(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0027920
(43) 공개일자 2011년03월17일

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0085738
(22) 출원일자 2009년09월11일
심사청구일자 2009년09월11일

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

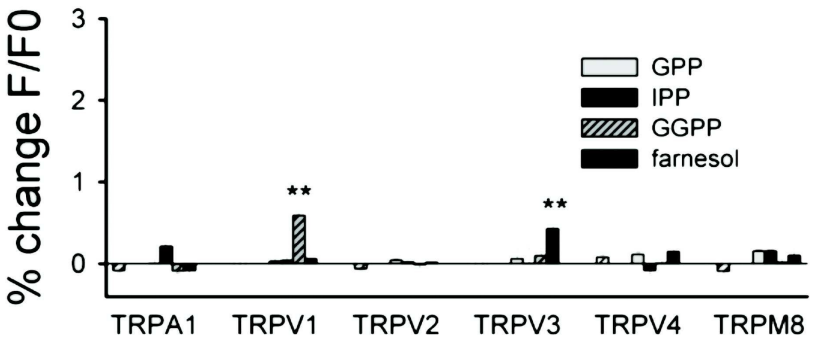
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 신규 활성제를 이용한 ＴＲＰＶ1 활성화 방법

(57) 요 약

본 발명은 제라닐제라닐피로인산(geranyl geranyl pyrophosphate; GGPP) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1) 활성제에 관한 것으로, 구체적으로는 GGPP를 이용한 피검화합물 확인방법에 관한 것이다. 본 발명의 GGPP는 TRPV1에만 특이적으로 작용하여, TRPV1을 발현하는 감각 신경세포만을 분리할 수 있게 할 수 있게 함으로 TRPV1 작용 기작 연구 및 TRPV1 작용 진통제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

부처명 한국학술진흥재단, 한국학술진흥재단, 과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 신진교수연구지원, (이공)일반연구자지원-기본연구, 뉴프론티어연구사업

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

기여율

주관기관 고려대학교, 고려대학교, 고려대학교

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

특허청구의 범위

청구항 1

제라닐제라닐피로인산(geranyl geranyl pyrophosphate; GGPP) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1) 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRPV1의 활성을 특이적으로 촉진하는 것을 특징으로 하는 스크리닝용 조성물.

청구항 3

1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계;

2) 단계 1)의 처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 비처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 TRPV1 양성 반응을 나타낸 감각 신경세포를 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 양성 감각 신경세포의 분리 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 10 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 단계 2)의 TRPV1 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 6

1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제를 순차적으로 또는 역순으로 처리하는 단계;

2) 단계 1)의 처리된 감각 신경세포의 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제가 비처리된 감각 신경세포의 활성 측정치와 비교하여 TRP 비특이적 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에는 음성 반응을 감각 신경세포를 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 음성 감각 신경세포의 분리 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 10 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것을 특징

으로 하는 분리 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, TRP 비특이적 활성제는 계피알데히드(cinnamaldehyde) 또는 멘톨(menthol)인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 단계 2)의 TRPV1 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 10

1) TRPV1 양성 감각 신경세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리하는 단계;

2) TRPV1 음성 감각 신경세포에 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

3) 단계 1) 및 단계 2)의 처리된 TRPV1 양성 감각신경세포 및 TRPV1 음성 감각 신경세포의 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 감각 신경세포의 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리한 TRPV1 양성 감각 신경세포의 활성을 억제하고 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 감각 신경세포의 활성에 영향을 주지 않는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, TRPV1 양성 감각 신경세포는 제 3항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, TRPV1 음성 감각 신경세포는 제 6항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 10 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 14

제 10항에 있어서, TRP 비특이적 활성제는 계피알데히드(cinnamaldehyde) 또는 멘톨(menthol)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 15

제 10항에 있어서, 단계 3)의 TRPV1 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 16

1) TRPV1를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리하는 단계;

3) TRPV1 음성 감각 신경세포에 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

4) 단계 2) 및 단계 3)의 처리된 형질전환체 및 TRPV1 음성 감각 신경세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

5) 단계 4)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리한 형질전환체의 활성을 억제하고 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 감각 신경세포의 활성에 영향을 주지 않는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, TRPV1 음성 감각 신경세포는 제 6항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 10 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 19

제 16항에 있어서, TRP 비특이적 활성제는 계피알데히드(cinnamaldehyde) 또는 멘톨(menthol)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 20

제 16항에 있어서, 단계 4)의 TRPV1 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 21

1) 피검체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 피검화합물을 투여하는 단계;

2) 단계 1)의 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 피검화합물의 침해성 행동을 유발하는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 조절제 스크리닝 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 단계 1)의 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 10 내지 100 mM의 농도로 투여하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 23

제 21항에 있어서, 단계 2)의 침해성 행동 유발의 측정은 염증성 감작 유발에 의한 뒷발 핥기/튀기기 행동 분석에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 염증성 감작은 상기 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 주사 전에 카라기난(carrageenan) 또는 CFA(complete Freund's adjuvant)를 주사하여 유발되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 25

1) TRPV1 양성 세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

2) 단계 1)의 처리된 TRPV1 양성 세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 세포(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법.

청구항 26

1) TRPV1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 형질전환체(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1) 활성제 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 생리학 및 약리학 분야의 연구를 통해 1997년에 말초감각 신경섬유에 존재하는 TRPV1(transient receptor

potential vanilloid 1)이 발견되었다. 상기 TRPV1은 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체 군인 thermoTRP 군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다. TRPV1은 고온 자극, 염증성 자극, 산성자극 및 매운맛의 성분인 캡사이신 (capsaicin) 등 다양한 자극을 감지하여 활성화되며, 상기 활성화에 의해 인체가 통증을 느끼게 된다. 염증매개물질인 프로스타글란딘, 브래디키닌(bradykinin) 등도 간접적으로 TRPV1 활성도를 높여 통증을 높이는 것으로 알려졌으며 역시 염증매개물질인 신경성장인자(nerve growth factor; NGF)는 TRPV1 발현을 촉진시켜 통증에 대해 더 민감하게 한다고 알려졌다. 연구자들은 통각수용체 TRPV1의 기능을 명확히 규명함으로써 인체의 통각 기전을 밝히고, 아울러 TRPV1의 조절약물의 개발을 통해 통증 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측하고 있다.

[0003] TRPV1과 통증에 대한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재까지는 생체에서 분비되는 내인성 물질로서 HPETE라는 분자가 신경세포 안에서 만들어져 TRPV1에 달라붙어 채널을 연다는 것이 알려졌지만, 상기 화학물질은 화학적으로 불안정하여 실온에서 쉽게 분해되는 단점이 있다.

