



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0009139
(43) 공개일자 2019년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0090989
(22) 출원일자 2017년07월18일
심사청구일자 2018년07월05일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
서준규
서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 803호 (대치동, 우성1차아파트)
류지간
인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 902동 701호(송도동, 더샵 익스포)
(74) 대리인
김순웅

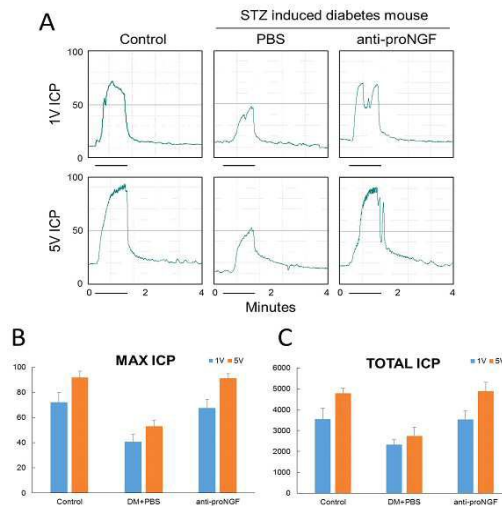
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 proNGF 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 proNGF (nerve growth factor) 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 proNGF 억제제는 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 활성 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있는바, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/5434 (2013.01)

응웬낫민

인천광역시 중구 인항로 6, A동 811호(신흥동3가)

(72) 발명자

송강문

경기도 부천시 양지로176번길 16-14, 303호(옥길동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0508

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발, 질병중심 중개중점연구

연구과제명 발기부전 동물모델에서 단백질공학을 이용한 신규 혈관생성-신경재생 인자의 효능·안전성

규명

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.07 ~ 2018.09.06

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A6A3A11030261

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 학문후속세대양성, 리서치펠로우

연구과제명 ProNGF 신호전달경로가 발기부전의 병인에 미치는 영향 규명 및 이를 겨냥한 신규 치료후

보물질 도출

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

proNGF(nerve growth factor)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 억제제는 proNGF의 mRNA에 특이적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 활성 억제제는 proNGF의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 proNGF의 발현 또는 활성 억제제는 음경해면체 혈관내피세포의 세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

proNGF(nerve growth factor)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 의약품 조성물.

청구항 6

proNGF(nerve growth factor)의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 proNGF (nerve growth factor) 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 발기부전은 남성 성기능 장애의 일종으로서, 남성의 성기가 발기되지 않거나 발기 상태가 지속되지 않아 성행위를 할 수 없는 현상이다. 발기부전의 원인은 크게 심인성 원인과 기질성 원인으로 구별된다. 심인성 발기부전은 심리적, 정신적 영향에 의한 교감신경의 과도한 작용으로 인한 노르아드레날린(noradrenaline)의 과도한 분비, 음경해면체 평활근 긴장도 증가, 신경 전달물질의 분비 억제 등에 기인한다.

[0003] 기질성 발기 부전은 그 원인에 따라, 신경인성, 혈관성, 및 내분비성 발기부전으로 분류된다. 상기 혈관성 발기부전은 고지질혈증, 당뇨, 고혈압, 흡연, 전신 심혈관질환 등으로 인해서 음경 해면체와 그 안의 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 등이 손상되어 이 내피세포에서 일산화질소(nitric oxide: NO) 등의 이완성 물질의 분비가 원활하지 않아 생기는 장애이다.

[0004] 최근 발기부전에 관한 연구는 기질성 원인에 더 비중을 두고 있고, 그의 치료로서 주로 비아그라(viagra, 성분명: 실데나필)를 포함한 경구용 PDE-5(phosphodiesterase-5) 저해제가 전 세계적으로 사용되고 있다. 이러한 경구용 약물은 음경해면체에 특이적으로 분포하는 PDE-5의 저해에 의한 cGMP의 농도를 증가시킴으로써 음경해면체 내 혈류를 증대시켜 발기를 유도하여 발기부전의 치료효과가 있는 것으로 알려졌다. 그러나 비아그라와 같은 PDE-5 저해제 계열의 약물들은 두통, 안면홍조, 소화불량, 및 심장마비 등 여러 가지 부작용을 가지고 있다고

보고되고 있을 뿐만 아니라, 분자적 수준에서 일시적인 단백질 발현 및 관련 인자들을 조절하는 것으로 근본적인 치료라 할 수 없다. 더욱이 당뇨에 의한 발기부전의 경우, 이와 같은 치료 효과가 잘 나타나지 않을 뿐만 아니라, 설령 효과가 있다 해도 그 효능이 장기간 지속되지 못한다는 단점이 있다.

