

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504027

(P2004-504027A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7052	A 6 1 K 31/7052	4 B 0 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-512353 (P2002-512353)	(71) 出願人	501442622
(86) (22) 出願日	平成13年7月13日 (2001.7.13)		イエンスニウス、イエンス クリスチャン
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月14日 (2003.1.14)		デンマーク国、デーコー-5230 オー
(86) 国際出願番号	PCT/DK2001/000499		デンセ、フィンセンス アレ 28
(87) 国際公開番号	W02002/006460	(71) 出願人	501442611
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)		ティール、ステフェン
(31) 優先権主張番号	PA 2000 01089		デンマーク国、デーコー-8240 リッ
(32) 優先日	平成12年7月13日 (2000.7.13)		スコウ、ノートフテバイ 11
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00870		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)	(74) 代理人	100092624
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 M A S P - 2、すなわち補体固定酵素及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、実質的に純粋なマンニン - 結合レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2 (M A S P - 2) ポリペプチド及びそのフラグメント、並びにそのようなポリペプチドをコードする核酸に関する。さらに、本発明は、マンナン - 結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2 (M A S P - 2) 由来のアミノ酸配列 (配列番号 2) 又はその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋なポリペプチドの医薬組成物の生成のためへの使用、並びに M A S P - 2 及び / 又は M A S P - 2 フラグメントを含んで成る医薬組成物に関する。さらに、本発明は、M A S P - 2 のインヒビター、及びそのようなインヒビターを含んで成る医薬組成物に関する。M A S P - 2 核酸発現を検出するための方法が本発明に包含される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マンナン - 結合性レクチンに会合したセリンプロテアーゼ - 2 (MASP - 2) 由来のアミノ酸配列 (配列番号 2) 又はその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋なポリペプチドの医薬組成物の生成のためへの使用。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 として同定される配列を含んで成る請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、マンナン結合性レクチン (MBL) と会合することができる請求項 1 記載の使用。 10

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項 1 又は 2 記載の使用。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成る請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、20 kD の分子質量を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 30 ~ 444 を含んで成る請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の使用。 20

【請求項 8】

前記ポリペプチドが、52 kD の分子質量を有する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 138 ~ 296 を含んで成る請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、セリンプロテアーゼ活性を有する請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の使用。 30

【請求項 11】

前記ポリペプチドが、MBL 補体経路機能についてインビトロアッセイにおいてMASP - 2 活性を阻害できる請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 12】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸 15 ~ 671 を含んで成る請求項 10 又は 11 記載の使用。

【請求項 13】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 16 ~ 296 を含んで成る請求項 10 又は 11 記載の使用。 40

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸 30 ~ 296 を含んで成る請求項 10 又は 11 記載の使用。

【請求項 15】

前記ポリペプチドが、MASP - 2 活性を競争的に阻害できる請求項 1 ~ 14 いずれかに 1 項記載の使用。

【請求項 16】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のポリペプチドのフラグメントを含んで成り、前記ポリペプチドがMBL / MASP - 2 を複合体化できる競争インヒビターである請求項 15 記載の使用。 50

【請求項 17】

前記ポリペプチドが、配列番号3として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成り、ここで位置8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18又は19での1又は複数のアミノ酸残基がもう1つのアミノ酸残基により位置されている請求項15又は16記載の使用。

【請求項 18】

前記少なくとも2つのアミノ酸残基が置換されている請求項17記載の使用。

【請求項 19】

配列番号3の位置14でのargが、もう1つのアミノ酸により置換されている請求項17記載の使用。

10

【請求項 20】

配列番号3の位置14でのargが、小さな荷電されていないアミノ酸から成る群から選択されたアミノ酸により配置されている請求項17記載の使用。

【請求項 21】

配列番号3の位置14でのargが、gly及びalaから成る群から選択されたアミノ酸により置換されている請求項17記載の使用。

【請求項 22】

前記医薬組成物が、感染の処理のためである請求項1～21のいずれか1項記載の使用。

【請求項 23】

前記感染が、微生物種により引き起こされる感染である請求項22記載の使用。

20

【請求項 24】

前記微生物種が、菌類である請求項23記載の使用。

【請求項 25】

前記微生物種が、酵母である請求項23記載の使用。

【請求項 26】

前記微生物種が、細菌である請求項23記載の使用。

【請求項 27】

前記細胞種が、少なくとも1つの抗生物質薬剤に対して耐性である請求項26記載の使用。

【請求項 28】

前記細菌種が、多耐性である請求項26記載の使用。

30

【請求項 29】

前記細菌種が、病原性である請求項26記載の使用。

【請求項 30】

前記感染が、ウィルス感染である請求項22記載の使用。

【請求項 31】

前記ウィルスが、レトロウィルスである請求項30記載の使用。

【請求項 32】

前記レトロウィルスが、ヒト免疫欠損ウィルスである請求項31記載の使用。

【請求項 33】

前記医薬組成物がさらに、少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) サブユニット、又は前記少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) サブユニットを含んで成る少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) オリゴマーを含んで成る請求項1記載の使用。

40

【請求項 34】

少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) サブユニット、又は前記少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) サブユニットを含んで成る少なくとも1つのマンナン - 結合性レクチン (MBL) オリゴマーの、キットの部品を得るための薬剤の製造のためへの使用をさらに含んで成る請求項1記載の使用。

【請求項 35】

50

前記オリゴマーが、MBLのテトラマー、ペンタマー及びノ又はヘキサマーから成るオリゴマーの群から好ましくは選択される請求項33又は34記載の使用。

【請求項36】

前記医薬組成物が、500 ng/ml以下の血清レベルのMBLによる、個人における感染の処理のためである請求項33～35のいずれか1項記載の使用。

【請求項37】

前記医薬組成物が、100 ng/ml以下の血清レベルのMBLによる、個人における感染の処理のためである請求項33～35のいずれか1項記載の使用。

【請求項38】

前記医薬組成物が、50 ng/ml以下の血清レベルのMBLによる、個人における感染の処理のためである請求項33～35のいずれか1項記載の使用。 10

【請求項39】

配列番号1として同定される配列又はその機能的相同体を含むポリペプチド。

【請求項40】

前記ポリペプチドが、20 kDの分子質量を有する請求項39記載のポリペプチド。

【請求項41】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸30～444を含んで成る請求項39記載のポリペプチド。

【請求項42】

前記ポリペプチドが、52 kDの分子質量を有する請求項39記載のポリペプチド。 20

【請求項43】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸138～296を含んで成る請求項39記載のポリペプチド。

【請求項44】

前記ポリペプチドが、セリンプロテアーゼ活性を有する請求項39記載のポリペプチド。

【請求項45】

前記ポリペプチドが、配列番号3のアミノ酸15～671を含んで成る請求項39記載のポリペプチド。

【請求項46】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸16～296を含んで成る請求項39記載のポリペプチド。 30

【請求項47】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸30～296を含んで成る請求項39記載のポリペプチド。

【請求項48】

前記ポリペプチドが、MBL補体経路機能についてインビトロアッセイにおいてMASP-2活性を阻害できる請求項39記載のポリペプチド。

【請求項49】

前記ポリペプチドが、MASP-2セリンプロテアーゼ活性を競争的に阻害できる請求項39記載のポリペプチド。 40

【請求項50】

配列番号3により同定されるような配列又はその機能的相同体を含んで成り、前記ポリペプチドがMBL/MASP-2の複合体化の競争インヒビターである請求項39記載のポリペプチド。

【請求項51】

配列番号3として同定される配列又はその機能的相同体を含んで成り、ここで位置8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18又は19での1又は複数のアミノ酸残基がもう1つのアミノ酸残基により位置されている請求項39記載のポリペプチド。

【請求項52】

前記少なくとも2つのアミノ酸残基が置換されている請求項51記載のポリペプチド。

【請求項53】

配列番号3の位置14でのargが、もう1つのアミノ酸により置換されている請求項51記載のポリペプチド。

【請求項54】

配列番号3の位置14でのargが、小さな荷電されていないアミノ酸から成る群から選択されたアミノ酸により配置されている請求項51記載のポリペプチド。

【請求項55】

配列番号3の位置14でのargが、gly及びalaから成る群から選択されたアミノ酸により置換されている請求項51記載のポリペプチド。

10

【請求項56】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項39又は55記載のポリペプチド。

【請求項57】

請求項39, 41, 43, 45, 46, 47及び50～55のいずれか1項記載のポリペプチド配列に対して少なくとも85%同一である配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子。

【請求項58】

請求項57記載の核酸分子を含んで成る核酸ベクター。

【請求項59】

20

前記ベクターが発現ベクターである請求項58記載のベクター。

【請求項60】

調節要素をさらに含んで成る請求項58記載のベクター。

【請求項61】

MASP-2の活性を競争阻害できる化合物又はその機能的相同体の薬剤の調製のためへの使用。

【請求項62】

前記化合物が、MASP-2の活性を競争阻害することができる請求項61記載の使用。

【請求項63】

前記化合物が、請求項49～55のいずれか1項記載のポリペプチドである請求項61記載の使用。

30

【請求項64】

前記化合物が、MASP-2と会合できるマンナン-結合性レクチン(MBL)のフラグメントである請求項61記載の使用。

【請求項65】

前記化合物が、抗体生成動物にMASP-2ポリペプチドを投与することによって生成される抗体である請求項61記載の使用。

【請求項66】

前記化合物が、MASP-2に対して選択的に結合する抗体である。請求項61記載の使用。

40

【請求項67】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項65又は66記載の使用。

【請求項68】

前記抗体が、検出マーカーを含んで成る化合物にカップリングされる請求項65又は66記載の使用。

【請求項69】

マンナン-結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)由来のアミノ酸配列(配列番号2)又はその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋な医薬組成物に生成のためのポリペプチドを含んで成る医薬組成物。

【請求項70】

50

前記ポリペプチドが、配列番号 3 として同定される配列を含んで成る請求項 6 9 記載の医薬組成物。

【請求項 7 1】

前記ポリペプチドが、マンナン結合性レクチン (M B L) と会合することができる請求項 6 9 記載の医薬組成物。

【請求項 7 2】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項 6 9 記載の医薬組成物。

【請求項 7 3】

請求項 3 9 ~ 5 5 のいずれか 1 項記載のポリペプチドを含んで成る請求項 6 9 記載の医薬組成物。

10

【請求項 7 4】

マンニン - 結合レクチン会合セリンプロテアーゼ 2 (M A S P - 2) の検出方法であって、

(a) 生物学的サンプルを獲得し；

(b) 前記生物学的サンプルと、M A S P - 2 を特異的に結合する M A S P - 2 ポリペプチド特異的結合パートナーとを接触せしめ；そして

(c) 存在するなら、前記サンプルにおけるマンニン - 結合レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2 の存在の表示として、前記複合体を検出することを含んで成る方法。

【請求項 7 5】

前記特異的結合パートナーが抗体である請求項 7 4 記載の方法。

20

【請求項 7 6】

M A S P - 2 補体固定活性についてのアッセイを含んで成る M A S P - 2 の検出方法。

【請求項 7 7】

生物学的サンプルにおける M A S P - 2 又は M A S P - 2 活性の定量アッセイのための請求項 7 4 又は 7 6 記載の方法。

【請求項 7 8】

M A S P - 2 核酸発現の検出方法であって、請求項 5 7 記載の核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする核酸プローブと共にサンプルを混合することによって、M A S P - 2 ポリペプチドをコードする配列を有する R N A を検出することを含んで成る方法。

30

【請求項 7 9】

請求項 3 9 ~ 4 2 及び 4 5 ~ 4 7 のいずれか 1 項記載のペプチドを、患者に投与することによって、M A S P - 2 を欠失する患者を処理するための方法。

【請求項 8 0】

請求項 5 7 記載の核酸を患者に投与することによって、M A S P - 2 を欠失する患者を処理するための方法。

【請求項 8 1】

M A S P - 2 の発現又は活性を阻害する化合物を、対象に投与することによって、M A S P - 2 の活性を阻害するための方法。

【請求項 8 2】

前記化合物が、M A S P - 2 アンチセンス核酸配列である請求項 8 1 記載の方法。

40

【請求項 8 3】

M B L 及び M A S P - 2 の複合体化を阻害する化合物を投与することを含んで成る請求項 8 1 記載の方法。

【請求項 8 4】

M A S P - 2 をコードする核酸配列における多形現象についてのアッセイ。

【請求項 8 5】

サンプルにおける M A S P - 2 コードを核酸の存在を検出するための方法であって、緊縮条件下で M A S P - 2 コード核酸との複合体を形成できる少なくとも 1 つの核酸プローブとサンプルとを混合し、そしてプローブがサンプル核酸に結合されるかどうかを決定する

50

ことを含んで成る方法。

【請求項 86】

緊縮条件下でMASP-2コード核酸と複合体を形成できる核酸プローブ。

【請求項 87】

MASP-2又はその前駆体を含んで成るポリペプチド配列における多形現象についてのアッセイ。

【請求項 88】

MASP-2の異常発現に関連する障害の診断方法であって、患者から生物学的サンプルを獲得し、そして前記生物学的サンプルにおけるMASP-2発現を測定することを含んで成り、ここで対照に比較して、前記生物学的サンプルにおける高められた又は低められたMASP-2発現が、前記患者がMASP-2の異常発現に関連する障害を有することを示す方法。 10

【請求項 89】

MASP-2の異常活性に関連する障害の診断方法であって、患者から生物学的サンプルを獲得し、そして前記生物学的サンプルにおけるMASP-2活性を測定することを含んで成り、ここで対照に比較して、前記生物学的サンプルにおける高められた又は低められたMASP-2活性が、前記患者がMASP-2の異常発現に関連する障害を有することを示す方法。

【請求項 90】

活性MBL-複合体化MASPについてのアッセイ方法であって、アッセイされるべきサンプルを供給し、そして従来の補体固定経路の活性化を効果的に低めるのに十分であるが、MBL-複合体化MASPの活性を実質的に妨げないほど高いイオン強度の存在下でアッセイを行うことによって、従来の補体固定経路の活性化に起因するいずれかの人工産物を実質的に低めることを含んで成る方法。 20

【請求項 91】

MASP-2活性についてのアッセイを含んで成る、MASP-2の活性の決定方法であって、

- MBL/MASP-2複合体を含んで成るサンプルを、固相に適用し、結合された複合体を獲得し、

- 少なくとも1つの補体因子を、前記複合体に適用し、 30

- 切断された補体因子の量を検出し、

- 前記切断された補体因子の量を、前記MASP-2の量と対比し、そして

- MASP-2の活性を決定する段階を含んで成る方法。

【請求項 92】

前記固相が、マンナン被膜である請求項91記載の方法。

【請求項 93】

前記少なくとも1つの補体因子が、MBL/MASP-2複合体により切断できる補体因子である請求項91又は92記載の方法。

【請求項 94】

前記少なくとも1つの補体因子が、C3、C4及びC5、好ましくはC4から選択される請求項91～93のいずれか1項記載の方法。 40

【請求項 95】

前記切断された補体因子が、前記補体因子に対して向けられた抗体により検出される請求項91～94のいずれか1項記載の方法。

【請求項 96】

前記従来の補体経路の活性化が阻害される請求項91～95のいずれか1項記載の方法。

【請求項 97】

前記活性化が、高いイオン強度でアッセイを行うことによって阻害される請求項96記載の方法。

【請求項 98】

前記塩濃度が、0.2 M以上、例えば0.3 M～1.0 M、例えば0.5 M～5 M、例えば0.7 M～2 M、例えば0.9 M～2 M、例えば約1.0 Mである請求項97記載の方法。

【請求項99】

前記塩が、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaI, KCl, MgI₂, CaI₂, NaBr, KBr, MgBr₂, CaBr₂, Na₂S₂O₃, (NH₄)₂SO₄ 及びNH₄HCO₃ から選択される請求項98記載の方法。

【請求項100】

生物学的サンプルにおけるMASP-2又はMASP-2活性の定量的アッセイのためである請求項91～99のいずれか1項記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野：

本発明は、マンナン結合性タンパク質とも呼ばれる、マンナン-結合性レクチン(MBL)を包含する補体固定化のための生来の経路の一般的分野に関する。

【0002】

発明の背景：

補体システムは、先天性及び適応性免疫防御の機能にとって重要な複雑に整列した酵素及び非酵素タンパク質を含んで成る(1)。最近まで、次の2種の活性化形式、すなわち抗体-抗原複合体により開始される従来の経路及び微生物の表面上の一定の構造物により開始されるもう1つの経路が知られている。補体活性化の第3の新規抗体-無関係経路が記載されている(2)。この経路は、マンナン-結合性レクチン(MBL、マンナン-結合タンパク質、NBPとして最初に記載されている；Ezekowitz, アメリカ特許第5,270,199号を参照のこと)が炭水化物に結合する場合に開始される。

20

【0003】

MBLは構造的に、補体の成分C1のC1q副成分に関連し、そしてMBLは従来の経路のC1r及びC1s成分に類似する、MASP(4)又はp100(5)と称する会合されるセリンプロテアーゼを通して補体システムを活性化するとされる。この新規補体活性化経路は、MBLectin経路と呼ばれる。この経路についての推定される機構によれば、MBLは、広範囲の種類の微生物、例えば細菌、酵母、寄生原生動物及びウィルスの表面上に見出される特定の炭水化物構造体に結合し(6)、そしてその抗微生物活性は、末端の溶菌性補体経路成分(7)又は促進性ファゴサイトーシス(8)の活性化に起因する。

30

【0004】

報告によれば、血漿におけるMBLのレベルが一般的に決定され得る(9, 10, 11)。MBL欠失は、子供(12, 13)及びたぶん、成人(13, 14)において種々の微生物による時折の感染に対する感受性に関連している。最近の情報は、HIV感染及びAIDSの進行に続いてのより急速な死とMBL欠失とを関連づけている(15, 16)。MBLは、リウマチ様関節炎患者に高濃度で見出され、そして次に、補体を活性化する、IgG(GO)のガラクトシル形に結合する(17)。MBL欠失はまた、再発性自然流産(18)の素因、及びまた全身性エリテマトーデス(19)の進行の素因と関連している。

40

【0005】

第1の臨床学的再構成試験においては、再発性感染を有するMBL-欠失少女は、精製されたMBLによる感染により明らかに治療された(20)。MBLに関する最近の再考に関しては、文献6を参照のこと。

MBL-欠失に関連する比較的高い頻度のMBL突然変異が研究されたすべての集団に報告されている。この観察は、MBLが、ある場合、標的組織への接近を得るために、MBLを利用する一定の細胞内感染剤に対して個人をより敏感にする仮説を導いている(21)。MBLは補体システムの非常に強力な活性化剤であるので、微生物炭水化物又は内毒

50

素を通しての不適當な活性化は損傷性炎症応答を導くことができる(10)。従って、集団の全体的な生存性は、広い個々の範囲のMBL濃度から有益であり得る。

【0006】

MASP-1(MBP-会合セリンプロテアーゼ、MASP)は、トリプシン及びトリプシン様セリンプロテアーゼに見出されるタイプのヒスチジンループ構造を有するが、補体経路のC1r及びC1sに対して構造的に類似するセリンプロテアーゼである。19個のアミノ酸の推定上のリーダーペプチド、続いて、成熟ペプチドを形成することが推定される680個のアミノ酸残基をコードする、MASP-1コードのcDNAクローンが報告されている。

摘要は、MASP-2(22)と称する第2MASPの存在を報告している。

10

【0007】

発明の要約:

本発明は、マンナン-結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)由来のアミノ酸配列(配列番号2)又はその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋なポリペプチドの医薬組成物の生成のためへの使用に関する。

本発明は、マンナン-結合性レクチン(MBL)会合セリンプロテアーゼ(MASP-2)の単離及び特徴化に関する。MASP-2は、前に報告されたMASP(MASP-1)及び2種のC1q-会合セリンプロテアーゼ、すなわちC1r及びC1sとのいくつかの相同性を示す。MBLは単独で、補体活性化の機能的MBLectin経路を提供しない。

20

【0008】

本発明者は、MASP-2をコードするcDNAをクローン化し、そして配列決定した。さらに、本発明者は、抗-MASP-2抗体を生成し、そして体液又は組織抽出物におけるMASP-2の評価についてのアッセイを構成した。さらに、本発明者は、MBL/MASP複合体の一部として、又はMBLにより会合されない遊離MASPとして存在する場合、血清又は血漿におけるMASP-2活性の決定についての定量アッセイを構成した。

【0009】

従って、本発明の1つの観点は、実質的に純粋なマンナン-結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)ポリペプチド及びそのようなポリペプチドをコードする核酸を特徴とする。好ましくは、MASP-2ポリペプチドは、MBLectin補体経路機能についてのインビトロアッセイ、例えば下記に記載されるアッセイシステムの1つにおける1又は複数のMASP-2機能、例えばマンナン-結合性レクチン(MBL)と会合できるその機能、セリンプロテアーゼ活性、又はMASP-2活性を保持する。本発明のいくつかのMASP-2ポリペプチド、例えば結合アッセイに使用されるそれらのポリペプチドは、アッセイにおけるそれらの存在の検出及び/又は定量化を可能にするために、ラベルに結合され得る。適切なラベルは、シグナル(例えば、可視吸光性)を生成する酵素、蛍光団、放射性核種、等を包含する。

30

【0010】

他のMASP-2ポリペプチドは、上記MASP-2活性の1つを競争的に阻害でき、そしてそれにより、MASP-2機能の評価において有用である。他のMASP-2ポリペプチドは、下記のように、抗体を生成するための有用な抗原又はハプテンである。MASP-2活性を競争的に阻害する化合物がまた特徴づけられる。好ましくは、そのような化合物は、MASP-2又はMASP-2のフラグメントのセリンプロテアーゼ活性を阻害することにより作用する。そのような化合物は、MBLectin経路による補体活性化に対して決定的なMBL-MASP-2相互作用を競争的に阻害するMBL又はMASP-2のフラグメント、及びMASP-2による補体因子C4及びC2の触媒分解を阻害する化合物、例えばペプチドフラグメントを包含することができる。

40

【0011】

本発明のこの観点に従っての特定のポリペプチドは、a)20Kの分子質量を有し、そし

50

て配列番号 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 A P P G Y R] として同定される配列を含むポリペプチド ; b) 5 2 K の分子質量を有し、そして配列番号 1 として同定される配列を含むポリペプチド ; c) 図 6 (配列番号 2) の完全アミノ酸配列を有するポリペプチドを包含する。

【 0 0 1 2 】

本発明のもう 1 つの観点は、配列番号 2 の配列に対して少なくとも 8 5 % 同一である配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子を包含する。

本発明はまた、上記マンナン - 結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2 (M A S P - 2) プロペプチドをコードする単離された核酸配列を特徴とする。そのような核酸配列は、核酸ベクター (例えば、発現システムにおいて組換え核酸の発現を可能にする調節核酸要素を有するそれらを包含する発現ベクター) に含まれ得る。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、M A S P - 2 に選択的に結合する抗体を特徴とする。そのような抗体は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体技法を包含する良く知られている技法のいずれかにより製造され得る。抗体は、M A S P - 2 を検出するために、アッセイにおいて使用され得るよう、検出マーカーを含んで成る化合物にカップリングされ得る。

【 0 0 1 4 】

ポリペプチド又は抗体は、医薬組成物中に配合され、そして下記のようにして、治療剤として投与され得る。

本発明はまた、マンナン - 結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2 (M A S P - 2) の検出方法を特徴とする。前記方法は、生物学的サンプルを獲得し、前記サンプルと M A S P - 2 ポリペプチド特異的パートナーと接触せしめ、そして存在するなら、前記結合された複合体を、生物学的サンプルにおける M A S P - 2 の存在の表示として検出することを含んで成る。アッセイに使用される結合パートナーは抗体であり得るか、又は M A S P - 2 についてのアッセイは補体固定活性について試験することができる。M A S P - 2 についてのそれらのアッセイはまた、生物学的サンプルにおける M A S P - 2 又は M A S P - 2 活性の定量アッセイのために使用され得る。結合パートナーの 1 つは、M B K に対して特異的であり得、従って M B L / M A S P - 2 複合体の検出を可能にする。

【 0 0 1 5 】

M A S P - 2 核酸発現を検出するための方法が、本発明に包含される。それらの方法は、M A S P - 2 のすべて又はそのフラグメントをコードする核酸配列に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする核酸プローブと共にサンプルを混合することによって、M A S P - 2 ポリペプチドをコードする配列を有する R N A を検出することを含んで成る。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、M A S P - 2 又は M A S P - 2 活性を欠失する患者を処理するための方法を特徴とする。これは、M A S P - 2 ポリペプチド又は M A S P - 2 をコードする核酸を患者に投与することによって達成される。時々、M A S P - 2 活性を阻害することが所望されるので、本発明は、M A S P - 2 の発現又は活性を阻害する化合物を患者に投与することによって、M A S P - 2 の活性を阻害するための方法を包含する。M A S P - 2 活性の阻害はまた、M A S P - 2 アンチセンス核酸配列を投与することによって達成され得る。

【 0 0 1 7 】

本発明は、M A S P - 2 をコードする核酸配列における多形現象についてのアッセイを特徴とする。サンプルにおける M A S P - 2 コードの核酸の存在を検出するための方法が請求されている。例として、前記方法は、緊縮条件下で M A S P - 2 コード核酸との複合体を形成できる少なくとも 1 つの核酸プローブとサンプルとを混合し、そしてプローブがサンプル核酸に結合されるかどうかを決定することを包含する。従って、本発明は、M A S P - 2 コードの核酸を有する複合体を緊縮条件下で形成できる核酸プローブを包含する

10

20

30

40

50

。

【 0 0 1 8 】

本発明は、MASP - 2 又はその前駆体を含んで成るポリペプチド配列での多形現象についてのアッセイを特徴とする。

MASP - 2 アッセイは、種々の疾病、例えば感染、炎症性患者及び再発性自然流産の患者におけるMASP - 2 レベル及びMASP - 2 活性の決定のために有用である。MASP - 2 は、MASP - 2 機能が最適状態に及ばない場合、感染の処理のために有用であり、そしてMASP - 2 活性の阻害は、MBlectin 経路の活性により引き起こされる炎症及び悪影響の調節のために有用である。

【 0 0 1 9 】

“マンナン - 結合性レクチン会合セリンプロテアーゼ - 2”又は“MASP - 2”とは、“マンナン - 結合タンパク質会合セリンプロテアーゼ - 2”又は“マンノース結合タンパク質会合セリンプロテアーゼ”、又は配列番号 2 と実質的な同一性を有するいずれかの他のポリペプチドを意味する。

【 0 0 2 0 】

用語“タンパク質”及び“ポリペプチド”とは、長さ又は後一翻訳修飾（例えば、解糖又はリン酸化）にもかかわらず、アミノ酸のいずれかの鎖を記載するために、本明細書において使用される。従って、用語“MASP - 2 ポリペプチド”は、十分な長さの天然に存在するMASP - 2 タンパク質、及び十分な長さの天然に存在するMASP - 2 ポリペプチド、又は天然に存在するタンパク質の特定のドメイン又は部分に対応する、組換え的に又は合成的に生成されたポリペプチドを包含する。この用語はまた、付加されたアミノ - 末端メチオニン（原核細胞における発現のために有用である）を有する成熟MASP - 2 を包含する。

【 0 0 2 1 】

用語“精製された”とは、本明細書において使用される場合、組換えDNA技法により生成される場合、細胞材料、ウィルス材料又は培養培地を実質的に有さず、又は化学的に合成される場合、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に有さない核酸又はペプチドを言及する。“単離された核酸分子”とは、生物の天然に存在するゲノムにおける配列からいずれかの手段で分離される核酸分子を意味する。従って、用語“単離された核酸分子”とは、天然に存在しない核酸分子、例えば組換えDNA技法により創造された核酸分子を包含する。

【 0 0 2 2 】

用語“核酸分子”とは、RNA 及びDNA、例えばcDNA、ゲノムDNA 及び合成（例えば、化学的に合成された）DNA を包含する。一本鎖である場合、核酸はセンス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。

本発明はまた、MASP - 2 ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、配列番号 2 をコードする配列、例えば図 6 に示されるcDNA 配列のタンパク質のコード部分を有する核酸分子）に対して、好ましくは緊縮条件下でハイブリダイズする核酸分子を包含する。好ましくは、ハイブリダイズする核酸分子は、400 個、より好ましくは200 個のヌクレオチドから成る。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、ハイブリダイズする核酸分子は、MASP - 2 により占有される活性をコードし、例えばそれらはMBL を結合し、そしてMBlectin 補体経路における活性を有し、そしてセリンプロテアーゼとして作用することができる。

【 0 0 2 4 】

本明細書及び特許性請求の範囲を通して、3 文字コード又は1 文字コードが、天然のアミノ酸について使用される。L 又はD 形が特定されていない場合、問題のアミノ酸は天然のL 形（Pure & Appl. Chem. Vol. 56 (5) pp. 595 - 624 (1984) を参照のこと）、又はD 形を有し、その結果、形成されるペプチドは、L 形、D 形のアミノ酸又は混合されたL 形及びD 形の配列から構成され得ることが理解さ

10

20

30

40

50

れるべきである。特にことわらない限り、本発明のポリペプチドのC - 末端アミノ酸は遊離カルボン酸として存在し、そしてポリペプチドのN - 末端アミノ酸は遊離アミノ機を含んで成ることが理解されるべきである。特にことわらない限り、アミノ酸は、天然に存在しても又はしてなくても、いずれかのアミノ酸、例えば α アミノ酸、 β アミノ酸及び/又は γ アミノ酸から選択され得る。従って、前記グループは次のものを含んで成るが、しかしそれらだけには限定されない: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Alb, Nal, Sar, Orn, リシン類似体 DAP 及び DAPA.

【0025】

10

本発明はまた、実質的に純粋な又は単離されたMASP - 2ポリペプチド、好ましくはMASP - 2の種類の機能的ドメイン又はそのフラグメントに対応するそれらのポリペプチドを特徴とする。本発明のポリペプチドは、図6に示されるアミノ酸配列に対して実質的に同一であるアミノ酸配列を包含する。

本発明のポリペプチドはまた、化学的に合成され、組換え技法により合成されるか、又はそれらは、それらが精製の標準の生化学的方法に従って、天然において発現される組織から精製され得る。

【0026】

1又は複数のMASP - 2の生物学的機能又は活性を有する“機能的ポリペプチド”がまた、本発明に包含される。それらの機能又は活性は、本明細書に詳細に記載される。機能的ポリペプチドはまた、それがMASP - 2又はそのフラグメント(特に、決定因子を含むフラグメント)に対して特異的に結合する抗体の生成のための抗原として作用する場合、本発明の範囲内であると思われる。

20

【0027】

機能的ポリペプチドは、本明細書に開示されるそれらのポリペプチドから修飾された一次アミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、それらの修飾は、本明細書に記載されるように、保存性アミノ酸置換から成る。ポリペプチドは、それらの異化を促進するか又は遅延するよう(それらの半減期を高める)企画されたいずれかの態様で置換され得る。

【0028】

用語“機能的相同体”及び“機能的同等物”とは、本明細書においては、交換可能的に使用され、そして本発明の範囲内でお互い類似するものとして理解されるべきである。本発明のポリペプチドの機能的相同体とは、MASP - 2活性又はMASP - 2フラグメントの活性、例えばMASP - 2の競争インヒビターとしての活性を発揮することができるいずれかのポリペプチド配列を含んで成ることを意味する。

30

【0029】

本発明の機能的相同体は、上記で概略されたように、予定されたポリペプチド配列と少なくともいくつかの相同性を共有する、アミノ酸配列を有するポリペプチドを含んで成る。例えば、そのようなポリペプチドは、上記に概略されるように、予定されたポリペプチドと、少なくとも40%、例えば少なくとも約50%相同であり、例えば少なくとも60%相同であり、例えば少なくとも約70%相同であり、例えば少なくとも約75%相同であり、例えば少なくとも約80%相同であり、例えば少なくとも約85%相同であり、例えば少なくとも約90%相同であり、例えば少なくとも92%相同であり、例えば少なくとも94%相同であり、例えば少なくとも95%相同であり、例えば少なくとも96%相同であり、例えば少なくとも97%相同であり、例えば少なくとも98%相同であり、例えば少なくとも99%相同である。

40

【0030】

アミノ酸配列間の相同性は、良く知られたアルゴリズム、例えばBLOSUM30, BLOSUM40, BLOSUM45, BLOSUM50, BLOSUM55, BLOSUM60, BLOSUM62, BLOSUM65, BLOSUM70, BLOSUM75, BLOSUM80, BLOSUM85及びBLOSUM90のい

50

ずれか 1 つのアルゴリズムを用いて計算され得る。

機能的相同性は、いずれか他のアミノ酸による 1 つのアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を含んで成るアミノ配列を含んで成る。例えば、そのような置換は、保存性アミノ酸置換であるか、又は非保存性置換であり得る。

【0031】

保存性アミノ酸置換は、予定されたアミノ酸グループ内の 1 つのアミノ酸の同じグループ内のもう 1 つのアミノ酸による置換であり、ここで予定されたグループ内のアミノ酸は、類似するか又は実質的に類似する特徴を示す。本明細書において適用されるような用語“保存性アミノ酸置換”の意味においては、1 つのアミノ酸が、下記のことを有することによって特徴づけられるアミノ酸のグループ内のもう 1 つのアミノ酸により置換され得る： 10

【0032】

- i) 極性側鎖 (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 及び Cys) ;
- ii) 非極性側鎖 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro 及び Met) ;
- iii) 脂肪族側鎖 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile) ;
- iv) 環状側鎖 (Phe, Tyr, Trp, His, Pro) ;
- v) 芳香族側鎖 (Phe, Tyr, Trp) ;
- vi) 酸性側鎖 (Asp, Glu) ;
- vii) 塩基性側鎖 (Lys, Arg, His) ; 20
- viii) アミド側鎖 (Asn, Gln) ;
- ix) ヒドロキシ側鎖 (Ser, Thr) ;
- x) 硫黄含有側鎖 (Cys, Met) ; 及び
- xi) モノアミノ - ジカルボン酸又はモノアミノ - モノカルボン酸 - モノアミノカルボン酸であるアミノ酸 (Asp, Glu, Asn, Gln) 。

【0033】

非保存性置換は、いずれか他の置換である。機能的相同体の形成を導く非保存性置換は、例えば i) 疎水性、例えば親水性残基、例えば Arg, Lys, Trp 又は Asp, 又は疎水性残基により置換される親水性残基、例えば, Thr, Ser, His, Gln, Asn, Lys, Asp, Glu 又は Trp により置換される疎水性残基 (Val, Ile, Leu, Phe 又は Met) とは実質的に異なり；そして / 又はポリペプチド主鎖配向に対するその効果、例えばもう 1 つの残基による Pro 又は Gly の置換において実質的に異なり；そして / 又は iii) 電荷、例えば正に荷電された残基、例えば Lys, His 又は Arg による、負に荷電された残基、例えば Glu 又は Asp の置換 (及び、逆もまた真である) において実質的に異なり；そして / 又は iv) 立体的容積、例えば大きな残基、例えば His, Trp, Phe 又は Tyr のマイナーな側鎖を有する残基、例えば Ala, Gly 又は Ser による置換 (及び、逆もまた真である) において実質的に異なる。 30

