



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월21일

(11) 등록번호 10-2254706

(24) 등록일자 2021년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2017.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/02 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0071441

(22) 출원일자 2019년06월17일

심사청구일자 2019년06월17일

(65) 공개번호 10-2020-0143857

(43) 공개일자 2020년12월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170120912 A*

US20130065792 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이진우

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 702호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)

허윤경

서울특별시 서초구 현릉로8길 22, 306동 1603호(신원동, 서초포레스타3단지)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 10 항

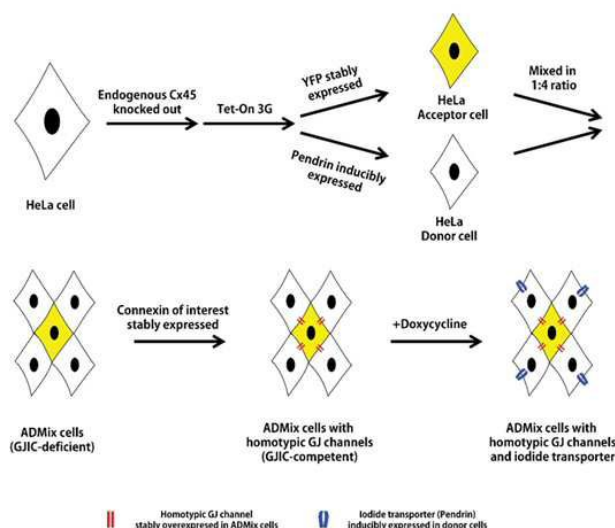
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 ADMix 세포, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 ADMix 세포, 이의 제조방법 및 상기 ADMix 세포를 이용한 갭정선 활성 측정하는 방법, 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12N 2830/003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1A6A1A03023718
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	연구재단
연구사업명	이공분야 중점연구소지원사업
연구과제명	난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톤 제어 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 요오드화물(iodide) 수용체를 유도 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 제조하는 단계;
- b) 상기 공여체 세포 및 수용체 세포를 혼합한 후 공동배양하는 단계; 및
- c) 상기 공동배양 된 혼합세포를 수득하는 단계를 포함하는,

상기 공여체 세포 및 수용체 세포가 동일 세포 주기 및 단계로서 커넥신(connexin, Cx) 26, 30, 31, 40, 43, 45 및 50으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 커넥신에 의한 갭정선 활성이 측정될 수 있는 ADMix 세포 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 공여체 세포는 독시사이클린에 의해 유도 발현이 가능한 프로모터를 포함하는 것인, ADMix 세포 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 제조방법으로 제조된, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포가 동일 세포 주기 및 단계로서 커넥신(connexin, Cx) 26, 30, 31, 40, 43, 45 및 50으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 커넥신에 의한 갭정선 활성이 측정될 수 있는 ADMix 세포.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 ADMix 세포는 공여체 세포 및 수용체 세포를 1 : 1 내지 5 : 1의 비율로 혼합 공동배양 후 수득된 혼합 세포인 것인, ADMix 세포.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 ADMix 세포는 세포간 갭정선(gap junction) 활성 측정용인 것인, ADMix 세포.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 ADMix 세포를 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트.

청구항 8

- a) 제4항의 ADMix 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계;
- b) 요오드화물(iodide)을 포함하는 완충 용액을 첨가하는 단계; 및
- c) 상기 b) 단계의 완충용액 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계를 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 c) 단계에서 측정된 형광 강도의 소광(quenching) 비율이 증가하면 갭정선 활성이 증가하는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정 방법.

청구항 10

a) 제4항의 ADMix 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계;

b) 피검물질을 처리하는 단계;

c) 요오드화물(iodide)을 포함하는 완충 용액을 첨가하는 단계;

d) 상기 c) 단계의 완충용액 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계;

e) 상기 d) 단계에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광 비율로서 계산하는 단계; 및

f) 상기 e) 단계에서 계산한 소광 비율을 미처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 f) 단계에서 비교한 결과, 소광 비율을 증가시키면 피검물질을 갭활성 유도물질로 판단하고, 소광 비율을 감소시키면 피검물질을 갭활성 억제물질로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ADMix 세포, 이의 제조방법 및 상기 ADMix 세포를 이용한 갭정선 활성 측정하는 방법, 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 갭정선(Gap junction, GJ)은 cAMP, Ca^{2+} 및 IP3와 같은 신호전달 물질이나, 영양소 및 대사산물을 포함하는 1kDa 미만의 소분자 물질의 확산을 위한 세포 내 통로이다. 6 개의 커넥신(connexin, Cx) 단백질들이 커넥손(connexon)이라고 하는 튜브 구조를 이루는데, 이러한 커넥손 구조는 세포 외부로의 헤미채널(hemichannel)로서의 역할을 하거나, 이웃하는 세포의 커넥손과 결합하여 갭정선을 형성한다. 인간의 커넥신 그룹은 21 종류의 커넥신 단백질로 구성될 수 있으며, 이들은 각각 자신의 분자량에 따라 명명된다.

[0003] 상기 커넥신 유전자의 변이로 인해 다양한 질병이 야기될 수 있다. 인간 커

[0004] 넥신 26을 암호화하는 GJB2의 변이는 피부 질환과 함께 증후군성 청력 손실 또는 비-증후군성 청력 손실을 야기하는 것으로 보고된 바 있고, GJA1 유전자의 변이에 의한 커넥신 43의 결함은 다양한 발달적 이상 현상을 야기할 수 있는 눈, 코, 치아, 골격 이형성증(Oculodentodigital dysplasia) 등의 원인이 되는 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 커넥신 유전자 내 돌연변이로 인한 다양한 질병이 유발되는 것을 통해 커넥신은 실행 가능한 약물 표적으로 간주되어 왔다. 그러나 커넥신 아이소타입-선택적 모듈레이터의 대규모 발견은 고속-대량 분석 기술의 부재로 인해 아직 탐구되고 있지 않고 있다. 기존에 인접한 셀 사이에 염료 이동을 측정하는 염료 전달 방법, 접합부의 전도도를 측정하는 패치 클램프 방법 등은 정확도, 정밀도가 부족하거나 고속 대량 약물 스크리닝에 적합하지 않다는 문제점이 있어왔다. 또한, 고속 대량 약물 스크리닝 수행의 경우, 이를 수행하기 위한 준비 단계가 복잡하여 간편하게 수행하기 어려운 단점이 있었다. 이에 따라 갭정선 채널의 활성을 민감하고 신속하게 측정할 수 있으면서도 간단하고 손쉽게 수행할 수 있는 초고속 스크리닝 분석법의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1818850호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 ADMix 세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 ADMix 세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 ADMix 세포를 이용한 세포 간 갭정선(gap junction) 활성 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 ADMix 세포를 이용한 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 a) 요오드화물(iodide) 수송체를 유도 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 제조하는 단계; b) 상기 공여체 세포 및 수용체 세포를 혼합한 후 공동배양하는 단계; 및 c) 상기 공동배양 된 혼합세포를 수득하는 단계를 포함하는, ADMix 세포 제조방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에서, “ADMix 세포”란, 상기 요오드화물 수송체를 발현하는 공여체 세포와 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 혼합하여 공동배양 후 수득된 혼합 세포를 말하며, 본 발명에서 신규 개발되었다.

[0013] 기존의 갭정선 활성 측정 방법은 요오드화물 수송체를 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포의 성장속도가 달라 세포를 각각 따로 배양한 후 갭정선 활성을 측정하고자 할 때 공여체 세포와 수용체 세포를 혼합 배양한 후에 측정하는 방식으로 이루어졌다. 상기 방식은 커넥신 아이소타입 종류에 따라 각각의 세포주를 배양하였다.

[0014] 구체적으로, 상기 공여체 세포는 독시사이클린에 의해 유도 발현이 가능한 프로모터를 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 상기와 같은 방식은 초고속 스크리닝 분석을 수행함에 있어 공여체 세포와 수용체 세포가 각기 배양됨으로써 각 세포의 주기 및 단계(phase)가 맞지 않아 세포의 분석시점이 모두 일치하지 않을 수 있다는 단점이 있었다.

[0016] 이에 본 발명자들은 요오드화물 수송체를 독시사이클린을 통해 유도 발현시킴으로써, 공여체 세포와 수용체 세포의 성장 속도를 동일하게 만들 수 있는 방안을 고안해냈다. 즉, 요오드화물 수송체를 암호화하는 유전자 중 하나인 펜드린의 발현이 세포의 성장을 둔화시키므로 독시사이클린 처리 여부에 따라 펜드린 유전자의 발현을 제한함으로써 공여체 세포 및 수용체 세포를 유사한 속도로 성장시킬 수 있게 되었다. 이에 따라, 본 발명에서는 공여체 세포와 수용체 세포를 각각 배양시킬 필요 없이 혼합하여 공동 배양시킴으로써 초고속 스크리닝 분석을 수행함에 있어 분석시점이 일치될 수 있도록 하였으며, 나아가 상기와 같은 방식을 이용함으로써 더욱 빠르고 간편한 분석이 이루어질 수 있도록 하였다.