[0005] 따라서, 발기부전 음경 내의 비정상화된 해면체 구조를 근본적으로 치료하고, 그 효능도 장시간 지속되는 발기부전 치료제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 한편, NGF (nerve growth factor)는 신경성장인자로서 Trk 수용체와 결합하여 그 하위 신호 전달을 통해 세포의 성장, 유지, 증식 및 생존 조절에 주로 관여한다. 그에 반하여 NGF의 전구체인 proNGF는 세포막의 p75NTR 수용체와 결합하여 하위 신호 전달을 통하여 세포 사멸을 유도 및 조절한다 (Barcelona et al., Neurobiology of Disease 36: 8826, 2016; Siao et al., Journal of Experimental Medicine 209; 2291, 2012). 하지만 현재까지 proNGF-p75NTR 신호전달경로와 발기기전 및 발기부전 치료에 대한 연구는 전무하다.

[0007] 이에 본 발명자들은 새로운 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, proNGF 억제제가 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시킴으로써, 우수한 발기부전 개선 효과를 보임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 proNGF (nerve growth factor) 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 proNGF의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 proNGF의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 proNGF의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 proNGF 억제제는 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 활성 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있는바, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 발기부전 마우스 모델에서 항-proNGF 항체 투여에 의한 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 항-proNGF 항체 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) 및 혈관주위세포 특이적 단백질인 NG2(neuron glial antigen 2)의 활성 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 항-proNGF 항체 투여에 의한 신경세포 특이적 단백질인 베타 III 튜불린의 활성 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 항-proNGF 항체 투여에 의한 혈관내피세포 세포사멸 억제 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 proNGF의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- [0015] 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [0016] 본 발명에서 용어, “proNGF”는 신경성장인자인 “NGF (nerve growth factor)”의 전구체로서 세포막의 p75NTR 수용체와 결합하여 하위 신호 전달을 통하여 세포 사멸을 유도 및 조절한다고 알려져 있다. 보다 구체적으로, “proNGF”는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서 용어, “proNGF의 발현 또는 활성억제제”는 “proNGF 억제제”와 동일한 의미로서 proNGF의 mRNA 발현 또는 단백질 활성을 감소시키는 물질을 통칭한다. 보다 구체적으로는 proNGF에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식을 통해 proNGF의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나 그 활성을 방해함으로써 proNGF의 발현 또는 활성을 감소시키는 모든 물질을 포함할 수 있다. 상기 proNGF 발현을 저해하는 물질은 proNGF를 표적으로 하여 proNGF의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한없이 사용 가능하다. proNGF 발현을 저해하는 물질의 예로, proNGF의 mRNA에 특이적으로 결합하여 proNGF mRNA의 발현을 저해하는 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids) 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 또한, proNGF 활성을 저해하는 물질의 예로, proNGF의 단백질에 특이적으로 결합하여 proNGF 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 앵타머, 화합물 등이 포함되며, 바람직하게는 항체이나 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에서 용어, “siRNA(small interference RNA)”는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 21 내지 25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각을 의미한다. 본 발명의 siRNA는 센스 가닥(mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다. 본 발명의 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 용어, “shRNA(short hairpin RNA)”는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시키는 방식을 이용한다. 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, “miRNA(microRNA)”는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA 분자로서, 타겟 mRNA의 파쇄 또는 해독단계에서의 억제를 통하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII 타입효소에 의해 70-90 염기 정도의 스템-루프 구조, 즉 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)라는 효소에 의해 절단되어 21-25 염기의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로써 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도한다. miRNAs는 다양한 생리학적 현상 및 질환에 관여한다.
- [0021] 본 발명에서 용어, “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타낸다.
- [0022] 본 발명에서 용어, “항체”는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 proNGF에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab,

