



등록특허 10-2257739



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월28일

(11) 등록번호 10-2257739

(24) 등록일자 2021년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/5076 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0071442

(22) 출원일자 2019년06월17일

심사청구일자 2019년06월17일

(65) 공개번호 10-2020-0143858

(43) 공개일자 2020년12월28일

(56) 선행기술조사문헌

Bodalia, The University of Western Ontario, 2013, pp. 1-81.*

Dourado et al., PLOS ONE, Vol. 9(6):e99596, 2014, pp. 1-14.*

KR1020170120912 A

Sahu et al., Scientific Reports, Vol. 4, No. 4955, 2014.

*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)

최은주

인천광역시 동구 육송로16번길 15(송림동)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 8 항

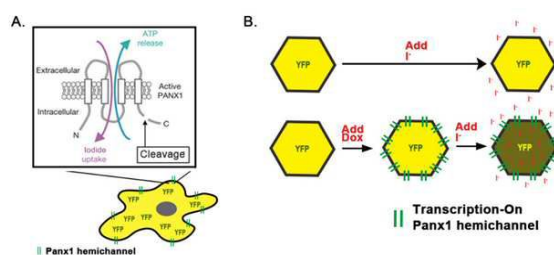
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 **Panx1 채널 활성을 측정하기 위한 고속 대량 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 Panx1 채널 활성 측정 방법, Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터, 이의 벡터로 형질전환된 세포, Panx1 채널 활성 측정용 키트 및 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



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) C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환 된 세포를 배양하는 단계;
- b) 상기 형질전환 된 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계;
- c) 요오드화물을 포함하는 완충 용액을 처리하는 단계;
- d) 상기 c) 단계의 완충 용액 첨가 시점으로부터 형광 강도를 측정하는 단계;
- e) 상기 d) 단계에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching)비율로서 계산하는 단계; 및
- f) 상기 e) 단계에서 계산한 소광 비율이 증가하면 Panx1 채널 활성이 증가하는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, Panx1 채널 활성 측정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 C-말단이 절단된 Panx1채널을 발현하는 재조합 벡터는 독시사이클린에 의해 유도 발현이 가능한 프로모터를 포함하는 것인, Panx1(Pannexin 1) 채널 활성 측정 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호 1로 이루어진 것인, Panx1 채널 활성 측정 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 형질전환 된 세포는 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 것인, Panx1 채널 활성 측정 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 요오드화물을 포함하는 완충 용액은 칼륨(K^+)을 더 포함하는 것인, Panx1 채널 활성 측정 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 d) 단계의 측정은 2 내지 150초 동안 수행하는 것인, Panx1 채널 활성 측정 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

- a) C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환 된 세포를 배양하는 단계;
- b) 상기 형질전환 된 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계;
- c) 피검물질을 처리하는 단계;
- d) 요오드화물을 포함하는 완충 용액을 처리하는 단계;
- e) 상기 d) 단계의 완충 용액 첨가 시점으로부터 형광 강도를 측정하는 단계;
- f) 상기 e) 단계에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching)비율로서 계산하는 단계; 및
- g) 상기 f) 단계에서 계산한 소광 비율을 미처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 g) 단계에서 비교한 결과, 소광 비율이 증가하면 피검물질을 Panx1 채널 활성 유도 물질로 판단하고, 소광 비율이 감소되면 Panx1 채널 활성 억제물질로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Panx1 채널 활성 측정 방법, Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터, 이의 벡터로 형질전환 된 세포, Panx1 채널 활성 측정용 키트 및 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Pannexin(Panx) 채널은 K^+ , Ca^{2+} 같은 원자 이온 뿐 아니라 ATP, 글루탐산 등 비교적 큰 물질이 세포 밖으로 이동할 수 있는 세포막 채널이다. 6개의 Panx 구조가 모인 단백질들이 파넥손(Pannexon)이라고 하는 튜브 구조를 이루는데, 이러한 파넥손 구조는 세포 외부로의 헤미채널(hemichannel)로서의 역할을 한다. 사람에는 총 3개의 Panx 패밀리가 있으며 주요 Panx는 Panx1이다.

[0003] Panx1은 인간의 뇌, 심장, 뼈 근육, 피부, 고환, 자궁, 간, 폐 등 인체 전반에 걸쳐 분포하며, 정상상태에서의 기능은 아직 명확하지 않으나, 다양한 질병 상태에서의 역할에 대하여는 많이 알려져 있다. 혈관 내피 세포에서 발현된 Panx1은 심근 섬유화를 유도하여 심부전을 야기할 수 있고, 뇌전증 발작시에는 Panx1 채널이 활성화되면

서 뇌전증을 악화시킨다. 또한 간 또는 장의 여러 조직 세포에도 Panx 단백질들이 분포하고 있어 비 정상적인 활성화는 간 또는 위장관기관들의 손상으로 이어져 기능 장애를 유도하는 등 과도한 Panx1 채널의 활성화는 허혈성 심질환, 뇌졸중, 뇌전증, 신경병성 통증 등의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 상기와 같이 다양한 질병을 야기하는 Panx 단백질의 활성을 억제할 수 있는 약물을 개발하고자 하는 연구는 지속되고 있으나 미흡한 실정이다. 아직 약물이 개발되지 못하는 가장 큰 요인 중 하나는 Panx1 억제 물질을 발굴하는데 필요한 적절한 분석법의 개발이 이루어지지 못했기 때문이다.

