



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0049048

(43) 공개일자

2012년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/47 (2006.01) A61P 15/10 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2010-0110617

(22) 출원일자

2010년11월08일

심사청구일자

2010년11월08일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

현재석

경상남도 진주시 하대로 142, 102동 1002호 (하대동, 현대아파트)

감성철

경상남도 진주시 향교로105번길 19, 푸른마을아파트 A동 202호 (옥봉동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

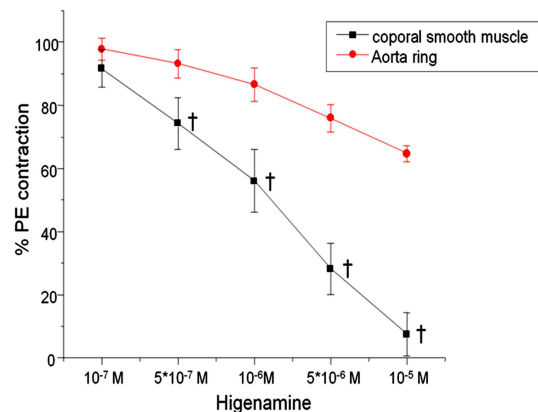
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 하이게나민을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 하이게나민(Higenamine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 의약품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 음경의 해면체 평활근을 특이적이며 농도의존적으로 이완시켜 음경의 발기력을 증가시키는 능력이 우수하고, 기존의 PDE-5 억제제의 음경 해면체 이완 작용을 증가시키므로 발기부전의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장기철

경상남도 사천시 정동면 대곡리 255번지

정재훈

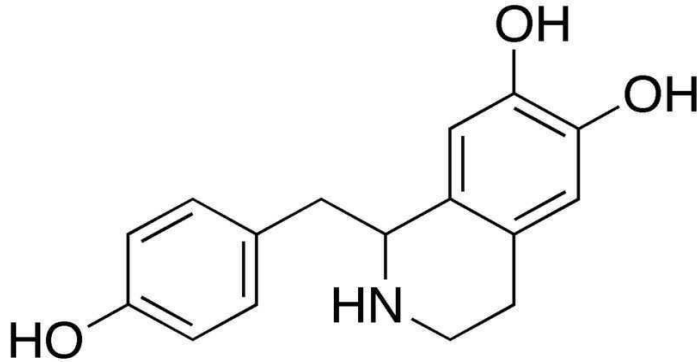
경상남도 진주시 신평공원길7번길 11, 505호 (평거동, 월드오피스텔)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 PDE-5(phosphodiesterase type 5) 억제제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 하이게나민 농도가 1×10^{-7} g/ml 내지 1×10^{-5} g/ml 인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 음경 해면체 내의 cAMP의 농도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 음경 해면체의 내압을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 발기부전 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 발기부전 개선용 의약품 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 하이게나민(Higenamine) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 의약품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 의학의 발전과 식생활의 개선으로 평균 수명이 증가하면서, 과거에는 중요하게 생각하지 않았던 여러 가지 삶의 질에 대한 문제가 나타나게 되었다. 남성의 발기 부전증은 삶의 질에 큰 영향을 주는 질병 중 하나이다.
- [0003] 음경은 성적자극이 가해지면, 프로스타글란딘 (PG), vasoactive intestinal peptide (VIP) 등의 국소작용으로 아드레날린성 신경은 억제되고 콜린성 또는 비아드레날린성-비콜린성 (NANC) 신경에 의한 작용과 혈관내피세포에서 분비되는 내피세포유도 이완 요소(endothelinum derived relaxing factor, EDRF)에 의해 음경 해면체 평활근이 이완되고 동맥은 확장되어, 혈류의 유입이 증가되며 음경내압이 증가함에 따라 백막하정맥이 백막과 팽창된 소공 사이에 눌러 혈류의 유출이 감소됨으로써 발기가 일어난다. 평활근의 이완작용에 관여하는 이차전령으로 guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP)와 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)가 있고, 이러한 이차전령의 세포 내 증가는 myosine light chains의 dephosphorylation을 일으켜 음경 해면체 평활근의 이완을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 음경 해면체의 이완능력이 저하되어 정상적인 성생활이 불가능한 경우, 발기 부전으로 정의하며 이를 예방 및 치료하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.
- [0004] 남성의 발기 부전 유병율은 최근 메사추세츠 남성 노화 연구(Massachusetts Male Study: MMAS)에 의하면 40대 이상의 일반 남성 중 52%에서 나타난다고 보고하였다. 또한 연령이 증가함에 따라 발생 빈도가 증가한다고 하였다. 즉, 많은 수의 남성이 발기 부전을 가지고 있다는 것이다.
- [0005] 현재 발기 부전의 일차 치료약으로 사용되는 PDE-5 억제제는 세포내 cGMP의 가수 분해를 억제하여 cGMP의 농도를 증가시켜 발기를 증진시킨다. 하지만 많은 발기 부전 환자에서 치료 실패를 경험하고 있으며, 특히 당뇨 및 전립선암 수술환자의 경우에는 낮은 치료 성공율을 보고하고 있다. 따라서 이를 보완하거나 대체할 수 있는 약물의 개발이 필요하다.
- [0006] 한편, 하이게나민은 미나리아재비과에 속하는 다년생 식물인 부자(Aconiti Tuber)에서 강심활성 성분이라고 추정되는 물질을 순수분리하여 화학구조를 밝힌 것으로서, 하이게나민은 생체내에서 아드레날린 β -수용체에 작용하여 강심 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 하이게나민은 심장부전에 효과적이며 그것의 기전이 아드레날린 β -길항제로 작용하는 것으로 알려져 있어, 이전까지의 하이게나민에 대한 주된 연구는 심장에 대한 강심 작용에 초점이 맞추어져 있다. 그러나, 심혈관계가 아닌 음경 해면체 평활근 특이적 이완에 하이게나민이 작용한다는 것에 대해서는 보고된 바 없다.
- [0007] 이러한 배경하에 본 발명자들은 하이게나민이 음경 발기에 미치는 효과를 확인한 결과, 하이게나민을 처리한 경우 음경 해면체의 평활근의 이완작용에 특이적으로 효과가 있음을 확인하고 이에 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 하이게나민 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

