

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/47

A61K 38/17

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194284.8

[45]授权公告日 2000 年 10 月 4 日

[11]授权公告号 CN 1057097C

[22]申请日 1994.9.23 [24]颁证日 2000.7.7

[21]申请号 94194284.8

[30]优先权

[32]1993.9.24 [33]US[31]126,596

[32]1994.9.22 [33]US[31]310,416

[86]国际申请 PCT/US94/10786 1994.9.23

[87]国际公布 WO95/08570 英 1995.3.30

[85]进入国家阶段日期 1996.5.24

[73]专利权人 赛托医学有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 J·-L·高 P·J·希金斯

C·G·叶

审查员 黄 赤

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 封阻补体激活的嵌合蛋白

[57]摘要

本发明涉及新嵌合蛋白,包括抑制补体激活的第一多肽,该第一多肽与抑制补体激活的第二多肽连接,编码新嵌合蛋白的核酸以及施用本发明嵌合蛋白减轻炎症的方法。

ISSN 1000-8-4274

权 利 要 求 书

1. 一种嵌合蛋白，包括抑制补体激活的第一多肽，该第一多肽与抑制补体激活的第二多肽连接，其中所述第一和第二多肽可以相同或不同，并且选自膜辅因子蛋白，衰变加速因子，补体受体 1，因子 H，C4b 结合蛋白，和其可溶性具有生物活性片段。
2. 权利要求 1 的嵌合蛋白，其中所述蛋白是可溶蛋白。
3. 权利要求 1 的嵌合蛋白，其中所述第一多肽是膜辅因子蛋白或其可溶性，具有生物活性的片段，所述第二多肽是衰变加速因子或其可溶性，具有生物活性的片段。
4. 权利要求 1 的嵌合蛋白，其中所述第一多肽与第二多肽通过肽键连接。
5. 权利要求 1 的嵌合蛋白，其中所述第一和第二多肽是不同的。
6. 权利要求 5 的嵌合蛋白，其中第一多肽包括膜辅因子蛋白片段，第二多肽包括衰变加速因子片段。
7. 权利要求 6 的嵌合蛋白，其中所述第一多肽包括至少膜辅因子蛋白短共有重复片段的 2，3 和 4 区，第二多肽包括至少衰变加速因子短共有重复序列的 2，3 和 4 区。
8. 一种编码权利要求 1 的嵌合蛋白的核酸。
9. 一种重组表达载体，包括选择性标记和权利要求 8 的核酸，所述权利要求 8 的核酸与调节序列有效地连接，以表达所述蛋白。
10. 权利要求 9 的重组表达载体，其中所述调节序列包括哺乳动物启动子。
11. 权利要求 9 的表达载体，其中所述选择性标记包括编码谷氨酰胺合成酶的基因或编码二氢叶酸还原酶的基因。
12. 一种制备重组嵌合蛋白的方法，包括在启动表达条件下培养含有

权利要求 9 的载体的合适的宿主细胞。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述宿主细胞是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、或哺乳动物细胞。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

15. 权利要求 12 的方法，进一步包括下述培养步骤：

(a) 收集所述宿主细胞的细胞上清液或细胞溶胞产物；

(b) 从所述上清液或细胞溶胞产物中去除酸沉淀杂质，得到部分纯化的组合物；

(c) 将所述组合物与阴离子交换树脂接触以将所述嵌合蛋白结合到树脂上，然后洗脱所述嵌合蛋白；

(d) 从所述嵌合蛋白中去除金属结合杂质；

(e) 将所述嵌合蛋白结合到苯基疏水性相互作用树脂上，然后洗脱所述嵌合蛋白；

(f) 将所述嵌合蛋白结合到丁基疏水性相互作用树脂上，然后洗脱所述嵌合蛋白；以及

(g) 从所述嵌合蛋白中去除内毒素，其中步骤 d-f 可以任何顺序进行。

16. 权利要求 1 的嵌合蛋白在制备抑制 C3a 和 C5a 生成的药物中的应用。

17. 一种药物组合物，它含有权利要求 1 的嵌合蛋白和药用载体。

18. 权利要求 1 的嵌合蛋白在制造用于减轻哺乳动物炎症的药物中的应用。

说明书

封阻补体激活的嵌合蛋白

本发明领域

本发明涉及补体抑制和炎症。

本发明背景

补体系统包括血浆中在免疫和变态反应中起内在作用的一组蛋白质。补体激活可以通过至少两种途径发生：牵涉抗原-抗体复合物的经典途径，牵涉酵母和细菌微生物细胞壁多糖的旁路途径。不管使用哪种起始途径，最终结果是生成激活的补体蛋白质片段（例如 C3a、C4a 和 C5a 过敏毒素和 C5b-9 膜攻击复合体），这些蛋白质介导了包括白细胞趋化性，巨噬细胞激活，血管渗透性和细胞溶胞作用的几种功能（Frank, M. 和 Fries, L. Complement. In Paul. W. (ed.) Fundamental Immunology, Raven Press, 1989）。

已经鉴定了几种补体系统的调节蛋白（图 1）。它们的基本功能是调节防止过量补体激活和宿主组织自溶破坏的 C3 / C5 转化酶的活性。这些补体调节剂或者是可溶血浆蛋白或是在各种细胞类型上表达的膜整合蛋白。前者包括 C4b 结合蛋白（C4bp）和因子 H。后者包括 C3b / C4b 受体（补体受体 1，CR1，CD35），膜辅因子蛋白（MCP，CD46），和衰变加速因子（DAF，CD55）。这些蛋白质有许多结构相似性。每种蛋白质由具有长度为大约 60 个氨基酸的多个短的共有重复片段（SCRs）构成，该 SCR 具有保守的半胱氨酸、甘氨酸和脯氨酸残基。编码这些蛋白质的基因已经定位在染色体 1 上并共同被认为

是补体激活调节剂 (CRA) 基因簇 (Hourcade, D. et al, 1989, Adv. Immunol. 45 : 331)。除了它在调节补体激活中的作用外, 红细胞CR1也作为循环免疫复合物的受体而起作用以促进它们从血浆中清除 (Cornacoff, J. et al, 1983, J. Clin. Invest. 71 : 236)。

MCP和DAF是重要的补体系统调节蛋白, 它们通过补体激活防止宿主组织自溶破坏。

MCP最初被Seya和其同事纯化并定性 (J. Exp. Med. 1986, 163 : 837; Biochem. J., 1989, 264 : 581); 他们证明MCP结合C3b和C4b并具有因子 I 辅因子活性。因此MCP通过蛋白酶裂解C3bi和C4bi不可逆地失活C3b和C4b而起作用 (见图 2)。已经证明MCP优选与C3b结合, 因此使它成为一个更有潜力的旁路途径转化酶的失活剂 (Seya, T et al, 1991, Mol. Immunol 28 : 1137)。

DAF首先被Ni Cholson - Weller和同事鉴定 (J. Immunol., 1982, 129 : 184) 并且被Medof和同事定性 (J. Exp. Med., 1984, 160 : 1558)。DAF也与C3b和C4b结合并从C 3 转化酶中解离这些分子而起作用, 因此促进转化酶的衰变 (失活作用) (见图 3)。相似地, DAF失活旁路和经典转化酶。

MCP和DAF只由 4 个SCRs组成, 使其成为最小的补体调节蛋白质。

MCP不具有衰变加速活性而DAF不具有辅因子活性。两种蛋白质在多种细胞类型中被表达包括内皮细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、粒细胞和单核细胞 (Hourcade, D. et al, 1989, Adv. Immunol. 45 : 381; McNearney, T. et al, 1989, J. Clin. Invest, 84 : 538)。MCP和DAF被认为通过不同补体机制, 作为防止补体介导的宿主细胞自溶的补体激活内在抑制剂起作用。

本发明概要

本发明涉及一种嵌合蛋白，其中抑制补体激活的第一多肽与抑制补体激活的第二多肽连接。这种嵌合蛋白优选为一种可溶蛋白。嵌合的第一多肽和第二多肽可以相同或不同，并且第一多肽可以通过肽键与第二多肽连接。

在一优选实施例中，第一多肽是MCP或其可溶性生物活性片段，例如含有至少MCP的SCR的2、3和4个区的片段。而第二多肽是DAF或其可溶性生物活性片段，例如含有至少DAF的SCR的2、3和4个区的片段。当这里使用的术语“片段”应用于多肽时，一般长度是至少大约5个连续的氨基酸，典型地是至少大约10个连续的氨基酸，更典型地是至少大约20个连续的氨基酸。通常是至少大约30个连续的氨基酸，优选至少大约40个连续的氨基酸，更优选至少大约50个连续的氨基酸，且最优选至少大约60至80或更多的连续的氨基酸。这种肽可以用本领域熟练技术人员公知的方法制备，包括蛋白质的蛋白酶裂解，片段的从头合成或基因工程。一个生物活性片段被定义为具有补体抑制活性的片段。片段的活性应该至少是天然存在的补体激活抑制剂的生物活性的1%，更优选是至少10%，但更优选至少50%，最优选至少相等。

与单独的，或结合物形式的可溶MCP或DAF蛋白相比，这种可溶性嵌合分子是更有效的补体激活抑制剂。而且这种可溶性嵌合蛋白具有外源性补体调节活性（失活未结合在相同细胞膜上的转化酶的能力）。相反，膜相联形式的MCP和DAF具有内在活性（失活仅结合在相同细胞膜上的转化酶的能力）。这种嵌合蛋白能用于炎症和自身免疫疾病的治疗。产生的抗这种嵌合蛋白的单克隆抗体能被用作诊断或治疗剂。

本发明也包括本发明嵌合蛋白的修饰。修饰（一般不改变一级序

列)包括多肽的体内和体外化学衍生化,例如乙酰化作用或羧化作用,也包括糖基化作用修饰,例如改变糖基化作用模式,例如在其合成和制备或进一步制备步骤中改变肽的糖基化模式完成的修饰,例如将多肽暴露于影响糖基化作用的酶,例如哺乳动物糖基化或去糖基化酶。

在另一个实施例中,嵌合物的第一和第二多肽可以选自MCP、DAF、补体受体1, H因子、C4b结合蛋白,或其可溶性生物活性片段。由于它们的C3/C5转化酶抑制活性,任何RCA族补体调节蛋白或肽可以是嵌合物的第一或第二多肽。

本发明也包括编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白中第一和第二多肽通过肽键连接,和重组表达载体,所述载体包含选择性标记例如谷氨酰胺合成酶和二氢叶酸还原酶,以及编码本发明嵌合蛋白的核酸,所述核酸与调节序列如,哺乳动物启动子有效地连接,以表达所述蛋白。本发明也包括一种制备本发明嵌合蛋白的方法,通过在合适的宿主细胞中,例如细菌细胞,酵母细胞,昆虫细胞或哺乳动物细胞,在启动嵌合蛋白表达的条件下培养嵌合蛋白编码表达载体。本方法优选在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达嵌合蛋白而完成。可以通过收集宿主细胞细胞培养上清液或细胞溶解物;去除酸沉淀杂质,例如在pH7.0以下沉淀的杂质,例如用pH5.0的25mM哌嗪以1:1稀释上清液或溶解物过程中从上清液或溶解物中沉淀出的杂质;收集与阴离子交换树脂结合的嵌合蛋白;去除金属结合的杂质;使嵌合蛋白与苯基疏水相互作用树脂结合,然后洗脱所述重组蛋白质,使嵌合蛋白与丁基疏水相互作用树脂结合,然后洗脱所述重组蛋白质;从嵌合蛋白中去除内毒素,从而制备本发明嵌合蛋白。本发明方法后三个步骤可以任何顺序进行。

本发明也包括一种通过使C3转化酶例如C3转化酶的C3b和C4b

亚基，和 C 5 转化酶，例如 C 5 转化酶 C3b 和 C4b 亚基与本发明嵌合蛋白接触抑制 C3a 和 C5a 产生的方法。本发明嵌合蛋白与转化酶的结合抑制转化酶的酶活性，因此抑制 C3a 和 C5a 的产生。

另一方面本发明的特征是一种通过给患者施用本发明嵌合蛋白，减轻以过量补体激活为特征的炎症的方法。

最后一方面，本发明另一特征为一种与本发明嵌合蛋白结合但不单独与嵌合物的第一多肽或第二多肽结合的抗体。

由下面的详细说明和权利要求书中可明显看出本发明的其它特征和优点。

详细说明

首先简要说明附图。

图 1 显示了补体系统蛋白质，其激活途径和调节其功能的蛋白质。

图 2 是 C 3 转化酶被 MCP 失活机理的图解。

图 3 是 C 3 转化酶被 DAF 失活机理的图解。

图 4 是 1 2 升被转染的 CHO-K 1 细胞微载体培养物中细胞密度和补体激活封阻体 2 (CAB-2) 蛋白质上清液浓度的时间进程曲线。将转染的 CHO-K 1 细胞以 8×10^4 个细胞/ml 接种于培养容器中含有 2.5g/ml 微载体和 10% 胎牛血清的 Iscove's 改性的 Dulbecco's 培养基 (IMDM) 中。生长几天后达到峰值细胞密度，将培养基转换为无血清 IMDM。在此后的每一天收集 10 升培养上清液并用新鲜无血清培养基替代。

