이동시켰다(도 2c). G733D/N736K 20 돌연변이 채널의 반-활성화 전압(half-activation voltage, V_{1/2})은 100 nM [Ca²⁺]_i에서 약 110 mV의 음적 변화를 나타냈다. 더욱이, 상기 돌연변이 채널의 이온전류는 Ca²⁺의 부존재 하에서조차 전압 펄스에 의해 완벽하게 활성화되었다(도 3a 및 도 3b). V_{1/2} 쉬프트가 넓은 범위의 [Ca²⁺]_i에서 발생하였는데, 이는 상기 이중 돌연변이에 의해 BK_{Ca} 채널의 밀폐 25 상태(closed states)와 개방 상태(open states; 활성화 상태) 간의 내인성 평형이 변화하였음을 시사한다(Kim, *et al.*, 2008). 상술한 결과들은 AD-239 세포주에서 안정적으로 발현된 G733D/N736K 돌연변이 채널이 안정 [Ca²⁺]_i에서 막 전압의 적당한 탈분극에 의해 활성화될 수 있다는 것을 의미한다.

알려진 BK_{Ca} 채널 활성인자에 의한 G733D/N736K 채널의 활성 촉진

BK_{Ca} 채널의 조절인자들을 동정하기 위한 플랫폼으로서 G733D/N736K 채널을 안정적으로 발현하는 세포주의 적합성을 평가하기 위해, 돌연변이 채널의 활성을 촉발시키는 강력한 BK_{Ca} 채널 활성인자인 CTBIC의 능력을 조사하였다(Gormemmis, *et al.*, 2005; Lee, *et al.*, 2012). 막 패치에 10 μ M CTBIC의 첨가는 WT BK_{Ca} 채널(도 4a) 및 G733D/N736K 돌연변이 BK_{Ca} 채널(도 4b) 모두에서 이온전류를 강하게 촉발시켰다. 각 채널의 상대적인 전도성(G/G_{max})은 -100 mV로의 과다분극 단계에 의해 발생된 꼬리전류를 최대꼬리전류로 표준화시킴으로써 획득하였다. 0 μ M 및 10 μ M CTBIC에서의 G/G_{max} 값은 볼츠만 함수를 이용하여 최적화되었다. CTBIC의 첨가는 WT 및 G733D/N736K 채널의 G/V 곡선 모두에서 음적 방향으로의 이동을 야기시켰다(도 4c). G733D/N736K 채널의 $V_{1/2}$ 쉬프트($V_{1/2}^{free}$ 대 $V_{1/2}^{10 \mu M}$)는 WT 채널의 쉬프트보다 현격하게 더 컸다(도 4d).

세포-기반된 어세이 플랫폼에서 G733D/N736K BK_{Ca} 채널의 강력한 활성화

최종적으로, 본 발명자들은 과다활성 BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포들이 채널 활성인자들의 고속(high-throughput) 스크리닝에 적합한 지 여부를 결정하기 위한 실험들을 실시하였다. 상업적으로 이용가능한 FluxORTM 다이(dye)는 K⁺ 채널을 위한 보편적인 세포-기반된 어세이로서 이용하였다. WT 또는 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포주가 폴리-D-라이신-코팅된 96-웰 플레이트에 분주되어 배양시킨 후 80% 내지 90% 컨플루언스(confluence)에 도달한 세포에서 FluxORTM 시그널을 측정하였다. 또한, 모 AD-293 세포주로부터 얻어진 형광 시그널이 대조군으로서 측정되었다. 형광 판독 전에, 세포들에 10 μ M CTBIC 또는 DMSO(대조군)를 전-처리하였다. 기본 형광을 2분 동안 측정한 후, 세포막을 탈분극화시키기 위한 10 mM 프리 K⁺를 포함하는 자극 완충액을 세포에 처리하였다. 10 μ M CTBIC의 첨가는 모 세포주에서 자극된 형광 증가 상에 최소한의 효과만을 나타냈다(도 5a). WT 채널을 발현하는 안정적인 세포주들을 테스트하였을 경우, 본 발명자들은 10 μ M CTBIC의 첨가에 의해 약 1.3배의 형광 증가를 관찰할 수 있었다(도 5b). 하지만, G733D/N736K 돌연변이를 발현하는 안정적인 세포주는 WT 채널을 발현하는 세포주보다 채널 활성인자에 대해 더욱 더 큰 반응을 보였다(도

5c). 상대적인 형광 유닛(relative fluorescence unit, RFU) 값은 기본 반응과 비교하여 2.3배까지 증가하였다. 상술한 결과들은 G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포를 이용한 플랫폼이 BK_{Ca} 채널 조절인자들에 대한 고속 스크리닝에 이용될 수 있다는 것을 지시한다.

5

추가논의사항

BK_{Ca} 채널의 생리학적 중요성 및 치료학적 강력함에도 불구하고, BK_{Ca} 채널의 화학적 조절인자들은 아직까지 심도있게 탐구되지 않았다. BK_{Ca} 채널 조절인자들을 스크리닝하는 것과 관련된 주요 난점은 고속 스크리닝에
10 적합한 세포-기반된 어세이 방법의 부재이다. 다른 전압-게이트된 K⁺ 채널들과 달리, 안정 [Ca²⁺]_i에서 BK_{Ca} 채널의 활성화는 정상적인 생리학적 조건들에서 발생하지 않는 큰 탈분극을 필요로 하는 반면에, [Ca²⁺]_i가 마이크로몰 범위에 이르는 경우 활성화는 크지 않은 탈분극에 의해 이루어진다. [Ca²⁺]_i는 세포막 내 Ca²⁺-투과성 채널들의 개방 또는 세포내
15 저장소(intracellular stores)로부터 Ca²⁺ 방출을 유도하는 세포 시그널링 경로들의 활성화에 의해 증가될 수 있다. [Ca²⁺]_i에 대한 BK_{Ca} 채널의 매우 정교한 민감도는 서브-막(sub-membrane) Ca²⁺ 농도의 정밀한 조절을 필요로 한다. 이러한 이유로, BK_{Ca} 채널 조절인자들의 평가를 위해 [Ca²⁺]_i를 조절하고자 하는 많은 노력들이 있었다: 예를 들어, [Ca²⁺]_i를 조절하기
20 위한 화합물의 이용을 포함하는 자동화된 패치 클램핑의 개선된 방법이 최근에 보고되었다(Do, *et al.*, 2012).

본 연구에서, 본 발명자들은 증가된 [Ca²⁺]_i의 필요 없이 형광-기반된 어세이에서 이용될 수 있는 BK_{Ca} 채널 조절인자들의 고속 스크리닝을 위한 새로운 세포-기반된 시스템을 개발하였다. 이전 연구가 BK_{Ca} 채널 내
25 2개의 RCK 도메인들의 잠재적인 유연성 인터페이스 간의 중요한 상호작용(Kim, *et al.*, 2008)을 제시했었기 때문에, 본 발명자들은 RCK2 도메인의 G733D 및 N736K 돌연변이를 포함하는 과다활성 돌연변이를 제조하여 이의 특성을 규명하였다. G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포주들의 패치 클램프 분석은 돌연변이 채널들이 세포내 Ca²⁺의
30 부존재 하에서 전압을 인가함으로써 완전히 활성화되는 반면에 WT 채널들은 그렇지 않다는 것을 확증하였다. 또한, K⁺ 채널을 위한 상업적으로

이용가능한 어세이를 이용하여 본 발명자들은 G733D/N736K 채널로부터 유래된 형광 시그널이 WT 채널의 형광 시그널보다 훨씬 더 높다는 것을 확인하였다. 예측한 대로, G733D/N736K BK_{Ca} 채널을 안정적으로 발현하는 세포주들의 RMP는 WT BK_{Ca} 채널을 발현하는 세포들의 RMP보다 현저하게 더 음적 전압을 나타냈다(도 3c). 보다 상세하게는, WT 및 G733D/N736K 채널을 발현하는 세포들의 RMP는 각각 -36.3 ± 2.2 V 및 -70.0 ± 2.1 V였다. 돌연변이 채널을 발현하는 세포들이 더 낮은 음적 RMP를 가진다는 것은 돌연변이 채널이 안정 $[Ca^{2+}]_i$ 및 막 전압에서 K⁺의 방출을 개방하고 매개할 수 있다는 것을 의미하는데, 이는 안정 상태에서 돌연변이 BK_{Ca} 채널의 과다활성화를 더욱 더 지지한다.

결론적으로, 본 연구에서 제시된 결과들은 과다활성 BK_{Ca} 채널을 발현하는 안정적인 세포주들은 BK_{Ca} 채널 활성의 조사를 위한 새로운 세포-기반된 어세이 시스템이라는 것을 의미한다. 상술한 세포주들은 형광-기반된 플랫폼들 및 자동화된 전기생리학적 방법들 모두를 이용하여 BK_{Ca} 채널들의 신규한 활성인자들을 스크리닝하는 데 매우 유용할 것으로 예상된다.

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.

참고문헌

- Brenner, R., Perez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T. and Aldrich R.W., 2000. Vasoregulation by the betal subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-6.
- Catterall, W.A., 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64, 493-531.
- Cui, J., Yang, H. and Lee, U.S., 2009. Molecular mechanisms of BK

- channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66, 852-75.
- Fettiplace, R. and Fuchs, P.A., 1999. Mechanisms of hair cell tuning. *Annu Rev Physiol* 61, 809-34.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X. and O'Rourke, S.T., 2006. Large-
5 conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-16.
- Gormem, A.E., Ha, T.S., Im, I., Jung, K.Y., Lee, J.Y., Park, C.S. and Kim, Y.C., 2005. Benzofuroindole analogues as potent BK(Ca) channel openers. *Chembiochem* 6, 1745-8.
- 10 Ido, K., Ohwada, T., Yasutomi, E., Yoshinaga, T., Arai, T., Kato, M., Sawada, K., 2012 Screening quality for Ca(2+)-activated potassium channel in IonWorks Quattro is greatly improved by using BAPTA-AM and ionomycin. *J Pharmacol Toxicol Methods* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.005>.
- 15 Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R., 2001. Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29, 593-601.
- Kim, H.J., Lim, H.H., Rho, S.H., Bao, L., Lee, J.H., Cox, D.H., Kim do, H. and Park, C.S., 2008. Modulation of the conductance-voltage relationship of the BKCa channel by mutations at the putative flexible interface between two RCK domains. *Biophys J* 94, 446-56.
- 20 Lee, B.C., Lim, H.H., Kim, S., Youn, H.S., Lee, Y., Kim, Y.C., Eom, S.H., Lee, K.W. and Park, C.S., 2012. Localization of a site of action for benzofuroindole-induced potentiation of BKCa channels. *Mol Pharm* 82, 143-55.
- 25 Lee, U.S. and Cui, J., 2010. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 33, 415-23.
- Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T. and Aldrich, R.W., 2004. Overactive bladder and incontinence in the
30 absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol*

Chem. 279, 36746-52.

