(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0060956
(43) 공개일자 2010년06월07일

(51) Int. Cl.
A61K 31/66 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0119772
(22) 출원일자 2008년11월28일
심사청구일자 2008년11월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
황선욱
서울 서초구 방배본동 3277 방배아이파크APT 402-1006호
방상수
경기 광명시 하안4동 하안주공10단지 아파트 1011-502
(74) 대리인
이원희

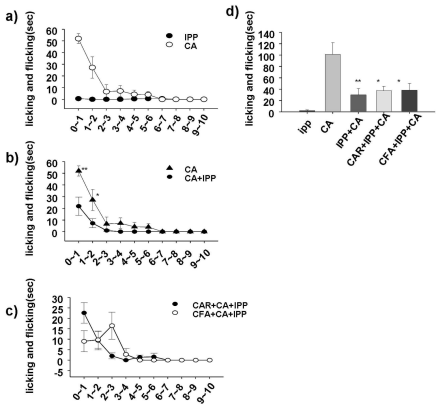
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) TRPA1 활성 억제 약물 및 이의 활용

(57) 요 약

본 발명은 TRPA1의 활성 억제제에 관한 것으로, 구체적으로 아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate)을 포함하는 TRPA1의 활성 억제제에 관한 것이다. 본 발명의 TRPA1의 활성 억제제는 TRPA1에 의해 발생할 수 있는 통증을 제어하므로 효과적이며 부작용이 적은 통증 치료제 개발을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M103KV010016-07K2201-01610, R01-2007-000-20493-0

부처명 과학기술부, 한국과학재단

연구사업명 뉴프론티어연구사업, 특정기초연구사업

연구과제명 감각이상 유발기전 및 제어기술 연구, 나노 서방출 시스템을 이용한 척추 디스크 통증 질환 치료제 개발 기반 연구

주관기관 고려대학교, 고려대학교

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일, 2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate)을 포함한 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)의 활성 억제제.

청구항 2

아이소펜테닐피로인산을 TRPA1을 발현하는 분리된 감각신경 세포에 처리하는 단계를 포함하는 TRPA1의 활성을 억제하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 10 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 TRPA1의 활성을 억제하는 방법.

청구항 4

1) TRPA1를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 TRPA1 특이적 활성제와 아이소펜테닐피로인산을 각각 처리하는 단계;

3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드 또는 아세트알데히드인 것을 특징으로 하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 7

아이소펜테닐피로인산을 포함한 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제용 조성물.

청구항 9

아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제용 약학적 조성물.

청구항 11

제 9항의 통증 억제용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 통증을 억제하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증을 억제하는 방법.

청구항 13

아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 개선용 건강식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TRPA1의 활성 억제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 생리학 및 약리학 분야의 연구를 통해 2003년에 말초감각신경섬유에 존재하는 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)이 발견되었다. 상기 TRPA1은 저온 자극, 염증성 자극 및 기계적 자극 등 다양한 자극을 감지하여 활성화되며, 상기 활성화에 의해 인체가 통증을 느끼게 된다. 특히 상기 TRPA1은 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체 군인 thermoTRP 군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다. 연구자들은 통각수용체 TRPA1의 기능을 명확히 규명함으로써 인체의 통각 기전을 밝히고, 아울러 TRPA1의 조절약물의 개발을 통해 통증 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측하고 있다.

[0003] 다양한 통증에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 현재까지 생체내에서의 통증 조절 물질에 대한 기전은 불명확하다. 염증시 발생하는 물질인 프로스타글라딘과 그 대사산물 및 알데하이드 류들은 생체내에서 발생하는 통증 유발 물질로 알려졌다. 동시에 생체내에서 만드는 통증 억제 물질에 대한 연구는 탐색된 바가 없다.