[0017] 또한 구체적으로, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포는 커넥신(connexin, Cx) 단백질을 발현하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 커넥신은 Cx 26, Cx 30, Cx 31, Cx 32, Cx 36, Cx 40, Cx 43, Cx 45, Cx 46 및 Cx 50 중 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않으며 필요에 따라 갭정선 활성을 측정할 수 있는 커넥신이면 모두 사용할 수 있다. 또한, 상기 커넥신은 하나 이상의 돌연변이가 일어난 커넥신일 수 있다. 예컨대 상기 돌연변이는 부위 특이적 돌연변이로, 하나의 아미노산에 치환이 일어난 V37I, A40G, L239A, T55I, R142W, R164W, L239I 등 일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 측면은 상기 제조방법으로 제조된 ADMix 세포에 관한 것이다.

[0020] 구체적으로, 상기 ADMix 세포는 공여체 세포 및 수용체 세포를 1 : 1 내지 5 : 1의 비율로 혼합 공동배양 후 수

득된 혼합 세포인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 필요에 따라 변경하여 적용할 수 있다.

- [0021] 또한 구체적으로, ADMix 세포는 세포간 갭정선(gap junction) 활성 측정용인 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, 세포간 갭정선 활성 측정 방법은 요오드화물(iodide) 수송체 막단백질을 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 단백질을 발현하는 수용체 세포를 이용한 것으로서, 요오드화물을 첨가하였을 때, 요오드화물이 공여체 세포 내로 들어가서 갭정선을 통해 수용체 세포로 확산 이동하게 되고, 이동한 요오드화물은 형광 단백질과 결합하여 형광을 소광(quenching)할 수 있으며, 이를 형광의 소광 정도를 측정하여 갭정선의 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있다. 세포 간 갭정선 활성은 커넥신 단백질(connexin, Cx)의 종류 및 발현 수준에 따라 달라질 수 있다.
- [0023] 상기 공여체 세포는 독시사이클린에 의해 유도 발현이 가능한 프로모터를 포함하는 것일 수 있으며, 이에 따라, 본 발명의 ADMix 세포는 독시사이클린을 처리하여 세포 간 갭정선 활성 측정을 위한 요오드화물 수송체가 유도 발현됨에 따라 세포 간 갭정선 활성 측정시의 세포 주기 및 세포 단계가 맞추어진 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한 구체적으로, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포는 커넥신(connexin, Cx) 단백질을 발현하는 것일 수 있다. 상기 커넥신은 Cx 26, Cx 30, Cx 31, Cx 32, Cx 36, Cx 40, Cx 43, Cx 45, Cx 46 및 Cx 50 중 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않으며 필요에 따라 갭정선 활성을 측정할 수 있는 커넥신이면 모두 사용할 수 있다. 또한, 상기 커넥신은 하나 이상의 돌연변이가 일어난 커넥신일 수 있다. 예컨대 상기 돌연변이는 부위 특이적 돌연변이로, 하나의 아미노산에 치환이 일어난 V37I, A40G, L239A, T55I, R142W, R164W, L239I 등 일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서는 GJIC-있는 ADMix 세포에 독시사이클린 처리 유무에 따라 YFP 소광되는지 여부를 관찰하였으며, 독시사이클린을 처리하였을 때 요오드화물이 요오드화물 수송체를 통해 수용체 세포로 이동함으로써, YFP 형광이 감소함을 확인하였다(도 4).
- [0026] 요오드화물 수송체를 발현하는 공여체 세포는 TRE3G 프로모터 및 Tet-on 3G 단백질을 포함하며, Tet-On 3G 유도 시스템을 이용하여 요오드화물 수송체를 유도 발현시킬 수 있다.
- [0027] 상기 “Tet-On 3G 유도 시스템(Tet-On 3G inducible system)”은 Tet-On 3G 단백질을 발현하면서 TRE3G 프로모터(P_{TRE3G})로 목적 유전자를 조절하는 Tet-On 3G 세포에 독시사이클린(doxycycline)을 첨가하여 목적 유전자를 고 발현시키는 시스템을 말한다. Tet-On 3G 단백질은 독시사이클린이 결합하면 형태적인 변화가 생겨 TRE3G 프로모터(P_{TRE3G})에 결합하게 되고, 높은 목적 유전자 발현을 가능하게 한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 ADMix 세포를 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트에 관한 것이다.
- [0029] 상기 키트는 ADMix 세포와 함께 상기 세포의 배양 또는 세포를 유지하기 위해 필요한 배양물, 세포 간 갭정선 활성을 측정할 수 있는 제제, 요오드화물 완충 용액 등을 제한없이 포함할 수 있으며, 키트의 사용을 위한 설명서를 추가할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 상기 ADMix 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계; b) 요오드화물(iodide)을 포함하는 완충 용액을 첨가하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계의 완충용액 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계를 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정 방법에 관한 것이다.
- [0031] 구체적으로, 상기 c) 단계에서 측정된 형광 강도의 소광(quenching) 비율이 증가하면 갭정선 활성이 증가하는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 세포 간 갭정선 활성 측정 방법은 상기 설명한 ADMix 세포를 이용한 것으로서, ADMix 세포에 원하는 커넥신 단백질을 추가로 발현시킴으로써 갭정선 활성 측정 플랫폼을 구축할 수 있다. 원하는 커넥신 단백질을 발현시킨 ADMix 세포에 요오드화물을 첨가하면, 요오드화물이 공여체 세포 내로 들어가서 갭정선을 통해 수용체 세포로 확산 이동하게 되고, 이동한 요오드화물은 형광 단백질과 결합하여 형광을 소광(quenching)할 수 있으며, 이를 측정하여 갭정선의 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는 10개의 커넥신 아이소타입을 발현하는 ADMix 세포에 요오드화물을 주입하여 형광 강도를 측정한 결과, 0 내지 8초 사이에서 형광의 빠른 감소 현상이 나타났으며, 이에 따라 ADMix 세포에서 갭정선 채널을 통해 공여체 세포에서 수용체 세포로의 요오드화물이 이동했음을 확인하였다(도 5).
- [0034] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 커넥신 돌연변이에 의해 야기된 갭정선 기능 상실 관련 증상이 본 발명의 I

(요오드화물)-YFP GJIC 분석법을 이용하는 경우에도 유사한 결과를 얻을 수 있는지 확인하기 위해 커넥신을 암호화하는 유전자에 부위 특이적 돌연변이를 유도하여 ADMix 세포 내에 발현시켰다. 상기와 같이 ADMix 세포를 이용하여 I-YFP GJIC 분석법을 적용함으로써 커넥신의 돌연변이에 따라 나타나는 GJ 채널 부재, GJ 채널의 기능 상실, GJ 플라크 부재 또는 접합적 결합(junctional coupling)형성 기능 상실 등의 증상을 확인하였다(도 10). 상기 YFP는 형광 표지를 나타낼 수 있는 종류 중 하나로서, 필요에 따라 형광 표지를 변경하여 적용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 상기 ADMix 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계; b) 피검물질을 처리하는 단계; c) 요오드화물(iodide)을 포함하는 완충 용액을 첨가하는 단계; d) 상기 c) 단계의 완충용액 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계; e) 상기 d) 단계에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광 비율로서 계산하는 단계; 및 f) 상기 e) 단계에서 계산한 소광 비율을 미처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 갱정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0036] 구체적으로, 상기 f) 단계에서 비교한 결과, 소광 비율을 증가시키면 피검물질을 갱정성 유도물질로 판단하고, 소광 비율을 감소시키면 피검물질을 갱정성 억제물질로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명 일 실시예에서는 ADMix 세포를 이용한 I-YFP GJIC 분석법을 적용하여 갱정선 억제제인 2-APB, CBX 및 FFA 처리시 각각의 억제제마다 갱정선 활성 억제 정도 및 억제 형태가 달라짐을 확인하였는 바(도 6), 본 발명의 ADMix 세포를 이용하여 갱정선 활성 억제제를 스크리닝 할 수 있다.

[0038] 나아가, 상기 2-APB, CBX 및 FFA와 같이 기존에 알려진 갱정선 억제제 외에 3-아릴벤조퓨란(3-arylbenzofuran) 유도체를 적용한 결과, 3-아릴벤조퓨란(3-arylbenzofuran) 유도체의 α -아미노 포스페이트(α -amino phosphonate) 존재 및 피페리딘의 질소의 친핵성(또는 염기성) 정도에 따라 갱정선 억제 효과가 달라짐을 확인하였는 바, 본 발명의 ADMix 세포를 이용한 I-YFP GJIC 분석법이 화합물의 치환기 또는 일부 원소 차이에 대해서도 민감하게 반응하여 분석해 낼 수 있음을 확인하였다(도 7).