图 5 是在聚丙烯酰胺凝胶上分离的纯化的可溶 MCP (sMCP) 和 CAB-2 蛋白的照片。5 μ g 等份的每种纯化的蛋白质在 10% 聚丙烯酰胺十二烷基硫酸钠 (SDS) 凝胶上进行电泳。在还原条件下进行凝胶电泳并用考马斯蓝染色。泳道 1，分子量标记；泳道 2，sMCP；泳

道 3, CAB-2。分子量标准是106, 80, 49.5, 32.5和27.5kDa。

图 6 是描述微载体产生CAB-2 蛋白七步纯化方法的图解。

图 7 是说明酶联免疫吸附测定(ELISA)测定的带有抗MCP和抗DAF抗体的CAB-2 蛋白双重反应活性的曲线。该测定使用了兔抗-MCP多克隆抗体捕捉, 鼠抗-DAF单克隆作为第二抗体。和辣根过氧化物酶(HRPO)结合的山羊抗鼠IgG第三抗体。

图 8 是说明辅因子测定中测得的sMCP和CAB-2 活性对比曲线基于各样品中完整链和它的裂解产物的相对比例, 进行光密度测定扫描, 从而测定具有类C36性质 α 链的溴化钾处理 C 3 的裂解。

图 9 是说明在衰变加速因子测定中测得的sDAF和CAB-2 活性对比的曲线。由每个样品最大裂解百分比值, 使用标准表, 测得 Z 值(裂解位点/细胞的数值)。

图 1 0 是在依赖经典途径的补体介导细胞溶胞作用测定中sMCP、sDAF, sMCP+sDAF混合物和CAB-2 抑制活性对比曲线。IgM敏感的绵羊红血细胞(RBC)是刺激剂, 且人血清(1:200最终稀释)用作补体源。

图 1 1 是在依赖旁路途径的补体介导细胞溶胞作用的测定中sMCP和CAB-2 抑制活性对比曲线。含有EGTA(以螯合 Ca^{2+})的缓冲液中的脱敏荷兰猪RBC是刺激剂, 且人血清(最终稀释为1:4)是补体源。

图 1 2 是sMCP和CAB-2 抑制C5a产生的曲线。被1:8稀释的人血清是补体源, 酵母聚糖(最终浓度1mg/ml)是旁路途径激活的刺激剂。用 ^{125}I -C5a脱精氨酸的竞争放射免疫测定定量C5a。

图 1 3 是大鼠体内sMCP和CAB-2 药物动力学曲线。用1mg/kg剂量纯化的蛋白质对动物静脉注射, 在注射后指定时间抽取血样。用ELISA测定sMCP和CAB-2 血浆含量。

图 1 4 是由用 ^{125}I -标记的CAB-2 静脉注射(i.v.)大鼠回收

的血清样品的放射自显影图。在注射后不同时间由鼠体获得血清样品并在10%聚丙烯酰胺SDS凝胶上进行电泳。将凝胶干燥并进行放射自显影。

图15是CAB-2蛋白质对荷兰猪的反向被动Arthus反应的体内抑制条形图。用20mg/kg卵白蛋白和1 μ Ci 125 I-BSA对动物i.v.注射,然后用10mg含有指定量CAB-2蛋白的抗卵白蛋白多克隆抗体真皮内(i.d.)竞争攻击。3小时后处死动物,皮活组织检查计数以对 125 I-BSA漏失量定量。

详细说明

这里所说制备和使用新的嵌合基因和它们编码的蛋白,这种蛋白表达了MCP和DAF两者的生物活性。术语“补体激活封阻体”(CAB)定义为具有两种不同补体抑制活性的重组嵌合蛋白,如因子I辅因子活性和衰变加速活性。

用这样一种方式构建本发明基因使被编码蛋白具有至少两个补体结合位点和因子I辅因子活性和衰变加速活性。

与单个MCP或DAF或它们的结合物相比,本发明嵌合分子是更有效的补体激活抑制剂。该嵌合蛋白可用来治疗炎症和自身免疫疾病,生产出的抗这种嵌合蛋白的单克隆抗体可用作诊断或治疗剂。

本发明包括编码具有补体因子I辅因子活性和衰变加速因子调节活性的嵌合蛋白的重组基因。由于具有两种生物活性,这种嵌合蛋白在抑制补体激活能力上比膜辅因子蛋白,衰变加速因子,或两种蛋白的结合物更有潜在效力。下面将说明用来构建和表达基因的重组体材料和方法,其制备有用量的方法,含该嵌合重组蛋白的药物组合物,它们用于治疗炎症和自身免疫疾病的方法。也说明了抗该嵌合补体调节蛋白的单克隆抗体,它们的制备方法和性质。这种单克隆抗体可用

作该嵌合蛋白定量和监测剂以及用作人类疾病的诊断和治疗剂。

在下面的实施例中描述了本发明的特别实例，详细说明了特定的嵌合蛋白CAB-2的构建，克隆和制备。另外，实施例详细描述了CAB-2蛋白质的体外生物活性的测定，例如增强的CAB-2抑制经典和旁路补体激活的效力。而且实施例描述了CAB-2蛋白体内药物动力学行为和它作为治疗动物模型中补体引发炎症的效力。

具有膜辅因子和衰变加速活性的补体受体融合蛋白的克隆和表达

编码MCP和DAF蛋白的cDNA克隆，Lublin, D. M. et al., 1989, J. Exp. Med. 168 : 181 - 194, 和Medof, M. E. et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 2007 - 2011中有说明，这里一起将两篇文献作为参考，该cDNA克隆被用于指导MCP和DAF融合蛋白合成的表达载体的构建。MCP和DAF蛋白和/或它们的生物活性片段或其衍生物可以用以Lublin D. M. 等，上文和Medof, D. E., 等，上文所公开的cDNA序列为基础的公知重组DNA技术制备。特别地，mRNA可由表达MCP和DAF的细胞分离，cDNA用随机引物合成，根据公开的序列用合成的一对引物聚合酶链反应（PCR）扩增相应基因的特定序列。编码其它抑制补体激活的蛋白质的cDNA也可以用相似方法分离，例如C4b结合蛋白（Chuny等，1985, Biochem J. 230 : 133 - 141, 这里作为参考），例如因子H（Ripoche等，1988, Biochem J. 249 : 593 - 602, 和EMBL Accession Number Y00716, 这里作为参考），例如CR1（Klickstein等，1988, J. Exp. Med. 168 : 1699, 这里作为参考）。

短共有重复片段（SCR）区3和4授予MCP蛋白C3b和C4b结合位点（Adams, 等，1991, J. Immunol, 147 : 3005 - 3011）。但除SCR3和4外，也需要SCR2以保留膜辅因子活性。使用的cDNA最短长度是编

码相应于MCP SCR3和4两者的氨基酸。DAF的SCR2、3和4有助于衰变加速活性 (Coyne, 等, 1992, J. Immunol 149 : 2906 - 2913)。例如编码含有MCP和DAF蛋白SCR1-4和/或丝氨酸-苏氨酸-脯氨酸富集 (S T) 区细胞外功能区的cDNA片段可用于这种融合蛋白质的制备。除MCP和DAF以外的具有C3b和C4b结合活性和膜辅因子和/或衰变加速活性的基因也可用于表达载体的构建, 该载体指导具有膜辅因子和衰变加速活性的融合蛋白合成。

表达载体中两基因间的接头

在表达载体构建中, DNA接头片段可以加到两种基因之间。但是第一和第二蛋白质编码区间接头片段的插入必须在5'和3'端保持合适的读框以确保连续的蛋白质翻译。

接头的长度可以是0至1500个氨基酸长, 且优选0-60个氨基酸长。如下文所说明的, 在MCP-DAF构建物的接界没有氨基酸加入, 只是两个新加入的氨基酸已被加在MCP-MCP, MCP-1/2 MCP和DAF-MCP构建物的接界。由于SCR1区的缺失并不减少MCP的辅因子活性, 大约60个氨基酸长的DAF-MCP构建物中的SCR1区可认为是除两个新加入氨基酸外接头的一部分。

氨基酸取代: 对C3b和C4b结合特异性和亲和性进行操作

补体调节基因族中所有SCR区共享一个共有序列的特点, 其中该序列的4个半胱氨酸全部在该区内构成两个二硫键。氨基酸可以一个SCR至另外一个以转变一个SCR的结合特异性或来增加与另一个的结合亲和性。例如, C3b结合可以转变为C4b结合或CR1中的两种特异性 (Krych等, 1994, J. Biol. Chem. 269 : 13273 - 13278)。这些控制可以使用本领域公知的定点突变技术来实现。

用于融合蛋白构建的基因

补体基因簇RCA的所有调节体共享基本结构相似性 (Hourcade, Holers和Atkinson, 1989, *Adv Immunol.* 45 : 381 - 416)。特定地, 它们由几个大约60个氨基酸长并有4个保守的半胱氨酸的SCRs组成。除MCP和DAF外, 所有调节体含有多于4个SCR区。例如, CR1有30个SCR区。具有膜辅因子活性和衰变加速活性的融合蛋白质可用多于两个的基因构建, 每种基因具有膜辅因子或衰变加速活性。用于构建物的每个cDNA片段的长度在上文中已讨论过。

融合蛋白的翻译后修饰

融合蛋白可以在有或没有糖基化作用下制备。RCA族中的许多成员具有糖基化作用位点。例如, MCP在SCR和ST区中分别具有三个N-连接和一个O-连接糖基化作用位点。DAF含有一个N-连接和多个O-连接寡糖 (Lublin, 等, 1986, *J. Immunol.* 137 : 1629), 通常, 在真核表达系统中的蛋白质的产生导致相应蛋白质以糖基化形式表达。有三种可能途径生产非糖基化融合蛋白: (1) 通过糖酶的酶切的去糖基化作用, 例如内-肽-N-半乳糖胺酶和O-寡糖酶分别裂解N-和O-连接的糖基化作用; (2) 在杆菌属和大肠杆菌中原核生物表达产生非糖基化融合蛋白; (3) 定点突变来改变N-或O-连接糖基化作用识别位点。

表达系统

融合蛋白能在原核和真核系统中生产, 每种系统使用适于每一宿主系统的不同表达载体。

本发明嵌合蛋白可在真核表达系统如下文所说明的杆状病毒或哺乳动物系统中生产。

下面是可用于真核表达系统中基因表达的表达载体的例子。质粒

pMSG使用来自小鼠乳瘤病毒 (MMTV) 长末端重复序列的启动子。用于pMSG表达的合适宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, HeLa细胞和鼠Lkt阴性细胞 (Lee, F., 等, 1981 Nature 294 : 228 - 232)。载体pSVL使用SV40晚期启动子。为了高度瞬时表达, 适于pSVL表达的宿主细胞是Cos细胞 (Sprague, J. 等, 1983, J. Virol, 45 : 773 - 781)。载体pRSV使用Rous肉瘤病毒启动子。适合于RSV表达宿主细胞是鼠成纤维细胞, 成淋巴细胞样细胞和COS细胞 (Gorman, Padmanabhan和Howard, 1983, Science 221 : 551 - 553)。

也可以使用杆状病毒表达载体。这些载体在昆虫细胞如Sf9中被稳定表达 (Luckow, V. A. 和Summers, M. D., 1988, Bio/Technology 6 : 47 - 55; Miller, L. K., 1988, Ann. Re. Microbiology 42 : 177 - 199)。

本发明嵌合蛋白也可以在原核表达系统中生产。下面是可在原核表达系统中被表达的表达载体的例子。

使用氧依赖启动子的pOX表达系列可以在E.coli.中被表达 (Khosla, G., 等, 1990, Bio/Technology 8 : 554 - 558)。使用入噬菌体的强pL启动子的pRL载体 (Reed, R. R., 1981, Cell 25 : 713 - 719; Mott, J. D., 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 88 - 92) 和使用由大肠杆菌色氨酸操纵子和乳糖操纵子启动子融合而衍生的杂合启动子的pKK 223-3载体 (Borsius, J.和Holy, A., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6929 - 6933) 可用于大肠杆菌中的表达。

酵母表达的合适载体也是本领域公知的, 例如Sleep, D. Belfield, D. P. 和Goodey, A. R., 1990, Bio/Technology 8 : 42 - 46; Sakai, A. et al., 1991, Bio/Technology 9 : 1382

- 1385; Kotula, L. 和Curtis, P. J., 1991, Bio/Technology 9 : 1386 - 1389所有这些文献在这里引作参考。

嵌合CABs的生产、定量、纯化和分析

一旦分离出表达嵌合基因的重组细胞系，一定要鉴定分泌的蛋白质并就其预计结构进行证明。可用各种方法来鉴定并表征被表达嵌合蛋白的特征。重组细胞系可以首先用 ^{35}S - 蛋氨酸温育以内源标记它的被表达蛋白质。通过用对一个或另一个嵌合蛋白的单克隆抗体，如抗-MCP或抗-DAF的放射免疫沉淀作用证明分泌的嵌合蛋白的存在。

在一个方法的实施例中，用抗-MCP或抗-DAF单克隆抗体与代谢地 ^{35}S - 标记的培养物上清液温育。免疫复合物通过与结合于琼脂糖凝胶的蛋白质A温育而沉淀。先进行免疫沉淀蛋白质的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后进行自放射显影能鉴定分泌的嵌合蛋白。如果期望嵌合蛋白表达MCP和DAF两个功能域，例如就CAB-2而言，将期望抗-DAF和抗-MCP两种抗体来免疫沉淀这种蛋白。

