

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/64



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12 C07K 14/47

C07K 16/18 G01N 33/573

A61P 31/00

[21] 申请号 01814642.2

[43] 公开日 2003 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 1449440A

[22] 申请日 2001.7.13 [21] 申请号 01814642.2

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 13 [33] DK [31] PA200001089

[32] 2001. 6. 1 [33] DK [31] PA20010087

[86] 国际申请 PCT/DK01/00499 2001.7.13

[87] 国际公布 WO02/06460 英 2002.1.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.25

[71] 申请人 詹斯·C·詹斯尼厄斯

地址 丹麦欧登塞

共同申请人 斯蒂芬·蒂尔

[72] 发明人 詹斯·C·詹斯尼厄斯

斯蒂芬·蒂尔

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 6 页 说明书 42 页 序列表 6 页
附图 6 页

[54] 发明名称 MASP-2, 一种补体固定酶及其用途

[57] 摘要

本发明涉及基本上纯的甘露聚糖-结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) 多肽及其片段, 以及编码该多肽的核酸。而且, 本发明涉及使用基本上纯的、含有衍生自甘露聚糖-结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) 或其功能性同系物的氨基酸序列的多肽在制备药物组合物以及含有 MASP-2 和/或 MASP-2 片段的药物组合物中的用途。另外, 本发明涉及 MASP-2 抑制剂和含有该抑制剂的药物组合物。本发明也包括检测 MASP-2 核酸表达的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 基本上纯的、包含衍生自甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) (SEQ ID. 2)或其功能性同系物的氨基酸序列的多肽在制备药物
5 组合物中的用途。
2. 根据权利要求1的用途,其中多肽包含定义为 SEQ ID NO. 3 的序列。
3. 根据权利要求1的用途,其中多肽能够与甘露聚糖-结合凝集素(MBL)结合。
4. 根据权利要求1或2的用途,其中多肽与标记物或毒素相偶联。
- 10 5. 根据前述任一权利要求的用途,其中多肽包括定义为 SEQ ID NO 1 的序列或其功能等效物。
6. 根据前述任一权利要求的用途,其中多肽具有 20 kD 的分子量。
7. 根据权利要求1至4任一项的用途,其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 30 至 444。
- 15 8. 根据前述任一权利要求的用途,其中多肽具有 52 kD 的分子量。
9. 根据权利要求1至4任一项的用途,其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 138 至 296。
10. 根据前述任一权利要求的用途,其中多肽具有丝氨酸蛋白酶活性。
11. 根据前述任一项权利要求的用途,其中多肽在体外测定 MBL 补体途径
20 功能中具有 MASP-2 活性。
12. 根据权利要求10或11的用途,其中多肽包括 SEQ ID NO 3 的氨基酸 15 至 671。
13. 根据权利要求10或11任一项的用途,其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 16 至 296。
- 25 14. 根据权利要求10或11任一项的用途,其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 30 至 296。
15. 根据权利要求1至4任一项的用途,其中多肽能够竞争性地抑制 MASP-2 活性。
16. 根据权利要求15的用途,其中多肽包含 SEQ ID NO: 2 多肽的片段,
30 所述多肽是 MBL/MASP-2 复合的竞争性抑制物。
17. 根据权利要求15或16的用途,其中多肽包括定义为 SEQ ID NO: 3 的序列或其功能等效物,其中位于 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

- 18 或 19 的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基取代。
18. 根据权利要求 17 的用途，其中至少两个氨基酸残基已被取代。
19. 根据权利要求 17 的用途，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被另一氨基酸取代。
- 5 20. 根据权利要求 17 的用途，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被选自小的不带电荷氨基酸的氨基酸取代。
21. 根据权利要求 17 的用途，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被选自 gly 和 ala 的组的氨基酸取代。
22. 根据前述任一项权利要求的用途，其中药物组合物用于治疗感染。
- 10 23. 根据权利要求 22 的用途，其中感染是由微生物类引起的感染。
24. 根据权利要求 23 的用途，其中微生物类是真菌。
25. 根据权利要求 23 的用途，其中微生物类是酵母。
26. 根据权利要求 23 的用途，其中微生物类是细菌。
27. 根据权利要求 26 的用途，其中细菌类对至少一种抗生素药物具有
- 15 抗性。
28. 根据权利要求 26 的用途，其中细菌类是多抗性的。
29. 根据权利要求 26 的用途，其中细菌类是致病菌。
30. 根据权利要求 22 的用途，其中感染是病毒感染。
31. 根据权利要求 30 的用途，其中病毒是逆转录病毒。
- 20 32. 根据权利要求 31 的用途，其中逆转录病毒是人免疫缺陷病毒。
33. 根据权利要求 1 的用途，其中药物组合物进一步包括至少一个甘露聚糖结合凝集素(MBL)亚单位，或者至少一种包含至少一个甘露聚糖结合凝集素(MBL)亚单位的甘露聚糖结合凝集素(MBL)寡聚物。
34. 根据权利要求 1 的用途，进一步包括利用至少一个甘露聚糖结合凝
- 25 集素(MBL)亚单位，或者至少一种包含至少一个甘露聚糖结合凝集素(MBL)亚单位的甘露聚糖结合凝集素(MBL)的寡聚物在制备作为试剂盒-部分的药物中的用途。
35. 根据权利要求 33 和 34 任一项的用途，其中所述寡聚物优先选自由 MBL 的四聚物、五聚物和/或六聚物组成的寡聚物。
- 30 36. 根据权利要求 33 至 35 任一项的用途，其中药物组合物用于治疗 MBL 血清水平低于 500 ng/ml 个体的感染。
37. 根据权利要求 33 至 35 任一项的用途，其中药物组合物用于治疗

MBL 血清水平低于 100 ng/ml 个体的感染。

38. 根据权利要求 33 至 35 任一项的用途，其中药物组合物用于治疗 MBL 血清水平低于 50 ng/ml 个体的感染。

39. 含有定义为 SEQ ID NO. 1 的序列的多肽或其功能同系物。

5 40. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽具有 20 kD 的分子量。

41. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 30 至 444。

42. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽具有 52 kD 的分子量。

10 43. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 138 至 296。

44. 权利要求 39 的多肽，所述多肽具有丝氨酸蛋白酶活性。

45. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO 3 的氨基酸 15 至 671。

46. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 16 至 296。

15 47. 根据权利要求 39 的多肽，其中多肽包括 SEQ ID NO. 2 的氨基酸 30 至 296。

48. 根据权利要求 39 的多肽，所述多肽在体外测定 MBLelectin 补体途径功能中具有 MASP-2 活性。

20 49. 根据权利要求 39 的多肽，所述多肽能够竞争性地抑制 MASP-2 丝氨酸蛋白酶活性。

50. 根据权利要求 39 的多肽，包括由 SEQ ID NO. 3 或其功能性同系物鉴定的序列，所述多肽是 MBL/MASP-2 复合的竞争性抑制物。

25 51. 根据权利要求 39 的多肽，包括由 SEQ ID NO 3 或其功能性同系物鉴定的序列，其中位于 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 位的一个或多个氨基酸残基已经被另一氨基酸残基取代。

52. 根据权利要求 51 的多肽，其中至少两个氨基酸残基已被取代。

53. 根据权利要求 51 的多肽，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被另一氨基酸取代。

30 54. 根据权利要求 51 的多肽，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被选自小的不带电荷氨基酸的氨基酸取代。

55. 根据权利要求 51 的多肽，其中 SEQ ID. NO 3 中 14 位 arg 已被氨基酸 gly 或 ala 所取代。

56. 根据权利要求 39 至 55 任一项的多肽, 其中所述多肽与标记物或毒素相偶联。
57. 分离的核酸分子, 包括编码多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有与权利要求 39、41、43、45、46、47 和 50 至 55 任一项中的多肽序列至少 85% 同一性的序列。
58. 核酸载体, 包括权利要求 57 的核酸分子。
59. 权利要求 58 的载体, 其中所述载体是表达载体。
60. 权利要求 58 的载体, 进一步包括一个调控元件。
61. 能够竞争性地抑制 MASP-2 或其功能性同系物活性的化合物在制备药物中的用途。
62. 根据权利要求 61 的用途, 其中化合物能够竞争性地抑制 MASP-2 活性。
63. 根据权利要求 61 的用途, 其中化合物是权利要求 49 至 55 任一项的多肽。
64. 根据权利要求 61 的用途, 其中化合物是能够与 MASP-2 结合的甘露聚糖结合凝集素(MBL)的片段。
65. 根据权利要求 61 的用途, 其中化合物是通过把 MASP-2 多肽施用于生产抗体的动物而制得的。
66. 根据权利要求 61 的用途, 其中化合物是选择性地与 MASP-2 结合的抗体。
67. 根据权利要求 65 和 66 任一项的用途, 其中抗体是单克隆抗体。
68. 根据权利要求 65 和 66 任一项的用途, 其中抗体与包括可检测标志的化合物相偶联。
69. 药物组合物, 包括基本上纯的、包含衍生自甘露聚糖-结合凝集素有关丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) (SEQ ID. 2) 的氨基酸序列的多肽或其功能性同系物用于制备药物组合物。
70. 根据权利要求 69 的药物组合物, 其中多肽包括定义为 SEQ ID NO. 3 的序列。
71. 根据权利要求 69 的药物组合物, 其中多肽能够与甘露聚糖-结合凝集素(MBL)结合。
72. 根据权利要求 69 的药物组合物, 其中多肽与标记物或毒素相偶联。
73. 根据权利要求 69 的药物组合物, 包括权利要求 39 至 55 任一项的多肽。
74. 检测甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) 的方法, 所述方法包括: (a) 获取生物样本; (b) 使所述生物样本与那些特异地结合 MASP-2

的 MASP-2 多肽特异性结合配偶体进行接触；并且(c)检测所述复合物，如果有的话，说明在所述样本中存在甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶-2。

75. 根据权利要求 74 的方法，其中特异性结合配偶体是抗体。

5 76. 检测 MASP-2 的方法，所述方法包括测定 MASP-2 补体结合活性。

77. 用于权利要求 74 或 76 的方法，用于定量测定生物样本中的 MASP-2 或 MASP-2 活性。

78. 检测 MASP-2 核酸表达的方法，包括将样品与在严格条件下特异地同权利要求 57 的核酸杂交的核酸探针进行混合，检测具有编码 MASP-2 多肽序
10 列的 RNA。

79. 通过向患者施用权利要求 39 至 42 以及 45 至 47 任一项的肽而治疗缺乏 MASP-2 患者的方法。

80. 通过向患者施用权利要求 57 的核酸而治疗缺乏 MASP-2 患者的方法。

81. 通过向主体施用抑制 MASP-2 表达或活性的化合物而抑制 MASP-2 活性的方法。
15

82. 权利要求 81 的方法，其中化合物是 MASP-2 反义核酸序列。

83. 权利要求 81 的方法，包括施用抑制 MBL 和 MASP-2 复合的化合物。

84. 测定编码 MASP-2 核酸序列多态性的试验。

85. 检测样本中 MASP-2-编码核酸存在的方法，包括：将样本与至少一个能够同 MASP-2-编码核酸在严格条件下形成复合物的核酸探针进行混合，并检测该探针是否与样品核酸相结合。
20

86. 能够与 MASP-2-编码核酸在严格条件下形成复合物的核酸探针。

87. 用于测定包括 MASP-2 或其前体的多肽序列多态性的试验。

88. 诊断与 MASP-2 异常表达有关的病症的方法，包括：从患者获取生物样本，测定 MASP-2 在所述生物样本中的表达，与对照相比，MASP-2 在所述生物样本中表达的增加或减少表明所述患者患有与 MASP-2 异常表达有关的病症。
25

89. 诊断与 MASP-2 异常活性有关的病症的方法，包括：从患者获取生物样本，测定 MASP-2 在所述生物样本中的活性，与对照相比，MASP-2 在所述生物样本中活性的增加或减少表明所述患者患有与 MASP-2 异常活性有关的病症。
30

90. 测定活性 MBL-复合的 MASP 的方法，方法包括：提供被测样本，并且

通过在有足够高离子强度以有效地减少经典补体结合途径激活但不致于高至基本上干扰 MBL-复合的 MASP 的活性的条件下,基本上减少源于激活经典补体结合途径的任何假象结果。

91.测定 MASP-2 活性的方法, 所述方法包括测定 MASP-2 活性, 包括下列步骤:

-把包含 MBL/MASP-2 复合物的样本加至固相以获得结合的复合物, -把至少一种补体因子加至复合物,

-检测裂解的补体因子的量,

-把裂解的补体因子的量与 MASP-2 量相关联, 以及

10 -确定 MASP-2 活性。

92. 根据权利要求 91 的方法, 其中固相是甘露聚糖涂层。

93. 根据权利要求 91 至 92 任一项的方法, 其中至少一种补体因子是可被 MBL/MASP-2 复合物裂解的补体因子。

94. 根据权利要求 91-93 任一项的方法, 其中至少一种补体因子选自 C3、C4、和 C5, 优选 C4。

95. 根据前述权利要求 91 至 94 任一项的方法, 其中裂解的补体因子通过针对补体因子的抗体检测。

96. 根据前述权利要求 91 至 95 任一项的方法, 其中经典补体途径的激活被抑制。

20 97. 根据权利要求 96 的方法, 其中激活是通过在高离子强度下进行测定而抑制。

98. 根据权利要求 97 的方法, 其中盐浓度超过 0.2 M, 如在 0.3 M 至 10 M 范围内, 如 0.5 M 至 5 M, 如 0.7 M 至 2 M, 如 0.9 M 至 2 M, 如约 1.0 M。

99. 根据权利要求 98 的方法, 其中盐选自 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、NaI、KCl、MgI₂、CaI₂, 选自 NaBr、KBr、MgBr₂、CaBr₂、Na₂S₂O₃、(NH₄)₂SO₄ 和 NH₄HCO₃。

25 100. 根据权利要求 91 至 99 任一项的方法, 用于定量测定生物样本中的 MASP-2 或 MASP-2 活性。

MASP- 2, 一种补体固定酶及其用途

5

发明领域

本发明属于涉及甘露聚糖结合凝集素(MBL,也称为甘露聚糖结合蛋白)的补体固定的固有途径的一般领域。

发明背景

10

该补体系统包括对天然功能以及相适应的免疫防御而言重要的酶与非-酶性蛋白质的复合物系列¹。直到最近才得知激活作用的两种模式,经典途径由抗体-抗原复合物引发,而替代途径由细菌表面上的一定结构引发。已经描述了补体激活的第三个即新的抗体-非依赖性途径²。当甘露聚糖-结合凝集素(MBL,最初被描述为甘露聚糖结合蛋白,MBP,参见Ezekowitz,美国专利 5,270,199)与碳水化合物结合时,则引发该途径。

15

MBL在结构上与补体组分C1的C1q亚组分有关,而且看来好像MBL经由称为MASP⁴或p100⁵(其类似于经典途径的C1r和C1s组分)的相关丝氨酸蛋白酶激活补体系统。该新的补体激活途径被称为MBLectin途径。根据该途径的假定机制,MBL与在多种微生物表面发现的特定碳水化合物结构相结合,而且它的抗微生物活力源自末端的激活,溶解补体途径组分⁷或促进噬菌作用⁸,所述微生物包括细菌、酵母、寄生原生动物和病毒⁶。

20

据报道,血浆中MBL的水平可能是由遗传决定的^{9,10,11}。MBL缺乏与儿童^{12,13}或成人^{13,14}对各种微生物的频繁感染的易感性有关。最新资料将MBL缺乏与HIV感染以及与随着AIDS发展而发生的更多急促死亡联系起来^{15,16}。MBL与半乳糖苷形式的IgG (G0)结合(发现后者在类风湿性关节炎病人中的浓度升高),然后激活补体¹⁷。MBL缺乏与复发性自发流产易患病体质有关¹⁸,也与系统性红斑狼疮的进展有关¹⁹。

25

在首次临床重建(reconstruction)试验中,一患有复发性感染的MBL-缺乏女婴似乎通过注射纯的MBL而得以治愈²⁰。至于有关MBL的最新评述,请参见参考文献6。

30

在所有研究的群体中已经报道了与MBL缺乏有关的MBL突变的相对高频率。此观察结果已经导致这样的假设,即在某些情况下,MBL可能使个体

对利用MBL进入靶组织的某些胞内传染物更为敏感²¹。既然MBL是补体系统很强的激活剂,那么它可能同时是那些通过细菌的碳水化合物或者内毒素而导致损害性炎症性反应的不适当激活剂¹⁰。因此,种群的总体幸存可能受益于宽范围的个体MBL浓度。

- 5 MASP- 1 (MBP-相关的丝氨酸蛋白酶, MASP)是在结构上与补体途径的C1r和C1s相似的丝氨酸蛋白酶,尽管它具有在胰蛋白酶以及胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶类中发现的组氨酸环结构。业已发现, MASP-1涉及MBL的补体激活。据报道, 编码MASP-1的cDNA克隆编码公认的19个氨基酸的前导肽, 前导肽后面是预计形成成熟肽的680个氨基酸残基。
- 10 有一摘要报道第二种MASP的存在, 称为MASP-2²²。

发明概述

- 15 本发明涉及基本上纯的、包含来源于甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) (SEQ ID.2)或其功能性同系物的氨基酸序列的多肽在制备药物组合物中的用途。

本发明涉及甘露聚糖-结合凝集素(MBL)有关的丝氨酸蛋白酶(MASP-2)的分离和定性。MASP-2显示出与以前报道的MASP (MASP-1)和两个C1q有关的丝氨酸蛋白酶, C1r和C1s, 具有某种同源性。MBL不能单独提供补体激活的功能性MBLectin途径。

- 20 我们已经克隆了编码MASP-2的cDNA并且进行了测序。另外, 我们已经生产了抗MASP-2抗体并且构建了用于评价体液或组织提取物中MASP-2的试验。此外, 我们已经构建了用于测定血清或血浆中MASP-2活性的定量测定法, 无论MASP-2以MBL/MASP复合物的一部分形式存在还是以不与MBL结合的游离MASP形式存在。

