



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0065968

(43) 공개일자 2015년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 15/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0144134

(22) 출원일자 2013년11월25일

심사청구일자 2013년11월25일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

서준규

서울 강남구 영동대로 230, 3동 803호 (대치동, 우성1차아파트)

류지간

인천 연수구 청능대로 175, 107동 1802호 (연수동, 연수우성1차아파트)

다스 난도 두라이

인천광역시 중구 신흥동1가 7-241

(74) 대리인

리엔목특허법인

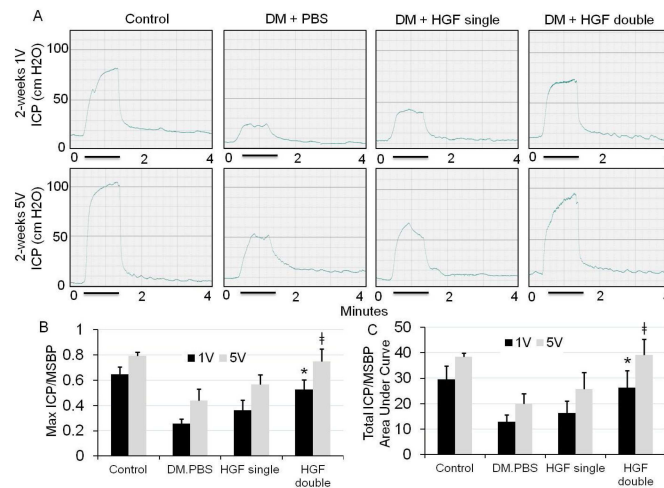
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 HGF 단백질 또는 그 유전자를 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 조성물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 HGF 단백질, 그의 생물학적 활성 단편, 또는 그의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 약학적 조성물, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 개체의 내피세포를 재생시키는 방법, 개체의 발기부전을 예방 또는 치료하는 방법 및 건강기능식품을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110076

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업/병원특성화센터

연구과제명 성의학특성화센터

기 여 율 1/1

주관기관 인하대병원

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 내피세포는 음경 해면체 내피세포, 음경 혈관 내피세포, 또는 평활근 세포인 것인 조성물.

청구항 3

HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 조성물은 음경 해면체의 내압을 증가시키는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 조성물은 내피세포에서 내피세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시키는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 내피세포 특이적인 단백질은 PECAM-1, SMA 및 PDGF-beta를 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 3에 있어서, 상기 발기부전은 음경 내피세포 또는 평활근 세포의 손상에 의하여 야기된 것인 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 음경 내피세포 및 평활근 세포의 손상은 고지질혈증, 당뇨병, 고혈압 및 음경신경손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상에 의하여 야기된 것인 조성물.

청구항 10

청구항 3에 있어서, 상기 조성물은 주사용 제형인 것인 조성물.

청구항 11

내피세포 재생에 유효한 양의 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, 내피세포 재생용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 내피세포를 재생시키는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 투여는 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하 또는 음경 해면체 내에 투여하는 것인 방법.

청구항 13

발기부전을 치료하기에 유효한 양의 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 발기부전을

예방 또는 치료하는 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 투여는 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하 또는 음경 해면체 내에 투여하는 것인 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 발기부전은 음경 내피세포 또는 평활근 세포의 손상에 의하여 야기된 것인 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 음경 내피세포 및 평활근 세포의 손상은 고지질혈증, 당뇨병, 고혈압 및 음경신경손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상에 의하여 야기된 것인 조성물.

청구항 17

HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 건강기능식품.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 식품 원료에 대하여 15 중량% 이하로 첨가되는 것인 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 내피세포 재생용 약학적 조성물, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 개체의 내피세포를 재생시키는 방법, 개체의 발기부전을 예방 또는 치료하는 방법 또는 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

HGF는 초대배양 간세포에 대한 증식촉진인자로서 발견되고 분리 및 복제된 증식인자이다. HGF는 여러 가지 간엽계 세포에 의해 생산되며, 대부분 상피계 세포, 뉴런, 혈관내피세포, 일부의 간엽계세포를 표적으로 한다. HGF는 세포증식촉진활성에 관여하여 세포운동성 촉진활성, 상피형태형성 유도활성을 갖는다. HGF는 발생과정에서 상피-간엽 상호작용의 매개체로서 간, 신장, 폐 등의 내장기관, 태반, 골격계의 형성에 관여한다. HGF가 성체에서는 간을 비롯하여 소화관, 신장, 폐의 재생을 촉진하는 기관재생인자로 기능한다는 점에서 여러 질환의 치료약으로 기대를 모으고 있다. 그러나, 현재까지 HGF의 발기부전 예방 또는 치료에 대한 기술내용이 교시되거나 기재된 바 없으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.

[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 과도한 작용으로 인한 노르아드레날린(noradrenaline)의 과도한 분비, 음경해면체 평활근 긴장도 증가, 신경 전달물질의 분비 억제 등에 기인한다. 또한, 기질성 발기 부전은 그 원인에 따라, 신경인성, 혈관성, 및 내분비성 발기부전으로 분류된다.

[0004]

상기 혈관성 발기부전은 고지질혈증, 당뇨, 고혈압, 흡연, 전신 심혈관질환 등으로 인해서 음경 혈관내피세포가 손상되어 혈관내피세포에서 일산화질소(nitric oxide: NO) 등의 이완성 물질의 분비가 원활하지 않아 생기는 장애이다.

[0005]

최근 연구는 기질성 원인에 더 비중을 두고 있고, 그의 치료로서 주로 비아그라(viagra, 성분명: 실테나필)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 두통, 안면홍조, 소화불량, 및 심장파비 등 여러 가지 부작용이 보고되고 있을 뿐만 아니라, 비아그라와 같은 PDE-5 저해제 계열의 약물들은 분자적 수준에서 일시적인 단백질 발현 및 관련 인자들을 조절하는 것으로 근본적인 치료라 할 수 없다. 더욱이 당뇨에 의한 발기부전의 경우, 이와 같은 치료제의 효과가 잘 나타나지 않을 뿐만 아니라, 설령 효과가 있다 해

도 그 효능이 장기간 지속되지 못한다는 단점이 있다.

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

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 양상은 내피세포 재생용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 일 양상은 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 일 양상은 개체의 내피세포를 재생시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 일 양상은 개체의 발기부전을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 일 양상은 HGF 단백질 등을 포함하는 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양상은 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 내피세포 재생용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 명세서에 있어서, "HGF 단백질"이란 간세포성장인자(hepatocyte growth factor)를 의미한다. HGF는 69kDa의 α 사슬과 34kDa의 β 사슬로 된 헤테로 2합체 단백질이고, α 사슬에 4개의 크린글(Kringle)구조가 있는 것일 수 있다. 티로신인산화효소 활성이 있는 *c-met*은 HGF의 수용체일 수 있다.

[0014] 상기 조성물은 상기 HGF 단백질 전체뿐만 아니라 그의 생물학적 활성 단편 또는 그의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 상기 생물학적 활성 단편은 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 유전자의 혈관내피세포 및 평활근세포 재생 활성을 실질적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 생물학적 활성 단편은 천연 HGF의 혈관내피세포 및 평활근세포 활성에 관여하는 활성 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 융합 단백질은 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 유전자의 혈관내피세포 및 평활근세포 재생 활성을 실질적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 융합 단백질은 HGF 단백질 또는 그의 단편이 HGF 단백질 또는 그의 단편의 분리에 유용한 융합 파트너, 표적부위로의 전달에 유용한 융합 파트너, 체내 안정성을 증가시키기 위한 융합 파트너 등에 연결된 것일 수 있다. 상기 연결은 HGF 단백질 또는 그의 단편의 N 말단 또는 C 말단 또는 측쇄를 통하여 연결된 것일 수 있다. 상기 연결은 공유 또는 비공유 결합에 의하여 이루어진 것일 수 있다. 상기 융합 파트너는 폴리펩티드를 포함하는 것일 수 있다. 분리에 유용한 융합 파트너는 His 서열, 예를 들면, His₆ 서열일 수 있다. 표적부위로의 전달에 유용한 융합 파트너, 또는 체내 안정성을 증가시키기 위한 융합 파트너는 항체 불변 영역, 예를 들면, Fc 영역 또는 PEG와 같은 체내 분해에 저항을 부여하는 중합체일 수 있다.