[0005] 기존에 Panx 채널의 활성을 측정하는 방법으로는 patch clamp 등의 전기생리학적인 방법, 형광 물질 이동을 측정하는 방법 등이 있으나 이는 고속 대량 스크리닝(High-Throughput Screening, HTS)을 적용하기 어려워 대량의 물질을 신속하게 처리할 수 없다는 문제점이 있다.

[0006] 또한, 최근 개발된 Panx1 anti-Fas 또는 UV를 이용하여 세포의 아포토시스를 유도하고 이때 활성화된 캐스페이즈(caspase)에 의해 Panx를 활성화시켜 Yo-Pro dye uptake를 측정하는 방법은 시간이 많이 걸리고 모든 샘플을 FACS로 측정하는 등 효율이 많이 떨어진다는 단점이 있다. 이에 따라 대량의 물질을 신속하게 처리하여 Panx 채널 억제 치료물질을 발굴하기 위한 시스템 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1818850호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 Panx1 채널 활성 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터로 형질전환 된 세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 Panx1 채널 활성 측정용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 a) C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환 된 세포를 배양하는 단계; b) 상기 형질전환 된 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계; c) 요오드화물을 포함하는 완충 용액을 처리하는 단계; d) 상기 c) 단계의 완충 용액 첨가 시점으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; e) 상기 d) 단계에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching)비율로서 계산하는 단계; 및 f) 상기 e) 단계에서 계산한 소광 비율이 증가하면 Panx1 채널 활성이 증가하는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 Panx1 채널 활성 측정 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에서 “벡터”는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 말하며, 상기 벡터는 바이러스 벡터 및 비-바이러스 벡터일 수 있다.

[0015] 상기 바이러스 벡터는 RNA-기반 바이러스성 벡터(RNA-based viral vector)로 온코레트로바이러스 벡터(Oncoretroviral vector), 렌티바이러스 벡터(Lentiviral vector), 인간 포말 바이러스 벡터(Human foamy viral vector) 등이 있고, DNA-기반 바이러스 벡터로 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 단순헤르페스바이러스(Herpes simplex virus), 수두바이러스(Poxvirus) 등이 있다.

[0016] 또한 구체적으로, 상기 벡터는 발현 벡터일 수 있다.

[0017] 상기 “발현 벡터”는 작동 가능하도록 연결된 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터를 의미한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술의 사용에서 발현 벡터는 플라스미드 형태이므로, 용어 플라스미드

및 벡터가 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스 벡터와 같이 동일한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터들도 포함할 수 있다.

- [0018] 구체적으로, 상기 발현 벡터는 pET-3a-d, pET-9a-d, pET-11a-d, pET-12a-c, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b, pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21a-d(+), pET-22b(+), pET-23a-d(+), pET-24a-d(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a-c(+), pET-29a-c(+), pET-30a-c(+), pET-30 Ek/LIC, pET-30 Xa/LIC, pET-31b(+), pET-32a-c(+), pET-32 Ek/LIC, pET-32 Xa/LIC, pET-33b(+), pET-34b(+), pET-35b(+), pET-36b(+), pET-37b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a-c(+), pET-41 Ek/LIC, pET-42a-c(+), pET-43.1a-c(+), pET-43.1 Ek/LIC, pET-44a-c(+), pRSETA, pRSETB, pRSETC, pESC-HIS, pESC-LEU, pESC-TRP, pESC-URA, Gateway pYES-DEST52, pAO815, pGAPZ A, pGAPZ B, pGAPZ C, pGAP α A, pGAP α B, pGAP α C, pPIC3.5K, pPIC6 A, pPIC6 B, pPIC6 C, pPIC6 α A, pPIC6 α B, pPIC6 α C, pPIC9K, pYC2/CT, pYD1 Yeast Display Vector, pYES2, pYES2/CT, pYES2/NT A, pYES2/NT B, pYES2/NT C, pYES2/CT, pYES2.1, pYES-DEST52, pTEF1/Zeo, pFLD1, PichiaPinkTM, p427-TEF, p417-CYC, pGAL-MF, p427-TEF, p417-CYC, PTEF-MF, pBY011, pSGP47, pSGP46, pSGP36, pSGP40, ZM552, pAG303GAL-ccdB, pAG414GAL-ccdB, pAS404, pBridge, pGAD-GH, pGAD T7, pGBK T7, pHIS-2, pOBD2, pRS408, pRS410, pRS418, pRS420, pRS428, yeast micron A form, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pYJ403, pYJ404, pYJ405 또는 pYJ406일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 벡터는 하나 이상의 조절/제어 구성요소를 포함할 수 있으며, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리 아데닐화 신호, 코작 공통(Kozak consensus)서열, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 스플라이스 엑셉터 또는 2A 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 프로모터는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터일 수 있으며, 필요에 따라 선택하여 사용할 수 있다.
- [0021] 구체적으로 상기 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 재조합 벡터는 독시사이클린에 의해 유도 발현이 가능한 프로모터를 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 재조합 벡터는 TRE3G 프로모터를 포함하며, Tet-On 3G 유도 시스템을 이용하여 Panx1 채널을 유도 발현시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 “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 고발현 시키는 시스템을 말한다. Tet-On 3G 단백질은 독시사이클린이 결합하면 형태적인 변화가 생겨 TRE3G 프로모터(P_{TRE3G})에 결합하게 되고, 높은 목적 유전자 발현을 가능하게 한다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에서는 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환 된 세포에 독시사이클린을 처리한 결과, 독시사이클린을 처리하지 않은 대조군에 비해 형광 값이 현저히 감소되는 것을 확인하였는 바, 독시사이클린에 의한 C-말단이 절단된 Panx1 채널 발현이 유도됨을 확인하였다.
- [0024] 상기 벡터는 리포터 유전자(예를 들어, GFP) 또는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선택 마커로는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 퓨로마이신(puromycin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 블라스티시딘(Blasticidine)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 구체적으로, 상기 형질전환 된 세포는 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현할 수 있다. 예컨대, 상기 요오드화물 센서 형광 단백질은 하나 이상의 아미노산 서열에 돌연변이가 일어난 YFP(yellow fluorescent protein)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 따른 Panx1 채널 활성 측정 방법은 활성화된 Panx1 채널을 발현하는 재조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환시킨 후 독시사이클린을 처리하여 활성화된 Panx1 채널을 유도 발현 시키고, 그 후 요오드화물을 포함하는 완충 용액을 처리하면 요오드화물이 숙주세포 내로 들어가서 활성화된 Panx1 채널로 확산 이동하게 되고, 이동한 요오드화물은 YFP 단백질과 결합하여 형광을 소광(quenching)할 수 있게 된다. 소광 정도를 측정함으로써 Panx1 채널의 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있음을 확인할 수 있다. 이러한 고속 스크리닝 방법에 대해 본 발명자들은 한국등록특허 제10-1818850호를 통해 등록 받은 바 있다. 이에 따라, 상기 Panx1 채널 활성 측정 방법은 한국등록특허 제10-1818850호를 참고할 수 있다.