- 25 因而, 本发明的一个方面是描述基本上纯的、甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶- 2 (MASP-2)多肽和编码此多肽的核酸的特征。优选地, MASP-2多肽保持一种或多种MASP-2功能, 例如能够与甘露聚糖-结合凝集素(MBL)结合、丝氨酸蛋白酶活性, 或者在研究MBLectin补体途径功能的体外试验(例如在下述测定体系的一个试验)中的MASP-2活性。本发明的一些
- 30 MASP-2多肽, 例如在结合试验中使用的那些MASP-2, 可以与一标记物偶联, 以便使得在试验中检测和/或定量它们的存在。适宜的标记物包括产生信号(例如, 可见吸收)的酶、荧光团、放射性核素等等。其它的MASP-2多肽能

够竞争性地抑制上述MASP-2活性的一种,因而在评价MASP-2功能方面非常有用。其它MASP-2多肽对于按下述方式生产抗体而言是有用的抗原或者半抗原。也描述了竞争性地抑制MASP-2活性的化合物的特征。优选地,此类化合物通过抑制MASP-2或MASP-2片段的丝氨酸蛋白酶活性而起作用。此类化合物可以包括竞争性地抑制MBL- MASP-2相互作用的MBL或MASP-2的片段(MBL- MASP-2相互作用对于通过MBLectin途径的补体激活而言是至关重要的)、以及抑制补体因子C4和C2通过MASP-2的催化裂解的化合物,例如肽片段。

根据本发明的这一方面,具体的多肽包括: a)分子量为20K并且包含定义为SEQ ID NO :1 [T P L G P K W P E P V F G R L A S P G F P G E Y A N D Q E R R W T L T P P G Y R] 的序列的多肽; b)分子量为52K并包含定义为SEQ ID NO :1的序列的多肽; c)具有图6 (SEQ ID NO : 2)完全氨基酸序列的多肽。

本发明的另一方面包括分离的核酸分子,它包含编码与SEQ ID NO :2的序列具有至少85%序列同一性的多肽的核苷酸序列。

本发明也描述了分离的编码上述甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶- 2 (MASP-2)多肽的核酸序列的特征。此类核酸序列可以包含在核酸载体中(例如表达载体,包括那些带有使得重组核酸在表达系统中表达的调控核酸元件的表达载体)。

本发明也描述了选择性地与MASP-2相结合的抗体的特征。这样的抗体可以通过任何众所周知的技术而制得,包括多克隆抗体和单克隆抗体技术。抗体可以与包含可检测标记物的化合物相偶联,以便它能够在例如检测MASP-2的试验中被使用。

所述多肽或抗体可以制成药物组合物并且按下述方式作为治疗剂施用。

本发明也描述了用于检测甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶- 2 (MASP-2)的方法的特征。方法包括: 获取生物样本,使生物样本与MASP-2多肽特异结合配偶体进行接触,并检测结合复合物,如果有的话,作为生物样本中MASP-2多肽存在的指征。试验中所用结合配偶体可以是抗体,或者检测MASP-2的试验可用于测定补体结合活性。用于MASP-2的这些试验也可用于生物样本中MASP-2或MASP-2活性的定量测定。结合配偶体之一对于MBK而言是特异的,从而允许检测到MBL/MASP-2复合物。

用于检测MASP-2核酸表达的方法包括在本发明之内。方法包括: 将样

本与在严格条件下特异地同编码MASP-2全部或片段的核酸序列杂交的核酸探针进行混合，检测具有编码MASP-2多肽序列的RNA。

5 本发明描述了用于治疗缺乏MASP-2或MASP-2活性病人的方法的特征。这通过向患者施用MASP-2多肽或编码MASP-2的核酸而实现。由于有时期望抑制MASP-2活性，所以本发明包括通过向患者施用抑制MASP-2表达或活性的化合物而抑制MASP-2活性的方法。MASP-2活性的抑制也可通过施用MASP-2反义核酸序列来完成。

10 本发明描述了用于测定编码MASP-2核酸序列多态性的试验的特征。请求保护检测样本中MASP-2-编码核酸存在的方法。举例来说，方法可以包括：将样本与至少一个能够同MASP-2-编码核酸在严格条件下形成复合物的核酸探针进行混合，并检测该探针是否与样本核酸相结合。因此，本发明包括能够与MASP-2-编码核酸在严格条件下形成复合物的核酸探针。

本发明描述了用于测定包括MASP-2或其前体的多肽序列多态性的试验的特征。

15 MASP-2试验对于测定患有各种疾病患者的MASP-2水平和MASP-2活性是非常有用的，所述疾病例如感染、炎症性疾病和自发性习惯性流产。当MASP-2功能处于亚最佳状态时，MASP-2对于治疗感染是非常有用的，而抑制MASP-2活性对于调节炎症和由MBLectin途径活动所引起的副作用非常有益。

20 “甘露聚糖-结合凝集素有关的丝氨酸蛋白酶-2 (mannan-binding lectin associated serine protease-2)”或“MASP-2”，是指称作“甘露聚糖结合蛋白有关的丝氨酸蛋白酶-2”或“甘露糖-结合蛋白有关的丝氨酸蛋白酶”的多肽或活性，或者任何其它与SEQ ID NO:2具有相当大的序列同一性的多肽。

25 本文所用术语“蛋白质”和“多肽”，旨在描述任何氨基酸链，而不管长度或翻译后修饰(例如糖基化作用或磷酸化作用)如何。因此，术语“MASP-2多肽”包括全长、天然存在的MASP-2蛋白质，以及重组或合成产生的对应全长天然存在MASP-2多肽或者对应天然存在蛋白质特定结构域或部分的多肽。术语也涵盖成熟MASP-2，后者具有添加的氨基末端蛋氨酸(它对于在原核细胞的表达是非常有用的)。

30 本文所用术语“纯的”，是指当通过重组DNA技术生产时基本上不含细胞物质、病毒材料或者培养介质，或者在用化学方法人工合成时基本上不含化学前体或其它化学制剂的核酸或者肽。“分离的核酸分子”是指以任何

方式从生物体的天然存在基因组序列中分离得到的核酸分子。因此，术语“分离的核酸分子”包括不是天然存在的核酸分子，例如通过重组DNA技术产生的核酸分子。

术语“核酸分子”涵盖RNA和DNA，包括cDNA、基因组DNA和合成(例如以化学方法合成)的DNA。当单链时，核酸可以有义链或者反义链。

本发明也涵盖那些与编码MASP-2多肽的核酸分子(例如，具有编码SEQ ID NO: 2序列，如图6所示cDNA序列的蛋白质编码部分的核酸分子)杂交、优选在严格条件下杂交的核酸分子。另外，本发明涵盖那些与包含在一克隆中的具有MASP-2编码cDNA序列的核酸分子杂交、优选在严格条件下杂交的核酸分子。优选地，杂交核酸分子由400个、更优选200个核苷酸组成。

优选的杂交核酸分子编码MASP-2所拥有的活性，例如它们结合MBL并在MBLectin补体途径中具有活性，而且可以起到丝氨酸蛋白酶的作用。

在整个说明书和权利要求书中，使用三字母代码或者单字母代码表示天然氨基酸。当没有说明是L或D形时，应当理解为正被讨论的氨基酸具有天然L形(参见Pure & Appl.Chem.Vol.56 (5) 595-624页(1984))或D形，这样，形成的肽可以由L形氨基酸、D形氨基酸、或者一系列L和D混合形式氨基酸组成。当没有特别说明时，应当理解为本发明多肽羧基末端氨基酸以游离羧酸形式存在，而多肽的氨基末端氨基酸包括一游离氨基。当没有特别说明时，氨基酸可以是任何氨基酸中选出来的，无论天然存在与否，例如 α 氨基酸、 β 氨基酸、和/或 γ 氨基酸。因此，氨基酸包括但不限于：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Met、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Aib、Nal、Sar、Orn、赖氨酸类似物DAP和DAPA。

本发明也描述了基本上纯的或分离的MASP-2多肽、优选那些相当于MASP-2的各种功能结构域或其片段的多肽。本发明多肽包括基本上与图6所示氨基酸序列相同的氨基酸序列。

本发明多肽也可通过化学合成、合成、重组技术，或者按照提纯的标准生化法从天然表达它们的组织中纯化得到。

本发明也包括拥有MASP-2的一种或多种生物学功能或活性的“功能性多肽”。在本说明书中，对这些功能或活性作了详细描述。功能性多肽也在本发明考虑范围内，如果该功能性多肽用作制备与MASP-2或其片段(尤其是包含决定簇的片段)特异结合的抗体的抗原的话。

功能性多肽可以包括那些由本文公开的氨基酸序列进行了修饰的基本

氨基酸序列。优选地，如本文所述，这些修饰由保守氨基酸取代组成。多肽可以以用来促进或延迟它们的分解代谢(增加它们的半衰期)的任何方式进行取代。

术语“功能性同系物”和“功能等效物”在本文中可互换使用，并且在
5 本发明范围内应该理解为彼此是同义词。根据本发明，多肽的功能性同系物是指包括任何能够发挥MASP-2活性或MASP-2片段活性的多肽序列，所述活性例如作为MASP-2竞争性抑制物的活性。

本发明的功能性同系物，包括具有氨基酸序列的多肽，所述序列与本文
上述预先确定的多肽序列具有至少某些同源性。例如，多肽与本文上述预定
10 多肽序列具有至少约40%同源性，如至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同源性。

使用众所周知的算法，如BLOSUM 30、BLOSUM 40、BLOSUM 45、
BLOSUM 50、BLOSUM 55、BLOSUM 60、BLOSUM 62、BLOSUM 65、
15 BLOSUM 70、BLOSUM 75、BLOSUM 80、BLOSUM 85和BLOSUM 90中的任何一个，可以计算出氨基酸序列之间的同源性。

功能性同系物可以包括含有至少一个氨基酸被其它氨基酸取代了的氨基酸序列。例如，此种取代是保守氨基酸取代或者是非保守取代。

保守氨基酸取代，是预先确定一组氨基酸内部的一个氨基酸取代相同组
20 内的另一氨基酸，其中预先确定组内的氨基酸显示相似或者基本上相似的特性。本申请所用术语“保守氨基酸取代”的含义是，一个氨基酸可以被组内具有以下特性的另一氨基酸取代：

- i) 极性侧链(Asp、Glu、Lys、Arg、His、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr、和 Cys);
- 25 ii) 非极性的侧链(Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro、和Met);
- iii) 脂肪族侧链(Gly、Ala、Val、Leu、Ile);
- iv) 环侧链(Phe、Tyr、Trp、His、Pro);
- v) 芳族侧链(Phe、Tyr、Trp);
- vi) 酸性支链(Asp、Glu);
- 30 vii) 硷性侧链(Lys、Arg、His);
- viii) 酰胺侧链(Asn、Gln);
- ix) 羟基侧链(Ser、Thr);

x)含硫侧链(Cys、Met); 以及

xi) 单氨基-二羧酸类氨基酸或者单氨基单羧酸-单酰胺羧酸类氨基酸(Asp、Glu、Asn Gln)。

非保守取代是任何其它取代。导致形成功能性同系物的非保守取代, 将使得出现例如 i)基本上不同的疏水性, 譬如疏水性残基(Val、Ile、Leu、Phe或Met)被亲水性残基如Arg、Lys、Trp或Asn所取代, 或者亲水性残基如Thr、Ser、His、Gln、Asn、Lys、Asp、Glu或Trp被疏水性残基取代; 和/或ii)基本上不同的对多肽主链方向的影响, 例如用Pro或Gly取代或者Pro或Gly被其它残基所取代; 和/或iii)基本上不同的电荷, 例如带负电荷的残基如Glu或Asp被带正电荷的残基如Lys、His或Arg取代(反之亦然); 和/或iv)基本上不同的立体体积, 例如一庞大残基如His、Trp、Phe或Tyr被一个具有较小侧链的残基例如Ala、Gly或Ser取代(反之亦然)。

本发明功能性同系物可以包括一个以上的此类取代, 例如两个氨基酸取代、三或四个氨基酸取代、五或六个氨基酸取代、七或八个氨基酸取代、10至15个氨基酸取代、15至25个氨基酸取代、25至30个氨基酸取代、30至40个氨基酸取代、40至50氨基酸取代、50至75个氨基酸取代、75至100个氨基酸取代、100以上个氨基酸取代。

氨基酸的增加或缺失, 可以是增加或缺失2至5个氨基酸, 例如5至10个氨基酸、10至20个氨基酸20至50个氨基酸。然而, 本发明也包括50个以上氨基酸的增加或缺失, 例如增加50至200个氨基酸。

在一个实施方案中, 包括其任何变体和功能性同系物的本发明多肽, 可包括5个以上氨基酸残基, 如10个以上氨基酸残基、20个以上氨基酸残基、25个以上氨基酸残基、50个以上氨基酸残基、75个以上氨基酸残基、100以上氨基酸残基、150以上个氨基酸残基、200以上个氨基酸残基。

在检测本文所用含义的功能性同系物时, 可以考虑到其它因素。例如, 功能性同系物能够与本发明多肽的特异抗血清联合。

在另一实施方案中, 本发明涉及包括具有亲水或疏水指数值在 ± 2.5 之内, 例如在 ± 2.3 、 ± 2.1 、 ± 2.0 、 ± 1.8 、 ± 1.6 、 ± 1.5 、 ± 1.4 、 ± 1.3 、 ± 1.2 、 ± 1.1 、 ± 1.0 、 ± 0.9 、 ± 0.8 、 ± 0.7 、 ± 0.6 、 ± 0.5 、 ± 0.4 、 ± 0.3 、 ± 0.25 、 ± 0.2 之内的氨基酸被取代的功能等效物。

亲水性和疏水性氨基酸指数在赋予蛋白质生物功能相互作用方面的重要性是本领域熟知的(Kyte & Doolittle, 1982 and Hopp, 美国专利权号

4,554,101, 每一篇文献均在此引入作为参考)。

本文所用氨基酸疏水指数值是: 异亮氨酸(+4.5); 缬氨酸(+4.2); 亮氨酸(+3.8); 苯基丙氨酸(+2.8); 半胱氨酸/胱氨酸(+2.5); 蛋氨酸(+1.9); 丙氨酸(+1.8); 甘氨酸(- 0.4); 苏氨酸(- 0.7); 丝氨酸(- 0.8); 色氨酸(-0.9); 酪氨酸(-1.3);
5 脯氨酸(- 1.6); 组氨酸(- 3.2); 谷氨酸(- 3.5); 谷酰胺(- 3.5); 天冬氨酸(- 3.5); 天门冬酰胺(- 3.5); 赖氨酸(- 3.9); 和精氨酸(-4.5) (Kyte & Doolittle, 1982)。

氨基酸亲水性值是: 精氨酸(+3.0); 赖氨酸(+3.0); 天冬氨酸(+3.0+-.1); 谷氨酸(+3.0. + -.1); 丝氨酸(+0.3); 天门冬酰胺(+0.2); 谷酰胺(+0.2); 甘氨酸(0); 苏氨酸(- 0.4); 脯氨酸(- 0.5. + -.1); 丙氨酸(- 0.5); 组氨酸(- 0.5); 半胱氨酸(- 1.0); 蛋氨酸(- 1.3); 缬氨酸(- 1.5); 亮氨酸(- 1.8); 异亮氨酸(- 1.8); 酪氨酸(- 2.3); 苯丙氨酸(- 2.5); 色氨酸(- 3.4) (美国4,554,101)。

因此, 在一实施方案中, 氨基酸取代是基于它们的疏水和亲水值以及氨基酸侧链取代基的相对类似性(包括电荷、大小等等)而进行的。具有各种上述特征的示范性氨基酸取代为本领域技术人员所熟知, 并且包括: 精氨酸
15 和赖氨酸; 谷氨酸和天冬氨酸; 丝氨酸和苏氨酸; 谷酰胺和天门冬酰胺; 以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

除本文描述的多肽化合物之外, 可以制成摹拟肽结构关键部分的空间类似化合物, 而且也可以按照本发明肽同样的方式使用此类化合物。这可以通过为本领域技术人员所已知的建模技术和化学设计来完成。举例来说, 酯化
20 及其他烷化可用于修饰例如二-精氨酸肽主链的氨基末端, 从而摹拟四肽结构。应当懂得所有这些空间类似构建物属于本发明的范围。

具有N-末端烷化和 C-末端酯化的肽也包括在本发明之内。功能等效物也包括糖基化的和共价的或者集聚而成的偶联物, 包括二聚物或独立的化学组成部分(moieties)。功能等效物是通过本领域已知的方法将官能团连接到在
25 片段中存在的任何一个N-和C-末端上或者同时连接到N-和C-末端基团上而制备的。

因此, 可包括偶联至羧基末端的脂肪族或酰基酯或酰胺、烷基胺或含羧基侧链的残基上的片段的功能等效物, 例如偶联至天冬氨酸残基的烷基胺; 含有羟基残基的O-酰基衍生物和氨基末端氨基酸或含氨基残基的N-酰基衍生物, 例如与 Met- Leu- Phe偶联。酰基基团的衍生物选自烷基部分
30 (alkylmoities) (包括C3至C10正链烷基)从而形成烷醇类, 和选自碳环或杂环化合物, 从而形成芳酰基类。反应基团优选已知的通过本身反应性侧原子团

供将蛋白质交联至不溶性基质上之用的双官能化合物。

本发明范围内的核酸序列同系物，是编码RNA和/或具有相似生物学功能蛋白质的核酸序列，其是

5 a)与所述核酸序列具有至少50%同一性,如至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%同一性,

或者b)能够与所述核酸序列的互补链在严格条件下杂交的核酸序列。

本文所用严格条件，如同例如Southern E.M., 1975, J. Mol. Biol. 98 : 503-517所描述的那样，表示在有关Southern印迹法和杂交方面通常使用严格方式。为了此目的，常规实践包括预杂交和杂交的步骤。按照Sambrook等, 1989,
10 在" Molecular Cloning / A Laboratory Manual "(Cold Spring Harbor) (该文献在此引入作为参考) 中描述的那样，步骤通常如下进行：使用含有6x SSPE、5% Denhardt's、0.5% SDS、50%甲酰胺、100 g/ml变性的鲑鱼睾丸DNA的溶液(于42℃温育18小时),继之用2x SSC和0.5% SDS洗涤(在室温和37℃进行),然后用0.1x SSC和0.5% SDS洗涤(在68℃温育30分)。

15 同源核酸序列也包括包含增加和/或缺失的核酸序列。核苷酸的增加和/或缺失，可以是位于内部或端部的增加和/或缺失。增加和/或缺失可以是1-5个核苷酸，例如5至10个核苷酸、10至50个核苷酸、50至100个核苷酸、至少100个核苷酸。

