



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월12일
(11) 등록번호 10-1454013
(24) 등록일자 2014년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2006.01) G01N 33/72 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7019056
(22) 출원일자(국제) 2008년02월12일
심사청구일자 2013년01월28일
(85) 번역문제출일자 2009년09월11일
(65) 공개번호 10-2010-0015315
(43) 공개일자 2010년02월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/001051
(87) 국제공개번호 WO 2008/098734
국제공개일자 2008년08월21일
(30) 우선권주장
0700339-5 2007년02월12일 스웨덴(SE)
(56) 선행기술조사문헌
“Evaluation of a Capillary Electrophoresis
Method for Routine Determination of
Hemoglobins A2 and F”, Frederic Cotton et
al, Clinical Chemistry 45:2, 237-243 (1999)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에이원엠 파마 에이비
스웨덴 223 81 룬드 메디콘 빌리지
(72) 발명자
한슨, 스테판
스웨덴 에스-234 롬마 42 카르스토프스배겐 46
아케어스트림, 보
스웨덴 에스-227 룬드 38 스코어테배겐 3
(74) 대리인
특허법인아주양현

전체 청구항 수 : 총 27 항

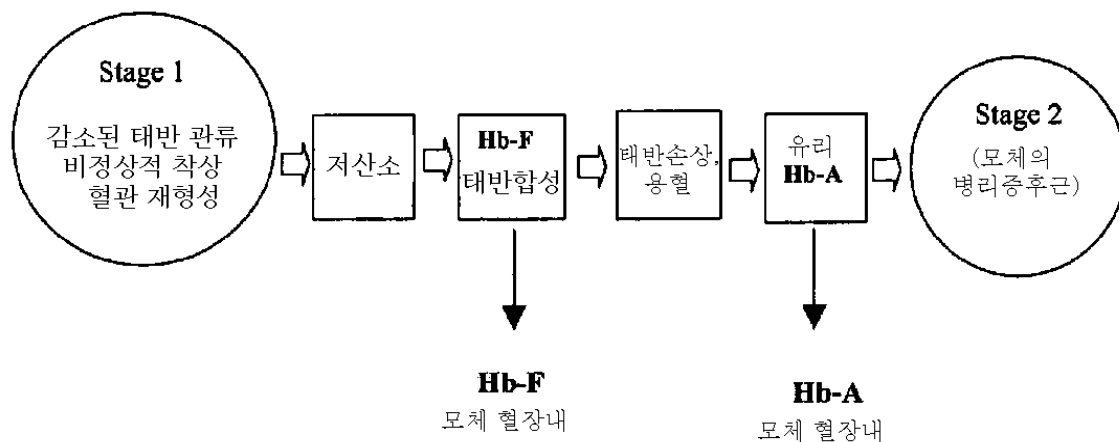
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 자간전증의 진단 및 치료

(57) 요약

본 발명은 자간전증에 대한 바이오마커 및 상기 질병의 치료에 관련된 것이다. 구체적으로, 본 발명은 증가된 수준의 유리 헤모글로빈, 특히 유리 태아 헤모글로빈을 검출하여, 임신한 암컷 포유류의 자간전증을 진단하는 방법 또는 진단을 돕는 방법에 관한 것이다. 이는 자간전증 상태가 발견될 때 조기진단 및 임상적 개입을 용이하게 한다. 또한, 본 발명은 자간전증과 연관된 병리학적 상태를 회복시키기 위해 자간전증을 갖는 암컷 포유류를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

이하의 단계들을 포함하는 자간전증의 진행 또는 퇴행을 모니터링하는데 사용되는 데이터를 얻는 방법:

- i) 임신한 암컷 포유류로부터 분리된 첫번째 생물학적 샘플에서 유리 태아 헤모글로빈의 수준을 측정하거나 또는 유리 태아 헤모글로빈의 수준 및 전체 유리 헤모글로빈의 수준을 측정하는 단계,
- ii) 이후에 상기 임신한 암컷 포유류로부터 분리된 두번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈의 수준을 측정하거나 또는 유리 태아 헤모글로빈의 수준 및 전체 유리 헤모글로빈의 수준을 측정하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 하기의 단계를 더 포함하는 것인, 방법:

- iii) 단계 i) 및 단계 ii)에서 측정된 값을 비교하는 단계.

청구항 9

이하의 단계들을 포함하는 자간전증 치료법의 유효성을 평가하는데 사용되는 데이터를 얻는 방법:

- i) 치료 전에 또는 t1일 때, 임신한 암컷 포유류로부터 얻은 첫번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈의 수준을 측정하거나 또는 유리 태아 헤모글로빈의 수준 및 전체 유리 헤모글로빈의 수준을 측정하는 단계,
- ii) 이후 t2일 때, 동일한 임신한 암컷 포유류로부터 얻은 두번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈의 수준을 측정하거나 또는 유리 태아 헤모글로빈의 수준 및 전체 유리 헤모글로빈의 수준을 측정하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 하기의 단계를 더 포함하는 것인, 방법:

- iii) 단계 i) 및 단계 ii)에서 측정된 값을 비교하는 단계.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액 샘플, 혈장 샘플, 뇨 샘플, 또는 태반 조직 샘플인 것인, 방법.

청구항 12

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈의 수준은 상기 샘플 내의 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ)의 수준을 측정함으로써 측정되는 것인, 방법.

청구항 13

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류는 인간인 것인, 방법.

청구항 14

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하기의 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법:

i) 상기 생물학적 샘플 내의 인간 백혈구 항원 DPA1(human leukocyte antigen DPA1, HLA-DPA1)의 수준을 측정하는 단계.

청구항 15

제14항에 있어서, 하기의 단계를 더 포함하는 것인, 방법:

ii) 상기 샘플 내의 HLA-DPA1 수준과 참고값을 비교하는 단계.

청구항 16

자간전증을 진단하거나 또는 자간전증의 진단을 돕는데 사용되는 평가 키트(assay kit)로서,

상기 키트는 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 비-세포성 태아 헤모글로빈인 유리 태아 헤모글로빈을 검출하기 위한 수단 또는 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 태아 Hb mRNA를 검출하기 위한 수단을 포함하고,

상기 키트는

- i) 태아 헤모글로빈으로 미리 코팅된 고체 표면;
- ii) 임신한 암컷 포유류 유래의 분리된 유리 태아 헤모글로빈 또는 면역학적 펩티드, 이들의 단편 또는 에피토프와 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 면역 반응성 단편;
- iii) 항원-항체 복합체 형성을 검출하는 수단을 포함하는 것인, 키트.

청구항 17

제16항에 있어서, 샘플 내의 전체 헤모글로빈 농도를 측정하기 위한 구성 성분을 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 샘플 내의 전체 헤모글로빈 농도를 측정하는데 필요한 구성 성분은

- i) 헤모글로빈으로 미리 코팅된 고체 표면;
- ii) 임신한 암컷 포유류 유래의 분리된 유리 헤모글로빈 또는 면역학적 펩티드, 이들의 단편 또는 에피토프와 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 면역 반응성 단편;
- iii) 항원-항체 복합체 형성을 검출하는 수단을 포함하는 것인, 키트.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체 표면 i)은 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 내의 하나 이상의 웰(들)인 것인 키트.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편 ii)는 헤모글로빈 알파 사슬, 헤모글로빈 베타 사슬, 헤모글로빈 델타 사슬, 헤모글로빈 감마 사슬 또는 면역학적 펩티드, 이들의 단편 또는 에피토프

에 특이적인 것인, 키트.

청구항 21

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 ii)는 단일클론성 또는 다클론성 항체인 것인, 키트.

청구항 22

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체의 검출 수단은 표지된 단일- 또는 다클론성 항체인 것인, 키트.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 표지된 항체는 ii)의 항체 또는 면역학적 펩티드, 이들의 단편 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인, 키트.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 표지된 항체는 효소-표지된 항체인 것인, 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 표지된 항체는 알칼라인 포스파타제 표지된 항체(alkaline phosphatase labeled antibody)인 것인, 키트.

청구항 26

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 형성의 검출 수단은 돼지-항-래빗 IgG-알칼라인 포스파타제 항체를 포함하는 것인, 키트.

청구항 27

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서, HLA-DPA1의 수준을 검출하기 위한 수단 및 상기 검출 수단의 사용설명서를 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 28

제16항에 있어서, 전체 Hb vs 태아 Hb의 비율 및/또는 vs 태아 Hb mRNA의 비율을 결정함으로써 전체 유리 헤모글로빈의 수준을 검출하기 위한 수단을 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 29

자간전증을 진단하거나 또는 자간전증의 진단을 돕는데 사용되는 평가 키트(assay kit)로서,

상기 키트는 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 비-세포성 태아 헤모글로빈인 유리 태아 헤모글로빈을 검출하기 위한 수단 또는 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 태아 Hb mRNA를 검출하기 위한 수단을 포함하고,

상기 키트는 샌드위치-타입 ELISA를 위한 수단을 포함하고, 상기 키트는 Hb- γ 에 특이적인 단일클론성 또는 다클론성 항체로 코팅된 고체 표면을 포함하는 것인, 키트.

청구항 30

제29항에 있어서, 래빗 항-헤모글로빈-ALP를 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 31

헤모글로빈 결합제, 헴-결합제(heme-binding agent), 헴-분리제 및/또는 철-결합제로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 자간전증의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 물질은

- i) 헤모글로빈의 항체 또는 이들의 단편;
- ii) 합토글로불린;
- iii) CD163;
- iv) 알파 1-마이크로글로불린;
- v) 헤모팩신;
- vi) 헴-옥시게나제;
- vii) 알부민;
- viii) 트랜스페린,
- ix) 페리틴으로부터 선택된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 비경구용 또는 경구용인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 자간전증에 대한 바이오마커 및 상기 질병의 치료와 관련된 것이다. 구체적으로, 본 발명은 특정 물질의 증가된 수준을 검출하여 임신한 암컷 포유류의 자간전증을 진단하는 방법 또는 진단을 돕는 방법에 관한 것이다. 이는 자간전증 상태가 발견될 때 조기진단 및 임상적 개입을 용이하게 한다. 또한, 본 발명은 자간전증과 연관된 병리학적 상태를 회복시키기 위해 이러한 질병을 갖는 암컷 포유류를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 임신성 당뇨병 고혈압인 자간전증(Preeclampsia, PE)은 전체 임신의 3~7%에서 일어나는 합병증으로 다발전신성 모체 질환이다. 전 세계적으로 연 8,500,000 케이스가 보고되고 있으며, 이중 5000 건이 스웨덴에서 보고되었다. 오늘날 임신기간 동안 태아 및 산모의 가장 통상적인 사망 원인이다.
- [0003] 자간전증은 이론상의 질병으로 명명되어 왔으며[Roberts, 2001], 3000년 전 고대 이집트인에 의해 기술되었다[Stevens, 1975]. 자간전증은 여전히, 주산기 모체(perinatal and maternal)의 이환 및 사망을 일으키는 우세한 산과적 합병증의 하나이다. 임상적 징후, 즉, 고혈압 및 단백질뇨는 회태 이후 20주부터 나타나지만, 근원적 메커니즘은 착상 초기에 시작될 수 있다. 질병의 진행시, 뇌 내부의 혈관연축(angiospasmus) 및 뇌 부종은 심각한 간질성 경련-자간증을 일으킬 수 있다[Lipstein et al., 2003].
- [0004] 자간전증의 병인학은 아직 알려지지 않았지만, 최근 데이터는 상기 질병이 이하의 두 단계로 진화했음을 제안하고 있다:
- [0005] 단계 1: 태반형성 과정에서, 태반세포 및 영양모세포의 나선 동맥 근육층으로의 결합적 침투가 나타난다[Brosens et al., 2002; Page, 1939]. 점점 더 많은 증거들이 산화적 스트레스가 태반의 혈관 기능을 더욱 악화시켜 혈액 관류를 손상시킨다는 것을 시사하고 있다. 예후로서 혈관수축 및 혈류에 대한 증가된 저항이 뒤따른다. 본 어레이 결과는 레독스(redox) 조절 및 염증 모두에 관여하는 유전자가 포함된다는 것을 보여준다[Hansson et al., 2005].
- [0006] 단계 2: 산화적 스트레스를 동반하는, 감소된 태반성 관류는 태반 내부에서 일반적인 내피세포 손상을 일으킨다. 단계 2의 후반부에서, 상기 내피세포 염증은 또한 모체 혈관계, 특히 자간전증에서 전형적인 조직학적 소견인, 신장을 손상시킨다[Roberts et al., 1989; de Groot 및 Taylor, 1993; Granger et al., 2001; Strevens et al, 2003]. 단계 1 및 2 사이의 연결은 아직까지 알려지지 않았다.
- [0007] 일반적으로, 자간전증은 여성에서 첫 임신기간에 발병하며, 일반적으로 10대 및 35세 이상의 여성에게 더욱 영향을 끼친다. 고혈압에 쉽게 걸리도록 하는 질병을 원래 갖고 있던 여성은 또한 그 중에서도 이러한 병태의 발병에 대해서 더 높은 위험성이 있다. 자간전증은 모체의 이환율 및 사망률을 증가시킨다. 전체 임신-관련 모체 사망의 12~18%를 차지한다(미국에서 매년 약 70건의 모체 사망 및 전 세계적으로 매년 50,000건으로 추정). 이는 또한 일차적으로 의인성 조산에 기인하는 높은 주산기 이환율 및 사망률과 관련된다. 자간전증에서 신경학적 징후가 일반적인데, 두통과, 발작(seizures), 뇌졸중(stroke) 및 피질성 맹증 같은 더욱 심각한 징후와 관련된 가시적 이상을 포함한다. 태아의 분만 및 태반의 제거가 자간전증의 유일한 치료법이다 - 태반 병리학이 자간전증의 발병에 중요하다고 하는 일반적으로 허용되는 이론을 정립했다는 사실. 심도있는 연구 노력에도 불구하고, 자간전증의 병인은 상당부분 알려지지 않은 상태로 남아있다.

- [0008] 상술한 바와 같이, 감소된 태반 관류를 야기하는 부적절한 태반형성은 자간전증 발병의 초기단계라고 여겨진다. 증가된 혈관 저항과 관련된 감소된 관류는 도플러 초음파로 검출될 수 있고, 임신 초기에 자궁 동맥 내에 증가된 저항의 증거("함요(notching)")를 갖는 여성은 이러한 소견을 보이지 않는 여성보다 자간전증의 발병 위험이 더 높다. 자간전증 진행시, 모체의 혈관상이 영향을 받으며, 일반적인 내피 염증이 나타난다. 잘못된 태반 관류는 병리학적 변형의 연쇄반응: 감소된 산소 운반, 산화적 스트레스, 활성산소종(reactive oxygen species)의 형성, 내피 손상, 증가된 혈관 투과성 및 염증을 야기하는 것으로 보여진다(도 1 참고).
- [0009] 자간전증의 증상은 전형적으로 임신의 3분기에서 나타나며, 통상적으로 여성의 혈압 및 뇨의 일반적인 모니터링에 의해 검출된다. 그러나, 이러한 모니터링 방법은 초기 단계에서의 증후군 진단에 효과가 없다. 초기 진단은 환자, 발병 중인 태아에 대한 위험을 감소시킬 수 있고, 고위험 환자는 좀더 구체적으로 모니터링될 수 있다. 또한, 오늘날까지 아직 없는 효과적인 치료법은 초기 검출과 연관되는 것이 이상적이다.
- [0010] 몇몇 진단방법이 당업계에 기술되어 왔지만, 이들 중 어떤 것도 대규모로 임상에서 성공적으로 사용된 적은 없었다. 예를 들어, 참고 문헌으로 미국 특허 제5,079,171호 공보 및 미국 특허 제5,108,898호 공보를 들 수 있고, 이들 문헌은 임신 여성의 혈액, 혈장 또는 혈청 샘플 내의 내피 세포 마커, 세포성 파이프록토텐의 존재를 동정함으로써, 예를 들면, 샌드위치 또는 경쟁적 면역분석법을 사용함으로써, 자간전증, 임신-유도성 고혈압, 및 자간전증을 진단할 수 있음을 개시하고 있다. 상기 내피 세포로부터 유래된 세포성 파이프록토텐은 질병의 진행 동안 과열되거나 교란된다. 미국 특허 제5,238,819호 공보는 혈액 내의 분열촉진 인자를 측정하는 평가법(assay)을 사용하는 자간전증 진단법을 개시한다. 상기 분열촉진 인자는 160 kDa 크기의 단백질성 화합물이며, 섬유아세포의 유사분열을 자극할 수 있다. 이들의 존재는 자간전증 환자의 혈청 또는 혈장에 의해 활성화되는 세포에 의해 섭취되는 방사성 표지된 티민을 탐지함으로써 검출할 수 있다. 이러한 마커는 손상 이후 이미 발생된 모체의 혈관상에 나타나며, 따라서 질병의 진행에서 늦게 나타난다.
- [0011] W005/093413(Yale University, Brigham 및 Women's Hospital)은 뇌척수액 샘플에서 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 것을 포함하는, 임신 여성에서 중증의 자간전증을 진단하는 방법을 개시하고 있다.
- [0012] 현재, 자간전증에 대한 치료법은 알려진 것이 없다. 자간전증은 약한 것부터 생명을 위협할 정도까지 그 중증도가 다양할 수 있다. 경증 형태의 자간전증은 침상에서 휴식을 취하고 자주 모니터링하는 것으로 약하게 유지할 수 있다. 중등증 정도의 경우에는, 입원이 필요하고, 발작을 방지하기 위한 혈압 제제 및 경련억제제가 처방된다. 증상이 모체 및 아기의 생명을 위협할 정도로 악화된다면, 임신을 종결시키는 것이 유일한 치료법이며, 이때 종종 미숙아를 분만하게 된다.
- [0013] 명백하게도, 자간전증의 치료법 결여는 상기 질병이 더욱 심각한 형태로 진행할 때까지 진단 능력의 장기간 부재 및 자간전증의 진단 및 치료를 위한 새로운 접근에 대한 필요성의 출현과 결부되며, 이는 심각한 공중보건의 문제이다.
- 발명의 상세한 설명**
- [0014] 따라서, i) 자간전증이 발병할 위험이 있는 임신 대상자, ii) 자간전증의 초기 단계인 임신 대상자, 및/또는 iii) 자간전증이 있는 임신 대상자를 신뢰성 있게 구별할 수 있는 바이오마커를 동정할 필요가 있다. 더욱이, 상기 그룹 i)~iii) 중의 임신 여성을 위한 치료 요법을 개발할 필요가 있다.
- [0015] 본 발명은 바이오마커, 즉, 자간전증이 있는 임신 여성에서 모체의 순환계로 들어가는 것으로 보여지는 태아 헤모글로빈을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 발명자의 지식, 및 임신 여성에서 유리 태아 헤모글로빈의 증가된 수준과 자간전증 발병의 위험성 증가와의 연관성 구현에 기초한다. 그러므로, 유리 태아 헤모글로빈은 자간전증의 진단을 위한 바이오마커로 사용될 수 있으며, 자간전증 치료를 위한 후보 표적이다.
- [0017] 상기 바이오마커는 자간전증 발병에 대한 증가된 위험성을 초기 단계에서 검출을 가능하게 하므로, 더욱 희망적으로 의미있는 치료법을 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 자간전증 진단방법은 위험군에 속하지 않는 임신여성의 불필요한 입원을 피할 수 있게 해준다. 또한, 자간전증의 진행이나 퇴행을 모니터링하는 방법은 태아의 분만을 계획하고 조산의 위험성을 감소시킬 수 있도록 도움을 줄 수 있다.
- [0018] 자간전증은 본원에서 간략하게 전술하였다. 여성에서, 임신 12주 이후에 이미 자궁-태반성 혈류가 발생된다. 상기 태반 장벽은 태아의 혈액 순환이 모체로부터 잘 분리되도록 유지시킨다(도 2 참조). 태반의 가장 작은 기능단위인, 용모는 영양분 및 산소를 장벽을 통해 운반시켜 태아에게 공급한다. 자간전증에서, 감소된 태반 관류는

산소포화도가 높은 혈액의 태반 공급을 낮춘다. 산소 결핍과 불안정한 혈액 관류는 태반 내에 산화적 스트레스를 야기한다. 산화적 스트레스는 태반 세포의 아포토시스를 유도하여 태반 내에서 염증 및 전반적인 내피세포 손상을 일으킨다(도 3 참조). 태반 장벽이 손상될 때, 태아세포가 모체 순환계 내부로 이동할 수 있다. 태아 세포가 모체의 순환계로 이동한다는 식견은 대략 10년간 효력이 있었지만, 지금까지는 아무도 유리 헤모글로빈을 주시하지 않았다(즉, 헤모글로빈은 세포 외부(예를 들면, 혈장 내에서)에서 발견되었고, 따라서, 세포 내에 결합되지 않았다). 대부분의 분석은 유리 태아 DNA의 대부분의 분석은 검토되어 있었다.

[0019] 본 발명은 자간전증 환자에서 유리 태아 헤모글로빈(또는 이의 단위체, 알파 및/또는 감마 사슬)수준이 증가된다는 것을 발견하였으며, 이는 본원 실시예에서 보고된 결과에 의해 뒷받침된다. 자간전증 환자가 아닌 여성에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준은 약 $0.038 \mu\text{g/ml}$ 가 되어야 하지만, 본 발명의 결과는 약 $1\mu\text{g/ml}$ 수준까지 20배 증가되거나, 질병의 중증도에 따라 의존한다는 것을 보여준다.

[0020] 자간전증 환자 여성이 전체 헤모글로빈 수준이 높아진다는 증상이 있었다 하더라도, 유리 태아 헤모글로빈이 안정적인 지시자(indicator)라는 것을 보여준 보고는 지금까지 없었다. 더욱이, 전체 헤모글로빈의 증분 증가보다는 오히려 유리 태아 헤모글로빈 수준의 증분 증가의 측정이 훨씬 안전하고 신뢰할만한 결과를 제공한다. 그 이유는 전체 헤모글로빈의 정상 수준이 태아 헤모글로빈보다 훨씬 높기 때문이다. 정상적인 임신 여성의 혈장 내 태아 헤모글로빈 수준은 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 인데 자간전증 환자에서는 $1 \mu\text{g/ml}$ 이다. 이때 증가 정도는 $(1-0.05)/0.05 \times 100=2000\%$ 이다. 이에 비해, 정상인 및 자간전증 환자의 전체 헤모글로빈 수준은 각각 $3 \mu\text{g/ml}$ 및 $4.5 \mu\text{g/ml}$ 인데, 이는 $(4.5-3)/3 \times 100=50\%$ (또는 1.5배)에 상응하는 값이다.

[0021] 도 1에 도시되어 있는 같이, 본원 실시예에 기재된 결과는 태아 헤모글로빈이 단계 1 및 단계 2의 연결자임을 말해준다. 수년 동안 자간전증의 지시자가 태반 독성제라는 가설이 있어왔다. 단계 1은 변형된 관류에 기인하는 저산소증의 결과로 태반에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 상기 태반 반응은 이때 모체 전신에 영향을 끼치지만 특이적 요소가 규명되지는 않았다. 실시예 부분에서 제시된 결과에 기초하면, 본 발명자는 이러한 요소가 상기 메커니즘에 따른 태아 Hb임을 제안한다. 초기 진단은 자간전증-"조기진단 및 치료"(early health) 발병 위험이 있는 여성에게 도움을 준다. 자간전증의 임상적 징후가 있는 여성은, 경과를 구체적으로 모니터링하고, 따라서, 그 후 태아 Hb 수준 및/또는 태아 Hb/전체 Hb 비를 모니터링할 수 있다고 하는 가정 하에 외래환자로서 모니터링될 수 있다. 상기 새로운 치료법의 필요성은 명백하며, 이의 유용성은 엄청날 것이다.

[0022] 태아 헤모글로빈 수준은 환자가 위험에 빠졌는지 아니면 이미 자간전증이 발병되었는지를 평가하기 위해 단독으로 이용될 수 있으나, 이는 또한 헤모글로빈 총 수준 또는 특정 신체 샘플 내에 존재하는 성인 헤모글로빈 수준을 병용하여 질병 진행의 지시자로서 이용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따르면, 임신 여성에서 유리 헤모글로빈, 특히 태아 헤모글로빈의 증가된 수준은 자간전증 발병에 대한 위험성 증가와 연관된다는 놀라운 사실이 발견되었다. 따라서, 태아 헤모글로빈은 자간전증 진단을 위한 바이오마커로 이용될 수 있으며, 이는 자간전증 치료를 위한 후보 표적이다.

[0024] 이러한 관점에 기초하여, 본 발명은 이하의 것들에 관한 것이다:

[0025] i) 자간전증 진단 방법;

[0026] ii) 자간전증 진행 또는 퇴행 평가를 위한 방법;

[0027] iii) 자간전증 치료의 효용성 평가 방법;

[0028] iv) 상기-언급된 방법 중 하나에서 사용하기 위한 키트;

[0029] v) 자간전증 치료에 사용하기 위한 물질 및 조성물; 및

[0030] vi) 바이오마커로서 인간 백혈구 항원 DPA1(HLA-DPA1).

[0031] 정의

[0032] 본원에서, 특별히 명시하지 않는다면, "하나"는 "하나 이상"을 의미한다.

[0033] 본원에서 "자간전증"이란 용어는 Terminology of the American College of Obstetrics and Gynecology 위원회에 의해 수립된 기준에 따라 정의되며, 이는 고혈압 플러스 단백뇨, 현성 부종, 또는 둘다이다. 예를 들어 자간전증은 $140/90 \text{ mmHg}$ 이상의 혈압 및 0.3 g/l 이상의 단백뇨로 정의될 수 있다.