[0016] 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 그 자체뿐만 아니라, 다른 물질과 융합된 형태의 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 다른 물질은 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 전달될 수 있도록 하는 것, 세포 내에서 세포 내의 유전자 발현기구에 의하여 발현될 수 있도록 하는 것, 및 세포 내에서 안정하게 유지되도록 하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 융합은 공유 또는 비공유 결합에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 융합은 소포 중에 포집되는 형태를 포함한다.

[0017] 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터, 오퍼레이터, 인핸서 및/또는 전사종결인자와 같은 유전자 발현 조절인자와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 플라스미드 또는 바이러스 게놈에 삽입되어 세포 내에서 발현될 수 있도록 된 것일 수 있다. 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 음경의 내피세포 및 평활근세포, 예를 들면, 해면체 내피세포 및 평활근세포 또는 음경 혈관 내피세포 및 평활근세포에 특이적으로 발현되도록 하는 조절인자와 연결된 구조체일 수 있다. 상기 HGF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 아데노바이러스 게놈에 삽입되어 해면체 내피세포 및 평활근세포 또는 음경 혈관 내피세포 및 평활근세포에 특이적으로 발현되도록 하는 조절인자와 연결된 구조체의 형태일 수 있다. 상기 구조체는 바이러스 입자에 포집되어 있는 것일 수 있다.

[0018] 본 명세서에 있어서, "유효성분"이란 상기 조성물이 개체에 투여되는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 내피세포 재생을 더 촉진하는 활성을 갖는 것을 포함한다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 마우스, 햄스터,

개, 고양이, 말, 소, 돼지 및 염소로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [0019] 본 명세서에 있어서, 상기 "내피세포"는 음경 해면체 내피세포, 음경 혈관내피세포 또는 평활근 세포인 것일 수 있다.
- [0020] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 상기 조성물은 경구투여용 제제 또는 비경구 투여용 제제일 수 있다.
- [0021] 본 명세서에 있어서, 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 mg/kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 음경 해면체 내(intracavernous)에 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0024] 상기 조성물은 개체의 발기부전을 예방 또는 치료하기 위한 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 양상은 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] HGF 단백질 및 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기에서 기술한 바와 같다.
- [0027] 용어 "유효성분"이란 상기 조성물이 개체에 투여되는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 발기부전의 예방 또는 치료하는 활성을 갖는 것을 포함한다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 마우스, 햄스터, 개, 고양이, 말, 소, 돼지 및 염소로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0028] 용어 "예방"이란, 상기 조성물이 투여되지 않은 것에 비하여 발기력이 약화되거나 발기력 지속시간이 감소되는 것을 방지하는 것을 포함한다. 용어 "치료"란 상기 조성물이 투여되지 않은 것에 비하여, 약화된 발기력 또는 감소된 발기 지속시간을 더 회복시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 본 발명에 따른 HGF 단백질은 당뇨병 발기부전 동물모델에 있어서, 음경 해면체 내피세포 및 평활근 세포 또는 음경 혈관 내피세포 및 평활근 세포의 재생을 유도함으로써 음경해면체 내압을 상승시켜 발기력을 개선시키는 우수한 효과가 있을 수 있다.
- [0029] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 상기 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 특히, 상기 조성물은 주사형 제형일 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 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 팜유 등을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있다. 상기 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 상기 조성물의 조제시, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 조성물은 경구투여용 제제 또는 비경구 투여용 제제일 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 사용되고, 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, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제가 포함될 수 있다. 또한, 비수용성제 또는 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 또는 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈

(tween) 61, 카카오지, 라우린지 또는 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0032] 상기 조성물은 HGF 단백질과 함께 발기부전의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0033] 상기 조성물은 음경해면체 내압을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 내피세포에서 내피세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 내피세포 특이적인 단백질은 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), SMA(smooth muscle actin), PDGF-beta(platelet-derived growth factor beta), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 발기부전은 음경 내피세포 또는 평활근 세포의 손상에 의하여 야기된 것일 수 있다. 상기 음경 내피세포 및 평활근 세포의 손상은 고지질혈증, 당뇨병, 고혈압 및 음경신경손상 중 하나 이상에 의하여 야기된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 양상은 내피세포 재생에 유효한 양의 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, 내피세포 재생용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 내피세포를 재생시키는 방법을 제공한다.
- [0037] 상기 내피세포 재생용 약학적 조성물은 상기에서 기술한 바와 같다.
- [0038] 상기 방법에 있어서, 용어 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미한다. 상기 개체는 내피세포가 손상되어 있는 개체일 수 있다. 상기 개체는 예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 말 및 소로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0039] 상기 방법에 있어서, "내피세포 재생에 유효한 양"은 상기 조성물이 개체에 투여되는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 내피세포 재생을 더 촉진하도록 하는 양을 포함한다. "내피세포 재생에 유효한 양"은 예를 들면, 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 0.00001mg/kg 내지 1000mg/kg, 예를 들면, 0.00001mg/kg 내지 100mg/kg, 0.00001mg/kg 내지 10mg/kg, 0.00001mg/kg 내지 10mg/kg, 0.0001mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.001mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.01mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.1mg/kg 내지 1000mg/kg, 1mg/kg 내지 1000mg/kg, 10mg/kg 내지 1000mg/kg, 또는 100mg/kg 내지 1000mg/kg일 수 있다.
- [0040] 상기 방법에 있어서, 투여는 상기 조성물을 음경의 발기조직에 도달할 수 있는 임의의 경로를 통한 투여를 포함한다. 상기 투여 경로는 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하 또는 음경 해면체 내에 투여 등이 포함된다.
- [0041] 상기 조성물은 음경해면체 내압을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 내피세포에서 내피세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 내피세포 특이적인 단백질은 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), SMA(smooth muscle actin), PDGF-beta(platelet-derived growth factor beta), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 발기부전은 음경 내피세포 또는 평활근 세포의 손상에 의하여 야기된 것일 수 있다. 상기 음경 내피세포 및 평활근 세포의 손상은 고지질혈증, 당뇨병, 고혈압 및 음경신경손상 중 하나 이상에 의하여 야기된 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 양상은 발기부전을 치료하기에 유효한 양의 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는, 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 발기부전을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

- [0045] 상기 발기부전 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기에서 기술한 바와 같다.
- [0046] 상기 방법에 있어서, 용어 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미한다. 상기 개체는 발기부전 증상을 가지고 있거나 발기부전 증상을 나타낼 가능성이 있는 개체일 수 있다. 상기 개체는 예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 말 및 소로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0047] 상기 방법에 있어서, "발기부전을 치료하기에 유효한 양"은 상기 조성물이 개체에 투여되는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 발기부전의 개선, 예를 들면, 발기력의 강화 및/또는 발기 지속 시간을 증가시키는 양을 포함한다. "발기부전을 치료하기에 유효한 양"은 예를 들면, 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 0.00001mg/kg 내지 1000mg/kg, 예를 들면, 0.00001mg/kg 내지 100mg/kg, 0.00001mg/kg 내지 10mg/kg, 0.00001mg/kg 내지 10mg/kg, 0.0001mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.001mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.01mg/kg 내지 1000mg/kg, 0.1mg/kg 내지 1000mg/kg, 1mg/kg 내지 1000mg/kg, 10mg/kg 내지 1000mg/kg, 또는 100mg/kg 내지 1000mg/kg일 수 있다.
- [0048] 상기 방법에 있어서, 투여는 상기 조성물을 음경의 발기조직에 도달할 수 있는 임의의 경로를 통한 투여를 포함한다. 상기 투여 경로는 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하 또는 음경 해면체 내에 투여 등이 포함된다.
- [0049] 상기 조성물은 음경해면체 내압을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 조성물은 내피세포에서 내피세포 특이적인 단백질의 수준을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 내피세포 특이적인 단백질은 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), SMA(smooth muscle actin), PDGF-beta(platelet-derived growth factor beta), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 발기부전은 음경 내피세포 또는 평활근 세포의 손상에 의하여 야기된 것일 수 있다. 상기 음경 내피세포 및 평활근 세포의 손상은 고지질혈증, 당뇨병, 고혈압 및 음경신경손상 중 하나 이상에 의하여 야기된 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 발기부전의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 다른 양상은 HGF 단백질 또는 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 건강기능식품을 제공한다.
- [0053] HGF 단백질 및 그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기에서 기술한 바와 같다.
- [0054] 본 발명의 HGF 단백질은 발기부전의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명에서, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해한 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 HGF 단백질을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 HGF 단백질을 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 HGF 단백질은 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.
- [0056] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0057] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제, 또는 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.

