



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 470**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00914965 .9**  
86 Fecha de presentación : **15.03.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1169058**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2002**

54 Título: **Factor de crecimiento similar a la insulina que une la proteasa de la proteína-4.**

30 Prioridad: **15.03.1999 US 124541 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.01.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.01.2008**

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL  
EDUCATION AND RESEARCH  
Mayo Clinic 200 First Street S.W.  
Rochester, Minnesota 55905, US  
Michael Toft Overgaard y  
Claus Oxvig**

72 Inventor/es: **Overgaard, Michael, Toft;  
Oxvig, Claus y  
Conover, Cheryl, A.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 288 470 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Factor de crecimiento similar a la insulina que une la proteasa de la proteína-4.

5 **Campo técnico**

La invención se relaciona con los usos de la proteína-A en plasma asociada al embarazo como un marcador para estados de crecimiento focales en pacientes no embarazadas.

10 **Antecedentes**

La división proteolítica de las seis conocidas proteínas de enlace del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBPs) es un medio poderoso de modificación rápida de la estructura y la función de estas importantes proteínas reguladoras de crecimiento. La IGFBP-4 intacta es un potente inhibidor de la acción del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) *in vitro*, y se ha demostrado que la división de IGFBP-4 suprime su capacidad de inhibir los efectos estimulantes del IGF en una variedad de sistemas, lo que sugiere que la proteólisis de IGFBP-4 actúa como un regulador positivo de la biodisponibilidad del IGF.

Lawrence, James B. *et al.*: "Characterization and partial purification of the insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4-specific protease from human fibroblast conditioned media". GROWTH HORMONE & IGF RESEARCH, Vol. 9, No. 1, February 1999 (1999-02), páginas 25 a 34 describe la actividad proteolítica presente en el medio acondicionado del fibroblasto humano que es específica para la IGFBP-4, una proteína de enlace de alta afinidad que modula la actividad de los IGFs. Adicionalmente, se describe que los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF)-I y -II son polipéptidos ca. de 7,5 kDa capaces de actuar en formas de autocrina, paracrina y endocrina para estimular el crecimiento de las células normales y transformadas.

El objeto fundamental de la presente invención es proporcionar un método para la selección o para el diagnóstico de los estados que promueven el crecimiento.

Este objetivo se soluciona por las características de la reivindicación 1. Ventajosas modalidades de la invención se describen por las características de las reivindicaciones 2 a 10.

En un aspecto, los métodos característicos de la invención para la selección de un estado que promueve el crecimiento o que inhibe el crecimiento en una paciente no embarazada. El método incluye la detección de un nivel de PAPP-A en una muestra biológica de la paciente no embarazada y comparando el nivel de PAPP-A en la paciente no embarazada con un nivel estándar de PAPP-A en pacientes no embarazadas. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste de sangre, orina, líquido pleural, lavados orales, biopsias de tejido, y líquido folicular, un incremento en el nivel de PAPP-A en la paciente no embarazada indica la presencia de un estado que promueve el crecimiento, mientras que una disminución en el nivel de PAPP-A indica la presencia de un estado que inhibe el crecimiento. Por ejemplo, un estado que promueve el crecimiento puede ser restenosis, arteriosclerosis, ovulación.

El nivel de PAPP-A se puede medir como la actividad de la proteasa de PAPP-A, o como una cantidad de proteína PAPP-A o ARN mensajero. La proteína PAPP-A se puede detectar inmunológicamente, por ejemplo, por al menos un anticuerpo monoclonal. La PAPP-A se puede detectar en un complejo PAPP-A con al menos otra proteína por ejemplo, proteína básica pro-principal, como un dímero de PAPP-A, o como un monómero de PAPP-A.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como comúnmente se entiende por alguien de ordinaria habilidad en el oficio para los cuales esta invención pertenece. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar para practicar la invención, los métodos y materiales apropiados se describen abajo. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos únicamente y no tienen la intención de ser una limitante.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

55 **Descripción de los dibujos**

Figuras 1A-1C son autoradiogramas que confirman la identidad de la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente como PAPP-A. Figura 1A indica que la actividad de la proteasa IGFBP-4 se inhibe por presencia del indicado título de los anticuerpos (anti-PAPP-A) policlonales PAPP-A/proteína básica pro principal (MBP), pero no en la presencia del título indicado del IgG de conejo no-específico. Figura 1B indica la inmunodepleción de la actividad de la proteasa IGFBP-4 del HFCM. HFCM se pre-ilustra con un título 1:50 de IgG de conejo no-específico, seguido por la inmunodepleción con el título indicado de anticuerpos PAPP-A, y luego ensayados por la actividad de la proteasa IGFBP-4. Figura 1C indica la actividad de la proteasa de PAPP-A/proMBP de la IGF-dependiente IGFBP-4 (0.5 mg) purificada a partir del suero de embarazo en la ausencia (-) o presencia (+) de 5 nM de IGF-II.

Figura 2 es un esquema que compara los productos de amplificación. Longitudes de los productos PCR con el ADN genómico (producto 1), el cADN (producto 2), o el estándar interno (IS, producto 3) como plantilla se indican

para la  $\beta$ -actina. Como existe una diferencia sustancial en los tamaños del producto entre el producto PCR 1 y 2, la contaminación con el ADN genómico en la preparación del mRNA se puede detectar fácilmente. A y B representan los cebadores PCR 5' - y 3' - competitivos, respectivamente. Las cajas representan los exones en el ADN genómico o el cADN. Las cajas sombreadas representan la parte del cADN que se suprime para generar el IS, tanto por excisión de un fragmento de restricción o por una delección mediada del cebador.

Figura 3 es el perfil de elución A260 de la separación por cromatografía de intercambio iónico de los productos PCR con cebadores específicos de PAPP-A. Los componentes reguladores, dNTPs, y los cebadores eluyen primero. Los productos PCR del cADN (A) y las plantillas del estándar interno (B) se separan bien y fácilmente pueden ser cuantificados. La flecha vertical indica el cambio de escala (incremento de 8 veces en sensibilidad).

Figura 4 es un histograma que indica las abundancias específicas de PAPP-A y mRNA de proMBP en tejidos analizados, normalizados contra la abundancia específica de la placenta a término promedio. Las desviaciones estándar se muestran como barras de error. El número de muestras para cada tejido se indica en las columnas anteriores.

Figura 5 es un autoradiograma del ARN poli A+-enriquecido del cultivo de células del músculo liso vascular porcino (vSMC) y fibroblastos de piel humana (HF) probados para la expresión de IGFBP-4 proteasa/PAPP-A y IGFBP-4.

Figuras 6A-6B son un cromatograma de intercambio aniónico y un Western blot de las fracciones seleccionadas, respectivamente. Figura 6A muestra la cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q HR 10/10. El suero de embarazo (3.2 ml) se diluyó con agua, se cargó en la columna, y eluyó con un gradiente de incremento de la concentración de sal. La velocidad de flujo fue 1 ml/min, y se colectaron las fracciones de 1 ml. La concentración del antígeno PAPP-A se midió en todas las fracciones por ELISA y se registró en el cromatograma. Notar que los ejes PAPP-A tienen escalas logarítmicas. El recombinante PAPP-A expresado en células de mamífero eluye más o menos en la fracción 24. Figura 6B es un Western blot de las fracciones cromatográficas separadas en SDS-PAGE 3-8%. El suero de embarazo PAPP-A que eluye temprano y retrasado a partir del intercambiador aniónico se analizó con un anticuerpo monoclonal específico PAPP-A, 234-2. Las fracciones en torno a la fracción 24 (fracciones 22-25) se combinaron y el antígeno PAPP-A se purificó por cromatografía de heparina y se cargó en el gel (senda 1). El material de la fracción 43 (PAPP-A que eluye retrasado) se cargó directamente en el gel (senda 2). La banda uno en la senda 2 reacciona con aproMBPspecificMAB. De las dos bandas visibles en la senda 1, únicamente la superior reacciona con aproMBPspecificmAb, 234-10.

### Descripción detallada

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son polipéptidos esenciales con acciones anabólicas y mitogénicas potentes *in vivo* e *in vitro*. La bioactividad de IGF se modula por distintas proteínas de enlace IGF de alta afinidad (IGFBPs), de las cuales, seis han sido identificadas hasta hoy. Las IGFBPs pueden experimentar proteólisis limitada con la consecuente modificación de la estructura y función de IGFBP, y por consiguiente la acción del IGF.

Una actividad de la metaloproteasa IGFBP-4-específica se secreta por fibroblastos humanos normales en cultivo. La incubación de IGFBP-4 en fibroblasto humano-medio acondicionado (HFCM) bajo las condiciones libre de células resulta en la división de IGFBP-4 (aproximadamente de 24 kDa no reducidas, aproximadamente de 32 kDa reducidas) en la porción media de la molécula que produce los distintos fragmentos de aproximadamente 18 y de aproximadamente 14 kDa. La característica definida de esta reacción proteolítica de IGFBP-4 es su absoluta dependencia de los IGFs para la actividad funcional. Solamente se necesitan muy bajas concentraciones de los IGFs, y, en general, IGF-II es más potente que IGF-I activando la proteólisis. Similar proteólisis IGF-dependiente del IGFBP-4 se ha descrito en, por ejemplo, los cultivos de osteoblastos humanos normales, células del músculo liso vascular, células estromales endometriales, células deciduales, y células granulosa, así como en líquido folicular ovárico. Previamente, la enzima responsable no se conocía por ser PAPP-A, haciendo la delineación de un papel fisiológico para la proteólisis del IGFBP-4 extremadamente difícil.

Según lo descrito aquí, la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente ha sido purificada de HFCM e identificada como PAPP-A. Los términos "proteasa IGFBP-4" y "PAPP-A" se utilizan de forma intercambiable a través del todo el texto. La PAPP-A ha sido descrita como una glicoproteína placentaria grande, presente en el suero de mujer embarazada en el incremento de las concentraciones a través del embarazo. La PAPP-A en suero de embarazo es disulfuro humano a la proforma de la proteína básica principal eosinófilo (proMBP), que forma un complejo de aproximadamente 500 kDa 2:2, denominado PAPP-A/proMBP. PAPP-A y proMBP se producen ambos en la placenta durante el embarazo, pero principalmente en diferentes tipos de células según se muestra por hibridación *in situ*. En este tejido, la inmensa mayoría de PAPP-A se sintetiza en el sincitiotrofoblasto, y allproMBP se sintetiza en los trofoblastos extracelular.

La secuencia de cADN de PAPP-A indica que la forma de suero se deriva de una pre-proteína con un péptido señal 22-residuo putativo, una pro-parte de 58 residuos, y un polipéptido maduro circulante de 1547-residuo. La secuencia no muestra ninguna similitud global con ninguna proteína conocida, pero contiene dos motivos de secuencia comunes a las metzincinas, una superfamilia de las metaloproteasas, tres repeticiones Lin-12/Notch conocidas de la superfamilia de proteína Notch, y cinco repeticiones consenso cortas conocidas de los componentes del sistema complemento. La PAPP-A sin el complejo con la proMBP no ha sido aislada a partir del suero de embarazo, pero, según lo descrito aquí, se puede aislar del medio acondicionado a partir de los fibroblastos humanos, osteoblastos humanos, de células del

músculo liso de arterias coronarias humanas, y de las células de mamífero transfectadas con cADN de PAPP-A. Ha sido reportado que el complejo PAPP-A/proMBP esta ausente del suero materno en embarazadas donde la madre lleva un feto con síndrome de Cornelia de Lange. Recientemente, se ha demostrado que PAPP-A y proMBP en conjunción con SPI son efectivos marcadores para detectar los fetos afectados con el síndrome de Down en 7-12 semanas de gestación.

La identificación de PAPP-A como la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente tiene ramificaciones inmediatas para la función placentaria y el desarrollo fetal. Adicionalmente, la identificación de la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente como PAPP-A, y la disponibilidad de la proteína pura y las herramientas moleculares asociadas actualmente permite la determinación del mecanismo fundamental, su IGF dependencia y el papel biológico de proteólisis IGF-dependiente localizado de IGFBP-4 en tales sistemas diversos como la cicatrización de la herida, remodelo del hueso, cáncer, arteriosclerosis, y desarrollo folicular.

Por consiguiente, la identificación de PAPP-A como la proteasa IGFBP-4 proporciona los métodos para la selección de estados de proliferación focal alterados en pacientes no embarazadas. "Estados de proliferación focal alterados" se refieren a los estados que promueven el crecimiento y que inhiben el crecimiento. Según se utiliza aquí, "que promueve el crecimiento" se refiere a uno o más de un incremento en el número de células, incremento en el tamaño de células, o un incremento en función celular diferenciada. Ejemplos no-limitantes de estados que promueven el crecimiento incluyen arteriosclerosis, restenosis, fibrosis, cicatrización de la herida, crecimiento de células cáncerosas IGF dependiente, y ovulación que incluyen el desarrollo folicular. "Que inhibe el crecimiento" se refiere a una disminución en la velocidad de crecimiento celular o tamaño de células, e incluye osteoporosis y tejidos/células en la vecindad de cánceres. Las células cáncerosas pueden tener expresión regulada hacia abajo de PAPP-A, ya que las células cáncerosas típicamente no dependen de los IGFs para el crecimiento. La expresión disminuida de PAPP-A puede desfavorecer las células circundantes, ya que las células circundantes dependen del IGF. Las pacientes no-embarazadas se examinan, como el ascenso grande en los niveles de PAPP-A en embarazo deberían opacar los cambios más pequeños en el nivel de PAPP-A. Los niveles de PAPP-A en suero bajo condiciones normales en voluntarios machos saludables son bajos, pero detectables ( $4.32 \pm 1.54$  mIU/L;  $n = 30$ ). En comparación, al alza de PAPP-A durante embarazo a aproximadamente 100,000 mIU/L a término.

#### 30 *Detección de la Proteína PAPP-A*

Una muestra biológica de una paciente no embarazada se evalúa para el nivel de PAPP-A, incluyendo el nivel de la proteína PAPP-A, mensaje (mARN), o actividad. Muestras biológicas apropiadas incluyen, por ejemplo, sangre, orina, líquido pleural, lavados orales, biopsias de tejido tales como piel, hueso, o placa de vasos sanguíneos, y líquido folicular. La sangre es una muestra biológica particularmente útil.

La proteína PAPP-A se puede detectar, por ejemplo, inmunológicamente. Por ejemplo, un ensayo sándwich se puede realizar capturando PAPP-A a partir de un ensayo biológico con un anticuerpo que tiene afinidad de enlace específico para PAPP-A. Luego se puede detectar la PAPP-A con un anticuerpo marcado que tiene afinidad de enlace específico para PAPP-A. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas inmunohistoquímicas estándar para detectar la proteína PAPP-A, utilizando tales anticuerpos. Los anticuerpos que tienen afinidad para los complejos PAPP-A/proMBP son disponibles. Ver, por ejemplo, Qin *et al.*, *Clin. Chem.*, 1997, 43(12):2323-2332. Los anticuerpos monoclonales que tienen afinidad de enlace específico para PAPP-A, pero no para los complejos PAPP-A/proMBP, se pueden producir a través de métodos estándar. En embarazo aproximadamente el 1% de PAPP-A de plasma y suero no forma complejos con la proteína proMBP, sino existe como un dímero de PAPP-A no-complejada. Las mediciones de la fracción de PAPP-A no complejada utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la forma no complejada de PAPP-A únicamente, es diferente de la medición total de PAPP-A con sus anticuerpos policlonales o monoclonales. La medición de la PAPP-A no complejada en suero de embarazo potencialmente tiene un valor de diagnóstico. Puesto que las funciones de proMBP como un inhibidor de la actividad de PAPP-A, la cantidad de PAPP-A no complejada también se puede estimar midiendo la actividad de PAPP-A de una muestra dada.

En general, la PAPP-A no complejada a proMBP se puede producir de varias formas, incluyendo recombinantemente, o se puede purificar a partir de una muestra biológica, y utilizar para inmunizar animales. Para producir PAPP-A recombinante, una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de PAPP-A se puede unir en un vector de expresión y utilizar para transformar una célula huésped bacteriana o eucariótica. En general, las construcciones de ácido nucleico incluyen una secuencia reguladora operablemente ligada a una secuencia de ácido nucleico de la PAPP-A. Las secuencias reguladoras no codifican típicamente un producto de genes, pero en lugar afectan la expresión de la secuencia de ácido nucleico. En sistemas bacterianos, una cepa de *Escherichia coli* tal como BL-21 se puede utilizar. Los vectores *E. coli* apropiados incluyen la serie pGEX de vectores que produce proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Las *E. coli* transformadas típicamente se cultivan exponencialmente, luego se estimulan con isopropiltiogalactopiranosida (IPTG) previo a la recolección. En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas por adsorción a unas perlas de glutatión-agarosa seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se designan para incluir trombina o sitios de división de proteasa factor Xa así que el producto de genes diana clonados se puede liberar de la fracción GST.