用于由MCP和DAF基因片段两者组成的双特异嵌合蛋白（例如，CAB-2）的另一方法是连续使用两个不同特异性单克隆抗体的双免疫沉淀法。用一个抗体预清除培养物上清液将导致与第二个抗体免疫沉淀阴性。这个方法将证明单个蛋白质表达了MCP和DAF两者的表位。

或者，双特异嵌合蛋白，例如CAB-2，能用Western印迹来鉴定。例如，经SDS-PAGE后转移到硝基纤维素上，用抗-MCP或抗-DAF单克隆抗体显色进行印迹。被表达双特异重组蛋白将与两种抗体反应，再次证明嵌合物上MCP和DAF抗原表位的存在。

也可以用ELISA实现对双特异嵌合蛋白如CAB-2的鉴定。例如，用特异于MCP或DAF的兔多克隆抗体对塑料微滴度ELISA平板涂层，然后加入来自表达CAB-2重组细胞系的培养上清液，并同捕获多克隆

抗体温育。可顺序使用单克隆抗-DAF或抗-MCP第二抗体，其特异性与捕获抗体不同。阳性反应将表明嵌合蛋白上两个抗原表位的存在。

通过与已知量纯化的CAB-2蛋白质标准曲线比较，ELISA用来定量测定培养物上清液或含有嵌合蛋白的任何其它未经纯化溶液中CAB-2的含量。CAB-2的定量对测定重组体细胞系生产速率，测定部分纯化制剂中蛋白质浓度，测定体内实验血浆中蛋白质浓度是有用的。

用多种标准层析方法能将嵌合CAB-2蛋白质从重组细胞培养上清液中纯化，包括但不限于免疫亲和层析，离子交换层析，凝胶过滤层析，反相高效液相色谱（HPLC），凝集素亲和层析，或层析聚焦。例如，小量的补充血清的培养上清液可以用例如抗-MCP或抗-DAF单克隆抗体进行免疫亲和层析纯化。与固定抗体结合的CAB-2蛋白质可以用离液溶液以纯化形式洗脱。

重组CHO细胞可在没有高浓度血清补充情况下培养制备大量（100升）含CAB-2蛋白上清液。下文是在12升容器中使用微载体的培养方法的说明。无血清培养上清液中CAB-2蛋白可以用下面实施例中详述的层析方法纯化。这种方法可产生几百毫克纯度大于90%的CAB-2蛋白。

一旦CAB-2蛋白被纯化，它的氨基酸顺序可以通过使用自动系统直接蛋白质序列分析而推断出来。N-连接和O-连接碳水化合物的存在可通过使用特异内切糖苷酶测定（Chavira, R. 等, 1984, Anal. Biochem. 136 : 446）。给其生化结构的进一步定性也可通过包括但不限于用等电聚焦进行pI测定，亲水性分析，X-线晶体学分析，和计算机模拟进行。

本发明嵌合蛋白的功能定性

嵌合重组蛋白的重要特性是它们既能作为因子I辅因子又能作为

衰变加速因子而起作用。可进行体外测定测得这些生物活性 (Medof, M. 等, 1984, J. Exp. Med. 160 : 1553; Masaki, T. 等, 1992, J. Biochem 111 : 573)。如在实施例中所说明的, 辅因子活性 (使用纯化的 C 3 和因子 I) 和衰变加速活性 (使用 IgM, C 1 和 C 4-致敏的绵羊 RBL 和纯化的 C 2) 的测定是用来证明 CAB-2 嵌合蛋白质的这两种补体的调节功能。辅因子或衰变加速活性, 或就 CAB-2 而言, 结合的两种活性的结果是 C 3 / C 5 转化酶的失活。下面实施例说明的另一个体外测定证明 CAB-2 能抑制 C 5 转化酶活性正如通过 C5a 产生而测得 (Moran, P. 等, 1992, J. Immunol, 149 : 1736, 这里引作参考)。另外的测定, 如下面实施例所说明的, 证明 CAB-2 抑制通过经典和旁路途径的补体诱导的细胞溶胞。

抗嵌合蛋白单克隆抗体的产生

可用标准方法产生单克隆抗体来纯化嵌合蛋白。用与合适佐剂混合的蛋白质对鼠进行免疫。用聚乙二醇使脾细胞与骨髓瘤细胞系融合, 用含有次黄嘌呤和氨基蝶呤的培养基选择杂交瘤。分泌所需抗体的杂交瘤可用 ELISA 筛选并克隆。单克隆抗体的特异性可以通过在 ELISA 中使用不同蛋白质或肽抗原来测定。有用量的抗体可通过产生鼠腹水液或克隆的生产抗体的杂交瘤细胞系的大量体外培养物而生产。抗体可用各种本领域公知的层析方法纯化, 例如在固定化的蛋白质 A 或蛋白质 G 上的亲和层析。

证明 CAB-2 体内治疗活性

Arthus 反应是由组织中抗原与循环抗体间相互作用引起的炎症应答。它已作为位于体内炎症应答的经典例子, 并以免疫复合物生成, 补体激活, 炎性细胞募集, 水肿和组织损伤为特征 (P. Bailey & A. Sturm, 1983, Biochem, Pharm 32 : 475)。实验上可在动物模型

中用抗原静脉内注射再用抗体攻击来建立反向Arthus反应。用荷兰猪作为动物模型，可评价本发明嵌合蛋白体内治疗效果(见下文实施例)。

也可以用与各种临床人类疾病相关的另外的动物模型来测试补体激活封阻剂的体内效力。这些包括但不限于局部缺血/再灌注损伤(急性心肌梗死; H. F. Weisman et al., 1990, Science 249 : 146); 脑缺血损伤(Stroke: L. Chang et al, 1992, J. Cerebr. Blood Flow Metab. 12 : 1030); 肺损伤(ARDS. S. Hosea et al, 1980, J. Clin. Invest. 66 : 375); 异种移植排斥(transplants J. Leventhal et al, 1993, Transplantation 55 : 857); 烧伤(F. Caldwell et al, 1993, J. Burn Care Rehab. 14 : 420; 急性胰腺炎(M. Steer, 1992, Yale J. Biol. Med. 65 : 421), 肾炎(R. Pichler et al, 1994, Am. J. Pathol 144 : 915), 心肺分流术(L. Nilsson et al., 1990, Artif. Organs 14 : 46), 和多发性硬化(C. Linington et al., 1989, Brain 112 : 895)。

应用

本发明嵌合蛋白，例如重组CAB-2蛋白可与一种合适的药物制剂结合，并通过各种途径给药，包括但不限于静脉栓注射，静脉内灌注，腹膜内，皮内，肌内，皮下，鼻内和口服途径。CAB-2体内给药将使蛋白质能结合内源C3/C5转化酶并抑制另外的C3b和C5b，以及C3a和C5a过敏毒素和C5b-9裂解复合物的生成。CAB-2蛋白质的补体调节活性因此抑制体内补体激活和与其相伴随的炎症后遗症，例如嗜中性白细胞募集和活化，宿主细胞的自溶解和水肿。CAB-2可用来治疗补体系统非正常和/或过量激活而介导的疾病和症状。这些包括但不限于：由于在心肌梗死，aneurysm，中风，出血性休克，或粉碎性损伤后缺血-再灌注(reperfusion)而引起的组织损

伤；烧伤；内毒素血症和脓毒性休克；成人呼吸窘迫综合症（ARDS）；移植的超急性排异反应；心肺分流术和胰腺炎。自身免疫疾病包括并不限于全身性红斑狼疮，类风湿关节炎和多发性硬化，这些也能用本发明嵌合蛋白治疗（也见表1）。

表 1

本发明蛋白嵌合物的可能临床靶物

旁路途径	经典途径
<u>再灌注损伤</u>	<u>自身免疫疾病</u>
脑梗死（中风）	全身性红斑狼疮
急性心肌梗死	类风湿关节炎
血容量减少性休克	肾小球性肾炎
多发性器官衰竭	溶血性贫血
压碎损伤	重症肌无力
肠缺血	多发性硬化
	脉管炎
	炎症性肠疾病
	大疱疾病
	荨麻疹
	阵发性夜间
	血红蛋白尿
	冷球蛋白血症
<u>炎症疾病</u>	<u>炎症疾病</u>
成人呼吸窘迫综合症	脓毒性休克和内毒素血症
热损伤（烧伤或冻伤）	
泵后综合症（心肺分流术和血液透析）	
节段性回肠炎	

镰状细胞性贫血

胰腺炎

不利的药物反应

药物变态反应

移植排异反应

超急性同种移植

Radiographic contrast media allergy

I L - 2 诱导的血管漏出综合症

移植排异反应

超急性异种移植

各种递送系统是已知的并可用来递送本发明嵌合蛋白，例如包被在脂质体中，或控制释放设计。本发明嵌合蛋白也可以体外给药，例如移植术之前预处理供体器官。本发明嵌合蛋白可配制于药物赋形剂中体重范围在大约 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 用于体内或体外治疗。

这里包括的下面的实施例是为了说明而不是限制本发明。

实施例 1：编码补体受体融合蛋白的重组基因的克隆和表达

这里说明的是指导补体受体融合蛋白，例如 MCP - MCP，MCP - 1 - 2 MCP，MCP - DAF 和 DAF - MCP 的表达的各种表达载体的构建。这些蛋白质如下制备。编码相应 MCP 和 DAF 细胞外域氨基酸序列的 DNA 片段在指导融合 MCP 和 DAF 表达的表达载体中连接在一起。

所有限制性内切核酸酶由 New England Biolabs, Beverly, MA 构得。Taq 聚合酶由 Cetus, Norwalk, CT 获得。定做的合成寡核苷酸由 National Biosciences Inc., Plymouth, MN 构得。pGEM - 3fz (-) 质粒 (这里写作 pG3N) 由 Promega Madison, WI 获得。pBluescript II SK(+) (这里写作 pII SK) 由 Stratagene, La Jolla, CA 获得。

COS - 7 (ATCC NO. CRL 1651) 日常保存在加有 10mM 谷氨酰胺，

20mM HEPES, 50 μ g/ml链霉素, 50单位/ml青霉素, 和10%胎牛血清的Dulbecco's改性的Eagle培养基(DMEM)中(GIBCO)。CHO-K1(ATCC NO. CCL 61)在含有10%胎牛血清, 50 μ g/ml链霉素和50单位/ml青霉素的Ham's营养混合物F-12(Sigma, St. Louis, MO)中培养。

A. MCP-pG3N质粒的构建

MCP-pG3N用作MCP-DAF, MCP-MCP和MCP-1/2 MCP表达载体构建的基本构架MCP-pG3N质粒的构建通过将编码相应于MCP细胞外域氨基酸序列的cDNA片段插入到pG3N质粒中而完成。编码MCP细胞外域的cDNA用PCR技术获得。

PCR反应是在下面文献提供的条件下完成的: S. J. Scharf. 1990, PCR protocol: A guide to methods and application S. M. A. Innis编, D. H. Gelfrand, J. J. Sninsky和J. J. White, New York, pp. 84 - 91; 这里引作参考。在一个典型的100 μ l反应中, 反应混合物含有50mM KCl 10mM Tris - HCl pH8.3, 1.5mM MgCl₂ 0.2mM四种脱氧核糖核苷酸; 1 ng线性模板, 配对引物的每一个是45pmol, 以及5个单位的Taq聚合酶。扩增反应进行30个循环, 每个循环由94 $^{\circ}$ C保温1分钟, 52 $^{\circ}$ C保温1分钟, 72 $^{\circ}$ C保温1分钟组成。最后循环结束后在72 $^{\circ}$ C再保温15分钟使扩增反应完全。

含有编码相应于MCP蛋白质氨基酸序列的cDNA序列的质粒 (Lublin等, 1988, J. Exp. Med. 168 : 181 - 94, 这里引作参考) 用作下面说明的PCR反应中的模板。

在PCR中, MCP-N1引物, 5' -- GGA ATT CGC ATG GAG CCT CCC GGC -- 3' (SEQUENCE ID NO : 1) 被用作正向引物, 而MCP-STB引物, 5' -- CTA TGA GGC ACT GGA CGC TGG AGA TTT -- 3'

(SEQUENCE ID NO : 2), 用作反向引物。有一个加入到MCP-N1引物5'端的EcoRI限制位点和加入到终止蛋白质翻译的MCP-STB引物5'端的终止密码子。

由这一PCR反应产生的MCP cDNA序列, MCP1片段, 跨越核苷酸序号41至943(D. M. Lublin等, 上文)。MCP1编码相应于MCP蛋白质细胞外域的氨基酸序列。它含有信号肽(SP)区, 短的共有重复SCR1-4和丝氨酸, 苏氨酸富集区(ST)部分。

为构建MCP-pG3N质粒, 用EcoRI和SalI限制性内切核酸酶切割MCP1片段, 凝胶纯化, 并亚克隆到用同一套限制性酶处理的pG3N质粒。用SalI对MCP1片段处理导致所有其ST编码序列断裂, 编码最初三个氨基酸的序列除外。

