(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0058251
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61P 15/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1875 (2013.01)
A61P 15/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0138797
(22) 출원일자 2022년10월26일
심사청구일자 2022년10월26일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
류지간
인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 30, 1503동 1603호(송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F15BL)
정두용
인천광역시 연수구 랜드마크로 68, 104동 4004호(송도동, 랜드마크시티센트럴더샵)
권미혜
인천광역시 연수구 청능대로 175, 114동 601호(연수동, 연수1차우성아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

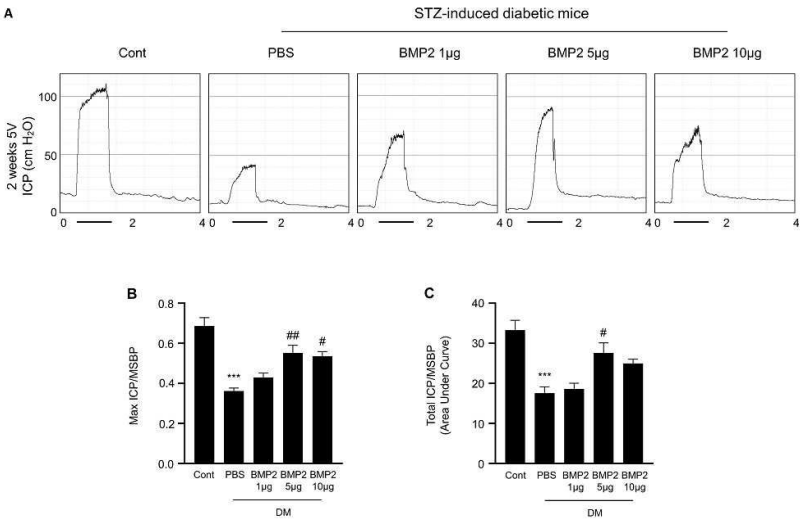
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **BMP2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

BMP2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, BMP2 단백질은 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포에 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 혈관세포 및 신경세포의 재생을 유도 시킴으로 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 확인하여 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 의약외품 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711158040
과제번호	2022R1A2B5B02001671
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	단일세포전사체분석 기반 음경 혈관주위세포 신규 마커 발굴 및 기능 검증을 통한 발기부전 치료기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164059
과제번호	2021R1C1C1008734
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	발기부전 동물모델에서 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)의 음경 혈관-신경 재생 및 발기력 개선 효능 규명
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 음경해면체 내압, 음경압력 및 음경해면체 내피세포의 이동능으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 혈소판-내피세포 부착 분자-1(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 또는 NG2(Neuron-Glial 2)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 내피세포 내 혈관 또는 해면체 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 약학 조성물은 현탁액, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형 제제, 주사제, 또는 연고제 형태인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 발기부전은 고령, 흡연, 음주, 당뇨, 고혈압 및 뇌혈관질환을 원인으로 하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 BMP2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] BMP(Bone morphogenetic protein)는 형질전환 성장인자-β(TGF-β) 슈퍼패밀리에 속하는 다기능 사이토카인이다. BMP 계열 중에서 BMP-2, -4 및 -7은 강력한 골 유도제로 인식되어 왔으며 적절한 담체 물질과 함께 BMP2를 주입하면 동소 및 이소 부위 모두에서 국소적으로 새로운 골 형성이 일관되게 유도된다. BMP2는 원래 연골 내 뼈 형성의 전체 캐스케이드를 유도하는 능력으로 설명되어왔다. 하지만 근래 연구에 따르면 BMP2는 골아세포, 연골세포뿐만 아니라 신경세포, 암세포 및 내피세포와 같은 다른 많은 세포 유형에도 작용하여 다양한 세포 유형의 이동을 자극하고 분화를 유도하는 다목적 사이토카인으로 인식되고 있다. 다른 연구에서는 BMP2가 내피세포에서 혈관신생 효과를 촉진하고 종양 혈관신생의 발병기전에 기여한다는 것을 입증하였다.

[0003] 한편, 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 과다한 작용으로 인한 노르아드레날린(noradrenaline)의 과도한 분비, 음경해면체 평활근 긴장도 증가, 신경 전달물질의 분비 억제 등에 기인한다.

[0004] 기질성 발기부전은 그 원인에 따라, 신경인성, 혈관성 및 내분비성 발기부전으로 분류된다. 상기 혈관성 및 신경인성 발기부전은 고지질혈증, 당뇨, 고혈압, 흡연, 전신 심혈관질환, 척수손상, 음경 신경 손상 등으로 인해서 음경해면체 및 혈관내피세포, 음경 신경세포가 손상되어 이들 세포에서 일산화질소(nitric oxide: NO) 등의 이완성 물질의 분비가 원활하지 않아 생기는 장애이다.

[0005] 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 전세계적으로 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 알려져 있다. 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 당뇨 또는 음경 신경 손상에 의한 발기부전의 경우, 이와 같은 치료 효과가 잘 나타나지 않을 뿐만 아니라, 설령 효과가 있다해도 그 효능이 장기간 지속되지 못한다는 단점이 있다.

[0006] 따라서, 발기부전 음경 내의 비정상화된 해면체 구조를 근본적으로 치료하고, 그 효능도 장시간 지속되는 발기부전 치료제의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Shock: April 2013 - Volume 39 - Issue 4 - p 353-360(2012.04 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] BMP2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, BMP2 단백질은 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 신경세포에 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경 해면체 혈관세포 및 신경세포의 재생을 유도시켜 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 확인하여 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 의약외품 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 당뇨성 발기부전 마우스 모델에서 BMP2 단백질 투여에 의한 음경 신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 확인한 것이다.

