



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0012135
(43) 공개일자 2015년02월03일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/167</i> (2006.01) <i>A61K 31/16</i> (2006.01)
 <i>A61P 25/00</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0087591
 (22) 출원일자 2013년07월24일
 심사청구일자 2013년07월24일</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 (72) 발명자
 황선옥
 서울특별시 서초구 효령로33길 50, 102동 102호 (방배동, 방배 서리풀 e-편한세상)
 양태진
 서울특별시 송파구 백제고분로28길 20-19, 201호 (삼전동, 한양골든빌라)
 유성재
 서울특별시 용산구 청파로85가길 10-6 (서계동)
 (74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 7 항

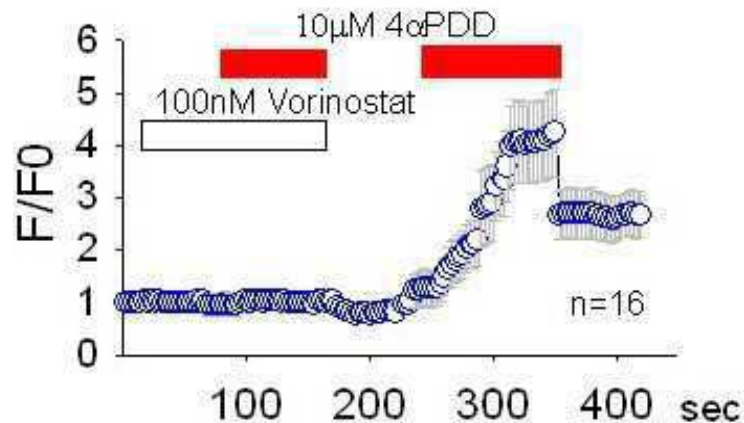
(54) 발명의 명칭 **TRPV4 활성 억제제로서의 vorinostat의 용도**

(57) 요약

본 발명은 TRPV4 활성 억제제로서의 vorinostat의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 Vorinostat(SAHA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, Vorinostat를 이용하여, TRPV4에서 저삼투압 통증을 효과적으로 억제할 수 있어, 통증억제제 또는 통증억제용 건강식품 개발에 매우 유용하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A11137312020000100

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 [2차년도] 신종 통각유전자 PNT ion channel의 진동타겟 검증 및 제어기술 기반 연구

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2012.11.01 ~ 2013.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013022990

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자-기본(추가지원)

연구과제명 새로운 촉각수용체의 발굴 및 이의 기능 탐구

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 Vorinostat(SAHA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 통증은 TRPV4 활성화에 의해 일어나는 저삼투압 통증인 것을 특징으로 하는 통증 억제용 조성물.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법;

- (a) TRPV4를 코딩하는 유전자로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계;
- (b) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성제와 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성제와 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 각각 처리하고, 실험군과 대조군의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제를 선별하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 단계 (b)의 TRPV4 특이적 활성제는 4 α PDD(4 α -phorbol 12,13-didecanoate)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 단계 (b)의 TRPV4 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 단계 (b)의 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.03 내지 10 μ M의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 7

Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

본 발명은 TRPV4 활성 억제제로서의 vorinostat의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 TRPV4(transient

[0001]

receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 Vorinostat(SAHA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [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 저삼투압 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 TRPV4가 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 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 4 α PDD(4 α 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 의한 것인지를 규명하기가 어렵다. 이러한 문제점으로 인해 TRPV4를 특이적으로 억제할 수 있는 억제제의 개발이 필요하며 이 억제제는 효과적인 통증 경감에 활용될 것으로 보인다.
- [0005] Vorinostat(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)는 악성종양 세포주기를 정지시켜 종양억제 효과 또는 종양 전이를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려진 물질이나(WO2008106524), TRPV4의 활성을 조절한다는 것과 통증을 억제하는 사실은 알려진 바 없다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 TRPV4 활성을 조절하여, 통증억제효과를 나타내는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, TRPV4를 발현하는 세포주에서, Vorinostat가 TRPV4 활성을 억제하여, TRPV4 활성화에 의해 유래되는 저삼투압 통증을 효과적으로 억제하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 TRPV4 활성을 조절하여, 통증억제효과를 나타내는 물질을 포함하는 통증억제용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 TRPV4 활성 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 TRPV4 활성을 조절하여, 통증억제효과를 나타내는 물질을 포함하는 통증억제용 건강기능 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 Vorinostat(SAHA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물을 제공

한다.

