



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/15 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005738
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 27일 (27.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0048280 2014년 4월 22일 (22.04.2014) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 홍순철 (HONG, Soon Cheol); 463-881 경기도 성남시 분당구 동판교로 123 백현마을 1단지 판교푸르지오그랑블아파트 108-1102, Gyeonggi-do (KR). 이아영 (LEE, Ah Young); 143-815 서울시 광진구 아차산로 70길 17-17 삼성아파트 1-909, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 135-748 서울시 강남구 테헤란로 123 여삼빌딩 11층, 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, LT, 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, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

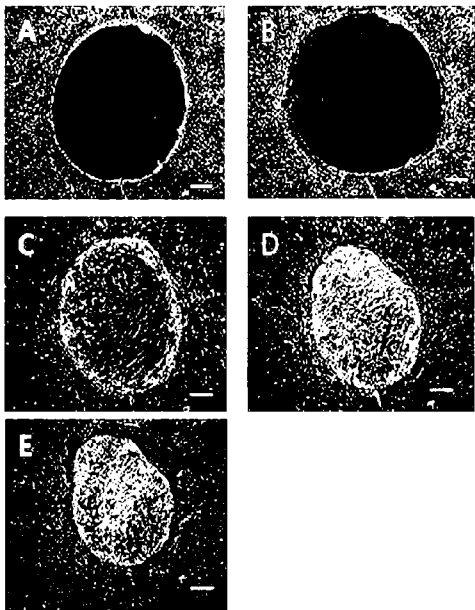
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING THERAPEUTIC AGENT FOR PREMATURE RUPTURE OF MEMBRANES

(54) 발명의 명칭: 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening a therapeutic agent for premature rupture of membranes and, specifically, to a method for screening a therapeutic agent for premature rupture of membranes by making a wound in the amnion tissue of the isolated placenta, treating the wound with a therapeutic agent candidate and culturing the amnion, and then selecting a therapeutic agent candidate, which is confirmed to promote the healing of the wound, as a therapeutic agent for premature rupture of membranes. The present invention has no ethical problem since the amnion discarded after childbirth is used, and is useful in screening a therapeutic agent for premature rupture of membranes, having excellent validity since the therapeutic agent can be easily screened in an environment similar to the interior of the human body.

(57) 요약서: 본 발명은 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 분리된 태반의 양막 조직에 상처를 낸 다음, 치료제 후보물질을 처리하고 양막을 배양한 후, 상처의 회복을 촉진하는 것으로 확인된 치료제 후보물질을 조기 양막파수 치료제로 선정하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 출산 후 폐기되는 양막을 사용하여 윤리적으로 문제가 없고, 체내와 유사한 환경에서 치료제를 용이하게 스크리닝할 수 있으므로 유효성이 뛰어난 조기 양막파수 치료제를 스크리닝하는데 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 분리된 태반의 양막 조직에 상처를 낸 다음, 치료제 후보물질을 처리하고 양막을 배양한 후, 상처의 회복을 촉진하는 것으로 확인된 치료제 후보물질을 조기 양막파수 치료제로 선정하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 양막은 태반의 가장 안쪽에 있는 0.02~0.5mm의 얇은 막으로 상피층, 기저층, 치밀층, 섬유아세포층, 해면층의 5층으로 구성되고, 신경, 림프관, 혈관 등이 존재하지 않는 무혈관성 기질의 태반막으로 태아를 둘러싸고 있어 모체로부터의 각종 감염 및 면역반응에서 태아를 보호하는 장벽 역할을 한다. 인간의 경우 처음 양막이 형성될 때 양막과 태아가 닿아 있지만, 임신 4-5주가 지나면, 그 안에 양수가 차기 시작한다. 양수가 찰수록 점점 양막은 늘어나게 되고 결국 양막 바깥쪽에 있는 융모막과 맞닿게 되며, 양수는 양막 내부의 태아의 움직임을 자유롭게 해주며 외부의 충격을 완화 시켜주는 역할을 한다.
- [4] 조기 양막파수(preterm premature rupture of membrane, PPRM)는 임신 중 태아를 둘러싸고 있는 양막에 이상이 생겨 양수가 양막 밖으로 새어 나오는 질환이다. 조기 양막파수는 주산기 합병증과 신생아 이환 및 사망의 주원인으로서 신생아 사망의 50%, 조산의 30-40%가 조기양막파수에 의한 것으로 알려져 있고, 특히 30-50%가 임신 37주 이전에 나타나는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 임신 24~25주 이전에 조기 양막파열이 일어나면 태아가 생존하기 힘들기 때문에 유산하기 쉬운데, 이는 조기 양막파수 질환이 부수적으로 자궁내 감염 위험의 심각한 증가와 태아 폐 시스템의 발달 장애를 야기하기 때문이다.
- [5] 사회가 점차 고령화 되어감에 따라 조산의 빈도가 높아지고 있고, 이에 따라 조기 양막파수 빈도도 함께 증가하고 있다. 특히, 우리나라의 경우 초고령화사회를 앞두고 저출산 문제가 대두 되고 있기 때문에 조산으로 인한 신생아 사망률 증가는 국가적으로도 중요한 문제이다. 실제로 2010년 조사에 따르면, 20대 산모가 꾸준히 감소하는 반면, 30세 이상의 산모의 출생비는 2000년 35.6%에서 2010년 62.8%로 급격히 증가하는 것으로 나타났다.
- [6] 그러나, 조기 양막파수 질환의 원인은 현재까지 정확하게 밝혀지지 않았으며, 치료방법 또한 명확히 제시되어있지 않은 실정이다. 이에 양막을 이용하여 치료제를 개발하고자 하는 많은 시도가 있었으나 종래의 기술은 양막 조직을 1~2mm²의 작은 조각으로 세절하여 그대로 배양하는 형태로서, 양막으로부터

