



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 26 606 T2** 2006.06.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 051 487 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 26 606.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL99/00036**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 901 094.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/038970**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.01.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **10.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

123098 29.01.1998 IL

(73) Patentinhaber:

Diagnostic Technologies Ltd., Haifa, IL

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ADMON, Arie, 36054 Kiryat Tivon, IL; PALTIELI,
Yoav, 34602 Haifa, IL; SLOTKY, Ronit, 34467 Haifa,
IL; MANDEL, Silvia, 34403 Haifa, IL**

(54) Bezeichnung: **PLAZENTAPROTEIN 13**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Plazenta-Protein und seine Anwendungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Verweise, auf die im Text hingewiesen wird, werden durch eine Zahl eingeschlossen in Parenthese am Ende der Beschreibung aufgeführt.

[0003] Das Ziel des Schwangerschaftsmanagements ist es, ein ausgereiftes gesundes Kind zur Welt zu bringen, ohne dass Komplikationen auftreten, welche in nachteilhafter Art und Weise das Wohl sowohl der Mutter als auch des Neugeborenen beeinträchtigen. Ein signifikanter Prozentsatz der Schwangerschaften wird durch verschiedene Erkrankungen beeinträchtigt. Unter diesen Komplikationen sind fröhschwangerschaftliche Komplikationen und Frühgeburt, intrauterine Wachstumsverzögerung und Präeklampsie. Diese Störungen beeinträchtigen negativ das Resultat von betroffenen Schwangerschaften was zu enormen Kosten sowohl für die Patienten als auch für das Gesundheitssystem führt.

[0004] Plazenta-Protein 13 (PP13) ist ein Protein, welches zuvor aus dem Gewebe der menschlichen Plazenta isoliert worden ist (U.S. 4,500,451 von Bohn, et al., deren Inhalte hier per Verweis eingeschlossen sind). Das Protein wurde durch die folgenden Parameter charakterisiert: elektrophoretische Mobilität, isoelektrischer Punkt, Sedimentationskoeffizient, Molekulargewicht bestimmt durch Ultrazentrifugation, Molekulargewicht bestimmt durch SDS-PAGE, Extinktionskoeffizient und Kohlenhydratanteil. Die Aminosäurezusammensetzung (Reste pro 100 Resten) wurde bestimmt, jedoch nicht die Aminosäuresequenz.

[0005] PP13 wurde verwendet, um einen Assay zu entwickeln zur Detektion von drei spezifischen schwangerschaftsverwandten Erkrankungen im frühen Stadium: intrauterine Wachstumsverzögerung, Präeklampsie und Frühgeburt (U.S. 5,198,366 von Silberman). Sowohl ein Radioimmunoassay (RIA) als auch ein Enzym-linked Immunoassay (ELISA) sind offenbart und beide setzen gelabeltes PP13 bzw. anti-PP13-Antiserum ein. Keine weiteren Eigenschaften von PP13 sind in dem Silberman-Patent offenbart.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein reines PP13-Protein zur Verfügung zu stellen.

[0007] Es ist des Weiteren eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein DNA-Molekül kodierend PP13 zur Verfügung zu stellen.

[0008] Es ist des Weiteren eine Aufgabe der Erfindung, ein rekombinantes Verfahren zum Erzeugen von PP13 zur Verfügung zu stellen.

[0009] Des Weiteren ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung einen diagnostischen Assay zur Verfügung zu stellen basierend auf PP13 mit dem Ziel des frühen Nachweises von Schwangerschaftskomplikationen.

[0010] Es ist des Weiteren eine andere Aufgabe der Erfindung immunogene Peptide zur Verfügung zu stellen, abgeleitet von PP13, welche in solch einem diagnostischen Assay verwendet werden können.

[0011] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Protein oder ein Polypeptid zur Verfügung gestellt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: (a) Plazenta-Protein 13 (PP13) mit der Aminosäuresequenz dargestellt in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 9) und (b) ein Protein oder Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz einschließlich die Aminosäuresequenz von (a).

[0012] Durch einen anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein DNA-Molekül zur Verfügung gestellt kodierend das obengenannte Protein oder Polypeptid.

[0013] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt zum Screenen auch Schwangerschafts-verwandte Komplikationen umfassend die Schritte von:

(a) Zurverfügungstellung einer Serumprobe einer schwangeren Frau;

- (b) Bestimmen des Spiegels an PP13 oder eines Peptids abgeleitet davon in einer Serumprobe und
- (c) Vergleichen des vorbestimmten Spiegels mit vorbestimmten normalen Spiegeln von Frauen im selben gestationalen Alter, wobei eine Abweichung zwischen den beiden Spiegeln eine schwangerschaftsverwandte Komplikation anzeigt.

[0014] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Bestimmung in Schritt (b) eine, welche mit Hilfe von Antikörpern, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern, durchgeführt wird, welche gerichtet sind gegen besagte Proteine oder Polypeptide.