F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

- [0023] 본 발명에서 용어, "애타머"는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 애타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있는데, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득되는 물질이다. 상기 애타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조정할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적이 기능한 능력을 차단할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "발기부전"은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않은 상태를 의미하며, 일반적으로 이러한 상태가 3개월 이상 지속되었을 경우 발기부전으로 정의한다. 상기 발기부전은 심리적인 요인에 기인하는 심인성 발기부전과 육체적인 장애에 기인하는 기질성 발기부전으로 크게 나눌 수 있으며, 본 발명의 proNGF 억제제는 궁극적으로 음경의 기능을 개선시켜 심인성 및 기질성 발기부전을 모두 치료할 수 있다. 상기 기질성 발기부전은 당뇨병, 음경조직손상, 관상동맥질환, 신장병증, 신경병증, 고혈압, 동맥경화 또는 고지혈증 등의 질병에 의한 것일 수 있으나, 상기 예시에 한정되는 것이 아니며 발기에 영향을 줄 수 있는 질병이라면 제한 없이 포함된다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "해면체"는 포유류의 음경이나 음핵의 주체를 이루는 발기조직으로, 주위가 탄성섬유를 함유하는 두껍고 튼튼한 결합조직의 막으로 싸여 있으며, 이 막이 내부로 들어가 있어 해면상의 작은 방을 이루고 있다. 남성의 음경 내부에는 좌우에 2개의 음경 해면체와 그 아래쪽에 1개의 요도 해면체가 있고, 여성에게는 음경 해면체와 비슷한 구조를 가진 음핵 해면체와 요도 해면체가 있다. 해면체에 정맥혈이 가득 차게 되면 음경이 발기하게 된다. 음경 해면체 평활근과 음경 혈관은 평상시 아드레날린성 교감 신경에 의해 수축 상태에 있으며, 이완에 의한 발기 반응 후, 아드레날린성 교감 신경계의 자극에 의해 다시 수축 상태로 되돌아온다. 이렇듯 발기조직은 평상시 수축 상태를 유지하지만, 성적 각성시 뇌 중추에서 보내는 신호와 신경계의 자극, 체내 및 발기조직 내의 여러 신경 전달 물질 및 호르몬 등에 의해 발기조직이 이완되고, 발기가 시작되며, 발기가 유지된다. 이러한 발기반응이 끝난 후, 다시 발기조직은 수축 상태를 유지하게 된다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 proNGF 억제제를 포함하는 조성물을 이용하여 발기부전 증상을 차단하거나, 발기부전 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 proNGF 억제제를 포함하는 조성물을 이용하여 발기부전 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0028] 본 발명에 따른 proNGF 억제제는 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 특이적인 단백질의 활성 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시킴으로써 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있다.
- [0029] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 proNGF 억제제는 발기부전의 예방, 개선 및 치료 효과가 우수하므로, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용한 의약품, 의약품 또는 건강기능식품으로 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물이 발기부전의 예방 또는 치료를 목적으로 약학적 조성물로 제형화 될 경우, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아

레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 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.

- [0033] 본 발명에서 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 음경 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 그러나 경구 투여 시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 proNGF 억제제와 함께 발기부전의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 또는 치료를 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물을 의약품 조성물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 용어, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체 조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0044] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0047] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사

용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0048] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0050] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 1. 발기부전 동물모델의 디자인 및 proNGF 억제제의 투여

[0053] 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6J)를 이용하여 당뇨병에 의한 발기부전을 유도하였으며, 총 3 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다 (N = 5/군; 1군, 정상 마우스; 2군, 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 PBS(phosphate-buffered solution)[20 μ L]를 투여한 마우스; 3군, 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 항-proNGF 항체를 2번 주사[day -3, 0; 20 μ L]한 마우스).

[0054] proNGF의 활성을 억제하기 위한 억제제로는 인간 NGF의 프로도메인 단편을 항원으로 하며, 마우스 및 랫트 proNGF에 대한 교차반응을 확인한 항-proNGF 항체를 이용하였다(Biosensis, S-080-100).