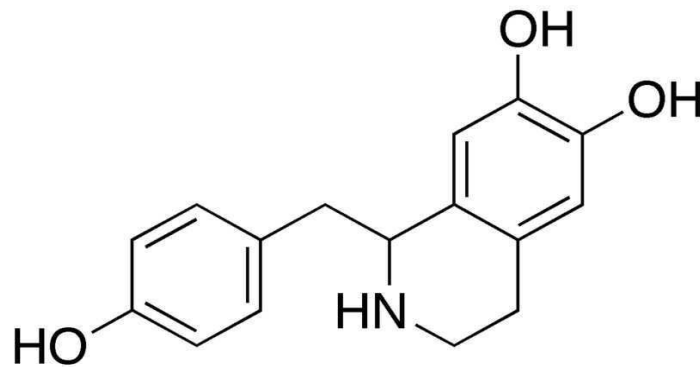
[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 개선용 의약품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서 본 발명은 하이게나민(Higenamine) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서 용어, "하이게나민(Higenamine)"은 미나리아재비과에 속하는 다년생 식물인 부자(Aconiti Tuber)에서 분리된 benzyltetrahydroisoquinoline계 화합물로서, 화학식은 $C_{17}H_{17}NO_3$ 이고, 하기 화학식 1의 구조를 갖는다.

화학식 1



[0014]

[0015] 본 발명의 하이게나민은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 당업자에 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성하거나, 부자에서 추출 분리하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.

[0017] 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0018] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0019] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어, "발기부전"은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않은 상태를 의미하며, 일반적으로 이러한 상태가 3개월 이상 지속되었을 경우 발기부전으로 정의한다.

[0021] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 하이게나민 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는

조성물을 이용하여 발기부전 증상을 차단하거나, 발기부전 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

- [0022] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 하이게나민 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 발기부전 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "PE(phenylephrine)"은 혈관 및 음경 해면체를 수축시키는 작용을 하는 물질로, 구체적으로 음경 해면체에 PE를 처리하여 혈관을 수축시킨 후, 본 발명의 하이게나민을 처리하여 음경 해면체가 이완되는 정도를 확인하였다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "PDE-5(phosphodiesterase type 5)"는 cGMP 또는 cAMP를 분해하는 효소를 말한다. 음경 해면체 내에는 평활근 이완을 담당하는 세포가 있으며, 이 세포에는 cAMP, cGMP와 같은 이차 전령 물질이 존재하는데 성적으로 자극을 받으면 체내에서는 산화질소(NO)가 생성되고 이는 구아닐레이트 사이클라제는 효소를 활성화시켜 음경의 발기체내에서 cGMP의 분비를 증가시키고, 이 cGMP가 음경 해면체 평활근을 이완시키고 음경으로 흐르는 혈류를 늘려 발기를 일으키게 된다. 이때, PDE-5는 발기를 일으키는 물질인 cGMP 또는 cAMP를 분해하여 발기가 소실되게 하는 역할을 한다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "해면체"는 포유류의 음경이나 음핵의 주체를 이루는 발기조직으로, 주위가 탄성섬유를 함유하는 두껍고 튼튼한 결합조직의 막으로 싸여있으며, 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 가득차게 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, 체 내 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 발명의 일 실시예에서는 하이게나민을 음경 해면체에 처리하여, 음경 해면체의 평활근의 이완 정도를 확인하여 발기능에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로 하이게나민을 음경 해면체에 농도별로 처리하고 음경 해면체 및 대동맥 고리의 이완 정도를 확인한 결과, 하이게나민의 처리 농도에 의존적으로 음경 해면체가 이완되고, 음경 해면체군이 대동맥 고리군보다 같은 농도에서 유의하게 더 많은 이완 작용을 나타내었다(표 1, 도 1). 이는 하이게나민이 전신 작용보다 음경 해면체 조직에 특이적으로 반응하는 것을 확인한 것이다.
- [0027] 음경 해면체 조직에서 하이게나민은 비선택적 아드레날린 β -antagonist인 프로프라놀롤에 의해 이완효과가 효과적으로 억제되었다. 하지만, 산화 질소 합성 억제제인 L-NAME 및 구아닐레이트 사이클라제 억제제인 메틸렌블루, 프로스타글란딘 억제제인 인도메사신, 칼슘의존성 포타슘통로 중 막전위의존성 포타슘통(KV) 차단제인 4-아미노피리딘, 그리고 ATP의존성 포타슘통로 (KATP) 차단제인 글리벤클라마이드(Glibenclamide) 와 내피세포의 유무는 하이게나민의 음경 해면체 이완작용에 영향을 주지 않았다.
- [0028] 또한, PDE-5 억제제 작용에 미치는 하이게나민의 영향을 확인한 결과 하이게나민을 전 처치한 군에서 PDE-5 억제제에 의한 음경 해면체의 이완 작용이 증진하는 것을 확인하였다(도 3, 표 3). cAMP 및 cGMP의 농도에 미치는 하이게나민의 영향을 확인한 결과, 하이게나민의 농도 증가에 의존적으로 cAMP의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 이러한 결과는 하이게나민이 기존의 발기부전 치료제들과는 다른 기전으로 음경 해면체를 특이적으로 이완시켜 발기 부전을 예방 또는 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하는 결과이다.
- [0029] 다른 하나의 양태로 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 하이게나민을 유효성분으로 포함하는 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서 하이게나민 성분을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수그로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐

피콜리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 하이게나민에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 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.

