

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 538804

(P2002 - 538804A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	2 G 0 4 5
A 6 1 B 17/58	310	A 6 1 B 17/58	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 L 31/00		A 6 1 L 31/00	4 B 0 6 4
A 6 1 M 29/02		A 6 1 M 29/02	4 C 0 6 0

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 70数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 604878(P2000 - 604878)

(86)(22)出願日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月17日(2001.9.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06728

(87)国際公開番号 W000/54806

(87)国際公開日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(31)優先権主張番号 60/124,541

(32)優先日 平成11年3月15日(1999.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 オヴェルガルド, ミッチェル, トフト
デンマーク国 ディーケイ - 8000 アール
ス シィ ティエイチ., ジャニユス ラ
コウルスガド 12, ストリート

(71)出願人 オキシヴィグ, クラウス
デンマーク国 ディーケイ - 8260 ヴィビ
ィ ジェイ ソエスクレンテン 36

(72)発明者 オヴェルガルド, ミッチェル, トフト
デンマーク国 ディーケイ - 8000 アール
ス シィ ティエイチ., ジャニユス ラ
コウルスガド 12, ストリート

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インスリン様増殖因子結合タンパク質 - 4 プロテアーゼ

(57)【要約】

妊娠関連血漿タンパク質A(PAPP-A)のレベルを
検出することを含む、非妊娠被験体における変化した局
所的増殖状態のスクリーニング方法が記載される。PA
PP-Aのプロテアーゼ活性を変化させる薬剤を同定す
る方法、並びにそのような薬剤を含む医薬組成物及び医
療器具も記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非妊娠被験体における増殖促進状態のスクリーニング又は診断のための方法であって、

a) 該非妊娠被験体からの生物学的サンプル中の妊娠関連血漿タンパク質 - A (PAPP-A)のレベルを検出すること、及び

b) 該非妊娠被験体におけるPAPP-Aの該レベルと、非妊娠被験体におけるPAPP-Aの標準レベルとを比較し、該非妊娠被験体におけるPAPP-Aの該レベルの増加が該増殖促進状態の存在を示すこと、

を含む前記方法。

【請求項2】 前記増殖促進状態が再狭窄、アテローム性動脈硬化、排卵、創傷治癒、線維症、又は癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 PAPP-Aの前記レベルがプロテアーゼ活性として測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記レベルがPAPP-Aタンパク質の量として測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記レベルがPAPP-AメッセンジャーRNAの量として測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 PAPP-Aタンパク質の量が免疫学的に検出される、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 PAPP-Aタンパク質の量が少なくとも1種のモノクローナル抗体により検出される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 生物学的サンプルが血液、尿、胸膜液、口内洗浄液、組織生検、及び卵胞液からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 生物学的サンプルが血液である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記PAPP-Aが少なくとも1種の他のタンパク質とのPAPP-A複合体中で検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記PAPP-AがPAPP-Aの二量体として検出される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記PAPP-AがPAPP-Aの単量体として検出される、請求項1

に記載の方法。

【請求項13】 プロMBPを含まないPAPP-Aに対して特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体。

【請求項14】 製薬上許容し得る担体と、PAPP-Aのプロテアーゼ活性を変化させる薬剤とを含む、医薬組成物。

【請求項15】 PAPP-Aのプロテアーゼ活性を阻害する薬剤を同定するための方法であって、単離されたPAPP-Aポリペプチド、プロテアーゼ活性のアクチベーター、及びPAPP-Aの基質を、該薬剤と共にインキュベートし、該基質のタンパク質分解が阻害されるか否かを判定することを含む、前記方法。

【請求項16】 前記基質がIGFBP-4又はその断片である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 プロテアーゼ活性のアクチベーターがインスリン様増殖因子I又はインスリン様増殖因子IIである、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 PAPP-Aのプロテアーゼ活性を増強する薬剤を同定するための方法であって、単離されたPAPP-Aポリペプチド及びPAPP-Aの基質と、該薬剤とをインキュベートし、該基質のタンパク質分解が増強されるか否かを判定することを含む、前記方法。

【請求項19】 前記薬剤がインスリン様増殖因子の断片である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 PAPP-Aの基質が固定化される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 PAPP-Aの基質がIGFBP-4である、請求項18に記載の方法

。

【請求項22】 IGFBP-4がそのN末端又はC末端上でタグ付けされる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 PAPP-Aプロテアーゼ活性を変化させる薬剤を含む、被験体に配置するための医療器具。

【請求項24】 前記薬剤がPAPP-Aプロテアーゼ活性を増強する、請求項23に記載の医療器具。

【請求項25】 前記薬剤がPAPP-Aプロテアーゼ活性を阻害する、請求項2

3に記載の医療器具。

【請求項26】 前記医療器具が前記薬剤で含浸されている、請求項23に記載の医療器具。

【請求項27】 前記医療器具が前記薬剤で被覆されている、請求項23に記載の医療器具。

【請求項28】 PAPP-Aプロテアーゼ活性の阻害剤が抗体である、請求項23に記載の医療器具。

【請求項29】 PAPP-Aプロテアーゼ活性の阻害剤がメタロプロテアーゼ阻害剤である、請求項23に記載の医療器具。

【請求項30】 メタロプロテアーゼ阻害剤が1,10-フェナントロリンである、請求項29に記載の医療器具。

【請求項31】 前記阻害剤がプロMBPである、請求項25に記載の医療器具。

【請求項32】 前記医療器具が被験体の管腔に配置するためのステントである、請求項23に記載の医療器具。

【請求項33】 PAPP-Aに対する特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体の作製方法であって、

- a) プロ主要塩基性タンパク質を含まないPAPP-Aポリペプチドで宿主動物を免疫して、抗体クローンを取得すること、及び
- b) PAPP-Aに対する結合親和性を有するが、PAPP-Aプロ主要塩基性タンパク質複合体に対する結合親和性を有しないモノクローナル抗体を選択すること、を含む、前記方法。

【請求項34】 非妊娠被験体における増殖抑制状態のスクリーニングのための方法であって、

- a) 該非妊娠被験体からの生物学的サンプル中のPAPP-Aのレベルを検出すること、及び
- b) 該非妊娠被験体におけるPAPP-Aの該レベルと、非妊娠被験体におけるPAPP-Aの標準レベルとを比較し、該非妊娠被験体におけるPAPP-Aの該レベルの減少が該増殖抑制状態の存在を示すこと、

を含む前記方法。

【請求項35】 増殖抑制状態が骨粗鬆症又は癌である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 生物学的サンプルと、PAPP-Aに対する特異的結合親和性を有するが、PAPP-A / プロ主要塩基性タンパク質複合体に対する特異的結合親和性を有しない抗体とを接触させて、該生物学的サンプル中のPAPP-Aを検出することを含む、生物学的サンプル中のPAPP-Aの検出方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****技術分野**

本発明は、非妊娠被験体における局所的増殖状態(focal growth state)のマーカ―及び治療標的としての妊娠関連血漿タンパク質Aの使用に関する。

【0002】**発明の背景**

6つの既知のインスリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)のタンパク質分解的切断は、これらの重要な増殖調節タンパク質を迅速に構造的及び機能的に改変するための強力な手段である。無傷のIGFBP-4は、in vitroでのインスリン様増殖因子(IGF)活性の効力のある阻害剤であり、IGFBP-4の切断により、種々の系においてIGF刺激作用を阻害するその能力が破壊されることが示され、このことはIGFBP-4タンパク質分解がIGFの生物学的利用能の正の調節因子として働くことを示唆している。

【0003】**発明の概要**

本発明は、部分的には、ヒト線維芽細胞ならし培地(HFCM)からのIGF依存性IGFBP-4特異的プロテアーゼの単離及び妊娠中の母体循環系に高濃度で認められるタンパク質である妊娠関連血漿タンパク質A(PAPP-A)としてのその同定に基づく。IGF依存性IGFBP-4特異的プロテアーゼとしてのPAPP-Aの同定は、増殖促進状態及び増殖抑制状態を含めた、非妊娠被験体における変化した増殖状態のスクリーニング方法を提供する。IGFBP-4プロテアーゼとしてのPAPP-Aの同定はまた、PAPP-Aのプロテアーゼ活性を増強又は阻害し、ひいては生物学的に利用可能なIGFのレベルを調節する薬剤のための治療標的をも提供する。

【0004】

一態様において、本発明の特徴は、非妊娠被験体における増殖促進又は増殖抑制状態のスクリーニング方法である。この方法は、非妊娠被験体からの生物学的サンプル中のPAPP-Aのレベルを検出すること、及び非妊娠被験体におけるPAPP-Aの該レベルと、非妊娠被験体におけるPAPP-Aの標準レベルとを比較することを含

む。生物学的サンプルは、血液、尿、胸膜液、口内洗浄液、組織生検、及び卵胞液からなる群より選択することができる。非妊娠被験体におけるPAPP-Aのレベルの増加は、増殖促進状態の存在を示し、PAPP-Aのレベルの減少は、増殖抑制状態の存在を示す。増殖促進状態とは、例えば、再狭窄、アテローム性動脈硬化、排卵、創傷治癒、線維症、及び癌であり得る。増殖抑制状態とは、例えば、骨粗鬆症又は癌であり得る。

【0005】

PAPP-Aのレベルは、PAPP-Aプロテアーゼ活性として、又はPAPP-Aタンパク質もしくはメッセンジャーRNAの量として測定することができる。PAPP-Aタンパク質は、例えば、少なくとも1種のモノクローナル抗体により、免疫学的に検出することができる。PAPP-Aは、少なくとも1種の他のタンパク質、例えば、プロ主要塩基性タンパク質とのPAPP-A複合体中で、PAPP-Aの二量体として、又はPAPP-A単量体として検出することができる。

【0006】

また、本発明の特徴は、プロ主要塩基性タンパク質を含まないPAPP-Aに対する特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体、及びそのようなモノクローナル抗体の作製方法でもある。この方法は、プロ主要塩基性タンパク質を含まないPAPP-Aポリペプチドで宿主動物を免疫して、抗体クローンを取得することを含む。次いで、PAPP-Aに対する結合親和性を有するが、PAPP-A/プロ主要塩基性タンパク質複合体に対する結合親和性を有しないモノクローナル抗体を選択する。また、生物学的サンプル中のPAPP-Aを検出する方法は、生物学的サンプルと、PAPP-Aに対する結合親和性を有するが、PAPP-A/プロ主要塩基性タンパク質複合体に対する結合親和性を有しない抗体とを接触させて、該生物学的サンプル中のPAPP-Aを検出することを含むことを特徴とする。

【0007】

別の態様において、本発明は、製薬上許容し得る担体と、PAPP-Aのプロテアーゼ活性を変化させる薬剤とを含む医薬組成物、並びにそのような薬剤の同定方法に関する。PAPP-A活性の阻害剤を同定するための方法は、単離されたPAPP-Aポリペプチド、プロテアーゼ活性のアクチベーター、及びIGFBP-4などのPAPP-Aの基

質を、該薬剤と共にインキュベートして、該基質のタンパク質分解が阻害されるか否かを判定することを含む。プロテアーゼ活性のアクチベーターは、インスリン様増殖因子I又はインスリン様増殖因子IIであってよい。PAPP-Aのプロテアーゼ活性を増強する薬剤を同定するための方法は、単離されたPAPP-Aポリペプチド及びPAPP-Aの基質(例えば、IGFBP-4)を、該薬剤と共にインキュベートして、該基質のタンパク質分解が増強されるか否かを判定することを含む。PAPP-Aを固定化することができる。例えば、PAPP-A活性を増強する薬剤は、インスリン様増殖因子の断片であってよい。

【0008】

本発明はまた、PAPP-Aプロテアーゼ活性を変化させる薬剤を含む、被験体に配置するための医療器具に関する。該薬剤は、PAPP-Aプロテアーゼ活性を増強又は阻害し得る。該医療器具は、該薬剤で含浸又は被覆されていてもよい。PAPP-Aプロテアーゼ活性の阻害剤は、例えば、プロMBP、抗体又は1,10-フェナントロリンなどのメタロプロテアーゼ阻害剤であってよい。該医療器具は、被験体の管腔に配置するためのステントであってよい。

【0009】

特に定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。本発明を実施するために、本明細書に記載のものと類似するか、又は等価な方法及び材料を用いることができるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に引用される全ての刊行物、特許出願及び他の参考文献は、参照により本明細書にその全体が組み入れられるものとする。コンフリクトの場合、定義を含む本明細書が支配するであろう。さらに、材料、方法及び実施例は、単に例示的なものであり、限定することを意図したものではない。

【0010】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0011】

詳細な説明

インスリン様増殖因子(IGF)は、in vivo及びin vitroの両方で強力な同化作用及び分裂促進作用を有する必須ポリペプチドである。IGFの生物学的活性は、別個の高親和性IGF結合タンパク質(IGFBP)により調節され、現在までにそのうちの6つが同定されている。IGFBPは限定的なタンパク質分解を受け、その結果、IGFBPの構造及び機能が改変され、従ってIGF作用も改変される。

【0012】

IGFBP-4特異的メタロプロテアーゼ活性は、培養中で正常ヒト線維芽細胞により分泌される。無細胞条件下でのヒト線維芽細胞ならし培地(HFCM)におけるIGFBP-4のインキュベーションの結果、分子の中央部でIGFBP-4(非還元下で約24 kDa、還元下で約32 kDa)の切断が起こり、約18 kDa及び約14 kDaの異なる断片が産生される。このIGFBP-4タンパク質分解反応の顕著な特徴は、機能活性に関するIGFに対する絶対的な依存性である。極めて低濃度のIGFのみを必要とし、一般的には、タンパク質分解の活性化においてはIGF-IIがIGF-Iよりも強力である。同様のIGF依存性IGFBP-4タンパク質分解は、例えば、正常ヒト骨芽細胞、血管平滑筋細胞、子宮内膜の間質細胞、脱落膜細胞、及び顆粒膜細胞の培養物、並びに卵胞液中で説明されてきた。以前は、原因となる酵素がPAPP-Aであることは知られておらず、IGFBP-4タンパク質分解の生理学的役割の記述を極めて困難にしていた。

【0013】

本明細書に記載のように、IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼは、HFCMから精製され、PAPP-Aとして同定された。用語「IGFBP-4プロテアーゼ」及び「PAPP-A」は、本文中を通して互換的に用いられる。PAPP-Aは、妊娠中を通して高濃度で妊婦の血清中に存在する大きな胎盤糖タンパク質として説明されてきた。妊娠血清中のPAPP-Aは、プロ型のエオシノフィル主要塩基性タンパク質(プロMBP)にジスルフィド結合し、約500 kDaの2:2複合体(PAPP-A/プロMBPと呼ばれる)を形成する。PAPP-AとプロMBPは共に、妊娠中の胎盤で産生されるが、in situハイブリダイゼーションにより示されるように、主に異なる細胞タイプにおいて産生される。この組織では、大部分のPAPP-Aは合胞体層で合成され、全てのプロMBPは細胞外栄養膜で合成される。

【0014】

PAPP-AのcDNA配列は、この血清型が推定22残基のシグナルペプチド、58残基のプロ部分、及び1547残基の循環する成熟ポリペプチドを有するプレプロタンパク質から誘導されることを示している。この配列は、全般的にはいかなる既知のタンパク質に対しても類似性を示さないが、メタロプロテアーゼのスーパーファミリーであるメトジンシンと共通の2つの配列モチーフ、Notchタンパク質スーパーファミリーとして知られる3つのLin-12/Notch反復配列、及び補体系の成分として知られる5つの短い共通反復配列を含む。プロMBPと複合体を形成していないPAPP-Aは、妊娠血清からは単離されていないが、本明細書に記載されるように、ヒト線維芽細胞、ヒト骨芽細胞、ヒト冠状動脈平滑筋細胞、及びPAPP-A cDNAでトランスフェクトされた哺乳動物細胞に由来するならし培地から単離することができる。PAPP-A/プロMBP複合体は、母体がコルネリア・ド・ランゲ症候群を有する胎児を宿している場合には、妊娠中の母体血清には存在しないことが報告された。最近、SP1と結合したPAPP-A及びプロMBPは、妊娠7～12週のダウン症候群に冒された胎児を検出するための有効なマーカーであることが示された。

【0015】

IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼとしてのPAPP-Aの同定は、胎盤の機能及び胎児の発達に関する隣接する分岐を有する。さらに、現在では、PAPP-AとしてのIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼの同定、並びに純粋なタンパク質及び関連分子ツールの利用可能性により、そのIGF依存性の基礎をなす機構の決定並びに創傷治癒、骨の再造形、癌、アテローム性動脈硬化症及び卵胞の発達などの多様な系における局在化したIGF依存性IGFBP-4タンパク質分解の生物学的役割の決定が可能になっている。

【0016】

従って、IGFBP-4プロテアーゼとしてのPAPP-Aの同定は、非妊娠被験体における変化した局所的増殖状態をスクリーニングするための方法を提供する。「変化した局所的増殖状態」とは、増殖促進状態及び増殖抑制状態の両方を指す。本明細書で用いられる、「増殖促進」とは、細胞数の増加、細胞の大きさの増大、又は分化した細胞機能の増加のうちの一つ以上を指す。増殖促進状態の非限定的な

例としては、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、線維症、創傷治癒、癌細胞のIGF依存的増殖、及び卵胞の発達を含む排卵などが挙げられる。「増殖抑制」とは、細胞の増殖速度又は細胞の大きさの減少を指し、骨粗鬆症及び癌近傍の組織/細胞を含む。癌細胞は、典型的には増殖に関してIGFに依存しないため、癌細胞ではPAPP-Aの発現がダウンレギュレートされることがある。PAPP-A発現の低下は、周囲の細胞に損傷を与えることがあるが、これは周囲の細胞がIGFに依存するためである。妊娠におけるPAPP-Aの大幅な上昇は、PAPP-Aレベルにおけるより小さな変化を目立たなくするため、非妊娠被験体を試験する。健常な男性ボランティアの正常条件下での血清PAPP-Aレベルは低い(4.32 ± 1.54 mIU/L, n = 30)。それに比べて、PAPP-Aは、妊娠中に上昇し、妊娠満期には約100,000 mIU/Lまでに達する。

【0017】

PAPP-Aタンパク質の検出

非妊娠被験体に由来する生物学的サンプルを、PAPP-Aのタンパク質、メッセンジャーRNA(mRNA)、又は活性のレベルなどのPAPP-Aのレベルについて評価する。好適な生物学的サンプルとしては、例えば、血液、尿、胸膜液、口内洗浄液、皮膚、骨、又は血管プラークなどの組織生検、及び卵胞液などが挙げられる。血液は、特に有用な生物学的サンプルである。

