(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 10 월 1 일 (01.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/147575 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/002993

(22) 국제출원일: 2015 년 3 월 26 일 (26.03.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0036243 2014 년 3 월 27 일 (27.03.2014) KR

(71) 출원인: **사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION)** [KR/KR]; 140-893 서울시 용산구 이태원로 55 길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이성원 (LEE, Sung Won)**; 135-272 서울시 강남구 언주로 30 길 26 타워팰리스 G 동 4403 호, Seoul (KR). **성현환 (SUNG, Hyun Hwan)**; 134-033 서울시 강동구 양재대로 95 길 53 중앙하이츠아파트 1204 호, Seoul (KR). **채미리 (CHAE, Mee Ree)**; 135-520 서울시 강남구 광평로 19 길 10 까치마을아파트 1001 동 404 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo Hyun)**; 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

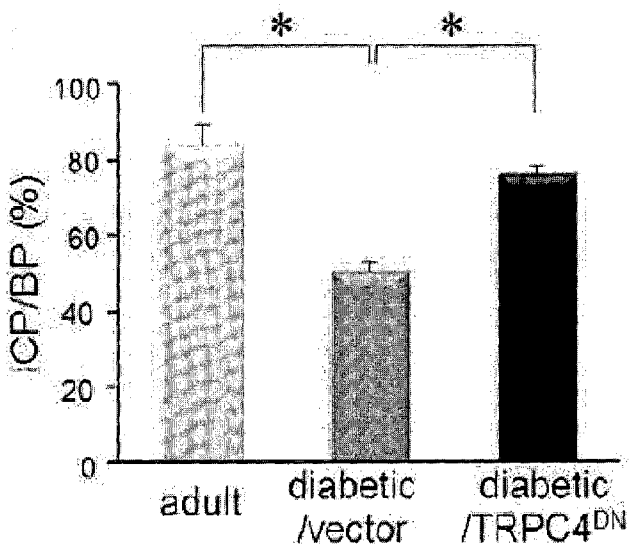
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING ERECTILE DYSFUNCTION, CONTAINING TRPC4 INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : TRPC4 의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물

Fig. 6d



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening an erectile dysfunction medicine candidate, the method comprising a step of measuring the inhibition of TRPC4 activity; and a pharmaceutical composition for treating erectile dysfunction, containing a TRPC4 inhibitor as an active ingredient. The present invention can effectively screen an erectile dysfunction medicine candidate by using a method for measuring TRPC4 activity. The TRPC4 activity inhibitor of the present invention is very effective in relieving the syndrome of erectile dysfunction, and thus can be developed for an erectile dysfunction medicine.

(57) 요약서: 본 발명은 TRPC4 의 활성 억제 측정 단계를 포함하는 발기 부전 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법 및 TRPC4 의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 TRPC4 의 활성 측정 방법을 이용하면 발기부전 치료제 후보물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다. 본 발명의 TRPC4 의 활성 억제제는 발기부전의 증상 완화에 매우 효과적이므로 발기부전 치료제로 개발될 수 있다.

WO 2015/147575 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

TRPC4의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물

【기술 분야】

본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI11C1489(A111535)에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 "질환극복기술개발/질병중심 중개 기반연구 비뇨생식기계통의 질환", 연구과제명은 "음경해면체의 이온통로 유전자 조절을 통한 안전한 발기부전 치료법 개발", 주관기관은 삼성서울병원, 연구기간은 2011. 11. 01 ~ 2014. 10. 31 이다.

본 특허출원은 2014년 03월 27일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0036243 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 TRPC4(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

【배경 기술】

발기부전(Erectile dysfunction, ED)은 주로 40 세 이상의 남성에게 영향을 주는 질환으로서 미국에서 1 천만명 내지 3 천만명의 남성이 이 질환을 갖는 것으로 알려져 있다(2, 3). 이 질환의 연간 발생율은 나이가 증가함에 따라 증가하는데, 1,000 명의 남성당, 40-49 세, 50-59 세, 및 60-69 세의 경우 각각 12.4, 29.8, 및 46.4 의 케이스가 발병되는 것으로 보고되고 있다(4). 발기는 음경해면체 평활근(penile corpus smooth muscle)의 수축과 이완 사이의 균형의 결과이다. 산화질소(nitric oxide, NO) 및 cGMP (cyclic guanyl monophosphate) 경로가 음경평활근 이완에서 매우 중요한 역할을 한다. NO-cGMP 경로에 기초한 PDE5 억제제들이 발기부전증 치료제로 소개되었으며, 5 천만명 이상의 환자들이 발기부전의

원인에 관계없이 PDE5 억제제에 의해 성공적으로 치료되었다(5). 그러나, 30-40%의 발기부전 환자들이 PDE5 억제제에 더 이상 반응하지 않으며, 추가적으로 침습적인 치료를 받아야 한다(6, 7). RhoA/ROCK 경로, maxi-K 채널, 및 TRP 채널과 같은 다른 병리생리학적 경로도 발기부전에 관여되어 있다고 알려져 있어, PDE5 억제제로부터 만족스런 결과를 얻지 못한 환자의 치료를 위해 가능성이 있는 새로운 화합물에 대한 연구가 지속되고 있다(8). TRP (Transient receptor potential) 패밀리는 이온 채널 유전자의 그룹이며, TRPC (canonical), TRPV (vallinoid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin) 및 TRPML (mucolipin)을 포함하는 6 개의 서브 패밀리로 나누어진다. 이들 중에서 TRPC 는 비선택적 Ca^{2+}-투과성 양이온 채널이고 7 개의 채널(TRPC1-TRPC7)을 가지고 있다. TRPC 채널은 다양한 크기의 혈관뿐만 아니라 자궁 및 위장관의 평활근 세포에서도 발현된다(9). 최근 TRPC 채널이 평활근의 기능 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(10). 따라서, 다양한 질환의 병태생리학적 기전에서 TRPC 채널의 관련성과 중요성이 제시되고 있다(11). 또한, 많은 연구자들은 최근 TRPC 채널의 기능 이상이 다양한 당뇨 합병증의 발생과 관련성이 있다는 보고에 주목하고 있다(12). 그러나, TRPC 채널 기능 장애가 당뇨병을 갖는 발기부전에 어느 정도 기여하는 지에 대해서는 거의 보고된 바 없다. TRPC4 채널은 발기부전 발생 및 진행에 핵심적인 내피세포의 기능 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(14). 당뇨에서 TRPC4 채널의 발현이 mRNA 및 단백질의 수준에서 증가하였다고 하는 보고되었으나(15, 16), 당뇨질환 발기부전 음경해면체 평활근에서 TRPC4 채널의 발현 변화은 아직 알려진 바가 없다.

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.

【선행기술문헌】

【특허문헌】

대한민국 공개특허 제10-2011-0016591

【비특허문헌】

1. Consensus development conference statement. National Institutes of Health. Impotence. December 7-9, 1992. Int J Impot Res 5:181-284.

2. Shamloul, R., and Ghanem, H. 2013. Erectile dysfunction. Lancet 381:153-165.

3. Feldman, H.A., Goldstein, I., Hatzichristou, D.G., Krane, R.J., and McKinlay, J.B. 1994. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urol 151:54-61.

4. Johannes, C.B., Araujo, A.B., Feldman, H.A., Derby, C.A., Kleinman, K.P., and McKinlay, J.B. 2000. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. J Urol 163:460-463.

5. Hatzimouratidis, K., Amar, E., Eardley, I., Giuliano, F., Hatzichristou, D., Montorsi, F., Vardi, Y., Wespes, E., and European Association of, U. 2010. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. Eur Urol 57:804-814.

6. Eardley, I., Donatucci, C., Corbin, J., El-Meliegy, A., Hatzimouratidis, K., McVary, K., Munarriz, R., and Lee, S.W. 2010. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. J Sex Med 7:524-540.

7. Hatzimouratidis, K., and Hatzichristou, D.G. 2005. A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient ? Drugs 65:1621-1650.

8. Albersen, M., Shindel, A.W., Mwamukonda, K.B., and Lue, T.F. 2010. The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction. Expert Opin Emerg Drugs 15:467-480.

9. Inoue, R., Jensen, L.J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A., and Ito, Y. 2006. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. Circ Res 99:119-131.

10. Gonzalez-Cobos, J.C., and Trebak, M. 2010. TRPC channels in smooth muscle cells. Front Biosci 15:1023-1039.

11. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J.A. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. Physiol Rev 87:165-217.

12. Graham, S., Yuan, J.P., and Ma, R. 2012. Canonical transient receptor potential channels in diabetes. Exp Biol Med (Maywood) 237:111-118.

13. Jung, J.H., Kim, B.J., Chae, M.R., Kam, S.C., Jeon, J.H., So, I., Chung, K.H., and Lee, S.W. 2010. Gene transfer of TRPC6 (dominant negative) restores erectile function in diabetic rats. J Sex Med 7:1126-1138.

14. Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., et al. 2001. Lack of an endothelial store-operated Ca2+ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. Nat Cell Biol 3:121-127.

15. Chung, A.W., Au Yeung, K., Chum, E., Okon, E.B., and van Breemen, C. 2009. Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. Eur J Pharmacol 613:114-118.

16. Evans, J.F., Lee, J.H., and Ragolia, L. 2009. Ang-II-induced Ca(2+) influx is mediated by the 1/4/5 subgroup of the transient receptor potential proteins in cultured aortic smooth muscle cells from diabetic Goto-Kakizaki rats. Mol Cell Endocrinol 302:49-57.

17. Palmer, L.S., Valcic, M., Melman, A., Giraldi, A., Wagner, G., and Christ, G.J. 1994. Characterization of cyclic AMP accumulation in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. J Urol 152:1308-1314.

18. Zhao, W., and Christ, G.J. 1995. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction. II. Calcium mobilization in

cultured human corporal smooth muscle cells. J Urol 154:1571-1579.

19. Rehman, J., Chenven, E., Brink, P., Peterson, B., Walcott, B., Wen, Y.P., Melman, A., and Christ, G. 1997. Diminished neurogenic but not pharmacological erections in the 2- to 3-month experimentally diabetic F-344 rat. Am J Physiol 272:H1960-1971.

20. Freichel, M., Schweig, U., Stauffenberger, S., Freise, D., Schorb, W., and Flockerzi, V. 1999. Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system. Cell Physiol Biochem 9:270-283.

21. Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X., and Schreibmayer, W. 1998. Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. FEBS Lett 437:101-106.

22. Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. 1999. Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. J Physiol 518 Pt 2:345-358.

23. Abramowitz, J., and Birnbaumer, L. 2009. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. FASEB J 23:297-328.

24. Stenmark, K.R., Fagan, K.A., and Frid, M.G. 2006. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. Circ Res 99:675-691.

25. Fantozzi, I., Zhang, S., Platoshyn, O., Remillard, C.V., Cowling, R.T., and Yuan, J.X. 2003. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca2+ entry in human pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285:L1233-1245.

26. Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., and Ito, H. 2008. TRP channel and cardiovascular disease. Pharmacol Ther 118:337-351.

27. Yip, H., Chan, W.Y., Leung, P.C., Kwan, H.Y., Liu, C., Huang, Y.,

Michel, V., Yew, D.T., and Yao, X. 2004. Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. Histochem Cell Biol 122:553-561.

28. Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S.M., Paria, B.C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A.B. 2002. Impairment of store-operated Ca2+ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. Circ Res 91:70-76.

29. Xie, A., Aihara, Y., Bouryi, V.A., Nikitina, E., Jahromi, B.S., Zhang, Z.D., Takahashi, M., and Macdonald, R.L. 2007. Novel mechanism of endothelin-1-induced vasospasm after subarachnoid hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab 27:1692-1701.

30. Zhang, S., Remillard, C.V., Fantozzi, I., and Yuan, J.X. 2004. ATP-induced mitogenesis is mediated by cyclic AMP response element-binding protein-enhanced TRPC4 expression and activity in human pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 287:C1192-1201.

31. Cooper, M.E., Bonnet, F., Oldfield, M., and Jandeleit-Dahm, K. 2001. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. Am J Hypertens 14:475-486.

32. Mita, M., Ito, K., Taira, K., Nakagawa, J., Walsh, M.P., and Shoji, M. 2010. Attenuation of store-operated Ca2+ entry and enhanced expression of TRPC channels in caudal artery smooth muscle from Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 37:670-678.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 발기부전의 효과적인 치료제 개발을 위해 발기부전의 발생 메카니즘에 관하여 심도있게 연구하였으며, 그 결과 당뇨병을 갖는 발기부전 랫트 동물모델의 음경해면체 조직에서 TRPC4 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 발현이 상당한 정도로 상향 조절됨을 확인하였으며, 음경해면제 조직에서 TRPC4의 활성을

억제하면 발기부전의 치료 효과가 달성됨을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 목적은 TRPC4의 활성 억제 측정 단계를 포함하는 발기부전 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명의 목적은 TRPC4의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적은 TRPC4의 우성음성돌연변이체 단백질 및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 TRPC4의 우성음성돌연변이체 단백질 및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 발기부전 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다:

(a) TRPC4 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포에 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질에 의해 상기 세포에서 TRPC4의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 단계로서, 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질에 의해 TRPC4의 활성이 억제되는 경우 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질을 발기 부전 치료제 후보물질로 판단하는 단계.

본 발명자들은 TRPC4 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)가 당뇨병을 갖는 발기부전 동물의 음경해면체 조직의 평활근세포에서 상향 발현됨을 확인하였고, 상향 발현된 TRPC4의 활성을 억제하면 발기부전 증상을 현저히 완화시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서, TRPC4의 활성 또는 발현을 억제하는 물질을 선별함으로써 발기부전

치료제 후보물질을 스크리닝할 수 있다.

본 명세서에서 용어 "TRPC4의 활성 억제 후보물질" 은 TRPC4의 활성을 억제할 것이라고 추정되는 물질로서 발기부전에 치료 효과가 있을 것으로 기대하여 스크리닝에 사용되는 물질을 의미한다.

본 명세서에서 "TRPC4의 활성 억제 후보물질의 처리" 는 TRPC4의 활성 억제 후보물질과 세포와의 접촉 뿐만 아니라 후보물질을 세포안으로 도입시키는 것도 포함한다.

본 발명에서 TRPC4의 활성 억제 후보물질은 TRPC4 단백질의 활성을 억제하는 물질 뿐만 아니라, TRPC4 유전자의 발현 수준을 하향조절함으로써 결과적으로 TRPC4 단백질의 활성을 저감시키는 물질도 포함한다.

따라서, 본 발명의 TRPC4의 활성 억제 후보물질은 TRPC4 유전자의 발현 수준을 하향조절하는 물질로서, RNAi (RNA interference) 분자, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, 또는 miRNA를 포함하고, TRPC4 단백질에 결합하여 이의 활성을 억제하는 물질로서 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체, 인간화 항체, PNA(Peptide nucleic acid), 앱타머(aptamer), 저분자 또는 고분자 화합물, 및 우성음성돌연변이체 (dominant negative mutant)를 포함한다.

본 발명에서 후보물질로 사용될 수 있는 화합물은 합성 화합물 또는 천연물 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며, 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 또한, 화합물은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예컨대, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고체상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phaseor solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann

et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

본 발명에서 TRPC4를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터는 TRPC4를 코딩하는 핵산 분자를 벡터에 클로닝하여 제조할 수 있으며, 본 발명에서 벡터는 전형적으로 원핵 또는 진핵 숙주세포에서 핵산을 발현시키는 데에 요구되는 모든 추가적인 요소를 함유하는 발현 카세트 또는 전사 단위를 포함한다. 따라서, 본 발명의 벡터는 TRPC4를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 작동적으로 연결된 프로모터 이외에, 전사체의 효율적인 폴리아데닐화 서열, 전사 종결, 리보솜 결합 부위, 또는 번역 종결에 요구되는 신호서열을 포함하며, 부가적 요소로서, 증강요소(enhancer element), 이종 스플라이싱 신호 또는 핵 국재화 신호(NLS) 등이 포함될 수 있다. 재조합 벡터의 제조에 관한 내용은 선행 문헌 "Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2nd ed. 1989; 3rd ed., 2001)"; "Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual(1990)"에 설명되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

본 발명에서 상기 재조합 벡터로 세포를 형질전환시키는 방법은 리포좀 매개 전달법, 전기천공법, 유리 DNA 흡수를 증가시키는 화학물질, 식물체 내로 DNA의 직접적인 주입, 입자총 충격법, 바이러스 또는 화분을 이용한 형질전환 및 미세주입법(microprojection), 원형질에 대한 칼슘/폴리에틸렌글리콜법(Krenset et al, 1982; Negrutiu et al, 1987), 원형질의 전기천공법(Shillito et al, 1985), 미세주사법(microinjection)(Crossway et al, 1986), DNA 또는 RNA 코팅된 입자 충격법(Klein et al, 1987), 및 바이러스 감염에 의한 방법을 포함한다.

본 발명의 스크리닝 방법에 사용되는 세포는 원핵세포 및 진핵세포를 포함하며, 박테리아, 효모, 곤충세포, 및 동물세포를 포함하며, 바람직하게는 동물세포이다.

본 발명의 스크리닝 방법에서 TRPC4의 활성의 억제 여부의 측정은

이온 채널의 활성을 측정할 수 있는 방법을 사용하여 행하며, 바람직하게는 TRPC4가 발현된 세포에서 패치 클램프 (patch clamp) 방법을 사용한다. 패치 클램프에 대한 내용은 선행문헌 [Kandel E.R. et al., (2000). Principles of Neural Science, 4th ed.. McGraw-Hill, New York. pp. 152-153.; Hamill OP et al., (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". Pflvgers Archiv European Journal of Physiology 391 (2): 85-100.]에 개시되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 TRPC4(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 용어 "발기부전(Erectile dysfunction)"은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않는 상태의 질환을 의미하며, 바람직하게는 본 발명에서의 발기부전은 당뇨병성 발기부전을 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 TRPC4의 억제제는 TRPC4 유전자의 발현 억제제이다.

본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 TRPC4 유전자의 발현 억제제는 TRPC4 유전자에 특이적으로 결합하는 RNAi (RNA interference) 분자이다.

본 발명에서 상기 TRPC4 유전자에 특이적으로 결합하는 RNAi (RNA interference) 분자는 TRPC4 유전자 염기 서열에 상보적인 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, 또는 miRNA 이다.

본 명세서에서 용어 "안티센스(anti-sense) 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역(translation)을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 TRPC4 유전자 염기서열에 상보적이고 TRPC4 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, TRPC4 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6

내지100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

본 명세서에서 용어 "siRNA (small interfering RNA)" 는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. 본 발명의 siRNA 분자는 센스 가닥(TRPC4 유전자의 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(TRPC4 유전자의 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. siRNA는 상보적인 RNA끼리 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고, 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 TRPC4 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다. 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

본 명세서에서 용어 "shRNA (small hairpin RNA Ehsms short hairpin RNA)"는 RAN 저해(RNA interference)를 통해 타겟 유전자의 발현을 침묵(sielencing) 시키는데 사용되는 견고한 헤어핀 턴(hairpin turn) 구조를 만드는 RNA 뉴클레오타이드 서열 또는 분자를 의미한다. shRNA는 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟

유전자 염기서열의 센스(sense)서열과 이에 상보적인 안티센스(anti-sense) 서열 사이에 3-10 개의 염기 링커를 연결하여 올리고뉴클레오타이드 DNA를 합성한다. 세포에서의 shRNA의 발현은 플라스미드 벡터 또는 바이러스 또는 박테리아용 벡터를 사용하여 이루어지며 프로모터는 견고한 shRNA 발현을 위해 적합한 것을 선택한다. U6 및 H1과 같은 중합효소(polymerase) III 프로모터가 사용될 수 있으며, shRNA의 발현 조절을 위해서는 중합효소(polymerase) II 프로모터가 사용될 수 있다. shRNA의 발현을 위해 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus) 또는 렌티바이러스(lentivirus)과 같은 다양한 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 벡터에 shRNA를 삽입하여 타겟 세포로 도입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀(hairpin) 구조의 shRNA (small hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 다이서(Dicer)에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타낸다. shRNA (small hairpin RNA)를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들어 미국특허 공개공보 제20040106567호 및 제20040086884호에는 shRNA를 포함하는 바이러스 벡터 등의 발현 컨스트럭트/벡터에 관한 정보가 개시되어 있다.

본 명세서의 용어 "miRNA(microRNA)"는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA 분자로써, 타겟 mRNA의 파쇄 또는 해독단계에서의 억제를 통하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 조절물질이다. 이러한 miRNA는 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 miRNA 전사체(primary miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNase type 효소에 의해 70-90 염기 정도의 스템-루프 구조, 즉 pre-miRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)라는 효소에 의해 절단되어 21-25 염기의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로써 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도한다.

본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 TRPC4의 억제제는 TRPC4 단백질의 활성 억제제이다.

본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 TRPC4의 활성 억제제는 TRPC4 단백질에 결합하여 이의 활성을 억제하는 물질이며,

바람직하게는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체, 인간화 항체, PNA(Peptide nucleic acid), 앱타머(aptamer), 저분자 또는 고분자 화합물, 및 우성음성돌연변이체 (dominant negative mutant)를 포함한다.

본 명세서에서 용어 "항체" 란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 TRPC4 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 본 발명에서 TRPC 단백질의 활성 억제가 발기 부전의 경감 또는 완화 효과적이라는 것이 규명되었고, TRPC 단백질의 활성을 억제할 수 있는 이에 대한 항체의 생성은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다. 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을

수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

본 명세서에서 용어 "키메릭 항체" 란 인간 이외의 원천, 예컨대 마우스 유래 항체 부위와 인간 유래 항체 부위를 조합하여 생성한 항체를 의미한다.