Las líneas celulares de mamífero que expresan la PAPP-A establemente se pueden producir utilizando los vectores de expresión con los elementos control apropiados y un marcador seleccionable. Por ejemplo, el vector de expresión eucariótico pCDNA.3.1+ (Invitrogen, San Diego, CA) es apropiado para la expresión de PAPP-A en, por ejemplo,

la células COS o células HEK293. Siguiendo la introducción del vector de expresión por electroporación, dextran DEAE, u otro método apropiado, las líneas celulares estables se seleccionan. En un sistema de expresión utilizando las células pCDNA3.1+ y HEK293, la producción de la proteína fue aproximadamente 5 mg/ml. El producto secretado fue un dímero falto de proMBP. Alternativamente, PAPP-A se puede transcribir y traducir *in vitro* utilizando extracto de germen de trigo o lisado de reticuloso de conejo.

En las células huésped eucarióticas, un número de sistemas de expresión viral-basados se pueden utilizar para expresar la PAPP-A. Un ácido nucleico que codifica la PAPP-A se puede clonar en, por ejemplo, un vector de baculovirus y luego se utiliza para transfectar células de insecto. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica la PAPP-A se puede introducir en un vector viral SV40, retroviral o basado de vacuna y utilizado para infectar las células huésped.

Como se describe aquí, la PAPP-A recombinante (rPAPP-A) es inmunoreactiva contra todos los anticuerpos monoclonales disponibles en ELISA y en Western blotting. La PAPP-A recombinante se secreta como un homodímero de aproximadamente 400 kDa; y después de la reducción produce los monómeros ligeramente más pequeños que la subunidad 200 kDa de la PAPP-A del suero de embarazo debido a un grado inferior de glicosilación. rPAPP-A es activa y divide IGFBP-4 de una manera IGF dependiente. La PAPP-A recombinante es aproximadamente 100-veces más activa que la PAPP-A en suero de embarazo.

PAPP-A se puede purificar, según lo descrito aquí. Por ejemplo, la PAPP-A se puede purificar a partir de HFCM pasándola sobre el ácido iminodiacético inmovilizado en Sepharose 6B cargada con  $Zn^{+2}$ . Después de la elución de las proteínas unidas con un gradiente de etapa por etapa disminuyendo el pH, la fracción de pH 5.0 se puede purificar además pasandola sobre una columna de aglutinina de germen de trigo. Las proteínas unidas se puede eluir con una solución de Tris-sal, luego por N-acetilglucosamina. Alternativamente, se puede utilizar una columna de heparina sefarosa y la PAPP-A se eluyó con un incremento en concentración de la sal a 1000 mM. Las fracciones que contienen la PAPP-A, según se mide con los anticuerpos PAPP-A específicos o con un ensayo específico de la actividad de la proteasa, se puedan mezclar, concentrar, luego evaluar por electroforesis de gel poliacrilamida SDS. En la reducción SDS/PAGE, la masa molecular del monómero de PAPP-A es aproximadamente 200 kDa.

Varios animales huésped pueden ser inmunizados por la inyección de la PAPP-A. Los animales huésped incluyen conejos, gallinas, ratones, conejillo de Indias y ratas. Varios adyuvantes que se pueden utilizar para incrementar la respuesta inmunológica dependen de la especie huésped e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, lapa californiana y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogénicas de las moléculas del anticuerpo que están contenidas en el suero de los animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, se pueden preparar utilizando una tecnología de polipéptido de PAPP-A y de hibridoma estándar. En particular, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas del anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo tales como las descritas por Kohler, G. *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), the human B-célula hybridoma technique (Kosbor *et al.*, *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cole *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 80:2026 (1983)), y the EBVhybridoma técnica (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1983)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, y cualquier subclase de estos. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden cultivar *in vitro* e *in vivo*.

Los fragmentos del anticuerpo que tienen afinidad del enlace específico para el polipéptido de PAPP-A se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se pueden producir por la digestión de pepsina de la molécula del anticuerpo, y los fragmentos Fab que se pueden generar por la reducción de los enlaces disulfuro de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bancos de expresión Fab. Ver, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275 (1989). Una vez producida, los anticuerpos o fragmentos de estos se analizan por reconocimiento de PAPP-A por métodos de inmunoensayo estándar que incluyen técnicas ELISA, radioinmunoensayos y Western blotting. Ver, *Short Protocols in Molecular Biology*, Chapter 11, Green Publishing Associates y John Wiley & Sons, Edited by Ausubel, F.M *et al.*, 1992. Los anticuerpos que tienen afinidad por PAPP-A se identifican en una selección positiva. Los anticuerpos identificados en tal selección pueden ser seleccionados negativamente contra PAPP-A/proMBP, para identificar los anticuerpos que tienen afinidad de enlace específico para los epítopos de PAPP-A que no son accesibles en el complejo específico de PAPP-A y proMBP.

#### Detección del Mensaje de PAPP-A

El mensaje de PAPP-A se puede detectar por un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general, el PCR se refiere a la amplificación de un ácido nucleico diana, utilizando la información de la secuencia a partir de los terminales de la región de interés o más allá de diseñar los cebadores de oligonucleótido que son idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas de la plantilla a ser amplificada. El PCR se puede utilizar para amplificar las secuencias específicas del ADN así como el ARN, que incluyen las secuencias del ADN genómico total o del ARN celular total. Los cebadores tienen típicamente de 14 a 40 nucleótidos de longitud, pero pueden fluctuar de 10 nucleótidos a un centenar de nucleótidos de longitud. El PCR se describe, por ejemplo en *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Ed. by Dieffenbach, C. y Dveksler, G., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Los ácidos nucleicos también se pueden amplificar por reacción en cadena de ligasa, amplificación del desplazamiento de la hebra, replicación de la

## ES 2 288 470 T3

secuencia sostenida por sí misma o amplificación de la secuencia de ácido nucleico-basada. Ver, por ejemplo, Lewis, R., *Genetic Engineering News*, 12(9):1 (1992); Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874-1878 (1990); y Weiss, R., *Science*, 254:1292 (1991).

5 Por ejemplo, los niveles del mRNA de la PAPP-A se pueden detectar utilizando un ensayo sensible, de reacción en cadena de la polimerasa -transcripción reversa semi cuantitativa (RT-PCR). El método se basa en la co-amplificación del cADN de la PAPP-A y una variante de delección de estos, la cual se utiliza como un estándar interno (IS). La cantidad de PAPP-A se normaliza contra la cantidad de mRNA total en la muestra, determinada como la cantidad de  $\beta$ -actina mRNA. Se ha mostrado que el RT-PCR es 1,000-10,000 veces más sensible que, las técnicas tradicionales de transferencia de ARN y fue competente para detectar y cuantificar la PAPP-A y el mRNA de proMBP en todos los tejidos analizados. En un número de estos tejidos, tales como colon, próstata, útero (endometrio y miometrio), ni la PAPP-A ni el mRNA de proMBP se detectaron cuando la selección de la transferencia en mancha de ARN comercial con sondas específicas PAPP-A o proMBP.

15 Los productos del PCR competitivo pueden ser cuantificados mediante cromatografía de intercambio iónico sobre un sistema de HPLC, un método exacto que involucra un mínimo de manipulación post-PCR. Por ejemplo, las muestras con aproximadamente iguales cantidades de productos de cADN y IS PCR, como se juzga por electroforesis en gel, se puede separar en un instrumento HPLC Hewlett-Packard 1084 equipado con una columna de intercambio iónico no porosa Waters Gen-Pak4,41J FAX utilizando un gradiente lineal de sal. Un valor de disolución,  $DI_{eq}$ , es la dilución que debería resultar en cantidades equimolares de aproximadamente cADN y PCR de los productos IS, y se pueden calcular de la ecuación 1:

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

donde:

30 CP es la cantidad de PCR del producto cADN, determinada como la absorción total A260; IP es la cantidad de producto PCR IS, determinado como la absorción total A260 corregida por la diferencia en tamaño a partir del producto de cADN; D es la dilución actual de la preparación de cADN; y  $DI_{eq(x)}$  es la dilución que debería resultar en cantidades molares iguales de IS y PCR del producto de cADN (x es PAPP-A, proMBP,  $\beta$ -actina, o GADPH).

35 La abundancia específica de PAPP-A o mRNA de proMBP,  $A_x$ , se puede determinar (ecuación 2):

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

donde:  $A(x)$  es la abundancia específica de la especie mRNA individual.

45 De tal manera, la abundancia específica es una medida del nivel de mRNA del gen de interés, normalizado contra una medida del mRNA total en la muestra. Dando una cantidad constante de las moléculas de mRNA de  $\beta$ -actina por célula, lo cual es una suposición lógica, la abundancia específica, A, es independiente de la cantidad de tejido usado. Como se describe aquí la PAPP-A y proMBP fueron significativamente más abundantes en placenta a término, que en otros tejidos analizados. Todos los tejidos analizados, que incluyen endometrio, miometrio, colon, y riñón, contenidos de mRNA de PAPP-A y de proMBP.

50 Las variaciones de este método incluyen un PCR cuantitativo de tiempo real utilizando el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7700 y sondas flurogénicas Taqman. Una referencia interna se utiliza, tal como la amplificación del rARN 28S con la concentración del cebador limitante. Este método permite la cuantificación inferior a aproximadamente 500 copias de la secuencia diana.

55 Alternativamente, las pruebas de tejidos diferentes para la presencia de mARNs específicos se pueden hacer rutinariamente por las técnicas de transferencia del ARN tales como transferencia en mancha o Northern. Como se describe aquí, los mARNs de PAPP-A y proMBP se detectaron en un rango de tejidos por selección ya sea un transferencia en mancha comercial de ARN o Northern blot que contienen cantidades normalizadas de ARN de diferentes tejidos humanos. La PAPP-A se detectó en placenta, y en tejidos no-placentarios tales como riñón, corazón, corteza adrenal, médula adrenal, testículos, intestino delgado, y estómago. La PAPP-A se detectó a niveles bajos en tejidos no-placentarios.

60 Como se describe aquí, la abundancia específica de PAPP-A y mRNA de proMBP difiere grandemente entre los tejidos; la placenta a término tiene niveles más altos de 200 veces más que cualquier tejido no-placentario analizado, verificando que el sitio principal de la síntesis de PAPP-A y proMBP durante el embarazo es la placenta. Los niveles bajos de mRNA de tejidos no-placentarios se reflejan en las concentraciones de PAPP-A y antígeno proMBP en suero muy bajas en individuos no-embarazados. Ambos PAPP-A y proMBP están entre los genes más altamente expresados

de la placenta, representando el 1% (PAPP-A) y el 5% (proMBP) del número total de clones en dos bancos de cADN placentarios (UniGene at <http://Hwww.ncbi.nlm.nih.gov/Uni-Gene/Hs.Home.html> library 398 y 399, respectivamente). En estos bancos, los clones PAPP-A y proMBP estaban entre los cinco más abundantes. Por consiguiente, las abundancias de mRNA específicas calculadas aquí para un número de tejidos son bajas comparadas con los niveles en placenta. En placenta, el mRNA de PAPP-A y de proMBP se detecta fácilmente por hibridación *in situ*.

La conclusión de que mRNA de PAPP-A se sintetiza en todos los tejidos examinados, reproductivos, así como no-reproductivos, indica que la PAPP-A funciona fuera del embarazo. Puesto que la mayoría de los tejidos analizados transcribe únicamente una de las dos especies de mRNA, se puede necesitar proMBP tanto para la función de PAPP-A como para la regulación de actividad de PAPP-A. Específicamente, proMBP puede ser un inhibidor de la actividad proteolítica de PAPP-A. La actividad medible de PAPP-A en suero de embarazo parece provenir de una pequeña fracción de PAPP-A que está presente como un dímero de PAPP-A no-inhibido. En la mayoría de los tejidos, la abundancia relativa de mRNA en la placenta a término es más alta para PAPP-A que para proMBP. No obstante, sin embargo, la concentración molar de PAPP-A en el tejido puede no exceder necesariamente la del proMBP. Todos los niveles de mRNA se expresan relativos al nivel en la placenta a término, donde la abundancia de mRNA de proMBP es más alta que la de PAPP-A. Interesantemente, en los tejidos donde proMBP o MBP se conocen por estar presentes en exceso de PAPP-A, i.e., células de médula ósea (leucositos eosinófilos) y placenta, la abundancia específica del mRNA de proMBP es más alta que la de la PAPP-A en relación con la placenta a término.

Los informes anteriores sobre la localización de PAPP-A en tejidos han dado lugar a resultados contradictorios, y la cuestión de la síntesis de PAPP-A no-placentaria ha sido un tema de controversia. Todas las investigaciones previas se han basado en los antisueros policlonales, y han aparecido, un número de informes describiendo la poliespecificidad y heterogeneidad de diferentes preparaciones de estos antisueros. Las preparaciones de antisueros han sido purificadas para minimizar la poliespecificidad, pero los antisueros policlonales levantados contra PAPP-A, ahora conocidas para ser PAPP-A/proMBP, invariablemente reconocerán la parte proMBP del complejo PAPP-A/proMBP, eosinófilo MBP maduro, así como SP1 y haptoglobina.

La hibridación *in situ* también se puede utilizar para detectar la PAPP-A mensaje. Esta técnica tiene la ventaja que localiza las células que sintetizan el mRNA, pero también es menos sensible que la RT-PCR. Como se describe aquí, los niveles de mRNA en varios de los tejidos son relativamente bajos, indicando que la síntesis mRNA de PAPP-A y de proMBP probablemente se limita a algunas células específicas en el tejido.

#### *Detección de la Actividad de PAPP-A*

La actividad de PAPP-A se puede detectar examinando la actividad proteolítica IGFBP-4 en una muestra biológica. Por ejemplo, un sustrato marcado de forma detectable se puede incubar en la presencia de la muestra biológica bajo condiciones apropiadas, y luego se detectan los productos proteolíticos. El sustrato puede ser, por ejemplo, IGFBP-4 o un fragmento de estos. En general, la reacción se puede realizar a 37°C en una solución reguladora tal como 2 mM CaCl<sub>2</sub>/50 mM Tris (pH 7.5), que incluye IGF-II o los fragmentos de este, o cualquier otro activador de proteasa. Típicamente, el sustrato se marca radioactivamente con isótopos tales como <sup>125</sup>I o <sup>32</sup>P, o se marca no-radioactivamente con biotina, digoxigenina, o un fluoróforo. La proteólisis de IGFBP-4 se detecta, por ejemplo, examinando los productos de proteólisis, tales como los productos de reacción de 18 y 14 kDa de IGFBP-4. Las proteínas radioactivas se pueden separar por la reducción 15% SDS/PAGE y visualizar por autoradiografía. Los productos de división proteolítica también se pueden detectar por inmunotransferencia.

La actividad de PAPP-A también se puede detectar después de capturar la PAPP-A con los anticuerpos policlonales o monoclonales inmovilizados, por ejemplo, en un pozo de una placa de microtitulación. Después del lavado de la proteína no unida de la muestra biológica, la actividad de PAPP-A se puede medir con un sustrato sintético de peso molecular bajo que libera un producto coloreado que se puede detectar espectrofotométricamente. El IGF-II u otro activador de PAPP-A se pueden adicionar con el sustrato.

Adicionalmente, la actividad de PAPP-A se puede detectar incubando la muestra en un pozo que contiene el sustrato inmovilizado, por ejemplo, IGFBP-4. El sustrato se marca específicamente, i.e., radioactiva o no-radioactivamente. Sobre la división proteolítica del sustrato, los fragmentos marcados se liberan en la fase líquida y se pueden detectar. El sustrato se puede inmovilizar, por ejemplo, mediante una cubierta con los anticuerpos o IGF-II.

La marcación también se puede lograr utilizando el IGFBP-4 expresado con diferentes marcas sobre el N-terminal o C-terminal de la proteína, por ejemplo una marca FLAG N-terminal y una marca c-myc C-terminal. Esto permite que el IGFBP-4 sea inmovilizado con un anticuerpo monoclonal que une una de estas marcas. La detección del enlace IGFBP-4 luego se puede lograr por metodología estándar ELISA utilizando, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal peroxidasa conjugado que reconoce la otra marca. El IGFBP-4 también se puede inmovilizar y detectar utilizando los anticuerpos monoclonales que reconocen el N-terminal y el C-terminal, respectivamente. La actividad proteolítica resultará en una señal disminuida, dependiendo de la cantidad de actividad de proteasa y el tiempo de incubación.

