

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0105771 (43) 공개일자 2017년09월20일
	(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 38/17 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) (52) CPC특허분류 A61K 38/1709 (2013.01) A23L 33/13 (2016.08) (21) 출원번호 10-2016-0028835 (22) 출원일자 2016년03월10일 심사청구일자 2016년03월10일	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 서준규 서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 803호 (대치동, 우성아파트) 류지간 인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 엑스포아파트 902동 701호 (74) 대리인 특허법인태백

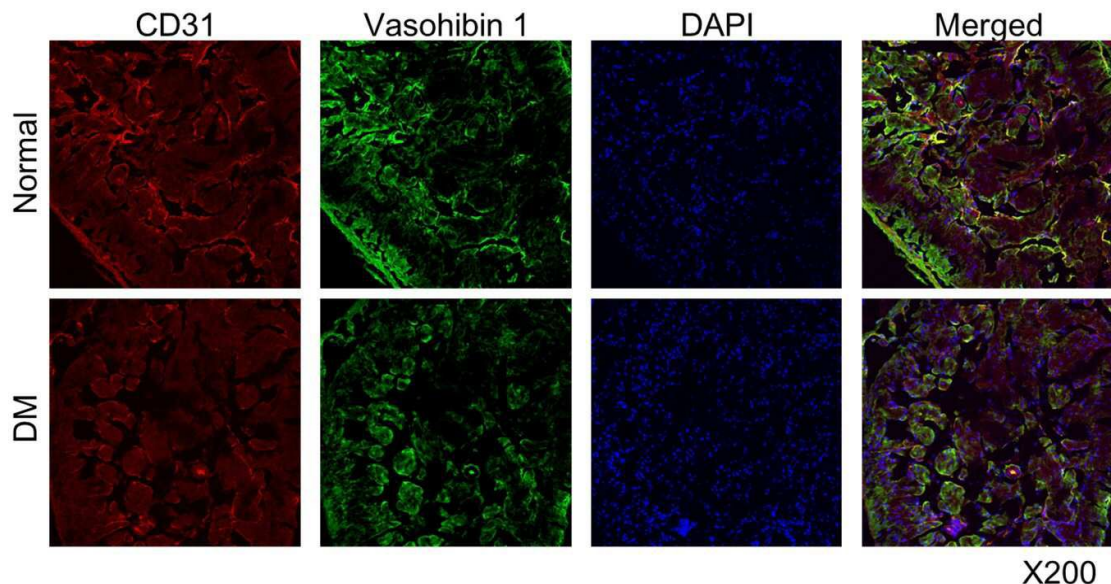
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 바소히빈-1을 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 바소히빈-1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 내피세포 및 혈관주위세포 특이적 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생과 내피세포 이음새를 강화함으로써, 음경 발기력을 개선시켰다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)

A61K 48/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

김우진

경상남도 양산시 양주로 98, 현대청어람 아파트
102동 1404호 (남부동)

송강문

경기도 부천시 원미구 안곡로 284, 102동 304호 (역곡동, 한국아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110076(HI11C0069)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업/병원특성화센터사업

연구과제명 인하대병원 성의학특성화센터

기 여 율 1/2

주관기관 인하대병원

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0025506

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 발기부전과 심혈관질환의 연관성 연구 및 동시치료제 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 바소히빈-1은 음경해면체 내피세포의 재생을 유도하는 것을 특징으로 하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 바소히빈-1은 음경해면체 조직에서 PECAM-1(Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 발기부전은 당뇨병성 발기부전인 것을 특징으로 하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발기부전 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병환은 여러 생체기관의 기능저하를 일으키며 혈관내피세포부전, 동맥경화증, 자율신경장애, 염증반응, 섬유화, 그리고 생식선 기능저하증 등의 여러 합병증을 유발한다. 당뇨병환을 가지고 있는 남성 환자의 50%-100%에서 발기부전을 일으키며, 당뇨병으로 인한 합병증, 혈관성 및 신경인성 병변이 주된 요인으로 알려져 있다.

[0003] PDE5(Phosphodiesterase-5) 저해제는 현재 가장 많이 사용되는 경구용 발기부전 약물로서 발기부전 환자에서 널리 이용되고 치료제이나, 당뇨병으로 인한 발기부전 환자에게서는 치료 반응 및 만족도가 낮은 실정이다.

[0004] 그 이유는 당뇨병으로 인한 심한 내피세포부전과 말초신경손상을 들 수 있다. PDE5 저해제가 효능을 나타내기 위해서는 일정량의 내인성 NO(nitric oxide)의 생성이 필수적인데 당뇨 환자에서는 심한 혈관내피세포부전으로 인한 내인성 NO가 부족하므로 PDE5 저해제를 복용하더라도 발기에 충분한 양의 cGMP(cyclic gua-nosine

monophosphate)를 생성할 수 없기 때문이다.

[0005] 또한 PDE5 저해제는 일시적인 혈관확장제로서 당뇨병으로 인해 손상된 혈관내피세포를 근본적으로 치료할 수 없다는 한계가 있고, 성관계 전마다 약을 복용해야 하는 번거로움이 따른다. 그러므로 난치성 발기부전, 즉, 당뇨, 신경손상(질환), 등으로 인한 발기부전에서는 보다 근본적이고 개선된 치료법의 개발이 절실하다. 이러한 관점에서 손상된 음경 혈관내피세포를 구조적, 기능적으로 개선하는 신 치료법의 개발은 기존 경구용 약물의 한계를 극복하는 데 있어서 아주 중요한 역할을 할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-1481778호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명은 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 발기부전 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0012] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 바소히빈-1 단백질 또는 바소히빈-1을 코딩하는 유전자는 내피세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 내피세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시키는, 우수한 발기부전 개선 효과를 보이므로, 이를 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 발기부전 마우스 모델 음경의 발기조직에서 바소히빈-1의 발현이 감소되는 것을 나타낸 결과이다.