[0056] 실시예 2. 발기부전 동물모델에서 항-proNGF 항체의 발기부전 치료 효과 검증

[0057] 2-1. 전기 자극에 따른 발기력 측정

[0058] 본 발명에 따른 proNGF 억제제에 의한 발기력 개선 효과를 확인하기 위하여, 음경해면체의 신경을 자극하여 발기력 변화를 확인하였다. 보다 구체적으로, 상기 실시예 1과 같이 음경해면체에 항-proNGF 항체를 투여하고 2주가 경과한 후, 각 마우스의 하복부에서 좌측 표피부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 이후 음경신경 부위에 압력 전달기(바이오스펙 시스템, 미국)가 연결된 카테터를 삽입한 후, 음경신경에 전기자극을 가하기 위하여 백금 전극을 음경신경에 위치고 약 1분 동안 5 V, 12 Hz의 강도로 전기자극을 가하였다. 이에 따라 상기 음경에 삽입되어 있던 카테터를 통하여 발기된 음경해면체 내압(ICP, Intracavernous Pressure)을 측정하였다. 음경해면체 내압에 대한 곡선은 도 1a에 나타내고, 최고 음경해면체 내압(Maximal ICP)은 도 1b에 나타내었으며, 도 1a에 나타난 음경해면체 내압 곡선의 면적(Total ICP[area under the curve])을 그래프화하여 도 1c에 나타내었다. 상기 ICP는 발기력을 나타내는 지표이며, 도 1a 내 가로축에 1분간의 전기자극 기간을 검정색 막대로 표시하였다.

[0059] 도 1에 나타난 바와 같이, proNGF 억제제인 항-proNGF 항체를 투여한 군(anti-proNGF)은 정상 대조군(Control) 수준으로 발기력이 회복되며, PBS 투여군에 비해 현저한 발기력 개선 효과를 보임을 확인하였다. 특히, 음경발기와 관련한 두 가지 변수, 즉 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 항-proNGF 항체 투여에 의해 현저하게 증가함을 확인하였다.

[0061] 2-2. 음경해면체 조직에서 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 특이적 단백질의 발현 분석

[0062] 음경은 음경발기의 기능을 담당하는 해면체 조직과 이에 영양을 공급하는 소혈관들로 이루어져 있다. 그러나 당뇨, 고지질증, 신경손상 등에 의한 병적 조건하에서는 이러한 혈관을 포함한 해면체 조직에 병변이 생기고 조직의 구조가 비정상적으로 되어 발기부전을 초래한다. 상기와 같은 배경 하에서, 본 발명에 따른 proNGF 억제제의 발기부전 치료 효과를 확인하기 위하여, 음경해면체 조직에서 혈관내피세포에 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1), 혈관주위세포에 특이적 단백질인 NG2, 신경세포에 특이적 단백질인 베타 III 튜불린의 활성 정도를 확인하였다.

[0063] 보다 구체적으로, 상기 실시예 1과 같이 음경해면체에 항-proNGF 항체를 투여하고 2주가 경과한 후, 각 마우스로부터 음경 해면체 조직을 분리하고 이를 4% 파라포름알데하이드에서 24시간 동안 고정하였다(4℃). 상기 음경

해면체 조직을 동결용 포매제를 이용하여 고정시킨 후, 동결 절편기에서 7 μ m 두께로 잘라 음경조직 절편을 준비하였다. 다음으로, 준비된 음경조직 절편을 슬라이드 상에 올리고, 4% 파라포름알데히드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 음경조직 절편을 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질을 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블락킹하였다. 그 후, 1차 항체(항-PECAM-1 햄스터 항체 1:50, 항-NG2 랫트 항체 1:50, 항- β III 튜불린 치킨 항체 1:200)와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 항체(TRITC-표지된 항-햄스터 항체 또는 FITC-표지된 항-랫트 항체 또는 TRITC-표지된 항-치킨 항체 1:1000)와 함께 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0064] 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군(DM+PBS)의 음경해면체 조직에서는 정상 대조군 (Control)에 비해 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) 및 혈관주위세포 특이적 단백질인 NG2(neuron glial antigen 2), 신경세포 특이적 단백질인 베타 III 튜불린의 활성이 현저하게 감소하였으나, proNGF 억제제인 항-proNGF 항체를 투여한 군(DM + anti-proNGF)은 PECAM-1, NG2, 및 베타-III 튜불린의 활성이 모두 증가함을 확인하였다. 이는 당뇨에 의하여 감소된 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포가 항-proNGF 항체에 의하여 재생이 유도되는바, 본 발명의 proNGF 억제제는 단순히 혈류량 증가에 의한 임시적인 발기부전 개선이 아니라 음경해면체 조직 자체의 상태 개선이라는 근본적인 원인 해결을 통한 발기부전 치료 효과를 가짐을 증명하는 결과이다.