【0034】

次に、本発明の機能的相同体は、1 つよりも多くのそのような置換、例えば 2 個のアミノ酸置換、例えば 3 又は 4 個のアミノ酸置換、例えば 5 又は 6 個のアミノ酸置換、例えば 7 又は 8 個のアミノ酸置換、例えば 10 ~ 15 個のアミノ酸置換、例えば 15 ~ 25 個のアミノ酸置換、例えば 25 ~ 30 個のアミノ酸置換、例えば 30 ~ 40 個のアミノ酸置換、例えば 40 ~ 50 個のアミノ酸置換、例えば 50 ~ 75 個のアミノ酸置換、例えば 75 ~ 100 個のアミノ酸置換、例えば 100 個以上のアミノ酸置換を含んで成る。 40

【0035】

アミノ酸の付加又は欠失は、2 ~ 5 個のアミノ酸、例えば 5 ~ 10 個のアミノ酸、例えば 10 ~ 20 個のアミノ酸、例えば 20 ~ 50 個のアミノ酸の付加又は欠失であり得る。しかしながら、50 個よりも多くのアミノ酸の付加又は欠失、例えば 50 ~ 200 個のアミノ酸の付加もまた、本発明内に包含される。 50

【0036】

いずれかの変異体及びその機能的相同体を包含する本発明のポリペプチドは、1つの態様においては、5個よりも多くのアミノ酸残基、例えば10個よりも多くのアミノ酸残基、例えば20個よりも多くのアミノ酸残基、例えば25個よりも多くのアミノ酸残基、例えば50個よりも多くのアミノ酸残基、例えば75個よりも多くのアミノ酸残基、例えば100個よりも多くのアミノ酸残基、例えば150個よりも多くのアミノ酸残基、例えば200個よりも多くのアミノ酸残基を含んで成ることができる。

【0037】

追加の因子は、本明細書において使用される手段に従って、機能的に相同体を決定する場合に考慮され得る。例えば、機能的相同体は、本発明のポリペプチドに対して特異的である抗血清と会合することができる。

10

さらなる態様においては、本発明は、置換しているアミノ酸の値の $+/-2.5$ 以内、例えば $+/-2.3$ 以内、例えば $+/-2.1$ 以内、例えば $+/-2.0$ 以内、例えば $+/-1.8$ 以内、例えば $+/-1.6$ 以内、例えば $+/-1.5$ 以内、例えば $+/-1.4$ 以内、例えば $+/-1.3$ 以内、例えば $+/-1.2$ 以内、例えば $+/-1.1$ 以内、例えば $+/-1.0$ 以内、例えば $+/-0.9$ 以内、例えば $+/-0.8$ 以内、例えば $+/-0.7$ 以内、例えば $+/-0.6$ 以内、例えば $+/-0.5$ 以内、例えば $+/-0.4$ 以内、例えば $+/-0.3$ 以内、例えば $+/-0.25$ 以内、例えば $+/-0.2$ 以内である親水性又は水治療性指数を有する置換されたアミノ酸を含んで成る機能的同等物に関する。

20

【0038】

タンパク質に対して相互作用性生物学的機能を付与することにおける親水性及び水治療性アミノ酸指数の重要性は、当業界において十分に理解されている(Kyte & Doolittle, 1982, 及びHopp. アメリカ特許第4,554,101号;それぞれ引用により本明細書に組み込まれる)。

【0039】

本明細書において使用されるようなアミノ酸水治療性指数値は次の通りであり得る：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；トレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リシン(-3.9)；及びアルギニン(-4.5)(Kyte & Doolittle, 1982)。

30

【0040】

アミノ酸親水性値は次の通りである：アルギニン(+3.0)；リシン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0, $+/-0.1$)；グルタミン酸(+3.0), $+/-0.1$)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；トレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5, $+/-0.1$)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)(アメリカ特許第4,554,101号)。

40

【0041】

従って、アミノ酸の置換は、1つの態様においては、それらの疎水性及び親水性値、及びアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば電荷、サイズ及び同様のものに基づいて行われ得る。種々の前述の特徴を考慮しての典型的なアミノ酸置換は、当業者に良く知られており、そして次のものを包含する：アルギニン及びリシン；グルタミン酸及びアスパラギン酸；セリン及びトレオニン；グルタミン及びアスパラギン；及びバリン、ロイシン及びイソロイシン。

50

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載されるポリペプチド化合物の他に、立体的に類似する化合物は、ペプチド構造のキー部分を模倣するよう、及びそのような化合物がまた、本発明のポリペプチドと同じ態様で使用され得るよう配合され得る。これは、当業者に知られている設計及び化学的企画の技法により達成され得る。例えば、エステル化及び他のアルキル化が、テトラペプチド構造を模倣するために、例えばジ - アルギニンペプチド主鎖のアミノ末端を修飾するために使用され得る。すべてのそのような立体的に類似する構造体は、本発明の範囲内にあることが理解されるであろう。

【 0 0 4 3 】

N末端アルキル化及びC末端エステル化を有するペプチドはまた、本発明内に包含される。機能的同等物はまた、グリコシル化された及び共有又は凝集性接合体、例えばダイマー又は無関係な化学的成分を含んで成る。そのような機能的同等物は、当業界において知られている手段により、N - 及びC - 末端のいずれか1つ又は両方で、フラグメントに見出される基への官能価の連結により調製される。

【 0 0 4 4 】

従って、機能的同等物は、カルボキシル末端、アルキルアミノ、又はカルボキシル側鎖を含む残基の脂肪族又はアシルエステル又はアミドに結合されるフラグメント、例えばアスパラギン酸残基でのアルキルアミノへの接合体；ヒドロキシル基含有残基のO - アシル誘導体、及びアミノ末端アミノ酸又はアミノ基含有残基のN - アシル誘導体、例えばMet - Leu - Pheを有する接合体を含むことができる。アシル基の誘導体は、アルキル成分(C3 ~ C10の標準アルキルを包含する)(それにより、アルカノイル種を形成する)、及び炭素環式又は複素乾式化合物(それにより、アロイル種を形成する)の群から選択される。

【 0 0 4 5 】

本発明の範囲内の核酸配列の相同体は、類似する生物学的機能を有するRNA及び/又はタンパク質をコードし、そして

a) 少なくとも50%同一であり、例えば少なくとも60%同一であり、例えば少なくとも70%同一であり、例えば少なくとも75%同一であり、例えば少なくとも95%同一であるか、又は
b) 緊縮条件下で、前記核酸配列の相補的鎖にハイブリダイズすることができる核酸配列である。

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用されるような緊縮条件は、例えばSouthern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98: 503 - 517により記載されるようなサザンプロット及びハイブリダイゼーションに関して通常適用されるような緊縮性を示すであろう。そのような目的のためには、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの段階を包含することは、通常の実施である。

【 0 0 4 7 】

そのような段階は通常、6 × SSPE、5%のDenhardt's、0.5%のSDS、50%のホルムアミド、100 g/mlの変性されたサケ精巢DNAを含む溶液(42で18時間のインキュベーション)、次に2 × SSC及び0.5%のSDSを含む洗浄液(室温で及び37で)、及び0.1 × SSC及び0.5%のSDSを含む洗浄液(68で30分間のインキュベーション)を用いて、Sambrookなど., 1989, "Molecular Cloning / A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor)(引用により本明細書に組み込まれる)により記載されるようにして、行われる。

【 0 0 4 8 】

核酸配列の相同体はまた、付加及び/又は欠失を包含する核酸配列を包含する。そのような付加及び/又は欠失は、内在性であり、末端で存在する。付加及び/又は欠失は、1 ~ 5個のヌクレオチド、例えば5 ~ 10個のヌクレオチド、例えば10 ~ 50個のヌクレオ

チド、例えば50～100個のヌクレオチド、例えば少なくとも10～50個のヌクレオチド、例えば50～100個のヌクレオチド、例えば少なくとも100個のヌクレオチドのものであり得る。

【0049】

興味あるポリペプチド又は他の化合物は、それらが天然に存在する組織物とは異なり、そして本明細書に提案される少なくとも1つの使用のために適切である場合、“実質的に純粋”であると言われる。天然に存在する物質に関して、単なるわずかに変更されている調製物は、いくぶん、有用であるが、より典型的には、調製物は、興味ある化合物に関して、少なくとも10重量%（乾量）異なる。好ましくは、調製物は、興味ある化合物に関して、少なくとも60重量%、より好ましくは少なくとも75重量%、及び最も好ましくは、少なくとも90重量%異なる。純度は、いずれかの適切な標準の方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はHPLC分析により測定される。

10

【0050】

ポリペプチド又は核酸分子は、それが対照のポリペプチド又は核酸分子の配列に対して、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%及びより好ましくは少なくとも95%、98%又は99%同一である配列を有する場合、対照のポリペプチド又は核酸分子に対して、“実質的に同一”である。

【0051】

特定のポリペプチドが定義される長さの対照ポリペプチドに対して特定の%同一性を有すると言われる場合、その%同一性は、対照ペプチドに対してである。従って、100個の長さのアミノ酸である対象ポリペプチドに対して50%同一であるペプチドは、対照ポリペプチドの50個の長さのアミノ酸に対して完全に同一である50個のアミノ酸のポリペプチドであり得る。それはまた、その完全な長さにわたって、対照ポリペプチドに対して50%同一である100個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。もちろん、多くの他のポリペプチドが、同じ基準を満たすであろう。

20

【0052】

対照配列に対して100%以下の同一性を有するポリペプチド配列の場合、非同一の位置は好ましくは（但し、必ずしも必要ではないが）、対照配列による保存性置換である。保存性置換は典型的には、次のグループによる置換を包含する：グリシン及びアラニン；バリン、イソロイシン及びロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン及びグルタミン；セリン及びトレオニン；リシン及びアルギニン；及びフェニルアラニン及びチロシン。

30

【0053】

ポリペプチドに関しては、対照ポリペプチド配列の長さは一般的に、少なくとも16個のアミノ酸、好ましくは少なくとも20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも25個のアミノ酸及び最も好ましくは35個のアミノ酸、50個のアミノ酸又は100個のアミノ酸であろう。核酸に関しては、対照核酸配列の長さは一般的に、少なくとも50個、好ましくは少なくとも60個、より好ましくは少なくとも75個、及び最も好ましくは100個又は300個のヌクレオチドであろう。

40

【0054】

配列同一性は、配列分析ソフトウェア（例えば、the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705）及び、そこに特定されるようなデフォルトパラメーターを用いて、測定され得る。

【0055】

本発明の核酸分子は、挿入体の発現を測定するであろう、下記に記載されるようなベクター中に挿入され得る。前記核酸分子及びそれらがコードするポリペプチドは、診断剤又は

50

治療剤として直接的に使用され得るか、又は治療剤又は診断剤として臨床学的に有用である抗体を生成するために使用され得る（ポリペプチドの場合、直接的に、又は核酸分子の場合、間接的に）。従って、本発明の核酸を含むベクター、それらのベクターによりトランスフェクトされた細胞、発現されるポリペプチド、及び完全なポリペプチド又はその抗原性フラグメントのいずれかに対して生成される抗体は、好ましい態様間に存在する。

【0056】

本発明はまた、MASP-2を特異的に結合する抗体、例えばモノクローナル抗体及び構築された抗体を特徴とする。“特異的に結合する”とは、特定の抗原、例えば本発明のMASP-2ポリペプチドを認識し、そしてそれを結語するが、しかしMASP-2を含むサンプル、例えば生物学的サンプルにおける他の分子を実質的に認識も又はそれを結合もしない抗体を意味する。検出可能なマーカーを含んで成る化合物にカップリングされる抗体（又はそのフラグメント）の構造体は、化学的手段を包含するいずれかの技法、又は組換え技法により製造される構造体を包含する。本発明はまた、MASP-2又はその機能的相同体の活性を阻害できる化合物を特徴とする。

10

【0057】

MASP-2の1つの活性は、補体活性化を助けることである。MASP-2のもう1つの活性は、MASP-2のセリンプロテアーゼ活性である。好ましくは、MASP-2の活性を阻害できる化合物は、MASP-2による補体活性化を阻害することができる。低い割合のMASPのみが血清におけるMBLにより会合されることを十分に理解することが重要である。従って、MASP-2活性を阻害できる化合物は、MBLを活性化しないで、MBLと会合し、そしてその結果、活性MASP-MBL複合体の血清を消耗することによって、補体活性化に対して阻害効果を発揮することができる。化合物は、MASP-2のフラグメントであり得、又はそれは、MASP-2の変異体又はそのフラグメントであり得る。さらに、化合物は抗体であり得る。

20

【0058】

本発明はまた、それぞれ、MASP-2の1又は複数の機能又は活性を阻害するか又は増強できるMASP-2のアнтаゴニスト及びアゴニストを特徴とする。適切なアンタゴニストは、小分子（すなわち、約500以下の分子量を有する分子）、大分子（すなわち、約500以上の分子量を有する分子）、MASP-2を結合し、そして“中和する”抗体（下記のような）、1つのタンパク質、例えばMBLに結合するために、生来の形のMASP-2と競争するポリペプチド、及びMASP-2の転写を妨げる核酸分子（例えば、アンチセンス核酸分子及びリボザイム）を包含することができる。MASP-2のアнтаゴニストはまた、小及び大分子、及び“中和”抗体以外の抗体を包含する。

30

【0059】

本発明はまた、MASP-2の発現を高めるか又は低めることができる（例えば、転写又は翻訳に影響を及ぼすことによって）分子を特徴とする。小分子（すなわち、約500以下の分子量を有する分子）、大分子（すなわち、約500以下の分子量を有する分子）、及びMASP-2の発現を阻害するために使用され得る核酸分子（例えば、アンチセンス及びリボザイム分子）、又はそれらの発現を増強するために使用され得る核酸分子（例えば、強いプロモーターシステムの制御下でMASP-2をコードする核酸配列を配置する発現構造体）、並びにMASP-2トランスジーンを発現するトランスジェニック動物もまた、本発明において特徴とされる。

40

【0060】

本発明は、MASP-2の発現又は活性に関連する疾患を処理するための方法を包含する。従って、本発明は、MASP-2の過剰発現又は活性に関連する疾患を処理するための方法を包含する。そのような方法は、MASP-2の発現又は活性を低める化合物を投与することを包含する。本発明はまた、MASP-2の不十分な発現に関連する疾病を処理するための方法を包含する。それらの方法は、MASP-2の発現又は活性を高める化合物を投与することを包含する。

【0061】

50

セリンプロテアーゼ活性を“競争的に阻害する”とは、例えば変更されたMBL又はそのフラグメントの作用が、セリンプロテアーゼ活性を活性化しないで、可逆的に又は不可逆的に、MASP-2ペプチドに結合できることを意味する。逆に言えば、MASP-2のフラグメント、例えばMASP-2のN-末端部分を包含するポリペプチドは、損なわれていないMASP-2の結合を競争的に阻害し、そして従って、MASP-2の活性化を効果的に阻害することができる。

本発明はまた、MASP-2ポリペプチドを検出するための方法の特徴とする。そのような方法は、生物学的サンプルを獲得し；MASP-2を特異的に結合する抗体と前記サンプルとを、特異的結合を可能にする条件下で接触せしめ；そして形成されるいずれかの抗体-MASP-2複合体を検出することを包含する。

10

【0062】

さらに、本発明は、MASP-2の不適切な発現又は活性に関連する疾病の診断評価、分類及び予後のための方法及び組成物を包含する。例えば、本発明の核酸分子は、MASP-2の不適切な発現、又はMASP-2遺伝子における突然変異を検出するための診断用ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。そのような方法は、MASP-2発現のレベルにより細胞を分類するために使用され得る。

他方では、核酸分子は、MASP-2遺伝子における遺伝子突然変異、対立遺伝子変動及び調節欠失の同定のための診断PCR分析のためのプライマーとして使用され得る。本発明はさらに、そのような方法の実施のための診断キットを提供する。

【0063】

20

本発明は、選択された化合物の存在及び不在でMASP-2の発現又は活性を評価することによって、MASP-2の発現又は活性を調節する化合物を同定するための方法の特徴とする。選択された化合物の存在及び不在でのMASP-2の発現又は活性のレベルの差異は、その選択された化合物がMASP-2の発現又は活性を調節できることを示す。発現は、当業者に良く知られている技法により、遺伝子発現（例えば、mRNAを測定することによって）又はタンパク質発現のレベルで評価され得る。MASP-2の活性は、機能的に、すなわち補体を活性化する化合物の能力をアッセイすることによって評価され得る。

【0064】

好ましい方法及び材料は、本発明を例示するが、しかし限定しない下記実施例において記載される。当業者は、本明細書に記載される方法及び材料に類似するか又は同等であり、そして本発明の実施又は試験に使用され得る方法及び材料を認識するであろう。

30

【0065】

特にことわらない限り、本明細書に使用されるすべての技法及び科学的用語は、本発明が属する当業者により通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料に類似するか又は同等の方法及び材料は本発明の実施又は試験において使用され得るが、好ましい方法及び材料が本明細書において記載される。本明細書において言及されるすべての出版物、特許出願、特許及び他の参考文献は、引用により本明細書に組み込まれる。さらに、材料、方法及び例は、例示的であって、本発明を制限するものではない。本発明の他の特徴及び利点は、下記特定の記載から明らかであろう。

40

【0066】

配列表の簡単な説明：

配列番号1：20kDのMASP-2フラグメントのアミノ酸配列。

配列番号2：シグナルペプチドを包含する十分な長さのMASP-2のアミノ酸配列：

配列番号3：シグナルペプチドを包含しない十分な長さのMASP-2のアミノ酸配列：

【0067】

好ましい態様の記載：

MASP-2核酸分子：

本発明のMASP-2核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA又はRNAであり得、そして二本鎖又は一本鎖（すなわち、センス又はアンチセンス鎖のいずれか）であ

50

り得る。それらの分子のフラグメントはまた、本発明の範囲内であると思われ、そして例えばポリメラーゼ鎖反応（PCR）により生成され得るか、又は1又は複数の制限エンドレアーゼによる処理により生成され得る。リボ核酸（RNA）分子は、インビトロ転写により生成され得る。好ましくは、核酸分子は、長さにかかわらず、正常な生理学的条件下で可溶性であるポリペプチドをコードする。

【0068】

本発明の核酸分子は、天然に存在する配列、又は天然に存在するそれらの配列とは異なるが、しかし遺伝子コードの宿主のために、同じポリペプチド（例えば、配列番号2のポリペプチド）をコードする配列を含むことができる。さらに、それらの核酸分子は、ポリペプチドを単にコードする配列に制限されず、そして従って、コード配列から上流又は下流に存在する非コード配列のいくつか又はすべてを含むことができる。

10

【0069】

本発明の核酸分子は、合成され（例えば、ホスホラミジットに基づく合成により）、又は生物学的細胞、例えば哺乳類の細胞から得られる。従って、核酸は、ヒト、マウス、ラット、テンジクネズミ、ウシ、羊、ウマ、ブタ、ウサギ、サル、イヌ又はネコの核酸であり得る。それらのタイプの核酸内のヌクレオチドの組合せ又は修飾がまた包含される。

【0070】

さらに、本発明の単離された核酸分子は、天然の状態において見出されないフラグメントを包含する。従って、本発明は、組換え分子、例えば核酸分子（例えば、MASP-2をコードする単離された核酸分子）が、ベクター（例えば、プラスミド又はウィルスベクター）、又は異種細胞のゲノム（又は、天然の染色体位置以外の位置での相同細胞のゲノム）中に組み込まれているそれらの分子を包含する。従って、組換え核酸分子及び使用がさらに下記に論じられる。

20

【0071】

本発明の核酸分子がアンチセンス分子をコードし、又はアンチセンス分子として作用する場合、それらはMASP-2の翻訳を調節するために使用され得る。核酸発現の欠失又は調節に関係する技法は、当業者に良く知られており、そしてMASP-2活性に関連する疾患を診断し、そして/又は処理するために使用され得る。それらの核酸分子は、それらの臨床学的有用性の分野においてさらに論じられる。

【0072】

本発明はまた、MASP-2ポリペプチドをコードする核酸分子に対して、緊縮条件下でハイブリダイズする核酸分子を包含する。本明細書に記載されるcDNA配列（配列番号3）は、他の種における相同ポリペプチドをコードする核酸、及びヒト又は他の哺乳類におけるMASP-2遺伝子のスプライス変異体を包含するそれらの核酸を同定するために使用され得る。従って、本発明は、それらの核酸分子を検出し、そして単離する方法を特徴とする。それらの方法を用いて、サンプル（例えば、核酸ライブラリー、例えばcDNA又はゲノムライブラリー）が、MASP-2-特異的プローブ（例えば、少なくとも12個の長さのヌクレオチドであるポリペプチド配列（配列番号2）をコードする、図6に示されるcDNA配列のフラグメント）と接触せしめられる。

30

【0073】

プローブは、関連するポリペプチドをコードする核酸（又はその相補的配列）に対して選択的にハイブリダイズするであろう。MASP-2よりコードされるポリペプチドは他のセリンプロテアーゼに関連するので、用語“選択的にハイブリダイズする”とは、プローブが、他のセリンプロテアーゼをコードする核酸（又はその相補的配列）に対してよりも検出できるほど高い程度に、MASP-2をコードする核酸（又はその相補的配列）に結合する現象を言及するために使用される。

40

【0074】

少なくとも12個（例えば、15, 25, 50, 100又は200個）のヌクレオチドを含むことができるプローブは、いくつかの標準の方法のいずれかを用いて生成され得る（例えば、Ausubelなど, “Current Protocols In Mo

50

lecular Biology, Vol. I", Green Publishing Associates, Inc., 及び John Wiley & Sons, Inc., NY, 1989を参照のこと)。例えば、プローブはPCR増幅方法を用いて生成され得、ここでオリゴヌクレオチドプライマーが、下記例4に記載されるように、核酸ライブラリーをスクリーンし、そしてそれにより、プローブにハイブリダイズする核酸分子(ライブラリー内の)を検出するために、プローブとして使用され得るMASP-2-特異的核酸配列(例えば、成熟MASP-2のN-末端をコードする核酸)を増幅するために使用される。

【0075】

一本鎖核酸は、二本鎖がそれらの間で形成する場合、お互いハイブリダイズすると言われる。これは、1つの核酸が、他の配列の逆及び補体である配列を含む場合に発生する(この同じ配列が、ゲノムにおけるDNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の天然の相互作用を生ぜしめ、そして“二重鎖”の配置に従う)。ハイブリダイズする領域間の完全な相補性は、二重鎖を形成するために必要とはされず; 対合された塩基の数が使用されるハイブリダイゼーション条件下で二重鎖を維持するために十分であることが単に必要である。

【0076】

典型的には、条件は、低い~中位の緊縮性のものである。それらの条件は、完全に相補的な配列間の特定の相互作用を好むが、しかし完全には適合しない配列間でのいくつかの非特異的相互作用の発生を可能にする。ハイブリダイゼーションの後、核酸は、いくつかの非特異的相互作用により一緒に結合される二本鎖を解離するために、中位又は高い緊縮条件下で“洗浄”され得る(従って、それらの二本鎖を形成する核酸は完全には相補的ではない)。

【0077】

当業界において知られているように、洗浄のための最適条件は、実験的に、しばしば緊縮性を徐々に高めることによって決定される。緊縮性に影響を及ぼすために変更され得るパラメーターは、主に温度及び塩濃度を包含する。一般的に、塩濃度が低く、且つ温度が高いほど、緊縮性は高い。洗浄は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度に等しいか、又は低い塩濃度を含む溶液を用いて、低い温度(例えば、室温)で開始され得る。続く洗浄は、同じ塩濃度を有する段階的に暖かな溶液を用いて行われ得る。他の手段として、塩濃度が低められ、そして温度が洗浄段階において維持され、又は塩濃度が低められ、そして温度が高められ得る。追加のパラメーターもまた変更され得る。例えば、不安定剤、例えばホルムアミドの使用が、緊縮条件を変更する。

【0078】

核酸がハイブリダイズされる反応においては、所定のレベルの緊縮性を達成するために使用される条件は変化するであろう。お互い85%同一であるすべての核酸間での二本鎖の形成を可能にするであろう1組の条件は存在せず; ハイブリダイゼーションはまた、個々の核酸のユニーク特徴に依存する。配列の長さ、配列の組成(例えば、プリン様ヌクレオチドの含有量-対-ピリミジン様ヌクレオチドの含有量)、及び核酸のタイプ(例えば、DNA又はRNA)は、ハイブリダイゼーションに影響を及ぼす。さらなる考慮は、核酸の1つが固定されるかどうかである(例えば、フィルター上に)。

【0079】

低い緊縮条件から高い緊縮条件への進行の例は、塩含有率がSSC(塩化ナトリウム及びクエン酸ナトリウムを含む塩溶液; $2 \times \text{SSC}$ は $0.2 \times \text{SSC}$ よりも10倍、より濃縮されている)の相対的多量性として与えられる場合である。核酸は、 $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ (ドデシル硫酸ナトリウム; 界面活性剤)において42でハイブリダイズされ、そして次に、室温で $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ (低い緊縮性の条件のための); 42で $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ (中位の緊縮性の条件のための); 及び68で $0.1 \times \text{SSC}$ (高い緊縮性の条件のための)により洗浄される。洗浄は、与えられる条件の1つのみを用いて行われ得、又は個々の条件が使用され得る(例えば、上記に列挙される順序で、それぞれ10~15分間の洗浄)。洗浄のいずれか又はすべては反復され

得る。上記に言及されたように、最適条件は変化し、そして実験的に決定され得る。

【0080】

“緊縮条件”として考慮される第2組の条件は、ハイブリダイゼーションがChurch緩衝液(7% SDS, 0.5% NaHPO₄, 1MのEDTA, 1%ウシ血清アルブミン)において50で行われ、そして洗浄が2×SSCにおいて50で行われるそれらの条件である。

検出されると、核酸分子は、多くの標準技法のいずれかにより単離され得る(例えば、Sambrookなど, “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと)。

10

【0081】

本発明はまた、(a)前述のMASP-2-関連のコード配列及び/又はそれらの補体(すなわち、“アンチセンス”配列)のいずれかを含む発現ベクター；(b)コード配列の発現を方向づける調節要素(それらの例は下記に与えられる)に操作可能的に結合される前述のMASP-2-関連コード配列のいずれかを含む発現ベクター；(c)MASP-2をコードする核酸配列に関係しない核酸配列、例えばレポーター又はマーカーをコードする分子を、MASP-2ポリペプチドをコードする配列の他に、含む発現ベクター；及び(d)前述の発現ベクターのいずれかを含み、そしてそれにより、宿主細胞において本発明の核酸分子を発現する、遺伝子的に構築された宿主細胞を包含する。

20

【0082】

組換え核酸分子は、可溶性MASP-2をコードする配列、成熟MASP-2、シグナル配列を有するMASP-2、又はMASP-2の機能的ドメイン、例えばセリンプロテアーゼドメイン、EGFドメイン、又はMBL-結合ドメインを含むことができる。十分な長さのMASP-2ポリペプチド、MASP-2のドメイン又はそのフラグメントが、下記のように、追加のポリペプチドに融合され得る。同様に、本発明の核酸分子は、MASP-2の成熟形、又は分泌を促進するポリペプチドをコードする形をコードすることができる。後者の場合、ポリペプチドは、典型的には、宿主細胞内のシグナル配列の除去により活性形に転換され得るプロタンパク質として言及される。プロタンパク質は、不活性配列の除去により、タンパク質の活性形に転換され得る。

30

【0083】

上記に言及される調節要素は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：当業者に知られており、そして調節遺伝子発現を誘導するか又は他方では、調節する、誘発性又は非誘発性プロモーター、エンハンサー、オペレーター及び他の要素。そのような調節要素は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：サイトメガロウイルスhCMV即時初期遺伝子、SV40の初期又は後期プロモーター、lacシステム、trpシステム、TACシステム、TRCシステム、ファージAの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御の領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのためのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、及び酵母α-接合因子のプロモーター。

40

【0084】

同様に、核酸は、追加のポリペプチド配列、例えばマーカー又はレポーターとして機能する配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成することができる。マーカー又はレポーター遺伝子の例は、次のものを包含する：β-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(neo', G418'), ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、ヒドロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ(HPH)、チミンキナーゼ(TK)、lacZ(β-ガラクトシダーゼをコードする)、緑色蛍光タンパク質(GFP)及びキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(XGPR T)。

50

【0085】

本発明の実施に関連する多くの標準方法に関して、当業者は、マーカー又はレポーターの機能を付与することができる追加の配列の追加の有用な試薬を気づくであろう。一般的に、ハイブリッドポリペプチドは、第1部分及び第2部分を含み；前記第1部分はMASP-2ポリペプチドであり、そして前記第2部分は、例えば上記に記載されるレポーター又は免疫グロブリン不変領域である。

【0086】

本発明のために使用され得る発現システムは次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：本発明の核酸分子を含む、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された微生物、例えば細菌（例えば、E. コリ及びB. サブチリス）；本発明の核酸分子を含む（好ましくは、MASP-2の核酸配列（配列番号3）を含む）組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス及びピチア）；本発明の核酸分子を含む組換えウィルス発現ベクター（例えば、バキュロウィルス）により感染された昆虫細胞システム；組換えウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウィルス（CaMV）及びタバコモザイクウィルス（TMV））に感染された、又はMASP-2ヌクレオチド配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）により形質転換された植物細胞システム；又は哺乳類細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウィルス（例えば、アデノウィルス後期プロモーター及びワクシニアウィルス7.5Kプロモーター）由来のプロモーターを含む組換え発現構造体を有する哺乳類細胞システム（例えば、COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI 38及びNIH3T3細胞）。

【0087】

細菌システムにおいては、多くの発現ベクターが、発現される遺伝子生成物のために意図される使用に依存して、都合良く選択され得る。例えば、多量のそのようなタンパク質が、MASP-2ポリペプチドを含む医薬組成物の生成、又はそれらのポリペプチドに対する抗体を生ぜしめるために生成される予定である場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を方向づけることができるベクターが所望される。

【0088】

そのようなベクターは次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：E. コリ発現ベクターpUR278（Rutherなど., EMBO J. 2: 1791, 1953）、ここで挿入体のコード配列は、融合タンパク質で生成されるよう、lacZコード領域と整合してベクター中に個々に連結され得る；pINベクター（Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109, 1985; Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509, 1989）；及び同様のもの。pGEXベクターはまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現するために使用され得る。

【0089】

一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸着、続いて、遊離グルタチオンの存在下での溶出により、溶解された細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子生成物がGST成分から開放され得るよう、トロンピン又は第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むよう企画される。

【0090】

昆虫システムにおいては、オートグラファ・カリホミカ（Autographa californica）核ポリヒドロシウィルス（AcNPV）が、外来性遺伝子を発現するためのベクターとして使用され得る。このウィルスは、スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）細胞において増殖する。挿入体のコード配列は、ウィルスの非必須領域（例えば、多面体遺伝子）中に個々にクローン化され、そし

10

20

30

40

50

て A c N P V プロモーター（例えば、多面体プロモーター）の制御下に配置され得る。

【0091】

コード配列の好結果をもたらす挿入は、多面体遺伝子の不活性化、及び妨げられていない組換えウイルス（すなわち、多面体遺伝子によりコードされるタンパク質性コードを欠いているウイルス）の生成をもたらすであろう。次に、それらの組換えウイルスが、挿入された遺伝子が発現されるスポドプテラ・フルギペルダ細胞を感染するために使用される（例えば、Smith など., J. Virol. 46: 584, 1983; Smith, アメリカ特許第 4, 215, 051 号を参照のこと）。

【0092】

哺乳類宿主細胞においては、多くのウイルスに基づく発現システムが利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、本発明の核酸分子は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーター及び3分節リーダー配列に結合され得る。次に、このキメラ遺伝子が、インビトロ又はインビボ組換えにより、アデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域 E1 又は E3）における挿入は、生存性であり、そして感染された宿主において MASP-2 遺伝子生成物を発現できる組換えウイルスをもたらすであろう（例えば、Logan and Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659, 1984 を参照のこと）。特定の開始シグナルがまた、挿入された核酸分子の効果的な翻訳のために必要とされる。それらのシグナルは、ATG 開始コドン及び隣接する配列を包含する。

10

20

【0093】

完全な遺伝子又は cDNA、例えばそれ自体の開始コドン及び隣接する配列が適切な発現ベクター中に挿入される場合、追加の翻訳制御シグナルは必要とされない。しかしながら、コード配列の一部のみが挿入される場合、外因性翻訳制御シグナル、例えば ATG 開始コドンが供給されるべきである。さらに、開始コドンは、完全挿入体の翻訳を確保するために所望するコード配列の読み取り枠と接合して存在すべきである。それらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、種々の起源、例えば天然及び合成起源のものであり得る。発現の効力は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、等の包含により増強され得る（Bittner など., Methods in Enzymol. 153: 516-544, 1987 を参照のこと）。

30

【0094】

さらに、挿入された配列の発現を調節するか、又は所望する特定の態様で遺伝子生成物を修飾し、そしてプロセッシングする宿主細胞株が選択される。タンパク質生成物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセッシング（例えば、切断）が、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なった宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子生成物の後-翻訳プロセッシング及び修飾のための特徴的且つ特異的機構を有する、適切な細胞系又は宿主システムが、発現される外来性タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確保するために選択され得る。このためには、遺伝子生成物の主要転写、グリコシル化及びリン酸化の正しいプロセッシングのための細胞機能を有する真核宿主細胞が使用され得る。上記に列挙される哺乳細胞型は、適切な宿主細胞として作用するそれらである。

40

【0095】

組換えタンパク質の長期の高収率生成に関しては、安定した発現が好ましい。例えば、上記 MASP-2 配列を安定して発現する細胞系が構築され得る。複数のウイルス起点を有する発現ベクターを用いるよりもむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等）、及び選択マーカーにより制御される DNA により形質転換され得る。外来性 DNA の導入に続いて、構築された細胞は、富化された培地における 1~2 日間の増殖、及び続いて、選択培地への交換を可能にされる。

【0096】

組換えプラスミドにおける選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、そしてプラスミ

50

ドのそれらの染色体への安定した組み込み、及び細胞系中にクローン化され、そして拡張され得る焦点物の形成のための増殖を可能にする。この方法は、好都合には、MASP-2を発現する細胞系を構築するために使用され得る。そのような構築された細胞系は、遺伝子生成物の内因性活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価において、及び治療使用のためのMASP-2の生成のために特に有用であり得る。それらの方法はまた、実験又は治療目的のために宿主生物中に導入される細胞を修飾するために使用され得る。

【0097】

多くの選択システムが使用され得る。例えば、ヘルペス単純ウィルスチミジンキナーゼ (Wigler など., Cell 11: 223, 1977)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026, 1962)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy など., Cell 22: 817, 1980) 遺伝子が、それぞれ tk⁻, hgprt⁻ 又は aprt⁻ 細胞において使用され得る。

【0098】

また、抗-代謝物耐性が、次の遺伝子のための選択に基づいて使用され得る：メトトレキサートに対する耐性を付与する dhfr (Wigler など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567, 1980; O'Hare など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527, 1981); マイコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt (Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072, 1981); アミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する neo (Colberre-Garapin など., J. Mol. Biol. 150: 1, 1981); 及びヒグロマイシンに対する耐性を付与する hygro (Santerre など., Gene 30: 147, 1984)。

