



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0125227
(43) 공개일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/57 (2006.01) A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) A61K 31/565 (2006.01)
A61K 31/567 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/57 (2013.01)
A61K 31/454 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0049206

(22) 출원일자 2019년04월26일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

안기훈

서울특별시 강남구 삼성로 417 대치포스코더샵아파트 103-1801

(74) 대리인

공병욱

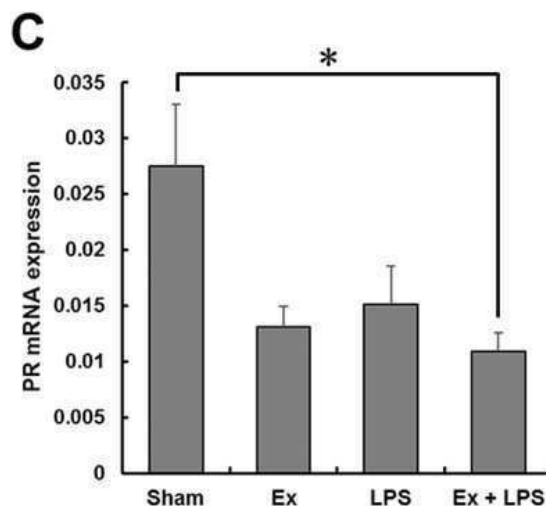
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 조산의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 조산을 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 자궁 경부 상피의 프로그스테론 수용체의 작용을 상향조절하거나, 자궁 경부 평활근의 에스트로겐 수용체 알파의 작용을 하향조절함으로써 조산을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)

A61K 31/565 (2013.01)

A61K 31/567 (2013.01)

A61K 31/7088 (2013.01)

A61P 15/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014R1A1A1002300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구
연구과제명	자궁경부결손 및 손상으로 인한 조산 동물모델의 구축과 그 유효성 확인을 위한 기
초연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

프로게스테론 수용체 작용제를 유효성분으로 포함하는 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제는 울리프리스탈(ulipristal), 아소프리스닐(Asoprisnil), 텔라프리스톤(Telapristone), 레보노르게스트렐(Levonorgestrel), 메게스트롤 아세테이트(Megestrol Acetate), 모메타손 푸로에이트(Mometasone furoate), 프로게스테론, 프로게스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제는 자궁 경부 상피의 프로게스테론 수용체의 작용을 상향조절하는 것인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

에스트로겐 수용체 알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

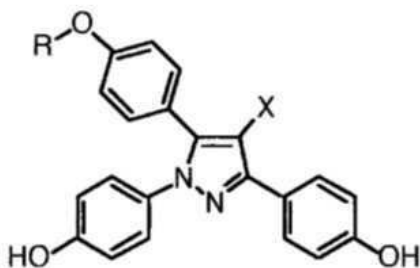
청구항 5

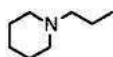
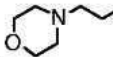
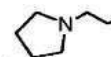
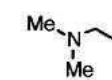
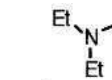
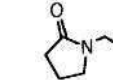
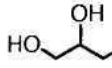
제4항에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 에스트로겐 수용체 알파 길항제인 것인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 길항제는 풀베스트란트(Fulvestrant), ICI-164384, 에타목시프리페톨(Ethamoxypriphetol), 미페프리스톤(mifepristone), 바제독시펜(bazedoxifene), 브로파레스트롤(broparestrol), 사이클로페닐(cyclofenil), 오르멜록시펜(ormeloxifene), 오스페미펜(ospemifene), 메틸피페리디노피라졸(Methylpiperidinopyrazole, MPP), 클로미펜(clomifene), 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 토레미펜(toremifene), ICI-182780, 트랜스-하이드록시타목시펜(trans-hydroxytamoxifen), 라소폭시펜(Lasofoxifene), 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물:

[화학식 1]



여기에서 상기 R은 -H, , , , , , , 및  로 이루어진 군으로부터 선택되고;

상기 X는 C1 내지 C5의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 에스트로겐 수용체 알파 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 리보자임으로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 수용체 알파 발현억제제인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 자궁 경부 평활근의 에스트로겐 수용체 알파의 작용을 하향조절하는 것인, 조산의 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조산의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 임신 20주 내지 37주 기간 동안의 분만을 조산이라고 하며, 전체 분만 중 5-18%를 차지한다. 약 75%의 출생 전후의 사망률이 조산에 기인하고, 조산된 신생아는 신경학적, 호흡기, 및 위장관 계열의 합병증을 가질 위험성이 높다. 따라서, 임신의 유지에 있어 필요한 과정과 조산의 잠재적인 원인을 잘 이해하고 치료하는 것은 매우 중요하다. 조산은 조산 경험, 다태임신, 자궁 경부 기능이상, 흡연 비정상적 체질량 지표, 음주(alcohol consumption), 산모의 연령(maternal age), 스트레스, 및 유전적 요인과 같은 원인들에 기인한다. 그러나, 상기 와 같은 조산에 영향을 미치는 요소들이 알려져 있음에도 불구하고, 아직까지 조산을 간단하고 쉽게 진단하고, 치료할 수 있는 방법은 개발된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Romero R et al., Preterm labor: one syndrome, many causes. Science 2014;345:760-5.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 산모의 조산 위험성을 판정하고, 조산을 쉽고 간단하게 진단하기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 조산 산모의 경우 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현이 크게 증가하고, 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 프로게스테론 수용체 유전자의 발현이 크게 감소하는 경향이 있음을 규명하였으며, 이로부터 자궁 경부의 프로게스테론의 수용체의 작용을 상향조절하고 에스트로겐 알파 수용체의 작용을 하향조절하면 조산을 예방 또는 치료할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명은 프로게스테론 수용체 작용제를 유효성분으로 포함하는 조산의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제는 울리프리스탈(ulipristal), 아소프리스닐(Asoprisnil), 텔라프리스톤(Telapristone), 레보노르게스트렐(Levonorgestrel), 메게스트롤 아세테이트(Megestrol Acetate), 모메타손 푸로에이트(Mometasone furoate), 프로게스테론, 프로게스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

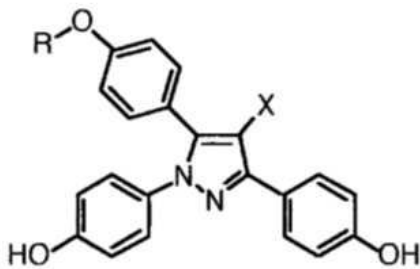
[0010] 본 발명에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제는 자궁 경부 상피의 프로게스테론 수용체의 작용을 상향조절하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 양태에 있어서, 본 발명은 에스트로겐 수용체 알파 억제제를 유효성분으로 포함하는 조산의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 에스트로겐 수용체 알파 길항제이다.

[0014] 본 발명에서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 길항제는 풀베스트란트(Fulvestrant), ICI-164384, 에타목시프리페톨(Ethamoxytriphetol), 미페프리스톤(mifepristone), 바제독시펜(bazedoxifene), 브로파레스트롤(broparestrol), 사이클로페닐(cyclofenil), 오르멜록시펜(ormeloxifene), 오스페미펜(ospemifene), 메틸피페리디노피라졸(Methylpiperidinopyrazole, MPP), 클로미펜(clomifene), 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 토레미펜(toremifene), ICI-182780, 트랜스-하이드록시타목시펜(trans-hydroxytamoxifen), 라소폭시펜(Lasofloxifen), 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0015] [화학식 1]



[0016]

[0017] 여기서 상기 R은 -H, , , , , , , 및 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0018] 상기 X는 C1 내지 C5의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 에스트로겐 수용체 알파 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, shRNA 및 리보자임으로 이루어진 군으로부터 선택된 에스트로겐 수용체 알파 발현억제제이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 억제제는 자궁 경부 평활근의 에스트로겐 수용체 알파의 작용을 하향조절하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 조산의 발병을 억제시키거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, "치료"란 상기 조성물의 투여로 조산을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0024] 본 발명의 조산의 예방 또는 치료용 조성물은 조산이 발생할 가능성이 있거나 또는 발생된 개체에 투여함으로써 조산의 발병을 억제하거나 호전시키는데 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물 및 치료방법은 인간뿐만 아니라 조산과 관련된 질병이 발병할 수 있는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이, 토끼, 설치류(마우스, 랫트, 햄스터, 저빌) 등의 모든 포유동물에게도 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 질정제, 캡슐제, 현탁액, 연고제, 크림제, 질크림제, 겔제, 액제, 질액제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제, 질좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0029] 상제하제는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 유효성분의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 연령, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 유효성분은 0.0001 ~ 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 유효성분은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.001 ~ 1 중량%의 양으로 존재하여야 한다.
- [0031] 또한, 본 발명의 유효성분의 약제학적 투여 형태는 이들의 약제학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약제학적 활성 유효성분과 결합하거나 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약제학적 조성물은 마우스, 랫트, 소, 말, 돼지 등의 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 복강, 직장 또는 정맥, 동맥, 근육, 흡입, 경피, 피하, 피내, 자궁 내, 질 내, 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 용어, "작용제"는 생체 작용 물질의 수용체에 결합하여 그 물질이 갖는 작용과 같은(또는 유사한) 작용을 하는 물질 또는 약제, 또는 수용부위의 활성을 높이는 분자를 말한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어, "억제제"는 길항제(antagonist)일 수 있다. 길항제란 어떤 생체작용물질의 수용체와의 결합에 길항적으로 작용하지만, 자신은 각 수용체를 통한 생리작용을 나타내지 않는 물질을 말하며, 길항제, 차단제(blocking agent), 저해제(inhibitor) 등이 이에 해당한다. 본 명세서에서 상기 길항제는 수용체에 대한 역작용제(inverse agonist)를 포함한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 서열은 에스트로겐 수용체 알파 mRNA에 상보적이고 에스트로겐 수용체 알

과 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, 에스트로겐 수용체 알파 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 구체적으로는 8 내지 60 염기이며, 보다 구체적으로는 10 내지 40 염기이다.