[0004] 상기 TRPA1의 활성화 억제를 기전으로하는 통증억제제 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPA1의 특성은 다음과 같다. TRPA1은 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각 신경세포 내부로 이동하고, 이에 의해 세포막 전류가 변화한다. 상기 세포막 전류의 변화에 의해 활동전압이 발생하고 이 전압신호가 궁극적으로 뇌로 전달되어 통증을 감지하는 것이다. 상기 TRPA1 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 팻취클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPA1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있

어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술 보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한 상기 TRPA1 활성화 측정 기술들은 동물의 감각신경 세포 배양기술, 세포주 배양기술, TRPA1 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPA1 특이적 억제제 후보물질들 및 표준 활성제를 TRPA1 과발현 세포에 각각 투여하고 TRPA1 활성화 억제 효과를 측정 및 비교함으로써, 억제제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 TRPA1을 발현하는 세포주를 제작하여 아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate) 및 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드 처리에 대한 반응을 비교한 결과, 상기 아이소펜테닐피로인산이 TRPA1 활성을 억제시키므로 TRPA1 통증 억제 물질로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)의 활성 억제제를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 아이소펜테닐피로인산을 이용하여 TRPA1의 활성을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 아이소펜테닐피로인산을 이용하여 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 통증 억제용 조성물을 이용하여 개체의 통증을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate)을 포함하는 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)의 활성 억제제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 이용하여 TRPA1의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은

[0016] 1) TRPA1를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0017] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 TRPA1 특이적 활성제와 아이소펜테닐피로인산을 각각 처리하는 단계;

[0018] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0019] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 통증 억제용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 통증을 억제하는 방법을 제공한다.

[0022] 아울러, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 아이소펜테닐피로인산(isopentenyl pyrophosphate)을 포함한 TRPA1의 활성 억제제를 제공한다.

[0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPA1 특이적 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 활성을 상기 아이소펜테닐피로인산이 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조). 또한, 아이소펜테닐피로인산이 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하는 것을 확인하였다(도 3 참조). 이에 상기 아이소펜테닐피로인산은 TRPA1의 활성 억제제로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0026] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0027] 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.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 TRPA1을 발현하는 분리된 감각신경 세포에 처리하는 단계를 포함하는 TRPA1의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPA1 특이적 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 활성을 상기 아이소펜테닐피로인산이 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조). 또한, 아이소펜테닐피로인산이 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하는 것을 확인하였다(도 3 참조). 이에 상기 아이소펜테닐피로인산은 TRPA1의 활성 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0030] 상기 아이소펜테닐피로인산을 10 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 TRPA1 억제제가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPA1 활성에 억제 효과를 나타내는 것을 시사한다(도 2 참조).

[0031] 또한, 본 발명은

[0032] 1) TRPA1를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0033] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 TRPA1 특이적 활성제와 아이소펜테닐피로인산을 각각 처리하는 단계;

[0034] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0035] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPA1 특이적 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 활성을 상기 아이소펜테닐피로인산이 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조). 또한, 아이소펜테닐피로인산이 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하는 것을 확인하였다(도 3 참조). 이에 상기 아이소펜테닐

피로인산은 TRPA1의 활성 억제제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0037] 상기 숙주세포는 이에 제한되는 것은 아니나, HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주 등의 이온 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주가 바람직하다.

[0038] 상기 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드, 아세트알데히드 등이 있다.

[0039] 상기 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0040] 상기 아이소펜테닐피로인산을 10 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 TRPA1 억제제가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPA1 활성에 억제 효과를 나타내는 것을 시사한다(도 2 참조).

[0041] 또한, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 포함한 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서 아이소펜테닐피로인산이 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하는 것을 확인하였다(도 3 참조). 이에 상기 아이소펜테닐피로인산은 통증 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0043] 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0044] 본 발명의 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 아이소펜테닐피로인산을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.

[0045] 본 발명에 따른 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 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 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0048] 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.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 통증 억제용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 통증을 억제하는 방법을 제공한다.

[0050] 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0051] 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, 근육내

주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 통증 억제용 조성물은 통증 억제를 위하여 상기 개체에 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0053] 아울러, 본 발명은 상기 아이소펜테닐피로인산을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

[0054] 상기 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

[0055] 본 발명의 상기 아이소펜테닐피로인산은 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 아이소펜테닐피로인산이 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.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

[0059] 본 발명의 TRPA1의 활성 억제제는 TRPA1에 의해 발생할 수 있는 통증을 제어하므로 효과적이며 부작용이 적은 통증 치료제 개발을 가능하게 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<실시예 1> TRPV 형질전환 세포주 제조**

[0063] HEK293T 세포주(ATCC CRL-11268)를 mTRPA1(서열번호 1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.