【0099】

他方では、いずれかの融合タンパク質が、発現される融合タンパク質に対する抗体を用いることによって容易に精製され得る。例えば、Janknecht などにより記載されるシステムは、ヒト細胞系において発現される、変性されていない融合タンパク質の容易な精製を可能にする (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976, 1991)。このシステムにおいては、興味ある遺伝子が、その遺伝子の読み取り枠が、6個のヒスチジン残基から成るアミノ末端標識に翻訳的に融合されるよう、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローン化される。組換えワクシニアウィルスにより感染された細胞化らの抽出物が、Ni²⁺-ニトロ酢酸-アガロースカラム上に負荷され、そしてヒスチジン標識されたタンパク質が、イミダゾール含有緩衝液により選択的に溶出される。

【0100】

MASP-2 ポリペプチド：

本発明のMASP-2ポリペプチドは、配列番号2に由来するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。さらに、本明細書に記載されるMASP-2ポリペプチドは、上記核酸分子のいずれかによりコードされるそれらであり、そしてMASP-2フラグメント、変異体、切断された形、及び融合タンパク質を包含する。それらのポリペプチドは、種々の用途、例えばMBLectin応答を調節できる他の細胞遺伝子生成物又は化合物の同定のための診断アッセイにおける試薬として、及びMBLectin経路の活性に関連する炎症及び一定の疾患(下記に記載される)の処理のために有用な医薬試験として、抗体の生成のために調製され得る。

【0101】

好ましいポリペプチド、例えば損なわれていないシグナル配列(配列番号2のアミノ酸1~15から延長する)を有するポリペプチドに対応するポリペプチド、ヒトMASP-2

ポリペプチドのポリペプチド（配列番号 2 のアミノ酸 16 ~ 686 から延長する）の成熟形、及び MASP - 2 ポリペプチドの一部を表すポリペプチドは、実質的に純粋な MASP - 2 ポリペプチドである。通常の生理学的条件下で可溶性であるポリペプチドが特に好ましい。

【0102】

1つの態様においては、本発明はまた、MASP - 2 に対して機能的に同等であるポリペプチドを包含する。機能的同等物は、配列番号 1 に概略されるような MASP - 2 アミノ酸配列のフラグメントのみを含んで成る。好ましい態様においては、MASP - 2 ポリペプチドは、下記のものから成る群から選択される：

i) 配列番号 1 として同定される配列、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド； 10

ii) 20 kD の分子質量を有する配列番号 1 として同定される配列、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；

iii) 配列番号 2 のアミノ酸 30 ~ 444、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；

【0103】

iv) 52 kD の分子質量を有する配列番号 2 のアミノ酸 30 ~ 444、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；

v) 配列番号 2 のアミノ酸 138 ~ 296、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド； 20

vi) セリンプロテアーゼ活性を有する配列番号 2 に起因するアミノ酸配列、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；

vii) MBL 補体経路機能についてのインビトロアッセイにおいて MASP - 2 活性を阻害できる、配列番号 2 に由来するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

【0104】

viii) 配列番号 3 のアミノ酸 15 ~ 671、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；

ix) 配列番号 2 のアミノ酸 16 ~ 296、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド；及び

x) 配列番号 2 のアミノ酸 30 ~ 296、又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド。 30

【0105】

それらのポリペプチドは、それらが生物学的システムにおいて MASP - 2 の 1 又は複数の機能を実施できることにおいて、MASP - 2 に対して同等である。好ましい MASP - 2 ポリペプチドは、本明細書に記載される MASP - 2 の十分に長い成熟ヒト形の活性の 20%、40%、50%、75%、80% 又は 90% を有する。そのような比較は、一般的に、ポリペプチドの等濃度が使用され、そして比較される、生物学的活性のアッセイに基づかれる。比較はまた、得ることができる最大活性の 50% に達するために必要とされるポリペプチドの量に基づかれる。

【0106】

機能的に同等のタンパク質は、例えば追加の、欠失された又は置換されたアミノ酸残基を含むそれらのタンパク質であり得る。置換は、関与する残基の極性、荷電、溶解性、疎水性、親水性、及び / 又は両親媒性に基づいて行われ得る。典型的には、お互いによる保存性置換を提供すると思われるアミノ酸が、本発明の要約に特定される。D - アミノ酸は、ポリペプチドの半減期を改良するために導入され得る。

【0107】

MASP - 2（配列番号 2）に対して機能的に同等であるポリペプチドは、当業者に良く知られているランダム突然変異誘発技法を用いて行われ得る（そして、得られる変異体 MASP - 2 タンパク質が活性について試験され得る）。しかしながら、そのようなポリペプチドは、特定部位の突然変異誘発により生成されるであろう（再び、当業者に良く知ら 50

れている技法を用いて)。それらのポリペプチドは、高められた機能、すなわち M B L e c t i n 経路を活性化するより高い能力を有することができる。そのようなポリペプチドは、M B L e c t i n 経路の免疫機能の活性を増強するために使用され得る。

【0108】

機能的に同等のポリペプチドを企画するためには、保存される位置と可変位置との間を区別することが有用である。これは、種々の生物から得られた M A S P - 2 c D N A の配列を一系列整列することによって行われ得る。当業者は、保存されるアミノ酸残基が機能の保存のために必要であることを理解するであろう。従って、保存される残基は変更されないことが好ましい。

M A S P - 2 コード配列内の突然変異は、選択された宿主細胞における発現のために適切である M A S P - 2 ペプチドを生成するために行われ得る。グリコシル化配列の導入はまた、変更された生物学的特徴を有する M A S P - 2 ポリペプチドを生成するために使用され得る。

【0109】

本発明はまた、M A S P - 2 又はその前駆体を含んで成るポリペプチド配列内の多形現象のアッセイ方法の特徴とする。これは、多くの技法により達成され得る。例えば、精製されたポリペプチドが、トリプシン消化にゆだねられ、そしてその得られるフラグメントが 1 又は 2 次元電気泳動により分析される。サンプルポリペプチドの分析からの結果が、既知の配列を用いての結果に比較される。また、分析は、1 又は 2 次元電気泳動、続く、膜への分離されたタンパク質のトランスファー（ウェスタンブロット）による生物学的サンプル（例えば、血清又は他の体液）の分離を包含する。次に、膜が、M A S P - 2 に対する抗体、続いてラベルされた第 2 抗体と反応せしめられる。染色パターンが、既知の配列又は修飾を有するサンプルを用いて得られるそのパターンと比較される。

【0110】

本発明のポリペプチドは、もう 1 つのポリペプチド、例えばマーカーポリペプチド又は融合パートナーに発現融合され得る。例えば、ポリペプチドは、細菌的に発現されたタンパク質の精製を促進するためにヘキサ - ヒスチジンに、真核細胞において発現されるタンパク質の精製を促進するために赤血球凝集素標識に融合され得る。本発明の M A S P - 2 ポリペプチド、又はその一部がまた、変更され、その結果、それは免疫グロブリン F c ドメインへの融合により長い循環半減期を有する（Capon など., Nature 337 : 525 - 531, 1989）。同様に、高められた安定性をインビボで有する、M A S P - 2 ポリペプチドのダイマー形が生成され得る。

【0111】

本発明のポリペプチドは、化学的に合成され得（例えば、Creighton, "Proteins: Structures and molecular Principles", W. H. Freeman & Co., NY, 1983）、又はたぶん、より好都合には、本明細書に記載のようにして、組換え DNA 技法により生成され得る。追加の案内に関しては、当業者は、次の文献を調べる：Ausubel など., (前記)；Sambrook など., ("Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)；及び特に、化学的合成の例に関しては、Gait, M. J. Ed. ("Oligonucleotide Synthesis", IRL Press, Oxford, 1984)。

【0112】

本発明はまた、M A S P - 2 活性を競争的に阻害できるポリペプチドを特徴とする。1 つの観点においては、そのようなポリペプチドは、下記から成る群から選択され得る：

i) 配列番号 2 のポリペプチドのフラグメントを含んで成るポリペプチド、ここで前記ポリペプチドは M B L / M A S P - 2 又はその機能的同等物の複合体化の競争インヒビターであり；

【0113】

i i) 配列番号 3 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド、ここで位置 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 又は 19 での 1 又は複数のアミノ酸残基がもう 1 つのアミノ酸残基により置換されており;

i i i) 配列番号 3 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド、ここで位置 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 又は 19 での少なくとも 2 つのアミノ酸残基がもう 1 つのアミノ酸残基により置換されており;

i v) 配列番号 3 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド、ここで位置 14 での *arg* がもう 1 つのアミノ酸により置換されており;

10

【0114】

v) 配列番号 3 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド、ここで位置 14 での *arg* が小さな荷電されていないアミノ酸から成る群から選択されたアミノ酸により置換されており;

v i) 配列番号 3 として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成るポリペプチド、ここで位置 14 での *arg* が *gly* 及び *ala* から成る群から選択されたアミノ酸により置換されており;

v i i) M A S P - 2 又はその機能的相同体と会合できるマンナン - 結合性レクチン (M B L) のフラグメントを含んで成るポリペプチド; 及び

v i i i) M A S P - 2 を選択的に結合する抗体。

20

【0115】

本発明はまた、M A S P - 2 (及びそれをコードする遺伝子) と相互作用し、そしてそれにより、M A S P - 2 の機能を変更するポリペプチドを特徴とする。相互作用するポリペプチドは、当業者に知られている方法を用いて同定され得る。1 つの適切な方法は、タンパク質相互作用をインビボで検出する “ 2 - ハイブリッドシステム ” である (Chlen など, , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578, 1991)。この方法を実施するためのキットは、Clontech (Palo Alto, CA) から入手できる。

【0116】

抗 - M A S P - 2 抗体:

30

ヒト M A S P - 2 ポリペプチド (又は免疫原性フラグメント又は類似体) が本発明において有用な抗体を生ぜしめるために使用され得; そのようなポリペプチドは組換え方法により生成され得るか、又は合成され得 (例えば、 “ Solid Phase Peptide Synthesis ”, 前記; Ausubel など, , 前記を参照のこと)。一般的に、ポリペプチドは、Ausubel など, , 前記に記載されるように、キャリアータンパク質、例えば K L H にカップリングされ、アジュバントと共に混合され、そして宿主哺乳類中に注入され得る。また、前記キャリアーは P P D であり得る。抗体は、ペプチド抗原親和性クロマトグラフィーにより精製され得る。

【0117】

特に、種々の宿主動物が、M A S P - 2 タンパク質又はポリペプチドによる注入により免疫化され得る。宿主動物は、ウサギ、マウス、テンジクネズミ、ラット及び鶏を包含する。免疫学的応答を高めるために使用され得る種々のアジュバントは、宿主種に依存し、そしてフロイントアジュバント (完全及び不完全)、鉍物ゲル、例えば水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニック ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンベットヘモシアニン及びジニトロフェノールを包含する。実質的に有用なヒトアジュバントは、B C G (Bacille Calmette - Guerin) 及びコリネバクテリウム・パルビウム (Corynebacterium parvum) を包含する。ポリクローナル抗体は、免疫化された動物の血清に含まれる抗体分子の異種集団である。

40

【0118】

50

従って、本発明内の抗体は、ポリクローナル抗体及び、さらに、モノクローナル抗体、ヒト適合された又はキメラ抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、及びFab発現ライブラリーを用いて生成される分子、及びファージ表示技法により生成される抗体又はフラグメントを包含する。

特定の抗原に対する抗体の相同集団であるモノクローナル抗体は、上記MASP-2タンパク質及び標準のハイブリドーマ技法を用いて調製され得る（例えば、Kohlerなど., Nature 256: 495, 1975; Kohlerなど., Eur. J. Immunol. 6: 511, 1976; Kohlerなど., Eur. J. Immunol. 6: 292, 1976; Hammerlingなど., "Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridoma", Elsevier, NY, 1981; Ausubel など., 前記を参照のこと）。 10

【0119】

特に、モノクローナル抗体は、Kohlerなど., Nature 256: 495, 1975及びアメリカ特許第4,376,110号に記載のように、培養物における連続細胞系による抗体分子の生成を提供するいずれかの技法；ヒトB-細胞ハイブリドーマ技法（Kosborなど., Immunology Today 4: 72, 1983; Coleなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026, 1983）；及びEBV-ハイブリドーマ技法（Coleなど., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983）により得られる。 20

【0120】

そのような抗体は、IgG, IgM, IgE, IgA, IgD及びそれらのいずれかのサブクラスを包含するいずれかの免疫グロブリンクラスのものであり得る。（鶏の場合、免疫グロブリンクラスはまた、IgYでもあり得る。）本発明のmAbを生成するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養され得る。インビボで高い力価のmAbを生成する能力が、これを現在好ましい生成方法にするが、しかしいくつかの場合、すなわち腹水からの標準の免疫グロブリンの存在が所望されない場合、又は論理的考慮に關与する場合、インビトロ生成が、生存動物中への癌細胞の導入を回避するために好ましいであろう。

【0121】

生成されると、ポリクローナル、モノクローナル又はファージ由来の抗体が、Ausubelなど., 前記に記載のように、標準の方法によるウェスタンブロット又は免疫沈殿分析により、特定のMASP-2認識について試験される。MASP-2を特異的に認識し、そしてそれに結合する抗体が本発明において有用である。例えば、そのような抗体は、動物により生成されるMASP-2のレベルをモニターするために（例えば、MASP-2の量又は非細胞位置を決定するために）、イムノアッセイにおいて使用され得る。また、抗体は、下記に論じられるように、MASP-2インヒビターとして使用され得る。 30

【0122】

好ましくは、本発明の抗体は、高く保存される領域外に存在し、そして基準、例えば高い頻度の荷電された残基により、たぶん抗原性であると思われるMASP-2タンパク質のフラグメントを用いて生成される。1つの特定の例においては、そのようなフラグメントは、PCRの標準技法により生成され、そして次に、pGEX発現ベクター中にクローン化される（Ausubelなど., 前記）。融合タンパク質は、E. コリにおいて発現され、そしてAusubelなど., 前記に記載のように、グルタチオンアガロース親和性マトリックスを用いて精製される。 40

【0123】

いくつかの場合、抗血清の低親和性又は特異性の可能性ある問題を最少にすることが所望される。そのような状況下で、2又は3個の融合体が個々のタンパク質のために生成され得、そして個々の融合体が少なくとも2匹のウサギ中に注射され得る。抗血清が、連続し 50

た、好ましくは少なくとも3回の追加免疫注射により生ぜしめられ得る。

抗血清がまた、組換えMASP-2タンパク質又は対照タンパク質、例えばグルココルチコイド受容体、CAT又はルシフェラーゼを免疫沈殿するその能力について調べられる。

【0124】

抗体は例えば、診断アッセイの一部として、生物学的サンプルにおけるMASP-2の検出に使用され得る。抗体はまた、MASP-2の発現又は局在化に対する候補体化合物の効果を測定するために、スクリーニングアッセイにおいて使用され得る。さらに、そのような抗体は、患者へのそれらの導入の前、正常な及び/又は構築されたMASP-2発現細胞を評価するために、記載される遺伝子治療技法に使用され得る。そのような抗体はさらに、異常MASP-2活性を阻害する方法に使用され得る。

10

【0125】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子と共に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることにより“キメラ抗体”(Morrissonなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851, 1984; Neubergerなど., Nature, 312: 604, 1984; Takedaなど., Nature, 314: 452, 1984)の生成のために開発された技法が、使用され得る。キメラ抗体は、1つの分子であり、ここで異なった動物種、例えばネズミmAb由来の可変領域及びヒト免疫グロブリン不変領域を有するそれらの種から、異なった部分が誘導される。

【0126】

他方では、一本鎖抗体の生成について記載される技法(アメリカ特許第4,946,778号、第4,946,778号及び第4,704,692号)は、MASP-2タンパク質又はポリペプチドに対する一本鎖抗体を生成するために適合され得る。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を通してFv領域のH及びL鎖フラグメントを連結し、一本鎖ポリペプチドをもたらすことにより形成される。

20

【0127】

特定のエピトープを認識し、そしてそれを結合する抗体フラグメントは、既知技法により生成され得る。例えば、そのようなフラグメントは、次のものを包含するが、但しそれだけには限定されない: 抗体分子のペプシン消化により生成され得るF(ab')₂フラグメント、及びF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成され得るFabフラグメント。他方では、Fab発現ライブラリーが、所望する特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの急速且つ容易な同定を可能にするために構成され得る(Huseなど., Science, 246: 1275, 1989)。

30

【0128】

MASP-2に対する抗体は、当業者は良く知られている技法を用いて、MASP-2の一部に類似する抗-イディオタイプ抗体を生成するために使用され得る(例えば、Greenspanなど., FASEB J. 7: 437, 1993; Nissinoff, J. Immunol. 147: 2429, 1991を参照のこと)。例えば、MASP-2に結合し、そしてMASP-2のリガンドの結合を競争的に阻害する抗体は、MASP-2のリガンド結合ドメインに類似し、そして従って、MASP-2、例えばMBLのリガンドを中和する抗-イディオタイプを生成するために使用され得る。そのような中和抗-イディオタイプ抗体又はそのような抗-イディオタイプ抗体のFabフラグメントが治療レジメに使用され得る。

40

【0129】

抗体は、当業界において知られている方法によりヒト適合化され得る。例えば、所望する結合特異性を有するモノクローナル抗体は商業的にヒト適合化され得る(Scottgen, Scott and: Oxford Molecular, Palo Alto, CA)。十分なヒト抗体、例えばトランスジェニック動物において発現されるそれらの抗体はまた、本発明の特徴である(Greenなど., Nature Genetics 7: 13-21, 1994; また、アメリカ特許第5,545,806号及び第5,5

50

69, 825号を参照のこと；それらの両者は引用により本明細書に組み込まれる）。

【0130】

抗-MASP-2抗体が使用される、本明細書に記載される方法は、下記障害の症状を示す患者を診断するために、臨床学的設定に便利に使用され得る、少なくとも1つの特異的MASP-2ヌクレオチド配列又は本明細書に記載される抗体試薬を含んで成る、予備包装された診断キットを用いて行われ得る。

【0131】

MASP-2の定量アッセイ：

単なる例として、定量アッセイが、体液又は器官（生検）抽出物におけるMASP-2の濃度の評価のために考案され得る。そのようなアッセイは、液相又は固相であり得る。例は競争性及び非競争性ELISAである。後者の例として、マイクロタイターウェルが、抗-MASP-2抗体により被覆され、サンプルと共にインキュベートされ、そしてMASP-2の存在が酵素ラベルされた抗体、続いて着色された化合物を沈殿する基質により可視化される。他方では、ラベル、例えばユウロピウムが使用され、そして検出が時間分解された蛍光分析法の使用により行われる。

10

【0132】

単独で又はMBL/MASP複合体の一部として、MASP-2の機能的活性のアッセイがいくつかの方法により行われ得る。MBL/MASP-2複合体についての試験の例として、試験サンプルがマンナン-被覆されたマイクロウェル上に適用され、そしてC4がC4-分解活性を評価するために添加され、又はC3が生成されるC3コンバーターゼのC3の分解活性を評価するために添加される。MBL/MASP複合体の一部として存在しないMASP-2のアッセイが同様に行われるが、しかしMBLが、マンナン-被覆されたウェルへのこの添加の前、マイクロウェル又はサンプルのいずれかに添加される。MBLの添加の前、サンプルはMBL及びMBL/MASP-1及びMBL/MASP-2複合体を、ビーズ結合される固相マンナンによる処理により、又は固相抗-MBL抗体により、又は前記複合体を沈殿するが、しかし上清液にMASP-2を残す適切な濃度の沈殿剤、例えばPEGによる処理により消耗される。アッセイは、従来の補体活性化経路及び他の補体活性化経路からの妨害を最少にするか又は排除する条件下で行われる。

20

【0133】

MASP-2の活性又はMASP-2を排除するアッセイが、個人、特に感染又は炎症性疾患を有するそれらの個人からのサンプルにおける診断及び処理目的のために使用され得る。

30

【0134】

治療のためのMASP-2：

特許請求の範囲において特定される成分の治療使用は、MASP-2における構成的又は一時的欠失が個人を1又は複数の感染に対して敏感に対する状況下で、又は個人が確立された感染を中和できない状況下で適用され得る。特異、本発明は、感染の処理のための薬剤の調製のためへのMASP-2の使用に関する。好ましくは、MASP-2欠失の個人がMASP-2により処理されたとしても、又は血清における正常MASP-2活性を有する個人も処理され得る。

40

【0135】

本発明のさらなる態様においては、MASP-2は、低MBL血清レベルを有する個人における感染の処理のための薬剤の調製のために使用され得る。そのような態様においては、医薬組成物は好ましくは、さらに、少なくとも1つのマンナン-結合性レクチン（MBL）サブユニット、又は前記少なくとも1つのマンナン-結合性レクチン（MBL）サブユニットを含んで成る少なくとも1つのマンナン-結合性レクチン（MBL）オリゴマーを含んで成る。他方では、MASP-2及びMBLは、キットの一部として投与され得る。

【0136】

好ましくは、本発明のMBLオリゴマーは、MBLのテトラマー、ペンタマー及び／又は

50

ヘキサマーから成るオリゴマー群から選択される。MBLは、組換え的に生成されるか、又は精製された天然に存在するMBLであり得る。例えば、MBLは、引用により本明細書に組み込まれる特許出願PCT/DK00/00246号又はPCT/DK00/00247号に開示されるMBL種のいずれかであり得る。本発明の低MBL血清レベルは好ましくは、500 ng/ml以下のMBL血清レベル、より好ましくは100 ng/ml以下のMBL血清レベル、さらにより好ましくは50 ng/ml位かのMBL血清レベルである。

【0137】

また、MASP-2は、投与されるMBLのために利用できる十分な量のMASP-2を確保するために、血清MBLレベルとは無関係にMBL処理を受ける個人にも投与され得る。

10

MASP-2又はMBL/MASP複合体は、個人の免疫防御を改良するために、静脈内注入により投与され得る。

【0138】

本発明者は、MASP-2がMBL/MASP複合体の強力な抗菌活性のために必要とされ、そして従って、遺伝的に決定されるか又は獲得されたMASP-2の欠失が、感染に対する個人の耐性及び確立された感染を攻撃する能力を不生にするであろうと信じている。天然の又は組換えMASP-2による再構成は、そのような状況下での有用な処理療法である。組換えMASP-2は、活性を調節するために、完全な分子の形、分子の一部、又は他の構造体にいずれかの手段により結合される完全な分子又はその一部の形で存在することができ、組換え生成物は、そのようなことが所望される場合、増強された活性又は低められた活性を得るために、天然の分子と構造的同一であるか、又はわずかに変性され得る。

20

【0139】

天然の又は組換えMBLによる再構成治療は、受容体がMBL/MASP活性の発現のための十分なMASP-2を有することを必要とする。従って、MASP-2は、患者が不十分なMASP-2活性を有する場合、治療用調製物に含まれるべきである。

MASP-2は好ましくは、50 ng/ml ~ 100 µg/ml、好ましくは100 ng/ml ~ 800 µg/ml、より好ましくは500 ng/ml ~ 500 µg/ml、さらにより好ましくは750 ng/ml ~ 250 µg/ml、さらにより好ましくは1 µg/ml ~ 100 µg/ml、さらにより好ましくは2 µg/ml、最も好ましくは2 µg/ml ~ 10 µg/mlの処理されるべき個人の血清におけるMASP-2の濃度をもたらす用量で投与される。

30

本発明の医薬組成物により処理され得る感染は、いずれかの感染剤による感染であり得る。例えば、感染は、微生物種により引き起こされ得る。

【0140】

微生物種は菌類；酵母、細菌又は寄生体であり得る。

本発明の細胞は、次のものから成る群から選択され得る：アクロモバクター・キシロソキシダン (*Achromobacter xylosoxidans*)、*A. カルコアセチカス* (*A. calcoaceticus*)、好ましくは*A. アニトラタス* (*A. anitratus*)、*A. ハエマリチカス* (*A. haemolyticus*)、*A. アルカリゲネス* (*A. alcaligenes*)、及び*A. イオフイ* (*A. iwoffii*)、*アクチノマイセス・イスラエリ* (*Actinomyces israelii*)、*アエロモナス・ヒドロフィリア* (*Aeromonas hydrophilia*)、*アルカリゲネス* (*Alcaligenes*) 種、好ましくは*A. フェエカリス* (*A. faecalis*)、*A. オドランス* (*A. odorans*) 及び*A. デニトリフィカンス* (*A. denitrificans*)、*アリゾナ・ヒンスハウイ* (*Arizona hinslawii*)、

40

【0141】

バチラス・アントラシス (*Bacillus anthracis*)、*B. セレウス* (*B*

50

. cereus)、バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*)、*B.メラニノゲニカス* (*B. melaninogenicus*)、ボルデテラ・ペルツシス (*Bordetella pertussis*)、ボレリア・ブルグドリフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、*B.レキュレンチス* (*B. recurrentis*)、ブルセラ (*Brusella*) 種、好ましくは *B.アボルタス* (*B. abortus*)、*B.スイス* (*B. suis*)、*B.メリテンシス* (*B. melitensis*) 及び *B.カニス* (*B. canis*)、カリマトバクテリウム・グラヌロマチス (*Calymmatobacterium granulomatis*)、カムピロバクター・フェタス ssp. インテスチナリス (*Campylobacter fetus* ssp. *Intestinalis*)、

10

【0142】

カムピロバクター・フェタス ssp. ジュジュニ (*Campylobacter fetus* ssp. *Jejuni*)、クラミジア (*Chlamydia*) 種、好ましくは *C.プシタシ* (*C. psittaci*) 及び *C.トラコマチス* (*C. trachomatis*)、クロモバクテリウム・ピオラセウム (*Chromobacterium violaceum*)、シトロバクター (*Citrobacter*) 種、好ましくは *C.フレウンジ* (*C. freundii*) 及び *C.ジベルサス* (*C. diversus*)、クロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botulinum*)、*C.ペルフリンゲンス* (*C. perfringens*)、*C.ジフィシレ* (*C. difficile*)、*C.テタニ* (*C. tetani*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*)、*C.ウレセランス* (*C. ulcerans*)、*C.ハエモリチカム* (*C. haemolyticum*) 及び *C.シュードツベルキュロシス* (*C. pseudotuberculosis*)、

20

【0143】

コキシエラ・ブメチ (*Coxiella burnetii*)、エトワルドシエラ・タルダ (*Edwardsiella tarda*)、エイケネラ・コロデンス (*Eikenella corrodens*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、好ましくは *E.クロアカエ* (*E. cloacae*)、*E.アエロゲネス* (*E. aerogenes*)、*E.ハフンラエ* (*E. hafnlae*) (また、*ハフニア・アルビイ* (*Habnia alvei*) とともに称する)、及び *E.アグロメラン* (*E. agglomerans*)、エリスルペロスリックス・リヒュスロパチアエ (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、エスシェリシア・コリ (*Escherichia coli*)、フラボバクテリウム・メニンゴセプトチカム (*Flavobacterium meningosepticum*)、フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、ガルドネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*)、

30

【0144】

ハエモフィラス・デュクレイ (*Haemophilus ducreyi*)、*H.インフルエンザエ* (*H. influenzae*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 種、クレブシエラ (*Klebsiella*) 種、好ましくは *K.プネウモニアエ* (*K. pneumoniae*)、*K.オザエナエ* (*K. ozaenae*)、*K.リノスクレオマチス* (*K. rhinoscleromatis*)、レジオネラ (*Legionella*) 種、レプトスピラ・インテロガンズ (*Leptospira interrogans*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、モラキセラ (*Moraxella*) 種、好ましくは *M.ラキュナタ* (*M. lacunata*) 及び *M.オスロエンシス* (*M. osloensis*)、マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*)、*M.レブラエ* (*M. leprae*)、*M.ツベルキュロシス* (*M. tuberculosis*)、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 種、好ましくは *M.プネウモニアエ* (*M. pneumoniae*)

40

50

）、

【0145】

ネisseria・ブノルホエアエ (*Neisseria gonorrhoeae*)、*N. メニンギチジス* (*N. meningitidis*)、*1カルジア* (*Nocardia*) 種、好ましくは *N. アステロイデネ* (*N. asteroidae*) 及び *N. ブラシリエンシス* (*N. brasiliensis*)、*パステルレリア・ハエモリチカ* (*Pasterurelia haemolytica*)、*P. ムルトシダ* (*P. multocida*)、*ペプトコーカス・マグナス* (*Peptococcus magnus*)、*プレシオモナス・シゲロイデス* (*Plesiomonas shigelloides*)、*プネウモコシ* (*Pneumococci*)、*プロテウス* (*Proteus*) 種、好ましくは *P. ミラビリス* (*P. mirabilis*)、*P. バルガリス* (*P. vulgaris*)、*P. レチゲリ* (*P. rettgeri*) 及び *P. モルガニ* (*P. morgani*) (また、それぞれ、*プロビデンシア・レトゲリ* (*Providencia rettgeri*) 及び *モルガネラ・モルガニル* (*Morganella morganii*) と呼ばれる)、

【0146】

プロビデンシア (*Providencia*) 種、好ましくは *P. アルカリファシエンス* (*P. alcalifaciens*)、*プロビデンシア* (*Providencia*) 種、好ましくは *P. アルカリファシエンス* (*P. alcalifaciens*)、*P. スツアルチ* (*P. stuartii*) 及び *P. レトゲリ* (*P. rettgeri*) (また、*プロテウス・レトゲリ* (*Proteus rettgeri*) と称する)、*シュードモナス・アエルギノサ* (*Pseudomonas aeruginosa*)、*P. マレイ* (*P. mallei*)、*P. シュードマレイ* (*P. pseudomallei*)、*リケツシア* (*Rickettsia*)、*ロカリマイア・ヘンセラエ* (*Rochalimaima henselae*)、*サルモネラ* (*Salmonella*) 種、好ましくは *S. エンテリジス* (*S. enteridis*)、*S. チピ* (*S. typhi*) 及び *S. デルビー* (*S. derby*)、及び最も好ましくは、*サルモネラ DT104 型のサルモネラ種*、*セラチア* (*Serratia*) 種、*S. マルセスセンス* (*S. marcescens*)、*シゲラ*、

【0147】

シセンテリアエ (*Shigella dysenteriae*)、*S. フレクシネリ* (*S. flexneri*)、*S. ボイジ* (*S. boydii*) 及び *S. ソネイ* (*S. sonnei*)、*スピリラム・ミノル* (*Spirillum minor*)、*スタフィロコーカス・アウレウス* (*Staphylococcus aureus*)、*S. エピデルミジス* (*S. epidermidis*)、*S. サプロフィチカス* (*S. saprophyticus*)、*ストレプトバシラス・モニリホルミス* (*Streptobacillus moniliformis*)、*ストレプトコーカス* (*Streptococcus*)、好ましくは *S. ファエカリス* (*S. faecalis*)、*S. ファエシウム* (*S. faecium*)、及び *S. デュランス* (*S. durans*)、*ストレプトコーカス・アガラクチアエ* (*Streptococcus agalactiae*)、*S. プネウモニアエ* (*S. pneumoniae*)、*S. ピロゲネス* (*S. pyogenes*)、

【0148】

トレポネマ・カラテウム (*Treponema carateum*)、*トレポネアム・パリダム* (*Treponema pallidum*)、*T. ペルテニユ* (*T. pertenue*)、好ましくは *T. パリダム* (*T. pallidum*)、*ウレアプラズマ・ウレアリチカム* (*Ureaplasma urealyticum*)、*ビブリオ・コレラエ* (*Vibrio cholerae*)、*V. パラハエモリチカス* (*V. parahemolyticus*)、*エルシニア・エンテロコリチカ* (*Yersinia enterocolitica*) 及び *Y. ペスチス* (*Y. pestis*)。

【0149】

本発明の寄生体は、次のものから成る群から選択され得る：*マラリア* (*Malaria*)

(プラスモジウム・ファルシパラム (*Plasmodium falciparum*)、
 P. ビバックス (*P. vivax*)、P. マラリアエ (*P. malariae*))、ス
 キストソメス (*Schistosomes*)、トリパノソメス (*Trypanosome*
s)、レルシマネア (*Leishmania*)、フィラリアル・レマトデス (*Filaria*
nematodes)、トリコモニアシス (*Trichomoniasis*)、サル
 コスポリジアシス (*Sarcosporidiasis*)、タエニア (*Taenia*)
 (T. サギナタ (*T. saginata*)、T. ソリウム (*T. solium*))、
 レイスマニア (*Leishmania*)、トキソプラズマ・ゴンジ (*Toxoplasma*
gondii)、トリキネロシス (*Trichinellosis*) (トリキネラ・ス
 ピラリス (*Trichinella spiralis*)) 又はコシジオシス (*Coccidioidosis*) (エイメリア (*Eimeria*) 種)。 10

【 0 1 5 0 】

菌類は、クリプトコカス・ネオホルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、カルジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、ススペル
 ギラス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 及びコシジオイド
 マイコシス (*Coccidioidomycosis*) から成る群から選択され得る。
 1つの好ましい態様においては、細菌種は、少なくとも1つの抗生物質薬剤に対して耐性
 であり得る。例えば、細菌種は、多耐性であり得る。1つの例においては、細菌種は病原
 性である。

本発明のもう1つの態様においては、感染は、ウィルスによる感染であるウィルス感染で 20
 ある。

【 0 1 5 1 】

本発明のウィルスは、下記のものから成る群から選択され得る：アデノ関連ウィルス、ア
 デノウィルス、鳥類感染性気管支炎ウィルス、バキュロウィルス、水痘、コロナウィルス
 、サイトメガロウィルス、ジステンパーウィルス、腸ウィルス、エプスタイン - バーウィ
 ルス、ネコ白血病ウィルス、フラビウィルス、口蹄疫ウィルス、A型肝炎ウィルス、B型
 肝炎ウィルス、C型肝炎ウィルス、E型肝炎ウィルス、疱疹ウィルス、単純疱疹ウィルス
 、インフルエンザウィルス、H I V - 1、H I V - 2、H T L V 1、A及びB型インフル
 エンザウィルス、K u n j i n ウィルス、ラッサ熱ウィルス、L C M V (リンパ球脈絡髄
 膜炎ウィルス)、レンチウィルス、麻疹ウィルス、メンゴウィルス、モルビルウィルス、 30
 ミクソウィルス、

【 0 1 5 2 】

乳頭種ウィルス、パロウィルス、パラインフルエンザウィルス、パラミクソウィルス、パ
 ルボウィルス、P o k o ウィルス、ポリオウィルス、ポリオマー腫瘍ウィルス、仮性狂犬
 病ウィルス、狂犬病ウィルス、レオウィルス、R S ウィルス、レトロウィルス、ライノウ
 イルス、牛疫ウィルス、ロタウィルス、S e m l i k i 森林ウィルス、センダイウィルス
 、シミアンウィルス40、シンドビスウィルス、S V 5、ダニ媒介脳炎ウィルス、トガウ
 イルス (風疹、黄熱病、デング熱)、ワクシニアウィルス、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウィ
 ルス及び水疱性口炎ウィルス。

【 0 1 5 3 】

1つの好ましい態様においては、ウィルスは、レトロウィルス、例えばヒト免疫欠損ウィ
 ルスである。 40

M A S P - 2 についてのアッセイ：

M A S P - 2 (又は M A S P - 2 インヒビター) による治療は通常、患者からの血清又は
 血漿における M A S P - 2 の推定により進められるべきである。そのようなアッセイの例
 は、下記に記載される。