当所关心的多肽或其它化合物不同于任何天然存在的成分，并且适于至少一个本文提出的用途时，则称它是"基本上纯的"。虽然相对于天然存在物质仅仅发生了稍微改变的制品可能具有某些用途，更代表性地，制品的至少10 %重量(干重)是目的化合物。优选地，按目的化合物重量计算，制品的至少60%、更优选至少75%、并且最优选至少90%。可以通过任何适当的标准方法测定纯度,例如, 柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析。

25 如果多肽或核酸分子与对照多肽或核酸分子具有85%、优选至少90%、更优选至少95%、98%、或99%相同序列的话，则多肽或核酸分子与对照多肽或核酸分子是“基本上同一的”。

当称一具体多肽与一限定长度的对照多肽具有一特定百分比同一性时，该同一性百分比是以对照肽为基准的。因此，一个肽与一对照多肽具有50%
30 同一性，就是指100个氨基酸长度的多肽中有50个氨基酸多肽是与该对照多肽的50个氨基酸长度的部分完全相同。也可能是100个氨基酸长度的多肽在其全长中有50%与该对照多肽相同。当然，许多其它多肽将满足这一标准。

在多肽序列与对照序列小于100%同一性的情况下, 优选但不是必要地, 不相同位置是对对照序列的保守取代。保守取代通常包括以下基团之内的取代: 甘氨酸和丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸; 天冬氨酸和谷氨酸; 天门冬酰胺和谷氨酰胺; 丝氨酸和苏氨酸; 赖氨酸和精氨酸; 以及苯丙氨酸和酪氨酸。

对于多肽, 对照多肽序列的长度通常是至少16个氨基酸, 优选至少20个氨基酸, 更优选至少25个氨基酸, 最优选35个氨基酸、50个氨基酸或100个氨基酸。对于核酸, 对照核酸的核酸序列长度通常是至少50个核苷酸, 优选至少60个核苷酸, 更优选至少75个核苷酸, 最优选100个核苷酸或300个核苷酸。

利用序列分析软件(例如the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705), 按照其说明使用缺省参数, 可以测定序列同一性。

按照下述方法可以将本发明核酸分子插入一载体中, 所述载体将促进插入物的表达。核酸分子和它们编码的多肽可以直接用作诊断或治疗剂, 或者用于产生抗体(在多肽的情况下直接地产生, 在核酸分子的情况下, 间接地产生), 所产生的抗体反过来作为治疗剂或者诊断剂用于临床。因此, 含有本发明核酸的载体、用这些载体转染的细胞、表达的多肽、和产生的抗体(针对整个多肽或者其抗原片段), 均在优选的实施方案中。

本发明也描述了特异地结合MASP-2的抗体的特征, 所述抗体例如单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体。"特异地结合", 是指抗体识别并且与特定抗原如本发明MASP-2多肽相结合, 但基本上不识别或者不与样本如包含MASP-2的生物样本中的其它分子相结合。关于与包含可检测标记物的化合物相偶联的抗体(或其片段)构建物, 包括通过任何技术制得的构建物, 所述技术包括化学方法或者重组技术。本发明也描述了能够抑制MASP-2或其功能性同系物活性的化合物的特征。MASP-2的一个活性是辅助补体激活。MASP-2的另一活性是MASP-2的丝氨酸蛋白酶活性。优选地, 能够抑制MASP-2活性的化合物能够抑制通过MASP-2的补体激活。重要的是, 认识到仅仅较小比例的MASP's与血清中MBL结合。所以, 能够抑制MASP-2活性的化合物通过与MBL结合但不激活MBL从而发挥抑制补体激活的作用, 由此耗竭血清中活化的MASP-MBL复合物。此类化合物可以是MASP-2的片段或

者是MASP-2的突变体或者是MASP-2突变体的片段。此外，化合物可以是抗体。

5 本发明也分别描述了能够抑制或者提高MASP-2的一种或多种功能或活性的MASP-2拮抗剂和激动剂的特征。适宜的拮抗剂包括小分子(即分子量低于约500的分子)、大分子(即分子量超过约500的分子)、那些结合和“中和”MASP-2的抗体(下述)、与天然形式MASP-2竞争性地与蛋白质(如，MBL)相结合的多肽、和干预MASP-2转录的核酸分子(例如，反义核酸分子和核糖酶)。MASP-2的激动剂也包括小分子和大分子以及除“中和”抗体以外的抗体。

10 本发明也描述了能够增加或减少MASP-2表达(例如，通过影响转录或翻译)的分子的特征。小分子(即分子量低于约500的分子)、大分子(即分子量超过约500的分子)、那些可用于抑制MASP-2表达(例如，反义和核酶分子)或提高其表达(例如，将编码MASP-2的核酸序列置于强启动子体系控制下的表达构建物)的核酸分子，和表达MASP-2转基因的转基因动物。

15 本发明包括用于治疗与MASP-2异常表达或MASP-2异常活性有关的病症的方法。因此，本发明包括用于治疗与MASP-2过度表达或MASP-2过度活性有关的病症的方法。此方法需要施用降低MASP-2表达或活性的化合物。本发明也包括用于治疗与MASP-2表达不足有关的病症的方法。方法需要施用提高MASP-2表达或活性的化合物。

20 “竞争性地抑制”丝氨酸蛋白酶活性，是指例如改变的MBL或其片段能够与MASP-2肽可逆或不可逆地结合但不激活丝氨酸蛋白酶活性的作用。相反地，MASP-2片段，例如包括MASP-2N-末端部分的多肽，可以竞争性地抑制完整无缺MASP-2的结合，并由此有效抑制MASP-2的激活。

25 本发明也描述了用于检测MASP-2多肽的方法的特征。这样的方法包括：获取生物样本；让样本与特异地同MASP-2结合的抗体在容许特异结合的条件下进行接触；并检测形成的任何抗体-MASP-2复合物。

另外，本发明包括用于与MASP-2不适当表达或活性有关的病症的诊断性评价、分型和预后方法和组合物。例如，本发明的核酸分子能够用作诊断性杂交探针以检测例如MASP-2的不适当表达或者MASP-2基因的突变。

30 该方法可依据MASP-2表达水平而用于细胞分类。

或者，核酸分子能够用作诊断性PCR分析的引物，用于鉴定MASP-2基因的基因突变、等位基因变异和调控缺陷。本发明进一步提供用于实施该方

法的诊断试剂盒。

本发明描述了在存在和缺少所选化合物的条件下，通过评定抑制MASP-2表达或活性从而鉴定调节MASP-2表达或活性的化合物的方法的特征。MASP-2的表达或活性水平在存在和缺少所选化合物的条件下有差异，
5 表明所选化合物能够调节MASP-2的表达或活性。通过本领域熟练技术人员熟知的技术，能够在基因表达水平(例如，通过测定mRNA)或者在蛋白质表达水平评定表达情况。可以功能性地评价MASP-2活性，即通过测定化合物激活补体的能力。

下面描述的实施例中，优选的方法和材料旨在举例说明，而不是对本发明
10 的限定。熟练技术人员能够认识到，与本文描述类似或等效的方法和材料可用于实施或检测本发明。

除非另外限定，否则本文所用全部技术术语和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的那样相同的含义。尽管与本文描述的类似或等效的方法和材料可用于实施或检测本发明，但是本文使用优选的方法和材料
15 料进行描述。

本文提到的全部出版物、专利申请、专利及其他参考文献，均以其全部引作参考。在矛盾的情况下，将以本说明书(包括定义)为准。此外，材料、方法和实施例仅仅是举例说明性的，并非为了限定。

从详细描述和从权利要求书可以看出，本发明的其它特征和优点是显然
20 的。

附图简述

图1a- 1b描述通过糖亲和色谱法纯化的人血浆蛋白质的蛋白质印迹。

图2显示MASP-2 (克隆phl- 4)、MASP-1^{17,22}、Clr^{23,24}和Cls^{25,26}的氨基酸序列的序列对比。

25 图3a- 3b代表证明MBL、MASP-1和MASP-2之间形成分子复合物的结果。

图4a- 4b代表证明C4通过Cls和MASP-2激活的蛋白质印迹。

图5图解说明补体激活的三个途径。

图6显示MASP- 2的cDNA序列和推导出的氨基酸序列。

所示序列的简要说明

30 SEQ ID 1: 20 kD MASP-2片段的氨基酸序列;

SEQ ID 2: 包括信号肽在内的全长MASP-2的氨基酸序列;

SEQ ID 3: 不含信号肽的全长MASP-2的氨基酸序列;

优选实施方案描述

MASP-2核酸分子

本发明MASP-2核酸分子可以是cDNA、基因组DNA、合成DNA或RNA、和并且可以是双链或单链的(即有义链或反义链)。这些分子的片段也在本发明考虑范围内,并且可以例如通过聚合酶链式反应(PCR)产生或者通过用一种或多种限制性内切酶处理而产生。核糖核酸(RNA)分子可以通过体外转录产生。优选地,编码多肽的核酸分子,不管长度如何,在正常生理条件下是可溶性的。

本发明核酸分子可以含有天然存在序列,或者不同于天然存在序列、但由于遗传密码简并而编码相同多肽(例如,SEQ ID NO: 2的多肽)的序列。而且,这些核酸分子不局限于仅仅编码多肽的序列,因此,可以包括位于编码序列上游或下游的某些或者全部非编码序列。

本发明核酸分子可以是人工合成的(例如,通过基于亚磷酰胺的合成)或者从生物细胞如哺乳动物细胞中获得。因此,核酸可以是人、小鼠、大鼠、豚鼠、牛、羊、马、猪、兔子、猴、犬、或者猫的核酸。也包括这些种类核酸内部核苷酸的联合或修饰。

另外,本发明分离的核酸分子包括在自然状态未发现的片段。因此,本发明包括重组分子,例如将核酸分子(例如分离的编码MASP-2的核酸分子)整合入载体(如,质粒或病毒载体)或者整合入异源细胞的基因组中(或者同源细胞的基因组,整合到除天然染色体位置以外的位置)。下面进一步论述重组核酸分子及用途。

如果本发明的核酸分子编码或者起反义分子的作用,那么它们可被用于例如调节MASP-2的翻译。与检测或调节核酸表达有关的技术为熟练技术人员所熟知,并且可用于诊断和/或治疗与MASP-2活性有关的病症。这些核酸分子的临床实用性,在下文中做进一步论述。

本发明也包括那些在严格条件下与编码MASP-2多肽的核酸分子杂交的核酸分子。本文所述的cDNA序列(SEQ ID NO: 3),可用于鉴定核酸,后者包括例如在其它物种中编码同源多肽的核酸、和人或其它哺乳动物中MASP-2基因的剪接变体。相应地,本发明描述检测和分离这些核酸分子的方法的特征。利用这些方法,使样本(例如核酸文库,如cDNA或基因组文库)与MASP-2特异探针(例如图6所示编码SEQ ID NO.2多肽序列的cDNA序列片段,也就是说至少12个核苷酸长)接触(或“筛选”)。探针将选择性地与编码有关多

肽的核酸(或其互补序列)杂交。由于由MASP-2编码的多肽与其它丝氨酸蛋白酶有关,所以,术语“选择性地杂交”用于指探针与编码MASP-2的核酸结合到较与编码其它丝氨酸蛋白酶(或其互补序列)的核酸(或其互补序列)结合更大的可测得程度的事件。利用数个标准方法(参见例如, Ausubel等, "

- 5 Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, " Green Publishing Associates, Inc., 和John Wiley & Sons, Inc., NY, 1989)中的任何一个,可以产生含有至少12个核苷酸(例如, 15、25、50、100或200个核苷酸)的探针。举例来说,可以利用聚合酶链式反应扩增方法产生探针,在该方法中,使用寡聚核苷酸引物来扩增MASP-2-特异性核酸序列(例如, 编码成熟MASP-2 N-末端的核酸),如
- 10 下面实施例4描述的那样,所述MASP-2-特异性核酸序列可被用作探针以便筛选核酸文库,并从而检测与探针杂交的核酸分子(文库内的)。

- 如果在单链核酸之间形成双螺旋,则可称一个单链核酸与另一单链核酸杂交。这在一个核酸含有另一核酸的反向且互补序列的时候发生(这种相同的排列导致基因组中DNA的有义和反义链之间固有的相互作用,并构成
- 15 “双螺旋”结构的基础)。形成双螺旋,并不要求在杂交区之间具有完全互补性;在所用杂交条件下,碱基对的数目足以维持双螺旋即可。

- 通常,杂交条件是低到中度严格条件。这些条件有利于在完全互补序列之间的特异性相互作用,但也允许在不足完全配对序列之间发生某些非特异性的相互作用。杂交后,在中度或高严格条件下将核酸洗掉,以便分离通过
- 20 某些非特异性的相互作用而结合在一起的双螺旋(因此,形成这些双螺旋的核酸是不完全补足的)。

- 如本领域已知的那样,洗涤用的最适条件常常是根据经验通过逐渐地增加严格程度确立的。可以变化从而影响严格条件的参数主要包括温度和盐浓度。通常,盐浓度越低和温度越高,则严格度越高。洗涤可以使用含有相当
- 25 于或低于杂交液的盐浓度的溶液、在低温(例如室温)开始。随后使用相同盐浓度的渐进地加温的溶液进行洗涤。与备选方案一样,在洗涤步骤中可以降低盐浓度而维持温度不变,或者降低盐浓度而升高温度。也可以改变其它参数。例如,使用去稳定剂如甲酰胺来改变严格条件。

- 在核酸杂交反应中,为达到设定的严格水平而使用的条件将各异。没有
- 30 一组条件使得在彼此具有85%同一性的全部核酸之间形成双螺旋;杂交也取决于各核酸的独特性。序列的长度、序列的组成(例如,嘌呤-样核苷酸含量相对于嘧啶-样核苷酸含量)以及核酸种类(例如, DNA或者RNA)影响杂交。另外

要考虑的是核酸是否是固定的(例如,固定在滤膜上)。

从较低到较高严格条件的一个实例是,其中含盐量以相对充裕的SSC(含有氯化钠和柠檬酸钠的盐溶液)的方式给出(2X SSC比0.2x SSC浓缩10倍)。核酸于42℃在2XSSC/0.1%SDS(十二烷基磺酸钠;一种去垢剂)中杂交,然后室温下(对于低严格条件)在0.2x SSC/0.1%SDS、于42℃在0.2x SSC / 0.1% SDS(对于中度严格条件)、和于68℃(对于高严格条件)在0.1X SSC中洗涤。洗涤可以仅仅使用给出的一个条件进行,或者可以使用每一个条件(例如,在上面所列各步骤中均洗涤10- 15分钟)。洗涤的任何或者所有步骤均可重复。如上所述,最适条件将有不同并可以根据经验予以确定。

考虑过的另一组“严格条件”是,杂交于50℃在Church buffer (7% SDS、0.5% NaHP04、1 M EDTA、1%牛血清清蛋白)中进行,并于50℃在2X SSC中洗涤。

一旦检出,可以通过大量标准技术中的任何一项技术将核酸分子分离出来(参见例如, Sambrook等, " Molecular Cloning Laboratory Manual"第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。

本发明也包括: (a)含有任何上述MASP-2-有关编码序列和/或其互补序列(即“反义”序列)的表达载体; (b)含有可操作地与引导编码序列表达的调控元件(下面给出其实例)相结合的任何上述MASP-2-有关的编码序列的表达载体; (c)含有除编码MASP-2多肽序列之外的与编码MASP-2核酸序列无关的核酸序列,例如编码报道分子或标记物的分子; 以及(d)含有任何上述表达载体的遗传基因工程宿主细胞和由此在宿主细胞中表达的本发明核酸分子。

重组核酸分子可以含有编码可溶性MASP-2、成熟MASP-2、具有信号序列MASP-2、或者MASP-2的功能域(如丝氨酸蛋白酶结构域、EGF结构域、或MBL结合结构域)的序列。全长MASP-2多肽、MASP-2的结构域或其片段,可以按下述方式与其它多肽融合。类似地,本发明核酸分子可以编码成熟形式MASP-2或者编码促进分泌形式的多肽。在后者情况下,多肽通常称为前蛋白,它可以例如在宿主细胞内通过除去信号顺序而变为活性形式。前蛋白可以通过除去不活动序列而变为蛋白质的活性形式。

上面提到的调控元件包括但不限于: 可诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子及其它元件,这些均为本领域技术人员所已知,它们驱动或者相反调节基因表达。调控元件包括但不限于: 巨细胞病毒hCMV立即早期基因、SV40腺病毒的迟或早启动子、lac系统、trp系统、TAC系统、TRC系

统、噬菌体A的主要操纵子和启动子区、fd 外壳蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子以及酵母 α -交配因子的启动子。

类似地,核酸可以成为编码其它多肽序列(例如,起标记物或报道分子作用的序列)的杂化基因的一部分。标记物或报道基因的实例包括: β -内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、腺苷脱氨酶(ADA)、氨基糖苷磷酸转移酶(neo^r, G418^r)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶(HPH)、胸苷激酶(TK)、lacZ(编码 β -半乳糖苷酶)、绿色荧光蛋白质GFP)、以及黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(XGPRT)。使用与实施本发明有关的许多标准程序时,熟练技术人员会意识到其它有用的试剂,例如起标记物或报道分子作用的其它序列。通常,杂化多肽包括第一部分和第二部分;第一部分是MASP-2多肽而第二部分是例如上述的报道分子或者免疫球蛋白恒定区。

可以用于本发明目的的表达系统包括但不限于:微生物,例如用含有本发明核酸分子的重组噬菌体DNA、质粒DNA或者粘粒DNA表达载体转化过的细菌(例如,大肠杆菌和*B.subtilis*);用含有本发明核酸分子(优选含有MASP-2的核酸序列(SEQ ID NO: 3))的重组酵母表达载体转化过的酵母(例如,酵母属(*Saccharomyces*)和毕赤氏酵母属(*Pichia*));用含有本发明核酸分子的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染过的昆虫细胞系统;用含有MASP-2核苷酸序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染过的,或者用重组质粒表达载体(例如, Ti质粒)转化过的植物细胞系;或者含有来源于哺乳动物细胞基因组启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或者来源于病毒(例如,腺病毒晚期启动子和牛痘病毒7.5K启动子)启动子的隐藏(harboring)重组表达构建物的哺乳动物细胞系(例如, COS、CHO、BHK、293、VERO、HeLa、MDCK、WI38、和NIH 3T3细胞)。

