

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0078981 (43) 공개일자 2012년07월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 31/202</i> (2006.01) <i>A61K 31/19</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 29/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0000309 (22) 출원일자 2011년01월03일 심사청구일자 2011년01월03일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 황선옥 서울특별시 서초구 동광로3길 18, 402동 1006호 (방배동, 방배 아이파크) 방상수 경기도 광명시 하안로 320, 하안주공10단지아파트 1011동 502호 (하안동) (74) 대리인 한양특허법인

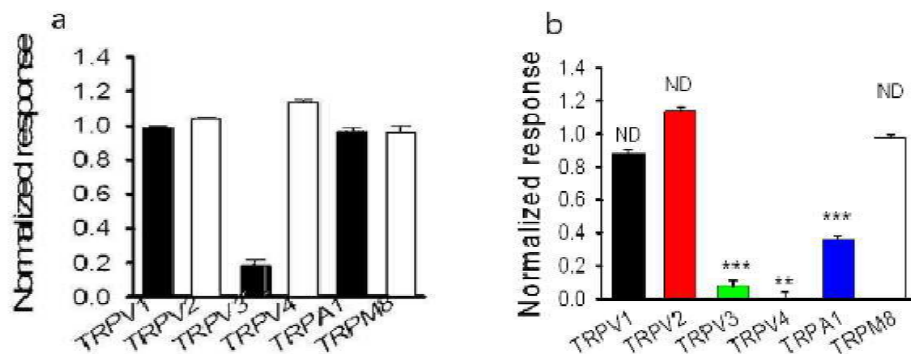
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **TRPV3 활성 억제제를 이용한, 통증 억제용 조성물, 통증 억제 방법 및 통증 억제제 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 피부 세포에 발현하는 통증수용체 TRPV3 이온 채널을 특이적 타겟으로 하는 통증 억제제에 관한 것으로, 구체적으로 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 TRPV3에 의해 야기되는 통증을 제어하고 부작용이 적은 통증 치료제 개발을 가능하게 한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	E00457
부처명	한국학술진흥재단
연구사업명	신진교수연구지원
연구과제명	비홍분성 세포에서의 thermoTRP 역할규명 및 작용약물 적용을 통한 세포 기능 조절
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100016133
부처명	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-기본(유형I)
연구과제명	Mevalonate pathway 신호경로의 TRP연관성 말초통증 조절 기전에 관한 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제용 조성물.

청구항 3

약학적으로 유효한 양의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 통증 억제 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제 방법.

청구항 5

- 1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- 2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성화제와 피검물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성화제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물, 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 단계 2)의 TRPV3 특이적 활성화제는 캄파, 멘톨, 2-APB로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것인 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 10

TRPV3을 발현하는 피부 세포에 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 TRPV3 활성 억제 방법.

청구항 11

- 1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- 2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 TRPV3 활성 억제제 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물, 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 단계 2)의 TRPV3 특이적 활성제는 캄파, 멘톨, 2-APB로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것인 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 15

17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 통증 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 TRPV3 활성 억제제를 통한 통증 억제용 조성물, 통증 억제 방법 및 통증 억제제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체 생리학 및 유전학 분야의 연구를 통해 인체에 존재하는 TRPV3 (transient receptor potential vanilloid 3)가 2002년에 발견되었고, 다양한 조직에서 생존유지에 필수기능을 수행할 것으로 예측되었다. 상기 TRPV3은 외부의 자극을 감지하는 피부 세포 및 감각 신경 세포에 발현되어 있으며, 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체군인 thermoTRP군 (temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다.

[0003] 통각수용체 TRPV3의 기능을 명확히 규명하고 이를 제어함으로써 통증질환 및 피부 질환 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측되고 있다. 따라서 상기 TRPV3의 기능 규명과 조절 약물 개발을 위해서 TRPV3의 활성을 조절할 수 있는 특이적인 조절제 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 상기 TRPV3의 조절제 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPV3 수용체의 특성은 다음과 같다. TRPV3은 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각 신경 세포 또는 피부 세포 내부로 이동하고, 칼슘의존적인 신호 전달 체계가 발생한다.

[0005] 또한 TRPV3은 33℃ 이상의 온도에 반응하며, 온도 자극에 의한 통증 또는 피부질환을 매개할 것으로 예상된다. 피부의 경우 이러한 칼슘 신호 전달 체계는 세포의 성장과 분화를 조절하고, 궁극적으로는 세포의 운명을 결정한다.

[0006] 상기 TRPV3의 활성화를 측정하는 기술로는 첫째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 패치클램프 전기생리학 기술과, 둘째, TRPV3가 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포 내 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 상기한 TRPV3 활성화 측정 기술들은, 세포주 배양기술, TRPV3 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPV3 활성의 특이적 조절제 후보물질들을 TRPV3 과발현 세포에 투여하여 TRPV3 활성화를 측정함으로써 조절제 여부 및 그 강도를 측정할 수 있다.

[0007] 또, 피부 세포와 신경 세포와의 연관 관계는 염증성 통증이나 만성 통증에 있어 매우 중요한 메커니즘으로 알려져 있다. 칼슘유입에 의하여 활성화된 피부 세포에서 분비되는 염증 유발 물질은 신경세포를 흥분시켜 급성 통증을 유발한다. 장기적인 신경의 흥분으로 인해서는 신경 자체에서 substance P 또는 CGRP 와 같은 신경성 염증 유발 물질이 역방향으로 분비되어 피부 세포를 재차 활성화시키는 악순환 고리를 형성한다. 이러한 신경과 피부조직 간의 상호 피드백 작용을 통해 만성적인 통증성 질환을 유발하는 것으로 알려져있다. 그러므로 통증을 완화하는데 있어서 감각 신경 세포와 피부 세포의 활성화를 억제함으로써 효율적으로 통증을 억제할 수 있다고 보인다.

[0008] 일반적인 레졸빈 D1은 7S, 8R, 17S-트리하이드록시-4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E, 19Z-도코사헥사에노익에시드를 의미한다. 이는 15- 및 5-지방산산화효소에 의한 DHA의 산화에 의해 생리적으로 생성되는 오메가3 지방산 대사체이다. 다만 레졸빈 D1에 아스피린을 처리하는 인위적 조작을 통해 17R 형태의 에피머를 제조할 수 있고, 이를 17R 레졸빈 D1이라고 부른다.

[0009] 상기 17R 레졸빈 D1은 급성 염증의 초기 반응인 인간 다핵성 백혈구 (polymorphonuclear leukocyte; PMNL)가 혈관 내피 세포를 따라 이동하는 것을 30 nM의 EC₅₀으로 감소시킨다. 또한 복막염에 걸린 뮌친 모델에서 백혈구 침투를 농도 의존적으로 감소시키고, 10-100 ng을 투여했을 때에는 최대 35%까지 억제한다. 다만, 현재까지 17R 레졸빈 D1이 TRPV3의 활성을 특이적으로 조절한다는 것은 알려진 바 없다.

[0010] 이에 본 발명자들은 TRPV3을 표적으로 하는 통증 억제제를 찾고자 연구하던 중, 17R 레졸빈 D1을 TRPV3를 발현하는 세포주에 처리한 결과, TRPV3의 활성화를 억제하여 세포 내부로의 칼슘 유입을 차단하는 것을 확인하였으며, 염증이 유발된 동물 개체의 행동실험에서도 TRPV3 매개 통증인 열자극 통증의 반응 역치가 17R 레졸빈 D1 투여에 의해 정상 수준으로 회복됨을 확인하였다. 또한, 17R 레졸빈 D1은 TRPV3만 억제하여 특이성에서 장점이 있는 것을 확인하였다. 종합하면 17R 레졸빈 D1이 TRPV3 매개의 통증을 억제하므로, TRPV3 관련 통증에 대한 억제 물질로 유용하게 사용될 수 있다는 것을 인식하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 이용하여 통증 억제용 조성물, 통증 억제 방법 및 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 이용한 TRPV3 활성 억제 방법 및 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 이용한 통증 개선용 건강 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 함유하는 통증 억제용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 통증 억제 방법을 제공한다.
- [0016] 또, 본 발명은
- [0017] 1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0018] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 피검물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;
- [0019] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0020] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0021] 또, 본 발명은 TRPV3을 발현하는 감각 신경 세포 또는 피부 세포에 17R 레졸빈 D1을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV3 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0022] 또, 본 발명은
- [0023] 1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0024] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;
- [0025] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0026] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 포함하는 조성물은 특이적으로 TRPV3의 활성화를 억제함으로써 TRPV3에 의해 매개되는 통증을 효과적으로 억제할 수 있다. 또한 17R 레졸빈 D1 및 그 염은 TRPV3에 관련된 통증을 억제할 수 있는 물질을 스크리닝 할 수 있도록 한다. 또한 본 발명의 TRPV3 억제방법 및 TRPV3 억제제 스크리닝 방법을 통해 TRPV3 관련 질병을 치료, 예방 할 수 있으며, 본 발명의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유

효성분으로 하는 건강식품을 통해 통증에 대한 치료, 예방 효과를 얻을 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 세포주에서 발현된 hTRPV3가 17R 레졸빈 D1에 의해 억제됨을 칼슘의 세포 내 유입을 억제하는 효과의 측정을 통해 억제효과가 있음을 나타낸 도이다. camp은 캄파를, men은 멘톨을, 17R-RvD은 17R 레졸빈 D1을 각각 의미한다.