[0011] 또한, 본 발명은 (a) TRPV4를 코딩하는 유전자로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계; (b) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성화제 와TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성화제와 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 각각 처리고, 실험군과 대조군의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제를 선별하는 단계.를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, Vorinostat를 이용하여, TRPV4에서 저삼투압 통증을 효과적으로 억제할 수 있어, 통증억제제 또는 통증억제용 건강식품 개발에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 HEK293 세포주에서 4aPDD에 의해 유도된 TRPV4 활성이 Vorinostat에 의해 억제되는 것을 칼슘 이미지화 방법으로 확인한 그래프이다(PDD: 4aPDD, Vorinostat).

도 2는 Vorinostat가 TRPV4를 농도 의존적으로 억제하는 것을 칼슘 이미지화를 통한 Hill-plot으로 확인한 것이다.

도 3은 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포에서 4aPDD에 의해 유도된 TRPV4 활성이 Vorinostat에 의해 억제되는 것을 칼슘 이미지화 방법으로 확인한 것이다(PDD: 4aPDD, Vorinostat).

도 4는 급성 발 플린치 행동 검사법을 수행한 결과, TRPV4 활성화제이자 통증을 유발시키는 물질인 DMAPP를 주입시 플린치 횟수가 증가한 데 반해 Vorinostat의 동시 주입 군에서는 플린치 횟수가 줄어드는 것을 확인한 것이다.

도 5는 급성 발 플린치 행동 검사법을 수행한 결과, 염증매개인자인 PGE2 주입시 플린치 횟수가 증가한 데 반해 Vorinostat의 동시 주입 군에서는 플린치 횟수가 줄어드는 것을 확인한 도이다.

도 6은 Von frey, Randall Sellito, Hargreaves를 통한 행동 검사법을 수행한 결과, 4aPDD와 염증유발성 물질인 CFA를 주입시 Von frey에 의한 통증, Randall Sellito 압력 세기, Hargreaves 열에 의한 intensity크기가 증가한 데 반해 Vorinostat의 동시 주입 군에서는 Von frey에 의한 통증, Randall Sellito 압력 세기, Hargreaves 열에 의한 intensity크기가 줄어드는 것을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

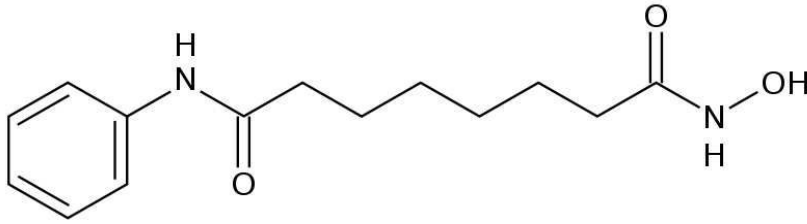
[0015] 일 관점에서, 본 발명은 TRPV4(transient receptor potential vanilloid 4)의 활성을 억제하는 Vorinostat(SAHA) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서, 상기 통증은 TRPV4 활성화에 의해 일어나는 저삼투압 통증인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 Vorinostat는 SAHA(eroylanilide hydroxamic acid)라고도 불리는 물질로, 히스톤 디아세틸레이즈(histone deacetylases,HDAC)를 저해하는 활성이 있는, HDI(histone deacetylase inhibitors)로 알려져 있으며, 화학식 1의 구조를 갖는다.

[0018] Vorinostat는 Zolanza라는 상품명으로 판매되고 있으며, CTCL(cutaneous T cell lymphoma) 치료제로 미국 FDA에서 승인을 받은 화합물이다.

화학식 1



본 발명에서는 상기 vorinostat의 통증억제제로서의 용도를 확인하였다.

본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4를 과발현하는 형질전환 세포 및 TRPV4를 발현하는 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포에서, TRPV4 특이적 활성제로 알려진 4 α PDD(4 α -phorbol 12,13-didecanoate)에 의해 증가된 활성을 상기 Vorinostat가 억제하는 것을 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술의 일종인 칼슘 이미징화로 확인하였다(도 1 및 도 3). 또한, 본 발명의 Vorinostat는 nanomole (nM) 농도의 범위에서 농도 의존적으로 TRPV4를 억제하는 효과를 보였으며 TRPV4에 대한 EC₅₀(effective concentration 50%; 50% 효과 농도)은 대략 28 nM이었고, N 값은 대략 2.88이었다(도 2 참조). 아울러, Vorinostat가 동물모델에서 TRPV4 활성을 기반으로 하는 저삼투 기계적 자극에 대한 통증감수성이 억제됨을 확인하였다(도 5). 이에, 상기 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 통증 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

상기 저삼투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.