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. and Lederer, W.J., 1995. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 633-7.

- 5 Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. and Wei, A., 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 7, 921-31.

- Werner, M.E., Zvara, P., Meredith, A.L., Aldrich, R.W. and Nelson, M.T., 2005. Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance
10 calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol* 567, 545-56.

Zheng, W., Spencer, R.H. and Kiss, L., 2004. High throughput assay technologies for ion channel drug discovery. *Assay Drug Dev Technol.* 2, 543-52.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 이온 채널 조절인자(modulators)의 스크리닝 방법:

- 5 (a) 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 돌연변이된 아미노산 서열-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 세포에서 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 분석하는 단계로, 상기 시험물질이 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 촉진시키면
10 이온 채널 활성화제(activators)로 판단하고 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 억제시키면 이온 채널 억제제(blockers)로 판단하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 2】

- 15 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 돌연변이된 아미노산 서열은 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 G733D 및 N736K로 돌연변이된 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 3】

- 20 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널은 $[Ca^{2+}]_i$ 에 관계없이 막 탈분극(membrane depolarization)에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 4】

- 25 제 3 항에 있어서, 상기 탈분극은 -80 mV 내지 200 mV 범위의 전압 펄스(voltage pulses)에서 10 mV 전압 증가로 단계적으로 유도되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 5】

- 30 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 전도성-전압 관계(conductance-voltage relationship, $G-V$)는 음적 전압(negative

voltage) 방향으로 이동된 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 분석은 Tl^{+} 이온 농도에 대한
5 형광 측정을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 7】

서열목록 제4서열의 아미노산 서열로 이루어진 돌연변이된 BK_{Ca} 채널
단백질.

10

【청구항 8】

(a) 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드
서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합된(operatively
linked) 프로모터; 및 (c) 터미네이터(terminator)를 포함하는 재조합 벡터.

15

【청구항 9】

제 8 항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

【청구항 10】

20 다음의 단계를 포함하는 BK_{Ca} 채널 활성-관련 질환, 질병 또는
상태(diseases, disorders or conditions)의 치료제 스크리닝 방법:

(a) 야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산
서열이 돌연변이된 아미노산 서열-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는
세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

25

(b) 상기 세포에서 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 분석하는
단계로서, 상기 시험물질이 상기 돌연변이된 BK_{Ca} 채널의 활성을 촉진시키면
 BK_{Ca} 채널 활성-관련 상태, 질환 또는 질병 치료제로 판단되는 것을
특징으로 하는 스크리닝 방법.

30 【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 돌연변이된 아미노산 서열은

야생형 BK_{Ca} 채널 유전자 내 G733 및 N736 위치의 아미노산 서열이 G733D 및 N736K로 돌연변이된 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 12】

5 제 10 항에 있어서, 상기 BK_{Ca} 채널 활성-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 스크리닝 방법.

10 【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 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 대동맥 질환
15 또는 말초혈관질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 14】

제 12 항에 있어서, 상기 폐쇄 또는 염증 기도 질환은 기도 과다반응, 진폐증, 알루미늄증, 탄분증, 석면증, 석폐증,
20 첩모탈락증(ptilosis), 철침착증(siderosis), 규폐증, 연초 중독증, 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,
25 만성 기관지염, 색색거리는(wheezy) 기관지염, 기도 과다반응 또는 낭섬유증 악화, 또는 만성 기침을 포함하는 기침, 기도 과다반응의 악화, 폐 섬유증, 폐 고혈압, 염증성 폐질환, 또는 급성 또는 만성 호흡 감염 질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

30 【청구항 15】

제 12 항에 있어서, 상기 하부 요로 질환은 과민성 방광(overactive

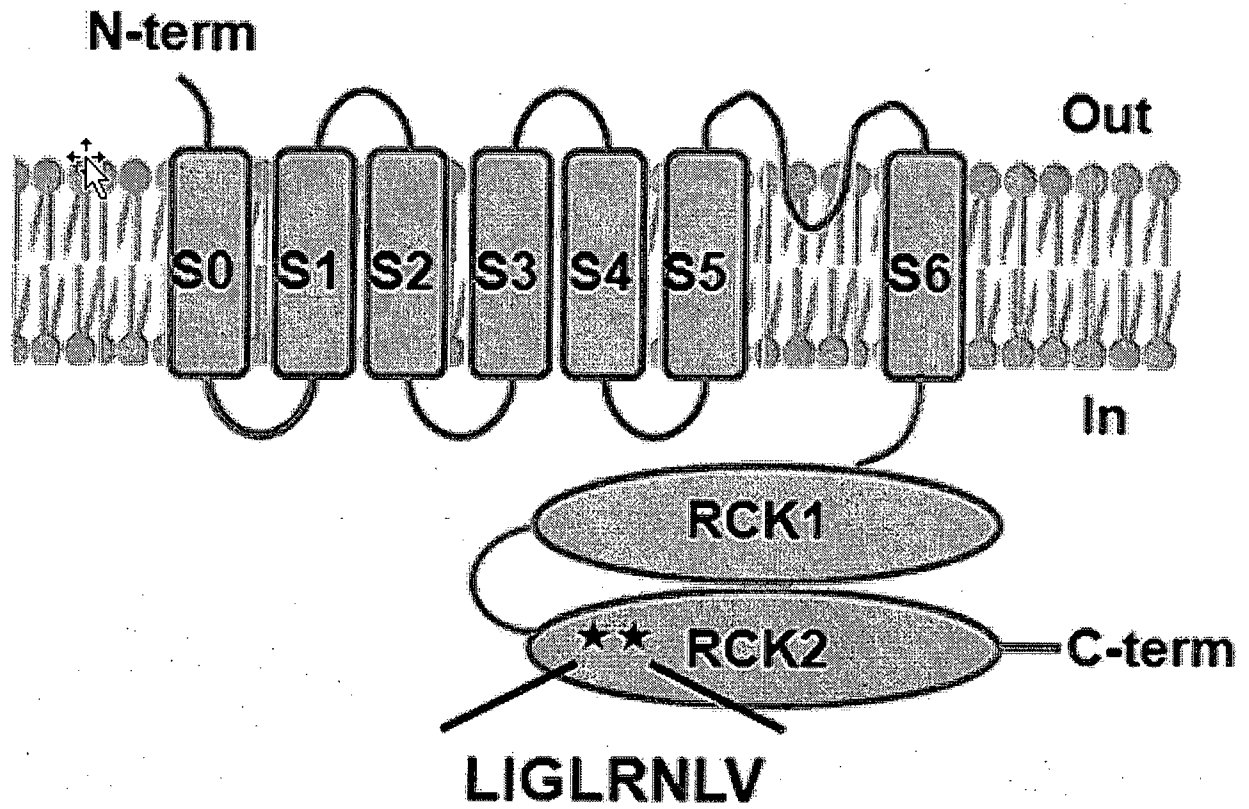
bladder), 불안정성 방광(unstable bladder), 과민성 배뇨근, 배뇨근불안정(detrusor instability), 배뇨근과반사(detrusor hyperreflexia), 감각성 급뇨(sensory urgency), 요실금, 긴박성 요실금(urge urinary incontinence), 스트레스성 요실금(urinary stress incontinence), 신경인성 요실금(reflex urinary incontinence), 느린 배뇨, 배뇨 말기 적하(dribbling), 배뇨 장애(dysuria) 또는 경련성 방광(spastic bladder)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 16】

제 12 항에 있어서, 상기 불안 및 불안-관련 상태는 범불안장애, 불안공황, 강박장애, 사회 공포증, 수행 불안(performance anxiety), 외상 후 스트레스 장애(posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 반응, 적응 장애(adjustment disorder), 건강염려성 장애(hypochondriacal disorder), 분리 불안 장애, 광장공포증 또는 특정 공포증(phobia)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

