(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 2 월 27 일 (27.02.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/042245 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/012644

(22) 국제출원일: 2024 년 8 월 23 일 (23.08.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0110891 2023 년 8 월 23 일 (23.08.2023) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (**THE ASAN FOUNDATION**) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION**) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 백인정 (**BAEK, In Jeoung**); 03491 서울특별시 은평구 은평터널로 65, 108동 103호, Seoul (KR). 이종걸 (**LEE, Jong Geol**); 05532 서울특별시 송파구 풍성로 22길 48, 202호, Seoul (KR). 연정민 (**YON, Jung-Min**); 05318 서울특별시 강동구 올림픽로92길 13, 해인 702호, Seoul (KR). 조유숙 (**CHO, You Sook**); 07338 서울특별시 영등포구 국제금융로7길 27, 10동 10024호, Seoul (KR). 김경곤 (**KIM, Kyung Gon**); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호, Seoul (KR).

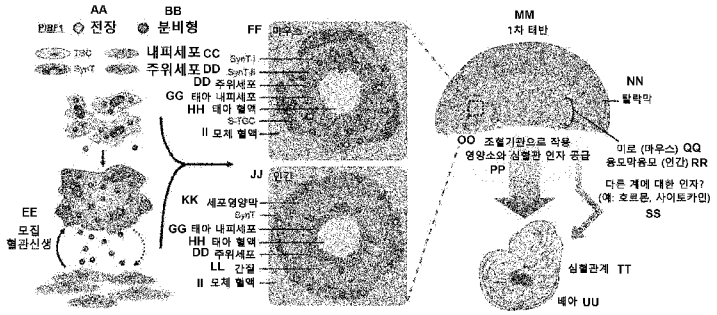
(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울특별시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

WO 2025/042245 A1

(54) Title: USE OF PIBF1 OR VECTOR COMPRISING GENE THAT ENCODES SAME FOR PREVENTING AND TREATING PREGNANCY COMPLICATIONS ASSOCIATED WITH PLACENTA OR FETAL CARDIOVASCULAR ABNORMALITIES

(54) 발명의 명칭: 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료를 위한 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도



AA ... Full length
BB ... Secretory form
CC ... Endotheliocyte
DD ... Pericyte
EE ... Recruitment angiogenesis
FF ... Mouse
GG ... Fetal endotheliocyte
HH ... Fetal blood
II ... Maternal blood
JJ ... Human
KK ... Cytotrophoblast
LL ... Stroma
MM ... Primary placenta
NN ... Decidua
OO ... Act as hematopoietic organ
PP ... Supply nutrients and cardiovascular factors
QQ ... Labyrinth (mouse)
RR ... Chorionic villi (human)
SS ... Are there factors about other system? (for example, hormones, cytokines)
TT ... Cardiovascular system
UU ... Embryo

(57) Abstract: The present invention relates to use of PIBF1 or a vector comprising a gene that encodes same for preventing and treating pregnancy complications associated with placenta or fetal cardiovascular abnormalities, and, more specifically, to: a pharmaceutical composition comprising PIBF1 or a vector comprising a gene encoding same for preventing and treating pregnancy complications associated with placenta or fetal cardiovascular abnormalities; and a method for preventing and treating pregnancy complications associated with placenta or fetal cardiovascular abnormalities by using the composition.

[다음 쪽 계속]

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료를 위한 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료를 위한 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료를 위한 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PIBF1 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 적절한 태반은 배아 기관의 정상적인 발달을 보장한다. 태반이 심혈관 발달을 제어한다는 몇 가지 증거가 제안되었으며(비특허문헌 1 내지 5), 이는 태반-심장 축으로 설명된다(비특허문헌 6 및 7). 그러나, 이 패러다임의 세포 및 분자 메커니즘은 제대로 밝혀지지 않았다. 프로게스테론 면역조절결합인자 1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1, PIBF1)은 임신 중 면역 관용에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있으며(비특허문헌 8 및 9), 임신 기간 동안 계속해서 상승하고, 마지막에는 모체 수준에서 증가한다(비특허문헌 10 및 11). 동시에, 인간 태반에서는 임신 초기에 합포체영양막세포(syncytiotrophoblast, SynT)에서 높게 발현되고, 만삭 시 감소한다. 단핵영양막세포(CTB)의 지속적인 융합을 통해 형성된 다핵층인 SynT는 산모와 태아 순환 사이의 교환을 위한 1차 장벽을 제공한다. 그러나, 산모-태아 경계면을 구성하는 요인이나, 태반이 배아의 발달 중인 심혈관계에 영향을 미치는 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았다.

[3] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 영양막세포 융합의 결과물로서 SynT가 인접한 혈관 세포와 상호 작용하여 태반에서 교환 장벽의 형성을 개시하고, 배아 심혈관 발달을 유지하며, 이는 영양막 발현 PIBF1 및 SynT 유래 PIBF1에 의해 조절된다는 것을 확인하였고, 특히 분비형과 같은 특정 형태의 PIBF1 단백질을 처리하는 경우, 태반의 주요 세포인 배아 유래 혈관내피세포, 혈관주위세포의 이동 및 혈관생성에 관한 신호전달기전을 활성화시켜 태반 내 혈관 신생(angiogenesis)을 촉진하고, 형성된 태반의 순환계를 따라 태아의 심혈관 발달을 촉진함으로써, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증을 예방, 개선 또는 치료하는데 효과적임을 입증함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [비특허문헌]

[6] (비특허문헌 1) V. Perez-Garcia et al., Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. Nature 555, 463-468 (2018)

[7] (비특허문헌 2) Y. Barak et al., PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell 4, 585-595 (1999)

[8] (비특허문헌 3) R. H. Adams et al., Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. Mol Cell 6, 109-116 (2000)

[9] (비특허문헌 4) G. D. Raffel et al., Ott1 (Rbm15) is essential for placental vascular branching morphogenesis and embryonic development of the heart and spleen. Mol Cell Biol 29, 333-341 (2009)

[10] (비특허문헌 5) E. O. Maruyama et al., Extraembryonic but not embryonic SUMO-specific protease 2 is required for heart 10 development. Sci Rep 6, 20999 (2016)

[11] (비특허문헌 6) M. Hemberger, J. C. Cross, Genes governing placental development. Trends Endocrinol Metab 12, 162-168 (2001)

[12] (비특허문헌 7) E. J. Camm, K. J. Botting, A. N. Sferruzzi-Perri, Near to One's Heart: The Intimate Relationship Between the Placenta and Fetal Heart. Front Physiol 9, 629 (2018)

[13] (비특허문헌 8) J. Szekeres-Bartho, B. Polgar, PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. Am J Reprod Immunol 64, 77-86 (2010)

[14] (비특허문헌 9) B. Huang et al., Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. Nat Med 23, 128-135 (2017)

[15] (비특허문헌 10) M. K. Lim et al., Characterisation of serum progesterone and progesterone-induced blocking factor (PIBF) 20 levels across trimesters in healthy pregnant women. Sci Rep 10, 3840 (2020)

[16] (비특허문헌 11) B. Polgar, E. Nagy, E. Miko, P. Varga, J. Szekeres-Bartho, Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. Biol Reprod 71, 1699-1705 (2004)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 따라서, 본 발명의 목적은 특정 형태의 PIBF1 단백질을 이용한, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 다른 목적은 특정 형태의 PIBF1 단백질을 이용한, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증의 예방, 개선 또는 치료용 약제의 제조를 위한 특정 형태의 PIBF1 단백질의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[20] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료에 사용하기 위한, (i) PIBF1 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[22] 추가로, 본 발명은 (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.

[23] 나아가, 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증의 예방, 개선 또는 치료용 약제의 제조를 위한, 전술한 조성물의 용도를 제공한다.

[24] 본 발명에 있어서, 상기 PIBF1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[25] 본 발명에 있어서, 상기 PIBF1 단백질의 단편은 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열 또는 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[26] 본 발명에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[27] 본 발명에 있어서, 상기 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[28] 본 발명에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[29] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물 또는 상기 조성물은 모체에서 25 내지 90 kDa의 분자량을 갖는 PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질을 증가시킬 수 있다.

[30] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물 또는 상기 조성물은 다음의 a) 내지 d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타낼 수 있다:

[31] a) 배아의 혈관 유사 구조의 형성;

[32] b) 배아의 혈관 신생;

[33] c) 배아의 심근 세포의 분화 및 성숙; 및

[34] d) 모체-태아 경계면의 형성.

[35] 본 발명에 있어서, 상기 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증은 습관성 유산, 자간전증 또는 태아 심장 결함을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[36] 본 발명에 따른 약학 조성물은 태반의 주요 세포인 배아 유래 혈관내피세포, 혈관주위세포의 이동 및 혈관생성에 관한 신호전달기전을 활성화시켜 태반 내 혈괄형성을 촉진하고, 형성된 태반의 순환계를 따라 태아의 심혈관 발달을 촉진하는 바, 습관성 유산, 자간전증 또는 태아 심장 결함과 같은 다양한 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신성 병증을 예방, 개선 또는 치료하는 데 유용하다.

도면의 간단한 설명

[37] 도 1은 인간 PIBF1의 엑손 2 또는 4를 표적하는 2개의 crRNA의 개략도를 나타낸다.

[38] 도 2a 내지 2e는 영양막세포 합포화가 *PIBF1* KO BeWo에서 파괴된다는 것을 나타내는 결과로, 도 2a는 각각 인간 PIBF1 엑손 2 및 4를 표적으로 하는 CRISPR/Cpf1을 사용하여 *PIBF1* KO BeWo 세포주 #1 및 #2에서 관찰된 돌연변이 PIBF1 서열을 나타낸 것이다. 도 2b는 WT 및 BeWo PIBF1 KO 세포주 #2에서의 영양막세포 융합 어세이를 나타낸 것으로, BeWo 경계와 핵은 Di-8-ANEPPS(Di-8; 초록색) 및 Hoechst(파란색)로 염색되었다. 흰색과 빨간색 점선은 융합된 세포 내의 원형질막과 핵을 나타낸다. 데이터는 WT 대조군에 대하여 표현된다. 도 2c는 FSK 처리 PIBF1 KO BeWo 세포주 #2에서 SynT 마커의 발현을 나타낸 것이다. 데이터는 RPS18을 사용하여 정규화하였고, WT의 데이터에 대하여 표현되었다. 도 2d는 FSK 처리 PIBF1 KO BeWo 세포주 #2에 의해 분비된 hCG의 수준을 나타낸 것이다. 도 2e는 FSK 처리 PIBF1 KO BeWo 세포주 #2에서 β-hCG 및 PIBF1의 발현을 나타낸다. β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었다. 데이터는 평균 ± SEM(도 2b 및 도 2d) 또는 평균 ± 최소에서 최대(도 2c)로 표시된다. 일원 분산 분석에서 ****$P < 0.0001$.

[39] 도 3a 내지 3p는 PIBF1이 영양막세포 합포화에 필요하다는 것을 나타낸 결과이다. 도 3a는 WT 및 *PIBF1* KO BeWo 세포에서의 영양막 융합 어세이 결과로, 포스콜린(FSK, 20μM)으로 48시간 인큐베이션한 후 BeWo 경계와 핵을 각각 Di-8-ANEPPS(Di-8; 초록색) 및 Hoechst(파란색)로 염색하였다. 흰색과 빨간색 점선은 융합된 세포 내의 원형질막과 핵을 나타낸다. 도 3b는 FSK 처리된 *PIBF1* KO BeWo 세포에서 SynT 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 3c는 FSK-처리된 *PIBF1* KO BeWo 세포에 의해 분비된 hCG의 수준을 나타낸 것이다. 도 3d는 FSK-처리된 *PIBF1* KO BeWo 세포에서 β-hCG 및 PIBF1의 발현을 나타낸 것이다. β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었다. 도 3e는 2D(상부) 및 3D 배양물(하부)에서 *PIBF1* KO hTSC 유래 합포체영양막세포(TS-SynT)의 위상 대비 이미지 및 2D *PIBF1* KO TS-SynT(중간)에서 β-hCG(초록색)의 면역염색을 나타낸 것이다. 흰색과 빨간색

점선은 융합된 세포 내의 원형질막과 핵을 나타낸다. 도 3f는 *PIBF1* KO TS-SynT에서 SynT 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 3g는 *PIBF1* KO TS-SynT에 의해 분비되는 hCG의 수준을 나타낸 것이다. 도 3h는 *PIBF1* KO TS-SynT에서 TS 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 3i는 면역결핍 NSG 마우스에 *PIBF1* KO hTSC 생착의 개략도를 나타낸 것이다. 도 3j는 *PIBF1* KO hTSC를 피하주사한 NSG 마우스의 혈청 hCG 수준을 나타낸 것이다. 도 3k는 *PIBF1* KO hTSC 주사 마우스에서 수집한 소변 샘플의 처방전 없이 살 수 있는 hCG 임신 테스트의 대표 이미지를 보여준다. 도 3l은 이식된 *PIBF1* KO hTSC로부터 발생된 육안적 융모성 병변을 보여준다. 도 3m은 *PIBF1* KO hTSC 유래 병변에서 KRT7(흰색), β-hCG(초록색) 및 HLA-G(빨간색)의 H&E 및 면역형광 염색 결과이다. 도 3n은 전장 PIBF1(fPIBF) 및/또는 분비형 PIBF1(sPIBF)이 재도입된 FSK-처리 *PIBF1* KO에서 PIBF1의 발현을 나타낸 것이다. 도 3o는 fPIBF 및/또는 sPIBF 복원 후, *PIBF1* KO BeWo 세포의 융합 어세이 결과를 나타낸 것이다. 도 3p는 재조합 fPIBF1(rfPIBF) 및/또는 sPIBF1(rsPIBF)이 보충된 *PIBF1* KO BeWo 세포에서의 융합 어세이 결과를 나타낸 것이다. 융합 어세이 데이터[도 3a, 3o 및 3p]는 WT 대조군의 데이터에 대해 표현된다. 전사 표현 데이터[3b, 3f 및 3h]는 *Gapdh*로 정규화되고 WT에 대해 표현된다. 데이터는 도 3a, 3c, 3g, 3j, 3o 및 3p에서 평균 ± SEM으로 표시되거나 도 3b, 3f 및 3f에서 평균 ± 최소값 내지 최대값으로 표시되었다. 일원분산분석(도 3a 내지 3c, 3o 및 3p) 또는 스튜던트 t-테스트(도 3f, 3h 및 3j)에서 *,**,***,****P<0.05, 0.01, 0.001, 0.0001

[40] 도 4a 내지 4h는 *PIBF1* KO가 거의 영향을 받지 않는 자체 재생 능력으로 TSC의 분화 기능을 저하시킨다는 것을 나타낸 결과이다. 도 4a는 인간 PIBF1 엑손 2를 표적하는 CRISPR/Cpf1을 사용하여 PIBF1 KO TSC에서 관찰된 돌연변이 PIBF1 서열이다. 도 4b는 PIBF1 KO TSC에서 PIBF1의 발현을 나타낸 것으로, β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었다. 도 4c는 줄기 세포 조건에서 *PIBF1* KO TSC의 세포 증식률을 나타낸 것으로, 데이터는 72시간에 WT에 대하여 표현되며, 평균 ± SEM으로 표시된다. 도 4d 및 4e는 줄기 세포 조건에서 *PIBF1* KO TSC의 TS 마커 전사체(도 4d) 및 단백질 수준(도 4e)의 발현을 나타낸 것이다. 도 4f는 미분화 *PIBF1* KO TSC에서 GCM1 전사체의 발현을 나타낸 것이다. 도 4g는 *PIBF1* KO TSC 유래 EVT(TS-EVT)에서 HLA-G 및 MMP2의 발현을 나타낸 것이다. 도 4h는 *PIBF1* KO TS-EVT에서 위상 대비 및 HLA-G(초록색) 면역염색 이미지이다. 전사 발현 데이터(도 4d, 4f 및 4g)는 GAPDH를 사용하여 정규화되었고, WT에 대하여 표현되었으며, 평균 ± 최소값 내지 최대값으로 표시되었다. 스튜던트 T 테스트에서 **P < 0.01; ****P < 0.0001.

[41] 도 5a 내지 5c는 재조합 PIBF1(rPIBF)의 외인성 처리가 PIBF1 KO BeWo 세포의 감소된 합포체 형성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내는 결과이다. 도 5a는 PIBF1의 전체 길이(fPIBF), 분비 형태(sPIBF), 활성 도메인(aPIBF) 및 C-말단 단편(cPIBF)을 포함하여, 본 발명에 사용된 rPIBF의 개략도를 보여준다. 도 5b는 재조

합 sPIBF(rsPIBF) 또는 rfPIBF 처리 *PIBF1* KO BeWo 세포주 #1의 대표 이미지이다. 도 5c는 rsPIBF 또는 rfPIBF로 보충된 PIBF1 KO BeWo 세포주 #2에서의 융합 어세이를 나타낸 것으로, 데이터는 WT에 대하여 표현되며, 평균 ± SEM으로 표시된다. 일원 분산 분석에서 **P<0.01.

[42] 도 6a 내지 6s는 영양막-유래 PIBF1이 혈관구조 형성 및 시험관 내(*in vitro*) 심혈관 특징의 발현을 매개한다는 것을 나타내는 결과이다. 도 6a는 hTSC, TS-SynT 및 TS-EVT에서 세포내 및 분비된 PIBF1의 다중 반응 모니터링(MRM) 분석 결과를 나타낸 것이다. 0.05 미만의 *P* 값은 일원분산분석에서 통계적 유의성을 나타낸다. ns, 유의하지 않음. 도 6b는 hTSC 유래 SynT 또는 융합된 BeWo 세포에 의한 내피 모집의 개략도를 나타낸 것으로, hTSC 유래 SynT 또는 FSK 처리된 BeWo 세포가 포함된 하부 챔버에 대해 24시간 동안 침입한 HUVEC를 크리스탈 바이올렛(CV)으로 염색하고 이들의 수로 분석하였다. 도 6c는 WT 및 *PIBF1* KO hTSC 유래의 분화된 SynT에 의한 HUVEC의 모집 분석(상단)과 *PIBF1* KO BeWo 세포에 fPIBF 및/또는 sPIBF의 회복(restoration)에 의한 HUVEC의 모집 분석(하단)을 나타낸 것이다. 도 6d는 rsPIBF 처리 HUVEC에서 이동(상단 패널) 및 튜브 형성 어세이(하단 패널)에 대한 대표 이미지를 보여준다. 도 6e 및 6f는 rsPIBF-처리된 HUVEC에서 이동(도 6e) 및 튜브 형성 어세이(도 6f)로부터 정량화된 데이터를 나타낸 것이다. 도 6g는 rsPIBF-처리된 HUVEC에서 혈관신생 관련 신호 캐스케이드의 발현을 나타낸 것이다. 데이터는 β-액틴으로 정규화되었다. 도 6h 및 6i는 rsPIBF-처리된 HUAEC에서의 이동(도 6h) 및 튜브 형성 어세이(도 6i)를 나타낸 것이다. 도 6j는 rsPIBF-처리된 태반 혈관주위세포에서의 이동 어세이를 나타낸 것이다. 도 6k는 iPSC에서 hHO로의 분화 및 rsPIBF 적용의 개략도를 나타낸 것이다. 도 6l은 rsPIBF-처리 hHO에서 cTnT, CD31 및 PDGFRβ의 면역염색을 나타낸 것이다. 도 6m은 rsPIBF 처리 hiPSC 유래 2D 배양 심근세포에서의 cTnT 및 α-액티닌의 면역염색을 나타낸 것이다(그룹 당 n= 8). 도 6n은 rsPIBF 처리 hHO의 다중 전극 어레이(MEA) 결과를 보여준다. FPD, 전계 전위 기간(field potential duration). 도 6o는 rsPIBF-처리된 hHO의 발아 어세이 결과를 보여준다. 발아는 위상 대비 및 PDGFRβ 염색 이미지로 확인되었다. 도 6p 및 도 6q는 hHO 발달 상 sPIBF1의 용량 효과를 나타낸 것으로, 도 6p는 rsPIBF를 50, 200, 1000 ng/ml 용량으로 처리한 hHO에서 cTnT 및 CD31의 면역염색을 나타낸 것이고, 도 6q는 rsPIBF를 50, 200, 1000 ng/ml 용량으로 처리한 hHO에서 발아 어세이를 나타낸 것이다. 도 6r은 sPIBF가 처리되지 않은 그룹과 비교하여 sPIBF가 처리된 hHO에서 유의적으로 상향 또는 하향 조절된 유전자의 발현 패턴을 히트맵을 사용하여 가시화한 것이다. 유전자의 2개 군집은 발현 패턴에 기초한 계층적 군집화에 의해 식별되었고, 각 군집의 대표적인 GO 용어는 막대 그래프를 사용하여 시각화되었다(막대의 폭 및 색상은 각각 유전자 비율 및 p-값을 나타냄). 도 6s는 sPIBF 처리에 의해 유의적으로 상향 조절된 유전자에 대한 상위 5개의 풍부한 GO 용어(큰 점)를 관련 유전자(작은 점)와 함께 시각화하였다. 큰 점의 크기는

연관된 유전자의 수를 나타낸다. 작은 점의 색상은 sPIBF 처리에 의한 유전자 배수 변화의 이진 로그를 나타낸다. GO 용어와 연관된 유전자를 연결하는 선은 GO 용어에 따라 고유하게 채색되었다. 모집(도 6c), 이동(도 6e, 6h 및 6j), 튜브 형성(도 6f 및 6i) 및 단백질의 밴드 강도(도 6g)는 WT 대조군에 대해 표현되며, 평균 ± SEM으로 표시되었다. 일원분산분석(도 6a, 6c 및 6e 내지 6j)에서 *P<0.05; **P < 0.01; ***P<0.001; ****P < 0.0001. 형광 표지된 세포의 강도(도 6l 및 6m)와 발아 길이 데이터(도 6o)는 대조군과 대하여 표현되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다(도 6l 내지 6o). 양측 스튜던트 t-테스트(도 6l 내지 6o)에서 *P<0.05; ***P<0.001; ****P<0.0001.

[43] 도 7a 내지 7l은 PIBF1이 시험관 내(*in vitro*)에서 EC 및 태반 혈관주위세포(Pl-PC)의 모집 및 혈관신생을 조절함으로써 혈관구조 형성을 조정한다는 것을 나타내는 결과이다. 도 7a는 트랜스웰 침입 어세이에서 hTSC 유래 SynT에 의한 HUVEC 모집을 나타낸 것이고, 도 7b는 트랜스웰 침입 어세이에서 합포화된 BeWo 세포에 의한 HUVEC 모집을 나타낸 것이다. 데이터는 대조군에 대하여 표현되며, 평균 ± SEM으로 표시된다. 스튜던트 t 테스트에서 ***P<0.001, ****P<0.0001. 도 7c는 rsPIBF 처리 HUVEC에서 혈관신생 관련 신호 캐스케이드의 대표적인 블롯 이미지이다. β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었다. 도 7d 및 7e는 rsPIBF 처리 HUAEC에서의 이동 및 튜브 형성 어세이의 대표 이미지(도 7d)와 rsPIBF 처리 Pl-PC에서의 이동 어세이의 대표 이미지(도 7e)이다. 도 7f 내지 7h는 rfPIBF, raPIBF 또는 rcPIBF 처리 HUVEC에서의 이동 및 튜브 형성 어세이의 대표 이미지(도 7f), 이들의 이동의 정량화된 결과(도 7g) 및 튜브 형성 어세이의 정량화된 결과(도 7h)이다. 도 7i 내지 7k는 rfPIBF, raPIBF 또는 rcPIBF 처리 HUAEC에서의 이동 및 튜브 형성 어세이의 대표적인 이미지(도 7i), 이들의 이동의 정량화된 결과(도 7j) 및 튜브 형성 어세이의 정량화된 결과(도 7k)이다. 도 7l은 rfPIBF, raPIBF 또는 rcPIBF 처리 Pl-PC에서의 이동 어세이를 나타낸 것이다. 이동(도 7g, 7j 및 7l) 및 튜브 형성 데이터(도 7h 및 도 7k)는 대조군에 대해 표현되며, 평균 ± SEM으로 표시된다. 일원분산분석에서 *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

[44] 도 8은 rsPIBF 처리 인간 심장 오가노이드에서 발현된 모든 유전자의 볼캐이노(Volcano) 플롯을 나타낸 것이다. 발현된 모든 유전자는 X축에 log2 스케일로 표시하고 Y축에 -log10 스케일로 계산된 확률(p-값)을 표시한다. 빨간색 점은 조정된 p-값 <0.05에서 배수 변화 >1.5로 유의하게 상향 또는 하향 조절된 차등 발현 유전자(DEG)를 나타낸다. 수직 및 수평 점선 파란색 선은 임계값을 나타낸다.

[45] 도 9a 내지 9d는 Pibf1-null 마우스가 자궁 내 치사율을 나타내며, 손상된 배아 발생의 시간대(time window)는 1차 태반 기간과 관련이 있다는 것을 나타낸 것이다. 도 9a는 $Pibf1^{+/-}$ 교차교배 후 신생아에서 예상되고 관찰된 유전자형 분포를 보여준다. $\chi 2$ 테스트에서 ****P < 0.0001. 도 9b는 $Pibf1^{-/-}$ 배아의 성장 배양에 의해 결

정된 내부 세포 질량(ICM), 영양외배엽(TE) 및 그 비율(ICM/TE)의 면적 정량화를 나타낸 것으로, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 도 9c는 E8.5-13.5에서 $Pibf1^{+/-}$ 교차의 유전자형 분포를 나타낸 것이다. †발달이 지연되고 몇 가지 결함(크기 감소, 심낭 삼출, 꼬리 회전 실패)을 가짐. ‡잔여물이 거의 없이 거의 재흡수됨. 도 9d는 E8.5-13.5에서 $Pibf1^{-/-}$ 배아의 머리-엉덩이 길이 측정 결과를 나타낸 것으로, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 스튜던트 t 테스트에서 $^{**}P < 0.05$; $^{***}P < 0.01$. $Pibf1^{-/-}$ 배아의 머리-엉덩이 길이는 E13.5에서 0으로 간주되었으며, 이 단계에서 $Pibf1^{-/-}$ 배아는 유전형 분석에 사용된 몇 개의 잔여물과 함께 거의 재흡수되었기 때문에, WT 그룹과 통계적으로 비교되지 않았다.

[46] 도 10a 내지 10l은 *Pibf1*-null 마우스에서 태반의 영양막 합포화 및 혈관 미로 온전성이 손상되었음을 나타낸 결과이다. 도 10a는 $Pibf1^{-/-}$ 수태물 및 미로 혈액사이 막(labyrinth interhaemal membrane)에서 Pibf1 결실을 포함하는 계통의 개략도를 나타낸다. S-TG: 시누소이드 영양막 거대 세포(sinusoidal trophoblast giant cell). ST-I 및 ST-II: 각각 합포체영양막세포(syncytiotrophoblast) 유형 I 및 II. EC: 내피세포. 도 10b는 태반 조직학 및 $Pibf1^{-/-}$ 배아의 총(gross) 외형. 검은색 실선은 미로의 최대 두께를 나타낸다. dec: 탈락막. jz: 접합 영역. lab: 미로. ch: 융모막. al: 요막. 도 10c 및 10d는 $Pibf1^{-/-}$ 태반에서 태반 형태학의 총 조직학적 평가(도 10c) 및 미로 혈관층의 형태학적 분석(도 10d)을 나타낸 것이다. mbs 및 fbs: 각각 모체 및 태아 혈액 공간. 도 10e는 질량 분석법(GC-MS)과 결합된 가스 크로마토그래피에 의해 측정된 $Pibf1^{-/-}$ 태반 및 E9.5-10.5에서 배아의 지방산(FA) 함량을 나타낸 것이다. 데이터는 야생형(WT; 회색 막대)(n=6/유전자형)과 비교하여 상대적인 양(%)(유색 막대)으로 표현되었다. DHA(docosahexaenoic acid)을 제외하고 "산"이라는 용어는 생략되었다. NEFA: 비필수 FA; EFA: 필수 FA. 도 10f는 미로 영양막에서 Ki67-양성 세포의 비율에 의해 결정된 바와 같은 $Pibf1^{-/-}$ 태반에서 미로 영양막의 증식을 나타낸 것이다. 도 10g는 $Pibf1^{-/-}$태반에서 TSC 및 그 계통에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. GlyT: 글리코겐 영양막 세포. SpT: 해면영양막. 도 10h는 내인성 알칼리성 포스파타제로 표지된 $Pibf1^{-/-}$ 미로에서 모체 혈액 부비동 커버 시누소이드 TGC(S-TGC)의 분포를 나타낸 것이다. 도 10i는 $Pibf1^{-/-}$ 태반에서 각각 SynT-I(화살촉) 및 -II(화살표) 층을 검출하기 위한 MCT1(빨간색) 및 MCT4(초록색)의 면역형광염색을 나타낸 것이다. MCT4 신호는 $Pibf1^{-/-}$ 미로에서 과도하게 감소하였다. m 및 f: 각각 산모 및 태아 혈액 부비동. 도 10j는 $Pibf1^{-/-}$ 미로에서 혈액사이 막의 초미세 구조를 나타낸 것이다. 상부 패널은 톨루이딘 블루(TB)로 염색된 반초박형 단면과 혈간막의 두께를 보여주고, 하단 패널은 초박형 단면(하단)의 가짜 색상(Pseudo-colored) 투과 전자 현미경(EM) 이미지를 보여준다. ii, ii' 및 ii"는 SynT-II 내의 융합 결여을 나타낸다. 해시태그는 SynT-I에서 과도한 전자 밀집 영역을 나타낸다. ec: 내피 세포, i: SynT-I, ii: SynT-

II. 도 10k는 Pibf1$^{-/-}$ 태반에서 태아 혈관 및 세포사멸성(apoptotic) 세포의 내피 내벽(endothelial lining)을 표지하기 위한 라미닌 및 TUNEL의 면역염색을 나타낸 것이다. TUNEL-양성 신호는 Pibf1$^{-/-}$ 미로(화살표)에서 태아 유래 혈관 또는 태아 적혈구와 관련된 세포에서만 검출되었다. 도 10l은 레이저 미세 해부 Pibf1$^{-/-}$ 태반 절편에서 내피 혈관구조 마커의 발현을 나타낸 것이다. 실험 샘플은 달리 명시되지 않는 한 E10.5에서 수득하였다. 전사 발현 데이터(도 10g 및 10l)는 *Gapdh*로 정규화되었고, WT의 데이터에 대해 표현되었다. 데이터는 도 10c 내지 10f, 10j 및 10l에서 평균 ± SEM으로 표시되거나, 도 10g에서 평균 ± 최소값 내지 최대값으로 표시되었다. 스튜던트 t- 테스트에서 *, **, *** P<0.05, 0.01, 0.001.

[47] 도 11a 내지 11g는 *Pibf1*-null 배아의 생존력이 자연 살해(uNK) 세포/림프구에 관한 자궁 면역 관용 또는 *Pibf1*의 모체 유전 용량과 관련이 없다는 것을 나타낸 결과이다. 도 11a는 *Pibf1*$^{+/-}$ 이종교배 배아의 야생형 가임신 암컷 마우스로의 체외 수정(IVF) 및 배아 이식(ET)을 나타낸 것이다. 도 11b는 *Pibf1*$^{+/-}$ 이종교배(왼쪽) 후 야생형 어미에서 E10.5 배아의 유전자형 분포 및 이들의 *Pibf1*$^{-/-}$ 배아의 전조직 이미지(오른쪽)를 나타낸 것이다. †발달이 지연되고 몇 가지 결함(크기 감소, 심낭 삼출, 꼬리 회전 실패)을 가짐. 도 11c는 탈락막에서 자궁 NK(uNK)와 보조 T 17(Th17) 세포 사이의 균형에 의해 조절되는 면역 내성 및 Pibf1$^{-/-}$ 수태물에서 *Pibf1* 결실을 포함하는 계통의 개략도이다. 도 11d는 E8.5 및 E10.5에서 Pibf1$^{-/-}$ 수태물 자궁간막(mesometrial) 영역에서 CD3e^{-}CD122^{+}DBA^{+} uNK 세포의 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 나타낸 것으로, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 도 11e는 Pibf1$^{-/-}$ 수태물 탈락막 영역에서 퍼포린-양성 uNK 세포의 정량화를 나타낸 것으로, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 도 11f는 Pibf1$^{+/-}$ 이종교배 배아의 *Il17*-결핍 가임신 암컷 마우스로의 IVF 및 ET를 나타낸 것이다. 도 11g는 Pibf1$^{+/-}$ 이종교배(왼쪽) 후 *Il17* 결핍 어미에서 E10.5 배아의 유전자형 분포 및 이들의 *Pibf1*$^{-/-}$ 배아의 전조직 이미지(오른쪽)를 나타낸 것이다. †발달이 지연되고 몇 가지 결함(크기 감소, 심낭 삼출, 꼬리 회전 실패)을 가짐.

[48] 도 12a 및 12b는 *Meox2* 추진(driven) cre 라인을 사용한 낭배의 외피(Epiblast) 특이적 *Pibf1* 녹아웃을 나타낸 것이다. 도 12a는 CRISPR/Cas9를 사용한 *Pibf1* 조건부 녹아웃(cKO) 마우스 생성을 보여준다. 도 12b는 *Meox2*^{cre} 매개 *Pibf1* 결실을 확인하기 위한 유전형 분석을 나타낸 것으로, E13.5 태아의 꼬리에서 준비한 게놈 DNA 샘플을 PCR을 위한 주형으로 사용하고, PCR 후 아가로스 겔 전기영동 어세이를 수행하였다. 프라이머 위치는 관련 대립 유전자에 검정색 또는 유색 화살표로 표시된다. 유색 점선 박스는 야생형 또는 *Pibf1* 플록스 대립유전자(빨간색)의 부재 및 *Pibf1* cKO 돌연변이에서 재조합 대립유전자(파란색)의 존재를 나타낸다.

[49] 도 13a 내지 13p는 *Pibf1*이 내피/조혈 계통이 아닌, 영양막 발달에 있어서 마우스의 정상적인 합포화, 태반 혈관 형성 및 후속 배아 생존에 필요하다는 것을 나

타낸 결과이다. 도 13a는 *Meox2*^{cre}(cKO^{Meox2})에 의해 추진되는 조건부 녹아웃(cKO)을 갖는 수태물 및 미로 간막에서 *Pibf1* 결실을 포함하는 계통의 개략도를 나타낸 것이다. 도 13b는 cKO^{Meox2} 이종 교배에서 예상되고 관찰되는 유전형 분포를 나타낸 것이다. 도 13c는 cKO^{Meox2} 배아의 태반 조직학 및 총 외관을 나타낸 것이다. 도 13d 및 13e는 cKO^{Meox2} 태반에서 태반 형태학(도 13d)의 총 조직학적 평가 및 미로 혈관층의 형태학적 분석(도 13e)을 나타낸 것이다. 도 13f는 cKO^{Meox2} 배아에서 머리-엉덩이 길이의 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 13g는 cKO^{Meox2} 태반에서 TSC 및 그 계통에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 13h는 cKO^{Meox2} 태반에서 각각 SynT-I(화살촉) 및 -II(화살표) 층을 검출하기 위한 MCT1(빨간색) 및 MCT4(초록색)의 면역형광염색을 나타낸 것이다. 도 13i는 cKO^{Meox2} 태반의 레이저 미세절개 단면에서 내피 혈관구조에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 13j는 콜로니 형성 단위(CFU) 어세이에 의해 결정된 *Pibf1* KO 및 cKO^{Meox2}의 난황낭(ys), 배아 고유(em) 및 태반(pl)에서의 조혈 가능성을 나타낸 것이다. CFU-GEMM = CFU-과립구, 적혈구, 대식세포, 거핵구. CFU-GM = CFU-과립구, 대식세포. BFU-E = 적아구군형성단위. 도 13k는 *Cdh5*^{cre}(cKO^{Cdh5}) 또는 *Tie2*^{cre}(cKO^{Tie2})에 의해 추진되는 내피 특이적 cKO(ecKO)를 갖는 수태물 및 미로 간막에서 *Pibf1* 결실을 포함하는 계통의 개략도를 나타낸 것이다. 도 13l은 cKO^{Cdh5} 또는 cKO^{Tie2} 이종 교배에서 예상되고 관찰되는 유전형 분포를 나타낸 것이다. 도 13m은 cKO^{Cdh5} 및 cKO^{Tie2} 배아의 태반 조직학 및 육안 모습을 보여준다. 도 13n은 ecKO 태반의 총 조직학적 평가를 나타낸 것이다. 도 13o는 ecKO 배아에서 머리-엉덩이 길이의 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 13p는 CFU 어세이에 의해 결정된 ecKO 돌연변이의 조혈 가능성을 보여준다. 달리 명시되지 않는 한 실험 샘플은 E10.5에서 수득하였다. 전사 발현 데이터(도 13g 및 13i)는 *Gapdh*로 정규화되었고, 대조군의 데이터에 대해 표현되었으며, CFU(도 13j 및 13p)는 대조군의 데이터에 대해 표현되었다. 각 막대의 수는 도 13j 및 13p에서 샘플 크기(n)를 나타낸다. 데이터는 도 13d 내지 13f, 13i, 13j 및 13n 내지 13p에서 평균 ± SEM으로 표시되거나, 도 13g에서 평균 ± 최소값 내지 최대값으로 표시되었다. n.s.: χ^2 테스트에서 유의하지 않음. 일원분산분석에서 **, *** P<0.01, 0.001.

[50] 도 14a 및 14b는 태반(도 14a) 및 배아 심장(도 14b)에서 *Meox2*-, *Cdh5*- 또는 *Tie2* 추진 cre 재조합효소 활성을 나타낸 것이다. *Meox2*-, *Cdh5*- 또는 *Tie2*-cre 대립유전자를 지닌 수컷을 암컷 R26R-lacZ 리포터와 교배시켰고, 배아, 태반 또는 심장을 E10.5 또는 E15.5에서 수득하였으며, 전조직 X-gal 염색을 실시하였다. R26R-lacZ를 가지고 있지만 cre 대립 유전자에 대해 음성인 배아를 음성 대조군으로 사용하였다. Dec: 탈락막; jz, 접합 영역; lab: 미로. fbs: 태아 혈액 공간; LaT: 미로 영양막세포; a: 심방; v: 심실. ra 및 la: 우심방 및 좌심방. rv 및 lv: 우심실 및 좌심실; oft: 유출관; ecc: 심내막융기.

[51] 도 15a 내지 15d는 Pibf1-null 수태물의 결함이 있는 조혈 조직 발달에 대한 지원 데이터이다. 도 15a는 E8.5-10.5에서 $Pibf1^{-/-}$ 난황낭(YS)의 전조직 이미지 및 E10.5에서 $Pibf1^{-/-}$ YS의 조직학적 소견을 나타낸 것이다. E10.5의 $Pibf1^{-/-}$ YS의 전조직 이미지에서 감소된 혈관구조 및 창백한 외관을 나타낸다. 별표는 $Pibf1^{-/-}$ E10.5 YS에서 팽창되고 무질서하며 적혈구 세포가 거의 포함되지 않은 혈액 섬을 나타낸다. 도 15b는 E8.5에서 $Pibf1^{-/-}$ YS의 조혈(왼쪽) 및 원시 적혈구계 세포의 글로빈(오른쪽)에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. 도 15c는 콜로니 형성 단위(CFU) 어세이에 의해 결정된 E9.5에서 $Pibf1^{-/-}$ 난황낭(ys), 배아 고유(em) 및 태반(pl)의 조혈 잠재력을 보여준다. 데이터는 야생형(WT)에 대해 표현된다. 각 막대의 숫자는 샘플 크기(n)를 나타낸다. CFU-GEMM = CFU-과립구, 적혈구, 대식세포, 거핵구. CFU-GM = CFU-과립구, 대식세포. BFU-E = 적아구군형성단위. 도 15d는 E10.5의 $Pibf1^{-/-}$ 태반에서 조혈(왼쪽) 및 원시 적혈구계 세포(오른쪽)의 글로빈에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. 전사 발현 데이터(도 15b 및 15d)는 *Gapdh*를 사용하여 정규화되었고, WT에 대하여 표현되었다. 데이터는 평균 ± SEM(도 15b 및 15d)으로 표시된다. 스튜던트 t 테스트에서 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

[52] 도 16a 내지 16c는 $Pibf1^{/}$;$Meox2^{cre/+}$ 태반 표현형에 대한 지원 데이터를 나타낸 것이다. 도 16a는 E13.5에서 *Meox2*^{cre}-매개 *Pibf1* cKO(cKO^{Meox2}) 태반의 총 조직학적 평가를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 도 16b는 질량 분석법(GC-MS)과 결합된 가스 크로마토그래피로 측정한 E13.5에서 cKO^{Meox2} 태반 및 배아의 지방산(FA) 함량을 나타낸 것으로, 데이터는 WT(회색 막대)(n=6/유전자형)와 비교하여 상대적인 양(%)(유색 막대)로 표현되었다. DHA를 제외하고 "산"이라는 용어는 생략되었다. NEFA: 비필수 FA; EFA: 필수 FA. 도 16c는 E13.5의 cKOMeox2 태반에서 각각 SynT-I 및 -II 층을 검출하기 위한 MCT1(빨간색) 및 MCT4(초록색)의 면역형광 염색을 보여준다. m 및 f: 각각 산모 및 태아 혈액 부비동.

[53] 도 17a 내지 17f는 조혈 계통에서 *Pibf1*의 손실이 정상적인 조혈을 방해하지 않는다는 것을 나타낸 결과이다. 도 17a는 E13.5에서 *Vav1*-cre (cKO^{Vav1}) 또는 *Tie2*-cre (cKO^{Tie2}) 라인을 사용하여 조혈 특이적 *Pibf1* cKO의 태아 및 태아 간의 총 이미지를 보여준다. 노란색 점선은 태아 간의 윤곽을 나타낸다. 도 17b는 cKO^{Vav1} 및 cKO^{Tie2} E13.5 태아의 머리-엉덩이 길이 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 17c는 cKO^{Vav1} 및 cKO^{Tie2}의 E13.5 태아 간의 세포성(cellularity) 분석을 나타낸 것이다. 도 17d는 E13.5에서 cKO^{Vav1} 및 cKO^{Tie2}의 난황낭, 태아 간 및 태반의 CFU 어세이 결과를 나타낸 것이다. 도 17e 및 17f는 cKO^{Cdh5} 및 cKO^{Vav1} 성체 마우스(4개월령)에서 골수(도 17e) 및 백혈구 감별(도 17f)에 의한 전체 혈구 수의 CFU 어세이 결과를 나타낸 것으로, 데이터는 대조군에 대하여 표현되며, 도 17c 내지 17f에서 평

균 ± SEM으로 표시되었다. 각 막대의 숫자는 도 17d 및 17e의 샘플 크기(n)를 나타낸다.

[54] 도 18a 내지 18j는 적절하게 합포화된 영양막을 갖는 태반이 마우스에서 혈관구조와 심장의 배아 발달을 유지시킨다는 것을 나타낸 결과이다. 도 18a는 전신 *Pibf1* KO(*Pibf1*$^{-/-}$), 낭배의 외피 특이적 cKO(cKO^{Meox2}) 또는 내피 특이적 cKO(cKO^{Cdh5}, cKO^{Tie2})를 갖는 심장에서 *Pibf1* 결실을 포함하는 계통의 개략도를 나타낸 것이다. Endo: 심내막, Myo: 심근, Epi: 심외막. 도 18b는 *Pibf1* 돌연변이 배아에서 난황낭, 간체(intersomitic) 혈관구조(ISV) 및 심장의 전조직 CD31 염색을 나타낸 것이다. 난황낭 이미지의 노란색 점선은 직경이 ≥40μm인 연속 혈관을 표시한다. 도 18c 및 18d는 *Pibf1* 돌연변이 심장에서 조직학적 단편의 CD31 염색(도 18c) 및 CD31-염색 영역의 정량화(도 18d)를 나타낸 것이다. a: 심방; la 및 ra: 좌심방 및 우심방. v: 심실. lv 및 rv: 좌심실 및 우심실. 도 18e는 *Pibf1* KO 및 cKO 심장의 전조직 이미지 및 조직학적 검사 결과를 나타낸 것이다. 흰색 선은 우심실 및 좌심실의 가장자리에서 가장자리까지의 최대 길이를 나타낸다. 좌심실 또는 우심실은 *Pibf1* KO 심장에서 특정되지 않았다. 도 18f는 전조직 이미지에서 측정한 *Pibf1* KO 및 cKO 심장의 심실 크기를 비교한 것이다. 도 18g 및 18h는 *Pibf1* 돌연변이 심장에서 조직학적 절편에서 cTnT의 면역염색(도 18g) 및 cTnT 염색 영역의 정량화(도 18h)를 나타낸 것이다. 도 18i 및 18j는 *Pibf1* KO 및 cKO 심장에서 관상 혈관 발달(도 18i) 및 심장 형성(도 18j)에 대한 마커의 발현을 나타낸 것이다. 달리 명시되지 않는 한 실험 샘플은 E10.5에서 수득하였다. 전사 발현 데이터(도 18i 및 18j)는 *Gapdh*로 정규화되었고, 대조군의 데이터에 대해 표현되었다. 데이터는 도 18d, 18f 및 18h에서 평균 ± SEM으로 표시되거나, 도 18i 및 18j에서 평균 ± 최소값 내지 최대값으로 표시된다. 일원분산분석에서 *, **, ***P<0.05, 0.01, 0.001.

[55] 도 19a 및 19b는 Pibf1 돌연변이 심장에서 심방과 심실의 높이 및 너비 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 19a에 나타난 바와 같이, E10.5 전조직 심장에서, 심방 및 심실 영역은 측정을 위해 복부 및 등쪽 보기에서 각각 캡처되었고, 도 19b와 같이 정량화되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. Pibf1$^{-/-}$ 심장의 심실 높이와 너비는 0으로 간주되었으며, Pibf$^{-/-}$ 심장이 뚜렷한 오른쪽 및 왼쪽 심실을 형성하지 못했기 때문에, 그룹 간에 통계적으로 비교되지 않았다.

[56] 도 20a 내지 20h는 *Pibf1*-null 배아 치사율이 *Trp53* 의존적이지 않으며, 섬모질환 관련 이상은 임신 후기의 *Pibf1*$^{\Delta/\Delta}$;*Meox2*$^{cre/+}$ 태아에서 나타난다는 것을 보여주는 결과이다. 도 20a는 E10.5 *Pibf1*$^{-/-}$ 배아에서 Trp53의 발현을 나타내며, β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었다. 도 20b는 *Pibf1*$^{-/-}$, *Trp53*$^{-/-}$ 배아를 얻기 위한 교배 계획을 나타낸 것이다. 도 20c는 Trp53이 결핍된 *Pibf1*$^{+/-}$ 이종교배 E10.5 배아의 유전자형 분포(상단 패널) 및 그들의 *Pibf1*$^{-/-}$;*Trp53*$^{-/-}$ 배아의 전조직 이미지(하단 패널)를 보여준다. †발달이 지연되고 몇 가지 결함(크기 감소, 심낭 삼출, 꼬리

회전 실패)을 가짐. 도 20d는 E18.5 및 출생 후 cKO^{Meox2} 이종교배의 예상되고 관찰되는 유전형 분포를 나타낸 것이다. χ^2 테스트에서 ***$P < 0.001$. 도 20e 및 20f는 cKO^{Meox2} E15.5 태아의 전체 형태(도 20e) 및 사지의 확대 보기(도 20f)를 보여준다. 화살표, 화살촉 및 별표는 다지증(polydactyly), 소안구증(microphthalmia) 및 피하 부종을 나타낸다. 도 20g는 cKO^{Meox2} E15.5 태아의 자기 공명 이미지이다. 화살표, 화살촉 및 별표는 소안구증, 피하 부종 및 뇌수종을 나타낸다. 도 20h는 cKO^{Meox2} E15.5 태아의 척수에서 Arl13b/아세틸화 튜불린 이중 양성 1차 섬모(화살촉)를 검출하기 위한 면역형광 염색을 나타낸 것이다. cc: 중심관; L: 루멘.

[57] 도 21a 내지 21c는 모체 혈액 및 면역 세포의 *Pibf1* 결실이 정상적인 생식력을 방해하지 않는다는 것을 나타낸 결과이다. 도 21a는 임신과 결과를 모니터링하기 위한 교배 계획을 나타낸 것이다. 도 21b에 나타낸 바와 같이, $Pibf1^{f/f}$ 또는 cKO^{Vav1} 암컷(8주령)을 4개월 동안 야생형 수컷과 교배하였고, 도 21c에 나타낸 바와 같이 유전형 당 3마리의 다른 한배 새끼에서 얻은 새끼를 8주 동안 체중으로 모니터링하였다.

[58] 도 22는 PIBF1이 영양막세포 융합에 필수 인자로 작용하며, 합포체영양막세포(SynT) 유래 PIBF1이 태반-심장 축을 유지하기 위한 배아의 심혈관 성장인자로 작용한다는 것을 나타낸 개략도이다. 영양막줄기세포(TSC)는 PIBF1을 통한 세포 간 융합으로 합포체영양막세포로 분화되며, 분화된 합포체영양막세포에서 분비된 PIBF1은 내피 세포 및 혈관 주위 세포와 같은 태반구성 배아 유래 혈관 형성 세포와 상호작용하며 혈관 신생을 촉진함으로써 일차 태반의 모체-태아 경계면을 구성하는 혈액사이(interhaemal) 막을 확립한다[SynT-I 및 SynT-II: 합포체영양막세포(syncytiotrophoblast) 유형 I 및 II; S-TGC: 시누소이드 영양막 거대 세포(sinusoidal trophoblast giant cell)].

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[59] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[60] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.

[61] 본 발명에서는 면역세포 유래의 임신기 면역관용을 조절하는 단백질로 알려져 있던 PIBF1의 새로운 분비 세포 확인을 통해, 태반, 배태아 혈관 및 심장 발달을 조절하는 새로운 기전을 밝혔다. 구체적으로, 본 발명자들은 PIBF1 단백질 또는 이의 단편이 인간 영양막 및 마우스 태반에서 영양막 분화 및 SynT로의 융합에 필수적이고, SynT 유래 PIBF1은 SynT와 인접한 혈관 세포 간의 통신을 가능하게 하여 1차 태반에서 혈관 네트워크를 발달시키며, 내분비 방식으로 배아 심혈관 시스템의 초기 발달에 추가로 영향을 미친다는 것을 확인함으로써, PIBF1 단백

질 또는 이의 단편의 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 가능성을 입증하였다.

[62] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[63] 이와 관련하여, 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료에 사용하기 위한, (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[64] 또한, 본 발명은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 약제를 제조하기 위한, (i) PIBF1 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[65] 본 발명에 있어서, 상기 PIBF1 단백질은 이의 전장 형태 또는 N-말단의 일부 아미노산 서열 또는 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[66] 인간에서 상기 PIBF1 단백질은 NCBI Reference Sequence: NP_006337.2 등에 개시된 아미노산 서열 또는 이의 일부를 포함할 수 있으나, 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한없이 포함할 수 있다. 상기 PIBF1 단백질은 동형 단백질(isoform) 또는 이의 전구체도 포함할 수 있다.

[67] 본 발명에 있어서, 상기 PIBF1 단백질은 다음의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있으나, 실질적으로 상기 PIBF1 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 아미노산 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[68] MSRKISKESKKVNISSSLESEDISLETTVPTDDISSSEEREGKVRITRQLIERK
ELLHNIQLLKIELSQKTMMIDNLKVDYLTKIEELEEKLNDALHQKQLLTL
RLDNQLAFQQKDASKYQELMKQEMETILLRQKQLEETNLQ

LREKAGDVRRNLRDFELTEEQYIKLKAFPEDQLSIPEYVS
VRFYELVNPLRKEICELQVKKNILAEELSTNKNQLKQLTE
TYEEDRKNYSEVQIRCQRLALELADTKQLIQQGDYRQENY
DKVKSERDALEQEVIELRRKHEILEASHMIQTKERSELSK
EVVTLEQTVTLLQKDKEYLNRQNMELSVRCAHEEDRLERL
QAQLEESKKAREEMYEKYVASRDHYKTEYENKLHDELEQI
RLKTNQEIDQLRNASREMYERENRNLREARDNAVAEKERA
VMAEKDALEKHDQLLDRYRELQLSTESKVTEFLHQSKLKS
FESERVQLLQEETARNLTQCQLECEKYQKKLEVLTKEFYS
LQASSEKRITELQAQNSEHQARLDIYEKLEKELDEIIMQT
AEIENEDEAERVLFSYGYGANVPTTAKRRLKQSVHLARRV
LQLEKQNSLILKDLEHRKDQVTQLSQELDRANSLLNQTQQ
PYRYLIESVRQRDSKIDSLTESIAQLEKDVSNLNKEKSAL
LQTKNQMALDLEQLLNHREELAAMKQILVKMHSKHSENSL
LLTKTEPKHVTENQKSKTLNVPKEHEDNIFTPKPTLFTKKEAPEWSKKQKMKT
(서열번호 1)

[69] 본 발명에 있어서, 상기 PIBF1 단백질의 단편은 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열 또는 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다.

[70] 구체적으로, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기를 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다. 예를 들어, N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 적어도 아미노산 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기로 필수적으로 이루어지며, 아미노산 위치 757 이전의 임의의 아미노산 위치까지의 아미노산 잔기를 제한 없이 포함할 수 있다.

[71] 또한, 상기 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다. 예를 들어, C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 적어도 아미노산 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기로 필수적으로 이루어지며, 아미노산 위치 1 이후의 임의의 아미노산 위치부터 C-말단 끝까지의 아미노산 잔기를 제한 없이 포함할 수 있다.

[72] 또한, 상기 PIBF1 단백질의 단편이 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함하는 경우, 전술한 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열이 융합된 형태일 수 있다. 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 적어도 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기와 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를 포함하거나, 이로 이루어질 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 적어도 위치 1부터 224까지의 아미노산 잔기와 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를

포함하거나, 이로 이루어질 수 있다. 이때, N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 위치 1부터 위치 224까지의 임의의 아미노산 잔기를 제한없이 포함할 수도 있다.

[73] 본 발명에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 다음의 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 실질적으로 상기 PIBF1 단백질 단편과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 2의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 아미노산 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[74] MSRKISKESKKVNISSSLESEDISLETTVPTDDISSSEEREGKVRITRQLIERK
ELLHNIQLLKIELSQKTMMIDNLKVDYLTKIEELEEKLNDALHQKQLLTL
RLDNQLAFQQKDASKYQELMKQEMETILLRQKQLEETNLQ
LREKAGDVRRNLRDFELTEEQYIKLKAFPEDQLSIPEYVS (서열번호 2)

[75] 본 발명에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 실질적으로 상기 PIBF1 단백질 단편과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 3의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 아미노산 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[76] MSRKISKESKKVNISSSLESEDISLETTVPTDDISSSEEREGKVRITRQLIERK
ELLHNIQLLKIELSQKTMMIDNLKVDYLTKIEELEEKLNDALHQKQLLTL
RLDNQLAFQQKDASKYQELMKQEMETILLRQKQLEETNLQ
LREKAGDVRRNLRDFELTEEQYIKLKAFPEDQLSIPEYVS

VRFYELVNPLRKEICELQVKKNILAEELSTNKNQLKQLTE
ELAAMKQILVKMHSKHSENSLLLTKTEPKHVTENQKSKTL
NVPKEHEDNIFTPKPTLFTKKEAPEWSKKQKMKT (서열번호 3)

[77] 실질적으로 상기 PIBF1 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역 을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 아미노산 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[78] 본 발명은 상기 PIBF1 단백질 또는 이의 단편과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드의 단편을 역시 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드란 아미노산 서열의 상동성과는 무관하게, 본 발명에서 사용된 것과 동일한 기능을 가지는 단백질을 의미한다. 상기 폴리펩타이드의 단편 또한 단편의 길이와는 무관하게, 본 발명에서 사용된 것과 동일한 기능을 가지는 단백질을 의미한다.

[79] 본 발명에서 사용되는 단백질은 그 일부 아미노산이 치환될 수 있는데, 본 출원의 아미노산 치환은 비보존 치환(non-conserved substitutions)일 수 있다. 상기 비보존 치환은, 예를 들어, 특정 측쇄 크기 또는 특정 특성 (예를 들어, 친수성)을 갖는 아미노산 잔기를 상이한 측쇄 크기 또는 상이한 특성 (예를 들어, 소수성)을 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 것과 같은 비 보존 방식으로, 표적 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 변경하는 것을 포함할 수 있다.

[80] 상기 아미노산 치환은 또한 보존된 치환(conserved substitutions) 일 수 있다. 상기 보존된 치환은, 예를 들어, 특정 측쇄 크기 또는 특정 특징 (예를 들어, 친수성)을 갖는 아미노산 잔기를 동일하거나 유사한 측쇄 크기 또는 동일하거나 유사한 특성 (예: 여전히 친수성)을 갖는 아미노산 잔기로 대체하는 것과 같이, 보존된 방식으로 표적 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 변경하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 보존된 치환은 일반적으로 생산된 단백질의 구조 또는 기능에 큰 영향을 미치지 않는다. 본 출원에서, 재조합 단백질의 돌연변이인 아미노산 서열 변이체, 이의 단편, 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된 이의 변이체는 단백질의 구조 또는 기능을 현저하게 변화시키지 않는 보존된 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[81] 예를 들어, 다음 그룹 각각에서 아미노산 간의 상호 치환(mutual substitutions)은 본 출원에서 보존적 치환으로 간주될 수 있다:

[82] 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 그룹: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌.

[83] 극성 측쇄를 갖는 비하전 아미노산 그룹: 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민.

[84] 극성 측쇄를 갖는 음전하 아미노산 그룹: 아스파르트산 및 글루탐산.

[85] 양전하를 띤 염기성 아미노산 그룹: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘.

[86] 페닐을 갖는 아미노산 그룹: 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신.

[87] 본 발명에 포함된 재조합 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 아미노산 서열은 또한 적어도 다음 범위를 포함하는 것으로 이해될 수 있다: 상기 재조합 단백질 또는 폴리펩타이드와 동일하거나 유사한 기능을 갖는 변이체 또는 상동체 (homologues).

[88] 본 발명에서, 상기 변이체는 상기 재조합 단백질 및/또는 상기 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩타이드 일 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 적어도 1 개의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입, 예를 들어 1-30, 1-20 또는 1-10, 대안적으로, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의한 아미노산 변화를 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 상기 기능적 변이체는 변화 (예를 들어, 치환, 결실 또는 첨가) 전에 상기 단백질 또는 상기 폴리펩타이드의 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 수 있다. 예를 들어, 상기 기능적 변이체는 변경 전에 상기 단백질 또는 상기 폴리펩타이드의 생물학적 활성의 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상을 보유할 수 있다.

[89] 본 발명에서, 상기 상동체(homologue)는 상기 단백질 및/또는 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 약 80 % (예를 들어, 적어도 약 85 %, 약 90%, 약91 %, 약 92 %, 약 93 %, 약 94 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 이상) 서열 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드 일 수 있다.

[90] 본 발명에서, 상기 상동성은 일반적으로 둘 이상의 서열 간의 유사성(similarity), 유의성(analogousness) 또는 연관성(association)을 지칭한다. " 서열 상동성 백분율 (percent of sequence homology)"은 동일한 핵산 염기 (예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 존재하는 위치의 수를 결정하는 비교 창에서 정렬된 두 서열을 비교하는 방식에 의해 계산될 수 있으며, 비교 창(즉, 윈도우 사이즈)의 일치하는 위치의 수를 제공하기 위하여 일치하는 위치의 수를 총 위치 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 상동성의 백분율을 제공한다. 서열 상동성의 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계에 알려진 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열 내에서 또는 표적 서열 영역 내에서 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를

결정할 수 있다. 상기 상동성은 또한 다음 방법에 의해 결정될 수 있다: FASTA 및 BLAST. FASTA 알고리즘은 예를 들어 W. R. Pearson and D. J. Lipman's "Improved Tool for Biological Sequence Comparison", Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 2444-2448, 1988; 및 D, J. Lipman and W. R. Pearson's "Fast and Sensitive Protein Similarity Search", Science, 227:1435-1441, 1989에 개시되어 있고, BLAST 알고리즘에 대한 설명은 S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. Lipman, "A Basic Local Alignment Search Tool", Journal of Molecular Biology, 215: 403-410, 1990에 개시되어 있다.

[91] PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자의 mRNA는 NCBI Reference Sequence: NM_006346.4 등에 개시된 염기서열 또는 이의 일부를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[92] 바람직하게는 상기 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있으나, 실질적으로 상기 염기서열과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 염기서열을 포함하거나, 이로 이루어진 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 염기서열을 포함한다. 염기서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 염기서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다

[93] 본 발명은 상기 염기서열과 실질적으로 동일한 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 이의 단편도 포함한다. 실질적으로 동일한 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드란 서열의 상동성과는 무관하게, 본 발명에서 사용된 것과 동일한 기능을 가지는 재조합 단백질을 코딩하는 유전자를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드의 단편 또한 단편의 길이와는 무관하게, 본 발명에서 사용된 것과 동일한 기능을 가지는 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[94] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 모체에서 25 내지 90 kDa 분자량을 갖는 PIBF1 단백질을 증가시킬 수 있다.

[95] 이때, 상기 PIBF1 단백질이 분비형(secretory) 단백질인 경우, 분비형 PIBF1 단백질은 다양한 분자량을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 25 내지 45 kDa일 수 있고, 바람직하게는 30 내지 40 kDa일 수 있고, 보다 바람직하게는 35 kDa일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 상기 분비형 PIBF1 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다.

[96] 본 발명의 조성물은 상기 PIBF1 단백질 및 이의 단편의 혼합물을 포함하거나, 또는 상기 PIBF1 단백질 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터와 상기 PIBF1 단백질의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함할 수 있다.

[97] 본 발명의 PIBF1 단백질 또는 이의 단편; 또는 PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터는 배아 유래 혈관내피세포, 혈관주위세포의 이동 및 혈관 신생에 관한 신호전달기전을 활성화시켜 태반 내 혈관 형성을 촉진할 수 있고, 형성된 태반의 순화계를 따라 태아의 심혈관발달을 촉진할 수 있다.

[98] 따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 다음의 a) 내지 d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내어, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다: a) 배아의 혈관 유사 구조의 형성; b) 배아의 혈관 신생; c) 배아의 심근 세포의 분화 및 성숙; 및 d) 모체-태아 경계면의 형성.

[99] 본 발명에 있어서, 상기 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증은 습관성 유산, 자간전증 또는 태아 심장 결함을 포함할 수 있다.

[100] 본 명세서에서, 상기 "습관성 유산"은 임신 5개월(20주) 이전의 유산이 2~3차례 이상 반복되는 것을 의미하며, 바람직하게는 태반 또는 태아 심혈관 이상으로 인한 유산 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[101] 본 명세서에서, 상기 "자간전증(preeclampsia, PE)"이란, 임신 20주 이후에 고혈압(140/90mmHg 이상)과 단백뇨(1일 뇨 중 0.3g 이상 및/또는 dipstick testing 1+ 이상)가 발생한 것을 의미한다. 자간전증은 발생 및 분만시기에 따라, 조기에 발병하여 34주 이전에 분만이 진행된 조기발생 자간전증(또는 조기발병 자간전증, EP) 및 중·후기에 발병하여 34주 이후, 예를 들어, 37주 내지 41주에 분만이 진행된 후기발생 자간전증(또는 후기발병 자간전 증, LP)으로 구분될 수 있다.

[102] 본 명세서에서, 용어 "예방"은 질병 또는 병증의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 발병 시기를 지연시키거나, 발병을 억제하는 것을 의미한다.

[103] 본 명세서에서, 용어 "개선"은 질병 또는 병증의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 증상을 호전시키거나, 이롭게 변경시키는 것을 의미한다.

[104] 본 명세서에서, 용어 "치료"는 질병 또는 병증의 진행을 지연, 중단 또는 역전시키는 모든 행위를 의미하는 것으로, 본 발명에 있어서는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 증상을 경감, 완화 또는 없애거나, 역전시키는 것을 의미한다.

[105] 본 발명의 약학 조성물이 벡터의 형태로 사용되는 경우, 상기 벡터는 임의의 타입을 가질 수 있고, 예를 들면 플라스미드 벡터 (plasmid vector) 또는 미니서클 (minicircle) DNA일 수 있다.

[106] 그러나, 통상적으로, 본 발명의 벡터는 바이러스 벡터 (viral vectors)일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 예를 들면 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스, 아데노바이러스(adenovirus) 또는 렌티바이러스(lentivirus)에 기반할 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus: AAV) 벡터 또는 그 유도체일 수 있다. 상기 바이러스 벡터 유도체는 키메라(chimeric), 셔플된(shuffled) 또는 캡시드 변형된(capsid modified) 유도체일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 AAV의 천연 유래된 혈청형(naturally derived serotype), 분리물(isolate) 또는 클레이드(clade)으로부터 유래된 AAV 게놈을 포함할 수 있다. 상 기 혈청형은 예를 들면 AAV2, AAV5 또는 AAV8일 수 있다.

[107] 유전자 요법의 효능은 일반적으로 공여된(donated) DNA의 적절하고 효과적인 전달에 의존한다. 상기 과정은 통상적으로 바이러스 벡터에 의해 매개된다. 아데노-관련 바이러스 (AAV)인 파르보바이러스과 (parvovirus family)의 멤버가 유전자 요법에 일반적으로 사용된다. 바이러스 유전자를 포함하는 야생형 AAV는 그 게놈 물질을 숙주 세포의 염색체 19로 삽입시킨다. 상기 AAV 단일-가닥 DNA 게놈은, 구조적(cap) 및 패키징(rep) 유전자를 포함하는, 2개의 반전 말단 반복부 (inverted terminal repeats: ITRs) 및 2개의 오픈 리딩 프레임(open reading frames)을 포함한다.

[108] 본 발명의 조성물은 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증을 예방 또는 치료하기 위한 목적으로, 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

[109] 본 발명에 있어서, 용어 "환자"는 인간, 인간, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[110] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 내 투여일 수 있다.