도 2는 발기부전 환자 음경의 발기조직에서 바소히빈-1의 발현이 감소되는 것을 나타낸 결과이다.

도 3은 바소히빈-1에 의한 마우스 음경 혈관내피세포의 튜브형성이 유도된 것을 나타낸 결과이다.

도 4는 마우스 음경 혈관내피세포에서 바소히빈-1에 의한 혈관표피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 유전자 및 단백질의 발현이 증가됨을 나타낸 결과이다.

도 5는 마우스 음경 혈관내피세포에서 바소히빈-1에 의한 안기오포이에틴-1(angiopoietin-1, Ang-1) 유전자 및 단백질의 발현이 증가됨을 나타낸 결과이다.

도 6은 마우스 음경 혈관내피세포에서 바소히빈-1에 의한 혈관 내피세포 이음새 단백질의 발현이 증가됨을 나타

낸 결과이다.

도 7은 발기부전 마우스에서 음경 내 바소히빈-1 펩타이드 국소 주사 후 음경 발기력의 회복됨을 나타낸 결과이다.

도 8은 정상마우스와 바소히빈-1 녹아웃(knock out) 마우스의 발기력 정도를 비교한 결과이다.

도 9는 발기부전 마우스 모델에서 음경 내 바소히빈-1 국소 주사 후 음경 내 PECAM-1(Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) 및 NG2의 발현이 증가됨을 나타낸 결과이다.

도 10은 정상마우스와 바소히빈-1 녹아웃 마우스의 음경 내 PECAM-1 및 NG2의 발현을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 발명자들은 새로운 발기부전 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, 당뇨 마우스 및 당뇨 환자의 음경 발기조직에서 바소히빈-1(Vasohibin-1)의 발현이 감소하였고, 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)으로 유도된 1형 당뇨 발기부전 동물모델에서 바소히빈-1 펩타이드가 음경 혈관신생유도, 신경재생 및 발기력 회복에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 음경 발기조직에서 일차 분리한 혈관내피세포(mouse cavernous endothelial cells, MCECs)에서 바소히빈-1이 튜브형성 및 세포이동을 유도함으로써 우수한 발기부전 개선 효과를 보임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 따라서 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 바소히빈-1은 음경해면체 내피세포의 재생을 유도하며, 음경해면체 조직에서 PECAM-1(Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)의 발현을 증가시켜 우수한 발기부전 개선 효과를 보인다.
- [0018] 상기 발기부전은 당뇨병성 발기부전이다.
- [0019] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 약학 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.
- [0022] 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 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0023] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 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.
- [0024] 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 약학 조성물의 유효성분인 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로

이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0027] 상기 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, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0029] 또한, 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 본 발명에 따른 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0030] 상기 건강기능식품에 함유된 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유효용량은 상기 약학 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0031] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0032] 일례로, 상기 음료수는 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.
- [0033] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 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 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 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.
- [0034] 또한, 본 발명은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 다른 의약품 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.
- [0036] 상기 의약품 조성물은 통상적으로 발기부전 예방 또는 개선용이라면 특별히 제한하지 않는다. 예를 들면, 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 연고제 또는 코팅제의 제조에 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물, 건강기능식품 또는 의약품 조성물은 바소히빈-1(Vasohibin-1) 단백질, 바소히빈-1을 코딩하는 유전자 및 이의 발현촉진제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상과 함께 발기부전의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0042] <실시예 1> 당뇨 마우스 및 당뇨 환자의 음경해면체 조직에서 바소히빈-1 단백질 및 유전자의 발현 분석

[0043] 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6J)를 대상으로 STZ를 마우스의 복강 내 (50 mg/kg)씩 5일간 주사하여 당뇨를 유도하였다. 당뇨 유도 후 8주째 마우스의 음경조직을 채취하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정하여 동결 절편 후 면역형광염색을 진행하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0044] 또한 정상 발기력을 가진 사람과 당뇨성 발기부전 환자의 음경 발기조직을 동결 절편한 후, 바소히빈-1 및 혈관 내피세포마커인 이소렉틴-IB4(Isolectin-IB4)에 대해 면역형광염색을 진행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0045] 보다 구체적으로는 음경조직을 채취하여 4% 파라포름알데히드가 담긴 튜브에 보관하여 4℃에서 하룻밤 고정하였다. 이후 음경조직을 PBS로 3회 세척하고 동결 절편기를 이용하여 7μm의 두께로 절편하였다. 절편한 음경 조직을 PBS에 5분간 3회 세척 후 BSA가 포함된 항체 희석 시약(antibody dilution reagent, Invitrogen, Eugene, OR, USA)을 이용하여 1시간 동안 블럭킹(blocking)하고, 1차 항체와 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 PBST(0.05% 트윈 20이 포함된 인산완충식염수, phosphate buffer saline with 0.05% tween 20)에 5분간 3회 세척하고 형광 2차 항체를 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBST에 5분간 3회 세척하고 수용성 마운트 용액(soluble mount solution)으로 고정하였다. 이후 공초점 형광현미경을 이용하여 분석하였다.

[0046] 도 1에 나타난 바와 같이, 정상마우스에 비해 당뇨 마우스의 음경 발기조직에서 바소히빈-1 발현이 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

[0047] 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 발기력을 갖고 있는 환자에 비해 당뇨 환자의 음경 발기조직에서 바소히빈-1 및 이소렉틴-IB4 발현이 현저히 감소되어 있는 것을 확인하였다.