[0004] 상기 TRPV1의 활성화 억제를 기전으로 하는 통증억제제 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPV1의 특성은 다음과 같다. TRPV1은 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 TRPV1 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 팻취클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPV1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한 상기 TRPV1 활성화 측정 기술들은 동물의 감각신경 세포 배양기술, 세포주 배양기술, TRPV1 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPV1 특이적 억제제 피검화합물들 및 표준 활성제를 TRPV1 과발현 세포에 각각 투여하고 TRPV1 활성화 억제 효과를 측정 및 비교함으로써, 억제제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 여러 TRP를 발현하는 세포주를 제작하여 제라닐제라닐피로인산(geranyl geranyl pyrophosphate; GGPP) 및 TRPV1 활성제로 알려진 캡사이신 처리에 대한 반응을 비교한 결과, 상기 GGPP도 캡사이신과 유사하게 TRPV1을 활성화하며 TRPV1 매개성 통증을 유발하고, 이에 TRPV1을 타깃으로 하는 약물개발에 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)에 특이적으로 활성을 나타내는 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 TRPV1에 특이적으로 활성을 나타내는 활성제를 이용하여 TRPV1 활성 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 TRPV1에 특이적으로 활성을 나타내는 활성제를 이용하여 TRPV1 활성제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제라닐제라닐피로인산(geranyl geranyl pyrophosphate; GGPP) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1) 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은

[0011] 1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계;

[0012] 2) 단계 1)의 처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0013] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 비처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 TRPV1 양성 반응을 나타낸 감각 신경세포를 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 양성 감각 신경세포의 분리 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은

[0015] 1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제를 순차적으로 또는 역순으로 처리하는 단계;

[0016] 2) 단계 1)의 처리된 세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0017] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제가 비처리된 세포의 활성 측정치와 비교하여 TRP 비특이적 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에는 음성 반응하는 신경을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 음성 세포의 분리 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은

[0019] 1) TRPV1 양성 세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0020] 2) TRPV1 음성 세포에 상기 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

[0021] 3) 단계 1) 및 단계 2)의 처리된 TRPV1 양성 세포 및 TRPV1 음성 세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0022] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 세포의 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물을 처리한 TRPV1 양성 세포의 활성을 억제하고 상기 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 세포의 활성에 영향을 주지 않는 후보 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은

[0024] 1) TRPV1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0025] 2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0026] 3) TRPV1 음성 세포에 상기 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

[0027] 4) 단계 2) 및 단계 3)의 처리된 형질전환체 및 TRPV1 음성 세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0028] 5) 단계 4)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물을 처리한 형질전환체의 활성을 억제하고 상기 TRPV1 활성 억제제 후보 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 세포의 활성에 영향을 주지 않는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은

[0030] 1) 피검체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 피검화합물을 투여하는 단계;

[0031] 2) 단계 1)의 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

[0032] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 피검화합물의 침해성 행동을 유발하는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은

[0034] 1) TRPV1 양성 세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성제 후보 피검화합물을 처리하는

단계;

[0035] 2) 단계 1)의 처리된 TRPV1 양성 세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0036] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 세포(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0037] 아울러, 본 발명은

[0038] 1) TRPV1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0039] 2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0040] 3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0041] 4) 단계 3)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 형질전환체(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

효 과

[0042] 본 발명의 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRPV1에만 특이적으로 작용하여, TRPV1을 발현하는 감각신경세포만을 분리할 수 있게 한다. 또한 GGPP를 TRPV1의 내재적 활성제로서 제공하여 상기 채널의 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0044] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제라닐제라닐피로인산(geranyl geranyl pyrophosphate; GGPP) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1) 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0045] 상기 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRPV1의 활성을 촉진하는 역할을 수행한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 GGPP 및 TRPV1 특이적 활성제인 캡사이신이 TRPV1에 미치는 영향을 팻취클램프 기법의 일종인 전세포 전압 클램프 실험 및 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술의 일종인 칼슘 이미지화로 확인한 결과 상기 두 물질이 TRPV1의 활성을 촉진하는 것으로 나타났고(도 1a 참조), 상기 활성은 일반적인 TRPV1 활성 억제제(pore blocker)인 캡사제핀에 의해 억제되었다(도 1b 참조). 즉, 캡사이신에 반응한 모든 세포들은 GGPP에 대해서도 반응하였다.

[0046] 또한 상기 GGPP는 TRPV1을 특이적으로 활성화하는 역할을 수행한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 감각 신경세포에서 발현되는 것으로 알려진 TRP 중에서 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1), TRPV1, TRPV3, TRPV4 및 TRPM8(Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8)를 발현하는 형질전환 세포주에서 GGPP에 의한 활성을 측정한 결과, 활성이 나타나지 않았다(도 2a 참조). 즉, GGPP는 TRPV1에 대해서만 활성을 나타낸다. 또한, GGPP 유사물질인 제라닐 피로인산(Geranyl pyrophosphate: GPP), 이소펜테닐 피로인산isopentenyl pyrophosphate: IPP), 파네솔은 rTRPV1 세포주에서 세포내 칼슘 수준을 향상시키지 못하였다.

[0047] 상기 GGPP는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 부가염이 유용하다. 적합한 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 및 인산

등을 사용할 수 있고 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartariac acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 GGPP는 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 조제될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

[0048] GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRPV1에만 특이적인 활성을 나타내므로, 감각 신경세포 중에 TRPV1 양성 세포만을 분리하는 데에 유용하게 사용될 수 있어서, 상기 감각 신경세포의 통각 감지 성격(예: 열, 화학적 및 기계적 자극에 대한 감수성)의 파악 및 특히 취약한 질환(예: 염증성, 신경병증성 및 약물부작용의 통증)의 판별이 가능할 수 있다. 또한, 상기 GGPP를 동물에 투여하여 통증행동반응 강도를 측정함으로써 상기 TRPV1 활성이 실제 행동반응으로 외삽되는 지를 확인할 수 있고, 또한 이를 통해 여러 통증 중 TRPV1의 관련 통증을 판별할 수 있을 것이다. 아울러, TRPV1 활성 억제제 개발에도 유용하게 사용될 것이다. 즉, TRPV1 활성제 개발의 경우, TRPV1 활성 피검화합물의 표준 물질로 사용될 수 있을 것이다. 또한, TRPV1 활성 억제제 개발의 경우, 피검화합물이 GGPP에 의한 TRPV1 활성화를 차단하는지 여부를 확인하는 데에 이용될 수 있을 것이다. 아울러, 상기 GGPP는 화학적 가공을 통해 더욱 높은 강도의 활성제 또는 활성 억제제로 변화시킬 수 있도록 활용할 수 있을 것이다.

[0049] 또한, 본 발명은

[0050] 1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계;

[0051] 2) 단계 1)의 처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0052] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 비처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 TRPV1 양성 반응을 나타낸 감각 신경세포를 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 양성 감각 신경세포의 분리 방법을 제공한다.

[0053] 상기 피검체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 더욱 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다. 상기 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10 내지 1000 μM의 농도이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 GGPP의 TRPV1에 대한 EC_{50}(effective concentration 50%: 50% 효과 농도)은 76.4 μM이었고, 최대 유효량은 대략 1 mM이었다. 이것은 GGPP가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPV1에 활성 효과를 나타내는 것을 시사한다(도 2b 참조).

[0054] 또한, 단계 2)의 TRPV1 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 전세포 전압 클램프 기술 및 TRPV1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0055] 본 발명의 구체적인 실시예에서 약리학적 결과 및 전류-전압 프로파일링 방법을 이용하여 감각 신경세포에서 GGPP에 의해 반응성이 특이적으로 나타난 것을 확인하였다(도 3 참조). 그러므로, 상기 감각 신경세포의 약리학적 결과 및 전류-전압 프로파일링을 결과를 통합적으로 분석함으로써, TRPV1 활성 억제제 및 활성제의 선별이 가능할 뿐만 아니라, 신규 TRPV1 활성제인 GGPP를 사용하여 TRPV1-양성 감각 신경세포를 약리학적으로 분리될 수 있음을 시사하였다.

[0056] 또한, 본 발명은

[0057] 1) 피검체로부터 분리된 감각 신경세포를 배양한 후 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제를 순차적으로 또는 역순으로 처리하는 단계;

[0058] 2) 단계 1)의 처리된 감각 신경세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0059] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRP 비특이적 활성제가 비처리된 세포의 활성 측정치와 비교하여 TRP 비특이적 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능

한 염에는 음성 반응하는 신경을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 음성 세포의 분리 방법을 제공한다.