[0015] In noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein rekombinantes Verfahren für die Erzeugung von PP13 zur Verfügung gestellt, umfassend das Einbringen besagten DNA-Moleküls in einen Expressionsvektor, Einbringen des Expressionsvektors in eine Wirtszelle und Inkubieren der Wirtszelle unter Bedingungen, welche die Expression des insertierten Vektors ermöglichen.

[0016] Die vorliegende Erfindung stellt zum ersten Mal die vollständige Aminosäuresequenz von PP13 zur Verfügung wie auch ihre vollständige cDNA-Sequenz. Diese Information kann in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden. Beispielsweise können modifizierte PP13 Protein-Homologe und -Analoge erzeugt werden, in welchen eine oder mehrere Aminosäuren addiert, deletiert oder ersetzt worden sind, wobei das modifizierte Protein typischerweise 75% Homologie mit PP13 beibehält. Verfahren zum Modifizieren der Aminosäuresequenz eines Proteins, dessen volle Sequenz bekannt ist, sind im Stand der Technik wohlbekannt und schließen beispielsweise eine chemische Synthese, gesteuerte Mutagenese und rekombinante Verfahren. Solche modifizierten Proteine können überlegene Eigenschaften gegenüber natürlichen PP13 in verschiedenen Anwendungen aufweisen, wie z.B. eine überlegene Immunogenizität oder Immunospezifität (beispielsweise kann das modifizierte Protein frei sein von anderen Immunepitopen, welche mit anderen Proteinen gemeinsam sind) zum Zwecke der Anwendung in einem Immunoassay für die frühe Detektion von schwangerschaftsverwandten Erkrankungen, wie dies im Silberman beschrieben wird.

[0017] Des Weiteren können Peptidfragmente hergestellt werden aus PP13 und solche Peptide können modifiziert werden wie dies oben beschrieben wird im Hinblick auf das Volllängenprotein. Diese Peptide können auch eingesetzt werden in verschiedenen Anwendungen. Beispielsweise ist es wohlbekannt, dass immunogene Proteine spezifische Aminosäuresequenzen oder Epitope aufweisen, welche verursachen, dass das Immunsystem eine Immunantwort gegen dieses Protein in Gang setzt. Die obengenannten Peptide können getestet werden auf das Vorliegen eines Epitops von PP13, um das/die Epitop(e) zu identifizieren. Ein Peptid enthaltend ein Epitop kann dann in einem Immunoassay für Schwangerschaftserkrankungen eingesetzt werden. Eine Vielzahl von PP13 abgeleiteten Peptiden sind unten offenbart.

[0018] Das reife PP13-Protein oder ein abgeleitetes Peptid können eingesetzt werden, um Antikörper gegen PP13 herzustellen. Entweder polyklonale oder monoklonale Antikörper können erzeugt werden durch Standardverfahren, die dem Fachmann auf dem Gebiet wohlbekannt sind.

[0019] Sowohl die Antikörper wie auch die Proteine und Peptide können verwendet werden, um diagnostische oder Screening-Assays zum Nachweis von schwangerschaftsverwandten Komplikationen herzustellen wie z.B. intrauterine Wachstumsverzögerung, Frühgeburt und Präeklampsie. Beispiele solcher Assays werden im Detail in Silberman beschrieben, deren Inhalt hier per Verweis eingeschlossen ist und schließen Radioimmunoassays (RIA) und Enzym-linked Immunoassays (ELISA) ein. Im Allgemeinen wird solch ein Assay die Schritte des Erhaltens einer Serumprobe von schwangeren Frauen enthalten, die Bestimmung des Spiegels von PP13 oder von normalen Spiegeln von Frauen im selben gestationalen Alter. Eine statistisch signifikante Abweichung zwischen den Spiegeln wird ein Hinweis auf die schwangerschaftsverwandte Komplikation sein.

[0020] Wie oben erwähnt wird die Volllängen-cDNA von PP13 hier zum ersten Mal offenbart. Da die Volllängen-Aminosäuresequenz von PP13 auch offenbart wird, können verschiedene DNA-Moleküle kodierend PP13 aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes hergestellt werden. Darüber hinaus sind DNA-Moleküle, welche in der Lage sind, an diese DNA-Moleküle unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren, auch herstellbar. Die DNA-Moleküle können in einem rekombinanten Verfahren zur Erzeugung von PP13 eingesetzt werden. Solche Verfahren sind im Stand der Technik wohlbekannt und involvieren üblicherweise das Insertieren des DNA-Moleküls in einen Expressionsvektor wie z. B. ein Plasmid, einen Phagen oder eine virale DNA. Der Expressionsvektor wird dann in eine kompatible Wirtszelle inseriert, wie z.B. bakteriellen Zellen oder eukaryontischen Zellen wie z.B. Hefe-, Pflanzen-Säuger- oder Insekten-Zellen. Die Wirtszelle wird inkubiert unter Bedingungen, welche die Expression des insertierten Vektors induzieren, wodurch PP13 erzeugt wird.