도 1a는 3 μ M 17R 레졸빈 D1이 4 mM 캄파에 의한 TRPV3 활성화를 억제함을 fura2 칼슘 이미지 기법으로 측정한 것을 나타낸 도이다.

도 1b는 3 μ M 17R 레졸빈 D1이 30 μ M 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate)에 의한 TRPV3 활성화를 억제함을 fura2 칼슘 이미지 기법으로 측정한 것을 나타낸 도이다.

도 1c는 3 μ M 17R 레졸빈 D1이 2 mM 멘톨에 의한 TRPV3 활성화를 억제함을 fura2 칼슘 이미지 기법으로 측정한 것을 나타낸 도이다.

도 1d는 3 μ M 17R 레졸빈 D1이 열에 의한 TRPV3 활성화를 fura2 칼슘 이미지 기법으로 측정한 것을 나타낸 도이다.

도 2는 전기 생리학적인 기법을 사용했을 시에도 캄파, 멘톨, 2-APB, 열에 의한 TRPV3 활성화가 3 μ M 17R 레졸빈 D1에 의해 억제됨을 확인한 도이다. Men 또는 men은 멘톨, 2APB 혹은 2apb는 2-APB를, camp는 캄파를, 17r은 17R 레졸빈 D1을 의미한다.

도 3은 6가지 thermoTRP를 과발현시킨 세포주에 17R 레졸빈 D1 및 17S 레졸빈 D1을 각각 처리한 후 칼슘 이미지를 통해 각 TRP에 대한 억제효과를 나타낸 도이다.

도 3a는 17R 레졸빈 D1에 대한 6가지 thermoTRP channel에 대해 실험한 결과 TRPV3 활성 억제에 특이적임을 나타낸 도이다.

도 3b는 17S 레졸빈 D1에 대한 6가지 thermoTRP channel에 대해 실험한 결과 TRPV3, TRPV4 그리고 TRPA1의 활성의 억제를 나타낸 도이다.

도 4는 농도에 따른 TRPV3 활성화에 의한 칼슘 유입량을 나타낸 농도-반응 곡선으로서 각각의 활성을 Hill-plot 방법으로 나타낸 도이다. IC_{50} 은 397 nM, N값은 1.17이었다.

도 5는 3 μ M 17R 레졸빈 D1이 4 mM 캄파에 의한 TRPV3 활성화를 억제함을 fura2 칼슘 이미지 기법으로 측정한 것을 나타낸 도이다.

도 6은 열조사법에 의해 열을 조사한 쥐에서 열자극에 대한 회피 시간을 평균하여 나타낸 도이다. 그 결과, CFA로 인해 유발된 염증 때문에 열자극에 대한 회피 시간이 빨라졌으며 이를 17R 레졸빈 D1이 유의성 있게 회복시킴을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

이하, 본 명세서에서 사용하는 용어를 정의한다.

[0031]

[0032]

본 명세서에서 사용되는 용어 "통증"은 통각수용기와 신경섬유로 구성된 구심성 신경로를 통하여 대뇌피질과 가장자리 계통영역과 맞닿은 부위를 자극함으로써 일어나는 모든 통각 및 감각 장애를 의미한다. 본 발명에서 사용된 "통증"이라는 용어는 모든 종류의 통증, 즉, 신경병 통증 등의 만성 통증과, 수술 후 통증, 만성 아래쪽 등 통증, 군발성 두통, 포진 신경통, 환지통, 중추통, 치통, 신경병 통증, 오피오이드 내성통, 창자통, 외통, 뼈 외상통, 분만 및 출산 중 통증, 햇빛화상을 비롯한 화상으로 초래되는 통증, 편두통, 협심통, 및 방광염통을 비롯한 요생식으로 관련 통증을 포함하는 것이고, 또한 외상수용통 또는 통각을 포함한다.

[0033]

본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 통증의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0034]

본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 통증의 증상이 호전 또는 이롭게 변

경되는 모든 행위를 의미한다.

[0035]

[0036]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0037]

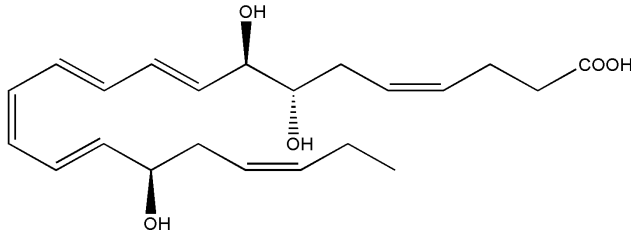
본 발명은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효 성분으로 포함하는 통증 억제용 조성물을 제공한다.

[0038]

17R 레졸빈 D1은 하기 [화학식 1]의 구조를 갖는다.

[0039]

화학식 1



[0040]

[0041]

[0042]

상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043]

본 발명의 한 구현예에서는 TRPV3 특이적 활성제로 알려진 화합물 (예를 들면, 캄파, 멘톨, 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate; 이하 2-APB라고 한다)과 열자극에 의해 증가된 활성을 상기 17R 레졸빈 D1이 억제하는 것을 확인하였다 (도 1 및 도 2 참조). 또, 17R 레졸빈 D1은 TRPV3을 선택적으로 억제하는 것을 확인하였다 (도 3a 참조).

[0044]

또한, 본 발명의 다른 한 구현예에서는 17R 레졸빈 D1이 동물모델에서 Complete Freund's Adjuvant (CFA)에 의한 염증시 열자극에 대한 과도한 감수성을 회복시킴을 확인하였다 (도 6 참조). 또한 이러한 열자극에 의한 감수성은 TRPV1 결핍 쥐에게서도 유사한 결과를 확인할 수 있었으며, 이는 17R 레졸빈 D1이 TRPV3 의존적으로 열자극을 억제한다는 것을 의미한다.

[0045]

따라서 본 발명의 17R 레졸빈 D1은 열자극 통증을 유발하는 TRPV3의 활성을 유의적으로 저해시켜 이에 의해 유발되는 열자극 통증을 효과적으로 저해할 수 있으므로 열자극 통증의 억제, 또는 열자극 통증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0046]

상기 17R 레졸빈 D1은 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매 화물이 포함된다. 이때 허용가능한 염으로는 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 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0047]

본 발명의 통증 억제용 조성물은 17R 레졸빈 D1외에 추가적으로 그와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효 성분을 1종 이상 더 포함할 수도 있다.

[0048]

[0049]

본 발명에 따른 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0050]

경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [0051] 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 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 본 발명에 따른 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 희석제, 봉해제 등을 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, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 봉해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스 카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다.
- [0055]
- [0056] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 구체적으로는 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 17R 레졸빈 D1 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 내지 1 중량%로, 바람직하게는 0.0001 내지 0.1 중량%를 포함하며 하루 1~6회 투여될 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명에 따른 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.
- [0058] 본 발명에 따른 조성물은 통증의 예방 및 치료를 위해 단독으로, 또는 수술, 방사선치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0059]
- [0060] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 통증 억제 방법을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 한 구현예에 따르면 17R 레졸빈 D1은 통증을 유발하는 TRPV3의 활성을 유의적으로 저해할 수 있으므로 (도 1 내지 6 참조) 통증의 억제, 또는 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 이는 곧, 17R 레졸빈 D1을 개체에 투여하는 방법으로 통증을 억제, 또는 예방 및 치료할 수 있음을 의미한다.
- [0062] 상기 개체는 척추동물이고, 바람직하게는 인간을 제외한 척추동물이며, 더욱 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물이다. 구체적으로는 쥐, 토끼, 기니피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물을 예로 들 수 있다.
- [0063] 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 또한, 투여방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 17R 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.
- [0066] 본 발명에서 통증의 치료 및 예방에 사용되는 약학적으로 유효한 양은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 1일 100 ng/kg 내지 10000 ng/kg으로, 바람직하게는 100 ng/kg 내지 10000 ng/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0067]

[0068] 또한, 본 발명은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 이용한 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0069]

본 발명의 구현예에서는 TRPV3 특이적 활성제로 알려진 화합물과 열자극에 의해 증가된 활성을 17R 레졸빈 D1 이 TRPV3 선택적으로 억제하는 것을 확인하였으므로, TRPV3 과발현 형질세포주에서 TRPV3 활성제에 의해 증가된 TRPV3 활성에 대한 17R 레졸빈 D1의 억제효과와 비교하여 이와 유사하거나 보다 높은 억제 효과를 갖는 물질을 선별함으로써 TRPV3에 의해 매개되는 통증을 억제하는 통증 예방 및 치료제를 스크리닝 할 수 있다.

[0070]

[0071]

구체적으로는,

[0072]

1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0073]

2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 피검물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;

[0074]

3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0075]

4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0076]

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물, 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0077]

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 숙주세포는 바람직하게는 HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주를, 더 바람직하게는 HEK 세포주를 이용하는 것이 좋지만 이에 한정되지는 않고, 이온 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주라면 모두 이용 가능하다.

[0078]

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 TRPV3 특이적 활성제는 캄파, 멘톨 또는 2-APB로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것이 바람직하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0079]

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미징에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.

[0080]

상기 통증은 TRPV3의 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정하지는 않는다.