[0058]

상기 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 상기 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

도면의 간단한 설명

[0059]

도 1은 당뇨 마우스 모델에서 HGF 단백질 투여에 의한 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력) 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 당뇨 마우스 모델의 음경 조직에서 HGF 단백질 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1 및 혈관평활근세포 특이적 단백질인 SMA의 발현 정도를 HGF 수용체(receptor)인 cMET의 발현양과 함께 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 당뇨 마우스 모델의 음경 조직에서 HGF 단백질 투여에 의한 과산화수소이온의 생성 양상을 비교하기 위해 히드로에티딘(hydroethidin) 염색을 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 당뇨 마우스 모델의 음경 조직에서 HGF 단백질 투여에 의한 퍼옥시나이트라이트의 생성양상을 비교하기 위해 니트로티로신에 대한 면역조직화학염색을 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 당뇨 마우스 모델의 음경 조직에서 HGF 단백질 투여에 의한 혈관의 안정성에 중요한 역할을 하는 혈관주위세포의 발현정도를 비교하기 위해 PDGFR- β 에 대한 면역조직화학염색을 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6는 마우스 음경 조직에서 일차배양해서 얻은 혈관내피세포를 고혈당(high glucose) 조건 하에서 처리 후 HGF 단백질 투여에 의한 HGF 수용체인 c-MET의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 마우스 음경 조직에서 일차배양해서 얻은 혈관내피세포를 고혈당 조건 하에서 처리 후 HGF 단백질 투여에 의한 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현 정도를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 마우스 음경 조직에서 일차배양해서 얻은 혈관내피세포를 고혈당 조건 하에서 처리 후 HGF 단백질 투여에 의한 튜브 형성 정도를 위상차현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9은 마우스 음경 조직에서 일차배양해서 얻은 혈관내피세포를 고혈당 조건 하에서 처리 후 HGF 단백질 투여에 의한 세포사멸사(apoptosis) 정도를 TUNEL 염색으로 분석한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060]

이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명의 내용을 한정하는 것이 아니다.

[0061]

실시예 1. 당뇨성 발기부전 모델에서 HGF 단백질의 발기부전 치료 효과

[0062]

생후 2개월 된 수컷 마우스(C57BL/6J)를 대상으로 하였고, 총 4 개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다 (N = 10/군; 1군, 정상 마우스; 2군, 정상 마우스 + 스트렙토조토신(streptozotocin)을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째 된 마우스] + PBS(Phosphate buffered solution) [20 μ l]; 3군, 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째] 마우스 + HGF 단백질을 1번 주사[day 0; 4.2 μ g/20 μ l]한 마우스; 4군, 스트렙토조토신을 이용한 당뇨 유도[50 mg/kg 농도로 5일 연속으로 복강 내 투여 후 8주째] 마우스 + HGF 단백질을 2번 주사[day -3, 0; 4.2 μ g/20 μ l]).

[0063] 케타민(ketamine)(100 mg/kg)과 자일라진(xylazine)(5 mg/kg) 근육 주사로 마취한 후 HGF 단백질을 음경해면체 내에 주사한 뒤 2주째에 음경해면체 신경자극 후 발기력을 측정하였다. 음경해면체 조직에서 혈소관-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1) 및 평활근 세포 특이적 단백질인 SMA와 HGF 수용체인 c-MET을 같이 면역조직화학염색을 시행하여 혈관내피세포의 발현 변화와 혈관 주위의 수축을 조절하고 형태를 유지하는 혈관주위세포(pericyte)의 발현변화를 PDGFR-beta(platelet-derived growth factor receptor-beta)에 대한 면역조직화학염색으로 살펴본다. 또한 과산화물 음이온(superoxide anion)의 생성을 히드로에티딘 염색으로 확인하였고, 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 발현정도를 니트로티로신(nitrotyrosine)에 대한 면역조직화학염색으로 평가하였다.

[0064] 그 결과, HGF 단백질 투여군 중에서 2번 주사한 군에서 가장 높은 발기력 개선효과를 보였고, 발기력이 정상 수준으로 회복되었음을 확인할 수 있었다. 스트렙토조토신 당뇨 유도 동물모델의 음경에서 해면체내피세포(혈관내피세포 포함) 및 평활근세포의 양이 정상 대조군에 비해서 현저하게 감소되었고, HGF 단백질 투여 후 해면체내피세포(혈관내피세포 포함) 및 평활근세포의 양이 거의 정상 수준으로 현저하게 회복되었다. 또한 HGF는 혈관주위세포의 발현도 현저하게 증가시켰고, 과산화물 음이온 및 퍼옥시나이트라이트 생성은 감소시켰다. 이하에서 보다 자세하게 설명하고자 한다.

[0065] (1) 전기 자극에 따른 발기력 분석

[0066] 발기력 측정에 관한 실험방법은, 준비된 마우스의 하복부에서 좌측 표피부분을 개복하고, 전립선의 후외측에 위치한 음경해면체신경(음경신경)이 잘 보이도록 준비하였다. 음경신경의 전기자극을 위해서 백금전극을 음경신경에 위치시킨 후, 1-5 볼트 12 헤르츠 강도로 약 1분 동안 전기자극을 가하였다. 전기자극을 가하게 되면, 음경은 발기를 하게 된다. 이때 음경 해면체에 삽입된 카테터를 통해서 발기시 음경내부의 압력(음경해면체 내압)에 대한 데이터 수집을 위하여 컴퓨터와 연결되어 있는 압력 전달기(바이오스펙 시스템, 미국)를 통해서 측정하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 측정된 압력 수치는 음경 발기력을 반영하게 된다.

[0067] 도 1은 당뇨 마우스 모델에서 HGF 단백질 투여군과 대조군에서 음경신경 전기자극에 따른 음경해면체 내압(발기력)을 나타낸 도면이다. 도 1A에서, 세로축의 ICP(Intracavernous Pressure: 음경해면체내 압력)는 발기시 음경내부의 압력(음경해면체내압)을 말하며 일반적으로 발기력을 나타내는 지표이다. 가로축은 전기자극 후의 시간을 나타낸다. 도 1A에서 1분간의 전기자극 기간은 가로축에 검정색 막대로 표시하였다. 도 1A는 HGF 단백질을 음경해면체 내에 한번 또는 두번 주사 후 2주째에 음경해면체에 1V 또는 5V로 신경자극 후 발기력을 측정한 결과이다.

[0068] 또한, 도 1B, 1C에서 세로축의 MSBP(Mean Systolic Blood Pressure)는 평균 수축기 혈압을 나타낸다. 일반적으로 발기력을 표현할 때는 최고 음경해면체내압(Maximal ICP) 또는 음경해면체내압 곡선의 면적(Total ICP [area under the curve])을 평균 수축기 혈압(MSBP)으로 나눈 값으로 나타내게 되는데 이는 혈압자체가 음경해면체내압에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 도 1에서, 대조군(Control), DM+PBS, HGF 1회 투여, HGF 2회 투여는 각각 상기한 제1 군에서 제4 군에 해당하는 개체이다.

[0069] 도 1에 나타난 바와 같이, HGF 단백질 2회 투여군(HGF double)에서 PBS 투여군(DM+PBS)에 비해서 가장 높은 발기력 개선효과를 보였다. 음경발기에 대한 두 가지 변수, 즉 최고 음경해면체 내압과 음경압력곡선의 면적이 HGF 단백질 투여 후 현저한 상승을 보였다.

[0070] (2) 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1 및 평활근세포 특이적 단백질인 SMA 발현분석

[0071] 음경은 일종의 특수한 혈관조직으로서, 정상적인 음경 발기를 위해서는 해면체 동양구조(cavernous sinusoids)와 음경혈관의 정상적인 활동이 필수적이다. 해면체 동양구조와 혈관은 가장 내벽을 이루는 단층 세포로서 혈액과 직접 접촉하게 되는 혈관벽 세포인 내피세포와 혈관 중막의 여러 개의 세포층을 구성하고 혈관의 수축, 이완을 담당하는 평활근세포로 이루어져 있다. 이러한 혈관내피세포와 평활근세포는 음경혈관의 이완 및 이로 인한 음경 발기에 중요한 역할을 한다. 음경해면체 동양구조와 혈관의 비정상적인 구조나 활동력은 발기력을 감소시키는 원인이 된다.

