(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
G01N 33/68
A61K 38/19
A61K 38/20

(45) 공고일자 2002년10월18일
(11) 등록번호 10-0350259
(24) 등록일자 2002년08월14일

(21) 출원번호	10-1996-0704278	(65) 공개번호	특1997-0700863
(22) 출원일자	1996년08월06일	(43) 공개일자	1997년02월12일
번역문제출일자	1996년08월06일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/02771	(87) 국제공개번호	WO 1995/24650
(86) 국제출원일자	1995년03월10일	(87) 국제공개일자	1995년09월14일
(81) 지정국	국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 브라질 캐나다 일본 북한 대한민국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 그리스 영국 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴		

(30) 우선권주장 08/212,446 1994년03월10일 미국(US)

(73) 특허권자 제네틱스 인스티튜트, 엘엘씨
미국 매사츄세츠 02140 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 87버지니아 테크 인터렉추얼 프라퍼티스, 인크.

(72) 발명자 미국, 버지니아 24060, 블랙스버그, 프래트 드라이브 1872, 스위트 1625
키이스 제임즈 시. 주니어
미합중국 매사추세츠 01810 앤도버 28 바인 스트리트

(74) 대리인 특허법인코리아나, 특허법인코리아나, 윤여범, 조영원

심사관 : 김희진

(54) 임신성고혈압또는자간전증의예방또는치료를위한약제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 자간전증 (子癎前症)의 진단 및 치료를 위한 사이토카인, 특히 M-CSF 의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 자간전증은 임산부와 태아의 사망률과 이환율 (罹患率) 의 주요한 원인이며, 임신 중의 인간에 특유한 질병이다. 최근의 증거에 의하면, 자간전증의 특징은 태반 (胎盤) 의 적응장애 및 몸 전체에 걸친 내피 세포의 손상에 있는 것으로 밝혀지고 있다. 임산부 나선(螺旋) 동맥의 자궁근층 (子宮筋層) 구역으로의 영양배엽 (營養胚葉) 침입의 부전 (不全), 그리고 전신성 (全身性) 의 내피 손상의 원인이 되는 세포독성 매개물질의 생성도 또한 관련되어 있는 것으로 보인다.

<3> 영양배엽은 정상 조직과 종양 조직 양쪽 모두의 특성을 공유하고 있다는 점에서 독특한 세포형이다. 정상 발달 동안, 사람의 영양배엽은, 종양 세포와 마찬가지로, 세포외(細胞外) 세포간질(細胞間質)을 통해 나선 동맥의 자궁근층 부분으로 침범한다. 그러나, 다른 기관을 끊임없이 침범하여 결국에는 다른 기관까지 퍼지는 종양 세포와는 달리, 영양배엽의 침범성은 궁극적으로 통제를 받고 있고, 세포의 분화는 더욱 진전되며 세포의 노화가 일어난다. 정상 임신시, 영양배엽은 상기의 과정에 의해 나선 동맥을 자궁태반 동맥으로 전환시킨다[피지넨보그 (Pijnenborg) 등, *영양배엽 연구 (Trophoblast Research)* [덴커 (Denker) 와 애플린 (Aplin) 편집] 플리넘 (Plenum) 출판사, 뉴욕, 제 33 페이지 (1990 년)]. 자궁태반 동맥은 이후 나선 동맥의 대략 30 배 만큼이나 크게 확장된다. 그 결과로 생기는 혈액동력학적 변화들로 인해 임신의 후반 단계 동안 태반상(床)은 태아의 산소에 대한 증가하는 요구를 충족시킬 수가 있다. 자간전증의 여성에서는, 그러나, 두 번째 3 개월의 기간이 시작될 때 영양배엽의 두 번째 웨이브(wave)가 자궁근층으로 이동할 수가 없기 때문에 나선 동맥이 자궁태반 동맥으로 적절하게 전환되지 않는다[콩 (Khong) 등, *산부인과학 저널 (J. Obstet. Gynecol.)*, 제 93 권: 제 1049 - 1059 페이지 (1986 년)]. 그 결과, 자간전증의 여성은 원래 그대로의 확장되지 않은 나선 동맥을 가진 채 고내성 (高耐性), 고압 (高壓), 저유량 (低流量) 상태를 나타내며[로버트슨 (Robertson) 등, *미국 산부인과학 저널 (Am. J. Obstet. Gynecol.)*, 제 155 권: 제 401 - 412 페이지 (1986 년)], 여러 가지의 각종 임상 증상을 나타내는 것이 전형적이다. 그러므로, 태아에서 유래된 영양배엽의 비정상 행동은 이 질병의 중요한 특징인 것으로 보인다.

<4> 사이토카인들은 면역 및 염증 반응의 조정에서 중요한 정보전달 시스템 (communication system) 을 제공한다. 사이토카인들 중에는, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니 자극

인자 (GM-CSF) 및 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF, 또한 CSF-1 로서 알려져 있기도 함)를 포함하여, 주요한 목표 세포 (target cell) 들에 따라 명명된 다수의 콜로니 자극 인자들 (CSFs) 이 있다. 그 밖의 사이토카인들에는 IL-1 에서 IL-13 까지를 포함하는, 인터루킨이 있으며 이들은 혈액생성에 관여하는 일, 그리고 병원성(病原性) 감염에 대한 방어 제공을 포함하는 다양한 활성들을 갖는 것으로 알려져 있다.

