

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0040875 (43) 공개일자 2012년04월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 35/12 (2006.01) A61K 35/48 (2006.01) A61P 15/10 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0102365 (22) 출원일자 2010년10월20일 심사청구일자 2010년10월20일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 서준규 서울특별시 강남구 영동대로 230, 우성 아파트 3동 803호 (대치동) 김우진 서울특별시 성북구 길음로 16, 래미안3차아파트 609동 1504호 (길음동) (74) 대리인 양부현

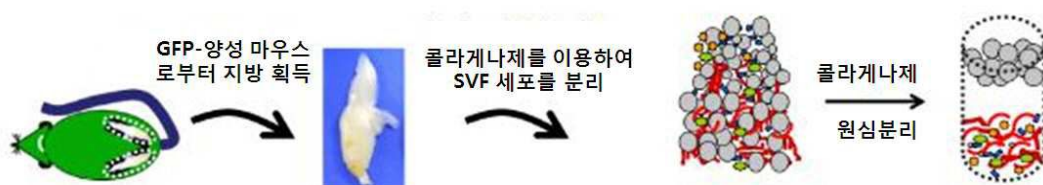
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 지방조직-유래된 기질혈관분획을 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)을 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 조성물 및 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 내피세포재생 활성을 가지고 음경 혈관 내의 혈관내피세포의 성장을 유도함으로써, 발기부전(보다 바람직하게는, 당뇨병성 발기부전)의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 자신의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 이용함으로써 면역부작용을 방지할 수 있고, 세포배양을 통한 방법보다 더 효율적이고 간편하게 분리 및 적용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 비정상화된 혈관구조를 치료함으로써 보다 더 지속적인 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

류지간

인천광역시 연수구 청능대로 175, 우성 1차 아파트
107동 1802호 (연수동)

김해영

인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 A동 2층
241호 인하대의대 임상의학연구소 음경혈관신경재
생연구실 (신흥동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A084511

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 지방줄기세포 및 혈관생성인자를 이용한 음경혈관신생유도 및 이를 이용한 발기부전의 국
소 치료법 개발

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2008.11.01 ~ 2010.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090083072

부처명 교육과학기술부

연구사업명 도약연구지원사업 (구. 국가지정연구실사업)