[0081]

상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염은 (100 nM 내지 3 μ M의 농도)로 처리하는 것이 바람직하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0082]

[0083]

또, 본 발명은 TRPV3를 발현하는 분리된 피부 세포에 상기 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 처리하는 단계를 포함하는 TRPV3의 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 구현예에서는 TRPV3 특이적 활성제로 알려진 캄파에 의해 증가된 활성을 상기 17R 레졸빈 D1이 억제하는 것을 확인하였다 (도 5 참조).

[0084]

이때 상기 17R 레졸빈 D1은 피부세포에 (100 nM 내지 3 μ M의 농도)로 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.

[0085]

[0086]

또한 본 발명은 17R 레졸빈 D1을 이용한 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0087]

구체적으로는,

[0088]

1) TRPV3을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0089]

2) 상기 형질전환체에 실험군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로서 TRPV3 특이적 활성제와 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 각각 처리하는 단계;

- [0090] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPV3 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0091] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군 보다 낮거나 유사한 TRPV3 이온 채널 활성을 나타내는 TRPV3 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV3 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0092] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 숙주세포는 바람직하게는 HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주를, 더 바람직하게는 HEK 세포주를 이용하는 것이 좋지만 이에 한정되지는 않고, 이온 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주라면 모두 이용 가능하다.
- [0093] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물, 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0094] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 TRPV3 특이적 활성제는 캄파, 멘톨 또는 2-APB로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것이 바람직하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0095]
- [0096] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미징에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.
- [0097] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 17R 레졸빈 D1은 (100 nM 내지 3 μ M)의 농도로 처리하는 것이 바람직하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0098] 본 발명의 구현예에서는 17R 레졸빈 D1이 TRPV3만을 선택적으로 억제한다는 것을 확인하였으므로, TRPV3가 과발현된 형질세포주에서 TRPV3 활성제에 의해 증가된 TRPV3 활성에 대한 17R 레졸빈 D1의 억제효과와 비교하여 이와 유사하거나 이보다 높은 억제 효과를 갖는 피검물질을 선별함으로써 TRPV3 활성 억제제를 스크리닝 할 수 있음을 알 수 있다.
- [0099]
- [0100] 또한 본 발명은 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 유효성분으로 함유하는 통증 개선용 건강식품을 제공한다. 상기 통증은 TRPV3 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0101] 본 발명의 상기 17R 레졸빈 D1 또는 그 염은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 17R 레졸빈 D1 또는 그 염을 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 섭취시 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있고, 안전성 면에서 아무런 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수도 있다.
- [0102] 본 발명의 건강식품은 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨 및 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.
- [0103] 본 발명의 상기 외에 건강식품은 여러가지 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 0.0001~0.001 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0104] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 소세지, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 유제품, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.
- [0105]

- [0106] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0107] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0108]
- [0109] **<실시예 1> TRPV3 형질전환 세포주 제조**
- [0110] HEK293 세포주 (ATCC CRL-11268)를 hTRPV3 (서열번호 3)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적 (transiently)으로 형질전환하였다.
- [0111] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 웰 플레이트 당 0.8 μ g의 hTRPV3의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터 및 0.2 μ g/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 CO₂인큐베이터에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하고, 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도달한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.
- [0112]
- [0113] 이하, 모든 실시예의 실험 결과는 양측 꼬리 (two-tailed), 쌍을 이루지 않은 (unpaired) 스튜던트 검정 (Student's t-test)을 이용하여 통계적으로 분석하였고, 평균 $\pm$ S.E.M.의 형태로 나타내었다. 또한, **P <0.01 및 *P <0.05였다.
- [0114]
- [0115] **<실시예 2> 피부 세포의 준비**
- [0116] 피부세포는 HaCat human keratinocyte cell line 을 사용했으며 세포는 CO₂인큐베이터에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양했다.
- [0117]
- [0118] **<실시예 3> TRPV3 억제제에 의한 TRPV3의 활성화 변화 조사**
- [0119] **<3-1> 화학물질 처리**
- [0120] 실시예 1의 방법으로 제조한 hTRPV3 형질전환 세포주에 4 mM 캄파 (camphor;MP Biomedicals, USA), 2 mM 멘톨 (menthol;MP Biomedicals, USA), 30 μ M 2-APB (Cayman Biochemicals, USA)를 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 0.3 μ M 또는 3 μ M 17R 레졸빈 D1 (17R Resolvin D1: Cayman biochem, USA)을 함께 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 에탄올을 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다.
- [0121]
- [0122] **<3-2> 칼슘 이미지화를 이용한 세포 내 칼슘수준변화 측정**
- [0123] 상기 실시예 3-1의 화학물질 처리 방법으로 처리된 형질전환 세포주에 칼슘 이미지화를 수행하였다.
- [0124] 구체적으로, 0.02% 플루로닉산 (pluronic acid; Invitrogen, USA)을 포함하는 배스 용액 (bath solution; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2mMMgCl₂, 10mMHEPES)을 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기 실시예 4-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fura2-AM (5 μ M; invitorgen, USA)을 37에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, fura2 calcium image system olympus 형광 현미경 (Olympus, 일본)을 이용하여 칼슘 이미지화 (Calcium imaging)를 수행하였고, Meta flow (Molecular device, 미국)를 이용하여 촬영이미지 (time-lapse image; 340 nm/380 nm)를 매 3초마다 측정하여 그 비율로 나타내었다.
- [0125] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 17R 레졸빈 D1은 TRPV3의 활성화를 억제함을 확인하였다.
- [0126]
- [0127] **<3-3> 전기 생리학적인 방법으로 세포 내 채널의 활성 측정**
- [0128] 상기 실시예 3-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 전기 생리학적인 측정을 수행하였다.

[0129] 구체적으로, 세포의 용액인 배스 용액 (bath solution)의 조성은 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 조정하였다. 그리고 유리 피펫에 사용된 피펫 용액 (pipet solution)의 조성은 140 mM CsCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES를 포함하고 pH 7.4로 조정하였다. 이런 용액하에서 세포에 존재하는 이온 채널의 활성은 유리 피펫을 이용하여 측정하였고 세포는 상기 실시예 1의 방법으로 처리된 형질전환 세포를 사용하였다. 이후, 패치 클램프 세트 (patch clamp set)를 이용하여 전체 세포 패치 클램프 (whole cell patch clamp)를 실시하였고, 이중 전압 전류 상관 곡선을 이용하여 이온 채널 특이적인 반응임을 확인함과 동시에 17R 레졸빈 D1이 이온 채널을 효과적으로 억제함을 나타내었다. 패치 클램프 세트는 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 clem X-10 (Molecular device, 미국)을 이용하여 데이터를 편집했다.

[0130]

[0131] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 17R 레졸빈 D1은 TRPV3 채널을 억제함을 확인하였다.

[0132]

[0133] **<실시예 4> 17R 레졸빈 D1의 TRPV3에 대한 선택적 억제 반응 조사**

[0134] 실시예 1의 방법으로 제조한 rTRPV1 (서열번호 1), rTRPV2 (서열번호 2), hTRPV3 (서열번호 3), rTRPV4 (서열번호 4), mTRPA1 (서열번호 5) 및 mTRPM8 (서열번호 6) 형질전환 세포주에 {3 mM} 17R 레졸빈 D1을 처리하였다. 이후 실시예 3-2의 방법으로 칼슘 이미징화를 수행하였다.

[0135] 17R 레졸빈 D1은 통증 전달에 관여하는 것으로 알려진 6개의 TRP 중에서 TRPV3만을 선택적으로 억제하였으나 (도 3a 참조), 17s 레졸빈은 TRPV3 뿐만 아니라 TRPV4, TRPA1을 동시에 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3b 참조).

[0136] 따라서 17R 레졸빈 D1은 선택적인 TRPV3 억제제로서 본 발명에 따른 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0137]

[0138] **<실시예 5> TRPV3의 17R 레졸빈 D1 농도 의존적 반응 조사**

[0139] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV3 형질전환 세포주에 0.1 내지 10 μ M 17R 레졸빈 D1을 각각 처리한 후, 실시예 3-2의 방법으로 칼슘 이미징화를 수행하였다. 이후, 측정값을 Hill-plot을 이용하여 농도-반응 곡선으로 작성하였다.

[0140] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 17R 레졸빈 D1의 TRPV3에 대한 IC₅₀은 대략 397 nM이었고, N 값은 1.13이었다

[0141]

[0142] **<실시예 6> 피부세포에서의 17R 레졸빈 D1의 특이적 반응 조사**

[0143] 실시예 2에서와 같이 culture 한 HaCat 피부세포는 17R 레졸빈 D1과 캄파 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 세포에 실시예 3-2의 방법으로 칼슘 이미징화를 수행하였다.

[0144] 그 결과, (도 5 참조)에서 나타난 바와 같이 17R 레졸빈 D1은 피부세포에서도 TRPV3 활성화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0145]

[0146] **<실시예 7> 동물통증행동실험을 통한 17R 레졸빈 D1 통증억제 반응 조사**

[0147] **염증 유발 및 열자극에 의한 행동 분석**

[0148] 하기 실험군의 뒷발에 CFA (Sigma, USA)를 10 μ l씩 주입한 후 24 시간 후에 열자극 기계 장치를 이용하여 주사한 후 자극에 대해 회피하는 시간을 측정하였다. 열자극 기계 장치는 Hargraves test (Ugo bassle, Italy)를 사용하였고 IR 강도는 30을 사용했다. 실험 마우스는 각각 무작위로 실험 약물 및 대조 약물을 주입한 후 무작위로 3회 각각 측정한 후 통계 처리하였다.