在细菌体系,取决于打算在被表达基因产物中的使用,有大量表达载体供方便地选择。举例来说,在要产生大量蛋白质时,对于制备含有MASP-2多肽的药物组合物或者对于生成针对多肽的抗体而言,可能期望使用能够引导容易纯化的融合蛋白产物高水平表达的载体。载体包括但不限于:大肠杆菌表达载体pUR278 (Ruther等, EMBOJ.2 : 1791,1983),其中插入物的编码序列可以单个地连接入载体的带有lacZ编码区的框架中以便产生融合蛋白; pIN载体(Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res.13 : 3101- 3109,1985; Van Heeke and Schuster, J.Biol.Chem.264 : 5503- 5509,1989)等等。pGEX载体也可以用于表达与谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合蛋白形式的外来多肽。一般说来,

融合蛋白是可溶性的,并且可以通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠上然后在有游离谷胱甘肽的情况下经洗脱而很容易地从溶解的细胞中纯化出来。将pGEX载体设计成包括凝血酶或者因子Xa蛋白酶裂解位点,以便克隆的靶基因产物可以从GST组成部分中释放出来。

- 5 在昆虫体系中, *Autographa californica*核性多汁症病毒(AcNPV)可被用作表达外来基因的载体。病毒在*Spodoptera frugiperda*细胞中生长。可以将插入物的编码序列逐一地克隆入病毒的非必要区域(譬如多角体蛋白基因),并且受控于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)。编码序列的成功插入,将导致多角体蛋白基因失活并产生非-封闭性重组病毒(即缺乏由多角体蛋白基因编码的蛋白质外衣的病毒)。然后,将这些重组病毒用于感染*Spodoptera frugiperda*细胞,插入的基因在所述细胞中表达。参见例如, Smith等, J.Virol.46 : 584,1983; Smith,美国专利4,215,051。

- 在哺乳动物宿主细胞,可以使用大量以病毒为基础的表达系统。如果腺病毒用作表达载体,那么本发明核酸分子可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物上,例如晚期启动子和三联前导序列。然后,通过体外或者体内重组,可以将这些嵌合基因插入腺病毒基因组。在病毒基因组的非必要区(例如, E1或E3区)插入将产生生活的并且能够在受感染宿主表达MASP-2基因产物的重组病毒(参见例如, Logan and Shenk, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81 : 3655-3659,1984)。对于插入核酸分子的高效翻译来说,特异起始信号也可能是需要的。这些信号包括ATG起始密码子和相邻的序列。如果将整个基因或cDNA,包括它自己的起始密码子和相邻的序列,插入适当的表达载体中,则不需要其它翻译控制信号。然而,如果仅仅插入编码序列的一部分,则必须提供外原性的翻译控制信号,或许包括ATG起始密码子。此外,起始密码子必须与所需的编码序列同相,以确保整个插入物的翻译。这些外原性翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的,无论天然还是合成的。通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等,可以提高表达效率(参见Bittner等, Methods in Enzymol.153 : 516- 544, 1987)。

- 另外,可以选择调节插入序列表达或者修饰和加工所需特定样式基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化作用和加工(例如裂解),对于蛋白质的功能而言可能是重要的。对于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰来说,不同的宿主细胞各具特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或者宿主系统,以确保对表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,

可以使用拥有对初级转录物恰当加工、糖基化和基因产物磷酸化的细胞机器的真核宿主细胞。上面提到的哺乳动物细胞类型属于可以用作适宜宿主细胞的部分。

5 为了长期、高产率产生重组蛋白，优选稳定的表达。例如，可以对稳定地表达上述MASP-2序列的细胞系进行基因工程改造。与其用含有病毒复制起点的表达载体，倒不如用通过适当的表达控制元件(例如，启动子、增强子序列、转录终止子、复制起点(polyadenylation)等和选择性标记控制的DNA转化宿主细胞。引入外源DNA后，使基因工程细胞在增菌培养基中生长1-2天，然后转到选择培养基。重组质粒中的选择性标记，赋予对选择的抗性并使得细胞稳定地将质粒整合入其染色体并且变为关注中心(foci)，后者反过来可以被克隆以及扩大为细胞系。此方法可以方便地用于表达MASP-2的基因工程细胞系。该基因工程细胞系对于筛选和评定影响基因产物内源活性的化合物和用于生产治疗用途的MASP-2特别有用。此方法也可用于修饰那些为了试验或治疗目的而被引入宿主生物体的细胞。引入的细胞可以短暂或永久性地

10 性地在宿主生物体内。

有大量的选择系统可以使用。例如，在 tk^- 、 $hgprt^-$ 或 $aprt^-$ 细胞中可以分别使用，单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等, Cell 11 : 223,1977)，次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska和Szybalski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48 : 2026,1962)，以及腺嘌呤转磷酸核糖基酶(Lowy等, Cell 22 : 817, 1980)基因。

20 并且，抗-代谢物抗性可被用作选择下列基因的基础: $dhfr$ ，它赋予对氨甲喋呤的抗性(Wigler等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 3567, 1980; O'Hare等, Proc. Natl. Sci. Acad. USA 78 : 1527, 1981); gpt ，它赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2072, 1981); neo ，它赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Colberre- Garapin等, J.Mol.Biol.150:1, 1981);以及 $hygro$ ，它赋予对潮霉素的抗性(Santerre等, Gene 30 : 147, 1984)。

25

或者，通过利用对被表达融合蛋白特异的抗体，可以容易地纯化任何融合蛋白。例如，通过Janknecht等描述的系统，方便地纯化在人细胞系表达的未变性的融合蛋白(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 8972- 8976, 1991)。在该系统，所关心的基因被亚克隆入牛痘的重组质粒，由此而将基因的开放读框翻译融合到由6个组氨酸残基组成的氨基末端标记物上。把感染过重组牛痘病毒的细胞提取物加载到 Ni^{2+} .次氨基乙酸-琼脂糖柱上，用含有咪唑的缓冲液选择性地洗脱出组氨酸-标记的蛋白。

30

MASP-2多肽

本发明MASP-2多肽是包含来源于SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽。而且，本文描述的MASP-2多肽是由上述任何核酸分子编码的那些多肽，并包括MASP-2片段、突变体、截短的形式以及融合蛋白。可以为了各种用途而制备这些多肽，所述用途包括但不限于：制备抗体、作为诊断试验的试剂、用于鉴定那些可以调节MBLectin应答的其它细胞性基因产物或化合物、以及作为对治疗炎症和与MBLectin途径活性有关的某些病症(下述)有用的药物制剂。优选的多肽是基本上纯的MASP-2多肽，包括那些相当于具有人MASP-2多肽的完整信号序列(从SEQ ID NO: 2的1- 15延伸的氨基酸)的多肽、成熟形式多肽(从SEQ ID NO: 2的16- 686延伸的氨基酸)以及代表MASP-2多肽一部分的多肽。尤其优选的是那些在正常生理条件下可溶性多肽。

在一实施方案中，本发明也包括与MASP-2功能等效的多肽。功能等效物可仅仅包含SEQ ID 2所示MASP-2氨基酸序列的片段。优选的实施方案中，MASP-2多肽选自由下列多肽组成的组：

- i)包含定义为SEQ ID NO.1序列的多肽或其功能等效物；
 - ii)包含定义为具有20 kD分子量的SEQ ID NO.1序列的多肽或其功能等效物；
 - iii)包含SEQ ID NO.2的30至444氨基酸的多肽或其功能等效物；
 - iv)包含具有52 kD分子量的SEQ ID NO.的30至444氨基酸的多肽或其功能等效物；
 - v)包含SEQ ID NO.2的138至296氨基酸的多肽或其功能等效物；
 - vi)包含来源于具有丝氨酸蛋白酶活性的SEQ ID NO 2的氨基酸序列的多肽或其功能等效物；
 - vii)包含来源于在MBL补体途径功能体外试验中具有MASP-2活性的SEQ ID NO 2的氨基酸序列的多肽；
 - viii)包含SEQ ID NO.3的15至671氨基酸的多肽或其功能等效物；
 - ix)包含SEQ ID NO.2的16至296氨基酸的多肽或其功能等效物；和
 - x)包含SEQ ID NO.2的30至296氨基酸的多肽或其功能等效物；
- 这些多肽在其能够实现MASP-2在生物系统的一种或多种功能方面与MASP-2相当。优选的MASP-2多肽具有本文描述的全长成熟人MASP-2活性的20%、40%、50%、75%、80%、乃至90%。通常，该比较是以生物活性试

验为基础的, 试验中使用相等浓度的多肽并进行比较。该比较也可以以达到可获得最大活性的50%所需多肽的量为准。

功能等效蛋白可以是那些例如含有增加、删去或取代的氨基酸残基的蛋白。取代可以基于所涉及残基的相似极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性
5 和/或亲水疏水两重性性质而进行。在发明概述中叙述了通常考虑的提供彼此保守取代的氨基酸。为了变更多肽的半衰期, 可以引入 D-氨基酸。

使用为本领域技术人员所熟知的随机诱变技术, 可以生成与MASP-2 (SEQ ID NO: 2)功能等效的多肽(并且检测产生的突变体MASP-2蛋白的活性)。然而, 更可能由定位诱变产生该多肽(也使用为本领域技术人员所熟知
10 的技术)。这些多肽可以具有提高的功能, 即更大的激活MBLectin途径的能力。多肽可用于提高MBLectin途径免疫功能的活性。

为设计功能等效多肽, 分清保守位置和可变位置是有益的。这通过校准从各种生物体中获得的MASP-2 cDNAs的序列即可做到。熟练技术人员将认识到保守氨基酸残基很可能是维持功能所必要的。因此, 更可取的是不改变
15 保守残基。

为了产生更适合在选择宿主细胞中表达的MASP-2肽, 可进行MASP-2编码序列内的突变。也可以引入糖基化序列, 用来产生具有改变的生物学特性的MASP-2多肽。

本发明也描述了用于测定包括MASP-2或其前体的多肽内序列多态性的
20 方法的特征。这可以通过大量技术来完成。例如, 纯化的多肽接受胰蛋白酶消化, 并用单向或双向电泳分析产生的片段。把样本多肽分析的结果与使用已知序列的结果进行比较。分析也可包括通过单向或双向电泳分离生物样本(例如, 血清或其它体液), 随后将分离的蛋白转印到薄膜上(蛋白质印迹)。然后, 薄膜与针对MASP-2的抗体起反应, 继之与二级标记的抗体发生反应。
25 染色图案(staining pattern)与使用具有已知序列或修饰的样本获得的结果相比较。

本发明多肽可以以与另一多肽, 例如标记多肽或融合配偶体, 相融合的形式表达。譬如, 多肽可以与六-组氨酸标记物融合以便于纯化细菌性表达的蛋白质, 或者与血细胞凝集素标记物融合以便于纯化在真核细胞表达的蛋
30 白质。也可以通过与免疫球蛋白Fc结构域融合而改变本发明MASP-2多肽或其部分, 以便它具有更长的循环半衰期(Capon等, Nature 337: 525- 531, 1989 531, 1989)。类似地, 可以生产二聚型MASP-2多肽, 后者在体内的稳定性增

加。

本发明多肽可以是化学合成的(参见例如, Creighton, " Proteins : Structures and Molecular Principles, " W.H.Freeman & Co., NY 1983), 或者, 也许更方便地通过如本文所述的重组DNA技术生产。至于其他的指导, 熟练技术人员可以查阅Ausubel等(出处同上), Sambrook等, ("Molecular Cloning Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), 和特别是Gait, M.J.编著的化学合成的实例("Oligonucleotide Synthesis," IRL Press, Oxford, 1984)。

10 本发明也描述了能够竞争性地抑制MASP-2活性的多肽的特征。在一实施方案中, 多肽可以自下组肽中选出:

i) 包含SEQ ID NO: 2多肽的片段, 所述多肽是MBL/MASP-2复合(complexing)的竞争性抑制物或其功能等效物;

15 ii) 包含定义为SEQ ID NO: 3序列或其功能等效物的多肽, 其中位于8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19的一个或多个氨基酸残基已经被另一氨基酸残基取代;

iii) 包含定义为SEQ ID NO: 3序列或其功能等效物的多肽, 其中位于8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19的至少两个氨基酸残基已经被另一氨基酸残基取代;

20 iv) 包含定义为SEQ ID NO: 3序列或其功能等效物的多肽, 其中14位的arg已经被另一个氨基酸取代;

v) 包含定义为SEQ ID NO: 3序列或其功能等效物的多肽, 其中14位的arg已经被另一个选自小的、无电荷氨基酸的氨基酸取代;

vi) 包含定义为SEQ ID NO: 3序列或其功能等效物的多肽, 其中14位的arg已经被另一个选自gly和ala的氨基酸取代;

25 和vii) 包含可以与MASP-2或其功能性同系物结合的甘露聚糖-结合凝集素(MBL)片段的多肽;

viii) 选择性地结合MASP-2的抗体。

30 本发明也描述了与MASP-2 (和编码它们的基因)相互作用从而改变MASP-2功能的多肽的特征, 使用本领域技术人员已知的方法, 可以鉴定与互相作用的多肽。一个适宜的方法是“两个-杂合系统”(two- hybrid system), 该系统检测体内蛋白质相互作用(Chien等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88 : 9578, 1991)。实施该方法的试剂盒可购自Clontech (Palo Alto, CA)。

抗- MASP-2抗体

人MASP-2多肽(或致免疫的片段或类似物)可用于产生对本发明有用的抗体;多肽可以通过重组技术或人工合成而产生(参见例如, "Solid Phase Peptide Synthesis", 出处同上; Ausubel等, 出处同上)。一般说来, 可以按照
5 Ausubel等(出处同上)描述的那样, 将肽与载体蛋白如KLH偶联、与佐剂混合并注入宿主哺乳动物中。载体也可以是PPD。可以用肽抗原亲和色谱法纯化抗体。

特别是, 通过注射MASP-2蛋白质或多肽而赋予各种宿主动物免疫性。宿主动物包括兔子、小鼠、豚鼠、大鼠和鸡。可用于增加免疫应答的各种助
10 剂取决于宿主物种, 并包括弗氏佐剂(完全和不完全佐剂)、矿物质凝胶剂如氢氧化铝、表面活性物质(如溶血卵磷脂)、复合多元醇、聚阴离子、肽、油乳化液、匙孔-血蓝蛋白和二硝基苯酚。潜在有用的人助剂包括BCG (bacille Calmette- Guerin, 卡介苗)和小棒状杆菌。多克隆抗体是被免疫动物血清中含有的异源种群的抗体分子。

15 因此, 本发明抗体包括多克隆抗体, 以及单克隆抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、和使用Fab表达文库产生的分子、以及通过噬菌体展示技术产生的抗体或片段。

使用上述MASP-2蛋白和标准杂交瘤技术(看例如, Kohler等, Nature 256 : 495, 1975; Kohler等, Eur. J. Immunol. 6 : 511, 1976; Kohler等, Eur. J. Immunol.
20 6 : 292, 1976; Hammering等, "Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas," Elsevier, NY, 1981; Ausubel 出处同上, 出处同上), 可以制备单克隆抗体 - 针对特定抗原的同种群抗体。

尤其是, 如在下述文献中描述的那样, 可以通过在培养基中连续传代细胞系而用生产抗体分子的任何技术来获得单克隆抗体: Kohler等, Nature 256 :
25 495, 1975, 和美国专利4,376,110; 人B细胞杂交瘤(Kosbor等, Immunology Today 4 : 72, 1983; Cole等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2026, 1983), 和EBV杂交瘤技术(Cole等, " Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc., 第77-96页, 1983)。抗体可以是任何免疫球蛋白类, 包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD和其任何亚类。(在鸡的情况下, 免疫球蛋白类也可以是IgY。)产生本发明mAb的杂交瘤, 可以在体外或体内培育得到。在体内产生高滴度mAbs的能力使得在体内生产成为目前优选的生产方法, 但是, 有
30 些情况下, 将优选在体外生产以避免把癌细胞引入活的动物中, 例如, 当存

在的来自acitis液体的正常免疫球蛋白是不希望有的情况下,或者在涉及道德方面考虑的情况下。

一旦产生,则按照标准方法,例如按照Ausubel等(出处同上)描述的那样,通过蛋白质印迹或者免疫沉淀反应分析法检测多克隆抗体、单克隆抗体、或者噬菌体来源的抗体的特异性MASP-2识别能力。那些特异地识别并与MASP-2相结合的抗体在本发明中是非常有用的。例如,抗体可用于免疫测定法以监测由动物产生的MASP-2的水平(例如,为确定MASP-2的量或亚细胞定位)。同时,抗体可以用作下面论述的MASP-2抑制剂。

优选地,使用位于高度保守区外侧并按照标准(如高频率的荷电残基)判断似乎可能是抗原性的MASP-2蛋白质片段来产生本发明抗体。在一具体实例中,此类片段是通过PCR标准技术产生的,并且随后被克隆入pGEX表达载体中(Ausubel等,出处同上)。融合蛋白在大肠杆菌中表达,并按照Ausubel等描述的那样(出处同上),利用谷胱甘肽琼脂糖亲和基质进行纯化。

有些情况下,也许期望将抗血清的低亲和力或专一性的潜在问题降至最小。在此情形下,可以为各个蛋白产生两个或三个融合蛋白,并且将各个融合蛋白注入至少两只兔子中。通过一系列注射,优选包括至少三次加强注射,可以产生抗血清。

也检验抗血清免疫沉淀重组MASP-2蛋白或对照蛋白(如糖皮质激素受体、CAT或荧光素酶)的能力。

抗体可作为诊断分析的一部分而在例如检测生物样本中MASP-2的试验中使用。抗体也可在为测定候选化合物对MASP-2表达或定位化影响的筛选试验中使用。此外,为了例如评估引入病人之前的正常和/或基因工程MASP-2表达细胞,可将抗体与所描述的基因治疗技术联合使用。抗体还可在抑制异常MASP-2活性的方法中使用。

而且,可以使用开发的生产"嵌合抗体"的技术(Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6851, 1984; Neuberger等, Nature, 312 : 604, 1984; Takeda等, Nature, 314 : 452, 1984),把来自适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自适当生物活性人抗体分子的基因剪接在一起。嵌合抗体是其中不同部分源自于不同动物物种的分子,例如具有来源于鼠科动物mAb可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。

或者,可将所述用于生产单链抗体的技术(美国专利4,946,778、4,946,778和4,704,692)用于生产针对MASP-2蛋白或多肽的单链抗体。单链抗体是由

