



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93109046.6

[51]Int.Cl⁵

C12P 21/00

[43]公开日 1994年12月28日

[22]申请日 93.6.21
 [71]申请人 索马公司
 地址 美国加利福尼亚州
 [72]发明人 G·蒂奥芬 L·S·格林纳
 A·霍维茨

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 汪 洋

C12N 15/13 C12N 15/63
 A61K 37/02

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 BPI-免疫球蛋白融合蛋白质

[57]摘要

本发明公开了新的杂交融合蛋白质，在其氨基末端包含有杀菌/通透性增强蛋白质或其生物学活性片段，并在其羧基末端包含至少一种免疫球蛋白重链恒定区，该蛋白质可用于治疗细菌感染。还公开了编码这些蛋白质的DNA序列，产生这些蛋白质的重组方法以及含有该重组产物的药物制剂。

权 利 要 求 书

1、一种杂交融合蛋白质，在其氨基末端包括有杀菌／通透性增强蛋白质或其生物学活性片段，并且在其羧基末端含有免疫球蛋白重链的至少一个恒定区或其等位基因变体。

2、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，它包含有两个免疫球蛋白重链恒定区。

3、根据权利要求2的杂交融合蛋白质，其中所说的两个免疫球蛋白重链恒定区是C H₂ 和C H₃ 区。

4、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，在融合体的杀菌／通透性增强蛋白质和免疫球蛋白部分之间还包含免疫球蛋白铰链区。

5、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，其主要由有杀菌／通透性增强蛋白质的起始 191 个氨基酸氨基末端残基组成。

6、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，其主要由杀菌／通透性增强蛋白质的起始 199 个氨基酸氨基末端残基组成。

7、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，其主要由杀菌／通透性增强蛋白质的起始 176 个氨基酸氨基末端残基组成。

8、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，其中在所说杀菌／通透性增强蛋白质中第 132 位的半胱氨酸残基被另一个氨基酸取代。

9、根据权利要求8的杂交融合蛋白质，其中所说的在杀菌／通透性增强蛋白质第 132 位的半胱氨酸残基被丙氨酸取代。

10、根据权利要求1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 的杂交融合蛋白质，其含有人蛋白质序列。

11、根据权利要求1的杂交融合蛋白质，其为单二聚体形式的。

1 2、根据权利要求 1 的杂交融合蛋白质，其中所说的免疫球蛋白重链的恒定区选自由 IgG，IgA 和 IgM 免疫球蛋白组成的一组中。

1 3、一种编码杂交融合蛋白质的 D N A 序列，在杂交融合蛋白质的氨基末端带有一个杀菌 / 通透性增强蛋白质或其生物学活性片段，并在其羧基末端含有免疫球蛋白重链的至少一个恒定区或其等位基因变体。

1 4、根据权利要求 1 3 的 D N A 序列，其包含编码两个免疫球蛋白重链恒定区的 D N A 序列。

1 5、根据权利要求 1 4 的 D N A 序列，其包含编码 CH₂ 和 CH₃ 重链恒定区的 D N A 序列。

1 6、根据权利要求 1 3 的 D N A，其包含编码从 B P I 的起始 176 个氨基末端残基到杀菌 / 通透性增强蛋白质的起始 199 个氨基末端残基的编码区。

1 7、根据权利要求 1 3 的 D N A，其包括编码杀菌 / 通透性增强蛋白质起始 191 个氨基末端残基的编码区。

1 8、根据权利要求 1 3 的 D N A，其包含编码杀菌 / 通透性增强蛋白质的起始 199 个氨基末端残基的编码区。

1 9、一种含有权利要求 1 3 之 D N A 之序列的 D N A 载体。

2 0、根据权利要求 1 9 的 D N A 载体，其选自下列一组载体：
pING 4512 (ATCC 75239)，pING 4514 (ATCC 75240)，pING 4515 (ATCC 75241) 和 pING 4517 (ATCC 75242)。

2 1、一种宿主细胞，该细胞已用权利要求 1 3 的 D N A 序列以允许在所说宿主细胞中表达由该序列编码的融合蛋白质的方式稳定地转化或转染。

2 2、一种根据权利要求 2 1 的原核宿主细胞。

2 3、一种根据权利要求 2 1 的真核宿主细胞。

2 4、一种根据权利要求 2 1 的具有保藏登记号 ATCC CRL 11042 的宿主细胞。

2 5、一种根据权利要求 2 1 的具有保藏登记号 ATCC CRL 11043 的宿主细胞。

2 6、一种根据权利要求 2 1 的具有保藏登记号 ATCC CRL 11044 的宿主细胞。

2 7、一种生产杂交融合蛋白质的方法，该融合蛋白质在其氨基末端包含杀菌/通透性增强蛋白质或其生物学活性片段，在其羧基端包含免疫球蛋白重链的至少一个恒定区或其等位基因变体，所说的方法包括

使权利要求 2 1 的宿主细胞在合适的培养基中生长；和

从所说宿主细胞或所说培养基中分离所说的杂交融合蛋白质。

2 8、一种药物组合物，其含有权利要求 1 的杂交融合蛋白质和药学上可接受的稀释剂、佐剂或载体。

2 9、一种治疗人体内细菌感染、内毒素血症、脓毒血症等的方法，包括使用有效量的权利要求 2 8 的药物组合物。

说明书

BPI-免疫球蛋白融合蛋白质

本发明是 1992 年 5 月 19 日申请的共同待批美国专利申请 No. 07/885,911 的后续申请。

本发明总的来说涉及用于治疗人体细菌感染的重组杂交融合蛋白质,编码这种蛋白质的DNA顺序,制备该蛋白质的重组方法,和含有该重组产物的药物制剂。本发明的杂交融合蛋白质是编码杀菌/通透性增强蛋白质或其生物活性片段的 DNA 和编码一个或多个免疫球蛋白重链恒定区之 DNA 的直接转录融合的表达产物,该融合体已经被掺入到合适的质粒载体中并转染或转化到宿主细胞中。重组产生的 BPI-免疫球蛋白融合蛋白质表达产物(以下称为“rBPI-Ig”)可用作内毒素结合蛋白和杀菌剂。

杀菌/通透性增强蛋白质(以下称为“BPI”)是一种与细菌脂多糖(以后称“LPS”)的脂A部分结合的阳离子蛋白质。BPI 蛋白质与细菌 LPS 的结合可以增强敏感性革兰氏阴性细菌的包膜通透性 [Ooi, et al., J. Biol. Chem., 262:14891 (1987)]。BPI 也与可溶性 LPS 结合。通过酸提取并结合离子交换层析或大肠杆菌 (*E. coli*) 亲和层析已从多形核中性白细胞(以下称为“PMNS”)中分离出人 BPI 蛋白质 (Elsbach, et al., J. Biol. Chem., 254:11000 (1979); Weiss, et al., Blood, 69:652 (1987))。

从人 PMNs 中分离的完整 BPI 蛋白质对革兰氏阴性细菌具有广谱的强杀菌活性 (Elsbach, et al., J. Biol. Chem., 254:11000 (1979))。这种抗菌活性似乎与分离的人全 BPI 蛋白质的氨基末端区

有关。相反，分离的人 BPI 蛋白质的 C - 末端区只表现出少许可检测出的抗菌活性 (Ooi, et al., J. Exp. Med., 174:649 (1991))。已经克隆出编码 BPL 的人 DNA, 并推断出所编码蛋白质的氨基酸顺序 (Gray et al., J. Biol. Chem., 264:9505-9509 (1989); 美国专利 No. 5,198,541)。

免疫球蛋白包括一个具有许多相似结构但重要结构不同的蛋白家族, 这些不同的重要结构导致不同的抗原结合特性和其他生物学活性。例如, IgG 同型抗体具有最长的血清半衰期并且易于穿过胎盘。最强的抗病毒活性与 IgA 同型抗体有关; 而 IgM 同型抗体具有最大的抗菌效率 (Stites, et al., Basic and Clinical Immunology, P. 32 (Appleton & Lange, 6th ed. 1987))。在免疫球蛋白家族中的每个抗体同型中还存在着几种亚类和异型变异体 (文献同上)。

所谓“免疫球蛋白基因总家族”的成员一般都具有细胞外区, 该区域的特征在于因二硫桥键形成而成多个环。这种成环出现在免疫球蛋白分子的重链恒定区中 (命名为 CH1, CH2, CH3 和 CH4)。也存在具有与免疫球蛋白总家族成员中的多成环区同源的多成环区的非免疫球蛋白化合物, 这些化合物中的某些已被称为“粘着物” (如参见 PCT 申请 No. Wo 89102922, 公布于 1989 年 4 月 6 号; Capon et al., Nature, 337:525-531 (1989))。

对于本发明特别有意义的报告是重组合成包括以粘着物部分为融合的第一成份和以免疫球蛋白重链恒定区作为融合的第二成份的杂交融合蛋白质。例如 Harris, Eur. J, Biol. Chem. 194:611 - 620 (1990) 和 Capon et al., (文献同上) 中叙述了 CD4/IgG 融合的形成。这种分子的结构设计基本原理是基于下述发现, 即融合的粘着成

份具有与免疫球蛋白成份相似的结构，并且可望能以与免疫球蛋白成份的结构互补的方式折叠。如 Gascoigne, et al., P.N.A.S. (USA), 84:2936-2940 (1987) 中叙述了重组嵌合 T 细胞受体 - 免疫球蛋白蛋白质。还参见 Mariuzza, et al., J. Biol. Chem., 264(13):7310-7316 (1989); Goverman, et al., Cell 60:929 - 939 (1990); Grcgoine, et al., P.N.A.S. (USA), 88:8077 - 8081 (1991); Bismuth, et al., Molecular Immunol., 27(11):1127-1136 (1990) (叙述了类似的 T 细胞受体 - 免疫球蛋白融合)。还报道了一种可溶性 CD44 - 免疫球蛋白融合蛋白质 (Aruffo, et al., Cell 61:1303-1313 (1990))。

Ashkenazi 等人 (P.N.A.S. (USA), 88:1035 (1991)), 报道了使用作为肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗剂的嵌合免疫 - 粘着蛋白质 (一种粘着物的变体) 防止内毒素性休克。该文报道的 TNF 拮抗剂是一种杂交融合蛋白质，其中 TNF 受体 (TNFR) 蛋白质的细胞外部分融合到人 IgG 重链的恒定区上。据报道这种 TNFR - IgG 融合体可以结合并阻断 TNF 对放线菌素 D 处理之细胞的细胞毒作用，并且在内毒素之前使用它可以提供抗内毒素攻击的保护作用。

上述的所有融合蛋白显然都包括了在细胞表面以整合膜蛋白形式表达的分子，并且除 CD44 和 TNF 受体之外，它们还具有免疫球蛋白基因总家族的结构特征。

已公开的 PCT 申请 WO 92/03535 报道了 BPI 的氨基末端部分与编码 IgG 恒定区的 cDNA 相融合的结构。尽管如此，该报道还没有说明怎样制备这种蛋白 - cDNA 结构，而且也没有教导怎样构建许多其他类型的 BPI-Ig 融合体。

本发明提供了用于治疗细菌感染及其后遗症的新的杂交融合蛋白质。还提供了编码这种蛋白质的 DNA 顺序，制备该蛋白质的重组方法，和含有该重组产物的药物制剂。

根据本发明的一个方面，所提供的杂交融合蛋白质在其氨基末端含有杀菌/通透性增强蛋白质或其生物活性片段，它融合到形成融合蛋白质之羧基末端的免疫球蛋白重链或其异型变体的至少一个恒定区上。

在本发明的一个优选方案中，该融合蛋白质的免疫球蛋白重链恒定区部分含有重链恒定区的两个区，且最优选的是 CH₂ 和 CH₃ 区。本发明的融合蛋白质在免疫球蛋白和 BPI 区之间还具有一个免疫球蛋白绞链区。

用于形成本发明杂交蛋白质的免疫球蛋白重链恒定区可以属于任何同型，但最好是以 IgG、IgGA 或 IgM 同型或这些同型的异变体为基础的。

在本发明的此优选方案中，杂交融合蛋白质的氨基末端片段包括成熟人 BPI 蛋白质的 176 至 199 个起始氨基末端残基。而且，融合蛋白质的 BPI 部分可以包含一个 BPI 类似物，其中在天然 BPI 序列 132 和 135 位之一或两者的半胱氨酸被另一个氨基酸取代，较好是被丙氨酸和丝氨酸取代。如果以重组方法制备时，则以单体或同型二聚体的形式分离融合蛋白质。