<5> 사이토카인들은 정상 임신 동안에 자궁과 태반에서 형성된다[타비브자데 (Tabibzadeh), *내분비 리뷰 (Endocrine Reviews)*, 제 12 권: 제 272 - 290 페이지 (1991 년)]. 랫트의 경우, M-CSF 는 자궁샘 세포에 의해 분비되며, 임신의 처음 몇 일 내에 그 농도가 대략 1,000 배 증가되고, 침입 영양배엽 세포상에 새로운 수용체가 존재한다는 사실이 관찰되었다[폴라드 (Pollard) 등, *네이처 (Nature)*, 제 330 권: 제 484 - 486 페이지 (1987 년)]; [우즈마끼 (Uzumaki) 등, *PNAS, USA*, 제 86 권: 제 9323 -9326 페이지 (1989 년)]. 사람의 경우, M-CSF mRNA 의 발현과 국재성 (局在性) 이 첫 3 개월의 기간에는 융모막 융모지질(支質)의 간엽(間葉) 세포, 특히 융모핵을 따라 늘어서 있는 세포영양배엽과 세포영양배엽 핵에서; 두 번째 3 개월의 기간에는 융모 간엽세포에서; 그리고 세 번째 3 개월의 기간에는 융모관을 따라 늘어서 있는 세포에서 나타났다[가나자끼 (Kanazaki) 등, *사람의 생식 (Human Reprod.*, 제 7 권: 제 563 - 567 페이지 (1992 년)]; [다이터 (Daiter) 등, *임상내분비대사 저널 (J. Clin. Endocrinol. Metab.)* 제 74 권: 제 850 - 858 페이지 (1992 년)]. 임신 중의 순환하는 대식세포 M-CSF 의 농도도 또한 비임신 여성의 농도보다 더 높다[용 (Yong) 등, *혈액 (Blood)*, 제 180 권: 제 2897 - 2902 페이지 (1992 년)].

<6> 그 밖의 사이토카인들은 태반 및/또는 자궁에서 확인되었다. TNF-α는 사람의 양막액 (羊膜液) 과 태반 및 탈락막 (脫落膜) 조직의 상청액에 존재한다[자아텔라 (Jaattela) 등, *실험연구 (Lab. Invest.)* 제 58 권: 제 48 -52 페이지 (1988 년)]. 영양배엽 유래의 TNF-α는 사람의 정상 영양배엽의 IL-6 및 IL-6 수용체-의존성 시스템들을 이용하여 사람 융모막 생식선자극홀몬 (hCG) 의 방출을 유도한다[잉 (Ying) 등, *임상내분비대사 저널,* 제 74 권: 제 184 - 191 페이지 (1992 년)]. 반대로, hCG 와 사람 태반 락토젠 (hPL) 은 TNFα의 발현을 증가시킨다[셰이퍼 (Schafer) 등, *출산의학 저널 (J. Perinat. Med.)*, 제 20 권: 제 233 - 240 페이지 (1992 년)].

발명의 상세한 설명

<7> 따라서, 본 발명은 태반 및/또는 자궁에 정상적으로 존재하지만, 자간전증의 여성에서는 없거나, 혹은 감소된 농도로 존재하는 생물학적 인자들의 농도를 측정하고, 필요하다면, 그 농도를 증가시킴으로써 자간전증을 탐지, 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 생물학적 인자들에는 순환 사이토카인들, 특히 CSF 들, 이를 테면 M-CSF, 인터루킨들, 이를 테면 IL--11, 그리고 성장 인자들, 이를 테면 TNF-α가 있다. 본 발명의 방법을 위한 가장 바람직한 성장인자는 M-CSF 이다.

<8> 한 특정 구현예에서, 본 발명은 자간전증 또는 임신성 고혈압 ("GH") 을 앓고 있거나 앓기 쉬운 환자의 혈청 M-CSF 농도를 측정하는 것을 포함하는, 임신성 고혈압 또는 자간전증의 위험도 증가를 진단하는 방법을 포함한다. 바람직한 구현예의 경우, 혈청 M-CSF 농도는 약 14 주 내지 16 주 임신상태에 있는 임신 여성에서 측정한다. 이 혈청 M-CSF 농도들을 정상 임신의 여성들의 혈청 M-CSF 농도와 비교한다. 이 명세서에서 뒤에 설명되고 있는 바와 같이, 혈청 M-CSF 농도는 최종 임신 결과에서 자간전증 또는 임신성 고혈압 (GH) 의 발생과 상관관계가 있다; 따라서, 본 발명은 최종 임신 결과에서 자간전증 및/또는 GH 의 발생의 위험도 증가를 정확히 예측하기 위한 목적에 유용하다. 이러한 정보는 M-CSF 에 의한 치료의 혜택을 받을 수 있는 여성들을 확인하는 데에 이용될 수도 있다.

<9> 본 발명자는 혈청 TNF-α 농도가 자간전증 임신의 초기 단계 동안에 감소되고, 따라서 초기 단계에서 임신성 고혈압 또는 자간전증의 위험도 증가를 진단 및/또는 치료하는 데에 추가로 도움이 될 수 있다는 사실을 발견하였다. 자간전증 임신의 후반 단계 동안에는, TNF-α농도가 증가하게 된다.