氨基酸桥将Fv区的重链和轻链片段连接从而形成的单链多肽。

可以用已知的技术生产那些识别并与特异抗原决定簇结合的抗体片段。例如, 片段包括但不限于: 通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生的F(ab')₂片段和通过还原F(ab')片段而产生的Fab片段。或者, 可以构建Fab表达文库(Huse
5 等, Science, 246 1275, 1989)以使得快速和容易地鉴定具有所需特异性的单克隆Fab片段。

反过来, 利用为本领域技术人员所熟知的技术(参见例如, Greenspan等, FASEB J. 7 : 437, 1993; Nissinoff, J. Immunol. 147 : 2429, 1991), 针对MASP-2
10 的抗体可用于生产那些类似于MASP-2一部分的抗-独特型抗体。例如, 与MASP-2结合并竞争性地抑制MASP-2配体结合的抗体, 可用于生产类似于MASP-2的配体结合结构域从而结合并中和MASP-2的配位体(如MBL)的抗独特型抗体。此类中和性抗-独特型抗体或抗-独特型抗体的Fab片段, 可在治疗方案中使用。

通过本领域已知的方法, 可以将抗体人源化。例如, 具有结合特异性的
15 单克隆抗体可以是商购的人源化抗体(Scotgene Scotland; OxfordMolecular, Palo Alto, CA)。本发明也描述了完全人抗体的特征, 如在转基因动物表达的那些抗体(Green等, Nature Genetics 7 : 13-21, 1994 21, 1994; 也参见美国专利5,545,806和5,569,825, 这些文献在此引作参考)。

为了诊断呈现下述病症的症状的患者, 通过使用包含至少一种本文所述
20 特异性MASP-2核苷酸序列或抗体试剂的预先-包装的诊断试剂盒(该诊断试剂盒可以方便地在临床环境中使用), 可以实施本文所述使用抗-MASP-2抗体的方法。

MASP-2的定量测定

仅仅作为一个例子, 为评价MASP-2在体液体或器官(活组织检查)提取物
25 中的浓度, 可以进行定量测定。此测定可以是液相或固相测定。实例是竞争性和非竞争性ELISAs(酶联免疫吸附测定)。

作为有关后者一个例子, 用抗-MASP-2抗体涂层微量滴定孔、与样品一起温育, 用酶标抗体、继之以沉着有色化合物的底物, 观测到MASP-2的存在。或者, 可以使用标记物如镧并利
30 用时间分辨荧光计进行检测。

通过数个方法, 可以完成单独或作为MBL/MASP复合物一部分的MASP-2的功能活性的测定。作为测定MBL/MASP-2复合物一个实例, 把试样加到甘露聚糖涂层的微孔上, 并加入C4以评价C4-裂解活性, 或者加入C3

以评价产生的C3转化酶的C3-裂解活性。对不以MBL/MASP复合物的一部分形式存在的MASP-2的测定,可类似地进行,但是,在把MBL加入到甘露聚糖-涂层的孔之前,把MBL加入微孔或者加入样品中。在加入MBL之前,通过用固相甘露聚糖处理(例如附着于珠粒),或者通过固相抗MBL抗体,或者通过用适宜浓度的沉淀剂(如PEG,它沉淀复合物但把MASP-2留在上清夜中),可以耗尽样品中的MBL和MBL/MASP-1以及MBL/MASP-2复合物。测定在最小化或消除来自经典补体激活途径和替代补体激活途径干扰的条件下进行。

评价MASP-2活性或MASP-2的试验,可用于诊断和处理来自个体、特别是患有感染性或炎症性疾病个体的样品的目的。

10 MASP-2用于治疗

权利要求书确定的治疗用途的组分,可以在体质性或临时性MASP-2不足造成个体易于患上一种或多种感染的情况下施用,或者在个体不能调和已患感染的情况下施用。尤其是,本发明涉及MASP-2在制备用于治疗感染的药物中的用途。即使优选用MASP-2治疗MASP-2不足的个体,但是也可以治疗具有正常血清MASP-2活性的个体。

在另一实施方案中,本发明MASP-2可用于制备治疗低MBL血清水平个体的感染的药物。在此实施方案中,药物组合物优选进一步包含至少一个甘露聚糖-结合凝集素(MBL)亚单位,或者至少一种包含至少一个甘露聚糖-结合凝集素(MBL)亚单位的甘露聚糖-结合凝集素(MBL)寡聚物。或者, MASP-2和MBL可以作为试剂盒的部分(kit-of-parts)而施用。

优选地,本发明MBL寡聚物选自MBL的四聚物、五聚物和/或六聚物。MBL可以重组产生或者经纯化天然存在MBL而得到。例如, MBL可以是专利申请PCT/DK00/00246或者PCT/DK00/00247中公开的任何种类MBL,所述文献在此引作参考。根据本发明,低MBL血清水平,优选是MBL血清水平低于500 ng/ml,更优选MBL血清水平低于100 ng/ml,更加优选MBL血清水平低于50 ng/ml。

同时,MASP-2可以向与血清MBL水平无关的接受MBL治疗的个体施用,以便确保施用的MBL达到充足量的MASP-2。

可以施用MASP-2或者MBL/MASP复合物,优选通过静脉输注施用,以便改善个体的免疫防御。

我们相信, MASP-2是MBL/MASP复合物的强大抗微生物活力所需要的,而MASP-2不足,无论遗传决定的还是后天获得性的,将因此而损害个

- 体对感染的抵抗力和同已患感染的战斗能力。在此情况下,重建天然或重组MASP-2是有用的治疗方式。重组MASP-2可以是完整分子的形式、可以是分子的一部分形式、或者是为了调节活性而通过任何方式附着到另一结构的完整或部分形式。重组产物在结构方面可以与天然分子相同,或者被稍微修饰
- 5 从而产生提高的活性或者降低的活性(当需要降低活性时)。

使用MBL(无论天然还是重组的MBL)的重建治疗,要求接受者具有足够的MASP-2用于表达MBL/MASP活性。因此,当患者的MASP-2活性不足时,治疗制品中必须包含MASP-2。

- MASP-2优选以在受治个体血清中产生50 ng/ml至1000 μ g/mlMASP-2浓
- 10 度的剂量施用,优选的浓度范围为100 ng/ml至800 μ g/ml,更优选500 ng/ml至500 μ g/ml,更加优选750 ng/ml至250 μ g/ml,然而更优选1 μ g/ml至100 μ g/ml,更加优选2 μ g/ml至50 μ g/ml,最优选2 μ g/ml至10 μ g/ml。

可用本发明药物组合物治疗的感染可以是任何传染物的感染。例如,由微生物引起的感染。

- 15 微生物可以是真菌或者酵母或者细菌或者寄生虫。

- 根据本发明,细菌可以选自例如:木糖氧化产碱菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、醋酸钙不动杆菌,优选无硝不动杆菌(*A. anitratus*)、溶血不动杆菌(*A. haemolyticus*)、产碱不动杆菌(*A.alcaligenes*)和鲁氏不动杆菌(*A. Iwoffii*),伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*)、产碱杆菌属类(*Alcaligenes species*),优选粪产碱杆菌(*A. faecalis*)、芳香产碱杆菌(*A. Odorans*)和反硝化产碱菌(*A. denitrificans*),亚利桑那沙门菌(*Arizona hinshawii*),炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*),蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*),脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*),产黑素拟杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*),百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*),博
- 20 氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)回归热螺旋体(*Borrelia recurrentis*),布鲁氏菌属类(*Brucella species*),优选流产布氏杆菌(*B. Abortus*)、猪布氏杆菌(*B. suis*)、马尔他布氏杆菌(*B. melitensis*)和狗布氏杆菌(*B. canis*),肉芽肿荚膜杆菌(*Calymmatobacterium granulomatis*),胎儿弯曲杆菌(*Campylobacter fetus*) ssp. *intestinalis*,胎儿弯曲杆菌(*Campylobacter fetus*) ssp. *jejuni*,衣
- 25 原体属类(*Chlamydia species*),优选鸚鵡热衣原体(*C. psittaci*)和沙眼衣原体(*C. trachomatis*),青色素杆菌(*Chromobacterium violaceum*),柠檬细菌柠檬酸杆菌属(*Citrobacter species*),优选费氏柠檬酸杆菌(*C. freundii*)和
- 30

- 差异柠檬酸杆菌 (*C. diversus*), 肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*), 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*), 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*), 破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*), 白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*), 棒状杆菌属 (*Corynebacterium*), 优选溃疡棒状杆菌 (*C. ulcerans*)、溶血
- 5 棒状杆菌 (*C. haemolyticum*) 和假结核棒状杆菌 (*C. pseudotuberculosis*), 伯氏考克斯氏体 (*Coxiella burnetii*), 迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*), 啮蚀艾肯氏菌 (*Eikenella corrodens*), 肠杆菌属, 优选泄殖腔肠杆菌 (*E. cloacae*)、产气肠杆菌 (*E. aerogenes*)、哈夫尼肠杆菌 (*E. hafniae*) (也称蜂窝哈夫尼菌) 和凝结肠杆菌 (*E. agglomerans*), 红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix*
- 10 *rhusiopathiae*), 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 脑膜脓毒性黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*), 土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*), 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*), 阴道加德纳菌 (*Gardnerella vaginalis*), 杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*), 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*), 螺杆菌类 (*Helicobacter species*), 克雷
- 15 伯氏杆菌类 (*Klebsiella species*), 优选肺炎克雷伯氏杆菌 (*K. pneumoniae*), 鼻臭克雷伯氏菌 (*K. ozaenae*) og, 鼻硬结克雷伯氏菌 (*K. rhinoscleromatis*), 军团菌类 (*Legionella species*), 问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*), 单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 莫拉氏菌类 (*Moraxella species*), 优选腔隙莫拉氏菌 (*M. lacunata*) 和奥斯陆莫拉氏菌 (*M. osloensis*),
- 20 牛分支杆菌 (*Mycobacterium bovis*), 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*), 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 支原体类, 优选肺炎支原体 (*M. pneumoniae*), 淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*), 诺卡氏菌类 (*Nocardia species*), 优选星状诺卡菌 (*N. asteroides*) 和巴西诺卡菌 (*N. brasiliensis*), 溶血巴斯德菌
- 25 (*Pasteurella haemolytica*), 多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*), 大消化球菌 (*Peptococcus magnus*), 类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*), 肺炎球菌 (*Pneumococci*), 变形杆菌类 (*Proteus species*), 优选奇异变形菌 (*P. mirabilis*)、寻常变形菌 (*P. vulgaris*)、雷氏变形菌 (*P. rettgeri*) 和摩根变形菌 (*P. morganii*) (也分别称雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*)
- 30 和摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*), 普罗威登斯菌类 (*Providencia species*), 优选产碱普罗威登斯菌 (*P. alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌 (*P. stuartii*) 和雷氏变形菌 (*P. rettgeri*) (也称雷特格氏变形杆菌 (*Proteus rettgeri*)), 绿

浓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*),
伪鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*),立克次氏体(*Rickettsia*),
Rochalimaia henselae,沙门氏菌类(*Salmonella species*),优选肠炎沙门氏
菌(*S. enteridis*)、伤寒沙门菌(*S. typhi*)和德比沙门菌(*S. derby*),而最
5 优选沙门氏菌类的沙门氏菌DT104型,沙雷氏菌类(*Serratia species*),优选
粘质沙雷菌(*S. marcescens*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、费氏
志贺氏菌(*S. flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*S. boydii*)和*S. sonnei*,小螺菌(*Spirillum*
minor),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),表皮葡萄球菌
(*Staphylococcus epidermidis*),腐生葡萄球菌(*Staphylococcus*
10 *saprophyticus*),念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*),链球菌
(*Streptococcus*),优选粪链球菌(*S. faecalis*)、屎链球菌(*S. faecium*)和
耐久链球菌(*S. durans*),无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),肺炎链
球菌(*Streptococcus pneumoniae*),酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*),
品他病密螺旋体(*Treponema carateum*),苍白密螺旋体(*Treponema*
15 *pallidum*),雅司螺旋体(*Treponema pertenuis*),优选苍白密螺旋体,解脲
支原体(*Ureaplasma urealyticum*),霍乱弧菌(*Vibrio cholera*),副溶血弧
菌(*Vibrio parahaemolyticus*),小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia*
enterocolitica),以及鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)。

根据本发明,寄生虫可以选自例如:疟疾(镰状疟原虫(*Plasmodium*
20 *falciparum*),间日疟原虫(*P. vivax*),三日疟原虫(*P. malariae*)),血吸
虫,锥体虫,利什曼原虫,丝虫线虫(*Filarial nematodes*),滴虫,肉孢子
虫,绦虫(无钩绦虫(*T. saginata*)、有钩绦虫(*T. solium*)),利什曼原虫
(*Leishmania*),鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*),旋毛虫(*Trichinella*)或者球
虫(*Coccidiosis*)(艾美球虫类(*Eimeria species*))。

25 真菌可以例如选自新型隐球菌、白色念珠菌、烟曲霉和球孢子菌。

在一优选的实施方案中,细菌类可以对至少一种抗生素药物具有抗性。
例如,细菌可以是多抗性的。在一实施例中,细菌是病原性细菌。

在本发明另一实施方案中,感染是病毒感染,即由病毒所致的感染。

根据本发明,病毒可以选自例如:腺病毒相关病毒,腺病毒,禽传染性
30 支气管炎病毒,杆状病毒(*Baculovirus*),水痘,冠状病毒,巨细胞病毒,
大瘟热(*Distemper*),肠道病毒(*Enterovirus*),Epstein Barr病毒,猫白血
病病毒(*Feline leukemia virus*),黄热病病毒(*Flavivirus*),口蹄疫病毒,

- 甲型肝炎, 乙型肝炎, 丙型肝炎, 戊型肝炎, 疱疹类, 单纯性疱疹, 流感病毒, HIV 1, HIV-2, HTLV 1, 流感A和B病毒, Kunjin病毒, 拉萨热病毒, LCMV (淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒), 慢病毒 (lentivirus), 囊虫 (Measles), 门果病毒 (Mengo virus), 麻疹病毒 (Morbillivirus) 粘液病毒 (Myxovirus),
- 5 乳头状瘤病毒 (Papilloma virus), Parovirus, 副流感病毒, 副粘液病毒 (Paramyxovirus), 细小病毒 (Parvovirus), Poko病毒, 骨髓灰白质炎病毒 (Polio virus), 多瘤肿瘤病毒, 伪狂犬病病毒, 狂犬病病毒呼肠孤病毒, 呼吸道合胞病毒, 逆转录病毒 (retrovirus), 鼻病毒, 牛痘 (Rinderpest), 轮状病毒 (Rotavirus), 西门利克森林病毒 (Semliki forest virus), 仙台病毒 (Sendai virus), 猿猴病毒40 (Simian Virus 40), 辛德毕斯病毒 (Sindbis virus), SV5, 蜱传脑炎病毒 (Tick borne encephalitis virus), 披膜病毒 (Togavirus) (风疹, 黄热病, 登革热), 牛痘病毒, 委内瑞拉马脑脊髓炎 (Venezuelan equine encephalomyelitis) 和水疱性斯托马季病毒 (Vesicular stomatis virus)。
- 10
- 15 在一优选的实施方案中, 病毒是逆转录病毒, 例如人类免疫缺陷性病毒。

对MASP-2进行试验

用MASP-2(或MASP-2抑制剂)治疗, 通常必须首先评定MASP-2在患者血清或血浆的情况。试验的实例描述如下。

20

测定MASP-2抗原。

利用标准免疫学方法, 可以方便地评价作为抗原的MASP-2蛋白。

- 仅仅作为一个例子来说, 如下构建MASP-2的定量TRIFMA (时间分辨免疫荧光测定): 1)用1 μ g抗 C'MASP-2抗体涂层微滴定孔; 2)用吐温-20封闭;
- 25 3)加试验样品, 如稀释的血浆或血清样本; 4)加Eu-标记的抗 N'MASP2抗体; 5)加增强溶液(Wallac Ltd); 6)在时间分辨荧光计上读Eu读数。(可以类似地用ELISA进行测定, 例如在步骤4用生物素-标记的抗 N'MASP-2; 在步骤5用碱性磷酸酶-标记的抗生物素蛋白; 6)加底物; 和7)读取颜色强度读数。) 除了
- 步骤6和7之间, 各步骤之间, 平皿在室温下温育并且洗涤。利用每毫升含有
- 30 1单位MASP-2的合并的 (pooled) 正常血浆的稀释物, 构建校准曲线。在MASP-2测定第一方案所用的抗体是针对针对合成肽而产生的, 并且与天然MASP-2的反应很弱。因此, 样本与SDS在沸水浴中预处理5 min, 并且在测

定之前用非离子型洗涤剂(Triton X-100)中和SDS。该试验的进一步显影是使用与天然MASP-2起反应的抗体,因此使SDS处理变得多余。

利用与MASP-2(天然或重组MASP-2或其部分)起反应的抗体,多克隆抗体或单克隆抗体或重组抗体,可以类似地构建试验。

- 5 通过利用选择性地与完整MASP-2或与活化产物起反应的抗体,或者通过联合抗MASP-2分子不同部分的抗体,可以构建试验用于评定在体内MBLectin途径的激活作用。这些试验将对于测定由该途径的激活而引起的炎症非常有用。

- 10 对MBL/MASP复合物的MASP-2活性进行测定。

- 通过其激活补体系统的能力来评价MASP-2。当C4被MASP-2裂解时,暴露出活性的硫羧酸酯,C4则共价附着于附近的亲核基团。因此,C4b的实质部分将附着于涂层的塑料孔并且可以被抗C4抗体检测到。从而,用数个方法,可以完成单独或作为MBL/MASP复合物一部分的MASP-2的功能活性的测定。用以下检测MASP-2的方法可以测定MBL/MASP-2裂解C4的活性,所述方法包括MASP-2活性测定,包括以下步骤:

- 把包含预定量MBL的样本加到固相上,得到结合的MBL,
- 把预定量的MASP-2加至结合的MBL上,
- 把至少一种补体因子加至复合物上,
- 20 -检测裂解的补体因子的量,
- 计算裂解的补体因子量与MASP-2量的相关性,以及
- 确定MASP-2的活性,
- 或者
- 把包含预定量MBL/MASP-2复合物的样本加至固相上得到结合的复合物,
- 25 物,
- 把至少一种补体因子加至复合物上,
- 检测裂解补体因子的量,
- 计算裂解的补体因子的量与MASP-2量的相关性,以及
- 确定MASP-2活性。