상기 Vorinostat는 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(tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 vorinostat은 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 조제될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

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

경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타폴라스마제의 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 봉해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크틸린 칼슘

등이 있다.

- [0027] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [0028] 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 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.
- [0029] 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.
- [0030] 다른 관점에서, 본 발명은 TRPV4를 발현하는 분리된 감각신경 세포에 상기 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV4의 활성을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 Vorinostat에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3). 이에 상기 Vorinostat는 TRPV4의 활성 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.
- [0032] 또한, 약제학적으로 유효한 양의 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 저삼투압 통증을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 Vorinostat에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3). 또한, Vorinostat가 동물모델에서 TRPV4 활성을 기반으로 하는 저삼투 기계적 자극에 대한 통증감수성이 억제됨을 확인하였다(도 5). 이에 상기 Vorinostat는 통증 억제에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.
- [0034] 상기 저삼투압 통증은 TRPV4 활성을 기반으로 하는 것을 나타낸다.
- [0035] 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 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 통증 억제를 위하여 상기 개체에 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약제학적으로 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 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 1일 400mg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수 있다.
- [0037] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) TRPV4를 코딩하는 유전자로 형질전환된 형질전환체를 제조하는 단계; (b) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPV4 특이적 활성제와 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하고(실험군), 대조군으로 상기 TRPV4 특이적 활성제와 Vorinostat 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 각각 처리하고, 실험군과 대조군의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPV4 활성을 나타내는 TRPV4 활성 억제제를 선별하는 단계.를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TRPV4 활성제로 알려진 4αPDD에 의해 증가된 활성이 상기 Vorinostat에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조). 이에 상기 Vorinostat는 TRPV4의 활성 억제제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)의 TRPV4 특이적 활성제는 4αPDD(4α-phorbol 12,13-didecanoate)인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 단계 (b)의 TRPV4 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의

해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 본 발명에서, 상기 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.1 내지 1000 μM 의 농도로 처리하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 내지 100 μM 의 농도로 처리하고, 가장 바람직하게는 1 μM 내지 30 μM 의 농도로 처리한다.

[0041] 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.

[0042] 상기 RPV4 활성 억제제 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 리간드, 앵타머(aptamer), 효소, 단백질, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 Vorinostat 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 저삼투압 통증 개선용 건강식품에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 상기 Vorinostat는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 Vorinostat를 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.

[0045] 본 발명의 건강식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 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.

[0046] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 소세지, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

[0047] 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 과일주스, 과일주스 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.

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0049] <실시예 1> TRPV 형질전환 세포주 제조

[0050] HEK293 세포주(ATCC CRL-11268)를 mTRPV4(서열번호 1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.

[0051] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 well plate 당 0.55 μg 의 mTRPV4의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 GFP 벡터 및 0.2 μg /웰의 pCDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Eugene HD(Roche Diagnostics, 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24 시간 동안 CO₂ 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.

[0052] <실시에 2> 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포 준비

[0053] 차가운 PBS에서 성체 ICR계 생쥐(6주령 수컷, 한림실험동물연구소, 한국)의 DRG(dorsal root ganglia)를 분리하여 세절한 후, 3mg/ml 콜라게나아제 타입 2(collagenase type 2; Invitrogen, 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/ml 2.5S NGF(calbiochem, USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 48 내지 72시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0054] <실시에 3> 칼슘 이미지화를 이용한 세포내 칼슘수준변화 측정

[0055] 실시예 1에서 제조한 mTRPV4 형질전환 세포주에 100 nM Vorinostat(Sigma-Aldrich, 미국)를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 4 aPDD(Sigma-Aldrich, 미국)를 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0056] 구체적으로, 0.02% 플루로닉산(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 Fura3-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.

[0057] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 Vorinostat는 TRPV4 활성화를 억제함을 확인하였다.

[0058] <실시에 4> TRPV4의 Vorinostat 농도 의존적 반응 조사

[0059] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV4 형질전환 세포주에 0.1 내지 100000 nM Vorinostat를 각각 처리한 후, 실시예 3의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다. 이후, 측정값을 Hill-plot을 이용하여 농도-반응 곡선으로 작성하였다.

[0060] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 Vorinostat의 TRPV4에 대한 EC₅₀(effective concentration 50%; 50% 효과 농도)은 대략 28 nM이었고, N 값은 대략 2.88이었다. 이것은 Vorinostat가 나노몰라 농도의 범위에서 TRPV4에 활성 효과를 나타내는 것을 지시한다.