B. MCP-DAF表达载体的构建

用PCR来合成用于MCP-DAF pG3N质粒构建的编码相应于DAF蛋白质细胞外域氨基酸序列的cDNA片段, DAF2片段。含有编码相应于DAF蛋白质氨基酸序列的cDNA的质粒(M. E. Medof等, 上文)被用在下面说明的PCR反应中。引物DAF-N5, 5'--CCT CTA GAG TCG ACT GAC TGT GGC CTT CCC CCA GAT GTA--3' (SEQUENCE ID NO : 3)和DAF-C5, 5'--TCT AGA GCA TGC GAA TTC TCA ACG GGT AGT ACC TGA AGT GGT TCC--3' (SEQUENCE ID NO : 4)被分别用作正向和反向引物。有一个加入到DAF-N5引物5'端的SalI限制位点。一个蛋白质翻译终止密码子被加到DAF-C5引物的5'端。在终止密码子之后, 两个限制位点, EcoRI和SphI也被引入。因此DAF2片段被在5'端装上SalI, 并且EcoRI-SphI在3'端成对。DAF2片段定义跨越核苷酸序号156至1124的区(M. E. Medof等, 上文), 它编码相应于含有SCR1-4和ST区的成熟DAF蛋白质细胞外

域氨基酸序列。

MCP-DAF pG3N质粒的构建是通过两个DNA被SalI和SphI限制酶切割后DAF2片段和MCP-pG3N质粒的连接反应而实现的。SalI位点是MCP和DAF DNA区段之间符合读框的连接位点，因此保证了由MCP至DAF的连续的蛋白质翻译。在SalI位点有一个核苷酸的转换，由ACT转换成ACC，但它还是作为氨基酸，苏氨酸的密码子。

MCP-DAF cDNA区段通过用EcoRI限制酶和凝胶纯化处理由MCP-DAF pG3N挽回。该cDNA片段然后被克隆到pEE14和P91203(B)载体的EcoRI位点，pEE14含有谷氨酰胺合成酶基因为可选择标记(M. I. Cockett 等, 1985, Science 228 : 810 - 815, 这里引作参考)，P91203(B)载体含有二氢叶酸还原酶基因作为可选择标记(G. G. Wong等, 1985, Science 228 : 810 - 815, 这里引作参考)载体。MCP-DAF P91203(B)表达载体使用腺病毒主要晚期启动子指导MCP-DAF蛋白质的表达并且适于COS-7中的瞬时表达和CHO中的永久表达。MCP-DAF pEE14表达载体中MCP-DAF蛋白质的表达是在巨细胞病毒启动子的控制下。这种载体适于永久CHO细胞系的建立其中MCP-DAF的表达能在高浓度蛋氨酸磺化亚胺的存在下扩增(M. I. Cockett et al, 上文)。

MCP-DAF表达载体能指导在氨基末端具有MCP序列且在羧基末端具有DAF序列融合蛋白质的表达。融合蛋白的MCP部分跨越在表达时34个氨基酸的信号肽被切除后，天然成熟的蛋白质的1至254位氨基酸。它含有4个SCR(1-4)区及ST区的前三个氨基酸。DAF部分包括正好在ST区后终止的成熟天然DAF蛋白质的细胞外域(4个SCR和1个ST区；氨基酸序号由1至324)。总之，MCP-DAF蛋白质是578个氨基酸长，预计分子量大约为70 kDa。但是由于它也含有4

个N-连接糖基化位点(3个在MCP内,1个在DAF内)和多个O-连接(DAF的ST区)糖基化位点,因此其实际分子量偏高。被MCP-DAF表达载体编码的重组嵌合蛋白被记作CAB-2。

C. MCP-MCP和MCP-1/2 MCP表达载体的构建

MCP-MCP和MCP-1/2 MCP表达载体的构建与MCP-DAF表达载体的构建相似,只是有些不同,如下文所说明的。

MCP-MCP表达载体

通过使用MCP-N4引物,5'--TCG ACC TGC AGG TGT GAG GAG CCA CCA ACA TTT--3' (SEQUENCE ID NO:5)为正向引物,MCP-UC1引物,5'--GCG AAT TCC TCA CAA ACT GTC AAG TAT TCC TTC CTC--3' (SEQUENCE ID NO:6)为反向引物的PCR技术合成MCP2片段。有一个加至MCP-N4引物5'端的PstI位点,并且后面紧跟新加入EcoRI位点的终止密码子被引入MCP-UC1引物的5'端。因此MCP2片段被5'端的PstI位点和3'端的EcoRI位点读框。MCP2定义编码相应于在跨膜区前被截短的成熟MCP蛋白质细胞外结构域氨基酸序列(氨基酸序号1至293)的区(核苷酸序号146-1024)。为完成MCP-MCP pG3N质粒的构建,用HindIII切割MCP-pG3N质粒,用Klenow片段末端补平,用PstI消化,最后与已用PstI限制酶切割的MCP2片段连接。新构建的MCP-MCP cDNA片段通过EcoRI消化,凝胶纯化回收并亚克隆到表达载体的EcoRI位点以完成MCP-MCP表达载体的构建。这些表达载体指导547个氨基酸长预计分子量大约70 kDa的MCP-MCP融合蛋白质的表达。由于其含有6个N-连接和多个O-连接糖基化位点,MCP-MCP蛋白质的实际分子量要较高一些。在两个MCP片段的连接外加入两个新氨基酸,半胱氨酸和精氨酸。

MCP-1/2 MCP表达载体

MCP-1 / 2 MCP表达载体的构建与MCP-MCP表达载体的构建相同，除去不同的正向引物，MCP-N 5，5' - TCG ACC TGC AGG AAG GTT TTG TGT ACA CCA CCT - - 3' (SEQUENCE ID NO : 7)，被用于1 / 2 MCP DNA区段的合成。1 / 2 MCP片段跨越核苷酸序号518至1024并编码定义MCP蛋白质SCR3，SCR4和S T区的氨基酸序列(氨基酸序号124-293)。MCP-1 / 2 MCP表达载体指导385个氨基酸长的MCP-1 / 2 MCP蛋白质的表达。MCP-1 / 2 MCP蛋白质有4个N-连接和多个O-连接糖基化位点，因此其实际分子量要高于预计的40kDa。

D. DAF-MCP表达载体的构建

用PCR技术来合成DAF DNA片段DAF1来构建用于遗传工程重组体DAF-MCP表达载体的DAF-pII S K质粒。使用了下面的引物：正向引物，DAF-N 2，5' - -CGG AAT TCC ATG ACC GTC GCG CGG CCG AGC GTG - - 3' (SEQUENCE ID NO : 8)和反向引物，DAF-C2R，5' - -ACC TGC AGG TTT TCC TCT GCA TTC AGG TGG T - - 3' (SEQUENCE ID NO : 9)。限制位点，EcoRI和PstI，被分别引入到DAF-N 2和DAF-C2R引物的5'端。DAF1包括DAF基因的核苷酸序号52至911，并编码相应于正好在S T区被截短的成熟DAF蛋白质细胞外结构区的氨基酸序列。

DAF-MCP pII S K质粒通过PstI-和SmaI处理的DAF-pII SK载体和用PstI处理过的MCP3片段的连接作用而构建。MCP3片段是PCR产物使用正向引物，MCP-4.2，5' - -TCG ACC TGC AGA GGA GCC ACC AAC ATT TGA AGC T - - 3' (SEQUENCE ID NO : 10)，一个PstI在5'端，和一反向引物，MCP-UC1，上文所说明的。DAF-MCP cDNA片段在用EcoRI切割，凝胶纯化后从DAF-MCP pII S K质粒中挽回，然后亚克隆到pEE14和P91023 (B) (Wong等，上文)表达载

体的EcoRI位点。

DAF-MCP表达载体指导546个氨基酸长的DAF-MCP蛋白质的合成。两个外源氨基酸，丝氨酸和苏氨酸由于载体构建被导入在DAF和MCP连接处。不考虑由于4个N-连接（一个在DAF中而三个在MCP中）和多个O-连接（位于MCP的ST区）的糖基化作用而增加的重量，这种蛋白质具有大约66 kDa的预计分子量。

E. 细胞培养和转染

根据生产者推荐的方案用lipofectin (GIBCO, Gaithersburg, MD) 进行COS-7细胞的转染。主要地，在转染的前一天：COS-7细胞以次日将以大约70至80%铺满的细胞密度在新的平皿（60mm）中传代培养。转染之前，用无血清opti-MEM培养基（GIBCO）将COS-7细胞洗涤两次。3 ml含5至10 μ g表达载体和20 μ g lipofectin的opti-MEM培养基被加到洗过的COS-7单层细胞中。转染在CO₂温育箱中在37℃下进行6小时。然后去除转染溶液并用10%胎牛血清，50 μ g/ml链霉素和50 U/ml青霉素补足的新鲜opti-MEM替换。然后被转染的细胞在无干扰下在37℃再温育三天。收集培养物上清液，并在进行生物活性评估前简单离心以去除死细胞。

CHO-K1 (ATCC No CCL 61) 被用来建立表达MCP-DAF, MCP-MCP, MCP-1 / 2 MCP和DAF-MCP永久细胞系。简要地说，除转染前细胞汇合大约20% CHO-K1细胞被使用上述lipofectin的表达载体转染，转染物在GMEM-S培养基（Glasgow MEN, 没有L-谷氨酰胺和tryptose磷酸盐肉汤，用10%透析的胎牛血清，非必需氨基酸，1 mM丙酮酸钠，60 μ g/ml L-谷氨酸，60 μ g/ml精氨酸，7 μ g/ml每种核苷，50 μ g/ml链霉素和50单位/ml青霉素补足）中培养。分离表达新蛋白质的转染物，并在增加了蛋氨酸磺化亚胺浓

度的GMEM-S培养基中传代培养。然后表达本发明蛋白嵌合物的CHO-K1克隆用两遍有限稀释克隆分离。含有由CHO-K1转染物衍生的产物表达载体的培养物上清液，即CAB-2蛋白，用下述方法纯化。

实施例2：用于大规模生产CAB-2的微载体培养物

用表达重组CAB-2蛋白的CHO-K1转染物细胞系改进微载体培养方法。

被转染CHO-K1细胞扩增并有限稀释克隆后，细胞初始培养于T形烧瓶中并在T形烧瓶中用10%胎牛血清(FBS)，丙酮酸钠，非必需氨基酸、谷氨酰胺、精氨酸、核苷、青霉素-链霉素，和蛋氨酸磺化亚胺补足的Pulbecco's改性的Eagle's培养基(DMEM)(选择培养基)中扩展。微载体培养物用外部装有Bellco顶部趋动高速搅拌装置，覆盖物气体入口和喷雾管的12-升Nalgene容器制备。以2.5 g/l使用Cultisphere-G微载体，并在使用前用PBS洗涤三次并用无血清IMDM洗涤一次。来自20个T150烧瓶的细胞用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤，用胰酶消化作用从平板上脱附，并以大约 1.0×10^4 个细胞/ml接种到12-升瓶中。使用的培养基是含有10%小牛血清和青霉素-链霉素的IMDM(生长培养基)。每2-3天，用培养基装填旋转瓶，使微载体沉淀，去除10升培养基，并用10升新鲜生长培养基替换。细胞密度通过计数细胞培养物样品中的细胞核而监测，这个方法包括用0.1M柠檬酸，0.1%龙胆紫溶液对微载体染色，接着在37℃保温1小时并用血细胞计计数。用Corning model 170血气相分析仪监测pH， pCO_2 ， pO_2 的值。使用40%氧气，5% CO_2 ，用 N_2 平衡的混合物，以10-50 ml/min的速度，通过玻璃喷嘴，保持氧浓度。

当培养物获得稳定细胞密度时(生长15-20天后，细胞密度

为 $3 - 10 \times 10^6$ 细胞/ml) 时, 开始生产阶段。通过用含有 1 mM 丁酸钠和青-链霉素的无蛋白生产培养基代替生长培养基而进行。在接下来的 10 - 14 天中, 每天用新鲜生产培养基替换 10 升培养基。收集上清液并在 4 °C 下保存直到培养终止。

典型的大规模培养的结果见图 4。发现在 15 天内细胞密度由 8×10^4 个细胞/ml 增至 8×10^6 个细胞/ml 的密度。生产阶段开始后, 12 天内细胞计数稳定下降。图 4 也说明了每一培养物采样中 CAB-2 蛋白的浓度。根据生产者的指导, 使用一个 0.45 微米滤柱 Pelicon 系统 (Millipore, Bedford, MA) 过滤条件培养基。然后用带有 10,000 分子量截留膜的 Pelicon 超滤系统将培养基浓缩 20 - 30 倍。培养基浓缩物存放于 70 °C 环境直至使用。

实施例 3 : CAB-2 从培养物上清液中的亲和纯化

小规模 CAB-2 蛋白质的纯化可通过使用抗 MCP 单克隆抗体, 例如 GB24 的免疫亲和色谱实现。抗体通过使用碳-琼脂糖凝胶 (Pierce, Cat, #20392G) 的糖基固定。产生的 CAB-2 重组 CHO 系的培养物上清液通过 3.5 ml GB24-琼脂糖凝胶树脂柱。柱子用 PBS 洗涤去除未结合蛋白质。用 0.1M, pH2.5 甘氨酸将 CAB-2 从柱上洗脱下来。收集级分并立即用 1/10 体积 1M pH8.5 的 Tris 缓冲液中和。合并含蛋白质的溶液, 在 PBS 中透析并浓缩。蛋白质在 10% 聚丙烯酰胺 SDS 凝胶上进行电泳 (见图 5)。测定到大约 110kDa 的单一蛋白质。这是基于减少的氨基酸序列和预计糖基化作用的所预期的 CAB-2 蛋白质的大小。