[0021] Beispielsweise kann die DNA kodierend PP13 in einen Expressionsvektor inseriert werden unter der Steuerung eines induzierbaren Promotors wie z.B. dem LacZ-Promotor, T7- oder T4-Polymerasepromotor, Heatshock-Promotoren etc. Ein Beispiel eines Expressionsvektors ist der pQE-Expressionsvektor (QIAGEN). Der pQE-Vektor stellt hohe Expressionsspiegel von Proteinen zur Verfügung enthaltend einen 6-His-Affinitätstag in *E. coli*. Der pQE enthält einen regulierbaren Promotor bestehend aus dem *E. coli*-Phagen T5-Promotor und zwei lac-Operatorsequenzen. Der Vektor wird dann in einen konkurrierenden M15 [PREP4] *E. coli*-Strang (Villarejo and Zabin. 1974) inseriert. Die M15-Wirtszelle enthält viele Kopien des Plasmids pREPA welches das lacI-Gen kodierend den lac-Repressor trägt. Die Wirtszelle wird mit IPTG inkubiert was schnell die Expression des inserierten Vektors induziert und dabei PP13 erzeugt. Viele andere Systeme können auch für die PP13-Expression eingesetzt werden, wie es dem Fachmann auf dem Gebiet wohlbekannt ist.

[0022] Ein Kit für die Diagnose von schwangerschaftsverwandten Komplikationen kann erzeugt werden basierend auf der vorliegenden Erfindung. Solch ein Kit kann beispielsweise die folgenden Komponenten umfassen: (1) Antikörper, welche in der Lage sind, spezifisch an PP-13 zu binden; (2) gelabeltes PP-13, beispielsweise einen radioaktiven, fluoreszenten oder enzymatischen Marker; (3) PP-13-Standardlösungen bei bekannten Konzentrationen; und (4) Mittel zum Nachweis des Signals erzeugt in dem Assay. Solche Mittel könnten beispielsweise Antiserum erzeugt gegen die PP-13-bindenden Antikörper darstellen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0023] Die vorliegende Erfindung wird besser verstehen zu sein aus der folgenden detaillierten Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen, welche in Verknüpfung mit den folgenden Zeichnungen zu sehen sind, in welchen:

[0024] [Fig. 1](#) ein partielles Nukleotid zeigt und eine deduzierte Aminosäuresequenz einer cDNA aus der Expressed Sequence Tag (EST) Datenbank (Zugangsnummer R24614). Regionen, welche ähnlich zu den sequenzierten Peptiden sind werden unterstrichen dargestellt. PP13 abgeleitetes Peptid #3 ([Fig. 1](#)) wurde als eines identifiziert, welches partielle Identität mit dieser cDNA (rot unterstrichene Buchstaben) zeigt und Peptide #4, #5 und #6 sind zu 100% identisch mit der EST-Datenbanksequenz. Die Nukleotidsequenz der 390-bp cDNA wird gezeigt mit einer Translation des offenen Leserahmens (118 Aminosäuren). Eine Kozak-ähnliche Translations-Initiations-Sequenz enthaltend ein mögliches Startcodon (ATG) am Nukleotid 33 wird mit einem Stern gekennzeichnet. Nukleotidnummern sind zur linken angegeben.

[0025] [Fig. 2](#) zeigt die vollständige Nukleotid- und die deduzierte Aminosäuresequenz des PP13-cDNA-Klons, wie er aus der RACE-Analyse erhalten wird. Die Nukleotidsequenz der 611-bp-cDNA wird mit der Translation des offenen Leserahmens (139 Aminosäuren) dargestellt. Regionen, welche identisch mit dem verdauten Peptid sind werden nummeriert und unterstrichen. Eine Kozak-ähnliche Initiation der Translationsequenz enthaltend ein hypothetisches Startcodon (ATG) am Nukleotid 41 wird mit einem Stern gekennzeichnet. Die Nukleotidnummern sind zur linken angegeben.

[0026] [Fig. 3](#) zeigt den Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von PP13 und Eosinophil-Lysophospholipase (SEQ ID NO: 11). Identische Aminosäuren des PP13-Proteins und von Eosinophil-Lysophospholipase (EPL) werden fett dargestellt. Es besteht ungefähr 54% Identität zwischen den beiden Proteinen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG EINER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORM

MATERIALIEN UND METHODEN Materialien

[0027] Modifiziertes Trypsin und LysC (Sequenzierungsqualität) waren von Promega. Trifluoressigsäure (TFA) und hydrogeniertes Triton X100 (RTX) stammten von Sigma. Ammoniumcarbonat (AC) war von Riedel-de Haen. Acetonitril (ACN) war von BioLab. 5' und 3' RACE-Systeme waren von Gibco BRL. pUC57-Klonierungsvektoren (T-Cloning Kit) waren von MBI Fermentas.