#### *Agentes que Alteran la Actividad de la Proteasa de PAPP-A*

La invención también proporciona métodos para los agentes de identificación que alteran la actividad de la proteasa de PAPP-A. "Alterada" se refiere a la inhibición o mejora de la actividad de PAPP-A. Según se utiliza aquí, "agentes" se

refiere a una macromolécula biológica tal como un oligonucleótido o un péptido, un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, o un extracto aislado de materia bacteriana, planta, hongos o animales. Los agentes inhibidores se identifican incubando un polipéptido de PAPP-A aislado, un activador de la actividad de la proteasa, y un sustrato de PAPP-A con el agente, y determinando si la proteólisis del sustrato se inhibe. Según se utiliza aquí, un “polipéptido de PAPP-A aislado” se separa de los componentes celulares que naturalmente lo acompañan. Típicamente, el polipéptido se aísla cuando es al menos 60% (por ejemplo 70%, 80%, 90%, o 95%), en peso, libre de proteínas y moléculas orgánicas que ocurren naturalmente que se asocian naturalmente con este. Según se utiliza aquí, “polipéptido” se refiere a un polipéptido de PAPP-A de cualquier longitud que tiene la actividad de la proteasa. Los activadores se identifican de una manera similar, excepto que el activador estándar, por ejemplo, el factor de crecimiento similar a la insulina I o II, se omite de la reacción. El IGFBP-4 o un fragmento de este, son sustratos particularmente útiles de PAPP-A. Las reacciones para identificar los inhibidores o activadores se realizan según lo descrito arriba. Los métodos son apropiados para librerías grandes de selección de inhibidores o activadores potenciales.

Como la PAPP-A se une a la célula superficial, inhibiendo o previniendo el enlace de PAPP-A a la célula superficial puede ser equivalente a la inhibición de la actividad proteolítica por interferencia con el sitio activo de la PAPP-A. Los agentes que inhiben o previenen el enlace de PAPP-A a la célula superficial se pueden identificar utilizando la citometría de flujo. En general, las células se incuban con un potencial agente de bloqueo, luego contactar con un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de enlace específico para PAPP-A, y el enlace a la célula superficial se evalúa con citometría de flujo. El agente de adhesión de bloqueo incluye, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal u otro polipéptido que se une a un epítopo necesitado del enlace a un receptor de célula-superficial.

#### *Dispositivos Médicos*

La invención también presenta un dispositivo médico para colocar a un paciente (por ejemplo, un implante) que incluye un agente que inhibe o activa la actividad de PAPP-A de la proteasa. Los agentes apropiados se identifican fácilmente utilizando los métodos descritos aquí. El dispositivo se puede impregnar con el agente o se puede cubrir con el agente. Ejemplos no-limitantes de los inhibidores incluyen un anticuerpo tal como anti-PAPP-A policlonal o monoclonal, o un inhibidor de metaloproteasa tal como 1,10-fenantrolina. La actividad de la proteasa del IGFBP-4 de PAPP-A se inhibe potently por la 1,10-fenantrolina, pero no se inhibe por inhibidores del tejido de la matriz metaloproteasas (TIMP'S). Otros inhibidores de la actividad de la proteasa del IGFBP-4 incluyen pequeñas moléculas tales como derivados de ácido hidroxámico. El IgG policlonal de la Anti-PAPP-A/proMBP, pero el IgG de conejo no específico, también inhibe la actividad IGF-dependiente del IGFBP-4 de la proteasa en HFCM de una manera dosis-dependiente. Adicionalmente, los polipéptidos (i.e., cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-translacional), incluyendo los polipéptidos modificados, pueden funcionar como inhibidores. Por ejemplo, las funciones de proMBP como un inhibidor de la actividad de la proteasa del IGFBP-4 de PAPP-A y se pueden utilizar para cubrir o impregnar el dispositivo médico. Los polipéptidos modificados incluyen sustituciones, deleciones, o inserciones de aminoácido en la secuencia de aminoácido como se compara con una secuencia de tipo salvaje correspondiente, así como las modificaciones químicas. Aunque el IGFBP-4 de la proteasa-resistente no es un inhibidor *per se* de la actividad de la proteasa del IGFBP-4 de PAPP-A, los resultados similares se esperan cuando el IGFBP-4 de proteasa resistente se utiliza para cubrir o impregnar un dispositivo médico.

Por ejemplo, la cubierta o impregnación del dispositivo médico con un inhibidor de PAPP-A puede ayudar a prevenir el desarrollo de restenosis siguiendo la angioplastia de globo, o puede prevenir un incremento adicional en tamaño de una placa aterosclerótica. La angioplastia coronaria con la colocación de un stent es actualmente el acercamiento terapéutico principal para la aterosclerosis coronaria. Un objetivo importante de la enfermedad de angioplastia de arteria coronaria es prevenir las complicaciones agudas y crónicas. Los procedimientos módem son absolutamente acertados en la eliminación inmediata de los problemas. Desafortunadamente, la restenosis todavía ocurre en el 20-30% de los pacientes tratados con stent. Ninguna intervención farmacológica conocida es disponible para prevenir la restenosis. Sin que se una por un mecanismo particular, se piensa que un incremento en la expresión del IGFBP-4 de la proteasa por células coronarias del músculo liso precede la formación neointimal en respuesta a la angioplastia en humanos.

Por ejemplo, la actividad de PAPP-A mejorada puede ser útil para la cicatrización de heridas, fracturas, osteoporosis, u ovulación. La osteoporosis u otras condiciones de pérdida de hueso se pueden beneficiar del incremento de la formación de hueso y disminución de la resorción del hueso. Los agentes que mejoran la actividad de PAPP-A pueden ser, por ejemplo, un IGF modificado, i.e., un análogo del IGF. Los análogos incluyen polipéptidos de IGF que contienen inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido, así como modificaciones químicas. Las sustituciones del aminoácido pueden incluir sustituciones de aminoácido conservadoras y no-conservadoras. Las sustituciones de aminoácido conservadoras reemplazan un aminoácido con un aminoácido de la misma clase, mientras que las sustituciones de aminoácido no-conservadoras reemplazan un aminoácido con un aminoácido de una clase diferente. Las sustituciones no-conservadoras resultan en un cambio en la hidrofobicidad del polipéptido o en el granel de un residuo de cadena lateral. Adicionalmente, las sustituciones no-conservadoras pueden hacer un cambio sustancial en la carga del polipéptido, tales como cargas electropositivas de reducción o cargas electronegativas de introducción. Los ejemplos de sustituciones no-conservadoras incluyen un aminoácido básico por un aminoácido no-polar, o un aminoácido polar por un aminoácido ácido. Las inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácido se pueden hacer utilizando mutagénesis aleatoria, mutagénesis sitio-dirigido, u otras técnicas recombinantes conocidas en el oficio.

El dispositivo médico puede ser, por ejemplo, placas de hueso o tornillos de hueso que se utilizan para estabilizar los huesos, o un stent, que típicamente se utiliza dentro del cuerpo para restaurar o mantener la evidencia de un lumen corporal. Los vasos sanguíneos, por ejemplo, pueden convertirse en obstruidos debido a una placa aterosclerótica que restringe el pasaje de la sangre. Una stent típicamente tiene una estructura tubular que define un canal interno que acomoda el flujo dentro del lumen corporal. Las paredes exteriores del stent ocupan las paredes interiores del lumen corporal. La posición de un stent dentro de un área afectada puede ayudar a prevenir la oclusión adicional del lumen corporal y permitir un flujo continuo. Un stent típicamente se destaca por la inserción percutánea de un catéter o cable guía que lleva el stent. El stent ordinariamente tiene una estructura expansible. Bajo la entrega al sitio deseado, el stent se puede expandir con un balón montado en el catéter. Alternativamente, el stent puede tener una estructura biselada o elástica que se mantiene dentro de una funda u otra restricción en un estado comprimido. El stent se expande voluntariamente cuando la restricción se retira. En cualquier caso, las paredes del stent se expanden para ocupar la pared interior del lumen corporal, y generalmente fijan el stent en una posición deseada.

#### Composiciones Farmacéuticas

La identificación de PAPP-A como el IGFBP-4 de la proteasa proporciona los métodos para afectar el crecimiento y la diferenciación *in vivo* utilizando PAPP-A como un blanco terapéutico. Los inhibidores de PAPP-A disminuirán la cantidad de IGF-I y IGF-II biodisponibles. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de PAPP-A puede ser útil en desórdenes tales como restenosis, aterosclerosis, y fibrosis. Los activadores, o agentes que incrementan la actividad de PAPP-A, incrementarán la cantidad de IGF-I y IGF-II biodisponible.

Los agentes que alteran la actividad de PAPP-A o que alteran la adherencia de PAPP-A a la superficie celular se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, un anticuerpo tal como anti-PAPP-A policlonal o monoclonal, se puede formular en una composición farmacéutica mezclando con los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables no-tóxicas. Tales compuestos y composiciones pueden ser preparadas para la administración parenteral, particularmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas en soluciones de solución reguladora fisiológica acuosa; para administración oral, particularmente en la forma de tabletas o cápsulas; o para la administración intranasal, particularmente en la forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Las composiciones para otras rutas de administración se pueden preparar según se desee utilizando métodos estándar.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes comunes (i.e., portadores farmacéuticamente aceptables) agua o salina estéril, polialquileño glicoles tales como polietileno glicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. En particular, biocompatible, polímero láctido biodegradable, lactido/copolímero glicólido, o copolímeros polioxietileno-polioxipropileno son ejemplos de excipientes para controlar la liberación de un compuesto de la invención *in vivo*. Otros sistemas de entrega parenterales apropiados incluyen partículas de copolímero acetato de etilvinilo, bombas osmáticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Formulaciones para la administración de inhalación pueden contener excipientes tales como lactosa, si se desea. Las formulaciones de inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y deoxicocolato, o pueden ser soluciones aceitosas para administración en la forma de gotas nasales. Si se desea, los compuestos se pueden formular como geles para ser aplicados intranasal. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden incluir el glicocolato para la administración bucal.

La invención será descrita adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

##### Identificación del IGFBP-4 de la proteasa como PAPP-A

Los fibroblastos humanos de un donante macho normal (GM03652, Coriell Institute, Camden, NJ) se cultivaron a confluencia en frascos T65, se lavaron dos veces con DMEM, y luego se cambian a 15 ml de 50:50 medio de Waymouth:DMEM que contiene 100 unidades/ml de penicilina. 100 mg/ml de estreptomycin/4 mM glutamina/0.1% BSA y se incubaron por 6 hr a 37°C. Las células otra vez se lavaron y cambiaron a 10 ml del medio libre de suero y se incubaron por 72 hr a 37°C. El medio acondicionado de fibroblasto humano (HFCM) se colocó en un tubo cónico estéril y se centrifugo a 2,500 rpm por 30 min a 4°C para remover restos celulares, se decantan en otro tubo cónico estéril, y se almacenó a -30°C.

**Actividad de PAPP-A.** La proteólisis del IGFBP-4 se ensayó incubando la muestra durante la noche a 37°C con 2 mM CaCl<sub>2</sub>/50 mM Tris (pH 7.5)/10,000 cpm de [<sup>125</sup>I] IGFBP-4 en la ausencia y presencia de 5 nM IGF-II en un volumen total de 25 µl. Las proteínas se separaron por reducción SDS/PAGE 15% y se visualizaron por autoradiografía. Para algunos experimentos, el anticuerpo policlonal de PAPP-A o IgG de conejo no específico se adicionó a la mezcla de ensayo o se utilizó en conjunción con la proteína G más proteína A-agarosa (Oncogene Science) para inmunoprecipitar la actividad de la proteasa del IGFBP-4 antes del ensayo.

**Purificación de PAPP-A.** HFCM (800 ml), en seis lotes de 130- a 150-ml, se pasaron sobre un lecho de 25-ml de volumen de ácido iminodiacético inmovilizado por Sepharose 6B (Sigma) se cargó con Zn<sup>+2</sup> y se equilibrio con

## ES 2 288 470 T3

50 mM Tris/50 mM de NaCl, pH 7.4. Las proteínas unidas se eluyeron secuencialmente con 50 ml cada una de un gradiente disminuyendo etapa por etapa una unidad de pH 0.5. La fracción de pH 5.0 se ajustó inmediatamente a pH 7.4 y se paso sobre una columna de lecho de 1-ml de volumen de aglutinina de germen de trigo equilibrada con 20 mM de Tris/100 mM de NaCl (pH 7.5) a 4°C. Las proteínas unidas se eluyeron con 15 ml cada una de 50 mM de Tris/100 mM de NaCl (pH 7.5) solo y luego con 25 mM y 500 mM de N-acetilglucosamina. Las fracciones de cinco-ml se colectaron y analizaron para la actividad de la proteasa del IGFBP-4. Las fracciones de las seis corridas de cromatografía se combinaron, concentraron por ultrafiltración, y se sometieron a electroforesis a través de un gel SDS/PAGE al 5% de acrilamida bajo condiciones de reducción. El gel SDS/PAGE se tiño con plata, y cuatro bandas a 400, 230, 200, y 175 kDa que correlacionaron con la actividad de la proteasa del IGFBP-4 se removieron para el análisis espectrométrico de masas.

Las bandas removidas se sometieron a digestión de tripsina en gel. Los fragmentos solubles se recuperaron de la digestión, luego se resolvieron y caracterizaron por cromatografía líquida de alta-resolución de microcolumna y espectrometría de masa en tándem automatizada. Las columnas microelectrospray se construyeron de 360-mm o.d x 100-mm i.d. de tubo capilar fundido de silica con el extremo de la columna afilado en punta a unos 5- a 10-mm. Las microcolumnas se empacaron con POROS 10 R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) a una longitud de 10-15 cm. La fase móvil utilizada para el gradiente de elución consiste de (i) 0.5% de ácido acético y (ii) acetonitrilo/agua 80:20 vol/vol que contienen 0.5% de ácido acético. El gradiente fue lineal de 0 a 40% durante 30 min y de 40 a 60% durante 5 min. El espectrometro de masas utilizado fue un Finnigan-MAT (San Jose, CA) LCQ equipado con una fuente de ionización microelectrospray. El espectro de masas en tándem se adquirió durante la corrida de gradiente total automáticamente. Las bases de datos de la secuencia de proteína y la secuencia de nucleótido se investigaron directamente con espectro de masas en tándem utilizando el programa de ordenador SEQUEST. Cada secuencia reenviada por SEQUEST se verificó inspeccionando el ajuste de la secuencia de aminoácido al correspondiente espectro de masas en tándem.

Siguiendo los protocolos estándar, poli(A)-con cola mRNA (10 mg) se sometieron a electroforesis a través de un gel agarosa 1.5% y se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia). La membrana se pre-hibridizó por 6 hr y luego se hibridizó durante la noche a 43°C con 107 cpm de una sonda decADNPAPP-A <sup>32</sup>P-marcado correspondiente al nucleótido 10-2365 (GenBank No. de acceso X68280). La membrana se lavó tres veces, se secó, y expuso a la película.

*Western Blotting.* Para el análisis Western, las muestras se corrieron en los geles 8% de Tris/tricina y se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (Millipore). La membrana se bloqueo en Tween 20 al 2% y se lavó con 5 mM de Tris/500 mM de NaCl/0.1% de Tween 20/1% de suero fetal bovino, pH 9.0. Las manchas luego se incubaron con anticuerpos monoclonales PAPP-A 234-2. Qin *et al.*, *Clin. Chem.*, 1997, 43:2323-2332. Los anticuerpos secundarios se conjugaron con peroxidasa anti (mouse- IgG) P260 (Dako). Las manchas se desarrollaron utilizando mejorada quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

*ELISA.* El antígeno PAPP-A se midió a través de un ELISA de fase doble estándar. El anticuerpo de captura fue el anti-PAPP-A/proMBP policlonal, y la detección se hizo con los anticuerpos monoclonales anti-PAPP-A 234-2 y 234-5 seguido por conjugado-peroxidasa anti(mouse-IgG) P260. Se utilizó para la calibración, la PAPP-A/proMBP purificada altamente, preparada según lo descrito por Oxvig *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1201:415-423.

La purificación de la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente se monitoreó con un bioensayo específico, i.e., degradación libre de células, de [<sup>125</sup>I]IGFBP-4 en fragmentos radiomarcados de 18- y 14-kDa en la presencia, pero no la ausencia, de IGF-II adicionado. Este acercamiento tiene la ventaja clara de garantizar la purificación de la enzima de interés específica. La proteasa de IGFBP-4 IGF-dependiente purificada altamente se obtuvo de 800 mL de HFCM por una combinación de cromatografía de afinidad de quelato de cinc y lecitina. Las proteínas No- y débilmente unidas salen en el flujo continuo o se eluyeron con tres lavados de 0 mM y tres lavados de 25 mM de N-acetilglucosamina. Actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente se eluyó con tres lavados de 500 mM de N-acetilglucosamina. La actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente se definió como la pérdida de [<sup>125</sup>I]IGFBP-4 de 24 kD intacto, y la apariencia del fragmento radiomarcado de 18- y 14-kDa en la presencia, pero no en la ausencia, de 5 nM IGF-I.

La fracción final que contiene la actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente se analizó adicionalmente por SDS/PAGE, la cual revela cuatro bandas de masa molecular alta a 400, 230, 200, y 175 kDa. Las proteínas en estas bandas se identificaron por microsecuenciación de espectrometría de masas en tándem. Todos los péptidos representaron las proteínas conocidas o proteínas deducidas de las secuencias de cADN conocidas. Los péptidos identificados en la banda de 175 kDa incluyen  $\alpha$ -2-macroglobulina humana, trombospondina 1 humana. El colágeno humano, pHHK1 isoforma  $\alpha$ -1-antiquimotripsina bovina, clon de cADN NHT testículos Soares humanos 727252.5', sommer *Pristionchus pacificus*, ribonucleasa humana 6, y clon decADN *Caenorhabditis elegans* yk 182d6. En la banda de 200 kDa, los péptidos identificados incluyen PAPP-A humano, hemiferina de rata, y transferina bovina. La cadena laminina  $\gamma$ -1 humana y  $\beta$ -cadena laminina humana se identificaron en la banda de 230 kD, y el colágeno  $\alpha$ -1 humano fue identificado en la banda de 400 kD.