【0018】

PAPP-Aタンパク質は、例えば、免疫学的に検出することができる。例えば、PAPP-Aに対する特異的な結合親和性を有する抗体を用いて、生物学的アッセイに由来するPAPP-Aを捕捉することにより、サンドイッチアッセイを行うことができる。次いで、PAPP-Aに対する特異的な結合親和性を有する標識抗体を用いて、PAPP-Aを検出することができる。あるいは、標準的な免疫組織化学的技術により、そのような抗体を用いてPAPP-Aタンパク質を検出することもできる。PAPP-A / プロMBP複合体に対する親和性を有する抗体が利用可能である。例えば、Qinら、Clin. Chem., 1997, 43(12):2323-2332を参照されたい。PAPP-Aに対する特異的な結合親和性を有するが、PAPP-A / プロMBP複合体に対する特異的な結合親和性を有さないモノクローナル抗体を、標準的な方法により製造することができる。妊娠血漿

中及び妊娠血清中では、PAPP-Aの約1%がプロMBPタンパク質と複合体を形成していないが、非複合体化PAPP-A二量体として存在する。PAPP-Aの非複合体化形態のみを認識するモノクローナル抗体を用いた、複合体を形成しないPAPP-Aの画分の測定は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いて全PAPP-Aを測定することとは異なる。妊娠血清中の非複合体化PAPP-Aの測定は、診断的な価値を有する。プロMBPIはPAPP-A活性の阻害剤として機能するため、所与のサンプルのPAPP-A活性を測定することにより、非複合体化PAPP-Aの量を評価することもできる。

【0019】

一般的には、プロMBPと複合体を形成しないPAPP-Aを、組換えなどの種々の方法で製造するか、又は生物学的サンプルから精製して、これを用いて動物を免疫することができる。組換えPAPP-Aを製造するためには、PAPP-Aポリペプチドをコードする核酸配列を発現ベクター中に連結し、これを用いて細菌又は真核宿主細胞を形質転換することができる。一般的には、核酸構築物は、PAPP-A核酸配列に機能し得る形で連結された調節配列を含む。典型的には、調節配列は遺伝子産物をコードしないが、その代わりに該核酸配列の発現に影響する。細菌系においては、BL-21などの大腸菌株を用いることができる。好適な大腸菌ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を産生するpGEXシリーズのベクターが挙げられる。典型的には、形質転換された大腸菌を指数的に増殖させ、次いで、回収前にイソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)で刺激する。一般的には、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、次いで遊離グルタチオンの存在下で溶出させることにより、溶解した細胞から容易に精製することができる。このpGEXベクターは、トロンビン又はXa因子のプロテアーゼ切断部位を含むように設計されているので、クローニングされた標的遺伝子産物をGST部分から遊離させることができる。

【0020】

PAPP-Aを安定に発現する哺乳動物細胞系を、適当な制御エレメント及び選択マーカーを有する発現ベクターを用いることにより作製することができる。例えば

、真核細胞発現ベクター-pCDNA.3.1+ (Invitrogen, San Diego, CA)が、例えば、COS細胞又はHEK293細胞におけるPAPP-Aの発現に好適である。エレクトロポレーション、DEAEデキストラン、又は他の好適な方法により発現ベクターを導入した後、安定な細胞系を選択する。pCDNA.3.1+ とHEK293細胞とを用いる発現系においては、タンパク質の収率は約5 µg/mlであった。分泌された産物はプロMBPを欠く二量体であった。あるいは、小麦麦芽抽出物又はウサギ網状赤血球溶解物を用いて、PAPP-Aをin vitroで転写及び翻訳することもできる。

【0021】

真核宿主細胞においては、いくつかのウイルスに基づく発現系を用いてPAPP-Aを発現させることができる。PAPP-Aをコードする核酸を、例えば、バキュロウイルスベクター中にクローニングした後、これを用いて昆虫細胞をトランスフェクトすることができる。あるいは、PAPP-Aをコードする核酸をSV40、レトロウイルス又はワクシニアウイルスに基づくウイルスベクター中に導入し、これを用いて宿主細胞に感染させてもよい。

【0022】

本明細書に記載の通り、組換えPAPP-A(rPAPP-A)は、ELISA及びウェスタンブロットティングにおいて、入手可能な全てのモノクローナル抗体と免疫反応する。組換えPAPP-Aは、約400 kDaのホモ二量体として分泌され、グリコシル化の程度が低いため、還元すると妊娠血清のPAPP-Aから200 kDaサブユニットよりわずかに小さい単量体が得られる。rPAPP-Aは活性で、IGF依存的な様式でIGFBP-4と反応し、これを切断する。組換えPAPP-Aは、妊娠血清中のPAPP-Aより約100倍強い活性を有する。

【0023】

本明細書に記載の通り、PAPP-Aを精製してもよい。例えば、Zn²⁺を負荷したSepharose 6Bに固定化したイミノ二酢酸上を通過させることにより、HFCMからPAPP-Aを精製することができる。徐々に減少するpH勾配を用いて結合したタンパク質を溶出した後、pH 5.0の画分を小麦麦芽アグルチニンカラム上を通過させることによりさらに精製することができる。Tris塩溶液、次いでN-アセチルグルコサミンを用いて、結合したタンパク質を溶出させることができる。あるいは、ヘパ

リンセファロースカラムを用いて、1000 mMまで塩濃度を増加させてPAPP-Aを溶出させることもできる。PAPP-A特異的抗体又は特異的プロテアーゼ活性アッセイを用いて測定されるような、PAPP-Aを含む画分をプールし、濃縮した後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によりアッセイすることができる。還元的SDS/PAGEにおいては、PAPP-A単量体の分子量は約200 kDaである。

【0024】

PAPP-Aの注入により、種々の宿主動物を免疫することができる。宿主動物としては、ウサギ、ニワトリ、マウス、モルモット、及びラットが挙げられる。免疫応答を上昇させるのに用いることができる種々のアジュバントは宿主の種に依存し、そのようなアジュバントとしては、Freundのアジュバント(完全及び不完全)、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、ブルニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳化物、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールなどが挙げられる。ポリクローナル抗体は、免疫した動物の血清中に含まれる抗体分子の異種集団である。特定の抗原に対する抗体の同種集団であるモノクローナル抗体は、PAPP-Aポリペプチド及び標準的なハイブリドーマ技術を用いて調製することができる。特に、モノクローナル抗体は、Kohler, G.ら、Nature, 256;495(1975)により記載されるような培養における連続的な細胞系により抗体分子の製造を提供する任意の技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、Immunology Today, 4:72(1983); Coleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026(1983))、及びEBV - ハイブリドーマ技術(Coleら、「モノクローナル抗体と癌の治療」(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)、Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96(1983))により取得することができる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む任意の免疫グロブリンクラス及びそれらの任意のサブクラスであってよい。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、in vitro及びin vivoで培養することができる。

【0025】

PAPP-Aポリペプチドに対する特異的結合親和性を有する抗体フラグメントを、公知の技術により作製することができる。例えば、そのようなフラグメントとしては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により作製すること

ができるF(ab')₂フラグメント、及びF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより作製することができるFabフラグメントが挙げられる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築することもできる。例えば、Huseら、Science, 246:1275(1989)を参照されたい。一度製造すれば、抗体又はそのフラグメントを、ELISA技術、ラジオイムノアッセイ及びウェスタンブロットティングなどの標準的な免疫アッセイ法により、PAPP-Aの認識について試験する。Short Protocols in Molecular Biology、第11章、Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Ausubel, F. M.ら(編)、1992を参照されたい。PAPP-Aに対して親和性を有する抗体を、陽性選択で同定する。そのような選択で同定された抗体を、PAPP-A / プロMBPに対して陰性選択をして、PAPP-AとプロMBPとの特異的複合体中では入手不可能なPAPP-Aのエピトープに対する特異的結合親和性を有する抗体を同定することができる。

【0026】

PAPP-Aメッセージの検出

PAPP-Aメッセージは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイにより検出することができる。一般的には、PCRとは、目的の領域の末端からの配列情報などを用いて、増幅しようとする鋳型の反対の鎖と同一か、もしくは類似の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、標的核酸を増幅することを指す。PCRを用いて、全ゲノムDNA又は全細胞RNAに由来する配列などのDNA並びにRNAに由来する特異的配列を増幅することができる。プライマーの長さは、典型的には14~40ヌクレオチドであるが、10ヌクレオチドから数百ヌクレオチドまで変えることができる。PCRは、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach, C.及びDveksler, G.(編)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。また、核酸は、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自己持続的(self-sustained)配列複製又は核酸配列に基づく増幅により増幅することもできる。例えば、Lewis, R., Genetic Engineering News, 12(9):1 (1992)、Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878 (1990)及びWeiss, R., Science, 254:1292 (1991)を参照されたい。

【0027】

例えば、PAPP-A mRNAのレベルを、感度がよく、半定量的な逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)アッセイを用いて検出することができる。この方法は、PAPP-A cDNA及び内部標準(IS)として用いられるその欠失変異体の同時増幅に基づくものである。PAPP-Aの量を、サンプル中のmRNAの全量に対して正規化し、 β -アクチンのmRNAの量として決定する。RT-PCRは、従来のRNAブロッティング技術よりも1,000~10,000倍感度がよいことが示され、試験した全ての組織においてPAPP-AとプロMBPのmRNAの双方を検出及び定量することができた。大腸、前立腺、子宮(子宮内膜及び子宮筋層)などのこれらの組織のいくつかにおいては、PAPP-A又はプロMBP特異的プローブを用いる市販のRNAドットプロットをスクリーニングした場合、PAPP-A mRNAもプロMBP mRNAも検出されなかった。

【0028】

競合的PCRに由来する産物を、PCR後の最小限の操作を含む正確な方法である、HPLCシステム上のイオン交換クロマトグラフィーにより定量化することができる。例えば、ゲル電気泳動により判定された、ほぼ等量のcDNA及びIS PCR産物を含むサンプルを、直線状の塩勾配を用いて、Waters Gen-Pak4,4IJ FAX非多孔性イオン交換カラムを備えたHewlett-Packard 1084 HPLC装置で分離することができる。希釈値 DI_{eq} は、ほぼ等モル量のcDNA及びIS PCR産物が得られる希釈率であり、式1から算出することができる。

【0029】

$$(1) \quad DI_{eq(x)} = D \times \frac{CP}{IP}$$

式中、CPは、全 A_{260} 吸収として決定されるcDNA PCR産物の量であり、IPは、cDNA産物との大きさの差異に関して補正された全 A_{260} 吸収として決定されるIS PCR産物の量であり、Dは、cDNA調製物の実際の希釈率であり、 $DI_{eq}(x)$ は、等モル量のIS及びcDNA PCR産物が得られる希釈率である(xはPAPP-A、プロMBP、 β -アクチン又はGADPHのいずれかである)。

【0030】

PAPP-A又はプロMBP mRNAの比存在率Axを決定することができる(式2)。

【0031】

$$(2) \quad A_x = \frac{D_{\text{eq}(x)}}{D_{\text{eq}(\beta\text{-actin})}}$$

式中、 $A(x)$ は個々のmRNA種の比存在率である。

【0032】

従って、比存在率は、サンプル中の全mRNAの分量に対して正規化された、目的遺伝子のmRNAレベルの分量である。合理的な仮定であるが、細胞当たり一定量の - アクチンのmRNA分子が存在するとすると、比存在率 A は、用いた組織の量に依存しない。本明細書に記載されるように、PAPP-A及びプロMBPは、分析した他の組織においてよりも、妊娠満期の胎盤において有意に豊富に存在していた。子宮内膜、子宮筋層、大腸、及び腎臓を含む、分析した全ての組織に、PAPP-A及びプロMBP双方のmRNAが含まれていた。

【0033】

この方法の変法として、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System及びTaqman蛍光プローブを用いるリアルタイム定量的PCRが挙げられる。限定的なプライマー濃度を用いた28S rRNAの増幅などの内部参照を使用する。この方法により、約500コピーまでの標的配列を定量化することができる。

【0034】

あるいは、特異的mRNAの存在に関する異なる組織の試験は、ノーザン又はドットプロットなどのRNAプロット技術により慣例的に行うこともできる。本明細書に記載のように、PAPP-A及びプロMBPのmRNAは、異なるヒト組織に由来する正規化された量のRNAを含む市販のRNAドットプロット又はノーザンプロットをスクリーニングすることにより、種々の組織において検出された。PAPP-Aは、胎盤並びに腎臓、心臓、副腎皮質、副腎髄質、精巣、小腸及び胃などの非胎盤組織において検出された。PAPP-Aは非胎盤組織では低レベルで検出された。

【0035】

本明細書に記載のように、PAPP-A及びプロMBPのmRNAの比存在率は、組織間で大きく異なる。妊娠満期の胎盤では、試験したどの非胎盤組織よりも200倍以上高いレベルであり、これは妊娠中のPAPP-A及びプロMBP合成の主要な部位が胎盤であることを示している。非胎盤組織の低いmRNAレベルは、非妊娠個体において

はPAPP-A及びプロMBP抗原の血清濃度が極めて低いことに反映されている。PAPP-A及びプロMBPは共に、胎盤において最も高度に発現される遺伝子であり、2つの胎盤cDNAライブラリー(それぞれ、UniGene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/Hs.Home.html>ライブラリー398及び399)のクローンの総数のうち、1%(PAPP-A)及び5%(プロMBP)を占める。これらのライブラリーにおいては、PAPP-A及びプロMBPクローンは、5つの中で最も豊富であった。従って、いくつかの組織についてここで算出されるmRNAの比存在率は、胎盤におけるレベルと比較して低い。胎盤においては、PAPP-A及びプロMBPは共にin situハイブリダイゼーションにより容易に検出される。

【0036】

PAPP-A mRNAは試験した全ての組織(生殖組織並びに非生殖組織)で合成されるという知見は、PAPP-Aが妊娠以外に機能することを示唆している。分析したほとんどの組織では、2つのmRNA種のうちの1つのみが転写されるため、プロMBPはPAPP-Aの機能又はPAPP-A活性のいずれかの調節に必要であるのかもしれない。具体的には、プロMBPは、PAPP-Aタンパク質分解活性の阻害剤であり得る。妊娠血清中の測定可能なPAPP-A活性は、阻害されないPAPP-A二量体として存在するPAPP-Aの小画分に由来するようである。大部分の組織では、妊娠満期の胎盤に関するmRNAの存在量は、プロMBPよりもPAPP-Aについての方が高い。しかしながら、それでもなお、該組織におけるPAPP-Aのモル濃度はプロMBPのモル濃度を必ずしも超えるわけではない。妊娠満期の胎盤におけるレベルに関しては、全てのmRNAレベルが発現するが、プロMBP mRNAの存在量はPAPP-Aの存在量よりも多い。興味深いことに、プロMBP又はMBPがPAPP-Aより過剰に存在することが知られている組織、すなわち骨髄細胞(好酸球)及び胎盤においては、妊娠満期の胎盤に関しては、プロMBP mRNAの比存在率は、PAPP-Aの非存在率よりも高い。

【0037】

組織におけるPAPP-Aの局在に関する初期の報告では、矛盾する結果が得られていたが、非胎盤性のPAPP-A合成に関する疑問が議論の課題であった。以前の調査は全て、ポリクローナル抗血清に基づくものであり、多くの報告がこれらの抗血清の種々の調製物の多特異性及び不均一性を説明していたようである。抗血清調

製物を精製して多特異性を最小化してきたが、現在ではPAPP-A / プロMBPであることが知られている、PAPP-Aに対するポリクローナル抗血清は、PAPP-A / プロMBP複合体、成熟好酸球MBP並びにSP1及びハプトグロビンの一部であるプロMBPを常に認識してしまうであろう。

【0038】

in situハイブリダイゼーションを用いて、PAPP-Aメッセージを検出することもできる。この技術の利点は、mRNAを合成する細胞を突き止めることができるということであるが、RT-PCRよりは感度が低い。本明細書に記載のように、いくつかの組織におけるmRNAレベルは相対的に低く、このことはPAPP-A及びプロMBPのmRNAの合成はおそらく該組織中のほんのいくつかの特定の細胞に限定されることを示している。

【0039】

PAPP-A活性の検出

生物学的サンプル中のIGFBP-4タンパク質分解活性を試験することにより、PAPP-A活性を検出することができる。例えば、検出可能に標識された基質を、生物学的サンプルの存在下、適当な条件でインキュベートした後、タンパク質分解産物を検出することができる。例えば、基質は、IGFBP-4又はその断片であってよい。一般的には、反応は37℃にて、IGF-IIもしくはその断片、又はその他の任意のプロテアーゼアクチベーターを含む2 mM CaCl₂/50 mM Tris (pH 7.5)などのバッファー中で行うことができる。典型的には、基質を¹²⁵Iもしくは³²Pなどの同位体で放射標識するか、又はビオチン、ジゴキシゲニン、もしくは発蛍光団で非放射標識する。例えば、IGFBP-4の18及び14 kDaの反応生成物などのタンパク質分解産物を試験することにより、IGFBP-4のタンパク質分解を検出する。還元15% SDS / PAGEにより放射性タンパク質を分離し、オートラジオグラフィーにより可視化することができる。また、タンパク質分解的切断産物を、免疫ブロッティングにより検出することもできる。

【0040】

例えば、マイクロタイタープレートのウェルに固定化したポリクローナル又はモノクローナル抗体を用いてPAPP-Aを捕捉した後、PAPP-A活性を検出することも

できる。生物学的サンプルの未結合タンパク質を洗い流した後、分光光度法で検出し得る着色産物を遊離する低分子量の合成基質を用いてPAPP-Aの活性を測定することができる。IGF-II又はその他のPAPP-Aアクチベーターを基質と共に添加することができる。

【0041】

さらに、固定化した基質、例えばIGFBP-4を含むウェル中でサンプルをインキュベートすることにより、PAPP-A活性を検出することができる。基質を特異的に(放射性又は非放射性)標識する。基質をタンパク質分解的に切断するときには、標識断片を液相中に遊離させ、これを検出することができる。例えば、抗体又はIGF-IIで被覆することにより、基質を固定化することができる。

