(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0027919
(43) 공개일자 2011년03월17일

(51) Int. Cl.
A61K 31/202 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0085737
(22) 출원일자 2009년09월11일
심사청구일자 2009년09월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황선욱
서울 서초구 방배본동 3277 방배아이파크APT 402-1006
방상수
경기 광명시 하안4동 하안주공10단지 아파트 1011-502
(74) 대리인
이원희

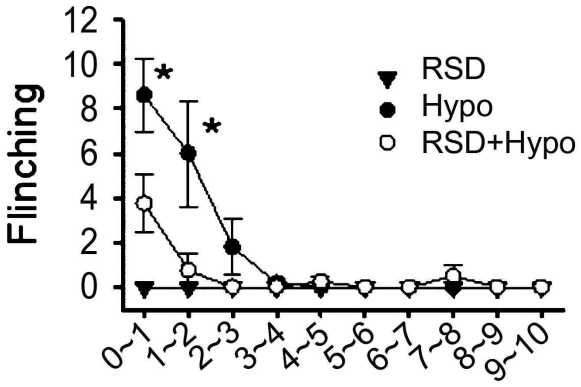
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 새로운 ＴＲＰＶ４ 활성 억제제 및 용도

(57) 요 약

본 발명은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성 억제제에 관한 것으로, 구체적으로 TRPV4의 활성을 억제하는 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPV4에서 유도된, 감각세포의 전류반응성 증가를 제어하므로 효과적인 저삽투압 통증 억제제 개발을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2008-331-E00457, 20090076543, M103KV01001508K

부처명 한국학술진흥재단, 한국학술진흥재단, 과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 신진교수연구지원, (이공)일반연구자지원-기본연구, 뉴프론티어연구사업

연구과제명 비흥분성 세포에서의 thermoTRP 역할규명 및 작용약물 적용을 통한 세포 기능 조절, Mevalonate pathway 신호경로의 TRP연관성 말초통증 조절 기전에 관한 연구, 감각이상 유발기전 및 제어기술 연구

기여율

주관기관 고려대학교, 고려대학교, 고려대학교

연구기간 2008년 07월 01일 ~ 2009년 06월 30일, 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일, 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 레졸빈 D1(Resolvin D1; RSD) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 저삽투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제용 조성물.

청구항 3

TRPV4를 발현하는 분리된 감각신경 세포에 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV4의 활성을 억제하는 방법.

청구항 4

약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 저삽투압 통증을 억제하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 저삽투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성제와 피검화합물을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성제와 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 각각 처리하는 단계;

3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 상기 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 단계 2)의 TRPV4 특이적 활성제는 4αPDD(4alpha-phorbol 12,13-didecanoate)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 단계 3)의 TRPV4 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 단계 2)의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.1 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 단계 2)의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 11

레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 개선용 건강식품.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 저삽투압 통증 개선용 건강식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 통증 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 생리학 및 유전학 분야의 연구를 통해 인체에 존재하는 TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4)가 발견되었고, 다양한 조직에서 생존유지에 필수기능을 수행할 것으로 예측되었다. 특히 상기 TRPV4는 외부의 자극을 감지하는 감각 신경세포에 발현되어 있으며, 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체 군인 thermoTRP 군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다. 또한 TRPV4는 여러 내장 기관에서도 발현하는데 특히 쓸개즙을 분비하는 조직에서 발견되었고 혈관의 수축 이완 조절 뼈의 형성조절에도 영향을 미치는 등 다양한 조직에서 역할이 규명되었다. 그중 통증 부분에 대해서는 기계적인 삼투압의 변화에 반응하는 것으로 알려졌으며 삼투압이 낮아져 세포의 부피가 커지면 이를 인식하는 채널로서 알려졌다. 이를 기반으로 저삽투압 자극에 의한 통증의 매개체로서의 역할이 주목되고 있고 이를 기반으로 한 통증 경감제의 개발이 요구되는 시점이다.