[0036] 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다. 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0037] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 디자인은, GenBank에 공지된 에스트로겐 수용체 알파 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다 (Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci., 55:334-358(1999)).

[0039] 본 명세서에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 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 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포연구에 응용되었다.

[0040] 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥(에스트로겐 수용체 알파 mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(에스트로겐 수용체 알파 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 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.

[0041] siRNA 말단 구조는 에스트로겐 수용체 알파 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활 말단(blunt end) 혹은 점착 말단(cohesive end) 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0042] 본 발명에서 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 스텐-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

- [0044] 본 명세서에서, 프로게스테론 수용체(Progesterone receptor, PR)란, NR3C3 또는 핵 수용체 서브 패밀리 3, 그룹 C, 멤버 3으로도 알려진 수용체로서, 세포 내부에서 발견되는 단백질이다. 프로게스테론 수용체는 스테로이드 호르몬인 프로게스테론에 의해 활성화된다. 인간에서 PR은 염색체 11q22에 존재하는 단일 PGR 유전자에 의해 암호화되며, 분자량이 다른 2 개의 이형체(isoform)인 PR-A와 PR-B를 가지고있다. PR-B는 프로게스테론 효과의 양성 조절제이며, PR-A는 PR-B의 효과에 길항 작용을 한다고 알려져 있다.
- [0045] 본 명세서에서, 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen receptor alpha, ER α)란, NR3A1 (핵 수용체 서브 패밀리 3, 그룹 A, 멤버 1)이라고도 알려진 수용체로서, 성 호르몬인 에스트로겐에 의해 활성화되는 핵 수용체인 에스트로겐 수용체의 두 가지 주요 유형 중 하나이다. 인간에서 ER α 는 유전자 ESR1 (EStrogen Receptor 1)에 의해 코딩된다.
- [0046] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 조산의 발병을 억제시키거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, "치료"란 상기 조성물의 투여로 조산을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0047] 본 발명의 조산의 예방 또는 치료용 조성물은 조산이 발생할 가능성이 있거나 또는 발생된 개체에 투여함으로써 조산의 발병을 억제하거나 호전시키는데 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물 및 치료방법은 인간뿐만 아니라 조산과 관련된 질병이 발병할 수 있는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 모든 포유동물에게도 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0052] 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 유효성분의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 연령, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 유효성분은 0.0001 ~ 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 유효성분은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.001 ~ 1 중량%의 양으로 존재하여야 한다.
- [0054] 또한, 본 발명의 유효성분의 약제학적 투여 형태는 이들의 약제학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수

있고, 또한 단독으로 또는 타 약제학적 활성 유효성분과 결합하거나 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

- [0055] 본 발명의 약제학적 조성물은 마우스, 랫트, 소, 말, 돼지 등의 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 복강, 직장 또는 정맥, 동맥, 근육, 흡입, 경피, 피하, 피내, 자궁 내, 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 유효 성분으로 포함하는 조산의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 상기 조산의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0058] 상기 식품 조성물에는 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제 이외에도 조산의 개선에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0059] 상기 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0060] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)도 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능성 식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 용어 "건강기능성 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0062] 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [0063] 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 에스트로겐 수용체 알파 길항제는 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량 %, 바람직하게는 5 ~ 10 중량 %의 용량으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하의 용량으로도 사용될 수 있다.
- [0064] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0065] 본 명세서에서 용어, "개선"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 조산의 병증이 호전 내지 완화되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 중성지방 양의 감소, 지방신생의 감소, 간내 지방량의 감소, 염증 및 섬유화의 감소 등 조산 질환의 증상을 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 투여가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 조산 질환의 치료방법을 제공한다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 용어, "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 상기 조성물을 필요로 하는 대상체(개체)에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

- [0068] 조성물의 "치료적 유효량"은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.
- [0069] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 대상체는 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이로 이루어진 군으로부터 선택되는 동물이나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 산모의 조산을 치료하는 방법을 제공한다:
- [0071] 대상자(subject)의 자궁 경부로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0072] 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 투여하는 단계.
- [0073] 본 명세서에서 용어 "대상자(subject)"는 조산의 가능성이 있을 것으로 추정되어 조산의 위험성에 대한 정보를 얻고자 하는 대상자를 의미하며, 임신이 가능한 포유류를 의미한다. 구체적으로 상기 포유류는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 마우스, 랫트, 또는 인간(human)을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 대상자는 조산 동물 모델이고, 보다 구체적으로는 조산 마우스/랫트 모델이며, 자궁 경부가 절제되고, 및/또는 LPS가 투여된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적인 일 구현예에 따른 상기 조산 동물 모델의 제조방법은 대한민국 공개특허 제10-2017-0125708호에 기재되어 있다.
- [0075] 본 발명자들은 조산의 발병시, 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현이 크게 증가하고, 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 프로게스테론 수용체 유전자의 발현이 크게 감소하는 경향을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서의 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현 수준 증가, 또는 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서의 프로게스테론 수용체 유전자의 발현수준 감소; 및 산모에서 조산의 발병과의 상관성에 기초한다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 유전자의 발현 수준은 대상자의 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0077] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 유전자의 발현 수준은 대상자의 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0078] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 측정된 대상자의 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 정상대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 유전자의 발현수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0079] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 ER α 또는 PR 유전자의 발현수준의 측정은 유전자의 mRNA 발현 수준, 또는 단백질 발현 수준의 측정을 통해 이루어진다.
- [0080] 본 발명의 방법에서, 상기 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA 발현 수준의 측정은 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA를 RT-PCR에 의해 증폭하는 단계에 의해 수행된다.
- [0081] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 ER α 의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 RT-PCR은 서열번호 3 및 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 수행된다.
- [0082] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 있어서, 상기 PR의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 RT-PCR은 서열번호 7 및 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 수행된다.
- [0083] 본 발명의 방법에서, 상기 ER α 또는 PR 유전자 단백질의 발현 수준의 측정은 ER α 또는 PR 유전자의 단백질을 면역 분석(immunoassay)하는 단계에 의해 수행된다.
- [0084] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 측정된 대상자의 ER α 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 증가되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0085] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 측정된 대상자의 PR 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0086] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은, 대상자의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트론(estrone, E1) 또는 프로게스테론(progesterone, P4)의 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.

- [0087] 또한, 본 발명의 방법은 상기 단계에서 측정된 E1 또는 P4의 수준을 정상대조군의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 측정된 E1 또는 P4의 수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0088] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 있어서, 상기 대상자의 에스트론 및 프로게스테론의 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우에는 산모의 조산 위험성이 더 높은 것으로 판정한다.
- [0089] 본 발명의 방법에서 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 측정하여 조산의 발병 위험성을 판단하는 것은 크게 두 가지의 방법, 즉 유전적 분석(genetic analysis) 방법과 면역 분석(immunoassay) 방법으로 실시할 수 있다.
- [0090] 유전적 분석에 기초하여 본 발명을 실시하는 경우, ER α 또는 PR 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브가 이용된다. 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 세포 또는 조직)에서 ER α 또는 PR mRNA 발현양을 조사하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다. mRNA를 얻기 위하여, 먼저 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당 업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다. 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포 내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다. 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.
- [0091] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어 이중체 구조를 형성한다. 이러한 이중체 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 등 공지문헌에 개시되어 있다.
- [0092] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus litalis, 및 Pyrococcus furiosus (Pfu)를 포함한다.
- [0093] 증폭 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요청된다.
- [0094] 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0095] 본 명세서에 기술된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR, 복구연쇄 반응(repair chain reaction), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0096] 본 발명의 구체적인 구현예에 의하면, 본 발명에서 증폭 반응에 이용되는 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머쌍은 주형인 ER α 또는 PR cDNA 서열에 완벽

하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다.

[0097] 본 발명의 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA (즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 디자인할 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산 분자를 적합한 방법으로 분석하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, ER α 유전자의 발현이 정상인 자궁 경부로부터 분리한 시료에서의 발현 수준에 비해 높은 것으로 확인되는 경우에는 조산 위험성이 높은 것으로 판정된다.

[0098] 또한, 이러한 증폭 반응을 통하여 PR 유전자의 발현이 정상인 자궁 경부로부터 분리한 시료에서의 발현 수준에 비해 낮은 것으로 확인되는 경우에는 조산 위험성이 높은 것으로 판정된다.

[0099] 또한, 본 발명의 방법은 ER α 또는 PR 유전자 또는 ER α 또는 PR의 cDNA에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 통해 시행할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 "프로브"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타겟 핵산 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위 내에서, 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 이들 변형, 즉 표지(label)는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신, 피코에리트린, 로다민, 리사민, 그리고 Cy3와 Cy5), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사성동위원소(P^{32} , 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 형광, 방사능, 발색측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0100] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, ER α 또는 PR 유전자의 cDNA에 혼성화되는 본 발명의 프로브는 불용성 담체(예컨대, 니트로셀룰로오스 또는 나일론 필터, 유리판, 실리콘 및 플루오로카본 지지체)에 고정화되어, 마이크로어레이를 제조할 수 있다. 불용성 담체로서의 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 담체에 결합될 수 있다.