[111] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 약학 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충진제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[112] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨,

만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[113] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[114] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[115] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[116] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[117] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

[118] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 단백질은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기제의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[119] 이외에도, 본 발명의 약학 조성물은 단백질 의약품을 투여하기에 적합한 것으로 공지된 모든 임의의 제형으로 제조하여 투여될 수 있다.

[120] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[121] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.001 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.001 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[122] 본 발명의 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[123] 본 발명의 제2 측면은 (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전

자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[124] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 "개체"는 전술한 "환자"와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 보다 상세하게는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증이 발병할 위험이 있는 인간을 포함한 포유동물, 또는 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증이 발병한 인간을 포함한 포유동물일 수 있으며, 이때 상기 포유동물은 인간, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 마우스(mouse), 랫트(rat) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[125] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 개체에 투여되는 조성물의 구성, 효과 및 이의 투여 경로, 투여 횟수, 투여량 등에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[127] [실시예 1]

[128] **세포 배양 및 PIBF1 KO 세포주 확립**

[129] 1-1. 세포 배양

[130] BeWo 세포(CCL-98, ATCC)는 10% FBS(16000-044, Gibco)가 보충된 둘베코 변형 이글 배지-햄 F12(DMEM/F12) 배지(11320-033, Gibco)에서 배양되었다. 콜라겐 I을 사용하여 기증된 임산부의 인간 탯줄에서 분리한 HUVEC를 대형 혈관 내피 보충제(LVES; A1460801, Gibco)가 보충된 Medium 200(M200500, Gibco)에서 배양하였다. HUAEC(8010, ScienCell Research Laboratories)는 Endothelial Cell Growth Medium(1001, ScienCell Research Laboratories)에서 배양되었다. 태반의 인간 혈관주위세포(Pl-PC; C-12980, PromoCell)를 Pericyte Growth Medium 2(C-28041, PromoCell)에서 배양하였다. BeWo, HUVEC, HUEAC 및 Pl-PCs 배양 배지는 1% 항생제-항진균제(페니실린 100 U/ml, 스트렙토마이신 100 μg/ml, 암포테리신 B 25 μg/ml; 15240-096, Gibco)를 포함하였다.

[131] 인간 영양막 줄기(hTS) 세포(RCB4936)는 Riken BRC에서 제공되었다. 상기 세포는 문헌 [H. Okae et al., Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell 22, 50-63 e56 (2018)]에 기술된 바와 같이 배양되고 유지되었다. 요약하면, hTS 세포를 5 μg/ml 콜라겐 IV(354233, Corning)-코팅 접시에 씨딩하고 TS 배지[0.1 mM 2-머캅토에탄올(2-ME; 16141-079, Gibco), 0.2% FBS(Gibco), 0.5% 항생제-항진균제, 0.3% BSA(017-22231, Wako), 1% ITS-X 보충제(094-06761, Wako), 1.5μg/ml L-아스코르빈산(013 -12061, Wako), 50ng/ml EGF(053-07871,

Wako), 2μM CHIR99021(038-23101, Wako), 0.5μM A83-01(035-24113, Wako), 1μM SB431542(031-24291, Wako), 0.8mM 발프로산(227-01071, Wako) 및 5μM Y27632(036-24023, Wako)로 보충된 DMEM/F12(Gibco)]에서 배양하고, 배양 배지를 2일마다 교체하였다. 모든 세포는 37 ℃에서 5% CO_2가 있는 가습 환경에서 배양되었다.

[132] 1-2. PIBF1 KO 세포주 확립

[133] 인간 세포주에서 PIBF1 유전자를 표적으로 하기 위해, CRISPR/AsCpf1(Acidaminococcus sp. BV3L6 Cpf1), pY108(Addgene 플라스미드 #84739; http:/n2t.net/addgene:84739; RRID:Addgene_84739)을 발현하는 렌티바이러스 벡터를 사용하였다. 인간 PIBF1 유전자에 특이적인 CRISPR RNA는 Benchling(https:/www.benchling.com)을 사용하여 디자인되었으며, 다음 올리고머는 Macrogen, Inc.에서 구입하였다.

[134] [표1]

올리고머	서열	서열번호
PIBF1 엑손 2-특이적 crRNA	5′-agatGAAACAACAGTTCCTACGGA-3′	4
	5′-aaaaTCCGTAGGAACTGTTGTTTC-3′	5
PIBF1 엑손 4-특이적 crRNA	5′-agatTTGAGACAGAAACAACTAGA-3′	6
	5′-aaaaTCTAGTTGTTTCTGTCTCAA-3′	7

[135] New England BioLabs, Inc.(NEB)의 BsmBI 제한 효소를 사용하여 각각의 올리고머 쌍을 어닐링하고 pY108로 클로닝하였다.

[136] BeWo 및 hTS 세포는 폴리브렌(2.5㎍/ml; 107689, Sigma)의 존재 하에 배양 배지 및 hPIBF1 엑손 2 또는 엑손 4 표적화 Cpf1-발현 벡터를 함유하는 렌티바이러스 상청액의 1:1 혼합물로 형질도입되었다. 48시간 동안 퓨로마이신(2 μg/ml; A1113803, Gibco)으로 세포를 선별한 다음, 형질도입되고 선별된 세포는 분리되어 단일 세포 성장이 가능한 가장 낮은 세포 농도로 100 mm 디쉬에 씨딩하였다. 그런 다음 세포가 눈에 보이는 콜로니를 형성할 때까지 성장시키고, 단일 세포 콜로니(각 표적 엑손에 대해 n = 60)를 96-웰 플레이트에 씨딩한 후 선별하였다.

[137] 웨스턴 블롯팅을 이용한 BeWo 및 hTSC 콜로니의 PIBF1 발현을 조사한 후, 콜로니를 더 큰 배양 플레이트로 확장시켰다. PIBF1 KO 의심 콜로니의 후속 서열 분석을 위해, 돌연변이 PIBF1 유전자좌는 다음 프라이머를 사용한 PCR 반응에 의해 증폭되었다.

[138] [표2]

프라이머	서열	크기	서열번호
hPIBF1 엑손 2	5′-cctccccgcaggaactg-3′	580 bp	8
	5′-tgccgtttgaagacaataaagca-3′		9
hPIBF1 엑손 4	5′-tactgtcaggtttctgatttcctaa -3′	443b p	10
	5′-aacaccattcaccatccatagc-3′		11

[139] 콜로니의 PCR 산물은 T-Blunt PCR 클로닝 키트(SOT02-K020, SolGent)를 사용하여 클로닝되었다. 돌연변이는 각 콜로니로부터 20-25개 클론의 생어 염기서열분석(Sanger sequencing analysis; Bionics, Seoul, Korea)으로 확인하였다. PIBF1 발현의 부재가 웨스턴 블롯팅에 의해 확인된 PIBF1 KO를 갖는 BeWo 및 hTS 콜로니를 더 큰 배양 플레이트로 확장시켰다. PIBF1 KO TS 세포는 6-8 계대에서 사용되었다.

[140] [실시예 2]

[141] **재조합 PIBF1**

[142] PIBF1의 전장의 재조합 단백질(rfPIBF; H00010464-P01) 및 C-말단 단편(rcPIBF; H00010464-Q01)은 Abnova에서 구입하였다. 또한, CHO 세포로부터 발현 및 정제된 PIBF1(1~298 a.a, rsPIBF)의 면역글로불린의 인간 Fc 융합 형태는 Ybiologics(대한민국, 대전)에서 구입하였다. raPIBF의 생산을 위해, PIBF1의 N-말단 cDNA(1~184 a.a)를 Bioneer(대한민국, 대전)에서 합성하여 대장균 발현 벡터 pET28.1a에 클로닝하였다. 이 재조합 DNA 벡터는 T7 프로모터 프라이머를 사용하여 배치를 위해 시퀀싱되었고, BL21(DE2) 대장균 발현 시스템으로 이동시켰다. 대장균을 배양하기 위해 2리터의 LB 배지를 적용하였고, 37℃, 150rpm 진탕 조건에서 O.D600 = 0.6에서 0.5mM 아이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드로 재조합 단백질 발현을 유도하였다. 세포 펠릿은 3,000rpm 원심분리를 사용하여 20 ℃에서 12시간 배양 후 수확되었다. 펠릿은 150mM NaCl 및 1X 프로테아제 억제제 칵테일과 함께 50mM Tris-HCl 완충액(pH8.5)을 사용하여 용해되었고, Q Sepharose Fast Flow(Cytiva, USA)를 사용한 이온 교환 크로마토그래피 및 Superdex 200(Cytiva, USA)와 1X PBS 버퍼를 사용한 순차적 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 재조합 단백질의 순도는 SDS-PAGE와 쿠마씨(Coomassie) 염색을 이용하여 확인하였으며, 단백질 용액은 사용하기 전까지 -20 ℃에 보관하였다.

[143] [실시예 3]

[144] **BeWo 실험**

[145] <u>3-1. 세포 간 융합 및 융합 인덱스(index) 정량화</u>

[146] 20-mm 공초점 접시에 24시간 파종한 후, BeWo 세포를 20μM 포스콜린(3828, Cell Signaling Technology)과 함께 배양하여 세포 융합을 유도하고, 포스콜린 함유 배지를 24시간마다 새로 교체하였다. 48시간 처리 후, 배양된 세포를 Hoechst

33342(H1399, Invitrogen) 및 2μM Di-8-ANEPPS(D3167, Invitrogen)로 30분 동안 염색하고, 염료가 없는 배지에서 2회 세척한 후 Zeiss LSM 880 Fast Airyscan 공초점 시스템(Carl Zeiss, Jena, Germany)로 이미지화하였다. 3회 이상의 독립적인 실험에서 무작위로 선택된 6개 필드의 형광 이미지에서, 비융합 또는 융합 세포 내의 핵 수를 ImageJ(NIH)를 사용하여 계수하였다. 2개 이상의 핵을 갖는 세포를 융합 세포로 동정하고, 각 그룹의 융합 인덱스를 다음과 같이 계산하였다: (융합된 세포 내 핵의 수)/(총 핵의 수). 융합 인덱스 데이터는 포스콜린-미처리 WT 대조군에 대해 표현되었다.

[147] 3-2. PIBF1 KO BeWo 세포에서 PIBF1 회복

[148] PIBF1을 재도입하기 위해, 인간 PIBF1(NP_006337.2)의 아미노산 1-757(fPIBF) 또는 1-224 + 684-757(sPIBF)을 암호화하는 cDNA 영역의 단편을 합성하여 Cosmogenetech(대한민국, 서울)에 의해 pCAGGS 발현 벡터(H. Niwa, K. Yamamura, J. Miyazaki, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-199 (1991).)에 삽입하였다. 제한 소화 분석 및 시퀀싱으로 올바른 삽입을 확인한 후, 제조사의 지침에 따라, fPIBF 또는 sPIBF 또는 빈 벡터 대조군을 발현하는 생성된 컨스트럭트 DNA(1 μg/ml)를 PLUS 시약(15338100, Invitrogen)과 함께 리포펙타민 LTX를 사용하여 PIBF1 KO BeWo 세포에 형질감염하였다. 이는 형질감염된 세포의 용해물에서 PIBF1의 웨스턴 블롯팅에 의해 추가로 확인되었다.

[149] 3-3. PIBF1 KO BeWo 세포에 대한 재조합 PIBF1 처리

[150] PIBF1 KO BeWo 세포를 20 μM 포스콜린과 동시에 rsPIBF(400 ng/ml) 또는 rfPIBF(400 ng/ml)와 함께 배양하였다. 48시간 후, 전술한 바와 같이 융합 인덱스를 얻었다.

[151] 3-4. 세포영양막-내피 트랜스웰 공동 배양

[152] 세포영양막-내피 공동 배양 시스템은 문헌[Y. Wang et al., Placental trophoblast-derived factors diminish endothelial barrier function. J Clin Endocrinol Metab 89, 2421-2428 (2004).]의 방법을 약간 수정하여 조정되었다. 요약하면, hTS 세포를 2.5μg/ml 콜라겐 IV로 코팅한 24웰 챔버 바닥에 도말하고, TS 또는 SynT(2D) 배지에서 5일 동안 배양한 다음 3일차에 새로운 배지를 교체하였다. 동일한 24웰 챔버 바닥에 있는 BeWo 세포는 fPIBF 발현 및/또는 sPIBF 발현 컨스트럭트 또는 대조군 벡터로 24시간 동안 형질감염시킨 다음 포스콜린으로 48시간 동안 자극하였다.

[153] 분화 5일 후 또는 포스콜린 자극 48시간 후, 배양 배지를 HUVEC-SynT에서 Medium 200/LVES와 변형된 SynT(2D)(EGF, Y27632 및 포스콜린이 없는 SynT(2D) 배지, 내피 침입 용량에 영향을 줄 수 있음)의 1:1 혼합 배지로 교체하거나, HUVEC-BeWo에서 Medium 200/LVES와 DMEM/F12/10% FBS로 교체하였다.

[154] 동시에, HUVEC를 마트리겔(354234, Corning)로 코팅된 8-μm 기공 크기의 트랜스웰 인서트(CLS3422, Corning)에 24시간 동안 둔 다음, 내피 인서트를 분화된

SynT 또는 포스콜린 자극 BeWo 배양물로 옮겼다. 24시간의 공동 배양 후, 막의 하부 표면을 침입한 HUVEC는 크리스탈 바이올렛으로 염색되었다. 침입된 세포의 수는 ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 각 샘플에서 무작위로 선택한 6개 필드에서 계산되었다.

[155] [실시예 4]

[156] **시험관 내(*in vitro*) 혈관 신생 어세이**

[157] 이동 어세이를 위해, HUVEC, HUAEC 및 Pl-PC가 95% 컨플루언스(confluence)에 도달하였을 때, 플레이트 전체에 200μl 파이펫 팁을 사용하여 세 개의 스크래치를 만들었다. 세척 후, 세포를 9시간(HUVEC), 14시간(HUAEC) 또는 8시간(Pl-PC) 동안 rsPIBF, rfPIBF, raPIBF 및 rcPIBF 없이 또는 20, 50, 100 및 200ng/ml의 용량으로 함께 배양하였다. VEGF(20ng/ml; 293-VE, R&D Systems) 및 PDGF-BB(50ng/ml; PeproTech, 100-14B)를 각각 EC 및 Pl-PC에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. 0시간 및 종말점에서의 세포 이동 이미지는 ImageJ를 사용하여 이동된 면적으로 분석되었고, 세포 이동 속도는 다음과 같이 계산되었다: [(0시간에서의 면적) - (종말점에서의 면적)]/(0시간에서의 면적) ϒ 100(%).

[158] 튜브 형성 어세이를 위해, HUVEC와 HUAEC가 80~90% 컨플루언스에 도달하였을 때, EC를 10μM CellTracker Green CMFDA Dye(C7025, Invitrogen)로 30분 동안 표지하였다. 그런 다음, 세포를 마트리겔 코팅 플레이트에 접종하고, 재조합 PIBF1 아이소폼 없이 또는 50, 100, 200 및 400 ng/ml 용량으로 9시간 동안 배양하였다. VEGF(50 ng/ml)를 양성 대조군으로 사용하였다. 이미지는 EVOS M5000 이미징 시스템(Invitrogen)을 사용하여 캡쳐하였고, HUVEC 및 HUAEC로 형성된 모세관 유사 구조는 ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 분석하였다.

[159] HUVEC에서 rsPIBF에 의해 유도된 혈관 신생 관련 신호 캐스케이드의 변화를 조사하기 위해, HUVEC를 VEGF(20 ng/ml), rsPIBF(200 ng/ml) 또는 비히클과 함께 30분 동안 배양하고, 세포를 웨스턴 블롯 분석을 위해 처리하였다.

[160] [실시예 5]

[161] **hTS 세포 실험**

[162] <u>5-1. hTS 세포의 분화</u>

[163] TS 세포의 SynT 또는 EVT로의 분화는 문헌[H. Okae et al., Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. Cell Stem Cell 22, 50-63 e56 (2018).]에 기술된 바와 같이 유도되었다. 요약하면, 2D[SynT(2D)] 배양에서 SynT 분화를 위해, TS 세포를 콜라겐 IV-코팅 접시에 접종하고, SynT(2D) 배지[0.1mM 2-ME, 0.5% 항생제-항진균제, 0.3% BSA, 1% ITS-X, 2.5μM Y27632, 2μM 포스콜린 및 4% KnockOut™ 혈청 대체물(KSR; 10828028, Gibco)로 보충된 DMEM/F12]에서 배양하였다. 세포를 3일차에 새로운 배지로 교체하고, 6일차에 분석하였다. 3D[SynT(3D)] 배양에서 SynT 분화의 경우, TS 세포는 SynT(3D) 배지[50 ng/ml EGF가 보충된 SynT(2D) 배지]에서 배양하였다. 세포는 3일차에 새로운 배지를 첨가하고, 6일차에 분석하였다.

[164] EVT 분화를 위해, TS 세포를 콜라겐 IV-코팅 접시에 접종하고, EVT 배지 [0.1mM 2-ME, 0.5% 항생제-항진균제, 0.3% BSA, 1% ITS-X, 7.5μM A83-01, 2.5μM Y27632, 4% KSR 및 100ng/ml NRG1(26941, Cell Signaling Technology)로 보충된 DMEM/F12(Gibco)]에서 배양하고, 마트리겔을 최종 농도 2%로 배지에 첨가하였다. 3일차에, 세포를 NRG1이 결여된 EVT 배지로 교체하고, 최종 농도 0.5%의 마트리겔을 첨가하였다. 6일차에 세포가 ~80% 컨플루언스에 도달하였을 때, 세포를 계대배양하고, 0.5% 마트리겔이 포함된, NRG1 및 KSR이 결여된 EVT 배지에서 추가로 2일 동안 배양하고, 8일차에 분석하였다.

[165] 5-2. 세포 생존율 어세이

[166] TSC의 생존율은 Ez-cytox cell viability assay(EZ-1000, DoGenBio)를 이용하여 측정하였다. 요약하면, TSC를 96-웰 플레이트에서 성장시키고, 배양 24시간 및 72시간에 수용성 테트라졸륨 용액을 첨가하고, 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트 판독기(SpectraMax 190, Molecular Devices)를 사용하여 450 nm에서의 광학 밀도를 측정하고, 제조사의 지침에 따라 세포 생존율을 계산하였다.

[167] 5-3. TS 세포의 생착(Engraftment)

[168] ~ 80% 컨플루언스로 성장시킨 TSC를 TrypLE(12604-021, Gibco)로 분리하고, 10^7개의 TSC를 마트리겔과 0.3% BSA 및 1% ITS-X를 함유하는 DMEM/F12의 1:2 혼합물 200μl에 재현탁시켰다. 현탁액을 6 내지 8주령의 SID 수컷 마우스에 피하 주사하였다. 병변, 소변 및 혈청을 주사 7일 후에 수집하였다. 병변을 촬영하고, 4 ℃에서 밤새 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 고정하고, 파라핀 포매한 후, 다음 실험 시까지 보관하였다. 소변 및 혈청 샘플은 사용할 때까지 -80 ℃에서 보관되었다.

[169] [실시예 6]

[170] **MRM 분석**

[171] 6-1. PIBF1 정량화를 위한 MRM 방법 확립

[172] PIBF1에 대한 대표적인 트립신 분해 펩타이드는 PeptideAltas(http://www.peptideatlas.org/) 아카이브를 사용하여 ELLHNIQLLK(분자량: 1219.72 Da, PIBF1의 N-말단(55-64 aa))인 것으로 결정되었다. ELLHNIQLLK(분자량: 1227.72 Da)에 대한 안정한 동위원소 표지된 내부 표준(SIS) 펩타이드는 MRM(Multiple Reaction Monitoring) 분석을 수행하기 위해 98% 순도(Peptron, South 한국)의 C-말단(L-리신-13C6,15N2)에서 중동위원소로 표지된 리신을 통합함으로써 합성되었다. ELLHNIQLLK의 이중 하전 펩타이드에 대한 가능한 b- 및 y-시리즈 생성물 이온 목록은 m/z 범위가 300~1,400인 Skyline 소프트웨어(64비트, 버전 19.1.0.193, University of Washington, MacCoss Lab)를 사용하여 이론적으로 생성되었다. 이러한 이론적 전이는 HPLC 시스템(1290 Infinity, Agilent Technologies)의 기본 기기 매개변수와 Jet Stream ESI Source(6495 Agilent, Agilent Technologies)를 사용하는 삼중 사중극자 질량 분석법(MS)으로 최적화되었다. MS 소스 설정은 다음과

같이 설정되었다: 가스 온도는 250 ℃, 가스 흐름은 15L/분, 네뷸라이저는 30psi, 외장 가스 온도는 350 ℃, 외장(sheath) 가스 흐름은 10L/분, 캐필러리는 양이온 누두(funneling)에 대해 3500V, 노즐 전압은 300V, 고압 RF에 대한 iFunnel 매개변수는 90V, 저압 RF는 60V였다. 가벼운 펩타이드와 SIS 펩타이드의 혼합물을 오븐 온도가 40 ℃인 역상 분석 컬럼(Zorbax Eclipse Plus C18 rapid resolution HD, 2.1 ϒ 100 mm, 1.8-micron column, Agilent Technologies)에 직접 주입하였다. 펩타이드 샘플을 분리하고 19분 동안 이동상 B의 선형 구배에서 5%에서 30% B로 0.3 ml/분으로 용출하였다(이동상 A: 물/0.1% FA, 이동상 B: 아세토니트릴/0.1% FA). 구배는 3분 동안 70% B로 기울어졌고, 3분 동안 90%로 기울어졌다. 다음 실행을 위해 컬럼을 10분 동안 5% B로 평형화하였다. 가벼운 펩타이드에 대한 상위 3개의 가장 강렬한 전이(Q1: 407.2550 m/z(삼중 전하), Q3: 501.3395(y4, 단일 전하), 433.2663(y7, 이중 전하) 및 489.8084(y8, 이중 전하)) 및 SIS 펩타이드(Q1: 410.2550 m/z(3중 전하), Q3: 509.3537(y4, 단일 전하), 437.2734(y7, 이중 전하) 및 493.8155(y8, 이중 전하))가 충돌 에너지 최적화 및 체류 시간 결정을 위해 각각 선택되었다. 100msec 주기 시간인 3분 감지 창(detection window)을 사용하여 대상 MS 수집을 수행하였다. MRM은 반응 곡선을 결정하기 위해 블랭크 매트릭스와 함께 0에서 50 fmol 범위의 농도 샘플 6개 지점을 사용하여 수행되었다. 3회 표준 편차 + 3회 블랭크 실행의 평균 피크 영역을 사용한 검출 한계(LoD) 및 10회 표준 편차 + 3회 블랭크 실행의 평균 피크 영역을 사용한 정량 한계(LoQ)를 역반응 곡선을 사용하여 결정하였다.

[173] 6-2. MRM 분석을 위한 세포 용해물 및 조건 배지의 준비

[174] hTSC, SynT 및 EVT는 BSA가 없는 배지에서 24시간 동안 배양되었다. 세포 펠릿을 용해 완충액[5% SDS, 50mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트(TEAB), 1X Halt쩨 프로테아제 억제제 칵테일(78429, Thermo Fisher Scientific), pH 8.5]에 현탁하고, 80 ℃에서 10분 동안 끓였다. 18,000 xg에서 20분 동안 원심분리하여 상청액을 수확하였다. 각 세포에서 1ml의 조건 배지(CM)를 동결건조하여 부피를 줄였다. 동결건조된 CM의 각 건조 펠릿을 300μl의 용해 완충액에 현탁하였다. 세포 용해물 및 CM의 각 상청액의 단백질 농도를 BCA 단백질 정량화 키트(Pierce™ BCA Protein Assay Kit; 23225, Thermo Fisher Scientific)로 측정하였다. Lys-C/트립신 혼합물(V5071, Promega)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 현탁액 트랩핑(S-Trap) 미니 컬럼(CO2-mini-80, ProtiFi)을 사용하여 100μg의 단백질 분취량(aliquot)을 분해하고 37 ℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다[A. Zougman, P. J. Selby, R. E. Banks, Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. Proteomics 14, 1006-1000 (2014)]. 용출된 펩타이드 혼합물은 콜드 트랩을 사용하여 동결건조하고, 사용할 때까지 -80 ℃에서 보관하였다.

[175] 6-3. MRM을 사용한 PIBF1의 정량화

[176] 세포 용해물 및 CM으로부터의 펩타이드 혼합물을 건조시키고 0.1% FA를 사용하여 1 μg/ul이 되도록 재구성하였다. SIS 펩타이드를 50 fmol로 스파이킹하고, 확립된 MRM 방법을 사용하여 표적 MRM 분석을 수행하였다. 각 전이에 대한 정량 정보는 Skyline을 이용하여 추출하였고, PIBF1의 농도는 50 fmol SIS 펩타이드의 피크 영역을 이용하여 계산하였다.

[177] [실시예 7]

[178] **hCG 측정**

[179] 마우스 소변 샘플에서 hCG의 존재는 시판되는 일반의약품 hCG 임신 테스트 키트를 사용하여 정성적으로 검출되었다. 또한, 마우스 혈청 또는 BeWo, SynT(2D) 또는 SynT(3D) 배양에서 얻은 조건 배지의 샘플에서 제조사의 지침에 따라 ELISA 키트(KA4005, Abnova)를 사용하여 hCG의 정량적 수준을 측정하였다.

[180] [실시예 8]

[181] **인간 심장 오가노이드(Human heart organoid, hHO) 실험**

[182] 8-1. hHO의 생성 및 rsPIBF1의 처리

[183] iPSC 유래 hHO는 문헌 [S. G. Lee et al., Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally similar to heart. Biomaterials 290, 121860 (2022).]에 설명된 바와 같이 생성되었다. 요약하면, 인간 iPSC를 10 μM Y-27632(1254, Tocris Bioscience) 및 10% 마트리겔(345277, Corning)을 함유하는 mTeSR-TM1 배지(StemCell Technologies)에서 3일 동안 진탕 배양기에서 배양하여 배아체(embryonic bodies, EBs)를 형성하였다. 그런 다음 EB를 인슐린이 없는 B27 보충제와 6μM CHIR99021(4423, Tocris Bioscience)을 포함하는 RPMI1640에서 2일 동안 배양한 다음, 인슐린 없이 B27 보충제와 2μM C-59(S7037, Selleckchem)를 포함하는 RPMI1640에서 2일 동안 배양하였다. 7일차에, 세포를 1% GlutaMAX 및 1% 항생제-항진균제(hHO 배지)를 포함하는 AD-MEM(Advanced MEM)에서 배양하였다.

[184] rsPIBF가 hHO의 발달에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포를 hHO 배지(대조군) 또는 200 ng/ml sPIBF를 포함하는 hHO 배지(sPIBF군)에서 8일차(hH2O 유도 1일 후)에 배양하고, 배지를 19-21일까지 이틀에 한 번씩 교체하였다.

[185] 8-2. 발아 어세이

[186] 발아 어세이를 위해 대조군 또는 rsPIBF-처리된 hHOs를 함유하는 마트리겔 20-μl 콜드 드롭을 실온에서 5분 동안 고형화하고, AD-MEM을 첨가하고, 2일마다 배지를 교체하는 진탕 배양기에서 4-6일 동안 배양하였다.

[187] 8-3. 다중 전극 어레이

[188] 다중 전극 어레이(MEA)의 경우, 대조군 또는 sPIBF 처리된 hHO를 MEA 장치(Maestro Edge 버전, Axion BioSystems, GA, USA)에 로딩한 후, 각 그룹의 전계 전위(FP)를 나타내는 원시 파형이 AxIS 소프트웨어에서 3분 동안 기록되었다. 기록된 FP의 3 가지 주요 지표(스파이크 진폭, 박동 기간 및 필드 전위 지속 시간)

는 Cardiac Analysis Tool 및 AxIS Metric Plotting Tool(Axion BioSystems)을 사용하여 분석되었다[S. G. Lee et al., Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally similar to heart. Biomaterials 290, 121860 (2022); S. G. Lee et al., Development and validation of dual-cardiotoxicity evaluation method based on analysis of field potential and contractile force of human iPSC-derived cardiomyocytes / multielectrode assay platform. Biochem Biophys Res Commun 555, 67-73 (2021)].

[189] 8-4. 조직학

[190] hHOs의 면역염색을 위해, 대조군 또는 rsPIBF-처리된 hHOs는 4% PFA에서 밤새 4℃에서 고정되었고, 수크로스 구배(15-30%)에서 탈수되었으며, OCT 화합물에 포매하였고, 9μm 두께로 냉동절편(cryosectioned)되었고, 다음 절차까지 -80℃에서 저장하였다.

[191] 8-5. RNA seq 및 유전자 온톨로지(Gene ontology, GO) 분석

[192] 총 RNA는 Trizol 시약 키트(15596026, Invitrogen)를 사용하여 EB(3일차), 대조군 또는 sPIBF 처리된 hHO(20일차)에서 분리되었다. NGS(Next-generation sequencing)는 LifeGenomics(대한민국, 수원)에서 수행하였다. 차별적으로 발현된 유전자 분석은 DESeq2 버전 1.36.0[M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014)]을 사용하여 수행되었다. 조정된 p-값(Benjamini-Hochberg 보정)으로 1.5배 이상 상향 또는 하향 조절된 유전자를 유의한 것으로 간주하였다. GO 분석은 clusterProfiler 버전 4.4.4[T. Wu et al., clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* **2**, 100141 (2021)]를 사용하여 수행되었다. 통계 분석 및 시각화는 R 버전 4.2.2 및 R 스튜디오 빌드 353 환경에서 수행되었다.

[193] [실시예 9]

[194] **hiPSC 유래 심근세포 실험**

[195] hiPSC 유래 심근세포의 2차원 배양은 문헌 [Lee, S. G. et al. Development and validation of dual-cardiotoxicity evaluationmethodbased on analysis of field potential and contractile force of human iPSC-derived cardiomyocytes / multielectrode assay platform. Biochem. Biophys. Res. Commun. 555, 67-73 (2021).]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 요약하면, hiPSC를 10 μM Y27632가 포함된 mTeSRTM1(StemCell Technologies) 배지가 있는 마트리겔 코팅 접시에 씨딩하였다. mTeSRTM1 배지는 hiPSC의 컨플루언시(confluency)가 90%에 도달할 때까지 매일 교체하였다. 먼저, 중배엽 계통으로 분화하기 위해, hiPSC를 6 μM CHIR99021이 보충된(0일차), 인슐린이 없는 B27 보충제를 포함하는(B27 배지) RPMI1640 배지에서 1일 동안 배양하였다. 다음 날(1일차)에는 3 μM CHIR99021이 포함된 B27 배지로 교체하고, 1일 동안 배양하였다. 다음으로, 심장 전구체로 유도하기 위해, Wnt 신호 억제제인 C59(Sellckem) 2 μM을 함유한 B27 배지를 2일차에 교체하였다. 다음 날(3

일차)에는 2 μM C59를 함유한 B27 배지로 교체하고 1일 동안 배양하였다. 4일차에서 10일차까지, 1% 페니실린/스트렙토마이신과 1% GlutaMAX(Gibco)를 함유한 Advanced MEM(Gibco) 배지(AD-MEM)를 분화된 세포의 박동이 시작될 때까지 2일마다 교체하였다.

[196] rsPIBF가 심근세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해, sPIBF(200 ng/ml)를 6일(4-10일차) 동안 처리하였다. 뛰는 것을 확인한 후, TrypLE(Gibco)를 사용하여 세포를 분리하고, 마트리겔로 코팅된 접시에 다시 씨딩하였다. 12일차에 hiPSC-CM을 4% PFA에 20분간 고정하고 cTnT(Abcam, ab45932, 토끼 1/200) 및 α-액티닌(Sigma, A7811, 마우스 1/200)에 대한 항체로 염색하였다.

[197] [실시예 10]

[198] **마우스 준비 및 Pibf1 cKO 마우스의 생성**

[199] 10-1. 마우스 준비

[200] 모든 동물 실험은 식품의약품안전처 지침에 따라 수행되었다. 실험 절차는 아산생명과학연구원 동물실험위원회(IACUC)의 검토 및 승인을 받았다(승인번호: 2019-12-217). 모든 마우스는 AMCLAR(아산병원 동물연구소)의 특정 병원균이 없는 시설에서 유지되었으며, 임의로 표준 실험실 음식과 물에 자유롭게 접근하도록 하였고, 12시간 암/광 주기를 제공하였다.

[201] 마우스에서 Pibf1(Pibf1em1Hwl/J)) 및 Trp53(Trp53em1Baek/J)의 기존 녹아웃에 대한 프로토콜은 각각 문헌[Y. H. Sung et al., Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. Nat Biotechnol 31, 23-24 (2013)] 및 [Y. Kim et al., Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. Nat Biotechnol 34, 808-810 (2016)]에 설명되어 있다. ICR 및 중증 면역 결핍(SID, NOD/J-Prkdcem1BaekIl2rgem1Baek/J) 마우스는 각각 OrientBio(대한민국, 경기도) 및 GEM Biosciences(대한민국 청주)에서 구입하였다. Meox2-cre(B6.129S4-Meox2tm1(cre)Sor/J, 003755), Vav1-iCre(B6N.Cg-Commd10Tg(Vav1-icre)A2Kio/J, 018968), Cdh5-cre(B6;129-Tg(Cdh5-cre)1Spe/J, 017968) 및 R26R 리포터(B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J, 003474) 마우스는 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. Tie2-cre(B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J, JAX 008863) 및 Il17a 녹아웃(B6.129P2-Il17atm1Yiw) 마우스는 각각 서울아산병원(대한민국 서울)의 하창훈 박사 및 이경진 박사로부터 제공받았다.

[202] 다른 임신 연령의 배아(conceptus) 조직 샘플을 얻기 위해, 7주령의 암컷 마우스를 저녁에 수컷 마우스와 1:1 비율로 교배시켰다. 질 플러그 형성일을 배아일(E) 0.5로 간주하였다. 그런 다음 임신한 쥐를 무작위로 다른 실험 그룹에 할당하고, 지정된 시점에 안락사시킨 다음, 입체 현미경(SMZ1000, Nikon, Tokyo, Japan)에서 배아의 다른 부분으로부터 조직 샘플을 해부하여 얻었다. 조직은 추가 분석을 위해 액체 질소에서 급속 냉동하고 -80 ℃에서 보관하거나 4% 파라포름알데히드(PFA)에 고정하였다.

[203] 10-2. Pibf1 cKO 마우스의 생성

[204] 플록스된(floxed) PIBF1 마우스에 사용되는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 생성하기 위해, Macrogen, Inc.에서 다음과 같은 올리고머를 구입하였다.

[205] [표3]

올리고머	서열	서열번호
Pibf1 인트론 1-특이적 sgRNA	5′-taggGCTATTTCAGTTTCTCTAAG-3′	12
	5′-aaacCTTAGAGAAACTGAAATAGC-3′	13
Pibf1 인트론 17-특이적 sgRNA	5′-taggACTCTATTTCTGCTTCCCGA-3′	14
	5′-aaacTCGGGAAGCAGAAATAGAGT-3′	15

[206] 각각의 올리고머 쌍을 어닐링하고 New England BioLabs, Inc.(NEB)의 BsaI 제한효소를 사용하여 Xingxu Huang으로부터 받은 pUC57-sgRNA 벡터(Addgene 플라스미드 # 51132; http:/n2t.net/addgene:51132; RRID:Addgene_51132)에 클로닝하였고, 클로닝된 벡터를 sgRNA 시험관 내(*in vitro*) 전사를 위한 주형으로 사용하였다.

[207] 다음 단일가닥 데옥시뉴클레오타이드 공여 DNA는 Integrated DNA Technologies, Inc.에서 구입하였다.

[208] [표4]

단일가닥 데옥시뉴클레오타이드 공여 DNA	서열	서열번호
loxP를 Pibf1 인트론 1에 삽입하기 위한 단일가닥 데옥시뉴클레오타이드 공여 DNA	5′-tgtaactcccttgtttaaatacgacacgatttagtaaaatagttatagaactagctatttcagtttctctATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATaagaggaacgctaaagaaggaggtctgtgtggtgggggggaacaggaagagcttcagtacaatccgcctc-3′	16
loxP를 Pibf1 인트론 17에 삽입하기 위한 단일가닥 데옥시뉴클레오타이드 공여 DNA	5′-caattctcctccttcaatatattgtgaatttctgttgaactgtgaaacagataactctatttctgcttccATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATcgagggctgaaattacaaccatgaaccaccatacccaggtgaaactatttttttttagagatataacata-3′	17

[209] 수정란의 미세 주입 및 대리모로의 이전은 문헌 [Y. H. Sung et al., Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. Nat Biotechnol 31, 23-24 (2013).]에 설명된 바와 같이 수행되었다. 요약하면, 과배란 및 교배 후, C57BL/6J(B6J) 백그

라운드를 갖는 3 내지 4주령 암컷 마우스의 난관으로부터 수정란을 채취하고, 전핵기 배아의 세포질에 sgRNA, Cas9 mRNA 및 ssODN을 공동 주입하였다.

[210] 37 ℃에서 24시간 동안 인큐베이션한 후, 2세포기 배아를 가임신 ICR 대리모에 옮겼다. 배아 또는 3주령 새끼의 꼬리에서 얻은 게놈 DNA 샘플은 표 5에 나열된 프라이머를 사용하여 유전형을 분석하였다.

[211] [표5]

유전형 분석에 사용된 프라이머 목록

프라이머	서열 (5′→3′)		서열번호
	정방향	역방향	
PCR 유전형분석			
Pibf1 3′ flox	AGTGTAGTGTCTTCAAGATTCATTC	CCTCCCAGCTCCCTGTAGT	18(정방향)/ 19(역방향)
Meox2-cre	1' GGGACCACCTTCTTTTGGCTTC		20
	2' AAGATGTGGAGAGTTCGGGGTAG		21
	3' CCAGATCCTCCTCAGAAATCAGC		22
Pibf1 5′flox & excised	1' CTTGGTAACTCACGCAAGGAT		23
	2' CCTTGGCAATTTTGCGAGACA		24
	3' CCTCCCAGCTCCCTGTAGT		25

[212] [실시예 11]

[213] **배아 생성물(outgrowth) 배양**

[214] Pibf1 이형접합 상호교잡(heterozygous intercrossing) 후, 수집된 배반포는 20% KnockOut Serum Replacement(10828010), 2mM GlutaMAX(35050061), 0.1mM 비필수 아미노산(11140050), 50 U/ml 페니실린-50 μg/ml 스트렙토마이신(15070063), 55 μM 2-메르캅토에탄올(21985023) 및 5 ng/ml 백혈병 억제 인자(A35933)로 보충된 KnockOut DMEM (10829018)에서 0.1% 젤라틴 코팅된 다중 웰 접시에서 37 ℃ 및 5% CO_2로 개별적으로 배양되었다(모든 시약은 Gibco에서 구입함). 배양 7일차에 생성물을 사진 촬영하고 수집한 후, PCR로 유전자형을 분석하였다.

[215] [실시예 12]

[216] **배아와 심장의 형태학적 분석**

[217] ProgRes C5 카메라와 Capture Pro 소프트웨어(Jenoptik Optical Systems, Jena, Germany)를 사용하여, 배아 생성물과 난황낭, 배아 및 심장을 포함하여 태아의 해부된 부분의 이미지를 촬영하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 생성물의 내부 세포 덩어리 영역과 외배엽 영역, 전조직 배아(whole-mount embryos)의 머리엉덩이 길이(crown-rump length, CRL) 및 전조직 심장(whole-mount hearts)의 심실의 너비와 높이의 정량적 측정을 수행하였다.

[218] [실시예 13]

[219] **조직학**

[220] 조직을 4% PFA로 고정하고, 파라핀 포매하고, 절편화하였다(두께 4~5μm). 절편을 탈랍하고, 재수화한 후, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 또는 면역염색하였다.

[221] 13-1. 태반의 형태 분석

[222] H&E 염색된 태반 절편은 광학현미경으로 태반의 3개 주요층(탈락막 기저부, 접합부, 미로) 및 미로 혈관 공간의 영역을 검사하였다. 태아 혈동(blood sinuses)은 원시 유핵 적혈구에 의해 모체 혈동과 구별되었다. 미로의 혈동을 검사하고, 각 샘플의 3개의 임의의 겹치지 않는 ϒ40 필드로 구획화하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 각 영역의 범위를 정량화하였다.

[223] 13-2. 면역염색

[224] 면역조직화학을 위해 조직 절편을 시트레이트 완충액(10mM 시트르산, 0.05% Tween 20, pH 6.0)에서 열 유도 항원 회복에 적용하였다. 그런 다음 절편을 5% 정상 염소 혈청으로 차단하고, 1차 항체와 함께 배양하고, 세척한 다음 제조사의 지침에 따라 비오티닐화된 염소 항-토끼 IgG(PK6101, Vector Labs)와 함께 배양하였다. 면역조직화학에 사용된 1차 항체는 다음과 같다: 항-Ki67(1/10000; ab15580, Abcam), 항-라미닌(1/750; L9393, Sigma-Aldrich) 및 항-퍼포린(1/200; ab16074, Abcam). 퍼포린 염색의 경우, 2차 항체로 과산화효소-접합 당나귀 항-래트 IgG(712-035-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 적용하였다. 신호는 액체 DAB+ 기질 크로모겐 시스템(K3467, Dako)으로 가시화되었다. 미로 Ki67-양성 영양막 세포 또는 탈락막 퍼포린-양성 세포를 각 샘플의 3개의 무작위로 선택된 ϒ40 필드에서 계수하였다.

[225] 면역형광 염색을 위해, 마우스 Ig 차단 시약(PK2200, Vector Labs) 유무에 따라 배양된 열 유도 항원 회복 절편을 5% 정상 염소 혈청으로 차단하고, 1차 항체에 적용한 후, Alexa Fluor(AF)-접합 2차 항체에 의해 포획하였다. 시험관 내 샘플의 경우, 고정된 세포 또는 hHO 냉동절편(cryosection)을 세척하고, 차단하고, 0.1% Triton X-100으로 투과화한 후, 1차 및 후속 2차 항체를 적용하였다. 절편을 DAPI(D1306, Molecular Probes)로 고정하고, Zeiss LSM 880 공초점 현미경 시스템(Carl Zeiss, Jena, Germany)에서 검사하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 CD31, cTnT 또는 PDGFRβ로 염색된 영역을 정량화하였다. 면역형광염색에 사용되는 항체는 표 6에 나타나 있다.

[226] [표6]

타겟	공급업체	식별	숙주	희석
면역형광염색				
β-hCG	Abcam	ab53087	토끼	1/100
HLA-G	Abcam	ab7759	마우스	1/100

KRT7	Abcam	ab181598	토끼	1/1000
GATA3	Cell Signaling Technology	5852	토끼	1/200
TEAD4	Abcam	ab58310	마우스	1/100
TP63	Cell Signaling Technology	13109	토끼	1/100
cTnT	Abcam	ab45932	토끼	1/200
CD31	Millipore	CBL468	마우스	1/200
PDGFRβ	Abcam	ab32570	토끼	1/200
MCT1	Sigma	AB1286-I	닭	1/150
MCT4	Santa Cruz	sc-376140	마우스	1/150
CD31	Abcam	ab28364	토끼	1/200
cTnT	Abcam	ab209813	토끼	1/500
ARL13B	Proteintech	17711-1-AP	토끼	1/500
Acetylated Tubulin	Proteintech	66200-1-Ig	마우스	1/1000
Anti-chicken IgY, AF488	Invitrogen	A11039	염소	1/200
Anti-mouse IgG, AF594	Invitrogen	A11005	염소	1/200
Anti-mouse IgG, AF488	Invitrogen	A11001	염소	1/200
Anti-rabbit IgG, AF488	Invitrogen	A11008	염소	1/200
Anti-rabbit IgG, AF555	Invitrogen	A21429	염소	1/200

[227] 13-3. 알칼리성 포스파타제 활성

[228] 분리된 태반을 Tissue-Tek OCT 화합물(25608-903, VWR)에 포매하고 6μm 두께의 냉동절편을 제조사의 지침에 따라 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트(BCIP) 및 니트로 블루 테트라졸륨(NBT) 발색 기질(S3731, Promega)을 함유하는 알칼리성 포스파타제(AP) 완충액(0.1M NaCl, 0.1M Tris-HCl, 0.05M MgCl2, 0.1% Tween 20, pH 9.5)에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 절편을 뉴클리어 패스트 레드(nuclear fast red)로 대조 염색하였다.

[229] 13-4. 투과 전자 현미경

[230] 분리된 태반을 신선한 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)으로 세척하고, 동일한 완충액의 2.5% 글루타르알데하이드로 4 ℃에서 4시간 동안 고정하였다. 태반의 미로 영역을 1-mm^3 단편으로 자르고 추가로 4 ℃에서 밤새 고정하였다. 신선한 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)에서 매회 10분 동안 3번 세척한 후, 조직을 실온에서 1시간 동안 1% OsO_4에 고정하고, 3번 세척한 다음 에탄올 및 산화 프로필렌으로 탈수 후 표준 기술에 따라 Epon에 포매하였다. 준초박(500nm) 및 초박(60nm) 절편을 블록으로부터 절단하였다. 준초박 절편을 톨루이딘 블루로 염색하고, 광학 현미경으로 검사하였다. 혈액사이 막의 두께는 각 샘플의 무작위로 선택된 5 개의 ϒ 100 필드에서 측정되었다. 초박 절편을 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트와 대비하고, Hitachi H-7100 투과 전자 현미경(Hitachi, Nackashi, Japan)을 사용하여 80kV에서 관찰하였다.

[231] [실시예 14]

[232] **지방산 측정**

[233] 태반 및 배아 지방산(FA)의 질량 분석법(GC/MS) 기반 측정과 결합된 가스 크로마토그래피는 문헌 [J. G. Lee et al., Lipid signatures reflect the function of the murine primary placentationdagger. Biol Reprod 106, 583-596 (2022).]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 요약하면, 배아 또는 태반 조직 샘플을 클로로포름/메탄올(2/1 v/v)에서 균질화하고 액체-액체 추출을 수행하였다. 지질 함유 유기상을 수집하고, 진공 원심분리기로 건조하고 가수분해하였다. 헥산을 첨가한 후, 추출된 FA를 포함하는 상부 상(upper phase)을 진공 건조하고 BCl_3-MeOH(12% w/w)와 60 ℃에서 30분 동안 반응시켰다. 헥산 추출을 반복하고, 상부 헥산 상에 무수황산나트륨을 첨가한 후, 상층액 샘플을 GC/MS 분석으로 처리하였다. 상업적으로 이용 가능한 FA 메틸 에스테르를 사용하여 검량선을 생성하였다. 모든 지질 표준은 Avanti-Polar Lipids 및 Sigma에서 구입하였다.

[234] 헬륨(99.99%)을 운반 가스로 사용하는 HP-5 MS 30m x 0.25mm x 0.25μm 컬럼(19091S-433, Agilent)이 장착된 Agilent 7890/5975 GCMSD 시스템을 사용하여 FA 메틸 에스테르를 분석하였다. GC-최적화된 온도 프로그램은 다음과 같다: 초기 50 ℃에서 2분 동안 유지; 10 ℃/min ~ 120 ℃; 10 ℃/min ~ 250 ℃; 250 ℃에서 15분간 유지; 최종 300 ℃에서 5분 동안 유지하여 컬럼을 닦았다. 5분 용매 지연 및 스캔 모드가 적용되었다. 특정 FA에 해당하는 추출된 이온 크로마토그램을 정량에 사용하였다. 정량화된 데이터는 야생형 그룹에 대한 상대적인 양(%)으로 표현되었다.

[235] [실시예 15]

[236] **레이저 미세 해부**

[237] 분리된 태반을 OCT 화합물에 포매하고 폴리에틸렌 나프탈레이트(PEN) 멤브레인 코팅 유리 슬라이드(LCM0522, Thermo Fisher Scientific)에 냉동 절편화하

였다. 미로, 접합부 및 탈락막에 해당하는 태반 구획을 미세 해부하고 Leica 6500 Laser Microdissection System(Leica, Germany)을 사용하여 수집하였다.

[238] [실시예 16]

[239] **정량 실시간 PCR**

[240] 제조사의 지침에 따라, Trizol 시약 키트(15596026, Invitrogen)를 사용하여 BeWo 세포, TSC 및 난황낭 또는 태반의 전체 조직에서 총 RNA를 분리하고, RNeasy 마이크로 키트(74004, Qiagen)를 사용하여 배아 심장 또는 레이저 미세 해부 태반의 총 RNA를 분리하였다. SuperScript III First-Strand 합성 시스템(18080-051, Invitrogen)으로 합성한 cDNA는 QuantStudio3 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems, CA, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix(170-8882AP, Bio-Rad) 및 프라이머 세트(표 7)를 사용한 정량적 실시간 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하였다. 데이터는 RPS18, GAPDH 및 mGapdh와 같은 내부 대조 유전자에 의해 정규화되었고, 야생형 또는 대조군의 발현 수준에 상대적으로 표현되었다.

[241] [표7]

정량적 RT-PCR에 사용된 프라이머 목록

프라이머	서열 (5′→3′)			
	정방향	서열번호	역방향	서열번호
qRT-PCR				
TP63	AGAAACGAAGATCCCCAGATGA	26	CTGTTGCTGTTGCCTGTACGTT	27
TEAD4	CAGGTGGTGGAGAAAGTTGAGA	28	GTGCTTGAGCTTGTGGATGAAG	29
ELF5	CTGCCTTTGAGCATCAGACA	30	TCCAGTATTCAGGGTGGACTG	31
GCM1	AACAGCTACGTCCAGTCTCC	32	TGCTCTTGCTTGGCAGTGAA	33
ERVW-1	GTTAATGACATCAAAGGCACCC	34	CCCCATCTCAACAGGAAAACC	35
ERFRD-1	GCCTACCGCCATCCTGATTT	36	GCTGTCCCTGGTGTTTCAGT	37
SDC1	CTATTCCCACGTCTCCAGAACC	38	GGACTACAGCCTCTCCCTCCTT	39
CGB	ACCCCTTGACCTGTGAT	40	CTTTATTGTGGGAGGATCGG	41

MMP2	TGGCACCCATTTACACCTACAC	42	ATGTCAGGAGAGGCCCCATAGA	43
HLA-G	CCACCACCCTGTCTTTGACTAT	44	ACGTCCTGGGTCTGGTCCT	45
RPS18	CACGCCAGTACAAGATCCCA	46	AAGTGACGCAGCCCTCTATG	47
GAPDH	CCTCAACGACCACTTTGTCAAG	48	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG	49
Cdx2	AGTGAGCTGGCTGCCACACT	50	GCTGCTGCTGCTTCTTCTTGA	51
Eomes	TCGCTGTGACGGCCTACCAA	52	AGGGGAATCCGTGGGAGATGGA	53
Esrrb	AGTACAAGCGACGGCTGG	54	CCTAGTAGATTCGAGACGATCTTAGTCA	55
Plf(Prl2c2)	AACGCAGTCCGGAACGGGG	56	TGTCTAGGCAGCTGATCATGCCA	57
Pl1(Prl3d1)	TTATCTTGGCCGCAGATGTGT	58	GGAGTATGGATGGAAGCAGTATGAC	59
Pl2(Prl3b1)	GCACTCGGGGAACAGCAGCC	60	ACTGCCAGCAACAGGAGTGCC	61
Ctsq	AATTGGCTATGGTTATGTGGGA	62	TCACACAGTAGGGTATTGGG	63
Gjb2	GGGATGGTACACAGGGCTTCT	64	CATCTCCTTTCTTTCACTGTGCTTT	65
Pcdh12	GCTGCTTTTGCGGAACGGAA	66	TTTGGGCTGGAATTGGCCCT	67
Ascl2	AGCCCGATGGAGCAGGAG	68	CCGAGCAGAGGTCAGTCAGC	69
Tpbpa	ACTGGAGTGCCCAGCACAGC	70	GCAGTTCAGCATCCAACTGCG	71
Syna	CCTCACCTCCCAGGCCCCTC	72	GGCAGGGAGTTTGCCCACGA	73

Mct1(Slc16a1)	TTGCCCCTTTGTC TACAACC	74	CAGCATTCCACA ATGGTCAC	75
Gcm1	ACCCCTGAAGCTT ATTCCCT	76	TCGCCTTTGGACT GGAAA	77
Synb	TCCGGAAAGGGA CCTGCCCA	78	CAGCAGTAGTGC GGGGTGCC	79
Mct4(Slc16a3)	TCACGGGTTTCTC CTACGC	80	GCCAAAGCGGTT CACACAC	81
Cd31	TGCAGGCATCGG CAAAG	82	GCATTTCGCACAC CTGGAT	83
Cd34	AGGCTGATGCTG GTGCTAG	84	AGTCTTTCGGGAA TAGCTCTG	85
Vwf	ACGCCATCTCCAG ATTCAAG	86	AAGCATCTCCCAC AGCATTC	87
Flk1	ACTGCAGTGATTG CCATGTTCT	88	CCTTCATTGGCCC GCTTAA	89
Lmo2	GCTGGGACGGAA ATTGTGCAGG	90	CCCGCATCGTCAT CTCATAGGC	91
Runx1	GCCTCTCTGCAGA ACTTTCCAGTC	92	TAGTGCATGCGC GGGTCGGAGAT	93
Tal1(Scl)	GCCCTCCCCATAT GAGATGGAGA	94	TTCACATTCTGCT GCCGCCATCG	95
Gata1	ACTGGCCTACTAC AGAGAAGC	96	GTAGAGTGCCGT CTTGCCATA	97
Gata2	CACCCCGCCGTAT TGAATG	98	CCTGCGAGTCGA GATGGTTG	99
Hba-x	GCGTGTGGATCC GGTCAACTTCA	100	TTGTCCCAGGCTT CGTGGACCTCA	101
Hbb-y	GGAAAAGACCCT CATCAATGGCC	102	TGGGTCCATGGGT ACACAACAAG	103
Hbb-bh1	ACTCTGGGAAGG CTCCTGAT	104	GGTCTCCTTGAGG TTGTCCA	105

Dll4	AGCTGTAAGGAC CAGGAGAATAGC	106	CTCACAGTGCTGG CCATAGTAG	107
Jag1	AGATGATGTCTCC AGGTCTTACC	108	AAGGCTCACAGG CTATGTAGATC	109
Nrg1	CAAACCCACCAC CAGAGAATGTG	110	CACAATATGCTCA CTGGAGATGAC	111
Bmp10	CATGCCGTCTGCT AACATCATCC	112	GTGAGGGATAGA CACATTGAAGAG	113
Fgf9	TATCCAGGGAAC CAGGAAAGACC	114	TTCTCGTTCATGC CGAGGTAGAG	115
Vcan	ATGCAGGCGTCT ACCGATGTG	116	TGGCTGCCCTGTA GTGAAACAC	117
Has2	GGTGGAAAGAGA GAAGTCATGTAC	118	AGATGAGGCAGG GTCAAGCATAG	119
Ugdh	GTGAGCTACAGA CCATTGGCTTC	120	TCGGAATCTCACC AGGAGTGTAC	121
Adamts1	GAAGTTTGATAA GTGTGGCGTTTGT G	122	TGTCATGATACCC AGGTCTTGTAC	123
Adamts2	CACCGTGCTGGTT ATTCCTGAAG	124	TGAGGGAGTCCT CGTGAATCATG	125
Adamts3	ATTACCTCCTCAC CCTGATGAAC	126	ATATGCACTCCGA GGGACTCATC	127
Adamts4	TGCAGTGCCCGAT TCATCAC	128	CCTTGCCAGGAA AAGTCGCT	129
Adamts5	AGCTAAGGGCAC AGGCTACTATG	130	CGTCACATCCAGT TCTCACACAC	131
Adamts9	CTGCTACAGTGCT GCCAAATGTC	132	ACTCCGTTAAAG ACAGCCCAGTC	133
Timp3	ATGCCTTCTGCAA CTCCGACATC	134	TAGTGTAGACCA GAGTGCCAAAGG	135
Nrp2	TCCACATGCCACT GCTGACT	136	GCAATGCCCAAA TGCCAC	137

Nr2f2(COUP-TFII)	ATGGACCACATACGGATCTTCC	138	ACAGGCATCTGAGGTGAACAGG	139
Dab2	GGATAAAGAGGTCAAGGAAGTG	140	TGGTCTACATGCTCCTGAGGAA	141
Flt4	TGTCACCTTCGACTGGGATT	142	TGCTGGAGAGTTCTGTGTGG	143
Ephb4	CTACGTCTCTAACCTCCCATCT	144	GCTGGTCACCCTTTCTCTTT	145
Nrp1	CATCTCCCGGTTACCCTCATTCTT	146	GCGGCCGCCTTCATTCTC	147
Foxc1	TTCTTGCGTTCAGAGACTCG	148	TCTTACAGGTGAGAGGCAAGG	149
Foxc2	GCAACCCAACAGCAAACTTTC	150	GACGGCGTAGCTCGATAGG	151
Notch1	GCCGCAAGAGGCTTGAGAT	152	GGAGTCCTGGCATCGTTGG	153
Hey1	CACTGCAGGAGGGAAAGGTTAT	154	CCCCAAACTCCGATAGTCCAT	155
Hey2	AAGCGCCCTTGTGAGGAAA	156	TCGCTCCCCACGTCGAT	157
Sox7	ATGCTGGGAAAGTCATGGAAG	158	CGTGTTCTGGTCACGAGAGA	159
Sox18	CCTGTCACCAACGTCTCGC	160	CAAAGCCATAGCGCCCTGA	161
Efnb2	CAGACAAGAGCCATGAAGATCC	162	TCTCCCATTTGTACCAGCTTCT	163
Gapdh	AGTGGCAAAGTGGAGATT	164	GTGGAGTCATACTGGAACA	165

[242] [실시예 17]

[243] **시험관 내(*in vitro*) 수정 및 배아 이식**

[244] 난모세포는 48시간 간격으로 5 IU 임신 암말 혈청 성선자극호르몬(G4877, Sigma) 및 5 IU 인간 융모막 성선자극호르몬(CG10, Sigma)으로 과배란된 암컷으로부터 수집되었다. Pibf1 이형접합의 체외 수정된 2세포 단계 배아를 가짜 임신

야생형 ICR 또는 Il17a 녹아웃 암컷 마우스로 옮겼다. E10.5에서 E11.0까지의 배아를 수집하고, 사진을 찍고, PCR로 유전자형을 결정하였다.

[245] [실시예 18]

[246] **형광 활성 세포 분류(FACS)**

[247] FACS 분석을 위해, 탈락막 기저부를 덮는 태아의 중간층 영역을 해부하고 E8.5 또는 E10.5에서 샘플링하고, 잘게 썰고, 1 mg/ml 콜라게나제 타입 II(C6885, Sigma) 및 1 U/ml DNase I(04536282001, Roche)를 사용하여 37 ℃에서 30분 동안 소화시켰다. 적혈구를 실온에서 5분 동안 ACK 용해 완충액(A1049201, Gibco)으로 제거하고 얼음처럼 차가운 D-PBS에서 2회 세척하였다. 준비된 단일 세포를 항-CD16/CD32(553142, BD Biosciences)로 Fc-차단한 후 FITC-접합된 돌리코스 바이플로러스 응집소 (Dolichos Biflorus Agglutinin, DBA)(20 μg/ml; L32474, Invitrogen) 및 다음의 항체로 염색하였다: 항-CD3e-PerCP-Cy5.5(1/100; 551163, BD Biosciences), 항-CD122-PE(1/100; 12-1221-82, eBioscience). FACS 분석의 모든 인큐베이션 단계는 2% FBS를 포함하는 D-PBS에서 수행되었다. 염색된 샘플을 FACSCanto II 시스템(BD Biosciences, CA, USA)을 사용하여 평가하고, FlowJo 소프트웨어(Tree Star, OR, USA)를 사용하여 추가로 분석하였다.

[248] [실시예 19]

[249] **전조직 X-gal 염색**

[250] 수태아의 분리된 부분을 4% PFA에서 4 ℃. 3시간 동안 고정하고, 전체 배아, 전체 심장 또는 1mm 두께의 가로로 자른 태반을 세정 완충액(2mM $MgCl_2$, 0.02% IGEPAL 및 PBS에 용해된 0.01% 데옥시콜산나트륨, pH 7.4)에서 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 세정 완충액으로 3회 간단히 세척한 후, 샘플을 4mM 페리시안화 칼륨, 4mM 페로시안화 칼륨 및 1mg/ml X-gal(B4252, Sigma)이 포함된 세정 완충액에서 37 ℃에서 밤새 어두운 곳에서 배양하고, 밤새 4% PFA에서 후-고정하고, 입체 현미경으로 시각화하였다. 조직학적 분석을 위해, X-gal로 염색된 조직을 파라핀 포매하고, 4μm 두께로 절단하고, 뉴클리어 패스트 레드로 대비 염색하였다.

[251] [실시예 20]

[252] **조혈 실험**

[253] <u>20-1. 콜로니 형성 단위 어세이</u>

[254] 임신 나이가 다른 태아의 해부된 부분을 2% FBS 및 0.1% 콜라게나제 타입 I(C0130, Sigma)을 포함하는 D-PBS에서 37 ℃에서 30분 동안 배양하여 기계적으로 잘게 자르고 효소적으로 분해하였다. 성체 골수 샘플을 준비하는 경우, 생후 4개월된 수컷 마우스의 대퇴골과 경골을 해부하고, 근위부와 원위부 골단을 절단하였다. 골수를 2% FBS 함유 D-PBS로 씻어내어 수집하고, 70 μm 세포 스트레이너를 통과시켜 분리하였다. 세포를 세척하고, 2% FBS(07700, Stem Cell Technologies)가 포함된 Iscove의 MDM에 재현탁하고 Methocult 메틸셀룰로오스 배지(M3434, Stem Cell Technologies)에 플레이팅하고, 37 ℃에서 5% CO2로 배양하였다. CFU-과립구, 대식세포(CFU-GM), 적아구군형성단위(erythroid burst

forming unit; BFU-E), 및 CFU-과립구, 적혈구, 대식세포, 거핵구(CFU-GEMM) 콜로니를 배양 10-12일 후에 점수화하였다.

[255] 20-2. 백혈구 감별을 이용한 전체 혈구 수

[256] 생후 4개월 된 수컷 마우스의 전혈 샘플을 하대정맥에서 EDTA 함유 튜브로 채취하여, ADVIA 2120i 자동혈액분석기(Siemens, Munich, Germany)를 이용하여 혈액학적 변수를 분석하였다.

[257] [실시예 21]

[258] **전조직 CD31 염색**

[259] 배아 또는 난황낭은 4 ℃에서 2시간 동안 4% PFA에 고정되었고, PBTx(0.1% Tween 20 및 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS)에서 3회 간단히 세척되었으며, 5% 염소 혈청에서 차단되었다. 이어서 샘플을 항-CD31(1:200; 553370, BD Biosciences)과 함께 인큐베이션하고, 세척한 다음 어두운 곳에서 AF594-접합 2차 항체(1:200; A21209, Invitrogen)와 함께 인큐베이션하였다. 어두운 곳에서 세척한 후, 면역 염색된 전조직을 Zeiss LSM 880 레이저 스캐닝 공초점 현미경 시스템(Carl Zeiss, Jena, Germany)에서 시각화하였다. 이 전조직 염색 절차의 모든 인큐베이션 단계는 달리 명시되지 않는 한 밤새 4 ℃에서 PBTx에서 수행되었다.

[260] [실시예 22]

[261] **웨스턴 블로팅**

[262] 세포 또는 조직 샘플의 단백질 용해물은 프로테아제 억제제 칵테일(Sigma, P2714) 및 페닐메틸설포닐 플루오라이드(0754, Amresco)가 보충된 세포 추출 완충액(FNN0011, Invitrogen)을 사용하여 준비하고, SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(IPVH00010, Millipore)으로 옮기고, 표 8에 나열된 1차 및 2차 항체로 면역블롯팅하였다. 신호는 SuperSignal West Pico 화학발광 시스템(34080, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 감지되었다.

[263] [표8]

타겟	공급업체	식별	숙주	희석
웨스턴 블로팅				
β-hCG	Abcam	ab54410	토끼	1/1000
PIBF1	Szekeres-Bartho, J.	PMID: 14634107*	토끼	1/1000
Phospho-PI3K p85	Cell Signaling Technology	4228	토끼	1/1000
PI3K p85	Cell Signaling Technology	4257	토끼	1/1000
Phospho-AKT	Cell Signaling Technology	4060	토끼	1/1000

AKT	Cell Signaling Technology	4691	토끼	1/1000
Phospho-eNOS	Cell Signaling Technology	9571	토끼	1/1000
eNOS	Cell Signaling Technology	32027	토끼	1/1000
Phospho-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	4511	토끼	1/1000
p38 MAPK	Santa Cruz	sc7972	마우스	1/1000
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology	4377	토끼	1/1000
p44/42 MAPK (ERK 1/2)	Cell Signaling Technology	4695	토끼	1/1000
Phospho-STAT3	Cell Signaling Technology	9145	토끼	1/1000
STAT3	Cell Signaling Technology	9139	마우스	1/1000
TRP53	Santa Cruz	sc6243	토끼	1/1000
β-ACTIN	Santa Cruz	sc47778	마우스	1/1000
anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology	7076s	말	1/5000
anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology	7074s	염소	1/5000

[264] *문헌[B. Polgar *et al.*, Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol* **171**, 5956-5963 (2003)] 참조

[265] [실시예 23]

[266] **자기 공명 영상(Magnetic resonance imaging)**

[267] MR 영상은 Paravision 6.0의 7.0 T/160 mm Parmascan 전임상 스캐너에서 수행되었으며, 직경 72mm 볼륨 전송 코일과 표면 수신 코일(Bruker Inc., 독일)이 장착되었다. 그런 다음 배아를 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고, MR 스캔 중에 PBS의 4% 포름알데하이드 용액에 담갔다. 이완 강화(2D RARE) 시퀀스를 사용한 고해상도 2D 빠른 획득, 빠른 스핀 에코 기반 T2 가중(T2w) 이미징은 축(Ax) 및 시상(Sag) 보기 - TR/TE = 4500/50 ms; 평균 = 40; 시야(FOV) = 12 ϒ 12mm(Ax),

14 ϒ 14(Sag); RARE 요인 = 8; 매트릭스 = 256 ϒ 256; 슬라이스 두께 = 0.4mm; 슬라이스 번호 = 20(갭 없음); 총 스캔 시간 = 3시간 12분으로 수행되었다. AsanJ-Morphometry쪠는 배아의 이상을 표시하는 데 사용되는 ImageJ(NIH) 전용 소프트웨어이다. AsanJ-Morphometry 소프트웨어는 연구 목적으로 대중에게 공개되며, http:/datasharing.aim-aicro.com/morphometry에서 다운로드할 수 있다.

