

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-511253
(P2004-511253A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 5 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 185 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-536334 (P2002-536334)
 (86) (22) 出願日 平成13年10月19日 (2001.10.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年4月21日 (2003.4.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2001/000695
 (87) 国際公開番号 W02002/032953
 (87) 国際公開日 平成14年4月25日 (2002.4.25)
 (31) 優先権主張番号 PA 2000 01571
 (32) 優先日 平成12年10月20日 (2000.10.20)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)
 (31) 優先権主張番号 60/241,840
 (32) 優先日 平成12年10月20日 (2000.10.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

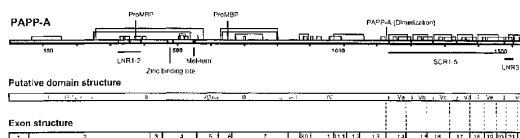
(71) 出願人 503148155
 コモ・バイオテック・アンパルトセルスカ
 ブ
 Como Biotech ApS
 デンマーク、デーコー 8000オールフ
 ス・セ、グスタフ・ヴィーズ・ヴェイ 10
 七番
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (74) 代理人 100064610
 弁理士 中嶋 正二
 (74) 代理人 100072730
 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠関連血漿蛋白-A2 (PAPP-A2)

(57) 【要約】

本発明は、妊娠関連血漿蛋白-A (PAPP-A) に対して相同性を有する新規な蛋白を同定しエンコードするヌクレオチドおよびアミノ酸配列を提供する。我々は、この蛋白を PAPP-A2 と示す。PAPP-A2 をエンコードする cDNA は、ヒト胎盤から誘導された。本発明はまた、PAPP-A2 をエンコードするヌクレオチド配列に対するアンチセンス分子、精製された PAPP-A2 の生成用の発現ベクター、PAPP-A2 に特異的に結合可能な抗体、PAPP-A2 をエンコードするヌクレオチド配列の検出用のハイブリダイゼーションプローブまたはオリゴヌクレオチド、PAPP-A2 の発現用の遺伝子改変された宿主細胞、該蛋白に特異的に結合可能な抗体を生成するための該蛋白の使用、妊娠しているまたは妊娠していない患者における、ヒト体液中の PAPP-A2 抗原または PAPP-A2 をエンコードする核酸分子の検出に基づいた病気のスクリーニング法、PAPP-A2 のプロテアーゼ活性を変える薬剤に対してスクリーニングするための該蛋白の使用、そのような薬剤に対する治療ターゲットとしての該蛋白の使用



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製ポリヌクレオチドであって、

i) 受け入れ番号 D S M 1 3 7 8 3 下の D S M Z に集積された、P A P P - A 2 のコード化配列に相当する、配列番号 1 のヌクレオチド 1 ~ 5 3 7 6 を含むポリヌクレオチド；および

ii) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド；および

iii) ポリヌクレオチド (i) または (ii) によりエンコードされたポリペプチドのフラグメントをエンコードするポリヌクレオチドであって、当該フラグメントが、

a) インシュリン様成長因子結合蛋白 5 型 (I G F B P - 5) またはその誘導体、あるいは任意の他の基質に特異的な蛋白分解活性を有し；そして / または

b) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして / または

c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリヌクレオチド；そして

iv) 相補鎖が、(i)、(ii)、および (iii) のいずれかで定義されるようなポリヌクレオチドと、厳密な条件下でハイブリダイズされるポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドが、配列番号 2 で示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのフラグメントをエンコードし、当該フラグメントが、

a) インシュリン様成長因子結合蛋白 5 型 (I G F B P - 5) またはその誘導体、あるいは任意の他の基質に特異的な蛋白分解活性を有し；そして / または

b) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして / または

c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリヌクレオチド；および

v) (iii) および (iv) のいずれかで定義されるようなポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に縮重されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

およびそのようなポリヌクレオチドの相補鎖、からなる群から選ばれる、精製ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載で、配列番号 1 に示されるようなコード化配列を含む、精製ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載で、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドをエンコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 に記載で、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントをエンコードするポリヌクレオチドであって、当該フラグメントが、

a) インシュリン様成長因子結合蛋白 5 型 (I G F B P - 5) に特異的な蛋白分解活性を有し；そして / または

b) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして / または

c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

該ポリペプチドの相補鎖が、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドと、厳密

10

20

30

40

50

な条件下でハイブリダイズする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 に記載で、請求項 3 及び 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に縮重されるヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

該ポリヌクレオチドが、請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載のポリヌクレオチドの相補鎖を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

3' 未翻訳領域、またはそのフラグメント、あるいは配列番号 1 に相当する、配列番号 1 の核酸残基 5377 ~ 8527 を含む更なるポリヌクレオチドに実施可能に結合した、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチドに実施可能に結合した発現シグナルを含む、発現ベクターの形態の組み換え DNA 分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、又は請求項 9 に記載のベクターを用いてトランスフェクト、あるいは形質転換した、宿主生体。

【請求項 11】

該生体が、哺乳類の生体である、請求項 10 に記載の宿主生体。

【請求項 12】

配列番号 2 またはそのフラグメントのアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される単離されたポリペプチドであって、当該フラグメントが、

i) インシュリン様成長因子結合蛋白 5 型 (IGFBP-5) に特異的な蛋白分解活性を有し；そして/または

ii) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして/または

iii) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリペプチド。

20

【請求項 13】

該フラグメントが、任意のプロセシング変異体を含む PAPP-A2 の成熟部分に相当する、アミノ酸残基 234 ~ 1791 を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される、請求項 12 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 14】

該フラグメントが、PAPP-A2 の prepro 部分に相当する、アミノ酸残基 1 ~ 233 を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

該フラグメントが、PAPP-A2 の pro 部分に相当する、アミノ酸残基 23 ~ 233 を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される、請求項 12 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 16】

該フラグメントが、PAPP-A2 のシグナルペプチドまたはリーダー配列に相当する、アミノ酸残基 1 ~ 22 を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 2 のアミノ酸残基 234 ~ 1791 に相当する、PAPP-A2 の成熟部分に実施可能に結合した、請求項 14 ~ 16 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 18】

該ポリペプチドが、組み換えポリペプチドである、請求項 12 ~ 17 のいずれかに記載のポリペプチド。

50

【請求項 19】

該ポリペプチドが、ヒト蛋白、または該ポリペプチドに天然に付随する他の蛋白を含まない、請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 20】

i) 請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、および / または ii) 請求項 9 に記載のベクター、および / または iii) 請求項 10 および 11 のいずれかに記載の宿主生体、および / または iv) 請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載のポリペプチドを、生理的に許容される担体と組み合わせて含む、組成物。

【請求項 21】

i) 請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、および / または ii) 請求項 9 に記載のベクター、および / または iii) 請求項 10 および 11 のいずれかに記載の宿主生体、および / または iv) 請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載のポリペプチドを、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む、医薬組成物。 10

【請求項 22】

請求項 12 に記載のポリペプチドに対して特異性を有する抗体の生成法であって、当該方法が、

- i) 宿主生体を提供し、
 - ii) その宿主生体を、請求項 10 に記載のポリペプチドを用いて免疫し、そして
 - iii) 当該抗体を得る、
- ことからなるステップを含む、方法。 20

【請求項 23】

請求項 12 に記載のポリペプチドに対して特異的な結合親和性を有する、抗体。

【請求項 24】

該抗体が、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体からなる群から選ばれる、請求項 23 に記載の抗体。

【請求項 25】

該抗体が、モノクローナルである、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

請求項 18 に記載のポリペプチドの生成法であって、当該方法が、

- i) 好適な宿主生体を提供し、 30
 - ii) ステップ i) で提供された宿主生体を、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、または請求項 9 に記載のベクターを用いてトランスフェクトまたは形質転換し、
 - iii) ステップ ii) で得られた宿主生体を該ポリヌクレオチドまたはベクターによりエンコードされたポリペプチドの発現に好適な条件下で培養し；そして所望により
 - iv) 宿主生体による組み換え発現の結果生じるポリペプチドを、その宿主生体から単離する、
- ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 27】

該宿主生体が、哺乳類細胞である、請求項 26 に記載の方法。 40

【請求項 28】

アンチセンス法を用いて、細胞中の PAPP - A2 の発現を阻害および / または減少させる方法であって、当該方法が、

- i) 請求項 7 に記載のポリヌクレオチドを提供し、
- ii) ステップ i) において提供される当該ポリヌクレオチドを用いて、PAPP - A2 を発現可能な細胞をトランスフェクトまたは形質転換し、
- iii) ステップ ii) において得られた細胞を、PAPP - A2 の発現に関与する当該細胞において、ステップ i) で提供されたポリヌクレオチドの相補的なポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションに好適な条件下で培養し、そして
- iv) 当該細胞において PAPP - A2 の発現を阻害および / または減少させる、 50

ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 29】

該アンチセンスポリヌクレオチドおよび該相補的なポリヌクレオチドが、別々のポリヌクレオチド分子から同時発現される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

個人から得た生物学的サンプルにおける PAPP - A₂ の検出法、あるいは PAPP - A₂ 量の測定法であって、当該方法が、

i) 当該個人から生物学的サンプルを得て、

ii) そのサンプルにおいて、

a) 請求項 12 に記載のポリペプチド；および/または

b) PAPP - A₂ 発現に由来する mRNA 形態のポリヌクレオチド、および/または

c) 好ましくは IGFBP - 5、その誘導体の開裂、または PAPP - A₂ に対する他の任意の好適な基質を検出することによる、PAPP - A₂ 特異的プロテアーゼ活性、

を検出することによりサンプル中の PAPP - A₂ を検出する、

ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 31】

該方法が、ステップ ii) で検出された PAPP - A₂ または PAPP - A₂ 量を、

i) 予め決められた PAPP - A₂ の量および/または濃度；および/または ii) 予め決められた PAPP - A₂ mRNA の量および/または濃度；および/または

iii) 予め決められた PAPP - A₂ 特異的なプロテアーゼ活性、

からなる群から選ばれる予め決められた値と比較することからなるステップを更に含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

該予め決められた値が、当該個人の正常な健康状態を示す、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

該生物学的サンプルが、血液、尿、胸腔内液、口腔洗浄液、組織バイオパシー、および卵胞液からなる群から選ばれる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

該 PAPP - A₂ 量が、PAPP - A₂ 特異的プロテアーゼ活性として測定される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

該 PAPP - A₂ 量が、PAPP - A₂ 蛋白の量として測定される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 36】

該 PAPP - A₂ 量が、PAPP - A₂ のメッセンジャー RNA の量として測定される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 37】

該 PAPP - A₂ 蛋白量が、免疫化学的分析により測定される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

該 PAPP - A₂ 蛋白量が、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体により検出される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

該 PAPP - A₂ 蛋白が、少なくとも 1 つ更なる成分を含む複合体、好ましくはポリペプチドにおいて検出される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 40】

該 PAPP - A₂ が、PAPP - A₂ 単量体として検出される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 41】

該 PAPP - A₂ が、PAPP - A₂ 二量体として検出される、請求項 30 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 4 2】

個人における病態の診断法であって、当該方法が、
i) 請求項 3 0 ~ 4 1 のいずれかに記載の方法を実施し、そして
i i) その病態を診断する、
ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 4 3】

該病態が、胎児異常である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

該胎児異常が、トリソミー 2 1、トリソミー 1 8、トリソミー 1 3、および開放型二分脊椎からなる群から選ばれる、請求項 4 3 に記載の方法。 10

【請求項 4 5】

該胎児異常が、子宮外妊娠、開放型二分脊椎、神経管閉鎖障害、腹部壁欠損、E d w a r d s 症候群、P a t e a u s 症候群、T u r n e r 症候群、モノソミー X、または K l e i n - f e l t e r ' s 症候群である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

該病態が、成長促進状態および成長阻害状態からなる群から選ばれる異常な成長状態である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

該病態が、再狭窄、アテローム性心筋梗塞、創傷治癒、線維症、心筋梗塞、骨粗鬆症、リュウマチ性関節炎、多発性骨髄腫、または癌からなる群から選ばれる、請求項 4 6 に記載の方法。 20

【請求項 4 8】

生物学的サンプルにおける請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現検出法であって、当該方法が：

i) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを推定で含有する生物学的サンプルを提供し、そして

i i) その生物学的サンプルを、i) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドに相補的な、および i i) それとハイブリダイズ可能な、鎖を含むポリヌクレオチドと接触させ、そして
i i i) ハイブリダイゼーションが起こさせ、そして 30

i v) ステップ i i i) で得られたハイブリダイゼーション複合体を検出する、
ことからなるステップを含み、

該ハイブリダイゼーション複合体の存在が、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、またはそのフラグメントの生物学的サンプルにおける発現を示している、方法。

【請求項 4 9】

P A P P - A 2 のプロテアーゼ活性を阻害する薬剤の同定法であって、当該方法が、

i) a) 請求項 1 2 に記載のポリペプチド、および b) 当該ポリペプチドに対して予め決められた基質、および c) 推定の阻害剤をインキュベートし、そして

i i) 該基質の蛋白分解が阻害されるかどうかを決定する、

ことからなるステップを含む、方法。 40

【請求項 5 0】

該基質が、ポリペプチドを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

該基質が、内部でクエンチングする蛍光性ペプチドを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

該基質が、I G F B P - 5 またはそのフラグメントを含むか、あるいはそれから本質的に構成される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

請求項 4 9 ~ 5 2 のいずれかの方法のいずれかに従って得られる、阻害剤。

【請求項 5 4】

病態の処置を必要とする個体においてその病態を処置するための薬物の製造における、請求項 5 3 に記載の阻害剤の使用。

【請求項 5 5】

P A P P - A 2 のプロテアーゼ活性を促進する薬剤の同定法に関し、当該方法が、
i) a) 請求項 1 2 に記載のポリペプチド、および b) 当該ポリペプチドに対して予め決められた基質、および c) 推定の促進剤をインキュベートし、そして
i i) 該基質の蛋白分解が促進されるかどうかを決定する、
ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 5 6】

該基質が、ポリペプチドを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

該基質が、内部でクエンチングする蛍光性ペプチドを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

該基質が、I G F B P - 5 またはそのフラグメントを含むか、あるいはそれから本質的に構成される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 9】

請求項 5 4 ~ 5 7 のいずれかの方法のいずれかに従って得られる、促進剤。

【請求項 6 0】

病態の処置を必要とする個体においてその病態を処置するための薬物の製造における、請求項 5 9 に記載の促進剤の使用。

20

【請求項 6 1】

個体の治療による処置法であって、当該方法が、i) 請求項 2 1 に記載の医薬組成物、および / または i i) 請求項 5 3 に記載の阻害剤、および / または請求項 5 9 に記載の促進剤を、当該個人に投与することからなるステップを含む、方法。

【請求項 6 2】

P A P P - A 2 または P A P P - A 2 の他の蛋白との複合体の精製法であって、当該方法が、

i) 請求項 1 2 に記載のポリペプチドに対して特異的な結合親和性を有するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を提供し、そして

i i) P A P P - A 2 をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する、ことからなるステップを含む、方法。

30

【請求項 6 3】

個人における該病態の診断法、または当該病態の素因の診断法であって、当該方法が、

a) 当該個人からの体液サンプルを提供し ; そして

b) 当該組体液サンプル中の P A P P - A / p r o M B P、P A P P - A 2 / p r o M B P、P A P P - A / P A P P - A 2、P A P P - A / P A P P - A 2 / p r o M B P、p r o M B P / A N G、および p r o M B P / A N G / C 3 d g からなる群から選ばれる複合体の量を測定し ; そして

c) 病態または病態の素因を診断 (予め決められた値より上または下の複合体量が病態または病態の素因を示す) する、

40

ことからなるステップを含む、方法。

【請求項 6 4】

哺乳類の胎児における病態を診断法、または当該病態の素因の診断法であって、当該方法が、

a) 当該胎児の母親からの体液サンプルを提供し ; そして

b) 当該体液サンプル中の P A P P - A / p r o M B P、P A P P - A 2 / p r o M B P、P A P P - A / P A P P - A 2、P A P P - A / P A P P - A 2 / p r o M B P、p r o M B P / A N G、および p r o M B P / A N G / C 3 d g からなる群から選ばれる複合体の量を測定し ; そして

c) 病態または病態の素因を診断 (予め決められた値より上または下の複合体量が病態ま

50

たは病態の素因を示す)する、
ことからなるステップを含む、方法。

【請求項65】

該病態が、ダウン症、子癇前症、および不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群からなる群から選ばれる、請求項63および64のいずれかに記載の方法。

【請求項66】

該複合体が、PAPP-A/promBPであって、該病態が、ダウン症、および不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群から選ばれる、請求項63および64のいずれかに記載の方法。

【請求項67】

該複合体が、promBP/ANGであって、該病態が、ダウン症である、請求項63および64のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明の属する分野

本発明は、妊娠関連血漿蛋白-A(PAPP-A)と相同性のある新規なポリペプチドに関する。本発明に記載の新規なポリペプチドは、PAPP-A₂と示す。本発明は更に、そのようなポリペプチドまたはそのフラグメントをエンコードする核酸配列を含む新規なポリヌクレオチドに関する。

本発明は更に、本明細書の以下で定義されるような、新規なポリヌクレオチド(そのフラグメントを含む)を用いる方法、および当該ポリヌクレオチドから生成可能な新規なポリペプチドの使用法に関する。

【0002】

本発明は、組み換えPAPP-A₂の発現と精製、およびPAPP-A₂に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の生成、そしてヒトの組織または体液由来の天然のPAPP-A₂の精製にも関する。

更なる態様において、本発明は、病理的状态に対するマーカーとして、および妊娠している、ならびに妊娠していない個人のPAPP-A₂の蛋白分解活性を改変する薬物に対する治療的ターゲットとしてのPAPP-A₂の使用に関する。

【0003】

本発明の背景

妊娠関連血漿蛋白-A(PAPP-A)

PAPP-Aは、1974年に初めて妊婦の血清から胎盤起源と考えられる他の蛋白と一緒に単離された(Lin et al., 1974, Am J Obstet Gynecol 118, 223-36)。血清中濃度は、妊娠の終了時には約50mg/リットルに達する(Folkersen et al., 1981, Am J Obstet Gynecol 139, 910-4; Oxvig et al., 1995, J Biol Chem 270, 13645-51)。PAPP-Aは、高分子量のホモ四量体として最初の特徴付けられた(Bischof, 1979, Arch Gynecol 227, 315-26; Lin et al., 1974, Am J Obstet Gynecol 118, 223-36; Sinosich, 1990, Electrophoresis 11, 70-8)が、今やPAPP-Aは、主として妊婦の血清および血漿に、好酸球主要塩基性蛋白のプロフォーム(promBP)との共有結合性のヘテロ四量体の2:2の複合体、PAPP-A/promBPとして存在することが実証されている(Oxvig et al., 1993, J Biol Chem 268, 12243-6)。妊婦の血清および血漿中において僅か約1%のPAPP-Aが、最近実証されるように(Overgaard et al., 2000, J Biol Chem)ホモ二量体として存在する。PAPP-A/promBP複合体の存在は、精製されたPAPP-A/promBPの消化から、ジスルフィド結合によって相互に結合されたPAPP-AおよびpromBPペプチドの単離により一部分は明らかとなった(Oxvig et al.

10

20

30

40

50

. , 1993 , J Biol Chem 268 , 12243 - 6) 。

【0004】

PAPP - A / proMBP 複合体のサブユニットは、ジスルフィド結合の還元および変性により不可逆的に分離可能である (Oxvig et al. , 1993 , J Biol Chem 268 , 12243 - 6) 。 SDS - PAGE を還元すると、PAPP - A サブユニットは、見かけの分子量が 200 kDa であり (Oxvig et al. , 1994 , Biochim Biophys Acta 1201 , 415 - 23) 、その 1547 残基の配列は、クローニングした cDNA から分かる (Kristensen et al. , 1994 , Biochemistry 33 , 1592 - 8) 。 PAPP - A は、80 残基の pre - pro 片 (Haaning et al. , 1996 , Eur J Biochem 237 , 159 - 63) を含む、pre - pro 蛋白 (pre pro PAPP - A) として合成される。PAPP - A と広範に相同性のある蛋白は、文献上では報告されていないが、PAPP - A は、482 ~ 492 位に伸長した亜鉛結合モチーフ (HEXXHXXGXH) (Kristensen et al. , 1994 , Biochemistry 33 , 1592 - 8 に従ってナンバリングしたもの) を含む配列モチーフを含有する。このモチーフおよび構造的に重要なメチオニン残基 (PAPP - A において 556 位の残基と考えられている) は、厳密には亜鉛ペプチダーゼのスーパーファミリーであるメトジンシン (metzincins) : astacins、adamalysins (または reprolysins)、serralysins、および matrixins (マトリックスメタロプロテアーゼまたは MMP ' s) 内に保持されている (Bode et al. , 1993 , FEBS Lett 331 , 134 - 40 ; Stocker et al. , 1995 , Protein Sci 4 , 823 - 40) 。

【0005】

ProMBP サブユニットは、23 kDa の計算されたペプチド質量を有する (Barker et al. , 1988 , J Exp Med 168 , 1493 - 8 ; McGrogan et al. , 1988 , J Exp Med 168 , 2295 - 308) 。 しかしながら SDS - PAGE において、proMBP は、おそらくその強力で異常なグリコシル化 (Oxvig et al. , 1994 , Biochem Mol Biol Int 33 , 329 - 36 ; Oxvig et al. , 1994 , Biochim Biophys Acta 1201 , 415 - 23) のために、クマシー染色したゲルでは見ることのできない 50 ~ 90 kDa のスミア (smear) として移動している (Oxvig et al. , 1993 , J Biol Chem 268 , 12243 - 6) 。 PAPP - A および proMBP は双方とも、インサイツハイブリダイゼーションにより示されるように (Bonno et al. , 1994 , Lab Invest 71 , 560 - 6) 妊娠中に胎盤においてであるが、主に異なる種類の細胞において生成される。RT - PCR による分析により、PAPP - A および proMBP の双方の mRNA が、胎盤中よりは量は少ないけれども、数種の生殖および非生殖組織中に存在することが明らかになった (Overgaard et al. , 1999 , Biol Reprod 61 , 1083 - 9) 。

【0006】

PAPP - A の臨床的用途

临床上、血清 PAPP - A 量の低下は、ダウン症妊娠の予測値として徐々に利用されてきており (Brambati et al. , 1993 , Br J Obstet Gynaecol 100 , 324 - 6 ; Haddow et al. , 1998 , N Engl J Med 338 , 955 - 61 ; Wald et al. , 1992 , Bmj 305 , 28 ; Wald et al. , 1999 , N Engl J Med 341 , 461 - 7) 、血清 PAPP - A 量は、他の胎児異常においてもまた低下することが示されている (Biagiotti et al. , 1998 , Prenat Diagn 18 , 907 - 13 ; Spencer et al. , 2000 , Prenat Diagn 20 40

0, 411-6; Westergaard et al., 1983, Prenat Diagn 3, 225-32)。

【0007】

更に、血管形成後の冠動脈の平滑筋細胞においてはPAPP-A合成が増大し(Bayes-Genis et al., 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol、製本中)、それは、現在臨床的価値の可能性があるために評価されている。妊婦血清におけるproMBPの測定が診断的価値があることもデータは示している(Christiansen et al., 1999, Prenat Diagn 19, 905-10)。

【0008】

PAPP-Aの蛋白分解活性：IGFBP-4の開裂

ごく最近になって、PAPP-Aの推定のメタロプロテアーゼ活性が、実験で確認されている(Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53)。PAPP-Aは、ヒト線維芽細胞調整培地(HFCM)から一部分精製され、インシュリン様成長因子結合蛋白(IGFBP)-4に対する蛋白分解活性を引き起こすことが示されている。IGFBPは、そのうちの6個が示されているが、IGF-Iおよび-II活性の重要なモジュレーターである(Fowlkes, 1997, Trends Endocrinol Metab 8, 299-306; Rajaram et al., 1997, Endocr Rev 18, 801-31)。

【0009】

IGF-Iおよび-IIは、インビボおよびインビトロの双方において、強力な蛋白同化および細胞分裂作用を有する重要なポリペプチドである。IGFBP-4に結合したIGFは、そのレセプターとは相互作用できないが、その結合蛋白が開裂すると、生理活性IGFが遊離される。興味深いことに、PAPP-AによるIGFBP-4の開裂は、厳密にはIGFの存在が必要とされる(Conover et al., 1993, J Clin Invest 91, 1129-37; Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53)。PAPP-A分泌は、骨芽細胞および骨髄間質細胞から(Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53)、顆粒膜細胞から(Conover et al., 1999, J Clin Endocrinol Metab 84, 4742-5)、および血管平滑筋細胞から(Bayes-Genis et al., 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol, in press)も実証されており、これらはすべて既知のIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を有する。

【0010】

IGFBP-5

IGFBP-4と同様、IGFBP-5開裂は、多数の組織および調整培地において、同定されていないプロテアーゼにより起こると広範に報告されている(Hwa et al., 1999, Endocr Rev 20, 761-87)。

【0011】

本発明の概要

妊娠関連血漿蛋白-A2

本発明に記載の新規な核酸は、ヒト胎盤から単離され、配列決定分析により特徴付けられる。該新規なヌクレオチド配列は、新規なポリペプチド、PAPP-A2をエンコードする。

PAPP-A2のアミノ酸配列は、233残基のpre-pro片および1558残基の成熟部分から構成される。PAPP-A2の成熟部分は、PAPP-Aの成熟部分と相同する(およそ45%の同一性)が、そのprepro片は、その2つの蛋白間で全く類似性がない。PAPP-Aと同様、PAPP-A2は、それをメトジンシンスーパーファミ

10

20

30

40

50

リーの推定のメタロプロテアーゼとして分類する保存アミノ酸伸長部を含有する

【0012】

PAPP-A2は、哺乳類の発現系において発現し、PAPP-A2が活性酵素であることが実証されている。更に、PAPP-A2が、IGFBP-5、インシュリン様成長因子結合蛋白5型を開裂することが実証されている。相対的に、PAPP-AによるIGFBP-4の開裂は、以前から実証されている。

完全長の形態のPAPP-A2をエンコードする相補的DNA(cDNA)が、同定され、配列決定され、単離される。該cDNAまたはcDNAの一部が、組み換え宿主における発現のために発現ベクター中にクローニングされる。該cDNAは、組み換え完全長のPAPP-A2またはPAPP-A2フラグメントを生成するのに有益である。該cDNAおよびそれ由来の組み換えPAPP-A2蛋白は、抗体生成、診断用キット、実験用試薬、およびアッセイにおいて有益となる。

10

【0013】

該cDNAおよび組み換えPAPP-A2蛋白は、PAPP-A2機能に影響を及ぼす化合物を同定するのに使用され得る。PAPP-A2アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスミメティクスは、臨床上PAPP-A2蛋白の発現を減少させ、それによりPAPP-Aの効果にアンタゴニストとして作用するために有益となり得る。同様に、PAPP-2コード化配列は、遺伝子治療に対して、ターゲット細胞中にPAPP-A2を導入し、それによりPAPP-A2の効果を進ませるために使用可能である。

【0014】

本発明は更に、細胞中のIGFBP-5蛋白分解活性の減少または削減に対する治療的ターゲットとして使用されるPAPP-A2に関する。

診断の目的でのPAPP-A2の使用法を提供することが、更なる本発明の目的である。本発明の他の特徴および利点は、以下に続く図面およびその説明、以下に続く詳細な説明、および請求項から明らかとなるであろう。

20

【0015】

定義

本明細書で使用されるように、PAPP-A2とは、本明細書に定義されるような図1に示されるアミノ酸配列(配列番号2)を有する単離されたPAPP-A2ポリペプチドまたはその変異体をいう。本発明に記載のPAPP-A2またはその変異体は、組み換えDNA技術により生成され得るか、あるいは該PAPP-A2が自然発生し得る。

ヌクレオチド配列をエンコードするPAPP-A2とは、本明細書に定義されるような図1に示される配列(配列番号1)を有する単離された核酸をいう。

30

【0016】

「活性のある」とは、任意の自然発生的なPAPP-A2の生物学的および/または免疫学的活性を保持しているPAPP-A2の形態をいう。

「自然発生的なPAPP-A2」とは、遺伝学的に作られたものではないヒト細胞より生成されたPAPP-A2をいい、特にアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化反応、脂質付加反応、アシル化、または他のポリペプチドと共有結合または非共有結合性の複合形態を含むがそれに限定されない、ポリペプチドの翻訳後修正により生ずる様々なPAPP-A2が考えられる。

40

【0017】

「単離されたポリペプチド」とは、ある蛋白質、あるいはその変異体またはフラグメントであり、蛋白質化学の分野においては既知の常法により評価されるように特定の調製物のうち90%またはそれ以上の蛋白含量からなる。

「誘導体」とは、ユビキチン化、標識化(例えば、放射性ヌクレオチド、様々な酵素等を用いる)、ペグ化(ポリエチレングリコールを用いる誘導体化)といった化学修飾により、またはオルニチンといったアミノ酸の挿入(または化学合成によるアミノ酸の置換)により自然発生的なPAPP-A2から誘導されるポリペプチドをいい、これは通常ヒト蛋白では生じない。

50

【0018】

「組み換え変異体」とは、組み換えDNA技術により作られた、アミノ酸の挿入、欠失、および置換による自然発生的なPAPP-A2とは異なる任意のポリペプチドをいう。どのアミノ酸残基が、蛋白分解活性または細胞接着性といった目的の活性を失うことなく、置換されたり、付加されたり、欠失されたりし得るかを決定する際の情報は、例えば構造的に類似の蛋白（例えば、他のメトジンシンファミリープテアーゼ）を用いて、既知のジスルフィド構造からなる局部的に相同する蛋白を用いて、または二次構造の予測により、PAPP-A2の一部分の配列を比較することにより見出し得る。

【0019】

好ましくは、アミノ酸「置換」は、限定ではないが、ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの置換、アスパラギン酸のグルタミン酸との置換、あるいはスレオニンのセリンとの置換といった、すなわち1つのアミノ酸を類似の構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸と置換、すなわち同類アミノ酸置換の結果である。本明細書で使用されるような「置換」なる用語の意味の範囲にある更なる例示および定義は、本明細書の以下の本発明の詳細な説明において提供されている。

【0020】

アミノ酸「挿入」または「欠失」は、典型的には約1個のアミノ酸～約20個のアミノ酸といった約1個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、例えば約1個のアミノ酸～約10個のアミノ酸といった約1個のアミノ酸～約20個のアミノ酸の範囲である。可能な変異体は、組み換えDNA技術を用いて系統的にPAPP-A2分子中にアミノ酸の挿入、欠失、または置換し、その結果生成する組み換え変異体を活性についてアッセイすることにより実験的に決定され得る。

【0021】

所望される場合、「シグナルまたはリーダー配列」は、細胞膜を通るポリペプチド（完全長のPAPP-A2、またはそのPAPP-A2ポリペプチドの一部分）を示し得る。このような配列は、本発明のポリペプチド上に天然に存在し得るか、あるいは組み換えDNA技術により異種の蛋白源から提供され得る。

【0022】

ポリペプチド「フラグメント」、「部分」、または「セグメント」とは、様々な実施態様において、少なくとも約5個のアミノ酸、しばしば少なくとも約7個のアミノ酸、典型的には少なくとも約9～13個のアミノ酸、例えば少なくとも約17個以上のアミノ酸のアミノ酸残基の伸長部である。それは、長さがインタクトなPAPP-A2までの更に長い残基の伸長部であってもよい。活性となるために、いかなるPAPP-A2ポリペプチドまたはPAPP-A2ポリペプチドフラグメントも、そのまま、あるいはキーホールリムベットヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin)といったキャリアー蛋白と結合したときに生物学的および/または免疫学的活性を呈するのに十分な長さを有さねばならない。

【0023】

「オリゴヌクレオチド」またはポリヌクレオチド「フラグメント」、「部分」、もしくは「セグメント」は、PAPP-A2ポリペプチドフラグメントの発現に有益な配列をエンコードするPAPP-A2の伸長部である。それはまた、典型的にはmRNAまたはDNA分子の関連する部分を増幅したり明らかにするためのポリメラーゼ鎖反応(PCR)またはハイブリダイゼーション法において使用可能なヌクレオチド残基の伸長部でもあり得る。特に、オリゴヌクレオチドプローブの一方または両方は、いかなる既知のまたは従来技術の分子とも同一性または相補性のないPAPP-A2の一部分と同一または相補的である配列を含むであろう。この目的で、当該オリゴヌクレオチドプローブは、一般的には約10個のヌクレオチド～50個のヌクレオチド、および好ましくは約15個のヌクレオチド～約30個ヌクレオチドを含むであろう。

【0024】

本明細書において使用されるように「動物」とは、ヒト、家庭用または農耕用（ネコ、イ

ヌ、ウシ、ヒツジ等)または試験用(マウス、ラット、ラビット等)の種を含むと定義され得る。

「組み換え」とはまた、PAPP-A2をエンコードし、組み換えDNA技術を用いて調製されるポリヌクレオチドをいい得る。PAPP-A2をエンコードするDNAは、対立遺伝子または組み換え変異体およびその突然変異体をも含み得る。

【0025】

「核酸プローブ」は、本発明により提供されるPAPP-A2をエンコードするcDNA配列をベースにして調製される。核酸プローブは、約6kbよりも少ないヌクレオチド、通常は約1kbよりも少ないヌクレオチドを有する配列部分を含む。偽陽性部を削除するために適当な試験をした後、これらのプローブをは、PAPP-A2をエンコードするmRNAが細胞または組織中に、または(Walsh et al., 1992, PCR Methods Appl 1, 241-50)に記載されるような細胞または組織から抽出した類似の染色体DNA由来の核酸配列を単離するために存在するかどうかを決定するために使用され得る。プローブは、自然発生的な、または組み換え1本または2本鎖の核酸から誘導され得るか、あるいは化学的に合成され得る。それらは、ニックトランスレーション法、Klenow フィルイン反応、PCR法、または当業者には周知の他の方法により標識され得る。本発明のプローブ、それらの調製および/または標識化は、(Sambrook et al., 1989);または(Ausubel et al., 1989)に詳しく示されている。

10

【0026】

別法としては、これらのPAPP-A2または類似のポリペプチドをエンコードする組み換え変異体を合成したり、遺伝子コード中の「重複性」を使用することにより選択したりしてもよい。様々な制限部位を提供するサイレント変化といった様々なコドン置換体が、プラスミドまたはウィルス性ベクター中へのクローニング、あるいは特定の原核または真核系統における発現を最適化するために導入されてもよい。制限されないが活性、鎖間のアフィニティー、あるいはポリペプチドの分解または代謝回転率を含む、ポリペプチドの特性を改変するために突然変異が導入されてもよい。一例としては、より小さい分子量の分子を提供するために、停止コドンヌクレオチド配列中に挿入してPAPP-A2のサイズを制限することが挙げられる。

20

【0027】

「発現ベクター」は、遺伝子のクローン化コピーの転写および適当な宿主中におけるmRNAの翻訳に必要なDNA配列として本明細書に定義されている。このようなベクターは、バクテリア、酵母、藍藻類、植物細胞、昆虫細胞、および動物細胞といった様々な宿主において、真核生物遺伝子を発現するために使用可能である。

30

本明細書で使用されるように、「抗体」なる用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびに抗原またはハプテンに結合可能なFv、Fab、F(ab)2といったそれらのフラグメントを含む。それは、従来のマウスモノクローナル抗体ならびにヒト抗体、およびヒト以外の抗体のヒト化形態を含み、そしてそれはまた、ファージ抗体ライブラリーから単離した「抗体」をも含む。

【0028】

「リボザイム」とは、RNAの特異的開裂を触媒可能な酵素のRNA分子である。リボザイム作用のメカニズムは、リボザイム分子の相補的なターゲットRNAへの配列特異的なハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断型開裂を包含する。本発明の範疇で、PAPP-A2のRNA配列のヌクレオチド鎖切断型開裂を特異的かつ効率的に触媒するハンマーヘッド型リボザイム分子が作られる。いかなる潜在的なRNAターゲット内の特異的なリボザイム開裂部位も、以下の配列、GUA、GUU、およびGUCを含むリボザイム開裂部位に対するターゲット分子をスキャンすることにより最初に同定される。いったん同定されると、開裂部位を含むターゲット遺伝子の領域に相当する15~20個の間のリボヌクレオチドからなる短いRNA配列が、オリゴヌクレオチド配列を不安定にし得る二次構造といった予測される構造特性について評価され得る。候補ターゲットの適合

40

50

性もまた、リボヌクレアーゼ蛋白アッセイを用いて、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのし易さを試験することにより評価され得る。

【0029】

発明の詳細な説明

PAPP-A2をエンコードするヌクレオチド配列の単離

本発明は1つの態様において、妊娠関連血漿蛋白-A (PAPP-A)と全体的に相同性のある蛋白をエンコードする新規なcDNA配列に関する。この蛋白は、PAPP-A2と示されている。PAPP-A2の完全なヌクレオチド配列は、ヒトの胎盤から単離されたmRNAから得られる(実施例1)。その完全なヌクレオチド配列(配列番号1)および翻訳されたPAPP-A2のアミノ酸配列(配列番号2)の両方が図1に示されている。

10

【0030】

PAPP-A2のPAPP-Aとの相同性は、図3に示すように2つのアミノ酸配列の整列化により明らかになる。PAPP-A2およびPAPP-Aは、およそ45%のアミノ酸残基を共有する。PAPP-Aの機能(Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8; Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53; Overgaard et al., 2000, J Biol Chem)に重要と考えられる配列モチーフが、PAPP-A2においても見い出されている。原則的には、PAPP-A2は、733~743位に伸張された亜鉛結合モチーフ(1文字表記により示されるアミノ酸)を含有する(図2)。このモチーフおよび構造的に重要なメチオニン残基は、厳密的には亜鉛ペプチダーゼのスーパーファミリーである、メトジンシン内に保持されている(Bode et al., 1993, FEBS Lett 331, 134-40; Stocker et al., 1995, Protein Sci 4, 823-40)。

20

【0031】

PAPP-Aと同様に、PAPP-A2は、prepro蛋白として合成される。PreproPAPP-A2は、1791個のアミノ酸を有する(図1)。PAPP-AおよびPAPP-A2のprepro部分間には、相同性はない。更に、該2つの蛋白のprepro部分は、長さにおいては有意に差はない。PAPP-A2preproペプチドは、233個の残基を有し(図3); PAPP-Apreproペプチドは、80個の残基を有する(Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63)。

30

【0032】

PAPP-A2をエンコードするヌクレオチド配列の使用

PAPP-A2(またはそのコンプリメント)をエンコードするヌクレオチド配列は、分子生物学の当業者には既知の技術において非常に多くの用途がある。これらの技術としては、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用、PCRに対するオリゴマーの構築における使用、PAPP-A2またはそのフラグメントの組み換え生成における使用、およびアンチセンスDNAまたはRNA、それらの化学的類似物(例えばPNAまたはLNA)等の産生における使用が挙げられる。本明細書において開示されるPAPP-A2をエンコードするヌクレオチドの使用は、既知の技術の例示であり、当業者には既知のいかなる技術の使用をも制限する意図はない。更に、本明細書において開示されるヌクレオチド配列は、新しい技術が、例えば、3つの遺伝子コード、特異的塩基対の相互作用が現在既知であるヌクレオチド配列の特性次第であるならば、まだ開発されていない分子生物学的技術において使用され得る。

40

【0033】

該遺伝子コードの縮重の結果、多数のPAPP-A2をエンコードするヌクレオチド配列が、幾分任意の既知のおよび自然発生的な遺伝子のヌクレオチド配列と最小限の相同性を有して生成され得ることが、当業者により理解されるであろう。本発明は、可能なコドン

50

選択に基づいた組み合わせを選択することにより作成され得るヌクレオチド配列の可能なバリエーションのそれぞれまたはすべてを特に考えている。これらの組み合わせは、自然発生的な P A P P - A 2 のヌクレオチド配列に適用されるような標準的な 3 つの遺伝子コードに従って作られ、特に開示されるように、そのバリエーションのすべてが考えら得る。

【 0 0 3 4 】

P A P P - A 2 および / またはその変異体をエンコードするヌクレオチド配列は、好ましくは厳密な条件下で、自然発生的な P A P P - A 2 のヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能であるけれども、P A P P - A 2 をエンコードするヌクレオチド配列または実質的には異なるコドン使用を有するその誘導体を生成することは有利であり得る。コドンは、特定のコドンが宿主により利用される頻度に従って、特に原核生物または真核生物の発現宿主においてペプチドの発現が起こる速度を上げるよう選択可能である。P A P P - A 2 をエンコードするヌクレオチド配列および / またはその誘導体を、そのエンコードされたアミノ酸配列を変えないで実質的に変える他の理由としては、自然発生的な配列から生成される転写物より長い半減期といった、より所望される特性を有する R N A 転写物の生成が挙げられる。

10

【 0 0 3 5 】

P A P P - A 2 をエンコードするヌクレオチド配列は、十分に確立された組み換え D N A 技術 (S a m b r o o k e t a l . , 1 9 8 9) を用いて、様々な他のヌクレオチド配列に結合され得る。P A P P - A 2 へ結合するのに有益なヌクレオチド配列としては、例えばプラスミド、コスミド、ラムダ・ファージ誘導体、ファージミド等の当業者には周知の各種クローニングベクターが挙げられる。対象のベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プロンプト産生ベクター、配列決定ベクター等が挙げられる。一般的には、対象のベクターは、少なくとも 1 つの生体において複製機能の発生源、すなわち簡単な制限エンドヌクレアーゼ感受性部位、および、宿主細胞に対する選択マーカールを含んでいてもよい。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の別の態様は、P A P P - A 2 をエンコードする自然発生的なヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能な P A P P - A 2 特異的核酸ハイブリダイゼーションプロンプトを提供することである。当該プロンプトはまた、同様の P A P P - A 2 をエンコードする配列の検出に使用され得、好ましくは保存領域または活性部位由来の少なくとも 5 0 % のヌクレオチドを含有するはずである。本発明のハイブリダイゼーションプロンプトは、配列番号 1 のヌクレオチド配列から、またはプロモーター、エンハンサー要素および / またはそれぞれの自然発生的な P A P P - A 2 を含む可能なイントロンを含む、ゲノム配列から誘導され得る。ハイブリダイゼーションプロンプトは、³²P または ³⁵S といった放射性核種、またはアビジン / ビオチンカップリング系等を介してプロンプトに結合したアルカリフォスファターゼといった酵素標識を含む、様々なレポーター群により標識され得る。

30

【 0 0 3 7 】

米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号および第 4 , 9 6 5 , 1 8 8 号に記載されるように、P C R は、P A P P - A 2 をエンコードするヌクレオチド配列に基づいたオリゴヌクレオチドの更なる使用を提供する。P C R において使用される当該プロンプトは、組み換え起源からなるものであってもよく、化学的に合成されてもよく、あるいはその混合であり、そして診断的用途のための分離したヌクレオチド配列、または非常に関連するゲノム配列の同定のための縮重した可能な配列のプールを含む。

40

【 0 0 3 8 】

P A P P - A 2 D N A に対して特異的なハイブリダイゼーションプロンプトを生成する他の手段としては、P A P P - A 2 または P A P P - A 2 の誘導体をエンコードする核酸配列の、m R N A プロンプトの生成用ベクター中へのクローニングが挙げられる。そのようなベクターは、当該分野では既知であり、市販で利用可能であり、そしてインビトロで T 7 または S P 6 R N A ポリメラーゼのような適当な R N A ポリメラーゼおよび適当に放射

50

活性標識したヌクレオチドの付加によりRNAプローブを合成するのに使用され得る。

【0039】

PAPP-A2をエンコードするDNA配列またはその一部分を完全に合成化学により生成することが可能であり、その後遺伝子をこの特許の出願時に当分野において既知である試薬、ベクター、および細胞を用いて多くの利用可能なDNAベクターのいずれか中に挿入可能である。更に、PAPP-A2配列またはその任意の部分中に変異を導入するのに、合成化学が利用されてもよい。

【0040】

異常量のPAPP-A2発現に係る疾患を検出するためのアッセイにおいて、該ヌクレオチド配列が利用可能である。該ヌクレオチド配列は、当該分野において既知の方法により標識され、ハイブリダイズ条件下で、患者からの体液または組織サンプルに添加可能である。インキュベーション期間後、ヌクレオチドが酵素により標識されるのであれば、そのサンプルを、所望により染料（または現像液を必要とする他の標識）を含有する適合流体で洗浄する。その適合流体を洗い流した後、染料を定量し、スタンダードと比較する。別法としては、PAPP-A2 mRNAの量は、固定のプローブを用いるマイクロアレイ法により測定可能である。サンプル中における発現は、（半定量的な）RT-PCRによっても評価可能である。サンプル中における発現は、別法としてハイブリダイゼーションをベースにした方法によっても評価可能である。例えば、インサイツハイブリダイゼーション法は、PAPP-A2 mRNAを検出するのに使用可能である。この方法は、mRNAを合成する細胞を示すという利点を有するが、RT-PCRよりも感受性が低い。

10

20

【0041】

アンチセンスRNAとDNA分子、およびPAPP-A2の翻訳を阻害する機能を有するリボザイムを含むオリゴヌクレオチド配列が、本発明の範疇に含まれる。アンチセンス法は、当該分野では既知であり、本明細書において適用され得る。本発明のアンチセンスRNAとDNA分子、およびリボザイムが両方とも、RNA分子の合成のために、当該分野で既知の任意の方法により調製され得る。これらは、例えば固相ホスホルアミダイト化学合成といった当該分野では周知のオリゴデオキシリボヌクレオチドを化学的に合成する技術を含む。別法としては、RNA分子は、当該アンチセンスRNA分子をエンコードするDNA配列のインビトロおよびインビボでの転写により産生され得る。そのようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターといった好適なRNAポリメラーゼプロモーターを導入する広範なベクター中に導入され得る。別法としては、使用されるプロモーター次第で、構成的にまたは誘導的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物を、細胞株中に安定に導入可能である。

30

【0042】

本発明は、他の種から単離した未知のPAPP-A2遺伝子およびそのPAPP-A2遺伝子の対立遺伝子に関し、その中にはPAPP-A2類似遺伝子または相同遺伝子が存在する。本明細書に示されたヒトPAPP-A2クローンの放射活性標識フラグメントを用いて、緩和された厳密条件下においてバクテリオファージcDNAライブラリーが、スクリーニングされ得る。別法として、そのヒトPAPP-A2配列は、PCRプローブとして、またはバクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用可能な縮重した、または完全に縮重したオリゴヌクレオチドプローブをデザインするために使用可能である。そのPCR生成物は、サブクローニングされ、増幅された配列がPAPP-A2配列を示すことを保証するために配列決定され得る。そのPCRフラグメントは、増幅フラグメントを放射活性標識し、バクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、完全長のPAPP-A2クローンを単離するために使用され得る。別法として、その標識化フラグメントは、ゲノムライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。使用され得るクローニング法の概説については、例えば(Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989)が参照される。

40

50

【0043】

組み換えPAPP-A2の発現

生物学的に活性なプロテアーゼを発現するために、その蛋白または機能的等価物に対してコードされるヌクレオチド配列を、適当な発現ベクター、すなわち挿入されたコード化配列の転写および翻訳に必要な要素を含有するベクター中に挿入可能である。例えば、組み換え蛋白は、免疫化して実験試薬としておよび診断キットにおいて抗体を得るために使用可能である。

【0044】

より具体的には、当業者に周知な方法が、PAPP-A2配列および適当な転写/翻訳の制御シグナルを含有する発現ベクターを構築するのに利用可能である。これらの方法としては、インピトロでの組み換えDNA法、合成法、およびインピボでの組み換え/遺伝的組み換えが挙げられる。例えば(Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989)に示される方法を参照。

10

【0045】

更に、PAPP-A2をエンコードする配列のフラグメントを含む発現ベクターが構築されてもよい。特に、これは、免疫用抗原としてのPAPP-A2ポリペプチドの一部分の使用に関連し得る。更に、PAPP-A2またはそのフラグメントのコード化配列が、ベクター中に存在するコード化ヌクレオチド配列を有するフレーム中でクローンされ得、その結果、融合蛋白または「タグ化」PAPP-A2蛋白となる。例えば、当該融合蛋白は、PAPP-A2およびGSTから構成されてもよく、当該タグが、c-mycタグ(検出用)および/またはヒスチジンタグ(精製用)であってもよい。

20

【0046】

様々な宿主-発現ベクター系が、PAPP-A2コード化配列またはそのフラグメントを発現するために利用され得る。これらは、PAPP-A2コード化配列を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換したバクテリア; PAPP-A2コード化配列を含有する組み換え酵母発現ベクターを用いて形質転換した酵母; PAPP-A2コード化配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)を用いて感染させた昆虫細胞系統; PAPP-A2コード化配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)を用いて感染させた、あるいはPAPP-A2コード化配列を含有する組み換えプラスミド発現ベクター(例えばTiプラスミド)を用いて形質転換した植物細胞系統; または安定に増幅された(CHO/dhfr)、あるいは2つの小さな染色体(例えば、マウスの細胞株)中で不安定に増幅された、いずれかの多数のPAPP-A2 DNAの複製を含有するように作成された細胞株を含む組み換えウイルス発現ベクター(例えば、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ヒト腫瘍細胞)を用いて感染させた動物細胞系統といった微生物体を含むがそれ限定されるわけではない。

30

【0047】

これらの系統の発現要素は、強度および特性が様々である。利用される宿主/ベクター系統次第で、構成的および誘導的プロモーターを含む、任意の数の好適な転写および翻訳要素が、発現ベクターにおいて利用され得る。例えば、バクテリア系統においてクローニングする場合、バクテリオファージ・ラムダのpL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lacハイブリッドプロモーター)等といった誘導プロモーターが使用され得; 昆虫細胞系統においてクローニングする場合、バキュロウイルス多角体プロモーターといったプロモーターが使用され得; 植物細胞系統においてクローニングする場合、植物細胞のゲノムから誘導されるプロモーター(例えば、熱ショックプロモーター; RUBISCOの小さなサブユニットに対するプロモーター; クロロフィルa/b結合蛋白に対するプロモーター)または植物ウイルスから誘導されるプロモーター(例えば、CaMVの35S RNAプロモーター; TMVのコート蛋白プロモーター)が使用され得; 哺乳類細胞系統においてクローニングする場合、哺乳類細胞のゲノムから誘導され得プロモーター(

40

50

例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳類ウイルスから誘導されるプロモーター(例えば、CMVプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシンウイルスの7.5Kのプロモーター)使用され得;PAPP-A2 DNAの複数の複製を含有する細胞株を産生する場合、SV40、BPV、およびEBVベースのベクターが適当な選択マーカーと一緒に使用され得る。