[0101] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다.

[0102] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium)등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 니트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

[0104] 다음으로, 본 발명에서 ER α 또는 PR 단백질의 발현 수준은 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.

[0105] 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked

immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색, 면역조직화학 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0106] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 ER α 또는 PR 단백질을 검출하는 데 이용될 수 있다. ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법 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 참조로 삽입된다.

[0107] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차 항체로서 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체와 상기 시료 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR, TMB, ABTS, o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT 및 m-PMS와 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0108] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 시료 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 표지가 결합되어 있고, ER α 또는 PR 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 표지로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0109] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 표지를 가지고 있다. 상기 표지는 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사성 물질(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 밖의 다양한 표지 및 표지화 방법은 당 업계에 공지되어 있다.

[0110] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0112] 본 발명에서, 상기 프로게스테론 수용체 작용제 또는 에스트로겐 수용체 알파의 억제제를 투여하는 단계는 상술한 본 발명의 일 양태인 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.

발명의 효과

[0114] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0115] 본 발명은 조산의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 식품조성물에 관한 것이다. 본 발명은 근위부 자궁

경부에서 ER α 유전자의 발현 수준의 증가 및 PR 유전자의 발현 수준의 감소가 조산의 발병과 상관관계가 있음을 발견한 것에 기초한다. 본 발명의 조성물은 자궁 경부 상피의 프로게스테론 수용체의 작용을 상향조절하거나, 자궁 경부 평활근의 에스트로겐 수용체 알파의 작용을 하향조절함으로써 조산을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0117]

도 1a 내지 도 1c는 qRT-PCR을 이용한 산후 생쥐 자궁 경부 조직에서 ER α , ER β 및 PR의 mRNA 발현을 나타낸 도이다. (1a) ER α , (1b) ER β 및 (1c) PR RNA 발현. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$. ER : 에스트로겐 수용체, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.

도 2a 내지 도 2e는 웨스턴 블롯을 통해 측정된 자궁 경부 조직에서의 ER α , ER β 및 PR의 단백질 발현을 나타낸 도이다. (2a) ER α , (2b) ER β , (2c) PR-A, (2d) PR-B 및 (2e) PR-A / PR-B 발현의 단백질 발현. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$. ER : 에스트로겐 수용체, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.

도 3a 내지 도 3i는 면역조직화학을 사용하여 결정된 근위 및 원위 자궁 경부의 ER α , ER β 및 PR의 국소화 및 발현 수준을 나타낸 도이다. (3a) 자궁 경부에서 ER α 의 발현 (x200). (3b) IHC 자궁 경부 상피의 ER α 점수. (3c) 자궁 경부의 평활근 층에서 ER α 의 IHC 점수. (3d) 자궁 경부의 ER β 의 발현 (x200). (3e) 자궁 경부의 상피에서 ER β 의 IHC 점수. (3f) 자궁 경부의 평활근 층에서 ER β 의 IHC 점수. (3g) 자궁 경부의 PR의 표현 (x200). (3h) IHC는 자궁 경부의 상피에서 PR의 점수. (3i) 자궁 경부의 평활근 층에서의 PR의 IHC 점수. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. EPI : 상피, SML : 평활근 층, P : 근위부 자궁 경부, D : 원위부 자궁 경부, ER : 에스트로겐 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.

도 4a 내지 도 4d는 근위 및 원위 자궁 경부의 ER / PR 발현을 나타낸 도이다. (4a) 자궁 경부 상피에서 ER α / PR의 발현. (4b) 자궁 평활근 층에서 ER α / PR의 발현. (4c) 자궁 경부 상피에서 ER β / PR의 발현. (4d) 자궁 경부 평활근 층에서 ER β / PR의 발현. EPI : 상피, SML : 평활근 층, P : 근위부 자궁 경부, D : 말초 자궁 경부, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$.

도 5a 내지 도 5c는 혈청 에스트로겐과 프로게스테론 수치를 비교하여 나타낸 도이다. (5a) 혈청 에스트론 (E1) 수준, (5b) 혈청 17 β 에스트라다올 (E2) 수준, (5c) 혈청 프로게스테론 (P4) 수준. 값은 평균 SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$.

도 6은 자궁 경부 절제와 관련된 조산과 분만에서 자궁 경부의 ER α 와 PR 시스템의 역할에 대한 이론적 모델을 나타낸 도이다. "Muscle fatigue, 근육 피로"는 근위부 자궁 경부에서 ER α 와 PR의 발현 비가 증가하고 기능성 프로게스테론이 제거되고, 근육 세포의 수축이 발생할 때 발생한다. "근육 피로" 이후 자궁 경부의 internal os가 약화되고 조산이 발생한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118]

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.

[0120]

실시예

[0122]

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0124]

실험재료 및 실험방법

1. 동물모델 및 처치

모든 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (KOREA-2016-0070). 성 성숙된 C57BL/6 마우스가 사용되었다. 대조군 마우스(sham group)에는 일반 생리식염수(NS)를 임신 16일에 주사하였고 (n=10), 절개 마우스군(Excision group, Ex)에는 일반 생리 식염수를 주사하였으며(n=9), LPS군에는 LPS를 주사하였고(n=10), Ex+LPS 군에는 자궁 경부를 절개하고 LPS를 주사하였다(n=10). 자궁 경부 절개는 5주령의 암컷 마우스에 실시되었다. 상기 마우스들은 이소플루란으로 호흡마취 하에 질을 통하여 자궁 경부 절개가 이루어졌다. 3주 후, 암수 마우스간에 교배가 이루어졌다. 교배 후 점액전(mucus plug)이 발견되는 날짜를 "임신 1일"로 설정하였다. 동물들은 물과 사료를 무제한 급여하였고, 22-24℃에서 12시간 명암주기 하에 사육되었다. 임신 16일에, 마우스들은 NS(100 μ l) 또는 NS에 용해시킨 LPS(100 μ g/)를 투여받았다. 다음으로 마우스들은 이소플루란으로 마취한 후, 개복하여 제1 및 제2 태낭 사이의 자궁강에 LPS를 주사하였다. 피하조직은 vicryl 로 봉합되었고, 피부는 검은 명주실(black silk)로 봉합되었다.

2. 조직의 수집

분만 직후, 자궁 경부와 혈액을 수집하였다. 자궁 경부는 4% 완충 포르말린으로 실온에서 24시간동안 고정되었고, 파라핀에 포매하여 면역조직화학 분석에 사용되었다. 자궁 경부의 일부는 액체 질소 처리하고, -80° C에 보관하였다가 RNA 및 단백질을 추출에 사용하였다.

3. RNA 추출, cDNA 합성, 및 정량적 실시간 PCR

총 RNA는 냉동한 마우스의 자궁 경부를 TRIzol 용액(79306; Qiagen, CA, USA)에서 균질화시킨 후 추출하였다. RNA 농도를 측정하고, 260/280 nm에서 NanoDrop 분광광도계(Thermo scientific, Massachusetts, USA)를 사용하여 순도를 확인하였다. cDNA 합성은 총 RNA 1 μ g을 사용하여 수행되었다. PCR 증폭은 SYBR Green (TOPreal qPCR 2x PreMIX; Enzynomics, Daejeon, South Korea)을 사용하여 수행되었다. 정량적 실시간 PCR은 CFX96™ real-time system (Bio-Rad, CA, USA)을 통하여 수행되었다. qRT-PCR 분석은 샘플당 3회씩 반복 수행되었다. 타겟 유전자에 대한 프라이머의 서열은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

정량적 실시간 PCR에 사용된 마우스 프라이머 서열

유전자	방향	서열(5' to 3')	SEQ ID NO
GAPDH	Forward	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	1
	Reverse	TCGTCCCGTAGACAAAATGG	2
ER α	Forward	CCTCCCGCCTTCTACAGGT	3
	Reverse	CACACGGCACAGTAGCGAG	4
ER β	Forward	CTGTGATGAACACAGTGTTC	5
	Reverse	CACATTGGGCTTGCAGTCTG	6
PR	Forward	CTCCGGG1ACCGAACAGAGT	7
	Reverse	ACAACAACCCTTGGTAGCAG	8

4. 단백질 추출 및 웨스턴 블랏

NS 또는 LPS를 주사한 임신한 마우스의 자궁 경부를 프로테아제 억제제 각테일을 포함하는 RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% SD, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA; Biosesang, Sungnam, South Korea)에서 균질화 하였다. 조직은 15℃에서 19,000 g 로 15분간 원심분리되었다. 단백질 농도는 브래드포드 방법(Protein assay dye reagent concentrate buffer; Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 정량화되었다. 단백질(레인 당 20 μ g)은 8% SDS PAGE 겔에서 100V로 전기영동하여 분리되었다. 사이즈 분별을 위해 Pre-stained marker(161-0374; Bio-Rad, CA, USA)를 포함시켰다. 전기영동이 완료된 겔은 니트로 셀룰로오스 멤브레인으로

100V에서 120분간 트랜스퍼하였다. 멤브레인은 3% 스킵 밀크로 블로킹하고, TBS-T(Tris-완충식염수 및 Tween 20)로 희석한 후, 1차 항체로 처리하여 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다: ER α (1:1000, sc8005; Santa Cruz, Texas, USA), ER β (1:1000, sc8974; Santa Cruz), PR (1:250, MA1-410; Invitrogen, CA, USA), HPRT (1:1000, sc376559; Santa Cruz), 및 β -actin (1:1000, sc47778; Santa Cruz). 1차 항체와 인큐베이션 된 멤브레인을 TBS-T (pH 7.4)로 세척하고, HRP로 컨쥬게이션 된 항-마우스 및 항-토끼 2차 항체(1:5000; Jackson Immuno Research, PA, USA)로 2시간 동안 인큐베이션하였다. 밴드는 화학발광을 이용하여 검출하였다. 블롯은 ECL 키트 (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; Thermo scientific, Massachusetts, USA)를 이용하여 현상하고, 의료용 X-레이 필름 (EA8EC; Agra-Gevaert, Mortsel, Belgium)에 노출시킨 후 Image J software를 사용하여 분석하였다.