[0049] <실시예 2> 바소히빈-1 펩타이드의 생체 외 혈관 형성 효과 분석

[0050] 바소히빈-1 펩타이드가 관형성능(tube formation)에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 인간 제대정맥혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVECs)와 마우스 음경해면체 내피세포(Mouse Cavernous Endothelial Cells, MCECs)를 사용하여 실험을 수행하였다. 96-웰 세포배양 접시에 각 웰마다 매트릭젤(matrigel)을 50μL씩 첨가하여 37℃ 배양기에서 젤 형태로 고체화시켰다. M199 배지(medium) 200 μL 가 들어 있는 각 웰에 MCECs를 2×10^4 cells의 농도로 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 현미경을 통해 관찰하였다.

[0051] 그 결과 도 3과 같이, 바소히빈-1 펩타이드(200 ng/mL)를 처리한 군은 아무것도 처리하지 않은 대조군보다 더 많은 튜브를 형성하였다. 이는 바소히빈-1 펩타이드가 혈관내피세포 또는 해면체 내피세포의 분화에 영향을 주어 해면체 및 혈관 형성을 유도한다는 것을 의미한다.

[0053] <실시예 3> 음경해면체 조직에서 바소히빈-1 펩타이드에 의한 VEGF 발현, 이음새 단백질의 발현 분석

[0054] 정상 마우스 음경에서 분리한 혈관내피세포(MCECs)에 바소히빈-1 펩타이드 (200ng/mL)를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에서 mRNA 및 단백질을 추출한 후 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)과 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 수행하여 바소히빈-1 펩타이드가 MCECs에서 혈관생성인자 및 이음새 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0056] 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

[0057] 총 RNA를 추출하기 위해서 트리자올 시약(Trizol reagent, Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 사용하였다. 총 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하기 위해 RT PreMix(BioNEER, Daejeon, South Korea)를 이용하였고, 하기 표 1과

같은 프라이머를 사용하였고, PCR 생성물은 1% 아가로스 겔(agarose gel)을 사용해 전기영동하였다.

표 1

[0058]

타겟	시퀀스	방향	서열번호
바소히빈-1	ATG CAG CGG CTC GGG GGT AT	정방향	1
	CTA AAT CTC CTC CTC TCC GC	역방향	2
VEGF	CAG GCT GCT GTA ACG ATG AA	정방향	3
	AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA	역방향	4
Ang-1	AAA CAG CAA ATG GGA ACA GG	정방향	5
	GGG CAG GTG AAC TCC ACT AA	역방향	6
클라우딘-5 (Claudin-5)	GGT CAC TGG GAA CTT CCT GA	정방향	7
	ATG CCA CTC ACT GCC TCT CT	역방향	8
어클루딘(occludin)	TCA GGC AGC CTC GTT ACA G	정방향	9
	CCT CCT CCA GCT CAT CAC A	역방향	10
ZO-1	ATA GCA CGG ACA GTA GAC ACA CTT C	정방향	11
	GTG AGT AAG GAG GGT ATG TCT GGT T	역방향	12

[0060]

웨스턴 블롯팅(Western blotting)

[0061]

단백질은 SDS-PAGE에 의하여 크기에 따라 분리하였고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membranes, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)에 고정하였다. 5% 탈지분유와 0.05% 트윈 20을 포함한 PBS를 이용하여 멤브레인을 블럭킹하였으며, 1차 항체(VEGF, Santa Cruz; angiopoietin1, NOVUS BIOLOGICAL; ZO-1, Abcam; occludin, SantaCruz Biotechnology; β -actin, Abcam)를 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 10분간 3회 세척 후 2차 항체를 2시간 동안 반응하여 ECL(enhanced chemiluminescence) 프로토콜을 따라 X-ray 필름에 노출하였다.

[0063]

그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군과 바소히빈-1 펩타이드를 처리한 실험군의 VEGF 발현을 비교한 결과, 바소히빈-1 펩타이드를 처리한 군에서 VEGF, Ang-1의 발현이 증가하였다.

[0064]

또한, 이음새 단백질의 발현을 확인한 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 바소히빈-1 펩타이드를 처리한 실험군은 고농도 글루코오스 조건에 비해 ZO-1, 어클루딘, 클라우딘-5의 유전자가 증가하였다. 더불어 바소히빈-1 펩타이드를 처리한 실험군의 경우, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 ZO-1, 어클루딘 단백질 발현이 현저하게 증가하였다.

[0066]

<실시예 4> 발기부전 동물모델에서 바소히빈-1 펩타이드 및 유전자의 발기부전 치료 효과 확인

[0067]

4-1. 발기부전 동물모델 준비

[0068]

생후 8주 된 수컷 마우스(C57BL/6J)를 대상으로 STZ(50 mg/kg)을 5일 연속 복강 내 투여하여 1형 당뇨 마우스 모델을 제작하였다. STZ 투여 마지막 날로부터 8주 후 100 mg/kg의 케타민(ketamine)과 5 mg/kg의 자일라진(xylazine)으로 마취 및 진정을 시킨 후, 바소히빈-1 펩타이드(Abnova, USA)의 발기력 개선 효과를 측정하였다.

[0069]

또한, 생후 8주 된 수컷 정상 마우스(C57BL/6J)와 바소히빈-1 녹아웃 마우스(C57BL/6J background)를 대상으로 발기력 정도를 비교 측정하였다.

[0071]

4-2. 전기 자극에 따른 발기력 측정

[0072]

상기 실시예 4-1과 같이 준비한 발기부전 동물모델을 4개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다(N = 4 / 군; 1군, 정상 마우스; 2군, STZ로 유도한 당뇨 마우스 + PBS 2회 투여군 [days -3 and 0; 20 μ L]; 3군, STZ로 유도한 당뇨 마우스 + 바소히빈-1 펩타이드 2회 투여군 [days -3 and 0; 1 μ g/20 μ L], 4군, STZ로 유도한 당뇨 마우스

스 + 바소히빈-1 펩타이드 2회 투여군 [days -3 and 0; 4 μ g/20 μ L]).