[0061] <실시에 5> 감각 신경세포의 Vorinostat 특이적 반응 조사

[0062] 실시예 2에서와 같이 분리된 감각 신경세포에 100nM Vorinostat를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 4 aPDD를 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0063] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 Vorinostat는 DRG 감각 신경세포에서도 TRPV4 활성화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0064] <실시에 7> 동물 통증행동실험을 통한 Vorinostat 통증억제 반응 조사

[0065] <7-1> 염증성 감각 유발

[0066] Vorinostat에 의한 염증성 감각(inflammatory sensitization) 반응을 관찰하기 위하여, 오른쪽 뒷발의 발바닥에 상기 Vorinostat 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 ml를 쥐의 오른쪽 뒷발에 피내 주사하였다.

- [0067] 대조군: 무처리;
- [0068] 실험군 1: 100 μ M 의 Vorinostat;
- [0069] 실험군 2: DDW + 100 ng PGE2;
- [0070] 실험군 3: 100 μ M Vorinostat + DDW + 100 ng PGE2.

[0071] <7-2> 급성 침해성 행동(발 플린치 행동) 분석

- [0072] 급성 발 플린치 행동(hindpaw flinching behavior)한 횟수를 10분 동안 측정하였다.
- [0073] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 DDW + 100ng PGE2의 경우 쥐가 발을 들어 바닥에 닿지 못하는 횟수가 증가한데 반해 Vorinostat을 같이 투여한 쥐의 경우 그 횟수가 현저히 줄어들었음을 확인하였다.

[0074] <7-3> Von frey, Randall Sellito, Hargreaves를 통한 행동 검사법

- [0075] 본 발명의 실시예에서, 각 데이터는 각 배양으로부터 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(standard error)로 나타냈다. T-검정 : 등분산 가정 두 집단을 이용하여 Fluo-3 Ca²⁺ imaging 실험 반응값, licking/flicking 시간, flinch 개수, Von frey 시간, Randall Sellito 압력 세기 측정, Hargreaves 열에 의한 intensity 측정을 분석하였다. 또한, ***P < 0.001, **P < 0.01 및 *P < 0.05 이었다.
- [0076] Von frey, Randall Sellito, Hargreaves를 통한 행동 검사법을 수행한 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, 4 α PDD와 염증유발성 물질인 CFA를 주입시 Von frey에 의한 통증, Randall Sellito 압력 세기, Hargreaves 열에 의한 intensity크기가 증가한 데 반해 Vorinostat의 동시 주입 군에서는 Von frey에 의한 통증, Randall Sellito 압력 세기, Hargreaves 열에 의한 intensity크기가 줄어드는 것을 확인하였다.

[0077] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

- [0078] 1. 산제의 제조
- | | | |
|--------|------------|-----|
| [0079] | vorinostat | 2 g |
| [0080] | 유당 | 1 g |
- [0081] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- [0082] 2. 정제의 제조
- | | | |
|--------|------------|--------|
| [0083] | vorinostat | 100 mg |
| [0084] | 옥수수전분 | 100 mg |
| [0085] | 유당 | 100 mg |
| [0086] | 스테아린산 마그네슘 | 2 mg |
- [0087] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

- [0088] 3. 캡슐제의 제조
- | | | |
|--------|------------|--------|
| [0089] | vorinostat | 100 mg |
| [0090] | 옥수수전분 | 100 mg |
| [0091] | 유당 | 100 mg |
| [0092] | 스테아린산 마그네슘 | 2 mg |

[0093] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0094] 4. 환의 제조

[0095] vorinostat 1 g

[0096] 유당 1.5 g

[0097] 글리세린 1 g

[0098] 자일리톨 0.5 g

[0099] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0100] 5. 과립의 제조

[0101] vorinostat 150 mg

[0102] 대두 추출물 50 mg

[0103] 포도당 200 mg

[0104] 전분 600 mg

[0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0106] <제조예 2> 유제품의 제조

[0107] 본 발명의 Vorinostat 및 이의 유사체 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0108] <제조예 3> 음료의 제조

[0109] 1. 건강음료의 제조

[0110] vorinostat 1000 mg

[0111] 구연산 1000 mg

[0112] 올리고당 100 g

[0113] 매실농축액 2 g

[0114] 타우린 1 g

[0115] 정제수를 가하여 전체 900 ml

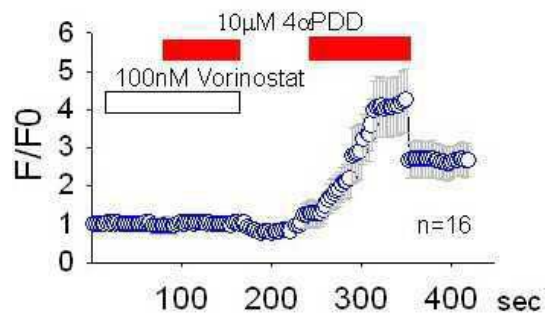
[0116] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0117] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시의 일예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다