[0032] 다른 하나의 양태로 본 발명은 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 하이게나민을 유효성분으로 포함하는 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0035] 또 다른 하나의 양태로 본 발명은 하이게나민을 유효성분으로 포함하는 발기부전 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0036] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 추출물을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0037] 또한, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0038] 또 다른 하나의 양태로 본 발명은 하이게나민을 유효성분으로 포함하는 발기부전 개선용 의약외품 조성물에 관한 것이다. 즉, 본 발명의 조성물은 발기부전 개선용 목적으로 의약외품 조성물에 첨가될 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 조성물은 음경의 해면체를 특이적으로 농도 의존적으로 이완시켜 음경의 발기력을 증가시키는 능력이 우수하고, 기존의 PDE-5 억제제의 음경 해면체의 이완작용을 증진시킬 수 있으므로 발기부전의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 래트에서 PE에 의해 유도된 대동맥 고리 및 음경 해면체의 평활근 수축에서 하이게나민 용량 의존적 억제제의 결과를 나타내는 결과이다. 음경 해면체 평활근: PE-전처리($5 \times 10^{-5} M$). 대동맥 고리: PE-전처리($10^{-7} M$). †

$P < 0.05$ 대동맥 고리와 비교하여 유의적 차이.

도 2는 PE가 전처리된 음경 해면체 평활근에서 용량 의존적 방식으로 하이게나민에 의한 이완을 나타낸다. 정상: PE-전처리(5×10^{-6} M). 프로프로아놀롤: 프로프로아놀롤 10^{-5} g/ml 존재하에 PE-전처리(5×10^{-6} M). $\dagger P < 0.05$ 정상 음경 해면체와 비교하여 유의적 차이.

도 3은 PE에 의해 수축이 유도된 래트의 해면체에서 PDE-5 억제제의 용량 의존적인 억제를 나타내는 도이다. 하이게나민을 전처리하는 경우 PDE-5 억제제에 의한 이완이 증가하였다. PDE-5 억제제: PE 전처리(5×10^{-6} M), 하이게나민: 하이게나민 10^{-7} g/ml 존재하에 PE 전처리, $\dagger P < 0.05$ PDE-5 억제제와 비교하여 유의적 차이.

도 4는 래트의 음경 해면체에서 cGMP에 미치는 하이게나민의 영향(A)을 나타낸 것이다. 래트음경 해면체에서 cAMP에 미치는 하이게나민의 영향(B)을 나타낸 것이다. $*P < 0.05$, 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타냄.

도 5는 전기장 자극으로부터 결과 및 ICP/BP의 대표값을 나타낸 것이다. 대조군 래트에서 ICP의 변화에 따른 대표적인 시간 경과(A), 하이게나민 0.25×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 래트(B), 하이게나민 0.5×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 래트(C), 및 하이게나민 0.5×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 래트(D)를 나타낸다.

도 6은 해면체 신경자극 기간 중 ICP의 변화를 나타낸다. 막대 그래프는 모든 그룹에서 해면체 신경 자극에 대한 반응으로 ICP의 증가를 나타낸다. 정상; 대조군 그룹. 0.25×10^{-5} ; 하이게나민을 0.25×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 그룹. 0.5×10^{-5} ; 하이게나민을 0.5×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 그룹. 10^{-5} ; 하이게나민을 0.5×10^{-5} mg/kg 정맥주사한 그룹. $*P < 0.05$, 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명을 이하의 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되지 않는다.

[0042] 실시예 1: 음경 해면체 조직의 organ bath study

[0043] 흰쥐의 음경 해면체 절편은 생후 9-11주된 280-320g의 Sprague Dawley rat 수컷을, 경추부를 탈구(dislocation)시켜서 죽인 후 즉시 음경을 절단하고 Krebs-Hanselite 용액 내에서 결체조직 및 지방 조직을 제거한 후 $2 \times 2 \times 6$ mm 크기의 음경 해면체 절편을 만들었다. 흰쥐 대동맥 고리도 Sprague Dawley rat 수컷의 흉부대동맥을 적출하여 결체조직을 제거하고 길이 3mm의 고리를 만들었다. 모든 과정에서 혈관내피세포의 손상을 주지 않기 위하여 최소한의 조직 조작을 하였으며 혈관내피세포의 제거를 위해서 대동맥 고리는 혈관의 내부를 25 gauge 바늘의 끝부분으로 부드럽게 문질러 내피 세포를 제거하였고, 음경 해면체 절편은 0.3% CHAPS 3ml에 20초간 전처리 후 절편을 엄지와 검지 사이에서 20초간 가볍게 문지른 후 Krebs-Hanselite 용액에 세척한 후 마른 거름종이에 부드럽게 굴러 제거하였다. 이러한 조작의 탈내피여부는 PE (5×10^{-6} M)에 의한 조직 수축이 acetylcholine (10^{-5} M)에 의해 소실되지 않는 것으로 확인하였다.