- [0073] 마우스의 음경해면체에 바소히빈-1 펩타이드를 3일 간격으로 2회 주사하고 2주 후에 음경해면체의 신경을 자극하고 발기력을 측정하였다. 보다 구체적으로, 발기력 측정을 위하여, 각 마우스의 하복부에서 좌측 표피부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 음경신경의 전기자극을 위해서 백금전극을 음경신경에 위치시킨 후, 5 볼트, 12 헤르츠의 강도로 약 1분 동안 전기자극을 가하였다.
- [0074] 전기자극을 가하게 되면, 음경은 발기를 하게 되는데 이때 발기 시 음경내부의 압력(음경해면체 내압)을 음경해면체에 삽입된 카테터를 통해 컴퓨터와 연결되어 있는 압력 전달기(바이오팩 시스템, 미국)를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0075] 도 7A에서의 세로축의 ICP(Intracavernous Pressure: 음경해면체내 압력)는 발기 시 음경내부의 압력(음경해면체 내압)을 의미하며, 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이다. 가로축은 전기자극 후의 시간을 나타내며, 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다.
- [0076] 또한, 도 7B는 음경발기력의 척도로서 최고 음경해면체 내압 (Maximal ICP)을 나타낸 것이고, 도7C는 음경해면체 내압 곡선의 면적 (Total ICP[area under the curve])을 나타낸 값이다.
- [0077] 도 7에 나타낸 바와 같이, 바소히빈-1 펩타이드(4 μ g / 20 μ L)를 투여한 군은 PBS 투여군에 비해 높은 발기력 개선효과를 보였으며, 정상 대조군(Control)의 약 80% 정도까지 발기력이 회복됨을 확인하였다. 특히, 음경발기와 관련한 두 가지 변수, 즉 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 바소히빈-1 펩타이드 투여 후 현저한 상승 효과가 나타남을 확인하였다.
- [0079] 더불어 정상마우스와 바소히빈-1 넉아웃 마우스의 발기력을 비교 측정하였다. 상기 실시예 4-1과 같이 준비한 발기부전 동물모델을 2개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다 (N = 4 / 군; 1군, 정상 마우스; 2군, 바소히빈-1 넉아웃 마우스). 생후 8주째 음경해면체신경 전기자극을 통해 발기력을 측정하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0080] 도 8A에서의 세로축의 음경해면체내 압력(Intracavernous Pressure, ICP)은 발기 시 음경내부의 압력을 의미하며, 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이다. 가로축은 전기자극 후의 시간을 나타내며, 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다.
- [0081] 측정 결과 바소히빈-1 넉아웃 마우스의 발기력은 정상 마우스의 발기력의 약 60% 정도의 발기력 감소를 나타내었다. 이를 통해 바소히빈-1 유전자 발현이 발기력에 많은 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0083] 4-3. 음경해면체 조직에서 혈관내피세포 특이적 단백질의 발현 분석

- [0084] 음경은 음경발기의 기능을 담당하는 해면체 조직과 이에 영양을 공급하는 소혈관들로 이루어져 있다. 그러나 당뇨, 고지질증, 신경손상 등에 의한 병적조건하에서는 이러한 혈관을 포함한 해면체 조직에 병변이 생기고 상기 조직의 구조가 비정상적으로 되어 발기부전을 초래한다.
- [0085] 상기 실시예 1의 당뇨병 발기부전 동물모델의 음경해면체 조직에서 혈관내피세포에 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1) 및 혈관주위세포(NG2)의 발현 정도를 분석하기 위하여, 면역조직화학염색 후 공초점 현미경을 이용하여 혈관내피세포의 양적 변화를 조사하였다.
- [0086] 보다 구체적으로, 각 마우스로부터 음경 해면체 조직을 분리한 후, 이를 4% 파라포름알데히드에서 4℃, 24시간 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, PECAM-1, NG2의 발현 분석을 위해 4% 파라포름알데히드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 음경조직 절편을 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% 아지드화나트륨(Sodium Azide)을 포함하는 PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA(bovine serum albumin)를 포함하는 PBS)로 1시간 동안 블락킹하였다. 그 후, 1차 항체(항-PECAM-1 햄스터 항체, 1:100, 항-NG2 레빗 항체)와 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 항체(TRITC-표지된 항-햄스터 항체, 1:1000, FITC-표지된 항-레빗 항체)와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 DAPI(4',6-

diamidino-2-phenylindole; 2 μ g/ml)를 넣고 5분간 상온에서 반응시켜서 세포 핵을 염색시켰다. 다시 세척 완충액으로 2 회 세척한 후에 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다.

[0087] 그 결과 도 9와 같이, PBS 투여군의 음경해면체 조직에서는 정상 마우스 (Control)에 비해 해면체 및 혈관내피세포의 수가 현저하게 감소되어 있으며, 바소히빈-1을 투여한 군의 음경해면체 조직에서는 대조군(PBS)에 비해 혈관내피세포 특이적 단백질 및 혈관주위세포의 발현이 증가함을 확인하였다. 이를 통해 당뇨에 의하여 감소된 해면체 및 혈관내피세포 및 혈관주위세포가 바소히빈-1에 의하여 재생이 유도되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 확인하였다.

[0088] 더불어 도 10과 같이, 바소히빈-1 녹아웃 마우스의 음경해면체 내 혈관내피세포 및 혈관주위세포의 수가 정상 마우스보다 현저하게 감소되어 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 바소히빈-1 유전자 및 단백질 발현이 혈관신생에 많은 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0090] 종합하면, 바소히빈-1은 혈관내피세포 및 혈관주위세포 특이적 발현 단백질의 수준을 증가시키고, 이는 음경해면체 혈관내피세포의 재생과 혈관내피세포 이음새를 강화시킴으로써, 음경 발기력을 개선시킨다는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 바소히빈-1의 뚜렷한 발기력의 개선 효과는 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다.