[0072] 이에 본 발명자들은 정상 마우스에 스트렙토조토신 투여 후 음경 발기조직 내 혈관의 구조적 변화를 조사하고자 해면체 및 혈관의 내피세포에 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현과 평활근세포 특이적 단백질인 SMA의 발현을 확인해 보았다.

- [0073] 음경조직을 4℃에서 4% 파라포름알데히드에서 24 시간 동안 고정한 후 동결 절편기에서 동결용 포매제를 이용하여 조직을 절편 만들기 쉽게 고정시킨 후 7 μ m 두께로 잘라서 음경조직 절편을 준비하였다.
- [0074] 다음으로, 준비된 음경조직 절편을 슬라이드 상에 올리고, PECAM-1 및 SMA 발현 분석을 위해 준비된 슬라이드 상의 조직을 4% 파라포름알데히드에서 약 5분간 고정시켰다. 고정된 음경조직 절편들을 세척 버퍼(2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 3회 세척한 후에 비특이적 단백질 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 블로킹(blocking)한다. 첫 번째 항체(항-PECAM-1 랫 항체 및 FITC-표지된 항-SMA 항체, 항-c-Met 가토 항체)를 1:50 비율로 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 다시 3회 세척한 다음, PECAM-1에 특이적으로 반응한 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 두 번째 항체(TRITC-표지된 항-랫 항체, FITC- 및 TRITC-표지된 항-가토 항체)를 1:1000 비율로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 3회 세척한 후에 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0075] 도 2A는 당뇨 마우스의 음경조직에서 HGF 단백질 투여군과 대조군의 HGF 수용체인 c-Met의 발현 정도 및 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현 정도를 나타낸 공초점 현미경 사진이다. 도 2A에 나타난 바와 같이, HGF 단백질을 투여한 당뇨 마우스에서 그 수용체인 c-Met의 발현이 증가함을 알 수 있다. HGF 단백질을 1번 투여한 군에서 PBS만 투여한 군보다 c-Met의 발현이 증가하였고, HGF 단백질을 2번 투여한 군에서 c-Met이 가장 많이 발현됨을 알 수 있었다.
- [0076] 당뇨 마우스에 PBS를 주사한 군(DM+PBS)의 음경에서 정상 마우스(Control)에 비해 혈관내피세포의 수가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있다. 여기서, 대조군은 제1 군 스트렙토조토신을 주사하지 않은 것을 제외하고는, 실험군과 동일하게 준비된 음경조직 절편에 대한 결과이다. HGF 단백질을 1회(DM+HGF single) 및 2회 투여한 군(DM+HGF double)에서 그렇지 않은 군(DM+PBS: HGF 단백질 대신 PBS를 투여한 군)에 비하여 혈관내피세포 특이적 단백질의 발현이 증가되었다. 도 2B는 음경해면체 면적 중에 c-Met의 발현량을 통계 처리하여 그래프로 나타낸 그림이다. 도 2C는 음경해면체 면적 중에 혈관내피세포의 발현량을 통계 처리하여 나타낸 그래프이다. 이는 당뇨에 의하여 감소된 혈관내피세포가 HGF 단백질에 의하여 그의 재생이 유도되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.
- [0077] 도 2D는 당뇨 마우스의 음경조직에서 HGF 단백질 투여군과 대조군의 평활근세포 특이적 단백질인 SMA의 발현 정도 및 HGF 수용체인 c-Met을 나타낸 공초점 현미경 사진이다. 도 2D에 나타난 바와 같이, 당뇨 마우스에 PBS를 주사한 군(DM+PBS)의 음경에서 정상 마우스에 비해 혈관 평활근세포의 수가 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있다. 여기서, 대조군은 제1 군 스트렙토조토신을 주사하지 않은 것을 제외하고는, 실험군과 동일하게 준비된 음경조직 절편에 대한 결과이다. HGF 단백질을 1회(DM+HGF single) 및 2회 투여한 군(DM+HGF double)에서 그렇지 않은 군(DM+PBS: HGF 단백질 대신 PBS를 투여한 군)에 비하여 평활근세포 특이적 단백질의 발현이 증가되었다. 도 2D와 2E는 당뇨에 의하여 감소된 평활근세포가 HGF 단백질에 의하여 그의 재생이 유도되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.
- [0078] **(3) 과산화물 음이온의 생성을 알 수 있는 히드로에티딘 반응 분석**
- [0079] 히드로에티딘은 산화환원에 민감한 프로브(probe)로 세포 속의 과산화물 음이온을 탐지하는데 사용한다. 과산화물(Superoxide)과 히드로에티딘이 반응하면 에티디움(ethidium)이라는 2개 전자 산화 생성물(two-electron oxidized product)이 생성되고 에티디움은 DNA에 붙어 500-530nm의 파장을 흡수하여 590-620nm의 형광을 낸다. 활성 산소 중 하나인 과산화물 음이온은 반응성이 강한 음이온 유리기로 NADPH 산화 효소에 의해 다량으로 만들어져 유해성을 띄며 DNA 손상까지 일으킬 수 있는 물질이다.
- [0080] 이에 본 발명자들은 정상 마우스에 스트렙토조토신 투여 후 음경 발기조직 내 과산화물 음이온의 생성여부를 조사하고자 히드로에티딘을 통한 반응 정도를 확인하였다.
- [0081] 상기에 명시된 방법으로 항-PECAM-1 항체로 형광면역염색을 하고 마지막 세척을 마친 후 히드로에티딘 [1mM in PBS]을 30분 처리한 후 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 컨포칼 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0082] 도 3는 당뇨 마우스의 음경조직에서 HGF 단백질 투여군과 대조군의 과산화물 음이온과 반응하는 히드로에티딘을 처리한 후 발광 정도를 나타낸 공초점 현미경 사진이다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 당뇨 마우스에 PBS를 주사

한 군(DM+PBS)의 음경에서 정상 마우스(Control)에 비해 과산화물 음이온이 현저하게 증가되어 있음을 알 수 있다. 여기서, Control은 제1 군 스트렙토조토신을 주사하지 않은 것을 제외하고는, 실험군과 동일하게 준비된 음경조직 절편에 대한 결과이다. HGF 단백질을 2회 투여한 군(DM+HGF double)에서 그렇지 않은 군(DM+PBS: HGF 단백질 대신 PBS를 투여한 군, DM+HGF single: HGF 단백질을 1회 투여한 군)에 비하여 과산화물 음이온의 생성이 감소되었다. 도 3B는 음경해면체 면적 중에 히드로에티딘의 발현량을 통계 처리하여 나타낸 그래프이다. 이는 당뇨에 의하여 증가된 과산화물 음이온이 HGF 단백질에 의하여 그의 생성이 감소되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0083] (4) 퍼옥시나이트라이드의 생성을 알 수 있는 니트로티로신 반응의 여부 분석

산화질소(Nitric oxide, NO)는 중요한 세포독성 매개체로 산화질소 합성효소(NO synthase, NOS)에 의해 생산된다. 최근에는 NO에 의한 직접적인 손상보다는 NO와 과산화물(superoxide)의 반응으로 생성되는 퍼옥시나이트라이드(ONOO-)가 세포에 더 큰 손상을 입히는 것으로 보고되고 있다. 퍼옥시나이트라이드는 단백질의 티로신기를 질소화하고 설파히드릴(sulfahydryl)기를 산화하여 세포막 지질의 과산화, DNA의 분열, 미토콘드리아에서 전해질 이동을 저해시키고 칼슘을 유출시켜 세포에서의 에너지 생산을 방해하여 세포 괴사를 초래하는 등 세포손상에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 퍼옥시나이트라이드는 단백질의 티로신기를 질화하여 3-니트로티로신으로 변화시키기 때문에 니트로티로신에 대한 면역염색을 시행하면 퍼옥시나이트라이드의 존재 및 활성도를 간접적으로 알 수 있다.

이에 본 발명자들은 정상 마우스에 스트렙토조토신 투여 후 음경 발기조직 내 퍼옥시나이트라이드의 생성여부를 조사하고자 니트로티로신을 염색해 발현 정도를 확인해 보았다.