- 30 通过下列步骤构建MASP-2活性的定量TRIFMA: 1)用在100 μ l缓冲液中的1 μ g甘露聚糖涂层微滴定孔; 2)用Tween-20封闭; 3)加试验样品,如稀释的血浆或血清样本; 4)以5 μ g/ml加入纯化的补体因子C4; 5)在37 $^{\circ}$ C温育

- 1小时; 6)加入Eu-标记的抗 C4抗体; 7)加入增强溶液;和8)读取时间分辨荧光计的Eu读数。(可以类似地通过ELISA进行评定,例如在第6步加入生物素标记的抗 C4; 7)加入碱性磷酸酶-标记的抗生物素蛋白; 8)加入底物; 和9)读取颜色强度读数)。除了步骤7和8之间,在各步骤之间,室温下温育平皿并洗涤。利用每一选择的正常血浆的稀释物构建校准曲线,其每毫升含有1单位MBL/MASP-2活性。所述检查在排除了经经典或替代补体激活途径激活C4的条件下进行。C4的激活被丝氨酸蛋白酶抑制剂苄脒彻底抑制。优选抑制经典补体途径的激活,以减少测定的伪差。优选的是,通过在高离子强度下进行测定而实施抑制,例如其中盐浓度超过0.2M,如超过2.5M,如在0.3M至10M范围内,如0.5M至5M,如0.7M至2M,如0.9M至2M,如约1.0M。所用的盐可以是适于该测定的任何一种或多种盐,例如选自NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、NaI、KCl、MgI₂、CaI₂的盐,选自NaBr、KBr、MgBr₂、CaBr₂、Na₂S₂O₃、(NH₄)₂SO₄和NH₄HCO₃的盐。经典途径的抑制优选不干扰MBL/MASP复合物但却破坏C1qrs复合物。替代途径的抑制,可以通过在实施测定之前将样品稀释至少5倍、例如至少10倍、至少20或更多而进行。

为评定游离MASP-2活性进行试验。

- 在涂有不含MASP的MBL的孔上完成对取自MBL-缺乏个体的样品中MASP-2活性的评定。按下列步骤对取自带有MBL个体的样品中的游离MASP进行评定:首先通过与琼脂糖凝胶-偶合甘露聚糖温育(300 μ l 10倍稀释的血浆或血清与10 μ l珠粒温育)而消除MBL/MASP-1和MBL/MASP-2复合物,然后分析上清液。

- 在TRIFMA甲酸盐中如下进行测定: 1)用在100 μ l缓冲液中的1 μ g甘露聚糖涂层微滴定孔; 2)用Tween-20封闭; 3)在缓冲液中1000倍稀释的100 ng不含MASP的MBL/ml中温育样品,并在每孔加入100 μ l混合物; 4) 4 $^{\circ}$ C温育过夜; 4)洗涤并加入5 μ g/ml纯化的补体因子C4; 5) 37 $^{\circ}$ C温育1小时; 6)加入Eu-标记的抗 C4抗体; 7)加入增强溶液; 和8)读取时间分辨荧光计的Eu读数。(可以类似地通过ELISA进行评定,例如在第6步加入生物素-标记的抗 C4; 7)加入碱性磷酸酶-标记的抗生物素蛋白; 8)加入底物; 和9)读取颜色强度读数。)在各步骤之间,室温下温育平皿并洗涤,除外步骤7和8之间。利用一个选择的使之每毫升含有1单位MASP-2活性的MBL-缺乏者的血浆的稀释物,可以构建校准曲线。该测定是在排除了通过经典的或替代补体激活途径激活C4

的条件下进行的(参见上面)。

抑制MASP-2活性。

为了控制MASP-2的补体激活活性和炎症性活性,可以使用MASP-2生物
5 活性抑制剂。此类抑制剂可以是代表C2或C4靶结构的底物类似物。抑制剂
可以是天然肽、修饰肽、或任何竞争性或非竞争性地抑制MASP-2活性的有
机分子。抑制剂可以被修饰以便在循环系统停留更短或更长时间,并被设计
成经注射或经口服给予。抑制剂可以是MASP-2的片段,由天然或重组
10 MASP-2通过化学或酶学方法产生。抑制剂可以是天然存在的较短形式的
MASP-2。抑制剂可以是可溶性形式或与固相相偶联形式。固相可以是适合
的表面,例如用于体外的血液或等离子体流(plasma flow)装置所用的表面。

微生物性碳水化合物或内源性寡聚糖可以引起不希望的MBL/MASP复
合物激活作用,导致损害性炎症反应。通过施用MASP-2活性抑制剂如
Pefabloc,可以减少这些病理生理学活性。在为测定MASP-2活性进行的
15 TRIFMA试验中,其它酶抑制剂(PMSF, 苄脒等)也被证明是有效的。显然,
设计体内使用的抑制剂时,毒性是主要的考虑因素,而且高度特异性抑制剂
被认为比广泛反应性抑制剂的毒性小。利用代表补体因子C4或C2分子上靶
结构的肽、肽类似物或肽衍生物,可以产生特异性抑制剂。另一类抑制剂可
以建立在针对MASP-2活性部位或MASP-2上其它结构的抗体(抗体片段)的基
20 础上,从而抑制MASP-2活性。针对MASP-2的抗体优选是上述讨论到的抗体。
抑制剂也可是针对抑制认为是受MASP-1影响的MASP-2的激活,即MASP-2
上MASP-1的靶结构可能是此类适宜的抑制剂。另一类抑制剂阻止MASP-2
与MBL的结合以及由此引起的MASP-2激活。MASP-2 N-末端20 kDa片段可
以是此类适宜的抑制剂。更准确地说,人们可以定位介导MASP-2与MBL结
25 合的多肽链的精确部分,并利用该合成肽或同功结构作为抑制剂。抑制剂可
以是用D氨基酸取代L-氨基酸。

并且,抑制剂可以是使用MASP-2或其片段作为选择分子通过SELEX
(通过指数富集系统性演化配体(systemic evolution of ligands by exponential
enrichment))分离的RNA或单链DNA。在该申请中的其它部分展示MASP-2
30 的前导序列。

此外, MASP-2的抑制剂可以是丝氨酸蛋白酶抑制剂, 如aprotinin。

通过MASP-1或任何其它摹拟MASP-1活性的物质的作用而使酶原形式

的MASP-2转化为活化的MASP-2，可以控制MASP-2活性。

实施例

实施例1：鉴定MASP-2

5 通过亲和色谱法在甘露聚糖-和N-乙酰葡萄糖胺-衍生的琼脂糖凝胶珠粒上纯化人血浆蛋白和以钙-依赖方式(即凝集素和凝集素-相关蛋白)与碳水化合物相结合的蛋白复合物。将用含有EDTA和酶抑制剂的缓冲液稀释的合并的CPD-血浆(2.5 l)通过琼脂糖凝胶2B CL和甘露聚糖琼脂糖凝胶。加入凝血抑制剂PPACK (D-苯丙氨酰-脯氨酰-精氨酰-氯甲基酮)和CaCl₂。样本通过琼
10 脂糖凝胶2B-CL和甘露聚糖-琼脂糖凝胶，用含有EDTA的缓冲液洗脱与甘露聚糖琼脂糖凝胶的钙-依赖性结合的蛋白。再钙化洗脱液，通过GlcNAc-琼脂糖凝胶柱，按上述方法洗脱，产生20 ml“凝集素制品”。

用SDS-PAGE和在PVDF-膜上的印迹分析该蛋白制品。用抗牛凝集素制品²⁵的小鸡抗体进行的印迹显示52 kDa的Mr和32 kDa的MBL。52 kDa带接受
15 氨基末端氨基酸序列分析。序列显示类似于前面描述过的MASP (MASP-1)的序列。针对代表19个氨基末端氨基酸的合成肽的抗体(抗 N'MASP-2抗血清)，识别该52 kDa分子和具有相当于20 kDa迁移率的分子(图1，泳道1)。在非还原条件下，用抗 N'-MASP-2抗血清检测76 kDa多肽(图1，泳道2)，表明存在链内二硫键。发现20 kDa多肽具有与52 kDa多肽相同的氨基末端序列，
20 前者可能代表后者的截短形式。直接测定的氨基酸序列(氨基末端以及肽链内的氨基酸)示于图6。在非还原条件下具有第一维度(维度)和在还原条件下具有第二维度的双向SDS-PAGE电泳显示，该52 kDa多肽属于具有76 kDaMr的二硫化物-连接的蛋白的部分。可能代表蛋白其余部分的31 kDa多肽(图1，泳道3)，也被针对代表蛋白羧基末端部分序列(用cDNA序列技术测定；
25 见下文)的合成肽的抗血清(抗C'MASP-2)识别为76 kDa蛋白的部分。在非还原条件下，用抗-N'-MASP-2抗体检测到的76 kDa带也被抗 C'MASP-2抗体识别(图1，泳道4)。

图1 b描述二维SDS-PAGE电泳，第一维度在非还原的条件下。切断泳道，在含有二硫苏糖醇(DTT)样品缓冲液中温育，放置在另一SDS-PAGE凝胶的
30 顶部，之后进行电泳，凝胶上印迹印记，用抗 N'MASP-2抗体显示印迹。指示出分子量标志物的位置。

实施例2：制备针对甘露聚糖-结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶的抗体

根据C. Koch, The State Serum Institute, Copenhagen, 对最初用BCG (Bacillus Calmette Guérin疫苗)免疫的动物用与PPD(结核菌素纯化蛋白衍生物)相偶联的合成肽进行免疫。称做抗 N'MASP-1、抗 C'MASP-1和抗 N'MASP-2的抗体, 来自于分别用相当于MASP-1的前19个氨基酸残基、

- 5 MASP-1的最后19个氨基酸残基和MASP-2的开始19个氨基酸残基的肽免疫过的兔。鸡抗 C'MASP-2抗体来自于用代表MASP-2 C-末端部分序列的两个肽(残基505至523和538至556)的混合物免疫过的鸡。所有肽具有偶合用的另外的C-末端半胱氨酸。从卵黄纯化抗体和正常鸡IgG²⁶。

- 用蛋白A亲和色谱法纯化单克隆抗MBL抗体、IgG₁- κ (克隆131-1)和对照
10 IgG₁- κ (克隆MOPC 21)。用胃蛋白酶消化兔抗-人C4和兔抗-人C1q, 产生F(ab')₂兔抗-人C4和F(ab')₂兔抗-人C1q (DAKO, Glostrup, Denmark)。为了使蛋白质印迹着色, 使用1 μ g/ml的抗体。用兔抗-鸡IgG, 继之以过氧化物酶-标记的山羊抗-兔IgG, 并用增强化学发光技术显影, 观测到结合的鸡抗体。分别用过氧化物酶-标记的兔抗-鼠IgG和用过氧化物酶-标记的山羊抗-兔IgG,
15 观测到结合的鼠抗体和兔抗体。

- 实施例3: 52 kDa和20 kDa多肽的氨基酸序列。将凝集素制品浓缩, 进行SDS-PAGE电泳, 并转印到PVDF-膜上。用抗-牛凝集素抗体显示两个条带25。用考马斯亮蓝染色印迹的其余部分。切下该相当于免疫-染色的52 kDa带的条带(断定代表考马斯-染色的蛋白的约5%), 并在Applied Biosystems蛋白序列
20 分析仪上接受序列分析。产生抗 N'MASP-2抗体后, 利用该抗 N'MASP-2抗体完成类似的蛋白质印迹。将用该抗体观测到的蛋白氨基末端的20 kDa和52 kDa带进行序列分析。用胰蛋白酶消化取自另一印迹的两个条带的蛋白来制备肽, 经反相色谱法分级, 主尖峰的肽接受序列分析。

实施例4: MASP-2的克隆和序列分析

- 25 肝脏是合成C1r、C1s、和MASP-1的主要场所。因此, 来自肝脏的RNA用作RT-PCR的模板, 使用由获得的肽序列推导出的序列做引物。使用第一链cDNA合成试剂盒(Pharmacia), 用1.3 μ g人肝RNA进行第一链cDNA的合成。使用简并的分别来源于氨基酸序列EYANDQER和KPFTGFEA的有义和反义引物, 完成对cDNA的PCR。PCR程序组成是: 1个循环的50 $^{\circ}$ C退火; 1个循环
30 的55 $^{\circ}$ C退火, 和33个循环的60 $^{\circ}$ C退火。使用TA-克隆试剂盒(InVitrogen)把产生的300 bp PCR产物克隆入大肠杆菌质粒pCRII中, 并检测插入的核苷酸序列。

产生的300 bp RT-PCR产物的核苷酸序列包含带有推导氨基酸序列的开放读框(ORF),证实了由其推导出引物的肽序列以及另一个测序肽的序列。对质粒的插入物作放射活性标记,标记后的插入物作为筛选商业人肝文库(stratagene)中总共 8×10^5 克隆的探针。16个克隆杂交,对4个最长的克隆(phl-1, 2, 3和4)进行彻底的序列分析。序列分析显示,所有4个克隆均代表相同的新人mRNA类的反向转录产物。最长的克隆phl-4包括2475 bp,从5'端 36 bp非翻译区开始继之以2061 bp的ORF和378 bp的3'非翻译区,以聚-A尾结束。phl-4的核苷酸序列与其翻译的氨基酸序列一起示于图6。该序列保藏在EMBL核苷酸序列数据库中(登记号为Y09926)。虽然phl1和-2的序列总起来与phl4一致,但是phl-3的核苷酸序列在2个位置不同于phl-4,一个易位在核苷酸1147位(G变成T),另一个变化在1515位(C变成T)。第一个变化导致Asp 356被Tyr替换。因为所有克隆均由从单一供体分离的RNA转录的肝文库分离得到,所以观察到的差异可能代表MASP-2基因的多态性,或者起因于构建该文库期间的误差。

在由克隆phl-4推导出的序列上鉴定NH₂-末端的氨基酸序列以及所有测序的肽。ORF编码686个氨基酸的多肽链,其中包括15个残基的信号肽。忽略信号肽不计,计算出的Mr是74,153,与在SDS-PAGE电泳上观察到的76 kDa一致(图1),等电点5.43,摩尔消光系数是113,640 (即浓度为1 mg/ml时,OD_{280nm} = 1.54)。与MASP-1相反,该序列不包含N-连接的糖基化位点。存在对于丝氨酸蛋白酶活性中心而言必不可少的三个氨基酸残基(His 468, Asp 517,和Ser 618)。

实施例5:MASP-2与MASP-1、Clr和Cls的比较。

由cDNA序列推断的氨基酸序列与MASP-1、Clr和Cls的序列相同(图2)。值得注意的是,4个蛋白的结构域单位相同,特征为一个Clr/Cls-样结构域、一个表皮生长因子-样(EGF-like)结构域,继之以第二个Clr/Cls-样结构域、两个互补对照蛋白(CCP)结构域和一个丝氨酸蛋白酶结构域。如存在于MASP1、Clr以及Cls中一样,表皮生长因子-样结构域的钙-结合基序(motif)中涉及的关键残基存在于获得的序列中。另外,所有4个蛋白中,底物特异性相关残基,在活性部位丝氨酸之前6个残基,是天冬氨酸。MASP-1、clr、以及cls均由位于第二个CCP结构域和丝氨酸蛋白酶结构域之间的残基Arg和Ile间肽键的裂解而被活化。产生的多肽链(最大的称为“重链”和最小的称为“轻链”)由二硫键结合在一起。以此类推,我们的结果表明:还原条件

下SDS-PAGE电泳之后,由针对MASP-2的N-末端的抗体识别的52 kDa多肽是MASP-2的重链,而由针对MASP-2的C-末端的抗体识别的31 kDa多肽是MASP-2的轻链。如图2所示,MASP-2中的Arg和Ile存在于第二个CCP结构域和蛋白酶结构域之间的预期位置。

- 5 基于图2中的排列,研究了四个蛋白之间的同一性和相似性。在各个突变数据矩阵(250PAMS)中加入偏差值6,并且使用缺口补偿(break penalty)为6。4种蛋白的同一性残基由星号指示。在序列上标出 C1r/C1s-样结构域、EGF-样结构域和CCP结构域的起始点。对准的半胱氨酸呈阴影。由其产生重链和轻链的Arg和Ile残基之间潜在的裂解位点与丝氨酸蛋白酶结构域开始的位点吻合。指出了对于丝氨酸蛋白酶活性中心而言必不可少的三个氨基酸残基(His 468, Asp 517,和Ser 618)标示为(0)。标出了MASP-1的组氨酸-环中的半胱氨酸(∇)。由肽的氨基酸序列获得的序列标以下划线。蛋白之间的同一性(图)均在39%至45%的范围,没有功能性相关的线索。蛋白之间的相似性(即,将类似性质残基和同一性残基考虑在内)(图3b)在39%和52%之间,MASP-1和C1s之间的相似性最小(39%),MASP-1和C1r之间(52%)、MASP-1和MASP-2之间的相似性最高(52%)。MASP-2与C1r和C1s的相似性分别为46%、47%。鉴于相对同一性没有给出功能性相关线索,C1s和MASP-2之间的相似性分值明显高于C1s和MASP-1相似性分值,而MASP-1与C1r的相似性较之与C1s的相似性更大,提示MASP-2,像C1s那样,是一个C2和C4的裂解酶。序列的
- 10 数个特征提示,MASP-2、C1r和C1s是由一个MASP-1祖先经基因复制和偏差进化而来的。只有MASP-1序列含有代表胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶特征的组氨酸环²⁷。与大多数丝氨酸蛋白酶一样,MASP-1中的活性部位丝氨酸由TCN密码子编码(N是A、T、G或C),而MASP-2中,C1r和C1s由AGY密码子编码(其中Y是T或C)。发现大多数丝氨酸蛋白酶中,包括MASP-1,在活性部位丝氨酸下游的第三位是脯氨酸残基,而在MASP-2、C1s和C1r却发现不同的氨基酸(MASP-2和C1s中是丙氨酸,C1r中是缬氨酸)。根据这些类推,可以预言:MASP-2的催化结构域与C1r和C1s一样是由单一外显子编码的,而大多数其它丝氨酸蛋白酶包括MASP-1具有分割的外显子²⁸。
- 15 20 25