[0060] 또한, 단계 2)의 TRPV1 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 전세포 전압 클램프 기술 및 TRPV1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0061] 또한, 단계 1)의 TRP 비특이적 활성제는 계피알데히드(cinnamaldehyde) 및 멘톨(menthol) 등의 TRPV1을 포함하는 thermoTRP 군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)의 활성제로 알려진 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 또한, 본 발명은

[0063] 1) TRPV1 양성 세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리하는 단계;

[0064] 2) TRPV1 음성 세포에 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

[0065] 3) 단계 1) 및 단계 2)의 처리된 TRPV1 양성 세포 및 TRPV1 음성 세포의 TRPV1 활성을 측정하는 단계; 및,

[0066] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 세포의 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리한 TRPV1 양성 세포의 활성을 억제하고 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 세포의 활성에 영향을 주지 않는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0067] 상기 TRPV1 양성 감각신경세포 및 TRPV1 음성 감각 신경세포는 본 발명의 방법에 의해 분리되는 것을 특징으로 한다. 단계 1)의 피검화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 앱타머(aptamer), 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 또한, 본 발명은

[0069] 1) TRPV1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0070] 2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리하는 단계;

[0071] 3) TRPV1 음성 세포에 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리하는 단계;

[0072] 4) 단계 2) 및 단계 3)의 처리된 형질전환체 및 TRPV1 음성 세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0073] 5) 단계 4)의 각각의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 피검화합물을 처리한 형질전환체의 활성을 억제하고 상기 피검화합물 및 TRP 비특이적 활성제를 처리한 TRPV1 음성 세포의 활성에 영향을 주지 않는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0074] 상기 숙주세포는 이에 제한되는 것은 아니나, HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주 등의 칼슘 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주가 바람직하다. 단계 2)의 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TRPV1만을 특이적으로 활성화하는 작용을 수행한다.

[0075] 본 발명의 구체적인 실시예에서 감각 감각신경세포에서 발현되는 것으로 알려진 TRP 중에서 TRPV1을 발현하는 형질전환 세포주에서만 GGPP에 의한 활성을 나타냈다(도 2a 참조). 상기 GGPP는 1 내지 1000 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10 내지 1000 μM의 농도이다.

[0076] 아울러, 본 발명은

[0077] 1) 피검체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 피검화합물을 투여하는 단계;

[0078] 2) 단계 1)의 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

[0079] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 피검화합물의 침해성 행동을 유발하는 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0080] 상기 피검체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 더욱 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다. 또한 단계 2)의 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1 내지 100 mM의 농도로 투여하는 것이 바람직하다. 단계 2)의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여 방법이 바람직하고, 피내 투여가 가장 바람직하다. 단계 3)의 침해성 행동 유발의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 염증성 감작 유발에 의한 뒷발 핥기/튀기기 행동 분석에 의해 수행될 수 있다. 상기 염증성 감작은 상기 GGPP 주사 전에 카라기난(carrageenan) 또는 CFA(complete Freund's adjuvant)를 주사하여 유발할 수 있다.

[0081] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 GGPP 처리에 의해 침해성(nocifensive) 행동을 실제로 유발할 수 있는지를 시험하였다. 뒷발에 카라기난 또는 CFA에 의해 염증을 일으킨 쥐에 GGPP를 투여한 결과, GGPP를 포함하지 않는 부형액만 투여한 군에서는 행동성 반응이 유발되지 않았으나, GGPP는 캡사이신과 유사하게 반응행동 시간을 증가시켰고 이는 TRPV1 특이적인 억제제로 알려진 캡사제핀에 의해 억제되었다(도 4 참조).

[0082] 또한, 본 발명은

[0083] 1) TRPV1 양성 세포에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활성제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0084] 2) 단계 1)의 처리된 TRPV1 양성 세포의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0085] 3) 단계 2)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 양성 세포(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0086] 아울러, 본 발명은

[0087] 1) TRPV1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0088] 2) 상기 형질전환체에 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 TRPV1 활제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0089] 3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV1 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0090] 4) 단계 3)의 측정치를 GGPP 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염만 처리된 TRPV1 형질전환체(대조군)의 TRPV1 활성 측정치와 비교하여 대조군보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV1 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

실 시 예

[0091] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0092] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0093] **<실시예 1> TRP 형질전환 세포주 제조**

[0094] HEK293T 세포주(ATCC CRL-11268)를 rTRPV1(서열번호 1), rTRPV2(서열번호 2), mTRPV3(서열번호 3), rTRPV4(서

열번호 4), mTRPM8(서열번호 5) 및 mTRPA1(서열번호 6) 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.

[0095] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 well plate 당 0.8 ㎍의 rTRPV2, rTRPV1의 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 pcDNA3.1 벡터, mTRPA1, hTRPV3, rTRPV4 및 mTRPM8의 각각 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터 및 0.2 ㎍/웰의 pCDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene HD(Roche Diagnostics, 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24 시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였고, 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.

[0096] **<실시예 2> 척수후근신경절(dorsal root ganglia: DRG) 감각 신경세포 준비**

[0097] 차가운 PBS에서 성체 ICR계 생쥐(한림실험동물연구소, 한국)의 DRG를 분리하여 세절한 후, 3 ㎎/㎖ 콜라게나아제 타입 2(collagenase type 2; Invirogen, USA)를 37℃에서 45분 동안 처리한 후 기계적인 방법으로 완전히 소화시켰다. 상기 방법으로 제조한 DRG 감각 신경세포를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/㎖ 2.5S NGF(calbiochemn, USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 48 내지 72시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0098] **<실시예 3> 통계적 처리**

[0099] 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.

[0100] **<실시예 4> GGPP에 의한 TRPV1의 활성화 변화 조사 방법**

[0101] **<4-1> 전기 생리학적인 방법으로 세포내 채널의 활성 측정**

[0102] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV1 형질전환 세포주에 TRPV1에 대한 특이적 활성제인 100 nM 캡사이신(CAP; sigma, USA), 30 μM GGPP(echelon, USA) 및 대조군으로 완충용액을 각각 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 DMSO를 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 전기 생리학적인 측정을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)과 피펫 용액(pipet solution, 140 mM CsCl 10 mM EGTA,10 mM HEPES를 포함하여 pH 7.4로 적정)을 사용하였다. 이후, 팻취 클랩프 셋트를 이용하여 전체 세포 팻취 클램프를 실시하였고 이중 전압 전류 상관 곡선을 이용하여 이온 채널 특이적인 반응임을 확인함과 동시에 GGPP에 의해 효과적으로 활성화함을 확인하였다. 팻취 클랩프 셋트는 multiclamp 700B(molecular device, 미국)을 이용하여 미세한 신호를 증폭하고, digidata1332a(Molecular device, 미국)를 이용하여 아날로그 신호를 디지털화하였다. pClamp 10(Molecular device, 미국)을 이용하여 데이터를 수집 및 기계를 조작했고, clemp X-10(Molecular device, 미국)을 이용하여 데이터를 편집했다.

[0104] 그 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이 GGPP는 CAP와 마찬가지로 TRPV1을 활성화함을 나타내었다.

[0105] **<4-2> 형광 현미경을 이용한 칼슘 이미지 기법**

[0106] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV1 형질전환 세포주에 검사 개시 200초 후부터 30 μM GGPP를 200초간 처리하면서, 상기 GGPP 처리 개시 잠시 후 TRPV1 특이적인 억제제인 20 μM 캡사제핀(capsazepine; CAZ)을 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 DMSO를 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0107] 구체적으로, 0.02% 플루로닉산(pluronic acid; Invitrogen, USA)을 포함하는 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기

방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fura2-AM(5 μM; invitorgen, USA)을 37℃에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, fura2 calcium image system olympus 형광 현미경(Olympus, 일본)을 이용하여 칼슘 이미지화(Calcium imaging)를 수행하였고, Meta flow(Morecular device, 미국)를 이용하여 촬영이미지(time-lapse image; 340 nm /380 nm)를 매 3초마다 측정하여 그 비율로 나타내었다.

