

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/12

C12N 15/57 C07K 14/47

C12N 9/64 A61K 38/48

A61K 38/17 A61K 47/48

A61P 37/00



# [12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95194984.5

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1104501C

[22] 申请日 1995.9.8 [21] 申请号 95194984.5

[30] 优先权

[32] 1994. 9. 8 [33] GB [31] 9418147.6

[32] 1995. 5. 4 [33] GB [31] 9509102.1

[86] 国际申请 PCT/GB95/02121 1995.9.8

[87] 国际公布 WO96/07738 英 1996.3.14

[85] 进入国家阶段日期 1997.3.10

[71] 专利权人 艾姆特兰有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 R·A·哈里森 T·C·法里依斯

[56] 参考文献

US4661347 1987.04.28 C12N15/12

审查员 常 矛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 13 页

[54] 发明名称 修饰的人 C3 蛋白质

[57] 摘要

本发明提供了能形成稳定的 C3 转化酶的修饰的天然补体途径蛋白质。优选地, 这些修饰蛋白质是修饰的人体 C3 蛋白质。本发明也提供了编码这些蛋白质的 DNA 序列和 DNA 构建体。本发明还提供了由这些蛋白质和特定的结合组分(如抗体)组成的缀合物以及这些蛋白质和/或缀合物在医疗上的用途。

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

1. 一种能形成稳定的 C3 转化酶的修饰的人体 C3 蛋白质，其中所说的修饰的蛋白质选自：

(a) 其中 Arg-1303, Arg-1320, 或者两者被另一氨基酸取代的 C3 蛋白质；

(b) 相对于天然的人体 C3 转化酶而言对因子 H 和/或因子 I 具有降低的敏感性的 C3 蛋白质，所说的蛋白质相对于天然的人体 C3 转化酶而言在相应于天然的人体 C3 转化酶的 752-754 位氨基酸残基和/或 758-780 位残基的区域具有一个或多个氨基酸改变的 C3 蛋白质；

(c) 相对于天然的人体 C3 转化酶而言在天然的人体 C3 转化酶的 1427, 1431 和/或 1433 位氨基酸残基上具有氨基酸改变的 C3 蛋白质。

2. 权利要求 1 所要求的蛋白质，其中所说的蛋白质是经用另一个氨基酸取代 1303 位精氨酸或 1320 位精氨酸或这两者来修饰的。

3. 权利要求 2 所要求的蛋白质，其中 1303 位精氨酸或 1320 位精氨酸或者两者被谷氨酰胺、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸或甘氨酸取代。

4. 权利要求 3 所要求的蛋白质，其中 1320 位精氨酸被谷氨酰胺取代。

5. 权利要求 3 或 4 所要求的蛋白质，其中 1303 位精氨酸被谷氨酸、甘氨酸或谷氨酰胺取代。

6. 按照权利要求 1 的蛋白质，该蛋白质相对于天然人体 C3 转化酶而言对因子 H 和/或因子 I 具有降低的敏感性，所说蛋白质相对于天然人体 C3 转化酶而言，在相应于 752-754 位氨基酸残基和/或 758-760 位残基的区域具有一个或多个氨基酸改变。

7. 权利要求 1 所要求的蛋白质，其中所说的一个或多个氨基酸改变是酸性氨基酸残基改变为中性氨基酸残基。

8. 权利要求 1 所要求的蛋白质，其中所说的氨基酸残基改变是天冬氨酸-谷氨酸-天冬氨酸改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸。

9. 按照权利要求 1 的蛋白质，所说蛋白质相对于天然人体 C3 转

化酶而言，在相应于天然人体 C3 转化酶的 1427, 1431 和/或 1433 位的氨基酸残基上具有氨基酸改变。

10. 一种 DNA 序列，该序列编码权利要求 1 到 9 之任一项所要求的蛋白质。

11. 一种 DNA 构建体，该构建体包含权利要求 10 所限定的 DNA 序列。

12. 一种缀合物，其包含连接到特异性结合部分上的权利要求 1 到 9 之任一项所限定的蛋白质。

13. 权利要求 12 所要求的缀合物，其中所说的特异性结合部分是一种特异性结合蛋白质。

14. 权利要求 13 所要求的缀合物，其中所说的特异性结合蛋白质是抗体或其抗原结合片段。

15. 权利要求 1 到 9 之任一项所限定的蛋白质或权利要求 12 到 14 之任一项所限定的缀合物在制造用于排除补体途径蛋白质水平的药物上的用途。

16. 权利要求 15 所要求的用途，其中所说的药物用来阻止对外来物质的排斥作用。

17. 权利要求 15 所要求的用途，其中所说的药物用于定位和/或扩大内源补体蛋白质的转化和在特定位点的沉积。

18. 一种药物制剂，其包含一种或多种权利要求 1 到 9 之任一项所限定的蛋白质或权利要求 12 到 14 之任一项所限定的缀合物以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

19. 权利要求 18 所要求的药物制剂，该制剂用于排除补体途径蛋白质水平。

20. 权利要求 18 所要求的药物制剂，该制剂用于阻止对外来物质的排斥作用。

21. 权利要求 18 所要求的药物制剂，该制剂用于定位和/或扩大内源补体蛋白质的转化和在特定位点的沉积。

## 修饰的人C3蛋白质

本发明涉及能形成稳定的C3转化酶( convertase)的新的修饰蛋白质和编码这些蛋白质的DNA序列, 以及这些蛋白质作为治疗剂(特别是用于排除补体途径蛋白质水平的治疗剂)的用途。

补体系统在人体和其它脊椎动物的免疫反应中起作用, 在效应子功能如诱导局部炎症反应的细胞的吞噬作用、溶解细胞和募集现象中十分重要[15]。这些特性对消除入侵的病原体(如细菌)是合乎需要的, 但是当被触发对抗宿主组织(例如局部缺血后的重新灌流伤害[3])或者排斥外来的治疗物质(如异种移植中的超急排斥[7])时是不合乎需要的。有人试图通过开发补体调节蛋白质(其正常功能是抑制补体活化[10, 18])的衍生物来消除这些不合乎需要的特征。

补体系统包括在细胞表面(受体和调节因子)和在液相(血浆和其它胞外环境)中的蛋白质。产生反应的关键步骤是C3蛋白水解转化成C3b和C3a片段。C3a象C5a一样, 是一种过敏毒素, 能把肥大细胞吸引到攻击位点, 导致局部组胺释放、血管舒张和其它炎症效果。新产生的C3b能够结合在其产生的位点周围的表面, 然后C3b由溶细胞的补体成分(C5-C9)集中攻击。

结合在表面的C3b, 以及它的降解产物, 也作为C3受体的配体起作用, 调节例如吞噬作用[15]。补体活化有两种有区别的途径, 它们都导致C3转化成C3b以及随后的反应。经典途径一般由抗体和抗原复合物激发, 引起涉及蛋白质C1q,C1r,C1s,C2和C4的酶级联反应。替代途径依赖一个活化环, 涉及C3自身并需要因子B和因子D。

C3向C3b(或C3i)转化产生的产物能与因子B结合, 形成C3bB(或C3ib)。这些复合物经因子D作用产生C3bBb, 它是一种C3转化酶, 能够将更多的C3断裂成C3b, 导致更多的C3bBb的形成, 从而又有更多的C3转化。在一定的环境条件下, C3bBb复合物通过和正调节因子备解素(P)结合稳定化, 然而这个正反馈环通常被调节蛋白质(最明显的是因子H和因子I)限制在很低的水平上。

因子H（在结构上和细胞结合分子相关）（i）从C3b取代B和Bb，（ii）作为因子I（把C3b裂解成iC3b）的辅因子起作用，从而阻止与因子B的任何重组形成更多的C3转化酶。在有表面如许多细菌的细胞壁（它可与新生成的C3b结合，阻止它被因子H和因子I调节）存在时，途径被“引发”来扩大C3b的产生。新产生的C3b也能够和内源细胞结合，因而，通常露置于补体的内源细胞表面额外地受膜结合调节物如MCP,DAF和CR1的保护，所述调节物以与因子H相似的方式起作用。

有少见的几种自然出现的状态，其中正常的液相调节不能进行，并且自发的C3转化最终导致C3在循环中普遍性耗竭：（i）因子H或因子I的遗传缺损[13]，（ii）和C3bBb结合并阻止解离的抗体（肾炎因子）的存在[4]，（iii）与眼镜蛇毒中一种叫眼镜蛇毒因子（CVF）的蛋白质（其和因子B结合并形成C3转化酶[14]，这种酶不包含C3b，也不受因子H和因子I的影响）相联系。这些情况说明在缺乏特异性活化时补体的负调节对正常生理活动有重要作用。

也有特异性活化发生的情况，但这不是所希望的，特别是当它直接抵抗宿主组织（例如局部缺血或外伤伤害组织）或抵抗特意施用的有治疗用途的外部物质（如异种移植，人工器官或透析膜）时。补体活化导致不期望的攻击和进一步的损害。因此，在这些情况下，阻断和抑制活化和反应将是有益的。

目前阻止补体介导损害的方法是：使用负调节蛋白质（CR1,MCP,DA以及因子H和因子I）阻止补体活化。补体抑制剂(如因子I，因子H和膜结合蛋白质CR1,DAF,MCP的可溶性衍生物)确实抑制替代途径的液相扩大环路。因而，在模拟生理状态下，有人试图使用这些分子，特别是CR1（看来它是效力最强的）来减少补体介导的损害[10，18]。

内源的因子H以高浓度（典型的是0.3-0.5mg/ml[15]）存在于血浆中。即使升高水平的抑制剂确实抑制液相反应，它们的效力也是微弱的，因此对活体用药就必须使用大量的纯化蛋白质（例如，可溶性的CR1的浓度可能超过5mg/kg体重），另外，因子H的效应被抑制的表面可以活化替代途径。当它不一定伴随着其它抑制因子的活性减少时，同样的因子表明它们不可能完全或全面地发挥效力。

眼镜蛇毒因子（CVF）有能产生稳定的C3转化酶的特性。C3转化酶在实验中可以排除动物体内的补体和其它体外样品（如人血浆）中的补体。CVF效力较高，（如40ug/kg就能破坏小鼠的补体活性[16]），然而它的缺点使它不合作人体治疗。

首先，它从眼镜蛇毒中获得（这个来源获取困难，操作危险），因而必须很小心的从神经毒液中提纯出来，在供应方面有明显的困难。这个问题不可能通过很容易地通过克隆和基因的体外表达来克服，因为在眼镜蛇体内有翻译后的修饰（特异性蛋白质水解加工），这种修饰要在体外完成是困难的（或是不可能的）。另外，这种加工所需的酶和酶切消化的条件在目前还是未知的。第二，蛋白质是属于外部来源的（对人而言），因而是免疫原性的。这使它不能进行重复治疗。而在好几周内除去病人的补体是需要重复治疗的（如使异种移植成活）。

尽管CVF和人体C3有一些结构和功能上的同源性，它与C3也有很大的差别（如链结构，生物合成位点，对补体调节因子的不敏感性，稳定的C3转化酶的形成）。它不能从C3的眼镜蛇等价物中获得，因为后者是已知的，已被克隆和测序，在大体结构和功能上与人体C3而不是CVF更相似[8]。

CVF是与人类在进化上距离很远的眼镜蛇的毒液中的特异性产物，因而使用基因操作把这个蛋白质修饰成可在人体非免疫原性地使用的产物是不可行的。

现在，我们设计了一种替代策略，它主要依靠越过生理调节，而不是抑制补体活性来引起系统的过度活化。它有两方面的应用。首先，它可用来在体内活化补体直到一种或几种组分排除，导致人体失去对任何随后的攻击（如异种移植）产生局部反应的能力。第二，它可以把无法调节的过度活化特意地定位在一个特定的目标（如一种病毒或一种病毒感染的细胞）以增加目标对补体介导的破坏的敏感性。

本文使用的术语“补体活化的调节因子”包括对C3转化的扩大有抑制作用的所有蛋白质，并不用来限制在那些基因定位在RCA基因座上的蛋白质。然而，它并不包括“正调节因子”如备解素。除非特别指出，“C3转化”是指C3蛋白质酶解转化成C3b和C3a，“C3转化酶”（或只是“转化

酶” )是指催化这种反应的酶 (典型的是两个或更多的蛋白质组分的复合物, 如C3bBb,C3iBb,CVFBb或C4b2a) 。

这样, 本发明的第一方面是提供一种修饰的天然补体途径蛋白质, 其能形成稳定的C3转化酶。

“天然”意指自然存在的, 也就是说可从大自然中获得的。所述的定义包括上述的被修饰的天然存在的补体途径蛋白质, 而无意于把它限制到特别的蛋白质种类。举例来说, 一种修饰后的人体蛋白质在其它的动物种类中可被用作一种稳定的C3转化酶。典型情况下, 使用从同一种类中得到的修饰补体途径蛋白质。

对C3 DNA编码序列的修饰 (例如使用定位诱变) 能产生C3的变体, 它能抗补体调节蛋白质, 同时保留了有益的功能特性 (用C3转化酶可裂解为C3b) 和结构完整性的特征 (正确的链结构, 巯基酯键的存在), 本发明此处所述的是关于天然补体蛋白质 (如人体C3) 的遗传修饰形式, 这种修饰形式的C3b片段获得了抵抗生理补体调节的特性。因为这种特性, 在生理环境中 (例如在活体内), 这些分子可以产生相应的C3转化酶的稳定形式, 这种形式可以产生C3向C3b的转化的扩大和后来的退化产物。

在一个优选的实施方案中, 本发明提供了一种修饰的C3蛋白质, 它能抵抗因子I的裂解。

这可以通过在蛋白质水解位点修饰蛋白质的残基来达到。

本发明一个特别优选的实施方案涉及修饰的人类C3蛋白质, 其中所说的蛋白质由用另一种氨基酸取代1303位精氨酸或1320位精氨酸或者两者来修饰, 所说的另一种氨基酸可以是酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸。1303位精氨酸最好被谷氨酸或甘氨酸取代 (被谷氨酰胺取代不是最好的), 1320位精氨酸最好被谷氨酰胺取代。

其它产生本发明适合的修饰蛋白质的方案包括:

i) 减少对因子H和其它相关蛋白质 (如MCP,DAF,CR1) 抑制活性的敏感性。例如, 人体C3的767-776位和1209-1271位残基牵涉结合因子H[20, 24], 这些残基或其它与蛋白质活性相联系的残基的一个或多个取代可以减少一个或多个这些调节蛋白质的结合。

ii) 降低C3bBb解离的速度。可以使用突变来加强C3b和Bb之间的相互作用。这将导致酶自发降解的减少以及因子H(和其它有关的调节因子)从C3b取代Bb效果的减弱。