【0042】

また、タンパク質のN末端又はC末端上に種々のタグ(例えば、N末端のFLAGタグ及びC末端のc-mycタグ)が発現したIGFBP-4を用いて、標識を行うこともできる。これにより、IGFBP-4を、これらのタグのうちの1つに結合するモノクローナル抗体で固定化することができる。次いで、例えば、他のタグを認識するペルオキシダーゼ結合モノクローナル抗体を用いる標準的なELISA法により、結合したIGFBP-4の検出を行うことができる。また、IGFBP-4を固定化し、それぞれN末端及びC末端を認識するモノクローナル抗体を用いて検出することもできる。タンパク質分解活性によりシグナルの低下がもたらされるが、これはプロテイナーゼ活性の量及びインキュベーションの時間に依存する。

【0043】

PAPP-Aプロテアーゼ活性を変化させる薬剤

本発明はまた、PAPP-Aのプロテアーゼ活性を変化させる薬剤を同定するための方法を提供する。「変化した」とは、PAPP-A活性を阻害又は増強することを指す。本明細書で用いられる「薬剤」とは、オリゴヌクレオチドもしくはペプチドなどの生物学的巨大分子、化合物、化合物の混合物、又は細菌、植物、菌類もしくは動物の材料から単離された抽出物を指す。単離されたPAPP-Aポリペプチド、プロテアーゼ活性のアクチベーター、及びPAPP-Aの基質を、該薬剤と共にインキュベートし、基質のタンパク質分解が阻害されるか否かを決定することにより、阻

害剤を同定する。本明細書で用いられる「単離されたPAPP-Aポリペプチド」は、それを天然に伴う細胞成分から分離される。典型的には、ポリペプチドは、それと天然に関連するタンパク質及び天然の有機分子を含まない、少なくとも60重量%(例えば、70重量%、80重量%、90重量%又は95重量%)である場合、単離されたと言う。本明細書で用いる「ポリペプチド」とは、プロテアーゼ活性を有する、任意の長さのPAPP-Aポリペプチドを指す。標準的なアクチベーター(例えば、インスリン様増殖因子I又はII)を反応から除く以外は同様の方法により、アクチベーターを同定する。IGFBP-4又はその断片は、PAPP-Aの基質として特に有用である。阻害剤又はアクチベーターを同定するための反応を、上記のように行う。この方法は、潜在的な阻害剤又はアクチベーターの大きいライブラリーをスクリーニングするのに好適である。

【0044】

PAPP-Aは細胞表面に結合するので、細胞表面へのPAPP-Aの結合を阻害又は防止することは、PAPP-Aの活性部位を妨害することによるタンパク質分解活性の阻害と等価でありうる。細胞表面へのPAPP-Aの結合を阻害又は防止する薬剤を、フローサイトメトリーを用いて同定することができる。一般的には、細胞を潜在的な遮断剤と共にインキュベートした後、PAPP-Aに対する特異的結合親和性を有するモノクローナル抗体と接触させ、フローサイトメトリーを用いて細胞表面への結合を評価する。接着遮断剤としては、例えば、細胞表面受容体への結合に必要なエピトープに結合するモノクローナル抗体又はその他のポリペプチドが挙げられる。

【0045】

医療器具

本発明はまた、PAPP-Aプロテアーゼ活性を阻害又は活性化する薬剤を含む、患者における配置(例えば、植込み)のための医療器具を特徴とする。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。該器具を、該薬剤で含浸するか、又は該薬剤で被覆することができる。阻害剤の非限定的な例としては、抗PAPP-Aポリクローナルもしくはモノクローナル抗体などの抗体、又は1,10-フェナントロリンなどのメタロプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。PAPP-AのIGFBP-4

プロテアーゼ活性は、1,10-フェナントロリンにより強力に阻害されるが、マトリックスメタロプロテアーゼ(TIMPS)の組織阻害剤によっては阻害されない。IGFBP-4プロテアーゼ活性の他の阻害剤としては、ヒドロキサム酸の誘導体などの小分子が挙げられる。非特異的ウサギIgGではなく、抗PAPP-A / プロMBPポリクローナルIgGもまた、用量依存的にHFCM中のIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を阻害する。さらに、修飾ポリペプチドを含むポリペプチド(すなわち、長さ又は翻訳後修飾に関わらず、アミノ酸の任意の鎖)が、阻害剤として機能し得る。例えば、プロMBPIは、PAPP-AのIGFBP-4プロテアーゼ活性の阻害剤として機能し、これを用いて医療器具を被覆又は含浸することができる。修飾ポリペプチドは、対応する野生型配列と比較して、アミノ酸配列中にアミノ酸置換、欠失又は挿入、並びに化学的修飾を含む。プロテアーゼ耐性IGFBP-4は、それ自体はPAPP-AのIGFBP-4プロテアーゼ活性の阻害剤ではないが、プロテアーゼ耐性IGFBP-4を医療器具を被覆又は含浸するために用いる場合には、同様の結果が得られると期待される。

【0046】

例えば、医療器具のPAPP-A阻害剤による被覆又は含浸は、バルーン血管形成術後の再狭窄の発生の防止を促進するか、又はアテローム性動脈硬化症のプラークの大きさの更なる増加を防止し得る。ステントの配置を用いる冠状血管形成術は、現在では冠状アテローム性動脈硬化症のための主要な治療法である。冠状動脈疾患の血管形成術の重要な目標は、急性及び慢性の両方の合併症を防止することである。現代の方法は、直接的な問題の排除には大変成功している。残念なことに、依然として、ステントを配置した患者の20~30%に再狭窄が起こる。再狭窄を防止するために利用可能な医薬的介入は知られていない。特定の機構に束縛されるものではないが、冠状平滑筋細胞によるIGFBP-4プロテアーゼ発現の増加は、ヒトにおいては、血管形成術に応答する新生内膜肥厚(neointimal formation)に先行する。

【0047】

例えば、増強されたPAPP-A活性は、創傷治癒、骨折、骨粗鬆症又は排卵に有用であり得る。骨粗鬆症又はその他の骨の破壊状態は、骨形成の増加及び骨吸収の

減少によって利益を得るであろう。PAPP-A活性を増強する薬剤は、例えば、改変されたIGF、すなわちIGF類似体であってよい。類似体には、アミノ酸の挿入、欠失又は置換並びに化学的修飾を含むIGFポリペプチドが含まれる。アミノ酸置換は、保存的及び非保存的アミノ酸置換を含んでもよい。保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、同じクラスのアミノ酸に置換するものであり、非保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、異なるクラスのアミノ酸に置換するものである。非保存的置換により、ポリペプチドの疎水性又は残基側鎖の大きさが変化する。さらに、非保存的置換は、ポリペプチドの電荷に実質的な変化をもたらす得る(正の電荷の減少又は負の電荷の導入など)。非保存的置換の例としては、非極性アミノ酸については塩基性アミノ酸、又は酸性アミノ酸については極性アミノ酸が挙げられる。アミノ酸の挿入、欠失及び置換は、ランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、又はその他の当業界で公知の組換え技術を用いて行うことができる。

【0048】

医療器具は、例えば、骨を安定化させるのに用いられる骨板もしくは骨ねじ、又は典型的には骨の内腔の開通性を回復するか、もしくは維持するために体内で用いられるステントであってもよい。例えば、血管は、血液の通過を制限するアテローム動脈硬化症のプラークによって閉塞され得る。典型的には、ステントは管状構造を有し、体腔内の流動を調節する内部の経路(channel)を規定する。ステントの外壁は体腔の内壁に相当する。影響を受けた領域内でのステントの配置は、体腔のさらなる閉塞を防止するのに役立ち、流動を継続させる。典型的には、ステントは、ステントを担持するカテーテル又はガイドワイヤの経皮的な挿入により配置される。通常、ステントは伸展性の構造を有する。所望の部位に送達する際に、カテーテル上に取り付けたバルーンを用いて、ステントを伸展させることができる。あるいは、ステントは、鞘の中に保持されるか、もしくは圧縮された状態で拘束された、偏った構造、又は弾性の構造を有してもよい。拘束を除去するとき、ステントは自発的に伸展する。どちらの場合も、ステントの壁は伸展して、体腔の内壁として使用され、一般的には所望の位置にステントが固定される。

【0049】

医薬組成物

IGFBP-4プロテアーゼとしてのPAPP-Aの同定は、治療の標的としてPAPP-Aを用いることにより、in vivoにおける増殖及び分化に変化をもたらす方法を提供する。PAPP-Aの阻害剤は、生物学的利用可能なIGF-I及びIGF-IIの量を減少させる。例えば、PAPP-A活性の阻害は、再狭窄、アテローム性動脈硬化症及び線維症などの障害において有用であり得る。PAPP-Aの活性を増加させるアクチベーター又は薬剤は、生物学的利用可能なIGF-I及びIGF-IIの量を増加させるだろう。

【0050】

PAPP-A活性を変化させる薬剤、又は細胞表面へのPAPP-Aの接着性を変化させる薬剤を、医薬組成物中に組み入れることができる。例えば、抗PAPP-Aポリクローナル又はモノクローナル抗体などの抗体を、製薬上許容される非毒性の賦形剤又は担体と混合することにより、医薬組成物中に製剤化することができる。非経口投与のためには、特に液体の溶液又は水性の生理学的バッファー溶液中の懸濁液の形態で、経口投与のためには、特に錠剤又はカプセル剤の形態で、鼻内投与のためには、特に粉末、点鼻又はエアロゾルの形態で、そのような化合物及び組成物を調製してもよい。他の投与経路のための組成物は、標準的な方法を用いて所望のように調製することができる。

【0051】

非経口投与のための製剤は、一般的な賦形剤(すなわち、製薬上許容される担体)として、滅菌された水又は生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、野菜起源の油、水素化されたナフタレンなどを含んでもよい。特に、生物学的互換性で生物学的分解可能なラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、又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は、in vivoにおける本発明の化合物の放出を制御するための賦形剤の例である。他の好適な非経口送達系としては、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透ポンプ、埋め込み可能な注入系、及びリポソームが挙げられる。吸入投与のための製剤は、必要に応じてラクトースなどの賦形剤を含んでもよい。吸入のための製剤は、例えば、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココ

ール酸塩及びデオキシコール酸塩を含む水性溶液であってもよく、又は点鼻剤形における投与のための油性溶液であってもよい。必要に応じて、該化合物をゲルとして製剤化し、鼻内的に適用することができる。また、非経口投与のための製剤としては、口腔投与のためのグリココール酸塩も挙げるができる。

【0052】

本発明を、以下の実施例でさらに説明するが、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0053】

実施例

実施例1 PAPP-AとしてのIGFBP-4プロテアーゼの同定

正常な男性ドナーから得たヒト線維芽細胞(GM03652, Coriell Institute, Camden, NJ)を、T65フラスコ中で集密になるまで増殖させ、DMEMで2回洗浄した後、15 mlの50:50のWaymouth培地:DMEM培地(100ユニット/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン/4 mMグルタミン/0.1% BSAを含む)に換え、37 °Cにて6時間インキュベートした。細胞を再び洗浄し、10 mlの無血清培地に換え、37 °Cにて72時間インキュベートした。ヒト線維芽細胞ならし培地(HFCM)を滅菌コニカルチューブに入れ、4 °Cにて30分間、2,500 rpmで遠心分離して、細胞の破片を除去し、別の滅菌コニカルチューブにデカンテーションで移し、-30 °Cにて保存した。

【0054】

PAPP-A活性

得られたサンプルを、総容量25 µlの5 nM IGF-IIの非存在下及び存在下で、2 mM CaCl₂/50 mM Tris (pH 7.5)/10,000 cpmの[¹²⁵I]IGFBP-4と共に、37 °Cにて一晩インキュベートすることにより、IGFBP-4タンパク質分解をアッセイした。還元化15% SDS/PAGEによりタンパク質を分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。いくつかの実験については、PAPP-Aポリクローナル抗体又は非特異的ウサギIgGをアッセイ混合物に添加するか、またはこれをプロテインGプラスプロテインA-アガロース(Oncogene Science)に結合させて用い、IGFBP-4プロテアーゼ活性を免疫沈降させた後、アッセイした。

【0055】

PAPP-Aの精製

6つの130～150 mlのバッチ中のHFCM(800 ml)を、 Zn^{2+} を充填し、50 mM Tris/50 mM NaCl, pH 7.4で平衡化させたSephacrose 6B (Sigma)に固定化し、25 ml床容量のイミノ二酢酸に通過させた。各50 mlの0.5 pH単位で徐々に減少する勾配を用いて、結合したタンパク質を連続的に溶出させた。直ちに、pH 5.0画分をpH 7.4に調整し、4 にて、20 mM Tris/100 mM NaCl (pH 7.5)で平衡化した小麦麦芽カラム1 ml床容量に通過させた。各15 mlの50 mM Tris/100 mM NaCl (pH 7.5)のみを用いてタンパク質を溶出させた後、25 mM及び500 mMのN-アセチルグルコサミンで溶出させた。5 ml画分を回収し、IGFBP-4プロテアーゼ活性についてアッセイした。6つのクロマトグラフィー流出物からの画分をプールし、限界濾過により濃縮し、還元条件下で5%アクリルアミドSDS / PAGEゲルを通して電気泳動した。SDS / PAGEゲルを銀染色し、IGFBP-4プロテアーゼ活性に相関する400、230、200及び175 kDaの4つのバンドを切り出し、質量分光分析を行った。

【0056】

切り出したバンドを、ゲル内トリプシン消化に供した。消化物から可溶性断片を回収した後、再溶解し、マイクロカラム高速液体クロマトグラフィー及び自動化タンデム型質量分光測定により特性評価した。マイクロ電子スプレーカラムを、開口部が5～10 μm まで細くなるカラムチップを有する、360 μm o.d x 100 μm i.d.に融合したシリカキャピラリーから構築した。このマイクロカラムを、POROS 10 R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)で、長さ10～15 cmまで充填した。勾配溶出に用いた移動相は、(i)0.5%酢酸及び(ii)0.5%酢酸を含むアセトニトリル / 水(80 : 20 vol/vol)から構成されていた。勾配は、30分間で0～40%及び5分間で40～60%の直線状であった。用いた質量分析計は、マイクロ電子スプレーイオン化源を備えたFinnigan-MAT (San Jose, CA) LCQであった。タンデム型質量スペクトルは、自動的に全体の勾配ランの間中に獲得された。コンピュータープログラムSEQUENTを利用することにより、タンデム型質量スペクトルを用いて、タンパク質配列及びヌクレオチド配列のデータベースを直接検索した。得られたアミノ酸配列と対応するタンデム型質量スペクトルとの適合を

精査することにより、SEQUESTにより返答された各配列を確認した。

【0057】

標準的なプロトコールに従って、ポリ(A)テイルを有するmRNA (10 µg)を1.5% アガロースゲルを通して電気泳動し、ナイロンメンブラン(Hybond-N, Amersham Pharmacia)に転写した。このメンブランを6時間プレハイブリダイズした後、43 にて一晩、ヌクレオチド10~2365に対応する107 cpmの³²P標識PAPP-A cDNAプローブ(GenBank 登録番号X68280)とハイブリダイズさせた。このメンブランを3回洗浄し、乾燥し、フィルムに露出させた。

【0058】

ウェスタンブロッティング

ウェスタン分析のために、サンプルを8% Tris/トリシゲル上に流し、ポリビニリデンジフルオリドメンブラン(Millipore)上にブロッティングした。メンブランを2% Tween 20中でブロッキングし、5 mM Tris/500 mM NaCl/0.1% Tween 20/1% ウシ胎児血清、pH 9.0で洗浄した。次いで、プロットをモノクローナルPAPP-A抗体234-2と共にインキュベートした。Qinら、Clin. Chem., 1997, 43: 2323-2332を参照されたい。二次抗体はペルオキシダーゼ結合抗(マウスIgG) P260 (Dako)であった。増強された化学発光(ECL, Amersham)を用いて、プロットを展開した。

【0059】

ELISA

標準的なサンドイッチELISAを用いて、PAPP-A抗原を測定した。捕捉抗体はポリクローナル抗PAPP-A/プロMBPであり、抗PAPP-Aモノクローナル抗体234-2及び234-5、次いでペルオキシダーゼ結合抗(マウスIgG)P260を用いて、検出を行った。Oxvigら、Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1201: 415-423により記載されたように調製された、高度に精製されたPAPP-A/プロMBPを用いてキャリブレーションを行った。

【0060】

IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼの精製を、特異的生物アッセイ、すなわち、添加されたIGF-IIの非存在下ではなく、存在下での、18及び14 kDaの放射標識断片

への $[^{125}\text{I}]$ IGFBP-4の無細胞分解を用いてモニターした。この手法は、目的の特異的酵素の精製を確認するという明らかな利点を有する。高度に精製されたIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼを、亜鉛キレートとレクチン親和性クロマトグラフィーの組合せにより、800 mLのHFCMから取得した。結合しなかったタンパク質又は弱く結合したタンパク質は、流出物中に出現するか、又は0 mM N-アセチルグルコサミンで3回、及び25 mM N-アセチルグルコサミンで3回、洗浄することにより溶出した。IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性は、500 mM N-アセチルグルコサミンの3回の洗浄で溶出した。IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を、5 nM IGF-Iの非存在下ではなく、存在下での無傷の24 kD $[^{125}\text{I}]$ IGFBP-4の損失並びに18及び14 kDa放射標識断片の出現として規定した。

【0061】

SDS / PAGEにより、IGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を含む最終画分をさらに分析したところ、400、230、200及び175 kDaに4つの高分子量のバンドが示された。これらのバンドのタンパク質を、タンデム型質量分光マイクロ配列決定分析により同定した。これらのペプチドは全て、既知のタンパク質であるか、又は既知のcDNA配列から推定されたタンパク質であった。175 kDaのバンドで同定されるペプチドとしては、ヒト α -2-マクログロブリン、ヒトトロンボスポンジン1、ヒトコラーゲン、ウシ α -1-アンチキモトリプシンのアイソフォームpHHK1、ヒトsoares精巢NHT cDNAクローン727252.5'、sommer *Pristionchus pacificus*、ヒトリボヌクレアーゼ6、及びCaenorhabditis elegans cDNAクローンyk 182d6が挙げられた。200 kDaのバンドで同定されるペプチドとしては、ヒトPAPP-A、ラットヘミフェリン、及びウシトランスフェリンが挙げられた。230 kDのバンドでは、ヒトラミニン α -1鎖及びヒトラミニン β -鎖が同定され、400 kDのバンドでは、ヒトコラーゲン α -1が同定された。