[0039] 상기와 같은 결과는 본 발명의 ADMix 세포 및 이를 이용한 갱정선 활성 분석을 통해 갱정선 활성 조절제를 높은 정확도로 스크리닝 할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0040] 본 발명의 ADMix 세포 및 이를 이용한 I-YFP GJIC 분석을 적용한 갱정선 활성 조절제 스크리닝 방법은 대량의 약물 후보군을 정확하고 초고속으로 스크리닝 할 수 있는 고속 대량 스크리닝(High Throughput Screening, HTS)이 가능하다. 이는 향후 갱정선 활성 조절제 등을 스크리닝함으로써 갱정선 돌연변이 등에 의해 유발되는 질병을 치료할 수 있는 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 ADMix 세포는 공여체 세포 및 수용체 세포 간의 세포 주기 및 단계의 차이가 없도록 하여 분석 적용시의 세포 상태를 동일하게 할 수 있는 바, 간편하면서도 민감도가 높아 필요로 되는 다양한 분석법에 널리 활용될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 ADMix 세포를 이용한 세포 간 갱정선 측정 및 갱정선 활성 조절제 스크리닝 방법은 종래 기술 대비 시간과 비용을 절약하고 보다 정확하고 민감하게 분석이 가능할 수 있도록 하는 바, 새로운 치료제 개발에도 널리 활용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 ADMix 세포를 생성하는 절차 및 원리를 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 Cx-EGFP 융합 단백질 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다(빨간색 화살표: 세포 사이에 형성된 갱정선 플라크 흰색 화살표: 세포막에 의해 형성된 인접한 세포 사이의 경계선).

도 3은 Cx 아이소타입의 발현 여부를 PAC 항체를 이용한 면역 블롯법을 통해 나타낸 것이다.

도 4는 독시사이클린 처리 유무에 따른 ADMix 세포 내 I-YFP GJIC 분석 형광 이미지를 나타낸 것이다.

도 5는 동종형 커넥신 아이소타입을 발현하는 ADMix 세포에서 요오드화물을 주입한 후 YFP 형광 퍼센트 변화를

측정하여 나타낸 것이다(가로축: 시간(sec) 세로축: %YFP fluorescence)

도 6은 6가지의 커넥신 아이소타입에 의해 형성된 갱정선에 갱정선 억제제를 처리한 결과를 나타낸 것이다((a): 2-APB 처리에 의한 갱정선 억제 비율, (b): CBX 처리에 의한 갱정선 억제 비율, (c): FFA 처리에 의한 갱정선 억제 비율).

도 7은 6가지의 커넥신 아이소타입에 의해 형성된 갱정선에 3-아릴벤조퓨란(3-arylbenzofuran)유도체를 처리했을 때의 갱정선 억제 효과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 커넥신 구조의 모식도를 나타낸 것이다(왼쪽: 커넥신 26 구조 오른쪽: 커넥신 32 구조).

도 9는 커넥신 26의 돌연변이에 의해 유발된 갱정선 억제 정도를 나타낸 것이다((a): ADMix 세포를 이용한 I-YFP-GJIC 분석 결과, (b): 갱정선 활성화).

도 10은 커넥신 32의 돌연변이에 의해 유발된 갱정선 억제 정도를 나타낸 것이다((a): ADMix 세포를 이용한 I-YFP-GJIC 분석 결과, (b): 갱정선 활성화).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1. 단일 커넥신 갱정선 채널에 대한 YFP 기반 요오드화물 이동 분석법의 설계

[0047] 1-1. 세포 배양

[0048] HeLa 세포를 10 µg/ml 시프로플록사신(ciprofloxacin)과 10% 소태아 혈청을 포함한 Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM)을 이용하여 5% CO₂, 37° C 에서 배양하였다.

[0049] 1-2. pLVX-EF1α-Tet3G, pLVX-TRE3G-IRES 및 pLVX-EIB1a-YFP^{OL} 플라스미드 제작

[0050] I-YFP GJIC분석을 수행하기 위하여 HeLa 세포에 SLC26A4 또는 YFP^{OL}을 발현하는 세포를 제작하였다.

[0051] 유도계를 위한 벡터인 pLVX-EF1α-Tet3G 및 pLVX-TRE3G-IRES는 Clontech (631363)로부터 구입하였다. 테트라사이클린-유도성 렌티바이러스성 유전자 발현 시스템을 구축하기 위해서, 펜드린(pendrin)을 코딩하는 SLC26A4 유전자를 pLVX-TRE3G-IRES 벡터에 삽입하였다. 본 발명자의 등록특허 제10-181885호의 방법을 참고하여 SLC26A4 세포를 제작하였으며, 벡터에 선별 마커로 푸로마이신 아세틸전달효소 대신 블라스티시딘 S-내성 유전자를 사용하여 pLVX-TRE3G-SLC26A4-IRES-Bla벡터를 생성하였다.

[0052] 또한, 본 발명의 I-YFP GJIC분석을 수행하기 위해, 요오드화물 센서 단백질로서 세포 내 요오드화물과 결합하면 노란색 형광발색을 소광(quenching)하는 YFP의 H148Q/I152L변이 단백질(YFP^{OL})을 발현하기 위한 플라스미드를 구축하였다 (Galiotta LJ, Haggie PM, Verkman AS. FEBS Lett. 2001;499(3):220-224.). pLVX-EIB1a-YFP^{OL} 벡터 구축방법은 본 발명자의 등록특허 제10-181885호의 방법을 이용하였다.

[0053] 커넥신 유전자(pLVX-EIP-hCx)을 포함하는 pLVX-EF1α-IRES-puro 벡터 (Clontech)는 PCR 또는 subcloning을 통해 구축하였다.

[0054] 사용된 프라이머와 템플릿은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

Connexin CDS PCR primers			
유전자	프라이머 서열	서열번호	템플릿
hCx26	Cx26 U1: gaattc AAA CCG CCC AGA GTA GAA G	1	Human genomic DNA
	Cx26 L1: tctaga GCA ATG CGT TAA ACT GGC	2	

hCx30	Cx30 U1: TCT TGC CCT CAT TCT TTG	3	Human genomic DNA
	Cx30 L1: TCT CCT TAT GAC GCA GCT AC	4	
	Cx30 U2: gaattc gccacc ATG GAT TGG GGG ACGC	5	
	Cx30 L2: tctaga aaatgt TTA GCT TGG GAA ACC	6	
hCx31	Cx31 U1: CAT GGA CTG GAA GAC ACT C	7	Human genomic DNA
	Cx31 L1: TTG CAT AAC TTA GTG AAC TCA	8	
	Cx31 U2: gaattc gcc ATG GAC TGG AAG ACA C	9	
	Cx31 L2: tctaga TCA GAT GGG GGT CAG GTT G	10	
hCx32	Cx32 U1: gaattc agg ATG AAC TGG ACA GGT	11	KRIBB cDNA #hMU013381
	Cx32 L1: tctaga GTG GCA TCA GCA GGC	12	
hCx36	Subcloned directly to pLVX-EIP vector	-	Versacclone cDNA #RDC1280
hCx40	Cx40 U1: gaattc aag ATG GGC GAT TGG AG	13	KRIBB cDNA #hMU010274
	Cx40 L1: tctaga GGG TCA CAC TGA TAG GTC	14	
hCx43	Cx43 U1: AGG AAA GTA CCA AAC AGC AG	15	Human genomic DNA
	Cx43 L1: ATA AGG CTG TTG AGT ACC ACC	16	
	Cx43 U2: tctaga acc ATG GGT GAC TGG AGC GC	17	
	Cx43 L2: tctaga CTA GAT CTC CAG GTC ATC AGG C	18	
hCx45	Cx45 U1: CTG ACC TCA ACT AAT CTG CC	19	Human genomic DNA
	Cx45 L1: TGA ACA AAG TAA TAG CAC TAG CC	20	
	Cx45 U2: gaattc acc ATG AGT TGG AGC	21	
	Cx45 L2: tctaga TTA AAT CCA GAC GGA GG	22	
hCx46	Cx46 U1: GTT GCA GCC CGG TGT TCA TG	23	Human genomic DNA
	Cx46 L1: CTA TCT GCT GGT GGG AAG TGC	24	
	Cx46 U2: gaattc acgacg ATG GGC GAC TGG AGC TT	25	
	Cx46 L2: tctaga TTA GAT GGC CAA GTC CTC	26	
hCx50	Cx50 U1: GCC TTC TCC CTC ATT TCT TCA G	27	Human genomic DNA
	Cx50 L1: GGG AGG ACA GGA GAC AGA AG	28	
	Cx50 U2: gaattc acgacg ATG GGC GAC TGG AGT TTC	29	
	Cx50 L2: tctaga TTC TTT GGC GTC ACT TCA TAC	30	

[0056]

L1, L2: lower 프라이머 U1, U2: upper 프라이머

[0057]

1-3. EGFP-태그된 커넥신을 포함하는 벡터 생성

[0058]

각각의 커넥신 아이소타입이 캡션 플라크를 형성할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, EGFP 융합 표지를 갖는 커넥신의 총 10개의 아이소타입의 세포 내 위치를 조사하였다.

[0059]

C-말단에 EGFP-표지된 커넥신 구조는 pLVX-EIP-hCx 벡터의 커넥신 서열을 주형으로 하여 합성하였다. PCR로부터 얻어진 각 커넥신 아이소타입의 코딩 서열을 pLVX-EIP-EGFP N1 벡터의 5'EcoRI/3'SpeI로 삽입하였으며, Cx26과 Cx43은 동일한 벡터의 5'XbaI/3'SpeI로 삽입하였다. pLVX-EIP-EGFP N1 벡터는 EGFP 서열을 pEGFP N1(Clontech)에서 pLVX-EF1 α -IRES-puro 벡터(Clontech)의 5'XbaI/3'XbaI로 삽입하여 클로닝하였다.