这些降低自发的和因子H调节的C3bBb的降解速率的突变是合乎需要的, 37℃时在备解素存在的条件下, 即使因子H缺乏, 液相C3bBb复合物的半衰期也大约只有10分钟[6]。

iii) 人体C3的752-761位残基牵涉结合因子B。在C3中这是一个高度保守的区域, 在C4中发现了一个与它密切相关的序列, 因为C4结合因子B同系物C2, 加上在C3和C4之间这个区域十分相似, 以及在C3中它的高度保守性, 进一步证实它在C3中作为因子B结合位点的角色。这样, 这一区的改变能影响因子B的亲和力以及C3bBb的稳定性。

iv) 对补体活化的其它调节因子(如CR1, DAF和MCP的)抗性也是符合需要的。这些调节因子的作用方式都与因子H相似, 因此, 可以不必有另外的诱导突变。一些病原体也以相似的方式表达它们自己的补体活化的抑制物, 这些抑制物常常和因子F在结构和功能上同源(例如痘苗病毒分泌性多肽[]), 这些分子保护侵入者不受免疫反应的影响, 能够用抗这些分子保护的定向C3转化酶来攻击这些病原体将是有利的。

v) 通过备解素增加C3转化酶稳定性的突变。备解素的作用是稳定C3bBb复合物, 延滞自发的和因子H依赖性的分解。这种稳定性在液相中是无效的, 但是它一旦在一个适合的活性表面开始, 就可能在扩大过程中起着更重要的作用[5], 增加它的活性(通过增加它的亲和力)能打破液相中的平衡, 因而促进自发的C3转化。这种方法与上述的其它修饰方法相结合尤其有用。

vi) 阻止C3bBb有C5转化酶活性的突变。当用于从循环中排除C3活性时, 不期望的负效应是产生大量的过敏性多肽, 它们中最具效力的是C5a, 它是由一些C3转化酶裂解C5得来的。这个反应可能依赖转化酶和另一分子C3b的亲和力[11], 因此, 可以通过C3突变除去这种相互作用。

vii) 增强C3转化酶的活性。C3bBb即C3转化酶的活性位点存在于Bb部分。推测C3b组分使Bb形成活性构象和/或结合并定位底物以使Bb对它起作

用。这是未知的，但不论在那一种情况下，都有可能通过C3突变增加转化酶的活性。

viii) 以功能形式表达。野生型C3在和新的C3转化酶复合体结合前要转化成C3b。在活体内使用时，对转化成C3b（或C3i）的需要将延滞修饰C3的作用。因此，需要一种能立即形成转化酶的形式使用蛋白质，或者使用初加工的转化酶复合物。因而，体外生产一种功能与C3b相似的药物将是有益的。这在体外是能达到的。

ix) 修饰天然蛋白质，以导入新的裂解位点，使结合因子B所需的多肽区保留下来而和因子H专一地结合所需的多肽区被特异性地除去。例如，可以通过导入位点使与C3b相似的修饰C3进一步裂解成一种仍能因子B结合，但不易被因子H和因子I灭活的形式。

x) 修饰其它区域，以影响C3b与因子B和/活因子H相互作用。

本发明基于通过促进C3转化以排除C3从而破坏补系统来改变传统的方法，本发明的另一个应用是具有在特定位点促进C3转化的潜能，因而能够补充补体依赖性效应因子机制以攻击特定的目标。

因而，修饰蛋白质加入到包含补体活化调节因子的生理介质（如血液）中时，最终的效果增加了C3转化的数量。这种活性可以用来排除那种介质中的天然C3或者把C3转化定位在所需的目标上。

C3b片段抗因子I作用的C3类似物（如在实施例1中描述的衍生物）能和因子B结合，其能被因子D裂解，最终分解成非活性形式。在不被因子I灭活的情况下，修饰的C3b能够重复地和因子B的新分子结合，从而促进其灭活。因此，在本发明中所述的修饰的另一个潜在的应用就是通过因子B活性的消耗使替代途径灭活。一个相似的方法也被用于修饰C4以促进C2的消耗，从而使补体活化的经典途径破坏。

本发明包括任何其它的和C3bBb酶使用方式相似的蛋白酶，即使在有补体活化的调节因子存在时，它们仍可使C3裂解成C3b。

本发明还包括编码其中蛋白质的DNA序列，以及组成这些DNA序列的DNA构建体。

“DNA序列”包括所有的也编码给定的氨基酸序列（利用遗传密码的简并性）的核酸序列和实质上与其同源的序列，这些序列因此也包括在本发明的范围内。

“实质上同源”的核酸序列也在本发明的范围内。“实质上的同源性”可以在核酸水平或氨基酸水平上评价。在核酸水平上实质上同源的序列可被视为在严格的条件下（例如，在35℃—65℃大约0.9M的盐溶液中）能和本发明的核酸序列杂交的序列。在氨基酸水平上，如果组成蛋白质的显著数目的氨基酸表现出同源性时就可以认为一个蛋白质序列和另一个蛋白质序列实质上同源。至少55%，60%，70%，80%，90%，95%甚至99%的氨基酸是同源的，这个数目越大，同源性就越大。

如在上面讨论的，本发明的蛋白质可以用来获得定位的补体活化作用。确保这种作用的一种方法是把蛋白质和一个部分结合，这个部分又能和所需的目标结合。从而，在另一方面，本发明提供了包含结合到一个特定的结合部分（例如一种特异性的结合蛋白质）上的本发明的蛋白质的缀合物。这种结合蛋白质的一个例子就是抗体或其抗原结合片段。

我们预期对受治疗者使用本发明的蛋白质后能得到期望的治疗效果。为达到这个目的，本发明也提供了：

- a) 用于治疗的本发明的蛋白质；
- b) 本发明的蛋白质和缀合物在制造用于排除补体途径蛋白质水平（特别是防止排斥外来物质）的药物上的用途；
- c) 包含本发明的一种或几种蛋白质或缀合物以及一种或几种药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物制剂；
- d) 一种在哺乳动物内减少补体途径蛋白质的方法，这种方法包括对动物使用本发明的蛋白质，最好以药物制剂的形式施用。

药物制剂可以用单位剂量给出。每剂包含着预先确定的活性成分的数量。这样一个单位可能包含着最小量的活性成分，例如1mg，优选地是2—3mg。一个单位剂量包含的最大量决定于许多因素，如处理条件，用药程序，病人的年龄、体重、病情以及经济上的考虑。例如，一个单位剂量可以包含10mg甚至100mg的活性成分。

本发明的蛋白质在体内使用能破坏补体系统，期望产生这种状态的情况包括以下几种：

(a) 为了防止补体介导的对移植体的破坏和损害，所述移植特别是异种移植（从不同种的动物中移植物质），尤其是不调和的异种移植（捐献者和接受者的种类是不调和的关系）。在手术之前，接受者将被除去补体，并把这种状态保持到移植体被接受或被一个更协调的器官取代。

最初的处理可以在移植前的几天内进行，另外，在排斥危机中也需要除去补体。在处理的同时，可以使用抗组胺药物控制可能由C3a和/或C5a的产生引起的普通炎症反应（例如血管舒张）。

在使用能活化补体系统的人工器官或组织（例如人工肾渗透膜）时，除去补体也是有益的。如上所述，蛋白质可以以非活化的形式，或者以功能性C3b类似物的形式，或者以初步加工的活性C3转化酶（如C3bBb）的形式用药。它们可以以能使活性转化酶遇到循环中C3的任何方式使用（如静脉注射，皮下注射等）。

另一种替代方式就是体外处理，例如，通过带有活性转化酶的基质输注到循环，这具有在除去补体的血液（或血浆）返回到病人体内之前，使得可以除去（如通过透析）过敏性多肽（C3a和C5a）和其它低分子量的炎症介导体（如组胺和氧化氮）的优点。

(b) 防止由大外科手术引起的补体介导的损害。如上所述，最好是在外科手术前（但如果需要也可在手术之后）将病人的补体除去，并把这种状态一直保持到补体依赖性免疫攻击所引起的附加的内部伤害减少到最小。

(c) 使由于非外科伤害引起的补体介导的损害减少到最小。在这些情况下，除去补体必须在最初的伤害之后进行，但药物制剂和使用方法可能与上面叙述的相同，当恢复参与了局部缺血的组织通过循环直接输血（如心肌局部缺血、冻伤、烧伤等）时，这是特别有用的。

(d) 使由于抗体-抗原相互作用引起的补体介导的损害减少到最小。在包括肾小球性肾炎、溶血性贫血、重症肌无力和II型胶原蛋白诱导的关节炎等自身免疫性疾病发病时，补体介导的防御反应是很不合需要的。治疗期间破坏补体系统可以减轻病情。

(e)使特定的病原体对补体介导的免疫机制更敏感。在这种方法中，目的是不使用过度激活的C3转化酶产生C3的排除，而是在期望的目标上使用转化酶集中转化C3。目标可以是病原体如细菌、病毒和其它寄生物，或是有害的宿主细胞和组织如肿瘤细胞和病毒感染的细胞。C3转化酶或是通过局部集中用药（如直接注射，可能在一种延缓其扩散进正常循环的介质中），或是通过与目标组分如抗体结合定位到目标上。这样，修饰蛋白质可以通过以下途径连结到特定的免疫球蛋白上：通过蛋白质的化学交联；或通过介入DNA序列编码和表达（并纯化）融合蛋白质（如就IgG来说，无论是重链还是轻链都能附加到C3上并和C3共同表达，或是两条链联结到一个完全融合的多肽内）；或通过特定的编码序列（例如“亮氨酸拉链”形结构域）掺入到两个融合部分（如修饰的C3和特定的抗体）的DNA中。当混合在一起时，表达的产物自身联合形成稳定的缀合物。融合蛋白质可在局部用药或进入通常的循环。

脂质体（表面带有抗体，并在表面或内部有修饰蛋白质）和/或病毒离子（例如，利用基因工程在它们的表面表达蛋白质）也能用来进行抗体和修饰蛋白质的共同传送。在疾病发展的任何阶段这种策略都可以单独直接或与其它处理结合使用。在手术除去肿瘤之后，用它来消除循环系统中的任何癌细胞是十分合适的。抗体-修饰蛋白质缀合物在体外使用也能够消除病原组织，例如在抽提的骨髓中杀死白细胞，然后把剩余的健康细胞送回到病人体内。

也可以用替代方法，在移植前从骨髓中除去不和移植接受者的MHC相容的淋巴细胞。修饰蛋白质也可以和抗原联结，不管是在体内还是体外，这种结合都可以用来攻击不期望的反应性的淋巴细胞（例如，当它抵抗移植和自身组织时）。

不管是使用人体修饰蛋白质的衍生物，还是为其它物种特制的类似物，都可以用同样的技术来处理这些物种。

本发明每一方面的优选的特点是：对每一方面来说，相互的双方都已在细节上作了必要的修正。

现在通过下面的实施例来叙述本发明，这些实施例不在任何一方面构成对本发明的限制。实施例涉及附图，其中：

图1: 表示在PC3中编码的人体C3的预料的蛋白质序列;

(使用标准的单字母氨基酸代码)。

图2: 表示PC3中的cDNA序列;

(使用标准的单字母脱氧核苷酸代码表示的有义链, 方向是从5'—3')。

图3: 表示本发明的修饰的蛋白质。

图4: 表示人体C3不同突变的作用, 其中取代1303位精氨酸或1320位精氨酸(因子I介导的这些位点的裂解)。

注:

1. [35S]--生物合成标记的样品。
2. 在正常的离子强度下进行的反应。
3. 用抗C3免疫沉淀。
4. 还原条件下的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。
5. 放射自显影。

图5: 表示掺入可由因子I和因子H灭活的1303位精氨酸→谷氨酰胺1303突变后人体C3增强的抗性。

图6: 表示在752-754和758-760位氨基酸残基突变的C3转化酶裂解的分析结果。

这是一张Western印迹的照片, 从7.5%SDS-PAGE电泳(还原条件下)中显影得出, 在电泳转移到硝酸纤维素上后, 用羊的抗人C3抗体探查, 用辣根过氧化物酶偶联的抗羊免疫球蛋白抗体和改良的化学发光测定法(方法和检测试剂均来自英国的Amersham)记录在X-射线胶片上。裂解反应和检测方法参考图3的效果按实施例4中提到的进行。

注:

1—4道: 野生型C3(在COS细胞中表达)

5—8道: 变异的C3(752-754位残基改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸, 758-760未残基也改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸)(在COS细胞中表达)

1, 5道: 不添加

2, 6道: +CVFBb

3, 7道: +因子H+因子I

4, 8道: +CVFBb+因子H+因子I

箭头所指示的带为:

- A: C3  $\alpha$  链
- B: C3  $\alpha'$  链
- C:  $\beta$  链
- D: C3  $\alpha'$  链裂解的68KDa产物
- E: IgG重链

图7 表示在野生型和突变体C3'S (C3i'S) 存在时, 由因子D裂解放射性标记的因子B的分析结果。

所示的是一张SDS-PAGE的放射自显影照片。所有的样品均包含因子D和 $^{125}\text{I}$ 标记的因子B并在37℃下培养3小时。

在编号道中的样品也包括:

1. 只有蒸馏水
2. 1/125野生型C3
3. 1/25野生型C3
4. 1/5野生型C3
5. 1/25突变体C3(1247谷氨酰胺, 1431天冬氨酸, 1433谷氨酰胺)
6. 1/5突变体C3
7. 没有稀释的突变体C3

箭头所指的带为:

- A. 没有裂解的 $^{125}\text{I}$ 标记的因子B (93KDa)
- B. 60KDa裂解产物 (“Bb”)
- C. 33KDa裂解产物 (“Ba”)

图8: 表示说明C3和IgG形成缀合物的SDS-PAGE研究

这是非还原条件下电泳的4%丙烯酰胺SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色图。编号的道包含的样品有:

1. PDP-IgG
2. C3i
3. PDP-IgG+C3i反应混合物

箭头指示处为:

A: 可能为C3i-IgG缀合物 (350KDa)

B: C3i (200KDa)

C: IgG (150KDa)

图9: 说明缀合物靶引C3转化酶抗羊红细胞活性。

这张图表示羊红细胞水解的百分率。按方法中所述的步骤进行: 红细胞先用C3-IgG缀合物或PDP-IgG或C3i稀释液包被, 然后洗涤, 用备解素和因子B、因子D产生C3转化酶, 最后在CFD/EDTA中经NGPS显影溶解物。只有缀合物产生水解, 这种水解是制剂依赖性的。

下面的标准方法和定义适用于所有的实施例:

除非特别指出, 所说的所有补体组分是人体来源的。对所有蛋白质以及它们衍生的片段都使用标准术语(就象文献[15]中包括的)。另外, 术语“C3i”指没有完整的巯基酯键但在 $\alpha$ 链保留了C3a多肽的任何分子形式的C3。

人体C3的cDNA和编码序列编号如图2所示。使用EMBL核苷酸数据库中所用的编号方式(从参考文献[2]中得出)。所示的序列是我们的构建体(PC3'), 它缺乏在文献中报道的5'未翻译区开始的11个核苷酸[2], 因而第一个碱基的编号是12。推定的起始密码子为编号是61-63的核苷酸。 $\beta$ -链的氨基端丝氨酸残基的密码子是127-129位核苷酸, $\alpha$ -链的氨基端丝氨酸残基的密码子是2074-2076位核苷酸。

蛋白质序列是根据图1所示的前体序列编号的, 前体序列是在附录1中的DNA序列的预测的翻译产物(1-22位氨基酸被认为组成一个在生物合成过程中被除去的序列, 668-671位氨基酸被认为在前体被分解成 $\alpha$ 和 $\beta$ 链时被除去)。

下面缩写的含义为: CVF: 眼镜蛇毒因子; ELISA: 酶联免疫吸附测定; *E. coli*: 大肠杆菌; Kb: 千碱基; HSV-1: 单纯疱疹病毒1型; PBS: 磷酸缓冲盐水; COS-1是由猴肾细胞衍生的细胞系。下列是限制性内切核酸酶: AflIII, DraII, DraIII, EcoRI, EcoRV, HindIII, NaeI, NheI, XbaI。

### 标准方法

标准分子生物学方法如质粒分离、琼脂糖凝胶电泳以及DNA连接都可在文献中查到[21]。双链DNA测序使用由美国生物化学公司提供的“测序酶

2.0版本”试剂盒。C3表达通过塑料板ELISA来测量，塑料板预先用亲合纯化的多克隆羊抗人C3包被，并加上组织培养物的上清液样品。束缚型C3用单克隆大鼠对C3的抗体和碱性磷酸酶、显色底物、对硝基苯磷酸结合后检测。测定结果用纯化的人体血浆C3校正。

补体蛋白质和CVF纯化的方法以及在分析中使用的亲合纯化的抗C3抗体的制备方法能在文献中查到[28]。相当的试剂也可以从Sigma化学有限公司买到。

### C3的cDNA编码序列

我们C3的cDNA编码序列由两个片段构建而成，这两个片段是从一段随机引发由载体PGEM4（Promega）携载的人体肝脏cDNA文库中分离得到的。五个寡脱氧核苷酸链，代表已知的人体C3编码序列的片段，用T4-多核苷酸激酶和[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP放射标记，并用来探测从琼脂板的文库的过滤转换。两个包括着大约4kb的插入序列的克隆被分离出来，限制性内切核酸酶消化，和特异性的寡脱氧核苷酸链探针杂交以及部分序列分析证明：其中插入序列'AB'包括有5.1kb信息的5'端，而另一段序列'B44'则伸向3'端。