【 0 1 5 4 】

M A S P - 2 抗原についてのアッセイ：

M A S P - 2 タンパク質は便利には、標準の免疫学的方法の1つを用いて、抗原として推
 定される。 50

単なる例として、M A S P - 2 の定量 T R I F M A (時間分解された免疫蛍光アッセイ) を、 1) 1 μ g の抗 - C ' M A S P - 2 抗体によるマイクロタイターウェルの被膜 ; 2) T w e e n - 2 0 による阻止 ; 3) 試験サンプル、例えば希釈された血漿又は血清サンプルの適用 ; 4) E u - ラベルされた抗 - N ' M A S P - 2 抗体の適用 ; 5) 増強溶液 (W a l l a c L t d) の適用 ; 6) 時間分解された蛍光計上での E u の読み取りにより構成した。

【 0 1 5 5 】

(E L I S A による評価は、同様にして、例えば段階 4 においてビオチン - ラベルされた抗 - N ' M A S P - 2 ; 段階 5 においてアルカリホスファターゼ - ラベルされたアビジンを用いることにより ; 6) 基質の適用 ; 及び 7) 色彩の強度を読み取り行われ得る。) 個々の段階の間で、プレートは室温でインキュベートされ、そして洗浄された (但し、段階 6 と 7 との間は除く) 。検量線が、任意には、 1 m l 当たり 1 単位の M A S P - 2 を含むと言われる、プールされた正常血漿の希釈溶液を用いて構成され得る。この第 1 段階の M A S P - 2 アッセイに使用される抗体は、合成ペプチドに対して生ぜしめられ、そして生来の M A S P - 2 とは良好には反応されなかった。従って、サンプルが、煮沸水浴上で 5 分間、S D S により前処理され、そして S D S が、アッセイの前、非イオン性界面活性剤 (T r i t o n X - 1 0 0) により中和された。アッセイのさらなる進行は、生来の M A S P - 2 と反応する抗体を使用し、S D S 処理を不必要にする。

10

【 0 1 5 6 】

アッセイは、天然の又は組換え M A S P - 2 又はその一部と反応する、ポリクローナル又はモノクローナル抗体又は組換え抗体を用いて、同様にして構成され得る。

20

損なわれていない M A S P - 2 と又は活性化生成物と選択的に反応する抗体の使用を通して、又は分子の種々の部分に対する抗体の組合せを通して、アッセイは、M B L e c t i n 経路のインビボ活性化の評価のために構成され得る。それらのアッセイは、この経路の活性化により引き起こされる炎症の決定のために有用であろう。

M B L / M A S P 複合体の M A S P - 2 活性についてのアッセイ :

【 0 1 5 7 】

M A S P - 2 は、補体システムを活性化するその能力により評価され得る。C 4 が M A S P - 2 により分解され得る場合、活性チオールエステルが露出され、そして C 4 が求核基近くに共有結合されるようになる。従って、C 4 b の実質的な部分が、被覆されたプラスチック壁に結合されるようになり、そして抗 - C 4 抗体により検出され得る。従って、単独で、又は M B L / M A S P 複合体の一部の M A S P - 2 の機能的活性のアッセイは、いくつかの方法により行われ得る。C 4 を分解する M B L / M A S P - 2 の活性は、M A S P - 2 を検出するための次の方法によりアッセイされ、ここで M A S P - 2 活性についてのアッセイを含んで成る前記方法は、

30

【 0 1 5 8 】

- 結合された M B L を獲得する固相に、予定された量の M B L を含んで成るサンプルを適用し ;

- 前記結合された M B L に予定された量の M A S P - 2 を適用し ;

- 前記複合体に少なくとも 1 つの補体因子を適用し ;

40

- 分解された補体因子の量を検出し ;

- 前記 M A S P - 2 の量と前記分解された補体因子の量とを相関し ; そして

- M A S P - 2 の活性を決定するか ; 又は

【 0 1 5 9 】

- 結合された複合体を獲得する固相に、予定された量の M B L / M A S P - 2 複合体を含んで成るサンプルを適用し ;

- 前記複合体に少なくとも 1 つの補体因子を適用し ;

- 分解された補体因子の量を検出し ;

- 前記 M A S P - 2 の量と前記分解された補体因子の量とを相関し ; そして

- M A S P - 2 の活性を決定する段階を含んで成る。

50

【0160】

M A S P - 2 活性についての定量的 T R I F M A が、1) 100 μ l の緩衝液中、1 / μ g のマンナンによりマイクロタイターウェルを被覆し；2) T w e e n - 20 により阻止し；3) 試験サンプル、例えば希釈された血漿又は血清サンプルを適用し；4) 5 μ g / ml での精製された補体因子 C 4 を適用し；5) 37 で1時間インキュベートし；6) E u - ラベルされた抗 - C 4 抗体を適用し；7) 増強溶液を適用し；そして8) 時間分解された蛍光計により E u を読み取ることによって構成された。(E L I S A による評価は、同様にして、例えば段階6においてビオチン - ラベルされた抗 - C 4 を適用し；7) アルカリホスファターゼ - ラベルされたアビジンを適用し；8) 基質を適用し；そして9) 色彩強度を読み取ることによって行われ得る。)

10

【0161】

個々の段階の間で、プレートは室温でインキュベートされ、そして洗浄され、但し段階7と8との間は除く。検量線は、任意には、1 ml 当たり1単位の M B L / M A S P - 2 活性を含むと言われる、1つの選択された正常血漿の希釈溶液を用いて構成され得る。アッセイは、従来の又は他の補体活性化経路による C 4 の活性化を妨げる条件下で行われる。C 4 の活性化は、セリンプロテアーゼインヒビターベンズアミジンにより完全に阻害された。従来の補体経路の活性化は好ましくは、アッセイの産物を減じるために阻害される。

【0162】

好ましくは、阻害は高いイオン強度でアッセイを行うことによって行われ、ここで塩濃度は、0.2 M 以上、例えば2.5 M 以上、例えば0.3 M ~ 1.0 M、例えば0.5 M ~ 5 M、例えば0.7 M ~ 2 M、例えば0.9 M ~ 2 M、例えば1.0 M 以上である。使用される塩は、アッセイのために適切ないずれか1又は複数の塩、例えば N a C l , K C l , M g C l ₂ , C a C l ₂ , N a I , K C l , M g I ₂ , C a I ₂ , N a B r , K B r , M g B r ₂ , C a B r ₂ , N a ₂ S ₂ O ₃ , (N H ₄) ₂ S O ₄ 及び N H ₄ H C O ₃ から選択された塩であり得る。従来の経路の阻害は好ましくは、M B L / M A S P 複合体を妨げないが、しかし C 1 q r s 複合体を破壊する。

20

【0163】

他の経路の阻害は、アッセイを行う前、サンプルを、少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍、例えば少なくとも20倍又はそれ以上に希釈することによって行われ得る。

【0164】

遊離 M A S P - 2 活性の評価についてのアッセイ：

M B L - 欠失個人からのサンプルにおける M A S P - 2 活性の評価は、M A S P - フリー M B L により被覆されたウェル上で行われる。M B L を有する個人からのサンプルにおける遊離 M A S P の評価が、まず、セファロース結合されたマンナンと共にインキュベートすることによって(10倍に希釈された血漿又は血清 300 μ l のビーズと共にインキュベートされる)、M B L / M A S P - 1 及び M B L / M A S P - 2 複合体を除去し、そして次に、上清液を分析することによって行われる。

30

【0165】

T R I F M A ホルメートにおいて行われるアッセイは次の通りにして進行する：1) 100 μ l の緩衝液中、1 μ l のマンナンによりマイクロタイターウェルを被覆し；2) T w e e n - 20 により阻止し；3) 100 ng / ml の M A S P - フリー M B L と共に、緩衝液中、1000倍希釈度でのサンプルをインキュベートし、そしてウェル当たり100 μ l の混合物を適用し；4) 4 で一晩インキュベートし；4) 洗浄し、そして5 μ g / ml での精製された補体因子 C 4 を適用し；5) 37 で1時間インキュベートし；6) E u - ラベルされた抗 - C 4 抗体を適用し；7) 増強溶液を適用し；そして8) 時間分解された蛍光分析法により E u を読み取る。

40

【0166】

(E L I S A による評価が、同様にして、例えば段階6においてビオチン - ラベルされた抗 - C 4 を適用し；7) アルカリホスファターゼ - ラベルされたアビジンを適用し；8) 基質を適用し；そして9) 色彩強度を読み取ることによって行われ得る。) 検量線が、任

50

意には、1 ml 当たり 1 単位の M A S P - 2 活性を含むと言われる、1 つの選択された M B L - 欠失血漿の希釈溶液を用いて構成され得る。アッセイは、従来の又は他の補体活性化経路により C 4 の活性化を妨げる条件下で行われる（上記を参照のこと）。

【 0 1 6 7 】

M A S P - 2 活性の障害：

M A S P - 2 の生物学的活性のインヒビターが、M A S P - 2 の補体活性化活性及び炎症活性を制御するために使用され得る。そのようなインヒビターは、C 2 又は C 4 の標的構造を表す基質類似体であり得る。インヒビターは、天然の又は修飾されたペプチド、又は M A S P - 2 の活性を競争的に又は非競争的に障害するいずれかの有機分子のものであり得る。インヒビターは、短い又は長い時間、循環にとどまるよう変性され、そして注射により又は経口的に与えられるよう構成され得る。インヒビターは、化学的又は酵素的方法により、天然の又は組換え M A S P - 2 から生成される M A S P - 2 のフラグメントであり得る。インヒビターは、天然に存在する短形の M A S P - 2 であり得る。インヒビターは、可溶性形で存在するか、又は固相にカップリングされ得る。固相は、体外血液又は血漿流動装置に使用される適合表面であり得る。

10

【 0 1 6 8 】

微生物炭水化物又は内因性オリゴ糖は、M B L / M A S P 複合体の所望しない活性化を誘発し、損傷性炎症応答をもたらすことができる。この病理生理学的活性は、M A S P - 2 活性のインヒビター、例えば P e f a b l o c の投与により低められ得る。また他の酵素インヒビター（P M S F , ペンズアミジン、等）が、M A S P - 2 活性について T R I F M A においてアッセイされる場合、効果的であることがわかっている。明らかに、インヒビター使用のためのインヒビターを企画する場合、毒性が主な考慮であり、そして高い特異性のインヒビターが広い反応性のインヒビターよりも低い毒性であると思われる。特異的インヒビターは、補体因子 C 4 又は C 2 分子上の標的構造体を表す、ペプチド、ペプチド類似体又はペプチド誘導体を用いて生成され得る。

20

【 0 1 6 9 】

もう 1 つのタイプのインヒビターは、M A S P - 2 の活性部位又は M A S P - 2 上の他の構造体に対する抗体（又は抗体のフラグメント）に基づかれ、従って M A S P - 2 の活性を障害する。M A S P - 2 に対する抗体は、好ましくは、上記で論じられた抗体である。インヒビターはまた、M A S P - 1 によりもたらされるが、M A S P - 2 の活性化の障害に向けられ、すなわち M A S P - 2 上の M A S P - 1 のための標的構造体がこのタイプの適切なインヒビターである。もう 1 つのタイプのインヒビターは、M B L への M A S P - 2 の結合を妨げ、そしてそれにより、M A S P - 2 の活性化を妨げる。M A S P - 2 の N - 末端の 20 k D a フラグメントが、このタイプの適切なインヒビターである。より特定には、M B L への M A S P - 2 の結合を仲介するポリペプチド鎖の正確な部分を特定し、そして合成ペプチド又は類似する構造体をインヒビターとして使用することができる。インヒビターは、L - アミノ酸により D - アミノ酸を置換され得る。

30

【 0 1 7 0 】

また、インヒビターは、選択分子として、M A S P - 2 又はそのフラグメントを用いて、S E L E X（指数的増強によるリガンドの組織的進展）により単離された R N A 又は一本鎖 D N A であり得る。M A S P - 2 のリーダー配列は本出願の他の部分に示されている。さらに、M A S P - 2 のインヒビターは、セリンプロテアーゼインヒビター、例えばアプロチニンである。

40

M A S P - 2 活性は、M A S P - 1 の作用、又は M A S P - 1 の活性を刺激するいずれか他の物質を通してのプロ酵素形の M A S P - 2 の活性化された M A S P - 2 への転換により制御され得る。

【 0 1 7 1 】

実施例

例 1 . M A S P - 2 の同定

カルシウム依存性態様で炭水化物に結合する、ヒト血漿タンパク質及びタンパク質複合体

50

(すなわち、レクチン及び会合タンパク質)を、マンナン - 及びN - アセチルグルコサミン - 誘導体化されたセファロースビーズでの親和性クロマトグラフィーにより精製した。EDTA及び酵素インヒビターを含む緩衝液により希釈された、プールされたCPD - 血漿(2.5L)を、セファロース2BCL及びマンナン - セファロールに通した。トロピンインヒビターPPACK(D - フェニルアラニン - プロイル - アルギニル - クロロメチルケトン)及びCaCl₂を添加した。そのプールを、セファロース2B - CL及びマンナン - セファロースに通して、そしてマンナン - セファロースにカルシウム依存的に結合するタンパク質を、EDTA緩衝液により溶出した。溶出液を再石灰化し、GlcnAc - セファロースカラムに通し、上記のように溶出し、20mlのレクチン調製物を得た。

10

【0172】

このタンパク質調製物を、SDS - PAGEにより、及びPVDF - 膜上にプロットすることにより分析した。ウシレクチン調製物(25)に対して生ぜしめられた鶏抗体によるプロットの進展は、52kDaのMrを有するタンパク質、及び32kDaでのMBLを表した。52kDaのバンドを、NH₂ - 末端アミノ酸配列分析にゆだねた。配列は、前に記載されたMASP(MASP - 1)の配列との類似性を示した。19個のNH₂ - 末端アミノ酸を表す合成ペプチドに対して生ぜしめられた抗体(抗 - N' MASP - 2抗血清)は、52kDaの分子、及び20kDaに対する移動度を有する分子を認識した(図1、レーン1)。非還元条件下で、76kDaのポリペプチドを、抗 - N' - MASP - 2抗血清を用いて検出し、鎖内ジスルフィド結合の存在を示した。20kDaのポリペ

20

【0173】

非還元条件下での第1の寸法及び還元条件下で第2の寸法を有する2寸法SDS - PAGEは、76kDaのMrを有するジスルフィド結合されたタンパク質の一部である52kDaのポリペプチドを示した。前記タンパク質の残りの部分をたぶん表す、31kDaのポリペプチド(図1、レーン3)はまた、タンパク質のCOOH - 末端部分における配列を表す合成ペプチドに対して生ぜしめられた抗血清(抗 - C' MASP - 2)により、76kDaのタンパク質の一部として認識された(cDNA配列決定技法により測定された; 下記を参照のこと)。非還元条件下で抗 - N' MASP - 2抗体に関して見出される76kDaのバンドもまた、抗 - C' MASP - 2抗体により認識された(図1、レーン4)。

30

【0174】

図1bは、非還元条件下での第1の寸法を包含する、2寸法でのSDS - PAGEを示す。レーンを切断し、ジチオトレイトール(DTT)を含むサンプル緩衝液においてインキュベートし、もう1つのSDS - PAGEゲル上に置き、そして電気泳動の後、ゲルをプロットし、そしてプロットを抗 - N' MASP - 2抗体により進行せしめた。分子量マーカーの位置が示される。

【0175】

例2. マンナン - 結合性レクチンに会合したセリンプロテアーゼに対する抗体の調製
BCG(Bacillus Calmette Guerinワクチン)により感作された動物を、C. Koch, The State Serum Institute, Copenhagenに従って、PPD(ツベルクリン精製されたタンパク質誘導体)に結合された合成ペプチドにより免疫化した。抗 - N' MASP - 1、抗 - C' MASP - 1及び抗 - N' MASP - 2と称する抗体は、それぞれ、MASP - 1の最初の19個のアミノ酸残基、MASP - 1の最後の19個のアミノ酸残基、及びMASP - 2の最初の19個のアミノ酸残基に対応するペプチドにより免疫化されたウサギからであった。鶏抗 - C' MASP - 2抗体は、MASP - 2のC末端部分における配列を表す2種のペプチド(残基505 ~ 523及び538 ~ 556)の混合物により免疫化された鶏からであっ

40

50

た。すべてのペプチドは、カップリングのための追加のC末端システムを有した。抗体及び標準鶏IgGを、卵黄から精製した(26)。

【0176】

モノクローナル抗-MBL抗体、IgG₁-κ(クローン131-1)及び対照IgG₁-κ(クローンMOPC21)を、プロテインA親和性クロマトグラフィーにより精製した。F(ab')₂ウサギ抗-ヒトC4及びF(ab')₂ウサギ抗-ヒトC1qを、ウサギ抗-ヒトC4及びウサギ抗-ヒトC1qのペプシン消化により生成した(DAKO, Glostrup, Denmark)。ウェスタンブロットの染色に関しては、抗体を1μg/mlで使用した。結合された鶏抗体を、ウサギ抗-鶏IgG、続いてペルオキシダーゼ-ラベルされたヤギ抗-ウサギIgG、及び増強された化学ルミネセンス技法を用いての進行により可視化した。結合されたマウス及びウサギ抗体を、それぞれペルオキシダーゼ-ラベルされたウサギ抗-マウスIgG及びペルオキシダーゼ-ラベルされたヤギ抗-ウサギIgGにより可視化した。

10

【0177】

例3. 52kDa及び20kDaのポリペプチドのアミノ酸配列決定

レクチン調製物を濃縮し、SDS-PAGEにゆだね、そしてPVDF膜にトランスファーした。2つのストリップを、抗-ビオチンレクチン抗体により進行せしめた(25)。ブロットの残りを、クーマシーブリリアントブルーにより染色した。全クーマシー染色されたタンパク質の約5%を表すことが判断されている、免疫染色された52kDaのバンドに対応するバンドを、切断し、そしてApplied Biosystemsタンパク

20

【0178】

抗-N'-MASP-2抗体の生成の後、類似するウェスタンブロットを、抗-N-MASP-2抗体を用いて行った。この抗体により可視化された、52kDa及び20kDaのバンドのタンパク質のNH₂-末端を配列決定した。ペプチドを、もう1つのブロットからの2種のバンドにおけるタンパク質のトリプシン消化により調製し、逆相クロマトグラフィーにより分別し、そして主要ピークにおけるペプチドを配列決定にゆだねた。

【0179】

例4. MASP-2のクローニング及び配列決定

肝臓は、C1r、C1s及びMASP-1の合成の一次部位である。従って、肝臓からのRNAを、得られたペプチド配列から推定されるプライマーによるRT-PCRのための鋳型として使用した。cDNAの第1鎖合成を、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia)を用いて、1.3μgのヒト肝臓RNAにより行った。PCRを、それぞれ、アミノ酸配列EYANDQER及びKPF TGF EAから誘導された変性センス及びアンチセンスプライマーを用いて、このcDNAに対して行った。PCRプログラムを次の通りに行った: 50 °Cでのアニーリング(1サイクル); 55 °Cでのアニーリング(1サイクル); 及び60 °Cでのアニーリング(33サイクル)。得られる300bpのPCR生成物を、TA-クローニングキット(Invitrogen)を用いてE. コリプラスミドpCRII中にクローン化し、そして挿入体のヌクレオチド配列を決定した。

30

40

【0180】

得られる300bpのRT-PCR生成物のヌクレオチド配列は、プライマーが誘導されたペプチドの配列を確かめる推定されるアミノ酸配列を有する読み取り枠(ORF)を含んだ。このプラスミドの挿入体を、放射性ラベルし、そして市販のヒト肝臓ライブラリー(Stratagene)における合計8×10⁵個のクローンをスクリーニングするためのプローブとして使用した。16個のクローニングがハイブリダイズし、そして4個の最長のもの(ph1-1, 2, 3及び4)を完全に配列決定した。配列分析は、すべてのクローンが同じ新規のヒトmRNA種の逆転写物を表すことを示した。

【0181】

最長のクローンph1-4は、36bpの5'末翻訳領域で開始する2475bp、続い

50

て 2061bp の ORF、及びポリ-A 末端で終る 378bp の 3' 未翻訳領域を含んで成る。phl-4 のヌクレオチド配列は、翻訳されたアミノ酸配列と共に図 6 に示される。配列は、EMBL ヌクレオチド配列データベースに寄託された（受託番号第 Y09926 号）。phl-1 及び phl-2 の配列は、phl-4 と全体的には一致するが、phl-3 のヌクレオチド配列は、2 種の位置での phl-4、ヌクレオチド位置 1147 でのトランスポージョン（G から T）及び位置 1515 でのトランジション（から T）で、phl-4 とは異なる。最初の変化が、Tyr による Asp356 の置換を誘導する。すべてのクローンは単一のドナーから単離された RNA から転写された肝臓ライブラリーから単離されるので、観察される差異は、MASP-2 遺伝子における多形現象を表すことができ、又はライブラリーの構成の間、創造される誤差のためである。

10

【0182】

NH₂-末端及びすべての配列決定されたペプチドのアミノ酸配列は、クローン phl-4 から推定される配列において同一であった。ORF は、15 個の残基のシグナルペプチドを包含する、686 個のアミノ酸のポリペプチド鎖をコードする。シグナルペプチドを排除すると、計算される Mr は 74,153 であり、これは SES-PAGE 上で観察される 76kDa と一致し（図 1）、等電点は 5.43 であり、そしてモル消衰係数は 113,640 である（すなわち、1mg/ml での OD_{280nm} = 1.54）。MASP-1 に比較して、その配列は、N-連結されたグルコシル化のための部位を含まない。セリンプロテアーゼにおいて活性中心のために必須である 3 個のアミノ酸残基（His468, Asp517 及び ser618）が存在する。

20

【0183】

例 5. MASP-1、C1r 及び C1s との MASP-2 の比較

cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列は、MASP-1、C1r 及び C1s のそれらの配列と相同である（図 2）。注目すべきは、ドメイン機構は、1 つの（1r/C1s-様ドメイン、1 つの上皮成長因子-様（EGF-様）ドメイン、続いて第 2 の C1r/C1s-様ドメイン、2 種の補体制御タンパク質（CCP）ドメイン及びセリンプロテアーゼドメインを特徴とするそれらの 4 種のタンパク質に共有する。上皮成長因子-様ドメインにおけるカルシウム結合モチーフに関与するキー残基は、得られる配列、並びに MASP-1, C1r 及び C1s に存在する。さらに、活性部位セリンの 6 個の残基の前の基質特異性関連残基は、すべての 4 種のタンパク質におけるアスパラギン酸である。

30

【0184】

MASP-1、C1r 及び C1s はすべて、残基 Arg と、第 2 CCP ドメインとセリンプロテアーゼドメインとの間に位置する Ile との間のペプチド結合の分解により活性化される。得られるポリペプチド鎖（最大のものは“H鎖”として言及され、そして最小のものは“L鎖”として言及される）は、ジスルフィド結合により一緒に維持される。類似性によれば、本発明者の結果は、還元条件下での SDS-PAGE の後、MASP-2 の N-末端に対する抗体により認識される 52kDa のポリペプチドが、MASP-2 の H鎖であり、ところが MASP-2 の -C 末端に対する抗体により認識される 31kDa のポリペプチドが L鎖であることを示す。図 2 において見出されるように、Arg 及び Ile は、第 2 の CCP ドメインとプロテアーゼドメインとの間の予測される位置で MASP-2 に存在する。

40

【0185】

前記 4 種のタンパク質間での同一性及び類似性を、図 2 における一列整列に基づいて研究した。6 の偏りを突然変異データマトリックス（250 PAMS）の個々の項に付加し、そして 6 の分解ペナルティーを使用した。すべての 4 種の種における同一の残基は、星印により示される。C1r/C1s-様ドメイン、EGF-様ドメイン及び CCP ドメインの開始は、配列上に示されている。一列整列されたシステインは濃く示されている。H鎖及び L鎖を生成する、Arg 残基と Ile 残基との間の可能性ある分解部位は、セリンプロテアーゼドメインが開始する部位と同一である。

【0186】

50

セリンプロテアーゼにおける活性中心のために必須である3個のアミノ酸残基 (H i s 4 6 8 , A s p 5 1 7 及び S e r 6 1 8) は、() により示される。M A S P - 1 のヒスチジン - ループにおけるシステインは、() により示される。ペプチドのアミノ酸配列決定により得られる配列は下線が引かれている。タンパク質間の同一性 (図 2) は、すべて、39% ~ 45% であり、そして機能的関連性の手掛かりを与えない。タンパク質間での類似する性質の残基及び同一の残基を考慮しての類似性 (図 3 b) は、39% ~ 52% であり、そして最小の類似性は M A S P - 1 と C 1 s との間であり (39%) 、そして最高の類似性は M A S P - 1 と C 1 r との間 (52%) 、及び M A S P - 2 と M A S P - 2 との間 (52%) である。

【 0 1 8 7 】

M A S P - 2 は、C 1 r (46%) 及び C 1 s (47%) との類似性を示す。相対的同一性は機能的関連性に関して手掛かりを与えないが、C 1 s と M A S P - 2 との間の類似性評点は、C 1 s と M A S P - 1 との評点よりも有意に高く、そして M A S P - 1 は、C 1 s に対してよりも C 1 r に対してより類似し、このことは、C 1 s と同じように M A S P - 2 が C 2 及び C 4 分解酵素であることを示唆する。配列のいくつかの特徴は、M A S P - 2、C 1 r 及び C 1 s が M A S P - 2 前駆体からの遺伝子重複及び分岐により進化したことを示唆する。M A S P - 1 配列のみが、トリプシン - 様セリンプロセアーゼの特徴であるヒスチジングループを含む (27) 。

【 0 1 8 8 】

活性部位セリンは、ほとんどのセリンプロテアーゼにおけるように、M A S P - 1 における T C N コドン (N は、A , T , G 又は C である) によりコードされ、そして M A S P - 2、C 1 r 及び C 1 s においては、それは A G Y コドン (ここで、Y は T 又は C である) によりコードされる。M A S P - 1 を包含する、ほとんどのセリンプロテアーゼにおいては、プロリン残基が、活性部位セリンから下流の第3位置で見出され、そして異なったアミノ酸が M A S P - 2、C 1 s 及び C 1 r に見出される (M A S P - 2 及び C 1 s におけるアラニン、C 1 r におけるバリン) 。それらの類似性に基づいて、M A S P - 2 の触媒ドメインが C 1 r 及び C 1 s におけるように単一のエキソンによりコードされ、そして M A S P - 1 を包含する (28) ほとんど他のセリンプロテアーゼが分解したエキソンを有することを予測できる。

【 0 1 8 9 】

例 6 . M B L / M A S P 複合体

上記レクチン調製物を、モノクローナル抗 - M B L 抗体により被覆されたマイクロタイターウェルにおいて、又は負の対照として、同じサブクラスの非特異的モノクローナル免疫グロブリンにより被覆されたウェルにおいてインキュベートした。抗体により捕獲されたタンパク質を溶出し、そして S D S - P A G E / ウェスターンプロットにより分析した。その結果 (図 3 a) は、結合 M B L の他に、抗 - M B L 抗体が M A S P - 1 及び M A S P - 2 の両者を捕獲することを示す。マイクロタイターウェルを、モノクローナル抗 - M B L 又は対照モノクローナルネズミ I g G 1 により被覆し、2種の異なったレクチン調製物 (a 及び b) のいずれか1つと共にインキュベートし、そして結合されたタンパク質を溶出し、そして還元条件下での S D S - P A G E、及びウェスターンプロットにより分析した。

【 0 1 9 0 】

プロット a を、抗 - M B L 抗体により、プロット b を抗 - C ' M A S P - 1 抗体により、そしてプロット c を、抗 - N ' M A S P - 2 抗体により進行せしめた。レーン 1 は分別されなかったレクチン調製物 a を表す。レーン 3 及び 4 は、抗 - M B L 抗体により被覆され、そしてレクチン調製物 b 及び a と共にそれぞれインキュベートされたウェルからの溶出物を表し、そしてレーン 2 及び 5 は、標準 I g G により被覆され、そしてレクチン調製物 b 及び a と共にそれぞれインキュベートされたウェルからの溶出物を表す。

【 0 1 9 1 】

S u p e r o s e 6 B C L 上でのレクチン調製物のゲル透過クロマトグラフィー (G P

10

20

30

40

50

C)からの画分を、MBL、MASP-1及びMASP-2について分析した(図3a)。レクチン調製物を、カルシウム含有緩衝液におけるSuperose 6カラム上でのGPCにゆだねた。MBLは750kDaのMrに対応する体積(Ve)での主要ピーク及び350kDaに対応する位置での小さなピークにおいて溶出された。パネルAは、モノクローナル抗-MBL抗体を用いてのウェスタンブロットによる画分の分析の結果を示す。

【0192】

約60kDaでのバンドはすべてのMBL調製物において見られ、そして試験される抗-MBL抗体(モノクローナル及びポリクローナル)により認識され、そして従って、たぶん、32kDaのポリペプチド鎖の非還元性ダイマーを表す。パネルBは、抗-N' MASP-2抗体(32kDaの上方バンドを展開する)、続いて、抗-C' MASP-1抗体(31kDaの下方バンドを展開する)を用いての同じ分析を示す。純粋に技術的な理由のために、20kDaの切断されたMASP-2がこの図に見られず、ここでプロットは抗-MASP-2及び抗-MASP-1とのインキュベーション間で部分的に切除されている。クロマトグラム上の矢印は、空隙率(1)及び次のマーカートンパク質IgMのための溶出位置(2)、C1q(3)、チログロブリン(4)、IgG(5)及び血清アルブミン(6)を示す。

10

【0193】

MASP-1及びMASP-2は、主として高分子量MBLと共に同時溶出する。pH6でのMBL調製物のクロマトグラフィー処理は、MASP-1又はMASP-2がMBLにより会合されなかったことを示した。Tanなど、(1996, Biochem. J. 319: 329-332)を参照のこと。

20

【0194】

例7. 補体活性化

従来の補体活性化経路及びMBL-開始される経路は、C4及びC2の酵素活性化を通してのC3転換複合体C4b2bの生成を包含する。C1複合体(C1qr₂s₂)においては、この特定のプロテアーゼ活性は、C1rによる酵素の活性化の後、C1sにより示される。C4の活性化に基づいて、反応性チオールエステルが暴露され、そしてC4bがアミノ又はヒドロキシル基近くに共有結合する。

【0195】

MASP-2及びMASP-2、並びにC1r及びC1sのC4活性化能力を比較した。これは、SDS-PAGE、続いてウェスタンブロットにより、C1調製物及びMBL/MASP調製物を分解することによって達成された。プロットを、37でのヒト血清とのインキュベーション、続く抗-C4抗体を用いての折出したC4bの検出により、C4転換活性について試験した。

30

【0196】

C1を、IgG-カップリングされたセファロースビーズを4でヒト血清と共にインキュベートすることにより精製した。ビーズを洗浄し、そしてC1r及びC1sの活性化のために37で30分間、インキュベートした。ビーズを非還元性サンプル緩衝液に懸濁し、そして煮沸しないで、SDS-PAGE、続いて、SDSの存在下でのプロットにゆだねた。類似するプロットは、酵素インヒビターの存在下で生成されたMBL調製物から製造された(The State Serum Institute, Copenhagen)。

40

【0197】

プロットのストリップを、Biorex 70上での分別によりC1qを消耗された、1.1%(v/v)のヒトMBL-欠失血清と共に37で30分間インキュベートした。プロットを、ピオチニル化されたF(ab')₂抗-C4抗体、続いてペルオキシダーゼ-ラベルされたストレプタビジン及び発光試薬により展開した。同目的のプロットを、血清とのインキュベーションの間、存在するセリンプロテアーゼインヒビター(アミノエチルベンゼンスルホニルフルオリド)により処理した。他のストリップを抗体により直接的に

50

展開した。

【0198】

図4の結果は、C4がMASP-2バンドに対応する位置で折出し、そしてC4折出はMASP-1に回答する位置で観察されなかったことを示す。MASP-1は、それがそれぞれ約30kDa及び70kDaで2つのバンドとして出現する（示されていない）還元条件下で、SDS-PAGEにより示されるような活性化された状態で存在した。観察されるC4活性化及び折出はセリンプロテアーゼインヒビターにより阻害された（図4）。C4を活性化する活性は、MBL/MASPが精製方法を通して添加される酵素インヒビターの存在下で調製される場合、検出され得なかったことがまた観察された。C1の調製物を同様に分析し、そして酵素インヒビターにより阻害されるC4折出が、使用される技法により分離されない、C1r及びC1sに対応する位置で観察された。 10

【0199】

図4は、C1s及びMASP-2によるC4の活性化を示すウェルターンプロットの表示である。パネルAは、非還元条件下で、及び電気泳動の前、サンプルを加熱しないで分離されたC1のウェスタンプロットを示す。レーン1を抗-C1s抗体により展開した。レーン2を、ヒト血清、続いて抗-C4抗体と共にインキュベートした。レーン3はレーン2と同じであったが、但し血清とのインキュベーションの間、セリンプロテアーゼインヒビターが存在した。

【0200】

パネルBは、Aにおけるようにして分離されたMBL調製物のウェスタンプロットを示す。レーン1は抗-N' MASP-1により、レーン2は抗-N' MASP-2により展開された。レーン3を、ヒト血清、次に抗-C4と共に37℃でインキュベートした。レーン4においては、プロットを、セリンプロテアーゼインヒビターと共にプレインキュベートし、そして血清とのインキュベーションはまた、インヒビターの存在下で行われた。MASP-1は、グリコシル化のために（17）、MASP-2よりも高いMr、及び9個の長いアミノ酸のポリペプチドを示す。 20

【0201】

本発明の結果は、内在性免疫系のMBLectin経路を通しての補体活性化と補体活性化の従来の経路を通してのその活性化との間での類似性を強調する（図5）。従来の経路を通しての活性化は脊椎動物においてのみ見出される特定の免疫応答に関連し、そしてMBLectin経路及び他の経路は、外来性生物の内因性認識に依存し、そして従って、たぶん特定の免疫系の進化を実際より早くする。すべての経路は、微生物表面に共有結合し、そして補体のエフェクター機能を仲介する、中心補体C3のC3bへの活性化に集中する。 30

【0202】

従来の及びMBLectin経路においては、開始分子複合体は、リガンドとの反応に基づいて、2種の会合されるセリンプロテアーゼ（それぞれ、MASP-1及びMASP-2、又はC1r及びC1s）を活性化する、オリゴマーリガンド-結合成分（それぞれ、MBL又はC1q）から構成される。

【0203】

参考文献

- 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. Bio. Chem. 262, 7451-7454 (1987).
- 3) Kawasaki, T., Etoh, R. & Yamashina, I. Is 50

- olation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. Biochem. Res. Commun, 81, 1018-1024 (1978).
- 4) Matsushita, M. & Fujita, T. 4) Activation of the classical complement pathway by mannanose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease J. Exp. Med. 176, 1497-1502 (1992).
- 5) Ji, Y-H. など., Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Reactive factor J. Immunol. 150, 571-578 (1993). 10
- 【0204】
- 6) Turner, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the 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). 20
- 8) Kuhlman, M., Joiner, K. & Ezekowitz, R.A.B. The human mannanose-binding protein functions as an opsonin. J. EXP. Med. 169, 1733-1745 (1989).
- 9) Sumiya, M. など. Molecular basis of opsonic defect in Immunodeficient children Lancet 337, 1569-1570 (1991).
- 10) Lipscombs, R.J. など., High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannanose binding protein gene. Hum. Mol. Genet. 1, 709-715 (1992). 30
- 【0205】
- 11) Madsen H.O. など., 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. & Tumer, M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. Lancet ii, 1236-1239 (1989). 40
- 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. など. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual 50

al and severe infections in adults. Lancet 345, 888-889 (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).