[268] [실시예 24]

[269] **불임 검사**

[270] 암컷 생식력은 2개월 된 $Pibf1^{f/f}$ 또는 $Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Vav1^{cre/+}$ 암컷을 이전에 정상적인 짝짓기 행동을 보이는 것으로 확인된 3개월 된 야생형 수컷과 교배하여 측정하였다. 4개월 동안, 각 암컷은 한 배에서 난 새끼(litter)의 수와 분만한 새끼의 수를 모니터링하였다. 그런 다음 3마리의 새끼에서 얻은 암컷과 수컷 새끼를 8주 동안 체중 증가의 변화로 모니터링하였다.

[271] 데이터 분석 및 통계

[272] 실험은 적어도 두 번 반복되었으며, 분석에서 제외된 데이터는 없었다. $\chi 2$ 테스트를 적용하여 다양한 번식 계획에서 얻은 마우스의 유전자형 분포가 예상되는 멘델 유전 패턴을 따르는지 여부를 테스트하였다. 다른 데이터는 Student's two-tailed unpaired t-test 또는 one-way ANOVA에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트로 분석되었다. GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software, CA, USA)를 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다. 다이어그램의 모든 데이터 포인트는 생물학적 복제를 나타낸다. 박스플롯(boxplot)의 선, 박스 및 위스커(whiskers)는 각각 중앙값, 1사분위수 및 3사분위수 및 값의 최소 내지 최대 분포를 나타낸다. 다른 다이어그램에서, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[273] <실험 결과>

[274] [실험예 1]

[275] **영양막세포 합포화(syncytialization)에서 PIBF1의 필수 역할**

[276] BeWo 세포주를 사용하여 PIBF1이 합포체를 매개하는지 여부를 조사하였다. 인간 PIBF1의 엑손 2 또는 4에 대한 CRISPR/Cpf1 매개 유전자 표적화(도 1)는 PIBF1 녹아웃(KO) BeWo 세포주(도 2a)를 생성하였다. 야생형(WT) 세포에서 아데닐산 고리화효소 활성화제인 포스콜린(forskolin)을 첨가하여 세포 융합 정도를 유도한 결과(도 3a), WT(도 3a)와 비교하여, PIBF1 KO BeWo 세포(도 2a에서 KO 라인 #1)에서는 합포체(syncytia)가 형성되지 않았고, 이에 동반하여 융합 유전자인 ERVFRD-1(Syncytin 2) 및 내분비 호르몬 유전자인 융모성 성선자극호르몬 베타(CGB)의 발현이 감소되었다(도 3b).

[277] 인간 CG(hCG)는 주로 SynT에 의해 생성되고, 임신 1기 동안 높은 수준으로 모계 구획으로 분비되며, 포스콜린 자극과 관계없이 PIBF1 결핍 세포에서 분비 및 단백질 수준 측면에서 유의적으로 낮게 검출되었다(도 3c 및 3d). 이러한 결과는

PIBF1 엑손 4 표적 KO 세포(KO 라인 #2)에서도 재현되었으며(도 2b 내지 2e), 이는 BeWo 영양막 융합에서 PIBF1의 필수적인 역할을 나타낸다.

[278] 다음으로, PIBF1이 인간 영양막 줄기세포(hTSC)의 SynT로의 분화를 매개하는지 여부를 결정하기 위해, PIBF1 KO hTSC를 생성하였다(도 1, 도 4a 및 4b). 그 결과, PIBF1 KO TSC는 세포 증식에 변화가 없었으며(도 4c), 줄기세포 상태에서 TS 마커가 약간 증가하였다(도 4d 및 4e). 그러나, PIBF1 KO hTSC는 2D 및 3D 배양 모두에서 β-hCG 발현이 저해된 결함이 있는 SynT로 분화하였으며(도 3e), 이는 기저 상태의 PIBF1 KO hTSC가 SynT 형성의 전형적인 마스터 조절자인 GCM1의 감소된 발현을 나타낸 것과 일치한다(도 4f). PIBF1 KO hTSC에서 유래된 결과물인 SynT는 SynT 마커(도 3f)와 β-hCG 분비(도 3g)의 수준이 감소한 반면, TS 마커는 비정상적으로 높게 유지되었다(도 3h).

[279] 또한, PIBF1 KO hTSC는 융모막외 영양막세포(extravillous trophoblast, EVT)로의 분화 능력에도 결함이 있었다(도 4g 및 4h).

[280] 최근 GCM1이 EVT 분화에 기여한다는 보고[M. J. Jeyarajah *et al.*, The multifaceted role of GCM1 during trophoblast differentiation in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2203071119 (2022)]가 있으며, PIBF1 KO hTSC의 GCM1이 낮게 발현되는 것은 향후 EVT 발달에서 PIBF1의 역할에 대한 추가 조사가 필요함을 시사한다.

[281] PIBF1 결실에 따른 hTSC의 생체 내(*in vivo*) 분화능을 알아보기 위해, PIBF1 KO hTSC를 면역 결실 수컷 마우스에 피하 이식하였다(도 3i). 야생형 유전자형을 가지는 hTSC를 주입한 숙주는 혈청과 소변에서 검출 가능한 양의 hCG를 함유하고 있는 반면, PIBF1 KO hTSC에서는 그렇지 않았다(도 3j 및 3k). PIBF1 KO hTSC가 이식된 세포군의 전체 크기는 WT와 차이가 없었으며(도 3l), 조직학적으로 범-영양막(pan-trophoblast) 마커인 사이토케라틴 7(cytokeratin 7, KRT7)이 두 유전자형에서도 유사하게 발현되었다(도 3m). 그러나, β-hCG 또는 HLA-G로 표지된 분화된 영양막세포(SynT, EVT)는 PIBF1 KO hTSC에서 분화된 세포군에서 대부분 결여되었다(도 3m). hTSC를 사용한 이러한 데이터는 PIBF1이 영양막 자체의 세포간 융합 및 TSC의 SynT로의 분화를 매개함을 나타낸다.

[282] 전장 PIBF1(fPIBF)은 핵 또는 중심체와 관련된 90kDa 단백질인 반면, 보다 작은 35kDa 분비형(sPIBF)은 세포질에 국한되어 있다[M. Lachmann *et al.*, PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer* **112**, 51-60 (2004)]. 연구 결과를 더 검증하기 위해, PIBF1 결핍 BeWo 세포에서 fPIBF 및/또는 sPIBF를 과발현시켰다(도 3n). 결과적으로, fPIBF 또는 sPIBF 유도 세포 간 융합의 복원은 두 변이체의 동시 재도입에 의해 더욱 강화된다(도 3o). 특히, PIBF1 KO BeWo에서 외인성 PIBF 처리(도 5a)는 합포체 형성에서 현저한 개선을 보이지 않았으며(도 3p, 도 5b 및 5c), 이는 PIBF1이 내생적으로 발현되고 생산될 때에만 세포 간 융합 이벤

트를 매개한다는 것을 나타낸다. 종합적으로, 이러한 데이터는 내인성 PIBF1이 영양막 분화 및 합포화에서 필수적인 역할을 한다는 것을 입증한다.

[283] [실험예 2]

[284] **SynT 유래 PIBF1의 혈관 신생 역할**

[285] 인간 태반 발생 시, 단핵세포영양막(CTB)은 TSC로서 작용하여 다핵 SynT로 분화하며, 이는 융모내피세포(EC)와 함께 물리적 및 면역학적 장벽뿐만 아니라 모체-태아 교환 경계면을 확립하는 데 역할을 한다. 그러나, 이러한 세포 집단이 서로 통신하여 다층 구조를 어떻게 확립하는지는 여전히 결정되지 않았다. 이러한 맥락에서, 본 발명자들은 sPIBF가 면역 세포에 의해 분비될 수 있고, 사이토카인으로 작용할 수 있기 때문에 융합된 영양막 세포가 복잡한 경계면을 구축하기 위해 PIBF1을 분비할 수 있다는 가설을 세웠다.

[286] 이 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 먼저 표적 단백질의 정량화를 위한 매우 선택적이고 민감한 기술인 다중 반응 모니터링을 사용하여 TSC, SynT 및 EVT에서 PIBF1의 세포 및 분비 수준을 측정하였다. 그 결과, PIBF1의 세포 내 수준은 TSC, SynT, EVT에서 비슷했지만(도 6a), 분비된 PIBF1은 TSC보다 SynT나 EVT에서 훨씬 더 풍부했으며(도 6a), 이는 태반 발달에서 영양막 세포 유래 PIBF1의 잠재적인 역할을 암시한다.

[287] 다음으로, SynT와 내피세포(EC) 사이의 상호 작용에 대해 보다 자세한 통찰력을 얻기 위해, SynT-EC 트랜스웰 공동 배양을 설계하여 합포화 영양막 세포가 혈관 내피세포를 모집할 수 있는지 여부를 확인하였다(도 6b). 결과적으로, hTSC 유래 SynT 또는 포스콜린에 의해 융합된 BeWo 세포가 미분화 hTSC 또는 융합되지 않은 세포와 비교하여 현저하게 더 많은 수의 HUVEC를 모집한다는 것을 발견하였고(도 7a 및 7b), 이는 내피세포에 대한 SynT 유래 측분비 또는 내분비 신호 전달을 암시한다.

[288] *PIBF1*이 hTSC에서 결핍되었을 때, 예상한 바와 같이, 이 내피 모집 능력이 결여되었다(도 6c). *PIBF1* KO BeWo 세포도 내피 모집에 결함을 보였지만, 이는 세포 내 fPIBF 및/또는 sPIBF의 외부적 도입에 의해 회복되었다(도 6c). 주목할 점은, sPIBF를 재도입하면 fPIBF에 비해 더 높은 수준의 내피 모집이 발생한다는 것이며(도 6c), 융합된 영양막 세포 유래 신호는 모체-태아 경계면 부위로의 내피세포 귀소(homing)를 촉진하고 1차 매개 인자는 sPIBF일 수 있음을 시사한다.

[289] 태반의 혈관은 EC와 혈관주위세포를 포함한 여러 세포 집단으로 구성되어 있기 때문에, 혈관 신생이 PIBF에 의해 영향을 받는 혈관 세포 유형을 테스트하였다. 제대 정맥과 동맥에서 유래한 내피 세포(각각 HUVEC 및 HUAEC)는 내피 정체성의 프로필이 다르기 때문에 채택되었다. 그 결과, 재조합 sPIBF는 HUVEC(도 6d 내지 6f)에서 혈관 신생 관련 신호 캐스케이드(도 6g 및 도 7c)의 활성화를 통해 용량 의존적으로 내피 이동 및 관 형성 지표를 향상시켰고, HUAEC에서도 마찬가지였다(도 6h 및 6i, 도 7d). 또한, 용량 의존적으로 태반 혈관주위세포의 이동 특성을 증가시켰다(도 6j 및 도 7e). 아미노산 1-184 범위의 N-말

단 부분은 PIBF1의 생물학적 활성 부위이며, 이는 본 발명의 PIBF1(aPIBF)의 재조합 활성 도메인과 동일하다(도 5a). fPIBF 및 aPIBF의 재조합 단백질은 또한 HUVEC(도 7f 내지 7h), HUAEC(도 7i 내지 7k) 및 태반 혈관주위세포(도 7l)에서 혈관 신생 효과로 검증되었다. 대조적으로, PIBF1의 C-말단 단편(cPIBF)은 내피 이동/관 형성 또는 혈관주위세포 이동(도 7f 내지 7l)에서 변화를 나타내지 않았으며, 이는 PIBF1의 혈관신생 특성이 이전에 면역학적 활성을 갖는 것으로 알려진 엑손 2-4에 의해 암호화된 N-말단 부분에 있음을 나타낸다.

[290] 이러한 결과를 종합하면, SynT 유래 PIBF1이 혈관 및 혈관 주변 세포를 모집하여 혈관과 같은 구조를 형성하고 혈관 신생을 촉진한다는 것을 보여주며, 이는 PIBF1이 태반 순환계와 태아-모체 경계면의 발달에 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[291] [실험예 3]

[292] **심장 오가노이드에서 PIBF1에 의해 촉진되는 심혈관 특징의 발현**

[293] 시험관 내(*in vitro*) 심혈관 특징에 대한 sPIBF의 효과를 추가로 확인하기 위해, 심장의 3차원 기능을 모방할 수 있는 유도만능줄기세포(iPSC) 유래 인간 심장 오가노이드(hHO) 모델을 활용하였다.

[294] sPIBF의 영향을 받는 조건에서 iPSC 유래 배아체로부터 hHOs를 분화시킨 후(도 6k), 심근세포 특이적 마커인 cTnT의 분포가 대조군에 비해 sPIBF 처리 hHO 군에서 유의하게 높은 것을 확인하였다(도 6l). 또한, 각각 내피세포 및 혈관주위세포에 대한 마커인 CD31 및 PDGFRβ의 공동-염색은 대조군에 비해 sPIBF1처리 hHO에서 CD31의 증가된 분포를 나타내었지만, PDGFRβ는 변하지 않았다(도 6l). 광범위한 rsPIBF 투여량(50-1000 ng/ml)도 hHO 내 내피와 심근세포 분포의 증가를 나타냈다(도 6p).

[295] hHO가 내피 세포 및 심근세포와 같은 여러 세포의 혼합 집단이라는 점을 고려할 때, sPIBF가 hHO에 미치는 영향이 심근세포 분화에 미치는 직접적인 영향 때문인지, 아니면 내피 혈관 신생이 증가하여 간접적으로 나타나는 영향 때문인지는 불확실하다. 이 문제를 해결하기 위해, 인간 iPSC 유래 심근세포의 2차원 배양을 수행하여, PIBF1이 심근세포 분화에 직접적인 영향을 끼칠 수 있음을 확인했다(도 6m).

[296] 인간 iPSC 유래 hHO는 기능적 특징으로 탈분극/재분극 결합을 모방할 수 있는 전기생리학적 신호를 반영하기 때문에, 전기생리학적 신호인 전계 전위(field potential, FP)의 선행 지표 변화를 다중 전극 어레이(MEA)를 통해 측정하였다. 그 결과 박동 주기와 전계 전위 지속 시간(FPD)에 큰 차이가 없었다(도 6n). 그러나, 대조군에 비해 sPIBF에서 스파이크 진폭이 유의하게 높은 것을 확인하였다(도 6n).

[297] 또한, 내피세포 및 혈관주위세포에서 관찰된 sPIBF의 혈관 신생 효과는 마트리겔 기반 발아 어세이를 사용하여 hHO에서 추가로 확인되었다: 대부분이 PDGFRβ 양성이었다(도 6o). 특히, sPIBF 처리 hHO는 비히클 처리 hHO보다 더

긴 발아 길이로 더 혈관화된 외관을 보였고(도 6o), 이는 sPIBF 용량 의존적으로 증가하였다(도 6q).

[298] 다음으로, sPIBF가 발달 중인 심장에 미치는 영향을 더 잘 이해하기 위해, 비히클 또는 sPIBF 처리된 hHO의 전사체를 분석한 결과, 240개의 유전자가 sPIBF에 의해 차등적으로 조절된다는 것을 발견하였으며, 그 중 105개의 차등 발현 유전자(DEG)가 증가하고, 135개가 감소하였다(도 8). DEG의 Gene Ontology 분석에 따르면, 미분화된 배아체(EB)에 비해 hHO에서 심장 근육뿐만 아니라 뼈와 지방과 같은 다른 중간엽 조직에 대한 마커의 발현이 증가하였다(도 6r, 히트맵의 컬럼 1 vs. 컬럼 2-4). 그러나, rsPIBF로 처리했을 때 다른 중간엽 세포 운명 관련 유전자의 발현이 상당히 억제되었다. 특히, 심근세포 관련 유전자의 발현이 유의미하게 증가하였다(도 6r, 히트맵의 컬럼 2-4 vs. 컬럼 5-7). 이는 sPIBF에 의한 근육 및 심장 발달의 운명 결정을 강화한다(도 6s).

[299] 종합하면, PIBF1은 시험관 내(*in vitro*) 심장 발달에서 심근세포의 분화/성숙과 내피 혈관 신생을 촉진한다. 혈관 신생과 1차 태반 형성에 있어서 SynT 유래의 PIBF1의 필수 역할에 대한 연구 결과와 함께 이는 배아의 심혈관계 발달에 기여할 수 있다.

[300] [실험예 4]

[301] **Pibf1이 결여된 태반에서 불완전한 합포화 및 모체-태아 경계면 형성**

[302] 다음으로, 영양막세포에서 Pibf1의 손실이 태반 및 후속 배아 발생에 영향을 미치는지 여부를 Pibf1-null 태반 및 배아를 평가하여 결정하였다. $Pibf1^{+/-}$ 교배는 $Pibf1^{-/-}$ 자손을 생산하지 않았으며(도 9a), 이는 배반포의 착상 가능성과 관련이 없었다(도 9b). 대신, $Pibf1^{-/-}$ 배아는 E9.5-10.5 이후로 발달이 지연되었다(도 9c 및 9d). 이 단계에서, 1차 태반이 발생하기 시작하고, 미로 혈액사이 막(labyrinthine interhaemal membrane)의 모든 세포 계통에서 Pibf1이 결실되는 이 시점에서(도 10a), Pibf1의 손실은 결함 있는 태반 및 배아 발생(크기의 성장 제한, 꼬리 회전 실패, 심낭 삼출)으로 이어진다(도 10b). $Pibf1^{-/-}$ 태반은 형태학적으로나 기능저으로 파괴되었으며, 이는 태아 유래 혈관이 감소하고(도 10c 및 10d), 지방산 전달 능력이 감소된 저발달 미로(labyrinth)로 입증되었다(도 10e).

[303] Pibf1-null 태반 및 배아의 발달 실패에 관한 Pibf1의 가능한 메커니즘은 문헌[M. K. Lim *et al.*, Characterisation of serum progesterone and progesterone-induced blocking factor (PIBF) 20 levels across trimesters in healthy pregnant women. *Sci Rep* **10**, 3840 (2020)]을 고려하여 탐색할 수 있다. 임신 상태와 결과는 산모의 PIBF1 수준과 관련이 있다. 그러나, $Pibf1^{-/-}$ 배아의 비정상적인 모습이 야생형 대리모에서도 재현되었기 때문에, Pibf1-null 치사율은 산모의 Pibf1 반가불충분성(haploinsufficiency)으로 인한 것이 아니다(도 11a 및 11b).

[304] 한편, Pibf1은 처음에 통상적인 세포용해성 자연 살해(NK) 세포의 억제제로 처음 기술되었으며[J. Szekeres-Bartho, B. Polgar, PIBF: the double edged sword.

Pregnancy and tumor. *Am J Reprod Immunol* **64**, 77-86 (2010)], 자궁 NK(uNK) 세포는 모체 탈락막에서 국소적으로 발생하는 IL17 생성 보조 T(Th17) 매개 염증을 약화시켜 면역 관용(tolerance)을 촉진한다[B. Fu *et al.*, Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E231-240 (2013)](도 11c). 따라서, 본 발명자들은 Pibf1의 배아 손실이 uNK 집단에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. 그러나, $Pibf1^{-/-}$ 배아를 포함하는 $Pibf1^{+/-}$ 탈락막에서 면역 세포 사이의 비율이나 절대 수에는 상당한 변화가 관찰되지 않았다(도 11d 및 11e). 또한, Th17 결핍 모체 면역 배경(도 11f)에서, $Pibf1^{-/-}$ 배아는 Pibf1 야생형 또는 이형 접합체 어미의 한배새끼에서 발견된 것과 유사하게 여전히 형태학적으로 비정상이었다(도 11g). 이러한 데이터는 적어도 부분적으로는 태아의 모체 구획이 유전적으로 또는 면역학적으로 $Pibf1^{-/-}$ 배아의 초기 결함의 원인이 아님을 설명한다.

[305] PIBF1이 시험관 내(*in vitro*) TSC 분화 및 영양막세포 융합에 필수적인 역할을 하기 때문에, Pibf1-null 태반이 SynT 형성에 결함이 있는지 여부를 조사하였다. $Pibf1^{-/-}$ 태반에서, 불완전한 미로 형성은 영양막세포의 증식 감소를 동반하였다(도 10f). TSC와 그 계통 중에서, Pibf1 결실에 의해 영향을 받은 혈간막 내의 미로 영양막세포는 SynT-II였다: s-TGC가 일반적으로 발달한 반면(도 10g의 Ctsq, 도 10h의 알칼리성 포스파타제 양성), SynT-II 마커(Gcm1, Synb, Mct4)는 크게 감소하였으며, SynT-I(Syna, Mct1)은 변하지 않았다(도 10g). 이는 MCT1/4 공동 염색으로 추가로 확인되었다(도 10i). 더욱이, $Pibf1^{-/-}$ 미로의 초미세 구조 수준에서 혈액 사이 막은 적고 두께가 비정상적으로 증가하였으며, 가장 중요한 것은 SynT-II가 융합에 실패했다는 것이다(도 10j). SynT-I는 또한 눈에 보이는 이상(지나치게 증가된 두께, 액포 및 전자 밀집 영역)이 있었다(도 10j). 태반 내의 혈관 발달 측면에서, $Pibf1^{-/-}$ 배아 유래 혈관 형성(라미닌 양성)은 검출된 세포사멸 증가(TUNEL 양성)와 함께 감소하였고(도 10k), 감소된 태반 혈관구조는 조직학적 데이터에 따라 미로에서만 부위 특이적이었다(도 10l).

[306] 종합적으로, 이러한 데이터는 Pibf1의 손실이 영양막세포의 손상된 세포-세포 융합 및 내피와의 상호작용으로 이어지고, 결과적으로 모체-태아 경계면을 형성하지 못함을 나타내며, 결함이 있는 1차 태반이 치사율의 주요 원인임을 시사한다.

[307] [실험예 5]

[308] ***Pibf1*** **이 온전한 영양막세포를 포함하는 기능성 태반에서 회복된 합포화 및 영양막세포-내피 상호작용**

[309] 태반 내에서 영양막세포 내재 및 배아 계통 유도 효과를 구별하기 위해, Meox2-cre(도 12a 및 12b), 낭배 외피(epiblast) 특이적 cre-재조합 효소 발현(내피, 태아 혈액세포)을 위한 형질전환주를 사용하여 조건부 Pibf1 KO(cKO) 수태물(conceptus)을 생성하였고, 태반 미로 내 영양외배엽 유래 세포(S-TGC, SynT-I, SynT-II)에

서는 그대로 발현을 유지하였다(도 13a 및 도 14a). Pibf1 보유 태반(/+)과 관련된 Pibf1-null 배아는 예상되는 멘델 비율(도 13b)로 정상적으로 검출되었고, 완전한 녹아웃 대응물이 형태학적으로 또는 조직학적으로 파괴된 단계인 E10.5에서 배아와 태반은 완전히 회복되었다(도 13c 내지 13f). 중요하게도, 이러한 회복은 TSC의 정상 상태와 차별화된 계통, 특히 SynT-II(도 13g 및 13h) 및 미로 혈관구조(도 13i)를 동반하였다.

[310] 태반은 또한 이 기간 동안 조혈 기관 역할을 한다. 요약하면, 원시 조혈은 처음에 난황낭 혈액 섬에서 발생하고(<E8.5), 그런 다음 태반(E9.5-10.5)을 포함한 태아의 주요 혈관의 내피세포로 확장되며, 그 후 조혈 전구체는 임신 중 태아 간과 출생 후 골수를 콜로니화한다. 본 발명에서, $Pibf1^{-/-}$ 난황낭과 태반의 조혈능은 E9.5까지는 정상이었지만(도 15a 내지 15c), E10.5에서 비정상적으로 감소하였다(도 13j, 도 15a 및 15d). 그러나, 이 결함은 Pibf1이 온전한 난황낭과 태반, 심지어 E10.5의 Pibf1 cKO 배아에서도 회복되었다(도 13j). 더욱이, 회복된 태반은 조직학적 평가 및 지방산 이동 능력 측정에서 각각 확인된 바와 같이, E13.5에서 정상적인 형태 계측 및 영양소 전달 기능을 나타냈다(도 16a 및 16b). 이 단계에서, SynT-I 및 -II의 분포도 대조군 태반의 분포와 비슷하였다(도 16c).

[311] 또한, 아세포성(subcellular) 특성과 관련하여, 전장 90kDa PIBF1은 핵 또는 중심체(centrosome)에 국한되어 있다. Pibf1-null 배아에서 증가된 아폽토시스와 아폽토시스 조절자 Trp53의 발현(도 20a)은 Pibf1이 결여된 배아의 생존율에서 Trp53의 역할을 조사하도록 촉구하였다. 그러나, Pibf1의 배아 기능은 Trp53 경로와 관련이 없었는데, Pibf1;Trp53 이중 KO 배아는 Pibf1 KO 배아를 표현형 복제했기 때문이다(도 20b 및 20c). 중심체 관련 단백질 PIBF1은 또한 일차 섬모 형성에 필수적인 것으로 보고되었으며, 일부 섬모병증 환자에서 돌연변이가 보고되었다. $Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Meox2^{cre/+}$ 태아가 E18.5까지 예상 멘델 비율을 보였지만 출생 후에는 cKO 신생아가 발견되지 않았다(도 20d). 또한, $Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Meox2^{cre/+}$ 태아는 섬모질환의 표현형 특징을 보였는데(도 20e 내지 20h), 이는 기능적으로 정상인 태반과 상관없이 출생 후 태아 사망에 기여할 가능성이 있다.

[312] 영양막세포 합포의 역할과 시험관 내(*in vitro*)에서 볼 수 있는 혈관 세포와의 상호 작용에 대한 추가 통찰력을 제공하기 위해, 내피 계통에서 각 프로모터 구동 cre 재조합효소를 발현하는 2개의 내피 특이적 cre 라인인 *Cdh5*-cre 및 *Tie2*-cre(도 14a)를 사용하여 미로 간혈막의 내피 세포 계통을 해부하였다(도 13k). 그 결과, *Cdh5*- 또는 *Tie2*-cre-매개 Pibf1 cKO 배아는 E10.5에서 명백한 형태학적 이상 없이(도 13m 및 13o), 예상되는 정상적인 멘델 유전 비율로(도 13l)으로 검출되었고, 태반의 조직학적 인덱스는 대조군과 크게 다르지 않았다(도 13m 및 13n). *Tie2*- 또는 *Cdh5*-cre 발현 세포는 내피 및 조혈세포 계통 둘 다의 동일성을 공유하므로, 내피 특이적 Pibf1 cKO 수태물은 혈액 생성 구획에서 기능적 조혈 활동으로 탐색되었으며, 이는 유전자형 간에 비슷한 수준을 나타냈다(도 13p). 또한, Pibf1이

Vav1-, *Cdh5*- 또는 *Tie2*-cre 라인을 사용하여 조혈 계통에서 제거되었을 때, 다른 *Pibf1* cKO 기관의 조혈 기능은 E13.5에서 출생 전과(도 17a 내지 17d의 cKO^{Vav1} 및 cKO^{Tie2}) 출생 후(도 17e 및 17f의 cKO^{Cdh5} 및 cKO^{Vav1})에서 모두 정상이었다. 이러한 조혈 데이터는 영양막세포의 적절한 합포화가 배아 외 기관과 배아 기관 모두에서 정상적인 조혈 발달을 보장할 수 있음을 시사한다. 이러한 결과는 정상적으로 합포화된 영양막세포 및 Pibf1에 의해 조율된 내피와의 상호 작용이 모체-태아 경계면, 기능적 태반 및 궁극적으로 배아 생존 확립을 위한 전제 조건임을 나타낸다.

[313] [실험예 6]

[314] **배아의 심혈관 발달에 대한 영양막세포 합포화의 영향**

[315] Pibf1 cKO 전략에 따라, cre 라인은 심장의 전체($Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Meox2^{cre/+}$) 또는 일부($Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Cdh5^{cre/+}$, $Pibf1^{\Delta/\Delta}$;$Tie2^{cre/+}$의 심장내 계통)에서 활성화된다(도 18a 및 도 14b). 태반과 배아 심장이 초기 임신 중에 병행하여 발달하고 그 결함이 일반적으로 공존합니다. SynT가 손상되지 않은 기능적 태반에 의해 배아치사 현상은 구출되었으며, 이는 기존에 확인된 Pibf1-null 배아의 미발달된 심장도 포함되었다(도 10b). 더욱이, 합포체화된 영양막세포는 PIBF1과 같은 혈관 신생 인자를 생성하는데(도 6a), 이는 발달 중인 심장의 내피 계통이나 심장 혈관 구조에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있다. 이러한 맥락에서, Pibf1 돌연변이에서 Pibf1-매개 영양막세포 합포체화가 심혈관 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 전조직(whole mount) CD31 염색에서 볼 수 있듯이, $Pibf1^{-/-}$ 배아에서는 난황낭, 체간 영역(intersomitic region) 및 심장의 혈관구조가 심각하게 파괴되었지만, *Pibf1* cKO 돌연변이 배아에서는 대부분 회복되었다(도 18b). 특히, 심장 영역에서 CD31로 염색된 영역은 $Pibf1^{-/-}$ 심장에서 상당히 감소했지만, 대조군과 *Pibf1* cKO 심장 사이에서는 비슷하였다(도 18c 및 18d). 육안 및 조직학적 외관에서, $Pibf1^{-/-}$ 심장은 오른쪽 및 왼쪽 심실 발달 부전, 비정상적으로 확장된 심막강, 감소된 심실 길이 및 감소된 섬유주(trabecular) 밀도를 포함하는 심각한 발달 지연을 보인 반면, 이러한 심장 결함은 태반 영양막세포에서 PIBF1 발현이 정상인 3개의 *Pibf1* cKO 모두에서 완전히 구조되었다(도 18e 및 18f). 이는 심근 마커 cTnT에 의해 조직학적으로 추가 확인되었다(도 18g 및 18h). 초기 심장 형성 관련 마커(심근 발달 및 심장교양질 조절)와 관상 혈관 발달 마커(범내피 계통 및 동맥/정맥 특성화)는 유사한 패턴을 나타냈다. 대부분이 $Pibf1^{-/-}$ 심장에서 감소하였고, 기능적 SynT 함유 태반의 영향을 받는 모든 *Pibf1* cKO 돌연변이(도 18i 및 18j)에서 회복되었다.

[316] 이러한 데이터는 배아의 심혈관 발달이 심장 또는 혈관계 자체에서 Pibf1의 유전적 상태가 아니라, *Pibf1* 매개 영양막세포 합포화 및 태반 형성에 의존한다는 것을 나타낸다.

[317] 또한, 특정 임신 환경에서의 면역 관용 기능 및 산모 수준과 임신 결과 사이의 관계와 관련하여, 모체 면역 세포에서 *Pibf1*의 손실이 임신, 결과 및 자손에

대한 영향에 미치는 영향을 다루었다(도 21a). 그 결과, Pibf1$^{\Delta/\Delta}$;Vav1$^{cre/+}$ 암컷 (Pibf1-deficient in hematopoietic/immune cells[J. de Boer *et al.*, Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* **33**, 314-325 (2003)])은 정상적인 생식 기능을 보였고(도 21b), 이들의 분만된 새끼는 정상적인 성장 속도를 보였으며(도 21c), 이는 모체 면역 세포에서 Pibf1의 유전적 결실이 마우스 임신 유지에는 직접적인 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 한편, 면역 세포의 기능은 다른 세포나 조직에서 생성될 수 있는 PIBF1에 의해 영향을 받을 수도 있다. 예를 들어, PIBF1은 자궁 내막의 중간 분비기 동안 자궁 내막 기질 세포에서 고도로 발현되며, 탈락막화에 필요하다. 따라서, 모체 환경에서 임신을 유지하는 데 있어 PIBF1의 역할을 이해하기 위해 추가 조사가 필요하다.

[318] 본 특허출원은 대한민국 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(① 과제번호: 2018M3A9D5A01087977, 연구과제명: 다각적 태반 표현형 분석 플랫폼 구축 및 활용 연구, 연구기간: 2018.09.20 ~ 2023.11.19; ② 과제번호: 2020R1A2C2012912, 연구과제명: 정자발생을 조절하는 신규 지질대사 단백질의 기능분석 및 이를 활용한 남성불임 치료전략 연구, 연구기간: 2020.03.01 ~ 2024.02.29; ③ 과제번호: RS-2024-00342508, 연구과제명: 임신기 태반-배아장기 발달 축 가설의 증명, 연구기간: 2024.05.01~2029.04.30)을 받아 수행된 연구 결과물이다.

청구범위

[청구항 1] (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는
(ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 PIBF1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 약학 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 PIBF1 단백질의 단편은 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열 또는 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기를 포함하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를 포함하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 모체에서 25 내지 90 kDa의 분자량을 갖는 PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질을 증가시키는, 약학 조성물.

[청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 다음의 a) 내지 d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내는 것인, 약학 조성물:
a) 배아의 혈관 유사 구조의 형성;
b) 배아의 혈관 신생;
c) 배아의 심근 세포의 분화 및 성숙; 및
d) 모체-태아 경계면의 형성.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증은 습관성 유산, 자간전증 또는 태아 심장 결함을 포함하는, 약학 조성물.

[청구항 10] (i) PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질 또는 이의 단편; 또는 (ii) PIBF1 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는

것을 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 PIBF1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 PIBF1 단백질의 단편은 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열 또는 PIBF1 단백질의 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열을 포함하는 것인, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 1부터 184까지의 아미노산 잔기를 포함하는 것인, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 적어도 위치 684부터 757까지의 아미노산 잔기를 포함하는 것인, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 N-말단의 일부 아미노산 서열과 C-말단의 일부 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 16] 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 모체에서 25 내지 90 kDa의 분자량을 갖는 PIBF1(Progesterone immunomodulatory binding factor 1) 단백질을 증가시키는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 17] 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 다음의 a) 내지 d)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효과를 나타내는 것인, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법:

a) 배아의 혈관 유사 구조의 형성;

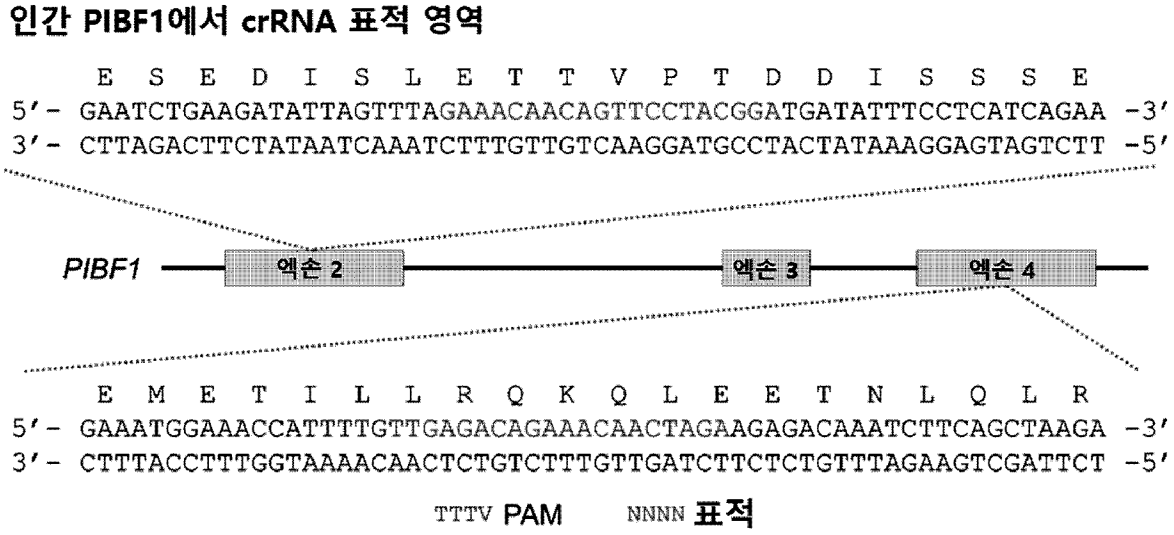
b) 배아의 혈관 신생;

c) 배아의 심근 세포의 분화 및 성숙; 및

d) 모체-태아 경계면의 형성.

[청구항 18] 제10항에 있어서, 상기 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증은 습관성 유산, 자간전증 또는 태아 심장 결함을 포함하는, 태반 또는 태아 심혈관 이상과 관련된 임신 합병증의 예방 또는 치료 방법.

[도1]



[도2a]

PIBF1 KO BeWO에서 엑손 2의 표적 영역 (KO 세포주 #1)

```
     E  S  E  D  I  S  L  E  T  T  V  P  T  D  D  I  S  S  S  E
WT   GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACAACAGTTCCTACGGATGATATTTCCTCATCAGAA

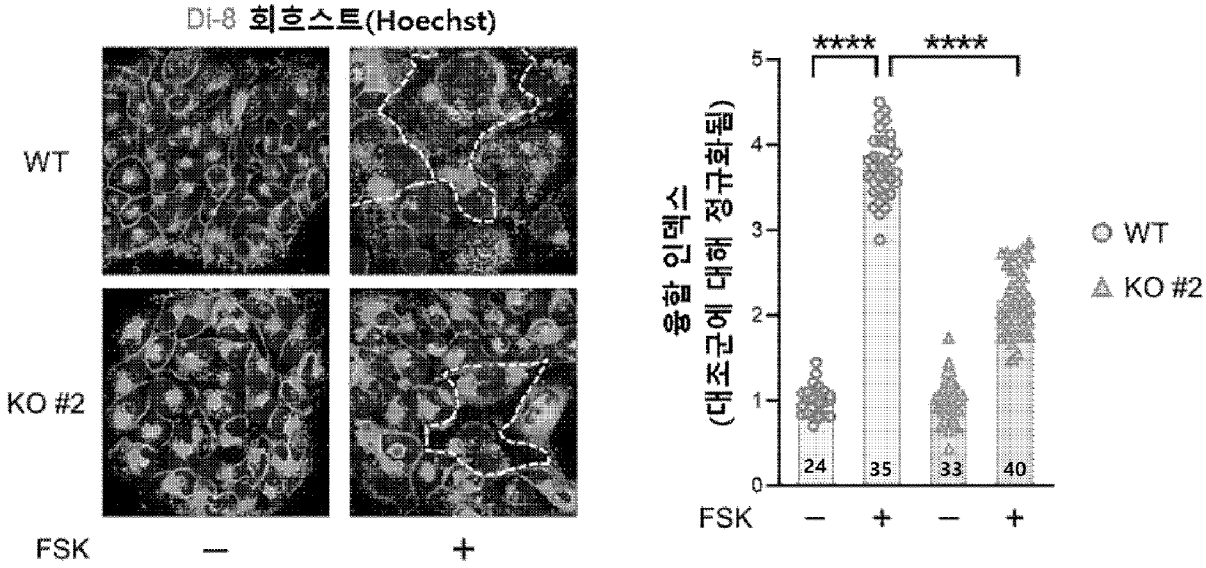
     GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACAACAGTTCCTA----TGATATTTCCTCATCAGAA   -4
     GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACA----------TGATATTTCCTCATCAGAA   -14
```

PIBF1 KO BeWO에서 엑손 4의 표적 영역 (KO 세포주 #2)

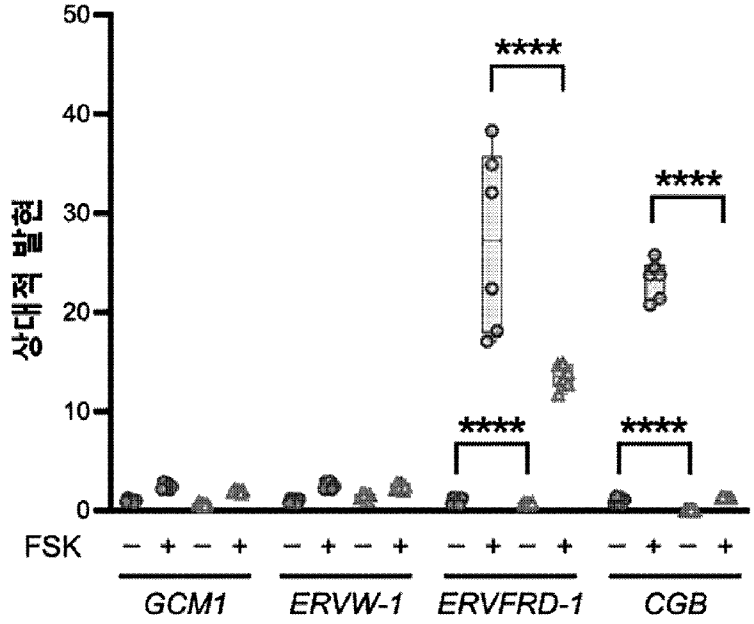
```
     E  M  E  T  I  L  L  R  Q  K  Q  L  E  E  T  N  L  Q  L  R
WT   GAAATGGAAACCATTTTGTTGAGACAGAAACAACTAGAAGAGACAAATCTTCAGCTAAGA

     GAAATGGAAACCATTTTGTTGAGACAGAAACAAC----------AAATCTTCAGCTAAGA   -10
     GAAATGGAAACCATTTTGTTGAGACAGAAA----------TCTTCAGCTAAGA   -17
```

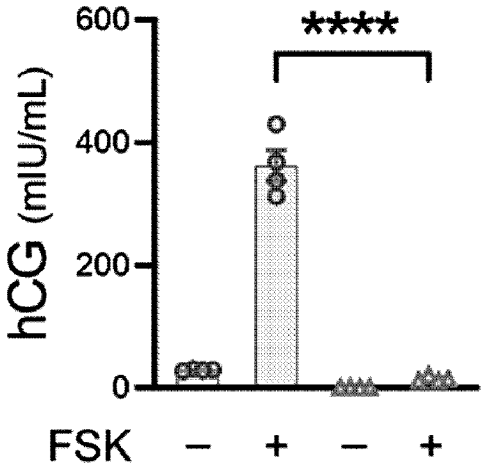
[도2b]



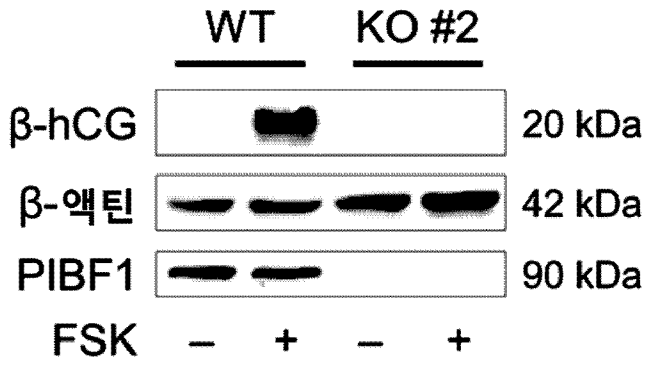
[도2c]


50
40
30
20
10
0
상대적 발현
****
****
****
****
FSK
– + – + – + – + – + – + – + – +
GCM1
ERVW-1
ERVFRD-1
CGB

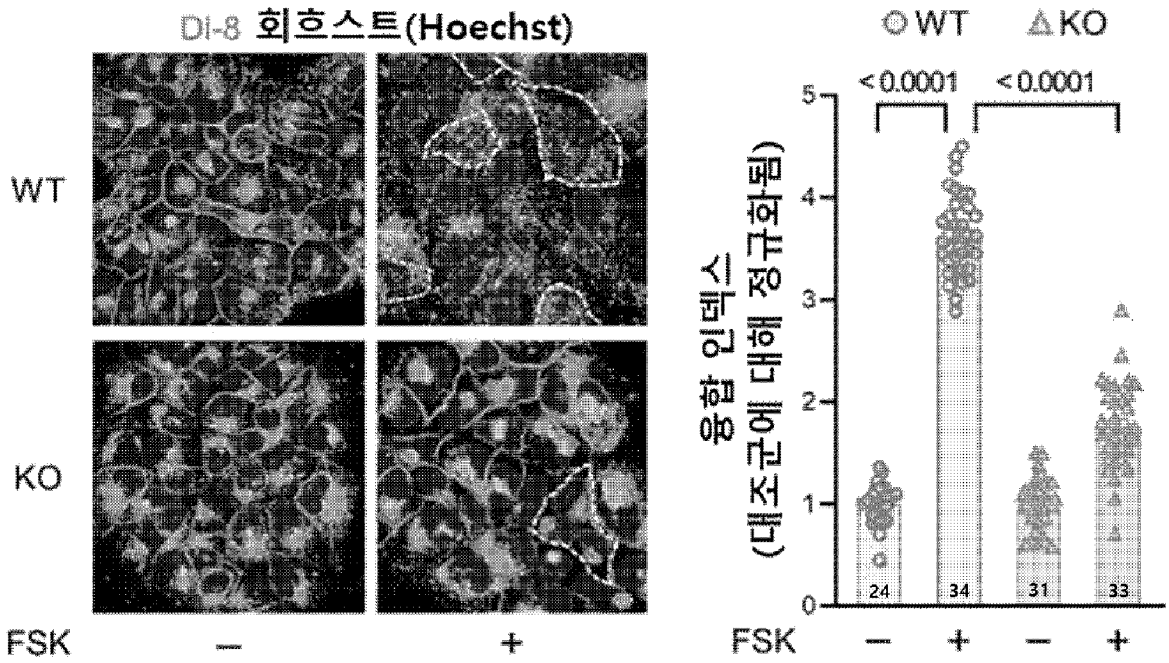
[도2d]


600
400
200
0
hCG (mIU/mL)
****
FSK – + – +

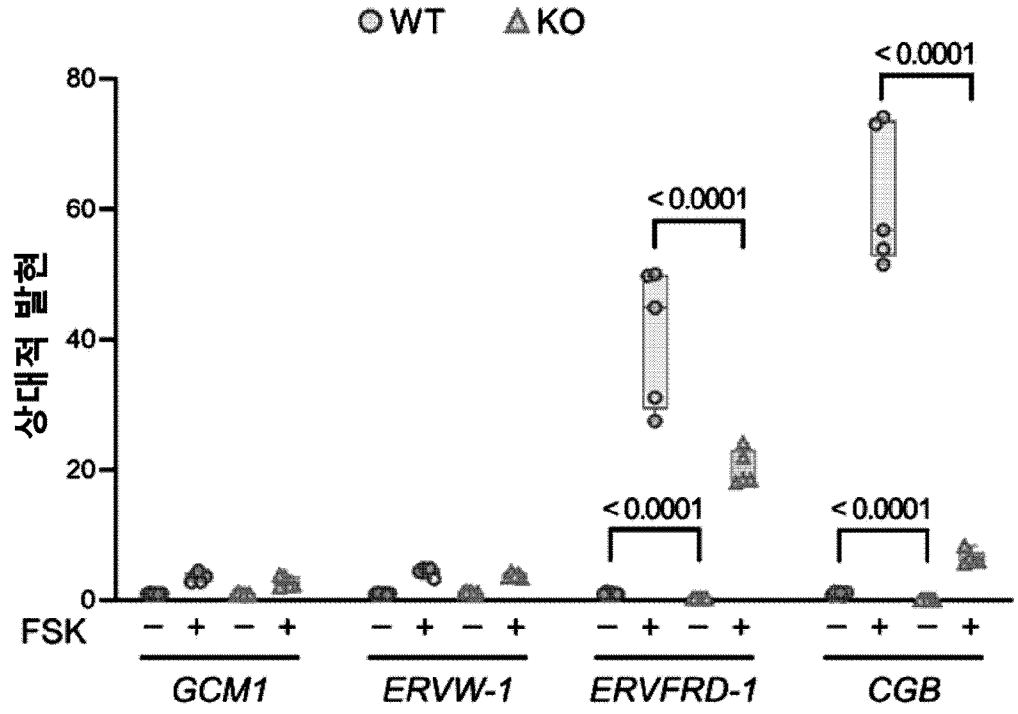
[도2e]


WT
KO #2
β-hCG
20 kDa
β-액틴
42 kDa
PIBF1
90 kDa
FSK – + – +

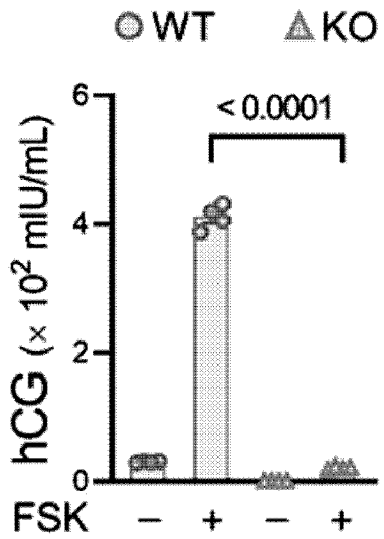
[도3a]


Di-8 회흐스트(Hoechst)
WT
KO
FSK
–
+
WT
KO
< 0.0001
< 0.0001
융합 인덱스
(대조군에 대해 정규화됨)
0
1
2
3
4
5
24
34
31
33
FSK
–
+
–
+

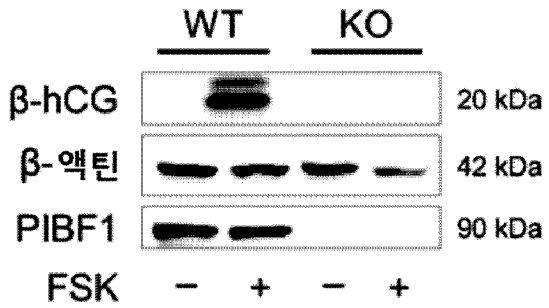
[도3b]


WT
KO
상대적 발현
0
20
40
60
80
< 0.0001
< 0.0001
< 0.0001
< 0.0001
FSK
– + – +
GCM1
ERVW-1
ERVFRD-1
CGB

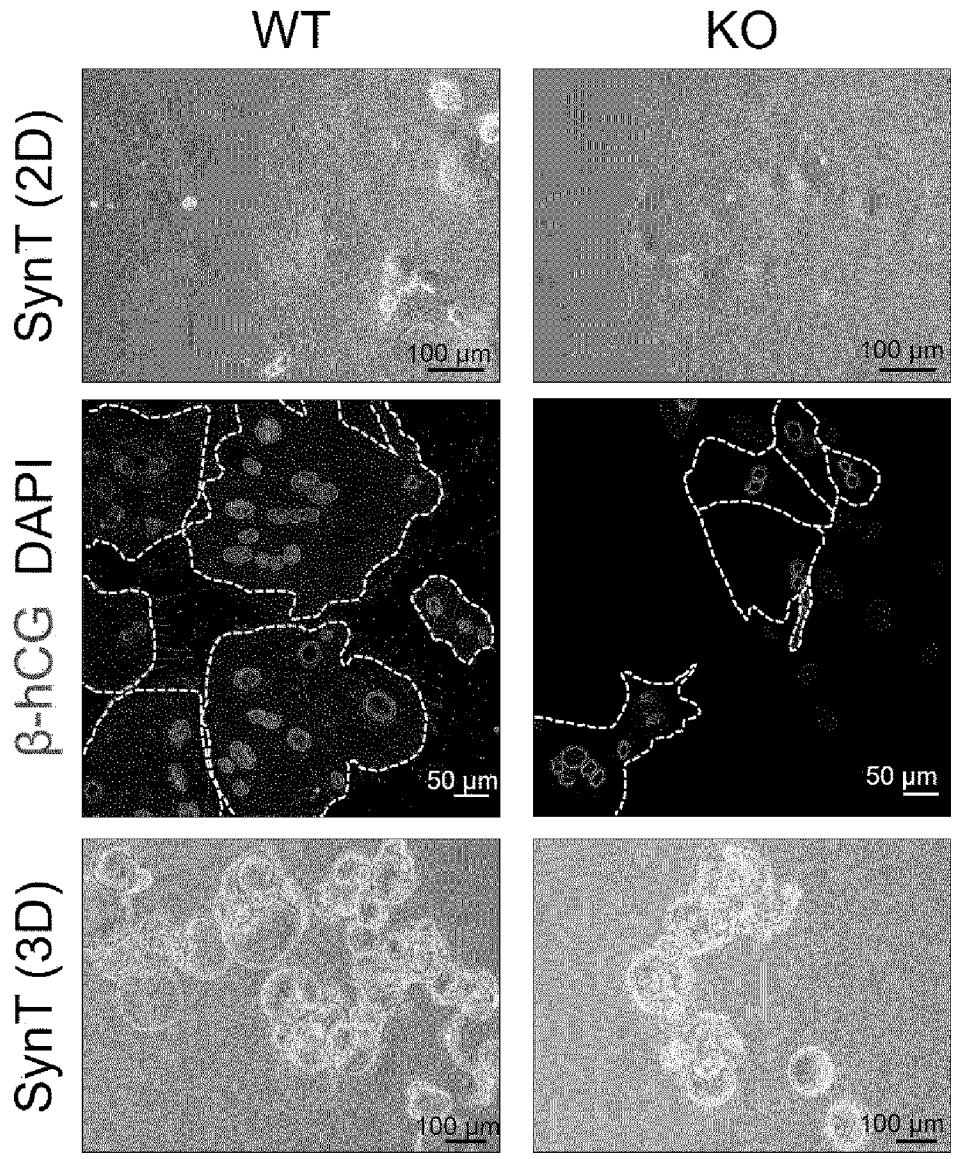
[도3c]


WT
KO
< 0.0001
hCG (× 10² mIU/mL)
6
4
2
0
FSK
–
+
–
+

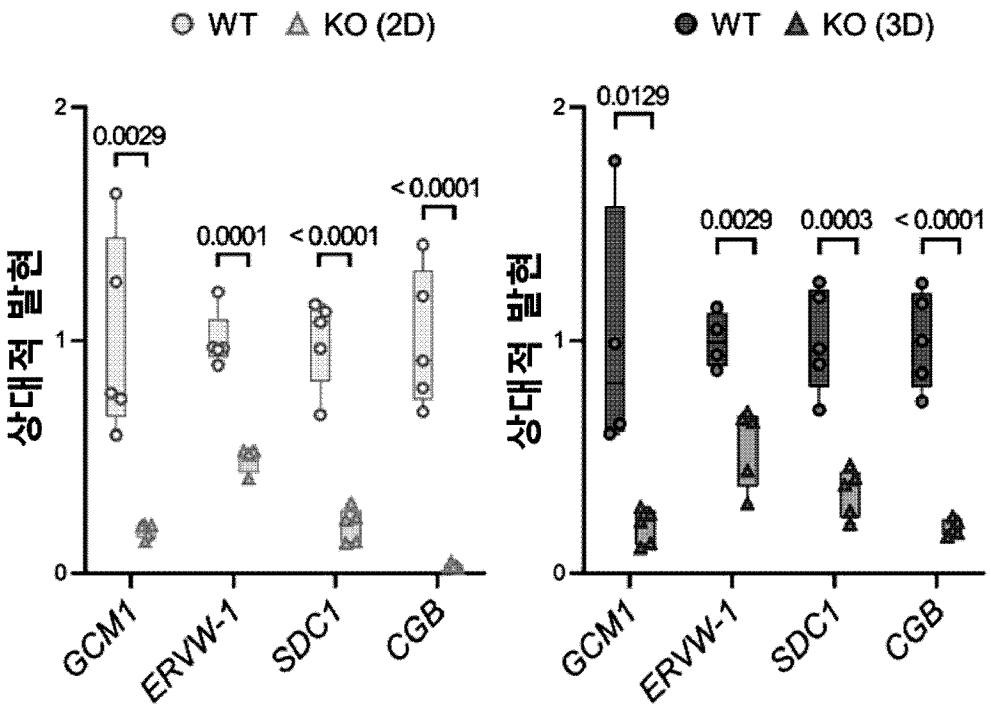
[도3d]


WT
KO
β-hCG
20 kDa
β-액틴
42 kDa
PIBF1
90 kDa
FSK
–
+
–
+

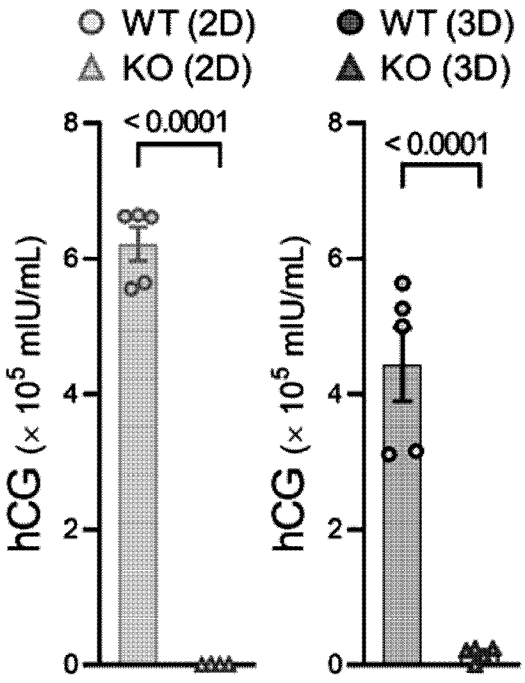
[도3e]


WT
KO
SynT (2D)
β-hCG DAPI
SynT (3D)
100 μm
100 μm
50 μm
50 μm
100 μm
100 μm

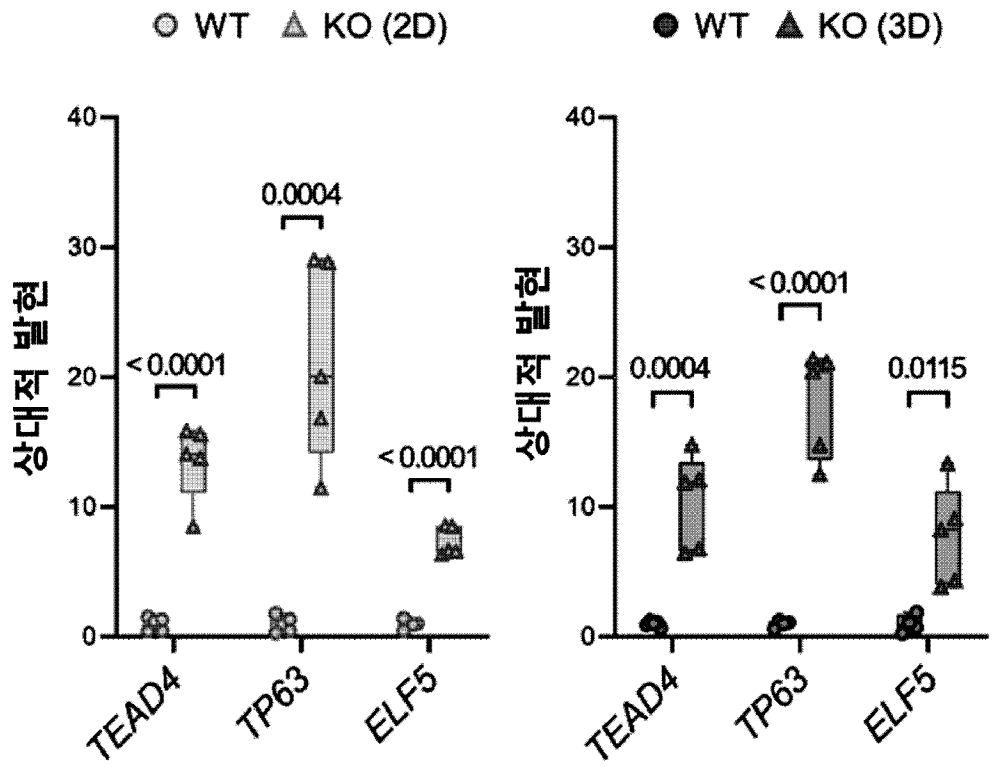
[도3f]


WT
KO (2D)
WT
KO (3D)
상대적 발현
0.0029
0.0001
< 0.0001
< 0.0001
0.0129
0.0029
0.0003
< 0.0001
GCM1
ERVW-1
SDC1
CGB

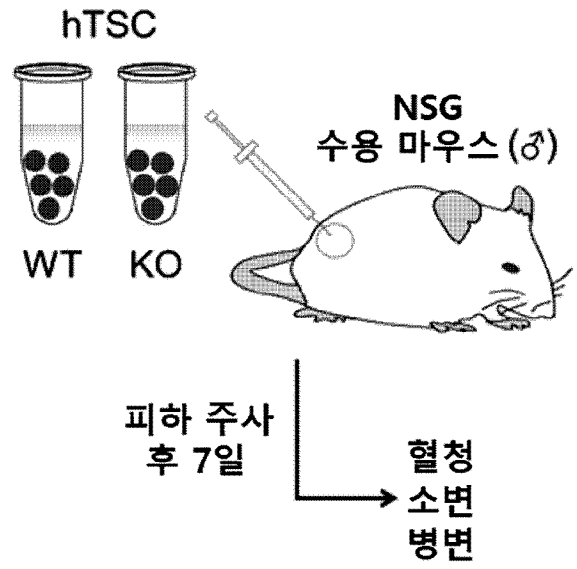
[도3g]


WT (2D)
KO (2D)
WT (3D)
KO (3D)
< 0.0001
< 0.0001
hCG (× 10^5 mIU/mL)

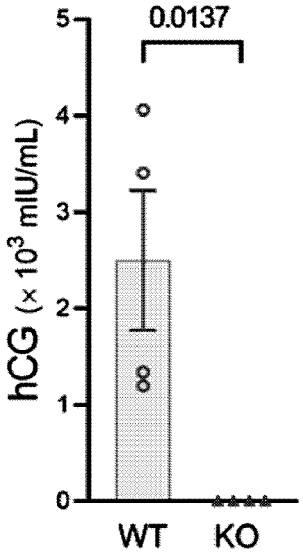
[도3h]


WT
KO (2D)
WT
KO (3D)
상대적 발현
40
30
20
10
0
< 0.0001
0.0004
< 0.0001
0.0004
< 0.0001
0.0115
TEAD4
TP63
ELF5
TEAD4
TP63
ELF5

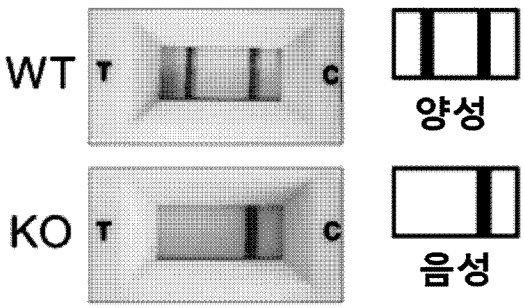
[도3i]


hTSC
NSG
수용 마우스 (♂)
WT
KO
피하 주사
후 7일
혈청
소변
병변

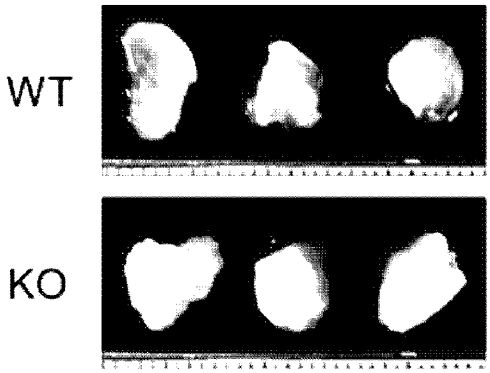
[도3j]



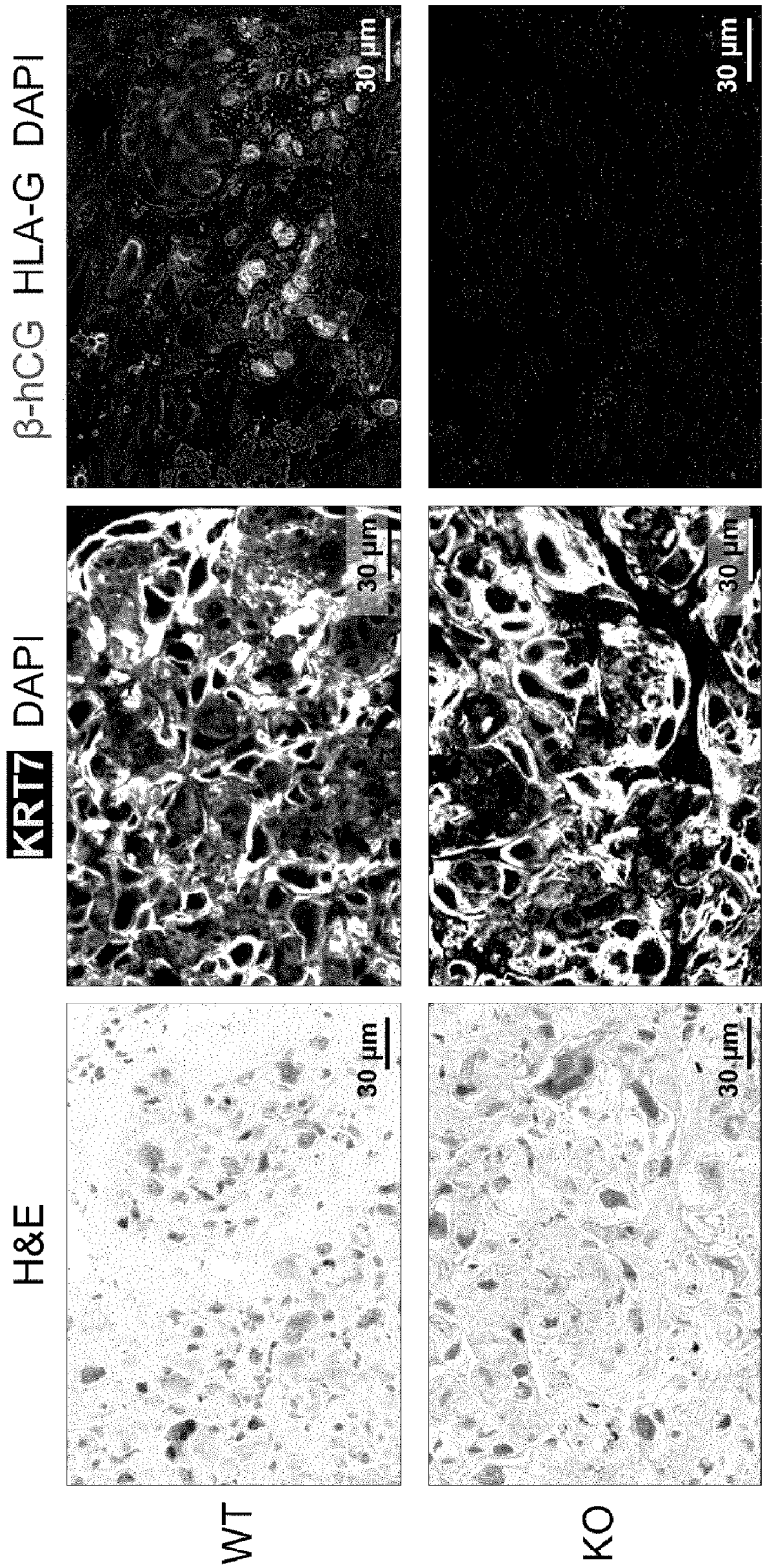
[도3k]