이동한 세포를 수득하여 시험하였기 때문에, 효과와 안전성을 입증하기 위한 생체 내 실험이 추가로 필요하였다.

- [7] 이에, 본 발명자들은 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 분리된 양막 조직에 상처를 낸 다음, 치료제 후보물질을 처리하고 양막을 배양하는 경우, 양막의 상처 회복을 촉진하는 치료제를 체내와 유사한 환경에서 선별할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] 발명의 요약

- [10] 본 발명의 목적은 조기 양막파수(preterm premature rupture of membrane) 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

- [11] 본 발명의 다른 목적은, 상기 방법에 의해 스크리닝된 치료제를 유효성분으로 함유하는 조기 양막파수 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

- [12] 본 발명의 또 다른 목적은, 폴 산(folic acid)을 유효성분으로 하는 조기 양막파수 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[13]

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 출산 후 버려지는 태반으로부터 양막을 박리하는 과정을 나타낸 그림이다.

- [15] 도 2는 박리한 양막을 천공하여 지름 5mm의 양막 조직을 수득하는 과정을 나타낸 그림이다.

- [16] 도 3은 지름 5mm 양막을 배양접시에 부착시킨 후 내부에 지름 1mm의 천공을 만드는 과정을 나타낸 그림이다.

- [17] 도 4는 내부에 지름 1mm의 천공을 가지는 원형천공 양막의 모식도이다.

- [18] 도 5는 원형천공 양막의 상처 회복을 13일 동안 관찰한 배양사진이다(A: Day 0, B: Day 3, C: Day 7, D: Day 10, E: Day 13).

- [19] 도 6은 치료제 후보물질인 폴 산(folic acid, FA) 처리 후 천공의 지름 크기 감소를 나타낸 결과이다.

[20]

[21] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [22] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [23] 본 발명은 일 관점에서, (a) 분리된 태반의 양막 조직에 상처를 낸 다음, 치료제 후보물질을 처리하고 양막을 배양하는 단계; 및 (b) 배양 후 상기 상처의 회복을 촉진하는 것으로 확인된 치료제 후보물질을 조기 양막파수 치료제로 선정하는

단계를 포함하는 조기 양막파수(preterm premature rupture of membrane) 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