这些插入序列大约有3kb的重叠，包括一个唯一的EcoRI限制性酶位点。A13的不完整的5'部分用EcoRI和NheI切割，用由EcoRI和XbaI消化的B44中分离到的完整片段取代。两个片段均在低熔点琼脂糖上凝胶电泳提纯，然后与T4DNA连接酶连结产生一个载体，它包含编码完整C3前体蛋白质的5.1kbDNA。

接头序列5'到C3编码区包含着两个ATG'，它们可能是潜在的假翻译起始位点，因而用带缺口的质粒诱变将它们除去，并不改变C3编码序列，这种方法在实施例1中有叙述，诱变所使用的寡脱氧核苷酸链是除去接头/衔接头DNA的大约50个碱基对的PL-ATC-3（tagggagaccggaagcttgc cctctccctctgtccctctg t）。这个突变的载体为7.7kb，包含5.1kb的C3 cDNA序列加上来自PGEM4载体（Promega）的2.6kb，就是所提到的PC3。

将PGC3质粒的C3编码区完全测序，只和先前发表的人体C3（“S”等位基因）cDNA序列有四个不同：

(i) C2481改变为G，C2805改变为T后不改变密码；

(ii) T1001改变为C, 编码先前叙述的HAV4-1-(亮氨酸314→脯氨酸)多形形式;

(iii) G2716→A编码缬氨酸886→异亮氨酸, 尽管在大鼠和小鼠C3的这个位置都发现了异亮氨酸, 但人体C3中以上的改变还未见报道。

所述的序列包括起始和终止密码子, 有完整的信号序列, 因而能编码有功能的C3。

用ELISA的方法检测到野生型C3在COS-1细胞(使用脂转染胺试剂和PCDNA3(Invitrogen)表达载体转染)的组织培养物上清液中表达的水平超过1.7 μg/ml。只由PCDNA3载体转染的细胞没有可检测到的C3产生。此外, 通过对免疫沉淀、SDS-PAGE、免疫杂交、裂解反应后表达的产物的分析证明:

(i) 最初的翻译产物正确地加工成成熟的双链形式。

(ii) 如天然的C3一样, 这个产物可由C3转化酶(CVFBb)裂解为C3b。

(iii) 如天然的C3一样, 表达的蛋白质不能由因子H加上因子I裂解, 但是由C3转化酶转化为C3b之后可裂解。这证实我们的起始质粒可以翻译成有功能的C3。

C3编码序列的表达和结构的替代的叙述见文献[25]。

**实施例1:** 在两个因子I裂解位点(氨基酸位置为1303和1320)精氨酸残基转变成谷氨酰胺残基以防止C3b片段被因子I裂解的C3的产生

a) 诱变

用来诱变的寡脱氧核苷酸链是QRI1(caactgcccagccaaagctccaagatcacc), QRI2(gccagcctcctgcaatcagaagagaccaag), 和AFL4149(taataaatcgaccttaaggtcaccataaaac)以及相应的反义寡脱氧核苷酸链QRI1n(ggtgatcttggagctttggctgggcagttg), QRI2n(cttgggtctcttctgattgcaggaggctggc)和AFL4149n(gtattatggtgaccttaaggtcgaatttatta)。

在C3前体序列氨基酸残基1303, 即因子I裂解位点, QRI1和QRI2可以特异性地使谷氨酰胺取代精氨酸(通过在cDNA序列上把G3968C3969改变为AA)。QRI2和QRI2n在氨基酸残基1320因子裂解位点能达到同样的取代(通过把核苷酸G4019变为A)。

AFL4149和AFL4149n在cDNA序列的4149位置插入一个限制性内切核酸酶AFLII的裂解位点（通过把C4149改变为T），没有改变编码的氨基酸序列。这两个引物被用作标记使在AFLII裂解DNA产物的基础上能够成功地鉴别诱变。

诱变通过使用“缺口质粒(gapped plasmid)”方法达到。一批在胸腺嘧啶脱氧核苷的地方富含尿嘧啶核苷的PGC3 ('UPGC3') 通过在0.25  $\mu$ g/ml 尿苷条件下生长在大肠杆菌CJ236品系内制备。这个质粒用SmaI消化，7.2kb产物 ('US1') 琼脂糖凝胶纯化以从C3序列（残基1463-1947）除去一个0.5kb的片段。缺口质粒的其它组分 ('DN2') 通过用DraIII加上NaeI消化PGC3，并用琼脂糖凝胶电泳纯化5.1kb片段两次制备而成。200ng的DNA和大约500ngUS1混合在50  $\mu$ l水中，加热到100℃，缓慢冷却到50℃以下，加20到25  $\mu$ l的2XT7缓冲液（100mM TRIS/HCl/PH7.4/14mM MgCl<sub>2</sub>，100mM NaCl, 2mM二硫苏糖醇，以及ATP, dATP, dCTP, dTTP和dGTP各1ml），再加每种5'-磷酸化诱变引物各10nmol（一个反应使用QRI1, QRI2和AFL4149，另一个反应使用QRI1n, QRI2n和AFL4149n）。混合物重新加热到70℃，保持5min，缓慢冷却（30--60min）到20℃。在0℃，加入10单位的T7DNA聚合酶和80单位的T4DNA连结酶。混合物（总体积为50  $\mu$ l）首先在0℃下培养5min，然后在室温下保持5min，最后在37℃下保持3hr。根据制造厂商的建议，每种混合物的1  $\mu$ l都可用来转化100  $\mu$ l的高活性的XL1 E. coli (Stratagene)。

就AflII裂解筛选抗氨基青霉素的菌落，将成功的突变体生长在100ml的培养基上，从中分离质粒并进行测序（使用一个已知序列的引物C3pa-3876, cttcatgggtgttccaagcct，它与C3-cDNA的核苷酸3876-3895相配对）以确定在因子I裂解位点突变的特征。

“缺口质粒”诱变的步骤见文献[26, 27]。

#### b) 突变体DNA向真核表达载体的转移

来自变异质粒的C3编码片段用HindIII和NaeI两次消化切除，再加上DraI使残留的质粒失活，C3编码序列用琼脂糖凝胶提纯并连结到pcDNA载体（Invitrogen）内，载体先用HindIII和EcoRV酶线性化并用小牛小肠磷

酸酶去磷酸化。连结混合物用来转化高活性的XL1大肠杆菌，接着后者就接种含有氨苄青霉素的培养板上。

随机选择(3个或4个)的抗氨苄青霉素的菌落生长在2--3ml的培养物中，质粒DNA小规模地分离。包含这正确插入序列的质粒通过用限制性内切核酸酶EcoRI, HindIII和AflIII消化质粒DNA来鉴别。相应的菌落生长在100ml培养基上，质粒通过标准方法提纯。突变体最初从PGC3中构建，因此把两个ATG's 5'保留到编码区，从而这个区域(加上C3编码序列中5'端的3kb)可以用HindIII加上EcoRI除去，并通过连结切自PC3的同样片段取代。重构的载体按标准方法制备，并用来转染COS细胞。

#### c) 野生型和突变体C3's的表达

突变体和野生型C3在转染进COS-1细胞的质粒中过渡性表达。转染根据制造厂商的建议使用脂转染胺<sup>®</sup>(GIBCO)法。一个标准的6孔培养板每孔的 $1-1.5 \times 10^5$ 个细胞使用2--4  $\mu$ g质粒和9  $\mu$ l的脂转染胺试剂。上清液用于测定C3分泌物，转染后3--6天，每毫升上清液有代表性的产量为0.3--1.7  $\mu$ g。

### 结果

#### a) 产生突变体

下面的突变体根据诱变时掺入的寡脱氧核苷酸链命名，到目前为止分离到的有：

(i) 用QRI1, QRI2加上AFL4149诱导产生的突变体有三个：C3M-26, C3M-28, C3M-61;

(ii) 用QRI1和QRI2但不加AFL4149诱导产生的突变体有一个：C3M-8;

(iii) 用QRI2和AFL4149但不加QRI1诱导产生的突变体有一个：C3M-51(在实施例3中使用);

b) 证实功能性的效果是由于突变特异性地发生在因子I裂解位点产生的序列分析证明：在每个突变体的突变区域周围的178--350碱基没有其它的改变。由这种方法产生的一个突变体C3M-51的序列(见实施例3)通过在诱变中使用完全的‘缺口’(碱基2463-5067)进行分析，没有发现来自野生型序列的其它衍生物。

此外，所有突变体的总数为2922个碱基的代表序列中，没有能由聚合酶调节错误引起的任何单点突变发生。所有表达的突变体都表现出双链结构和可被C3转化酶裂解这两个天然C3具有的特性。总之，尽管没有重新分析所使用的突变体的序列，它们中不可能包含着任何不需要的改变。

实施例2：在一个因子I裂解位点（氨基酸位置为1303）精氨酸残基转化为谷氨酰胺残基的C3产物

除了在诱变中使用寡脱氧核苷酸链AFL4149加上QRI1或AFL4149n加上QRI1n（即无QRI2和QRI2n）外，所有的步骤均与实施例1相同。

#### 结果

##### a) 获得的突变体

分离到两个用QRI1和AFL4149但无QRI2诱导产生的突变体：C3M-I23,27。如在实施例1中所述的，突变体C3M-I23被表达。

这个蛋白质被CVFBb裂解，与C3b类似的产物与野生型比较能抗由因子I和因子H在1303位点的裂解。因而，这个C3b衍生物对因子I有部分抗性。

实施例3：在一个因子I裂解位点（氨基酸位置为1320）精氨酸残基转化为谷氨酰胺残基的C3产物

除了在诱变中使用寡脱氧核苷酸链AFL4149加上QRI2或AFL4149n加上QRI2n（即无QRI1和QRI1n）外，所有的步骤均与实施例1相同。另外，在实施例1中使用的方法也能产生一个用QRI2和AFL4149但无QRI1诱导的突变体。

#### 结果

##### a) 获得的突变体

分离到两个用QRI2和AFL4149但无QRI1诱导产生的突变体：C3M-51, C3M-Q2, C3M-Q13。如在实施例1中所述的，突变体C3M-51被表达。这个蛋白质被CVFBb裂解，与C3b类似的产物在位点1320不易被因子I和因子H在位1320裂解，但在位点1303仍能被裂解。因而，这个C3b衍生物对因子I有部分抗性。

#### 实施例4: 突变的功能性效果分析

将来自转染的COS细胞的上清液(100--400  $\mu$ l)在37℃下培养2小时:

COS细胞用带有以下插入序列的pcDNA转染:

- 1) 突变体C3序列;
- 2) 突变体C3M-I23(1303位精氨酸→谷氨酰胺);
- 3) 突变体C3M-26(1303位精氨酸→谷氨酰胺, 1320位精氨酸→谷氨酰胺);
- 4) 突变体C3M-51(1320位精氨酸→谷氨酰胺);

转染后三天的培养物上清液200  $\mu$ l, 用2nM苯基甲烷磺酰氟(0℃, 15分钟)预处理, 加上下列物质, 在37℃下培养2小时:

- a) 不添加;
- b) 初步加工的C3转化酶, CVFBb(在包含6.6  $\mu$ g CVF, 100  $\mu$ g 因子B和1.4  $\mu$ g 因子D(在含有10mM  $MgCl_2$ 的磷酸缓冲液盐溶液中)的200  $\mu$ l的溶液中取10ml, 在37℃下预先温育15分钟);
- c) 因子H(5  $\mu$ g)和因子I(1  $\mu$ g);
- d) CVFBb加上因子H和因子I.

在室温下通过加0.6  $\mu$ g亲合纯化的羊抗人C3免疫球蛋白免疫沉淀, 1小时后加上20  $\mu$ l 5%洗涤过的甲醛水溶液固定的C组*Streptococcus sp.*细胞(G蛋白质)(Sigma)的悬浮液。室温下45分钟后, 粒子在5mM  $NaN_3$ 的PBS中洗涤一次, 在20mM TRIS/HCl, 137mM NaCl, 0.1%(v/v) Tween20, PH7.6中再洗涤一次, 然后用1% SDS/2% 2-巯基乙醇(90--100℃, 5分钟)洗脱。洗脱物通过SDS-PAGE分离, 硝酸纤维素上电印迹, C3带通过亲合纯化的羊抗人C3免疫球蛋白再用辣根过氧化物酶偶联驴抗羊免疫球蛋白(Sigma)检测。使用“改良的化学发光法”检测的底物由Amersham提供。对X-射线底片曝光2分钟照相。可见的C3衍生带由标记箭头示出。单个样品(1--4, A--D)就是上面提到的。(在所有样品中都出现的大约50KDa的很明显的带(在46KDa和50KDa之间)是在免疫沉淀中使用的IgG的重链, 可以用辣根过氧化物酶加上驴抗羊免疫球蛋白检测。)

### 结果（参见图3）

1. 所有未处理的样品（1-A, 2-A, 3-A, 4-A）都包含着C3的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链正确迁移的带，表明所有的突变体都被表达，而且翻译后能够正确地加工。

在这些样品中，43或46KDa带的出现表明在培养介质中有一些类似因子H+因子I的活性物的存在。在三天的生物合成期间，C3自发水解产生C3i，C3i能被上述的活性物裂解。在未突变的C3中，这种裂解产生43KDa和75KDa带（75KDa带是不可见的，因为：（i）它被75KDa的 $\beta$ 链覆盖，（ii）用来显示Western印迹的抗体对C3 $\alpha$ 链的这个区域活性非常低。后来它的存在是通过与这个区域特异性结合的大鼠单克隆抗体“克隆-3”重新探测来证实的。加入因子H和因子I，不加CVFBb（1-C, 2-C, 3-C, 4-C）没有裂解保留的C3表明其代表活性C3（巯基酯键完整）。

2. 未突变的C3：（1）由CVFBb裂解，产物C3b在1-B中进一步被内源性酶裂解，在1-D中是加入因子H和因子I的裂解。43KDa带表明裂解发生在1320位精氨酸，48KDa带（在长时间的曝光中可见）表明裂解发生在1303位精氨酸。

3. 突变体C3M-I23（1303位精氨酸→谷氨酰胺）可由CVFBb裂解。产物对内源的类似因子H和因子I的活性物（2-B）相对有抗性，有显著数量的 $\alpha'$ 链（C3b）存在，但仍能被额外的因子H和因子I裂解（2-D），产物43KDa表明裂解发生在1320位精氨酸，（在71KDa处微弱的带表明在长时间的曝光中，能看到 $\alpha$ 链的其它片段），但是没有68KDa带，表明这个突变体在突变的谷氨酰胺1303位点是抗裂解的。

4. 突变体C3M-26（1303位精氨酸→谷氨酰胺，1320位精氨酸→谷氨酰胺）可由CVFBb裂解，与C3b类似的产物（ $\alpha'$ ）抗内源的类似因子H和因子I的活性物（3-B）与未突变体C3（1）和其它突变体（2和4）相比，它也对加入的因子H和因子I有较强的抗性。少量的46KDa产物表明在突变的谷氨酰胺1303有一些裂解（伴随产生的68KDa片段长时间曝光后也是可见的）。很少或不能检测到在谷氨酰胺1320位点裂解的43KDa。因而，在位点1303精氨酸→谷氨酰胺的突变比在位点1320的突变对阻止因子I裂解的

效果要弱。（缓慢的残基裂解可能也发生在突变体C3M-I23（1303位精氨酸→谷氨酰胺），但是46KDa中间物在未突变的1320位精氨酸可能通过进一步裂解快速加工成43KDa。）

5. 突变体C3M-51（1320位精氨酸→谷氨酰胺）可由CVFBb裂解，产物可被内源的因子H和因子I的活性物裂解（4-B），也可被加入的因子H和因子I裂解（4-D）。46KDa产物（和微弱的68KDa）表明裂解发生在1303位精氨酸位点。然而缺少43KDa带表明在突变体谷氨酰胺1320位点是不可裂解的。