1/16

도 1a



2/16

도 1b

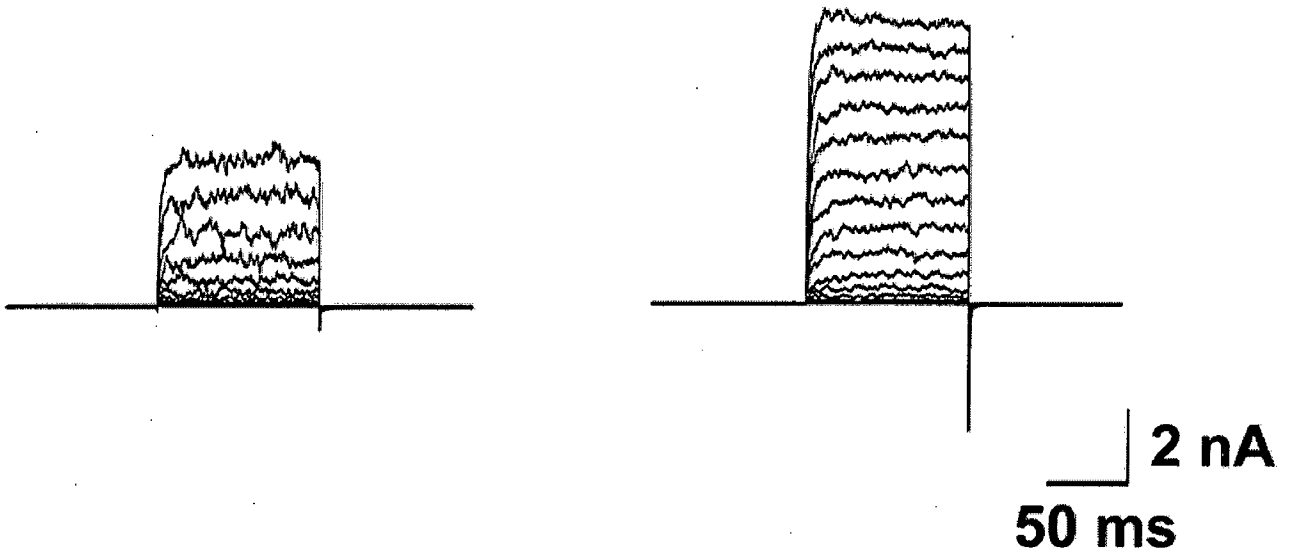


3/16

도 1c

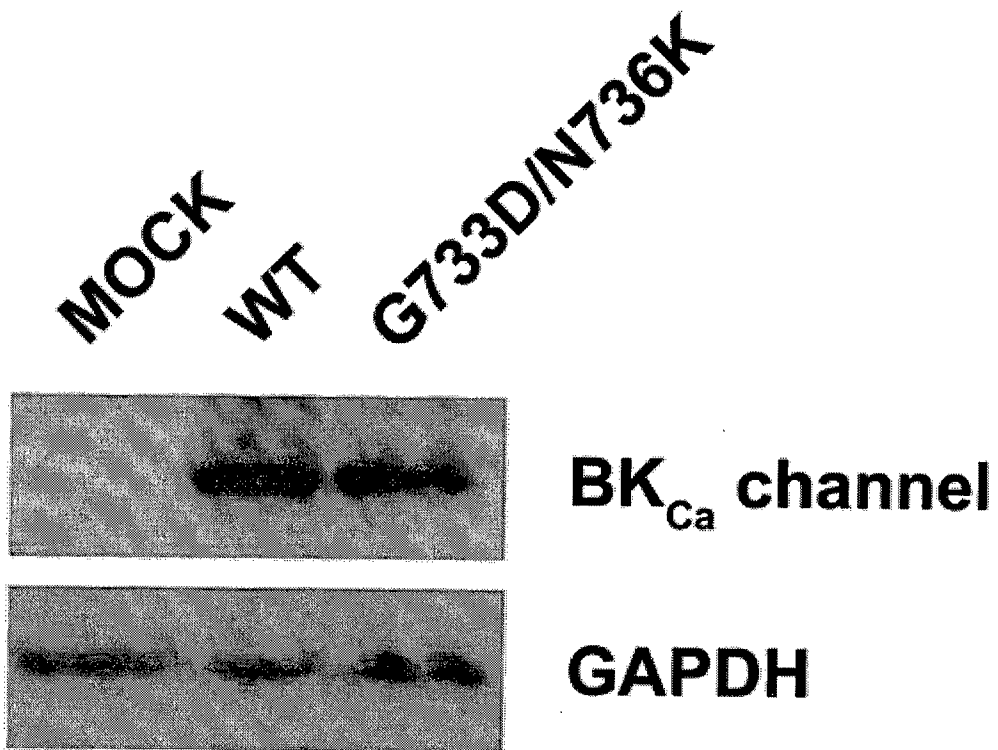
WT

G733D/N736K



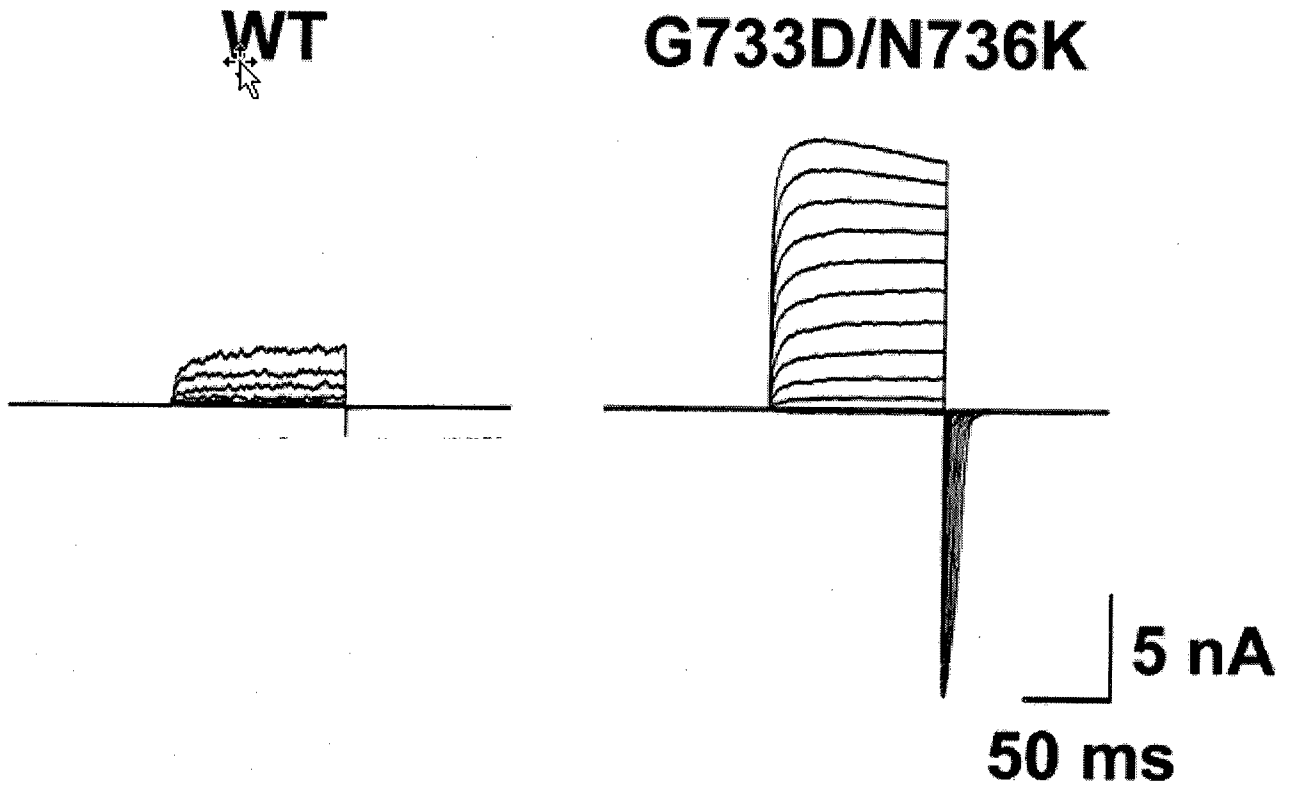