【0206】

16) Gerred, P., Madsen, H.O., Balslev, U., Hofmann, B., Pedersen, C., Gerstoft, J. and Svejgaard, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannan-binding lectin, Lancet 349, 236-240 (1997). 10

17) Malhotra, R. Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A. and Sim, R.B. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannan-binding protein. Nature Med. 1, 237-243 (1995). 20

18) Kilpatrick, D.C., Bevan, B.H. and Liston, W.A. Association between 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. Mannan-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 38, 110-114 (1995). 30

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

【0207】

21) Gerred, P., Madsen, H.O., Kurtzhals, J.A., など. Diallelic polymorphism may explain variations of blood concentrations of mannan-binding in Eskimos but not in black Africans, Eur. J. Immunogenet. 19, 403-412 (1992). 40

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., Reld, K.B.M., Hansen, S. and Jensenius, J.C. Identification of a new manna 50

n-binding lectin associated serine protease (MASP-2). Mol. Immunol., 33, Suppl. 1, 91 (1996).

24) Jensen, T.V., Stover, C., Poulsen, K., Lausen, S.B., Eggieton, 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. Immunol., 33, Suppl. 1, 81 (1996).

25) Baatrup, G., Thiel, S., Isager, H., Svehaag, 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).

【0208】

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).

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 C1r and C1s genes. Int. Immunol. 9, 1355-1358 (1996).

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 Ca^{2+} -independent association with a C1s-like serine protease. Biochem. J. 319, 329-332 (1996).

30) Barton, G. J. Protein multiple sequence alignment and flexible pattern matching. Methods Enzymol. 403-428 (1990).

【0209】

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

32) Journat, A. & Tosi, M. Cloning and sequencing of full-length cDNA encoding the prec

10

20

30

40

50

urson of human complement component C1r, Biochem. J. 240, 783-787 (1986).

33) Lytus, S.P., Kurachi, K., Sakariassen, K. S. & Davie, E.W. Nucleotide sequence of cDNA coding for human complement C1r. 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).

35) Tosl, 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).

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 a - 1 b は、糖親和性クロマトグラフィーにより精製されたヒト血漿タンパク質のウェスタンブロットを示す。

20

【図 2】

図 2 は、MASP - 2 (クローン ph1 - 4)、MASP - 1 (17, 22)、C1r (23, 24) 及び C1s (25, 26) のアミノ酸配列の配列一列整列を示す。

【図 3】

図 3 a - 3 b は、MBL、MASP - 1 及び MASP - 2 間で形成される分子複合体を示す結果を示す。

【図 4】

図 4 a - 4 b は、C1s 及び MASP - 2 による C4 の活性化を示すウェルターンブロットを示す。

【図 5】

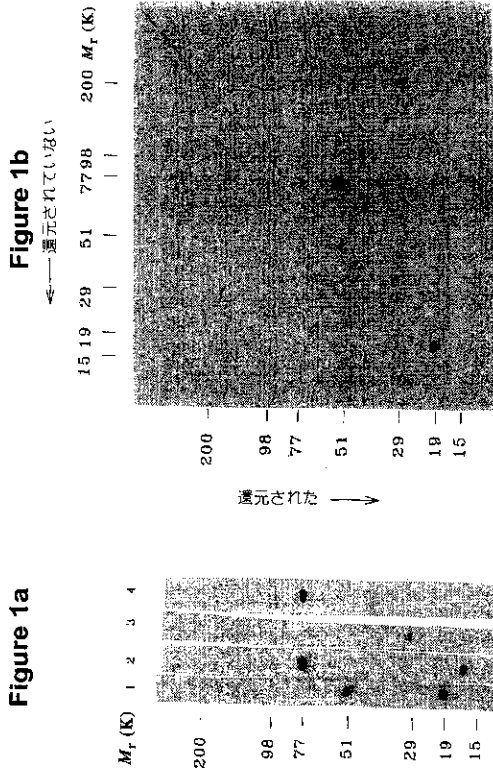
図 5 は、補体活性化の 3 種の経路を示す。

30

【図 6】

図 6 は、MASP - 2 の cDNA 配列及び推定されるアミノ酸配列を示す。

【図 1】



【図 2】

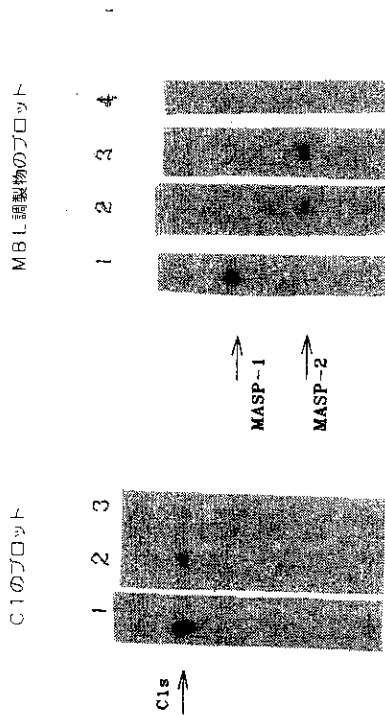
Figure 2

Figure 2 shows a partial amino acid sequence of a protein, likely a complement component, with various residues numbered. The sequence is presented in a table-like format with columns for residue numbers and the corresponding amino acid sequences. The sequence is as follows:

Residue	Sequence
1	...
2	...
3	...
4	...
5	...
6	...
7	...
8	...
9	...
10	...
11	...
12	...
13	...
14	...
15	...
16	...
17	...
18	...
19	...
20	...
21	...
22	...
23	...
24	...
25	...
26	...
27	...
28	...
29	...
30	...
31	...
32	...
33	...
34	...
35	...
36	...
37	...
38	...
39	...
40	...
41	...
42	...
43	...
44	...
45	...
46	...
47	...
48	...
49	...
50	...
51	...
52	...
53	...
54	...
55	...
56	...
57	...
58	...
59	...
60	...
61	...
62	...
63	...
64	...
65	...
66	...
67	...
68	...
69	...
70	...
71	...
72	...
73	...
74	...
75	...
76	...
77	...
78	...
79	...
80	...
81	...
82	...
83	...
84	...
85	...
86	...
87	...
88	...
89	...
90	...
91	...
92	...
93	...
94	...
95	...
96	...
97	...
98	...
99	...
100	...

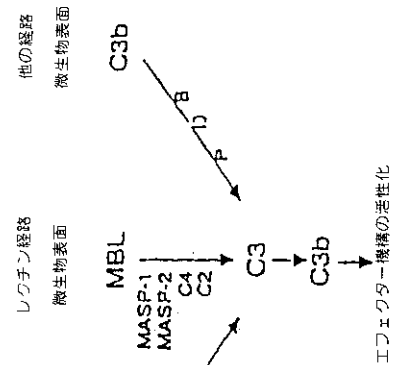
【図 4】

Figure 4



【図 5】

Figure 5



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06460 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/64, 15/12, C07K 14/47, 16/18, G01N 33/573
- (21) International Application Number: PCT/DK01/00499
- (22) International Filing Date: 13 July 2001 (13.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PA 2000 01089 13 July 2000 (13.07.2000) DK
PA 2001 00870 1 June 2001 (01.06.2001) DK
- (71) Applicants and
(72) Inventors: JENSENIUS, Jens, Christian (DK/DK); Fin-
sen, Aili 28, DK-5230 Odense (DK); THIEL, Steffen
(DK/DK); Nordtvedtvej 11, DK-8240 Risskov (DK).
- (74) Agent: HOIBERG APS; St. Kongensgade 50B, DK 1264
Copenhagen K (DK).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/06460 A2

(54) Title: MASP 2, A COMPLEMENT FIXING ENZYME, AND USES FOR IT

(57) Abstract: The present invention relates to substantially pure mannin-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) polypeptides and fragments thereof as well as nucleic acids encoding such polypeptides. Furthermore, the present invention relates to uses of a substantially pure polypeptide comprising amino acid sequences derived from mannin-binding lectin associated serine protease-2 (MASP2) or a functional homologue thereof for the production of a pharmaceutical composition as well as pharmaceutical compositions comprising MASP-2 and/or MASP-2 fragments. In addition the present invention relates to inhibitors of MASP-2 and pharmaceutical compositions comprising such inhibitors. Methods for detecting MASP 2 nucleic acid expression are included in the invention.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

MASP-2, A COMPLEMENT-FIXING ENZYME, AND USES FOR ITField of the invention

5 The invention is in the general field of innate pathways for complement fixation involving mannan-binding lectin (MBL), also termed mannan binding protein.

Background of the invention

10 The complement system comprises a complex array of enzymes and non-enzymatic proteins of importance to the function of the innate as well as the adaptive immune defense¹. Until recently two modes of activation were known, the classical pathway initiated by antibody-antigen complexes and the alternative pathway initiated by certain structures on microbial surfaces. A third, novel antibody-independent pathway of complement activation has been described². This pathway is initiated when mannan-binding lectin (MBL, first described as mannan-binding protein, MBP, see Ezekowitz, U.S. Patent 5,270,199) binds to carbohydrates.

15 MBL is structurally related to the C1q subcomponent of component C1 of complement, and it appears that MBL activates the complement system via an associated serine protease termed MASP⁴ or p100⁵, which is similar to the C1r and C1s components of the classical pathway. The new complement activation pathway is called the MBLectin pathway. According to the mechanism postulated for this pathway, MBL binds to specific carbohydrate structures found on the surface of a range of microorganisms including bacteria, yeast, parasitic protozoa and viruses⁶, and its antimicrobial activity results from activation of the terminal, lytic complement pathway components⁷ or promoting phagocytosis⁸.

20 Reportedly, the level of MBL in plasma may be genetically determined^{9,10,11}. MBL deficiency is associated with susceptibility to frequent infections with a variety of microorganisms in childhood^{12,13}, and, possibly, in adults^{13,14}. Recent information associates MBL deficiency with HIV infection and with more rapid death following development of AIDS^{15,16}. MBL binds to the a galactosyl form of IgG (G0), which is found at elevated concentrations in rheumatoid arthritis patients, and then activates complement¹⁷. MBL deficiency is also associated with a predisposition to recurrent spontaneous abortions¹⁸, and also to development of systemic lupus erythematosus¹⁹.

25 In the first clinical reconstitution trial, an infant MBL-deficient girl suffering from recurrent infections was apparently cured by injections with purified MBL²⁰. For a recent review on MBL, see ref. 6.

30 Relatively high frequencies of MBL mutations associated with MBL-deficiency have been reported in all populations studied. This observation has led to

CONFIRMATION COPY

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

2

the hypothesis that MBL may, in certain cases, render the individual more susceptible to certain intracellular infectious agents exploiting MBL to gain access to the target tissues²¹. Since MBL is a very powerful activator of the complement system, it may also be that inexpedient activation through microbial carbohydrates or endotoxins can lead to damaging inflammatory responses¹⁹. Thus, the overall survival of a population may benefit from the wide individual range of MBL concentrations.

MASP-1 (MBP-associated serine protease, MASP) is a serine protease similar in structure to C1r and C1s of the complement pathway although it has a histidine loop structure of the type found in trypsin and trypsin-like serine proteases. MASP-1 has been found to be involved in complement activation by MBL. A cDNA clone encoding MASP-1 has been reported that encodes a putative leader peptide of 19 amino acids followed by 680 amino acid residues predicted to form the mature peptide.

An abstract reports the existence of a second MASP, termed MASP-2.²²

Summary of the Invention

The present invention relates to uses of a substantially pure polypeptide comprising amino acid sequences derived from mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP2)(SEQ ID. 2) or a functional homologue thereof for the production of a pharmaceutical composition.

The invention relates to the isolation and characterization of a mannan-binding lectin (MBL) associated serine protease (MASP-2). MASP-2 shows some homology with the previously reported MASP (MASP-1) and the two C1q-associated serine proteases, C1r and C1s. MBL alone does not provide a functional MBLectin pathway of complement activation.

We have cloned and sequenced the cDNA encoding MASP-2. In addition, we have produced anti-MASP-2 antibody and constructed an assay for the estimation of MASP-2 in body fluids or tissue extracts. Furthermore, we have constructed quantitative assays for the determination of MASP-2 activity in serum or plasma, either when present as part of the MBL/MASP complex or as free MASP not associated with MBL.

Thus, one aspect of the invention features substantially pure mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) polypeptides and nucleic acids encoding such polypeptides. Preferably, the MASP-2 polypeptide retains one or more

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

3

MASP-2 functions, such as being capable of associating with mannan-binding lectin (MBL), serine protease activity, or the MASP-2 activity in an *in vitro* assay for MBLectin complement pathway function, e.g., in one of the assay systems described below. Some MASP-2 polypeptides according to the invention, e.g., those used in binding assays, may be conjugated to a label so as to permit detection and/or quantification of their presence in the assay. Suitable labels include enzymes which generate a signal (e.g., visible absorption), fluorophores, radionuclides, etc. Other MASP-2 polypeptides are capable of competitively inhibiting one of the MASP-2 activities described above, and thereby are useful in evaluating MASP-2 function. Other MASP-2 polypeptides are useful antigens or haptens for producing antibodies as described below. Compounds which competitively inhibit a MASP-2 activity are also featured. Preferably, such compounds act by inhibiting the serine protease activity of MASP-2 or of a fragment of MASP-2. Such compounds may include fragments of MBL or of MASP-2 which competitively inhibit the MBL-MASP-2 interactions critical to complement activation by the MBLectin pathway, as well as compounds, e.g., peptide fragments, which inhibit the catalytic cleavage of complement factors C4 and C2 by MASP-2.

Specific polypeptides according to this aspect of the invention include: a) a polypeptide with a molecular mass of 20K and containing the sequence identified as 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 A P P G Y R]; b) a polypeptide with a molecular mass of 52K and containing the sequence identified as SEQ ID NO:1; c) a polypeptide having the complete amino acid sequence of Fig. 6 (SEQ ID NO:2).

Another aspect of the invention includes an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide having sequence that is at least 85% identical to the sequence of SEQ ID NO:2.

The invention also features isolated nucleic acid sequences encoding the above mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) polypeptides. Such nucleic acid sequences may be included in nucleic acid vectors (e.g., expression vectors including those with regulatory nucleic acid elements permitting expression of recombinant nucleic acid in an expression system).

The invention also features antibodies that selectively bind to MASP-2. Such antibodies may be made by any of the well known techniques including polyclonal and monoclonal antibody techniques. The antibody may be coupled to a compound comprising a detectable marker, so that it can be used, e.g. in an assay to detect MASP-2.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

4

The polypeptides or antibodies may be formulated into pharmaceutical compositions and administered as therapeutics as described below.

5 The invention also features methods for detecting mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2). The method comprises: obtaining a biological sample, contacting the biological sample with a MASP-2 polypeptide specific binding partner, and detecting the bound complexes, if any, as an indication of the presence of MASP-2 in the biological sample. The binding partner used in the assay may be an antibody, or the assay for MASP-2 may test for complement fixing activity. These assays for MASP-2 may also be used for quantitative assays of MASP-2 or MASP-2 activity in biological samples. One of the binding partners may be specific for MBK thus allowing for the detection of MBL/MASP-2 complexes.

10 Methods for detecting MASP-2 nucleic acid expression are included in the invention. These methods comprise detecting RNA having a sequence encoding a MASP-2 polypeptide by mixing the sample with a nucleic acid probe that specifically hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid sequence encoding all or a fragment of MASP-2.

15 The invention also features methods for treating patients deficient in MASP-2 or MASP-2 activity. This is accomplished by administering to the patient MASP-2 polypeptide or nucleic acid encoding MASP-2. Because it is sometimes desirable to inhibit MASP-2 activity, the invention includes a method for inhibiting the activity of MASP-2 by administering to the patient a compound that inhibits expression or activity of MASP-2. Inhibition of MASP-2 activity may also be achieved by administering a MASP-2 anti-sense nucleic acid sequence.

20 The invention features an assay for polymorphisms in the nucleic acid sequence encoding MASP-2. A method of detecting the presence of MASP-2-encoding nucleic acid in a sample is claimed. As an example, the method may include mixing the sample with at least one nucleic acid probe capable of forming a complex with MASP-2-encoding nucleic acid under stringent conditions, and determining whether the probe is bound to sample nucleic acid. The invention thus includes nucleic acid probe capable of forming a complex with MASP-2-encoding nucleic acid under stringent conditions.

25 The invention features an assay for polymorphisms in the polypeptide sequence comprising MASP-2 or its precursor.

30 MASP-2 assays are useful for the determination of MASP-2 levels and MASP-2 activity in patients suffering from various diseases such as infections,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

5

inflammatory diseases and spontaneous recurrent abortion. MASP-2 is useful for the treatment of infections when MASP-2 function is suboptimal, and inhibition of MASP-2 activity is useful for regulation of inflammation and adverse effects caused by activity of the MBLectin pathway.

5 By "mannan-binding lectin associated serine protease-2" or "MASP-2" is meant the polypeptide or activity called "mannan-binding protein associated serine protease-2" or "mannose-binding protein associated serine protease" or any other polypeptide having substantial sequence identity with SEQ ID NO:2.

10 The terms "protein" and "polypeptide" are used herein to describe any chain of amino acids, regardless of length or post-translational modification (for example, glycosylation or phosphorylation). Thus, the term "MASP-2 polypeptide" includes full-length, naturally occurring MASP-2 protein, as well as recombinantly or synthetically produced polypeptide that corresponds to a full-length naturally occurring MASP-2 polypeptide, or to particular domains or portions of a naturally occurring protein. The term also encompasses mature MASP-2 which has an added amino-

15 terminal methionine (which is useful for expression in prokaryotic cells).

The term "purified" as used herein refers to a nucleic acid or peptide that is substantially free of cellular material, viral material, or culture medium when produced by recombinant DNA techniques, or chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. By "isolated nucleic acid molecule" is meant a nucleic acid molecule that is separated in any way from sequences in the naturally occurring genome of an organism. Thus, the term "isolated nucleic acid molecule" includes nucleic acid molecules which are not naturally occurring, e.g., nucleic acid molecules created by recombinant DNA techniques.

20

25 The term "nucleic acid molecule" encompasses both RNA and DNA, including cDNA, genomic DNA, and synthetic (e.g., chemically synthesized) DNA. Where single-stranded, the nucleic acid may be a sense strand or an antisense strand.

The invention also encompasses nucleic acid molecules that hybridize, preferably under stringent conditions, to a nucleic acid molecule encoding an MASP-2 polypeptide (e.g., a nucleic acid molecule having the sequence encoding SEQ ID NO:2, e.g., the protein encoding portion of the cDNA sequence shown in Fig. 6). In addition, the invention encompasses nucleic acid molecules that hybridize, preferably under stringent conditions, to a nucleic acid molecule having the sequence of the MASP-2 encoding cDNA contained in a clone. Preferably the hybridizing nucleic acid molecule consists of 400, more preferably 200 nucleotides.

30

35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

6

Preferred hybridizing nucleic acid molecules encode an activity possessed by MASP-2, e.g., they bind MBL and have activity in the MBLectin complement pathway, and can act as serine proteases.

5 Throughout the description and claims either the three letter code or the one-letter code for natural amino acids are used. Where the L or D form has not been specified it is to be understood that the amino acid in question has the natural L form, cf. Pure & Appl. Chem. Vol. (56(5) pp 595-624 (1984) or the D form, so that the peptides formed may be constituted of amino acids of L form, D form, or a sequence of mixed L forms and D forms. Where nothing is specified it is to be understood that the C-terminal amino acid of a polypeptide of the invention exists as the free carboxylic acid and the N-terminal amino acid of a polypeptide comprise a free amino-group. Where nothing else is specified amino acid can be selected from any amino acid, whether naturally occurring or not, such as alpha amino acids, beta amino acids, and/or gamma amino acids. Accordingly, the group comprises but are not limited to: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Alb, Nal, Sar, Orn, Lysine analogues DAP and DAPA.

10 The invention also features substantially pure or isolated MASP-2 polypeptides, preferably those that correspond to various functional domains of MASP-2, or fragments thereof. The polypeptides of the invention encompass amino acid sequences that are substantially identical to the amino acid sequence shown in Fig.6.

15 The polypeptides of the invention can also be chemically synthesized, synthesized by recombinant technology, or they can be purified from tissues in which they are naturally expressed, according to standard biochemical methods of purification.

20 Also included in the invention are "functional polypeptides" which possess one or more of the biological functions or activities of MASP-2. These functions or activities are described in detail in the specification. A functional polypeptide is also considered within the scope of the invention if it serves as an antigen for production of antibodies that specifically bind to MASP-2 or fragments (particularly determinant containing fragments) thereof.

25 The functional polypeptides may contain a primary amino acid sequence that has been modified from those disclosed herein. Preferably these modifications consist of conservative amino acid substitutions, as described herein. The

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

7

polypeptides may be substituted in any manner designed to promote or delay their catabolism (increase their half-life).

5 The terms "functional homologues" and "functional equivalent" are used interchangeably herein and should be understood as synonymous with one another within the scope of the present invention. Functional homologues of polypeptides according to the present invention is meant to comprise any polypeptide sequence which is capable of exerting MASP-2 activity or activity of a MASP-2 fragment, such as for example activity as a competitive inhibitor of MASP-2.

10 Functional homologues according to the present invention comprise polypeptides with an amino acid sequence, which are sharing at least some homology with the predetermined polypeptide sequences as outlined herein above. For example such polypeptides are at least about 40 percent, such as at least about 50 percent homologous, for example at least about 60 percent homologous, such as at least
15 about 70 percent homologous, for example at least about 75 percent homologous, such as at least about 80 percent homologous, for example at least about 85 percent homologous, such as at least about 90 percent homologous, for example at least 92 percent homologous, such as at least 94 percent homologous, for example at least 95 percent homologous, such as at least 96 percent homologous, for example at least 97 percent homologous, such as at least 98 percent homologous, for example at least 99 percent homologous with the predetermined polypeptide sequences as outlined herein above.

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

25 Functional homologues may comprise an amino acid sequence that comprises at least one substitution of one amino acid for any other amino acid. For example such a substitution may be a conservative amino acid substitution or it may be a non-conservative substitution.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

8

5 A conservative amino acid substitution is a substitution of one amino acid within a predetermined group of amino acids for another amino acid within the same group, wherein the amino acids within a predetermined groups exhibit similar or substantially similar characteristics. Within the meaning of the term "conservative amino acid substitution" as applied herein, one amino acid may be substituted for another within groups of amino acids characterised by having

- i) polar side chains (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, and Cys.)
- 10 ii) non-polar side chains (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, and Met)
- iii) aliphatic side chains (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
- iv) cyclic side chains (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- 15 v) aromatic side chains (Phe, Tyr, Trp)
- vi) acidic side chains (Asp, Glu)
- 20 vii) basic side chains (Lys, Arg, His)
- viii) amide side chains (Asn, Gln)
- ix) hydroxy side chains (Ser, Thr)
- 25 x) sulphur-containing side chains (Cys, Met), and
- xi) amino acids being monoamino-dicarboxylic acids or monoamino-monocarboxylic-monoamidocarboxylic acids (Asp, Glu, Asn, Gln).

30 Non-conservative substitutions are any other substitutions. A non-conservative substitution leading to the formation of a functional homologue would for example i) differ substantially in hydrophobicity, for example a hydrophobic residue (Val, Ile, Leu, Phe or Met) substituted for a hydrophilic residue such as Arg, Lys, Trp or Asn, or a hydrophilic residue such as Thr, Ser, His, Gln, Asn, Lys, Asp, Glu or Trp substituted

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

9

for a hydrophobic residue; and/or ii) differ substantially in its effect on polypeptide backbone orientation such as substitution of or for Pro or Gly by another residue; and/or iii) differ substantially in electric charge, for example substitution of a negatively charged residue such as Glu or Asp for a positively charged residue such as Lys, His or Arg (and vice versa); and/or iv) differ substantially in steric bulk, for example substitution of a bulky residue such as His, Trp, Phe or Tyr for one having a minor side chain, e.g. Ala, Gly or Ser (and vice versa).

Functional homologues according to the present invention may comprise more than one such substitution, such as e.g. two amino acid substitutions, for example three or four amino acid substitutions, such as five or six amino acid substitutions, for example seven or eight amino acid substitutions, such as from 10 to 15 amino acid substitutions, for example from 15 to 25 amino acid substitution, such as from 25 to 30 amino acid substitutions, for example from 30 to 40 amino acid substitution, such as from 40 to 50 amino acid substitutions, for example from 50 to 75 amino acid substitution, such as from 75 to 100 amino acid substitutions, for example more than 100 amino acid substitutions.

The addition or deletion of an amino acid may be an addition or deletion of from 2 to 5 amino acids, such as from 5 to 10 amino acids, for example from 10 to 20 amino acids, such as from 20 to 50 amino acids. However, additions or deletions of more than 50 amino acids, such as additions from 50 to 200 amino acids, are also comprised within the present invention.

The polypeptides according to the present invention, including any variants and functional homologues thereof, may in one embodiment comprise more than 5 amino acid residues, such as more than 10 amino acid residues, for example more than 20 amino acid residues, such as more than 25 amino acid residues, for example more than 50 amino acid residues, such as more than 75 amino acid residues, for example more than 100 amino acid residues, such as more than 150 amino acid residues, for example more than 200 amino acid residues.

Additional factors may be taken into consideration when determining functional homologues according to the meaning used herein. For example functional homo-

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

10

logues may be capable of associating with antisera which are specific for the polypeptides according to the present invention.

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

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

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

The amino acid hydrophilicity values are: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0, ± 0.1); glutamate (+3.0, ± 0.1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5, ± 0.1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4) (U.S. 4,554,101).

Substitution of amino acids can therefore in one embodiment be made based upon their hydrophobicity and hydrophilicity values and the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, including charge, size, and the like. Exemplary amino acid substitutions which take various of the foregoing characteristics into considera-

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

11

tion are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

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

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

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

Homologues of nucleic acid sequences within the scope of the present invention are nucleic acid sequences, which encodes an RNA and/or a protein with similar biological function, and which is either

35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

12

- a) at least 50% identical, such as at least 60% identical, for example at least 70% identical, such as at least 75% identical, for example at least 80% identical, such as at least 85% identical, for example at least 90% identical, such as at least 95% identical
- 5 b) or able to hybridise to the complementary strand of said nucleic acid sequence under stringent conditions.

Stringent conditions as used herein shall denote stringency as normally applied in connection with Southern blotting and hybridisation as described e.g. by Southern E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517. For such purposes it is routine practise to include steps of prehybridization and hybridization. Such steps are normally performed using solutions containing 6x SSPE, 5% Denhardt's, 0.5% SDS, 50% formamide, 100 g/ml denaturated salmon testis DNA (incubation for 18 hrs at 42°C), followed by washings with 2x SSC and 0.5% SDS (at room temperature and at 37°C), and a washing with 0.1x SSC and 0.5% SDS (incubation at 68°C for 30 min), as described by Sambrook et al., 1989, in "Molecular Cloning/A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, which is incorporated herein by reference.

Homologous of nucleic acid sequences also encompass nucleic acid sequences which comprise additions and/or deletions. Such additions and/or deletions may be internal or at the end. Additions and/or deletions may be of 1-5 nucleotides, such as 5 to 10 nucleotide, for example 10 to 50 nucleotides, such as 50 to 100 nucleotides, for example at least 100 nucleotides.

Polypeptides or other compounds of interest are said to be "substantially pure" when they are distinct from any naturally occurring composition, and suitable for at least one of the uses proposed herein. While preparations that are only slightly altered with respect to naturally occurring substances may be somewhat useful, more typically, the preparations are at least 10% by weight (dry weight) the compound of interest. Preferably, the preparation is at least 60%, more preferably at least 75%, and most preferably at least 90%, by weight the compound of interest. Purity can be measured by any appropriate standard method, for example, by column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis.

A polypeptide or nucleic acid molecule is "substantially identical" to a reference polypeptide or nucleic acid molecule if it has a sequence that is at least 85%,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

13

preferably at least 90%, and more preferably at least 95%, 98%, or 99% identical to the sequence of the reference polypeptide or nucleic acid molecule.

Where a particular polypeptide is said to have a specific percent identity to a reference polypeptide of a defined length, the percent identity is relative to the reference peptide. Thus, a peptide that is 50% identical to a reference polypeptide that is 100 amino acids long can be a 50 amino acid polypeptide that is completely identical to a 50 amino acid long portion of the reference polypeptide. It might also be a 100 amino acid long polypeptide which is 50% identical to the reference polypeptide over its entire length. Of course, many other polypeptides will meet the same criteria.

In the case of polypeptide sequences which are less than 100% identical to a reference sequence, the non-identical positions are preferably, but not necessarily, conservative substitutions for the reference sequence. Conservative substitutions typically include substitutions within the following groups: glycine and alanine; valine, isoleucine, and leucine; aspartic acid and glutamic acid; asparagine and glutamine; serine and threonine; lysine and arginine; and phenylalanine and tyrosine.

For polypeptides, the length of the reference polypeptide sequence will generally be at least 16 amino acids, preferably at least 20 amino acids, more preferably at least 25 amino acids, and most preferably 35 amino acids, 50 amino acids, or 100 amino acids. For nucleic acids, the length of the reference nucleic acid sequence will generally be at least 50 nucleotides, preferably at least 60 nucleotides, more preferably at least 75 nucleotides, and most preferably 100 nucleotides or 300 nucleotides.

Sequence identity can be measured using sequence analysis software (for example, the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705), with the default parameters as specified therein.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into a vector, as described below, which will facilitate expression of the insert. The nucleic acid molecules and the polypeptides they encode can be used directly as diagnostic or therapeutic agents, or can be used (directly in the case of the polypeptide or indirectly in the case of a nucleic acid molecule) to generate antibodies that, in turn, are clinically useful as a therapeutic or diagnostic agent. Accordingly, vectors containing the nucleic acid of the invention, cells transfected with these vectors, the polypeptides expressed, and antibodies generated, against either the entire polypeptide or an antigenic fragment thereof, are among the preferred embodiments.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

14

The invention also features antibodies, e.g., monoclonal, polyclonal, and engineered antibodies, which specifically bind MASP-2. By "specifically binds" is meant an antibody that recognizes and binds to a particular antigen, e.g., the MASP-2 polypeptide of the invention, but which does not substantially recognize or bind to other molecules in a sample, e.g., a biological sample, which includes MASP-2. References to constructs of antibody (or fragment thereof) coupled to a compound comprising a detectable marker includes constructs made by any technique, including chemical means or by recombinant techniques. The invention also features compounds capable of inhibiting activity of MASP-2 or a functional homologue thereof. One activity of MASP-2 is to aid complement activation. Another activity of MASP-2 is the serine protease activity of MASP-2. Preferably, compounds capable of inhibiting activity of MASP-2 are capable of inhibiting complement activation by MASP-2. It is important to realise that only a minor proportion of MASP's are associated with MBL in serum. Accordingly, a compound capable of inhibiting MASP-2 activity may exert an inhibitory effect on the complement activation by associating with MBL without activating MBL, and so depleting serum of active MASP-MBL complexes. The compound may be a fragment of MASP-2 or it may be a mutant of MASP-2 or a fragment of a mutant of MASP-2. Furthermore, the compound may be an antibody.

The invention also features antagonists and agonists of MASP-2 that can inhibit or enhance one or more of the functions or activities of MASP-2, respectively. Suitable antagonists can include small molecules (i.e., molecules with a molecular weight below about 500), large molecules (i.e., molecules with a molecular weight above about 500), antibodies that bind and "neutralize" MASP-2 (as described below), polypeptides which compete with a native form of MASP-2 for binding to a protein, e.g., MBL, and nucleic acid molecules that interfere with transcription of MASP-2 (for example, antisense nucleic acid molecules and ribozymes). Agonists of MASP-2 also include small and large molecules, and antibodies other than "neutralizing" antibodies.

The invention also features molecules which can increase or decrease the expression of MASP-2 (e.g., by influencing transcription or translation). Small molecules (i.e., molecules with a molecular weight below about 500), large molecules (i.e., molecules with a molecular weight above about 500), and nucleic acid molecules that can be used to inhibit the expression of MASP-2 (for example, antisense and ribozyme molecules) or to enhance their expression (for example, expression constructs that place nucleic acid sequences encoding MASP-2 under the control of a strong promoter system), and transgenic animals that express a MASP-2 transgene.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

15

5 The invention encompasses methods for treating disorders associated with aberrant expression or activity of MASP-2. Thus, the invention includes methods for treating disorders associated with excessive expression or activity of MASP-2. Such methods entail administering a compound which decreases the expression or activity of MASP-2. The invention also includes methods for treating disorders associated with insufficient expression of MASP-2. These methods entail administering a compound which increases the expression or activity of MASP-2.

10 By "competitively inhibiting" serine protease activity is meant that, for example, the action of an altered MBL or fragment thereof that can bind to a MASP-2 peptide, reversibly or irreversibly without activating serine protease activity. Conversely, a fragment of MASP-2, e.g., a polypeptide encompassing the N-terminal part of MASP-2, may competitively inhibit the binding of the intact MASP-2 and thus effectively inhibit the activation of MASP-2.

15 The invention also features methods for detecting a MASP-2 polypeptide. Such methods include: obtaining a biological sample; contacting the sample with an antibody that specifically binds MASP-2 under conditions which permit specific binding; and detecting any antibody-MASP-2 complexes formed.

20 In addition, the present invention encompasses methods and compositions for the diagnostic evaluation, typing, and prognosis of disorders associated with inappropriate expression or activity of MASP-2. For example, the nucleic acid molecules of the invention can be used as diagnostic hybridization probes to detect, for example, inappropriate expression of MASP-2 or mutations in the MASP-2 gene. Such methods may be used to classify cells by the level of MASP-2 expression.

25 Alternatively, the nucleic acid molecules can be used as primers for diagnostic PCR analysis for the identification of gene mutations, allelic variations and regulatory defects in the MASP-2 gene. The present invention further provides for diagnostic kits for the practice of such methods.

30 The invention features methods of identifying compounds that modulate the expression or activity of MASP-2 by assessing the expression or activity of MASP-2 in the presence and absence of a selected compound. A difference in the level of expression or activity of MASP-2 in the presence and absence of the selected compound indicates that the selected compound is capable of modulating expression or activity of MASP-2. Expression can be assessed either at the level of gene expression (e.g., by measuring mRNA) or protein expression by techniques that are

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

16

well known to skilled artisans. The activity of MASP-2 can be assessed functionally, i.e., by assaying the ability of the compound to activate complement.

The preferred methods and materials are described below in examples which are meant to illustrate, not limit, the invention. Skilled artisans will recognize methods and materials that are similar or equivalent to those described herein, and that can be used in the practice or testing of the present invention.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are described herein. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and are not intended to be limiting.

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

Brief Description of the Drawings

Figures 1a-1b depict a Western blot of human plasma proteins purified by sugar affinity chromatography.