연구과제명 질환-특이 동물모델에서 국소적 혈관생성-신경재생 제어기술을 이용한 음경기능 재생

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2007.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)을 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 내피세포는 혈관내피세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 음경해면체의 혈관내피세포의 성장을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 발기력 개선효과를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 발기력의 분석은 음경해면체 내압의 분석 또는 혈관내피세포-특이적 마커의 발현 분석을 통해 실시하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 혈관내피세포-특이적 마커는 PECAM-1인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물의 주입은 동물 조직에서 당뇨병에 의해 감소된 PECAM-1의 발현을 정상 수준으로 회복시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 AD-SVF는 정소상체 지방조직(Epididymal adipose tissues)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 AD-SVF는 정소상체 지방조직(Epididymal adipose tissues)에 콜라게나아제를 처리하여 얻은 결과물을 50-80 메쉬 필터로 필터링하고 원심분리하여 얻은 침전물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 AD-SVF는 내피세포재생 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 내피세포는 혈관내피세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 발기부전은 당뇨병성 발기부전인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 10 항에 있어서, 상기 조성물은 동물 조직에서 당뇨병에 의해 감소된 PECAM-1의 발현을 정상 수준으로 회복시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 동물은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 지방조직-유래된 기질혈관분획(AD-SVF)을 유효성분으로 포함하는 내피세포재생용 조성물 및 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근의 보고들을 살펴보면, 지방조직이 다분화가능한 줄기세포의 중요한 근원 중의 하나임이 밝혀지고 있다(B. Cousin et al., BBRC, 301: 1016, 2003; A. Miranville et al., Circulation 110:349, 2004; S. Gronthos et al., J. Cell Physiol., 189:54, 2001; M.J. Seo et al., BBRC, 328:258, 2005). 즉, 지방흡입술에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포들이 존재하고 있고, 이것이 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로도 분화가 가능하다고 보고되었다(P.A. Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001; A.M. Rodriguez et al., BBRC, 315:255, 2004). 또한, 지방조직 유래 세포가 근육재생과 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있다는 것이 동물모델 실험을 통하여 알려진 바 있다. 이러한 지방조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점과 많은 환자에게서 직접 분리를 할 수 있다는 장점으로 인하여 기존의 줄기세포이용에서 발생할 수 있는 면역관련 부작용을 줄일 수 있다는 커다란 장점들이 있어서, 기존의 단점들을 보완하는 새로운 줄기세포의 근원으로 중용하게 고려되고 있다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명자들은 당뇨병성 발기부전을 치료하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 내피세포 재생 활성을 가지는 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)이 동물에 투여되었을 경우, 비정상화된 혈관구조를 개선, 회복 또는 치료하는 효과를 나타내며, 이를 이용하여 당뇨병성 발기부전을 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0005] 본 발명의 목적은 내피세포 재생용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)을 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명자들은 당뇨병성 발기부전을 치료하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 내피세포 재생 활성을 가지는 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)이 동물에 투여되었을 경우, 비정상화된 혈관구조를 개선, 회복 또는 치료하는 효과를 나타내며, 이를 이용하여 당뇨병성 발기부전을 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0010] 본 발명자는 지방조직-유래된 기질혈관분획이 내피세포재생 활성을 통해 음경 혈관의 비정상적 혈관구조를 개선 또는 회복시키는 효과를 가진다는 사실을 최초로 발견하고, 이를 기반으로 당뇨병환 마우스에서 발기부전을 치료하는 효능을 검증하였다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 종래 기술과 비교하여 매우 간편하게 획득되어 적용될 수 있고, 자신의 지방줄기세포를 이용함으로써 면역 부작용에서 자유로우며, 혈관구조를 기본적으로 치료한다는 점에서 그 효능이 매우 장기간 지속된다는 장점을 가진다.
- [0011] 본 명세서의 용어 “지방조직(adipose)”는 백색지방, 황색지방 또는 갈색지방으로 구성된 일차적인 대사성 중요성을 가지는 퍼진 기관(diffuse organ)을 의미한다. 지방조직은 지방세포 및 기질(stroma)을 포함한다. 지방조직은 동물의 몸 전체에 걸쳐서 발견된다. 예를 들어, 포유동물에서 지방조직은 장막(omentum), 골수, 피하 부위 및 대부분 기관(예를 들어, 부고환 같은 음경 조직)의 주위에 존재한다. 본 명세서의 용어 “지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)”은 지방조직-유래된 줄기세포(adipose-derived stem cells)를 포함하고, 바람직하게는 다른 세포들(예를 들어, 지방세포, 적혈구세포 및 다른 기질세포, 등) 및 세포외 매트릭스 물질을 실질적으로 포함하지 않으며, 보다 바람직하게는 다른 세포들 및 세포외 매트릭스 물질을 전혀 포함하지 않는다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 AD-SVF는 포유동물의 지방조직으로부터 수득할 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이의 지방조직으로부터 수득할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 인간, 마우스, 래트 또는 원숭이로부터 수득할 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간 또는 마우스로부터 수득할 수 있다.
- [0013] 보다 상세하게는, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 지방조직, 바람직하게는 정소상체 지방조직(Epididymal adipose tissues)으로부터 수득할 수 있다. 상술한 지방조직은 당업계에 잘 알려진 적합한 방법에 따라 동물로부터 얻을 수 있다. 우선, 소스 동물(바람직하게는 인간 또는 마우스)로부터 지방조직을 얻는데, 이때 지방기질세포(adipose stromal cells)가 살아있다면 동물은 살아있는 상태일 수도 있고 죽은 상태일 수도 있다. 얻어진 지방조직은 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획과 나머지 지방조직으로 구분하기 위해 처리된다. 즉, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 얻어진 지방조직을 PBS(phosphate buffer

