



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0030059
(43) 공개일자 2011년03월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/202 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0087994

(22) 출원일자 2009년09월17일

심사청구일자 2009년09월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

황선욱

서울 서초구 방배본동 3277 방배아이파크APT
402-1006호

방상수

경기 광명시 하안4동 하안주공10단지 아파트
1011-502

(74) 대리인

이원희

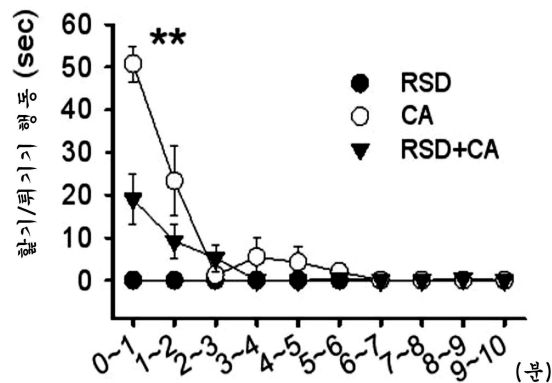
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 새로운 TRPA1 활성 억제제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 새로운 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) 활성 억제제 및 용도에 관한 것으로, 구체적으로 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 농도의존적으로 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 기계적 통증을 억제하므로, 상기 레졸빈 D1은 TRPA1 활성 억제제 및 TRPA1 매개 기계적 통증 억제제에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2008-331-E00457, 20090076543, M103KV010016-07

부처명 교육과학기술부, 교육과학기술부, 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 신진교수연구지원, (이공)일반연구자지원-기본연구, 뉴프론티어연구사업

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

기여율

주관기관 고려대학교, 고려대학교, 고려대학교

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

특허청구의 범위

청구항 1

레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 기계적 통증은 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 기계적 통증 억제용 조성물.

청구항 3

TRPA1을 발현하는 감각신경세포 또는 피부세포에 레졸빈 D1을 처리하는 단계를 포함하는 TRPA1의 활성 억제 방법.

청구항 4

약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 기계적 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 기계적 통증 억제 방법.

청구항 6

- 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 상기 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)을 각각 처리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드(cinnamaldehyde)인 것을 특징으로 하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 단계 3)의 TRPA1 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 9

- 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 피검물질을 처리하고, 대조군으로 상기 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)을 각각 처리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드(cinnamaldehyde)인 것을 특징으로 하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 단계 3)의 TRPA1 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 기계적 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것을 특징으로 하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법.

청구항 13

레졸빈 D1을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 개선용 건강식품.

청구항 14

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

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 TRPA1 활성 억제제 및 TRPA1 매개 기계적 통증 억제제에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인체 생리학 및 약리학 분야의 연구를 통해 2003년에 말초감각 신경섬유에 존재하는 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)이 발견되었다. 상기 TRPA1은 저온 자극, 염증성 자극 및 기계적 자극 등 다양한 자극을 감지하여 활성화되며, 상기 활성화에 의해 인체가 통증을 느끼게 된다. 특히 상기 TRPA1은 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체 군인 thermoTRP군(temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다. 통각수용체 TRPA1의 기능을 명확히 규명함으로써 인체의 통각 기전을 밝히고, 아울러 TRPA1 활성 조절 약물의 개발을 통해 통증 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측하고 있다.
- [0003] 상기 TRPA1의 활성화 억제를 기전으로 하는 통증 억제제 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPA1의 특성은 다음과 같다. TRPA1은 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각 신경세포 내부로 이동하고, 이에 의해 세포막 전류가 변화한다. 상기 세포막 전류의 변화에 의해 활동전압이 발생하고 이 전압신호가 궁극적으로 뇌로 전달되어 통증을 감지하는 것이다. 상기 TRPA1 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 패치클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPA1이 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술 보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한, 상기 TRPA1 활성화 측정 기술들은 동물의 감각 신경세포 배양기술, 세포주 배양 기술, TRPA1 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPA1 특이적 억제제 후보 물질들 및 표준 활성제를 TRPA1 과발현 세포에 각각 투여하고 TRPA1 활성화 억제 효과를 측정 및 비교함으로써, 억제제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다.
- [0004] 레졸빈 D1(Resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosaehaenoic acid)은 잠재적인 항-염증성 지질 매개물질이다. 레졸빈 D1은 15- 및 5-지방산산화효소(lipoxygenase)에 의한 DHA의 산화에 의해 생리적으로 생성되는 오메가3 지방산 대사체이다. 또한 아스피린으로 처리된 시료로부터 레졸빈 D1의 17(R)-에피머(epimer)가 생성될 수도 있다. 상기 레졸빈 D1 및 이의 17(R) 구조는 급성 염증의 초기 반응인 인간 다핵성 백혈구(polymorphonuclear leukocyte; PMNL)가 혈관 내피 세포를 따라 이동하는 것을 30 nM의 EC₅₀ 수치로 감소시킨다. 또한, 레졸빈 D1 및 이의 아스피린에 의해 유도된 형태는 복막염에 걸린 쥐 모델에서 백혈구 침투를 농도 의존적으로 감소시키며, 10-100 ng을 투여했을 때, 최대 35%까지 억제한다. 이와 같이 레졸빈 D1이 TRPA1의 활성을 조절한다는 것은 알려진바 없다.
- [0005] 이에 본 발명자들은 TRPA1을 표적으로 하는 기계적 통증 억제제를 찾고자 연구하던 중, 레졸빈 D1이 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 농도 의존적으로 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 기계적 통증을 억제하므로, 이를 TRPA1 활성 억제제 및 TRPA1 매개 기계적 통증 억제제에 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosaehaenoic acid)을 이용한 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) 활성 억제제, TRPA1 활성 억제 방법, 및 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 레졸빈 D1을 이용한 기계적 통증 억제제, 기계적 통증 억제 방법, 및 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 레졸빈 D1을 이용한 기계적 통증 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 억제용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1)을 발현하는 감각신경세포 또는 피부세포에 레졸빈 D1을 처리하는 단계를 포함하는 TRPA1의 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은
- [0013] 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0014] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1을 각각 처리하는 단계;
- [0015] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0016] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은
- [0018] 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0019] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 피검화합물을 처리하고, 대조군으로 상기 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1을 각각 처리하는 단계;
- [0020] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0021] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 아울러, 본 발명은 레졸빈 D1을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 개선용 건강식품을 제공한다.