도 2는 음경 신경 손상 발기부전 마우스 모델에서 BMP2단백질 투여에 의한 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 확인한 것이다.

도 3은 당뇨성 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 BMP2 단백질 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자- 1(PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molucule-1) 및 혈관주위세포 특이적 단백질인 NG2(Neuron-Glial 2)의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 확인한 것이다.

도4는 음경 신경 손상 발기부전 마우스 모델의 음경해면체 조직에서 BMP2 단백질 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자- 1(PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molucule-1), 혈관주위세포 특이적 단백질인NG2(Neuron-Glial 2) 및 SMA(Smooth muscle actin)의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 확인한 것이다.

도 5는 마우스 음경해면체 내피세포를 이용하여 BMP2 단백질에 의한 내피세포의 미세혈관 생성 정도, 이동성 및 튜브 형성 정도를 비교한 결과를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 조성물은 음경해면체 내압, 음경압력 및 음경해면체 내피세포의 이동능으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 조성물은 혈소판-내피세포 부착 분자-1(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 또는 NG2(Neuron-Glial 2)의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0021] 상기 조성물은 내피세포 내 혈관 또는 해면체 형성을 유도할 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 현탁액, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형 제제, 주사제, 또는 연고제 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 발기부전은 고령, 흡연, 음주, 당뇨, 고혈압 또는 뇌혈관질환을 원인으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전

분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 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, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0026] 또한, 본 발명은 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0029] 또한, BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 의약외품 조성물에는 상기 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 이외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 달성할 수 있는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 조성물을 의약외품으로 사용하는 경우, 상기 BMP2(bone morphogenetic protein 2) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다. 상기 유효성분의 추가시에는 복합 사용에 따른 피부 안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다. 상기 추가적인 유효성분은 전체 의약외품 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 10중량 %(w/w)로 포함될 수 있으며, 상기 함량 범위는 피부 안전성, 제형화의 용이성 등을 고려하여 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0032] 본 발명의 의약외품 조성물은 외용제, 산제, 살균소독제, 치약제, 연고제, 로션제, 내복용 제제(비타민·미네랄 제제, 자양강장변질제), 물티슈, 스프레이 파스, 밴드 또는 패취(patch) 등을 예시할 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니며, 의약외품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 당해 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시 예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시 예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시 예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시 예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0036] **<실험 예 1> 당뇨성 발기부전 동물모델의 디자인**

[0037] 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)에 스트렙토조토신(streptozotocin)을 투여하여 당뇨병에 의한 발기부전을 유도하였으며, 총 5개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다(N = 5/군).

[0038] 1) 1군- 정상 마우스(Control)

[0039] 2) 2군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도 [50mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 PBS(phosphate-buffered solution) 20㎕를 투여한 마우스(DM+PBS)

[0040] 3) 3군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도 [50mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사 [day -3, 0; 1㎍/20㎕](DM+BMP2(1㎍))

[0041] 4) 4군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도 [50mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사 [day -3, 0; 5㎍/20㎕]한 마우스)(DM+BMP2(5㎍))

[0042] 5) 5군- 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도 [50mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사 [day -3, 0; 10㎍/20㎕]한 마우스)(DM+BMP2(10㎍)).

[0043]

[0044] **<실험 예 2> 음경 신경손상 발기부전 동물모델의 디자인**

[0045] 생후 3개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)에 겸자로 양측 음경 신경에 약 2분간 압착손상을 가해서 음경 신경 손상에 의한 발기부전을 유도하였으며, 하기와 같이 총 5 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다(N = 5/군).

[0046] 1) 1군- 샴 수술[sham operation] 마우스(Sham)

[0047] 2) 2군- 음경 신경 손상 마우스 + 음경해면체에 PBS(phosphate-buffered solution)[20㎕]를 투여한 마우스(CNI+PBS)

[0048] 3) 3군- 음경신경손상 마우스 + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 0.5㎍/20㎕]한 마우스)(CNI+BMP2(0.5㎍))

[0049] 4) 4군- 음경 신경 손상 마우스 + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 1㎍/20㎕]한 마우스)(CNI+BMP2(1㎍))

[0050] 5) 5군- 음경 신경 손상 마우스 + 음경해면체에 BMP2 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 5㎍/20㎕]한 마우스)(CNI+BMP2(5㎍)).

[0051]

[0052] **<실시 예 1> 전기 자극에 따른 발기력 측정**

[0053] 당뇨병 발기부전 동물모델과 음경 신경손상 발기부전 동물모델의 음경해면체에 BMP2 단백질을 주사하고 2주 후에 음경해면체의 신경을 자극하고 발기력을 측정하였다. 각 마우스의 하복부에서 좌측 표피부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경 신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 음경 신경의 전기자극을 위해서 백금전극을 음경 신경에 위치시킨 후, 5볼트, 12헤르츠의 강도로 약 1분 동안 전기자극을 가하였다. 전기자극을 가하게 되면, 음경은 발기를 하게 되고, 발기 시 음경내부의 압력(음경해면체 내압)을 음경해면체에 삽입된 카테터를 통해 컴퓨터와 연결된 압력 전달기(바이오스팩 시스템, 미국)를 이용하여 측정하였다.