saline) 같은 생리학적-친화성(physiologically-compatible) 용액으로 세척함으로써 얻을 수 있다. 세척 과정은 해리과정(dissociation)을 포함한다. 해리과정은 효소분해 및 중화에 의해 실시하거나, 효소처리와 결합되어 실시하거나, 또는 기계적 교반, 음파 에너지(sonic energy) 또는 열 에너지 같은 처리에 의해 실시할 수 있다. 가장 바람직하게는, 해리과정은 효소분해(바람직하게는, 콜라게나제) 및 중화에 의해 실시한다. 이후, 원심분리를 통해 분리된 지방층(lipid layers) 중 가장 아래층이 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 포함한다.

[0014] 보다 더 순수한 지방조직-유래된 기질혈관분획을 얻기 위해, 한번 이상 원심분리를 실시하여 세척 후 펠렛을 재현탁하고, 나머지 지방조직을 제거하기 위해 세포 분리(cell sorting; 예를 들어, 필터링), 크기 분획화, 과립화(granularity), 밀도 방법, 분자적 방법(예를 들어, 텔로미어의 길이는 측정하는 방법), 형태적 방법 또는 조직면역학적 방법(예를 들어, 자성 비드 또는 친화성 크로마토그래피를 이용한 패닝 방법) 같은 다양한 방법을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 크기에 따라 분리하는 세포 분리 방법이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 정소상체 지방조직(Epididymal adipose tissues)에 콜라게나아제를 처리하여 얻은 결과물을 50-150 , 보다 바람직하게는 50-100 , 보다 더 바람직하게는 50-80 , 및 가장 바람직하게는 70 메쉬 필터로 필터링하고 원심분리하여 얻은 침전물을 포함한다. 또한, 지방조직-유래된 기질혈관분획을 분리하기 위한 과정은 당업계에 잘 알려진 적합한 장치(device)를 이용하여 실시될 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내피세포재생 활성을 가진다. 본 발명의 조성물에서 언급하는 내피세포재생 활성에 있어서, 내피세포는 혈관내피세포를 의미한다. 본 명세서의 용어 “혈관내피세포(vascular endothelial cells)” 는 혈관의 내피를 구성하는 세포를 의미하며, PECAM-1, CD31, α -SMA, CD34, VE 카드헤린, eNOS 등의 마커를 발현시키는 세포를 말한다.

[0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 음경해면체의 혈관내피세포의 성장을 유도한다. 보다 상세하게는, 본 발명의 조성물의 유효성분인 지방조직-유래된 기질혈관분획의 동물 조직(바람직하게는, 음경조직)내 주입은 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획에 의해 동물 조직의 혈관에 밀착해 들어간 후, 기존의 혈관을 보다 더 튼튼한 혈관으로 만들고 부족한 혈관내피세포의 성장을 유도하였다(참고: 도 4).

[0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 발기력 개선효과를 가진다. 상술한 방법에 따라 얻어진 1×10^5 세포의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 음경해면체에 투여한 결과, 정상 대조군의 82% 정도까지 발기력을 회복되었고, 투여 후 1일째에 가장 높은 효과를 나타냈다. 하지만, 음경해면체 평활근세포의 양은 변화가 없었다(참고: 도 2 및 도 5).

[0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 발기력의 분석은 음경해면체 내압의 분석 또는 혈관내피세포-특이적 마커의 발현 분석을 통해 실시한다. 음경해면체 내압의 분석에 있어서, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 당뇨병성 질환이 유도된 마우스에 주입하고 전기 자극을 가함으로써, 음경해면체 내압의 변화를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획에 포함된 세포의 수가 발기력 개선과 비례하지 않았으며, 가장 우수한 효과를 나타내는 세포의 수는 1×10^5 세포였다(참고: 도 2). 또한, 혈관내피세포-특이적 마커의 발현 분석을 통한 발기력 개선 효과 분석에 있어서, 당뇨병성 질환이 유도된 마우스가 정상 마우스보다 혈관내피세포의 수가 현저하게 적었고, 이는 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 투여함으로써 감소된 혈관내피세포의 수가 다시 회복되었다. 이는 혈관내피세포-특이적 바이오마커인 PECAM-1의 발현에 대한 면역분석을 통해 확인할 수 있었다(참고: 도 3).