- [0027] 상기 Panx1 채널은 일반적인 상태에서는 닫혀 비활성화되어 있어 Panx1 채널의 활성화 정도를 측정하기에 어려움이 있다. 이에 대해 “활성화된 Panx1 채널”은 Panx1 채널의 C-말단을 절단하거나 세포 내 칼슘 또는 세포 외 칼륨을 증가시킴으로써 제작할 수 있으며, 본 발명자들은 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 유도 발현시킴으로써 활성화된 Panx1 채널을 Panx1 채널 활성 측정 방법에 활용하였다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에서는 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 세포와 C-말단이 절단되지 않은 Panx1 채널을 발현하는 세포에서 I(요오드화물)-YFP Panx1 헤미채널 분석(hemichannel assay)을 수행한 결과, C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 세포에서 채널이 활성화되는 것을 확인하였다. (도 2C 및 2D).
- [0029] 또한, 구체적으로 상기 Panx1 채널은 요오드화물을 포함하는 완충 용액에 칼륨(K^+)을 더 포함할 수 있다. 상기 완충 용액에 칼륨(K^+)의 농도를 높임으로써 Panx1 채널을 더 활성화시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서는 고농도의 칼륨(K^+)을 포함하는 요오드화물 완충 용액인 I-용액(K^+ 존재)을 처리한 C-말단이 절단된 Panx1 채널에서 고농도의 나트륨(Na^+)을 포함한 요오드화물 완충 용액인 I-용액(Na^+ 존재)을 처리한 C-말단이 절단된 Panx1 채널보다 더 효과적으로 Panx1 채널이 활성화됨을 확인하였다(도 2B 및 2D).
- [0031] 보다 더 구체적으로, 상기 Panx1 채널 활성 측정은 2 내지 150초 동안 수행함으로써 Panx1 채널 활성 정도를 확인할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서는 I-용액(K^+ 존재)을 처리한 숙주 세포에 독시사이클린을 처리한 실험군과 독시사이클린을 처리하지 않은 대조군의 형광 값의 변화를 20초, 30초 또는 120초 동안 측정함으로써 실험군의 형광값이 감소됨을 확인하였다.
- [0033] 본 발명의 다른 일 측면은 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0034] 구체적으로 상기 벡터는 독시사이클린에 의해 C-말단이 절단된 Panx1의 발현이 유도되는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 코딩하는 뉴클레오티드는 서열번호1로 이루어진 것일 수 있다.
- [0035] 또한 구체적으로, 상기 벡터는 Panx1 채널 활성 측정용인 것일 수 있다.
- [0036] '재조합 벡터'에 관한 내용은 상기 설명된 바와 같다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 재조합 벡터로 형질전환 된 세포에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 세포는 Panx1 채널 활성 측정용일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 Panx1 채널 활성 측정용 재조합 벡터 또는 이의 벡터로 형질전환 된 세포를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0039] 상기 키트는 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 세포를 유지하기 위해 필요한 배양물, Panx1 채널 활성을 측정할 수 있는 제제, 요오드화물 완충 용액 등을 제한없이 포함할 수 있으며, 키트의 사용을 위한 설명서를 추가할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) C-말단이 절단된 Panx1채널을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환 된 세포를 배양하는 단계; b) 상기 형질전환 된 세포에 독시사이클린을 처리하는 단계; c) 피검물질을 처리하는 단계; d) 요오드화물을 포함하는 완충 용액을 처리하는 단계; e) 상기 d) 단계의 완충 용액 첨가 시점으로부터 형광 강도를 측정하는 단계; f) 상기 e) 단계에서 측정된 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching)비율로서 계산하는 단계; 및 g) 상기 f) 단계에서 계산한 소광 비율을 미처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0041] 구체적으로 상기 g) 단계에서 비교한 결과, 소광 비율이 증가하면 피검물질을 Panx1 채널 활성 유도 물질로 판단하고, 소광 비율이 감소되면 Panx1 채널 활성 억제 물질로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서는 Panx1 억제제를 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 세포에 처리한 결과, Panx1 억제제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 Panx1 채널의 활성이 현저히 억제됨을 확인하였다(도 3). 이는, 본 발명의 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법을 이용하여 Panx1 채널 활성 억제 약물을 발굴할 수 있음을 시사한다.