4/16

도 2a



5/16

도 2b



6/16

도 2c

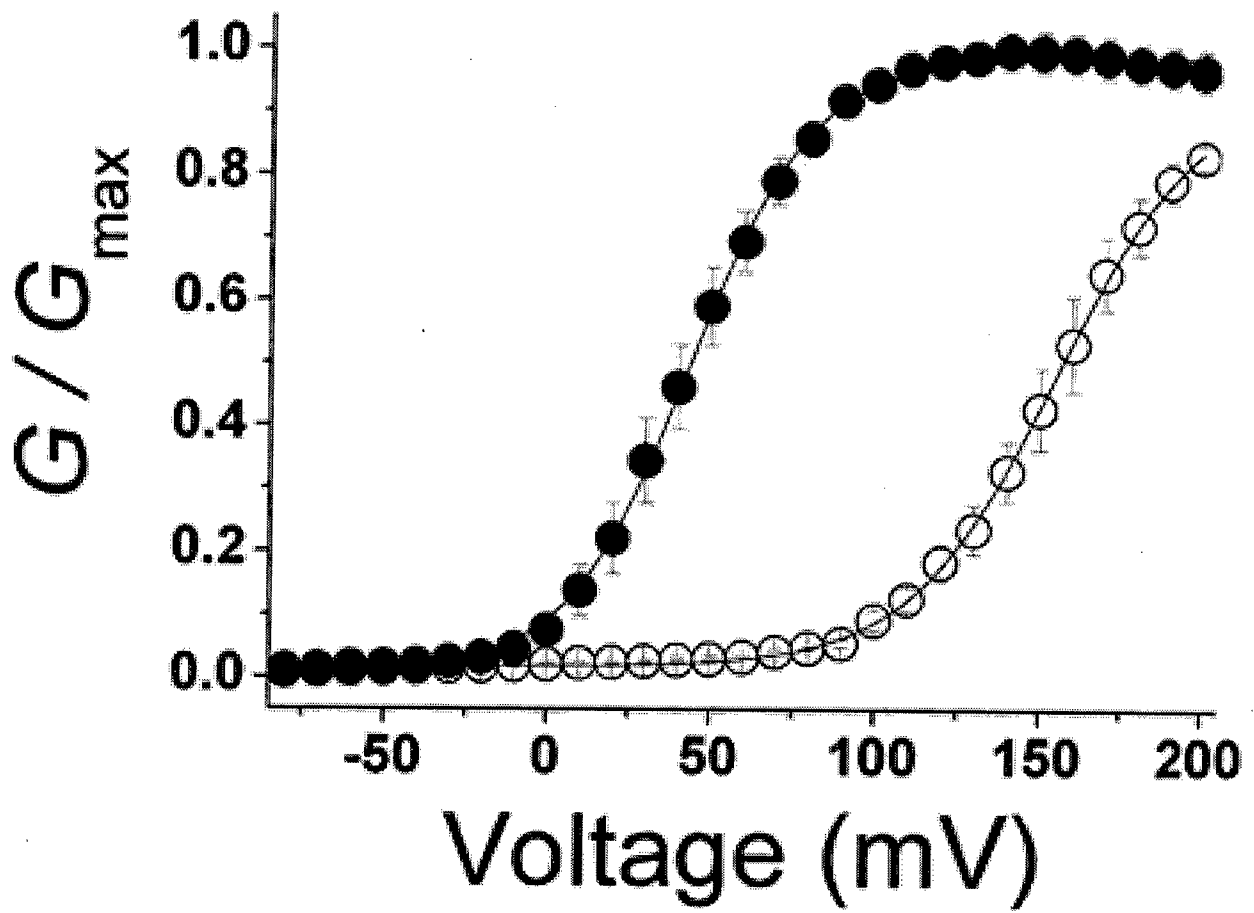
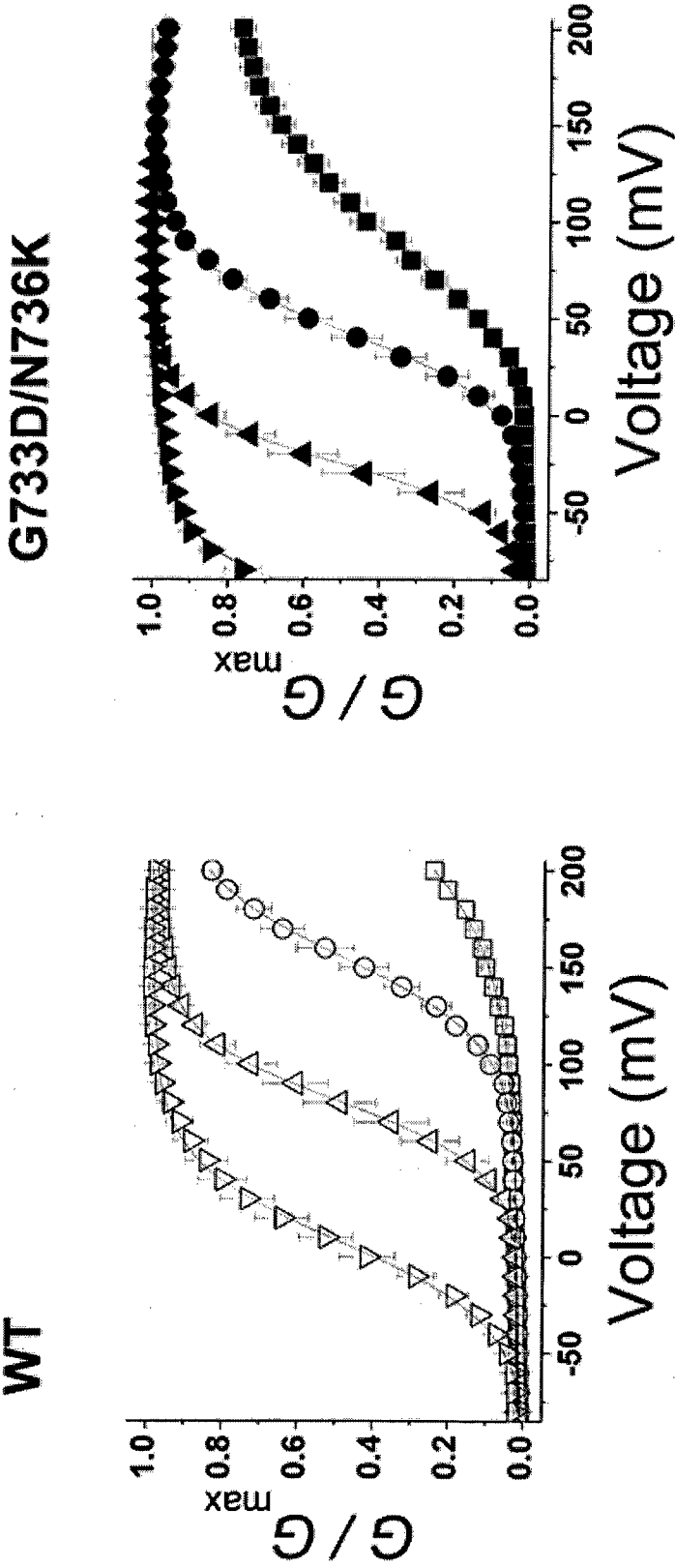
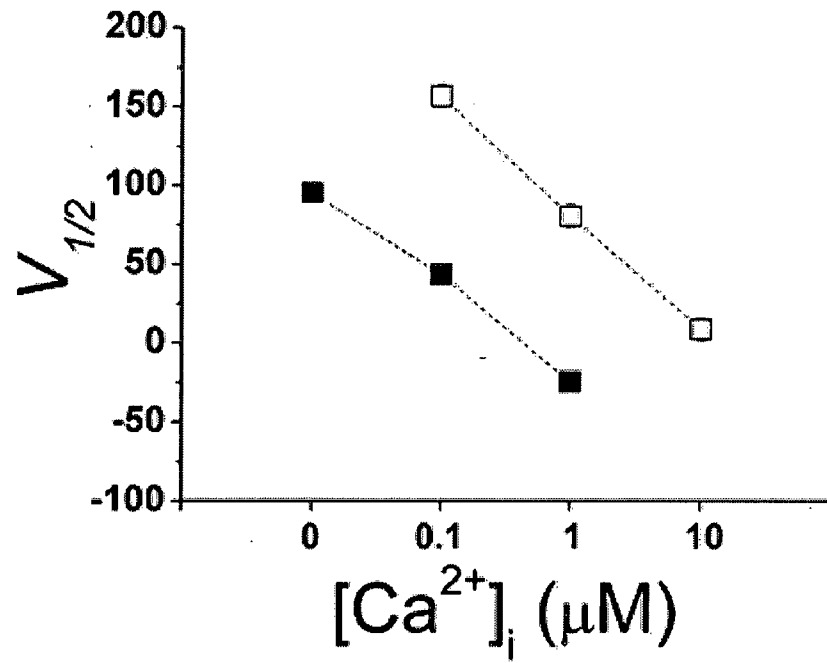