Una investigación de literatura extensiva que involucra una comparación de las características de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente a partir del HFCM y las proteínas identificadas por espectrometría de masas en tándem revelaron únicamente una coincidencia. Esta proteína candidato fue la PAPP-A. Los péptidos identificados para los re-

siduos incluidos de PAPP-A 110-116 (ADLELPR, SEQ ID NO: 1), 133-143 (SPAVITGLYDK, SEQ ID NO:2), 190-209 (SYLPGQWVYLAATYDQGFMK, SEQ ID NO:3), 373-387 (EQVDFQHHQLAEAFK, SEQ ID NO:4), 1071-1087 (TISYPYSOLAQTTFWLR, SEQ ID NO:5), y 1180-1195 (SFDNFDPVTLSSCQRG, SEQ ID NO:6). La PAPP-A es una de las cuatro proteínas originalmente aisladas del suero de embarazo humano normal. Lin *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1974, 118:223-236. La PAPP-A ha sido usada como un índice de función placentaria y una selección del primer-trimestre para el Síndrome de Down. Adicionalmente, la PAPP-A placentaria “genéticamente deficiente” en humanos parece que se asocia con el síndrome de Cornelia de Lange, una condición que involucra el desarrollo fetal incompleto y las subsiguientes deformidades. La PAPP-A y la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente a partir del HFCM son similares en que ambas son proteínas glicosiladas de alto peso molecular que unen el  $Zn^{2+}$ . Adicionalmente, la secuencia de aminoácido derivada del cADN clonado que codifica la PAPP-A revela un motivo de enlace específico de  $Zn^{2+}$  (HEXXHXXGXXH, SEQ ID NO: 7) en la posición 482-492 y una Met de giro además C-terminal encontrada únicamente en la familia metzincina de metaloproteasas. La PAPP-A no se asemeja a otras características definidas de los miembros de la superfamilia metzincina individual, e interesantemente, en la distancia lineal de PAPP-A entre el motivo del enlace zinc y la Met-residuo conservada es de 63 aminoácidos, mientras que en otras metzincinas esta distancia está entre 7 y 44 residuos.

La identificación de la proteasa IGFBP-4 IGF-dependiente como PAPP-A se verificó con otros análisis bioquímicos. El IgG policlonal de Anti-PAPP-A/proMBP, pero no IgG de conejo no específico, la actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente inhibida en HFCM de una manera dosis-dependiente (Fig. 1A). En un título 1:50 del anticuerpo policlonal anti-PAPP-A/proMBP, proteólisis del IGFBP-4 se inhibió completamente; un título 1:500 inhibido 84% de la actividad de la proteasa, mientras que un título 1:5,000 inhibido 15% de la actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-inducido en estos ensayos libre de células. En otros experimentos, los IgGs policlonales anti-PAPP-A/proMBP se utilizaron para la inmunodepleción específicamente y completamente la actividad de la proteasa del IGFBP-4 del medio (Fig. 1B). Por otra parte, la PAPP-A/proMBP que había sido purificada a partir del suero de mujer embarazada exhibió la actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF dependiente (Fig. 1C). En un ensayo libre de células, PAPP-A/proMBP sola no tiene efecto sobre el [ $^{125}I$ ]IGFBP-4, pero la adición de la proteólisis iniciada del IGF-II en fragmentos radiomarcados de 18 y 14 kDa, idénticos para que se vean con HFCM. Resultados similares se obtuvieron con cuatro diferentes preparaciones de PAPP-A/proMBP altamente purificada.

La PAPP-A se expresa más altamente en el sincitiotrofoblasto de la placenta, la cual es la principal fuente de la PAPP-A circulante en embarazo. Bonne *et al.*, *Lab. Invest.*, 1994, 71:560-566. PAPP-A, sin embargo, se ha detectado en suero de una mujer no embarazada así como embarazada y en líquido folicular preovulatorio y ha sido inmunolocalizado al endometrio secretorio, al endotelio vascular, y activamente a la proliferación fetal y a tejidos adultos cuando los antisueros policlonales, que reacciona con PAPP-A y proMBP, y se utilizó, en un grado desconocido con otras proteínas.

El análisis Northern y Western se realizó para demostrar la expresión de PAPP-A inequívoca en cultivo de fibroblastos humanos y células de hueso. Para el análisis Northern, mARNs poli-A con cola (10 mg) de las células humanas cultivadas se probaron con cADN  $^{32}P$ -marcado de la PAPP-A. Las células humanas que se analizaron incluyeron fibroblastos adultos, osteoblastos adultos, osteoblastos totales, células estromales de la médula ósea, células de osteosarcoma MG63, células de osteosarcoma U2, y células de osteosarcoma TE85. De acuerdo con estos experimentos, se observó que los fibroblastos humanos expresaron las dos transcripciones PAPP-A en - 13 y 8.5 kB. Los resultados del Northern blotting también muestran la expresión del mARN de la PAPP-A por osteoblastos humanos normales a partir de fuentes adultas y fetales y por las células osteoprogenitor, pero no por varias líneas celulares del osteosarcoma. Estos hallazgos están en concordancia con aquellos de los estudios previos que muestran la actividad de la proteasa del IGFBP-4 IGF-dependiente en medio acondicionado por osteoblastos humanos normales, pero no por las células osteoblásticas transformadas. Durham *et al.*, *Endocrinology*, 1995, 80:987-993. No solo el mARN de la PAPP-A se expresa por los fibroblastos humanos, la proteína PAPP-A es, de hecho, secretado por el cultivo de fibroblastos humanos. Mediante el ELISA, el HFCM se encontró que contenía  $0.186 \pm 0.02$  mg/ml PAPP-A ( $n = 4$ ). Por comparación, el suero de embarazo a término contiene aproximadamente  $26 \mu\text{g/ml}$  de la PAPP-A. Las inmunotransferencias Western se realizaron utilizando el HFCM ( $10 \mu\text{l}$  de 30x concentrado correspondiente a 0.05 mg de PAPP-A por ELISA) y la PAPP-A/proMBP purificada del suero de embarazo (0.05 mg). Las proteínas se separaron por SDS/PAGE bajo ambas condiciones no reductoras y reductoras, se transfirieron a la membrana, e inmunotransferidas con anticuerpos monoclonales de la PAPP-A-específica.

El análisis Western blotting mostró que la HFCM reacciona con los anticuerpos monoclonales específicos para la PAPP-A. En SDS/PAGE no reductor, la PAPP-A del HFCM migra con una masa molecular de 400 kDa, algo así más rápido que la PAPP-A/proMBP aislada del suero de embarazo pero inferior que el monómero de PAPP-A visto a 200 kDa en reducción de SDS/PAGE. La expresión de proMBP por fibroblastos no se detectó por el ELISA, Western o Northern blotting. De tal manera, la PAPP-A en formas de HFCM monodímeros.

## Ejemplo 2

### *Expresión de PAPP-A en Tejidos Reproductivos y No-Reproductivos*

El tejido placentario a término (lado material exterior) de las operación cesárea, se proporcionó por el Departamento de Ginecología y Obstetricia, Aarhus University Hospital. El tejido del primer trimestre de trofoblasto fue del Danish Cancer Society, Aarhus. El tejido de próstata de hiperplasia y de adenocarcinomas se proporcionó por el De-

partment de Experimental Clinical Oncology, Aarhus University Hospital. Las células mononucleares de la médula ósea, preparadas como se describe, se obtuvieron del Department de Hematology, Aarhus County Hospital, Denmark. El tejido de pecho normal, y las muestras de los carcinomas de pecho lobular y ductal se proporcionaron por el Department de Pathology, Aarhus County Hospital, Denmark. Las muestras del ovario, endometrio, miometrio, y tuba  
 5 uterina, proporcionados por el Departamento de Ginecología y Obstetricia, Aarhus University Hospital, fueron de histerectomías de una mujer postmenopáusica normal (edad <50 años). Una muestra de sangre se obtuvo de una mujer embarazada (primer trimestre). Todas las muestras de tejido se almacenaron en nitrógeno líquido.

*Extracción del mRNA y Síntesis del cADN.* Las muestras de tejido congeladas se pulverizaron utilizando un mortero embebido en hielo seco. Aproximadamente 20 mg del tejido en polvo o  $10^6$  células luego se lisaron en 1 ml lisis/enlace solución reguladora (0.5 M LiCl, 10 mM de EDTA, 5 mM de ditiotreitól, 1% SDS, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0) utilizando un homonegizador de vidrio (Wheaton, USA). Poly-A+ ARN se aisló utilizando el kit Dynabeads mRNA DIRECT (DynaL A/S, Norway), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Poly-A+ ARN se eluyó de la oligo-dT Dynabeads por incubación en 20 ml EDTA 2 mM durante 2 min a 65°C. El primer cADN  
 15 de la hebra se sintetizó inmediatamente a continuación incubando 50% del Poly-A+-ARN eluido durante 60 min a 42°C con 4 unidades de transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis aviar, 10 pmol oligo-dT24 1 pmol 5'-AAACCCATTTTATTGCAGGGAGG-3' (cebador específico MBP (nt 840-818 en la secuencia de cADN del proMBP, SEQ ID NO:8), 1 pmol 5'-CTGTGGTTGTGTGACAAATGGC-3' (cebador específico PAPP-A (nt 4936-4915 en la secuencia de cADN de la PAPP-A, SEQ ID NO: 9), 40 unidades de ARNsin, 1 mM dNTP, y 5 mM  $Mg^{2+}$ , en 20 ml de la solución reguladora suministrada. Todos los reactivos, excepto los cebadores, fueron del Promega. El Poly-A+3 ARN remanente se procesó en paralelo sin adición de la transcriptasa reversa. El cADN resultante se diluyó (1:44, n=1 a 10) en ddH<sub>2</sub>O, y se utilizó directamente como la plantilla para PCR competitivo, o se almacenó a -20°C hasta su uso.

*Preparación de Las Plantillas del Estándar Interno.* El estándar interno (IS) es una variante de delección del producto PCR del cADN respectivo (Fig. 2) que se puede amplificar con los mismos cebadores como el cADN. La PAPP-A IS se construyó por delección mediada del cebador según lo descrito previamente. Brevemente, el 5'-CAGTCAGCTGCTCAACGGAAGGACTCACATTGG-3' (nt 4712-4731 y 4789-4805 en la secuencia de cADN de la PAPP-A, SEQ ID NO:10) se utilizó con 5'-GGAGGCTCTGGGACTGCAC-3' (nt 4904-4886, SEQ ID NO:11) como cebadores en un PCR, utilizando el primer cADN de la hebra de la placenta como plantilla, para hacer una variante  
 30 de delección 62 bp del cADN del PCR-producto de la PAPP-A con las mismas secuencias del enlace cebador como el cADN de PAPP-A. Un MBP IS se construyó por excisión de un fragmento HinPII-MspI (nt 447-522 en el proMBP de la secuencia de cADN), que resulta en una variante de delección 76 bp del producto PCR del cADN. La  $\beta$ -actina IS se construyó por excisión de un fragmento HinPII-MspI (nt 1045-1 136 en la  $\beta$ -actina de la secuencia de cADN), resultando en una variante de delección de 92 bp. Para la construcción de un gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) IS, el cebador 5'-AACGGGAAGCTCACTGGCATGATGACATCAAGAAGGTGGTG-3' (nt 674-694 y 765-787 en la secuencia de cADN GAPDH, SEQ ID NO:12) se utilizó con 5'-CCACCACCCTGATGCTGTAGC-3' (nt 977-957, SEQ ID NO:13) en un PCR utilizando el primer cADN de la hebra como plantilla para hacer una variante de delección de 73 bp del PCR-producto GAPDH con las mismas secuencias del enlace cebador como el PCR-producto del cADN. Los ISs se purificaron a partir de los geles de agarosa y verificaron por un análisis de secuencia. La cantidad fija del IS adicionado a cada PCR se tomó del mismo lote almacenado en alícuotas listas para usar a -20°C.

*Cebadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa Competitiva.*  $\beta$ -actina 5'-CACCCAGCACAATGAAG ATCAAG-3' (nt 1003-1025, SEQ ID NO:14) y 5'-GTCAAGAAAGGGTGTAAACGCAAC-3' (nt 1207-1185, SEQ ID NO:15); PAPP-A: 5'-CAGTCAGCTGCTCAACGGA-3' (nt 4712-4731, SEQ ID NO: 16) y 5'-GGAGGCTCTG GGACTGCAC-3' (nt 4904-4886, SEQ ID NO:17); MBP: 5'-TTAGTCAAGCTTGGTTTACTTGC-3' (nt 423-445, SEQ ID NO:18) y 5'-GGAAGTCTTCTGAGGCAGTGG-3' (nt 720-700, SEQ ID NO:19); GAPDH: 5'-AACGGG- GAAGCTCACTGGCATG-3' (nt 674-694, SEQ ID NO:20) y 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3' (nt 977-957, SEQ ID NO:21). Los números en paréntesis se refieren a las posiciones en las correspondientes secuencias de cADN. Las secuencias del Gen y cADN se obtuvieron de Genbank (números de acceso: GAPDH: J02642 y J04038;  $\beta$ -actina: X00351 y M10277; MBP: X14088 y M34462; PAPP-A: X68280). Todos los cebadores fueron de ADN Technology, Aarhus, Denmark.

*Reacción en Cadena de la Polimerasa Competitiva.* Todos los PCRs se realizaron en un volumen total de 50  $\mu$ l con 1.5 unidad de SuperTaq (HT Biotechnology, UK). 0.25 nM dNTP (Pharmacia, Sweden), 80 pmol de cada cebador, solución reguladora 1xSuperTaq, 1 ml de la plantilla del estándar interno (excepto el blanco control) en tubos de vidrio utilizando un Abacus thermal cycler (Denzyme, Denmark) con una rampa de velocidad de 4°C/s. Las alícuotas diluidas de todos los reactivos (almacenadas a -20°C) se utilizaron para preparar una mezcla de reacción de la cual 49 ml se midieron con pipeta en cada tubo en una serie de experimentos PCR. Una serie incluye reacciones con una serie de diluciones del primer-cADN de la hebra de un tejido, una serie de diluciones de otro tejido, un control con IS como la  
 60 plantilla sola, y un blanco control (el cual se toma de la PCR-mezcla maestra antes de la adición del IS). Después de la adición de 1 ml diluido de la plantilla cADN, 37 ciclos de PCR se realizaron utilizando los siguientes parámetros: 94°C durante 30 s (90 s en el primer ciclo), fijado durante 30 s (*vide infra*), 72°C durante 40 s (400 s en el último ciclo). Las temperaturas de fijación fueron 62°C para la  $\beta$ -actina y GAPDH, 60°C para PAPP-A, y 58°C para MBP. La cantidad de la plantilla de IS, fue en una región lineal del registro logarítmico doble del producto PCR como una función del factor de dilución. Esto asegura que las amplificaciones fueran en la fase exponencial a través de los 37 ciclos. Los cebadores PCR en cada cebador-par se colocaron en diferentes exones permitiendo una fácil detección de la contaminación del ADN genómico posible (Figura 2 y Tabla 1). No se observó ninguna contaminación del ADN genómico a partir de las preparaciones de cADN en ninguno de los tejidos examinados.

TABLA 1

<b>Tamaño de los productos-PCR de las plantillas indicadas en pares de base</b>			
Plantilla	ADN Genómico	cADN	Estándar Interno
$\beta$ -actina	317	205	113
GAPDH	1529	304	231
PAPP-A	nd <sup>a)</sup>	189	127
MBP	408 <sup>b)</sup>	298	222

<sup>a)</sup> La estructura intrón/exón no se determina para PAPP-A.  
<sup>b)</sup> El cebador-5' utilizado a lo largo de un intrón.

*Quantificación.* Para cada serie de diluciones, las dos muestras con cantidades aproximadamente iguales de cADN y IS PCR productos, según se analizó por gel-electroforesis en un gel agarosa 2.5%, se separaron en un instrumento HPLC Hewlett-Packard 1084 equipado con una columna de intercambio iónico no porosa Waters Gen-Pak4,41J FAX utilizando un gradiente lineal de 20 min. de 0.3 a 0.7 M de NaCl en solución reguladora TE, pH 7.5 a 60°C (Figura 3). La dilución, D<sub>Ieq</sub>, que habría dado lugar a cantidades equimolares de cADN y productos PCR de IS, se calculó a partir de la ecuación 1, según lo descrito arriba.