根据本发明的另一个方面，提供了编码上述杂交融合蛋白质的 DNA 序列。还提供了包括这种 DNA 序列的自动复制 DNA 质粒载体，以及用该 DNA 序列以允许其表达的方式稳定转化或转染的宿主细胞。优选能最大程度表达蛋白质产物的 DNA 掺入到 rBPI - Ig 融合载体

中。本发明的转化的宿主细胞适用于大量生产融合蛋白质的方法中，该方法包括在一种合适的培养基中培养宿主使之生长，并从细胞或其生长培养基中分离蛋白质。

本发明还提供了含有本发明的杂交融合蛋白质和药学上可接受的稀释剂、佐剂及载体物的新的药物组合物。该组合物本身可用于治疗革兰氏阴性细菌感染及其并发症，包括内毒素性休克以及与之相关的一种或多种疾病如弥散性血管内凝血、贫血、血小板减少症，白细胞减少、成人呼吸窘迫症、肾衰竭、高血压、发烧及代谢性酸中毒。将BPI 蛋白质或蛋白质片段或类似蛋白质作为融合的一部分与免疫球蛋白 (Ig) 重链恒定区融合，其提供了 Fc 受体结合、与 LPS 的双价结合、补体结合及增加胎盘穿透能力等潜在优点。

在制备药品级 BPI 产物过程中所遇到的问题形成可降低产物均一性及活性的宏观颗粒。因此，优选的含 rBPI-Ig 融合蛋白质的药物组合物包含组合的 Poloxamer (聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物) 表面活性剂和 (聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯) 表面活性剂。有关这种结合的教导可参见未决待审的 Mc Gregor 的美国专利申请 No. 08/012,360，这种结合在稳定药物活性多肽抗颗粒形成方面具有协同作用。最优选的组合中 rBPI - Ig 融合体以 1mg/ml 的浓度存在于枸橼酸缓冲盐溶液中 (0.02 M 枸橼酸盐，0.15M NaCl, PH5.0)，并含有 0.1% 重量比 Poloxamer 188 (Pluronic F-68, BASF Wyandotte, Parsippany, NJ) 和 0.002% 重量单位的聚山梨醇酯 80 (吐温 80, ICI americas Inc., Wilmington, DE)。

在考虑到下文对本发明优选实施方案所作详细描述的情况下，本领域中的熟练技术人员可以显而易见地认识到本发明的许多其他方面

内容和优越性。

图 1 显示了对含有本发明融合蛋白质的柱洗脱物所作 SDS-PAGE 分析的结果。

图 2 和 3 显示可溶性的、重组产生的 BPI (“rBPI”) 和 rBPI-Ig 与 LPS 的结合。

图 4 显示固相化的 rBPI - Ig 与可溶性 LPS 的结合。

图 5 显示本发明产物对 E. coli J5 细胞的杀菌活性。

图 6 和 7 显示用羊抗人 γ 过氧化物酶测定的本发明产物与 U937 细胞的结合。

图 8 显示本发明产物与 U937 细胞表面的不同结合情况。

图 9 显示 rBPI(1-199) - Ig 融合蛋白质和 rBPI(1-199) 与 ^3H 肝素的结合。

图 10 显示 ^{125}I rBPI(1-199) - Ig 融合蛋白质和 ^{125}I rBPI(1-199) 在大鼠体内的血清清除情况。

图 11 显示涉及 rBPI(1-199) 和 rBPI (1-199) - Ig 融合蛋白质的 LAL 抑制检测的结果。

下面详细描述本发明 BPI - Ig 融合蛋白质生产。更具体地说，实施例 1 涉及构建表达本发明各种 rBPI - Ig 融合蛋白质的 DNA 序列。实施例 2 涉及将实施例 1 的 DNA 导入到宿主细胞中并表达所编码的蛋白质。实施例 3 涉及产生、扩大生产、并分离本发明的融合蛋白质。实施例 4 提供了本发明融合蛋白质的免疫学和活性特征。实施例 5 提供了本发明融合蛋白质的特性，包括结合特性、药物动力学特性和体内性质。

实施例 1

构建 rBPI - Ig 表达载体

A. 构建用于表达包括 IgG 区的 rBPI - Ig 融合蛋白的载体

构建用于表达杂交融合蛋白的几个载体.这些融合蛋白一般包括编码 BPI 部分的 DNA 与人免疫球蛋白 $\gamma - 1$ 重链恒定区 (IgG, HC; Fc 区) 的一个或多个区域的直接转录融合体。这些载体中 BPI 和 IgG 编码序列间连接点的确切位置各不相同。

基于起初制备的用于表达免疫球蛋白重链基因的载体 (例如, pING 2227) 构建本文所述的用于在哺乳动物细胞中表达 rBPI - Ig 融合蛋白的质粒载体。有关构建 pING 2227 的描述可参见 Robinson et al., *Hum. Antibod. Hybridoma* 2:84-93, (1991)。该载体包含下述特征性结构: 小鼠免疫球蛋白重链增强子成份, 来源于小鼠 Abelson 病毒 DNA 的 LTR 增强子-启动子, 所要表达之基因 5' 末端的 Sv40 16S 切接点, 以及在 3' 末端的人基因组 $\gamma - 1$ 多聚腺苷酸化序列。该载体具有可以插入所要表达之基因的 SalI 和 SstII 克隆位点。该载体还含有一个在 SV40 早期启动子控制下的可选择标志 (neo), 以及用于在大肠杆菌中生长所必需的 pBR322 序列。衍生于 pING2227 的载体 pING2237N 含有一个在独特 AatII 位点处被导入到衍生于 pBR322 的 pING2227 序列中的唯一 NotI 位点。pING2237N 并不含有所说的 neo 可选择标志基因, 而是含有一个如 Simonsen 等人 (*P. N. A. S. (USA)*, 80:2495-2499 (1983)) 所述的改变了的小鼠二氢叶酸还原酶 (“DHFR”) 基因序列。用于下述某些 rBPI - Ig 构建的质粒 pMB27 基本上相同于 pING2237N, 其中结合了一个对嵌合 H65 的重链编码区具有特异性的 DNA 插头, 后者是一个抗由小鼠

可变区和人 IgG1 恒定区组成的 CD5 的抗体。

用表达载体 pING4503 作为编码重组表达产物的 DNA 的一个来源，所说的重组表达产物被命名为“rBPI(1-199)”，即一个具有如 SEQ ID Nos: 1 和 2 中所列出的成熟人 BPI 之 N 末端 31 残基信号序列和前 199 个氨基酸的多肽，不同的只是在 151 位的缬氨酸以 GTG 表示而不是 GTC，且 185 位残基是谷氨酸（由 GAG 表示）而不是赖氨酸（由 AAG 表示）。本文定名的 BPI 产物“rBPI(1-199)”以往称为“rBPI-23”，并且全 rBPI 蛋白质以前被称为“rBPI-50”（如参见 Gazzano - Santoro, et al., *Infection and Immunity*, 60: 4754 - 4761 (1992)、共同申请人的未决待审美国专利申请 No. 07/885,911)。将 pING4503 中的 BPI 编码 DNA 插入到该载体中的独特 SallI 和 SstII 位点中。质粒 pING4503 除了以一个 gpt 可选择性标志代替 DHFR 以外，基本上是与 pING 2237N 相同的。

设计两个载体，质粒 pING4511 和质粒 pING4512，用于使编码 LBPI 的 30bp 5' 非翻译区、信号序列和前 191 个氨基酸的 DNA 在读码内以平头接点与 IgG HC DNA 序列相融合。

1. 构建 pING4511

为了构建 pING4511，用 AlwNI 切割质粒 pING4503，并用 T4 DNA 聚合酶将其末端填成平头，然后再用 SallI 切割此 DNA。所得到的约 700 bp SallI/平头 DNA 片段包含有 30 bp 5' 未翻译序列和编码 BPI 之信号及前 191 个氨基酸的 DNA，并用凝胶纯化该片段。使用下列引物从质粒 pMB27（如上所述）中 PCR 扩增 IgG HC 序列：

(1) 设计具有序列 5'-CGTATGGCCAGCACCTGAACTCCT-3' (SEQ. I.

D. NO.3) 的引物 CH2-MscI, 以用于进行上链扩增, 并在扩增的 CH2 区之 5' 端导入一个 MscI 位点 (IGGCCA)。

(2) 设计具有序列 5'-GAGGGCTTTGTTGGAGA-3' (SEQ. I.D. NO.4) 的引物 KAQ - γ^3 , 以用于从 pMB27 中 IgG HC 的 SstII 位点序列下游 (3') 开始下链扩增。

使用 GeneAmp PCR Kit 药盒 (Perkin - Elmer Cetus, Norwalk, CT) 按照厂商提供的程序完成 PCR 扩增。典型的 PCR 扩增反应运行 30 个循环, 包括在 94 °C 下变性 1 分钟, 在 55 °C 下退火 2 分钟, 在 72 °C 下延伸 3 分钟, 最后在 72 °C 下延伸 10 分钟。用 MscI 和 SstII 消化用上述引物扩增的 DNA, 并凝胶纯化所产生的约 1856p 片段。该片段的 5' (平头) 端被设计为相当于紧接在铰链区之后的位于 IgG HC 之 CH₂ 区 5' 端的序列 "PAPELL....." (SEQ ID NO:5); 3' 端则与 CH₂ 区内的独特 SstII 位点相对应。将此片段与 SallI/平头 BPI DNA 片段 (如上述) 一起连接到来源于 pMB27 的 SallI/SstII 消化的载体片段中, 以产生质粒 pING4511。测定 pING 4511 中平头 BPI-IgG 连接处的序列后, 发现 MscI 位点没有被消化, 并因而可知融合蛋白质的 IgG 部分与 BPI 部分不在同一的翻译阅读框架中。因此不用该质粒转染哺乳动物细胞, 但用它作为下述其他载体构建中的片段来源。

2. 构建 pING4512

使用与构建 pING4511 所用方法相似的方法构建 pING4512, 包括将编码 30 bp 5' 未翻译区的 DNA 序列、信号序列和 BPI 的前 191 个氨基酸与 IgG HC 序列融合, 后者还包括 IgG HC 的铰链区。

使用引物 KAO γ 3 和具有序列：5'-CAGTTTAAACTCACACATGCCACC-3' (SEQ. I.D. NO.6) 的引物 CH2-ZC-Dra 对来源于 pMB27 的 IgG 部分进行 PCR 扩增，并设计为在扩增片段的 5' 端导入一个 DraI 位点 (TTTAAA)。用 DraI 和 SstII 消化扩增的 PCR 片段，并凝胶纯化所产生的约 210 bp 的片段。将此片段的 5' (平头) 末端设计为与序列 "KTHTCPPC……" (SEQ. I.D. NO.7) (也即 IgG 重链铰链区的上游 4 个残基) 相对应；3' 端则与 CH₂ 区中的独特 SstII 位点相对应。然后将此片段与来源于 pING 4503 的约 700 bp SallI/平头 BPI 片段 (如上述) 一起连接到来源于 pMB27 的 SallI/SstII 切割的载体上以产生 pING 4512。根据对 pING 4512 中平头 BPI-IgG 连接点的序列测定，发现 DraI 位点没有被消化。该 IgG 部分与 BPI 部分位于同一的阅读框架中，并且在 BPI 和 IgG HC 间的连接处插入了编码氨基酸 Gln - Phe 的序列 5'-CAGTTT-3'。质粒 pING 4512 已寄存于美国典型培养物保藏中心，12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA。保藏日期 1992 年 5 月 12 日，登记号 ATCC 75239。

3. 构建 pING 4514 和 pING 4515

构建两个 rBPI - IgG 融合载体，即质粒 pING 4514 和 pING 4515，它们都含有融合到 IgG 序列上的 30 bp 5' 未翻译序列、信号序列和人 BPI 的起始 199 个氨基末端氨基酸。使用位于成熟 BPI 序列前 199 个氨基酸内的引物 BPI-5: 5'-AGCTTCCCAGTTCAG-3' (SEQ. I. D. NO.8) 和与 BPI 片段序列的 3' 端相对应的 (也即穿过残基 199 的) BPI-11: 5'-TATTTTGGTCATTACTGGCAGAGT-3' (SEQ. I.