Sequenzieren des PP13-Proteins

[0028] Das PP13-Protein war immunoaffinitätsaufgereinigt unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern, erzeugt gegen Plazenta-Proteine und affinitätsaufgereinigt auf dem PP-13-Protein. Um des Weiteren das PP-13-Protein aufzureinigen und es mit proteolytischen Enzymen zu verdauern, wurde von uns das Verfahren von Rosenfeld et al. (1992) wie folgt eingesetzt. Das PP-13-Protein wurde von anderen verunreinigenden Proteinen abgetrennt durch sein Auflösen auf SDS-PAGE in einen Minigelformat (10 × 10 cm), ge-

folgt vom Fixieren des Gels und dem Anfärben des Gels mit Coomassie brilliant blue. Das Gel wurde entfärbt in 40% Ethanol + 10% Essigsäure. Die gefärbte Gelbande enthaltend das PP-13-Protein wurde ausgeschnitten mit einer sauberen Rasierklinge und gewaschen mit 50% Acetonitril (ACN) + 200 mM Ammoniumcarbonat (AC) in Wasser. Diese Behandlung wurde durchgeführt, um so viel als möglich des SDS, von Coomassie brilliant blue und von Essigsäure zu entfernen. Die gewaschenen Gelstücke wurden an Luft getrocknet für 30 Minuten und rehydratisiert durch Zugabe von 50–100 µl an 200 mM AC + 1% RTX-Puffer enthaltend 0,5 µg modifiziertes Trypsin oder 0,5 µg von LysC. Nach Inkubieren unter mildem Schütteln bei 37°C für 12 Stunden wurden die proteolytischen Peptide, freigesetzt aus dem PP-13-Protein, aus dem Gelstück durch sein zweimaliges Schütteln in 100 µl an 0,1% TFA + 60% ACN bei Raumtemperatur für 60 min eluiert. Die Lösung wurde abgetrennt von dem Gelstück durch Zentrifugation und getrocknet in einem Speed-Vac, um den Überschuss an ACN zu entfernen. Die proteolytischen Peptide wurden aufgelöst durch Revers-Phasen-HPLC auf einer Vydac 1 × 150 mm, C18, 300-Säule mit einem linearen Gradienten von 4% ACN + 0,1% TFA bis 60% ACN + 0,085% TFA bei Raumtemperatur mit einer Fließrate von 40 µl/min. Das Eluierungsmuster der Peptide wurde durch UV-Absorption bei 214 nm bestimmt und Fraktionen enthaltend Peptide wurden eingesammelt per Hand in einer Mikrofugen-Tube und bei –80°C gelagert. Einige der Fraktionen enthaltend Peptide wurden sequenziert auf einem Protein-Peptid-Sequenzierautomat (Modell 476A und 494A, Perkin Elmer) gemäß dem vom Hersteller eingesetzten üblichen Edman-Chemien und Zyklen.

cDNA 3'- und 5'-Enden-Analyse

[0029] Um die Vollängen-cDNA-Sequenz des PP-13-Gens zu isolieren, verwendeten wir ein Standardverfahren, welches Rapid Amplification von cDNA-Enden (RACE) (2) genannt wird, um sowohl die 5'- als auch die 3'-Enden der bekannten Teile der cDNAs an ihren Enden zu verlängern. Im Allgemeinen erzeugt das RACE-Verfahren cDNA unter Verwendung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), um Kopien der Region zwischen bekannten Segmenten der cDNA an spezifischen Punkten in dem Transkript und an seinen 3'- oder 5'-Enden zu amplifizieren. Dies wurde realisiert dadurch, dass Kopien der cDNA zwischen synthetischen DNA-Primern erzeugt wurden, welche komplementär zu bekannten Segmenten des Codons der Primer waren, welche an die Enden der cDNA annealen.

[0030] Für die Bestimmung des 3'-Primeendes wurde eine reverse Transkriptase (RT) Reaktion durchgeführt unter Verwendung von 4 µg von gesamter plazentaler RNA (hergestellt durch TRI-Reagenz aus Molecular Research Center, Inc.) und dem 3'-Endenprimer: (106ras) 5'-ggc cac gcg tcg act agt act tt ttt ttt tt-3'. Dies wurde gefolgt von einer PCR-Reaktion zwischen den Primern: (107ras für die Vorwärtsreaktion) 5'-ggc cac gcg tcg act agt ac-3' und dem Rückwärtsprimer (100ras, homolog zu Peptid #4) wie folgt: 5'-ggg ata tgg atg ttg gag gag ac-3'. Die PCR-Reaktion enthielt 2,5 mM MgCl₂, eine Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden, Primerannealen bei 60°C für 45 Sekunden und Primerextension bei 72°C für 2 Minuten über 35 Zyklen.