【0062】

HFCMに由来するIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼの特徴とタンデム型質量分光測定によって同定されたタンパク質の特徴との比較に関する広範囲の文献検索により、1つだけ合致した。この候補タンパク質はPAPP-Aであった。PAPP-Aとして同定されたタンパク質は、残基110~116 (ADLELPR、配列番号1)、133~143 (SPAV

ITGLYDK、配列番号2)、190~209 (SYLPGQWVYLAATYDQGFMK、配列番号3)、373~387 (EQVDFQHHQLAEAFK、配列番号4)、1071~1087 (TISYPYSOLAQTTFWLR、配列番号5)、及び1180~1195 (SFDNFDVTLSSCQRG、配列番号6)を含んでいた。PAPP-Aは、もともと正常なヒトの妊娠血清から単離された4つのタンパク質のうちの1つである。Linら、Am. J. Obstet. Gynecol., 1974, 118: 223-236を参照されたい。PAPP-Aは、胎盤機能の指標及びダウン症候群の最初のトリメスターのスクリーニングの指標として用いられてきた。さらに、ヒトにおける胎盤のPAPP-Aの「ノックアウト」は、不完全な胎児の発生及びそれに続く奇形を含む症状であるコルネリア・ド・ランゲ症候群と関連するようである。HFCMに由来するPAPP-AとIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼは、これらが共に Zn^{2+} に結合する高分子量のグリコシル化されたタンパク質であるという点で類似している。さらに、PAPP-Aをコードするクローン化されたcDNAから誘導されるアミノ酸配列は、位置482~492に特異的な Zn^{2+} 結合モチーフ(HEXXHXXGXXH、配列番号7)及びさらにメトジンシンファミリーのメタロプロテアーゼのみにC末端に見出されるMetターンを有する。PAPP-Aは個々のメトジンシンスーパーファミリーメンバーの他の規定的特徴に従わず、興味深いことに、PAPP-Aにおいては、亜鉛結合モチーフと保存されたMet残基の間の直線距離は63アミノ酸であるのに対して、他のメトジンシンにおいては、この距離は7~44残基である。

【0063】

PAPP-AとしてのIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼの同定を、さらなる生化学的アッセイを用いて検査した。非特異的ウサギIgGではなく、抗PAPP-A/プロMBPポリクローナルIgGは、用量依存的にHFCMにおけるIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を阻害した(図1A)。これらの無細胞アッセイにおいて、抗PAPP-A/プロMBPポリクローナル抗体の力価が1:50のとき、IGFBP-4タンパク質分解が完全に阻害され、力価が1:500のとき、プロテアーゼ活性の84%が阻害されたが、力価が1:5,000のとき、IGFにより誘導されたIGFBP-4プロテアーゼ活性の15%が阻害された。他の実験において、抗PAPP-A/プロMBPポリクローナルIgGを用いて、培地から、IGFBP-4プロテアーゼ活性を特異的かつ完全に免疫枯渇させた(図1B)。さらに、妊娠した女性の血清から精製されたPAPP-A/プロMBPは、IGF依存性IGFBP-4プロ

テアーゼ活性を示した(図1C)。無細胞アッセイにおいては、PAPP-A / プロMBPは単独では $[^{125}\text{I}]$ IGFBP-4に作用しなかったが、IGF-IIの添加により、18及び14 kDaの放射標識断片へのタンパク質分解が開始された。これはHFCMを用いたときに認められるものと同じである。高度に精製されたPAPP-A / プロMBPの4つの異なる調製物を用いた場合も同様の結果が得られた。

【0064】

PAPP-Aは、妊娠中にPAPP-Aを循環させる主要な源である胎盤の合胞体層において最も多く発現する。Bonneら、*Lab. Invest.*, 1994, 71:560-566を参照されたい。しかし、PAPP-Aは、非妊娠並びに妊娠女性からの血清及び排卵前の卵胞液において検出され、PAPP-A及びプロMBPの双方と反応し、かつ、どの程度かは不明であるが他のタンパク質とも反応するポリクローナル抗血清を用いた場合、分泌性子宮内膜、血管内皮、及び活発に増殖する胎児組織及び成人組織に免疫局在化した。

【0065】

ノーザン分析及びウェスタン分析を行って、培養されたヒト線維芽細胞及び骨細胞における明確なPAPP-A発現を証明した。ノーザン分析については、培養されたヒト細胞から得たポリAテイルを有するmRNA(10 µg)を、 ^{32}P 標識PAPP-A cDNAを用いて精査した。試験されたヒト細胞は、成人線維芽細胞、成人骨芽細胞、全骨芽細胞、骨髄間質細胞、MG63骨肉種細胞、U2骨肉種細胞、及びTE85骨肉種細胞であった。これらの実験に基づいて、ヒト線維芽細胞が13及び8.5 kDaにPAPP-A転写産物を発現することが観察された。また、ノーザンブロッティングから得られた結果は、PAPP-A mRNAは、成人及び胎児起源の正常ヒト骨芽細胞によって、及び前骨芽細胞によって発現されるが、いくつかの骨肉種細胞系によっては発現されないことを示している。これらの知見は、正常なヒト骨芽細胞によって馴化された培地中ではIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を示すが、形質転換された骨芽細胞によって馴化された培地中では示さないという以前の研究の結果と一致するものである。Durhamら、*Endocrinology*, 1995, 80:987-993を参照されたい。ヒト線維芽細胞によって発現されるのは、PAPP-A mRNAだけではなく、実際に、培養されたヒト線維芽細胞はPAPP-Aタンパク質を分泌する。ELISAによると、HFCM

は $0.18 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ のPAPP-A($n=4$)を含むことが判明した。比較としては、妊娠満期の血清は、約 $25 \mu\text{g/ml}$ のPAPP-Aを含む。HFCM($10 \mu\text{l}$ の30x濃縮物(ELISAによると $0.05 \mu\text{g}$ のPAPP-Aに相当する))及び妊娠血清から精製されたPAPP-A / プロMBP ($0.05 \mu\text{g}$)を用いて、ウェスタン免疫ブロッティングを行った。非還元的及び還元的条件下でSDS / PAGEによりタンパク質を分離し、メンブランに転写し、PAPP-A特異的モノクローナル抗体を用いて免疫プロットした。

【0066】

ウェスタンブロッティング分析により、HFCMがPAPP-Aに特異的なモノクローナル抗体と反応することが示された。非還元的SDS / PAGEにおいては、HFCMから得られたPAPP-Aは、分子量400 kDaを有し、妊娠血清から単離されたPAPP-A / プロMBPよりはいくらか速く移動するが、還元的SDS / PAGEにおいて200 kDaに認められるPAPP-A単量体よりはゆっくり移動する。線維芽細胞によるプロMBPの発現は、ELISA、ウェスタン又はノーザンブロッティングによっては検出されなかった。従って、HFCM中のPAPP-Aは、モノ二量体を形成する。

【0067】

実施例2 生殖組織及び非生殖組織におけるPAPP-Aの発現

帝王切開で得られた妊娠満期の胎盤組織(母体側の外)は、Aarhus University HospitalのDepartment of Gynecology and Obstetricsから提供されたものである。最初のトリメスターの栄養膜組織は、AarhusのDanish Cancer Societyから提供された。過形成及び腺癌に由来する前立腺組織は、Aarhus University HospitalのDepartment of Experimental Clinical Oncologyから提供された。骨髓に由来する単核細胞は、記載のように調製され、Aarhus County Hospital, DenmarkのDepartment of Hematologyから取得した。正常な乳腺組織並びに小葉乳腺癌及び乳腺管癌に由来するサンプルは、Aarhus County Hospital, DenmarkのDepartment of Pathologyから提供された。Aarhus University HospitalのDepartment of Gynecology and Obstetricsから提供された、卵巣、子宮内膜、子宮筋層、及び卵管に由来するサンプルは、正常な閉経後の女性(年齢 < 50歳)から子宮摘出術により得たものであった。血液サンプルは、妊娠女性(最初のトリメスター)から採取した。組織サンプルは全て、液体窒素中で保存した。

【0068】

mRNAの抽出とcDNAの合成

ドライアイス中に埋め込んだ乳鉢を用いて、凍結した組織サンプルを粉末状にした。次いで、約20 mgの組織粉末又は106細胞を、ガラスホモジェニセーター(Wheaton, USA)を用いて、1 mlの溶解/結合バッファー(0.5 M LiCl、10 mM EDTA、5 mM ジチオトレイトール、1% SDS、100 mM Tris-HCl、pH 8.0)中で溶解した。製造業者の指示に従って、Dynabeads mRNA DIRECTキット(DynaL A/S, Norway)を用いて、ポリA+RNAを単離した。20 µlの2 mM EDTA中で2分間、65 °Cにてインキュベートすることにより、オリゴdT DynabeadsからポリA+RNAを溶出させた。この直後、50%の溶出したポリA+RNAを、20 µlの供給バッファー中に溶解した4ユニットのトリ骨髄芽細胞症ウイルス逆転写酵素、10 pmolのオリゴdT₂₄、1 pmolの5'-AAACCCATTTTATTGCAGGGAGG-3' (MBP特異的プライマー(プロMBP cDNA配列中のnt 840-818、配列番号8))、1 pmolの5'-CTGTGGTTGTGTGACAAATGGC-3' (PAPP-A特異的プライマー(PAPP-A cDNA配列中のnt 4936-4915、配列番号9))、40ユニットのRNasin、1 mM dNTP、及び5 mMのMg²⁺と共に、60分間、42 °Cにてインキュベートすることにより、第1鎖cDNAを合成した。プライマー以外の全ての試薬はPromegaから入手した。残りのポリA+3 RNAを、逆転写酵素を加えずに同様に処理した。得られたcDNAをddH₂O中に希釈し(1:44, n=1~10)、競合的PCRの鋳型として直接用いるか、又は使用するまで-20 °Cで保存した。

【0069】

内部標準鋳型の調製

内部標準(IS)は、cDNAと同じプライマーで増幅することができる各cDNA PCR産物の欠失変異体(図2)である。先に記載された通り、プライマーを介する欠失により、PAPP-AのISを構築した。簡単に述べると、鋳型として胎盤由来の第1鎖cDNAを用いて、プライマーとしての5'-GGAGGCTCTGGGACTGCAC-3' (nt 4904-4886、配列番号11)と共に、5'-CAGTCAGCTGCTCAACGGAAGGACTCACATTGG-3' (PAPP-A cDNA配列中のnt 4712-4731及び4789-4805、配列番号10)を用いてPCRを行い、PAPP-A cDNAと同じプライマー結合配列を有するPAPP-A cDNA PCR産物の62 bp欠失変異体を作製した。HinPII-MspI断片(プロMBP cDNA配列中のnt 447-522)の切り出し

により、MBPのISを構築したところ、cDNA PCR産物の76 bp欠失変異体を得られた。HinPII-MspI断片(- アクチン cDNA配列中のnt 1045-1136)の切り出しにより、 - アクチンのISを構築したところ、92 bp欠失変異体を得られた。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のISの構築のために、鋳型として第1鎖cDNAを用いて、プライマー5'-AACGGGAAGCTCACTGGCATGATGACATCAAGAAGGTGGTG-3' (GAPDH cDNA配列中のnt 674-694及び765-787、配列番号12)を、5'-CCACCACCTGATGCTGTAGC-3' (nt 977-957、配列番号13)と共に用いてPCRを行い、cDNA PCR産物と同じプライマー結合配列を有するGAPDH PCR産物の73 bp欠失変異体を作製した。ISをアガロースゲルから精製し、配列分析により確認した。各PCRに添加された固定量のISを、即時使用可能なアリコートで - 20 にて保存された同じバッチから取得した。

【0070】

競合的ポリメラーゼ連鎖反応のためのプライマー

アクチン：5'-CACCCAGCACAATGAAGATCAAG-3' (ヌクレオチド1003-1025、配列番号14) および5'-GTCAAGAAAGGGTGTAAACGCAAC-3' (ヌクレオチド1207-1185、配列番号15) ; PAPP-A：5'-CAGTCAGCTGCTCAACGGAA-3' (ヌクレオチド4712-4731、配列番号16) および5'-GGAGGCTCTGGGACTGCAC-3' (ヌクレオチド4904-4886、配列番号17) ; MBP：5'-TTAGTCAAGCTTGGTTTACTTGC-3' (ヌクレオチド423-445、配列番号18) および5'-GGAAGTCTTCTGAGGCAGTGG-3' (ヌクレオチド720-700、配列番号19) ; GAPDH：5'-AACGGGAAGCTCACTGGCATG-3' (ヌクレオチド674-694、配列番号20) および5'-CCACCACCTGTTGCTGTAGC-3' (ヌクレオチド977-957、配列番号21)。括弧の中の数字は対応するcDNA配列中の位置を意味する。遺伝子およびcDNA配列は、Genbankから得た(登録番号：GAPDH:J02642およびJ04038; アクチン:X00351およびM10277; MBP:X14088およびM34462; PAPP-A:X68280)。全てのプライマーは、DNA Technology, Aarhus, Denmarkから得た。

【0071】

競合的ポリメラーゼ連鎖反応

全てのPCRを、1.5ユニットSuperTaq(HT Biotechnology, UK)、0.25mM dNTP(Pharmacia, Sweden)、80pmolの各々のプライマー、1x SuperTaqバッファー、1μl

内部標準鋳型(ブランク対照を除く)を総容量50 μ lで、ランプ速度4 /sでAbacus サーマルサイクラー(Denzyme, Denmark)を用いてガラス管内で行なった。全ての試薬(-20 で保存)の希釈したアリコートを使用して反応混合物を調製し、このうち49 μ lを一連のPCR実験においてそれぞれのガラス管へピペットで移した。1シリーズには、1組織からの第1鎖cDNAの希釈シリーズ、別の組織からの希釈シリーズ、唯一の鋳型としてISを用いた1つの対照、および1つのブランク対照(これはISの添加前にマスターPCR混合物から選ばれる)が含まれる。1 μ lの希釈cDNA鋳型の添加後、37サイクルのPCRを次のパラメーターを用いて行なった: 94 で30秒間(最初のサイクルでは90秒間)、アニーリングを30秒間(下記参照)、72 で40秒間(最後のサイクルでは400秒間)。アニーリング温度は、 β -アクチンおよびGAPDHに対しては62、PAPP-Aに対しては60、およびMBPに対しては58であった。IS鋳型量は、希釈因子の関数としてのPCR産物の両対数プロット(double logarithmic plot)の直線部分中に存在した。このことは、増幅が37サイクルを通して指数期にあったことを確実なものとする。各々のプライマー対のPCRプライマーは、可能性のあるゲノムDNAの混入の容易な検出を可能にする異なるエキソン上に位置していた(図2および表1)。cDNA調製物中へのゲノムDNAの混入は、調べた組織のいずれにおいても観察されなかった。

【0072】

【表1】

示された鋳型に対するPCR産物のサイズ(塩基対数)

鋳型	ゲノムDNA	cDNA	内部標準
β -アクチン	317	205	113
GAPDH	1529	304	231
PAPP-A	nd ^{a)}	189	127
MBP	408 ^{b)}	298	222

a) PAPP-Aのイントロン/エクソン構造は未決定。

b) 使用した5'-プライマーはイントロンの範囲に及ぶ。

【0073】

定量化

各希釈シリーズのために、ほぼ同量のcDNAおよびIS PCR産物を有する2つのサンプルを、2.5%アガロースゲルでゲル電気泳動によって判断するのに、20分間、TEバッファー中0.3~0.7Mの直線濃度勾配NaCl、pH 7.5、60 の条件で使用するWaters Gen-Pak4,41J FAX無孔イオン交換カラムを備えたHewlett-Packard 1084 HPLC装置で分離した(図3)。等モル量のcDNAおよびIS PCR産物を生じるであろう希釈率Dleqは、上記式1から計算した。

【0074】

Dleq値は、2つの別々の希釈シリーズのPCRから、および各々のシリーズの2つのcDNA希釈から得られる平均値として、それぞれの遺伝子産物に対して測定した。最終的に、PAPP-AまたはプロMBP mRNAの比存在率 Axは、上記の式2から決定した。

【0075】

したがって、該特定の存在比は、サンプル中の全mRNAの尺度に対して正規化された、目的遺伝子のmRNAレベルの尺度である。合理的な仮定であるが、細胞当たり一定量の - アクチンのmRNA分子が得られ、比存在率Aは、用いた組織の量に依存しない。

【0076】

RNAドットプロット分析

³²P標識PAPP-A cDNA断片pPa-1および³²P標識MBP PCR産物(上記参照)を、製造業者の教示に従い、ヒトRNAマスタープロット(Clontech)にハイブリダイズさせた。0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム、0.1% SDSを用いてpH7.0、65 で30分間の条件で2回洗浄した後、オートラジオグラフィーをフォスフォイメージャー(phosphorimager; Molecular Dynamics)を使用して、24時間行なった。前記ヒトRNAマスタープロットは、対照DNAサンプルに加えて、膜上にスポットされた以下の50の異なる組織からのサンプルを含む: 全脳; 小脳扁桃; 尾状核; 小脳; 大脳皮質; 前頭葉; 海馬; 延髄; 大脳後頭極; 果核; 黒質; 側頭葉; 視床; 視床下核; 脊髄; 心臓; 大動脈; 骨格筋; 結腸; 膀胱; 子宮; 前立腺; 胃; 精巣; 卵巣; 膵臓; 脳下垂体; 副腎; 甲状腺; 唾液腺; 乳腺; 腎臓; 肝臓; 小腸; 脾臓; 胸腺; 末梢白血球; リンパ節; 骨髄; 虫垂; 肺; 気管; 胎盤; 胎児脳; 胎

児心臓；胎児腎臓；胎児肝臓；胎児脾臓；胎児胸腺；胎児肺；酵母全RNA；酵母tRNA；大腸菌rRNA；大腸菌DNA；ポリr(A)；ヒトゲノム反復DNA；およびヒトDNA。全組織からのRNA量は、マスターロット上の8種のハウスキーピング遺伝子産物に対して正規化した。