본 명세서에서 용어 "인간화 항체" 란 인간 이외의 원천으로부터의 아미노산 서열을 갖는 항체를 변형시켜 인간에서 발생되는 항체 변이체와의 유사도를 증가시킨 항체를 의미하며, 이에 대한 내용은 [Riechmann L et al., (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". Nature 332 (6162): 332-323; Queen C et al., "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor.". Proc Natl Acad Sci U S A. 86 (24): 10029-33.]에 개시되어 있다.

본 명세서에서 용어 "앱타머(aptamer)" 는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앱타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

본 명세서에서 용어 "PNA (Peptide nucleic acid)" 는 DNA 또는 RNA와 유사한 구조를 갖는 합성된 중합체 물질로서, 이의 골격(backbone)은 펩티드 결합에 의해 연결된 반복되는 N-(2-아미노에틸-글리신) 유닛으로 구성되며, 퓨린 및 피리미딘 염기가 상기 골격에 메틸렌 다리(-CH2-)으로 연결되어 있다. PNA에 대한 상세한 내용은 선행문헌 [Nielsen PE, et al., (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-500; Egholm M et al., (1993). "PNA Hybridizes to

Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydrogen Bonding Rules". Nature 365 (6446): 566-8.]에 기재되어 있다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 TRPC4 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 우성음성돌연변이체 (dominant negative mutant) 단백질을 제공한다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 우성음성돌연변이체 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다.

본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 우성음성돌연변이체 단백질 또는 이 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현가능한 형태로 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 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.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 모두 가능하며, 비경구 투여는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여

등을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학 조성물은 음경해면체에 직접 주입하여 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 병용되는 약물, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 1일 당 0.0001 ng/kg(체중) 내지 100 mg/kg(체중)이다.

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 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

【발명의 효과】

본 발명의 이점 및 특징을 요약하면 다음과 같다:

(i) 본 발명은 TRPC4의 활성 억제 측정 단계를 포함하는 발기 부전 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법 및 TRPC4의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

(ii) 본 발명은 TRPC4의 활성 측정 방법을 이용하면 발기부전 치료제 후보물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

(iii) 본 발명의 TRPC4의 활성 억제제는 발기부전의 증상 완화에 매우 효과적이므로 발기부전 치료제로 개발될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 1b은 각각 인간(human) [(a: 세포(cell) 및 b: 조직(tissue)] 및 랫트(rat)의 음경해면체 평활근에서 TRPC mRNA에 대해 RT-PCR로 분석한 결과이다.

도 2는 음경해면체에서 정상 대조군과 비교한 TRPC mRNA 발현의 상대수준을 보여준다. TRPC3: 1.4 ± 0.15 배, TRPC4: 1.8 ± 0.29배,

TRPC6: 1.5 ± 0.20 배, n=7, *: $p < 0.05$ vs. 정상 대조군.

도 3a 및 3b는 웨스턴 블로팅을 사용하여 TRPC의 단백질 수준을 측정한 결과이다. TRPC1: 1.1 ± 0.08 배, TRPC4: 3.2 ± 0.24 배 및 TRPC6: 2.24 ± 0.37 배, n=8, *: $p < 0.05$ vs. 정상 대조군.

도 4a 및 4b는 랫트 음경 조직에서 TRPC1, TRPC4 및 TRPC6의 발현의 면역조직화학적 실험을 수행한 결과(x 50) 및 TRPC4의 면역조직화학을 정맥, 동맥 및 음경 해면체(penile sinus)에서 행한 결과이다. TRPC4의 증가된 강도는 정맥 및 동맥 뿐만 아니라 음경 해면체(penile sinus)에서도 나타났다(패널 B, x400). 청색, 녹색, 적색은 각각 DAPI, TRPC, 및 α-액틴을 지시한다: N: 정상, DM: 당뇨병.

도 5a 및 5b는 정상대조군과 비교하여 랫트의 음경 조직에서 TRPC1, TRPC4, 및 TRPC6의 형광강도를 각각 측정한 결과이다(패널 A 참조).

도 6a 내지 6d는 정상 대조군, 당뇨병 대조군 및 $TRPC4^{DN}$-트랜스펙션된 당뇨병 랫트들의 발기 기능을 비교하기 위해 인 비보 음경신경자극을 행한 결과를 보여준다. 당뇨병 랫트는 정상 대조군 보다 유의하게 낮은 ICP/ABP 비율을 나타냈고, $TRPC4^{DN}$ 유전자를 트랜스펙션한 랫트는 정상 대조군과 차이가 없었다.

도 7은 트랜스펙션한 후 2주 지난 시점에서 랫트의 CSM 조직에서의 $TRPC4^{DN}$ 유전자의 발현을 측정한 결과를 보여준다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

1. CSM (corpus smooth muscle; 음경해면체 평활근) 세포 배양

인체 조직은 음경 보철물을 이식한 유기적 발기부전증 환자의 음경해면체로부터 얻었다. 종래 공지된 방법(17, 18)에 따라 조직

이식방법을 이용하여 인체 CSM (corpus smooth muscle, 음경해면체 평활근) 세포를 배양하였다. 인체 CSM 세포를 10% FBS-DMEM (fetal bovine serum-Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였고, 배지는 매 2-3일 간격으로 교체하였다. 1차 배양세포는 2-4 계대를 사용하였다.

2. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 분석을 통한 TRPC mRNA의 측정

RT-PCR을 사용하여 CSM에서 TRPC 발현을 스크리닝하였다. 총 RNA는 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 방법을 사용하여 배양한 인체 CSM 세포와 동결된 조직 그리고 랫트의 음경 조직으로부터 각각 추출하였다. RNA는 Superscript Ⅲ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 랜덤 헥사머 프라이머를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Taq DNA 중합효소(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 TRPC mRNA의 발현을 확인하였다. 반응에 사용한 프라이머들의 조합은 표 1에 나타내었다. GAPDH는 로딩 대조군 및 RNA 투입 내부 대조군으로 사용하였다. TRPC 4 및 GAPDH를 증폭하기 위한 최적의 PCR 조건은 95℃에서 1분, 44-55℃ (TRPC1 및 TRPC6: 44℃, TRPC5 및 TRPC7: 50℃, TRPC3 및 TRPC4: 54℃, GAPDH: 55℃)에서 1분 및 72℃에서 2분을 30 사이클 수행하고, 72℃에서 10 분간의 최종 연장 반응으로 행하였다. PCR 산물은 1.8% 아가로스 젤에서 전기영동하고 EtBr(Ethidium Bromide) 염색 후 자외선(UV)광하에서 DNA 밴드를 확인하였다.

3. Real-time RT-PCR 분석을 통한 TRPC mRNA의 정략적 측정

당뇨병 랫트에서 TRPC 서브타입의 발현 변화를 정량하기 위해, 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기와 Taqman gene expression master mix (Applied Biosystems)를 사용하여 실시간 정량 PCR을 수행하였다. 랫트 TRPC1 (Rn00585625_m1), TRPC3 (Rn00572928_m1), TRPC4 (Rn00584835_m1), TRPC6 (Rn00677559_m1), 및 β 액틴 (actin-Rn00667869_m1)에 대한 유전자 특이적 Taqman 프라이머 및 프로브를 Applied Biosystems로부터 구입하였다. PCR 조건은 다음과

같이 하였다: 초기 변성은 95℃에서 10 분간 행하고, 이어서 95℃에서 15초간 변성과정, 60℃에서 1분간 연장반응으로 구성된 증폭과정을 40회 시행하였다. 주형을 사용하지 않은 샘플을 음성 대조군으로 정하였고 모든 샘플에 대해 3회 반복 측정을 행하였다. 유전자 정량에 대한 표준 곡선은 랫트 뇌 에서 얻은 RNA로 cDNA를 합성한 후 순차적으로 10배 희석하여 PCR을 수행하여 얻었고, 유전자의 상대 정량치(fold change)는 대상 유전자와 하우스키핑(housekeeping) 유전자인 β-액틴(actin)비로 산출하였다. 유전자 발현 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다.

4. 웨스턴 블로팅에 의한 단백질 분석

동결한 조직을 막자사발을 사용하여 분쇄하여 균질화하고, 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM NaCl, 및 0.1% SDS를 포함하는 용해 완충액 (Pro-prep protein extraction solution, iNtRON, Seoul, Korea)과 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하여 세포를 용해시킨 후 4℃에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. BCA (bicinchoninic acid) 단백질 분석법(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 상등액중의 단백질의 농도를 결정한 후, 각 샘플의 단백질을 8% SDS-PAGE상에서 전기영동하였고, PVDF (polyvinylidene fluoride) 멤브레인 (Millipore, Billerica, USA)으로 옮겼다. 멤브레인을 0.1% Tween-20을 포함하는 TBS (Tris buffered saline; 10 mM Tris, 100 mM NaCl)에서 5% BSA와 함께 1시간 동안 상온에서 블로킹한 후, 마우스 모노클로날 항-TRPC1 항체 (1:2000 희석, SantaCruz, CA, USA), 마우스 모노클로날 항-TRPC4 항체 (1:2000 희석, Neuromab, Davis, CA), 래빗 폴리클로날 항-TRPC6 항체 (1:500 희석, Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), 또는 모노클로날 항- β-액틴 (1: 5000 희석, Abcam, MA, USA)으로 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. TBST으로 세정한 후에, 멤브레인을 항-래빗 또는 항-마우스 IgG 알카라인 포스파타아제 결합된 항체 (1:1000, Santa Cruz)와 함께 상온의 블로킹 완충액내에서 1시간 동안 반응시켰다. 과량의 2차 항체를 다시 세정하고, 결합된 2차 항체는 ECL(enhanced chemiluminescence; Pierce)으로 검출하였다. 정량을 행하기 위해, 필름을 평상형

스캐너상에서 스캔하고 밴드의 상대 강도를 디지털화한 후에 UN-SCAN-IT 소프트웨어 (Silk Scientific, UT, USA)를 사용하여 분석하였다. 웨스턴 블로팅은 다른 랫트 조직을 사용하여 6회 이상 반복하였다. 밴드의 상대 강도는 Image J 1.34 이미지 분석 시스템 (National Institutes of Health)을 사용하여 정량하였다.

5. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

TRPC 및 평활근 α-액틴에 대한 이중 면역형광표지는 대조군 및 당뇨병 랫트 조직내에서 수행하였다. 면역조직화학 실험을 위해, 음경조직을 4% 파라포름알데히드내에서 상온에서 4 시간 동안 고정하였고, 다양한 농도의 수크로오스 용액 (PBS내에서 5, 10, 15, 20% w/v, 5-15%에 대해서 각 15분, 20%에 대해서는 하룻밤)에서 탈수시켰다. 시료는 Optimum Cutting Temperature Compound (OCT, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)내에 넣고 액체질소에서 신속하게 냉동시킨 후에 -70℃에서 보관하였다. 저온유지 절편(10 μm)을 PBS로 15분간 4회 세정하고, 2차 항체에 의한 비특이적 염색을 줄이기 위해, 1% BSA (bovine serum albumin)과 함께 PBS내에서 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 조직 절편을 1% BSA 및 0.5% Triton X-100을 포함하는 PBS내에서 적합하게 희석한 1차 항체들의 혼합물(항-TRPC 항체 및 평활근 항-α-액틴 항체)와 함께 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 다음의 항체들을 사용하였다: 마우스 모노클로날 항-TRPC1 (1:50, Santacruz) 및 항-TRPC4 (1:50, Neuromab), 래빗 폴리클로날 항-TRPC6 (1:50, Abcam), 마우스 모노클로날 또는 래빗 폴리클로날 평활근 항-α-액틴 (1:500, Abcam). 음성 대조군은 1차 항체를 제외하여 실시하였다. PBS-Triton으로 3회 세정한 후에, 절편을 Alexa fluor 488- 및 594-컨쥬게이트한 2차 항체 (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).) 혼합물과 함께 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 절편을 세정하고 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 장착하였다. 면역형광이미지는 레이저 스캐닝 공초점 이미지 시스템 (Zeiss LSM 700, Germany)하에서 관찰하였다. TRPC Ab의 면역형광강도는 그룹당 6개 시료에 대해 Image J 1.34 이미지 분석 시스템 (National Institutes of Health)으로 정량 분석하였다.

6. 당뇨병 랫트의 유도

투여 시점에서 8주령의 실험동물에서 4개월간의 당뇨병의 유도는 공지된 방법(19)에 따라, 시트레이트 완충액 (100 mM 시트르산 60 mL 및 200 mM 디소디엄 포스페이트 40 mL, pH 4.6)에 용해시킨 Streptozocin(STZ)를 60 mg/kg의 투여량으로 복강내 단일 주사를 통해 행하였다. 대조군은 벡터만을 주입하였다. 당뇨병 랫트는 1주일 당뇨인 것으로 확인(혈당수준이 300 mg/dL 보다 높은 경우 당뇨로 규정)하여 이를 연구에 사용하였다. 혈당 수준은 처음 1달간은 1주일 간격으로 모니터링하였고 그 후 4개월까지는 1개월 마다 모니터링하였다.

7. DNA 컨스트럭트

pcDNA3 내의 mTRPC4β는 Dr. M. Schaefer으로부터 제공받았다. TRPC4β의 우성음성돌연변이체(dominant negative form, DN)의 제조는 제조사의 지시서에 따라 QuikChang Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Cendar Creek, TX, USA)를 사용하여 PCR (중합효소연쇄반응)-매개 돌연변이유발에 의해 행하여 보존도가 높은 3개의 아미노산 잔기인 LFW571-573이 AAA571-573으로 교체된 우성음성돌연변이체($TRPC4^{DN}$)을 제작하였으며, 이의 염기서열을 분석하여 최종 확인하였다. 이 돌연변이의 우성음성효과는 야생형 TRPC4β으로 트랜스펙션된 HEK 293 세포의 야생형 채널 활성을 패치 클램프(patch clamp)를 이용한 전기생리학적 방법을 사용하여 측정하여 확인하였다.

8. $TRPC4^{DN}$ 유전자의 CSM 세포로의 인 비보 유전자 전달

실험에는 총 30마리의 성체 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 실험동물들을 대조군과 당뇨병 실험군으로 나누었는데, 10마리의 랫트는 대조군으로 하고 나머지 20마리는 당뇨병 실험군으로 하였다. 실험군중에서 각각 10 마리의 랫트는 당뇨병 대조군으로 사용하고 10 마리는 $TRPC4^{DN}$ 유전자 트랜스펙션군으로 사용하였다. 실험에 사용한 모든 랫트들은 일정한 온도 및 광 조건하에서 사육하였다. 당뇨병 유도 4개월 후, STZ-유도된 당뇨병 랫트를 케타민 (ketamine)을 복강투여(50

mg/kg)하여 마취시켰다. 음경을 절개하고 무균적으로 노출시킨 후에 음경의 바닥 부분에서 결찰을 행하였다. $TRPC4^{DN}$ 유전자 주사군은 $TRPC4^{DN}$ 유전자를 200 μg / 100μL [20% 수크로오스-PBS(phosphate buffered saline)]의 용량으로 음경해면체에 주사하였고 대조군은 동량의 용매만을 주사하였다. 결찰은 주입한 후 2분 후에 제거하였다.

9. 골반 신경 자극을 통한 인 비보 발기 기능 테스트

$TRPC4^{DN}$ 유전자 또는 벡터만을 STZ-유도된 당뇨병 랫트의 음경 해면체 세포 안으로 트랜스펙션시킨 다음 2주후 시점에서, 발기 반응 측정을 행하였다. 발기 반응을 측정하는 상세한 방법은 선행문헌(19)에 기재되어 있다. 정상 대조군 랫트 및 STZ-유도된 당뇨병 랫트를 마취한 후, 전신 동맥 혈압(PB)은 폴리에틸렌(PE)-50 튜브를 목 동맥에 삽관하여 모니터링하였다. 전립선 및 방광을 정중전 복부 절개를 통해 노출시켰다. 주요 골반 결절, 골반 신경 및 해면체 신경을 각 측면상에서 후측방으로서 전립선까지 확인하고, 전기 자극을 위해 스테인레스 스틸 2극 후크 전극을 갖는 전기 자극자를 해면체 신경 주위에 설치하였다. 음경해면체내압(ICP)를 모니터링하기 위해, 25-게이지 카눌라를 250 U/mL의 헤파린(heparin)으로 충전하고 PE-50 튜브에 연결한 후 오른쪽 음경각안으로 삽입하였다. 전신 BP 및 ICP를 데이터 수집용 컴퓨터 시스템 (PowerLab ADI Instruments, Sydney, Australia)에 연결된 변환기(transducer)로 측정하였다. 실시간 디스플레이 및 혈압의 기록은 Chart 5 software (ADI Instruments)를 사용하여 행하였다. 전기장 자극 파라미터는 다음과 같다: 전기 자극자(model PG 721A; Austin Electronic Specialties Inc, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 전압은 6V이고, 60 초간 지속하였다. 발기 반응의 피크에서 얻은 동맥 BP에 대한 최대 ICP의 비율을 측정하여 동맥 BP에서의 변동에 대한 대조군으로 사용하였다. 실험의 마지막 단계에서 랫트를 희생시키고 해면체 조직을 신속히 추출한 후 RT-PCR을 수행하기 위해 액체질소에 냉동시켰다.

10. $TRPC4^{DN}$ 유전자 발현을 확인하기 위한 RT-PCR

상기한 방법에 따라 총 RNA를 랫트의 냉동한 조직으로부터

추출하였다. cDNA 역전사 생성물은 CMV 프로모터 및 TRPC4 사이의 영역에 대한 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 2-단계 네스티드 PCR을 통해 증폭하였다. 제1 PCR에 대한 네스티드 프라이머 염기서열은 다음과 같다: 5′ -ATCGCTATTACCATGGTGATG-3′ (서열번호 1) 및 5'-TGGGCACTGAGACACCTTTC-3'(서열번호 2). 2차 PCR에 대한 프라이머 염기서열은 다음과 같다: 5′ -AGTTCTATTACAAAAGAAATGTC-3′ (서열번호 3) 및 5′ -GAACTGTTTATCAAGGAGAATG-3′ (서열번호 4). Perkin-Elmer Thermal Cycler (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA)을 사용한 PCR 반응은 다음의 조건으로 행하였다: 95℃에서 5 분간 초기 변성; 95℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 30초의 사이클을 30 사이클; 72℃에서 7분의 최종 연장. GAPDH는 동일한 로딩 및 RNA의 견고성을 확인하기 위한 대조군으로 사용하였다. PCR 산물을 1% 아가로스 젤 전기영동을 행하고 DNA 밴드를 EtBr(ethidium bromide) 염색하여 UV 광하에서 시각화하였다.

11. 통계 분석

데이터는 평균±표준편차로 표시하고 IBM SPSS 20.0 statistical package (IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 분석하였다. Two-tailed Student's t-test를 사용하여 각 군 평균간의 비교가 적합한지 평가하였다. $p < 0.05$인 경우에 모든 차이가 유의한 것으로 판단하였다.

실험결과

1. 인간 및 랫트 CSM 세포에서 TRPC 동형(isoform)의 발현

CSM에서 어떠한 TRPC 상동체들이 발현되는지를 측하기 위해 각각의 TRPC 상동체들에 대해 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 반응을 수행하였다(표 1).

【표 1】

유전자	프라이머	크기(bp)
hTRPC1	전방향: 5 '-CAAGATTTTGGAAAATTTCTTG-3' (서열번호 5)	372
	역방향: 5 '-TTTGTCTTCATGATTTGCTAT-3' (서열번호 6)	
hTRPC3	전방향: 5 '-TGACTTCCGTTGTGCTCAAATATG-3' (서열번호 7)	318
	역방향: 5 '-CCTTCTGAAGCCTTCTCCTTCTGC-3' (서열번호 8)	
hTRPC4	전방향: 5 '-TCTGCAAATATCTCTGGGAAGAATGC-3' (서열번호 9)	415
	역방향: 5 '-AAGCTTTGTTCGTGCAAATTTCCATTC-3' (서열번호 10)	
hTRPC5	전방향: 5 '-GTGGAGTGTGTGTCTAGTTCAG-3' (서열번호 11)	502
	역방향: 5 '-AGACAGCATGGGAAACAGGAAC-3' (서열번호 12)	
hTRPC6	전방향: 5 '-CTCAAGAAAGAAAACCTCTC-3' (서열번호 13)	428
	역방향: 5 '-ATGACTGGATCTTCACTAGAC-3' (서열번호 14)	
hTRPC7	전방향: 5 '-GGATGCAGATGTGGAATGGAAG-3' (서열번호 15)	365
	역방향: 5 '-CGTCATTTTCTCTGTCCACCTG-3' (서열번호 16)	
hGADPH	전방향: 5 '-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3' (서열번호 17)	550
	역방향: 5 '-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG-3' (서열번호 18)	
rTRPC1	전방향: 5 '-GATTTTGGGAAATTTCTAGGAATG-3' (서열번호 19)	363
	역방향: 5 '-CTCATGATTTGCTATCAGCTGG-3' (서열번호 20)	
rTRPC3	전방향: 5 '-CCTGAGCGAAGTCACACTCCCAC-3' (서열번호 21)	529
	역방향: 5 '-CCACTCTACATCACTGTCATC C-3' (서열번호 22)	
rTRPC4	전방향: 5 '-CTGCAGATATCTCTGGGAAG-3' (서열번호 23)	412
	역방향: 5 '-GCTTTGTTCGAGCAAATTTCC-3' (서열번호 24)	
rTRPC6	전방향: 5 '-ACCTCTGCAGATTTCACTTG-3' (서열번호 25)	506
	역방향: 5 '-CCTGGATAAGCTCAGACATC-3' (서열번호 26)	
rGADPH	전방향: 5 '-ATAGACAAGATGGTGAAGGTC-3' (서열번호 27)	1000
	역방향: 5 '-TACTCCTTGGAGGCCATGTAG-3' (서열번호 28)	

RT-PCR 분석결과 알려진 7개의 TRPC 동형들 중에서, TRPC1, TRPC3, TRPC4 및 TRPC6 mRNA가 인체 음경해면체 조직과 배양된 세포에서 그리고 랫트 음경해면체 조직에서 발현되었으나, TRPC5 및 TRPC7 동형들은 발현되지 않았다(도 1a 및 1b 참조).