<10> 또 하나의 구현예에서, 본 발명은 자간전증 또는 GH 를 앓고 있거나 앓기 쉬운 여성을 M-CSF 로 치료하는 방법을 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명은 환자, 즉 일반적으로 자간전증 또는 GH 를 앓기 쉬운 것으로 예측되거나 또는 앓고 있는 임신 여성에게 M-CSF 와 같은 사이토카인을 치료상 유효한 양 투여하는 것을 포함한다. M-CSF 외에도, 상기의 환자는 하나 또는 그 이상의 다른 생물학적 인자들, 이를 테면 IL-11으로 치료될 수 있다.

<11> 또 하나의 구현예에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 사이토카인들, 특히 CSF 들, 더욱 특별하게는 M-CSF 의 발현을 암호화하는 유전자로 처리된, 즉 형질전환된 세포들을 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 한 구현예에서, 사용된 세포들은, 보다 많은 양의 사이토카인(들)의 발현을 가능케 하기 위한 목적으로, 환자로부터 빼내어 그 사이토카인(들)을 암호화하는 유전자로 처리한, 즉 형질전환시킨 다음, 상기 환자 즉 일반적으로 자간전증을 앓기 쉬운 것으로 예측되거나 또는 앓고 있는 임신 여성에게 투여하는 영양배엽들이다. 형질전환 세포의 제조에 유용한 벡터 및 유전자들은 미국 특허 제 4,868,119 호와 제 4,879,227 호에 기술되어 있으며, 그 발명의 정보가 여기에 참고로 수록되어 있다.

<12> 본 발명에 유용한 생물학적 인자들에는 증식하는 영양배엽들의 국소 환경에서 정상적으로 생성되는 것들이 있다. 본 발명에 유용한 생물학적 인자들 중에는 사이토카인들, 특히 콜로니 자극 인자들, 이를 테면 G-CSF, GM-CSF 및 M-CSF 그리고 인터루킨들 이를 테면 IL-1 에서 IL-13 까지가 있다. 본 발명의 방법상의 투여에 유용한 그 밖의 사이토카인들에는 종양 괴사 인자, 특히 TNF-α, 인터페론들, 그리고 성장 인자들, 이를 테면 형질전환 성장 인자 β, IGF, 및 FGF 가 있다. 본 발명상의 투여에 유용한 그 밖의 생물학적 인자들에는 지방산 대사물질들, 이를 테면 프로스타시클린, 루코트리엔들 그리고 PAF 가 있다. 바람직한 생물학적 인자들은 M-CSF 단독이거나 혹은 GM-CSF, IL-11 또는 기타 생물학적 인자들과 조합한 것이다.

<13> 본 발명은 또한 환자에 대한 투여에 가장 적절한 생물학적 인자들을 결정하는 방법을 포함한 것이기도 하다. 환자에게 투여하고자 하는 적절한 생물학적 인자들을 결정함에 있어, 의사는 태반 및/또는 자궁에 존재하는 생물학적 인자들의 농도를 측정할 수도 있다. 정상 임신과 비교하여 감소된 농

도로 존재하는 인자들이 환자에 대한 투여에 적절한 인자로 고려될 수 있다.

<14> 본 발명의 한 특정 구현예에서, 임신 여성의 경우 임신의 첫 3 개월의 기간 동안 [대략 1 주 내지 14 주] 혈청 M-CSF 농도를 측정함으로써 임신성 고혈압 또는 자간전증의 위험도 증가에 대해 진단할 수 있다. M-CSF 농도는 이 기간 중 적어도 두 차례 측정하는 것이 좋으며, 바람직하게는 약 14 주 내지 16 주째의 측정을 포함하는 것이 좋다. M-CSF 농도가 정상보다 상당히 아래인 경우, M-CSF 의 투여를 통한 치료 과정이 이용될 수 있다. 일반적으로, 1 ml 당 500 단위 M-CSF 또는 그 이상의 농도가 정상으로 간주된다. 그러나, 1 ml 당 약 500 단위 내지 약 600 단위 M-CSF 의 M-CSF 농도라면 의심해 볼 수 있으며, TNF-α에 대한 분석검사 또는 M-CSF 의 추가 측정의 형태로 더 감시하는 것이 적절할 수 있다. M-CSF 한 단위는 대략 12 피코그램의 M-CSF 에 상당한다. 따라서, M-CSF 의 존재량을 직접 분석검사 [혈청에 존재하는 M-CSF 의 정확한 ng/ml] 하거나, 또는 생체검사 [M-CSF 12 피코그램의 활성치에 비교하여 혈청 중의 M-CSF 활성치] 에 의한 방법으로 단위가 측정될 수 있다. 환자의 혈청 M-CSF 농도가 약 500 단위/ml 미만인 경우, 그 환자는 임신성 고혈압 및/또는 자간전증을 앓을 위험이 증가된 것으로 진단할 수 있다. 고혈압 관리를 위한 치료 과정이 적절한 것일 수 있다.

<15> 추가 감시가 요구되는 경우에는, 환자의 혈청 TNF-α의 생물학적 활성치를 측정함으로써 달성될 수 있다. 대략 40 단위/ml 또는 그 이상의 혈청 TNF-α 의 생물학적 활성치는 일반적으로 정상으로 간주된다[키이스 (Keith) 등, *출산학 저널 (J. Perinatology)*, 제 13 권: 제 417 - 418 페이지 (1993 년) 와 키이스 등, *고혈압과 임신 (Hypertension and Pregnancy)* (1995 년) 제 14 권: 제 81 - 90 페이지 참조]. 이들 논문 둘 다의 발명에 관한 정보는 여기에 참고로 수록되어 있다. 혈청 M-CSF 농도가 정상 이하이거나, 혹은 의심스럽고, 혈청 TNF-α농도도 또한 정상 이하인 경우, 이 환자는 임신성 고혈압과 자간전증을 앓을 위험이 증가된 것으로 진단할 수 있다.

