(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0123025
(43) 공개일자 2020년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01) *A61K 31/661* (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0605 (2013.01)
A61K 31/661 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0046783
(22) 출원일자 2020년04월17일
심사청구일자 2020년04월17일
(30) 우선권주장
1020190046187 2019년04월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
경남과학기술대학교 산학협력단
경상남도 진주시 동진로 33 (칠암동)
(72) 발명자
한중수
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 의과대학
이소영
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 의과대학
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **포스파티딘산 함유 온도 감응성 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 포스파티딘산 함유 온도 감응성 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 실온에서 액체 상태이고 체내에서는 겔을 형성하여 자궁내막에 부착하여 방출되는 특성을 가지는 포스파티딘산 함유 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 제공하며, 상기 온도 감응성 조성물은 질 좌제로 제형화될 수 있어 포스파티딘산의 자궁내 투여가 용이할 뿐 아니라, 포스파티딘산을 자궁내막 기질세포에 직접 작용할 수 있어 약효가 우수한 장점이 있다.

대 표 도 - 도17



(52) CPC특허분류
A61P 15/08 (2018.01)
C12N 2501/73 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자
이윤영
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 의과대학
김경수
경상남도 진주시 대밭골로 92, 204동 503호(충무공동, 진주혁신도시 라온프라이빗 아파트)
이정균
경상북도 구미시 백산로 153, 105동 701호(송정동, 동양한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI19C0611
과제번호 201900000420001
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업 / 보건의료기술연구개발사업 / 공익적 질병극복 연구지원사업
연구과제명 (1세부) 착상효율을 극대화시킬수 있는 새로운 decidua 분화 촉진제 PA의 적용연구
기 여 율 80/100
과제수행기관명 한양대학교 산학협력단
연구기간 2019.04.19 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B4015358
과제번호 201800000001026
부처명 과학기술정보통신부(2017Y)
과제관리(전문)기관명 (재)한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비1.5억초과~3억이하)
연구과제명 착상유전자 PLD1의 Decidua 분화 시그널링 규명을 통한 새로운 불임기전 발굴
기 여 율 20/100
과제수행기관명 한양대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

0.01 내지 1 중량%의 포스파티딘산;

20 내지 35 중량%의 폴록사머 188 및 폴록사머 407의 혼합물; 및

0.01 내지 3 중량%의 폴리소르베이트(polysorbate)계 안정화제를 유효성분으로 포함하는 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

폴록사머 188 및 폴록사머 407의 혼합물은 1 : 0.1 내지 1 : 10의 중량비로 혼합된 것인, 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 자궁내막 기질세포의 착상효율을 증대시켜 착상장애를 예방 또는 치료하는, 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

폴리소르베이트계 안정화제는 트윈 20, 트윈 40, 트윈 60 및 트윈 80으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 30 내지 36 ℃에서 겔화되는, 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 질 좌제, 질 정제, 반고형제, 액제, 스프레이제 또는 필름 제제 중 어느 하나의 제형으로 제조되는 것인, 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물.

청구항 7

a) 폴록사머 188을 냉소에서 정제수에 녹인 후 폴리소르베이트계 안정화제 및 포스파티딘산을 첨가하여 50 내지 60 ℃에서 녹이거나 분산하는 단계;

b) 폴록사머 407을 냉소에서 정제수에 녹이는 단계; 및

c) a) 단계에서 얻은 용액과 b)단계에서 얻은 용액을 냉소에서 혼합하는 단계를 거쳐 제조되는, 제1항의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물의 제조방법.

청구항 8

제1항의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 포함하는 불임 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자궁내막 기질세포의 착상효율을 증대시키기 위한 포스파티딘산 함유 온도 감응성 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포스파티딘산(Phosphatidic acid)은 일반적으로 탄소1에 결합한 포화지방산, 탄소2에 결합한 불포화지방산 및 탄소3에 결합한 인산기와 함께 글리세롤 백본으로 구성된다. 포스파티딘산은 크게 세 가지 방법에 의해 형성될 수 있다. 첫째로, 포스포리파아제 D(PLD)에 의한 포스파티딜콜린의 P-O결합의 가수분해를 통해 포스파티딘산과 콜린이 형성된다. 두 번째로, DAG 키나아제에 의한 디아실글리세롤(DAG)의 인산화에 의해 포스파티딘산이 형성된다. 세 번째로, lysoPA-아실트렌스퍼라제(LPAAT)에 의한 리소포스파티딘산의 아실화에 의해 포스파티딘산이 형성되며, 이는 포스파티딘산 형성의 가장 흔한 방법이다. 포스파티딘산은 가장 간단한 인지질이며, 세포의 기능에서 중요한 역할을 한다. 구체적으로, 포스파티딘산은 Raf-1이 세포막으로 이동하도록 촉진시키고, MAP 키나아제(MAPK) 경로의 활성을 유도한다. 또한, 포스파티딘산은 세포 내에서 중요한 지질 메신저의 역할로서 세포의 성장 및 증식, 분화, 세포 사멸, 소낭 수송, 세포 골격의 재구성, 물질 분비 등과 같은 다양한 생리적 조절자의 역할을 한다. 이러한 포스파티딘산의 다양한 역할을 바탕으로 금단 증후군 또는 폐경기 여성의 발열 발생 치료에서의 용도(대한민국 등록특허 제10-0404693호) 뿐 아니라, 노화 억제 효과(대한민국 공개특허 제10-2019-0101851)등에 대하여 연구되고 있다.

[0003] 자궁내막(Endometrium)은 자궁 내 공간의 선을 이루는 세포로서 배아의 착상에 중요한 역할을 하며 성장인자와 사이토카인을 분비하여 배아가 착상하고 발달하는 환경을 제공하는 것으로 알려져 있다. 이런 자궁내막은 에스트로겐과 프로게스테론의 조절에 의하여 모양적, 기능적으로 일정한 주기에 따라 변화를 일으킨다. 자궁내막 기질세포(Endometrial stromal cells)는 인간의 생리 주기와 초기 임신상태에서 탈락막 세포(Decidual cell)로 분화를 하게 된다. 탈락막 세포로의 성공적인 분화 과정은 포유류의 배아 착상에 있어서 매우 중요한 역할을 하는데 탈락막화 과정 중 프로락틴(Prolactin)과 IGF(Insulin-like growth factor)와 같은 탈락막화 특이적인 유전자가 발현되며 세포의 모양은 길쭉한 모양에서 둥글고 세포질이 큰 상태로 바뀌게 된다. 최근에는 탈락막화 과정에서 인지질 분해효소인 PLD-1과 그 산물인 포스파티딘산이 중요한 매개체로 작용하는 것으로 확인되었다(Lee et al., FEBS J, 281, 4163-4175, 2016). 그러나 포스파티딘산이 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화를 유도하여 착상 및 임신 유지에 효과가 있을 가능성에 대한 확인은 알려진 바가 없다. 다만 탈락막 자궁내막세포와 히알루론산(Hyaluronic acid)을 이용하여 자궁내막 손상에 대한 치료의 유용성(대한민국 등록특허 제10-1802090호)은 연구된 바가 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화를 활성화시킬 수 있는 포스파티딘산의 최적 제형을 개발하고, 상기 제형이 착상장애 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 대한민국 등록특허 제10-0404693호 (2003. 10. 27)

(특허문헌 0002) [특허문헌 2] 대한민국 공개특허 제10-2019-0101851 (2014. 12. 09)

(특허문헌 0003) [특허문헌 3] 대한민국 등록특허 제10-1802090호 (2017. 11. 21)

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] Lee et al., FEBS J, 281, 4163-4175 (2016)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수정란 착상에 중요한 Decidua 분화를 유도하는 포스파티딘산(PA)을 착상장애 치료에 사용하기 위한 제형 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 제형을 포함하는 불임 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제형을 대상체에 투여하여 불임을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 0.01 내지 1 중량%의 포스파티딘산; 20 내지 35 중량%의 폴록사머 188 및 폴록사머 407의 혼합물; 및 0.01 내지 3 중량%의 폴리소르베이트(polysorbate)계 안정화제를 유효성분으로 포함하는 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 a) 폴록사머 188을 냉소에서 정제수에 녹인 후 폴리소르베이트계 안정화제 및 포스파티딘산을 첨가하여 50 내지 60 ℃에서 녹이거나 분산하는 단계; b) 폴록사머 407을 냉소에서 정제수에 녹이는 단계; 및 c) a) 단계에서 얻은 용액과 b)단계에서 얻은 용액을 냉소에서 혼합하는 단계를 거쳐 제조되는, 상기의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 포함하는 불임 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 유효량의 상기의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 불임 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 실온에서 액체 상태이고 체내에서는 겔을 형성하여 자궁내막에 부착하여 방출되는 특성을 갖는 포스파티딘산 함유 온도 감응성 질 좌제로 제형화할 수 있으며, 이를 통해 포스파티딘산의 자궁내 투여가 용이하고, 포스파티딘산이 자궁내막 기질세포에 직접 작용하여 포스파티딘산의 약효를 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 PLD1과 이의 대사산물인 PA에 의한 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 유도 결과를 나타낸 것으로,

(A)는 0.5 mM 8-Br-cAMP의 2일 처리에 의해 인간자궁내막 기질세포가 Decidua 세포로 분화 유도됨을 보여주는 현미경 사진이다(원래 배율 200X). 상기 인간자궁내막 기질세포는 10 μM FIPI (PLD 억제제)의 1시간 전처리 후 0.5 mM 8-Br-cAMP의 2일 처리에 의해 완전히 분화된다.

(B)는 0.5 mM 8-Br-cAMP의 존재 하에서 인간자궁내막 기질세포를 10 μM 또는 20 μM FIPI로 1시간 전처리하고, RNA를 분리한 다음 IGFBP1과 prolactin의 mRNA 수준을 실시간 PCR로 측정한 결과이다. 발현 수준은 GAPDH로 정규화 되었다.

(C)는 인간자궁내막 기질세포를 48 시간 동안 대조군 siRNA 또는 PLD1 siRNA로 형질감염시킨 후 8-Br-cAMP의 존재 하에서 2일 동안 분화 유도한 결과를 보여주는 광학 현미경 사진이다(원래의 배율 200X).

(D)는 IGFBP1과 prolactin mRNA 수준을 보여주는 실시간 PCR 결과이다.

(E)는 인간자궁내막 기질세포를 0.5 mM 8-Br-cAMP 또는 지시된 양의 PA 존재 하에서 2일 동안 분화 유도하여 얻은 현미경 사진이다(원래의 배율 X200).

(F)는 100 μM PA로 자극한 후, 총 RNA를 분리하여 얻은 IGFBP1 및 prolactin의 mRNA 수준 실시간 PCR 측정 결과이다.

데이터는 최소한 5회 이상 독립적인 실험 결과의 평균±SEM이다. 차이는 Student's t-test로 평가한다. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

도 2는 포스포리파아제 D1(phospholipase D1, PLD1)과 이의 대사산물인 포스파티딘산(PA)에 의한 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화과정에서 FoxO1의 탈인산화 증가됨을 결과로 나타낸 것으로,

(A)는 인간자궁내막 기질세포를 10 μM 또는 20 μM FIPI로 1시간 동안 전 처리하고, Decidua 분화를 유도하기

위해 0.5 mM 8-Br-cAMP로 40분간 자극한 후, 단백질 샘플을 RIPA 버퍼에서 녹이고 항-phospho-FoxO1(Ser256), 항-FoxO1 및 항-GAPDH로 웨스턴 블랏팅하여 분석한 결과이다. 5회 이상의 독립적인 실험이 수행되었으며 총 FoxO1(FoxO1)에 대한 phospho-FoxO1의 비율은 농도계(IMAGE J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 측정한 밴드 강도에 기초하여 계산한다.