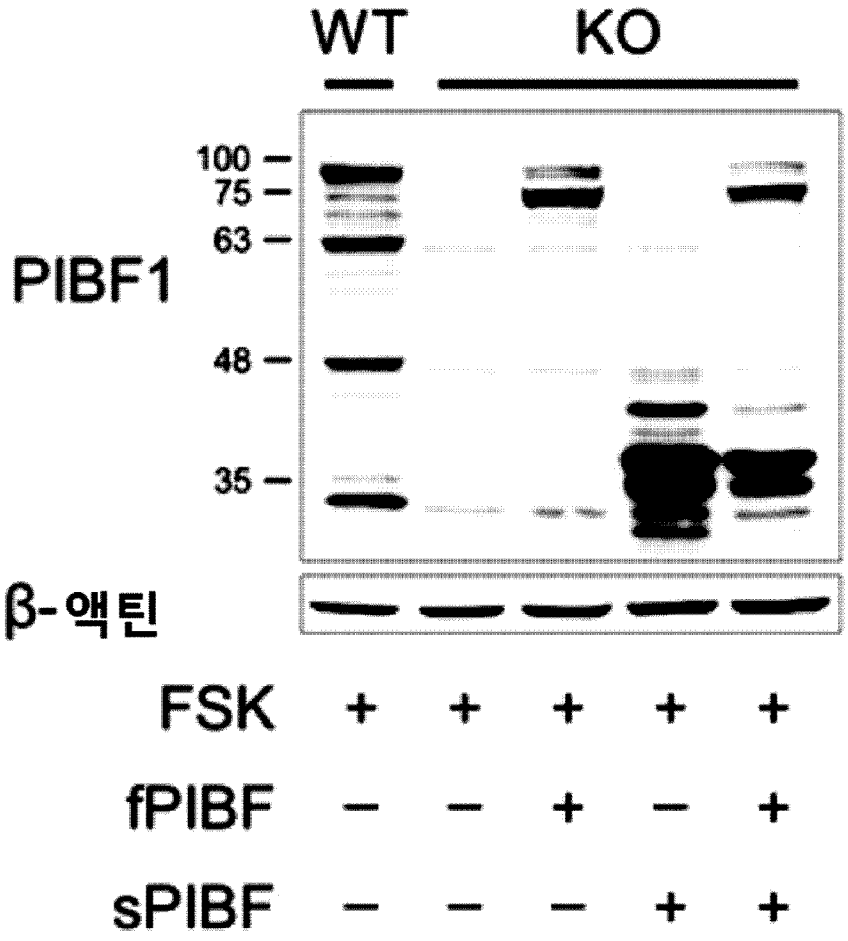
[도3l]



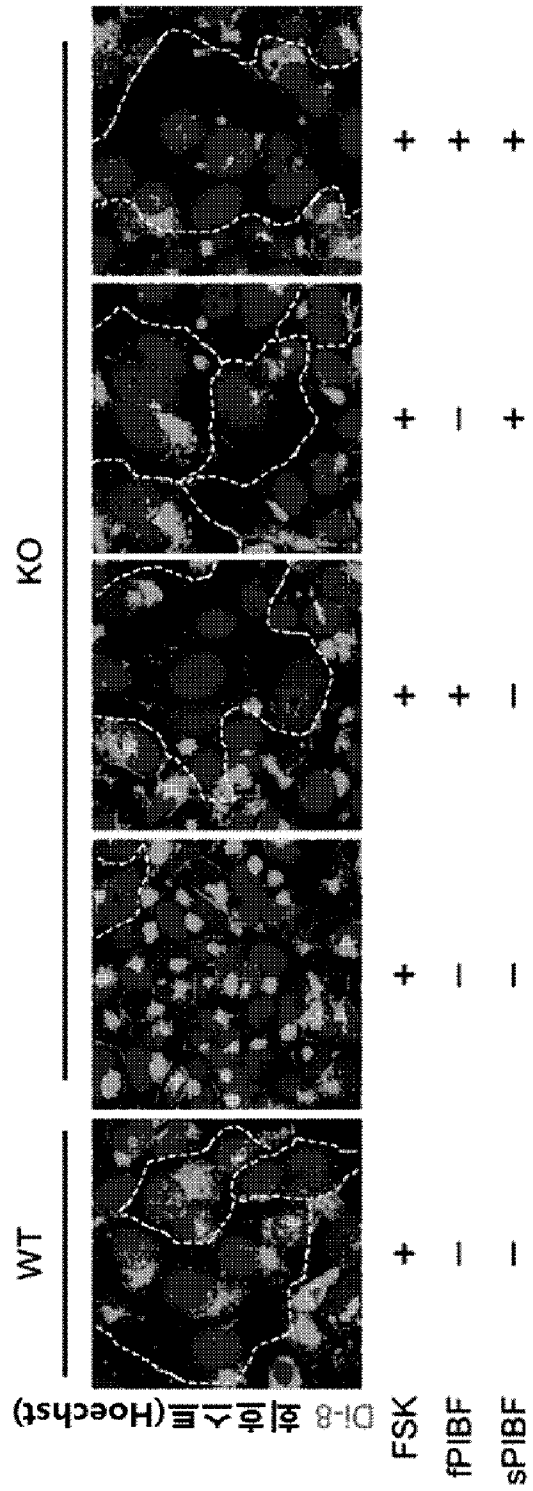
[도3m]

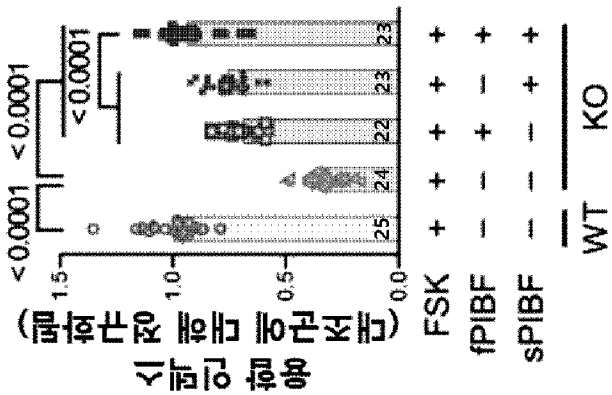


[도3n]

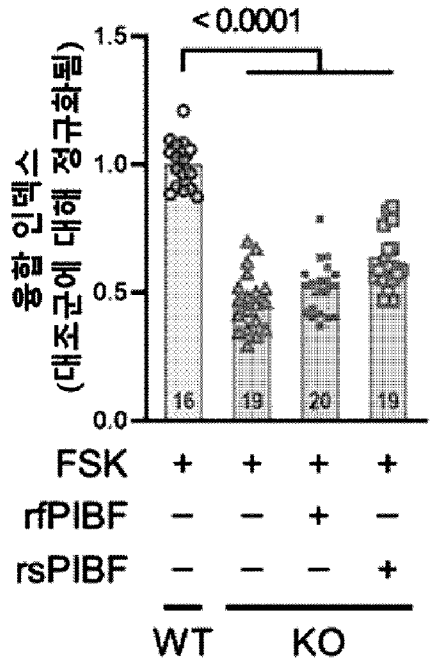


[도3o]


WT
KO
DI-8 핵염색(Hoechst)
FSK
fPIBF
sPIBF
+ + +
+ − +
+ + −
+ − −


융합 인덱스
(대조군에 대해 정규화됨)
1.5
1.0
0.5
0.0
< 0.0001
< 0.0001
< 0.0001
25
24
22
23
23
FSK
fPIBF
sPIBF
+ + + + +
+ − + − +
+ − − − +
WT
KO

[도3p]



[도4a]

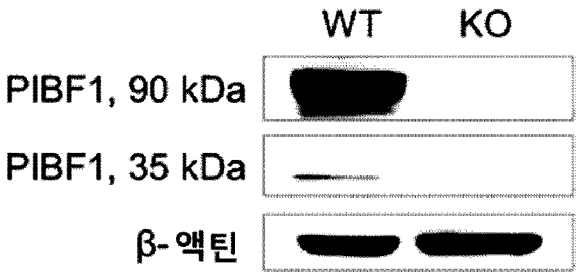
PIBF1 KO TS 세포에서 엑손 2의 표적 영역

```
     E  S  E  D  I  S  L  E  T  T  V  P  T  D  D  I  S  S  S  E
WT   GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACAACAGTTCCTACGGATGATATTTCCTCATCAGAA

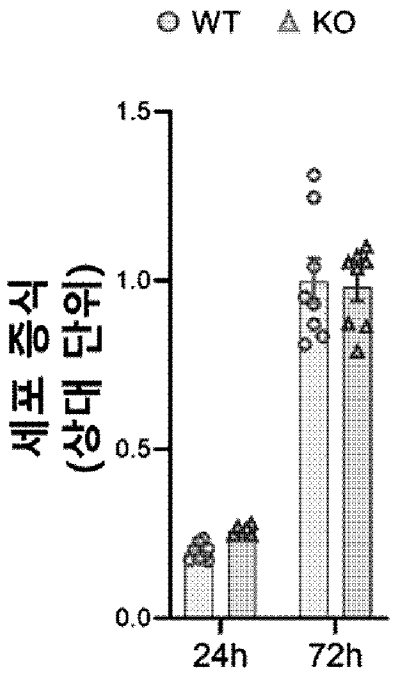
     GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACAACAGTTC----------TATTTCCTCATCAGAA   -10
     GAATCTGAAGATATTAGTTTAGAAACAACAGTTC-------TGATATTTCCTCATCAGAA   -7
```

TTTA PAM NNNN 표적

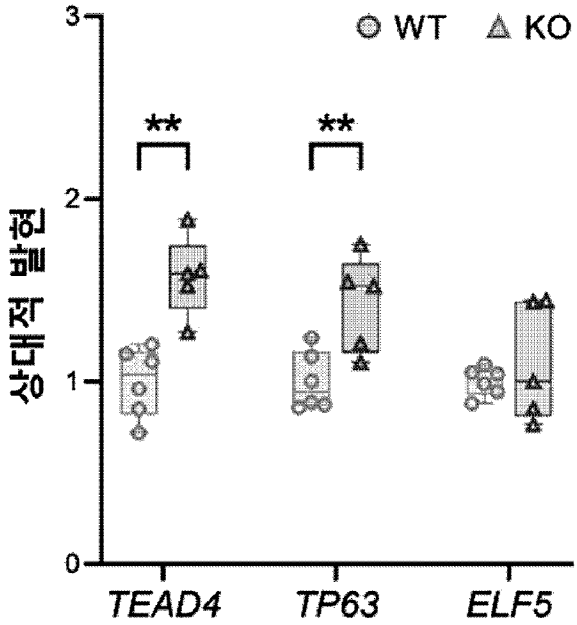
[도4b]



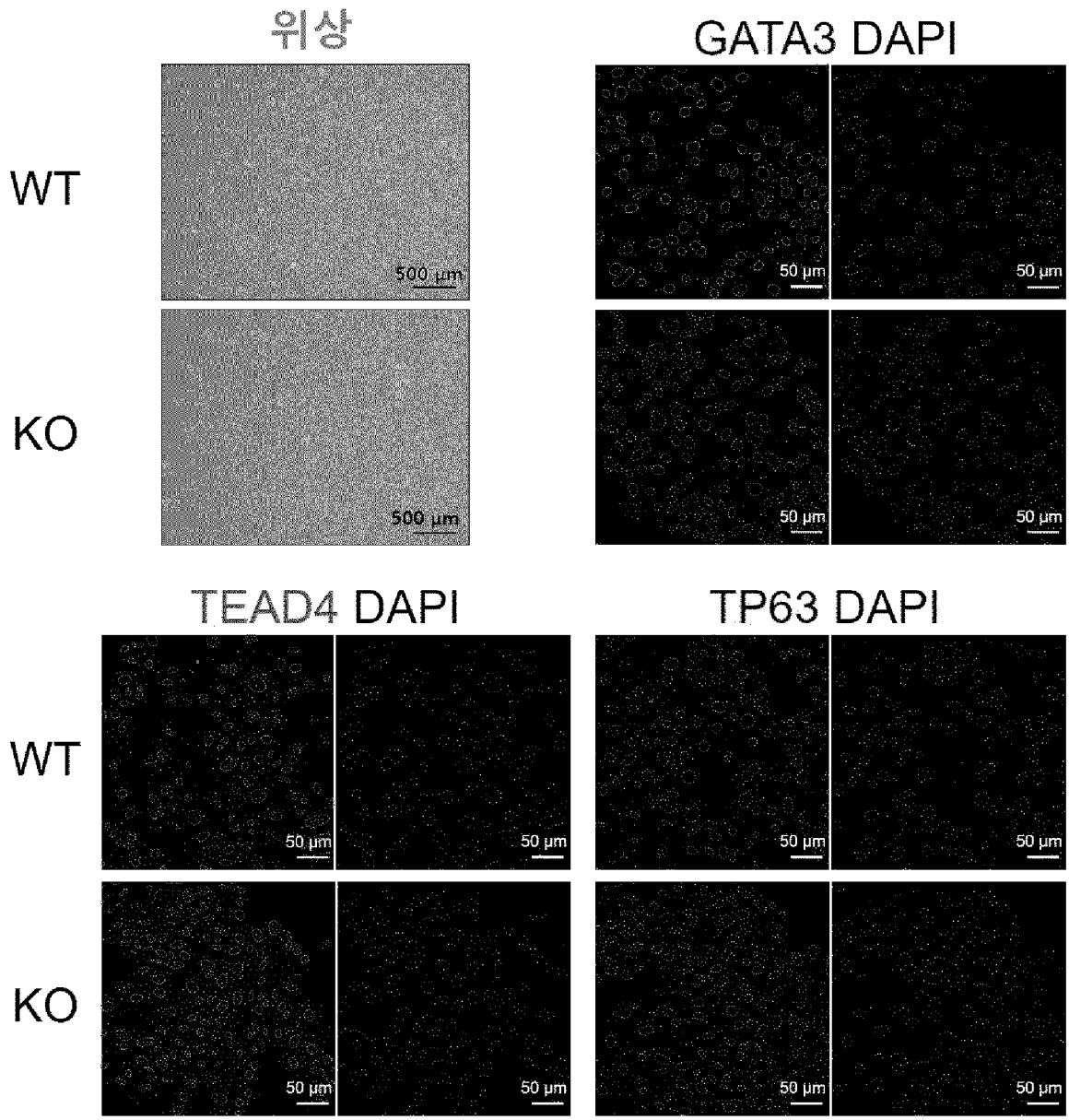
[도4c]


WT
KO
1.5
1.0
0.5
0.0
세포 증식 (상대 단위)
24h
72h

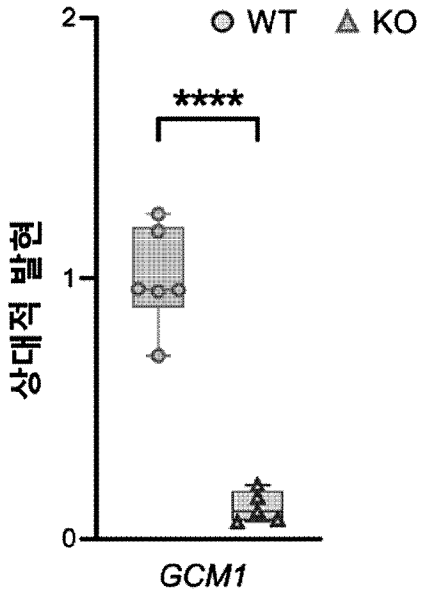
[도4d]


WT
KO
3
2
1
0
상대적 발현
**
**
TEAD4
TP63
ELF5

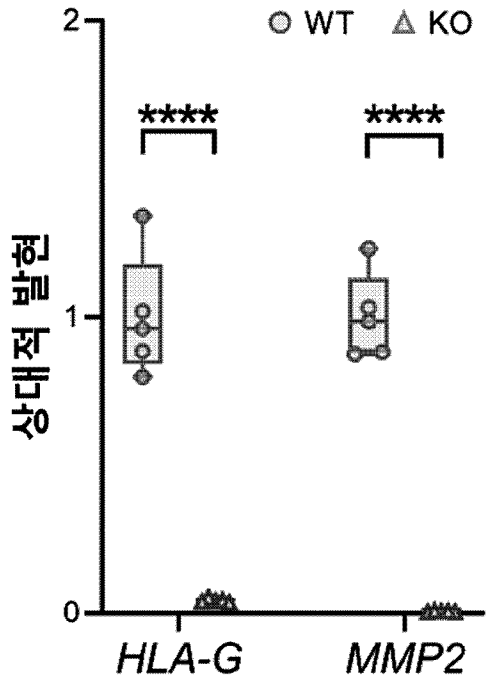
[도4e]


위상
GATA3 DAPI
WT
KO
500 μm
50 μm
TEAD4 DAPI
TP63 DAPI

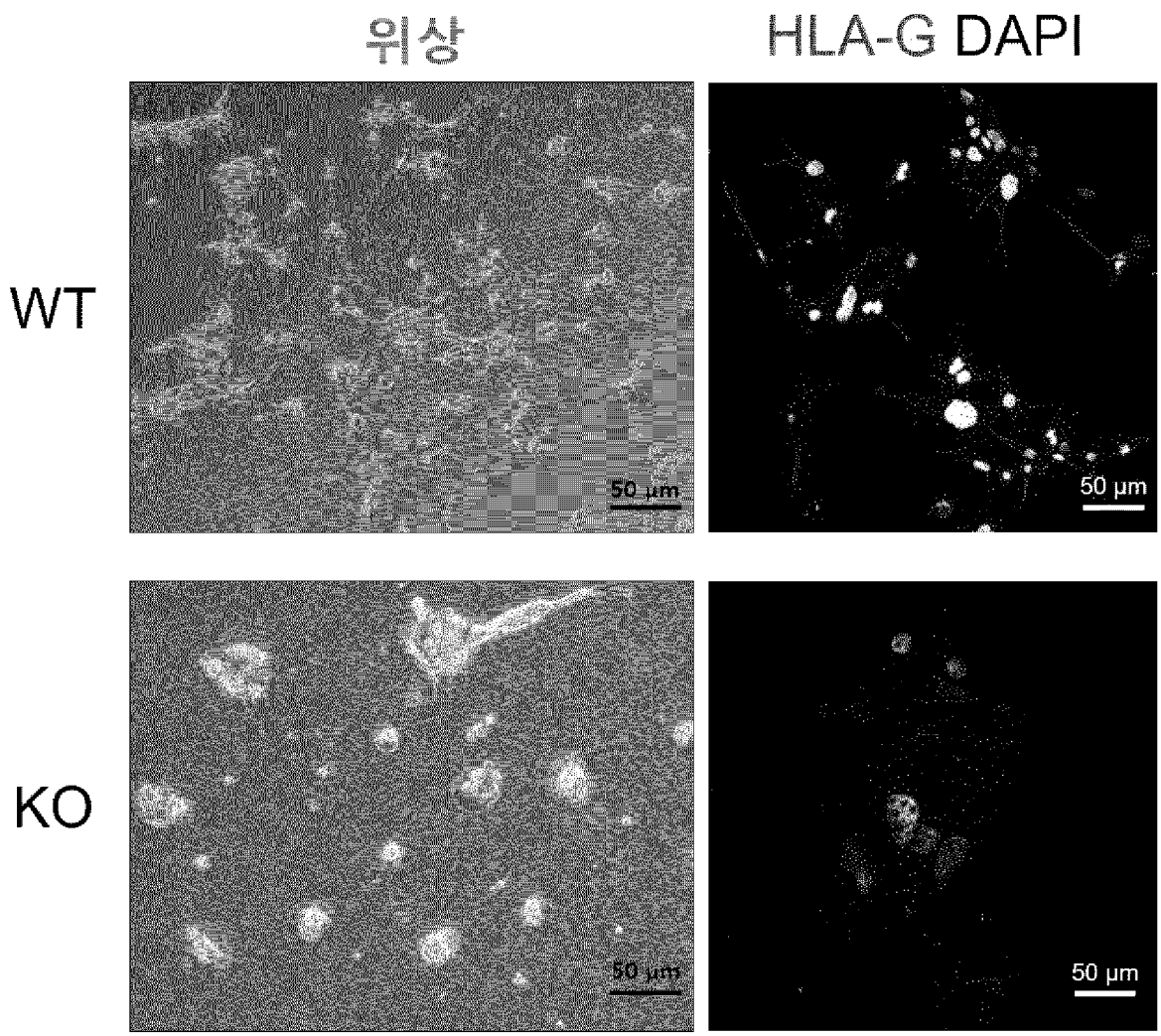
[도4f]


WT
KO
****
상대적 발현
2
1
0
GCM1

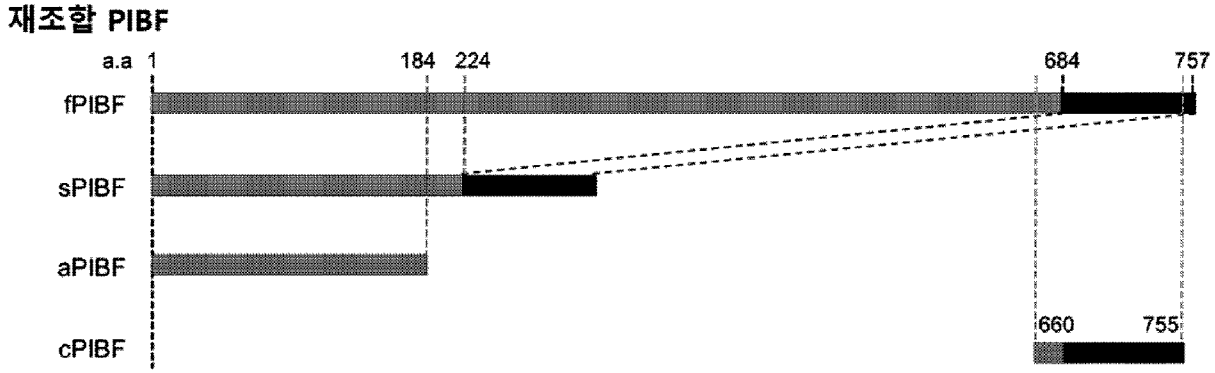
[도4g]


WT
KO
2
1
0
****
****
상대적 발현
HLA-G
MMP2

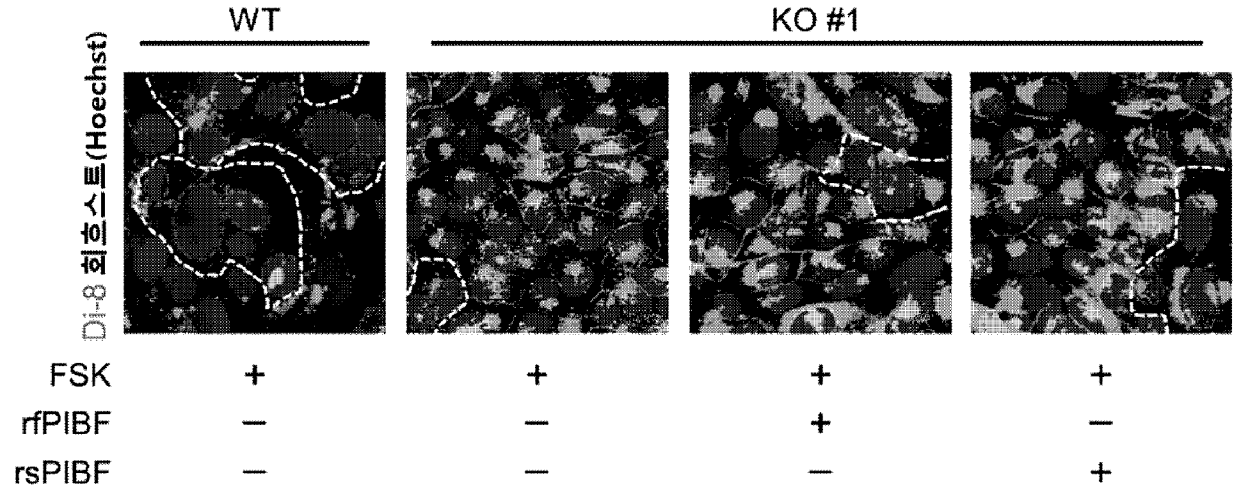
[도4h]


위상
HLA-G DAPI
WT
KO
50 μm
50 μm
50 μm
50 μm

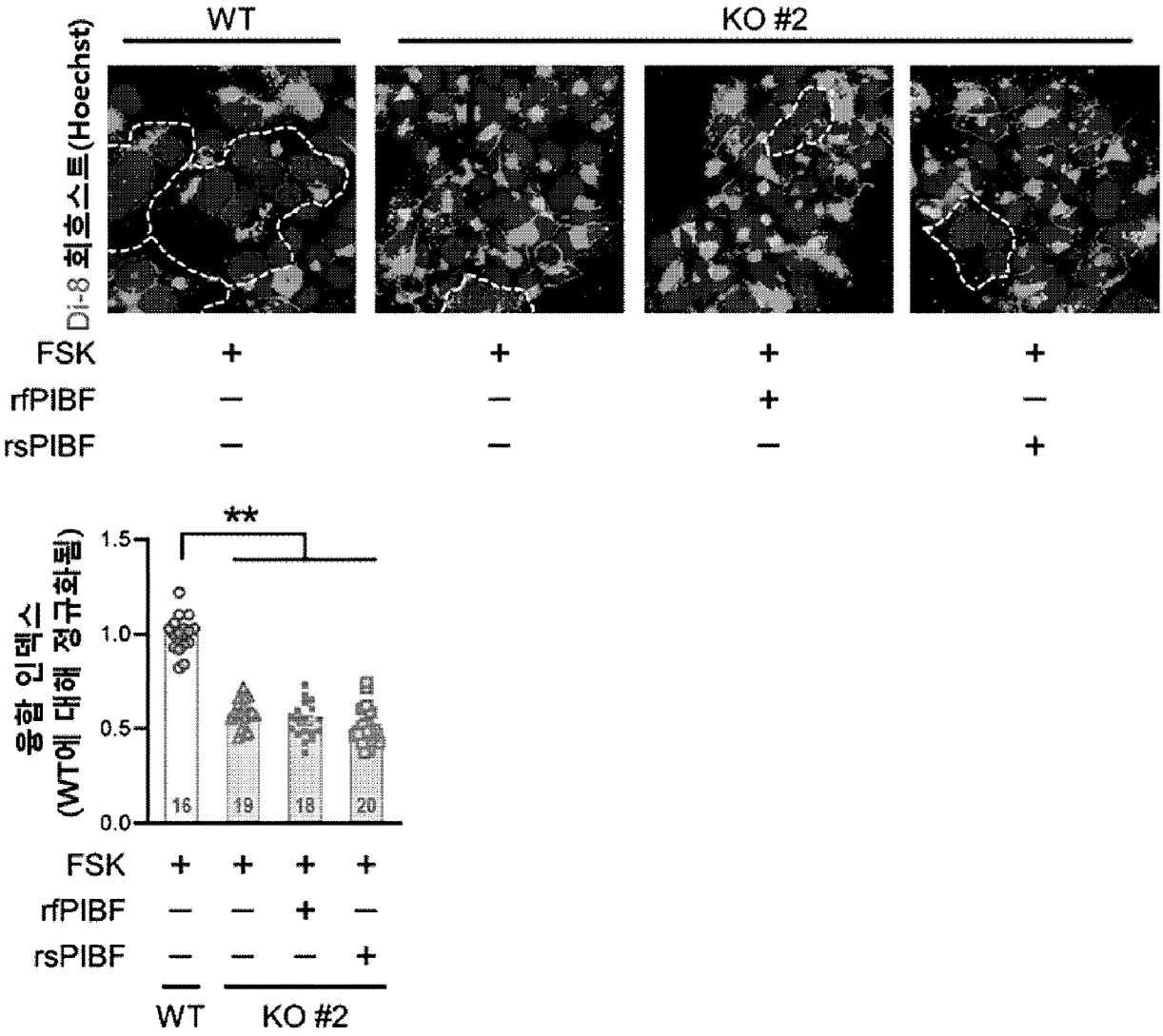
[도5a]


재조합 PIBF
a.a 1
184
224
684
757
fPIBF
sPIBF
aPIBF
cPIBF
660
755

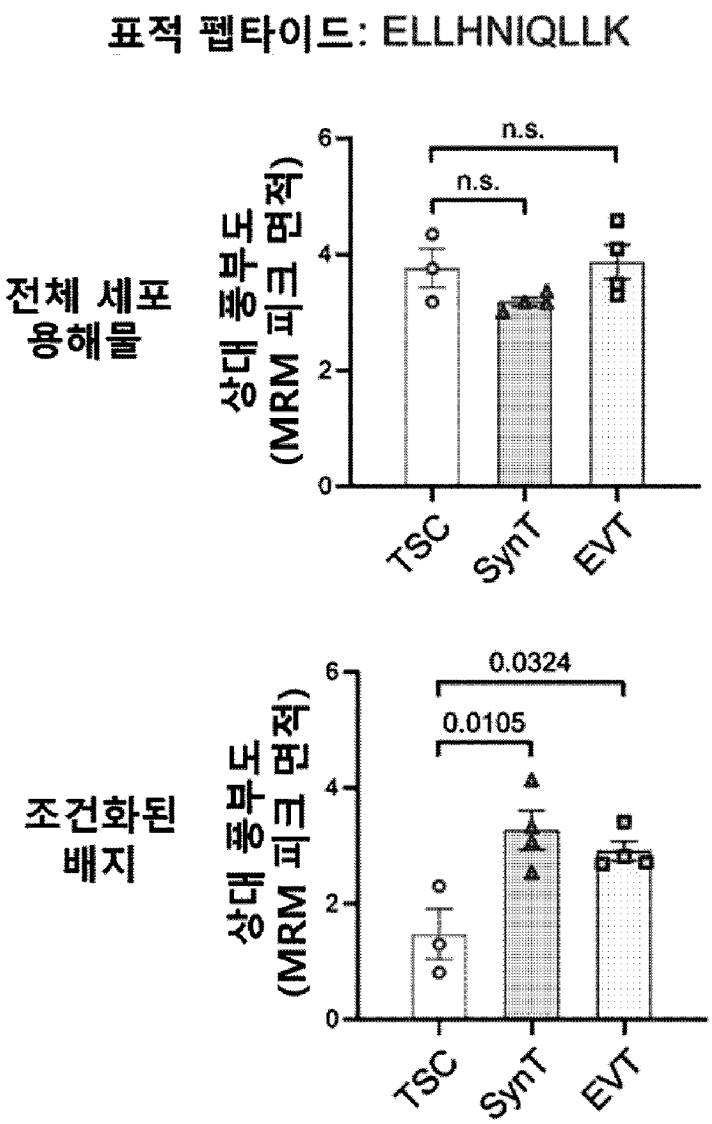
[도5b]


WT
KO #1
Di-8 희흐스트(Hoechst)
FSK + + + +
rfPIBF − − + −
rsPIBF − − − +

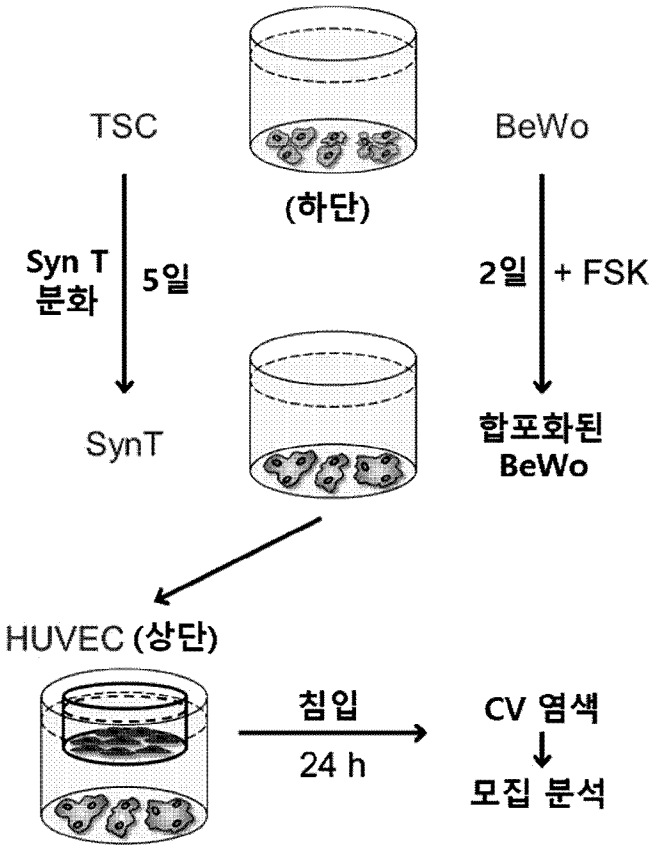
[도5c]


WT
KO #2
DI-8 희흔스트(Hoechst)
FSK + + + +
rfPIBF − − + −
rsPIBF − − − +
**
융합 인덱스 (WT에 대해 정규화됨)
1.5
1.0
0.5
0.0
16
19
18
20
FSK + + + +
rfPIBF − − + −
rsPIBF − − − +
WT
KO #2

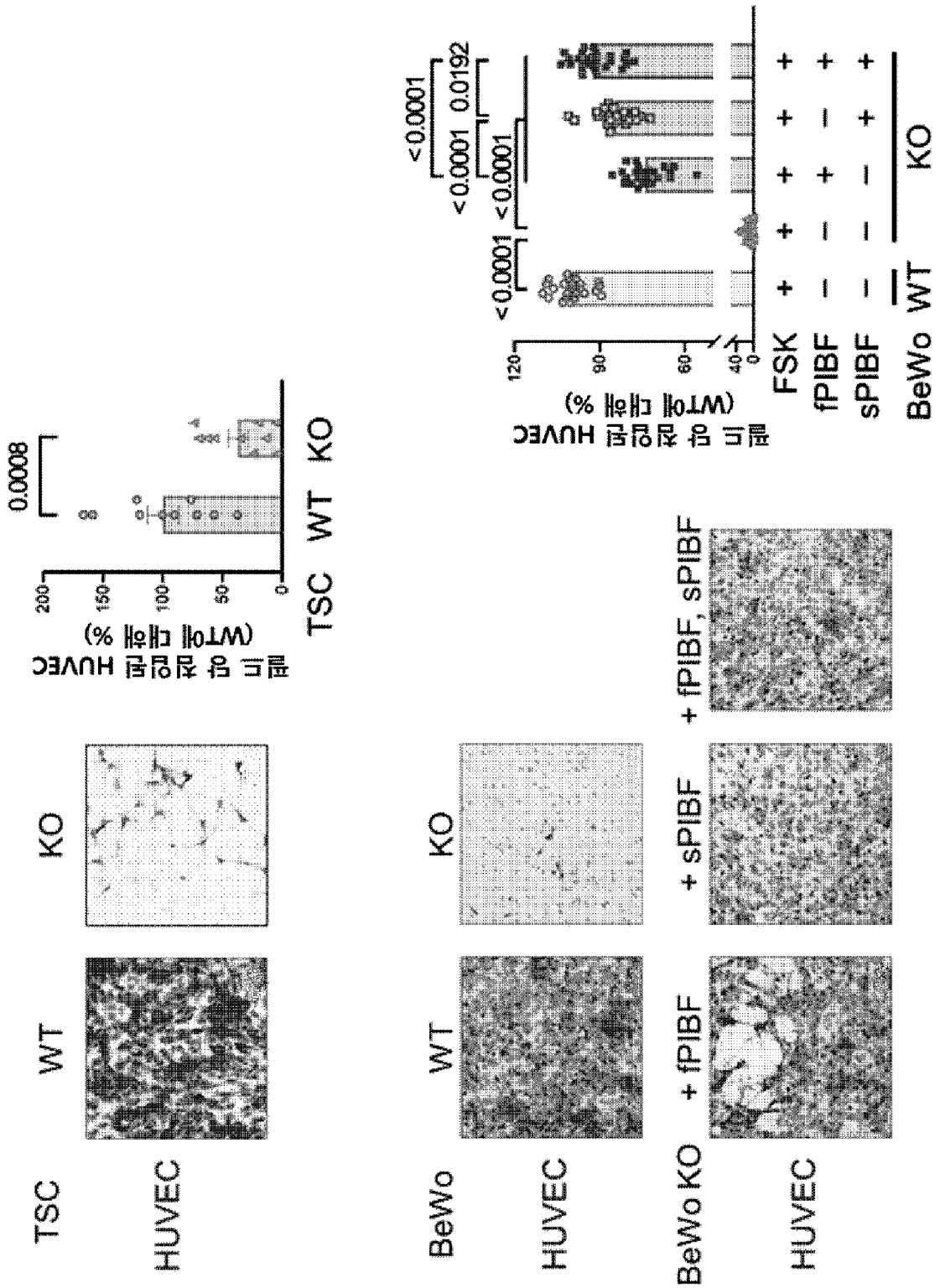
[도6a]


표적 펩타이드: ELLHNIQLLK
전체 세포 용해물
조건화된 배지
상대 풍부도 (MRM 피크 면적)
n.s.
n.s.
0.0324
0.0105
0
2
4
6
TSC
SynT
EVT

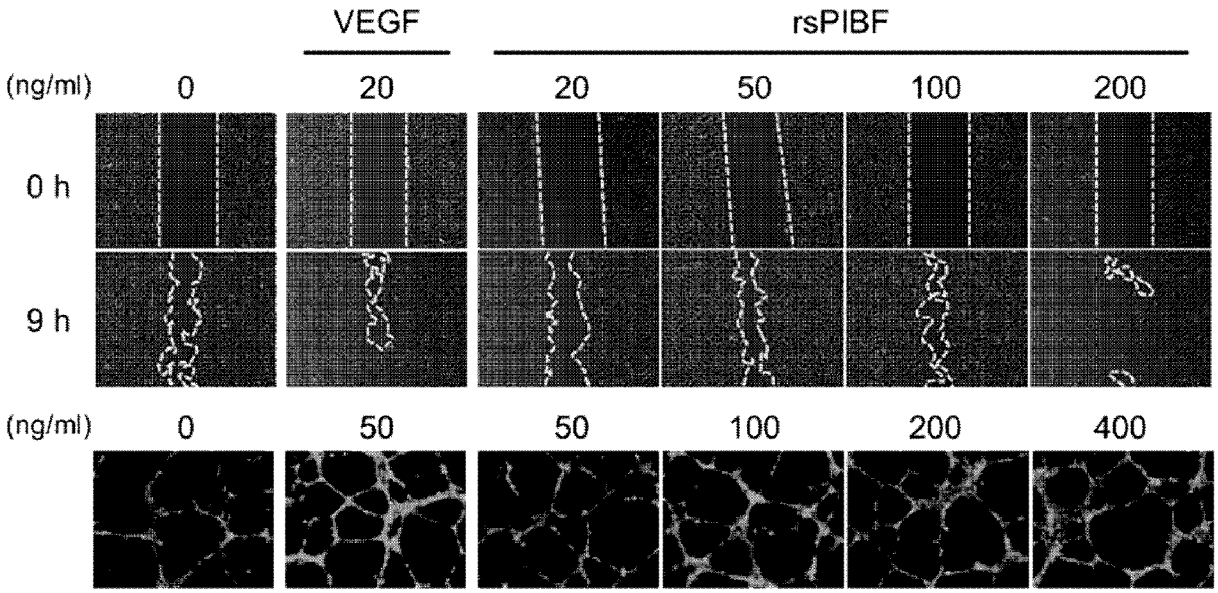
[도6b]


TSC
BeWo
(하단)
Syn T
분화
5일
2일
+ FSK
SynT
합포화된
BeWo
HUVEC (상단)
침입
24 h
CV 염색
모집 분석

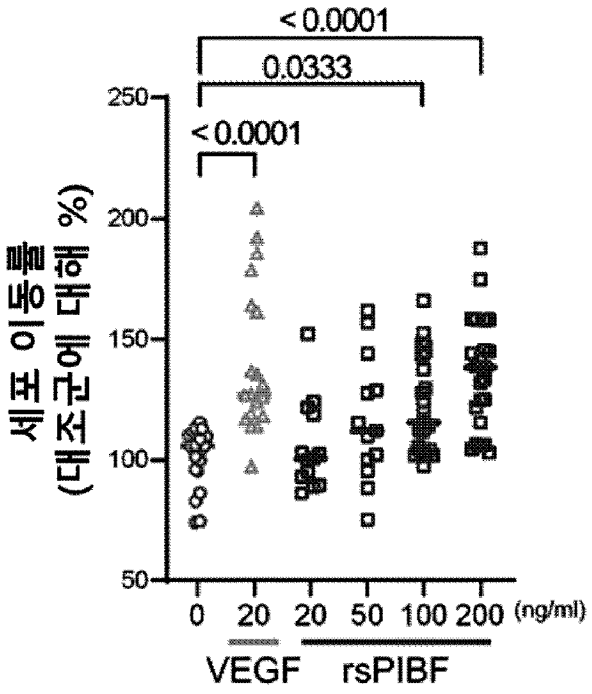
[도6c]


TSC
HUVEC
WT
KO
BeWo
HUVEC
WT
KO
BeWo KO
HUVEC
+ fPIBF
+ sPIBF
+ fPIBF, sPIBF
필드 당 침입된 HUVEC (WT에 대해 %)
0.0008
TSC WT KO
필드 당 침입된 HUVEC (WT에 대해 %)
< 0.0001
< 0.0001
< 0.0001
< 0.0001
0.0192
FSK
fPIBF
sPIBF
BeWo WT KO

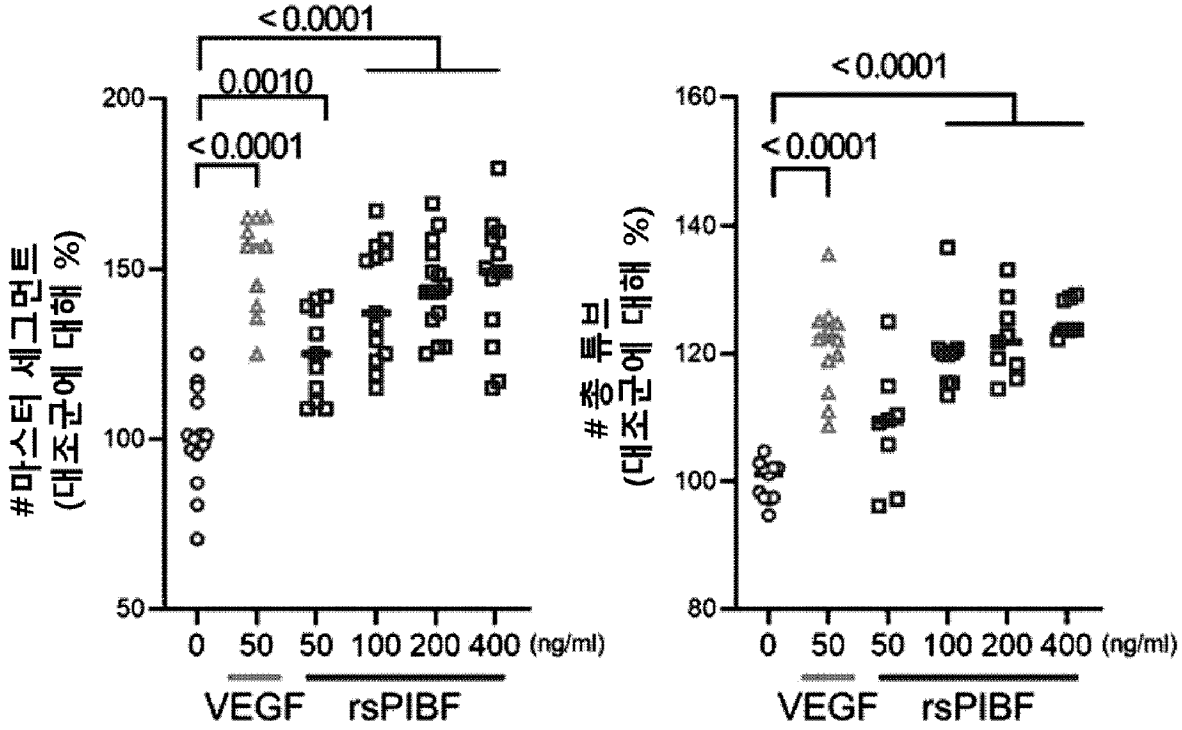
[도6d]


VEGF
rsPIBF
(ng/ml)
0
20
20
50
100
200
0 h
9 h
(ng/ml)
0
50
50
100
200
400

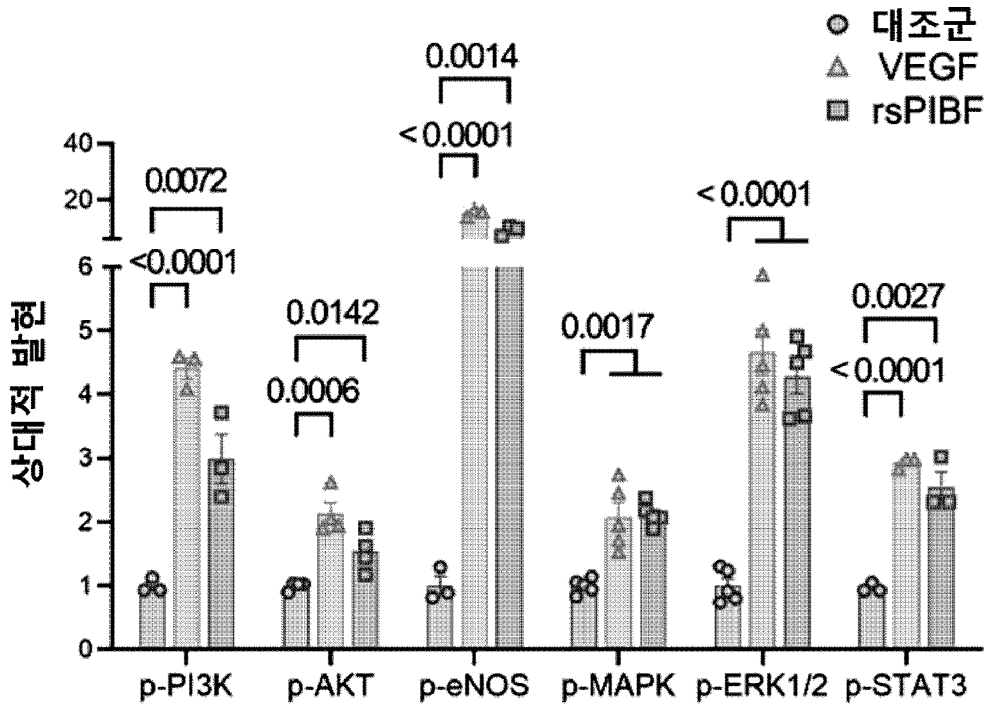
[도6e]


< 0.0001
0.0333
< 0.0001
세포 이동률
(대조군에 대해 %)
250
200
150
100
50
0
20
20
50
100
200
(ng/ml)
VEGF
rsPIBF

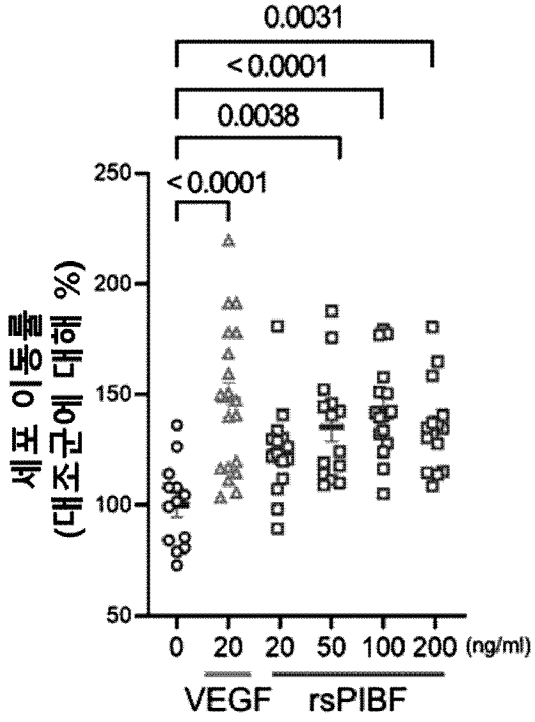
[도6f]


< 0.0001
0.0010
< 0.0001
#마스터 세그먼트
(대조군에 대해 %)
200
150
100
50
0 50 50 100 200 400 (ng/ml)
VEGF rsPIBF
< 0.0001
< 0.0001
#종양 튜브
(대조군에 대해 %)
160
140
120
100
80
0 50 50 100 200 400 (ng/ml)
VEGF rsPIBF

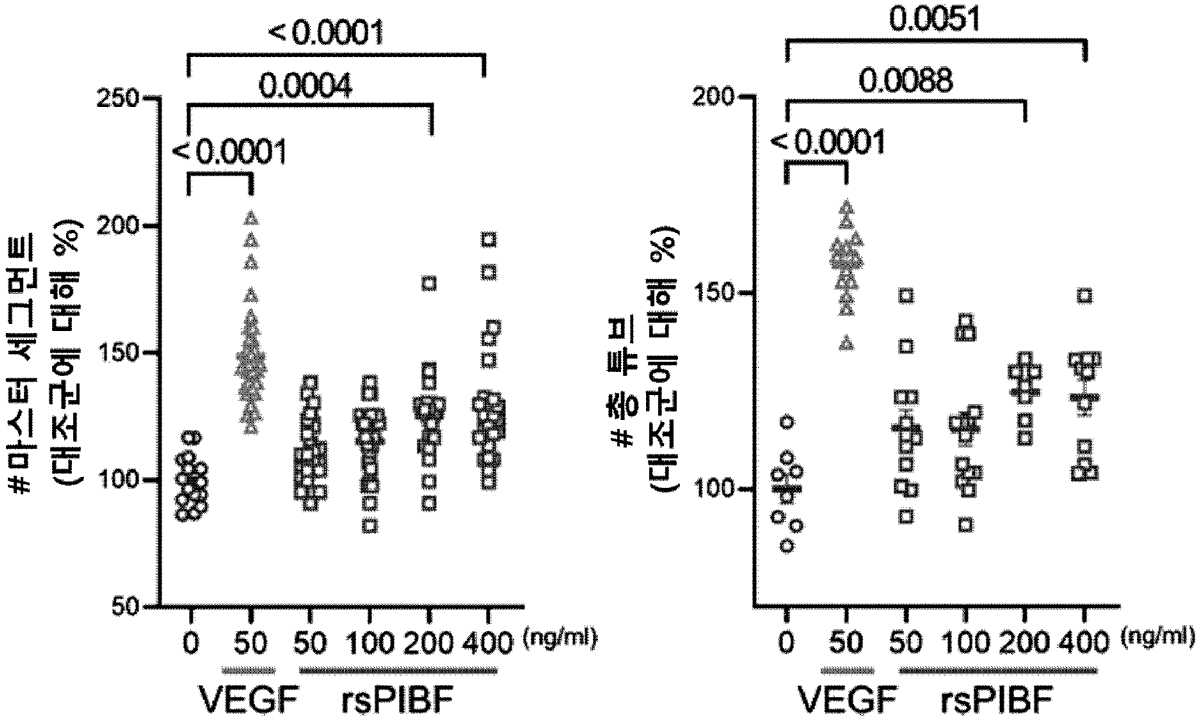
[도6g]


대조군
VEGF
rsPIBF
0.0014
< 0.0001
0.0072
< 0.0001
0.0142
0.0006
0.0017
< 0.0001
0.0027
< 0.0001
상대적 발현
40
20
6
5
4
3
2
1
0
p-PI3K
p-AKT
p-eNOS
p-MAPK
p-ERK1/2
p-STAT3

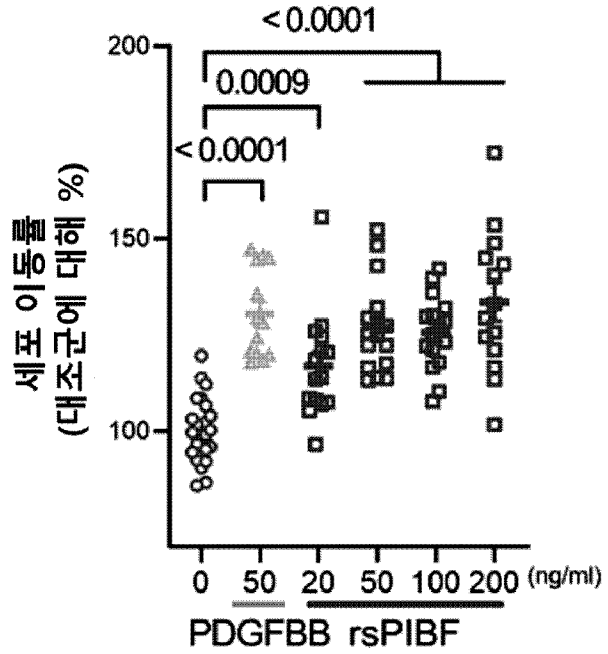
[도6h]


0.0031
< 0.0001
0.0038
< 0.0001
250
200
150
100
50
세포 이동률
(대조군에 대해 %)
0 20 20 50 100 200 (ng/ml)
VEGF rsPIBF

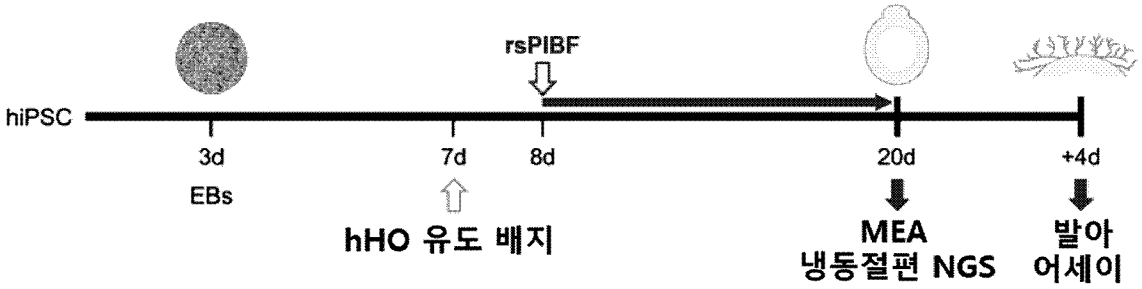
[도6i]


< 0.0001
0.0004
< 0.0001
250
200
150
100
50
마스터 세그먼트
(대조군에 대해 %)
0 50 50 100 200 400 (ng/ml)
VEGF rsPIBF
0.0051
0.0088
< 0.0001
200
150
100
종 튜브
(대조군에 대해 %)
0 50 50 100 200 400 (ng/ml)
VEGF rsPIBF

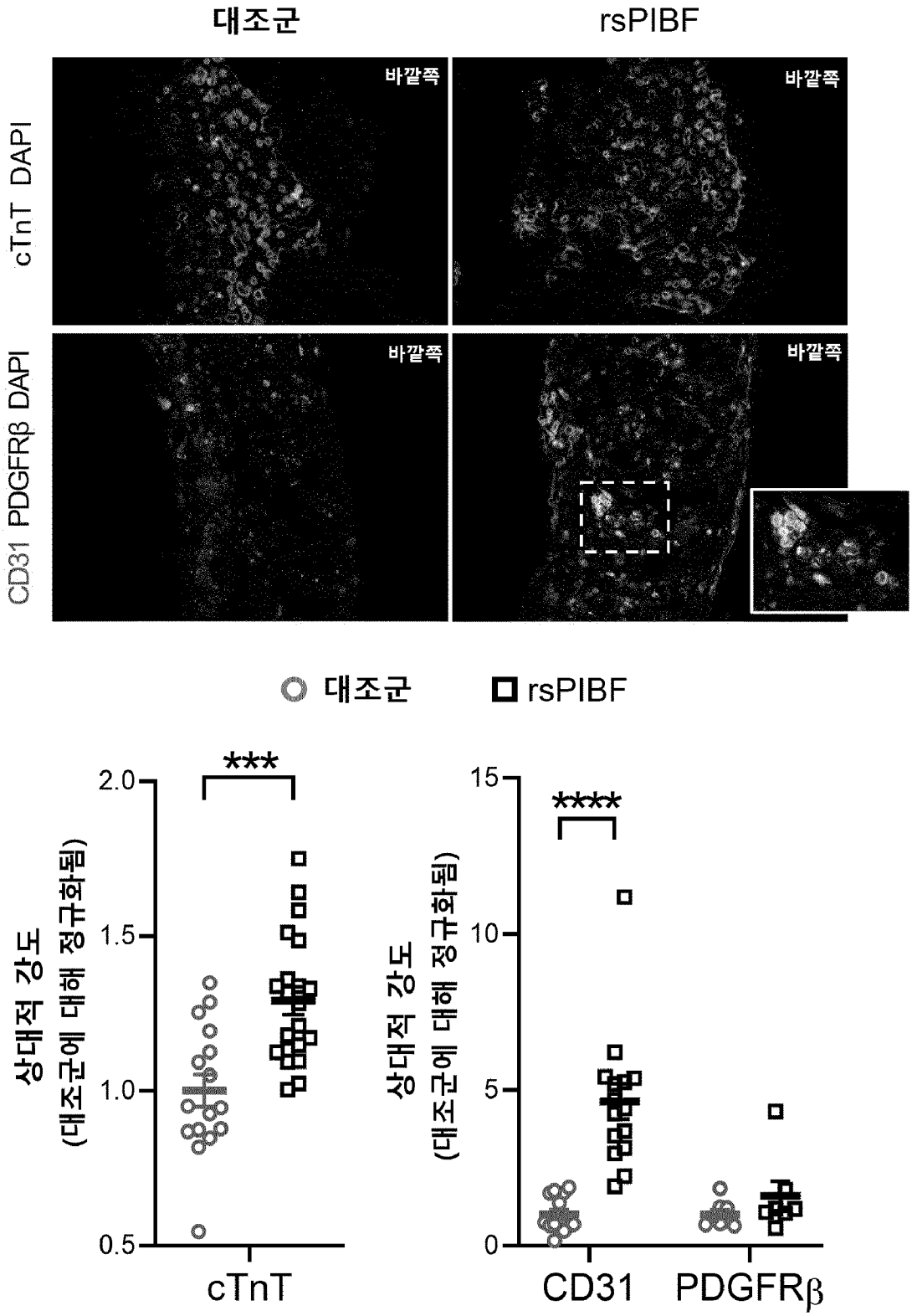
[도6j]


< 0.0001
0.0009
< 0.0001
200
150
100
세포 이동률 (대조군에 대해 %)
0 50 20 50 100 200 (ng/ml)
PDGFBB rsPIBF

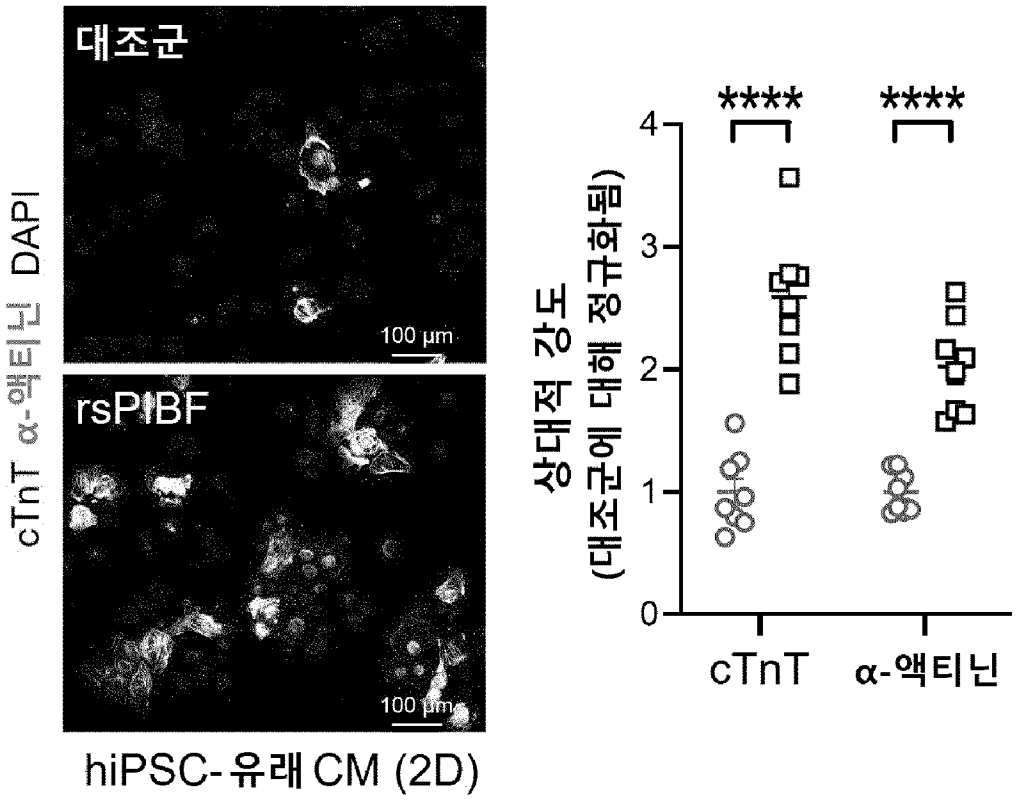
[도6k]


rsPIBF
hiPSC
3d
EBs
7d
8d
20d
+4d
hHO 유도 배지
MEA
냉동절편 NGS
발아
어세이

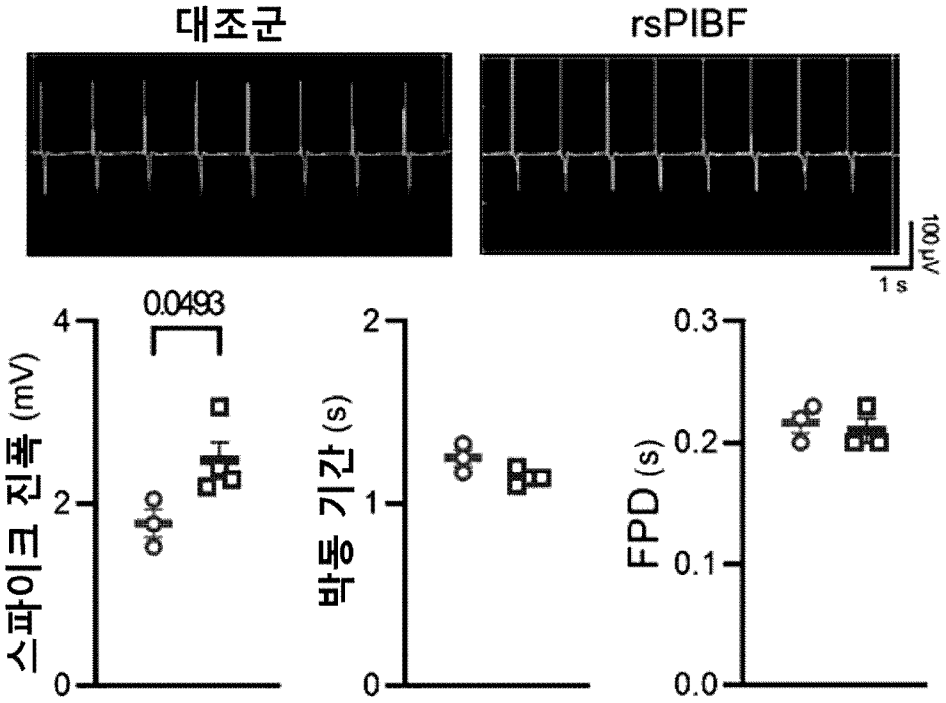
[도6l]


대조군
rsPIBF
바깥쪽
cTnT DAPI
CD31 PDGFRβ DAPI
대조군
rsPIBF
상대적 강도
(대조군에 대해 정규화됨)
***
2.0
1.5
1.0
0.5
cTnT
****
15
10
5
0
CD31
PDGFRβ

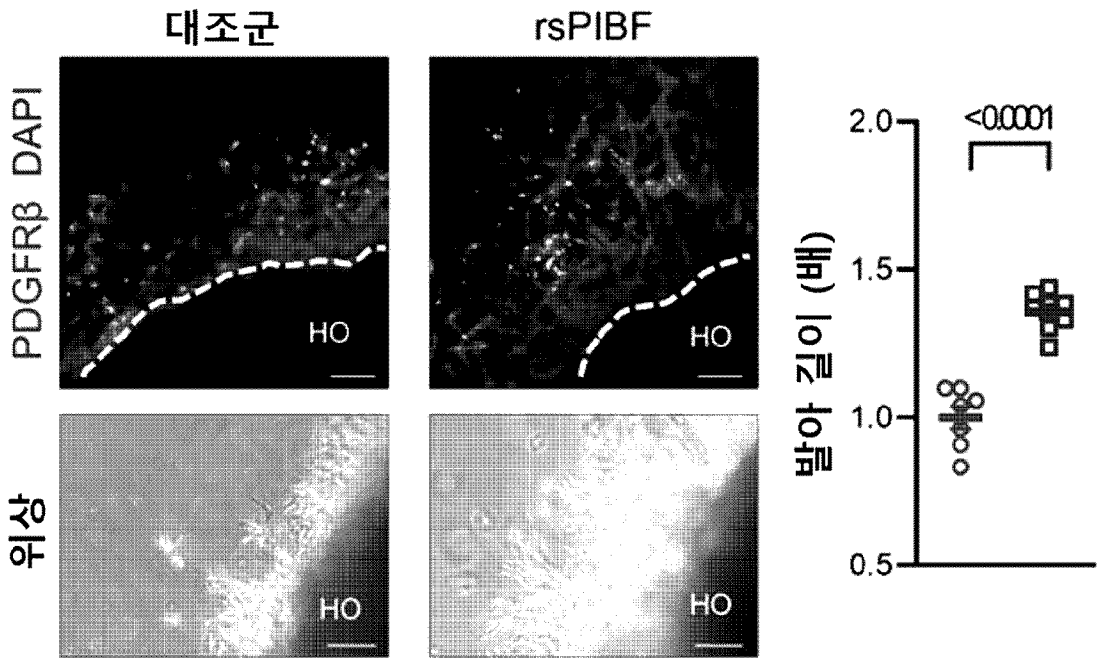
[도6m]