D. NO.9) 在 pING 4503 内对 BPI 片段 DNA 插入物的 3' 端进行 PCR 扩增来完成对上述两个载体的构建。用 Bst BI (载体中唯一的 BPI 编码区中的一个位点) 切割所产生的 PCR 片段, 然后纯化该代表通过氨基酸 199 的 BPI 氨基末端片段之 3' 端的 100bp DNA 片段。为了构建 pING 4514 (它代表了 BPI 片段 DNA 与不带免疫球蛋白铰链区之 IgG HC 的融合), 将下列 3 个片段连接在一起: 100bp BstBI/ 平头 BPI 3' 末端片段、来源于 pING 4511 的 MscI-SstII IgG HC 片段和来源于 pING 4511 的 BstBI - SstII 载体。质粒 pING 4511 已寄存于美国典型培养物保藏中心, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA, 保藏日期 1992 年 5 月 12 日, 登记号 ATCC 75240。为了构建 pING 4515 (代表 BPI 片段 DNA 与包括铰链区之 IgG HC 序列的融合), 将下列 3 个片段连接在一起: 100bp BstBI/ 平头 rBPI(1-199) 3' 端片段; 来源于 pING 4512 的 DraI/ SstII IgG HC 片段和来源于载体 pING 4511 的 BstBI - SstII 片段。质粒 pING 4515 已寄存于美国典型培养物保藏中心, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA, 保藏日期 1992 年 5 月 12 日, 登记号 ATCC 75241。

4. 构建 pING 4528

构建一个 BPI - IgG 融合载体, 其中 BPI 信号序列置于 rBPI 的残基 61-191 (也即缺失成熟 BPI 的 1-60 位残基) 的编码区之前, 并且与编码 IgG HC 之铰链 -CH₂ -CH₃ 区的 DNA 融合。为了获得编码 BPI 信号序列的片段, 用 EagI 消化一种含有与 pING 4503 中相同的 BPI DNA 插入物的质粒 PIC110, 该质粒分别在 5' 和 3' 端带

有 SallI 和 SstII 位点，并已克隆到 pT7T3 18U (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 的 SmaI 位点中。用 T4 DNA 聚合酶将该末端修成平头，再用 SallI 消化该 DNA。对产生的大约 123 bp SallI/平头片段（代表 30 bp 的 5' 未翻译 DNA 和 BPI 信号序列）进行凝胶纯化。用质粒 pING 4512（如上述）获得一个含有融合到 IgG HC 序列上的 BPI 残基 61-191 之编码区的片段。用 EcoRI 消化 pING 4512 以在编码残基 60-61 (Glu - Phe, GAATTC) 的区域切割该 BPI 序列。这样产生一个 46p 的 5' 突出端：AATT。为了使该片段的 5' 端变成平头，并且使之在读码内以残基 61 位 (Phe, TTC) 开始，只在脱氧三磷酸腺苷存在的情况下用 T4 DNA 聚合酶填充下链的 3' 缩入端，而留下一个 2 碱基对 5' 突出端 AA。用绿豆核酸酶处理以去掉 5' 突出端，产生所需平头。用 DraIII（位于 3' 聚腺苷酸化区中的唯一位点）从载体中切下包括某些 3' 旁侧载体序列的所需 rBPI - Ig 编码 DNA 片段。对所产生的平端 /DraIII 1963 bp 片段进行凝胶纯化。然后连接下列 3 个片段以构建 pING 4528：约 123 bp SallI /平端 BPI 信号序列片段，含平端 /DraIII rBPI - Ig 的片段，和来源于 pING 4506（基本上相似于上述 rBPI 表达载体 pING 4503，但含有一个 gpt 标志）的 SallI/DraIII 载体片段。

5. 构建其他载体

上述的载体 pING 4511, pING 4512, pING 4514 和 pING 4515 均含有小鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因作为选择标志。可构建含有 rBPI - IgG 融合和其他可选择标志的相似载体。例如，pING 4529 含有一个与 pING 4512 所含插入物相同的 DNA 插入物，但该

载体含有 *gpt* 选择标志而不是 DHFR。

使用本文所述的方法可以构建其他的可在哺乳动物细胞中表达的载体（代表编码 BPI 序列之 DNA 与编码 IgG 重链序列之 DNA 的融合）。例如，融合的 BPI 部分可以包括 BPI 序列的任何部分缺失，而不是上述的特定缺失。另外，BPI 序列的部分又可以是被取代、改变或突变的，或者是利用它们的组合。IgG 部分可由重链恒定区序列的任何部分组成。

B. 构建载体以用于表达包括 IgM 区的 rBPI - Ig 融合蛋白质

使用含有在 pBR 322 中克隆的人 IgM 重链基因组 DNA 的质粒 pJB 123 作为 IgM HC 恒定区 DNA 序列的来源。从 EMBL 数据库中获得人 IgM HC 恒定区的 DNA 序列，登录号 X14940。从 pJB 123（得自 P.Leder）中切下一个 1672 bp PstI 片段，并将其亚克隆到质粒 pTTT3 18U (Pharmacia) 的 PstI 位点中，以产生质粒 pICI09。切下的 PstI 片段包括 IgM HC 的部分 DNA 序列，该序列从正好在 CH₂ 区之前的内含子的 3' 端开始，并延伸到位于 IgM 序列的 CH₄ 区和第一膜外显子之间内含子中。切下的 PstI 序列还进一步编码外显子，以编码 IgM HC 的 CH₂，CH₃ 和 CH₄ 区，包括干扰序列。按下述方法获得用于构建 rBPI - Ig M 融合载体的部分 Ig M DNA 序列。用 PstI 切割质粒 pICI09。用 T4 DNA 聚合酶将末端修成平头，然后用 BanI 切下插入物的 3' 端。用凝胶纯化所产生的 1456 bp 片段。该片段的 5' 平头包括一个额外的 GTG，用于编码缬氨酸，它位于 CH₂ 外显子的编码区之前。因 BanI 在该片段的 3' 端消化，而将 DNA 在位于 CH₄ 外显子末端的终止密码子上游切掉 11 个碱基对。为了

再构建 CH₄ 的 3' 端并置入一个 SstII 位点以有利于克隆到哺乳动物表达载体中，合成两个互补的寡核苷酸：具有序列 5'-GCACCTGCTACTGACCGC-3' (SEQ. I. D. NO.10) 的“IgM - BS 接头”和具有序列 5'-GGTCAGTAGCAG-3' (SEQ. I. D. NO. 11) 的“IgM - SB 接头”。使这两个寡核苷酸退火，产生一个带 BanI 和 SstII 粘性末端的小接头片段。为了得到最后的表达载体，将平端/BanI IgM 片段 (含 CH₂, CH₃ 和 CH₄ 区) 和 BanI/SstII 接头片段与 100bp Bst BI/平头 BPI 3' 末端片段 (如上文 3, A 部分中所述) 一起连接到来源于 pING 4506 的 Bst BI - SstII 载体片段上，其中 pING 4506 是一个结合有特异性限定信号肽的 DNA 插入物和 rBPI (1-199) 残基并且包括 gpt 选择基因的表达载体。所得到的载体被命名为 pING 4517。质粒 pING 4517 已寄存于美国典型培养物保藏中心，12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA, 保藏日期 1992 年 5 月 12 日，登记号 ATCC 75242。

C. 构建用于表达 rBPIala¹³²-Ig 融合蛋白质的载体

构建含有 BPI N 末端片段的表达载体，其中第 132 位残基的半胱氨酸被丙氨酸取代。重组产生的这种类型的类似物一般命名为“rBPIala¹³²”，而含有这种类似物并已融合到免疫球蛋白重链恒定区的融合蛋白质一般定名为“rBPIala¹³²-Ig”。构建用于表达 rBPIala¹³²-IgG 融合蛋白质的三个载体，其中融合蛋白质的 rBPIala¹³² 部分包含 BPI N 末端的前 191 或 176 个氨基酸 (分别命名为“rBPI(1-191)ala¹³²-Ig”和“rBPI(1-176)ala¹³²”。

1. 构建 pING 4531

为了获得含有已融合到 IgG 重链恒定区上之“rBPI” (1-191) ala¹³²的 pING 4531, 首先构建质粒 pING 4519。有关 pING 4519 的构建在共同申请人的未决待审美国专利申请 No. 08/ 013,801 (Theofan) 中已作了详细描述。简言之, 就是使用只在编码 rBPI (1-191) 的 DNA 中出现过一次并位于 132 和 135 位半胱氨酸残基之间的 PvuII 位点 (CAGCTG) 构建 pING4519。用 Sall 和 SstII 消化 pING 4530, 以获得编码 BPI (1-199) 片段并包括一个 31 氨基酸信号序列的 DNA, 其中 pING 4503 是一个含有位于特有 Sall 和 SstII 位点之间的 BPI (1-199) 片段、小鼠免疫球蛋白重链增强子成份、来源于 Abelson 小鼠白血病病毒 (A-MuLv) DNA 的 LTR 增强子-启动子成份, 位于待表达基因 5' 端的 SV40 19 S/16S 切接接头, 和位于待表达基因 3' 端的人基因组 γ -1 聚腺苷酸化位点的载体。

纯化含有 BPI(1-199) 的 Sall - SstII 片段并用 PvuII 消化, 产生一个大约 529 bp 的 Sall - PvuII 片段和一个大约 209 bp 的 PvuII - SstII 片段, 然后分别纯化这两个片段。

质粒 pING 4519 含有一个 BPI编码插入物, 其中 132 位编码半胱氨酸的密码子被该位点编码丙氨酸的密码子所取代。为了造成这一取代, 使用引物 BPI-6, AAGCTTGTGCGACCAGGCCTTGAGGT (SEQ ID NO. 12) 和 BPI-14, CTGGAGGCGGTGATGGTG (SEQ ID NO. 13) 对上述 BPI 编码序列进行 PCR 扩增, 其中所说的引物已掺入了编码 132 位丙氨酸所必需的碱基取代。使用 Gene Amp PCR 药盒 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), 按照厂方推荐的程序完成 PCR 扩增。用 Sall 消化所产生的 PCR 片段得到一个 526 bp Sall 平端片段, 将该片段

与上述的大约 209 bp 的 PvuII - SstII 片段和用 Sall - SstII 消化 pING 4503 所得到的大载体片段相连接, 以产生 pING 4519。

用 AlwNI 消化 pING 4519, 用 T4 聚合酶处理, 并用 Sall 消化产生一个含有 rBPI(1-199)ala¹³² 之残基 (1-191) 的约 700 bp 片段, 从而构建成有意义质粒 pING 4531。然后, 用 DraI 和 DraIII 消化 pING 4512, 产生一个大约 1565 bp 片段, 它含有融合蛋白质的免疫球蛋白部分和额外的下游载体序列。最后, 用 DraIII 和 Sall 消化 pING 4513, 并纯化含有 gpt 标志的大载体片段。连接上述的 3 个载体片段产生 pING 4531。

2. 构建 pING 4534 和 pING 4535

质粒 pING 4534 含有 BPI - Ig 融合体, 该融合体包含一个截短形式的 rBPI, 其中包括 BPI N 末端的起始 176 个氨基酸, 并且其中存在有 132 位丙氨酸对半胱氨酸的取代 (命名为 "rBPI" (1-176) ala¹³²)。另外, pING 4534 只含有 IgG 重链的 CH2 和 CH3 区。为了获得截短的 rBPI(1-176)ala¹³² 类似物, 用 BstBI 消化编码 rBPI (1-199) 的 DNA, 以在 167 位氨基酸之后切断之。使用两个已退火的互补寡核苷酸, BPI-24, 5'-CGAAACAAGATGAACAGCCAGGTCTGCCGAG-3' (SEQ ID NO: 14) 和 BPI-25, 5'-CTCGCAGACCTGGCTGTTTCATCTTGTTT-3' (SEQ ID NO: 15) 取代额外的 BPI 序列 (即 168 - 176 位氨基酸)。

连接下列片段以构建含有编码 rBPI(1-176)ala¹³² - Ig 融合蛋白质之 DNA 的载体 pING 4534: 来源于含有全部载体序列和编码 rBPI (1-176)ala¹³²DNA 之 pINF 4531 的 SstII - BstI 片段, 来源于 pING 4511 的大约 186 bp MscI - SstII 片段和经退火

BPI-24 和 BPI-25 所产生的 BstBI 平头片段。

质粒 pING 4535 除还含有一个免疫球蛋白铰链区外与 pING 4534 相同。使用下列 3 个片段构建质粒 pING 4535 含有 SstII - Bst BI 载体和来源于 pING 4531 之 BPI 的片段，来源于 pING 4512 的约 210 bp 的 DraI - SstII 免疫球蛋白编码片段，和通过退火 BPI - 24 和 BPI - 25 所产生的 BstBI 平头片段。

D. 构建用于表达 rBPI - Ig 融合蛋白质的最佳载体

1. 构建具有最佳表达所需之成份的含 rBPI 的载体

构建含有适于最佳表达 rBPI - Ig 融合蛋白质所需之 DNA 序列的质粒。为了完成此过程，使用以前公开于共同申请人 (Theofan 等人) 的未决待审美国专利申请 No. 08/013,801 中的几个质粒作为最佳表达融合蛋白质所需成份的来源。这种所需成份包括但不限于最佳化 Kozak 翻译起始序列和小鼠轻链转录终止序列。