[0031] Für die Bestimmung des 5'-Endes wurde die RT-Reaktion mit 4 µg an gesamtplazentaler RNA durchgeführt und einem spezifischen 3'-Primer (101ras): 5'-gtc tcc tcc aac atc cat at-3'. Das 5'-Ende der cDNA wurde verlängert durch Zugabe zu seiner Poly-dC unter Verwendung des RACE-Protokolls und Reagenzes (Gibco BRL). Dies wurde gefolgt von einer PCR-Reaktion unter Verwendung von Bedingungen wie oben erwähnt und den folgenden Primern: ein Rückwärtsprimer mit dem verkürzten Ankerprimer (AAP), zur Verfügung gestellt von Gibco BRL, und dem Vorwärtsreaktionsprimer 101 ras, wie oben beschrieben.

[0032] Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in den pUC57-T-Klonierungsvektor (T-Cloning Kit #K1212 MBI Fermentas) inseriert und die Klone enthaltend das Insert wurden ausgewählt und sequenziert durch automatisiertes DNA-Sequenzieren vom biologischen Service am Weizmann Institute, Rehovot, Israel.

ERGEBNISSE

Identifikation von Peptiden aus PP13-Protein

[0033] Um entweder das Gen kodierend das PP-13-Protein zu klonen oder sein Gen in einer der Datenbanken zu identifizieren, war es notwendig, die primäre Aminosäuresequenz des PP-13-Proteins zu erhalten. Da das PP13-Protein an seinem Aminoterminus blockiert war, wurden innere Aminosäuresequenzen nach proteolytischer Verdauung des Proteins in Peptidfragmente erhalten. Diese Peptide wurden abgetrennt und aufgereinigt durch Chromatografie unter Verwendung von Reversphasen-HPLC und einige der ablösenden Peptide wurden sequenziert. Die Aminosäuresequenzen der Peptide, welche erfolgreich sequenziert wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Aminosäuresequenzen von PP13 abgeleiteten Peptidfragmenten erhalten nach Trypsin- und LysC-Verdauung wie oben beschrieben.

Peptid-Nummer	Aminosäuresequenz
1. (SEQ ID NO: 1)	L P V S L S V G
2. (SEQ ID NO: 2)	V I I K
3. (SEQ ID NO: 3)	G T P I H S F I N D P Q L Q V D F
4. (SEQ ID NO: 4)	E F G I W M L E E T T D Y V P F E
5. (SEQ ID NO: 5)	Q F E L C I Y
6. (SEQ ID NO: 6)	V H Y N E Y
7. (SEQ ID NO: 7)	G F V H R

Vergleich von Peptidsequenzen mit Datenbanken

[0034] DNA und Proteindatenbanken, die verfügbar sind über das Internet, wurden abgesucht auf Homologie mit erhaltenen PP-13-Peptidsequenzen. Eine cDNA-Sequenz (SEQ ID NO: 8) kodierend vier der Peptidfragmente ([Fig. 2](#)) wurde identifiziert (EST Zugangsnummer R24614). Die Tatsache, dass Homologie mit mehr als einer Peptidsequenz in der identifizierten cDNA vorliegt, zeigt an, dass diese cDNA wahrscheinlich ein Produkt des Gens darstellt, welches das Protein kodiert, welches der hauptsächliche Bestandteil der PP13-Präparierung ist.

[0035] Die Sequenz wurde in einer EST-Datenbank, erzeugt von der Universität von Washington, gefunden und über das National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter Verwendung des BLAST-Suchprogramms gesucht. Die R24614 cDNA enthält eine Kozak-ähnliche Translations-Initiations-Sequenz und einen 358 Basenpaar offenen Leserahmen (ORF) kodierend ein 118 Aminosäure großes Polypeptid. Das berechnete Molekulargewicht des Polypeptids kodiert durch den R24614 offenen Leserahmen beträgt 13,9 KDa. Vier der sequenzierten Peptide waren homolog mit Teilen der reduzierten Sequenz des großen offenen Leserahmens von R24614 cDNA ([Fig. 1](#)). Die erhaltene Aminosäuresequenz von Peptid #3 zeigte sich als eine, welche teilweise Identität mit der EST cDNA zeigte und die Peptidnummern 4, 5 und 6 waren identisch mit verschiedenen Segmenten des ORFs in der R24614-Sequenz.

[0036] Da die offene Leserahmen-Sequenz von R24614, erhalten von der Datenbank, nicht die vollständig kodierende Region des PP13-Proteins enthielt, war es notwendig, die Vollängen-cDNA-Sequenz zu erhalten.