(B)는 대조군 siRNA 또는 200 nM PLD1 siRNA로 48시간 형질감염시킨 후, 인간자궁내막 기질세포를 8-Br-cAMP로 40분 동안 처리하여 Decidua 분화를 유도하고, 항-phospho-FoxO1(Ser256), 항-FoxO1 및 항-GAPDH로 웨스턴 블랏팅하여 단백질을 분석한 결과이다. 막대 그래프는 포스포-FoxO1 대 총 FoxO1(n = 3)의 농도 분석을 나타낸다(IMAGE J; National Institutes of Health).

(C)는 인간자궁내막 기질세포를 8-Br-cAMP 없이 40분 동안 표시된 농도의 포스파티딘산(PA)으로 처리하고, 용해물에 대해 FoxO1 인산화를 측정하기 위해 웨스턴 블랏팅으로 분석한 결과이다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다. phospho-FoxO1 대 총 FoxO1의 비율은 농도계(IMAGE J; National Institutes of Health)(n = 5)로 측정한 밴드 강도를 기반으로 계산한다.

데이터는 최소 5회의 독립적인 실험에 대한 평균±SEM로 표현한다. 차이는 Student 's t-test에 의해 평가한다. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001

도 3은 포스파티딘산(PA) 매개 인간 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 동안 Akt의 탈인산화 유도 결과를 나타낸 것으로,

(A)는 인간자궁내막 기질세포를 10 μM 또는 20 μM FIPI로 1시간 동안 전처리하고, 0.5 mM 8-Br-cAMP로 40분 동안 처리한 후, 세포를 용해시켜 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt 및 항-GAPDH로 웨스턴 블랏팅하여 분석한 결과이다. 막대 그래프는 농도계의 분석(n ≥ 3)에 의한 phospho-Akt 대 총 Akt(Akt)의 비율을 나타낸다(IMAGE J; National Institutes of Health).

(B)는 인간자궁내막 기질세포를 대조군 siRNA 또는 200 nM PLD1 siRNA로 48시간 형질감염 시킨 후 Decidua 분화를 유도하기 위해 0.5 mM 8-Br-cAMP로 40분간 처리하여 용해물을 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt 및 항-GAPDH로 웨스턴 블랏팅하여 분석한 결과이다. phospho-Akt 대 총 Akt의 비율은 농도계(IMAGE J; National Institutes of Health)(n≥3)에 의해 측정된 밴드 강도에 기초하여 계산한다.

(C)는 인간자궁내막 기질세포를 8-Br-cAMP 없이 40분 동안 50 μM 또는 100 μM 포스파타딘산(PA)으로 자극하고, 단백질을 분리하여 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt 및 항-GAPDH로 웨스턴 블랏팅한 결과이다. 5회의 독립적인 실험의 phospho-Akt 대 총 Akt의 농도 분석을 나타낸다(IMAGE J, National Institutes of Health). 데이터는 최소 5회의 독립적인 실험의 평균±SEM으로 표시한다. 차이는 Student 's t-test에 의해 평가한다. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001

도 4는 인간 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 동안 포스파티딘산(PA)에 의해 유도되는 Akt의 비활성화에 따른 FoxO1의 탈인산화를 보여주는 결과로,

(A)는 인간자궁내막 기질세포를 0.5 mM 8-Br-cAMP 없이 40분 동안 2 μM AKTi (Akt 억제제)로 처리한 후, 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt, 항-phospho-FoxO1(Ser256), 항-FoxO1 및 항-GAPDH로 용해물의 Akt 및 FoxO1 인산화 수준을 측정하기 위해 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과이다. phospho-Akt 대 총 Akt(Akt) 및 phospho-FoxO1 대 총 FoxO1(FoxO1)의 비율은 농도계(IMAGE J; National Institutes of Health)(n≥5)에 의해 측정된 밴드 강도에 기초하여 계산한다.

(B)는 인간자궁내막 기질세포를 2 μM AKTi 또는 0.5 mM 8-Br-cAMP의 존재 하에서 2 내지 3일 동안 Decidua 분화를 유도하여 얻은 현미경 사진이다(원래 배율 200X).

(C)는 IGFBP1과 prolactin의 mRNA 수준을 실시간 PCR로 측정한 결과이다. 데이터는 최소 5회의 독립적인 실험의 평균±SEM으로 표시한다. 차이는 미처리 세포와 비교하여 Student 's t-test에 의해 평가한다. *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001

도 5는 포스파티딘산(PA) 매개 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 동안 PP2A-Akt 결합을 통해 Akt 및 FoxO1의 탈인산화가 유도됨을 보여주는 결과로,

(A)는 인간자궁내막 기질세포를 30 nM 오카다산(PP2A 억제제)으로 1시간 전처리하고 0.5 mM 8-Br-cAMP 또는 100 μM 포스파티딘산(PA)으로 40분간 처리한 후, 단백질을 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt, 항-phospho-

FoxO1(Ser256), 항-FoxO1 및 항-GAPDH 로 웨스턴 블랏팅하여 분석한 결과이다. phospho-Akt 대 총 Akt 및 phospho-FoxO1 대 전체 FoxO1의 비율은 농도계(IMAGE J; National Institutes of Health)(n≥5)에 의해 측정된 밴드 강도에 기초하여 계산한다. 데이터는 최소 5회의 독립적인 실험의 평균±SEM으로 표시한다. 차이는 Student 's t-test에 의해 평가한다. **p <0.01; ***p <0.001

(B)는 인간자궁내막 기질세포를 30 nM 오카다산으로 1시간 동안 전처리 한 다음 100 μM 포스파티딘산(PA)으로 2일 처리하여 얻은 현미경 사진이다(원래 배율 200X).

(C)는 인간자궁내막 기질세포에서 분리한 총 RNA의 IGFBP1 및 prolactin mRNA 발현 수준을 측정한 실시간 PCR 분석 결과이다. 데이터는 최소 5회의 독립적인 실험의 평균±SEM으로 표시한다. 차이는 Student 's t-test에 의해 평가한다. *p <0.05; **p <0.01

(D)는 세포를 0.5 mM 8-Br-cAMP 또는 100 μM 포스파티딘산(PA)으로 40분 동안 처리하고, 항-PP2A로 면역 침전된 것을 항-PP2A 및 항-Akt로 웨스턴 블랏팅하여 분석한 결과이다. 면역 침전물(IP)의 웨스턴 블랏을 항-Akt, 항-PP2A 및 항-phospho-Akt(Thr306)와 함께 인큐베이션 하였다.

도 6은 포스파티딘산(PA)에 의한 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 활성 메커니즘의 모식도이다.

도 7은 포스포리파아제 D1(PLD1)에 의한 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화에서 FAK을 통한 형태학적 변화 메커니즘을 규명한 결과이다.

도 8은 포스포리파아제 D1(PLD1) 산물인 포스파티딘산(PA)에 의해 FAK-RhoA가 활성화되어 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적 변화가 유도됨을 규명한 결과이다.

도 9는 포스파티딘산(PA) 처리 농도 별 인간자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적 변화를 나타낸 것이다.

도 10은 포스파티딘산(PA)를 마우스 자궁 내에 직접 투여하여 artificial Decidua 분화를 유도하는지 확인한 결과를 나타낸 것이다.

(A) PA 처리에 의한 마우스 자궁의 내막 두께를 비교한 결과이다.

(B) PA 처리에 의한 마우스 자궁의 무게를 비교한 결과이다.

(C) PA 처리에 의한 마우스 자궁의 H&E 염색 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 실시예 2 ~ 11을 제조하는 방법을 흐름도의 방식으로 정리하여 나타낸 그래프이다.

도 12는 실시예 2와 4 및 비교예 4와 5를 제조한 후 하루 동안 방치 후 상온에서 관찰한 온도 감응성 겔 조성물의 성상 사진이다.

도 13은 실험예 9에 따른 겔화온도 측정장치의 모식도이다.

도 14는 실험예 10에 따른 겔화시간 측정장치의 모식도이다.

도 15는 실시예 2, 5, 7 및 비교예 3, 4의 겔화시간에 따른 점도변화 그래프이다.

도 16은 PA 함유 온도 감응성 겔 제제의 투여에 의한 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 효능을 확인한 결과로, (A)는 PA 함유 온도 감응성 겔 제제 투여로 인한 Decidua 분화의 형태학적 변화를 나타낸 것이고, (B)는 PA 함유 온도 감응성 겔 제제 투여로 인한 IGFBP1의 발현을 나타낸 것이다.

도 17은 마우스 자궁 내에 PA 함유 온도 감응성 겔 제제를 투여하여 artificial Decidua 분화를 유도해 그 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

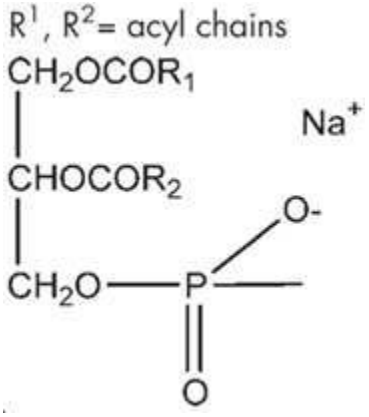
[0017] 본 발명은 0.01 내지 1 중량%의 포스파티딘산; 20 내지 35 중량%의 폴록사머 188 및 폴록사머 407의 혼합물; 및 0.01 내지 3 중량%의 폴리소르베이트(polysorbate)계 안정화제를 유효성분으로 포함하는 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물에 관한 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 a) 폴록사머 188을 냉소에서 정제수에 녹인 후 폴리소르베이트계 안정화제 및 포스파티딘산을

첨가하여 50 내지 60 ℃에서 녹이거나 분산하는 단계; b) 폴록사머 407을 냉소에서 정제수에 녹이는 단계; 및 c) a) 단계에서 얻은 용액과 b)단계에서 얻은 용액을 냉소에서 혼합하는 단계를 거쳐 제조되는, 상기의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 사용하고 있는 포스파티딘산은 글리세롤-3-인산의 1번과 2번 탄소에 지방산이 에스터 결합으로 붙어있는 인지질 분자(화학식 1)이다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] 상기 포스파티딘산의 1번과 2번 탄소에 에스터 결합으로 붙어있는 화합물은 탄소수 6 내지 24의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 구체적으로는 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 아라키돈산 및 도코사헥사엔산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 팔미트산이다. 상기 포스파티딘산의 제조방법은 대두 또는 난황 등에서 유래하는 인지질을 원료로 하여, 유럽 특허 EP0399544호 및 미국특허 US5183750호에 기술된 방법에 따라 쉽게 제조될 수 있다. 본 발명에서 사용하고 있는 포스파티딘산은 음전하를 띤 머리작용기를 가지고 있는 구조를 띠고 있어 나트륨 및 칼륨 등의 양이온을 이용하여 약제학적으로 허용 가능한 염으로 만들어 사용하는 것이 필요하다. 이 중 가장 바람직한 것은 포스파티딘산 나트륨이다.

[0023] 포스파티딘산은 세포내 신호전달 단백질들과 결합하여 이들 단백질들의 활성을 조절함으로써 세포의 성장, 분화, 이동, 분비와 같은 다양한 생리현상을 조절하는 이차 신호전달물질로서 기능하는 것으로 알려져 있다.