[0003] 상기 TRPV4의 특이적인 조절제의 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPV4 수용체의 특성은 다음과 같다. TRPV4는 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각 신경세포 내부로 이동하고, 칼슘 의존적인 신호 전달 체계가 발생한다. 상기 TRPV4의 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 팻취클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPV4가 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술 보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한 상기 TRPV4 활성화 측정 기술들은, 세포주 배양기술, TRPV4 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPV4 활성의 특이적 조절제 후보물질들을 TRPV4 과발현 세포에 투여하여, TRPV4 특이적 활성제인 4αPDD(4alpha-phorbol 12,13-didecanoate)에 의한 활성화에 대한 억제 효과를 측정 및 비교함으로써, 억제제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다.

[0004] TRPV4의 활성을 억제하는 물질로는 류테늄 레드가 알려졌으나 이는 비특이적인 칼슘 채널 억제제이며 TRPV4에

특이적이지는 않다. 또한 실제적인 통증에서의 효과가 TRPV4에 위한 것인지를 규명하기가 어렵다. 이러한 문제점으로 인해 TRPV4 를 특이적으로 억제할 수 있는 억제제의 개발이 필요하며 이 억제제는 효과적인 통증 경감에 활용될 것으로 보인다.

[0005] 레졸빈 D1(Resolvin D1; RSD)은 잠재적인 항-염증성 지질 매개물질이다. RSD는 15- 및 5-지방산화효소(lipoxygenase)에 의한 DHA의 산화에 의해 생리적으로 생성되는 오메가3 지방산 대사체이다. 또한 아스피린으로 처리된 시료로부터 RSD의 17(R)-에피머(epimer)가 생성될 수도 있다. 상기 RSD 및 이의 17(R) 구조는 급성 염증의 초기 반응인 인간 다핵성 백혈구(polymorphonuclear leukocyte; PMNL)가 혈관 내피 세포를 따라 이동하는 것을 30 nM의 EC_{50} 수치로 감소시킨다. 또한, RSD 및 이의 아스피린에 의해 유도된 형태는 복막염에 걸린 뮤린 모델에서 백혈구 침투를 농도 의존적으로 감소시키며, 10-100 ng을 투여했을 대, 최대 35%까지 억제한다. 이와 같이 RSD는 염증반응과 관련되어 있는 것으로 보고되어있으나, TRPV4의 활성을 조절한다는 것은 알려진바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 TRPV4를 발현하는 세포주를 제작하여 레졸빈 D1 및 TRPA4 활성제인 4αPDD 처리에 대한 반응을 비교한 결과, 상기 레졸빈 D1이 TRPV4 활성을 억제하므로 TRPV4를 기반으로 하는 저삽투압 통증 억제 물질로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 저삽투압 통증 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 TRPV4의 활성을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 개체의 저삽투압 통증을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 레졸빈 D1(Resolvin D1; RSD) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 억제용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 TRPV4를 발현하는 분리된 감각신경 세포에 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV4의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 저삽투압 통증을 억제하는 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은

[0016] 1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0017] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성제와 피검화합물을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성제와 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 각각 처리하는 단계;

[0018] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 상기 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0019] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 아울러, 본 발명은 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

효 과

[0021] 본 발명의 TRPV4 활성 억제제인 레졸빈 D1은 TRPV4에서 유도된, 감각세포의 전류반응성 증가를 제어하므로 효과적인 저삽투압 통증 억제제 개발을 가능하게 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 레졸빈 D1(Resolvin D1; RSD) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 억제용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4를 과발현하는 형질전환 세포 및 TRPV4를 발현하는 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포에서, TRPV4 특이적 활성제로 알려진 4αPDD(4alpha-phorbol 12,13-didecanoate)에 의해 증가된 활성을 상기 레졸빈 D1이 억제하는 것을 팻취클램프 기법의 일종인 전세포 전압 클램프 실험 및 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술의 일종인 칼슘 이미지화로 확인하였다(도 1 및 도 3 참조). 또한, 본 발명의 레졸빈 D1은 마이크로몰라 농도의 범위에서 농도 의존적으로 TRPV4를 억제하는 효과를 보였으며 TRPV4에 대한 EC_{50}(effective concentration 50%; 50% 효과 농도)은 대략 3.09 μM이었고, N 값은 대략 1.10이었다(도 2 참조). 아울러, 레졸빈 D1이 동물모델에서 TRPV4 활성을 기반으로 하는 저삼투 기계적 자극에 대한 통증감수성이 억제됨을 확인하였다(도 4 참조). 이에, 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 통증 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0025] 상기 저삽투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0026] 상기 레졸빈 D1은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 부가염이 유용하다. 적합한 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartariac acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 레졸빈은 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 조제될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캅셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만

니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 붕해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다.