- [0043] 본 발명의 Panx1 채널 활성 조절제 스크리닝 방법은 대량의 후보 약물 후보군을 정확하고 고속으로 스크리닝 할 수 있도록 고속 대량 스크리닝(High-Throughput Screening, HTS)이 가능하다.
- [0044] Panx1 채널은 전술한 바와 같이 다양한 조직에서 발현하며 복잡한 신호 기전에 관여하고 있으므로 이러한 Panx1 채널의 활성을 억제시키기 위한 약물을 개발하기 위해 스크리닝해야 할 약물은 적게는 수 백 내지 수백만 중에 이르는 바, 약물 스크리닝 방법을 고속화 시키고 비용 및 시간 등을 최소화하기 위해서는 HTS의 이용이 요구된다.
- [0045] 본 발명의 “고속 대량 스크리닝(High-Throughput Screening, HTS)”은 동시에 다수의 물질에 대한 분석을 고속으로 수행하는 고효율의 물질 탐색 방법으로, 신약 후보 물질 화합물 또는 천연물 등에 대한 약리 활성 및 독성 등을 분석할 수 있어 신약 개발 등에 있어 중요한 도구로 이용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에서는 I-YFP Panx1 헤미채널 분석법(I-YFP Panx1 hemichannel assay)의 Z' 값(Z' Factor)을 측정함으로써 본 발명의 분석법이 HTS를 이용한 Panx1 조절제 또는 약물의 고속 대량 스크리닝이 가능함을 확인하였다(도 4).
- [0047] 이에, 본 발명에서는 I-YFP Panx1 헤미채널 분석법(hemichannel assay)을 이용하여 Panx1 채널 활성화 여부를 민감하고 신속하게 처리할 수 있는 방법을 개발하였는 바, 향후 Panx1 조절제를 스크리닝하는데 유용하게 활용될 수 있을 뿐만 아니라 Panx1 채널의 활성 정도를 이용한 치료제 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

- [0048] 본 명세서에서 개시하는 Panx1 채널 활성 측정 시스템은 세포 내부 또는 외부의 여러 요인에 따른 Panx1 채널 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있다. 나아가 상기 Panx1 채널 활성 측정 시스템은 고속 대량 스크리닝(High-Throughput Screening, HTS)를 이용하기에 적절한 바, Panx1 채널 활성 측정 방법을 이용하여 Panx1 채널의 활성을 억제할 수 있는 약물 스크리닝에 유용하게 사용함으로써 새로운 치료제의 개발에 활용될 수 있다.
- [0049] 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

- [0050] 도 1은 I-YFP Panx1 헤미채널 분석(I-YFP Panx1 hemichannel assay)제작 원리를 모식도로 나타낸 것이다.
- 도 2는 Panx1-채널 분석법을 이용하여 C-말단 절단과 고농도 이온 자극에 따른 Panx1 채널 활성 결과를 측정하여 나타낸 것이다(A: C-말단 절단하지 않은 Panx1 및 고농도 Na^+ 에서 측정 B: C-말단 절단한 Panx1 및 고농도 Na^+ 에서 측정 C: C-말단 절단하지 않은 Panx1 및 고농도 K^+ 에서 측정 D: C-말단 절단한 Panx1 및 고농도 K^+ 에서의 측정).
- 도 3은 C-말단이 절단된 Panx1를 발현하는 세포에 Panx1 억제제를 처리하였을 때의 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 I-YFP Panx1 헤미채널 분석의 Z' 값(Z' Factor) 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0052] **실시예 1. I(요오드화물)-YFP Panx1 hemichannel assay 제작**
- [0053] 1-1. C-말단이 절단 및 절단되지 않은 Panx1 채널을 발현하기 위한 플라스미드 구축
- [0054] 70 °C 정지(Pause), 95 °C 2 분 이후, 95 °C 20초, 52 °C 20초, 72 °C 1분 30초 조건으로 34회를 사이클(cycle) 반복 후, 72°C 3분, 4°C 정지 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 샘플은 PCR용으로, 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포를 빠르게 분화시킨 세포(MSC-OST)로부터 합성된 cDNA로 준비하였으며(연세대학교 약학대학 줄기세포 연구실에서 제공), 각 샘플의 cDNA를 1 ug/1 ml이 되도록 희석하고, 10X Diasta-taq 완충용액(buffer) 5 ul, 10mM dNTP 혼합물(mix) 1 ul, EcoRI-hPanx1 U2, hPanx1-EcoRI L4 프라이머 각각 0.2 ul씩(hPanx1의 경우), 또는 EcoRI-hPanx1 U2, hPanx1-d379-XbaI L7 프라이머 각각 0.2 ul씩(hPanx-d379의 경우), Diasta-taq 중합효

소(polymerase) 0.5 ul 및 증류수를 42.1 ul를 넣어 각 튜브 당 총 50 ul가 되도록 하여 혼합하였다. 프라이머의 경우, 기존에 보고된 바가 없어 새로 제작하였다. 이 때, 프라이머 쌍은 하기 표 1에 기재된 바와 같다.