Identifikation der vollständigen PP13-cDNA-Sequenz

[0037] Um die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten, verwendeten wir die Rapid Amplification von cDNA-Enden (RACE). Unter Verwendung des RACE-Verfahrens mit einem internalen spezifischen Primer homolog zur Sequenz aus der Region von Peptid 4, welches zuvor gefunden worden war ([Fig. 1](#)), entdeckten wir die Codons der 3'- und 5'-Enden von PP13. Die vollständige PP13-Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 9) und cDNA (SEQ ID NO: 10) sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0038] Die vollständige cDNA enthält eine Kozak-ähnliche Translations-Initiations-Sequenz und einen 417-bp offenen Leserahmen kodierend ein 139 Aminosäure großes Polypeptid mit einer vorbestimmten Masse von 15,1 KDa, was ungefähr in derselben Größenordnung des molekularen Gewichts von PP13 liegt, welches aus seiner Migration in SDS-PAGE berechnet worden war. Der hauptsächliche offene Leserahmen der vollständigen cDNA-Sequenz enthält alle der Peptidsequenzen, welche zuvor durch Edman-Sequenzierung der Reversphasen aufgereinigten proteolytischen Peptide gefunden worden waren ([Fig. 1](#)).

Vergleich mit anderen Proteinen

[0039] Es stellte sich heraus, dass das neue Gen eine Sequenzähnlichkeit mit Eosinophil-Lysophospholipase (3) zeigte, ein Protein von bekannter Signifikanz in der Immunität und in Schwangerschaftserkrankungen ([Fig. 3](#)). PP13 und Eosinophil-Lysophospholipase weisen ungefähr 54% Aminosäureidentität und 56% Nukleinsäureidentität auf. Die Identität der beiden Proteine und Regionen der Peptide, speziell Peptidnummern 4 und 6 ist gering, so dass es klar ist, dass die beiden Proteine verschieden sind, jedoch die Homologie und Identität nahe legen könnte, dass sie zur gleichen Proteinfamilie gehören.

Literaturverweise:

1. Rosenfeld et al. (1992) In-Gel digestion of protein for internal sequence analysis after one or two dimensional Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 203, 173–175.
2. Frohman, M. A., (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds.) p. 28, Academic Press, San Diego.
3. Ackerman, S. J., Corrette, S. E., Rosenberg, H. F., Bennett, J. C., Mastrianni, D. M., Nicholson-Weller, A., Weller, P. F., Chin, D. T., and Tener, D. G. (1993) *The J. of Immunology*, 150, No. 2, pp 456–468.
4. Villarego, M. R. and Zabin, I. (1974) *J. Bacteriol.*, 120, 466–474.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES LTD.

<120> Plazenta-Protein 13

<130> Diagnostic Technologies Ltd.

<140>

<141>

<150> 123098

<151> 1998-01-29

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(8)

<223> PP-13 abgeleitet (Page 8)

<400> 1

Leu Pro Val Ser Leu Ser Val Gly

1

5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(4)

<223> PP-13 abgeleitet (Page 8)

<400> 2

Val Ile Ile Lys

1

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> humanes Plazenta-Gewebe
 <220>
 <221> PEPTID
 <222> (1)..(17)
 <223> PP-13 abgeleitet (Page 8)
 <400> 3

```

      Gly Thr Pro Ile His Ser Phe Ile Asn Asp Pro Gln Leu Gln Val Asp
      1               5               10               15

      Phe
    
```

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> humanes Plazenta-Gewebe
 <220>
 <221> PEPTID
 <222> (1)..(17)
 <223> PP-13 abgeleitet (Page 8)
 <400> 4

```

      Glu Phe Gly Ile Trp Met Leu Glu Glu Thr Thr Asp Tyr Val Pro Phe
      1               5               10               15

      Glu
    
```

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> humanes Plazenta-Gewebe
 <220>
 <221> PEPTID

<222> (1)..(7)

<223> PP-13 abgeleitet (Page 8)

<400> 5

Gln Phe Glu Leu Cys Ile Tyr

1

5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(6)

<223> PP-13 abgeleitet (Page 8)

<400> 6

Val His Tyr Asn Glu Tyr

1

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(5)

<223> PP-13 abgeleitet (Page 8)

<400> 7

Gly Phe Val His Arg

1

5

<210> 8

<211> 611

<212> DNA

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(611)

<223> PP-13-Klon R24614 (Fig. 2)

<400> 8

```

actggaactca attctgaagg tcgccaagaa agaaaaaaca atgtcttctt taccctgtgcc 60
atacaaactcg cctgtgtctt tgtctgttgg ttcctgcctg ataataaaag ggacaccaat 120
ccactctctt atcaatgacc cacagctgca ggtggatttc tacactgaca tggatgagga 180
ttcagatatt gccctccgtt ccgagtgca ctttggcaat catgttggtca tgaacaggcg 240