[0030] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.

[0032] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0033] 또한, 본 발명은 TRPV4를 발현하는 분리된 감각신경 세포에 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV4의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 RSD에 의해 농도의 존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조). 이에 상기 RSD는 TRPV4의 활성 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0035] 또한, 약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 저삽투압 통증을 억제하는 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 RSD에 의해 농도의 존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조). 또한, 레졸빈 D1이 동물모델에서 TRPV4 활성을 기반으로 하는 저삼투 기계적 자극에 대한 통증감수성이 억제됨을 확인하였다(도 4 참조). 이에 상기 RSD는 통증 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0037] 상기 저삽투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0038] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다. 또한, 투여방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 통증 억제를 위하여 상기 개체에 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적으로 유효한 양은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1일 0.0001 내지 100 mg/kgg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0040] 또한, 본 발명은

[0041] 1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0042] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성제와 피검화합물을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성제와 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 각각 처리하는 단계;

[0043] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 상기 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0044] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 RSD에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조). 이에 상기 RSD는 TRPV4의 활성 억제제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0046] 상기 숙주세포는 이에 제한되는 것은 아니나, HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주, HaCat 세포주 등의 칼슘 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주가 바람직하다.

[0047] 상기 단계 2)의 TRPV4 특이적 활성제는 4αPDD이다.

[0048] 상기 단계 3)의 TRPV4 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 전세포 전압 클램프 기술 및 TRPV1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0049] 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.1 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 내지 100 μM의 농도로 처리하고, 가장 바람직하게는 1 μM 내지 30 μM의 농도로 처리한다.

[0050] 상기 피검화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 리간드, 앱타머(aptamer), 효소, 단백질, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 아울러, 본 발명은 상기 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삽투압 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

[0052] 상기 저삽투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0053] 본 발명의 상기 RSD는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 RSD를 원료에 대하여 0.2 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.24 내지 10 중량%로 첨가한다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 건강식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.04 중량부, 바람직하게는 약 0.02~0.03 중량부 범위에서 선택하는 것이 바람직하다.

[0055] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 소세지, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

[0056] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러

한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

실 시 예

[0057] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0058] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **<실시예 1> TRPV 형질전환 세포주 제조**

[0060] HEK293 세포주(ATCC CRL-11268)를 rTRPV4(서열번호 1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.

[0061] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 well plate 당 0.8 ㎍ 의 rTRPV4의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터 및 0.2 ㎍/웰의 pCDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene HD(Roche Diagnostics, 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24 시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였고, 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.

[0062] **<실시예 2> 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포 준비**

[0063] 차가운 PBS에서 성체 ICR계 생쥐(한림실험동물연구소, 한국)의 DRG를 분리하여 세절한 후, 3 mg/㎖ 콜라게나아제 타입 2(collagenase type 2; Invirogen, USA)를 37℃에서 45분 동안 처리한 후 기계적인 방법으로 완전히 소화시켰다. 상기 방법으로 제조한 DRG 감각 신경세포를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/㎖ 2.5S NGF(calbiochemn, USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 48 내지 72시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0064] **<실시예 3> 통계적 처리**

[0065] 이하, 모든 실시예의 실험 결과는 양측 꼬리(two-tailed), 쌍을 이루지 않은(unpaired) 스튜던트 검정(Student's t-test)을 이용하여 통계적으로 분석하였고, 평균±S.E.M.의 형태로 나타내었다. 또한, $^{**}P < 0.01$ 및 $^{*}P < 0.05$이었다.

[0066] **<실시예 4> RSD에 의한 TRPV4의 활성화 변화 조사 방법**

[0067] **<4-1> 전기 생리학적인 방법으로 세포내 채널의 활성 측정**

[0068] 실시예 1의 방법으로 제조한 rTRPv4 형질전환 세포주에 10 μM 4αPDD(Sigma, USA) 또는 30 μM 레졸빈 D1(Resolvin D1: Cayman biochem, USA)을 각각 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 DMSO 을 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 전기 생리학적인 측정을 수행하였다.