5. 면역조직화학 및 점수화

4% 완충 포르말린에서 1시간 동안 고정시키고 파라핀 블록으로 포매된 조직의 조직학은 다음과 같이 분석되었다. 파라핀 블록을 4 μ m의 절편으로 세절하고, 실란(silane) (5116-20F; MUTO, Tokyo, Japan)으로 코팅된 슬라이드 위에 마운팅한 후 염색하였다. 모든 슬라이드들은 현미경 (BX61; Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 파라핀으로 포매된 절편은 ER α (1:35, M7047; Dako, CA, USA), ER β (1:30, sc8974; Santa Cruz), 및 PR (1:70, sc538; Santa Cruz) 항체로 염색되었다. 절편들은 자일렌으로 왁스를 제거하고, 농도구배 에탄올로 재수화시켰다. 다음으로 절편들을 수돗물로 세척하고, 15분간 구연산 완충액에서 가열한 후, 실온에서 30분간 두었다. 절편들을 0.1% H₂O₂ 로 10분간 처리하여 내재적인 퍼옥시다아제를 블로킹하고, Tris 완충 생리식염수 (Tween 20, 1x, pH 7.4; Scytek, UT, USA)로 세척한 후, Super block (Scytek, UT, USA)으로 10분간 블로킹하였다.

ER α , ER β , 및 PR의 수준은 절편들을 ER α , ER β , 및 PR에 대한 1차 항체와 인큐베이션하여 측정하였다. 이어서, 절편을 Tris 완충 식염수로 세척하고, 비오틴화된 2차 항체와 인큐베이션하였다. 발색은 슬라이드를 DAB 시약과 인큐베이팅하여 이루어졌다. 절편들은 헤마톡실린으로 역염색, 탈수, 및 마운팅되었다. 모든 단계는 실온에서 수행되었다. 절편들은 Rotary Microtome (RM2255; Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 분석되었다. 면역염색 점수는 발색 수준에 따라 0에서 3까지 평가되었다. 점수화는 염색의 강도에 기초하여 다음과 같이 이루어졌다:

음성(0) - 염색이 되지 않거나 10% 미만이 염색;

약한 염색(+1) - 10% 초과 부분이 염색;

약함 내지 중간 염색(+2) - 34% 초과 부분이 염색; 및

강한 염색(+3) - 67% 초과 부분이 염색.

6. 혈청 호르몬의 정량

혈액을 수집하여 3,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 혈청을 분리하고 -80℃에서 보관하였다. 혈청 에스트론 (Serum estrone, E1), 17 β 에스트라디올 (17 β estradiol, E2), 에스트리올 (estriol, E3), 및 프로게스테론 (P4) 수준은 ELISA를 사용하여 확인하였다. Mouse E1 ELISA kit (1:50, MBS766232; Mybiosource, CA, USA), E2 ELISA kit (ab108667; Abcam, MA, USA), E3 ELISA kit (KA0316; Abnova, Taipei, Taiwan), 및 P4 ELISA kit (1:300, ADI-900-011; Enzo, NY, USA)가 제조사의 지침에 따라 사용되었다. 혈청 E3는 결과를 표시하지는 않았으나, 반복된 실험에도 검출되지 않았다.

7. 통계적 분석

데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현되었다. 각 실험의 결과들은 ANOVA(one-way analysis of variance)를 사용하여 분석하였고, 평균은 Tukey's and Duncan post hoc multiple comparisons으로 비교하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 통계적 분석은 SPSS 소프트웨어를 사용하여 수행하였다 (version 13.0; SPSS Inc, Chicago, IL).

[0154] **결과**

[0155] **1. 자궁 경부에서 ER 및 PR의 mRNA 발현**

[0156] 자궁 경부에서 ER 및 PR의 mRNA 발현은 정량적 PCR을 이용하여 측정하였다. 유사한 패턴은 ER α 및 ER β 의 발현에서 발견되었다. Ex 및 LPS 군에서 ER α 및 ER β 의 발현은 sham과 다른 그룹에서 유사하게 나타났다 (도 1a, 및 도 1b). 자궁 경부에서 PR의 발현은 sham 군에서보다 Ex 및 LPS 군에서 더 낮게 나타나는 경향이 있었다. Ex + LPS 군에서의 자궁 경부 PR 발현은 sham 군보다 유의적으로 낮았다 (도 1c).

[0158] **2. ER 및 PR의 단백질 수준**

[0159] Ex군의 ER α 발현은 sham 군 및 LPS 군보다 유의하게 높았다 (도 2a). 자궁 경부의 ER β 발현은 군간에 차이가 없었다 (도 2b). Ex 및 Ex + LPS 군에서의 PR-A 발현은 sham 및 LPS 군에서의 발현보다 유의하게 낮았다 (도 2c). Ex 및 Ex + LPS 군에서의 PR-B 발현은 LPS 군에서의 발현보다 유의하게 낮았다 (도 2d). PR-A와 PR-B는 그룹 간에 유사한 발현 양상을 보였으므로 그룹 간의 PR-A/PR-B는 유의적인 차이가 없었다 (도 2e).

[0161] **3. 자궁 경부에서 ER 및 PR 수용체의 국소화 및 발현(Localization and expression of ER and PR receptors in the cervix)**

[0162] 자궁 경부에서 성 호르몬 수용체의 발현 경향을 보다 구체적으로 파악하기 위하여, 본 발명자들은 면역조직화학을 이용하였다. 구체적으로, ER과 PR의 발현 수준과 부위를 확인하기 위해, 자궁 경부를 근위 및 원위로 나누어 조직 절편을 제작하였고, 절편당 3 부위를 무작위로 선택하여 ER 및 PR 발현을 평가하였다. 발현의 평균값을 계산하였다. 보다 구체적으로는, 상피 세포 (epithelium, EPI)와 평활근 세포 (smooth muscle layer, SML)의 발현 수준을 구별하여 기록하였다.

[0163] Ex + LPS 군에서 근위부 자궁 경부의 SML의 ER α 발현은 sham 군보다 높았다. 그러나 EPI에서는 차이가 없었다 (도 3a-3c). 그룹 간의 ER β 발현은 차이가 없었다 (도 3d-3f). 근위 경부의 EPI에서 PR 발현은 Ex + LPS 군에서 sham 군보다 유의하게 낮았다. 그러나 자궁 경부 EPI에서는 차이가 없었다 (도 3g-3i). 근위 경부 EPI에서의 ER과 PR의 비율(ER α /PR)은 Ex + LPS군에서 sham과 LPS 군보다 유의하게 높았다 (도 4).

[0164] 상기 결과로부터, 조산의 경우 근위부 자궁 경부의 평활근에서 ER α 의 발현이 증가되고, 근위부 자궁 경부의 상피세포에서 PR의 발현이 감소됨을 알 수 있다.

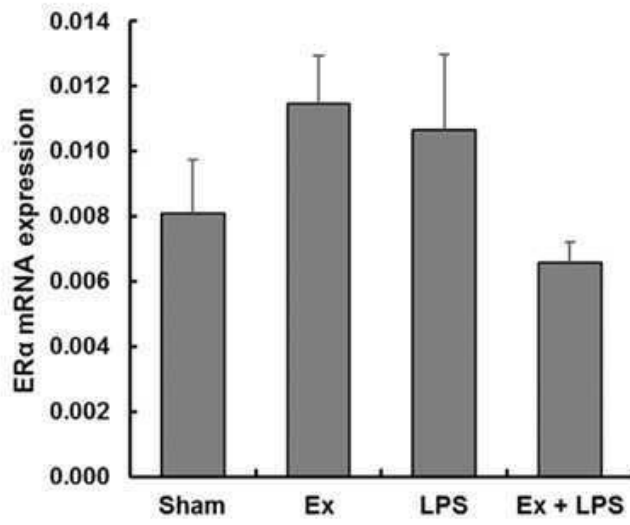
[0166] **4. 모체의 에스트로겐 및 프로게스테론의 혈청 내 수준**

[0167] 에스트론(E1)은 Ex 군과 Ex + LPS 군에서 sham 군보다 낮았다 (도 5a). 17 β 에스트라디올 수준은 그룹 간에 차이가 없었다 (도 5b). Ex, LPS 및 Ex + LPS 군에서 프로게스테론(P4) 수준은 sham 군보다 유의하게 낮았다 (도 5c).