实施例 4 : CAB-2 自微载体培养物上清液中的层析纯化

建立 CAB-2 由无血清培养物上清液中纯化的 7 步方法, 并扩大规模至 100mg 规模。详细说明了纯化条件, 然后是回收结果和内毒素

减少水平（见图 6 和表 3，其说明了纯化程度及每一层析步骤后 CAB-2 的百分产率）。在表 3 说明的代表性纯化作用中，最终样品的纯度是大约 93%，内毒素水平 0.045 内毒素单位（EU）/mg CAB-2，总的 CAB-2 回收率为 24%。由于最后一步未说明的 CAB-2 损失，这种方法的回收率低。CAB-2 的回收率通常是 35-50%。

步骤 1：杂质沉淀

浓缩的条件培养基用 Q 琼脂糖凝胶平衡缓冲液（25mM 哌嗪，pH5.0）以 1:1 稀释，并且将 pH 调至 5.0。生成了细小的沉淀并用布氏（Buchner）漏斗通过沉淀吸附剂（Celite 621, Aldrich）过滤。

步骤 2：阴离子交换层析

将 Q 琼脂糖 FF 树脂（Pharmacia）装成 1.1 升柱（9.0×17.3cm）。树脂用 0.5N NaOH 去热源并用 25mM 哌嗪（pH5.0）平衡。由步骤 1 得到的合并滤液以每 ml 树脂 10 mg 总蛋白（TP）上柱。柱子用平衡缓冲液（25mM，pH5.0 哌嗪）洗涤去除杂质。然后柱子用 200mM NaCl 缓冲液洗脱，产生两个洗脱峰，第一个峰含有 CAB-2，第二个峰含有培养基有色添加剂（苯酚红）。

步骤 3：固定化金属亲和层析

装入 50 ml 床体积（2.2×13 cm）的螯合琼脂糖 FF（Pharmacia）。树脂用 0.5N NaOH 去热源并用 dH₂O 洗涤。树脂装载有 100ml 0.3M ZnCl₂，用 dH₂O 洗涤并用含有 0.2M NaCl 的 25mM pH6.0 的 MES 平衡。Q 琼脂糖合并液（由 Q 琼脂糖柱洗脱的含 CAB-2 蛋白质的材料）放入 25mM pH6.0 的 MES 中，并以每 ml 树脂 20 mg TP 上柱，速率为 150cm/hr。用平衡缓冲液洗脱，在流出液中收集 CAB-2。

步骤 4：苯基疏水性相互作用层析

290ml (4.4×19.1cm) TosoHaas Phenyl 650M HIC柱用0.5N NaOH去热源并用含有 3 M NaCl的25mM, pH7.0磷酸盐缓冲液平衡。由步骤 3 得到的流出合并液调成25mM, pH7.0的磷酸盐和 3 M NaCl溶液, 以每ml树脂3.5mg T P上柱。用平衡缓冲液洗脱, 用含 1 M NaCl的25mM, pH7.0的磷酸盐溶液洗脱。

步骤 5：丁基疏水性相互作用层析

含有TosoHaas Butyl 650M HIC树脂的110ml柱(3.2×13.7cm)用0.5N NaOH去热原并用含有 3 M NaCl的25mM, pH7.0的磷酸盐溶液平衡。由步骤 4 得到的洗脱合并液配成 3 M, pH7.0的NaCl溶液, 然后上柱。用平衡缓冲液洗柱。然后用含有 1 M NaCl的25mM, pH7.0的磷酸盐溶液洗脱CAB-2。

步骤 6：透滤并浓缩

由步骤 5 得到的洗脱合并液用Mini-ultrasette切向流系统由含10kDa MWCO Omega膜的Filtron浓缩 5 ~ 6 倍。合并液然后用 4 - 5 样品体积PBS透滤。

表 3 - CAB - 2 纯化方法 062194			
(用250mg于条件培养基中的CAB - 2 起始)			
步骤	纯度百分比 mg CAB-2/mg TP (x100)	总回收百分比*	内毒素水平 EU per mg CAB-2
起始培养基	1	-	-
1 - 杂质沉淀	1	110.1	72.34
2 - 阴离子交换	22	56.7	73.95
3-IMAC	16	43.2	109.71
4 - 苯基 HIC	42	40.7	27.60
5 - 丁基 HIC	49	38.9	7.61
6 - 过滤和浓缩	NA	NA	4.10
7 - 后 - 解毒凝胶	93	23.7*	0.05

步骤 7 : 内毒素去除及最终浓度

尽管苯基和丁基HIC步骤明显减少了样品中内毒素含量(见表 3), 样品要进一步通过Pierce内毒素亲和性树脂洗脱两次去热源。5 ml柱 (1 × 6 cm) 首先用 1 % 脱氧胆酸盐解吸内毒素, 然后用无内毒素PBS 平衡。在无菌PBS中CAB - 2 通过柱子。最后CAB - 2 用Amicon Centriprep 10 (先用 70 % 乙醇去热原) 浓缩。最终内毒素浓度是每mg CAB - 2 0.045 EU。

实施例 5 : 用ELISA测定CAB - 2

用抗膜辅因子蛋白质 (MCP) 和衰变加速因子 (DAF) 的抗体进行 ELISA测定。通过用可溶性MCP (sMCP) 对兔的免疫作用产生兔抗MCP 多克隆抗血清。IgG通过固定化蛋白质 A 亲和层析由抗血清中纯化。

将等份 (50 μ l) 多克隆抗MCP IgG以 2 μ g/ml 浓度加到 96 孔 ELISA 平板上, 平板在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜。用含 1% BSA, 0.1% Tween PBS 封阻平板后, 在封阻缓冲液中加入不同浓度纯化的 sMCP 或 CAB-2 蛋白质, 并在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。鼠抗-DAF 单克隆抗体 (BRIC 216, Harlan Bioproducts Cat. #MCA914) 以 1 μ g/ml 浓度加入并在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。HRPO-连接的羊抗鼠 IgG 三级抗体以 1:1000 稀释度加入并在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。加入酶底物 (TMB, Pierce Chemical Co., Rockford, IU Cat. #34021), 并用 2 M H_2SO_4 终止反应。在 ELISA 平板读数器上测定 OD₄₅₀ 值。图 7 的数据证明 CAB-2 蛋白质用两个抗体夹心 ELISA 测定, 表明该蛋白质表达 MCP 和 DAF 两个结构域。另一方面, 这种抗体的结合不能测定可溶的 MCP。

实施例 6: CAB-2 嵌合蛋白质辅因子活性的体外活性证明

按 Seya 等 (J. Exp. Med., 1986, 163: 837, 这里引作参考) 所说明的被进行因子 I 辅因子活性测定分析。1 mg/ml 纯化的人 C3 蛋白质 (Quidel, San Diego, AC, Cat. #A401) 与等体积 4 M KBr 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时以裂解内硫酯键。所得蛋白质 (iC3) 在磷酸盐缓冲盐水中透析过夜。等份 iC3 (8 μ l) 与 2 μ l 66 μ g/ml 纯化的因子 I (Quidel, San Diego, CA, Cat. #A411) 和 6 μ g 体积不同浓度纯化的缓冲液中 (1:6 稀释的 PBS, 0.5% NP-40) 的 CAB-2 或 sMCP 蛋白质混合。混合物在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 并通过加入等体积 SDS 样品缓冲液 (100mM Tris pH6.8, 20mM 二硫苏糖醇, 20% 蔗糖, 2% SDS, 0.01% 溴酚蓝) 使反应终止。样品煮沸 5 分钟, 并用标准方法 (Laemmli, U., 1970, Nature 227: 680) 在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。凝胶用 0.05% 考马斯蓝染色, 脱色并干燥, 用扫描密度仪 (XRS Omnimedia 扫描仪) 定量测得 iC3 α 链的裂解百

分率。图 8 的结果证明CAB-2 蛋白质具有与可溶MCP重组蛋白可比的因子 I 辅因子活性。

衰变加速因子活性

如下进行嵌合CAB-2 蛋白质衰变加速活性的测定。商售的用IgM, C 1 和 C 4 致敏的羊RBC (EAC14, Diamedix Cat #789 - 053) 被用作细胞膜沉积C4b源。RBC在缓冲液 (2.5mM佛罗那, 75mM NaCl, 0.15mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0.1%明胶, 2.5%葡萄糖) 中稀释至 2.5×10^8 /ml, 并在 30 °C 预保温 5 分钟。向细胞中加入相同缓冲液中稀释到 3.3 U/ml 的纯化的 C 2 (Quidel, San Diego, CA, Cat #A403) 并在 30 °C 保温 4 分钟。RBC立即用10mM EDTA缓冲液 (2.5mM佛罗那, 75mM NaCl, 0.1%明胶, 10mM EDTA) 洗涤并再悬浮于相同缓冲液中。等份致敏RBC (50 μ l) 被转移到含不同浓度 (50 μ l) 可溶DAF或CAB-2 蛋白质的试管中。让样品在 30 °C 衰变 15 分钟, 然后通过加入40mM EDTA缓冲液 (2.5佛罗那, 75mM NaCl, 0.1%明胶, 40mM EDTA) 中0.5ml荷兰猪补体 (1 : 50 稀释的血清) 扩大裂解位点。在 37 °C 保温 30 - 40 分钟后, 离心细胞并测定上清液OD₄₀₅。用标准表确定裂解位点/细胞的数 (Z), 并通过与阳性对照 (无DAF或CAB-2 的样品) 相比 Z 值的减少来测定衰变加速活性。图 9 的结果证明CAB-2 蛋白具有与sDAF可比的衰变加速活性。

补体介导的溶胞抑制, 经典激活

通过使用IgM致敏的绵羊RBC的溶血分析, 测定嵌合CAB-2 蛋白通过经典途径抑制补体介导的细胞溶胞的能力。100 μ l 等份的商售IgM致敏的绵羊RBC (Diamedix, Cat, #789 - 001) 加至以不同浓度溶于明胶佛罗那缓冲液 (GVB⁺) (Sigma, Cat. #G - 6514) 中的 50 μ l

纯化sMCP，纯化的sDAF或CAB-2蛋白质中。立即加入以1:50比例在GVB⁻²中稀释的人血清(50 μl)作为补体源。细胞在37℃保温30分钟，离心，上清液转移到多孔平板中。测量上清液OD₄₀₅值并测定每份蛋白质的溶血抑制作用。图10的结果说明尽管效力不同(IC₅₀分别为7000nM和100nM)，sMCP和sDAF能通过经典途径各自抑制补体介导细胞溶胞。当等摩尔量一起加入sMCP和sDAF两者时，它们加合的效力并不增加(IC₅₀为200nM)。相反，既具有辅因子又具有衰变加速活性的CAB-2抑制细胞溶胞的效力(IC₅₀为30nM)明显强于单独的sMCP(230倍)，单独的sDAF(3倍)，或两种因子的结合(6倍)。

补体介导溶胞抑制，旁路激活

通过旁路途径的补体介导细胞溶胞通过使用引起旁路途径补体激活的未致敏荷兰猪RBC测定。荷兰猪血液经肝素处理的注射器采集，并用PBS洗涤两次。RBC以 2×10^8 / ml的浓度再悬浮在测定缓冲液(含有8 mM EGTA和1.5 mM添加的MgCl₂的GVB⁻²)中。细胞(100 μl)与测定缓冲液中各种浓度的50 μl体积纯化的sMCP，sDAF或CAB-2混合。加入未稀释的人血清(50 μl)作为补体源。样品在37℃保温30分钟并离心。上清液转移到微滴度板上并测量其OD₄₀₅。结果见图11。发现sMCP抑制旁路途径介导的溶血作用的能力比其在经典溶血测定中的活性大(IC₅₀分别是350nM和7000nM)。但在这一测定中CAB-2蛋白质的抑制活性比sMCP和sDAF大(IC₅₀为100nM)。

C5a生成抑制

CAB-2补体抑制活性也可以由特异地测定通过C5a产生的C5转化酶的抑制分析来测定。以1:8在GVB⁻²中稀释的人血清被用作补体源。以不同浓度向血清中加入纯化的sMCP或CAB-2蛋白。通过加

入 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度热聚集兔IgG开始经典途径。在 37°C 保温1小时后，加入 100mM EDTA停止反应，通过使用商售的C5desarg药盒（Amersham, Cat #RPA520）的竞争注射免疫分析进行反应中C5a的检测。酵母聚糖诱导的C5a生成的结果见图12。CAB-2与sMCP相比更有效地通过旁路途径抑制C5a的生成（ IC_{50} 分别是 300nM 和 5000nM ）。