[0108] 그 결과, 도 1b에서 나타난 바와 같이 GGPP에 의한 TRPV1 활성이 TRPV1 특이적인 억제제인 CAZ에 의해 억제됨이 확인되었다.

[0109] **<실시예 5> TRP 형질전환 세포주별 GGPP에 대한 반응 조사**

[0110] GGPP는 인체 내에서 콜레스테롤 생합성 경로인 메발로네이트경로(mevalonate pathway) 상의 중간산물이다. 이에 본 발명자들은 상기 대사경로의 여타 중간물질도 TRPV1의 활성화 효과가 있는지 확인하였다. 제라닐 피로인산(Geranyl pyrophosphate: GPP)은 GGPP의 제라닐(geranyl)기가 빠진 형태이며, 이소펜테닐 피로인산 isopentenyl pyrophosphate: IPP)은 GGPP의 전구물질이다. 파네솔(farnesol)은 GGPP의 전구물질로부터 생성되는 물질이다.

[0111] 또한, 상기 GGPP가 TRP 채널 중 TRPV1만을 특이적으로 활성화하는지 여부를 확인하고자, 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 및 TRPM8 형질전환 세포주 및 형질전환되지 않은 HEK 세포주(대조군)를 대상으로, 상기 세포주에 10 μM GPP, 10 μM IPP, 10 μM GGPP 및 10 μM 파네솔을 각각 처리하였다. 이후 실시예 4-2의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0112] 그 결과, 도 2a에서 나타낸 바와 같이 통증 감지에 중요한 것으로 알려진 상기 6개의 TRP 중에서 TRPV1에 대해서만 GGPP에 의한 활성을 확인하였다.

[0113] 즉, GGPP 유사물질인 GPP, IPP, 파네솔은 rTRPV1 세포주에서 세포내 칼슘 수준을 향상시키지 못하였다. 그러나 상기 세포주는 GGPP에 대해서는 통계적으로 유의하게 반응하였다.

[0114] **<실시예 6> TRPV1의 GGPP 농도 의존적 반응 조사**

[0115] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV1 형질전환 세포주에 1 내지 1,000 μM GGPP를 각각 처리한 후, 실시예 4-2의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다. 이후, 측정값을 Hill-plot을 이용하여 농도-반응 곡선으로 작성하였다.

[0116] 그 결과, 도 2b에서 나타난 바와 같이 GGPP의 TRPV1에 대한 EC_{50}(effective concentration 50%; 50% 효과 농도)은 대략 76.4 μM이었고, 최대 유효량은 대략 1 mM이었다. 이것은 GGPP가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPV1에 활성 효과를 나타내는 것을 지시한다.

[0117] **<실시예 7> 감각 신경세포의 GGPP 특이적 반응 조사**

[0118] 실시예 2에서와 같이 분리된 감각 신경세포에 300 nM CAP를 처리한 후, 잠시 후 10 μM GGPP를 처리하였다. 이를 실시예 4의 방법으로 전기 생리학적인 기법을 수행하였다.

[0119] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 GGPP가 감각 신경세포의 TRPV1을 활성화하여 내향전류를 발생시키고, 기존 TRPV1 특이적인 활성제인 캡사이신에 반응하는 감각 신경세포와 GPPP에 반응하는 감각 신경세포가 서로 일치하는 것을 확인하였다. 즉, CAP에 특이적인 반응을 보이는 감각 신경세포가 GGPP에도 특이적으로 반응함을 확인하였다.

[0120] **<실시예 8> 동물 통증행동실험을 통한 GGPP 통증 반응 조사**

[0121] **<8-1> 염증성 감작 유발**

[0122] GGPP에 의한 염증성 감작(inflammatory sensitization) 반응을 관찰하기 위하여, 오른쪽 뒷발의 발바닥에 상기 GGPP 주사 3 시간 전에 50 ㎕의 1% 카라기난(carrageenan; Sigma aldrich, USA)을 주사하거나, 또는 상기 GGPP 주사 24 시간 전에 50 ㎕의 CFA(complete Freund's adjuvant; Sigma aldrich, USA)를 주사하였다. 또한, 실험에 앞서 쥐를 1 시간 동안 실험환경에 적응하도록 순화시켰으며, 하기 실험군 각각 25 ㎖를 쥐의 오른쪽 뒷발에

피내 주사하였다.

[0123] 대조군: 무처리;

[0124] 실험군 1: 10 mM의 GGPP;

[0125] 실험군 2: 1 mM CAP; 및,

[0126] 실험군 3: 3 mM CAZ +10 mM의 GGPP.

[0127] **<8-2> 급성 침해성 행동(핥기/튀기기 행동) 분석**

[0128] 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.

[0129] 그 결과, 도 4에서 나타낸 바와 같이 GGPP는 CAP와 유사하게 동물들의 통증행동 소요시간을 증가시켰고, 이는 GGPP와 CAZ을 동시에 사용함으로써 통증행동 소요시간이 억제되었다.

도면의 간단한 설명

[0130] 도 1은 rTRPV1 세포주에서 GGPP에 의해 활성화됨을 확인한 도이다(CAP: 캡사이신, CAZ: 캡사제핀):

[0131] a: 전기 생리학적인 방법으로, 130 μM GGPP가 100 nM CAP과 유사하게 TRPV1을 활성화함을 나타낸 것을 확인함; 및,

[0132] b: 칼슘 이미지화 방법으로, 30 μM GGPP에 의한 TRPV1의 활성을 TRPV1 특이적인 억제제인 20 μM CAZ에 의해 억제되는 것을 확인함.

[0133] 도 2는 GGPP가 TRPV1을 특이적이며 농도 의존적으로 활성화하는 것을 확인한 도이다:

[0134] a: GGPP가 6종의 thermoTRP 중 TRPV1만을 활성화하는 것을 확인함; 및,

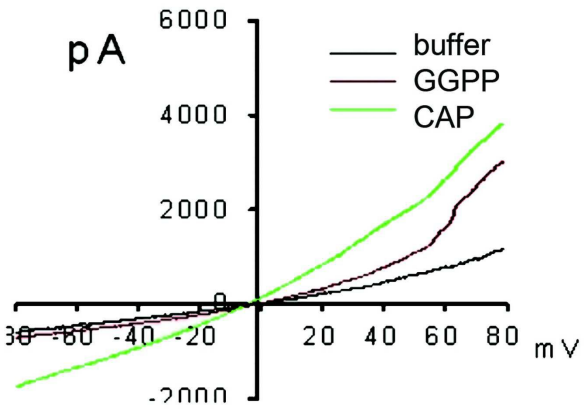
[0135] b: GGPP의 TRPV1에 대한 EC_{50}은 대략 76.4 μM임.

[0136] 도 3은 CAP에 특이적인 반응을 보이는 감각 신경세포가 GGPP에도 특이적으로 반응하는 것을 확인한 도이다.

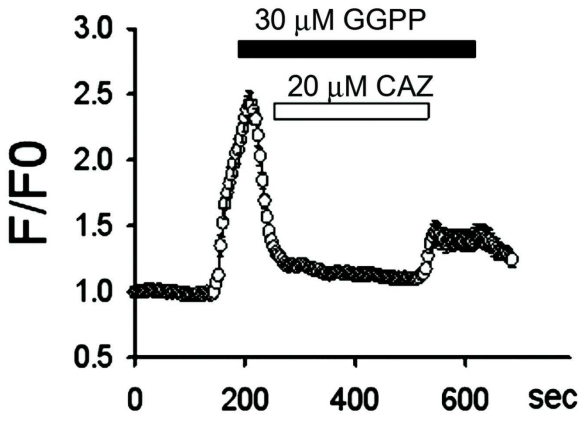
[0137] 도 4는 급성 핥기 튀기 반응 검사법을 수행한 결과, GGPP는 CAP와 유사하게 반응행동 시간을 증가시켰고, 이는 TRPV1 특이적 억제제인 CAZ에 의해 억제됨을 확인한 도이다.