[0034] 헤모글로빈의 다른 형태가 존재한다. 성인 헤모글로빈(헤모글로빈 A)은 두 개의 알파 폴리펩티드 사슬 및 두 개

의 베타 폴리펩티드 사슬(Hb α, Hb β)로 구성되며, 이들 각각은 단일 산소 분자와 가역적으로 결합하는 비-헴(비-헴(heme)기)을 포함하고 있다. 또 다른 성인 헤모글로빈 구성요소인 헤모글로빈 A2는 두개의 알파 사슬 및 두 개의 델타 사슬(Hb α, Hb δ)로 구성된다. 한편, 태아 헤모글로빈(헤모글로빈 F)은 태아에서 주요한 헤모글로빈의 구성요소이다. 이 헤모글로빈은 두개의 알파 폴리펩티드 및 두 개의 감마 폴리펩티드 사슬(Hb α, Hb γ)을 가진다.

[0035] 본원에서 "유리 헤모글로빈"이란 용어는 일반적으로 유리된 헤모글로빈을 의미하며, 전체 유리 헤모글로빈, 유리 헤모글로빈 A, 유리 헤모글로빈 A2, 유리 헤모글로빈 F, 유리 헤모글로빈 서브유닛(예를 들어, Hb α, Hb β, Hb δ 또는 Hb γ 사슬) 일부, 또는 이들의 조합을 포함한다. 이는 또한 치료 표적으로서 적용될 때를 제외하고, 폴리펩티드(단백질) 또는 뉴클레오티드(RNA) 중 하나의 형태로 이들 헤모글로빈 단위를 포함한다. "유리 태아 헤모글로빈"이란 용어는 유리 헤모글로빈 F, 또는 헤모글로빈 F의 임의의 서브유닛을 의미하며, 치료 표적으로서 적용될 때를 제외하고, 폴리펩티드(단백질) 또는 뉴클레오티드(RNA) 형태로 상기 헤모글로빈 F 단위를 포함한다.

[0036] 본원에서 "유리"란 용어는 "유리 헤모글로빈", "유리 태아 헤모글로빈" 또는 "유리 헤모글로빈 서브유닛(예를 들어, 예를 들어, Hb α, Hb β, Hb δ 또는 Hb γ 사슬)" 표현 중에서도, 세포 내부에 존재하는 분자를 의미하는 세포성 헤모글로빈과 대비하여, 생물학적 체액 내에서 자유롭게 순환하는 헤모글로빈, 태아 헤모글로빈 또는 헤모글로빈 서브유닛을 의미한다. 이러한 의미에서 상기 "유리"란 용어는 주로 유리 헤모글로빈을 완전한 적혈구 내에 존재하는 유리 헤모글로빈과 구별하기 위해 사용된다.

[0037] 본원에서 "마커" 또는 "바이오마커"란 용어는 생체분자, 바람직하게는, 폴리펩티드 또는 단백질을 의미하며, 이는 "정상"여성/자간전증이 없거나 자간전증 발병 위험이 있는 대상자와 관련된 여성에서 채취한 샘플과 비교하여, 자간전증이 있거나 자간전증 발병 위험이 높은 여성에서 채취한 샘플에서 다르게 존재한다.

[0038] "임신한 암컷 포유류로부터 얻은 생물학적 샘플"이란 용어 또는 이들의 동의어는 포유류 자체에서 얻은 샘플을 의미한다; 따라서, 상기 샘플은 예를 들어, 태아 또는 양수로부터 얻은 것이 아니다.

[0039] 본 명세서 전체적으로, 일부 및 모든 참고문헌은 참고로 본 특허 출원에 구체적으로 인용된다.

[0040] i) 자간전증 진단 방법에 관하여:

[0041] 첫 번째 양태로서 본 발명은 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 진단 방법 또는 진단을 돕는 방법을 제공한다: (a) 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계; (b) 상기 생물학적 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 참고값을 비교하거나, 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준 사이의 비율을 참고값과 비교하여 상기 임신한 암컷이 자간전증인지 아닌지, 또는 자간전증 발병 위험이 증가되었는지를 결정하는 단계.

[0042] 상기 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계는 당업계에 잘 알려진 표준방법으로 얻어진 생물학적 샘플을 제공하는 과정을 포함한다.

[0043] 상기 생물학적 샘플은 예를 들면, 혈액, 혈액 혈청, 혈장, 뇨, 질 분비액, 눈물, 조직, 혈청, 대변, 가래, 양수 및 뇌척수액이 될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 뇨, 양수 또는 태반 조직이다.

[0044] 몇몇 실시형태에서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 뇨 또는 태반 조직이다.

[0045] 상기 수집되는 생물학적 샘플의 크기는 개개의 요구 및 감수성에 따라 다양하다. 상기 수집된 양은 사용되는 검사의 종류, 수집 부위 및 모체 또는 태아에 해로운 영향을 줄 가능성에 따라 다양할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 혈액 샘플 크기는 약 5 내지 약 75 ml, 바람직하게는 약 20 내지 약 40 ml 정도이다.

[0046] 본 발명의 방법은 "태반"동물, 즉, 태반을 통해 태내의 태아를 기르는 동물에게 적용될 수 있다. 이러한 동물은 인간, 다른 영장류, 또는 포유류의 먹이 동물을 포함한다. 진단을 위한 바람직한 동물은 인간 또는 상업적으로 이용가능한 동물 또는 가축이다.

[0047] 바람직한 실시형태에서, 상기 포유류는 인간이다.

[0048] 몇몇 실시형태에서, 샘플은 임신 여성에서 수집된다. 상기 임신 여성은 개인력 또는 가족력에 기초하여 자간전증에 대해 높은 위험성을 가지는 것으로 결정된 개인일 수 있다. 그 중에서도 특히, 환자는 자간전증이 있는 것으로 판명된 임신 여성, 및 그들이 받는 치료요법이나 치료의 유용성을 결정하는데 사용되는 검사를 받는 여성

을 포함한다. 또한, 대부분의 일반 검사를 받은 건강한 임신 여성을 포함할 수 있다.

- [0049] 바람직하게는, 상기 샘플은 유리 태아 헤모글로빈의 검출가능성을 향상시키도록 준비될 수 있다. 통상적으로, 샘플 준비는 샘플을 분류하고 유리 헤모글로빈을 함유하는 것으로 결정된 분획을 수집하는 것을 포함한다. 전-분류 방법은 예를 들면, 원심분리, RNA/DNA 추출, 크기배제 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 겔 전기영동 및 액체 크로마토그래피를 포함한다.
- [0050] 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계는 예를 들면, 면역적 평가법(예를 들어, ELISA, 또는 SPRIA 같은 다른 고상-기반 면역분석법, 또는 IMRAMP라 불리는 증폭된(amplified) ELISA)), 단백질칩 평가법, 정량적 실시간 PCR 증폭(quantitative real-time PCR amplification), SELDI(surface-enhanced laser desorption/ionization), 고성능 액체 크로마토그래피, 질량 분석법, 제자리 부합법(in situ hybridization), 면역조직화학법, 화학발광, 비탁법(nephelometry)/터보메트리(turbometry), 측방 유동(lateral flow) 또는 순수 또는 편광 형광 또는 전기영동에 의해 수행될 수 있다. 그러나, 이러한 목록상의 기술은 완전하지 않다는 것과 유리 태아 헤모글로빈 수준 측정을 위해 본 발명에서 사용될 수 있는 적절한 방법에 불과하다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0051] 본 발명의 방법으로 검출 및/또는 측정되는 물질은 전체 헤모글로빈, 헤모글로빈 A, 헤모글로빈 A2, 헤모글로빈 F, 헤모글로빈 사슬(예를 들어, Hb α , Hb β , Hb δ 및 Hb γ) 일부, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 방법으로 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ)이 검출 및/또는 측정된다. 명백하게도, 헤모글로빈 F 및 그의 서브 유닛은, 그 지견이 유리 태아 헤모글로빈의 증가된 수준 및 자간전증의 발병에 대한 이들의 영향에 기초하므로 가장 중요하다. 본원에 개시된 바와 같이, 상기 감마 사슬은 태아 헤모글로빈의 지시자이며, 반면에 예를 들어 베타 및 델타 사슬은 성인 헤모글로빈의 지시자이다. 당업자라면 본원 설명에 기초하여 헤모글로빈 사슬이 측정될 수 있음을 알 수 있을 것이다.
- [0052] 본 발명에 따른 면역학적 평가법(면역분석법, immunoassay)은 유리 헤모글로빈 수준 측정에 이용될 수 있다. 면역분석법은 항원(예를 들어, 헤모글로빈)에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 평가법이다. 상기 면역분석법은 특정 항체의 특이적 결합 성질을 사용하여 항원을 분리, 표적화 및/또는 정량하는 것이 특징이다. 따라서, 고안된 면역분석법 조건 하에서, 상기 특이적인 항체는 배경보다 적어도 두 배 이상으로 특정 단백질과 결합하며, 샘플 내에 존재하는 다른 단백질과 상당한 양으로 실질적으로 결합하지 않는다. 상기 정제된 마커 또는 그들의 핵산 서열, 마커(예를 들어, 헤모글로빈)에 특이적으로 결합하는 항체의 이용은 당업계의 적절한 방법을 사용하여 준비될 수 있다[예를 들어, Coligan, 1991 참조].
- [0053] 첫 번째 양태의 몇몇 실시형태에서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 유리 태아 헤모글로빈 RNA 측정을 통해 결정된다. 구체적으로, 유리 태아 헤모글로빈 RNA는 실시간(real-time) PCR을 사용하여 측정된다. 전체 헤모글로빈 수준이 또한 결정되는 장소의 경우에, 이러한 수준은 또한 헤모글로빈 알파-사슬 RNA를 측정함으로써, 예를 들어, 실시간 PCR을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0054] 일반적으로 대상자로부터 얻은 샘플은 상기 마커와 특이적으로 결합하는 항체와 접촉될 수 있다. 선택적으로, 상기 항체는 샘플과 접촉하기 전에 세척 및 복합체의 순차적 분리가 용이하도록 고체 지지체에 고정될 수 있다. 고체 지지체의 예로는 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate), 스틱, 비드 또는 마이크로비드 형태의 유리 또는 플라스틱을 포함한다.
- [0055] 상기 샘플을 항체와 함께 배양한 후, 상기 혼합물을 세척하고, 상기 항체-마커 복합체 형성을 검출할 수 있다. 이는 세척된 혼합물을 검출용액과 반응시킴으로써 수행할 수 있다. 이러한 검출 용액은 예를 들어, 검출가능한 표지로 표지화된 2차 항체일 수 있다. 대표적인 검출가능한 표지는 자성 비드, 형광염료, 방사성 표지, 효소(예를 들어, 홀스 래디쉬 퍼옥사이드, 알칼라인 포스파타제 및 ELISA에서 통상적으로 사용되는 다른 것들), 및 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱 비드 등과 같은 비색 표지법을 포함한다.
- [0056] 대안적으로, 상기 샘플 내의 마커는 예를 들어, 2차 표지된 항체를 결합된 마커 특이적 항체를 검출하는데 사용하는 간접적 평가법을 사용하고/사용하거나, 예를 들어, 상기 마커의 특정 에피토프에 결합하는 단일클론 항체를 상기 혼합물과 동시에 반응시키는 경쟁 또는 저해 평가법으로 검출할 수 있다.
- [0057] 항체-마커 복합체의 양 또는 존재를 측정하는 방법은 예를 들어, 형광, 발광, 화학발광, 흡광도, 반사율, 투과도, 굴절률(예를 들어, 표면 플라즈몬 공명, 엘립소메트리, 공명거울법, 그레이팅 커플러 웨이브가이드 방법 또는 간섭법) 또는 방사성의 검출이다. 광학적 방법은 현미경(공초점 및 비공초점 모두), 이미징 방법 및 비이미징 방법을 포함한다. 전기화학적 방법은 전압전류법 및 전류법을 포함한다. 무선주파수법은 다극성 공명 분광법

을 포함한다.

- [0058] 예를 들어, 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 같은 효소 면역분석법(enzyme immunoassay, EIA), RIA 및 SPRIA 같은 방사성 면역분석법; 웨스턴 블롯 평가법; 슬롯 블롯 평가법을 포함하는 유용한 평가법이 당업계에 공지되어 있다.
- [0059] 구체적 실시형태에서, ELISA는 유리 헤모글로빈 수준 특징을 위한 바람직한 방법이다.
- [0060] 본 발명에 다른 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계는 또한, 상기 샘플 내의 헤모글로빈 폴리펩티드를 코딩하는 유리 RNA의 검출 및 측정, 예를 들어, 혈장 내의 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ), 또는 이들의 단편을 코딩하는 RNA 서열 검출을 통해 달성될 수 있다.
- [0061] 구체적 실시형태에 따르면, 유리 헤모글로빈 RNA는 실시간 PCR을 사용하여 정량화된다.
- [0062] 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 참고값을 비교하거나, 상기 샘플 내의 유리 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 사이의 비율을 참고값과 비교하는 단계에서, 본 발명과 관련하여 "참고값"이란 용어는, 실시형태에 따르면, 유리 헤모글로빈, 즉, 단계 (b)에서 측정되는 유리 헤모글로빈의 동일한 종류의 측정 기준값 또는 평균 수준, 또는 대조군 샘플에서 유리 헤모글로빈 서브유닛과 전체 유리 헤모글로빈 수준 사이의 비율을 의미한다. 바람직하게는, 상기 대조군은 자간전증으로 진단되지 않은 임신 암컷 포유류를 포함한다.
- [0063] 대조군을 사용할 때, 상기 유리 태아 헤모글로빈의 참고값의 결정은 당업계에 공지된 표준 분석법을 이용하여 수행된다. 상기 값은 물론, 예를 들어, 사용된 평가법의 종류, 측정된 유리 헤모글로빈의 형태, 생물학적 샘플의 종류, 대상자의 그룹에 의존하여 가변적이다. 예를 들면, 자간전증으로 진단받지 않은 임신 여성 그룹에서 ELISA로 측정된 전체 유리 헤모글로빈의 정상적 평균 혈액 수준은 일반적으로 2.5 내지 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 범위이지만, 물론, 나이, 체중, 조기 임신의 수에 따라 다양할 수 있다.
- [0064] 상기 경우에서 언급된 참고값은 대조군 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준이거나 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이고, 상기 참고값과 비교하여 상기 샘플 내에서의 더 높은 수준의 유리 태아 헤모글로빈 또는 더 높은 값의 비율은 상기 임신 여성이 자간전증을 갖거나 자간전증의 발병 위험이 높은 것을 말한다.
- [0065] 첫 번째 양태의 몇몇 실시형태에서, 상기 참고값은 대조군 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준이거나 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이고, 상기 참고값과 비교하여 상기 샘플 내에서의 더 높은 수준의 유리 태아 헤모글로빈 또는 더 높은 값의 비율은 상기 임신 여성이 자간전증을 갖거나 자간전증의 발병 위험이 높은 것을 말한다. 예비시험 결과-유리 태아 헤모글로빈 측정을 위한 웨스턴 블롯 방법을 사용-는, 약 5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 그 이상의 혈장 수준을 갖는 여성이거나, 1 $\mu\text{g/ml}$ 또는 그 이상의 뇨 수준을 갖는 여성이 자간전증 환자이거나 또는 자간전증을 발병하는 자임을 의미한다. 그러나, 이러한 값들은 더욱 감수성이 높은 방법, 예를 들어, ELISA를 사용할 때 더욱 잘 확인될 것으로 기대된다. 연구에 의하면, 태아 헤모글로빈의 정상 혈장 수준은 약 0.3~76 $\mu\text{g/l}$, 즉, 0.0003~0.076 $\mu\text{g/ml}$ 로, 평균값은 0.038 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 보고되었다(Turpeinen et al, 1992 참조). 따라서, 자간전증이 발병 중인 여성 또는 이미 자간전증 환자인 여성에서 현저한 수준의 태아 헤모글로빈이 나타나는 것이다. 따라서, 정상 수준 보다 5~10배 이상의 태아 헤모글로빈 혈장 수준을 갖는 여성(즉, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 이상)은 자간전증 발병의 위험성이 있는 것으로 예상된다. 그러나, 이러한 값들은 더욱 감수성이 높은 방법, 예를 들어, ELISA를 사용할 때 더욱 잘 확인될 것으로 기대된다. 구체적 실시형태에서, 만약 태아 헤모글로빈 혈장 수준이 약 20배 이상, 약 50배 이상, 약 75배 이상 또는 약 100배 이상이면, 이때 그 여성은 자간전증 발병 위험이 있거나, 단계 1 또는 2의 자간전증 환자로 예상된다. 다른 방법에서 보여지고, 상기 언급된 정상 범위 적용에서 제안했듯이, 만약 여성의 유리 태아 헤모글로빈의 혈장 수준이 약 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 예를 들어, 약 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 1.75 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 2 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 3 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 4 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 약 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상, 또는 약 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상이면, 여성은 자간전증의 위험이 있거나 자간전증 환자이다. 더 낮은 태아 헤모글로빈 수준이 덜 심각하다는 것은 현재 단계에서의 질병을 예상한 것이다. 상기 질병의 진행(또는 퇴행)은 동일한 여성의 태아 헤모글로빈을 자주 측정함으로써 주시될 수 있다.
- [0066] 본원 실시예들의 결과는 상기 연구를 뒷받침한다. 예를 들면, 웨스턴 블롯을 사용할 때 그룹 II(즉, 이미 자간전증 환자인 그룹)의 약 20%가 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 혈장 수준을 가졌다. 뇨 수준과 관련하여, 자간전증 환자 여성의 약 20%가 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 태아 헤모글로빈 뇨 수준을 가졌다(실시예 5.2 참조). 따라서, 뇨 수준과 관련하여, 상기 수준이 혈장 수준보다 약간 낮으면, 결국, 상기에서 언급된 모든 혈장 수준이 적용되는 것처럼 보이지만,

상기 더 낮은 수준은 뇨에서 약 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 등으로 감소되었다.

[0067] 여성이 자간전증의 위험성이 있거나 이미 자간전증의 징후를 갖는지를 판단하기 위해, 정확한 혈장 또는 뇨의 태아 헤모글로빈 수준을 관찰하는 것 외의 다른 방법은 혈장 또는 뇨 수준(또는, 사실상 다른 적절한 체액 내의 수준)을 결정할 때 수행되는 검사에 대한 표준 편차를 관찰하는 것이다. 본원에서 상대적 파라미터는 정상 수준(예를 들어, 혈장 또는 뇨 등에서)으로부터 5배 이상의 표준편차, 예를 들어, 10배 이상의 표준편차, 25배 이상의 표준편차, 50배 이상의 표준편차, 또는 100배 이상의 표준편차의 증가인 것으로 상정된다.

[0068] 유리 태아 Hb(Hb F)와 유리 전체 Hb(전체 Hb) 간의 비율(R) 측정과 관련하여, Turpeinen et al., 및 하기(실시예 5)에 기술된 시간-분해 면역형광법으로 두 가지 파라미터를 측정할 때, 정상 여성(즉, 자간전증 환자가 아닌)의 상기 비율은 약 $0.38 \mu\text{g}/\text{ml} / 3 \mu\text{g}/\text{ml} = 0.012$ 이다. 따라서, 0.12 이상의 비율 R은 여성이 자간전증의 위험이 있거나 자간전증이 이미 어떤 단계로 발병된 것으로 인지됨을 예상할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 자간전증의 위험성 또는 특정 단계의 질병상태는 R이 0.15 또는 그 이상(예를 들어, 0.2 이상, 0.3 이상, 0.4 이상, 0.5 이상, 0.6 이상)인지 여부에 의해 인지된다. 이론적으로, 유리 전체 Hb 모두(100%)가 태아 Hb일 때 R=1이다. 따라서, 이 값은 상한선이다.

[0069] 본 발명은 또한 본원에서 기술된 상기 이용방법을 다른 진단방법과 병용할 수 있음을 설명한다. 본 발명의 방법과 병용하여 사용될 수 있는 진단방법은 당업계의 의료 종사자에게 잘 알려진 현재의 자간전증 진단 방법이나 자간전증 진단을 돕는 방법을 포함하며, 이러한 방법의 예로는 뇨 수준 또는 혈청 내의 시스테인 C 수준을 측정하는 것이 언급될 수 있다. 생물학적 샘플은 먼저 본원에 기술된 방법으로 분석될 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 이후 다른 방법으로 검사하여 상기 관찰 결과를 확증할 수 있다. 따라서, 본 발명의 진단 방법의 정확성은 다른 진단방법과 병용함에 의해 개선될 수 있다.

[0070] ii) 자간전증의 진행/퇴행 평가에 관하여:

[0071] 또한, 본 발명의 실시형태에서, 유리 태아 헤모글로빈(예를 들어, 유리 태아 헤모글로빈 서브유닛)은 환자의 자간전증 상태(예를 들어, 중증의 자간전증)를 결정하거나 예후, 즉, 질병 결과를 예측하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 유리 헤모글로빈의 농도는 자간전증의 중증도와 관련된다(예를 들어, 경증 또는 중증의 자간전증). 발작(seizures), 혼수(coma)(자간전증), 뇌졸중(stroke), 고혈압성 뇌병증(hypertensive encephalopathy), 두통 및 가시적 이상(시아암점(scotomata), 복시증(diplopia), 흑내장(amaurosis), 동측반맹(homonymous hemianopsia))과 같은 신경학적 징후가 중증의 자간전증에서 통상적인 것으로 알려져 있다[Douglas 및 Redman, 1994].

[0072] 따라서, 두 번째 양태로서 본 발명은 이하의 단계들을 포함하는 자간전증의 진행 또는 퇴행의 모니터링 방법을 제공한다: (a) 임신한 암컷 포유류에서 분리한 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; (b) 이후에 상기 임신한 암컷 포유류에서 분리한 두 번째 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; (c) 단계 (a) 및 단계 (b)에서 측정된 값을 비교하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 증가하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 증가하는 것은 자간전증의 진행을 나타내고; 또한, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 감소하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 감소하는 것은 자간전증의 퇴행을 나타내는 것인 비교단계.

[0073] 본 발명자들은 탄자니아의 주요 도시인 다르 에스 살람(Dar es Salaam)에 위치한 무힘빌리 병원(Muhimbili Hospital)에서 연구의 일부분을 수행하였다(실시예 5 참조). 무힘빌리 병원은 자치도시의 병원으로서 주로 환자를 받는 3차 의료기관이다. MUHAS(Muhimbili University of Health 및 Allied Sciences)는 보건학 고등교육을 제공하는 국가에서 유일한 공립 대학교이다. 탄자니아에서 자간전증 및 자간에 의해 악화된 많은 수의 임신부가 본 발명의 연구를 위해 적절하게 선택되었다. 무힘빌리 병원에서, 자간전증은 임신부 건강진단 클리닉을 받는 여성의 16%에서 발견되었다. 상기 병원에 기초한 자간의 발병률은 1999년 내지 2000년 동안의 연구에 의거해서 200/10,000 분만이다. 이는 유럽에서 5/10,000 모체의 발병률인 것과 비교될 수 있다. 중증의 자간전증 또는 자간을 갖는 10명의 환자와 대응되는 10명의 대조군이 본 연구에 포함되었다(하기 표 참조).

표 1

[0074]

본 연구에 참가한 분만 환자의 임상적 특성		
	자간전증	대조군
수 ^a	10	10
나이(년)	28.5(19-40)	21.5(18-30)
출산수	1.6±2.3	0.6±1.4
임신주수(일수)	256(217-266)	280(231-287)
수축기압(mmHg) ^{***}	191±34	115±9
확장기압(mmHg) ^{***}	124±18	74±7
단백뇨(g/ℓ) ^{***,b}	2.6±0.8	0.3±1.0
출생 체중(g)	2005±717	3040±398
태반 무게(g)	335±120	506±68
절개(수)	6	4
자궁내태아사망(수)	5	0
자간(수)	4	0
그룹 간의 차이를 통계적으로 평가하기 위해 본페로니의 다중 비교 사후 검정법(post hoc Bonferroni's Multiple Comparison Test)에 의한 일원분산분석(one-way Anova)을 사용하였다.		
^{***} 상기 검사는 자간전증과 대조군 사이의 유의한 차이점을 보여준다.		
^a 자간전증 그룹에서 분만 후 24시간 이내에 모체가 사망한 하나의 사례		
^b 단백질뇨 값은 방법적인 한계로 부정확하다. 가장 높은 측정가능한 값은 3 g/ℓ 이다.		

[0075]

환자는 무함빌리 병원에서의 산부인과에서 2007년 9월~10월, 6주에 걸쳐 선택되었다. 자간전증 그룹은 하루에 평균 2명의 자간전증 환자가 들어오는 자간성 집중 치료 병동에서 선택되었다. 포함 기준은 중증의 자간전증(2회 측정시 확장기 혈압 ≥ 110 인 경우) 또는 자간(eclampsia)이다. 임신 전에 만성 고혈압으로 기록된 환자는 모두 본 연구에서 배제되었다. 상기 환자는 스와힐리어로 번역된 질문 시트를 사용하여 인터뷰되었다. 각 참가 환자의 병원 차트는 추가적인 정보를 얻기 위해 연구되었다. 본 연구에 포함된 여성은 입원 후 초기 24시간 동안 혈압이 지속적으로 상승하였으며, 단백질 ≥ 1 g/ℓ 이었다. 나이, 출산수, 출산전 방문 횟수, 분만형태, 입원 후 분만간격, 모체 및 태아의 회복이 기록되었다.

[0076]

분만 전에 채취된 뇨 샘플은 자간전증 그룹과 대조군 간의 전체 헤모글로빈 수준에서 통계적으로 유의한 차이를 보여준다(도 21). 통계적 계산은 비모수적 맨-휘트니 유-테스트(non-parametric Mann-Whitney U-test)로 수행되었으며, p-값은 0.0093을 나타냈다. 자간전증 그룹의 평균값이 31.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임에 비해 대조군의 평균값은 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 대조군의 높은 값은 말라리아의 높은 발병률에 기인하는 것 같다. 분만 후에 수집된 뇨 샘플 또한 분석되었다.