[0044] 흰쥐의 음경 해면체 절편과 흉부 대동맥 고리를 10ml의 Krebs-Hanselite 용액이 들어있는 이중벽 실험용기에 옮기고 한쪽 끝은 근육고정기에 연결하고 다른 끝은 등척성 장력변환기 SG-10에 연결하여 신호를 Physiography (PowerLab ADI Instruments, Sydney, Australia)에 연결하여 측정하였다. 장력의 실시간 모니터링은 Chart 5 software (ADI Instruments, Sydney, Australia)를 이용하였다. 실험용기 내 Krebs-Hanselite 용액은 37°C로 유지시키고 95% O₂와 5% CO₂의 혼합기체를 계속 공급하여 pH 7.4 로 하였다. 각 절편의 초기장력을 2g 정도로 유지시킨 상태에서 약 1시간 30분에서 2시간 동안 Krebs-Hanselite 용액을 갈아 주면서 안정상태에 도달하도록 하였다. 안정 상태에서 PE (5×10^{-6} M)을 투여하여 수축 정도를 관찰하였다. 그 후 Krebs-Hanselite 용액을 3회 이상 씻어 안정상태로 회복시키고 장력을 0.5g씩 올린 후, 안정상태에서 PE (5×10^{-6} M)에 의한 수축 정도를 재관찰하였다. 이와 같은 조작을 반복하여 이전 수축의 10%이내일 때를 이상적인 최적 평상 등장성 수축력 (resting optimal isometric tension)으로 결정하였다. 각 절편이 최적 평상 등장성 수축력에서 안정상태를 유지하면 실험용기 내에 PE (5×10^{-6} M)를 전처리하여 조직을 수축시킨 후 Higenamine을 10^{-7} M 부터 10^{-5} M까지 5배수씩 투여하여 나타나는 장력곡선의 변화를 관찰하여 이완 정도를 확인하였다.

[0045] 음경 해면체에서 Higenamine의 이완 기전을 알아보기 위하여, 내피세포를 제거한 군, L-NAME (10^{-5} M), 프로프로아놀롤(Propranolol, 10^{-5} M), 인도메사신(Indomethacin, 3×10^{-5} M), 글리벤클라마이드(Glibenclamide, 10^{-5} M), 4-아미노피리딘(4-aminopyridine, 10^{-5} M), 메틸렌블루(Methylene blue, 10^{-5} M)을 각각 30분간 전처리 한 군에서 이완 반응을 비교하였다.

[0046] **실시예 2: 음경 해면체에서 Higenamine 과 PDE-5 억제제의 상호작용**

[0047] 음경 해면체 절편에 PE (5×10^{-6} M)를 전처리하여 조직을 수축시킨 후 PDE-5 억제제를 10^{-5} M 부터 5×10^{-4} M까지 5 배수씩 투여하여 이완 반응을 확인하였다. 그리고 위의 실험에서 하이게나민이 음경해면체 이완에 작용하는 최소농도를 구하여, 이 농도로 하이게나민을 20분간 전처리 후 PE (5×10^{-6} M)로 조직을 수축하고 PDE-5 억제제를 투여하여 나타나는 이완 정도를 비교 관찰하였다.

[0048] **실시예 3: 흰쥐 음경해면체의 cGMP 및 cAMP 측정**

[0049] 5%의 이산화탄소 (CO₂)를 포함한 산소 (O₂)를 기포화된 Krebs-Hanselite 용액에서 1시간 동안 평활근 절편을 균형시킨 후, phenylephrine (PE: 5×10^{-6} M)으로 수축시킨 후 하이게나민에 7분간 노출시킨 후 조직을 떼어내 액체 질소에서 급속 동결시켜 ice-cold 6% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)에서 균질화시켰다. 균질화된 것을 15분 동안 원심분리한 후, 부유물에서 통상적인 방법으로 세포질 단백을 분리하였다. 방사선 면역요법을 이용하여 정상 음경 해면체군과 하이게나민의 농도에 따라 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M 처리군으로 나누어 유리되는 각각의 cGMP (각 군의 수, n=6)와 cAMP (각 군의 수, n=6)양을 측정하였다.

[0050] **실시예 4: 전기자극 발기유발 실험**

[0051] 총 28마리의 생후 9-11주된 280-320g 의 Sprague Dawley rat 수컷을 사용하여 7마리씩 4개의 군으로 분류하였다. 첫 번째 군은 정상 대조군 7마리, 두 번째 군은 하이게나민 10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 7마리, 세 번째 군은 하이게나민 0.5×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 7마리, 네 번째 군은 하이게나민 0.25×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 7마리로 군을 분류하였다.

[0052] 케타민(50mg/kg)을 실험 쥐의 복강 내 주사하여 마취하였다. 수술대에서 양와위 자세를 취하고, 경동맥에 카테터 (polyethylene (PE) ©50 tube)를 삽입하여 혈압을 모니터링 하였다. 복부의 정중앙 절개를 시행하여 전립선과 방광을 노출시켰다. 그리고 전립선의 후외측에 있는 골반신경절 (pelvic ganglion)을 찾고 그와 관련된 골반신경, 해면체신경을 확인하고, 신경손상이 가지 않게 박리하였다. 전기자극기(electric stimulator)와 백금 전극을 사용하여 해면체 신경에 신경자극을 시행하였다. 신경의 전기자극에 따른 발기 및 그 정도를 알기 위하여 음경 해면체를 음경 각부 (crura)까지 박리하고, 음경 각부를 둘러싸고 있는 좌골해면체근을 박리하여 음경각부의 백막 (tunicar albuginia)을 확인하고, 25 게이지 바늘(헤파린 250 U/ml 전처리 한 PE-50 tube사용)을 백막하 음경 해면체 속에 유지하였다.