[0149]

[0150] 대조군 : 무처리;

[0151] 실험군 1. 30 μ M 의 17R 레졸빈 D1;

[0152] 실험군 2. 24H CFA;

[0153] 실험군 3. 24H CFA + 17R 레졸빈 D1;

[0154] 실험군 4. TRPV1 결핍 마우스 + 30 μ M 의 17R 레졸빈 D1

[0155] 실험군 5. TRPV1 결핍 마우스 + 24H CFA;

[0156] 실험군 6. TRPV1 결핍 마우스 + 24H CFA + 17R 레졸빈 D1;

[0157]

[0158] 그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이 17R 레졸빈 D1은 염증 유발 전에는 감각이상을 보이지 않았고, 염증을 유발한 후에는 염증에 의해 비정상적으로 짧아진 열자극에 의한 회피 시간을 통계적으로 유의성 있게 회복시키는 효과를 보였다.

[0159]

[0160] <제조예 1> 17R 레졸빈 D1 또는 그 염의 제형화

[0161] 1. 산제의 제조

[0162] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.002 g

[0163] 유당 1 g

[0164] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0165]

[0166] 2. 정제의 제조

[0167] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.01 mg

[0168] 옥수수전분 100 mg

[0169] 유 당 100 mg

[0170] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0171] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0172]

[0173] 3. 캡슐제의 제조

[0174] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.01 mg

[0175] 옥수수전분 100 mg

[0176] 유 당 100 mg

[0177] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0178] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0179]

[0180] 4. 환의 제조

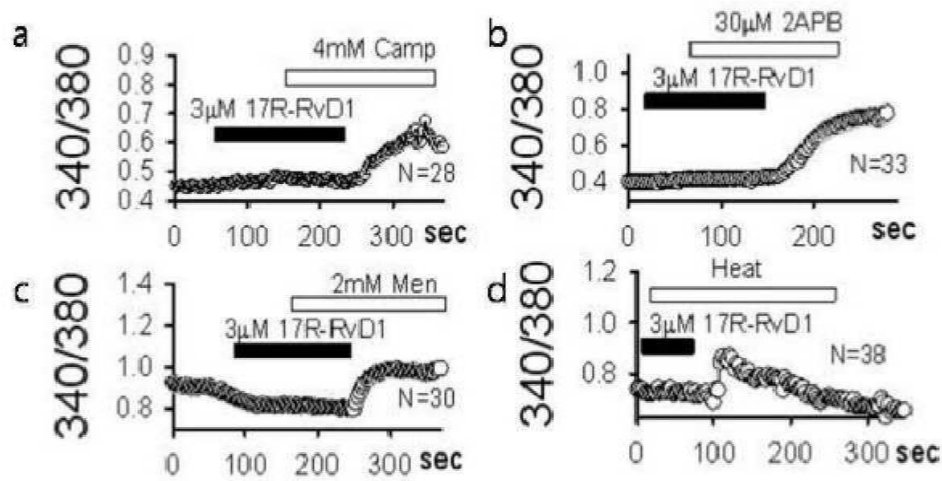
[0181] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.01 mg

[0182] 유당 1.5 g

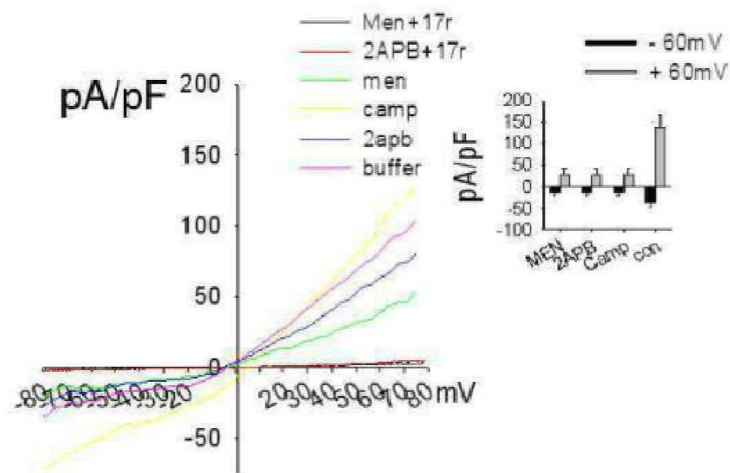
- [0183] 클리세린 1 g
- [0184] 자일리톨 0.5 g
- [0185] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0186]
- [0187] 5. 과립의 제조
- [0188] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.01 mg
- [0189] 대두 추출물 50 mg
- [0190] 포도당 200 mg
- [0191] 전분 600 mg
- [0192] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0193]
- [0194] <제조예 2> 식품의 제조
- [0195] 1. 유제품의 제조
- [0196] 본 발명의 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0197]
- [0198] 2. 음료의 제조
- [0199] 17R 레졸빈 D1 또는 그 염 0.01 μ g
- [0200] 구연산 1000 mg
- [0201] 올리고당 100 g
- [0202] 매실농축액 2 g
- [0203] 타우린 1 g
- [0204] 정제수를 가하여 전체 900 ml
- [0205] 통상의 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 용액을 여과하여 멸균된 2 L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 음료 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 무방하다.

