

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0120182 (43) 공개일자 2014년10월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/16 (2006.01) A61K 31/166 (2006.01) C07C 259/04 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0035955 (22) 출원일자 2013년04월02일 심사청구일자 2013년04월02일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93 (72) 발명자 김정훈 서울특별시 서초구 동광로30길 23, 303호(방배동, 성지 라빌레트 A) (74) 대리인 특허법인 에이치애플

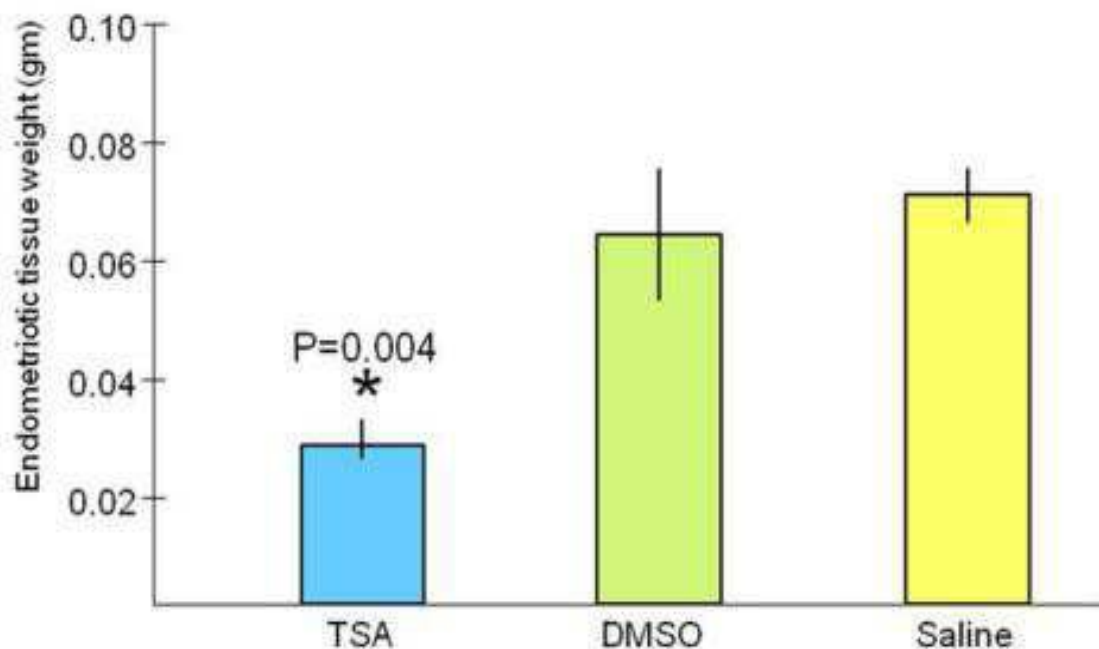
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제를 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(histone deacetylase inhibitor, HDACI)의 신규한 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제를 포함하는 자궁내막증(endometriosis) 치료용 조성물 및 이를 이용한 자궁내막증의 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(HDACI)는 동물 실험에서 자궁내막증 병소의 크기를 유의하게 감소시켰으며, 자궁내막증 병소에서 나타나는 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)의 활성화를 억제시켰다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 자궁내막증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(histone deacetylase inhibitor, HDACI)를 유효성분으로 함유하는 자궁내막증 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제는 트리코스타틴 A(Trichostatin A)인 것을 특징으로 하는 자궁내막증 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제는 자궁내막증 병소에서 발생하는 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(histone deacetylase inhibitor, HDACI)의 신규한 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제를 포함하는 자궁내막증(endometriosis) 치료용 조성물 및 이를 이용한 자궁내막증의 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자궁내막증(endometriosis)은 자궁내막세포가 자궁 이외의 장소에서 증식하여 자라는 병으로 월경통, 만성적인 골반 통증 및 불임까지 유발하는 부인과 질환이다. 이러한 자궁내막증의 유병률은 정상적인 배란주기를 가지는 젊은 여성에서 약 7-10%, 만성적인 골반 통증을 호소하는 여성에서는 약 20-90% 정도에 이르는 것으로 알려져 있다. 이러한 자궁내막증의 치료방법들로는 수술적 치료, 호르몬 치료를 근간으로 하는 약물적 치료, 통증 완화를 목적으로 하는 보존적 치료 등이 있으나, 대부분의 치료가 50%정도의 환자에 대해서만 통증을 경감시키는데 그치며, 지금까지 알려진 어떠한 치료를 하더라도 양측 난소를 모두 제거하지 않는 한 치료 후 5년 내에 약 40-70%의 환자에서 재발하는 것으로 보고되고 있다. 즉, 지금까지 연구되고 시행되어온 어떠한 치료도 대부분 제한적인 효과에 그치며, 자궁내막증을 완치시킨다고 보다는 억제 또는 완화시키는 수준에 그치는 것들이었다. 따라서 자궁내막증에 대한 새로운 치료방법의 개발이 절실한 실정이다.