[0077]

구체적인 실시형태에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준에서 2 표준 편차 또는 그 이상(예를 들어, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 7 이상, 10 이상)의 표준 편차에 상응하는 증가는 자간전증 발병에 대한 증가된 위험성 및/또는 상기 질병의 진행을 나타내는 것으로 상정된다. 유사한 방법으로, 유리 태아 헤모글로빈 수준에서 2 표준 편차 또는 그 이상(예를 들어, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 7 이상, 10 이상)의 표준 편차에 상응하는 감소는 자간전증 발병에 대한 감소된 위험성 및/또는 상기 질병의 퇴행을 나타낸다. 다른 측정값은 t_2 에서의 Hb F 및 t_1 에서의 Hb F 간의 비율(R_t)이며, 여기서 t_1 은 첫 번째 샘플을 얻는 시각이고, t_2 는 두 번째 샘플을 얻는 시각이다. R_t 의 증가는 상기 질병의 진행을 나타내며, R_t 의 감소는 상기 질병의 퇴행을 나타낸다. 동일한 여성이 검사 대상자라는 점에서 개인적 다양성은 최소화될 것으로 기대되며, 작은 증가 또는 감소도 유효한 지표가 될 수 있을 것이다. 1.1 이상의 R_t 값은 질병의 진행을 나타낼 것이며, 반면에 0.9 이하의 R_t 값은 질병의 퇴행을 나타낼 것이다.

[0078]

상기 경우에, 비율 R (즉, Hb F와 전체 Fb 간의 비율)을 사용하는 경우, 상기 측정은 전형적으로 두 번째 시간 지점(R_2)에서 얻어진 R 과 첫 번째 시간 지점(R_1)에서 얻어진 R 간의 비율이다. R_2/R_1 의 증가는 질병의 진행을 지시하며, R_2/R_1 의 감소는 질병의 퇴행을 지시한다. 동일한 여성이 검사 대상자라는 점에서 개인적 다양성은 최소화

화될 것으로 기대되며, 작은 증가 또는 감소도 유효한 지표가 될 수 있을 것이다. 비율 R_2/R_1 값이 1.1 이상이면 질병의 진행을 나타내며, 0.9 이하이면 질병의 퇴행을 나타낸다.

[0079] 상기 첫 번째 양태에 대해 언급된 설명은 또한 이 두 번째 양태 및 하기 양태에도 적용된다.

[0080] **iii) 자간전증의 구체적 치료법의 유효성 평가 방법에 관하여:**

[0081] 세 번째 양태로서 본 발명은 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 치료법의 유효성 평가 방법을 제공한다: (a) 치료 전에 임신한 암컷 포유류에서 얻은 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; (b) 치료 후에 동일한 임신 포유류로부터 얻은 두 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; (c) 단계 (a)에서 측정된 수준과 단계 (b)에서 측정된 수준을 비교하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 감소하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 감소하는 것은 그 치료법이 자간전증 치료에 유효한 것임을 나타내는 것인 비교단계.

[0082] 구체적 실시형태에서, 상기 치료법의 유효성은 유리 태아 헤모글로빈의 감소 정도 측정을 통해 평가될 수 있다. 만약 상기 감소가 2 표준 편차 또는 그 이상(예를 들어, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 7 이상, 10 이상)의 표준 편차에 상응한다면, 이는 상기 치료법이 자간전증의 진행 억제 및/또는 상기 질병의 치료 및/또는 상기 질병과 관련된 징후의 경감에 있어 유효하다는 것을 나타낸다. 유사한 방법으로, 유리 태아 헤모글로빈 수준에서 2 표준 편차 또는 그 이상(예를 들어, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 7 이상, 10 이상)의 표준 편차에 상응하는 증가는 비효과적인 치료법임을 나타낸다. 다른 측정값은 t_2 에서의 Hb F 및 t_1 에서의 Hb F 간의 비율(R_t)이며, 여기서 t_1 은 첫 번째 샘플을 얻는 시각이고, t_2 는 두 번째 샘플을 얻는 시각이다. R_t 의 증가는 상기 질병의 진행을 나타내며, 즉, 그 치료법은 충분하지 않음을 나타내고, R_t 의 감소는 상기 질병의 퇴행 및 효과적인 치료법임을 나타낸다. 동일한 여성이 검사 대상자라는 점에서 개인적 다양성은 최소화될 것으로 기대되며, 작은 증가 또는 감소도 유효한 지표가 될 수 있을 것이다. 1.1 이상의 R_t 값은 질병의 진행을 나타낼 것이며, 반면에 0.9 이하의 R_t 값은 질병의 퇴행을 나타낼 것이다.

[0083] 상기 경우에, 비율 R (즉, Hb F와 전체 FbF 간의 비율)을 사용하는 경우, 상기 측정은 전형적으로 두 번째 시간 지점(R_2)에서 얻어진 R 과 첫 번째 시간 지점(R_1)에서 얻어진 R 간의 비율이다. R_2/R_1 의 증가는 질병의 진행을 나타내고, 즉, 그 치료법이 충분하지 않으며, 반면에 R_2/R_1 의 감소는 질병의 퇴행을 나타내고, 즉, 그 치료법은 원하는 효과를 내는 것으로 여겨진다. 동일한 여성이 검사 대상자라는 점에서 개인적 다양성은 최소화될 것으로 기대되며, 작은 증가 또는 감소도 유효한 지표가 될 수 있을 것이다. 비율 R_2/R_1 값이 1.1 이상이면 질병의 진행을 나타내며, 반면에 비율 R_2/R_1 값이 0.9 이하이면 질병의 퇴행을 나타낸다.

[0084] **iv) 진단 키트에 관하여:**

[0085] 네 번째 양태로서 본 발명은 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하는 수단 및 상기 검출 수단의 사용을 위한 사용설명서를 포함하는, 자간전증 진단 또는 자간전증 진단을 돕기 위한 평가 키트를 제공한다.

[0086] 본 발명은 자간전증의 진단 또는 진단을 돕기 위한 키트를 제공한다. 상기 키트는 자간전증 환자로부터 얻은 샘플에 다르게 존재하는 유리 헤모글로빈의 존재를 검출하거나 스크린하는데 이용된다.

[0087] 하나의 실시형태에서, 상기 키트는 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 유리 헤모글로빈(예를 들어, 헤모글로빈 알파 사슬(Hb α), 헤모글로빈 베타 사슬(Hb β), 헤모글로빈 델타 사슬(Hb δ), 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 및 전체 유리 헤모글로빈) 수준을 검출하기 위한 수단을, 단독으로 또는 다른 검출 수단과 병용하여 포함하며, 상기 검출 수단의 사용을 위한 설명서를 포함한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 본 발명에 따른 키트는 태아 Hb mRNA 측정을 위한 수단을 포함한다.

[0088] 바람직한 실시형태에서, 상기 키트는 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하기 위한 수단, 예를 들면, 샘플 내의 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 수준을 측정하기 위한 수단을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 이는 또한 전체 유리 헤모글로빈 수준을 검출하기 위한 수단을 포함한다.

- [0089] 하나의 실시형태에서, 상기 검출 수단은 헤모글로빈, 바람직하게는 태아 헤모글로빈에 특이적인 항체(예를 들면, 항-인간-Hb γ 항체)를 포함한다.
- [0090] 추가적인 실시형태에서, 상기 설명서는 라벨이나 분리형 삽입물 형태로 된 적절한 작동 파라미터를 포함한다. 예를 들면, 상기 설명서는 소비자에게 샘플을 어떻게 수집하고, 프로브를 어떻게 세척하는지에 대한 정보를 줄 수 있다. 전체 Hb의 잘못된 값을 피하기 위해서는 혈액 샘플의 용혈을 최소화하도록 세심한 주의가 필요하다.
- [0091] 본 발명의 상기 방법에 이용되는 키트는 분석물 표준, 반응액 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0092] 네 번째 양태의 특정 실시형태에서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 수준을 측정함으로써 결정된다.
- [0093] 네 번째 양태의 특정 실시형태에서, 상기 평가 키트는 전체 유리 헤모글로빈 수준을 검출하기 위한(예를 들어, 전체 Hb vs 태아 Hb의 비율 및/또는 vs 태아 Hb mRNA의 비율을 측정하기 위한) 수단을 추가로 포함한다.
- [0094] 더욱 구체적으로, 본 발명의 진단 키트는 예를 들면, 샘플 내의 태아 헤모글로빈-농도를 측정하기 위해 고안된 ELISA 또는 샘플 내의 태아 헤모글로빈- 및 전체 헤모글로빈-농도 모두를 측정하기 위해 고안된 두 개의 ELISA를 수행하는데 필요한 구성성분(물 제외)을 모두 포함한다. 태아 헤모글로빈의 농도를 측정하기 위한 바람직한 방법은 하기에 기술된 경쟁적 ELISA의 변형이다.
- [0095] 물에 1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석된 헤모글로빈-F를 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 코팅한 후 밤새 배양하였다. 프리코팅된 플레이트가 키트 사용을 위해 준비되었다. 마이크로타이터 플레이트는 수용액 A(예를 들어, 0.1% 계면활성제(예를 들어, 트윈 20) 및 0.1% 소 혈청 알부민을 포함하는 9% NaCl)에 1000 내지 10000 배 희석된 50 μl 의 래빗 항-헤모글로빈-F와 표준 산화헤모글로빈-F 샘플 시리즈 50 μl 를 더하거나 환자 샘플(수용액 A로 100~10000 배 희석)을 더한 혼합물이 있는 상태로 진료소에서 배양되어야 한다. 상기 혼합물은 상온에서 30 분 내지 3 시간 정도의 시간 동안 마이크로타이터 플레이트 웰 내에서 유지되어야 한다. 상기 플레이트는 이후 수용액 A로 3 번 세척해야 하며, 각 웰은 수용액 A로 1000 내지 10000배 희석된, 100 μl 의 돼지-항-래빗 IgG-알칼라인 포스파타제(ALP)와 함께 30분간 배양하였다. 상기 플레이트는 이후 수용액 A로 3번 세척해야하며, 마지막으로 ALP가 특이적으로 반응할 수 있는 기질과 함께 배양되어 색상을 띠는 산출물로 변하게 된다. 상기 기질 용액은 예를 들면, 1M 다이에탄올아민에 용해된 1 $\text{mg}/\mu\text{l}$ p-니트로페닐 포스페이트 + 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.8이 될 수 있다. 이때 웰 내의 상기 산출물의 농도(=색상 강도)는 그 웰 내의 항 헤모글로빈-F의 양에 비례하며, 이어서, 항체의 양은 환자 또는 대조군 샘플 내의 헤모글로빈-F의 양에 반비례한다. 상기 색상 강도는 흡광-타입 마이크로타이터 플레이트-리더기로 정확하게 측정되거나, 육안으로도 평가될 수 있다.
- [0096] 2차 항체와 결합하는 효소로는 ALP 보다는 상기 효소 홀스-래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 당업자가 더 많이 선택한다. 그러나, 본원에서는 상기 동일한 마이크로타이터 플레이트 웰 내에 존재하게 될 헤모글로빈이 또한 퍼옥시다제 효소라서 색상을 띠는 산출물이 허위로 높은 값을 갖도록 하므로, HRP는 사용될 수 없다.
- [0097] 본 발명자들이 알기로는, 다클론성 래빗 항혈청을 ALP와 병용하여 사용하는 경쟁적 ELISA는 태아 헤모글로빈-F 측정에 사용된 적이 없다.
- [0098] 각 단계의 절차, 정확한 부피, 희석, 농도, 배양 시간 및 온도에 대한 설명서를 포함하는 매뉴얼은 키트와 함께 제공될 수 있다. 또한 프리코팅된 마이크로타이터 플레이트, 코팅을 위한 산화헤모글로빈-F 또는 "전체(total)" 산화헤모글로빈 용액, 표준 희석액 시리즈, 래빗 항-헤모글로빈-F 또는 래빗 항-전체 헤모글로빈 용액, 돼지 항-래빗 IgG-ALP 용액, ALP-기질 용액 및 수용액 A가 제공된다.
- [0099] 산화헤모글로빈-F 및 "전체" 산화헤모글로빈은 하기와 같이 본 발명자들의 실험실에서 준비될 수 있다. 50 ml 제대혈에서 분리한 적혈구(Hb-F 표본) 또는 성인 혈액(전체 Hb 표본)을 원심분리하여(1200 \times g, 10분) 분리하고, 10배 부피의 인산완충용액(PBS, 10 mM phosphate, pH 7.4; 120 mM NaCl 및 3 mM KCl)으로 4 번 세척하였다. 다음으로 상기 혈구 세포를 얼음 상에서 저장액(20 부피 H2O: 1 부피 PBS)에 현탁시켜 용해시키고, 상기 상등액을 4°C에서 15 mM Tris-HCl, pH 8.0으로 3 번 투석시켰다. DEAE-Sepharose(GE Healthcare) 200 ml를 컬럼 안에 채우고, 상기 투석된 상등액을 겔에 적용하고 15 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 15 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0.2 M NaCl로 구성된 농도 구배로 분리시켰다. 분획을 수집하고 흡광도를 280 nm, 577 nm 및 630 nm에서 측정하여 산화헤모글로빈-F 또는 전체 산화헤모글로빈 농도를 측정하고 확인했다[Winterbourn, 1990]. 상기 코팅액 및 표준 시리즈 용액은 수용액 A로 희석하여 준비하였다.
- [0100] 래빗 항-전체 헤모글로빈은 Dako, 덴마크에서 구입하고, 래빗 항-헤모글로빈-F는 표준 방법에 따라 정제된 헤모

글로빈 γ -사슬(Hb- γ)으로 토끼를 면역시키고, 출혈시켜 준비했다. 상기 면역 및 출혈은 상업적 기관("아웃소싱")에서 수행되었다. Hb- γ 는 본 발명자들의 실험실에서 주로 문헌[Kajita et al. (1969)] 및 [Noble (1971)]의 프로토콜에 따라, Hb-F로부터 α - 및 γ -사슬을 분리함으로써 정제되었다. 인산칼륨(0.1 ml 1 M KH₂PO₄) 및 염화나트륨(0.2 ml 2 M NaCl)을 10 ml의 3%(w/v) 헤모글로빈-F 용액에 첨가하였다. 50 mg의 ρ -머큐리벤조에이트를 0.2 ml 1M NaOH에 녹이고 이것에 첨가하였다. 이러한 두 가지 용액을 혼합하고, 1 M 아세트산으로 pH 4.5까지 조심스럽게 적정한 후, 저온실로 옮겨 밤새 두었다. 다음날 아침, 1 M NaOH로 pH를 7까지 조정하고, 원심분리하였다(5000×g, 10 분, 10℃). 펠렛은 버리고 상등액을 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 투석시켰다. 다음으로 상기 투석된 샘플을 10 mM Tris-HCl, pH7.5로 미리 평형을 맞춘 10 ml DEAE-Sepharose(지이 헬스케어사(GE Healthcare) 제품) 컬럼에 적용시켰다. 상기 샘플 적용 이후, 상기 컬럼을 50 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.5로 세척한 후, 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 및 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 0.2 M NaCl로 구성된 염-완충액 농도구배(salt-buffer gradient)로 처리하였다. 샘플 세척 및 농도구배 용출은 40 ml/hour 유속으로 수행되었으며, 3 ml 분획으로 수집하였다. 상기 각 용출된 분획의 α - 및 γ -사슬 농도는 이후 415 nm에서의 흡광도, SDS-PAGE, native PAGE 및 아미노말단 아미노산 서열측정(aminoterminal amino acid sequencing)으로 평가되었다. 순수한 γ -사슬만을 포함하는 분획을 골라, 2-머캅토에탄올을 50 mM이 되도록 첨가하여 하프-시스틴(half-cystines)과 ρ -머큐리벤조에이트를 분리하였다. 다음으로 ρ -머큐리벤조에이트를 Sephadex G-25 컬럼(PD-10, 지이 헬스케어사 제품) 상에서 탈염하고 0.1M 인산나트륨, pH 7.5 + 50 mM 2-머캅토에탄올로 용출시켜 단백질에서 제거하였다. 마지막으로, 상기 용출된 단백질 분획을 0.1M 인산나트륨, pH 7.5로 투석하였다.

[0101] 돼지 항-래빗 IgG-ALP는 시그마사(Sigma)에서 구입하였으며, 상기 기질 용액 및 수용액 A는 본 발명자들의 실험실에서 통상적으로 허용되는 화학제품으로 제조하였다.

[0102] 대안적으로, 상기 태아 헤모글로빈-ELISA는 코팅용 Hb- γ 에 특이적인 단일클론성 또는 다클론성 항체, 배양 단계 1에서의 표준 태아 헤모글로빈 시리즈 또는 적절한 희석액으로 희석된 임상 샘플 및 두 번째 배양 단계에서의 래빗 항-헤모글로빈-ALP를 사용하는 샌드위치-타입 ELISA일 수 있다.

[0103] 대안적으로, 상기 진단키트에서 임상 샘플 내의 태아 헤모글로빈 농도의 측정수단으로서 Hb- γ 와 특이적으로 반응하는 단일클론성 항체로 코팅된 단백질칩이 이용될 수 있다.

[0104] **v) 자간전증의 예방 및/또는 치료에 사용되는 물질 및 조성물에 관하여:**

[0105] 유리 태아 헤모글로빈이 자간전증의 지시자이고 Hb F 수준(또는 일반적인 Hb 수준)의 증가가 질병의 진행을 억제할 것이라는 본원에서 보고된 결과에 의하면, i) 유리 Hb(유리 Hb F 또는 다른 Hb) 형성을 저해하는 능력, ii) 유리 Hb(유리 Hb F 또는 다른 Hb)에 결합하는 능력, 또는 iii) 순환하는 유리 Hb(유리 Hb F 또는 다른 Hb) 농도를 감소시키는 능력을 가진 물질은 자간전증의 치료 및/또는 예방에 효과적인 잠재적 물질일 수 있음을 예상할 수 있다. 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 헤모글로빈 결합 제제; 헴(heme) 결합/분리 제제; 철-결합 제제; 헤모글로빈 분리, 헴 분리 및/또는 철 격리를 자극하는 제제; 및 또는 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 성분의 자간전증 치료를 위한 용도를 제공한다. 더욱이, 또 다른 양태로서, 본 발명은 이러한 물질의 자간전증의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0106] 본 발명과 관련하여 다양한 문법 형태로 존재하는 "치료 또는 예방"이란 용어는 (1)자간전증에 해로운 효과, (2)질병의 진행, 또는 (3) 질병을 야기시키는 작용제를 예방(preventing), 치유(curing), 전환(reversing), 약화(attenuating), 완화(alleviating), 개선(ameliorating), 저해(inhibiting), 최소화(minimizing) 억제(suppressing) 또는 저지(halting)하는 것을 의미한다.

[0107] 헤모글로빈은 산화에 필수적이지만, 순환계 내의 유리 헤모글로빈은 제1철에서 제2철 상태로 가는 헴의 자가-산화 과정 동안 혈관의 레독스(redox) 평형을 변형시키고[Motterlini et al., 1995], 아마도 글로빈-중심에 유리 라디칼을 유도하여[Svistunenko et al., 1997] 조직에 해롭다.

[0108] 출원인은 자간전증을 갖는 여성의 혈액 내 유리 헤모글로빈의 증가된 수준은 상기 질병의 마커로서 제공될 뿐만 아니라, 이러한 환자에서 통상적으로 발견되는 상기 질병의 징후를 지각하거나, 일부 지각할 수 있다. 그러므로, 유리 헤모글로빈은 또한 자간전증 치료를 위한 후보 표적이다. 유리 태아 헤모글로빈이 자간전증의 마커로서 여겨진다면, 일반적인 유리 헤모글로빈(즉, 태아 헤모글로빈뿐만 아니라 더욱 비특이적인 헤모글로빈(예를 들면, 성인 헤모글로빈 같은))의 감소는 자간전증의 진행을 최소화하거나 자간전증을 치료할 것이다.

[0109] 이러한 양태의 특정 실시형태에서, 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합 제제는 알파

1-마이크로글로불린이다. 앞으로, 이러한 제제는 알파-1-마이크로글로불린 또는 α_1 -마이크로글로불린 및 약자로 α_{1m} 으로 불릴 것이다. 과학문헌에서 사용되어 온 이 물질의 다른 명칭은 단백질 HC(heterogeneous in charge; human complex-forming), AMBP-단백질 및 알파-1-마이크로당단백질이지만, 이들 명칭은 α_{1m} 와 동일한 것이다.

[0110] 이러한 양태의 특정 실시형태에서, 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합 제제는 헤모글로빈 및/또는 헴에 특이적인 항체이다.

[0111] 따라서, 본 발명은 또한 자간전증의 치료 또는 예방 방법을 제공하는데, 상기 방법은 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합/분리 제제 및/또는 철-결합 제제; 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리 및/또는 철 격리를 자극하는 제제; 및 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 성분을 포함하는 상기에서 언급된 하나 이상의 이러한 제제의 유효량을 이러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0112] 또한, 본 발명은 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합/분리 제제, 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리 및/또는 철 격리를 자극하는 제제, 및 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상 성분의 자간전증의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 제제의 제조를 위한 용도; 및 자간전증의 치료 또는 예방 방법을 제공하는데, 상기 방법은 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합/분리 제제 및/또는 철 격리 제제, 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리 및/또는 철 격리를 자극하는 제제, 및 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상 성분을 포함하는 약제학적 제제의 유효량을 이러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상자에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 양태에서, 상기 목적은, 조직의 손상, 나아가서는, 상기 질병의 진행을 방지하기 위하여, 예를 들어, 모체 혈액 내에 존재하는, 유리 헤모글로빈 및 이들의 분해 산물 헴의 양을 감소시키는 것이다.

[0113] 상기 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합/분리 제제는 헤모글로빈 및/또는 헴 결합/분리 특성을 나타내는 화합물이다. 상기 철 격리 제제는 유리 철과 결합하고 철이 레독스 반응에 참여하지 못하도록 하는 화합물이다.

[0114] 하나의 실시형태에서, 상기 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합/분리 제제는 α_{1m} 이다. 이러한 작은 혈장 및 조직 단백질은 헴-결합제이고[Allhorn et al., 2002; Larsson et al., 2004], 라디칼 소거제이며[Akerstrom et al. 2007], 헴-분리 형태인 t- α_{1m} 은 α_{1m} 이 유리 헤모글로빈과 혼합될 때, 단백질가수분해를 통해 C-말단 테트라펩티드, LIPR 제거에 의해 유도된다[Allhorn et al., 2002]. 이는 또한 태반 내의 헤모글로빈에 결합할 수 있다(하기 참조). 유리 헤모글로빈 및 활성 산소종은 간 세포 및 혈구 세포에서 α_{1m} 생성을 증가시킨다[Olsson et al. 2007]. 그러므로, α_{1m} 은 헴- 및 헤모글로빈-유도성 세포 및 조직 구성성분의 손상을 보호할 수 있는 헴- 및 헤모글로빈 길항제(antagonist)이다. 실시예 5.4 내지 5.7은 또한 이에 대한 증거를 제시한다. 즉, 실시예 5.4는 자간전증 환자가 α_{1m} 수준의 증가에 의해 질병에 반응하는 것을 나타내고, 실시예 5.5는 α_{1m} 이 세포 및 조직의 헴-유도된 산화적 손상을 저해하고 수복하는 것을 나타내며, 실시예 5.6은 치료요법-제제의 테스트가 생체내(*in vivo*) 테스트와 유사하게 한 단계로 수행될 수 있는 태반의 생체외(*in vitro*) 모델을 기술하고 있고, 실시예 5.7은 헤모글로빈이 태반-조직에서 α_{1m} 과 결합된 것을 나타낸다.

[0115] 자간전증의 치료 또는 예방을 위해 가능한 활성제로 예상되는 다른 제제는 하기와 같다:

[0116] **헤모글로빈-결합제:**

[0117] 항체

[0118] 헤모글로빈과 강하게 결합하고 헤모글로빈의 레독스 효소 활성을 막는 단일클론성 항체가 개발될 수 있다. 상기 항체는 생체내에서 또는 생체외에서 면역을 통해 생산될 수 있거나, 이미 존재하는 라이브러리에서 선택될 수 있다. 상기 항체는 알파-, 베타-, 델타- 또는 감마-글로빈 사슬 또는 이러한 글로빈 사슬의 공통 부분에 대한 특이성에 대해 선택될 수 있다. 상기 항체는 인간의 치료에 적합하도록 변형될 수 있다. 즉, 인간 면역글로불린 프레임워크로 제공될 수 있다. 항체의 일부분, 즉, Fv- 및 Fab 단편 또는 전체 면역글로불린 등이 사용될 수 있다.

[0119] 합토글로불린(Haptoglobulin)

[0120] 합토글로불린은 혈장에서 발견되는 당단백질이다. 합토글로불린의 세 가지 형태, Hp1-1, Hp2-1 및 Hp2-2가 존재한다. 모든 형태는 헤모글로빈과 결합하며, Hp-Hb 복합체를 형성한다. 상기 Hp-Hb 복합체는 유리 헤모글로빈보

다도 레독스 효소 활성을 약화시키고, 그러므로, 산화적 손상을 줄인다. Hb와의 결합은 예를 들면, 헴 그룹으로부터의 철 손실을 예방한다.

[0121] *CD163*

[0122] CD163은 대식세포, 단핵구, 혈관을 이루고 있는 세망내피계에서 발견되는 소거제 수용체이다. 상기 수용체는 Hp-Hb 복합체를 인식하고, 엔도사이토시스 및 이들의 리소좀으로의 운반, HO-1에 의한 분리(하기 참조) 및 세포성 페리틴에 의한 유리 철의 격리를 중재한다. 따라서, CD163은 헤모글로빈-유도성 산화적 스트레스를 제거하는데 기여한다.