【0077】

メッセンジャーRNAは、凍結ホモジナイズ組織サンプルからオリゴdT連結磁気ビーズを使用して抽出した。これは最小限度の分解を保証する迅速かつ容易なプロトコールである。感度を増大させるために、プロMBP、PAPP-AおよびオリゴdT特異的プライマー両方を第1鎖cDNA合成で使用した。連続希釈物を逆転写反応で得たcDNAプールを用いて作製した。これらのcDNA希釈物を競合的PCRの鋳型として、添加する固定量の遺伝子特異的IS鋳型と共に使用した。アクチンmRNAレベルの測定値から、比存在率を上記の各々の組織について計算した。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)mRNAレベルも測定した。予想通り、GAPDH mRNAの比存在率は最小の変化量を示した(128 ± 58 SD)。このことは、アクチンmRNAに対する正規化が有効であることを実証する。

【0078】

13の異なる組織由来の合計43サンプルにおけるPAPP-AおよびプロMBP mRNAの比存在率を、上記の半定量的RT-PCR法を用いて測定した。結果を図4に概説し、ここで各組織に対する平均比mRNA存在率を、妊娠満期の胎盤における比存在率の相対値として示す。妊娠満期の胎盤は、PAPP-AおよびプロMBPの両方について最高レベルの測定値を有していた。評価した組織には、妊娠満期の胎盤、最初のトリメスターの胎盤、子宮筋層、子宮内膜、卵管、卵巣、乳房、乳癌、前立腺、前立腺癌、骨髄、結腸、および腎臓が含まれる。最初のトリメスターの胎盤におけるPAPP-AおよびプロMBP mRNAの比存在率は、妊娠満期の胎盤よりも劇的に低かった(それぞれ75倍および17倍)。また、試験した全ての組織が測定可能な量の両mRNA種を含有していたことは明白である(図4)。閉経後の女性の子宮内膜においては、PAPP-A mRNAレベルは妊娠満期の胎盤よりも250倍低かった。試験した大部分の他の組織では、比PAPP-A mRNA存在率が妊娠満期の胎盤よりも500~3000倍低かった。骨髄細胞ではプロMBP mRNAは比較的高いレベルが予想されていたが、そ

の比プロMBP mRNA存在率は妊娠満期の胎盤よりも230倍低かった。胸部組織では、プロMBP mRNA存在率は妊娠満期の胎盤よりも800倍低かったが、一方で、試験した全ての他の組織では妊娠満期の胎盤よりも1300倍以上低かった。

【0079】

妊娠女性から採血した1.5ml全血のmRNA分析では、非常に低い アクチンmRNA レベルが示され、PAPP-AまたはプロMBP mRNAは検出不能であった。したがって、組織サンプル中に存在する血液は、mRNA種の比存在率の測定を妨害することはできない。

【0080】

半定量的RT-PCR法によって分析した組織サンプルに加えて、大量のPAPP-AまたはプロMBP mRNAを産生する組織に対する迅速なスクリーニングを実施した。これは、特異的³²P標識PAPP-A(pPA-1)またはプロMBP cDNAプローブを、50の異なるヒト組織由来のRNAを含有する膜にハイブリダイズさせることによって行なった。

【0081】

予想通り、胎盤は両mRNA種に対して非常に高いシグナルを示した。バックグラウンドより高いPAPP-Aシグナルを有する唯一他の組織は腎臓であった。この方法を用いて、プロMBP mRNAを胎盤、骨髄、および非常に低いレベルで腎臓において検出した。

【0082】

実施例3 ブタ平滑筋及びブタ冠状血管再狭窄モデルにおけるPAPP-A発現

ブタ血管平滑筋培養細胞 (vSMC) 及びヒトの皮膚線維芽細胞 (HF) のポリA+に富むmRNAをPAPP-A及びIGFBP-4の発現について調べた。図5に示すように、PAPP-A mRNA及びその基質であるIGFBP-4はvSMCにおいて発現していた。

【0083】

IGF-依存型IGFBP-4プロテアーゼ活性も、vSMC及びHF由来の細胞ならし培地で検出された。実施例1に記載したように、[¹²⁵I]IGFBP-4を用い、IGF-IIの存在下または不存在下、無細胞アッセイでプロテアーゼ活性を6時間モニターした。反応産物をSDS-PAGE及びオートラジオグラフィーで分析した。血管平滑筋細胞は、PAPP-Aと同一のプロテアーゼを分泌する。

【0084】

PAPP-Aタンパク質はまた、in vivoにおいて血管組織、特にブタ冠状動脈のバルーン損傷7日後の新生内膜 (neointima) の内皮細胞及び平滑筋細胞で検出された。新生内膜の過形成を刺激するために、若い雌ブタで特大のバルーンによる血管形成術を行った。Schwartz, R. S.ら, *Circulation*, 82:2190-2200, 1990。未成熟雌ブタ (*Sus scrofa*) で特大のバルーンによる血管形成術及びステント移植を行った。血小板凝集及び冠状血管の痙縮による急死を抑制するために、術前24時間に全ての動物に対して650mgのアスピリンと250mgのクロピドグレル、及び120mgのイソブチン-SRRを投与した。標準的な外科手術の方法で動脈切開術を実施し、頸動脈に導入用シースを入れた。シースを通してヘパリン (200units/kg) を投与して活性化凝固時間 (ACT) > 300を維持した。次いでガイド用カテーテルをシース内に入れ、必要に応じてX線透視下で冠状動脈内まで進行させた。0.014ガイドワイヤーを使用して所定の部位までデバイスを送達した。ステント設置直後に脈管内超音波を実施してステントの拡張及び付着特性を実証し、血管の直径を測定した。次いでカテーテルを取り出し、ステントの配置特性に留意し、動脈の切開部位を修復し、被験動物を回復させた。屠殺時には市販の静脈内バルビツレートの過剰量 (Sleepaway、耳の静脈から10ml) を投与して安楽死させた。心臓を取り出して冷却した生理的溶液 (クレブス - リンゲル) 中に入れた。冠状動脈を切り出して輪状に切断し、切片を4%パラホルムアルデヒドを含有するNaPO₄緩衝液 (pH7.4) に浸漬して固定した。次いでこの切片をパラフィン中に包埋し、正常な動脈から損傷部を経て正常な動脈へと戻る3mmの横断切片にスライスした。切片はヘマトキシリン及びエオシン (H & E)、弾性のある (elastic) ヴァン・ギーソンで染色するか、または凍結して保存した。血管形成術によって引き起こされた動脈損傷の度合いはSchwartzら, *Circulation*, 1990, 82:2190-2200による損傷スコアに従って評価した。

【0085】

施術1、7、14、28及び90日後、損傷していない血管及び損傷した血管から冠状動脈を切り出してパラフィンに包埋した。免疫組織化学染色のために、モノクローナルヒトIGFBP-4プロテアーゼ (PAPP-A) 抗体を使用した。Qin Q-Pら

, Clin. Chem. 1997, 43:2323-2332。中間層及び新生内膜の細胞は血管形成術後7日目にIGFBP-4プロテアーゼに対して強い免疫染色性を示し、28日目に発現がピークとなった。1日目では染色は観察されず、90日目で最小の染色が観察された。損傷のない切片ではIGFBP-4プロテアーゼ染色は見られなかった。市販の抗体を用いた場合、IGFBP-4染色は弱くぼやけており、IGFBP-5に対しては特異的な染色はなかった。PAPP-Aは、PAPP-Aマウスモノクローナル抗体(234-5)、ビオチニル化二次抗体である抗マウスIgG、及びストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼによって検出された。3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質で発色させた。

【0086】

実施例4 組み換えPAPP-Aの発現

本実施例では、哺乳動物細胞における組み換えPAPP-A (rPAPP-A) の発現について記載する。これはIGF/IGFBP系におけるPAPP-Aの役割に関する更なる研究、及び独特なメタロプロテイナーゼとしてのPAPP-Aの研究のための重要な知見を示す。興味深いことに、妊娠時血清中のrPAPP-A及びPAPP-A/プロMBP複合体の比較から、タンパク質分解活性における明白な差異が明らかにされた。これらの研究に基づき、プロMBPが*in vivo*においてプロテイナーゼ阻害剤として機能することが考えられる。この知見から、好酸球以外でのプロMBPの生物学的役割が明らかとなった。また、ジスルフィド結合によって阻害剤に共有結合した酵素と協同してのプロテイナーゼ阻害の新たな様式が提示される。

【0087】

プラスミドの構築

3個の重複する部分PAPP-A cDNAクローンである、p29-2、pPA3、及びpPA1から、PAPP-A発現プラスミドを構築した。Kristensen, T.ら, Biochemistry, 1994, 33:1592-1598, Haaning, J.ら, Eur. J. Biochem., 1996, 237(1):159-63。PAPP-Aの残基6-228をコードするp29-2のBbeI-EcoRI断片(及び残基1であるN末端Glu残基、及びヌクレオチド1-3としてGlu-1(GAG)をコードするコドンと共に番号付けされるcDNA配列)をそれぞれ部分消化及び完全消化によって切り出し、合成シグナルペプチド(MKDSCITVMAMALLSGFFFFAPASSYAA; 配列番号22)をコードする

ヌクレオチド断片及びPAPP-Aの残基1-5に連結した。簡単に説明すれば、後者の断片を、鋳型として重複オリゴヌクレオチド：

- 5' -CCTGCATCACTGTGATGGCCATGGCGCTGC-3' (配列番号23)、
 5' -TGTCTGGGTTCTTTTTCTTCGCGCCGGCCTC-3' (配列番号24)、
 5' -GAGCTATGCCGCGGAAGCTAGGGGCGCCAT-3' (配列番号25)、および
 5' -GCGGCATAGCTCGAGGCCGGCGCGAAGAAA-3' (配列番号26)
 5' -AAGAACCCAGACAGCAGCGCCATGGCCATC-3' (配列番号27)
 5' -ACAGTGATGCAGGAATCCTTCATAAGCTTAG-3' (配列番号28)

の混合物、及びHindIII制限部位(5' -CTAAGCTTATGAAGGATT-3' ; 配列番号29)及びBbeI制限部位(5' -ATGGCGCCCCTAGCTTCC-3' ; 配列番号30)を含むプライマーを用いてPCRで作製した。連結した生成物をpBluescript II (Stratagene)のHindIII/EcoRI部位にクローニングしてpBN-228を作製した。PAPP-Aの残基229-784をコードするpPA3のEcoRI-ClaI断片を切断してpBN-228のHindIII-EcoRI断片に連結し、pBluescript IIのHindIII/ClaI部位にクローニングしてpBN-784を作製した。更に、PAPP-Aの残基785-1547をコードし、3'UTRの一部を含むpPA-1のClaI-EcoRI断片を切断してpBN-784のHindIII-ClaI断片に連結し、pBluescript IIのHindIII/EcoRI部位にクローニングしてpBN-1547を作製した。PAPP-A cDNAのClaI部位はメチル化に対して感受性を有するため、必要な場合にはプラスミドを大腸菌dam株中で増殖させた。

【0088】

最後に、合成シグナルペプチド及びPAPP-Aの残基1-1547をコードするpBN-1547のHindIII-XbaI断片を、哺乳動物発現ベクター-pcDNA3.1+ (Invitrogen)のHindIII/XbaI部位にクローニングしてpcDNA3.1-PAPP-Aを作製した。この構築物は配列解析によって確認された。ハイグロマイシンB (Invitrogen)による選択を可能にするために、pcDNA3.1-PAPP-AのHindIII-XbaI断片を切り出してpcDNA3.1/Hygro(+)(Invitrogen)にクローニングし、安定にトランスフェクトされた細胞の作製のためにpcDNA3.1/Hygro-PAPP-Aを得た。トランスフェクションのためのプラスミドDNAはQIAprep Spin Kit (Qiagen)で調製した。

【0089】

公表されているPAPP-A cDNA配列との相違は1箇所で見られた。ヌクレオチド78-80 (AGT) は存在せず、その結果Val-27がなかった。元のcDNAクローン (p29-2及びpPA3) においても、再度の配列決定において同じ相違が見られた。

【0090】

組織培養、トランスフェクション及びタンパク質の発現

ヒト胚腎293T細胞 (293tsA1609neo) を、10%ウシ胎児血清、2 mMグルタミン、非必須アミノ酸、及びゲンタマイシン (Life Technologies) を添加した高グルコースDMEM培地で維持した。細胞を6 cmの組織培養皿上にまき、18時間後に10 µgのDNA (pcDNA3.1-PAPP-A) を用いてリン酸カルシウム共沈降法によりトランスフェクトした。更に48時間後、上清を回収して遠心分離により清澄化した。PAPP-Aを安定に発現する293T細胞系を作製するために、細胞をFspI-線状化pcDNA3.1/Hygro-PAPP-Aで同じ方法によってトランスフェクトし、400 µg/mlのハイグロマイシンB (Invitrogen) に対する抵抗性によって選択した。単一コロニーを拾って増殖させ、安定な細胞系を100 µg/mlのハイグロマイシンBを含む培地中に維持した。COS-7細胞は同じ培地中に維持したが、SuperFect (Qiagen) を用い、製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。

【0091】

トランスフェクションの2日後、上清は、PAPP-Aに特異的なELISAによる測定でおよそ5 µg/mlの組み換えPAPP-A (rPAPP-A) を含有していた。擬似トランスフェクト細胞由来の上清では、PAPP-Aは検出できなかった。rPAPP-A抗原は、入手可能な全てのモノクローナル抗体によってELISAで認識され、タンパク質の完全性 (integrity) はウエスタンブロッティングによって確認された。同様の結果はトランスフェクトされたCOS-7細胞においても得られた。

【0092】

ELISA

上清中の組み換えPAPP-Aのレベルは標準的なサンドイッチELISAによって測定した。PAPP-Aポリクローナル抗体、抗(PAPP-A/プロMBP)を捕捉のために用い、検出のためにPAPP-Aモノクローナル抗体 (mAb) (234-2、234-5、234-4、234-6、234-3、または234-7)、次いでペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG (P260、DAKO)

を用いた。妊娠時血清から精製されたPAPP-A/プロMBPまたは精製rPAPP-Aを使用して標準曲線を確立した。Qin, Q.P.ら, Clin. Chem., 1997, 43:2323-2332を参照のこと。標準におけるタンパク質の量はアミノ酸分析によって決定した。

【0093】

タンパク質の分画

細胞培養上清からのrPAPP-Aの精製は、沈降、ヘパリンクロマトグラフィー、及びゲル濾過の手順によって行った。妊娠時血清からのPAPP-A/プロMBP複合体の精製のためのプロトコルは、PEGによる沈降における相違（プロMBP/PAPP-A複合体で16%に対し、rPAPP-Aで4-12%）のために、rPAPP-Aの精製には有用ではなかった。組み換えPAPP-Aは、10% (w/v) PEG6000によって細胞培養上清（50 ml）から本質的には定量的に沈降した。沈降物を、標準的なプロテアーゼ阻害剤を含有する50 mM Tris、50 mM NaCl、pH8.0に溶解し、同じ緩衝液で平衡化したHiTrapヘパリンセファロース（5 ml）（Pharmacia）にのせた。結合したタンパク質を、1 ml/分で30分間かけて塩濃度を1000 mMまで直線的に増加させて溶出させた。組み換えPAPP-Aは、主として600 mM NaClのあたりで単一のピークとして溶出した。最後に、集めた画分を限外濾過によって濃縮し、PBSで平衡化したSuperose 6HR 10/30（Pharmacia）上で0.5 ml/分でクロマトグラフにかけた。PAPP-A/プロMBPは、Oxvig, C.ら, Biochem. Biophys. Acta., 1994, 1201:415-423に先に記載されたように、満期妊娠時血清から精製した。

【0094】

分析目的のために、集めた妊娠時血清、妊娠時血漿または培養上清を、50 mM Tris、50 mM NaCl、pH8.0で平衡化したMono Q HR 10/10（Pharmacia）にかけた。カラムにのせる前に、2倍容量の水の添加によってサンプルを希釈した。1 ml/分で40分間かけて50 mMから1000 mMまでの直線状塩勾配で溶出を実施し、1 mlの画分を回収した。全ての実験において、塩濃度は画分10で50 mM、画分50で1000 mMであった（図6A）。280 nmにおける吸光度は、同じ血清の1/10濃度の2度目の実験で記録し、それに10をかけて得た。得られた2個のクロマトグラムは重ね合わせることができ、PAPP-Aのより大きいピーク（およそ画分43）の形及び位置は同じであった。PAPP-Aのより小さいピーク（およそ画分24）

も2回の実験で同じ位置にきたが、ELISAを使用した場合には、PAPP-A抗原のレベルは2度目の実験からの画分では正確には決定できなかった。従って、最初の実験におけるELISAの値を使用する。

【0095】

種々の手順

SDS-PAGEはTris-グリシンゲル(10~20%もしくは15%)または予め作製した3~8%のTris-酢酸ゲル(Novex)で実施した。分離したタンパク質はゲルのクーマシー染色によって可視化するか、あるいは、オンラインHPLCを備えたApplied Biosystems 477A配列決定装置による配列解析のために、まずPVDF膜上にプロットした。免疫的可視化(Immunovisualization)は、化学発光の増大を利用して実施例2のようにして実施した。プロットは2%のTween20でブロックし、50mM Tris、500mM NaCl、0.1% Tween20、pH9.0(TST)で平衡化した。一次抗体(PAPP-Aに対してmAb234-2、プロMBPに対してmAb234-10)を0.5%ウシ胎児血清を含有するTSTで希釈し、プロットを37℃で1時間インキュベートした。TSTで希釈したペルオキシダーゼ結合二次抗体(P260、DAKO)とのインキュベーションは、室温で1時間行った。アミノ酸及びアミノ糖の加水分解及び定量は、Oxvig, C.ら, Biochem. Biophys. Acta., 1994, 1201:415-423に先に記載されたように行った。

【0096】

PAPP-Aのタンパク質分解活性の測定

IGFBP-4のタンパク質分解は、実施例1に記載したようにアッセイした。より反応容積を大きくした2つの並行経時的実験において、PAPP-A/プロMBP複合体の活性をrPAPP-Aの活性と比較した。等量のサンプルA(精製PAPP-A/プロMBPで較正したELISAによる測定で7µg/mlのPAPP-A/プロMBPに希釈した妊娠時血清プール)及びサンプルB(サンプルAと同様であるが、精製rPAPP-Aで較正したELISAによる測定で7µg/mlまで添加したrPAPP-A上清)を、5nMのIGF-IIIの存在下で[¹²⁵I]IGFBP-4と共にインキュベートした。レーンあたり10,000cpmに相当するサンプルを所定の時点でとり、EDTAを5mMまで添加することによって反応を止めた。また、サンプルAでの実験は、ポリクローナル抗(PAPP-A/プロMBP)の存在下でも