Un valor D<sub>Ieq</sub> se determinó para cada uno de los productos de genes como el valor promedio obtenido del PCR de dos series de diluciones independientes y de dos diluciones de cADN en cada serie. Finalmente, la abundancia específica de PAPP-A o mRNA de proMBP, A<sub>x</sub>, se determinó a partir de la ecuación 2, según lo descrito arriba.

De tal manera, la abundancia específica es una medida del nivel de mRNA del gen de interés, normalizado contra una medida del mRNA total en la muestra. Dando una cantidad constante de las moléculas de  $\beta$ -actina mRNA por célula, que es una suposición lógica, la abundancia específica, A, es independiente de la cantidad del tejido usado.

*Análisis por Transferencia en mancha del ARN.* Un cADN <sup>32</sup>P-marcado del fragmento pPa-1 de la PAPP-A y un producto PCR de MBP <sup>32</sup>P-marcado (ver arriba) se hibridizó a una transferencia maestra de ARN humano (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de lavar dos veces con 0.15 M de NaCl, 15 mM de citrato de sodio, 0.1% de SDS, pH 7.0 a 65°C durante 30 min, se realiza la autoradiografía por 24 h utilizando el sistema de imágenes de fósforo (Molecular Dynamics). La transferencia maestra del ARN humano contiene muestras de 50 tejidos diferentes localizados sobre la membrana, adicionalmente a las muestras de ADN control, incluyendo: cerebro completo; amígdala; núcleo caudal; cerebelo; corteza cerebral; lóbulo frontal; hipocampo; médula oblongada; polo occipital; putamen; substantia nigra; lóbulo temporal; tálamo; núcleo sutamámico; médula espinal; corazón; aorta; músculo esquelético; colon; vejiga; útero; próstata; estómago; testículo; ovario; páncreas; glándula pituitaria; glándula suprarrenal; glándula tiroideas; glándula salivales; glándula mamaria; riñón; hígado; intestino delgado; bazo; timo; leucocito periférico; nódulo de linfa; médula ósea; apéndice; pulmón; traquea; placenta; fetal cerebro; corazón fetal; riñón fetal; hígado fetal; bazo fetal; timo fetal; pulmón fetal; ARN total levadura; tRNA levadura, *E. coli* rARN; *E. coli* ADN; Poli r(A); ADN repetido genómico humano; y ADN humano. Las cantidades de ARN de todos los tejidos se normalizaron contra ocho diferentes transcripciones del gen de mantenimiento sobre la transferencia maestra.

El ARN Mensajero se extrajo de las muestras de tejido congeladas, homogenizados utilizando lechos magnéticos acoplados oligo-dT. Esto es un protocolo rápido y fácil asegurando la degradación mínima. Para incrementar la sensibilidad, se utilizaron cebadores específicos proMBP, PAPP-A, y oligo-dT en la síntesis del primer cADN de la hebra. Las diluciones seriales se hicieron con la mezcla del cADN obtenido de la reacción de transcripción reversa. Estas diluciones de cADN se utilizaron como plantillas en PCRs competitivos, con cantidades fijas de la plantilla IS del gen específico adicionado. De las mediciones de los niveles de  $\beta$ -actina de mRNA, la abundancia específica se calculó para cada tejido según lo detallado arriba. Los niveles de gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) mRNA también se midieron. Como lo esperado, la abundancia específica de GAPDH mRNA mostró la variación mínima (128658 SD). Esto valida la normalización contra  $\beta$ -actina mRNA.

La abundancia específica de PAPP-A y mRNA de proMBP en un total de 43 muestras a partir de 13 tejidos diferentes se midió, utilizando el método RT-PCR semi-cuantitativo descrito arriba. Los resultados se resumen en la Figura 4, donde la abundancia del mRNA específica media para cada tejido se muestra relativa a la abundancia específica en la placenta a término, que contenía el nivel más alto medido para ambas PAPP-A y proMBP. Los tejidos analizados incluyen placenta a término, primer trimestre de la placenta, miometrio, endometrio, tuba uterina, ovario, seno, cáncer de seno, próstata, cáncer de próstata, médula ósea, colon, y riñón. La abundancia específica de PAPP-A y de mRNA de proMBP fue inferior dramáticamente en el primer trimestre de la placenta que en la placenta a término (75 y 17 veces respectivamente). También hay evidencia de que todos los tejidos examinados contienen cantidades medibles de ambas especies de mRNA (Figura 4). En endometrio a partir de mujer post-menopáusica, el nivel de mRNA de PAPP-A fue 250 veces más bajo que en la placenta a término. La mayoría de los otros tejidos examinados

5 tienen una abundancia del mRNA de PAPP-A específica 500 a 3000 veces más baja que la placenta a término. En las células de médula ósea, donde el mRNA de proMBP se esperaba a un nivel relativamente alto, la abundancia específica del mRNA de proMBP fue 230 veces más baja que en la placenta a término. En tejido de pecho, esta fue 800 veces más baja que en la placenta a término, mientras que la abundancia del mRNA de proMBP fue más de 1300 veces más

10 Análisis del mRNA en 1.5 ml de sangre total, obtenido de una mujer embarazada, mostró un nivel de mRNA  $\beta$ -actina muy bajo, y de PAPP-A o mRNA de proMBP no detectable. De tal manera, la sangre presente en las muestras de tejido no puede interferir con las mediciones de las abundancias específicas de especies de mRNA.

15 Adicionalmente a las muestras del tejido analizado por un RT-PCR semi cuantitativo, una rápida selección de los tejidos que producen altas cantidades de PAPP-A o mRNA de proMBP fue realizada. Esto se hizo hibridizando una sonda de cADN de proMBP o PAPP-A (pPA-1)  $^{32}\text{P}$ -marcada específica a una membrana que contiene ARN de 50 diferentes tejidos humanos.

20 Como se esperaba, la placenta mostró una señal muy alta para ambas especies de mRNA. El único otro tejido con una señal de PAPP-A sobre el fondo era riñón. Con este método, el mRNA de proMBP se detectó en placenta, médula ósea, y a niveles muy bajos en riñón.

### Ejemplo 3

#### *Expresión de PAPP-A en Músculo Liso de Porcino y en un modelo de restenosis coronaria de cerdo*

25 PolyA<sup>+</sup>- enriquecido mRNA del cultivo- células del músculo liso vascular de porcino (vSMC) y fibroblastos de piel humana (HF) se probaron para la expresión PAPP-A y IGFBP-4. Según lo indicado en Figura 5, PAPP-AmRNA y su sustrato, IGFBP-4 se expresaron en vSMC.

30 La actividad de la proteasa del IGFBP-4 de IGF-dependiente también se detectó en célula-medio acondicionado de vSMC y HF. La actividad de la proteasa se monitoreó en un ensayo libre de células, como se describe en el Ejemplo 1, utilizando [ $^{125}\text{I}$ ]IGFBP-4 con, y sin, IGF-II durante 6 horas. Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE y la autoradiografía. Las células del músculo liso vasculares secretan una proteasa idéntica a PAPP-A.

35 La proteína PAPP-A también se detectó en tejido vascular *in vivo*, particularmente células endoteliales y células del músculo liso de la lesión post-balón neointima 7 días de arterias coronarias de cerdo. La angioplastia de globo de gran tamaño se realizó en cerdos hembras jóvenes para estimular la hiperplasia neointimal. Schwartz, R.S. *et al.*, *Circulation*, 82:2190-2200, 1990. La angioplastia de globo de gran tamaño y la implantación del stent se realiza en cerdos hembras inmaduras (*Sus scrofa*). Todos los animales reciben 650 mg de aspirina + 250 mg Clopidogrel y 120 mg Isoptin-SRR 24 horas previas a la cirugía para reducir la mortalidad aguda debido a la agregación de plaquetas y espasmos coronarios. Una arteriotomía se realiza en un procedimiento quirúrgico estándar, y una funda introductora se colocó en la arteria carótida. La heparina (200 unidades/kg) se administró a través de la funda para mantener un tiempo de coagulación activado (ACT) >300. Un catéter guiado luego se colocó en la funda y se adelanta según se necesite bajo una guía fluoroscópica en las arterias coronarias. Un cable guía 0.014 se utilizó para entregar los dispositivos a los sitios predeterminados. Inmediatamente después de la colocación de los stents, el ultrasonido intravascular se realizó para documentar las características de expansión y aposición del stent, así como para medir el diámetro del vaso. Los catéteres luego se retiraron, las características de despliegue del stent se registraron, el sitio de reducción arterial reparado, y el animal se dejó recuperar. En el sacrificio, los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de un barbitúrico intravenoso comercial (Sleepaway, 10 ml por la vena de la oreja). El corazón se extrajo y colocó en una solución fisiológica fría (Rngers de Krebs). Las arterias coronarias se removieron y cortaron en anillos, y las secciones se fijaron por inmersión en 4% de paraformaldehído en una solución reguladora  $\text{NaPO}_4$  (pH 7.4). Luego las secciones se embebieron en parafina y se cortaron en rodajas en secciones en cruz de 3 mm a partir de la arteria normal a través de la lesión y nuevamente dentro de la arteria normal. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), Van Gieson elástico, o se mantuvieron congeladas. La severidad de la lesión arterial inducida por la angioplastia se evaluó de acuerdo con la puntuación de la lesión por Schwartz *et al.*, *Circulation*, 1990, 82: 55 2190-2200.

60 Las arterias coronarias a partir de vasos con lesiones e ilesos 1, 7, 14, 28 y 90 días después del procedimiento se removieron y embebieron en parafina. El anticuerpo monoclonal humano proteasa IGFBP-4 (PAPP-A) se utilizó para la tinción inmunohistoquímica. Qin Q-P *et al.*, *Clin. Chem.*, 1997,43:2323-2332. Las células de la capa del medio y la neointima mostraron una fuerte inmunotinción para la proteasa de la IGFBP-4 a los 7 días con una expresión pico 28 días después de la angioplastia. No se detectó ninguna tinción el día 1 y se observó una tinción mínima en el día 90. Ninguna tinción de la proteasa de la IGFBP-4 fue apreciable en las secciones ilesas. Utilizando los anticuerpos disponibles comercialmente, la tinción de IGFBP-4 fue baja y difusa, y no hubo una tinción específica para IGFBP-5. La PAPP-A se detectó por anticuerpo monoclonal de ratón PAPP-A (234-5), secundario biotinilado anti-ratón IgG, y peroxidasa streptavidina-rábano picante. El color se desarrolló con sustrato 3-amino-9-etilcarbazono. 65

## Ejemplo 4

*Expresión de PAPP-A Recombinante*

5 Este ejemplo describe la expresión de la PAPP-A recombinante (rPAPP-A) en células de mamífero. Esto representa un importante logro para el posterior estudio del papel de PAPP-A en el sistema IGF/IGFBP, y para el estudio de PAPP-A como una única metaloproteína. De interés, una comparación entre rPAPP-A y el complejo PAPP-A/proMBP del suero de embarazo reveló una diferencia pronunciada en la actividad proteolítica. De acuerdo con estos estudios, se cree que las funciones de proMBP como inhibidor de la proteinasa *in vivo*. Este descubrimiento establece un  
10 papel biológico de proMBP fuera del eosinófiloleucocito. También representa un modo novedoso de inhibición de la proteinasa con la enzima unida covalentemente por los enlaces disulfuro a su inhibidor.

Construcción del Plásmido. Un plásmido de expresión de PAPP-A se construyó a partir de tres clones de cADN de la PAPP-A parciales solapados, p29-2, pPA3, y pPA1. Kristensen, T. *et al.*, *Biochemistry*, 1994, 33:1592-1598, Haaning, J. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1996, 237(1): 159-63. El fragmento BbeI-EcoRI de p29-2, que codifica los residuos de PAPP-A 6-228 (con el residuo Glu N-terminal que es el residuo 1 y la secuencia de cADN numerada con el codón que codifica Glu-1 (GAG) como los nucleótidos 1-3), se extrajo por digestión parcial y completa, respectivamente, y se ligó a un fragmento de nucleótido que codifica un péptido señal artificial (MKDSCITVMAMALLSGFFFFAPASSYAA, SEQ ID NO:22) más los residuos 1-5 de PAPP-A. En breve, este último fragmento se generó en un PCR utilizando una mezcla de oligonucleótidos solapados (5'-CCTGCATCCTGTGATGGCCATGGCGCTGC-3' (SEQ ID NO:23), 5'-TGTCTGGGTTCTTTTCTTCGCGCCGGCCTC-3' (SEQ ID NO: 24), 5'-GAGCTATGCCGCGGAAGCTAGGGGCGCCAT-3' (SEQ ID NO:25), y 5'-GCGGCATAGCTCGAGGCCGGCGCGAAGAAA-3' (SEQ ID NO:26), 5'-AA GAACCCAGACAGCAGCGCCATGGCCATC-3' (SEQ ID NO:27), 5'-ACAGTGATGCAGGAATCCTTCATAAGC TTAG-3' (SEQ ID NO:28)) como una plantilla, y cebadores que contienen un HindIII (5'-CTAAGCTTATGAAG GATT-3', SEQ ID NO:29) y un sitio de reconocimiento BbeI (5'-ATGGCGCCCCTAGCTTCC-3', SEQ ID NO:30). El producto de unión se clonó en los sitios HindIII/EcoRI de pBluescript II (Stratagene) para generar pBN- 228. El fragmento de EcoRI-ClaI de pPA3, que codifica los residuos de PAPP-A 229-784, se extrajo y ligo al fragmento HindIIIEcoRI de pBN-228, y se clono en los sitios HindIII/ClaI de pBluescript II para generar pBN-784. Adicionalmente, el fragmento ClaI-EcoRI de pPA 1, que codifica los residuos de PAPP-A 785-1547 y que contiene parte del 3'UTR, se extrajo y ligo al fragmento HindIII-ClaI de pBN-784, y se clonó en los sitios HindIII/EcoRI de pBluescript II para generar pBN- 1547. Puesto que el sitio ClaI en el cADN de la PAPP-A es sensible a la metilación, los plásmidos se propagaron en una *E. coli* dam-cepa cuando se necesite.

Finalmente, el fragmento HindIII-XbaI de pBN-1547, que codifica el péptido señal artificial más los residuos PAPP-A 1-1547, se clonó en los sitios HindIII/XbaI del vector de expresión de mamífero pcDNA3.1+ (Invitrogen) para generar pcDNA3.1-PAPP-A. Esta construcción se verificó por el análisis de secuencia. Para permitir la selección con la higromicina B (Invitrogen), el fragmento HindIII-XbaI de pcDNA3.1-PAPP-A se extrajo y clonó en pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen) para obtener pcDNA3.1/Hygro-PAPP-A para la generación de las células transfectadas establemente. El ADN del plásmido para la transfección fue preparado con QIAprep Spin Kit (Qiagen).

Una desviación de la secuencia de cADN de la PAPP-A publicada se encontró en un sitio: Los nucleótidos 78-80 (AGT) no estuvieron presentes, resultando en la ausencia de Val-27. En los clones (p29-2 y pPA3) del cADN original, la misma desviación se observó sobre la re-secuenciación.

45 *Cultivo de Tejidos, Transfección, y Expresión de la Proteína:* Las células 293T de riñón embrionario humano (293tsA1609neo) se conservaron en medio DMEM de alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, aminoácidos no esenciales, y gentamicina (Life Technologies). Las células se colocaron en placas sobre platos de cultivo de tejido de 6 cm, y se transfectaron 18 h después mediante coprecipitación de fosfato de calcio utilizando 10 mg de ADN (pcDNA3.1-PAPP-A). Después de unas 48 h adicionales, los sobrenadantes se cosecharon y aclararon por centrifugación. Para la producción de las líneas celulares 293T que expresan PAPP-A establemente, las células se transfectaron con FspI-linealizado pcDNA3.1/Hygro-PAPP-A por el mismo método, seleccionado de la resistencia a 400 mg/ml de higromicina B (Invitrogen). Las colonias sencillas se escogieron y expandieron, y las líneas celulares estables se conservaron en medio con 100 mg/ml de higromicina B. Las células COS-7 se conservaron en el mismo medio, pero transfectadas con SuperFect (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

55 Dos días de post transfección el sobrenadante contenía más o menos 5 mg/ml de PAPP-A recombinante (rPAPP-A) según se midió por un ELISA específico de la PAPP-A. La PAPP-A no fue detectable en sobrenadantes de células transfectadas falsas. El antígeno rPAPP-A se reconoció en el ELISA mediante todos los anticuerpos monoclonales disponibles, y la integridad de la proteína se verificó por Western blotting. Resultados similares se obtuvieron con las células COS-7 transfectadas.

65 *ELISA:* Los niveles de PAPP-A recombinante en el sobrenadantes se midieron por un ELISA de fase doble estándar. Los anticuerpos policlonales de PAPP-A, anti(PAPP-A/proMBP), se utilizaron para capturar, y un anticuerpo monoclonal de la PAPP-A (mAb) (234-2, 234-5, 234-4, 234-6, 234-3, o 234-7) seguido por la peroxidasa conjugada anti(ratón IgG) (P260, DAKO) por detección. La PAPP-A/proMBP purificada del suero de embarazo o rPAPP-A purificada se utilizó para establecer las curvas estándar. Ver Qin, Q.P. *et al.*, *Clin. Chem.*, 1997, 43:2323-2332. La cantidad de proteína en los estándares se determinó por un análisis de aminoácido.