Figure 3a



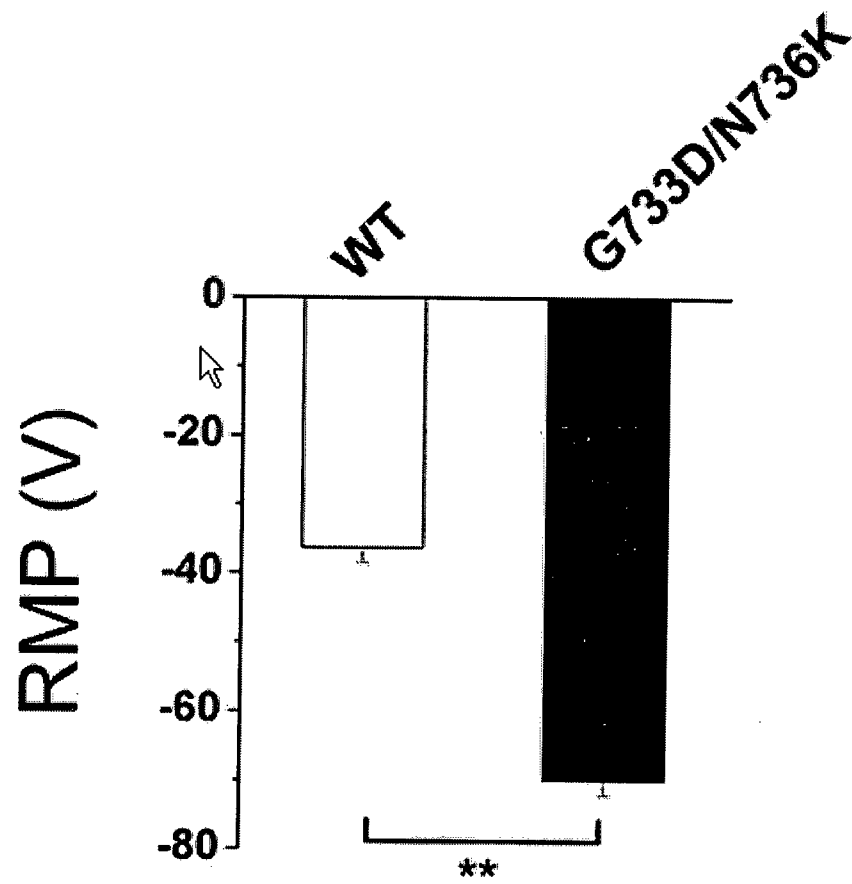
8/16

도 3b



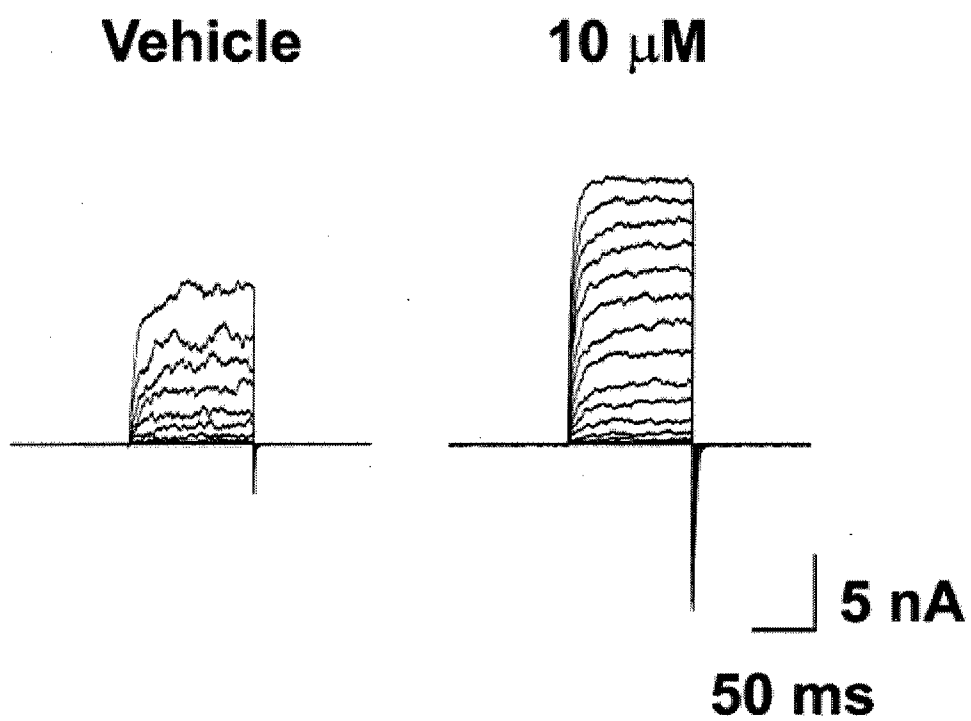
9/16

도 3c



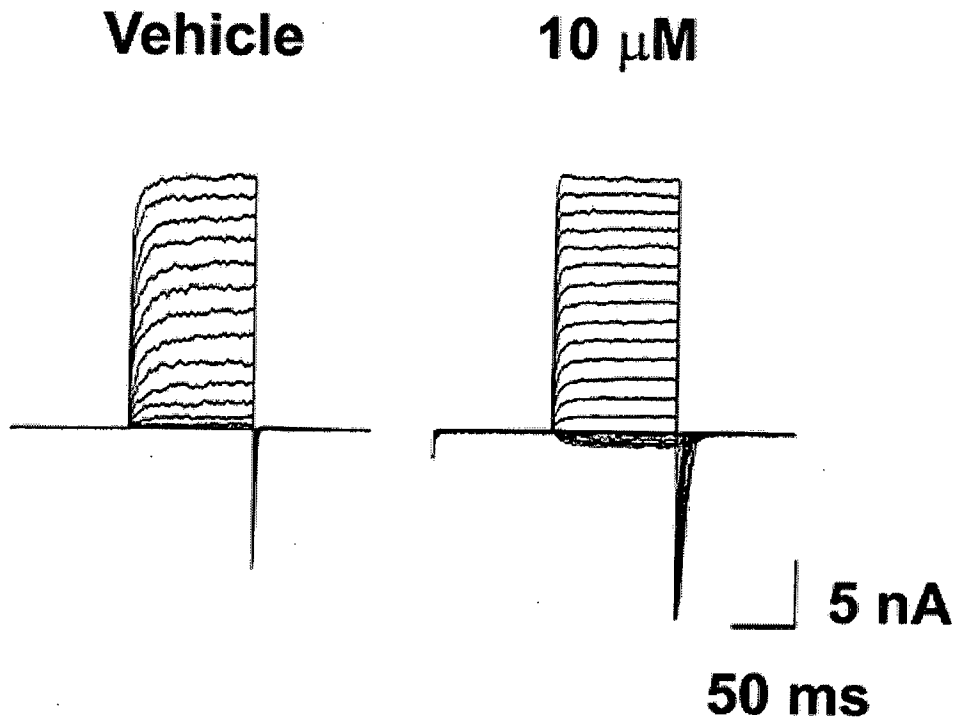
10/16

도 4a



11/16

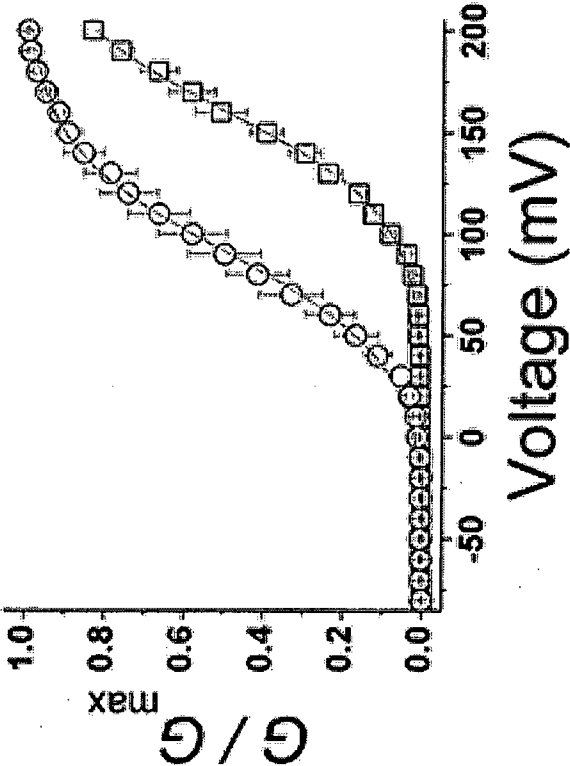
도 4b



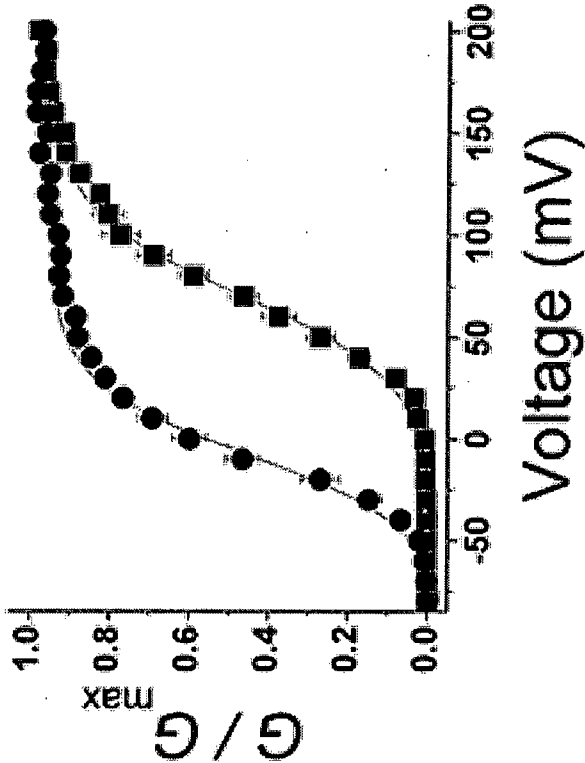
12/16

도 4c

WT

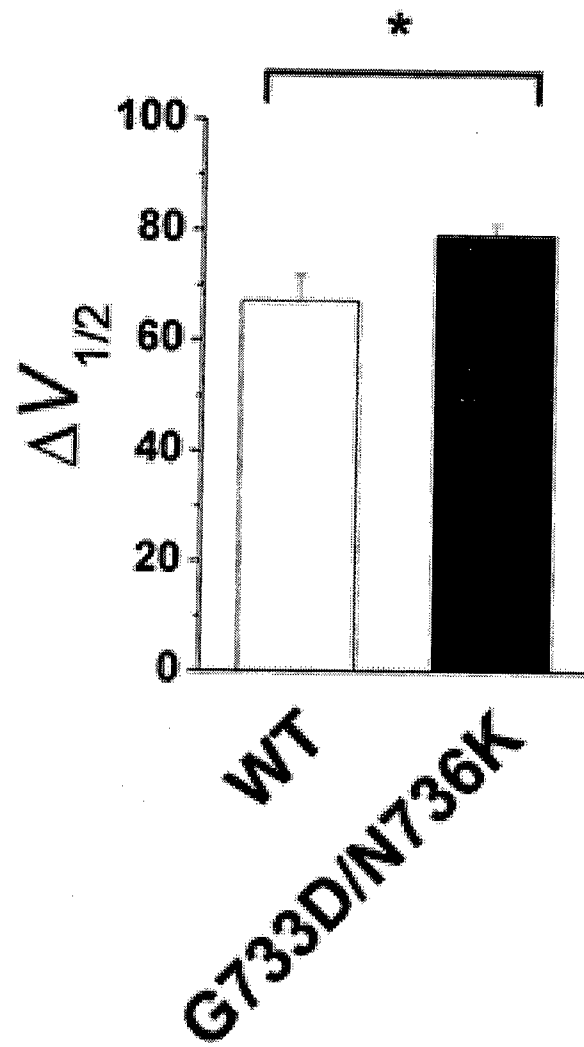


G733D/N736K



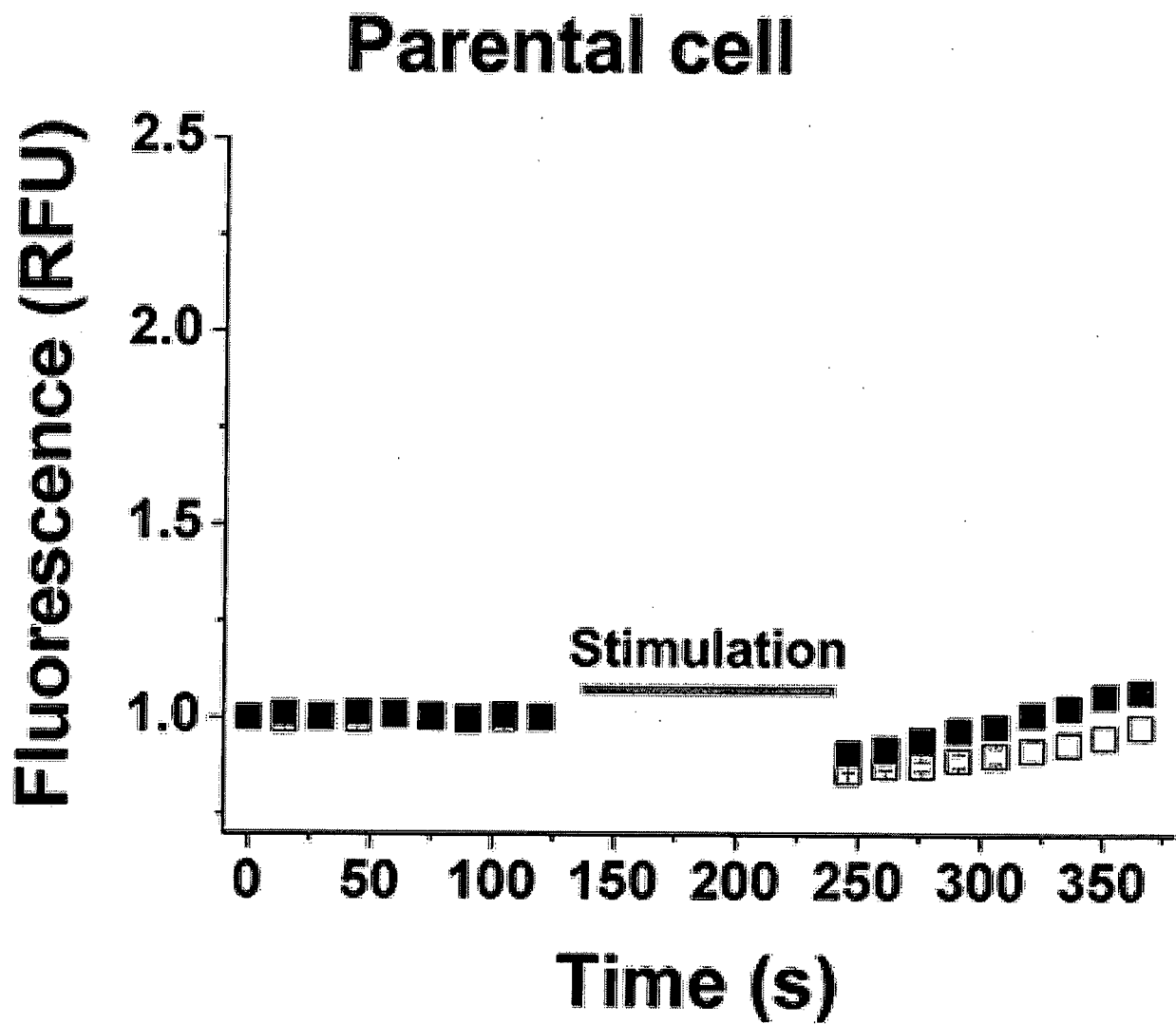
13/16

도 4d



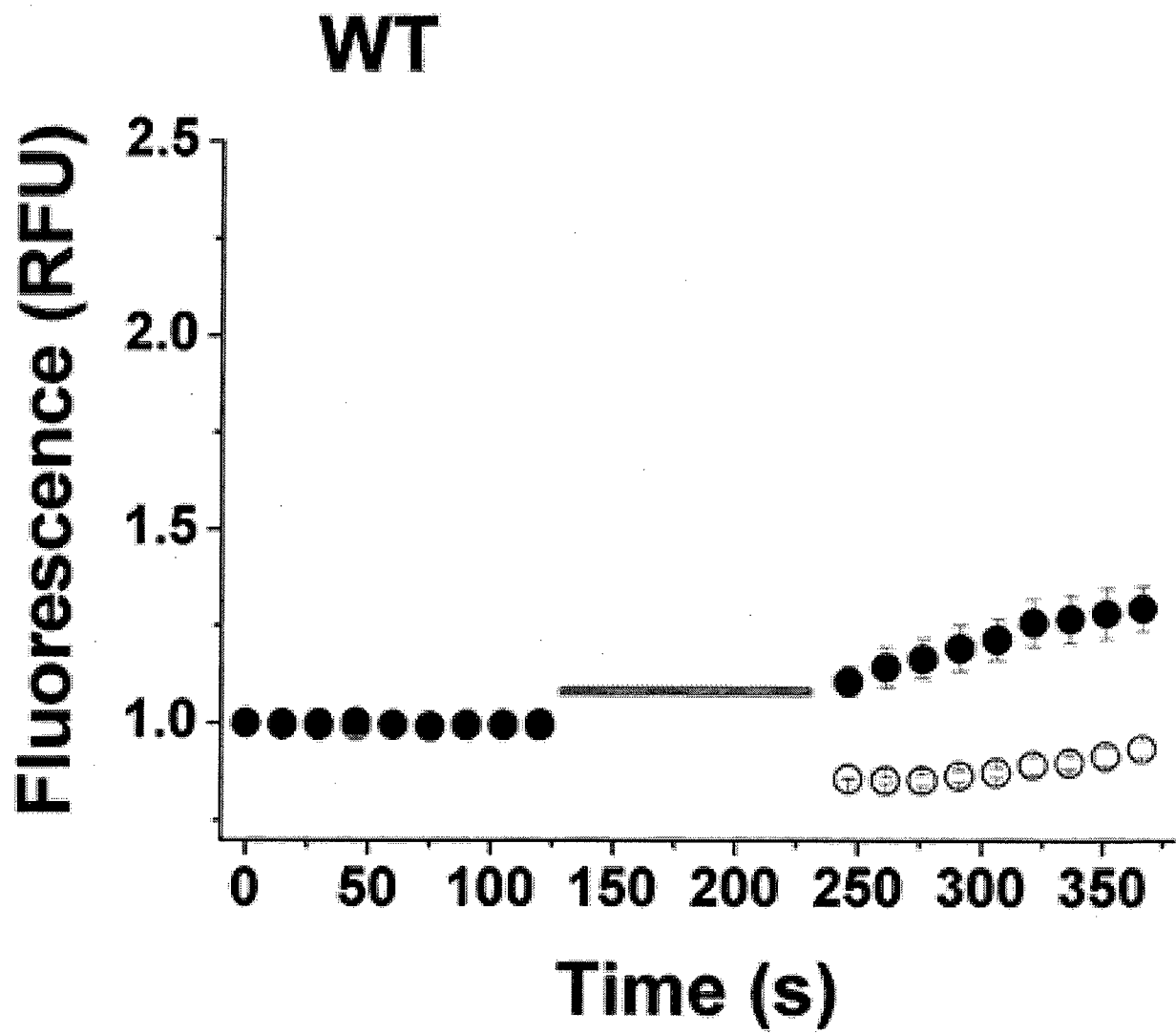
14/16

도 5a



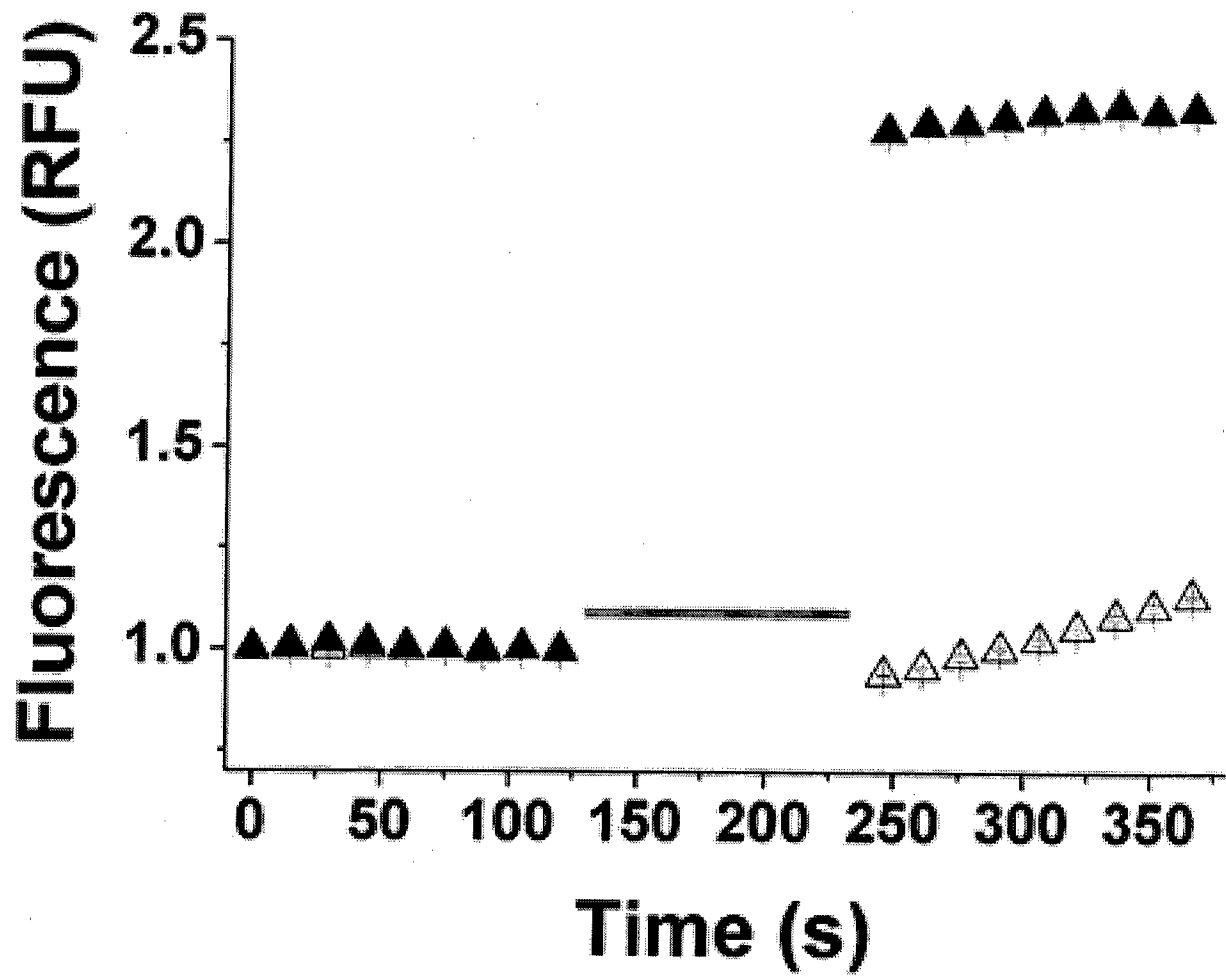
15/16

도 5b



16/16

도 5c

G733D/N736K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011414**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/68(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)

C12Q 1/68; A61K 31/24; A61K 31/365; C07C 69/34; A61K 31/13; A61K 38/17; C12N 15/11; C12N 15/63; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: BKCa channel, modulators(modulators), double mutation, screening, transformed cells

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE et al., "Modulation of the conductance-voltage relationship of the BK(Ca) channel by shortening the cytosolic loop connecting two RCK domains" Biophysical Journal, vol. 97, no. 3, pp. 730-737 (05 August 2009) See the entire document.	1-16
A	US 2005-0090434 A1 (MORRIS et al.) 28 April 2005 See abstract, claims 1-4, 50 and sequence number 193.	1-16
A	WON et al., "Movements of individual BKCa channels in live cell membrane monitored by site-specific labeling using quantum dots" Biophysical Journal, vol. 99, no. 9, pp. 2853-2862 (03 November 2010) See the entire document.	1-16
A	US 2002-0065315 A1 (JENSEN et al.) 30 May 2002 See abstract and claims 1, 13.	1-16
A	US 2002-0169203 A1 (JENSEN et al.) 14 November 2002 See abstract and claims 1, 21, 24.	1-16