[0060]

사용된 프라이머와 템플릿은 하기 표 2에 나타난 바와 같다.

표 2

[0061]

PCR primers for EGFP fusion protein			
유전자	프라이머 서열	서열번호	템플릿
hCx26-EGFP	Cx26 U2: tctaga ccacc ATGGATTGGGGCACG	31	pLVX-EIP-hCx26
	Cx26 L2: actagt gcc AACTGGCTTTTTTGACTTCC	32	
hCx30-EGFP	Cx30 U2: gaattc gccacc ATG GAT TGG GGG ACGC	33	pLVX-EIP-hCx30
	Cx30 L3: actagt gcc GCTTGGGAAACCTGTGATTG	34	
hCx31-EGFP	Cx31 U2: gaattc gcc ATG GAC TGG AAG ACA C	35	pLVX-EIP-hCx31
	Cx31 L3: actagt gcc GATGGGGTCAGGTTGG	36	
hCx32-EGFP	Cx32 U1: gaattc agg ATG AAC TGG ACA GGT	37	pLVX-EIP-hCx32
	Cx32 L2: actagt tcc GCAGGCCGAGCAGC	38	
hCx36-EGFP	Cx36 U1: gaattc gccacc ATGGGGGAATG	39	pLVX-EIP-hCx36
	Cx36 L1: actagt tcc CACATAGGCAGAGTCACTG	40	

hCx40-EGFP	Cx40 U1: gaattc aag ATG GGC GAT TGG AG	41	pLVX-EIP-hCx40
	Cx40 L2: actagt gcc CACTGATAGGTCATCTGAC	42	
hCx43-EGFP	Cx43 U2: tctaga acc ATG GGT GAC TGG AGC GC	43	pLVX-EIP-hCx43
	Cx43 L3: actagt gcc GATCTCCAGGTCATCAGGC	44	
hCx45-EGFP	Cx45 U2: gaattc acc ATG AGT TGG AGC	45	pLVX-EIP-hCx45
	Cx45 L3: actagt gcc AATCCAGACGGAGGTCTTC	46	
hCx46-EGFP	Cx46 U2: gaattc acgacg ATG GGC GAC TGG AGC TT	47	pLVX-EIP-hCx46
	Cx46 L3: actagt tcc GATGGCCAAGTCCTCC	48	
hCx50-EGFP	Cx46 U2: gaattc acgacg ATG GGC GAC TGG AGC TT	49	pLVX-EIP-hCx50
	Cx50 L3: actagt gcc TACTGTTAGATCGTCTGACCTG	50	

[0062]

L1, L2, L3: lower 프라이머 U1, U2: upper 프라이머

[0063]

이러한 EGFP-표지된 커넥신 구조를 렌티바이러스를 생성하는데 사용하였고, EGFP-표지된 커넥신 플라크를 표현하는 안정적인 세포주를 만들기 위해 HeLa 세포에 전달하였다.

[0064]

Cx-EGFP를 안정적으로 발현하는 HeLa 세포를 형광 현미경(Carl Zeiss AG Axio Observer D1 inverted microscope)에 의해 이미지화 하였다. 모든 이미지는 100% confluency에서 플레이팅 후 4일 뒤에 수집하였다.

[0065]

그 결과 각각의 커넥신 아이소타입 간에 플라크 형성 수준과 플라크 크기의 유의미한 차이는 있지만, 모두 겹점선 플라크를 형성하는 것을 확인하였다(도 2).

[0066]

1-4. GJC1(hCx45를 암호화하는 유전자) 닉아웃(knock-out)

[0067]

공지의 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 HeLa 세포에서 GJC1(hCx45를 암호화하는 유전자)을 닉아웃 시켰다. 커넥신(connexin, Cx) 45에 대한 gRNA를 삽입한 LentiCRISPRv2 플라스미드 벡터(Addgene #52961)에서 퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)를 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistance gene)로 대체하여 LentiCRISPRv2-hCx45 sgRNA2 벡터를 제작하였다. 구체적인 sgRNA 프라이머 서열은 아래 표 3과 같다.

표 3

[0068]

sgRNA 프라이머	서열	서열번호
hCx45-sgRNA2 s	CACCGATAGCCCAGGTACATCACAG	51
hCx45-sgRNA2 as	AAACCTGTGATGTACCTGGGCTATC	52

[0069]

상기 제작한 CRISPR/Cas9 시스템을 HeLa 세포에 도입하기 위해 렌티바이러스를 생산하고 형질도입하였다. 상세 과정은 아래 1-5와 동일하게 진행하였다. HeLa세포에서 GJC1이 닉아웃 되었는지 여부를 확인하기 위해 hCx45 항체를 이용하여 웨스턴블롯(MERCK, Cat# MAB3100)을 진행하였고, 이를 통해 hCx45가 닉아웃 세포주에서는 발현이 되지 않는 것을 검증하였다.

[0070]

1-5. 렌티바이러스 생산

[0071]

상기 구축한 SLC26A4를 발현하기 위한 플라스미드를 공여체 세포로 형질 주입하고 pLVX-EIB1a-YFP^{OL} 플라스미드를 수용체 세포로 형질도입하기 위해, HeLa 세포에 각각의 플라스미드를 렌티바이러스 형질도입하였다.

[0072]

렌티바이러스를 생산하기 위해, 1500 ng의 트랜스퍼 플라스미드와 함께 1125 ng의 패키징 플라스미드(psPAX2, Addgene #12260) 및 375 ng의 VSV-G envelope가 발현된 플라스미드(pMD2.G, Addgene #12259)를 HEK293T 세포(90% confluent in a 6-well plate)에 공동 감염시켰다.

[0073]

폴리에틸아민(polyethylenimine, PEI)을 형질도입 시약으로 사용하였으며, 형질도입 후 증식배지를 교체하고 24 시간 배양하였다. 이후, 바이러스를 함유하고 있는 배지를 채취하고 0.45 μ M 셀룰로오스 아세테이트 필터(GVS Filter Technology)를 사용하여 여과시켜 정제하였다.

[0074]

1-6. 렌티바이러스 형질도입 및 선별

[0075]

형질도입을 위해, HeLa 세포를 24-well 에 30% 밀도로 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지는 4 μ g/ml 폴리브렌과 함께 바이러스를 함유한 배지와 새로운 배양 배지의 1:2 혼합물 600 μ L로 교체하여 16시간 배

양한 후, 다시 배양 배지를 새로 교체하였다. 선별을 위해, 형질도입 72시간 후에 항생제를 세포에 첨가하고, 형질 전환되지 않은 세포가 완전히 제거 될 때까지 유지하였다. 항생제는 히그로마이신, G418, 블라스티시딘, 및 푸로마이신을 각각 500 µg/ml, 400 µg/ml, 20 µg/ml 및 2 µg/ml의 농도로 사용하였다. 상기 렌티바이러스 생산, 도입 및 선별 방법은 본 발명자의 등록특허 제10-181885호의 방법을 참고한다.

[0076] 선별 결과, SLC26A4를 발현하기 위한 플라스미드를 포함하는 HeLa 세포를 I-YFP GJIC분석을 위한 공여체 세포로 수득하였고, pLVX-EIB1a-YFP^{OL} 플라스미드를 포함하는 HeLa 세포를 I-YFP GJIC분석을 위한 수용체 세포로 수득하였다.

[0077] 실시예 2. ADMix 세포의 제조 및 확인

[0078] 2-1. ADMix 세포 제조

[0079] 상기 1-4 의 실험예에서 HeLa 세포의 GJIC를 넥아웃 시킨 후 YFP^{OL} 유전자를 렌티바이러스 벡터를 통해 형질도입 하여 수용체 세포를 제조하였다. 독시사이클린(Doxycycline) 유도 방식으로 펜드린을 발현하는 공여체 세포는 Lenti-XTM Tet-On@3G 유도성 발현 시스템을 사용하여 제조하였다. 상기 수용체 세포와 공여체 세포를 1 : 4 비율로 혼합 후 공동배양 하여 공동배양 된 세포를 수득하였다. 상기와 같이 수득된 세포를 ADMix 세포로 명명하였다.

[0080] 관심있는 커넥신 유전자를 상기 제조된 ADMix 세포로 전달한 후 특정 아이소타입의 커넥신을 발현하는 ADMix 세포를 제조하였다.

[0081] 2-2. 제조된 ADMix 세포에서의 Cx 아이소타입 발현 확인

[0082] ADMix 세포의 총 단백질은 0.5% Triton-X 100이 보충된 PBS에서 추출하였다. 샘플은 Laemmli SDS-PAGE 로딩 버퍼를 첨가하고 겔을 변성시키는 폴리아크릴아마이드에서 분리하여 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨졌다. 5% 탈지유 및 0.1% 트윈을 함유하는 PBS에서 다른 단백질이 붙지 않도록 blocking 한 후 PAC 항체 및 α-tubulin(Sigma-Aldrich, 1:5000)를 차례대로 반응시켰다.