行った。同様の経時的実験を、選択したカラム画分におけるPAPP-A活性の比較のために行った。

【0097】

rPAPP-Aの特徴付け

精製したrPAPP-Aは、SDS-PAGEにおいて、妊娠血清から精製されたジスルフィド結合したPAPP-A/プロMBP 2:2複合体よりも速く移動した。還元されたrPAPP-Aおよび還元されたPAPP-A/プロMBPからのPAPP-Aは、双方ともおよそ200kDaのバンドとして移動した。従って、rPAPP-Aは、約400kDaの二量体として分泌される。防止できないと思われる限られた程度の分解が、ジスルフィド結合の還元後の双方の種類、および還元していない妊娠血清由来のPAPP-A/プロMBPについて見られる。

【0098】

無傷のrPAPP-A単量体の配列分析により、N-末端Gluの前にアラニン残基が付加されている、予想されたN-末端配列(Ala-Glu-Ala-Arg-Gly-Ala-Thr-Glu)が明らかになり、さらにPAPP-A単量体あたりのN-アセチル-グルコサミン(GlcN)モノサッカライドの数は、酸加水分解を通じて22個であることが見出された。PAPP-A/プロMBPから単離されたPAPP-Aは、PAPP-Aポリペプチド鎖あたり44個のGlcN単量体を含有する。

【0099】

唯一知られているPAPP-Aの基質であるIGFBP-4に対するrPAPP-Aの活性を分析したところ、予想した通り、IGFBP-4は、IGFの存在下で切断されるが、IGFの不在下では切断されなかった。rPAPP-Aの活性は、ポリクローナル抗(PAPP-A/プロMBP)抗体、EDTAおよび1,10-フェナントロリンによって阻害されるが、マトリックスメタロプロテイナーゼの広域スペクトルの阻害剤であるTIMP-1によっては阻害されなかった。偽形質転換された細胞由来の上清は、IGFを添加してもしなくとも、IGFBP-4タンパク質分解活性を含んでいなかった。

【0100】

初期実験により、妊娠血清から精製されたPAPP-A/プロMBP複合体は、0.1ngのrPAPP-Aと同程度のIGFBP-4切断を得るためにおよそ50ng必要とされることが明か

にされた。仮説としては、この相違は、クロマトグラフィー処理の間のPAPP-A/プロMBPの活性低下によって引き起こされ得る。従って、未分画妊娠血清のIGFBP-4タンパク質分解活性を経時的実験で測定し、平行した実験において妊娠血清PAPP-Aと同じ濃度にrPAPP-Aを添加した妊娠血清の活性を測定した。妊娠血清中のPAPP-AとrPAPP-Aとの比活性の相違は、この実験から約100倍であると概算された。妊娠血清とポリクローナル抗(PAPP-A/プロMBP)抗体とのインキュベーションは、IGFBP-4の切断を無効にした。阻害性抗(PAPP-A/プロMBP)抗体の存在下にて2倍量の妊娠血清とのより長いインキュベーション(24h)は、どのようなIGFBP-4分解も示さなかった。このことから判断すると、PAPP-Aは、IGFBP-4を切断することができる、優勢な、おそらく妊娠血清中唯一の、プロテイナーゼである。従って、妊娠血清中に存在するPAPP-Aは、プロMBPに結合することによって強く阻害される。

【0101】

上記の実験に基づいて、妊娠血清が、プロMBPと複合体を形成することなく、阻害されないPAPP-Aの痕跡量を含むかどうかを調べた。妊娠血清をロードしたMono Qカラムからの画分中のPAPP-A抗原の分布は、予想された通り、広範囲でかつ後期に溶出するPAPP-A/プロMBPピークを画分43付近に示した(図6A)。このピークの前に、より小さく、あまり広範囲ではない最大ピークが画分24に示された。興味深いことに、同様のクロマトグラフシステムで分析したとき、このピークの溶出位置および形状がrPAPP-Aのものに対応した。IGFBP-4に対する活性の比較から、PAPP-A抗原の比活性は、後期に溶出するピークよりも初期に溶出するピークにおいて高く、25倍を超えることが実証された。従って、画分24付近で溶出するPAPP-A抗原が、複合体を形成していないPAPP-Aである可能性が大である。2つのPAPP-Aピークはうまく分離されないため、初期のピークの画分はまた、比較的多量のPAPP-A/プロMBP複合体を含む。この解釈は、2つのピークの物質のウェスタンブロットングにより確認された(図6B)。プロMBP特異的モノクローナル抗体を用いた、平行したウェスタンブロットングにより、プロMBPは、初期のピークの上部PAPP-Aバンドには存在するが、下方PAPP-Aバンドには存在しないことが示された。複合体を形成していない二量体PAPP-Aは、妊娠血清中には

これまで証明されていない。プロMBPとの複合体形成は血液凝固の結果ではないことを確認するため、新たに採取されたEDTA処理妊娠血漿の別個の実験を同一の系で分析した。この場合も、2つのPAPP-Aピークが見出され、初期および後期に溶出するピークの高さの相違は、血清における場合と同じであった。従って、PAPP-Aの大部分は、PAPP-A/プロMBP複合体として妊娠血清および血漿の双方に存在するが、PAPP-Aの少量画分 (<1%) は、複合体を形成していないPAPP-A二量体として存在する。この複合体を形成していない画分が、非常に高い比活性を有する。

【0102】

結論として、プロMBPIは、PAPP-Aと共有結合性複合体を形成することによって妊娠血清中のPAPP-A活性を劇的に阻害する。妊娠血清の測定可能なPAPP-A活性は、阻害されていないPAPP-A二量体として存在する、1%未満のPAPP-A画分に由来する。しかしながら、後期に溶出するPAPP-Aが完全に不活性というわけではないので、少量の、仮説的には不完全に阻害されるPAPP-A/プロMBP 2:1複合体もまた、寄与しているかもしれない。かかる複合体は、主として、プロMBP炭水化物の極端な異種性によってPAPP-A/プロMBP 2:2複合体と一緒に溶出するだろう。

【0103】

多くのプロテイナーゼは、折りたたみおよび/または分泌を手助けするためのプロペプチドを必要とする。しかしながら、成熟rPAPP-AIは、抗原性があり、機能的であり、予想されるサイズの二量体として培養培地に豊富に分泌されるので、推定上のPAPP-Aプロペプチドは折りたたみにも分泌にも必要とされない。多くの場合、プロペプチドは、プロペプチド切断後のみに細胞外コンパートメントにおいて活性型となるチモーゲンのタンパク質分解活性を保持するように機能する。しかし、PAPP-Aの残基1のすぐ前の4残基のストレッチArg-Gln-Gln-Argは、コンセンサスフェューリン切断部位に類似する。従って、PAPP-AIは、in vivoで活性型プロテイナーゼとして分泌されると思われる。PAPP-Aポリペプチドの他の領域(おそらくはタンパク質分解ドメインのC-末端側の領域)は、別のメツジネイン(metzinein)メタロプロテイナーゼであるメプリン(mepriin)Aについて最近見出されたように、適切な折りたたみおよび分泌にとっておそらく重要である。

【0104】

実施例5 卵胞液中のIGFBP-4:

卵胞液を、体外受精(IVF)術のための卵胞吸引の際に採取し、さらに先に記載されるように(Chandrasekher, Y.A.ら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 1995, 80:2734-2739)定期的に生理のある女性から採取して、遠心することで細胞コンパートメントを除去し、-20 で凍結保存した。アンドロステンジオン対エストラジオールの比が4以下であった個々の卵胞を、エストロゲン優先体としてみなし、この比が4より大きい卵胞を、アンドロゲン優先体とみなした。ヘルシンキ宣言に応じたインフォームドコンセントが被験者より得られた後に、卵胞液サンプルを回収した。この研究は、医学的研究におけるヒト被験者の使用に関するスタンフォード大学委員会により承認された。先に記載されたように(Cataldo, N. A.ら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 1993. 76:207-215)、顆粒膜細胞を培養し、無血清ならし培地を回収した。ヒトIGFBP-4およびIGFBP-5は、それぞれS. Mohan博士(Loma Linda, CA)およびD. L. Andress博士(Seattle, WA)により提供された。TIMP-1はG. Murphy博士(Norwich, England)より提供された。

【0105】

IGFBP-4タンパク質分解は、実施例1に記載のように、サンプルを $[^{125}I]$ IGFBP-4とともに37 で6時間インキュベーションすることによってアッセイした。反応産物を、非還元7.5~15%勾配SDS-PAGEによって分離し、オートラジオグラフィによって視覚化した。

【0106】

幾つかの実験において、プロテアーゼ阻害剤(表2を参照)もしくはPAPP-Aポリクローナル抗体を6時間のインキュベーションの間、アッセイ混合物に添加した。他の実験において、PAPP-A抗体もしくは非特異的ウサギIgGをプロテインG-プラス/プロテイン-A-アガロース(Oncogene Science)に結合させて用い、IGFBP-4プロテアーゼ活性を免疫沈降させ、次いでサンプルの上清をプロテアーゼアッセイに用いた。

【0107】

PAPP-A ELISA

サンドイッチビオチン-チラミド(tyramide)増幅ELISAを、捕獲用のPAPP-Aポリクローナル抗体および検出用のPAPP-Aモノクローナル抗体のコレクションを用いて実施した(実施例4を参照のこと)。妊娠血清から精製したPAPP-Aを、較正のために用いた。

【0108】

IVF卵胞液を[¹²⁵I]IGFBP-4と共にインキュベーションすると、無傷のIGFBP-4(非還元SDS-PAGEで24-kD、還元SDS-PAGEで32-kD)の低下を招き、放射線標識された18-および14-kDaの断片が生成された。アッセイ混合物に、非特異的ウサギIgGではなく、PAPP-Aポリクローナル抗体を含めると、卵胞液中のIGFBP-4プロテアーゼ活性が完全に阻害された。この阻害は、IGFBP-4タンパク質分解に特異的であった。というのは、PAPP-A抗体は、卵胞液中の別のセリンプロテアーゼにより誘導される[¹²⁵I]IGFBP-5タンパク質分解を阻害しなかったからである。他の実験において、IGFBP-4タンパク質分解活性は、特異的PAPP-A抗体を用いて卵胞液から効果的に免疫枯渇された(immunodepleted)。

【0109】

IVF卵胞液中のIGFBP-4プロテアーゼ活性は、EDTAおよび1,10-フェナントロリンにより完全に抑制されたが、セリンプロテアーゼ阻害剤であるPMSFおよびペファブロック(pefabloc)によっては抑制されなかった。TIMP-1は何の影響も及ぼさなかった。これらの実験を2回にわたり実施して、同様の結果を得たので、表2に要約した。この結果は、精製PAPP-A(上記参照)、ヒト線維芽細胞ならし培地中のIGFBP-4プロテアーゼ活性(Conover C.A.ら, J. Clin. Invest., 1993, 91:1129-1137)および上記の組換え発現されたPAPP-Aについての阻害剤プロファイルと一致した。

【0110】

【表2】

IGFBP-4タンパク質分解に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の効果

プロテアーゼ阻害剤	FF	阻害% PAPP-A
EDTA、5mM	100	100
1,10フェナントロリン、5mM	100	100
PMSF、10mM	0	20
ペファブロック (Pefabloc)、1mM	15	ND
TIMP-1、5 μ g/ml	0	0

卵胞液 (FF、10 μ l) または妊娠血清から精製したPAPP-A (500ng) を、 $[^{125}\text{I}]$ IGFBP-4および上記の阻害剤とインキュベーションした。
ND: 測定せず

【0111】

様々な卵巣液中のPAPP-Aレベルに関するデータを表3に示した。特異的なPAPP-A ELISAを用いたところ、FF_e (IVF)卵胞液は、260~3728mIU/Lの範囲にある1604 \pm 315mIU/LのPAPP-Aを含有していた。FF_e (IVFではない)は、160 mIU/Lを有していた。比較したところ、IGFBP-4プロテアーゼ活性の欠如に関する先の論文に一致して、どのFF_eサンプルにおいても検出可能なPAPP-Aは存在しなかった。培養下の黄体化顆粒膜細胞由来の無血清ならし培地にはまた、PAPP-A免疫反応性物質が含まれていたが、非黄体化顆粒膜細胞由来の無血清ならし培地には含まれなかった。ヒト線維芽細胞ならし培地中のPAPP-Aレベルを比較のために用いた。

【0112】

【表3】

生物学的体液中のPAPP-Aレベル

サンプル	n	PAPP-A (mIU/L)
卵胞液		
FF _e (IVF)	12	1604 \pm 315
FF _e (非IVF)	1	160
FF _a	7	-
ならし培地		
黄体化GC	3	106 \pm 37
非黄体化GC	2	-
ヒト線維芽細胞	4	360 \pm 40

結果は、「n」個のサンプルの平均 \pm SEMである。

-: アッセイ感度以下を示す。

GC: 顆粒膜細胞

【0113】

卵胞液中のIGFBP-4プロテアーゼ活性は、外因性IGFとは無関係であった。このことは、卵胞液がIGFBP-4タンパク質分解を活性化させるのに十分なIGFペプチド、主としてIGF-II、を含有するという事実により説明できる。VanDessel, T.J.H.M., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1996, 81:1224-1231。実際に、黄体化顆粒膜細胞由来のならし培地は、無細胞アッセイにおいてIGF-依存的IGFBP-4プロテアーゼ活性を明かに示した。Cataldo, N.A.ら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 1998, 83:179-186;およびChandrakher, Y.A.ら, Proceedings of the 28th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 1995, Davis, C A(抄録102)。見かけ上構成的なIGFBP-4活性はヒト骨芽細胞においても報告されており、IGFの内因的生産に起因することが示された。

【0114】

特定の作用機構に拘束されるものではないが、卵胞発生の正確な段階での卵巣におけるPAPP-Aの発現は、IGFBP-4を切断するように作用し、局所の生物学的に利用可能なIGFの増加がステロイド産生を刺激し、排卵のための優性卵胞の発生を促進することを可能にする。このことは、無傷のIGFBP-4がヒト果粒膜細胞においてIGF刺激エストラジオール産生を阻害する一方で、タンパク質分解されたIGFBP-4は何の影響も及ぼさないことを示すin vitro研究により支持される。Iwas hita Mら, Horm. Res., 1996. 46(補遺.1):31-36。

【0115】

実施例6 ヒト冠状動脈平滑筋細胞はIGFBPを発現する:

成人のヒト冠状動脈平滑筋細胞(hCASMC)の一次培養物を、Clonetics(Walkersville, MD)から得て、5%のウシ胎児血清および抗生物質(50mg/mlのゲンタマイシン、50mg/mlのアンホテリシン-B)を含有する平滑筋細胞基礎培地(SmBM, 改変されたMCDB 131)中で培養した。この細胞培養物を5%CO₂/95%空気の湿潤雰囲気中で37℃に維持し、実験には5~7回継代して使用した。これらの細胞は、 α -アクチン平滑筋発現について陽性に染色され、第VIII因子関連抗原については陰性に染色される。

【0116】

細胞ならしhCAsMC培地は、細胞を2回洗浄し、6時間のウォッシュアウト期間、無血清培地(SFM, SmBM+0.1% RIA等級のウシ血清アルブミン)に交換することにより得た。培養物を、もう一度洗浄し、実験添加物を含む新鮮なSFMに交換した。インキュベーションの終わりに、細胞ならし培地を、2500rpmで30分間、4 で遠心分離し、細胞の破片を除去して-80 で保存した。

【0117】

培養hCAsMCは特異的なIGFBPを発現する。3種のhCAsMC培養物由来の24時間無血清ならし培地のウエスタンリガンドブロッキングは、24kD、29~32kDおよび38/42kDの主要なIGFBPを示した。特異的抗体を用いたイムノブロッキングは、これらの形態がそれぞれIGFBP-4、IGFBP-5およびIGFBP-3を表すことを示した。hCAsMCから抽出したRNAのノーザン分析は、基礎培養条件下でのIGFBP-3、-4および-5 mRNAの強い発現、IGFBP-2および-6 mRNAの弱い発現およびIGFBP-1 mRNAの検出不可能な発現を示した。

【0118】

培養hCAsMCはまた、特異的なIGFBPプロテアーゼを分泌する。hCAsMCは、PAPP-A mRNAを発現し、さらにPAPP-A抗原はならし培地中にELISAによって検出された(24時間、48時間、72時間でそれぞれ 10^5 細胞あたり 572 ± 38 、 740 ± 69 および 1224 ± 515 mIU/L; 1群あたりn = 4)。hCAsMCならし培地中のIGFBP-4プロテアーゼ活性は、特異的PAPP-A抗体によって阻害された。hCAsMCはまた、IGFBP-5に特異的なセリンプロテアーゼ活性を分泌する。この酵素の正体は決定されないままであるが、その活性はPAPP-A抗体によって阻害されなかった。プロMBPはhCAsMCならし培地中に検出されなかった。

【0119】

実施例7 細胞表面に結合するPAPP-A

フローサイトメトリーを用いて、空の発現ベクターまたはrPAPP-AをコードするcDNAを含むベクターのいずれかでトランスフェクトしたHEK 293細胞の細胞表面へのPAPP-Aの結合を評価した(ベクターおよびトランスフェクションの説明については実施例4を参照されたい)。トランスフェクトして48時間後の細胞を、5 mMのEDTAで剥がし、2% FBSを含むL15培地(L15/FBS)中で洗浄し、同一の培地

中に、約1,000,000 細胞/ml となるように再懸濁した。15 μ lの細胞懸濁液を一次抗体とともに(精製したPAPP-A特異的mAb 234-2の最終濃度を5 μ g/mlとした)氷上で30分間インキュベートした。次に、細胞をL15/FBS で3回洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートが結合したヤギ抗マウスIgG (重鎖および軽鎖、Zymed Laboratories, San Francisco, CA)とともに氷上で30分間インキュベートした。1%ホルムアルデヒドを含むバッファー中で細胞を固定し、Becton Dickinsonの装置でフローサイトメトリーにかけた。結果は、PAPP-AがHEK 293細胞の表面に結合することを示した。同様の結果が、その他のPAPP-Aモノクローナル抗体(234-3、234-4、234-5および234-7)でも得られた。

【0120】

実施例8 プロテアーゼ耐性IGFBP-4変異体によって被覆された生物活性ステント(stent)