2. 당뇨병에 의해 유도되는 TRPC4의 mRNA 및 단백질 발현 변화

도 2에 나타난 바와 같이, 실시간 PCR 결과 STZ-유도된 당뇨병 랫트 모델에서 TRPC3, TRPC 4 및 TRPC6의 mRNA의 상대 발현 수준은 정상 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(TRPC3: 1.4 ± 0.15 배, TRPC4: 1.8 ± 0.29 배, TRPC6: 1.5 ± 0.2 배, n=7, $p < 0.05$ vs. 대조군, 도 2 참조), 반면에 TRPC1 발현 수준은 아무런 차이가 없었다(1.1 ± 0.08 배, n=7, $p > 0.05$ vs. 정상 대조군). TRPC4 발현 변화는 다른 TRPC 서브유닛들 보다 더욱 크게 나타났다. TRPC 발현에서의 변화는 웨스턴 블로팅 분석에 의해

확인하였다. 실시간 PCR 결과와 일관되게, TRPC4 및 TRPC6 단백질들이 정상 대조군과 비교하여 당뇨병 랫트에서 유의하게 증가되었으나, 반면에 TRPC1의 유의한 발현 변화는 측정되지 않았다. 대조군 및 당뇨병 모델사이에서 TRPC4 발현의 차이는 웨스턴 블로팅에서 더욱 확연하게 나타났다.

TRPC4 단백질 수준은 정상 대조군 대비 당뇨병 랫트에서 3배 더 증가하였다(TRPC4: 3.2 ± 0.24 배, 및 TRPC6: 2.24 ± 0.4 배, n=8, $p < 0.05$ vs. 정상 대조군, 도 3a 및 3b 참조). TRPC 채널의 발현 수준에서의 변화와 세포에서의 분포변화(localization)을 검사하기 위해, 음경 조직에서 면역조직화학 실험을 수행하였다. 정상 대조군 랫트에서, 면역조직화학 실험 수행 결과 음경 조직에서 TRPC1, TRPC4 및 TRPC6의 발현을 확인하였다. TRPC 채널에 대한 면역반응성은 분석한 모든 부위에서 고르게 검출되었다.

TRPC 항체 및 α-SMA (평활근 세포 마커)에 대한 항체를 사용하여 이중 표지를 행한 결과, TRPC1, TRPC4 및 TRPC6 염색이 α-SMA 염색과 중복된다는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 이들 단백질들이 평활근에 존재한다는 것을 지시하는 것이다(도 4a 참조). 중요하게도 실시간 PCR 및 웨스턴 블로팅의 결과와 유사하게 TRPC4 발현은 정상 랫트와 비교하여 당뇨병 랫트의 CSM 조직에서 더 높은 강도로 나타났다.

TRPC4의 강도 증가는 음경 해면체(penile sinus) 뿐만 아니라 정맥 및 동맥에서도 관찰되었다(n=6, 1.8 ± 0.03 배 vs. 대조군, $p = 0.3$, 도 4b 참조). 당뇨병 랫트에서도 TRPC4 형광염색은 α-SMA 형광염색과 일치하였다. TRPC6 면역형광이 정상 대조군에 비해 당뇨병 랫트에서 약간 높게 나타났지만, TRPC1에서와 같이 2개 그룹 사이에서 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 이러한 데이터들은 도 5a 및 5b의 막대 그래프로 요약하여 나타내었다. 1차 항체를 제외하고 인큐베이션한 음성 대조군에서는 백그라운드 염색만이 관찰되었다. RT-PCR, 웨스턴 블로팅 및 면역조직화학을 사용하여 얻는 결과를 종합하면, 당뇨병 랫트의 CSM에서 TRPC4 채널의 발현이 mRNA 및 단백질 수준에서 상향 조절된다는 것을 강하게 제시한다.

3. 정상 대조군, 당뇨병 대조군 및 $TRPC4^{DN}$-트랜스펙션된 당뇨병 랫트 사이의 발기 기능을 비교하기 위한 인 비보 음경 신경 자극 실험

당뇨병에 의해 유도되는 음경해면체 평활근긴장도의 증가가 TRPC4의 발현의 증가와 관련이 있는지를 평가하기 위해서, TRPC4 우성음성돌연변이($TRPC4^{DN}$) 유전자 전달을 통해 TRPC4 활성을 억제한 경우, 당뇨병 랫트에서 발기 기능에 어떠한 영향을 주는지를 측정하였다. 음경해면체내로 나이를 매칭시킨 정상 랫트에 벡터만을 주입한 경우(정상 대조군), 당뇨병 랫트에 백터만을 주입한 당뇨병 대조군과 당뇨병 랫트에 $TRPC4^{DN}$을 주입한 실험군에서 유전자 주입 2 주후에 음경 신경 자극을 수행하여 발기 기능을 측정하였다. 정상 랫트 및 당뇨병 대조군의 전기 자극에 대한 발기 반응은 도 6a 및 6b에 나타내었다. 당뇨병 랫트는 정상 대조군과 비교하여 ICP/ABP 비율이 유의하게 낮았다. $TRPC4^{DN}$의 유전자를 트랜스펙션시킨 경우 당뇨병 랫트의 발기 기능을 회복시켰으며(도 6c 참조), 이 발기 기능의 수준은 정상 대조군의 것과 유사한 수준이었다(도 6d 참조). 모든 반응은 최초 자극 이후 30분 후에 재생이 가능하였다.

4. RT-PCR에 의한 인 비보 실험 모델에서 트랜스펙션된 $TRPC4^{DN}$ 유전자의 확인

CSM 조직내에서 $TRPC4^{DN}$ 유전자 발현은 트랜스펙션 후 2주 시점에서 RT-PCR에 의해 확인하였다(도 7 참조). 당뇨병 랫트에서 $TRPC4^{DN}$ 유전자 전달에 의해 발기 기능의 회복 및 ICP/BP의 증가가 유도되었으며, 이는 적어도 2주간 유지되었다.

결론

TRPC4 채널은 당뇨병을 갖는 랫트의 음경 CSM 세포에서 발현이 증가되어 있다. 음경 조직안으로 $TRPC4^{DN}$의 유전자를 전달한 경우 당뇨병 랫트에서 발기 기능이 회복되었다. TRPC4 채널은 발기부전증의 중요한 병리생리학적 요소이며 발기부전증의 치료를 위한 중요한 표적(target)이 될 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 발기부전 치료제 후보물질을 스크리닝하는 방법:

(a) TRPC4 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현가능한 형태로 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 세포에 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질에 의해 상기 세포에서 TRPC4의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 단계로서, 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질에 의해 TRPC4의 활성이 억제되는 경우 상기 TRPC4의 활성 억제 후보물질을 발기부전 치료제 후보물질로 판단하는 단계.

【청구항 2】

TRPC4(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 억제제를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 TRPC4의 억제제는 TRPC4 유전자의 발현 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 TRPC4 유전자의 발현 억제제는 TRPC4 유전자에 대한 RNAi (RNA interference) 분자인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 RNAi (RNA interference) 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, 또는 miRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제 2 항에 있어서, 상기 TRPC4의 억제제는 TRPC4 단백질에 결합하여 이의 활성을 억제하는 물질인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 4 항에 있어서, 상기 TRPC4 단백질의 활성을 억제하는 물질은 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체, 인간화 항체, PNA(Peptide nucleic acid), 앱타머(aptamer), 저분자 또는 고분자 화합물, 또는 우성음성돌연변이체 (dominant negative mutant)인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 TRPC4(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4)의 우성음성돌연변이체(dominant negative mutant) 단백질.

【청구항 9】

제 8 항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

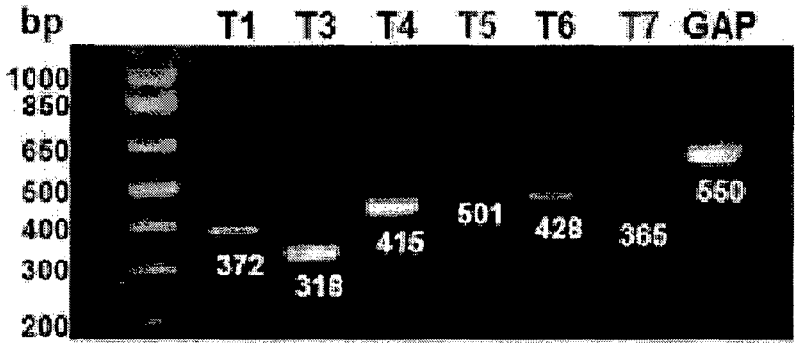
【청구항 10】

제 8 항의 단백질 또는 제 9 항의 폴리뉴클레오타이드를 발현가능한 형태로 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 발기부전 치료용 약제학적 조성물.