### 实施例5：在位点1303不同的氨基酸替代物的比较

#### 1. 引言

前面的实施例描述了1303位精氨酸和1320位精氨酸突变为谷氨酰胺残基。两个突变都对因子I在这个位点的裂解产生抗性。然而，在谷氨酰胺1303有一个很小但却能检测到的裂解。因而，我们制备并检测了其它许多氨基酸替代这个位点的突变体，以产生裂解的效力下降的顺序排列的1303残基为：精氨酸>酪氨酸>[半胱氨酸或色氨酸]>谷氨酰胺>[谷氨酸或甘氨酸]。这些结果是出乎意料的，因为：（i）所有已知的自然产生的因子I介导的裂解发生在C-末端精氨酸残基，因此，可以推测酶需要精氨酸；（ii）如果裂解发生在其它残基，可以推测这些残基一定和精氨酸静电相似，即为碱性残基（赖氨酸或组氨酸）（如胰蛋白酶选择性地裂解C-末端成为精氨酸，赖氨酸或组氨酸），因此，酪氨酸替代物的裂解是出乎意料的。

因而1303位精氨酸用甘氨酸或谷氨酸替代的替代物用于创造一种C3抗因子I的衍生物是优选的。

#### 2. 方法

##### 2.1 诱变：所使用的简并诱变引物是：

caactgcccagc(gt)(ag)(cg)agctccaagatcacc（在括号中的字母表明在那个位置为碱基混合物）突变体的构建或是通过缺口质粒方法（如在前面的实施例中提到的）或是采用“多引物方法”（V. Picard 等，核酸研究 22: 2587-91, (1994)），其中上游引物为：caccaggaactgaatctagatgtgtccctc，

下游引物为: gttttatggtgaccttaaggtcggatttatta。所有的突变都在模板上进行, 其中C3编码DNA突变已突变, 以使1320位氨基酸残基变为谷氨酰胺, 在位点4149导入一个AflIII的限制性位点(如前面的实施例中叙述的), 并由DNA测序证实。

## 2. 2 表达

如前面的实施例所述, 以在无血清的介质中用<sup>35</sup>S-甲硫氨酸生物合成标记的pcDNA为载体, 突变体在COS细胞中表达。

## 2. 3 测定:

上清液用CVFBb(CVF和因子B、因子D在含镁的缓冲液中反应形成)以及因子H和因子I处理, 再用抗C3免疫沉淀。在还原条件下用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(如前面的实施例所述)。固定凝胶, 用Amersham的“Amplify”试剂处理, 干燥, 放射自显影, 得到如图所示的结果。

## 3. 结果

在位点1303(位点1)因子I介导的裂解产生46和68KDa两条带, 而在1320(位点2)的裂解则没有(这儿已突变为谷氨酰胺)。可以看出, 裂解以下列顺序进行: 精氨酸(R)>酪氨酸(Y)>半胱氨酸(C)和色氨酸(W)>谷氨酰胺(Q)>甘氨酸(G)和谷氨酸(E)。野生型(两个位点均为精氨酸)在两个位置都被裂解, 产生片段为43KDa(太小以至在这个凝胶上不可见)和68KDa。

## 4. 图示

结果如图4所示, 在位点1(位置在1303)和位点2(1320)的残基能从各自的道上显示出来。

**实施例6: 1303位精氨酸突变为谷氨酰胺后对因子I和因子H灭活抗性增强的证明**

### 1. 引言

前面的实施例证明不论是1303位精氨酸还是1320位精氨酸转变为谷氨酰胺都使这个位点抗因子I的裂解。两个位点突变产生的分子在其中一个位点都抗裂解。在这里, 我们进一步证明: 与野生型相比: 只有1303位精氨酸突变为谷氨酰胺(不改变1320位精氨酸)产生显著的对因子I和因子H功能性灭活的抗性。

## 2. 方法

2. 1表达: 1303位精氨酸→谷氨酰胺突变体的制备如前面的实施例所述。突变体通过磷酸钙方法转染进CHO(从中国仓鼠卵巢细胞衍生的一种实验室常用的细胞系), 稳定的转染子在抗G418("Geneticin"可以从Sigma买到)的基础上选择。收集细胞培养物上清液, 表达的C3先用硫酸钠沉淀(10--20%(w/v)级分)部分纯化, 在用Q-琼脂糖凝胶和Mono-Q-琼脂糖凝胶离子交换层析提纯(A W Dodds 酶学方法 223: 46(1993))。

2. 2测定: 羊红细胞用SO16单克隆抗体包被(R A Harrision and P J Lachmann 实验免疫学手册 第4版 39章(1986))。5%(v/v)悬浮液4.4ml用大约10 $\mu$ g C2, 24 $\mu$ g C4和1 $\mu$ g C1(提纯的人体组分)在37℃下CFD中培养10分钟(R A Harrision and P J Lachmann 同上)。0.8ml混合物用0.25ml包含着半纯化的突变体或野生型C3和EDTA(最终浓度为12.5mM)的溶液中培养105分钟。细胞在CFD中清洗, 在包含0.1%(w/v)明胶(CFD-gel)的CFD中使用。用与[<sup>125</sup>I]标记的克隆-4单克隆抗C3抗体结合的放射性配体证实有相似数量的野生型或突变体C3b沉淀。

为了测定, 将40 $\mu$ l 5%的细胞悬浮液在250 $\mu$ l CFD-gel中稀释, 50 $\mu$ l等分样在包含着最终浓度分别为100, 10, 1和0 $\mu$ g/ml的因子I和因子H稀释液的CFD-gel 50 $\mu$ l中培养30分钟, 加入0.9ml CFD, 离心使细胞沉淀, 用CFD洗两次以上, 每次1ml。然后细胞在包含100 $\mu$ g/ml 因子B, 100 $\mu$ g/ml 备解素, 1 $\mu$ g/ml 因子D和0.3mM NiCl<sub>2</sub>的100 $\mu$ l CFD-gel中重新悬浮, 在包含10mM EDTA和2%(v/v)正常的豚鼠血清的CFD 37℃下10分钟后, 在37℃下进一步培养30分钟, 未水解的细胞离心沉淀, 水解的程度由测量上清液在412nm的吸光度决定。与100%水解相当的吸光度通过一个等分样细胞在水中水解测定, 并由此计算水解的百分比。

这种方法测定沉淀的C3b形成功能性的C3bBbP转化酶的能力。转化成iC3b阻止转化酶形成和随后在血清/EDTA中的水解。

## 3. 结果

图示结果表明: 与野生型比较, 取消1303位精氨酸→谷氨酰胺突变体的溶血活性需要超过10倍的因子I和因子H。因而, 这种突变有利于创造一种

C3衍生物，其C3b产物抗因子I和因子H的灭活。上述效果可能是因为位点1303（精氨酸突变为谷氨酰胺）对裂解有更高的抗性，也可能是因为位点1320对裂解有更高的抗性（当裂解首先发生在位点1303时）。

#### 4. 图示

效果如图5所示。X轴表示因子H和因子I的浓度，Q1代表1303位精氨酸→谷氨酰胺突变。水解百分率按方法中所述的步骤测量。

#### 讨论

人体C3和此处叙述的修饰变异体的本质特征如下：

(i) 分子有一个功能性的类似C3的衍生物，它可以与有活性功能的人体因子B结合，然后被因子D裂解形成一个可裂解C3的酶。

(ii) 衍生物的氨基酸序列是与人体C3而不是与其它任何目前所知序列的物种的C3，也不是与目前所知的任何蛋白质序列同源。存在于野生型蛋白质中，但在修饰的衍生物中不是必须的C3结构特征包括：

(a) 在本发明的实施例中使用的人体C3变异体的DNA编码序列和翻译的蛋白质序列在图2中和图1中分别给出。这个蛋白质序列和已发表的蛋白质序列[2]相比仅仅有两个氨基酸不同（在实施例中详细叙述），尽管大多数变异并不在人体中表现出来，推测其中很多变异对C3功能是协调的。

(b) 最初的翻译产物由蛋白质水解加工成两个二硫键连结的链， $\alpha$ 链（残基672-1663）和 $\beta$ 链（残基23-667），并除去信号序列（残基1-22）。

(c) 成熟的蛋白质在残基半胱氨酸1010和谷氨酰胺1013中包含有一个硫基酯键。

(d) C3转化酶裂解C3除去C3a（残基672-748）。这个反应伴随着硫基酯键的破裂。

(e) 在因子H存在时，因子I在残基1303位精氨酸和丝氨酸1304之间，以及1320位精氨酸和丝氨酸1321之间裂解C3b。

#### 对天然C3分子所做的修饰

##### 1303位精氨酸由谷氨酰胺取代

这种修饰是在因子I裂解C3b的一个位点上发生的。效果是降低因子I在这个位置的裂解速率。选择改变为谷氨酰胺是为了移去精氨酸的正控制（精氨酸对因子I的丝氨酸蛋白质酶活性可能是重要的），同时保留亲水特征以

及相似的侧链大小（使侧链对蛋白质三级结构的损害减到最小）。支持这个假定的证据是：突变不能阻止两链结构的加工，巯基酯键的形成或C3转化酶对C3的裂解。如在实施例5中证明的，1303位精氨酸突变为另一个氨基酸能达到一个相似的甚至更佳的效果。

通过突变丝氨酸1304（裂解位点的另一边）或突变参与酶-底物相互作用的其它残基以减少裂解也是可能的。

1320位精氨酸由谷氨酰胺取代

这种修饰发生在因子I裂解C3b的另一个位点上。效果是强烈地降低（实质是破坏）因子I在这个位置的裂解速率。选择改变为谷氨酰胺所用的标准与上述的相同，突变也不阻止两链结构的加工，巯基酯键的形成或C3转化酶对C3的裂解。相似地，突变为另一个氨基酸如丝氨酸1321突变或参与酶-底物相互作用的其它残基突变也能达到同样的效果。

当两个突变体结合时1303位精氨酸-谷氨酰胺或1320位精氨酸-谷氨酰胺保护C3不受灭活的影响，因而保留了它形成活性的C3bBb转化酶部分的能力。其它破坏两个裂解反应的突变（包括突变的结合）也可以使用（例如1303位精氨酸 谷氨酰胺或1303位精氨酸 甘氨酸都可有于和1320位精氨酸结合）。

## 实施例7：减少C3b/C3i与因子H相互作用的各种突变

### 7.1 引言

一些实验室提出基于合成多肽的效用的证据（Ganu,V.S.and Muller-Eberhard, H.J., 1985, 补体2: 27; Becherer, J.D.等, 1992. 生物化学 31:1784-1794）或是限制诱变的证据（Taniguchi-Sidle,A.and Isenman, D.E.,1994 免疫学杂志 153:5285-5302）表明：在C3转录的最初序列中，残基752-761能够参与与因子H的相互作用（见图1）。然而，其它发表的证据表明：只有残基767-776参与与因子H的相互作用，但是残基752-761对与因子B的相互作用是重要的（Fishelson,1991,分子免疫学 28:545-552）。我们推测，这个区域更广泛的诱变能减少对因子H的亲合力，从而可望达到创造一种抗因子H的C3衍生物的目标。而且，我们猜想：突变的重要残基是突出的酸性残基（天门冬氨酸和谷氨酸），从而可望把它们变为中性残基，

后者可能使强烈的相互作用减弱。在这个实施例中，我们把残基752-754从天冬氨酸-谷氨酸-天冬氨酸改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸，结合把残基758-760从谷氨酸-谷氨酸-天冬酰胺改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸。出现的产物伴随着对因子H的敏感性降低，降低了裂解特性。这证明：可以修饰C3以减少它与因子H的结合，从而降低它对因子H和因子I的敏感性。这些修饰可望创造一种在生理条件下稳定的C3转化酶。

## 7. 2方法

诱变、表达和分析的方法在上述的实施例中都已叙述，合成的诱变寡核苷酸链如下：`agtaacctgggttcgggcattgcaggatcgggcacgtttcc`。

## 7. 3结果

裂解反应的结果如图6所示。这表明：

1. CVFBb加入到野生型C3导致 $\alpha$ 链的消失（道2），因为形成的C3b对在培养物上清液中低浓度的因子I和因子H敏感。在表达和随后的培养中形成的C3i以同样的方式分解成iC3i。因而，外源的因子I和因子H（道3与4）的加入和道1与道2没有不同，因为介质中自身包含着足够的因子H和因子I活性物使C3裂解完全。

2. 相对而言，突变体C3用CVFBb处理（道6）不导致 $\alpha$ 链的消失。相应于C3的生成，有一些 $\alpha'$ 链的生成，但是一些或所有的 $\alpha$ 链的保留表明 $\alpha$ 链的存在不仅仅是CVFBb裂解失败的结果。因而在道2保留的未裂解的 $\alpha$ 链代表没有被因子H和因子I的活性物裂解的C3i（如果突变体对CVFBb产生了部分抗性，它也可能代表天然C3存在）。

高浓度的外源因子H和因子I的加入（道7 和8）不能排除 $\alpha$ 链和 $\alpha'$ 链，这表明：（i）突变体不完全抗这些因子（ii）在道2 没有被CVFBb裂解的 $\alpha$ 链主要来自C3i（它可被因子H和因子I但不能被CVFBb裂解）而不是来自天然的C3（它可被CVFBb但不能被因子H和因子I裂解）。即使在道8，仍然不是所有  $\alpha$  链的都被裂解，这可能是因为对因子H和因子I的抗性。

因而，残基752-754和残基758-760的突变可生成一个仍能被C3转化酶裂解但对因子H和因子I的作用有部分抗性的C3分子。参考其它发表的数据，这最可能是因为突变修饰了一个参与C3分子与因子H相互作用的区域，因而导致对因子H亲和力的降低。

### 实施例8: 突变C3的一个位点以修饰C3i与因子B相互作用

#### 8. 1引言

前面的实施例证明: C3突变可以调整它与因子H和因子I的相互作用。为了在C3中找出可与因子B相互作用的其它位点, 我们比较了已知不同种类的C3分子序列, 还比较了能找到的C4和其它同源蛋白质的序列。我们鉴别出对应于人体C3残基1427-1433的区域, 这个区域可能参与了C3和C4的特定功能。这些功能也包括与因子B(或它的同系物C2, 一些情况下是C4)的相互作用, 但并不是必须包括的, 因为其它潜在的功能包括巯基酯键的形成, 转化为C3b(或C4b)的形式, 以转化酶活性物与底物C3和/或C3i相互作用以及与因子I和它的辅因子的相互作用。因而选择的残基突变成相应的在另一个同源蛋白质如C5中的残基(以序列组合为基础)。这样残基1427从精氨酸改变为谷氨酰胺, 残基1431从赖氨酸改变为天冬氨酸, 残基1433从谷氨酸改变为谷氨酰胺, 发现得到的突变体对C3转化酶(CVFBb)的裂解是敏感的。C3b产物可被因子H和因子I裂解。然而, 这个突变体不支持依赖于因子B和C3i(或C3b)结合的因子B向Bb和Ba的转化。因而我们有证据说明: 这个区域的突变减少了C3与因子B的相互作用。过度活化的C3转化酶的产生是不合需要的, 但同时它的确说明了其它对C3这个区域的修饰也改变了与因子B的相互作用, 其中一些修饰有可能增强其亲和力。因而, 这种突变也可以增加双分子转化酶C3bBb(或C3iBb)的稳定性和活性。

#### 8. 2方法

下页表1所示的序列表说明了我们为什么把这个区域作为诱变的候选区域。我们推测一定的残基特性在C3和C4中高度保守但在其它的蛋白质中明显不同。选择残基1427、1431和1433是因为它们的荷电特性可能指示着参与蛋白质-蛋白质相互作用的基团。在人体C5中, 相应的残基被改变, 因为它们表现出非常不同的静电特性, 但在一些其它保守残基的邻近序列中, 这种特性可能指示着一个相似的局部结构。