Figure 2 shows the sequence alignment²¹ of the amino acid sequences of MASP-2 (clone phl-4), MASP-1^{17,22}, C1^{23,24} and C1s^{25,26}.

Figures 3a-3b are representations of the results demonstrating molecular complexes formed between MBL, MASP-1 and MASP-2.

Figures 4a-4b are representations of Western blots demonstrating the activation of C4 by C1s and MASP-2.

Figure 5 illustrates the three pathways of complement activation.

Figure 6 shows the cDNA sequence and deduced amino acid sequence of MASP-2.

Brief description of sequence listing

SEQ ID 1: Amino acid sequence of 20 kD MASP-2 fragment

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

17

SEQ ID 2: Amino acid sequence of full length MASP-2 including the signal peptide

SEQ ID 3: Amino acid sequence of full length MASP-2 without the signal peptide

5

Description of the Preferred Embodiments

MASP-2 nucleic acid molecules

The MASP-2 nucleic acid molecules of the invention can be cDNA, genomic DNA, synthetic DNA, or RNA, and can be double-stranded or single-stranded (i.e., either a sense or an antisense strand). Fragments of these molecules are also considered within the scope of the invention, and can be produced, for example, by the polymerase chain reaction (PCR) or generated by treatment with one or more restriction endonucleases. A ribonucleic acid (RNA) molecule can be produced by *in vitro* transcription. Preferably, the nucleic acid molecules encode polypeptides that, regardless of length, are soluble under normal physiological conditions.

The nucleic acid molecules of the invention can contain naturally occurring sequences, or sequences that differ from those that occur naturally, but, due to the degeneracy of the genetic code, encode the same polypeptide (for example, the polypeptide of SEQ ID NO:2). In addition, these nucleic acid molecules are not limited to sequences that only encode polypeptides, and thus, can include some or all of the non-coding sequences that lie upstream or downstream from a coding sequence.

The nucleic acid molecules of the invention can be synthesized (for example, by phosphoramidite-based synthesis) or obtained from a biological cell, such as the cell of a mammal. Thus, the nucleic acids can be those of a human, mouse, rat, guinea pig, cow, sheep, horse, pig, rabbit, monkey, dog, or cat. Combinations or modifications of the nucleotides within these types of nucleic acids are also encompassed.

In addition, the isolated nucleic acid molecules of the invention encompass fragments that are not found as such in the natural state. Thus, the invention encompasses recombinant molecules, such as those in which a nucleic acid molecule (for example, an isolated nucleic acid molecule encoding MASP-2) is incorporated into a vector (for example, a plasmid or viral vector) or into the genome of a heterologous cell (or the genome of a homologous cell, at a position other than the natural

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

18

chromosomal location). Recombinant nucleic acid molecules and uses therefore are discussed further below.

5 In the event the nucleic acid molecules of the invention encode or act as antisense molecules, they can be used for example, to regulate translation of MASP-2. Techniques associated with detection or regulation of nucleic acid expression are well known to skilled artisans and can be used to diagnose and/or treat disorders associated with MASP-2 activity. These nucleic acid molecules are discussed further below in the context of their clinical utility.

10 The invention also encompasses nucleic acid molecules that hybridize under stringent conditions to a nucleic acid molecule encoding a MASP-2 polypeptide. The cDNA sequence described herein (SEQ ID NO:3) can be used to identify these nucleic acids, which include, for example, nucleic acids that encode homologous polypeptides in other species, and splice variants of the MASP-2 gene in humans or other mammals. Accordingly, the invention features methods of detecting and isolating these nucleic acid molecules. Using these methods, a sample (for example, a nucleic acid library, such as a cDNA or genomic library) is contacted (or "screened") with a MASP-2-specific probe (for example, a fragment of the cDNA sequence depicted in figure 8 encoding the polypeptide sequence SEQ ID NO. 2, that is at least 12 nucleotides long). The probe will selectively hybridize to nucleic acids encoding related polypeptides (or to complementary sequences thereof). Because the polypeptide encoded by MASP-2 is related to other serine proteases, the term "selectively hybridize" is used to refer to an event in which a probe binds to nucleic acids encoding MASP-2 (or to complementary sequences thereof) to a detectably greater extent than to nucleic acids encoding other serine proteases (or to complementary sequences thereof). The probe, which can contain at least 12 (for example, 15, 25, 50, 100, or 200 nucleotides) can be produced using any of several standard methods (see, for example, Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I," Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., NY, 1989). For example, the probe can be generated using PCR amplification methods in which oligonucleotide primers are used to amplify a MASP-2-specific nucleic acid sequence (for example, a nucleic acid encoding the N-terminus of mature MASP-2) that can be used as a probe to screen a nucleic acid library, as described in Example 4 below, and thereby detect nucleic acid molecules (within the library) that hybridize to the probe.

35 One single-stranded nucleic acid is said to hybridize to another if a duplex forms between them. This occurs when one nucleic acid contains a sequence that is

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

19

the reverse and complement of the other (this same arrangement gives rise to the natural interaction between the sense and antisense strands of DNA in the genome and underlies the configuration of the "double helix"). Complete complementarity between the hybridizing regions is not required in order for a duplex to form; it is only
5 necessary that the number of paired bases is sufficient to maintain the duplex under the hybridization conditions used.

Typically, hybridization conditions are of low to moderate stringency. These conditions favor specific interactions between completely complementary sequences, but allow some non-specific interaction between less than perfectly
10 matched sequences to occur as well. After hybridization, the nucleic acids can be "washed" under moderate or high conditions of stringency to dissociate duplexes that are bound together by some non-specific interaction (the nucleic acids that form these duplexes are thus not completely complementary).

As is known in the art, the optimal conditions for washing are determined empirically, often by gradually increasing the stringency. The parameters that can be changed to affect stringency include, primarily, temperature and salt concentration. In
15 general, the lower the salt concentration and the higher the temperature, the higher the stringency. Washing can be initiated at a low temperature (for example, room temperature) using a solution containing a salt concentration that is equivalent to or lower than that of the hybridization solution. Subsequent washing can be carried out using progressively warmer solutions having the same salt concentration. As
20 alternatives, the salt concentration can be lowered and the temperature maintained in the washing step, or the salt concentration can be lowered and the temperature increased. Additional parameters can also be altered. For example, use of a destabilizing agent, such as formamide, alters the stringency conditions.
25

In reactions where nucleic acids are hybridized, the conditions used to achieve a given level of stringency will vary. There is not one set of conditions, for example, that will allow duplexes to form between all nucleic acids that are 85% identical to one another; hybridization also depends on unique features of each
30 nucleic acid. The length of the sequence, the composition of the sequence (for example, the content of purine-like nucleotides versus the content of pyrimidine-like nucleotides) and the type of nucleic acid (for example, DNA or RNA) affect hybridization. An additional consideration is whether one of the nucleic acids is immobilized (for example, on a filter).

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

20

An example of a progression from lower to higher stringency conditions is the following, where the salt content is given as the relative abundance of SSC (a salt solution containing sodium chloride and sodium citrate; 2X SSC is 10-fold more concentrated than 0.2X SSC). Nucleic acids are hybridized at 42°C in 2X SSC/0.1% SDS (sodium dodecylsulfate; a detergent) and then washed in 0.2X SSC/0.1% SDS at room temperature (for conditions of low stringency); 0.2X SSC/0.1% SDS at 42°C (for conditions of moderate stringency); and 0.1X SSC at 68°C (for conditions of high stringency). Washing can be carried out using only one of the conditions given, or each of the conditions can be used (for example, washing for 10-15 minutes each in the order listed above). Any or all of the washes can be repeated. As mentioned above, optimal conditions will vary and can be determined empirically.

A second set of conditions that are considered "stringent conditions" are those in which hybridization is carried out at 50°C in Church buffer (7% SDS, 0.5% NaHPO₄, 1 M EDTA, 1% bovine serum albumin) and washing is carried out at 50°C in 2X SSC.

Once detected, the nucleic acid molecules can be isolated by any of a number of standard techniques (see, for example, Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual," 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

The invention also encompasses: (a) expression vectors that contain any of the foregoing MASP-2-related coding sequences and/or their complements (that is, "antisense" sequence); (b) expression vectors that contain any of the foregoing MASP-2-related coding sequences operatively associated with a regulatory element (examples of which are given below) that directs the expression of the coding sequences; (c) expression vectors containing, in addition to sequences encoding a MASP-2 polypeptide, nucleic acid sequences that are unrelated to nucleic acid sequences encoding MASP-2, such as molecules encoding a reporter or marker; and (d) genetically engineered host cells that contain any of the foregoing expression vectors and thereby express the nucleic acid molecules of the invention in the host cell.

Recombinant nucleic acid molecule can contain a sequence encoding a soluble MASP-2, mature MASP-2, MASP-2 having a signal sequence, or functional domains of MASP-2 such as the serine protease domain, EGF domain, or the MBL-binding domain. The full length MASP-2 polypeptide, a domain of MASP-2, or a fragment thereof may be fused to additional polypeptides, as described below.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

21

Similarly, the nucleic acid molecules of the invention can encode the mature form of MASP-2 or a form that encodes a polypeptide which facilitates secretion. In the latter instance, the polypeptide is typically referred to as a proprotein, which can be converted into an active form by removal of the signal sequence, for example, within the host cell. Proproteins can be converted into the active form of the protein by removal of the inactivating sequence.

The regulatory elements referred to above include, but are not limited to, inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements, which are known to those skilled in the art, and which drive or otherwise regulate gene expression. Such regulatory elements include but are not limited to the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, the early or late promoters of SV40 adenovirus, the *lac* system, the *trp* system, the *TAC* system, the *TRC* system, the major operator and promoter regions of phage λ , the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of acid phosphatase, and the promoters of the yeast α -mating factors.

Similarly, the nucleic acid can form part of a hybrid gene encoding additional polypeptide sequences, for example, sequences that function as a marker or reporter. Examples of marker or reporter genes include β -lactamase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), adenosine deaminase (ADA), aminoglycoside phosphotransferase (*neo^r*, G418^r), dihydrofolate reductase (DHFR), hygromycin-B-phosphotransferase (HPR), thymidine kinase (TK), *lacZ* (encoding β -galactosidase), green fluorescent protein (GFP), and xanthine guanine phosphoribosyltransferase (XGPRT). As with many of the standard procedures associated with the practice of the invention, skilled artisans will be aware of additional useful reagents, for example, of additional sequences that can serve the function of a marker or reporter. Generally, the hybrid polypeptide will include a first portion and a second portion; the first portion being a MASP-2 polypeptide and the second portion being, for example, the reporter described above or an immunoglobulin constant region.

The expression systems that may be used for purposes of the invention include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria (for example, *E. coli* and *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA expression vectors containing the nucleic acid molecules of the invention; yeast (for example, *Saccharomyces* and *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing the nucleic acid molecules of the invention (preferably containing the nucleic acid sequence of MASP-2 (SEQ ID NO:3)); insect cell systems

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

22

infected with recombinant virus expression vectors (for example, baculovirus) containing the nucleic acid molecules of the invention; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (for example, cauliflower mosaic virus (CaMV) and tobacco mosaic virus (TMV)) or transformed with recombinant plasmid expression
 5 vectors (for example, Ti plasmid) containing MASP-2 nucleotide sequences; or mammalian cell systems (for example, COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38, and NIH 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (for example, the metallothionein promoter) or from mammalian viruses (for example, the adenovirus late promoter and the vaccinia virus 7.5K promoter).
 10

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the gene product being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions containing MASP-2 polypeptides or for
 15 raising antibodies to those polypeptides, vectors that are capable of directing the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited to, the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2:1791, 1983), in which the coding sequence of the insert may be ligated individually into the vector in frame with the lacZ coding region so
 20 that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109, 1985; Van Heeke and Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509, 1989); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-
 25 agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) can be used as a vector to express foreign genes. The virus grows in
 30 *Spodoptera frugiperda* cells. The coding sequence of the insert may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). Successful insertion of the coding sequence will result in inactivation of the polyhedrin gene and production of non-occluded recombinant virus (i.e., virus lacking the proteinaceous coat coded for by the polyhedrin gene). These recombinant viruses
 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

23

are then used to infect *Spodoptera frugiperda* cells in which the inserted gene is expressed. (for example, see Smith et al., *J. Virol.* 46:584, 1983; Smith, U.S. Patent No. 4,215,051).

5 In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the nucleic acid molecule of the invention may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, for example, the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (for example, 10 region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing a MASP-2 gene product in infected hosts (for example, see Logan and Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659, 1984). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted nucleic acid molecules. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where an 15 entire gene or cDNA, including its own initiation codon and adjacent sequences, is inserted into the appropriate expression vector, no additional translational control signals may be needed. However, in cases where only a portion of the coding sequence is inserted, exogenous translational control signals, including, perhaps, the ATG initiation codon, must be provided. Furthermore, the initiation codon must be in 20 phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:516-544, 25 1987).

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (for example, glycosylation) and processing (for example, cleavage) of protein products may be important for the 30 function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the 35 primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be

used. The mammalian cell types listed above are among those that could serve as suitable host cells.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the MASP-2 sequences described above may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (for example, promoter, enhancer sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method can advantageously be used to engineer cell lines which express MASP-2. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that affect the endogenous activity of the gene product and for production of MASP-2 for therapeutic uses. These methods may also be used to modify cells that are introduced into a host organism either for experimental or therapeutic purposes. The introduced cells may be transient or permanent within the host organism.

A number of selection systems can be used. For example, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, et al., *Cell* 11:223, 1977), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska and Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026, 1962), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, et al., *Cell* 22:817, 1980) genes can be employed in tk^r, hgprt^r or aprt^r cells, respectively. Also, anti-metabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567, 1980; O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527, 1981); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072, 1981); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1, 1981); and hygromycin (Santerre et al., *Gene* 30:147, 1984).

Alternatively, any fusion protein may be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8976,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

25

1991). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the gene's open reading frame is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. Extracts from cells infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni^{2+} -nitriloacetic acid-agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-containing buffers.

MASP-2 polypeptides

The MASP-2 polypeptides according to the present invention are polypeptides comprising amino acid sequences derived from SEQ ID NO. 2. Furthermore, MASP-2 polypeptides described herein are those encoded by any of the nucleic acid molecules described above and include MASP-2 fragments, mutants, truncated forms, and fusion proteins. These polypeptides can be prepared for a variety of uses, including but not limited to the generation of antibodies, as reagents in diagnostic assays, for the identification of other cellular gene products or compounds that can modulate the MBlectin response, and as pharmaceutical reagents useful for the treatment of inflammation and certain disorders (described below) that are associated with activity of the MBlectin pathway. Preferred polypeptides are substantially pure MASP-2 polypeptides, including those that correspond to the polypeptide with an intact signal sequence (extending from amino acids 1-15 of SEQ ID NO:2), the mature form of the polypeptide (extending from amino acids 16-686 of SEQ ID NO:2) of the human MASP-2 polypeptide as well as polypeptides representing a part of the MASP-2 polypeptide. Especially preferred are polypeptides that are soluble under normal physiological conditions.

In one embodiment the invention also encompasses polypeptides that are functionally equivalent to MASP-2. Functional equivalents may comprise only a fragment of the MASP-2 amino acid sequence as outlined in SEQ ID. 2. In preferred embodiments the MASP-2 polypeptides are selected from the group consisting of:

- i) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO 1 or a functional equivalent thereof; and
- ii) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO 1 having a molecular mass of 20 kD or a functional equivalent thereof; and
- iii) Polypeptide comprises amino acid 30 to 444 of SEQ ID NO. 2 or a functional equivalent thereof; and

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

26

- iv) Polypeptide comprises amino acid 30 to 444 of SEQ ID NO. having a molecular mass of 52 kD or a functional equivalent thereof; and
- v) Polypeptide comprising amino acid 138 to 296 of SEQ ID NO. 2 or a functional equivalent thereof; and
- 5 vi) Polypeptides comprising an amino acid sequence derived from SEQ ID NO 2 having serine protease activity or a functional equivalent thereof; and
- vii) Polypeptides comprising an amino acid sequence derived from SEQ ID NO 2 capable of MASP-2 activity in an in vitro assay for MBL complement pathway function; and
- 10 viii) Polypeptides comprising amino acid 15 to 671 of SEQ ID NO 3 or a functional equivalent thereof; and
- ix) Polypeptides comprising amino acid 16 to 296 of SEQ ID NO. 2 or a functional equivalent thereof; and
- 15 x) Polypeptides comprising amino acid 30 to 296 of SEQ ID NO. 2 or a functional equivalent thereof.

These polypeptides are equivalent to MASP-2 in that they are capable of carrying out one or more of the functions of MASP-2 in a biological system. Preferred MASP-2 polypeptides have 20%, 40%, 50%, 75%, 80%, or even 90% of the activity of the full-length, mature human form of MASP-2 described herein. Such comparisons are generally based on an assay of biological activity in which equal concentrations of the polypeptides are used and compared. The comparison can also be based on the amount of the polypeptide required to reach 50% of the maximal activity obtainable.

Functionally equivalent proteins can be those, for example, that contain additional, deleted or substituted amino acid residues. Substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. Amino acids that are typically considered to provide a conservative substitution for one another are specified in the summary of the invention. D-amino acids may be introduced in order to modify the half-life of the polypeptide.

Polypeptides that are functionally equivalent to MASP-2 (SEQ ID NO:2) can be made using random mutagenesis techniques well known to those skilled in the art (and the resulting mutant MASP-2 proteins can be tested for activity). It is more likely, however, that such polypeptides will be generated by site-directed mutagenesis

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

27

(again using techniques well known to those skilled in the art). These polypeptides may have an increased function, *i.e.*, a greater ability to activate the MBLectin pathway. Such polypeptides can be used to enhance the activity of MBLectin pathway immune function.

5 To design functionally equivalent polypeptides, it is useful to distinguish between conserved positions and variable positions. This can be done by aligning the sequence of MASP-2 cDNAs that were obtained from various organisms. Skilled artisans will recognize that conserved amino acid residues are more likely to be necessary for preservation of function. Thus, it is preferable that conserved residues
10 are not altered.

Mutations within the MASP-2 coding sequence can be made to generate MASP-2 peptides that are better suited for expression in a selected host cell. Introduction of a glycosylation sequence can also be used to generate a MASP-2 polypeptide with altered biological characteristics.

15 The invention also features methods for assay of polymorphisms within the polypeptide sequence comprising MASP-2 or its precursor. This may be accomplished by a number of techniques. For example, the purified polypeptide is subjected to tryptic digestion and the resulting fragments analyzed by either one- or two dimensional electrophoresis. The results from analysis of a sample polypeptide are compared to the
20 results using a known sequence. Also the analysis may encompass separation of a biological sample (e.g., serum or other body fluids) by either one- or two-dimensional electrophoresis followed by transfer of the separated proteins onto a membrane (western blot). The membrane is then reacted with antibodies against MASP-2, followed by a secondary labelled antibody. The staining pattern is compared with that
25 obtained using a sample with a known sequence or modification.

The polypeptides of the invention can be expressed fused to another polypeptide, for example, a marker polypeptide or fusion partner. For example, the polypeptide can be fused to a hexa-histidine tag to facilitate purification of bacterially expressed protein or a hemagglutinin tag to facilitate purification of protein expressed
30 in eukaryotic cells. The MASP-2 polypeptide of the invention, or a portion thereof, can also be altered so that it has a longer circulating half-life by fusion to an immunoglobulin Fc domain (Capon et al., Nature 337:525-531, 1989). Similarly, a dimeric form of the MASP-2 polypeptide can be produced, which has increased stability *in vivo*.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

28

The polypeptides of the invention can be chemically synthesized (for example, see Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Principles," W.H. Freeman & Co., NY, 1983), or, perhaps more advantageously, produced by recombinant DNA technology as described herein. For additional guidance, skilled artisans may consult Ausubel et al. (*supra*), Sambrook et al. ("Molecular Cloning, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and, particularly for examples of chemical synthesis Gait, M.J. Ed. ("Oligonucleotide Synthesis," IRL Press, Oxford, 1984).

The invention also features polypeptides that may be capable of competitively inhibiting MASP-2 activity. In one embodiment such polypeptides may be selected from the group consisting of:

- i) Polypeptides comprising a fragment of the polypeptide of SEQ ID NO: 2, said polypeptide being a competitive inhibitor of complexing of MBL/MASP-2 or a functional equivalent thereof; and
- ii) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein one or more of the amino acid residues at position 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, or 19 has been substituted with another amino acid residue; and
- iii) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein at least two of the amino acid residues at position 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, or 19 has been substituted with another amino acid residue; and
- iv) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein the arg at position 14 has been substituted for another amino acid; and
- v) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein the arg at position 14 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting of small uncharged amino acids; and
- vi) Polypeptides comprising the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein the arg at position 14 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting of gly and ala; and

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

29

- vii) Polypeptides comprising fragments of mannan-binding lectin (MBL) that can associate with MASP-2 or functional homologues thereof.
- viii) Antibodies that selectively binds MASP-2

5 The invention also features polypeptides that interact with MASP-2 (and the genes that encode them) and thereby alter the function of MASP-2. Interacting polypeptides can be identified using methods known to those skilled in the art. One suitable method is the "two-hybrid system," which detects protein interactions *in vivo* (Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578, 1991). A kit for practicing this method is available from Clontech (Palo Alto, CA).

Anti-MASP-2 antibodies

Human MASP-2 polypeptides (or immunogenic fragments or analogs) can be used to raise antibodies useful in the invention; such polypeptides can be produced by recombinant techniques or synthesized (see, for example, "Solid Phase Peptide Synthesis," *supra*; Ausubel et al., *supra*). In general, the peptides can be coupled to a carrier protein, such as KLH, as described in Ausubel et al., *supra*, mixed with an adjuvant, and injected into a host mammal. Also the carrier could be PPD. Antibodies can be purified by peptide antigen affinity chromatography.

20 In particular, various host animals can be immunized by injection with a MASP-2 protein or polypeptide. Host animals include rabbits, mice, guinea pigs, rats, and chickens. Various adjuvants that can be used to increase the immunological response depend on the host species and include Freund's adjuvant (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Potentially useful human adjuvants include BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. Polyclonal antibodies are heterogeneous populations of antibody molecules that are contained in the sera of the immunized animals.

30 Antibodies within the invention therefore include polyclonal antibodies and, in addition, monoclonal antibodies, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, and molecules produced using a Fab expression library, and antibodies or fragments produced by phage display techniques.

35 Monoclonal antibodies, which are homogeneous populations of antibodies to a particular antigen, can be prepared using the MASP-2 proteins described above

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

30

and standard hybridoma technology (see, for example, Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:511, 1976; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:292, 1976; Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas," Elsevier, NY, 1981; Ausubel et al., *supra*).

5 In particular, monoclonal antibodies can be obtained by any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture such as described in Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975, and U.S. Patent No. 4,376,110; the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72, 1983; Cole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026, 1983), and the EBV-
10 hybridoma technique (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983). Such antibodies can be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. (In the case of chickens, the immunoglobulin class can also be IgY.) The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*. The ability to produce high titers of
15 mAbs *in vivo* makes this the presently preferred method of production, but in some cases, *in vitro* production will be preferred to avoid introducing cancer cells into live animals, for example, in cases where the presence of normal immunoglobulins coming from the acitis fluids are unwanted, or in cases involving ethical considerations.

Once produced, polyclonal, monoclonal, or phage-derived antibodies are
20 tested for specific MASP-2 recognition by Western blot or immunoprecipitation analysis by standard methods, e.g., as described in Ausubel et al., *supra*. Antibodies that specifically recognize and bind to MASP-2 are useful in the invention. For example, such antibodies can be used in an immunoassay to monitor the level of MASP-2 produced by an animal (for example, to determine the amount or subcellular location of
25 MASP-2). Also, the antibodies may be used as MASP-2 inhibitors as discussed below.

Preferably, antibodies of the invention are produced using fragments of the MASP-2 protein which lie outside highly conserved regions and appear likely to be antigenic, by criteria such as high frequency of charged residues. In one specific
30 example, such fragments are generated by standard techniques of PCR, and are then cloned into the pGEX expression vector (Ausubel et al., *supra*). Fusion proteins are expressed in *E. coli* and purified using a glutathione agarose affinity matrix as described in Ausubel, et al., *supra*.

In some cases it may be desirable to minimize the potential problems of low
35 affinity or specificity of antisera. In such circumstances, two or three fusions can be generated for each protein, and each fusion can be injected into at least two rabbits.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

31

Antisera can be raised by injections in a series, preferably including at least three booster injections.

Antisera is also checked for its ability to immunoprecipitate recombinant MASP-2 proteins or control proteins, such as glucocorticoid receptor, CAT, or luciferase.

The antibodies can be used, for example, in the detection of the MASP-2 in a biological sample as part of a diagnostic assay. Antibodies also can be used in a screening assay to measure the effect of a candidate compound on expression or localization of MASP-2. Additionally, such antibodies can be used in conjunction with the gene therapy techniques described to, for example, evaluate the normal and/or engineered MASP-2-expressing cells prior to their introduction into the patient. Such antibodies additionally can be used in a method for inhibiting abnormal MASP-2 activity.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604, 1984; Takeda et al., *Nature*, 314:452, 1984) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 4,946,776, 4,946,778, and 4,704,692) can be adapted to produce single chain antibodies against a MASP-2 protein or polypeptide. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide.

Antibody fragments that recognize and bind to specific epitopes can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to F(ab')₂ fragments that can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule, and Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries can be constructed (Huse et al., *Science*, 246:1275, 1989) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity.

Antibodies to MASP-2 can, in turn, be used to generate anti-idiotypic antibodies that resemble a portion of MASP-2 using techniques well known to those

skilled in the art (see, e.g., Greenspan et al., *FASEB J.* 7:437, 1993; Nissinoff, *J. Immunol.* 147:2429, 1991). For example, antibodies that bind to MASP-2 and competitively inhibit the binding of a ligand of MASP-2 can be used to generate anti-idiotypes that resemble a ligand binding domain of MASP-2 and, therefore, bind and neutralize a ligand of MASP-2 such as MBL. Such neutralizing anti-idiotypic antibodies or Fab fragments of such anti-idiotypic antibodies can be used in therapeutic regimens.

Antibodies can be humanized by methods known in the art. For example, monoclonal antibodies with a desired binding specificity can be commercially humanized (Sotogene, Scotland; Oxford Molecular, Palo Alto, CA). Fully human antibodies, such as those expressed in transgenic animals are also features of the invention (Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21, 1994; see also U.S. Patents 5,545,806 and 5,569,825, both of which are hereby incorporated by reference).

The methods described herein in which anti-MASP-2 antibodies are employed may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one specific MASP-2 nucleotide sequence or antibody reagent described herein, which may be conveniently used, for example, in clinical settings, to diagnose patients exhibiting symptoms of the disorders described below.

Quantitative assays of MASP-2

As an example only, quantitative assays may be devised for the estimation of MASP-2 concentrations in body fluids or organ (biopsy) extracts. Such assays may be fluid phase or solid phase. Examples are competitive and non-competitive ELISAs. As an example of the latter, microtiter wells are coated with anti-MASP-2 antibody, incubated with samples, and the presence of MASP-2 visualized with enzyme-labelled antibody followed by substrate that deposits a colored compound. Alternatively, a label such as europium may be used and the detection made by use of time resolved fluorometry.

Assays of the functional activity of MASP-2, either alone or as part of the MBL/MASP complex may be performed by several methods. As an example of a test for MBL/ MASP-2 complex, the test sample is applied onto mannan-coated micro wells and C4 is added to estimate the C4-cleaving activity, or C3 is added to estimate the C3 cleaving activity of the generated C3 convertase. Assay of MASP-2 not occurring as part of the MBL/MASP complex is carried out similarly, but MBL is added either to the micro well or to the sample before adding this to the mannan-coated well. Before the addition of MBL the sample may be depleted of MBL and MBL/MASP-1 and

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

33

MBL/MASP-2 complexes by treatment with solid phase mannan, e.g. attached to beads, or by solid phase anti-MBL antibodies, or by treatment with a suitable concentration of a precipitating agent, e.g., PEG, which precipitates the complex but leaves MASP-2 in the supernatant. The assay is carried out at conditions which minimize or eliminate interference from the classical complement activation pathway and the alternative complement activation pathway.

Assays estimating the activity of MASP-2 or MASP-2 may be used for diagnostic and treatment purposes in samples from individuals, notably those suffering from infectious or inflammatory diseases.

MASP-2 for therapy

Therapeutic use of components specified in the claims may be applied in situations where a constitutional or temporary deficiency in MASP-2 renders the individual susceptible to one or more infections, or situations where the individual cannot neutralize an established infection. In particular, the present invention relates to uses of MASP-2 for the preparation of a medicament for the treatment of infections. Even though preferably, MASP-2 deficient individuals may be treated with MASP-2, also individuals with normal MASP-2 activity in serum may be treated.

In a further embodiment of the present invention MASP-2 may be used for preparation of a medicament for the treatment of infections in an individual with low MBL serum levels. In such an embodiment the pharmaceutical composition preferably furthermore comprises at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit, or at least one mannan-binding lectin (MBL) oligomer comprising the at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit. Alternatively, MASP-2 and MBL may be administered as a kit-of-parts.

Preferably, MBL oligomers according to the present invention is selected from the group of oligomers consisting of tetramers, pentamers and/or hexamers of MBL.

MBL may be recombinantly produced or purified naturally occurring MBL. For example MBL may be any of the MBL species disclosed in patent applications PCT/DK00/00246 or PCT/DK00/00247, which are hereby incorporated by reference.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

34

Low MBL serum levels according to the present invention are preferably MBL serum levels below 500 ng/ml, more preferably, MBL serum levels below 100 ng/ml, even more preferably, MBL serum level below 50 ng/ml.

5 Also, MASP-2 may be administrated to individuals receiving MBL treatment independent of the serum MBL level in order to secure sufficient amount of MASP-2 available for the administrated MBL.

10 MASP-2 or MBL/MASP complexes can be administered, preferably by intravenous infusions, in order to improve the individual's immune defense.

We believe MASP-2 is required for the powerful antimicrobial activity of the MBL/MASP complex, and deficiency in MASP-2, either genetically determined or acquired, will therefore compromise an individual's resistance to infections and ability to combat established infections. Reconstitution with natural or recombinant MASP-2 is
15 a useful treatment modality in such situations. Recombinant MASP-2 may be in the form of the whole molecule, parts of the molecule, or the whole or part thereof attached by any means to another structure in order to modulate the activity. The recombinant products may be identical in structure to the natural molecule or slightly modified to yield enhanced activity or decreased activity when such is desired.

20 Reconstitution therapy with MBL, either natural or recombinant, requires that the recipient has sufficient MASP-2 for the expression of MBL/MASP activity. Thus, MASP-2 must be included in the therapeutic preparation when the patient has insufficient MASP-2 activity.

25 MASP-2 is preferably administrated in a dosage, which results in a concentration of MASP-2 in serum of the individual to be treated of between 50 ng/ml to 1000 µg/ml, preferably, between 100 ng/ml to 800 µg/ml, more preferably, between 500 ng/ml to 500 µg/ml, even more preferably, between 750 ng/ml to 250 µg/ml, yet more preferably, between 1 µg/ml to 100 µg/ml, even more preferably, between 2 µg/ml to
30 50 µg/ml, most preferably, between 2 µg/ml to 10 µg/ml.

The infection which may be treated with the pharmaceutical compositions according to the present invention may be infection by any infectious agent. For example the infection may be caused by a microbial species.

35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

35

The microbial species may be a fungus or the microbial species may be a yeast or the microbial species may be a bacteria or the microbial species may be a parasite.

Bacteria according to the present invention may for example be selected from the group consisting of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, preferably *A. anitratus*, *A. haemolyticus*, *A. alcaligenes*, and *A. lwoffii*, *Actinomyces israelii*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes* species, preferably *A. faecalis*, *A. odorans* and *A. denitrificans*, *Arizona hinshawii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Brucella* species, preferably *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* and *B. canis*, *Calymatobacterium granulomatis*, *Campylobacter fetus* ssp. *intestinalis*, *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*, *Chlamydia* species, preferably *C. psittaci* and *C. trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* species, preferably *C. freundii* and *C. diversus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*, preferably *C. ulcerans*, *C. haemolyticum* and *C. pseudotuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Edwardsiella tarda*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacter*, preferably *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae* (also named *Hafnia alvei*) and *E. agglomerans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter* species, *Klebsiella* species, preferably *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* and *K. rhinoscleromatis*, *Legionella* species, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella* species, preferably *M. lacunata* and *M. osloensis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma* species, preferably *M. pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia* species, preferably *N. asteroides* and *N. brasiliensis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptococcus magnus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pneumococci*, *Proteus* species, preferably *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* and *P. morganii* (also named *Providencia rettgeri* and *Morganella morganii* respectively), *Providencia* species, preferably *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* and *P. rettgeri* (also named *Proteus rettgeri*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Rickettsia*, *Rochalimaea henselae*, *Salmonella* species, preferably *S. enteridis*, *S. typhi* and *S. derby*, and most preferably *Salmonella* species of the type *Salmonella* DT104, *Serratia* species,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

36

- preferably *S. marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. sonnei*, *Spirillum minor*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus*, preferably *S. faecalis*, *S. faecium* and *S. durans*, *Streptococcus agalactiae*,
5 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, preferably *T. pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, and *Yersinia pestis*.
- 10 Parasites according to the present invention may for example be selected from the group consisting of Malaria (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), Schistosomes, Trypanosomes, Leishmania, Filarial nematodes, Trichomoniasis, Sarcosporidiasis, Taenia (*T. saginata*, *T. solium*), Leishmania, *Toxoplasma gondii*, Trichinellosis (*Trichinella spiralis*) or Coccidiosis (*Eimeria* species).
- 15 Fungi may for example be selected from the group consisting of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Coccidioidomycosis*.
- 20 In one preferred embodiment the bacterial species may be resistant to at least one antibiotic medicament. For example the bacterial species may be multiresistant. In one example the bacterial species is pathogenic.
- In another embodiment of the present invention the infection is a viral infection, that is infection by a virus.
- 25 Viruses according to the present invention may for example be selected from the group consisting of: Adeno-associated virus, Adenovirus, Avian infectious bronchitis virus, Baculovirus, Chicken pox, Corona virus, Cytomegalovirus, Distemper, Enterovirus, Epstein Barr virus, Feline leukemia virus, Flavivirus, Foot and mouth disease virus, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis E, Herpes species, Herpes simplex, Influenza virus, HIV-1, HIV-2, HTLV 1, Influenza A and B, Kunjin virus, Lassa fever virus, LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), lentivirus, Measles, Mingo virus, Morbillivirus, Myxovirus, Papilloma virus, Parovirus, Parainfluenza virus, Paranyxovirus, Parvovirus, Poko virus, Polio virus, Polyoma tumour virus, pseudorabies, Rabies virus, Reovirus, Respiratory syncytial virus, retrovirus, rhinovirus,
30 Rinderpest, Rotavirus, Semliki forest virus, Sendai virus, Simian Virus 40, Sindbis

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

37

virus, SV5, Tick borne encephalitis virus, Togavirus (rubella, yellow fever, dengue fever), Vaccinia virus, Venezuelan equine encephalomyelitis and Vesicular stomatitis virus.