【0048】

形質転換、トランスフェクション、感染、プロトプラスト融合、およびエレクトロポレーションを含むがそれに限定されない多数の方法のうちの任意の1つを介して、該発現ベクターを宿主細胞中に導入し得る。その発現ベクターを含有する細胞を、それがPAPP-A2蛋白を生成するかどうかを決定するためにクローンで増殖し、個々に分析する。PAPP-A2を発現する宿主細胞クローンの同定は、抗PAPP-A2抗体との免疫反応性を含むがそれに限定されない数種の手段、および宿主細胞関連PAPP-A2活性の存在によりなされ得る。

10

【0049】

バクテリア系統において、多数の発現ベクターが、発現されたPAPP-A2の予定の使用される使用次第で有利に選択され得る。例えば、大量のPAPP-A2生成される予定である場合、容易に精製され得る融合蛋白生成物の高レベルの発現を導くベクターが所望となり得る。そのようなベクターとしては、大腸菌発現ベクター、pUR278(Rutherford and Muller-Hill, 1983, Embo J 2, 1791-4)が挙げられるがそれに限定されず、当該ベクターにおいてPAPP-A2コード化配列は、ハイブリッドAS-lacZ蛋白を生成するよう、lacZコード化領域を有するフレーム内のベクター中にリゲートされ得る。pGEXベクターはまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白として外来のポリペプチドを発現するために使用され得る。一般的に、そのような融合蛋白は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着、次いで遊離型のグルタチオンの存在中での溶出により可溶化細胞から容易に精製可能である。目的のクローン化ポリペプチドがGST部分から遊離可能となるよう、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ開裂部位を含むようにpGEXベクターがデザインされる。酵母において、構成的または誘導的プロモーターを含有する多数のベクターが使用され得る。概説については、(Ausubel et al., 1989; Bitter et al., 1987, Methods Enzymol 153, 516-44; Rosenfeld, 1999, Methods Enzymol 306, 154-69)参照。

20

30

【0050】

植物発現ベクターが使用される場合、PAPP-A2コード化配列の発現は、多数のプロモーターのうちのいずれかにより引き起こされ得る。例えば、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーターといったウイルスプロモーター(Gmunder and Kohli, 1989, Mol Gen Genet 220, 95-101);あるいは、RUBISCOの小さなサブユニットといった植物プロモーター(Brogli et al., 1984, Science 224, 838-43)が使用され得る。

40

【0051】

PAPP-A2を発現するために使用可能な代替の発現系は、昆虫系統である。そのような系においては、バキュロウイルスが、外来遺伝子を発現するベクターとして使用される。その後、ウイルスは、昆虫細胞において成育する。PAPP-A2コード化配列が、ウイルスの非必須領域(例えば、多角体遺伝子)中でクローン化されて、バキュロウイルスプロモーターの制御下に置かれてもよい。次いで、これらの組み換えウイルスは、挿入された遺伝子が発現される昆虫細胞を感染するために使用される。例えば(Smith et al., 1983, Mol Cell Biol 3, 2156-65)参照。

【0052】

様々な哺乳類の発現ベクターが、哺乳類細胞中で組み換えPAPP-A2を発現するため

50

に使用され得る。組み換え PAPP - A2 発現に好適となり得る市販で入手可能な哺乳類の発現ベクターとしては、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO - pSV2 - neo (ATTC 37593)、pBPV - 1 (8 - 2) (ATCC 37110)、pcDNA3.1 およびその誘導体 (Stratagene) が挙げられるがそれに限定されない。好適となり得、かつ市販で入手可能である哺乳類種由来の細胞株としては、CV - 1、COS - 1、COS - 7、CHO - K1、3T3、NIH3T3、HeLa、C127I、BS - C - 1、MRC - 5 および 293 が挙げられるがそれに限定されない。更に、哺乳類の宿主細胞において、多数のウィルスベクターの発現系が利用され得る。発現ベクターとしてアデノウィルスが使用される場合においては、PAPP - A2 コード化配列が、アデノウィルス転写 / 翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3つのリーダー配列にリゲートされ得る。次に、このキメラ遺伝子が、インビトロまたはインビボの組み換えによりアデノウィルスゲノム中に挿入され得る。ウィルスゲノムの非必須領域 (例えば E1 または E3 領域) への挿入により、生育可能で感染宿主中で PAPP - A2 が発現可能な組み換えウィルスとなるであろう。例えば (Logan and Shenk, 1984, Proc Natl Acad Sci U S A 81, 3655 - 9) 参照。別法としては、ワクシニアの 7.5K のプロモーターが使用されてもよい。例えば (Mackett et al., 1982, Proc Natl Acad Sci U S A 79, 7415 - 9) 参照。

10

【0053】

長期間にわたる高収率の組み換え蛋白生成のために、安定した発現が好ましい。例えば、PAPP - A2 を安定に発現する細胞株が作成されてもよい。複製のウィルス源を含有する発現ベクターを用いるよりもむしろ、宿主細胞は、適当な発現制御要素 (例えば、プロモーター、エンハンサー、シーケンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等) 、および選択マーカーにより制御された PAPP - A2 DNA を用いて形質転換可能である。外来 DNA の導入に続いて、作成された細胞が、栄養強化培地において 1 ~ 2 日間生育され得、その後、選択培地に交換される。組み換えプラスミド中の選択マーカーは、その選択に耐性を与え、そして細胞が安定にそのプラスミドを染色体に組み入れ、増殖して病巣を形成するのを可能にし、次にクローン化され細胞株中に拡大可能となる。

20

【0054】

組み換え PAPP - A2 の適用のいくつかは、その蛋白を精製されたあるいは一部精製された形態にする必要があり得る。組み換えにより発現した PAPP - A2 または PAPP - A2 ポリペプチドのフラグメントは、液体クロマトグラフィーによって単離可能である。当該分野において周知の様々な蛋白精製法としては、例えば (Scopes, 1987) に示されている方法が挙げられる。別法としては、組み換え PAPP - A2 融合蛋白、または「タグ化」PAPP - A2 がアフィニティークロマトグラフィーにより精製され得る。更に、PAPP - A2 に対して産生される抗体が、イムノアフィニティークロマトグラフィーによる精製のために使用され得る。

30

PAPP - A2 の組み換え変異体が、部位特異的突然変異誘発により生成され得る。PAPP - A2 の適用の中には、こういった変異体が、例えば蛋白安定性の増大、または活性の変化のために好ましくなり得るものもある。

40

【0055】

PAPP - A2 に対する抗体の生成と使用

組み換え蛋白が抗体を産生するのに使用され得る。PAPP - A2 に対する単一特異的抗体が、PAPP - A2 に対して反応性のある抗体を含有する哺乳類の抗血清から精製可能であり、あるいは標準的な方法を用いて PAPP - A2 と反応可能なモノクローナル抗体として調製可能である。

【0056】

本明細書において使用されるように単一特異的抗体は、PAPP - A2 に対して同種結合特性を有する単一の抗体種または多数の抗体種として定義される。本明細書において使用

50

されるように同種結合とは、上述に示すように、抗体種の P A P P - A 2 と関連する抗原といった特異的な抗原またはエピトープへの結合能をいう。P A P P - A 2 特異的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ウマ等といった動物を（ラビットまたはマウスが好ましい）、免疫アジュバント有りあるいは無しいずれかで、適当な P A P P - A 2 の濃度を用いて免疫することにより産生される。例えば、P A P P - A 2 に対して特異的な抗体は、天然および組み換え P A P P - A 2 の精製用に、実験試薬として、および抗体ベースの診断用キットにおいて使用可能である。

【 0 0 5 7 】

P A P P - A 2 と反応可能なモノクローナル抗体 (m A b) は、常法により、例えば同系交配マウスを P A P P - A 2 で免疫することにより調製可能である。該マウスは、約 0 . 5 m l の緩衝液または生理食塩水中において等量の許容可能なアジュバントに組み込まれた約 0 . 1 m g ~ 約 1 0 m g 、好ましくは約 1 m g の P A P P - A 2 を用いて免疫される。フロイントの完全アジュバントが好ましい。該マウスは、0 日目に初期免疫を受け、約 3 ~ 約 3 0 週間休息させる。免疫化マウスは、約 0 . 1 ~ 約 1 0 m g の P A P P - A 2 をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) とした緩衝溶液で静注 (I V) 経路により、1 度またはそれ以上追加免疫される。抗体陽性のマウス由来のリンパ節は、当該分野において既知の標準的な方法で免疫化マウスから脾臓を除去することにより得られる。ハイブリドーマ細胞は、安定なハイブリドーマが形成される条件下で、脾リンパ節を適当な融合相手と混合することにより生成される。融合されたハイブリドーマ細胞は、当該分野において既知の方法を用いて、ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテインを補充したダルベッコ変法イーグル培地 (D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e s M e d i u m , D M E M) での生育により選択される。約 1 4 、 1 8 、 および 2 1 日目で生育陽性のウェルから上清液を回収し、固相イムノラジオアッセイ (S P I R A) としたイムノアッセイによる抗体生成に対して、抗原として P A P P - A 2 を用いてスクリーニングする。m A b のアイソトープを決定するために、オクタロニー (O u c h t e r l o n y) 沈降アッセイにおいて培養液も試験される。次に抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞がクローン化される。詳細については (P e t e r s a n d B a u m g a r t e n , 1 9 9 2) 参照。

【 0 0 5 8 】

インビトロでの抗 P A P P - A 2 の生成は、十分な量の特異的 m A b を得るために約 2 % のウシ胎仔血清を含有する D M E M におけるハイブリドーマの生育により実施される。該 m A b は、当該分野において既知の方法により精製される。腹水またはハイブリドーマ培養液の抗体価は、沈降法、受身凝集反応、酵素免疫測定法 (E L I S A) (C r o w t h e r , 1 9 9 5) を含むがそれに限定されない様々な血清学的または免疫学的アッセイにより決定される。

【 0 0 5 9 】

「モノクローナル抗体」はまた、例えば (C l a c k s o n e t a l . , 1 9 9 1 , Nature 3 5 2 , 6 2 4 - 8 ; M a r k s e t a l . , 1 9 9 1 , J Mol Biol 2 2 2 , 5 8 1 - 9 7) に示されている方法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。同定されたファージ抗体は、バクテリアにおける発現により生成可能である。

上述のような方法は、P A P P - A 2 ポリペプチドフラグメントまたは完全長の発生期の P A P P - A 2 ポリペプチドに特異的な単一特異的抗体を生成するのに使用され得る。

【 0 0 6 0 】

A f f i g e l - 1 0 (B i o r a d) としたゲル支持体で、抗体がアガロースゲルビーズ支持体と非共有結合を形成するように N - ヒドロキシスクシンイミドと予め活性化されるゲル支持体に抗体を付加することにより、P A P P - A 2 抗体アフィニティーカラムが作成可能である。その後、該抗体は、スパーサーアームを用いてアミノ結合により該ゲルと結合される。残りの活性化エステルが、その後 1 M エタノールアミン H C l (p H 8) でクエンチングされる。そのカラムを、水、次いで 0 . 2 3 M グリシン H C l (p

10

20

30

40

50

H 2 . 6) で洗淨して、いかなる非共役型抗体または外来蛋白をも除去する。次に、そのカラムをリン酸緩衝生理食塩水 (p H 7 . 3) 中で平衡化し、 P A P P - A 2 または P A P P - A 2 フラグメントを含有する細胞培養上清または細胞抽出物をそのカラムにゆっくりと通過させる。次に、そのカラムを洗淨し、蛋白を溶出する。精製された P A P P - A 2 蛋白を次に、リン酸緩衝生理食塩水で透析する。

【 0 0 6 1 】

ヒト血漿または血清、組織抽出物、あるいはトランスフェクトされていない細胞株由来の培地といった起源 (P A P P - A 2 を内生に分泌する) 由来の天然の P A P P - A 2 も、抗体アフィニティーカラムを使用することにより精製され得る。

P A P P - A 2 に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、体液または組織、および細胞抽出物中の P A P P - A 2 抗原の測定に多数のアッセイが実施され得る。診断の目的で、抗体ベースのキットが使用され得る。該アッセイとしては、沈降法、受身凝集反応、酵素免疫測定法 (E L I S A)、およびラジオイムノアッセイ (R I A) 法が挙げられるがそれに限定されない。

10

【 0 0 6 2 】

例えば、そのような E L I S A の 1 つにおいて、サンプル中に存在する抗原が固定化ポリクローナル抗 (P A P P - A 2) により獲得される場合、サンドイッチアッセイ法が実施可能である。次に、1 つまたはそれ以上のモノクローナル P A P P - A 2 抗体およびペルオキシダーゼ共役抗 (マウス I g G) を使用することにより、検出が実施される。別のアッセイにおいては、サンプル中に存在する抗原が、固定化ポリクローナル抗 (P A P P - A 2) により獲得され、ビオチン化ポリクローナル抗 (P A P P - A 2) を用いて検出される。更なる実施例および詳細については、(C r o w t h e r , 1 9 9 5) 参照。アッセイは、精製された P A P P - A 2 を用いて、キャリプレートして一連の希釈により標準曲線を構築することができる。精製された形態での溶液中の P A P P - A 2 濃度は、アミノ酸分析 (S o t t r u p - J e n s e n , 1 9 9 3 , B i o c h e m M o l B i o l I n t 3 0 , 7 8 9 - 9 4) により正確に測定可能である。

20

【 0 0 6 3 】

P A P P - A 2 の生物学的活性を阻害するために、ポリクローナル抗体が使用され得る。特異的に、ポリクローナル P A P P - A 抗体による P A P P - A の I G F B P - 4 蛋白分解活性の阻害 (L a w r e n c e e t a l . , 1 9 9 9 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 6 , 3 1 4 9 - 5 3) と同様に、P A P P - A 2 の蛋白分解活性を阻害するために、抗 (P A P P - A 2) が使用され得る。P A P P - A 2 の活性に対して、特定のモノクローナル抗体がまた、抑制性となり得る。そのようなモノクローナル抗体は、P A P P - A 2 の活性部位に非常に近接するエピトープを認識する傾向があるが、その阻害活性は、活性部位の近く以外のエピトープへの結合に基づくものであり得る。抑制性のモノクローナル抗体は、P A P P - A 2、P A P P - A 2 から誘導されたペプチドを有する P A P P - A 2 フラグメントの免疫により得ることができる。抑制性 (モノクローナル) 抗体は、P A P P - A 2 活性を減少させるのに所望となり得る病状において治療的価値を有し得る。

30

【 0 0 6 4 】

P A P P - A 2 の活性

P A P P - A と同様、P A P P - A 2 は、メトジンシンスーパーファミリーの推定のメタロプロテアーゼ (S t o c k e r e t a l . , 1 9 9 5 , P r o t e i n S c i 4 , 8 2 3 - 4 0) として分類される保存アミノ酸分岐鎖を含有する。P A P P - A 2 がインシュリン様成長因子結合蛋白、(I G F B P) - 5 の開裂を示すことにより蛋白分解活性を呈する (実施例 6 . 7) ことが、実験で確認されている。

40

【 0 0 6 5 】

一般的に、潜在的な蛋白基質に対する P A P P - A 2 の蛋白分解活性が、精製または一部分精製された P A P P - A 2 を様々な実験条件 (例えば、温度、緩衝液組成、イオン強度、および p H) 下でその潜在的な基質とインキュベーションすることにより評価され得る

50

。当該蛋白に対する PAPP-A2 の酵素活性は、SDS-PAGE (明確に形成される蛋白分解性フラグメントの分解または遊離が明らかとなる)、または遊離したペプチドの高速液体クロマトグラフィー検出により評価可能である。そのような方法を用いることにより、PAPP-A2 の他の基質ターゲットが同定され得る。例えば活性部位の残基が不活性な酵素を獲得するために置換されている様々な PAPP-A2 とのインキュベーションが、適切なネガティブコントロールとしての役割を果たす。

【0066】

固相支持体に接着したアミノ酸の可能なすべての組み合わせからなるランダムペプチドライブラリーが、PAPP-A2 により開裂可能なペプチドを同定するのに使用され得る。そのようなペプチドの同定は、ペプチドライブラリーを組み換え可溶性 PAPP-A2 を用いてスクリーニングすることにより達成され得る。酵素の発現および精製法が上述で示され、目的の機能的ドメインによって、組み換えの完全長 PAPP-A2 またはそのフラグメント、類似物、あるいは誘導体を使用され得る。更なる詳細については、(Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 65-74; Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 51-7) 参照。あるいは、ペプチド基質が、同定された PAPP-A2 の蛋白基質から誘導されてもよい。

10

別法としては、PAPP-A2 により開裂可能なペプチドを同定するのにペプチドライブラリーのファージディスプレイが使用されてもよい (Matthews and Wells, 1993, Science 260, 1113-7)。

【0067】

PAPP-A2 基質としての機能するペプチドは、体液または組織、および細胞抽出物における PAPP-A2 蛋白分解活性の検出用アッセイにおいて機能し得る。蛍光クエンチングに基づいたアッセイにおいて機能するために、基質ペプチドが誘導され得る (Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 65-74)。そのような、または他の方法に基づいたキットが、PAPP-A2 活性の測定が関係する病気において診断目的で使用され得る。

20

【0068】

PAPP-A2 の活性を改変する試薬の同定

PAPP-A2 の蛋白分解活性の検出用アッセイは、上述のように、PAPP-A2 の活性を改変する分子の同定法を提供する。そのような分子は、例えば、ペプチド、誘導化ペプチド、ヒドロキサム酸誘導化ペプチド、小さな有機分子、または抗体であってもよい。

30

【0069】

ペプチドライブラリーのスクリーニングは、PAPP-A2 の生物学的活性を改変および/または阻害するよう作用する試薬を見いだすために使用可能である。酵素の発現および精製法は、上述で示されており、目的の機能的ドメインによって、組み換えの完全長 PAPP-A2 またはそのフラグメント、類似物、あるいは誘導体を発現するために使用され得る。固相支持体に接着したアミノ酸の可能なすべての組み合わせからなるランダムペプチドライブラリーは、PAPP-A2 の活性部位または他の部位に結合することにより、PAPP-A2 活性を改変および/または阻害可能なペプチドを同定するため使用され得る。例えば、(Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 75-82) 参照。

40

同様に、PAPP-A2 の活性に影響を及ぼす低分子量の有機分子を同定するために、コンビナトリアルケミストリーが利用されてもよい。

【0070】

PAPP-A または PAPP-A2 の複合体の測定

PAPP-A は、好酸球主要塩基蛋白 (proMBP) のプロフォームとの 2:2 のジスルフィド結合複合体、PAPP-A/proMBP として主に妊婦の血清中に存在する。PAPP-A/proMBP 複合体に加えて、proMBP は、アンジオテンシン (ANG) との 2:2 のジスルフィド結合複合体、proMBP/ANG として循環中に存在し、この複合体のフラクションは、更に補体成分 C3dg のフラグメントと複合体化 (PR

50

OMB P / A N G / C 3 d g) している (O x v i g , 1 9 9 5 ; C h r i s t i a n s e n , 2 0 0 0) 。

【 0 0 7 1 】

個人の体液中の P A P P - A および / または P A P P - A 2 および / または p r o M B P を含む複合体の量は、病態の素因を示したり、または病態の存在を示したりし得る。従って、本発明は、1つの実施態様において、個人において病態を診断したり、当該病態の素因を診断したりする方法を教示し、その方法は、

a) 当該個人から体液サンプルを提供し ; そして

b) 当該組体液サンプル中の P A P P - A / p r o M B P 、 P A P P - A 2 / p r o M B P 、 P A P P - A / P A P P - A 2 、 P A P P - A / P A P P - A 2 / p r o M B P 、 p r o M B P / A N G 、 および p r o M B P / A N G / C 3 d g からなる群から選ばれる複合体の量を測定し ; そして

c) 病態または病態の素因を診断 (予め決められた値より上または下の複合体量が病態または病態の素因を示す) する

ことからなるステップを含む。

【 0 0 7 2 】

更に、哺乳類の母親の体液中の P A P P - A および / または P A P P - A 2 および / または p r o M B P を含む複合体量は、当該母親の胎児の病態の素因を示したり、病態の存在を示したりし得る。それゆえ、本発明は、哺乳類の胎児において病態を診断したり、当該病態の素因を診断する方法を提供し、その方法は、

a) 当該胎児の母親から体液サンプルを提供し ; そして

b) 当該体液サンプル中の P A P P - A / p r o M B P 、 P A P P - A 2 / p r o M B P 、 P A P P - A / P A P P - A 2 、 P A P P - A / P A P P - A 2 / p r o M B P 、 p r o M B P / A N G 、 および p r o M B P / A N G / C 3 d g からなる群から選ばれる複合体の量を測定し ; そして

c) 病態または病態の素因を診断 (予め決められた値より上または下の複合体量が病態または病態の素因を示す) する

ことからなるステップを含む。

【 0 0 7 3 】

特に、本発明の方法に従って、以下に示す複合体のうちの1つまたはそれ以上の量が決定され得る :

P A P P - A / p r o M B P

P A P P - A 2 および p r o M B P (P A P P - A 2 / p r o M B P)

P A P P - A 2 および P A P P - A (P A P P - A / P A P P - A 2)

p r o M B P を有する P A P P - A / P A P P - A 2 (P A P P - A / P A P P - A / p r o M B P)

p r o M B P / A N G

p r o M B P / A N G / C 3 d g

【 0 0 7 4 】

体液サンプル中の P A P P - A および / または P A P P - A 2 および / または p r o M B P を含む複合体量は、当業者には既知の任意の従来法によって決定され得る。例えば、P A P P - A 、 P A P P - A 2 、 p r o M B P 、 A N G 、 または C 3 d g と特異的に相互作用する免疫特異的な試薬といった、測定するのに所望の複合体の1つまたはそれ以上の成分と特異的に相互作用する免疫特異的な試薬の使用を含む方法により、その量は測定可能である。例えば、免疫特異的な試薬は、複合体の個々の成分に特異的な、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および / またはその抗原結合フラグメントであり得る。

【 0 0 7 5 】

そのような方法としては、サンドイッチ E L I S A 法が挙げられるがそれに限定されるわけではなく、当該方法においては、複合体の1成分を特異的に認識する免疫特異的な試薬が捕獲抗体として使用され、その複合体が検出抗体として使用されるならば、別の免疫特

異的な試薬が別の成分を特異的に認識する。その検出抗体が、直接的または間接的のいずれかで検出可能であるのが好ましく、例えば検出抗体が検出可能なラベルに直接結合してもよく、あるいは検出抗体が、検出可能なラベルと結合した別の試薬と相互作用可能であってもよい。

例えば、検出可能なラベルは、蛍光ラベル、色素体、放射活性ラベル、重金属、または酵素であり得る。

【0076】

例えば、体液サンプル中のPAPP-A / proMBP複合体の量は、捕獲用のPAPP-A特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体および検出用のproMBP特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、サンドイッチELISA法により決定され得、あるいは体液サンプル中のproMBP / ANGの量は、捕獲用のproMBP特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体および検出用のANG特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いてサンドイッチELISA法により決定され得る。

10

【0077】

病態は、PAPP-Aおよび/またはPAPP-A2および/またはproMBPを含む複合体の量より診断され得る、あるいはPAPP-Aおよび/またはPAPP-A2および/またはproMBPを含む複合体の量により素因が診断され得る任意の病態であり得る。例えば、病態は、ダウン症、子癇前症、および不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群からなる群から選ばれ得る。

20

【0078】

体液サンプルは、血清サンプルを含む血液サンプル、尿サンプル、糞サンプル、または羊水サンプルといった任意の有用な体液サンプルであり得る。

特に、PAPP-A / proMBP量は、病態が、ダウン症、および不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群からなる群から選ばれる場合に決定され得る。

【0079】

本発明の1つの実施態様において、ダウン症の診断またはダウン症の素因の診断は、PAPP-A / proMBP量の決定することを含み、予め決められた値より低いPAPP-A / proMBP量は、ダウン症またはダウン症の素因があることを示している。

本発明の別に実施態様において、不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群の診断、または不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群の素因の診断は、PAPP-A / proMBP量を決定することを含み、予め決められた値より高いPAPP-A / proMBP量は、不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群または不安定狭心症および心筋梗塞を含む急性冠症候群の素因があることを示している。

30

【0080】

更に別の実施態様において、ダウン症の素因を診断する、あるいはダウン症を診断するために、proMBP / ANG量が決定され得る。上述の診断法はすべて、1つまたはそれ以上の他の診断法と組み合わせて実施されてもよい。更に、本発明に記載の1以上の異なる診断が実施されてもよく、例えば、1以上の複合体量を測定する、あるいは異なる個体サンプルにおいて1つの複合体量を測定することが可能である。

40

【0081】

天然の蛋白分解性フラグメントを産生するためのPAPP-A2の使用

PAPP-A2は、PAPP-A2により特異的に開裂される蛋白の天然のフラグメントを産生するために使用され得る。IGFBP-5の場合のように(実施例6.7および6.9参照)、そういったフラグメントは、インタクトなIGFBP-5とは異なる生物学的効果を有し得る。精製されたPAPP-A2で開裂後、標準的なクロマトグラフィーによりフラグメントを精製可能である(実施例6.9参照)。

【0082】

発現用PAPP-A2フラグメントのデザイン

成熟PAPP-Aにおいて見られるシステイン残基がすべて、成熟PAPP-A2におい

50

ても見られるため（図3参照）、ジスルフィド結合パターンは、共通のシステイン残基のパターンについては、PAPP-A2と同じであると推定することができる。それゆえ、PAPP-Aサブユニットのジスルフィド構造（図8参照）の知見が、すべてのシステイン残基組み合わせが可能であるPAPP-A2フラグメントを合理的にデザインするために利用可能である。PAPP-A2の推定のドメイン境界は、図8に示されるジスルフィド構造に基づいて決めることができる。それらのドメインは、別々にまたは一緒に発現可能である。ドメインが別のPAPP-AサブユニットまたはproMBPに対して鎖間ジスルフィド結合を形成する（図8参照）ことが既知のシステイン残基を含有する場合に、このシステインが突然変異して、例えばセリンまたはアラニン残基となることが必要となり得る。

10

【0083】

従って、可能な境界領域は、Cys-403とCys-499との間、Cys-828とCys-881との間、Cys-1048とCys-1115との間、Cys-1390とCys-1396との間、Cys-1459とCys-1464との間、Cys-1521とCys-1525との間、Cys-1590とCys-1595との間、Cys-1646とCys-1653との間、およびCys-1729とCys-1773との間（preproPAPP-A2ナンバリングは、図1および3と同様）である。

【0084】

医薬組成物

IGFBP-5プロテアーゼとしてのPAPP-A2の同定は、治療用ターゲットとしてPAPP-A2を用いることにより、インビボにおいて成長および分化に影響を及ぼす方法を提供する。PAPP-A2の阻害は、バイオアベイラブルなIGF-IおよびIGF-IIの量を減少させると考えられている。例えば、PAPP-A2活性の阻害は、再狭窄、アテローム性動脈硬化、および線維症といった疾患に有益となり得る。アクチベーター、またはPAPP-A2の活性を上昇させる薬剤は、バイオアベイラブルなIGF-IおよびIGF-IIの量を上昇させると考えられている。

20

【0085】

PAPP-A2活性を変化させる、またはPAPP-A2の細胞表面への接着を変化させる薬剤を、医薬組成物中に組み込むことができる。そのような薬剤は、PAPP-A活性を変化させる、あるいはPAPP-Aの細胞表面への接着を変化させる薬剤と一緒に組み込まれてもよい。PAPP-A2特異的な薬剤とPAPP-A特異的な薬剤との組み合わせは、PAPP-Aに対して示される従来の試薬よりも有効となり得る。PAPP-A2特異的な試薬とPAPP-A特異的な試薬との組み合わせを薬学的に有効量でそれらを必要とする個人に投与することからなるステップを含む処置法もまた提供されている。

30

【0086】

一例として、抗PAPP-A2ポリクローナルまたはモノクローナルといった抗体が、薬学的に許容される無毒性の賦形剤または担体との混合により医薬組成物に製剤化することができる。そのような1つまたは複数の組成物は、特に溶液または水性生理緩衝食塩水中に懸濁した形態で経腸投与用に；特に錠剤またはカプセルの形態で経口投与用に；あるいは特に粉末状、点鼻薬、またはエアロゾルの形態で経鼻用に調製されてもよい。他の投与経路用の組成物が、常法を用いて所望されるように調製されてもよい。

40

【0087】

経腸投与用製剤は、一般的な賦形剤（すなわち、薬学的に許容される担体）として、滅菌水または生理食塩水、ポリエチレングリコールといったポリアルキレングリコール、野菜起源の油、水素化ナフタレン等を含有してもよい。特に、生物適合性、生物分解性の乳酸ポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーが、インビボで本発明の化合物の放出を制御する賦形剤の例である。他の好適な経腸的送達システムとしては、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透ポンプ、埋込み型注入システム、およびリポソームが挙げられる。吸入投与用製剤は、所望であれば、ラクトースといった賦形剤を含有してもよい。吸入製剤は、例えばポリオキシ

50

エチル - 9 - ラウリルエーテル、グリココール酸、およびデオキシコール酸を含有する水性溶液であってもよく、あるいはそれらが点鼻薬の形態での投与用油状溶液であってもよい。所望であれば、該化合物が経鼻的に適用されるゲルとして製剤化可能である。経腸投与用製剤も、舌下投与用にグリココール酸を含んでいてもよい。

【0088】

医療用具

本発明は、患者の体内配置（例えば移植）用医療用具も特徴としており、それはPAPP-A2プロテアーゼ活性を阻害または活性化する製剤を含む。好適な薬剤は、本明細書に記載の方法を用いて容易に同定される。用具は、該薬剤を含んだり、あるいは該試薬をコートすることが可能である。阻害剤の非制限的な例としては、抗-PAPP-A2ポリクローナルまたはモノクローナルといった抗体、あるいは1,10-フェナントロリンといったメタロプロテアーゼが挙げられる。

10

【0089】

PAPP-A2のIGFBP-5プロテアーゼ活性は、1,10-フェナントロリンにより強く阻害されるが、マトリックスメタロプロテアーゼの組織阻害剤(TIMP'S)によっては阻害されない。他の阻害剤としては、ヒドロキサム酸の誘導体といった小分子が挙げられる。抗PAPP-A2ポリクローナルIgGもまた、HFCMにおいてIGF-依存性-またはIGF-非依存性-IGFBP-5特異的PAPP-A2プロテアーゼ活性を用量依存的に阻害し得る。

【0090】

更に、修飾化ポリペプチドを含むポリペプチド（すなわち、長さまたは翻訳後修飾にかかわらず、任意のアミノ酸）は、阻害剤として機能することができる。本発明に記載の医療用具をコートしたり埋め込むために、PAPP-A2のIGFBP-5プロテアーゼ活性の任意の阻害剤を使用可能である。修飾化ポリペプチドとしては、対応する野生型配列と比較して、アミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、欠失、または挿入、ならびに化学修飾が挙げられる。プロテアーゼ抵抗性IGFBP-5が、PAPP-A2のIGFBP-5プロテアーゼ活性の阻害剤そのものではないけれども、それが医療用具をコートしたり埋め込んだりするのに使用される場合、同様の結果が期待される。

20

【0091】

一例として、PAPP-A2阻害剤を用いた医療用具のコティングまたは埋め込みは、所望によりPAPP-A阻害剤と組み合わせて、バルーン血管形成後の再狭窄の進行の阻害を助けたり、動脈硬化性プラークサイズの更なる増大を阻害したりすることが可能である。ステント留置による冠動脈血管形成は、冠動脈アテローム性動脈硬化に対する現在の主要な治療法である。冠動脈疾患の血管形成の重要な目的は、急性および慢性の合併症の両方を回避することである。現代の方法は、当面の問題の削減には非常に成功している。残念なことに、ステントされた患者の20~30%においては、それでもなお再狭窄が起こる。既知の薬理的治療法(pharmacological intervention)で、再狭窄を回避するのに利用可能なものはない。

30

【0092】

特定のメカニズムにより結合されないで、ヒトにおける血管形成に応答した新生内膜肥厚に先立って冠動脈平滑筋細胞によるIGFBP-5プロテアーゼ発現が増加すると考えられている。

40

例えば、PAPP-A2活性の促進は、創傷治癒、骨折、骨粗鬆症、または排卵に有益となり得る。骨粗鬆症または骨量減少の他の症状は、骨形成が増大し、骨再吸収が減少することにより利益を受け得る。PAPP-A2活性を促進させる薬剤としては、例えば修飾化IGF、すなわちIGF類似物が可能である。

【0093】

類似物としては、アミノ酸の挿入、欠失、または置換、ならびに化学修飾を含むIGFポリペプチドが挙げられる。アミノ酸の置換としては、同類および非同類アミノ酸置換が挙げられ得る。同類アミノ酸置換は、あるアミノ酸を同じクラスのアミノ酸と置き換え、一

50

方、非同類アミノ酸置換は、あるアミノ酸を異なるクラスのアミノ酸と置き換える。非同類置換の結果、ポリペプチドの疎水性または残りの側鎖のバルクが変化する。更に、非同類置換は、正電荷を減少させ負電荷を導入するなど、ポリペプチドの電荷を本質的に変化させる。非同類置換の例としては、非極性アミノ酸の塩基性アミノ酸への置き換え、または酸性アミノ酸の極性アミノ酸の置き換えが挙げられる。アミノ酸の挿入、欠失、および置換は、当該分野には既知のランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、または他の組み換え法の使用が可能である。

【0094】

例えば、医療用具としては、骨を安定させるために使用される骨プレートまたは骨スクリュー、あるいは体内管腔部の開存性を回復したり維持したりするために典型的には体内で使用されるステントが可能である。例えば、血管は血液の流れを制限する動脈硬化性のプラークにより詰まってくる。典型的にはステントは、体内管腔部内の流動を調節する内部チャンネルを形成する管状構造を有している。ステントの外壁は、体内管腔部の内壁と接合している。病変部内のステントの配置により、体内管腔部の更なる閉塞の回避し、そして継続的な流動を可能にすることを助けることができる。典型的にはステントは、ステントを運ぶカテーテルまたはガイドワイヤーの経皮的挿入により実施される。通常ステントは、膨張可能な構造を有する。所望の部位へ送達する際、ステントはカテーテルに装着されたバルーンにより膨張可能である。別法としては、ステントが、圧縮された状態で鞘または他の制限部内に保持するバイアス構造または弾性構造を有していてもよい。その制限が除かれたときに、ステントは自発的に膨張する。いずれの場合においても、ステント壁は、膨張して体内管腔部の内壁に接合し、そして一般的には所望の位置にステントを固定する。

【0095】

本発明の記載

第1の態様において、本発明は、

i) 受け入れ番号DSM13783下のDSMZに集積された、PAPP-A2のコード化配列に相当する、配列番号1のヌクレオチド1~5376を含むポリヌクレオチド；および

ii) 配列番号2も示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド；および

iii) ポリヌクレオチド(i)または(ii)によりエンコードされたポリペプチドのフラグメントをエンコードするポリヌクレオチドであって、当該フラグメントが、

a) インシュリン様成長因子結合蛋白5型(IGFBP-5)またはその誘導體、あるいは任意の他の基質に特異的な蛋白分解活性を有し；そして/または

b) 配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして/または

c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリヌクレオチド；そして

iv) 相補鎖が、(i)、(ii)、および(iii)のいずれかで定義されるようなポリヌクレオチドと、厳密な条件下でハイブリダイズされるポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドが、配列番号2で示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのフラグメントをエンコードし、当該フラグメントが、

a) インシュリン様成長因子結合蛋白5型(IGFBP-5)またはその誘導體、あるいは任意の他の基質に特異的な蛋白分解活性を有し；そして/または

b) 配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして/または

c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、ポリヌクレオチド；および

10

20

30

40

50

v) (iii) および (iv) のいずれかで定義されるようなポリヌクレオチドのヌクレオチド配列に縮重されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、およびそのようなポリヌクレオチドの相補鎖、からなる群から選ばれる精製ポリヌクレオチドに関する。

【0096】

本明細書において使用されるように、ポリヌクレオチドとは、任意の自然発生的な基本骨格構造を有する任意の自然発生的なポリヌクレオチド、ならびに当該分野において LNA (ロック型核酸、locked nucleic acid) および PNA (ペプチド核酸) として既知のヌクレオチドをいう。

好ましい実施態様において、精製ポリヌクレオチドは、配列番号 1 で示されるような P A P P - A 2、ヌクレオチド 1 ~ 5 3 7 6 からなるコード化配列、または配列番号 2 で示されるようなアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列を含む。 10

【0097】

別の好ましい実施態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 で示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントをエンコードするヌクレオチド配列を含み、当該フラグメントは、

- a) インシュリン様成長因子結合蛋白 5 型 (IGFBP-5) またはその誘導体、あるいは任意の他の基質に特異的な蛋白分解活性を有し；そして/または
- b) 配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され；そして/または 20
- c) 当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する。

相補鎖が本発明に記載のポリヌクレオチドと厳密な条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも提供される。

【0098】

本明細書で使用されるような厳密な条件とは、例えば、Southern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517 により示されるようなサザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションに関連して通常適用されるような厳密さをいう。そのような目的のために、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションからなるステップを含むことが日常的に実施されている。このようなステップは、通常、"Molecular Cloning / A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor において Sambrook et al., 1989 により示される (これは、参照して本明細書の一部とする) ように、6 x S S P E、5% Denhardt's、0.5% SDS、50% ホルムアミド、100 mg / ml 変性サケ精巢 DNA (42 で 18 時間インキュベーション) を含有する溶液を用いて実施され、次に 2 x S S C および 0.5% SDS (室温および 37) で洗浄し、0.1 x S S C および 0.5% SDS (68 で 30 分間インキュベーション) で洗浄する。 30

【0099】

DNA 配列は、様々な方法で使用される。それらは、uHase のホモログ (例えば、h uHase のホモログ) を同定するためのプローブとして使用され得る。哺乳類のホモログは、相互に実質的な配列類似性、すなわち少なくとも 75%、通常少なくとも 90%、より一般的には少なくとも 95% の配列同一性を有する。配列類似性は、保存モチーフ、コード化領域、フランキング領域等といった比較的長い配列のサブセットであり得る標準配列を基準にして計算される。標準配列は、通常、少なくとも約 18 nt の長さ、より一般的には少なくとも約 30 nt の長さとなり、比較される完全長の配列まで延び得る。配列分析に対するアルゴリズムは、当該分野、例えば Altschul et al., 1990 J Mol Biol 215:403-10 に記載される BLAST において既知である。 40

【0100】

配列類似性を有する核酸が、厳密性の低い条件下、例えば50 および10倍のSSC(0.9M生理食塩水/0.09Mクエン酸ナトリウム)でハイブリダイゼーションにより検出され、55 および1倍のSSCで洗浄されるときには結合したままである。配列同一性は、厳密性の高い条件下、例えば50 またはそれ以上および0.1倍のSSC(9mM生理食塩水/0.9Mクエン酸ナトリウム)でハイブリダイゼーションにより検出され得る。プローブ、特にDNA配列の標識化プローブを使用することにより、ホモログまたは関連遺伝子を単離することができる。ホモログ遺伝子の起源は、任意の種、例えば霊長類、特にヒト;例えばラットおよびマウスといったげっ歯類、イヌ、ネコ、ウシ、オバイン、ウマ、酵母、ショウジョウバエ、シノラブディス(Caenorhabditis)等であり得る。

10

【0101】

更なる実施態様において、配列番号1にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド、またはそのフラグメントに縮重されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。縮重は、本明細書において使用されるように、該縮重したポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドと関係する活性または機能性に鑑みて定義されており、該ポリヌクレオチドは、i)少なくともインシュリン様成長因子結合蛋白5型(IGFBP-5)特異的なタンパク分解活性を含み、そして/またはii)配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体またはその結合フラグメントにより認識され;そして/またはiii)当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する、のいずれかである。

20

【0102】

更なる実施態様において、本発明に記載のポリヌクレオチドの相補鎖を含むポリヌクレオチドが提供される。

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、PAPP-A2の3'未翻訳領域またはそのフラグメントに相当する核酸残基を含む更なるポリヌクレオチドに実施可能に結合され得る。本明細書で使用されるように、その3'未翻訳領域は、配列番号1の5377~8527の核酸残基を含む。

本明細書に記載のポリヌクレオチドに実施可能に結合された発現シグナルを含む発現ベクターの形態で組み換えDNA分子もまた提供される。

30

【0103】

更なる態様において、本発明に記載のポリヌクレオチドまたは本発明に記載のベクターでトランスフェクトまたは形質転換した宿主生体が提供される。その宿主生体は、例えば哺乳類の細胞株といった哺乳類の生体が好ましい。しかしながら、酵母または真菌類(fungus)といった微生物真核生物もまた使用され得、同様にシラス属(Bacillus)または大腸菌といった微生物原核生物も使用され得る。当業者であれば、特定の細胞における発現に好適なリーダー配列および/またはシグナルペプチドを含む、発現シグナルをいかに選択するかを知っているだろう。当業者であればまた、標準的な分子生物学的方法を使用することにより特定細胞における発現量をいかに決定するかを知っているだろう。

40

【0104】

更なる態様において、本発明は、配列番号2またはそのフラグメントのアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらから本質的に構成される単離されたポリペプチドに関し、当該フラグメントは、

a)インシュリン様成長因子結合蛋白5型(IGFBP-5)に特異的な蛋白分解活性を有し;そして/または

b)配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識可能な抗体、またはその結合フラグメントにより認識され;そして/または

c)当該ポリペプチドに対して親和性を有する細胞表面レセプターに結合するのに、配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチドと競合する。

50

【0105】

本発明の好ましい1つの実施態様において、配列番号2の変異体およびそのフラグメントの変異体もまた提供される。変異体は、予め決められたアミノ酸配列と同一性の程度またはそれらの相同性に基づいて決定され、当該予め決められたアミノ酸配列は、配列番号2であり、またその変異体がフラグメントである場合には、配列番号2のフラグメントである。

【0106】

従って、変異体は、予め決定された配列と、少なくとも75%の配列同一性配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、例えば少なくとも98%の配列同一性、例えば少なくとも99%の配列同一性を有するのが好ましい。

10

【0107】

変異体はまた、本明細書の以下で定義されるような予め決定された数の同類アミノ酸置換に基づいて決定される。本明細書で定義されるような同類アミノ酸置換は、1つのアミノ酸（予め決定されたアミノ酸群内）の別のアミノ酸（同一群内）との置換に関し、そのアミノ酸は、同様またはほぼ同様の特性を呈する。

【0108】

本明細書において適用されるような「同類アミノ酸置換」なる用語の意味の範疇で、本明細書の以下で示すアミノ酸群内で、1つのアミノ酸が別のアミノ酸に置換されてもよい：

20

i) 極性の側鎖を有するアミノ酸 (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, および Cys)

ii) 非極性の側鎖を有するアミノ酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, および Met)

iii) 脂肪族の側鎖を有するアミノ酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)

iv) 環状の側鎖を有するアミノ酸 (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

v) 芳香族側鎖を有するアミノ酸 (Phe, Tyr, Trp)

vi) 酸性の側鎖を有するアミノ酸 (Asp, Glu)

30

vii) 塩基性の側鎖を有するアミノ酸 (Lys, Arg, His)

viii) アミド側鎖を有するアミノ酸 (Asn, Gln)

ix) ヒドロキシ側鎖を有するアミノ酸 (Ser, Thr)

x) 硫黄を含有する側鎖を有するアミノ酸 (Cys, Met)

xi) 中性で弱い疎水性のアミノ酸 (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)

xii) 親水性で酸性のアミノ酸 (Gln, Asn, Glu, Asp)、および xiii

iii) 疎水性アミノ酸 (Leu, Ile, Val)。

【0109】

従って、本発明に記載の変異体またはそのフラグメントは、配列が同一の変異体またはそのフラグメント内、あるいは配列が異なる変異体またはそのフラグメント間に、相互に独立して導入された複数の置換体といった、少なくとも1つの置換体を含んでいてもよい。その同一の変異体またはそのフラグメントが、本明細書の上述で定義されるような1つ以上の同類アミノ酸群から1つ以上の同類アミノ酸置換体を含んでいてもよいことが、上述の概要から明らかである。

40

【0110】

アミノ酸の付加または欠失は、2~10個のアミノ酸、例えば10~20個のアミノ酸、例えば20~30個のアミノ酸、例えば40~50個のアミノ酸の付加または欠失であり得る。しかしながら、50個以上のアミノ酸の付加または欠失、例えば10~100個のアミノ酸の付加、例えば100~150個のアミノ酸の付加、例えば150~250個のアミノ酸の付加もまた、本発明の範疇に含まれる。

50

【0111】

いかなる機能的等価物をも含む、本発明に記載のポリペプチドフラグメントは、1つの実施態様において、少なくとも250個の未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも240個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも225個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも200個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも180個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも160個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも150個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも140個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも130個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも120個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも110個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも100個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも90個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも85個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも80個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも75個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも70個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも65個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも60個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも55個未満のアミノ酸残基、例えば少なくとも50個未満のアミノ酸残基を含み得る。

10

【0112】

本発明において使用されるような「機能的等価性」とは、予め決められた配列のフラグメントに相当する機能性を基準にして確立された1つの好ましい実施態様に従う。より具体的には、機能的等価性とは、ポリペプチドフラグメントのIGFBP-5特異的プロテアーゼ活性を示す、および/またはPAPP-A2を認識可能な抗体により認識される、および/またはPAPP-A2に対する親和性を有するレセプターへ結合するのにPAPP-A2と競合する能力として理解されるべきである。

20

【0113】

PAPP-A2の機能的等価物または変異体は、挿入、欠失、および同類置換を含む置換の数および範囲が増えるにつれて、次第に好ましく予め決められたPAPP-A2配列とは異なるアミノ酸配列を示すと理解される。この相違は、好ましい予め決められた配列とそのフラグメントまたは機能的等価物との間の相同性の減少として測定される。

【0114】

配列番号2のすべてのフラグメントまたは機能的等価物は、本明細書において報告されるようなPAPP-A2の好ましい予め決められた配列に対してそれらが示す相同性の程度にかかわらず、本発明の範疇に含まれる。この理由は、PAPP-A2の領域の幾つかが、その結果生成するフラグメントの結合活性にいかなる有意な影響をも与えることなく最も容易に変異し易い、あるいは完全に欠失可能であるからである。

30

【0115】

置換により得られる機能的変異体は、天然PAPP-A2活性のある程度の形態または度合を十分に示し得、機能的に類似のアミノ酸側鎖を含む残基が置換されると、相同性は更に低くなる。この点で機能的な類似性とは、疎水性、塩基性、中性または酸性、あるいは立体的なパルクの有無といった側鎖の主要な特性をいう。従って、本発明の1つの実施態様において、同一性の程度は、本発明に記載の好ましい予め決められたフラグメントの変異体または機能的等価物であるフラグメントの原則的な尺度ではない。

アミノ酸配列間の相同性は、BLOSUM30、BLOSUM40、BLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM55、BLOSUM60、BLOSUM62、BLOSUM65、BLOSUM70、BLOSUM75、BLOSUM80、BLOSUM85、またはBLOSUM90といった周知のアルゴリズムを用いて計算され得る。

40

【0116】

配列番号2のフラグメントと少なくともある程度の相同性を共有するフラグメントは、それらが配列番号2の当該フラグメントと、少なくとも約90%相同する、例えば少なくとも92%相同する、例えば少なくとも94%相同する、例えば少なくとも95%相同する、例えば少なくとも96%相同する、例えば少なくとも97%相同する、例えば少なくとも98%相同するときには、本発明の範疇にあると考えられるべきである。本発明の1つの実施態様に従って、相同性の割合を、同一性の割合という。

50

【0117】

本明細書で使用される意味に従って、機能的等価性を決定するときに考慮に入れられ得る更なる因子は、i) 本発明に記載のPAPP-A2フラグメントを検出する抗血清能、ii) 機能的に等価なPAPP-A2フラグメントのバインディングアッセイにおけるPAPP-A2との競合能である。既知のアミノ酸配列内の免疫遺伝学的に活性なアミノ酸の配列を決定する1つの方法は、米国特許5,595,915号においてGeysenにより示されており、これは参照して本明細書に組み込まれている。

【0118】

ペプチドフラグメントの構造および機能相関を決定するために更に好適に適応される方法は、米国特許第6,013,478号に示されており、これは参照して本明細書に組み込まれている。また、アミノ酸配列のレセプター部分への結合のアッセイ法は、当業者には既知である。

10

同類置換は、配列番号2の好ましい予め決められた任意の位置に導入され得、そしてそれは、任意の1以上の位置に非同類置換を導入するのにもまた所望となり得る。

【0119】

PAPP-A2フラグメントの機能的に等価なフラグメントの形成をもたらす非同類置換は、例えば；i) 例えば非極性の側鎖(Ala、Leu、Pro、Trp、Val、Ile、Leu、Phe、またはMet)を有する残基が、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、またはGlnといった極性の側鎖を有する残基またはAsp、Glu、Arg、またはLysといった帯電したアミノ酸に置換される、あるいは帯電したまたは極性の残基を非極性残基と置換するなど、実質的に極性が異なる；および/またはii) 別の残基によるProまたはGlyの置換またはProまたはGlyへの変換といった、ポリペプチド基本骨格配向性への効果が実質的に異なる；および/またはiii) 例えばGluまたはAspといった負に帯電した残基のLys、HisまたはArgといった正に帯電した残基への置換(およびその反対)など、実質的に電荷が異なる；および/またはiv) 例えばHis、Trp、Phe、またはTyrといった嵩高い残基のマイナーな側鎖を有する残基、例えばAla、GlyまたはSerへの置換(およびその反対)など、実質的に立体的なバルクが異なる。

20

【0120】

アミノ酸の置換により得られる変異体は、1つの好ましい実施態様において、疎水性および親水性の値、および電荷、サイズ等を含むアミノ酸側鎖置換体との相対的な類似性に基づいて作成され得る。例えば、様々な前述の特性を考慮に入れるアミノ酸置換は、当業者には周知であり、：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；およびバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

30

【0121】

本明細書に記載の変異体に加えて、立体構造的に類似の変異体は、変異体構造の鍵となる部分を模倣するために形成され得、当該化合物がまた、本発明の変異体と同様に使用されてもよい。これは、当業者には既知のモデリングおよび化学的デザインの技術により達成され得る。そのような立体構造的に類似する構成はすべて、本発明の範疇にあることが理解されよう。

40

【0122】

更なる実施態様において、本発明は、置換されたアミノ酸の値の+/-2.5以内、例えば+/-2.3以内、例えば+/-2.1以内、例えば+/-2.0以内、例えば+/-1.8以内、例えば+/-1.6以内、例えば+/-1.5以内、例えば+/-1.4以内、例えば+/-1.3以内、例えば+/-1.2以内、例えば+/-1.1以内、例えば+/-1.0以内、例えば+/-0.9以内、例えば+/-0.8以内、例えば+/-0.7以内、例えば+/-0.6以内、例えば+/-0.5以内、例えば+/-0.4以内、例えば+/-0.3以内、例えば+/-0.25以内、例えば+/-0.2以内である親水性または疎水性指標を有する機能的に構成される置換アミノ酸に関する。