효 과

- [0023] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 기계적 통증을 억제하므로, 상기 레졸빈 D1은 TRPA1 활성 억제제 및 기계적 통증 억제제에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명에서 사용하는 용어를 정의한다.
- [0025] 본 발명에서 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 통증을 말하며, 신경병 통증 등의 만성 통증과, 수술후 통증, 만성 아래쪽 등 통증, 군발성 두통, 포진신경통, 환지통, 중추통, 치통, 신경병 통증, 오피오이드 내성통, 창자통, 외통, 뼈 외상통, 분만 및 출산 중 통증, 햇빛화상을 비롯한 화상으로 초래되는 통증, 분만후통, 편두통, 협심통, 및 방광염통을 비롯한 요생식로 관련 통증을 포함하는 것이고, 또한 외상수용통 또는 통각을 포함한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 통증의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키

는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 통증의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

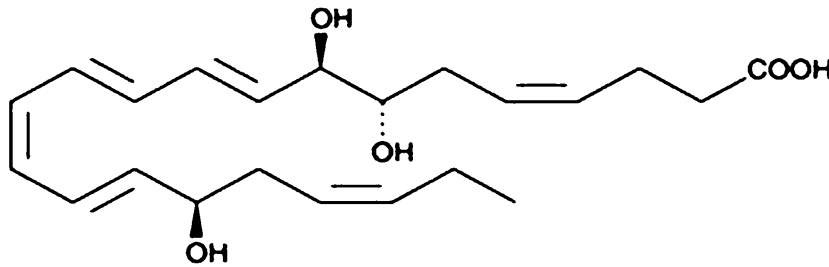
[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "동물"은 척추동물을 의미하며, 바람직하게는 척추동물은 포유동물을 의미한다. 본 발명에서 사용된 "동물"이라는 용어는 보다 고등 척추동물인 포유류를 포함하며, 이는 사람을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명은 레졸빈 D1(resolvin D1; 7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid)을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 억제용 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 레졸빈 D1은 하기 [화학적식 1]로 구성된 화합물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

화학적식 1



[0032]

[0033] 상기 기계적 통증은 TRPA1(Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0034] 본 발명자들은 레졸빈 D1에 의한 TRPA1의 활성의 변화를 알아보기 위해, TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 TRPA1을 발현하는 척수후근신경절 감각 신경세포에 신남알데히드와 레졸빈 D1을 함께 처리하여 패치클램프 기법의 일종인 전세포 전압 클램프 실험 및 세포내 칼슘 농도 변화 측정 기술의 일종인 칼슘 이미지화를 실시하였다. 그 결과, TRPA1 특이적 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1의 활성을 상기 레졸빈 D1이 억제하는 것으로 나타났다(도 1, 도 2 및 도 4 참조).

[0035] 본 발명자들은 TRPA1의 GGPP 농도 의존적 반응을 알아보기 위해, TRPA1 형질전환 세포주에 0.1 내지 1000 μ M 레졸빈 D1을 각각 처리하여 칼슘 이미지화를 수행하였다. 그 결과, 레졸빈 D1은 마이크로몰라 농도의 범위에서 농도 의존적으로 TRPA1을 억제하는 효과를 보였으며 TRPA1에 대한 IC_{50} 은 약 23 μ M이었으며, N 값은 약 1.02이었다(도 3 참조).

[0036] 본 발명자들은 동물 통증 행동실험을 통한 레졸빈 D1의 기계적 통증억제 작용을 확인하기 위해, 급성 침해성 행동(활기/튀기기 행동) 분석 및 기계적 통각 과민 행동 분석을 실시한 결과, 동물모델에서 레졸빈 D1은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 급성 침해성 행동 소요시간 및 기계적 자극에 대한 통증 감수성을 억제하는 것으로 나타났다(도 5 및 도 6 참조).

[0037] 따라서 본 발명의 레졸빈 D1은 기계적 통증을 유발하는 TRPA1의 활성을 유의적으로 저해시켜 이에 의해 유발되는 기계적 통증을 효과적으로 저해할 수 있으므로 기계적 통증의 억제, 또는 기계적 통증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 본 발명의 기계적 통증 억제용 조성물은 레졸빈 D1에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0039] 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형,