상기에 명시된 방법으로 항-PECAM-1 항체와 항-니트로티로신 항체로 형광면역염색을 하고 두 번째 항체(TRITC-표지된 항-랫 항체, FITC-표지된 항-가토 항체)를 반응시켰다. 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

도 4A는 당뇨 마우스의 음경조직에서 HGF 단백질 투여군과 대조군의 니트로티로신의 발현 정도를 나타낸 공초점 현미경 사진이다. 도 4A에 나타난 바와 같이, 당뇨 마우스에 PBS를 주사한 군(DM+PBS)의 음경에서 정상 마우스(Control)에 비해 니트로티로신이 현저하게 증가되어 있음을 알 수 있다. 여기서, 대조군은 제1 군 스트렙토조토신을 주사하지 않은 것을 제외하고는, 실험군과 동일하게 준비된 음경조직 절편에 대한 결과이다. HGF 단백질을 2회 투여한 군(DM+HGF double)에서 그렇지 않은 군(DM+PBS: HGF 단백질 대신 PBS를 투여한 군, DM+HGF single: HGF 단백질을 1회 투여한 군)에 비하여 니트로티로신의 생성이 감소되었다. 도 4B는 음경해면체 면적 중에 니트로티로신의 발현량을 통계 처리하여 나타낸 그래프이다. 이는 당뇨에 의하여 증가된 퍼옥시나이트라이드가 HGF 단백질에 의하여 그의 생성이 감소되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0088] (5) 혈관주위세포(pericyte) 특이적 단백질인 PDGFR-beta 발현분석

혈관 신생이란 이미 존재하는 혈관으로부터 미세혈관이 생성되는 것을 의미한다. 이러한 혈관 신생의 단계 중 마지막 단계로, 혈관을 구성하는 혈관주위세포(pericyte)가 들어가게 되어 내피세포-혈관주위세포의 구조를 형성함으로써, 새로운 혈관이 성숙되고 안정화된다. 이때, 혈관내피세포로부터 분비되는 혈소판 유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF-BB)가 혈관주위세포의 모집과 차별화에 기여하는 것으로 알려져 있다.

이에 본 발명자들은 음경 조직에 HGF를 주사하여 PDGFR-beta의 발현을 조사해 보았다. 이에 본 발명자들은 정상 마우스에 스트렙토조토신 투여 후 음경 발기조직 내 혈관주위세포 생성여부를 조사하고자 PDGFR-beta를 염색해 발현 정도를 확인해 보았다.

상기에 명시된 방법으로 항-PECAM-1 항체와 항-PDGFR-beta 항체로 형광면역염색을 하고 두 번째 항체(TRITC-표지된 항-랫 항체, FITC-표지된 항-가토 항체)를 반응시켰다. 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5A는 당뇨 마우스의 음경조직에서 HGF 단백질 투여군과 대조군의 혈관주위세포의 발현 정도를 나타낸 공초점 현미경 사진이다. 도 5A에 나타난 바와 같이, 당뇨 마우스에 PBS를 주사한 군(DM+PBS)의 음경에서 정상 마우스(Control)에 비해 혈관주위세포의 양이 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있다. 여기서, 대조군은 제1 군 스트렙토조토신을 주사하지 않은 것을 제외하고는, 실험군과 동일하게 준비된 음경조직 절편에 대한 결과이다. HGF 단

백질을 2번 투여한 군(DM+HGF double)에서 그렇지 않은 군(DM+PBS: HGF 단백질 대신 PBS를 투여한 군, DM+HGF single: HGF 단백질을 1번 투여한 군)에 비하여 혈관주위세포의 양이 증가되었다. 도 5B는 음경해면체 면적 중에 혈관주위세포의 양을 통계 처리하여 나타낸 그래프이다. 이는 당뇨에 의하여 감소된 혈관주위세포가 HGF 단백질에 의하여 그의 양이 증가되고, 그에 따라 발기력이 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0093] **실시예 2. 마우스 음경조직을 일차배양해서 얻은 내피세포로 고혈당 유도 후 HGF 단백질의 효과 평가**

[0094] 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포를 대상으로 하였고, 총 4개의 군으로 나누어 생체의 실험을 진행하였다(1군, NG (Normal Glucose), 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포+Glucose 5mmol, 48시간 처리; 2군, NG+HGF, 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포+Glucose 5mmol, 48시간 처리 후 HGF 단백질 200ng/ml, 24시간 처리; 3군, HG (고혈당), 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포+Glucose 30mmol, 48시간 처리; 4군, HG+HGF, 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포+Glucose 30mmol, 48시간 처리 후 HGF 단백질 200ng/ml, 24시간 처리).

[0095] Glucose와 HGF 처리 후 HGF 수용체인 c-Met과 혈소판-내피세포 부착 분자-1(PECAM-1)에 대한 면역조직화학염색을 시행하였고, 튜브 형성 분석(tube formation assay)을 통해 튜브 형성 정도를 알아보았으며, TUNEL(TdT mediated dUTP biotin nick end labeling method) 분석을 수행하여 세포사멸사(apoptosis) 정도를 조사하였다.

[0096] 그 결과, 마우스 음경 조직을 일차 배양하여 얻은 혈관내피세포에서 c-Met이 발현됨을 알 수 있었고, 정상 글루코스(normal glucose) 군이 고혈당 군보다 c-Met이 더 발현되었다. HGF 단백질 처리군은 그렇지 않은 군에 비해 c-Met의 발현량이 높음을 알 수 있었다. PECAM-1 염색 및 튜브 형성 분석 결과 고혈당군에서 PECAM-1의 발현과 튜브 형성이 적었지만, HGF 단백질 처리군에서 회복됨을 알 수 있었다. 세포사멸사를 알 수 있는 TUNEL 분석 결과 고혈당군에서 세포사멸사가 많이 일어났지만 HGF 단백질 처리군에서 세포사멸사의 감소를 확인하였다. 이하에서 상술하고자 한다.

[0097] **(1) HGF의 수용체인 c-MET의 발현 양상 분석**

[0098] 마우스 음경 조직에서 내피세포를 얻는 일차배양 실험방법은 다음과 같다. 8주령 C57BL/6J 마우스의 음경 조직을 잘라 요도와 배정맥을 제거한 후 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣는다. 클린 벤치(clean bench)에서 HBSS와 PBS로 세척 후 조직을 잘라 60-mm 세포 배양 접시(cell culture dish)에 시딩(seeding) 하고 bFGF(recombinant mouse FGF basic)가 들어간 매트릭젤(matrigel)(5 ng/ml bFGF:matrigel=1:50)로 조직을 덮는다. 이 상태로 37℃에서 5분 정도 인큐베이션한다. 매트릭젤이 굳으면 Complement medium 199(20% Fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin 용액, 50 mg/ml heparin 및 5 ng/ml bFGF 포함) 3ml을 넣고 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 배양한다. 3주정도 후 조직에서 나온 세포들이 배양 접시에 차면 0.2% 젤라틴 코팅한 배양 접시에 계대 배양한다.

[0099] 본 발명자들은 마우스 음경 조직에서 내피세포를 얻어 생체 외 실험을 진행하였다.

[0100] 음경 조직에서 얻은 내피세포를 형광 염색하는 방법은 다음과 같다. 12-웰 세포 배양 접시를 준비하여 커버 슬라이드(cover slide)를 넣고 0.2% 젤라틴 코팅을 한다. 세포를 계대 배양하여 웰에 넣고 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 1-2일 정도 배양한다. 세포가 붙어있는 슬라이드를 웰에서 꺼내어 세척 버퍼 (2% FBS + 0.1% Sodium Azide in PBS)에 3회 세척한 후에 4% 파라포름알데히드에서 약 10분간 실온에서 세포를 고정시켰다. 세척 버퍼로 3번 세척하고, 차가운 메탄올로 1-2분정도 처리하여 투과성을 높인 후, 세척 버퍼로 세척하고, 비특이적 단백질을 차단 버퍼(5% BSA in PBS)로 1시간 블로킹한다. 첫 번째 항체(항-c-Met 항체)를 1:100 비율로 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 세척 버퍼로 다시 3회 세척한 다음, c-Met에 특이적으로 반응한 항체를 형광으로 확인할 수 있도록 제작된 두 번째 항체 (FITC-표지된 항-가토 항체)를 1:200 비율로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 세척 버퍼로 다시 3회 세척한 후에 핵을 염색할 수 있는 DAPI가 들어간 마운팅 용액(mounting solution)을 넣고 커버 슬라이드로 덮는다. 그 후, 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0101] 도 6은 마우스 음경 조직에서 얻은 내피세포에 글루코스를 처리(30mmol) 하여 고혈당을 유도한 후, HGF 단백질

처리군과 대조군에서 HGF 수용체인 c-Met의 발현을 나타낸 컨포칼 현미경 사진이다. 도 6에 나타난 바와 같이, 정상군(normal glucose)보다 고혈당군에서 c-Met의 발현이 감소하였고, 정상군 및 고혈당군에서 HGF 단백질을 처리한 경우 HGF 수용체인 c-Met의 발현이 증가하였다. 이는 마우스 음경 조직에서 얻은 내피세포에서 HGF 단백질을 처리했을 때 그 수용체가 증가함으로써 HGF 단백질이 음경 내피세포에 효과가 있음을 증명한 결과이다.