[0066] 2-3. 음경해면체 조직에서 혈관내피세포의 세포사멸 억제 효과 분석

[0067] 본 발명에 따른 proNGF 억제제에 의한 발기부전 치료 효과를 확인하기 위하여, 혈관내피세포의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하였다. 보다 구체적으로, 상기 실시예 1과 같이 음경해면체에 항-proNGF 항체를 투여하고 2주가 경과한 후, 각 마우스로부터 음경 해면체 조직을 분리하고 이를 4% 파라포름알데히드에서 4℃, 24 시간 동안 고정하였다. 상기 조직을 동결용 포매제를 이용하여 고정시킨 후, 동결 절편기에서 7 μ m 두께로 잘라 음경조직 절편을 준비하였다. 다음으로, 준비된 음경조직 절편을 슬라이드 상에 올리고, 4% 파라포름알데히드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 음경조직 절편을 세척 버퍼 (PBS)로 3회 세척한 후, TUNEL Kit (S7111 | ApopTag® Plus In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit)의 실험 지시 사항을 따라 TUNEL 염색을 수행하였다. TUNEL 염색 후 세척 버퍼 (PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블락킹하였다. 그 후, 항-PECAM-1 햄스터 항체 1:50와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 TRITC-표지된 항-햄스터 항체 1:1000)와 함께 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0068] 도 4에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군(DM+PBS)의 음경해면체 조직에서는 정상 대조군 (Control)에 비해 사멸된 혈관내피세포의 수가 현저하게 증가하였으나, proNGF 억제제인 항-proNGF 항체를 투여한 군(DM + anti-proNGF)의 음경해면체 조직에서는 이러한 혈관내피세포의 사멸 정도가 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 당뇨에 의하여 증가된 혈관내피세포의 세포사멸이 proNGF 억제제에 의하여 억제되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0070] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 proNGF 억제제가 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포 특이적 단백질의 활성 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하고 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 proNGF 억제제는 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0072] 이하 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0074] 제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[0075] **1-1. 캡슐제의 제조**

[0076] proNGF 억제제 10 mg

[0077] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0078] 락토오스 14.8 mg

[0079] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0080] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0082] **1-2. 주사제의 제조**

[0083] proNGF 억제제 10 mg

[0084] 만니톨 180 mg

[0085] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0086] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0087] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0089] **1-3. 액제의 제조**

[0090] proNGF 억제제 20 mg

[0091] 이성화당 10 g

[0092] 만니톨 5 g

[0093] 정제수 적량

[0094] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0096] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**