50

【0123】

蛋白に相互作用性の生物学的機能を与える際の親水性および疎水性アミノ酸指標の重要性は、当業者には十分に理解されている (K y t e & D o o l i t t l e , 1 9 8 2 および H o p p 、 国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号、それぞれ参照して本明細書に組み込まれる)。

【0124】

本明細書で使用されるようなアミノ酸疎水性指標値は以下の通りである：イソロイシン (+ 4 . 5) ; パリン (+ 4 . 2) ; ロイシン (+ 3 . 8) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8) ; システイン / シスチン (+ 2 . 5) ; メチオニン (+ 1 . 9) ; アラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; スレオニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロシン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタミン酸 (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5) (K y t e & D o o l i t t l e , 1 9 8 2) 。

【0125】

アミノ酸親水性値を以下の通りである：アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 . + - . 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 . + - . 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0 . 4) ; プロリン (- 0 . 5 . + - . 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; パリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) (米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号) 。

【0126】

本明細書に記載のペプチジル化合物に加えて、立体構造的に類似の化合物が、ペプチド構造の鍵の部分に模倣するために形成され得、そしてその当該化合物はまた、本発明のペプチドと同様に使用され得る。これは、当業者には既知のモデリングおよび化学的デザインの技術により達成され得る。例えば、テトラペプチド構造を模倣するために、例えばジアルギニンペプチド基本骨格のアミノ末端を修飾するようエステル化およびアルキル化が実施されてもよい。そのような立体構造的に類似の構成はすべて、本発明の範疇にあることが理解されよう。

【0127】

N 末端をアルキル化および C 末端をエステル化したペプチドもまた、本発明の範疇に含まれる。機能的等価物はまた、二量体または無関係な化学的部分を含む、同一または他の P A P P - A 2 フラグメントおよび / または P A P P - A 2 分子を用いて形成される、グリコシル化して共有結合性または凝集性の共役体を含む。そのような機能的等価物は、当該分野において既知の方法により、N 末端および C 末端のいずれか一方または両方を含むフラグメントにおいて見られる群への機能性の結合により調製される。

【0128】

機能的等価物が、それゆえカルボキシル末端の脂肪族またはアシルエステルまたはアミド、アルキルアミン、またはカルボキシル側鎖を含む残基に共役した、例えばアスパラギン酸残基でアルキルアミンに共役したフラグメント；水酸基を含む残基の O - アシル誘導体およびアミノ末端のアミノ酸またはアミノ基を含有する残基の N - アシル誘導体、例えば f M e t - L e u - P h e または免疫原性蛋白を有する共役体を含み得る。アシル基の誘導体は、アルキル部分の群 (C 3 ~ C 1 0 の直鎖アルキルを含む) から選ばれ、それによりアルカノイル種、および炭素環式またはヘテロ環式化合物を形成し、それによりアロイル種を形成する。反応基は、好ましくは反応側鎖の基を通じて不溶性のマトリクスに架橋結合する蛋白に使用するそれ自身は既知の二官能性化合物である。

【0129】

共有結合性または凝集性の機能的等価物およびその誘導体は、イムノアッセイにおける試

薬として、またはアフィニティー精製法に有益である。例えば、本発明に記載の P A P P - A 2 のフラグメントは、それ自身既知の方法により臭化シアン活性化セファロースに共有結合することにより可溶化され、抗 P A P P - A 2 抗体または細胞表面レセプターのアッセイまたは精製に使用されるグルタルアルデヒド架橋を用いてまたは用いないでポリオレフィン表面に吸収され得る。フラグメントは、検出可能な基で標識化、例えばクロラミン T 法による放射性ヨウ素化される、希土類キレートに共有結合される、または例えば診断アッセイに使用する別の蛍光部分と共役され得る。

【 0 1 3 0 】

P A P P - A 2 の好ましい予め決められたフラグメントの突然変異誘発は、アミノ酸を、通常、約 1 ~ 1 0 個程度のアミノ酸残基、好ましくは約 1 ~ 5 個のアミノ酸残基を挿入する、あるいは約 1 ~ 1 0 個の残基、例えば約 2 ~ 5 個の残基を欠失することにより実施可能である。

10

【 0 1 3 1 】

1 つの実施態様において、P A P P - A 2 のフラグメントは、自動合成により合成される。任意の商業的に利用可能な固相法、例えば Merrifield の固相合成法が実施され得、その方法において、アミノ酸が、成長するアミノ酸鎖に順次付加される (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2146, 1963 参照)。

【 0 1 3 2 】

ポリペプチドの自動合成用装置は、Foster City, Calif. の Applied Biosystems, Inc. といった供給業者から市販で入手可能であり、一般的には取扱説明書に従って操作され得る。固相合成により、本発明に記載の任意の P A P P - A 2 フラグメントに所望のアミノ酸置換を導入することが可能になる。置換、欠失、相挿入、またはその任意のサブコンビネーションが、組み合わされて機能的等価物の最終配列に到達し得ることが理解されよう。挿入は、例えば疎水性または免疫原性蛋白、または任意のポリペプチドといった担体、または担体と同様の役割をすることが可能な骨格構造を用いたアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合を含むと理解されるはずである。

20

【 0 1 3 3 】

本発明に記載の P A P P - A 2 のフラグメントのホモ二量体およびヘテロ二量体を含む二量体を含むオリゴマーも提供され、本発明の範疇に該当する。P A P P - A 2 の機能的等価物および変異体が、他のアミノ酸配列を有する、または天然の P A P P - A 2 配列を有するホモ二量体およびヘテロ二量体として生成可能である。ヘテロ二量体としては、いかなる生物活性をも有するまたは示す必要がない免疫反応性 P A P P - A 2 フラグメントならびに P A P P - A 2 フラグメントを含有する二量体である。

30

【 0 1 3 4 】

本発明に記載の P A P P - A 2 フラグメントは、インビトロおよびインビボの両方で合成され得る。インビトロの合成法は周知であり、P A P P - A 2 のインビボでの合成法に好適なまたは好適に適応可能な方法は、従来技術でも示されている。インビボで合成される場合、宿主細胞は、P A P P - A 2 またはそのフラグメントをエンコードする DNA を含有するベクターを用いて形質転換される。ベクターは、複製可能な核酸構築物として定義されている。ベクターは、P A P P - A 2 の発現を仲介するために使用される。発現ベクターは、複製可能な DNA 構築物であり、予め決められた P A P P - A 2 フラグメントをエンコードする核酸配列、またはインビボで発現可能な任意の機能的等価物が、好適な宿主においてそのフラグメントまたは等価物の発現に影響を与えることが可能な好適なコントロール配列に実施可能に結合される。そのようなコントロール配列は、当該分野においては周知である。

40

【 0 1 3 5 】

多細胞生体由来の細胞培養により、好ましい生体細胞となる。原則として、脊椎動物培養由来であろうと無脊椎動物培養由来であろうと任意の真核細胞培地が高等であるほど有効

50

である。例えば有益な宿主細胞株は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、およびWI38、BHK、COS-7、293およびMDC K細胞株である。好ましい宿主細胞は、内因性のPAPP-A2を合成することが既知の真核細胞である。当該宿主細胞の培養物は、フラグメントの起源として単離および使用され得、あるいは成育状態を促進または阻害することを目的とする治療法、あるいはヒトまたは動物の身体に関して実施される治療法を含む治療的処置法において使用され得る。

【0136】

特定の実施態様において、本発明は、本発明に記載のポリペプチドフラグメントに関し、PAPP-A2フラグメントは、その任意のプロセシング変異体を含む、PAPP-A2の成熟部分に相当する234~1791のアミノ酸残基を含むかあるいは本質的に構成される。

10

プロセシング変異体は、シグナルペプチダーゼおよびフリニン(furin)を含むがそれに限定されない任意のプロテアーゼにより触媒された、別のプロセシング事象、可能なプロセシング事象の結果生成する変異体である。1つの推定される開裂部位は、233位の後ろに位置し、本明細書の以降において詳細に示されている。別の推定される開裂部位は、RQRRモチーフ(PAPP-A2のアミノ酸配列において196~199位)の後ろに位置する。プロセシング変異体は、PAPP-A2がヒトまたは動物の組織、血清または体液において発現されるときにインビボでのプロセシングから生じる変異体を含むと理解されるはずである。

【0137】

20

配列番号2に示される成熟配列(アミノ酸残基234~1791)から本質的に構成される成熟PAPP-A2アミノ酸配列は、1つの実施態様において、1~約10個のN末端アミノ酸またはC末端アミノ酸、好ましくは1~10個のN末端アミノ酸、例えば2~8個のN末端アミノ酸、例えば3~6個のN末端アミノ酸の間が欠損しているこの部分の配列を含むことが理解されるはずである。

【0138】

また、本明細書において使用されるように、本質的に構成されるという定義においては、配列番号2に示される成熟配列(アミノ酸残基234~1791)がそれに加えて更に1~約10個のN末端アミノ酸またはC末端アミノ酸、好ましくは1~10個のN末端アミノ酸、例えば2~8個のN末端アミノ酸、例えば3~6個のN末端アミノ酸を有することも含まれる。この本質的に構成されるという定義はまた、他の態様において適用されて、PAPP-A2の特定部分と結合して使用されることに制限されない。この定義は、プロセシングされたPAPP-A2がもともと単離されているもの以外の、組織、血清、または体液において別のプロセシングから生じるポリペプチドを含む他のプロセスPAPP-A2ポリペプチドにも適用されるはずである。

30

【0139】

更に、好ましいフラグメントは、PAPP-A2のprepro部分に相当するアミノ酸残基1~233、PAPP-A2のpro部分に相当するアミノ酸残基23~233、PAPP-A2のシグナルペプチドまたはリーダー配列に相当するアミノ酸残基1~22を含み、あるいはそれらから本質的に構成され、当該配列は、配列番号2のアミノ酸残基234~1791に相当するPAPP-A2の成熟部分に実施可能に結合される。

40

組み換えPAPP-A2ポリペプチド、またはそのフラグメントも提供され、当該ポリペプチドにはヒト蛋白、あるいは当該ポリペプチドに天然に付随する他の蛋白がないのが好ましい。

【0140】

更なる態様において、i)本発明に記載のポリヌクレオチド、および/またはii)本発明に記載のベクター、および/またはiii)本発明に記載の宿主生体、および/またはiv)本発明に記載のポリペプチドを、生理的に許容される担体と組み合わせて含む組成物が提供される。

更に別の態様において、i)本発明に記載のポリヌクレオチド、および/またはii)本

50

発明に記載のベクター、および/または i i i) 本発明に記載の宿主生体、および/または i v) 本発明に記載のポリペプチドを、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

【0141】

本発明は更に、本発明に記載の P A P P - A 2 ポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異性を有する抗体の生成法に関し、当該方法は、

- i) 宿主生体を提供し、
 - i i) その宿主生体を、請求項 10 に記載のポリペプチドを用いて免疫し、そして
 - i i i) 当該抗体を得る、
- ことからなるステップを含む。

10

【0142】

本発明に記載の P A P P - A 2 ポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特定の結合親和性を有するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体がまた提供される。該抗体は、モノクローナルであるのが好ましい。

【0143】

更なる態様において、本発明に記載の P A P P - A 2 ポリペプチドの生成法が提供され、当該方法は、

- i) 好適な宿主生体、好ましくは哺乳類細胞を提供し、
 - i i) ステップ i) で提供された宿主生体を、本発明に記載のポリヌクレオチド、または本発明に記載のベクターを用いてトランスフェクトまたは形質転換し、
 - i i i) ステップ i i) で得られた宿主生体を該ポリヌクレオチドまたはベクターによりエンコードされたポリペプチドの発現に好適な条件下で培養し；そして所望により
 - i v) 宿主生体による組み換え発現の結果生じるポリペプチドを、その宿主生体から単離する、
- ことからなるステップを含む。

20

【0144】

本発明の更に更なる態様において、アンチセンス法を用いて細胞中の P A P P - A 2 の発現を阻害および/または減少させる方法が提供され、当該方法は、

- i) 本発明に記載のアンチセンスポリヌクレオチドを提供し、
 - i i) ステップ i) において提供された当該アンチセンスポリヌクレオチドを用いて、P A P P - A 2 を発現可能な細胞をトランスフェクトまたは形質転換し、
 - i i i) ステップ i i) において得られた細胞を、P A P P - A 2 の発現に關与する当該細胞において、ステップ i) で提供されたポリヌクレオチドの相補的なポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションに好適な条件下で培養し、そして
 - i v) 当該細胞において P A P P - A 2 の発現を阻害および/または減少させる、
- ことからなるステップを含む。

30

【0145】

該アンチセンスポリヌクレオチドおよび該相補的なポリヌクレオチドは、別々のポリヌクレオチド分子から同時発現されてもよく、あるいはそれらが、同一の分子から発現されてもよい。ハイブリダイゼーションの別法として、該方法は、逆転写 P C R 法 (r t P C T 法) の使用を含み得る。

40

【0146】

本発明の更に別の態様において、個人から得た生物学的サンプルにおける P A P P - A 2 の検出法、あるいは P A P P - A 2 量の測定法が提供され、当該方法は、

- i) 当該個人から生物学的サンプルを得て、
- i i) そのサンプルにおいて、
 - a) P A P P - A 2 ポリペプチドまたはそのフラグメント、および/または
 - b) P A P P - A 2 発現に由来する m R N A 形態のポリヌクレオチド、および/または
 - c) P A P P - A 2 特異的プロテアーゼ活性、好ましくは I G F B P - 5 プロテアーゼ活性、または I G F B P - 5 の誘導体に対して示される蛋白分解活性を検出することにより

50

サンプル中の P A P P - A 2 を検出する、
ことからなるステップを含む。

【 0 1 4 7 】

該方法は、ステップ i i) で検出された P A P P - A 2 または P A P P - A 2 量を、
a) P A P P - A 2 の予め決められた量および / または濃度 ; および / または
b) P A P P - A 2 m R N A の予め決められた量および / または濃度 ; および / または
c) 予め決められた P A P P - A 2 特異的なプロテアーゼ活性、
からなる群から選ばれる予め決められた値と比較することからなるステップを更に含んで
いてもよい。

1 つの実施態様においてその予め決められた値は、当該個人の正常な健康状態を示してい
る。 10

該生物学的サンプルは、血液、尿、胸腔内液、口腔洗浄液、組織バイオパシーおよび卵胞
液からなる群から選ばれるのが好ましい。

【 0 1 4 8 】

P A P P - A 2 の量が、P A P P - A 2 蛋白の量として測定される場合、その P A P P -
A 2 蛋白が免疫化学分析により測定されるのが好ましく、当該方法においては P A P P -
A 2 蛋白が、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体により検出される。P A P P - A 2 蛋
白はまた、少なくとも 1 つの更なる成分、好ましくは例えば p r o - M B P (p r o - 主
要塩基性蛋白) であるがそれに限定されないポリペプチドを含む複合体において検出され
得る。P A P P - A 2 はまた、P A P P - A 2 単量体としてあるいは P A P P - A 2 二量 20
体として検出され得る。

【 0 1 4 9 】

本発明の更なる態様は、個人における病態の診断法に関し、当該方法は、
i) P A P P - A 2 の検出法または P A P P - A 2 量の測定法を実施し、そして
i i) その病態を診断する
からなるステップを含む。

【 0 1 5 0 】

該病態は、例えばトリソミー 2 1、トリソミー 1 8、トリソミー 1 3、および開放型二分
脊椎からなる群から選ばれる胎児異常であるがそれに限定されない胎児異常が好ましい。
本発明に従って診断可能な更なる胎児異常は、子宮外妊娠、開放型二分脊椎、神経管閉鎖 30
障害、腹部壁欠損、E d w a r d s 症候群、P a t e a u s 症候群、T u r n e r 症候群
、モノソミー X、または K l e i n - f e l t e r ' s 症候群である。

【 0 1 5 1 】

別の態様において、該病態は、再狭窄、アテローム性心筋梗塞、創傷治癒、線維症、心筋
梗塞、骨粗鬆症、リュウマチ性関節炎、多発性骨髄腫、または癌を含むがそれに限定され
ない成長促進状態および成長阻害状態からなる群から選ばれる異常な成長状態である。

【 0 1 5 2 】

本発明の更に更なる態様において、生物学的サンプルにおける本発明に記載のポリヌクレ
オチドの発現検出法が提供され、当該方法は、
i) 本発明に記載のポリヌクレオチドを推定で含有する生物学的サンプルを提供し、そし 40
て
i i) その生物学的サンプルを、i) 本発明に記載のポリヌクレオチドに相補的な、およ
び i i) それとハイブリダイズ可能な鎖を含むポリヌクレオチドと接触させ、そして
i i i) ハイブリダイゼーションが起こさせ、そして
i v) ステップ i i i) で得られたハイブリダイゼーション複合体を検出する、
ことからなるステップを含み、
当該方法において、ハイブリダイゼーション複合体の存在は、本発明に記載のポリヌクレ
オチドまたはそのフラグメントの生物学的サンプルにおける発現を示している。

【 0 1 5 3 】

本発明の更に更なる態様において、P A P P - A 2 のプロテアーゼ活性を阻害する薬剤の 50

同定法が提供され、当該方法は、

i) a) 本発明に記載のポリペプチドまたはそのフラグメント、および b) 当該ポリペプチドまたはフラグメントに対して予め決められた基質、および c) 推定の阻害剤をインキュベートし、そして

ii) 該基質の蛋白分解が阻害されるかどうかを決定する

、ことからなるステップを含む。

該基質は、内部でクエンチングする蛍光性ペプチドであり得るポリペプチドを含むのが好ましい。1つの好ましい基質は、IGFBP-5またはそのフラグメントを含むか、あるいはそれから本質的に構成される。

【0154】

本発明はまた、PAPP-A2のプロテアーゼ活性を阻害する薬剤を同定する当該方法に従って得られる阻害剤に関する。

病態の処置を必要とする個体において、その病態を処置するための薬物の製造における当該提供された阻害剤の使用も提供される。

【0155】

更に更なる態様において、本発明は、PAPP-A2のプロテアーゼ活性を促進可能な薬剤の同定法に関し、当該方法は、

i) a) 本発明に記載のポリペプチドまたはフラグメント、および b) 当該ポリペプチドに対して予め決められた基質、および c) 推定の促進剤をインキュベートし、そして

ii) 該基質の蛋白分解が促進されるかどうかを決定する、

ことからなるステップを含む。

該基質は、内部でクエンチングする蛍光性ペプチドであり得るポリペプチドを含むのが好ましい。IGFBP-5またはそのフラグメントが基質として特に好ましい。

【0156】

PAPP-A2のプロテアーゼ活性を促進可能な薬剤を同定する方法に従って得られる促進剤も提供され、本発明はまた、病態の処置を必要とする個体においてその病態を処置するための薬物の製造における当該促進剤の使用も提供される。

【0157】

更に別の態様において、個体の治療による処置法が提供され、当該方法は、i) 本発明に記載の医薬組成物、および/または ii) 本発明に記載の阻害剤、および/または本発明に記載の促進剤を当該個人に投与することからなるステップを含む。

【0158】

更に更なる態様において、PAPP-A2またはPAPP-A2の他の蛋白との複合体の精製法が提供され、当該方法は、

i) 本発明に記載のポリペプチド、またはそのフラグメントに対して特異的な結合親和性を有するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を提供し、そして

ii) PAPP-A2、またはそのフラグメントをアフィニティークロマトグラフィーにより精製する、

ことからなるステップを含む。

【0159】

本発明がその詳細な説明と組み合わせて示されている一方、前述の説明は、添付の請求の範囲により定義される本発明の範囲を説明し、そして制限しないことが意図されていることが理解される。他の態様、利点、および修飾は、以下に示す請求項の範疇である。

【0160】

図面の簡単な説明

図1は、preproPAPP-A2をエンコードするmRNAに相当するcDNA配列(5' 3'の方向で)を示す。配列のコード化部分およびその末端のストップコドン(*)だけが示されて、1~5376がナンバリングされている。preproPAPP-A2の翻訳されたポリペプチド配列も示されている。シグナルペプチド開裂部位は、SignalPV2.0を用いてnt.64-66によりエンコードされたアラニン残基の

10

20

30

40

50

後となると予測された (Nielsen et al., 1997, Protein Eng 10, 1-6)、<http://genome.cbs.dtu.dk/>にある WWW 予測サーバー)。preproPAPP-A2 のシグナルペプチド (nt. 1-66、22 残基) が太字で示されている。この図のヌクレオチド配列は、配列番号 1 の nt. 1~5376 を示している。この図の蛋白配列が配列番号 2 として示されている。

【0161】

図 2 は、アミノ酸配列に翻訳されたときの PAPP-A (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8) と、PAPP-A の N-末端部 (hom-N、受入れ番号 AL031734 のコード化部分) および C-末端部 (hom-C、受入れ番号 AL031290 のコード化部分) と同一性のある 2 つのゲノムクローン内に含まれる配列伸長部との間の相関関係を示す図式である。この図はまた、PAPP-A の中央領域と同一性のある cDNA 配列を得る方法をも示している。Hom-N、hom-C、および中央領域が一緒になって、新規な蛋白、PAPP-A2 の完全な配列をエンコードし、これは、PAPP-A のホモログである。該中央領域は、テンプレートとして特異的に初回刺激を受けて (プライマー、Rt-N-mid)、逆転写したヒト胎盤 mRNA、PCR 用にプライマー、PR-mid5 および PR-mid3 を用いて PCR により得られた (表 1)。完全長の PAPP-A2 をエンコードする cDNA 構築物を得るために、ゲノムクローン hom-N および hom-C に相当する cDNA クローンも、テンプレートとして特異的に初回刺激を受けた胎盤 mRNA (プライマーは示さず、表 1 参照) により合成された cDNA を用いて得た。これは、明細書中に詳細に示されるように、シグナルペプチド伸長部 (hom-N 中) および停止コドン (hom-C の 3' 末端) の同定が必要とされた。プライマーはすべて、表 1 に示されている。注：ここで示される配列の相対的な位置は、実施される実験に従うものであるが、図は、縮尺に正確には示されていない。

【0162】

図 3 は、preproPAPP-A2 (配列番号 2) のアミノ酸配列を、preproPAPP-A と整列して示している。preproPAPP-A2 (PA2) の推定のアミノ酸配列が、CLUSTAL W (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res 22, 4673-80) を用いて preproPAPP-A (PA) (Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63)、AAC50543) の配列と整列された。PAPP-A の prepro 部分が、PAPP-A2 に相当する領域と有意な同一性を示さなかったため、そのアラインメントを、proペプチドの長さの違いを強調するために手動で調節した。矢印は、PAPP-A については以前に見い出された成熟蛋白の N 末端部 (Glu-81) (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8)、そして PAPP-A2 については本発明で見出された N 末端部 (Ser-234) を示す。推定のシグナルペプチドは、SignalP V2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein Eng 10, 1-6) を用いて強く予測されるが、小文字で示している。PAPP-A2 の pro 部分は、Met-168 に相当する候補開始コドンを別に 1 つ含むが、SignalP を用いてこの残基の後に続くシグナルペプチドは何も予測されなかった。PAPP-A の配列モチーフ (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8) もまた、PAPP-A2 において見い出され：触媒亜鉛結合モチーフおよび推定の Met-ターンの残基は、両方の配列において下線が引いて、太字にしている。Lin-ノッチモチーフ (LNR1-3) および短いコンセンサスリピート (SCR-1~5) は四角で囲んでいる。システイン残基は、影付きになっている、成熟 PAPP-A のシステインはすべて、PAPP-A2 でも見られる。更に、分泌型の PAPP-A2 は 4 つのシステイン残基 (Cys-343、Cys-533、Cys-618、および Cys-1268) を有し、PAPP-A にはそれに相当するものはない。

【0163】

10

20

30

40

50

図4は、ウエスタンブロッティングおよびクマシー染色によるPAPP-A2を示している。トランスフェクトした293T細胞由来の培地は、モノクローナル抗c-mycを用いてウエスタンブロットされる。レーン1、空ベクターでトランスフェクトした細胞；レーン2、c-mycペプチド(pPA2-mH)を用いてC末端をタグ化した野生型PAPP-A2をエンコードするcDNAを用いてトランスフェクトした細胞、非還元型；レーン3、不活性化E734Q変異体(pPA2-KO-mH)を有するPAPP-A2をエンコードするcDNAでトランスフェクトした細胞、非還元型；レーン4、レーン2と同じであるが還元型。可能な自触反応を除去するために、組み換えPAPP-A2を、pPA2-KO-mHでトランスフェクトした細胞の血清フリーの培地からニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した(レーン5、還元型)。

10

【0164】

図5は、IGFBP-1~6に対するPAPP-A2活性を示す。空ベクター(-)またはPAPP-A2をエンコードするcDNA(pPA2)(+)でトランスフェクトした293T細胞由来の培地を、6つのIGFBP(BP1~BP6)のそれぞれと一緒にインキュベートし、その活性を放射標識したIGF-IIを用いてリガンドブロッティングにより評価した。IGFBP-5の完全の開裂は、BP5+レーンにおけるシグナルの不在から明らかである。IGFBP-3の部分分解もまた、明らかである。

【0165】

図6は、IGFBP-5に対するPAPP-A2の蛋白分解活性を示す。空ベクター(レーン1)、不活性化E734Q変異体を有するPAPP-A2をエンコードするcDNA(pPA2-KO)(レーン2)、または野生型PAPP-A2をエンコードするcDNA(pPA2)(レーン3~6)でトランスフェクトした293T細胞由来の培地を、C末端をc-mycタグ化したrIGFBP-5と一緒にインキュベートした。蛋白分解活性を、抗c-mycを用いてウエスタンブロッティングにより評価した。「i」は、インタクトなrIGFBP-5を示し；「c」は、検出可能なC末端c-mycタグ化開裂生成物を示す。阻害剤なしの場合において、野生型PAPP-A2は、すべてのrIGFBP-5を分解した(レーン3)。PAPP-A2活性は、10mMフェナントロリン(レーン4)および5mMEDTA(レーン5)により止められるが、100mM3,4-DCI(レーン6)によっては影響は受けなかった。精製されたrIGFBP-5のクマシー染色したSDS-PAGEが、精製されたPAPP-A2による消化前(レーン7)および後(レーン8)で示されている。抗c-mycを用いた同じ消化のウエスタンブロットも示されている(レーン9)。配列分析により、Ser-142とLys-143の間の部位でPAPP-A2がIGFBP-5を開裂することが明らかになった。

20

30

【0166】

図7は、PAPP-A2 mRNAコード化領域のcDNA配列を示しており3'UTRの配列が直接続いている。3'UTRの配列は、実施例6.3で詳細に示されるように得られる。この配列の最初の5376個のヌクレオチド(nt.1~5376)は、図1および配列番号1(nt.1~5376)で示されるコード化配列を示す。この配列のヌクレオチド5377~8527は、配列番号3(nt.5377~8527)で示されるPAPP-A2 mRNAの3'UTRに相当する。

40

【0167】

図8は、PAPP-A/promBP複合体(上の棒状の図)中のPAPP-Aサブユニットのジスルフィド構造を示している。PAPP-A/promBP複合体をプロテアーゼおよび臭化シアンで分解した後、標準的なHPLCにより、PAPP-A/promBP複合体起源のシステイン含有ペプチドを単離した。ペプチドは、アミノ酸分析、N末端配列分析により、そして質量分析により同定した(Overgaard, M. T., Oxvig, C., 未公表)。ジスルフィド結合が、細線で示されている。2つのシステイン残基は、promBPへの鎖間ジスルフィド架橋を形成し、1つがPAPP-Aへの鎖間架橋を形成してそれにより二量体が生じる(図示の通り)。アスタリスクは、パートナーが見い出されていないシステインを示す。成熟PAPP-Aにおいて存在するシス

50

テイン残基は、成熟 P A P P - A 2 においても存在している（図 3 参照）。P A P P - A 2 ジスルフィドペアは同じであると仮定するのが理にかなっている。それゆえ、この情報は、P A P P - A 2 の単離されたドメイン（フラグメント）の発現に対して境界領域を決定する際、重要である。P A P P - A の遺伝子構造も示されている（下の棒状の図）。エクソン/イントロンの境界は、P A P P - A c D N A (A N X 6 8 2 8 0) のゲノム配列 (A N A B 0 2 0 8 7 8 、 A L 3 5 3 1 4 1 、 および A L 1 3 7 0 2 4) との比較に基づいている。中央の棒状の図は、上側および下側の棒状の図の情報に基づいた P A P P - A の推定のドメインを示している。

【 0 1 6 8 】

実施例

6 . 1 . P A P P - A 2 をエンコードするヌクレオチド配列の同定

本明細書において提供される受入れ番号 (A N) は、G e n - B a n k または他の生物学的配列データベースで示された配列をいう。A N は、特定の A N のもとで示される蛋白またはヌクレオチド配列と置き換え可能である。

【 0 1 6 9 】

P A P P - A と相同性のある D N A 配列 ((K r i s t e n s e n e t a l . , 1 9 9 4 , Biochemistry 33 , 1 5 9 2 - 8) 、 A N C A A 4 8 3 4 1) について、公式のヌクレオチドデータベースを調査すると、ポリペプチド配列に翻訳された場合、A N A L 0 3 1 7 3 4 および A L 0 3 1 2 9 0 を有する 2 つのゲノムクローンが明らかとなった。両方とも、ヒト染色体 1 (1 q 2 4) 起源である。調査は、デフォルト設定による <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> で t b l a s t n プログラムを用いて、データベースの「nr」コレクションに対して実施された。この実施例において、P A P P - A は、(K r i s t e n s e n e t a l . , 1 9 9 4 , Biochemistry 33 , 1 5 9 2 - 8) に示すように、N 末端の G l u を残基 1 としてナンバリングしている。蓄積された配列記録 (A N X 6 8 2 8 0) において、この G l u は残基 5 である。

【 0 1 7 0 】

A L 0 3 1 7 3 4 で報告される配列は、1 6 8 8 3 5 の塩基対を含む。全体配列のうち 2 つの不連続配列伸長部 (n t . 1 0 3 4 3 2 ~ 1 0 3 5 6 6 、 および 1 4 0 8 4 6 ~ 1 4 1 9 1 9) が一緒に、翻訳されたときに P A P P - A ポリペプチド配列の残基 1 6 ~ 5 9 および 5 9 ~ 4 1 3 と整列される。A L 0 3 1 2 9 0 において報告される配列は、1 2 1 7 8 0 の塩基対を含む。全体配列のうち 4 つの不連続配列伸長部 (n t . 1 0 2 0 9 ~ 1 0 3 5 8 、 1 1 7 5 2 ~ 1 1 9 0 1 、 2 0 5 3 1 ~ 2 0 4 6 3 、 および 6 0 5 3 6 ~ 6 0 6 5 2) が一緒に、翻訳されたときに P A P P - A ポリペプチド配列の残基 1 3 1 3 ~ 1 3 6 2 、 1 3 7 6 ~ 1 4 2 5 、 1 4 5 7 ~ 1 4 7 9 、 および 1 4 7 0 ~ 1 5 0 6 と整列される。両方のゲノム配列のコード化領域間の配列伸長部は、非コード化ゲノム D N A (イントロン) または整列しないコード化領域を示す。

【 0 1 7 1 】

これらの所見に基づいて、我々は、P A P P - A と相同性のある新規蛋白、P A P P - A 2 の存在を仮定した。そのあと、それは、A L 0 3 1 7 3 4 および A L 0 3 1 2 9 0 に報告される 2 つのゲノム配列により部分的に包含される P A P P - A 2 領域の完全なコード化配列を確立した。我々は、これらの連続的配列、h o m - N および h o m - C をそれぞれ示した（図 2）。しかしまず第 1 に、我々は、P A P P - A に対してまた相同性を示し、h o m - N および h o m - C (図 2) の配列に結合するコード化 c D N A 配列の存在を確立した。使用される重要なプライマーはすべて表 1 に示されている。1 7 9 1 残基の p r e p r o P A P P - A 2 をエンコードする c D N A 配列全体を、図 1 に示している。標準的なクローニング法が利用されて、すべての D N A 構築物は、配列決定により分析された。使用される方法は、以下に示される。P A P P - A 2 という名前は、この D N A 配列によりエンコードされた蛋白に対して使用される。

【 0 1 7 2 】

10

20

30

40

50

Hom-Nとhom-Cとの間の中央領域に相当する連続的なコード化cDNA伸長部のクローニング：該中央領域（図2）を得るために、テンプレートとしてヒト胎盤mRNAおよびプライマー、AL031290から誘導されるRT-N-midを用いて、cDNAを合成した（表1、図2）。このcDNAは、仮定のPAPP-A2の中央領域に相当するcDNAを得るために、PCRにおいてテンプレートとして使用した。PCRプライマーは、PR-mid5およびPR-mid3であった（表1、図2）。得られた中央領域のコード化配列は、図3の残基665～1572（配列番号1）、全体で908個のアミノ酸に相当する。

【0173】

【表1】

表1. 逆転写またはPCRに使用されるプライマーの部位。
プライマーは、使用順に示されている。

名称	起源 ^a	Nt番号 ^b	配列 ^c
RT-N-mid: AL031290		10262-10281, (4770-4789)	GCTCACACACCACAGGAATG*
PR-mid5: AL031734		141874-141894, (1947-1967)	GGCTGATGTGCGCAAGACCTG
PR-mid3: AL031290		10208-10229, (4716-4737)	GCATTGTATCTTCAGGAGCTTG*
PR-N5: AL031734		102606-102628, (-)	GAAGTTGACTTCTGGTTCTGTAG
PR-N3: -		-, (2380-2400)	CCCTGGGAAGCGAGTGAAGCC*
RT-C: AL031290		62982-63006, (-)	GCATTTCTTATAAGATCCTTCATGC*
PR-C5: -		-, (4180-4201)	GACAGCTGTCCGTCATTGCTGC
PR-C3: AL031290		62876-62897, (-)	CTTACTGCCTCTGAGGCAGTGG*

^a 該当するゲノムクローンの受け入れ番号が提供される。プライマー、PR-N3およびPR-C5は、hom-Nおよびhom-Cを繋ぐ配列中に位置し、それゆえデータベースには示されない。

^bヌクレオチド番号とは、該当する受け入れ番号を有するファイルにおいて報告される配列の番号をいう。この配列中になくプライマー、PR-N5、RT-C、およびPR-C3を除いて、括弧内には、配列番号1（図1）の対応番号が提供されている。

^c 配列は実際のプライマー配列（5'から3'の方向）である。アスタリスクが付された配列は、データベース配列または図1に挙げられた配列と相補的である。

【0174】

PAPP-A2のN末端部に相当する連続的なコード化cDNA伸長部（hom-N）のクローニング：5'方向に更に続くゲノム配列AL031734のマニュアル調査により、PAPP-A残基16～59に相当する配列伸長部の読み取り枠：Nt. 102646～103566が、メチオニン残基で始まる307残基のポリペプチド配列をエンコードすることが明らかになった。この所見に基づいて、中央領域（上述で詳細に示されるような、RT-N-midで初回刺激を受けた胎盤mRNA）を得るために使用されるcDN

10

20

30

40

50

Aを、hom-Nの連続的なcDNAを得るためのPCRにおいてテンプレートとして使用した。PCRプライマーは：PR-N5およびPR-N3（表1、図2）であった。

【0175】

PAPP-A2のC末端部に相当する連続的なコード化cDNA伸長部(hom-C)のクローニング：AL031290のゲノム配列に適合するヒトEST配列について利用可能なデータベース（デフォルト設定を有するhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/でのblastnプログラムを用いて）を調査することにより、伸長部nt.60536~60652（上述参照）ですでに定義されたAL031290のコード化領域のいくつかとオーバーラップするEST配列が明らかになった。AL031290のnt.62790-62995もまた、胎盤起源のヒトEST配列、AA368081の配列と適合した。ポリペプチド配列に翻訳されたときに、このEST配列は、PAPP-AのC末端部と相同性を示した。更に、停止コドンが、PAPP-Aのアミノ酸1537に相当するコード化配列内に存在した。すなわち、その2つの配列が整列化されるときに、PAPP-A2は、PAPP-AよりもC末端側には存在しない。このことに基づいて、テンプレートとしてヒト胎盤mRNAおよびAL031290起源のプライマー（表1）を用いて、cDNAを合成した。PCRプライマー、PR-C5およびPR-C3（表1、図2）を用いて、hom-Cの連続的なcDNAを得るためのPCRにおいてテンプレートとして、このcDNAを使用した。

10

【0176】

すべてのPCRは、Pfuポリメラーゼ(Stratagene)を用いて実施した。3つのオーバーラップするPAPP-A2 cDNA(hom-N、新規な中央領域、およびhom-C)はすべて、ベクターPCR-BluntII-TOPO(Invitrogen)中でクローン化した。いくつかのクローンを双方向で配列決定した。その構築物は、それぞれp2N、p2Mid、およびp2Cという。PAPP-A2をエンコードする全体的なヌクレオチド配列は、図1（および配列番号1）に示されている。

20

【0177】

6.2. PAPP-A2のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の分析
成熟PAPP-Aの1547残基のうち、708残基(45.8%)が、preproPAPP-A2と同一である。PAPP-Aのprepro部分とPAPP-A2の残りの(N末端)との間には、十分な同一性はない(図3)。この実施例において、PAPP-Aは、(Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63)、AAC50543)に従ってナンバリングしている。

30

【0178】

PAPP-Aにおいて認識される配列モチーフ(Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8)は、PAPP-A2にも存在する：伸長された亜鉛結合連続配列、3つlin-ノッチ反復(LNR1~3)、および5つの短い連続反復(SCR1~5)(図3)。更に、PAPP-Aの82個のシステイン残基すべてが、その2つの蛋白の間に保持されて、更に4個のシステインがPAPP-A2ポリペプチド配列中に存在する。

【0179】

6.3. PAPP-A2 mRNA起源のヒトEST配列の同定
AL031290のゲノム配列と適合するEST配列のクラスターを、PAPP-A2をエンコードする配列の末端部からのおよそ1.2kbで始まり、AL031290のnt.64000~66000周辺で同定した。PAPP-A2のコード化領域およびこのクラスターに結合するmRNAの存在が、AL031290由来のプライマー(5'-GGAAAGAGCAGAGTTCACCCAT-3'、AL031290のnt.64900-64879)およびPAPP-A2をエンコードする配列(5'-CCGTCCTTAGTCCACTGCATCC-3'、AL031290のnt.20499-20519、AF311940のnt.5171-5191)、およびテンプレートとしてオリゴdT初回刺激を受けた胎盤cDNAを用いて、PCRにおいて明らかにされた(Over

40

50

gaard et al., 1999, *Biol Reprod* 61, 1083-9)。
 予測されるように、結果の生成物のサイズは、2.2 kb であり、更に約 3 kb の 3' UTR を有する PAPP-A2 mRNA の存在が示される。組織間の分配は、表 2 に示されている。

【0180】

【表 2】

表 2. 利用可能な EST 配列^aにより評価されたヒト組織における PAPP-A2 mRNA の発現

起源組織	見いだされた EST の数	
ヒト胎盤	38	
妊婦の子宮	21	
胎児の肝臓 / 脾臓	11	
腎臓	5	
網膜 / 胎児の網膜	3	
核膜至質	2	
胎児の心臓	2	20
Gessler Wilms 腫瘍	2	
他の組織	14	

^a blast アルゴリズム (Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402) を用いて、全部で 98 の PAPP-2 mRNA 配列の 3' UTR と適合するヒト EST 配列を同定した。組織間の分配は、個々のデータベースエントリー(示さず)のアノテーションに基づいている。

^b 組織プール起源、あるいは 1 つの EST 配列のみが示された組織起源の EST 配列

30

【0181】

6.4. 組み換え PAPP-A2 および PAPP-A2 変異体の哺乳類細胞における発現
 以下に示すプラスミド構築物が作成された：

a) pPA2：発現ベクター、pCDNA3.1+においてアミノ酸 1-1791 をエンコードする pre-pro-PAPP-A2 の cDNA 配列

b) pPA2-KO：pPA2 と同様であるが、PAPP-A2 の活性部位の Glu-734 が Glu 残基と置換されたもの (E734Q)

c) pPA2-mH：発現ベクター、pCDNA3.1/Myc-His(-)A を含有する、アミノ酸 1~1791 をエンコードする pre-pro-PAPP-A2 の cDNA 配列で、後に停止コドンは続くのではなくて、c-myc および His タグが続いているもの

d) pPA2-KO-mH：pPA2-mH と同様であるが、pPA2-KO が E734Q 置換されたもの

【0182】

3 つのオーバーラップしている PAPP-A2 cDNA フラグメント (hom-N、中央領域、および hom-C) を、PAPP-A2 をエンコードする一本の連続した cDNA 配列の構築に使用した。そのオーバーラップするフラグメントは、ベクター、PCR-BLUNT II-TOPO (Invitrogen) 中にすべて含まれており、上述に詳細に示すように、p2N、p2Mid、および p2C という (実施例 6.1)。適当な配

50

向の cDNA 挿入部を有する p2N および p2C のクローンを選んだ。

【0183】

pPA2 の構築 : NotI - BamHI フラグメントを p2C から切り取り、pBlue script IISK+ (Stratagene) 中でクローン化して p2C Blue を得た。NotI - SpeI フラグメントを p2N から切り取り、SpeI - BclI フラグメントを p2Mid から切り取った。それら 2 つのフラグメントを、1 つの反応において p2C Blue の NotI / BclI 部位にリゲートして、PAPP - A2 cDNA 全体を含む p2N Mid C Blue を得た。pBlue script IISK+ の NotI - ApaI フラグメントを切り取って、哺乳類の発現ベクター、pcDNA3.1+ (Invitrogen) の NotI / ApaI 部位中にリゲートして、このベクターの修飾型である、pcDNA - NA を得た。その後、完全長の cDNA を、NotI および XhoI を用いて p2N Mid C Blue から切り取り、pcDNA - NA 中でクローン化して pPA2 を得た。SpeI と BclI を除いて、使用されるすべての制限部位は、ベクターのマルチクローニング部位中にあり、両方とも p2N、p2Mid、および p2C のコード化 PAPP - A2 配列伸長部の 2 つのオーバーラップ領域のそれぞれに位置する (それぞれ、図 3 の nt . 2365 および nt . 4203)。

【0184】

pPA2 - KO の構築 : pPA2 - KO 構築物は、PAPP - A2 の活性部位の Glu - 734 残基が Gln 残基と置換した pPA2 発現構築物の一変異体である。従って、その突然変異体は、E734Q である。pPA2 - KO 構築物は、テンプレートとして pPA2 を用いて、オーバーラップ伸長 PCR 法 (Horet al., 1989, Gene 77, 51 - 9) を用いた部位特異的突然変異誘発により作成した。簡単にいうと、外側のプライマーが、5' - CGCTCAGGGAAGGACAAAGGG - 3' (5' 末端プライマー、配列番号 1 の nt . 976 ~ 995) および 5' - CTAGAAGGCACAGTCGAGGC - 3' (3' 末端プライマー nt . 1040 ~ 1021、ベクター pcDNA3.1+ の配列) である。オーバーラップする内部プライマーは、5' - TGTCCCACCTTGATGGATCATGGTGTCTGGTGTGG - 3' (配列番号 1 の nt . 2210 ~ 2178、E734Q の結果 nt . 2200 は C ではなくて G である) および 5' - CCATCAAGTGGGACATGTTCTGGGAC - 3' (配列番号 1 の nt . 2196 ~ 2221、E734Q の結果、nt . 2200 は G ではなくて C である) である。その結果生成する突然変異フラグメントを、XbaI および XhoI を用いて消化し、pPA2 と交換して pPA2 - KO を産生した。PCR はすべて、PfuDNA ポリメラーゼ (Stratagene) を用いて実施し、全ての構築物を配列分析により確認した。

【0185】

pPA2 - mH の構築 : 2 つのプライマー (5' - GAGGGCCTGTGGACCCAGGAG - 3'、配列番号 1 の nt . 4906 ~ 4926、および 5' - GACGTAAGCTTCTGATTTCTTCTGCTTGG - 3'、配列番号 1 の nt . 5373 ~ 5354、HindIII 部位、AAGCTT、および PCR 生成物の開裂を促進する nt . GACGTA の前にある) を、PCR において、テンプレートとして pPA2 と一緒に使用して、発現ベクターへのインフレームでリゲーションするために HindIII 部位で置換された停止コドンを持つ PAPP - A2 の C 末端の 156 残基をエンコードするヌクレオチドフラグメントを産生した。簡単にいうと、PCR 生成物を EcoRI と HindIII を用いて消化し、pcDNA3.1 / Myc - His (-) A ベクターの EcoRI / HindIII 部位中でクローン化して pPA2C - mH を産生した。NotI - XbaI フラグメント (PAPP - A2 の N 末端部分をエンコードする)、および XbaI - EcoRI フラグメント (PAPP - A2 の残りの中央部分をエンコードする) を pPA2 から切り取って、1 つの反応において pPA2C - mH の NotI / EcoRI 部位にリゲートした。その結果生成する構築物、pPA2 - mH は、PAPP - A2、続いて KLG P 残基、myc エピトープ (EQKLISEEDL)、NSAVD 残

基、および6個のH-残基(アミノ酸は、1文字表記されている)をエンコードした。6個のヒスチジン残基の直後に停止コドンが続いている。

【0186】

pPA2-KO-mHの構築: 残基Glu-734をGln残基に置換したpPA2-mH変異体を構築した: pPA2-KOのNotI-KpnIフラグメントを切り取り、pPA2-mHのNotI-KpnI部位と交換してpPA2-KO-mHを産生した。

【0187】

哺乳類細胞における発現: すべての構築物(pPA2、pPA2-KO、pPA2-mH、およびpPA2-KO-mH)ならびに空の発現ベクター(pCDNA3.1+およびpCDNA3.1/Myc-His(-)A)を、組み換えPAPP-A2蛋白の発現のために哺乳類の細胞中に短期間トランスフェクトした。簡単にいうと、ヒトの胎児の腎臓293T細胞(293tsA1609neo)(DuBridge et al., 1987, Mol Cell Biol 7, 379-87)を、10%のウシ胎仔血清、2 mM グルタミン、非必須アミノ酸、およびゲンタマイシン(Life Technologies)を補充した高濃度のグルコースDMEM培地中で維持した。細胞を6 cmの培養皿上にプレATINGし、QIAPrep Spinキット(Qiagen)により調製した10 μgのプラスミドDNAを用いたリン酸カルシウム共沈(Pear et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90, 8392-6)により18時間後にトランスフェクトした。更に48時間後、その上清を回収して、血清フリーの培地(293SFMI, Life Technologies)で更に48時間置き換えた。その血清フリーの培地を回収して、遠心分離により除去した。

10

20

【0188】

構築物、pPA2-mHおよびpPA2-KO-mHを用いたトランスフェクションの結果生成する組み換え蛋白のウエスタンブロットングによる分析は、PAPP-A2が、220 kDaの蛋白(図2参照)として分泌されることを示した。ジスルフィド結合の還元により、バンド移動には目に見える変化はもたらされなかった。従って、PAPP-Aとは対照的に、PAPP-A2は、単量体として分泌される。

【0189】

6.5. タグ化PAPP-A2のアフィニティークロマトグラフィーによる精製 金属キレートアフィニティークラム(2 ml, Pharmacia)をニッケルイオンで帯電して、pPA2-KO-mHを用いて短期間トランスフェクトした細胞(実施例6.4参照)由来の血清フリー培地をロードした(50 ml)。1 M NaClを含有するPBS中の洗浄後、結合蛋白を、10 mM EDTAの0.5 mlのPBSフラクション中で溶出した。PAPP-A2を含有するフラクションを、SDS-PAGEにより位置決めした(図4、レーン5)。この蛋白は、空ベクターにより同じ方法で処置したトランスフェクトした細胞(偽のトランスフェクタント、mock transfectants)からは見られなかった。

30

【0190】

6.6. PAPP-A2のN末端配列分析

構築物、pPA2-KO-mH(実施例6.4および6.5参照)を用いてトランスフェクトした細胞の培地から精製された、C末端側をタグ化したPAPP-A2を還元し、10~20% SDSゲル上に流して、更にPVDF膜(ProBlott, Biosystemsより提供)上にブロットングした。4つのレーンのバンドを切り取って、オンラインのHPLCを備えたApplied Biosystems 477Aシーケンサー(Sottrup-Jensen, 1995, Anal Biochem 225, 187-8)で、N末端分析を実施した。PAPP-A2ポリペプチドのSer-234の前で、R(230)VKKの後の開裂の結果得られたおよそ20 pmol量でN末端配列: Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Ser-Asn(SPPEESN)が見られた。

40

【0191】

50

これにより、PAPP-A2がPAPP-Aと同様、prepro蛋白として合成されるという予測が確認される。P1位におけるアルギニン残基の不在は、この開裂の原因となるpro蛋白プロセシング酵素がフリンではなくて、似た別のpro蛋白転換酵素(Nakayama, 1997, Biochem J 327, 625-35)であることを示している。proPAPP-A2の開裂は、典型的にフリン開裂を示すR(196)QRR(Nakayama, 1997, Biochem J 327, 625-35)の後と予想されるかもしれない。我々は、開裂がこの部位で起こり、所見のN末端部が更なるプロセシングの結果によるものであるということ排除することはできない。

【0192】

6.7. インシュリン様成長因子結合蛋白(IGFBP)-5の開裂 10
 IGFBP-1(HepG2調整培地由来)、rIGFBP-2(GroPep)、rIGFBP-3(Powell博士より贈与)、rIGFBP-4(Austral)、rIGFBP-5(Andress博士より贈与)、およびrIGFBP-6(Austral)に対する活性をアッセイするために、放射標識したIGF-II(Bachem)を用いたりガンドプロットティング(Conover et al., 1993, J Clin Invest 91, 1129-37)を利用した。6つの結合蛋白のうち、IGFBP-5は、完全な開裂を示した(図5)。IGFBP-3は、一部分分解した(図5)。この開裂は、IGFの存在とは無関係であった。実験は、pPA2または空ベクターを用いてトランスフェクトした細胞由来の培地を用いて実施した。

【0193】

更なる分析に対して、組み換えIGFBP-5が哺乳類の細胞中で生成された。簡単にいうと、ヒト胎盤オリゴ-dTで初回刺激したcDNA(Overgaard et al., 1999, Biol Reprod 61, 1083-9)を、テンプレートとして用いて、ヒトIGFBP-5(受け入れ番号 M65062)をエンコードするcDNAを増幅した。XhoI部位(5'-TCCGCTCGAGATGGTGTGCTCACCGCGGT-3')およびHindIII部位(5'-CGATAAGCTTCTCAACGTTGCTGCTGTCG-3')を含有する特異的なプライマーを使用し、その結果のPCR生成物を消化して、pcDNA3.1/Myc-His(-)A(Invitrogen)のXhoI/HindIII部位中でクローン化した。完全長のproIGFBP-5をエンコードした構築物の直後に、残基KLG P、mycエピトープ(EQKLISEEDL)、NSAVD残基、および6個のH-残基(アミノ酸は、一文字表記されている)が続く。その構築物を、配列分析により確認した。トランスフェクション用のプラスミドDNAを、QIAPrep Spinキット(Qiagen)により調製した。組み換えIGFBP-5の細胞培養および発現は、上述の実施例6.4.に示される通りに実施した。