Fig. 1a

A. Human

a) Cell



b) Tissue

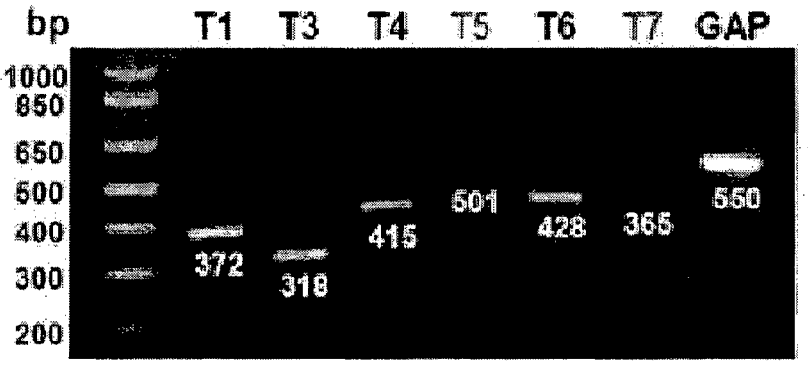


Fig. 1b

B. Rat

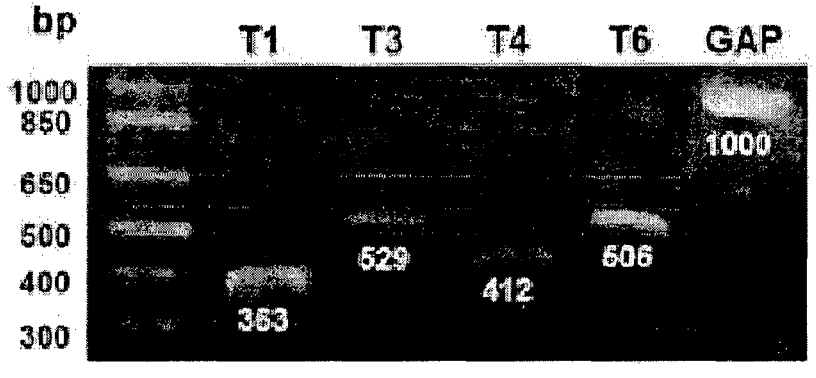


Fig. 2

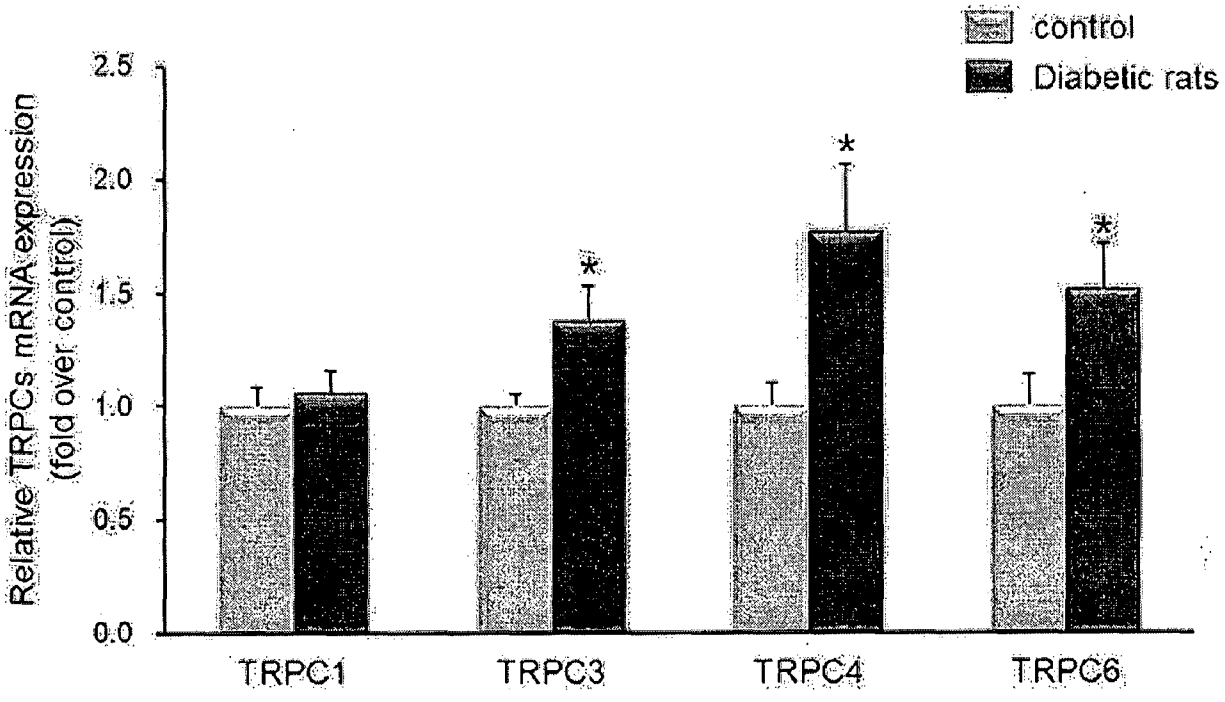

control
Diabetic rats
Relative TRPCs mRNA expression
(fold over control)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
TRPC1
TRPC3
TRPC4
TRPC6

Fig. 3a

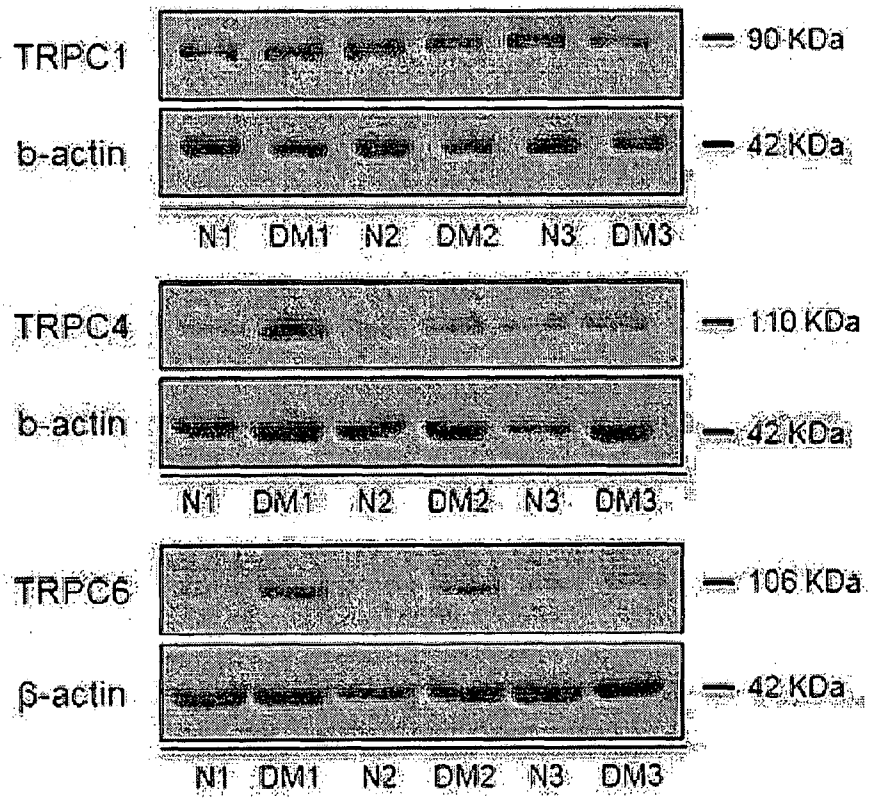

TRPC1
90 KDa
b-actin
42 KDa
N1 DM1 N2 DM2 N3 DM3
TRPC4
110 KDa
b-actin
42 KDa
N1 DM1 N2 DM2 N3 DM3
TRPC6
106 KDa
β-actin
42 KDa
N1 DM1 N2 DM2 N3 DM3