대조군
rsPIBF
100 μm
100 μm
cTnT α-액티닌 DAPI
hiPSC-유래 CM (2D)
****
****
상대적 강도
(대조군에 대해 정규화됨)
cTnT
α-액티닌

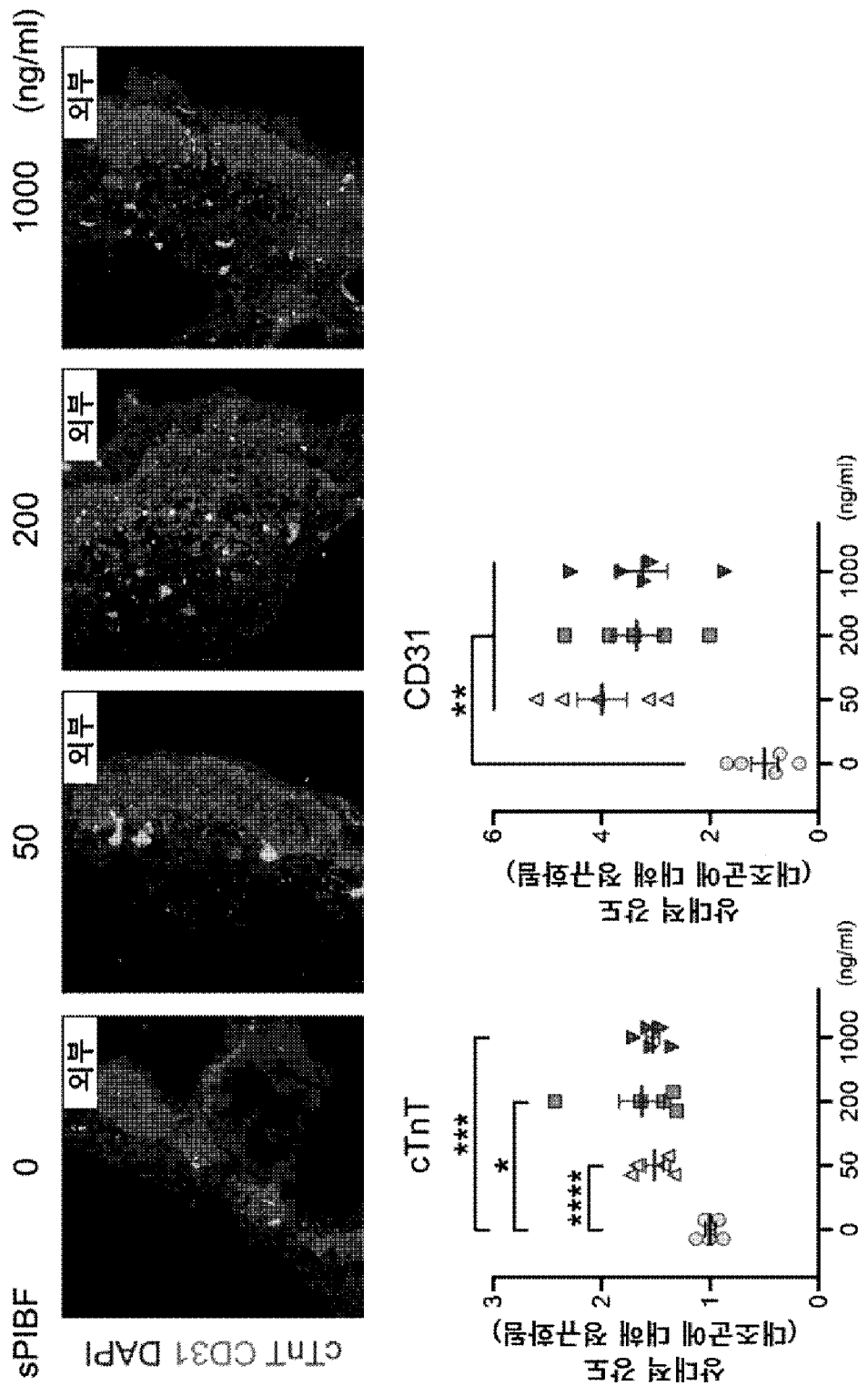
[도6n]


대조군
rsPIBF
100 μV
1 s
0.0493
스파이크 진폭 (mV)
박동 기간 (s)
FPD (s)

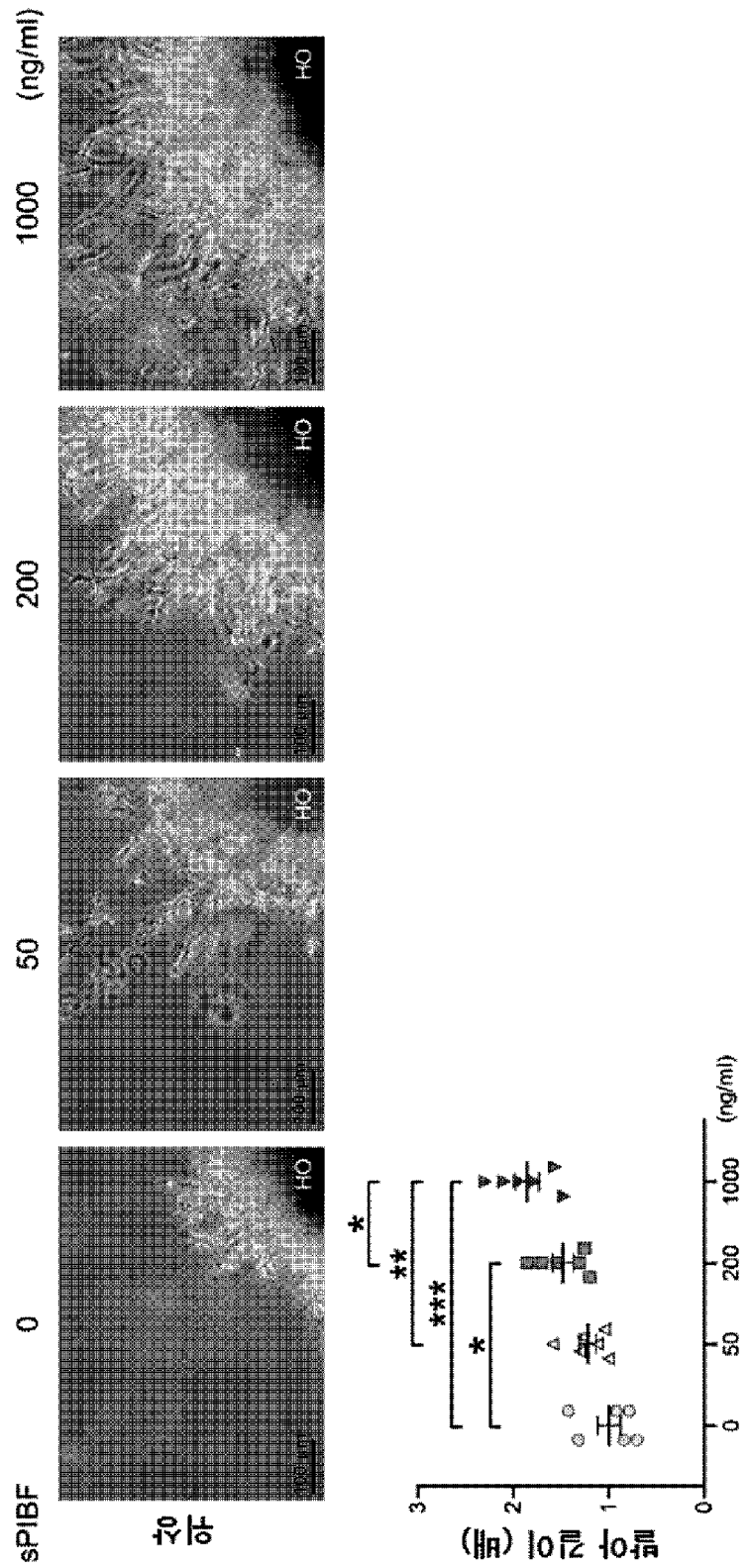
[도6o]



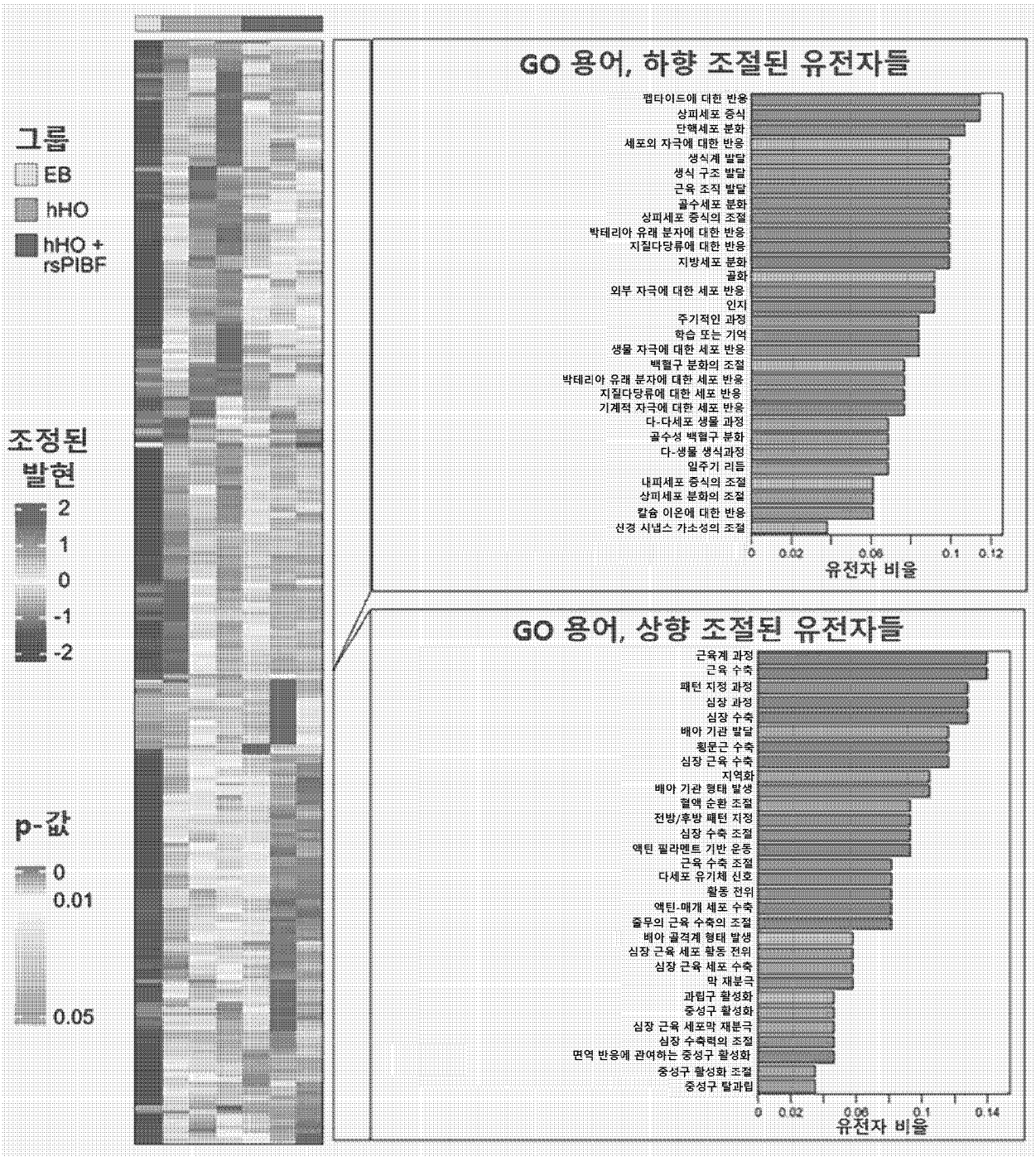
[도6p]


sPIBF
0
50
200
1000 (ng/ml)
외부
cTnT CD31 DAPI
cTnT
CD31
상대적 강도
(대조군에 대해 정규화됨)
(ng/ml)
0
50
200
1000
*
***
****
**

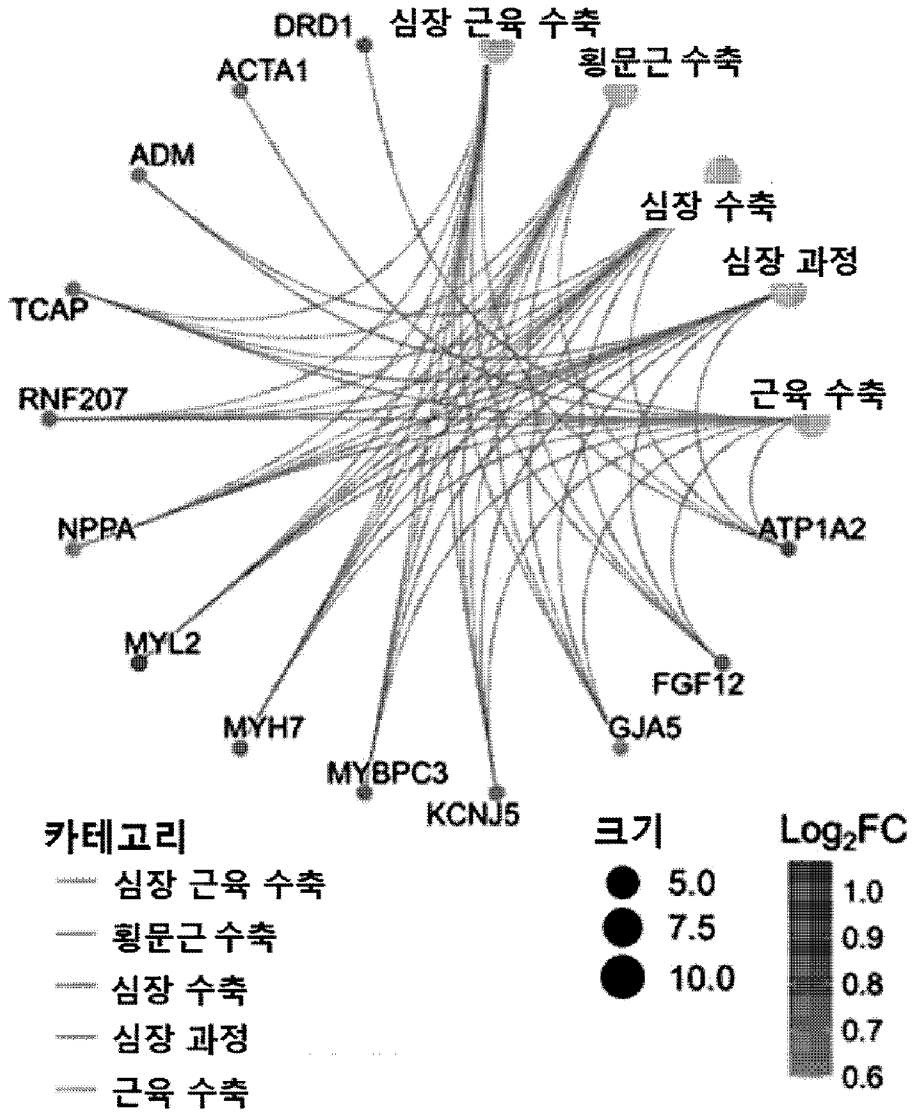
[도6q]



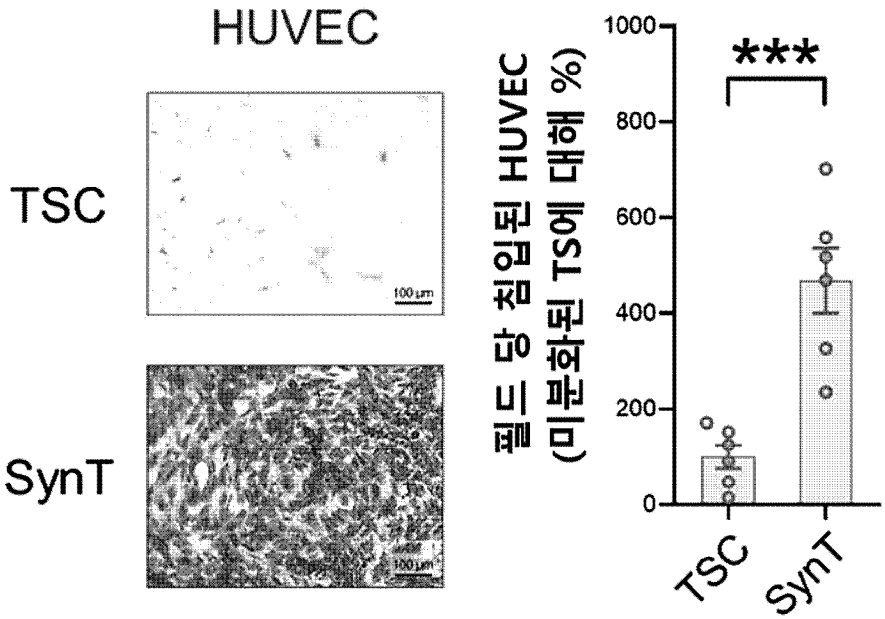
[도6r]


그룹
EB
hHO
hHO + rsPIBF
조정된 발현
2
1
0
-1
-2
p-값
0
0.01
0.05
GO 용어, 하향 조절된 유전자들
펩타이드에 대한 반응
상피세포 증식
단핵세포 분화
세포의 자극에 대한 반응
생식계 발달
생식 구조 발달
근육 조직 발달
골수세포 분화
상피세포 증식의 조절
박테리아 유래 분자에 대한 반응
지질다당류에 대한 반응
지방세포 분화
골화
외부 자극에 대한 세포 반응
인지
주기적인 과정
학습 또는 기억
생물 자극에 대한 세포 반응
백혈구 분화의 조절
박테리아 유래 분자에 대한 세포 반응
지질다당류에 대한 세포 반응
기계적 자극에 대한 세포 반응
다-다세포 생물 과정
골수성 백혈구 분화
다-생물 생식과정
일주기 리듬
내피세포 증식의 조절
상피세포 분화의 조절
칼슘 이온에 대한 반응
신경 시냅스 가소성의 조절
0
0.02
0.06
0.1
0.12
유전자 비율
GO 용어, 상향 조절된 유전자들
근육계 과정
근육 수축
패턴 지정 과정
심장 과정
심장 수축
배아 기관 발달
횡문근 수축
심장 근육 수축
지역화
배아 기관 형태 발생
혈액 순환 조절
전방/후방 패턴 지정
심장 수축 조절
액틴 필라멘트 기반 운동
근육 수축 조절
다세포 유기체 신호
활동 전위
액틴-매개 세포 수축
줄무의 근육 수축의 조절
배아 골격계 형태 발생
심장 근육 세포 활동 전위
심장 근육 세포 수축
막 재분극
과립구 활성화
중성구 활성화
심장 근육 세포막 재분극
심장 수축력의 조절
면역 반응에 관여하는 중성구 활성화
중성구 활성화 조절
중성구 탈과립
0
0.02
0.06
0.1
0.14
유전자 비율

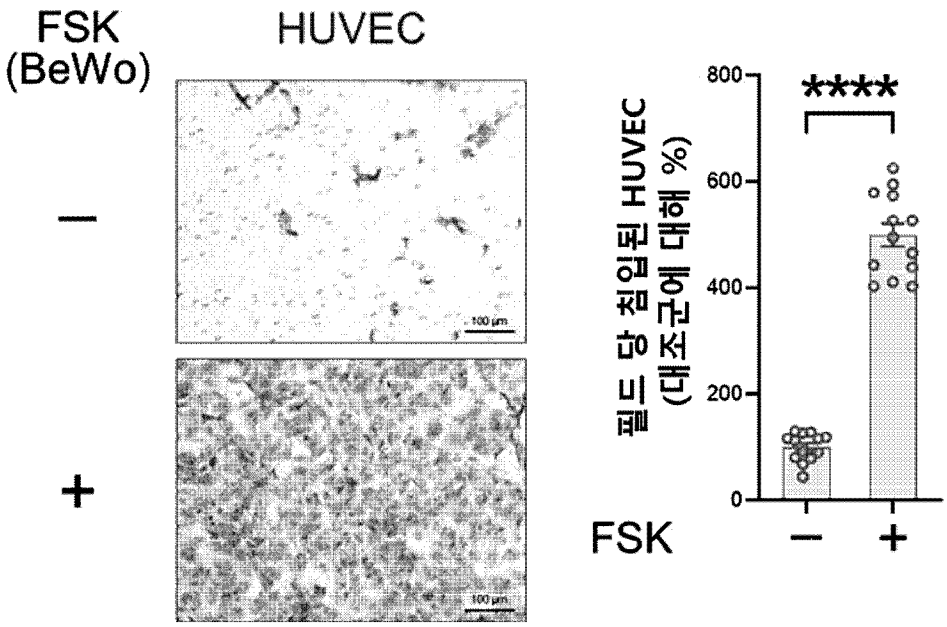
[도6s]


DRD1
심장 근육 수축
ACTA1
횡문근 수축
ADM
심장 수축
심장 과정
TCAP
RNF207
근육 수축
NPPA
ATP1A2
MYL2
FGF12
MYH7
GJA5
MYBPC3
KCNJ5
카테고리
심장 근육 수축
횡문근 수축
심장 수축
심장 과정
근육 수축
크기
5.0
7.5
10.0
Log2FC
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6

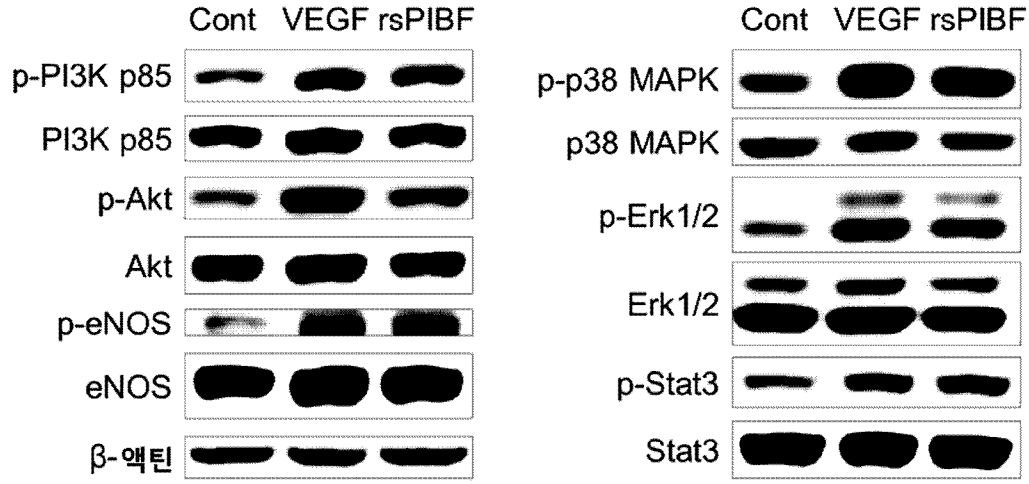
[도7a]


HUVEC
TSC
SynT
100 μm
100 μm
폴드 당 침입된 HUVEC
(미분화된 TS에 대해 %)
1000
800
600
400
200
0
***
TSC
SynT

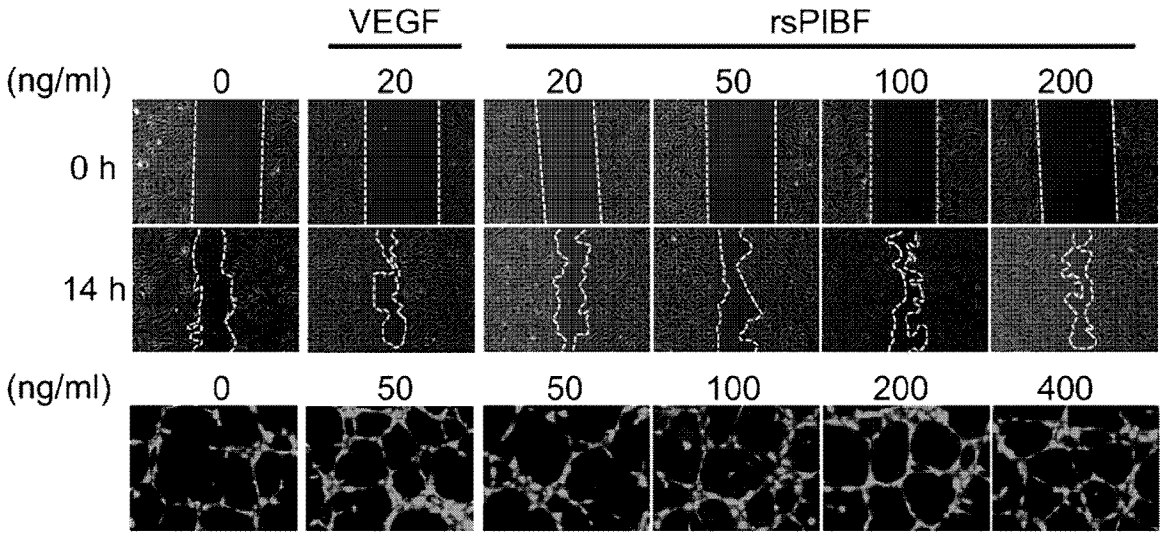
[도7b]


FSK
(BeWo)
HUVEC
−
+
100 μm
100 μm
필드 당 침입된 HUVEC
(대조군에 대해 %)
800
600
400
200
0
****
FSK
−
+

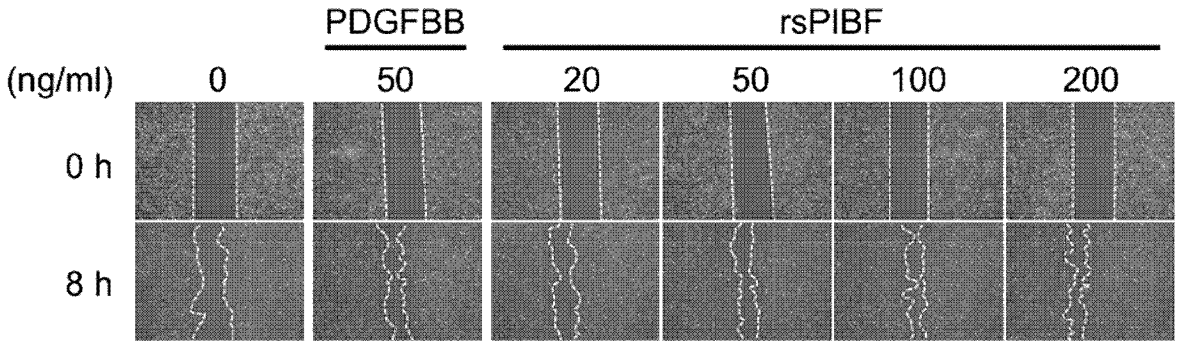
[도7c]


Cont VEGF rsPIBF
p-PI3K p85
PI3K p85
p-Akt
Akt
p-eNOS
eNOS
β-액틴
Cont VEGF rsPIBF
p-p38 MAPK
p38 MAPK
p-Erk1/2
Erk1/2
p-Stat3
Stat3

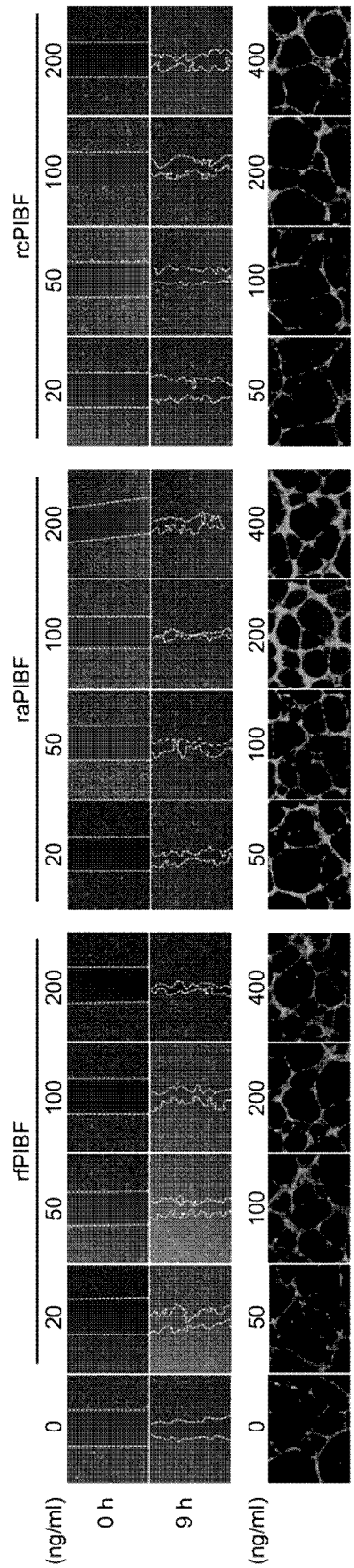
[도7d]


VEGF
rsPIBF
(ng/ml) 0 20 20 50 100 200
0 h
14 h
(ng/ml) 0 50 50 100 200 400

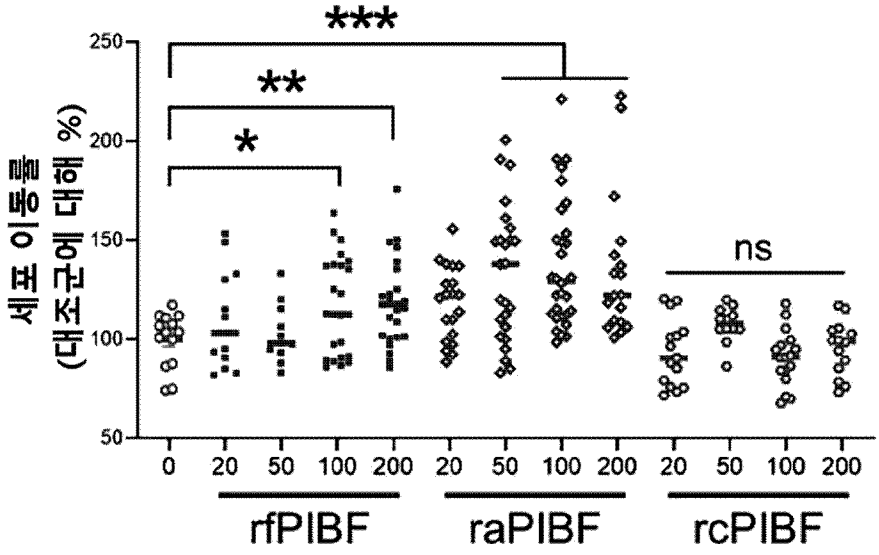
[도7e]



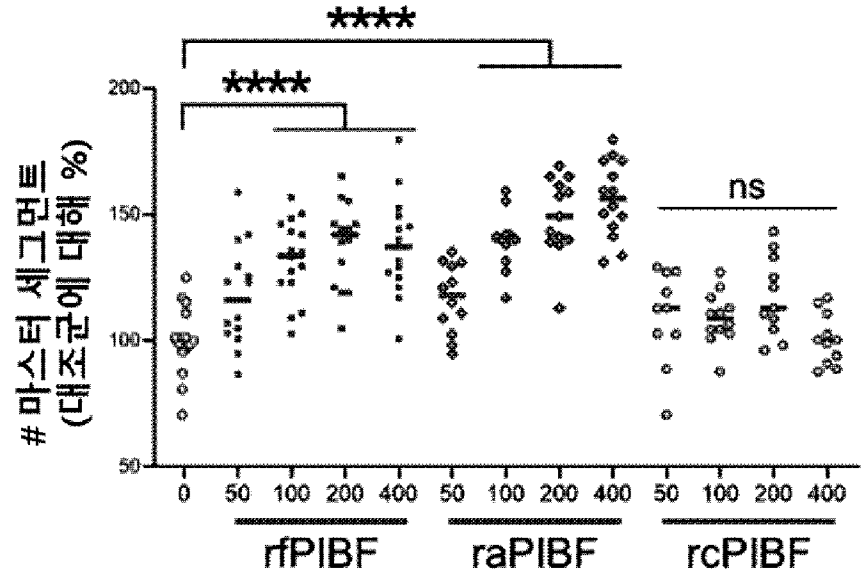
[도7f]

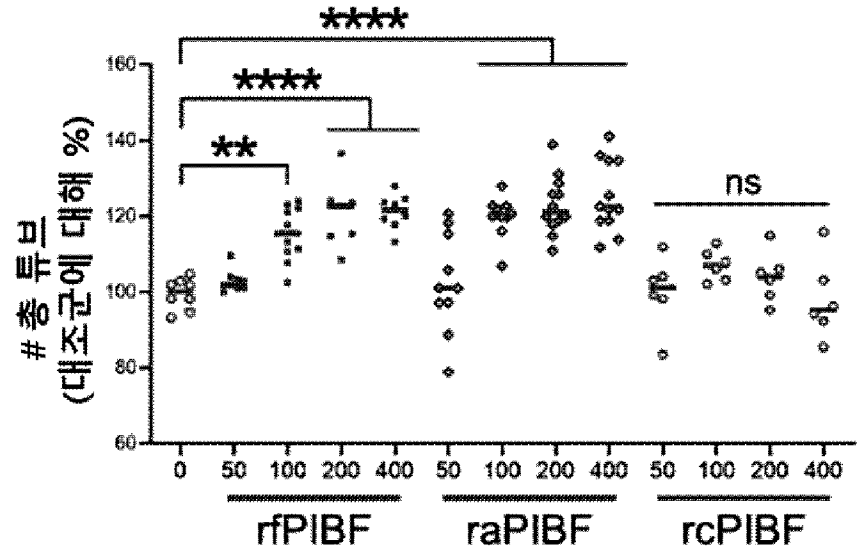


[도7g]

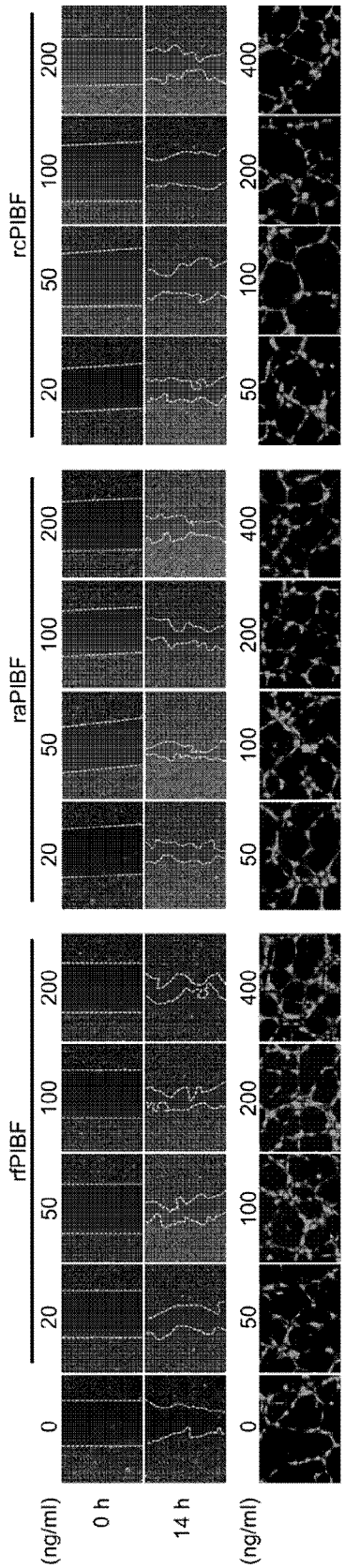

***
**
*
ns
세포 이동률
(대조군에 대해 %)
250
200
150
100
50
0 20 50 100 200 20 50 100 200 20 50 100 200
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF

[도7h]

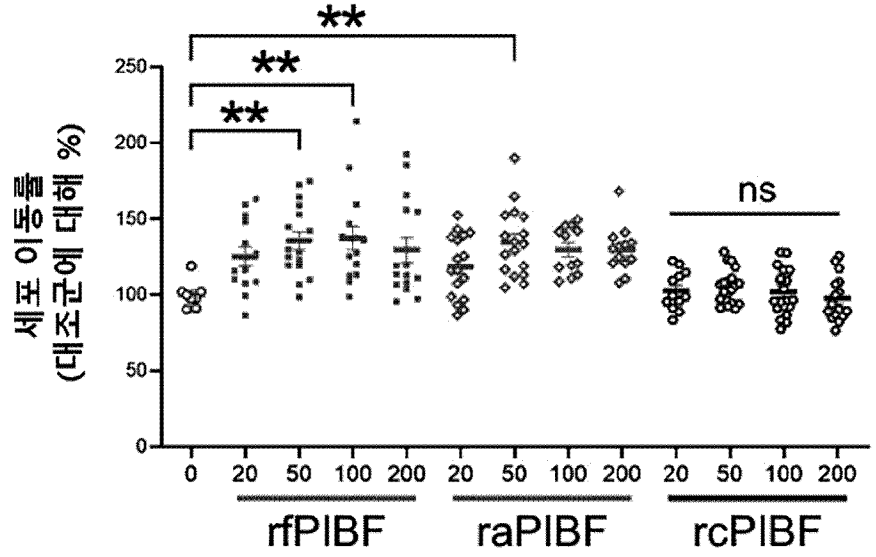

****
****
ns
마스터 세그먼트
(대조군에 대해 %)
200
150
100
50
0 50 100 200 400 50 100 200 400 50 100 200 400
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF


****
****
**
ns
총 튜브
(대조군에 대해 %)
160
140
120
100
80
60
0 50 100 200 400 50 100 200 400 50 100 200 400
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF

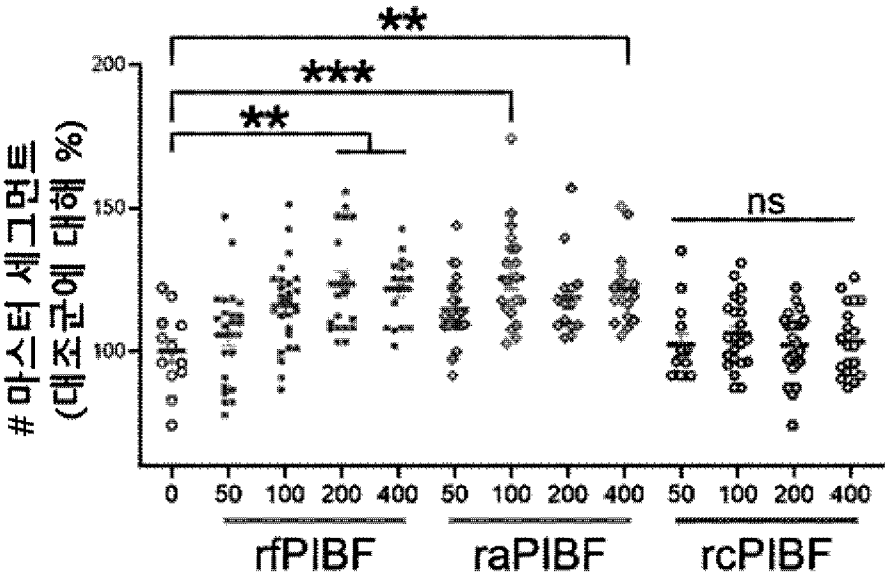
[도7i]

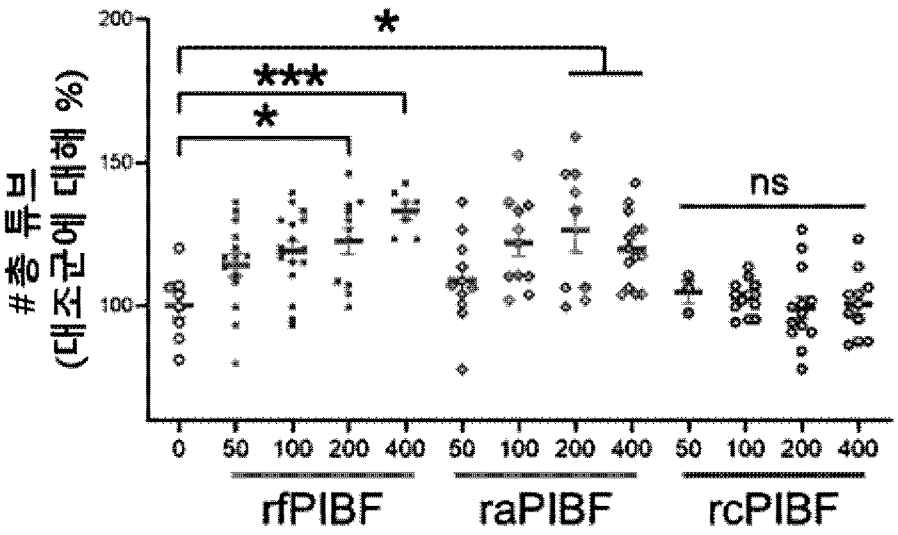


[도7j]

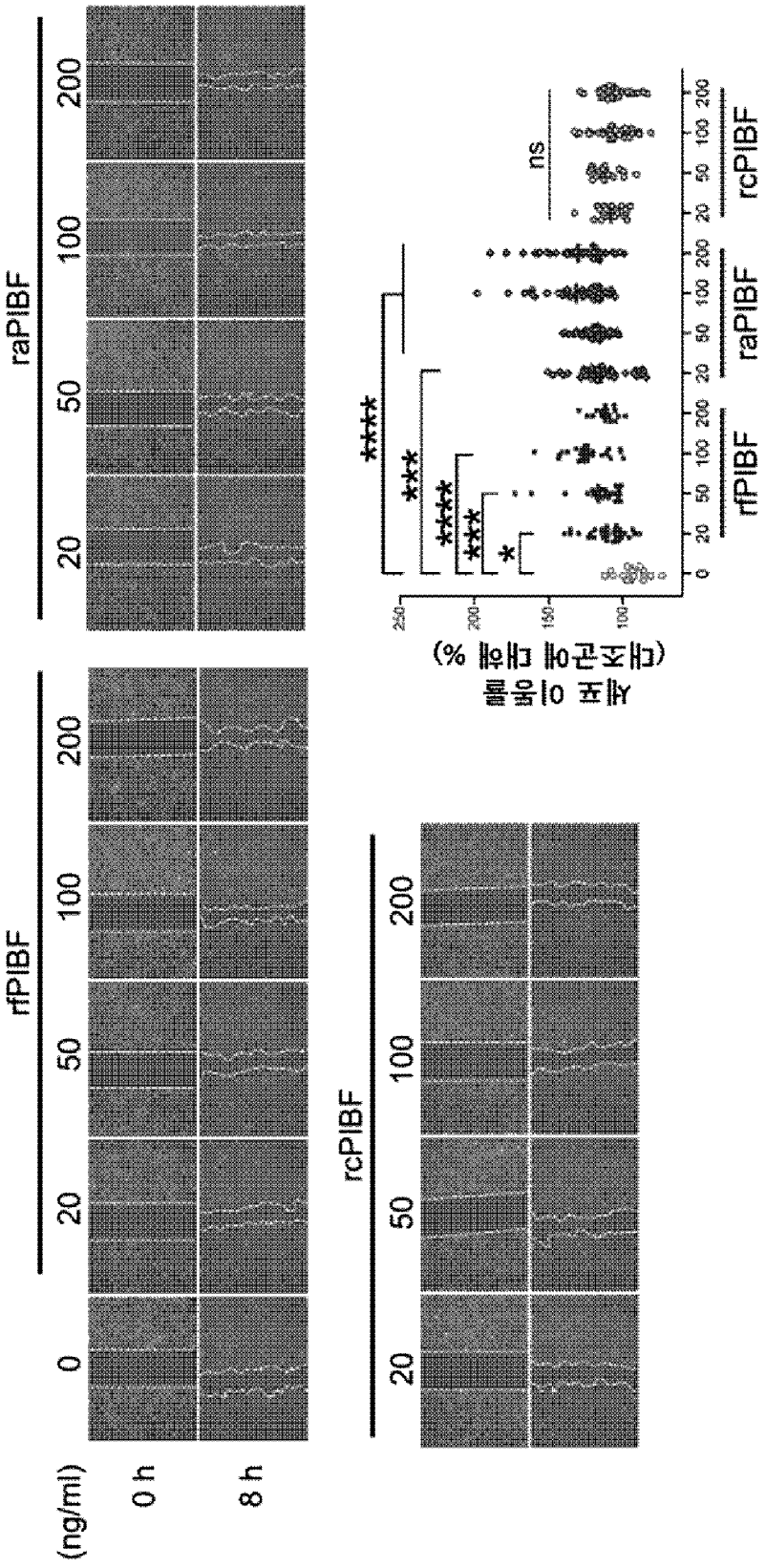

세포 이동률
(대조군에 대해 %)
**
**
**
ns
250
200
150
100
50
0
0 20 50 100 200 20 50 100 200 20 50 100 200
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF

[도7k]

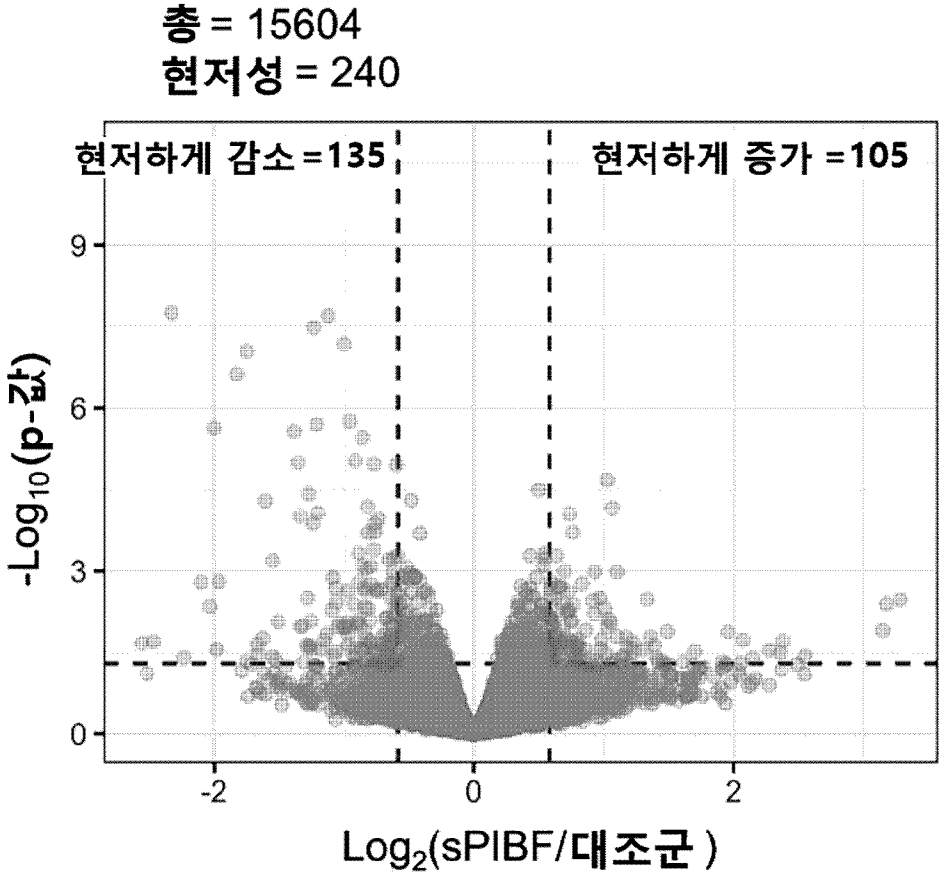

마스터 세그먼트
(대조군에 대해 %)
**
***
**
ns
200
150
100
0 50 100 200 400 50 100 200 400 50 100 200 400
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF


총 튜브
(대조군에 대해 %)
*
***
*
ns
200
150
100
0 50 100 200 400 50 100 200 400 50 100 200 400
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF

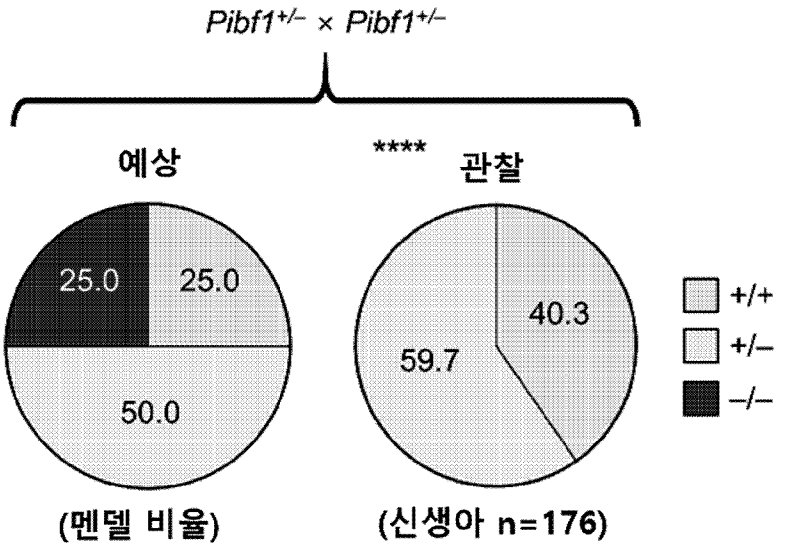
[도7]


raPIBF
20
50
100
200
rfPIBF
0
20
50
100
200
rcPIBF
20
50
100
200
(ng/ml)
0 h
8 h
세포 이동률
(대조군에 대해 %)
250
200
150
100
*
***
****
***
****
ns
rfPIBF
raPIBF
rcPIBF

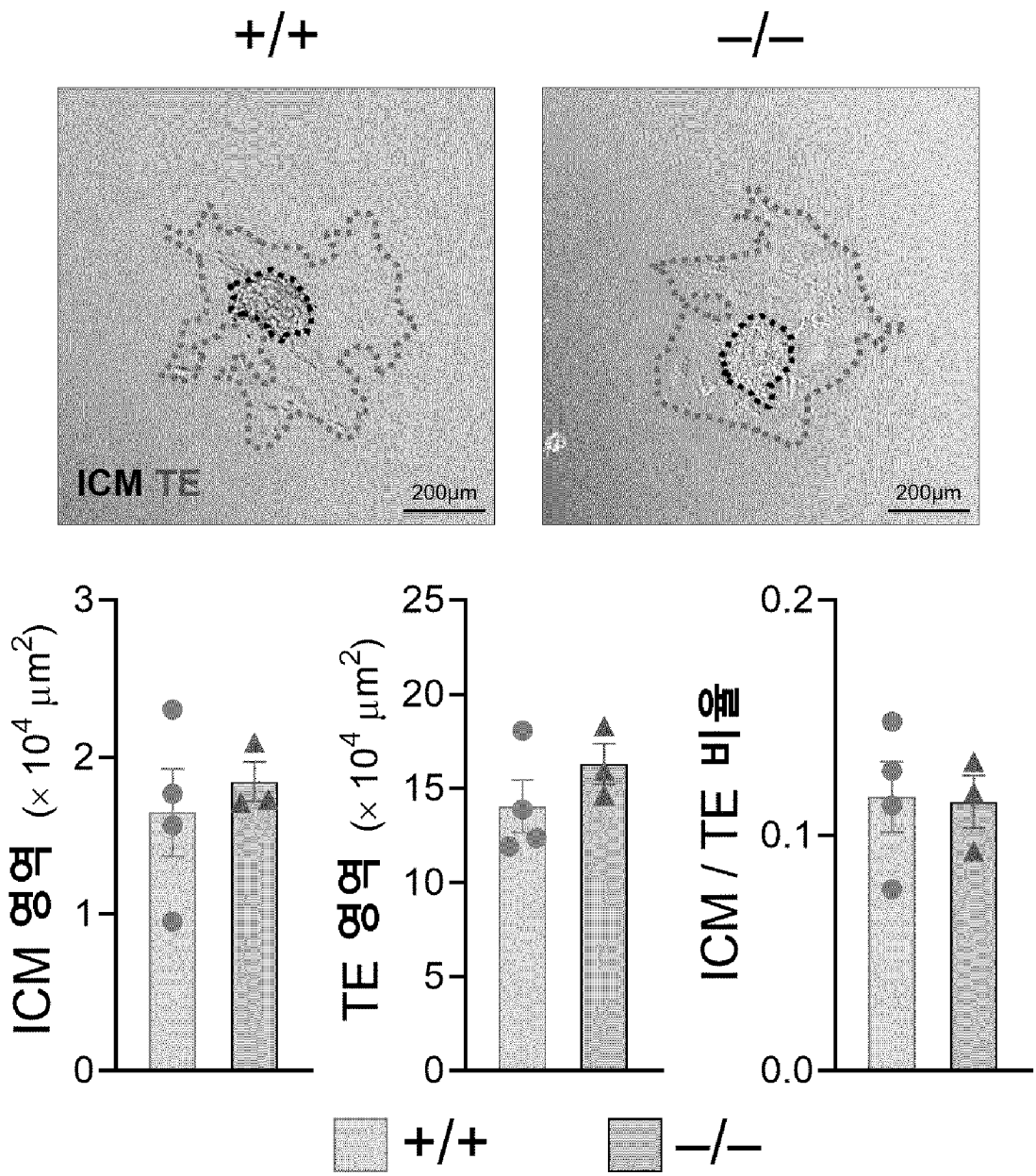
[도8]


총 = 15604
현저성 = 240
현저하게 감소 =135
현저하게 증가 =105
9
6
3
0
-Log10(p-값)
-2
0
2
Log2(sPlBF/대조군)

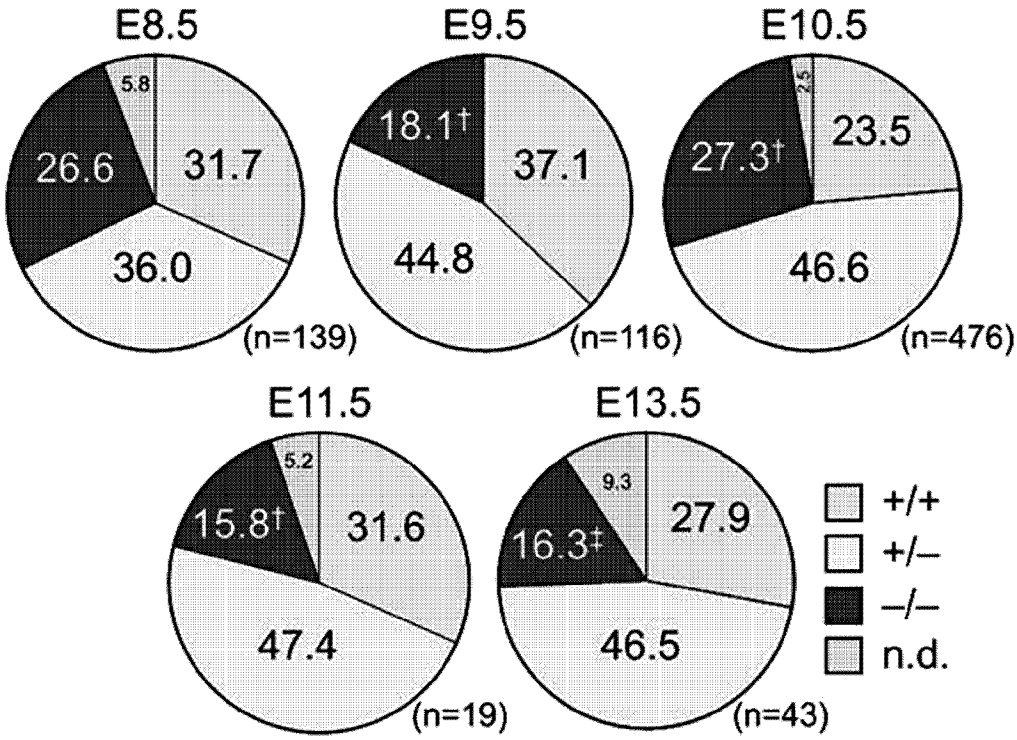
[도9a]


Pibf1+/– × Pibf1+/–
예상
****
관찰
25.0
25.0
50.0
40.3
59.7
+/+
+/–
–/–
(멘델 비율)
(신생아 n=176)

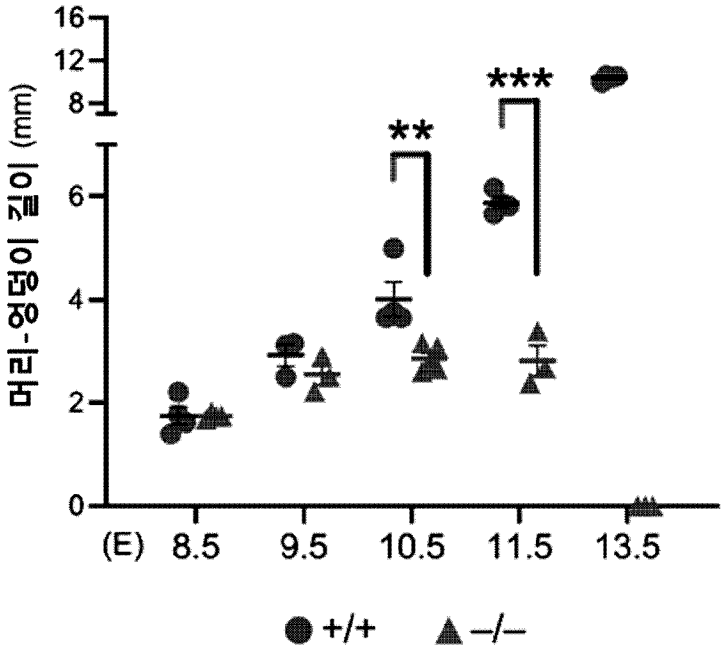
[도9b]


+/+
−/−
ICM
TE
200μm
200μm
ICM 영역 (×10^4 μm^2)
TE 영역 (×10^4 μm^2)
ICM / TE 비율
0
1
2
3
0
5
10
15
20
25
0.0
0.1
0.2
+/+
−/−

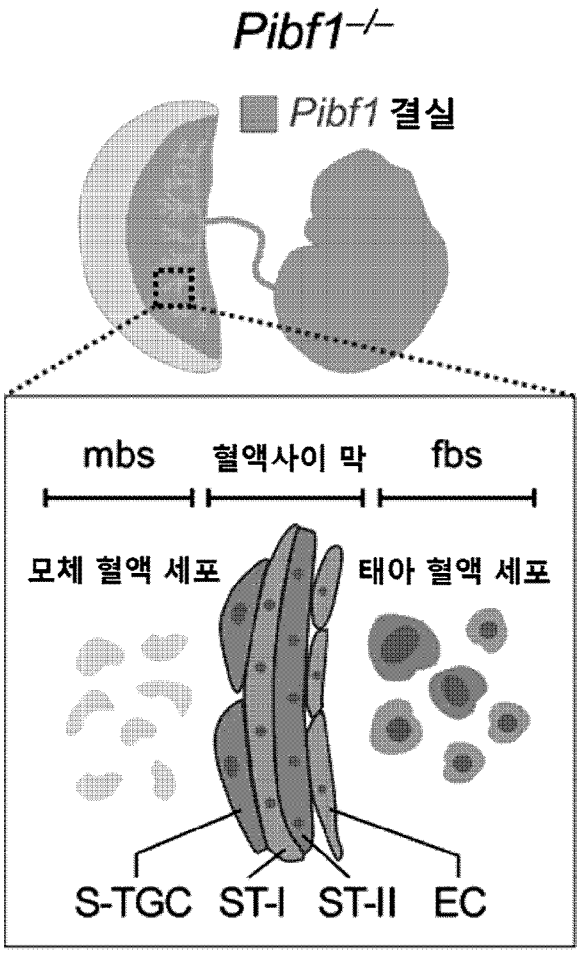
[도9c]


E8.5
5.8
26.6
31.7
36.0
(n=139)
E9.5
18.1†
37.1
44.8
(n=116)
E10.5
2.5
27.3†
23.5
46.6
(n=476)
E11.5
5.2
15.8†
31.6
47.4
(n=19)
E13.5
9.3
16.3‡
27.9
46.5
(n=43)
+/+
+/–
–/–
n.d.