この研究では、プロテアーゼ耐性IGFBP-4変異体によって被覆された生物活性ステントを使用する。IGFBP-4 変異体は既にステントに結合しているので、所望の作用部位に直接送達される。生物活性ステントの移植は、全身的送達と比較して、応答を引き出すのに要する分量を大幅に減じる可能性を有する。金属表面に直接物理的に結合しているIGFBP-4変異体により、治療用タンパク質は移植片と同時に送達され、さらなる介入の必要性を排除する。

【0121】

共有結合法を使用して、プロテアーゼ耐性IGFBP-4をステントストラット表面に架橋する。プロテアーゼ耐性IGFBP-4の説明については、Qin, X.ら、J. Bone Min. Res., 1999,14: 2079-2088を参照されたい。ステントあたり約1mgおよび10mgのIGFBP-4変異体を試験する。IGF系タンパク質を金属表面に架橋するための技術では、オルガノシランおよび二官能性架橋剤を利用する。この方法では、最初にオルガノシランを金属表面の酸化物に結合させ、続いてタンパク質をオルガノシラン上のアミノ基に、二官能性架橋剤を用いて物理的に架橋することが必要である。これまでに、ヘパリン、細胞接着タンパク質および成長因子を含む生体分子を、金属を含む様々な表面に結合するために、様々な架橋法が使用されてきた。IGFBP-4変異体を移植片に架橋するための調製方法は、ステントを、2.5%フ

ッ化水素酸-10.5%硝酸で1分間酸処理し、高純度の水で徹底的に洗浄することからなる。酸処理したステントは、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (95% EtOH 中1: 50 v/v)で30分間、23 でシリコン化する。シリコン化したステントを高純度の水で徹底的に洗浄し、110 のオープン中に10分間置き、次に45 のオープンに一晩置いた。IGFBP-4 (1mgまたは 10 mg) はステントに、PBS中のビス-(スルホスクシンイミジル) スベレートを用い、23 にて30分間で架橋した。架橋反応は、25 mM Tris、pH 7.5を用い、23 にて30分間で停止させた。対照ステントは、上記のように酸処理し、さらなる処理は次の洗浄工程の後に停止させる。準備したステントは凍結乾燥し、in vitro またはin vivo実験まで4で保存する。照射または冷氣による滅菌を使用して、移植片を滅菌する。

【0122】

IGFBP-4が結合した材料の生物学的有効性は、該材料を37 で最大28日間、バッファー中および血清含有培地中でインキュベートした後、IGF-I結合およびIGF-I誘導性のhCASMC遊走の阻害が示されることによりin vitroで証明される。非架橋材料をこの研究における対照として使用する。

【0123】

生物活性ステント(プロテアーゼ耐性IGFBP-4変異体)と非被覆(対照)ステントとの直接的比較は、次のように実施する。10匹の非近交系若年ブタを、各グループにつき5匹ずつ使用する。1個の被覆ステントを血管造影に好適な(適した直径で、大きな分岐がない)冠状動脈中に留置し、同様の大きさの1個の非被覆対照ステントを別の好適な大きさの冠状動脈中に留置する。以前の経験に基づくと、新生内膜肥厚(neointimal formation)および内腔の減少における有意な違いを検出するには、10個の処理動脈および10個の対照動脈で十分である。

【0124】

主な応答変数は、28日目の2つの状態における新生内膜肥厚の程度、ブタモデルに再狭窄が生じるのに要する時間である。処理の28日後(±2日)、動物は、処理した冠状動脈の定量的血管造影評価を実施した後で安楽死させる。続いて、心臓の血流を留め、ステントが留置されたセグメントを標準的なHistology ラボプロトコールに従って処理し、切断し、そして染色した。H & E染色およびエラ

スチカ-バンギーソン (elastic van Gieson) 染色 を、ステントの長さにわたる連続的な切片に対して実施する。

【0125】

定量的血管造影は、ステント留置前および後、ならびに28日後の血管直径を測定するために重要である。実施する定量的冠状動脈造影 (QCA)測定には次のものが含まれる：最小内腔直径；遠位および近位参照内腔直径；狭窄症% [最小内腔直径/参照内腔直径 (近位および遠位) × 100]。

【0126】

組織学的測定は、双方のステント (被覆と対照) の異なる効果についての知見をもたらす。これらは、被覆ステントおよび対照ステントの近位、中位および遠位から得られる。横断面測定には、内腔領域、内弾性板 (IEL) および/またはステント領域、新生内膜領域 (neointimal area)、内膜領域、外弾性板 (EEL) 領域、外膜領域、各ストラットワイア (strut wire) の内膜撓側厚 (新生内膜厚)、ステント内狭窄%、各ストラットワイアの傷害スコアを含む。血管傷害スコアはSchwartzら (前掲) が記載した方法を用いて次のように計算する。0、無傷の平均的内皮；1、内皮露出；2、IEL 裂傷；3、IELおよび中膜の裂傷；4、EEL裂傷。新生内膜厚は各ワイア部位で測定する。参照血管内腔領域は、ステントが留置されていない近位および遠位部位から得られる。

【0127】

1グループあたり10匹の動物サンプルの大きさは、考えられる新生内膜厚の相違0.1mmの0.8倍を検出できるように選択する。統計的分析を、各ワイア部位の傷害および新生内膜について実施する。回帰モデルを使用して、傷害および傷害依存性新生内膜応答を説明する。3つのモデルを使用して、調査した2つのグループ間の、インターセプトもしくはスロープにおける相違、またはインターセプトとスロープの双方における相違の有無を確認する。これらの変数の統計的有意性は、そのグループが新生内膜および傷害のスロープまたはインターセプトのいずれに有意性があるかを決定する。各障害レベルでの治療グループ間の相違はTukey-Kramer多比較t検定で解析する。

【0128】

in vitro実験は、架橋IGFBP-4変異体が生理学的条件下で長期にわたり機能性であることを示す。これらの実験は、IGFBP-4変異体が血清プロテアーゼによる全般的タンパク質分解に対して耐性を有することを実証する。7日間のインキュベーション後の架橋IGFBP-4変異体によるhCASMC遊走の有意な阻害が終点となる。In vivo研究の終点は、非被覆ステントと比較した、被覆ステントにおいて観察される血管造影（ステント内の狭窄）の低減および組織（内膜肥厚）の減少として測定される。さらに、実験用ステントから得られるデータを、組織に被覆されたステントのデータと比較する。

【0129】

実施例9 ヒトアテローム性冠状動脈硬化症プラークはIGFBP-4プロテアーゼを
発現する

4つの安定プラーク、5つの破裂プラークおよび5つの侵食プラークを含む14のプラークで、突然心臓死した患者の検死体から得たものを試験した。免疫組織化学的染色を、PAPP-A、IGF-IおよびIGFBP-4について実施した。プラークの細胞組成は、平滑筋アクチンおよびマクロファージに対する抗体を使用して決定した。PAPP-Aの発現は、冠状動脈中膜、プラークおよび脈管の脈管の中膜に由来するアクチン細胞内で、かなり高度であった。内皮および外膜は、有意に低いPAPP-Aレベルを示した ($p < 0.05$)。マクロファージではPAPP-Aは全く検出されず、安定プラークと不安定プラークの間に差異は観察されなかった。検出可能なIGF-I発現は見られず、IGFBP-4染色は全ての細胞種に散在した。

【0130】

従って、PAPP-Aはヒトアテローム性動脈硬化症プラーク中に存在する。PAPP-Aは、IGF-Iの局所的な生物学的利用可能性を増大させ、アテローム性動脈硬化症の進行に対するマーカーならびにプラークの成長を制限する治療上の標的となりうる。

【0131】

その他の実施例

本発明を詳細な説明とともに記載したが、上記の記載は説明を意図するものであって、本発明の範囲を制限することを意図するものではないことが理解されよ

う。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。その他の態様、有利な効果および改変は、特許請求の範囲に包含される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research
<120> INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN-4 PROTEASE
<130> 07039-145W01
<150> US 60/124,541
<151> 1999-03-15
<160> 30
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Ala Asp Leu Glu Leu Pro Arg
  1                               5
<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Ser Pro Ala Val Ile Thr Gly Leu Tyr Asp Lys
  1                               5                               10
<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Ser Tyr Leu Pro Gly Gln Trp Val Tyr Leu Ala Ala Thr Tyr Asp Gly
  1                               5                               10                               15
Gln Phe Met Lys
  20
<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Glu Gln Val Asp Phe Gln His His Gln Leu Ala Glu Ala Phe Lys
  1                               5                               10                               15
<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Thr Ile Ser Tyr Pro Tyr Ser Leu Ala Gln Thr Thr Phe Trp Leu Arg
  1                               5                               10                               15
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 6
 Ser Phe Asp Asn Phe Asp Pro Val Thr Leu Ser Ser Cys Gln Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus binding motif

<221> VARIANT
 <222> (1)...(11)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 7
 His Glu Xaa Xaa His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His
 1 5 10

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 aaaccattt tattgcagg agg 23

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 ctgtggttgt gtgacaaatg gc 22

<210> 10
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 cagtcagctg ctcaacggaa ggactcacat tgg 33

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ggaggctctg ggactgcac 19

<210> 12
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 aacgggaagc tcaactggcat gatgacatca agaaggtggt g 41

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 ccaccaccct gatgctgtag c 21

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 caccagcac aatgaagatc aag 23

 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 gtcaagaaag ggtgtaacgc aac 23

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 cagtcagctg ctcaacggaa 20

 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 17
 ggaggctctg ggactgcac 19

 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 ttagtcaagc ttggtttact tgc 23

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 19
 ggaagtcttc tgaggcagtg g 21

 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 20
 aacgggaagc tcaactggcat g 21

 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 21
 ccaccaccct gttgctgtag c 21

 <210> 22
 <211> 28

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial signal peptide

<400> 22
Met Lys Asp Ser Cys Ile Thr Val Met Ala Met Ala Leu Leu Ser Gly
 1           5           10           15
Phe Phe Phe Phe Ala Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Ala
      20           25

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
cctgcatcac tgtgatggcc atggcgctgc                               30

<210> 24
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgtctggggtt ctttttcttc gcgcggcct c                               31

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
gagctatgcc gcggaagcta ggggcgccat                               30

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 26
gcggcatagc tcgaggccgg cgcaagaaa                               30

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
aagaacccag acagcagcgc catggccatc                               30

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
acagtgatgc aggaatcctt cataagctta                               30

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
ctaagcttat gaaggatt                                           18

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 30
atgggcgcc tagcttcc                                           18

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A～1Cは、PAPP-AとしてのIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼの正体を確認するオートラジオグラムである。図1Aは、IGFBP-4プロテアーゼ活性が、示された力価のポリクローナルPAPP-A / プロ主要塩基性タンパク質(MBP)抗体(抗PAPP-A)の存在により阻害されるが、示された力価の非特異的ウサギIgGの存在下では阻害されないことを示す。図1Bは、HFCMからのIGFBP-4プロテアーゼ活性の免疫枯渇を示す。HFCMは、1:50の力価の非特異的ウサギIgGで予備除去し、次いで、示された力価のPAPP-A抗体で免疫枯渇させ、その後、IGFBP-4プロテアーゼ活性についてアッセイした。図1Cは、5 nMのIGF-IIの非存在下(-)又は存在下(+)で妊娠血清から精製されたPAPP-A / プロMBP(0.5 µg)のIGF依存性IGFBP-4プロテアーゼ活性を示す。

【図2】

図2は、増幅産物を比較する図表である。鋳型としてゲノムDNA(産物1)、cDNA(産物2)、又は内部標準(IS、産物3)を用いたPCR産物の長さを - アクチンについて示す。PCR産物1及び2の間の産物の大きさに相当の差異があるので、mRNA調製におけるゲノムDNAによる汚染を容易に検出することができる。A及びBは、それぞれ5'-及び3'-競合的PCRプライマーを表す。ボックスは、ゲノムDNA又はcDNA中のエクソンを表す。影付きのボックスは、ISを作製するために制限断片の切り出し又はプライマー介在欠失により欠失されるcDNAの一部を表す。

【図3】

図3は、PAPP-A特異的プライマーを用いたPCR産物のイオン交換クロマトグラフィー分離からのA_{2.60}溶出プロファイルである。バッファー成分、dNTP及びプライマーが最初に溶出する。cDNA(A)及び内部標準(B)鋳型のPCR産物は、良好に分離されており、容易に定量化することができる。縦の矢印は、スケールの変化(感度の8倍増加)を示す。

【図4】

図4は、平均妊娠満期胎盤比存在率(average term placenta specific abundance)に対して正規化した、試験した組織におけるPAPP-A及びプロMBPのmRNAの比存在率を示す棒グラフである。標準偏差を誤差バーとして示す。各組織について

のサンプル数を棒グラフの上に示す。

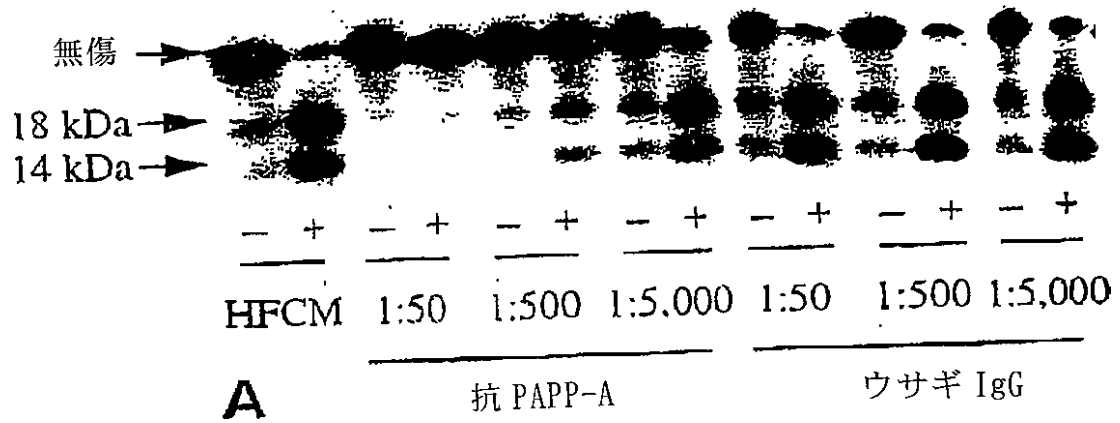
【図5】

図5は、IGFBP-4プロテアーゼ/PAPP-A及びIGFBP-4発現について精査された、培養ブタ血管平滑筋(vSMC)及びヒト皮膚線維芽細胞(HF)に由来するポリA⁺富化RNAのオートラジオグラムである。

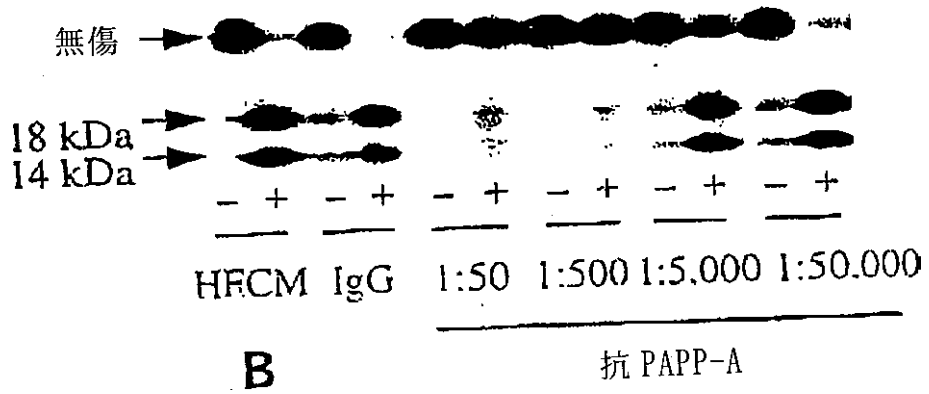
【図6】

図6A～6Bは、それぞれ選択された画分の陰イオン交換クロマトグラム及びウェスタンブロットである。図6Aは、Mono Q HR 10/10カラム上の陰イオン交換クロマトグラフィーを示す。妊娠血清(3.2 ml)を水で希釈し、カラムに載せ、次第に増加する塩濃度の勾配で溶出した。流速は1 ml/分であり、1 mlの画分を回収した。PAPP-A抗原の濃度を、ELISAにより全画分において測定し、クロマトグラム上にプロットした。PAPP-A軸は対数目盛りを有することに留意されたい。哺乳動物細胞中で発現された組換えPAPP-Aは、画分24の周辺に溶出する。図6Bは、3～8%のSDS-PAGEで分離されたクロマトグラフィー画分のウェスタンブロットである。陰イオン交換体から初期及び後期に溶出する妊娠血清PAPP-Aを、PAPP-A特異的モノクローナル抗体234-2を用いて分析した。画分24の周辺の画分(画分22～25)をプールし、ヘパリンクロマトグラフィーによりPAPP-A抗原を精製し、ゲル上に載せた(レーン1)。画分43からの物質(後期溶出PAPP-A)を、ゲル上に直接載せた(レーン2)。レーン2中の1つのバンドは、プロMBP特異的MABと反応した。レーン1中に認められる2つのバンドのうち、上部のバンドのみがプロMBP特異的mAbである234-10と反応した