도면

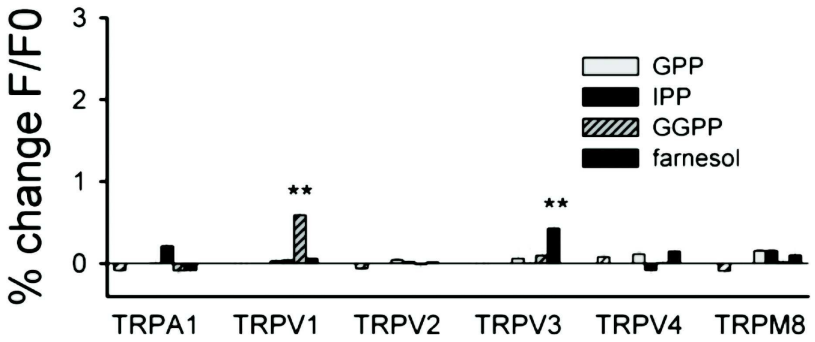
도면1a



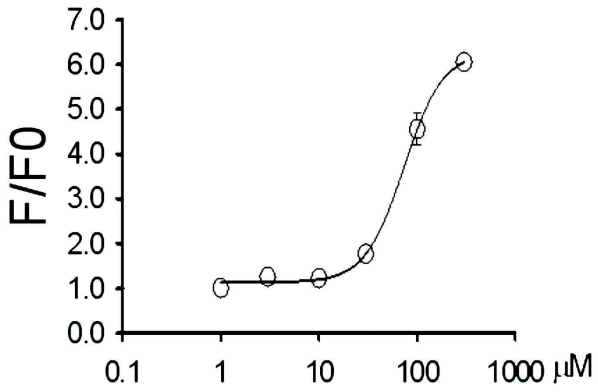
도면1b



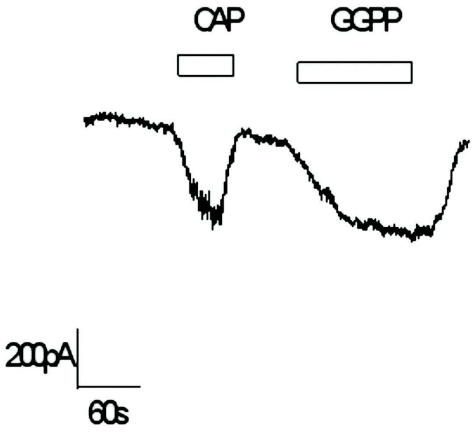
도면2a



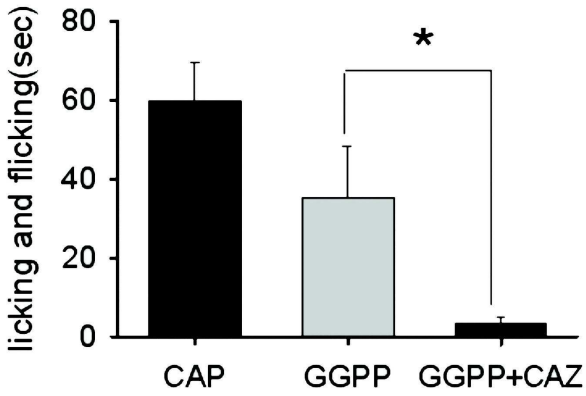
도면2b



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY Industry & Academy Collaboration Foundation
<120> Method for activation of Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 using a novel activator

<130> 9P-08-48

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 2847
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rTRPV1