[0019] 본 발명에서 혈관내피세포의 확인은 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, PECAM-1 단백질 양의 변화는 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블롯팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0021] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 타겟에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0023] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0024] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P_{450} 을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 타겟에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 과립형성 인자 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0026] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P_{450}), 방사능물질(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0027] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0028] 또한, 혈관내피세포에 대한 바이오마커로서 PECAM-1 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0029] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 제1쇄 cDNA를 제조한다. 이어, 제1쇄 cDNA를 주형으로 이용하고, PECAM-1 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 PECAM-1 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)을 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 상술한 지방조직-유래된 기질혈관분획을 유효성분으로 이용하기 때문에, 본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 당뇨병성 발기부전의 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예컨대, 정맥 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여)할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 조성물은 내피세포-관련 질환(endothelial cell disorder)을 예방, 개선 또는 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 내피세포-관련 질환은 알츠하이머병, 근위축성측삭경화증, 당뇨병성 신경병증, 뇌졸중, 동맥경화증, 당뇨병, 재협착증, 관상동맥질환, 말초혈관질환, 혈관누출증, 맥관염, 베게너병, 위 또는 구강 궤양, 간경변, 간신증후군, 크론병, 모발 손상, 피부 자반증, 모세혈관 확장증, 상처 치유 지연, 자간전증, 폐혈증, 허혈-재관류 손상, 고혈압, 만성 또는 급성 감염, 월경 과다증, 신생아의 호흡곤란, 폐섬유증, 폐기종, 신병증, 사구체신염 또는 혈관이형성증을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0039] (a) 본 발명은 지방조직-유래된 기질혈관분획을 유효성분으로 포함하는 내피세포재생용 조성물 및 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0040] (b) 본 발명은 자신의 지방조직-유래된 기질혈관분획을 이용함으로써 면역부작용을 방지할 수 있고, 세포배양을 통한 방법보다 더 효율적이고 간편하게 분리 및 적용할 수 있다.
- [0041] (c) 또한, 본 발명의 조성물은 비정상화된 혈관구조를 치료함으로써, 보다 더 지속적인 효과를 나타낼 수 있다.
- [0042] (d) 본 발명의 지방조직-유래된 기질혈관분획은 내피세포재생 활성을 가지고 음경 혈관 내의 혈관내피세포의 성장을 유도함으로써, 발기부전(보다 바람직하게는, 당뇨병성 발기부전)의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 지방조직-유래된 기질혈관분획(AD-SVF) 분리 모식도이다. 쥐의 지방을 획득한 후 콜라게나제를 처리하게 되면 결합하고 있던 세포들을 단일세포들로 떨어지게 되며, 콜라게나제를 처리한 조직을 원심분리하게 되면 아래층에는 AD-SVF와 여러 가지 세포들이 함께 가라앉게 되고, 위층에는 지방이 뜨게 된다. 아래층의 AD-SVF층을 확보하여 음경에 주입하게 된다.
- 도 2는 AD-SVF를 발기부전 동물에 주입하게 되면, 전반적으로 AD-SVF를 처리한 군에서는 정상치의 발기력 또는 정상보다 조금 낮은 수치의 발기력으로 회복하는 것을 보여준다.
- 도 3은 AD-SVF 처리에 의한 발기력 증가는 혈관내피세포의 조직적 회복과 관련이 있는 것을 보여주는 것으로, 혈관내피세포의 특이적 단백질인 PECAM-1을 염색하게 되면 AD-SVF를 처리한 군에서 현저히 증가되었다.
- 도 4는 주입한 AD-SVF는 혈관내피세포에 직접적으로 끼어들어 좀 더 튼튼한 혈관을 만드는 과정에 관여하는 것을 보여준다.
- 도 5는 주입한 AD-SVF 세포들은 주입 후 7일까지는 활발하게 활동을 하고 있음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] 실시예