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

26 FEBRUARY 2014 (26.02.2014)

Date of mailing of the international search report

03 MARCH 2014 (03.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2005-0090434 A1	28/04/2005	AU 2002-337943 A8	06/05/2003
		AU 2002-364052 A1	09/07/2003
		AU 2002-364052 B2	10/07/2008
		AU 2002-364708 A1	10/06/2003
		AU 2002-367390 A1	24/07/2003
		AU 2003-218331 A1	08/10/2003
		AU 2003-218331 B2	10/12/2009
		AU 2003-219959 A1	16/09/2003
		AU 2003-219959 B2	31/07/2008
		AU 2003-220178 A1	08/10/2003
		AU 2003-220178 B2	25/03/2010
		AU 2003-224641 A1	09/09/2003
		AU 2003-225750 A1	08/10/2003
		AU 2003-225750 B2	22/04/2010
		AU 2003-225750 C1	02/09/2010
		AU 2003-225826 A1	08/10/2003
		AU 2003-225826 B2	14/02/2008
		AU 2003-230669 A1	08/10/2003
		AU 2003-230669 B2	29/05/2008
		AU 2003-230669 B2	03/09/2009
		AU 2003-299645 A1	22/07/2004
		AU 2003-299645 B2	27/11/2008
		AU 2003-299646 A1	22/07/2004
		AU 2003-299646 B2	11/11/2010
		AU 2003-299897 A1	29/07/2004
		AU 2003-299897 B2	12/03/2009
		AU 2003-303638 A1	29/07/2004
		AU 2004-213432 A1	02/09/2004
		AU 2004-213452 A1	02/09/2004
		AU 2004-276821 A1	07/04/2005
		CA 2465921 A1	15/05/2003
		CA 2468316 A1	05/06/2003
		CA 2470844 A1	03/07/2003
		CA 2471840 A1	17/07/2003
		CA 2477225 A1	04/09/2003
		CA 2477974 A1	12/09/2003
		CA 2479719 A1	02/10/2003
		CA 2479721 A1	02/10/2003
		CA 2479723 A1	02/10/2003
		CA 2479727 A1	02/10/2003
		CA 2479731 A1	02/10/2003
		CA 2508944 A1	15/07/2004
		CA 2510311 A1	15/07/2004
		CA 2511817 A1	22/07/2004
		CA 2516128 A1	02/09/2004
		CA 2516138 A1	02/09/2004
		CA 2539709 A1	07/04/2005
		EP 1469769 A2	27/10/2004
		EP 1469870 A2	27/10/2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 1476067 A2	17/11/2004
		EP 1490388 A1	29/12/2004
		EP 1490500 A1	29/12/2004
		EP 1490688 A1	29/12/2004
		EP 1490689 A1	29/12/2004
		EP 1490690 A2	29/12/2004
		EP 1509539 A2	02/03/2005
		EP 1558623 A2	03/08/2005
		EP 1581244 A1	05/10/2005
		EP 1581542 A2	05/10/2005
		EP 1583501 A2	12/10/2005
		EP 1587405 A2	26/10/2005
		EP 1587476 A2	26/10/2005
		EP 1592708 A2	09/11/2005
		EP 1594893 A2	16/11/2005
		EP 1685157 A2	02/08/2006
		EP 2014669 A2	14/01/2009
		EP 2014669 A3	25/02/2009
		EP 2031076 A1	04/03/2009
		EP 2034030 A2	11/03/2009
		EP 2034030 A3	22/07/2009
		EP 2058408 A2	13/05/2009
		EP 2058408 A3	09/09/2009
		EP 2196474 A2	16/06/2010
		EP 2196474 A3	15/12/2010
		EP 2253643 A1	24/11/2010
		JP 2005-508175 A	31/03/2005
		JP 2005-510225 A	21/04/2005
		JP 2005-512558 A	12/05/2005
		JP 2005-514923 A	26/05/2005
		JP 2005-520536 A	14/07/2005
		JP 2005-520551 A	14/07/2005
		JP 2005-520561 A	14/07/2005
		JP 2005-526508 A	08/09/2005
		JP 2005-531290 A	20/10/2005
		JP 2005-538692 A	22/12/2005
		JP 2006-507794 A	09/03/2006
		JP 2006-518991 A	24/08/2006
		JP 2006-519589 A	31/08/2006
		JP 2007-524362 A	30/08/2007
		JP 2009-195241 A	03/09/2009
		JP 2009-195242 A	03/09/2009
		JP 2009-195243 A	03/09/2009
		JP 2009-195244 A	03/09/2009
		JP 2009-195249 A	03/09/2009
		JP 2009-207497 A	17/09/2009
		JP 2009-225806 A	08/10/2009
		JP 2009-225807 A	08/10/2009
		JP 2009-232852 A	15/10/2009
		JP 2009-240319 A	22/10/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2009-519002 A	14/05/2009
		JP 2009-520459 A	28/05/2009
		JP 2009-521204 A	04/06/2009
		JP 2010-063464 A	25/03/2010
		JP 2010-124828 A	10/06/2010
		JP 2010-200753 A	16/09/2010
		JP 2010-263894 A	25/11/2010
		US 2002-0182586 A1	05/12/2002
		US 2003-0022255 A1	30/01/2003
		US 2003-0064383 A1	03/04/2003
		US 2003-0087252 A1	08/05/2003
		US 2003-0099963 A1	29/05/2003
		US 2003-0165878 A1	04/09/2003
		US 2003-0194702 A1	16/10/2003
		US 2003-0216558 A1	20/11/2003
		US 2003-0232334 A1	18/12/2003
		US 2004-0072154 A1	15/04/2004
		US 2004-0126762 A1	01/07/2004
		US 2004-0166490 A1	26/08/2004
		US 2004-0170982 A1	02/09/2004
		US 2004-0180344 A1	16/09/2004
		US 2004-0197778 A1	07/10/2004
		US 2004-0219528 A1	04/11/2004
		US 2004-072264 A1	15/04/2004
		US 2005-0202442 A1	15/09/2005
		US 2006-0040262 A1	23/02/2006
		US 2006-0121454 A1	08/06/2006
		US 2006-0134623 A1	22/06/2006
		US 2006-0154250 A1	13/07/2006
		US 2006-0166213 A1	27/07/2006
		US 2006-0177861 A1	10/08/2006
		US 2006-0194265 A1	31/08/2006
		US 2006-0204982 A1	14/09/2006
		US 2006-0211015 A1	21/09/2006
		US 2006-0228710 A1	12/10/2006
		US 2007-0037145 A1	15/02/2007
		US 2007-0071757 A1	29/03/2007
		US 2007-0149449 A1	28/06/2007
		US 2007-0212351 A1	13/09/2007
		US 2007-0218071 A1	20/09/2007
		US 2007-0237770 A1	11/10/2007
		US 2007-0274990 A1	29/11/2007
		US 2010-0216713 A1	26/08/2010
		US 2010-0317003 A1	16/12/2010
		US 7645441 B2	12/01/2010
		US 7700274 B2	20/04/2010
		US 7767387 B2	03/08/2010
		US 7816076 B2	19/10/2010
		US 7820447 B2	26/10/2010
		US 7892730 B2	22/02/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2003-008583 A2	30/01/2003
		WO 2003-008583 A3	03/07/2003
		WO 2003-035837 A2	01/05/2003
		WO 2003-035837 A3	26/02/2004
		WO 2003-039484 A2	15/05/2003
		WO 2003-039484 A3	12/08/2004
		WO 2003-045230 A2	05/06/2003
		WO 2003-045230 A3	10/09/2004
		WO 2003-053224 A2	03/07/2003
		WO 2003-053224 A3	04/09/2003
		WO 2003-057146 A2	17/07/2003
		WO 2003-057146 A3	29/12/2004
		WO 2003-071933 A2	04/09/2003
		WO 2003-071933 A3	29/12/2005
		WO 2003-073826 A2	12/09/2003
		WO 2003-079977 A2	02/10/2003
		WO 2003-079977 A3	12/08/2004
		WO 2003-080639 A1	02/10/2003
		WO 2003-080853 A1	02/10/2003
		WO 2003-081250 A1	02/10/2003
		WO 2003-081251 A1	02/10/2003
		WO 2004-058146 A2	15/07/2004
		WO 2004-058146 A3	30/09/2004
		WO 2004-058288 A1	15/07/2004
		WO 2004-060301 A2	22/07/2004
		WO 2004-060301 A3	02/02/2006
		WO 2004-060304 A2	22/07/2004
		WO 2004-060304 A3	06/12/2007
		WO 2004-074320 A2	02/09/2004
		WO 2004-074320 A3	02/06/2005
		WO 2004-074321 A2	02/09/2004
		WO 2004-074321 A3	13/01/2005
		WO 2005-031001 A2	07/04/2005
		WO 2005-031001 A3	01/09/2005
US 2002-0065315 A1	30/05/2002	AU 2000-45374 A1	05/12/2000
		AU 4537400 A	05/12/2000
		EP 1178963 A1	13/02/2002
		JP 2002-544258 A	24/12/2002
		WO 00-69823 A1	23/11/2000
US 2002-0169203 A1	14/11/2002	AU 2000-18576 A1	12/07/2000
		EP 1140784 A2	10/10/2001
		JP 2002-533318 A	08/10/2002
		US 7012146 B2	14/03/2006
		WO 00-37422 A2	29/06/2000
		WO 00-37422 A3	14/09/2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/68; A61K 31/24; A61K 31/365; C07C 69/34; A61K 31/13; A61K 38/17; C12N 15/11; C12N 15/63; G01N 33/68 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: BKCa 채널, 이온 채널 조절인자(modulators), 이중 돌연변이, 스크리닝, 형질전환 세포		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE 외, 'Modulation of the conductance-voltage relationship of the BK(Ca) channel by shortening the cytosolic loop connecting two RCK domains' Biophysical Journal, Vol. 97, No. 3, pp. 730-737 (2009.08.05.) 문서 전체 참조.	1-16