<400> 1
cagctccaag gcacttgctc catttggggt gtgcctgcac ctagctggtt gcaaattggg 60

ccacagagga tctggaaagg atggaacaac gggctagctt agactcagag gagtctgagt 120

ccccacccca agagaactcc tgcctggacc ctccagacag agaccctaac tgcaagccac 180

ctccagtcaa gccccacatc ttcactacca ggagtcgtac ccggcttttt gggaagggtg 240

actcggagga ggcctctccc ctggactgcc cttatgagga aggcgggctg gcttcctgcc 300

ctatcatcac tgtcagctct gttctaacta tccagaggcc tggggatgga cctgccagtg 360

tcaggccgtc atcccaggac tccgtctccg ctggtgagaa gcccccgagg ctctatgatc 420

gcaggagcat cttcgatgct gtggctcaga gtaactgcca ggagctggag agcctgctgc 480

ccttcctgca gaggagcaag aagcgcctga ctgacagcga gttcaaagac ccagagacag 540

gaaagacctg tctgctaaaa gccatgctca atctgcacaa tgggcagaat gacaccatcg 600

ctctgctcct ggacgttgcc cggaagacag acagcctgaa gcagtttgtc aatgccagct 660

acacagacag ctactacaag ggccagacag cactgcacat tgccattgaa cggcggaaca 720

tgacgctggt gaccctcttg gtggagaatg gagcagatgt ccaggctgcg gctaacgggg 780

acttcttcaa gaaaaccaaa gggaggcctg gcttctactt tggtgagctg cccctgtccc 840

tggctgcgtg caccaaccag ctggccattg tgaagttcct gctgcagaac tcctggcagc 900

ctgcagacat cagcgcccgg gactcagtgg gcaacacggt gcttcatgcc ctggtggagg 960

tggcagataa cacagttgac aacaccaagt tcgtgacaag catgtacaac gagatcttga 1020

tcctgggggc caaactccac cccacgctga agctggaaga gatcaccaac aggaaggggc 1080

tcacgccact ggctctggct gctagcagtg ggaagatcgg ggtcttggcc tacattctcc 1140

agagggagat ccatgaaccc gagtgccgac acctatccag gaagttcacc gaatgggcct 1200

atgggccagt gcactcctcc ctttatgacc tgtcctgcat tgacacctgt gaaaagaact 1260

cggttctgga ggtgatcgct tacagcagca gtgagacccc taaccgtcat gacatgcttc 1320

tcgtggaacc cttgaaccga ctcctacagg acaagtggga cagatttgtc aagcgcatct 1380

tctacttcaa cttcttcgtc tactgcttgt atatgatcat cttcaccgcg gctgcctact 1440

atcggcctgt ggaaggcttg ccccccctata agctgaaaaa caccgttggg gactatttcc 1500

gagtcaccgg agagatcttg tctgtgtcag gaggagtcta cttcttcttc cgagggattc 1560

aatatttcct gcagaggcga ccatccctca agagtttgtt tgtggacagc tacagtgaga 1620

tacttttctt tgtacagtcg ctgttcatgc tggtgtctgt ggtactgtac ttcagccaac 1680

gcaaggagta tgtggcttcc atggtgttct ccctggccat gggctggacc aacatgctct 1740

actatacccg aggattccag cagatgggca tctatgctgt catgattgag aagatgatcc 1800

tcagagacct gtgccggttt atgttcgtct acctcgtgtt cttgtttgga ttttccacag 1860

ctgtggtgac actgattgag gatgggaaga ataactctct gcctatggag tccacaccac 1920

acaagtgccg ggggtctgcc tgcaagccag gtaactctta caacagcctg tattccacat 1980

gtctggagct gttcaagttc accatcggca tgggcgacct ggagttcact gagaactacg 2040

acttcaaggc tgtcttcatc atcctgttac tggcctatgt gattctcacc tacatccttc 2100

tgctcaacat gctcattgct ctcatgggtg agaccgtcaa caagattgca caagagagca 2160

agaacatctg gaagctgcag agagccatca ccatcctgga tacagagaag agcttcctga 2220

agtgcatgag gaaggccttc cgctctggca agctgctgca ggtggggttc actcctgacg 2280

gcaaggatga ctaccggtgg tgtttcaggg tggacgaggt aaactggact acctggaaca 2340

ccaatgtggg tatcatcaac gaggacccag gcaactgtga gggcgtcaag cgcaccctga 2400

gcttctccct gaggtcaggc cgagtttcag ggagaaactg gaagaacttt gccctggttc 2460

cccttctgag ggatgcaagc actcgagata gacatgccac ccagcaggaa gaagttcaac 2520

tgaagcatta tacgggatcc cttaagccag aggatgctga ggttttcaag gattccatgg 2580

tcccagggga gaaataatgg acactatgca gggatcaatg cggggtcttt gggtggtctg 2640

cttagggaac cagcagggtt gacgttatct gggtccactc tgtgcctgcc taggcacatt 2700

cctaggactt cggcgggcct gctgtgggaa ctgggaggtg tgtgggaatt gagatgtgta 2760

tccaaccatg atctccaaac atttggcttt caactcttta tggactttat taaacagagt 2820

gaatggcaaa tctctacttg gacacat 2847

<210> 2
<211> 2768
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rTRPV2

<400> 2
ctgctctgtc cactgtgtga gacgaacagg tggagggtgg acgacgcaga gaaagctcgg 60

agcgggccgc ggaggttccc acagccccat tactgtcagc gttgagccgc acccctccgg 120

gccgcacttc ctctctcagt ccccgctgcc ggagagcccc gctaggctcg gtgatcctag 180

cctgcagttt gccgccgcta caccttggct tcagcctgcg ggcccctctc catcaccttc 240

tccaggtccc agccaggcct gcccctgcgg tatgagagag gaaccttaac atctccatct 300

ctacagaggt ttcagctgta aggagcatcc tcctctctca ggatgacttc agcctccagc 360

cccccagctt tcaggctgga gacttccgat ggagatgaag agggcaatgc tgaggtgaac 420

aaggggaagc aggaaccgcc ccccatggag tcaccattcc agagggagga ccggaattcc 480

tcccctcaga tcaaagtgaa cctcaacttc ataaagagac ctcctaaaaa cacttctgct 540

cccagccagc aggagccaga tcggtttgac cgtgaccgac tcttcagtgt ggtctcccgg 600

ggtgtccccg aggaactgac tggactgcta gaatacctgc gctggaacag caagtacctc 660

actgactctg catacacaga aggctccact ggaaagacgt gcctgatgaa ggctgtgctg 720

aaccttcagg atggggtcaa tgcctgcatc atgccgctgc tgcagattga caaggattcc 780

ggcaatccca agcccctcgt caatgcccag tgcatcgatg agttctacca aggccacagt 840

gcgctgcaca tcgccataga gaagaggagc ctgcagtgcg tgaagctgct ggtagagaat 900

ggagcggatg ttcacctccg agcctgtggc cgcttcttcc aaaagcacca aggaacttgt 960

ttctattttg gagagctacc tctttctctg gctgcgtgca ccaagcagtg ggatgtggtg 1020

acctacctcc tggagaaccc acaccagccg gccagcctgg aggccaccga ctccctgggc 1080

aacacagtcc tgcatgctct ggtaatgatt gcagataact cgcctgagaa cagtgccctg 1140

gtgatccaca tgtacgacgg gcttctacaa atgggggcgc gcctctgccc cactgtgcag 1200

cttgaggaaa tctccaacca ccaaggcctc acacccctga aactagccgc caaggaaggc 1260

aaaatcgaga ttttcaggca cattctgcag cgggaattct caggaccgta ccagcccctt 1320

tcccgaaagt ttactgagtg gtgttacggt cctgtgcggg tatcgctgta cgacctgtcc 1380

tctgtggaca gctgggaaaa gaactcggtg ctggagatca tcgcttttca ttgcaagagc 1440

ccgaaccggc accgcatggt ggttttagaa ccactgaaca agcttctgca ggagaaatgg 1500

gatcggctcg tctcaagatt cttcttcaac ttcgcctgct acttggtcta catgttcatc 1560

ttcaccgtcg ttgcctacca ccagccttcc ctggatcagc cagccatccc ctcatcaaaa 1620

gcgacttttg gggaatccat gctgctgctg ggccacattc tgatcctgct tgggggtatt 1680

tacctcttac tgggccagct gtggtacttt tggcggcggc gcctgttcat ctggatctca 1740

ttcatggaca gctactttga aatcctcttt ctccttcagg ctctgctcac agtgctgtcc 1800

caggtgctgc gcttcatgga gactgaatgg tacctacccc tgctagtgtt atccctagtg 1860

ctgggctggc tgaacctgct ttactacaca cggggctttc agcacacagg catctacagt 1920

gtcatgatcc agaaggtcat ccttcgagac ctgctccgtt tcctgctggt ctacctggtc 1980

ttccttttcg gctttgctgt agccctagta agcttgagca gagaggcccg aagtcccaaa 2040

gcccctgaag ataacaactc cacagtgacg gaacagccca cggtgggcca ggaggaggag 2100

ccagctccat atcggagcat tctggatgcc tccctagagc tgttcaagtt caccattggt 2160

atgggggagc tggctttcca ggaacagctg cgttttcgtg gggtggtcct 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 cagggggat ggtacccctg atgagcgctg gtgcttcagg 2460

gtggaggaag taaattgggt tgcttgggag aagactcttc ccaccttatc tgaggatcca 2520

tcagggccag gcatcactgg taataaaaag aacccaacct ctaaaccggg gaagaacagt 2580

gcctcagagg aagaccatct gccccttcag gtcctccagt ccccctgatg gcccagatgc 2640

agcagcaggc tggcaggatg gagtagggaa tcttcccagc cacaccagag gctactgagt 2700

tttggtggaa atataaatat ttttttgcat aaccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760