외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

- [0040] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 붕해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크틸린 칼슘 등이 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로즈, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [0043] 본 발명의 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.
- [0044] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 레졸빈 D1의 양을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%이고, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 기계적 통증의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 레졸빈 D1을 TRPA1 발현 세포에 처리하는 단계를 포함하는 TRPA1의 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 레졸빈 D1은 10 내지 100 μ M의 농도로 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 상기 TRPA1 발현 세포는 말초 감각신경세포 또는 피부세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 기계적 통증을 억제하므로, 레졸빈 D1을 처리하여 TRPA1의 활성을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 레졸빈 D1을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제 방법을 제공한다.
- [0051] 상기 기계적 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0052] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 기계적 통증을 억제하므로, 기계적 통증의 억제, 또는 기계적 통증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0053] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다. 또한, 투여방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0054] 상기 레졸빈 D1은 기계적 통증 억제를 위하여 상기 개체에 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0055] 상기 약학적으로 유효한 양은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 레졸빈 D1을 이용한 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0057] 구체적으로,
- [0058] 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0059] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 처리하고, 대조군으로 상기 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1을 각각 처리하는 단계;
- [0060] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 상기 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0061] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 이온 채널 활성을 나타내는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPA1 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0062] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 숙주세포는 HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주 또는 RBL-2H3 세포주를 이용하는 것이 바람직하고, HEK 세포주를 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 이온 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주라면 모두 이용가능하다.
- [0063] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드(cinnamaldehyde)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 레졸빈 D1은 10 μ M에서 100 μ M의 농도로 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0065] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하므로, TRPA1 활성에 대한 레졸빈 D1의 억제 효과와 비교하여 이와 유사하거나 보다 높은 억제 효과를 갖는 TRPA1 활성 억제제 후보물질을 선별함으로써 TRPA1 활성 억제제를 스크리닝할 수 있음을 알 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명은 레졸빈 D1을 이용한 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0069] 상기 기계적 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0070] 구체적으로,
- [0071] 1) TRPA1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;
- [0072] 2) 상기 형질전환체에 실험군으로 TRPA1 특이적 활성제와 피검화합물을 처리하고, 대조군으로 상기 TRPA1 특이적 활성제와 레졸빈 D1을 각각 처리하는 단계;
- [0073] 3) 단계 2)의 실험군과 대조군의 TRPA1 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,
- [0074] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 대조군보다 낮거나 유사한 TRPA1 활성을 나타내는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기계적 통증 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0075] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 숙주세포는 HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주 또는 RBL-2H3 세포주를 이용하는 것이 바람직하고, HEK 세포주를 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 이온 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주라면 모두 이용가능하다.
- [0076] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 TRPA1 특이적 활성제는 신남알데히드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0077] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 레졸빈 D1은 10 내지 100 μ M의 농도로 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0078] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0079] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 TRPA1 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 또는 칼슘 이미징화에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하므로, TRPA1 활성에 대한 레졸빈 D1의 억제 효과와 비교하여 이와 유사하거나 보다 높은 억제 효과를 갖는 피검물질을 선별함으로써 TRPA1에 의해 매개되는 기계적 통증을 억제하는 통증 예방 및 치료제를 스크리닝할 수 있음을 알 수 있다.
- [0081] 아울러, 본 발명은 레졸빈 D1을 유효성분으로 함유하는 기계적 통증 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0082] 상기 기계적 통증은 TRPA1 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명의 레졸빈 D1은 TRPA1을 과발현하는 형질전환 세포 및 척수후근신경절 감각 신경세포에서 TRPA1 활성제로 알려진 신남알데히드에 의해 증가된 TRPA1 활성을 억제하고, 동물모델에서 TRPA1 활성 기반의 통증을 억제하므로, 상기 레졸빈 D1은 레졸빈 D1을 기계적 통증 억제 또는 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0084] 본 발명의 레졸빈 D1은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 레졸빈 D1을 원료에 대하여 0.2 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.24 내지 10 중량%로 첨가한다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 건강식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트마와 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.

[0086] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 소세지, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

[0087] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

실시예

[0088] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0089] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정하는 것은 아니다.

[0090] <실시예 1> TRPA1 형질전환 세포주의 제조

[0091] HEK293 세포주(ATCC CRL-11268)를 mTRPA1(서열번호 : 1)의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다. 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 24 웰 플레이트 당 0.8 μ g의 mTRPA1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 pcDNA5/FRT 벡터 및 0.2 μ g/웰의 pCDNA3(Invitrogen Corp., USA; 녹색형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene HD(Roche Diagnostics, 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였고, 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버슬립에 도달한 후, 10 내지 24시간 동안 추가 배양하였다.

[0092] <실시예 2> 척수후근신경절(dorsal root ganglia, DRG) 감각 신경세포 준비

[0093] 차가운 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에서 성체 ICR계 생쥐(한림실험동물연구소, 한국)의 DRG를 분리하여 세절한 후, 3 mg/ml 콜라게나아제 타입 2(collagenase type 2; Invitrogen, USA)를 37℃에서 45분 동안 처리한 후 기계적인 방법으로 완전히 소화시켰다. 상기 방법으로 제조한 DRG 감각 신경세포를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/ml 2.5S NGF(calbiochem, USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-오르트린 코팅된 유리 커버슬립에 도달한 후, 48 내지 72시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0094] <실시예 3> 레졸빈 D1에 의한 TRPA1의 활성화 변화 확인

[0095] <3-1> 전기 생리화학적 방법으로 세포내 채널의 활성 측정

[0096] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조한 mTRPA1 형질전환 세포주에 300 μ M 신남알데히드(CA: cinnamaldehyde; MP Biomedicals, USA)와 30 μ M 레졸빈 D1(Resolvin D1: Cayman biochem, USA)을 함께 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물 또는 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 전기 생리화학적 측정을 수행하였다. 구체적으로, 배스 용액(bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES)를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)과 피펫 용액(pipet solution, 140 mM CsCl 10mM EGTA, 10mM HEPES를 포함하여 pH 7.4로 적정)을 이용하였다. 그 후, 패치 클램프 셋트를 이용하여 전체 세포 패치 클램프를 실시하였고 이중 전압 전류 상판 곡선을 이용하여 이온 채널 특이적인 반응임을 확인함과 동시에 GGPP에 의해 효과적으로 활성화함을 확인하였다. 패치 클램프 셋트는 multiclamp 700B(molecular device, 미국)를 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, clempl X-10(Molecular device, 미국)을 이용하여 데이터를 편집하였다.