[0064] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 35 ㎜ 디쉬 당 3 ㎍의 mTRPA1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터 및 600 ng/웰의 pCDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene6(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/F12 배지에서 배양하고, 폴리-L-라이신 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.

[0065] **<실시예 2> 통계적 처리**

[0066] 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 < 0.05이었다.

[0067] **<실시예 3> TRPA1 억제제에 의한 TRPA1의 활성화 변화 조사**

[0068] **<3-1> 화합물질 처리**

[0069] 실시예 1의 방법으로 제조한 mTRPA1 형질전환 세포주(n=73)에 300 μM 신남알데히드(CA:cinnamaldehyde; MP Biomedicals, USA)를 처리한 후, 상기 CA 처리기간 중 일부 기간 동안, 100 μM 아이소펜테닐피로인산(Biomol, USA)을 함께 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 에탄올을 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다.

[0070] **<3-2> 칼슘 이미지화를 이용한 세포내 칼슘수준변화 측정**

[0071] 상기 실시예 3-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0072] 구체적으로, 0.02% 풀루로닉산(pluronic acid; Invitrogen, USA)을 포함하는 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기 실시예 3-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fluo-3AM(5 μM; Sigma aldrich, USA)을 37℃에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, LSM5 Pascal 공초점 현미경(Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 칼슘 이미지화(Calcium imaging)를 수행하였고, Carl Zeiss ratio tool software(Carl Zeiss, 독일)를 이용하여 저속촬영이미지(time-lapse image; 488 ㎚ 여기/514 ㎚ 방출)를 매 3초마다 저장하였다. 힐 플랏(Hill plot)에 의해 칼슘 유입 반응의 평균 수치 곡선을 작성하였다.

[0073] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 신남알데히드에 의한 TRPA1 특이적 활성이, 아이소펜테닐피로인산에 의해 억제되는 것을 확인하였다.

[0074] **<실시예 4> TRPA1 억제제 농도 의존적 TRPA1에 대한 활성 조사**

[0075] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPA1 형질전환 세포주(n=73-127)에 300 μM CA 및 1, 10 및 100 μM의 아이소펜테닐피로인산을 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 실시예 3-2의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0076] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 신남알데히드에 의한 TRPA1 특이적 활성이 아이소펜테닐피로인산에 의해 mTRPA1 세포주에서 농도의존적으로 활성을 억제하는 효과를 보였다.

[0077] **<실시예 5> 동물통증행동실험을 통한 TRPA1 억제제 통증억제 반응 조사**

[0078] **<5-1> 염증성 감작 유발**

[0079] 아이소펜테닐피로인산에 의한 염증성 감작(inflammatory sensitization) 반응의 억제를 관찰하기 위하여, 오른쪽 뒷발의 발바닥에 상기 아이소펜테닐피로인산의 주사 3 시간 전에 50 ㎕의 1% 카라기난(CAR:carrageenan;

Sigma aldrich, USA)을 주사하거나, 또는 상기 아이소펜테닐피로인산 주사 24 시간 전에 10 ㎕의 CFA(complete Freund's adjuvant; Sigma aldrich, USA)를 주사하였다. 또한, 신남알데히는 10 mM 신남알데히드를 부형액(PBS containing 0.5% Tween 80)에 희석하여 주사하였다. 실험에 앞서 쥐를 1 시간 동안 실험환경에 적응하도록 순화시켰으며, 부형액(3% DMSO 및 0.5% Tween 80을 포함하는 식염수) 및 아이소펜테닐피로인산(3 mM)을 포함하는 부형액 각각 10 ㎕ 를 쥐의 오른쪽 뒷발에 피내 주사하였다.

[0080] **<5-2> 급성 핥기/튀기기 행동 분석**

[0081] 하기 실험군의 뒷발 핥기/튀기기 행동(hindpaw licking/flicking behavior)에 걸린 시간을 Bandell M 외(*Neuron* 41:849-857, 2004) 및 Moqrich A 외(*Science* 307:1468-1472, 2005)의 방법에 따라 10분 동안 측정하였다.