[0102] (2) 혈관내피세포 특이적 단백질인 PECAM-1 발현 분석

본 발명자들은 음경 조직에서 얻은 내피세포에 HGF 단백질 투여 후 혈관내피세포의 변화를 조사하고자 혈관내피세포에 특이적 단백질인 PECAM-1의 발현정도를 살펴보았다. 상기에 명시된 방법으로 항-PECAM-1 항체로 형광면역염색을 하고 마지막 세척을 마친 후 핵을 염색할 수 있는 DAPI가 들어간 마운팅 용액을 넣고 커버 슬라이드로 덮는다. 그 후 형광현미경이나 형광물질을 확인할 수 있는 공초점 현미경으로 발현 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, NG군과 NG+HGF군은 PECAM-1 발현의 차이가 없었다. HG군에서는 NG군에 비해 PECAM-1 발현이 현저하게 감소 되었으며, HG+HGF군에서는 대조군(NG군) 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 이는 고혈당 조건에 의해서 감소된 내피세포의 양이 HGF 단백질에 의하여 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0104] (3) 신생혈관형성 과정 중 튜브 형성 정도를 평가

혈관신생은 혈관내피세포의 단순한 증식만이 아닌, 여러 단계의 복잡하고 순차적인 과정으로 구성되며, 각각 단계는 혈관 네트워크의 구축에 반드시 필요하다. 혈관신생 과정을 크게 세가지로 나누어 살펴보면, 증식(proliferation), 이동(migration), 튜브 형성(tube formation) 과정으로 나뉠 수 있다. 튜브 형성 단계는 혈관신생 과정 중 이동, 증식한 내피세포들이 분열을 계속하여 속이 빈 튜브 모양으로 성장하여 최종 혈관으로 분화하고 여기에 혈액이 들어가 혈관 생성이 완성되는 단계이다. 본 연구자들은 튜브 형성 분석을 통해 HGF 단백질이 혈관신생 과정 중 튜브 형성에 관여하는지 여부를 관찰하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 이동

음경 조직을 일차배양 해서 얻은 내피세포에 혈청 기아(serum starvation)를 24시간 한 후 상기에 명시된 4개의 군으로 나누어 각각 글루코스와 HGF 단백질을 처리하여 48-well 세포 배양 접시의 매트릭셀 위에 시딩하고 37℃, 5% CO2 인큐베이터에서 배양한다.

도 8는 4, 8, 24시간 후 튜브 형성 정도를 현미경을 통해 관찰한 결과이다. 튜브는 8시간 이후부터 뚜렷하게 생성되었고, HG군에서 튜브 형성이 현저하게 감소되었다가 HG+HGF군에서 대조군 수준으로 회복됨을 관찰할 수 있었다. 이는 고혈당 조건에 의해서 감소된 튜브의 형성이 HGF 단백질에 의하여 회복된다는 것을 증명하는 결과이다.

[0109] (4) 세포 예정사 정도를 알 수 있는 TUNEL 분석

TUNEL 분석은 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)라는 효소를 이용해 디곡시제닌(digoxigenin)이 표지된 UTP(uridine triphosphate)를 DNA 조각 말단에 붙여 DNA 단편화가 일어났는지 여부를 파악하는 실험방법이다. 세포 핵 안의 DNA가 분해되는 과정에서 DNA 단편화가 일어나면 2중 나선 구조에 분열이 생기고 N 말단의 3'-OH기가 노출되게 되어 N 말단에 TUNEL이 결합하는 방법으로 분석한다. TUNEL 분석 결과를 도 9에 나타내었다. 이때 세포의 핵을 염색하기 위하여 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 사용하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, HG군에서 NG군, NG+HGF군에 비해 세포사멸사가 증가 하였고, HG+HGF군에서 세포사멸사가 현저히 감소하였다. 이는 고혈당 조건에 의해서 증가된 세포사멸사가 HGF 단백질에 의하여 감소된다는 것을 증명하는 결과이다.

이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 HGF 단백질은 당뇨에 의해 감소된 혈관내피세포, 평활근세포, 혈관주위세포의 재생을 유도하고, 혈관내피세포, 평활근세포, 혈관주위세포 특이적 단백질인 PECAM-1, SMA, PDGF-beta의 발현을 증가시켰다. 또한 HGF 단백질은 혈관내피세포에서 튜브생성 촉진 및 세포사멸사 억제효과를 보였다. 상기 기전을 통해서 HGF 단백질은 음경해면체 내압을 상승시킴으로써 발기부전에 대하여 우수한 발기력 개선 효과가 있어, 발기부전의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0112] 이하 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아니다.

[0113] **제제예 1. 약학적 조성물의 제제**

[0114] **1-1. 산제의 제조**

[0115] HGF 단백질 20 mg

[0116] 유당 100 mg

[0117] 탈크 10 mg

[0118] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0119] **1-2. 정제의 제조**

[0120] HGF 단백질 10 mg

[0121] 옥수수전분 100 mg

[0122] 유당 100 mg

[0123] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0124] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제 를 제조한다.

[0125] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0126] HGF 단백질 10 mg

[0127] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0128] 락토오스 14.8 mg

[0129] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0130] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0131] **1-4. 주사제의 제조**

[0132] HGF 단백질 10 mg

[0133] 만니톨 180 mg

[0134] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0135] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0136] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0137] **1-5. 액제의 제조**