[0123] **헴-결합제/분리제:**

[0124] *헤모펙신(Hemopexin)*

[0125] 헤모펙신은 인간 혈장에서 발견되는 당단백질(60 kDa)로, 이것은 유리 헴과 강하게 결합하고(Kd appr 1pmol/ℓ) 세망내피계에서의 분리를 위해 헴을 간으로 이동시킴으로써 혈장에서 유리 헴을 제거한다.

[0126] *헴-옥시게나제(Heme-oxygenase)*

[0127] 헴-옥시게나제는 헴을 빌리베르딘, 일산화탄소 및 유리 철로 전환시키는 세포성 헴-결합 및 분리 효소 복합체이다. 이후 세포성 페리틴 및 빌리베르딘의 격리는 궁극적으로 노 내부로 분비되는 빌리루빈에 대한 빌리베르딘 환원효소에 의해 감소된다. 매우 다양한 구조를 갖는 헴 옥시게나제 유전자의 세가지 형태는 HO-1, HO-2 및 HO-3으로 알려져 있다. HO-1은 가장 중요하다. 이 유전자는 실질적으로 모든 세포에서 헤모글로빈, 유리 헴, 저산소증, 유리 라디칼, ROS(활성산소종) 및 다른 염증 시그널에 의해 상향조절(upregulate)된다. HO-1은 산화제 헴 및 철을 제거할 뿐만 아니라, 일부 산화제에 대해 강력한 항-산화 효과를 내는 빌리루빈을 생성시키기 때문에, 강력한 항-산화제이다.

[0128] *알부민*

[0129] 알부민은 헴과 결합할 수 있는 인간 혈장 내에 존재하는 66 kDa 단백질이다. 알부민-헴-복합체의 세포적 섭취(uptake) 및 분해의 증거는 없으며, 알부민의 효과는 아마도 헴의 저장소로서 작용하여 헴이 내피세포막, 혈관 기저막 등으로 유입하는 것을 막는 것일 것이다.

[0130] **철-결합제:**

[0131] *트랜스페린(Transferrin)*

[0132] 트랜스페린은 혈액에 존재하는 가장 중요한 철의 수송체이다. 트랜스페린-철 복합체는 복합체를 결합시키고 분리시키는 세포 수용체에 의해 인식되고 결합된다.

[0133] *페리틴(Ferritin)*

[0134] 이는 두 가지 종류의 24개 서브유닛으로 구성된 다중결합성 단백질로 유리 철의 주요한 세포내 저장소이다. 이는 4500 철 원자/페리틴 분자의 높은 철-저장 용량을 가진다. 페리틴에 결합된 철은 산화 환원 반응을 거의 못하며, 그러므로 산화적 손상을 예방할 수 있게 된다.

[0135] 또 다른 실시형태에서, 상기 헤모글로빈 결합제는 헤모글로빈 및/또는 헴에 특이적인 항체이다.

[0136] 구체적 실시양태에서, 상기 약제학적 제제는 헤모글로빈 결합체 및/또는 헴 결합 제제 및/또는 철 격리 제제를 포함한다.

[0137] 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리를 자극하는 제제는 합토글로빈 헤모펙신 및 헴 옥시게나제 같은 단백질을 포함하지만, 이제 제한되는 것은 아니다.

[0138] 본 발명의 약제학적 제제는 인간, 다른 영장류, 또는 포유류의 먹이 동물 등과 같은 "태반" 동물에게 투여할 수 있다. 투여를 위한 바람직한 동물은 인간 또는 상업적으로 이용가능한 동물 또는 가축이다.

[0139] 투여는 투여 동물이 무엇인지, 상기 치료제를 필요로 하는 동물의 상태, 및 치료제에 대한 특이적 적응증에 따라 다른 방식으로 수행될 수 있다. 투여 경로는 경구, 직장내, 비경구 투여 또는 코위관(nasogastric tube)을 통한 투여가 가능하다. 비경구 투여의 예로는 정맥내, 복강내, 근육내, 또는 피하주사이다.

[0140] 약학적 제제의 제형은 활성 성분의 약물학적 성질뿐만 아니라 이들의 생리화학적 성질 및 투여 경로의 방법에

따라 선택될 수 있다. 약제학적 제제를 제형화하는 다른 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0141] 비경구용 조성물을 위해, 액상 조성물, 또는 물에 타서 원래대로 될 수 있는, 예를 들면, 복용 전에 수용액으로 되는 고상 조성물이 바람직하다. 적합한 부형제는 하기를 포함한다: 용매(예를 들어, 물, 수용액, 알콜, 식물성 오일, 지질, 프로필렌 글리콜과 같은 유기 용매 등), 삼투압 조정제(예를 들어, 염화나트륨, 만니톨 등), 가용제, pH 조정제, 방부제(가능한 경우), 흡수 증강제 등.

[0142] 경구용 조성물을 위해, 상기 조성물은 고상, 반-고상 또는 액상 형태일 수 있다. 적절한 조성물은 고상 투여 형태(예를 들어, 모든 종류의 정제를 포함하는 정제, 포(sachet) 및 캡슐), 파우더, 과립, 펠렛, 비드, 시럽, 혼합물, 현탁액, 에멀전 등.

[0143] 적합한 부형제는 예를 들면, 충전제, 결합제, 붕해제, 윤활제 등을 포함하고(고상 투여 형태 또는 고상 형태의 조성물용), 액상 또는 반-고상 형태를 위해, 용매, 예를 들면, 물, 유기용매, 식물성 오일등을 포함한다. 또한, 추가적인 pH 조정 제제, 감미제(taste-making agents), 풍미제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

[0144] 또한, 활성 성분을 신체의 특정 부분에 표적화시키는 특이적인 담체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체- α_{1m} 복합체는 이들의 태반-에피토프에 대한 특이성에 의해 태반으로 표적화된다("회귀성(homing)"); 태반-회귀성 성질(예를 들어, 태반에 특이적인 인테그린-수용체) 및 다량의 α_{1m} 을 분비시킬 수 있는 인공 또는 원래의 능력을 갖는 줄기 세포 또는 재조합 세포. 상기 치료는 약물이 태반으로 집중되기 때문에 더욱 효과적이다.

[0145] 본 발명과 관련하여 "유효량"이란 용어는 주어진 상태와 투여 방식에 대해 치료상의 효과를 제공하는 양을 의미한다. 이는 원하는 치료학적 효과를 내기 위해 계산된 활성 물질과 요구되는 첨가제 및 희석제(즉, 담체 또는 투여 운반체)를 미리결정한 양이다. 또한, 이는 숙주의 활성 및 반응을 감소시키고, 가장 바람직하게는 임상적으로 유의적인 결손을 예방하기 위한 평균 유효량일 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 숙주에서 임상적으로 유의적인 상태의 개선을 가져오기에 충분하다. 당업자에게 이해되듯이, 화합물의 양은 이들의 특이적 활성에 의존하여 가변적이다. 적절한 투여 용량은 원하는 치료학적 효과를 내기 위해 계산된 활성 조성물과 요구되는 부형제(즉, 담체 또는 첨가제)를 미리 결정한 양을 포함한다. 또한, 투여될 용량은 활성제 성분 또는 용도, 치료될 환자의 나이, 체중 등에 의존하여 가변적일 수 있지만, 일반적으로는 0.001 내지 1000 mg/kg체중/일(day) 범위 이내일 것이다. 더욱이, 상기 투여량은 투여 경로에 의존한다.

[0146] **vi) 바이오마커로서 HLA-DPA-1에 관하여:**

[0147] 본 발명의 또 다른 실시형태는 태아 세포가 분화되어 모체의 면역 반응을 일으킬 수 있다는 발견에 대한 것이다. HLA 유전자 패밀리의 역할은 외래 항원을 모체의 면역계에 제공하는 것이다. HLA-DPA1 유전자를 발현하는 여성은 초기 단계에서 태아 세포를 "볼 수 있으며", 이것은 그들의 추가적인 손상을 막을 수 있다.(본원에서 보고된 연구에서, 본 발명자들은, 자간전증을 발병하지 않았지만 함요를 지닌 여성이 HLA-DPA1를 발현하는 것을 관찰하였다.

[0148] 따라서, HLA-DPA1는 태아 헤모글로빈 및/또는 자간전증의 간접적인 지시자로 사용될 수 있다. 그러므로, 또 다른 양태에서, 본 발명은 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 진단 방법을 제공한다: (a) 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계; (b) 상기 생물학적 샘플 내의 인간 백혈구 항원 DPA1(human leukocyte antigen DPA1, HLA-DPA1) 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 샘플 내의 HLA-DPA1 수준과 참고값을 비교하는 단계. 상기 언급된 HLA 조성물이 제공되면, 상기 여성은 아마도 자간전증(유리 태아 HB를 가지거나, 그렇지 않은 채로)에 대한 발병 위험이 낮아질 것인 반면에, 이러한 보호적 HLA를 갖지 않은 경우, 이 여성은 높은 위험에 처하게 되고, 특히 유리 태아 헤모글로빈 수준이 증가한다면 더욱 그럴 것이다.

[0149] 이러한 양태의 몇몇 실시형태에서, 상기 단계 (a) 내지 (c)는 상기 임신 여성이 자간전증의 발병 위험이 있는지 없는지, 또는 중증 형태의 자간전증 발병 위험이 있는지 없는지를 결정하기 위해 수행된다.

[0150] 이러한 양태의 몇몇 실시형태에서, HLA-DPA1의 발현 및 고발현은 HLA-DPA1의 발현이 없는 것보다 더 좋은 예후이다.

[0151] 마지막 양태로서, 본 발명은 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 HLA-DPA1 수준을 측정하는 수단 및 상기 검출 수단의 사용을 위한 사용설명서를 포함하는, 본 발명에 따른 자간전증 진단 방법에 따른, 자간전증 진단 또는 자간전증 진단을 돕기 위한 평가 키트를 제공한다.

[0152] 본 발명은 이하에 더욱 상세하게 기술될 것이다.

실시예

- [0174] 본 발명을 설명하기 위해 하기 실시예가 제공된다. 그러나, 본 발명이 이들 실시예에 기재된 특정 조건으로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.
- [0175] **실시예 1**
- [0176] **태반에서 Hb RNA 및 단백질 검출**
- [0177] 정량적(quantitative) RT-PCR, 인 시튜 혼성화 및 면역조직화학법을 수행하여 자간전증 대 대조군 대상자의 태반 샘플에서 Hb α , Hb β 및 Hb γ 의 mRNA와 단백질 발현을 분석하였다.
- [0178] **샘플 수집**
- [0179] 태반 조직은 산부인과(Lund University Hospital)에서 수집하였다. 상기 샘플링은 서면 동의하에 수행되었으며, 인간 대상자의 연구 목적임을 Ethical Committee Review Board로부터 승인받았다. 태반 조직은 10명의 자간전증, 15명의 정상 임신부, 5명의 양쪽성 함요(bilateral notch)를 가진 환자 및 5명의 자간전증과 양쪽성 함요를 가진 환자들이 본 연구에서 포함되었다. 5명의 자간전증을 갖는 환자 및 5명의 대조군에서 얻어진 태반 상 샘플(하기 참조)을 수집하였다. 자간전증은 혈압 > 140/90 mmHg 및 단백뇨 > 0.3 g/l로 판별되었다. 본태성 고혈압 또는 다른 전신 질환을 갖는 환자는 제외되었다. 태반 샘플은 출생시 채취하였으며, 즉시 동결하고 -80℃에서 저장하였다.
- [0180] **조직 샘플링 및 취급방법**
- [0181] 태반 샘플은 출산 직후 채취하였다. 괴사되거나 경색된 것으로 보이는 부분을 제외하고 태반 중심부에서 10×10×10 mm 입방체 크기의 용모 조직을 떼어냈다. 자궁근육층의 10×10×10 mm 입방체는 제왕절개한 여성에서 채취하였다. 상기 샘플은 드라이 아이스 상에서 즉시 동결시키고, RNA 추출될 때까지 -80℃에서 저장하였다. 상기 조직은 RNA 추출 또는 RNA 보전성을 가장 잘 확인할 수 있는 동결절단(cryosectioning) 전에는 녹이지 않았다.
- [0182] **RNA 추출**
- [0183] 전체 RNA는 Trizol(등록상표)(인비트로젠사(Invitrogen) 제품)를 사용하여 설명서에 따라 동결조직에서 추출하였다. 단백다당체 및 다당류는 0.8 M 구연산나트륨 및 0.2 M 염화나트륨으로 고-염 침전하여 제거하였다. RNA 보전성은 6.7% 포르말린 및 1X MOPS 버퍼를 사용한 변성 1% 아가로스 겔 전기영동하여 측정하였다. 샘플은 사용 때까지 -80℃에서 RNase가 없는 물에 저장하였다. 사용 전에 샘플을 70% 에탄올로 침전 및 세척하여 Trisol 잔여물을 제거하였다.
- [0184] **실시간 PCR 증폭**
- [0185] 어플라이드 바이오시스템즈사(Applied Biosystems)의 프로토콜에 따라 역전사효소(reverse transcriptase)로 cDNA를 합성하였다. 50 μ l 반응액(0.5 μ g의 전체 RNA, 1X TaqMan RT 버퍼, 5.5mM MgCl₂, 500 μ M dNTPs, 2.5 μ M 랜덤 헥사머, 0.4 U/ μ l RNase 저해제 및 1.25 U/ μ l MultiScribe 역전사효소를 포함)를 사용하였다. 상기 반응물은 25℃에서 10분간, 48℃에서 30분간 및 마지막으로 95℃에서 5분간 반응시켰다. 샘플은 분석때까지 -20℃에서 저장하였다.
- [0186] 유전자 전사체는 ABI PRISM(등록상표) 7000 서열 검사 시스템(어플라이드 바이오시스템즈사 제품)을 사용하여 실시간 PCR 방법으로 평가하였다. 프라이머 및 프로브는 Primer Express(등록상표) 소프트웨어 프로그램을 사용하거나 Assays onDesign/Demand(상표명)(어플라이드 바이오시스템즈사 제품)에 주문하여 디자인하였다. 상기 프라이머는 오염성 게놈 DNA를 증폭하는 것을 피하기 위해 관심 유전자의 다른 엑손들을 표적화했다. 반응은 25 μ l 최종 부피(:1X 유니버설 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템즈사 제품), 0.25 μ mol/l 프로브, 0.9 μ mol/l의 순방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머 각각, 및 1 μ l의 DNA 분획물(aliquot)(10 ng/ μ l 농도)을 포함)에서 수행되었다. 온도 사이클 환경은 50℃에서 2분간 UNG 활성화 및 95℃에서 10분간 초기 변성화에 의해 개시되었다. 이후 40 사이클을 진행했다: 95℃에서 15초, 60℃에서 1분. 주형을 갖지 않는 음성 대조군을 증폭의 각 세트에 포함시켰다. β -액틴을 각 샘플에서 나오는 신호를 표준화하기 위한 참고값으로 사용하였다. 주형 DNA의 순차적인 4배 희석액(0.08-80ng)을 사용하여 검정 곡선(calibration curve)을 만들어 정량분석을 수행하였다. 결과값은 공통 요소인 β -액틴과의 비율로서 나타냈다.
- [0187] **인 시튜 혼성화(ISHH)**

- [0188] 혼성화는 문헌[Hansson et al., 2005]에 기재된 방법대로 수행하였다. 동결절편(sryostat setions)은 염처리된 슬라이드 상에서 녹여 마운팅한 후, 사용 전까지 -80℃에서 저장하였다. mRNA 검출을 최대화하기 위해 신선한 동결 조직을 사용하였다. 절편은 문헌[Bradley et al., 1992]에 기재된 대로 고정, 탈수, 탈지질(delipidated) 및 혼성화하였다. 혼성화는 80 μ l의 혼성화 버퍼(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA(pH 8.0), 300mM NaCl, 50% 포름아마이드, 10% 덱스트란 설페이트, 1×Denhardt's 25 mg/ml 효모 tRNA, 100 μ g/ml 연어 정자 DNA, 250 μ g/ml 전체 이스트 RNA(fraction XI, 시그마사 제품), 150 mM DTT(dithiothreitol), 0.15% NTS(sodium thiosulfate) 및 0.15% SDS(sodium dodecyl sulphate)) 당 2×10^6 cpm의 변성된 35S-cRNA 프로브를 사용하여 55℃에서 20~24 시간 동안 수행하였다. 슬라이드를 세척한 후 2일간 Kodak Hyperfilm Biomax MR에 덧붙여 놓았 으며, 그 이후 이들을 핵 트랙 에멀전(nuclear track emulsion)(NTB-3, 코닥사 제품)으로 코팅하였다. 슬라이드 는 4℃에서 3주(Hb α 2, Hb γ 2), 4주(Hb β) 동안 노출시키고 나서, 이것을 Dektol(코닥사 제품)에서 현상 (developed)하고, 고정한 후 짐사염색(Giemsa stain)으로 대비염색하였다.
- [0189] 면역조직화학법
- [0190] 태반 샘플의 14 μ m 두께의 동결 절편을 상온에서 4% 완충 포름알데하이드에 담가 고정시켰다. 이후 절편을 블로 킹 용액(Powerblock; Zymed)에서 30분간 상온으로 반응시켰다. PBS로 세척한 후, 상기 절편을 양에서 생산되고 1:500으로 희석된 항-인간 태아 Hb 항체(베틀 라보라토리즈사(Bethyl Laboratories) 제품) 내로 옮겼다. 상온에 서 한 시간 반응시킨 후, 상기 절편을 세척하고, 당나귀(잭슨 라보라토리즈사(Jackson laboratories) 제품)에서 생산되고 1:1000으로 희석된 항-양 CY3 항체로 한 시간 반응시켰다. 이후 상기 절편을 세척하고, 0.1M Tris를 떨어뜨리고 커버슬립을 덮은 후, Leica DMA 6000 역상 현광현미경으로 관찰하였다. 사진은 Volocity software를 사용하여 찍었다.
- [0191] 결과
- [0192] 도 4는 태반 내의 Hb α , Hb γ 및 Hb β 의 실시간 PCR 정량분석 결과를 나타내고 있다. 모든 값은 β -액틴의 양으 로 표준화되었고, 산점도로 나타냈다. (A) 태반 내의 Hb α mRNA 발현. 자간전증 대 대조군 간(p=0.004), 및 자 간전증\Notch(합요를 가진 자간전증) 대 대조군 간(p=0.03)에 유의적 차이가 발견되었다. (B) Hb γ 상대적 mRNA 값은 자간전증 대 대조군 간(p=0.003), 및 자간전증\Notch 대 대조군 간(p=0.03)의 유의적 차이를 나타낸 다. (C) Hb β 는 자간전증 대 대조군 간(p=0.02), 및 자간전증\Notch 대 대조군 간(p=0.04)의 유의적 과발현을 나타낸다.
- [0193] 요약하면, Hb α (p=0.004), Hb γ (p=0.003) 및 Hb β (p=0.02)의 mRNA 수준은 대조군에 비해 자간전증 샘플에서 유 의적으로 증가된 것으로 나타났으며(도 4A, 도 4B, 도 4C), 또한 대조군과 비교하여 합요를 가진 자간전증 샘플 에서 유의적으로 증가된 것으로 나타났다(Hb α p=0.02, Hb γ p=0.03 and Hb β p=0.04). (Hb β 는 어레이 상에 표시되지 않았지만, Hb α 및 Hb γ 에서 검출된 차이로 조사되었다.)
- [0194] 도 5는 태반 및 태반상 샘플에서의 인 시튜 혼성화 결과를 보여준다. 이는 태반의 융모 절편(V), 사이에 나선 동맥(S)을 갖는 하부의 태반상 절편(M)을 보여주는 인간 태반의 이미지를 보여준다. (A) 대표적인 자간전증 태 반 샘플에서의 Hb α mRNA-발현을 보여주는 밝은 영역 이미지. Hb α 발현은 특히 혈관 내부 및 주위에서 보였다. 그러나, 융모 내부 공간에서 몇몇 산포되어 있는 세포가 또한 보여졌다. (B) 동일한 섹션의 어두운 영역 이미지. (C) 대표적인 대조군 태반에서 얻어진 Hb α mRNA 발현을 보여주는 어두운 영역 이미지. 자간전증 태반 과 비교하여 대조군 태반은 융모 내부 공간에서 더 적은 Hb α 발현-세포들을 보인다. (D) 자간 전증 환자에서 얻은 대표적인 자궁근육층 샘플의 밝은 영역 이미지. Hb α 발현은 나선 동맥에서만 보여지고, 자궁근육층 조직 에서는 발현되지 않았다. (E) 어두운 영역 상태의 동일한 자궁근육층 절편. (F) 대조군 태반에서 얻은 자궁근육 층 샘플. Hb α mRNA 발현은 자간전증의 자궁근육층에서 보인 발현량과 비슷하였다.
- [0195] 요약하면, 인 시튜 혼성화법은 자간전증 및 대조군 샘플 모두에서 융모 내부 공간에 흩어져 있는 Hb α - 및 Hb γ -발현 세포의 핵을 나타나게 한다. 자간전증 환자의 태반은 대조군 샘플보다 더 많은 Hb 함유 세포를 갖는 것으 로 나타났으며(태아 Hb), 세포당 시그널도 대조군에 비해 더 강한 것으로 나타났다. 몇몇 샘플의 연구에서, Hb- 양성 세포는, 루멘에서 몇몇 세포가 자유로이 존재하는 상태에서, 혈관벽과 관련된다. 많은 단일 세포들이 융모 내부 공간에서 발견되었다. 이들의 형태, 위치 및 분포에 기초하면, 이들은 영양막세포가 아니다.
- [0196] 도 6은 태반에서의 Hb γ 단백질 발현을 나타내는 대표적인 이미지이다. 단백질 발현은 붉은색 형광 마커로 보여 진다. 자간전증 태반에서, 혈관 루멘(lu)에서는 Hb γ 이 강하게 발현되지만, Hb γ 은 또한 혈관 내피(화살표)에서 도 발현된다(A). 그러나, 정상혈압의 대조군 태반은 혈관 루멘에서 Hb γ 를 발현하지 않았지만(B), Hb γ (즉, 유

리 태아 헤모글로빈)는 혈관 내피에서 발현되었다(화살표). 이미지의 스케일 바는 25 μ m이다.

[0197] 요약하면, Hb γ -발현은 특히 자간전증 태반 샘플 내의 혈관 루멘 내부에서 검출되었으나, 또한, 혈관벽의 내피 세포 가까이에서도 검출되었다. 대조군 태반 샘플은 혈관 내피에서 Hb γ -발현을 보였으나, 혈관 루멘에서는 발현되지 않았다.

[0198] 토의

[0199] 정량적 RT-PCR은 대조군에 비해 자간전증에서 Hb α 및 Hb γ mRNA의 증가된 발현을 보여주었다. 인 시류 혼성화는 대조군 대상자에 비해 자간전증 대상자에서 얻은 태반 샘플에서 Hb를 발현하는 세포 수가 증가하는 것을 보여주었다. Hb 발현 세포가 혈관벽과 연관되어 위치한다는 사실은 상기 세포가 혈관의 내부 또는 외부로 이동하거나 이러한 세포의 혈관벽 상의 결합 부위에 존재함을 의미한다. 자궁근육층 혈관은 태반 혈관에 비해 Hb mRNA를 발현하는 핵을 갖는 세포가 거의 없다는 사실은, 이들 세포가 모체의 기관을 형성하지 않는다는 것을 암시한다. (태아) Hb γ mRNA가 태반 Hb-양성 세포뿐만 아니라, 자궁근육층의 혈관 루멘 내의 더 적은 수의 Hb 발현 세포에 존재한다는 본 발명자들의 발견은 태아 세포가 자간전증 태반 및 혈액에서 보여지는 증가된 Hb 발현을 야기시키는 것임을 시사한다.

[0200] 전술한 태아 Hb-생산 세포가 빠르게 턴오버(turn over)된다면, 이들은 높은 수준의 헴을 용모-외부 공간 및 태반 혈관 내부로 방출할 수 있다. 실제로, 본 발명의 면역조직화학법은 자간전증 태반 혈관 루멘에서 높은 수준의 헤모글로빈을 보인다. 반면에 대조군 태반은 혈관 내부로의 헤모글로빈 방출을 보이지 않았다. 공교롭게도, 자간전증 태반의 피사 부분 및 혈전 부분에서의 용혈은 여기에 유리 헴의 양을 더하는 것으로 보인다.

[0201] 유리 헴은 활성 산소종(ROS)의 생성을 통해 심각한 손상을 일으키는 강력한 레독스제이다. 헴은 LDL(low-density lipoproteins)을 포함하는 몇몇 지질을 산화시키고, 이들을 내피세포 손상을 일으키는 세포독성 퍼옥사이드로 전환시킨다. 또한, 헴은 세포막을 파괴하고 막단백질을 산화시켜 막 투과성 및 세포용해를 증가시킴으로써 세포를 직접적으로 손상시킬 수 있다.

[0202] 그러므로, 많은 수의 Hb 양성 세포에 의한 태반의 침윤은 근심스런 신호이다. 이러한 세포들로부터의 헴 방출은 매우 해로울 수 있으며, 자간전증과 관련된 태반 병리학의 많은 부분을 초래할 수 있다.

[0203] 결론적으로, 이론에 얽매는 것을 원치 않지만, 본 발명의 결과는 자간전증 태반에서 세포의 소집단에서 Hb 유전자가 과발현됨을 시사한다. 감소된 관류 및 가능한 국소적 저산소 상태에 반응하는 태반 세포에 의한 조혈을 자극하는 생산 체제는 상기 세포의 형성, 모집 및 분산에 기여할 수 있다. 이들이 정상 임산부 대상자의 태반에도 존재하는 것으로 보여지지만, 자간전증 환자 태반에서의 증가가 문제가 되는 것이다. 이들이 빠르게 턴오버되고 이들의 Hb(및 헴)이 과대하게 방출된다면, 이들은 혈관 내피를 포함하는 인접 구조를 손상시킬 수 있다.