[0055] 준비된 PCR 기계에 각 샘플들을 넣고 반응시켰으며, 반응이 진행되는 동안 1% 아가로즈 겔(agarose gel)을 준비한 후 반응이 끝난 샘플들을 1% 아가로즈 겔에 내려 사이즈를 분리하였다. 겔 추출(gel extraction)과정을 통해 hPax1 및 hPax1-d379 절편을 수득하였다. hPax1 절편은 EcoRI으로, hPax1-d379 절편은 EcoRI과 XbaI 제한효소로 절단하였다. 상기 EcoRI과 XbaI 제한효소로 절단하여 얻은 C-말단이 절단된 Pax1 채널에 대한 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1로 나타내었으며, 이후 pLVX-TRE3g 플라스미드 벡터(Clontech, #631354)에 삽입하였다. 이후 DH5α 컴피턴트 세포(competent cell)로 도입한 후 최종 pLVX-TRE3g-hPax1 및 pLVX-TRE3g-hPax1-d379를 얻었다.

표 1

서열번호	프라이머	서열
2	EcoRI-hPax1 U2	TAT AGA ATT CGC AGC CAT GGC CAT CG
3	hPax1-EcoRI L4	ATA TAG AAT TCA TCA GCA AGA AGA ATC CAG AAG
4	hPax1-d379-XbaI L7	TAT ATC TAG ATT AAT CAA CAA CAT CCA TCT TG

[0057] 1-2. 렌티바이러스 제작

[0058] HEK293T 세포를 폴리-L-라이신(Poly-L-Lysin)으로 코팅한 6 웰(well) 플레이트(plate)에 60-70% 되도록 키운 후, 배지를 항생제 없는 배지로 교환하고 폴리에틸아민(PEI; cat. 23966-1, Polyscience, Inc)을 이용하여 형질전환을 실시하였다. 제작한 pLVX-TRE3g-dIRES-hPax1과 pLVX-TRE3g-dIRES-hPax1-d379를 각각 psPAX2, pMD2.G를 섞어서 총 2-3ug의 DNA로 형질전환 시켰다. 다음날 항생제 있는 배지로 교환한 후 이틀에 걸쳐 바이러스가 생성된 배지를 수집하고 소분하여 -80℃에 보관하였다.

[0059] 또한, 동일 종류의 세포에 pLVX-CIB1a-YFP^{OL}와 psPAX2, pMD2.G를 4:3:1의 비율로 섞은 총 2-3ug의 DNA를 이용하여 형질전환 시킨 후 동일한 방법으로 바이러스 생성한 뒤 다음날 항생제 있는 배지로 교환한 후에 이틀에 걸쳐 바이러스가 생성된 배지를 거두어 소분한 후 -80℃에 보관하였다.

[0060] 또한, 동일 종류의 세포에 pLVX-EF1α-Tet3g(Clontech, #631354)과 psPAX2, pMD2.G를 4:3:1의 비율로 섞은 후 총 2-3ug의 DNA를 형질전환 시킨 후 동일한 방법으로 바이러스 생성한 뒤 다음날 항생제 있는 배지로 교환한 후에 이틀에 걸쳐 바이러스가 생성된 배지를 거두어 소분한 후 -80℃에 보관하였다.

[0061] 1-3. C-말단이 절단된 Pax1 채널을 발현하는 형질전환 된 세포 제작

[0062] GJA1-null LN215 세포에 Tet3g 바이러스를 감염시키고 밤새 배양한 후에 정상 배지로 교환하였다. 48 시간 후 네오마이신 2,000 ug/ml로 섞어 교환해주고 3일동안 선별한 뒤 다시 정상 배지로 교환하였다. 상기 선별된 세포를 GJA1-null LN215-Tet3g로 명명하였다.

[0063] 위에서 제작한 pLVX-TRE3g-dIRES-hPax1 또는 pLVX-TRE3g-dIRES-hPax1-d379를 GJA1-null LN215-Tet3g 세포에 처리하였다. 1 ml 배지와 1 ml 바이러스 배지를 섞어 각 웰의 배지를 교체하고 밤새 배양한 후에 정상 배지로 교환하였다. 48시간 후 배지에 푸로마이신 2 ug/ml로 섞어 교환하고 3일 동안 선별한 뒤 다시 정상 배지로 교환하였다.

[0064] 1-4. I-YFP-Pax1 헤미채널 분석용 세포 제작

[0065] 제작된 GJA1-null LN215-hPax1-d379 세포를 6 웰(well) 플레이트에 50-60% 키운 후, 렌티바이러스(Lentivirus)-YFP^{OL}를 감염시켰다. 밤새 배양한 후 정상 배지로 교환하고 48 시간 후에 블라스티시딘(blasticidine) 5 ug/ml로 섞어 교환하였다. 3일동안 선별한 후 정상 배지로 교환하여 96 웰 플레이트에 100%가 될 때까지 배양하여 I-YFP-Pax1 헤미채널 분석용 세포를 제작하였다. 상기 세포는 본 발명자의 한국등록특허 제 10-1818850호의 I-YFP GJIC 분석 방법이 적용될 수 있도록 한 것으로서, 요오드화물 센서 형광 단백질이 발현되도록 한 것이다.