质粒 pING 4533 含有 rBPI (1-199)ala¹³²，它带有一个起始 ATG，与相符 Kozak 翻译起始序列 GCCACCRCCATGG (SEQ ID NO: 16) [Kozak, Nucl. Acids Res., 15:8125 (1982)] 相连。使用已在 BPI 信号的 - 27 位 ATG (蛋氨酸) 之前掺入 SalI 限制性位点和核苷酸 GCCACC 的 PCR 引物 BPI-23 : ACTGTCGACGCCACCATGGCCAGGGGC (SEQ ID NO: 17) 和与 rBPI (1-199) 编码序列之 3' 端相对应的引物 BPI -2 : CCGCGGCTCGAGCTATATTTTGGTCAT (SEQ ID NO: 18)，从含有全长度 BPI cDNA [在 pGEM - 7zf(+) 中] 的质粒进行 BPI 序列的 PCR 扩增而制得该载体。

用 Sall 和 EcoRI 消化约 700 bp PCR 扩增的 DNA, 并纯化所得的包含大约前 3 个 BPI (1-199) 编码序列的 270 bp 片段。将 Sall - EcoRI 片段连接到两个其他片段上: (1) 来源于 pING 4519 的 420 bp EcoRI - SstII 片段, 它编码 BPI (1-199) 的剩余部分, 其中在 132 位丙氨酸取代半胱氨酸; 和 (2) 来源于 pING 4502 的约 800 bp SstII - Sall 载体片段 (一个基本上相似于 pING 4503 的载体, 不同的是它不含有 30 bp 5' 未翻译序列并且具有一个 gpt 标志而不是 DHFR 标志), 以产生含有 gpt 标志的 pING 4533。

还构建另一个载体系列, 这些载体含有在构建用于最佳化表达基因产物的含 BPI - Ig 融合体之载体过程中所用的成份。这些载体以 pING 4537 为基础, 后者是一个与 pING 4533 基本相似的载体, 但它含有人轻链聚腺苷酸化序列和小鼠轻链转录终止序列而不是 pING 4533 中的人重链序列。从 pING 3170 中获得小鼠 κ 3' 序列, 该载体编码人轻链 cDNA 并包含小鼠基因组轻链 3' 转录终止序列。完成这一过程需要用 SstI 消化, 切下小鼠轻链终止密码子的 35 bp 下游, 用 T4 DNA 聚合酶处理以造成平头, 然后用 BamHI 切割, 并纯化包括小鼠 κ 3' 序列的约 1350 碱基对片段。所得到的片段包括大约 250 bp 的人轻链恒定区 cDNA 的 3' 部分和聚腺苷酸化信号, 后接如 Lui 等人在 J. Immunol. 139: 3521 (1987) 中所述称为 $\Delta 8$ 构件的 BamHI 接头。该约 1350 碱基对片段的剩余部分包括一个 BglII - BamHI 小鼠 κ 3' 基因组片段, 即 Xu 等人在 J. Biol. Chem., 261 : 3838 (1986) 中所述的 "D" 片段, 并且由它提供转录终止序列。此片段可用于与下述来源于 pING 4533 的两个片段进行的三段连接 —— 3044 碱基对片段, 它包括所有的 BPI 插入物和经

用 SstII 消化、T4 聚合酶处理及 NotI 消化获得之载体的一部分，以及一个约 4574 bp 的 BamHI - NotI 片段。所产生的载体 pING 4537 除了上述的在基因组 3' 未翻译区中的差异外，基本相同于 pING 4533。

使用 pING 4537 作为 κ 3' 片段的来源构建含 κ 3' 未翻译序列的其他载体。用 XhoI（它在紧跟 BPI 终止密码子之后的特有 XhoI 位点切割）和 BamHI 消化 pING 4537 并分离这样的片段。将产生的约 1360 bp XhoI - BamHI 片段用于一系列的 3 片段连接以产生两个载体，这两个载体在信号序列的 -27 位残基处都含最佳化 Kozak 翻译起始序列。其中的第一个载体 pING 4543 含有 gpt 标志，并可通过将来源于 pING 4223 的 4574 bp BamHI - NotI 片段与大约 3019 bp 的含 NotI - XhoI BPI 插入物的片段及 pING 4537 XhoI - BamHI 片段相连接而得到。第二个载体 pING 4146 含有 DHFR 标志，并可通过将 pING 4222 约 4159 碱基对的 BamHI - NtoI 片段与约 3019 碱基对的含 pING 4223 NotI - XhoI BPI 插入物的片段及 pING 4537 的 XhoI - BamHI 片段相连接而得到。

2. 构建用于表达 rBPI - Ig 融合蛋白质的载体

构建含有编码 rBPI - Ig 融合蛋白质之 DNA 的表达载体，它包含上部分所述质粒最佳化表达融合蛋白质所需的成份。

这些载体中的第一个载体 pING 4156 包含如 pING 4512 中的相同 BPI 编码区，并可使用来自下列三个其他构造的载体片段构建而成：

1) 来源于 pING 4143 的 270 bp SallI - EcoRI 片段，它包含 Kozak 序列和 BPI 编码区的大约前三分之一；

2) 通过用 XhoI 消化，用 T4 聚合酶修成平头和用 SalI 切割而从 pING 4143 获得的载体序列；以及

3) 来源于 pING 4512 的大约 1092 bp EcoRI - NaeI 片段，其含有经过氨基酸 191 的 BPI 序列之剩余部分和免疫球蛋白序列。

第二个载体，pING 4157，含有一个已融合到免疫球蛋白铰链 -CH₂-CH₃ 区上的编码 rBPI (1-176) 的 DNA 插入物，其可通过三片段连接组装而成。第一片段是一个来源于 pING 4145 (一个除在 132 位含有野生型半胱氨酸外基本上与上述的 pING 4143 相同的载体) 的 590 bp SalI - BstBI 片段。将此片段连接到用 XhoI 消化 pING 4145 并用 T4 聚合酶将末端修成平头，再用 SalI 切割而获得的载体序列上。第三个连接片段是来源于 pING 4535 的约 720 bp BstBI - NaeI 片段。由于 pING 4156 和 pING 4157 都含有 gpt 标志，故可根据已知技术构建含其他标志，如 his 或 DHFR 的构件，如包括前部分所述的那些。这样的两个载体是 pING 4158 和 pING 4159，它们除了都含有 DHFR 标志而取代 gpt 外，分别与 pING 4156 和 pING 4157 相同。

现将含有 rBPI - Ig 融合蛋白质的所有前述载体构建总结于下列表 1 中。

表 1

总结含 BPI-Ig 融合体的构建

质粒	BPI 片段	免疫球蛋白片段	可选择标志	连接点序列	其他
pING4512	1-199	IgG 绞链-CH2-CH3	DHFR	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL...	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4514	1-199	IgG CH2-CH3	DHFR	..VMTKI: :PAPELL...	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4515	1-199	IgG 绞链-CH2-CH3	DHFR	...VMTKI: :KTHTCPPEL L...	重链 3' UT, 天然 5' UT

质粒	BPI 片段	免疫球蛋白片段	可选择 标志	连接点序列	其他
pING4517	1-199	IgM CH2-CH3-CH4	<i>gpt</i>	...VMTKI:V:IAELP P	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4528	61-191	IgG 蚊链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL...	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4529	1-191	IgG 蚊链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL...	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4531	1-191ala ¹³²	IgG 蚊链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL...	重链 3' UT, 天然 5' UT
pING4534	1-176ala ¹³²	IgG CH2-CH3	<i>gpt</i>	...SQVCE: :PAPELL	重链 3' UT, 天然 5' UT

质粒	BPI 片段	免疫球蛋白片段	可选择标志	连接点序列	其他
pING4535	1-176ala ¹³²	IgG 轻链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...SQVCE: :KHTTCPPCPAPEL L	重链 3' UT, 天然 UT
pING4156	1-191	IgG 轻链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL	轻链 3' UT optimized Kozak 序列
pING4157	1-176	IgG 轻链-CH2-CH3	<i>gpt</i>	...SQVCE: :KHTTCPPCPAPEL L	轻链 3' UT optimized Kozak 序列
pING4158	1-191	IgG 轻链-CH2-CH3	DHFR	...QPYFQ:QF:KTHT CPPCPAPELL	轻链 3' UT optimized Kozak 序列
pING4159	1-176	IgG 轻链-CH2-CH3	DHFR	...SQVCE: :KHTTCPPCPAPEL L	轻链 3' UT optimized Kozak 序列

实施例 2

A. 转染 CHO 细胞以生产 rBPI - Ig 融合蛋白质

哺乳动物细胞是生产本发明蛋白质的优选宿主细胞，因为这种细胞可以分泌杂二聚体和多聚体蛋白质并使之合适地折叠，还可以提供翻译后修饰如原序列 (pro - sequence) 加工和糖基化。

可以用作生产本发明 rBPI - IgG 融合体之宿主的哺乳动物细胞包括淋巴源细胞，如杂交瘤 Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 1581) 和成纤维细胞源细胞，如 Vero 细胞 (ATCC CRL 81)，CHO - K1，CHO - DXB11，或 CHO - DG44。后一个细胞系 (从 Dr. Lawrence Chasin, Columbia University 处获得的 CHO Toronto 的一种 DHFR 突变体) 保存于加有 10% 胎牛血清并补充有谷氨酰胺 / 青霉素 / 链霉素的 Ham's F₁₂ 培养基中 (Irvine Scientific, Irvine, CA)。

运用 Wigler 等人 (Cell, 11: 223 (1977)) 的磷酸钙方法用线性的 pING 4512, pING 4514 或 pING 4515 DNA (40 μg, 用 PvuI 消化, 酚-氯仿提取和乙醇沉淀) 转染 CHO - DG 44 细胞。磷酸钙处理之后, 将细胞置于 T 7 5 烧瓶中, 使其在含有无核苷之 α MEM 培养基 (Irvine Scientific) 和补充有透析的胎牛血清 (用 4L 冷的 0.15 NaCl 在 4 °C 下以 6000-800 截留分子量将 100ML 血清透析 16 小时) 的选择性培养基中生长获得转染体。未转染的 CHO - DG 44 细胞不能在这种培养基中生长, 因为它们具有 DHFR 突变, 并在连续补充选择性培养基过程中被除去。在 1.5 至 2 周时, 只观察到由转染细胞组成的小菌落。对于 pING 4512 和 pING 4514 来说, 通过胰酶消化和在 96 孔平板中限制性稀释进行亚克隆而从烧瓶中除去转染

的细胞。对于 pING 4515 来说，使转染的细胞在补充有 $0.1\mu\text{M}$ 氨甲蝶呤的选择性培养基中以混合培养物的形式生长。然后通过胰酶消化和在 96 孔平板中限制性稀释进行亚克隆而从烧瓶中除去氨甲蝶呤抗性细胞。

用抗 γ ELISA 法分析亚克隆是否在培养上清中含有 IgG 反应性蛋白质。在该项分析中，用羊 α -人 γ 抗血清预包被 Immulon - II 96 孔平板 (Dynatech)。然后加入上清液样品，并用过氧化物酶标记的羊抗人 γ 抗血清检测结合的 α 人 γ 反应性蛋白质。对于 pING 4512 和 pING 4515 转染体来说，在选择性 α MEM 培养基中扩展 15 个有最好生产能力的阳性克隆。然后使 pING 4512 转染体在补充有 $0.1\mu\text{M}$ 氨甲蝶呤的选择性培养基上生长。对于 pING 4514 来说，使最佳生产能力的 15 个阳性克隆在补充有 $0.1\mu\text{M}$ 氨甲蝶呤的选择性 α MEM 培养基中扩展。用 α - γ ELISA 法在不活动的 48 孔培养物中再次估测亚克隆的生产能力。对于 pING 4512 和 pING 4515 转染体来说，根据 γ ELISA 测定结果，最佳分离物分别分泌大约 5 和 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由 γ ELISA 测得 pING 4514 转染体的单个最佳亚克隆分泌了大约 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用 γ ELISA 法测知最佳 pING 4512 亚克隆的上清液在抗 BPI ELISA 分析中也表现阳性。从 pING4512 和 pING 4515 转染体的每个中选择三个分离物，并从 pING 4514 转染体中选择四个分离物以用于进一步研究。每一组中有最佳生产能力的亚克隆产生的 rBPI-IgG 融合蛋白质均按比例增加。最佳生产克隆是 pING 4512 (克隆 100M, 菌株 C1551), pING 4514 (克隆 8D7, 菌株 C1552) 和 pING 4515 (克隆 4E6, 菌株 C1549)。这三个细胞系已寄存于美国典型培养物保藏中心, 12301 Parklawn Drive, Rockville,