[0069] 구체적으로, 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)과 피펫 용액(pipet solution, 140mM CsCl 10mM EGTA,10mM HEPES 를 포함하여 pH 7.4로 적정)을 이용하였다. 이후, 팻취 클랩프 셋트를 이용하여 전체 세포 팻취 클램프를 실시하였고 이중 전압 전류 상관 곡선을 이용하여 이온 채널 특이적인 반응임을 확인함과 동시에 GGPP에 의해 효과적으로 활성화함을 확인하였다. 팻취 클랩프 셋트는 multiclamp 700B(molecular device, 미국)을 이용하여 미세한 신호를 증폭하고, digidata1332a(Molecular device, 미국)를 이용하여 아날로그 신호를 디지털화하였다. pClamp 10(Molecular device, 미국)을 이용하여 데이터를 수집 및 기계를 조작했고, clemp X-10(Molecular device, 미

국)을 이용하여 데이터를 편집했다.

[0070] 그 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이 레졸빈 D1은 4αPDD에 의한 TRPV4 특이적 활성을 억제함을 확인하였다.

[0071] **<4-2> 칼슘 이미지화를 이용한 세포내 칼슘수준변화 측정**

[0072] rTRPv4 형질전환 세포주에 30 μM RSD를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 4αPDD를 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 0.02% 풀루로닉산(pluronic acid; Invitrogen, USA)을 포함하는 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl2, 2 mM MgCl2, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fura2-AM(5 μM; invitorgen, USA)을 37℃에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, fura2 calcium image system olympus 형광 현미경(Olympus, 일본)을 이용하여 칼슘 이미지화(Calcium imaging)를 수행하였고, Meta flow(Morecular device, 미국)를 이용하여 촬영이미지(time-lapse image; 340 nm /380 nm)를 매 3초마다 측정하여 그 비율로 나타내었다.

[0074] 그 결과, 도 1b에서 나타난 바와 같이 레졸빈 D1은 TRPV4 활성화를 억제함을 확인하였다.

[0075] **<실시예 5> TRPV1의 GGPP 농도 의존적 반응 조사**

[0076] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV4 형질전환 세포주에 0.1 내지 500 μM RSD를 각각 처리한 후, 실시예 4-2의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다. 이후, 측정값을 Hill-plot을 이용하여 농도-반응 곡선으로 작성하였다.

[0077] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 RSD의 TRPV4에 대한 EC_{50}(effective concentration 50%; 50% 효과 농도)은 대략 3.09 μM이었고, N 값은 대략 1.10이었다. 이것은 RSD가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPV4에 활성 효과를 나타내는 것을 지시한다.

[0078] **<실시예 6> 감각 신경세포의 RSD 특이적 반응 조사**

[0079] 실시예 2에서와 같이 분리된 감각 신경세포에 30 μM RSD를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 4αPDD를 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0080] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 레졸빈 D1은 DRG 감각 신경세포에서도 TRPV4 활성화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0081] **<실시예 7> 동물 통증행동실험을 통한 RSD 통증억제 반응 조사**

[0082] **<7-1> 염증성 감작 유발**

[0083] RSD에 의한 염증성 감작(inflammatory sensitization) 반응을 관찰하기 위하여, 오른쪽 뒷발의 발바닥에 상기 RSD 주사 3 시간 전에 염증매개인자인, 100 ng PGE2(carrageenan; Sigma aldrich, USA)을 주사하였다. 또한, 실험에 앞서 쥐를 1 시간 동안 실험환경에 적응하도록 순화시켰으며, 하기 실험군 각각 25 ㎖를 쥐의 오른쪽 뒷발에 피내 주사하였다.

[0084] 대조군: 무처리;

[0085] 실험군 1: 3 mM 의 레졸빈 D1;

[0086] 실험군 2: DDW + 100 ng PGE2;

[0087] 실험군 3: 3 mM 레졸빈 + DDW + 100 ng PGE2.

[0088] **<7-2> 급성 침해성 행동(발 플린치 행동) 분석**

[0089] 급성 발 플린치 행동(hindpaw flinching behavior)한 횟수를 10분 동안 측정하였다.