- [24] 용어 '양막'은 조류, 포유류, 파충류 등 양막류(amniota) 생물의 임신 중 관찰되는 막으로서, 태아를 둘러싸고 외부환경으로부터 태아를 보호하는 역할을 하는 무혈관성 기질로 이루어진 막을 의미한다. 본 발명에서 양막은 출산 후 적출물로서 처리되는 태반을 사용하는 것이 바람직하며, 사람 유래의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 양막은 양막 상피 줄기세포를 포함할 수 있는데, 양막 상피 줄기세포는 다분화 능력을 가지고 타 조직 유래 줄기세포보다 면역거부 가능성이 적은 특징을 가진다. 이들 세포는 CD73, CD90, CD349, SSEA-4, Oct-3/4, CD324, CD105, Sox-2 및 Nanog를 발현하고, CD19 및 CD34는 미발현하는 것으로 알려져 있다.
- [25] 용어 '양수'는 양막 내의 양막강을 채우는 액체로서, 양막과의 유착 및 태아보호 역할을 하는 것을 의미한다. 임신중에는 태아, 탯줄 등으로 외력이 가해지는 것을 막고 태아의 운동을 자유롭게 하여 사지의 발달을 도우며, 분만시에는 태포를 형성하여 자궁경관의 개대를 촉진한다. 출산시 정상적으로 파수된 양수는 산도를 씻어내고, 윤활작용을 한다.
- [26] 본 발명의 양막조직의 상처는 펀치 생검(punch biopsy)으로 천공을 생성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [27] 용어 '천공'은 양막을 관통하는 구멍을 의미하며, 천공 생성시 천공내에는 어떠한 조직 및 세포도 존재하지 않는 상태를 의미한다. 천공은 양막의 회복 과정에 따라 다시 조직으로 메워질 수 있다. 천공의 형태는 사용하는 도구에 따라 원형, 타원형, 다각형일 수 있고, 원형인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, 비정형의 천공도 가능하다.
- [28] 상기 천공은 지름 또는 장축이 1mm 내지 10mm인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [29] 양막 파수는 임상적으로 10mm이내의 크기로 발생하므로 본 발명의 천공의 지름 또는 장축은 10mm 이내인 것이 바람직하고, 현미경 관찰이 용이한 크기인 1mm 내외인 것이 더욱 바람직하다.
- [30] 본 발명의 일 실시예에서는, 내부에 1mm 지름의 포어(pore)를 가지는 지름 5mm의 원형천공 양막조직을 배양하여 치료제 스크리닝에 사용하였다. 출산 후 버려지는 태반으로부터 양막을 무균상태에서 분리한 다음, 양막을 편평하게 고정시키고, 생검 도구를 사용하여 다수의 양막 조직 조각을 수득하였다. 수득한 지름 5mm의 양막 조직을 배양에 적합한 크기를 가지는 배양접시인 24-well 플레이트에 고정시킨 다음, 1mm 지름을 가지는 생검도구로 중심부를 천공하였다.
- [31] 본 발명의 배양은 3일 내지 28일 동안 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [32] 본 발명의 다른 실시예에서는, 원형천공 양막을 배양하여 자연적으로 상처가 회복되는 과정을 보았다. 16일의 배양기간 동안 양막 내의 천공은 상처 변두리로부터 세포의 증식이 나타나 점차 채워지게 되며, 세포가 생산하는

세포외 기질에 의하여 포어(pore)의 크기가 줄어들었다.

[33] 본 발명의 치료제 후보물질의 처리는 치료제 후보물질을 양막의 배양배지에 첨가하거나, 상처 부위에 직접 도포하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[34] 본 발명의 치료제의 선정은 천공의 크기, 천공내 세포수 또는 천공내 세포 생존률 측정을 기반으로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[35] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 의해 스크리닝된 치료제를 유효성분으로 함유하는 조기양막파수 치료용 조성물에 관한 것이다.

[36] 본 발명의 치료제 후보물질은 폴 산(folic acid), 복합 비타민(multivitamine), 프로그스테론(progesterone), 코르티코 스테로이드(corticosteroids)일 수 있고, 바람직하게는 폴 산(folic acid)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[37] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 원형천공 양막의 배양액에 폴 산(folic acid)을 첨가하여 배양할 경우 양막의 상처 회복이 2배 이상 촉진되는 것을 확인하여 폴 산이 조기양막파수 치료제로서 사용이 가능함을 확인하였다.

[38] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 폴 산(folic acid)을 유효성분으로 하는 조기 양막파수 치료용 조성물에 관한 것이다.

[39]

[40] 실시예

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

[42]

[43] 실시예 1: 원형천공 양막의 제조

[44] 출산 과정에서 버려지는 태반으로 부터 양막조직을 도 1에 나타낸 바와 같이 분리하고 멸균된 PBS로 충분히 세척하여 다른 조직으로부터의 오염을 배제하였다. 분리한 양막을 멸균된 유리 배양접시에 옮기고 마르지 않도록 멸균된 생리식염수를 넣어주었다. 핀셋으로 양막을 고르게 편 다음, 직경 5mm 생검도구(biopsy punch)를 수직으로 세워 위에서 아래로 양막을 지그시 눌러주어 수십 개의 직경 5mm의 양막 조직을 떼어내었다 (도 2). 떼어낸 양막조직을 다시 한번 직경 1mm의 생검도구를 사용하여 중앙을 천공하였다. 그 결과, 1mm 지름의 천공을 가지는 5mm의 원형천공 양막조직을 제조하였다(도 3 및 도 4).