[0138] HGF 단백질 20 mg

[0139] 이성화당 10 g

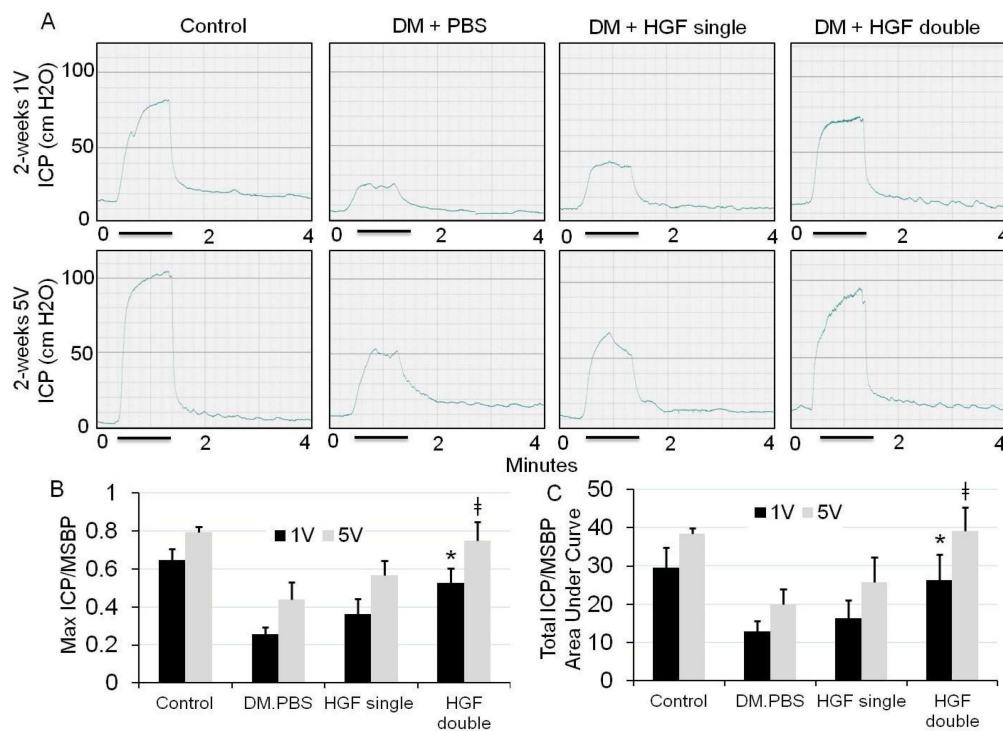
[0140] 만니톨 5 g

- [0141] 정제수 적량
- [0142] 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.
- [0143] **제제예 2. 식품 조성물의 제제**
- [0144] **2-1. 건강식품의 제조**
- [0145] HGF 단백질 100 mg
- [0146] 비타민 혼합물 적량
- [0147] 비타민 A 아세테이트 70 μg
- [0148] 비타민 E 1.0 mg
- [0149] 비타민 B1 0.13 mg
- [0150] 비타민 B2 0.15 mg
- [0151] 비타민 B6 0.5 mg
- [0152] 비타민 B12 0.2 μg
- [0153] 비타민 C 10 mg
- [0154] 비오틴 10 μg
- [0155] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0156] 엽산 50 μg
- [0157] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0158] 무기질 혼합물 적량
- [0159] 황산제1철 1.75 mg
- [0160] 산화아연 0.82 mg
- [0161] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0162] 제1인산칼륨 15 mg
- [0163] 제2인산칼슘 55 mg
- [0164] 구연산칼륨 90 mg
- [0165] 탄산칼슘 100 mg
- [0166] 염화마그네슘 24.8 mg
- [0167] 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.
- [0168] **2-2. 건강음료의 제조**
- [0169] HGF 단백질 100 mg
- [0170] 비타민 C 15 g
- [0171] 비타민 E(분말) 100 g

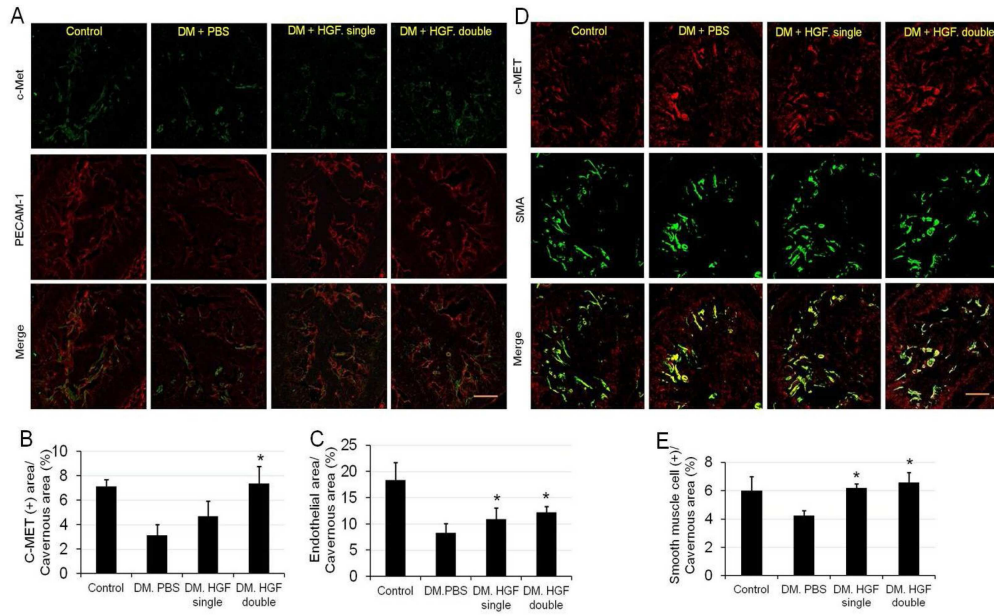
- [0172] 젖산철 19.75 g
- [0173] 산화아연 3.5 g
- [0174] 니코틴산아미드 3.5 g
- [0175] 비타민 A 0.2 g
- [0176] 비타민 B1 0.25 g
- [0177] 비타민 B2 0.3 g
- [0178] 물 정량
- [0179] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0180] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