【0194】

ウエスタンプロットティングにより開裂分析を実施した(図6)。簡単にいうと、5μLの細胞培養培地中に含まれるような組み換えIGFBP-5を、pPA2、pPA2-KO、または空の発現ベクター(実施例6.4参照)を用いてトランスフェクトされた細胞由来の培養上清(10μL)と一緒にインキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水を添加して、50μLの最終容量とした。37℃で12時間インキュベーション後、15μLの反応混合物を、16% SDS-PAGEを還元して分離し、PVDF膜状にプロットティングし、C末端開裂生成物を、ペルオキシダーゼ共役型二次抗体(P260、DAKO)、および化学発光増幅(ECL、Amersham)を使用して、モノクローナル抗c-myc(クローン9E19、ATTC)により検出した。

【0195】

6.8. PAPP-A2活性の阻害 40
 IGFBP-5に対するPAPP-A2の蛋白分解活性の阻害能について、様々な薬剤を分析した。実験条件は、試験される薬剤を添加することを除いては、本質的には実施例6.7に示される通りであった(図6)。PAPP-A2の蛋白分解活性に影響を与えない 50

と見い出された薬剤としては更に、PMSFおよびアプロチニンが挙げられる。

【0196】

6.9. IGFBP-5における開裂部位の同定

開裂部位の決定については、精製されたrIGFBP-5(図6、レーン7)を、精製したPAPP-A2で消化し、SDS-PAGE(図6、レーン8)により分析した。プロットした物質のエドマン分解により、別々の目に見える分解生成物(図6、レーン8)は両方とも、N末端配列、K(144)FVGG A(IGFBP-5は、成熟蛋白のN末端Leuを残基を1としてナンバリングしている)を含んでいることが示された。2つのバンドは両方とも、C末端c-mycタグを含むため(図6、レーン9)、インタクトなC末端開裂フラグメントを示しており;それらは精製されたrIGFBP-5(図6、レーン7)の異質性により、様々にグリコシル化される可能性がある。両方のバンドとも、低レベル(45%)で、IGFBP-5に相当する第2の配列、L(1)GXFVHを含んでいた。Serが存在しないことは、第3のサイクルで予想されるが、Ser-3の炭化水素置換の証拠と考えられた。N末端開裂フラグメント上のO-結合型グリカンが、2つ別々のC末端フラグメントの周りをスマアさせる可能性がある。反応混合物(>100 pmol)に関してSDS-PAGE分離をしない配列分析は、等モルで同一の2つのIGFBP-5配列のみを示した。従って、PAPP-A2は、Ser-143とLys-144との間の1つの部位でIGFBP-5を開裂する。

【0197】

6.10. PAPP-A2がIGFBP-5の蛋白分解を引き起こし得る組織

IGFBP-5に対する蛋白分解活性は、数種の起源、例えば妊婦血清(Claussen et al., 1994, Endocrinology 134, 1964-6)、精漿(Lee et al., 1994, J Clin Endocrinol Metab 79, 1367-72)、平滑筋細胞(Imai et al., 1997, J Clin Invest 100, 2596-605)、顆粒膜細胞(Resnick et al., 1998, Endocrinology 139, 1249-57)、骨肉腫細胞(Conover and Kiefer, 1993, J Clin Endocrinol Metab 76, 1153-9)、およびまたは骨芽細胞(Thraill et al., 1995, Endocrinology 136, 3527-33)由来の培養培地、および線維芽細胞(Busby et al., 2000, J Biol Chem)から広範に報告されている。一般的に、IGFBP-5の開裂の原因となるプロテアーゼは、同定されないままである。

【0198】

線維芽細胞および骨芽細胞(Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53)と同様、濾胞液(Conover et al., 1999, J Clin Endocrinol Metab 84, 4742-5)、妊婦血清(Overgaard et al., 2000, J Biol Chem)、および血管平滑筋細胞(Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Ashai, K., Lewis, D. A., Overgaard, M. T., Christiansen, M., Oxvig, C., Holmes, D. R., Jr., and Conover, C. A. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.、製本中)におけるIGFBP-4プロテアーゼとしてのPAPP-Aの最近の同定は、いくつかの系においてはPAPP-AおよびIGFBP-4を重要な機能ペアとして完全に確立した。PAPP-Aに対して見い出されているような基質以外はいずれも、および他のプロテアーゼはいずれも、生理的にIGFBP-4を開裂することが示されていない。それ故、PAPP-A2とIGFBP-5のペアが、上述のおよび/または他の多数の組織において、類似の役割を果たすものと思われる。興味深いことに、IGFBP-5を平滑筋細胞調整培地と一緒にインキュベーションした結果、Ser-143とLys-144との間が開裂し(Imai et al., 1997, J Clin Invest 100, 2596-605)、

これはPAPP-A2により本明細書において見られるのと同じの開裂である。このことは、PAPP-A2をこの組織に対する明らかな候補IGFBP-5プロテアーゼとして直接示唆する。

【0199】

引用文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389 - 402. 10
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York City, NY: John Wiley & Sons).
- Barker, R. L., Gleich, G. J., and Pease, L. R. (1988). Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA [published erratum appears in *J Exp Med* 1989 Sep 1; 170(3):1057]. *J Exp Med* 168, 1493 - 8. 20
- Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Ashai, K., A., L. D., Overgaard, M. T., Christian-sen, M., Oxvig, C., Holmes Jr, D. R., and Conover, C. A. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by arterial smooth muscle cells in vitro is increased in the coronary artery following angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press. 30
- Biagiotti, R., Cariati, E., Brizzi, L., Cappelli, G., and D'Agata, A. (1998). Maternal serum screening for trisomy 18 in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 18, 907 - 13.
- Bischof, P. (1979). Purification and characterization of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A). *Arch Gynecol* 227, 315 - 26. 40
- Bitter, G. A., Egan, K. M., Koski, R. A., Jones, M. O., Elliott, S. G., and Giffin, J. C. (1987). Expression and secretion vectors for yeast. *Methods Enzymol* 153, 516 - 44.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., and Stockler, W. (1993). Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'm 50

- etzincins'. FEBS Lett 331, 134-40.
- Bonno, M., Oxvig, C., Kephart, G. M., Wagner, J. M., Kristensen, T., Sottrup-Jensen, L., and Gleich, G. J. (1994). Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta. Lab Invest 71, 560-6. 10
- Brambati, B., Macintosh, M. C., Teisner, B., Maguiness, S., Shrimanker, K., Lanzani, A., Bonacchi, I., Tului, L., Chard, T., and Grudzinskas, J. G. (1993). Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. Br J Obstet Gynaecol 100, 324-6.
- Broglie, R., Coruzzi, G., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Niedermeyer, J. G., Fink, C. L., and Chua, N. H. (1984). Light-regulated expression of a pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene in transformed plant cells. Science 224, 838-43. 20
- Busby, W. H., Jr., Nam, T. J., Morales, A., Smith, C., Jennings, M., and Clemmons, D. R. (2000). The Complement Component C1s is the Protease That Accounts for Cleavage of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 in Fibroblast Medium. J Biol Chem. 30
- Christiansen, M., Oxvig, C., Wagner, J. M., Qin, Q. P., Nguyen, T. H., Overgaard, M. T., Larsen, S. O., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., and Norgaard-Pedersen, B. (1999). The proform of eosinophil major basic protein: a new maternal serum marker for Down syndrome. Prenat Diagn 19, 905-10.
- Christiansen, M., Jaliashvili, I., Overgaard, M. T., Ensinger, C., Oxvig, C. (2000) Quantitation and characterization of pregnancy-associated complexes between angiotensinogen and the proform of eosinophil major basic protein in serum and amniotic fluid. Clin. Chem. 46, 1099-1105. 40
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-8.
- Claussen, M., Zapf, J., and Braulke, T. (19 50

- 94). Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-5 by pregnancy serum and amniotic fluid. *Endocrinology* 134, 1964-6.
- Conover, C. A., and Kiefer, M. C. (1993). Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 1153-9.
- Conover, C. A., Kiefer, M. C., and Zapf, J. (1993). Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. *J Clin Invest* 91, 1129-37. 10
- Conover, C. A., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Christiansen, M., and Giudice, L. C. (1999). Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A [In Process Citation]. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4742-5. 20
- Crowther, J. R. (1995). ELISA. Theory and Practice, *Methods in Molecular Biology*. vol 42 (Totowa, NJ: Humana Press).
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-87. 30
- Folkersen, J., Grudzinskas, J. G., Hinderson, P., Teisner, B., and Westergaard, J. G. (1981). Pregnancy-associated plasma protein A: circulating levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 139, 910-4.
- Fowlkes, J. L. (1997). Insulinlike growth factor-binding protein proteolysis. An emerging paradigm in insulin-like growth factor physiology. *Trends Endocrinol Metab* 8, 299-306. 40
- Gmunder, H., and Kohli, J. (1989). Cauliflower mosaic virus promoters direct efficient expression of a bacterial G418 resistance gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 220, 95-101.
- Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Knight, G. J., Williams, J., Miller, W. A., and Johnson, A. (1998). Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester 50

ter. N Engl J Med 338, 955-61.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [see comments]. Gene 77, 51-9.

Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. Endocr Rev 20, 761-87.

Haaning, J., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Ebbesen, P., Kristensen, T., and Sottrup-Jensen, L. (1996). Complete cDNA sequence of the preproform of human pregnancy-associated plasma protein-A. Evidence for expression in the brain and induction by cAMP. Eur J Biochem 237, 159-63.

Imai, Y., Busby, W. H., Jr., Smith, C. E., Clarke, J. B., Garmong, A. J., Horwitz, G. D., Rees, C., and Clemmons, D. R. (1997). Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. J Clin Invest 100, 2596-605.

Kristensen, T., Oxvig, C., Sand, O., Moller, N. P., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. Biochemistry 33, 1592-8.

Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., Hays, L. G., Yates, J. R., 3rd, and Conover, C. A. (1999). The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53.

Lee, K. O., Oh, Y., Giudice, L. C., Cohen, P., Peehl, D. M., and Rosenfeld, R. G. (1994). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. J Clin Endocrinol Metab 79, 1367-72.

Lin, T. M., Galbert, S. P., Kiefer, D., Spellacy, W. N., and Gall, S. (1974). Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. Am J Obstet Gynecol 118, 2

10

20

30

40

50

23 - 36 .

- Logan, J. , and Shenk, T. (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. Proc Natl Acad Sci U S A 81, 3655 - 9.
- Mackett, M. , Smith, G. L. , and Moss, B. (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 7415 - 9.
- Marks, J. D. , Hoogenboom, H. R. , Bonnert, T. P. , McCafferty, J. , Griffiths, A. D. , and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 222, 581 - 97.
- Matthews, D. J. , and Wells, J. A. (1993). Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. Science 260, 1113 - 7.
- McGrogan, M. , Simonsen, C. , Scott, R. , Griffith, J. , Ellis, N. , Kennedy, J. , Campanelli, D. , Nathan, C. , and Gabay, J. (1988). Isolation of a complementary DNA clone encoding a precursor to human eosinophil major basic protein. J Exp Med 168, 2295 - 308.
- Meldal, M. (1998). Intramolecular fluorescence-quenched substrate libraries. Methods Mol Biol 87, 65 - 74.
- Meldal, M. (1998). Introduction to combinatorial solid-phase assays for enzyme activity and inhibition. Methods Mol Biol 87, 51 - 7.
- Meldal, M. (1998). The solid-phase enzyme inhibitor library assay. Methods Mol Biol 87, 75 - 82.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. Biochem J 327, 625 - 35.
- Nielsen, H. , Engelbrecht, J. , Brunak, S. , and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10, 1 - 6.
- Overgaard, M. T. , Haaning, J. , Boldt, H. B. , Olsen, I. M. , Laursen, L. , Christiansen, M. , Gleich, G. J. , Sottrup-Jensen, L. , Conover, C. A. , and Oxvig, C. (2000). Expression of Recombinant Human Pregnancy-Associated Plasma Protein-A and Identification of the Proform of Eosinophil Major Basic Protein 50

- as its Physiological Inhibitor. *J Biol Chem*.
- Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Lawrence, J. B., Conover, C. A., Gleich, G. J., Sottrup-Jensen, L., and Haaning, J. (1999). Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 61, 1083-9. 10
- Oxvig, C., Haaning, J., Hojrup, P., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Location and nature of carbohydrate groups in proform of human major basic protein isolated from pregnancy serum. *Biochem Mol Biol Int* 33, 329-36.
- Oxvig, C., Haaning, J., Kristensen, L., Wagner, J. M., Rubin, I., Stigbrand, T., Gleich, G. J., and Sottrup-Jensen, L. (1995). Identification of angiotensinogen and complement C3dg as novel proteins binding the proform of eosinophil major basic protein in human pregnancy serum and plasma. *J Biol Chem* 270, 13645-51. 20
- Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Gleich, G. J., and Sottrup-Jensen, L. (1993). Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J Biol Chem* 268, 12243-6. 30
- Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Kristensen, L., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochim Biophys Acta* 1201, 415-23.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-6. 40
- Peters, J. H., and Baumgarten, H. (1992). *Monoclonal Antibodies* (Offersheim, Germany: Springer-Verlag).
- Rajaram, S., Baylink, D. J., and Mohan, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 18, 801-31. 50

- Resnick, C. E., Fielder, P. J., Rosenfeld, R. G., and Adashi, E. Y. (1998). Characterization and hormonal regulation of a rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-5 endopeptidase: an FSH-inducible granulosa cell-derived metalloprotease. *Endocrinology* 139, 1249-57.
- Rosenfeld, S. A. (1999). Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 306, 154-69. 10
- Ruther, U., and Muller-Hill, B. (1983). Easy identification of cDNA clones. *Embo J* 2, 1791-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scopes, R. K. (1987). *Protein Purification. Principles and Practice*. (Harrisonburg, VA: Springer-Verlag). 20
- Sinosich, M. J. (1990). Molecular characterization of pregnancy-associated plasma protein-A by electrophoresis. *Electrophoresis* 11, 70-8.
- Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3, 2156-65.
- Sottrup-Jensen, L. (1993). Determination of halfcystine in proteins as cysteine from reducing hydrolyzates. *Biochem Mol Biol Int* 30, 789-94. 30
- Sottrup-Jensen, L. (1995). A low-pH reverse-phase high-performance liquid chromatography system for analysis of the phenylthiohydantoins of S-carboxymethylcysteine and S-carboxyamidomethylcysteine. *Anal Biochem* 225, 187-8.
- Spencer, K., Ong, C., Skentou, H., A, W. L., and K, H. N. (2000). Screening for tri-somy 13 by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 20, 411-6.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B., and Bode, W. (1995). The metzincins - topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily 50

- of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4, 823-40.
Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.
- Thraillkill, K. M., Quarles, L. D., Nagase, H., Suzuki, K., Serra, D. M., and Fowlkes, J. L. (1995). Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* 136, 3527-33. 10
- Wald, N., Stone, R., Cuckle, H. S., Grudzinskas, J. G., Barkai, G., Brambati, B., Teisner, B., and Fuhrmann, W. (1992). First trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome [see comments]. *Bmj* 305, 28. 20
- Wald, N. J., Watt, H. C., and Hackshaw, A. K. (1999). Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters [see comments]. *N Engl J Med* 341, 461-7.
- Walsh, P. S., Erlich, H. A., and Higuchi, R. (1992). Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl* 1, 241-50. 30
- Westergaard, J. G., Chemnitz, J., Teisner, B., Poulsen, H. K., Ipsen, L., Beck, B., and Grudzinskas, J. G. (1983). Pregnancy-associated plasma protein A: a possible marker in the classification and prenatal diagnosis of Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 3, 225-32.
- 【0200】
【表3】

出願人又は代理人の書類記号 P 495 PC00	国際出願番号 PCT/DK01/00695
--------------------------	-----------------------

寄託された微生物に関する表示

(PCT規則13の2)

A. 下記の表示は明細書30頁25行に記載された微生物に関連している。	
B. 寄託の表示	他の寄託が追加頁に表示されている <input type="checkbox"/>
寄託機関の名称 ドイチェ・ザムルング・フォン・マイクロオルガニズメン・ウント・ツェルクルチュウレン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング (デーエスエムツェット)	
寄託機関の住所 ドイツ連邦共和国、デー-38124 ブラウンシュバイヒ、マシエルオーダー・ペーク 1 ぺー番	
寄託の日付 2000年10月19日	受託番号 DSM13783
C. 追加の表示	この情報は追加頁に続く <input type="checkbox"/>
出願人は、本寄託微生物は、申請者により指定された専門家および i) 出願人、 ii) 指定国または選択国の特許庁のいずれかにより承認された専門家へのサンプルの提供によってのみ入手可能であることを要請する。	
D. この表示を行うための指定国	
E. 追加事項の表示の届け出	

10

20

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員

<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は2002年3月7日に国際事務局が受理した
権限のある職員 (署名)

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 preproPAPP-A2 をエンコードする mRNA に相当する cDNA の配列図である。

【図2】 アミノ酸配列に翻訳されたときの PAPP-A と、 PAPP-A の配列伸長部との間の相関関係を示し、また PAPP-A の中央領域と相同性のある cDNA 配列を得る方法を示す図である。

40

【図3】 preproPAPP-A と整列した preproPAPP-A2 のアミノ酸配列を示した図である。

【図4】 PAPP-A2 をウエスタンブロットイングおよびクマシー染色した図である。

【図5】 IGFBP-1 ~ 6 に対する PAPP-A2 活性を示した図である。

【図6】 IGFBP-5 に対する PAPP-A2 の蛋白分解活性を示した図である。

【図7】 PAPP-A2 mRNA コード化領域の cDNA 配列を示した図である。

【図8】 PAPP-A / proMBP 複合体中の PAPP-A サブユニットのジスルフィド構造、 PAPP-A の推定のドメイン、 および PAPP-A の遺伝子構造を示す図である。

PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A2 (PAPP-A2)**FIELD OF THE INVENTION**

- 5 The present invention relates to a novel polypeptide with homology to pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). The novel polypeptide according to the invention is denoted PAPP-A2. The invention further relates to novel polynucleotides comprising a nucleic acid sequence encoding such a polypeptide, or a fragment thereof.
- 10 The invention further relates to methods for using the novel polynucleotides, including fragments thereof as defined herein below, and methods for using the novel polypeptides capable of being produced from such polynucleotides.
- 15 The invention also relates to expression and purification of recombinant PAPP-A2, and to production of polyclonal and monoclonal antibodies against PAPP-A2, and to the purification of native PAPP-A2 from human tissues or body fluids.
- 20 In further aspects the invention relates to uses of PAPP-A2 as a marker for pathological states, and as a therapeutic target for drugs that modify the proteolytic activity of PAPP-A2 in pregnant as well as non-pregnant individuals.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 25 Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)
- PAPP-A was first isolated in 1974 from pregnancy serum along with other proteins believed to be of placental origin (Lin et al., 1974, Am J Obstet Gynecol 118, 223-36). The concentration in serum reaches about 50 mg/liter at the end of pregnancy (Folkersen et al., 1981, Am J Obstet Gynecol 139, 910-4; Oxvig et al., 1995, J Biol Chem 270, 13645-51). PAPP-A was originally characterized as a high molecular weight homotetramer (Bischof, 1979, Arch Gynecol 227, 315-26; Lin et al., 1974, Am J Obstet Gynecol 118, 223-36; Sinosich, 1990, Electrophoresis 11, 70-8), but it
- 35 has now been demonstrated that PAPP-A primarily exists in pregnancy serum and

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

2

- plasma as a covalent, heterotetrameric 2:2 complex with the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), PAPP-A/proMBP (Oxvig et al., 1993, J Biol Chem 268, 12243-6). Only about 1% of PAPP-A in pregnancy serum and plasma is present as a homodimer, as recently demonstrated (Overgaard et al., 2000, J Biol Chem). The existence of the PAPP-A/proMBP complex was revealed, in part, by the isolation of a PAPP-A and a proMBP peptide, linked together by a disulfide bond, from a digest of purified PAPP-A/proMBP (Oxvig et al., 1993, J Biol Chem 268, 12243-6).
- The subunits of the PAPP-A/proMBP complex can be irreversibly separated by reduction of disulfide bonds and denaturation (Oxvig et al., 1993, J Biol Chem 268, 12243-6). In reducing SDS-PAGE, the PAPP-A subunit has an apparent molecular weight of 200 kDa (Oxvig et al., 1994, Biochim Biophys Acta 1201, 415-23), and its 1547-residue sequence is known from cloned cDNA (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8). PAPP-A is synthesized as a pre-pro-protein (preproPAPP-A), including a 80-residue pre-pro-piece (Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63). No proteins with global homology to PAPP-A has been reported in the literature, but PAPP-A contains sequence motifs, including an elongated zinc binding motif (HEXXHXXGXXH) at position 482-492 (numbering according to Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8). This motif and a structurally important methionine residue, also thought to reside in PAPP-A at position 556, are strictly conserved within the metzincins, a superfamily of zinc peptidases: astacins, adamalysins (or reprolysins), serralsins and matrixins (matrix metalloproteinases or MMP's) (Bode et al., 1993, FEBS Lett 331, 134-40; Stocker et al., 1995, Protein Sci 4, 823-40).
- The proMBP subunit has a calculated peptide mass of 23 kDa (Barker et al., 1988, J Exp Med 168, 1493-8; McGrogan et al., 1988, J Exp Med 168, 2295-308). In SDS-PAGE, however, proMBP migrates as a smear of 50-90 kDa that is not visible in Coomassie-stained gels (Oxvig et al., 1993, J Biol Chem 268, 12243-6), probably due to its strong and unusual glycosylation (Oxvig et al., 1994, Biochem Mol Biol Int 33, 329-36; Oxvig et al., 1994, Biochim Biophys Acta 1201, 415-23). PAPP-A and proMBP are both produced in the placenta during pregnancy, but mainly in different cell types as shown by *in situ* hybridization (Bonno et al., 1994, Lab Invest 71, 560-6). Analyses by RT-PCR revealed that both PAPP-A and proMBP mRNA are pres-

ent in several reproductive and nonreproductive tissues, although the levels are lower than in the placenta (Overgaard et al., 1999, Biol Reprod 61, 1083-9).

5 Clinical use of PAPP-A

Clinically, depressed serum levels of PAPP-A are increasingly being used as a predictor of Down's syndrome pregnancies (Brambati et al., 1993, Br J Obstet Gynaecol 100, 324-6; Haddow et al., 1998, N Engl J Med 338, 955-61; Wald et al., 1992, Bmj 305, 28; Wald et al., 1999, N Engl J Med 341, 461-7), and it has been shown
10 that PAPP-A serum levels are also depressed in other fetal abnormalities (Biagiotti et al., 1998, Prenat Diagn 18, 907-13; Spencer et al., 2000, Prenat Diagn 20, 411-6; Westergaard et al., 1983, Prenat Diagn 3, 225-32).

15 Further, the synthesis of PAPP-A in smooth muscle cells of the coronary artery following angioplasty is increased (Bayes-Genis et al., 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol, in press), which is currently being evaluated for potential clinical value. Data show that measurements of proMBP in pregnancy serum also have a diagnostic value (Christiansen et al., 1999, Prenat Diagn 19, 905-10).
20

Proteolytic activity of PAPP-A: Cleavage of IGFBP-4

25 Only recently, the putative metalloproteinase activity of PAPP-A has been experimentally confirmed (Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53). PAPP-A was partially purified from human fibroblast-conditioned medium (HFCM) and shown to be responsible for the proteolytic activity of HFCM against insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4. IGFBP's, of which six have been described, are important modulators of IGF-I and -II activity (Fowlkes, 1997, Trends Endocrinol
30 Metab 8, 299-306; Rajaram et al., 1997, Endocr Rev 18, 801-31).

IGF-I and -II are essential polypeptides with potent anabolic and mitogenic actions both *in vivo* and *in vitro*. IGF bound to IGFBP-4 cannot interact with its receptor, but
35 bioactive IGF is released once the binding protein is cleaved. Interestingly, cleavage of IGFBP-4 by PAPP-A strictly requires the presence of IGF (Conover et al., 1993, J

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

4

Clin Invest 91, 1129-37; Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53). PAPP-A secretion has also been demonstrated from osteoblasts and marrow stromal cells (Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53), from granulosa cells (Conover et al., 1999, J Clin Endocrinol Metab 84, 4742-5), and from vascular smooth muscle cells (Bayes-Genis et al., 2000, Arterioscler Thromb Vasc Biol, in press), all of which have known IGF-dependent IGFBP-4 proteinase activity.

IGFBP-5

10 Like IGFBP-4, IGFBP-5 cleavage has been widely reported to occur by unidentified proteinases in a number of tissues and conditioned media (Hwa et al., 1999, Endocr Rev 20, 761-87).

SUMMARY OF THE INVENTION

15

Pregnancy-associated plasma protein-A2

The novel nucleic acid according to the invention has been isolated from human placenta and characterised by means of sequencing analysis. The novel nucleotide sequence encodes a new polypeptide, PAPP-A2.

20

The amino acid sequence of PAPP-A2 is composed of a 233-residue pre-pro-piece and a 1558-residue mature portion. The mature portion of PAPP-A2 is homologous with the mature portion of PAPP-A (approx. 45 % identity), but the prepro-pieces do not show any similarity between the two proteins. Like PAPP-A, PAPP-A2 contains conserved amino acid stretches that classify it as a putative metalloproteinase of the metzincin superfamily.

25

PAPP-A2 has been expressed in a mammalian expression system, and it has been demonstrated that PAPP-A2 is an active enzyme. Further, it has been shown that PAPP-A2 cleaves IGFBP-5, Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5. In comparison, the cleavage of IGFBP-4 by PAPP-A has previously been demonstrated.

30

A complementary DNA (cDNA) which encodes the full length form of PAPP-A2 is identified, sequenced and isolated. The cDNA or portions of the cDNA is cloned into

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

5

expression vectors for expression in a recombinant host. The cDNA is useful to produce recombinant full-length PAPP-A2 or fragments of PAPP-A2. The cDNA and the recombinant PAPP-A2 protein derived therefrom are useful in the production of antibodies, diagnostic kits, laboratory reagents and assays.

5

The cDNA and the recombinant PAPP-A2 protein may also be used to identify compounds that affect PAPP-A2 function. PAPP-A2 antisense oligonucleotides or antisense mimetics may be clinically useful for reducing the expression of PAPP-A2 protein and thereby antagonizing the effects of PAPP-A. Similarly, the PAPP-A2 coding sequence can be used for gene therapy to introduce PAPP-A2 into target cells thereby enhancing the effects of PAPP-A2.

10

The invention furthermore pertains to PAPP-A2 for use as a therapeutic target for the reduction or elimination of IGFBP-5 proteolytic activity in a cell.

15

It is furthermore an objective of the present invention to provide methods for use of PAPP-A2 for diagnostic purposes.

20

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following drawings and description hereof, from the following detailed description, and from the claims.

DEFINITIONS

25

As used herein, PAPP-A2 refers to an isolated PAPP-A2 polypeptide having the amino acid sequence listed in Fig. 1 (SEQ ID NO:2), or a variant thereof as defined herein. The PAPP-A2 according to the invention, or a variant thereof, may be produced by recombinant DNA technology, or the PAPP-A2 may be naturally occurring.

30

A PAPP-A2 encoding nucleotide sequence refers to an isolated nucleic acid having the sequence listed in Fig. 1 (SEQ ID NO:1), or a variant thereof as defined herein.

"Active" refers to those forms of PAPP-A2 which retain the biological and/or immunological activities of any naturally occurring PAPP-A2.

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

6

5 "Naturally occurring PAPP-A2" refers to PAPP-A2 produced by human cells that have not been genetically engineered and specifically contemplates various PAPP-A2s arising from post-translational modifications of the polypeptide including but not limited to acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, acylation, or complex formation, covalent or noncovalent, with other polypeptides.

10 An "isolated polypeptide" is a protein, or a variant or fragment thereof, which constitutes 90% or more of the protein contents of a given preparation as evaluated by standard methods known in the art of protein chemistry.

15 "Derivative" refers to polypeptides derived from naturally occurring PAPP-A2 by chemical modifications such as ubiquitination, labeling (e.g., with radionuclides, various enzymes, etc.), pegylation (derivatization with polyethylene glycol), or by insertion (or substitution by chemical synthesis) of amino acids (amino acids) such as ornithine, which do not normally occur in human proteins.

20 "Recombinant variant" refers to any polypeptide differing from naturally occurring PAPP-A2 by amino acid insertions, deletions, and substitutions, created using recombinant DNA techniques. Guidance in determining which amino acid residues may be replaced, added or deleted without abolishing activities of interest, such as proteolytic activity or cell adhesion, may be found e.g. by comparing parts of the sequence of PAPP-A2 with structurally similar proteins (e.g. other metzincin family proteinases), with locally homologous proteins of known disulfide structure, or by secondary structure predictions.

25 Preferably, amino acid "substitutions" are the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as, but not limited to, the replacement of a leucine with an isoleucine or valine, replacement of an aspartate with a glutamate, or replacement with a threonine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Further examples and definitions falling within the meaning of the term "substitutions" as applied herein are provided in the detailed description of the invention herein below.

30 Amino acid "insertions" or "deletions" are typically in the range of from about about 1 amino acid to about 50 amino acids, such as from about 1 amino acid to about 20

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

7

amino acids, for example from about 1 amino acid to about 20 amino acids, such as from about 1 amino acid to about 10 amino acids. The variation allowed may be experimentally determined by systematically making insertions, deletions, or substitutions of amino acids in a PAPP-A2 molecule using recombinant DNA techniques and assaying the resulting recombinant variants for activity.

Where desired, a "signal or leader sequence" can direct the polypeptide (full length PAPP-A2, or portions of the PAPP-A2 polypeptide) through the membrane of a cell. Such a sequence may be naturally present on the polypeptides of the present invention or provided from heterologous protein sources by recombinant DNA techniques.

A polypeptide "fragment", "portion", or "segment" is a stretch of amino acid residues of at least about 5 amino acids, often at least about 7 amino acids, typically at least about 9 to 13 amino acids, such as at least about 17 or more amino acids in various embodiments. It may also be a longer stretch of residues up to intact PAPP-A2 in length. To be active, any PAPP-A2 polypeptide or PAPP-A2 polypeptide fragment must have sufficient length to display biologic and/or immunologic activity on their own, or when conjugated to a carrier protein such as keyhole limpet hemocyanin.

An "oligonucleotide" or polynucleotide "fragment", "portion", or "segment" is a stretch of the PAPP-A2 encoding sequence which is useful in the expression of PAPP-A2 polypeptide fragments. It may also be a stretch of nucleotide residues capable of being used in a polymerase chain reaction (PCR) or a hybridization procedure, typically for amplifying or revealing related parts of mRNA or DNA molecules. In particular, one or both oligonucleotide probes will comprise sequence that is identical or complementary to a portion of PAPP-A2 where there is little or no identity or complementarity with any known or prior art molecule. For this purpose, such oligonucleotide probes will generally comprise between about 10 nucleotides and 50 nucleotides, and preferably between about 15 nucleotides and about 30 nucleotides.

"Animal" as used herein may be defined to include human, domestic or agricultural (cats, dogs, cows, sheep, etc) or test species (mouse, rat, rabbit, etc).

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

8

"Recombinant" may also refer to a polynucleotide which encodes PAPP-A2 and is prepared using recombinant DNA techniques. The DNAs which encode PAPP-A2 may also include allelic or recombinant variants and mutants thereof.

5 "Nucleic acid probes" are prepared based on the cDNA sequences which encode PAPP-A2 provided by the present invention. Nucleic acid probes comprise portions of the sequence having fewer nucleotides than about 6 kb, usually fewer than about 1 kb. After appropriate testing to eliminate false positives, these probes may be used to determine whether mRNAs encoding PAPP-A2 are present in a cell or tissue or to isolate similar nucleic acid sequences from chromosomal DNA extracted from such cells or tissues as described in (Walsh et al., 1992, PCR Methods Appl 1, 241-50). Probes may be derived from naturally occurring or recombinant single- or double-stranded nucleic acids or be chemically synthesized. They may be labeled by nick translation, Klenow fill-in reaction, PCR or other methods well known in the art. Probes of the present invention, their preparation and/or labeling are elaborated in (Sambrook et al., 1989); or (Ausubel et al., 1989).

10 Alternatively, recombinant variants encoding these PAPP-A2 or similar polypeptides may be synthesized or selected by making use of the "redundancy" in the genetic code. Various codon substitutions, such as the silent changes which produce various restriction sites, may be introduced to optimize cloning into a plasmid or viral vector or expression in a particular prokaryotic or eukaryotic system. Mutations may also be introduced to modify the properties of the polypeptide, including but not limited to activity, interchain affinities, or polypeptide degradation or turnover rate. One example involves inserting a stop codon into the nucleotide sequence to limit the size of PAPP-A2 so as to provide a molecule of smaller molecular weight.

20 "Expression vectors" are defined herein as DNA sequences that are required for the transcription of cloned copies of genes and the translation of their mRNAs in an appropriate host. Such vectors can be used to express eukaryotic genes in a variety of hosts such as bacteria, yeast, bluegreen algae, plant cells, insect cells and animal cells.

30 The term "antibody" as used herein includes both polyclonal and monoclonal antibodies, as well as fragments thereof, such as, Fv, Fab and F(ab)2 fragments that

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

9

are capable of binding antigen or hapten. It includes conventional murine monoclonal antibodies as well as human antibodies, and humanized forms of non-human antibodies, and it also includes 'antibodies' isolated from phage antibody libraries.

5 "Ribozymes" are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic cleavage. Within the scope of the invention are engineered hammerhead motif ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyze endonucleolytic
10 cleavage of PAPP-A2 RNA sequences. Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences, GUA, GUU and GUC. Once identified, short RNA sequences of between fifteen (15) and twenty (20) ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage
15 site may be evaluated for predicted structural features such as secondary structure that may render the oligonucleotide sequence unsuitable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing their accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides, using ribonuclease protection assays.

20 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Isolation of a nucleotide sequence encoding PAPP-A2

25 The present invention in one aspect relates to a novel cDNA sequence encoding a protein with global homology to pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). This protein has been denoted PAPP-A2. The complete nucleotide sequence of PAPP-A2 has been obtained from mRNA isolated from human placenta (Example 1). The complete nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) and translated amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of PAPP-A2 are both shown in Figure 1.

30 Homology of PAPP-A2 with PAPP-A is evident upon alignment of the two amino acid sequences as shown in Figure 3. PAPP-A2 and PAPP-A share approximately 45% of their amino acid residues. Sequence motifs known to be important for the function of PAPP-A (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8; Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53; Overgaard et al., 2000, J Biol
35

Chem) are also found in PAPP-A2. Principally, PAPP-A2 contains an elongated zinc binding motif (HEXXHXXGXXH, amino acids shown by one letter code) at position 733-743 (Figure 2). This motif and a structurally important methionine residue, are strictly conserved within the metzincins, a superfamily of zinc peptidases (Bode et al., 1993, FEBS Lett 331, 134-40; Stocker et al., 1995, Protein Sci 4, 823-40).

Like PAPP-A, PAPP-A2 is synthesized as a prepro-protein. PreproPAPP-A2 has 1791 amino acids (Figure 1). There is no homology between the prepro-portions of PAPP-A and PAPP-A2. Further, the prepro-portions of the two proteins differ significantly in length. The PAPP-A2 prepro-peptide has 233 residues (Figure 3); the PAPP-A prepro-peptide has 80 residues (Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63).

Uses of the nucleotide sequence encoding PAPP-A2

The nucleotide sequence encoding PAPP-A2 (or its complement) have numerous applications in techniques known to those skilled in the art of molecular biology. These techniques include use as hybridization probes, use in the construction of oligomers for PCR, use in the recombinant production of PAPP-A2 or fragments hereof, and use in generation of anti-sense DNA or RNA, their chemical analogs (e.g. PNA or LNA) and the like. Uses of nucleotides encoding PAPP-A2 disclosed herein are exemplary of known techniques and are not intended to limit their use in any technique known to a person of ordinary skill in the art. Furthermore, the nucleotide sequences disclosed herein may be used in molecular biology techniques that have not yet been developed, provided the new techniques rely on properties of nucleotide sequences that are currently known, e.g., the triplet genetic code, specific base pair interactions, etc.

It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of PAPP-A2-encoding nucleotide sequences, some bearing minimal homology to the nucleotide sequence of any known and naturally occurring gene may be produced. The invention has specifically contemplated each and every possible variation of nucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the nucleotide se-

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

11

quence of naturally occurring PAPP-A2, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

5 Although the nucleotide sequences which encode PAPP-A2 and/or its variants are preferably capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring PAPP-A2 under stringent conditions, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding PAPP-A2 or its derivatives possessing a substantially different codon usage. Codons can be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic expression host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by 10 the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding PAPP-A2 and/or its derivatives without altering the encoded amino acid sequence include the production of RNA transcripts having more desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring sequence.

15 Nucleotide sequences encoding PAPP-A2 may be joined to a variety of other nucleotide sequences by means of well established recombinant DNA techniques (Sambrook et al., 1989). Useful nucleotide sequences for joining to PAPP-A2 include an assortment of cloning vectors, e.g., plasmids, cosmids, lambda phage derivatives, phagemids, and the like, that are well known in the art. Vectors of interest 20 include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, sequencing vectors, and the like. In general, vectors of interest may contain an origin of replication functional in at least one organism, convenient restriction endonuclease sensitive sites, and selectable markers for the host cell.

25 Another aspect of the subject invention is to provide for PAPP-A2-specific nucleic acid hybridization probes capable of hybridizing with naturally occurring nucleotide sequences encoding PAPP-A2. Such probes may also be used for the detection of similar PAPP-A2 encoding sequences and should preferably contain at least 50% of 30 the nucleotides from the conserved region or active site. The hybridization probes of the subject invention may be derived from the nucleotide sequences of the SEQ ID NO:1 or from genomic sequences including promoters, enhancer elements and/or possible introns of the respective naturally occurring PAPP-A2. Hybridization probes may be labeled by a variety of reporter groups, including radionuclides such as ³²P

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

12

or 35S, or enzymatic labels such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

5 PCR as described (U.S. Pat. Nos 4,683,195; and 4,965,188) provides additional uses for oligonucleotides based upon the nucleotide sequence which encodes PAPP-A2. Such probes used in PCR may be of recombinant origin, may be chemically synthesized, or a mixture of both and comprise a discrete nucleotide sequence for diagnostic use or a degenerate pool of possible sequences for identification of

10

Other means of producing specific hybridization probes for PAPP-A2 DNAs include the cloning of nucleic acid sequences encoding PAPP-A2 or PAPP-A2 derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art and are commercially available and may be used to synthesize RNA probes *in vitro*

15

by means of the addition of the appropriate RNA polymerase as T7 or SP6 RNA polymerase and the appropriate radioactively labeled nucleotides.

20

It is possible to produce a DNA sequence, or portions thereof, encoding PAPP-A2 and their derivatives entirely by synthetic chemistry, after which the gene can be inserted into any of the many available DNA vectors using reagents, vectors and cells that are known in the art at the time of the filing of this application. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into the PAPP-A2 sequences or any portion thereof.

25

The nucleotide sequence can be used in an assay to detect disease associated with abnormal levels of expression of PAPP-A2. The nucleotide sequence can be labeled by methods known in the art and added to a fluid or tissue sample from a patient under hybridizing conditions. After an incubation period, the sample is washed with a compatible fluid which optionally contains a dye (or other label requiring a developer) if the nucleotide has been labeled with an enzyme. After the compatible fluid is

30

rinsed off, the dye is quantitated and compared with a standard. Alternatively, levels of PAPP-A2 mRNA can be measured by micro array techniques using immobilized probes. Expression in samples can also be evaluated by (semi-quantitative) RT-PCR. Expression in samples can alternatively be evaluated by techniques based on

35

hybridization. For example, *in situ* hybridization can be used to detect PAPP-A2

mRNA. This technique has the advantage that it locates the cells that synthesize the mRNA, but also is less sensitive than RT-PCR.

5 Included in the scope of the invention are oligoribonucleotide sequences, that include antisense RNA and DNA molecules and ribozymes that function to inhibit translation of PAPP-A2. Antisense techniques are known in the art and may be applied herein. Both antisense RNA and DNA molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors which incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

20 The invention also relates to unknown PAPP-A2 genes isolated from other species and alleles of the PAPP-A2 gene, in which PAPP-A2 orthologues or homologues exists. A bacteriophage cDNA library may be screened, under conditions of reduced stringency, using a radioactively labeled fragment of the human PAPP-A2 clone described herein. Alternatively the human PAPP-A2 sequence can be used to design degenerate or fully degenerate oligonucleotide probes which can be used as PCR probes or to screen bacteriophage cDNA libraries. The PCR product may be subcloned and sequenced to insure that the amplified sequences represent the PAPP-A2 sequences. The PCR fragment may be used to isolate a full length PAPP-A2 clone by radioactively labeling the amplified fragment and screening a bacteriophage cDNA library. Alternatively, the labeled fragment may be used to screen a genomic library. For a review of cloning strategies which may be used, see e.g., (Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989).

Expression of recombinant PAPP-A2

In order to express a biologically active proteinase, the nucleotide sequence coding for the protein, or a functional equivalent, can be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. For example, recombinant protein can be used for immunization to obtain antibodies, as a laboratory reagent, and in diagnostic kits.

More specifically, methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing the PAPP-A2 sequence and appropriate transcriptional/translational control signals. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques and in vivo recombination/genetic recombination. See e.g., the techniques described in (Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989).

Further, expression vectors containing fragments of the PAPP-A2 encoding sequence may also be constructed. In particular, this may be relevant for the use of portions of the PAPP-A2 polypeptide as an antigen for immunization. In addition, the coding sequence of PAPP-A2 or fragments hereof may be cloned in frame with a coding nucleotide sequence present in the vector to result in a fusion protein or a 'tagged' PAPP-A2 protein. For example, such a fusion protein may be composed of PAPP-A2 and GST, and such tag may be a c-myc tag (for detection) and/or a histidine tag (for purification).

A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the PAPP-A2 coding sequence or fragments hereof. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing the PAPP-A2 coding sequence; yeast transformed with recombinant yeast expression vectors containing the PAPP-A2 coding sequence; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing the PAPP-A2 coding sequence; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing the PAPP-A2 coding sequence; or animal cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., adenovirus, vaccinia virus, human tumor cells) including cell lines engineered

to contain multiple copies of the PAPP-A2 DNA either stably amplified (CHO/dhfr) or unstably amplified in double-minute chromosomes (e.g., murine cell lines).

The expression elements of these systems vary in their strength and specificities.

5 Depending on the host/vector system utilized, any of a number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used in the expression vector. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as pL of bacteriophage lambda, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac hybrid promoter) and the like may be used; when cloning in insect cell systems, promoters such as the baculovirus polyhedron promoter may be used; when cloning in
10 plant cell systems, promoters derived from the genome of plant cells (e.g., heat shock promoters; the promoter for the small subunit of RUBISCO; the promoter for the chlorophyll a/b binding protein) or from plant viruses (e.g., the 35S RNA promoter of CaMV; the coat protein promoter of TMV) may be used; when cloning in
15 mammalian cell systems, promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the CMV promoter, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter) may be used; when generating cell lines that contain multiple copies of the PAPP-A2 DNA SV40-, BPV- and EBV-based vectors may be used with an appropriate selectable marker.

20

The expression vector may be introduced into host cells via any one of a number of techniques including but not limited to transformation, transfection, infection, protoplast fusion, and electroporation. The expression vector-containing cells are clonally propagated and individually analyzed to determine whether they produce PAPP-A2
25 protein. Identification of PAPP-A2 expressing host cell clones may be done by several means, including but not limited to immunological reactivity with anti-PAPP-A2 antibodies, and the presence of host cell-associated PAPP-A2 activity.

25

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the PAPP-A2 expressed. For example, when large quantities of PAPP-A2 are to be produced, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include but are not limited to the E. coli expression vector pUR278 (Ruther and Muller-Hill, 1983, Embo J 2, 1791-4), in which the PAPP-A2
30 coding sequence may be ligated into the vector in frame with the lac Z coding region
35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

16

so that a hybrid AS-lac Z protein is produced. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety. In yeast, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters may be used. For a review, see (Ausubel et al., 1989; Bitter et al., 1987, Methods Enzymol 153, 516-44; Rosenfeld, 1999, Methods Enzymol 10 306, 154-69).

In cases where plant expression vectors are used, the expression of the PAPP-A2 coding sequence may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S RNA and 19S RNA promoters of CaMV may be used (Gmunder and Kohli, 1989, Mol Gen Genet 220, 95-101); alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO (Broglie et al., 1984, Science 224, 838-43).

An alternative expression system which could be used to express PAPP-A2 is an insect system. In one such system, Baculovirus is used as a vector to express foreign genes. The virus then grows in the insect cells. The PAPP-A2 coding sequence may be cloned into non-essential regions (for example the polyhedron gene) of the virus and placed under control of a Baculovirus promoter. These recombinant viruses are then used to infect insect cells in which the inserted gene is expressed. For example, see (Smith et al., 1983, Mol Cell Biol 3, 2156-65).

A variety of mammalian expression vectors may be used to express recombinant PAPP-A2 in mammalian cells. Commercially-available mammalian expression vectors which may be suitable for recombinant PAPP-A2 expression, include but are not limited to, pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pcDNA3.1 and its derivatives (Stratagene). Cell lines derived from mammalian species which may be suitable and which are commercially available, include but are not limited to, CV-1, COS-1, COS-7, CHO-K1, 3T3, NIH3T3, HeLa, C1271, BS-C-1, MRC-5, and 293. 35 Further, in mammalian host cells, a number of viral based expression systems may

be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the PAPP-A2 coding sequence may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing PAPP-A2 in infected hosts. See for example (Logan and Shenk, 1984, Proc Natl Acad Sci U S A 81, 3655-9). Alternatively, the vaccinia 7.5K promoter may be used. See for example (Mackett et al., 1982, Proc Natl Acad Sci U S A 79, 7415-9).

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express PAPP-A2 may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with PAPP-A2 DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines.

Some applications of the recombinant PAPP-A2 may require the protein to be in purified or partially purified form. Recombinantly expressed PAPP-A2 or fragments of the PAPP-A2 polypeptide can be isolated by liquid chromatography. Various methods of protein purification well known in the art include those described in for example (Scopes, 1987). Alternatively, recombinant PAPP-A2 fusion proteins or 'tagged' PAPP-A2 may be purified by affinity chromatography. Further, antibodies raised against PAPP-A2 may be used for purification by immunoaffinity chromatography.

Recombinant variant of PAPP-A2 may be produced by site directed mutagenesis. In some applications of PAPP-A2 such variants may be preferred due to for example increased protein stability, or changes in activity.

Production and uses of antibodies against PAPP-A2

The recombinant protein may be used to generate antibodies. Monospecific antibodies to PAPP-A2 can be purified from mammalian antisera containing antibodies
5 reactive against PAPP-A2 or can be prepared as monoclonal antibodies reactive with PAPP-A2 using standard techniques.

Monospecific antibody as used herein is defined as a single antibody species or
10 multiple antibody species with homogenous binding characteristics for PAPP-A2. Homogenous binding as used herein refers to the ability of the antibody species to bind to a specific antigen or epitope, such as those associated with the PAPP-A2, as described above. PAPP-A2 specific antibodies are raised by immunizing animals such as mice, rats, guinea pigs, rabbits, goats, horses and the like, with rabbits or mice being preferred, with an appropriate concentration of PAPP-A2 either with or
15 without an immune adjuvant. For example, antibodies specific against PAPP-A2 can be used for the purification of native and recombinant PAPP-A2, as a laboratory reagent, and in antibody based diagnostic kits.

Monoclonal antibodies (mAb) reactive with PAPP-A2 can be prepared by conventional methods, such as by immunizing inbred mice with PAPP-A2. The mice are
20 immunized with about 0.1 mg to about 10 mg, preferably about 1 mg, of PAPP-A2 in about 0.5 ml buffer or saline incorporated in an equal volume of an acceptable adjuvant. Freund's complete adjuvant is preferred. The mice receive an initial immunization on day 0 and are rested for about 3 to about 30 weeks. Immunized mice are
25 given one or more booster immunizations of about 0.1 to about 10 mg of PAPP-A2 in a buffer solution such as phosphate buffered saline (PBS) by the intravenous (IV) route. Lymphocytes from antibody-positive mice are obtained by removing spleens from immunized mice by standard procedures known in the art. Hybridoma cells are produced by mixing the splenic lymphocytes with an appropriate fusion partner under conditions which will allow the formation of stable hybridomas. Fused hybridoma
30 cells are selected by growth in hypoxanthine, thymidine and aminopterin supplemented Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) by procedures known in the art. Supernatant fluids are collected from growth positive wells on about days 14, 18, and 21 and are screened for antibody production by an immunoassay such as solid phase immunoradioassay (SPIRA) using PAPP-A2 as the antigen. The culture fluids
35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

19

are also tested in the Ouchterlony precipitation assay to determine the isotype of the mAb. Hybridoma cells from antibody positive wells are then cloned. For details, see (Peters and Baumgarten, 1992).

- 5 In vitro production of anti-PAPP-A2 is carried out by growing the hybridoma in DMEM containing about 2% fetal calf serum to obtain sufficient quantities of the specific mAb. The mAb are purified by techniques known in the art.
- 10 Antibody titers of ascites or hybridoma culture fluids are determined by various serological or immunological assays which include, but are not limited to, precipitation, passive agglutination, enzyme-linked immunosorbent antibody (ELISA) technique (Crowther, 1995).
- 15 The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in (Clackson et al., 1991, *Nature* 352, 624-8; Marks et al., 1991, *J Mol Biol* 222, 581-97), for example. Identified phage antibodies can be produced by expression in bacteria.
- 20 Methods such as those described above may be used to produce monospecific antibodies specific for PAPP-A2 polypeptide fragments or full-length nascent PAPP-A2 polypeptide.
- 25 PAPP-A2 antibody affinity columns can be made by adding the antibodies to a gel support, such as Affigel-10 (Biorad), a gel support which is pre-activated with N-hydroxysuccinimide esters such that the antibodies form covalent linkages with the agarose gel bead support. The antibodies are then coupled to the gel via amide bonds with the spacer arm. The remaining activated esters are then quenched with 1M ethanolamine HCl (pH 8). The column is washed with water followed by 0.23 M glycine HCl (pH 2.6) to remove any non-conjugated antibody or extraneous protein.
- 30 The column is then equilibrated in phosphate buffered saline (pH 7.3) and the cell culture supernatants or cell extracts containing PAPP-A2 or PAPP-A2 fragments are slowly passed through the column. The column is then washed, and the protein is eluted. The purified PAPP-A2 protein is then dialyzed against phosphate buffered saline.
- 35

Native PAPP-A2 from sources such as human plasma or serum, tissue extracts, or media from nontransfected cell lines (that endogenously secrete PAPP-A2) may also be purified by use of an antibody affinity column.