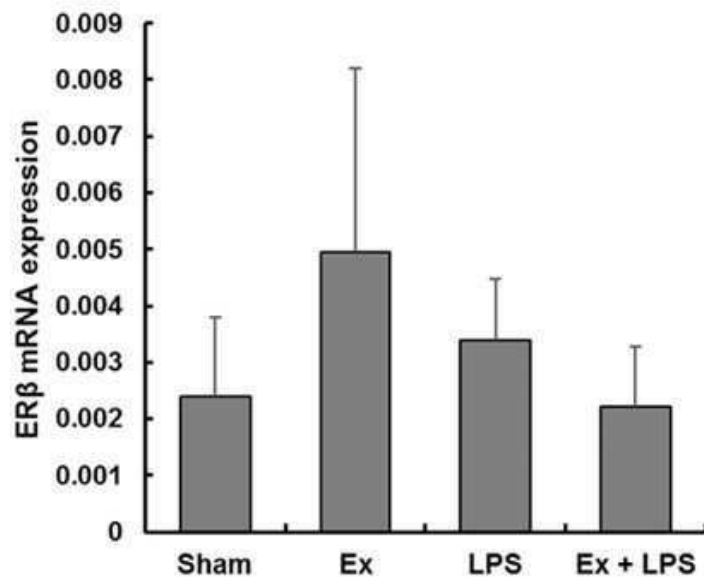
[0168] 상기 결과로부터, 조산의 경우 모체의 에스트론(E1) 및 프로게스테론(P4)의 혈청 내 수준이 감소함을 알 수 있다.

도면

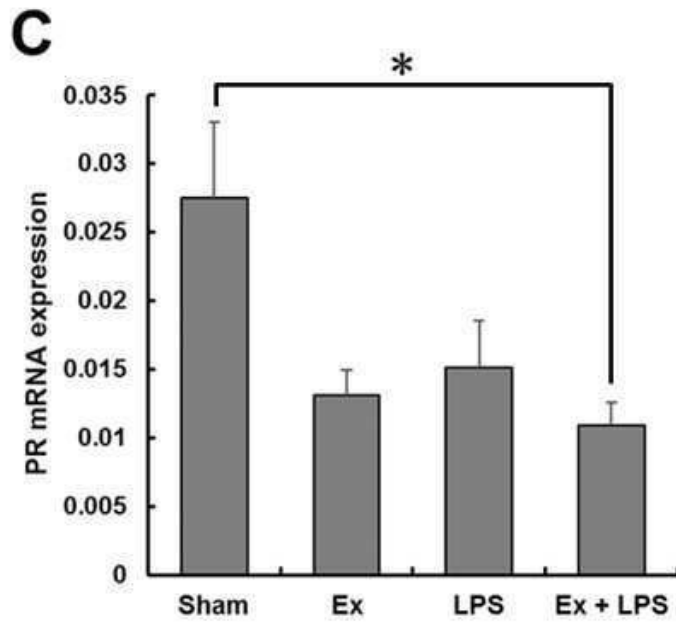
도면1a



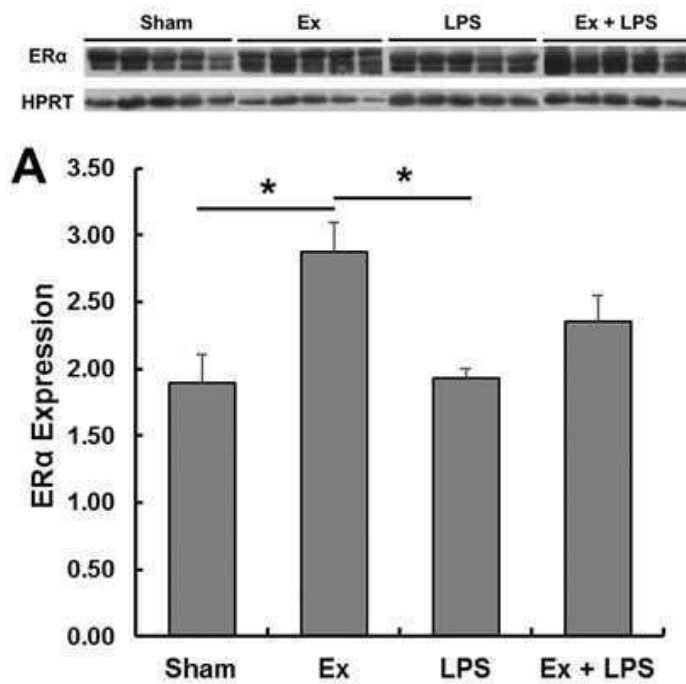
도면1b



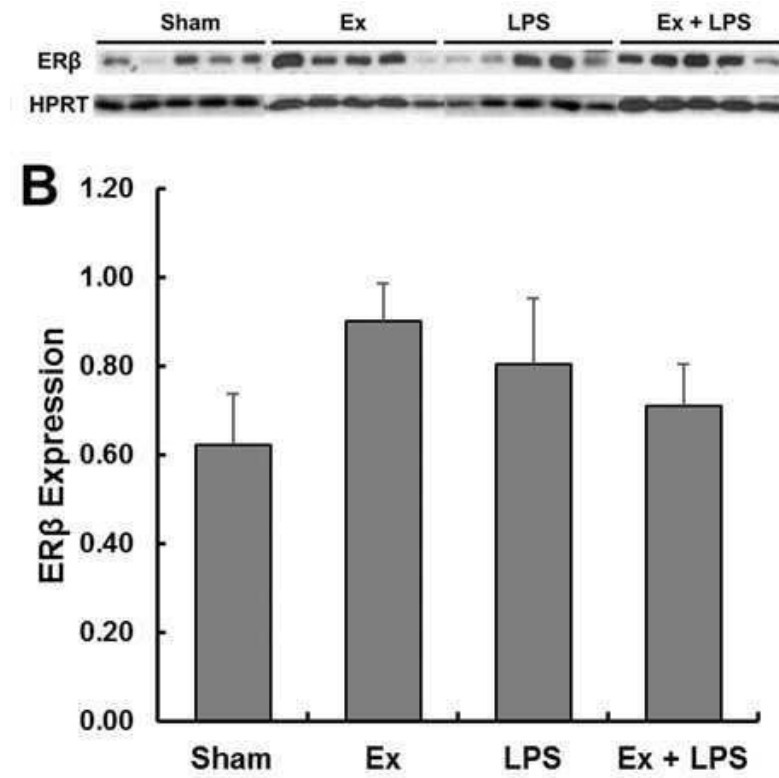
도면1c



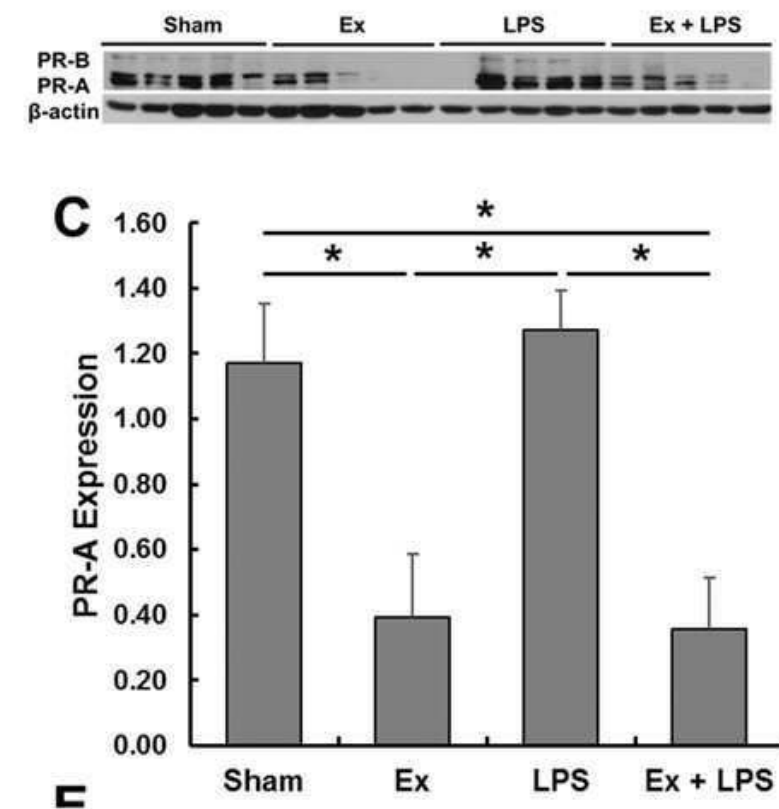
도면2a



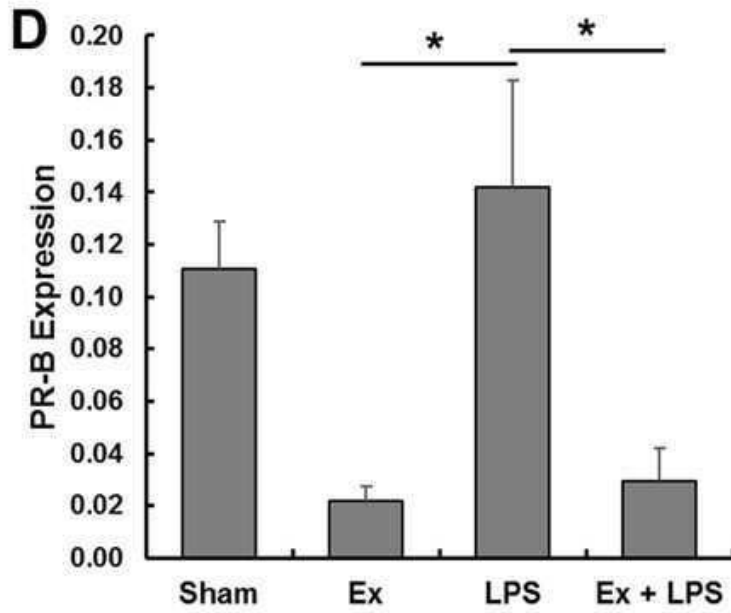
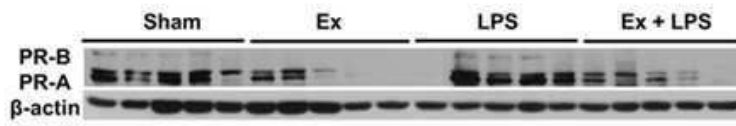
도면2b