5 In one preferred embodiment the virus is a retrovirus, such as for example Human Immunodeficiency Virus.

Assays for MASP-2

10 Therapy with MASP-2 (or MASP-2 inhibitors) must usually be preceded by the estimation of MASP-2 in serum or plasma from the patient. Examples of such assays are described below.

Assays for MASP-2 antigen.

15 MASP-2 protein is conveniently estimated as antigen using one of the standard immunological procedures.

As an example only, a quantitative TRIFMA (time resolved immunofluorometric assay) for MASP-2 was constructed by 1) coating microtitre wells with 1 µg anti-C'MASP-2 antibody; 2) blocking with Tween-20; 3) applying test samples, e.g. diluted plasma or serum samples; 4) applying Eu-labelled anti-N' MASP-2 antibody; 5) applying enhancement solution (Wallac Ltd); 6) reading the Eu on a time resolved fluorometer. (Estimation by ELISA may be carried out similarly, e.g. by using biotin-labelled anti-N'MASP-2 in step 4; alkaline phosphatase-labelled avidin in step 5; 6) apply substrate; and 7) read the colour intensity.) Between each step, the plate was incubated at room temperature and washed, except between step 6 and 7. A calibration curve may be constructed using dilutions of pooled normal plasma, arbitrarily said to contain 1 unit of MASP-2 per ml. The antibodies used in this first version of a MASP-2 assay were raised against synthetic peptides and reacted poorly with native MASP-2. The samples are thus pretreated with SDS on a boiling water bath for 5 min. and the SDS neutralized with non-ionic detergent (Triton X-100) before the assay. A further development of the assay employs antibodies reacting with native MASP-2, thus rendering the SDS treatment superfluous.

Assays may be similarly constructed using antibodies, polyclonal or monoclonal or recombinant antibodies, which reacts with MASP-2, natural or recombinant, or parts thereof.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

38

Through the use of antibodies reacting selectively with intact MASP-2 or with activation products, or through combination of antibodies against various parts of the molecule, assays may be constructed for the estimation of the activation *in vivo* of the MBLectin pathway. These assays will be useful for the determination of inflammation caused by the activation of this pathway.

Assays for MASP-2 activity of the MBL/MASP complex.

MASP-2 may be estimated by its capacity to activate the complement system. When C4 is cleaved by MASP-2 an active thiol ester is exposed and C4 becomes covalently attached to nearby nucleophilic groups. A substantial part of the C4b will thus become attached to the coated plastic well and may be detected by anti-C4 antibody. Thus, assays of the functional activity of MASP-2 either alone or as part of the MBL/MASP complex may be performed by several methods. The activity of MBL/MASP-2 to cleave the C4 may be assayed by the following method for detecting MASP-2, said method comprising an assay for MASP-2 activity, comprising the steps of

- applying a sample comprising a predetermined amount of MBL to a solid phase obtaining bound MBL,
- applying a predetermined amount of MASP-2 to the bound MBL
- applying at least one complement factor to the complexes,
- detecting the amount of cleaved complement factors,
- correlating the amount of cleaved complement factors to the amount of MASP-2, and
- determining the activity of MASP-2.

or

- applying a sample comprising a predetermined amount of MBL/MASP-2 complexes to a solid phase obtaining bound complexes,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

39

- applying at least one complement factor to the complexes,
- detecting the amount of cleaved complement factors,
- correlating the amount of cleaved complement factors to the amount of MASP-2, and
- determining the activity of MASP-2.

10

A quantitative TRIFMA for MASP-2 activity was constructed by 1) coating microtitre wells with 1 µg mannan in 100 µl buffer; 2) blocking with Tween-20; 3) applying test samples, e.g. diluted plasma or serum samples; 4) applying purified complement factor C4 at 5 µg/ml; 5) incubate for one hour at 37°C; 6) applying Eu-labelled anti-C4 antibody; 7) applying enhancement solution; and 8) reading the Eu by time resolved fluorometry. (Estimation by ELISA may be carried out similarly, e.g. by applying biotin-labelled anti-C4 in step 6; 7) apply alkaline phosphatase-labelled avidin; 8) apply substrate; and 9) read the colour intensity). Between each step the plate was incubated at room temperature and washed, except between step 7 and 8. A calibration curve can be constructed using dilutions of one selected normal plasma, arbitrarily said to contain 1 unit of MBL/MASP-2 activity per ml. The assay is carried out at conditions which preclude activation of C4 by the classical or alternative complement activation pathways. The activation of C4 was completely inhibited by the serine protease inhibitor benzamide. Activation of the classical complement pathway is preferably inhibited to reduce the artefacts of the assay. It is preferred that the inhibition is conducted by carrying out the assay at high ionic strength, such as wherein the salt concentration is above 0.2 M, such as above 2.5 M, such as in the range of from 0.3 M to 10 M, such as from 0.5 M to 5 M, such as from 0.7 M to 2 M, such as from 0.9 M to 2 M, such as about 1.0 M. The salts used may be any one or more salts suitable for the assay, such as salts selected from NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaI, KCl, MgI₂, CaI₂, from NaBr, KBr, MgBr₂, CaBr₂, Na₂S₂O₃, (NH₄)₂SO₄, and NH₄HCO₃. The inhibition of the classical pathway does preferably not interfere with the MBL/MASP complex but destroys the C1qrs complex.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

40

The inhibition of the alternative pathway may be carried out by diluting the sample at least 5 times, such as at least 10 times, such as at least 20 times or more, before conducting the assay.

5 *Assays for the estimation of free MASP-2 activity.*

 The estimation of MASP-2 activity in samples from MBL-deficient individuals is carried out on wells coated with MASP-free MBL. The estimation of free MASP in samples from individuals with MBL is carried out by first removing MBL/MASP-1 and MBL/MASP-2 complexes by incubating with Sepharose-coupled mannan (300 µl of 10 fold diluted plasma or serum is incubated with 10 µl beads), and then analyzing the supernatant.

 The assay carried out in the TRIFMA format proceeds as follows: 1) coating microtitre wells with 1 µg mannan in 100 µl buffer; 2) blocking with Tween-20; 3) incubate sample at a 1000 fold dilution in buffer with 100 ng of MASP-free MBL/ml, and applying 100 µl of the mixture per well; 4) incubate over night at 4°C; 5) wash and applying purified complement factor C4 at 5 µg/ml; 6) incubate for one hour at 37°C; 7) applying Eu-labelled anti-C4 antibody; 8) applying enhancement solution; and 9) reading the Eu by time resolved fluorometry. (Estimation by ELISA may be carried out similarly, e.g. by applying biotin-labelled anti-C4 in step 6; 7) apply alkaline phosphatase-labelled avidin; 8) apply substrate; and 9) read the colour intensity.) Between each step the plate was washed, except between step 7 and 8. A calibration curve may be constructed using dilutions of one selected MBL-deficient plasma, arbitrarily said to contain 1 unit of MASP-2 activity per ml. The assay is carried out at conditions which preclude activation of C4 by the classical or alternative complement activation pathways (see above).

25 *Inhibition of MASP-2 activity.*

 Inhibitors of the biological activity of MASP-2 may be employed to control the complement activating activity and inflammatory activity of MASP-2. Such inhibitors may be substrate analogues representing target structures of C2 or C4. Inhibitors may be of peptide nature, modified peptides, or any organic molecule which inhibits the activity of MASP-2 competitively or non-competitively. The inhibitor may be modified to stay in circulation for short or longer time, and constructed to be given by injection or orally. Inhibitors may be fragments of MASP-2, produced from natural or recombinant MASP-2, by chemical or enzymatic procedures. Inhibitors may be naturally occurring shorter forms of MASP-2. Inhibitors may be in soluble form or

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

41

coupled to a solid phase. A solid phase could be a compatible surface such as used in extracorporeal blood or plasma flow devices.

5 Microbial carbohydrates or endogenous oligosaccharides may provoke undesirable activation of the MBL/MASP complex resulting in damaging inflammatory responses. This pathophysiological activity may be reduced through the administration of inhibitors of MASP-2 activity such as Pefabloc. Also other enzyme inhibitors (PMSF, benzamidine, etc.) have proved effective when assayed in the TRIFMA for MASP-2 activity. Obviously, when designing inhibitors for *in vivo* use toxicity is a major consideration, and highly specific inhibitors can be assumed to be less toxic than more broadly reactive inhibitors. Specific inhibitors may be generated through using peptides, peptide analogues or peptide derivatives representing the target structures on complement factor C4 or C2 molecules. Another type of inhibitors may be based on antibodies (or fragments of antibodies) against the active site of MASP-2 or other structures on MASP-2 thus inhibiting the activity of MASP-2. The antibodies against MASP-2 are preferably the antibodies discussed above. Inhibitors may also be directed towards inhibition of the activation of MASP-2, thought to be effected by MASP-1, i.e. the target structure for MASP-1 on MASP-2 would be a suitable inhibitor of this type. Another type of inhibitor would prevent the binding of MASP-2 to MBL and thereby the activation of MASP-2. The N-terminal 20 kDa fragment of MASP-2 may be a suitable inhibitor of this type. More specifically one can localize the precise part of the polypeptide chain, which mediates the binding of MASP-2 to MBL and use the synthetic peptide or analogous structures as inhibitor. Inhibitors may be substituted with D amino acids for L-amino acids.

25 Also, inhibitors could be RNA or single stranded DNA isolated by SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) using MASP-2 or fragments thereof as selecting molecule. The leader sequence of MASP-2 is shown elsewhere in this application.

Furthermore, inhibitors of MASP-2 could be a serine protease inhibitor, such as aprotinin.

30 MASP-2 activity may be controlled by the conversion of the pro-enzyme form of MASP-2 into activated MASP-2 through the action of MASP-1 or any other substance simulating the activity of MASP-1.

35

EXAMPLES*Example 1: Identification of MASP-2*

Human plasma proteins and protein complexes, that bind to carbohydrates in a calcium-dependent manner (i.e. lectins and lectin-associated proteins), were purified by affinity chromatography on mannan- and N-acetylglucosamine-derivatized Sepharose beads. Pooled CPD-plasma (2.5 l), diluted with buffer containing EDTA and enzyme inhibitors were passed through Sepharose 2B CL and mannan-Sepharose. A thrombin inhibitor, PPACK (D-phenylalanyl-prolyl-arginyl-chloromethyl ketone) and CaCl_2 were added. The pool was passed through Sepharose 2B-CL and mannan-Sepharose, and the proteins binding calcium-dependently to mannan-Sepharose were eluted with EDTA-containing buffer. The eluate was recalcified, passed through a GlcNAc-Sepharose column which was eluted as above to yield 20 ml "lectin preparation".

This protein preparation was analyzed by SDS-PAGE and blotting onto a PVDF-membrane. Development of the blot with chicken antibody raised against a bovine lectin preparation²⁶ revealed a protein with an M_r of 52 kDa as well as MBL at 32 kDa. The 52 kDa band was subjected to NH_2 -terminal amino acid sequence analysis. The sequence showed similarity to that of the previously described MASP (MASP-1). Antibody raised against a synthetic peptide representing the 19 NH_2 -terminal amino acids (anti-N-MASP-2 antiserum) recognized the 52 kDa molecule as well as a molecule with a mobility corresponding to 20 kDa (Fig. 1, lane 1). Under non-reducing conditions a polypeptide of 76 kDa was detected using the anti-N-MASP-2 antiserum (Fig. 1, lane 2), indicating the presence of intra-chain disulphide bonds. The 20 kDa polypeptide was found to have the same NH_2 -terminal sequence as the 52 kDa polypeptide and is likely to represent a truncated form of the latter. The directly determined amino acid sequences (NH_2 -terminal as well as those of internal peptides) are indicated in Fig. 6. Two dimensional SDS-PAGE with the first dimension under nonreducing conditions and the second dimension under reducing conditions showed the 52 kDa polypeptide to be part of a disulphide-linked protein with an M_r of 76 kDa. A polypeptide of 31 kDa (Fig. 1, lane 3), likely to represent the remaining part of the protein, was also recognized as part of the 76 kDa protein by an antiserum (anti-C-MASP-2) raised against synthetic peptides representing sequences in the COOH -terminal part of the protein (determined by cDNA sequencing techniques; see below).

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

43

The 76 kDa band seen with the anti-N'MASP-2 antibody under non-reducing conditions was also recognized by the anti-C'MASP-2 antibody (Fig. 1, lane 4).

Figure 1b depicts SDS-PAGE in two dimensions, the first dimension under non-reducing conditions. The lane was cut out, incubated in sample buffer containing dithiothreitol (DTT), placed on top of another SDS-PAGE gel, and after electrophoresis, the gel was blotted and the blot developed with anti-N'MASP-2 antibody. The positions of molecular weight markers are indicated.

Example 2: Preparation of antibodies against mamman-binding lectin associated serine proteases

Animals, primed with BCG (Bacillus Calmette Guérin vaccine) were immunized with synthetic peptides coupled to PPD (tuberculin purified protein derivative) according to C. Koch, The State Serum Institute, Copenhagen. Antibody designated anti-N'MASP-1, anti-C'MASP-1 and anti-N'MASP-2 were from rabbits immunized with peptides corresponding to the first 19 amino acid residues of MASP-1, the last 19 amino acid residues of MASP-1 and the first 19 amino acid residues of MASP-2, respectively. Chicken anti-C'MASP-2 antibody was from chickens immunized with a mixture of two peptides representing sequences in the C-terminal part of MASP-2 (residues 505 to 523 and 539 to 556). All peptides had an additional C-terminal cysteine for coupling. Antibody and normal chicken IgG was purified from yolk²⁶. Monoclonal anti-MBL antibody, IgG₁-kappa (clone 131-1) and control IgG₁-kappa (clone MOPC 21) were purified by Protein A affinity chromatography. F(ab')₂ rabbit anti-human C4 and F(ab')₂ rabbit anti-human C1q were produced by pepsin digestion of rabbit anti-human C4 and rabbit anti-human C1q (DAKO, Glostrup, Denmark). For staining of Western blots antibodies were used at 1µg/ml. Bound chicken antibody was visualized with rabbit anti-chicken IgG followed by peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG and development using the enhanced chemiluminescence technique. Bound mouse and rabbit antibodies were visualized with peroxidase-labelled rabbit anti-mouse IgG and peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG, respectively.

Example 3: Amino acid sequencing of the 52 kDa and the 20 kDa polypeptides

The lectin preparation was concentrated, subjected to SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. Two strips were developed with anti-bovine lectin

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

44

antibody²⁶. The rest of the blot was stained with Coomassie Brilliant Blue. The band corresponding to the immuno-stained 52 kDa band, judged to represent about 5% of the total Coomassie-stained proteins, was cut out and subjected to sequencing on an Applied Biosystems protein sequencer. After production of anti-N¹MASP-2 antibody, a similar Western blot was performed using the anti-N-MASP-2 antibody. The NH₂-termini of the proteins in the 52 kDa and the 20 kDa bands visualized with this antibody were sequenced. Peptides were prepared by trypsin digestion of the proteins in the two bands from another blot, fractionated by reverse phase chromatography and the peptides in the major peaks were subjected to sequencing.

Example 4: Cloning and sequencing of MASP-2

The liver is the primary site of synthesis of C1r, C1s, and MASP-1. Thus, RNA from liver was used as template for RT-PCR with primers deduced from the obtained peptide sequences. First strand synthesis of cDNA was carried out with 1.3 µg human liver RNA using a First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia). PCR was performed on this cDNA using degenerate sense and antisense primers derived from the amino acid sequences EYANDQER and KPFTGFEEA, respectively. The PCR program consisted of 1 cycle with annealing at 50°C; 1 cycle with annealing at 55°C, and 33 cycles with annealing at 60°C. The resulting 300 bp PCR product was cloned into the *E. coli* plasmid pCRII using the TA-cloning kit (Invitrogen) and the nucleotide sequence of the insert was determined.

The nucleotide sequence of the resulting 300 bp RT-PCR product contained an open reading frame (ORF) with a deduced amino acid sequence confirming the sequences of the peptides from which the primers were derived as well as that of another of the sequenced peptides. The insert of this plasmid was radioactively labelled and used as a probe for screening a total of 8×10^5 clones in a commercial human liver library (Stratagene). Sixteen clones hybridized and the 4 longest (phl-1,2,3 and 4) were completely sequenced. Sequence analysis revealed that all four clones represent reverse transcripts of the same novel human mRNA species. The longest clone, phl-4, comprises 2475 bp starting with a 5' untranslated region of 36 bp followed by an ORF of 2061 bp and a 3' untranslated region of 378 bp ending with a poly-A tail. The nucleotide sequence of phl-4 is shown in Fig. 6 together with the translated amino acid sequence. The sequences are deposited at the EMBL nucleotide sequence data base (accession no. Y09926). While the sequence of phl-1

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

45

and -2 were in total agreement with phi-4, the nucleotide sequence of phi-3 differs from phi-4 at two positions, a transversion at nucleotide position 1147 (G to T) and a transition at position 1515 (C to T). The first change leads to the replacement of Asp 356 with Tyr. Because all clones were isolated from a liver library transcribed from RNA isolated from a single donor, the observed difference may represent a polymorphism in the MASP-2 gene, or is due to an error created during construction of the library.

The amino acid sequences of the NH₂-terminus as well as all sequenced peptides were identified in the sequence deduced from clone phi-4. The ORF encodes a polypeptide chain of 686 amino acids including a signal peptide of 15 residues. Omitting the signal peptide, the calculated M_r is 74,153, in agreement with the 76 kDa observed on SDS-PAGE (Fig. 1), the isoelectric point is 5.43 and the molar extinction coefficient is 113,640 (i.e. OD_{280nm} = 1.54 at 1 mg/ml). In contrast to MASP-1 the sequence contains no sites for N-linked glycosylation. The three amino acid residues which are essential for the active centre in serine proteases (His 468, Asp 517, and Ser 618) are present.

Example 5: Comparison of MASP-2 to MASP-1, C1r and C1s.

The amino acid sequence deduced from the cDNA sequences is homologous to those of MASP-1, C1r and C1s (Fig. 2). Notably, the domain organization is common to these four proteins, featuring one C1r/C1s-like domain, one epidermal growth factor-like (EGF-like) domain, followed by a second C1r/C1s-like domain, two complement control protein (CCP) domains, and a serine protease domain. The key residues involved in the calcium-binding motif in the epidermal growth factor-like domains are present in the obtained sequence, as well as in MASP-1, C1r and C1s. In addition, the substrate specificity related residue, 6 residues before the active site serine, is aspartic acid in all four proteins. MASP-1, C1r, and C1s are all activated by cleavage of the peptide bond between the residues Arg and Ile located between the second CCP domain and the serine protease domain. The resulting polypeptide chains (the largest referred to as the "heavy chain" and the smallest as "light chain") are held together by a disulphide bond. By analogy, our results indicate that the 52 kDa polypeptide, recognized by antibody against the N-terminal of MASP-2 after SDS-PAGE under reducing conditions, is the heavy chain of MASP-2, whereas the 31 kDa polypeptide, recognized by antibody against the C-terminal of MASP-2, is

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

46

the light chain. As seen in Fig. 2, Arg and Ile are present in MASP-2 at the expected positions between the second CCP domain and the protease domain.

Identities and similarities between the four proteins were studied based on the alignment in Fig. 2. A bias of 6 was added to each term of the mutation data matrix (250PAMS) and a break penalty of 6 was used. Identical residues in all four species are indicated by asterisks. The beginning of the C1r/C1s-like domains, the EGF-like domain and the CCP domains are indicated above the sequences. The aligned cysteines are shaded. The potential cleavage site between Arg and Ile residues, which generates heavy and light chains, is identical to the site where the serine protease domain starts. The three amino acid residues, which are essential for the active centre in serine proteases (His 468, Asp 517 and Ser 618), are indicated (*). The cysteines in the histidine-loop of MASP-1 are marked (V). The sequences obtained by amino acid sequencing of peptides are underlined. The identities between the proteins (Fig. 2) are all in the range of 39% to 45% and gives no clue to functional relatedness. The similarity, i.e. taking into account residues of similar nature as well as identical residues, between the proteins (Fig. 3b) are between 39 and 52% with the least similarity being between MASP-1 and C1s (39%) and the highest similarity between MASP-1 and C1r (52%) and between MASP-1 and MASP-2 (52%). MASP-2 shows similarity with C1r (46%) and C1s (47%). Whereas the relative identities gives no clue as to functional relatedness the similarity score between C1s and MASP-2 is significantly higher than between C1s and MASP-1 while MASP-1 is more similar to C1r than to C1s, suggesting that MASP-2, like C1s, could be a C2 and C4 cleaving enzyme. Several features of the sequences suggest that MASP-2, C1r and C1s have evolved by gene duplication and divergence from a MASP-1 ancestor. Only the MASP-1 sequence contains the histidine loop, characteristic of trypsin-like serine proteases²⁷. The active site serine is encoded by a TCN codon (N is A, T, G or C) in MASP-1 as in most serine proteases, whereas in MASP-2, C1r and C1s it is encoded by an AGY codon (where Y is T or C). In most serine proteases, including MASP-1, a proline residue is found at the third position downstream from the active site serine, whereas a different amino acid is found in MASP-2, C1s and C1r (alanine in MASP-2 and C1s, valine in C1r). Based on these analogies one may predict that the catalytic domain of MASP-2 is encoded by a single exon as in C1r and C1s, whereas most other serine proteases, including MASP-1²⁸, have split exons.

35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

47

Example 6: MBL/MASP complexes.

The lectin preparation described above was incubated in microtitre wells coated with monoclonal anti-MBL antibody, or, as a negative control, wells coated with non-specific monoclonal immunoglobulin of the same subclass. The proteins captured by the antibody were eluted and analyzed by SDS-PAGE/Western blotting. The results (Fig.3a) show that the anti-MBL antibody, in addition to binding MBL, captures both MASP-1 and MASP-2. Microtitre wells were coated with monoclonal anti-MBL or control monoclonal murine IgG1, incubated with either one of two different lectin preparations (a and b), and the bound proteins were eluted and analysed by SDS-PAGE under reducing conditions and Western blotting. Blot a was developed with anti-MBL antibody, blot b with anti-C'MASP-1 antibody and blot c with anti-N'MASP-2 antibody. Lane 1 represents unfractionated lectin preparation a. Lanes 3 and 4 represent eluates from wells coated with anti-MBL antibody and incubated with lectin preparation b and a, respectively, while lanes 2 and 5 represent eluates from wells coated with normal IgG and incubated with lectin preparation b and a, respectively.

Fractions from gel permeation chromatography (GPC) of the lectin preparation on Superose 6B CL were analyzed for MBL, MASP-1 and MASP-2 (Fig. 3a). The lectin preparation was subjected to GPC on a Superose 6 column in buffer containing calcium. MBL was eluted in a main peak at a volume (V_a) corresponding to an M_r of 750 kDa, and a smaller peak at a position corresponding to 350 kDa. Panel A shows the results of analysis of the fractions by Western blotting using monoclonal anti-MBL antibody. The band at about 60 kDa is seen in all MBL preparations and is recognized by all the anti-MBL antibodies tested (monoclonal as well as polyclonal) and thus probably represents a non-reducible dimer of the 32 kDa polypeptide chain. Panel B shows the same analysis using anti-N'MASP-2 antibody (developing the upper band of 52 kDa) followed by anti-C'MASP-1 antibody (developing the lower band of 31 kDa). For purely technical reasons the 20 kDa truncated MASP-2 is not seen in this picture where the blot was partially stripped between the incubations with anti-MASP-2 and anti-MASP-1. The arrows on the chromatogram indicate the void volume (1) and the elution positions for the following marker proteins IgM (2), C1q (3), thyroglobulin (4), IgG (5) and serum albumin (6).

Masp-1 and MASP-2 co-elute largely with the high molecular weight MBL. Chromatography of the MBL preparation at pH 5 revealed that no MASP-1 or MASP-2 was associated with MBL. See, Tan et al. (1996, Biochem J, 319: 329-332).

Example 7: Complement activation.

The classical complement activation pathway, as well as the MBL-initiated pathway involves the generation of a C3 converting complex, C4b2b, through enzymatic activation of C4 and C2. In the C1 complex (C1q₂s₂) this specific protease activity is exhibited by C1s after activation of the enzyme by C1r. Upon activation of C4, a reactive thiol ester is exposed and C4b covalently binds to nearby amino or hydroxyl groups.

The C4 activating potentials of MASP-1 and MASP-2, and C1r and C1s, were compared. This was accomplished by separating a C1 preparation and an MBL/MASP preparation by SDS-PAGE followed by Western blotting. The blot was examined for C4 converting activity by incubation with human serum at 37°C, followed by detection of deposited C4b using anti-C4 antibodies.

C1 was purified by incubating IgG-coupled Sepharose beads with human serum at 4°C. The beads were washed and incubated at 37°C for 30 minutes for activation of C1r and C1s. The beads were suspended in non-reducing sample buffer and, without boiling, subjected to SDS-PAGE, followed by blotting in the absence of SDS. A similar blot was made of an MBL preparation produced in the absence of enzyme inhibitors (The State Serum Institute, Copenhagen). Strips of the blots were incubated for 30 minutes at 37°C with 1.1% (w/v) human MBL-deficient serum, depleted of C1q by fractionation on Biorex 70. The blots were developed with biotinylated F(ab')₂ anti-C4 antibody followed by peroxidase-labelled streptavidin and luminescence reagent. Parallel blots were treated with a serine protease inhibitor (aminoethylbenzenesulfonyl fluoride), which was also present during incubation with serum. Other strips were directly developed with antibodies.

The results in Fig. 4 show that C4 was deposited at a position corresponding to the MASP-2 band, whereas no C4 deposition was observed at positions corresponding to MASP-1. MASP-1 was present in the activated state as shown by SDS-PAGE under reducing conditions where it appears as two bands at about 30 kDa and 70 kDa, respectively (not shown). The observed C4 activation and deposition was inhibited by serine protease inhibitors (Fig. 4). It was also observed that no C4 activating activity could be detected when MBL/MASP was prepared in the presence of enzyme inhibitors added throughout the purification procedure. A preparation of C1 was analyzed similarly and C4 deposition, which could be inhibited

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

49

by enzyme inhibitors, was observed at a position corresponding to C1r and C1s, which are not separated by the technique employed.

Figure 4 is a representation of Western blots demonstrating the activation of C4 by C1s and MASP-2. Panel A shows a Western blot of C1 separated under non-reducing conditions, and without heating the sample before electrophoresis. Lane 1 was developed with anti-C1s antibody. Lane 2 was incubated with human serum followed by anti-C4 antibody. Lane 3 was as lane 2 except for the presence of serine protease inhibitors during the incubation with serum. Panel B shows a Western blot of an MBL preparation separated as in A. Lane 1 was developed with anti-NMASP-1, lane 2 with anti-NMASP-2. Lane 3 was incubated with human serum at 37°C followed by anti-C4. In lane 4 the blot was preincubated with serine protease inhibitors and the incubation with serum was also in the presence of inhibitors. MASP-1 shows a higher M_r than MASP-2 due to glycosylation¹⁷ and a polypeptide chain 9 amino acids longer.

Our results emphasize the similarity between complement activation through the MBlectin pathway of the innate immune system and the classical pathway of complement activation (Fig. 6). Activation via the classical pathway is associated with the specific immune response found only in vertebrates, while the MBlectin pathway and the alternative pathway rely on innate recognition of foreign organisms and are thus likely to predate the evolution of the specific immune system. All pathways converge on the activation of the central component C3 into C3b, which binds covalently to the microbial surface and mediates the effector functions of complement.

In both the classical and MBlectin pathways, the initiating molecular complexes are composed of an oligomeric ligand-binding component (MBL or C1q, respectively) which, on reacting with ligands, activates the two associated serine proteases (MASP-1 and MASP-2 or C1r and C1s, respectively).

References

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).

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

50

- 3) Kawasaki, T., Etoh, R. & Yamashina, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 1016-1024 (1978).
- 5 4) Matsushita, M. & Fujita, T. 4) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease *J. Exp. Med.* **176**, 1497-1502 (1992).
- 10 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).
- 15 6) Turner, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the 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).
- 20 8) Kuhlman, M., Joiner, K. & Ezekowitz, R.A.B. The human 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).
- 25 10) Lipscombe, R.J. *et al.* High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 709-715 (1992).
- 30 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).

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

51

- 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. *Lancet* ii, 1236-1239 (1989).
- 5 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).
- 10 14) Summerfield, J.A. *et al.* Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 345, 886-889 (1995).
- 15 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 16) Garred, P., Madsen, H.O., Balslev, U., Hofmann, B., Pedersen, C., Gerstoft, J. and Svejgaard, A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannan-binding lectin. *Lancet* 349, 236-240 (1997).
- 20 17) Malhotra, R. Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A. and Sim, R.B. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannan-binding protein. *Nature Med.* 1, 237-243 (1995).
- 25 18) Kilpatrick, D.C., Bevan, B.H. and Liston, W.A. Association between mannan-binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* 1, 2501-2505 (1995).
- 30 19) Davies, E.J., Snowden, N., Hillarby, M.C., Carthy, D., Grennan, D.M., Thomson, W. and Cllier, W.E.R. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 38, 110-114 (1995).
- 35 20) Jensenius, J.C. Mannan-binding lectin (MBL): From investigations on fish and chickens to substitution therapy in an infant with severe infections. *Immunology*, 86, Suppl. 1, 100, abstract (1995).

WO 02/06460

52

PCT/DK01/00499

- 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).
- 10 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. Immunol.*, **33**, Suppl. 1, 91 (1996).
- 15 24) Jensen, T.V., Stover, C., Poulsen, K., Laursen, S.B., Eggleston, P., Reid, K.B.M., Willis, A., Schwaebler, W., Lu, J., Holmskov, U., Jensenius, J.C. and Thiel, S. Cloning of cDNA encoding a human MASP-like protein (MASP-2). *Mol. Immunol.*, **33**, Suppl. 1, 81 (1996).
- 20 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).
- 25 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).
- 30 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 C1r and C1s genes. *Int. Immunol.* **9**, 1355-1358 (1996).

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

53

- 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 Ca^{2+} - independent association with a C1s-like serine protease. *Biochem. J.* **319**, 329-332 (1996).
- 5 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
10 human serum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**, 1003-1009 (1993).
- 32) Journat, A. & Tosi, M. Cloning and sequencing of full-length cDNA encoding the precursor of human complement component C1r. *Biochem. J.* **240**, 783-787 (1986).
- 15 33) Lytus, S.P., Kurachi, K., Sakariassen, K.S. & Davie, E.W. Nucleotide sequence of cDNA coding for human complement C1r. *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
20 sequence. *Eur. J. Biochem.* **169**, 547-553 (1987).
- 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).
- 25

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

54

Claims

1. Use of a substantially pure polypeptide comprising amino acid sequences derived from mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) (SEQ ID. 2) or a functional homologue thereof for the production of a pharmaceutical composition.
5
2. The use according to claim 1, wherein the polypeptide comprises the sequence as identified SEQ ID NO. 3.
10
3. The use according to claim 1, wherein the polypeptide is capable of associating with mannan-binding lectin (MBL).
15
4. The use according to claim 1 or 2, wherein the polypeptide is conjugated to a label or a toxin.
20
5. The use according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide comprises the sequence identified as SEQ ID NO 1, or a functional equivalent thereof.
25
6. The use according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide has a molecular mass of 20 kD.
30
7. The use according to any of claims 1 to 4, wherein the polypeptide comprises amino acid 30 to 444 of SEQ ID NO. 2.
35
8. The use according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide has a molecular mass of 52 kD.
9. The use according to any of claims 1 to 4, wherein the polypeptide comprises amino acid 138 to 296 of SEQ ID NO. 2.
10. The use according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide has serine protease activity.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

55

11. The use according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide is capable of MASP-2 activity in an in vitro assay for MBL complement pathway function.
- 5 12. The use according to claim 10 or 11, wherein the polypeptide comprises amino acid 15 to 671 of SEQ ID NO 3.
13. The use according to claim 10 or 11, wherein the polypeptide comprises amino acid 16 to 286 of SEQ ID NO. 2.
- 10 14. The use according to claim 10 or 11, wherein the polypeptide comprises amino acid 30 to 296 of SEQ ID NO. 2
15. The use according to any of claims 1 to 4, wherein the polypeptide is capable of competitively inhibiting MASP-2 activity.
- 15 16. The use according to claim 15, wherein the polypeptide comprises a fragment of the polypeptide of SEQ ID NO: 2, said polypeptide being a competitive inhibitor of complexing of MBL/MASP-2.
- 20 17. The use according to claim 15 or 16, wherein the polypeptide comprises the sequence identified as SEQ ID NO: 3 or a functional equivalent thereof, wherein one or more of the amino acid residues at position 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, or 19 has been substituted with another amino acid residue.
- 25 18. The use according to claim 17, wherein the at least two amino acid residues have been substituted.
19. The use according to claim 17, wherein the arg at position 14 of SEQ ID. NO 3 has been substituted for another amino acid.
- 30 20. The use according to claim 17, wherein the arg at position 14 of SEQ ID. NO 3 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting of small uncharged amino acids.
- 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

56

21. The use according to claim 17, wherein the arg at position 14 of SEQ ID. NO 3 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting of gly and ala.
- 5 22. The use according to any of the preceding claims, wherein the pharmaceutical composition is for the treatment of infections.
23. The use according to claim 22, wherein the infections is an infection caused by a microbial species.
- 10 24. The use according to claim 23, wherein the microbial species is a fungus.
25. The use according to claim 23, wherein the microbial species is a yeast.
- 15 26. The use according to claim 23, wherein the microbial species is a bacteria.
27. The use according to claim 26, wherein the bacterial species is resistant to at least one antibiotic medicament.
- 20 28. The use according to claim 26, wherein the bacterial species is multiresistant.
29. The use according to claim 26, wherein the bacterial species is pathogenic.
30. The use according to claim 22, wherein the infection is a viral infection.
- 25 31. The use according to claim 30, wherein the virus is a retrovirus.
32. The use according to claim 31, wherein the retrovirus is a Human Immunodeficiency Virus.
- 30 33. The use according to claim 1, wherein the pharmaceutical composition furthermore comprises at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit, or at least one mannan-binding lectin (MBL) oligomer comprising the at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit.
- 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

57

- 5 34. The use according to claim 1, further comprising the use of at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit, or at least one mannan-binding lectin (MBL) oligomer comprising the at least one mannan-binding lectin (MBL) subunit for the manufacture of a medicament for obtaining a kit-of-parts.
35. The use according to any of claims 33 and 34, wherein said oligomer is preferably selected from the group of oligomers consisting of tetramers, pentamers and/or hexamers of MBL.
- 10 36. The use according to any of the claims 33 to 35, wherein the pharmaceutical composition is for the treatment of infections in an individual with MBL serum level below 500 ng/ml.
- 15 37. The use according to any of the claims 33 to 35, wherein the pharmaceutical composition is for the treatment of infections in an individual with MBL serum level below 100 ng/ml.
- 20 38. The use according to any of the claims 33 to 35, wherein the pharmaceutical composition is for the treatment of infections in an individual with MBL serum level below 50 ng/ml.
39. A polypeptide containing the sequence identified as SEQ ID NO. 1 or a functional homologue thereof.
- 25 40. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide has a molecular mass of 20 kD.
41. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide comprises amino acid 30 to 444 of SEQ. ID: NO. 2.
- 30 42. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide has a molecular mass of 52 kD.
43. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide comprises amino acid 138 to 296 of SEQ ID NO.2.
- 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