*Fraccionamiento de la Proteína:* La purificación de rPAPP-A a partir de los sobrenadantes del cultivo celular se logró por un procedimiento de precipitación, cromatografía de heparina, y de filtración de gel. Los protocolos para la purificación del complejo PAPP-A/proMBP del suero de embarazo no fue útil para la purificación de rPAPP-A debido a diferencias en precipitación con PEG (16% para el complejo proMBP/PAPP-A vs. 4-12% para rPAPP-A). La PAPP-A recombinante se precipitó en esencia cuantitativamente a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (50 ml) por 10% (w/v) PEG 6000. El precipitado se disolvió en 50 mM de Tris, 50 mM de NaCl, pH 8.0 que contiene los inhibidores de proteasa estándar y se cargó sobre una HiTrap Heparin Sepharose (5 ml) (Pharmacia) equilibrada con la misma solución reguladora. Las proteínas unidas se eluyeron mediante un incremento lineal en la concentración de sal a 1000 mM durante 30 min a 1 ml/min. La PAPP-A recombinante eluyó principalmente como un solo pico más o menos 600 mM de NaCl. Finalmente, las fracciones combinadas se concentraron por ultrafiltración y se sometieron a cromatografía a 0.5 ml/min sobre una Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada con PBS. La PAPP-A/proMBP se purificó a partir del suero de embarazo a término según lo descrito previamente por Oxvig. C. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 1994, 1201:415-423.

Para propósitos analíticos el suero de embarazo, plasma de embarazo, o cultivo sobrenadante mezclado se corrió en una Mono Q HR 10/10 (Pharmacia) equilibrada con 50 mM de Tris, 50 mM de NaCl, pH 8.0. Previo a la carga de la columna, las muestras se diluyeron por adición de dos volúmenes de agua. La elución se realiza con un gradiente de sal lineal de 50 mM a 1000 mM durante 40 min a 1 ml/min, y las fracciones de 1 ml se colectaron. Para todas las corridas, la concentración de sal fue 50 mM en la fracción 10 y 1000 mM en la fracción 50 (Figura 6A). La absorbancia a 280 nm se registró en una segunda corrida de 1/10 del mismo suero, y multiplicado por un factor de diez. Los dos cromatogramas obtenidos fueron superpuestos, y la forma y posición del pico más grande de PAPP-A (más o menos la fracción 43) fue el mismo. Los picos más pequeños de PAPP-A (más o menos la fracción 24) también tenían la misma posición en las dos corridas, pero con el ELISA utilizado, los niveles del antígeno de la PAPP-A no podrían ser determinados exactamente en aquellas fracciones de la segunda corrida. De tal manera, se utilizan, los valores ELISA de la primera corrida.

Procedimientos Misceláneos SDS-PAGE se realizan en geles de Tris-glicina (10-20% o 15%) o en geles 3-8% de Tris-acetate premoldeados (Novex). Las proteínas separadas se visualizaron por tinción de Coomassie de geles, o primero se transfieren en una membrana PVDF para el análisis de secuencia sobre un secuenciador Applied Biosystems 477A equipado con un HPLC en-línea. La inmunovisualización se realiza como en el Ejemplo 2 utilizando la quimioluminiscencia mejorada. Las manchas se bloquearon con 2% de Tween 20 y equilibrado en 50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20, pH 9.0 (TST). El anticuerpo primario (mAb 234-2 para la PAPP-A, y mAb 234-10 para la proMBP) se diluyó en TST que contiene 0.5% de suero fetal bovino, y la manchas se incubaron durante 1 h a 37°C. La incubación con anticuerpos secundarios peroxidasa conjugados (P260, DAKO) diluidos en TST se hizo durante 1 h a temperatura ambiente. La hidrólisis y cuantificación de los aminoácidos y amino azúcares se realizó según lo descrito previamente por Oxvig *et al.*, *Biochim. Biophys Acta*, 1994, 1201:415-423.

*Medición de la Actividad Proteolítica PAPP-A:* la proteólisis del IGFBP-4 se ensayó como se describe en el Ejemplo 1. La actividad del complejo PAPP-A/proMBP se comparó con la actividad de rPAPP-A en dos experimentos paralelos cursados a tiempo escalado hasta volúmenes de reacción más grandes: Las cantidades iguales de la muestra A (mezcla de suero de embarazo diluido a 7 µ/ml de PAPP-A/proMBP según lo determinado por el ELISA calibrado con PAPP-A/proMBP purificado) y la muestra B (como la muestra A, pero sobrenadante de rPAPP-A adicionado a 7 µ/ml según lo determinado por ELISA calibrado con rPAPP-A purificado) se incubaron con [<sup>125</sup>I]IGFBP-4 en la presencia de 5 nM de IGF-II. Las muestras, correspondientes a 10,000 cpm por senda, se sacaron en los puntos de tiempo seleccionados y la reacción se detuvo mediante la adición de EDTA a 5 mM. El experimento con la muestra A, también se realizó en la presencia de anti(PAPP-A/proMBP) policlonal. Un experimento similar cursado a tiempo se realiza por comparación de la actividad de PAPP-A en las fracciones de la columna seleccionadas.

*Caracterización de rPAPP-A.* El rPAPP-A purificado migra más rápido en el SDS-PAGE que el enlace disulfuro 2:2 complejo PAPP-A/proMBP purificado a partir del suero de embarazo, y rPAPP-A reducido y la PAPP-A a partir del PAPP-A/proMBP reducido ambos migran como una banda más o menos de 200 kDa. De tal manera, rPAPP-A se secreta como un dímero de aproximadamente 400 kDa. Un grado de degradación limitado que podría no ser prevenido es aparente para ambas especies después de la reducción de los enlaces disulfuro, y para PAPP-A/proMBP a partir del suero de embarazo sin reducción.

Análisis de Secuencia del monómero de rPAPP-A intacto revelado de la secuencia N-terminal esperada, con la adición de un residuo de alanina precedente del N-terminal Glu (Ala-Glu-Ala-Arg-Gly-Ala-Thr-Glu), y el número de monosacáridos N-aceril glucosamina (GlcN) por monómero de PAPP-A se encontró a través de la hidrólisis ácida para ser 22. PAPP-A aislada a partir de PAPP-A/proMBP contiene 44 GlcN monómeros por polipéptido de la cadena de PAPP-A.

La actividad de rPAPP-A contra IGFBP-4, el sustrato de PAPP-A conocido únicamente, se analizó. Como lo esperado, IGFBP-4 se dividió en la presencia, pero no en la ausencia del IGF. La actividad de rPAPP-A se inhibió por el anti(PAPP-A/proMBP), EDTA policlonal, y 1,10 fenantrolina, pero no por la TIMP-1, un inhibidor de amplio espectro de la matriz de las metaloproteinasas. Los sobrenadantes a partir de las células transfectadas falsas, con o sin IGF adicionado, no contuvieron actividad proteolítica del IGFBP-4.

Un experimento inicial reveló que aproximadamente 50 ng del complejo PAPP-A/proMBP purificado a partir del suero de embarazo fue necesario para obtener el mismo grado de división de IGFBP-4 como 0.1 ng de rPAPP-A. Hipotéticamente, esta diferencia podría ser causada por una reducción en la actividad de PAPP-A/proMBP durante el proceso cromatográfico. Por consiguiente, la actividad proteolítica del IGFBP-4 de suero de embarazo no fraccionado se midió en un experimento cursado a tiempo, y, en un experimento paralelo, la actividad de suero de embarazo con rPAPP-A adicionado a la misma concentración como suero de embarazo PAPP-A. La diferencia en actividad específica entre PAPP-A en suero de embarazo y rPAPP-A se estimó a partir de este experimento para ser aproximadamente 100-veces. La incubación de suero de embarazo con anti(PAPP-A/proMBP) policlonal suprime la división del IGFBP-4. La incubación alargada (24 h) con dos veces la cantidad de suero de embarazo en la presencia de anti (PAPP-A/proMBP) inhibitorio no mostró ninguna degradación del IGFBP-4. Según lo juzgado de esto, la PAPP-A es la dominante, quizás la única proteinasa en suero de embarazo, capaz de dividir IGFBP-4. De tal manera, la PAPP-A que está presente en suero de embarazo se inhibe fuertemente por su enlace con proMBP.

De acuerdo con los experimentos citados anteriormente, se determinó si el suero de embarazo contiene trazas de PAPP-A no-inhibida, no complejada con proMBP. La distribución del antígeno de PAPP-A en fracciones a partir de una Mono Q columna cargada con suero de embarazo mostró lo esperado, amplio y retrasado que eluye el pico PAPP-A/proMBP más o menos la fracción 43 (Figura 6A). Este pico fue precedido por un pico más pequeño, menos amplio con un máximo en la fracción 24. Interesantemente, la posición de elución y la forma de este pico corresponde a la de rPAPP-A cuando se analizó en el mismo sistema cromatográfico. La comparación de la actividad contra IGFBP-4 demostró que la actividad específica del antígeno de PAPP-A fue más alta, mayor de 25-veces, en el pico que eluye temprano que en el pico retrasado. De tal manera, la mayoría probablemente del antígeno de PAPP-A que eluye más o menos en la fracción 24 es PAPP-A no complejada. Puesto que los dos picos PAPP-A no se separan bien, las fracciones del pico que eluye temprano también contienen una cantidad relativamente alta del complejo PAPP-A proMBP. Esta interpretación se confirmó por Western blotting del material en los dos picos (Figura 6B). Una transferencia Western en paralelo con una proMBP específica monoclonal demostró que proMBP estaba presente en la banda superior, pero no en la más baja PAPP-A del pico que eluye temprano. Una PAPP-A dimérica no complejada, no ha sido previamente demostrada en suero de embarazo. Para verificar que la formación del complejo con proMBP no es una consecuencia de la coagulación de la sangre, las corridas separadas de plasma de embarazo se trataron con EDTA extraído recientemente, se analizaron sobre el mismo sistema. Una vez más, dos picos de PAPP-A se encontraron, y la diferencia en alturas del pico que eluye temprano y retrasado fue la misma como para el suero. De tal manera, la inmensa mayoría de PAPP-A está presente en ambos el suero de embarazo y el plasma como el complejo PAPP-A/proMBP, pero una fracción menor (< 1%) de PAPP-A está presente como un dímero no complejado de PAPP-A. Esta fracción no complejada tiene una actividad específica mucho más alta.

En conclusión, la proMBP inhibe dramáticamente la actividad de PAPP-A en suero de embarazo formando un complejo covalente con PAPP-A. La actividad medible de PAPP-A del suero de embarazo proviene de una fracción de PAPP-A menor del 1%, que está presente como un dímero no-inhibido de PAPP-A. Sin embargo, dado que PAPP-A eluye retrasada no es completamente inactiva, cantidades bajas de un complejo hipotético PAPP-A/proMBP 2:1 inhibido insuficientemente, también pueden contribuir. Tal como un complejo podría co-eluir en su mayor parte con complejo PAPP-A/proMBP 2:2 debido a la heterogeneidad extrema de los carbohidratos de proMBP.

Muchas proteinasas requieren de un propéptido para ayudar en el plegado y/o la secreción. Sin embargo, porque la rPAPP-A madura es antigénica, funcional, y se secreta abundantemente en el cultivo medio como un dímero del tamaño esperado, un propéptido de PAPP-A putativo no se necesita ni para el plegado ni la secreción. Con frecuencia un propéptido funciona para retener la actividad proteolítica de una zimógeno que llega a ser activo en el compartimiento extracelular únicamente después de la división del propéptido. Pero el cuarto tramo del residuo que procede inmediatamente del residuo 1 de PAPP-A, Arg-Gln-Gln-Arg, se parece al sitio de división de la furina consenso. De tal manera, la PAPP-A probablemente es para ser secretada *in vivo* como una proteinasa activa. Otras regiones del polipéptido de PAPP-A, posiblemente en el lado C-terminal del dominio proteolítico, son posiblemente importantes para el correcto plegado y secreción según lo encontrado recientemente para meprina A, otra metzincina metaloproteinasa.

## Ejemplo 5

### *IGFBP-4 en Fluido Folicular*

El fluido folicular se obtuvo en el tiempo de aspiración del folículo para procedimientos de fertilización *in vitro* (IVF) y de mujer que menstrúa con regularidad como se describe previamente (Chandrasekher, Y.A. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80:2734-2739), se centrifuga para remover los componentes celulares, y se almacena congelado a -20°C. Los folículos individuales en los cuales la relación de androstenediona con estradiol fue de  $\leq 4$  se estimaron como estrógeno-dominante, y folículos con esta relación  $>4$  se estimaron como andrógeno-dominante. Las muestras de fluido folicular se colectaron después del consentimiento informado fuera dado por los sujetos, de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Stanford University Committee en el Uso de Sujetos Humanos en Investigación Médica. Las células granulosa se cultivaron y el medio

5 acondicionado libre de suero colectado como se describe previamente. Cataldo, N.A. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, 76: 207-215. El IGFBP-4 y IGFBP-5 humano se proporcionaron por el Dr. S. Mohan (Loma Linda, CA) y Dr. D. L. Andress (Seattle, WA), respectivamente. TIMP-1 se proporcionó por el Dr. G. Murphy (Norwich, England).

10 La proteólisis del IGFBP-4 se ensayó como se describe en el Ejemplo 1, incubando la muestra a 37°C por 6 h con [<sup>125</sup>I] IGFBP-4. Los productos de reacción se separaron por SDS-PAGE gradiente 7.5-15% no reductor, y se visualizaron por autoradiografía.

15 Para algunos experimentos, los inhibidores de proteasa (ver la Tabla 2) o el anticuerpo policlonal de PAPP-A se adicionaron a la mezcla de ensayo durante las 6 h de incubación. En otros, el anticuerpo de PAPP-A o IgG de conejo no específico se utilizó en conjunción con la Proteína G-más/Protein-A-agarose (Oncogene Science) para inmunoprecipitar la actividad de la proteasa del IGFBP-4 y los sobrenadantes de la muestra luego se utilizaron en el ensayo de proteasa.

20 *ELISA de doble fase A de PAPP-A* El ELISA biotina-tiramida amplificada se realiza utilizando un anticuerpo policlonal de PAPP-A para capturar y una colección de anticuerpos monoclonales de PAPP-A para la detección (ver el Ejemplo 4). La PAPP-A purificada del suero de embarazo se utilizó para la calibración.

25 La incubación del líquido folicular IVF con [<sup>125</sup>I]IGFBP-4 resultó en la pérdida del IGFBP-4 intacto (SDS-PAGE no reductor de 24-kD, reductor de 32-kD) y la generación de fragmentos radiomarcados de 18- y 14-kDa. La inclusión del anticuerpo policlonal de PAPP-A en el ensayo, pero no el IgG de conejo no específico, la actividad de la proteasa del IGFBP-4 completamente inhibida en líquido folicular. Esta inhibición fue específica para la proteólisis del IGFBP-4 porque el anticuerpo de PAPP-A no inhibió la proteólisis inducida [<sup>125</sup>I]IGFBP-5 por distintas proteasas de serina en líquido folicular. En otros experimentos, la actividad proteolítica del IGFBP-4 fue efectivamente inmunosuprimida a partir del líquido folicular utilizando un anticuerpo PAPP-A específico.

30 La actividad de la proteasa del IGFBP-4 en líquido folicular IVF fue completamente suprimida por EDTA y 1,10 fenantrolina, pero no por los inhibidores de serina proteasa, PMSF, y pefabloc. TIMP-1 no tiene ningún efecto. Estos experimentos, se realizaron dos veces con resultados similares, se resumen en la Tabla 2. Los resultados coinciden con el perfil del inhibidor para la PAPP-A purificada (ver arriba), la actividad de la proteasa del IGFBP-4 en medio acondicionado del fibroblasto humano (Conover C.A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1993, 91:1129-1137) y la PAPP-A recombinantemente expresada descrita arriba.

TABLA 2

Efecto de los inhibidores de proteasa en la proteólisis del IGFBP-4		
Inhibidores de la Proteasa	% de Inhibición	
	FF	PAPP-A
EDTA, 5 mM	100	100
1,10 fenantrolina, 5 mM	100	100
PMSF, 10 mM	0	20
Pefabloc, 1 mM	15	ND
TIMP-1, 5 µg/ml	0	0
Fluido folicular (FF, 10ml) o PAPP-A purificado del suero de embarazo (500 ng) se incubó con [ <sup>125</sup> I]IGFBP-4 y los inhibidores indicados según lo descrito arriba. ND: no determinado.		