[45] 각 원형천공 양막조직은 24-well 플레이트에 well당 하나의 조직이 들어가도록 배치하고, 조직이 구겨지거나 접혀지지 않도록 잘 퍼진 상태로 위치고정을 한 다음 배양에 사용하였다. 양막의 위치고정은 약 2~3분간 말려서 수행하되 완전히 마르지 않도록 주의하여야 한다.

[46]

[47] 실시예 2: 원형천공 양막의 배양

[48] 상기 실시예 1에서 제조한 원형천공 양막조직을 10% FBS(Gibco, USA)가

첨가된 DMEM(Gibco, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하면서 양막의 상처가 회복되는 과정을 관찰하였다(도 5). 그 결과, 배양 5일째 양막 상처의 가장자리로부터 세포가 자라나와 점차 구멍이 메워 지는 것을 관찰하였다(도 5B). 배양 9일째, 세포가 자라 채워진 자리가 세포로부터 분비된 세포외 기질에 의하여 점차 메워지는 힐링현상을 관찰하였고(도 5C), 배양 11일째는 구멍이 완전히 세포로 메워지고 상처의 크기가 좀 더 줄어드는 것으로 나타났다(도 5D). 배양 16일째에는 구멍 전반에 걸친 회복과정이 나타나고 있었으나, 구멍의 크기는 배양 9일에 비하여 크게 감소하지 못하였다(도 5E).

[49]

[50] 실시예 3: 원형천공 양막의 배양을 통한 조기 양막과수 치료제 스크리닝

[51] 상기 실시예 1에서 제조한 원형천공 양막조직을 치료제 후보물질 및 10% FBS(Gibco, USA)가 첨가된 DMEM(Gibco, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하면서 양막의 상처 회복 정도를 평가하였다.

[52] 조기 양막과수 치료제 후보물질로서 50mM Folic acid(FA; Sigma-Aldrich, 미국)를 원형천공 양막 배양액에 첨가하고 30일 동안 배양하였다. 배양 14일과 27일에 사진을 찍고 구멍의 내경을 측정하여 치유 정도를 분석하였다. 그 결과, 대조군은 자연회복에 의하여 구멍의 크기가 50μm 로 감소하는 반면, 배양액에 폴 산(FA)를 첨가한 실험군은 27μm 로 감소하여, 폴 산(FA)가 상처회복을 자연상태보다 2배 이상 촉진함을 관찰하였다(도 6).

[53]

산업상 이용가능성

[54] 본 발명에 따르면, 출산 후 폐기되는 양막을 사용하여 체내와 유사한 환경에서 치료제를 용이하게 스크리닝할 수 있으므로 유효성이 뛰어난 조기 양막과수 치료제를 스크리닝하는데 유용하다.

[55]

[56] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 조기 양막파수(preterm premature rupture of membrane) 치료제의 스크리닝 방법:
 (a) 분리된 태반의 양막 조직에 상처를 낸 다음, 치료제 후보물질을 처리하고 양막을 배양하는 단계; 및
 (b) 배양 후 상기 상처의 회복을 촉진하는 것으로 확인된 치료제 후보물질을 조기 양막파수 치료제로 선정하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 양막조직의 상처는 펀치 생검(punch biopsy)으로 천공을 생성하는 것을 특징으로 하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 천공은 지름 또는 장축이 1mm 내지 10mm인 것을 특징으로 하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 배양은 3일 내지 28일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 치료제 후보물질의 처리는 치료제 후보물질을 양막의 배양배지에 첨가하거나, 상처 부위에 직접 도포하는 것을 특징으로 하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 치료제의 선정은 천공의 크기, 천공내 세포수 또는 천공내 세포 생존률 측정을 기반으로 수행하는 것을 특징으로 하는 조기 양막파수 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항의 방법에 의해 스크리닝된 치료제를 유효성분으로 함유하는 조기양막파수 치료용 조성물.
- [청구항 8] 폴 산(folic acid)을 유효성분으로 하는 조기 양막파수 치료용 조성물.