[0024] 본 발명에서는 유효성분인 포스파티딘산이 수정란의 착상에 가장 중요한 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화를 유도해 수정란이 착상되고 임신이 유지될 수 있는 최상의 자궁환경을 만들어 줄 수 있다.

[0025] 본 발명의 포스파티딘산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01 내지 1 중량%를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.05 내지 0.5 중량%를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 온도 감응성 조성물에서 포스파티딘산의 농도가 0.01 중량% 미만인 경우 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 기전을 활성화시켜줌으로써 수정란 착상률 및 임신효율을 높이기 어려우며, 포스파티딘산의 농도가 1 중량%를 초과하는 경우 물에 녹기 힘든 소수성 특성을 가지는 포스파티딘산을 온도 감응성 조성물에 녹이거나 분산시키기가 불가능할 뿐만 아니라, 물리·화학적 안정성이 떨어져 의약품으로서의 품질확보가 어렵다.

[0026] 본 발명에서 “온도 감응성”이라 함은 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 것을 특징으로 하여 특정 온도에서 가역적인 졸-겔 상전이가 일어나는 특성을 말하며, 졸-겔 상전이 시스템은 온도로 인해 물리적으로 하이드로겔을 형성하는 가역적인 상전이 현상을 보이는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 포스파티딘산 함유 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물의 기제로 독성을 일으키지 않는 것으로 알려진 폴록사머를 사용할 수 있다. 상기 폴록사머는 일반적으로 생체점막에 손상을 주지 않으며, 난용성 약물을 가용화시켜 생체이용률을 증가시킬 수 있는 부형제이다. 또한, 폴록사머 수용액은 온도 및 농도의 증가에 의해 단일 가닥(unimer)에서 마이셀(micelle)로 전이가 일어난 후 마이셀의 부피 비율이 특정 값 이상으로 증가하면 겔이 형성될 수 있다.

[0028] 본 발명에서는 상업적으로 사용할 수 있는 폴록사머 중에서 폴록사머 188 및 폴록사머 407의 혼합물을 사용한다. 본 발명에서 폴록사머 188과 폴록사머 407의 혼합물로 만들어지는 온도 감응성 하이드로겔은 높은 점도와 견고성 덕분에 외부 온도의 증가에 따라 빠른 시간 안에 겔화가 이루어질 수 있는 장점이 있다. 또한, 소

수성 약물을 담지하기에 효과적인 장점이 있어 물에 난용성인 포스파티딘산을 마이셀 형태로 만들어 본 발명의 약제학적 조성물의 물리·화학적 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0029] 상기 폴록사머 기제는 본 발명의 조성물 중 20 내지 35 중량%의 함량으로 함유되고, 또한 본 발명의 조성물의 겔화온도가 30 내지 36℃ 범위를 유지하도록 폴록사머 기제가 구성되는 것이 바람직하다. 만일 상기 폴록사머 혼합기제가 35 중량%를 초과일 경우 겔화 온도가 30℃ 미만이 되어 온도 감응성 제제가 실온에서 겔화 상태이기 때문에 투여가 매우 힘들며, 20 중량% 미만으로 포함될 경우 겔화 온도가 36℃를 초과하여 체내에서도 액체상으로 유지되어 약물이 자궁내막에 효과적으로 작용하지 못하고 체외로 흘러나와 자궁내막에서 충분한 약물농도에 도달하지 못하여 효과를 발휘하기 어려울 뿐만 아니라, 유효성분인 포스파티딘산을 완전 가용화시킬 수 없거나, 가용화 후 침전이 형성되는 문제점을 나타낸다.

[0030] 본 발명의 포스파티딘산 함유 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물은 포스파티딘산의 용해도를 높이기 위해 안정화제를 사용할 수 있다. 상기 안정화제는 폴리소르베이트(polysorbate)계 안정화제일 수 있으며, 예를 들면 트윈 20(폴리소르베이트 20, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우르산), 트윈 40(폴리소르베이트 40, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미트산), 트윈 60(폴리소르베이트 60, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노스테아르산) 및 트윈80(폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레산)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 안정화제는 트윈 80일 수 있다. 바람직하게는 상기 트윈 80을 0.01 내지 3 중량%로 포함할 수 있다. 폴리소르베이트계 안정화제를 3 중량% 초과하여 포함하는 경우 겔화온도가 30℃ 미만이 되어 온도 감응성 겔 조성물이 실온에서 겔화 상태이기 때문에 자궁내 투여가 매우 힘들뿐 아니라 실제 생산에서 강한 점도 때문에 제조의 어려움이 있으며 투여가 어렵고 자궁 내막에 손상을 입힐 우려가 있다. 또한 0.01 중량% 미만으로 포함하는 경우 보관 안정성이 떨어져 시간이 지날수록 포스파티딘산이 서로 달라붙어 응집체(aggregate)를 형성하여 침전함으로써 포스파티딘산 함유 온도감응성 겔 조성물의 물리·화학적 안정성 등에 문제점을 일으킨다.

[0031] 본 발명에 따르는 포스파티딘산 함유 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물은

[0032] a) 폴록사머 188을 냉소에서 정제수에 녹인 후 트윈 80 및 포스파티딘산을 첨가하여 50 내지 60 ℃에서 녹이거나 분산하는 단계;

[0033] b) 폴록사머 407을 냉소에서 정제수에 녹이는 단계; 및

[0034] c) a) 단계에서 얻은 용액과 b)단계에서 얻은 용액을 냉소에서 혼합하는 단계를 거쳐 제조될 수 있다.

[0035] 상기 공정들은 냉소에서, 바람직하게는 대한약전에서 정의된 1 내지 15℃, 보다 바람직하게는, 4℃ 전후의 저온에서 수행되며, 필요 시 포스파티딘산을 완전히 녹이기 위하여 60℃ 이내에서 일정 시간 이내로 a) 단계의 용액을 가열할 수 있다.

[0036] 상기 c) 단계에서 폴록사머 188과 폴록사머 407 용액의 중량비는 1 : 0.1 ~ 1 : 10로 혼합할 수 있다.

[0037] 본 발명의 포스파티딘산 함유 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물은 겔화온도가 30 ~ 36℃이고 적절한 겔강도 및 10분 이하의 겔화시간을 가지기 때문에, 실온에서는 액상이고 체내에서는 겔상을 형성하여 투여가 용이하고 투여 후 자궁내막에 부착하여 체외로 빠져나오지 않음으로써 투여의 편리성 및 우수한 약효를 나타낼 뿐만 아니라 제조방법 또한 용이하다.

[0038] 또한, 본 발명의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물은 당업자들에게 잘 알려진 통상의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 보존제 등의 첨가제를 추가로 포함하여 약제학적 형태로 제조될 수 있다.

[0039] 상기 약제학적 형태로, 질 좌제, 질 정제, 반고형제, 액제, 스프레이제 또는 필름 제제 등을 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한 상기의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 포함하는 불임 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0041] 포스파티딘산은 8-Br-cAMP, 에스트로겐, 프로게스테론 등 다른 약물의 도움 없이 단독적으로 인간 자궁내막 기질세포의 충분한 Decidua 분화를 유도하기 때문에 착상장애로 발생하는 불임 치료제로서 응용이 가능하다. 포스파티딘산은 세포막을 구성하는 성분으로 생체 물질이기 때문에 불임 치료 물질로서 임상 적용 시, 독성이 적거나 없을 것으로 예상되어 현재 임상 시행되고 있는 호르몬 치료의 대체가 가능할 수 있다. 또한, 수정란 착상 및 임신 효율을 높여주는 근본적 원인인 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화를 직접적으로 유도하는 치료법은 부재하므로, 포스파티딘산을 이용한 치료 방법은 획기적인 불임 치료제로써 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0042] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0043] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0046] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 자궁내 직접 투여에 적합한 형태, 예컨대, 질 좌제, 질 정제, 반고형제, 액제, 스프레이제 또는 필름 제제 등으로 제제화될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 유효량의 자궁내 투여용 온도 감응성 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 불임 치료 방법을 제공한다.

[0049] 본 명세서에서, "불임"은 수정란 착상 및 임신 유지에 가장 중요한 과정인 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화가 유도되지 않는 상태를 의미한다.

[0050] 상기 대상체는 인간 또는 인간 이외의 생물, 예를 들면 소, 원숭이, 새, 고양이, 마우스, 랫트, 햄스터, 돼지, 개, 토끼, 양, 말 등의 비인간 포유동물일 수 있다.

[0051] 본 발명의 치료 방법에서, 상기 조성물의 제형, 투여 방식 등은 상술한 바와 같다.

[0052] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> PLD1 대사산물 포스파티딘산(PA)에 의한 인간 자궁내막 기질세포의 형태학적/생화학적 변화

[0054] (윤리 강령)

[0055] 샘플은 한양대학교 병원 임상 시험 위원회의 승인을 받아 채취하였고, 모든 참가자로부터 서면 동의를 얻었다.

[0056] (실험 재료)

[0057] 우태아혈청(FBS), 페니실린-스트렙토마이신 및 Dulbecco's modified Eagle medium, low glucose(DMEM)를 포함한 세포 배양을 위한 재료들은 Wisent Inc.(St. Bruno, QC, Canada)에서 입수하였다. 8-Br-cAMP는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MI, USA)에서 구입하였다. FIPI(PLD 억제제) 및 AKTi는 Calbiochem(San Diego, CA, USA)에서 입수하였다. 오카다산은 Enzo(Farmingdale, NY, USA)에서, 포스파티딘산은 Avanti Polar Lipid Inc.(Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다.

[0058] (hESCs의 분리 및 배양)

[0059] 인간 자궁내막은 2008년 9월부터 2014년 9월까지 한양대학교 병원에서 자궁내막이상으로 수술을 받은 40-45세의 폐경전 여성 25명을 대상으로 자궁적출술을 통해 얻었다. 이로부터 얻은 각각의 자궁내막의 표본에 대해 조직학적으로 검사하였다. hESCs는 이전에 설명한대로 분리하였다. 간단히 말해, 조직 샘플을 100 IU/mL의 페니실린, 100 ㎍/mL의 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 10%(v/v) FBS를 함유하는 DMEM에서 수득하였다. 세척 및 트리밍을 통해 혈전 및 점액을 제거한 후, 표본을 라미나 플로우 후드 하에서 1 ㎜ 미만 크기의 조각으로 분쇄하고, 37℃에서 60분 동안 0.25% 콜라게나아제 I으로 분해하였다. 세포 현탁액을 40㎛-기공-크기의 체(BD Falcon, Bedford, MA, USA)를 통해 2회 여과하였다. 효소적 분해 후 기질세포의 대부분은 단일세포 또는 작은 응집체로 존재하였다. 이 방법에 의해 얻은 기질세포의 순도는 기질세포 마커인 비멘틴에 대한 면역세포화학 염색으로 측

정하였을 때 전형적으로 >90%였다. 정제된 기질세포를 세척하고, 생존 세포는 트립판 블루를 사용한 염색 제외를 통해 계수하였다. 분리된 세포의 생존율은 각 실험에서 적어도 90%였다.

[0060] hESCs는 공기 중에서 5% CO_2의 가습 분위기에서 10%(v/v) FBS, 100 IU/mL 페니실린 및 100 ㎍/mL의 스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 37℃에서 100mm-직경의 배양 접시에서 컨플루언시까지 배양하였다. 인 비트로 Decidua 분화를 유도하기 위해, 0.5 mM 8-Br-cAMP에서 3일간 세포를 노출시켰다. 위상차 현미경을 사용하여 분화와 연관된 형태학적 변화를 확인하였다.