[0097] 실험 결과는 양측 꼬리(two-tailed), 쌍을 이루지 않은(unpaired) 스튜던트 검정(Student's t-test)을 이용하여 통계적으로 분석하였고, 평균±표준편차의 형태로 나타냈으며, **P < 0.01 및 *P < 0.05이었다. 이하, 모든 실시예의 실험 결과는 이와 동일한 방법으로 나타내었다.

[0098] 그 결과, [도 1]에서 나타난 바와 같이, 레졸빈 D1은 신남알데히드에 의한 TRPA1 특이적 활성을 억제함을 확인하였다.

[0099]

[0100] <3-2> 칼슘 이미지화를 이용한 세포내 칼슘수준변화 측정

[0101] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조한 mTRPA1 형질전환 세포주에 300 μ M 신남알데히드와 100 μ M 레졸빈 D1을 함께 처리하여 형질전환 세포의 칼슘 이미지화를 수행하였다. 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 실시예 <3-1>의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fura2-AM(5 μ M; invitorgen, USA)을 37℃에서 1시간 동안 주입하였다. 그 후, 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.

[0102] 그 결과, [도 2]에서 나타난 바와 같이, 레졸빈 D1과 신남알데히드를 함께 처리하는 기간 동안, 레졸빈 D1은 TRPA1 활성화를 억제함을 확인하였다.

[0103] <실시예 4> TRPA1의 GGPP 농도 의존적 반응 확인

[0104] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조한 TRPA1 형질전환 세포주에 0.1 내지 1000 μ M 레졸빈 D1을 각각 처리한 후, 상기 실시예 <3-2>의 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하였다. 이후, 측정값을 Hill-plot을 이용하여 농도-반응 곡선으로 작성하였다.

[0105] 그 결과, [도 3]에서 나타난 바와 같이, 레졸빈 D1의 TRPA1에 대한 IC_{50} 은 약 23.259 μ M이었고, N 값은 약 1.02이었으며, 약 10 내지 100 μ M 농도 범위에서 TRPA1 활성을 급격히 억제하는 것으로 나타나 레졸빈 D1이 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPA1에 대한 활성 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

[0106] <실시예 5> 감각 신경세포의 레졸빈 D1 특이적 반응 조사

[0107] 상기 <실시예 2>에서 분리된 감각 신경세포에 100 μ M 레졸빈 D1을 처리한 후, 상기 약물 처리기간 중 일부 기간 동안, 300 μ M 신남알데히드를 함께 처리하였다. 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0108] 그 결과, [도 4]에서 나타난 바와 같이, 레졸빈 D1과 신남알데히드를 함께 처리하는 기간 동안, 레졸빈 D1은 DRG 감각 신경세포에서도 TRPA1 활성화를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0109] <실시예 6> 동물 통증 행동실험을 통한 레졸빈 D1 통증억제 반응 확인

[0110] <6-1> 급성 침해성 행동(핥기/튀기기 행동) 분석

[0111] 하기 [표 1]의 대조군 및 실험군의 쥐의 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.

표 1

[0112]

대조군	무처리
실험군 1	3 mM 레졸빈 D1
실험군 2	10 mM 신남알데히드
실험군 3	10 mM 신남알데히드 + 3 mM 레졸린 D1

[0113]

그 결과, [도 5]에서 나타낸 바와 같이, 레졸빈 D1과는 달리 신남알데히드는 동물들의 행동 소요시간을 증가시켰고, 이는 신남알데히드와 레졸빈 D1을 동시에 사용함으로써 행동 소요시간이 억제되었다.

[0114]

<6-2> 염증성 기계적 통각 과민 행동 분석

[0115]

하기 [표 2]의 대조군 및 실험군을 von-frey 기계를 사용하여 바늘의 압력에 저항하는 시간을 측정하였다. 구체적으로, CFA(Complete Freund's Adjuvant)를 쥐에 주입하여 염증을 유발하고, CFA 투여 24시간 후에 레졸빈 D1을 투입하여 von-frey 기계를 이용하여 기계적 자극에 회피하는 시간을 3회 측정하였다 이때, 5마리의 생쥐를 실험에 사용하였다.

표 2

[0116]

대조군	무처리
실험군 1	3 mM 레졸빈 D1
실험군 2	CFA
실험군 3	CFA + 3 mM 레졸린 D1

[0117]

그 결과, [도 6]에서 나타난 바와 같이 레졸빈 D1 투여에 의하여 정상적인 상황에서는 기계적 자극에 대한 감수성이 변하지 않았으나, CFA로 염증을 일으킨 쥐와 레졸빈 D1을 함께 투여한 쥐를 비교하였더니 CFA염증에 의해 민감화된 반응시간이 레졸빈 D1에 의해 억제되어, 염증성 통증 시 기계적 자극 감수성이 높아진 현상을 억제하는 효과를 나타냈다.

[0118]

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0119]

<1-1> 산제의 제조

[0120]

레졸빈 D1 2 g

[0121]

유당 1 g

[0122]

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0123]

<1-2> 정제의 제조

[0124]

레졸빈 D1 100 mg

[0125]

옥수수전분 100 mg

[0126]

유 당 100 mg

[0127]

스테아린산 마그네 2 mg

[0128]

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

[0129]

<1-3> 캡슐제의 제조

[0130]

레졸빈 D1 100 mg

[0131]	옥수수전분	100 mg
[0132]	유 당	100 mg
[0133]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0134]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
[0135]	<1-4> 환의 제조	
[0136]	레졸빈 D1	1 g
[0137]	유당	1.5 g
[0138]	글리세린	1 g
[0139]	자일리톨	0.5 g
[0140]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0141]	<1-5> 과립의 제조	
[0142]	레졸빈 D1	150 mg
[0143]	대두추출물	50 mg
[0144]	포도당	200 mg
[0145]	전분	600 mg
[0146]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0147]	<제조예 2> 식품의 제조	
[0148]	<2-1> 밀가루 식품의 제조	
[0149]	본 발명의 레졸빈 D1 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.	
[0150]	<2-2> 유제품(dairy products)의 제조	
[0151]	본 발명의 레졸빈 D1 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0152]	<2-3> 선식의 제조	
[0153]	현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0154]	검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0155]	본 발명의 레졸빈 D1을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.	
[0156]	상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 레졸빈 D1을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.	