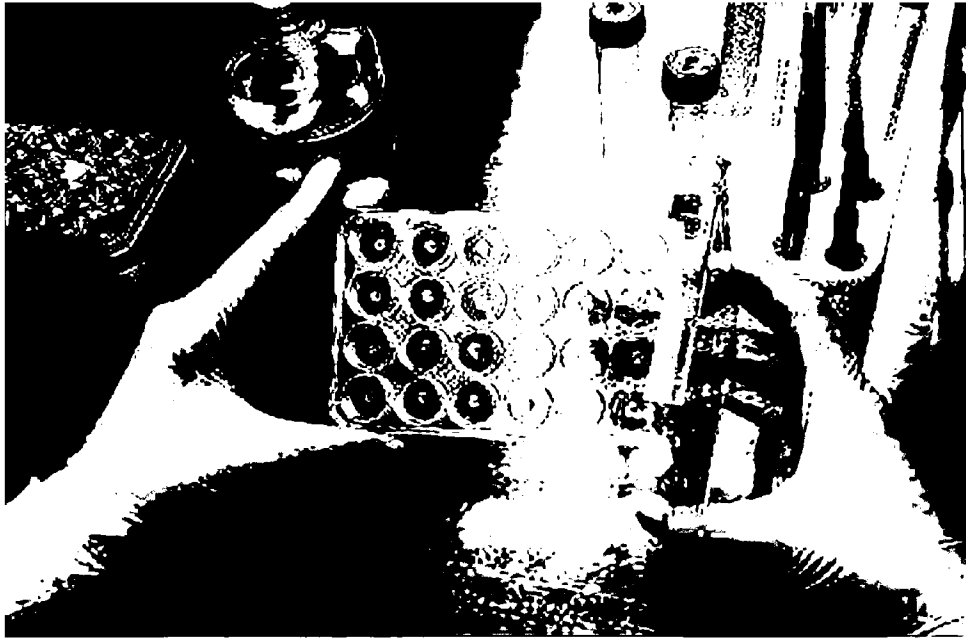
[Fig. 1]



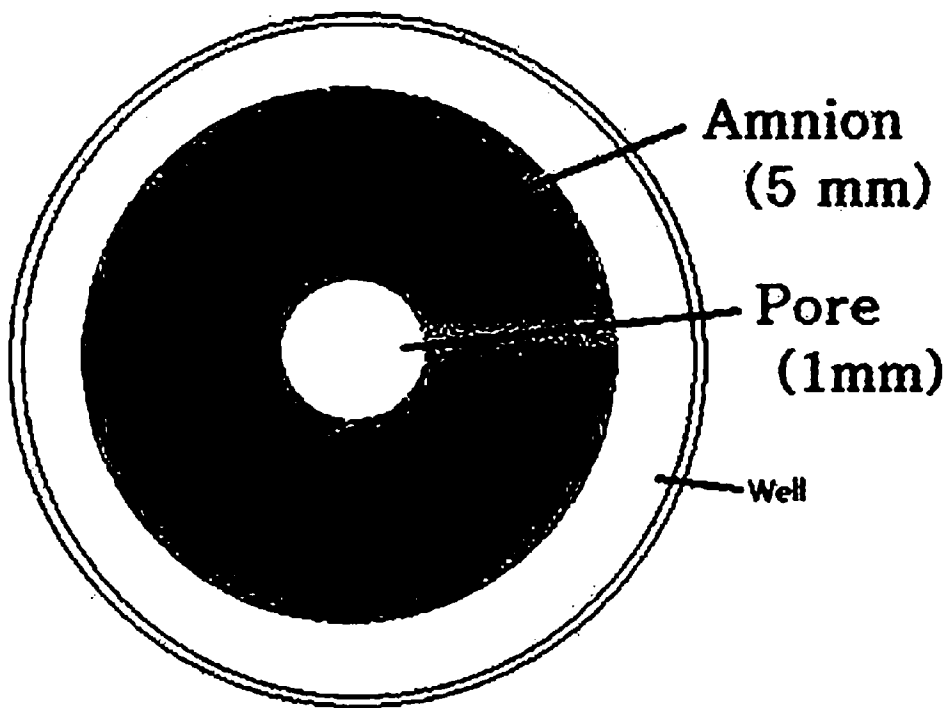
[Fig. 2]