MD20852 USA, 保藏时期 1992 年 5 月 1 2 日, 登记号分别是 ATCC CRL 11043, ATCC CRL11044, 和 ATCC CRL 11042。

实施例 3

5. 在滚轴瓶中成比例地增殖并产生 BPI - IgG 融合蛋白质

利用在滚轴瓶中生长来产生含 rBPI - IgG 融合蛋白质的细胞。使用质粒 pING 4512 进行下面的生长, 分离和测定步骤, 并且是作为一举例给出的。可以将类似的方法用于本发明的其他质粒, 这对于本领域中的普通熟练技术人员来说是显而易见的。对于每个滚轴瓶, 均用转染的细胞接种 T150 烧瓶 (含 59ml 无核苷的 α MEM 和 10% 透析的胎牛血清), 并使细胞生长会合 (约 3 - 4 天)。然后用胰酶消化该细胞, 并转移到含 500ml Ham's F12 培养基和 10% 胎牛血清的 900cm² 滚轴瓶中, 使之生长会合 (约 3 天)。一旦细胞会合, 去除 Ham's F12 培养基, 并更换 500ml HB-CHO 无血清培养基 (Irvine Scientific, Irvine CA)。以前曾发现, 向滚轴瓶中的 HB-CHO 培养基中加入无菌 S - Sepharose 小珠 (Pharmacia, fast-flow #17 - 0511 - 01) 可以达到从滚轴瓶中最佳纯化重组 BPI 片段的目的 (参见共同申请人 Grinna 的未决待审美国专利申请 No. 07/885,501; 也可参见共同申请人最近提交的美国专利申请 No. _____ (代理案卷号 No. 27129/31405), 其公开内容作为参考被本发明引用)。首先清洗小珠并高压灭菌 (121°C 灭菌 20 分钟, 10 ml 一份), 然后无菌操作加入到各滚轴瓶内的 HB - CHO 培养基中。将细胞在 37°C 下保温 3 天, 此时去除培养基 / 小珠。按下述方法从无

菌小珠上纯化 rBPI - IgG 融合产物。还可以用回收的细胞在含 Sepharose 小珠的新鲜 HB - CHO 培养基中进行第二次和第三次生产循环（2天/循环），以便增加每个滚轴瓶中的 rBPI - IgG 产量。可以用 T 烧瓶替代滚轴瓶来完成类似步骤。

B. 分离 rBPI - Ig 融合体

从滚瓶中取出生长培养基和 S-Sepharose 树脂，收集在一起并放置至少 15 分钟使 S-Sepharose 沉降在容器底部。倾出大量培养基和澄清的树脂，并通过过滤装置如多孔过滤盘进行过滤，以除去细胞，并保留 S-Sepharose。倾去培养基后，将 S-Sepharose 悬浮于醋酸盐缓冲液中（该缓冲液含 20 mM 醋酸钠/醋酸，PH4.0，并含 0.1M NaCl）轻轻搅拌，使之沉降 10 分钟。然后倾去缓冲液，将少量 S-Sepharose 转移到合适大小的液相层析柱上。用 Econocolumn 柱（BioRad, Richmond, CA）（2.5×10 cm）分析从 3 - 5 个滚瓶中收集的 20 - 40 克 S-Sepharose 树脂样品。用 0.1M NaCl - 醋酸盐缓冲液洗填充的 S-Sepharose 柱直到洗脱物的 A 280 吸收值等于 0.1M NaCl - 醋酸盐缓冲液的吸收值。用 0.7M NaCl - 乙酸盐缓冲液、1.0M NaCl - 乙酸盐缓冲液和 1.5M NaCl - 乙酸盐缓冲液连续洗柱。收集各部分。主要在 1.5M NaCl - 乙酸盐缓冲液部分中洗脱出 rBPI-IgG 融合蛋白质。

实施例 4

A. 产生抗 rBPI (1-199) 的多克隆抗血清

为了举例说明，将由 pING 4512 DNA 转染的细胞表达的 BPI-Ig 融合蛋白质用于本实施例的方法。用纯化的 rBPI (1-199) 片段作为抗原在兔 (Cocalico Biologicals, Reamstown, PA) 体内产生多克隆抗血清。发现兔抗血清与激发抗原和重组 BPI 全蛋白质 (“rBPI-50”) 以及 rBPI-IgG 融合蛋白质 (pING 4512 的表达产物) 具有交叉反应活性，不过对激发抗原的免疫反应活性要比对全蛋白质 rBPI 或融合蛋白质的免疫反应活性大。该抗体可有效地用于 ELISA, Western 印迹分析和免疫沉淀，并且在大多数情况下以大于 1:2000 的稀释度使用。

B. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹分析步骤

在还原条件下用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 方法分离从 S-Sepharose 柱 (如实施例 2 所述) 的 1.5M NaCl-乙酸盐缓冲液洗脱物中得到的含有由 pING 4512 分泌之融合蛋白质的蛋白样品。首先调整样品至含有小于 0.5ml NaCl, 然后加入冰冷的丙酮达到最终 75% 的丙酮浓度使之沉淀。然后以大于 10,000 rpm 的转速离心 5 到 10 分钟使得到的蛋白沉淀物沉淀成团块。除去上清, 将沉淀物悬浮于凝胶样品缓冲液中, 该缓冲液含有 8M 尿素、2% SDS、60 mM Tris HCl, PH6.8, 加有或不加 50 mM 二硫苏糖醇。将悬浮样品和合适的蛋白质分子量标准品 (BioRad, Richmond, CA and BRL, Bethesda, MD) 分别加热至 95 °C 3 - 5 分钟, 然后装到均一百分比或线性百分比的聚丙烯酰胺凝胶 (BioRad) 上, 并使用小 Protean II 型凝胶电泳设备 (BioRad) 进行分离。电泳之后, 对凝胶直接进行考马斯 (Coomassie) 染色 (0.5% 考马斯亮兰 - R, 25% 异丙醇,

10%乙酸，染色1小时，用10%甲醇，10%乙醇脱色)，或者将其用于电转移。将 SDS-PAGE 分离的蛋白质在硝化纤维素 (BA85, Schleicher and Schuell, Keene, NH) 或 PVDF (Immobilon - P, Millipore, Bedford, MA) 膜上与合适的预染色的标准蛋白质 (BioRad) 一起进行电迁移。在10% CAPS (环己氨基-1-丙磺酸), 10%甲醇, pH11.5 中以 0.5 安培转移 20 分钟。将产生的印迹用于氨基酸测序, 或者用蛋白-A-金处理以检测 IgG 重链, 或用 1:2000 稀释度的兔抗 rBPI 抗体处理再用 1-1000 稀释度的过氧化物酶结合的羊抗兔抗体处理以检测 rBPI。为了进行 rBPI Western 印迹分析, 使用 Western Lite Chemiluminescent Detection System (Tropix System, Bedford, MA) 根据厂家的说明展现印迹。使用 0.25% 的明胶代替 Tropix I-Block, 并且在电转移时不使膜干燥。将处理过的膜暴露于 Cronex 4 胶片 (Dupont, Wilmington, DE)。

图 1 显示从 pING 4512 产生的 BPI-Ig 融合蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。左泳道是考马斯兰染色的凝胶。将中间和右泳道的谱带电转稀到 PVDF 膜上, 并按 Western 印迹分析处理方式进行处理。中间泳道是用蛋白-A-金产生的印迹用于检测人 IgG。右侧泳道是用兔抗 BPI 抗体处理接着用过氧化物酶结合的羊抗兔抗体处理并用 Western Lite Chemiluminescent Detection Kit 药盒检测而产生的印迹 (如实施例 4 所述)。

C. 分子量测定

按 B 部分所述, 用 SDS - PAGE 和继后的考马斯染色对用 1.5M NaCl-乙酸盐缓冲液从 S-Sepharose 上洗脱的样品进行分析, 发现作

为主要成份，是具有表观分子量 95,000 至 110,000 道尔顿并与 rBPI-IgG 融合蛋白质的高二聚体大小相对应的蛋白质。在还原条件下，该 100kd 蛋白质具有表观分子量 45,000 至 50,000 道尔顿，与所说融合蛋白的单体大小相符。

D. 氨基末端氨基酸序列

将实施例 2 所述的 S-Sepharose 柱的 1.5M NaCl-乙酸盐缓冲液洗脱物加在 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，并转移到 PVDF 膜上进行考马斯染色，观察到 100kd 蛋白谱带，然后从膜上切下该谱带，用气相序列测定仪 (Applied Biosystems, Model 470A) 对其进行氨基末端氨基酸序列测定。测定该 100kd 蛋白质的氨基末端氨基酸序列是 Val - Asn - Pro - Gly - Val - Val (SEQ. I. D. No. 19)。这个序列与由体内分泌途径在信号序列的氨基酸 - 1 和 + 1 之间裂解信号序列所产生的氨基末端序列相一致。

E. 融合蛋白质之杂交特性的证据

将相同的 1.5M NaCl-乙酸盐缓冲液洗脱物样品在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，电转移到 PVDF 膜上用于 Western 印迹分析。用蛋白 - A - 金进行 Western 分析直接检测融合蛋白质的 IgG 重链部分。结果表明 100kd 谱带含有 IgG 蛋白序列。对使用兔抗 - BPI (1-199) 抗体处理过的同一电转移的样品进行 Western 分析以检测 rBPI-IgG 融合蛋白质的 BPI 部分。此 Western 分析表明在 95kd 至 110kd 区中存在 BPI 免疫反应活性蛋白质，而在小于 95KD 和大于 110KD 的区内只有很小量的 BPI 特异性免疫反应活性。对由质粒

pING 4512 产生的 rBPI-IgG 融合蛋白质进行的 Western 印迹分析示于图 1 中，其中左泳道是考马斯染色的，中间泳道是用蛋白-A-金产生的，而右侧泳道是用兔抗体产生的。

F. 活性检测

与 BPI 氨基末端区相对应的片段呈现有 BPI 的临床相关活性。这些活性包括革兰氏阴性细胞中的通透增强活性和杀菌活性 (Elsbach, et al. J. Biol. Chem., 262:14891 (1987))，以及它结合可溶性脂多糖 (LPS) 和中和中性白细胞之激活作用的能力。rBPI-IgG 融合蛋白质具有这些活性表明该融合蛋白质的 BPI 部分是处于正确的折叠状态。融合蛋白质的 CH_2-CH_3 (Fc) 部分应表现出 Fc 受体和补体结合活性。这些活性的存在表明融合蛋白质的 Fc 区也是处于正确的折叠状态。进行几种试验以检测由 CHO 细胞纯化的各种融合蛋白质的 BPI 和 Fc 相关活性。

1. 脂多糖 - Western 分析法

使用上述用于蛋白质 SDS-PAGE 的 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶以凝胶电泳法将大肠杆菌 (菌株 0111-B4) 或明尼苏达沙门氏菌 (Rd 突变体) 脂多糖 (LPS, Sigma, St. Louis, MO) 样品分成每份 $20\mu\text{g}$ 至 $60\mu\text{g}$ 的剂量范围。电泳之后，按照上述转移蛋白质的方法用 CAPS 缓冲液将 LPS 样品与预染色的蛋白质标准样品 (BioRad) 一起从聚丙烯酰胺凝胶上电转移到硝化纤维素 (BA 85, Schleicher 和 Schuell) 上。将该膜于 37°C 在 30 mg/ml BAS、 50mM Tris、 0.2M NaCl、 $\text{pH}7.4$ (TBS) 中浸渍 30 分钟，然后将此膜于 $21^\circ - 24^\circ\text{C}$

下在含有 2 - 4 μ g 部分纯化的 rBPI-IgG 融合蛋白质或对照重组蛋白质 [rBPI (1-199) 或全 rBPI] 的 TBS 溶液中保温 12-18 小时以处理这些 LPS 印迹。然后用 TBS 洗涤该膜, 在 30 分钟内更换至少 3 次溶液。然后将该膜在 1:1000 稀释度的兔抗 rBPI (1-199) 抗体在 TBS、1mg/ml BSA 中制成的溶液中保温 3 小时。洗涤至少 3 次后, 使用上述 B 部分所述的 Western Lite ChemiLuminescent Detection System 处理该膜。对 LPS 凝胶的一式两个泳道进行银染色, 在图 2 和 3 中分别给出了 Rd. 明尼苏达沙门氏菌 (*S. minnesota*) 和 (0111- B4) 结合的结果。每个凝胶最左侧的泳道是银染色的 LPS。如图所示, 从质粒 pING 4512 产生的 rBPI-IgG 融合蛋白质与固定在硝化纤维素上的 LPS 的结合相同或更好于对照重组蛋白质, rBPI (1-199) 及全 rBPI。