[0204] 실시예 2. 모체 혈액에서의 태아 Hb 검출

[0205] 정량적 RT-PCR을 수행하여 자간전증 환자의 혈액 샘플에서 Hb γ mRNA를 분석하였다.

[0206] 실시간 PCR

[0207] QIAamp Viral RNA mini kit(퀴아젠사(Qiagen) 제품)를 사용하여 설명서에 따라 RNA를 추출하였다. 간단하게, 튜브를 10번 거꾸로 뒤집는 방식으로 3.6 ml의 AVL 버퍼를 36 μ l의 캐리어-RNA(퀴아젠사 제품)와 혼합하였다. 1 ml의 혈장 샘플은 1150g에서 10분간 회전시켰다. 900 μ l의 혈장 및 3.6 μ l의 99% 에탄올을 AVL 버퍼에 첨가하였다. 상기 용액 650 μ l를 QIAamp column에 넣은 후, 6000g에서 1 분간 회전시켰다. 이는 전체 혈장 부피가 컬럼에 넣어질 때까지 반복되었다. 컬럼을 AW1 버퍼로 한번 세척한 후, 6000g에서 1 분간 회전시키고, AW2 버퍼로 세척한 이후, 20,000g에서 3 분간 회전시켰다. RNA는 50 μ l의 RNase가 없는 물로 용출시켰다.

[0208] 태아 Hb RNA가 실시간 PCR로 정량화되었다.

[0209] 결과

[0210] 도 7은 자간전증을 갖는 여성에서 분만 전에 얻어진 모체 혈장에서의 태아 Hb γ mRNA 수준을 실시간 PCR로 정량화한 산점도를 보여준다. 상기 플롯은 왼쪽 축 상의 Ct 값을 나타내며, 샘플 내의 Hb γ mRNA 수준의 양에 대한 측정값을 제공한다. 이는 모체 혈액 내에서의 헤모글로빈 γ 의 단백질 수준뿐만 아니라 RNA의 양도 측정가능함을 보여주는 것이다.

[0211] 실시예 3.

[0212] 2D-겔 전기영동을 이용한 자간전증 태반의 단백질 발현 프로파일링

[0213] 대조군 태반과 비교하여 자간전증 태반에서 다르게 발현되는 단백질을 스크린하기 위해, 본 발명자들은 자간전증을 가진 여성(n=30) 및 건강한 대조군(n=30)에서 분만시 태반 샘플을 수집하였다. 본 발명자들은 프로테오믹스 테크놀로지(2-차원 겔 전기영동)를 이용하여 다른 태반 샘플에서의 헤모글로빈 델타(Hb δ) 발현 수준을 비교하였다.

[0214] 환자 및 샘플 수집

[0215] 산부인과(Lund University Hospital)를 방문한 60명이 포함되었으며, 두 그룹으로 나누었다; 자간전증(n=30) 및 대조군(n=30)(표 2). 자간전증은 혈압>140/90 mmHg 및 단백뇨 >0.3 g/ℓ로 판별하거나 임신 첫 3개월에서 20 mmHg 이상의 혈압이 올라가는지로 판별하였다. 태반이 제거된 직후, 10×10×10 mm 입방체 크기의 태반 조직을 채취하였다. 샘플은 즉시 드라이아이스 상에서 동결시켜 -80℃에서 저장하였다. 다른 전신성 질환을 갖는 환자는 본 연구에서 배제되었다. 상기 연구는 인간 대상자의 연구 목적임을 Ethical Committee Review Board로부터 승인받았으며, 모든 여성은 서면 동의서를 제출하였다.

표 2

[0216]

	대조군	자간전증
수(n)	30	30 ns
모체 나이(년)	31.7±5.2	30.9±5.3 ns
임신주수(일수)	271.3±10.8	266.6±11.2 ns
수축기압(mmHg)	116.3±11.3	149.8±12.1 †
확장기압(mmHg)	67.3±4.4	103.3±7.9 †
단백뇨(g/ℓ)	ND	1.4±2.0 †
태반 무게(g)	686.8±144.8	630.9±128.0 ns
ND = 검출되지 않음		
ns- 그룹 간에 유의적 차이 없음		
†Mann-Whitney 테스트는 그룹 간에서 P<0.0001의 유의성을 보여줌		

[0217] 단백질 추출

[0218] 단백질은 Trizol(등록상표)(인비트로젠사 제품)을 사용하여 설명서에 따라 추출하였다. 간단하게, 태반 조직을 얼음 상의 트리졸(Trizol) 내에서 파쇄(homogenize)시킨 후, 4℃에서 12000g로 10분간 원심분리하였다. 클로로포름을 사용하여 단백질 분획을 분리하고 2-프로판올을 사용하여 침전시켰다. 상기 단백질 펠렛은 1.5 ml의 0.3M 구아니딘 하이드로-클로라이드로 세 번 세척하고 1.5 ml의 75% 에탄올로 한 번 세척하였다. 펠렛은 0.8M 요소 및 2% CHAPS로 녹이고, 분광학적 방법을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 단백질은 사용 때까지 -20℃에 저장하였다.

[0219] 단백질 침전

[0220] 등전점(isoelectric focusing, IEF) 분석에 앞서, 샘플은 단백질 분해효소를 불활성화시키고, 염과 간섭 물질을 제거하기 위해 아세톤으로 침전시켰다. 각 태반에서 추출된 단백질, 400 μg을 최종 농도가 80% 아세톤이 되도록 차가운 아세톤과 혼합하였다. 샘플을 -20℃에서 한 시간 동안 방치한 후, 9000×g로 2분간 원심분리하였다. 상기 아세톤을 제거하고 단백질 펠렛을 공기 건조하였다.

[0221] 2차원 겔 전기영동

[0222] Immobiline Dry strips(180×3×0.5 mm, pH 3-10 NL, 지이 헬스케어 라이프 사이언스사(GE Healthcare Life Sciences) 제품)을 350 μℓ의 가용화 용액(8 M 요소, 2% CHAPS, 10 mM DTT 및 2% IPG 3-10 버퍼를 포함)에서 400 또는 800 μg 샘플과 함께 상온에서 밤새 재수화시켰다(rehydrate). 상기 IEF 단계를 Multiphor II를 사용하여 하기 스케줄에 따라 20℃에서 수행하였다: (1) 150 V로 1시간 동안, (2) 300 V로 3시간 동안, (3) 3000 V로 60000 vhr이 될 때까지. 상기 스트립은 65 mM DTT, 6 M 요소, 30%(w/v) 글리세롤, 2%(w/v) SDS 및 50 mM Tris-HCl pH 8.8을 포함하는 용액으로 10분간 평형화시켰다. 두 번째 평형 단계는 DTT가 제거되고 대신 259 mM 아이오도아세트아마이드를 포함하는 용액으로 10분간 수행하였다. 상기 스트립을 2차원 직전에 전기영동 버퍼

(24 mM Tris base, 0.2 M 글라이신 및 0.1% SDS)에 담갔다. 상기 스트립을 12.5% 균질 듀라크릴 슬라브겔(homogeneous Duracryl slabgel)(240×190×1mm, 또는 290×245×1mm)에 적용하였다. 상기 스트립은 전기영동 버퍼에 녹인 1% 아가로즈 용액으로 발랐다(60℃로 유지). 전기영동은 Hoefer DALT 겔 기구(미국 캘리포니아주의 샌프란시스코시에 소재한 아머삼 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)사 제품)을 사용하여 20℃에서 정전압 80 V로 19시간 동안 수행하거나, 상기와 같은 전기영동 버퍼를 사용하는 겔 기구를 사용하여 20℃에서 18 mA로 염료(dye)가 전면에서 겔의 바닥에 도달할 때까지 실행하였다. 상기 실행 시간은 약 17시간이었다.

[0223] 겔 염색

[0224] 겔은 실버 염색하였고, 염색 후에 상기 겔은 겔 드라이어(Slab gel Dryer SGD2000, Savant)를 사용하여 건조시켰다.

[0225] 스팟 분석

[0226] 겔은 CanoScan 9950F(Canon)를 사용하여 스캔하였다. 스팟 분석은 PDQUEST(version 7.1.0) 2-차원 겔 분석 시스템(two-dimensional gel analysis system)(Bio-Rad discovery series; 스웨덴 선비버그시에 소재한 바이오-라드 라보라토리즈사 제품)을 이용하여 수행되었다.

[0227] 질량분석 동정

[0228] 관심 스팟을 0.5 ml Milli-Q water로 한 시간 동안 세척한 후, 25 mM 탄산수소암모늄에 용해된 0.5 ml의 40% 아세트로나이트릴(ACN)으로 30분씩 4번 세척하였다. 단백질을 25 mM 탄산수소암모늄 내에 용해시킨 트립신(서열결정 등급; 프로메가사(Promega) 제품)으로 특징적 절편으로 분해(digestion)시키기 전에 겔 조각을 SpeedVac concentrator에서 37℃에서 밤새 건조시켰다. 분해는 20 μ l의 2% 트리플루오로 아세트산을 첨가하여 종결시키고, 또한 겔에서 펩티드를 추출하였다. 상온에서 2시간 방치 후, C18 Ziptips(밀리포아사(Millipore) 제품)를 사용하여 상기 펩티드를 분해 버퍼로부터 정제하였다. 간단하게, 2×10 μ l의 50% ACN, 0.1% TFA(Milli-Q water에 녹인)를 사용하여 상기 고상을 조성하였다. 상기 유기 용매를 10 μ l의 0.1% TFA로 두 번 씻어 세척하여 제거하였다. 상기 샘플을 여러번 흡인했다가 배출하고 0.1% TFA로 두 번 세척하여 염과 비결합된 물질을 제거하였다. 상기 정제된 펩티드는 0.7 μ l의 매트릭스, 2.5-다이하이드록시벤조산(30% ACN에 용해된 3 mg/ml 농도)이 첨가된 샘플 표적 상으로 직접적으로 용출시켰다. 양전하를 띤 이온의 질량 스펙트럼이 리플렉터 모드에서 작동된 Bruker Reflex III instrument(Bruker Daltonik)에 기록되었다. 각 샘플에서 총 160~210 싱글 샷(single shot) 스펙트럼이 축적되었다. 제조사에서 제공하는 XMASS 5.0 및 MS Biotools software packages가 데이터 프로세싱을 위해 이용되었다. 트립신으로 인한 자가 단백질분해 산물은 내부적 교정을 위해 사용되었다.

[0229] MS/MS 분석

[0230] 각각의 펩티드 추출물로부터, 0.5 μ l를 스테인리스 강제 MALDI 표적 상에 직접 떨어뜨리고, 건조되도록 두었다. 0.5 μ l의 매트릭스 용액(5 mg/ml의 α -시아노-4-하이드록시 신남산, 50% 아세트로나이트릴, 0.1% TFA 및 50 mM 시트릭산을 함유)을 첨가하고, 건조되도록 하였다. MALDI-TOF-MS 및 MS/MS 스펙트럼은 4700 Proteomics Analyzer(어플라이드 바이오시스템즈사 제품, Framingham, CA, USA) 질량분석기를 사용하여 양성 리플렉터 모드에서 얻어졌다. 상기에서 얻어진 MS 스펙트럼은 두 개의 트립신 자가 단백질 분해 펩티드를 사용하여 m/z 값 842.51 및 2211.097로 내부적으로 교정하였다. 단백질 동정은 GPS Explorer software를 사용하고, NCBI 비-중복 데이터베이스를 검색하는 사내의 Mascot search engine(Matrix Science, London, UK){Perkins, 1999 #132}으로 수행하였다. 검색시 특정된 파라미터는 다음과 같다: 분류군, 포유류; 결손 분할(missed cleavages), 1; 펩티드 질량 허용오차(peptide mass tolerance), +/-30ppm; 조각 이온 질량 허용오차(fragment ion mass tolerance, +/-0.15Da); 가변성 변형(variable modifications), 없음.

[0231] 데이터베이스 검색

[0232] 단백질 동정을 위해, ProFound Peptide Mapping(version 4.10.5, The Rockefeller University Edition) 및 Mascot Software(Matrix Science Ltd)를 사용하여 NCBI 데이터베이스 내에서 인간 단백질 서열을 검색하였다.

[0233] 웨스턴 블롯

[0234] 설명서에 따라 12% Bis-Tris 겔(미국의 인비트로젠사 제품) 상에서 웨스턴 블롯을 실행하였다. 간단하게, 2.5 ml LDS 샘플 버퍼를 갖는 20 μ g의 단백질을 겔 상에서 로드하고, 1×MOPS 러닝 버퍼 내에서 200 V로 50분 동안 실행하였다. 전기영동된 겔을 PDVF 멤브레인(미국의 바이오-라드(Bio-Rad)사 제품) 상으로 30V로 1시간 동안 블롯팅하고, 그 이후 상기 멤브레인을 0.1% Tween20(등록상표)(미국 오하이오주에 소재한 ICN Biomedichals Inc.

제품) 및 2% 드라이 밀크(미국의 바이오-라드사 제품)를 함유하는 TBS(Tris Buffered Saline)로 4℃에서 밤새 방치시켰다.

[0235] 상기 블롯을 1차 마우스 단일클론성 IgG1 항체(항-인간-Hb γ (2% 드라이 밀크가 함유된 TBS-T로 1:8000 희석)(Nordic Biosite AB, Sweden)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 이후 상기 멤브레인을 TBS-T로 15분간 한번 세척하고, TBS-T로 5분씩 3번 세척하였다. 세척 후, 블롯을 고트 항-마우스 IgG1-HRP 2차 항체(TBS-T로 1:5000 희석)(SDS Santa Cruz Biotechnology, USA)로 1시간 동안 배양하였다. 그 이후 상기 멤브레인을 상기와 같이 세척하였다. 그 다음으로, 상기 멤브레인을 Enhanced chemiluminescence ECL+(영국의 지이 헬스케어 바이오사이언스사 제품)로 3분간 노출시켰다. 만족스런 노출 결과를 얻기 위해 방사성 필름(Hyperfilm ECL; 미국 아머샴사 제품)을 1분간 블롯에 적용시켰다.

[0236] RNA 추출

[0237] 전체 RNA는 RNEasy(키아젠사 제품)를 사용하여 설명서에 따라 상기와 동일한 환자에서 얻어진 10 개의 자간전증-샘플 및 10 개의 대조군-샘플에서 추출하였다. 간단하게, 태반 샘플은 TissueLyzer를 사용하여 RNEasy 용출 버퍼(RLT 버퍼 및 β -머크캡토에탄올)(키아젠사 제품) 내에서 파쇄시켰다. 샘플을 70% 에탄올로 침전시킨 후, 제조사의 프로토콜에 따라, RNEasy 미니 컬럼을 사용하여 분리하였다. 샘플은 50 μ l의 RNase가 제거된 물로 용출시켰다.

[0238] 실시간 PCR(상기와 같음)

[0239] 제조사의 프로토콜(어플라이드 바이오시스템즈사 제품)에 따라 역전사효소(reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 간단하게, 50 μ l 반응혼합물(0.5 μ g 전체 RNA, 1X TaqMan RT 버퍼, 5.5mM MgCl₂, 500 μ M dNTPs, 2.5 μ M 랜덤 헥사머(random hexamers), 0.4 U/ μ l RNase 저해제 및 1.25 U/ μ l MultiScribe 역전사효소)을 사용하였다. 상기 반응물은 25℃(10분), 48℃(30분) 및 마지막으로 95℃(5분)에서 반응시켰다. 샘플은 분석 때까지 -20℃에서 저장하였다.

[0240] 획득된 유전자 전사체는 ABI PRISM(등록상표) 7000 서열 검출 시스템(어플라이드 바이오시스템즈사 제품)을 사용하여 실시간 PCR 방법으로 정량화하였다. TF(assay ID: Hs00169070_m1) 및 Hb δ (assay ID: Hs00426283_m1)에 대한 프라이머 및 프로브는 Assays onDesign/Demand(상표명)(어플라이드 바이오시스템즈사 제품)에 주문하였다. 상기 프라이머는 오염성 게놈 DNA를 증폭하는 것을 피하기 위해 적어도 하나의 엑손 경계를 포함시켰다. 반응은 최종 농도: 1X 유니버설 PCR 마스터 믹스(어플라이드 바이오시스템즈사 제품), 0.25 μ mol/l 프로브, 0.9 μ mol/l의 순방향 및 역방향 프라이머 각각, 및 2.2 μ l의 DNA 분획물을 포함하는 25 μ l의 최종 부피에서 수행되었다. 온도 사이클링은 50℃에서 2분간 UNG 활성화 및 95℃에서 10분간 초기 변성화에 의해 개시되었다. 이후 40 사이클을 진행했다: 95℃에서 15초, 60℃에서 1분. 주형을 갖지 않는 음성 대조군을 증폭의 각 세트에 포함시켰다. β -액틴을 각 샘플에서 나오는 신호를 표준화하기 위한 참고값으로 사용하였다. 주형 DNA의 순차적인 4배 희석액(0.08~80ng)을 사용하여 검정 곡선을 만들어 정량분석을 수행하였다. 결과값은 공통 요소인 β -액틴과의 비율로서 나타냈다.

[0241] 인 시튜 혼성화(상기와 같음)

[0242] 인 시튜 혼성화는 18 개의 자간전증 샘플 및 19개의 대조군 샘플에 대해 수행되었다. 동결절편은 염처리된 슬라이드 상에서 녹여 마운팅한 후, 사용 전까지 -80℃에서 저장하였다. mRNA 검출을 최대화하기 위해 신선한 동결 조직을 사용하였다. 절편은 고정, 탈수, 탈지질 및 혼성화하였다.

[0243] 혼성화는 80 μ l의 혼성화 버퍼(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA(pH 8.0), 300mM NaCl, 50% 포름아마이드, 10% 텍스트란 설페이트, 1×Denhardt's 25 mg/ml 효모 tRNA, 100 μ g/ml 연어 정자 DNA, 250 μ g/ml 전체 이스트 RNA(fraction XI, 시그마사 제품), 150 mM DTT, 0.15% NTS 및 0.15% SDS) 당 2×10^6 cpm의 변성된 35S-cRNA 프로브를 사용하여 55℃에서 20~24시간 동안 수행하였다. 슬라이드를 세척한 후 2일간 Kodak Hyperfilm Biomax MR에 덧붙여 놓았으며, 그 이후 이들을 핵 트랙 에멀전(nuclear track emulsion)(NTB-3, 코닥사 제품)으로 코팅하였다. 슬라이드는 4℃에서 4주간 노출시키고 나서, 이것을 Dektol(코닥사 제품)에서 현상하고, 고정한 후 짐사염색으로 대비염색하였다.

[0244] 결과

[0245] 자간전증 환자와 건강한 대조군 간의 단백질 발현 차이를 연구하기 위해 상기 추출된 태반 단백질을 2D-PAGE로 분리하였다. 첫 번째 실험 셋업에서, 400 μ g의 샘플을 IPG-스트립에 로드하고, Hoefer DALT 겔 기기(gel

apparatus)를 사용하여 2차원을 러닝하였다. 두 그룹 간에 단지 하나의 스팟만 유의적으로 다르게 나타났다. 스팟을 동정하기 위해 800 μ g의 샘플을 겔에 로드하고, 두 개의 자간전증 및 두 개의 대조군 샘플, 네 개 샘플 전체를 러닝하였다. 정성분석을 위해 2차원으로 러닝하였다. 그렇게 하는 동안, 자간전증 샘플에서 두 번째로 다르게 발현되는 스팟이 육안으로 관찰되었다(도 8). 관심 있는 두 개 단백질 스팟을 겔에서 떼어내어, 효소적으로 분해시키고 MALDI-TOF MS를 사용하여 동정하였다. 첫 번째 단백질은 트랜스페린으로, 두 번째 단백질은 헤모글로빈으로 규명되었다.

[0246] MALDI 데이터로 헤모글로빈의 하위분류를 알아내는 것은 불가능하다. 그러므로 이 스팟을 추가적으로 MS-MS분석을 이용하여 서열분석하였다. 상기 MS-MS 데이터는 얻어진 서열이 헤모글로빈의 델타 사슬(Hb δ)에 속한다는 것을 보여주었다. 단백질-분석과 일치하게도, 실시간 PCR도 대조군에 비해 자간전증 태반(p=0.04)에서 Hb δ 가 유의적으로 증가된 유전자 발현을 나타냈다(도 9).

[0247] 인 시류 혼성화는 용모 내부 공간 도처에서 Hb δ mRNA를 발현하는 단일 세포들을 보여주었다. Hb δ mRNA 발현 세포는 특히 태반 혈관의 내부 및 주위에서 발견되었다. 자간전증 태반은 대조군 보다 혈관 외부에 Hb δ mRNA를 발현하는 흩어져 있는 세포들을 더욱 많이 갖는 것으로 보여졌다. 영양막 세포들에서는 아무것도 검출되지 않았다. 상기 Hb δ 발현 세포들의 세포 형태는 실버 그레인을 양성 세포에 처리하여 밝혀냈다(도 10).

[0248] 토의

[0249] 본 발명자들의 현재 발견은, 자간전증에서 Hb δ -단백질의 증가된 발현 및 대응하는 유전자 발현을 본원에서 입증함으로써, 태반 조혈을 지지한다.

[0250] 태반에서, 증가된 Hb δ mRNA 수준은 단백질로 번역되고 이는 본원에서 자간전증 태반에 축적되는 것으로 보인다. 그러나, 생성된 Hb 사슬이 포르피린링과 철-이온을 결합시키는 기능적 Hb 분자로 배열되는지는 확실하지 않다. 철의 수송 및 세포적 섭취는 트랜스페린(TF)에 의해 촉진된다. 본 발명의 2D-겔은 또한 자간전증 태반이 세포내 TF가 제거되는 것을 보여준다. 자간전증 태반에서의 TF 단백질 결여는 Hb δ 를 발현하는 세포 집단으로의 손상된 철 수송에 영향을 미칠 것이다. 이에, Hb 생산 세포는 그러므로 그들의 철 공급이 결여되어 자간전증 태반에서 Hb 사슬 및/또는 기능장애가 있는 Hb 분자의 축적을 야기할 수 있다. 흥미롭게도, 대조군 태반에서는 인 시류 혼성화가 Hb δ 에 대한 mRNA 발현을 보였음에도, 헤모글로빈 축적이 전혀 없었다. 건강한 태반은 자간전증 태반과는 반대로, mRNA 번역, 단백질 분해의 조절에 의하거나, 조혈작용의 끝수외 부분을 형성하는 것에 의해 Hb의 생산이 조절될 수 있다. Hb 합성의 결여는 적혈구를 결핍시킬 수 있고, 이는 저항력이 감소되고 쉽게 떨어져 더 많은 유리 Hb를 초래한다.

[0251] 실시예 4

[0252] HLA-DPA1 RNA 발현 검출

[0253] 샘플 수집; 조직 샘플링 및 취급방법; RNA 추출; 및 실시간 PCR 증폭을 실시예 1에 기재된 대로 필요한 변경을 가하여 수행하였다.

[0254] 결과

[0255] 주요한 조직적합성 복합체(histocompatibility complex), 클래스 II, DP 알파1(HLA-DPA1)은 모든 다른 그룹에 비해 함량을 가진 그룹에서 유의적으로 상향조절되었다(함요가 없는 자간전증에 대한 p = 0.01, 함요가 있는 자간전증에 대한 p = 0.02, 및 대조군에 대한 p = 0.01)(도 4D 참조).

[0256] 토의

[0257] 함요를 가진 것으로 진단된 여성은 임신 이후 자간전증 발병 위험이 높다. 그러나, 함요를 가진 모든 여성이 자간전증을 발병하지 않는다는 사실은 그들이 보호 유전자를 발현하거나 그들에게 손상을 가하는 유전자를 억제할 수 있음을 암시한다. 마이크로어레이 및 qPCR 모두 모든 다른 그룹에 비해, 함요 그룹에서 HLA-DPA1의 증가된 발현을 나타냈다. HLA-DPA1는 적합한 면역 반응의 일부로서 외래 항원을 제공하는 역할을 하는 구성원인, 제2급의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 패밀리아이다. 단지 제1급의 MHC 분자인, HLA 타입G 및 E1이 영양막 세포 상에 발현하였다. 이들은 태아-모체 경계에서 모체의 면역 반응을 변형시켜 모체의 면역 반응으로부터 태아를 보호하는 것으로 생각된다. 그러므로, 제2급의 MHC 분자인 HLA-DPA1은 양양막에 의해 형성되지 않을 것이다. 대신에, 이것은 태반 내의 태아 세포 존재에 대한 모체의 반응일 것이다.

[0258] 태아 세포는 임신 동안 모체의 순환계로 들어가는 것으로 알려져 있으며, 태반벽을 통과하여 모체 시스템 내로

의 태반 세포의 지속적인 유입을 수반하는 정상 임신 과정에서 이들의 수준은 증가하였다. 자간전증에서, 모체 순환계 내의 태반 세포의 수는 정상혈압의 임신부에 비해 증가되었다. 상기에서 기재했듯이, 상기 함요 그룹에서 HLA-DPA1의 증가된 발현은 모체의 면역 반응이 태반, 특히 그곳의 태아 세포 내의 "외래" 항원과 반응할 수 있음을 시사한다. 그러므로, HLA-DPA1은 세포를 동정하여 파괴되는 것들에 표지를 함으로써, 태아 세포가 모체 계로 유입되는 것을 방지하는 면역학적 장벽의 구축에 기여할 수 있다. 본 발명자들의 실험에서 보여진 Hb-발현 세포는 태아 기원을 형성할 것이며, HLA-DPA1는 또한 이들 세포가 태반 내로 새나가는 것을 막아, 헤모글로빈 및 유리 헤스의 과도한 생산으로부터 태반을 보호할 수 있다.