aaaaaagg 2768

<210> 3
<211> 2440
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTRPV3

<400> 3
gatctcaagg caaggactgc caccaccatc tggaacctgc cagcatatgc cttaggctcc 60

agcaatgaat gcccactcca aggagatggt gcccctcatg ggcaaaagaa ccacggcacc 120

tggcgggaac cctgttgtac tgacagagaa gaggccagca gatctcaccc ccaccaagaa 180

gagtgcacac ttcttcctgg agatagaagg atttgagccc aaccccacgg tcaccaagac 240

ctctccaccc atcttctcca agccgatgga ctccaacatc cggcagtgcc tctctggcaa 300

ctgtgatgac atggactctc cccagtctcc tcaggatgat gtgacagaga ccccatccaa 360

tcccaacagt ccgagcgcaa acctggccaa ggaagaacag aggcagaaga agaagcgact 420

gaagaagcgc atcttcgcgg ctgtgtccga gggctgcgtg gaggagctgc gggaactcct 480

acaggatctg caggacctct gcaggaggcg ccgcggcctg gatgtgcctg acttcctcat 540

gcacaagctg acagcctcag acaccgggaa gacctgcctg atgaaggctt tgctcaacat 600

caatcccaac accaaagaga tcgtgcggat tctgcttgcc ttcgctgagg agaacgacat 660

cctggacagg ttcatcaacg ctgagtacac ggaagaggcc tatgaagggc agacagcgct 720

gaacatcgcc atcgagcggc gccagggaga catcacagca gtgcttatag cagcgggtgc 780

tgacgtcaat gctcacgcca agggggtctt cttcaacccc aaataccagc atgaaggctt 840

ctattttggc gagacacccc tggctttggc agcgtgtact aaccagcctg agattgtgca 900

gctgctgatg gagaatgagc agacagacat cacttcccag gattcccggg gaaacaacat 960

cctgcacgcg ctggtgacag tggctgagga cttcaagact cagaatgact tcgttaagcg 1020

catgtatgac atgatcctgc tgaggagtgg caactgggag ctggagacca tgcgcaacaa 1080

cgatgggctc acaccactgc agctggctgc caagatgggc aaggctgaga tcctgaagta 1140

catcctcagc cgcgagatca aggagaagcc tctccggagc ttgtccagga agttcacgga 1200

ctgggcgtat gggcctgtgt catcctcact ctatgacctc accaatgtag acacaacgac 1260

ggataactct gtgctggaaa tcatcgtcta caacaccaac attgataacc gacatgagat 1320

gctgaccctg gagcctctgc atacgctgct acacacgaaa tggaagaaat ttgccaagta 1380

catgttcttc ttgtccttct gcttctattt cttctacaac atcaccctga cccttgtctc 1440

ttactaccgt cctcgggaag atgaggatct cccacacccc ttggccctga cacacaaaat 1500

gagttggctt cagctcctag ggaggatgtt tgtcctcatc tgggccacat gcatctctgt 1560

gaaagaaggc attgccattt tcctgctgag accctccgat cttcagtcca tcctgtcaga 1620

tgcctggttt cactttgtct tttttgtcca agctgtactt gtgatactgt ctgtattctt 1680

gtacttgttt gcctacaaag aatacctcgc ctgcctcgtg ctggccatgg ccctgggctg 1740

ggcgaacatg ctctactaca cgagaggctt ccagtctatg ggcatgtaca gcgtcatgat 1800

ccagaaggtc attttgcatg atgtcctcaa gttcttgttt gtttacatcc tgttcttact 1860

tggatttgga gtagcgctgg cctcactgat tgagaagtgc tccaaggaca aaaaggactg 1920

cagttcctat ggcagcttca gcgacgcggt gctggagctc ttcaagctca ccataggcct 1980

gggcgacctg aacatccagc agaactccac ctaccccatc ctctttctct tcctactcat 2040

cacctatgtc atcctcacct tcgtcctcct cctcaacatg ctcatcgccc tgatggggga 2100

gacggtggag aacgtctcca aagaaagtga gcggatctgg cgcttgcaga gagccaggac 2160

catcttggag tttgagaaaa tgttaccaga atggctgaga agcagattcc gcatgggcga 2220

gctgtgcaaa gtagcagatg aggacttccg gctgtgtctg cggatcaacg aggtgaagtg 2280

gacggaatgg aaaacacacg tgtccttcct taatgaagac ccgggaccca taagacggac 2340

agcagattta aacaagattc aagattcttc caggagcaat agcaaaacca ccctctatgc 2400

gtttgatgaa ttagatgaat tcccagaaac gtcggtgtag 2440

<210> 4
<211> 3211
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rTRPV4

<400> 4
gggaggagga cgcggcggga tcaggaagcg gctgcgctgc gcccgcgtcc caagcaggcc 60

gagaagtcca aacagatctg ctcagggtcc agtatggcag atcctggtga tggcccccgt 120

gcagcgcctg gggatgtggc tgagcccccc ggagacgaga gtggcacttc tggtggggag 180

gccttccccc tctcttccct ggccaacctg tttgagggag aggaaggctc ctcttctctt 240

tcaccagtgg atgctagccg ccctgctggc cccggggatg gacgtccaaa cctgcgtatg 300

aagttccagg gcgctttccg caaggggggtt cccaacccca ttgacctgct ggagtccacc 360

ctgtatgagt cctcagtagt gcctgggccc aagaaagcgc ccatggattc gttgttcgac 420

tatggcactt accggcacca ccccagtgac aacaagagat ggaggaggaa ggtcgtagag 480

aagcagccac agagccccaa agctcccgcc ccccagccac cccccatcct caaagtcttc 540

aaccggccca tcctctttga catcgtgtcc cggggctcca ctgccgacct ggacggactg 600

ctctcctact tgctgaccca caagaagcgc ctgactgatg aggagttccg ggaaccatcc 660

acagggaaga cctgcctgcc caaggcactt ctgaacttaa gcaatggccg aaacgacacc 720

atcccagtgt tgctggacat tgcggaacgc acgggcaaca tgcgggagtt catcaactcg 780

cccttcagag acatctacta ccgagggcag acggcactgc acatcgccat tgaacggcgc 840

tgcaagcatt acgtggagct cctggtggcc cagggagccg atgtgcacgc gcaggcccga 900

gggcggttct tccagcccaa ggatgagggt ggctacttct actttgggga gctgcccttg 960

tccttggcag cctgcaccaa ccagccgcac atcgtcaact acctgacaga gaaccctcac 1020

aagaaagccg atatgaggcg acaggactcc agaggcaaca cggtgctcca cgcgctggtg 1080

gccatcgctg acaacacccg agagaacacc aagtttgtca ccaagatgta tgacctgttg 1140

cttctcaagt gctcccgcct cttcccagac agcaacctgg agactgtgct taacaatgac 1200

ggtctttcgc ccctcatgat ggctgccaag actggcaaga tcggggtctt tcagcacatc 1260

atccgacggg aggtgacaga tgaggacaca cggcacctgt ctcgcaagtt caaggactgg 1320

gcctacgggc ctgtgtattc ttctctctac gacctctcct ccctggatac gtgcggggag 1380

gaagtgtccg tgctggagat cctggtttac aacagcaaga tcgagaaccg ccatgagatg 1440

ctggctgtgg agcccattaa cgaactgctg agggacaagt ggcgtaagtt cggggccgtg 1500

tccttctaca tcaacgttgt ctcctatctg tgtgccatgg tcatcttcac cctcacagcc 1560

tactatcagc cactggaggg cacgccaccc tacccttacc gtaccacggt ggactacctg 1620

aggctggctg gtgaggtcat cacgctcctc acaggagtcc tgttcttctt taccagtatc 1680

aaagacttgt tcatgaagaa atgccctgga gtgaattctc tcttcgtcga tggctccttc 1740

cagttgctct acttcatcta ctcagtgctg gtggttgtgt ctgcggcgct ctacctggca 1800

gggatcgagg cctatctggc tgtgatggtc tttgccctgg tcctgggctg gatgaatgcc 1860

ctttacttca cccgtgggct gaagctgaca gggacctaca gcatcatgat tcagaagatc 1920

ctcttcaaag atctcttccg ctttctgctg gtctacctgc tttttatgat tggctatgcc 1980

tcagctctgg tcaccctcct gaatccgtgc accaacatga aggtctgtaa cgaggaccag 2040

agcaactgca cggtgccctc ataccccgcg tgccgggaca gcgagacctt cagcgccttc 2100