[0046] 실시예 1: 지방조직-유래된 기질혈관분획(AD-SVF)의 분리 및 당뇨질환 마우스 제조

- [0047] 마우스로부터 정소상체 지방조직(Epididymal adipose tissues)을 획득하여, 0.2% 제II형 콜라게나제(collagenase type 2; Sigma-Aldrich, MO, USA)가 첨가된 HBSS(Hanks' Balanced Salts Solution) 완충액에 조직을 넣고 1시간 동안 교반기에서 흔들어주었다. 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS; Sigma-Aldrich, MO, USA)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich, MO, USA) 배지를 첨가하여 콜라게나제의 활성을 억제시켰다. 세포를 파이프팅해 준 후, 70 나이론 메쉬 필터(nylon mesh filter; BD Bioscience)로 덩어리진 부분들은 걸러주었다. 획득한 세포를 1,800 rpm, 4분, 4℃ 조건에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액에 떠 있는 지방세포와 다른 이물질들은 제거하고, 아래로 가라 앉은 지방유래 줄기세포층을 확보하였다. 확보한 지방조직-유래된 기질혈관분획(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)을 PBS 완충액(Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 세척하였다.

- [0048] 당뇨질환 마우스는 생후 8주된 수컷 생쥐(C57BL/6J; Orient Bio, 경기도, 한국)에 50 mg/kg 스트렙토조토신(streptozotocin; Sigma-Aldrich, MO, USA)을 5일 연속 복강 내 투여하는 방법으로 당뇨를 유도하여 제조하였다.

[0049] 실시예 2: 지방조직-유래된 기질혈관분획의 발기부전 치료 효과

- [0050] 실시예 1의 방법에 따라, 유전적으로 녹색형광 단백질(green fluorescent protein)을 띤 마우스(Jackson Laboratory)의 부고환 지방조직에서 AD-SVF를 분리하여 당뇨질환 마우스 제조하고, 8주 후 총 6개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다(N = 6; 1군, 대조군; 2군, 당뇨군 + 비처리군; 3군, 당뇨군 + PBS 투여군; 4군, 당뇨군 + AD-SVF 투여군[1×10^4 세포/20 μ l]; 5군, 당뇨군 + AD-SVF 투여군[1×10^5 세포/20 μ l]; 6군, AD-SVF 투여군[3×10^5 세포/20 μ l]). PBS 및 AD-SVF를 음경해면체 내에 투여 후 2주째에 음경해면체신경자극 후 발기력을 측정하였다. 음경해면체 조직에서 PECAM-1, 평활근 α -액틴(smooth muscle α -actin, α -SMA)에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 내피세포 및 평활근 세포의 양을 정량화 하였다. 또한, AD-SVF(1×10^5 세포/20 μ l) 주사 후 1, 3, 7일 및 2주째에 주사한 AD-SVF 세포의 생존율과 음경해면체 내피세포 양의 변화를 측정하였다.

- [0051] 그 결과, AD-SVF 투여군 중에서 1×10^5 농도에서 가장 높은 발기력 개선효과를 보였고, 정상 대조군의 82% 정

도까지 발기력이 회복되었다. 주사한 AD-SVF 세포는 투여 후 1일 제 가장 높은 발현을 보였다가 이후에는 점차 감소되었고, 투여 후 7일째까지 관찰되었다. 또한, 당뇨군에서 AD-SVF 투여 후 음경해면체 내피세포 양은 1일째부터 증가하였고, 3일과 7일째에 가장 높았다. AD-SVF 투여 후 2주째는 내피세포 양이 감소하는 소견을 보였으나, 내피세포 양이 여전히 정상 대조군과 비슷한 정도로 유지되었다. 음경해면체 평활근세포의 양은 AD-SVF 투여 후 유의하게 변화하지 않았다. 보다 상세하게는, 하기와 같다.