[0083] 그 결과 10개의 아이소타입의 Cx 는 유의미한 차이 없이 PAC 발현이 일어났으며, 이를 통해 ADMix 세포에서 각각의 아이소타입이 안정한 발현을 하는 것을 확인하였다(도 3).

[0084] 실험예 1. ADMix 세포를 이용한 I-YFP GJIC 분석

[0085] 1-1. Cx 아이소타입을 발현하는 ADMix세포의 I-YFP GJIC 분석

[0086] 상기 실시예 2에서 제조된 Cx 아이소타입을 발현하는 ADMix-hCx32세포를 이용하여 I-YFP GJIC 분석을 수행하였다.

[0087] 구체적으로, 6-웰(well) 플레이트의 두 개의 분리된 웰에서 배양하였으며, 하나는 독시사이클린 없이 배양하였고, 다른 하나는 1,000 ng/mL의 독시사이클린을 처리하고 배양하였다. 배양 48시간이 지난 후 배양 배지를 1mL의 C-solution(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)으로 대체하였다. 위상차 및 형광차 이미지를 각각 얻고, 1분 후 1mL의 I-solution(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaI, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)을 첨가하여 YFP 형광 강도를 관찰하였다.

[0088] 그 결과 독시사이클린을 GJIC-결핍된 ADMix 세포에 처리하였을 때에는 GJIC가 없기 때문에 YFP 소광이 관찰되지 않았다. 또한, 독시사이클린을 GJIC-결핍된 또는 GJIC-ADmix 세포에 처리하지 않아 요오드화물 전달체의 발현을 유도하지 않을 때 역시 YFP 형광의 변화가 관찰되지 않았다.

[0089] 반면, 독시사이클린을 GJIC-ADmix 세포에 처리한 결과 주입된 요오드화물이 요오드화물 수송체를 통해 공여 세포로 용이하게 전달되고, 공여체와 수용체 세포 사이에 형성된 갭전선 채널을 통해 수용체 세포로 쉽게 이동함으로써, YFP형광이 현저하게 감소하여 소광됨을 관찰하였다(도 4).

[0090] 상기 결과를 통해 독시사이클린 처리에 따른 펜드린의 유도 발현 여부를 확인하였으며, 수용체 세포로의 요오드화물 전달은 오직 공여체 세포와 수용체 세포사이의 갭전선을 통해서만 이루어짐을 확인하였다.

[0091] 1-2. 10개의 Cx 아이소타입을 발현하는 각 ADMix세포의 I-YFP GJIC 분석

[0092] 동종형 커넥신 아이소타입을 발현하는 각각의 ADMix 세포에 요오드화물을 주입한 후 YFP 형광의 퍼센트 변화를

측정하였다.

[0093] 상기 1-1의 I-YFP GJIC 분석 방법과 동일한 방식을 이용하였다. 구체적으로, ADMix 세포를 96 웰 플레이트에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 100 μ L의 C-solution으로 교체하고, 요오드화물 주입 전에 10분 동안 배양하였다. 첫 번째 측정을 하고 1초 후에 플레이트 판독기의 자동 인젝터를 사용하여 같은 양의 I-solution을 추가하였다. 각 웰의 형광을 20초 동안 0.4초 마다 측정하였다. 각 Cx 아이소타입의 분석을 독시사이클린을 처리한 3개의 웰 및 독시사이클린을 처리하지 않은 3개의 웰에서 수행하였다. 각 시점에서 독시사이클린이 처리된 웰의 YFP 형광의 퍼센트를 평균을 얻고, 독시사이클린이 처리되지 않은 웰로부터의 측정을 뺐다.

[0094] 그 결과 ADMix 세포로서 개별적으로 도입된 10개의 Cx 아이소타입 중 6개의 아이소타입(Cx26, Cx30, Cx32, Cx40, Cx43 및 Cx45)에서 YFP 형광 강도가 감소됨을 확인하였다. 약 0 내지 8초 사이에서 형광의 빠른 감소 현상은 동형의 갭정선 채널을 통해 공여체 세포에서 수용체 세포로의 요오드화물의 이동을 의미한다(도 5).

[0095] 상기 결과는 I-YFP GJIC분석법이 다양한 아이소타입의 커넥션을 발현하는 세포에 적용 가능함을 시사한다.

[0096] 실험예 2. 선택적 갭정선 억제제에 대한 고속대량 스크리닝 확인

[0097] 2-1. 갭정선 억제제를 이용한 I-YFP GJIC 분석

[0098] 약물 스크리닝에의 적용 가능성을 확인하기 위하여, 갭정선 억제제로 이미 알려진 카르베녹솔론(carbenoxolone, CBX), 2-아미노에톡시디페닐 보레이트(2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB) 및 플루페나믹 산(flufenamic acid, FFA)의 세가지 물질이 6개의 Cx 아이소타입의 각각의 다른 농도에서 어떻게 반응하는지 관찰하였다.

[0099] I-YFP-GJIC 분석은 상기 실험예 1에서와 동일한 방식을 이용하였다. 상기 3개의 억제제를 각각 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M의 농도로 ADMix 세포에 처리하였다. 갭정선 억제율은 DMSO 처리된 웰과 화합물이 처리된 웰을 비교하였을 때, 20초 마다 소광된 YFP의 퍼센트 차이를 통해 계산하였으며, 데이터는 3 번의 독립 시험 \pm SEM의 평균으로 표시하였다.

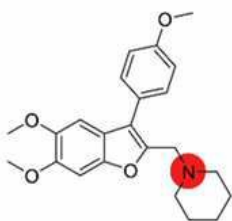
[0100] 그 결과 2-APB를 처리한 경우, 10 μ M 농도 처리시부터 Cx40를 발현하는 ADMix 세포의 갭정선 채널 억제가 나타남을 관찰하였다(도 6A). 또한, CBX의 경우 10 μ M 처리시에서 Cx43의 갭정선을 부분적으로 억제하였고, 30 μ M에서 Cx26 및 Cx43의 갭정선을 완전히 억제하였으며, 100 μ M에서 전체 6개 아이소타입 갭정선 전부를 억제하였다(도 6B). 반면, FFA의 경우 측정된 농도 중 가장 높은 농도에서 Cx26 및 Cx40 갭정선 채널을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다(도 6C).

[0101] 상기 결과는 I-YFP GJIC 분석법을 이용하여 기존에 알려진 화합물의 갭정선 억제효과가 있는지 여부를 분석할 수 있음을 입증한 것으로, 새로운 갭정선 억제 화합 후보물에 대한 약물 스크리닝이 가능함을 시사한다.

[0102] 2-2. 3-아릴벤조퓨란(3-arylbenzofuran) 유도체의 갭정선 억제 여부 확인

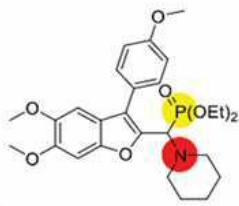
[0103] 약물 스크리닝에 대해 본 발명의 ADMix 세포를 이용한 I-YFP-Cx-GJIC 분석법의 적용 가능성을 더 시험하기 위해, 46개의 벤조퓨란 유도체를 포함하는 작은 화합물질 라이브러리를 사용하여 갭정선 억제 효과를 확인하였다. 상기 46개 중 4개의 대표적인 화합물은 하기와 같다.

화학식 1

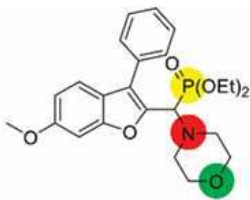


[0104]

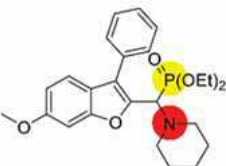
화학식 2



화학식 3



화학식 4



화합물 1 및 화합물 2는 α -아미노 포스페이트(α -amino phosphonate)의 존재 여부에 차이가 있으며, 화합물 3은 화합물 4의 피페리딘기의 탄소 원자가 산소로 치환된 것이다.

상기 벤조퓨란 유도체를 30 μ M의 농도로 6개의 서로 다른 커넥신 아이소타입을 가진 ADMix에 각각 처리하였다. DMSO가 처리된 웰(well)과 화합물이 처리된 웰을 비교하여, 10초 마다 소광된 YFP의 퍼센트 차이를 통해 계산하여 껌정선 억제율을 구하였다.

그 결과 Cx45를 제외한 모든 동종형의 커넥신 껌정선 채널은 화합물 2에 의해 비선택적으로 억제된 반면, 디에틸 포스포네이트(diethyl phosphonate)가 없는 구조적으로 유사한 유도체인 화합물 1은 모든 Cx 아이소타입에 영향을 미치지 않았다.

단일 원자의 차이가 있는 화합물 3 및 화합물 4는 완전히 대조적인 결과를 나타내었다. 구체적으로 화합물 3의 경우, 모르폴린 그룹에 산소가 존재하여 질소의 전자밀도가 낮아지도록 함으로써 친핵성 및 염기성 정도가 낮아지게 되어 껌정선 억제효과가 나타나지 않는다. 반면, 화합물 4의 경우 피페리딘 그룹의 질소가 상대적으로 친핵성 및 염기성 정도가 높아 Cx 아이소타입 대부분에서 껌정선 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 7).