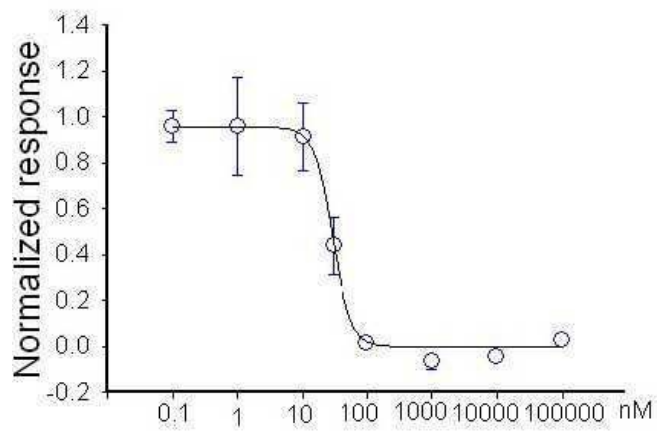
고 할 것이다.

도면

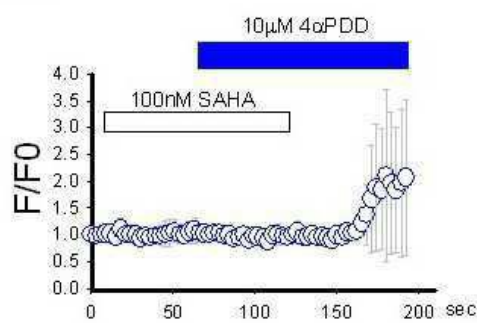
도면1



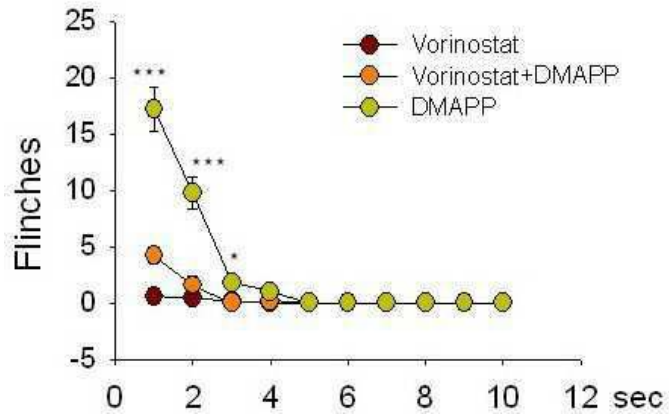
도면2



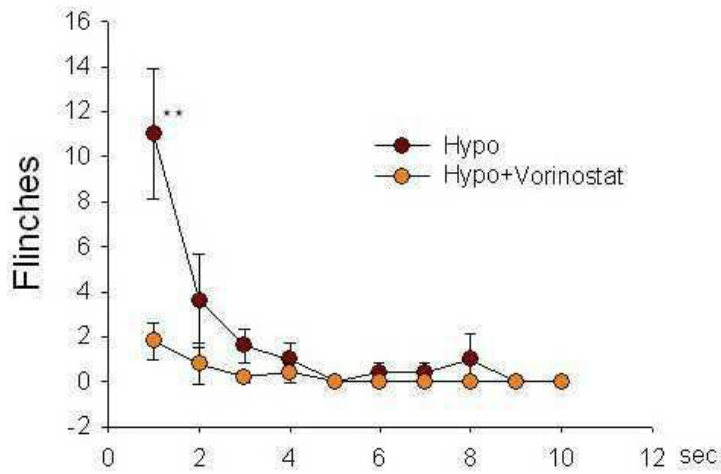
도면3



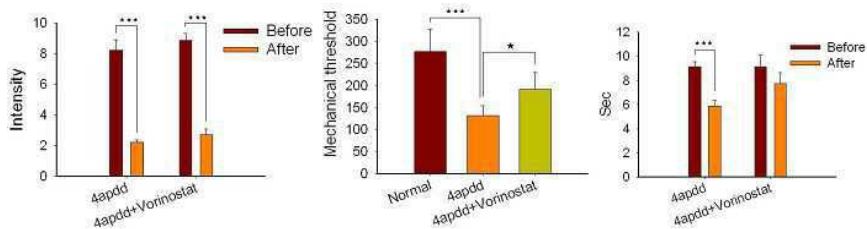
도면4



도면5



도면6a



도면6b