[0066] 1-5. I-YFP GJIC 분석 확인

[0067] 상기 1-4에서 I-YFP-Pax1 헤미채널 분석용 세포 제작 및 배양 후 24 시간이 지난 후, 독시사이클린

(Doxycycline)을 500ng/ml이 되도록 처리하였으며, 독시사이클린을 처리하지 않은 대조군을 웰(well)에 남겨두었다. 96 웰 플레이트에 100ul C-용액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM 글루코스, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)으로 배지를 교체하고 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)에 고농도의 칼륨(K⁺)을 포함한 요오드화물 완충 용액 KI-용액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM KI, 10 mM 글루코스, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) 또는 고농도의 나트륨(Na⁺)을 포함한 요오드화물 완충 용액 “NaI-용액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaI, 10 mM 글루코스, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)을 넣어 20초 동안 형광 값의 변화를 측정하였다. 1초가 되는 시점에서 I-용액(K⁺ 존재) 또는 I-용액(Na⁺ 존재)를 넣어준 후 형광 값의 변화를 측정하였으며 대조군(독시사이클린을 처리하지 않은 세포)과 비교하여 실험군(독시사이클린을 처리한 세포)에서 형광 값의 감소되는 정도를 측정하였다. 상기 실험군에서의 형광 값이 감소되는 정도가 Panx1를 통한 헤미채널의 활성을 의미한다.

[0068] 상기 결과를 통해 본 발명에서 제작한 I-YFP-Panx1 헤미채널 분석용 세포가 정상적으로 작동됨을 확인하였다.

[0069] **실험예 1. I-YFP Panx1 헤미채널 분석(hemichannel assay)**

[0070] **1-1. I-YFP Panx1 헤미채널의 활성 측정**

[0071] Panx1 헤미채널이 활성화되는 조건을 확인하기 위하여 C-말단 절단 여부 및 외부 환경조건을 달리하여 I-YFP Panx1 헤미채널 분석을 수행하였다.

[0072] 상기 실시예 1을 통해서 제작된 C-말단이 절단된 Panx1 채널을 발현하는 GJA1-null LN215-hPanx1-d379 세포와 C-말단이 절단되지 않은 Panx1 채널을 발현하는 GJA1-null LN215-hPanx1 세포를 I-용액(Na⁺ 존재)으로 자극을 주어 hPanx1 채널의 활성을 유도한 후 헤미채널 분석을 120초 동안 수행하였다. 또한 동일한 GJA1-null LN215-hPanx1-d379세포와 GJA1-null LN215-hPanx1 세포를 I-용액(K⁺ 존재)으로 자극을 주어 hPanx1 채널의 활성을 유도한 후 헤미채널 분석을 120초 동안 수행하였다.

[0073] 그 결과, GJA1-null LN215-hPanx1 세포를 이용한 경우 채널의 활성이 일어나지 않으나(도 2A 및 2C), GJA1-null LN215-hPanx1-d379 세포를 이용한 경우에는 채널 활성이 일어남을 확인하였다(도 2B 및 2D).

[0074] 또한 외부 환경적 스트레스를 I-용액(K⁺ 존재)으로 유도할 때 I-용액(Na⁺ 존재)로 유도할 때 보다 채널 활성이 더 잘 유도되는 것을 확인하였다(도 2C 및 2D).

[0075] 상기 결과를 통해 hPanx1 채널은 C-말단 절단에 의해 활성화되며, 외부 환경의 K⁺농도가 높을 때 채널 활성이 더 잘 유도될 수 있음을 확인하였다.

[0076] **실험예 2. Panx1 억제제를 이용한 I-YFP Panx1 헤미채널 분석**

[0077] Panx1 채널이 활성화된 세포에 Panx1 억제제를 처리한 후 I-YFP Panx1 헤미채널 분석을 이용하여 Panx1 채널의 활성이 억제되는 정도를 확인하였다.

[0078] 상기 실시예 1을 통해서 제작된 GJA1-null LN215-hPanx1-d379 세포에 Panx1 억제제인 카르벤옥솔론(Carbenoxolone, CBX), 트로바플록사신(Trovafloxacin), 프로베네시드(Probenecid), 2-아미노에톡시디페닐보레이트(2-Aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB) 및 프루페나믹산(Flufenamic acid, FFA)을 각 100uM씩 처리한 후 I-YFP Panx1 헤미채널 분석을 30초 동안 수행하였다.

[0079] 그 결과, CBX는 30 초에서 대조군에 대한 억제율(inhibition ratio)이 87.48%로 가장 높은 수치를 보였다. 트로바플록사신(Trovafloxacin)은 30 초에서 대조군에 대한 억제율이 60.61% 이었으며, 프로베네시드(Probenecid)는 30 초에서 대조군에 대한 억제율이 40.54% 이었고, 2-APB는 30 초에서 대조군에 대한 억제율이 46.48%이고, 마지막으로 FFA는 30 초에서 대조군에 대한 억제율이 37.38%임을 확인하였다(도 3).

[0080] 상기 결과는 I-YFP Panx1 헤미채널 분석을 이용하여 Panx1 채널형활성에 따른 형광 강도 감소 여부를 측정할 수 있고, 이는 Panx1 채널 활성 억제 물질을 발굴할 수 있는 시스템으로 활용될 수 있음을 시사한다.