35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Los datos sobre los niveles de PAPP-A en los diferentes fluidos ováricos se presentan en la Tabla 3. Utilizando un ELISA de PAPP-A específico, el líquido folicular FF<sub>e</sub> (IVF) contiene 1604 ± 315 mIU/L de PAPP-A con un rango de 260-3728 mIU/L. El FF<sub>e</sub> (no-IVF) tiene 160 mIU/L. En comparación, fue PAPP-A no detectable en ninguna de las muestras FF<sub>s</sub>, en concordancia con previos informes de una falta de actividad de la proteasa del IGFBP-4. El medio acondicionado libre de suero a partir del luteinizado pero no las células granulosas no-luteinizadas en cultivo también contenida en el material inmunoreactivo de PAPP-A. Los niveles de PAPP-A en el medio acondicionado del fibroblasto humano se incluyen por comparación.

TABLA 3

<b>Niveles de PAPP-A en fluidos biológicos</b>		
Muestra	n	PAPP-A (mIU/L)
Fluido Folicular		
FF <sub>c</sub> (IVF)	12	1604 ± 315
FF <sub>c</sub> (no-IVF)	1	160
FF <sub>a</sub>	7	--
Medio Acondicionado		
GC luteinizado	3	106 ± 37
GC No-luteinizado	2	--
fibroblasto humano	4	360 ± 40
Los resultados son el promedio de ± SEM de "n" muestras, --: indica a o debajo de la sensibilidad del ensayo. GC: intervenciones de la célula granulosa.		

La actividad de la proteasa del IGFBP-4 en líquido folicular fue independiente del IGF exógeno. Este se puede explicar por el hecho de que el líquido folicular contiene péptidos de IGF, principalmente IGF-II, suficiente para activar la proteólisis del IGFBP-4. VanDessel, T.J.H.M., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81:1224-1231. De hecho, el medio acondicionado de las células granulosas luteinizadas claramente muestra actividad de la proteasa del IGFBP-4 del IGF-dependiente en el ensayo libre de células. Cataldo, N.A. *et al. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83:179-186; y Chandrasekher, Y.A. *et al., Proceedings de the 28th Annual Meeting de the Society for the Study de Reproduction*, 1995, Davis, CA (Abstract 102). La actividad del IGFBP-4 aparente constitutiva también se reportó en osteoblastos humanos, y se demostró que se debe a la producción de IGF endógeno.

Sin que se una a un mecanismo particular, la expresión de PAPP-A en el ovario en estados precisos del desarrollo folicular actúa para dividir el IGFBP-4 permitiendo el incremento del IGF local biodisponible para estimular la esteroidogénesis y promover el desarrollo del folículo dominante para la ovulación. Esto es apoyado por los estudios *in vitro* que muestran que el IGFBP-4 intacto inhibió la producción de estradiol de IGF-estimulado en células humanas granulosas, mientras que el IGFBP-4 proteolizado no tiene ningún efecto. Iwashita M. *et al., Horm. Res.*, 1996. 46 (suppl. 1):31-36.

#### Ejemplo 6

##### *IGFBPs Expresión de Células de Músculo Liso de Arteria Coronaria Humana*

Los cultivos primarios de las células del músculo liso de la arteria coronaria adultas humanas (hCASMC) se obtuvieron de Clonetics (Walkersville, MD) y se cultivaron en medio basal de célula de músculo liso (SmBM, modified MCDB 131) que contiene 5% de suero fetal bovino y antibióticos (50 mg/ml gentamicina, 50 mg/ml amfotericina-B). Los cultivos celulares se conservaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/ 95% de aire, y se utilizan en una pasaje 5-7 para los experimentos. Estas células tiñen positivo para la expresión del músculo liso β-actina y negativo para el factor antígeno VIII-relacionado.

El medio hCASMC acondicionado celular se obtuvo lavando las células dos veces y cambiando a medio libre de suero (SFM, SmBM + 0.1% de RIA-grado albúmina de suero bovino) durante un periodo de lavado de 6-h. Los cultivos se lavaron otra vez y se cambiaron a SFM reciente con adiciones experimentales. En el final de la incubación, el medio acondicionado-célula se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos a 4°C para remover los restos celulares y se almacenó a -80°C.

El cultivo de CASMC expresa los IGFBPs específicos. El Western blotting ligando de 24-h en medio acondicionado libre de suero de los tres cultivos hCASMC indicó los IGFBPs predominantes de 24 kD, 29-32 kD, y 38/42 kD. La inmunotransferencia con anticuerpos específicos demostró que estas formas representan el GFBP-4, IGFBP-5, y IGFBP-3. respectivamente. El análisis Northern de ARN extraído de hCASMC indicó una fuerte expresión de IGFBP-3, -4, y -5 mARN, débil expresión de IGFBP-2 y -6 mARN, y expresión no detectable de IGFBP-1 mARN bajo las condiciones de cultivo básicas.

El cultivo de hCASMC también secreta las proteasas IGFBP específicas. hCASMC expresa el mARN de PAPP-A y el antígeno de PAPP-A se detectó en el medio acondicionado por ELISA (572 ± 38, 740 ± 69, y 1224 ± 515 mIU/L

por 10<sup>5</sup> células a 24 h, 48 h, 72 h, respectivamente; n = 4 por grupo). La actividad de la proteasa de IGFBP-4 en el medio acondicionado hCASMCM se inhibió por los anticuerpos específicos de la PAPP-A, hCASMCM también secreta la específica actividad de la serina proteasa para IGFBP-5. La identidad de esta enzima(s) permanece por ser determinada pero su actividad no fue inhibida por el anticuerpo de PAPP-A. ProMBP no se detectó en un medio acondicionado hCASMCM.

#### Ejemplo 7

##### *PAPP-A Unida a la Superficie Celular*

La citometría de flujo se utilizó para evaluar el enlace de PAPP-A a la célula superficial de HEK 293 células ya sea transfectada con vector de expresión vacío o con el vector que contiene el cADN que codifica rPAPP-A (ver Ejemplo 4 para una descripción de vectores y transfecciones). La células después de 48 h de post-transfección se desprendieron con 5 mM de EDTA, se lavaron en medio L15 que contiene 2% de FBS (L15/FBS) y resuspendieron a aproximadamente 1, 000,000 células/ml en el mismo medio. Cincuenta ml de la suspensión celular se incubaron con el anticuerpo primario (concentración final 5 mg-/ml PAPP-A purificado específica mAb 234-2) sobre hielo por 30 min. Las células luego se lavaron tres veces con L15/FBS y se incubaron con IgG anti-ratón de cabra fluoresceína isotiocianato-conjugado (cadena pesada y ligera, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) por 30 min sobre hielo. Las células se fijaron en solución reguladora con 1% de formaldehído antes de la citometría de flujo sobre un instrumento Becton Dickinson. Los resultados indicaron que PAPP-A se une a la superficie de las células 293HEK. Resultados similares se obtuvieron con otros anticuerpos monoclonales de PAPP-A (234-3, 234-4, 234-5, y 234-7).

#### Ejemplo 8

##### *Stents Bioactivos Cubiertos por el Mutante IGFBP-4 Proteasa-resistente*

Este estudio emplea las stents bioactivos cubiertos por un mutante IGFBP-4 proteasa-resistente. Puesto que las variantes IGFBP-4 ya se unen al stent, se entregan directamente al sitio deseado de acción. El implante de un stent bioactivo tiene el potencial de reducir grandemente la cantidad requerida para producir una respuesta comparada a la entrega sistémica. Uniendo físicamente las variantes IGFBP-4 directamente a la superficie del metal, las proteínas terapéuticas se entregan simultáneamente con el implante, imposibilitando la necesidad de adicionales intervenciones.

Una técnica covalente adjunta se utiliza para ligar en cruz el IGFBP-4 proteasa-resistente a la superficie de los refuerzos del stent. Ver, Qin, X. *et al.*, *J. Bone Min. Res.*, 1999, 14:2079-2088 para una descripción del IGFBP-4 proteasa-resistente. Aproximadamente 1 mg y 10 mg del mutante IGFBP-4 serán analizados por stent. La técnica para ligar en cruz las proteínas del sistema IGF a las superficies del metal utiliza organosilanos y ligadores en cruz bifuncionales. Este proceso requiere el enlace primero de los organosilanos a los óxidos en la superficie del metal seguido por la unión en cruz física de las proteínas a los grupos amino en los organosilanos utilizando los ligadores en cruz bifuncionales. Varias técnicas para ligar en cruz han sido previamente utilizadas para unir las moléculas biológicas que incluyen heparina, la célula unida a las proteínas, y los factores de crecimiento a varias superficies que incluyen metales. El proceso de preparación para ligar en cruz las variantes IGFBP-4 a los implantes consiste de los stents tratados con ácido con 2.5% de ácido fluorhídrico-10.5% ácido nítrico por 1 min y aclarando extensamente con agua ultrapura. Los stents tratados con ácido son siliconados utilizando 3-aminopropiltriétoxosilano (1: 50 v/v en 95% de ETOH) durante 30 min, 23°C. Los stents siliconados se aclaran extensamente con agua ultrapura y colocan en un horno a 110°C durante 10 min luego en un horno a 45°C durante la noche. El IGFBP-4 (1 o 10 mg) se liga en cruz a los stents utilizando bis-(sulfosuccinimidil) suberato en PBS, 30 min, 23°C. La reacción de unión en cruz se termina utilizando 25 mM de Tris, pH 7.5 por 30 min, 23°C. Los stents control se tratan con ácido como se cito anteriormente y además el proceso se termina después de la siguiente etapa de aclarado. Los stents preparados se secaron por liofilización y se almacenaron a 4°C hasta los experimentos *in vitro* o *in vivo*. La irradiación o esterilización con gas frío se utilizaran para esterilizar los implantes.

La bioefectividad del IGFBP-4 unido al material se demuestra *in vitro* demostrando el enlace IGF-I y la inhibición de la migración IGF-I-inducido de hCASMCM después de la incubación del material a 37°C hasta 28 días en solución reguladora y en medio que contiene suero. El material no-ligado en cruz se utiliza como un control en estos estudios.

Una comparación directa del stent bioactivo (mutante IGFBP-4 proteasa-resistente) *versus* un stent no-cubierto (control) se realiza como sigue. Diez cochinitos jóvenes no consanguíneos se utilizan, 5 en cada grupo. Un stent cubierto se coloca en una arteria coronaria apropiada angiográficamente (apropiados diámetro, rama lateral no principal) y un stent control no-cubierto de similar tamaño será colocado en otra arteria coronaria del tamaño apropiado. Basados en la experiencia previa, 10 arterias tratadas y 10 arterias control son suficientes para detectar las diferencias significantes en la formación neointimal y la reducción del lumen.

La respuesta primaria variable es la extensión de la formación neointimal en las dos condiciones a 28 días, el tiempo necesario para la restenosis ocurre en el modelo de porcino. Veinti-ocho días ( $\pm$  2 días) post-procedimiento, el animal se sometió a eutanasia después de realizar una evaluación angiográfica cuantitativa de las arterias coronarias tratadas. El corazón luego se fija perfusión y los segmentos tratados con stent se procesan, seccionan, y tiñen siguiendo los protocolos estándar de Histology lab. se realizaron la tinción H & E y elastic van Gieson stains sobre una serie de secciones a través de la longitud del stent.

La angiografía cuantitativa es importante para medir el diámetro del vaso pre- y post-colocación de stent y en el reoterado día 28. Las mediciones de la angiografía coronaria cuantitativa (QCA) que se realizaron incluyen: diámetro mínimo de lumen; diámetro del lumen referencia distal y proximal; % de estenosis [diámetro de lumen mínimo/diámetro lumen referencia (proximal y distal) x 100].

5 Las mediciones histológicas proporcionan una comprensión del efecto diferencial de ambos stents (cubierto y control). Estos serán fabricados de las porciones próxima, media, y distal del stent cubierto y el stent control. Las mediciones seccionales en cruz incluyen: área del lumen, lámina elástica interna (IEL) y/ o área del stent, área neointimal, área medial, área lámina elástica externa (EEL), área adventicia, espesor intimal radial en cada cable de refuerzo (espesor neointimal), por ciento de estenosis en el stent, puntuación de la lesión en cada cable de refuerzo. Una puntuación de la lesión del vaso se calcula utilizando el método descrito por Schwartz *et al.*, *supra*, como sigue: 0, endotelio medio intacto; 1 denudación endotelial; 2, IEL laceración; 3, IEL y laceración media; y 4, laceración EEL. El espesor neointimal se mide en cada sitio del cable. El área luminal del vaso referencia se obtiene de los sitios proximal y distal que no tenían el stent.

15 Una muestra de tamaño de 10 animales por grupo se selecciona así que la diferencia proyectada en el espesor neointimal de 0.1 mm en una energía de 0.8 se puede detectar. El análisis estadístico se realiza en la lesión y neointima en cada sitio del cable. El modelo de regresión se utiliza para contar la lesión y la respuesta neointimal lesión-dependiente. Tres modelos se utilizan para establecer si hay diferencias en interceptos, pendientes, o ambos interceptos y pendientes a través de los dos grupos estudiados. La significancia estadística de estas variables determina el significado del grupo para la pendiente o intercepto de neointima y lesión. Las diferencias entre los grupos tratados en cada nivel de lesión se analizaron por el test t de comparaciones múltiples Tukey-Kramer.

25 Los experimentos *in vitro* demostraran que el mutante IGFBP-4 ligado en cruz es funcional durante un tiempo bajo condiciones fisiológicas. Estos experimentos validaran la resistencia del mutante IGFBP-4 para la proteólisis general por proteasas de suero. El punto final será significante la inhibición de la migración de hCASM C por el mutante IGFBP-4 ligado en cruz después de 7 días de incubación. Los puntos finales para los estudios *in vivo* se medirán como la reducción angiográfica (estenosis en-stent) y histológica (espesor intimal) observada en los stents cubiertos *versus* los stents no-cubiertos. Adicionalmente, los datos de los stents experimentales serán comparados con los datos históricos del stent cubierto.

#### Ejemplo 9

##### *Placas arteroscleoróticas coronarias humanas expresan la Proteasa IGFBP-4*

35 Catorce placas, que comprenden cuatro placas estables, cinco placas agrietadas y cinco erosiones de placa, obtenidas del material de la autopsia de pacientes de muerte cardíaca repentina, se examinaron. La tinción inmunohistoquímica se realiza por PAPP-A, IGF-I, y IGFBP-4. La composición celular de la placa se determinó utilizando los anticuerpos para músculo liso  $\alpha$ -actina y macrófagos. La expresión PAPP-A fue sustancialmente más alta en las células  $\beta$ -actina a partir del medio coronario, la placa, y el medio de vasa vasorum. El endotelio y adventitia mostró niveles significativamente más bajos de PAPP-A ( $p < 0.05$ ). Ninguna PAPP-A se detectó en macrófagos, y no se observaron diferencias entre las placas estables e inestables. No se detectó la expresión de IGF-I, y la tinción IGFBP-4 fue difusa en todos los tipos de células.

45 De tal manera, la PAPP-A está presente en placas arteroscleróticas humanas. La PAPP-A incrementa la biodisponibilidad de IGF-I local, y puede ser un marcador para la progresión de la aterosclerosis así como un blanco terapéutico para limitar el crecimiento de la placa.