<16> 본 발명의 또 하나의 구현예에서, 임신성 고혈압 또는 자간전증의 위험도가 증가된 환자는 M-CSF 의 투여를 통하여 치료된다. 바람직하게는, M-CSF 에 의한 치료는 첫 3 개월의 말기, 즉 약 14 주 내지 약 16 주째에, 혹은 둘째 3 개월의 초기, 즉 약 16 주 내지 약 18 주째에 시작하여, 측정한 혈청 M-CSF 농도가 정상 농도의 범위내에 올라갈 때까지 계속할 수 있다. 바람직하게는, M-CSF 에 의한 치료는 임신의 대략 30 주를 지나서는 계속되지 않는다. 본 발명의 목적상, 정상 혈청 M-CSF 농도는 자간전증 또는 임신성 고혈압을 앓고 있지 않은 임신 여성들에 전형적인 농도, 일반적으로 적어도 대략 500 단위/ml 로 정의한다. [500 단위/ml ≒ 6 나노그람/ml] 바람직하게는, M-CSF 에 의한 치료는 M-CSF 농도가 정상 농도의 범위내에 있은 후, 그리고 M-CSF 투여의 어떤 해로운 효과도 관찰되기 전에 중단된다.

<17> 바람직한 구현예에서, M-CSF 는 IL-11 의 투여와 함께 투여하거나, 또는 IL-11 의 투여 이전에 투여할 수 있다. 최근, 아이어란드 (Ireland) 등 [*혈액(Blod)* 제 84 권: 제 267a 페이지 (1994 년)] 이 인터루킨-11 (IL-11) 은 태반의 섬유아세포에 의해서 생성되며, 영양배엽 분화 및 태반형성에 관여하는 것으로 보인다는 보고를 하였다. 정상 임신의 경우 혈장 용량은 생리적으로 확장된 상태에 있는 것이 전형적이나, 자간전증은 감소된 혈장 용량 상태이다. IL-11 은 혈장 용량의 증가에 도움을 줄 수 있으며 [올트 (Ault) 등, *혈액(Blood)* 제 84 권: 제 276a 페이지 (1994 년)], 자간전증의 경우에서 임신 말기 동안 증가되게 되는 TNF-α의 생성을 조정할 수 있다[키이스 등, (1993 년), *상기*, 및 키이스 등 (1995 년), *상기*]. 그러므로, IL-11 에 의한 치료 이전에 시작하는 M-CSF 에 의한 치료는 상승 작용 (相乘作用) 을 보여줄 수 있다. M-CSF 에 의한 초기 치료 [첫 3 개월의 기간 중에 시작하여 대략 정상의 M-CSF 농도가 얻어질 때까지 계속] 및 이후의 IL-11 에 의한 치료 [둘째 3 개월의 기간 중에, 바람직하게는 대략 18 주 내지 22 주째에 시작하여 임신의 약 36 주째까지 계속] 는 자간전증의 최선의 해결책이 될 수 있다.

<18> 본 발명의 방법에서, M-CSF 및/또는 그 밖의 인자들은 어떠한 공지의 방법으로도 투여될 수 있다. 투여는 전신성이어야 하며, 예를 들면 비경구적 투여여야 한다. 바람직한 투여 방식은 피하 (皮下) 이며, 하루에 1× 를 넘지 않는 것이 좋다. 치료 유효량은 전신성의 독성 반응을 유발하지 아니할 정도로 적으면서, 그러나 원하는 치료 반응을 일으키기에 충분한 양이어야 한다. 상기 처방화를 위한 실제 복용 양생법은 약물의 작용을 변화시키는 각종 인자들, 예를 들면, 환자의 상태, 체중, 성 (性) 그리고 식사, 투여 시간, 및 질병의 내습 정도 등을 고려하는 담당 의사에 의해 결정될 것이다.

<19> 일반적으로, M-CSF 의 치료 유효량, 즉, 혈청 M-CSF 농도를 정상 범위내까지 증가시키기에 충분한 양은 약 1 - 200 ㎍/kg/일 의 범위 또는 더욱 바람직하게는 약 5 - 150 ㎍/kg/일 의 범위에 있을 것으로 예상된다. 본 발명의 방법은 약제 조성물의 연속 투여를 포함할 수 있다. 이와 같은 연속 투여는 약 7 일 내지 약 21 일의 기간에 걸쳐 행하여질 수 있다. 한 차례 또는 그 이상 연속 투여를 할 수 있다.

<20> IL-11 을 투여하는 바람직한 한 구현예에서, IL-11 의 치료 유효량은 약 1 - 100 ㎍/kg/일 의 범위 또는 더욱 바람직하게는 약 1 - 50 ㎍/kg/일 의 범위에 있을 것으로 예상된다. IL-11 은 피하 투여하는 것이 좋다.