- [0157] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
 [0158] 종실류(들깨 7 중량부, 검은콩 8 중량부, 검은깨 7 중량부),
 [0159] 레졸빈 D1(3 중량부),
 [0160] 영지(0.5 중량부),
 [0161] 지황(0.5 중량부)

[0162] <제조예 3> 음료의 제조

[0163] 건강음료의 제조

[0164]	레졸빈 D1	1000 mg
[0165]	구연산	1000 mg
[0166]	올리고당	100 g
[0167]	매실농축액	2 g
[0168]	타우린	1 g
[0169]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0170] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강 음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

산업이용 가능성

[0171] 상기와 같이, 본 발명의 오메가3 지방산 대사체인 레졸빈 D1은 TRPA1의 활성화 억제 작용을 가지므로, 기계적 통증을 효과적으로 제어하고 부작용이 적은 기계적 통증 치료제의 개발과 TRPA1의 활성화 억제제 또는 기계적 통증 치료제의 탐색 및 개발을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0172] 도 1은 세포주에서 발현된 mTRPA1이 레졸빈 D1에 의해 억제됨을 전기 생리학적인 이온 채널의 열림 억제 효과의 측정을 통해 억제효과가 있음을 나타낸 것으로, 30 μ M 레졸빈 D1이 300 μ M 신남알데히드에 의해 활성화된 TRPA1 반응을 전기 생리학적인 방법으로 억제함을 나타낸 그래프이다(RSD: 레졸빈 D1, CA: 신남알데히드).

[0173] 도 2는 세포주에서 발현된 mTRPA1이 레졸빈 D1에 의해 억제됨을 칼슘의 세포내 유입 억제 효과의 측정을 통해 억제효과가 있음을 나타낸 것으로, 100 μ M 레졸빈 D1이 칼슘 이미지화 실험에서 유용하게 억제됨을 나타낸 그래프이다(RSD: 레졸빈 D1, CA: 신남알데히드).

[0174] 도 3은 농도에 따른 TRPA1 활성화에 의한 칼슘 유입량을 나타낸 농도-반응 곡선으로서 각각의 활성을 Hill-plot 방법으로 도표화하여 나타낸 그래프이고, 이때 23.259 μ M의 IC₅₀ 값을 얻었고 N 값은 1.02이었다(RSD: 레졸빈 D1, CA: 신남알데히드).

[0175] 도 4는 6주된 성체 생쥐에서 척수후근신경절(DRG) 감각 신경세포를 추출하여 배양한 후 상기 칼슘 이미지 기법을 이용하여 감각 신경세포에서도 레졸빈 D1이 TRPA1을 효과적으로 억제함을 보여주는 것으로, 300 μ M 신남알데히드에 의한 TRPA1 반응이 100 μ M 레졸빈 D1에 의해 억제됨을 나타낸 그래프이다(RSD: 레졸빈 D1, CA: 신남알데히드).

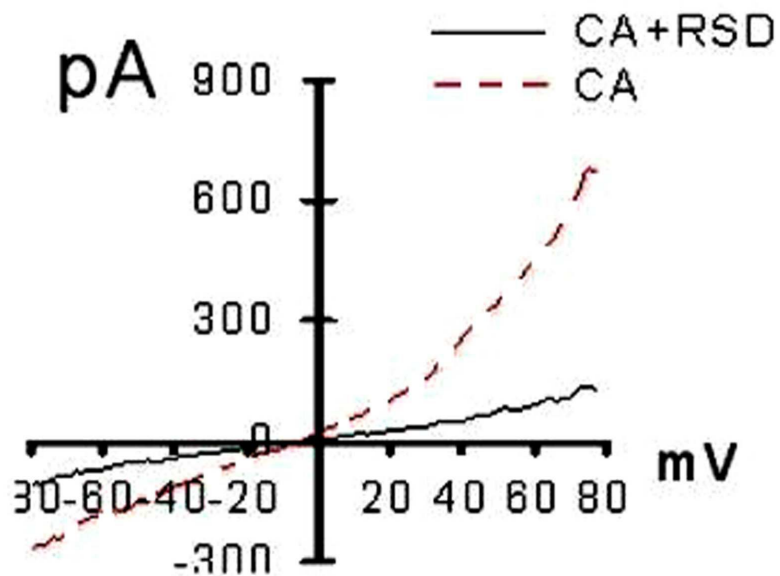
[0176] 도 5는 급성 핏기/튀기기 반응 실험에서, 10 mM 신남알데히드 발바닥 주입에 의한 통증이 3 mM 레졸빈 D1을 신남알데히드 투여 10분 전에 미리 발바닥에 주입하였을 때 억제됨을 신남알데히드 투여 후 매 분마다 측정한 결

과로 나타낸 그래프이다(RSD: 레졸빈 D1, CA: 신남알테히드).