[0054] 도 1A 및 도 2A에서의 세로축의 ICP(Intracavernous Pressure: 음경해면체내 압력)는 발기 시 음경 내부의 압력(음경해면체 내압)을 의미하며, 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이고, 도 1A 및 도 2A에서 가로축은 전기자극 후의 시간을 나타내며, 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다. 또한, 도 1B 및 도 2B는 최고 음경해면체 내압(Maximal ICP)을 평균 수축기 혈압(MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것이고, 도 1C 및 도 2C는 음경해면체 내압 곡선의 면적(Total ICP[area under the curve])을 평균 수축기 혈압(MSBP)으로 나눈 값을 나타낸 것으로 이는 혈압 자체가 음경해면체 내압에 영향을 줄 수 있기 때문에 발기력을 측정하기 위해 확인하는 값이다.

[0055] 그 결과, 도 1에 따르면, 당뇨병 발기부전 동물모델과 관련하여, BMP2 단백질을 투여한 군(DM+BMP2(1㎍), DM+BMP2(5㎍) 또는 DM+BMP2(10㎍))은 PBS 투여군(DM+PBS)에 비해 높은 발기력 개선 효과를 보였으며, DM+BMP2(5㎍) 군에서 정상 대조군(Control)의 80% 수준으로 발기력이 회복됨을 확인하였다. 특히, 음경발기와 관련한 두 가지 변수, 즉 최고 음경해면체 내압과 음경 압력곡선의 면적이 BMP2 단백질을 투여한 군에서 현저한 상승 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0056] 또한, 도 2에 따르면, 음경 신경손상 발기부전 동물모델과 관련하여, BMP2 단백질을 투여한 군(CNI+BMP2(0.5㎍), CNI+BMP2(1㎍) 또는 CNI+BMP2(5㎍)은 당뇨성 발기부전 동물모델의 결과와 마찬가지로 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 증가하는 등 PBS 투여군(CNI+PBS)에 비해 현저하게 개선된 발기력을 보임을 확인하였다.

[0058] **<실시 예 2> 음경해면체 조직에서 혈관내피세포 및 혈관주위세포 특이적 단백질의 발현에 미치는 영향**

[0059] 음경은 음경발기의 기능을 담당하는 해면체 조직과 이에 영양을 공급하는 소혈관들로 이루어져있다. 그러나 당뇨, 고지질증, 신경손상 등에 의한 병적 조건하에서는 이러한 혈관세포와 혈관주위세포를 포함한 해면체 조직에 병변이 생기고 상기 조직의 구조가 비정상적으로 되어 발기부전을 초래한다.

[0060] 당뇨성 발기부전 동물모델의 음경해면체 조직에서 혈관내피세포에 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1) 및 혈관주위세포 특이적인 단백질인 NG2(Neuron-Glial 2)의 발현 정도를 분석하기 위하여, 면역조직화학염색 후 공초점 현미경을 이용하여 각 세포 마커의 양적 변화를 조사하였다.

[0061] 또한, 음경 신경손상 발기부전 동물모델의 음경해면체 조직에서 혈관내피세포에 특이적 단백질인 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1) 및 혈관주위세포 특이적인 단백질인 NG2(Neuron-Glial 2)와 SMA(smooth muscle actin)의 발현 정도를 분석하기 위하여, 면역조직화학염색 후 공초점 현미경을 이용하여 각 세포 마커의 양적 변화를 조사하였다.

[0062] 보다 구체적으로, 각 마우스로부터 음경해면체 조직을 분리한 후, 이를 4% 파라포름알데히드에서 4℃, 24시간 동안 고정하였다. 상기 조직을 동결용 포매제를 이용하여 고정시킨 후, 동결 절편기에서 12㎛ 두께로 잘라 음경조직 절편을 준비하였다. 다음으로, 준비된 음경조직 절편을 슬라이드 상에 올리고 음경조직 절편을 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)로 3회 세척한 후, 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 동안 블락킹 하였다. 그 후, 1차 항체(항-PECAM-1 햄스터 항체, 항-NG2 래빗 항체 또는 항-SMA 마우스 항체, 1:100)로 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 3회 세척한 다음, 2차 항체(TRITC-표지된 항-햄스터 항체, FITC-표지된 항-래빗 항체 또는 Alexa Fluor 488-표지된 항-마우스 항체, 1:1000)로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 2회 세척한 후 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다.

[0063] 그 결과, 도 3 및 도 4에 따르면, PBS 투여군(DM+PBS 또는 CNI+PBS)의 음경해면체 조직에서는 정상 마우스(Control 또는 Sham)에 비해 혈관내피세포 및 혈관주위세포의 수가 현저하게 감소되었으나, BMP2 단백질을 투여한 군(DM+BMP2(5㎍), CNI+BMP2(1㎍))의 음경해면체 조직에서는 PBS 투여 대조군에 비해 혈관내피세포 또는 혈관주위세포 특이적 단백질의 발현이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0065] **<실시 예 3> 마우스 대동맥 절편을 이용한 미세혈관 형성 유도 효과 분석**

[0066] BMP2 단백질의 허혈성 질환 치료 효과를 확인하기 위하여, 대동맥, 대정맥, 음경 조직 절편을 배양하여 미세혈관신생에 미치는 영향을 현미경으로 분석하였다.