<21> 일반적으로, 투여는 초기에 복용 범위의 최저량으로 시작될 것이며, 미리 선택된 시간 과정에 걸쳐 양성 효과가 관찰될 때까지 그 투여량을 늘리게 될 것이다. 이후, 투여량은 점증적으로 증가될 것이며 이러한 점증적 증가는 그에 상응하는 효과상의 증대가 이루어지는 수준까지 제한되고, 나타날 수 있는 모든 부작용을 고려한다. 본 발명의 방법을 사용하는 정맥내 요법 또는 피하 요법의 기간과 빈도는 질병의 심한 정도, 또는 치료하고자 하는 성장 인자의 감소 그리고 각 환자의 상태와 잠재적인 특이체질의 반응에 따라 다를 것이다. M-CSF 의 각 정맥내 적용 기간은 연속 투여의 12 시간 내지 24 시간의 범위에 있는 것을 생각해 볼 수 있을 것이다. 궁극적으로는, 담당 의사가 본 발명의 방법을 사용하는 적절한 치료 기간을 결정하게 될 것이다.

<22> 유전자 요법상, 본 발명에서 사이토카인의 투여를 위한 바람직한 세포형은 영양배엽들이다. 상기한 바와 같이, 영양배엽은 임신 동안의 자궁 및/또는 태반에서 활동적인 일종의 독특한 세포형이다.

실시예

<23> 실시예 1. 영양배엽 세포 배양.

<24> 태반 샘플은 분만시에 승낙한 정상 임신 여성 및 자간전증 임신의 여성들로부터 얻어졌다. 정상 및 자간전증 임신의 사람 태반에서 분리된 영양배엽의 1 차 세포 배양은, 여기에 기술된 바와 같이, 클리만 (Kliman) 등 [*내분비학 (Endocrinology)*, 제 118 권: 제 1567 -1582 페이지 (1986 년)] 의 부분변형 기법에 따라 확립된다.

<25> (제 1 일) 무균 기법으로 태반을 얻어서 보존하고 차가운 PBS 로 씻어 준다. 태반의 임산부 쪽에서 취한 태반 절편 (20 그람) 여러 개를 멸균 페트리 디쉬에 놓고 차가운 멸균 PBS 로 씻어 혈액 응고물을 씻어 낸다. 외과용 메스를 사용하여 결합조직 재료로부터 영양배엽 세포들을 분리한다. 그 세포들을 페트리 디쉬 두껑으로 덮고, 무게를 단 다음, 50 ml 의 트립신 용액에 첨가한다.

<26> (제 2 일) 4 ℃ 에서의 하룻밤 후, 세포들을 트립신과 함께 0.01 % DN에이즈 (DNase) I (건조 분말) 과 혼합하여, 37 ℃ 의 물 중탕에서 15 분간 항온배양시킨다. 용액 50 ml 당 태아기 송아지 혈청 (FCS) 20 % 배지 10 ml 가 든 DMEM 을 첨가하고 1 분간 내버려 둔다. 이 용액을 여과 (20 μ) 시킨 다음, 멸균 깁코(Gibco) 플라스크 속에 부어 넣는다. 이 용액을 흔들어서 세포들을 현탁시킨다. 마지막으로, 세포들을 연속 퍼콜(Percoll) 기울기로 원심분리한다.

<27> 비트로넥틴을 함유하는 상피세포 플레이팅 배지 (깁코) 를 사용하여 세포 부착을 촉진시킨 후에 피브로넥틴이 코팅된 플라스틱상에서, 혹은 상피세포 성장 배지 (깁코) 에서 20 % FCS 가 보충된 DMEM 에서 영양배엽 세포를 배양한다. 이와 같은 세포들은 증식 활성이 거의 없기 때문에, 2 차 배양은 가능하지 않으나, 갓 분리한 영양배엽 세포들의 동결 (凍結) 은 실행될 수가 있다. 일부 세포의 동결은 유사한 조건하에서 얻어진 세포들에 대한 여러 차례 실험을 가능케 한다.

<28> 첫 3 개월 기간의 영양배엽 효과의 모델로서 JEG-3 융모암 세포주도 또한 사용될 수 있다. JEG-3 융모암 세포주는 팰콘(Falcon) 플라스크 또는 넝크(Nunc) 마이크로타이터 (microtiter) 플레이트에서 20 % FCS 가 보충된 DMEM 을 사용하여, 표준 세포 배양 기법에 따라 배양한다.

<29> 넝크 마이크로타이터 플레이트의 웰 (well) 들을 최소 필수 배지로 씻어준 후, 배지를 M-CSF 또는 적절한 매개물이 보충된 배양 배지로 바꾼다. 24 시간, 48 시간 또는 72 시간 동안 세포들을 항온배양시킨 후 배양 배지를 제거하고, 600 g에서 10 분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거한다. 상청액을 사이토카인 및 지방산 대사물질들에 대한 분석검사를 할 때까지 - 70 ℃ 에서 저장한다. 플레이트를 세포 형태학 및 세포 수에 대한 평가를 위해 4 % 파라포름알데히드의 PBS 용액으로 고정시키고 염색한다.

<30> 이 조직학적 관찰의 결과는 실시예 3 에서 보고되어 있다.

<31> 실시예 2. 사이토카인 및 지방산 대사물질 측정.

<32> **A. 사이토카인에 대한 ELISA:** 시중에서 구입가능한, 효소-결합 면역흡착 검사 (ELISA) 키트 [젠자임 코포레이션 (Genzyme Corporation), 케임브리지, 메사추세츠] 를 사용하여 사이토카인을 측정한다. 이 검사는 스트렙타비딘-퍼옥시데이즈, 그리고 발색단 (發色團) 으로서 O-페닐렌디아민과 함께 모노클로날 항-GM-CSF, -G-CSF, -M-CSF, 또는 -TNF-α 비오틴화 염소 항-토끼 면역글로불린을 사용하는 3중 항체 샌드위치법이다.