상기 결과는 α -아미노 포스페이트(α -amino phosphonate)의 존재 및 피페리딘 질소의 친핵성(또는 염기성)이 껌정선 차단에 중요한 역할을 하며, 구조 활성 상관관계(SAR) 연구에 대한 상기 GJIC 분석법의 적용 가능성을 시사한다. 또한 이는 아이소타입-선택성 껌정선 억제제와 관련하여 대규모 약물 스크리닝에 적용될 수 있음을 나타내는 것이다.

실험예 3. 커넥신 돌연변이에 대한 I-YFP GJIC 분석

기존에 알려진 Cx 유전자의 돌연변이에 의해 야기된 껌정선 기능 상실에 따른 질환이 본 발명의 I-YFP-GJIC 분석법을 이용하여도 유사한 결과를 얻을 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다.

[0116] Cx에 부위 특이적 돌연변이를 유도하기 위하여 커넥신 돌연변이 유전자를 함유하고 있는 플라스미드 벡터를 overlap extension 방법을 이용하여 생산하였으며, pLVX-EIP 벡터로 클로닝하고, 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0117] 사용된 프라이머 및 템플릿은 하기 표 4에 나타난 바와 같다.

표 4

부위 특이적 돌연변이 유발 프라이머	서열	서열번호
EF1 α -F	CTC AGA CAG TGG TTC AAA G	53
IRES-R	ACG CAC ACC GGC CTT ATT C	54
hCx26 V37I	Cx26 V37I s: ttgcattatgatectc a ttgtggctgcaaaggag	55
	Cx26 V37I as: ctccctttgcagccacaa t gaggatcataatgcgaa	56
hCx26 A40G	Cx26 A40G s: cctcgttgtggct gga aaggaggtgtggg	57
	Cx26 A40G as: cccacacctctt tcc agccacaacgagg	58
hCx26 T135A	Cx26 T135A s: gctccctgtgtgg gcc tacacaagcagc	59
	Cx26 T135A as: gctcgttgtgtg ggc ccaccacagggagc	60
hCx32 T55I	Cx32 T55I s: gaaatcttcttcatctgcaac ata ctccagcctgg	61
	Cx32 T55I as: ccaggctggagatgtttgcagatgaaggaagatttc	62
hCx32 R142W	Cx32 R142W s: catcagcgtgtgttc tgg ctgttgtttgaggc	63
	Cx32 R142W as: gcctcaaacaacag cca gaacaccacgctgatg	64
hCx32 R164W	Cx32 R164W s: gctatgccatggtg tgg ctgtcaagtgc	65
	Cx32 R164W as: gcacttgaccag cca caccatggcatagc	66
hCx32 L239I	Cx32 L239I s: gcttcggccaccgc atc tcacctgaatac	67
	Cx32 L239I as: gtattcagggtga gat gcgggtggccgaagc	68

[0119] 하기 표 5는 Cx26 및 Cx32의 각각 다른 질병 조건에 대해 얻어진 갭정선 활성화에 대한 실험 결과를 나타낸 것이다. 상기 Cx26 및 Cx32의 구조는 도 8의 모식도에 나타난 바와 같다.

[0120] Cx26 돌연변이는 V37I, A40G 및 T135A의 부위 특이적 돌연변이를 유발하여 갭정선 활성을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명에서 제조한 야생형 Cx26 ADMix 세포와 함께 돌연변이 Cx26 A40G 및 Cx26 V37I ADMix 세포를 이용하여 I-YFP GJIC 분석을 수행하였다.

[0121] 그 결과 야생형과 비교하여 갭정선 활성화는 V37I에서 54.6%(절반 손실), 그리고 A40G에서 11.7%(총 손실)으로 나타났다으며, 이는 전기생리학 연구 결과와 유사함을 나타낸다(도 9).

[0122] 또한, 총 14개의 X-연관 샤르코마리투스병(CMT1X)-관련 돌연변이를 두 가지 범주, 말초적 이상(peripheral abnormalities) 및 CNS 징후가 함께 나타나는 돌연변이(CNS+PNS) 및 말초적 이상만 나타나는 돌연변이(PNS only)로 분류하였다. 각 돌연변이의 갭정선 활동을 관찰하기 위해 CNS+PNS 돌연변이 중 3 가지와 PNS 돌연변이 중 하나를 채택하였다.

[0123] 그 결과 형태학적 갭정선 플라크를 형성하지 않은 두 개의 CNS+PNS 돌연변이는 갭정선 활성을 거의 보이지 않는 것으로 나타났으며, 갭정선 플라크를 형성했지만 접합적 연결을 거의 생성하지 않은 CNS+PNS 돌연변이는 갭정선 활성화의 부분적 손실을 나타냈다. PNS 돌연변이인 L239I는 야생형 Cx32와 유사한 표준적 YFP 소광이 나타났다(도 10).

표 5

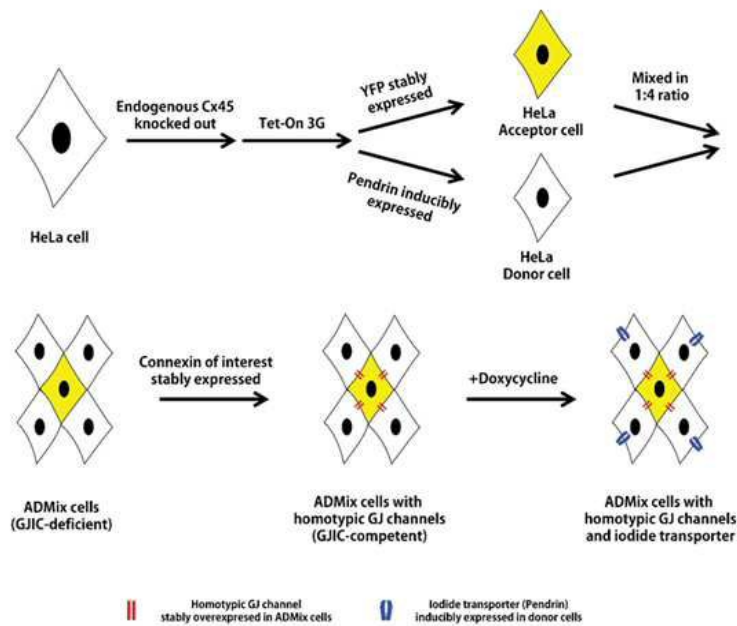
돌연변이	임상적 표현형	이전 연구에서 보고된 기능	GJ 활성화(%)
Cx26 돌연변이: 난청			
V37I	비증후성 난청(경미)	기능성 GJ 채널을 형성하지만 컨덕턴스 감소 (부분 손실)	54.6 \pm 4.1
A40G	비증후성 난청(중증)	기능성 GJ 채널을 형성 못함	11.7 \pm 2.0
T135A	-	GJ 채널은 형성하나 기능성이 없음	2.1 \pm 0.5
Cx32 돌연변이: CMT1X			
T55I	CNS+PNS	GJ 플라크 형성 없음	20.9 \pm 3.6
R142W	CNS+PNS		28.6 \pm 1.4

R164W	CNS+PNS	GJ 플라크는 형성하나, 접합적 결합(junctional coupling)은 거의 없음	67.8 ± 2.8
L239I	PNS only	GJ 플라크는 형성하며, 정상적인 접합적 결합(junctional coupling)함	92.8 ± 5.4

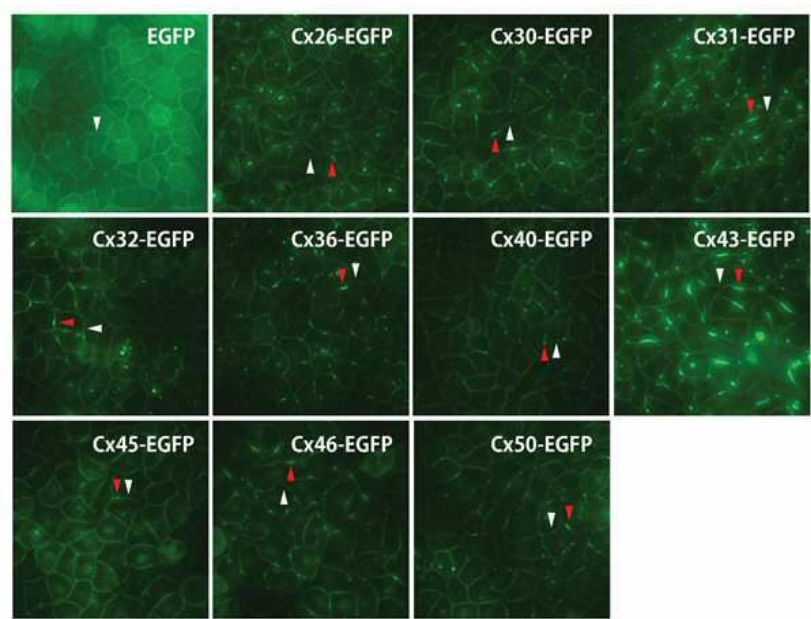
- [0125] 상기 결과들을 통해 본 발명의 I-YFP GJIC분석법이 다양한 Cx 아이소타입에 대한 갭 정션 활성 측정이 가능함을 확인하였으며, 세포에 처리한 후보 물질의 갭정션 활성 억제 효과 및 커넥신 돌연변이에 따른 갭정션 활성을 확인하였는 바, 이는 본 발명에서 제조한 ADMix 세포를 이용한 I-YFP GJIC분석법이 갭정션 조절제 후보 물질의 고속 대량 스크리닝에 활용될 수 있음을 시사한다.
- [0126] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