[0092] <제제예 1> 약학 조성물의 제조

[0093] 이하 본 발명에 따른 약학 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아니며 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0094] 1-1. 캡슐제의 제조

[0095] 바소히빈-1 단백질 10 mg

[0096] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0097] 락토오스 14.8 mg

[0098] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0099] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0101] 1-2. 주사제의 제조

[0102] 바소히빈-1 단백질 10 mg

[0103] 만니톨 180 mg

[0104] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0105] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0106] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0108] 1-3. 액제의 제조

[0109] 바소히빈-1 단백질 20 mg

[0110] 이성화당 10 g

[0111] 만니톨 5 g

[0112] 정제수 적량

[0113] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성

분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0115] <제제예 2> 식품 조성물의 제조

[0116] 2-1. 건강식품의 제조

[0117] 바소히빈-1 단백질 100 mg

[0118] 비타민 혼합물 적량

[0119] 비타민 A 아세테이트 70 μ g

[0120] 비타민 E 1.0 mg

[0121] 비타민 B1 0.13 mg

[0122] 비타민 B2 0.15 mg

[0123] 비타민 B6 0.5 mg

[0124] 비타민 B12 0.2 μ g

[0125] 비타민 C 10 mg

[0126] 비오틴 10 μ g

[0127] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0128] 엽산 50 μ g

[0129] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0130] 무기질 혼합물 적량

[0131] 황산제1철 1.75 mg

[0132] 산화아연 0.82 mg

[0133] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0134] 제1인산칼륨 15 mg

[0135] 제2인산칼슘 55 mg

[0136] 구연산칼륨 90 mg

[0137] 탄산칼슘 100 mg

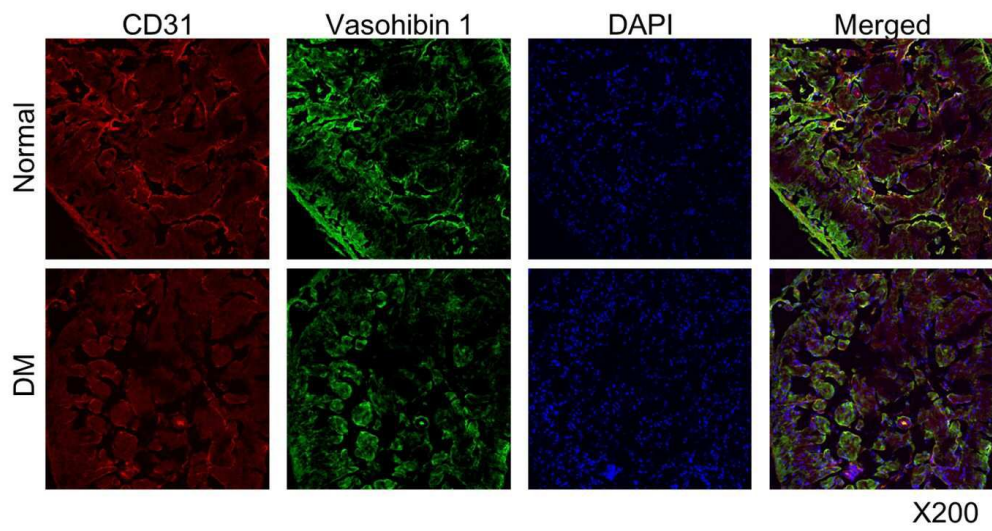
[0138] 염화마그네슘 24.8 mg

[0139] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성으로 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.

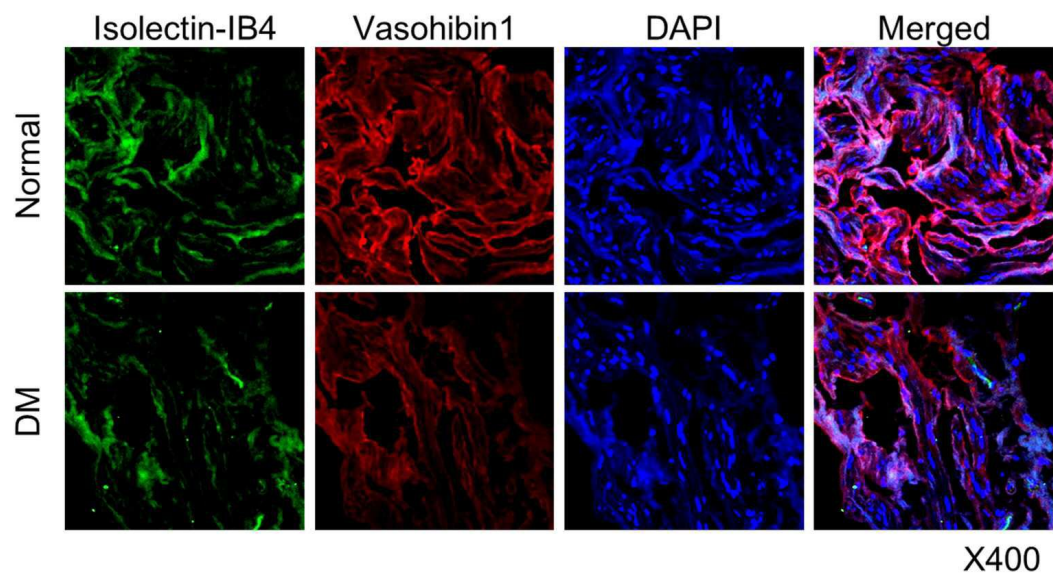
[0141] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