<33> **B. TNF-α에 대한 생체검사:** TNFα 생체활성에 대한 L929 마우스 섬유육종 세포의 세포독성 검사는 3중으로 96 웰 마이크로타이터 플레이트에서 다음과 같이 실행한다. DMEM + 10 % FCS 에서 씻고 재현탁시킨 L929 목표 (target) 세포들을 1.0 × 10^5 세포/ml 및 250 ㎕/웰의 밀도로 둔다. 세포들을 밤새 웰 바닥에 부착되게 한 후, 배지를 제거하고, 시험 샘플이 함유된 신선한 동일 배지로 교체한다. 37 ℃ 에서의 16 - 18 시간 항온 배양 후, 각각의 웰에 PBS 내의 2.5 ㎎/㎖ (3-[4,5-디메틸티아졸-2-y]-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로미드) (MTT) [시그마 케미칼 (Sigma Chemical Co.), 세인트 루이스, 미주리] 의 용액 40 ml 를 첨가한다. 37 ℃ 에서 2 시간 동안 MTT 에 의한 항온 배양 후, 상청액을 제거하고, 포름아잔 결정 (반응 생성물) 을 소렌슨 (Sorenson's) 글리신 완충액 100 ㎕ 로 용해시킨다. 그 다음에 플레이트를 마이크로플레이트 리더 (reader) 를 사용하여 550 nm 에서 분광광도계에서 읽는다. FCS 대조표준은 흡광도가 대략 0.650 - 0.900 이어야 한다. 세포독성은 세포독성 지수를 얻기 위해 1 에서 뺀, FCS 대조표준의 % 로서 표현된다. 이 검사의 특이성은 항-TNFα 항체들에 의한 세포독성의 중화로 뒷받침된다.

<34> **C. GM-CSF 및 M-CSF 에 대한 생체검사:** FDCP-G 세포와 분석용 샘플의 재(再)희석액 또는 대조표준으로서의 재조합 GM-CSF 및 M-CSF를 3 중으로 마이크로타이터 플레이트에서 항온배양한다. 24 시간 예비항온배양 후, [^{3}H]메틸 티미딘을 첨가한다 (0.5 μCi/웰). 16 - 18 시간 후에, 세포들을 모으고 방사능 혼입 상태를 1 분당 카운트 (cpm) 로 측정한다. GM-CSF 활성을 중화시키기 위해, GM-CSF 에 대한 중화 항체 160 ㎕ 를 영양배엽 조직의 항온배양에 조건지워진 5637CM 배지 160 ㎕, 또는 대조표준으로서의 RPMI/BSA 와 37 ℃ 에서 4 시간 항온배양시킨다. 재조합 GM-CSF 에 대하여는, 항체 (10 ㎍/ml) 160 ㎕ 를 2.5 ng/ml rGM-CSF 160 ㎕ 와 항온배양시킨다.

<35> 실시예 3. 영양배엽 세포의 평가.

<36> **A. 세포학적 시험:** 세포들은 사이토카인 또는 항-사이토카인 항체가 첨가된 플라스틱 커버슬립 및 그렇지 아니한 플라스틱 커버슬립상에서 성장시킨다. 항온배양 24 시간, 48 시간 그리고 72 시간에, 세포들을 4 % 파라포름알데히드의 PBS (pH 7.4) 용액으로 고정시키고, 톨루이딘 블루로 염색하고, 거대 세포 형성의 정도에 대한 평가를 포함하여, 광(光) 현미경검사로 시험한다. 현미경사진검사를 수행, 평가할 수도 있다.

<37> **B. 증식 분석검사:**

<38> **1) MTT 분석검사 [실시예 2B 에서 기술됨]:** 증식은 % FCS 로 나타냄.

<39> **2) [^{3}H] 티미딘 혼입:** 영양배엽 세포주를 PBS 로 2 차례 씻어 주고 배양 배지를 재구성한다. 선택된 사이토카인 또는 항체를 웰에 첨가한다. 웰 하나당 1 μCi 의 농도로 [^{3}H] 티미딘을 시험 화합물과 똑같은 시점에 첨가하고, 그 배양액을 24 시간, 48 시간 또는 72 시간 동안 항온배양한다. 항온배양이 끝날 때 세포 수확기로 모은 세포들에 대한 베타 카운트 (계수, 計數) 로부터 증식 반응을 평가한다.

<40> **C. 흘몬 함량 분석 (hCG):** hCG 의 각 배양세포 배지 속으로의 분비는 β-서브유니트 사슬에 대한 미소입자 효소 면역분석 [애버트 래버러토리즈 (Abbott Laboratories), 애버트 파크, 일리노이] 으로 확인된다. 간단히 말해, 조건부 배지의 희석 샘플을 알칼리성 포스파테이즈가 결합된 항-hCG 항체로 처리한다. 그 다음에 이 효소-항체-항원 복합체를 항-hCG-코팅 미소입자와 항온배양시키고, 이 혼합물의 일정 분획량을 유리 섬유 매트릭스에 옮겨 준다. 그 다음에는 이 매트릭스를 씻어서 결합하지 않은 물질 및 기질을 제거한다; 인산 4-메틸룸벨리페릴을 첨가하고, 그 결과로 생기는 형광을 측정한다.