[0061] (역전사 및 실시간 PCR)

[0062] Tri 시약(Takara, Otsu, Japan)을 사용하여 hESC 배양물로부터 총 RNA를 추출하였다. 역전사를 위해, GoScriptTM Reverse Transcriptase Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 1 ㎍의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하고, 실시간에서 주형으로 사용하였다. 프라이머 서열(센스 및 안티센스)은 다음과 같다:

[0063] IGFBP1, 5'-TTGGGACGCCATCAGTACCTA-3'(SEQ ID NO: 1) 및 5'-TTGGCT AAACTCTCTACGACTCT-3'(SEQ ID NO: 2)

[0064] prolactin, 5'-TGACCCTTCGAGACTGTTTG-3' (SEQ ID NO: 3) 및 5'-CTTGCTCCTTGTCTTCGG G-3' (SEQ ID NO: 4)

[0065] FoxO1, 5'-TTCGTGTGCAGAATGAAGGA-3' (SEQ ID NO: 5)

[0066] GAPDH, 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' (SEQ ID NO: 6) 및 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3(SEQ ID NO: 7)

[0067] 전사체는 iQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad, Hercules CA, USA)로 검출하였다. 온도 사이클링 조건은 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 15초 및 61℃에서 1분간 40 사이클이다. 도입한 cDNA는 GAPDH로 정규화하였다.

[0068] (웨스턴 블랏 분석 및 면역침전)

[0069] hESCs 세포 용해물을 차가운 PBS로 1회 세척하고, 온화한 라이시스 버퍼[pH 7.5 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 및 프로테아제 억제제 칵테일(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)]에서 용해시키고, 4℃에서 13000g로 10분 동안 원심분리하여 수득하였다.

[0070] 면역침전을 위해, 이들 세포 용해물을 단백질 A/G 플러스-아가로오스 면역침전 시약(Santa Cruz Biotechnology)과 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하고, 4℃에서 밤새도록 PP2A C 서브유닛 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 결합시켰다. 면역침전물을 온화한 라이시스 버퍼로 5회 세척하고(9000 r.p.m.; 1분, 4℃), 추가 분석에 사용하였다. 토끼 IgG를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0071] 웨스턴 블랏팅을 위해, 단백질을 6% 또는 8% SDS/PAGE로 분석하고, 폴리(비닐리덴 디플루오라이드) 멤브레인(GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. 멤브레인을 5%(w/v) phosphoBLOCKER Blocking Reagent(Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 함유한 0.01%(v/v) Tween-20를 함유한 Tris-buffered saline으로 1시간 동안 블록킹하고 나서, 4℃에서 밤새도록 1차 항체(1 ㎍/mL), 이어서 HRP(호스래디쉬 페록시다아제)-결합된 2차 항체(1:2000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)와 인큐베이션한 다음, ECL(Thermofisher Scientific, Rockford, IL, USA)에 의해 특이 밴드를 검출하였다. 다음의 1차 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다: 항-phospho-Akt(Thr308), 항-Akt, 항-phospho-FoxO1(Ser256), 항-FoxO1(C29H4), 항-PP2A C 서브유닛(52F8) 및 항-PLD1. 항-GAPDH는 Bioworld Technology (St. Louis Park, MN, USA)에서 구입하였다.

[0072] (PLD1 및 FoxO1 전사체 고갈)

[0073] PLD1의 siRNA(5'-GGUGGGACGACAAUGAGCA-3') (SEQ ID NO: 8) 및 음성 대조군(5'-CCUACGCCACCAAUUUCGU-3')(SEQ ID NO: 9)은 Bioneer(Daejeon, Daedeok, South Korea)에서 구입하였다. FoxO1 siRNA 처리는 Dharmacon(Lafayette, CO, USA) ONTARGETplus SMART pool siRNA (L-003006-00-0005)로 수행하였다. PLD1 siRNA 200 nM 및 FoxO1 siRNA 200 nM는 Lipofectamine®2000(Invitrogen TM, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 48시간 동안 hESCs에 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포에 0.5 mM 8-Br-cAMP를 40분 또는 2-3일간 처리하였다. 유전자 사일런싱은 RT-PCR 또는 ?스턴 블랏팅으로 분석하였다.

[0074] (통계 분석)

[0075] 데이터는 적어도 5회 독립적인 실험의 평균±SEM으로 표시한다: $P < 0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주한다. 그룹 간의 비교는 통계 패키지 GRAPHPAD PRISM 6(GraphPad Software Incorporated, La Jolla, CA,

USA)를 사용한 unpaired Student's t-test를 이용하여 만들었다.

[0076] 도 1은 PLD1과 이의 대사산물인 PA를 처리해 인간 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 유도를 확인한 결과이다. 도 1의 (A)에서는 cAMP에 의해 유도된 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적 변화가 PLD 억제제인 FIPI 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 도 1의 (B)는 Decidua 분화의 생화학적 지표 인자인 *IGFBP-1, Prolactin* 유전자 발현 역시 cAMP 처리에 의해 증가함을 나타내며, 이는 FIPI 처리에 의해 감소하는 것을 RT-PCR과 qPCR를 통해 확인할 수 있었다. 도 1의 (C, D)는 PLD1 siRNA를 이용한 기능상실(loss-of-function) 실험을 통해 PLD1 siRNA가 형태학적, 생화학적 변화를 억제시킴으로써 PLD1은 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화에 있어 중요 인자임을 확인한 결과이다. 도 1의 (E, F)에서 PLD1의 활성 산물인 PA가 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화에 영향을 주는지 알아보았다. 도 1의 (E)는 cAMP 처리에 의한 자궁내막 기질세포의 형태학적 변화가 PA처리에 의해서도 마찬가지로 유도되었음을 나타내고, 도 1의 (F)는 지표 인자들의 발현 역시 PA 처리에 의해 증가함을 확인한 결과이다.

[0077] 종합적으로, PLD1의 활성은 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정에 중요하게 작용하는 것을 확인하였고, 또한 PLD1의 산물인 PA가 중요한 신호전달 물질로 작용하는 것을 알 수 있었다.

[0078] <실험예 1> PLD1과 PA에 의한 인간 자궁내막 기질세포의 분화에 관여하는 신호전달 단백질 FoxO1의 탈인산화 작용기전 규명

[0079] 문헌 검색을 통해 FoxO1이 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정 동안 *IGFBP-1, Prolactin* 유전자 발현을 조절하는 전사 인자임을 탐색하였다(*Endocrinology*, 2006). FoxO1은 단백질 특성상 인산화에 의해 세포질에 존재하며 비활성화되어 있다가, 탈인산화를 통해 핵 내로 들어가 전사 인자로서 활성을 나타낸다.

[0080] 도 2는 FoxO1가 PA에 의해 조절되는 인자인지 검증한 것으로, 도 2의 (A)에서 대조군 세포에서 인산화된 형태로 존재하던 FoxO1이 cAMP 처리에 의해 탈인산화 되었음을 확인하였다. 이 탈인산화 현상은 PLD 억제제인 FIPI 와 PLD1 siRNA에 의해 억제된다는 것을 도 2의 (A)와 (B)에서 확인하였다. 도 2의 (C)는 PA 처리에 의해 FoxO1의 탈인산화를 확인한 결과이다.

[0081] <실험예 2> PA 매개 인간 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정 동안 유도되는 Akt의 탈인산화 작용기전 규명

[0082] Akt는 FoxO1의 인산화를 유도하는 인산화 효소로서 많은 다른 이전 연구들을 통해 밝혀진 바 있다. 또한, Decidua 분화 과정 동한 Akt는 탈인산화 된다는 보고가 있었다. 이를 토대로 PLD1 과 그의 활성 산물인 PA가 Decidua 분화 과정 동안 Akt의 탈인산화를 유도하는 지를 확인하였다.

[0083] 도 3의 (A, B)를 참조하면, cAMP에 의해 유도되는 Decidua 분화 과정에서 Akt의 탈인산화가 일어남을 확인하였고, 이는 PLD 억제제인 FIPI와 siRNA에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 마찬가지로, 도 3의 (C)에서 PLD1의 활성 산물인 PA가 cAMP와 동일하게 Akt의 탈인산화를 유도하는 것을 확인할 수 있다.

[0084] 결과적으로, PLD1와 효소적 산물인 PA가 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정 동안 Akt의 탈인산화를 유도하는 것을 확인하였다.

[0085] <실험예 3> 탈인산화로 인한 Akt의 비활성화가 FoxO1의 탈인산화를 유도하여 궁극적으로 Decidua 분화를 유도하는지 확인

[0086] 도 4의 (A)에서 cAMP에 의한 Akt의 탈인산화는 Akt의 억제제인 AKTi 처리만으로도 동일하게 재현되는 것을 확인하였다. 도 4의 (B)는, 마찬가지로 cAMP에 의해 증가하는 Decidua 분화의 지표 인자들의 유전자 발현은 AKTi에 의한 Akt 비활성화를 통해서도 유도되었음을 확인한 결과이다.

[0087] 따라서 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정에서 PLD1의 활성은 Akt의 탈인산화를 유도하여 FoxO1의 인산화를 억제해 활성화시켜 준다는 것을 확인하였다.

[0088] <실험예 4> PA에 의해 유도되는 Akt와 FoxO1의 탈인산화를 유도하는 PP2A의 작용기전 규명

[0089] PA에 의해 조절되는 Akt의 비활성화에 관련해 문헌 검색 결과 탈인산화 효소인 PP2A가 관여하고 있음을 확인하였다. 이를 확인하기 위해, PP2A의 억제제인 오카다산을 처리하여 Akt와 FoxO1의 탈인산화를 확인하였다.

[0090] 도 5의 (A)에서와 같이, PA에 의해 유도되는 Akt와 FoxO1의 탈인산화는 PP2A 억제에 의해 현저히 감소하였다. 또한, 도 5의 (B, C)에서는 PA에 의한 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적, 생화학적 변화가 오카다산에 의해 눈에 띄게 감소함을 확인하였다. 따라서, 이 결과들을 통해 PP2A가 Decidua 분화 과정에서의 Akt의

비활성화에 중요한 역할을 하는 단백질임을 확인할 수 있다. 도 5의 (D)에서는 PP2A와 Akt 사이의 분자적 작용 기전을 확인하기 위해 면역침전법을 통해 PP2A와 Akt의 결합을 확인하였다. 그 결과 PA에 의해 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화가 유도됨에 따라 PP2A와 Akt가 직접적으로 결합한다는 결과를 얻었다.

[0091] 종합적으로, 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 과정에서 PA는 PP2A와 Akt의 결합 복합체를 형성하게 하여 Akt의 탈인산화를 일으키며 이로 인해 하위 신호전달 물질인 FoxO1의 탈인산화가 유도됨을 확인하였다.

[0092] <실험예 5> PLD1에 의해 유도되는 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적 변화 메커니즘

[0093] 자궁내막 기질세포의 형태학적 변화는 세포골격의 변화에 의해 나타나므로, PLD1과 PA에 의한 자궁내막 기질세포의 세포골격의 변화 메커니즘을 규명하였다.