[0082] 대조군 : 무처리;

[0083] 실험군 1. 100 μM의 아이소펜테닐피로인산;

[0084] 실험군 2. 300 μM CA;

[0085] 실험군 3. 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산;

[0086] 실험군 4. 50 ㎕의 CAR + 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산; 및,

[0087] 실험군 5. 10 ㎕의 CFA + 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산.

[0088] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 아이소펜테닐피로인산과는 달리 신남알데히드는 동물들의 행동 소요시간을 증가시켰고(도 3a), 이는 신남알데히드와 아이소펜테닐피로인산을 동시에 사용함으로서 행동 소요시간이 억제되었다(도 3b).

[0089] 또한, 카라기난 혹은 CFA를 주입한 염증조건에서의 신남알데히드는 동물들의 행동 소요시간 또한 아이소펜테닐피로인산 투여에 의해 억제되었다(도 3c 참조). 이러한 동물실험 결과를 10분간 반응한 시간을 모아서 분석한 결과 도3d와 같은 결과를 나타내었다.

[0090] 추가로, CAR 및 CFA만 단독으로 주입하였을 때 및 아이소펜테닐피로인산을 단독으로 주입하였을 때는 행동소요시간의 증가가 없었다(데이타 생략).

[0091] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0092] 1. 산제의 제조

[0093] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 2 g

[0094] 유당 1 g

[0095] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0096] 2. 정제의 제조

[0097] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 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] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 100 ㎎

[0104] 옥수수전분 100 ㎎

[0105] 유 당 100 ㎎

[0106] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

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

[0108] 4. 환의 제조

[0109] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 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] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 150 ㎎

[0116] 대두 추출물 50 ㎎

[0117] 포도당 200 ㎎

[0118] 전분 600 ㎎

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

[0120] **<제조예 2> 유제품의 제조**

[0121] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 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] 본 발명의 아이소펜테닐피로인산 1000 ㎎

[0125] 구연산 1000 ㎎

[0126] 올리고당 100 g

[0127] 매실농축액 2 g

[0128] 타우린 1 g

[0129] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0130] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 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, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방

하다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 mTRPA1 세포주에서 신남알데히드에 의한 TRPA1 특이적 활성이, 아이소펜테닐피로인산에 의해 억제되는 것을 나타낸 도이다(CA:신남알데히드).

[0132] 도 2는 mTRPA1 세포주에서 농도의존적으로 아이소펜테닐피로인산이 TRPA1 특이적 활성을 억제하는 것을 나타낸 도이다.

[0133] 도 3은 정상 조건과 염증성 조건에서의 신남알데히드에 의한 통증이 아이소펜테닐피로인산에 의해서 억제되는 것을 나타낸 도이다(CAR:카라기난, CFA:complete Freund's adjuvant):

[0134] a: 100 μM의 아이소펜테닐피로인산 및 300 μM CA;

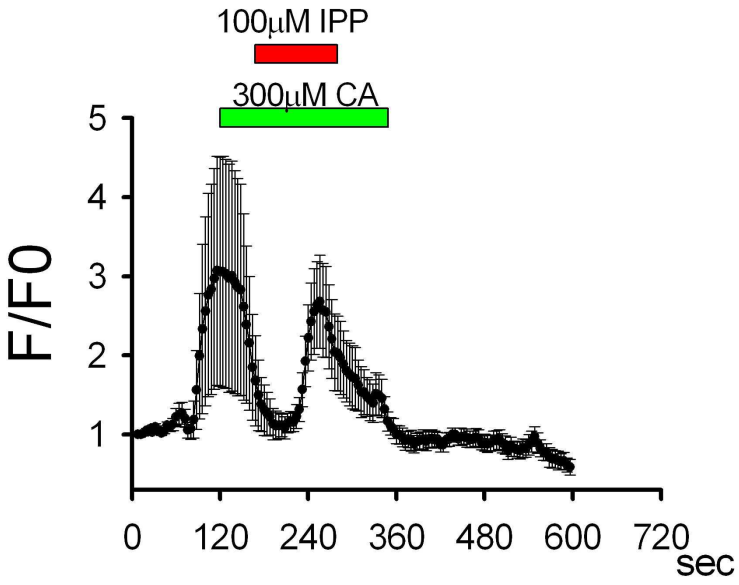
[0135] b: 300 μM CA 및 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산;