表1 C3和人体C3 1427-1435位残基区相关分子的序列对比残基(人体)

| 蛋白质                         | 种类    | 1427 | 1428 | 1429 | 1430 | 1431 | 1432 | 1433 | 1434 | 1435 |
|-----------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| C3                          | 人     | R    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | L    | D    |
|                             | 小鼠    | R    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | M    | N    |
|                             | 大鼠    | R    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | M    | D    |
|                             | 猪     | R    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | L    | D    |
|                             | 兔     | R    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | L    | N    |
| C4                          | 眼镜蛇   | R    | Y    | I    | S    | K    | F    | E    | I    | D    |
|                             | 爪蟾属   | K    | Y    | I    | S    | K    | Y    | E    | V    | N    |
|                             | 鲑鱼    | R    | Y    | I    | E    | K    | F    | E    | M    | D    |
|                             | 人     | R    | Y    | V    | S    | H    | F    | E    | T    | E    |
|                             | 小鼠    | R    | Y    | V    | S    | H    | F    | E    | T    | D    |
| Slp<br>C3/C4-样              | 小鼠    | R    | Y    | V    | S    | H    | F    | E    | T    | D    |
|                             | 八目鳗类鱼 | N    | Y    | I    | V    | Q    | Y    | E    | I    | R    |
|                             | 七鳃鳗   | K    | Y    | I    | S    | N    | Y    | E    | I    | T    |
|                             | 人     | Q    | L    | F    | T    | D    | Y    | Q    | I    | K    |
|                             | 小鼠    | Q    | L    | L    | T    | D    | Y    | Q    | I    | K    |
| A2M                         | 人     | P    | T    | V    | K    | M    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 小鼠    | P    | S    | V    | K    | R    | L    | Q    | D    | Q    |
|                             | 大鼠    | P    | T    | V    | K    | M    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 人     | P    | T    | V    | K    | M    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 小鼠    | P    | T    | V    | K    | K    | L    | E    | R    | L    |
| PZP<br>鼠球蛋白(Murinoglobulin) | 大鼠    | P    | S    | V    | K    | K    | L    | Q    | D    | Q    |
|                             | 小鼠    | P    | T    | V    | K    | K    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 大鼠    | P    | T    | V    | K    | K    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 仓鼠    | P    | T    | V    | K    | K    | L    | E    | R    | S    |
|                             | 大鼠    | P    | T    | V    | K    | K    | L    | E    | R    | L    |

C3裂解反应的诱变、表达和分析的方法如前面的实施例所述（实施例1--4），诱变的寡核苷酸链用以下序列合成：  
tggtgttgaccaatacatctccgactatcagctggacaa。

因子B的转化测定：

表达的产物从COS介质中通过在实施例9中叙述的Clone-3-琼脂糖凝胶柱中亲和纯化来提纯。这种方法导致相当多的巯基酯键断裂形式，即C3i的形成。野生型C3用同样的步骤分离得到。野生型C3的稀释液（1/5，1/25和1/125）在SDS-PAGE凝胶上（还原条件）和突变体C3一起电泳。银染证明：突变体C3以一个相当于稍小于1/25但远大于1/125野生型稀释液的浓度存在。同样的稀释液用于因子B的转化测定。5  $\mu$ l的这种C3's与含有5  $\mu$ g/ml的因子D和大约1.6  $\mu$ g/ml的<sup>125</sup>I-标记的因子B（大约1000-2000dpm/ $\mu$ l）的25  $\mu$ l的CFD-G一起在37℃下培养3小时。样品通过SDS-PAGE（还原条件）干胶的放射自显影分析，结果如图7所示。

### 8. 3结果

如图7所示。即使在野生型C3（C3i）的1/125稀释液中，因子B的裂解也很明显。相对而言，变异C3即使在未稀释时都没有观察到因子B有明显的裂解，此时变异C3的浓度高于1/125的野生型样品的浓度。

因而，看起来这个突变体支持因子B裂解的能力受到了损害，更可能是由于它和因子B结合的亲和力降低。因而C3的这个区域的突变可以调整C3i（或C3b）和因子B的相互作用，从而也可以调整转化酶（C3iBb或C3bBb）的稳定性。

## 实施例9：表达的突体C3分子的纯化

### 9. 1引言

本实施例说明怎样把突变体C3分子从表达的介质如转染真核细胞的培养基中分离出来。通过简单的亲和纯化，就能获得足够纯度的C3分子，按实施例10中叙述的方法进行功能测定和抗体结合。尽管从抗体上洗脱伴随着相当大比例的内部巯基酯键的水解，C3i产物仍是产生活性C3转化酶和C3i-抗体复合物的稳定前体。这种方法作为制备活体内使用的药物的一部分也可能是有用的。

## 9. 2方法

### 在Clone-3-琼脂糖凝胶上的亲和纯化

Clone-3是特异性地和C3以及它的衍生物（包括C3b和C3i）结合的大鼠单克隆抗体（Lachmann,P.J. et al.,1980,免疫学杂志.41:503-515）。其它抗C3的单克隆抗体也可得到，在某些情况下可以成功地把C3从少量的人体血浆中分离出来（Dodds,A.W.,1993,酶学方法.223:46-61），因而也可用于体外表达的分子的纯化。使用溴化氰把IgG片段偶联到丝氨酸pharose CL-4B琼脂糖凝胶上（方法可在文献中找到：Harrison和Lachmann,1986,实验免疫学手册，第四版，编者，Weir，Herzenberg，Blackwell and Herzenberg;Blackwell.oxford）。培养物上清液可以直接通过这种树脂的层析柱（再循环），或者首先用25%（w/v）Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀浓缩，重新溶解，透析进5mM NaN<sub>3</sub>的PBS中，然后层析柱用下列溶液连续冲洗：（i）5mM NaN<sub>3</sub>的PBS，（ii）含1M NaCl的PBS。大量的C3用PH为10.5的硼酸钠缓冲液洗脱，立即按0.9ml片段收集物加入0.1ml PH为7的1M Tris/HCl中性化。接着，材料透析进 5mM NaN<sub>3</sub>的PBS。

### 带“组氨酸-尾端”的C3的制备

“组氨酸-尾端”是一个组氨酸残基带，它和带镍离子的层析柱有亲和力。这种方法可用于辅助表达蛋白质的分离。我们认为这对于表达的变异C3分子的分离是有用的，因此，我们使用插入诱变的方法产生一个质粒，它能编码C3使其在C末端加上一段6个组氨酸残基的尾端（紧靠C末端的1663位残基）。如此选择组氨酸标记的位置使为了使其对新生C3的合成、折叠、加工和二硫键形成的干扰减到最小。残基1661 是一个半胱氨酸，它和序列前面的一个残基形成二硫键（可能是半胱氨酸1537；Dolmer,K.和 Sottrup-Jensen,L.,1993,FEBS-LETT 315: 85-90），因而这种方法在使用插入序列不影响结构特性方面是慎重考虑的。使用实施例1中“缺口质粒”技术所用的诱变的寡核苷酸链用下面的序列合成：  
tgggtgcccccaaccatcatcatcattgaccacaccccc.

正确序列的掺入用DNA测序证实。这个DNA序列再转移到表达载体上，在转染真核细胞后，通过和带镍离子的层析柱的亲和力或者通过其它任何对组氨酸标记有特异性亲和力的基质来分离表达的C3。

### 9. 3结果

大量突变体C3在Clone-3-琼脂糖凝胶上得到纯化，包括那些在实施例1和2中叙述的在CHO细胞内表达的C3。产物保留了支持因子D裂解因子B的能力，同样的方法可用于分离在实施例B2中叙述的突变体。银染的SDS-PAGE凝胶表明：分离的产物纯度不是100%的，但看来常常是大于或等于50%的。这来自起始材料，其通常含有少于10  $\mu$ g/ml C3（在10%（v/v）小牛血清加上其它细胞的蛋白质中）。另外，在分离中的C3's不分级，内源性的因子H和因子I活性看来是除去了。

使用“组氨酸-尾端”纯化是通过带镍离子的层析柱，洗脱环境是温和的，例如，使用EDTA，因而，用于C3使内部的巯基酯键不致破裂。

### 实施例10: C3i和抗体的结合并用于靶引针对特定细胞的C3转化酶活性

#### 10. 1引言

本发明的一个方面是从突变体C3分子衍生出的稳定的C3转化酶能引起C3转化的增强。这种作用如果定位在特定的目标位点上，将促进对目标的补体依赖性攻击。达到这个反应的较好方法是把C3分子（不论是C3i还是C3b的衍生物）和与期望目标特异性结合的抗体偶联。在这个实施例中，我们阐述了这样一个缀合物形成的方法，它可用于突变体C3i或C3b分子，也可用于表达系统中物质的亲和纯化，在加工中C3巯基酯键的破裂。通过C3与特异性地和羊红细胞结合的抗体相偶联，我们进一步证明：缀合物把C3i固定在红细胞的表面，这样可以形成转化酶C3iBbP，当其它的补体成分以正常的豚鼠血清（在EDTA中阻止C3转化酶的从头形成）方式供给时，这种转化酶可以启动这些细胞的水解。这样，和抗体结合可用于使C3i分子启动对特定分子类型的补体依赖性攻击。本实施例使用来自人体血浆的野生型C3i，它可在体外形成C3转化酶。在体内，野生型C3i和C3b被因子H和因子I破坏。因而，根据本专利的计划构建的抗因子H和因子I从而能形成稳定的C3转化酶的突变体C3，在生理环境中将是有利的。

## 10. 2方法

### (i) C3i-抗体缀合物的产生和纯化

使用的抗体是从多克隆兔抗羊红细胞抗血清分离的IgG组分。1.1mg抗体在PH为7.5 (20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 60mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0.12M  $\text{NaCl}$ ) 的复合缓冲液中室温下用75nmol的SPDP培养2小时。PDP-IgG在Superose-6琼脂糖凝胶柱 (Pharmacia) (在PH为7.4包含0.5M  $\text{NaCl}$ 的磷酸缓冲液中) 上凝胶过滤纯化。一个样品用二硫苏糖醇还原, 用于结合每分子IgG偶联的四组PDP, C3i通过用PH为7.2浓度为0.1M的甲胺处理纯化的C3制备 (37℃下2小时)。过量的甲胺用凝胶过滤以及透析进复合缓冲液中除去。18nmol的C3i与1.7nmol的PDP-IgG混合在1.26ml复合缓冲液中, 在室温下培养一天, 再在4℃下培养1.5天, 图8表示用考马斯蓝染色结合反应的混合物的SDS-PAGE凝胶, 表明有一种大约350KDa的蛋白质出现, 这种蛋白质无论在PDP-IgG或C3i中都不存在, 在存在于PH为7.4包含0.5M  $\text{NaCl}$ 的磷酸缓冲液中的琼脂糖凝胶-6层析柱上部分纯化这种蛋白质, 接着将其透析进PBS。它在C3之前洗脱, 从它的体积可以用球形分子重量标准校正法估测到它的分子重量为300-400KDa。缀合物、自由抗体和未偶联的C3的浓度从考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶 (非还原条件) 上估测到。二维SDS-PAGE (第一维是非还原的, 第二维是还原的) 表明在IgG和C3i之间以1:1结合的方式是合适的。

(ii) 对C3-抗体缀合物可用于靶引针对特定细胞的转化酶活性的证明。

20  $\mu\text{l}$  的缀合物稀释液 (0 (无缀合物)、1/100、1/50、1/10) 用100  $\mu\text{l}$  大约1% (v/v) 羊红细胞 (用CFD预先洗过) 37℃下培养1小时, 同时用相当数量的PDP-IgG (无C3) 和纯C3作平行培养, 接着细胞用CFD洗4次, 重新悬浮到100  $\mu\text{l}$  的CFD中, 50  $\mu\text{l}$  的此物150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  水解, 再加上含10mM EDTA和2% (v/v) NGPS的CFD800  $\mu\text{l}$ 。另外50  $\mu\text{l}$  缀合物包被的细胞在37℃下用50  $\mu\text{l}$  含1%  $\mu\text{g/ml}$  因子B, 20  $\mu\text{g/ml}$  因子D, 20  $\mu\text{g/ml}$  备解素, 和0.6mM  $\text{NiCl}_2$  的CFD-G水解15分钟, 在37℃下停留30分钟, 离心 (200  $\times g$ , 大约3分钟) 沉淀细胞, 在412nm处测定上清液的吸光度。使用水处理样品为100%水解, 无细胞的缓冲液作为空白, 计算水解百分率, 结果如

图9所示。在无任何处理的条件下，缀合物产生了制剂依赖性水解，但是PDP-IgG和C3i单独都不能产生任何能明显观察到的水解。

### 10. 3结果概述

如下所述，使用的方法成功地证明了C3i和IgG的偶联：

1. 一个对于C3:IgG为1:1缀合物来说适当大小的带形成，如图8SDS-PAGE所示。

2. 二维的SDS-PAGE（第一维是非还原的，第二维是还原的）表明这种蛋白质包含着IgG和C3i。

3. 这种蛋白质在凝胶滤膜上的洗脱特征和一个大约350KDa的大小又是一致的。

4. 缀合物表现出一种无论是PDP-IgG还是C3i都没有的溶血活性（图9）。

溶血测定进一步证明：

1. 特异性的抗羊红细胞抗体把C3i定位到目标细胞（羊红细胞）膜上，并能阻止它被洗涤除去（以自由C3i为对照）。

2. 缀合物保留了C3i的活性，它仍能与备解素、因子B和因子D反应形成C3转化酶。

3. 这种转化酶能引起对目标的补体依赖性攻击，在这种情况下通过活化水解途径（c5--c9）水解红细胞。

来自其它实验室的另外一些数据表明：眼镜蛇毒因子可以和一个抗体偶联，这些缀合物可以靶引针对特定的细胞类的补体活化。（Vogel,1988,定向诊断治疗, 1:191-224; Muller,B.和Muller-Ruchholtz,W.,1987,白血病研究(*Leuk.Res* ).11:461-468; Parker,C.J.,White,V.F.和Falk,R.J.,1986,补体3:223-235; Petrella,E.C.等,1987,免疫学方法杂志 104: 159-172)。这些数据支持下述论点：C3被修饰以使它能形成稳定的C3转化酶，象眼镜蛇毒因子一样，这个酶能用来作用于补体介导的反应，就如在本发明概要部分叙述的。

### 实施例11：突变体C3分子在正常的人体血清中诱导因子B转化的证明

#### 11. 1引言

此处叙述的本发明的一个重要用途就是：排除生物体液中的补体活性物。本发明叙述了抗因子H和因子I负调节的C3分子的制备方法。在这种情况下，它们将与因子B结合，产生活性的C3转化酶，这些转化酶的活性通过在实施例6中使用的溶血测定得到了证实。因而，这种转化酶能消耗C3。如果酶不稳定，它将分解，没有太多的C3转化。然而它能结合新鲜的因子B，并使其转化为Bb和Ba。这样，突变体C3将促进因子B的消耗，最终导致替代途径的破坏，并使它不能放大经典途径的刺激。如果稳定的C3转化酶形成，因子B的转化将减少，但是C3的消耗却增加。两种情况都是期望发生的。在这个实施例中。我们证明：被修饰使其抗因子I但并不改变转化酶的稳定性的变异C3分子，在人体血清中促进因子B的加速转化。象比较，野生型C3没有引起明显的转化，推测是因为野生型C3i被因子H和因子I快速降解。

#### 11. 2方法

制备的突变体如下：

Q1R2 1303位精氨酸改变为谷氨酰胺（实施例2）

Q1Q2 1303位精氨酸改变为谷氨酰胺，加上1320位精氨酸改变为谷氨酰胺（实施例1）

E1Q2 1303位精氨酸改变为谷氨酸，加上1320位精氨酸改变为谷氨酰胺（实施例5）

所有这些突变体都在COS细胞中表达，用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀纯化，再如实施例3所述的在Clone-3-琼脂糖凝胶上亲和纯化。野生型C3用相似的方法分离。通过银染SDS-PAGE，Q1的浓度在1/5到1/25野生型之间，Q1Q2的浓度大约是 1/5野生型，E1Q2的浓度在1/25到1/125野生型之间。所有的制备可能都包含着许多巯基酯键断裂形成的分子（C3i）。

C3的制备物10 μl用10 μl存在于PBS中的20%（v/v）正常人体血清溶液在37℃下培养1小时，在溶液中包含着1mM MgCl<sub>2</sub>和大约300ng<sup>125</sup>I标记的因子B（大约2--300,000dpm）5 μl用SDS-PAGE（还原条件）分析。干燥的凝胶放射自显影表明了相对应于完整的因子B和它的裂解产物的条带位置。然后，切下它们并计算以确定裂解的程度，在只有缓冲液中得到的