[0090] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 DDW + 100ng PGE2의 경우 쥐가 발을 들어 바닥에 닿지 못하는 횟수가 증가

한대 반해 레졸빈 D1을 같이 투여한 쥐의 경우 그 횟수가 현저히 줄어들었음을 확인하였다.

[0091] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0092] 1. 산제의 제조

[0093] 레졸빈 D1 2 g

[0094] 유당 1 g

[0095] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0096] 2. 정제의 제조

[0097] 레졸빈 D1 100 mg

[0098] 옥수수전분 100 mg

[0099] 유 당 100 mg

[0100] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0101] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0102] 3. 캡슐제의 제조

[0103] 레졸빈 D1 100 mg

[0104] 옥수수전분 100 mg

[0105] 유 당 100 mg

[0106] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0107] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0108] 4. 환의 제조

[0109] 레졸빈 D1 1 g

[0110] 유당 1.5 g

[0111] 글리세린 1 g

[0112] 자일리톨 0.5 g

[0113] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0114] 5. 과립의 제조

[0115] 레졸빈 D1 150 mg

[0116] 대두 추출물 50 mg

[0117] 포도당 200 mg

[0118] 전분 600 mg

[0119] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0120] <제조예 2> 유제품의 제조

[0121] 본 발명의 레졸빈 D1 및 이의 유사체 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0122] <제조예 3> 음료의 제조

[0123] 1. 건강음료의 제조

[0124] 레졸빈 D1	1000 mg
[0125] 구연산	1000 mg
[0126] 올리고당	100 g
[0127] 매실농축액	2 g
[0128] 타우린	1 g
[0129] 정제수를 가하여 전체	900 mℓ

[0130] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 rTRPV4 세포주에서 4αPDD에 의해 유도된 TRPV4 활성이 레졸빈 D1에 의해 활성화됨을 확인한 도이다 (PDD: 4αPDD, RSD: 레졸빈 D1):

[0132] a: 전기 생리학적인 방법으로 확인함; 및,

[0133] b: 칼슘 이미지화 방법으로 확인함.

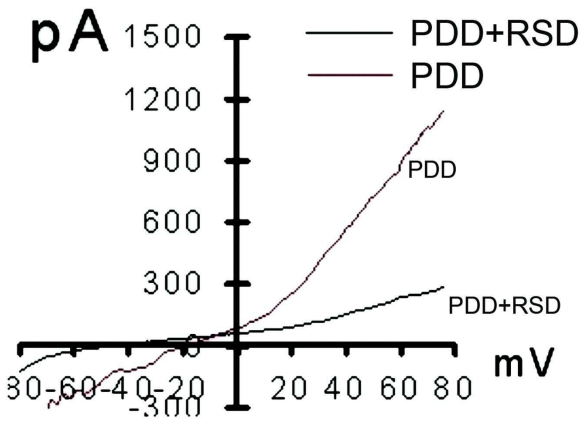
[0134] 도 2는 RSD가 TRPV4를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인한 도이다.

[0135] 도 3은 4αPDD에 특이적인 반응을 보이는 감각 신경세포가 RSD에 의해 억제되는 것을 확인한 도이다.

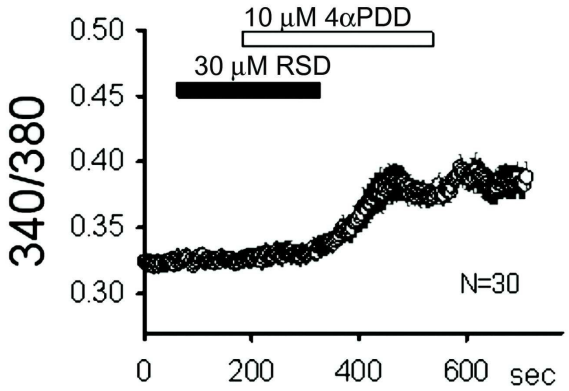
[0136] 도 4는 급성 발 플린치 행동 검사법을 수행한 결과, 염증매개인자인 PGE2 주입시 플린치 횟수가 증가한 데 반해 레졸빈 D1의 동시 주입 군에서는 플린치 횟수가 줄어드는 것을 확인한 도이다.