[0136] c: 50 ㎕의 CAR + 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산 및 10 ㎕의 CFA + 300 μM CA + 100 μM의 아이소펜테닐피로인산; 및,

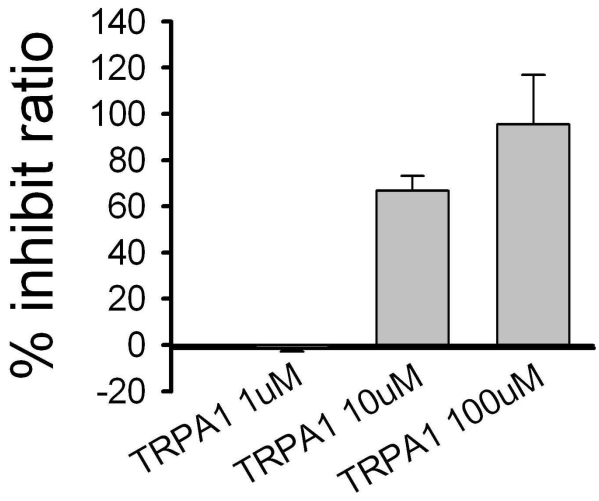
[0137] d: 도 3a 내지 3c의 10분간의 반응 결과를 총합한 히스토그램(CA 단독을 기준으로 각 소요시간을 T-test 통계로 처리한 결과).

도면

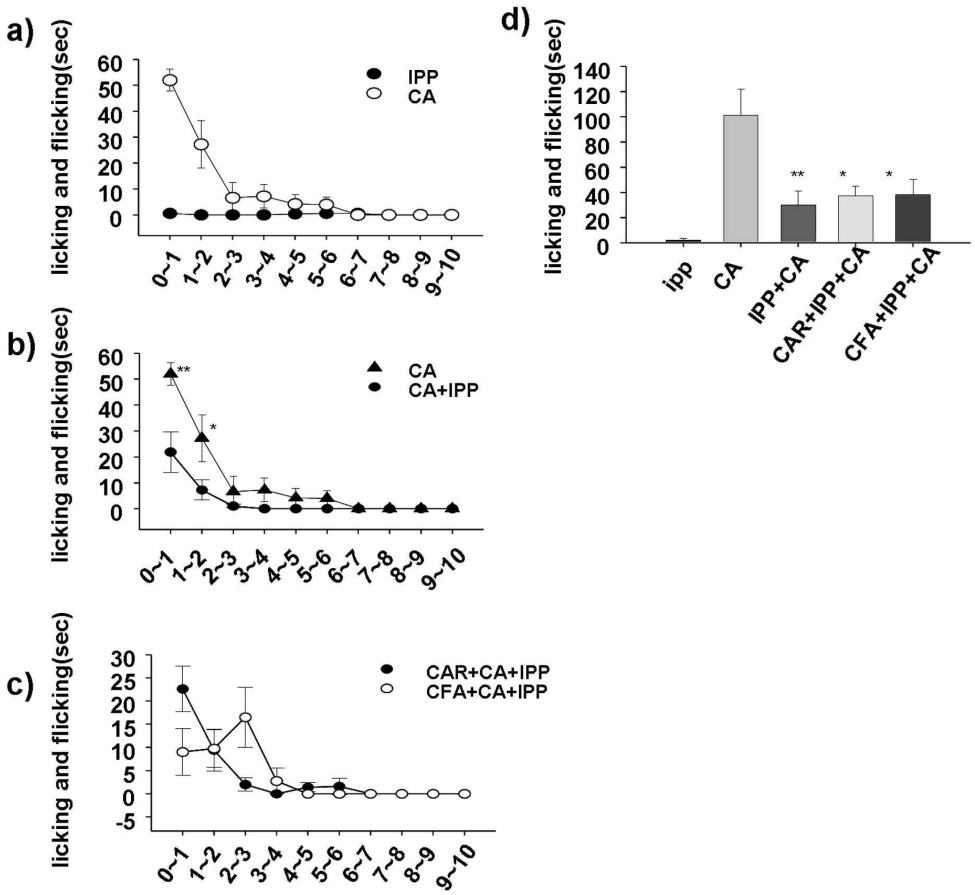
도면1



도면2


% inhibit ratio
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
TRPA1 1uM
TRPA1 10uM
TRPA1 100uM