[0052] **2-1: 전기 자극에 따른 발기력 분석**

[0053] 발기력측정에 관한 실험방법은, 준비된 마우스의 하복부에서 좌측표피부분을 개복하고, 전립선 측면에 위치한 해면체 신경을 가시적으로 보이도록 준비한다. 전기자극장치를 이용하여 해면체신경을 감싸고, 1볼트와 5볼트 12 Hz(헤르츠)에서 1분 동안 전기자극을 가한다. 전기자극을 주게 되면, 음경은 발기를 하게 되고, 음경해면체 내압은 음경해면체내에 압력측정장치를 통하여 모니터링 가능하게 된다. 즉, 모니터링 된 수치가 발기력을 반영하게 된다.

[0054] 실시예 1의 방법(도 1)으로 분리한 지방세포 유래 줄기세포를 당뇨병성 질환을 가진 쥐에 주입하였다. 이후, 1 전압(voltage)과 5 전압의 전기 자극에 따른 발기력을 측정하였다. 그 결과, 당뇨질환으로 인하여 유발된 발기부전이 지방세포 유래 줄기세포를 주입하게 되면 다시 발기력이 다시 높아짐을 확인할 수 있었다(도 2). 하지만 발기력의 회복은 주입해준 줄기세포의 수와는 상응하게 증가되지 않았다. 1×10^5 의 세포를 넣어준 군에서 3×10^5 의 세포를 넣어준 군들 보다 발기력은 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 즉, 더 많은 세포를 넣어준다고 해서 더 좋은 발기력 효과를 나타낸 것은 아니었다.

[0055] **2-2: 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1 발현 분석**

[0056] PECAM-1 발현 분석은, 준비된 슬라이드 상의 조직을 3.7% 파라포름알데하이드(Sigma-Aldrich, MO, USA)에서 약 5분 동안 고정시켰다. 고정된 혈관내피세포들을 세척 완충액(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 일차항체(항-PECAM-1; Santa Cruz)를 1:100 비율로 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직을 반응에 이루어지지 않고 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 세 번에 걸쳐서 세척한 다음, PECAM-1에 특이적으로 반응한 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체[FITC(또는 TRITC)-표지된-항-래빗(또는 마우스) 항체; Santa Cruz]를 1:100 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 형광현미경(Carl Zeiss, Germany)이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 발현 정도를 분석하였다.

[0057] 발기력은 혈류와 밀접한 관계가 있기 때문에, 정상적인 발기력을 위해서는 혈관의 정상적인 활동이 필수적이다. 혈관의 비정상적인 구조나 활동력은 발기력을 감소시킬 수 있는 원인이 된다. 따라서, 당뇨질환과 음경내 혈관과의 관계를 확인하고자 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현을 확인해 보았다. 그 결과, 혈관내피세포의 수가 당뇨질환을 가진 마우스에서 정상 마우스보다 현저히 떨어져 있음을 알 수 있었고, 이렇게 감소된 혈관내피의 수는 지방세포 유래 줄기세포의 주입으로 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 3). 즉, 당뇨질환으로 인한 발기부전은 혈관의 비정상적 구조와 밀접한 관계가 있음을 보여준다.