도면

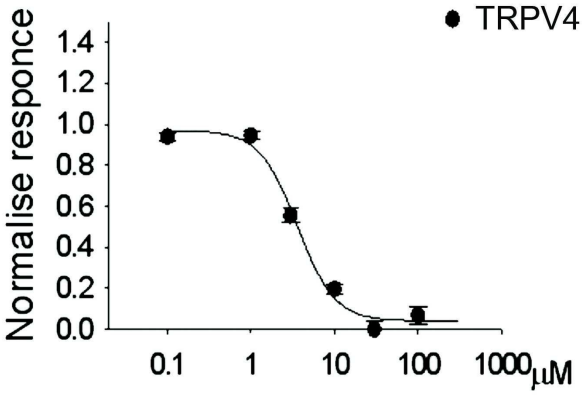
도면1a



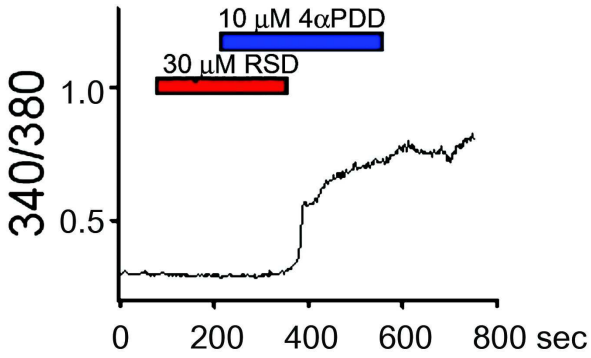
도면1b



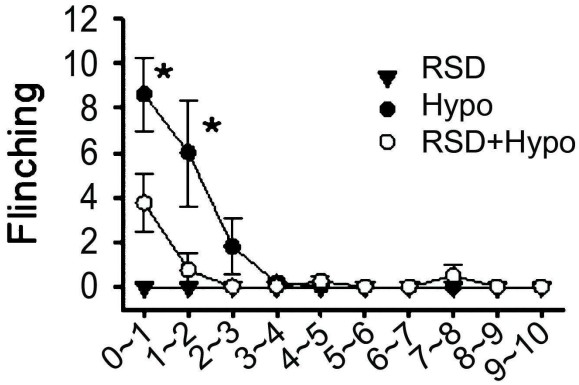
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY Industry & Academy Collaboration Foundation
<120> Novel TRPV4 inhibitor and its use

<130> 9P-08-47

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 3211
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rTRPV4