도면3


a)
licking and flicking(sec)
IPP
CA
b)
CA
CA+IPP
c)
CAR+CA+IPP
CFA+CA+IPP
d)
licking and flicking(sec)
ipp
CA
IPP+CA
CAR+IPP+CA
CFA+IPP+CA

서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY Industry & Academy Collaboration Foundation
<120> A compound for inhibiting TRPA1 function and use thereof

<130> 8p-10-58

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 4263
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTRPA1

<400> 1
gcgccagccg gcgtccaggt ggagtcaatg aagcgcggct tgaggaggat tctgctcccg 60

gaggaaagga aggaggtcca gggcgttgtc tatcgcggcg tcggggaaga catggactgc 120

tccaaggaat cctttaaggt ggacattgaa ggagatatgt gtagattaga agacttcatc 180

aagaaccgaa gaaaactaag caaatatgag gatgaaaatc tctgtcctct gcatcacgca 240

gcagcagaag gtcaagttga actgatggaa ctgatcatca atggttcttc gtgtgaagtg 300

ctgaatataa tggatggtta tggaaatacc ccactgcatt gtgctgcaga aaaaaatcaa 360

gttgaaagtg taaagtttct tctcagccaa ggagcaaatc caaacctccg aaatagaaac 420

atgatgtcac cccttcacat agctgtgcat ggcatgtaca acgaagtgat caaggtgttg 480

actgagcaca aggccactaa catcaattta gaaggagaga atgggaacac ggctttgatg 540

tccacgtgtg ccaaagacaa cagtgaagct ttgcaaattt tgttagaaaa aggagctaag 600

ctgtgtaaat caaataagtg gggagactac cctgtgcacc aggcagcatt ttcaggtgcc 660

aaaaaatgca tggaattaat cttagcatat ggtgaaaaga acggctacag cagggagact 720

cacattaatt ttgtgaatca caagaaagcc agccctctcc acctagcagt tcaaagcgga 780

gacttggaca tgattaagat gtgcctggac aacggtgcac acatcgacat gatggagaat 840

gccaaatgca tggccctcca ttttgctgca acccagggag ccactgacat cgttaagctc 900

atgatctcat cctataccgg aagtagtgat attgtgaatg cagttgatgg caatcaggag 960

accctgcttc acagagcctc gttatttgat caccatgacc tggcagaata cctaatatca 1020

gtgggagcag acatcaacag cactgattct gaaggacgct ctccacttat tttagcaaca 1080

gcttctgcat cctggaacat tgtgaatttg ctcctctgta aaggtgccaa agtagacata 1140

aaagatcatc ttggacgtaa ctttttgcat ttgactgtgc agcagcctta tggactaaga 1200

aatttgcggc ctgagtttat gcagatgcaa cacatcaaag agctggtgat ggatgaagac 1260

aatgacggat gcacacctct ccattatgcc tgtaggcagg gggttcctgt ctctgtaaat 1320

aacctccttg gcttcaatgt gtccattcat agcaaaagta aagataagaa gtcgcccctg 1380

cattttgcag ccagttatgg gcgcatcaat acatgtcaga gacttctgca agacataagt 1440

gatacgaggc ttttgaatga aggggatctc catgggatga cccctctcca cctggcagca 1500

aaaaatgggc atgataaagt cgttcaactc cttctgaaga aaggggcctt atttctcagt 1560

gaccacaatg gctggactgc tttgcatcac gcctccatgg gtgggtacac tcagaccatg 1620

aaggtcattc ttgatactaa cttgaaatgc acagaccgac tagatgaaga agggaacaca 1680

gcactccact ttgcagcacg ggaaggccat gccaaggctg ttgcaatgct tttgagctac 1740

aatgctgaca tcctcctgaa caagaagcaa gcttcctttc tgcatattgc cctgcacaat 1800

aagcgcaagg aagtggttct cacaaccatc agaaataaaa gatgggatga gtgtcttcaa 1860

gttttcactc ataattctcc aagcaatcga tgtccaatca tggagatggt agaatacctc 1920

cccgagtgca tgaaagttct tttagatttc tgcatgatac cttccacaga agacaagtcc 1980