도면

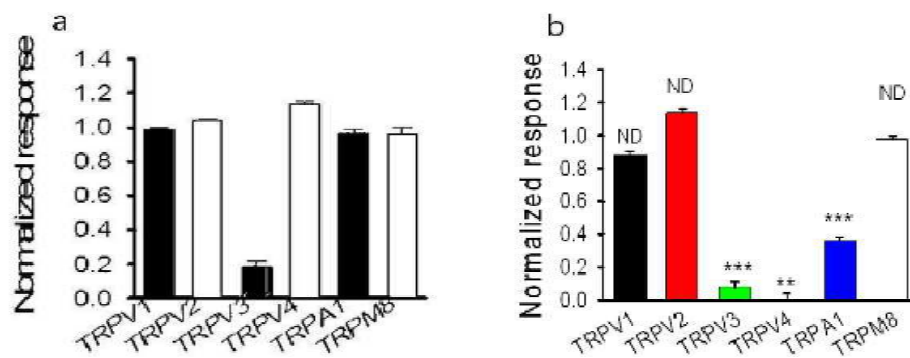
도면1



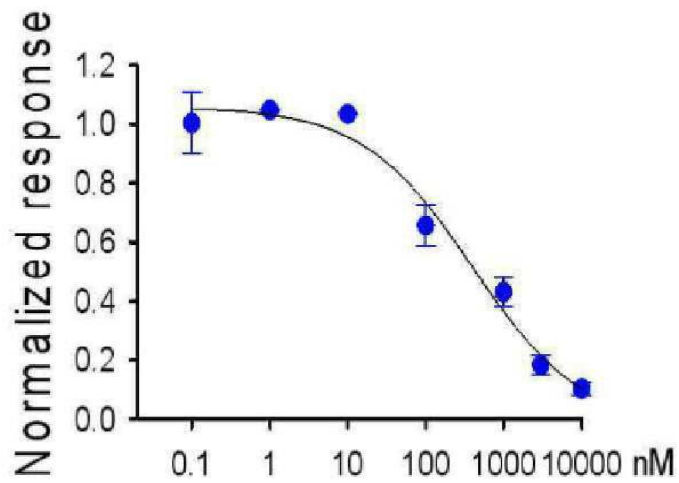
도면2



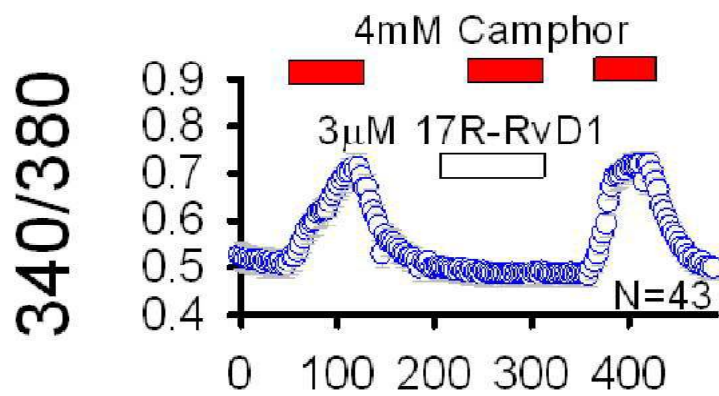
도면3



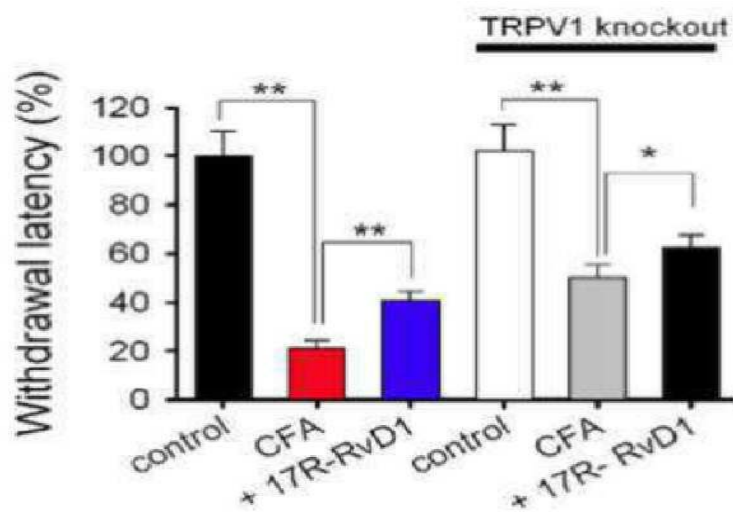
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Compositions and methods for suppressing pain and screening methods for pain suppressant using TRPV3 inhibition	
<130>	HY101402	
<160>	6	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	2847	
<212>	DNA	
<213>	rTRPV1	
<400>	1	
	cagctccaag gcacttgctc catttggggt gtgctgcac ctagctggtt gcaaattggg	60
	ccacagagga tctggaaagg atggaacaac gggctagctt agactcagag gagtctgagt	120
	ccccaccca agagaactcc tgcctggacc ctccagacag agaccctaac tgcaagccac	180
	ctccagtcaa gccccacatc ttcactacca ggagtcgtac ccggcttttt gggaagggtg	240
	actcggagga ggcctctccc ctggactgcc cttatgagga aggcgggctg gcttctgcc	300
	ctatcatcac tgcagctct gttctaacta tccagaggcc tgggatgga cctgccagt	360
	tcaggccgtc atcccaggac tccgtctccg ctggtgagaa gccccgagg ctctatgatc	420
	gcaggagcat cttgatgct gtggctcaga gtaactgcca ggagctggag agcctgctgc	480
	ccttctgca gaggagcaag aagcgctga ctgacagca gttcaaagac ccagagacag	540
	gaaagacctg tctgctaaa gccatgctca atctgcacaa tgggcagaat gacaccatcg	600
	ctctgctcct ggacgttgcc cggaagacag acagcctgaa gcagtttgc aatgccagct	660
	acacagacag ctactacaag ggccagacag cactgcatat tgccattgaa cggcggaaca	720
	tgacgtggt gaccctcttg gtggagaatg gacagatgt ccaggctgcg gctaacgggg	780
	acttcttcaa gaaaaccaa gggaggcctg gcttctactt tggtagctg ccctgtccc	840
	tggctgcgtg caccaaccag ctggccattg tgaagtctt gctgcagaac tcttggcagc	900
	ctgcagacat cagcgcccg gactcagtgg gcaacacggt gcttcattgcc ctggtggagg	960
	tggcagataa cacagttgac aacaccaagt tctgacaag catgtacaac gagatcttga	1020
	tcttgggggc caaactccac cccacgtga agctggaaga gatcaccaac aggaaggggc	1080
	tcacgccact ggctctggct gctagcagt ggaagatcgg ggtcttgcc tacattctcc	1140
	agaggagat ccatgaaccc gagtccgac acctatccag gaagttcacc gaatgggcct	1200

atgggccagt gcactcctcc ctttatgacc tgcctgcat tgacacctgt gaaaagaact 1260
cggttctgga ggtgatcgt tacagcagca gtgagacccc taaccgtcat gacatgcttc 1320
tcgtggaacc cttgaaccga ctctacagg acaagtggga cagatttgc aagcgcatct 1380
tctacttcaa ctcttcgtc tactgcttgt atatgatcat cttaccgcg gctgcctact 1440

atcggcctgt ggaaggcttg cccccata agctgaaaa caccgttggg gactatttcc 1500
gagtcaccgg agagatcttg tctgtgtag gaggagtcta cttcttctc cgagggattc 1560
aatatttct gcagaggcga ccacccctca agagtttgtt tgtggacagc tacagtgaga 1620
tacttttctt tgtacagtcg ctgttcacgc tgggtgtctgt ggtactgtac ttcagccaac 1680
gcaaggagta tgggcttcc atgggttct cctggccat gggctggacc aacatgctct 1740
actatacccg aggattccag cagatgggca tctatgctgt catgattgag aagatgatcc 1800
tcagagacct gtgccggttt atgttcgtct acctcgtgtt cttgtttgga tttccacag 1860

ctgtggtgac actgattgag gatgggaaga ataactctct gcctatggag tccacaccac 1920
acaagtgccg ggggtctgcc tgcaagccag gtaactctta caacagcctg tattccacat 1980
gtctggagct gttcaagtc accatcggca tgggcgacct ggagttcact gagaactacg 2040
acttcaaggc tgtcttcac atctgttac tggcctatgt gattctcacc tacatccttc 2100
tgctcaacat gtcattgct ctcatgggtg agaccgtcaa caagattgca caagagagca 2160
agaacatctg gaagctgcag agagccatca ccacctgga tacagagaag agcttcctga 2220
agtgcattgag gaaggccttc cgctctggca agctgctgca ggtgggggttc actcctgacg 2280

gcaaggatga ctaccggigg tgtttcaggg tggacgaggt aaactggact acctggaaca 2340
ccaatgtggg tatcatcaac gaggaccag gcaactgtga gggcgtaag cgcaccctga 2400
gcttctccct gaggtcaggc cgagtttcag ggagaaactg gaagaacttt gccctggttc 2460
cccttctgag ggaatgaagc actcgagata gacatgccac ccagcaggaa gaagttcaac 2520
tgaagcatta tacgggatcc cttaagccag aggatgctga ggttttcaag gattccatgg 2580
tcccagggga gaaataatgg acactatgca gggatcaatg cggggtcttt ggtggtctg 2640
cttagggaac cagcagggtt gacgttatct ggtccactc tgtgcctgcc taggcacatt 2700

cctaggactt cggcgggcct gctgtgggaa ctgggaggtg tgtgggaatt gagatgtgta 2760
tccaaccatg atctccaaac atttggttt caactcttta tggactttat taaacagagt 2820
gaatggcaaa tctctacttg gacacat 2847

<210> 2

<211> 2768

<212> DNA

<213> rTRPV2

<400> 2

ctgctctgtc cactgtgtga gacgaacagg tggagggtgg acgacgcaga gaaagctcgg	60
agcggggccgc ggagggtccc acagcccat tactgtcagc gttgagccgc acccctccgg	120
gccgcacttc ctctctcagt ccccgctgcc ggagagcccc gctaggctcg gtgacccag	180
cctgcagttt gccgccgcta caccttggct tcagcctgcg ggccctctc catcaccttc	240
tccaggtccc agccaggcct gccctgcgg tatgagagag gaaccttaac atctccatct	300
ctacagaggt ttcagctgta aggagcatcc tctctctca ggatgacttc agcctccagc	360
ccccagctt tcaggctgga gacttccgat ggagatgaag agggcaatgc tgaggagaac	420
aagggaagc aggaaccgcc ccccatggag tcaccattcc agagggagga ccggaattcc	480
tccctcaga tcaaagtga cctcaacttc ataaagagac ctctaaaaa cacttctgct	540
cccagccagc aggagccaga tcggtttgac cgtgaccgac tcttcagtgt ggtctcccg	600
ggtgtccccg aggaactgac tggactgcta gaatacctgc gctggaacag caagtacctc	660
actgactctg catacacaga aggtccact ggaaagacgt gcctgatgaa ggctgtgctg	720
aaccttcagg atggggctca tgccctgcatc atgccgtgc tgcagattga caaggattcc	780
ggcaatccca agccctcgt caatgccag tgcctcgtg agttctacca aggccacagt	840
gcgtgcaca tcgcataga gaagaggagc ctgcagtgcg tgaagctgct ggtagagaat	900
ggagcggatg ttacctccg agcctgtggc cgttcttcc aaaagcacca aggaacttgt	960
ttctattttg gagagctacc tctttctctg gctgcgtgca ccaagcagtg ggatgtggtg	1020
acctacctcc tggagaacct acaccagccg gccagcctgg aggccaccga ctccctgggc	1080
aacacagtcc tgcattgctt ggtaagtatt gcagataact cgcctgagaa cagtgcctg	1140
gtgatccaca tgtacgacgg gcttctacaa atgggggcgc gcctctgccc cactgtgcag	1200
cttgaggaaa tctccaacca ccaaggcctc acaccctga aactagccgc caaggaaggc	1260
aaaatcgaga ttttcaggca cattctgcag cgggaattct caggaccgta ccagccctt	1320
tcccgaagt ttactgagt gtgttacggt cctgtgcggg tatcgtgta cgacctgtcc	1380
tctgtggaca gctgggaaaa gaactcgggt ctggagatca tcgcttttca ttgcaagagc	1440
ccgaaccggc accgcatggt ggttttagaa cactgaaca agcttctgca ggagaaatgg	1500
gatcggctcg tcicaagatt ctcttcaac ttgcctgct acttggtcta catgttcac	1560
ttcaccgtcg ttgcctacca ccagccttc ctggatcagc cagccatccc ctcatcaaaa	1620
gcgacttttg gggaatccat gctgtgctg ggccacattc tgatcctgct tgggggtatt	1680
tacctcttac tgggccagct gtggtacttt tggcggcggc gcctgttcat ctggatctca	1740