[0067] 이를 위해 생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6)의 대동맥, 대정맥, 음경 조직을 사용하여 실험을 수행하였다. 각 조직 절편을 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5mM 글루코스(NG; Normal glucose) 및 고혈당 수치에 해당하는 30mM 글루코스(HG; High glucose)의 조건에 5일 동안 노출시켰으며, BMP2 단백질(R&D, Cat# 355-BM-100; 200ng/㎖)을 글루코스와 동시에 처리하였다. 대조군은 글루코스와 동시에 PBS를 처리하였다.

[0068] 보다 구체적으로, 조직 배양 접시에 조직 절편을 올려놓고 마트리겔(Matrigel)로 각각의 조직을 덮어준다. 정상 농도 글루코스(NG), 고농도 글루코스(HG)와 PBS, 그리고 고농도 글루코스(HG)와 BMP2 단백질에 조직 절편을 노출시키고, 각각 5일 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 배양한 후, 현미경을 통해 조직 절편으로부터 미세혈관신생 정도를 관찰하였다.

[0069] 그 결과, 도 5A에 따르면, 고농도 글루코스(HG+PBS)에 노출된 대동맥, 대정맥 또는 음경 조직 절편은 정상 농도 글루코스(NG) 처리군에 비해 미세 혈관신생 정도가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 반면, 고농도 글루코스와 BMP2 단백질에 함께 노출시켰던 대동맥 절편에서는 미세혈관신생이 현저하게 증가하였음을 확인하였다.

[0070]

[0071] **<실시 예 4> 마우스 음경해면체 내피세포를 이용한 세포 이동 유도 효과**

[0072] 내피세포의 성장 및 이동성 증가는 새로운 혈관의 형성을 유도하는데 필수적인 과정으로, BMP2 단백질이 내피세포의 이동능(migration)에 미치는 영향을 마우스 음경해면체내피세포(MCECs)를 이용한 상처치유 이동 어세이(wound healing assay)를 통하여 분석하였다.

[0073] 보다 구체적으로, 마우스 음경해면체내피세포는 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5mM 글루코스(NG) 및 고혈당 수치에 해당하는 30mM 글루코스(HG) 조건에서 48시간 동안 노출시켰다. 각각의 정상 농도 글루코스(NG), 고농도 글루코스와 PBS(HG+PBS), 그리고 고농도 글루코스와 재조합 BMP2 단백질(HG+BMP2(200ng/ml))에 노출시킨 마우스 음경해면체 내피세포는 이동성 평가를 위해 세포 배양 접시에 부착된 0.5mm 두께의 실리콘으로 이루어진 두 웰 안에 세포를 주입하고 세포가 웰을 완전히 채울 때까지 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 배양 후 실리콘 고무를 제거하고 24시간째 웰간 0.5mm의 간극을 이동하는 세포를 현미경을 통해 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 5B에 따르면, 고농도 글루코스와 PBS(HG+PBS)에 노출된 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)는 정상 농도 글루코스(NG) 처리군에 비해 세포의 이동능이 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 반면, 재조합 BMP2 단백질을 처리하는 경우, 고농도 글루코스군에 비해 세포 이동능이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[0075] 이는 BMP2 단백질이 당뇨로 인해 활성이 저해된 해면체 내피세포의 이동성에 영향을 주어 혈관 및 해면체 형성을 유도한다는 것을 의미한다.

[0076]

[0077] **<실시 예 5> 마우스 음경해면체 내피세포를 이용한 관형성 유도 효과 분석**

[0078] 관형성(tube formation) 단계는 혈관신생 과정 중 증식, 이동한 내피세포들이 분열을 계속하여 속이 빈 튜브 모양으로 성장하여 최종 혈관으로 분화하고 여기에 혈액이 들어가 혈관 생성이 완성되는 단계이다.

[0079] BMP2 단백질의 관형성능(tube formation)에 미치는 영향을 분석하기 위해 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)를 사용하여 실험을 수행하였고, BMP2 단백질을 처리하였다. 세포는 정상 범위의 혈당 수치와 유사한 5mM 글루코스(NG), 및 고혈당 수치에 해당하는 30mM 글루코스(HG) 조건에서 48시간 동안 노출시켰으며, BMP2 단백질(200ng/ml)을 처리하였다.

[0080] 보다 구체적으로, 마트리겔(Matrigel)이 코팅된 세포 배양 접시에 정상 농도 글루코스(NG), 고농도 글루코스와 PBS(HG+PBS), 그리고 고농도 글루코스와 재조합 BMP2 단백질(HG+BMP2(200ng/ml))에 노출시킨 마우스 음경해면체 내피세포를 3 $\times 10^5$cells/㎠만큼 넣고, 튜브 형성을 위해 각각 18시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 배양한 후, 현미경을 통해 관찰하였다.

[0081] 그 결과, 도 5C에 따르면, 고농도 글루코스와 PBS(HG+PBS)에 노출된 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)는 정상 농도 글루코스(NG) 처리군에 비해 튜브 형성 정도가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 반면, 고농도 글루코스와 BMP2 단백질(HG+BMP2(200ng/ml))에 함께 노출시켰던 마우스 음경해면체 내피세포(MCECs)에서는 PBS 처리된 고농도 글루코스군에 비해 튜브 형성이 증가하였음을 확인하였다.