[0094] 도 7 (A, B)에서 F-액틴 염색을 통해 자궁내막 기질세포의 세포골격을 관찰한 결과, cAMP에 의해 세포바깥으로의 스트레스 섬유(stress fiber) 배열을 확연히 관찰할 수 있었다. 또한, Decidua 분화에 의해 유도된 형태학적 변화가 PLD1 억제제인 FIPI와 siRNA에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 도 7의 (C)에서는 세포골격 재배열(cytoskeletal rearrangement) 관련 대표적 인자인 FAK과 PLD1의 관련성을 확인한 결과, PLD1 억제제인 FIPI에 의해 FAK의 인산화가 억제되었으므로, PLD1이 FAK의 인산화를 조절해 자궁내막 기질세포의 형태학적 변화를 유도함을 알 수 있었다.

[0095] <실험예 6> PA의 FAK과 RhoA를 매개로 하여 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화의 형태학적 변화를 유도하는 기능

[0096] 도 8의 (A)에서는 PA에 의해 자궁내막 기질세포의 형태학적 변화가 유도되었음을 F-액틴 염색을 통해 확인하였다. 도 8의 (B)에서는 PA 처리에 의해 인산화를 통한 FAK의 활성이 유도됨을 확인하였다. 도 8의 (C)에서는 FAK에 의해 조절 되는 하위인자로서 small G protein RhoA가 PA 유도 Decidua 분화의 세포형태 변화에 작용함을 RhoA siRNA 트랜스펙션을 통해 확인하였다. cAMP와 PA에 의해 유도된 형태학적 변화가 RhoA siRNA에 의해 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0097] 따라서, PA에 의해 유도되는 자궁내막 기질세포 Decidua 분화의 세포형태 변화 기전에는 FAK과 RhoA가 중요한 인자로서 작용함을 확인할 수 있었다.

[0098] <실험예 7> PA의 처리 농도별 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 형태적 변화를 유도하는 효능

[0099] 도 9에서는 PA의 처리 농도에 따른 자궁내막 기질세포의 형태학적 변화 정도를 확인하였다. 따라서 PA를 50 μM ~ 150 μM 농도 범위로 처리하였을 때 효과적으로 자궁내막 기질세포 Decidua 분화의 세포형태 변화를 유도함을 확인할 수 있었다.

[0100] <실험예 8> 마우스 자궁 내 PA 처리에 의한 artificial Decidua 분화 효능 검증

[0101] 7주령 암컷(C57BL/6J) 마우스의 난소를 절제한 후 10 내지 12일 이후에 에스트로겐 100 ng을 3일간 피하투여하였다. 그 후 3일 뒤 에스트로겐 10 ng과 프로게스테론 1 mg의 혼합액을 3일간 피하투여하였다. 혼합액 투여 3일째 되는 날 마우스 자궁 강 내에 대조군(Control)과 PA를 투여하고 5일간 에스트로겐 10 ng과 프로게스테론 1 mg의 혼합액을 피하투여하여 artificial Decidua 분화를 유도하였다.

[0102] 도 10에서는 PA를 마우스 자궁 내에 직접 투여하여, artificial Decidua 분화를 유도하는지 확인하였다. (A, B)에서는 대조군(Control)과 마찬가지로 PA를 자궁 내에 처리에 의해, artificial Decidua 분화가 유도되어 마우스 자궁이 크게 부풀고 무게도 증가하는 것을 확인하였다. (C)에서는 H&E 염색을 통해 PA 처리에 의해 마우스 자궁의 내막 두께가 두꺼워지는 것을 확인하였다. 따라서, *in vivo* 상에서도 PA 처리에 의해 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화가 유도됨을 증명하였다.

[0103] <실시예 2> 내지 <실시예 11> 및 <비교예 1> 내지 <비교예 5> 포스파티딘산 함유 온도 감응성 질 좌제 조성물의 제조

[0104] 표 1에 나타낸 바와 같은 조성으로 도 11의 방법을 이용하여 포스파티딘산을 폴록사머 용액에 첨가하여 녹인 후 완전히 혼합한 용액을 냉장고에 하루 방치하여 거품을 제거한 후 자궁 투여를 위한 온도 감응성 질 좌제 조성물을 제조하였다.

표 1

[0105]

조성	실시예										비교예				
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5
포스파티딘산(g)	0.2	0.05	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.5
폴록사머 407(g)	15	15	15	15	15	18	12	10	15	15	18	15	15	8	15
폴록사머 188(g)	12.5	12.5	12.5	12.5	15	5	22	25	12.5	12.5	18	22	5	10	12.5
트윈 80(g)	1	1	0.1	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	2	0.1	0.1	0.1	0	0
정제수(g)	71.3	71.45	72.2	71	69.8	76.8	65.8	64.8	71.8	70.3	63.8	62.8	79.8	81.8	72
합계(g)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
겔화온도(℃)	**33.9 ±0.6**	**34.2 ±0.5**	**34.1 ±0.4**	**33.2 ±0.3**	**32.7 ±0.4**	**31.3 ±0.2**	**32.2 ±0.3**	**33.5 ±0.8**	**34.6 ±0.5**	**32.0 ±0.4**	**15.6 ±0.2**	**15.4 ±0.6**	**41.5 ±0.4**	**겔화 안됨**	**33.3 ±0.5**
겔화시간(분)	**5.4 ±0.2**	**5.8 ±0.4**	**6.1 ±0.3**	**5.1 ±0.2**	**4.6 ±0.5**	**6.9 ±0.4**	**5.3 ±0.3**	**4.9 ±0.2**	**6.2 ±0.3**	**5.2 ±0.4**	-	-	-	-	-

[0107] 냉장고에서 하루 방치한 후 실시예 2 내지 11 및 비교예 4 및 5를 상온에 30분 이상 꺼내두고 육안 관찰한 결과 실시예 2 내지 11의 조성물은 포스파티딘산이 완전히 용해된 상태를 유지하여 투명한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 비교예 4 및 5의 경우 도 12에서 관찰할 수 있듯이 불투명한 성상을 나타내며 포스파티딘산이 응집체를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0108] <실험예 9> 겔화온도의 측정

[0109] 상기에서 제조한 실시예 2 내지 11 및 비교예 1 내지 5 조성물 각 20g을 20mL 바이알 용기에 마그네틱바와 함께 넣은 다음 도 13의 교반기(Stirrer) 위에 물 중탕할 수 있도록 설치하고 마그네틱바와 접촉하지 않도록 디지털 온도계를 시료에 꽂았다. 일정속도로 교반하면서 온도를 1℃/분의 속도로 상승시키면서 마그네틱바가 완전히 멈추는 온도를 겔화온도로 하였다. 겔화온도의 실험 결과는 표 1에 정리하였다.

[0110] 표 1의 겔화온도 결과 값에서 확인할 수 있듯이 폴록사머의 사용량이 20 ~ 35 중량%를 넘지 않는 실시예 2 ~ 11의 모든 조성물은 겔화온도가 30 ~ 36℃인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이 조성물들은 포스파티딘산을 자궁내에 투여하기 적당한 온도 감응성 겔 제형인 것을 확인할 수 있었다. 그러나 비교예 1 내지 4의 조성물의 경우 겔화온도가 30℃ 보다 낮거나 36℃ 이상인 것으로 나타나 자궁내로 투여가 매우 불편하거나, 체내에서 겔이 형성되지 않고 액상을 유지하는 경향을 나타낸다.

[0111] <실험예 10> 겔화시간의 측정

[0112] Brookfield사의 DV2T RV 점도계를 이용하여 겔화시간을 측정하였다. 샘플 어댑터를 사용하여 샘플의 온도가 36.5℃로 고정될 수 있도록 설치하고(도 14), 스핀들 회전 속도는 50rpm으로 설정한 회전형 점도계를 이용하여 4℃ 항온조에 보관하고 있던 조성물을 꺼내어 10분간 점도 변화를 측정하여 점도가 12,000 mPas을 넘었을 때를 겔화되었다고 판단하여 그때의 시간을 겔화시간으로 하였다. 겔화시간의 결과는 표 1에 정리하였다. 표 1의 겔화시간 값에서 확인할 수 있듯이 실시예 2 내지 11의 조성물의 겔화시간은 모두 7분 이내로 측정되었다. 따로 실시예 2, 5, 7 및 비교예 3, 4 조성물을 가지고 실험한 결과를 시간에 따른 점도 변화 그래프로 나타내었다.

[0113] 도 15를 보면 실시예 2, 5 및 7의 경우 약 5분 시점이 지나면서부터 점도값이 급격히 증가하며 12,000 mPas을 넘는 결과를 나타내었으나, 비교예 3 및 4의 경우 10분이 지나도록 점도 값의 급격한 상승은 확인되지 않았다. 따라서 본 발명의 자궁 투여를 위한 포스파티딘산 함유 온도 감응성 겔 제형은 투여 후 신속하게 겔화되어 체외로 빠져나가는 것을 막을 수 있으며 포스파티딘산을 효율적으로 자궁내막에 전달할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0114] <실험예 11> PA 함유 온도 감응성 겔 제제 처리에 의한 자궁내막 기질세포의 형태학적, 생화학적 변화

[0115] 도 16은 상기 실시예 1에 개시된 방법에 따라 수행된 PA 함유 온도 감응성 겔 제제의 투여에 의한 자궁내막 기질세포의 Decidua 분화 효능을 확인한 것으로, 도 16의 (A)에 의하면 PA 함유 온도 감응성 겔 제제의 투여로 인해 Decidua 분화의 형태학적 변화가 유도되었고, 도 16의 (B)에서는 Decidua 분화의 생화학적 변화 지표(마커 유전자)인 IGFBP1의 발현이 증가하였다. 따라서, PA 투여와 마찬가지로 PA 함유 온도 감응성 겔 제제에 의해 Decidua 분화가 유도됨을 증명하였다.

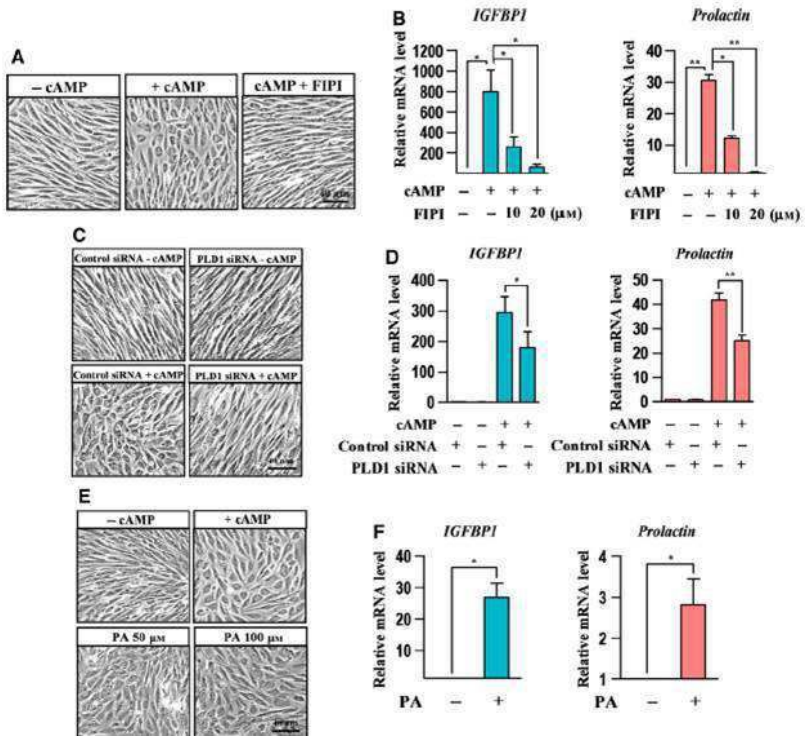
[0116] <실험예 12> 마우스 자궁 내 PA 함유 온도 감응성 겔 제제 처리에 의한 artificial Decidua 분화 효능

[0117] 7주령 암컷(C57BL/6J) 마우스의 난소를 절제한 후 10 내지 12일 이후에 에스트로겐 100 ng을 3일간 피하투여하였다. 그 후 3일 뒤 에스트로겐 10 ng과 프로게스테론 1 mg의 혼합액을 3일간 피하투여하였다. 혼합액 투여 3일째 되는 날 마우스 자궁 강 내에 대조군과 PA 함유 온도 감응성 겔 제제를 투여하고 5일간 에스트로겐 10 ng과 프로게스테론 1 mg의 혼합액을 피하투여하여 artificial Decidua 분화를 유도하였다.