- 5 Using polyclonal or monoclonal antibodies against PAPP-A2 a number of assays may be constructed for measurement of PAPP-A2 antigen in body fluids or tissue and cell extracts. Kits based on antibodies may be used for diagnostic purposes. The assays include, but are not limited to, precipitation, passive agglutination, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques, and radioimmunoassay (RIA) techniques.

10 For example, in one such ELISA, a sandwich assay can be constructed where antigen present in a sample is caught by immobilized polyclonal anti(PAPP-A2). Detection is then performed by the use of one or more monoclonal PAPP-A2 antibodies and peroxidase conjugated anti(murine IgG). In another assay, antigen present in a sample is caught by immobilized polyclonal anti(PAPP-A2), and detected using biotinylated polyclonal anti(PAPP-A2). For further examples and details, see (Crowther, 1995). Assays can be calibrated using purified PAPP-A2 to construct a standard curve by serial dilution. The concentration of PAPP-A2 in solution in a purified form can be accurately measured by amino acid analysis (Sottrup-Jensen, 1993, Biochem Mol Biol Int 30, 789-94).

15 Polyclonal antibodies may be used to inhibit the biological activity of PAPP-A2. Specifically, in analogy with the inhibition of the IGFBP-4 proteolytic activity of PAPP-A by polyclonal PAPP-A antibodies (Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53), anti(PAPP-A2) may be used to inhibit the proteolytic activity of PAPP-A2. Certain monoclonal antibodies may also be inhibitory towards the activity of PAPP-A2. Such monoclonal antibodies are likely to recognize an epitope in close proximity to the active site of PAPP-A2, but the inhibitory activity may also be based on binding to epitopes other than those close to the active site. Inhibitory monoclonal antibodies can be obtained by immunization with PAPP-A2, PAPP-A2 fragments, with peptides derived from PAPP-A2.

20 Inhibitory (monoclonal) antibodies may have therapeutic value in conditions of pathologies in which it may be desirable to decrease the activity of PAPP-A2.

5 Activity of PAPP-A2

10 Like PAPP-A, PAPP-A2 contains conserved amino acid stretches that classify it as a putative metalloproteinase of the metzincin superfamily (Stocker et al., 1995, Protein Sci 4, 823-40). It has been experimentally verified that PAPP-A2 does exhibit proteolytic activity by demonstrating its cleavage of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 (Example 6.7).

15 In general, proteolytic activity of PAPP-A2 against potential protein substrates may be evaluated by the incubation of purified or partially purified PAPP-A2 with the potential substrate under a variety of experimental conditions (such as for example temperature, buffer composition, ionic strength, and pH). Enzymatic activity of PAPP-A2 against the protein in question can be evaluated by SDS-PAGE (in which degradation or release of well defined proteolytic fragment(s) will be evident), or by high-pressure liquid chromatographic detection of released peptide(s). By means of
20 such procedures, other substrate targets of PAPP-A2 may be identified. Incubation with a variant of PAPP-A2 where, for example, a residue in the active site has been substituted to obtain an inactive enzyme, serves as a proper negative control.

25 Random peptide libraries consisting of all possible combinations of amino acids attached to a solid phase support may be used to identify peptides that can be cleaved by PAPP-A2. Identification of such peptides may be accomplished by screening a peptide library with recombinant soluble PAPP-A2. Methods for expression and purification of the enzyme are described above and may be used to express recombinant full length PAPP-A2 or fragments, analogs, or derivatives thereof
30 depending on the functional domains of interest. For further details, see (Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 65-74; Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 51-7). Alternatively, peptide substrates may be derived from identified protein substrates of PAPP-A2.

Alternatively, phage display of peptide libraries may be used to identify peptides that can be cleaved by PAPP-A2 (Matthews and Wells, 1993, Science 260, 1113-7).

5 Peptides that function as PAPP-A2 substrates may function in assays for the detection of PAPP-A2 proteolytic activity in body fluids or tissue and cell extracts. Substrate peptides may be derivatized to function in an assay based on quenched-fluorescence (Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 65-74). Kits based on such, or other, techniques may be used for diagnostic purposes in pathologies where measurement of PAPP-A2 activity is relevant.

10

Identification of agents that modify the activity of PAPP-A2

15 An assay for the detection of PAPP-A2 proteolytic activity, as described above, provides a method for the identification of molecules that modify the activity of PAPP-A2. Such molecules may be, for example, peptides, derivatized peptides, hydroxamic acid derivatized peptides, small organic molecules, or antibodies.

20 The screening of peptide libraries can be used to discover pharmaceutical agents that act to modulate and/or inhibit the biological activity of PAPP-A2. Methods for expression and purification of the enzyme are described above and may be used to express recombinant full length PAPP-A2 or fragments, analogs, or derivatives thereof depending on the functional domains of interest. Random peptide libraries consisting of all possible combinations of amino acids attached to a solid phase support may be used to identify peptides that are able to modulate and/or inhibit PAPP-A2 activity by binding to the active site or other sites of PAPP-A2. For example, see (Meldal, 1998, Methods Mol Biol 87, 75-82).

25 Similarly, combinatorial chemistry may be used to identify low molecular weight organic molecules that affect the activity of PAPP-A2.

30

Measurement of complexes of PAPP-A or PAPP-A2

35 PAPP-A primarily exists in pregnancy serum as a disulfide bound 2:2 complex with the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), PAPP-A/proMBP. In addition to the PAPP-A/proMBP complex, proMBP exists in the circulation as a disulfide

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

23

bound 2:2 complex with angiotensin (ANG), proMBP/ANG, and a fraction of this complex is further complexed to a fragment of complement component C3dg (PROMBP/ANG/C3dg) (Oxvig, 1995; Christiansen, 2000).

5 The level of complexes comprising PAPP-A and/or PAPP-A2 and/or proMBP in body fluids of an individual may be indicative of predisposition to a clinical condition or indicative of the presence of a clinical condition. Accordingly, the present invention in one embodiment is directed towards a method of diagnosing a clinical condition or diagnosing predisposition to said clinical condition in an individual comprising the steps of

- 10 a) providing a body sample from said individual; and
- b) measuring the level of a complex selected from the group consisting of PAPP-A/proMBP, PAPP-A2/proMBP, PAPP-A/PAPP-A2, PAPP-A/PAPP-A2/proMBP, proMBP/ANG and proMBP/ANG/C3dg in said body fluid sample; and
- 15 c) diagnosing the clinical condition or diagnosing predisposition to the clinical condition, wherein the level of the complex above or below a predetermined value is indicative of the clinical condition or predisposition to the clinical condition.

20 Furthermore, the levels of complexes comprising PAPP-A and/or PAPP-A2 and/or proMBP in body fluids of a mammalian mother may be indicative of predisposition to a clinical condition or indicative of the presence of a clinical condition in a fetus of said mother. Hence, the present invention provides methods of diagnosing a clinical condition or diagnosing predisposition to said clinical condition in a mammalian fetus comprising the steps of

- 25 a) providing a body fluid sample from the mother of said fetus; and
- 30 b) measuring the level of a complex selected from the group consisting of PAPP-A/proMBP, PAPP-A2/proMBP, PAPP-A/PAPP-A2, PAPP-A/PAPP-A2/proMBP, proMBP/ANG and proMBP/ANG/C3dg in said body fluid sample; and
- 35 c) diagnosing the clinical condition or diagnosing predisposition to the clinical condition, wherein the level of the complex above or below a predetermined

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

24

value is indicative of the clinical condition or predisposition to the clinical condition.

In particular, according to the present method the level of one or more of the following complexes may be determined:

- PAPP-A/proMBP
- PAPP-A2 and proMBP (PAPP-A2/proMBP)
- PAPP-A2 and PAPP-A (PAPP-A/PAPP-A2)
- 10 PAPP-A/PAPP-A2 with proMBP (PAPP-A/PAPP-A/proMBP)
- proMBP/ANG
- proMBP/ANG/C3dg

15 The level of complexes comprising PAPP-A and/or PAPP-A2 and/or proMBP in a body fluid sample may be determined by any conventional method known to the person skilled in the art. For example, the level can be measured by a method comprising the use of immunospecific reagents specifically interacting with one or more components of the complex desirable to measure, such as immunospecific reagents

20 specifically interacting with PAPP-A, PAPP-A2, proMBP, ANG or C3dg. Immunospecific reagents may for example be monoclonal antibodies, polyclonal antibodies and/or antigen binding fragments thereof, specific towards the individual components of the complex.

25 Such methods include but are not limited to sandwich ELISA, wherein an immunospecific reagent specifically recognising one component of the complex is employed as catching antibody and another immunospecific reagent specifically recognising another component of the complex is employed as detection antibody. The detection antibody is preferably either directly or indirectly detectable, for example the detection

30 antibody may be directly coupled to a detectable label or the detection antibody may be capable of interacting with another agent which is coupled to a detectable label.

A detectable label may for example be a fluorescent label, a chromophore, a radioactive label, a heavy metal or an enzyme.

35

5 For example, the level of PAPP-A/proMBP complexes in a body fluid sample may be determined by sandwich ELISA using a PAPP-A specific monoclonal or polyclonal antibody for catching and a proMBP specific monoclonal or polyclonal antibody for detection or the level of proMBP/ANG in a body fluid sample may be determined by sandwich ELISA using a proMBP specific monoclonal or polyclonal antibody for catching and a ANG specific monoclonal or polyclonal antibody for detection.

10 The clinical condition may be any clinical condition which may be diagnosed by the level of complexes comprising PAPP-A and/or PAPP-A2 and/or proMBP or wherein predisposition may be diagnosed by the level of complexes comprising PAPP-A and/or PAPP-A2 and/or proMBP. The clinical condition may for example be selected from the group comprising Down's syndrome, preeclampsia and acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction.

15 The body fluid sample may be any usefull body fluid sample, such as a blood sample including a serum sample, a urine sample, a saliva sample or an amniotic fluid sample.

20 In particular, the level of PAPP-A/proMBP may be determined when the clinical condition is selected from the group consisting of Down's syndrome, and acute coronary syndrome including unstable angina and myocardial infarction.

25 In one embodiment of the present invention diagnosing Down's syndrome or diagnosing predisposition to Down's syndrome, comprises determining the level of PAPP-A/proMBP, wherein the level of PAPP-A/proMBP below a predetermined value is indicative of the Down's syndrome or predisposition to Down's syndrome.

30 In another embodiment of the present invention diagnosing acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction or diagnosing predisposition to acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction, comprises determining the level of PAPP-A/proMBP, wherein the level of PAPP-A/proMBP above a predetermined value is indicative of the acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction or predisposition to acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction.

35

In yet another embodiment the level of proMBP/ANG may be determined to diagnose predisposition to Down's syndrome or to diagnose Down's syndrome.

5 All the above mentioned methods of diagnosis may also be performed in combination with one or more other methods of diagnosis. In addition, more than one different diagnosis according to the present invention may be performed, for example it is possible to measure the level of more than one complex or to measure the level of one complex in different body samples.

10 Use of PAPP-A2 to generate natural proteolytic fragments

PAPP-A2 may be used to generate natural fragments of proteins that are specifically cleaved by PAPP-A2. As in the case of IGFBP-5 (see Examples 6.7 and 6.9), such fragments may have biological effects different from intact IGFBP-5. Fragments can be purified by standard chromatography after cleavage with purified PAPP-A2 (see Example 6.9).

Design of fragments of PAPP-A2 for expression

20 Because all cysteine residues found in mature PAPP-A are also found in mature PAPP-A2 (see Figure 3), the pattern of disulfide bonds can be assumed to be the same for PAPP-A2 for those common cysteine residues. Therefore, knowledge of the disulfide structure of the PAPP-A subunit (see Figure 8) can be used to rationally design fragments of PAPP-A2 in which pairing of all cysteine residues is possible.

25 Putative domain boundaries of PAPP-A2 can be defined based on the disulfide structure shown in Figure 8. Those domains can be expressed separately or in combination. In the event that a domain contains a cysteine residue known to form an inter-chain disulfide bridge to another PAPP-A subunit or to proMBP (see Figure 8), it may be required that this cysteine is mutated to for example a serine or an alanine residue

30 Thus, possible boundary regions are *between* Cys-403 and Cys-499, between Cys-828 and Cys-881, between Cys-1048 and Cys-1115, between Cys-1390 and Cys-1396, between Cys-1459 and Cys-1464, between Cys-1521 and Cys-1525, between

Cys-1590 and Cys-1595, between Cys-1646 and Cys-1653, and between Cys-1729 and Cys-1733 (numbering of preproPAPP-A2, as in Figure 1 and 3).

Pharmaceutical Compositions

5

Identification of PAPP-A2 as the IGFBP-5 protease provides methods for affecting growth and differentiation *in vivo* by using PAPP-A2 as a therapeutic target. Inhibitors of PAPP-A2 is believed to decrease the amount of bioavailable IGF-I and IGF-II. For example, inhibition of PAPP-A2 activity can be useful in disorders such as stenosis, atherosclerosis, and fibrosis. Activators, or agents that increase the activity of PAPP-A2, is believed to increase the amount of bioavailable IGF-I and IGF-II.

10

Agents that alter PAPP-A2 activity or that alter adherence of PAPP-A2 to cell surfaces can be incorporated into pharmaceutical compositions. Such agents may be incorporated together with agents that alter PAPP-A activity or that alter adherence of PAPP-A to cell surfaces. A combination of PAPP-A2 specific agents and PAPP-A specific agents may be more effective than traditional agents directed against PAPP-A. There is also provided a method of treatment comprising the step of administering to an individual in need thereof a combination of PAPP-A2 specific agents and PAPP-A specific agents in pharmaceutically effective amounts.

15

20

As an example, an antibody such as anti-PAPP-A2 polyclonal or monoclonal, can be formulated into a pharmaceutical composition by admixture with pharmaceutically acceptable non-toxic excipients or carriers. Such compounds and compositions may be prepared for parenteral administration, particularly in the form of liquid solutions or suspensions in aqueous physiological buffer solutions; for oral administration, particularly in the form of tablets or capsules; or for intranasal administration, particularly in the form of powders, nasal drops, or aerosols. Compositions for other routes of administration may be prepared as desired using standard methods.

25

30

Formulations for parenteral administration may contain as common excipients (i.e., pharmaceutically acceptable carriers) sterile water or saline, polyalkylene glycols such as polyethylene glycol, oils of vegetable origin, hydrogenated naphthalenes, and the like. In particular, biocompatible, biodegradable lactide polymer,

35

lactide/glycolide copolymer, or polyoxethylene-polyoxypropylene copolymers are examples of excipients for controlling the release of a compound of the invention in vivo. Other suitable parenteral delivery systems include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes.

5 Formulations for inhalation administration may contain excipients such as lactose, if desired. Inhalation formulations may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or they may be oily solutions for administration in the form of nasal drops. If desired, the compounds can be formulated as gels to be applied intranasally. Formulations for parenteral
10 administration may also include glycocholate for buccal administration

Medical Devices

The invention also features a medical device for placement in a patient (e.g., an implant) that includes an agent that inhibits or activates PAPP-A2 protease activity.
15 Suitable agents are readily identified using the methods described herein. The device can be impregnated with the agent or can be coated with the agent. Non-limiting examples of inhibitors include an antibody such as anti-PAPP-A2 polyclonal or monoclonal, or a metalloprotease inhibitor such as 1,10-phenanthroline.

20 IGFBP-5 protease activity of PAPP-A2 is potently inhibited by 1,10-phenanthroline, but is not inhibited by tissue inhibitors of matrix metalloproteases (TIMP'S). Other inhibitors include small molecules such as derivatives of hydroxamic acid. Anti-PAPP-A2 polyclonal IgG may also inhibit IGF-dependent - or IGF-independent -
25 IGFBP-5 specific PAPP-A2 protease activity in HFCM in a dose-dependent manner.

In addition, polypeptides (i.e., any chain of amino acids, regardless of length or post-translational modification), including modified polypeptides, can function as inhibitors. Any inhibitor of the IGFBP-5 protease activity of PAPP-A2 can be used for
30 coating or impregnating a medical device according to the invention. Modified polypeptides include amino acid substitutions, deletions, or insertions in the amino acid sequence as compared with a corresponding wild-type sequence, as well as chemical modifications. Although protease-resistant IGFBP-5 is not an inhibitor per se of the IGFBP-5 protease activity of PAPP-A2, similar results are expected when it is
35 used for coating or impregnating a medical device.

As an example, coating or impregnating the medical device with a PAPP-A2 inhibitor, optionally in combination with a PAPP-A inhibitor, can help prevent the development of restenosis following balloon angioplasty, or can prevent a further increase in size of an atherosclerotic plaque. Coronary angioplasty with stent placement is currently the leading therapeutic approach for coronary atherosclerosis. An important goal of angioplasty of coronary artery disease is to prevent both acute and chronic complications. Modern procedures are quite successful in eliminating immediate problems. Unfortunately, restenosis still occurs in 20-30% of stented patients. No known pharmacological intervention is available to prevent the restenosis.

Without being bound by a particular mechanism, it is thought that an increase in IGFBP-5 protease expression by coronary smooth muscle cells precedes neointimal formation in response to angioplasty in humans.

For example, enhanced PAPP-A2 activity can be useful for wound healing, fractures, osteoporosis, or ovulation. Osteoporosis or other conditions of bone loss may benefit from increased bone formation and decreased bone resorption. Agents that enhance PAPP-A2 activity can be, for example, a modified IGF, i.e., an IGF analog.

Analogs include IGF polypeptides containing amino acid insertions, deletions or substitutions, as well as chemical modifications. Amino acid substitutions can include conservative and non-conservative amino acid substitutions. Conservative amino acid substitutions replace an amino acid with an amino acid of the same class, whereas non-conservative amino acid substitutions replace an amino acid with an amino acid of a different class. Non-conservative substitutions result in a change in the hydrophobicity of the polypeptide or in the bulk of a residue side chain. In addition, non-conservative substitutions can make a substantial change in the charge of the polypeptide, such as reducing electropositive charges or introducing electronegative charges. Examples of non-conservative substitutions include a basic amino acid for a non-polar amino acid, or a polar amino acid for an acidic amino acid. Amino acid insertions, deletions and substitutions can be made using random mutagenesis, site-directed mutagenesis, or other recombinant techniques known in the art.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

30

The medical device can be, for example, bone plates or bone screws that are used to stabilize bones, or a stent, which typically is used within the body to restore or maintain the patency of a body lumen. Blood vessels, for example, can become
5 obstructed due to an atherosclerotic plaque that restricts the passage of blood. A stent typically has a tubular structure defining an inner channel that accommodates flow within the body lumen. The outer walls of the stent engage the inner walls of the body lumen. Positioning of a stent within an affected area can help prevent further occlusion of the body lumen and permit continued flow. A stent typically is
10 deployed by percutaneous insertion of a catheter or guide wire that carries the stent. The stent ordinarily has an expandable structure. Upon delivery to the desired site, the stent can be expanded with a balloon mounted on the catheter. Alternatively, the stent may have a biased or elastic structure that is held within a sheath or other restraint in a compressed state. The stent expands voluntarily when the restraint is
15 removed. In either case, the walls of the stent expand to engage the inner wall of the body lumen, and generally fix the stent in a desired position.

STATEMENTS OF INVENTION

- 20 In a first aspect the present invention relates to a purified polynucleotide selected from the group consisting of
- 25 i) a polynucleotide comprising nucleotides 1 to 5376 of SEQ ID NO:1, corresponding to the coding sequence of PAPP-A2, as deposited with DSMZ under accession number DSM 13783; and
 - ii) a polynucleotide encoding a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and
 - 30 iii) a polynucleotide encoding a fragment of a polypeptide encoded by polynucleotides (i) or (ii), wherein said fragment
- a) has a proteolytic activity specific for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5), or a derivative thereof, or any other substrate; and/or
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

31

- 5
- b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide; and
- 10 iv) a polynucleotide, the complementary strand of which hybridizes, under stringent conditions, with a polynucleotide as defined in any of (i), (ii) and (iii), said polynucleotide encoding a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, wherein said fragment
- 15 a) has a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or
- b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- 20 c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide; and
- 25 v) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is degenerate to the nucleotide sequence of a polynucleotide as defined in any of (iii) and (iv),
- 30 and the complementary strand of such a polynucleotide.

A polynucleotide as used herein shall denote any naturally occurring polynucleotide having any naturally occurring backbone structure, as well as nucleotides known in the art as LNA (locked nucleic acid) and PNA (peptide nucleic acid).

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

32

In preferred embodiments the purified polynucleotide comprises the coding sequence of PAPP-A2, nucleotides 1 to 5376, as shown in SEQ ID NO:1, or a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2.

5

In another preferred embodiment the polynucleotide comprises a nucleotide sequence encoding a fragment of the polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2, wherein said fragment

10

a) has a proteolytic activity specific for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5), or a derivative thereof, or any other substrate; and/or

15

b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or

20

c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide

There is also provided a polynucleotide, the complementary strand of which hybridizes, under stringent conditions, with a polynucleotide according to the invention.

25

Stringent conditions as used herein shall denote stringency as normally applied in connection with Southern blotting and hybridization as described e.g. by Southern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517. For such purposes it is routine practise to include steps of prehybridization and hybridization. Such steps are normally performed using solutions containing 6x SSPE, 5% Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamide, 100

30

µg/ml denaturated salmon testis DNA (incubation for 18 hrs at 42°C), followed by washings with 2x SSC and 0.5% SDS (at room temperature and at 37°C), and a washing with 0.1x SSC and 0.5% SDS (incubation at 68°C for 30 min), as described by Sambrook et al., 1989, in "Molecular Cloning/A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, which is incorporated herein by reference.

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

33

The DNA sequences are used in a variety of ways. They may be used as probes for identifying homologs of uHase (e.g., homologs of huHase). Mammalian homologs have substantial sequence similarity to one another, i.e. at least 75%, usually at least 90%, more usually at least 95% sequence identity. Sequence similarity is calculated based on a reference sequence, which may be a subset of a larger sequence, such as a conserved motif, coding region, flanking region, etc. A reference sequence will usually be at least about 18 nt long, more usually at least about 30 nt long, and may extend to the complete sequence that is being compared. Algorithms for sequence analysis are known in the art, such as BLAST, described in Altschul et al. 1990 J Mol Biol 215:403-10.

Nucleic acids having sequence similarity are detected by hybridization under low stringency conditions, for example, at 50.degree. C. and 10.times.SSC (0.9 M saline/0.09 M sodium citrate) and remain bound when subjected to washing at 55.degree. C. in 1.times.SSC. Sequence identity may be determined by hybridization under high stringency conditions, for example, at 50.degree. C. or higher and 0.1.times.SSC (9 mM saline/0.9 mM sodium citrate). By using probes, particularly labeled probes of DNA sequences, one can isolate homologous or related genes. The source of homologous genes may be any species, e.g. Primate species, particularly human; rodents, such as rats and mice, canines, felines, bovine, opines, equine, yeast, Drosophila, Caerthorabdittis, etc.

In a further embodiment there is provided a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is degenerate to a polynucleotide capable of hybridising to SEQ ID NO:1, or a fragment thereof.

Degeneracy as used herein is defined in terms of the activity or functionality associated with the polypeptide expressed from said degenerate polynucleotide, said polynucleotide is either i) comprising a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or ii) recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or iii) competing with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide.

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

34

In a further embodiment there is provided a polynucleotide comprising the complementary strand of a polynucleotide according to the invention.

5 The polynucleotide according to the invention may be operably linked to a further polynucleotide comprising nucleic acid residues corresponding to the 3' untranslated region of PAPP-A2, or a fragment thereof. As used herein the 3' untranslated region comprises nucleic acid residues 5377 to 8527 of SEQ ID NO:1.

10 There is also provided a recombinant DNA molecule in the form of an expression vector comprising an expression signal operably linked to a polynucleotide according to the invention.

15 In a further embodiment there is provided a host organism transfected or transformed with the polynucleotide according to the invention, or the vector according to the invention. The host organism is preferably a mammalian organism such as e.g. a mammalian cell line. However, a microbial eukaryote such as yeast or fungi may also be used, as may a microbial prokaryote such as Bacillus or E. coli. The person skilled in the art will know how to select expression signals, including leader sequences and/or signal peptides suitable for expression in a given cell. The person
20 skilled in the art will also know how to determine the level of expression in a given cell by using standard molecular biology techniques.

In a further aspect the invention relates to an isolated polypeptide comprising or essentially consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment
25 thereof, wherein said fragment

- a) has a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or
- 30 b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

35

c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor with an affinity for said polypeptide.

5 In one preferred embodiment of the invention there is also provided variants of SEQ ID NO:2, and variants of fragments thereof. Variants are determined on the basis of their degree of identity or their homology with a predetermined amino acid sequence, said predetermined amino acid sequence being SEQ ID NO:2, or, when the variant is a fragment, a fragment of SEQ ID NO:2.

10 Accordingly, variants preferably have at least 75% sequence identity, for example at least 80% sequence identity, such as at least 85 % sequence identity, for example at least 90 % sequence identity, such as at least 91 % sequence identity, for example at least 91% sequence identity, such as at least 92 % sequence identity, 15 for example at least 93 % sequence identity, such as at least 94 % sequence identity, for example at least 95 % sequence identity, such as at least 96 % sequence identity, for example at least 97% sequence identity, such as at least 98 % sequence identity, for example 99% sequence identity with the predetermined sequence.

20 Variants are also determined based on a predetermined number of conservative amino acid substitutions as defined herein below. Conservative amino acid substitution as used herein relates to the substitution of one amino acid (within a predetermined group of amino acids) for another amino acid (within the same group), 25 wherein the amino acids exhibit similar or substantially similar characteristics.

Within the meaning of the term "conservative amino acid substitution" as applied herein, one amino acid may be substituted for another within the groups of amino acids indicated herein below:

- 30
- i) Amino acids having polar side chains (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, and Cys.)
 - ii) Amino acids having non-polar side chains (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, 35 Pro, and Met)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

36

- iii) Amino acids having aliphatic side chains (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
- iv) Amino acids having cyclic side chains (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- 5 v) Amino acids having aromatic side chains (Phe, Tyr, Trp)
- vi) Amino acids having acidic side chains (Asp, Glu)
- 10 vii) Amino acids having basic side chains (Lys, Arg, His)
- viii) Amino acids having amide side chains (Asn, Gln)
- ix) Amino acids having hydroxy side chains (Ser, Thr)
- 15 x) Amino acids having sulphur-containing side chains (Cys, Met),
- xi) Neutral, weakly hydrophobic amino acids (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
- 20 xii) Hydrophilic, acidic amino acids (Gln, Asn, Glu, Asp), and
- xiii) Hydrophobic amino acids (Leu, Ile, Val)

25 Accordingly, a variant or a fragment thereof according to the invention may comprise, within the same variant of the sequence or fragments thereof, or among different variants of the sequence or fragments thereof, at least one substitution, such as a plurality of substitutions introduced independently of one another.

30 It is clear from the above outline that the same variant or fragment thereof may comprise more than one conservative amino acid substitution from more than one group of conservative amino acids as defined herein above.

35 The addition or deletion of an amino acid may be an addition or deletion of from 2 to 10 amino acids, such as from 10 to 20 amino acids, for example from 20 to 30 amino acids, such as from 40 to 50 amino acids. However, additions or deletions of

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

37

more than 50 amino acids, such as additions from 10 to 100 amino acids, addition of 100 to 150 amino acids, addition of 150-250 amino acids, are also comprised within the present invention.

5 The polypeptide fragments according to the present invention, including any functional equivalents thereof, may in one embodiment comprise less than 250 amino acid residues, such as less than 240 amino acid residues, for example less than 225 amino acid residues, such as less than 200 amino acid residues, for
10 residues, for example less than 180 amino acid residues, such as less than 160 amino acid residues, for example less than 150 amino acid residues, such as less than 140 amino acid residues, for example less than 130 amino acid residues, such as less than 120 amino acid residues, for example less than 110 amino acid residues, such as less than 100 amino acid residues, for example less than 90 amino acid residues, such as less than 85 amino acid residues, for example less than 80 amino acid
15 residues, such as less than 75 amino acid residues, for example less than 70 amino acid residues, such as less than 65 amino acid residues, for example less than 60 amino acid residues, such as less than 55 amino acid residues, for example less than 50 amino acid residues.

20 "Functional equivalency" as used in the present invention is according to one preferred embodiment established by means of reference to the corresponding functionality of a predetermined fragment of the sequence. More specifically, functional equivalency is to be understood as the ability of a polypeptide fragment to exert IGFBP-5 specific protease activity and/or to be recognised by an antibody
25 capable of recognising PAPP-A2 and/or to compete with PAPP-A2 for binding to a receptor having affinity for PAPP-A2.

Functional equivalents or variants of PAPP-A2 will be understood to exhibit amino acid sequences gradually differing from the preferred predetermined PAPP-A2
30 sequence, as the number and scope of insertions, deletions and substitutions including conservative substitutions increases. This difference is measured as a reduction in homology between the preferred predetermined sequence and the fragment or functional equivalent.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

38

5 All fragments or functional equivalents of SEQ ID NO:2 are included within the scope of this invention, regardless of the degree of homology that they show to a preferred predetermined sequence of PAPP-A2 as reported herein. The reason for this is that some regions of PAPP-A2 are most likely readily mutable, or capable of being completely deleted, without any significant effect on the binding activity of the resulting fragment.

10 A functional variant obtained by substitution may well exhibit some form or degree of native PAPP-A2 activity, and yet be less homologous, if residues containing functionally similar amino acid side chains are substituted. Functionally similar in this respect refers to dominant characteristics of the side chains such as hydrophobic, basic, neutral or acidic, or the presence or absence of steric bulk. Accordingly, in one embodiment of the invention, the degree of identity is not a principal measure of a fragment being a variant or functional equivalent of a preferred predetermined
15 fragment according to the present invention.

The homology between amino acid sequences may be calculated using well known algorithms such as BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, or BLOSUM 90.
20

Fragments sharing at least some homology with fragments of SEQ ID NO:2 are to be considered as falling within the scope of the present invention when they are at least about 90 percent homologous, for example at least 92 percent homologous, 25 such as at least 94 percent homologous, for example at least 95 percent homologous, such as at least 96 percent homologous, for example at least 97 percent homologous, such as at least 98 percent homologous, for example at least 99 percent homologous with said fragments of SEQ ID NO:2. According to one embodiment of the invention the homology percentages refer to identity percentages.
30

Additional factors that may be taken into consideration when determining functional equivalence according to the meaning used herein are i) the ability of antisera to detect a PAPP-A2 fragment according to the present invention, or ii) the ability of the functionally equivalent PAPP-A2 fragment to compete with PAPP-A2 in a binding
35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

39

assay. One method of determining a sequence of immunogenically active amino acids within a known amino acid sequence has been described by Geysen in US 5,595,915 and is incorporated herein by reference.

5 A further suitably adaptable method for determining structure and function relationships of peptide fragments is described by US 6,013,478, which is herein incorporated by reference. Also, methods of assaying the binding of an amino acid sequence to a receptor moiety are known to the skilled artisan.

10 Conservative substitutions may be introduced in any position of a preferred predetermined fragment of SEQ ID NO:2, and it may also be desirable to introduce non-conservative substitutions in any one or more positions.

A non-conservative substitution leading to the formation of a functionally equivalent fragment of PAPP-A2 would for example i) differ substantially in polarity, for 15 example a residue with a non-polar side chain (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe or Met) substituted for a residue with a polar side chain such as Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, or Gln or a charged amino acid such as Asp, Glu, Arg, or Lys, or substituting a charged or a polar residue for a non-polar one; and/or ii) differ 20 substantially in its effect on polypeptide backbone orientation such as substitution of or for Pro or Gly by another residue; and/or iii) differ substantially in electric charge, for example substitution of a negatively charged residue such as Glu or Asp for a positively charged residue such as Lys, His or Arg (and vice versa); and/or iv) differ 25 substantially in steric bulk, for example substitution of a bulky residue such as His, Trp, Phe or Tyr for one having a minor side chain, e.g. Ala, Gly or Ser (and vice versa).

30 Variants obtained by substitution of amino acids may in one preferred embodiment be made based upon the hydrophobicity and hydrophilicity values and the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, including charge, size, and the like. Exemplary amino acid substitutions which take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

40

In addition to the variants described herein, sterically similar variants may be formulated to mimic the key portions of the variant structure and that such compounds may also be used in the same manner as the variants of the invention. This may be achieved by techniques of modelling and chemical designing known to those of skill in the art. It will be understood that all such sterically similar constructs fall within the scope of the present invention.

In a further embodiment the present invention relates to functional comprising substituted amino acids having hydrophilic or hydrophobic indices that are within ± 2.5 , for example within ± 2.3 , such as within ± 2.1 , for example within ± 2.0 , such as within ± 1.8 , for example within ± 1.6 , such as within ± 1.5 , for example within ± 1.4 , such as within ± 1.3 for example within ± 1.2 , such as within ± 1.1 , for example within ± 1.0 , such as within ± 0.9 , for example within ± 0.8 , such as within ± 0.7 , for example within ± 0.6 , such as within ± 0.5 , for example within ± 0.4 , such as within ± 0.3 , for example within ± 0.25 , such as within ± 0.2 of the value of the amino acid it has substituted.

The importance of the hydrophilic and hydrophobic amino acid indices in conferring interactive biologic function on a protein is well understood in the art (Kyte & Doolittle, 1982 and Hopp, U.S. Pat. No. 4,554,101, each incorporated herein by reference).

The amino acid hydrophobic index values as used herein are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5) (Kyte & Doolittle, 1982).

The amino acid hydrophilicity values are: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0, ± 1); glutamate (+3.0, ± 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5, ± 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4) (U.S. 4,554,101).

In addition to the peptidyl compounds described herein, sterically similar compounds may be formulated to mimic the key portions of the peptide structure and that such compounds may also be used in the same manner as the peptides of the invention. This may be achieved by techniques of modelling and chemical designing known to those of skill in the art. For example, esterification and other alkylations may be employed to modify the amino terminus of, e.g., a di-arginine peptide backbone, to mimic a tetra peptide structure. It will be understood that all such sterically similar constructs fall within the scope of the present invention.

Peptides with N-terminal alkylations and C-terminal esterifications are also encompassed within the present invention. Functional equivalents also comprise glycosylated and covalent or aggregative conjugates formed with the same or other PAPP-A2 fragments and/or PAPP-A2 molecules, including dimers or unrelated chemical moieties. Such functional equivalents are prepared by linkage of functionalities to groups which are found in fragment including at any one or both of the N- and C-termini, by means known in the art.

Functional equivalents may thus comprise fragments conjugated to aliphatic or acyl esters or amides of the carboxyl terminus, alkylamines or residues containing carboxyl side chains, e.g., conjugates to alkylamines at aspartic acid residues; O-acyl derivatives of hydroxyl group-containing residues and N-acyl derivatives of the amino terminal amino acid or amino-group containing residues, e.g. conjugates with fMet-Leu-Phe or immunogenic proteins. Derivatives of the acyl groups are selected from the group of alkyl-moieties (including C3 to C10 normal alkyl), thereby forming alkanoyl species, and carbocyclic or heterocyclic compounds, thereby forming aroyl species. The reactive groups preferably are difunctional compounds known per se for use in cross-linking proteins to insoluble matrices through reactive side groups.

Covalent or aggregative functional equivalents and derivatives thereof are useful as reagents in immunoassays or for affinity purification procedures. For example, a fragment of PAPP-A2 according to the present invention may be insolubilized by covalent bonding to cyanogen bromide-activated Sepharose by methods known per se or adsorbed to polyolefin surfaces, either with or without glutaraldehyde cross-linking, for use in an assay or purification of anti-PAPP-A2 antibodies or cell surface receptors. Fragments may also be labelled with a detectable group, e.g., radiocidi-

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

42

nated by the chloramine T procedure, covalently bound to rare earth chelates or conjugated to another fluorescent moiety for use in e.g. diagnostic assays.

5 Mutagenesis of a preferred predetermined fragment of PAPP-A2 can be conducted by making amino acid insertions, usually on the order of about from 1 to 10 amino acid residues, preferably from about 1 to 5 amino acid residues, or deletions of from about from 1 to 10 residues, such as from about 2 to 5 residues.

10 In one embodiment the fragment of PAPP-A2 is synthesised by automated synthesis. Any of the commercially available solid-phase techniques may be employed, such as the Merrifield solid phase synthesis method, in which amino acids are sequentially added to a growing amino acid chain. (See Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963).

15 Equipment for automated synthesis of polypeptides is commercially available from suppliers such as Applied Biosystems, Inc. of Foster City, Calif., and may generally be operated according to the manufacturer's instructions. Solid phase synthesis will enable the incorporation of desirable amino acid substitutions into any fragment of PAPP-A2 according to the present invention. It will be understood that substitutions, 20 deletions, insertions or any subcombination thereof may be combined to arrive at a final sequence of a functional equivalent. Insertions shall be understood to include amino-terminal and/or carboxyl-terminal fusions, e.g. with a hydrophobic or immunogenic protein or a carrier such as any polypeptide or scaffold structure capable as serving as a carrier.

25 Oligomers including dimers including homodimers and heterodimers of fragments of PAPP-A2 according to the invention are also provided and fall under the scope of the invention. PAPP-A2 functional equivalents and variants can be produced as homodimers or heterodimers with other amino acid sequences or with native PAPP-A2 30 sequences. Heterodimers include dimers containing immunoreactive PAPP-A2 fragments as well as PAPP-A2 fragments that need not have or exert any biological activity.

35 PAPP-A2 fragments according to the invention may be synthesised both in vitro and in vivo. Method for in vitro synthesis are well known, and methods being suitable or

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

43

5 suitably adaptable to the synthesis in vivo of PAPP-A2 are also described in the prior art. When synthesized in vivo, a host cell is transformed with vectors containing DNA encoding PAPP-A2 or a fragment thereof. A vector is defined as a replicable nucleic acid construct. Vectors are used to mediate expression of PAPP-A2. An expression vector is a replicable DNA construct in which a nucleic acid sequence encoding the predetermined PAPP-A2 fragment, or any functional equivalent thereof that can be expressed in vivo, is operably linked to suitable control sequences capable of effecting the expression of the fragment or equivalent in a suitable host. Such control sequences are well known in the art.

10 Cultures of cells derived from multicellular organisms represent preferred host cells. In principle, any higher eukaryotic cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. Examples of useful host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, and WI38, BHK, COS-7, 293 and MDCK cell lines. Preferred host cells are eukaryotic cells known to synthesize endogenous PAPP-A2. Cultures of such host cells may be isolated and used as a source of the fragment, or used in therapeutic methods of treatment, including therapeutic methods aimed at promoting or inhibiting a growth state, or diagnostic methods carried out on the human or animal body.

20 In particular embodiments the present invention relates to a polypeptide fragment according to the invention, wherein the PAPP-A2 fragment comprises or essentially consists of amino acid residues 234 to 1791 corresponding to the mature part of PAPP-A2, including any processing variants thereof.

25 Processing variants are variants resulting from alternative processing events, possibly processing events catalysed by any protease including, but not limited to, a signal peptidase and a furin. One putative cleavage site is located after position 233 is described herein below in detail. Another putative cleavage site is located after the motif RQRR (position 196 - 199 in the amino acid sequence of PAPP-A2). Processing variants shall be understood to comprise variants arising from processing in vivo when PAPP-A2 is expressed in human or animal tissue, sera or body fluids.

30 Mature PAPP-A2 amino acids sequences essentially consisting of the mature sequence designated in SEQ ID NO:2 (amino acid residues 234 to 1791) shall be understood in one embodiment to comprise this part of the sequence lacking between

35

1 to about 10 N-terminal amino acids or C-terminal amino acids, preferably 1 to 10 N-terminal amino acids, such as 2 to 8 N-terminal acids, for example 3 to 6 N-terminal amino acids.

5 Also included in the definition of essentially consisting of as used herein shall be the mature sequence designated in SEQ ID NO:2 (amino acid residues 234 to 1791) having in addition thereto an additional 1 to about 10 N-terminal amino acids or C-terminal amino acids, preferably 1 to 10 N-terminal amino acids, such as 2 to 8 N-terminal acids, for example 3 to 6 N-terminal amino acids. This definition of essentially consisting of shall also apply in other aspects and is not restricted to being
10 used in connection with a particular part of PAPP-A2. The definition shall also apply to other processes PAPP-A2 polypeptides including polypeptides arising from alternative processing in tissue, sera or body fluids other than the ones from where the processed PAPP-A2 has originally been isolated.

15 Additionally preferred fragments comprise or essentially consists of amino acid residues 1 to 233 corresponding to the prepro part of PAPP-A2, of amino acid residues 23 to 233 corresponding to the pro part of PAPP-A2, of amino acid residues 1 to 22 corresponding to the signal peptide or leader sequence of PAPP-A2, and to such
20 sequences operably linked to the mature part of PAPP-A2 corresponding to amino acid residues 234 to 1791 of SEQ ID NO:2.

There is also provided recombinant PAPP-A2 polypeptide, or a fragment thereof, wherein preferably the polypeptide is free of human proteins, or other proteins
25 natively associated with said polypeptide.

In a further aspect there is provided a composition comprising i) a polynucleotide according to the invention, and/or ii) a vector according to the invention, and/or iii) a host organism according to the invention, and/or iv) a polypeptide according to the
30 invention, in combination with a physiologically acceptable carrier.

In yet another aspect there is provided a pharmaceutical composition comprising i) a polynucleotide according to the invention, and/or ii) a vector according to the invention, and/or iii) a host organism according to the invention, and/or iv) a polypeptide

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

45

according to the invention, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

5 The invention further pertains to a method for producing an antibody with specificity for a PAPP-A2 polypeptide according to the invention, or a fragment thereof, said method comprising the steps of

- i) providing a host organism,
- 10 ii) immunizing the host organism with the polypeptide according to claim 10, and
- iii) obtaining said antibody.

15 There is also provided monoclonal antibodies and polyclonal antibodies having specific binding affinity for a PAPP-A2 polypeptide according to the invention, or a fragment thereof. The antibody is preferably a monoclonal.

20 In a further aspect there is provided a method for producing a PAPP-A2 polypeptide according to the invention, said method comprising the steps of

- i) providing a suitable host organism, preferably a mammalian cell,
- 25 ii) transfecting or transforming the host organism provided in step i) with a polynucleotide according to the invention, or a vector according to the invention,
- iii) culturing the host organism obtained in step ii) under conditions suitable for expression of the polypeptide encoded by the polynucleotide or the vector; and optionally
- 30 iv) isolating from the host organism the polypeptide resulting from recombinant expression by the host organism.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

46

In a still further aspect of the invention there is provided a method for inhibiting and/or reducing the expression of PAPP-A2 in a cell by means of anti-sense technology, said method comprising the steps of

- 5 i) providing an anti-sense polynucleotide according to the invention,
- ii) transfecting or transforming a cell capable of expressing PAPP-A2 with said anti-sense polynucleotide provided in step i),
- 10 iii) culturing the cell obtained in step ii) under conditions suitable for hybridization of the polynucleotide provided in step i) to a complementary polynucleotide in said cell involved in the expression of PAPP-A2, and
- iv) inhibiting and/or reducing the expression of PAPP-A2 in said cell.

15

The antisense polynucleotide and the complementary polynucleotide may be co-expressed from distinct polynucleotide molecules or they may be expressed from the same molecule. As an alternative to hybridization, the method may include the use of reverse transcriptase PCR technology (rt PCT technology).

20

In yet another aspect of the invention there is provided a method for detecting PAPP-A2, or measuring the level of PAPP-A2, in a biological sample obtained from an individual, said method comprising the steps of

- 25 i) obtaining a biological sample from said individual,
- ii) detecting PAPP-A2 in said sample by detecting
- a) a PAPP-A2 polypeptide, or a fragment thereof, and/or
- 30 b) a polynucleotide in the form of mRNA originating from PAPP-A2 expression, and/or
- c) PAPP-A2 specific protease activity, preferably IGFBP-5 protease activity, or proteolytic activity directed against a derivative of IGFBP-5.
- 35

The method may comprise the further step of comparing the PAPP-A2 or the level of PAPP-A2 detected in step ii) with a predetermined value selected from the group consisting of

5

a) a predetermined amount and/or concentration of PAPP-A2; and/or

b) a predetermined amount and/or concentration of PAPP-A2 mRNA;
and/or

10

c) a predetermined PAPP-A2 specific protease activity.

The predetermined value in one embodiment will be indicative of a normal physiological condition of said individual.

15

The biological sample is preferably selected from the group consisting of blood, urine, pleural fluid, oral washings, tissue biopsies, and follicular fluid.

When the level of PAPP-A2 is measured as an amount of PAPP-A2 protein, the PAPP-A2 protein is preferably measured by immunochemical analysis wherein PAPP-A2 protein is detected by at least one monoclonal antibody. PAPP-A2 protein may also be detected in a complex comprising at least one additional component, preferably a polypeptide such as, but not limited to, pro-MBP (pro-Major-Basic Protein). PAPP-A2 may also be detected as a PAPP-A2 monomer or as a PAPP-A2 dimer.

20
25

Further aspects of the invention relates to a method of diagnosing a clinical condition in an individual, said method comprising the steps of

30

i) performing a method for detecting PAPP-A2 or measuring the level of PAPP-A2, and

ii) diagnosing the clinical condition.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

48

- The clinical condition is preferably a fetal abnormality such as, but not limited to, a fetal abnormality selected from the group consisting of Trisomy 21, Trisomy 18, Trisomy 13, and Open Spina Bifida.
- 5 Additional fetal abnormalities capable of being diagnosed according to the invention is ectopic pregnancy, open spina bifida, neural tube defects, ventral wall defects, Edwards Syndrome, Patau Syndrome, Turner Syndrome, Monosomy X or Klinefelter's Syndrome.
- 10 In another aspect the clinical condition is an altered growth state selected from the group consisting of a growth promoting state and a growth inhibiting state, including, but not limited to, restenosis, atherosclerosis, wound healing, fibrosis, myocardial infarction, osteoporoses, rheumatoid arthritis, multiple myeloma, or cancer.
- 15 In a yet further aspect of the invention there is provided a method for detecting expression of a polynucleotide according to the invention in a biological sample, said method comprising the steps of
- 20 i) providing a biological sample putatively containing a polynucleotide according to the invention, and
- ii) contacting the biological sample with a polynucleotide comprising a strand that is i) complementary to the polynucleotide according to the invention and ii) capable of hybridizing thereto, and
- 25 iii) allowing hybridization to occur, and
- iv) detecting the hybridization complex obtained in step iii),
- 30 wherein the presence of the hybridization complex is indicative of the expression in the biological sample of the polynucleotide according to the invention, or a fragment thereof.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

49

In a still further aspect of the invention there is provided a method for identifying an agent inhibiting the protease activity of PAPP-A2, said method comprising the steps of

- 5 i) incubating a) the polypeptide according to the invention, or a fragment thereof, and b) a predetermined substrate for said polypeptide or fragment, and c) a putative inhibitory agent, and
- ii) determining if proteolysis of said substrate is inhibited.

10

The substrate preferably comprises a polypeptide that may be an internally quenched fluorescent peptide. One preferred substrate comprises or essentially consists of IGFBP-5, or a fragment thereof.

15

The invention also pertains to an inhibitory agent obtainable according to such a method for identifying an agent inhibiting the protease activity of PAPP-A2.

20

There is also provided the use of such provided inhibitory agents in the manufacture of a medicament for treating a clinical condition in an individual in need of such treatment.

25

In a still further aspect the invention pertains to a method for identifying an agent capable of enhancing the protease activity of PAPP-A2, said method comprising the steps of

- i) incubating a) the polypeptide according to the invention, or a fragment thereof, and b) a predetermined substrate for said polypeptide, and c) a putative enhancer agent, and
- 30 ii) determining if proteolysis of said substrate is enhanced.

35

The substrate preferably comprises a polypeptide including an internally quenched fluorescent peptide. IGFBP-5, or a fragment thereof, is particularly preferred as a substrate.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

50

There is also provided an enhancing agent obtainable according to the method for identifying an agent capable of enhancing the protease activity of PAPP-A2, and the invention also pertains to the use of such enhancing agents in the manufacture of a medicament for treating a clinical condition in an individual in need of such treatment.

In yet another aspect there is provided a method of treatment by therapy of an individual, said method comprising the step of administrating to said individual i) a pharmaceutical composition according to the invention, and/or ii) the inhibitory agent according to the invention, and/or the enhancing agent according to the invention.

In a still further aspect there is provided a method for purification of PAPP-A2 or complexes of PAPP-A2 with other proteins, said method comprising the steps of

- 15 i) providing a polyclonal or monoclonal antibody with specific binding affinity for a polypeptide according to the invention, or a fragment thereof, and
- 20 ii) purifying PAPP-A2, or a fragment thereof, by means of affinity chromatography.

It is understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

30 Figure 1 shows the cDNA sequence (in 5'→3' orientation) corresponding to the mRNA that encodes preproPAPP-A2. Only the coding part of the sequence and the terminal stop codon (*) is shown and is numbered 1-5376. The translated polypeptide sequence of preproPAPP-A2 is also shown. The signal peptide cleavage site was predicted using SignalP V2.0 to be after the alanine residue encoded by nt. 64-

66 ((Nielsen et al., 1997, Protein Eng 10, 1-6), WWW prediction server is located at
http://genome.cbs.dtu.dk/). The signal peptide of preproPAPP-A2 (nt. 1-66, 22 resi-
dues) is shown in bold. The nucleotide sequence of this figure represents nt. 1 to
5376 of SEQ ID NO:1. The protein sequence of this figure is illustrated as SEQ ID
5 NO:2.

Figure 2 is a schematic drawing of the relationship between PAPP-A (Kristensen et
al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8), and sequence stretches contained within two
10 genomic clones with homology to the N-terminal end (hom-N, coding portion of ac-
cession number AL031734) and the C-terminal end (hom-C, coding portion of ac-
cession number AL031290) of PAPP-A, when translated into amino acid sequence.
This figure also illustrates the method by which a cDNA sequence with homology to
the midregion of PAPP-A was obtained. Hom-N, hom-C, and the midregion together
encodes the complete sequence of a novel protein, PAPP-A2, which is a homolog of
15 PAPP-A. The midregion was obtained by PCR using specifically primed (primer RT-
N-mid), reversed transcribed human placental mRNA as the template, and primers
PR-mid5 and PR-mid3 for the PCR (Table 1). To obtain a cDNA construct encoding
the full-length PAPP-A2, cDNA clones corresponding to the genomic clones hom-N
and hom-C were also obtained using cDNA synthesized with specifically primed pla-
20 cental mRNA as the template (primers not shown, see Table 1). This required iden-
tification of a signal peptide stretch (in hom-N) and a stop codon (at the 3' end of
hom-C), as detailed in the main text. All primers used are shown in Table 1. Note:
The relative positions of the sequences depicted here are in accordance with the
experiments performed, but the figure is not accurately drawn to scale.