[0082] 이상의 실험 결과를 통하여, BMP2 단백질은 우수한 혈관신생 유도 효과를 가지고 있는바, 발기부전 치료에 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0084] 종합적으로 본 발명에 따른 BMP2 단백질은 혈관내피세포 및 혈관주위세포, 그리고 신경세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시켜 음경해면체 혈관세포 및 신경세포의 재생을 유도하여 음경 발기력을 증가시키는 등 우수한 발기부전 개선 효과를 가지고 있다. 따라서 본 발명에 따른 BMP2 단백질은 발기부전 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0086] 이하 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0088] **<제제 예 1> 약학적 조성물의 제조**

[0089] **1-1. 캡슐제의 제조**

[0090] BMP2 단백질 10mg

[0091] 결정성 셀룰로오스 3mg

[0092] 락토오스 14.8mg

[0093] 마그네슘 스테아레이트 0.2mg

[0094] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0096] **1-2. 주사제의 제조**

[0097] BMP2 단백질 10mg

[0098] 만니톨 180mg

[0099] 주사용 멸균 증류수 2974mg

[0100] $Na_2HPO_4 2H_2O$ 26mg

[0101] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0103] **1-3. 액제의 제조**

[0104] BMP2단백질 20mg

[0105] 이성화당 10g

[0106] 만니톨 5g

[0107] 정제수 적량

[0108] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0110] **<제제 예 2> 식품 조성물의 제조**

[0111] **2-1. 건강식품의 제조**

[0112]	BMP2 단백질	100mg
[0113]	비타민 혼합물 적량	
[0114]	비타민A 아세테이트	70㎍
[0115]	비타민E	1.0mg
[0116]	비타민B1	0.13mg
[0117]	비타민B2	0.15mg
[0118]	비타민B6	0.5mg
[0119]	비타민B12	0.2㎍
[0120]	비타민C	10mg
[0121]	비오틴	10㎍
[0122]	니코틴산아미드	1.7mg
[0123]	엽산	50㎍
[0124]	판토텐산 칼슘	0.5mg
[0125]	무기질 혼합물 적량	
[0126]	황산제1철	1.75mg
[0127]	산화아연	0.82mg
[0128]	탄산마그네슘	25.3mg
[0129]	제1인산칼륨	15mg
[0130]	제2인산칼슘	55mg
[0131]	구연산칼륨	90mg
[0132]	탄산칼슘	100mg
[0133]	염화마그네슘	24.8mg

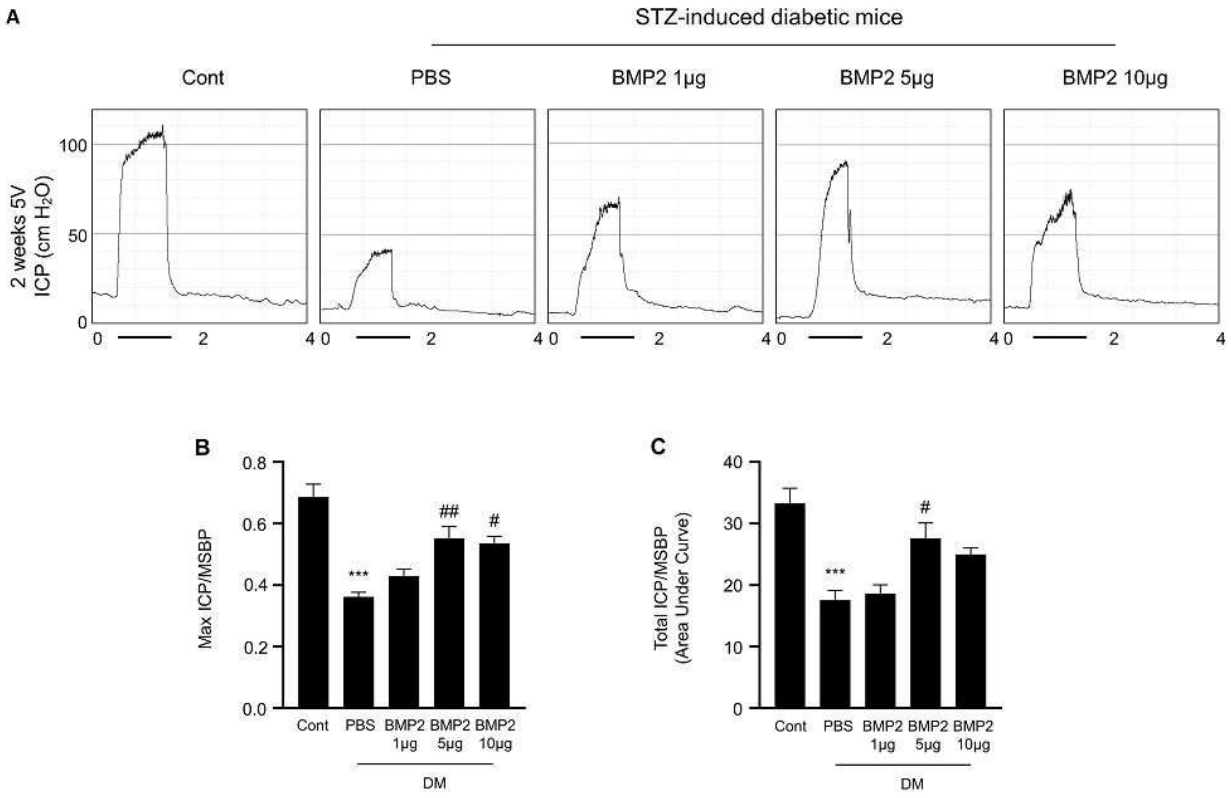
[0134] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0135] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