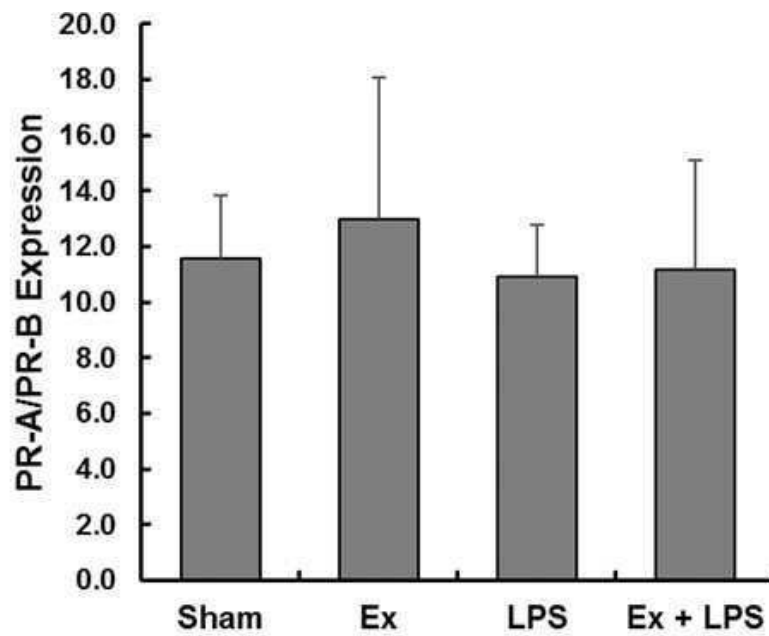
도면2c



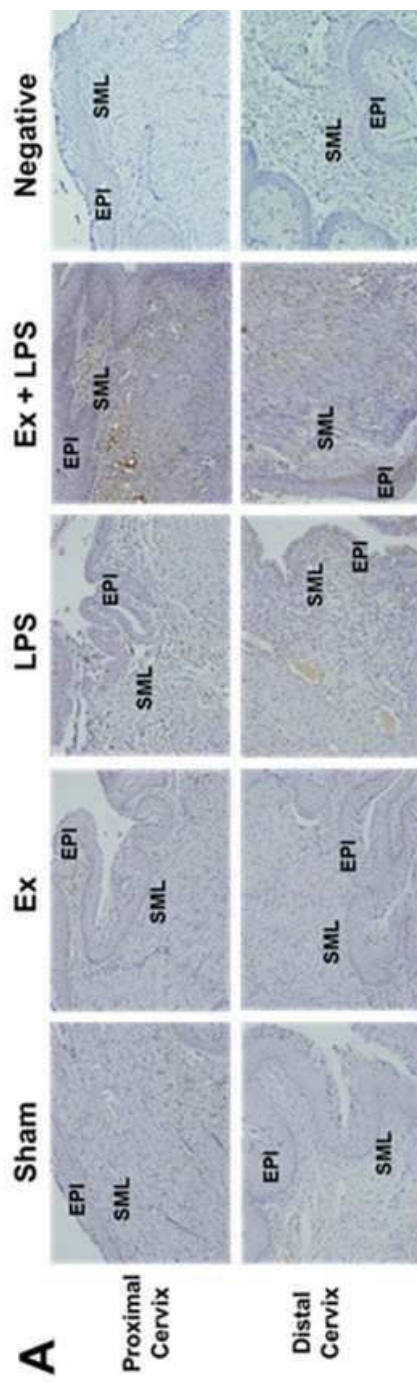
도면2d



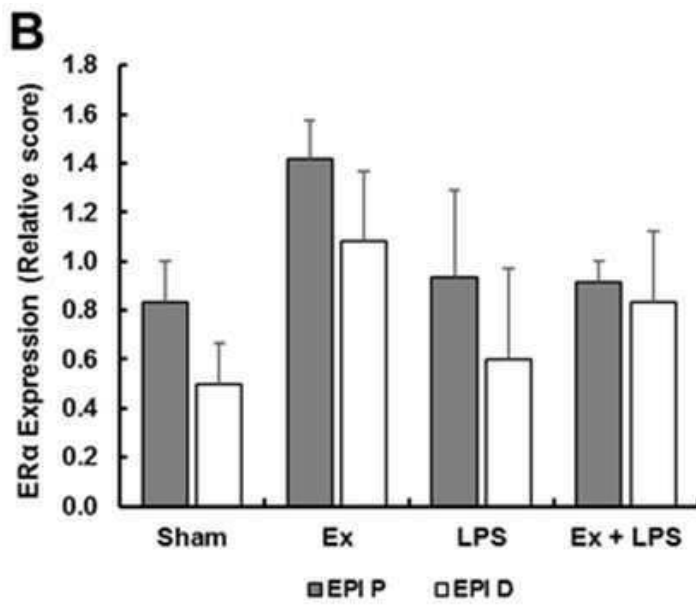
도면2e



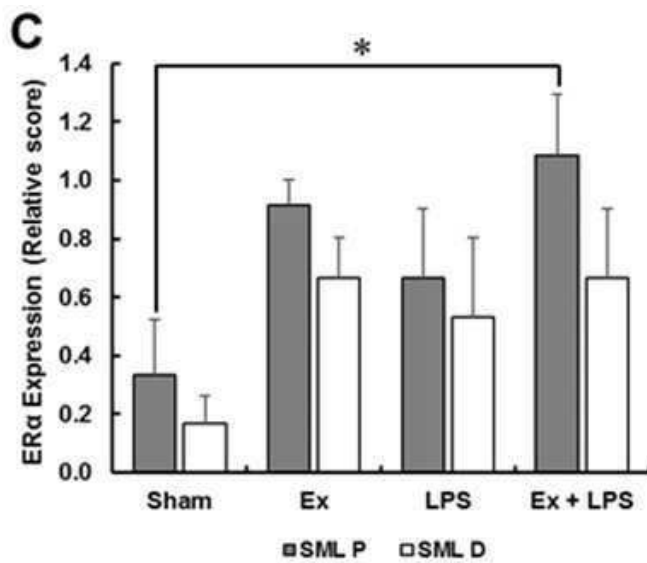
도면3a



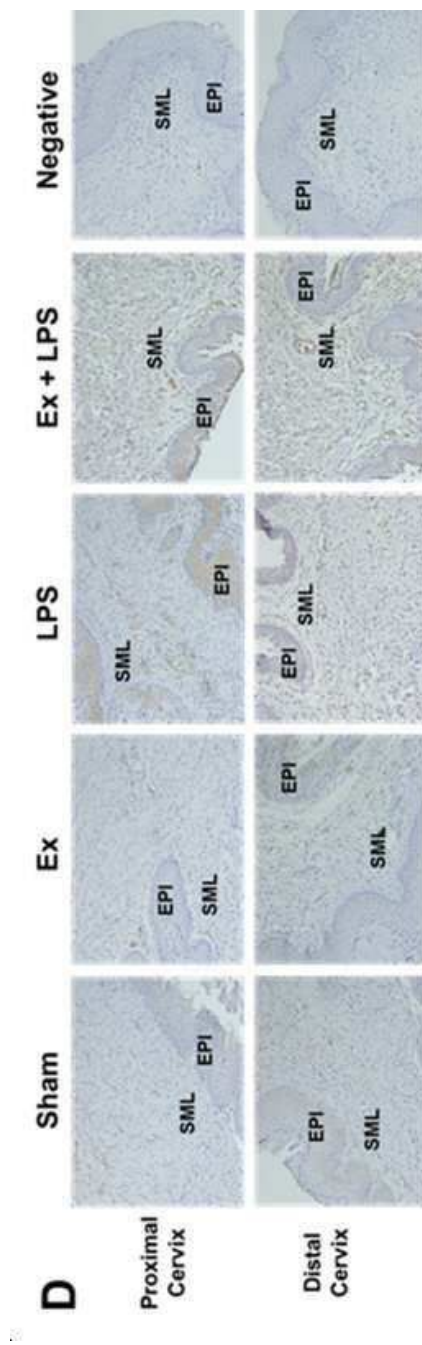
도면3b



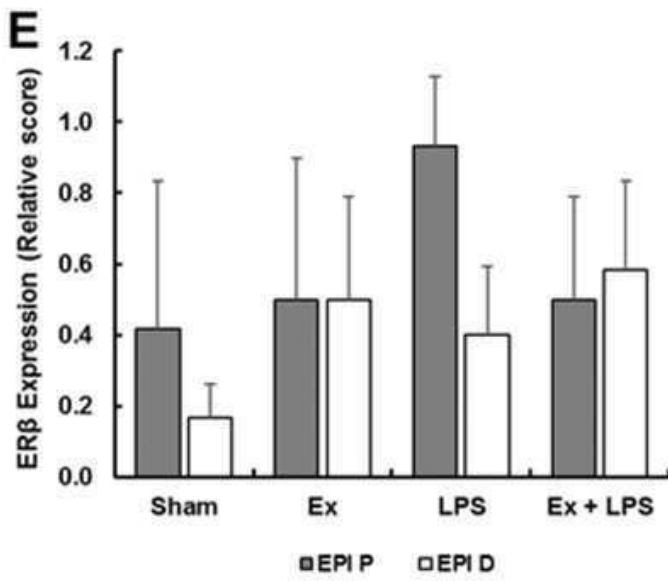
도면3c



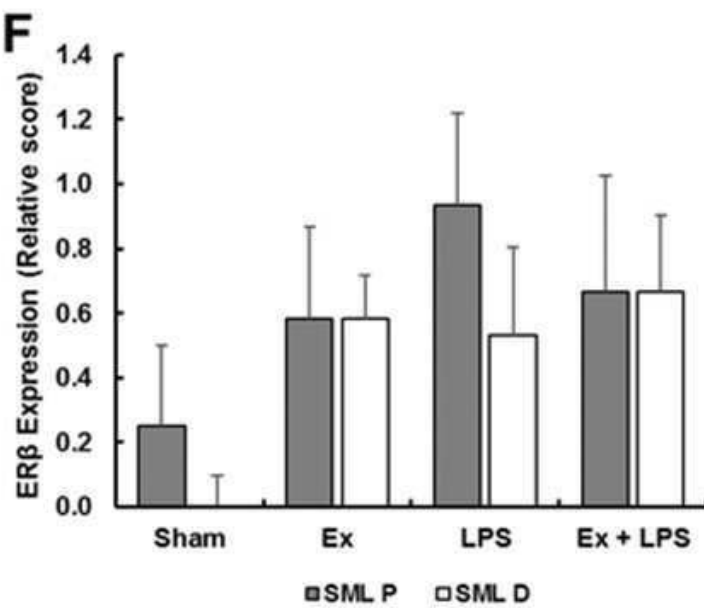
도면3d



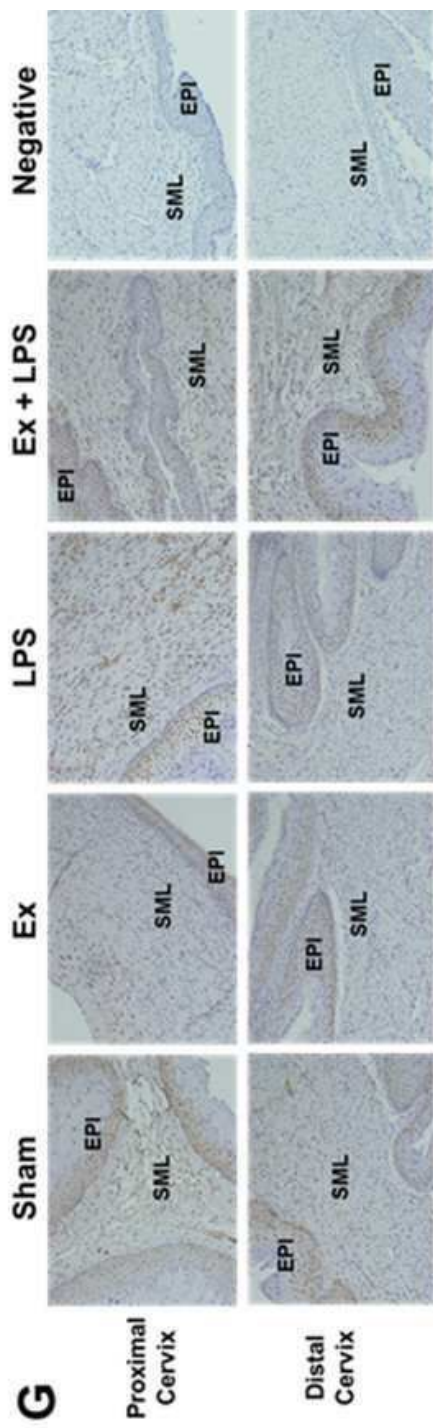
도면3e



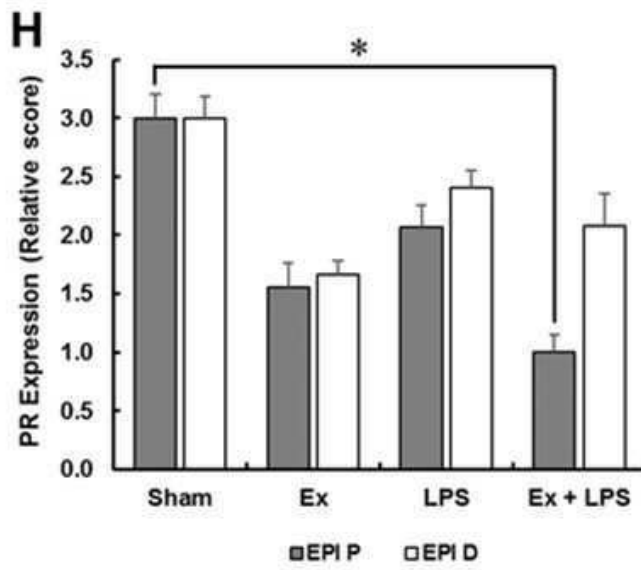
도면3f



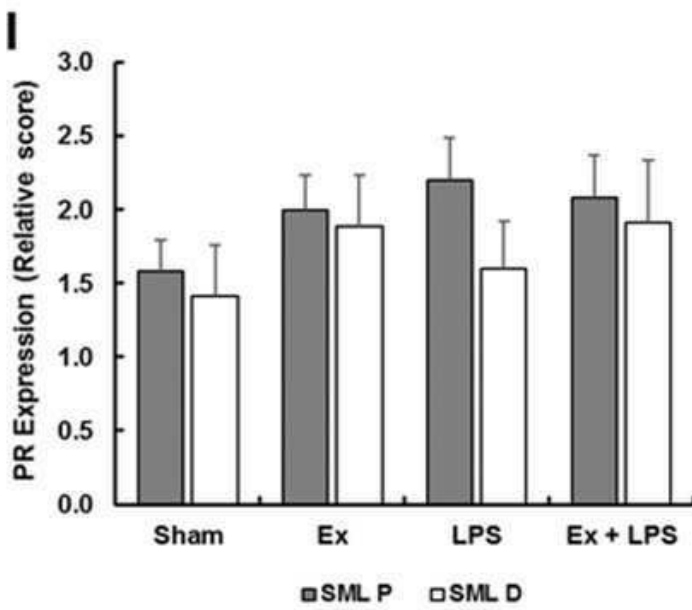
도면3g



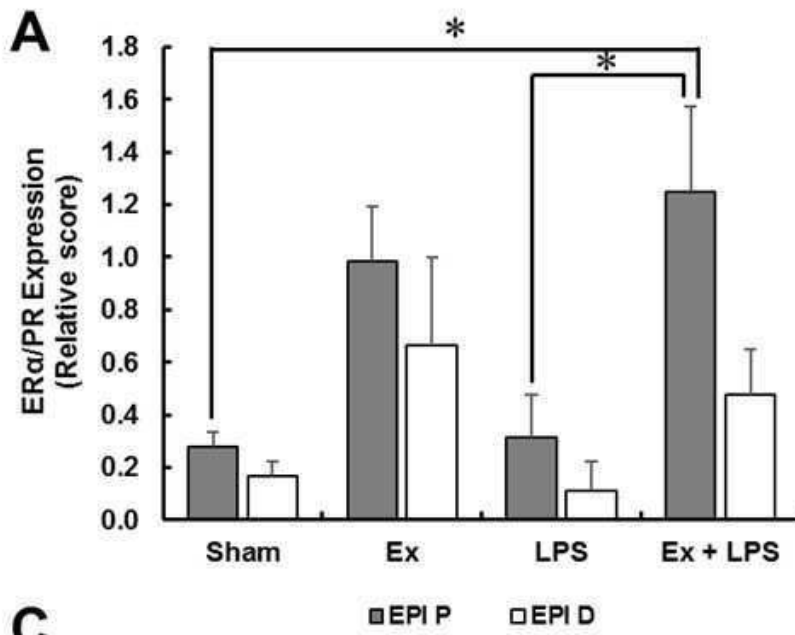
도면3h



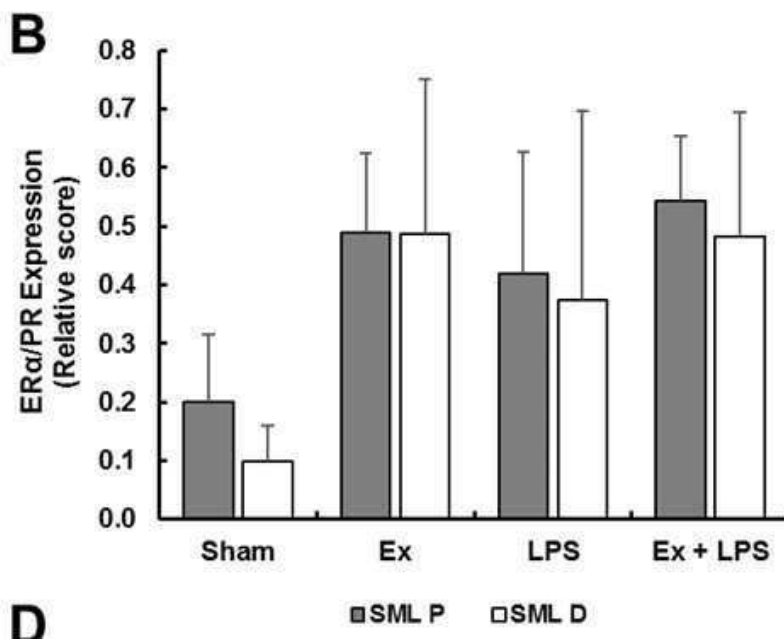
도면3i



도면4a

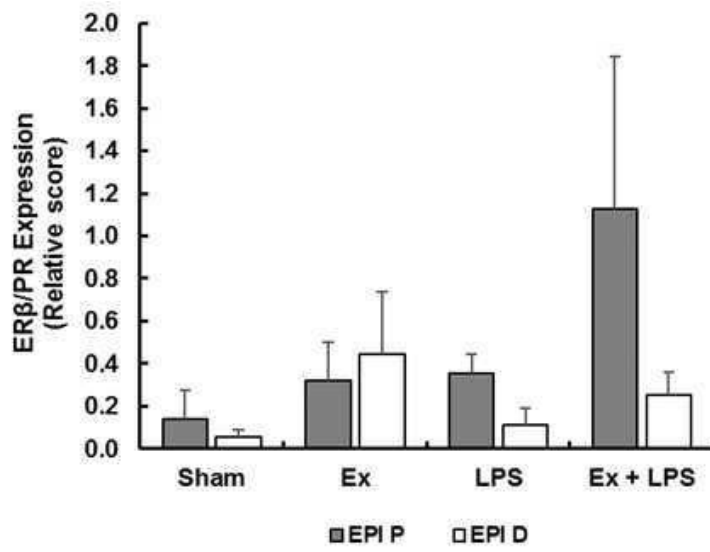