[0097] **2-1. 건강식품의 제조**

[0098] proNGF 억제제 100 mg

[0099] 비타민 혼합물 적량

[0100] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0101] 비타민 E 1.0 mg

[0102] 비타민 B1 0.13 mg

[0103] 비타민 B2 0.15 mg

[0104] 비타민 B6 0.5 mg

[0105] 비타민 B12 0.2 μg

[0106] 비타민 C 10 mg

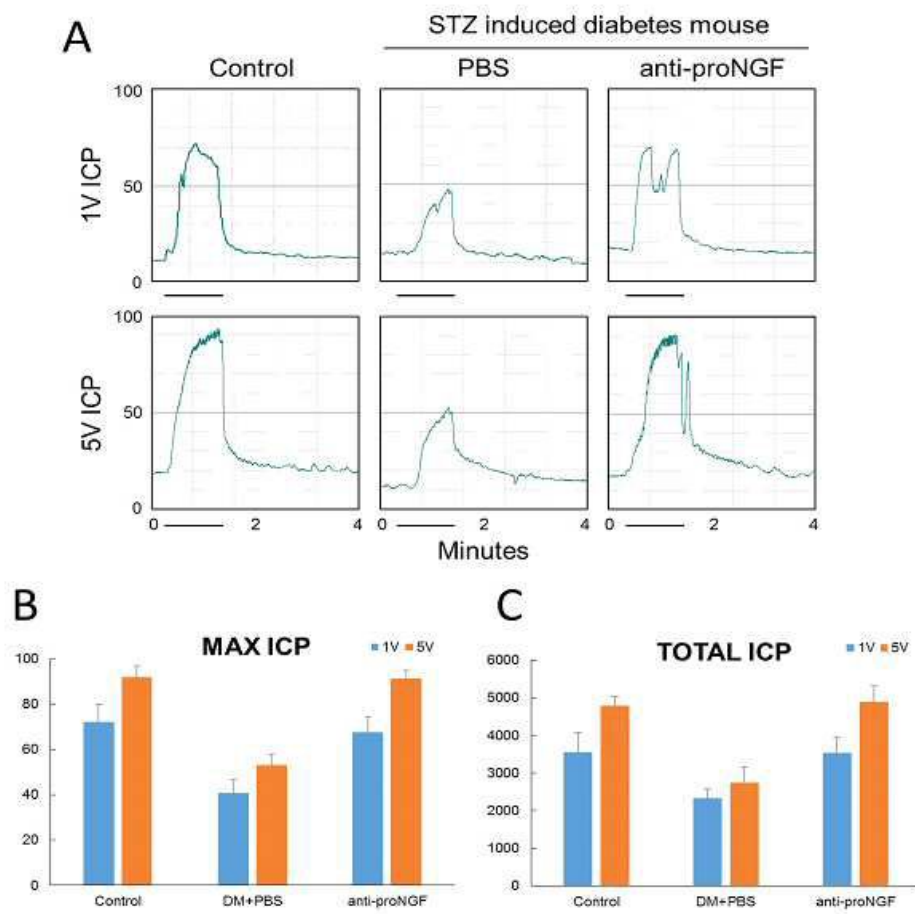
[0107] 비오틴 10 μg

[0108] 니코틴산아미드 1.7 mg

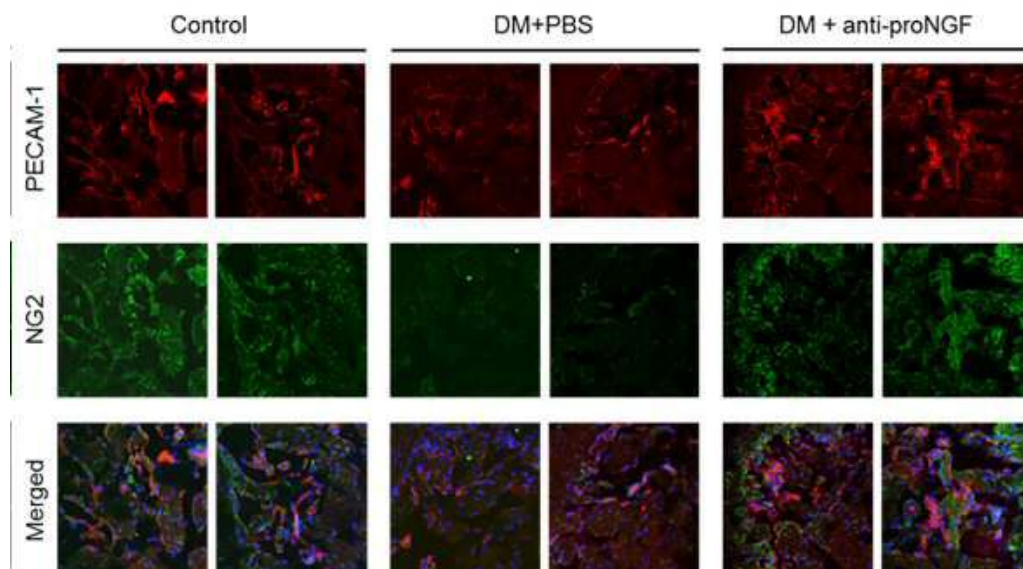
- [0109] 엽산 50 μ g
- [0110] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0111] 무기질 혼합물 적량
- [0112] 황산제1철 1.75 mg
- [0113] 산화아연 0.82 mg
- [0114] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0115] 제1인산칼륨 15 mg
- [0116] 제2인산칼슘 55 mg
- [0117] 구연산칼륨 90 mg
- [0118] 탄산칼슘 100 mg
- [0119] 염화마그네슘 24.8 mg
- [0120] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