<41> **D. Ki-67/PKKK1 에 의한 재염색 (영양배엽 세포형의 확인):** 멸균 유리 커버슬립을 24-웰 배양 플레이트 (팰컨) 의 웰에 놓고, 500 ㎕ 의 영양배엽 배지 또는 시험 화합물이 함유된 배지로 미리 코팅해준다. 24 시간, 48 시간 또는 72 시간의 배양 후, 커버슬립을 부드럽게 씻어 주고 4 ℃, 5 분 동안 아세톤으로 고정시킨다. 그 다음에 이 커버슬립을 다음과 같이 즉시 염색한다: 커버슬립을 PBS 속에서 재(再)수화시키고, (세포질에서) PKKK1 에 대한 모노클로날 항체와 (핵에서) Ki-67 에 대한 모노클로날 항체 [1/10 다코 (Dako)] 로 동시적으로 실온에서 30 분간 항온배양시킨다. 염색과정의 나머지는 [체그린 (Chegrin) 등의 *성장인자와 난소 (Growth factors and the ovary)* [허쉬필드 (Hirshfield) 편집] 플리넘 출판사, 뉴욕, 제 213 - 220 페이지 91988 년)] 에 기술된 과정을 따른다.

<42> **e. 통계적 분석:** 사이토카인 및 아이코사노이드의 기초 농도의 표를 작성하고, 각종 시험 화합물의 효과를 시험 화합물들에 의한 사이토카인 및 아이코사노이드 농도의 변화를 비교함으로써 평가한다. 각 실험의 평균값들간의 차이에 대한 유의성은 ANOVA 로 평가한다. 자료들은 평균값 ± 표준 편차로서 표시된다. p 값 < 0.05 는 의미있는 것으로 간주된다.

<43> **F. 시험관 내 (In Vitro) 및 생체 외 (Ex Vivo) 에서의 영양배엽 배양 실험의 결과.**

<44> 자간전증에 대한 임상적 정의는 임신의 셋째 3 개월의 기간 중의 임상 징후 및 증상으로 이루어지므로, 첫째 또는 둘째 3 개월 기간 중의 영양배엽 세포들을 자간전증으로 분류하는 것은 불가능하다. 그러므로, M-CSF 및 GM-CSF 과의 배양 실험들은, 첫째 3 개월 기간의 영양배엽 세포의 하나의 모델로서 첫째 또는 둘째 3 개월 기간 중의 자연 유산아 샘플이나 JEG-3 융모암 세포를 사용하여 수행되었다. 200 U/ml 의 M-CSF 또는 GM-CSF 에 반응하였을 때, 증식은 72 시간의 항온배양 동안 대조표준 이상으로 증가 ($p < 0.05$) 하였다 (표 1). 첫째 3 개월 기간의 영양배엽 세포 (n = 3 자연 유산아 샘플) 에서는, 증식은 용량에 의존하는 방식으로 증가하였다 (표 2).

<45> 대조적이게도, 정상 및 자간전증 임신의 셋째 3 개월 기간의 영양배엽 세포들은 M-CSF 나 GM-CSF 에 전혀 반응을 나타내지 않았다 (표 3). 이는 본 출원의 배경기술 부분에 인용된 문헌상의 기존 발견사실과 일치하고 있는 것으로 볼 수 있다.

<46> **증식 결과:** 정상 임신의 영양배엽 세포들은 자간전증 임신의 세포보다 더 많이 생존하였다 (표 1); 차이는 세포 배양 제 5 일 째에 가장 두드러졌다.

[표 1]

<47> JEG-3 융모암 세포의 증식 (첫 3 개월 기간의 영양배엽 세포의 모델)

	대 조 표 준	M-CSF (200U/ML)	GM-CSF (200U/ML)
제 1 일	100	124 ±10.5	120 ±9.7
제 2 일	145 ±10.3	187 ±15.6	203 ±20.1
제 3 일	197 ±25.9	341 ±37.1	337 ±45.2

<48> 데이터는 대조표준과 비교하여 각각의 값의 퍼센트 비율로 나타냄

<49> (제 1 일 성장인자 없음). % = 값 (광학 밀도) (제 1 일) × 100.

[표 2]

<50> 첫 3 개월 기간의 영양배엽 세포의 증식

M-CSF (U/ML)	대조표준으로부터의 변화 %
2	1.75 ± 4.45
20	11.6 ± 4.3
200	16.3 ± 5.5
2000	23.1 ± 5.6

<51> (N = 3 태반)

[표 3A]

<52> 정상 영양배엽 세포의 생존

	대조표준	M-CSF (2000U/ML)	GM-CSF (2000U/ML)
제 1 일	100	104 ± 13.5	95 ± 7.2
제 2 일	93 ± 10.7	90 ± 12.3	96 ± 11.2
제 3 일	80 ± 12.8	82 ± 16.0	80 ± 12.9

[표 3B]

<53> 자간전증 영양배엽 세포의 생존

	대조표준	M-CSF (2000U/ML)	GM-CSF (2000U/ML)
제 1 일	100	97 ± 8.8	97 ± 9.0
제 2 일	84 ± 6.6	87 ± 11.4	80 ± 14.4
제 3 일	58 ± 13.5	60 ± 18.7	66 ± 19.1