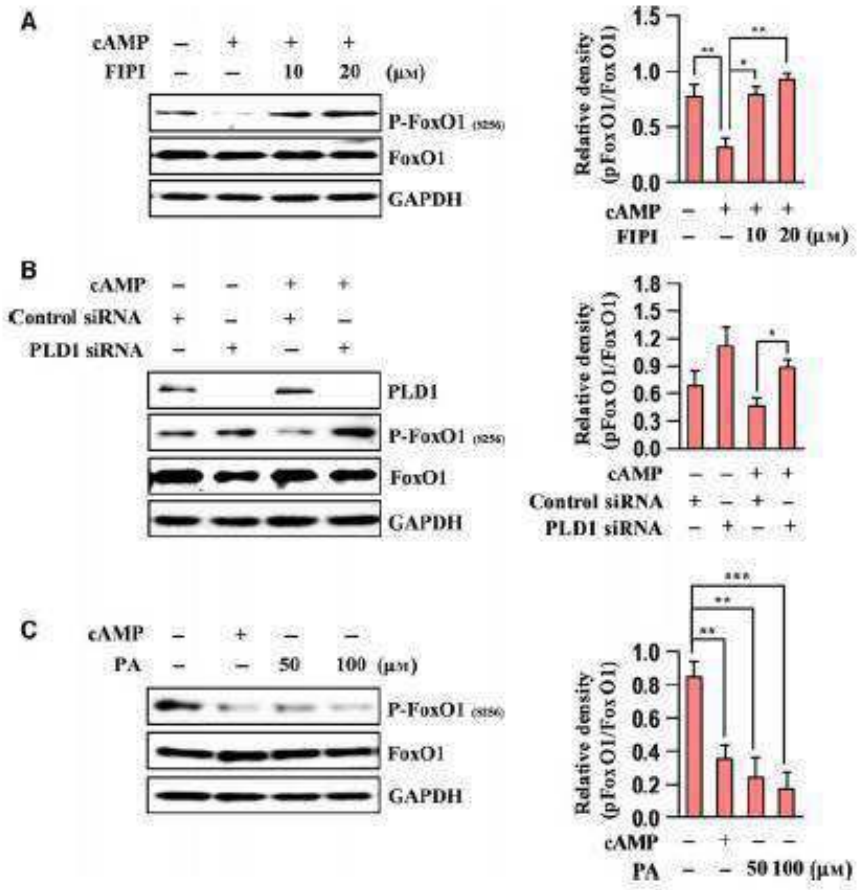
[0118] 도 17은 마우스 자궁 내에 PA 함유 온도 감응성 겔 제제를 투여하여 artificial Decidua 분화를 유도해 그 효능을 평가한 결과로, PA 함유 온도 감응성 겔 제제 투여에 의해 artificial Decidua 분화가 유도되어 마우스 자궁이 크게 부푼 것을 확인하였다.

도면

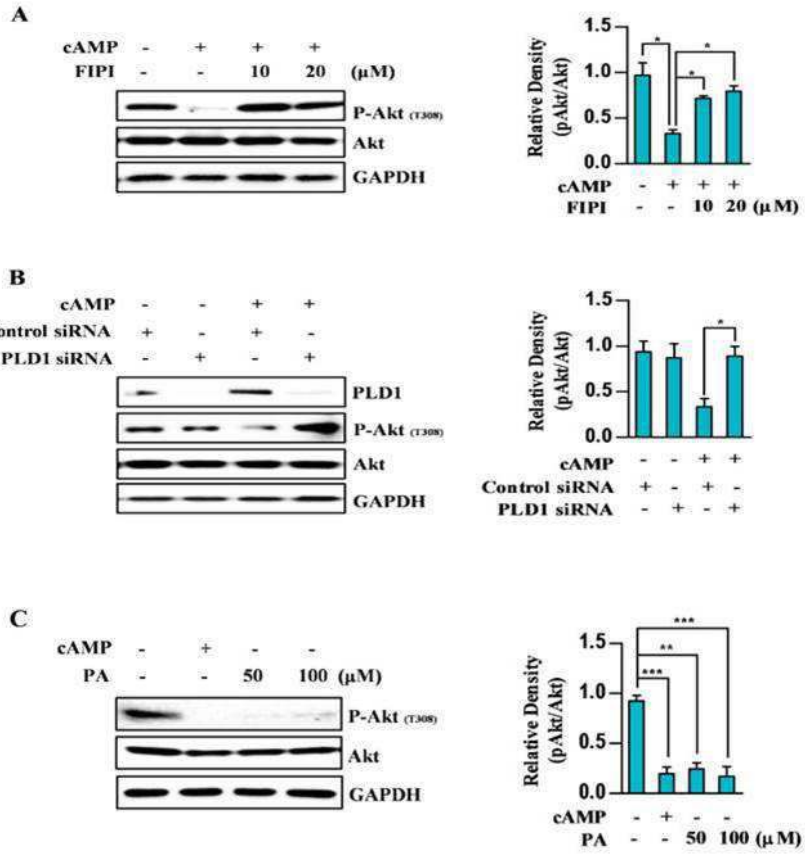
도면1



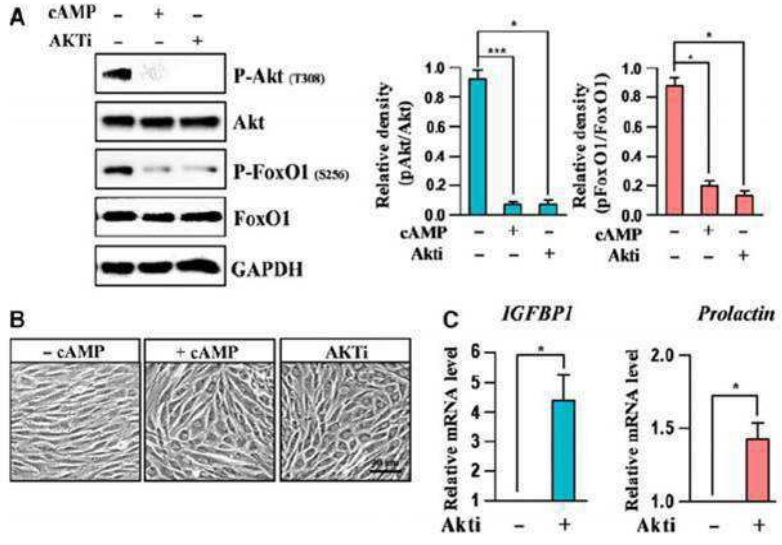
도면2


A
cAMP – + + +
FIPI – – 10 20 (μM)
P-FoxO1 (S256)
FoxO1
GAPDH
Relative density (pFoxO1/FoxO1)
1.5
1.0
0.5
0.0
cAMP – + + +
FIPI – – 10 20 (μM)
B
cAMP – – + +
Control siRNA + – + –
PLD1 siRNA – + – +
PLD1
P-FoxO1 (S256)
FoxO1
GAPDH
Relative density (pFoxO1/FoxO1)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
cAMP – – + +
Control siRNA + – + –
PLD1 siRNA – + – +
C
cAMP – + – –
PA – – 50 100 (μM)
P-FoxO1 (S256)
FoxO1
GAPDH
Relative density (pFoxO1/FoxO1)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
cAMP – + – –
PA – – 50 100 (μM)

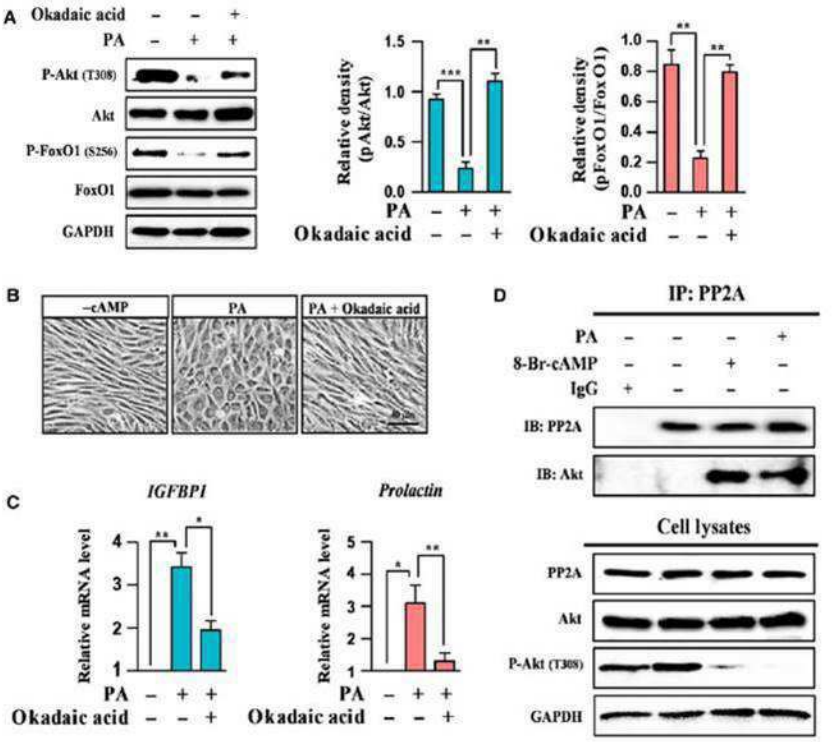
도면3


A
cAMP - + + +
FIPI - - 10 20 (μM)
P-Akt (T308)
Akt
GAPDH
Relative Density (pAkt/Akt)
1.5
1.0
0.5
0.0
cAMP - + + +
FIPI - - 10 20 (μM)
B
cAMP - - + +
Control siRNA + - + -
PLD1 siRNA - + - +
PLD1
P-Akt (T308)
Akt
GAPDH
Relative Density (pAkt/Akt)
cAMP - - + +
Control siRNA + - + -
PLD1 siRNA - + - +
C
cAMP - + - -
PA - - 50 100 (μM)
P-Akt (T308)
Akt
GAPDH
Relative Density (pAkt/Akt)
cAMP - + - -
PA - - 50 100 (μM)