[0003] 자궁내막증의 병태생리를 보면 자궁내막 조직이 다른 조직 내로 침윤 또는 본래의 자리를 벗어나 원격 전이를 한다는 면에서 종양 세포와 상당히 유사한 성장, 발달을 한다고 할 수 있다. 이러한 종양 세포의 성장을 조절하는 중요한 기전 중 하나가 후생유전학적 조절(epigenetic control)인 것으로 알려져 있다. 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylase)는 4개의 클래스를 가지는 효소로, 발암 DNA 융합 단백질(oncogenic DNA fusion protein)의 프로모터(promoter)로 작용하여 종양 세포의 염색체 전위(chromosomal translocation)를 일으키거나 전사 인자(transcriptional factor)를 과발현시켜 종양세포의 생성 및 성장을 돕는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 히스톤 탈아세틸화 효소를 억제하는 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(histone deacetylase inhibitor, HDACI)는 종양세포의 생성 및 성장을 억제시킬 수 있을 것으로 보인다. HDACI는 TNF 수용체 슈퍼패밀리(TNF receptor super family)의 전사를 활성화 시키는 것으로 알려져 있지만, 그 외에도 종양 세포의 세포사멸(apoptosis)을 유발하고 또한 신생혈관생성 억제효과도 보이기 때문에 종양세포를 괴사시킬 수 있을 것으로 예상되나 아직 그 기작은 밝혀지지 않았다. 위와 같은 연구 결과들을 바탕으로 악성종양의 치료제로서 HDACI의 실제적인 효용성에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0004] 또한 최근의 몇몇 연구들은 히스톤 탈아세틸화 효소의 다른 기능들을 밝힌 바 있다. 예컨대, 히스톤 탈아세틸화 효소는 에스트로젠 수용체 알파(estrogen receptor α)의 조절에 관여하는 것으로 확인된 바 있다. HDACI의 세포 증식 억제효과와 더불어 에스트로젠 수용체 조절 효과 등을 볼 때 HDACI 제제는 자궁내막증 세포 증식 억제 효과가 있을 것임을 추측하여 볼 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(HDACI)를 잠재적인 자궁내막증 치료제로 예상하고 실험을 거듭한 끝에 HDACI가 자궁내막증 병소를 소멸시킬 뿐 아니라, 자궁내막증의 발생 및 자궁내막증 병소에서의 NF- κ B 활성화를 동시에 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(HDACI)를 포함하는 자궁내막증 치료용 조성물을 제공하는 것이다. 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 치료제를 이용하여 자궁내막증을 치료 및 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(HDACI)를 유효성분으로 함유하는 자궁내막증(endometriosis) 치료용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제는 트리코스타틴 A(Trichostatin A)일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제는 자궁내막증 병소에서 발생하는 NF- κ B (nuclear factor- κ B)의 활성화를 억제할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 자궁내막증 환자에게 본 발명에 따른 자궁내막증 치료용 조성물을 유효량 투여하여 자궁내막증을 치료하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 치료 방법은 상기 환자의 자궁내막증 병소에서 NF- κ B의 활성화를 억제하여 자궁내막증 병소의 확산을 억제하는 방법일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(HDACI)는 동물 실험에서 자궁내막증 병소의 크기를 감소시켰으며, 자궁내막증 병소에서 나타나는 NF- κ B (nuclear factor- κ B)의 활성화를 억제시켰다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 자궁내막증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 각 TSA, DMSO 및 saline을 처리한 군에서 GFP-발현된 자궁내막증 조직 무게(tissue weight)를 나타낸 그림이다.

도 2는 각 TSA, DMSO 및 saline을 처리한 군에서 체중에 대한 GFP-발현 자궁내막증 조직의 무게 비율을 나타낸 그림이다.