<400> 1
gggaggagga cgcggcggga tcaggaagcg gctgcgctgc gcccgcgtcc caagcaggcc 60

gagaagtcca aacagatctg ctcagggtcc agtatggcag atcctggtga tggcccccgt 120

gcagcgcctg gggatgtggc tgagcccccct ggagacgaga gtggcacttc tggtggggag 180

gccttccccc tctcttccct ggccaacctg tttgagggag aggaaggctc ctcttctctt 240

tcaccagtgg atgctagccg ccctgctggc cccggggatg gacgtccaaa cctgcgtatg 300

aagttccagg gcgctttccg caagggggtt cccaacccca ttgacctgct ggagtccacc 360

ctgtatgagt cctcagtagt gcctgggccc aagaaagcgc ccatggattc gttgttcgac 420

tatggcactt accggcacca ccccagtgac aacaagagat ggaggaggaa ggtcgtagag 480

aagcagccac agagccccaa agctcccgcc ccccagccac cccccatcct caaagtcttc 540

aaccggccca tcctctttga catcgtgtcc cggggctcca ctgccgacct ggacggactg 600

ctctcctact tgctgaccca caagaagcgc ctgactgatg aggagttccg ggaaccatcc 660

acagggaaga cctgcctgcc caaggcactt ctgaacttaa gcaatggccg aaacgacacc 720

atcccagtgt tgctggacat tgcggaacgc acgggcaaca tgcgggagtt catcaactcg 780

cccttcagag acatctacta ccgagggcag acggcactgc acatcgccat tgaacggcgc 840

tgcaagcatt acgtggagct cctggtggcc cagggagccg atgtgcacgc gcaggcccga 900

gggcggttct tccagcccaa ggatgagggt ggctacttct actttgggga gctgcccttg 960

tccttggcag cctgcaccaa ccagccgcac atcgtcaact acctgacaga gaaccctcac 1020

aagaaagccg atatgaggcg acaggactcc agaggcaaca cggtgctcca cgcgctggtg 1080

gccatcgctg acaacacccg agagaacacc aagtttgtca ccaagatgta tgacctgttg 1140

cttctcaagt gctcccgcct cttcccagac agcaacctgg agactgtgct taacaatgac 1200

ggtctttcgc ccctcatgat ggctgccaag actggcaaga tcggggtctt tcagcacatc 1260

atccgacggg aggtgacaga tgaggacaca cggcacctgt ctcgcaagtt caaggactgg 1320

gcctacgggc ctgtgtattc ttctctctac gacctctcct ccctggatac gtgcggggag 1380

gaagtgtccg tgctggagat cctggtttac aacagcaaga tcgagaaccg ccatgagatg 1440

ctggctgtgg agcccattaa cgaactgctg agggacaagt ggcgtaagtt cggggccgtg 1500

tccttctaca tcaacgttgt ctcctatctg tgtgccatgg tcatcttcac cctcacagcc 1560

tactatcagc cactggaggg cacgccaccc tacccttacc gtaccacggt ggactacctg 1620

aggctggctg gtgaggtcat cacgctcctc acaggagtcc tgttcttctt taccagtatc 1680

aaagacttgt tcatgaagaa atgccctgga gtgaattctc tcttcgtcga tggctccttc 1740

cagttgctct acttcatcta ctcagtgctg gtggttgtgt ctgcggcgct ctacctggca 1800

gggatcgagg cctatctggc tgtgatggtc tttgccctgg tcctgggctg gatgaatgcc 1860

ctttacttca cccgtgggct gaagctgaca gggacctaca gcatcatgat tcagaagatc 1920

ctcttcaaag atctcttccg ctttctgctg gtctacctgc tttttatgat tggctatgcc 1980

tcagctctgg tcaccctcct gaatccgtgc accaacatga aggtctgtaa cgaggaccag 2040

agcaactgca cggtgccctc ataccccgcg tgccgggaca gcgagacctt cagcgccttc 2100

ctactggacc tcttcaagct caccatcggc atgggcgacc tggagatgct gagcagcgct 2160

aagtaccccg tggtcttcat tctcctgctg gttacctaca tcatcctcac cttcgtgctc 2220

ctgctgaaca tgctcatcgc cctcatgggt gagaccgtgg gccaggtgtc caaggagagc 2280

aagcacatct ggaagctgca gtgggccacc accatcctgg acatcgagcg ctccttccct 2340

gtgttcctga ggaaggcctt ccgctccgga gagatggtga cagtgggcaa gagctcggat 2400

ggcactccag accgcaggtg gtgcttcagg gtggacgagg tgaactggtc tcactggaac 2460

cagaacctgg gcatcattaa cgaggacccc ggcaagagcg agatctacca gtactatggc 2520

ttctcccata ccatggggcg cctccgcagg gatcgctggt cctcagtggt gccccgcgtg 2580

gtggagctga acaagaactc aggcacagat gaagtggtgg tccccctgga taacctaggg 2640

aaccccaact gtgacggcca ccagcaaggt tatgctccca agtggagggc ggaggacgca 2700

ccactgtagg ggccatgcca gggctggggt caatggccca ggcttggccc ttgctcccac 2760

ctacatttca gcatctgtcc tgtgtcttcc cacacccaca cgtgacctcg gaggtgaggg 2820

cctctgtgga gactctgggg aggccccagg accctctggt ccccacaaag acttttgctc 2880

ttatttctac tcctccccac atgggggacg gggctcctgg ccacctgtct cactcccatg 2940

gagtcaccta agccagctca gggcccctcc actcacaggg ctcaggcccc tgtccctctt 3000

gtgcactatt tattgctctc ctcaggaaaa tgacatcaca ggagtctacc tgcagctgga 3060

acctggccag ggctgaggct catgcaggga cactgcagcc ctgacccgct gcagatctga 3120

cctgctgcag cccgggctag ggtgggtctt ctgtactttg tagagatcgg ggctgttggt 3180

gctcaataaa tgtttgttta ttctcggtgg a 3211