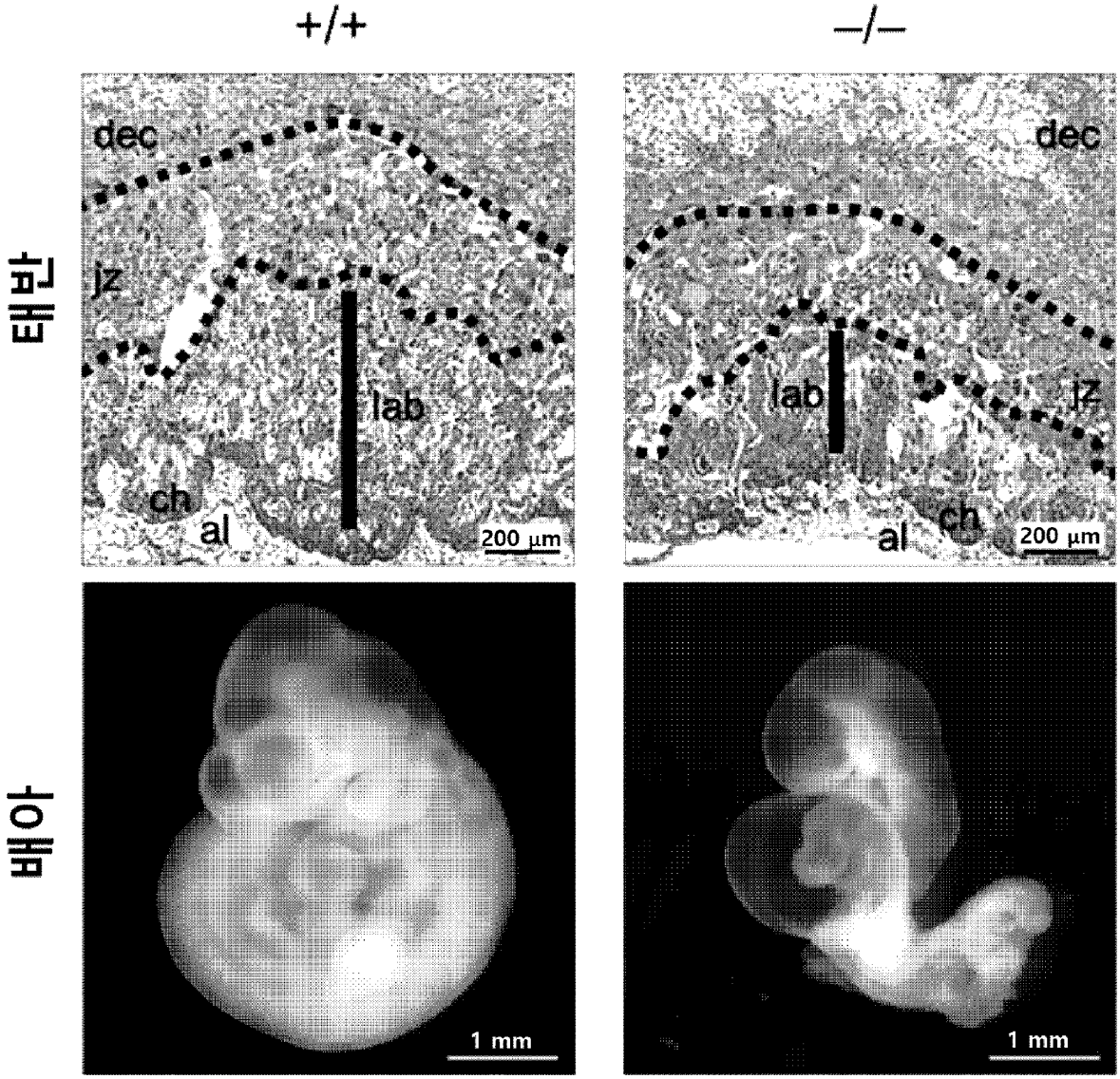
[도9d]


머리-엉덩이 길이 (mm)
16
12
8
6
4
2
0
**
***
(E) 8.5
9.5
10.5
11.5
13.5
+/+
–/–

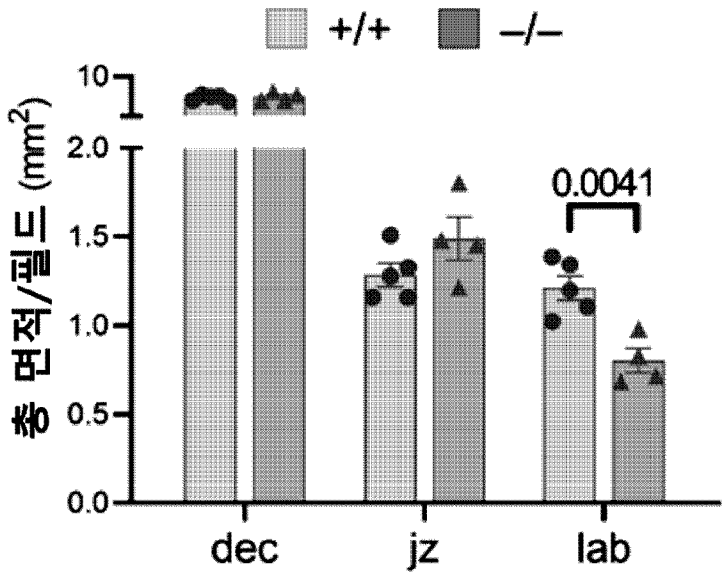
[도10a]



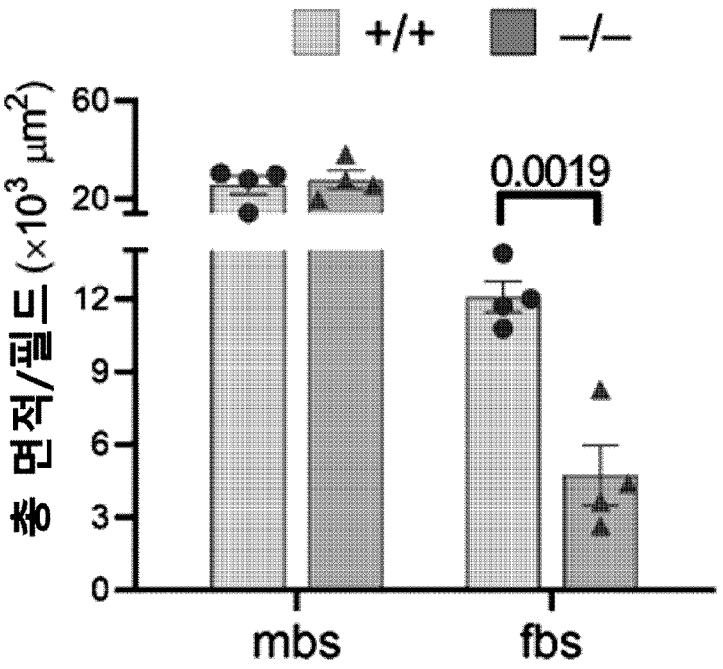
[도10b]


+/+
–/–
태반
배아
dec
jz
lab
ch
al
200 μm
1 mm

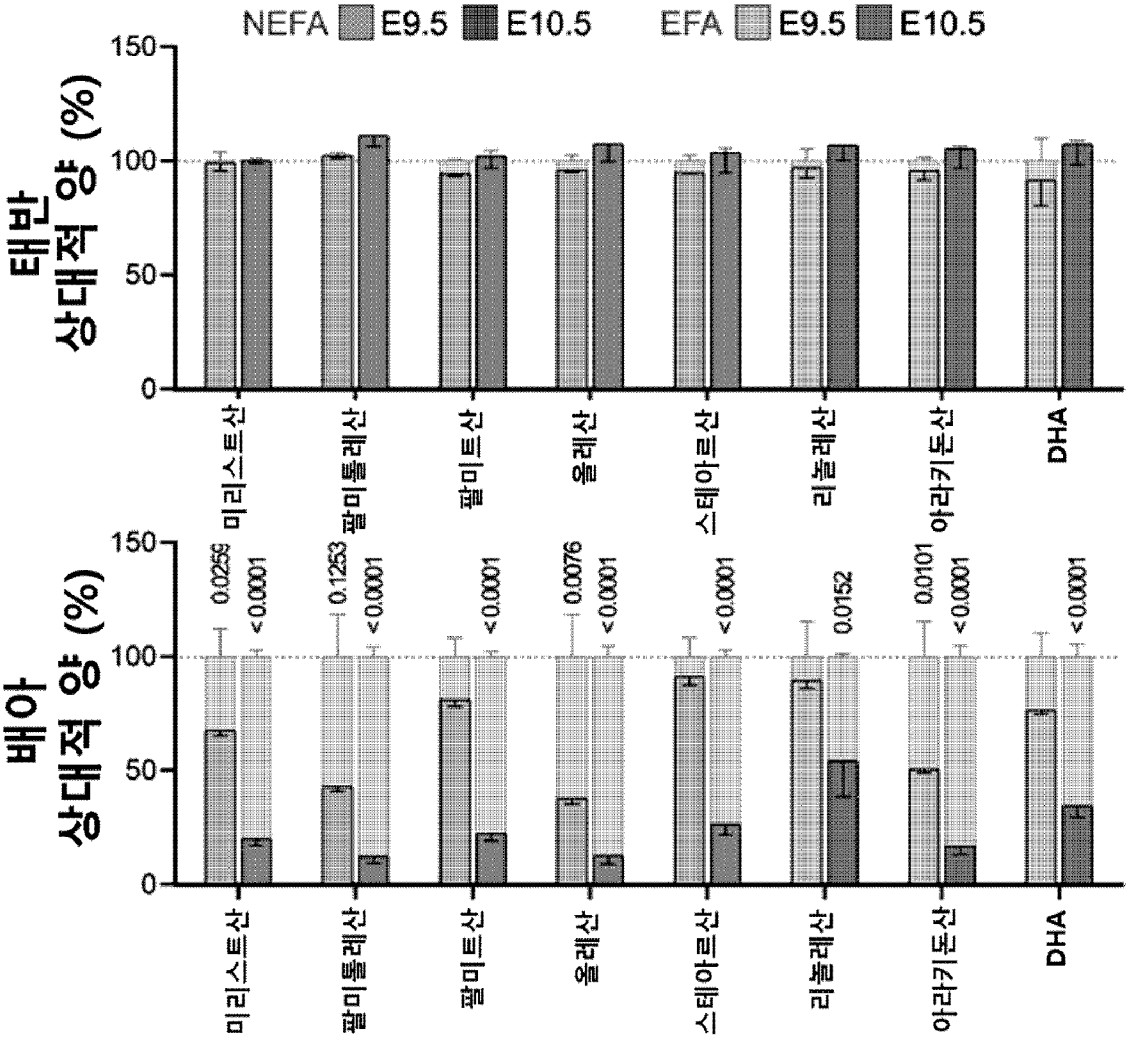
[도10c]


+/+
–/–
총 면적/필드 (mm²)
10
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0041
dec
jz
lab

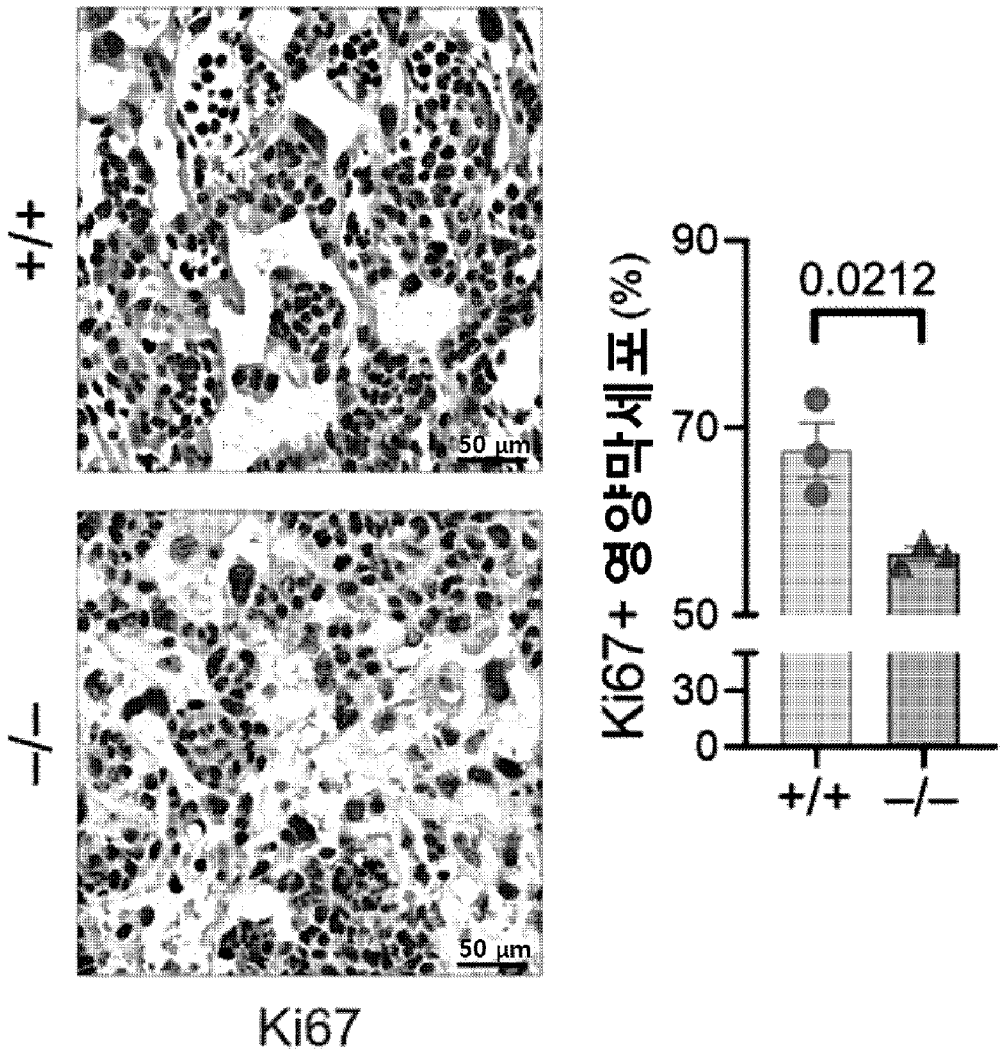
[도10d]


+/+
–/–
총 면적/필드 (×10³ μm²)
60
20
12
9
6
3
0
0.0019
mbs
fbs

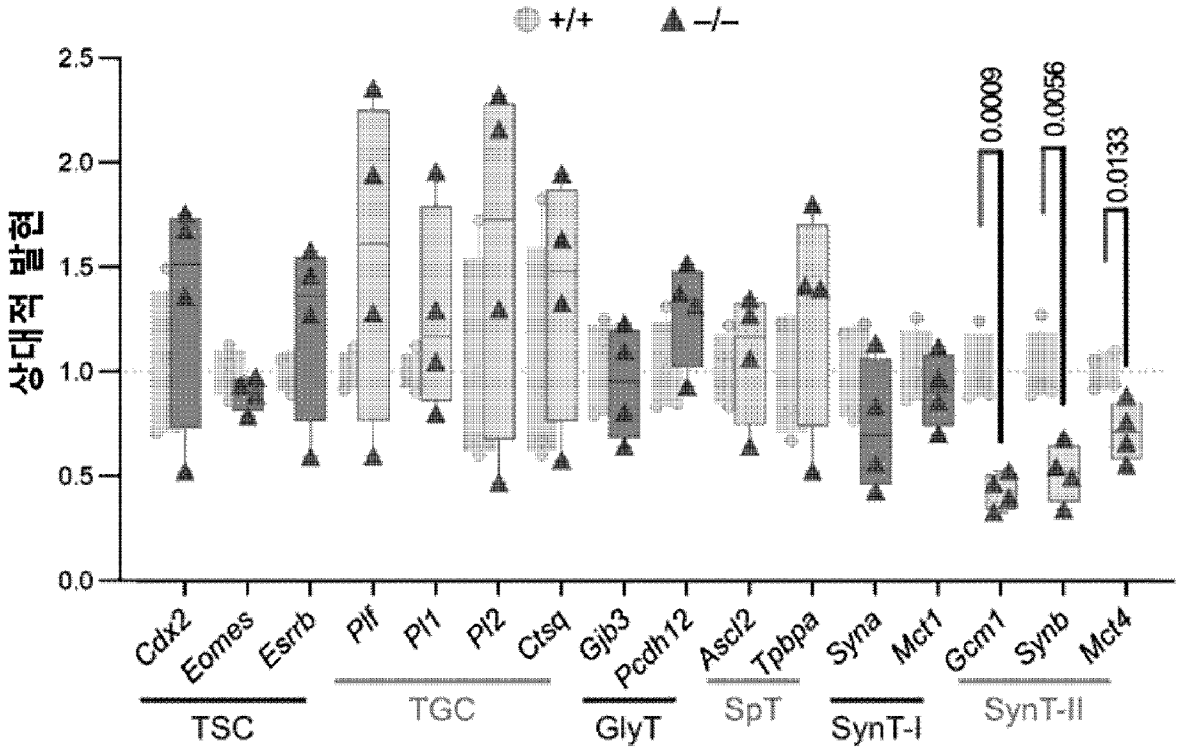
[도10e]


NEFA E9.5 E10.5
EFA E9.5 E10.5
태반 상대적 양 (%)
150
100
50
0
미리스트산
팔미톨레산
팔미트산
올레산
스테아르산
리놀레산
아라키돈산
DHA
베아 상대적 양 (%)
0.0259
< 0.0001
0.1253
< 0.0001
< 0.0001
0.0076
< 0.0001
< 0.0001
0.0152
0.0101
< 0.0001
< 0.0001

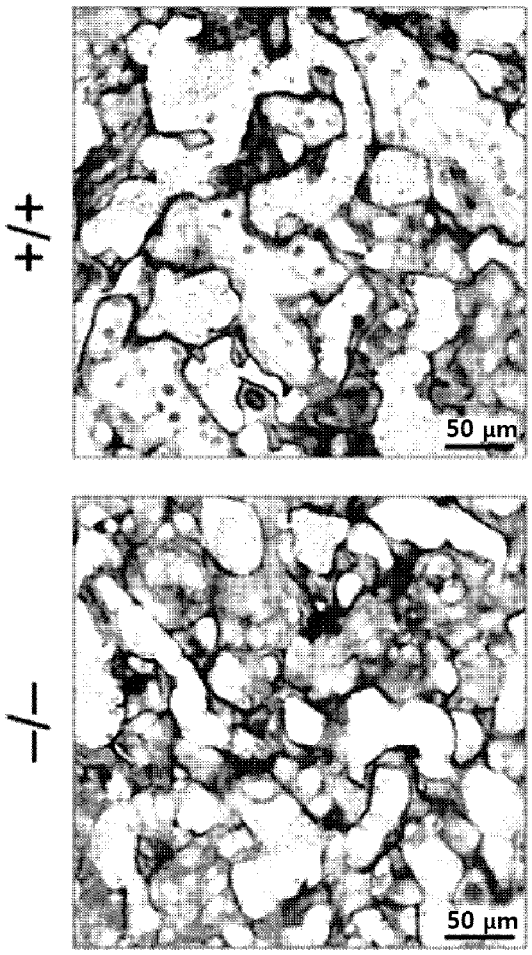
[도10f]


+/+
−/−
50 μm
50 μm
Ki67
Ki67+ 양성 세포 (%)
90
70
50
30
0
0.0212
+/+
−/−

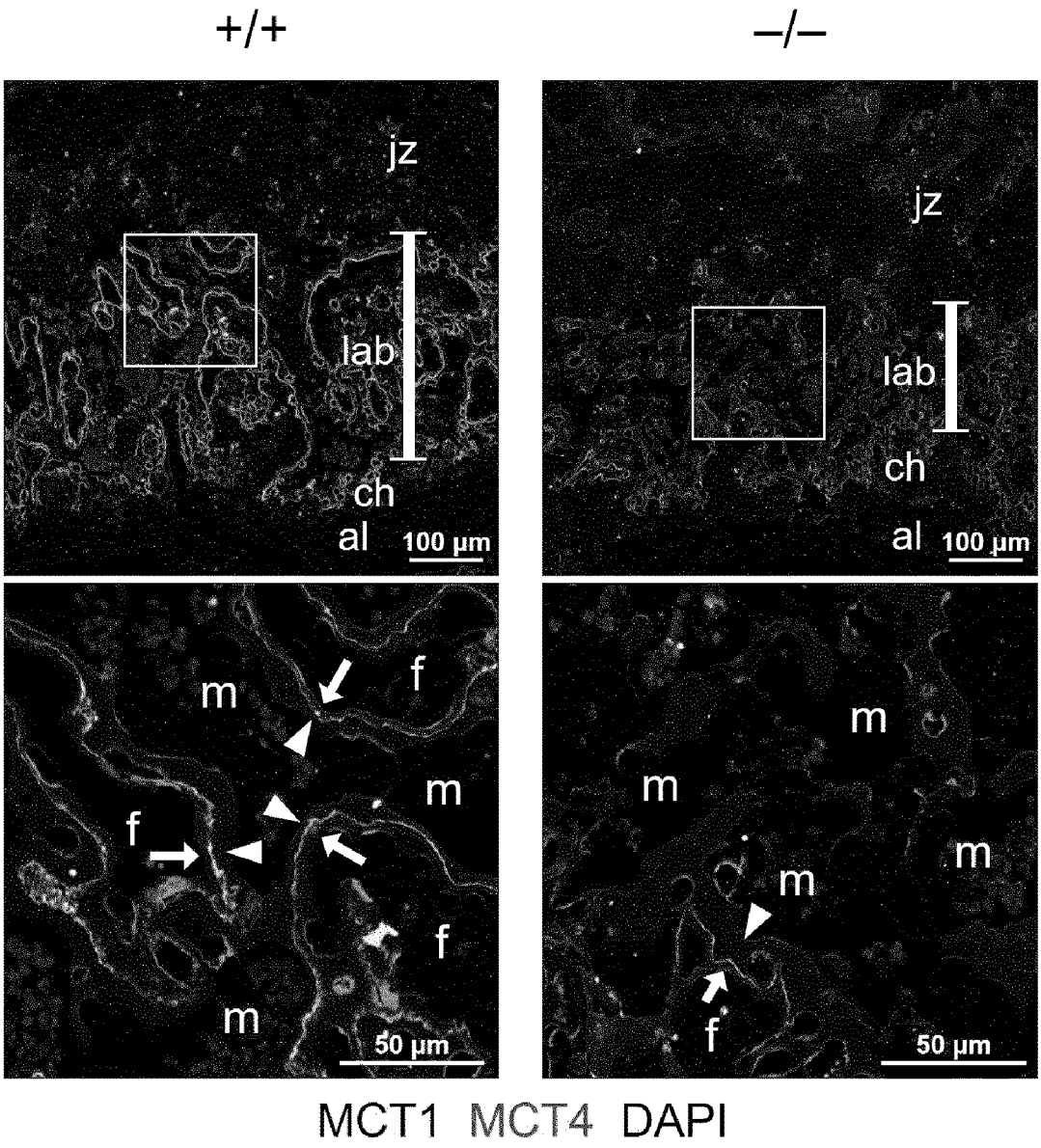
[도10g]


+/+
−/−
상대적 발현
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0009
0.0056
0.0133
Cdx2
Eomes
Esrrb
Plf
Pl1
Pl2
Ctsq
Gjb3
Pcdh12
Ascl2
Tpbpa
Syna
Mct1
Gcm1
Synb
Mct4
TSC
TGC
GlyT
SpT
SynT-I
SynT-II

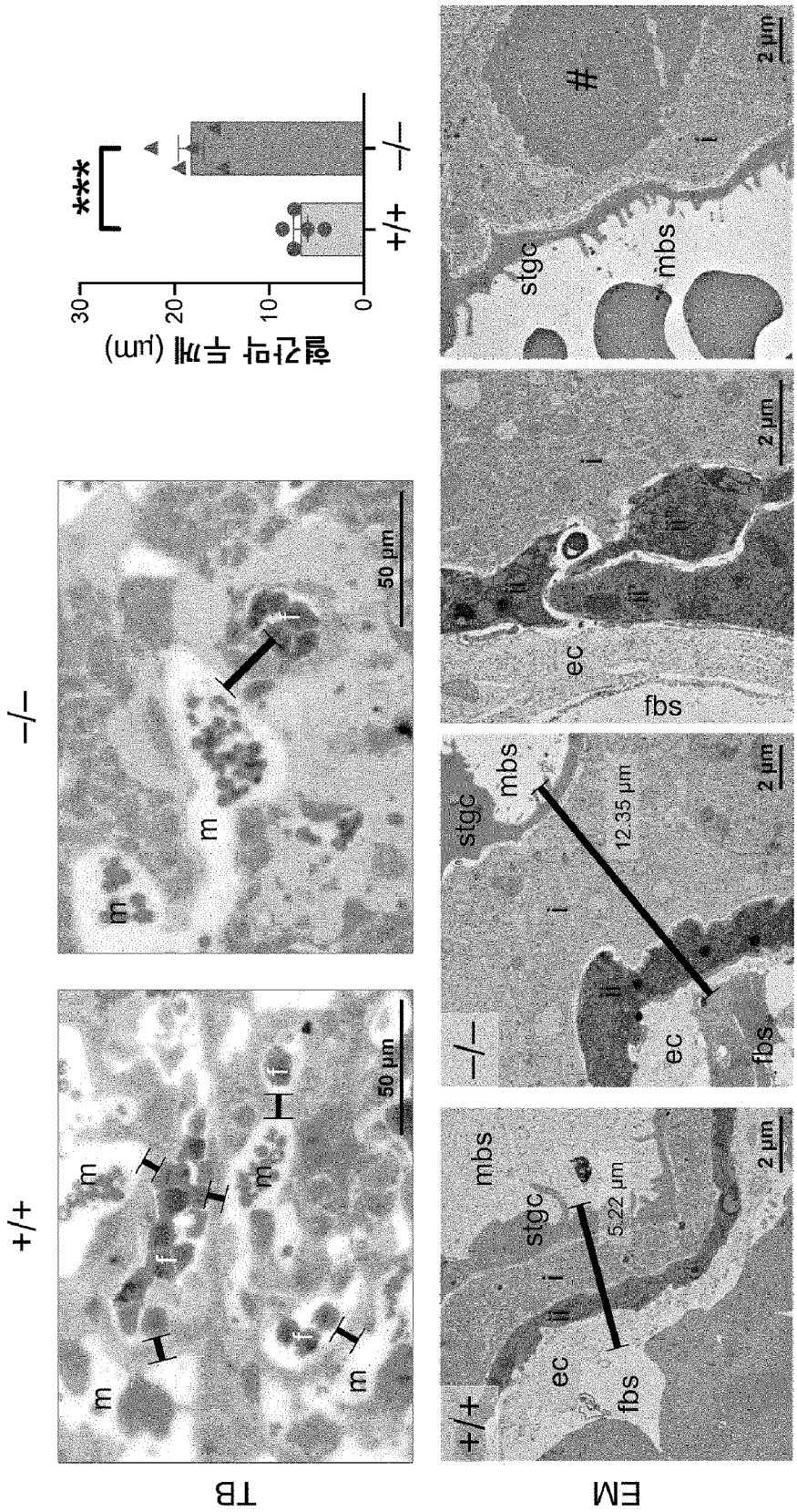
[도10h]



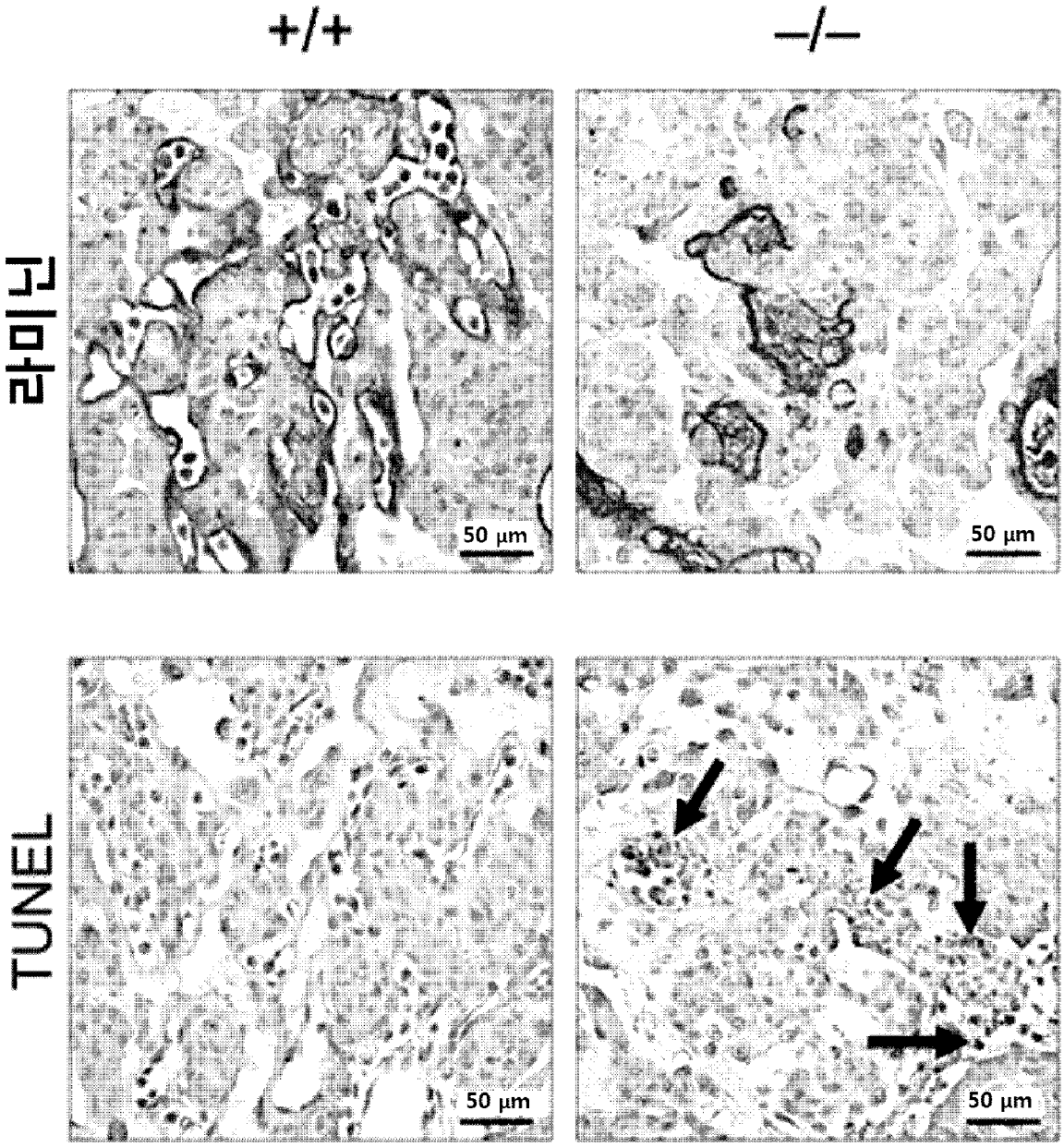
[도10i]



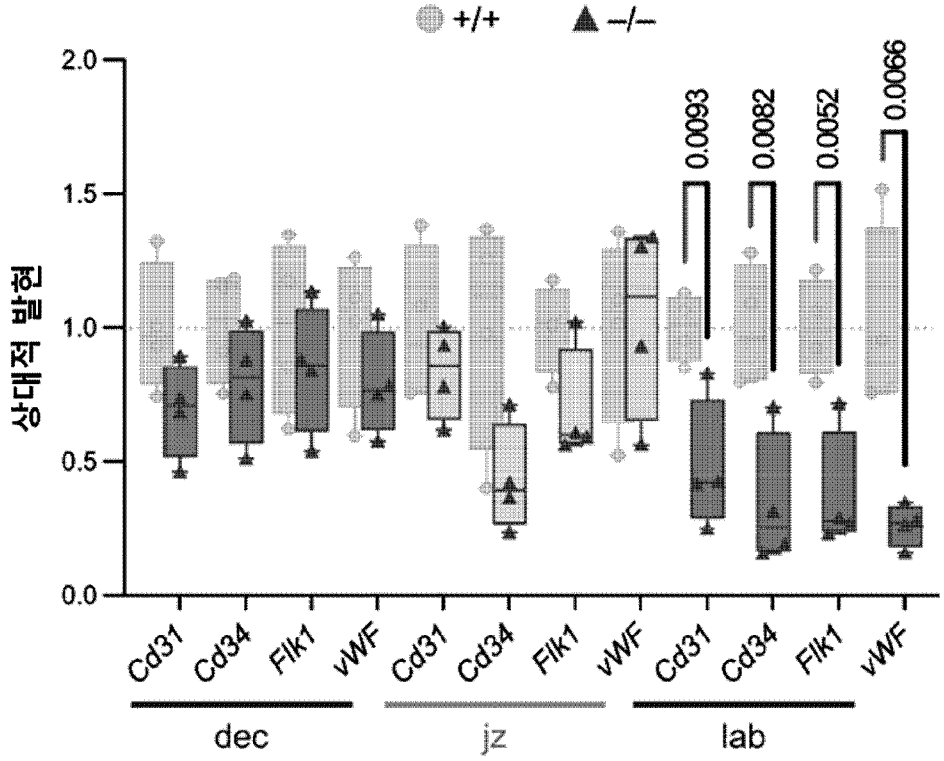
[도10j]


TB
EM
+/+
-/-
m
f
50 μm
mbs
stgc
i
ii
ec
fbs
5.22 μm
12.35 μm
2 μm
#
***
혈간막 두께 (μm)
0
10
20
30
+/+
-/-

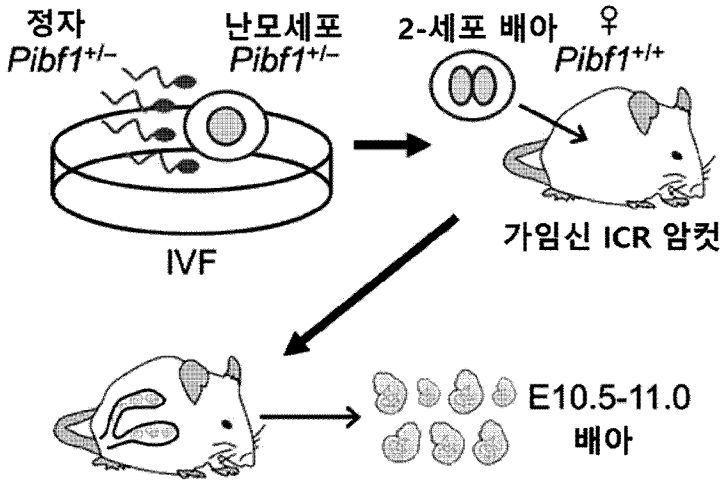
[도10k]



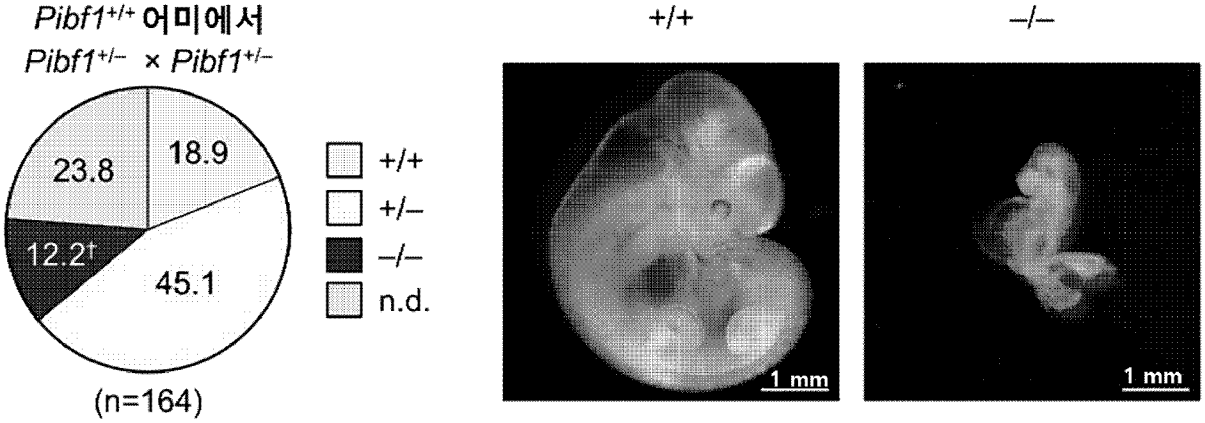
[도10l]



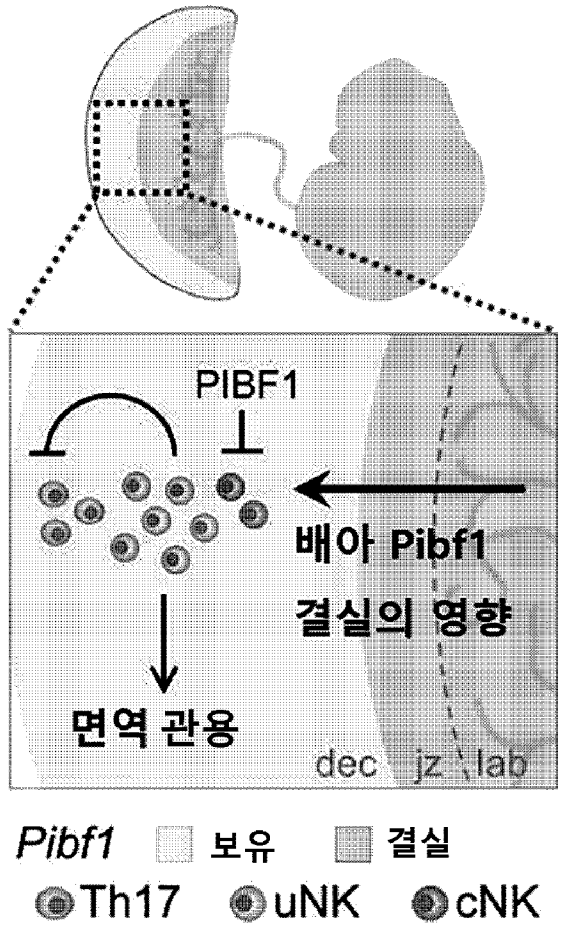
[도11a]



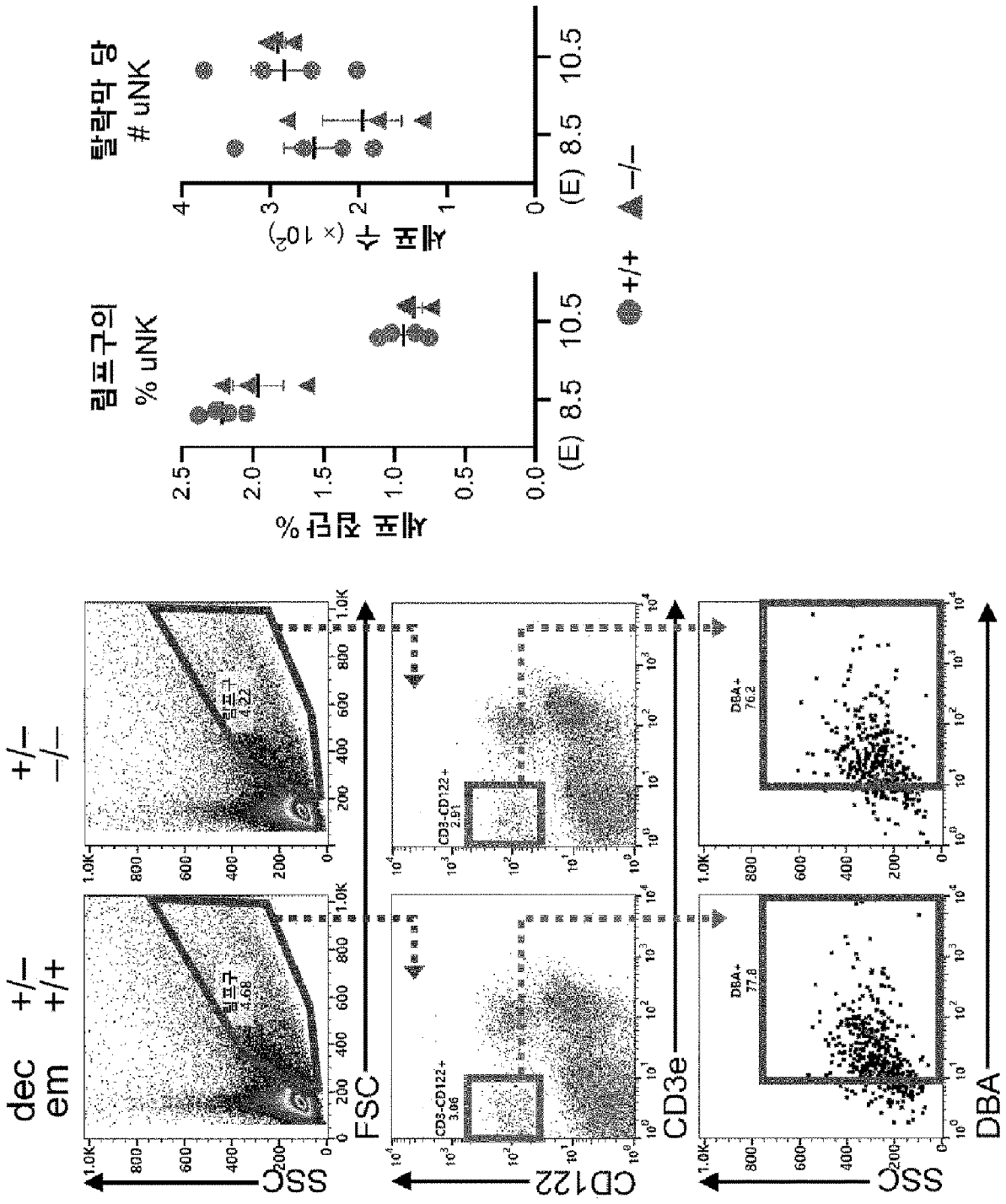
[도11b]



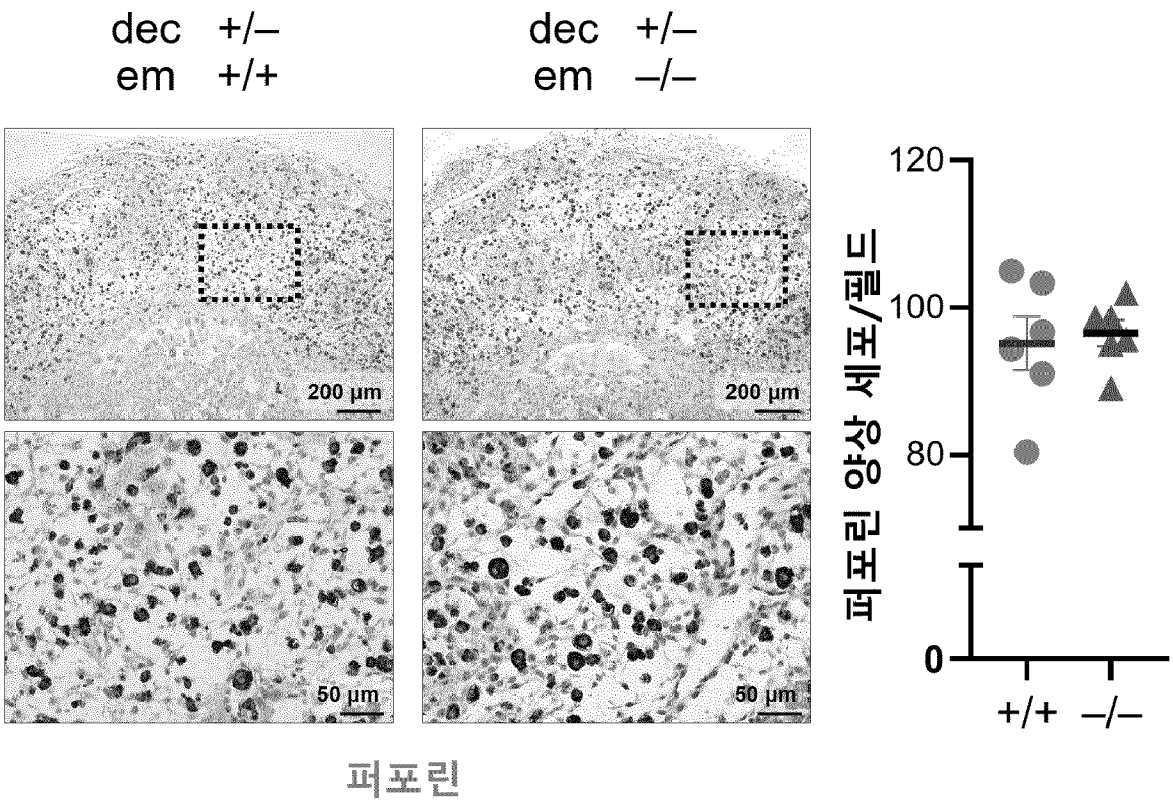
[도11c]



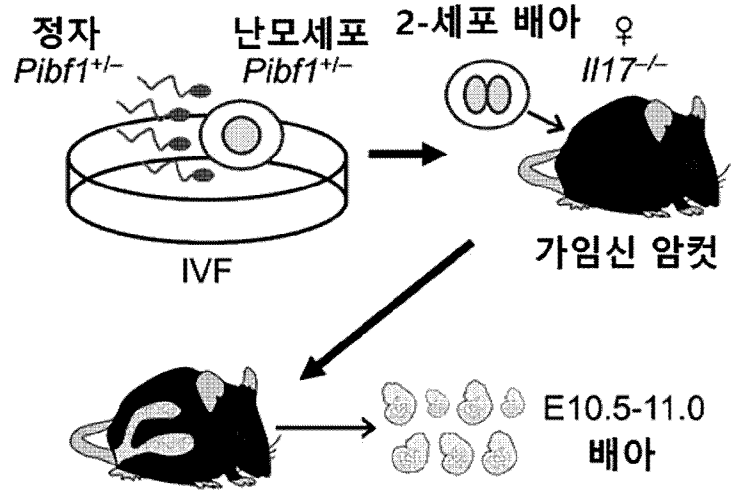
[도11d]


탈락막 당
uNK
림프구의
% uNK
세포 수 (× 10²)
세포 점유율 %
(E) 8.5
10.5
+/+
−/−
dec
em
+/−
+/+
+/−
−/−
SSC
FSC
CD122
CD3e
DBA
림프구
4.68
4.22
CD3-CD122+
3.06
2.91
DBA+
77.8
76.2

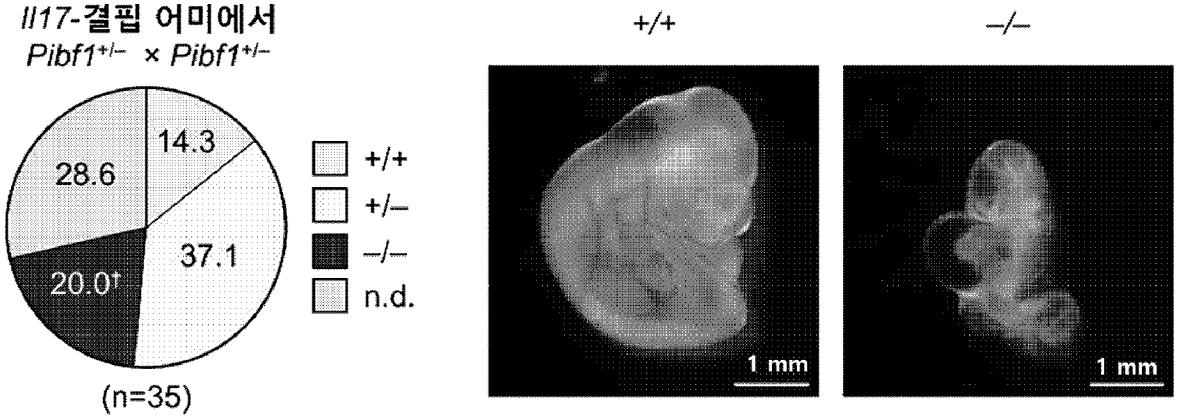
[도11e]



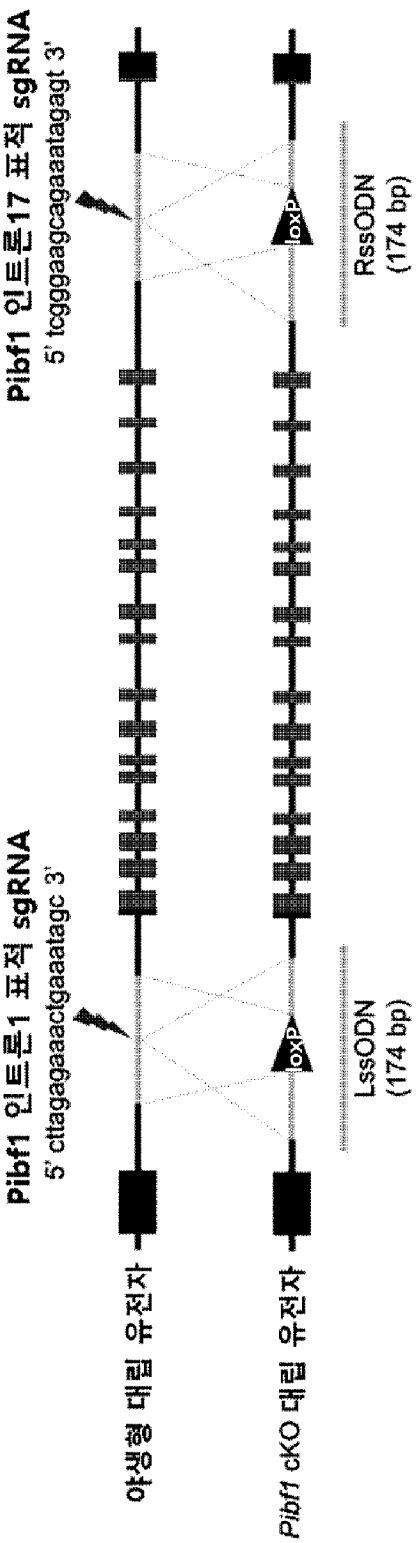
[도11f]



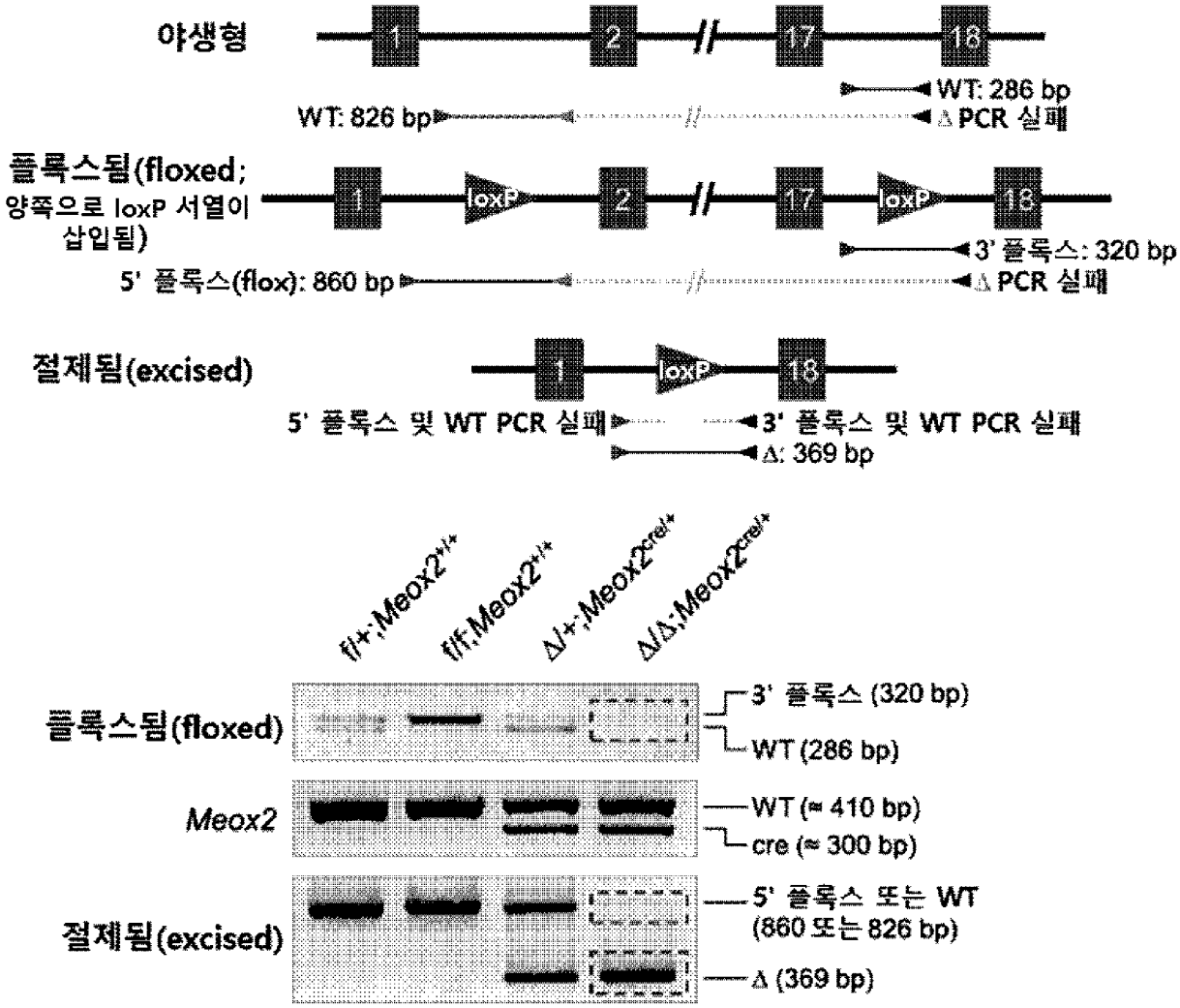
[도11g]



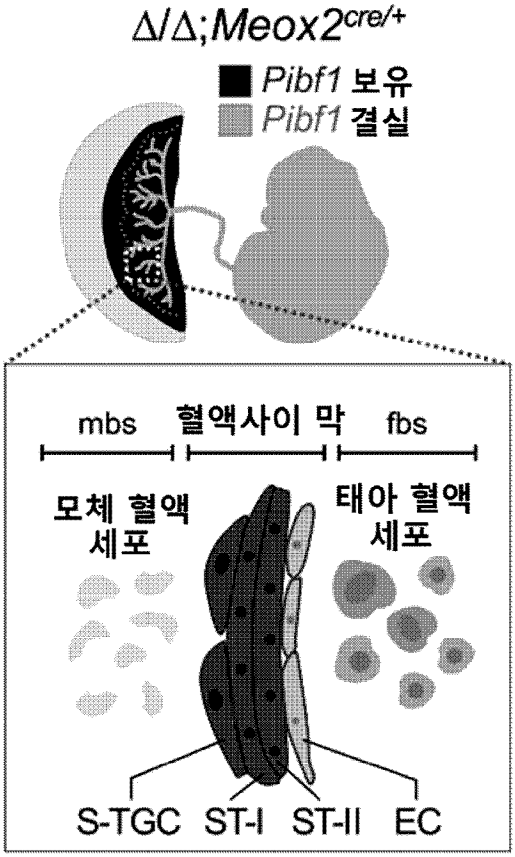
[도12a]


Pibf1 인트론17 표적 sgRNA
5' tcgggaagcagaaatagagt 3'
Pibf1 인트론1 표적 sgRNA
5' cttagagaaactgaaatagc 3'
loxP
loxP
RssODN
(174 bp)
LssODN
(174 bp)
야생형 대립 유전자
Pibf1 cKO 대립 유전자

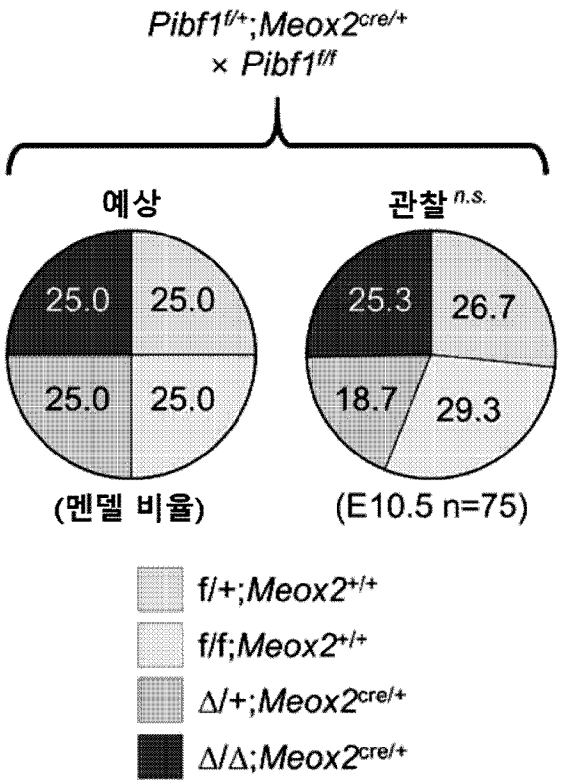
[도12b]


야생형
1
2
17
18
WT: 286 bp
WT: 826 bp
Δ PCR 실패
플록스됨(floxed;
양쪽으로 loxP 서열이
삽입됨)
loxP
3' 플록스: 320 bp
5' 플록스(flox): 860 bp
절제됨(excised)
5' 플록스 및 WT PCR 실패
3' 플록스 및 WT PCR 실패
Δ: 369 bp
f/+;Meox2+/+
f/f;Meox2+/+
Δ/+;Meox2Cre/+
Δ/Δ;Meox2Cre/+
플록스됨(floxed)
3' 플록스 (320 bp)
WT (286 bp)
Meox2
WT (≈ 410 bp)
cre (≈ 300 bp)
절제됨(excised)
5' 플록스 또는 WT
(860 또는 826 bp)
Δ (369 bp)

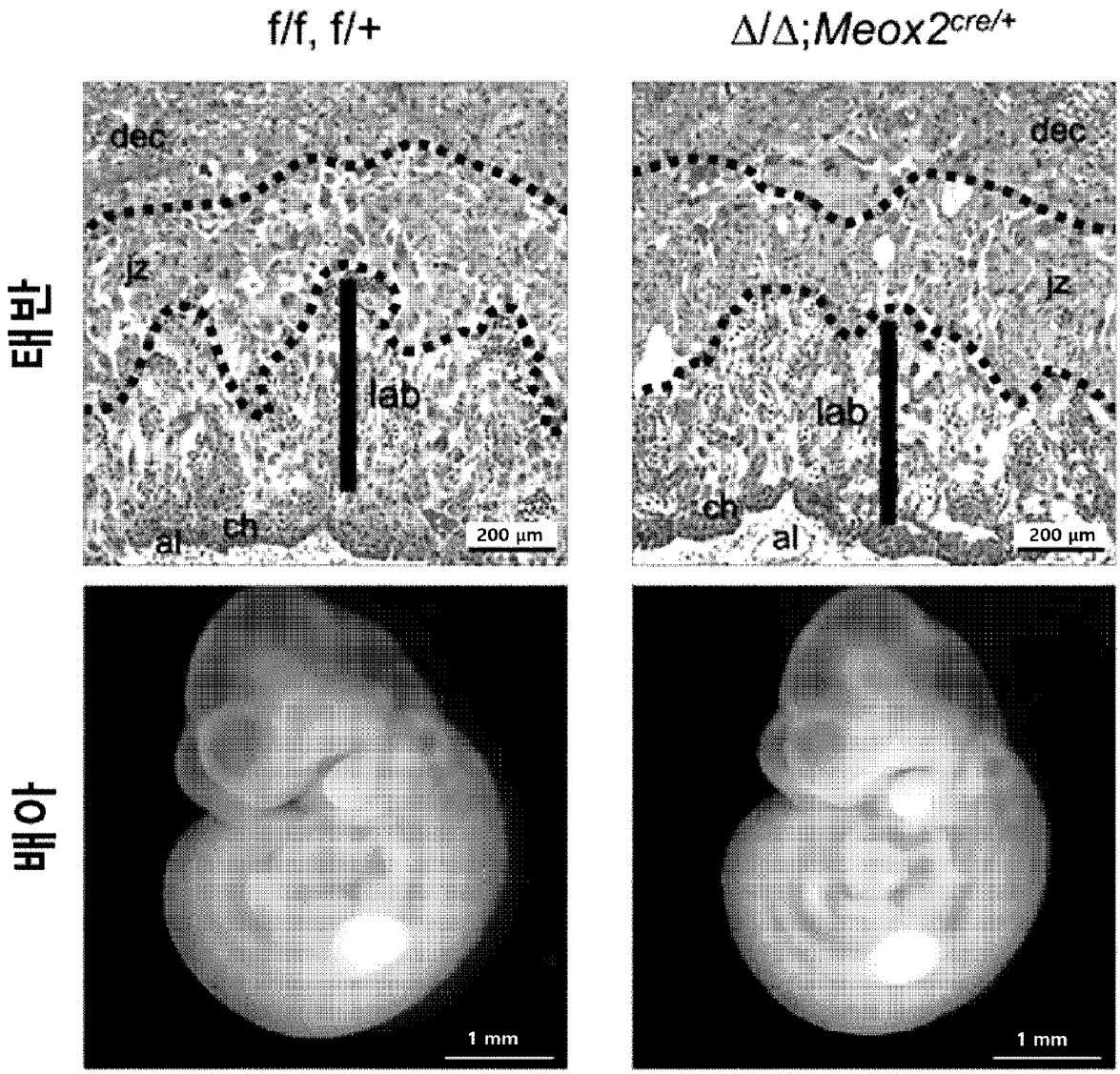
[도13a]


Δ/Δ;Meox2cre/+
Pibf1 보유
Pibf1 결실
mbs
혈액사이 막
fbs
모체 혈액 세포
태아 혈액 세포
S-TGC
ST-I
ST-II
EC

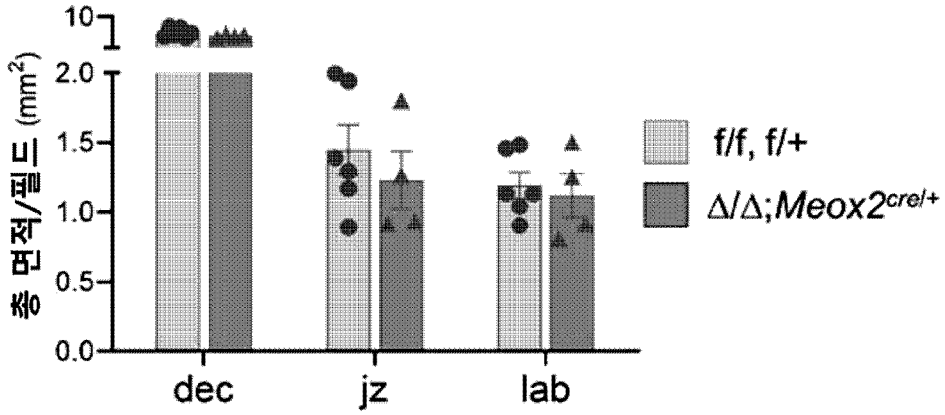
[도13b]


Pibf1f/+;Meox2cre/+
× Pibf1f/f
예상
관찰 n.s.
25.0
25.0
25.0
25.0
25.3
26.7
18.7
29.3
(멘델 비율)
(E10.5 n=75)
f/+;Meox2+/+
f/f;Meox2+/+
Δ/+;Meox2cre/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

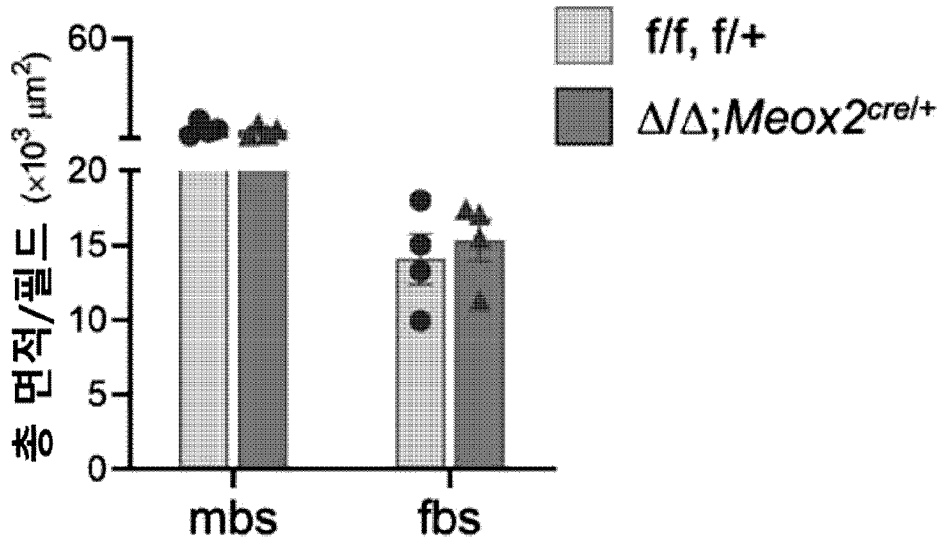
[도13c]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
태반
배아
dec
jz
lab
ch
al
200 μm
1 mm

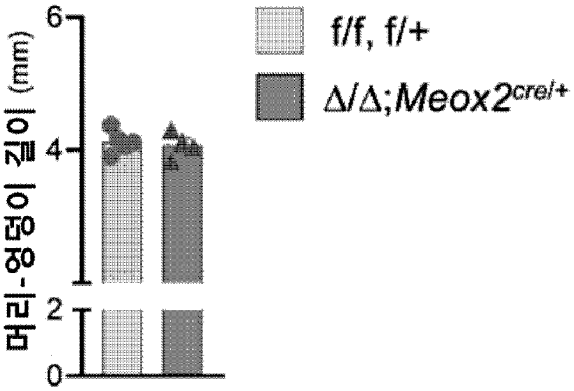
[도13d]


총 면적/필드 (mm2)
10
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
dec
jz
lab
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

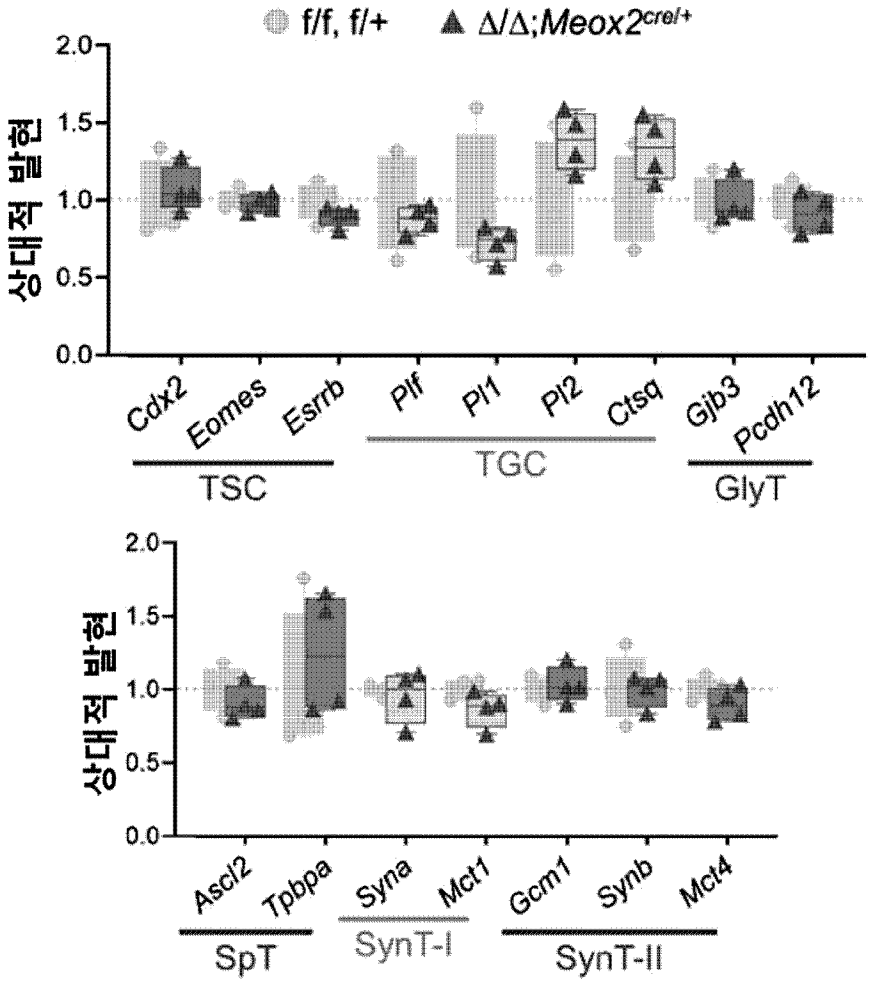
[도13e]


60
20
15
10
5
0
총 면적/필드 (×10³ μm²)
mbs
fbs
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

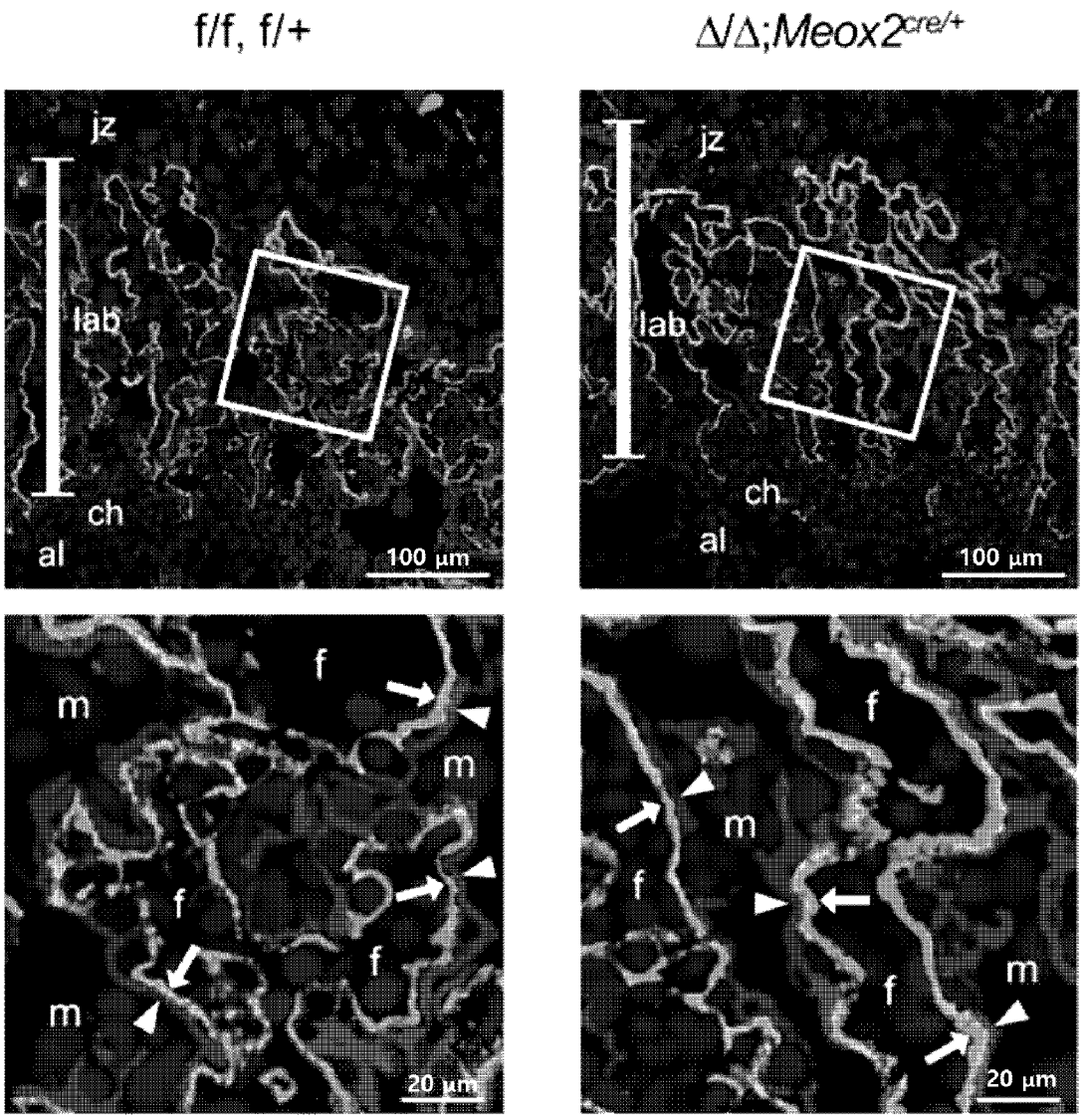
[도13f]