实施例7：CAB-2的药物动力学

在大鼠体中测定纯化的CAB-2蛋白质的药物动力学行为，并与sMCP相比较。腹腔内（i. p.）注射 $40\text{g}/\text{kg}$ 剂量的戊巴比妥钠麻醉重 $250-300\text{g}$ 的雌性Sprague - Dawley鼠。动物在股动脉和股静脉插入导管。通过静脉导管注射 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重剂量的溶于盐水的sMCP或CAB-2。注射后不同时间（ $T = 1、5、12、30$ 分钟，和1、2、3、4小时）通过动脉导管将等份（ $0.2-0.3\text{ml}$ ）血液采集入经肝素处理的注射器中并立即用等体积盐水取代。血样立即离心并去除血浆并冷冻。使用兔抗MCP多克隆抗体为捕获抗体，HRPO-连接抗MCP单克隆抗体（GB24）为第二抗体，通过ELISA测定血浆蛋白质水平。用纯化sMCP或CAB-2的标准曲线被用来定量血样中各个蛋白质的浓度。结果见图13。CAB-2的清除率明显比sMCP慢（ $T_{1/2\beta}$ 分别是560分钟和80分钟）。另外，由清除曲线下的区域面积测得的分配相血浆中重组蛋白质的损失在CAB-2（6%）情况下比sMCP（16%）小。增长的CAB-2在血浆中的延续时间使这种蛋白质成为更好的临床治疗的候选物。体内注射后CAB-2蛋白质的结构完整性通过使用 ^{125}I -标记的CAB-2而测定。i. v. 注射 ^{125}I -CAB-2后，在不同时间由鼠体获得等份血清。血清样品在10%聚丙烯酰胺SDS凝胶上电泳并自放射显影。CAB-2蛋白质显示在体内6小时后可测降解作用（图14）。

实施例 8：反向被动Arthus模型中CAB-2 的体内效能

i.p.注射40mg/kg戊巴比妥钠麻醉雄性荷兰猪(300-350g)。给动物i.v.注射20mg/kg剂量的卵白蛋白以及1 μ Ci¹²⁵I 标记的BSA。然后立即通过在背部i.d.注射10mg多克隆抗卵白蛋白抗体，该抗体或单独使用或与各种剂量CAB-2混合，来攻击动物。总的i.d.注射体积为100ml。三小时后，吸入CO₂杀死动物。摘取皮肤。通过5/8英寸活检打孔凿分离抗体攻击位点，并进行活检计数。炎症应答的抑制是¹²⁵I-BSA在用CAB-2其注射的位点的皮肤中的渗漏相对于不用CAB-2的位点相比较(每激发位点CPM)而测得。另一组动物在开始Arthus应答之前24小时i.p.注射200U/kg眼镜蛇毒因子进行预处理。这一处理导致动物的去补体作用，是这一模型的补体抑制效应的阳性对照。如图15所示，注射CAB-2以剂量依赖方式抑制反向被动Arthus反应。所发现的最大抑制作用可比于CUF预处理的情况。

其它实例

本发明嵌合蛋白类似物也在本发明领域之内。

优选类似物包括其序列只是由于保守氨基酸置换，优选只有一个、两个，或三个置换，而不同于野生型序列(即自然存在肽的同源部分的序列)的类似物。例如，用一个氨基酸取代另一个相似性质的氨基酸(例如用Val取代Gly，Arg取代Lys等)或通过不丧失多肽的生物活性的一个或多个非保守性氨基酸置换，缺失或插入。表2列出一些保守性氨基酸置换。

表 2
保守性氨基酸置换

被置换氨基酸	代码	取代所用氨基酸
丙氨酸	A	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
精氨酸	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
天冬酰胺	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
天冬氨酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
半胱氨酸	C	D-Cys, S-Me-Cys [†] , Met, D-Met, Thr, D-Thr
谷氨酰胺	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
谷氨酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
甘氨酸	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
异亮氨酸	I	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
异亮氨酸	L	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
赖氨酸	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
蛋氨酸	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
苯丙氨酸	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, or 5-phenylproline, AdaA, AdaG, cis-3,4, or 5-phenylproline, Bpa, D-Bpa
脯氨酸	P	D-Pro, L-I-thioazolidine-4-carboxylic acid, D-or L-1-oxazolidine-4-carboxylic acid (Kauer, U.S. Patent (4,511,390))
丝氨酸	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
苏氨酸	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
酪氨酸	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
缬氨酸	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG

序列表

(1) 一般信息 :

(i) 申请人 : Jone - Long Ko Paul J. Higgins C. Grace Yeh

(ii) 发明名称 : 封阻补体激活的嵌合蛋白

(iii) 序列数目 : 1 0

(iv) 联系地址 :

(A) 地址 : Fish & Richardson

(B) 街道 : 225 Franklin Street

(C) 城市 : Boston

(D) 州 : Massachusetts

(E) 国家 : U.S.A.

(F) 邮编 : 02110 - 2804

(v) 计算机可读形式 :

(A) 介质类型 : 3.5" Diskette, 1.44Mb

(B) 计算机 : IBM PS/2 Model 50Z or 55SX

(C) 操作系统 : MS - DOS (Version 5.0)

(D) 软件 : WordPerfect (Version 5.1)

(vi) 本申请数据 :

(A) 申请号 : 还未获得

(B) 申请日 : 1994. 9. 22

(C) 分类 :

(vii) 优先申请数据 :

(A) 申请号 : 08 / 126, 596

(B) 申请日 : 1993. 9. 24

(viii) 代理人信息：

(A) 姓名： Paul T. Clark

(B) 登记号： 30, 162

(C) 参考/摘要号： 06180 005001

(ix) 电信信息：

(A) 电话： (617) 542 - 5070

(B) 电传： (617) 542 - 8906

(C) 用户电传： 200154

(2) 序列ID NO. 1信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 24

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑结构： 线性

(xi) 序列说明： SEQ ID NO : 1

GGAATTCGCA TGGAGCCTCC CGGC

24

(2) 序列ID NO. 2信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 27

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑结构： 线性

(xi) 序列说明： SEQ ID NO : 2

CTATGAGGCA CTGGACGCTG GAGTTT

27

(2) 序列ID NO. 3信息：

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 39

(B) 类型 : 核酸

(C) 链型 : 单链

(D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 3

CCTCTAGAGT CGACTGACTG TGGCCTTCCC CCAGATGTA

39

(2) 序列ID NO. 4信息 :

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 45

(B) 类型 : 核酸

(C) 链型 : 单链

(D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 4

TCTAGAGCAT GCGAATTCTC AACGGGTAGT ACCTGAAGTG GTTCC

45

(2) 序列ID NO. 5信息 :

(i) 序列特征 :

(A) 长度 : 33

(B) 类型 : 核酸

(C) 链型 : 单链

(D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 5

TCGACCTGCA GGTGTGAGGA GCCACCAACA TTT

33

(2) 序列ID NO. 6信息 :

(i) 序列特征 :

- (A) 长度 : 36
- (B) 类型 : 核酸
- (C) 链型 : 单链
- (D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 6

GCGAATTCCT CACAACTGT CAAGTATTCC TTCCTC

36

(2) 序列ID NO. 7信息 :

(i) 序列特征 :

- (A) 长度 : 33
- (B) 类型 : 核酸
- (C) 链型 : 单链
- (D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 7

TCGACACCA CCT

33

(2) 序列ID NO. 8信息 :

(i) 序列特征 :

- (A) 长度 : 33
- (B) 类型 : 核酸
- (C) 链型 : 单链
- (D) 拓扑结构 : 线性

(xi) 序列说明 : SEQ ID NO : 8

C GGAATTCCA TGACCGTCGC GCGGCCGAGC GTG

33

(2) 序列ID NO. 9信息 :

(i) 序列特征 :

- (A) 长度 : 31

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑结构：线性

(xi) 序列说明：SEQ ID NO : 9

ACCTGCAGGT TTCCTCTGC ATTCAGGTGG T

31

(2) 序列ID NO. 10信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：34

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑结构：线性

(xi) 序列说明：SEQ ID NO : 10

TCGACCTGCA GAGGAGCCAC CAACATTGA AGCT

34

说明书附图

补体激活的调节

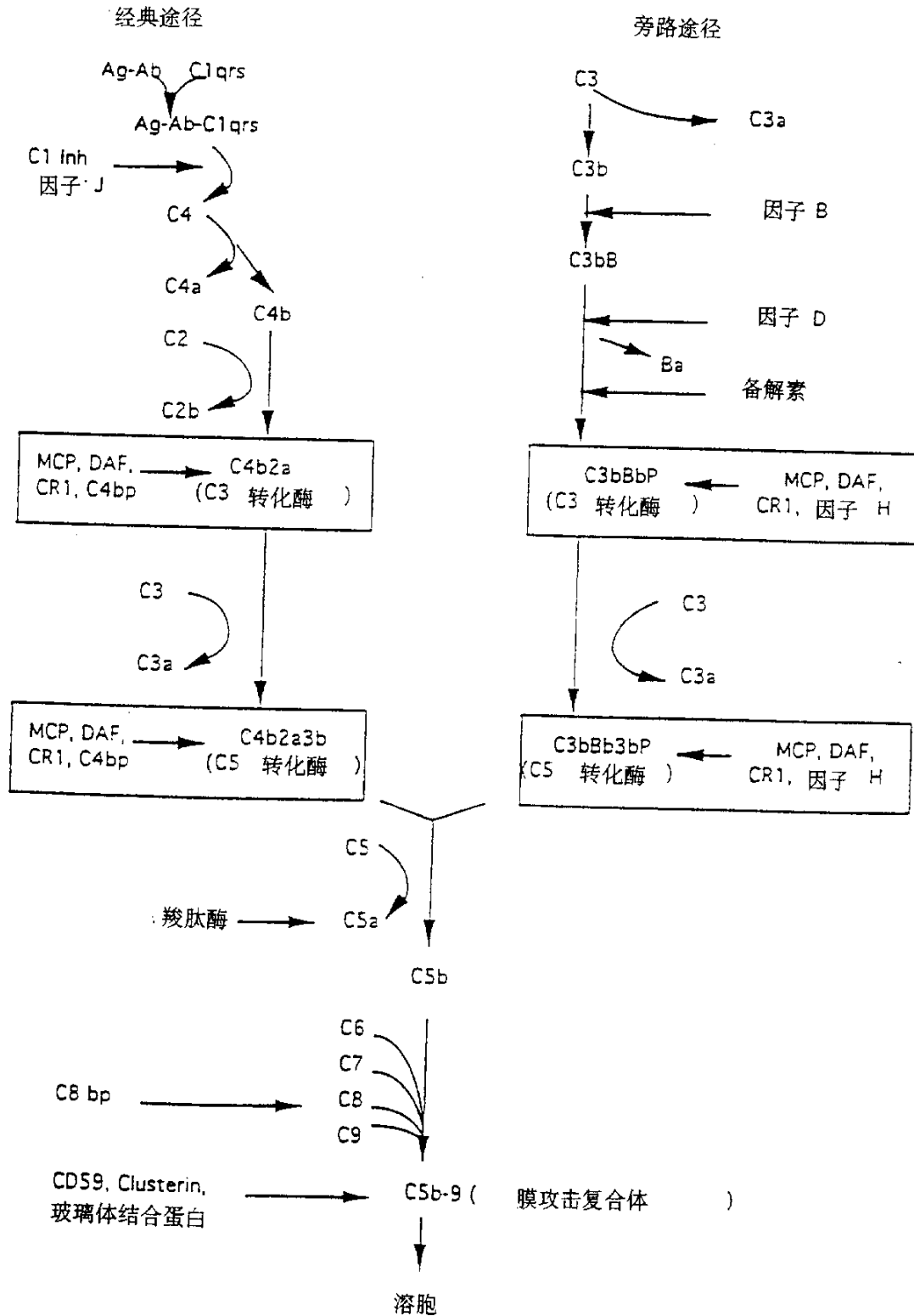
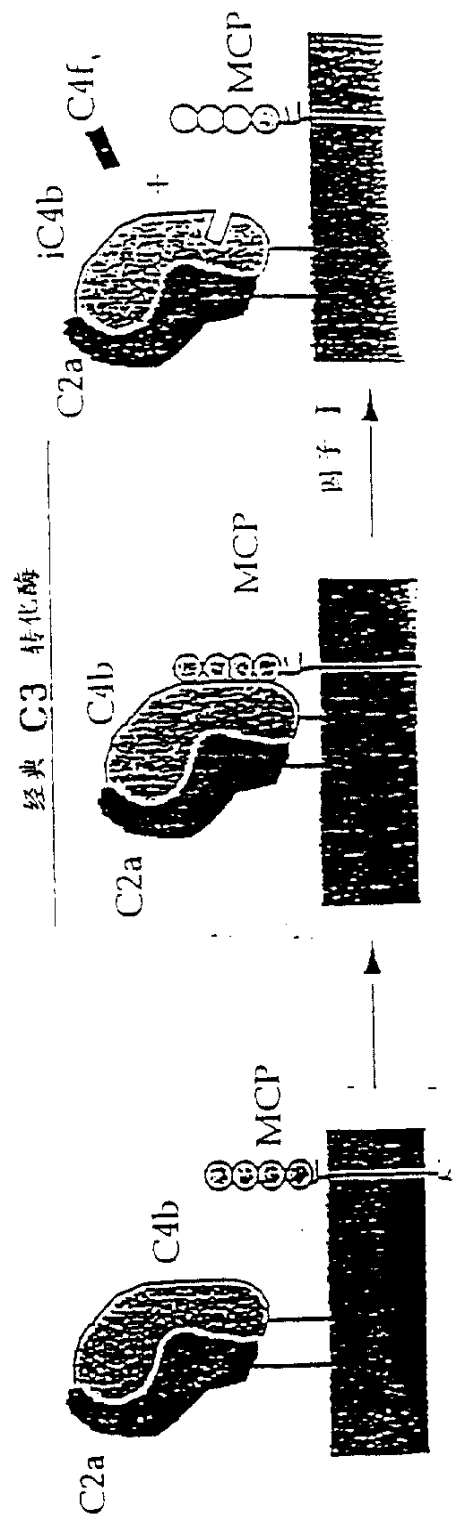
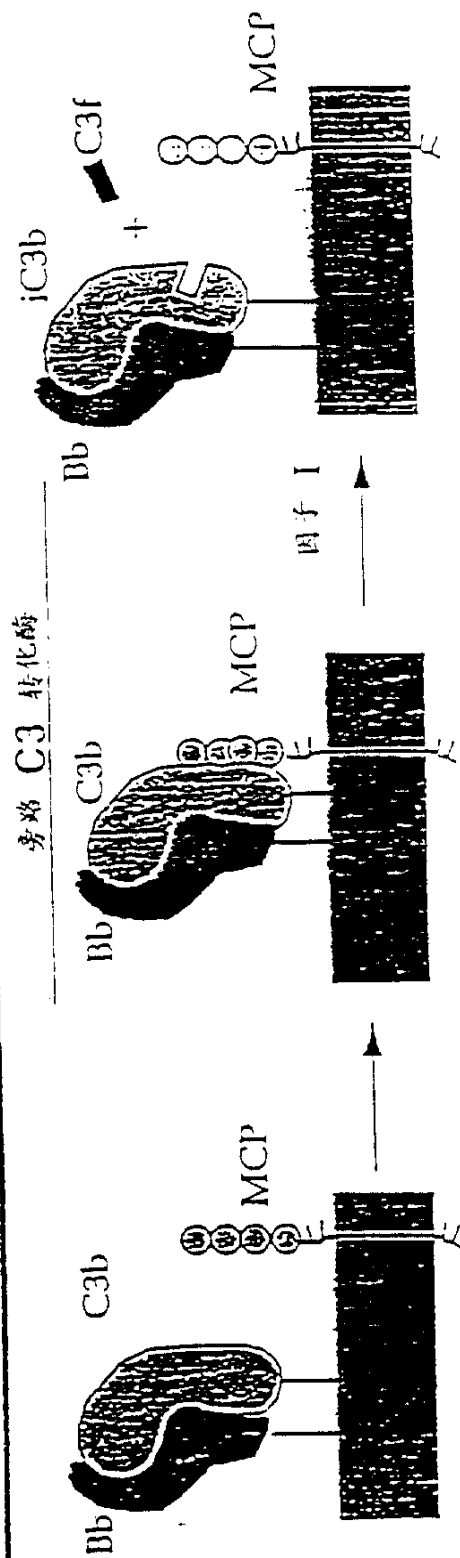