58

44. The polypeptide of claim 39, said polypeptide having serine protease activity.
45. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide comprises
5 amino acid 15 to 671 of SEQ ID NO 3.
46. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide comprises
amino acid 16 to 296 of SEQ ID NO. 2.
47. The polypeptide according to claim 39, wherein the polypeptide comprises
10 amino acid 30 to 296 of SEQ ID NO. 2.
48. The polypeptide of claim 39, said polypeptide being capable of MASP-2 activity in
an *in vitro* assay for MBLectin complement pathway function.
49. The polypeptide according to claim 39, said polypeptide being capable of
15 competitively inhibiting MASP-2 serine protease activity.
50. The polypeptide according to claim 39, comprising the sequence as identified by
20 SEQ ID NO. 3 or a functional homologue thereof, said polypeptide being a
competitive inhibitor of complexing of MBL/MASP-2.
51. The polypeptide according to claim 39, comprising the sequence as identified by
25 SEQ ID NO. 3 or a functional homologue thereof, wherein one or more of the
amino acid residues at position 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 or 19 has
been substituted for another amino acid residue.
52. The polypeptide according to claim 51, wherein the at least two amino acid resi-
30 dues have been substituted.
53. The polypeptide according to claim 51, wherein the arg at position 14 of SEQ ID.
NO 3 has been substituted for another amino acid.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

59

54. The polypeptide according to claim 51, wherein the arg at position 14 of SEQ ID.
NO 3 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting
of small uncharged amino acids.
- 5 55. The polypeptide according to claim 51, wherein the arg at position 14 of SEQ ID.
NO 3 has been substituted for an amino acid selected from the group consisting
of gly and ala.
56. The polypeptide according to any of claims 39 to 55, wherein said polypeptide is
10 conjugated to a label or toxin.
57. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a
polypeptide having a sequence that is at least 85% identical to the polypeptide
sequence according to any of claims 39, 41, 43, 45, 46, 47 and 50 to 55.
- 15 58. A nucleic acid vector comprising the nucleic acid molecule of claim 57.
59. The vector of claim 58, wherein said vector is an expression vector.
- 20 60. The vector of claim 58, further comprising a regulatory element.
61. A use of a compound capable of competitively inhibiting activity of MASP-2 or a
functional homologue thereof for the preparation of a medicament.
- 25 62. The use according to claim 61, wherein the compound is capable of competitively
inhibiting activity of MASP-2.
63. The use according to claim 61, wherein the compound is a polypeptide according
to any of claims 49 to 55.
- 30 64. The use according to claim 61, wherein the compound is a fragment of mannan-
binding lectin (MBL) that is capable of associating with MASP-2.
- 35 65. The use according to claim 61, wherein the compound is an antibody produced by
administering an MASP-2 polypeptide to an antibody producing animal.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

60

65. The use according to claim 61, wherein the compound is an antibody that selectively binds to MASP-2.
- 5 67. The use according to any of claims 65 and 66, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
68. The use according to any of claims 65 and 66, wherein the antibody is being coupled to a compound comprising a detectable marker.
- 10 69. A pharmaceutical composition comprising a substantially pure polypeptide comprising amino acid sequences derived from mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) (SEQ ID. 2) or a functional homologue thereof for the production of a pharmaceutical composition.
- 15 70. The pharmaceutical composition according to claim 69, wherein the polypeptide comprises the sequence as identified SEQ ID NO. 3.
71. The pharmaceutical composition according to claim 69, wherein the polypeptide is capable of associating with mannan-binding lectin (MBL).
- 20 72. The pharmaceutical composition according to claim 69, wherein the polypeptide is conjugated to a label or a toxin.
73. The pharmaceutical composition according to claim 69, comprising the polypeptide according to any of claims 39 to 55.
- 25 74. A method for detecting mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2), said method comprising:
- 30 (a) obtaining a biological sample;
- (b) contacting said biological sample with a MASP-2 polypeptide specific binding partner that specifically binds MASP-2; and
- (c) detecting said complexes, if any, as an indication of the presence of mannan-binding lectin associated serine protease-2 in said sample.
- 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

61

75. The method according to claim 74, in which the specific binding partner is an antibody.
- 5 76. A method for detecting MASP-2, said method comprising an assay for MASP-2 complement fixing activity.
77. The methods of claims 74 or 76 for quantitative assay of MASP-2 or MASP-2 activity in biological samples.
- 10 78. A method for detecting MASP-2 nucleic acid expression, comprising detecting RNA having a sequence encoding a MASP-2 polypeptide by mixing the sample with a nucleic acid probe that specifically hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid of claim 57.
- 15 79. A method for treating patients deficient in MASP-2 by administering to the patient the peptide according to any of claims 39 to 42 and 45 to 47.
80. A method for treating patients deficient in MASP-2 by administering to the patient nucleic acid according to claim 57.
- 20 81. A method for inhibiting the activity of MASP-2 by administering to the subject a compound that inhibits expression or activity of MASP-2.
82. The method of claim 81 in which the compound is a MASP-2 anti-sense nucleic acid sequence.
- 25 83. The method of claim 81 comprising administering a compound that inhibits complexing of MBL and MASP-2.
- 30 84. An assay for polymorphisms in the nucleic acid sequence encoding MASP-2.
85. A method of detecting the presence of MASP-2-encoding nucleic acid in a sample, comprising mixing the sample with at least one nucleic acid probe capable of forming a complex with MASP-2-encoding nucleic acid under stringent conditions, and determining whether the probe is bound to sample nucleic acid.
- 35

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

62

86. A nucleic acid probe capable of forming a complex with MASP-2-encoding nucleic acid under stringent conditions.
- 5 87. An assay for polymorphisms in the polypeptide sequence comprising MASP-2 or its precursor.
- 10 88. A method for diagnosing a disorder associated with aberrant expression of MASP-2, comprising obtaining a biological sample from a patient and measuring MASP-2 expression in said biological sample, wherein increased or decreased MASP-2 expression in said biological sample compared to a control indicates that said patient suffers from a disorder associated with aberrant expression of MASP-2.
- 15 89. A method for diagnosing a disorder associated with aberrant activity of MASP-2, comprising obtaining a biological sample from a patient and measuring MASP-2 activity in said biological sample, wherein increased or decreased MASP-2 activity in said biological sample compared to a control indicates that said patient suffers from a disorder associated with aberrant activity of MASP-2.
- 20 90. A method of assaying for activity MBL-complexed MASP, the method comprising providing a sample to be assayed and substantially reducing any artifact resulting from activation of the classical complement fixing pathway by conducting the assay in the presence of an ionic strength high enough to effectively reduce activation of the classical complement fixing pathway but not so high as to substantially interfere with activity of MBL-complexed MASP.
- 25 91. A method for determining the activity of MASP-2, said method comprising an assay for MASP-2 activity, comprising the steps of
- 30 - applying a sample comprising MBL/MASP-2 complexes to a solid phase obtaining a bound complexes,
- applying at least one complement factor to the complexes,
- 35 - detecting the amount of cleaved complement factors,

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

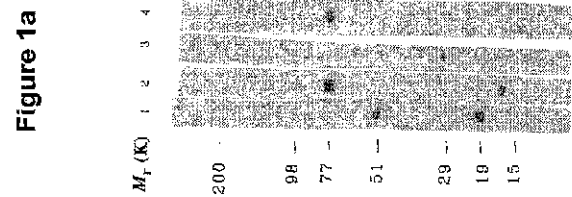
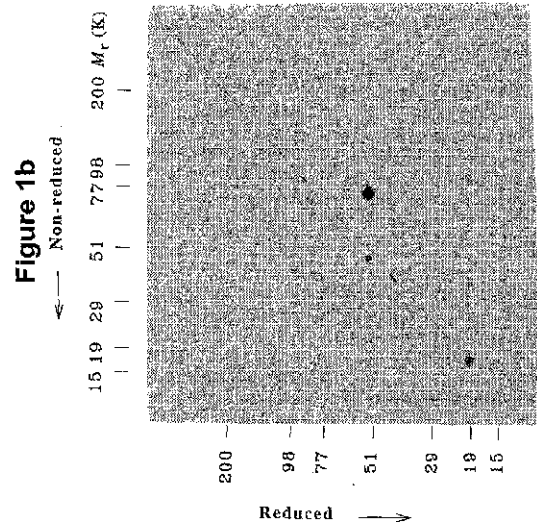
63

- correlating the amount of cleaved complement factors to the MASP-2 amount,
and
 - 5 - determining the activity of MASP-2.
92. The method according to claim 91, wherein the solid phase is a mannan coating.
93. The method according to any of the claims 91 to 92, wherein the at least one
10 complement factor is a complement factor cleavable by the MBL/MASP-2 complex.
94. The method according to any of the claims 91 to 93, wherein the at least one
15 complement factor is selected from C3, C4, and C5, preferably C4.
95. The method according to any of the preceding claims 91 to 94, wherein the
cleaved complement factor is detected by means of antibodies directed to the
complement factor.
- 20 96. The method according to any of the preceding claims 91 to 95, wherein activation of the classical complement pathway is inhibited.
97. The method according to claim 96, wherein the activation is inhibited by conducting the assay at high ionic strength.
- 25 98. The method according to claim 97, wherein the salt concentration is above 0.2 M, such as in the range of from 0.3 M to 10 M, such as from 0.5 M to 5 M, such as from 0.7 M to 2 M, such as from 0.9 M to 2 M, such as about 1.0 M.
- 30 99. The method according to claim 98, wherein the salt is selected from NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaI, KCl, MgI₂, CaI₂, from NaBr, KBr, MgBr₂, CaBr₂, Na₂S₂O₃, (NH₄)₂SO₄, and NH₄HCO₃.
100. The method according to any of the claims 91 to 99 for quantitative
35 assay of MASP-2 or MASP-2 activity in biological samples.

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

1/6



PCIT/DK01/00499

Figure 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

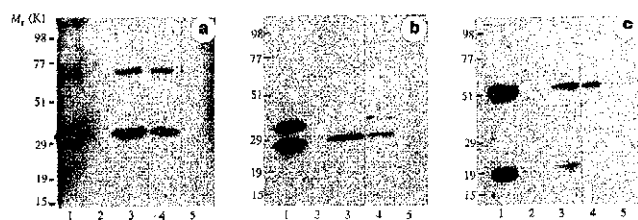
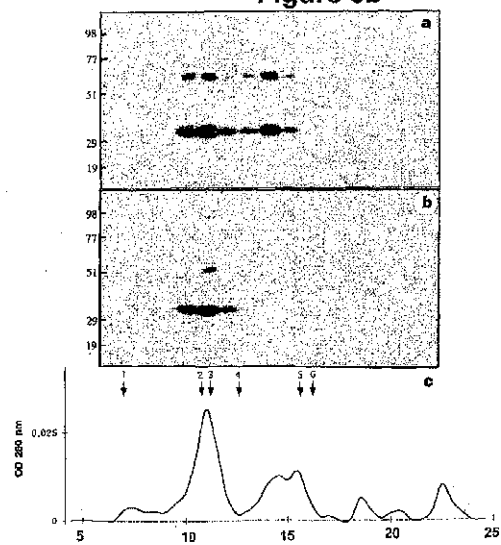
3/6
Figure 3a

Figure 3b



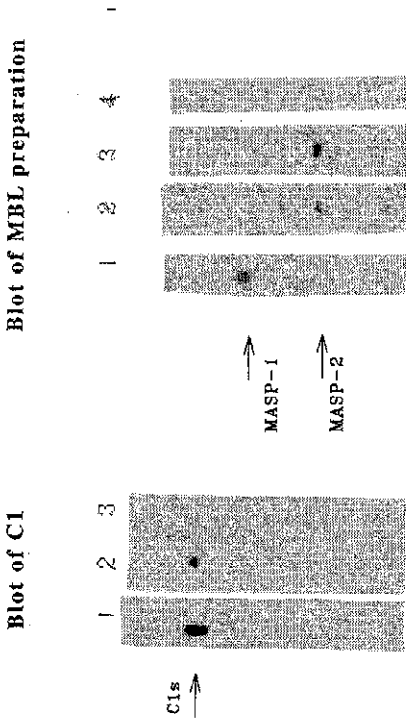
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

4/6

Figure 4

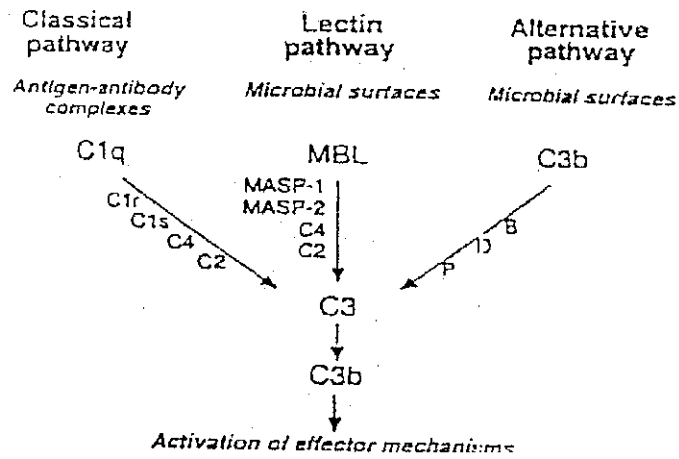


WO 02/06460

PCT/DK01/00499

5/6

Figure 5



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCIT/DK01/00499

Figure 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

SEQUENCE LISTING

<110> NatImmune

<120> MASP-2, a complement fixing-enzyme, and uses for it

<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> 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> 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

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

```

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 Glu 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 Glu 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

```

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

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
 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
 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> PXT
 <213> Homo sapiens

 <400> 3
 Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

```

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 Glu 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

```

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

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 Glu 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

WO 02/06460

PCT/DK01/00499

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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06460 A3(51) International Patent Classification: C12N 9/64,
15/12, C07K 14/47, 16/18, G01N 53/53, A61P 31/00

(21) International Application Number: PCT/DK01/00499

(22) International Filing Date: 13 July 2001 (13.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2000 01089 13 July 2000 (13.07.2000) DK
PA 2001 00879 1 June 2001 (01.06.2001) DK(71) Applicants and
(72) Inventors: JENSEN, Jens, Christian [DK/DK]; Phin-
sen, Aik' 28, DK-5230 Odense (DK); THIEL, Steffen
[DK/DK]; Nordhøjevej 11, DK-8240 Risskov (DK).CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE,
EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regions): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TJ).Published:
— with international search report(74) Agent: HØIBERG APS, St. Knogensgade 59B, DK-1264
Copenhagen K (DK).(85) Date of publication of the international search report:
2 May 2002(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/06460 A3

(54) Title: MASP-2, A COMPLEMENT FIXING ENZYME, AND USES FOR IT

(57) Abstract: The present invention relates to substantially pure mannin-binding lectin associated serine protease 2 (MASP 2) polypeptides and fragments thereof as well as nucleic acids encoding such polypeptides. Furthermore, the present invention relates to uses of a substantially pure polypeptide comprising amino acid sequences derived from mannin-binding lectin associated serine protease 2 (MASP 2) or a functional homologue thereof for the production of a pharmaceutical composition as well as pharmaceutical compositions comprising MASP 2 and/or MASP 2 fragments. In addition the present invention relates to inhibitors of MASP 2 and pharmaceutical compositions comprising such inhibitors. Methods for detecting MASP 2 nucleic acid expression are included in the invention.

【手続補正書】

【提出日】平成14年10月16日(2002.10.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マンナン - 結合性レクチンに会合したプロテアーゼ - 2 (MASP - 2) 由来のアミノ酸配列 (配列番号2) 又はその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋なポリペプチドの医薬組成物の生成のためへの使用であって、前記機能的相同体が配列番号2に示される配列と少なくとも60%の相同性を有する配列を含んで成り、そして/又は

i) マンナン - 結合性レクチン (MBL) と会合でき、そして/又は

ii) セリンプロテアーゼ活性であり得、そして/又は

iii) MBLectin補体経路機能についてのインビトロアッセイにおいてMASP - 2 活性であり得るポリペプチドである、ことを特徴とする使用。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、配列番号3として同定される配列を含んで成る請求項1記載の使用。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、マンナン結合性レクチン (MBL) と会合することができる請求項1記載の使用。

【請求項4】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項1又は2記載の使用。

【請求項5】

前記ポリペプチドが、配列番号1として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成る請求項1～4のいずれか1項記載の使用。

【請求項6】

前記ポリペプチドが、20kDの分子質量を有する請求項1～5のいずれか1項記載の使用。

【請求項7】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸30～444を含んで成る請求項1～3のいずれか1項記載の使用。

【請求項8】

前記ポリペプチドが、52kDの分子質量を有する請求項1～7のいずれか1項記載の使用。

【請求項9】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸138～296を含んで成る請求項1～3のいずれか1項記載の使用。

【請求項10】

前記ポリペプチドが、セリンプロテアーゼ活性を有する請求項1～9のいずれか1項記載の使用。

【請求項11】

前記ポリペプチドが、MBL補体経路機能についてインビトロアッセイにおいてMASP - 2 活性を阻害できる請求項1～10のいずれか1項記載の使用。

【請求項12】

前記ポリペプチドが、配列番号3のアミノ酸15～671を含んで成る請求項10又は11記載の使用。

【請求項13】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸16～296を含んで成る請求項10又は11記載の使用。

【請求項14】

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸30～296を含んで成る請求項10又は11記載の使用。

【請求項15】

前記ポリペプチドが、MASP-2活性を競争的に阻害できる請求項1～3いずれかに1項記載の使用。

【請求項16】

前記ポリペプチドが、配列番号2のポリペプチドのフラグメントを含んで成り、前記ポリペプチドがMBL/MASP-2を複合体化できる競争インヒビターである請求項15記載の使用。

【請求項17】

前記ポリペプチドが、配列番号3として同定される配列又はその機能的同等物を含んで成り、ここで位置8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18又は19での1又は複数のアミノ酸残基がもう1つのアミノ酸残基により位置されている請求項15又は16記載の使用。

【請求項18】

前記少なくとも2つのアミノ酸残基が置換されている請求項17記載の使用。

【請求項19】

配列番号3の位置14でのargが、もう1つのアミノ酸により置換されている請求項17記載の使用。

【請求項20】

配列番号3の位置14でのargが、小さな荷電されていないアミノ酸から成る群から選択されたアミノ酸により配置されている請求項17記載の使用。

【請求項21】

配列番号3の位置14でのargが、gly及びalaから成る群から選択されたアミノ酸により置換されている請求項17記載の使用。

【請求項22】

前記医薬組成物が、感染の処理のためである請求項1～21のいずれか1項記載の使用。

【請求項23】

前記感染が、微生物種により引き起こされる感染である請求項22記載の使用。

【請求項24】

前記微生物種が、菌類である請求項23記載の使用。

【請求項25】

前記微生物種が、酵母である請求項23記載の使用。

【請求項26】

前記微生物種が、細菌である請求項23記載の使用。

【請求項27】

前記細菌種が、少なくとも1つの抗生物質薬剤に対して耐性である請求項26記載の使用。

【請求項28】

前記細菌種が、多耐性である請求項26記載の使用。

【請求項29】

前記細菌種が、病原性である請求項26記載の使用。

【請求項30】

前記感染が、ウィルス感染である請求項22記載の使用。

【請求項31】

前記ウィルスが、レトロウィルスである請求項30記載の使用。

【請求項32】

前記レトロウィルスが、ヒト免疫欠損ウィルスである請求項 3 1 記載の使用。

【請求項 3 3】

前記医薬組成物がさらに、少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) サブユニット、又は前記少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) サブユニットを含んで成る少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) オリゴマーを含んで成る請求項 1 記載の使用。

【請求項 3 4】

少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) サブユニット、又は前記少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) サブユニットを含んで成る少なくとも 1 つのマンナン - 結合性レクチン (M B L) オリゴマーの、キットの部品を得るための薬剤の製造のためへの使用をさらに含んで成る請求項 1 記載の使用。

【請求項 3 5】

前記オリゴマーが、 M B L のテトラマー、ペンタマー及び / 又はヘキサマーから成るオリゴマーの群から好ましくは選択される請求項 3 3 又は 3 4 記載の使用。

【請求項 3 6】

前記医薬組成物が、 5 0 0 n g / m l 以下の血清レベルの M B L による、個人における感染の処理のためである請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 3 7】

前記医薬組成物が、 1 0 0 n g / m l 以下の血清レベルの M B L による、個人における感染の処理のためである請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 3 8】

前記医薬組成物が、 5 0 n g / m l 以下の血清レベルの M B L による、個人における感染の処理のためである請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 3 9】

配列番号 1 により同定されるようなアミノ酸配列又はその機能的相同体を有するポリペプチドであって、前記相同体が配列番号 1 に示される配列に対して少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド。

【請求項 4 0】

配列番号 2 の残基 3 0 ~ 4 4 4 からのアミノ酸配列又はその機能的相同体を有するポリペプチドであって、前記相同体が配列番号 2 に示される配列に対して少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド。

【請求項 4 1】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 の残基 3 0 ~ 2 9 6 からのアミノ酸、又はそのフラグメント又は変異体を含んで成る請求項 4 0 記載のポリペプチド。

【請求項 4 2】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 の残基 1 3 8 ~ 2 9 6 からのアミノ酸、又はそのフラグメント又は変異体を含んで成る請求項 4 0 記載のポリペプチド。

【請求項 4 3】

配列番号 3 の残基 1 5 ~ 6 7 1 からのアミノ酸配列又はその機能的相同体を有するポリペプチドであって、前記相同体が配列番号 3 に示される配列に対して少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド。

【請求項 4 4】

配列番号 2 の残基 1 6 ~ 2 9 6 からのアミノ酸配列又はその機能的相同体を有するポリペプチドであって、前記相同体が配列番号 2 に示される配列に対して少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド。

【請求項 4 5】

配列番号 3 により同定されるような配列に対して少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成る、 M B L / M A S P - 2 の複合体化の競争インヒビターであるポリペプチド。

【請求項 4 6】

配列番号 3 として同定される配列又はその機能的相同体を含んで成り、ここで位置 8 , 9 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 , 18 又は 19 での 1 又は複数のアミノ酸残基がもう 1 つのアミノ酸残基により位置されている請求項 45 記載のポリペプチド。

【請求項 47】

前記少なくとも 2 つのアミノ酸残基が置換されている請求項 45 記載のポリペプチド。

【請求項 48】

配列番号 3 の位置 14 での *arg* が、もう 1 つのアミノ酸により置換されている請求項 45 記載のポリペプチド。

【請求項 49】

配列番号 3 の位置 14 での *arg* が、小さな荷電されていないアミノ酸から成る群から選択されたアミノ酸により配置されている請求項 45 記載のポリペプチド。

【請求項 50】

配列番号 3 の位置 14 での *arg* が、*gly* 及び *ala* から成る群から選択されたアミノ酸により置換されている請求項 45 記載のポリペプチド。

【請求項 51】

前記ポリペプチドが、MBLectin 補体経路機能についてのインビトロアッセイにおける MASP - 2 活性であり得る請求項 39 ~ 50 のいずれか 1 項記載のポリペプチド。

【請求項 52】

前記ポリペプチドが、MASP - 2 セリンプロテアーゼ活性を競争的に阻害できる請求項 39 ~ 50 のいずれか 1 項記載のポリペプチド。

【請求項 53】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項 39 ~ 52 のいずれか 1 項記載のポリペプチド。

【請求項 54】

請求項 39 ~ 50 のいずれか 1 項記載のポリペプチド配列に対して少なくとも 85 % 同一である配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子。

【請求項 55】

請求項 54 記載の核酸分子を含んで成る核酸ベクター。

【請求項 56】

前記ベクターが発現ベクターである請求項 55 記載のベクター。

【請求項 57】

調節要素をさらに含んで成る請求項 55 記載のベクター。

【請求項 58】

MASP - 2 の活性を競争特異的に阻害できる化合物の薬剤の調製のためへの使用。

【請求項 59】

前記化合物が、補体因子 C2 または C4 のペプチドフラグメントである請求項 58 記載の使用。

【請求項 60】

前記化合物が、請求項 39 ~ 50 のいずれか 1 項記載のポリペプチドである請求項 58 記載の使用。

【請求項 61】

前記化合物が、MASP - 2 と会合できるマンナン - 結合性レクチン (MBL) のフラグメントである請求項 58 記載の使用。

【請求項 62】

前記化合物が、抗体生成動物に MASP - 2 ポリペプチドを投与することによって生成される抗体である請求項 58 記載の使用。

【請求項 63】

前記化合物が、MASP - 2 に対して選択的に結合する抗体である。請求項 58 記載の使

用。

【請求項 6 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 6 3 記載の使用。

【請求項 6 5】

前記抗体が、検出マーカーを含んで成る化合物にカップリングされる請求項 6 2 ~ 6 4 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 6 6】

マンナン - 結合性レクチンに会合したセリンプロテアーゼ - 2 (M A S P - 2) 由来のアミノ酸配列 (配列番号 2) 又は配列番号 2 に示される配列と少なくとも 6 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を含んで成るその機能的相同体を含んで成る実質的に純粋なポリペプチドを含んで成る医薬組成物。

【請求項 6 7】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 として同定される配列を含んで成る請求項 6 6 記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

前記ポリペプチドが、マンナン結合性レクチン (M B L) と会合することができる請求項 6 6 記載の医薬組成物。

【請求項 6 9】

前記ポリペプチドが、ラベル又はトキシンに接合される請求項 6 6 記載の医薬組成物。

【請求項 7 0】

請求項 3 9 ~ 5 2 のいずれか 1 項記載のポリペプチドを含んで成る請求項 6 6 記載の医薬組成物。

【請求項 7 1】

活性 M B L - 複合体化 M A S P についてのアッセイ方法であって、アッセイされるべきサンプルを供給し、そして従来の補体固定経路の活性化を効果的に低めるのに十分であるが、M B L - 複合体化 M A S P の活性を実質的に妨げないほど高いイオン強度の存在下でアッセイを行うことによって、従来の補体固定経路の活性化に起因するいずれかの人工産物を実質的に低めることを含んで成る方法。

【請求項 7 2】

M A S P - 2 活性についてのアッセイを含んで成る、M A S P - 2 の活性の決定方法であって、

- M B L / M A S P - 2 複合体を含んで成るサンプルを、固相に適用し、結合された複合体を獲得し、
- 少なくとも 1 つの補体因子を、前記複合体に適用し、
- 切断された補体因子の量を検出し、
- 前記切断された補体因子の量を、前記 M A S P - 2 の量と対比し、そして
- M A S P - 2 の活性を決定する段階を含んで成る方法。

【請求項 7 3】

前記固相が、マンナン被膜である請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

前記少なくとも 1 つの補体因子が、M B L / M A S P - 2 複合体により切断できる補体因子である請求項 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7 5】

前記少なくとも 1 つの補体因子が、C 3、C 4 及び C 5、好ましくは C 4 から選択される請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

前記切断された補体因子が、前記補体因子に対して向けられた抗体により検出される請求項 7 2 ~ 7 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7 7】

前記従来の補体経路の活性化が阻害される請求項 7 2 ~ 7 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 78】

前記活性化が、高いイオン強度でアッセイを行うことによって阻害される請求項 77 記載の方法。

【請求項 79】

前記塩濃度が、0.2 M 以上、例えば 0.3 M ~ 1.0 M、例えば 0.5 M ~ 5 M、例えば 0.7 M ~ 2 M、例えば 0.9 M ~ 2 M、例えば約 1.0 M である請求項 78 記載の方法。

【請求項 80】

前記塩が、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaI, KI, MgI₂, CaI₂, NaBr, KBr, MgBr₂, CaBr₂, Na₂S₂O₃, (NH₄)₂SO₄ 及び NH₄HCO₃ から選択される請求項 79 記載の方法。

【請求項 81】

生物学的サンプルにおける MASP-2 又は MASP-2 活性の定量的アッセイのためである請求項 72 ~ 80 のいずれか 1 項記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No. PCT/DK 01/00499
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/64 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/573 A61P31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
P, X	WO 01 40451 A (THIEL STEFFEN ; JENSENIUS JENS CHRISTIAN (DK)) 7 June 2001 (2001-06-07) claims 1-76	61, 62, 64-68, 74-77
A	WO 01 12212 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 22 February 2001 (2001-02-22) claims 1-29	61, 62, 64-68, 74-77
	- / - -	
☒ Further documents are listed in the continuations of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" state document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the prior art or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search: 23 November 2001		Date of mailing of the international search report: 15. 01. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 50116, Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 000 04 Fax: (+31-70) 340-2016		Authorised officer: Fernando Farieta

Form PCT/ISA/210 (separate sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: 1st Application No
 PCT/DK 01/00499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 00 55180 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;ROSEN CRAIG A (US); RUBEN STEVEN M (US)) 21 September 2000 (2000-09-21) claims 1-74	61,62, 64-68, 74-77, 91-100
A	--- -& DATABASE GSP [Online] retrieved from EMBL Database accession no. AA858273 XP002902154 45% identity with SEQ. ID. No. 2 in 288 aa overlap	7
A,P	EP 1 033 401 A (GENSET SA) 6 September 2000 (2000-09-06) the whole document -& DATABASE GSP [Online] retrieved from EMBL Database accession no. AA601729 XP002902155 45% identity with SEQ. ID. No.1 in 31 aa overlap	5
A	US 6 008 017 A (ARLETH ET AL) 28 December 1999 (1999-12-28) the whole document -& DATABASE GSP [Online] retrieved from EMBL Database accession no. AAE42150 XP002902156 37% identity with SEQ. ID. No.2 in 163 aa overlap	9
A,P	WO 01 10902 A (CURAGEN CORP ;FERNANDES ELMA (US); SHIMKETS RICHARD A (US)) 15 February 2001 (2001-02-15) the whole document -& DATABASE EPOP [Online] retrieved from EMBL Database accession no. AX084224 XP002902157 55% identity with SEQ. ID. No.1 in 29 aa overlap --- -/--	5

2

Form PCT/DK/210 (Continuation of Form PCT/DK/100)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No.
PCT/DK 01/00499

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 10, 31 August 1999 (1999-08-31) & JP 11 123085 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 11 May 1999 (1999-05-11) abstract -& DATABASE JPOP [Online] retrieved from EMBL Database accession no. E74405 XP002902158 37% identity with SEQ. ID. No.2 in 275 aa overlap -----	14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/DK 01/00499
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: 22-32, 88, 89 because they relate to subject matter not found to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/DK 01/00499

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 22-32 , 88, 89

Claims 22-32, 88-89 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body / Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds /compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on parent family members

Intern. Patent Application No.

PCT/DK 01/00499

FCI/BR 07/00459

Patent document: cited in search report		Publication date	Patent family members:	Publication date
WO 0140451	A	07-06-2001	AU 1693801 A WO 0140451 A2	12-06-2001 07-06-2001
WO 0112212	A	22-02-2001	AU 6637000 A WO 0112212 A1	13-03-2001 22-02-2001
WO 0055180	A	21-09-2000	AU 3395900 A AU 3617600 A AU 3617700 A AU 3619400 A AU 3619500 A AU 3869400 A EP 1168917 A2 EP 1165588 A1 EP 1169469 A1 EP 1165589 A1 EP 1159420 A1 EP 1163358 A1 WO 0055173 A1 WO 0055350 A1 WO 0055351 A1 WO 0055180 A2 WO 0055174 A1 WO 0055320 A1	04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 09-01-2002 02-01-2002 09-01-2002 02-01-2002 05-12-2001 19-12-2001 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000
EP 1033401	A	06-09-2000	EP 1033401 A2 JP 2001269182 A	06-09-2000 02-10-2001
US 6008017	A	28-12-1999	EP 0854191 A2 JP 11042092 A	22-07-1998 16-02-1999
WO 0110902	A	15-02-2001	AU 6899700 A WO 0110902 A2	05-03-2001 15-02-2001
JP 11123085	A	11-05-1999	US 5955309 A CA 2239605 A1 EP 0885960 A2	21-09-1999 18-12-1998 23-12-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/00	C 1 2 N 9/64	Z
C 1 2 N 9/64	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 イェンセニウス, イェンス クリスチャン

デンマーク国, デーコー - 5 2 3 0 オーデンセ, フィンセンス アレ 2 8

(72)発明者 ティール, ステフェン

デンマーク国, デーコー - 8 2 4 0 リッスコウ, ノートフデバイ 1 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA14 CA04 CA09 CA12 CA20 FA01 HA11 HA14
HA17
4B050 CC01 CC03 DD11 EE01 LL01 LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ21 QQ36 QQ41 QQ44 QQ53
QQ61 QQ89 QR08 QR16 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR51
QR55 QR57 QR62 QR67 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01
QX02
4C084 AA01 AA02 AA13 AA16 BA04 BA19 BA20 BA21 BA22 DC03
DC32 NA14 ZB321
4C085 AA14 BB22
4C086 AA01 EA16 NA14 ZB32

专利名称(译)	MASP-2，一种补体固定酶及其用途		
公开(公告)号	JP2004504027A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002512353	申请日	2001-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	晒颜延费森尤斯基基督教 蒂尔硬脂芬		
申请(专利权)人(译)	lenseniusu，延斯·克里斯蒂安 蒂尔，斯特芬		
[标]发明人	イエンセニウスイエンスクリスチャン ティールステフェン		
发明人	イエンセニウス,イエン スクリスチャン ティール,ステフェン		
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	A61K38/482 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 C07K16/40 C07K2319/21 C07K2319/42 C12N9/6424 C12Y304/21104 G01N33/573 G01N2333/96433		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7052 A61K39/395.P A61K45/00 A61K48/00 A61P31/00 C12N9/64.Z C12Q1/ /37 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA01 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/ /FA01 4B024/HA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/ /QA19 4B063/QQ21 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/ /QR51 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR67 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/ /AA16 4C084/BA04 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/DC03 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZB321 4C085/AA14 4C085/BB22 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ /ZB32		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	200001089 2000-07-13 DK 200100870 2001-06-01 DK		
其他公开文献	JP5226169B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基本纯的甘露糖连接的凝集素相关丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) 多肽及其片段和编码这些多肽的核酸。此外，本发明是，甘露聚糖 - 结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP-2) 从所述氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2) 或基本上纯的多肽的药物组合物包含其功能同源使用的用于生产的产品，和药物组合物，其包括MASP-2和/或MASP-2片段。此外，本发明涉及MASP-2的抑制剂，以及包含这种抑制剂的药物组合物。用于检测MASP-2核酸表达的方法包括在本发明中。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7052	A 6 1 K 31/7052	4 B O 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 P	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-512353 (P2002-512353)	(71) 出願人	501442622
(86) (22) 出願日	平成13年7月13日 (2001.7.13)		イェンセニウス、イェンス クリスチャン
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月14日 (2003.1.14)		デンマーク国、デーコー—5 2 3 0 オー
(86) 国際出願番号	PCT/DK2001/000499		デンセ、フィンセン ス アレ 2 8
(87) 国際公開番号	W02002/006460	(71) 出願人	501442611
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)		ティール、ステフェン
(31) 優先権主張番号	PA 2000 01089		デンマーク国、デーコー—8 2 4 0 リッ
(32) 優先日	平成12年7月13日 (2000.7.13)		スコウ、ノートフチバイ 1 1
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00870		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)	(74) 代理人	100092624
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 藤田 準一
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 慎