50

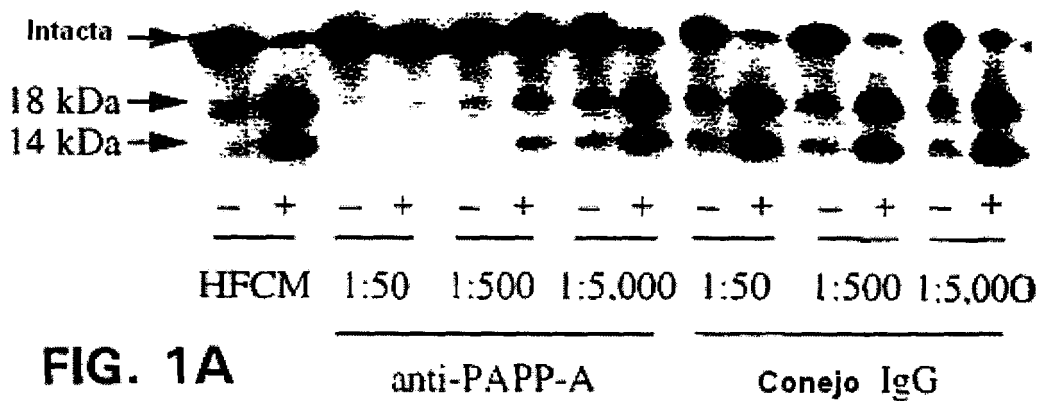
55

60

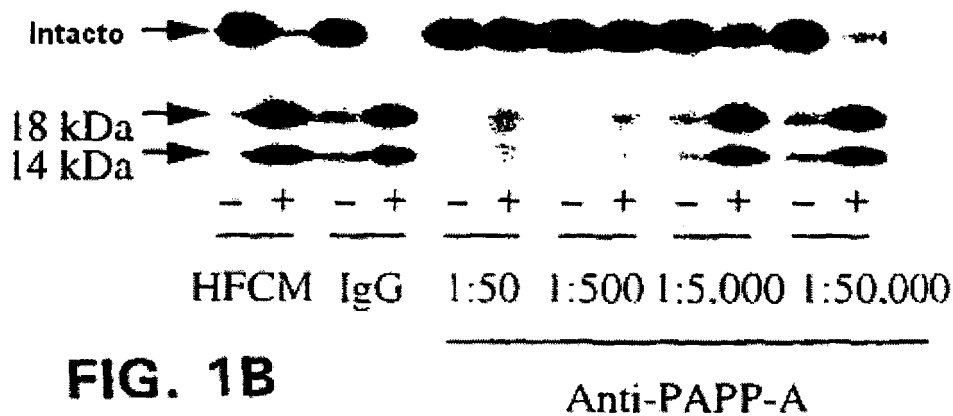
65

REIVINDICACIONES

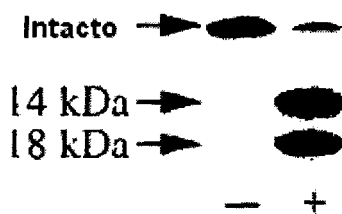
- 5 1. Un método de selección o de diagnóstico de un estado que promueve el crecimiento en una paciente no embarazada, dicho método comprende:
- a) la detección de un nivel de proteína-A en plasma asociada al embarazo (PAPP-A) en una muestra biológica de dicha paciente no embarazada; y
- 10 b) la comparación de dicho nivel de PAPP-A en dicha paciente no embarazada a un nivel estándar de PAPP-A en pacientes no embarazadas, en donde un incremento de dicho nivel de PAPP-A en dicha paciente no embarazada indica la presencia de dicho estado que promueve el crecimiento, en donde el citado estado que promueve el crecimiento es la restenosis, la aterosclerosis, o la ovulación.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel de PAPP-A se mide como actividad de la proteasa.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel se mide como una cantidad de la proteína PAPP-A.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel se mide como una cantidad del ARN mensajero de PAPP-A.
5. El método de la reivindicación 3, en donde dicha cantidad de la proteína PAPP-A se detecta inmunológicamente.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha cantidad de la proteína PAPP-A se detecta por al menos un anticuerpo monoclonal.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que comprende sangre, orina, líquido pleural, lavados orales, biopsias de tejidos, y líquido folicular.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica es sangre.
9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha PAPP-A se detecta como un dímero de PAPP-A.
- 35 10. Un método de detección de PAPP-A en una muestra biológica que comprende el contacto de dicha muestra biológica con un anticuerpo que tiene afinidad de enlace específico para PAPP-A, pero no para el complejo de proteína básica principal PAPP-A/pro, para detectar la PAPP-A en dicha muestra biológica.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65



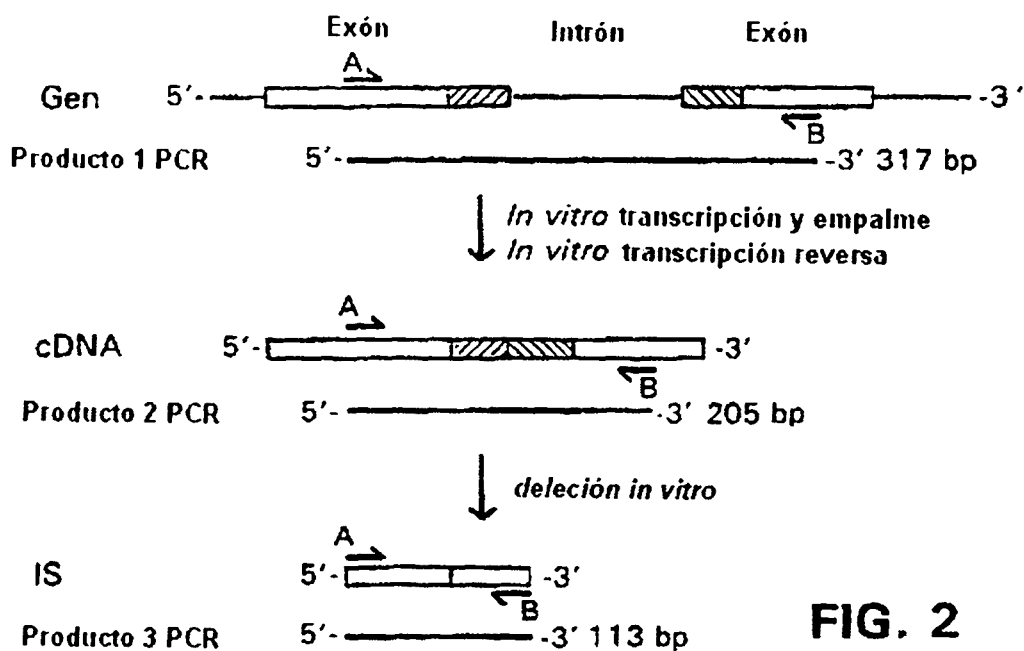
**FIG. 1A**



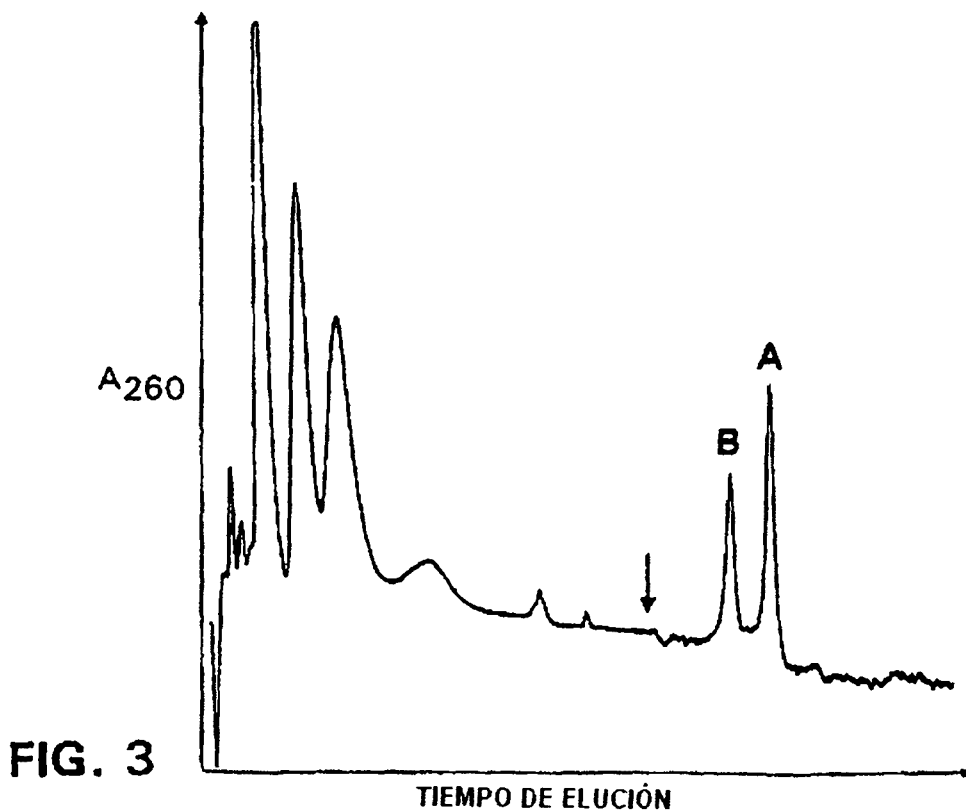
**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



**FIG. 2**



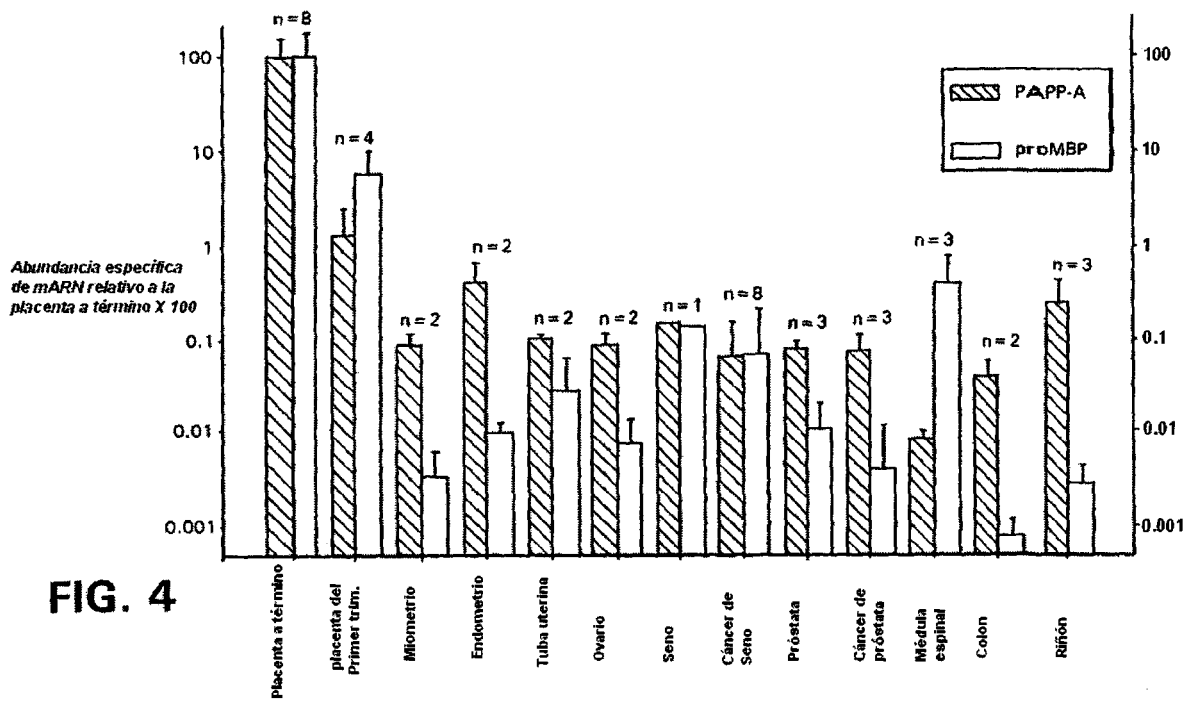


FIG. 4

**IGFBP – Proteasa; PAPP-A mARN Expresión de Células del Músculo Liso Vascular**

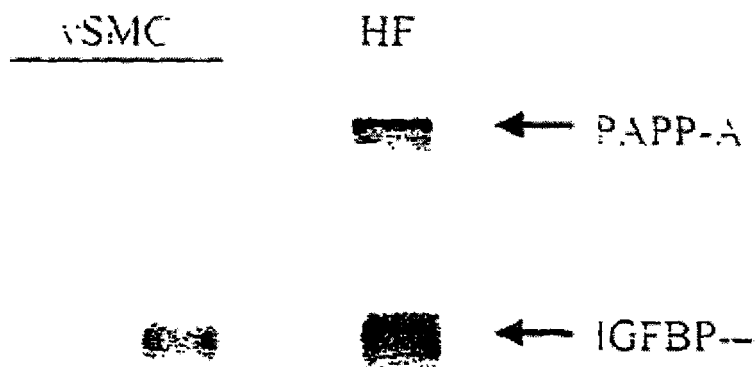


FIG. 5

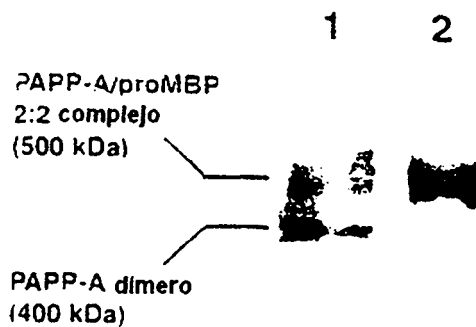


FIG. 6B

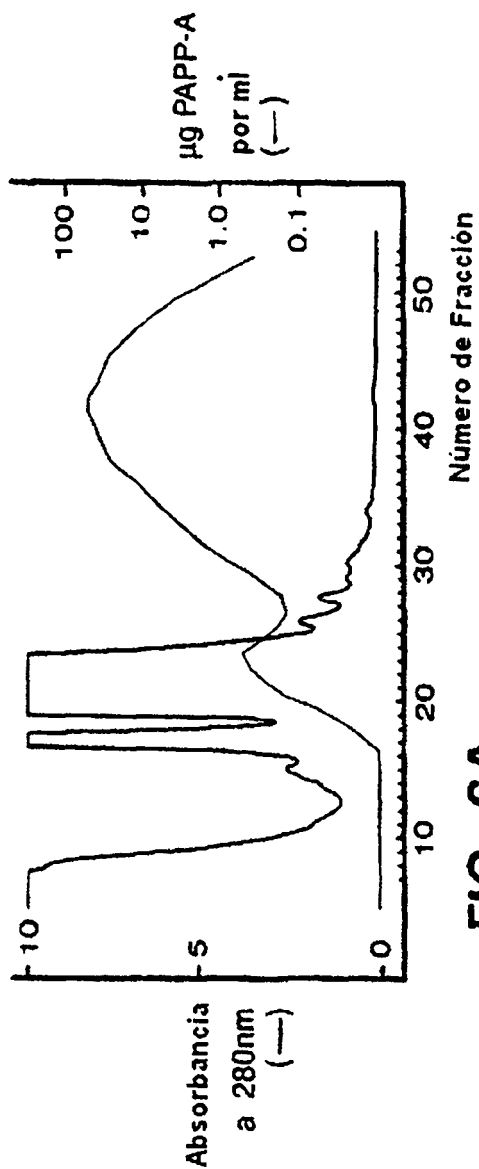


FIG. 6A

# ES 2 288 470 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Mayo Foundation for Medical Education y Research

5 <120> FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA QUE UNE LA PROTEASA DE LA PROTEÍNA-4

<130> 07039-145WO1

<150> US 60/124,541

10 <151> 1999-03-15

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

15 <211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

Ala Asp Leu Glu Leu Pro Arg  
1 5

25

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

35 Ser Pro Ala Val Ile Thr Gly Leu Tyr Asp Lys  
1 5 10

<210> 3

40 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 3

Ser Tyr Leu Pro Gly Gln Trp Val Tyr Leu Ala Ala Thr Tyr Asp Gly  
1 5 10 15

50 Gln Phe Met Lys  
20

<210> 4

55 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 4

Glu Gln Val Asp Phe Gln His His Gln Leu Ala Glu Ala Phe Lys  
1 5 10 15

65 <210> 5

<211> 16

# ES 2 288 470 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 5  
    Thr Ile Ser Tyr Pro Tyr Ser Leu Ala Gln Thr Thr Phe Trp Leu Arg  
    1                  5                  10                  15

10 <210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
15 <213> *Homo sapiens*

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

<210> 7  
<211> 11  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
30 <223> consenso enlace motif  
<221> VARIANT  
<222> (1)...(11)  
<223> Xaa = Any Amino Acid

35 <400> 7  
    His Glu Xaa Xaa His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His  
    1                  5                  10

40 <210> 8  
<211> 23  
45 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 8  
50 aaaccattt tattgcaggg agg 23

<210> 9  
55 <211> 22  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 9  
    ctgtggttgt gtgacaaatg gc 22

65 <210> 10  
<211> 33  
<212> ADN

## ES 2 288 470 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
5	cagtcagctg ctcaacggaa ggactcacat tgg	33
	<210> 11	
10	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 11	
	ggaggctctg ggactgcac	19
20	<210> 12	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 12	
	aacgggaagc tcaactggcat gatgacatca agaaggtggt g	41
30	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
40	ccaccacct gatgctgtag c	21
	<210> 14	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
50	caccagcac aatgaagatc aag	23
	<210> 15	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 15	
	gtcaagaaag ggtgtaacgc aac	23
65	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	

## ES 2 288 470 T3

	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 16</i>	
5	cagtcagctg ctcaacggaa	20
	<i>&lt;210&gt; 17</i>	
10	<i>&lt;211&gt; 19</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
15	<i>&lt;400&gt; 17</i>	
	ggaggctctg ggactgcac	19
20	<i>&lt;210&gt; 18</i>	
	<i>&lt;211&gt; 23</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
25	<i>&lt;400&gt; 18</i>	
	ttagtcaagc ttggttact tgc	23
30	<i>&lt;210&gt; 19</i>	
	<i>&lt;211&gt; 21</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
35	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 19</i>	
40	ggaagtcttc tgaggcagt g	21
	<i>&lt;210&gt; 20</i>	
	<i>&lt;211&gt; 21</i>	
45	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
	<i>&lt;400&gt; 20</i>	
50	aacgggaagc tcaactggcat g	21
	<i>&lt;210&gt; 21</i>	
55	<i>&lt;211&gt; 21</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Homo sapiens</i>	
60	<i>&lt;400&gt; 21</i>	
	ccaccacct gttgctgtag c	21
65	<i>&lt;210&gt; 22</i>	
	<i>&lt;211&gt; 28</i>	
	<i>&lt;212&gt; PRT</i>	



## ES 2 288 470 T3

	<400> 27	
	aagaaccag acagcagcgc catggccatc	30
5	<210> 28	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28	
15	acagtgatgc aggaatcctt cataagctta	30
	<210> 29	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
25	ctaagcttat gaaggatt	18
	<210> 30	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 30	
	atggcgcccc tagcttcc	18
40		
45		
50		
55		
60		
65		