值作为背景减去（不仅包括背景裂解，而且包括降解产物和其它存在于放射性配体制备中的杂质）。

### 11. 3结果

因子B裂解程度的结果如下所示：

|         |       |
|---------|-------|
| 1/25野生型 | 1.49% |
| 1/5野生型  | 2.74% |
| Q1R2    | 6.19% |
| Q1Q2    | 7.41% |
| E1Q2    | 6.42% |

因而，抗因子I突变体均比相当数量的野生型C3（C3i）产生更高水平的因子B裂解。用更大的剂量和更长的培养，将导致替代途径的完全失活。

使用在上述实施例中的缩略词包括：CFD，补体固定稀释液（Harrison和Lachmann定义，1986，实验免疫学手册，第四版，编者，Weir，Herzenberg,Blackwell and Herzenberg;Blackwell.oxford）；CFD-G：包含0.1%（w/v）明胶的CFD；PBS：磷酸缓冲盐溶液；NGPS：正常的豚鼠血清；SDS-PAGE：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳；SPDP：N-琥珀酰亚胺-3-[2-吡啶二硫代]-丙酸酯。

### 参考文献

1. Bergmann, M. 和 Fruton, J. S. (1941) 酶学进展, 1:63-98
2. Bruijn, M.H. 和 Fey, G.H. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. 82:708-712
3. Crawford -MH 等. (1988) 循环 (Circulation) 78:1449-58
4. Daha, M.R. 和 van Es, L.A. (1982) 免疫学 43:33-38
5. Farries, TC ; Lachmann, PJ 和 Harrison RA (1988) 生物化学杂志 252 : 47-54
6. Farries, TC ; Lachmann, PJ 和 Harrison RA (1988) 生物化学杂志 253 : 667-75
7. Forty, J ; Hasan, R ; Cary, N ; White, DJ Wallwork, J(1992) Transplant Proc. 24:488-9

8. Fritzinger , D.C. 等. (1992 ) 免疫学杂志 149:3554-3562
9. Harrison , R.A. 和 Lachmann , P.J. (1980 )分子免疫学 17:9-20
10. Kalli , K.R. , Hsu , P. 和 Fearon , D.T. (1994 )Springer Semin. Immunopathol. 15:417-431.
11. Kinoshita , T ; Takata , Y ; Kozono , H ; Takeda , J ; Hong, KS 和 Inoue , K(1988 )免疫学杂志 141:3895-901
12. McNearney , TA ; Odell , C ; Holers , VM ; Spear, PG ; Atkinson , JP (1987 )J. Exp. Med. 166:1525-35
13. Nicol, P. A. E. 和 Lachmann , P. J. (1973 )免疫学 24:259-275
14. Pangburn , MK 和 Muller-Eberhard , HJ (1984 )Springer Semin. Immunopathol. 7:163-92
15. Rother, K. 和 Till, G.O. (编者)(1988 ) "补体系统" (Springer-Verlag Berlin Heidelberg , 德国)
16. Van den Berg , C.W. , Aerts , P.C. 和 Van Dijk , H. (1991 ) 免疫学方法 136 : 287-294.
17. Vogel , CW ; Smith , CA Muller-Eberhard , HJ (1984 ) 免疫学杂志 133:3235-41
18. Weisman , HF 等 (1990 ) 科学 249 : 146-51
19. Wu , R. (编者 ) (1993 )酶学方法 217 : ch.s 12-14 (学术出版社, San Diego , 美国)
20. Botto , M, Fong, K.Y. , So, A.K. , Koch , C.和 Walport , M.J. (1990 )J. Exp. Med. 172:1011-7
21. Sambrook , J. , Fritsch , E.F. 和 Maniatis , T. (1989 ) "分子克隆, 实验室手册" 第二版(Cold Spring Harbor Laboratory 出版社)
22. Fishelson , Z. (1991 )分子免疫学 28:545-52.
23. Taniguchi-Sidle, A 和 Isenman, D.E., Isenman , D. E. (1993 )分子免疫学 30:54.
24. Lambris , J. D. , Avila , D. , Becherer , J. D. 和 Miller, Eberhard , H.J. (1988 ) 生物化学杂志 263:12147-50.
25. Taniguchi -Sidle , A. 和 Isenman , D.E. (1992 )生物化学杂志

---

267:635-643

26. Hofer , B. 和 Kuhlein , B. (1993 )酶学方法 217:173-189

27. Morinaga , Y. , Franceschini , T. , Inouye , S. 和 Inouye , M. (1984 )  
生物-技术 2: 636-639.

28. Harrison , R.A. 和 Lachmann , P.J. (1986 ) “实验免疫学手册” (编  
者 Weir, Herzenberg , Blackwell 和 Herzenberg ; Blackwell, 牛津大学)  
第四版

29. Kotwal , G. , J. , 和 Moss, B. , 自然(1988 )335 (6186): 176-8

## PC3 中编码的人体 C3 的预料的蛋白质序列

(标准的单字母氨基酸代码)

|             |             |            |             |             |             |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 10          | 20          | 30         | 40          | 50          | 60          |
| MGPTSGPSLL  | LLLLTHLPLA  | LGSPMYSIIT | PNILRLESEE  | TMVLEAHDAQ  | GDVPVTVTVH  |
| 70          | 80          | 90         | 100         | 110         | 120         |
| DFPGKKLVLS  | SEKTVLTPAT  | NHMGNVTFIT | PANREFKSEK  | GRNKFVTVQA  | TFGTQVVEKV  |
| 130         | 140         | 150        | 160         | 170         | 180         |
| VLVSLQSGYL  | FIQTDKTIYT  | PGSTVLYRIF | TVNHKLLPVG  | RTVMVNIENP  | EGIPVKQDSL  |
| 190         | 200         | 210        | 220         | 230         | 240         |
| SSQNQLGVLP  | LSWDIPSLVN  | MGQWKIRAYY | ENSPQQVFST  | EFEVKEYVLP  | SFEVIVEPTE  |
| 250         | 260         | 270        | 280         | 290         | 300         |
| KFYIYNEKG   | LEVITITARFL | YGKKVEGTAF | VIFGIQDGEQ  | RISLPESLKR  | IPIEDGSGEV  |
| 310         | 320         | 330        | 340         | 350         | 360         |
| VLSRKVLDDG  | VQNPRADLV   | GKSLYVSATV | ILHSGSDMVQ  | AERSGIPIVT  | SPYQIHFTKT  |
| 370         | 380         | 390        | 400         | 410         | 420         |
| PKYFKPGMPF  | DLMVFVTNPD  | GSPAYRVPVA | VQGEDTVQSL  | TQGDGVAKLS  | INTHPSQKPL  |
| 430         | 440         | 450        | 460         | 470         | 480         |
| SITVRTKKQE  | LSEAEQATRT  | MQALPYSTVG | NSNNYLHLSV  | LRTELRPGET  | LNVNFLLRMD  |
| 490         | 500         | 510        | 520         | 530         | 540         |
| RAHEAKIRYY  | TYLIMNKGRL  | LKAGRQVREP | GQDLVVLPLS  | ITTDIFIPSFR | LVAYYTLIGA  |
| 550         | 560         | 570        | 580         | 590         | 600         |
| SGQREVADS   | VWVDVKDSCV  | GSLVVKSGQS | EDRQVPVPGQ  | MTLKIEGDHG  | ARVVLVAVDK  |
| 610         | 620         | 630        | 640         | 650         | 660         |
| GVFVLNKKNK  | LTQSKIWDVV  | EKADIGCTPG | SGKDYAGVFS  | DAGLTFTSSS  | GQQTAAQRAEL |
| 670         | 680         | 690        | 700         | 710         | 720         |
| QCPQPAARRR  | RSVQLTEKRM  | DKVGKYPKEL | RKCCEDGMRE  | NPMRFSCQRR  | TRFISLGEAC  |
| 730         | 740         | 750        | 760         | 770         | 780         |
| KKVFLDCCNY  | ITELRRQHAR  | ASHLGLARSN | LDEDIAEEN   | IVSRSEFPES  | WLWNVEDLKE  |
| 790         | 800         | 810        | 820         | 830         | 840         |
| PPKNGISTKL  | MNIFLKDSIT  | TWEILAVSMS | DKKGICVADP  | FEVTVMQDFF  | IDLRLPYSVV  |
| 850         | 860         | 870        | 880         | 890         | 900         |
| RNEQVEIRAV  | LYNYRQNQEL  | KVRVELLHNP | AFCSLATTKR  | RHQQTITIPP  | KSSLSVPYVI  |
| 910         | 920         | 930        | 940         | 950         | 960         |
| VPLKTGLQEV  | EVKAAVYHHF  | ISDGVRSKSL | VVPEGIRMNK  | TVAVRTLDP   | RLGREGVQKE  |
| 970         | 980         | 990        | 1000        | 1010        | 1020        |
| DIPPADLSDQ  | VPDTESETRI  | LLQGTPVAQM | TEDAVIDAERL | KHLIVTPSGC  | GEQNMIGMTP  |
| 1030        | 1040        | 1050       | 1060        | 1070        | 1080        |
| TVIAVHYLDE  | TEQWEKFGLE  | KRQGALELIK | KGYTQQLAFR  | QPSSAFAAFV  | KRAPSTWLTA  |
| 1090        | 1100        | 1110       | 1120        | 1130        | 1140        |
| YVVKVFS LAV | NLIAIDSQVL  | CGAVKWLILE | KQKPDGVFQE  | DAPVIHQEMI  | GGLRNNEKND  |
| 1150        | 1160        | 1170       | 1180        | 1190        | 1200        |
| MALTAFLVIS  | LQEAKDICEE  | QVNSLPGSIT | KAGDFLEANY  | MNLQRSYTVA  | IAGYALAQMG  |

|            |             |            |            |            |            |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1210       | 1220        | 1230       | 1240       | 1250       | 1260       |
| RLKGPLLKNF | LTTAKDKNRW  | EDPGKQLYNV | EATSYALLAL | LQLKDFDFVP | PVVRWLNEQR |
| 1270       | 1280        | 1290       | 1300       | 1310       | 1320       |
| YYGGGYGSTQ | ATFMVFAQALA | QYQKDAPDHQ | ELNLDVSLQL | PSRSSKITHR | IHWESASLLR |
| 1330       | 1340        | 1350       | 1360       | 1370       | 1380       |
| SEETKENEGF | TVTAEGKGQG  | TLSVVTMYHA | KAKDQLTCNK | FDLKVTIKPA | PETEKRPQDA |
| 1390       | 1400        | 1410       | 1420       | 1430       | 1440       |
| KNTMILEICT | RYRGDQDATM  | SILDISMTG  | FAPDTDDLKQ | LANGVDRYIS | KYELDKAFSD |
| 1450       | 1460        | 1470       | 1480       | 1490       | 1500       |
| RNTLIIYLDK | VSHSEDDCLA  | FKVHQYFNVE | LIQPGAVKVY | AYYNLEESCT | RFYHPEKEDG |
| 1510       | 1520        | 1530       | 1540       | 1550       | 1560       |
| KLNLKCRDEL | CRCAEENCPI  | QKSDDKVTLE | ERLDKACEPG | VDYVYKTRLV | KVQLSNDFDE |
| 1570       | 1580        | 1590       | 1600       | 1610       | 1620       |
| YIMAIEQTIK | SGSDEVQVGQ  | QRTFISPIKC | REALKLEKK  | HYLMWGLSSD | FWGEKPNLSY |
| 1630       | 1640        | 1650       | 1660       |            |            |
| IIGKDTWVEH | WPPEEDCQDE  | ENQKQCQDLG | AFTESMVVFG | CPN        |            |

图 1(II)

## 图 2(I)

## PC3 中 C3 cDNA 序列

(标准的单字母脱氧核苷酸代码表示的有义链, 方向从 5'→3')

```

      cctctccct  ctgtccctct  gtccctctga  ccctgcactg  tcccagcacc
      12         20         30         40         50         60

atgggaccca  cctcagggtcc  cagcctgctg  ctcttggtac  taaccacacct  ccccttggt
      70         80         90        100        110        120

ctggggagtc  ccattgtactc  tatcatcacc  cccaacatct  tgcggctgga  gagcgaggag
      130        140        150        160        170        180

accatggtgc  tggaggccca  cgacgcgcaa  ggggatgttc  cagtcaactgt  tactgtccac
      190        200        210        220        230        240

gacttcccag  gcaaaaaact  agtgctgtcc  agtgagaaga  ctgtgctgac  ccctgccacc
      250        260        270        280        290        300

aaccacatgg  gcaacgtcac  cttcacgata  ccagccaaca  gggagttaa  gtcagaaaag
      310        320        330        340        350        360

gggcgcaaca  agttcgtgac  cgtgcaggcc  accttcggga  cccaagtgg  ggagaagggtg
      370        380        390        400        410        420

gtgctggtca  gcctgcagag  cgggtacctc  ttcattccaga  cagacaagac  catctacacc
      430        440        450        460        470        480

cctggctcca  cagttctctc  tcggatcttc  accgtcaacc  acaagctgct  acccgtgggc
      490        500        510        520        530        540

cggacggtca  tggtaacat  tgagaacctg  gaaggcatcc  cggtaagca  ggactccttg
      550        560        570        580        590        600

tcttctcaga  accagcttgg  cgtcttgccc  ttgtcttgagg  acattccgga  actcgtcaac
      610        620        630        640        650        660

atgggccagt  ggaagatccg  agcctactat  gaaaactcac  cacagcaggt  cttctccact
      670        680        690        700        710        720

gagtttgagg  tgaaggagta  cgtgctgccc  agtttcgagg  tcatagtgg  gcctacagag
      730        740        750        760        770        780

aaattctact  acatctataa  cgagaagggc  ctggagggtca  ccatcacccg  caggttcctc
      790        800        810        820        830        840

tacgggaaga  aagtggaggg  aactgccttt  gtcattcttcg  ggatccagga  tggcgaacag
      850        860        870        880        890        900

aggatttccc  tgctgaatc  cctcaagccg  attccgattg  aggatggctc  gggggagggtt
      910        920        930        940        950        960

gtgctgagcc  ggaagggtact  gctggacggg  gtgcagaacc  cccgagcaga  agacctgggtg
      970        980        990       1000       1010       1020

gggaagtctt  tgtacgtgtc  tgccaccgtc  atcttgcaact  caggcagtga  catggtgcag
     1030       1040       1050       1060       1070       1080

gcagagcgca  gcgggatccc  catcgtgacc  tctccctacc  agatccactt  caccaagaca
     1090       1100       1110       1120       1130       1140

cccaagtact  tcaaaccagg  aatgcccttt  gacctcatgg  tgttcgtgac  gaacctgat
     1150       1160       1170       1180       1190       1200

ggctctccag  cctaccgagt  ccccgaggca  gtccaggggc  aggacactgt  gcagtctcta
     1210       1220       1230       1240       1250       1260