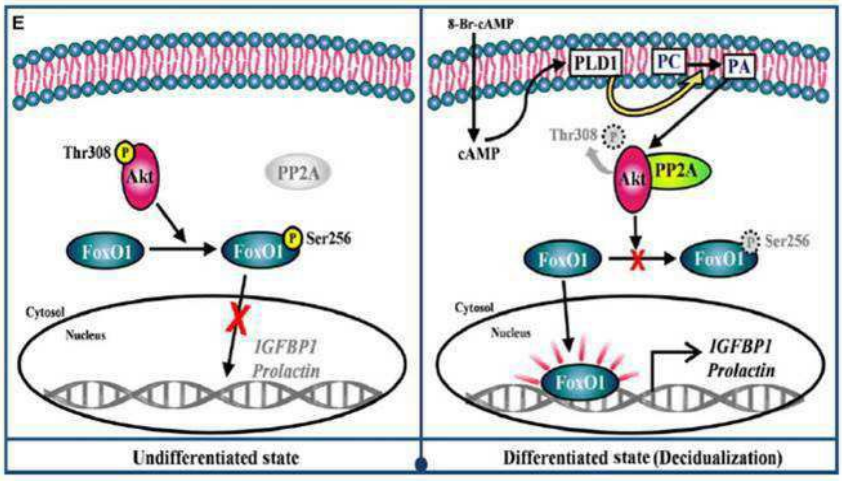
도면4


A
cAMP - + -
AKTi - - +
P-Akt (T308)
Akt
P-FoxO1 (S256)
FoxO1
GAPDH
Relative density (pAkt/Akt)
cAMP - + -
Akti - - +
Relative density (pFoxO1/FoxO1)
cAMP - + -
Akti - - +
B
- cAMP
+ cAMP
AKTi
C
IGFBP1
Relative mRNA level
Akti - +
Prolactin
Relative mRNA level
Akti - +

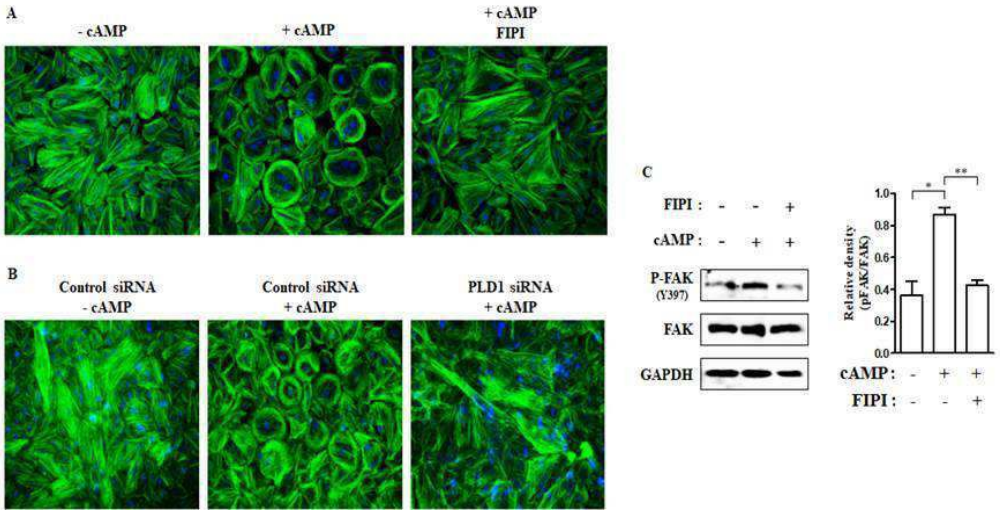
도면5


A
Okadaic acid
PA
P-Akt (T308)
Akt
P-FoxO1 (S256)
FoxO1
GAPDH
Relative density (pAkt/Akt)
Relative density (pFoxO1/FoxO1)
B
–cAMP
PA
PA + Okadaic acid
C
IGFBP1
Prolactin
Relative mRNA level
D
IP: PP2A
8-Br-cAMP
IgG
IB: PP2A
IB: Akt
Cell lysates
PP2A
Akt
P-Akt (T308)
GAPDH

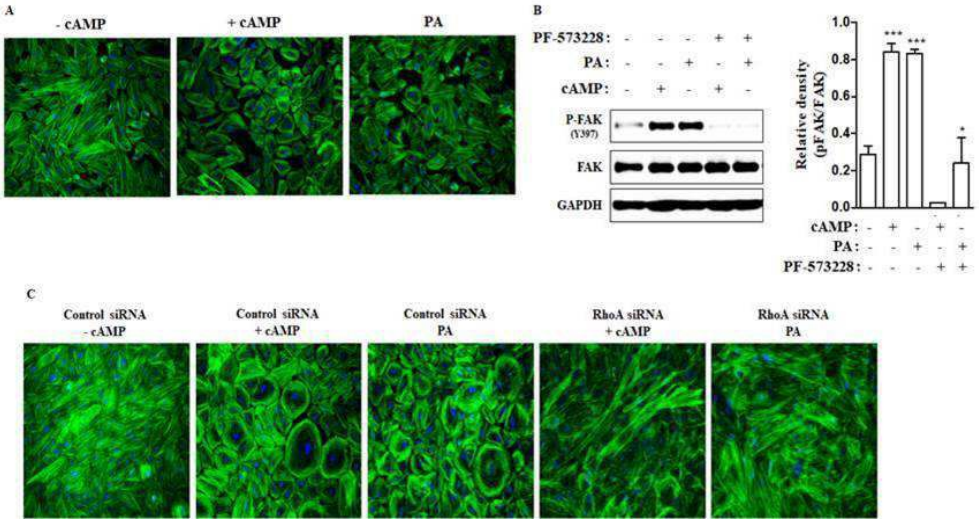
도면6


E
8-Br-cAMP
PLD1
PC
PA
cAMP
Thr308
Akt
PP2A
FoxO1
Ser256
Cytosol
Nucleus
IGFBP1
Prolactin
Undifferentiated state
Differentiated state (Decidualization)

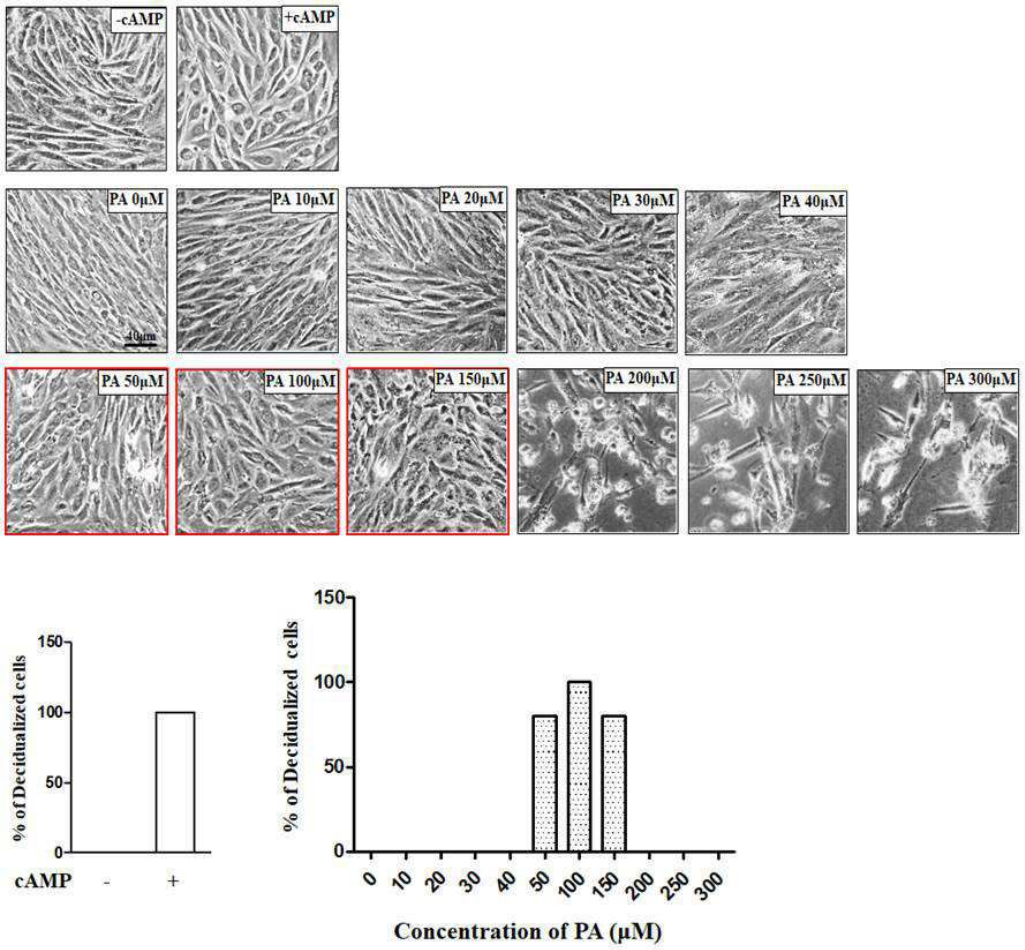
도면7


A
- cAMP
+ cAMP
+ cAMP
FIPI
B
Control siRNA
- cAMP
Control siRNA
+ cAMP
PLD1 siRNA
+ cAMP
C
FIPI : - - +
cAMP : - + +
P-FAK
(Y397)
FAK
GAPDH
Relative density
(pFAK/FAK)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
cAMP : - + +
FIPI : - - +

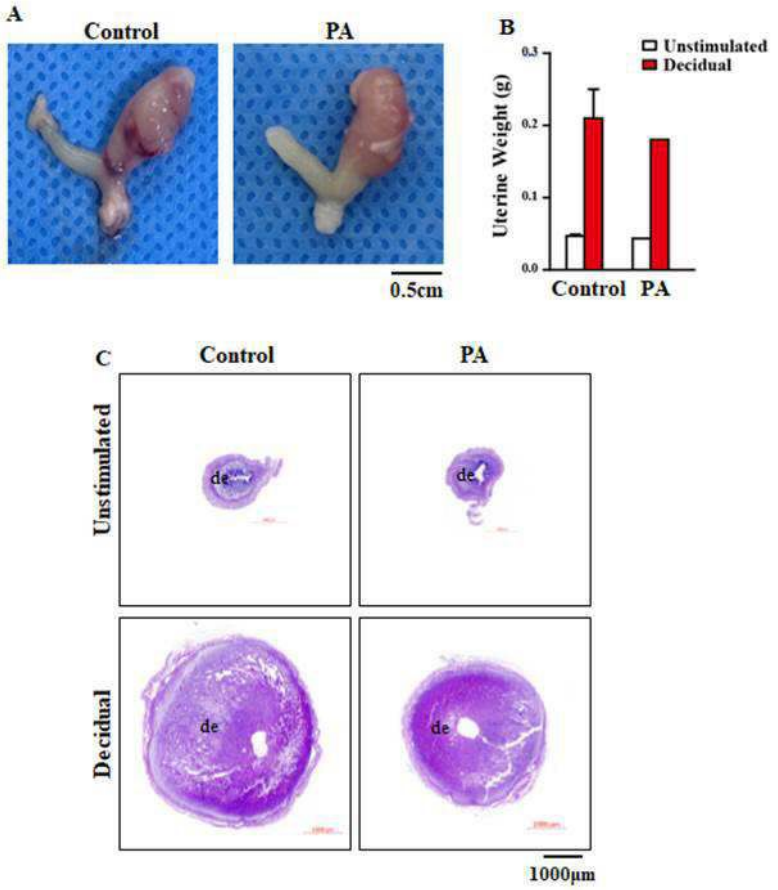
도면8


A
- cAMP
+ cAMP
PA
B
PF-573228 : - - - + +
PA : - - + - +
cAMP : - + - + -
P-FAK
(Y397)
FAK
GAPDH
Relative density
(pFAK/FAK)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
***
*
cAMP : - + - + -
PA : - - + - +
PF-573228 : - - - + +
C
Control siRNA
- cAMP
Control siRNA
+ cAMP
Control siRNA
PA
RhoA siRNA
+ cAMP
RhoA siRNA
PA