实施例6:MBL/MASP复合物。

- 30 将上述凝集素制品在涂有单克隆抗MBL抗体的微滴定孔中温育,涂有相同亚类非特异性单克隆免疫球蛋白的孔作为阴性对照。洗脱被抗体捕获的蛋白,并用SDS-PAGE/蛋白质印迹法分析蛋白。结果(图3a)表明,抗MBL抗

体除结合MBL之外,还捕获MASP-1和MASP-2。用单克隆抗MBL或对照单克隆鼠IgG1涂层的微滴定孔与两个不同凝集素制品(a和b)之一一起温育,洗脱结合的蛋白质,并用还原条件下的SDS PAGE和蛋白质印迹法分析蛋白。印迹a用抗MBL抗体显影,印迹b用抗-C'MASP-1抗体显影,印迹c用抗-N'MASP-2抗体显影。泳道1代表未分级的凝集素制品a。泳道3和4分别代表来自涂有抗MBL抗体并与凝集素制品b和a温育的孔的洗脱液,而泳道2和5分别代表来自涂有正常IgG并与凝集素制品b和a温育的孔的洗脱液。

对凝集素制品在Superose 6B CL上的凝胶渗透色谱(GPC)的级分进行分析,以检测MBL、MASP-1和MASP-2(图3a)。凝集素制品在含钙缓冲液中的Superose 6柱上进行GPC。洗脱MBL, 体积(V_e)的主峰处相当于750 kDa Mr,而较小的峰相当于350 kDa的位置。长方形图(panel)A显示使用单克隆抗MBL抗体通过蛋白质印迹法的级分分析结果。所有MBL制品均见到大约60 kDa的带,而且为检测的所有抗MBL抗体(单克隆和多克隆抗体)识别,因此可能代表32 kDa多肽链的不可还原二聚物。

长方形图B显示使用抗-N'MASP-2抗体(显影上面一条52 kDa的带)继之以抗-C'MASP-1抗体(显影下面一条31 kDa的带)进行的同样的分析。出于纯技术原因,20 kDa截短的MASP-2未在图画中显示,其印迹部分地分布在与抗MASP-2和抗MASP-1的温育品之间的条带。色谱图上的箭头指示空段体积(1)和随后的标志蛋白IgM (2)、C1q (3)、甲状腺球蛋白(4)、IgG (5)以及血清白蛋白(6)的洗脱位置。

MASP-1和MASP-2大量地与高分子量MBL共-洗脱。MBL制品在pH 5的层析显示,没有MASP-1或MASP-2与MBL相结合。参见Tan等(1996, Biochem J. 319: 329-332)。

实施例7:补体激活。

经典补体激活途径以及MBL-引发的途径,涉及通过酶激活C4和C2而生成C3转化复合物C4b2b。在C1复合物($C1qr_2s_2$)中,在C1r激活酶后由C1s显示出特异性蛋白酶活性。激活C4后,暴露出反应性羧基, C4b与附近的氨基或羟基共价结合。

比较了MASP-1和MASP-2、C1r和C1s的C4激活效力。这通过由SDS-PAGE分离C1制品和MBL/MASP制品继之以蛋白质印迹法而完成。通过在37℃与人血清温育,随后使用保藏的抗C4抗体进行检测,从而检验C4转化活性的印迹。

IgG-偶合的琼脂糖凝胶珠粒与人血清在4℃一起孵育,来纯化C1。洗涤珠粒并在37℃温育30分钟,以激活C1r和C1s。珠粒悬浮在非还原样品缓冲液中而不煮沸,接受SDS-PAGE电泳,接着在无SDS的条件下印迹。对在不存在酶抑制剂的条件下产生的MBL制品,进行类似的印迹(The State Serum Institute, Copenhagen)。印迹条带与1.1% (v/v)人MBL-缺乏的血清在37℃温育30分钟,在Biorex 70经分级而去除C1q。用生物素化的F(ab')₂抗 C4抗体,随后用过氧化物酶标记的抗生蛋白链菌素和荧光试剂显影印迹。用丝氨酸蛋白酶抑制剂(氨基苯磺酰基氟化物 (aminoethylbenzenesulfonyl))处理平行印迹,所述平行印迹在与血清温育期间也存在。直接用抗体显影其它条带。

- 10 图4结果表明,C4沉积在相当于MASP-2带的位置,而在相当于MASP-1的位置未观察到C4沉积。如还原条件下的SDS-PAGE所示,MASP-1在活化状态中存在,其以分别大约30 kDa和70 kDa的两个条带出现(未显示)。观察到的C4活化和沉积被丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制(图4)。也注意到,当在整个纯化方法中添加了酶抑制剂的情况下制备MBL/MASP时,检测不到C4活化
- 15 活性。类似地分析C1的制品,而在相当于C1r和C1s的位置(在使用的该项技术中C1r和C1s不分离)观察到可以被酶抑制剂抑制的C4沉积。

- 图4代表证明C4通过C1s和MASP-2激活的蛋白质印迹。长方形图A显示在非还原条件、但在电泳之前不加热样本的条件下,分离的C1的蛋白质印迹。泳道1用抗 C1s抗体显影。泳道2与人血清温育,然后用抗 C4抗体显影。泳道3同泳道2,除了在与血清温育期间存在丝氨酸蛋白酶抑制剂。长方形图B显示如在A中分离的MBL制品的蛋白质印迹。泳道1用抗 N'MASP-1显影,泳道2用抗 N'MASP-2显影。泳道3是与人血清在37℃温育,然后用抗 C4抗体显影。泳道4中,印迹预先与丝氨酸蛋白酶抑制剂温育,而且与血清的温育也含有抑制剂。MASP-1显示较MASP-2更高的Mr,这是由于糖基化作用¹⁷
- 25 和多肽链长9个氨基酸。

- 我们的结果强调通过固有免疫系统的MBLectin途径补体激活和通过经典途径补体激活之间的相似性(图5)。仅在脊椎动物发现通过经典途径的激活作用与特异性免疫应答有关,而MBLectin途径和替代途径依赖固有的对外来生物体的识别,因此可能居先于特异性免疫系统的演化。所有途径集中于激活中体(central component)C3成为C3b,后者共价结合到微生物表面并介导补体的效应子功能。
- 30

在经典途径和MBLectin途径中,起始分子复合物由寡聚配体-结合组分

(分别为MBL或C1q)组成, 其与配体反应, 激活两个相关的丝氨酸蛋白酶(分别为MASP-1和MASP-2或者C1r和C1s)。

参考文献

- 5 1) Law, S. K. A. & Reid, K. B. M. Complement, 2. ed. (Ed. Male, D.) 1-88
(In Focus, IRL Press, Oxford, 1996).
- 2) Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T. & Yamashina, I. Serum
lectin with known structure activates complement through the classical pathway.
J. Biol. Chem. 262,7451-7454 (1987).
- 10 3) Kawasaki, T., Etoh, R. & Yamashina, I. Isolation and characterization of a
mannanbinding protein from rabbit liver. Biochem. Biophys. Res. Commun.
81,1018-1024 (1978).
- 4) Matsushita, M. & Fujita, T. 4) Activation of the classical complement
pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine
15 protease J. Exp. Med. 176,1497-1502 (1992).
- 5) Ji, Y-H. et al Activation of the C4 and C2 components of complement by
a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor J. Immunol.
150,571-578 (1993).
- 6) Turner, M. W. Mannose-binding lectin : the pluripotent molecule of the
20 innate immune system. Immunol. Today, 17,532-540 (1996).
- 7) Kawasaki, N., Kawasaki, T. & Yamashina, I. A serum lectin
(mannan-binding-protein) has complement-dependent bactericidal activity. J.
Biochem. 106,483-489 (1989).
- 8) Kuhlman, M., Joiner, K. & Ezekowitz, R. A. B. The human
25 mannose-binding protein functions as an opsonin. J. Exp. Med. 169,1733-1745
(1989).
- 9) Sumiya, M. et al Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient
children. Lancet 337,1569-1570 (1991).
- 10) Lipscombe, R. J. et al High frequencies in African and non-African
30 populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. Hum.
Mol. Genet. 1, 709-715 (1992).
- 11) Madsen H. O. et al A new frequent allele is the missing link in the

structural polymorphism of the human mannan-binding-protein. Immunogenetics 40,37-44 (1994).

- 12) Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R. J. & Turner, M. W. Association of low levels of mannan-binding-protein with a common defect of opsonisation. 5 Lancet ii, 1236-1239 (1989).

13) Garred, P., Madsen, H. O., Hofmann, B. & Svejgaard, A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. Lancet 346, 941-943 (1995).

- 14) Summerfield, J. A. et al Mannose binding protein gene mutations 10 associated with unusual and severe infections in adults. Lancet 345,886-889 (1995).

15) Nielsen, S. L., Andersen, P. L., Koch, C., Jensenius, J. C. & Thiel, S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. Clin. Exp. Immunol. 100,219-222 (1995).

- 16) Garred, P., Madsen, H. O., Balslev, U., Hofmann, B., Pedersen, C., 15 Gerstoft, J. and

Svejgaard, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. Lancet 349,236-240 (1997).

- 17) Malhotra, R. Wormald, M. R., Rudd, P. M., Fischer, P. B., Dwek, R. A. 20 and Sim, R. B.

Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nature Med. 1,237-243 (1995).

- 18) Kilpatrick, D. C., Bevan, B. H. and Liston, W. A. Association between 25 mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. Mol. Hum. Reprod. 1,2501-2505 (1995).

19) Davies, E. J., Snowden, N., Hillarby, M. C., Carthy, D. Grennan, D. M., Thomson, W. and Ollier, W. E. R. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 38,110-114 (1995).

- 20) Jensenius, J. C. mannan-binding lectin (MBL): From investigations on 30 fish and chickens to substitution therapy in an infant with severe infections. Immunology, 86, Suppl. 1,100, abstract (1995).

- 21) Garred, P., Madsen, H. O., Kurtzhals, J. A., et al. Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentrations of mannan binding protein in Eskimos but not in black Africans. *Eur. J. Immunogenet.* 19,403-412 (1992).
- 5 22) Thiel, S., Jensen, T. V., Laursen, S. B., Willis, A. and Jensenius, J. C. Identification of a new mannan binding protein associated serine protease (MASP-2). *Immunology* 86, Suppl. 1,101 (1995).
- 23) Thiel, S., Jensen, T. V., Laursen, S. B., Willis, A., Reid, K. B. M., Hansen, S. and Jensenius, J. C. Identification of a new mannan – binding lectin associated serine protease (MASP-2). *Mol. immune.*, 33, Suppl. 1,91 (1996).
- 10 24) Jensen, T. V., Stover, C., Pulsen, K., Laursen, S. B., Eggleton, P., Reid, K. B. M., Willis, A., Schwaeble, W., Lu, J., Holmskov, U., Jensenius, J. C. and Thiel, S. Cloning of cDNA encoding a human MASP-like protein (MASDP-2). *Mol. immune.*, 33, Suppl. 1,81 (1996).
- 15 25) Baatrup, G., Thiel, S., Isager, H., Svehag, S. E. & Jensenius, J. C. Demonstration in human plasma of a lectin activity analogous to that of bovine conglutinin. *Scand. J. Immunol.* 26, 355-361 (1987).
- 26) Jensenius, J. C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. & Koch, C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods.* 46, 63-66 (1981).
- 20 27) Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose binding protein. *Int. Immunol.* 6,665-669 (1994).
- 28) Endo, Y., Sato, T., Matsushita, M. & Fujita, T. Exon structure of the gene encoding the human mannose-binding protein-associated serine protease light chain: comparison with complement C1 r and C1s genes. *Int. Immunol.* 9,1355-1358 (1996).
- 25 29) Tan, S. M., Chung, M. C. M., Kon, O. L., Thiel, S. Lee, S. H. & Lu, J. Improvements on the purification of mannan-binding lectin and demonstration of its Ca²⁺-independent association with a C1s-like serine protease. *Biochem. J.* 319, 329-332 (1996).
- 30 30) Barton, G. J. Protein multiple sequence alignment and flexible pattern

matching. *Methods Enzymol.* 183,403-428 (1990).

- 31) Takada, F., Takayama, Y., Hatsuse, H. & Kawakami, M. A new member of the C1s family of complement proteins found in a bactericidal factor, Ra-reactive factor, in human serum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 5 196,1003-1009 (1993).

32) Journat, A. & Tosi, M. Cloning and sequencing of full-length cDNA encoding the precursor of human complement component C1 r. *Biochem. J.* 240,783-787 (1986).

- 33) Lytus, S. P., Kurachi, K., Sakariassen, K. S. & Davie, E. W. Nucleotide 10 sequence of cDNA coding for human complement C1 r. *Biochemistry* 25, 4855-4863 (1986).

34) Mackinnon, C. M., Carter, P. E., Smyth, S. J., Dunbar, B. & Fothergill, J. E. Molecular cloning of cDNA for human complement component C1s. The complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 169,547-553 (1987).

- 15 35) Tosi, M., Duponchel, C., Meo, T. & Julier, C. Complete cDNA sequence of human complement C1s and close physical linkage of the homologous genes C1s and C1r. *Biochemistry* 26, 8516-8524 (1987).

<110> Nat Immune

<120> MASP-2, 一种补体固定酶及其用途

<130> MASP-2

<140>

<141>

<150> PA 2000 01089

<151> 2001-07-13

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg
35 40

<210> 2

<211> 686

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
 130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
 145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
 165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg
 180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
 195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
 210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
 245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
 260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala His Ala Cys Pro Tyr Pro Met
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln
 325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly

405	410	415
Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro 420 425 430		
Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly 435 440 445		
Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly 450 455 460		
Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr 465 470 475 480		
Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp 485 490 495		
Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala 500 505 510		
Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly 515 520 525		
Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile 530 535 540		
Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser 545 550 555 560		
Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr 565 570 575		
Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile 580 585 590		
Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro 595 600 605		
Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly 610 615 620		
Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu 625 630 635 640		
Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly 645 650 655		
Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val 660 665 670		
Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe 675 680 685		

<210> 3

<211> 671

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln
165 170 175

Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val
195 200 205

Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr
210 215 220

Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His
225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser
245 250 255

Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr
260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala His Ala Cys Pro Tyr Pro
275 280 285

Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile
290 295 300

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu
 305 310 315 320

Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
 325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly
 340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro
 355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
 385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu
 405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly
 420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
 435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
 465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
 485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val
 515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
 530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
 545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
 565 570 575

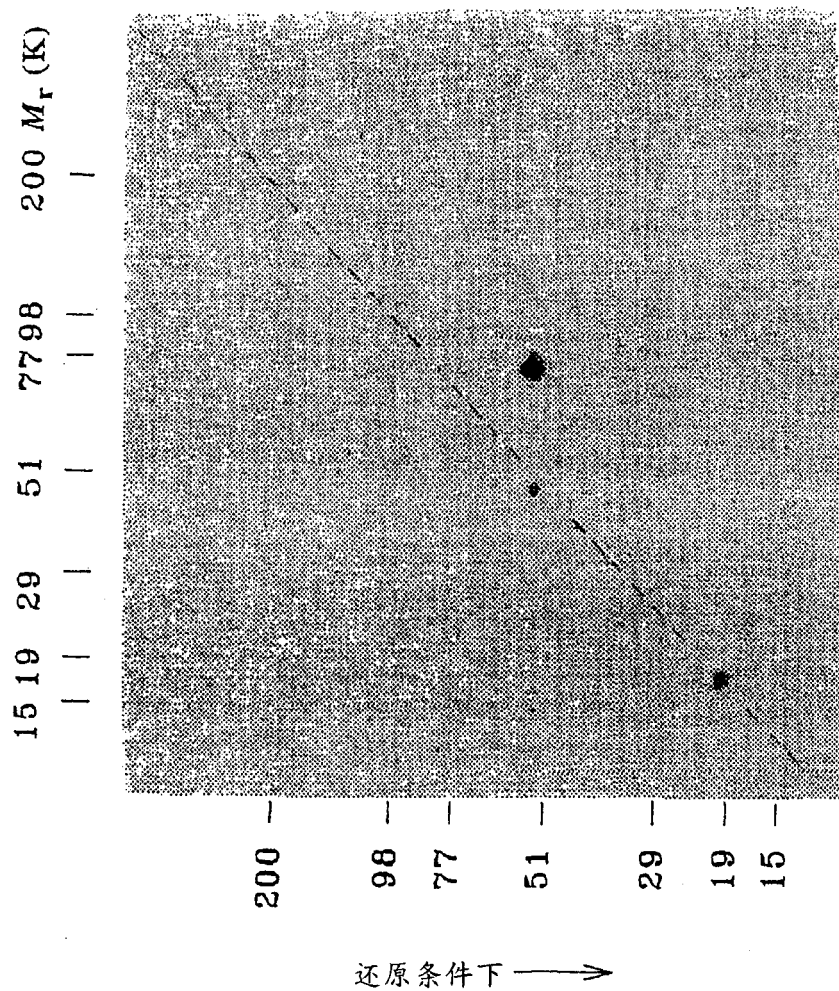
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
 580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
 595 600 605

Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe
610						615					620				
Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Glu	Arg	Trp	Phe	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Trp
625					630					635					640
Gly	Ser	Met	Asn	Cys	Gly	Glu	Ala	Gly	Gln	Tyr	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys
				645					650					655	
Val	Ile	Asn	Tyr	Ile	Pro	Trp	Ile	Glu	Asn	Ile	Ile	Ser	Asp	Phe	
			660					665					670		

图 1b

←—非还原条件下



还原条件下 →

图 1a

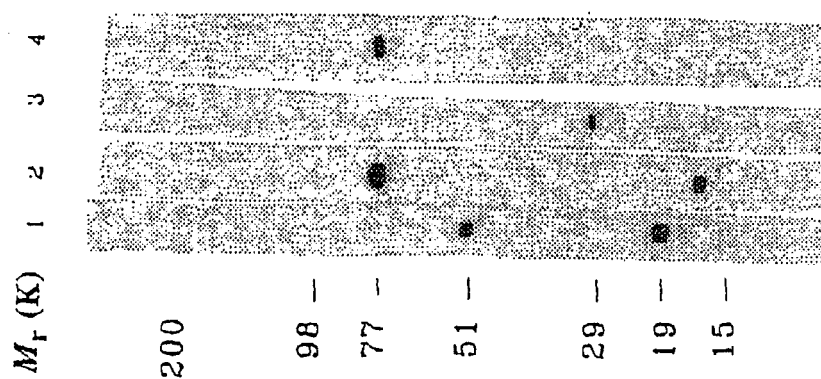


图 2

[illegible]