图 1

图 2

辅因子活性



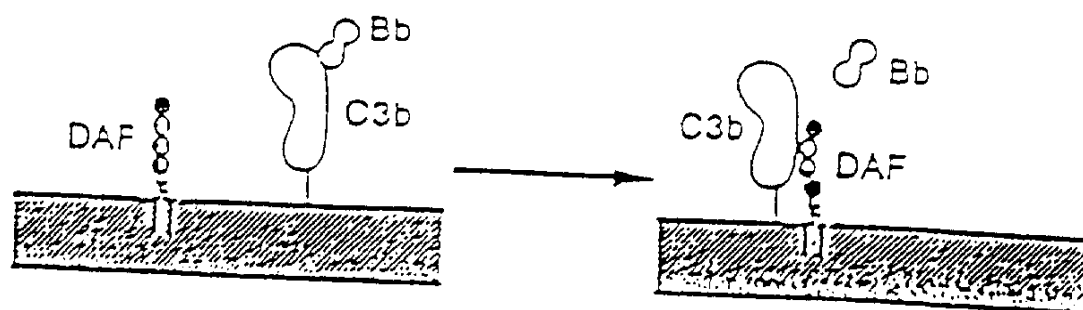


图 3

五轮实验的 CAB-2 微载体

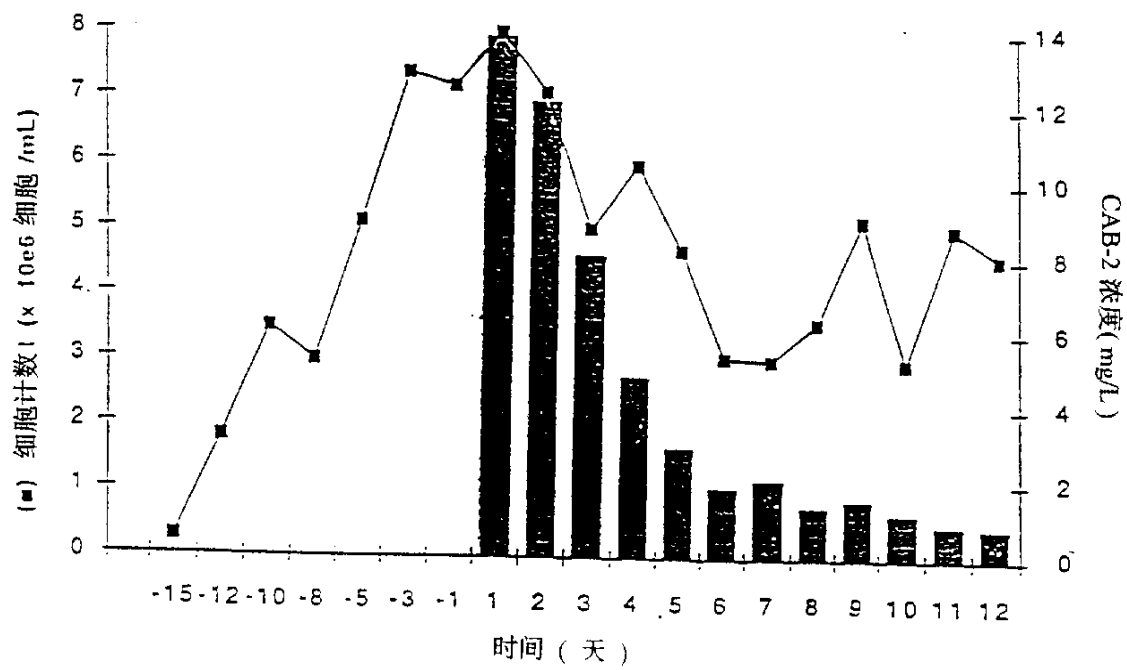


图 4

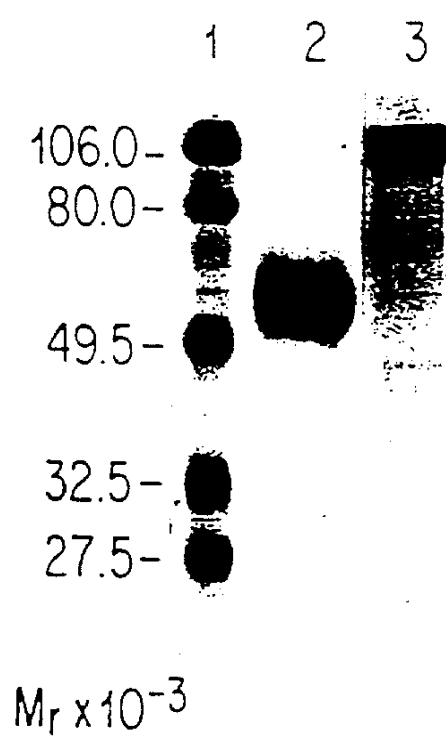


图 5

微载体生产CAB-2：7步纯化

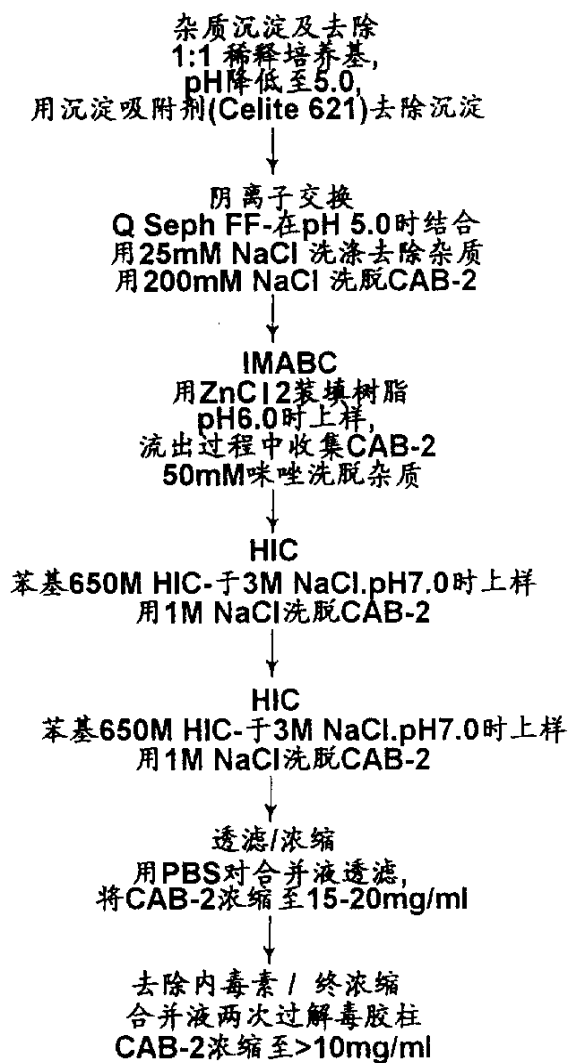


图 6

酶联免疫吸附试验
抗 MCP 多克隆捕获抗体
抗 DAF 单克隆第二抗体

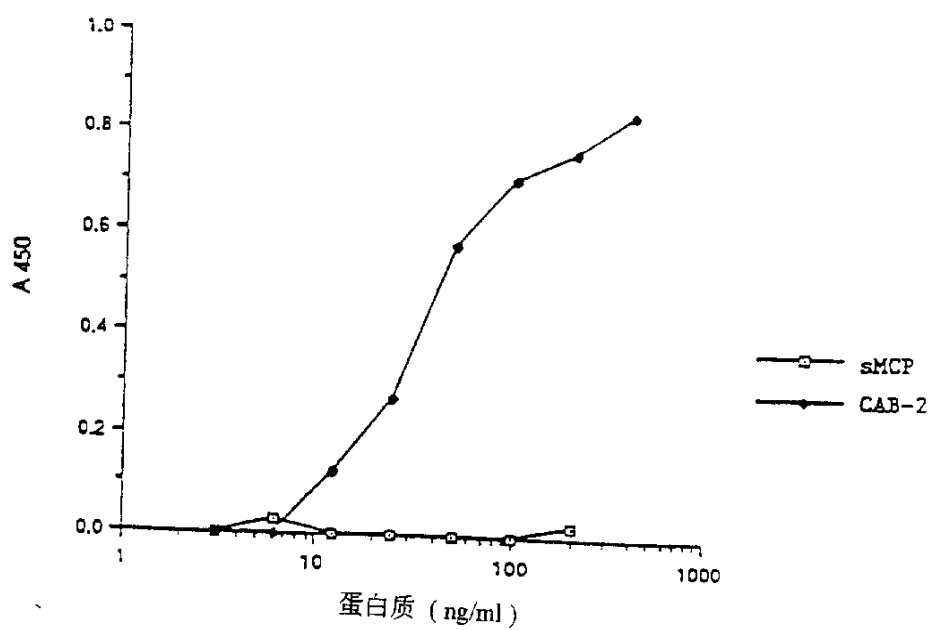


图 7

辅因子试验
sMCP 和 CAB-2 比较

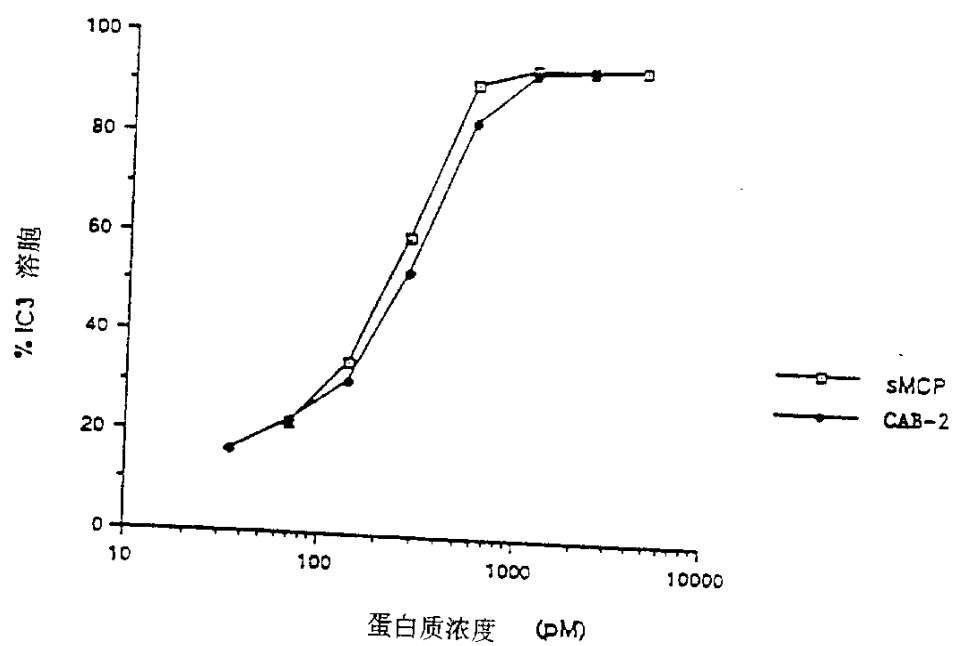


图 8

衰变加速因子试验
sDAF 和 CAB-2 之比较