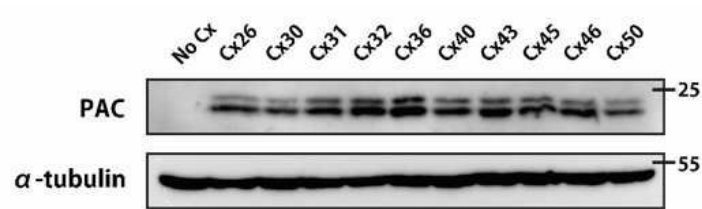
도면1



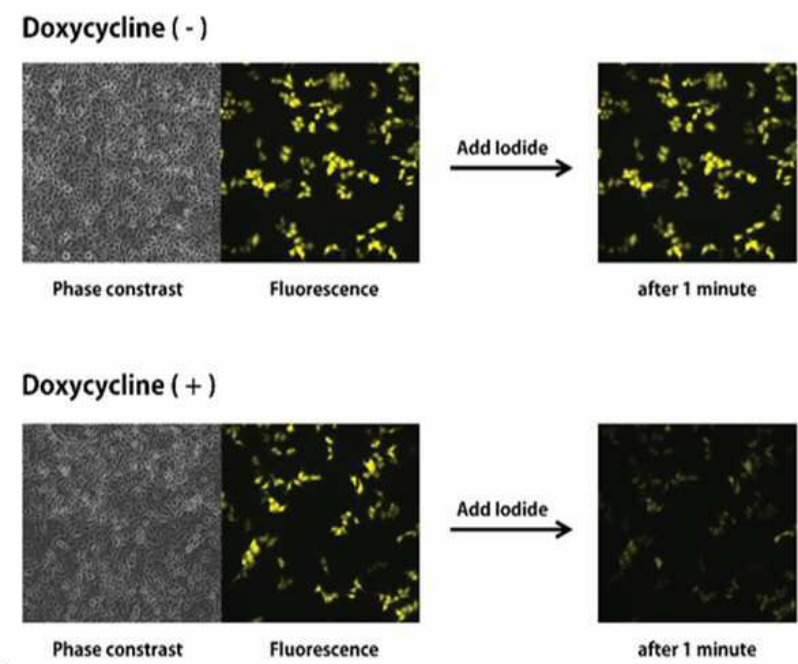
도면2



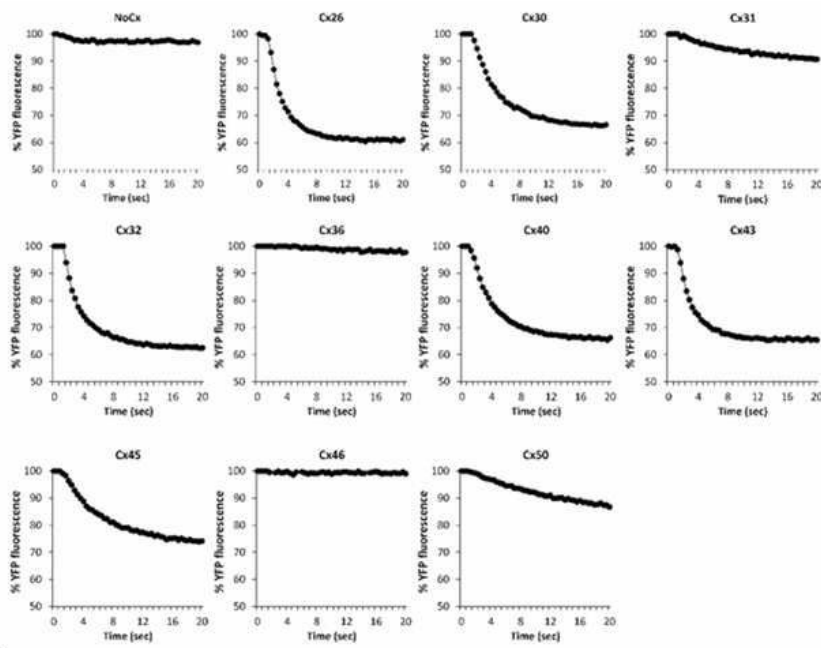
도면3



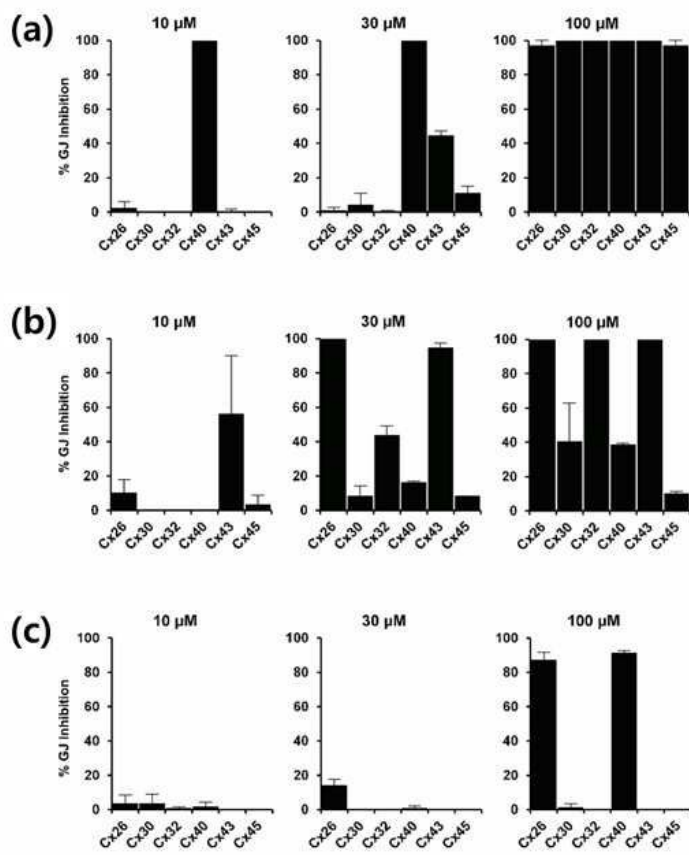
도면4



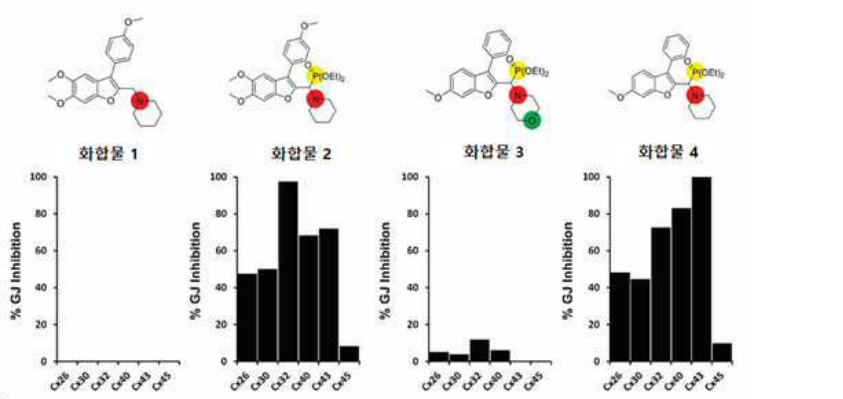
도면5



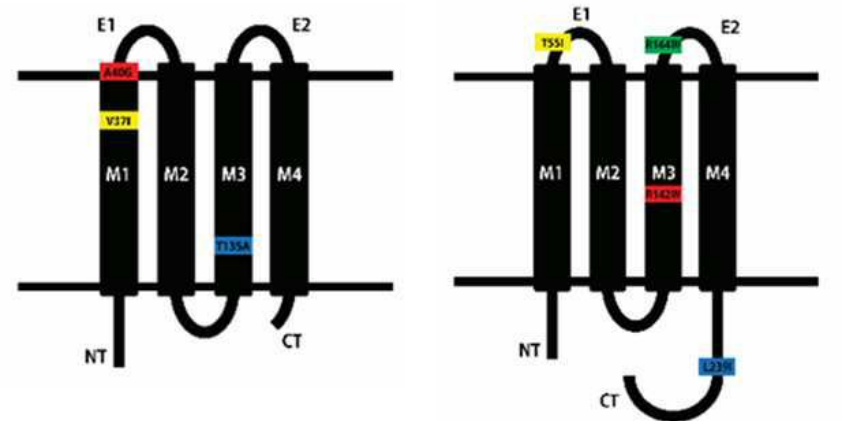
도면6



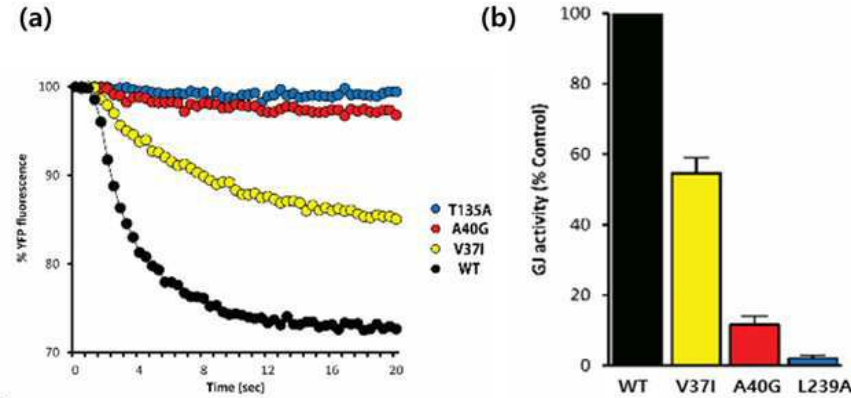
도면7



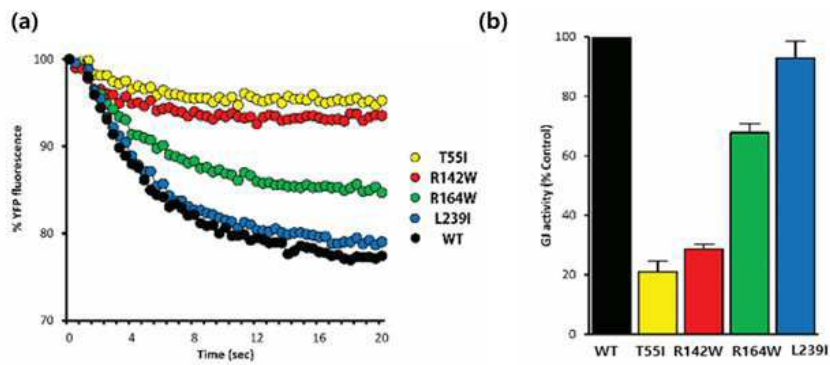
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> ADMix CELL, PREPARATION METHOD THEREOF, AND USE THEREOF

<130> 19PP30308

<160> 68

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx26 U1

<400> 1

gaattcaaac cgcccagagt agaag

25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx26 L1

<400> 2

tctagagcaa tgcgttaaac tggc

24

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx30 U1

<400>	3	
tcttgccctc attctttg		18
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Connexin CDS PCR primers Cx30 L1	
<400>	4	
tctccttatg acgcagctac		20
<210>	5	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Connexin CDS PCR primers Cx30 U2	
<400>	5	
gaattcgcca ccatggattg ggggacgc		28
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Connexin CDS PCR primers Cx30 L2	
<400>	6	
tctagaaaat gtttagcttg ggaaacc		27
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Connexin CDS PCR primers Cx31 U1	
<400>	7	
catggactgg aagacactc		19
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx31 L1

<400> 8

ttgcataact tagtgaactc a 21

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx31 U2

<400> 9

gaattcgcca tggactggaa gacac 25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx31 L2

<400> 10

tctagatcag atgggggtca ggttg 25

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx32 U1

<400> 11

gaattcagga tgaactggac aggt 24

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Connexin CDS PCR primers Cx32 L1

<400> 12

tctagagtgg catcagcagg c 21

<210> 13

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Connexin CDS PCR primers Cx40 U1
 <400> 13
 gaattcaaga tgggcgattg gag 23
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Connexin CDS PCR primers Cx40 L1
 <400> 14
 tctagagggt cacactgata ggtc 24
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Connexin CDS PCR primers Cx43 U1
 <400> 15
 aggaaagtac caaacagcag 20
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Connexin CDS PCR primers Cx43 L1
 <400> 16
 ataaggctgt tgagtaccac c 21
 <210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Connexin CDS PCR primers Cx43 U2
 <400> 17

tctagaacca tgggtgactg gagcgc	26
<210> 18	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx43 L2	
<400> 18	
tctagactag atctccaggt catcaggc	28
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx45 U1	
<400> 19	
ctgacctcaa ctaatctgcc	20
<210> 20	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx45 L1	
<400> 20	
tgaacaaagt aatagcacta gcc	23
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx45 U2	
<400> 21	
gaattcacca tgagttggag c	21
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	

> Connexin CDS PCR primers Cx45 L2

<400> 22
tctagattaa atccagacgg agg 23

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx46 U1

<400> 23
gttgcagccc ggtgttcacg 20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx46 L1

<400> 24
ctatctgctg gtgggaagtg c 21

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx46 U2

<400> 25
gaattcacga cgatgggcga ctggagctt 29

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx46 L2

<400> 26
tctagattag atggccaagt cctc 24

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Connexin CDS PCR primers Cx50 U1

<400> 27

gccttctccc tcatttcttc ag 22

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx50 L1

<400> 28

gggaggacag gagacagaag 20

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx50 U2

<400> 29

gaattcacga cgatgggcga ctggagtffc 30

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Connexin CDS PCR primers Cx50 L2

<400> 30

tctagattct ttggcgctcac ttcatac 27

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx26 U2

<400> 31

tctagaccac catggattgg ggcacg 26

<210> 32

<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx26 L2	
<400>	32	
	actagtgccactggcttttttgacttcc	29