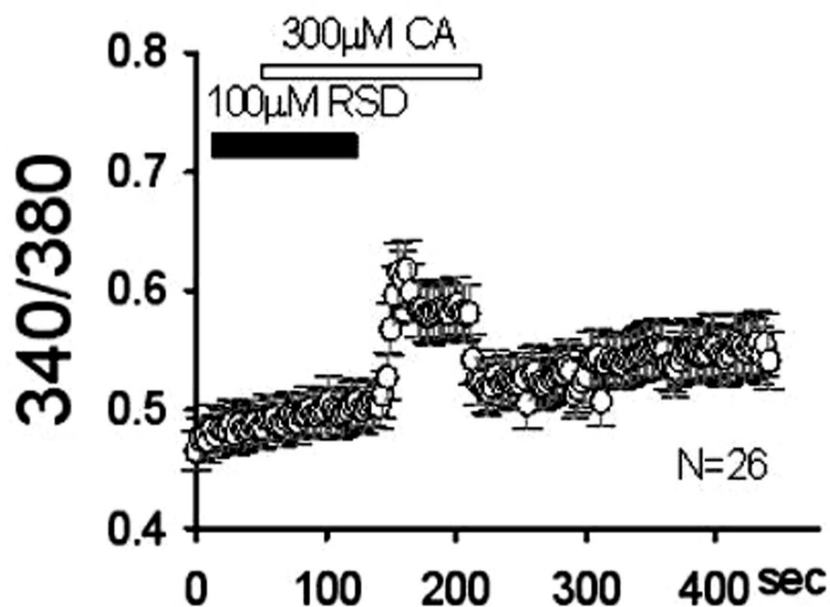
[0177] 도 6은 염증시 기계적 자극에 대한 통증 감수성을 von-frey 방법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(RSD: 레졸빈 D1, CFA:complete Freund's Adjuvant, ND: 정상상태).