Fig. 3b

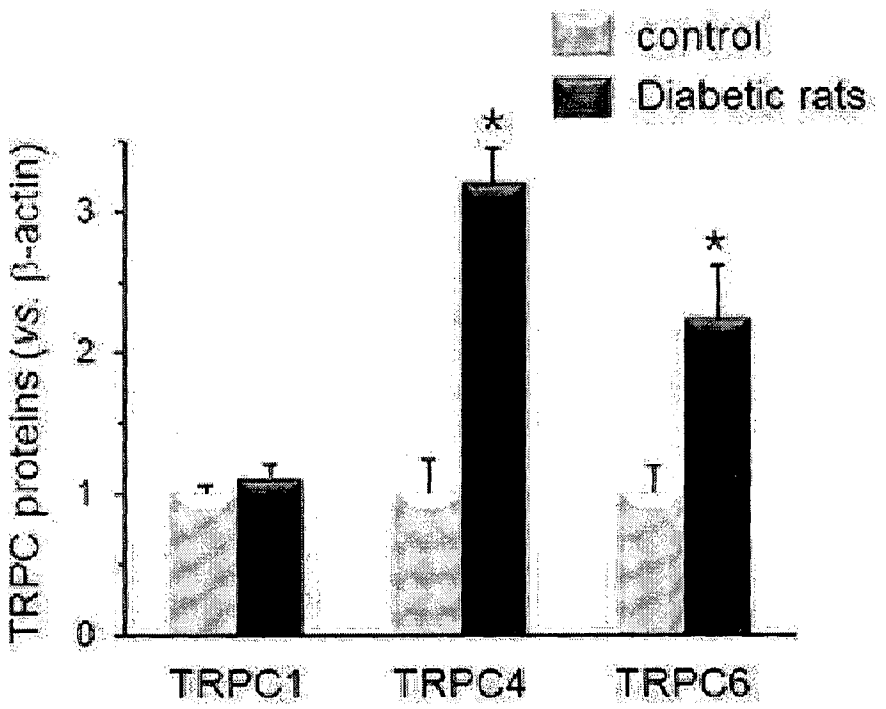

control
Diabetic rats
TRPC proteins (vs. β-actin)
0
1
2
3
*
*
TRPC1
TRPC4
TRPC6

Fig. 4a

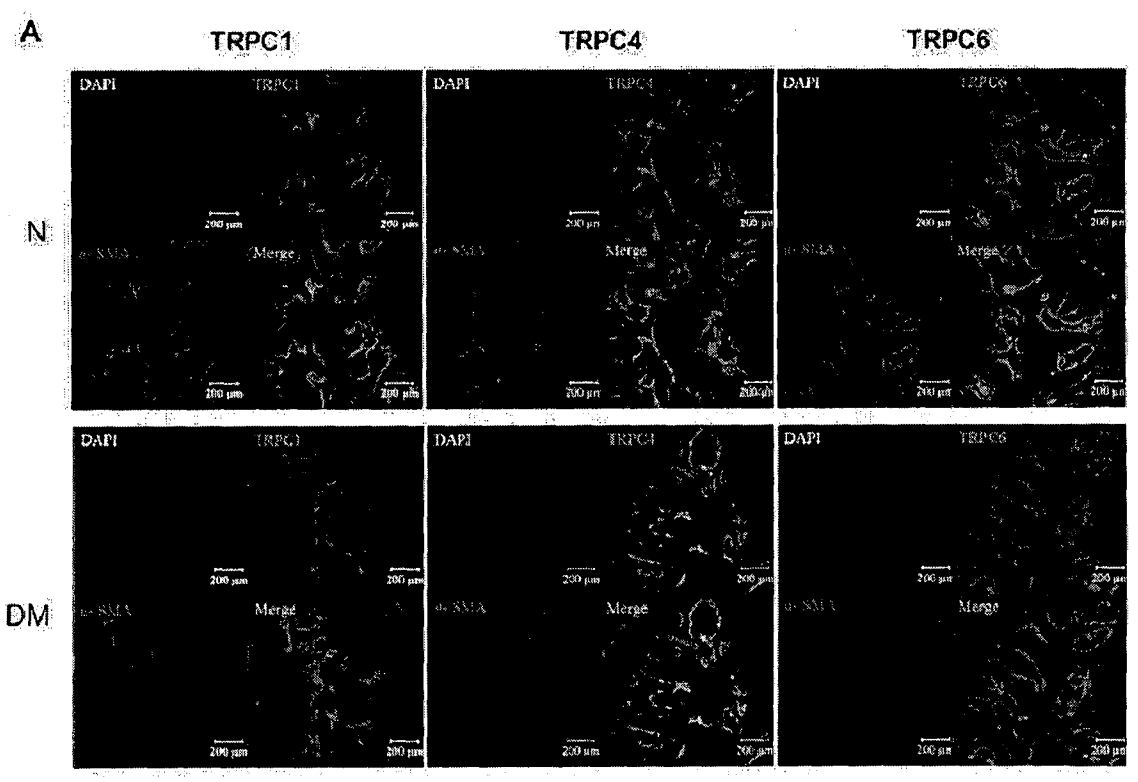

A
TRPC1
TRPC4
TRPC6
N
DM
DAPI
Merge

Fig. 4b

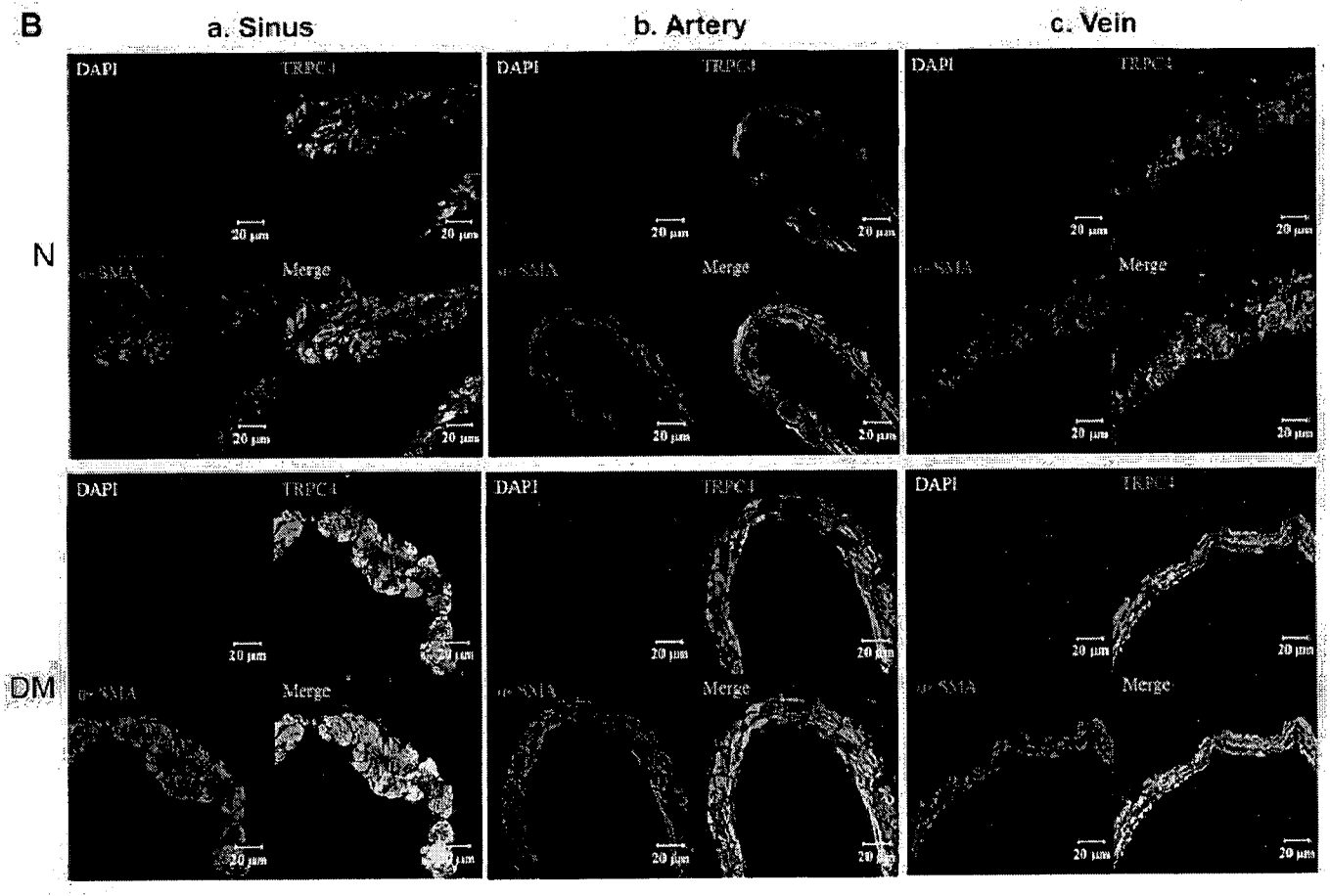

B
a. Sinus
b. Artery
c. Vein
N
DM
DAPI
TRPC4
α-SMA
Merge
20 μm

Fig. 5a

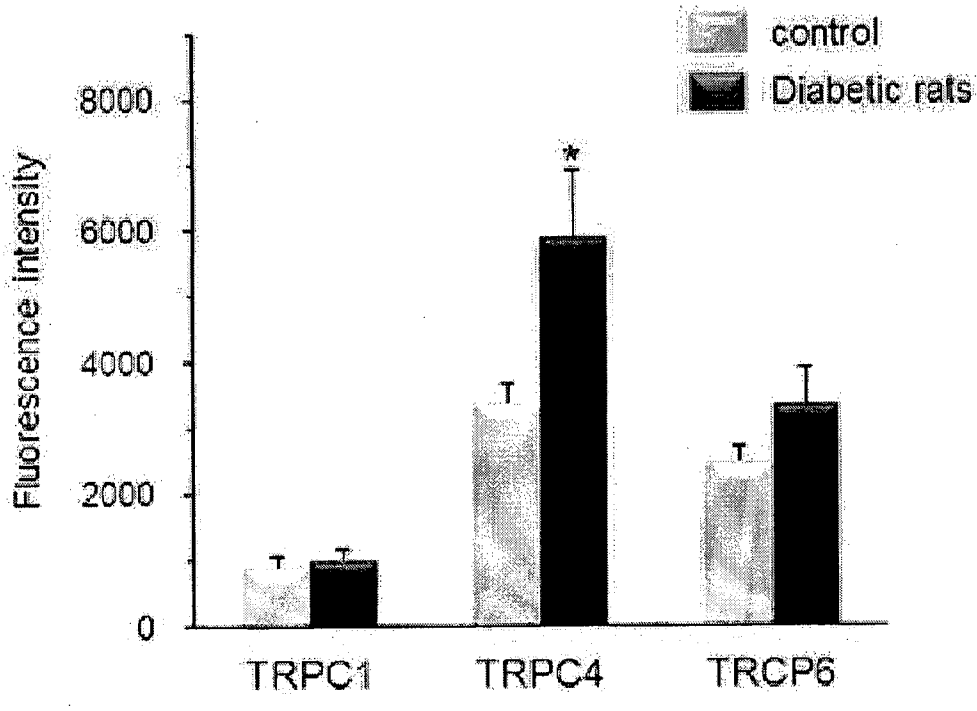

control
Diabetic rats
Fluorescence intensity
8000
6000
4000
2000
0
TRPC1
TRPC4
TRCP6

Fig. 5b

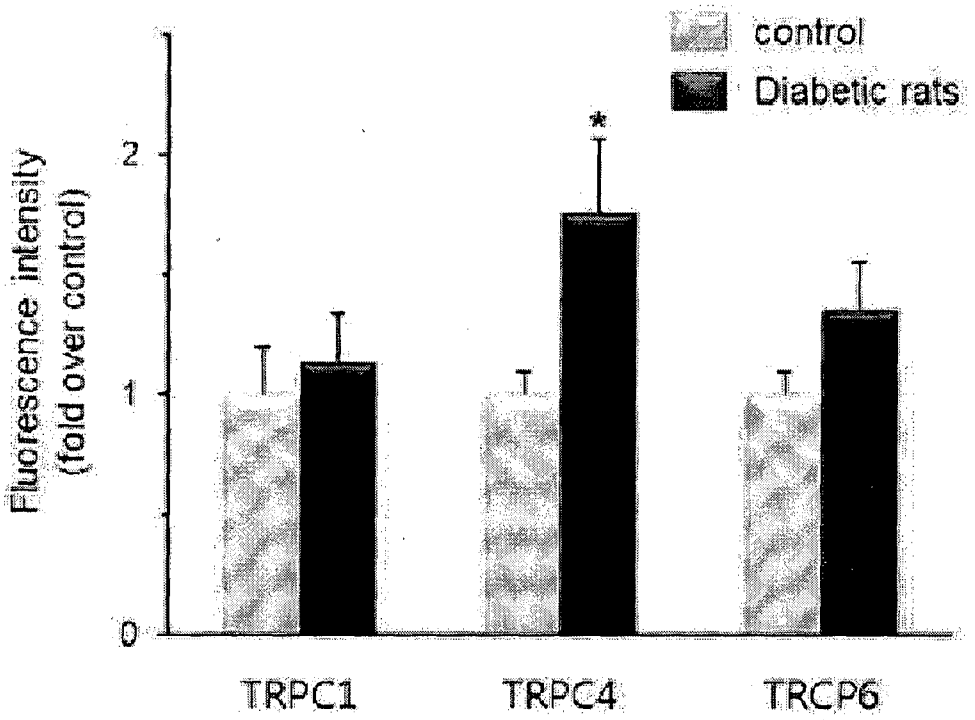

control
Diabetic rats
Fluorescence intensity
(fold over control)
2
1
0
*
TRPC1
TRPC4
TRCP6