6
4
2
0
머리-엉덩이 길이 (mm)
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

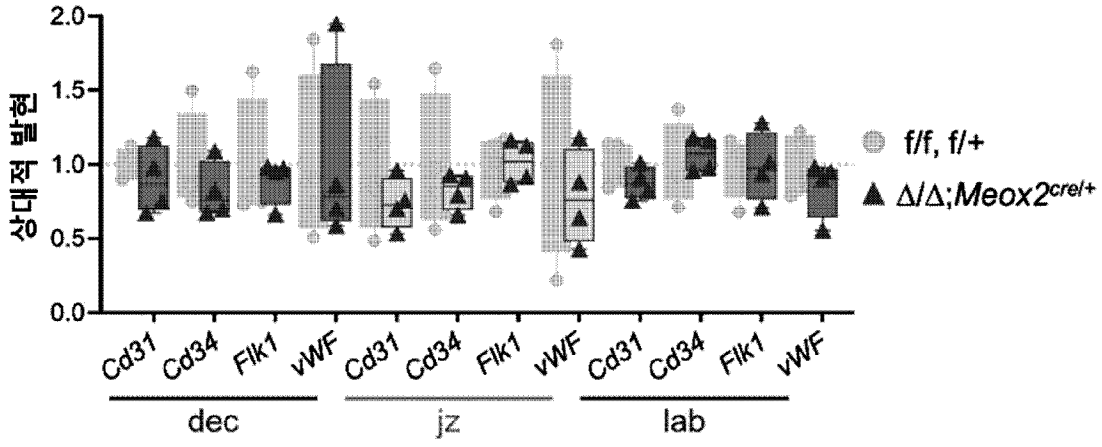
[도13g]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
상대적 발현
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Cdx2
Eomes
Esrrb
Plf
Pl1
Pl2
Ctsq
Gjb3
Pcdh12
TSC
TGC
GlyT
상대적 발현
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ascl2
Tpbpa
Syna
Mct1
Gcm1
Synb
Mct4
SpT
SynT-I
SynT-II

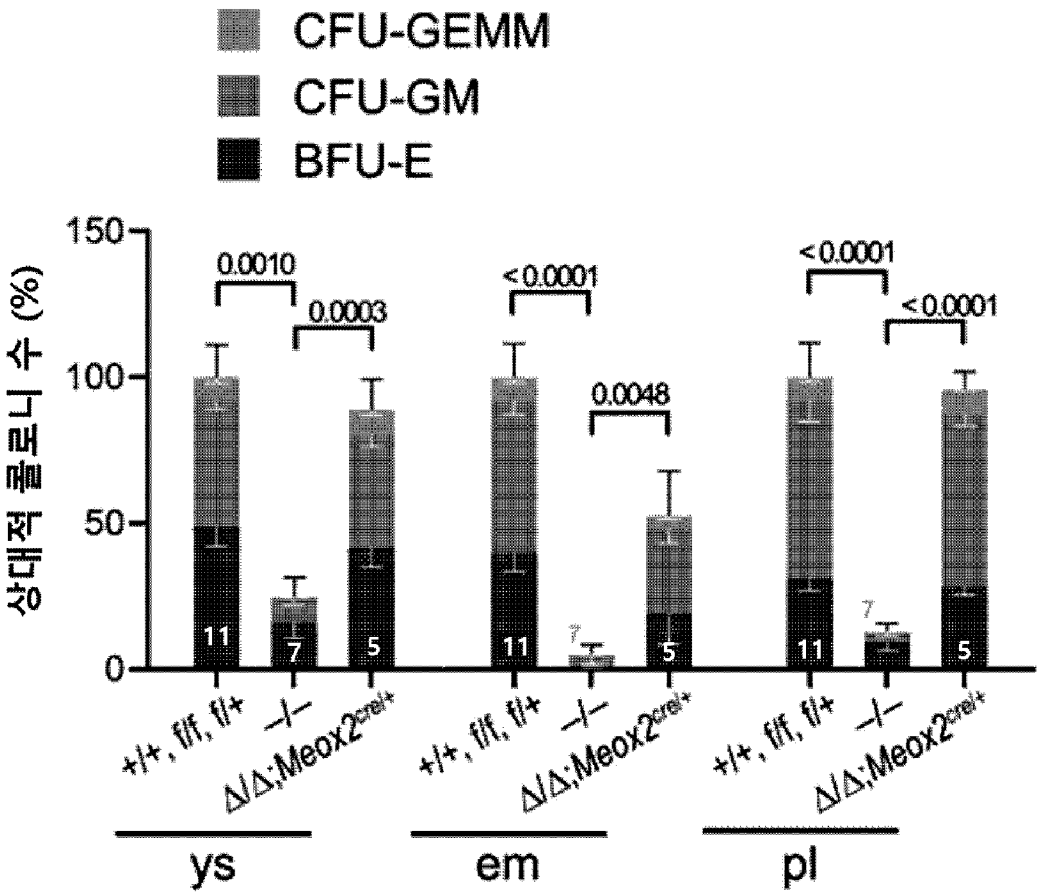
[도13h]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
jz
lab
ch
al
100 μm
f
m
20 μm
MCT1 MCT4 DAPI

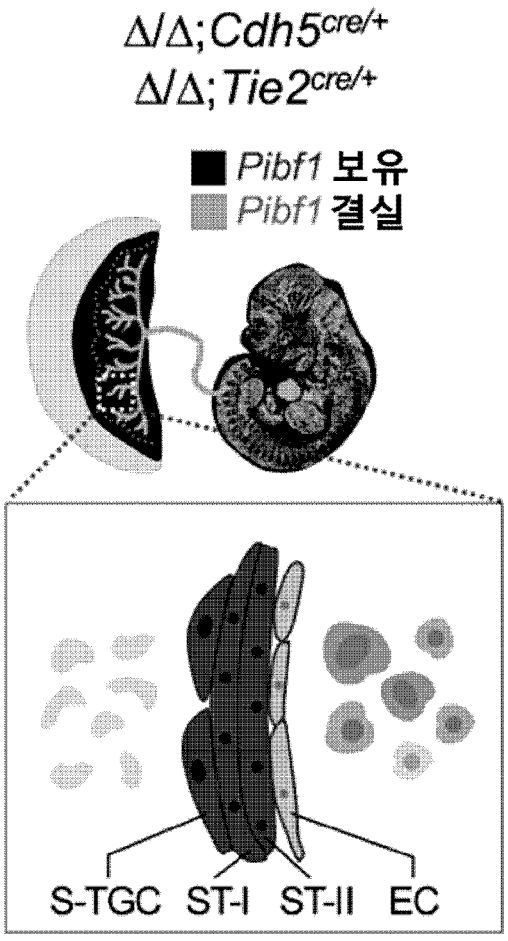
[도13i]


상대적 발현
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Cd31
Cd34
Flk1
vWF
dec
jz
lab
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

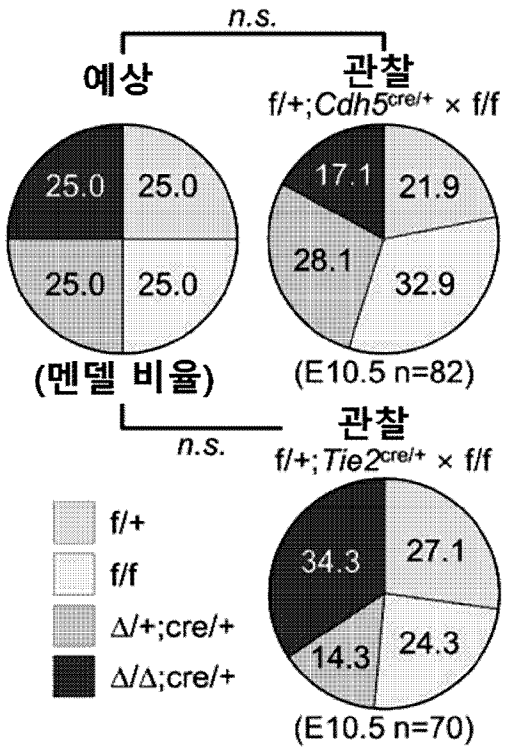
[도13j]


CFU-GEMM
CFU-GM
BFU-E
상대적 콜로니 수 (%)
150
100
50
0
0.0010
0.0003
<0.0001
0.0048
<0.0001
<0.0001
11
7
5
11
7
5
11
7
5
+/+, f/f, f/+
-/-
Δ/Δ;Meox2cre/+
ys
em
pl

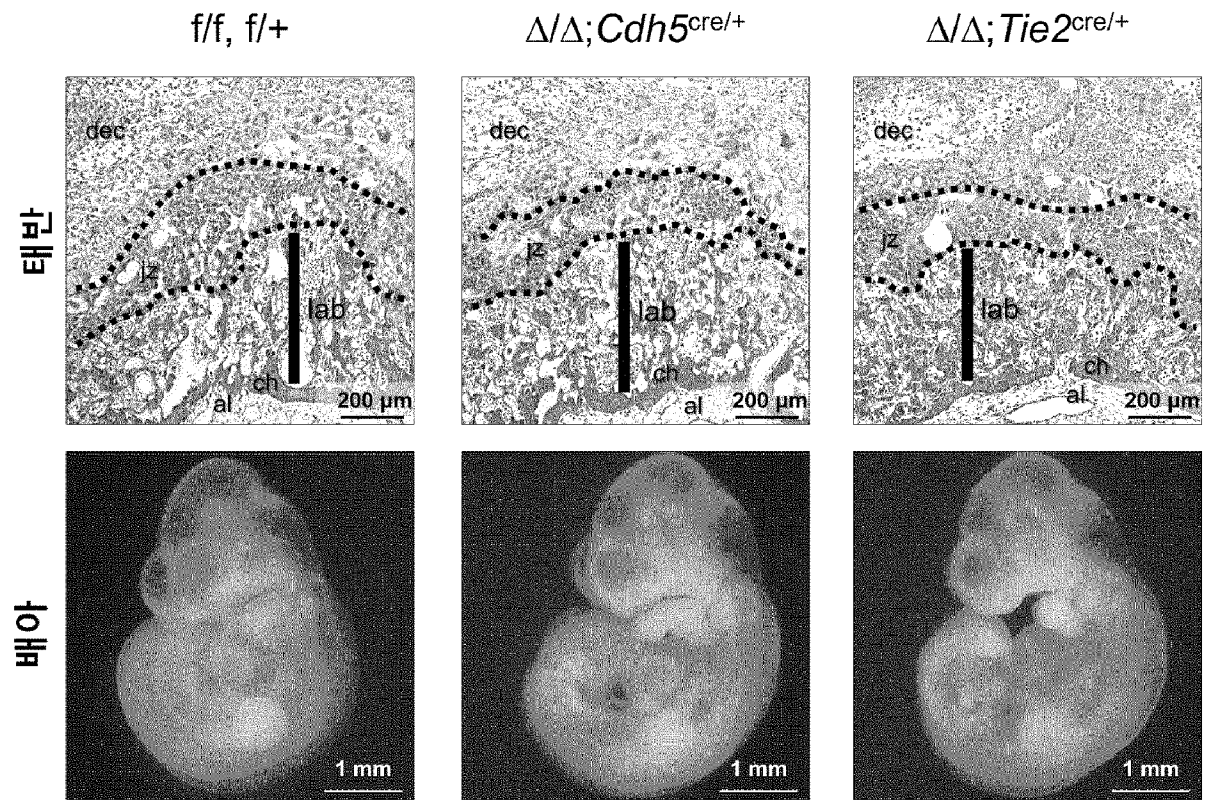
[도13k]


Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
Pibf1 보유
Pibf1 결실
S-TGC
ST-I
ST-II
EC

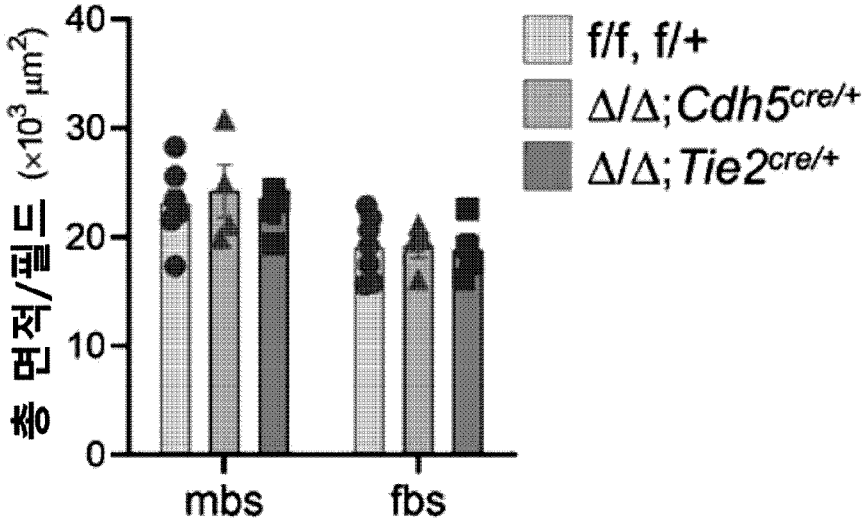
[도13l]


n.s.
예상
관찰
f/+;Cdh5cre/+ × f/f
25.0
25.0
25.0
25.0
17.1
21.9
28.1
32.9
(멘델 비율)
(E10.5 n=82)
n.s.
관찰
f/+;Tie2cre/+ × f/f
f/+
f/f
Δ/+;cre/+
Δ/Δ;cre/+
34.3
27.1
14.3
24.3
(E10.5 n=70)

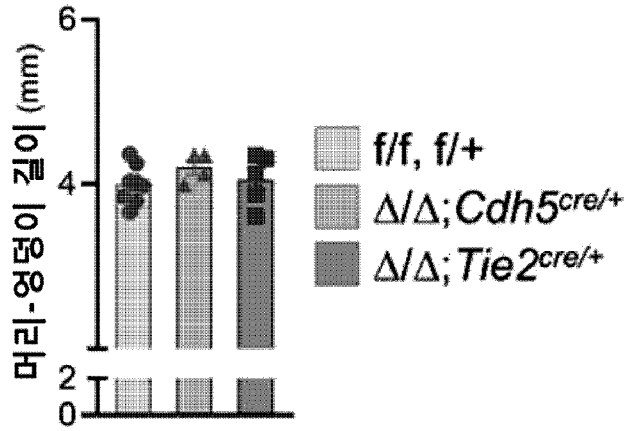
[도13m]


f/f, f/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
태반
배아
dec
jz
lab
ch
al
200 μm
1 mm

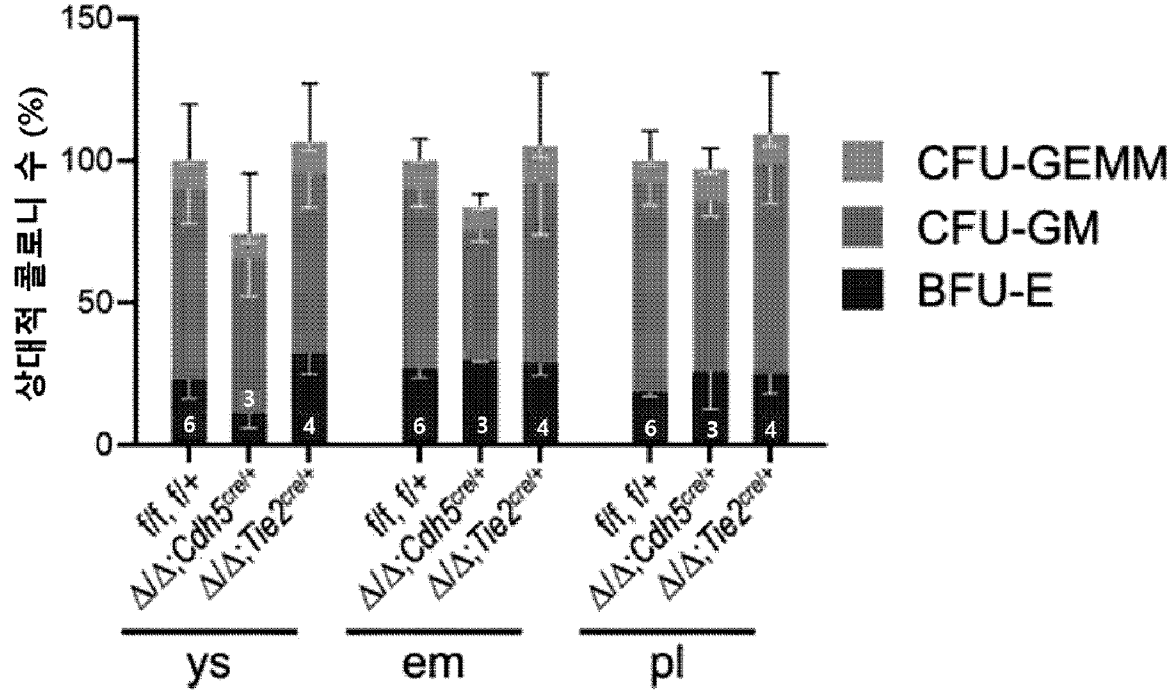
[도13n]



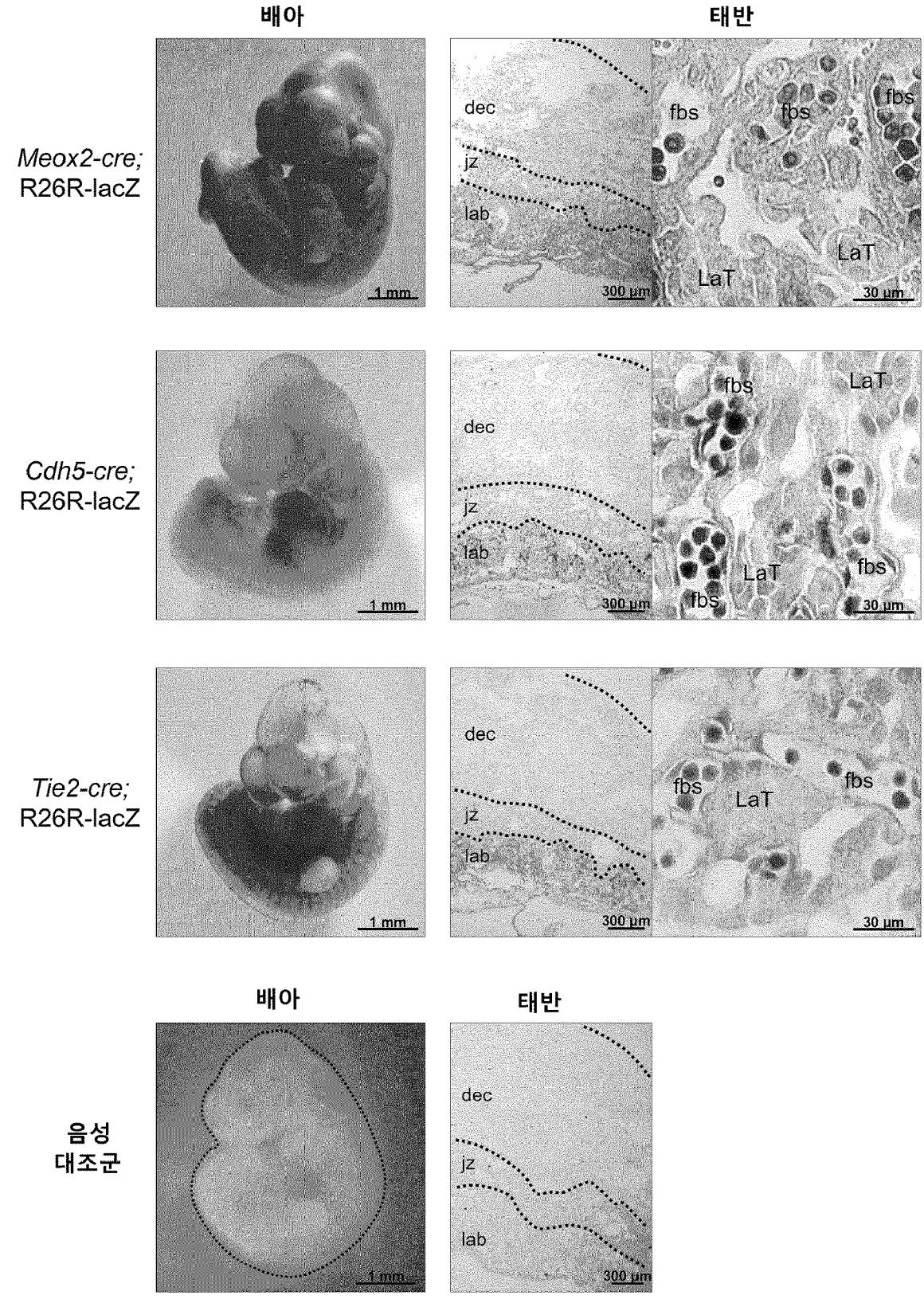
[도13o]



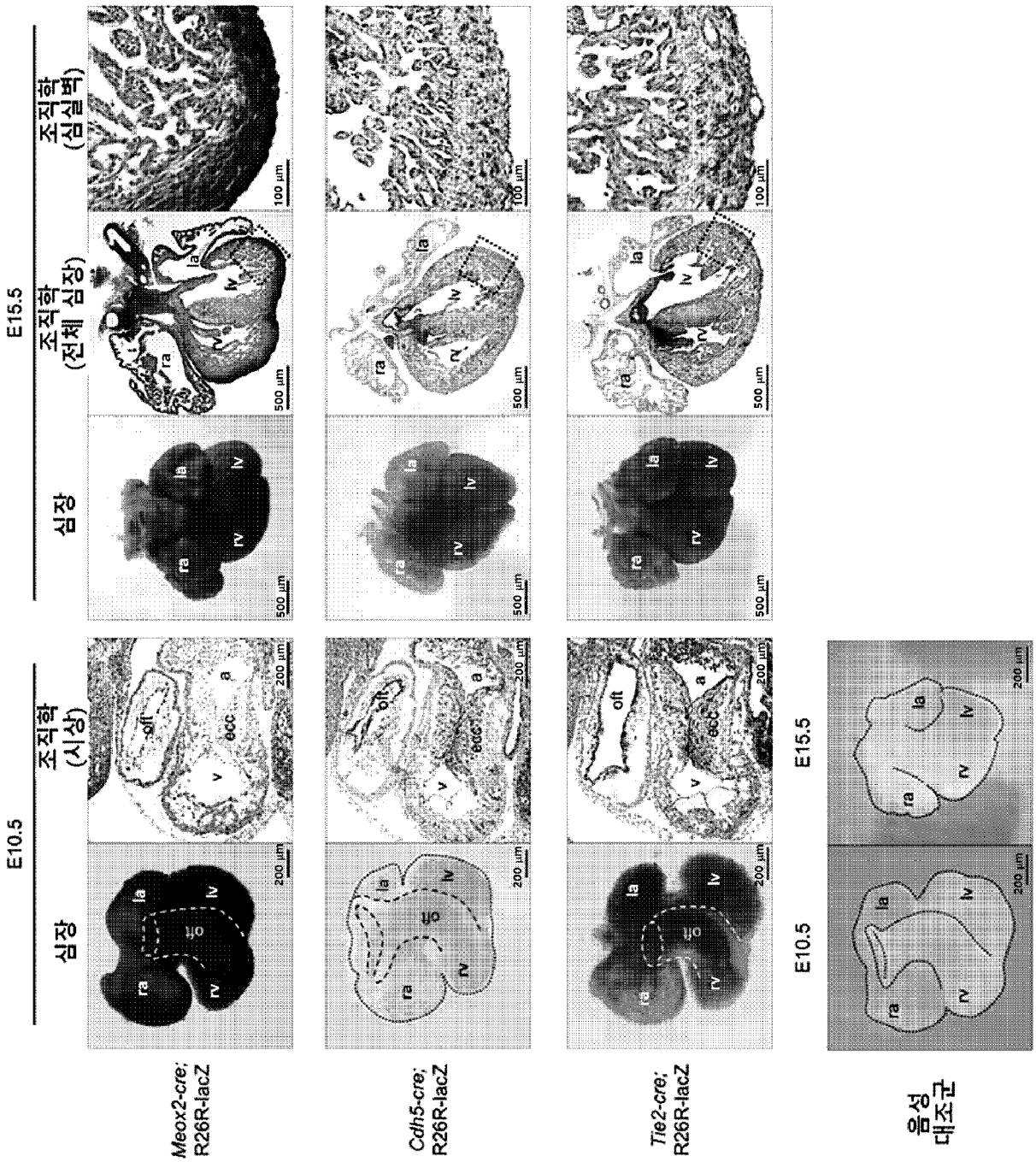
[도13p]



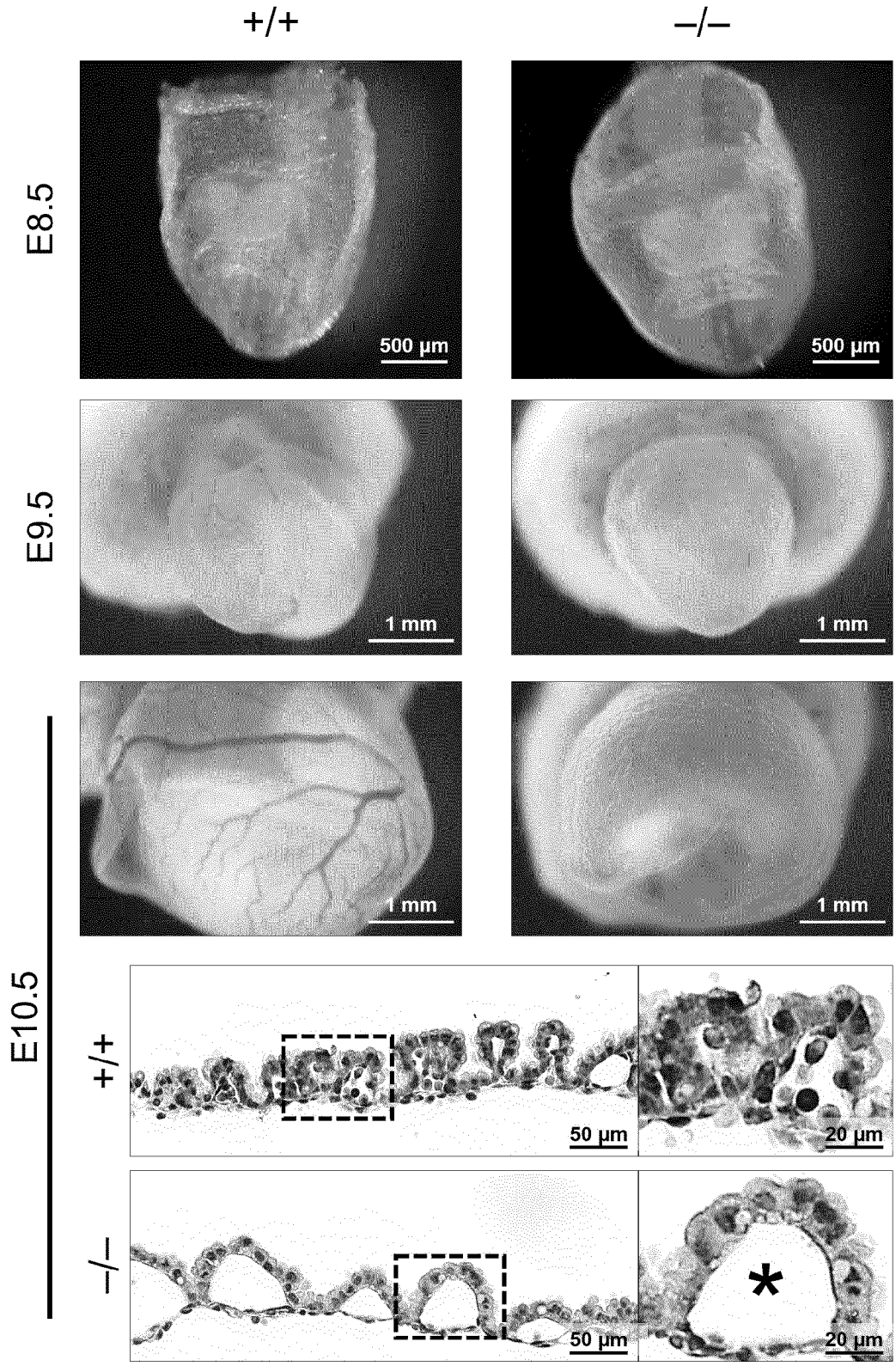
[도14a]


배아
태반
Meox2-cre;
R26R-lacZ
Cdh5-cre;
R26R-lacZ
Tie2-cre;
R26R-lacZ
음성
대조군
dec
jz
lab
fbs
LaT
1 mm
300 μm
30 μm

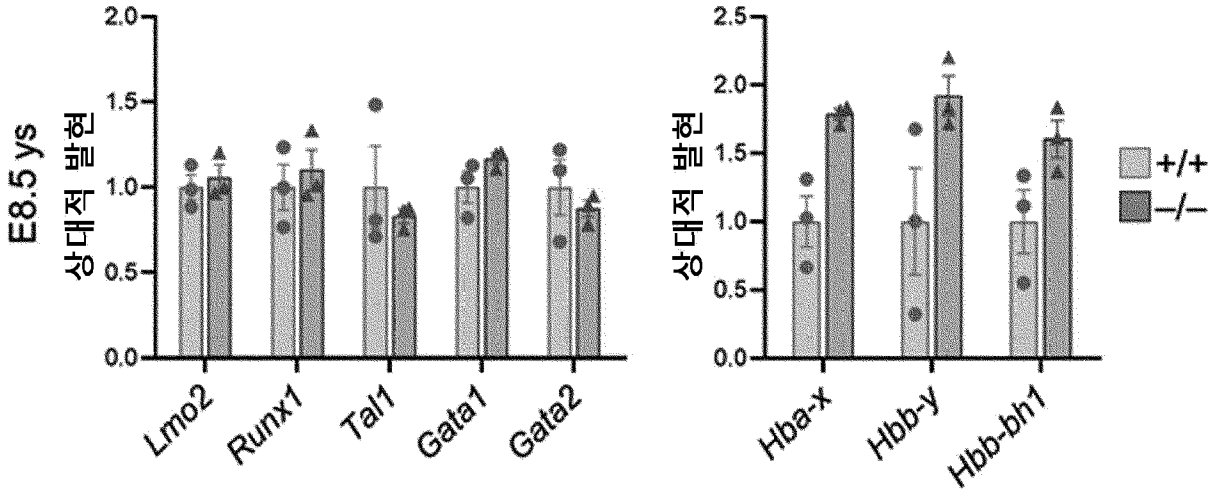
[도14b]


E15.5
조직학 (심실벽)
조직학 (전체 심장)
심장
E10.5
조직학 (시상)
심장
Meox2-cre; R26R-lacZ
Cdh5-cre; R26R-lacZ
Tie2-cre; R26R-lacZ
음성 대조군
E10.5
E15.5
la
lv
ra
rv
oft
ecc
a
v
100 μm
200 μm
500 μm

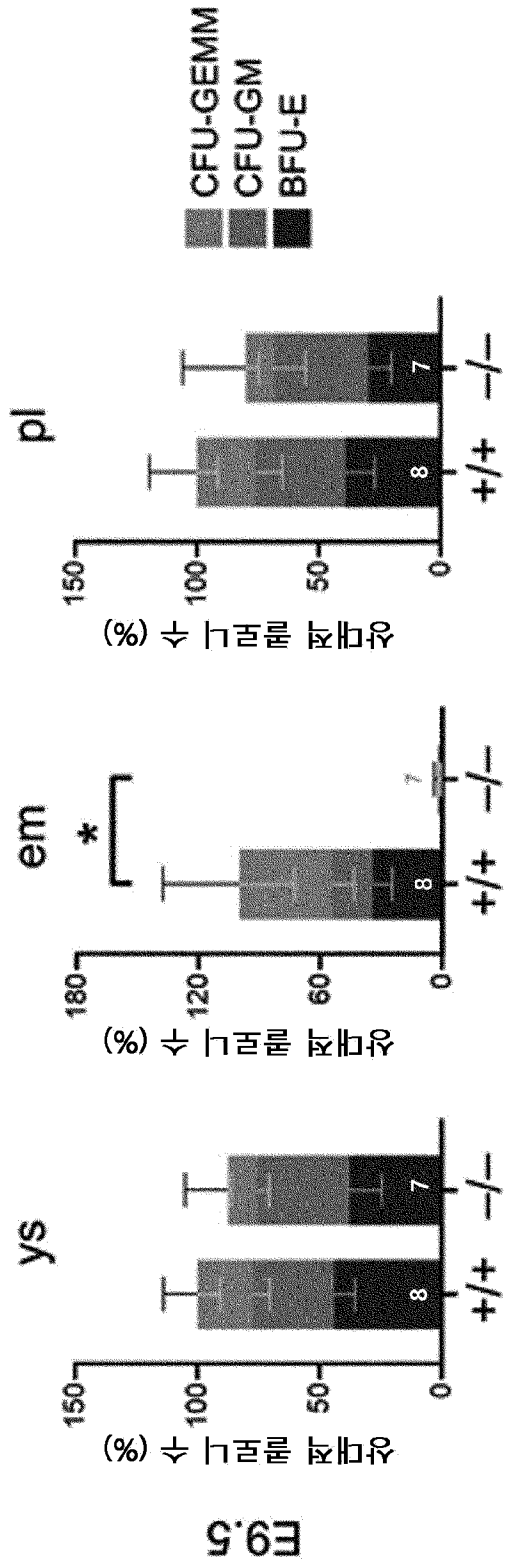
[도15a]



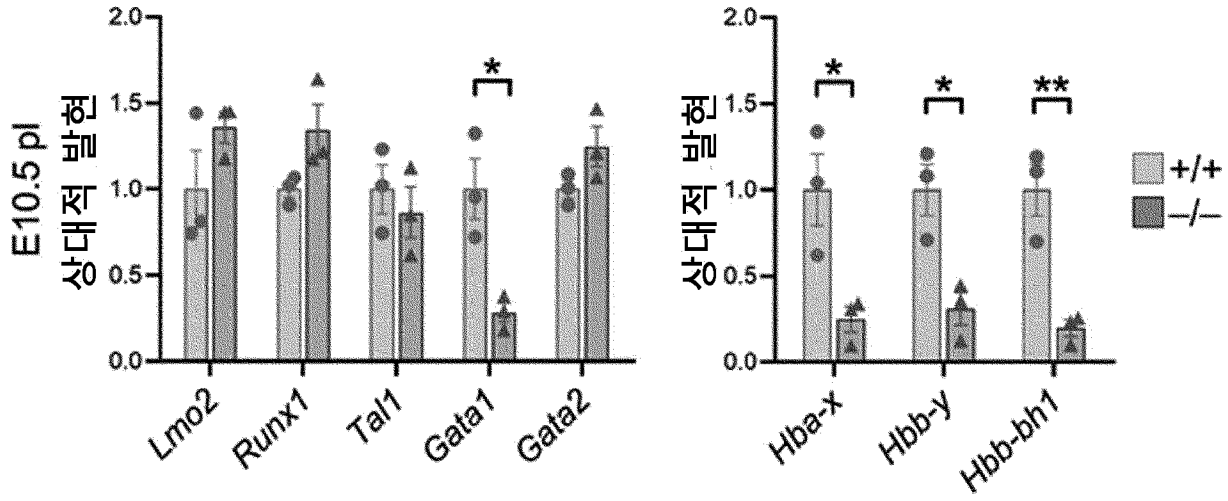
[도15b]


E8.5 ys
상대적 발현
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Lmo2
Runx1
Tal1
Gata1
Gata2
상대적 발현
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Hba-x
Hbb-y
Hbb-bh1
+/+
−/−

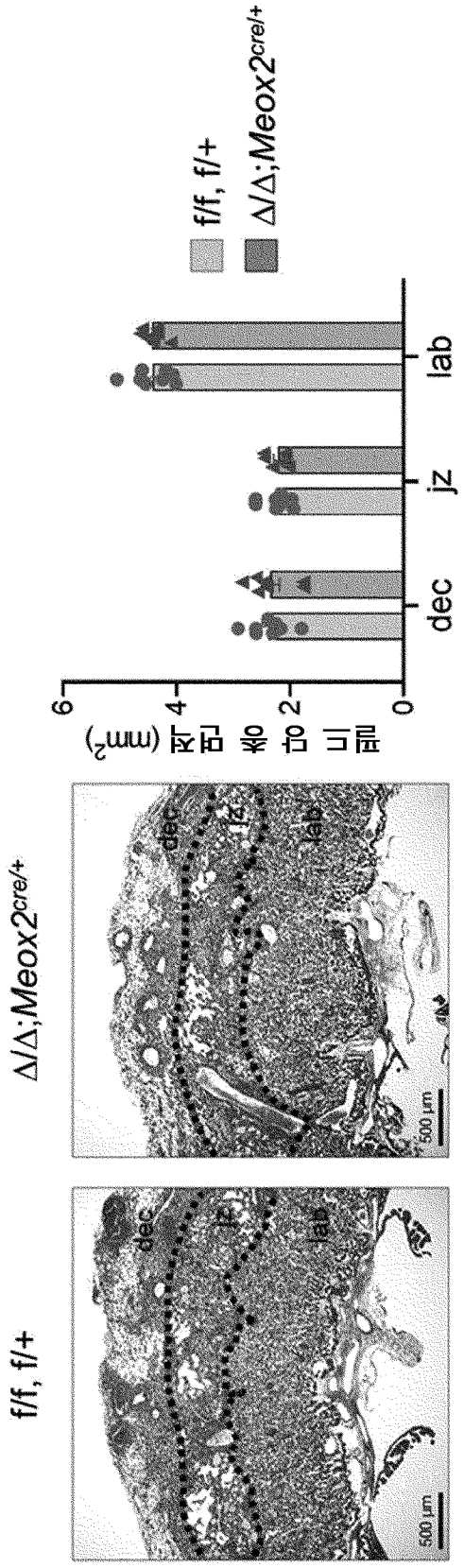
[도15c]



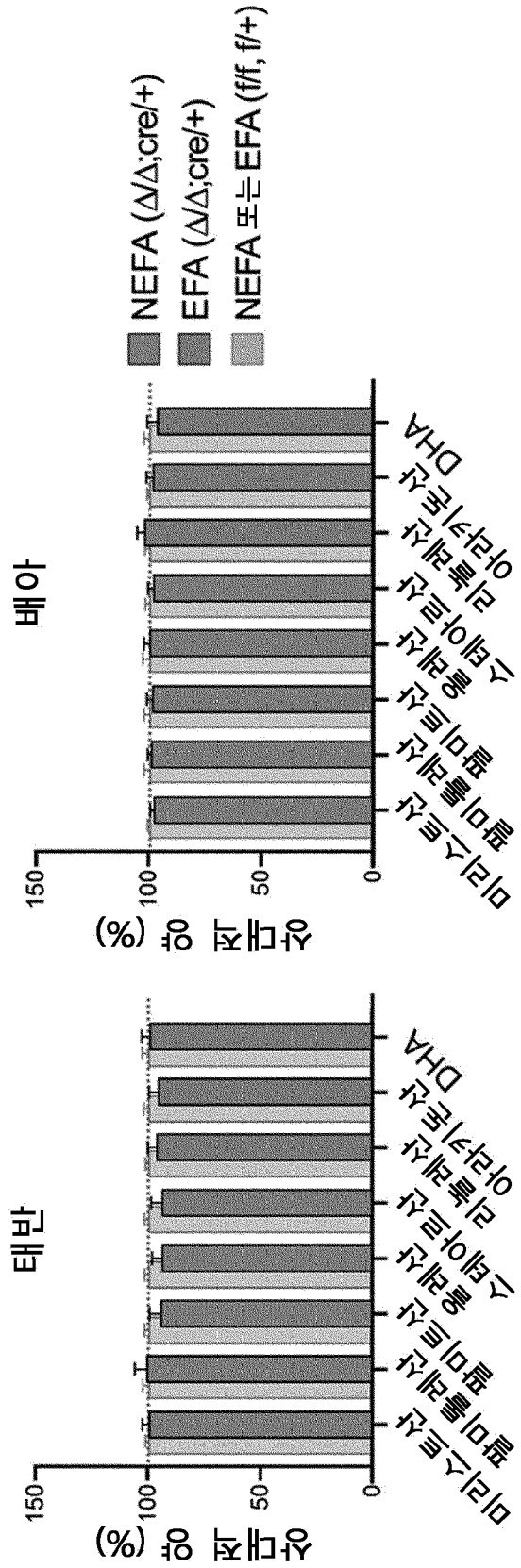
[도15d]


E10.5 pl
상대적 발현
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Lmo2
Runx1
Tal1
Gata1
Gata2
상대적 발현
*
*
**
Hba-x
Hbb-y
Hbb-bh1
+/+
–/–

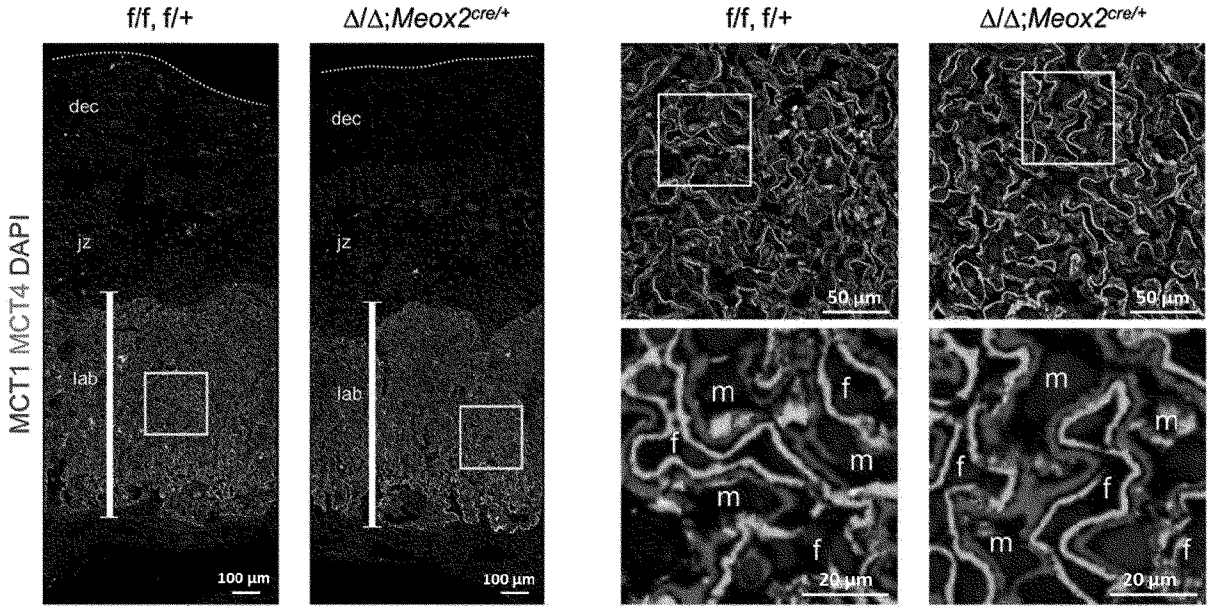
[도16a]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
dec
jz
lab
500 μm
필드 당 육 면적 (mm²)
0
2
4
6
dec
jz
lab
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+

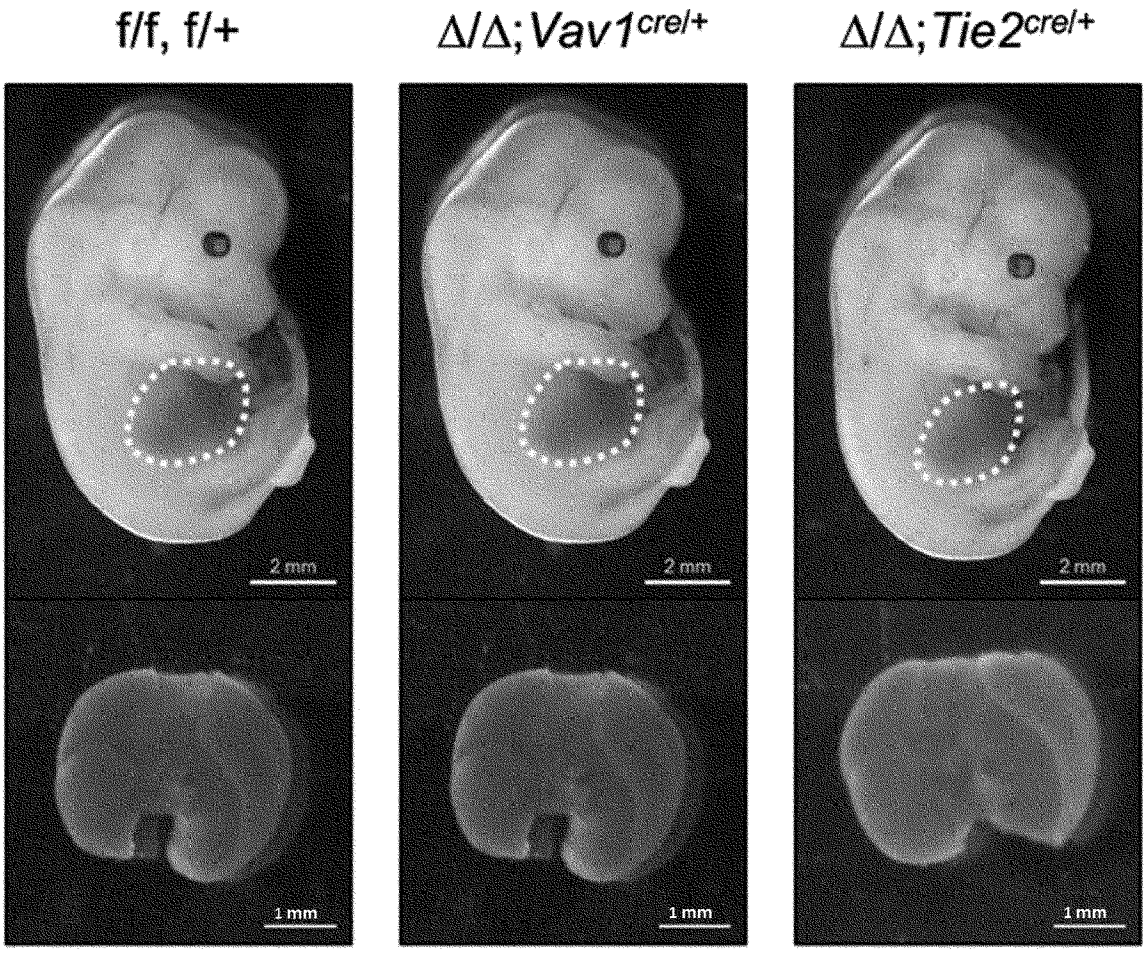
[도16b]


NEFA (Δ/Δ;cre/+)
EFA (Δ/Δ;cre/+)
NEFA 또는 EFA (f/f, f/+)
배아
태반
상대적 양 (%)
150
100
50
0
미리스트산
팔미톨레산
팔미트산
스테아르산
리놀레산
아라키돈산
DHA

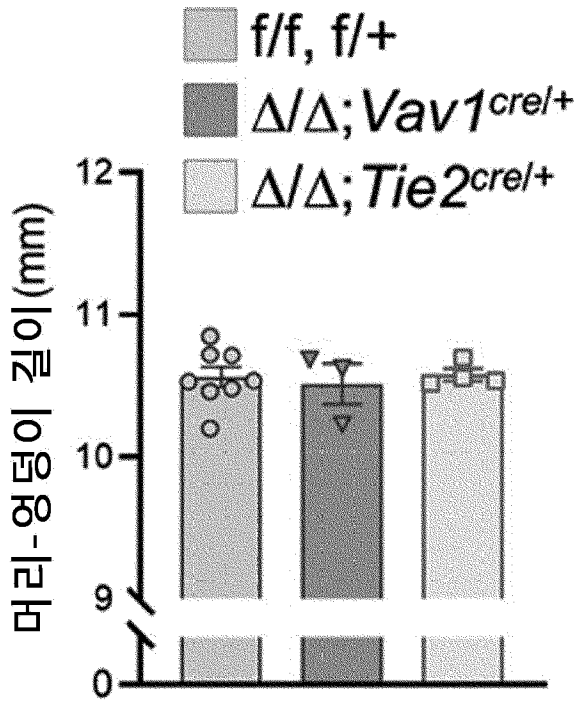
[도16c]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
MCT1 MCT4 DAPI
dec
jz
lab
100 μm
50 μm
m
f
20 μm

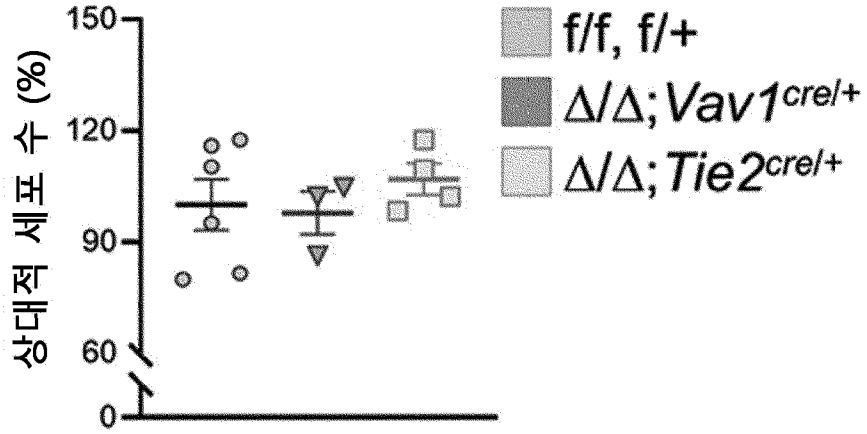
[도17a]


f/f, f/+
Δ/Δ;Vav1cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
2 mm
1 mm

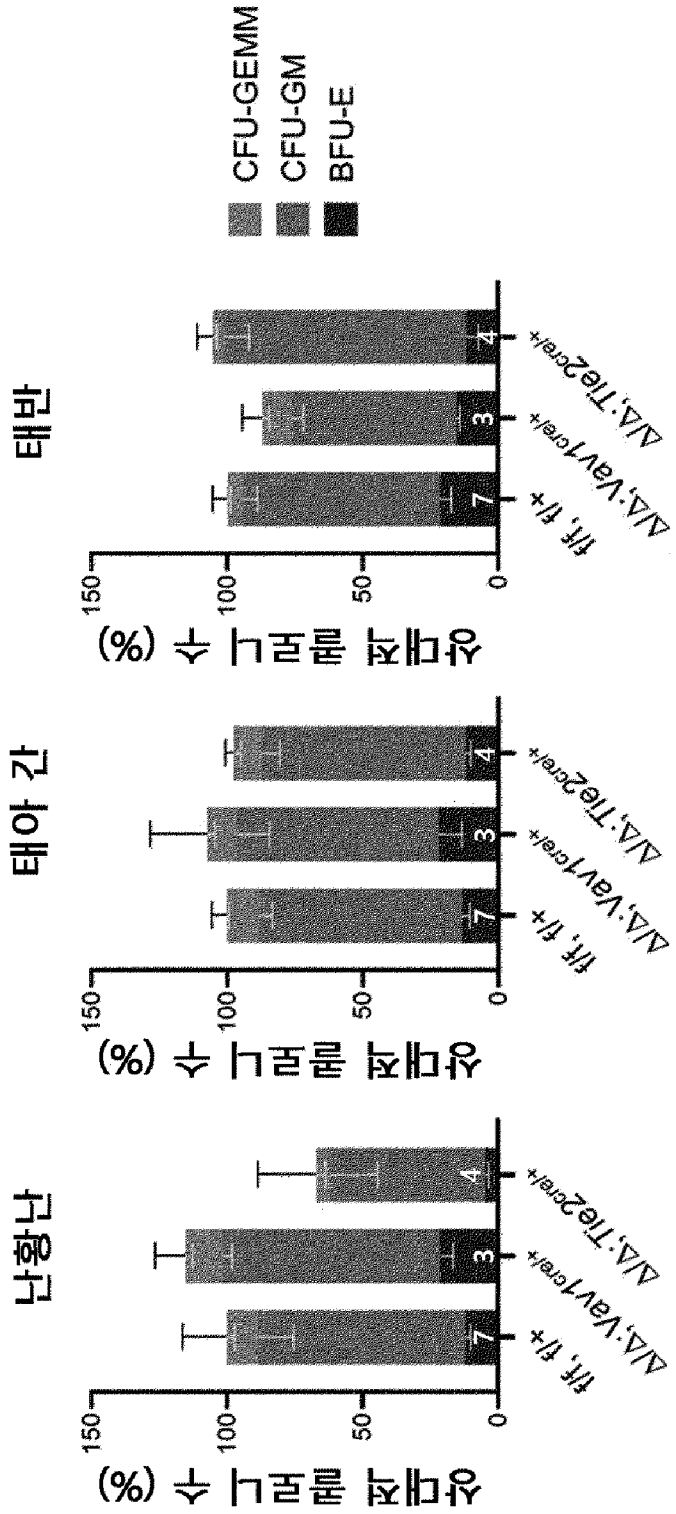
[도17b]


f/f, f/+
Δ/Δ;Vav1cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
머리-엉덩이 길이(mm)
12
11
10
9
0

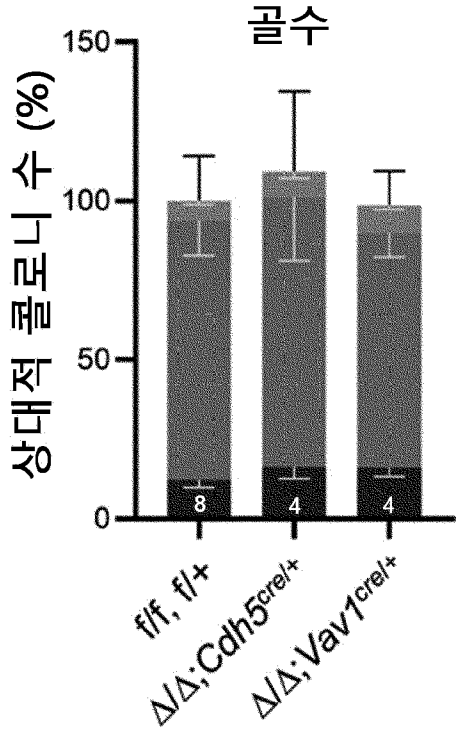
[도17c]


f/f, f/+
Δ/Δ;Vav1cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
상대적 세포 수 (%)
150
120
90
60
0

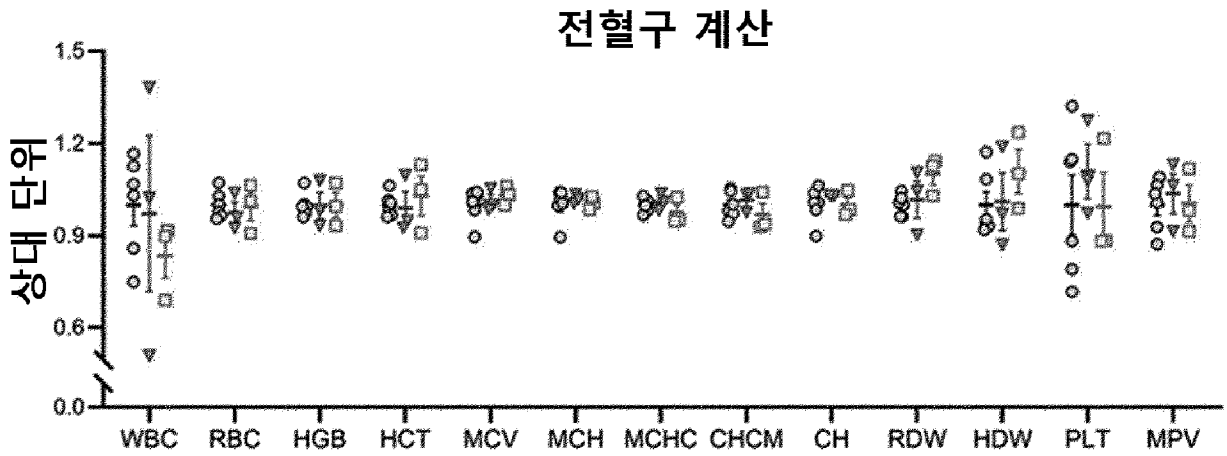
[도17d]

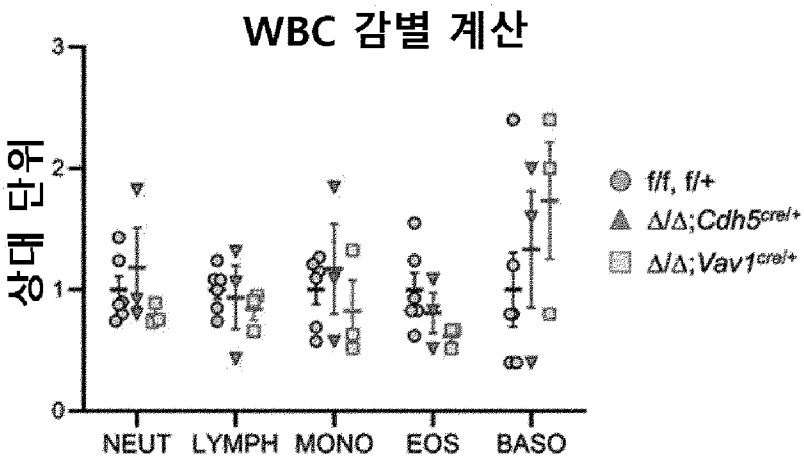

CFU-GEMM
CFU-GM
BFU-E
난황낭
태아 간
태반
상대적 콜로니 수 (%)
0
50
100
150
7
3
4
fl/+, fl/+
Δ/Δ;Vav1cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+

[도17e]

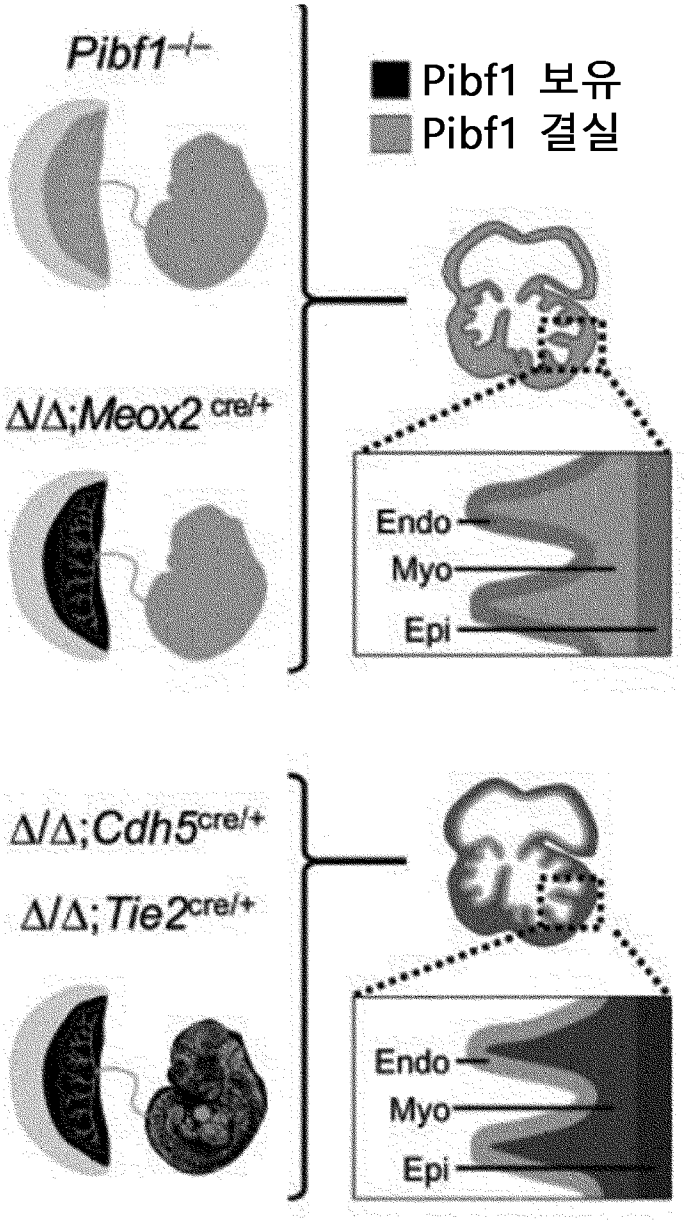

골수
상대적 콜로니 수 (%)
150
100
50
0
8
4
4
f/f, f/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Vav1cre/+

[도17f]

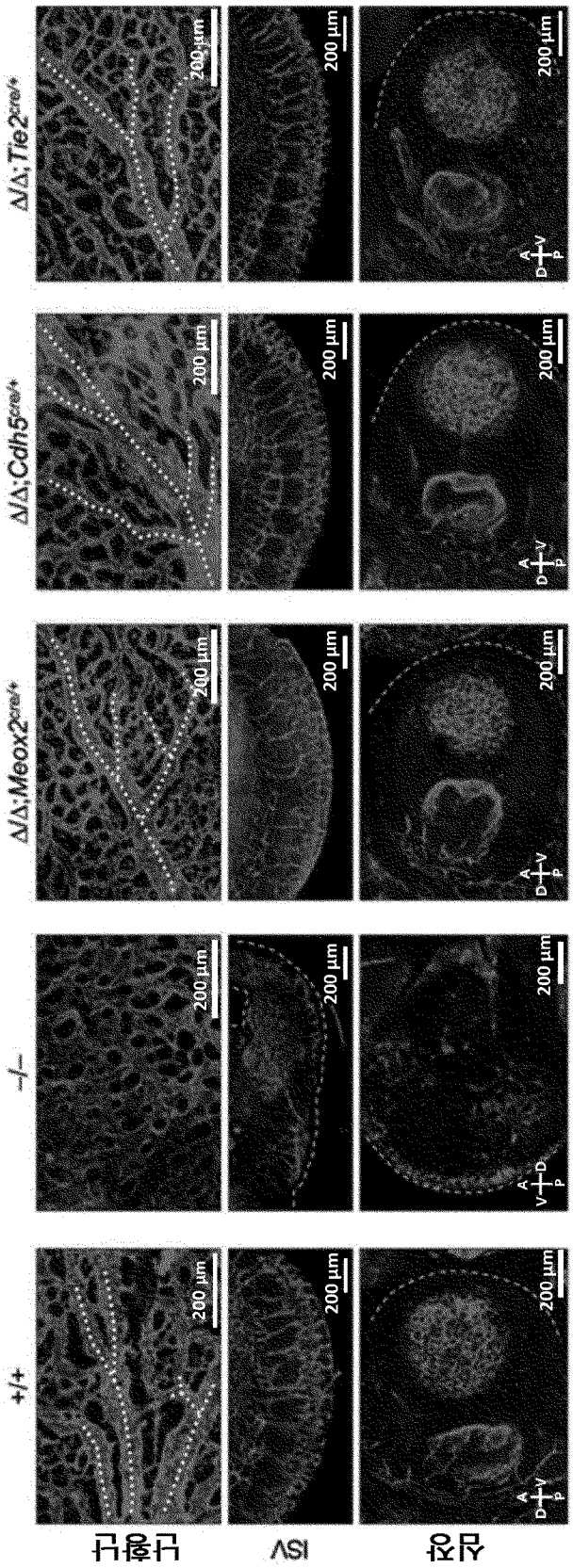

전혈구 계산
상대 단위
1.5
1.2
0.9
0.6
0.0
WBC
RBC
HGB
HCT
MCV
MCH
MCHC
CHCM
CH
RDW
HDW
PLT
MPV


WBC 감별 계산
상대 단위
3
2
1
0
NEUT
LYMPH
MONO
EOS
BASO
f/f, f/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Vav1cre/+

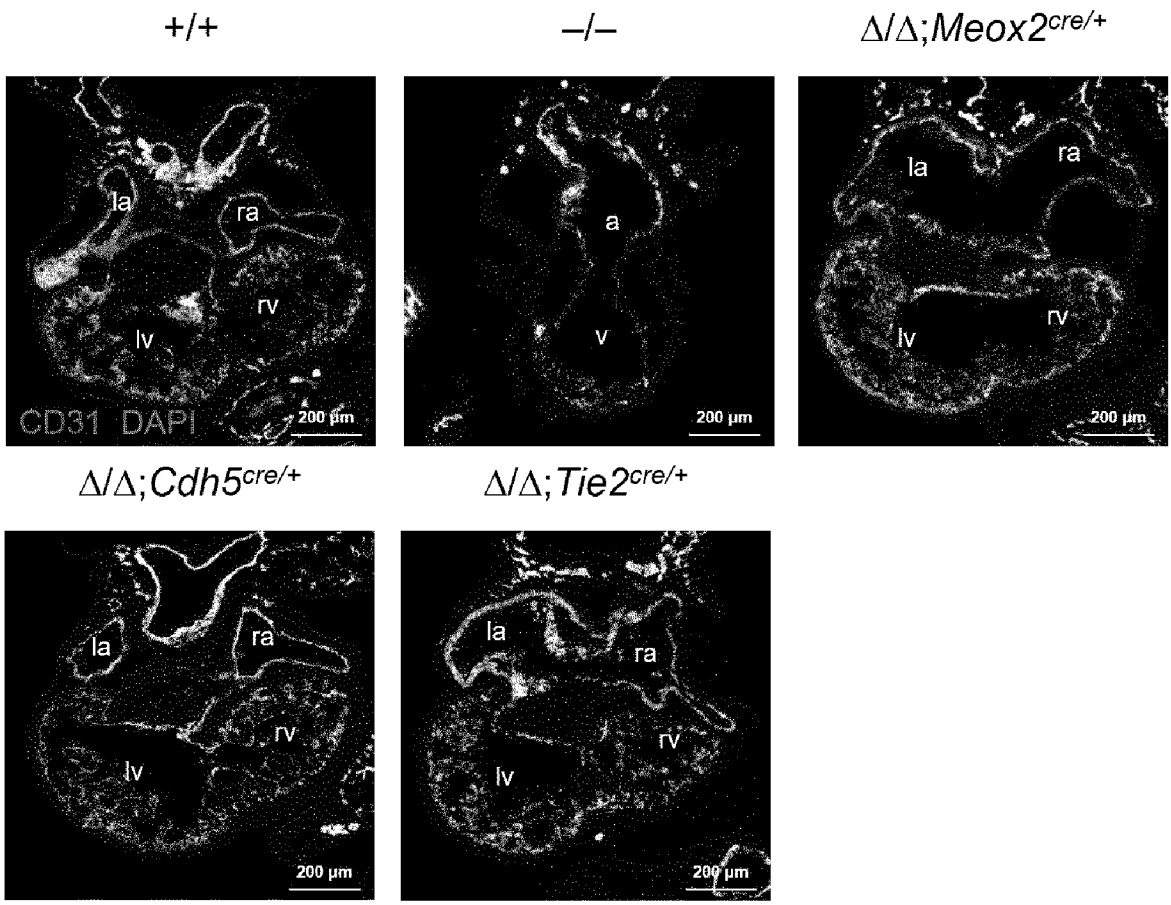
[도18a]