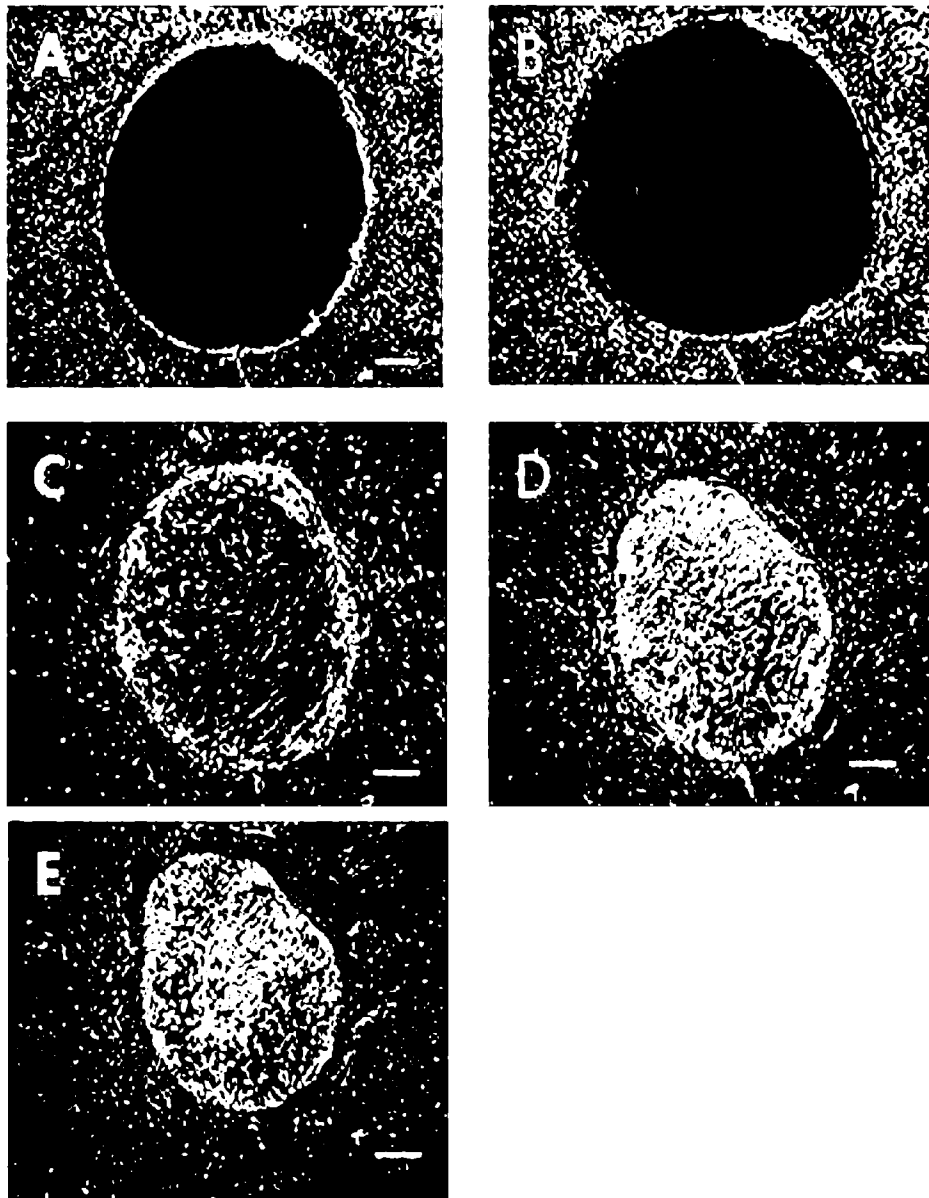
[Fig. 3]