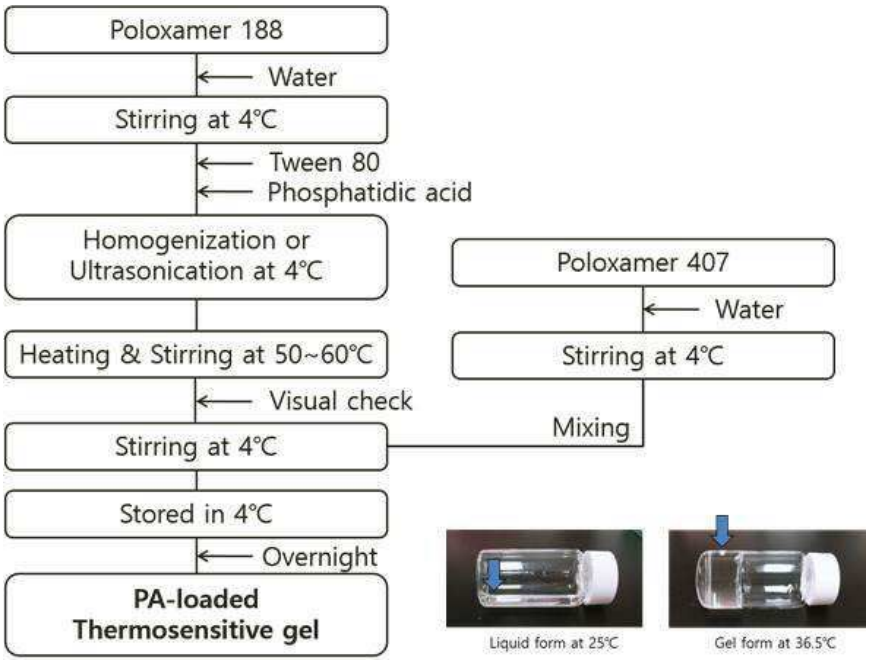
도면9


-cAMP
+cAMP
PA 0μM
PA 10μM
PA 20μM
PA 30μM
PA 40μM
40μm
PA 50μM
PA 100μM
PA 150μM
PA 200μM
PA 250μM
PA 300μM
% of Decidualized cells
150
100
50
0
cAMP - +
% of Decidualized cells
150
100
50
0
0 10 20 30 40 50 100 150 200 250 300
Concentration of PA (μM)

도면10


A
Control
PA
0.5cm
B
Unstimulated
Decidual
Uterine Weight (g)
0.3
0.2
0.1
0.0
Control
PA
C
Control
PA
Unstimulated
Decidual
de
1000μm

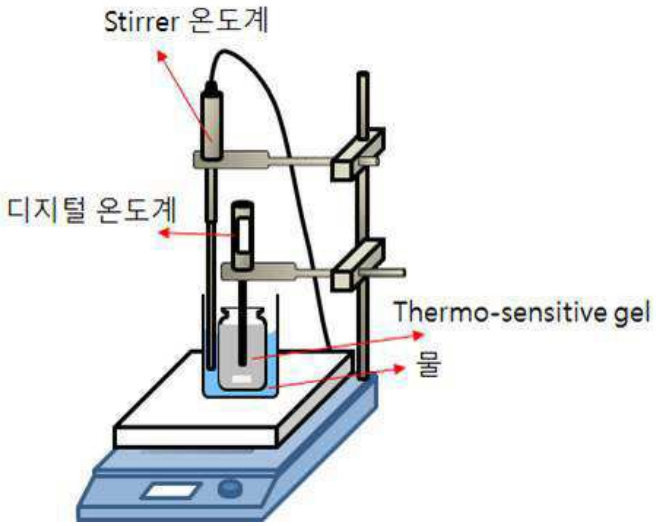
도면11


Poloxamer 188
Water
Stirring at 4℃
Tween 80
Phosphatidic acid
Homogenization or
Ultrasonication at 4℃
Heating & Stirring at 50~60℃
Visual check
Stirring at 4℃
Stored in 4℃
Overnight
PA-loaded
Thermosensitive gel
Poloxamer 407
Water
Stirring at 4℃
Mixing
Liquid form at 25℃
Gel form at 36.5℃

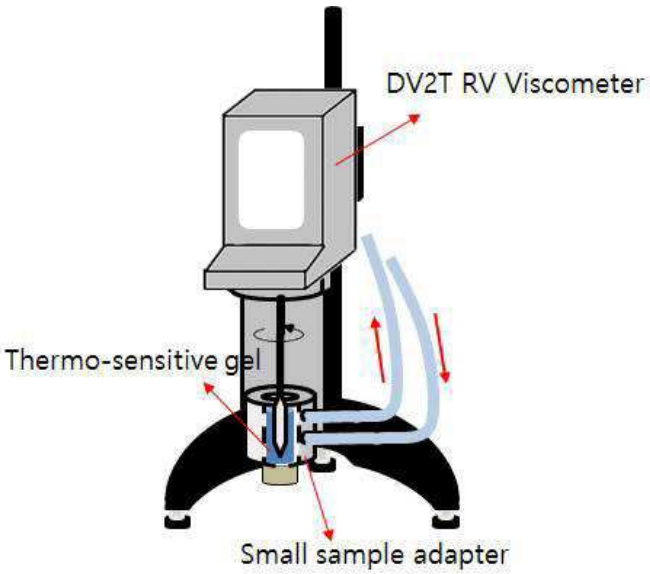
도면12



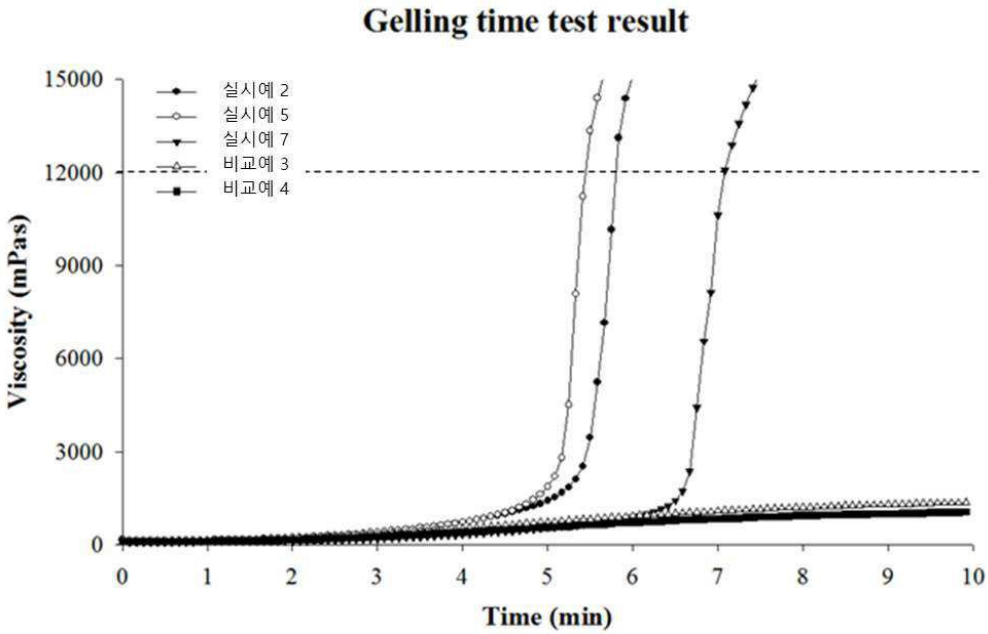
도면13



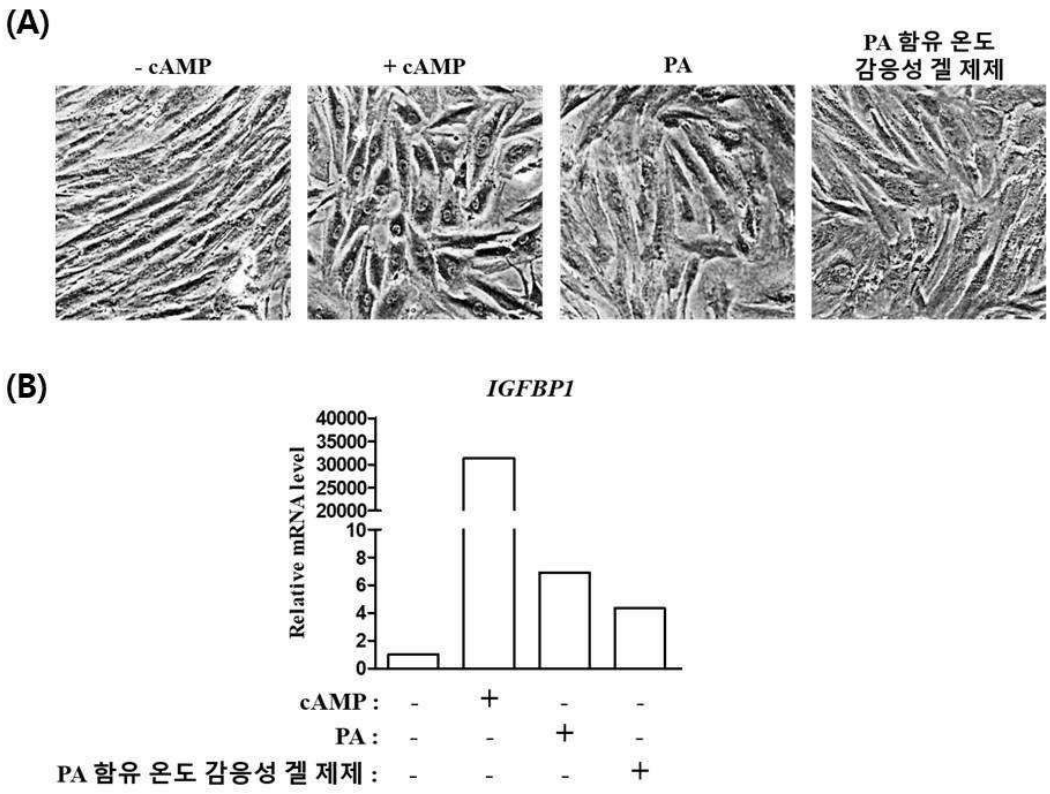
도면14



도면15


Gelling time test result
실시예 2
실시예 5
실시예 7
비교예 3
비교예 4
Viscosity (mPas)
Time (min)
15000
12000
9000
6000
3000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

도면16


(A)
- cAMP
+ cAMP
PA
PA 함유 온도 감응성 겔 제제
(B)
IGFBP1
Relative mRNA level
40000
35000
30000
25000
20000
10
8
6
4
2
0
cAMP : - + - -
PA : - - + -
PA 함유 온도 감응성 겔 제제 : - - - +

도면17



서 열 목 록

<110> IUCF-HYU (Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University)

<120> Thermosensitive composition comprising phosphatidic acid and the use thereof

<130> P20U10C0142

<150> KR 10-2019-0046187

<151> 2019-04-19

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGFBP1 primer(forward)

<400> 1

ttgggacgcc atcagtacct a 21

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IGFBP1 primer(reverse)

<400> 2

ttggctaaac tctctacgac tct 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> prolactin primer(forward)

<400> 3

tgacccttcg agactgtttg 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> prolactin primer(reverse)

<400> 4

cttgctcctt gtcttcggg 19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FoxO1 primer

<400> 5

ttcgtgtgca gaatgaagga 20

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer(forward)

<400> 6

catgagaagt atgacaacag cct 23

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer(reverse)

<400> 7

agtccttcca cgataccaaa gt 22

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLD1 siRNA

<400> 8

ggugggacga caaugagca 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Negative control

<400> 9

ccuacgccac caauuucgu 19