25 Figure 3 shows the amino acid sequence of preproPAPP-A2 (SEQ ID NO:2) aligned
with preproPAPP-A. The deduced amino acid sequence of preproPAPP-A2 (PA2)
was aligned with the sequence of preproPAPP-A (PA) ((Haaning et al., 1996, Eur J
Biochem 237, 159-63), AAC50543) using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994, Nu-
30 cleic Acids Res 22, 4673-80). Because the prepro-portion of PAPP-A did not show
significant identity with the corresponding region of PAPP-A2, the alignment was
manually adjusted to emphasize difference in length of pro-peptides. Arrows indicate
the N-termini of the mature proteins as found earlier for PAPP-A (Kristensen et al.,
1994, Biochemistry 33, 1592-8) (Glu-81), and here for PAPP-A2 (Ser-234). Putative
35 signal peptides, strongly predicted using SignalP V2.0 (Nielsen et al., 1997, Protein

Eng 10, 1-6) are shown with lower case letters. The proportion of PAPP-A2 contains one other candidate initiation codon corresponding to Met-168, but no signal peptide was predicted following this residue using SignalP. The sequence motifs of PAPP-A (Kristensen et al., 1994, *Biochemistry* 33, 1592-8) are also found in PAPP-A2: The catalytic zinc binding motif and residues of the putative Met-turn are underlined and bolded in both sequences. Lin-notch motifs (LNR1-3) and short consensus repeats (SCR-1-5) are boxed. Cysteine residues are shaded. All cysteines of mature PAPP-A are also found in PAPP-A2. In addition, the secreted form of PAPP-A2 has four cysteine residues (Cys-343, Cys-533, Cys-618, and Cys-1268) with no counterpart in PAPP-A.

Figure 4 shows PAPP-A2 by Western blotting and Coomassie staining. Medium from transfected 293T cells was Western blotted using monoclonal anti-*c-myc*. Lane 1, cells transfected with empty vector; lane 2, cells transfected with cDNA encoding wild-type PAPP-A2 C-terminally tagged with the *c-myc* peptide (pPA2-mH), non-reduced; lane 3, cells transfected with or cDNA encoding PAPP-A2 with an inactivating E734Q mutation (pPA2-KO-mH), non-reduced; lane 4, as lane 2, but reduced. Recombinant PAPP-A2 was purified by nickel affinity chromatography from serum free medium of cells transfected with pPA2-KO-mH, to eliminate possible autocatalysis (lane 5, reduced).

Figure 5 shows the activity of PAPP-A2 against IGFBP-1-6. Medium from 293T cells transfected with empty vector (-), or cDNA encoding PAPP-A2 (pPA2) (+) was incubated with each of the six IGFBPs (BP1-BP6), and the activity was assessed by ligand blotting using radiolabeled IGF-II. Complete cleavage of IGFBP-5 is evident from the absence of a signal in the BP5+ lane. Partial degradation of IGFBP-3 is also evident.

Figure 6 shows proteolytic activity of PAPP-A2 against IGFBP-5. Medium from 293T cells transfected with empty vector (lane 1), cDNA encoding PAPP-A2 with an inactivating E734Q mutation (pPA2-KO) (lane 2), or cDNA encoding wild-type PAPP-A2 (pPA2) (lanes 3-6) was incubated with C-terminally *c-myc* tagged rIGFBP-5. Proteolytic activity was assessed by Western blotting using anti-*c-myc*. 'i' denotes intact rIGFBP-5; 'c' denotes the detectable C-terminal *c-myc* tagged cleavage product. In the absence of inhibitors, wild-type PAPP-A2 degraded all rIGFBP-5 (lane 3). The

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

53

PAPP-A2 activity was abolished by 10 mM phenantroline (lane 4) and 5 mM EDTA (lane 5), but not affected by 100 μ M 3,4-DCI (lane 6). Coomassie-stained SDS-PAGE of purified rIGFBP-5 is shown before (lane 7) and after (lane 8) digestion with purified PAPP-A2. A Western blot of the same digest, using anti-c-myc, is also shown (lane 9). Sequence analysis revealed that PAPP-A2 cleaves IGFBP-5 at one site, between Ser-142 and Lys-143.

Figure 7 shows the cDNA sequence of the PAPP-A2 mRNA coding region directly followed by the sequence of the 3'UTR. The sequence of the 3'UTR was obtained as detailed in Example 6.3 The first 5376 nucleotides of this sequence (nt. 1 - 5376) represents the coding sequence as illustrated in Figure 1 and SEQ ID NO:1 (nt. 1 - 5376). Nucleotides 5377 - 8527 of this sequence corresponds to the 3'UTR of the PAPP-A2 mRNA as illustrated in SEQ ID NO:3 (nt. 5377 - 8527).

Figure 8 shows the disulfide structure of the PAPP-A subunit in the PAPP-A/proMBP complex (upper bar). Cysteine containing peptides originating from the PAPP-A/proMBP complex were isolated by degrading PAPP-A/proMBP complex with proteinases and cyanogen bromide followed by standard HPLC. Peptides were identified by amino acid analysis, N-terminal sequence analysis, and by mass spectrometry (Overgaard, M. T., Oxvig, C., unpublished). Disulfide bonds are shown by thin lines. Two cysteine residues form inter-chain disulfide bridges to proMBP, and one forms an inter-chain bridge to PAPP-A causing it to be a dimer (as indicated). Asterisks mark a cysteine residue to which no partner has been found. The cysteine residues present in mature PAPP-A is also present in mature PAPP-A2 (see Figure 3). It is reasonable to assume that the disulfide pairing of PAPP-A2 is the same. Thus, this information is valuable in determination of boundary regions for expression of isolated domains (fragments) of PAPP-A2. The gene structure of PAPP-A is also shown (lower bar). Exon/intron boundaries are based on comparison of PAPP-A cDNA (AN X68280) with genomic sequences (ANs AB020878, AL353141, and AL137024). The central bar shows putative domains of PAPP-A based on information of the upper and lower bars.

35

EXAMPLES

5

6.1. Identification of a nucleotide sequence encoding PAPP-A2

10 Accession numbers (ANs) given in this text refer to sequences deposited in GenBank or other biological sequence databases. ANs are used interchangeable with the protein or nucleotide sequences deposited under the given AN.

15 Searching public nucleotide databases for DNA sequences with homology to PAPP-A ((Kristensen et al., 1994, *Biochemistry* 33, 1592-8), AN CAA48341) when translated into polypeptide sequence revealed two genomic clones with the ANs AL031734 and AL031290. Both originate from the human chromosome 1 (1q24). The search was performed against the "nr" collection of databases using the program tblastn at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> with default settings. In this example, PAPP-A is numbered with the N-terminal Glu as residue 1, as in (Kristensen et al., 1994, *Biochemistry* 33, 1592-8). In the deposited sequence record (AN X68280) this Glu is residue 5.

25 The sequence reported in AL031734 contains 168835 base pairs. Two noncontiguous sequence stretches (nt. 103432-103566, and 140846-141919) of the total sequence together aligned with residues 16-59, and 59-413 of the PAPP-A polypeptide sequence when translated. The sequence reported in AL031290 contains 121780 base pairs. Four noncontiguous sequence stretches (nt. 10209-10358, 11752-11901, 20531-20463, and 60536-60652) of the total sequence together aligned with residues 1313-1362, 1376-1425, 1457-1479, and 1470-1506 of the PAPP-A polypeptide sequence when translated. The sequence stretches between
30 the coding regions of both of the genomic sequences represent noncoding genomic DNA (introns) or coding regions that do not align.

35 Based on these findings, we hypothesized the existence of a novel protein, PAPP-A2, with homology to PAPP-A. It was then established the complete coding sequence of the regions of PAPP-A2 that were partially covered by the two genomic

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

55

sequences reported in AL031734 and AL031290. We denote those contiguous sequences hom-N and hom-C, respectively (Figure 2). But first, we established the existence of a coding cDNA sequence that also showed homology to PAPP-A, and that connected the sequence of hom-N and hom-C (Figure 2). All essential primers used are described in Table 1. The entire cDNA sequence encoding the 1791-residue preproPAPP-A2 is shown in Figure 1. Standard cloning techniques were used, and all DNA constructs were analyzed by sequencing. The methodology used is described below. The name PAPP-A2 is used for the protein encoded by this DNA sequence.

Cloning of a contiguous coding cDNA stretch corresponding to the midregion between hom-N and hom-C: To obtain the midregion (Figure 2), cDNA was synthesized using human placental mRNA as a template and a primer, RT-N-mid, derived from AL031290 (Table 1, Figure 2). This cDNA was used as a template in a PCR to obtain a cDNA corresponding to the midregion of the hypothesized PAPP-A2. PCR primers were PR-mid5 and PR-mid3 (Table 1, Figure 2). The coding sequence of the midregion obtained corresponds to residues 665-1572 of Figure 3 (SEQ ID NO:1), a total of 908 amino acids.

TABLE 1. Locations of primers used for reverse transcription or PCR. The primers are listed in the order of their use.

	NAME	SOURCE ^a	Nt. NUMBERS ^b	SEQUENCE ^c
25	RT-N-mid:	AL031290	10262-10281, (4770-4789)	GCTCACACACCACAGGAATG*
	PR-mid5:	AL031734	141874-141894, (1947-1967)	GGCTGATGTGCGCAAGACCTG
	PR-mid3:	AL031290	10208-10229, (4716-4737)	GCATTGTATCTTCAGGAGCTTG*
30	PR-N5:	AL031734	102606-102628, (-)	GAAGTTGACTTCTGGTTCTGTAG
	PR-N3:	-	-, (2380-2400)	CCCTGGGAAGCGAGTGAAGCC*
	RT-C:	AL031290	62982-63006, (-)	GCATTCTTATAAGATCCTTCATGC*
35	PR-C5:	-	-, (4180-4201)	GACAGCTGTCCGTCATTGCTGC
	PR-C3:	AL031290	62876-62897, (-)	CTTACTGCCTCTGAGGCAGTGG*

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

56

^aAccession numbers of the relevant genomic clones are given. Primers PR-N3 and PR-C5 were located in the sequence connecting hom-N and hom-C, and are therefore not represented in the databases.

5 ^bNucleotide numbers refer to the numbering of the sequences as reported in the file with the relevant accession number. In parentheses are given the corresponding numbers of SEQ ID NO:1 (Figure 1), except for primers PR-N5, RT-C and PR-C3, not within this sequence.

10 ^cSequences are actual primer sequences (orientation 5'-to-3'). Sequences marked with an asterisk are complementary to the database sequences or the sequence given in Figure 1.

Cloning of a contiguous coding cDNA stretch corresponding to the N-terminal end of PAPP-A2 (hom-N): Manual inspection of the genomic sequence AL031734 revealed that the open reading frame of the sequence stretch corresponding to PAPP-A residues 16-59 continued further in the 5' direction: Nt. 102646-103566 encodes a polypeptide sequence of 307 residues that starts with a methionine residue. Based on this finding, the cDNA used to obtain the midregion (placental mRNA primed with RT-N-mid, as detailed above) was used as a template in a PCR to obtain the contiguous cDNA of hom-N. PCR primers were: PR-N5 and PR-N3 (Table 1, Figure 2).

Cloning of a contiguous coding cDNA stretch corresponding to the C-terminal end of PAPP-A2 (hom-C): Searching available databases (using the program blastn at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> with default settings) for human EST sequences matching the genomic sequence of AL031290 revealed an EST sequence overlapping with some of the coding regions of AL031290 already defined by the stretch nt. 60536-60652 (cf. above). Nt. 62790-62995 of AL031290 also matched the sequence of the human EST sequence AA368081 originating from placenta. When translated into polypeptide sequence, this EST sequence showed homology to the C-terminal end of PAPP-A. Further, a stop codon was present within the coding sequence corresponding to amino acid 1537 of PAPP-A. That is, PAPP-A2 does not extend C-terminally beyond PAPP-A when the two sequences are aligned. Based on this, cDNA was synthesized using human placental mRNA as a template and a primer originating from AL031290 (Table 1). This cDNA was used as a template in a PCR to obtain the contiguous cDNA of hom-C using PCR primers PR-C5 and PR-C3 (Table 1, Figure 2).

All PCRs were carried out with *Pfu* polymerase (Stratagene). The three overlapping PAPP-A2 cDNA fragments (hom-N, the novel midregion, and hom-C) were all cloned into the vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). Several clones were sequenced in both orientations. The constructs are referred to as p2N, p2Mid, and p2C, respectively. The entire nucleotide sequence encoding PAPP-A2 is shown in Figure 1 (and SEQ ID NO:1).

6.2. Analyses of the nucleotide and amino acid sequence of PAPP-A2

Of the 1547 residues of mature PAPP-A, 708 residues (45.8%) are identical in pre-proPAPP-A2. There is no significant degree of identity between the prepro portion of PAPP-A and the remaining (N-terminal) portion of PAPP-A2 (Figure 3). In this example, PAPP-A is numbered according to ((Haaning et al., 1996, Eur J Biochem 237, 159-63), AAC50543).

The sequence motifs recognized in PAPP-A (Kristensen et al., 1994, Biochemistry 33, 1592-8) are also present PAPP-A2: An elongated zinc binding consensus sequence, three lin-notch repeats (LNR1-3), and five short consensus repeats (SCR1-5) (Figure 3). Further, all 82 cysteine residues of PAPP-A are conserved between the two proteins, and an additional 4 cysteines are present in the PAPP-A2 polypeptide sequence.

6.3. Identification of human EST sequences originating from the PAPP-A2 mRNA

A cluster of EST sequences matching the genomic sequence of AL031290 were identified around nt 64000-66000 of AL031290, starting approximately 1.2 kb from the end of the PAPP-A2 encoding sequence. The existence of mRNA connecting the coding region of PAPP-A2 and this cluster was verified in a PCR using primers from AL031290 (5'-GGAAAGAGCAGAGTTCCACCCAT-3', nt. 64900-64879 of AL031290) and the PAPP-A2 encoding sequence (5'-CCGTCTTAGTCCACTGCATCC-3', nt. 20499-20519 of AL031290, nt 5171-5191 of AF311940), and oligo-dT primed placental cDNA as a template (Overgaard et al., 1999, Biol Reprod 61, 1083-9). As expected, the size of the resulting product was

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

58

2.2 kb, further demonstrating the existence of a PAPP-A2 mRNA with a 3'UTR of about 3 kb. The distribution among tissues is shown in Table 2.

5 TABLE 2. Expression of PAPP-A2 mRNA in human tissues evaluated by available EST sequences^a.

	Tissue of origin	Number of ESTs found
10	Human placenta	38
	Pregnant uterus	21
	Fetal liver/spleen	11
	Kidney	5
	Retina/Fetal retina	3
15	Corneal stroma	2
	Fetal heart	2
	Gessler Wilms tumor	2
	Other tissues ^b	14

20

^a Using the blast algorithm (Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402), a total of 98 human EST sequences were identified that matched the 3'UTR of the PAPP-A2 mRNA sequence. The distribution among tissues is based on the annotations of individual database entries (not listed).

25

^b EST sequences originated from pools of tissue, or from tissue represented by only one EST sequence.

30 6.4. Expression in mammalian cells of recombinant PAPP-A2 and variants of PAPP-A2

The following plasmid constructs were made:

35 a) pPA2: The cDNA sequence of pre-pro-PAPP-A2 encoding amino acids 1-1791 in expression vector pcDNA3.1+.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

59

- b) pPA2-KO: As pPA2, but Glu-734 of the active site of PAPP-A2 substituted with a Gln residue (E734Q).
- c) pPA2-mH: The expression vector pcDNA3.1/*Myc*-His(-)A containing the cDNA sequence of pre-pro-PAPP-A2 encoding amino acids 1-1791, not followed by a stop codon, but rather a *c-myc* and a His tag.
- d) pPA2-KO-mH: As pPA2-mH, but with the E734Q substitution of pPA2-KO.
- 10 The three overlapping PAPP-A2 cDNA fragments (hom-N, the midregion, and hom-C) were used for the construction of a single contiguous cDNA sequence encoding PAPP-A2. The overlapping fragments were all contained in the vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) and referred to as p2N, p2Mid, and p2C, as detailed above (example 6.1). Clones of p2N and p2C were selected that had the proper orientation of the cDNA insert.
- 15
- Construction of pPA2: The *NotI*-*Bam*HI fragment was excised from p2C and cloned into pBluescriptIIISK+ (Stratagene) to obtain p2CBlue. The *NotI*-*SpeI* fragment was excised from p2N, and the *SpeI*-*Bcl*II fragment was excised from p2Mid. Those two fragments were ligated into the *NotI*/*Bcl*II sites of p2CBlue in one reaction to obtain p2NMidCBlue, containing the entire PAPP-A2 cDNA. The *NotI*-*Apa*I fragment of pBluescriptIIISK+ was excised and ligated into the *NotI*/*Apa*I sites of the mammalian expression vector pcDNA3.1+ (Invitrogen) to obtain a modified version of this vector, pcDNA-NA. The full length cDNA was then excised from p2NMidCBlue with *NotI* and *Xho*I and cloned into pcDNA-NA to obtain pPA2. All restriction sites used are in the multi cloning sites of the vectors, except for *SpeI* and *Bcl*II, both located in each of the two overlapping regions of the coding PAPP-A2 sequence stretches of p2N, p2Mid, and p2C (nt. 2365 and nt. 4203, respectively, of Figure 3).
- 20
- 25
- 30 Construction of pPA2-KO: The construct pPA2-KO is a variant of the pPA2 expression construct in which residue Glu-734 of the active site of PAPP-A2 was substituted with a Gln residue. Thus, the mutant is E734Q. The pPA2-KO construct was made by site directed mutagenesis using the method of overlap extension PCR (Ho et al., 1989, *Gene* 77, 51-9) with pPA2 as the template. In brief, outer primers were
- 35 5'-CGCTCAGGGAAGGACAAGGG-3' (5' end primer, nt. 976-995 of SEQ ID NO:1)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

60

and 5'-CTAGAAGGCACAGTCGAGGC-3' (3' end primer, nt. 1040-1021, sequence of vector pcDNA3.1+). Overlapping internal primers were 5'-

TGTCCTCACTTGATGGATCATGGTGTGGTGG-3' (nt. 2210-2178 of SEQ ID NO:1, nt. 2200 not C, but G resulting in E734Q) and 5'-

5 CCATCAAGTGGGACATGTTCTGGGAC-3' (nt. 2196-2221 of SEQ ID NO:1, nt. 2200 not G, but C resulting in E734Q). The resulting mutated fragment was digested with *XbaI* and *XhoI* and swapped into pPA2 to generate pPA2-KO. All PCRs were carried out with *Pfu* DNA polymerase (Stratagene), and all constructs were verified by sequence analysis.

10

Construction of pPA2-mH: Two primers (5'-GAGGGCCTGTGGACCCAGGAG-3', nt. 4906-4926 of SEQ ID NO:1, and 5'-

GACGTAAAGCTTCTGATTTTCTCTGCCTTGG-3', nt. 5373-5354 of SEQ ID NO:1, preceded by a *HindIII* site, AAGCTT, and nt. GACGTA to facilitate cleavage of the

15

PCR product) were used in a PCR with pPA2 as the template to generate a nucleotide fragment encoding the C-terminal 156 residues of PAPP-A2 with the stop codon replaced by a *HindIII* site for in-frame ligation to expression vector. In brief, the PCR

product was digested with *EcoRI* and *HindIII* and cloned into the *EcoRI/HindIII* sites of the vector pcDNA3.1/*Myc-His(-)A* to generate pPA2C-mH. The *NotI-XbaI* frag-

20

ment (encoding the N-terminal portion of PAPP-A2), and the *XbaI-EcoRI* fragment (encoding the remaining central portion of PAPP-A2) were excised from pPA2 and

ligated in one reaction into the *NotI/EcoRI* sites of pPA2C-mH. The resulting construct, pPA2-mH, encoded PAPP-A2 followed by residues KLGP, the *myc* epitope (EQKLISEEDL), residues NSAVD, and six H-residues (amino acids are given as

25

one letter code). A stop codon follows immediately after the six histidine residues.

Construction of pPA2-KO-mH: A variant of pPA2-mH was constructed with residue Glu-734 substituted into a Gln residue: The *NotI-KpnI* fragment of pPA2-KO was excised and swapped into the *NotI-KpnI* sites of pPA2-mH, to generate pPA2-KO-mH.

30

Expression in mammalian cells: All constructs (pPA2, pPA2-KO, pPA2-mH, and pPA2-KO-mH) as well as empty expression vectors (pcDNA3.1+ and pcDNA3.1/*Myc-His(-)A*) were transiently transfected into mammalian cells for ex-

35

pression of recombinant PAPP-A2 protein. Briefly, human embryonic kidney 293T cells (293tsA1609neo) (DuBridge et al., 1987, *Mol Cell Biol* 7, 379-87) were main-

tained in high glucose DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, nonessential amino acids, and gentamicin (Life Technologies). Cells were plated onto 6 cm tissue culture dishes, and were transfected 18 h later by calcium phosphate coprecipitation (Pear et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A 90, 8392-6) using 10 µg of plasmid DNA prepared by QIAprep Spin Kit (Qiagen). After a further 48 h the supernatants were harvested, and replaced by serum-free medium (293 SFM II, Life Technologies) for another 48 h. The serum-free medium was harvested and cleared by centrifugation.

Analysis by Western blotting of recombinant protein resulting from transfection with the constructs pPA2-mH and pPA2-KO-mH, demonstrated that PAPP-A2 is secreted as a protein of 220 kDa (See Figure 2). Reduction of disulfide bonds did not cause a visible change in band migration. Thus, in contrast to PAPP-A, PAPP-A2 is secreted as a monomer.

15

6.5. Purification by affinity chromatography of tagged PAPP-A2

A metal chelate affinity column (2 ml, Pharmacia) was charged with nickel ions and loaded with serum-free medium (50 ml) from cells transiently transfected with pPA2-KO-mH (see example 6.4). After washing in PBS containing 1M NaCl, bound protein was eluted with 10 mM EDTA in PBS in fractions of 0.5 ml. PAPP-A2 containing fractions were located by SDS-PAGE (Figure 4, lane 5). This protein was not seen from medium of cells transfected with empty vector (mock transfectants) and treated in a parallel manner.

25

6.6. N-terminal sequence analysis of PAPP-A2

C-terminally tagged PAPP-A2 purified from medium of cells transfected with construct pPA2-KO-mH (see examples 6.4 and 6.5) was reduced and run on a 10-20% SDS gel, and further blotted onto PVDF membrane (ProBlott, Applied Biosystems). Bands of 4 lanes were excised and subjected to N-terminal sequence analysis on an Applied Biosystems 477A sequencer equipped with an on-line HPLC (Sottrup-Jensen, 1995, Anal Biochem 225, 187-8). The N-terminal sequence observed at a level of approximately 20 pmol was: Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Ser-Asn (SPPEESN), resulting from cleavage before Ser-234 of the PAPP-A2 polypeptide after R(230)VKK.

35

This confirms the prediction, that PAPP-A2, like PAPP-A, is synthesized as a prepro protein. The absence of an arginine residue in the P1 position, indicates that the proprotein processing enzyme responsible for this cleavage is not furin, but likely another proprotein convertase (Nakayama, 1997, Biochem J 327, 625-35). Cleavage of proPAPP-A2 might have been predicted after R(196)QRR, which archetypically marks furin cleavage (Nakayama, 1997, Biochem J 327, 625-35). We cannot exclude that cleavage occurred at this site, and that the observed N-terminus results from further processing.

10

6.7. Cleavage of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5

Ligand blotting (Conover et al., 1993, J Clin Invest 91, 1129-37) with radiolabeled IGF-II (Bachem) was used to assay for activity against IGFBP-1 (from HepG2 conditioned medium), rIGFBP-2 (GroPep), rIGFBP-3 (gift of D. Powell), rIGFBP-4 (Austral), rIGFBP-5 (gift of D. Andress), and rIGFBP-6 (Austral). Of the six binding proteins, IGFBP-5 showed complete cleavage (Figure 5). IGFBP-3 was partially degraded (Figure 5). This cleavage was independent of the presence of IGF. Experiments were carried out with media from cells transfected with pPA2 or empty vector.

20

For further analysis, recombinant IGFBP-5 was produced in mammalian cells. In brief, human placental oligo-dT primed cDNA (Overgaard et al., 1999, Biol Reprod 61, 1083-9) was used as a template to amplify cDNA encoding human IGFBP-5 (Accession number M65062). Specific primers containing an *XhoI* site (5'-TCCGCTCGAGATGGTGTGCTCACC GCGGT-3') and a *HindIII* site (5'-CGATAAGCTTCTCAACGTTGCTGCTGCTCG-3') were used, and the resulting PCR product was digested and cloned into the *XhoI/HindIII* sites of pcDNA3.1/Myc-His(-)A (Invitrogen). The construct encoded the full-length proIGFBP-5, immediately followed by residues KLGP, the *myc* epitope (EQKLISEEDL), residues NSAVD, and six H-residues (amino acids are given as one letter code). The construct was verified by sequence analysis. Plasmid DNA for transfection was prepared by QIAprep Spin Kit (Qiagen). Cell culture and expression of recombinant IGFBP-5 was performed as described above in Example 6.4.

25

30

Cleavage analysis was performed by Western blotting (Figure 6). Briefly, recombinant IGFBP-5 as contained in 5 microL cell culture medium was incubated with culture supernatants (10 microL) from cells transfected with pPA2, pPA2-KO, or empty expression expression vectors (see example 6.4). Phosphate buffered saline was added to a final volume of 50 microL. After incubation at 37 degrees Celsius for 12 hours, 15 microL of the reaction mixture was separated by reducing 16% SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane, and the C-terminal cleavage product was detected with monoclonal anti-c-myc (clone 9E19, ATTC) using peroxidase-conjugated secondary antibodies (P260, DAKO), and enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham).

6.8. Inhibition of the activity of PAPP-A2

Various agents were analyzed for their ability to inhibit the proteolytic activity of PAPP-A2 against IGFBP-5. The experimental conditions were essentially as described in Example 6.7, except the agents to be tested were added (Figure 6). Agents found to have no effect on the proteolytic activity of PAPP-A2 further included PMSF and aprotinin.

6.9. Identification of the cleavage site in IGFBP-5

For cleavage site determination, purified rIGFBP-5 (Fig. 6, lane 7) was digested with purified PAPP-A2 and analyzed by SDS-PAGE (Fig. 6, lane 8). Edman degradation of blotted material showed that both distinct, visible degradation products (fig. 6, lane 8) contained the N-terminal sequence K(144)FVGGA (IGFBP-5 is numbered with the N-terminal Leu of the mature protein as residue 1). The two bands both represent intact C-terminal cleavage fragments, because they also contain the C-terminal c-myc tag (Fig. 6, lane 9); they are likely to be differently glycosylated, in accordance with the heterogeneity of purified rIGFBP-5 (Figure 6, lane 7). Both bands contained a second sequence at lower level (45%), L(1)GXFVH, corresponding to the N-terminal sequence of IGFBP-5. The absence of Ser, expected in the third cycle, was taken as evidence for carbohydrate substitution of Ser-3. O-linked glycan on the N-terminal cleavage fragment is likely to cause it to smear around the two distinct, C-terminal fragments. Sequence analysis on the reaction mixture (> 100 pmol) without SDS-PAGE separation showed only the same two

IGFBP-5 sequences in equimolar amounts. Thus, PAPP-A2 cleaves IGFBP-5 at one site, between Ser-143 and Lys-144.

5 6.10. Tissues where PAPP-A2 may cause proteolysis of IGFBP-5

Proteolytic activity against IGFBP-5 has been widely reported from several sources, e.g. pregnancy serum (Claussen et al., 1994, Endocrinology 134, 1964-6), seminal plasma (Lee et al., 1994, J Clin Endocrinol Metab 79, 1367-72), culture media from smooth muscle cells (Imai et al., 1997, J Clin Invest 100, 2596-605), 10 granulosa cells (Resnick et al., 1998, Endocrinology 139, 1249-57), osteosarcoma cells (Conover and Kiefer, 1993, J Clin Endocrinol Metab 76, 1153-9), and also from osteoblasts (Thraill et al., 1995, Endocrinology 136, 3527-33), and fibroblasts (Busby et al., 2000, J Biol Chem). In general, the proteinase responsible for cleavage of IGFBP-5 has remained unidentified. 15

The recent identification of PAPP-A as the IGFBP-4 proteinase in fibroblasts and osteoblasts (Lawrence et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3149-53), ovarian follicular fluid (Conover et al., 1999, J Clin Endocrinol Metab 84, 4742-5), pregnancy 20 serum (Overgaard et al., 2000, J Biol Chem), and vascular smooth muscle cells (Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Ashai, K., Lewis, D. A., Overgaard, M. T., Christiansen, M., Oxvig, C., Holmes, D. R., Jr., and Conover, C. A. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., in press) firmly establishes PAPP-A and IGFBP-4 as an important functional pair in several systems. No other substrate as has been found for PAPP-A, 25 and no other proteinase has been shown to cleave IGFBP-4 physiologically. It is therefore likely that the pair of PAPP-A2 and IGFBP-5 plays an analogous role in a number of the tissues mentioned above and/or elsewhere. Interestingly, incubating IGFBP-5 with smooth muscle cells conditioned medium resulted in cleavage between Ser-143 and Lys-144 (Imai et al., 1997, J Clin Invest 100, 2596-605), the 30 same cleavage site as found here with PAPP-A2. This immediately suggests PAPP-A2 as an obvious candidate IGFBP-5 proteinase for this tissue.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

65

Cited references

- 5 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402.
- 10 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York City, NY: John Wiley & Sons).
- 15 Barker, R. L., Gleich, G. J., and Pease, L. R. (1988). Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA [published erratum appears in *J Exp Med* 1989 Sep 1;170(3):1057]. *J Exp Med* 168, 1493-8.
- 20 Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Ashai, K. A., L. D., Overgaard, M. T., Christiansen, M., Oxvig, C., Holmes Jr, D. R., and Conover, C. A. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by arterial smooth muscle cells in vitro is increased in the coronary artery following angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press.
- 25 Biagiotti, R., Cariatì, E., Brizzi, L., Cappelli, G., and D'Agata, A. (1998). Maternal serum screening for trisomy 18 in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 18, 907-13.
- 30 Bischof, P. (1979). Purification and characterization of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A). *Arch Gynecol* 227, 315-26.
- 35 Bitter, G. A., Egan, K. M., Koski, R. A., Jones, M. O., Elliott, S. G., and Giffin, J. C. (1987). Expression and secretion vectors for yeast. *Methods Enzymol* 153, 516-44.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., and Stockler, W. (1993). Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331, 134-40.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

66

- 5 Bonno, M., Oxvig, C., Kephart, G. M., Wagner, J. M., Kristensen, T., Sottrup-Jensen, L., and Gleich, G. J. (1994). Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta. *Lab Invest* 71, 560-6.
- 10 Brambati, B., Macintosh, M. C., Teisner, B., Maguiness, S., Shrimanker, K., Lanzani, A., Bonacchi, I., Tului, L., Chard, T., and Grudzinskas, J. G. (1993). Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *Br J Obstet Gynaecol* 100, 324-6.
- 15 Broglie, R., Coruzzi, G., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Niedermeyer, J. G., Fink, C. L., and Chua, N. H. (1984). Light-regulated expression of a pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene in transformed plant cells. *Science* 224, 838-43.
- 20 Busby, W. H., Jr., Nam, T. J., Moralez, A., Smith, C., Jennings, M., and Clemmons, D. R. (2000). The Complement Component C1s is the Protease That Accounts for Cleavage of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 in Fibroblast Medium. *J Biol Chem*.
- 25 Christiansen, M., Oxvig, C., Wagner, J. M., Qin, Q. P., Nguyen, T. H., Overgaard, M. T., Larsen, S. O., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., and Norgaard-Pedersen, B. (1999). The proform of eosinophil major basic protein: a new maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat Diagn* 19, 905-10.
- 30 Christiansen, M., Jallashvili, I., Overgaard, M.T., Ensinger, C., Oxvig, C. (2000) Quantitation and characterization of pregnancy-associated complexes between angiotensinogen and the proform of eosinophil major basic protein in serum and amniotic fluid. *Clin. Chem.* 46, 1099-1105
- 35 Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-8.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

67

- 5 Claussen, M., Zapf, J., and Braulke, T. (1994). Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-5 by pregnancy serum and amniotic fluid. *Endocrinology* 134, 1964-6.
- 10 Conover, C. A., and Kiefer, M. C. (1993). Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 1153-9.
- 15 Conover, C. A., Kiefer, M. C., and Zapf, J. (1993). Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. *J Clin Invest* 91, 1129-37.
- 20 Conover, C. A., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Christiansen, M., and Giudice, L. C. (1999). Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A [In Process Citation]. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4742-5.
- 25 Crowther, J. R. (1995). ELISA. Theory and Practice, Methods in Molecular Biology, vol 42 (Totowa, NJ: Humana Press).
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-87.
- Folkersen, J., Grudzinskas, J. G., Hindersson, P., Teisner, B., and Westergaard, J. G. (1981). Pregnancy-associated plasma protein A: circulating levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 139, 910-4.
- 30 Fowlkes, J. L. (1997). Insulinlike growth factor-binding protein proteolysis. An emerging paradigm in insulinlike growth factor physiology. *Trends Endocrinol Metab* 8, 299-306.

- Gmunder, H., and Kohli, J. (1989). Cauliflower mosaic virus promoters direct efficient expression of a bacterial G418 resistance gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 220, 95-101.
- 5 Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Knight, G. J., Williams, J., Miller, W. A., and Johnson, A. (1998). Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N Engl J Med* 338, 955-61.
- 10 Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [see comments]. *Gene* 77, 51-9.
- Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20, 761-87.
- 15 Haaning, J., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Ebbesen, P., Kristensen, T., and Sottrup-Jensen, L. (1996). Complete cDNA sequence of the preproform of human pregnancy-associated plasma protein-A. Evidence for expression in the brain and induction by cAMP. *Eur J Biochem* 237, 159-63.
- 20 Imai, Y., Busby, W. H., Jr., Smith, C. E., Clarke, J. B., Garmong, A. J., Horwitz, G. D., Rees, C., and Clemmons, D. R. (1997). Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 100, 2596-605.
- 25 Kristensen, T., Oxvig, C., Sand, O., Moller, N. P., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry* 33, 1592-8.
- 30 Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., Hays, L. G., Yates, J. R., 3rd, and Conover, C. A. (1999). The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3149-53.
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

69

- Lee, K. O., Oh, Y., Giudice, L. C., Cohen, P., Peehl, D. M., and Rosenfeld, R. G. (1994). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1367-72.
- 5 Lin, T. M., Galbert, S. P., Kiefer, D., Spellacy, W. N., and Gall, S. (1974). Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol* 118, 223-36.
- 10 Logan, J., and Shenk, T. (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3655-9.
- Mackett, M., Smith, G. L., and Moss, B. (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7415-9.
- 15 Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-97.
- 20 Matthews, D. J., and Wells, J. A. (1993). Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* 260, 1113-7.
- McGrogan, M., Simonsen, C., Scott, R., Griffith, J., Ellis, N., Kennedy, J., Campanelli, D., Nathan, C., and Gabay, J. (1988). Isolation of a complementary DNA clone encoding a precursor to human eosinophil major basic protein. *J Exp Med* 168, 2295-308.
- 25 Meldal, M. (1998). Intramolecular fluorescence-quenched substrate libraries. *Methods Mol Biol* 87, 65-74.
- 30 Meldal, M. (1998). Introduction to combinatorial solid-phase assays for enzyme activity and inhibition. *Methods Mol Biol* 87, 51-7.
- Meldal, M. (1998). The solid-phase enzyme inhibitor library assay. *Methods Mol Biol* 87, 75-82.
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

70

- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327, 625-35.
- 5 Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- 10 Overgaard, M. T., Haaning, J., Boldt, H. B., Olsen, I. M., Laursen, L., Christiansen, M., Gleich, G. J., Sottrup-Jensen, L., Conover, C. A., and Oxvig, C. (2000). Expression of Recombinant Human Pregnancy-Associated Plasma Protein-A and Identification of the Proform of Eosinophil Major Basic Protein as its Physiological Inhibitor. *J Biol Chem*.
- 15 Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Lawrence, J. B., Conover, C. A., Gleich, G. J., Sottrup-Jensen, L., and Haaning, J. (1999). Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 61, 1083-9.
- 20 Oxvig, C., Haaning, J., Hojrup, P., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Location and nature of carbohydrate groups in proform of human major basic protein isolated from pregnancy serum. *Biochem Mol Biol Int* 33, 329-36.
- 25 Oxvig, C., Haaning, J., Kristensen, L., Wagner, J. M., Rubin, I., Stigbrand, T., Gleich, G. J., and Sottrup-Jensen, L. (1995). Identification of angiotensinogen and complement C3dg as novel proteins binding the proform of eosinophil major basic protein in human pregnancy serum and plasma. *J Biol Chem* 270, 13645-51.
- 30 Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Gleich, G. J., and Sottrup-Jensen, L. (1993). Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J Biol Chem* 268, 12243-6.
- 35 Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Kristensen, L., and Sottrup-Jensen, L. (1994). Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

71

- associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochim Biophys Acta* 1201, 415-23.
- 5 Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-6.
- 10 Peters, J. H., and Baumgarten, H. (1992). *Monoclonal Antibodies* (Offensheim, Germany: Springer-Verlag).
- 15 Rajaram, S., Baylink, D. J., and Mohan, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 18, 801-31.
- 20 Resnick, C. E., Fielder, P. J., Rosenfeld, R. G., and Adashi, E. Y. (1998). Characterization and hormonal regulation of a rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-5 endopeptidase: an FSH-inducible granulosa cell-derived metalloprotease. *Endocrinology* 139, 1249-57.
- 25 Rosenfeld, S. A. (1999). Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 306, 154-69.
- Ruther, U., and Muller-Hill, B. (1983). Easy identification of cDNA clones. *Embo J* 2, 1791-4.
- 30 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scopes, R. K. (1987). *Protein Purification. Principles and Practice*. (Harrisonburg, VA: Springer-Verlag).
- Sinosich, M. J. (1990). Molecular characterization of pregnancy-associated plasma protein-A by electrophoresis. *Electrophoresis* 11, 70-8.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

72

- Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3, 2156-65.
- 5 Sottrup-Jensen, L. (1993). Determination of halfcystine in proteins as cysteine from reducing hydrolyzates. *Biochem Mol Biol Int* 30, 789-94.
- Sottrup-Jensen, L. (1995). A low-pH reverse-phase high-performance liquid chromatography system for analysis of the phenylthiohydantoins of S-
- 10 carboxymethylcysteine and S-carboxyamidomethylcysteine. *Anal Biochem* 225, 187-8.
- Spencer, K., Ong, C., Skentou, H., A, W. L., and K, H. N. (2000). Screening for trisomy 13 by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and
- 15 PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 20, 411-6.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B., and Bode, W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a
- 20 superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4, 823-40.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence
- 25 weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.
- Thraillkill, K. M., Quarles, L. D., Nagase, H., Suzuki, K., Serra, D. M., and Fowkes, J. L. (1995). Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology*
- 30 136, 3527-33.
- Wald, N., Stone, R., Cuckle, H. S., Grudzinskas, J. G., Barkai, G., Brambati, B., Teisner, B., and Fuhrmann, W. (1992). First trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome [see
- 35 comments]. *Bmj* 305, 28.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

73

- Wald, N. J., Watt, H. C., and Hackshaw, A. K. (1999). Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters [see comments]. *N Engl J Med* 341, 461-7.
- 5 Walsh, P. S., Erlich, H. A., and Higuchi, R. (1992). Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl* 1, 241-50.
- 10 Westergaard, J. G., Chernitz, J., Teisner, B., Poulsen, H. K., Ipsen, L., Beck, B., and Grudzinskas, J. G. (1983). Pregnancy-associated plasma protein A: a possible marker in the classification and prenatal diagnosis of Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 3, 225-32.

PATENT CLAIMS:

1. A purified polynucleotide selected from the group consisting of
- 5 i) a polynucleotide comprising nucleotides 1 to 5376 of SEQ ID NO:1, corresponding to the coding sequence of PAPP-A2, as deposited with DSMZ under accession number DSM 13783; and
- 10 ii) a polynucleotide encoding a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and
- 15 iii) a polynucleotide encoding a fragment of a polypeptide encoded by polynucleotides (i) or (ii), wherein said fragment
- 20 a) has a proteolytic activity specific for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5), or a derivative thereof, or any other substrate; and/or
- 25 b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- 30 c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide; and
- 35 iv) a polynucleotide, the complementary strand of which hybridizes, under stringent conditions, with a polynucleotide as defined in any of (i), (ii) and (iii), said polynucleotide encoding a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, wherein said fragment
- a) has a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

75

- b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- 5 c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide; and
- 10 v) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is degenerate to the nucleotide sequence of a polynucleotide as defined in any of (iii) and (iv),
- and the complementary strand of such a polynucleotide.
- 15 2. A purified polynucleotide according to claim 1 and comprising the coding sequence as shown in SEQ ID NO:1.
3. A polynucleotide according to claim 1 and encoding a polypeptide the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2.
- 20 4. A polynucleotide according to claim 1 and encoding a fragment of the polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2, wherein said fragment
- 25 a) has a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or
- b) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- 30 c) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor having an affinity for said polypeptide
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

76

5. A polynucleotide according to claim 1, wherein the complementary strand of said polynucleotide hybridizes, under stringent conditions, with a polynucleotide according to any of claims 2 to 4.
- 5 6. A polynucleotide according to claim 1 and comprising a nucleotide sequence which is degenerate to the nucleotide sequence of a polynucleotide according to any of claims 3 and 4.
- 10 7. A polynucleotide according to claim 1, said polynucleotide comprising the complementary strand of a polynucleotide according to any of claims 2 to 6.
8. A polynucleotide according to any of the preceding claims operably linked to a further polynucleotide comprising nucleic acid residues 5377 to 8527 of SEQ ID NO:1, corresponding to a 3' untranslated region, or a fragment thereof, or SEQ ID NO:1.
- 15 9. A recombinant DNA molecule in the form of an expression vector comprising an expression signal operably linked to a polynucleotide according to any of claims 1 to 7.
- 20 10. A host organism transfected or transformed with the polynucleotide according to any of claims 1 to 8, or the vector according to claim 9.
- 25 11. Host organism according to claim 10, wherein said organism is a mammalian organism.
12. An isolated polypeptide comprising or essentially consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, wherein said fragment
- 30 i) has a proteolytic activity specific at least for Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP-5); and/or
- ii) is recognised by an antibody, or a binding fragment thereof, which is capable of recognising a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2; and/or
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

77

- iii) competes with a polypeptide having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 for binding to a cell surface receptor with an affinity for said polypeptide.
- 5
13. Polypeptide according to claim 12, wherein the fragment comprises or essentially consists of amino acid residues 234 to 1791 corresponding to the mature part of PAPP-A2, including any processing variant thereof.
- 10
14. Polypeptide according to claim 12, wherein the fragment comprises or essentially consists of amino acid residues 1 to 233 corresponding to the prepro part of PAPP-A2.
- 15
15. Polypeptide according to claim 12, wherein the fragment comprises or essentially consists of amino acid residues 23 to 233 corresponding to the pro part of PAPP-A2.
- 20
16. Polypeptide according to claim 12, wherein the fragment comprises or essentially consists of amino acid residues 1 to 22 corresponding to the signal peptide or leader sequence of PAPP-A2.
- 25
17. Polypeptide according to any of claims 14 to 16 operably linked to the mature part of PAPP-A2 corresponding to amino acid residues 234 to 1791 of SEQ ID NO:2.
- 30
18. Polypeptide according to any of claims 12 to 17, wherein said polypeptide is a recombinant polypeptide.
- 35
19. Polypeptide according to any of claims 12 to 18, wherein the polypeptide is free of human proteins, or other proteins natively associated with said polypeptide.
20. A composition comprising i) the polynucleotide according to any of claims 1 to 8, and/or ii) the vector according to claim 9, and/or iii) the host organism according to any of claims 10 and 11, and/or iv) the polypeptide according to any of claims 12 to 19, in combination with a physiologically acceptable carrier.

21. A pharmaceutical composition comprising i) the polynucleotide according to any of claims 1 to 8, and/or ii) the vector according to claim 9, and/or iii) the host organism according to any of claims 10 and 11, and/or iv) the polypeptide according to any of claims 12 to 19, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.
22. A method for producing an antibody with specificity for the polypeptide according to claim 12, said method comprising the steps of
- i) providing a host organism,
 - ii) immunizing the host organism with the polypeptide according to claim 10, and
 - iii) obtaining said antibody.
23. An antibody having specific binding affinity for a polypeptide according to claim 12.
24. Antibody according to claim 23, wherein said antibody is selected from the group consisting of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies.
25. Antibody according to claim 24, wherein said antibody is monoclonal.
26. A method for producing the polypeptide according to claim 18, said method comprising the steps of
- i) providing a suitable host organism,
 - ii) transfecting or transforming the host organism provided in step i) with the polynucleotide according to any of claims 1 to 8, or the vector according to claim 9,

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

79

- iii) culturing the host organism obtained in step ii) under conditions suitable for expression of the polypeptide encoded by the polynucleotide or the vector; and optionally
 - 5 iv) isolating from the host organism the polypeptide resulting from recombinant expression by the host organism.
27. The method of claim 26, wherein said host organism is a mammalian cell.
- 10 28. A method for inhibiting and/or reducing expression of PAPP-A2 in a cell by means of anti-sense technology, said method comprising the steps of
- i) providing the polynucleotide according to claim 7,
 - 15 ii) transfecting or transforming a cell capable of expressing PAPP-A2 with said polynucleotide provided in step i),
 - iii) culturing the cell obtained in step ii) under conditions suitable for hybridization of the polynucleotide provided in step i) to a complementary polynucleotide in said cell involved in the expression of PAPP-A2, and
 - 20 iv) inhibiting and/or reducing the expression of PAPP-A2 in said cell.
29. Method of claim 28, wherein the antisense polynucleotide and the complementary polynucleotide are co-expressed from distinct polynucleotide molecules.
- 25 30. A method for detecting PAPP-A2, or measuring the level of PAPP-A2, in a biological sample obtained from an individual, said method comprising the steps of
- 30 i) obtaining a biological sample from said individual,
 - ii) detecting PAPP-A2 in said sample by detecting
 - a) a polypeptide according to claim 12; and/or

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

80

- b) a polynucleotide in the form of mRNA originating from PAPP-A2 expression, and/or
- 5 c) PAPP-A2 specific protease activity, preferably by detecting cleavage of IGFBP-5, a derivative thereof, or any other suitable substrate for PAPP-A2.
- 10 31. Method of claim 30, said method comprising the further step of comparing the PAPP-A2 or the level of PAPP-A2 detected in step ii) with a predetermined value selected from the group consisting of
- i) a predetermined amount and/or concentration of PAPP-A2; and/or
- 15 ii) a predetermined amount and/or concentration of PAPP-A2 mRNA; and/or
- iii) a predetermined PAPP-A2 specific protease activity.
- 20 32. Method of claim 31, wherein said predetermined value is indicative of a normal physiological condition of said individual.
- 25 33. The method of claim 30, wherein said biological sample is selected from the group consisting of blood, urine, pleural fluid, oral washings, tissue biopsies, and follicular fluid.
- 30 34. The method of claim 30, wherein said level of PAPP-A2 is measured as PAPP-A2 specific protease activity.
- 35 35. The method of claim 30, wherein said level of PAPP-A2 is measured as amount of PAPP-A2 protein.
36. The method of claim 30, wherein said level of PAPP-A2 is measured as amount of PAPP-A2 messenger RNA.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

81

37. The method of claim 35, wherein said amount of PAPP-A2 protein is measured by immunochemical analysis.
- 5 38. The method of claim 37, wherein said amount of PAPP-A2 protein is detected by at least one monoclonal antibody.
39. The method of claim 30, wherein said PAPP-A2 protein is detected in a complex comprising at least one additional component, preferably a polypeptide.
- 10 40. The method of claim 30, wherein said PAPP-A2 is detected as a PAPP-A2 monomer.
41. The method of claim 30, wherein said PAPP-A2 is detected as a PAPP-A2 dimer.
- 15 42. A method of diagnosing a clinical condition in an individual, said method comprising the steps of
- 20 i) performing the method of any of claims 30 to 41, and
- ii) diagnosing the clinical condition.
43. Method of claim 42, wherein said clinical condition is a fetal abnormality.
- 25 44. The method of claim 43, wherein said fetal abnormality is selected from the group consisting of Trisomy 21, Trisomy 18, Trisomy 13, and Open Spina Bifida.
45. The method according to claim 43, wherein said fetal abnormality is ectopic pregnancy, open spina bifida, neural tube defects, ventral wall defects, Edwards Syndrome, Patau's Syndrome, Turner Syndrome, Monosomy X or Klinefelter's Syndrome.
- 30 46. The method of claim 43, wherein said clinical condition is an altered growth state selected from the group consisting of a growth promoting state and a growth inhibiting state.
- 35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

82

47. The method of claim 46, wherein said clinical condition is selected from the group consisting of restenosis, atherosclerosis, wound healing, fibrosis, myocardial infarction, osteoporoses, rheumatoid arthritis, multiple myeloma, or cancer.

5

48. A method for detecting expression of a polynucleotide according to claim 1 in a biological sample, said method comprising the steps of:

- 10 i) providing a biological sample putatively containing a polynucleotide according to claim 1, and
- ii) contacting the biological sample with a polynucleotide comprising a strand that is i) complementary to the polynucleotide according to claim 1 and ii) capable of hybridizing thereto, and
- 15 iii) allowing hybridization to occur, and
- iv) detecting the hybridization complex obtained in step iii),
- 20

wherein the presence of the hybridization complex is indicative of the expression in the biological sample of the polynucleotide according to claim 1, or a fragment thereof.

25 49. A method for identifying an agent inhibiting the protease activity of PAPP-A2, said method comprising the steps of

- i) incubating a) the polypeptide according to claim 12 and b) a predetermined substrate for said polypeptide, and c) a putative inhibitory agent, and
- 30 ii) determining if proteolysis of said substrate is inhibited.