ttcatggaca gctactttga aatcctcttt ctccctcagg ctctgctcac agtgctgtcc	1800
caggtgctgc gcttcatgga gactgaatgg tacctacccc tgctagtgtt atccctagtg	1860
ctgggctggc tgaacctgct ttactacaca cggggctttc agcacacagg catctacagt	1920
gtcatgatcc agaaggtcat ccttcgagac ctgctccgtt tcctgctggc ctacctgggc	1980
ttctttttcg gctttgctgt agccctagta agcttgagca gagaggcccg aagtcccaaa	2040
gccccgaag ataacaactc cacagtgcac gaacagccca cggggggcca ggaggaggag	2100
ccagctccat atcggagcat tctggatgcc tccttagagc tgttcaagtt caccattggt	2160
atgggggagc tggctttcca ggaacagctg cgttttcgtg ggggtggtcct gctgttgctg	2220
ttggcctacg tccttctcac ctacgtcctg ctgctcaaca tgctcattgc tctcatgagc	2280
gaaactgtca accacgttgc tgacaacagc tggagcatct ggaagttgca gaaagccatc	2340
tctgtcttgg agatggagaa tggttactgg tggtgccgga ggaagaaaca tcgtgaaggg	2400
aggctgctga aagtcggcac caggggggat ggtacccctg atgagcgtg gtgcttcagg	2460
gtggaggaag taaattgggt tgcttgggag aagactcttc ccacctatc tgaggatcca	2520
tcagggccag gcatcactgg taataaaaag aacccaacct ctaaaccggg gaagaacagt	2580
gcctcagagg aagacctatc gcccttcag gtctccagt cccctgatg gccagatgc	2640
agcagcaggc tggcaggatg gagtagggaa tcttcccagc cacaccagag gctactgagt	2700
tttggtgga aataaataat tttttgcat aaccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2760
aaaaaagg	2768
<210> 3	
<211> 3420	
<212> DNA	
<213> hTRPV3	
<400> 3	
ccacaacttc gatcttggca cctgcggcct ccctgcctt ttctccggtg gggatgaggc	60
tgctgtgtgg gtgtgggggt gactcacacg ggccacgtgg gtggcggggt gctgcagctg	120
tggctgggtg gcgtggcctg cctggcgccg agggcagggt gctcagccag ttctgcctct	180
gacgcctcat tccagccatc cctctgcctg caatgagagc ttcccgcgc ctcagccaca	240
gtcccacccg ggggccttgg gcccagaca tgcggtgatc tcagggaag ggttgccacg	300
accaccaga acctcaccag ccatgaaagc ccacccaag gagatggtgc ctctcatggg	360
caagagagtt gctgccccca gtgggaacc tgccatcctg ccagagaaga ggccggcgga	420
gatcaccccc acaaagaaga gtgcacactt cttcctggag atagaagggt ttgaacccaa	480

ccccacagtt gccaaagacct ctctctctgt cttctccaag cccatggatt ccaacatccg	540
gcagtgcac tcttgtaact gtgatgacat ggactcccc cagtctctc aggatgatgt	600
gacagagacc ccatccaatc ccaacagccc cagtgcacag ctggccaagg aagagcagag	660
gaggaaaaag aggcggtcga agaagcgcat ctttcagcc gtgtctgagg gctgcgtgga	720
ggagtggta gagtgtctgg tggagctgca ggagctttgc aggcgggccc atgatgagga	780
tgtgcctgac ttctcatgc acaagctgac ggctccgac acggggaaga cctgcctgat	840
gaaggccttg ttaaacatca accccaacac caaggagata gtgcggatcc tgcttgctt	900
tgctgaagag aacgacatcc tgggcagggt catcaacgcc gactacacag aggaggccta	960
tgaaggcgag acggcgctga acatcgccat cgagcggcgg cagggggaca tcgcagccct	1020
gctcatgcc gccggcgccg acgtcaacgc gcacgccaag ggggccttct tcaacccaa	1080
gtaccaacac gaaggcttct acttcggtga gacgccctg gccctggcag catgcaccaa	1140
ccagcccag atgtgcagc tgctgatgga gcacgagcag acggacatca cctcgcgga	1200
ctcacgagc aacaacatcc ttacgcctt ggtgaccgtg gccgaggact tcaagacgca	1260
gaatgacttt gtgaagcgca tgtacgacat gatcctactg cggagtggca actgggagct	1320
ggagaccact cgcaacaacg atggcctcac gccgtgcag ctggccgcca agatgggcaa	1380
ggcggagatc ctgaagiaca tcctcagtcg tgagatcaag gagaagcggc tccggagcct	1440
gtccaggaag ttcaccgact gggcgtacgg acccgtgtca tcctccctct acgacctcac	1500
caacgtggac accaccacgg acaactcagt gctggaaatc actgtctaca acaccaacat	1560
cgacaaccgg catgagatgc tgacctgga gccgtgcac acgtgctgc atatgaagt	1620
gaagaagttt gccaaagcaca tgtttttct gtccttctgc ttttatttct tctacaacat	1680
cacctgacc ctgtctctgt actaccgcc ccgggaggag gaggccatcc cgcaccctt	1740
ggcctgacg cacaagatgg ggtggctgca gtcctaggg aggatgttg tgctcatctg	1800
ggccatgtgc atctctgtga aagaggcat tgccatctc ctgctgagac cctcgatct	1860
gcagtccatc ctctcgatg cctggttcca ctttgtctt tttatccaag ctgtgcttgt	1920
gatactgtct gtcttcttgt acttgtttgc ctacaaagag tacctgcct gcctcgtgct	1980
ggccatggcc ctgggctggg cgaacatgct ctactatag cggggtttcc agtccatggg	2040
catgtacagc gtcatgatcc agaaggatc tttgatgat gttctgaagt tcttgttgt	2100
atatactgtg tttttgcttg gatttggagt agccttgcc tcgctgatcg agaagtgtcc	2160
caaagacaac aaggactgca gtcctacgg cagcttcagc gacgcagtgc tggaactctt	2220
caagctcacc ataggcctgg gtgacctgaa catccagcag aactccaagt atccattct	2280
ctttctgttc ctgctcatca cctatgtcat cctcacctt gttctctcc tcaacatgct	2340

cattgctctg atgggcgaga ctgtggagaa cgtctccaag gagagcgaac gcatctggcg 2400
 cctgcagaga gccaggacca tcttggagtt tgagaaaatg ttaccagaat ggctgaggag 2460
 cagattccgg atgggagagc tgtgcaaagt ggccgaggat gatttccgac tgtgtttgcg 2520
 gatcaatgag gtgaagtgga ctgaatggaa gacgcacgtc tccttctta acgaagaccc 2580
 ggggcctgta agacgaacag atttcaacaa aatccaagat tcttccagga acaacagcaa 2640
 aaccactctc aatgcatttg aagaagtcga ggaattcccg gaaacctcgg tgtagaagcg 2700
 gaaccagag ctggtgtgcg cgtgcgctgt ctggcgctgc aggcggagtc accgactctg 2760

tgcagagagg ctttgaggga tggaggagtc cggctctgct ggccctagaag cagagtgcac 2820
 cctcgtgctc agtgcctcagt ggggtgtctga actgaggggc agttgtcaat ttgtctgagt 2880
 gggaaacatc ctggattttg ttacttggca aacagctggt gtaaacctac agccagcagc 2940
 agtctggagc ctgggagcct cctgaagtcc cgggtgaagc ctcctggtttt accaattgca 3000
 ggtcggcttg gctgggagag atggatggcg ggaaaggggc agcagtcttg aggagcaggg 3060
 agaggagtct ttctctctgc cagcttcccc cgtcagcccc aaccccagcc cacacattgt 3120
 accatctctt ctgctgtgac tgggttgcct gaatttgttg gagaccctg atcccatccc 3180

agagtgtgcg ggggacggag gtaagctgga tatcctgggg gaggagggga atgcgctctg 3240
 gaaacaccct tccggaaccc ttcgggaaa aggagaccat ccttggagtg aacgtccct 3300
 gacaccccaa ggttcaaact gtctcaagct gagagatgtt tttagtagca gaattaacac 3360
 agggttttta ctigcaatac ggaaaagaca ttccagttga gaatgaaaat tactacaatg 3420
 3420

<210> 4
 <211> 3211
 <212> DNA
 <213> rTRPV4
 <400> 4

gggaggagga cgcggcggga tcaggaagcg gctgcgctgc gcccgctcc caagcaggcc 60
 gagaagtcca aacagatctg ctgagggtcc agtatggcag atcctggtga tggccccgt 120
 gcagcgctg gggatgtggc tgagccccct ggagacgaga gtggcacttc tggtagggag 180
 gccttcccc tccttccct ggccaacctg tttgaggag aggaaggctc ctcttctctt 240
 tcaccagtgg atgctagccg cctgctggc cccgggatg gacgtccaaa cctgcgtatg 300
 aagttccagg gcgtttccg caagggggtt cccaacccca ttgacctgct ggagtccacc 360
 ctgtatgagt cctcagtagt gcctgggccc aagaaagcgc ccatggattc gttgttcgac 420