<210>	33	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx30 U2	
<400>	33	
	gaattcgccaccatggattgggggacgc	28
<210>	34	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx30 L3	
<400>	34	
	actagtgccgcttgggaaacctgtgattg	29
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx31 U2	
<400>	35	
	gaattcgccatggactggagacac	25
<210>	36	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx31 L3	
<400>	36	

actagtgccg atgggggtca ggttgg	26
<210> 37	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx32 U1	
<400> 37	
gaattcagga tgaactggac aggt	24
<210> 38	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx32 L2	
<400> 38	
actagttccg caggccgagc agc	23
<210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx36 U1	
<400> 39	
gaattcgcca ccatggggga atg	23
<210> 40	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx36 L1	
<400> 40	
actagttccc acataggcag agtcactg	28
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx40 U1

<400> 41

gaattcaaga tgggcgattg gag 23

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx40 L2

<400> 42

actagtgcc actgataggt catctgac 28

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx43 U2

<400> 43

tctagaacca tgggtgactg gagcgc 26

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx43 L3

<400> 44

actagtgcg atctccaggt catcaggc 28

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primers for EGFP fusion protein Cx45 U2

<400> 45

gaattcacca tgagttggag c 21

<210> 46

<211> 28

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx45 L3	
<400>	46	
	actagtgccca atccagacgg aggtcttc	28
<210>	47	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx46 U2	
<400>	47	
	gaattcacga cgatgggcga ctggagctt	29
<210>	48	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx46 L3	
<400>	48	
	actagttccg atggccaagt cctcc	25
<210>	49	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx46 U2	
<400>	49	
	gaattcacga cgatgggcga ctggagctt	29
<210>	50	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primers for EGFP fusion protein Cx50 L3	
<400>	50	

actagtcct actgttagat cgtctgacct g 31

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx45-sgRNA2 s

<400> 51

caccgatagc ccaggtacat cacag 25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx45-sgRNA2 as

<400> 52

aaacctgtga tgtacctggg ctatc 25

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EF1a-F

<400> 53

ctcagacagt ggttcaaag 19

<210> 54

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IRES-R

<400> 54

acgcacaccg gccttattc 19

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cx26 V37I s

<400> 55

ttcgcattat gatcctcatt gtggctgcaa aggag 35

<210> 56

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cx26 V37I as

<400> 56

ctcctttgca gccacaatga ggatcataat gcgaa 35

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cx26 A40G s

<400> 57

cctcgttgtg gctggaaagg aggtgtggg 29

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cx26 A40G as

<400> 58

cccacacctc ctttccagcc acaacgagg 29

<210> 59

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cx26 T135A s

<400> 59

gtccctgtg gtgggcctac acaagcagc 29

<210> 60

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx26 T135A as
 <400> 60
 gctgcttgtg taggccacc acagggagc 29
 <210> 61
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 T55I s
 <400> 61
 gaaatcttcc ttcatctgca acatactcca gcctgg 36
 <210> 62
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 T55I as
 <400> 62
 ccaggctgga gtatgttgca gatgaaggaa gatttc 36
 <210> 63
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 R142W s
 <400> 63
 catcagcgtg gtgttctggc tgttgtttga ggc 33
 <210> 64
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 R142W as
 <400> 64
 gcctcaaaca acagccagaa caccacgtg atg 33
 <210> 65

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 R164W s
 <400> 65
 gctatgccat ggtgtggctg gtcaagtgc 29

<210> 66
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 R164W as
 <400> 66
 gcacttgacc agccacacca tggcatagc 29

<210> 67
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 L239I s
 <400> 67
 gcttcggcca ccgcatctca cctgaatac 29

<210> 68
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cx32 L239I as
 <400> 68
 glattcaggt gagatgcggt ggccgaagc 29