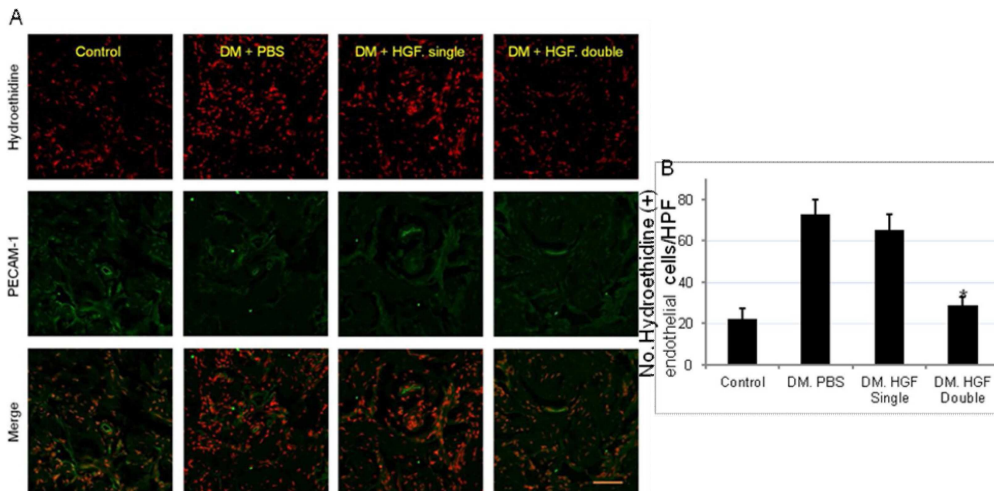
도면1



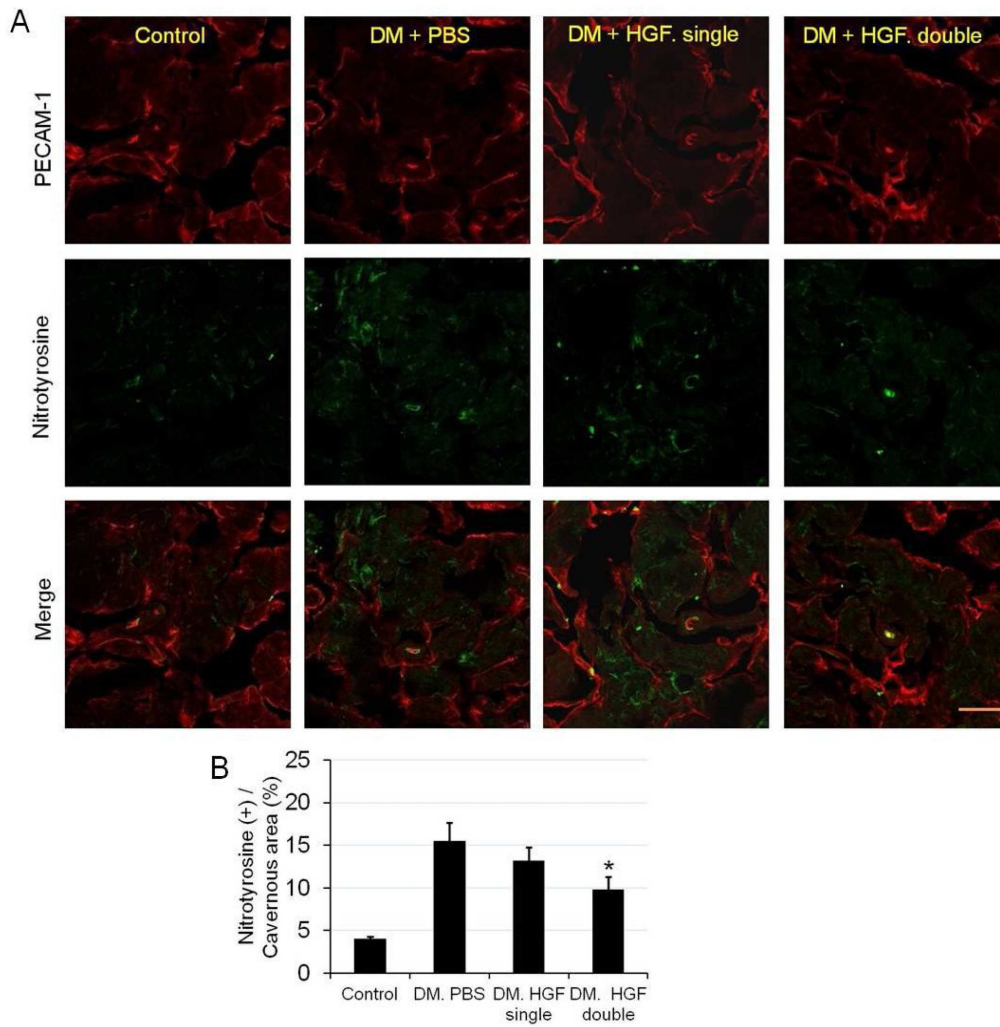
도면2



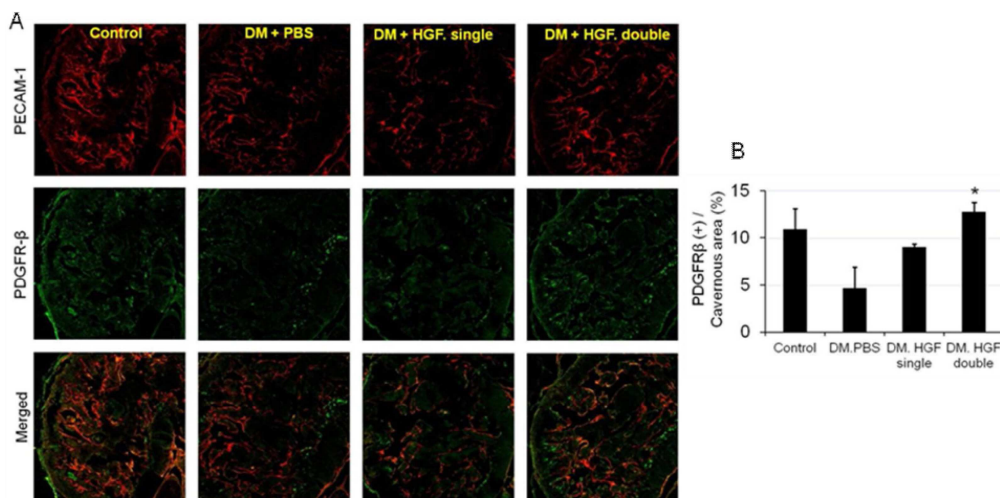
도면3



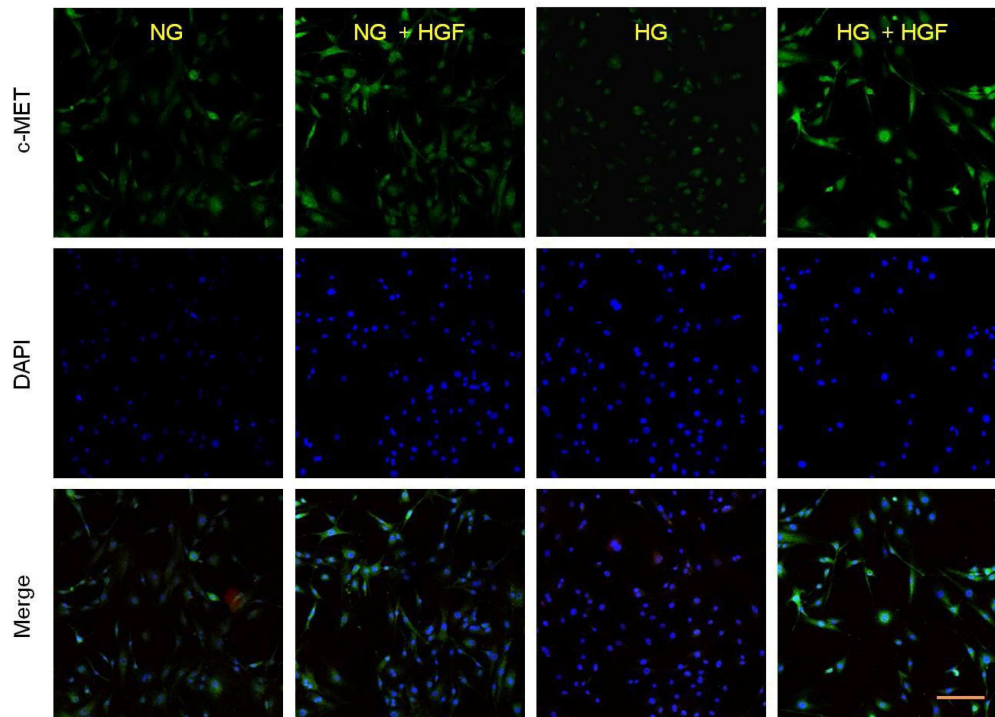
도면4



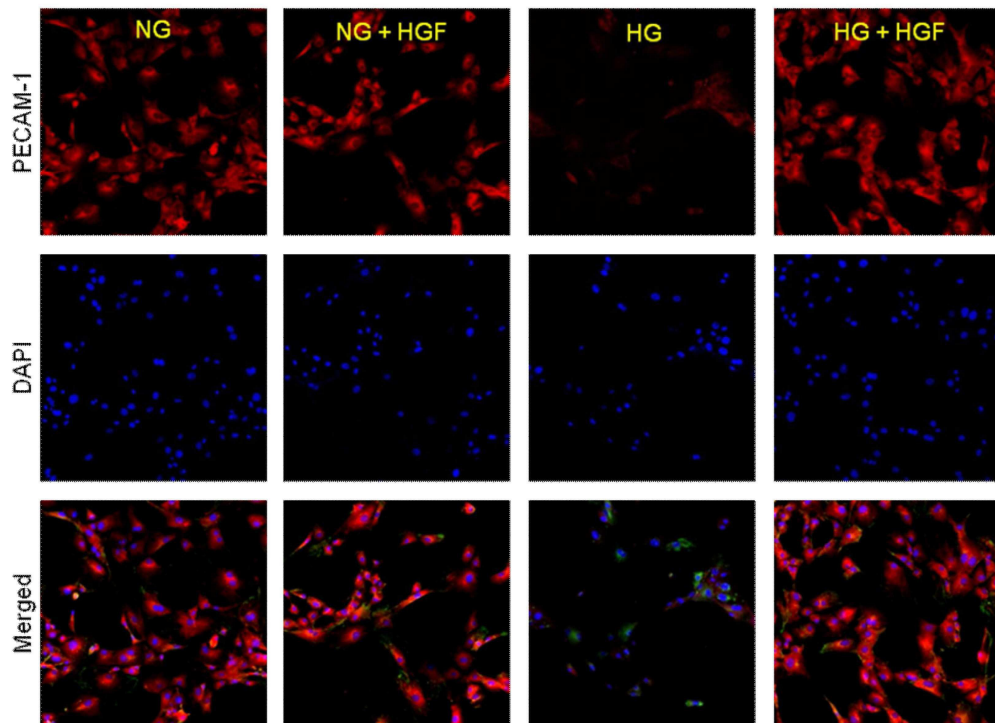
도면5



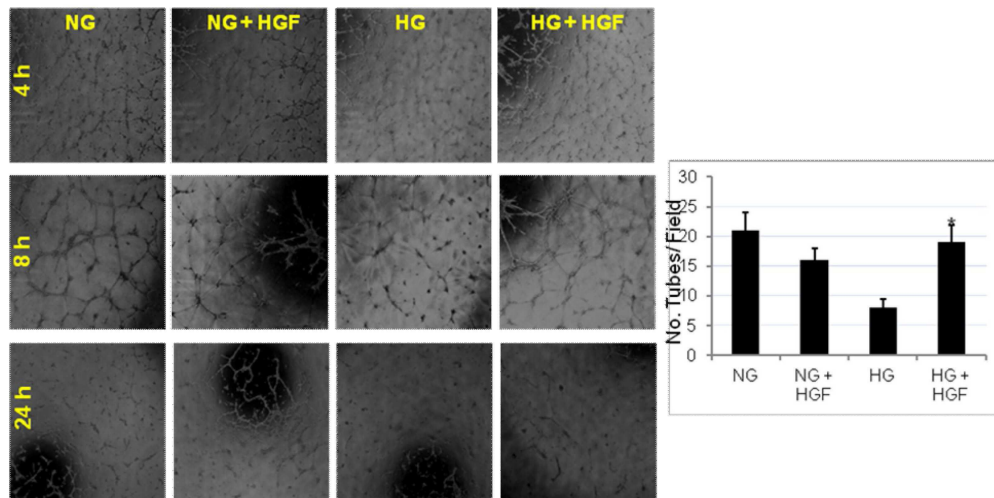
도면6



도면7



도면8



도면9