tatggcactt accggcacca cccagtgac aacaagagat ggaggaggaa ggtcgtagag	480
aagcagccac agagcccaaa agctcccgcc cccagccac ccccatcct caaagtcttc	540
aaccggccca tctctttga catcgtgtcc cggggctcca ctgccgacct ggacggactg	600
ctctcctact tgctgaccca caagaagcgc ctgactgatg aggagtccg ggaaccatcc	660
acaggaaga cctgcctgcc caaggcactt ctgaacttaa gcaatggccg aaacgacacc	720
atcccagtgt tgctggacat tgcggaacgc acgggcaaca tgcgggagtt catcaactcg	780
cccttcagag acatctacta ccgagggcag acggcactgc acatcgccat tgaacggcgc	840
tgcaagcatt acgtggagct cctggtggcc caggagccg atgtgcacgc gcaggcccg	900
ggcggttct tccagccaa ggatgagggt ggctacttct actttggga gctgcccttg	960
tccttggcag cctgcacaa ccagccgcac atcgtaact acctgacaga gaacctcac	1020
aagaaagccg atatgaggcg acaggactcc agaggcaaca cggtgctcca cgcgtggtg	1080
gccatcgtg acaacaccg agagaacacc aagtttgtca ccaagatgta tgacctgtg	1140
cttctcaagt gctccgcct ctccagac agcaacctgg agactgtgct taacaatgac	1200
ggtctttcgc cctcatgat ggctccaag actggcaaga tcggggtctt tcagcacatc	1260
atccgacggg aggtgacaga tgaggacaca cggcacctgt ctgcaagtt caaggactgg	1320
gcctacgggc ctgtgtattc ttctctctac gacctctct cctggatac gtgcggggag	1380
gaagtgtccg tgcgtgagat cctggtttac aacagcaaga tcgagaaccg ccatgagatg	1440
ctggctgtgg agccattaa cgaactgctg agggacaagt ggcgtaatgt cggggccgtg	1500
tccttctaca tcaacgtgt ctctatctg tgtccatgg tcattttcac cctcacagcc	1560
tactatcagc cactggaggg cagccaccc tacccttacc gtaccacgtt ggactacctg	1620
aggctggctg gtgaggtcat cagctctc acaggagtcc tgttcttctt taccagtatc	1680
aaagacttgt tcatgaagaa atgccctgga gtgaattctc tcttcgtcga tggtctctc	1740
cagttgctct actcatcta ctcagtgtg gtggttgtgt ctgcggcgct ctacctggca	1800
gggatcgagg cctatctggc tgtgatggc tttgccctgg tcctgggctg gatgaatgcc	1860
ctttacttca cccgtgggct gaagctgaca gggacctaca gcatcatgat tcagaagatc	1920
ctcttcaaag atctcttccg tttctgtg gtctacctgc ttttatgat tggctatgcc	1980
tcagctctgg tcacctctt gaatccgtgc accaactga aggtctgtaa cgaggaccag	2040
agcaactgca cggtgccctc ataccccgcg tgccgggaca gcgagacctt cagcgccttc	2100
ctactggacc tcttcaagct caccatcggc atggcgacc tggagatgct gagcagcgt	2160
aagtaccccg tggcttctcat tctctgtctg gttacctaca tcatcctcac ctctgtctc	2220

ctgctgaaca tgctcatcgc cctcatgggt gagaccgtgg gccaggtgtc caaggagagc 2280
aagcacatct ggaagctgca gtgggccacc accatcctgg acatcgagcg ctcttccct 2340
gtgttctga ggaaggcctt ccgctccgga gagatggtga cagtgggcaa gagctcggat 2400
ggcactccag accgcagggtg gtgcttcagg gtggacgagg tgaactgttc tacttgaac 2460
cagaacctgg gcatcattaa cgaggacccc ggcaagagcg agatctacca gtactatggc 2520
ttctccata ccatggggcg cctccgcagg gatcgctggt cctcagtggt gccccgcgtg 2580

gtggagctga acaagaactc aggcacagat gaagtgtggt tccccctgga taacctaggg 2640
aaccccaact gtgacggcca ccagcaaggt tatgtccca agtggagggc ggaggacgca 2700
ccactgtagg ggccatgcca gggctgggggt caatggcca ggcttggccc ttgctccac 2760
ctacatttca gcatctgtcc tgtgtcttcc cacaccaca cgtgacctcg gaggtgaggg 2820
cctctgtgga gactctgggg agggcccagg accctctggt cccacaaaag acttttgctc 2880
ttatttctac tcttccccc atgggggacg gggtctctgg ccacctgtct cactcccatg 2940
gagtcaccta agccagctca gggcccctcc actcacaggg ctcaggcccc tgtccctctt 3000

gtgcactatt tattgtctc ctcaggaaaa tgacatcaca ggagtctacc tgcagctgga 3060
acctggccag ggctgaggct catgcaggga cactgcagcc ctgacctgt gcagatctga 3120
cctgtctcag cccgggctag ggtgggtctt ctgtactttg tagagatcgg ggctgttggt 3180
gctcaataaa tgtttgttta ttctcggtgg a 3211

<210> 5
<211> 4263
<212> DNA
<213> mTRPA1
<400> 5

gcgccagccg gcgtccaggt ggagtcaatg aagcgcggt tgaggaggat tctgtcccg 60
gaggaaagga aggaggtcca gggcgttggt tatcgggcg tcggggaaga catggactgc 120

tccaaggaat ctttaaggt ggacattgaa ggagatatgt gtagattaga agacttcac 180
aagaaccgaa gaaaactaag caaatatgag gatgaaaac tctgtcctct gcatcacgca 240
gcagcagaag gtcaagtga actgatgga ctgatcatca atggttcttc gtgtgaagtg 300
ctgaataata tggatggtta tggaaatacc cactgcatt gtgtgcaga aaaaaatcaa 360
gttgaaagt taaagtctt tctcagccaa ggagcaaatc caaacctccg aatagaaac 420
atgatgtcac ccttcacat agctgtgcat ggcatgtaca acgaagtgat caaggtgttg 480
actgagcaca aggcactaa catcaattta gaaggagaga atgggaacac ggctttgatg 540

tccacgtgtg ccaaagacaa cagtgaagct ttgcaaattt tgttagaaaa aggagctaag	600
ctgtgtaaat caaataagtg gggagactac cctgtgcacc aggcagcatt ttcaggtgcc	660
aaaaaatgca tggaaattaat cttagcatat ggtgaaaaga acggtacag cagggagact	720
cacattaatt ttgtgaatca caagaaagcc agccctctcc acctagcagt tcaaagcgga	780
gacttggaca tgattaagat gtgcctggac aacggtgcac acatcgacat gatggagaat	840
gccaaatgca tggccctcca ttttctgca acccagggag ccaactgacat cgtaaagctc	900
atgatctcat cctataccgg aagtagtgat attgtgaatg cagttgatgg caatcaggag	960
accctgcttc acagagcctc gttatttgat caccatgacc tggcagaata cctaataatca	1020
gtgggagcag acatcaacag cactgattct gaaggacgct ctccattat tttagcaaca	1080
gcttctgcat cctggaacat tgtgaatttg ctctctgta aaggtgcaa agtagacata	1140
aaagatcatc ttggacgtaa ctttttgcac ttgactgtgc agcagcctta tggactaaga	1200
aatttgccgc ctgagtttat gcagatgcaa cacatcaaag agctggatgat ggatgaagac	1260
aatgacggat gcacacctct ccattatgcc ttaggcagg gggttcctgt ctctgtaaat	1320
aacctccttg gcttcaatgt gtccattcat agcaaaagta aagataagaa gtcgccctg	1380
cattttgcag ccagttatgg gcgcatcaat acatgtcaga gacttctgca agacataagt	1440
gatacagggc 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 gccaagctg ttgcaatgct tttgagctac	1740
aatgctgaca tcctcctgaa caagaagcaa gcttcctttc tgcatattgc cctgcacaat	1800
aagcgcaagg aagtggttct cacaaccatc agaaataaaa gatgggatga gtgtcttcaa	1860
gttttcactc ataattctcc aagcaatcga tgtccaatca tggagatggg agaatacctc	1920
cccagtgca tgaagttct tttagatttc tgcatgatac cttccacaga agacaagtcc	1980
tgtcaagact accatattga gtataatttc aagtatctcc aatgcccatt atccatgacc	2040
aaaaaagtag cacctacca ggatgtggta tatgagcctc ttacaatcct caatgcatg	2100
gtccaacata accgcataga actcctcaac caccctgtgt gtagggagta cttactcatg	2160
aatgggtgtg cctatggatt cagagcccat atgatgaacc taggatctta ttgtcttggt	2220
ctcataccca tgaccttct tgttgtcaaa atacagcctg gaatggcctt caattctact	2280
ggaataatca atggaactag tagtactcat gaggaaagaa tagacactct gaattcattt	2340
ccaataaaaa tatgtatgat tctagttttt ttatcaagta tatttggata ttgcaagaa	2400