2. 脂多糖俘获试验

将终体积 50 μ l 有不同稀释度的 rBPI - IgG 样品和重组 BPI 蛋白质 [rBPI (1-199) 或全 rBPI] 结合到含 PBS 的 96 孔 Immunon-2 型干底多孔平板 (Dynetech Labs) 上。结合之后, 用 0.05% 吐温 -20 和 PBS 洗平板, 并在 37 $^{\circ}$ C 下与含大肠杆菌 0111-B4 或明尼苏达沙门氏菌 Rd 脂多糖 (20pg) 的 0.05% 吐温 -20、BPS 一起保温 2 小时。然后用 0.05% 吐温 -20、BPS 强烈地洗该平板, 用 Limulus Amebocyte Lysate 药盒 (Whitlaker, Walkersville, MD) 显影, 在 EL309 微平板自动阅读器 (Biotek Instruments, Winooski, VT) 上于 405nm 处读数。结果图示于图 4 中, 该结果显示固相化的 rBPI - IgG 与可溶性 LPS 的结合相同或更好于对照重

组蛋白质，rBPI (1-199) 或全 rBPI。

具体地讲，图 4 显示了不含 LPS 的样品（柱 A）、不含 BPI 的样品（柱 B），只含 LPS 的样品（柱 C），含 pING 4512 产生的 rBPI-IgG 融合蛋白质的样品（柱 D），含 rBPI (1-199) 的样品（柱 E）或含全 rBPI（柱 F）样品的 LPS 俘获试验结果。

3. 大肠杆菌生长检测法

可以几种方法测定 BPI 的杀菌活性。在所有这些方法中，加入大约 100mM 氯化镁可以减小或消除 BPI 的杀菌效果。一种测试方法是对本发明的 rBPI-IgG 融合蛋白质进行培养液生长抑制试验。

该检测法是以用 BPI 片段或 rBPI-IgG 融合蛋白质处理大肠杆菌后的培养液生长抑制为基础的。检测中所用的细胞是 J 5 细胞（一种带有短链 LPS 的大肠杆菌“粗糙”菌株），该细胞已在三乙醇胺缓冲的矿物盐培养基（Simon, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)*, 51:877 (1964)）中生长以使得该细胞对 BPI 的作用尤其敏感。洗涤该细胞，并再悬浮于 0.9% NaCl 中达到大约 5×10^8 /ml 的浓度。然后将大约 5×10^6 至 1×10^7 个细胞与 $5 \mu\text{g/ml}$ pING 4512 和 pING 4514 rBPI-IgG 融合蛋白质或重组蛋白质 rBPI (1-199) 在总量为 200-400 μl 的缓冲液（10% Hanks 平衡盐水、40 mM Tris - HCl, pH7.5, 0.1% 酪蛋白氨基酸）中保温 30 分钟。还在 100mM MgCl_2 存在下将融合蛋白质再与大肠杆菌一起保温。单独与 rBPI-IgG 融合蛋白质或 rBPI (1-199) 片段一起保温后，用补充有 0.9% NaCl 的 10 体积营养培养液稀释细胞，使之生长几小时。如图 5 所示，结果表明融合蛋白质基本上保留了与 rBPI (1-199) 蛋

白质相关的杀菌活性，其中 A 线代表用 pING 4512 产生的融合蛋白质和镁处理；B 行代表用 pING 4514 和镁处理，C 线代表对照组 [只有缓冲液]；D 线代表用 pING 4514 产生的融合蛋白质处理；E 线代表用 pING 4512 产生的融合蛋白质处理；F 线代表用 BPI (1-199) 处理。正如所预料的，此活性可被氯化镁抑制。用 pING 4515 rBPI-IgG 融合蛋白质可以获得类似结果。

4. Fc 受体结合测试

使用人单核细胞系 U937 检查 rBPI-Ig 融合蛋白质与 Fc 受体的结合，其中细胞系已知可表达高亲和性 FcR₁ (CD64) 受体 ($k_d = 10^{-8} - 10^{-9}$) 和低亲和性 Fc RII (CD32) 受体 ($k_d = 10^{-7}$ 或更高)。

为了进行此试验，将存在于 DMEM+ 1% BSA 中的 U937 细胞在 4 °C 下与浓度为 100nM 至 0.8nM 的两种 rBPI-Ig 融合蛋白质 (来源于 pING 4512 和 pING 4514) 中的任一种或浓度为 6.7 至 0.5mM 的嵌合小鼠-人抗体阳性对照蛋白质一起于 V 形底 96 孔平板中保温 3 小时。然后用 DMEM+ 1% BSA 将细胞洗 3 次 (200 μ l / 洗涤；4 °C 下以 1000 RPM 离心平板)。向平板孔内加入羊 $\alpha - \gamma$ 过氧化物酶 (1/4000 稀释) 或 $\alpha - k$ 过氧化物酶 (1/1000 稀释)，并将细胞在室温下保温 1 小时。按上述方法洗 3 次后，向各孔内加入 100 μ l 显色剂 (溶于 12.5ml 枸橼酸盐缓冲液 + 5 μ l H₂O₂ 中的 5mg 邻苯二胺二盐酸化物 [O-PD] 并在室温下将平板保温 15-20 分钟。加入 100 μ l / 孔 1.8M H₂SO₄ 以终止显色，并测定 A490 处的吸光率。

用 $\alpha - \gamma$ 和 $\alpha - k$ 抗体测定的结果分别示于图 6 和 7 中，结果表明 rBPI-Ig 融合蛋白质和嵌合 H65 IgG 对照蛋白质都结合到 U937

细胞上。在图 6 和图 7 中，线 C 代表嵌合 H65 IgG 对照蛋白质；线 B 代表由 pING 4514 产生的 BPI - Ig 融合蛋白质；线 A 代表 pING 4512 产生的 BPI - Ig 融合蛋白质。这些蛋白质与 U937 细胞的相对亲和性估算如下：pING 4512 产物 = $\sim 7\text{nM}$ ；pING 4514 产物 = $\sim 4\text{nM}$ ；嵌合 H65 IgG = $\sim 0.2\text{nM}$ 。这些结果提示高亲和性受体 (FcRI) 可被 rBPI - Ig 融合蛋白质和嵌合 H65 IgG 两者结合。但是，不能排除 rBPI - IgG 融合蛋白质与其他受体 (可能是低亲合性 FcRII) 的结合，因为在饱和状态下这些融合蛋白质的吸收值 ($A_{490}=2.0$) 明显地大于嵌合 IgG 在饱和状态下的吸收值 ($A_{490}=0.4$)。这些结果还说明融合蛋白质可比嵌合 IgG 结合更多的受体或者说明对融合蛋白质用 $\alpha - \gamma$ 抗体检测结合的融合蛋白质比检测结合的嵌合 IgG 更有效。还用 U937 检测了几个其他的 IgG's (与 pING 4512 融合蛋白质白比较)，并且这些 IgG 的行为类似于嵌合 H65 IgG。用 U937 和 pING 4512 融合蛋白质表达产物，嵌合 H65 及 rBPI (1-199) 进行如上述的类似实验，但是用兔 α - 人 BPI 抗血清检测结合在细胞表面上的 rBPI - Ig。如图 8 所示，(其中 A 线代表 pING 4512 产生的 BPI - Ig 融合蛋白质；B 线代表 rBPI (1-199)；和 C 线代表嵌合 H65 IgG 对照蛋白质) 结果表明只有 rBPI - Ig 融合蛋白质可在 U937 细胞表面上被检测出。

实施例 5

rBPI - Ig 融合蛋白质的特性

检测本发明 rBPI - Ig 融合蛋白质结合肝素的能力、该融合蛋

白质的药物动力学特性、体内活性和 LAL 抑制作用。

A. 比较 rBPI - Ig 和 rBPI (1-199) 的肝素结合能力

使用直接³H-肝素结合实验分析 rBPI (1-199) 和 rBPI - Ig 融合蛋白质与肝素的竞争性结合。该实验是基于衍生尼龙膜能以高容量结合蛋白质。事先将这种膜掺入到 Millipore Corp. 公司 (Bedford MA) (Multiscreen IP Plates) 产生的 96 孔微量滴定板的底部, 并且可以从每个孔中取出以进行闪烁计数。

为了进行这一试验, 将用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (PH7.4) 稀释的 rBPI (1-199) 或 rBPI (1-191) - IgG 融合蛋白质以 100 pmol/孔的浓度加入到带尼龙膜的 96 孔平板的孔中。当吸收到膜上后, 用含有 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 封闭缓冲液封闭各孔。用此封闭缓冲液以 5-4 μg/ml 制备³H 肝素 (DuPont, NEN, Wilmington, DE) 的系列稀释液, 并于 4 °C 下在 rBPI (1-199) 或 rBPI (1-191) - IgG 包被的孔中保温 1 小时。1 小时后, 吸出未结合的肝素, 并用封闭缓冲液洗涤各孔三次, 干燥后取出用液体闪烁计数器测定结合的³H - 肝素的量。

实验结果示于图 9 中, 其中空方块代表 rBPI (1-199) 与肝素的结合; 菱形代表 rBPI (1-191) - Ig 融合蛋白质与肝素的结合; 和实心方块代表本底。图 9 所示的结果表明, 当 rBPI (1-199) 在所希望的 BPI K_d 值范围内 (表观亲和性 = 114 ± 30 nM) 与肝素结合时, 融合蛋白质不能表现出类似的结合特性。甚至在最高³H 肝素测定浓度 (2.5 μM) 下融合蛋白质也不能达到饱和。因此, rBPI (1-191) - IgG 融合蛋白质与肝素的结合大约比本底高 3 倍, 但 rBPI (1-199) 则不是这样。

B. rBPI - Ig 融合蛋白质的药物动力学特性

给雄性 CD 小鼠静脉内注射 $1\text{mg/kg } ^{125}\text{I-BPI (1-191) - IgG}$ 融合蛋白质或缓冲液以测定 rBPI - Ig 融合蛋白质的体内药物动力学特性。从融合蛋白质或缓冲液给药后 0.5 分钟至 24 小时收集血样，测定 ^{125}I 放射活性。还用 TCA 沉淀法和 SDS-PAGE 法分析血清样品，以确定与 rBPI - Ig 和较高分子量蛋白质相关的血清放射活性量。

在下面的表 2 和图 10 (其中三角代表 rBPI - Ig 融合蛋白质，圆圈代表 rBPI (1-199)) 中，提供了前述研究所获得的药物动力学参数。表格提供了从图 10 曲线中获得的定量数据。正如表 2 和图 10 所示，融合蛋白质的血清浓度表现出两阶段清除并持续达给药后的 2 小时，分别为 2.5 ± 0.2 分钟的 $\alpha + 1/2$ 和 39 ± 13 分钟的 $\beta + 1/2$ 。表 2 还示出了平均滞留时间 (MRT) (融合蛋白质在体内残存时间的一种计算方法)、清除率、中心体积分布 (V_c) 和静态体积分布 (V_{ss})。该表中还给出了代表图 10 中曲线下面积的数据，其提供了另一种测定体内残留时间的方法。在表 2 或图 10 中所测得的 rBPI (1-199) 和 rBPI (1-191) - IgG 融合蛋白质之间的任何药物动力学特性均没有统计学上的显著性差异。

表 2

从图 1 0 血清清除曲线得到的 $1\text{mg/kg } ^{125}\text{I rBPI(1-199)}$
和 $^{125}\text{I rBPI(1-199)}$ 融合蛋白质的药物动力学参数值

BPI 形式	曲线下面积 % Dose/ mL·kg	V_c mL/kg	V_d mL/kg	清除率 ml/min/kg	MRT 分钟	$\alpha t 1/2$ 分钟	$\beta t 1/2$ 分钟
rBPI(1-199)	8.31 ± 0.36	71.8 ± 7.8	467 ± 47	12.0 ± 0.5	38.8 ± 4.2	1.87 ± 0.19	45.7 ± 4.8
n=60							
rBPI(1-191)- IgG 融合蛋白质	6.96 ± 2.14	100.4 ± 18.1	420 ± 157	15.9 ± 4.9	25.9 ± 1.9	2.53 ± 0.16	39.1 ± 12.9
n=2							