50. The method of claim 49, wherein said substrate comprises a polypeptide.

35

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

83

51. The method of claim 50, wherein said substrate comprises an internally quenched fluorescent peptide.
52. The method of claim 50, wherein said substrate comprises or essentially consists of IGFBP-5, or a fragment thereof.
53. An inhibitory agent obtainable according to any to the method of any of claims 49 to 52.
54. Use of the inhibitory agent according to claim 53 in the manufacture of a medicament for treating a clinical condition in an individual in need of such treatment.
55. A method for identifying an agent enhancing the protease activity of PAPP-A2, said method comprising the steps of
- i) incubating a) the polypeptide according to claim 12 and b) a predetermined substrate for said polypeptide, and c) a putative enhancer agent, and
 - ii) determining if proteolysis of said substrate is enhanced.
56. The method of claim 53, wherein said substrate comprises a polypeptide.
57. The method of claim 54, wherein said substrate comprises an internally quenched fluorescent peptide.
58. The method of claim 54, wherein said substrate comprises or essentially consists of IGFBP-5, or a fragment thereof.
59. An enhancing agent obtainable according to any to the method of any of claims 54 to 57.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

84

80. Use of the enhancing agent according to claim 59 in the manufacture of a medicament for treating a clinical condition in an individual in need of such treatment.
- 5 61. A method of treatment by therapy of an individual, said method comprising the step of administrating to said individual i) the pharmaceutical composition according to claim 21, and/or ii) the inhibitory agent according to claim 53, and/or the enhancing agent according to claim 59.
- 10 62. A method for purification of PAPP-A2 or complexes of PAPP-A2 with other proteins, said method comprising the steps of
- i) providing a polyclonal or monoclonal antibody with specific binding affinity for a polypeptide according to claim 12,
- 15 ii) purifying PAPP-A2 by means of affinity chromatography.
63. A method of diagnosing a clinical condition or diagnosing predisposition to said clinical condition in an individual comprising the steps of
- 20 a) providing a body sample from said individual; and
- b) measuring the level of a complex selected from the group consisting of PAPP-A/proMBP, PAPP-A2/proMBP, PAPP-A/PAPP-A2, PAPP-A/PAPP-A2/proMBP, proMBP/ANG and proMBP/ANG/C3dg in said body fluid sample; and
- 25 c) diagnosing the clinical condition or diagnosing predisposition to the clinical condition, wherein the level of the complex above or below a predetermined value is indicative of the clinical condition or predisposition to the clinical condition.
- 30 64. A method of diagnosing a clinical condition or diagnosing predisposition to said clinical condition in a mammalian fetus comprising the steps of
- a) providing a body fluid sample from the mother of said fetus; and

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

85

- b) measuring the level of a complex selected from the group consisting of PAPP-A/proMBP, PAPP-A2/proMBP, PAPP-A/PAPP-A2, PAPP-A/PAPP-A2/proMBP, proMBP/ANG and proMBP/ANG/C3dg in said body fluid sample; and
- 5 c) diagnosing the clinical condition or diagnosing predisposition to the clinical condition, wherein the level of the complex above or below a predetermined value is indicative of the clinical condition or predisposition to the clinical condition.
- 10 65. The method according to any of claims 63 and 64, wherein the clinical condition is selected from the group consisting of Down's syndrome, preeclampsia and acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction.
- 15 66. The method according to any of claims 63 and 64, wherein the complex is PAPP-A/proMBP and the clinical condition is selected from the group consisting of Down's syndrome and acute coronary syndrome, including unstable angina and myocardial infarction.
- 20 67. The method according to any of claims 63 and 64, wherein the complex is proMBP/ANG and the clinical condition is Down's syndrome.

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

Fig. 1a

1/11

ATGATGTCCTTAAAGATCCTAAGAATAAGCCTGGGATTTGGCTGGTGGGACTCTGT 50
 M M C L K I L R I E L A I L A G W A L C (20)
 TCTGCCAAGCTCTGAGCTGCTGGAACCCGAGAAATCCCTGGTTGAGAGGGAACCTG 120
 S A N S E L G W T R R K K S L V R R R H L (40)
 AATCAGTGTCTTGGAGGAGAACTGTGTGGCTGGGGCCAGAGTTCGAAGACCCAGA 180
 F Q V L L R G E R C W L G A R V R R F R (60)
 GCTTCTCCAGCATCCTCTTGGGTCCTCCCGCAGGGCTGGGACTACCTAAGG 240
 A S P Q H H L F G W Y T S R A G N Y L R (80)
 CCTTACCCGCGGGGAGCAAAATCTCTCTGAGGAGCCGCAACCCAGACTGAA 300
 P Y P V G G Q E L I H H T C S S X F D T R (100)
 GGAATGCTGTGAGCTCTTCCCGCAGCCTGCTGAAATCCAGCGAGCTGAGGGT 360
 G N A V S L V P P D L T E N F A G L R G (120)
 CGAGTGAAGAGCCGCTGCCCCATGGTGGGATGCTCTTGGGCAATCTGAGCTG 420
 A V E E F A A P N V G D S F I G Q S E L (140)
 CTGGAGATGAGCCTTATCTGGCAATCAAGATCCAGAGTCTTAGCTGAGGCC 480
 L G D D D A Y L G N Q R S K E S L G E A (160)
 CGGATTCGAAAGCTCAGCCATGCTCCACTTCCACCCGCAATTTACCAACCTG 540
 G I Q K G S A M A A T T T T A I F T T L (180)
 AACGACCCAAAGCAGAACCCAGAGGGGCTGGCCAACTCCAGCCAGCTCCCAA 600
 N E P K P E T Q R R G W A K S R Q R R Q (200)
 GTGTGAGAGCGGGCCGAGAGTGGGCGAGGACTCCGATCTCTCAGATTCCAA 660
 V W R R R A E D G Q G D S G I S S H F Q (220)
 CTTGGCCAGGCTTCCCTTAAACACAGGCTCAAAAGAGTCCACGAGGAAAGCAC 720
 P N D E H S L K H F W K K S P P E E S H (240)
 GAAATGGGGAGAGGCTCTACGAGAGCAGAGACTTTACTCCAGTGGAGCTG 780
 Q N G G E G S Y R E A S T F E D S Q V G L (260)
 CCACTCTTACTTCTCTGGAGCGGAGCGCTCTCTGCTCCAGAGTCTGCT 840
 F I L Y F S G R R R E R L L L R P E V L A (280)
 GAGATCCCGGAGGAGTTCAGTGAAGCTGGGTAAACCCGAGGAGGAGCAAC 900
 B I P R E A F T V E A W Y K P E G G Q N (300)
 AACCCAGCCATCAGCGAGTGTGTTAATACCTGCTCCCACTTTCAGTGAAGGC 960
 N P A I I A G V F D N C S H T V S D K G (320)
 TGGSCCTGGGGATCCCTCAGGGAAGCAAGGGAAGGGGATGCTCTCTCTCTC 1020
 W A L G I R S G K D K G K R D A R F F F (340)
 TCCCTCTGACCCGAGCGCTGAAAGAGCCACCATCTGATTAAGCCAGCTGACCA 1080
 S L C T D R V K K A T I L I S H S R Y Q (360)
 CCGSCACATGACCCATGTTGGCAGCACTTACGATGAGCGCAATGGCCCTGATCT 1140
 P G T W T H V A A T Y D G R N H A L Y V (380)
 GATGCACTCAGTGTGCTAGCAGTCTAGCCAGTCTGTCCCTGAAAGCCCTTCA 1200
 D G T Q V A S S L D Q S G P L N B P P F M (400)
 GATCTTCCCTCTTGTCTCTGGGGGAGCAGCTCTGAGAGTGGGCACTATTCCT 1260
 A S C R S L L L G G D S S E D G W Y F R (420)
 GAGCACTGGGCACTGCTGTTTCTGCTGACCCCTGCGCAAGGCCAATTTGAGC 1320
 G H L G T L V F N S T A L P Q H F Q H (440)
 AGTCTCAGCATTCAGTGGGAGGAGGAGCCTACTGCTGCTGACAGCCAGCTTT 1380
 S S Q H S S G E E E A T D D L V L T A S F (460)
 GAGCCTGTAAACAGAGTGGCTCCCTTAAAGATGAGAGTACCCAGACTTGGGTT 1440
 E P V N T E N V P P R D E K Y P R L E V (480)
 CTCGAGGCTTTGAGCCAGCCTGAGATCTGTCCCTTGGAGCCCTCTGCTGGG 1500
 L Q G F E P E P H I L S P L Q P P L C G (500)
 CAAACACTCTGACAAATGGAATGATCTCCAGTCAATGGAATGCGCCCTTGG 1560
 Q T V C D N V E L I S Q Y N G Y W P L R (520)
 GGAGGAGGTTGATAGCTACAGGTTGAGACTCTGTGATGAGGAGGCTTAAACCC 1620
 G E X V I R Y Q V V N I C D D E G L N F (540)
 ATTGTGAGTGAAGCAGATTGCTCTCAGCAGGAGCACTGAAAGAGGCTTAAACCC 1680
 I V S E E Q I R L Q H E A L N E A P S R (560)
 TACAACATCAGCTGAGCTCCAGCTCCAGCTCCCAATCCACCTGCGACCCG 1740
 Y N I S W Q L S W H Q V H N S T L R H R (580)
 GTTGTCTTGTGAACTGAGCCCGCAGATGCGCATGACCATGCGCCCGAGTGT 1800
 V V L V N C E P S E T G N D R C D P E G (600)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

2/11

Fig. 1b

GAGCACCCTCAGGCTATGATGGGCTGACCTCCGCTCCAGGGCCCTGCTACTCC 1860
 R H P L T R Y D S R C F L Q G E C Y S (1920)
 TGGAACCCAGGATGGCTCTCTGAGGTGGAGTACAGAGTCTGAAAGCACTTTCAC 1920
 W N R R D G L C H V E C R N H L N D F D (1640)
 GAGGAGACTGCTGAGGCTCCAGGCTGAGTGGGCAAGACTCTTTGACCTGAC 1980
 D G D D C C D P Q V A D V R R K T C F D P D (1660)
 TCACCCAGAGGGCATACTGATGTTGAGGAGCTGAGGAGGCGCTCCAGCTGACAGT 2040
 S P K R A Y M S V X E L K E A L Q L N S (1680)
 ACTCACTTCTCACTACTACTTTGCCAGCTCAGTCCGGGAGACCTTCAGGTCTCC 2100
 T H F L N I Y F A S S V R E D L A G A A (1700)
 ACCTGGCCCTGGGACAGGAGCTCTCACTCAGCTGGGCTGCTTCTCCAGCCAGCA 2160
 T W F P W D K D A V T H L G G I V L S P A (1720)
 TATTATGGATGCTGGCCACACCCAGCAAGTCCATGAGGTGGACATGTTCTGGGA 2220
 Y Y G M F P G H T D T M I H E S V G H V L G (1740)
 CTCACCACTCTTAAAGAGTCAAGTGAAGAGATCTCTGCAATGACCCCTGCAAGG 2280
 L Y H Y P F P G V S E R E S C H D F C K E (1760)
 ACAGTGCATCCATGAAAGAGAGCTCTCTCCGACACCCGCCCACTCCAGAGT 2340
 C V P S N E T G D L C A D T A P T P K S (1780)
 GAGCTGGAGGACAGAGCCCACTGAGTGGAGCTGGGCTCACTCTCCAGGGS 2400
 S L C R E P E E T S D T C G F T R F P G (1800)
 GCTCGTCCCACTGATGAGTCAAGGAGTACAGCTGACCTGACCTCACTCTCT 2460
 A P F T N Y M S Y T D D N C T D H F T P (1820)
 AACCAAGTGGCCGATGCTACTTTGGCCAGTCTATCAGCAGTGGACTGAAAGC 2520
 N Q V A R N H C Y L D L V Y Q Q W T E S (1840)
 AAGAGCCCAACCCCACTCCCACTGATGATGATGAGCAGACCAAGTCCCTC 2580
 R K P T P I P I P P M V I G Q T N K S L (1860)
 ACTATCCACTGGCTCCCTCTTATGAGGATGATGATGAGGAGGCTCCAGGAGCTG 2640
 T I H N L P P I S G V V Y D R A S G S L (1880)
 TGTGGAGTGGACTGAGAGGAGCTTTCTGCTGATGATGACAGACTCTCCCGG 2700
 C G A C T E D G T F R Q Y V H T A S E R (1900)
 CGGTGTGACTCTCAGTATTGAGACCCGAGAGGCTGTGGGCTCTCTGATG 2760
 R V C D S S G Y W F E E A V G P P D V (1920)
 GATGCGCTGAGGCTCAGCTTACAGGCTGAGCCTGAGCTGAGCTGACCTTACCA 2820
 D Q F C E P S L G A R S P S V H L Y H M (1940)
 AACATGAGGCTCCCTCCCAAGAGGCTGAGCTGGAGCTCTCTCCAGACCTG 2880
 H M T V V C P T E G C S L E L L F Q H P (1960)
 CTCAGCCCAACCTCCAGCTGAGGCTGAGCTCTCTCTCTGATGAGCTCCAGG 2940
 V Q A D T L T L W V T S F P F M E S S Q V (1980)
 CTCCTTACACAGAGTCTTCTGAGAAACAGGAGTCTGCTGACCTGGGCTTAC 3000
 L F D T E I L L E N K E S V H L G P L D (1000)
 ACTTCTGAGCATCCCACTCACCATCRAACTGCACTGGATGGAGGCTGCGGG 3060
 T F C D I P L T I K L H V D G K V S G V (1020)
 AAGCTACACCTTTGATGAGGAGTATGAGGAGTATGAGCAGCTCTGACTTCCAG 3120
 X V Y T F D E R I E I D A A L L T S Q P (1040)
 CACAGTCCCTTGTGCTGAGCTGAGGCTGAGGATCCAGGCTCTCCAGGATCC 3180
 H S P L C S G C R F V R Y Q V L R D P P (1060)
 TTTSCCHTGGTTGCCCTGTGTGACACATCTCACAGAGTTCACGAGCTGG 3240
 F A S G L P V V V T H S W R K P T D V E (1080)
 GTCACCTGAGCAGATGATGATGAGGAGTCTGAGGAGTGGAGGAGGAGGAG 3300
 V T P G Q M Y Q Y G V L A S A G G S L G (1100)
 GAGCTTCCCTCTGAGCAGCTTACAGGAGCTCTTATGAGGAGGAGGAGGAG 3360
 E A S P P L N H I H G A P Y C G D G K V (1120)
 TCAGCAGCTGGAGAGGAGTGTGATGAGGAGCTTGTGAGGAGGAGGAGGAG 3420
 S B R L G E E C D D G D L V S G D G C S (1140)
 AAGTGTGAGGCTGGAGGAGTTCACCTGTTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3480
 R V C E L B E G F N C V G E P S L C Y M (1160)
 TATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3540
 Y E G D C I C R P F F E R K T S I V D C G (1180)
 ATCTACCTCCAGAGGATCTGAGTCAATGGGCTACCCGGCTTACTCTCATGA 3600
 I Y T F K G Y L D Q W A T R A Y S S H E (1200)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

Fig. 1c

3/11

GACGAGAGAGAGCTTCCTCTTCTCTGTAACCTGGAGAACCTCATTCCCTAATTGACACA 3650
D K K K K C P V S L V T G E P H S L I C T (1320)

TCATACCATCCAGATTACCCACACCGTCCCTAATCTGGCTGGTTCCCTGTGTGCC 3720
S Y H P D L P N H R P L T G W F P C V A (1240)

AGTGAATAAATACTCGGATGACAGGAGTGAACAGCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 3780
S E N E T Q D D R S E Q P F E G S L K K E (1250)

GATGAGGTTGGCTCAAGTGTGTTTCAATAGACAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 3840
D E V W L X V C F N R P F G E A R A I F I (1230)

TFTTGAACAATGATGGCTAGTTCGCGAGAGCATCAGCAGCGAGAGAGAGAGAGAGAG 3900
F L T T D G L V P E E H Q Q P T V T L X Y (1330)

CTGACCAATGTCGAGAGCACTCTCTTGGAACTGTGGACTGTCTATGCCAGCAT 3960
L T D Y R G S N H S L G T Y G L S C D H (1320)

ANTCCATGATTAATGATGAGCCCTGACCGAGATGCTTTCCACCTGACCACTCA 4020
N P L I I N V T H R Q N V L F H H T T S (1340)

GTGCTGTAAATTCATCCCAAGGCTGGCATCTGCTGTGGCTTAAGACATCC 4080
V L L N P S S P R V G I S A V A L E T S (1360)

TCCCGCATGGCTTCCTCCGCTCCAGTACTCTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4140
S R I G L S A P S N C I S E D E G Q N H (1380)

CAGGGACAGCATCTATCCATCCGCTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4200
Q G Q S C I H R P C G K Q D S C P S L L (1400)

CTTGATCTGCTGATGAGTGTGACTGTACTTATAGGCCAGGCTCTCAAGTGTGCT 4260
L D H A D V V N C T S I G F G L M K C A (1420)

ATCACTGTCAAGAGGATTTGCCCTTCAGGCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4320
I T C Q R G F A L Q A S S G Q Y I R P M (1440)

CGAGAGAAATTCGCTCAATGTTCTTCGAGCATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4380
G K E I D L V C S S H K P Q M V E C L (1460)

CCCTGAGTCTGGTTCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4440
F V D C G V E D F S L V N A N F S C S (1480)

GAGGAAACCAATTTCTGAAGCTGCTGATCTCTGTGTCGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4500
E G T K F L K R C S I S C V P P A K L Q (1500)

GGATGAGCCATGAGCATGCTTGAAGATGCTCTGGTCTCCCTGAGTCTAC 4560
G L S P W L T C L E D G L W S L P R V Y (1520)

TGCAAGTTGAGTGTGATGCTCCCTATATTTGAAATGCAACTTCCCTGCTCAC 4620
C K L E C D A P P I I L N A N L L L P H (1540)

TGCTCCAGACACCAAG 4680
C L Q D N H D V G T I C K Y E C K P G Y (1560)

TATGTGAGAAATGAG 4740
Y V A E S A E G K V R N K L L K I Q C L (1580)

GAAGTGAATCTGAG 4800
E G G I W E Q G S C I P V V C E F P P (1600)

GTGTTGAGGCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 4860
V F E G H Y E C T N S F E D S Q C V L (1620)

AACTGTGAG 4920
N C H Q E R B K L P I L C T K E G L W T (1640)

CHGAGTTTATGTTGTGAGATCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 4980
Q B F K L C E N L Q G E C P F P P S E L (1660)

AACTGTGAG 5040
N S V E Y K C E Q G Y G I G A V C S P L (1680)

TGTGTAATCCCCCGAG 5100
C V I P P S D P V M L E B N I T A D T L (1700)

GAGCACTGAG 5160
E H W M E P V K V Q S I V C T G E R G W (1720)

CACCGAG 5220
H P D P V L V H C I Q S C E P F Q A D G (1740)

TGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT 5280
W C D T I N R R A Y C H Y D G D C S (1760)

TCCACACTCTCTCCAG 5340
S T L S C K X V T F R A D C D L E E C (1780)

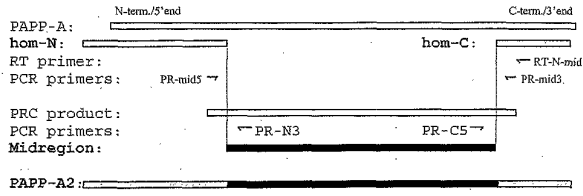
ACCTCCGAG 5376
T C R D P K A E E R Q (1791)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

4/11

Fig. 2

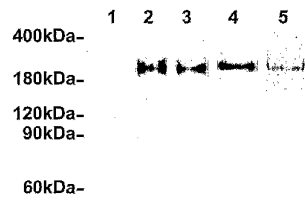


WO 02/32953

PCT/DK01/00695

6/11

Fig. 4

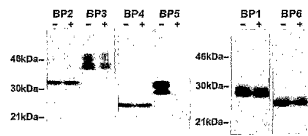


WO 02/32953

PCT/DK01/00695

7/11

Fig. 5

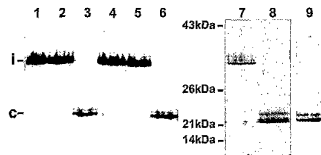


WO 02/32953

PCT/DK01/00695

Fig. 6

8/11



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

Fig. 7a

9/11

```

ATGATGTCCT TAAAGATCCT AAGATAAGC CTGACGATT TGGCTGGTG GGCACCTGT 60
TCTGCCACT CTGAGCTGGC CTGGACACC AAGAAATCCT TGGTTOAGAG GBAACACTG 120
AATCGGTGC TGTGGAGG AAGACTTGT TGGCTGGTG CCAAGTTTC AAGACCCGA 180
GCTTGTCCG ACCTGCTCT CTGTGGTGT TCCCGGAG GGTCTGGGA CCACTTAGG 240
CCCTACCCG TGGGGGAGA AAGATTCAT CATAAGGAC GAGGAAACC AGACACTGA 300
GAAATGCTG TGAGCCTGT TCCCCAGAC CTGACTGAA ATCCAGAGG ACTGAGGST 360
GAGTGTAGG AATGGCTGC CCGTGGGTA GGGATAGTC CTATTGGCA ATCTGAGCTG 420
CTGGAGTGT TGGCTGTA TCTGCGAT GAAATGCA AAGATCTCT AGTGGAGGC 480
GGATTCAGA AAGGCTCAG CAGTGGTCC ACTACTACA CCGCATTTT CACACCCCTG 540
AACAAACCA AACAGAGAC CCAAGAGGG GCTGGGCCA AGTCCAGCA GGTTCGCCA 600
GTGTGAAAG GAGGGCCGA AATGGGCGA GGAATCTCG GTATCTCTC ACATTTCCA 660
CCTTGGCCG ACCTTCTCT TACACAGG GTCAAAAGG GTCCAGGGA GBAAGGAC 720
CAAAATGCT GAGAGGCTC CTACCGAGA GCGAGACCT TTAATCCCA AGTAGGACTG 780
CCCATCTAT ACTTCTCTG GAGCGGGAG CGCTGCTGC TGGTCCAGA AGTGTGGCT 840
GAAATTCGC GAGGGGCTT CCGATGGTA GCTGGGTTA AACCGAGGG AGCAGGAGC 900
AACCGAGCA TGTGGGAG TGTGTGAT AACTCTGCC ACATCTGAG TGGTAAAGG 960
TGGCCCTGT GATCCGCTC AGGGAAGGC AAGGAAAGC GGAATGCTC CTCTCTCTC 1020
TCCCTTCTC CCGACCGCT GAGGAAGCC ACCATCTTG TTAGCCAG TCGTACCAA 1080
CCAGCAGAT GAGCCGCTT GCGAGCCTT TACATGAC GGCACATGC CTGTATGTT 1140
ATGTCGCTC AGTGTGCTT CAGTCTGAC CAGTCTGTC CCGTAAAGC CCGTCTGAG 1200
GCATCTTCC GCTCTTGT CCTGGGGGA GACAGCTCT AGGATGGCA CTATTTCTG 1260
GGACCTTGA GCACATGCT TTTCTGGTG ACCGCCCTC CCAAAACCA TTTCTGAGC 1320
AGTCTCAGG ATTCAGTGT GAGGAGGAA GCGATGACT TGGTCTGAC AGCAGGCTT 1380
GAGCTGTGA AGCTAGGCT CAGTCTGCT GAGTGTAGA AACTGTGGA GCTCTGAG 1440
CTCCAGGCT TTAGCCAGA GCTTGAAT CTGTGCTCT TGCAGCCCC ACTCTGAGG 1500
CAACAGTCT GTAGCATGT GGAATGATC TCCAGTACA ATGGATCTG GCGCTTGG 1560
GGAGGAGAG TGAAGCTTA CAGTGTGTT AACATCTGT ATGATGGGG CTAACACCC 1620
ATGTGCTGT AGGCAAGAT CAGGAGGAG GAGTGTGCA GATATGCTC CTTCAGGCA 1680
TACAAATCA GCTGAGGCT GAGCTCAG CAGTCCACA ATCCACCTT GCGAGCCGG 1740
GTGTGCTTG TGAATGTA CCGCAGCAG ATTGGCAAT ACCATGTA CCGCGAGGT 1800
GAGACCCAC TCAAGGACTA TGAAGGGGT GACTGCCGC TCGAGGGGG CTGACTTCC 1860
TGAACCCCA GGGAGGCTT CAGTCTGCT GAGTGTAGA AACTGTGGA GCTCTGAG 1920
GAGCGAGCT GCTAGCACC CAGGCTGCT GATGTGACA AGACTGCTT TGCACCTGAC 1980
TCAACCAAG GGCATCAT GAGTGTGAG GAGCTGAGG AGGCCCTCA CGTGAAAGT 2040
ACTCCTTCC TCAAGCTTA CTGTGCCAG TCGATGGGG AAGACTTGC AGTGTGCTC 2100
ACGTGCTCT GBAAGAGG CAGTCTGCT CAGTGTGAG GATATGCTC CAGCCAGCA 2160
TATATGAGA TGTGTGCGA CAGCAGACC ATGATCCAT AGTGTGACA TGTGTGGA 2220
CTTACCATG TTTTAAAGG AGTCAATGA AAGAAATCCT GCAATGACC CTGCAAGAG 2280
ACAGTCCAT CCAAGAAAC GGGAGACTC TGTCCGACA CCGCCCCAC TCCAAAGAT 2340
GAGCTGTGC GBAAGCAG CCACTCATG GAGCTGTGT AACTGTGGA GCTCTGAG 2400
GCTTGTGCA CCACTCATG GAGTGTGAG GATGATAGT GCACTGACA CTCTACTCT 2460
AACCAAGTG CCGAATGCA TGTCTATTG GACTATGCT ATCAGCAGT GACTGAAGC 2520
AAGAAAGCCA CCGCATCC CATTCCATC ATGTCTATG GACAGACCA CAGTCCCTC 2580
ACTATCACT GCTTCCCTC TATTGAGA GTGTATATG AAGGCCCTC AGGCCGCTG 2640
TGTGCTCTT GCGTGAAG TGGGACTTT CTGAGGATG GAGTGTGAG TTTCTGAG 2700
CGATGTGTG ACTCTCAG TATGTAGCC CCGAGGAGG CTGTGGGAC TCTGTGTT 2760
GATCAGCCT GCGAGCCAG CTTAGAGCC TGGAGCCTG AGTCCACCT GTACCAAGT 2820
AAGTGTGAG TCCCTGCTC CAGAGAGGC TGTAGCTTG AGTGTCTTT CCAACACCC 2880
GTCAAGGCG ACGCTGCT CAGTCTGCT ACTTCTCT TCGAGGATG CTGTGAGT 2940
CTCTTGA CAAGAGCTT GCTGGAAG AAGAGTCA GAGCCTGG CCGCTTAGC 3000
ACTTCTGTG ACATCCCAT CACCATCAA CTGACCTGG ATGGAAAGT GTCGGGGTT 3060
AAGTCTACA CTTTGAAG GAGGAGAGG ATGATGAG CAGTCCAGC TTCTCAGCC 3120
CAGTCTCTT TGTCTGAG CAGGCTGCT GAGTGTGAG AAGTGTGAG TTTCTGAG 3180
TTGCGAGTG GTTCCGCT GTGTGAGA CATTTGACA GAACTTCA GAGCTGAGG 3240
GTCAACCTG GACAGATTA TGAATCAA GTTCTAGCT AGCTGAGG AAGACTGGA 3300
GAGCTTCC CTCTGTGA CCACTTCTT GAGTCTCTT ATGTGTGAG TGGAGAGT 3360
TGGAGAGG TGGAGAGG GTGTGATG GAGTCTGCT TGGAGAGG TGGTGTGCT 3420
AAGTGTGTG AGCTGAGGA AGTGTGAG TGTGTAGAG AAGCAGCT TGTCTAGT 3480
TATAGGAGG ATGACATG TGAACCTTT GAGGAGAAA CAGCATTTT AACTGTGCT 3540
ATCTACTCT CCAAGATTA CTGATGAA TGGGATCCC GAGCTACT CTCTCATGA 3600
GAGAGAGG AGTGTGCT TCTCTGTA AGTGTGAG CACTCTCT ATTTGACA 3660
TCTAACCTC CAGATTACC CAGCAGCTT CCGTACTG CAGTCTTCC CTGTGTGCC 3720
AGTGAAGT AAATCAGGA TGAAGGAGT GACAGCCAG AAGTGTGCT AAGAAAGAG 3780
GATGAGTGT GCTCAGAT GTTCTCAT AGACAGGAG AGCCAGAGC ATTTTAT 3840
TTTTGACA CAGTGTCT ATGTCGGA GAGTCTGAC AGCCAGAT GACTCTTAC 3900
CTGAGGAT TCGTGGAG CAGCAGCTT CTGGAACCT ATGAGCTG ATGCCAGAT 3960
AATCCAGTA TATCAGAT GAGCCTGAC CAGATGCT TTTCCACA TACCACCTA 4020
GTCTCTGA ATTTCTCT CCGAGGCTT GAGTCTGAG CAGTCTCT AAGGACTCC 4080
TCCGAGTGT GTCTTGGC TCCGAGAC TCACTCTG AGAGAGGG GAGGACTCT 4140
CAGGAGAG CAGTGTGCA TGGCCCTGT GGAAGCAGG AAGCTTCT GATGTGCT 4200
CTGATCAT CAGATGCT GAGTGTACC TCTAGGCC CAGTCTCAT AAGTGTGCT 4260
ATCACTTGC AAGGGGAT TGGCTCTAG GCGAGAGT GCGATCAT CAGGCCATG 4320

```

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

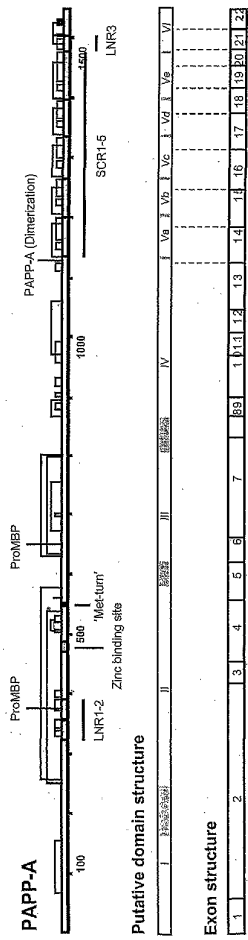
Fig. 7b

10/11

CAGAAAGAAA	TTCTGCTCAC	ATGTTCTTCT	GGGCACTGGG	ACCGAANTGT	GAGCTGCCTT	4380
CCCGTSGACT	GGGSGTGTCC	GGGCCCGTCT	TTGSGTBACT	ATGCAAACTT	CTCTGCTCA	4440
GAAGGACCA	AAITTTCTGA	AGCTGCTCA	ATCTTTGTG	TTCCACGAGC	CAAGCTGCA	4500
GGACTGAGCC	CAGSCTGAC	ATGCTGTGAA	GATGGTCTCT	GGTCTCTCCC	TGAGTCTCAC	4560
TGCAAGTGG	AGTSTGATGC	TCCCCCTAIT	ATCTGAAATG	CCAAGTGTCT	CCTGCTCCAC	4620
TGCTTCCAGG	ACAACCAAGA	CGTGGGCAAC	ATCTGCAAAAT	ATGAAATGCA	ACCAGGATAC	4680
TATGTGSCAG	AAAGTGCAGA	GGTAAAGTCT	AGGACAGAGC	TCTGAAAGT	ACAAATGCTG	4740
GAAGGTGGA	TCTGAGGCA	AGGCACTGCT	ATCTCTGTG	TGTGTAAGCC	ACCCCTCTCT	4800
GTGTTTGAAG	GCATGTATCA	ATGTAACCAAT	GGCTTCAAGC	TGGAAGGCA	GTGTGTGCTC	4860
AACTGTAAAC	AGGAACCTGA	AAAGCTTCCC	ATCTCTGCA	CTAAAGAGGG	GCTGTGAGCC	4920
CAGGAGTTTA	AGTGTGTGA	GAATCTGCA	GGAGAAATGCC	CACCACCCCC	CTCAGAGCTG	4980
AAITCTGTGG	AGTACAAATG	TGACAAAGGA	TATGAGATG	GTGCAAGTGT	TTCCCATATG	5040
TGTGTATTC	CCCTCCATG	CCGCTGATG	CTACTGGA	ATATCACTGG	TGACACTGTG	5100
GGCACTGGA	TGGAACCTGT	CAAGTCCAG	AGCAATGTGT	GCATCGCCG	GCCTCAATGG	5160
CACCCAGCA	CCGTCTTAGT	CCAATGATC	CAGTCAATG	AGCCCTTCCA	AGCAGATGGT	5220
TGTTGTGACA	CTATCAACA	CCGAGCCTAC	TGCCACTATG	ACGSGAGAGA	CTGCTGCTCT	5280
TCCCACTCT	CTTCCAGAA	GGTCACTCA	TTTGTGCTG	ACTGTGACTT	GGATGATGG	5340
ACTCTCCGG	ACCCCAAGG	AGAGAAAT	CAATGACTGT	GGAAAGAGC	CCCTCCCTCT	5400
ACTGCTCAG	AGGCAGTAG	AAAGAGGGC	CGACCCAGGA	GGAAACAAG	GGTGAATGA	5460
GAGAAACAAT	CAAGAAATG	AGAGAGGAG	AAAGCATGA	AGGATCTTAT	AGAAATGCA	5520
AGAGGATATT	GATAGGTGTG	AACTAGTCA	TCAGTAGCC	CAAGTAGGAG	AGATCATAG	5580
CGAAAGATT	CTTAAAGTG	GCATGTGAT	AACTAGGAG	GGAAATATG	ATGATATAT	5640
AGSACCTTC	GTCTCTCAT	TATATCTAT	TAAATCTAT	CTCACTCTCT	TGCTCTCTCT	5700
TCCGCTCAC	CCCTCGCCA	CTACTGACT	CCACCCAAT	TGTAAGCAA	TACCAAAATA	5760
CTAGAGGGA	AGTTGAGAG	GATACTGTTA	ATACCCAAT	TGAATGGAT	GCCATCTTCT	5820
AGAGCTTCT	TGCTCTCAC	TGGCTCTTT	TCCTTTTGT	TAGTTTCCCT	TAAATATGA	5880
AGTAAATAT	TATCTCTTA	TAAATATTA	AACTAATTA	TAAATATTA	TATTAATAT	5940
TATTTTTTT	GCTTTTTCT	AGCTAATA	TTATCTATG	TTCCACAC	GCTCTCTGA	6000
AGTCCACTT	CAAGATGAT	GTTGAGACT	TGAGACAGA	AAAGCACTT	ATTTCCCAT	6060
CTTCTATGG	ATGCGGATG	GCAGTGTGA	TGGAGGTAC	AGAGAGGAG	AGATATATTA	6120
GATGGAATTC	TGATGCTAG	CATGTAAAGC	TAACTACTT	TTTTTTATG	ACCTGAGAGC	6180
TGSCCTATT	TTTGCACCA	GGAAATGGG	AGTTGAAATG	GGSTACTAT	GGACTATGG	6240
AAATUNATG	TAAATACCAT	TGGTATGGG	TCCAGAGAA	CTAGACTATG	GTCTCTGAT	6300
ATCTGCTCAC	AAAGATATA	CTAATCTTGT	TCACTCTCT	AGAACTCCA	ACTGAGTCTG	6360
GTGAGACCTA	GGATTTCTG	CACCTCCACA	CATGCTGTT	CCAAAGTGG	CTGTCAGCCA	6420
GTCCACAGT	TGTACTATG	GCCCATCTC	TGATCACAG	GATTCAGGA	ACTCAGACAC	6480
TCTCTACTT	TGCTCTTGT	TCCCTCTCT	TGTAGAGT	CTCCAGACT	GGCCACTAC	6540
ATGACCAAGT	GTTCATTTT	CTGAGGAAA	AATTTATGG	AAATGATTA	GGGAAAGGT	6600
GGGAGAGAT	GAAGACAG	GCAGAGCTG	TCAGGTTAA	ATCCAGGCC	GGCATGAGA	6660
ATGGAAGTGA	TCAGGAGAC	TOGGCTCTG	TTCCAGTCT	CCAAAGAGA	CCAAATGGG	6720
TCCCTTATG	AATGAAAT	CTGAGATAA	TTCTCTTCA	GATCACTGA	CAAAATCTGT	6780
GGCCAGGA	TTTTGCTGT	AGCAAGCAT	GGAAATGCT	GGAGAGGG	TGCACTCTG	6840
TGSSAGACA	GAAGATTC	ARCAATIDA	TGTCATTT	GTGTGTTTA	CCCTTTCTA	6900
TCCAAATGAT	GGAAATGCA	TGAAATGACC	ATATTAGCC	TCTCTTAT	TACATCCAG	6960
GCTCACTGG	ATGTATCTA	CTGCAATAC	ATTTCTTGT	AAAGTTTCT	GGATTAGCC	7020
CTAGGAAAG	TGATGAGGA	GCCAGTTCT	GTTTAAGTT	CTAGTTTAC	TCTTTTAGG	7080
AAAGCTGTA	GTAGGCTGT	TCTCTTAA	AGTTCTTCT	CCAAATGAA	CCAGACAG	7140
ACAAATTTA	GAGCTCAGCT	GTGCTCTCT	CTCATCTCT	GCTCTTTGC	TTGACACCA	7200
GTTTTCTAC	TCTTCCACT	AACACTAGG	CAMGGCTGT	GCAAATGGA	ATAGAAATA	7260
CTACCACAT	GATAGAAATA	TATCCACAC	TATCACTAG	GGAAAGACA	TATCTGARA	7320
GGAAATPAA	CACATATAG	GTGATATCC	CACATTAAT	TGTGGTTG	TGAAATGAG	7380
CTTGCARAT	TATGAGGA	AGAAAGAGC	AGATCTCC	CTTCAAAA	AACTTTTG	7440
TCTACTAAT	TCTAGTGA	AGAAATGTA	GTTCAATAC	CACTCATGT	CTTGGCTAT	7500
GCTTAGTCC	CCCAAGAGA	CAAAATATT	TATTTGAG	ATTCATAG	GCTTCAATAT	7560
CAAAAGACA	ATGAAAGAT	TGACACACT	TATTTCAA	ATTTATRA	CTTGTATAT	7620
TGSSAAAT	GTCAAAATG	CTAGACACT	TCTAAGTCT	GCTTGGGA	ATCCACTTT	7680
GTCTGAAAT	GGGAGAGG	ATTTGATC	CGSCTATA	CTCACTCAG	GACATGAG	7740
CTTGTGTTT	ATGCCAGTGT	GTGCTTCA	GCAGTCTCT	CACAGAGCA	CAAGTAGAA	7800
CAITTCGTT	TAAATTTCA	TTTTAAATA	TTTTATTAT	TGCATCAC	CAGTCTCTG	7860
GGAAAGCAA	AGAAAGTTC	CTGTTGTGT	TGAGAGCCT	CTTAGCTAT	AGGCTTCCC	7920
AGCAATAGT	AGCTATGCT	ATTCAGAGC	AGCAAGTCT	TCCACTTTT	GTCTTGGGA	7980
CTCTGTTTT	TGCAACTCT	AGTCTCTA	TAAATGGA	GGCTTAAAG	ACTTGGTGA	8040
CAATCCAG	CAACATCAAC	TCACACTCA	TCCAGTGGT	GCTCCACTT	CTGCTACTCT	8100
TATCCACCA	TGTGCTCAT	GGAGCCTTT	CTCAGACT	CTTCTGTGT	TTGATGTGT	8160
CCCAAGTGC	CCAGGCTAG	CTGCTCTA	CACTAGACT	GACAGCTCC	AATCAGAAAG	8220
GCAGTATAG	GGAGGCTG	AGGAAATGG	GGAAATGCT	ACAAATTA	AGTAAAGGG	8280
ATTTGAAAG	TGAGAGCTC	TTCCCTGAT	TCACTCTCT	TTTTTTTAT	TACAGAGCT	8340
TGAACTGGC	ACTTCTGTA	TCTTTTGA	TCACTATGA	GTGCAITAG	TACACCCAA	8400
GGGATGGCT	TGATGGGA	TGTATGAA	GGAGCTGAT	TACTTATTT	TATGTAATA	8460
CAGCTACAGC	CAGTATTTT	GTAAGATAT	AAATTTTCA	TAAATAATC	AGCACACAA	8520
ATATGAA						8527

Fig. 8

11/11



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

1

SEQUENCE LISTING

```

<110> Como Biotech
<120> Pregnancy-Associated Plasma Protein-A2 (PAPP-A2)
<130> P 495 DK00
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 8527
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(5376)
<223> prepro-PAPP-A2 coding sequence
<220>
<221> 3'UTR
<222> (5377)..(8527)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (700)..(5376)
<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(66)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(699)
<223> prepro part of PAPP-A2
<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(699)
<223> pro part of PAPP-A2
<400> 1
atg atg tgc tta aag atc cta aga ata agc ctg gcg att ttg gct ggg 48
Met Met Cys Leu Lys Ile Leu Arg Ile Ser Leu Ala Ile Leu Ala Gly
-230 -225 -220
tgg gca ctc tgt tct gcc aac tct gag ctg gcc tgg aca cgc aag aaa 96
Trp Ala Leu Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Gly Trp Thr Arg Lys Lys
-215 -210 -205
tcc ttg gtt gag agg gaa cac ctg aat cag gtg ctg ttg gaa gaa gaa 144
Ser Leu Val Glu Arg Glu His Leu Asn Gln Val Leu Leu Glu Gly Glu
-200 -195 -190

```

WO 02/32953

2

PCT/DK01/00695

cgt tgt tgg ctg ggg gcc aag gtt cga aga ccc aga gct tct cca cag 192
 Arg Cys Trp Leu Gly Ala Lys Val Arg Arg Pro Arg Ala Ser Pro Gln
 -185 -180 -175 -170

cat cac ctc ttt gga gtc tac ccc agc agg gct ggg aac tac cta agg 240
 His His Leu Phe Gly Val Tyr Pro Ser Arg Ala Gly Asn Tyr Leu Arg
 -165 -160 -155

ccc tac ccc gtg ggg gag caa gaa atc cat cat aca gga cgc agc aaa 288
 Pro Tyr Pro Val Gly Glu Gln Glu Ile His His Thr Gly Arg Ser Lys
 -150 -145 -140

cca gac act gaa gga aat gct gtg agc ctt gtt ccc cca gac ctg act 336
 Pro Asp Thr Glu Gly Asn Ala Val Ser Leu Val Pro Pro Asp Leu Thr
 -135 -130 -125

gaa aat cca gca gga ctg agg ggt gca gtt gaa gag cgc gct gcc cca 384
 Glu Asn Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala Val Glu Glu Pro Ala Ala Pro
 -120 -115 -110

tgg gta ggg gat agt cct att ggg caa tct gag ctg ctg gga gat gat 432
 Trp Val Gly Asp Ser Pro Ile Gly Gln Ser Glu Leu Leu Gly Asp Asp
 -105 -100 -95 -90

gac gct tat ctc ggc aat caa aga tcc aag gag tct cta ggt gag gcc 480
 Asp Ala Tyr Leu Gly Asn Gln Arg Ser Lys Glu Ser Leu Gly Glu Ala
 -85 -80 -75

ggg att cag aaa ggc tca gcc atg gct gcc act act acc acc gcc att 528
 Gly Ile Gln Lys Gly Ser Ala Met Ala Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ile
 -70 -65 -60

ttc aca acc ctg aac gaa ccc aaa cca gag acc caa agg agg ggc tgg 576
 Phe Thr Thr Leu Asn Glu Pro Lys Pro Glu Thr Gln Arg Arg Gly Trp
 -55 -50 -45

gcc aag tcc agg cag cgt cgc caa gfg tgg aag agg cgg cgc gaa gat 624
 Ala Lys Ser Arg Gln Arg Arg Gln Val Trp Lys Arg Arg Ala Glu Asp
 -40 -35 -30

ggg cag gga gac tcc ggt atc tct tca cat ttc caa cct tgg ccc aag 672
 Gly Gln Gly Asp Ser Gly Ile Ser Ser His Phe Gln Pro Trp Pro Lys
 -25 -20 -15 -10

cat tcc ctt aaa cac agy gtc aaa aag agt cca ccg gag gaa agc aac 720
 His Ser Leu Lys His Arg Val Lys Lys Ser Pro Pro Glu Glu Ser Asn
 -5 -1 1 5

caa aat ggt gga gag ggc tcc tac cga gaa gca gag acc ttt aac tcc 768
 Gln Asn Gly Gly Glu Gly Ser Tyr Arg Glu Ala Glu Thr Phe Asn Ser
 10 15 20

caa gta gga ctg ccc atc tta tac ttc tct ggg agg cgg gag cgg ctg 816
 Gln Val Gly Leu Pro Ile Leu Tyr Phe Ser Gly Arg Arg Glu Arg Leu
 25 30 35

ctg ctg cgt cca gaa gtg ctg gct gag att ccc cgg gag cgc ttc aca 864
 Leu Leu Arg Pro Glu Val Leu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Ala Phe Thr

WO 02/32953

3

PCT/DK01/00695

40	45	50	55	
gtg gaa gcc tgg gtt aaa ccg gag gga gga cag aac aac cca gcc atc				912
Val Glu Ala Trp Val Lys Pro Glu Gly Gly Gln Asn Asn Pro Ala Ile	60	65	70	
atc gca ggt gtg ttt gat aac tgc tcc cac act gtc agt gac aaa ggc				960
Ile Ala Gly Val Phe Asp Asn Cys Ser His Thr Val Ser Asp Lys Gly	75	80	85	
tgg gcc ctg ggg atc cgc tca ggg aag gac aag gga aag cgg gat gct				1008
Trp Ala Leu Gly Ile Arg Ser Gly Lys Asp Lys Gly Lys Arg Asp Ala	90	95	100	
cgc ttc ttc ttc tcc ctc tgc acc gac cgc gtg aag aaa gcc acc atc				1056
Arg Phe Phe Phe Ser Leu Cys Thr Asp Arg Val Lys Lys Ala Thr Ile	105	110	115	
ttg att agc cac agt cgc tac caa cca ggc aca tgg acc cat gtg gca				1104
Leu Ile Ser His Ser Arg Tyr Gln Pro Gly Thr Trp Thr His Val Ala	120	125	130	135
gcc act tac gat gga cgg cac atg gcc ctg tat gtg gat ggc act cag				1152
Ala Thr Tyr Asp Gly Arg His Met Ala Leu Tyr Val Asp Gly Thr Gln	140	145	150	
gtg gct agc agt cta gac cag tct ggt ccc ctg aac agc ccc ttc atg				1200
Val Ala Ser Ser Leu Asp Gln Ser Gly Pro Leu Asn Ser Pro Phe Met	155	160	165	
gca tct tgc cgc tct ttg ctc ctg ggg gga gac agc tct gag gat ggg				1248
Ala Ser Cys Arg Ser Leu Leu Leu Gly Gly Asp Ser Ser Glu Asp Gly	170	175	180	
cac tat ttc cgt gga cac ctg ggc aca ctg gtt ttc tgg teg acc gcc				1296
His Tyr Phe Arg Gly His Leu Gly Thr Leu Val Phe Trp Ser Thr Ala	185	190	195	
ctg cca caa agc cat ttt cag cac agt tct cag cat tca agt ggg gag				1344
Leu Pro Gln Ser His Phe Gln His Ser Ser Gln His Ser Ser Gly Glu	200	205	210	215
gag gaa cgg act gac ttg gtc ctg aca cgg agc ttt gag cct gtg aac				1392
Glu Glu Ala Thr Asp Leu Val Leu Thr Ala Ser Phe Phe Glu Pro Val Asn	220	225	230	
aca gag tgg gtt ccc ttt aga gat gag aag tac cca cga ctt gag gtt				1440
Thr Glu Trp Val Pro Phe Arg Asp Glu Lys Tyr Pro Arg Leu Glu Val	235	240	245	
ctc cag ggc ttt gag cca gag cct gag att ctg teg cct ttg cag ccc				1488
Leu Gln Gly Phe Glu Pro Glu Pro Glu Ile Leu Ser Pro Leu Gln Pro	250	255	260	
cca ctc tgt ggg caa aca gtc tgt gac aat gtg gaa ttg atc tcc cag				1536
Pro Leu Cys Gly Gln Thr Val Cys Asp Asn Val Glu Leu Ile Ser Gln	265	270	275	
tac aat gga tac tgg ccc ctt cgg gga gag aag gtg ata cgc tac cag				1584

WO 02/32953

4

PCT/DK01/00695

```

Tyr Asn Gly Tyr Trp Pro Leu Arg Gly Glu Lys Val Ile Arg Tyr Gln
280                285                290                295

gtg gtg aac atc tgt gat gat gag ggc cta aac ccc att gtg agt gag 1632
Val Val Asn Ile Cys Asp Asp Glu Gly Leu Asn Pro Ile Val Ser Glu
300                305

gag cag att cgt ctg cag cac gag gca ctg aat gag gcc ttc agc cgc 1680
Glu Gln Ile Arg Leu Gln His Glu Ala Leu Asn Glu Ala Phe Ser Arg
315                320                325

tac aac atc agc tgg cag ctg agc gtc cac cag gtc cac aat tcc acc 1728
Tyr Asn Ile Ser Trp Gln Leu Ser Val His Gln Val His Asn Ser Thr
330                335                340

ctg cga cac cgg gtt gtg ctt gtg aac tgt gag ccc agc aag att ggc 1776
Leu Arg His Arg Val Val Leu Val Asn Cys Glu Pro Ser Lys Ile Gly
345                350                355

aat gac cat tgt gac ccc gag tgt gag cac cca ctc aca ggc tat gat 1824
Asn Asp His Cys Asp Pro Glu Cys Glu His Pro Leu Thr Gly Tyr Asp
360                365                370                375

ggg ggt gac tgc cgc ctg cag ggc cgc tgc tac tcc tgg aac cgc agg 1872
Gly Gly Asp Cys Arg Leu Gln Gly Arg Cys Tyr Ser Trp Asn Arg Arg
380                385                390

gat ggg ctc tgt cac gtg gag tgt aac aac atg ctg aac gac ttt gac 1920
Asp Gly Leu Cys His Val Glu Cys Asn Asn Met Leu Asn Asp Phe Asp
395                400                405

gac gga gac tgc tgc gac ccc cag gtg gct gat gtg cgc aag acc tgc 1968
Asp Gly Asp Cys Cys Asp Pro Gln Val Ala Asp Val Arg Lys Thr Cys
410                415                420

ttt gac cct gac tca ccc aag agg gca tac atg agt gtg aag gag ctg 2016
Phe Asp Pro Asp Ser Pro Lys Arg Ala Tyr Met Ser Val Lys Glu Leu
425                430                435

aag gag gcc ctg cag ctg aac agt act cac ttc ctc aac atc tac ttt 2064
Lys Glu Ala Leu Gln Leu Asn Ser Thr His Phe Leu Asn Ile Tyr Phe
440                445                450                455

gcc agc tca gtg cgg gaa gac ctt gca ggt gct gcc acc tgg cct tgg 2112
Ala Ser Ser Val Arg Glu Asp Leu Ala Gly Ala Ala Thr Trp Pro Trp
460                465                470

gac aag gac get gtc act cac ctg ggt ggc att gtc ctc agc cca gca 2160
Asp Lys Asp Ala Val Thr His Leu Gly Gly Ile Val Leu Ser Pro Ala
475                480                485

tat tat ggg atg cct ggc cac acc gac acc atg atc cat gaa gtg gga 2208
Tyr Tyr Gly Met Pro Gly His Thr Asp Thr Met Ile His Glu Val Gly
490                495                500

cat gtt ctg gga ctc tac cat gtc ttt aaa gga gtc agt gaa aga gaa 2256
His Val Leu Gly Leu Tyr His Val Phe Lys Gly Val Ser Glu Arg Glu
505                510                515