<54> **G. M-CSF 의 태반층 생체조직절편검사 평가의 결과.**

<55> M-CSF 발현과 자간전증 태반층 손상간의 관계를 평가하기 위해, 정상 (n = 11) 및 자간전증 (PE) (n = 20) 임신의 태반층 생체조직절편검사에서 M-CSF 의 분포를 연구하였다. 면역조직화학적 염색은 스트렙타비딘 퍼옥시데이즈법을 통해 재조합 M-CSF, α-악틴 (평활근의 판별적 특징) 및 대식세포의 모노클로날 항체들을 사용하여 포르말린 또는 부앵액 (Bouin's) 으로 고정시킨, 파라핀에 박힌 샘플에서 수행되었다. 정상의 생체조직절편검사에서, 세포영양배엽 및 합포체영양배엽(合胞體營養胚葉) 세포들은 M-CSF 에 양성이었다. 자궁태반 동맥 (UPA) 의 벽내(壁內) 맥관내 영양배엽 세포들은 희미한 M-CSF 염색이 있었으며 그 혈관들은 α-악틴 염색이 전혀 없었다. UPA 의 근내막 (筋內膜) 의 증식 영역에서는, M-CSF 양성의 대시세포와 영양배엽 세포들이 존재하였다. PE 동맥은, 아테롬성 동맥경화증과 함께, M-CSF 에 염색되지 않았으나 α-악틴에는 염색이 되었다. 맥관 벽에는 영양배엽 세포가 없었으나, 동맥주위의 세포영양배엽 세포들은 M-CSF 에 양성이었다.

<56> 실시예 4. 혈청 M-CSF 농도의 측정과 자간전증 및/또는 임신성 고혈압 ("GH") 과의 상관관계.

<57> M-CSF 의 혈청 농도는 여성 68 명의 임신 16 주째에 측정하였다. 이들 환자 중 22 명이 나중에 GH 를 나타냈고, 46 명의 환자들은 정상 임신이었다. 나중에 GH 를 나타낸 환자들의 평균 혈청 M-CSF 농도는 정상 임신의 환자들의 평균치보다 상당히 더 낮았다. 나중에 GH 또는 자간전증을 나타낸 환자들의 경우, 평균 혈청 M-CSF 농도는 455.2 ± 10.5 단위/ml 였으며 정상 임신 환자의 평균 혈청 M-CSF 농도 536.1 ± 20.4 단위/ml (평균치 ± 표준 편차) 와 비교가 된다. 이 측정된 차이의 p 값은 $p < 0.01$ 이고, 따라서 통계적으로 의미있는 것으로 간주된다.

<58> GH 를 나타낸 환자 22 명 및 정상 임신의 환자 21 명에 대해 더 측정을 하였다. 이 짝지은 환자 집합에 대해, M-CSF 농도는 다시 GH 를 가진 환자들에서 더 낮았다, (455.2 ± 10.5 단위/ml 대 530.3 ± 16.5 단위/ml, $p < 0.0001$). 혈청 M-CSF 농도는 임신 중의 최대 심장확장 압력 ($R = -0.472$, $p < 0.0005$) 및 임신 중의 최대 심장수축 압력 ($R = -0.472$, $p < 0.0001$) 과 역비례 관계가 있었다. GH 의 환자 22 명 중, 6 명이 자간전증으로 진단되었다. GH 가 없는 환자들은 어느 누구도 자간전증으로 진단되지 아니하였다. 4 명의 여성은 자간전증의 가장 심각한 증세인 HELLP 증후군 [Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelets] 을 앓고 있는 것으로 진단되었다. 이들 여성 4 명 모두는 혈청 M-CSF 농도가 500 단위/ml 이하였다.

도면의 간단한 설명

<59> 도 1 은 임신 16 주째 측정된 혈청 M-CSF 농도들과 최종 임신 결과 간의 관계의 도표이다 (△ = GH 의 환자 ("PIH"); ○ = 정상 임신의 환자).

(57) 청구의 범위

청구항 1

M-CSF 를 투여하는 것을 포함하는, 임신성 고혈압 또는 자간전증의 예방 또는 치료를 위한 약제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, M-CSF 를 임신의 첫 3 개월의 말기에 투여 개시하거나 또는 둘째 3 개월의 기간 중에 투여하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 3

제 2 항에 있어서, M-CSF 를 임신의 대략 제 14 주 내지 제 16 주에서 임신의 대략 제 30 주까지의 기간 중에 투여하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 4

제 1 항에 있어서, M-CSF 를 임신의 대략 제 14 주 내지 제 16 주부터 투여개시하고, 측정되는 혈청 M-CSF 농도가 정상 농도의 범위내에 있을 때까지 상기 투여를 계속하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 5

제 1 항에 있어서, IL-11 을 투여하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 6

제 5 항에 있어서, M-CSF 를 IL-11 의 투여 이전에 투여 개시하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 7

제 6 항에 있어서, M-CSF 를 임신의 첫 3 개월의 기간 중에 투여 개시하여 측정되는 혈청 M-CSF 농도가 정상 농도의 범위내에 있을 때까지 투여하고, IL-11 은 임신의 둘째 3 개월의 기간 중에 투여 개시하는 것을 특징으로 하는 약제.

요약

본 발명은 임신성 고혈압이나 자간전증의 위험도가 증가된 환자의 진단 및 치료를 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 혈청 M-CSF 농도의 측정, 그리고 M-CSF 의 투여를 필요로 한다.

대표도

도1

도면

도면1