[0081] **실험예 3. 고속 대량 스크리닝(High-Throughput Screening, HTS) 적용 가능한지 여부 확인**

[0082] I-YFP Panx1 헤미채널 분석의 Z'값(Z' Factor)을 측정하여 고속 대량 스크리닝에서의 활용 가능성을

확인하였다.

[0083] Z' 값은 0에서 1까지의 범위를 가지며, 0 내지 0.5는 분석 효율이 한정적임을 의미하며, 0.5 내지 1.0은 고속 대량 스크리닝이 가능한 분석 효율을 나타낸다. 1.0은 가장 이상적인 Z' 값이다.

[0084] GJA1-null LN215 세포를 96 웰 플레이트에 100%가 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 이후, 48 개의 웰은 독시사이클린 500 ng/ml이 포함된 배지 100 ul로 교체하고, 나머지 48개의 웰에는 일반 배지 100 ul로 교체한 후 9시간 배양하였다.

[0085] 이후, 모든 웰의 배지를 C-용액 100 ul로 교체하고 37°C 에서 10분 간 배양하였으며, 마이크로플레이트 리더기 (microplate reader)에서 I-용액(K⁺ 존재) 또는 I-용액(Na⁺ 존재)을 넣어주며 20초 동안 형광값의 변화를 측정함으로써 채널 활성 정도를 비교하였다. 1초가 되는 시점에서 I-용액(K⁺ 존재) 또는 I-용액(Na⁺ 존재)을 넣어 준 후 형광값의 변화를 측정하였으며, 대조군(독시사이클린을 처리하지 않은 웰)과 실험군의 결과값을 그래프로 나타내었다. Z' 값은 하기 식을 통해 계산하였다.

[0086] [식 1]

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{\mu_p - \mu_n}$$

[0089] 그 결과, I-용액(Na⁺ 존재)를 사용한 실험군에서의 Z' 값이 0.6559 ± 0.16이며, I-용액 (K⁺ 존재)를 사용한 실험군에서의 Z' 값이 0.8063 ± 0.04임을 확인하였다(도 4).

[0090] 상기 결과를 통해 I-용액(Na⁺ 존재) 및 I-용액(K⁺ 존재) 에서 모두 고속 대량 스크리닝이 가능한 효율이 나타났으며, 특히 I-용액(K⁺ 존재)에서 약 0.8 이상의 높은 Z' 값을 보여주는 바, 이를 통해 본 발명의 I-YFP Panx1 헤미채널 분석법이 고속 대량 스크리닝에 적용할 수 있음을 확인하였다.

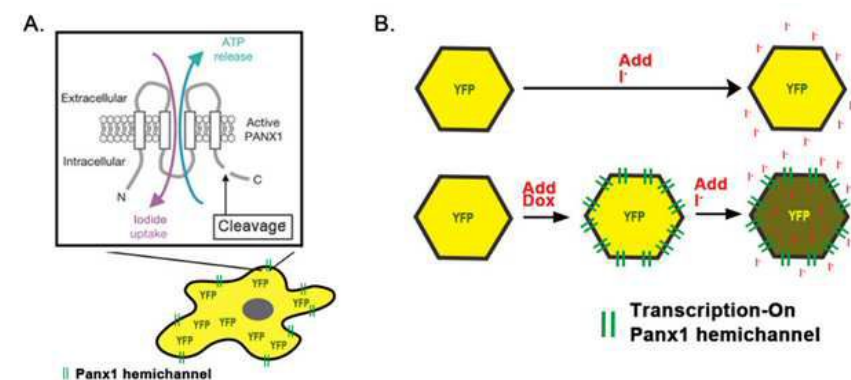
[0091] 상기 결과들은 본 발명의 I-YFP Panx1 헤미채널 분석법이 활성화된 Panx1 채널의 유도 발현을 이용하여 Panx1의 채널 활성 정도를 측정할 수 있고, HTS를 통해 대량의 Panx1 억제 약물을 신속하게 스크리닝 할 수 있음을 시사한다.

[0092] 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.

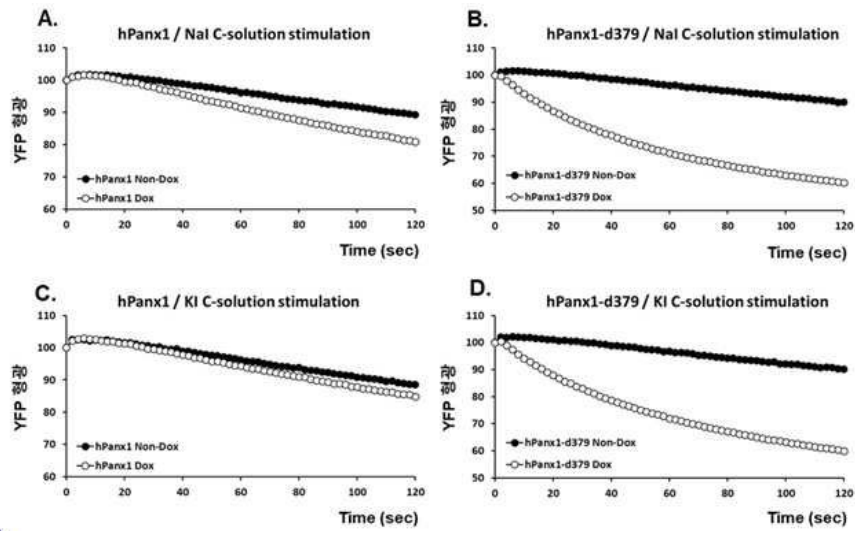
[0093] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