[0058] **2-3: 혈관내피세포의 성장을 유도 분석**

[0059] PECAM-1 발현 분석은, 준비된 슬라이드 상의 조직을 3.7% 파라포름알데하이드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 혈관내피세포들을 세척 완충액(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 일차항체(항-PECAM-1)를 1:100 비율로 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직을 반응에 이루어지지 않고 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 세 번에 걸쳐서 세척한 다음, PECAM-1에 특이적으로 반응한 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체[FITC(또는 TRITC)-표지된-항-래빗(또는 마우스) 항체]를 1:100 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였다. 또한, GFP(녹색 형광물질)라는 형광물질이 유전적으로 발현이 되도록 제작된 쥐에서 지방조직유래 줄기세포를 분리해서 다른 쥐에 주입을 하였기에, GFP 형광물질은 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는

현미경만으로 확인이 가능하였다. 즉, GFP를 발현하는 세포는 연구자들이 주입해 준 세포이며, GFP를 발현하지 않는 세포는 기존에 존재하는 세포로, 주입해준 세포와 기존의 존재하던 세포를 확인가능하다.

[0060] 지방조직-유래된 기질혈관분화에 의한 발기력 회복 과정을 확인한 결과, 주입된 줄기세포들이 기존 음경 혈관에 밀착해 들어가는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 줄기세포들은 좀 더 튼튼한 혈관을 만들고 부족한 혈관내피세포의 성장을 유도함으로써, 발기력을 회복시키는 것으로 확인되었다(도 4).

[0061] 2-4: 조직염색법을 이용한 주입된 줄기세포의 활성 분석

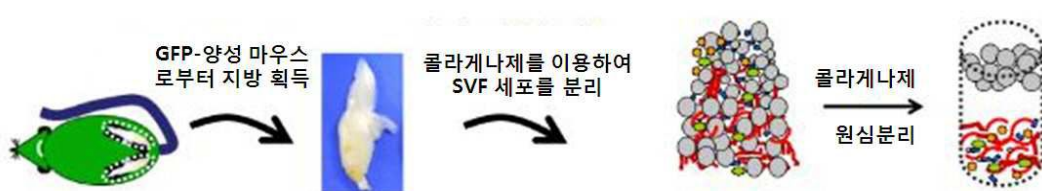
[0062] PECAM-1 발현 분석은, 준비된 슬라이드 상의 조직을 3.7% 파라포름알데하이드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 혈관내피세포들을 세척 완충액(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 일차항체(항-PECAM-1)를 1:100 비율로 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그후 조직을 반응에 이루어지지 않고 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 완충액으로 세 번에 걸쳐서 세척한 다음, PECAM-1에 특이적으로 반응한 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체[FITC(또는 TRITC)-표지된-항-래빗(또는 마우스) 항체]를 1:100 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 완충액으로 다시 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였다. 또한, GFP(녹색 형광물질)라는 형광물질이 유전적으로 발현이 되도록 제작된 쥐에서 지방조직유래 줄기세포를 분리해서 다른 쥐에 주입을 하였기에, GFP 형광물질은 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 현미경만으로 확인이 가능하였다. 즉, GFP를 발현하는 세포는 연구자들이 주입해 준 세포이며, GFP를 발현하지 않는 세포는 기존에 존재하는 세포로, 주입해준 세포와 기존의 존재하던 세포를 확인가능하다. 주입해준 세포가 얼마나 오랫동안 활동을 하는지 확인하기 위해서 지방조직유래 줄기세포를 주입후 날짜별로 확인을 해 보았다.

[0063] 주입된 줄기세포들이 생체 내에서 얼마간 활성을 나타내는지를 조직염색법으로 분석하였다. 동물에 주입된 줄기세포의 작용은 일주일까지는 선명하게 확인이 되었고, 2주일에 확인한 동물들에서는 거의 확인이 되지 않았다(도 5).