Pibf1−/−
Pibf1 보유
Pibf1 결실
Δ/Δ;Meox2 cre/+
Endo
Myo
Epi
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
Endo
Myo
Epi

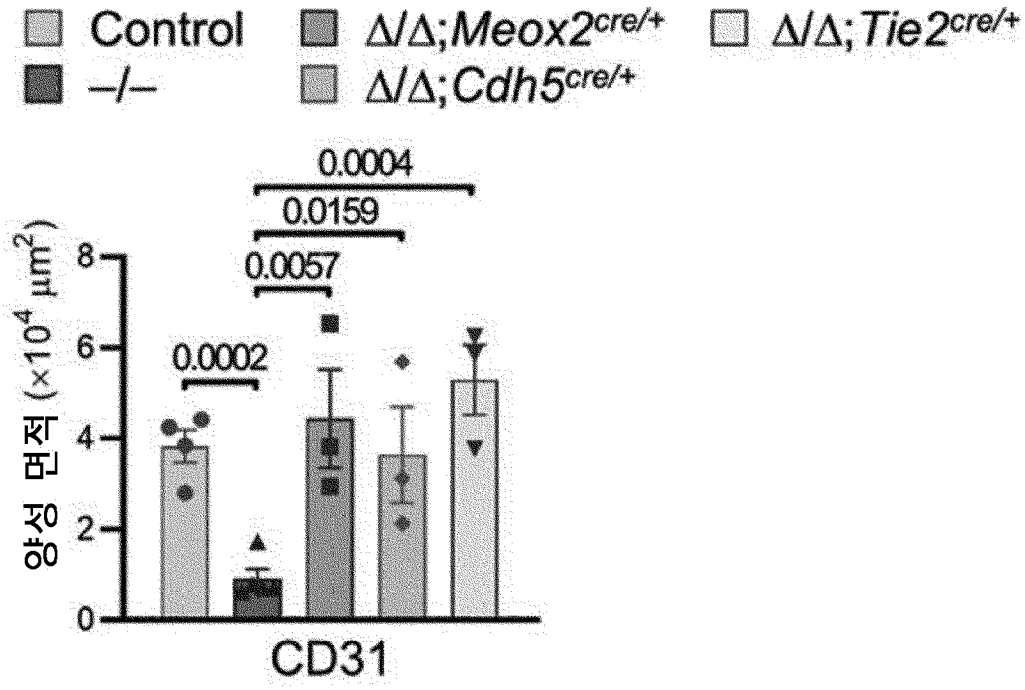
[도18b]



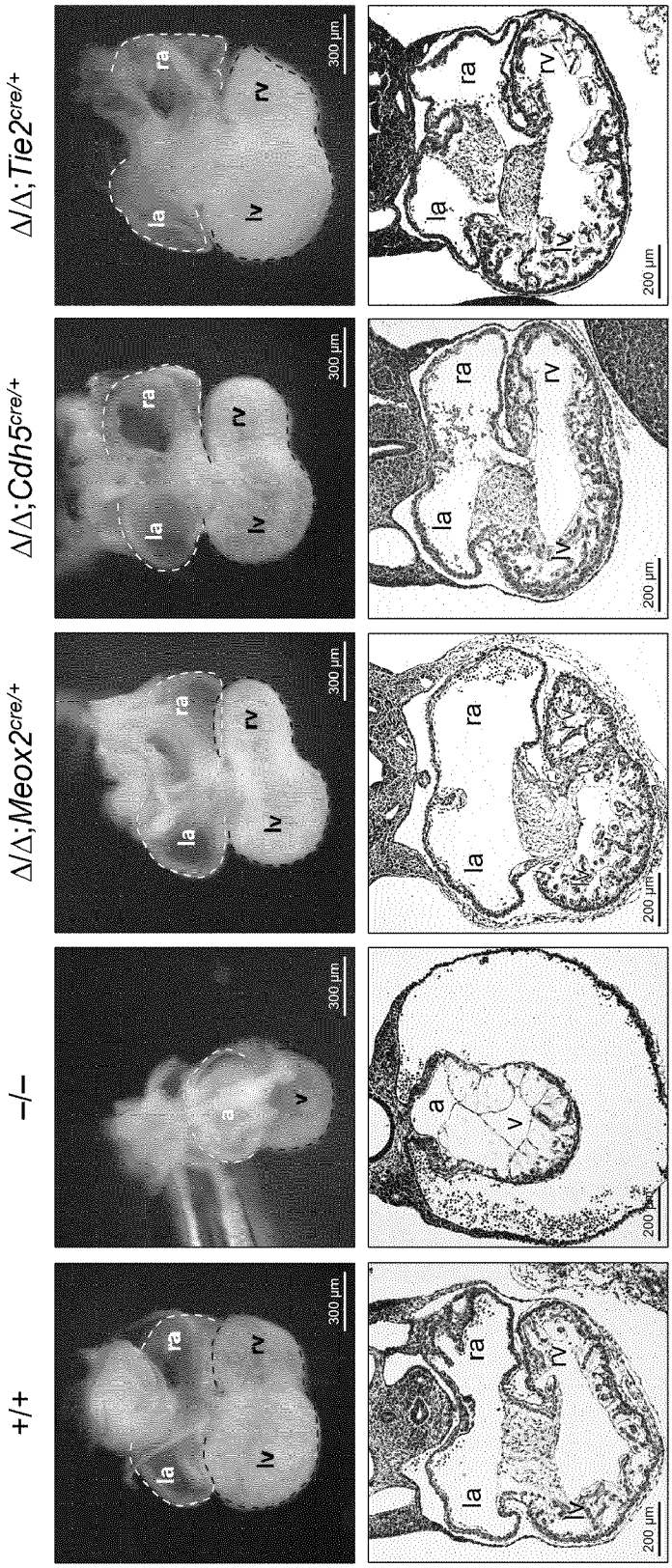
[도18c]


+/+
–/–
Δ/Δ;Meox2cre/+
la
ra
rv
lv
CD31 DAPI
200 μm
a
v
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+

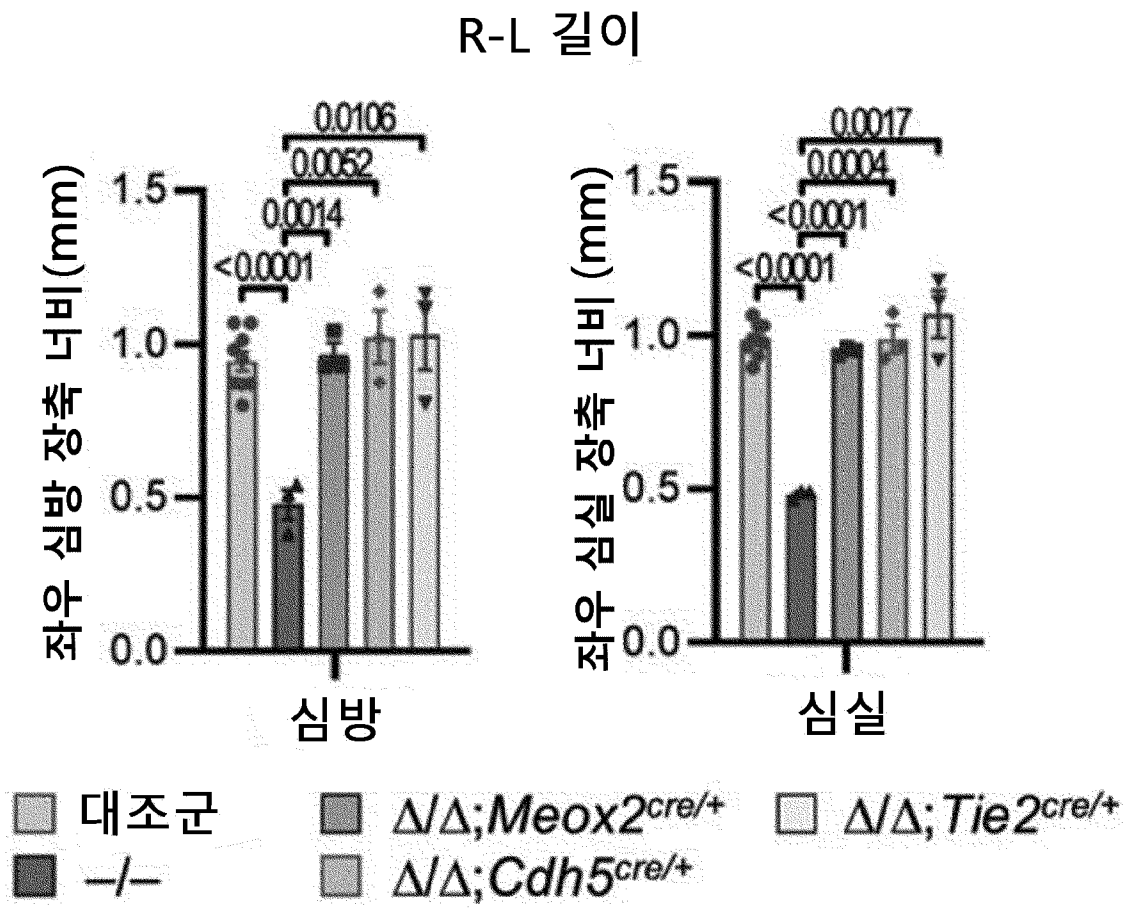
[도18d]


Control
–/–
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
0.0004
0.0159
0.0057
0.0002
양성 면적 (×10⁴ μm²)
0
2
4
6
8
CD31

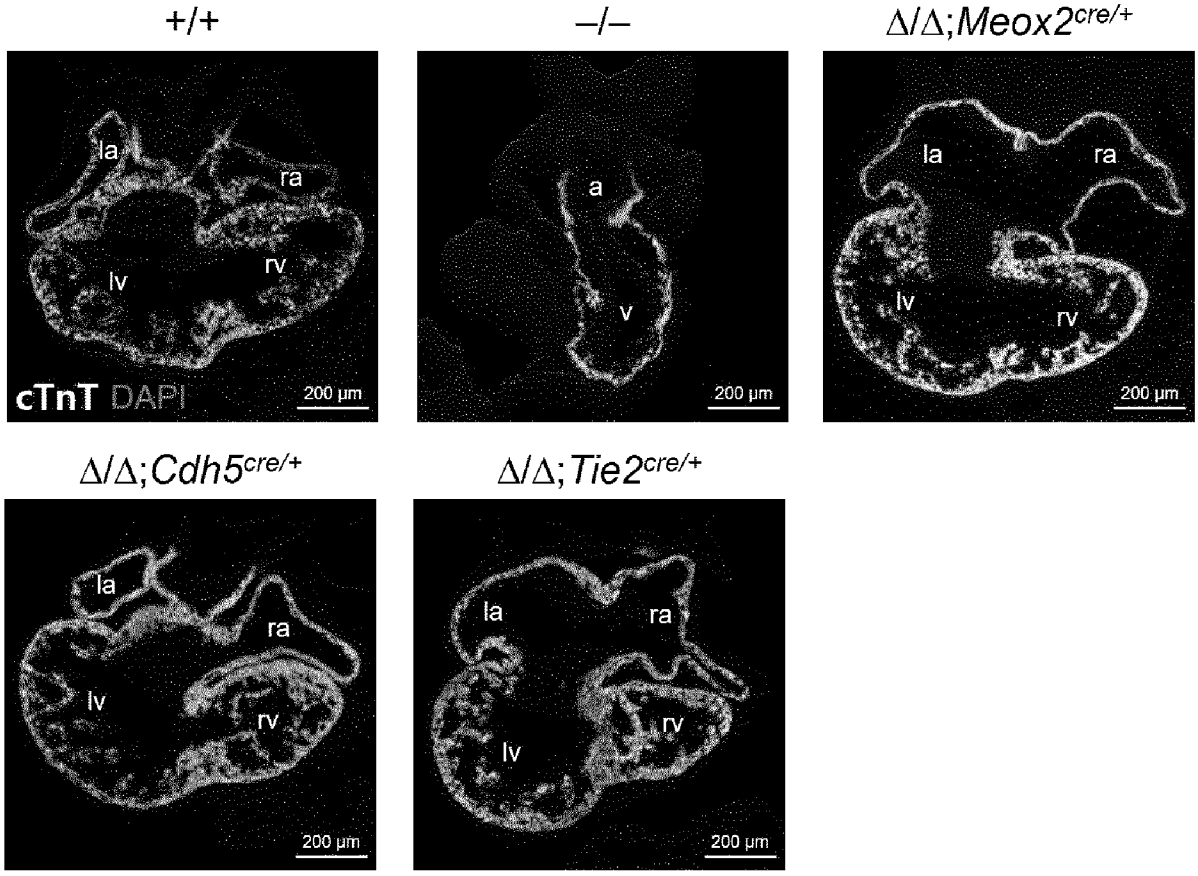
[도18e]



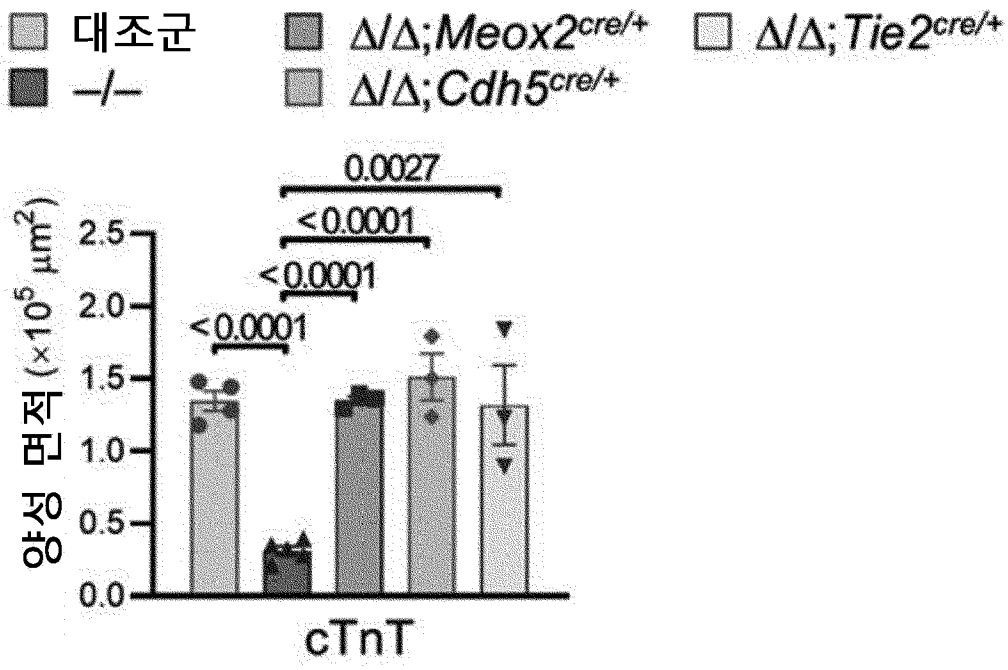
[도18f]


R-L 길이
0.0106
0.0052
0.0014
<0.0001
0.0017
0.0004
<0.0001
<0.0001
좌우 심방 장축 너비(mm)
좌우 심실 장축 너비 (mm)
1.5
1.0
0.5
0.0
심방
심실
대조군
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
–/–
Δ/Δ;Cdh5cre/+

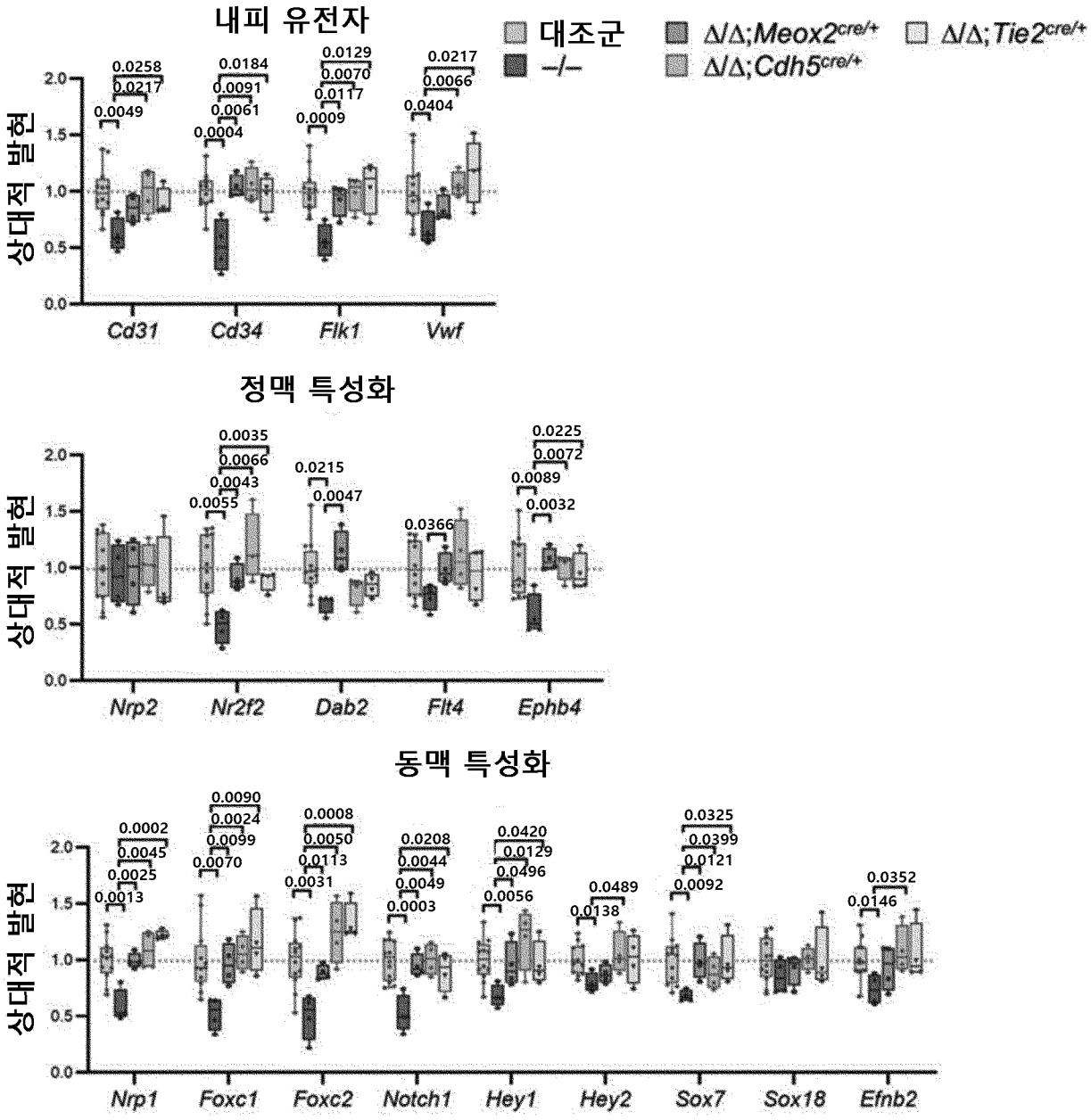
[도18g]


+/+
–/–
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
la
ra
lv
rv
a
v
cTnT DAPI
200 μm

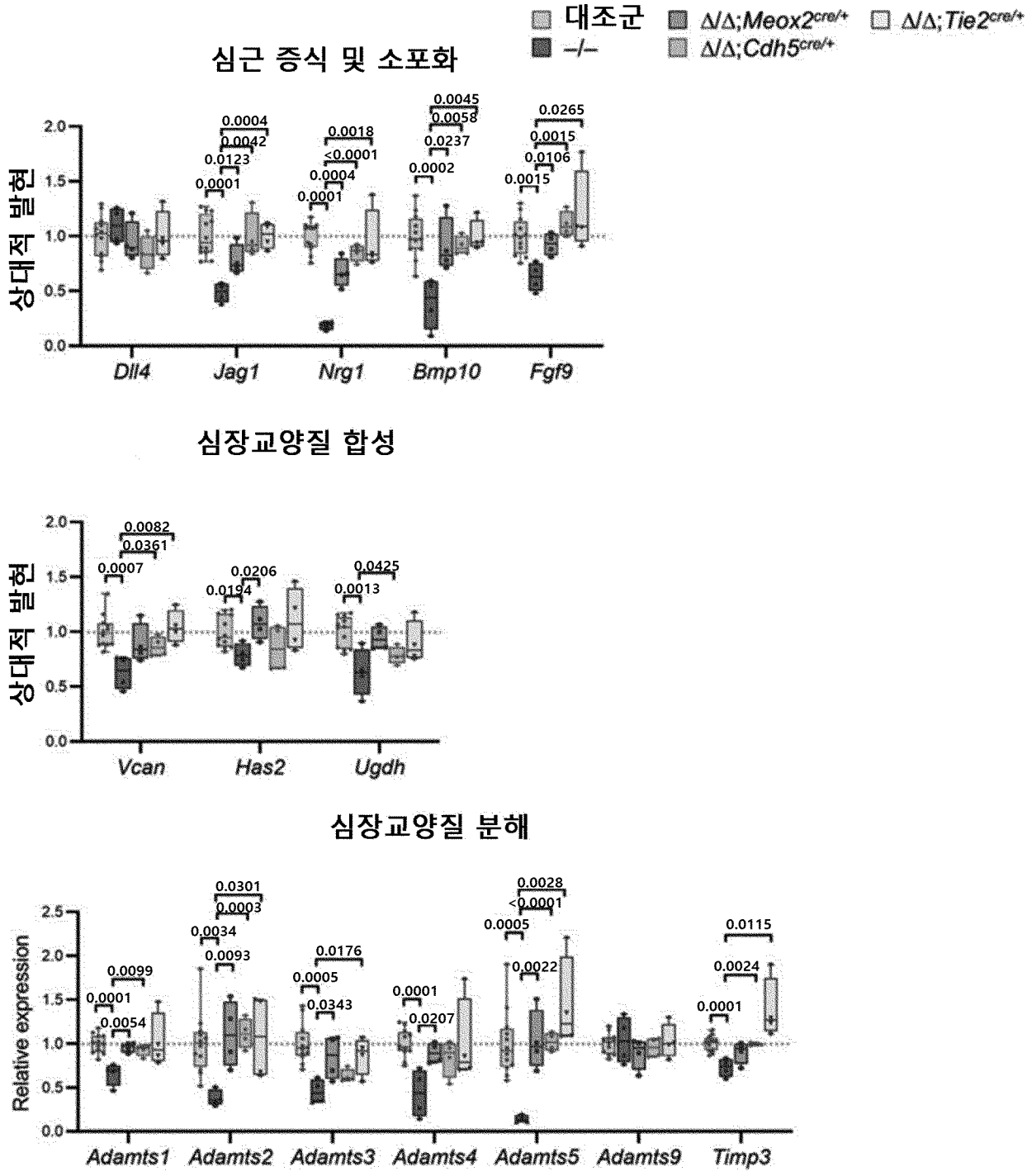
[도18h]


대조군
–/–
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
양성 면적 (×10^5 μm^2)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0027
<0.0001
<0.0001
<0.0001
cTnT

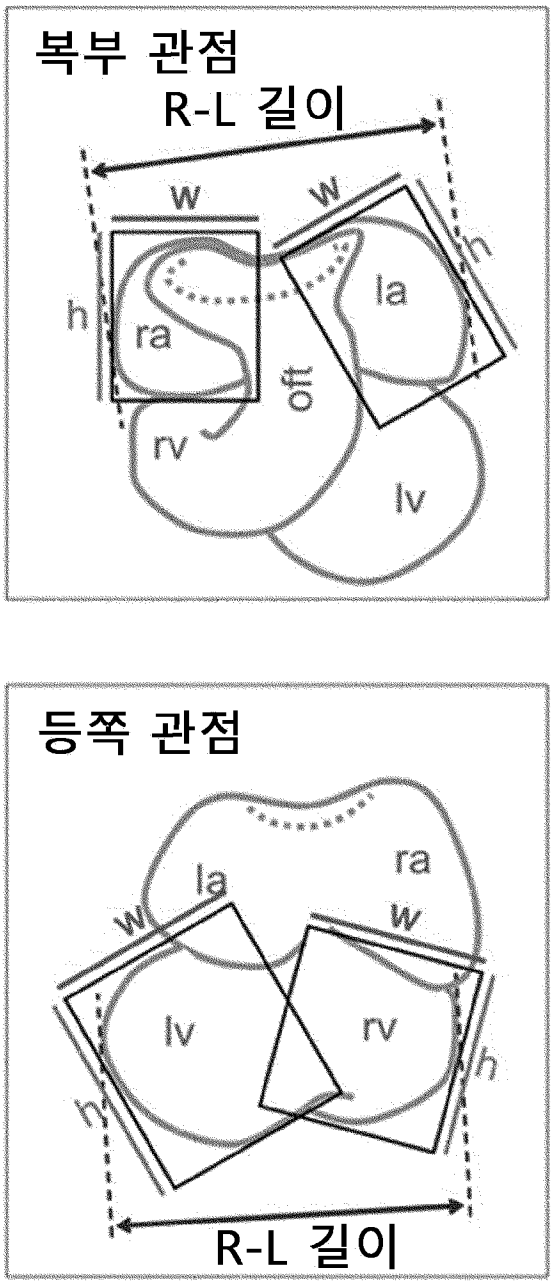
[도18i]


내피 유전자
대조군
−/−
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
상대적 발현
Cd31
Cd34
Flk1
Vwf
정맥 특성화
Nrp2
Nr2f2
Dab2
Flt4
Ephb4
동맥 특성화
Nrp1
Foxc1
Foxc2
Notch1
Hey1
Hey2
Sox7
Sox18
Efnb2

[도18j]

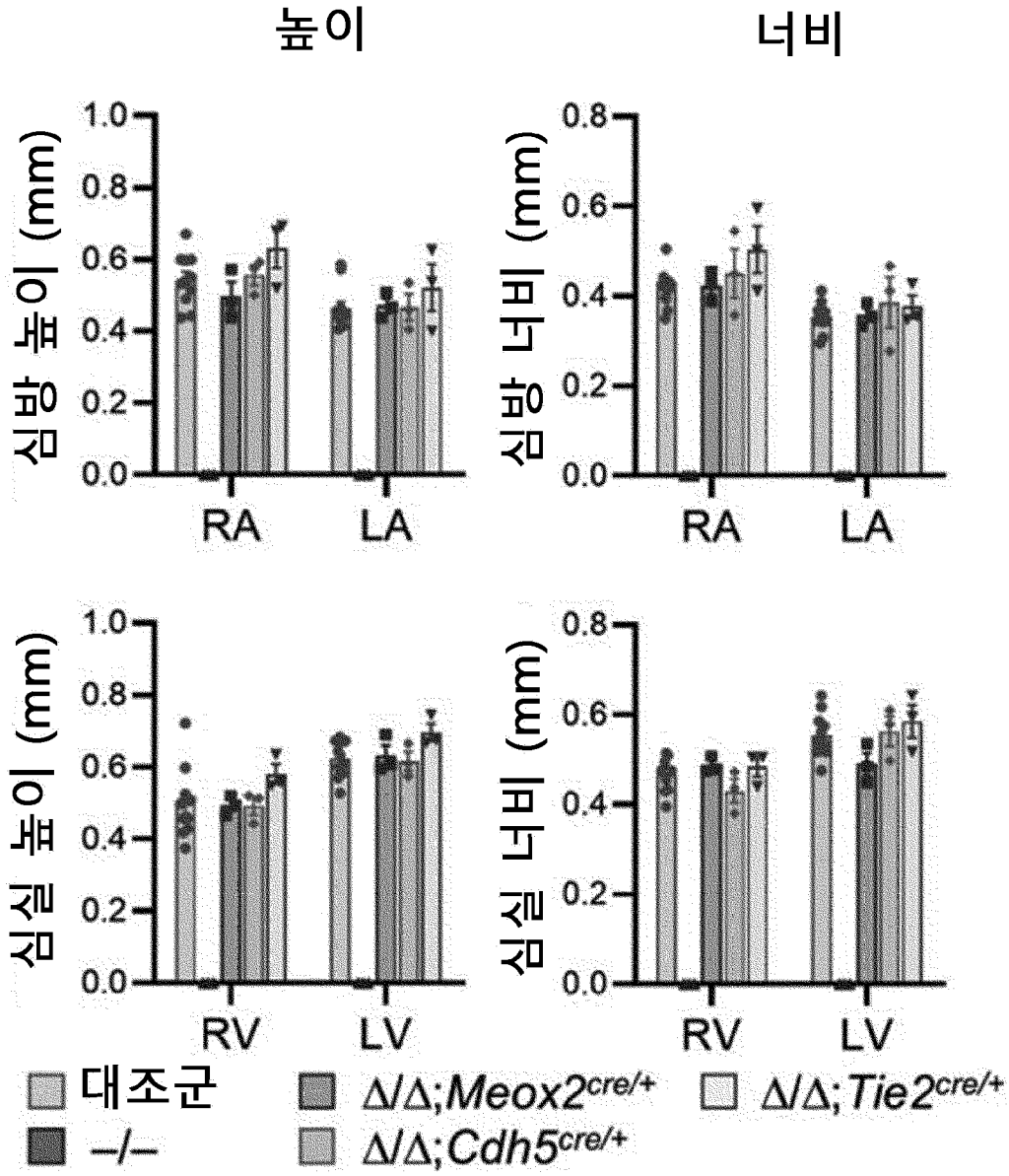

대조군
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+
–/–
Δ/Δ;Cdh5cre/+
심근 증식 및 소포화
상대적 발현
Dll4
Jag1
Nrg1
Bmp10
Fgf9
심장교양질 합성
상대적 발현
Vcan
Has2
Ugdh
심장교양질 분해
Relative expression
Adamts1
Adamts2
Adamts3
Adamts4
Adamts5
Adamts9
Timp3

[도19a]

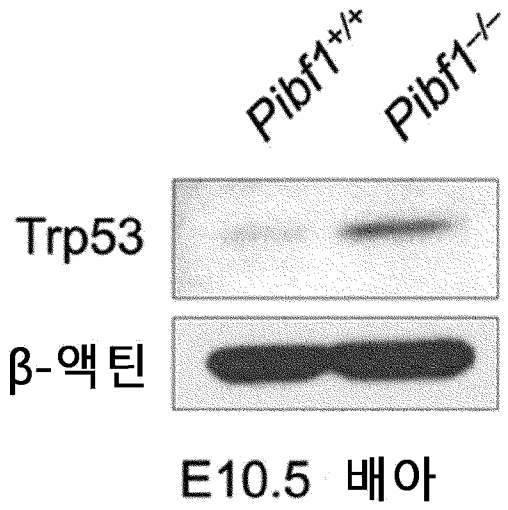


배아기 10.5 심장

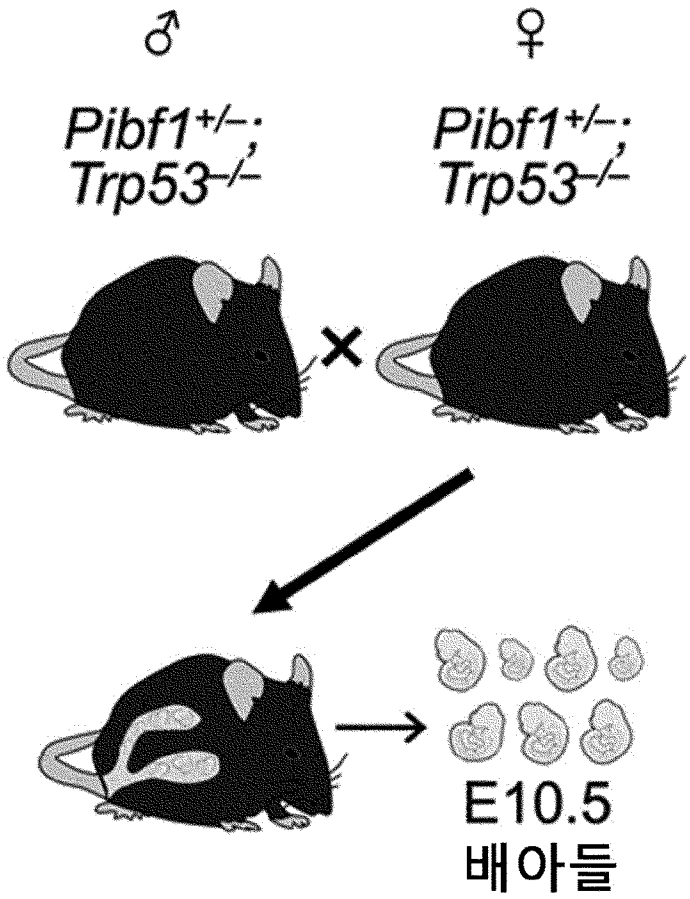
[도19b]


높이
너비
심방 높이 (mm)
심방 너비 (mm)
심실 높이 (mm)
심실 너비 (mm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
RA
LA
RV
LV
대조군
–/–
Δ/Δ;Meox2cre/+
Δ/Δ;Cdh5cre/+
Δ/Δ;Tie2cre/+

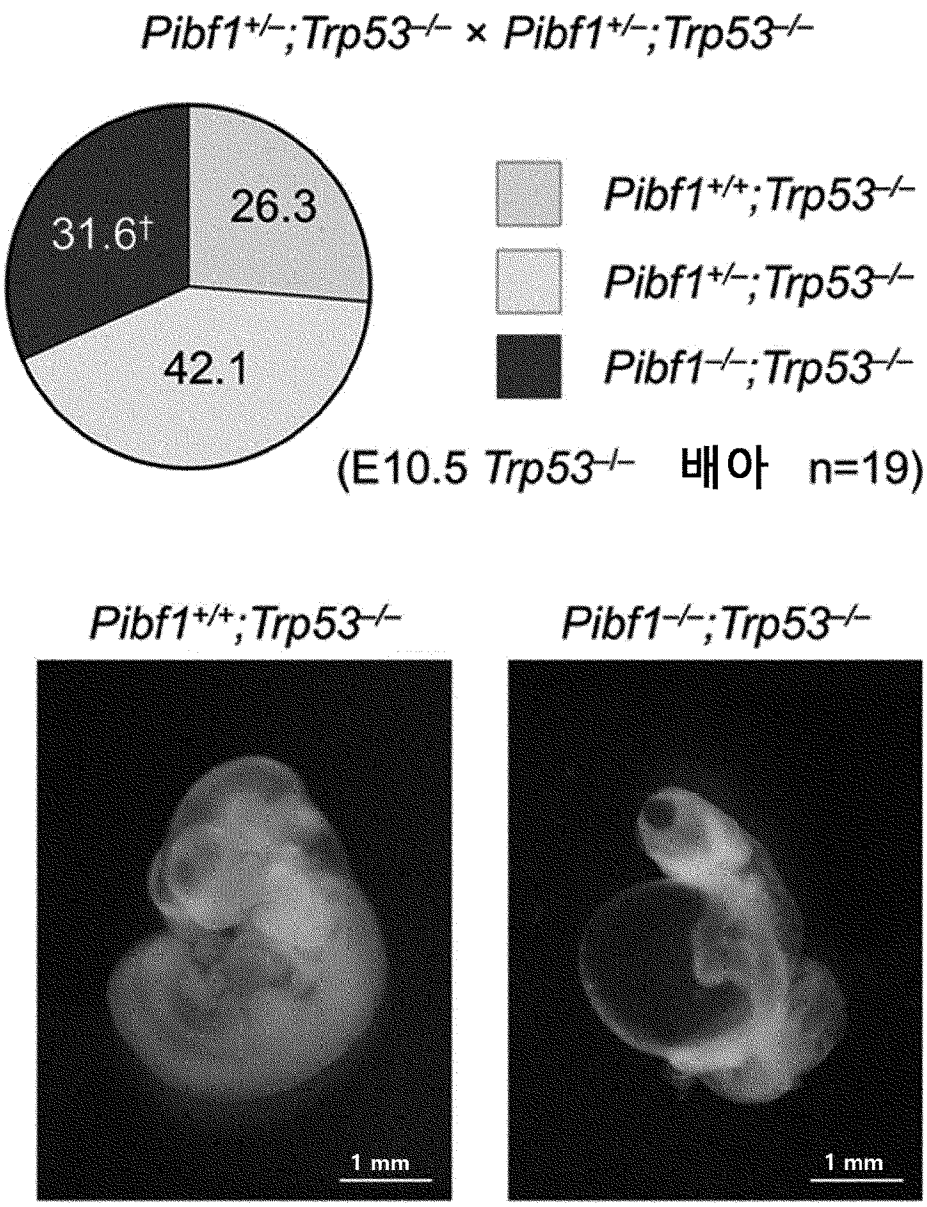
[도20a]


Pibf1+/+
Pibf1–/–
Trp53
β-액틴
E10.5 배아

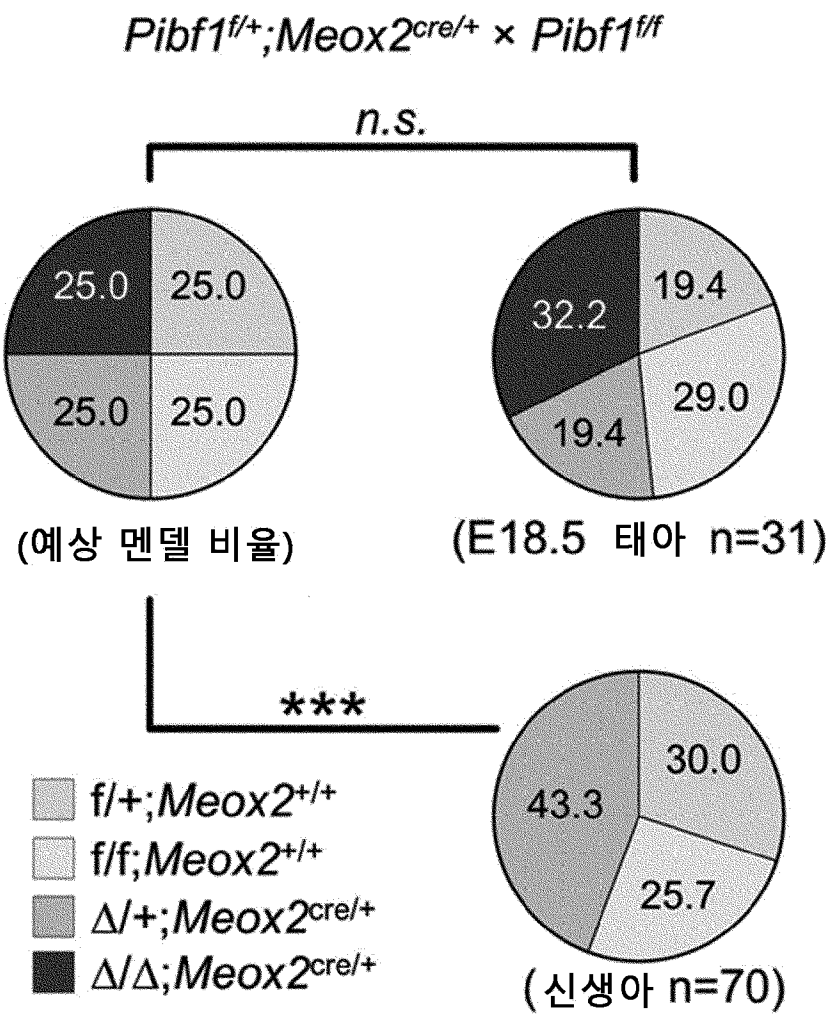
[도20b]



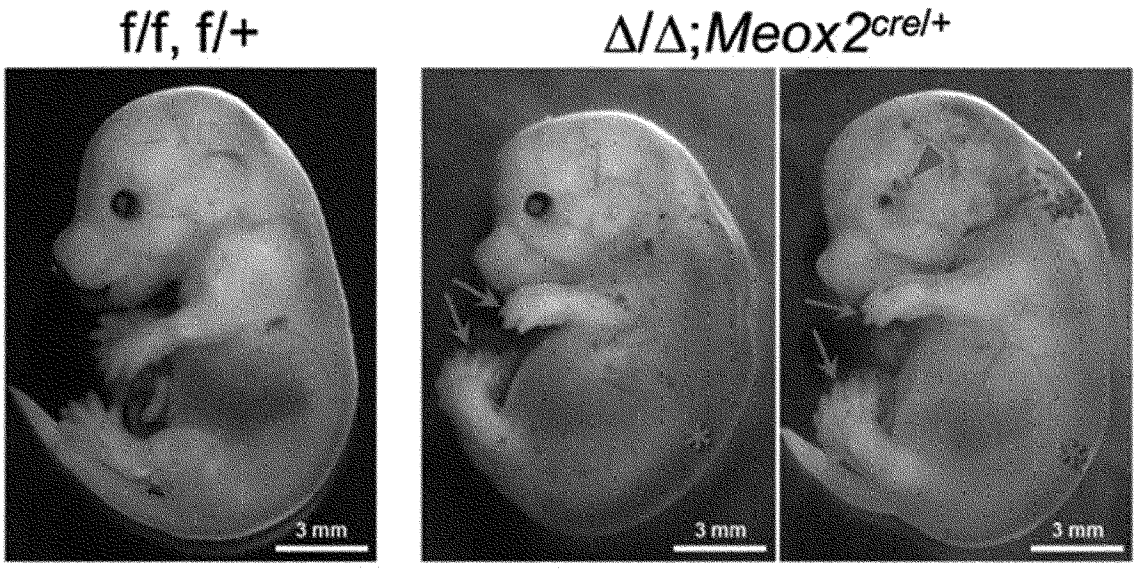
[도20c]


Pibf1+/–;Trp53–/– × Pibf1+/–;Trp53–/–
31.6†
26.3
42.1
Pibf1+/+;Trp53–/–
Pibf1+/–;Trp53–/–
Pibf1–/–;Trp53–/–
(E10.5 Trp53–/– 배아 n=19)
Pibf1+/+;Trp53–/–
Pibf1–/–;Trp53–/–
1 mm
1 mm

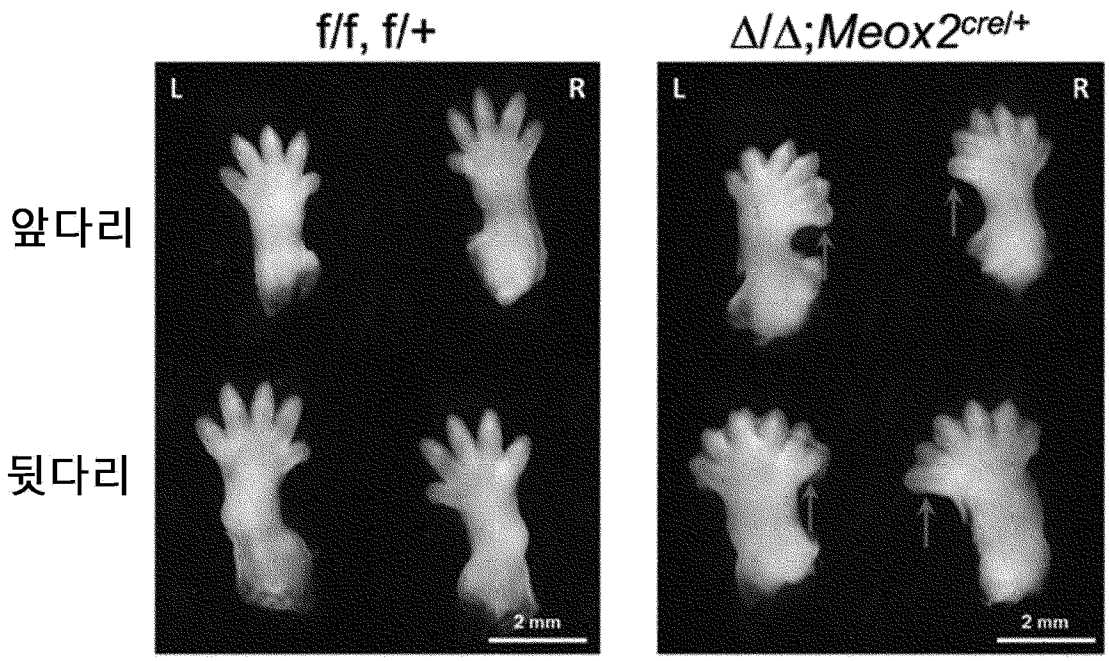
[도20d]


Pibf1f/+;Meox2cre/+ × Pibf1f/f
n.s.
25.0
25.0
25.0
25.0
(예상 멘델 비율)
32.2
19.4
29.0
19.4
(E18.5 태아 n=31)
***
f/+;Meox2+/+
f/f;Meox2+/+
Δ/+;Meox2cre/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
30.0
43.3
25.7
(신생아 n=70)

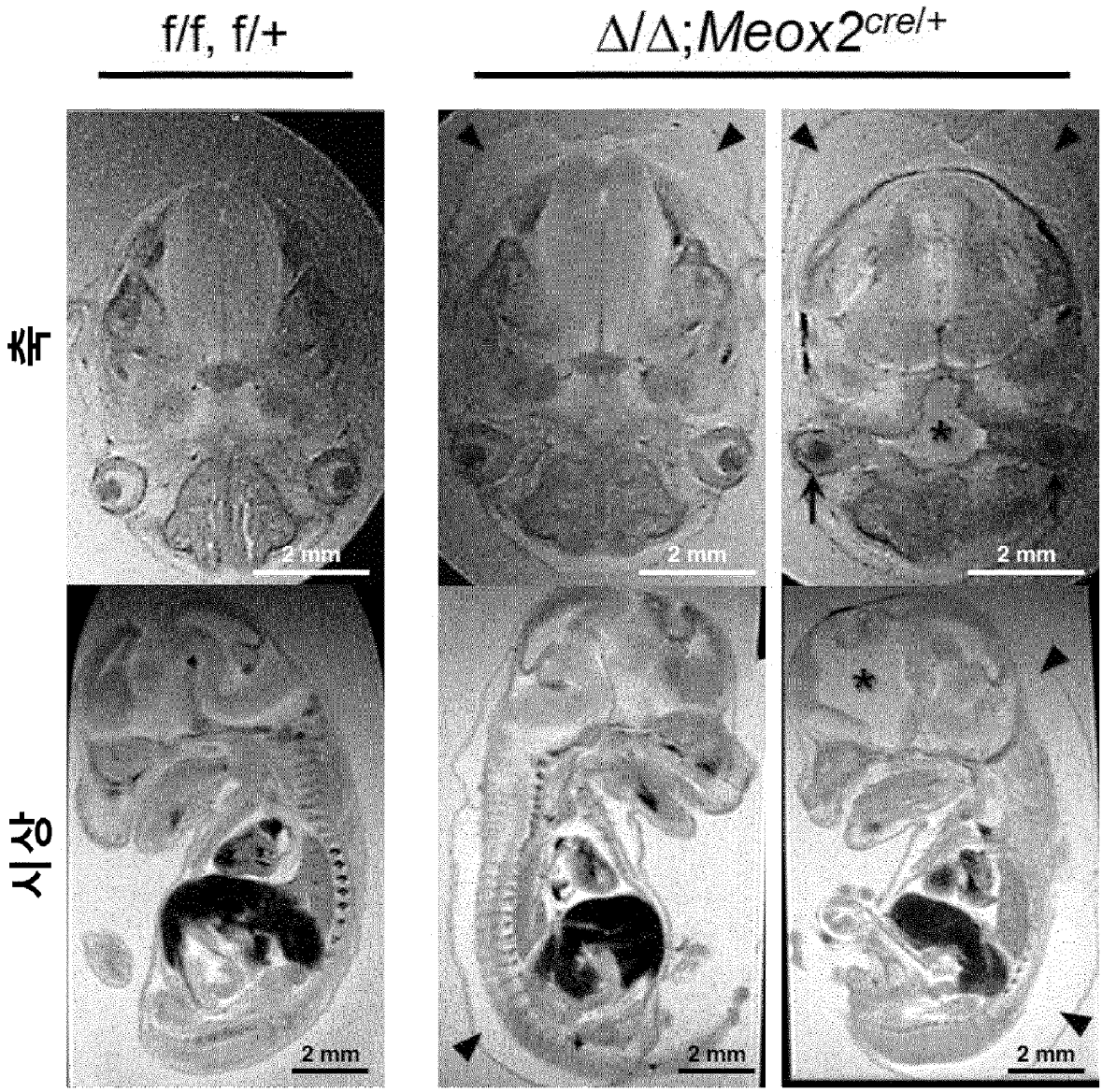
[도20e]


f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
3 mm
3 mm
3 mm

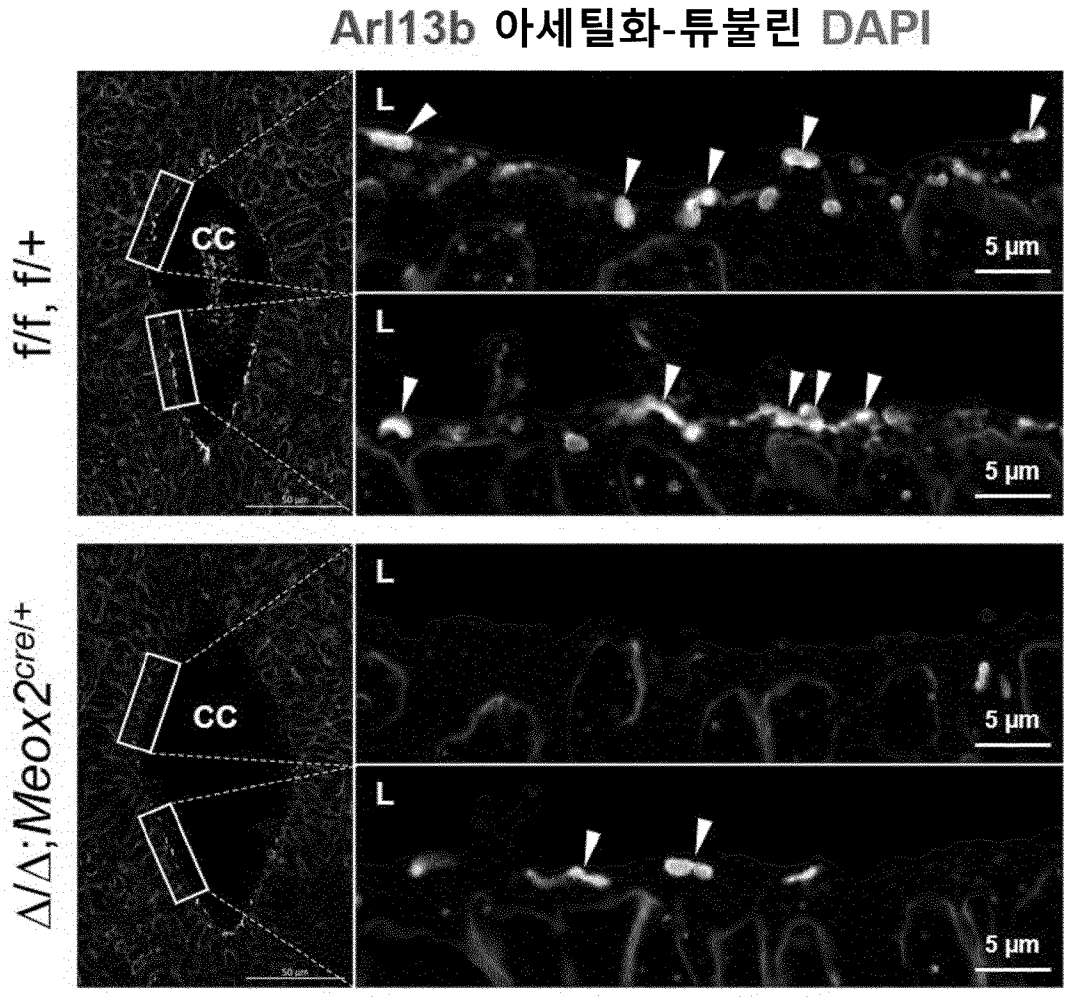
[도20f]



[도20g]

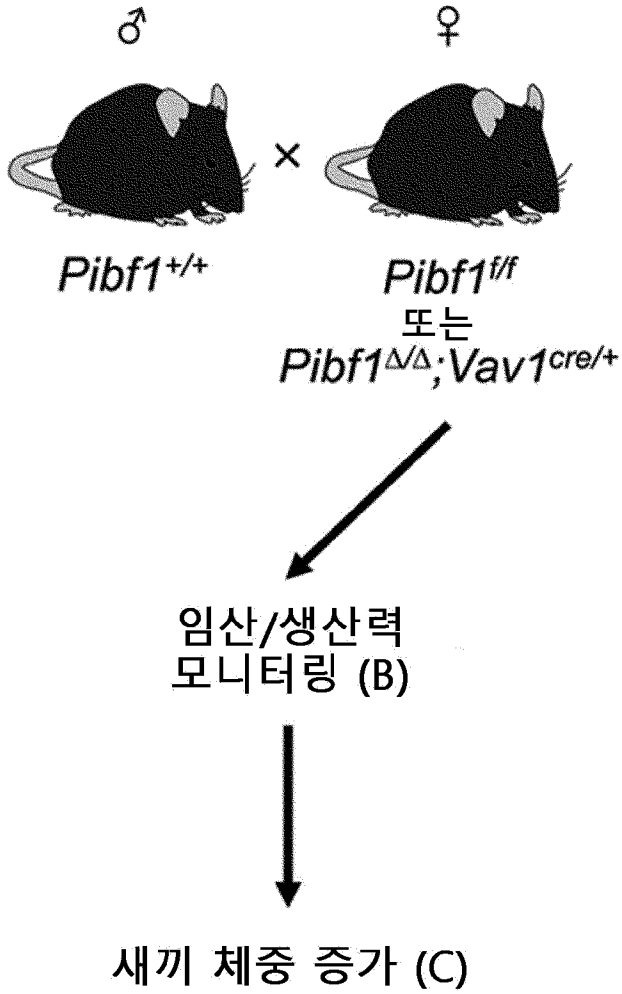


[도20h]

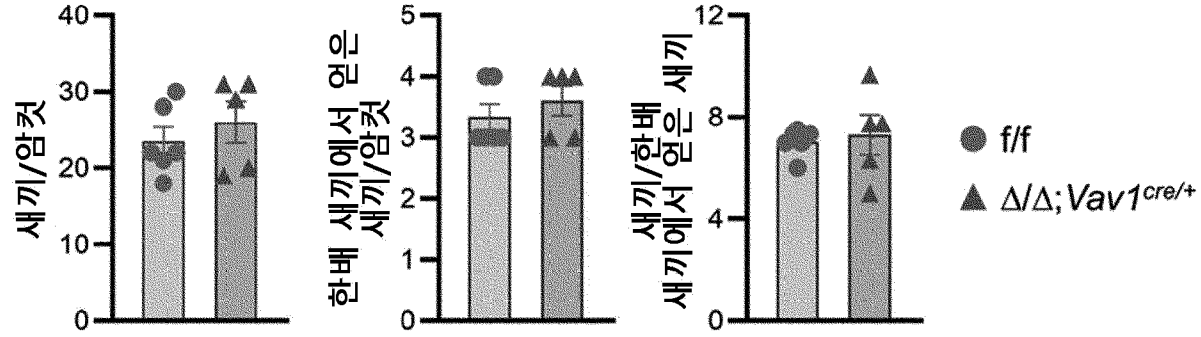

Arl13b 아세틸화-튜불린 DAPI
f/f, f/+
Δ/Δ;Meox2cre/+
CC
CC
L
L
L
L
5 μm
5 μm
5 μm
5 μm

E15.5 척수

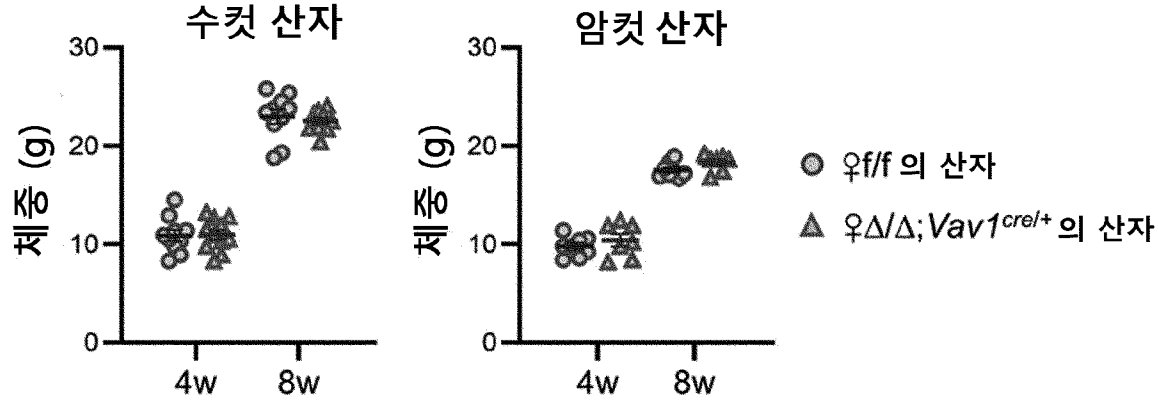
[도21a]



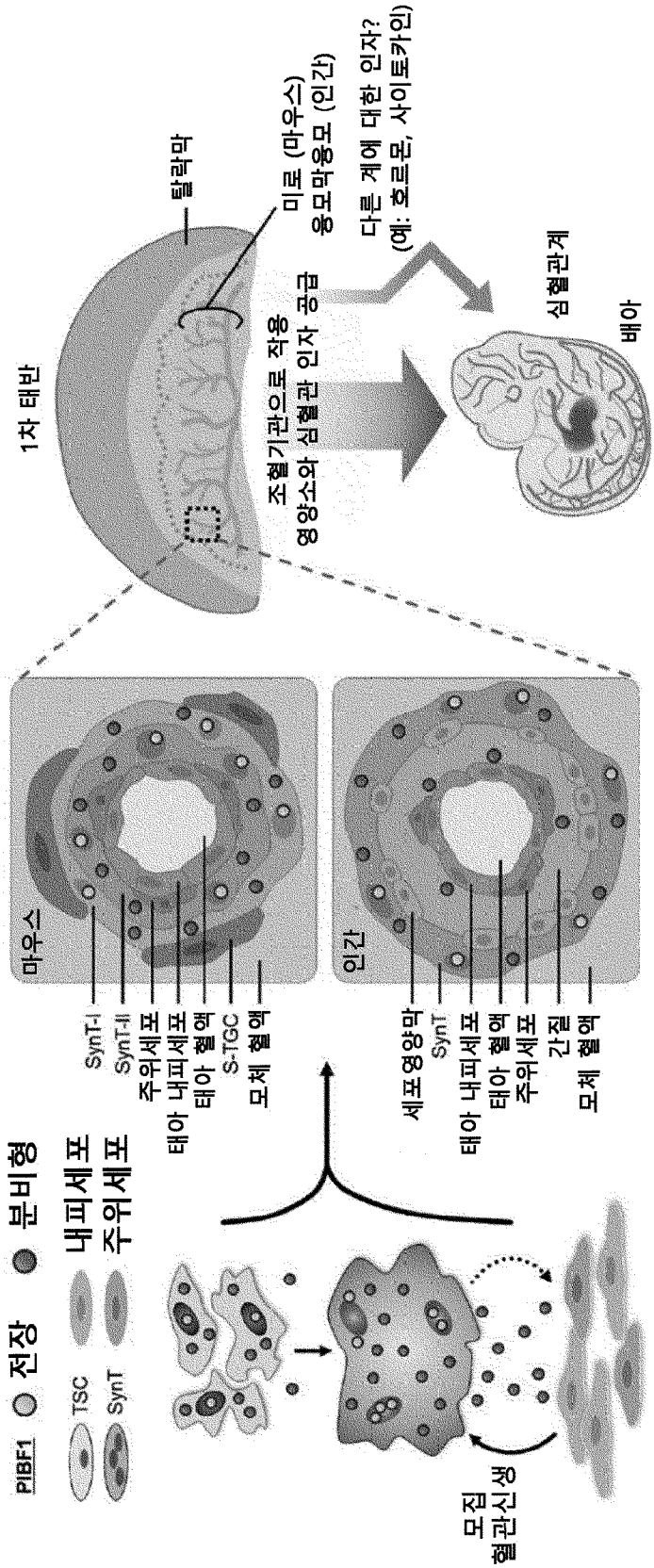
[도21b]



[도21c]



[도22]


1차 태반
탈락막
미로 (마우스)
융모막융모 (인간)
다른 계에 대한 인자?
(예: 호르몬, 사이토카인)
조혈기관으로 작용
영양소와 심혈관 인자 공급
심혈관계
배아
마우스
인간
SynT-I
SynT-II
주위세포
태아 내피세포
태아 혈액
S-TGC
모체 혈액
세포영양막
SynT
태아 내피세포
태아 혈액
주위세포
간질
모체 혈액
PlBF1
전장
분비형
내피세포
주위세포
TSC
SynT
모집
혈관신생

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 49/00(2006.01); G01N 33/48(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: PIBF1(progesterone immunomodulatory binding factor 1), 단백질(protein), 태반(placenta), 태아(fetus), 임신합병증(pregnancy complications), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 유산(abortion), 자간전증(pre-eclampsia)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018-0055910 A1 (WAYNE STATE UNIVERSITY) 01 March 2018 (2018-03-01) See abstract; claims 1, 2 and 19; paragraph [0089]; SEQ ID NO: 1; and figure 4H.	1-9
Y	US 8586006 B2 (HOOD, L. et al.) 19 November 2013 (2013-11-19) See column 137, fifth paragraph; column 157, fourth paragraph and column 158, third paragraph; and SEQ ID: 3013.	1-9
A	SZEKERES-BARTHO, J. et al. Biologia futura: embryo-maternal communication via progesterone-induced blocking factor (PIBF) positive embryo-derived extracellular vesicles. Their role in maternal immunomodulation. Biologia Futura. 2021, vol. 72, pp. 69-74. See pages 70 and 73.	1-9
A	WO 2022-040187 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 24 February 2022 (2022-02-24) See abstract; and claim 1.	1-9

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 December 2024	**09 December 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012644

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005-0222029 A1 (BARTEL, P. et al.) 06 October 2005 (2005-10-06) See claim 1.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012644

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/012644

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **10-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10-18 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/012644

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2018-0055910 A1	01 March 2018	US 10391148 B2	27 August 2019
US 8586006 B2	19 November 2013	AU 2007-284651 A1	21 February 2008
		AU 2007-284651 B2	20 March 2014
		CA 2660286 A1	21 February 2008
		EP 2057465 A2	13 May 2009
		EP 2520935 A3	13 February 2013
		JP 2010-500568 A	07 January 2010
		JP 5244103 B2	24 July 2013
		US 2012-0087862 A1	12 April 2012
		US 2014-0106981 A1	17 April 2014
		WO 2008-021290 A2	21 February 2008
		WO 2008-021290 A3	13 November 2008
		WO 2008-021290 A9	16 April 2009
WO 2022-040187 A1	24 February 2022	CA 3189254 A1	24 February 2022
		EP 4196601 A1	21 June 2023
		EP 4196601 A4	17 July 2024
		US 2023-0296622 A1	21 September 2023
		WO 2022-040187 A9	19 May 2022
US 2005-0222029 A1	06 October 2005	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012644

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 49/00(2006.01); G01N 33/48(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PIBF1(progesterone immunomodulatory binding factor 1), 단백질(protein), 태반(placenta), 태아(fetus), 임신합병증(pregnancy comlications), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 유산(abortion), 자간전증(pre-eclampsia)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2018-0055910 A1 (WAYNE STATE UNIVERSITY) 2018.03.01 요약; 청구항 1, 2, 19; 단락 [0089]; 서열번호 1; 도면 4H	1-9
Y	US 8586006 B2 (HOOD, L. 등) 2013.11.19 컬럼 137, 다섯 번째 단락; 컬럼 157, 네 번째 단락; 컬럼 158, 세 번째 단락; 서열번호 3013	1-9
A	"SZEKERES-BARTHO, J. 등", "Biologia futura: embryo-maternal communication via progesterone-induced blocking factor (PIBF) positive embryo-derived extracellular vesicles. Their role in maternal immunomodulation", Biologia Futura, 2021, 72권, 페이지 69-74 페이지 70, 73	1-9
A	WO 2022-040187 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2022.02.24 요약; 청구항 1	1-9
A	US 2005-0222029 A1 (BARTEL, P. 등) 2005.10.06 청구항 1	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년12월09일(09.12.2024)	**2024년12월09일(09.12.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012644

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/012644

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **10-18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 10-18은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/012644

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0055910 A1	2018/03/01	US 10391148 B2	2019/08/27
US 8586006 B2	2013/11/19	AU 2007-284651 A1	2008/02/21
		AU 2007-284651 B2	2014/03/20
		CA 2660286 A1	2008/02/21
		EP 2057465 A2	2009/05/13
		EP 2520935 A3	2013/02/13
		JP 2010-500568 A	2010/01/07
		JP 5244103 B2	2013/07/24
		US 2012-0087862 A1	2012/04/12
		US 2014-0106981 A1	2014/04/17
		WO 2008-021290 A2	2008/02/21
		WO 2008-021290 A3	2008/11/13
		WO 2008-021290 A9	2009/04/16
WO 2022-040187 A1	2022/02/24	CA 3189254 A1	2022/02/24
		EP 4196601 A1	2023/06/21
		EP 4196601 A4	2024/07/17
		US 2023-0296622 A1	2023/09/21
		WO 2022-040187 A9	2022/05/19
US 2005-0222029 A1	2005/10/06	없음	