[0259] 실시예 5

[0260] **혈장 및 뇨에서 헤모글로빈 및 α_1 -마이크로글로불린 농도, α_1 -마이크로글로불린에 의한 산화 및 시험관내 태반 관류**

[0261] 재료 및 방법

[0262] 헤모글로빈

[0263] 헤모글로빈은 시그마사에서 구입하였다. 산화헤모글로빈-A는 본 발명자들의 실험실에서 하기와 같이 준비하였다. 50 ml의 인간 혈액을 원심분리(1200×g, 10분)하여 적혈구를 분리하고, 10 배 부피의 PBS(phosphate buffered saline, 10 mM 포스페이트, pH 7.4; 120 mM NaCl 및 3 mM KCl)로 4번 세척하였다. 다음으로 상기 혈구 세포를 얼음 상에서 저장 완충액(20 부피 H₂O : 1 부피 PBS)에서 현탁하여 용해시켰다. 원심 분리(14000×g, 20분)를 통해 세포질로부터 막을 분리하고, 상등액을 4℃에서 15mM Tris-HCl, pH 8.0으로 3번 투석시켰다. DEAE-Sephadex A-50(스웨덴 업살라시에 소재한 아머샴 바이오사이언시스 아메사(Amersham Biosciences AB) 제품) 200 ml를 컬럼 안에 채우고, 상기 투석된 상등액을 겔에 적용하고 15 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 15 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0.2 M NaCl로 구성된 농도 구배로 분리시켰다. 분획을 수집하고 흡광도를 280 nm, 577 nm 및 630 nm에서 측정하여 산화헤모글로빈-A 농도를 측정하고 확인했다. 산화헤모글로빈 F는 동일한 프로토콜을 사용하여 인간 제대혈에서 준비하였다.

[0264] 단백질 및 항체

[0265] 제조합 인간 α_1 -마이크로글로불린(α_{1m})을 문헌[Kwasek et al., 2007]에 기재된 대로 대장균에서 발현시키고, 정제 및 재폴딩시켰다. 래빗 항-마우스 면역글로불린, 래빗 항-헤모글로빈 및 돼지 항-래빗 면역글로불린-알칼라인 포스파타제(ALP)는 Dako(Denmark)에서 구입하였다. 마우스 단일클론성 항-헤모글로빈 감마 사슬 항체는 Santa Cruz Biotechnologies Inc(cat no. sc-21756)에서 구입하였다. 래빗 항-인간 α_{1m} 및 고트 항-래빗 면역글로불린은 각각 문헌[Elbashir et al. 1990] 및 [Bjorck et al. 1977]에 기술된 대로 제조되었다. 인간 α_{1m} (BN11.10)에 대한 단일클론성 마우스 항체는 문헌[Babiker-Mohamed et al., 1991]에 기술된 대로 제조되었다.

[0266] 요오드에 의한 표지

[0267] 클로라민-T 방법[Greenwood et al, 1963]을 사용하여 단백질을 ¹²⁵I(스웨덴 스톡홀름시에 소재한 바이오-뉴클리어 아메(Bio-Nuclear AB)사 제품)로 표지하였다. 상기 표지된 단백질을 Sephadex G-25 컬럼(PD-10, 지이 헬스 케어사 제품) 상에서 겔 여과하여 유리 요오드와 분리하였다. 상기 특이 활성은 α_{1m} 에 대해 μ g 단백질 당 약 0.3MBq이고, 면역글로불린에 대해 μ g 단백질 당 0.5MBq였다.

[0268] 환자 및 샘플링

[0269] 태반 및 혈액 샘플은 Lund University Hospital을 방문한 여성으로부터 수집하였다(30명의 대조군, 30명의 자간전증). 상기 샘플링은 서면 동의하에 수행되었으며, Swedish Ethical Committee Review Board로부터 승인받았다. 자간전증은 혈압>140/90 mmHg 및 단백뇨 >0.3 g/l 로 판별하였다(Milne, 2005 #89). 자간전증이 없으면서 함요를 가진 그룹 중에 양쪽성 함요를 가진 환자만을 샘플링하였다. 분만 직후 10×10×10 mm 입방체 크기의 용모 조직을 떼어내고 즉시 드라이아이스 위에 두었다. 샘플은 사용 때까지 -80℃에서 저장하였다. 분만 전에 혈액 샘플을 채취하고 사용 때까지 Paxgene Blood RNA System(미국 발렌시아에 소재한 쿼겐사 제품)을 사용하여 -20℃에서 저장하였다. 이들 그룹의 다양한 파라미터를 표 2에 기재하였다. 또한, 탄자니아 연구(Tanzania study)의 10명 환자 및 10명 대조군 대상자의 샘플이 실시예 5에서 조사되었다(표 1 참조).

[0270] ELISA

- [0271] 헤모글로빈-A 농도는 고상 방사성 면역분석법(solid phase radioimmunoassay, SPRIA)을 위한 경쟁적 ELISA를 사용하여 측정될 수 있으며, 사용 버퍼, 세척 방법 및 반응 시간은 문헌[Nilson et al., 1986]에 기술되어 있다. 헤모글로빈(시그마사 제품)을 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅되도록 하고, 플레이트를 세척하고, 래빗 항-헤모글로빈과 표준 산화헤모글로빈-A 또는 언노운 샘플 중 하나와의 혼합물을 처리하여 반응시키고, 세척한 후, 돼지-항-래빗 IgG-ALP(Dako)을 처리하여 반응시키고, 세척한 후, 마지막으로 기질과 함께 반응시켰다. 각 단계의 적절한 희석 물과 반응액은 별도로 적정하였다. 흡광도는 415 nm (Bio-Rad Model 550, Microplate reader)에서 측정하였다. 각 배양 단계에 사용한 부피는 100 μl 였다. 모든 실험은 3개씩(triplicates) 수행하였다.
- [0272] RIA
- [0273] $\alpha_1\text{m}$ 농도는 문헌[Plesner et al. 1975; Akerstrom, 1985]에 기재된 대로 RIA(radioimmunoassay)로 측정되었다. 간단하게, 인간 $\alpha_1\text{m}$ 에 대한 고트 항혈청(0.2 ml, 1:6000으로 희석)을 ^{125}I -표지된 $\alpha_1\text{m}$ (0.1 ml, 약 0.05 pg/ml)과 미지의 샘플 또는 표준 $\alpha_1\text{m}$ -농도액(0.2 ml)과 혼합하였다. 상기 희석은 0.1M 인산나트륨, pH 7.5 + 0.1 % BSA(RIA 버퍼)로 수행했다. 상온에서 밤새 배양한 후, 0.3 ml의 소 혈청, 1.6 ml의 15% 폴리에틸렌 글리콜(RIA-버퍼에 녹인)을 첨가하고, 1500×G로 40분간 원심분리하여 항체-결합된 $\alpha_1\text{m}$ 을 침전시키고, Wallac Wizard 1470 gamma counter(Perkin Elmer Life Sciences)로 펠렛의 ^{125}I -활성을 분석하였다.
- [0274] Hb-F 농도의 결정
- [0275] 헤모글로빈 F의 혈장 농도는 Montage Albumin Deplete Kit(카탈로그 번호. LSKAD0024; 밀리포아사 제품)를 사용하여 혈장 알부민을 제거한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 결정하였다. 간단하게, 10개 컬럼에서 획득된 비드를 하나의 배취(batch)에 혼주시키고(pooled), PBS로 세척한 후, 50개의 동일한 분획물로 나누었다. 원심분리 후, 각 분획물의 상등액을 따라버리고 40 μl 의 혈장(PBS로 1:1 희석된)을 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 2회 배양시켰다. 상기 튜브를 원심분리하여 상등액을 모으고, 상기 비드는 순차적으로 1 ml 0.1M 글라이신-HCl, pH 2.3 및 1 ml 0.1M Tris-HCl, pH 8로 세척하였다. 원심분리하고 상등액을 제거한 후, 상기 혈장을 첨가하고 상온에서 1시간 동안 다시 반응시켰다. 원심분리하고 펠렛을 버린 후, 이렇게 알부민-제거된 혈장 10 μl 을 SDS-PAGE(T=13.5%; C=3.3%)로 분리하고, 600x로 희석된 마우스 항-인간 Hb-F/ γ -사슬, 다음으로 래빗 항-마우스 Ig(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 ^{125}I -표지된 고트 항-래빗 IgG를 처리하여 하기에 기술된 대로 블롯팅하였다. 헤모글로빈 F의 정량화는 Image Gauge V4.0 software(Fuji, Tokyo, Japan) 및 표준 헤모글로빈 F(15 및 75 ng/웰)을 이용하여 양성 밴드의 밀도로 측정될 수 있다. 헤모글로빈 F의 노 농도는 동일한 프로토콜을 사용하여 측정하였으나, Montage Albumin Deplete Kit를 사용하는 단계는 생략하였다.
- [0276] 웨스턴 블롯팅
- [0277] SDS-PAGE(T=12%, C=3.3%)를 문헌[Laemmli, 1970]에 기재된 대로 수행하였다. 겔은 고분자량의 표준액(Rainbow markers; 영국 버밍엄셔주에 소재한 아머샴 바이오사이언시스사 제품)을 사용하여 환원 조건에서 러닝하였다. 문헌[Matsudaira, 1987]에 기재된 대로, 분리된 단백질을 PVDF(polyvinylidenedifluoride) 멤브레인(Immobilon; 미국 매사추세츠주 베드포드시에 소재한 밀리포아사 제품)으로 트랜스퍼하였다. 이후 문헌[Wester et al. (1997)]에 이미 기술되었듯이, 상기 멤브레인을 적절한 항체와 반응시키고 ^{125}I -표지된 2차 고트 항-래빗 면역글로불린을 사용하고, 상기 멤브레인 상의 이미지를 Fuji FLA 3000 phosphoimaging system(스웨덴 스톡홀름시에 소재한 후지필름 스웨덴 아베(Fujifilm Sweden AB)사 제품)으로 현상하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0278] 태반 조직 추출 및 $\alpha_1\text{m}$ -분자의 준비
- [0279] $\alpha_1\text{m}$ 을 포함하는 분자를 문헌[Berggard et al., 1999]에 기술된 대로, 태반 조직으로부터 분리하여 정제하였다. 명백히 정상 조건의 인간 태반 약 200 g을 분만 후 3시간 이내에 채취하고, 200 ml의 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25 M 수크로즈, 2 mM EDTA, 펩스타틴, 1 mg/l, 안티파인, 5 mg/l, 및 류펩틴, 10 mg/l 내에서 단단하게 피팅된 테프론 공이가 설치된 Potter-Elvehjem 장치를 사용하여 파쇄시켰다. 상기 파쇄액을 10,000G에서 10분간 원심분리하였다. 이 펠렛을 파쇄 버퍼 내에서 1:1로 재현탁하고, 10,000G에서 10분간 원심분리를 반복하여 세척하였다. 상기 상등액을 100,000G에서 90분간 원심분리하였다. 이 펠렛은 태반 막 및 막-결합 단백질을 함유하고 있는데, 펠렛을 40 ml의 파쇄 버퍼(0.5%(w/v) Nonidet P-40(BDH 케미컬즈사 제품))에 녹이고, 20,000G에서 30분간 원심분리하여 미립자 물질을 제거하였다. 모든 단계는 얼음 상에서 또는 4℃에서 수행하였다. 면역흡착 친

화 크로마토그래피는 설명서(미국 캘리포니아주의 리치몬드시에 소재한 바이오-라드 라보라토리즈사 제품)에 따라, Affigel Hz(20 mg/ml)에 고정된 단일클론성 마우스 항- $\alpha_2\mu$, BN11.10을 사용하여 수행되었다.

[0280] 시험관내 태반 관류

[0281] 최근까지 자간전증을 위한 적절한 동물 모델이 없었다. 유리 헤모글로빈의 효과를 연구하기 위해, 본 발명자들은 Henning Schneider(독일 그라이프스발트시)와 협력하여 이원적인 태반 관류 모델을 셋업했다. 이원적-태반 관류는 시험관내에서 태반 혈액 흐름을 연구하기 위한 잘-확립된 모델이다[Schneider et al., 1985]. 최근에, 잔틴 및 잔틴 옥시다아제로 ROS 형성을 유도하여 형성시킨 모조(mimic) 자간전증에 상기 모델이 사용되었다[Di Santo et al., 2007]. 본 발명의 매우 최근 데이터는 잔틴으로 관류된 태반이 자간전증 태반과 유사한 유전자 프로파일을 가짐을 시사한다.

[0282] 인간 태반은 산화된 배지로 인공적으로 관류된다. 모체 및 태아 순환은 연동 펌프를 사용하여 관류된다(따라서 "이원적"임). 두 개의 분리된 순환에서 얻어진 상기 배지는 누출(leaks)에 대해 모니터링된다. 상기 배지 및 태반 조직은 상기에서 언급된 방법으로 분석된다.

[0283] **실시예 5.1**

[0284] **헤모글로빈-A는 자간전증 혈장에서 상승된다.**

[0285] **결과**

[0286] 결과는 도 11 내지 도 12에 나타내었다. 30명의 자간전증 환자 및 30명의 대조군 임신부에서 ELISA에 의한 전체 헤모글로빈 농도 측정은 자간전증 그룹에서 거의 두 배 이상 증가를 나타냈다. 환자의 평균값 \pm -SD는 3.01 \pm -0.39 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 대조군에서 4.44 \pm -1.0이었다. 이러한 차이는 유의적이다($P<0.05$).

[0287] **실시예 5.2**

[0288] **헤모글로빈-F는 자간전증 혈장 및 뇨에서 상승된다.**

[0289] 혈장 및 뇨에서의 태아 헤모글로빈은 웨스턴 블롯을 수행하여 항-감마 사슬과 반응한 15 kDa-밴드로서 볼 수 있다. 도 13은 두 명의 환자(PE 1 및 2) 및 두 명의 대조군 대상자(대조군 1 및 2)의 혈장에 적용시킨 웨스턴 블롯팅 방법의 예시를 나타내었다. 상기 방법의 검출 한계는 혈장에서 약 5 $\mu\text{g/ml}$ 및 뇨에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 상기 Hb-F 농도는 밀도로 평가되었고, 표 3은 자간전증 및 대조군에서 얻어진 혈장 및 뇨 샘플에서의 Hb-F 밴드를 보여준다. 9명의 환자 혈장에서 밴드가 보였으나, 대조군 대상자는 양성인 것이 없었다. 따라서, 9명의 환자와 대조군이 아닌 여성은 혈장 내에 5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 태아 헤모글로빈을 가졌다. 대조군 여성의 혈장 농도를 문헌[Turpeinen et al. (1992)]의 연구에서 제안한 방식으로 추정하면 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 인데, 즉, 정상적인 혈장 농도, 본 발명의 결과는 자간전증 환자의 20%에서 태아 헤모글로빈이 125 배 증가하는 것을 보여준다. 8명 환자의 뇨가 상기 밴드에 포함되었으며, 대조군 중에는 2명이었다(표 3). 이들 두 명의 대조군 대상자는 말라리아의 높은 발병률을 갖는 탄자니아 여성 중에서 발견되었다. 가장 알부민처럼 보이는, 67 kDa에서의 약한 양성 밴드는 모든 샘플에서 동일한 강도로 보였다.

표 3

[0290]

혈장에서 >5 $\mu\text{g/ml}$ 및 뇨에서 >1 $\mu\text{g/ml}$ 을 갖는 개인의 빈도			
혈장		뇨	
자간전증 %	대조군 %	자간전증 %	대조군 %
19.6 (9/46)	0 (0/39)	20 (8/40)	5 (2/39)

[0291] **실시예 5.3**

[0292] **혈장 헤모글로빈 A 및 F의 시간-의존성**

[0293] 자간전증의 가능성 있는 초기 병리학적 요소는 예들 들어 지체되는 관류, 비정상적인 착상 또는 기아에 의해 야기되는 저산소증이다. 저산소증은 태아 및 성인 모두의 조혈줄기- 및 전구 세포에서 Hb-F 발현을 상향조절할 수

있다[Narayan et al., 2005]. 태반의 물리적 장벽에 손상을 가하는 것과 함께 이는 단계 1 및 단계 2 사이에서 태반 세포 및 유리 Hb-F를 모체 순환계 내로 누출시킬 수 있다(도 15 참조). 질병이 진행되면, 상기 수가 증가되는 것은 증가된 유리 태아 헤모글로빈 수준으로서 모니터링될 수 있다. 모체의 혈관벽이 유리 태아 헤모글로빈에 의해 손상될 때, 모체 혈구 세포는 또한 사멸되기 시작한다. 이것은 또한 질병의 부정적인 악순환을 가져오는, 유리 모체 헤모글로빈의 수준의 증가를 초래한다. 상기 가설은 Hb-F가 전체 Hb보다 우선하는 것이다.

[0294] 실시예 5.4

[0295] α_{1m} 은 자간전증 혈장 및 뇨에서 상승된다.

[0296] 작은 혈장 및 조직 단백질인 α_1 -마이크로글로불린(α_{1m})은 헴-결합체이며[Allhorn et al., 2002; Larsson et al., 2004], 라디칼 소거제이고[Akerstrom et al. 2007], 헴-분리 형태인 t- α_{1m} 은 α_{1m} 이 유리 헤모글로빈과 혼합될 때, 단백질가수분해를 통해 C-말단 테트라펩티드, LIPR 제거에 의해 유도된다[Allhorn et al., 2002]. 유리 헤모글로빈 및 활성 산소종은 간 세포 및 혈구 세포에서 α_{1m} 생성을 증가시킨다[Olsson et al. 2007]. 그러므로, α_{1m} 은 헴- 및 헤모글로빈-유도성 세포 및 조직 구성성분의 손상을 보호할 수 있는 헴- 및 헤모글로빈 길항제이다.

[0297] 상기 가설과 관련하여, 본 발명자들은 α_{1m} 농도가 대조군 임신부에 비해 자간전증을 갖는 환자 유래의 혈장 및 뇨에서 증가된다는 것을 발견하였다(혈장 및 뇨 모두에서 유의값 $P < 0.01$)(도 15). 평균 혈장 α_{1m} -농도(\pm SD)는 환자에서 $19.1(\pm 5.5) \mu\text{g/ml}$, 대조군에서 $16.1(\pm 3.7) \mu\text{g/ml}$ 였다. 평균 뇨 α_{1m} -농도(\pm SD)는 환자에서 $9.4(\pm 5.5) \mu\text{g/ml}$, 대조군에서 $5.3(\pm 4.6) \mu\text{g/ml}$ 였다. 이러한 결과는 1) 신체는 α_{1m} 의 생산 증가와 이로 인한 혈장 농도의 증가에 의한 자간전증으로 인한 손상에 반응하고 2)헤모글로빈, 헴, 철 및/또는 ROS의 증가에 의해 세포 내에서 α_{1m} 이 상향조절되므로 헤모글로빈, 헴, 철 및/또는 ROS는 손상제(insult)의 성분이라는 것을 암시한다. 그러므로, α_{1m} 는 자간전증에 의한 손상에 대한 신체의 방어 반응인 것 같다. 그 결과로, 더 높은 수준, 예를 들어 $32 \mu\text{g/ml}$ (정상 농도의 두 배)로의 α_{1m} 농도 증가는 항-자간전증 효과를 갖게 되며, α_{1m} 은 따라서, 상기 질병의 치료를 위한 잠재적 약물이다.

[0298] 실시예 5.5

[0299] α_{1m} 은 항-산화 및 헴-결합을 통해 세포 및 조직 구성성분을 보호한다.

[0300] α_{1m} 의 항-산화 성질은 도 16 및 17에 도시하였다. 첫째로, 이는 세포외부적으로 첨가된 α_{1m} 이 세포질 및 세포질 단백질 티올기(thiol groups)의 레독스 전하를 환원시킬 수 있고, 헴 및 ROS에 의한 이들 구성성분의 산화를 저해할 수 있음을 보여준다. 세포외부적으로 첨가된 α_{1m} 은 또한 헴에 의해 유도되는 세포 용해(즉, 세포 사멸)를 저해한다(도 16). 콜라겐 및 LDL(low-density lipoproteins)의 산화적 변형은 많은 질병의 발병기전에 포함되며, 또한 자간전증에서 Hb-유도성 산화의 표적일 수 있다. α_{1m} 은 콜라겐, LDL, 막지질 및 전체 세포의 헴- 및 ROS-유도성 산화를 저해했고, α_{1m} 은 또한 콜라겐 및 LDL에 대해 전구-형태의 산화 생성물을 제거했다(도 17). 이러한 작용의 가능한 메커니즘은 산화제, 산화적 변형, 또는 모두를 환원시키는, α_{1m} 의 환원효소적 성질일 것이다.

[0301] α_{1m} 의 세포보호적 효과의 메커니즘을 연구하기 위해, 본 발명자들은 단백질 및 세포-결합된 헴 간 작용을 분석하기 위한 연속적인 실험을 시도했다. 첫째로, 세포에 $10 \mu\text{M}$ 헴을 처리하여 30분간 배양하고, 여분의 헴을 세척한 뒤, α_{1m} 또는 대조군 단백질을 2 또는 $10 \mu\text{M}$ 농도로 첨가하고 2 시간 동안 배양하였다. 상기 배양액을 보관하고, 세포를 세척하고 가용화한 후, 배양액 및 가용화된 세포를 모두 분광학적으로 분석하고(도 18A), 육안으로 분석했다(도 18B). 헴은 세포에서 강한 갈색-갈라를 띄고 있는 것으로 보여졌으며, 400 nm 부근에서 어떤 특징적 피크를 갖지 않는 통상적인 흡광도를 보였다. α_{1m} 을 첨가했을 때, 상기 헴은 세포에서 거의 완전히 제거되었으며, 대신 배지에서 발견되었다. 대조군인 리포칼린 AGP는 세포-결합된 헴에 어떤 영향도 주지 않았다. 본 발명자들은, 자간전증에서 유리 헴 수준이, 적어도 국소적으로는, $10 \mu\text{M}$ 이상에 도달될 수 있는 것과, 유리 헴의 독성 효과에 의해 영향을 받는 세포가 혈관을 구성하는 내피 세포를 포함하는 것을 예측한다.

[0302] 상기의 몇몇 경우에서 기재했듯이, 헤모글로빈 및 헴의 자가산화에 의해 발생하는 유리 헤모글로빈, 유리 헴 및 ROS에 의한 산화적 손상은 자간전증 진행의 주요한 병리학적 요소를 구성하는 것으로 여겨진다. 콜라겐 및 내피 세포막 및 세포질은 물론 상기 산화적 손상의 중요한 표적이 된다. 이러한 예시에서 상기 결과는 α_{1m} 이 생체 내에서도 유리 헤모글로빈, 헴 및 ROS에 의해 가해지는 손상을 저해하고 수복할 수 있으며, 따라서, 자간전증의 치료제로서 작용할 수 있음을 확실히 한다.

[0303] 실시예 5.6

[0304] 헤모글로빈에 의한 시험관내 관류는 태반 누출 및 α_{1m} -상향조절을 유도한다.

[0305] 자간전증은 태아 및 모체 쪽의, 두 가지 분리된 순환계를 갖는 시험관내 태반 관류 모델을 이용하여 연구되었다. 두 가지 순환계를 먼저 세척하였다. 태반을 태아 쪽(빈 기호)에서 Hb-A 용액(2 mg/ml)으로, 또한 모체 쪽(채워진 기호)에서 버퍼만으로 120분간 관류하고("1차 관류"), 양쪽에서 모두 버퍼만으로 120분간 관류하였다("2차 관류"). 작은 분획물은 두 가지 순환계에서 규칙적으로 채취했으며, Hb-A, Hb-F 및 α_{1m} 의 농도를 측정했다. 도 19에 나타냈듯이(왼쪽), Hb-A는 1차 관류 동안 모체 쪽에서 빠르게 나타났으며, 2차 관류 동안에는 더 작은 양으로 되었다. 이는 태반 조직에서의 Hb-A의 누출 또는 내재적 생산, 또는 모두의 결과일 수 있다. α_{1m} 는 또한 모든 관류 기간 동안 모체 쪽에서 나타났다(도 19, 오른쪽). 이는 α_{1m} 이 헤모글로빈 관류의 결과로 태반 조직에서 생산된다는 것을 제안한다. 마지막으로, Hb-F는 1차 관류(120분)의 종결 시점에 모체 순환계에서 나타났으며, 아마도 태반 내에서의 생산 및 모체 순환계로의 누출의 결과로 보여진다.

[0306] 이에, 상기 시험관내 관류 모델은 따라서 태아 순환계 내의 유리 헤모글로빈이 태반 장벽 기능에 미치는 효과, α_{1m} 의 보호 효과 및 조직의 보호적 세포반응을 연구하는데 이용될 수 있다.

[0307] 실시예 5.7

[0308] 서로 결합된 α_{1m} 및 헤모글로빈으로 구성된 태반 내의 새로운 분자

[0309] α_{1m} 은 수용액 내에서 헤모글로빈과 혼합될 때, 헤모글로빈으로부터 헴-그룹을 가져올 수 있다[Allhorn et al., 2002; Larsson et al., 2004]. 생체내에서 이를 달성하기 위해서, 상기 헤모글로빈과 α_{1m} 분자는 서로 결합되어야만 한다. 이러한 α_{1m} -헤모글로빈 분자의 증거는 α_{1m} -함유 분자종을 분리한 후, 항-Hb 블롯팅으로 분석하여 태반 추출물에서 발견되었다(도 20). 43 kDa 단백질 밴드는 α_{1m} 및 Hb-A 모두에 대한 항체와 반응하였다. 상기 밴드는 α_{1m} 및 알파- 및 베타-글로빈 사슬을 모두 포함시킨 Maldi-MS 펩티드 맵핑으로 나타났다(보이지 않음). 상기 분자의 크기는 상기 분자가 각 α_{1m} 의 하나의 사슬과 Hb α 또는 Hb γ 가 될 수 있는 다른 사슬로 구성되어 있음을 제시한다. 상기 밴드는 머크캅토에탄올을 첨가한 후에는 보이지 않았으며, 이는 상기 사슬이 이 황화결합으로 서로 결합되었음을 암시한다.