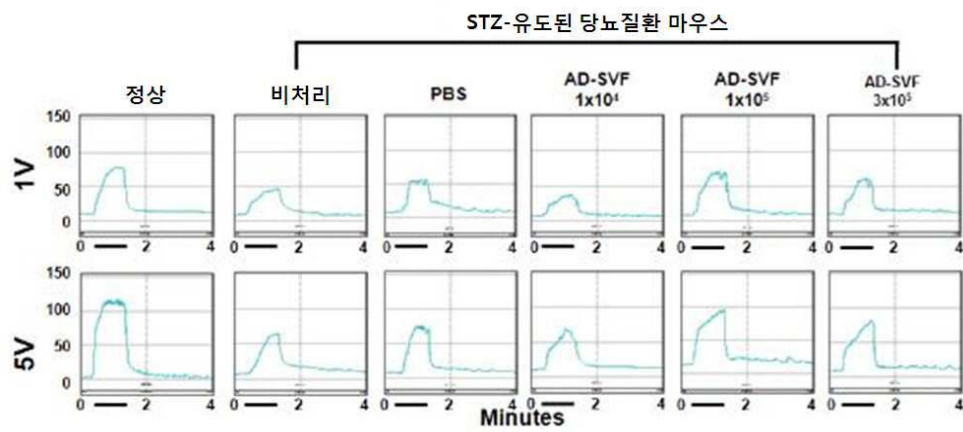
[0064] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

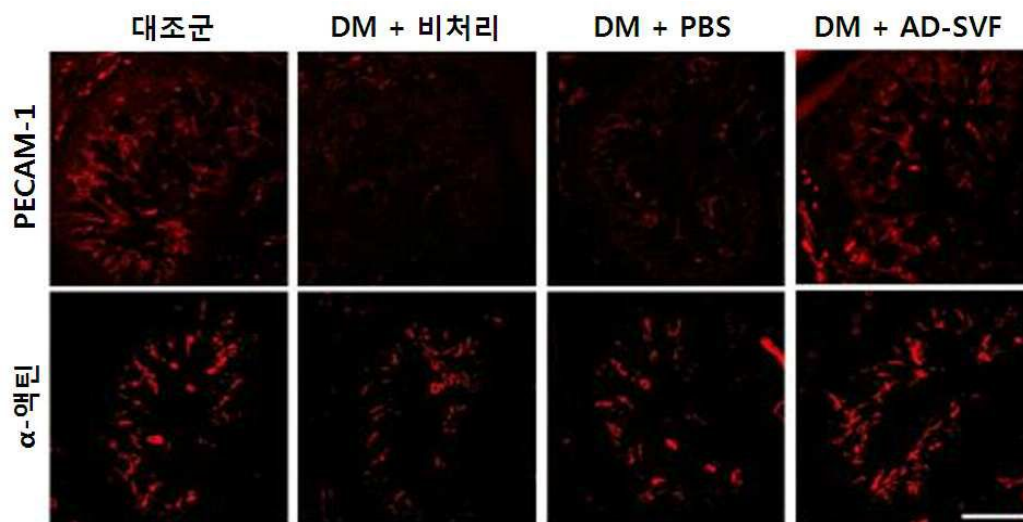
도면1



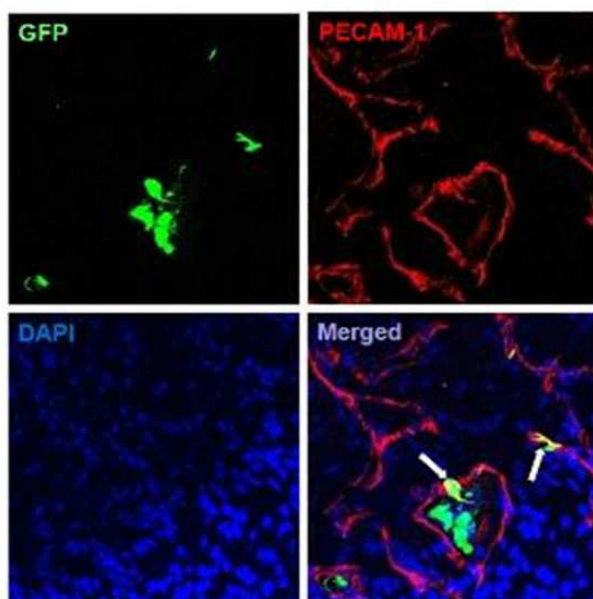
도면2



도면3



도면4



도면5