A	US 2005-0090434 A1 (MORRIS 외) 2005.04.28. 요약, 청구항 1-4, 50 및 서열번호 193 참조.	1-16
A	WON 외, 'Movements of individual BKCa channels in live cell membrane monitored by site-specific labeling using quantum dots' Biophysical Journal, Vol. 99, No. 9, pp. 2853-2862 (2010.11.03.) 문서 전체 참조.	1-16
A	US 2002-0065315 A1 (JENSEN 외) 2002.05.30. 요약 및 청구항 1, 13 참조.	1-16
A	US 2002-0169203 A1 (JENSEN 외) 2002.11.14. 요약 및 청구항 1, 21, 24 참조.	1-16
☐ 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 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 02월 26일 (26.02.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 03월 03일 (03.03.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2005-0090434 A1	2005/04/28	AU 2002-337943 A8	2003/05/06
		AU 2002-364052 A1	2003/07/09
		AU 2002-364052 B2	2008/07/10
		AU 2002-364708 A1	2003/06/10
		AU 2002-367390 A1	2003/07/24
		AU 2003-218331 A1	2003/10/08
		AU 2003-218331 B2	2009/12/10
		AU 2003-219959 A1	2003/09/16
		AU 2003-219959 B2	2008/07/31
		AU 2003-220178 A1	2003/10/08
		AU 2003-220178 B2	2010/03/25
		AU 2003-224641 A1	2003/09/09
		AU 2003-225750 A1	2003/10/08
		AU 2003-225750 B2	2010/04/22
		AU 2003-225750 C1	2010/09/02
		AU 2003-225826 A1	2003/10/08
		AU 2003-225826 B2	2008/02/14
		AU 2003-230669 A1	2003/10/08
		AU 2003-230669 B2	2008/05/29
		AU 2003-230669 C1	2009/09/03
		AU 2003-299645 A1	2004/07/22
		AU 2003-299645 B2	2008/11/27
		AU 2003-299646 A1	2004/07/22
		AU 2003-299646 B2	2010/11/11
		AU 2003-299897 A1	2004/07/29
		AU 2003-299897 B2	2009/03/12
		AU 2003-303638 A1	2004/07/29
		AU 2004-213432 A1	2004/09/02
		AU 2004-213452 A1	2004/09/02
		AU 2004-276821 A1	2005/04/07
		CA 2465921 A1	2003/05/15
		CA 2468316 A1	2003/06/05
		CA 2470844 A1	2003/07/03
		CA 2471840 A1	2003/07/17
		CA 2477225 A1	2003/09/04
		CA 2477974 A1	2003/09/12
		CA 2479719 A1	2003/10/02
		CA 2479721 A1	2003/10/02
		CA 2479723 A1	2003/10/02
		CA 2479727 A1	2003/10/02
		CA 2479731 A1	2003/10/02
		CA 2508944 A1	2004/07/15
		CA 2510311 A1	2004/07/15
		CA 2511817 A1	2004/07/22
		CA 2516128 A1	2004/09/02
		CA 2516138 A1	2004/09/02
		CA 2539709 A1	2005/04/07
		EP 1469769 A2	2004/10/27
		EP 1469870 A2	2004/10/27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 1476067 A2	2004/11/17
		EP 1490388 A1	2004/12/29
		EP 1490500 A1	2004/12/29
		EP 1490688 A1	2004/12/29
		EP 1490689 A1	2004/12/29
		EP 1490690 A2	2004/12/29
		EP 1509539 A2	2005/03/02
		EP 1558623 A2	2005/08/03
		EP 1581244 A1	2005/10/05
		EP 1581542 A2	2005/10/05
		EP 1583501 A2	2005/10/12
		EP 1587405 A2	2005/10/26
		EP 1587476 A2	2005/10/26
		EP 1592708 A2	2005/11/09
		EP 1594893 A2	2005/11/16
		EP 1685157 A2	2006/08/02
		EP 2014669 A2	2009/01/14
		EP 2014669 A3	2009/02/25
		EP 2031076 A1	2009/03/04
		EP 2034030 A2	2009/03/11
		EP 2034030 A3	2009/07/22
		EP 2058408 A2	2009/05/13
		EP 2058408 A3	2009/09/09
		EP 2196474 A2	2010/06/16
		EP 2196474 A3	2010/12/15
		EP 2253643 A1	2010/11/24
		JP 2005-508175 A	2005/03/31
		JP 2005-510225 A	2005/04/21
		JP 2005-512558 A	2005/05/12
		JP 2005-514923 A	2005/05/26
		JP 2005-520536 A	2005/07/14
		JP 2005-520551 A	2005/07/14
		JP 2005-520561 A	2005/07/14
		JP 2005-526508 A	2005/09/08
		JP 2005-531290 A	2005/10/20
		JP 2005-538692 A	2005/12/22
		JP 2006-507794 A	2006/03/09
		JP 2006-518991 A	2006/08/24
		JP 2006-519589 A	2006/08/31
		JP 2007-524362 A	2007/08/30
		JP 2009-195241 A	2009/09/03
		JP 2009-195242 A	2009/09/03
		JP 2009-195243 A	2009/09/03
		JP 2009-195244 A	2009/09/03
		JP 2009-195249 A	2009/09/03
		JP 2009-207497 A	2009/09/17
		JP 2009-225806 A	2009/10/08
		JP 2009-225807 A	2009/10/08
		JP 2009-232852 A	2009/10/15
		JP 2009-240319 A	2009/10/22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2009-519002 A	2009/05/14
		JP 2009-520459 A	2009/05/28
		JP 2009-521204 A	2009/06/04
		JP 2010-063464 A	2010/03/25
		JP 2010-124828 A	2010/06/10
		JP 2010-200753 A	2010/09/16
		JP 2010-263894 A	2010/11/25
		US 2002-0182586 A1	2002/12/05
		US 2003-0022255 A1	2003/01/30
		US 2003-0064383 A1	2003/04/03
		US 2003-0087252 A1	2003/05/08
		US 2003-0099963 A1	2003/05/29
		US 2003-0165878 A1	2003/09/04
		US 2003-0194702 A1	2003/10/16
		US 2003-0216558 A1	2003/11/20
		US 2003-0232334 A1	2003/12/18
		US 2004-0072154 A1	2004/04/15
		US 2004-0126762 A1	2004/07/01
		US 2004-0166490 A1	2004/08/26
		US 2004-0170982 A1	2004/09/02
		US 2004-0180344 A1	2004/09/16
		US 2004-0197778 A1	2004/10/07
		US 2004-0219528 A1	2004/11/04
		US 2004-072264 A1	2004/04/15
		US 2005-0202442 A1	2005/09/15
		US 2006-0040262 A1	2006/02/23
		US 2006-0121454 A1	2006/06/08
		US 2006-0134623 A1	2006/06/22
		US 2006-0154250 A1	2006/07/13
		US 2006-0166213 A1	2006/07/27
		US 2006-0177861 A1	2006/08/10
		US 2006-0194265 A1	2006/08/31
		US 2006-0204982 A1	2006/09/14
		US 2006-0211015 A1	2006/09/21
		US 2006-0228710 A1	2006/10/12
		US 2007-0037145 A1	2007/02/15
		US 2007-0071757 A1	2007/03/29
		US 2007-0149449 A1	2007/06/28
		US 2007-0212351 A1	2007/09/13
		US 2007-0218071 A1	2007/09/20
		US 2007-0237770 A1	2007/10/11
		US 2007-0274990 A1	2007/11/29
		US 2010-0216713 A1	2010/08/26
		US 2010-0317003 A1	2010/12/16
		US 7645441 B2	2010/01/12
		US 7700274 B2	2010/04/20
		US 7767387 B2	2010/08/03
		US 7816076 B2	2010/10/19
		US 7820447 B2	2010/10/26
		US 7892730 B2	2011/02/22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2003-008583 A2	2003/01/30
		WO 2003-008583 A3	2003/07/03
		WO 2003-035837 A2	2003/05/01
		WO 2003-035837 A3	2004/02/26
		WO 2003-039484 A2	2003/05/15
		WO 2003-039484 A3	2004/08/12
		WO 2003-045230 A2	2003/06/05
		WO 2003-045230 A3	2004/09/10
		WO 2003-053224 A2	2003/07/03
		WO 2003-053224 A3	2003/09/04
		WO 2003-057146 A2	2003/07/17
		WO 2003-057146 A3	2004/12/29
		WO 2003-071933 A2	2003/09/04
		WO 2003-071933 A3	2005/12/29
		WO 2003-073826 A2	2003/09/12
		WO 2003-079977 A2	2003/10/02
		WO 2003-079977 A3	2004/08/12
		WO 2003-080639 A1	2003/10/02
		WO 2003-080853 A1	2003/10/02
		WO 2003-081250 A1	2003/10/02
		WO 2003-081251 A1	2003/10/02
		WO 2004-058146 A2	2004/07/15
		WO 2004-058146 A3	2004/09/30
		WO 2004-058288 A1	2004/07/15
		WO 2004-060301 A2	2004/07/22
		WO 2004-060301 A3	2006/02/02
		WO 2004-060304 A2	2004/07/22
		WO 2004-060304 A3	2007/12/06
		WO 2004-074320 A2	2004/09/02
		WO 2004-074320 A3	2005/06/02
		WO 2004-074321 A2	2004/09/02
		WO 2004-074321 A3	2005/01/13
		WO 2005-031001 A2	2005/04/07
		WO 2005-031001 A3	2005/09/01
US 2002-0065315 A1	2002/05/30	AU 2000-45374 A1	2000/12/05
		AU 4537400 A	2000/12/05
		EP 1178963 A1	2002/02/13
		JP 2002-544258 A	2002/12/24
		WO 00-69823 A1	2000/11/23
US 2002-0169203 A1	2002/11/14	AU 2000-18576 A1	2000/07/12
		EP 1140784 A2	2001/10/10
		JP 2002-533318 A	2002/10/08
		US 7012146 B2	2006/03/14
		WO 00-37422 A2	2000/06/29
		WO 00-37422 A3	2000/09/14