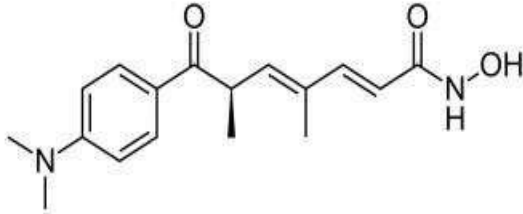
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제(histone deacetylase inhibitor, HDACI)의 자궁내막증 치료제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명자들은 히스톤 탈아세틸화 효소가 기존에 알려진 항암 효과뿐만 아니라 자궁내막증에 대한 억제 효과도 나타낼 것으로 예측하고 동물 실험모델을 대상으로 하여 실험한 끝에 NF- κ B 활성화 억제 및 자궁내막증 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0015] 본 발명의 일실시예에서, 본 발명자들은 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제로서 트리코스타틴 A(Trichostatin A, TSA)를 사용하였다. TSA (7-[4-(dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxohepta-2,4-dienamide)는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 물질로서, 항균물질로도 알려져 있다. TSA는 히스톤으로부터 아세틸 그룹의 제거를 방해하여 유전자 발현을 변경하는 역할을 할 수 있으며, 그에 따라 DNA 전사인자가 DNA 분자에 접근하지 못

하게 막는다. TSA는 광범위한 후생유전학적 활성(epigenetic activities)을 나타내는 상위의 HDACI 클래스 멤버이다. 따라서, TSA는 잠재적인 항암제로도 알려져 있다(Drummond DC, et al. (2005). "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents". Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 495-528).

화학식 1



[0016]

[0017]

본 발명자들은 상기 TSA 물질과 GFP-발현 형질전환 마우스를 이용하여 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제의 자궁내막증 억제 효과를 실험하였다. 즉, 실험 대상 마우스를 TSA 처리군(그룹 1), DMSO 처리 대조군(그룹 2), 및 염처리 대조군(그룹 3)의 3그룹으로 나누어 각각에 해당 물질을 주사한 뒤, 자궁내막증 조직의 크기 변화 및 NF-κB 활성화를 측정하였다.

[0018]

우선, 자궁내막증 조직의 크기 변화는 GFP-발현 자궁내막 조직을 수여 마우스에 접종한 후, TSA를 일정 기간 처리한 후 측정하였다. 처음 GFP-발현 자궁내막 조직을 접종한 날의 실험쥐의 체중은 상기 세 그룹 사이에서 비슷하였다(TSA 처리군(그룹 1): $26.2 \pm 1.5\text{gm}$, DMSO 처리군(그룹 2): $26.6 \pm 2.8\text{gm}$, 염(saline) 처리군(그룹 3): $26.8 \pm 1.9\text{gm}$). 그 후, 도면 1에서 보는 바와 같이, GFP-발현 자궁내막증 조직의 무게는 TSA 처리군이 대조군인 DMSO 처리군 그리고 saline 처리군에 비해 현저히 낮은 것을 확인하였다($P=0.004$)(TSA 처리군: $0.027 \pm 0.002\text{gm}$, DMSO 처리군: $0.064 \pm 0.012\text{gm}$, saline 처리군: $0.072 \pm 0.004\text{gm}$). 또한 도면 2에서 보는 바와 같이, 마우스의 체중에 대한 자궁내막증 병소 비율도 TSA 처리군이 다른 처리군에 비해 뚜렷이 낮은 것을 확인하였다($P=0.04$)(TSA 처리군: 0.000978 ± 0.0001462 , DMSO 처리군: 0.002295 ± 0.0005130 , saline 처리군: 0.002539 ± 0.0002196)($P=0.04$).

[0019]

또한, 본 발명의 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제가 NF-κB (nuclear factor-kappa B) 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, NF-κB P65 (RelA) 서브유닛에 대한 마우스 단클론 항체를 사용하여, 면역조직화학법으로 상기 RelA-양성 혹은 음성 핵을 측정하였다. 그 결과, 하기 <실시예 4>의 표 1에 나타낸 바와 같이, 상피세포 및 기질세포 모두에서 NF-κB 핵 전좌(nuclear translocation)가 다른 두 군보다 TSA 처리군에서 특이적으로 감소되었음을 확인하였다.

[0020]

따라서 본 발명의 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제는 이를 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료용 또는 예방용 조성물로 제공될 수 있다.