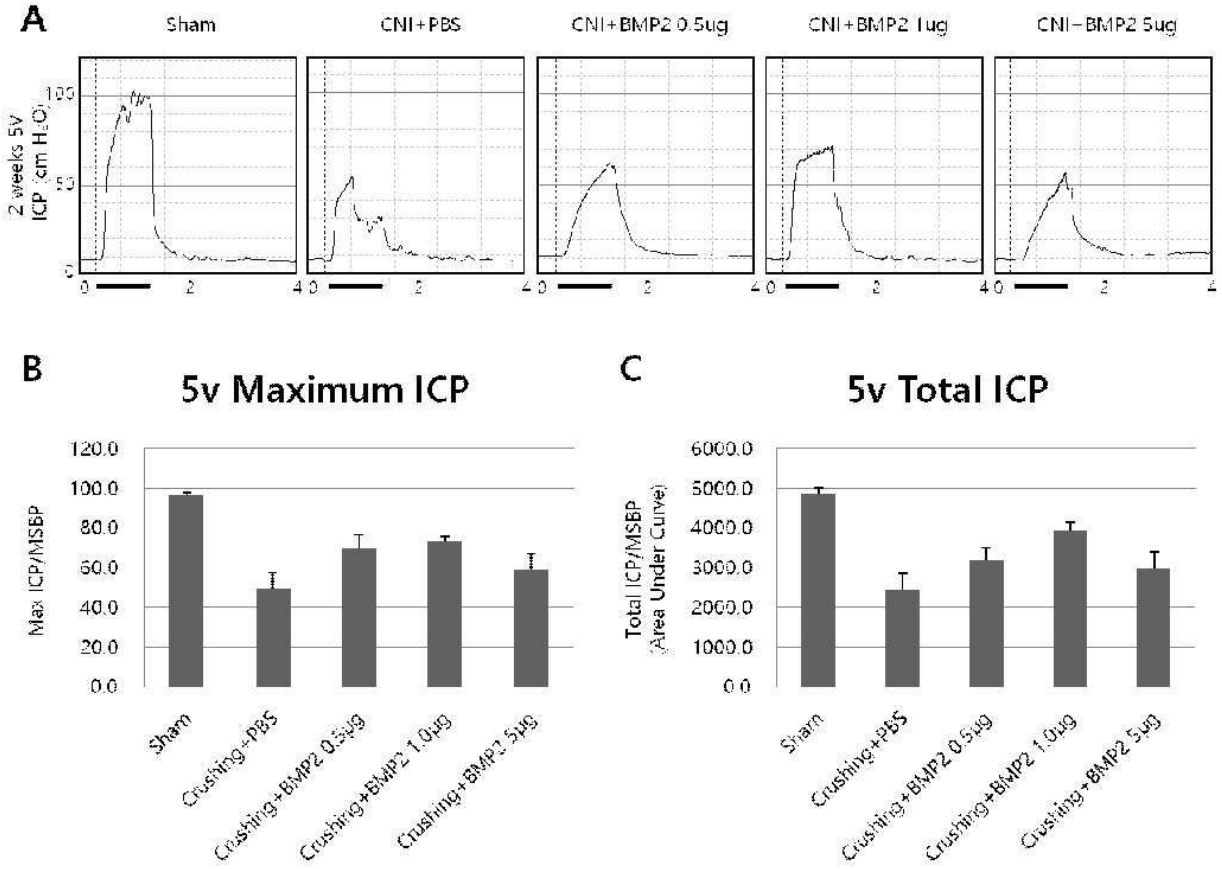
[0136] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