C、rBPI-Ig 融合蛋白质的体内效应

在体内致死性内毒素血症动物模型中进行研究以评价 rBPI-IgG 融合蛋白质的效应。在此项研究中，对雄性 ICR 小鼠静脉内给药，注射放线菌素 D (800 μ g/kg) 和 0.1 μ g/kg 或 0.3 μ g/kg 内毒素 (大肠杆菌 0111:B4) 的混合物。注射放线菌素 D 和内毒素之后，马上给小鼠第二次静脉内注射 rBPI-IgG 融合蛋白质或含有 20mM 枸橼酸钠，150mM 氯化钠和 0.1% Poloxamer 以及 0.002% 聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯，pH5.0 的 BPI 配制品缓冲液 (表 3 中的“缓冲液对照”组)。其中一组第二次注射 PBS (磷酸盐缓冲盐水) (表 3 中的“阴性对照”组)。然后计算 7 天内每天死亡数。此项研究的结果示于下列表 3 中。

表 3

LPS 剂量 μg/Kg	放线菌素 D 剂量 μg/Kg	rBPI-IgG 剂量 mg/Kg	死亡数/总动物数	% 死亡率
0	800	阴性对照	0/15	0
0.1	800	缓冲液对照	12/15	80
0.1	800	0.5	11/15	73
0.1	800	5.0	7/15	47
0.3	800	缓冲液对照	15/15	100
0.3	800	0.5	14/15	93
0.3	800	5.0	9/15	60

用 X^2 法测得与缓冲液相比统计学上差异性显著 ($P < 0.5$)

此项研究的结果表明 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rBPI-IgG 融合蛋白质可以显著地防止以 $0.3\mu\text{g}/\text{kg}$ 内毒素攻击的放线菌素 D 致敏的小鼠体内内毒素的致死性效应。

D、LAL 抑制试验

对 rBPI(1-199) 和 rBPI(1-191)-Ig 融合蛋白质进行鲎溶解物 LAL 抑制试验，以确定这些化合物的 LPS 结合特性。具体地讲，将 rBPI (1-199) 或 rBPI (1-191)-Ig 融合蛋白质在 Eppendorf 试管中与固定浓度的大肠杆菌 0113 LPS ($4\text{ng}/\text{ml}$ 终浓度)混合，并在 37°C 不时振荡下保温 3 小时。保温之后，向各试管内加入 $360\mu\text{l}$ D-PBS 以达到 $200\text{pg}/\text{ml}$ 的 LPS 浓度用于 LAL 试验。然后以每孔 $50\mu\text{L}$ 的体积将各样品转移到 ImmulonII 条 (Dynatech, Chantilly, VA) 中。

以每孔 $50\mu\text{l}$ 加入鲎溶解物 (Quantitative Chromogenic LAL 药盒, Whitaker Bioproducts, Inc., Walkersville, MD)，并在室温下保温 25 分钟。保温后再以 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的体积加入生色底物，并充分混合。室温下保温 20-30 分钟后，加入 $100\mu\text{l}$ 的 25% 醋酸以终止反应。然后在多平板阅读仪 (Vmax, Medical Devices Menlo Park, CA) 上测定 405nm 处的光密度。

LAL 试验结果示于图 1.1 中，其中实线代表用 rBPI (1-191)-Ig 融合蛋白质获得的结果，带实圈点线代表用 rBPI (1-199) 蛋白质获得的结果，而带空方块的点线代表无 LPS 对照。如图中所示，在对鲎变形细胞溶解物试验中对 LPS 刺激的抑制能力方面 rBPI (1-199) 和 rBPI (1-191)-Ig 融合蛋白质之间的试验结果没有显著

性差异。

本领域中的熟练技术人员在考虑到前述的本发明优选实施方案后，实施本发明时可作出许多修改和变化。因此，对本发明的范围内的限制只在后面的待批权利要求中体现出来。

序列表

(1) 一般资料：

(I) 申请人：Theofan, Georgia

Grinna, Lynns

Horwite, Arnold

(II) 发明名称：B P I - 免疫球蛋白融合蛋白质

(III) 序列数：1 9

(IV) 联系地址：

(A) 地址：Marshall, O'Toole, Gerstin, Murray Sc Borun

(B) 街道：6300 Sears Tower, 233 South Wacker

(C) 城市：Illinois inois

(D) 国家：U S A

(F) 编号：60606-6402

(V) 计算机阅读形式：

(A) 媒介类型：软盘

(B) 计算机：I B M P C 兼容

(C) 操作系统：PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件：patentIn Release #1.0, Version #1.25

(VI) 目前申请数据

(A) 申请号 :

(B) 申请日 :

(C) 分类 :

(VIII) 代理机构 / 代理人 资料

(A) 名称 : Meyers Thomas C.

(B) 登记号 : 36, 989

(C) 案卷号 : 30659

(IX) 通讯信息 :

(A) 电话 : 312/474-6300

(B) 传真 : 312/474-0448

(C) 电报 : 25-3856

(2) S E Q I D N O : 1 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 1813 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : D N A

(IX) 特征 :

(A) 名称 / 信息标号 : C D S

(B) 位置 : 3 1 ... 1 4 9 1

(IX) 特征 :

(A) 名称 / 信息标号 : mat_Peptide

(B) 位置 : 1 2 4 ... 1 4 9 1

(XI) 序列描述 : S E D I D N O : 1 :

CAGGCCTTGA GGTTTTGGCA GCTCTGGAGG ATG AGA GAG AAC ATG GCC AGG GGC	54
Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly	
-31 -30 -25	
CCT TGC AAC GCG CCG AGA TGG GTG TCC CTG ATG GTG CTC GTC GCC ATA	102
Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile	
-20 -15 -10	
GGC ACC GCC GTG ACA GCG GCC GTC AAC CCT GGC GTC GTG GTC AGG ATC	150
Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile	
-5 1 5	
TCC CAG AAG GGC CTG GAC TAC GCC AGC CAG CAG GGG ACG GCC GCT CTG	198
Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu	
10 15 20 25	
CAG AAG GAG CTG AAG AGG ATC AAG ATT CCT GAC TAC TCA GAC AGC TTT	246
Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe	
30 35 40	
AAG ATC AAG CAT CTT GGG AAG GGG CAT TAT AGC TTC TAC AGC ATG GAC	294
Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp	
45 50 55	
ATC CGT GAA TTC CAG CTT CCC AGT TCC CAG ATA AGC ATG GTG CCC AAT	342
Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn	
60 65 70	
GTG GGC CTT AAG TTC TCC ATC AGC AAC GCC AAT ATC AAG ATC AGC GGC	390
Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly	
75 80 85	
AAA TGG AAG GCA CAA AAG AGA TTC TTA AAA ATG AGC GGC AAT TTT GAC	438
Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp	
90 95 100 105	
CTG AGC ATA GAA GGC ATG TCC ATT TCG GCT GAT CTG AAG CTG GGC AGT	486
Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser	
110 115 120	

AAC Asn	CCC Pro	ACG Thr	TCA Ser 125	GGC Gly	AAG Lys	CCC Pro	ACC Thr	ATC Ile 130	ACC Thr	TGC Cys	TCC Ser	AGC Ser 135	TGC Cys 135	AGC Ser	AGC Ser	534
CAC His	ATC Ile	AAC Asn 140	AGT Ser	GTC Val	CAC His	GTG Val	CAC His 145	ATC Ile	TCA Ser	AAG Lys	AGC Ser	AAA Lys 150	GTC Val	GGG Gly	TGG Trp	582
CTG Leu	ATC Ile 155	CAA Gln	CTC Leu	TTC Phe	CAC His	AAA Lys 160	AAA Lys	ATT Ile	GAG Glu	TCT Ser	GCG Ala 165	CTT Leu	CGA Arg	AAC Asn	AAG Lys	630
ATG Met 170	AAC Asn	AGC Ser	CAG Gln	GTC Val	TGC Cys 175	GAG Glu	AAA Lys	GTG Val	ACC Thr	AAT Asn 180	TCT Ser	GTA Val	TCC Ser	TCC Ser	AAG Lys 185	678
CTG Leu	CAA Gln	CCT Pro	TAT Tyr 190	TTC Phe	CAG Gln	ACT Thr	CTG Leu	CCA Pro	GTA Val 195	ATG Met	ACC Thr	AAA Lys	ATA Ile	GAT Asp 200	TCT Ser	726
GTG Val	GCT Ala	GGA Gly	ATC Ile 205	AAC Asn	TAT Tyr	GGT Gly	CTG Leu	GTG Val 210	GCA Ala	CCT Pro	CCA Pro	GCA Ala	ACC Thr 215	ACG Thr	GCT Ala	774
GAG Glu	ACC Thr	CTG Leu 220	GAT Asp	GTA Val	CAG Gln	ATG Met	AAG Lys 225	GGG Gly	GAG Glu	TTT Phe	TAC Tyr	AGT Ser 230	GAG Glu	AAC Asn	CAC His	822
CAC His 235	AAT Asn	CCA Pro	CCT Pro	CCC Pro	TTT Phe	GCT Ala 240	CCA Pro	CCA Pro	GTG Val	ATG Met	GAG Glu 245	TTT Phe	CCC Pro	GCT Ala	GCC Ala	870
CAT His 250	GAC Asp	CGC Arg	ATG Met	GTA Val	TAC Tyr 255	CTG Leu	GGC Gly	CTC Leu	TCA Ser	GAC Asp 260	TAC Tyr	TTC Phe	TTC Phe	AAC Asn	ACA Thr 265	918
GCC Ala	GGG Gly	CTT Leu	GTA Val	TAC Tyr 270	CAA Gln	GAG Glu	GCT Ala	GGG Gly 275	GTC Val	TTG Leu	AAG Lys	ATG Met	ACC Thr 280	CTT Leu	AGA Arg	966
GAT Asp	GAC Asp	ATG Met	ATT Ile 285	CCA Pro	AAG Lys	GAG Glu	TCC Ser	AAA Lys 290	TTT Phe	CGA Arg	CTG Leu	ACA Thr	ACC Thr 295	AAG Lys	TTC Phe	1014
TTT Phe	GGA Gly	ACC Thr 300	TTC Phe	CTA Leu	CCT Pro	GAG Glu	GTG Val 305	GCC Ala	AAG Lys	AAG Lys	TTT Phe	CCC Pro 310	AAC Asn	ATG Met	AAG Lys	1062
ATA Ile 315	CAG Gln	ATC Ile	CAT His	GTC Val	TCA Ser	GCC Ala 320	TCC Ser	ACC Thr	CCG Pro	CCA Pro	CAC His 325	CTG Leu	TCT Ser	GTG Val	CAG Gln	1110

CCC ACC GGC CTT ACC TTC TAC CCT GCC GTG GAT GTC CAG GCC TTT GCC Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala 330 335 340 345	1158
GTC CTC CCC AAC TCC TCC CTG GCT TCC CTC TTC CTG ATT GGC ATG CAC Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His 350 355 360	1206
ACA ACT GGT TCC ATG GAG GTC AGC GCC GAG TCC AAC AGG CTT GTT GGA Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly 365 370 375	1254
GAG CTC AAG CTG GAT AGG CTG CTC CTG GAA CTG AAG CAC TCA AAT ATT Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile 380 385 390	1302
GGC CCC TTC CCG GTT GAA TTG CTG CAG GAT ATC ATG AAC TAC ATT GTA Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val 395 400 405	1350
CCC ATT CTT GTG CTG CCC AGG GTT AAC GAG AAA CTA CAG AAA GGC TTC Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe 410 415 420 425	1398
CCT CTC CCG ACG CCG GCC AGA GTC CAG CTC TAC AAC GTA GTG CTT CAG Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln 430 435 440	1446
CCT CAC CAG AAC TTC CTG CTG TTC GGT GCA GAC GTT GTC TAT AAA Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe Glu Ala Asp Val Val Tyr Lys 445 450 455	1491
TGAAGGCACC AGGGGTGCCG GGGGCTGTCA GCCGCACCTG TTCCTGATGG GCTGTGGGGC	1551
ACCGGCTGCC TTTCCCAGG GAATCCTCTC CAGATCTTAA CCAAGAGCCC CTGCAAACCT	1611
TCTTCGACTC AGATTCAGAA ATGATCTAAA CACGAGGAAA CATTATTCAT TGGAAAAGTG	1671
CATGGTGTGT ATTTTAGGGA TTATGAGCTT CTTTCAAGGG CTAAGGCTGC AGAGATATTT	1731
CCTCCAGGAA TCGTGTTCAT ATTGTAACCA AGAAATTTCC ATTTGTGCTT CATGAAAAAA	1791
AACTTCTGGT TTTTTTCATG TG	1813

(2) S E Q I D N O : 2 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 4 8 7 氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(C) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : 蛋白质

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 :