```

图2(II)

|             |             |             |             |            |            |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| accagggag   | atggcggtggc | caaactcagc  | atcaacacac  | accccagcca | gaagcccttg |
| 1270        | 1280        | 1290        | 1300        | 1310       | 1320       |
| agcatcacgg  | tgccgcacgaa | gaagcaggag  | ctctcggagg  | cagagcaggg | taccaggacc |
| 1330        | 1340        | 1350        | 1360        | 1370       | 1380       |
| atgcaggctc  | tgccctacag  | caccgtgggc  | aaactccaaca | attacctgca | tctctcagtg |
| 1390        | 1400        | 1410        | 1420        | 1430       | 1440       |
| ctacgtacag  | agctcagacc  | cggggagacc  | ctcaacgtca  | acttcctcct | gcgaatggac |
| 1450        | 1460        | 1470        | 1480        | 1490       | 1500       |
| cgcgccccacg | aggccaagat  | ccgctactac  | acctacctga  | tcatgaacaa | gggcaggctg |
| 1510        | 1520        | 1530        | 1540        | 1550       | 1560       |
| ttgaaggcgg  | gacgccagggt | gcgagagccc  | ggccaggacc  | tggtggtgct | gccccgtcc  |
| 1570        | 1580        | 1590        | 1600        | 1610       | 1620       |
| atcaccaccg  | acttcattccc | tctcttcgcg  | ctggtggcgt  | actaacgct  | gacgggtgcc |
| 1630        | 1640        | 1650        | 1660        | 1670       | 1680       |
| agcggccaga  | gggaggtggt  | ggccgactcc  | gtgtgggtgg  | acgtcaagga | ctcctgcgtg |
| 1690        | 1700        | 1710        | 1720        | 1730       | 1740       |
| ggctcgctgg  | tggtaaaaag  | cgccagtcga  | gaagaccggc  | agcctgtacc | tgggcagcag |
| 1750        | 1760        | 1770        | 1780        | 1790       | 1800       |
| atgaccctga  | agatagaggg  | tgaccacggg  | gcccgggtgg  | tactggtggc | cgtggacaag |
| 1810        | 1820        | 1830        | 1840        | 1850       | 1860       |
| ggcgtgttcg  | tgctgaataa  | gaagaacaaa  | ctgacgcaga  | gtaagatctg | ggacgtggtg |
| 1870        | 1880        | 1890        | 1900        | 1910       | 1920       |
| gagaaggcag  | acatcggtcg  | caccccggtc  | agtgggaagg  | attacgccgg | tgtcttctcc |
| 1930        | 1940        | 1950        | 1960        | 1970       | 1980       |
| gacgcagggc  | tgaccttcac  | gagcagcagt  | ggccagcaga  | ccgcccagag | ggcagaactt |
| 1990        | 2000        | 2010        | 2020        | 2030       | 2040       |
| cagtgcctgc  | agccagccgc  | ccgccgacgc  | cgttcctgtc  | agctcacgga | gaagcgaatg |
| 2050        | 2060        | 2070        | 2080        | 2090       | 2100       |
| gacaaagtct  | gcaagtaccc  | caaggagctg  | cgcaagtgtc  | gcgaggacgg | catgcgggag |
| 2110        | 2120        | 2130        | 2140        | 2150       | 2160       |
| aaccccatga  | ggttctcgtg  | ccagcgccgg  | acccgtttca  | tctccctggg | cgaggcgtgc |
| 2170        | 2180        | 2190        | 2200        | 2210       | 2220       |
| aagaaggtct  | tcttggaactg | ctgcaactac  | atcacagagc  | tgcggcggca | gcacgcgcgg |
| 2230        | 2240        | 2250        | 2260        | 2270       | 2280       |
| gccagccacc  | tgggcctggc  | caggagtaac  | ctggatgagg  | acatcattgc | agaagagaac |
| 2290        | 2300        | 2310        | 2320        | 2330       | 2340       |
| atcgtttccc  | gaagtgagtt  | cccagagagc  | tggctgtgga  | acgttgagga | cttgaaagag |
| 2350        | 2360        | 2370        | 2380        | 2390       | 2400       |
| ccaccgaaaa  | atggaatctc  | tacgaagctc  | atgaatatat  | ttttgaaaga | ctccatcacc |
| 2410        | 2420        | 2430        | 2440        | 2450       | 2460       |
| acgtgggaga  | ttctggctgt  | gagcatgtcg  | gacaagaaaag | ggatctgtgt | ggcagacccc |
| 2470        | 2480        | 2490        | 2500        | 2510       | 2520       |
| ttcgagggtca | cagtaatgca  | ggactttcttc | atcgacctgc  | ggctacccta | ctctgtgttt |
| 2530        | 2540        | 2550        | 2560        | 2570       | 2580       |

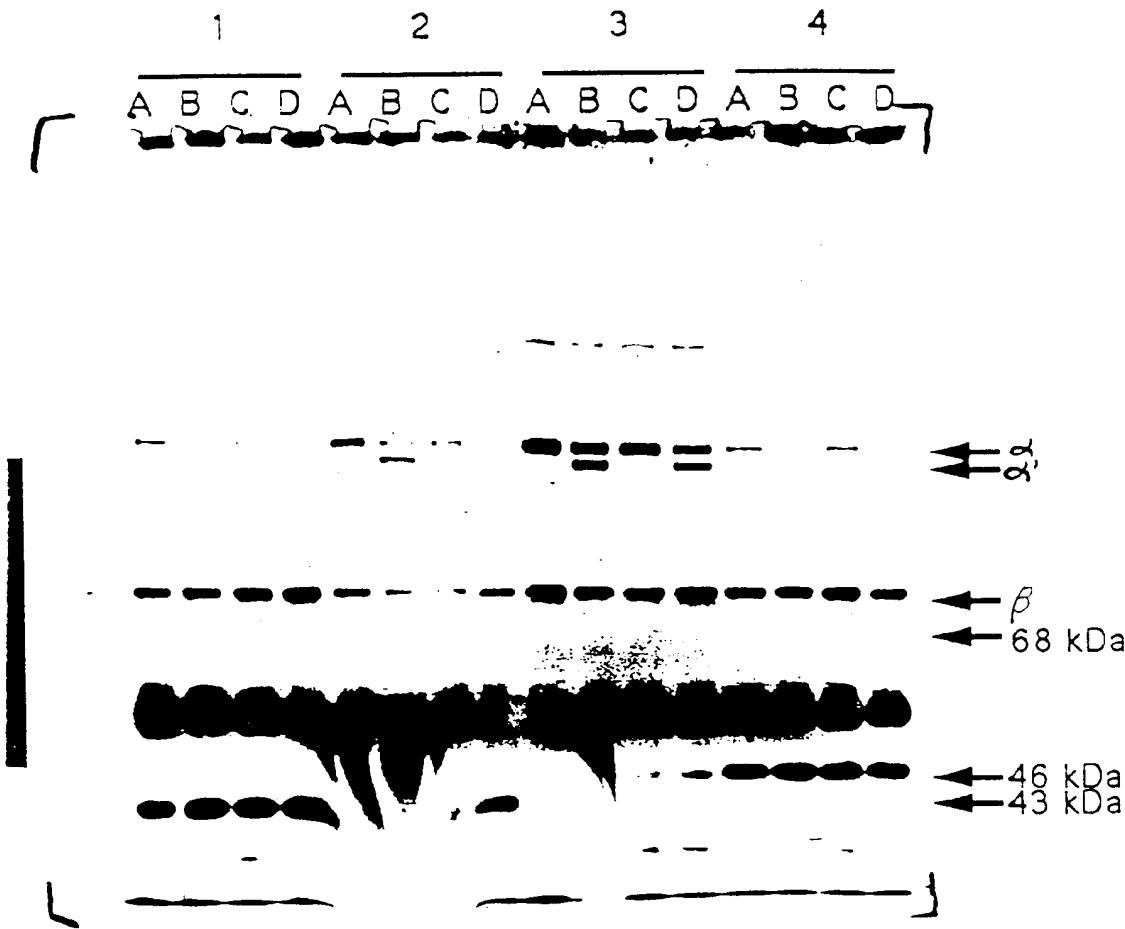
## 图 2(III)

|                     |                    |                    |                    |                    |                    |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| cgaaacgagc<br>2590  | aggtggaaat<br>2600 | ccgagccgtt<br>2610 | ctctacaatt<br>2620 | accggcagaa<br>2630 | ccaagagctc<br>2640 |
| aaggtgaggg<br>2650  | tggaactact<br>2660 | ccacaatcca<br>2670 | gccttctgca<br>2680 | gcctggccac<br>2690 | caccaagagg<br>2700 |
| cgtcaccagc<br>2710  | agaccataac<br>2720 | catacccccc<br>2730 | aagtcctcgt<br>2740 | tgtccgttcc<br>2750 | atatgtcacc<br>2760 |
| gtgccgctaa<br>2770  | agaccggcct<br>2780 | gcaggaagtg<br>2790 | gaagtcaagg<br>2800 | ctgctgtcta<br>2810 | ccatcatttc<br>2820 |
| atcagtgacg<br>2830  | gtgtcaggaa<br>2840 | gtccctgaag<br>2850 | gtcgtgccgg<br>2860 | aaggaatcag<br>2870 | aatgaacaaa<br>2880 |
| actgtggctg<br>2890  | ttcgcaccct<br>2900 | ggatccagaa<br>2910 | cgctggggcc<br>2920 | gtgaaggagt<br>2930 | gcagaaagag<br>2940 |
| gacatcccac<br>2950  | ctgcagacct<br>2960 | cagtgaccaa<br>2970 | gtcccggaac<br>2980 | ccgagtctga<br>2990 | gaccagaatt<br>3000 |
| ctcctgcaag<br>3010  | ggaccccagt<br>3020 | ggcccagatg<br>3030 | acagaggatg<br>3040 | ccgtcgacgc<br>3050 | ggaacggctg<br>3060 |
| aagcacctca<br>3070  | ttgtgacccc<br>3080 | ctcgggctgc<br>3090 | ggggaacaga<br>3100 | acatgatcgg<br>3110 | catgacgccc<br>3120 |
| acggtcacgc<br>3130  | ctgtgcatta<br>3140 | cctggatgaa<br>3150 | acggagcagt<br>3160 | gggagaagtt<br>3170 | cggcctagag<br>3180 |
| aagcggcagg<br>3190  | gggccttgga<br>3200 | gctcatcaag<br>3210 | aaggggtaca<br>3220 | cccagcagct<br>3230 | ggccttcaga<br>3240 |
| caaccacgct<br>3250  | ctgcctttgc<br>3260 | ggccttcgtg<br>3270 | aaacgggcac<br>3280 | ccagcacctg<br>3290 | gctgaccgcc<br>3300 |
| tacgtggcca<br>3310  | aggtctttct<br>3320 | tctggctgtc<br>3330 | aacctcatcg<br>3340 | ccatcgactc<br>3350 | ccaagtcctc<br>3360 |
| tgcggggctg<br>3370  | ttaaatggct<br>3380 | gatacctggg<br>3390 | aagcagaagc<br>3400 | ccgacggggg<br>3410 | cttccaggag<br>3420 |
| gatgcgcccc<br>3430  | tgatacacca<br>3440 | agaaatgatt<br>3450 | ggtggattac<br>3460 | ggaacaacaa<br>3470 | cgagaaagag<br>3480 |
| atggccctca<br>3490  | cggcctttgt<br>3500 | tctcatctcg<br>3510 | ctgcaggagg<br>3520 | ctaaagatat<br>3530 | ttgcgaggag<br>3540 |
| caggtcaaca<br>3550  | gcctgccagg<br>3560 | cagcatcact<br>3570 | aaagcaggag<br>3580 | acttccttga<br>3590 | agccaactac<br>3600 |
| atgaacctac<br>3610  | agagatccta<br>3620 | cactgtggcc<br>3630 | attgctggct<br>3640 | atgctctggc<br>3650 | ccagatgggc<br>3660 |
| aggctgaagg<br>3670  | ggcctcttct<br>3680 | taacaaattt<br>3690 | ctgaccacag<br>3700 | ccaaagataa<br>3710 | gaaccgctgg<br>3720 |
| gaggaccctg<br>3730  | gtaagcagct<br>3740 | ctacaacgtg<br>3750 | gaggccacat<br>3760 | cctatgccct<br>3770 | cttggcccta<br>3780 |
| ctgcagctaa<br>3790  | aagactttga<br>3800 | ctttgtgcct<br>3810 | cccgtcgtgc<br>3820 | gttggctcaa<br>3830 | tgaacagaga<br>3840 |
| tactacgggtg<br>3850 | gtggctatgg<br>3860 | ctctaccacg<br>3870 | gccaccttca<br>3880 | tgggtgtcca<br>3890 | agccttggct<br>3900 |

图 2(IV)

|             |             |            |             |            |             |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| caataccaaa  | aggacgcccc  | tgaccaccag | gaactgaacc  | ttgatgtgtc | cctccaaactg |
| 3910        | 3920        | 3930       | 3940        | 3950       | 3960        |
| cccagcgagca | gttccaagat  | cacccaccgt | atccactggg  | aatctgccag | cctcctgcga  |
| 3970        | 3980        | 3990       | 4000        | 4010       | 4020        |
| tcagaagaga  | ccaaggaaaa  | tgagggtttc | acagtcacag  | ctgaaggaaa | aggccaaggc  |
| 4030        | 4040        | 4050       | 4060        | 4070       | 4080        |
| accttgtcgg  | tggtgacaat  | gtaccatgct | aaggccaaag  | atcaactcac | ctgtaataaa  |
| 4090        | 4100        | 4110       | 4120        | 4130       | 4140        |
| ttcgacctca  | aggtcaccat  | aaaaccagca | ccggaaacag  | aaaagaggcc | tcaggatgcc  |
| 4150        | 4160        | 4170       | 4180        | 4190       | 4200        |
| aagaacacta  | tgatccttga  | gatctgtacc | aggtaccggg  | gagaccagga | tgccactatg  |
| 4210        | 4220        | 4230       | 4240        | 4250       | 4260        |
| tctatattgg  | acatatccat  | gatgactggc | tttgtccag   | acacagatga | cctgaagcag  |
| 4270        | 4280        | 4290       | 4300        | 4310       | 4320        |
| ctggccaatg  | gtgttgacag  | atacatctcc | aagtatgagc  | tggacaaagc | cttctccgat  |
| 4330        | 4340        | 4350       | 4360        | 4370       | 4380        |
| aggaacaccc  | tcatcatcta  | cctggacaag | gtctcacact  | ctgaggatga | ctgtctagct  |
| 4390        | 4400        | 4410       | 4420        | 4430       | 4440        |
| ttcaaagttc  | accaatactt  | taatgtagag | cttatccagc  | ctggagcagt | caaggctctac |
| 4450        | 4460        | 4470       | 4480        | 4490       | 4500        |
| gcctattaca  | acctggagga  | aagctgtacc | cggtttctacc | atccggaaaa | ggaggatgga  |
| 4510        | 4520        | 4530       | 4540        | 4550       | 4560        |
| aagctgaaca  | agctctgccg  | tgatgaactg | tgccgctgtg  | ctgaggagaa | ttgcttcata  |
| 4570        | 4580        | 4590       | 4600        | 4610       | 4620        |
| caaaagtcgg  | atgacaagggt | caccctggaa | gaacggctgg  | acaaggcctg | tgagccagga  |
| 4630        | 4640        | 4650       | 4660        | 4670       | 4680        |
| gtggactatg  | tgtacaagac  | ccgactggtc | aaggttcagc  | tgtccaatga | ctttgacgag  |
| 4690        | 4700        | 4710       | 4720        | 4730       | 4740        |
| tacatcatgg  | ccattgagca  | gaccatcaag | tcaggctcgg  | atgaggtgca | ggttgagacag |
| 4750        | 4760        | 4770       | 4780        | 4790       | 4800        |
| cagcgcacgt  | tcatcagccc  | catcaagtgc | agagaagccc  | tgaagctgga | ggagaagaaa  |
| 4810        | 4820        | 4830       | 4840        | 4850       | 4860        |
| cactacctga  | tgtaggggtct | ctctccgat  | ttctggggag  | agaagcccaa | cctcagctac  |
| 4870        | 4880        | 4890       | 4900        | 4910       | 4920        |
| atcatcggga  | aggacacttg  | ggtggagcac | tggcctgagg  | aggacgaatg | ccaagacgaa  |
| 4930        | 4940        | 4950       | 4960        | 4970       | 4980        |
| gagaaccaga  | aacaatgccg  | ggacctcgcc | gccttcaccg  | agagcatggg | tgtctttggg  |
| 4990        | 5000        | 5010       | 5020        | 5030       | 5040        |
| tgccccaaact | gaccacaccc  | ccattcc    |             |            |             |
| 5050        | 5060        |            |             |            |             |