[0310] 참고문헌

Åkerström B. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4839-4844.

Åkerström B, Maghzal G, Winterbourn CC, Kettle AJ. *J Biol Chem.* 282 (2007) 31493-31503.

Allhorn M, Berggård T, Nordberg J, Olsson ML, Åkerström B. *Blood.* 99 (2002) 1894-1901.

[0311]

- Babiker-Mohamed H, Forsberg M, Olsson ML, Winqvist O, Nilson BHK, Lögdberg L, Åkerström B. Scand J Immunol 34 (1991) 655-666.
- Berggård T, Enghild JJ, Badve S, Salafia CM, Lögdberg L, Åkerström B. Am J Repr Immunol 41 (1999) 52-60.
- Björck L, Cigen R, Berggård B, Löw B, Berggård I. Scand J Immunol 6 (1977)1063-1069.
- Bradley DJ et al. J Neurosci 12 (1992) 2288-2302
- J. J. Brosens, R. Pijnenborg, I. A. Brosens, Am J Obstet Gynecol. 187, 1416 (2002).
- Coligan JE. (ed) Current Protocols in Immunology. Wiley Interscience.
- C. J. M. de Groot, R. N. Taylor, Annals of Medicine 25, 243 (1993).
- Di Santo S, Sager R, Andres AC, Guller S, Schneider H. Placenta (2007).
- Douglas and Redman, Br Med J 309 (1994)1395-1400
- Elbashir MI, Nilson B, Åkesson P, Björck L, Åkerström, B. J Immunol Methods 135 (1990) 171-179.
- J. P. Granger, B. T. Alexander, W. A. Bennett, R. A. Khalil, Am J Hypertens. 14, 178S (2001).
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover J S. Biochem. J, 89 (1963) 114-123.
- S. R. Hansson *et al.*, Mol Human Reproduction, (2005).
- T. H. Hung, J. N. Skepper, D. S. Charnock-Jones, G. J. Burton, Circ Res 90, 1274 (Jun 28, 2002).
- Kajita A, Taniguchi K, Shukuya K. Biochim Biophys Acta 175 (1969) 41-48.
- Kwasek A, Osmark P, Allhorn M, Lindqvist A, Åkerström B, Wasylewski Z. Protein Expr. Purif. 53 (2007) 145-152.

[0312]

- Laemmli UK. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Larsson J, Allhorn M, Åkerström B. *Arch Biochem. Biophys.* 432 (2004) 196-204.
- H. Lipstein, C. C. Lee, R. S. Crupi, *Am J Emerg Med.* 21, 223 (May, 2003).
- Matsudaira P. J. *Biol. Chem.* 262 (1987) 10035-10038.
- Motterlini et al., *Am J Physiol* 269 (1995) 648-655.
- Narayan AD., Ersek A., Campbell TA., Colón DM, Pixley JS, Zanjani ED. *Br J Haematol* 128 (2005) 562-570.
- Nilson B, Björck L and Åkerström B. *J Immunol Methods* 91 (1986) 275-281.
- Noble RW. *J Biol Chem* 246 (1971) 2972-2976.
- Olsson MG, Allhorn M, Olofsson T, Åkerström B. *Free Rad Biol Med* 42 (2007) 842-851.
- E. W. Page, *Am J Obstet Gynecol.* 37, 291 (1939).
- Plesner T, Nørgaard-Pedersen B, Boenisch T. *Scand J Clin Lab Invest* 35 (1975) 729-735.
- J. M. Roberts *et al.*, *Am J Obstet Gynecol* 161, 1200 (1989).
- J. M. Roberts, C. A. Hubel, *Lancet* 354, 788 (Sep 4, 1999).
- J. M. Roberts, D. W. Cooper, *Lancet* 357, 53 (2001).
- Schneider H, Huch A, *Contrib Gynecol Obstet* 13 (1985) 40.
- A. H. Shennan, L. Poston, L. C. Chappell, P. T. Seed, *Lancet* 357, 1534 (2001/5/12, 2001).
- J. M. Stevens, *Med J Aust.* 2, 949 (Dec 20-27, 1975).
- H. Strevens *et al.*, *Br J Obstet Gynaecol.* 110, 831 (sep, 2003)
- Svistunenko et al., *J Biol Chem* 272 (1997) 7114-7121
- Turpeinen U, Stenman U-H. Determination of fetal hemoglobin by time-resolved immunofluorometric assay. *Clin Chem* 38 (1992) 2013-2018.
- Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 265-272.

[0313]

[0314]

[0315]

항목(본 발명의 구체적 실시형태)

- [0316] 1. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 진단 방법 또는 진단을 돕는 방법:
- [0317] (a) 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계;
- [0318] (b) 상기 생물학적 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및
- [0319] (c) 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 참고값을 비교하거나, 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준 사이의 비율을 참고값과 비교하여 상기 임신한 암컷이 자간전증인지 아닌지, 또는 자간전증 발병 위험이 증가되었는지를 결정하는 단계.
- [0320] 2. 항목 1에 있어서, 참고값은 대조군 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준이거나 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이고, 상기 참고값과 비교하여 상기 샘플 내에서의 더 높은 수준의 유리 태아 헤모글로빈 또는 더 높은 값의 비율은 상기 임신 암컷이 자간전증을 갖거나 자간전증의 발병 위험이 높은 것을 말함을 특징으로 하는 방법.
- [0321] 3. 항목 1-2 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액인 방법.
- [0322] 4. 항목 1-2 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 뇨인 방법.
- [0323] 5. 항목 1-2 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 태반 조직인 방법.
- [0324] 6. 항목 1-5 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 샘플 내의 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ)을 측정함으로써 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0325] 7. 항목 1-6 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 면역학적 평가법을 사용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0326] 8. 항목 7에 있어서, 상기 면역학적 평가법은 ELISA인 방법.
- [0327] 9. 항목 1-6 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 유리 태아 헤모글로빈 RNA 측정을 통해 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0328] 10. 항목 9에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 RNA는 실시간 PCR을 사용하여 측정되는 것인 방법.
- [0329] 11. 항목 1-10 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 포유류는 인간인 방법.
- [0330] 12. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증의 진행 또는 퇴행의 모니터링 방법:
- [0331] (a) 임신한 암컷 포유류에서 분리한 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계;
- [0332] (b) 이후에 상기 임신한 암컷 포유류에서 분리한 두 번째 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및
- [0333] (c) 상기 단계 (a) 및 단계 (b)에서 측정된 값을 비교하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 증가하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 증가하는 것은 자간전증의 진행을 나타내며; 또한, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 감소하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 감소하는 것은 자간전증의 퇴행을 나타내는 것인 비교단계.
- [0334] 13. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 치료법의 유효성 평가 방법:
- [0335] (a) 치료 전에 임신한 암컷 포유류에서 얻은 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계;
- [0336] (b) 치료 후에 동일한 임신 포유류로부터 얻은 두 번째 생물학적 샘플에서, 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및
- [0337] (c) 상기 단계 (a)에서 측정된 수준과 상기 단계 (b)에서 측정된 수준을 비교하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서

의 유리 태아 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준이 감소하거나, 첫 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이 감소하는 것은 그 치료법이 자간전증 치료에 유효한 것임을 의미하는 것인 비교 단계.

- [0338] 14. 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하는 수단 및 상기 검출 수단의 사용을 위한 사용설명서를 포함하는, 항목 1~11 중 어느 한 항목의 방법에 따른 자간전증 진단 또는 자간전증 진단을 돕기 위한 평가 키트.
- [0339] 15. 항목 14에 있어서, 상기 유리 태아 헤모글로빈 수준은 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ)을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.
- [0340] 16. 항목 14~15 중 어느 한 항목에 있어서, 전체 유리 헤모글로빈 수준을 검출하는 수단을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0341] 17. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 진단 방법 또는 진단을 돕는 방법:
- [0342] (a) 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계;
- [0343] (b) 상기 생물학적 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준을 측정하거나 유리 태아 헤모글로빈 서브유닛 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및
- [0344] (c) 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준과 참고값을 비교하거나, 상기 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 서브유닛 수준 및 전체 유리 헤모글로빈 수준 사이의 비율을 참고값과 비교하여 상기 임신한 암컷이 자간전증인지 아닌지, 또는 자간전증 발병 위험이 증가되었는지를 결정하는 단계.
- [0345] 18. 항목 17에 있어서, 상기 참고값은 대조군 샘플 내의 유리 태아 헤모글로빈 수준이거나 유리 태아 헤모글로빈 서브유닛 수준과 전체 유리 헤모글로빈 수준 간의 비율이고, 상기 참고값과 비교하여 상기 샘플 내에서의 더 높은 수준의 유리 태아 헤모글로빈 또는 더 높은 값의 비율은 상기 임신한 암컷이 자간전증을 갖거나 자간전증의 발병 위험이 높은 것을 나타내는 것인 방법.
- [0346] 19. 항목 17~18 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액인 방법.
- [0347] 20. 항목 17~18 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 뇨인 방법.
- [0348] 21. 항목 17~18 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 태반 조직인 방법.
- [0349] 22. 항목 17~21 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 샘플 내의 헤모글로빈 알파 사슬(Hb α), 헤모글로빈 베타 사슬(Hb β), 헤모글로빈 델타 사슬(Hb δ), 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 및/또는 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.
- [0350] 23. 항목 17~22 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 면역학적 평가법을 사용하여 측정되는 것인 방법.
- [0351] 24. 항목 23에 있어서, 상기 면역학적 평가법은 ELISA인 방법.
- [0352] 25. 항목 17~22 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 유리 헤모글로빈 RNA의 측정을 통해 결정되는 것인 방법.
- [0353] 26. 항목 25에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 RNA는 실시간 PCR을 사용하여 측정되는 것인 방법.
- [0354] 27. 항목 17~26 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 포유류는 인간인 방법.
- [0355] 28. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증의 진행 또는 퇴행의 모니터링 방법:
- [0356] (a) 임신한 암컷 포유류에서 분리한 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및
- [0357] (b) 이후에 상기 임신한 암컷 포유류에서 분리한 두 번째 샘플에서, 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준이 증가하는 것은 자간전증의 진행을 나타내며, 첫 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준이 감소하는 것은 자간전증의 퇴행을 나타내는 것인 측정 단계.
- [0358] 29. 항목 28에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 헤모글로빈 알파 사슬(Hb α), 헤모글로빈 베타 사슬(Hb

β), 헤모글로빈 델타 사슬(Hb δ), 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 및/또는 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.

[0359] 30. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 치료법의 유효성 평가 방법:

[0360] (a) 치료 전에 임신한 암컷 포유류에서 얻은 첫 번째 생물학적 샘플에서, 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계;

[0361] (b) 치료 후에 동일한 임신 포유류로부터 얻은 두 번째 생물학적 샘플에서, 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 단계; 및

[0362] (c) 단계 (a)에서 측정된 수준과 단계 (b)에서 측정된 수준을 비교하는 단계로서, 첫 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준에 비해 두 번째 샘플에서의 유리 헤모글로빈 수준이 감소하는 것은 그 치료법이 자간전증 치료에 유효한 것임을 나타내는 것인 비교단계.

[0363] 31. 항목 30에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 헤모글로빈 알파 사슬(Hb α), 헤모글로빈 베타 사슬(Hb β), 헤모글로빈 델타 사슬(Hb δ), 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 및/또는 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.

[0364] 32. 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 유리 헤모글로빈 수준을 측정하는 수단 및 상기 검출 수단의 사용을 위한 사용설명서를 포함하는, 항목 17~27 중 어느 한 항의 방법에 따른 자간전증 진단 또는 자간전증 진단을 돕기 위한 평가 키트.

[0365] 33. 항목 32에 있어서, 상기 유리 헤모글로빈 수준은 헤모글로빈 알파 사슬(Hb α), 헤모글로빈 베타 사슬(Hb β), 헤모글로빈 델타 사슬(Hb δ), 헤모글로빈 감마 사슬(Hb γ) 및/또는 전체 유리 헤모글로빈 수준을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.

[0366] 34. 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합 제제; 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리를 자극하는 제제; 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 성분을 포함하는 조성물의 자간전증의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 제제의 제조를 위한 용도.

[0367] 35. 항목 34에 있어서, 상기 헤모글로빈 결합제 및/또는 헴 결합제는 알파 1-마이크로글로불린인 용도.

[0368] 36. 항목 34에 있어서, 상기 헤모글로빈 결합제 및/또는 헴 결합제는 헤모글로빈 및/또는 헴에 특이적인 항체인 용도.

[0369] 37. 자간전증의 치료 또는 예방 방법으로서, 상기 방법은 헤모글로빈 결합 제제 및/또는 헴 결합 제제; 헤모글로빈 분리 및/또는 헴 분리를 자극하는 제제; 태반 조혈을 저해하는 제제로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 성분을 포함하는 약제학적 제제의 유효량을 이러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

[0370] 38. 항목 37에 있어서, 상기 헤모글로빈 결합제 및/또는 헴 결합제는 알파 1-마이크로글로불린인 방법.

[0371] 39. 항목 37에 있어서, 상기 헤모글로빈 결합제 및/또는 헴 결합제는 헤모글로빈 및/또는 헴에 특이적인 항체인 용도.

[0372] 40. 이하의 단계들을 포함하는 자간전증 진단 방법:

[0373] (a) 임신한 암컷 포유류로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계;

[0374] (b) 상기 생물학적 샘플 내의 인간 백혈구 항원 DPA1(human leukocyte antigen DPA1, HLA-DPA1) 수준을 측정하는 단계; 및

[0375] (c) 상기 샘플 내의 HLA-DPA1 수준과 참고값을 비교하는 단계.

[0376] 41. 항목 40에 있어서, 상기 단계 (a) 내지 (c)는 상기 임신한 암컷이 자간전증의 발병 위험이 있는지 없는지, 또는 중증 형태의 자간전증 발병 위험이 있는지 없는지를 결정하기 위해 수행되는 것인 방법.

[0377] 42. 항목 40~41 중 어느 한 항목에 있어서, HLA-DPA1의 발현 및 고발현은 HLA-DPA1의 발현이 없는 것보다 더 좋은 예후임을 나타내는 것인 방법.

[0378] 43. 임신한 암컷 포유류의 생물학적 샘플에서 HLA-DPA1 수준을 측정하는 수단 및 상기 검출 수단의 사용을 위한

사용설명서를 포함하는, 항목 40~42 중 어느 한 항목의 방법에 따른 자간전증 진단 또는 자간전증 진단을 돕기 위한 평가 키트.

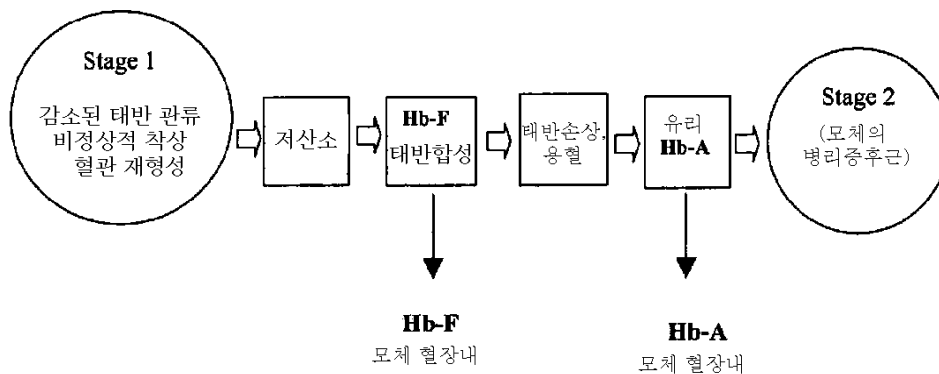
도면의 간단한 설명

- [0153] 도 1은 Hb-F 및 Hb-A의 외관을 강조 표시한, 모체의 혈장 내에서 Hb-F 및 Hb-A의 발견물 및 질병의 다른 단계의 마커로서의 이들의 가능한 용도에 기초한, 자간전증 발병의 연속적인 모델을 도시한 도면;
- [0154] 도 2A는 초기 임신에서의 태반을 나타낸 도면이고(초음파), 도 2B는 모체 혈액으로 채워진 용모간강에서 내려오는 용모 내에서의 태아 순환계를 나타낸 도면이며, C는 태아 순환이 있는 최소의 기능적 단위-용모를 나타낸 도면;
- [0155] 도 3A는 덜 산화된 모체 혈액(더 어두움)으로 채워진 용모간강에서 내려오는 용모 내에서의 태아 순환계를 나타낸 도면이고, 도 3B는 태반 세포-양모막에서 활성 산소종(ROS)에 의해 유도된 아포토시스(타원형 점)를 나타낸 도면이며, 도 3C는 혈액-태반벽이 손상된 것을 나타낸 도면;
- [0156] 도 4는 태반에서의 Hb α , Hb γ , Hb β , 및 HLA-DPA1 mRNA를 정량화한 실시간 PCR 결과를 나타낸 도면;
- [0157] 도 5는 인간 태반 및 태반상 샘플에서 얻은 인 시튜 혼성화(*in situ hybridization*) 이미지를 나타낸 사진;
- [0158] 도 6은 태반에서 Hb γ 단백질 발현의 대표적 이미지 사진;
- [0159] 도 7은 자간전증을 가진 여성에서 분만 전에 얻어진 모체 혈장에서의 Hb γ mRNA 수준을 실시간 PCR로 정량화한 산점도(scatter plot)를 나타낸 도면으로, 이 도면에서 왼쪽 축 상의 Ct 값은 샘플 내의 Hb γ mRNA 수준의 양에 대한 측정값을 부여하는 것임;
- [0160] 도 8은 Hb δ 에 대한 대표적인 겔-이미지 사진으로, A) 자간전증 샘플에서 Hb δ 스팟이 명확하게 보임(화살표). B) 대조군 샘플 유래 겔에서 Hb δ 스팟은 없음(원형);
- [0161] 도 9는 qPCR로 정량화한 태반에서의 Hb δ mRNA 값을 산점도로 나타낸 도면;
- [0162] 도 10은 Hb δ mRNA를 발현하는 자간전증 태반에서의 인 시튜 이미지 사진;
- [0163] 도 11은 태반 및 태반상에서의 인 시튜 혼성화(왼쪽 패널)를 나타내며, 대표적인 자간전증 태반 샘플 및 대조군에서의 헤모글로빈 mRNA-발현의 어두운 영역 이미지. 헤모글로빈 mRNA 발현은 특히 혈관 주위에서 나타났으며(화살표 머리), 용모간강 내의 수개의 산포된 세포들이 자간전증에서 보였고, 면역조직화학(오른쪽 패널)은 태반 혈관계의 루멘(lu)에서의 유리 태아 헤모글로빈의 축적을 나타냄;
- [0164] 도 12는 자간전증을 갖는 여성(n=30) 및 정상 임산부(n=30)의 혈장 내 전체 헤모글로빈 농도를 나타낸 도면으로, 상기 농도는 혈장을 1000배로 희석한 성인 헤모글로빈(Hb-A)에 대한 항체를 사용하여 ELISA로 측정됨;
- [0165] 도 13. 두 명의 자간전증 환자(PE 1 및 2) 및 두 명의 정상 임산부인 대조군 대상자(대조군 1 및 2)의 혈장의 웨스턴 블롯에 의한 Hb-F의 측정 결과를 나타낸 도면으로, 상기 혈장 샘플은 기술된 대로 알부민-추출액 비드로 처리되고 나서, 희석되지 않은 상태로 SDS-PAGE/웨스턴 블롯팅 절차에 적용되었으며(15 μ l), μ g/ml 단위의 농도를 평가하기 위해, 0.1 μ g의 정제된 Hb-F를 별도의 레인에 적용시켰음("정제된 Hb-F");
- [0166] 도 14는 헤모글로빈 합성 세포를 갖는 태아 순환계(검은 점을 갖는 흰색 타원형). 태반벽에 대한 손상으로 인해, 태아 세포는 용모간강 내로 누출되고, 이에 의해 모체 순환계로 누출됨;
- [0167] 도 15는 자간전증을 가진 여성(n=30) 및 정상 임산부(n=30)의 혈장 내 전체 α_1 m 농도를 나타낸 도면으로, 상기 농도는 500 \times 로 희석된 혈장을 RIA로 측정한 것임;
- [0168] 도 16A는 헴- 및 ROS-유도성 산화에 대한 α_1 m의 세포-보호적 성질을 나타낸 도면으로, K562 세포를 산화-감수성 프로브 H₂DCFDA로 표지하고, 세척한 후, α_1 m(2, 5 또는 10 μ M), AGP(2, 5 또는 10 μ M) 또는 아스코르브산염(ascorbate)(10 μ M)과 함께 배양한 후, 10 μ M 헴을 첨가하였으며, 상기 세포를 2 시간 동안 배양하고 FACS로 분석한 것이고, 도 16B는 K562 세포를 α_1 m(2, 5 또는 10 μ M) 또는 대조군 단백질(α_1 -산 당단백질(α_1 -acid glycoprotein), AGP)(10 μ M)과 함께 배양한 후, 200 μ M 헴을 첨가하여 4시간 배양하고, 상기 세포 서스펜션을 모아서, 요오드화 프로피디움(Propidium iodide)과 혼합한 후, FACS로 분석한 것임;

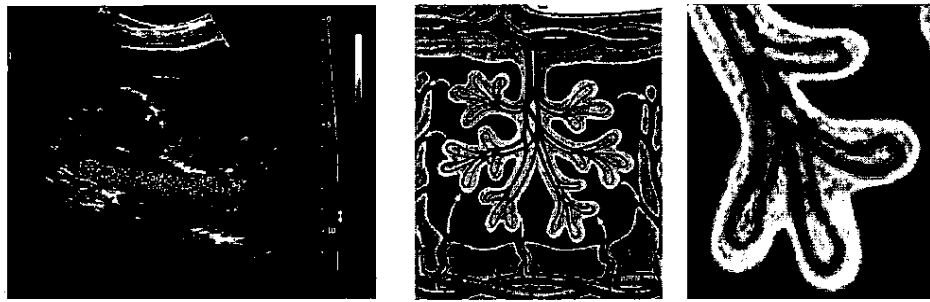
- [0169] 도 17은 α_{1m} 에 의해 산화된 콜라겐의 카보닐기의 환원을 나타낸 도면으로, 마이크로타이터 플레이트를 코팅한, 콜라겐은 50 μ M의 헴과 17시간 동안 배양되어 산화되었고, 세척 후, 0.1, 0.3 또는 1 μ M의 α_{1m} , 난백알부민 또는 아스코르브산염을 첨가하고 2 시간 동안 배양하였으며, 카르보닐기는 ELISA로 측정되었고, 각각의 컬럼은 3 개의 \pm SE 평균값을 나타냄;
- [0170] 도 18은 α_{1m} 에 의한 세포 헴의 소거(Scavenging)를 나타낸 도면으로, 인간 적백혈병 세포(Human erythroleukemic cells)(K562)를 버퍼 또는 10 μ M 헴과 함께 30분간 배양한 후, 세척하고, 새로운 배양 배지로 재현탁했으며, 도 18A는 상기 세포를 이후 α_{1m} (2 또는 10 μ M)과 함께 2 시간 동안 배양하고, 시간이 지난 후에 상기 배양액을 보관하고 나서, 상기 세포를 세척하고 1% NP-40을 함유하는 버퍼로 현탁하여 가용화시켰으며, 상기 배양액 및 세포 현탁액은 이후 흡광 스펙트럼(300~700)을 읽음으로써 분광학적으로 분석된 것이고, 도 18B는 다양한 배양액을 육안으로 분석한 것으로, 세포를 버퍼 또는 10 μ M heme과 함께 30 분간 배양한 후(단계 1), 세척하고, 이후 버퍼, 10 μ M α_{1m} 또는 10 μ M AGP와 함께 2 시간 동안 배양한 후(단계 2), 세척하고 상술한 대로 가용화시킨 것임;
- [0171] 도 19는 "건강한" 태반의 시험관내 관류를 태아 쪽(빈 기호)에서 Hb-A 용액(2 mg/ml)으로, 또한 모체 쪽(채워진 기호)에서 버퍼만으로 120분간 수행("1차 관류"), 및 양쪽에서 모두 버퍼만으로 120분간 수행("2차 관류")한 것을 나타낸 도면으로, 샘플은 규칙적으로 채취했으며, ELISA로 측정된 Hb-A 농도(왼쪽 도표), RIA로 측정된 α_{1m} 농도(오른쪽 도표), 및 웨스턴 블롯으로 측정된 태아 Hb-A 농도(오른쪽 사진)임;
- [0172] 도 20은 태반 조직에서 분리된 헤모글로빈- α_{1m} 복합체를 나타낸 도면으로, 건강한 공여자 유래의 태반을 파쇄하고 100,000G에서 60분간 원심분리하고 나서, 상등액을 항- α_{1m} Affigel 컬럼에 적용하고, 이를 세척한 뒤 0.1M 글리세린-HCl, pH 2.3로 용출시켰으며, 상기 용출액을 SDS-PAGE에서 분리하고, 짐사로 염색하거나(두 개의 왼쪽 레인), PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하고 항- α_{1m} 또는 항-Hb-A로 블롯팅한 것임;
- [0173] 도 21은 탄자니아 연구 결과를 나타낸 도면으로, 분만 전 뇨에서의 전체 헤모글로빈(μ g/ml)을 나타냄.