tgtcaagact accatattga gtataatttc aagtatctcc aatgcccatt atccatgacc 2040

aaaaaagtag cacctaccca ggatgtggta tatgagcctc ttacaatcct caatgtcatg 2100

gtccaacata accgcataga actcctcaac caccctgtgt gtagggagta cttactcatg 2160

aaatggtgtg cctatggatt cagagcccat atgatgaacc taggatctta ttgtcttggt 2220

ctcataccca tgacccttct tgttgtcaaa atacagcctg gaatggcctt caattctact 2280

ggaataatca atggaactag tagtactcat gaggaaagaa tagacactct gaattcattt 2340

ccaataaaaa tatgtatgat tctagttttt ttatcaagta tatttggata ttgcaaagaa 2400

gtgatccaaa ttttccaaca gaaaaggaat tacttcctgg attacaacaa tgctctggaa 2460

tgggttatct atacaactag tatcatcttc gtgttgccct tgttcctcaa catcccagcg 2520

tatatgcagt ggcaatgtgg agcaatagcg atattcttct actggatgaa cttcctactg 2580

tatcttcaaa ggtttgagaa ctgtggaatt ttcattgtta tgttggaggt gatttttaaa 2640

acattgctga gatcgaccgg agtgtttatc ttcctcctac tggcttttgg cctcagcttt 2700

tatgttctcc tgaatttcca agatgccttc agcaccccat tgctttcctt aatccagaca 2760

ttcagtatga tgctaggaga catcaattat cgagatgcct tcctagaacc attgtttaga 2820

aatgagttgg catacccagt cctgaccttt gggcagctta ttgccttcac aatgtttgtc 2880

ccaattgttc tcatgaactt actgattggc ttggcggttg gggacattgc tgaggtccag 2940

aagcatgcgt cattgaagag gattgctatg caggtggaac ttcataccaa cttagaaaaa 3000

aagctgccac tctggtactt acgcaaagtg gatcagaggt ccaccatcgt gtatccaaat 3060

agacccaggc acggcaggat gctacggttt tttcattact ttcttaatat gcaagaaaca 3120

cgacaagaag taccaaacat tgacacatgc ttggaaatgg aaatattgaa acagaaatat 3180

cggctgaagg acctcacttc cctcttggaa aagcagcatg agctcatcaa actcatcatc 3240

cagaagatgg agatcatctc agagacagaa gatgaagata accattgctc tttccaagac 3300

aggttcaaga aggagaggct ggaacagatg cacagcaagt ggaattttgt cttaaacgca 3360

gttaagacta aaacacattg ttctattagc cacccggact tttagttctg tgtcttatgg 3420

gagtgggaga ctgctttaca tacttatttc agtgaatttc agtttggaaa agagcaaaga 3480

aacagaaagt tgactaacat tgctgcatgg agatcctagt tcctgcaacc tcacccatac 3540

atatgctcat atttcctgtc aattactatg tattgagaag atcctttctg acatgttcaa 3600

tttgaacatg aaggatagtc tctttcgagt gaataaaaac cagggttgtt ggaatgcata 3660

ttatggagga taagaattaa tgtaactatt aaggcagaac acaactacat aatacaagat 3720

gcatataatt ccaagtatta tatttaatct cctaccatgt taaaccttcc tgtgttataa 3780

cctgtctggg acactataat ctctgttcct actatgatta gatcatagtc tcaccctcct 3840

cgtcccatca cacatgacat cattttgagc cacatgacag aagtcctagt tagtagactg 3900

tgataagtat gaatgttaca atagaaatgt gttcccttag tgttcatcag ttgtgatggt 3960

ttaaatgaga aacgttgccc acagactcat acatttaaac ccttagtccc agttgttgct 4020

gctgcttagg ggggccacac agccttgctt gctctctcct ttctgagtgt ggagagaaat 4080

gtgatcagta agactcctgc tcctgctgcc atgctcttta ttccattatg gacttcttct 4140

gaaactgcaa gcagaaattc actgttcctt cctcaaattt cttttggtca tggtattata 4200

tcatagcaac agaaactaac ttatgtacca atggtcttaa taaagaataa agcctgtaca 4260

gtc 4263