[0053] 혈압과 음경해면체내압은 혈압측정용 transducer 및 기록계 (PowerLab ADI Instruments, Sydney, Australia)에 연결하여 측정하였다. 혈압의 실시간 모니터링은 Chart 5 software (ADI Instruments, Sydney, Australia)를 이용하였다. 전기 자극은 전압 5 V, 시간은 60초 시행하였다.

[0054] 자율신경자극에 따른 혈역동학적 반응을 알아보기 위해 압력을 신경자극전, 자극동안, 자극후에 측정하였다. 또한 신경자극에 의한 반응을 보기 위해, 해면체신경자극을 시행하여 최대음경해면체내압/평균동맥혈압 백분율(ICP/MAP×100)을 측정하였고 군간의 차이를 비교하였다.

[0055] **실시예 5: 사용약물 및 용액**

[0056] Phenylephrine hydrochloride (PE), N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), glibenclamide, 4-

aminopiridine, indomethacin, Methylene blue, Propioanolol, 3-[(3-cholamide propyl)]-1-propane sulfonate (CHAPS)등은 Sigma (Sigma Chemical, St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. phosphodiesterase type 5 (Udenaphyl)은 동아제약에서 제공받아 사용하였다. 실험에 사용한 Krebs-Hanselite 용액의 조성은 NaCl, 118.1; NaHCO₃, 25; KCl, 4.6; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂ 2.5; MgSO₄, 1.21 Glucose, 11.0 (단위: mM)이며, pH 7.4 였다.

[0057] 실시예 6: 분석

[0058] 통계학적인 유의성은 SPSS 14.0 (SPSS, statistical package for social science, Chicago, USA)을 사용하여, ANOVA 분산분석을 이용하여 검정하였으며 대조군과 실험군간에 p값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

[0059] 실험예 1: 하이게나민의 흰쥐 대동맥 고리와 음경해면체 절편에 대한 효과

[0060] 안정상태에서 PE 10⁻⁷ M은 대동맥 고리를 수축시켰다. PE에 의한 대동맥 고리 수축에 대한 하이게나민의 농도에 따른 효과를 관찰한 결과, 하이게나민의 농도를 10⁻⁷ g/ml부터 증가시키에 따라 PE에 의한 수축 작용이 감소되어 대동맥 고리는 이완하였다. 하이게나민의 농도가 10⁻⁵ g/ml 일 때 35.3±2.6 %정도로 최대이완이 있었다. 내피세포를 제거한 군에서도 하이게나민의 농도를 증가 시킴에 따라 PE에 의한 수축 작용이 감소되어 대동맥 고리는 이완하였다. 하이게나민의 농도가 10⁻⁵ g/ml 일 때 35.6±8.7 %정도로 최대이완이 있었다. 하이게나민의 농도에 따른 대동맥 고리의 수축 억제 효과는 농도에 의존적인 양상을 보였으며 내피세포의 존재 유무와는 상관관계가 없었다 (P>0.05).

[0061] 안정상태에서 PE 5×10⁻⁶ M은 음경해면체를 수축시켰다. PE에 의한 음경해면체 절편에 대한 하이게나민의 농도에 따른 변화를 관찰한 결과, 하이게나민의 농도를 10⁻⁷ g/ml부터 증가시키에 따라 PE에 의한 수축 작용이 감소되어 음경해면체는 이완하였다. 하이게나민의 농도가 10⁻⁵ g/ml 일 때 92.5±6.9 %정도로 최대이완이 있었다.

[0062] 하이게나민은 PE으로 수축된 흰쥐의 음경 해면체와 대동맥 고리를 농도 의존적으로 이완시켰다. 또한, 음경 해면체군 (N=6)이 대동맥 고리군 (N=6)보다 같은 농도에서 의미 있게 더 많은 이완 작용을 나타내었다 (P<0.01) (표 1, 도 1).

표 1

	N	Precontraction by PE (g)	Maximal relaxation
Cavernous smooth muscle	6	1.45±0.187	92.5±6.9
Aorta ring	6	1.56±0.326	35.4±2.6

[0064] 평균±SD로 나타냄. N, 래트의 수

[0065] 음경 평활근, PE 전처리군(5×10⁻⁶ M)

[0066] 대동맥 고리, PE 전처리군(10⁻⁷ M)

[0067] 이는, 하이게나민이 전신 작용보다 음경 해면체 조직에 특이적으로 반응하는 것을 확인한 것이다.

[0068] 실험예 2: 하이게나민 이완반응에 대한 기전 확인

[0069] 하이게나민에 의한 음경해면체 절편의 이완이 beta-adrenoceptor의 활성화에 의한 것인지 확인하기 위하여 beta-adrenoceptor antagonist 인 propranolol (10⁻⁵ M)을 30분간 전처리 후 PE 5×10⁻⁶ M로 수축시킨 음경해면체 절편에 하이게나민을 투여하여 이완정도를 관찰한 결과, 농도를 증가시키에 따라 PE에 의한 수축 작용이 감소되어

음경해면체는 이완하였다. 하이게나민의 농도가 10^{-5} g/ml 일 때 42.1 ± 7.5 %정도로 최대이완이 있었다. 하지만 Propranolol로 전처리 한 군은 정상 대조군에 비해 유의하게 이완작용이 억제되는 결과를 나타내었다 ($P < 0.05$)(도 2).