도면4b

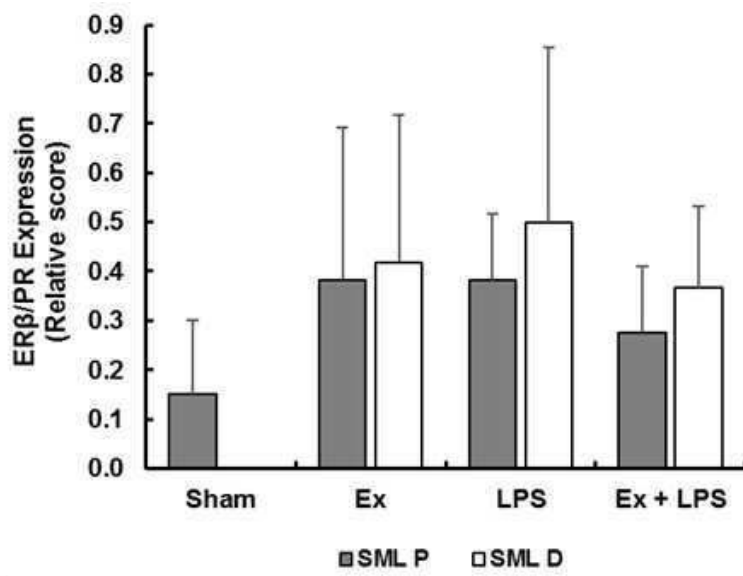


D

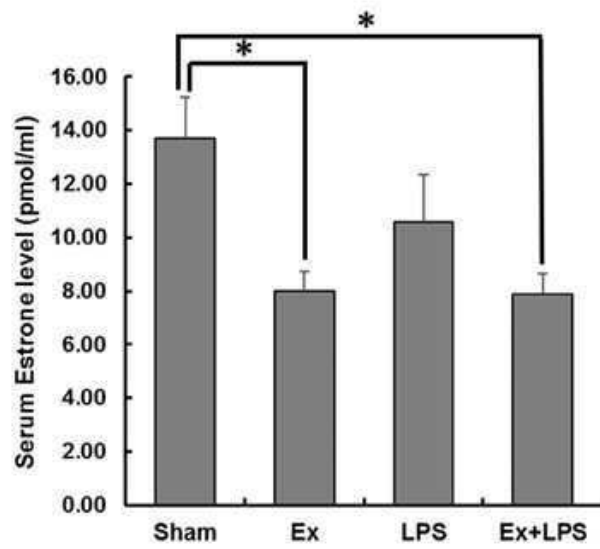
도면4c



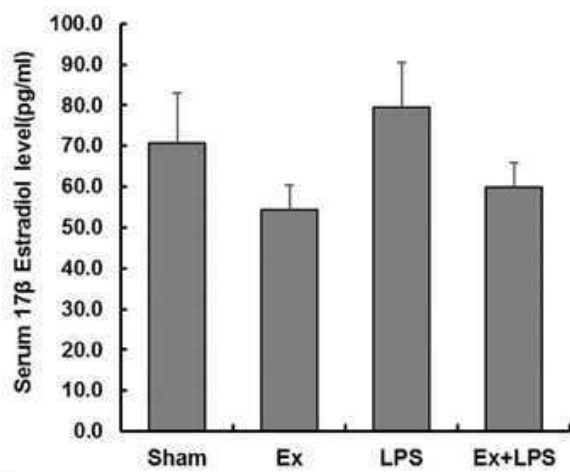
도면4d



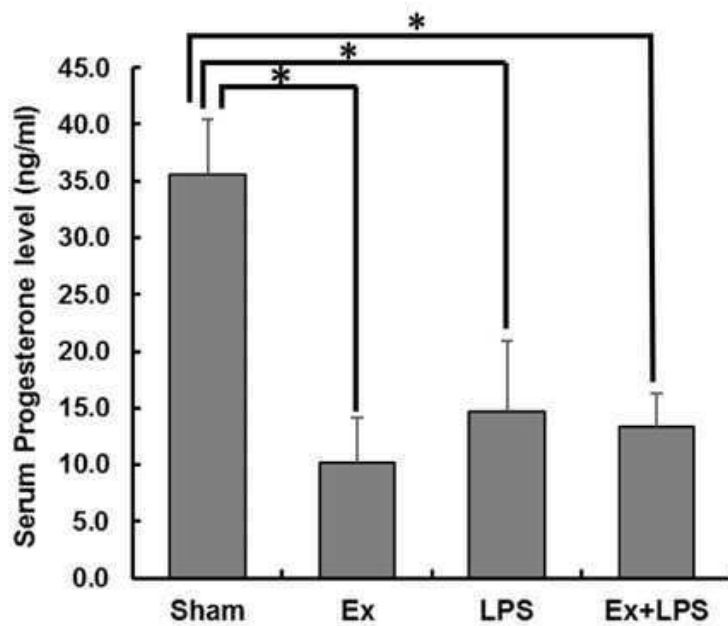
도면5a



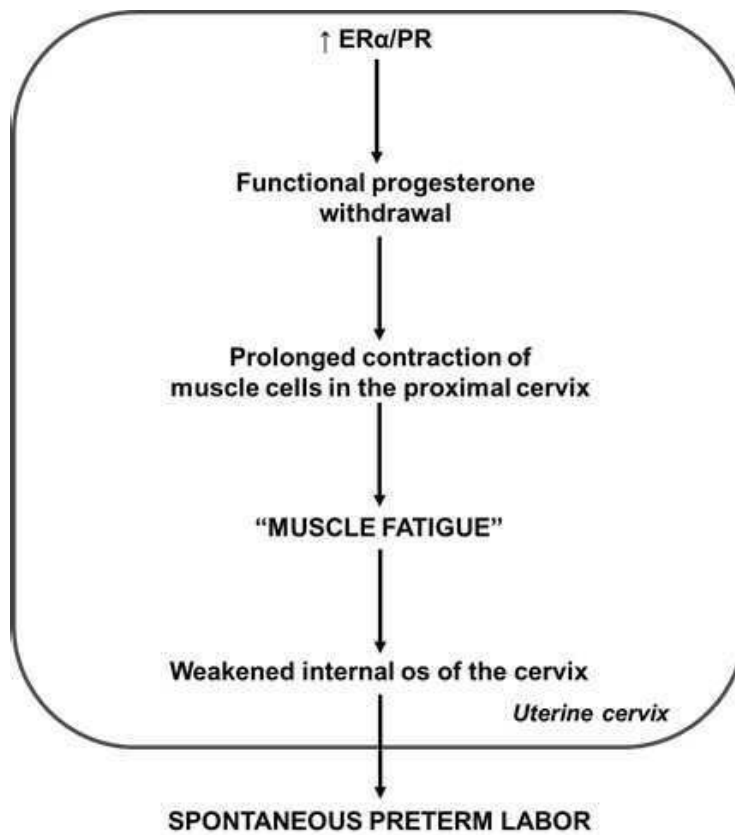
도면5b



도면5c



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for preventing or treating preterm birth

<130> PN190148
 <160> 8
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH forward primer
 <400> 1
 ttgaggtcaa tgaaggggtc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH reverse primer
 <400> 2
 tcgtcccgta gacaaaatgg 20

 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ER alpha forward primer
 <400> 3
 cctccgcct tctacaggt 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ER alpha reverse primer
 <400> 4
 cacacggcac agtagcgag 19
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ER beta forward primer

<400> 5

ctgtgatgaa ctacagtgtt ccc 23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ER beta reverse primer

<400> 6

cacatttggg ctgcagtct g 21

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR forward primer

<400> 7

ctccgggacc gaacagagt 19

<210> 8

<211>

21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR reverse primer

<400> 8

acaacaaccc ttgtagca g 21