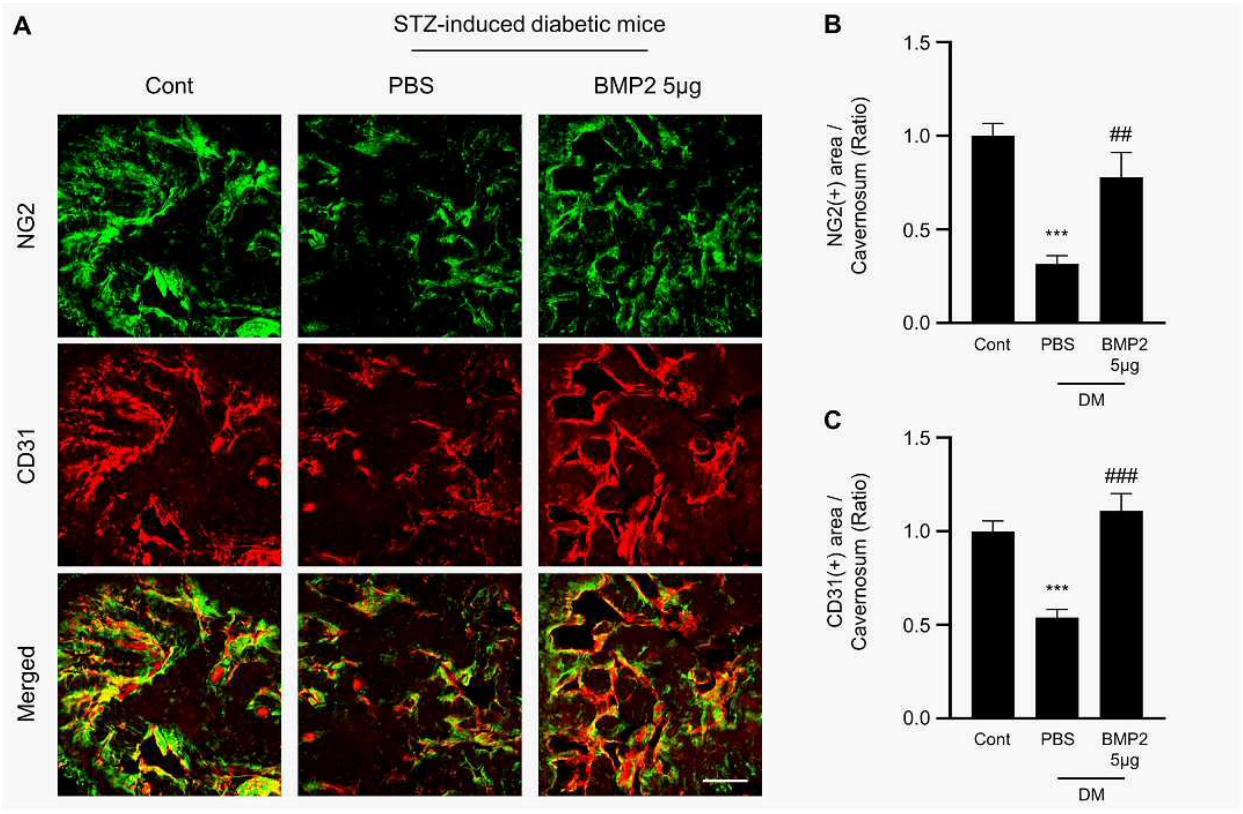
도면1


A
STZ-induced diabetic mice
Cont
PBS
BMP2 1μg
BMP2 5μg
BMP2 10μg
2 weeks 5V
ICP (cm H2O)
100
50
0
0
2
4
B
Max ICP/MSBP
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
##
#
Cont
PBS
BMP2 1μg
BMP2 5μg
BMP2 10μg
DM
C
Total ICP/MSBP (Area Under Curve)
40
30
20
10
0
***
#
Cont
PBS
BMP2 1μg
BMP2 5μg
BMP2 10μg
DM

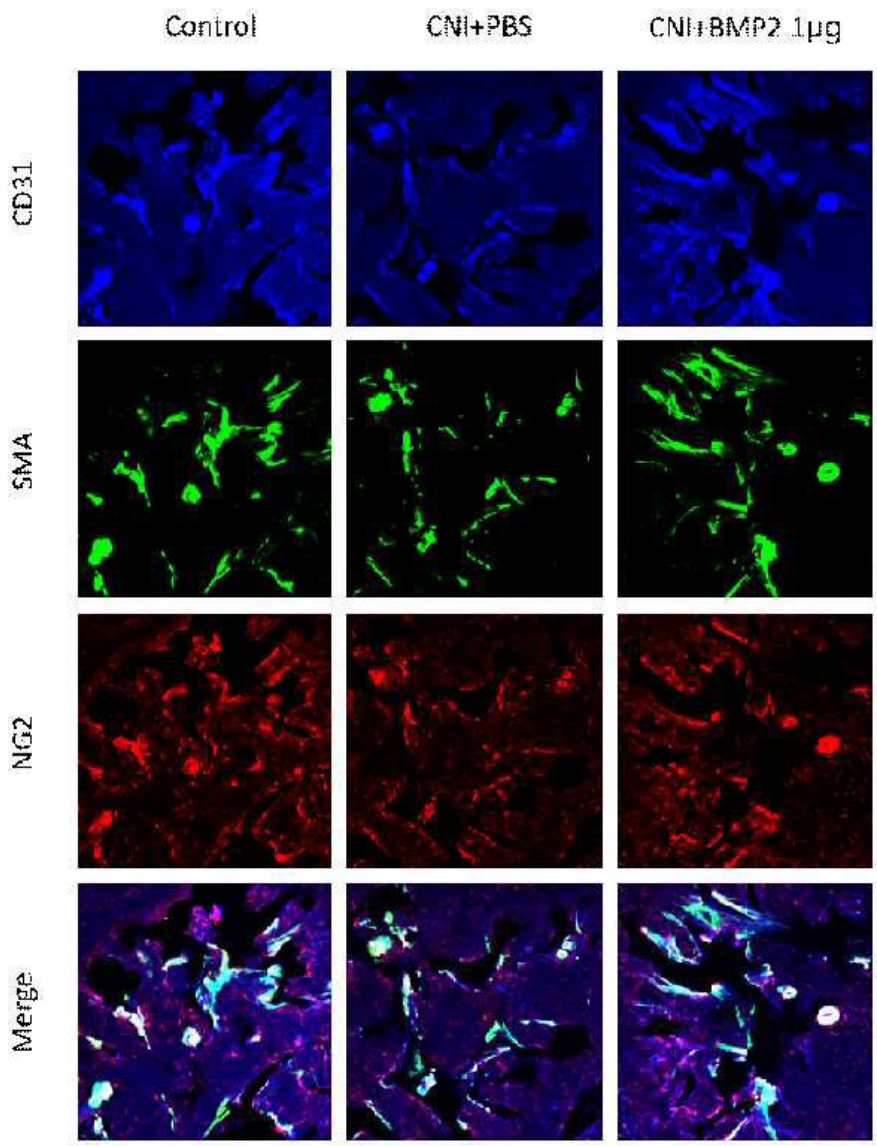
도면2


A
Sham
CNI+PBS
CNI+BMP2 0.5ug
CNI+BMP2 1ug
CNI+BMP2 5ug
2 weeks 5V
ICP (cm H2O)
B
5v Maximum ICP
Max ICP/MSBP
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
Sham
Crushing+PBS
Crushing+BMP2 0.5ug
Crushing+BMP2 1.0ug
Crushing+BMP2 5ug
C
5v Total ICP
Total ICP/MSBP
(Area Under Curve)
6000.0
5000.0
4000.0
3000.0
2000.0
1000.0
0.0
Sham
Crushing+PBS
Crushing+BMP2 0.5ug
Crushing+BMP2 1.0ug
Crushing+BMP2 5ug