gtgatccaaa ttttccaaca gaaaaggaat tacttctctgg attacaacaa tgctctggaa	2460
tgggttatct atacaactag tatcatcttc gtgttgccct tgttcctcaa catcccagcg	2520
tatatgcagt ggcaatgtgg agcaatagcg atattcttct actggatgaa ctctctactg	2580
tatcttcaaa ggtttgagaa ctgtggaatt ttcattgtta tgttgagggt gatttttaaa	2640
acattgctga gatcgaccgg agtgtttattc ttcttcttac tggcttttgg cctcagcttt	2700
tatgttctcc tgaatttcca agatgccttc agcaccccat tgccttcctt aatccagaca	2760
ttcagtatga tgctaggaga catcaattat cgagatgcct tcctagaacc attgtttaga	2820
aatgagttag cataccagct cctgaccttt gggcagctta ttgccttcac aatgtttgtc	2880
ccaattgttc tcatgaactt actgattggc ttggcggttg gggacattgc tgaggtccag	2940
aagcatgcgt cattgaagag gattgctatg caggtggaac ttcataccaa cttagaaaaa	3000
aagctgccac tciggtactt acgcaaagtg gatcagagggt ccaccatcgt gtatccaaat	3060
agaccaggc acggcaggat gctacggttt ttctattact ttcttaatat gcaagaaaca	3120
cgacaagaag taccaaacat tgacacatgc ttggaaatgg aaatattgaa acagaaatat	3180
cggctgaagg acctcacttc cctcttgga aagcagcatg agctcatcaa actcatcatc	3240
cagaagatgg agatcatctc agagacagaa gatgaagata accattgtctc ttccaagac	3300
aggttcaaga aggagaggct ggaacagatg cacagcaagt ggaattttgt cttaaacgca	3360
gttaagacta aaacacattg ttctattagc caccggact tttagtctg tgtcttatgg	3420
gagtgggaga ctgctttaca tacttatttc agtgaatttc agtttggaag agagcaaaga	3480
aacagaaagt tgactaacat tgctgcatgg agatcctagt tcctgcaacc tcaccatac	3540
atatgctcat atttctgtc aattactatg tattgagaag atcctttctg acatgttcaa	3600
tttgaacatg aaggatagtc tctttcgagt gaataaaaac cagggttgtt ggaatgcata	3660
ttatggagga taagaattaa tgtaactatt aaggcagaac acaactacat aatacaagat	3720
gcataataat ccaagtatta tatttaactc cctacatgt taaaccttcc tgtgttataa	3780
cctgtctggg acactataat ctctgttctt actatgatta gatcatagtc tcacctcct	3840
cgteccatca cacatgacat cattttgagc cacatgacag aagtcctagt tagtagactg	3900
tgataagtat gaatgttaca atagaaatgt gttcccttag tgttcatcag ttgtgatggt	3960
ttaaatgaga aacgttgccc acagactcat acatttaaac ccttagtccc agttgttgct	4020
gctgcttagg ggggccacac agccttgctt gctctctctt ttctgagtgt ggagagaaat	4080
gtgatcagta agactctcgc tctgtctgcc atgctcttta ttccattatg gacttcttct	4140
gaaactgcaa gcagaaattc actgttctt cctcaaatit cttttggtca tgggtattata	4200
tcatagcaac agaaactaac ttatgtacca atggtcttaa taaagaataa agcctgtaca	4260

gtc

4263

<210> 6

<211> 3869

<212> DNA

<213> mTRPM8

<400> 6

tcctccctcc tccagtgagc taagagacaa gcaggctctt tgaggagaga gaagctcttg	60
gctgattgag cagctccacg tcctggctgt cccggagctt gatacataga aaagactgac	120
ctcagatata cagagatcct tctgcttctg tctcccaagt gctgggatca caggcaagat	180
gtccttcgag ggagccaggc tcagcatgag gagccgcaga aatggtacta tgggcagcac	240
ccggaccctg tactccagtg tatctcggag cacagacgtg tcctacagtg acagtgattt	300
ggtgaatttt attcaggcaa attttaaaaa acgagaatgt gtcttcttta ccagagactc	360

caaggccatg gagaacatat gcaagtgtgg ttatgccag agccagcaca tcgaaggcac	420
ccagatcaac caaatgaga agtggaaacta caaaaaacat accaaggagt ttccaacaga	480
cgcttcggg gacattcagt ttgagactct ggggaagaaa ggcaagtact tacgcttgtc	540
ctgtgacacc gactctgaaa ctctctacga actgctgacc cagcactggc acctcaaac	600
acccaacctg gtcatttcag tgacgggtgg agccaaaaac tttgctttga agccacgcat	660
gcgcaagatc ttcagcaggc tgatttacat cgcacagtct aaaggtgcgt ggattctcac	720
tggaggcact cactacggcc tgatgaagta cataggcgag gtggtgagag acaacacat	780

cagcaggaac tcagaagaga acatcgtggc cattggcatc gcagcatggg gcatggtctc	840
caacagggac accctcatca ggagctgtga tgatgaggga catttttcag ctcaatacat	900
catggatgac ttaccagag accctctata catcctggac aacaaccata cccacctgct	960
gcttgtggac aacggttgct atggacaccc cacagtggaa gccaaagtcc ggaatcagct	1020
ggaaaagtac atctctgagc gcaccagtca agattccaac tatggtggta agatcccat	1080
cgtgtgtttt gcccaaggag gtggaagaga gactctaaaa gccatcaaca cctctgtcaa	1140
aagcaagatc ccttgtgtgg tgggtgaagg ctcggggcag attgctgatg tgatcgccag	1200

cctggtggag gtggaggatg ttttaacctc ttccatggc aaagagaagc tggtagctt	1260
tttaccacgc actgtgtccc ggctgcctga agaggaaatt gagagctgga tcaaatggct	1320
caaagaaatt cttgagagtt ctcacctact cacagtaatt aagatggaag aggctggaga	1380
tgagattgtg agcaacgcca ttctctatgc gctgtacaaa gccttcagca ctaatgagca	1440
agacaaggac aactggaatg gacagctgaa gcttctgctg gagtggaacc agttggacct	1500

tgccagtgat gagatcttca ccaatgatcg ccgtgggag tctgccgacc ttcaggaggt	1560
catgttcacg gctctcataa aggacagacc caagtttgc cgcctcttcc tggagaatgg	1620
cctgaatctg cagaagtttc tcaccaatga agtccctaca gagctcttct ccaccactt	1680
cagcaccta gtgtaccgga atctgcagat cgccaagaac tcctacaatg acgcactcct	1740
cacctttgtc tggaagtggg tggcaaacct ccgtcgaagc ttttgaaag aggacagaag	1800
cagcaggag gacttggatg tggaaactca tgatgcatct ctaccaccc ggcacccgt	1860
gcaagctctc ttcacttggg ccattcttca gaacaagaag gaactctcca aggtcatttg	1920
ggagcagacc aaaggctgta ctctggcagc cttgggggcc agcaagcttc tgaagacct	1980
ggccaaagt aagaatgata tcaacgctgc tggggaatcg gaggaactgg ccaatgaata	2040
tgagaccga gcagtggagt tggtcaccga gtgttacagc aatgatgaag acttggcaga	2100
acagctactg gtctactcct gcgaagcctg gggtagggagc aactgtctgg agctggcagt	2160
ggaggctaca gatcagcatt tcatcgtca gcctggggtc cagaatttcc tttctaagca	2220
atggtatgga gagatttccc gagacacgaa gaactggaag attatcctgt gtctattcat	2280
catccctta gtgggctgtg gcctcgtatc atttaggaag aaaccattg acaagcaca	2340
gaagctgctg tggtaactat tggccttctt cacgtcgcct ttcgttgtct tctcctggaa	2400
cgtggcttcc tacatcgctt tctcctgct gtttgcctat gtgctgctca tggacttcca	2460
ctcagtcca cacacccccg agctgactct ctacgccctg gtcttcgtcc tcttctgtga	2520
tgaagtgagg cagtgttaca tgaacggagt gaattatttc accgacctat ggaacgttat	2580
ggacaccctg ggaactctct acttcatagc gggatattga ttcggctcc actcttctaa	2640
taaaagctcg ttgtactctg ggcgctcat tttctgtctg gattacatta tattcacgt	2700
aaggctcatc cacattttca ccgtcagcag gaacttggga cccaagatta taatgtgca	2760
gcggtgctg atcgacgttt tcttcttctt gttcctcttt gctgtgtgga tggtagcctt	2820
tggcgtggcc agacagggga tcctaaggca aatgaacag cgctggagat ggatcttccg	2880
ctctgtcatc tatgagccct acctggccat gtttggccag gttcccagt acgtggatag	2940
taccacatat gacttctccc actgtacct ctcgggaaat gattccaagc cactgtgtgt	3000
ggagctggat gagcacaacc tgccccgtt ccttgagtgg atcaccattc cgctggtgtg	3060
catctacatg ctctccacca atatcttctt ggtcaacctc ctggtcgcca tgtttggcta	3120
cacggtaggc atgttacagg agaacaacga ccaggtctgg aaattccagc ggtacttctt	3180
ggtgcaggag tactgcaacc gcctaaacat ccccttcccc ttcgttgtct tcgcttattt	3240
ctacatggtg gtgaagaagt gtttcaaatg ctgctgtaaa gagaagaata tggagtctaa	3300

tgctgctgt ttcagaaatg aggacaatga gactttggcg tgggagggtg tcatgaagga	3360
gaattacctt gtcaagatca acacgaaagc caacgacaac tcagaggaga tgaggcatcg	3420
gtttagacaa ctggactcaa agcttaacga cctcaaaagt cttctgaaag agattgctaa	3480
taacatcaag taaggctggc gatgcttgtg gggagaaacc aaatcacaat gaggtcacag	3540
caaccacctg gatgtggagg ctcatgggac actgatggac agtactgcta atgacttcta	3600
aaggagacat tttcaggacc ctgagcacag ggtggatgac tcttagtcac cctcaagggc	3660
ataggtcagg gagcaaagtg tacagaggac ttacacctg aagagggtg caaaggacca	3720
tgcttctctg tgaagggtgc tgtgttttct gcatctcaga gccttgcct gatgctgagg	3780
gattaagtgt tgacactcct ttcccacgac tgtgactctg gccctgattt tatacttata	3840
ctgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3869