도면

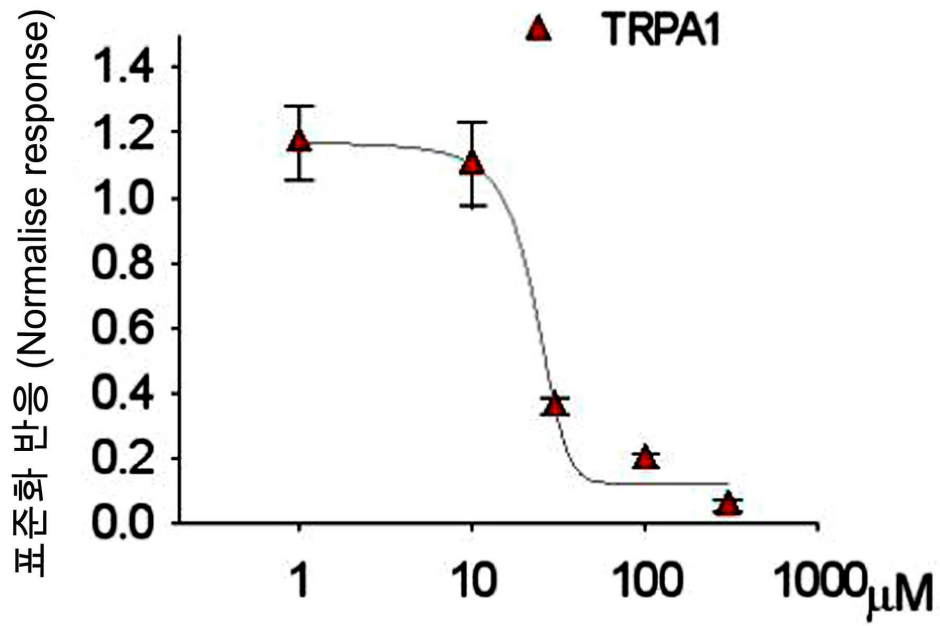
도면1



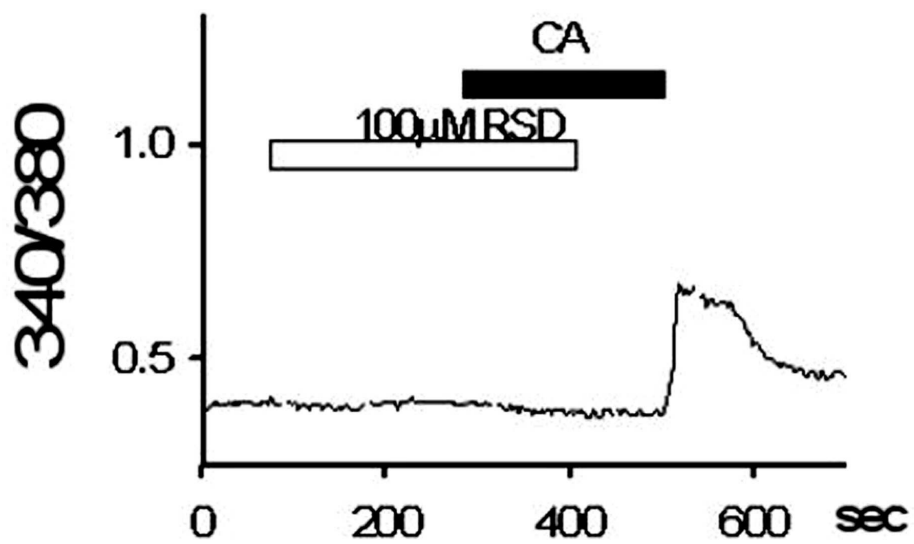
도면2



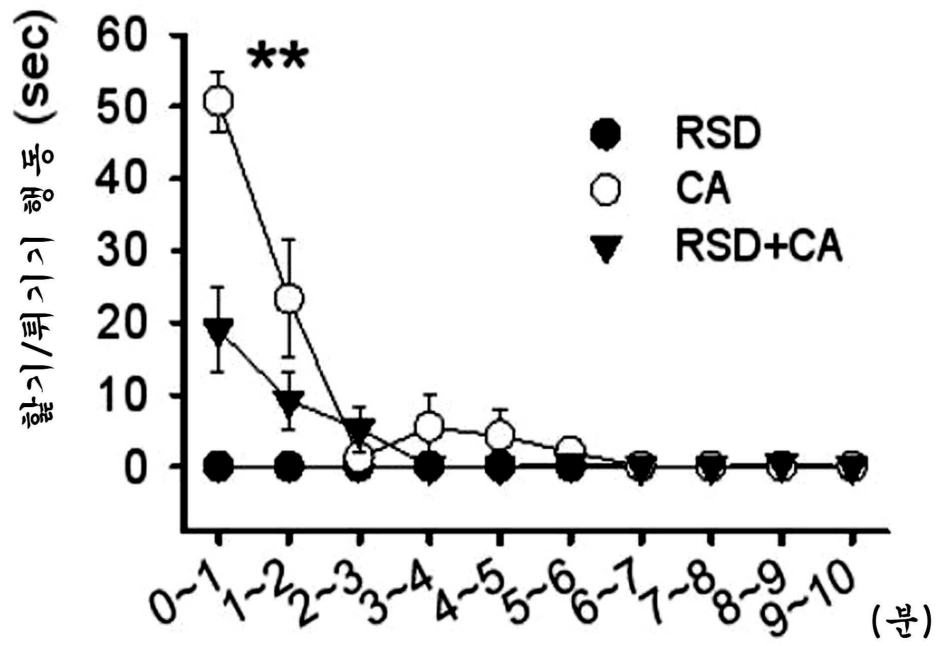
도면3



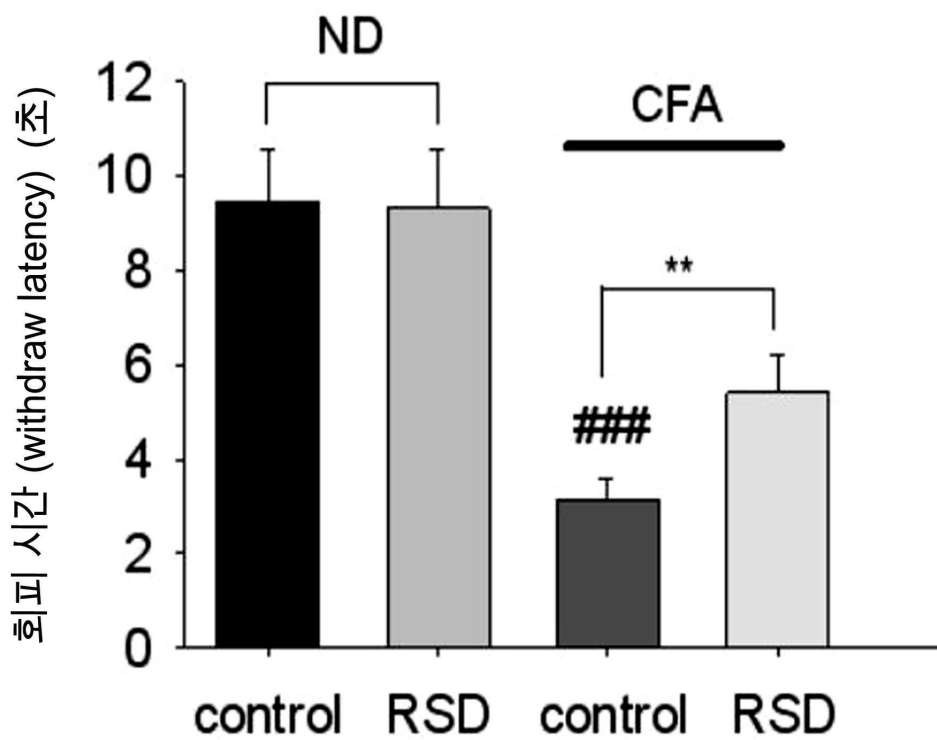
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY Industry & Academy Collaboration Foundation
 <120> NovelTRPA1 inhibitor and use thereof

<130> 9p-08-46

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 4263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mTRPA1