[0021]

또한, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 어떠한 형태의 것이라도 가능하며, 예를 들어 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말리톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences 등에 상세히 기재되어 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위

한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자궁내막증 치료용 조성물을 유효량 투여하여 자궁내막증 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효 투입량은 질환의 진행 정도, 환자의 나이, 성별, 신체상태, 제제화 방법, 투여기간, 투여방법, 환자의 체중, 식사, 배출 속도 등에 따라 달라질 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 본 발명의 약학 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg의 범위로 비경구 또는 경구 투여될 수 있다. 그리고, 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌실내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0024] <실시예 1> 실험동물에 대한 자궁내막증의 유도

[0025] <1-1> 실험동물의 준비

[0026] 오리엔트 바이오사(대한민국)로부터 6~8주령 된 암컷 형질전환(C57/BL6) 및 야생형(ICR) 마우스를 입수하였다. 상기 마우스들을 12시간/12시간 명/암 주기의 제한된 환경에서 쥐사료 및 식수를 주어 키웠다. 상기 사료에는 사료 1g당 0.05g 에스트라디올(estradiol, E2)에 대응하는 양 만큼의 파이토에스트로젠(phytoestrogen)이 포함되어 있었다. 따라서, 사료로부터는 소량의 에스트로젠(estrogen)만이 섭취되었다. 상기 마우스에 대한 침습적 시술(invasive procedure)에 앞서, 마우스에 100mg/kg 염산 케타민(ketamine hydrochloride)을 복강내 주사(intraperitoneal injection)하여 마취시켰고, 상기 시술은 무균 조건하에서 수행되었다. 본 실시예의 동물실험은 아산의료원 동물실험윤리위원회의 지침에 따랐다.

[0027] <1-2> 자궁내막증의 유도

[0028] 자궁내막증(endometriosis)의 유도는 공지된 방법에 따라 실시하였다(Somigliana 등, 1999). 먼저, 6~8주령 된 공여(donor) 마우스(녹색형광단백질(GFP) 마우스) 및 수여(recipient) 마우스(wt 마우스)에 대해 난소절제술(ovariectomy)을 수행하였다. 그 날 이후부터 매주 모든 공여 및 수여 마우스에 100 mg/kg의 에스트라디올 발레이트(estradiol valerate) (Sigma) 를 옥수수유에 넣어 피하주사하였다. 난소절제술 2주 후에, 공여 마우스를 경추탈골법으로 죽인 후, 그 자궁각(Uterine horns)을 떼어내어, PBS (phosphate-buffered saline)가 담긴 살레에 넣었다. 장막(serosa) 및 자궁근육층(myometrium)을 조심스럽게 벗겨내어 얻게 된 자궁내막 단편들을 면도날(razor blade)을 이용하여 으깨었다. GFP 쥐로부터 얻은 상기 자궁내막 단편들을 PBS로 현탁하였고, 상기 자궁내막 단편-현탁된 PBS 0.6ml을 18-구경(gauge) 주사바늘로 수여 마우스에게 복강내 주사하였다. 투여 비율은 공여 대 수여 마우스가 1:2의 비율이었다.

[0029] <실시예 2> 트리코스타틴 A (TSA)의 투여

[0030] 상기 실시예 <1-2>에서 자궁내막 단편-현탁된 PBS를 수여 마우스에 투여하고 2주 후에, 히스톤 탈인산화 효소 억제제의 일종인 트리코스타틴 A(Trichostatin A, TSA)를 투여하기 시작하였다. 마우스에 투여하기 위하여, TSA를 용해 매질인 DMSO (dimethylsulfoxide)에 용해시킨 뒤 희석시켰다. 9마리의 수여 마우스를 다음의 3그룹으로 나누어 각각 처리하였다. 먼저, 그룹 1에는 TSA 2mg/kg을 처리하였다. 나머지 두 그룹은 대조군으로서, 그룹 2에는 DMSO를 처리하였고, 그룹 3에는 염(saline)을 처리하였다. 이들 각 그룹의 마우스들에게 각각의 해당 물질을 21일간 매일 접종하였다. 투여량은 체중 1그램당 1μl를 유지하였으며, 복강 내 주사하였다.