ctactggacc tcttcaagct caccatcggc atgggcgacc tggagatgct gagcagcgct 2160

aagtaccccg tggtcttcat tctcctgctg gttacctaca tcatcctcac cttcgtgctc 2220

ctgctgaaca tgctcatcgc cctcatgggt gagaccgtgg gccaggtgtc caaggagagc 2280

aagcacatct ggaagctgca gtgggccacc accatcctgg acatcgagcg ctccttccct 2340

gtgttcctga ggaaggcctt ccgctccgga gagatggtga cagtgggcaa gagctcggat 2400

ggcactccag accgcaggtg gtgcttcagg gtggacgagg tgaactggtc tcactggaac 2460

cagaacctgg gcatcattaa cgaggacccc ggcaagagcg agatctacca gtactatggc 2520

ttctcccata ccatggggcg cctccgcagg gatcgctggt cctcagtggt gccccgcgtg 2580

gtggagctga acaagaactc aggcacagat gaagtggtgg tccccctgga taacctaggg 2640

aaccccaact gtgacggcca ccagcaaggt tatgctccca agtggagggc ggaggacgca 2700

ccactgtagg ggccatgcca gggctggggt caatggccca ggcttggccc ttgctcccac 2760

ctacatttca gcatctgtcc tgtgtcttcc cacacccaca cgtgacctcg gaggtgaggg 2820

cctctgtgga gactctgggg aggccccagg accctctggt ccccacaaag acttttgctc 2880

ttatttctac tcctccccac atgggggacg gggctcctgg ccacctgtct cactcccatg 2940

gagtcaccta agccagctca gggcccctcc actcacaggg ctcaggcccc tgtccctctt 3000

gtgcactatt tattgctctc ctcaggaaaa tgacatcaca ggagtctacc tgcagctgga 3060

acctggccag ggctgaggct catgcaggga cactgcagcc ctgacccgct gcagatctga 3120

cctgctgcag cccgggctag ggtgggtctt ctgtactttg tagagatcgg ggctgttggt 3180

gctcaataaa tgtttgttta ttctcggtgg a 3211

<210> 5
<211> 3869
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTRPM8

<400> 5
tcctccctcc tccagtgagc taagagacaa gcaggctctt tgaggagaga gaagctcttg 60

gctgattgag cagctccacg tcctggctgt cccggagctt gatacataga aaagactgac 120

ctcagataca 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 ttatgcccag agccagcaca tcgaaggcac 420

ccagatcaac caaaatgaga agtggaacta caaaaaacat accaaggagt ttccaacaga 480

cgccttcggg gacattcagt ttgagactct ggggaagaaa ggcaagtact tacgcttgtc 540

ctgtgacacc gactctgaaa ctctctacga actgctgacc cagcactggc acctcaaaac 600

acccaacctg gtcatttcag tgacgggtgg agccaaaaac tttgctttga agccacgcat 660

gcgcaagatc ttcagcaggc tgatttacat cgcacagtct aaaggtgcgt ggattctcac 720

tggaggcact cactacggcc tgatgaagta cataggcgag gtggtgagag acaacaccat 780

cagcaggaac tcagaagaga acatcgtggc cattggcatc gcagcatggg gcatggtctc 840

caacagggac accctcatca ggagctgtga tgatgaggga catttttcag ctcaatacat 900

catggatgac tttaccagag accctctata catcctggac aacaaccata cccacctgct 960

gcttgtggac aacggttgtc atggacaccc cacagtggaa gccaagctcc ggaatcagct 1020

ggaaaagtac atctctgagc gcaccagtca agattccaac tatggtggta agatccccat 1080

cgtgtgtttt gcccaaggag gtggaagaga gactctaaaa gccatcaaca cctctgtcaa 1140

aagcaagatc ccttgtgtgg tggtggaagg ctcggggcag attgctgatg tgatcgccag 1200

cctggtggag gtggaggatg ttttaacctc ttccatggtc aaagagaagc tggtacgctt 1260

tttaccacgc actgtgtccc ggctgcctga agaggaaatt gagagctgga tcaaatggct 1320

caaagaaatt cttgagagtt ctcacctact cacagtaatt aagatggaag aggctggaga 1380

tgagattgtg agcaacgcca tttcctatgc gctgtacaaa gccttcagca ctaatgagca 1440

agacaaggac aactggaatg gacagctgaa gcttctgctg gagtggaacc agttggacct 1500

tgccagtgat gagatcttca ccaatgatcg ccgctgggag tctgccgacc ttcaggaggt 1560

catgttcacg gctctcataa aggacagacc caagtttgtc cgcctctttc tggagaatgg 1620

cctgaatctg cagaagtttc tcaccaatga agtcctcaca gagctcttct ccacccactt 1680

cagcacccta gtgtaccgga atctgcagat cgccaagaac tcctacaatg acgcactcct 1740

caccttttgtc tggaagttgg tggcaaactt ccgtcgaagc ttctggaaag aggacagaag 1800

cagcagggag gacttggatg tggaactcca tgatgcatct ctcaccaccc ggcacccgct 1860

gcaagctctc ttcatctggg ccattcttca gaacaagaag gaactctcca aggtcatttg 1920

ggagcagacc aaaggctgta ctctggcagc cttgggggcc agcaagcttc tgaagaccct 1980

ggccaaagtt aagaatgata tcaacgctgc tggggaatcg gaggaactgg ccaatgaata 2040

tgagacccga gcagtggagt tgttcaccga gtgttacagc aatgatgaag acttggcaga 2100

acagctactg gtctactcct gcgaagcctg gggtgggagc aactgtctgg agctggcagt 2160

ggaggctaca gatcagcatt tcatcgctca gcctggggtc cagaatttcc tttctaagca 2220

atggtatgga gagatttccc gagacacgaa gaactggaag attatcctgt gtctattcat 2280

catcccctta gtgggctgtg gcctcgtatc atttaggaag aaacccattg acaagcacaa 2340

gaagctgctg tggtactatg tggccttctt cacgtcgccc ttcgtggtct tctcctggaa 2400

cgtggtcttc tacatcgcct tcctcctgct gtttgcctat gtgctgctca tggacttcca 2460

ctcagtgcca cacacccccg agctgatcct ctacgccctg gtcttcgtcc tcttctgtga 2520

tgaagtgagg cagtggtaca tgaacggagt gaattatttc accgacctat ggaacgttat 2580

ggacaccctg ggactcttct acttcatagc gggtattgta ttccggctcc actcttctaa 2640

taaaagctcg ttgtactctg ggcgcgtcat tttctgtctg gattacatta tattcacgct 2700

aaggctcatc cacattttca ccgtcagcag gaacttggga cccaagatta taatgctgca 2760

gcggatgctg atcgacgttt tcttcttcct gttcctcttt gctgtgtgga tggtggcctt 2820

tggcgtggcc agacagggga tcctaaggca aaatgaacag cgctggagat ggatcttccg 2880

ctctgtcatc tatgagccct acctggccat gtttggccag gttcccagtg acgtggatag 2940

taccacatat gacttctccc actgtacctt ctcgggaaat gagtccaagc cactgtgtgt 3000

ggagctggat gagcacaacc tgccccgctt ccctgagtgg atcaccattc cgctggtgtg 3060

catctacatg ctctccacca atatccttct ggtcaacctc ctggtcgcca tgtttggcta 3120

cacggtaggc attgtacagg agaacaacga ccaggtctgg aaattccagc ggtacttcct 3180

ggtgcaggag tactgcaacc gcctaaacat ccccttcccc ttcgttgtct tcgcttattt 3240

ctacatggtg gtgaagaagt gtttcaaatg ctgctgtaaa gagaagaata tggagtctaa 3300

tgcctgctgt 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 tttcaggtcc ctgagcacag ggtggatgac tcttagtcac cctcaagggc 3660

ataggtcagg gagcaaagtg tacagaggac tttacacctg aagaggggtg caaaggacca 3720

tgttcttctg tgaaggtgcc tgtgttttct gcatctcaga gccttgtcct gatgctgagg 3780

gattaagtgt tgacactcct ttcccacgac tgtgactctg gccctgattt tatacttata 3840

ctgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 3869

<210> 6
<211> 4263
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mTRPA1

<400> 6
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