图 3



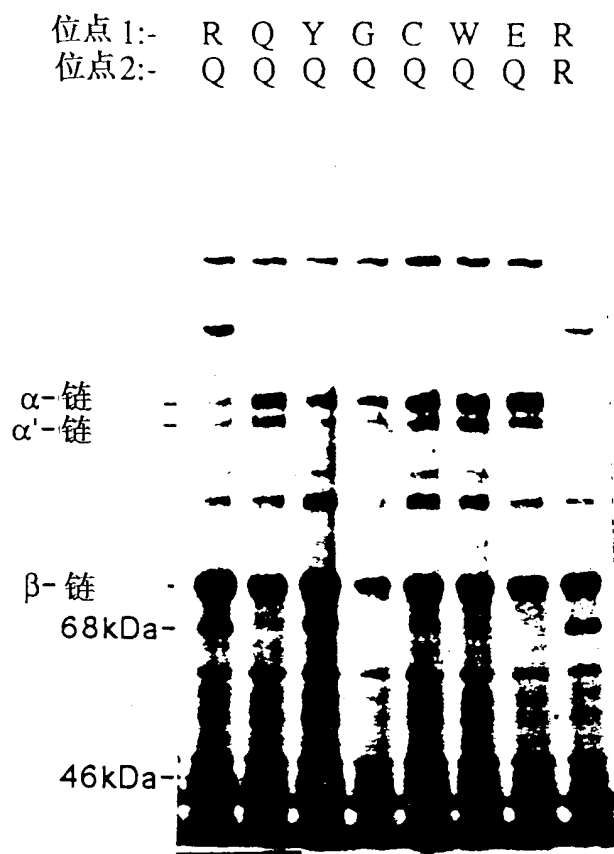


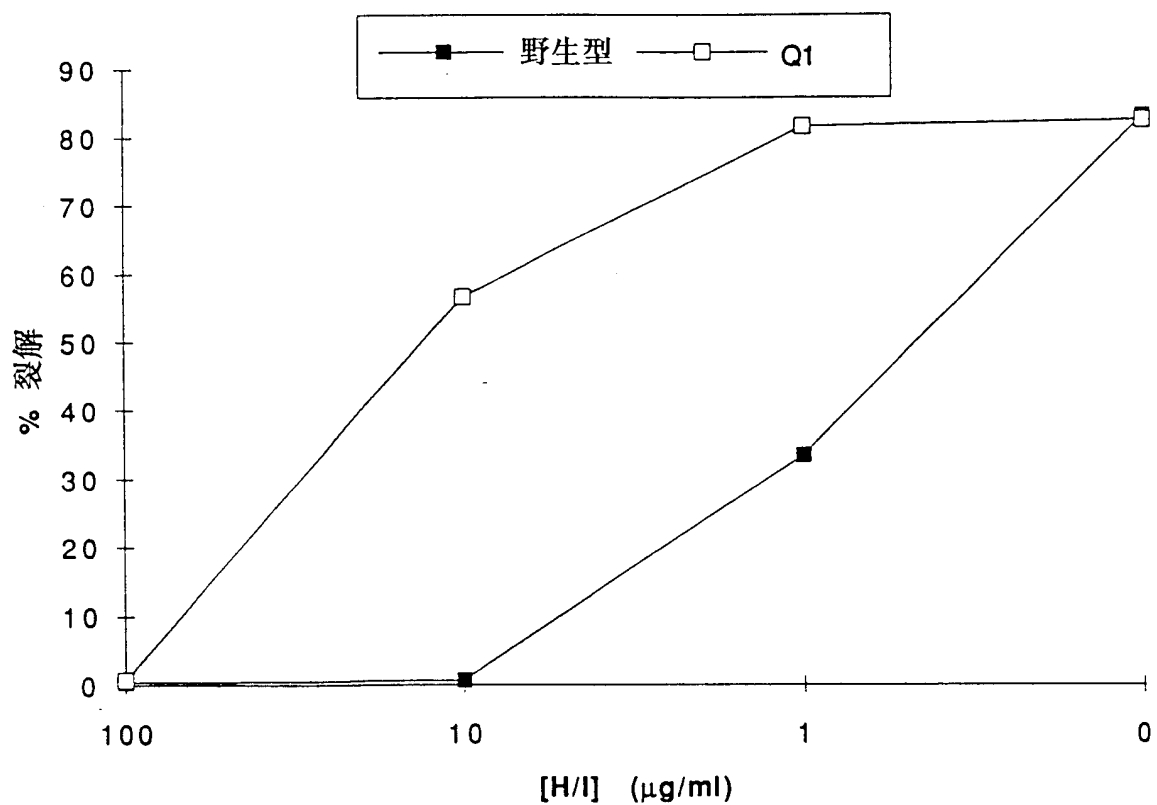
图 4：因子 I - 介导的在各  
位点 1 个残基的裂解

注：

1.  $[^{35}\text{S}]$ —生物合成标记的样品。
2. 在正常的离子强度下进行的反应。
3. 用抗 C3 免疫沉淀。
4. 还原条件下的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。
5. 放射自显影。

图 5

图5: 掺入可由因子I和因子H灭活的1303位精氨酸→谷氨酰胺1303突变后增强的抗性。



## 图 6

图6:在752-754和758-760位氨基酸残基突变的C3裂解的分析结果。

这是一张Western印迹的照片，从7.5%SDS-PAGE电泳（还原条件下）中显影得出，在电泳转移到硝酸纤维素上后，用羊的抗人C3抗体探查，用辣根过氧化物酶偶联的抗羊免疫球蛋白抗体和改良的化学发光测定法（方法和检测试剂均来自英国的Amersham）记录在X-射线胶片上。裂解反应和检测方法参考图3的效果按实施例4中提到的进行。

注：

1—4道：野生型C3（在COS细胞中表达）

5—8道：变异的C3（752-754位残基改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸，758-760未残基也改变为甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸）（在COS细胞中表达）

1, 5道：不添加

2, 6道：+CVFBb

3, 7道：+因子H+因子I

4, 8道：+CVFBb+因子H+因子I

箭头所指示的带为：

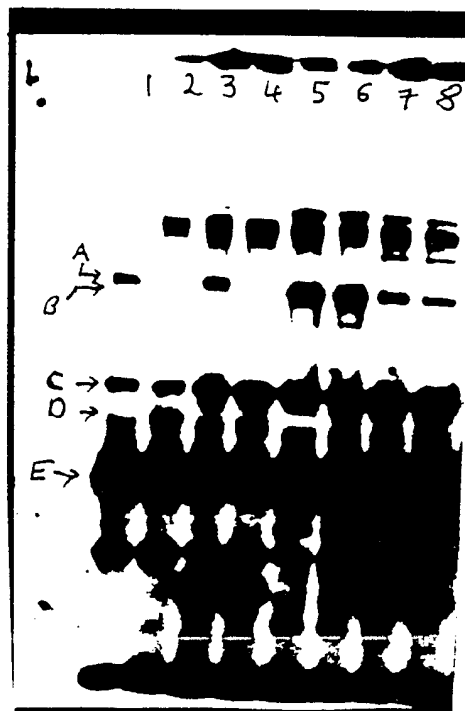
A: C3  $\alpha$  链

B: C3  $\alpha'$  链

C:  $\beta$  链

D: C3  $\alpha'$  链裂解的68KDa产物

E: IgG重链



## 图 7

图7:在野生型和突变体C3'S (C3i'S) 存在时, 由因子D 引起的放射性标记的因子B的裂解

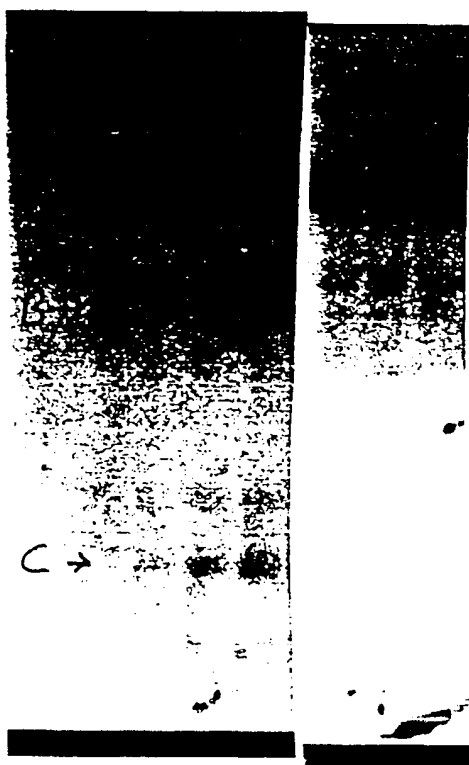
所示的是一张SDS-PAGE的放射自显影照片。所有的样品均包含因子D和<sup>125</sup>I标记的因子B并在37℃下培养3小时。

在编号道中的样品也包括:

1. 只有蒸馏水
2. 1/125野生型C3
3. 1/25野生型C3
4. 1/5野生型C3
5. 1/25突变体C3 (1247谷氨酰胺, 1431天冬氨酸, 1433谷氨酰胺)
6. 1/5突变体C3
7. 没有稀释的突变体C3

箭头所指的带为:

- A. 没有裂解的<sup>125</sup>I标记的因子B (93KDa)
- B. 60KDa裂解产物 (“Bb”)
- C. 33KDa裂解产物 (“Ba”)



## 图 8

图8: 由 SDS—PAGE 说明 C3 和 IgG 之间形成缀合物

这是非还原条件下电泳的4%丙烯酰胺SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色图。  
编号的道包含的样品有:

1. PDP-IgG
2. C3i
3. PDP-IgG+C3i反应混合物

箭头指示处为:

- A: 可能为C3i-IgG缀合物 (350KDa)  
B: C3i (200KDa)  
C: IgG (150KDa)

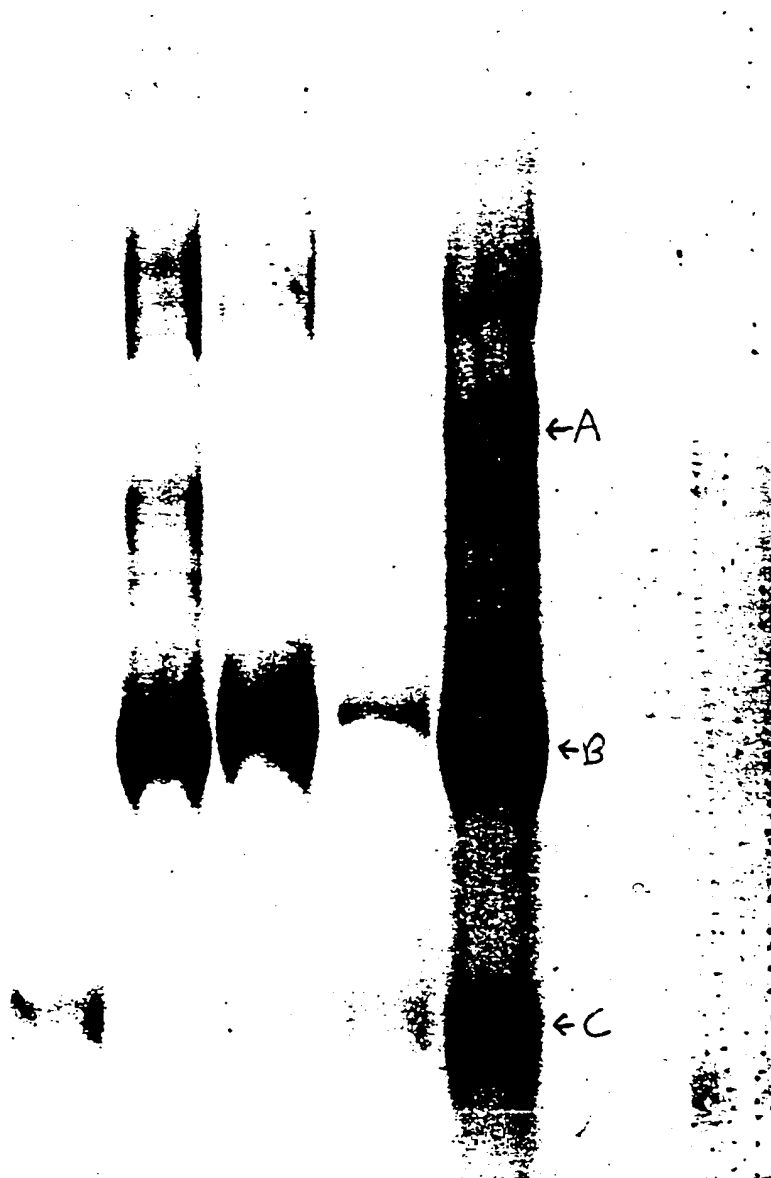
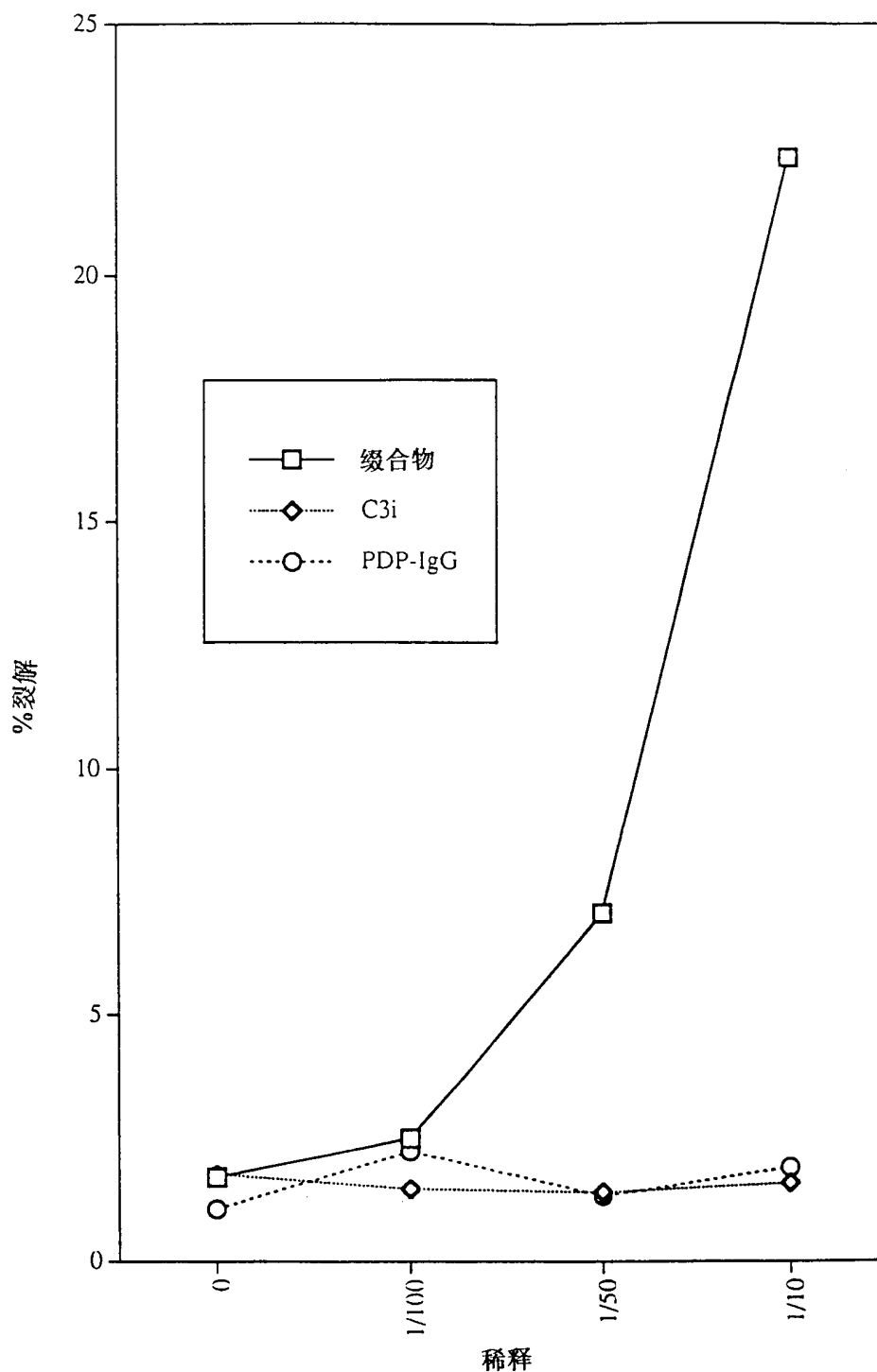


图 9

图9：说明缀合物靶引C3转化酶抗羊红细胞活性。



这张图表示羊红细胞水解的百分率。按方法中所述的步骤进行：红细胞先用C3-IgG缀合物或PDP-IgG或C3i稀释液包被，然后洗涤，用备解素和因子B、因子D产生C3转化酶，最后在CFD/EDTA中经NGPS显影溶解物。只有缀合物产生水解，这种水解是制剂依赖性的。