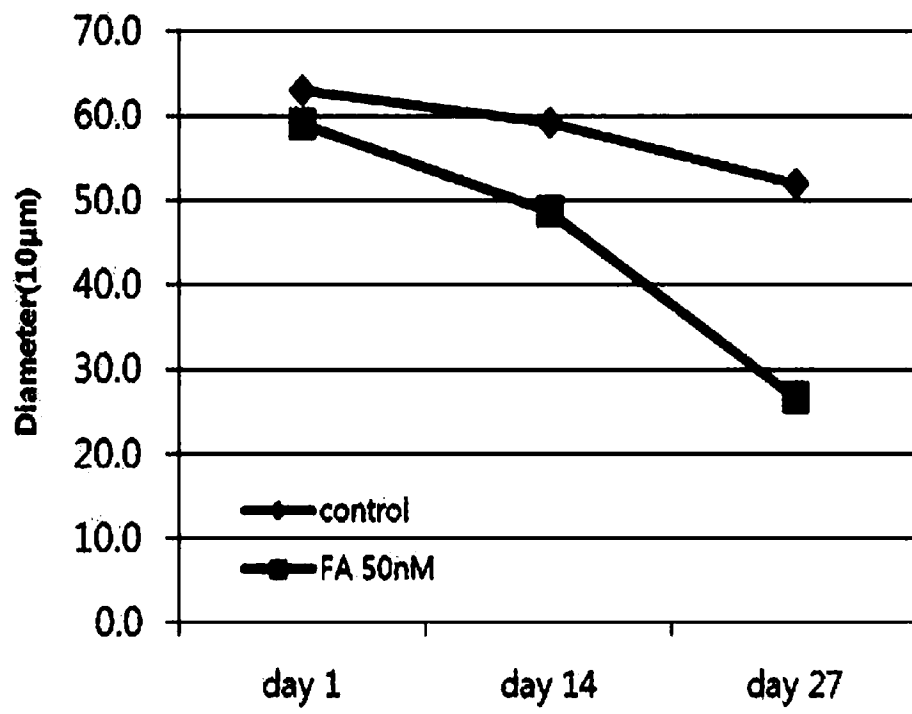
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005738**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/15(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A61K 31/19(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)

G01N 33/15; G01N 33/50; A61K 31/19

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) & Keywords: preterm premature rupture of membrane, therapy, screening, placenta, amnion tissue, perforation, coating, folic acid(folic acid)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CZEIZEL et al., Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2010, vol. 148, no. 2, pages 135-140 See pages 135-139.	1-6,8
A	FERGUSON et al., preterm premature rupture of membranes: nutritional and socioeconomic factors, Obstetrics & Gynecology, 2002, vol. 100, no. 6, pages 1250-1256 See pages 1250-1255.	1-6,8
A	GOLDENBERG et al., Biochemical markers for the prediction of reterm birth, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005, vol. 192, no. 5, pages S36-S46 See pages S36-S44.	1-6,8
A	SEGEL et al., Duration of antibiotic therapy after preterm premature rupture of fetal membranes, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2003, vol. 189, no. 3, pages 799-802 See pages 799-802.	1-6,8



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

"I" 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

14 JANUARY 2015 (14.01.2015)

Date of mailing of the international search report

14 JANUARY 2015 (14.01.2015)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005738

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JUNG, Won Yeong, Epilepsy and pregnancy, 17th Spring Conference of Korean Neurological Association, 1999, ISSN 1225-7044, pages 29-38 See pages 29-36.	1-6,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005738

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005738

**Patent document
cited in search report**

**Publication
date**

**Patent family
member**

**Publication
date**

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/15(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A61K 31/19(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/15; G01N 33/50; A61K 31/19 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) & 키워드:조기 양막파수, 치료, 스크리닝, 태반, 양막 조직, 천공, 도포, 폴산(folic acid)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CZEIZEL 외 4명, Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2010년, 148권, 2호, 페이지 135-140 페이지 135-139 참조.	1-6,8
A	FERGUSON 외 4명, preterm premature rupture of membranes: nutritional and socioeconomic factors, Obstetrics & Gynecology, 2002년, 100권, 6호, 페이지 1250-1256 페이지 1250-1255 참조.	1-6,8
A	GOLDENBERG 외 2명, Biochemical markers for the prediction of reterm birth, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005년, 192권, 5호, 페이지 S36-S46 페이지 S36-S44 참조.	1-6,8
A	SEGEL 외 4명, Duration of antibiotic therapy after preterm premature rupture of fetal membranes, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2003년, 189권, 3호, 페이지 799-802 페이지 799-802 참조.	1-6,8
☒ 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 2015년 01월 14일 (14.01.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 01월 14일 (14.01.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 3473		심사관 장봉호 전화번호 ++82-42-481-3353 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	정원영, Epilepsy and pregnancy, 제17차 대한신경과학회 춘계학술대회, 1999년, ISSN 1225-7044, 페이지 29-38 페이지 29-36 참조.	1-6, 8

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음