도면

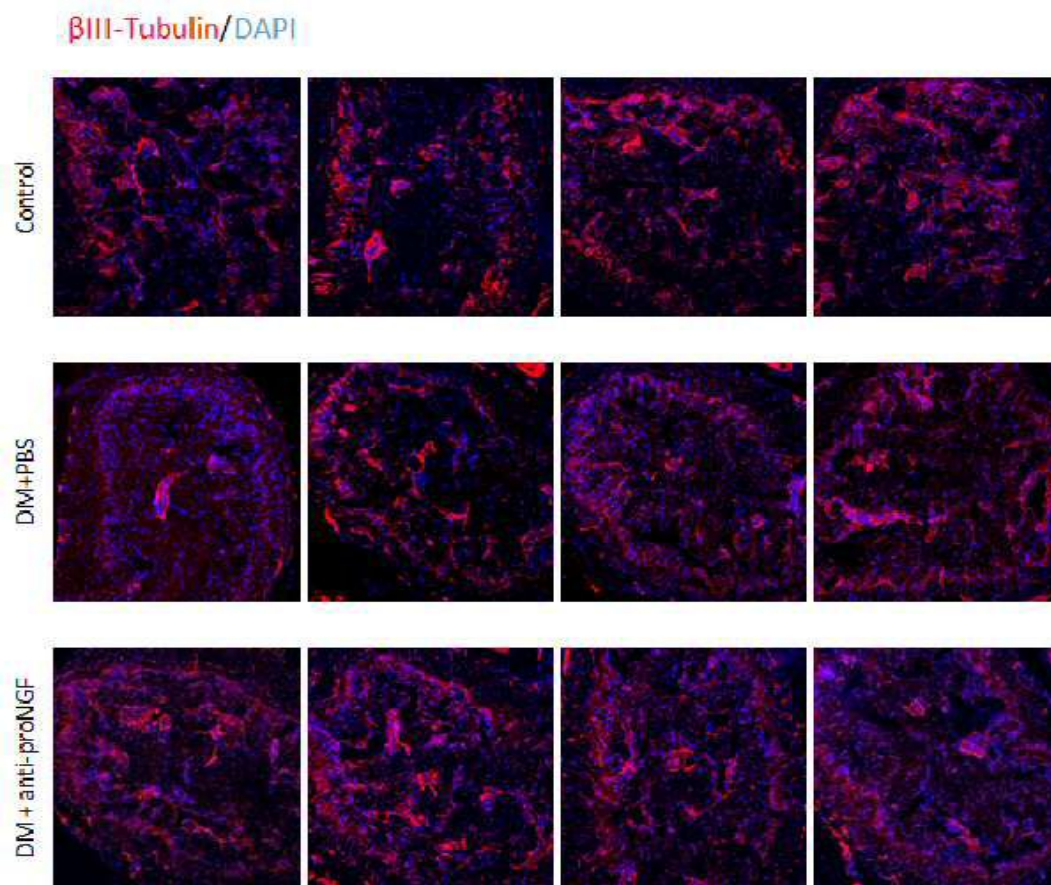
도면1



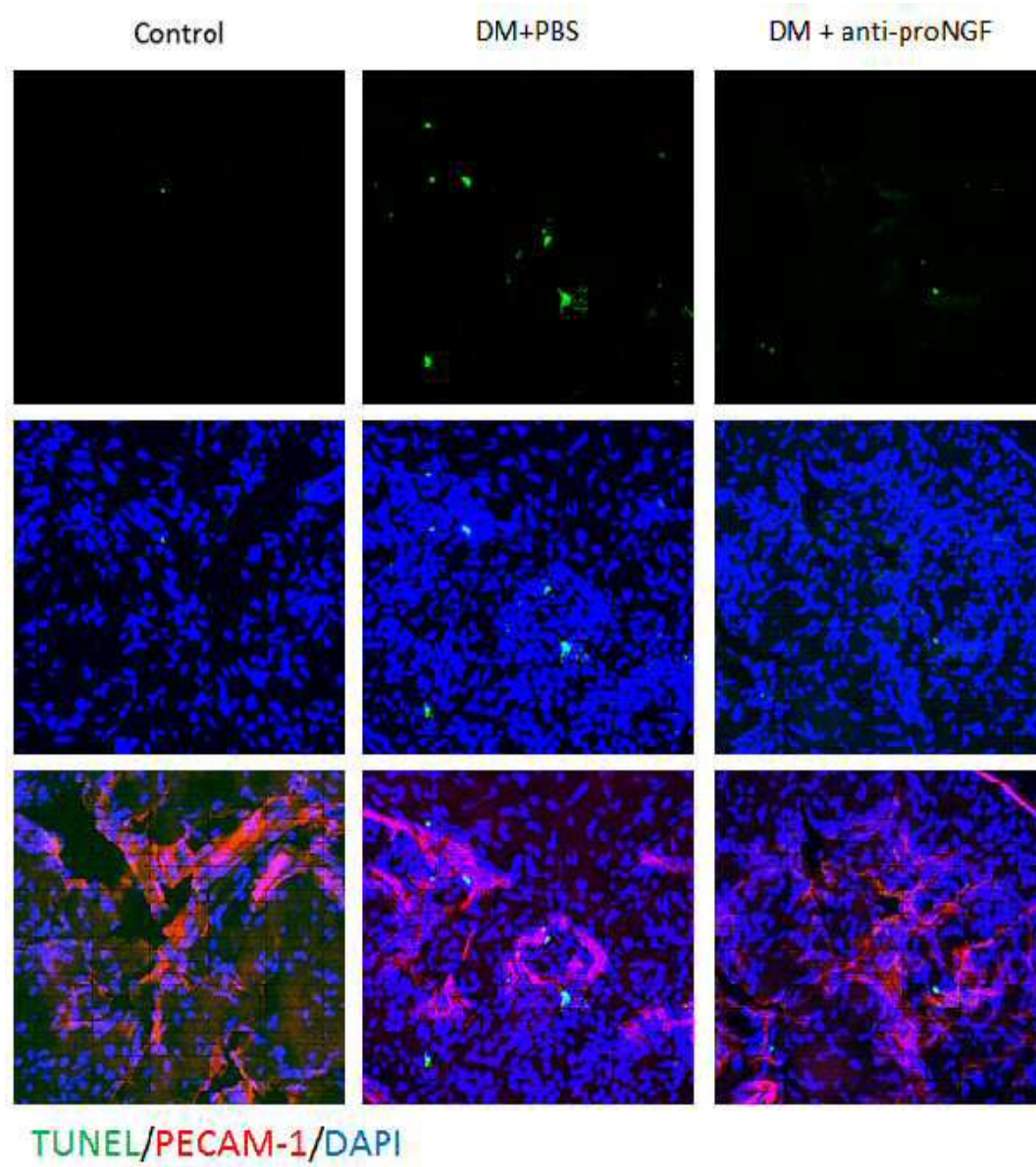
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Composition for preventing or treating erectile dysfunction
comprising proNGF inhibitor
- <130> 1-246
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 241
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile

1 5 10 15

Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile

20 25 30

Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu

35 40 45

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala

50 55 60

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg

65 70 75 80

Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu

85 90 95

Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro

100 105 110

Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe

115 120 125

His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly

130 135 140

Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu

145 150 155 160

Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu

165 170 175

Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile

180 185 190

Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val

195 200 205

Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg

210 215 220

Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg

225 230 235 240

Ala

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Val

1 5 10 15

Gln Ala Glu Pro Tyr Thr Asp Ser Asn Val Pro Glu Gly Asp Ser Val

20 25 30

Pro Glu Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu

35 40 45

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Thr Ala Pro Ile Ala Ala Arg Val Thr

50 55 60

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg

65 70 75 80

Arg Leu His Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Pro Thr

85 90 95

Ser Ser Asp Thr Leu Asp Leu Asp Phe Gln Ala His Gly Thr Ile Pro

100 105 110

Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Thr His Pro Val Phe

115 120 125

His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly

130 135 140

Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Thr Val Leu

145 150 155 160

Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu

165 170 175

Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro Val Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile

180 185 190

Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val

195	200	205	
Lys Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg			
210	215	220	
Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg			
225	230	235	240
Gly			