도면

도면1



도면2

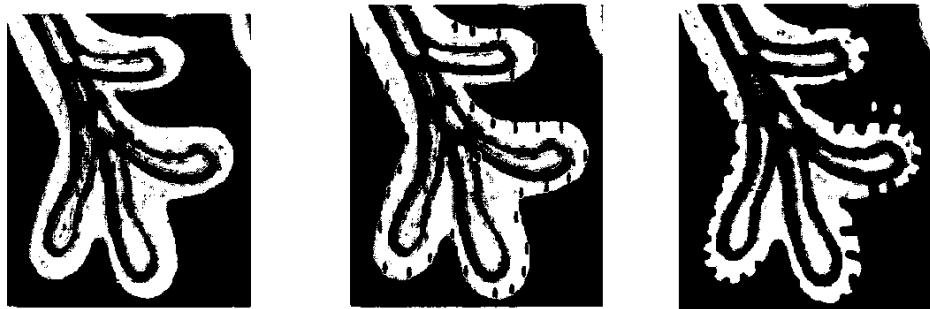


A

B

C

도면3

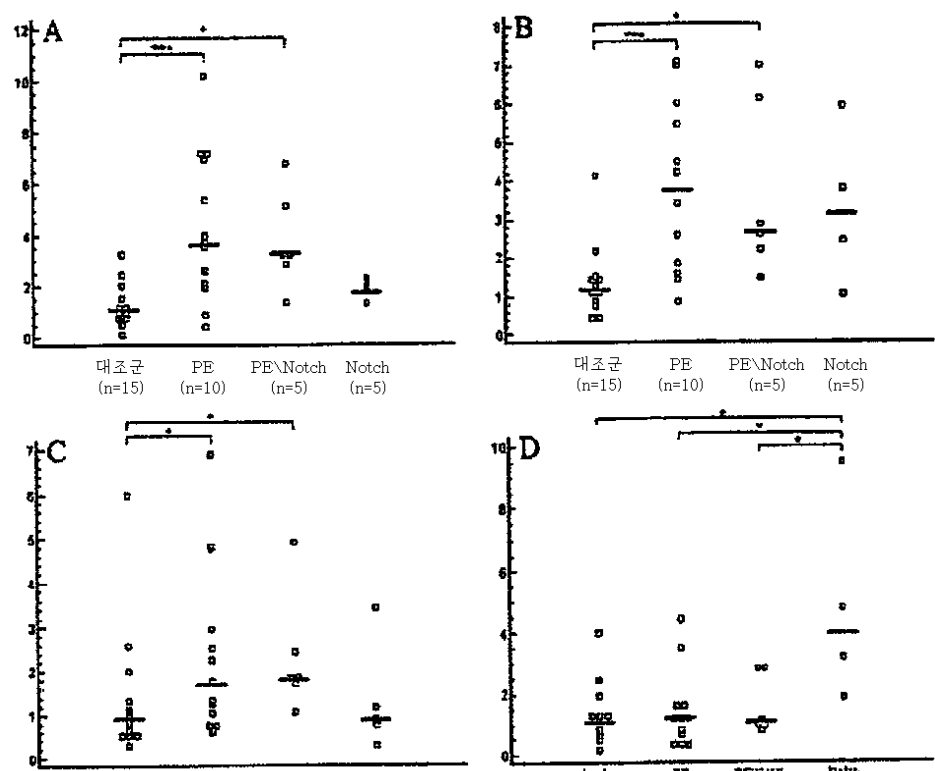


A

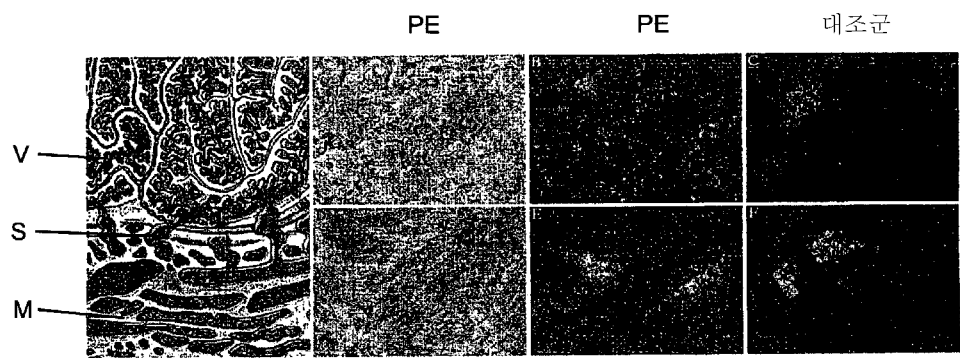
B

C

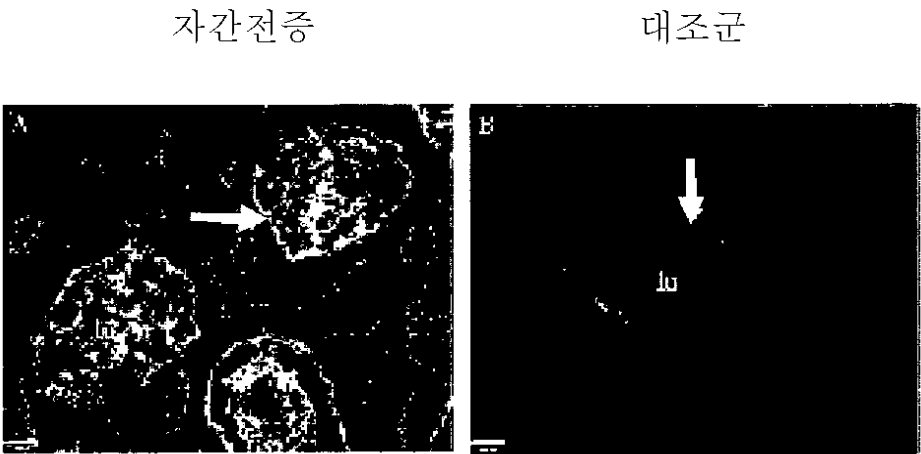
도면4



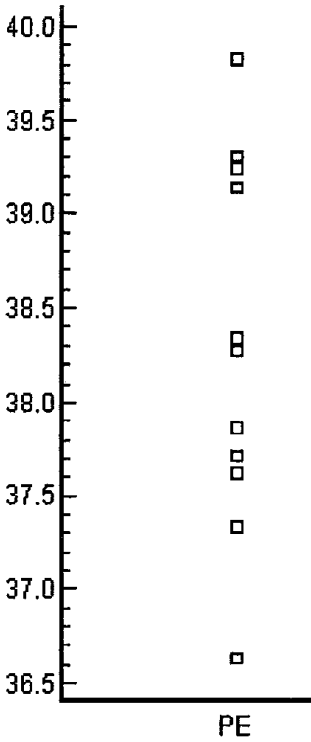
도면5



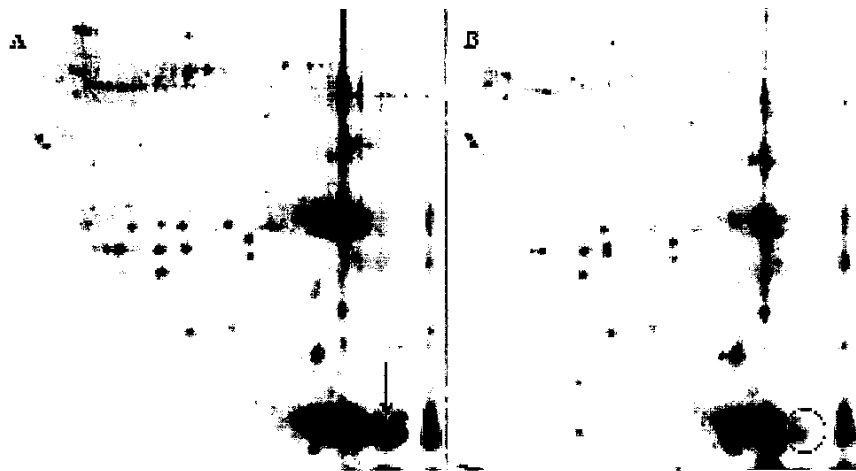
도면6



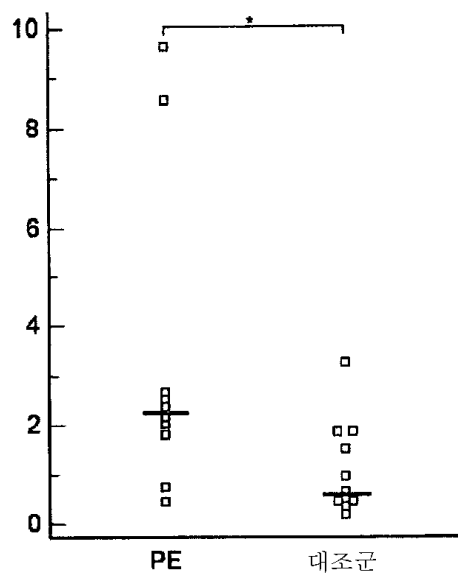
도면7



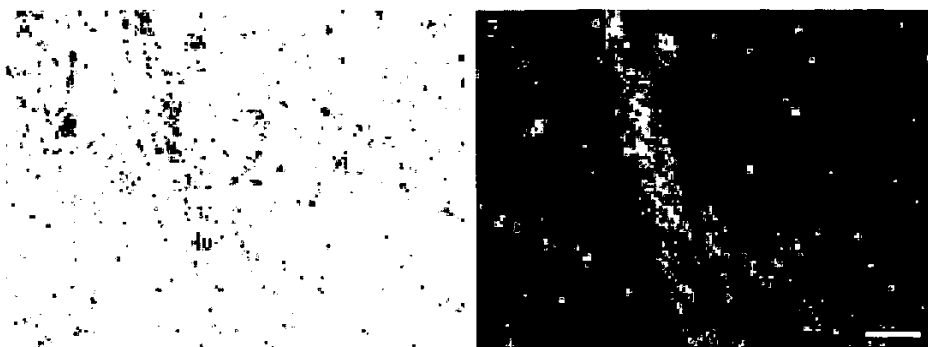
도면8



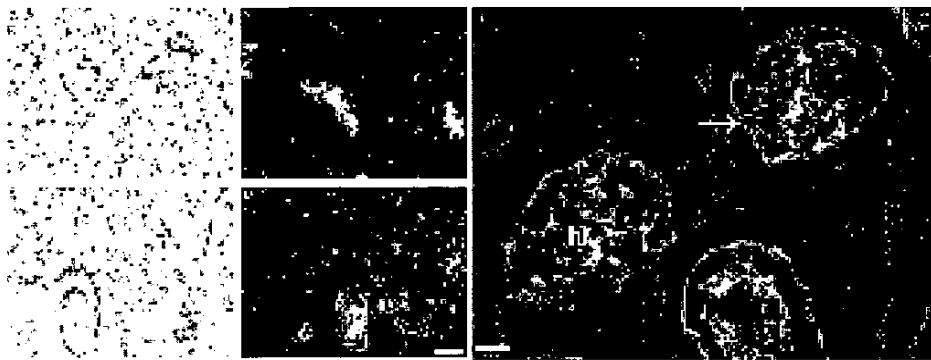
도면9



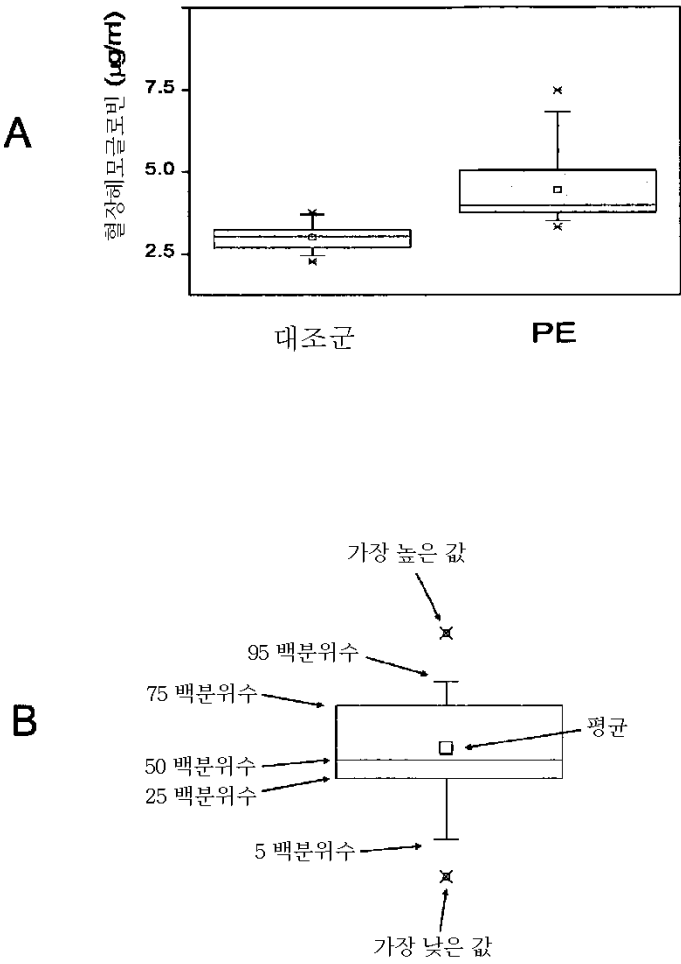
도면10



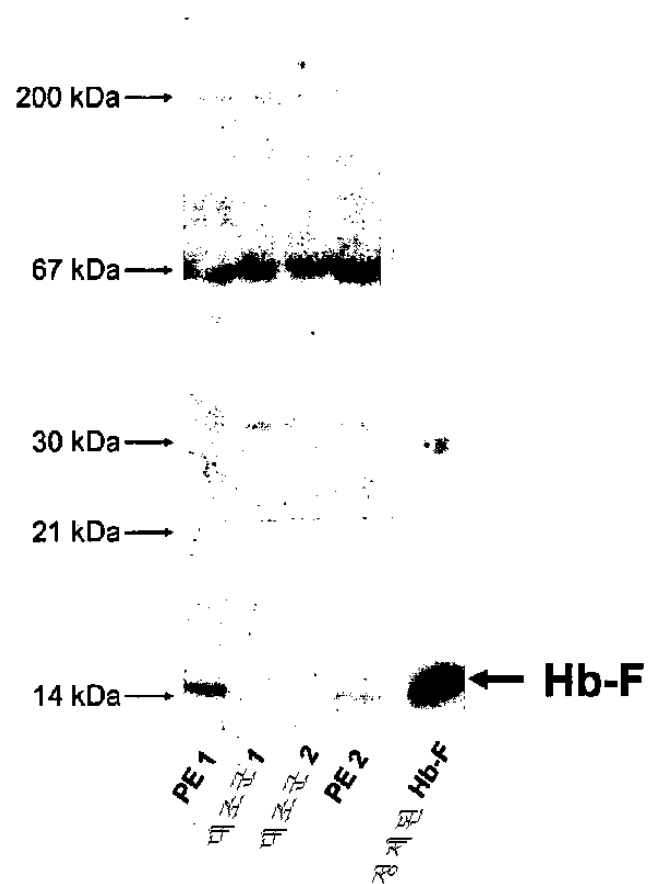
도면11



도면12



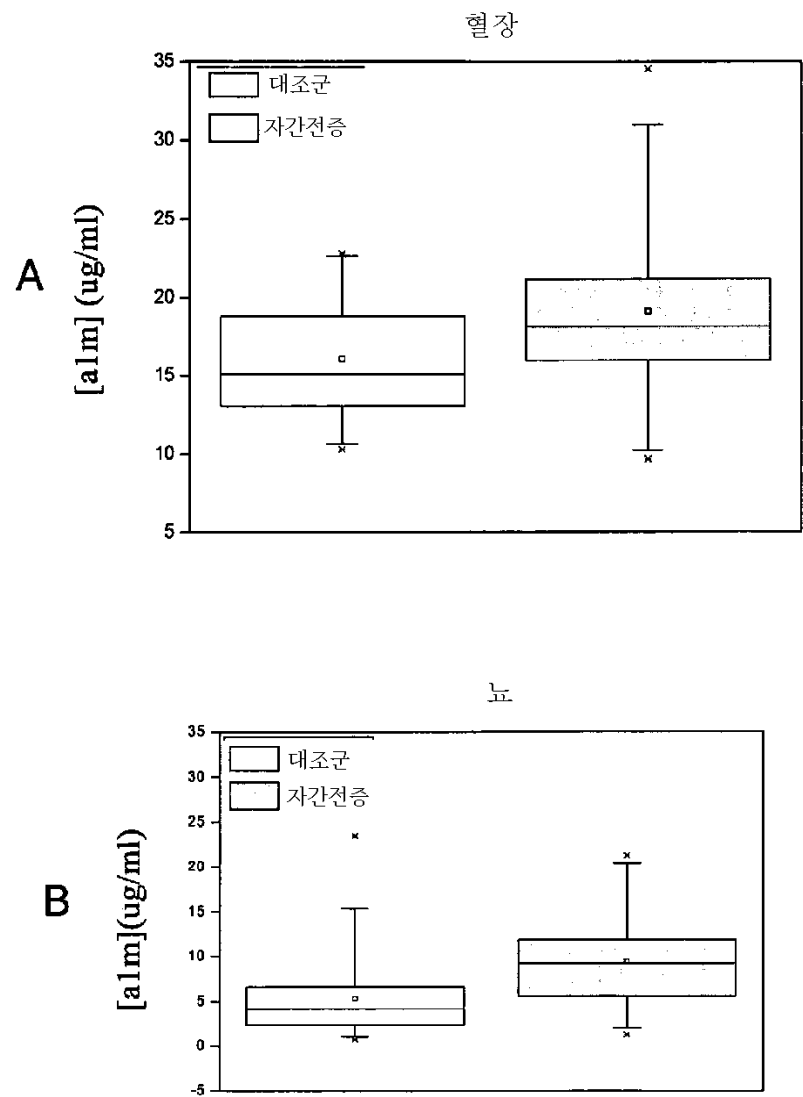
도면13



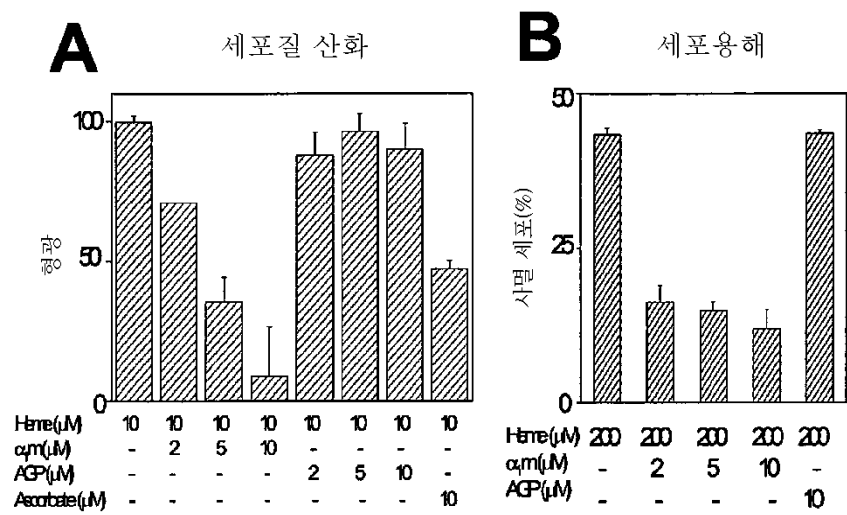
도면14



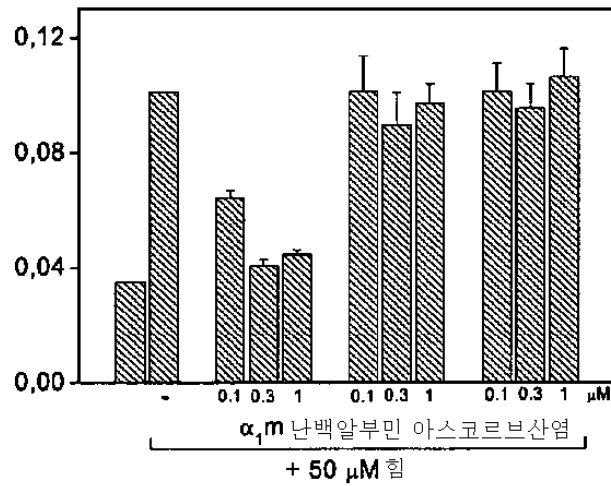
도면15



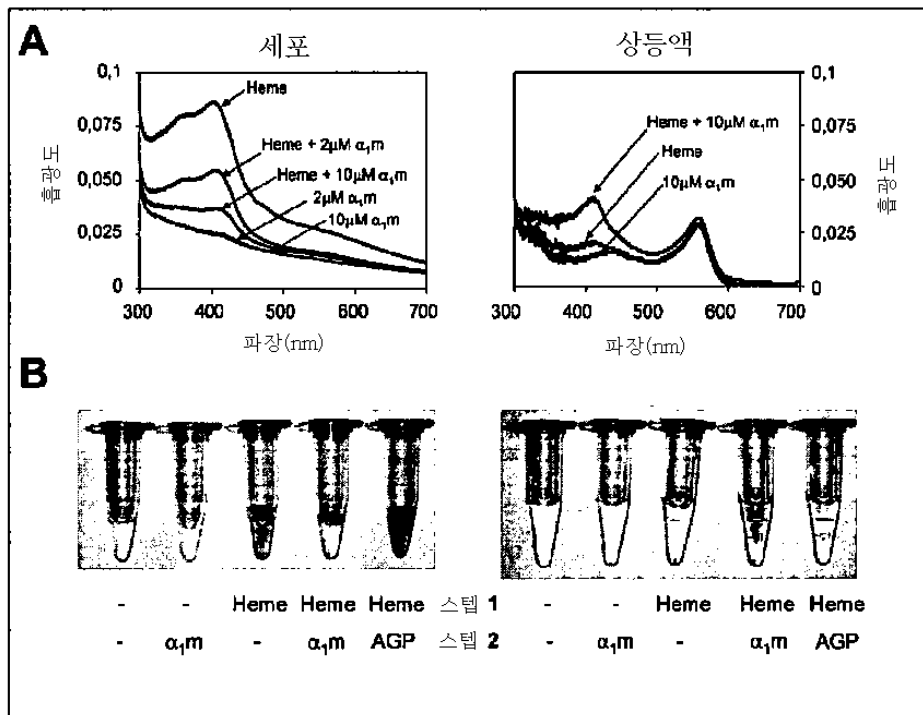
도면16



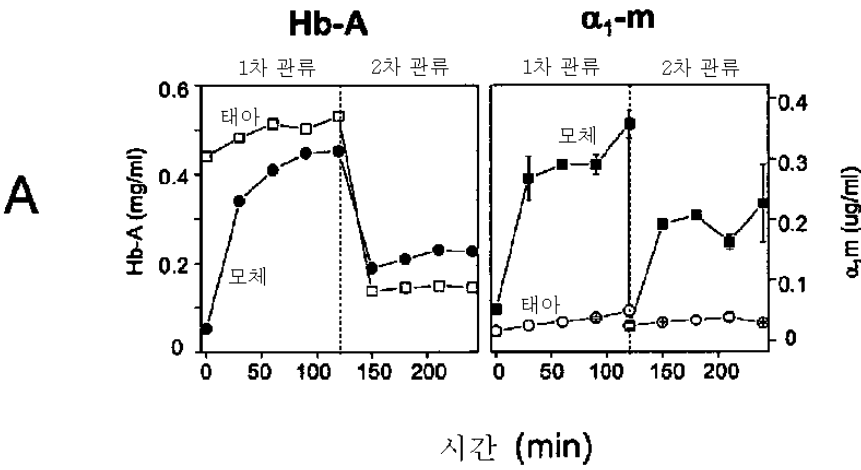
도면17



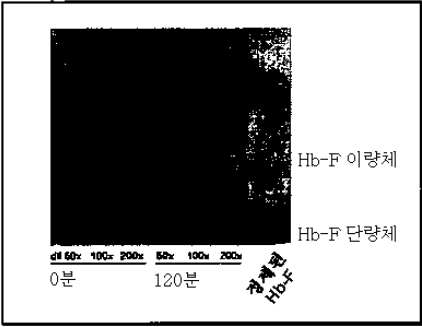
도면18



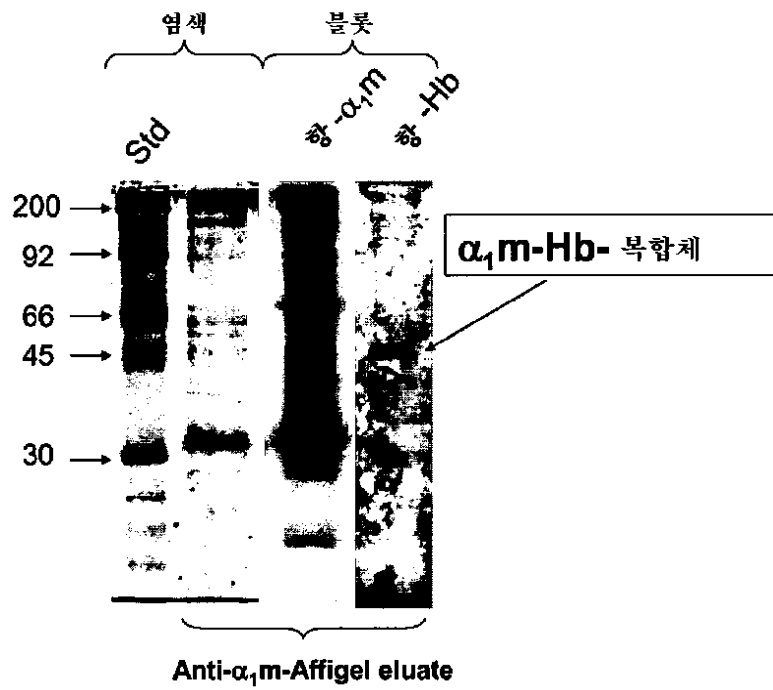
도면19



B



도면20



도면21