[0070] 반면, 산화질소(nitric oxide)합성 억제제인 L-NAME (10^{-5} M) 및 구아닐레이트 사이클라제(guanylate cyclase) 억제제인 메틸렌블루(Methylene blue, 10^{-5} M), 프로스타글란딘(prostaglandine) 억제제인 인도메사신(Indomethacin, 3×10^{-5} M), 칼슘의존성 포타슘통로 중 막전위의존성 포타슘통로(K_V) 차단제인 4-아미노피리딘(4-aminopyridine, 10^{-5} M), 그리고 ATP의존성 포타슘통로 (K_{ATP}) 차단제인 글리벤클라마이드(Glibenclamide, 10^{-5} M)의 30분간 전처리 후 또는 내피세포의존성 이완 여부 확인을 위한 내피세포의 제거 후 PE 5×10^{-6} M로 수축시킨 음경해면체 절편에 하이게나민을 투여하여 이완정도를 관찰한 결과, 모두에서 하이게나민의 음경해면체 이완 작용에 영향을 주지 않았다 ($P > 0.05$)(표 2).

표 2

[0071]

	N	Concentration of the Higenamine (g/ml)				
		10^{-7} M	$10^{-6.5}$ M	10^{-6} M	$10^{-5.5}$ M	10^{-5} M
Normal	6	91.6 ± 5.9	74.2 ± 8.2	56.1 ± 9.7	28.2 ± 8.0	7.49 ± 6.9
Propranolol	6	98.5 ± 3.7	96.1 ± 7.3	91.0 ± 10.0	78.8 ± 10.4	57.9 ± 7.3
Glibenclamide	6	92.9 ± 4.5	81.9 ± 6.7	64.1 ± 8.2	36.4 ± 8.3	13.5 ± 9.4
Indomethacin	6	92.0 ± 5.2	77.6 ± 6.2	59.7 ± 5.4	34.8 ± 6.3	12.9 ± 7.3
Methylene blue	6	89.0 ± 3.5	76.8 ± 6.2	60.4 ± 8.3	37.7 ± 5.3	11.3 ± 4.9
4-Aminopyridine	6	96.0 ± 3.4	84.9 ± 3.9	68.9 ± 4.1	35.4 ± 5.3	11.7 ± 3.1
E(-)	6	92.5 ± 4.9	78.1 ± 8.5	63.4 ± 8.8	34.2 ± 6.4	10.7 ± 6.1
L-NAME	6	92.5 ± 0.8	82.3 ± 7.8	64.8 ± 9.2	38.8 ± 10.0	16.8 ± 8.5

[0072] 평균 $\pm$ SD의 값으로 나타냄. N은 래트의 수를 나타냄.

[0073] E(-) 그룹: 내피세포 제거 그룹

[0074] 이는, 하이게나민에 의한 음경해면체의 이완이 베타-아드레노셉터의 활성화에 의한 것이고, NOS, 내피세포 등에는 의존적이지 않다는 것을 의미한다.

[0075] 실험예 3: 음경 해면체에서 Higenamine 과 PDE-5 억제제의 상호작용

[0076] 음경해면체 절편에 대한 PDE-5 억제제의 농도에 따른 변화를 관찰한 결과, PDE-5 억제제의 농도를 10^{-5} g/ml부터 증가시키면 따라 PE에 의한 수축 작용이 감소되어 음경해면체는 이완하였다. PDE-5 억제제의 농도가 5×10^{-4} g/ml 일 때 84.2 ± 13.9 %정도로 최대이완이 있었다. 하이게나민이 음경해면체 이완에 작용하는 최소농도는 10^{-7} g/ml로 8.4 ± 5.9 %정도 이완작용을 나타내었다. 하이게나민 10^{-7} g/ml 을 20분간 전처리 후 PE (5×10^{-6} M)로 조직을 수축하고 PDE-5 억제제를 투여한 결과, PDE-5 억제제의 농도가 10^{-4} g/ml군과 5×10^{-4} g/ml군에서 하이게나민을 전 처리 하지 않은 PDE-5 억제제군에 비하여 통계적으로 유의하게 음경해면체 이완 작용이 증가하였다 ($P < 0.05$)(표 3, 도 3).

표 3

[0077]

	N	Precontraction by PE (g)	Maximal relaxation
PDE-5 inhibitor	6	2.1 ± 0.6	84.2 ± 13.9
Higenamine	6	2.35 ± 0.6	98.5 ± 3.8

[0078] 평균±SD로 나타냄. N, 래트의 수를 나타냄.

[0079] PDE-5 억제제, PE 전처리(5×10^{-6} M)

[0080] 하이게나민, 하이게나민 10^{-7} PE 전처리(5×10^{-6} M)

[0081] 이는, 하이게나민에 의한 음경해면체의 이완 작용이 PDE-5 억제제의 작용을 보완 및 대체할 수 있음을 의미한다.