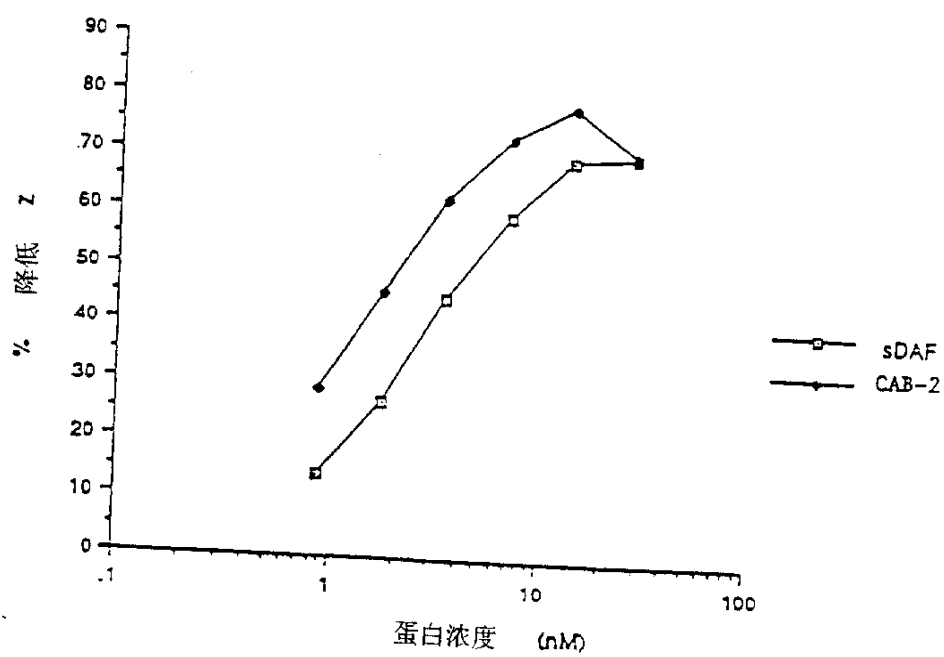


图 9

羊 RBC 溶胞试验
 $sMCP$, $sDAF$, $sMCP + sDAF$ 和 CAB-2 之比较

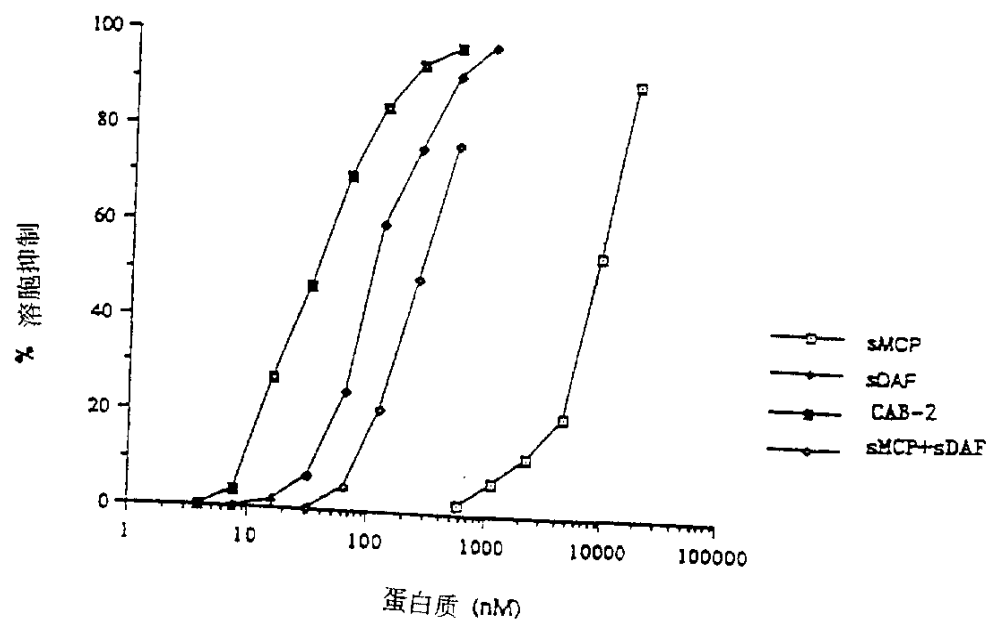


图 10

豚鼠 RBC 溶胞试验
sMCP, CAB-2 和 sDAF 之比较

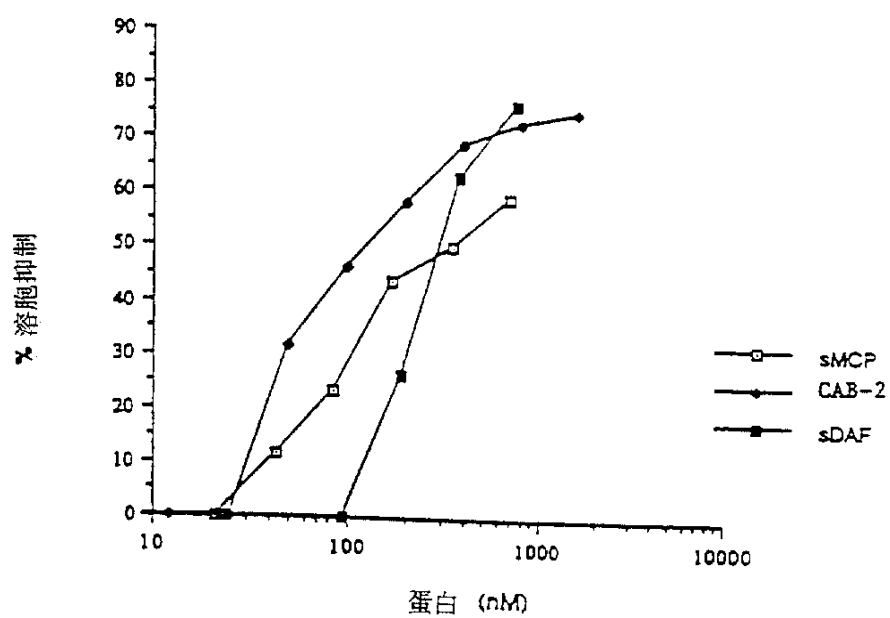


图 11

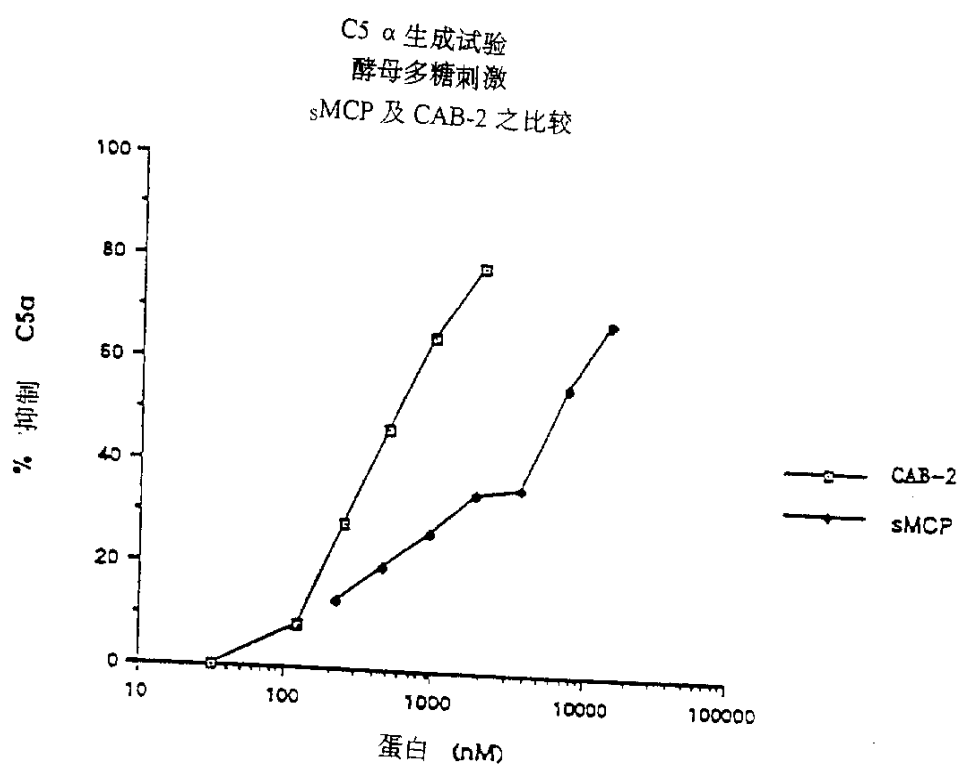


图 12

药代动力学
sMCP 和 CAB-2 之比较

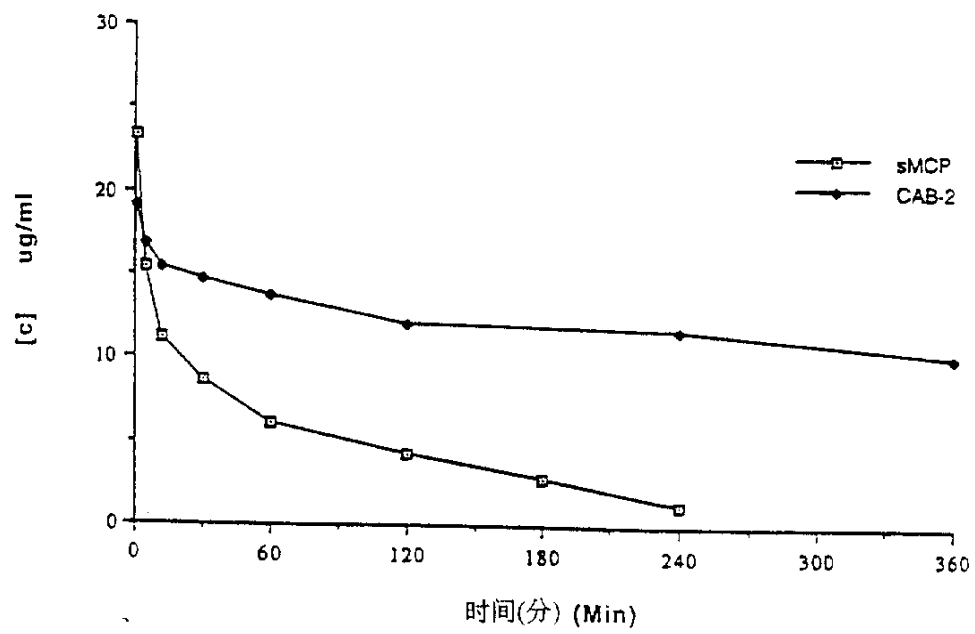


图 13



图 14

反相被动 Arthus 反应
内皮 CAB-2 之效应

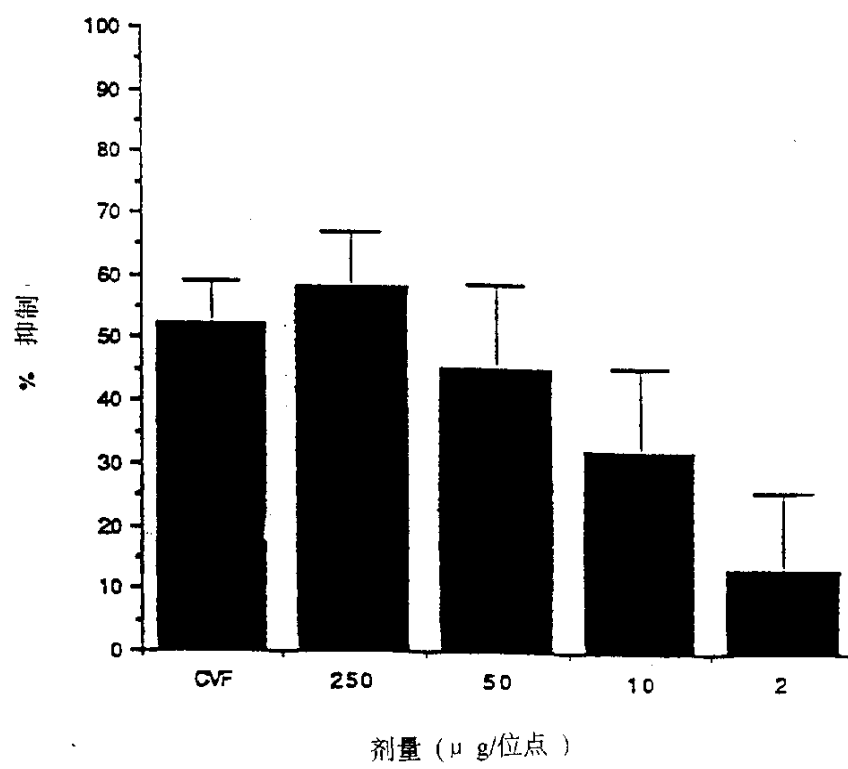


图 15