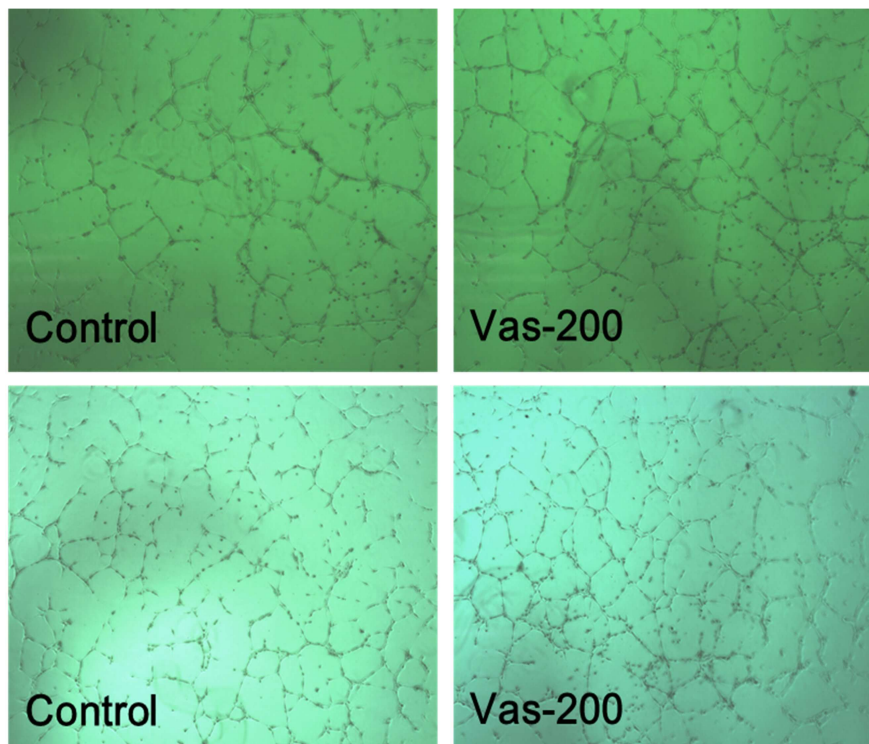
도면1



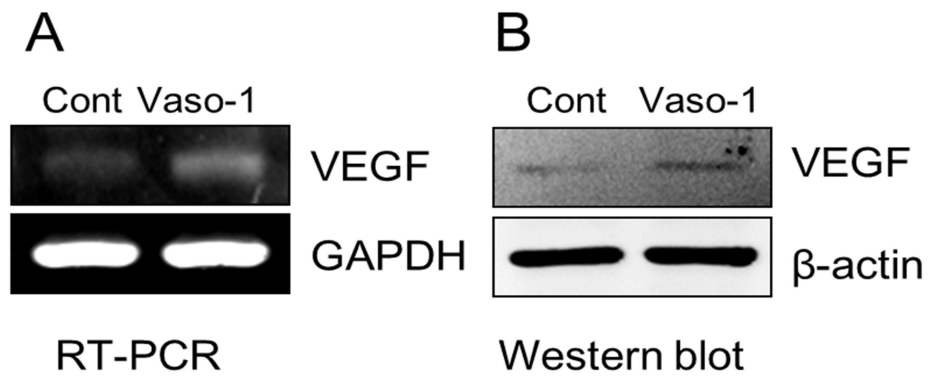
도면2



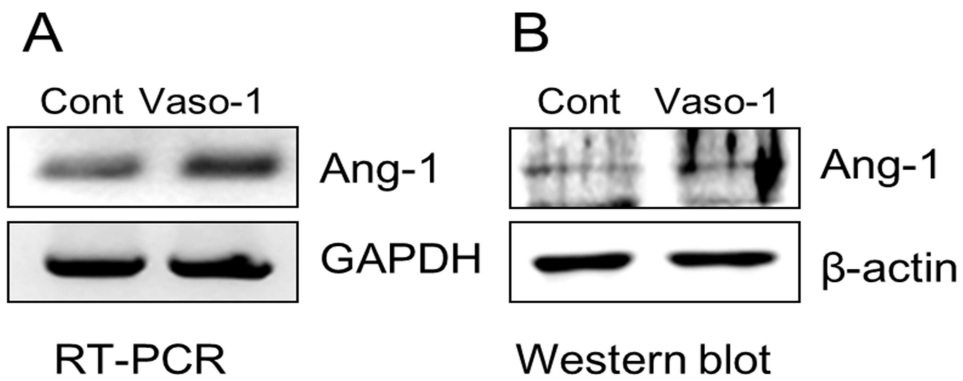
도면3



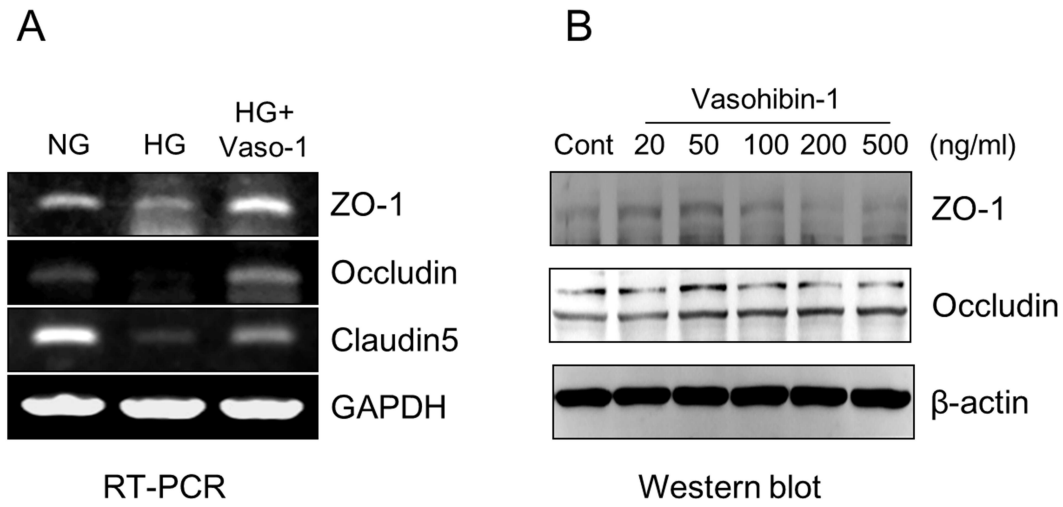
도면4



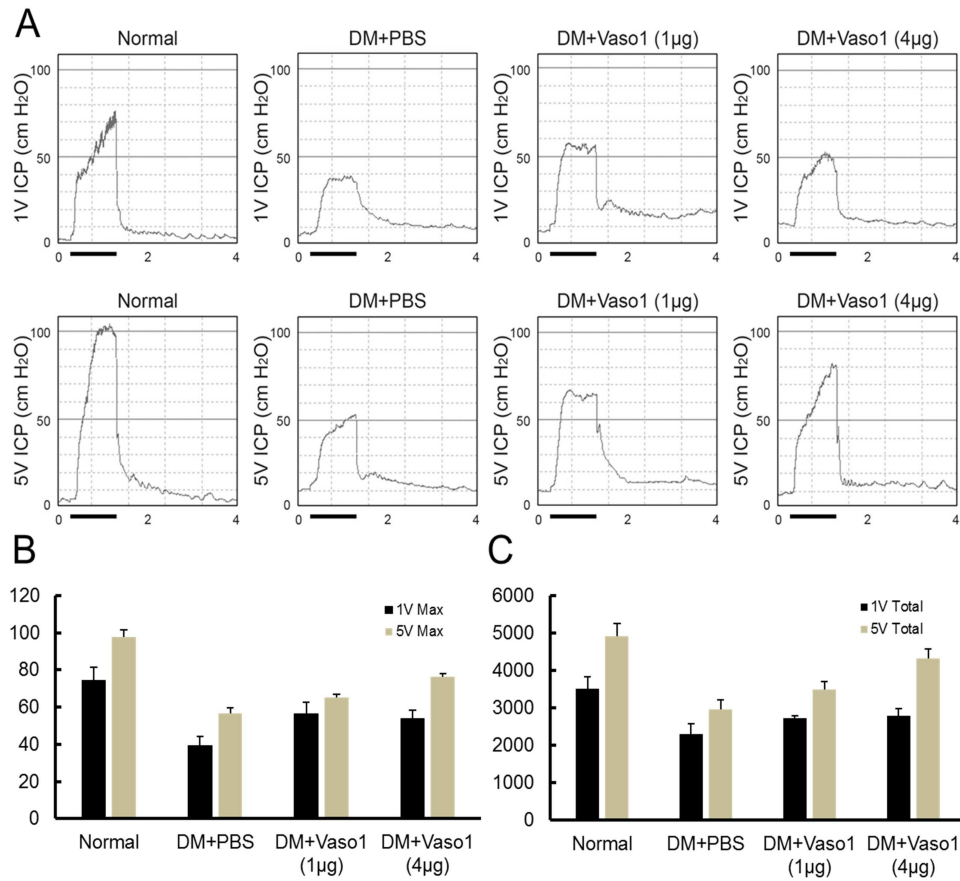
도면5



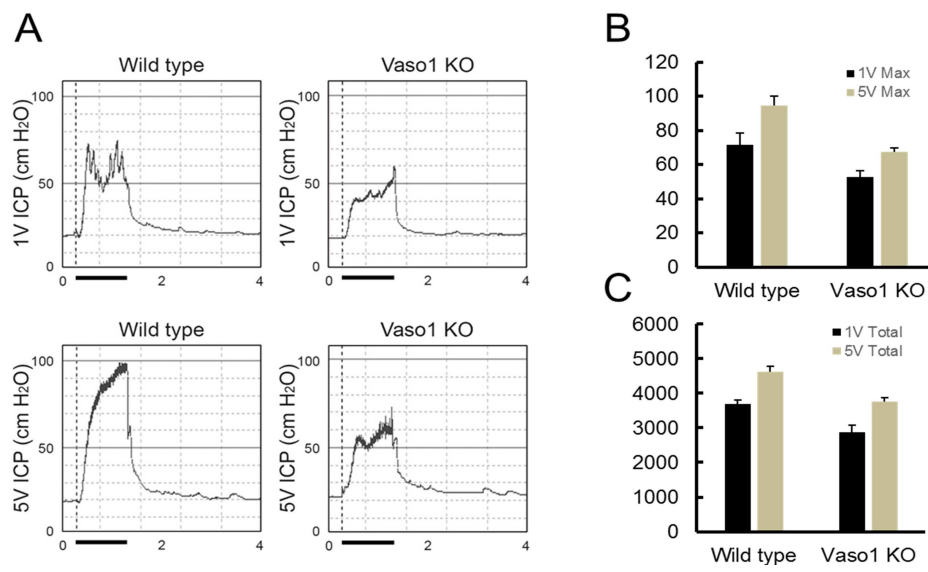
도면6



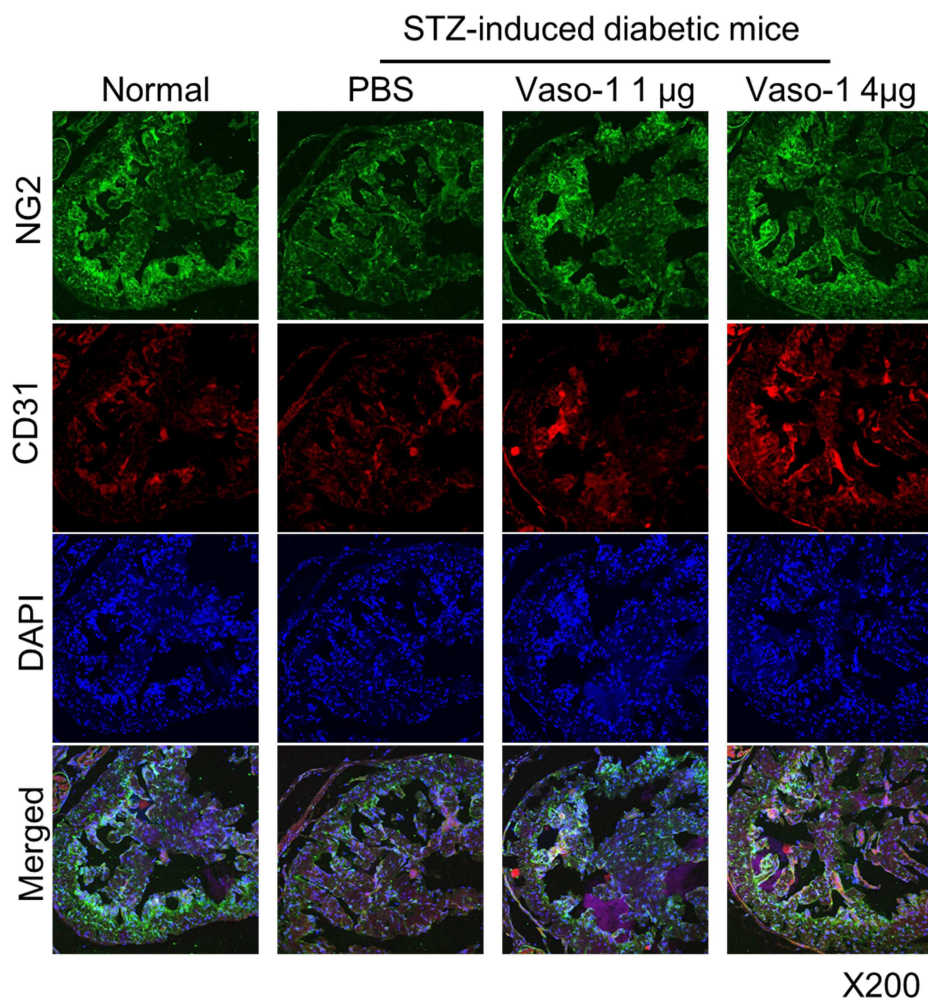
도면7



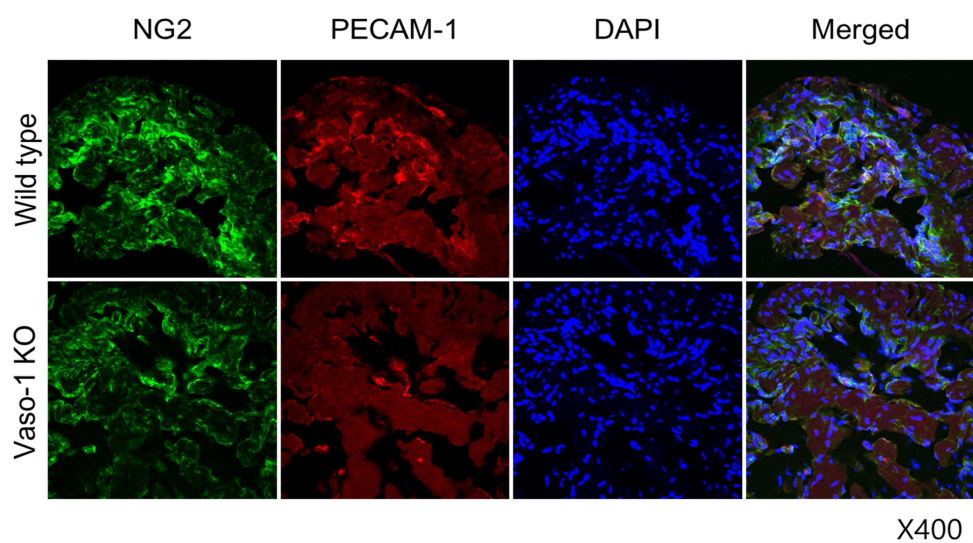
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110>	INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE	
<120>	Composition for preventing or treating erectile dysfunction comprising Vasohibin-1	
<130>	ADP-2016-0109	
<160>	12	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	vasohibin1 forward primer	
<400>	1	
	atgcagcggc tcgggggtat	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	vasohibin1 reverse primer	
<400>	2	
	ctaaatctcc tcctctccgc	20
<210>	3	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF forward primer
 <400> 3
 caggctgctg taacgatgaa 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF reverse primer
 <400> 4
 aaatgctttc tccgctctga 20
 <210> 5
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ang1 forward primer
 <400> 5
 aaacagcaaa tggaacagg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ang1 reverse primer
 <400> 6
 gggcaggtga actccactaa 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Claudin5 forward primer
 <400> 7

ggtcactggg aacttcctga	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Claudin5 reverse primer	
<400> 8	
atgccactca ctgcctctct	20
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> occludin forward primer	
<400> 9	
tcaggcagcc tcgttacag	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> occludin reverse primer	
<400> 10	
cctcctccag ctcataca	19
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ZO1 forward primer	
<400> 11	
atagcacgga cagtagacac acttc	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Z01 reverse primer

<400> 12

gtgagtaagg agggtatgtc tggtt

25