[0082] **실험예 4: 하이게나민의 농도에 따른 흰쥐 음경해면체의 cGMP 및 cAMP의 농도**

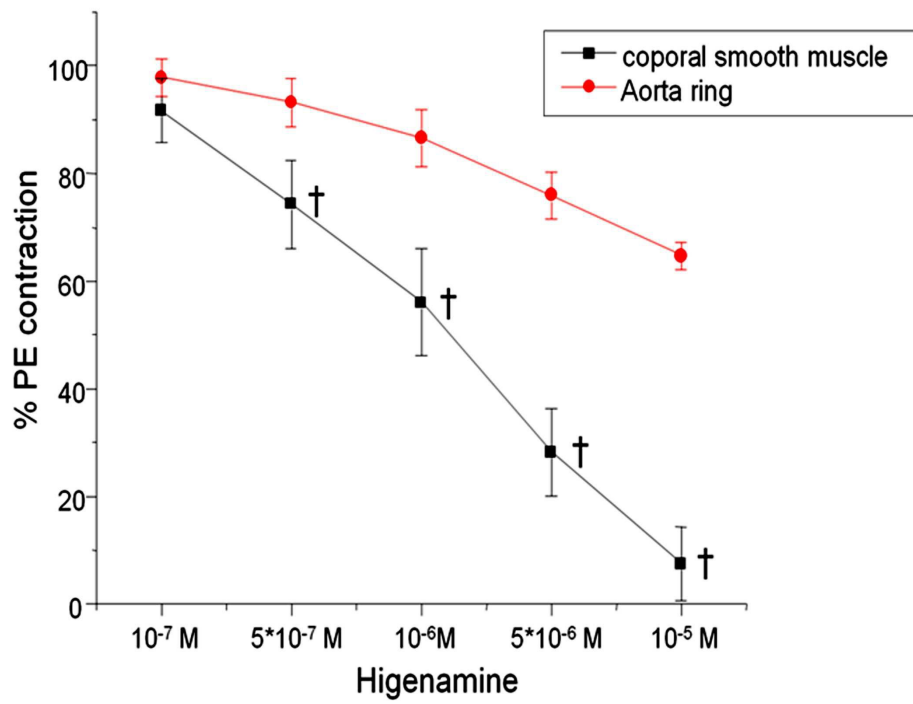
[0083] 흰쥐의 정상 음경해면체와 하이게나민의 농도를 달리하여 방사선 면역요법을 이용하여 cGMP와 cAMP의 농도를 측정하였다. 정상 해면체에서는 628.8 ± 262.1 pmol/g, Higenamine의 농도가 10^{-7} g/ml에서는 1381.1 ± 585.6 pmol/g, 10^{-6} g/ml에서는 1998.6 ± 1132.7 pmol/g, 10^{-5} g/ml에서는 3862.5 ± 2073.5 pmol/g의 cGMP가 측정되었다. 하이게나민 투여시 cGMP의 양은 정상 대조군에 비해 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다($P > 0.05$)(도 4). 그리고 cAMP는 정상 해면체에서는 261.7 ± 56.9 pmol/g, 10^{-7} g/ml에서는 344.8 ± 46.5 pmol/g, 10^{-6} g/ml에서는 439.5 ± 90.1 pmol/g, 10^{-5} g/ml에서는 495.9 ± 63.6 pmol/g의 cAMP가 측정되었다. 하이게나민 10^{-6} g/ml 과 10^{-5} g/ml 투여시 cAMP의 양은 정상 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$)(도 5). 상기 결과로부터, 하이게나민은 음경 해면체 조직의 cAMP의 증가에 의해 이완 작용이 일어나며, cGMP의 증가는 이완에 의한 이차적 작용으로 증가하는 것으로 보인다.

[0084] **실험예 5: 하이게나민이 쥐의 음경해면체 내압에 미치는 영향**

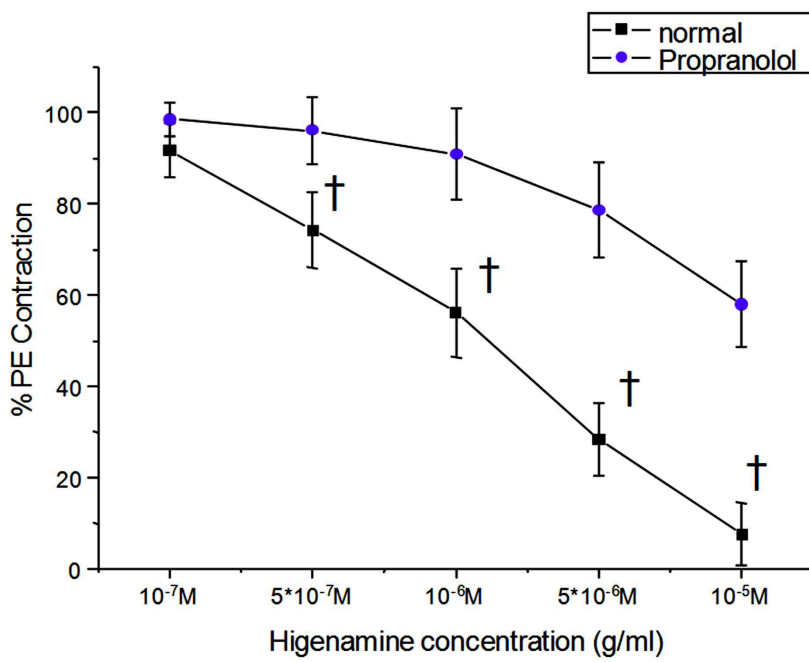
[0085] 정상 대조군과 실험군의 음경해면체 신경자극 전과 후의 혈압은 통계학적 차이가 없었다. 신경자극 시 정상 대조군의 평균 음경해면체 내압은 72.9 ± 11.7 mmHg, 음경해면체 내압을 혈압으로 나눈 백분율은 $59.2 \pm 6.6\%$ 로 측정되었다. 하이게나민 10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군의 평균 음경해면체 내압은 87.8 ± 14.1 mmHg, 음경해면체 내압을 혈압으로 나눈 백분율은 $76.0 \pm 5.1\%$ 로 측정되었다. 하이게나민 0.5×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군의 평균 음경해면체 내압은 87.7 ± 14.4 mmHg, 음경해면체 내압을 혈압으로 나눈 백분율은 $74.5 \pm 8.4\%$ 로 측정되었다. 하이게나민 0.25×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군의 평균 음경해면체 내압은 67.3 ± 13.0 mmHg, 음경해면체 내압을 혈압으로 나눈 백분율은 $59.3 \pm 10.4\%$ 로 측정되었다. 하이게나민 10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군과 하이게나민 0.5×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군의 음경해면체 내압을 혈압으로 나눈 백분율은 정상 대조군과의 비교에서 통계학적으로 유의한 상승이 있었다($P < 0.05$). 하지만 하이게나민 0.25×10^{-5} mg/kg을 정맥주사한 군은 정상대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다($P = 0.19$)(도 5, 내지 도 6). 즉, 하이게나민이 정상 대조군과 비교하여 유의하게 음경 해면체 내압을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