```

```

tgagtttggg atatggatgt tggaggagac aacagactac ggcctcttg aggatggcaa 300
acaatttgag cgtgcctct acgtacatca caatgagtat gagataaagg tcaatggcat 360
angcattcac ggttttgtcc atcgaatccc gccatcattt gtgaagatgg tgaagtgtc 420
gagagatctc tccctgacct cagtgtgtgt ctgcaattga gggagatgat cacactcttc 480
attgttgagg aaatccccct ttctacctga ccacgggatt ccagaaacct gctaacagaa 540
taatccctgc tcacatttc cctacactt tgtcattaaa acagcacgaa aactcaaaaa 600
aaaaaaaaa a

```

611

<210> 9

<211> 139

<212> PRT

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(139)

<223> PP-13 (Fig. 2)

<400> 9

```

Met Ser Ser Leu Pro Val Pro Tyr Lys Leu Pro Val Ser Leu Ser Val
 1              5              10              15

Gly Ser Cys Val Ile Ile Lys Gly Thr Pro Ile His Ser Phe Ile Asn
 20              25              30

Asp Pro Gln Leu Gln Val Asp Phe Tyr Thr Asp Met Asp Glu Asp Ser
 35              40              45

Asp Ile Ala Phe Arg Phe Arg Val His Phe Gly Asn His Val Val Met
 50              55              60

Asn Arg Arg Glu Phe Gly Ile Trp Met Leu Glu Glu Thr Thr Asp Tyr
 65              70              75              80

Val Pro Phe Glu Asp Gly Lys Gln Phe Glu Leu Cys Ile Tyr Val His
 85              90              95

Tyr Asn Glu Tyr Glu Ile Lys Val Asn Gly Ile Arg Ile Tyr Gly Phe
100              105              110

Val His Arg Ile Pro Pro Ser Phe Val Lys Met Val Gln Val Ser Arg
115              120              125

Asp Ile Ser Leu Thr Ser Val Cys Val Cys Asn
130              135

```

<210> 10

<211> 417

<212> DNA

<213> humanes Plazenta-Gewebe

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(417)

<223> PP-13 (Fig. 2)

<400> 10

```

atgtcttctt tacccgtguc atacaaactg cctgtgtctt tgtctgttgg tccctgcgtg 60
ataatcaaag ggaacaccaat ccactctctt atcaatgacc cacagctgca ggtggatctc 120
taccctgaca tggatgagga ttcagataat gccttcctgt tccgagtgcg ctttggcaat 180
catgttgta tgaacaggcg tgagtttggg atatggatgt tggaggagac aacagactac 240
gtgcctcttg aggatggcax acattctgag ctgtgcactc acgtacatta caatgagcat 300
gagataaagg tcaatggcat acgcatttac ggctttgtcc atcgaatccc gccatcatta 360
gtgaagatgg tgcagtgtc gagagatata tccctgacct cagtgtgtgt ctgcaac 417

```

<210> 11

<211> 142

<212> PRT

<213> humane weiße Blutzellen

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(142)

<223> Eosinophil- Lysophospholipase (Fig. 3)

<400> 11

```

Met Ser Leu Leu Pro Val Pro Tyr Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ser Thr
  1              5              10              15

```

```

Gly Ser Thr Val Thr Ile Lys Gly Arg Pro Leu Val Cys Phe Leu Asn
          20              25              30

```

```

Glu Pro Tyr Leu Gln Val Asp Phe His Thr Glu Met Lys Glu Glu Ser
          35              40              45

```

```

Asp Ile Val Phe His Phe Gln Val Cys Phe Gly Arg Arg Val Val Met
          50              55              60

```

```

Asn Ser Arg Glu Tyr Gly Ala Trp Lys Gln Gln Val Glu Ser Lys Asn
          65              70              75              80

```

```

Met Pro Phe Gln Asp Gly Gln Glu Phe Glu Leu Ser Ile Ser Val Leu
          85              90              95

```

```

Pro Asp Lys Tyr Gln Val Met Val Asn Gly Gln Ser Ser Tyr Thr Phe
          100              105              110

```

```

Asp His Arg Ile Lys Pro Glu Ala Val Lys Met Val Gln Val Trp Arg
          115              120              125

```

```

Asp Ile Ser Leu Thr Lys Phe Asn Val Ser Tyr Leu Lys Arg
          130              135              140

```

Patentansprüche

1. Ein rekombinantes Protein oder Polypeptid ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

(a) Plazenta-Protein 13 (PP13) von der Aminosäuresequenz dargestellt in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 9); und
(b) einem Protein oder Polypeptid, welches eine Aminosäuresequenz aufweist, welche die Aminosäuresequenz von (a) einschließt.

2. Ein DNA-Molekül kodierend für das Protein oder Polypeptid von Anspruch 1.

3. Das DNA-Molekül gemäß Anspruch 2, welches die Nukleinsäuresequenz, welche in [Fig. 2](#) erscheint, aufweist (SEQ ID NO: 10).

4. Ein rekombinantes Verfahren zum Herstellen von PP13 umfassend:

- (a) Insertieren eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 2 in einen Expressionsvektor;
- (b) Insertieren besagtem Expressionsvektors in eine Wirtszelle; und
- (c) Inkubieren besagter Wirtszelle unter Bedingungen, welche die Expression des insertierten Vektors erlauben, wodurch PP13 produziert wird.