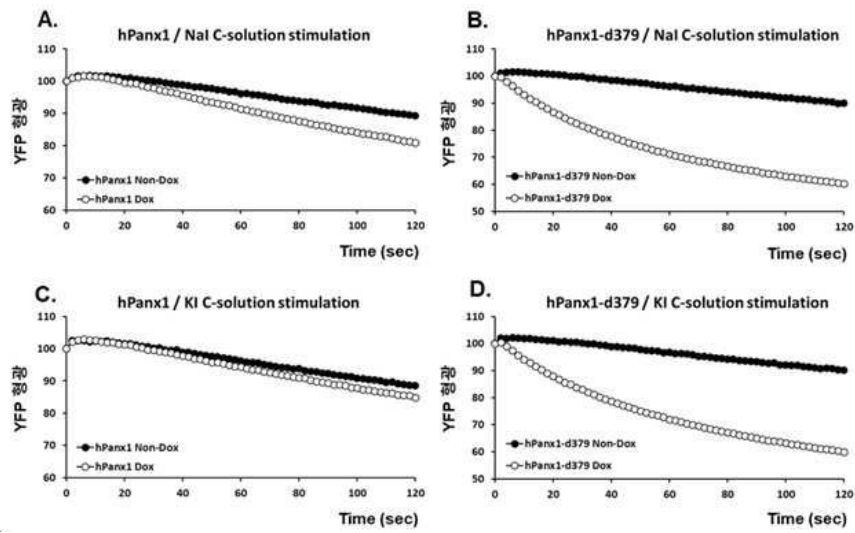
도면1



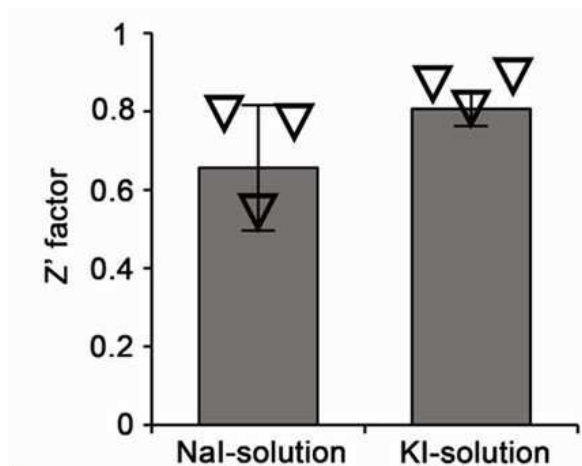
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHOD FOR MEASURING PANX1 CHANNEL
ACTIVITY
- <130> 19PP30309
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1158
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> hPanx1-d379 full sequence
- <400> 1

gaattcgcag ccatggccat cgctcaactg gccacggagt acgtgttctc ggatttcttg	60
ctgaaggagc ccacggagcc caagttcaag gggctgcgac tggagctggc tgtggacaag	120
atggtcacgt gcattgcggt ggggctgccc ctgctgtca tctcgtggc cttcgcgag	180
gagatctcga ttggtacaca gataagctgt ttctctccaa gttctttctc ctggcgctcag	240
gctgcctttg tggattcata ttgctgggcg gctgttcagc agaagaactc actgcagagc	300
gagtctggaa acctccact gtggctgcat aagtttttcc cctacatcct gctgctcttt	360
gcgacctcc tgtacctgcc cccgctgttc tggcgtttcg cagctgctcc tcataattgc	420
tcagacttga agtttatcat ggaagaactt gacaaagttt acaaccgtgc aattaaggct	480
gcaaagagtg cgcgtgacct tgacatgaga gatggagcct gctcagttcc aggtgttacc	540
gagaacttag ggcaaagttt gtgggaggta tctgaaagcc acttcaagta cccaattgtg	600
gagcagtact tgaagacaaa gaaaaattct aataatttaa tcatcaagta cattagctgc	660
cgctgctga cactcatcat tatactgtta gcgtgtatct acctgggcta ttacttcagc	720
ctctctcac ttcagacga gtttgtgtgc agcatcaaat cagggatcct gagaaacgac	780
agcaccgtgc ccgatcagtt tcagtgcaaa ctcatcgccg tgggcatctt ccagttgctc	840
agtgtcatta accttgttgt ttatgtcctg ctggctcccg tggttgtcta cacgtgttt	900
gttccattcc gacagaagac agatgttctc aaagtgtacg aaatcctccc cacttttgat	960
gttctgcatt tcaaactga aggggtacaac gatttgagcc tctacaatct cttcttggag	1020
gaaaatataa gtgaggtaaa gtcatacaag tgtcttaagg tactggagaa tattaagagc	1080
agtggtcagg ggatcgaccc aatgctactc ctgacaaacc ttggcatgat caagatggat	1140

gttggttgatt aatctaga	1158
<210> 2	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> EcoRI-hPanx1 U2	
<400> 2	
tatagaattc gcagccatgg ccatcg	26
<210> 3	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><	
223> hPanx1-EcoRI L4	
<400> 3	
atatagaatt catcagcaag aagaatccag aag	33
<210> 4	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hPanx1-d379-XbaI L7	
<400> 4	
tatatctaga ttaatcaaca acatccatct tg	32