<400> 1

gcgccagccg gcgtccaggt ggagtcaatg aagcgcggtc tgaggaggat tctgctcccg 60

gaggaaagga aggaggtcca gggcgttgct tatcgcggtc tcggggaaga catggactgc 120

tccaaggaat cctttaaggt ggacattgaa ggagatatgt gtagattaga agacttcac 180

aagaaccgaa gaaaactaag caaatatgag gatgaaaac tctgtcctct gcatcacgca 240

gcagcagaag gtcaagtga actgatggaa ctgatcatca atggttcttc gtgtgaagtg 300

ctgaatataa tggatggta tggaaatacc cactgcatt gtgctgcaga aaaaaatcaa 360

gttgaaagtg taaagtttct tctcagccaa ggagcaaac caaacctccg aaatagaaac 420

atgatgtcac cccttcacat agctgtgcat ggcatgtaca acgaagtgat caagggttg 480

actgagcaca aggccactaa catcaattta gaaggagaga atgggaacac ggctttgatg 540

tccacgtgtg ccaaagacaa cagtgaagct ttgcaaattt tgtagaaaa aggagctaag	600
ctgtgtaaat caaataagtg gggagactac cctgtgcacc aggcagcatt ttcaggtgcc	660
aaaaaatgca tggaattaat cttagcatat ggtgaaaaga acggctacag caggagact	720
cacattaatt ttgtgaatca caagaaagcc agccctctcc acctagcagt tcaaagcgga	780
gacttggaca tgattaagat gtgcctggac aacggtgcac acatcgacat gatggagaat	840
gccaaatgca tggccctcca ttttctgca acccaggag ccactgacat cgtaagctc	900
atgatctcat cctataccgg aagtagtgat attgtgaatg cagttgatgg caatcaggag	960
accctgcttc acagagcctc gttatttgat caccatgacc tggcagaata cctaataatca	1020
gtgggagcag acatcaacag cactgattct gaaggacgt ctccattat ttagcaaca	1080
gcttctgcat cctggaacat tgtgaatttg ctctctgta aaggtgcaa agtagacata	1140
aaagatcatc ttggacgtaa ctttttgcat ttgactgtgc agcagcctta tggactaaga	1200
aatttgcggc 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
gatacaggc ttttgaatga aggggatctc catgggatga cccctctcca cctggcagca	1500
aaaaatgggc atgataaagt cgttcaactc ctctgaaga aaggggcctt atttctcagt	1560
gaccacaatg gctggactgc ttgcatcac gcctccatgg gtgggtacac tcagaccatg	1620
aaggtcattc ttgatactaa cttgaaatgc acagaccgac tagatgaaga agggaacaca	1680
gcactccact ttgcagcag ggaaggccat gccaaaggctg ttgcaatgct tttgagctac	1740

aatgctgaca tectctgaa caagaagcaa gcttccttcc tgcatattgc cctgcacaat	1800
aagcgcaagg aagtggttct cacaaccatc agaaataaaa gatgggatga gtgtcttcaa	1860
gttttcactc ataattctcc aagcaatcga tgcctaatca tggagatggt agaatacctc	1920
cccgagtgcg tgaagttct tttagatttc tgcatgatac cttccacaga agacaagtcc	1980
tgtcaagact accatattga gtataatttc aagtatctcc aatgcccatt atccatgacc	2040
aaaaaagtag cacctacca ggatgtggta tatgagcctc ttacaatcct caatgtcatg	2100
gtccaacata accgcataga actcctcaac caccctgtgt gtagggagta cttactcatg	2160
aaatggtgtg cctatggatt cagagcccat atgatgaacc taggatctta ttgtcttggt	2220
ctcatacca tgaccttct tgttgtcaaa atacagcctg gaatggcctt caattctact	2280
ggaataatca atggaactag tagtactcat gaggaaagaa tagacactct gaattcattt	2340
ccaataaaaa tatgtatgat tctagttttt ttatcaagta tatttggata ttgcaaagaa	2400
gtgatccaaa ttttccaaca gaaaaggaat tacttctctg attacaacaa tgctctggaa	2460
tgggttatct atacaactag tatcatcttc gtgttgccct tgttctcaa catcccagcg	2520
tatatgcagt ggcaatgtgg agcaatagcg atattcttct actggatgaa ctctctactg	2580
tatcttcaaa ggtttgagaa ctgtggaatt ttcattgtta tgttggaggt gatttttaaa	2640
acattgctga gatcgaccgg agtgtttatt ttctctctac tggtttttgg cctcagcttt	2700
tatgttctcc tgaatttcca agatgccttc agcaccccat tgctttcctt aatccagaca	2760
ttcagtatga tgctaggaga catcaattat cgagatgcct tctagaacc attgtttaga	2820
aatgagtgg cataccagct cctgaccttt gggcagctta ttgccttcac aatgtttgtc	2880

ccaattgttc tcatgaactt actgattggc ttggcggttg gggacattgc tgaggtccag	2940
aagcatgcgt cattgaagag gattgctatg cagggtggaac ttcataccaa cttagaaaaa	3000
aagctgccac tcigtgtactt acgcaaagtg gatcagagggt ccaccatcgt gtatccaaat	3060
agaccaggc acggcaggat gctacgggtt ttctattact ttcttaatat gcaagaaaca	3120
cgacaagaag taccaaacat tgacacatgc ttggaaatgg aaatattgaa acagaaatat	3180
cggctgaagg acctcacttc cctcttggaa aagcagcatg agtcatcaa actcatcatc	3240
cagaagatgg agatcatctc agagacagaa gatgaagata accattgctc ttccaagac	3300
aggttcaaga aggagaggct ggaacagatg cacagcaagt ggaattttgt cttaaacgca	3360
gttaagacta aaacacattg ttctattagc caccggact tttagtctg tgtcttatgg	3420
gagtgggaga ctgctttaca tacttatttc agtgaatttc agtttgaaa agagcaaaga	3480
aacagaaagt tgactaacat tgctgcatgg agatcctagt tctgcaacc tcaccatac	3540
atatgtcat atttctgtc aattactatg tattgagaag atcctttctg acatgttcaa	3600
tttgaacatg aaggatagtc tcttcgagt gaataaaaac cagggttgtt ggaatgcata	3660
ttatggagga taagaattaa tgtaactatt aaggcagaac acaactacat aatacaagat	3720
gcataataat ccaagtatta tatttaatct cctaccatgt taaaccttcc tgtgttataa	3780
cctgtctggg aactataat ctctgttctt actatgatta gatcatagtc tcacctcct	3840
cgtcccatca cacatgacat cattttgagc cacatgacag aagtcctagt tagtagactg	3900
tgataagtat gaatgttaca atagaaatgt gttcccttag tgttcatcag ttgtgatggt	3960
ttaaatgaga aacgttgccc acagactcat acatttaaac ccttagtccc agttgttgct	4020
gttgcttagg ggggccacac agccttgctt gctctctcct ttctgagtgt ggagagaaat	4080

gtgatcagta agactectgc tectgtgcc atgctcttta ttcattatg gactttctt	4140
gaaactgcaa gcagaaattc actgttcctt cctcaaattt cttttgtca tggattata	4200
tcatagcaac agaaactaac ttatgtacca atggtcttaa taaagaataa agcctgtaca	4260
gtc	4263