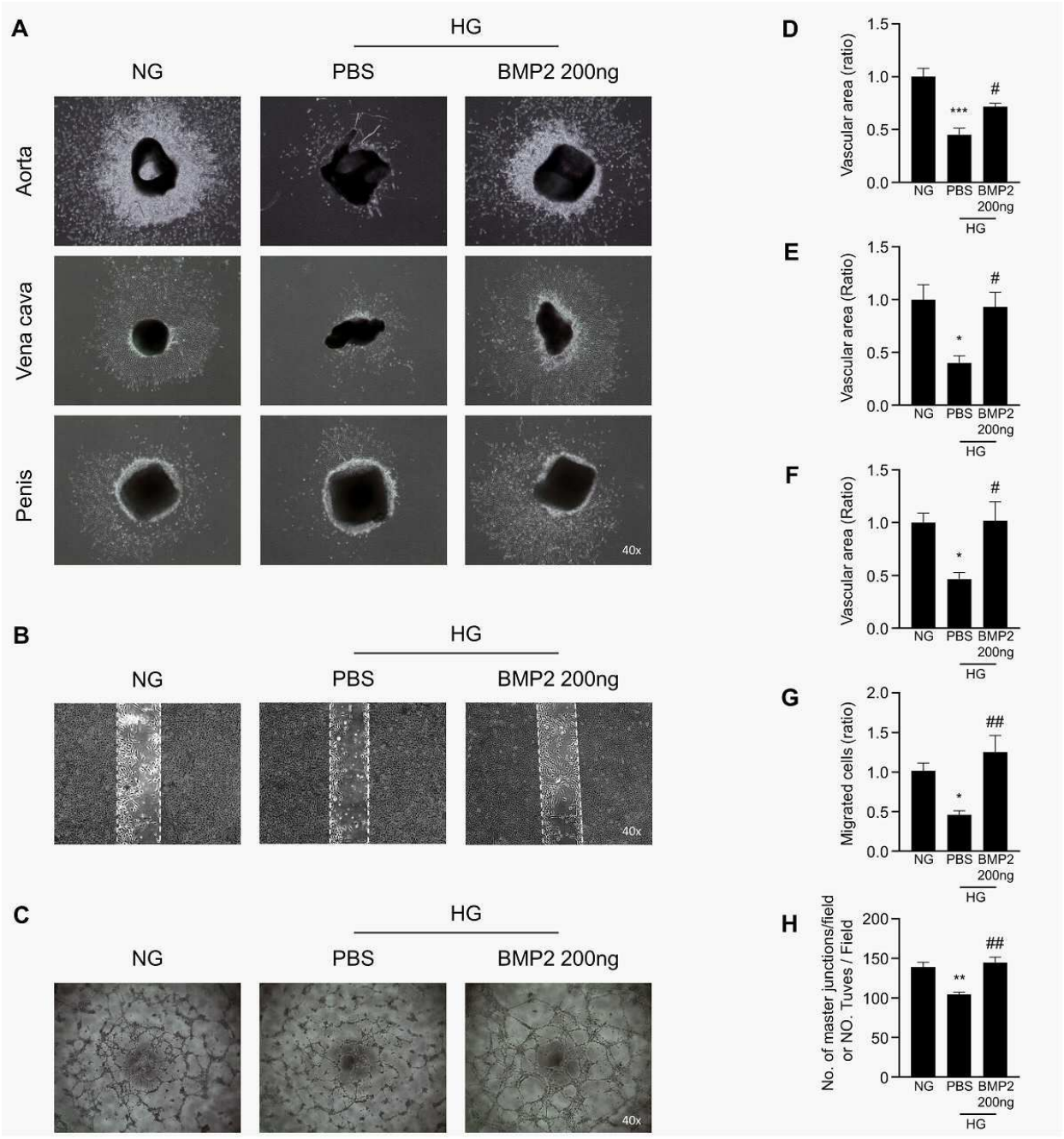
도면3


A
STZ-induced diabetic mice
Cont
PBS
BMP2 5μg
NG2
CD31
Merged
B
NG2(+) area /
Cavernosum (Ratio)
1.5
1.0
0.5
0.0
##
***
Cont
PBS
BMP2
5μg
DM
C
CD31(+) area /
Cavernosum (Ratio)
1.5
1.0
0.5
0.0
###
***
Cont
PBS
BMP2
5μg
DM

도면4



도면5


A
HG
NG
PBS
BMP2 200ng
Aorta
Vena cava
Penis
40x
B
HG
NG
PBS
BMP2 200ng
40x
C
HG
NG
PBS
BMP2 200ng
40x
D
Vascular area (ratio)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
#
NG
PBS
BMP2 200ng
HG
E
Vascular area (Ratio)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
NG
PBS
BMP2 200ng
HG
F
Vascular area (Ratio)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
NG
PBS
BMP2 200ng
HG
G
Migrated cells (ratio)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
##
NG
PBS
BMP2 200ng
HG
H
No. of master junctions/field or NO. Tuves / Field
200
150
100
50
0
**
##
NG
PBS
BMP2 200ng
HG