```

WO 02/32953

5

PCT/DK01/00695

```

tcc tgc aat gac ccc tgc aag gag aca gtg cca tcc atg gaa acg gga 2304
Ser Cys Asn Asp Pro Cys Lys Glu Thr Val Pro Ser Met Glu Thr Gly
520 525 530 535

gac ctc tgt gcc gac acc gcc ccc act ccc aag agt gag ctg tgc cgg 2352
Asp Leu Cys Ala Asp Thr Ala Pro Thr Pro Lys Ser Glu Leu Cys Arg
540 545 550

gaa cca gag ccc act agt gac acc tgt ggc ttc act cgc ttc cca ggg 2400
Glu Pro Glu Pro Thr Ser Asp Thr Cys Gly Phe Thr Arg Phe Pro Gly
555 560 565

gct cgg ttc acc aac tac atg agc tac acg gat gat aac tgc act gac 2448
Ala Pro Phe Thr Asn Tyr Met Ser Tyr Thr Asp Asp Asn Cys Thr Asp
570 575 580

aac ttc act cct aac caa gtg gcc cga atg cat tgc tat ttg gac cta 2496
Asn Phe Thr Pro Asn Gln Val Ala Arg Met His Cys Tyr Leu Asp Leu
585 590 595

gtc tat cag cag tgg act gaa agc aga aag ccc acc ccc atc ccc att 2544
Val Tyr Gln Gln Trp Thr Glu Ser Arg Lys Pro Thr Pro Ile Pro Ile
600 605 610 615

cca cct atg gtc atc gga cag acc aac aag tcc ctc act atc cac tgg 2592
Pro Pro Met Val Ile Gly Gln Thr Asn Lys Ser Leu Thr Ile His Trp
620 625 630

ctg cct cct att agt gga gtt gta tat gac agg gcc tca ggc agc ttg 2640
Leu Pro Pro Ile Ser Gly Val Val Tyr Asp Arg Ala Ser Gly Ser Leu
635 640 645

tgt ggc gct tgc act gaa gat ggg acc ttt cgt cag tat gtg cac aca 2688
Cys Gly Ala Cys Thr Glu Asp Gly Thr Phe Arg Gln Tyr Val His Thr
650 655 660

gct tcc tcc cgg cgg gtg tgt gac tcc tca ggt tat tgg acc cca gag 2736
Ala Ser Ser Arg Arg Val Cys Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Thr Pro Glu
665 670 675

gag gct gtg ggg cct cct gat gtg gat cag ccc tgc gag cca agc tta 2784
Glu Ala Val Gly Pro Pro Asp Val Asp Gln Pro Cys Glu Pro Ser Leu
680 685 690 695

cag gcc tgg agc cct gag gtc cac ctg tac cac atg aac atg acg gtc 2832
Gln Ala Trp Ser Pro Glu Val His Leu Tyr His Met Asn Met Thr Val
700 705 710

ccc tgc ccc aca gaa ggc tgt agc ttg gag ctg ctc ttc caa cac ccg 2880
Pro Cys Pro Thr Glu Gly Cys Ser Leu Glu Leu Leu Phe Gln His Pro
715 720 725

gtc caa gcc gac acc ctc acc ctg tgg gtc act tcc ttc ttc atg gag 2928
Val Gln Ala Asp Thr Leu Thr Leu Trp Val Thr Ser Phe Phe Met Glu
730 735 740

tcc tcg cag gtc ctc ttt gac aca gag atc ttg ctg gaa aac aag gag 2976
Ser Ser Gln Val Leu Phe Asp Thr Glu Ile Leu Leu Glu Asn Lys Glu
745 750 755

```

WO 02/32953

6

PCT/DK01/00695

tca gtg cac ctg ggc ccc tta gac act ttc tgt gac atc cca ctc acc 3024
 Ser Val His Leu Gly Pro Leu Asp Thr Phe Cys Asp Ile Pro Leu Thr
 760 765 770 775

atc aaa ctg cac gtg gat ggg aag gtg tgg ggg gtg aaa gtc tac acc 3072
 Ile Lys Leu His Val Asp Gly Lys Val Ser Gly Val Lys Val Tyr Thr
 780 785 790

ttt gat gag agg ata gag att gat gca gca ctc ctg act tct cag ccc 3120
 Phe Asp Glu Arg Ile Glu Ile Asp Ala Ala Leu Leu Thr Ser Gln Pro
 795 800 805

cac agt ccc ttg tgc tct ggc tgc agg cct gtg agg tac cag gtt ctc 3168
 His Ser Pro Leu Cys Ser Gly Cys Arg Pro Val Arg Tyr Gln Val Leu
 810 815 820

gpc gat ccc cca ttt gcc agt ggt ttg ccc gtg gtg gtg aca cat tct 3216
 Arg Asp Pro Pro Phe Ala Ser Gly Leu Pro Val Val Val Thr His Ser
 825 830 835

cac agg aag ttc acg gac gtg gag gtc aca cct gga cag atg tat cag 3264
 His Arg Lys Phe Thr Asp Val Glu Val Thr Pro Gly Gln Met Tyr Gln
 840 845 850 855

tac caa gtt cta gct gaa gct gga gga gaa ctg gga gaa gct tgg cct 3312
 Tyr Gln Val Leu Ala Glu Ala Gly Gly Glu Leu Gly Glu Ala Ser Pro
 860 865 870

cct ctg aac cac att cat gga gct cct tat tgt gga gat ggg aag gtg 3360
 Pro Leu Asn His Ile His Gly Ala Pro Tyr Cys Gly Asp Gly Lys Val
 875 880 885

tca gag aga ctg gga gaa gag tgt gat gat gga gac ctt gtg agc gga 3408
 Ser Glu Arg Leu Gly Glu Glu Cys Asp Asp Gly Asp Leu Val Ser Gly
 890 895 900

gat ggc tgc tcc aag gtg tgt gat gat gga gaa ggt ttc aac tgt gta 3456
 Asp Gly Cys Ser Lys Val Cys Glu Leu Glu Glu Gly Phe Asn Cys Val
 905 910 915

gga gag cca agc ctt tgc tac atg tat gag gga gat ggc ata tgt gaa 3504
 Gly Glu Pro Ser Leu Cys Tyr Met Tyr Glu Gly Asp Gly Ile Cys Glu
 920 925 930 935

cct ttt gag aga aaa acc agc att gta gac tgt ggc atc tac act ccc 3552
 Pro Phe Glu Arg Lys Thr Ser Ile Val Asp Cys Gly Ile Tyr Thr Pro
 940 945 950

aaa gga tac ttg gat caa tgg gct acc cgg gct tac tcc tct cat gaa 3600
 Lys Gly Tyr Leu Asp Gln Trp Ala Thr Arg Ala Tyr Ser Ser His Glu
 955 960 965

gac aag aag aag tgt cct gtt tcc ttg gta act gga gaa cct cat tcc 3648
 Asp Lys Lys Lys Cys Pro Val Ser Leu Val Thr Gly Glu Pro His Ser
 970 975 980

cta att tgc aca tca tac cat cca gat tta ccc aac cac cgt ccc cta 3696
 Leu Ile Cys Thr Ser Tyr His Pro Asp Leu Pro Asn His Arg Pro Leu

WO 02/32953

7

PCT/DK01/00695

985	990	995	
act ggc tgg ttt ccc tgt gtt gcc agt gaa aat gaa act cag gat gac			3744
Thr Gly Trp Phe Pro Cys Val Ala Ser Glu Asn Glu Thr Gln Asp Asp			
1000	1005	1010	1015
agg agt gaa cag cca gaa ggt agc ctg aag aaa gag gat gag gtt tgg			3792
Arg Ser Glu Gln Pro Glu Gly Ser Leu Lys Lys Glu Asp Glu Val Trp			
	1020	1025	1030
ctc aaa gtg tgt ttc aat aga cca gga gag gcc aga gca att ttt att			3840
Leu Lys Val Cys Phe Asn Arg Pro Gly Glu Ala Arg Ala Ile Phe Ile			
	1035	1040	1045
ttt ttg aca act gat ggc cta gtt ccc gga gag cat cag cag ccg aca			3888
Phe Leu Thr Thr Asp Gly Leu Val Pro Gly Glu His Gln Gln Pro Thr			
	1050	1055	1060
gtg act ctc tac ctg acc gat gtc cgt gga agc aac cac tct ctt gga			3936
Val Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Val Arg Gly Ser Asn His Ser Leu Gly			
	1065	1070	1075
acc tat gga ctg tca tgc cag cat aat cca ctg att atc aat gtg acc			3984
Thr Tyr Gly Leu Ser Cys Gln His Asn Pro Leu Ile Ile Asn Val Thr			
	1080	1085	1090
cat cac cag aat gtc ctt ttc cac cat acc acc tca gtg ctg ctg aat			4032
His His Gln Asn Val Leu Phe His His Thr Ser Val Leu Leu Asn			
	1100	1105	1110
ttc tca tcc cca cgg gtc gcc atc tca gct gtg gct cta agg aca tcc			4080
Phe Ser Ser Pro Arg Val Gly Ile Ser Ala Val Ala Leu Arg Thr Ser			
	1115	1120	1125
tcc cgc att ggt ctt tgc gct ccc agt aac tgc atc tca gag gac gag			4128
Ser Arg Ile Gly Leu Ser Ala Pro Ser Asn Cys Ile Ser Glu Asp Glu			
	1130	1135	1140
ggg cag aat cat cag gga cag agc tgt atc cat cgg ccc tgt ggg aag			4176
Gly Gln Asn His Gln Gly Gln Ser Cys Ile His Arg Pro Cys Gly Lys			
	1145	1150	1155
cag gac agc tgt ccg tca ttg ctg ctt gat cat gct gat gtg gtg aac			4224
Gln Asp Ser Cys Pro Ser Leu Leu Leu Asp His Ala Asp Val Val Asn			
	1160	1165	1170
gtg acc tct ata ggc cca ggt ctc atg aag tgt gct atc act tgt caa			4272
Cys Thr Ser Ile Gly Pro Gly Leu Met Lys Cys Ala Ile Thr Cys Gln			
	1180	1185	1190
agg gga ttt gcc ctt cag gcc agc agt ggg cag tac atc agg ccc atg			4320
Arg Gly Phe Ala Leu Gln Ala Ser Ser Gly Gln Tyr Ile Arg Pro Met			
	1195	1200	1205
cag aag gaa att ctg ctc aca tgt tct tct ggg cac tgg gac cag aat			4368
Gln Lys Glu Ile Leu Leu Thr Cys Ser Ser Gly His Trp Asp Gln Asn			
	1210	1215	1220
gtg agc tgc ctt ccc gtg gac tgc ggt gtt ccc gac cag tct ttg gtg			4416

WO 02/32953

8

PCT/DK01/00695

Val Ser Cys Leu Pro Val Asp Cys Gly Val Pro Asp Pro Ser Leu Val	
1225	1230 1235
aac tat gca aac ttc tcc tgc tca gag gga acc aaa ttt ctg aaa cgc	4464
Asn Tyr Ala Asn Phe Ser Cys Ser Glu Gly Thr Lys Phe Leu Lys Arg	
1240	1245 1250 1255
tgc tca atc tct tgt gtc cca cca gcc aag ctg caa gga ctg agc cca	4512
Cys Ser Ile Ser Cys Val Pro Pro Ala Lys Leu Gln Gly Leu Ser Pro	
	1260 1265 1270
tgg ctg aca tgt ctt gaa gat ggt ctc tgg tct ctc cct gaa gtc tac	4560
Trp Leu Thr Cys Leu Glu Asp Gly Leu Trp Ser Leu Pro Glu Val Tyr	
	1275 1280 1285
tgc aag ttg gag tgt gat gct ccc cct att att ctg aat gcc aac ttg	4608
Cys Lys Leu Glu Cys Asp Ala Pro Pro Ile Ile Leu Asn Ala Asn Leu	
	1290 1295 1300
ctc ctg cct cac tgc ctc cag gac aac cac gac gtg ggc acc atc tgc	4656
Leu Leu Pro His Cys Leu Gln Asp Asn His Asp Val Gly Thr Ile Cys	
	1305 1310 1315
aaa tat gaa tgc aaa cca ggg tac tat gtg gca gaa agt gca gag ggt	4704
Lys Tyr Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Tyr Val Ala Glu Ser Ala Glu Gly	
	1320 1325 1330 1335
aaa gtc agg aac aag ctc ctg aag ata caa tgc ctg gaa ggt gga atc	4752
Lys Val Arg Asn Lys Leu Leu Lys Ile Gln Cys Leu Glu Gly Gly Ile	
	1340 1345 1350
tgg gag caa ggc agc tgc att cct gtg gtg tgt gag cca ccc cct cct	4800
Trp Glu Gln Gly Ser Cys Ile Pro Val Val Cys Glu Pro Pro Pro Pro	
	1355 1360 1365
gtg ttt gaa ggc atg tat gaa tgt acc aat ggc ttc agc ctg gac agc	4848
Val Phe Glu Gly Met Tyr Glu Cys Thr Asn Gly Phe Ser Leu Asp Ser	
	1370 1375 1380
cag tgt gtg ctc aac tgt aac cag gaa cgt gaa aag ctt ccc atc ctc	4896
Gln Cys Val Leu Asn Cys Asn Gln Glu Arg Glu Lys Leu Pro Ile Leu	
	1385 1390 1395
tgc act aaa gag ggc ctg tgg acc cag gag ttt aag ttg tgt gag aat	4944
Cys Thr Lys Glu Gly Leu Trp Thr Gln Glu Phe Lys Leu Cys Glu Asn	
	1400 1405 1410 1415
ctg caa gga gaa tgc cca cca ccc ccc tca gag ctg aat tct gtg gag	4992
Leu Gln Gly Glu Cys Pro Pro Pro Pro Ser Glu Leu Asn Ser Val Glu	
	1420 1425 1430
tac aaa tgt gaa caa gga tat ggg att ggt gca gtg tgt tcc cca ttg	5040
Tyr Lys Cys Glu Gln Gly Tyr Gly Ile Gly Ala Val Cys Ser Pro Leu	
	1435 1440 1445
tgt gta atc ccc ccc agt gac ccc gtg atg cta cct gag aat atc act	5088
Cys Val Ile Pro Pro Ser Asp Pro Val Met Leu Pro Glu Asn Ile Thr	
	1450 1455 1460

WO 02/32953

9

PCT/DK01/00695

gct gac act ctg gag cac tgg atg gaa cct gtc aaa gtc cag agc att 5136
 Ala Asp Thr Leu Glu His Trp Met Glu Pro Val Lys Val Gln Ser Ile
 1465 1470 1475

gtg tgc act ggc cgg cgt caa tgg cac cca gac ccc gtc tta gtc cac 5184
 Val Cys Thr Gly Arg Arg Gln Trp His Pro Asp Pro Val Leu Val His
 1480 1485 1490 1495

tgc atc cag tca tgt gag ccc ttc caa gca gat ggt tgg tgt gac act 5232
 Cys Ile Gln Ser Cys Glu Pro Phe Gln Ala Asp Gly Trp Cys Asp Thr
 1500 1505 1510

atc aac aac cga gcc tac tgc cac tat gac ggg gga gac tgc tgc tct 5280
 Ile Asn Asn Arg Ala Tyr Cys His Tyr Asp Gly Gly Ala Ala Asp Cys Ser
 1515 1520 1525

tcc aca ctc tcc tcc aag aag gtc att cca ttt gct gct gac tgt gac 5328
 Ser Thr Leu Ser Ser Lys Lys Val Ile Pro Phe Ala Ala Asp Cys Asp
 1530 1535 1540

ctg gat gag tgc acc tgc cgg gac ccc aag gca gaa gaa aat cag taa 5376
 Leu Asp Glu Cys Thr Cys Arg Asp Pro Lys Ala Glu Glu Asn Gln
 1545 1550 1555

ctgtgggaac aagccctccc ctccactgcc tcagaggcag taagaagag aggcogacc 5436
 .aggaggaaac aaaggtgaa tgaagaagaa caatcatgaa atggaagaag gaggaagagc 5496
 atgaaggatc ttataagaaa tgcaagagga tattgatagg tgtgaactag ttcatacaat 5556
 agcccaagta ggagagaatc ataggcaaaa gtttctttaa agtggcagtt gattaacatg 5616
 gaaggggaaa tatgatagat atataaggac cctcctccct cacttatatt ctattaatc 5676
 ctatcctcaa ctcttgcct gctctccgct ccacccctg ccaactactc agtcccacc 5736
 aacttgtaaa ccaataccaa aatactagag gagaagttgg cagggatact gttaataccc 5796
 attttgaatg gattgccatc tticagagct tgcctgctct caactggctc ttttctttt 5856
 tgtgtagttt cccttaaata atgaagttag ttaltaatc ttataagta tttaacata 5916
 attatataaa tatattatat atattatatt ttttgctgtt tactaagcta aaaattatc 5976
 atgttccac acatgctgct gtgaagtcca cattcaagat gaatgttgag actttgagga 6036
 cagaaaggca acttatttcc ccatcttctc atggatgagg attggcaggt tgaatggaa 6096
 gtacagaagg agagagagta attagatgga attctggatg ctagcatgta aagctaata 6156
 tctttttttt tatgacctgg gagctggccc cattttatga ccaaggagat ggggagttgg 6216
 aatggtgga ctaaggagca taggaagttg agtgtgaata ccattggtga tgggtccag 6276
 agaactagac tatggttctt gaatatctgt ccacaaagaa tatactaact ttgtcaact 6336
 tctcagaact cccaactgga gtgggtgaga cctaggattt tctgcactic cacacatgcc 6396
 tgttcoaagt gtgctgtca gccagtcac aagtttgtac tatggccat tctctgatca 6456

WO 02/32953

10

PCT/DK01/00695

ccaggattac aggaactcac acactcctca tacttggcct gtagtectac ttctgttag 6516
aagtctccaa gtctggccag tcacatgacc aagtgttgat tttctggag gaaaaatttt 6576
atggaatga tataggggaa aggtgggagg agatgaaaga acaggcaaga gctgtcaggg 6636
ttaaattccag gcccgggcat gagaatgaa gtgatcaggg agactcggtc cttgttccaa 6696
gtctccaaag aagaccaaag tgggtccott gagcaatgaa gaactcggaga taaattcctc 6756
tcaagtatca tgtacaaaat ctgtgagcca gagattttga ctgtgagcaag ccatggaaat 6816
gcatggagca aggggtgacac tctgtgggga gacagaagaa ttccaactat ttaatgtcca 6876
ttttgttgtt tttacccttt cttatccaat agatggaatg cacatgaaat gaccatatta 6936
agcctctctc tatttacatc ccaggctcac tgggatgtga tctactcgag ttacattttc 6996
ttgtaacggt ttctggatta gacctagggt aaagtgagta agggaccagt ttctgtttaa 7056
cattctagtt ttactcattt taggaaggct gtgagtgagg cttgtctctc ttaaagtttc 7116
ttctccaatg gaaaccaaga acagacaaaa tttagagctc agctgtggtc tcttctcacc 7176
ttctgtctct ttgctttgac cacagttttt ctactcttcc catcaacact agagcaatgg 7236
ctgtgcaaat aggaatagga aatactacca caatgataga aatattatcc acactatcac 7296
gtagggaga acaatctctc gaaagagaat aaaaacgaa taagggtgat taccacatt 7356
aatctgtggg ttgttggaaat gagggttgya aagttattgg gaaaaggaaa gacagagtt 7416
caccattca aaaaaaacct ttgtctactc aatctctagt gtaagaaaa tgtagttcag 7476
ataccattca ttgtcttggg tcatgcttag tgccccaag aagacaaaca tattattct 7536
tgggattctg ataggcttca atatgcaag gacatggaa aagtttagac actctatttt 7596
caaaatttta taaacttggt ttatbgggga aaatgtcaa attgttagac acattctaag 7656
ttctgccttg gagaatccta ctttgtctga gattgagga gaggaattgt tatctgggc 7716
attactcagc tcaggaaacat ggagcctgtg gttcatgcca gtgtgtgtct tcatgcagtc 7776
tctccacaag agcaacagta agaacatttc tgttttaaat ttcattttaa aatattttat 7836
tatctgcaat tcaccactgc tctgggaaag caaaaggaaa gttcctgttg tgtgtgaaga 7896
gcctcttagc ctataaggct tcccagccat agtcagctat agctattcag agacagcagg 7956
ttcttccagt cttgttctc gggactgat gttttgagca actcaggtca ctgataaagt 8016
ggaaggacta agacactgtg gtcacagatc ccagcaacat caactcacac tcaatccatg 8076
tgggtgtcca cattctgcta ctcttatcca cccatgtggt cattgagagc ctttctcaga 8136
gactctctg tgtgtttgat tgtgccagg tggccagggt ctgctggct ctaacaacta 8196

WO 02/32953

PCT/DK01/00695

11

gcgatgacagc ctccaatcag aaaggcaggt aaggggacag ggtgaggaga atgggcagat 8256
 actgacagaa attaaagtaa agggattgtg aaagtaaga gctcttctctg attctcatct 8316
 tctctttttt ctattacaag gcattgaact tggcacttcc tgtattcttt gtgatcacta 8376
 ttgagtgcac tagttaacac ccaaggggat ggcttgattg ggaatgtagt gaaaggagct 8436
 gatctactgt attgtaatgt aaaaacagcta cagccagtta ttttgtaaga ttataagttg 8496
 ttcattaaaa aatcagcaca caaaatatga a 8527

<210> 2
 <211> 1791
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Met Cys Leu Lys Ile Leu Arg Ile Ser Leu Ala Ile Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Trp Ala Leu Cys Ser Ala Asn Ser Glu Leu Gly Trp Thr Arg Lys Lys
 20 25 30
 Ser Leu Val Glu Arg Glu His Leu Asn Gln Val Leu Leu Glu Gly Glu
 35 40 45
 Arg Cys Trp Leu Gly Ala Lys Val Arg Arg Pro Arg Ala Ser Pro Gln
 50 55 60
 His His Leu Phe Gly Val Tyr Pro Ser Arg Ala Gly Asn Tyr Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Tyr Pro Val Gly Glu Gln Glu Ile His His Thr Gly Arg Ser Lys
 85 90 95
 Pro Asp Thr Glu Gly Asn Ala Val Ser Leu Val Pro Pro Asp Leu Thr
 100 105 110
 Glu Asn Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala Val Glu Glu Pro Ala Ala Pro
 115 120 125
 Trp Val Gly Asp Ser Pro Ile Gly Gln Ser Glu Leu Leu Gly Asp Asp
 130 135 140
 Asp Ala Tyr Leu Gly Asn Gln Arg Ser Lys Glu Ser Leu Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Gly Ile Gln Lys Gly Ser Ala Met Ala Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ile
 165 170 175
 Phe Thr Thr Leu Asn Glu Pro Lys Pro Glu Thr Gln Arg Arg Gly Trp
 180 185 190
 Ala Lys Ser Arg Gln Arg Arg Gln Val Trp Lys Arg Arg Ala Glu Asp
 195 200 205
 Gly Gln Gly Asp Ser Gly Ile Ser Ser His Phe Gln Pro Trp Pro Lys
 210 215 220
 His Ser Leu Lys His Arg Val Lys Lys Ser Pro Pro Glu Glu Ser Asn
 225 230 235 240
 Gln Asn Gly Gly Glu Gly Ser Tyr Arg Glu Ala Glu Thr Phe Asn Ser
 245 250 255
 Gln Val Gly Leu Pro Ile Leu Tyr Phe Ser Gly Arg Arg Glu Arg Leu
 260 265 270
 Leu Leu Arg Pro Glu Val Leu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Ala Phe Thr
 275 280 285
 Val Glu Ala Trp Val Lys Pro Glu Gly Gly Gln Asn Asn Pro Ala Ile
 290 295 300
 Ile Ala Gly Val Phe Asp Asn Cys Ser His Thr Val Ser Asp Lys Gly
 305 310 315 320

WO 02/32953

12

PCT/DK01/00695

Trp Ala Leu Gly Ile Arg Ser Gly Lys Asp Lys Gly Lys Arg Asp Ala
 325 330 335
 Arg Phe Phe Phe Ser Leu Cys Thr Asp Arg Val Lys Lys Ala Thr Ile
 340 345 350
 Leu Ile Ser His Ser Arg Tyr Gln Pro Gly Thr Trp Thr His Val Ala
 355 360 365
 Ala Thr Tyr Asp Gly Arg His Met Ala Leu Tyr Val Asp Gly Thr Gln
 370 375 380
 Val Ala Ser Ser Leu Asp Gln Ser Gly Pro Leu Asn Ser Pro Phe Met
 385 390 395 400
 Ala Ser Cys Arg Ser Leu Leu Leu Gly Gly Asp Ser Ser Glu Asp Gly
 405 410 415
 His Tyr Phe Arg Gly His Leu Gly Thr Leu Val Phe Trp Ser Thr Ala
 420 425 430
 Leu Pro Gln Ser His Phe Gln His Ser Ser Gln His Ser Ser Gly Glu
 435 440 445
 Glu Glu Ala Thr Asp Leu Val Leu Thr Ala Ser Phe Glu Pro Val Asn
 450 455 460
 Thr Glu Trp Val Pro Phe Arg Asp Glu Lys Tyr Pro Arg Leu Glu Val
 465 470 475 480
 Leu Gln Gly Phe Glu Pro Glu Pro Glu Ile Leu Ser Pro Leu Gln Pro
 485 490 495
 Pro Leu Cys Gly Gln Thr Val Cys Asp Asn Val Glu Leu Ile Ser Gln
 500 505 510
 Tyr Asn Gly Tyr Trp Pro Leu Arg Gly Glu Lys Val Ile Arg Tyr Gln
 515 520 525
 Val Val Asn Ile Cys Asp Asp Glu Gly Leu Asn Pro Ile Val Ser Glu
 530 535 540
 Glu Gln Ile Arg Leu Gln His Glu Ala Leu Asn Glu Ala Phe Ser Arg
 545 550 555 560
 Tyr Asn Ile Ser Trp Gln Leu Ser Val His Gln Val His Asn Ser Thr
 565 570 575
 Leu Arg His Arg Val Val Leu Val Asn Cys Glu Pro Ser Lys Ile Gly
 580 585 590
 Asn Asp His Cys Asp Pro Glu Cys Glu His Pro Leu Thr Gly Tyr Asp
 595 600 605
 Gly Gly Asp Cys Arg Leu Gln Gly Arg Cys Tyr Ser Trp Asn Arg Arg
 610 615 620
 Asp Gly Leu Cys His Val Glu Cys Asn Asn Met Leu Asn Asp Phe Asp
 625 630 635 640
 Asp Gly Asp Cys Cys Asp Pro Gln Val Ala Asp Val Arg Lys Thr Cys
 645 650 655
 Phe Asp Pro Asp Ser Pro Lys Arg Ala Tyr Met Ser Val Lys Glu Leu
 660 665 670
 Lys Glu Ala Leu Gln Leu Asn Ser Thr His Phe Leu Asn Ile Tyr Phe
 675 680 685
 Ala Ser Ser Val Arg Glu Asp Leu Ala Gly Ala Ala Thr Trp Pro Trp
 690 695 700
 Asp Lys Asp Ala Val Thr His Leu Gly Gly Ile Val Leu Ser Pro Ala
 705 710 715 720
 Tyr Tyr Gly Met Pro Gly His Thr Asp Thr Met Ile His Glu Val Gly
 725 730 735
 His Val Leu Gly Leu Tyr His Val Phe Lys Gly Val Ser Glu Arg Glu
 740 745 750
 Ser Cys Asn Asp Pro Cys Lys Glu Thr Val Pro Ser Met Glu Thr Gly
 755 760 765
 Asp Leu Cys Ala Asp Thr Ala Pro Thr Pro Lys Ser Glu Leu Cys Arg
 770 775 780
 Glu Pro Glu Pro Thr Ser Asp Thr Cys Gly Phe Thr Arg Phe Pro Gly

WO 02/32953

13

PCT/DK01/00695

785 - 790 795 800
Ala Pro Phe Thr Asn Tyr Met Ser Tyr Thr Asp Asp Asn Cys Thr Asp
805 810 815
Asn Phe Thr Pro Asn Gln Val Ala Arg Met His Cys Tyr Leu Asp Leu
820 825 830
Val Tyr Gln Gln Trp Thr Glu Ser Arg Lys Pro Thr Pro Ile Pro Ile
835 840 845
Pro Pro Met Val Ile Ser Gly Gln Thr Asn Lys Ser Leu Thr Ile His Trp
850 855 860
Leu Pro Pro Ile Ser Gly Val Val Tyr Asp Arg Ala Ser Gly Ser Leu
865 870 875 880
Cys Gly Ala Cys Thr Glu Asp Gly Thr Phe Arg Gln Tyr Val His Thr
885 890 895
Ala Ser Ser Arg Arg Val Cys Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Thr Pro Glu
900 905 910
Glu Ala Val Gly Pro Pro Asp Val Asp Gln Pro Cys Glu Pro Ser Leu
915 920 925
Gln Ala Trp Ser Pro Glu Val His Leu Tyr His Met Asn Met Thr Val
930 935 940
Pro Cys Pro Thr Glu Gly Cys Ser Leu Glu Leu Leu Phe Gln His Pro
945 950 955 960
Val Gln Ala Asp Thr Leu Thr Leu Trp Val Thr Ser Phe Phe Met Glu
965 970 975
Ser Ser Gln Val Leu Phe Asp Thr Glu Ile Leu Leu Glu Asn Lys Glu
980 985 990
Ser Val His Leu Gly Pro Leu Asp Thr Phe Cys Asp Ile Pro Leu Thr
995 1000 1005
Ile Lys Leu His Val Asp Gly Lys Val Ser Gly Val Lys Val Tyr Thr
1010 1015 1020
Phe Asp Glu Arg Ile Glu Ile Asp Ala Ala Leu Leu Thr Ser Gln Pro
1025 1030 1035 1040
His Ser Pro Leu Cys Ser Gly Cys Arg Pro Val Arg Tyr Gln Val Leu
1045 1050 1055
Arg Asp Pro Pro Phe Ala Ser Gly Leu Pro Val Val Val Thr His Ser
1060 1065 1070
His Arg Lys Phe Thr Asp Val Glu Val Thr Pro Gly Gln Met Tyr Gln
1075 1080 1085
Tyr Gln Val Leu Ala Glu Ala Gly Gly Glu Leu Gly Glu Ala Ser Pro
1090 1095 1100
Pro Leu Asn His Ile His Gly Ala Pro Tyr Cys Gly Asp Gly Lys Val
1105 1110 1115 1120
Ser Glu Arg Leu Gly Glu Cys Asp Asp Gly Asp Leu Val Ser Gly
1125 1130 1135
Asp Gly Cys Ser Lys Val Cys Glu Leu Glu Glu Gly Phe Asn Cys Val
1140 1145 1150
Gly Glu Pro Ser Leu Cys Tyr Met Tyr Glu Gly Asp Gly Ile Cys Glu
1155 1160 1165
Pro Phe Glu Arg Lys Thr Ser Ile Val Asp Cys Gly Ile Tyr Thr Pro
1170 1175 1180
Lys Gly Tyr Leu Asp Gln Trp Ala Thr Arg Ala Tyr Ser Ser His Glu
1185 1190 1195 1200
Asp Lys Lys Lys Cys Pro Val Ser Leu Val Thr Gly Glu Pro His Ser
1205 1210 1215
Leu Ile Cys Thr Ser Tyr His Pro Asp Leu Pro Asn His Arg Pro Leu
1220 1225 1230
Thr Gly Trp Phe Pro Cys Val Ala Ser Glu Asn Glu Thr Gln Asp Asp
1235 1240 1245
Arg Ser Glu Gln Pro Glu Gly Ser Leu Lys Lys Glu Asp Glu Val Trp
1250 1255 1260

WO 02/32953

14

PCT/DK01/00695

Leu Lys Val Cys Phe Asn Arg Pro Gly Glu Ala Arg Ala Ile Phe Ile
 1265 1270 1275 1280
 Phe Leu Thr Thr Asp Gly Leu Val Pro Gly Glu His Gln Gln Pro Thr
 1285 1290 1295
 Val Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Val Arg Gly Ser Asn His Ser Leu Gly
 1300 1305 1310
 Thr Tyr Gly Leu Ser Cys Gln His Asn Pro Leu Ile Ile Asn Val Thr
 1315 1320 1325
 His His Gln Asn Val Leu Phe His His Thr Thr Ser Val Leu Leu Asn
 1330 1335 1340
 Phe Ser Ser Pro Arg Val Gly Ile Ser Ala Val Ala Leu Arg Thr Ser
 1345 1350 1355 1360
 Ser Arg Ile Gly Leu Ser Ala Pro Ser Asn Cys Ile Ser Glu Asp Glu
 1365 1370 1375
 Gly Gln Asn His Gln Gly Gln Ser Cys Ile His Arg Pro Cys Gly Lys
 1380 1385 1390
 Gln Asp Ser Cys Pro Ser Leu Leu Leu Asp His Ala Asp Val Val Asn
 1395 1400 1405
 Cys Thr Ser Ile Gly Pro Gly Leu Met Lys Cys Ala Ile Thr Cys Gln
 1410 1415 1420
 Arg Gly Phe Ala Leu Gln Ala Ser Ser Gly Gln Tyr Ile Arg Pro Met
 1425 1430 1435 1440
 Gln Lys Glu Ile Leu Leu Thr Cys Ser Ser Gly His Trp Asp Gln Asn
 1445 1450 1455
 Val Ser Cys Leu Pro Val Asp Cys Gly Val Pro Asp Pro Ser Leu Val
 1460 1465 1470
 Asn Tyr Ala Asn Phe Ser Cys Ser Glu Gly Thr Lys Phe Leu Lys Arg
 1475 1480 1485
 Cys Ser Ile Ser Cys Val Pro Ala Lys Leu Gln Gly Leu Ser Pro
 1490 1495 1500
 Trp Leu Thr Cys Leu Glu Asp Gly Leu Trp Ser Leu Pro Glu Val Tyr
 1505 1510 1515 1520
 Cys Lys Leu Glu Cys Asp Ala Pro Pro Ile Ile Leu Asn Ala Asn Leu
 1525 1530 1535
 Leu Leu Pro His Cys Leu Gln Asp Asn His Asp Val Gly Thr Ile Cys
 1540 1545 1550
 Lys Tyr Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Tyr Val Ala Glu Ser Ala Glu Gly
 1555 1560 1565
 Lys Val Arg Asn Lys Leu Leu Lys Ile Gln Cys Leu Glu Gly Gly Ile
 1570 1575 1580
 Trp Glu Gln Gly Ser Cys Ile Pro Val Val Cys Glu Pro Pro Pro
 1585 1590 1595 1600
 Val Phe Glu Gly Met Tyr Glu Cys Thr Asn Gly Phe Ser Leu Asp Ser
 1605 1610 1615
 Gln Cys Val Leu Asn Cys Asn Gln Glu Arg Glu Lys Leu Pro Ile Leu
 1620 1625 1630
 Cys Thr Lys Glu Gly Leu Trp Thr Gln Glu Phe Lys Leu Cys Glu Asn
 1635 1640 1645
 Leu Gln Gly Glu Cys Pro Pro Pro Ser Glu Leu Asn Ser Val Glu
 1650 1655 1660
 Tyr Lys Cys Glu Gln Gly Tyr Gly Ile Gly Ala Val Cys Ser Pro Leu
 1665 1670 1675 1680
 Cys Val Ile Pro Pro Ser Asp Pro Val Met Leu Pro Glu Asn Ile Thr
 1685 1690 1695
 Ala Asp Thr Leu Glu His Trp Met Glu Pro Val Lys Val Gln Ser Ile
 1700 1705 1710
 Val Cys Thr Gly Arg Arg Gln Trp His Pro Asp Pro Val Leu Val His
 1715 1720 1725
 Cys Ile Gln Ser Cys Glu Pro Phe Gln Ala Asp Gly Trp Cys Asp Thr

WO 02/32953

15

PCT/DK01/00695

1730 1735 1740
Ile Asn Asn Arg Ala Tyr Cys His Tyr Asp Gly Gly Asp Cys Cys Ser
1745 1750 1755 1760
Ser Thr Leu Ser Ser Lys Lys Val Ile Pro Phe Ala Ala Asp Cys Asp
 1765 1770 1775
Leu Asp Glu Cys Thr Cys Arg Asp Pro Lys Ala Glu Glu Asn Gln
 1780 1785 1790

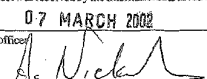
PCT/DK01/00695

Applicant's or agent's file reference number	P 495 PC00	International application No.
--	------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 136is)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 20, line 25	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures))	
Address of depositary institution (including postal code and country): Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig GERMANY	
Date of deposit: 19 October 2000	Accession Number: DSM 13783
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicant hereby requests that deposited biological material identified herein shall be made available only by the issue of a sample to an expert nominated by the requester and approved either i) by the Applicant or ii) by a National Office of a Designated State or an Elected State, whichever applies.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: 07 MARCH 2002
Authorized officer	Authorized officer: 

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/032953 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/37, C12N 9/64 // G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/DK01/00695
- (22) International Filing Date: 19 October 2001 (19.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PA 2000 01571 20 October 2000 (20.10.2000) DK 60/241,840 20 October 2000 (20.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): COMO BIOTECH APS [DK/DK]; Gustav Wieds Vej 10C, DK-8000 Aarhus C (DK).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

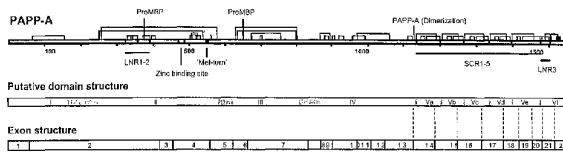
Published:
— with international search report
with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): OXVIG, Claus [DK/DK]; Seskrænten 36, DK-8260 Viby J (DK); OVERGAARD, Michael, Toft [DK/DK]; Janus la Cours Gade 12, st. th., DK-8000 Aarhus C (DK).
- (74) Agent: HOIBERG APS; St. Kongensgade 59B, DK-1264 Copenhagen K (DK).

- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
- (88) Date of publication of the international search report: 9 January 2003

[Continued on next page]

(54) Title: PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A2 (PAPP-A2)



(57) Abstract: The present invention provides nucleotide and amino acid sequences that identify and encode a new protein with homology to pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). We denote this protein PAPP-A2. The cDNA encoding PAPP-A2 was derived from human placenta. The present invention also provides for antisense molecules to the nucleotide sequences which encode PAPP-A2, expression vectors for the production of purified PAPP-A2, antibodies capable of binding specifically to PAPP-A2, hybridization probes or oligonucleotides for the detection of PAPP-A2-encoding nucleotide sequences, genetically engineered host cells for the expression of PAPP-A2, use of the protein to produce antibodies capable of binding specifically to the protein, methods for screening for pathologies in pregnant and non-pregnant patients that are based on detection of PAPP-A2 antigen in human body fluids or PAPP-A2-encoding nucleic acid molecules, use of the protein to screen for agents that alter the protease activity of PAPP-A2, use of the protein as a therapeutic target for such agents, and use of the protein as a therapeutic agent in relevant pathological states. Methods for screening for altered focal proliferation states in pregnant and/or non-pregnant patients, which include detecting levels of PAPP-A2, are also described. The present invention also provides the identification of a natural substrate of PAPP-A2, insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5.



WO 02/032953 A3

WO 02/032953 A3 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DK 01/00695
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/37 C12N9/64 //G01N33/68		
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) IPC 7 C12Q C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAWRENCE J B ET AL: "The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A." PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 96, March 1999 (1999-03), pages 3149-3153, XP002902423 the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA- HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No. 2. --- -/--	1-62
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2002		Date of mailing of the international search report 26. 08. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Fernando Farieta

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK 01/00695

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRISTENSEN T ET AL: "Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA." BIOCHEMISTRY, vol. 33, 1994, pages 1592-1598, XP002902424 the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2. ---	1-62
X	OVERGAARD M T ET AL: "Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 40, 6 October 2000 (2000-10-06), pages 31128-31133, XP002902425 the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2 ---	1-67
X	OXVIG C ET AL: "Identification of angiotensinogen and complement C3dg as novel proteins binding the proform of eosinophil major basic protein in human pregnancy serum and plasma." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 23, 9 June 1995 (1995-06-09), pages 13645-13651, XP002902426 the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2. --- -/--	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK 01/00695

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>OVERGAARD M T ET AL: "Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: Expression in human reproductive and nonreproductive tissues." BIOLOGY AND REPRODUCTION, vol. 61, 1999, pages 1083-1089, XP002902427</p> <p>the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2.</p> <p>---</p>	1-62
X	<p>BONNO M ET AL: "Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta." LABORATORY INVESTIGATION, vol. 71, no. 4, 1994, pages 560-566, XP002902428</p> <p>& DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. I D. No 2</p> <p>---</p>	1-62
A	---	63-67
P,X	<p>PAGE N M ET AL: "The characterization of pregnancy associated plasma protein-E and the identification of an alternative splice variant." PLACENTA, vol. 22, 2001, pages 681-687, XP002902429</p> <p>the whole document & DATABASE EMBL [Online] PAPA-HUMAN, Q13219, Q08371, Q9UDK7.; 16 October 2001 (2001-10-16) 46% Identity in 1627 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2.</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK 01/00695

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>OVERGAARD M T ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 24, 16 June 2001 (2001-06-16), pages 21849-21853, XP002902430 the whole document & DATABASE EMBL [Online] Q9BXP8; XP000000008 100% identity in 1791 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2.</p>	1-62
X	<p>FARR M ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein-E (PAPP-E)" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1493, no. 3, 2 October 2000 (2000-10-02), pages 356-362, XP004275781 ISSN: 0167-4781 the whole document & DATABASE EMBL [Online] Q9H4C9; 1 March 2001 (2001-03-01) 99% identity in 1624 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2.</p>	1-62
X	<p>CHRISTIANSEN M ET AL: "Quantification and characterization of pregnancy-associated complexes of angiotensinogen and the proform of eosinophil major basic protein in serum and amniotic fluid." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 8, 2000, pages 1099-1105, XP002992701 the whole document</p>	63-67
X	<p>OXVIG C ET AL: "Circulation human pregnancy-associated plasma protein-A 1s disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 17, 1993, pages 12243-12246, XP002902702 the whole document</p>	63-67
A	<p>WD 00 54806 A (OXVIG CLAUS ;OVERGAARD MICHAEL TOFT (DK); MAYO FOUNDATION (US); CO) 21 September 2000 (2000-09-21) claims 1-36</p>	1-62

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/DK 01/00695

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 01 75067 A (HYSEQ INC) 11 October 2001 (2001-10-11) & DATABASE EMBL [Online] AB6 11138; 18 February 2002 (2002-02-18) 46% Identity in 1752 a.a. overlap with SEQ. ID. No 2.	1-62
P,A	--- ERICKSON G F ET AL: "The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors." FERTILITY AND STERILITY, vol. 76, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 943-949, XP002902431 page 947	1-62
P,A	--- GORDON C S SMITH ET AL: "Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth" THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 87, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 1762-1767, XP002902703 the whole document	63-67
A	--- WO 01 95855 A (TSCHESCHE H ET AL) 20 December 2001 (2001-12-20) claims 1-12	1-62
A	--- GIUDICE L C ET AL: "Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: Evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation." THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 87, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 2359-2366, XP002902704 the whole document	63-67
A	--- WALD N J ET AL: "First trimester serum screening for down's syndrome." PRENATAL DIAGNOSIS, vol. 15, 1995, pages 1227-1240, XP002902432 the whole document	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/DK 01/00695
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 61 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1, 12 and 53-54, 56-60. 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, part of the additional fees are to be refunded.	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK 01/00695

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 61

Claim 61 relates to a method of treatment of the human or animal body by therapy /diagnostic method practised on the human or animal body/ Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for this claim. The search has been based on the alleged effects of the composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 12 and 53-54, 56-60.

Present claims 1 and 12 relate to a purified polynucleotide defined by reference to a desirable characteristic or property, namely:

- * Having a proteolytic activity specific for IGFBP-5.
- * Being recognised by an antibody.
- * Binding to a cell surface receptor.

The claims cover all polynucleotides having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such polynucleotides. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the polynucleotide by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the polynucleotide of SEQ ID No. 2.

The terms "inhibitory agent or enhancing agent" used in claim 53-54 and 56-60 are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear (Article 6 PCT).

An attempt is made to define the "agent" by reference to a result to be achieved (inhibitor or enhancing). Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International

International Application No. PCT/DK 01/00695

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/DK 01/00695

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 2-11, 13-52, 55, 62 and part of claims 1, 12, 53-54, 56-60

A polynucleotide (SEQ. ID. No 1) and the corresponding polypeptide (SEQ. ID. No 2), relating to PAPP-A2, according to claims 2-11, 13-52, 55, 62 and part of claims 1, 12, 53-54, 56-60.

2. Claims: 63-67

A method for diagnosing a clinical condition, measuring the level of protein-complex in a body sample, according to claims 63-67.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DK 01/00695

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0054806 A	21-09-2000	AU 3627800 A	04-10-2000
		EP 1169058 A1	09-01-2002
		WO 0054806 A1	21-09-2000
WO 0175067 A	11-10-2001	AU 3486501 A	14-08-2001
		AU 3995501 A	12-09-2001
		AU 4925101 A	15-10-2001
		AU 4972801 A	15-10-2001
		AU 5119401 A	15-10-2001
		AU 5521401 A	15-10-2001
		WO 0157266 A1	09-08-2001
		WO 0164839 A2	07-09-2001
		WO 0175067 A2	11-10-2001
		WO 0175064 A2	11-10-2001
		WO 0174836 A1	11-10-2001
		WO 0175093 A1	11-10-2001
		US 2002061567 A1	23-05-2002
		WO 0195855 A	20-12-2001
WO 0195855 A2	20-12-2001		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/10	4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 7
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/64 Z	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 9/64	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 21/77 Z	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 21/78 C	
G 0 1 N 21/77	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/50 P	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/68	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00 A	
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R, O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 クラウス・オクスヴィッヒ

デンマーク、デーコー - 8 2 6 0 ヴィビー・ヨズ、セスクレンテン 3 6 番

(72) 発明者 ミカエル・トフト・オーヴァーゴード

デンマーク、デーコー - 8 0 0 0 オールフス・セ、ヤヌス・ラ・クール・ギャーゼ 1 2 番、ストゥエン・テル・ヘイレ

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB20 CB01 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03
 2G054 AB03 AB04 CA22 CA23 EA03 GA04
 4B024 AA01 AA11 BA14 BA53 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20
 DA02 DA03 EA04 FA01 GA03 GA11 GA18 GA25 HA03 HA11
 HA13 HA14 HA17
 4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 EE01 FF14E LL01 LL03 LL05
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ36 QQ41 QQ43 QQ53

QQ61 QQ89 QQ95 QR08 QR16 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56
QR58 QR62 QR77 QR80 QS16 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01
QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA01
BA02 BA16 BB01 BC01 BD14 CA33 CA43 CA44 CA46
4C084 AA01 AA13 AA17 BA02 BA08 BA22 CA17 ZA36 ZA45 ZA97
ZB15 ZB22 ZB26 ZC02 ZC51 ZC78
4C086 AA01 EA16 ZC78
4C087 AA03 BB33 ZC78
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA71 FA72

【要約の続き】

、および関係する病態における治療剤としての該蛋白の使用を提供する。妊娠しているおよび/または妊娠していない患者において、異常な局所性の増殖状態（検出されるPAPP-A2量を含む）に対するスクリーニング法も示されている。本発明はまた、PAPP-A2の天然の基質である、インシュリン様成長因子結合蛋白、(IGFBP)-5の同定を提供する。

专利名称(译)	妊娠関連血浆蛋白-A2(PAPP-A2)		
公开(公告)号	JP2004511253A	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002536334	申请日	2001-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	COMO BIOTECH		
申请(专利权)人(译)	科莫生物恩VACANCES细胞Sukabu		
[标]发明人	クラウスオクスヴィッヒ ミカエルトフトオーヴァーゴード		
发明人	クラウス・オクスヴィッヒ ミカエル・トフト・オーヴァーゴード		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P29/00 C12N9/6489 C07K14/4715 C07K2319/21 C07K2319/41 C12Q1/37 C12Q1/6876 G01N33/689 G01N2333/96486 G01N2500/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/10 A61P19 /02 A61P19/10 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N21/77.Z G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50. P G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B G01N33/68 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045 /FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024 /CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA25 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024 /HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063 /QR56 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064 /CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065 /AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065 /BA02 4B065/BA16 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/CA33 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /CA17 4C084/ZA36 4C084/ZA45 4C084/ZA97 4C084/ZB15 4C084/ZB22 4C084/ZB26 4C084/ZC02 4C084/ZC51 4C084/ZC78 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/ZC78 4C087/AA03 4C087/BB33 4C087 /ZC78 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	200001571 2000-10-20 DK 60/241840 2000-10-20 US		
其他公开文献	JP2004511253A5 JP4460829B2		

摘要(译)

本发明提供了鉴定与编码与妊娠相关血浆蛋白-A (PAPP-A) 同源的新蛋白的核苷酸和氨基酸序列。 我们将该蛋白称为PAPP-A2。 编码PAPP-A2的cDNA源自人胎盘。 本发明还提供了针对编码PAPP-A2的核苷酸序列的反义分子, 该表达载体用于产生纯化的PAPP-A2, 该表达载体能够特异性结合PAPP-A2, 该核苷酸编码PAPP-A2。 用于检测序列的杂交探针或寡核苷酸, 用于表达PAPP-A2的经基因修饰的宿主细胞, 使用所述蛋白质产生能够特异性结合所述蛋白质的抗体 或基于非孕妇患者体液中PAPP-A2抗原或编码PAPP-A2核酸分子检测的疾病筛查方法, 以筛查可改变PAPP-A2蛋白酶活性的药物 蛋白质作为此类药物的治疗靶标以及在相关病理状况下作为治疗剂的用途 为了提供使用该蛋白质。 还显示了在孕妇和/或非孕妇中检测异常局部增生状况 (包括检测到的PAPP-A2水平) 的方法。 本发明还提供了胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) -5 (PAPP-A2的天然底物) 的鉴定。