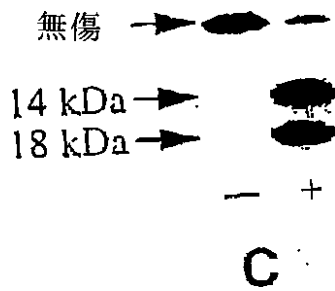
【図1A】



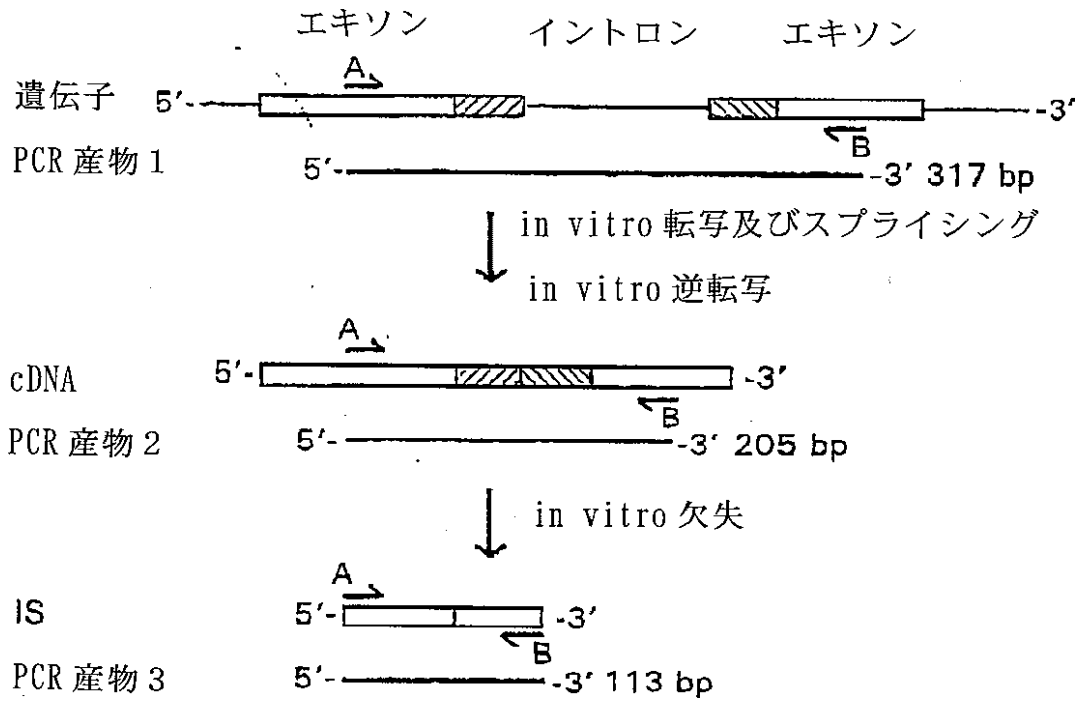
【図1B】



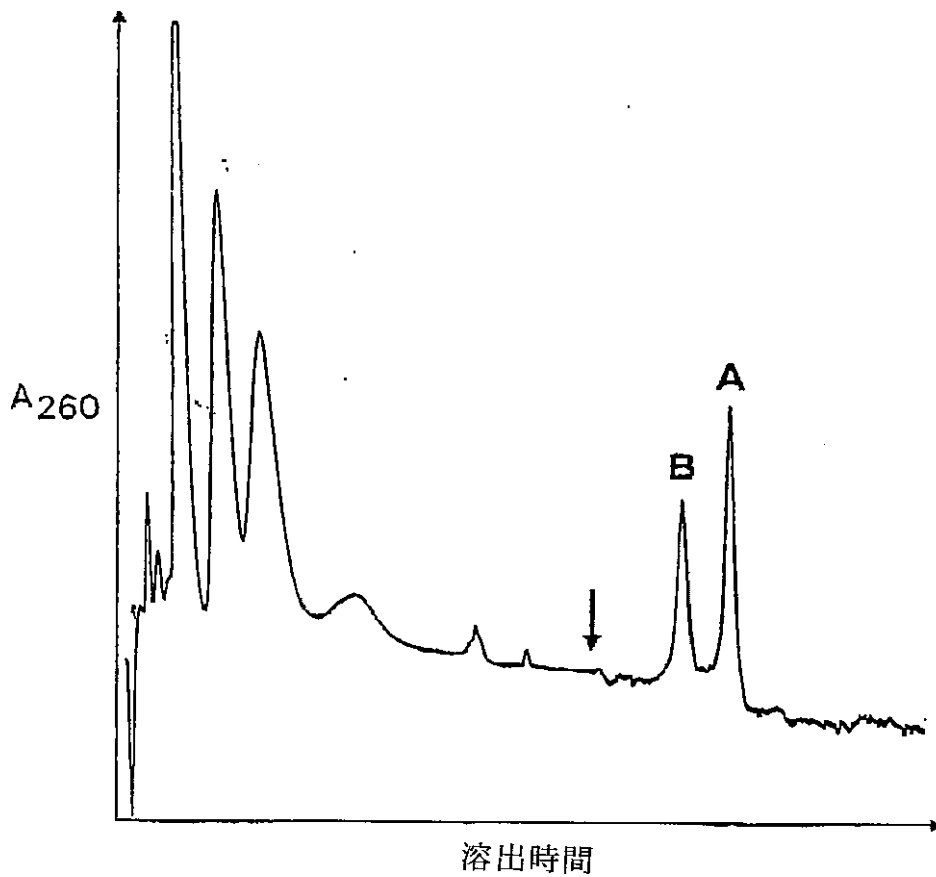
【図1C】



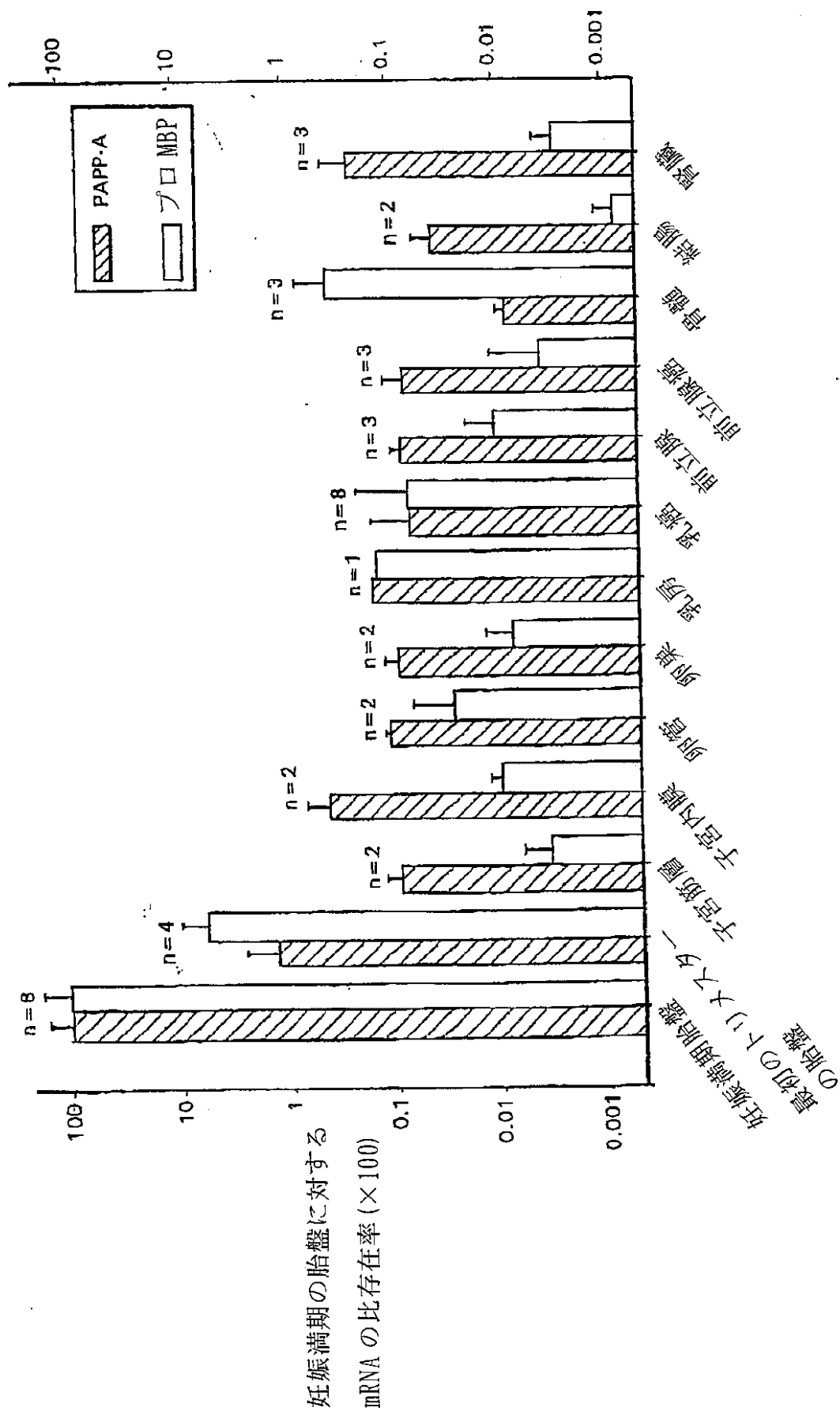
【図2】



【図3】

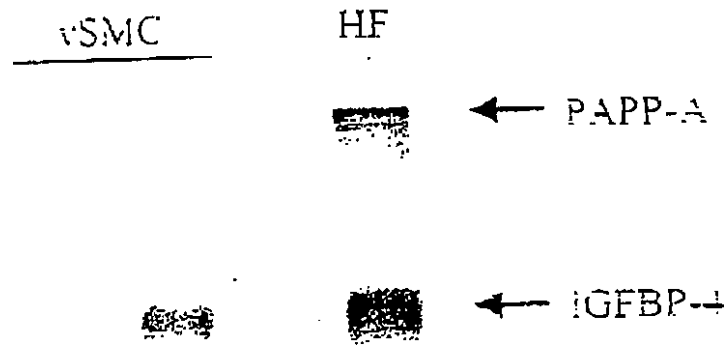


【図4】

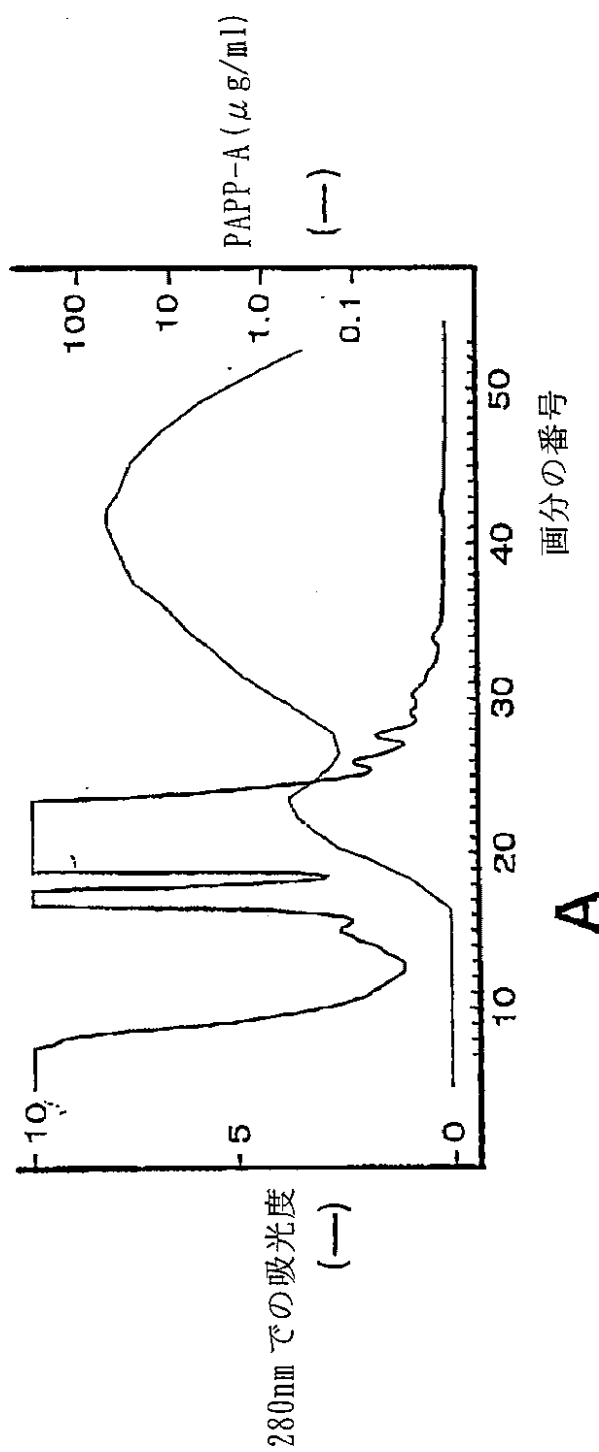


【図5】

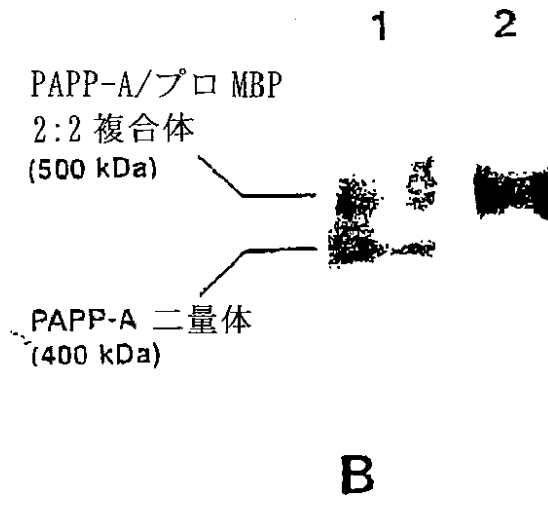
血管平滑筋細胞における IGFBP-4
プロテアーゼ/PAPP-A mRNA の発現



【図6A】



【図6B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/06728
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395, C12Q 1/00, C12Q 1/68, C12N 9/00 US CL : 424/146.1, 435/4, 435/6, 435/183		
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) U.S. : 424/146.1, 435/4, 435/6, 435/183		
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 practicable, search terms used) STN, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 99/32620 A1 (FORSSMANN et al) 01 July 1999 (01.07.99), p.26.	1-13,33-36
A	SEPPALA, M. et al. Pregnancy proteins in seminal plasma, seminal vesicles, preovulatory follicular fluid, and ovary. Annals of the New York Academy of Sciences. 1985, Vol. 442, pages 212-220, especially pages 219-224.	1,2,4,6-8
A	BERSINGER, N. et al. The pattern of serum levels of pregnancy - associated plasma protein A (PAPP-A) during the ovulatory menstrual cycle. British Journal of Obstetrics and Gynaecology. December 1984, Vol. 91, No. 12, pages 1245-1248, especially page 1246.	1,2,4,6-9
A	SJOBERG, J. et al. Hyperstimulated human preovulatory follicular fluid, luteinized cells of unruptured follicles, and corpus luteum contain pregnancy-associated protein A. Fertility and Sterility. April 1984, Vol. 41, No. 4, pages 551-557, especially pages 553-557.	1,2,4,6-9
Y	BISCHOF, P. et al. Is pregnancy-associated plasma protein A a tumor marker? American Journal of Obstetrics and Gynecology. 15 June 1982 (15.06.1982) Vol. 143, No. 4, pages 379-381, especially page 380.	1-13
Y	KUHADJA, F. et al. Pregnancy-associated plasma protein A. American Journal of Pathology. November 1985, Vol. 121, No. 2, pages 343-348, especially pages 342-347.	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" documents 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	
"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)	"Y" documents 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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"a" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 May 2000 (01.05.2000)	Date of mailing of the international search report 23 MAY 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Hurtzall Paula Dorothy Lawrence Telephone No. 703-308-0196	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 P	5/24	A 6 1 P	4 C 0 8 1
	9/10		4 C 0 8 4
	17/02		4 C 1 6 7
	19/10		4 H 0 4 5
	25/00		
	35/00		
	43/00	1 1 1	1 1 1
C 0 7 K	16/18	C 0 7 K	
C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	P
	33/53		D
	33/577		B
	33/68		
// C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	Z N A A
			A

Z N A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)出願人 マヨ ファウンデーション フォー メディカル エデュケーション アンド リサーチ

アメリカ合衆国 55905 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウス ウェスト 200

(72)発明者 オヴェルガルド, ミッチェル, トフト
デンマーク国 ディーケイ - 8000 アールス シィ テイエイチ., ジャニユス ラコウルスガド 12, ストリート

(72)発明者 オキシヴィグ, クラウス
デンマーク国 ディーケイ - 8260 ヴィビィ ジェイ ソエスクレンテン 36

(72)発明者 コノバー, シェリル, エイ.
アメリカ合州国 55902 ミネソタ州 ロ
チェスター, 22エヌディー アヴェニュー
エスタブリュ 939

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB14 BB20 BB24 BB46
BB48 BB50 CA25 CB01 CB03
DA14 DA36 FB01 FB03 FB05
FB06 FB08 FB13
4B024 AA11 BA43 DA02 HA11
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ36
QQ53 QQ95 QS33
4B064 AG27 CA10 DA03 DA13
4C060 LL15 MM24
4C081 AB02 CE02 DA01 DC14
4C084 AA17 NA14 ZA01 ZA45 ZA97
ZB26 ZC02 ZC11
4C167 AA42 BB05 BB70 CC09 DD01
GG16 GG41
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50

专利名称(译)	胰岛素样生长因子结合蛋白-4蛋白酶		
公开(公告)号	JP2002538804A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000604878	申请日	2000-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	哦, 威赛加德·米切尔托夫特 氧Vie的ING克劳斯 梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	Overugarudo, 米切尔, 托夫特 Okishivigu, 克劳斯 梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	オヴェルガルドミッチェルトフト オキシヴィグクラウス コノバーシェリルエイ		
发明人	オヴェルガルド,ミッチェル,トフト オキシヴィグ,クラウス コノバー,シェリル,エイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61B17/58 A61F2/84 A61K38/00 A61K45/00 A61L31/00 A61P5/24 A61P9/10 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/18 C12N9/64 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1 /37 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 A61M29/02		
CPC分类号	A61K38/00 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 C07K16/40 C07K2317/76 C12N9/6489 C12Q1/37 G01N33/57484 G01N33/689		
FI分类号	C12Q1/37 A61B17/58.310 A61K45/00 A61L31/00.Z A61M29/02 A61P5/24 A61P9/10 A61P17/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/68 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/BB50 2G045 /CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB13 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/HA11 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ53 4B063/QQ95 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA03 4B064/DA13 4C060/LL15 4C060/MM24 4C081/AB02 4C081 /CE02 4C081/DA01 4C081/DC14 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA45 4C084/ZA97 4C084/ZB26 4C084/ZC02 4C084/ZC11 4C167/AA42 4C167/BB05 4C167/BB70 4C167/CC09 4C167 /DD01 4C167/GG16 4C167/GG41 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	60/124541 1999-03-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了一种在非妊娠受试者中筛选改变的局部增生状态的方法, 其包括检测与妊娠相关的血浆蛋白A (PAPP-A) 的水平。还描述了鉴定改变PAPP-A的蛋白酶活性的试剂的方法, 以及含有这种试剂的药物组合物和医疗器械。

示された鋳型に対するPCR産物のサイズ(塩基対数)

鋳型	ゲノムDNA	cDNA	内部標準
β -アクチン	317	205	113
GAPDH	1529	304	231
PAPP-A	nd ^{a)}	189	127
MBP	408 ^{b)}	298	222

^{a)} PAPP-Aのイントロン/エクソン構造は未決定。

^{b)} 使用した5'-プライマーはイントロンの範囲に及ぶ。