5. Ein Kit für die Diagnose von Schwangerschaft verwandten Komplikationen umfassend:

- (a) Antikörper, welche in der Lage sind, spezifisch an das Protein oder Polypeptid von Anspruch 1 zu binden;
- (b) gelabeltes PP13 von Anspruch 1; und
- (c) eine Standardlösung von rekombinantem PP13 in bekannten Konzentrationen.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

* #3
 M S S L P L Q V D
 1 caattctgaaggtcgccaagaaggagagaacaATGTCTTCTTTACCCCTGCAGGTGGAT
 F Y T D M D E D S D I A F R F R V H F G
 60 TTCTACACTGACATGGATGAGGATTGAGATATTGCCTTCCGTTTCCGAGTGCACTTTGGC
 - #4
 N H V V M N R R E F G I W M L E E T T D
 120 AATCATGTGGTCATGAACAGGCGTGAGTTTGGGATATGGATGTTGGAGGAGACAACAGAC
 #5 #6
 Y V P F E D G K Q F E L C I Y V R Y N E
 180 TACGTGCCCTTTGAGGATGGCAAACAATTTGAGCTGTGCATCTACGTACATTACAATGAG
 Y E I K V N G H T H L R L C P I E S R H
 240 TATGAGATAAAGGTCAATGGGCATACGCATTTACGGCTTTGTCCCATCGAATCCCGNCAT
 H L L K M G A S V R G D I F P G P S V C
 300 CATTTETTGAAGATGGGTGCAAGTGTCCGAGGAGATATCTTCCCTGGACNTCAGTGTGT
 V L Q F ? G E M I H
 360 GTCTTGCAATTTNAGGGGGAGATGATCCACA

FIG. 1

5'							M S S	L P V P	
1	actggactca	attctgaagg	tgcgcaagaa	agaaaaaacaca	ATGTCTTCTT	TACCCGTGCC			
	#1			#2		#3			
	Y K L	P V S	L S V G	S C V	I I K	G T P I			
61	ATACAAACTG	CCTGTGTCTT	TGTCTGTITGG	TTCCTGCGTG	ATAATCAAG	GGCACCPAT			
	H S F	I N D	P Q L Q	V D F	Y T D	M D E D			
121	CCACTCTTTT	ATCAATGACC	CACAGCTGCA	GGTGGATTTC	TACACTGACA	TGGATGAGGA			
	S D I	A F R	F R V H	F G N	H V V	M N R R			
181	TTCAGATATT	GCCTTCCGTT	TCCGAGTGCA	CTTTGGCAT	CATGTGGTCA	TGAACAGGCG			
	#4								
	E F G	I W M	L E E T	T D Y	V P F	E D G K			
241	TGAGTTTGGG	ATATGGATGT	TGEAGGAGAC	AACAGACTAC	GTGCCCTTTG	AGGATGGCAA			
	#5		#6						
	Q F E	L C I	I V H Y	N E Y	E I K	V N G I			
301	ACRATTTGAG	CTGTGCATCT	ACGLACATTA	CAATGAGTAT	GAGATAAAGG	TCAATGGCAT			
	#7								
	R I Y	G F V	H R I P	P S F	V X M	V Q V S			
361	ACGCATTTC	GGCTTTGTCC	ATCGAATCCC	GCCATCATTI	GTGAAGTGG	TGCAAGTGTIC			
	R D I	S L T	S V C V	C N					
421	GAGAGATATC	TCCCTGACCT	CAGTGTGTGT	CTGCAATtga	gggagatgat	cacactcctc			
481	attgttgagg	aatccctct	ttctacctga	ccatgggatt	cccagaacct	gctaacagaa			
541	taatecctgc	tcacattttc	ccctacactt	tytcattaa	acagcacgaa	aactcaaaaa			
601	aaaaaaaaaaa								

FIG. 2


```

PP13 1 MSSLPVPYKLPVSLSVGSCVIKGTPIHSFINDPQLQVDFYTDMD
      || ||||| ||| || ||| | ||| ||||| |||
EPL 1 MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLEPYLQVDFHTEMKEE

PP13 48 SDIAFRFRVHFGNHVVMNRREFGIWMLEETDQVPSFEDGKQFELCIY
      ||| | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
EPL 48 SDIVFHFQVCFGRVVMNSREYGAWKQQVESKMPFQDGGQEFELSI

PP13 95 VHYNEYEIKVNGIRIYGFVHRIPPSFVKMVQVSRDISLTSVCVCN
      | | ||| | ||| | ||||| ||||| |||
EPL 95 VL?DKYQVMVNGQSSYTFDERIKPEAVKMVQVWRDISLTKFNVSYLKR

```

FIG. 3