图 3a

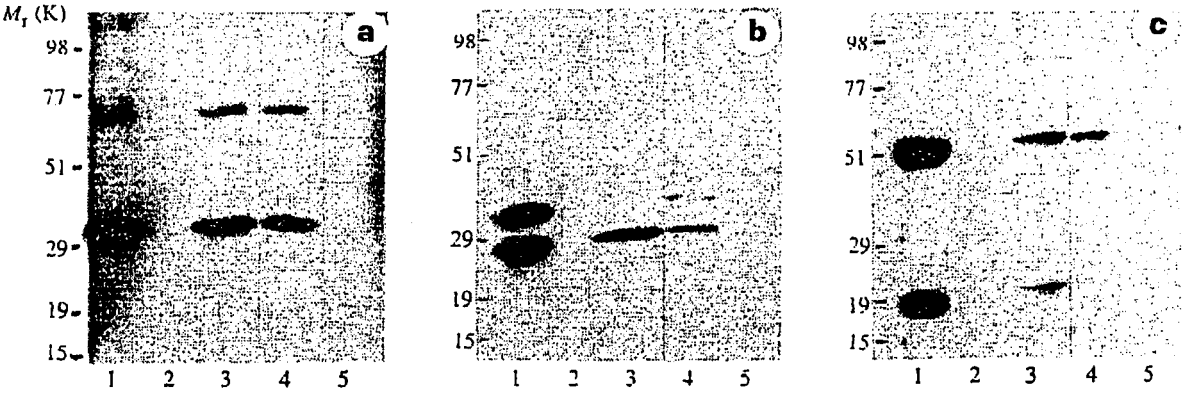


图 3b

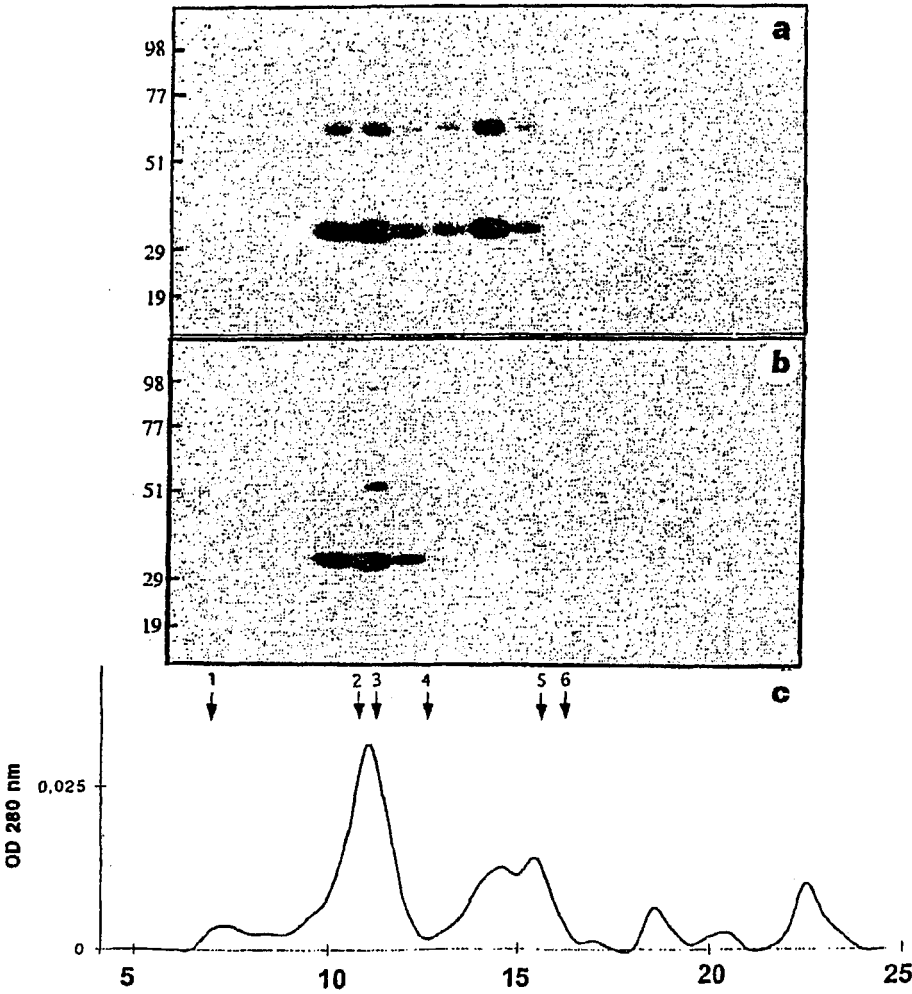


图 4

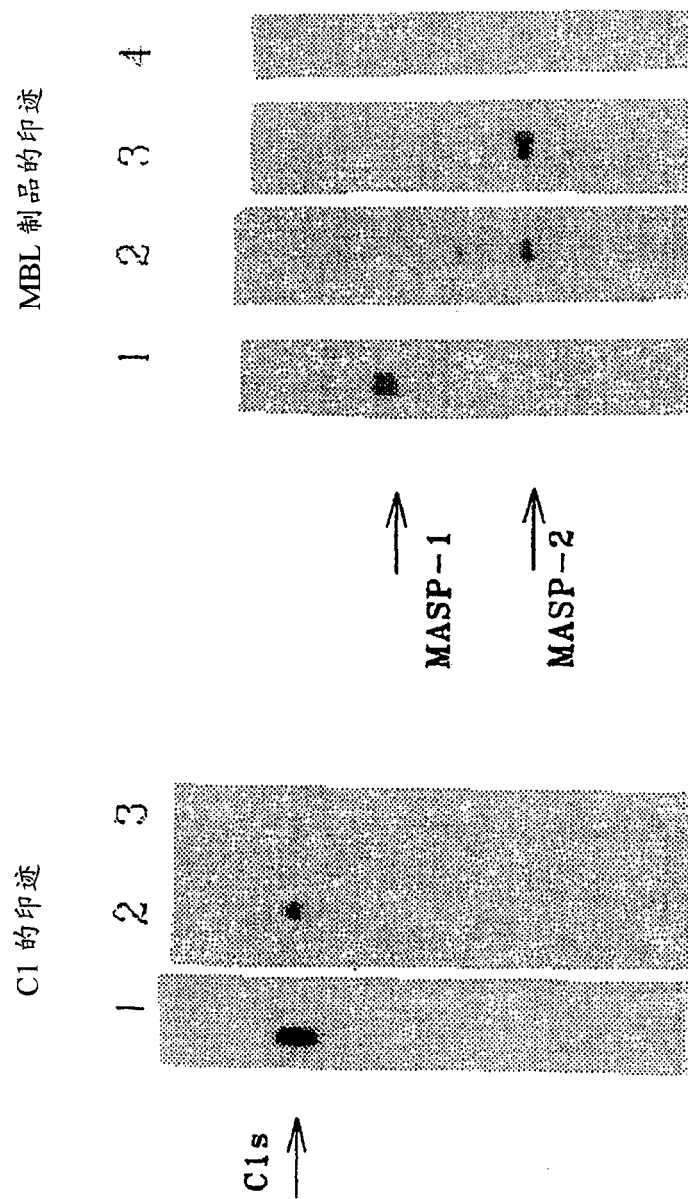


图 5

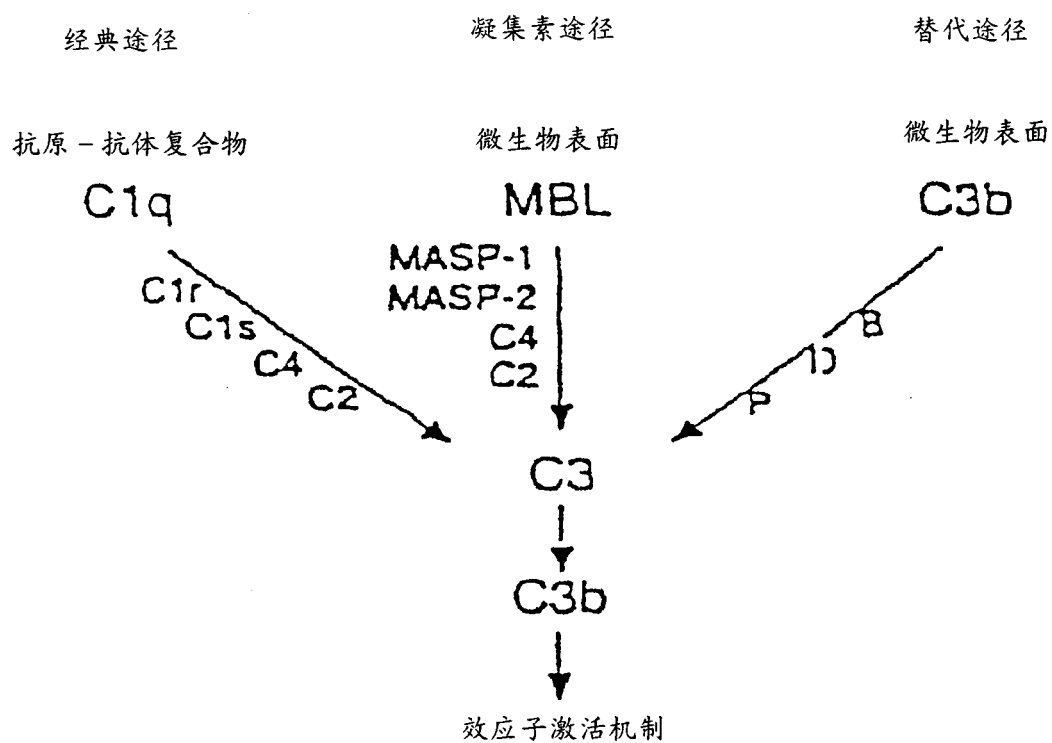


图 6

	+1	
ccgcgtgcaatttcggcgacgaggctggagcgggcaaccatTAGAGGCTGTGACCCCTCCTGGCGCTCTGTGTGCTTCGGTGCAGCCCCCTTAGGCCCGGAAGT	100	
M R L L T L L G C L L E C G S V A T P L Q P K	6	
GCGCTGAACCTGTGTTCGGCGCCTGGCATCCCCCGGCTTCCAGGGGAGTATGCCAATCAACAGGAGCGCGCTGGAACCTTGACTGCACCCCCTGGGCTA	200	
W P E P V F G R L A S P G F P G E Y A N D O E R R W T L T A P P G Y	40	
CCTGCTGGCCTCTACTTACCACCACTTCGACCTCGAGCTCTCCCACTCTCGGAGTAGCACTTCGTCAGCTGAGCTCGGGGGCCAAGTGTGCGCCACG	300	
R L R L Y F T H F D L E L S H L C E Y D F V K L S S G A K V L A T	73	
CTGTGCGGCGAGGAGAGCACAGACGAGCGGGCCCCCTGGCAAGGACACTTTCTACTCGCTCGGGCTCGCCCTGGACATTACCTTCCCTCCGACTACT	400	
L C G Q E S T T D T E R A F P G K A D T F Y S L G S C L D I T F R R C G D Y	106	
CCAAAGAGAGCGGTTCACCGGGGTTCCAGGCCCTTCTATCGAGCGGAGCAATTCAGGAGTGCCACAGTGGGCCCCGGGAGAGGCGCCCACTGCGACCAACA	500	
S N E K P F T G F E A F Y A A E D I D E C Q V J P G E A P T C D H H	140	
.CCACAAACCACTTGGGCGGTTTCTACTGCTCCTGCGCGCGAGGCTACGTCCTGCGACGTAACAAGCGTACCTGCTCAGCCCTGTGCTCCGCGCAGGTG	600	
C H N H L G G F Y C S C R A G Y V L H R N X R T C S A L C S G Q V	173	
TTCACCAAGGCTCGGGAGCTCAGCAGCCCTGAATACCCAAGCCGATCCCAAACCTTCCAGTTCGCTTACAGCATCAGCCCTCGAGGAGCGGGCTCA	700	
F T Q R S G G E L S S P E Y P R P Y P K L S S C T Y S I S L E E G F	206	
GTGTCAITCTGCACTTTGTGGAGTCTTTCGATGTGGAGACACACCTGAAAACCTGTGTCTCTCAAGACTTCTCTCAAGATTCAAACAGACAGAGAAGAACA	800	
S V I L D F V E S F D V E T H P E T L C P Y D L K I Q T D R E E H	240	
TGGCCCACTTCTGTGGGAAGACATTGCCCCCAACGAGATTGAACAAAAAGCAACCGGTGACCTTCACTTTGTGCACAGATGAATCAGGAGACCAACACGCC	900	
G P F C G K T L P H R I E T K S N T V T I T F V T D E S G D H T G	273	
TGGAAGATCCACTACAGGACCAAGCGCAGCCCTTGCCCTTATCCGATGGCCCAACCTTAATGGCCACGTTTCACCTGTGCAAGCCCAATACATCTGAAAG	1000	
W K I H Y T S T A A Q P C P Y P M A A F P N G H V S P V Q A K Y I L K	306	
ACAGCTTCTCATCTTTTGGCAGACTGCTATGAGCTTCTGCAAGSTCAGTGGCCCTGAATCTCTTACTGCACTTTGTCAAAAGATGGATCTTGGGA	1100	
D S F S I F C E T G Y E L L Q G H L P L K S F T A V C Q K D G S W D	340	
CCGCGCAATCCCGCGCTGCAGCATTGTTGACTGTGCGCCCTCTCATGATCTACCCAGTGGCGGAGTGGAGTACATCACAGCTCTCGAGTGAACCACTAC	1200	
R P M P A C S I V D C G P P D G A L P S G R V E Y I T G P G T T T Y	373	
AAGCTGTGATTCACTACAGCTGTGAAGAGACCTTCTACACAATGAAAGTGAATGCTGAATATGTGTGTGAGCTGATGCACTTCTGGAAGGACCTCA	1300	
K A V I Q Y S C E E T F Y T M K V N D G K Y V C E A D G F W T S	406	
AAGGAGAAAAATCACTCCAGTCTGTGAGCCCTGTTTGTGGACTATCAGCCCGCAACACAGGAGCGGCTTATATGGAGGGCAAAAGGCAAAACCTGTGA	1400	
K G E K S L P V C E P V C G L S A R T T G G R I Y G G Q K A K P G D	440	
TTTTCTTGGCAAGTCTGTATATTAGGTGGAACCAAGCAGCAGCAGCTGCACTTTTATATGACAACTGGGTCTTAAACAGCTGCTCATGCCGTCTATGACAA	1500	
F P W Q V L I L G G T T A A G A G A L L Y D N W V L T A A A V Y E Q	473	
*AACATGTGCATCGCCCTGGACATTGCAATGGCGACCTTGAAGAGCACTACCTTACATACACAGCTTATACAGAGCTGTTTTATACATGAAG	1600	
X H D A S A L D I R M G T L K R L S P H Y T A C A W S E A V F I H E	506	
GTATACTCATGATGCTGCTTTTGACAAATGACATAGCACTGATTAAATGAATAAACAAAGTTGTAATCAATAGCAACATCAAGCCCTTATGTCTGCCAAG	1700	
G Y T H D A G F D N I A L I X L N N K V V I N S N I T P I C L P R	540	
AAAAGAGCTGAATCTTTATGAGGACAGATGACATTGGAACTGCTCTCGATCGGATTAAACCAAAAGGGGTTTTCTGTGTAAGATCTAATGTATGTC	1800	
K E A E S F M R T D D I G T A S G W G L T Q H G F L A R N L M Y V	573	
GACATACCGATTGTGACCATCAAAATGTACTGTGTCATGAAAGAGCCACCTTATCCAAAGCGGAGCTGTAACCTGCTAACATGCTTTGTGCTGGCTTAG	1900	
D I P I V D H Q K K C T A A Y E X P P Y P R G S V T A N M L C A G L	606	
AAAGTGGCGGCAAGGACAGCTGCAAGAGTCAACCGGAGCGGCACTGCTGTTTCTAGATAGTGAACAACAGAGGTGTTTGTGGGAGCAATAGTGTCTG	2000	
E S G G K D S C R G D G G A L V F L D S E T E R W F V G G I V S W	640	
GGGTTCCATGAATTTGTGGGAAGCAGGTCAATGAGTCTACACAAAAGTTATTAATATATCCCTGATCGAGAACATAATTAGTGAATTTTAACTT	2100	
G S H N C G E A G Q Y G V Y K V I N Y I P H I E N I I S D F *cop	671	
ggcgttctgcagtcgaagattctttcatcttttagaaatgcctgtggaagaacttgcagcgagcttggtctcagaagaccttaccattactctggaagattggca	2200	
gttgtctctgcccccacccccacagatccaggtgagggctgcctcttccaccttgcagtttaactccagccttaccattgactcacaggggacat	2300	
aatacgcagagagtgcagacttatcttttccccccacagctgaatgtcactgtccaatatgatcttattacctaataaagccagctctcttccatattggct	2400	
gttgscattctctgtaaacctgcctgtccatctcttctttttaaacctgtctcttattggaataaaaataaaaaa	2475	

专利名称(译)	MASP - 2, 一种补体固定酶及其用途		
公开(公告)号	CN1449440A	公开(公告)日	2003-10-15
申请号	CN01814642.2	申请日	2001-07-13
[标]发明人	詹斯C詹斯尼厄斯 斯蒂芬蒂尔		
发明人	詹斯·C·詹斯尼厄斯 斯蒂芬·蒂尔		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7052 A61K38/00 A61K38/48 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N C12N9/64 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/57 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/573 C07K2319/42 G01N2333/96433 A61K38/482 C07K2319/21 C12N9/6424 C07K16/40 C12Y304/21104 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18		
优先权	200001089 2000-07-13 DK 200100087 2001-06-01 DK		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基本上纯的甘露聚糖 - 结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶 - 2 (MASP - 2)多肽及其片段, 以及编码该多肽的核酸。而且, 本发明涉及使用基本上纯的、含有衍生自甘露聚糖 - 结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶 - 2(MASP - 2)或其功能性同系物的氨基酸序列的多肽在制备药物组合物以及含有MASP - 2和/或MASP - 2片段的药物组合物中的用途。另外, 本发明涉及MASP - 2抑制剂和含有该抑制剂的药物组合物。本发明也包括检测MASP - 2核酸表达的方法。