Fig. 6a

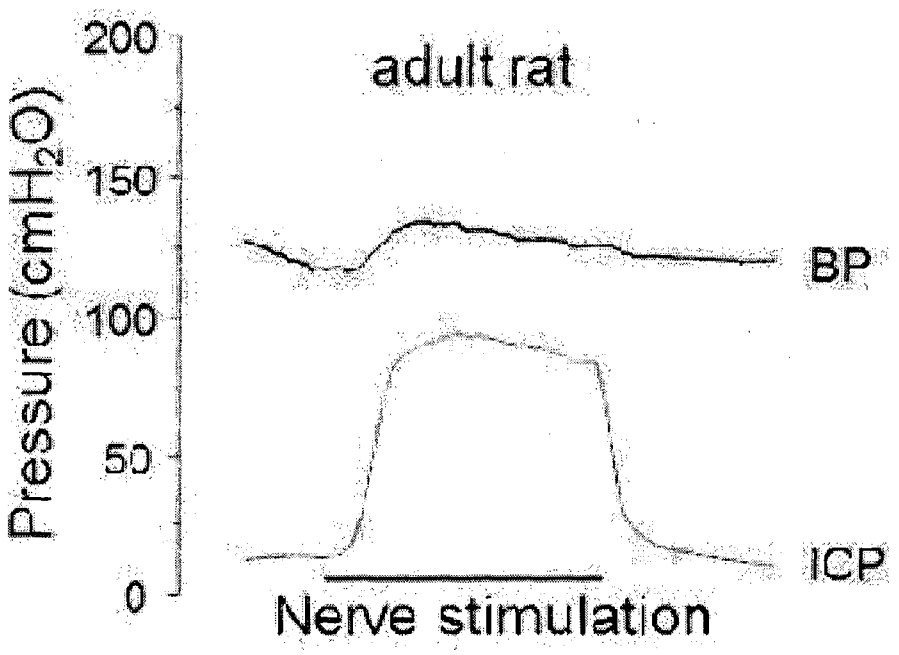

adult rat
Pressure (cmH2O)
200
150
100
50
0
BP
ICP
Nerve stimulation

Fig. 6b

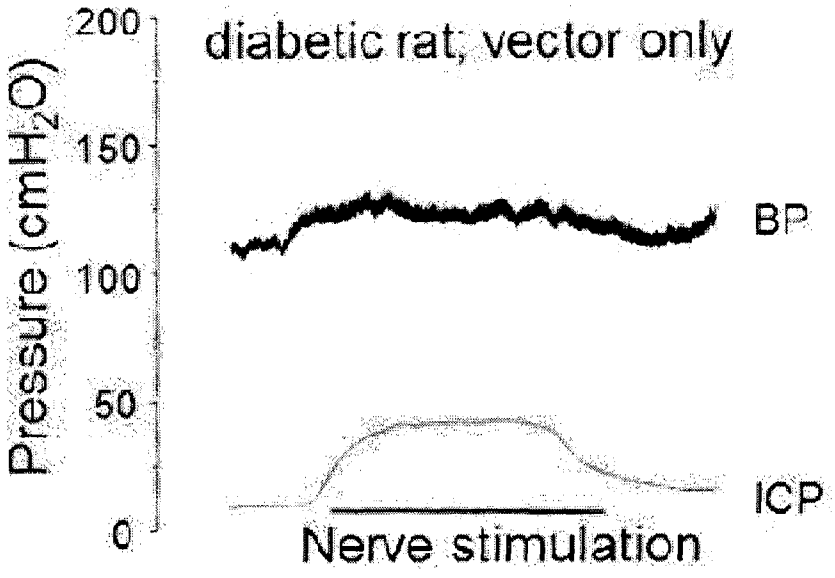
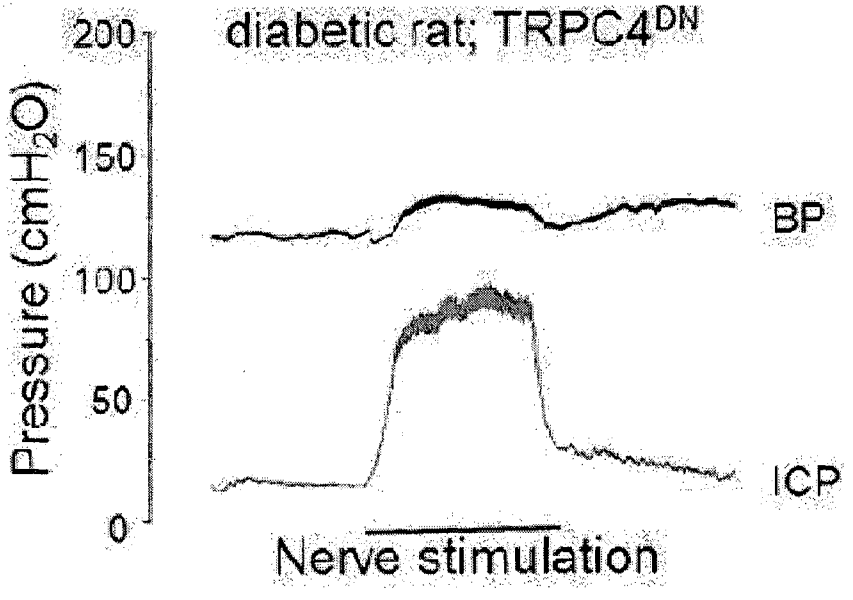

diabetic rat; vector only
Pressure (cmH2O)
200
150
100
50
0
BP
ICP
Nerve stimulation

Fig. 6c


diabetic rat; TRPC4DN
Pressure (cmH2O)
200
150
100
50
0
BP
ICP
Nerve stimulation

///

Fig. 6d

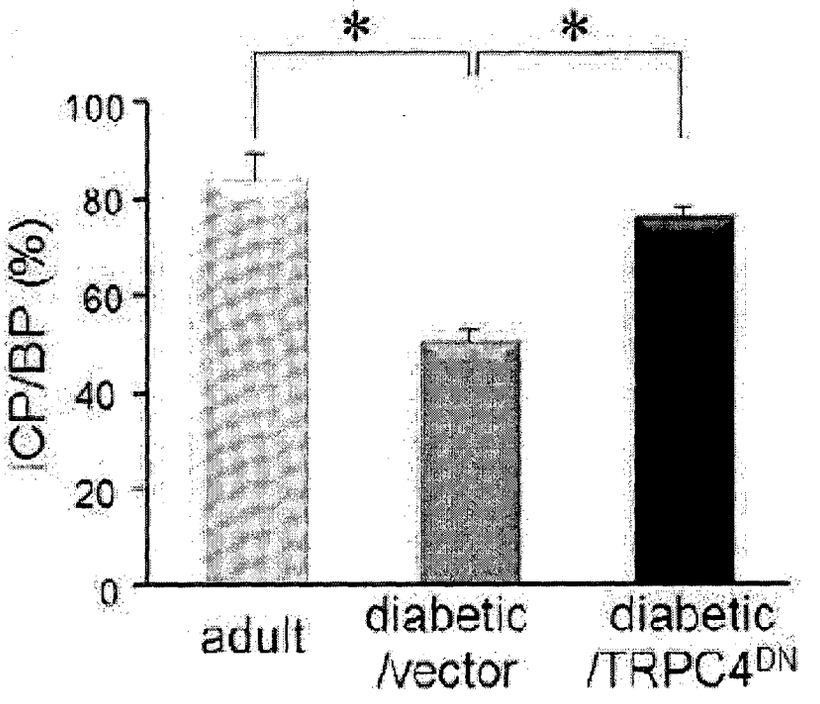
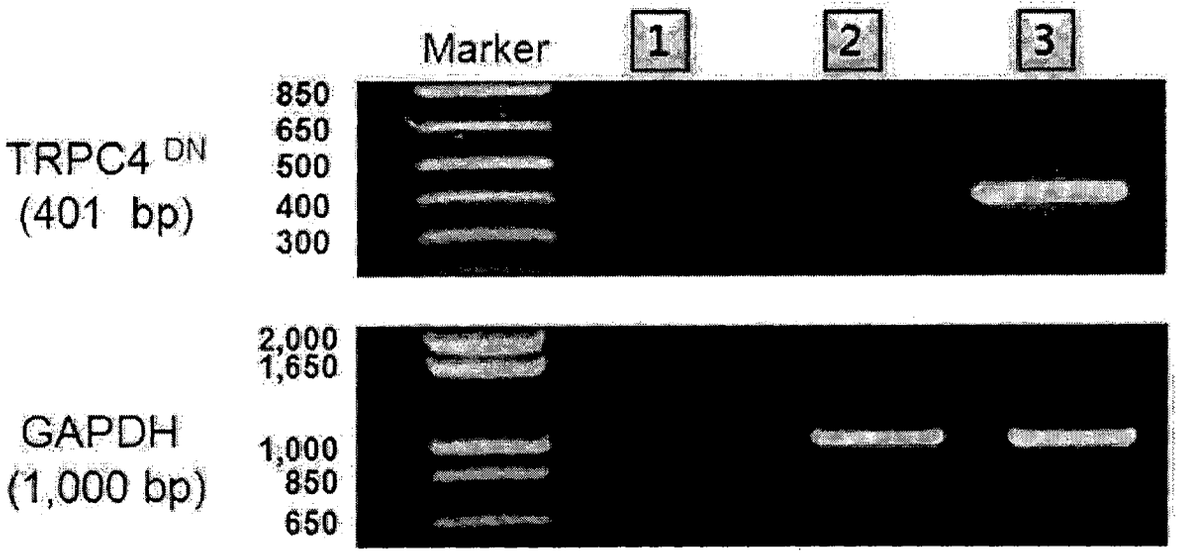

*
*
100
80
60
40
20
0
ICP/BP (%)
adult
diabetic /vector
diabetic /TRPC4DN

Fig. 7


Marker
1
2
3
TRPC4 DN (401 bp)
850
650
500
400
300
GAPDH (1,000 bp)
2,000
1,650
1,000
850
650

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/002993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/02; A61P 15/10; G01N 33/15; A61K 48/00; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), NDSL, Naver & Keywords: TRPC4, erectile dysfunction(erectile dysfunction)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Seong Won et al., "Development of Etiology-Specific Gene Therapy by Regulation of TRPC Signaling Module in Erectile Dysfunction", Samsung Seoul Hospital, Final Report of Health & Medical Technology R&D Program (18 April 2013) - See the entire main text, especially p. 30, p. 39, figure 9, figure 17 and figure 18	1-7
Y	- See the entire main text, especially p. 28 and figure 7	8-10
Y	DATABASE NCBI GenBank, "transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4, isoform CRA_a [Mus musculus]", Accession No. EDL35253 (07 June 2007) - See the entire main text, especially amino acid sequence of ORIGIN	8-10
A	KR 10-2011-0016591 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 18 February 2011 - See the entire main text	1-10
A	KR 10-2010-0135619 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 27 December 2010 - See the entire main text	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 JULY 2015 (07.07.2015)	**08 JULY 2015 (08.07.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/002993

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0016591 A	18/02/2011	US 2011-0039784 A1	17/02/2011
KR 10-2010-0135619 A	27/12/2010	WO 2010-147273 A2	23/12/2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/002993

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/02(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/02; A61P 15/10; G01N 33/15; A61K 48/00; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), NDSL, 네이버 & 키워드: TRPC4, 발기부전(erectile dysfunction)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	이성원 외 2명, "TRPC signaling module 제어를 통한 발기부전의 원인별 맞춤형 유전자 치료법 개발", 삼성서울병원, 보건의료기술연구개발 최종보고서 (2013.04.18.) - 본문 전체 참조, 특히 p. 30, p. 39, 그림 9, 그림 17 및 그림 18	1-7
Y	- 본문 전체 참조, 특히 p. 28 및 그림 7	8-10
Y	DATABASE NCBI GenBank, "transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4, isoform CRA_a [Mus musculus]", Accession No. EDL35253 (2007.06.07.) - 본문 전체 참조, 특히 ORIGIN의 아미노산 서열	8-10
A	KR 10-2011-0016591 A (성균관대학교산학협력단) 2011.02.18 - 본문 전체 참조	1-10
A	KR 10-2010-0135619 A (경상대학교산학협력단) 2010.12.27 - 본문 전체 참조	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 07월 07일 (07.07.2015)	2015년 07월 08일 (08.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
윤준호
전화번호 +82-42-481-3350

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/002993

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0016591 A	2011/02/18	US 2011-0039784 A1	2011/02/17
KR 10-2010-0135619 A	2010/12/27	WO 2010-147273 A2	2010/12/23