[0031] <실시예 3> 자궁내막증 병소의 조직학적 확인

[0032] 형광 영상 하에서 GFP-발현 병소(lesions)를 제거하고, 12시간 동안 PBS에서 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 후고정(post-fix)시켰다. 그 후 조직들을 OCT 화합물(Sakura, Japan)에 넣어 급속냉동(snap-frozen)시켰다. 이의 연속적인 절편(serial sections)을 저온 유지 장치(cryostat)에서 8 μ m 두께로 잘라 poly-L-lysine-처리된 슬라이드에 고정시켰다. 절편들은 얼음 안에서 아세톤으로 30분 동안 고정시킨 후 PBS로 5분 동안 두 번 세척하였다. 일부 절편들은 헤마톡실린-에오신(haematoxylin-eosin)으로 염색하였으며, 또 다른 절편들은 세포 핵 염색을 위해 Hoechst 33258 (Sigma)로 염색한 후 형광현미경(fluorescence microscopy, BX50; Olympus)으로 관찰하였다. 자궁내막증의 조직학적 진단은 자궁내막의 선조직(gland)과 기질(stroma)의 형태학적 특징(morphological identification)을 기반으로 실시하였다.

[0033] <실시예 4> 자궁내막증 병소의 정량 및 NF- κ B 활성화 측정

[0034] 상기 처리 이후에, GFP-발현된 병소를 형광 영상 하에서 떼어낸 뒤, 체중에 대한 GFP-발현 병소의 양을 세 그룹 사이에서 비교하였다. 각 병소의 절편은 NF- κ B 활성화 측정을 위한 RelA 면역조직화학(immunohistochemistry, IHC)에 사용하였다. 사람 NF- κ B P65 (RelA) 서브유닛에 대한 마우스 단클론 항체(monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif., USA)를 1:50으로 희석(dilution)하여 사용하였다. 면역조직화학(IHC)은 표준 면역과옥시다제법(immunoperoxidase method)을 이용하여 수행하였다. NF- κ B 활성화는 각 GFP-발현 자궁내막증 병소의 단일 절편에서 200x 배율로 관찰한 모든 상피 세포(epithelial cell)와 400x 배율로 관찰한 모든 기질세포(stromal cell)의 RelA-양성 혹은 음성 핵을 세어 측정한 것이다.

[0035] 그 결과, 도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, GFP-발현한 자궁내막증 조직의 무게 및 마우스의 체중에 대한 자궁내막증 병소 비율은 TSA 처리군이 대조군에 비해 현저히 낮은 것을 확인하였다. 또한 하기 표 1에서 보는 바와 같이, NF- κ B활성화는 다른 두 군에 비해 TSA 처리된 마우스의 자궁내막증 조직의 상피 및 기질 세포에서 모두 현저히 감소한 것으로 확인되었다.

표 1

	Total cell count	TSA	DMSO	Saline
Epithelial cells	1256.2 $\pm$ 123.5	51.1 $\pm$ 10.2 *	189.4 $\pm$ 33.2	181.2 $\pm$ 28.8
Stromal cells	798.4 $\pm$ 88.4	16.2 $\pm$ 3.3 *	235.6 $\pm$ 28.4	222.2 $\pm$ 25.4

[0036]

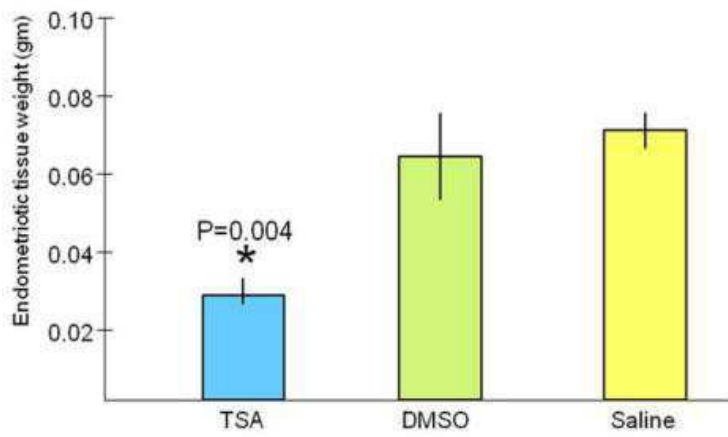
[0037] 통계분석

[0038] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표현하였다. E2-보충 마우스와 대조군의 총 형광강도(fluorescence intensity) 비교는 Kruskal-Wallis test로 실시하였다.

[0039] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