도면

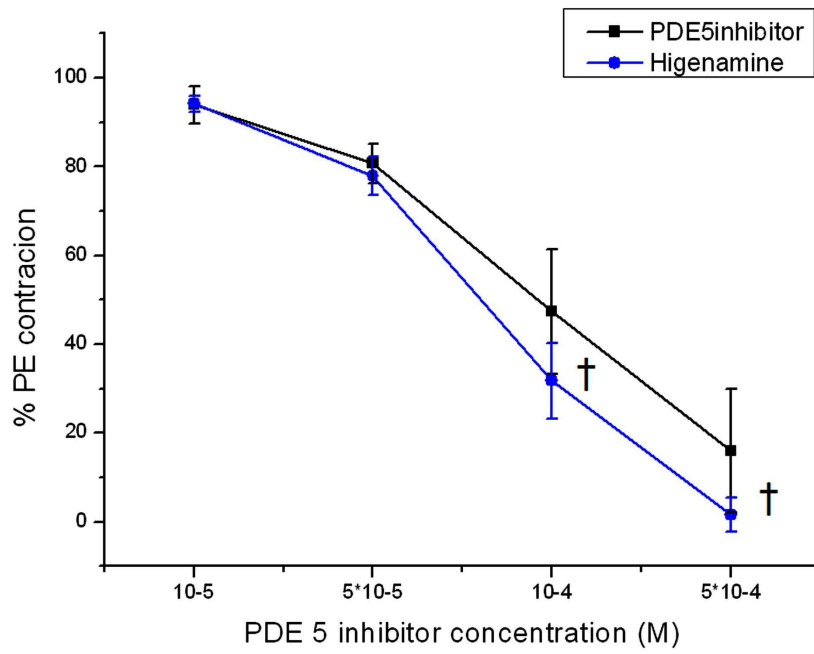
도면1



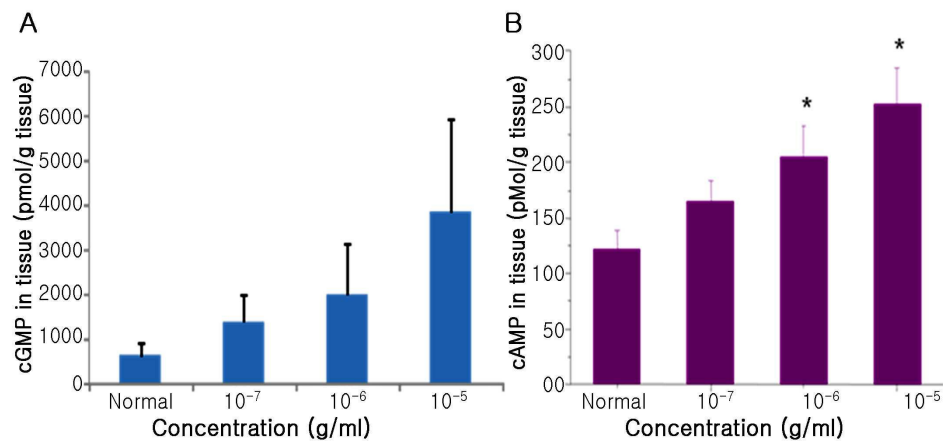
도면2



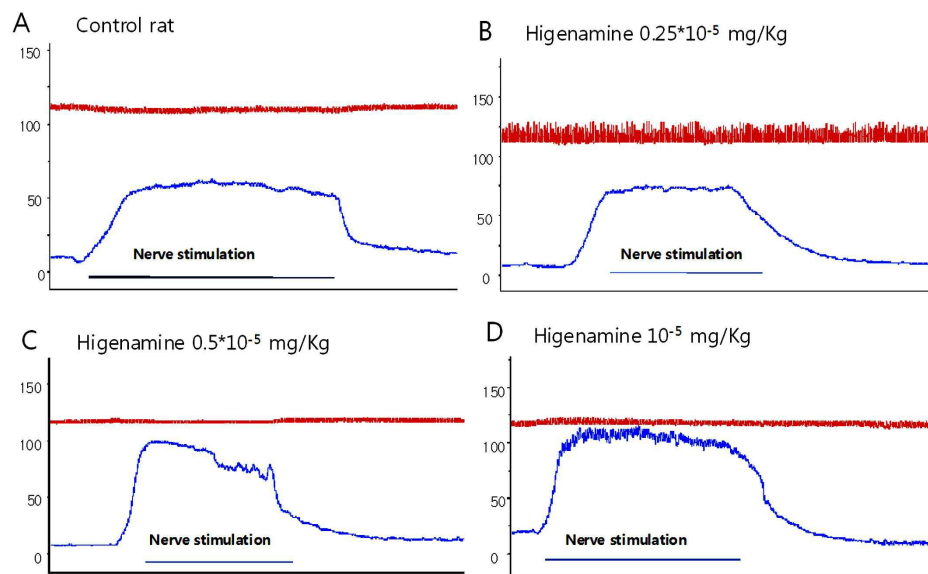
도면3



도면4



도면5



도면6