Met Arg Glu Asn Met Ala Arg Gly Pro Cys Asn Ala Pro Arg Trp Val
-31 -30 -25 -20
Ser Leu Met Val Leu Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Thr Ala Ala Val
-15 -10 -5 1
Asn Pro Gly Val Val Val Arg Ile Ser Gln Lys Gly Leu Asp Tyr Ala
5 10 15
Ser Gln Gln Gly Thr Ala Ala Leu Gln Lys Glu Leu Lys Arg Ile Lys
20 25 30
Ile Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Phe Lys Ile Lys His Leu Gly Lys Gly
35 40 45
His Tyr Ser Phe Tyr Ser Met Asp Ile Arg Glu Phe Gln Leu Pro Ser
50 55 60 65
Ser Gln Ile Ser Met Val Pro Asn Val Gly Leu Lys Phe Ser Ile Ser
70 75 80
Asn Ala Asn Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe
85 90 95
Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Leu Ser Ile Glu Gly Met Ser Ile
100 105 110
Ser Ala Asp Leu Lys Leu Gly Ser Asn Pro Thr Ser Gly Lys Pro Thr
115 120 125
Ile Thr Cys Ser Ser Cys Ser Ser His Ile Asn Ser Val His Val His
130 135 140 145
Ile Ser Lys Ser Lys Val Gly Trp Leu Ile Gln Leu Phe His Lys Lys
150 155 160
Ile Glu Ser Ala Leu Arg Asn Lys Met Asn Ser Gln Val Cys Glu Lys
165 170 175
Val Thr Asn Ser Val Ser Ser Lys Leu Gln Pro Tyr Phe Gln Thr Leu
180 185 190
Pro Val Met Thr Lys Ile Asp Ser Val Ala Gly Ile Asn Tyr Gly Leu
195 200 205
Val Ala Pro Pro Ala Thr Thr Ala Glu Thr Leu Asp Val Gln Met Lys
210 215 220 225

Gly Glu Phe Tyr Ser Glu Asn His His Asn Pro Pro Pro Phe Ala Pro
 230 235 240
 Pro Val Met Glu Phe Pro Ala Ala His Asp Arg Met Val Tyr Leu Gly
 245 250 255
 Leu Ser Asp Tyr Phe Phe Asn Thr Ala Gly Leu Val Tyr Gln Glu Ala
 260 265 270
 Gly Val Leu Lys Met Thr Leu Arg Asp Asp Met Ile Pro Lys Glu Ser
 275 280 285
 Lys Phe Arg Leu Thr Thr Lys Phe Phe Gly Thr Phe Leu Pro Glu Val
 290 295 300 305
 Ala Lys Lys Phe Pro Asn Met Lys Ile Gln Ile His Val Ser Ala Ser
 310 315 320
 Thr Pro Pro His Leu Ser Val Gln Pro Thr Gly Leu Thr Phe Tyr Pro
 325 330 335
 Ala Val Asp Val Gln Ala Phe Ala Val Leu Pro Asn Ser Ser Leu Ala
 340 345 350
 Ser Leu Phe Leu Ile Gly Met His Thr Thr Gly Ser Met Glu Val Ser
 355 360 365
 Ala Glu Ser Asn Arg Leu Val Gly Glu Leu Lys Leu Asp Arg Leu Leu
 370 375 380 385
 Leu Glu Leu Lys His Ser Asn Ile Gly Pro Phe Pro Val Glu Leu Leu
 390 395 400
 Gln Asp Ile Met Asn Tyr Ile Val Pro Ile Leu Val Leu Pro Arg Val
 405 410 415
 Asn Glu Lys Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Pro Thr Pro Ala Arg Val
 420 425 430
 Gln Leu Tyr Asn Val Val Leu Gln Pro His Gln Asn Phe Leu Leu Phe
 435 440 445
 Gly Ala Asp Val Val Tyr Lys
 450 455

(2) S E Q W I D N O : 3 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 4 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D N A

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 3 :

CGTATGGCCA GCACCTGAAC TCCT

(2) S E Q I D N O : 4 的资料 :

(I) 序列描述 :

(A) 长度 : 1 7 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D N A

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 4 :

GAGGGCTTTG TTGGAGA

(2) S E Q I D N O : 5 的资料 :

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 6 氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : 肽

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 5 :

Pro Ala Pro Glu Leu Leu

(2) S E Q I D N O : 6 的资料 :

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 6 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D N A

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 6

CAGTTTAAAA CTCA CACATG CCCACC

(2) S E Q I D N O : 7 的资料 :

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 8 氨基酸 :

(B) 类型 : 氨基酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : 肽

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 7

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

(2) S E Q I D N O : 8 的资料 :

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 7 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数：单链

(D) 拓扑：线性

(II) 分子类型：c D N A

(XI) 序列描述：S E Q I D N O : 8 :

AGCTTCCCAG TTCCCAG

(2) S E Q I D N O : 9 的资料

(I) 序列特征：

(A) 长度：2 4 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 拓扑：线性

(II) 分子类型：c D A N

(XI) 序列描述：S E Q I D N O : 9

TATTTTGGTC ATTACTGGCA GAGT

(2) S E Q I D N O : 1 0 的资料

(I) 序列特征：

(A) 长度：1 8 碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链数：单链

(D) 拓扑：线性

(II) 分子类型：c D A N

(XI) 序列描述：S E Q I D N O : 1 0 :

G C A C C T G C T A C T G A C C G C

(2) S E Q I D N O : 1 1 的资料 :

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 2 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 1 :

GGTCAGTAGC AG

(2) S E Q I D N O : 1 2 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 5 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 2 :

AAGCTTGTCG ACCAGGCCTT GAGGT

(2) S E Q I D N O : 1 3 的资料

(I) 序列特征 :

- (A) 长度：1 8 碱基对
- (B) 类型：核酸
- (C) 链数：单链
- (D) 拓扑：线性
- (II) 分子类型：c D A N
- (XI) 序列描述：S E Q I D N O : 1 3 :
CTGGAGGCGG TGATGGTG

(2) S E Q I D N O : 1 4 的资料

- (I) 序列特征：
 - (A) 长度：3 0 碱基对
 - (B) 类型：核酸
 - (C) 链数：单链
 - (D) 拓扑：线性
- (II) 分子类型：c D A N
- (XI) 序列描述：S E Q I D N O : 1 4 :
CGAAACAAGA TGAACAGCCA GGTCTGCGAG

(2) S E Q I D N O : 1 5 的资料

- (I) 序列特征：
 - (A) 长度：2 8 碱基对
 - (B) 类型：核酸
 - (C) 链数：单链
 - (D) 拓扑：线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 5 :

CTCGCAGACC TGGCTGTTCA TCTTGTTT

(2) S E Q I D N O : 1 6 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 3 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 6 :

GCCACCRCCA TGG

(2) S E Q I D N O : 1 7 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 7 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 7 :

ACTGTGACG CCACCATGGC CAGGGGC

(2) S E Q I D N O : 1 8 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 7 碱基对

(B) 类型 : 核酸

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : c D A N

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 8 :

CCGCGGCTCG AGCTATATTT TGGTCAT

(2) S E Q I D N O : 1 9 的资料

(I) 序列特征 :

(A) 长度 : 6 氨基酸

(B) 类型 : 肽

(C) 链数 : 单链

(D) 拓扑 : 线性

(II) 分子类型 : 肽

(XI) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 9 :

Val Asn Pro Gly Val Val

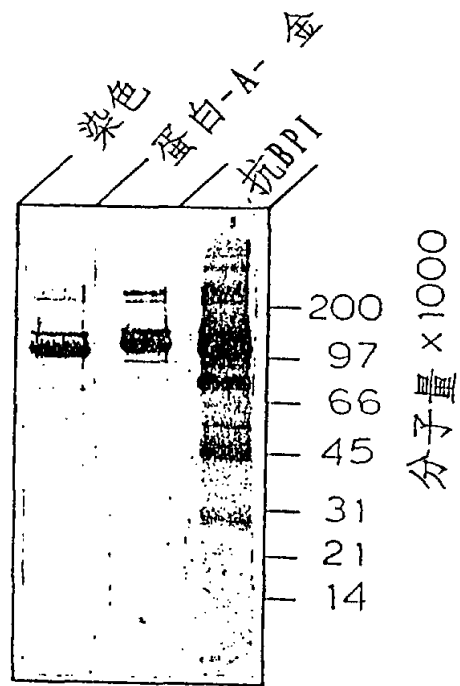


图 1

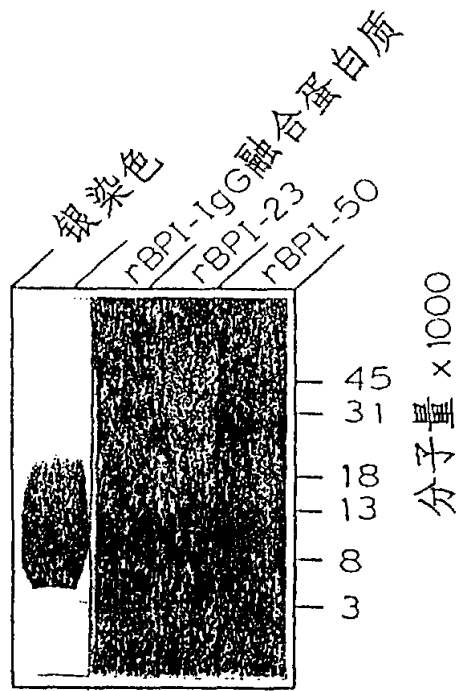


图 2

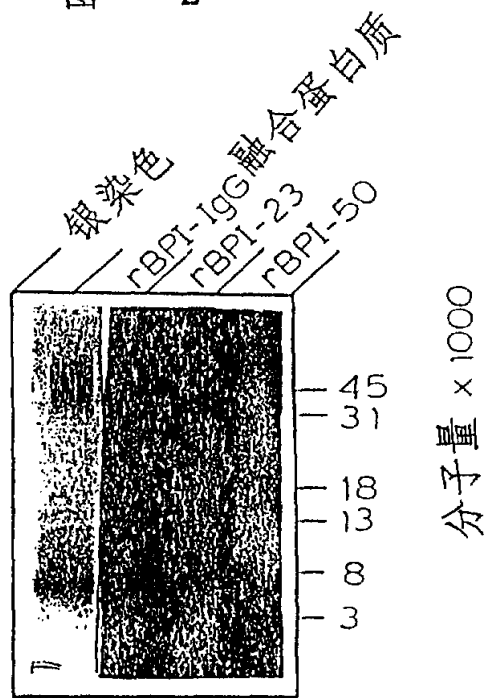


图 3

图 4

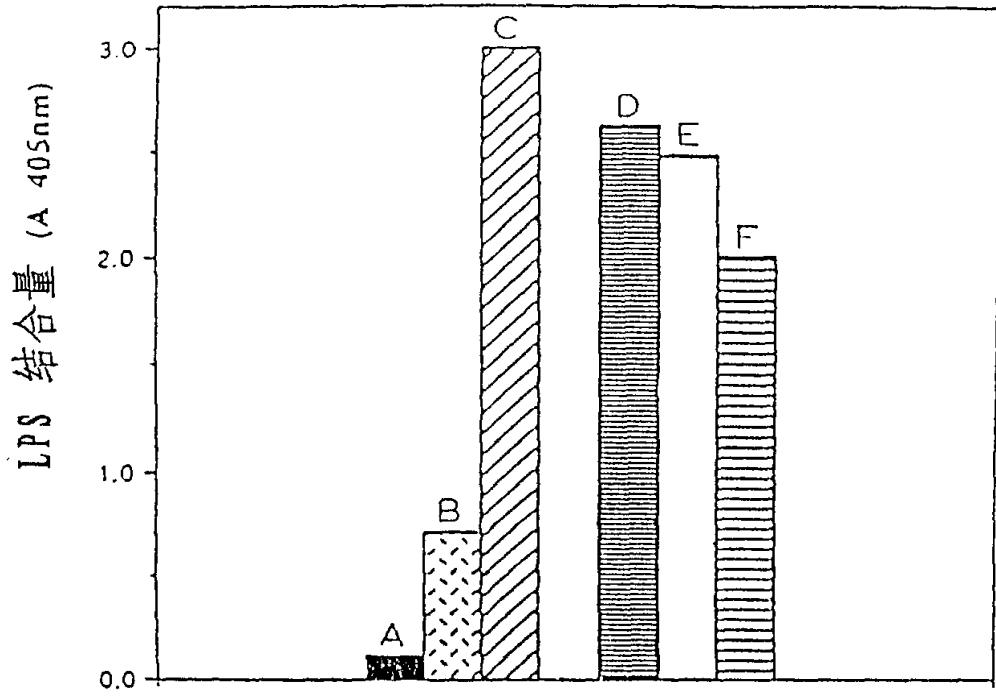


图 5

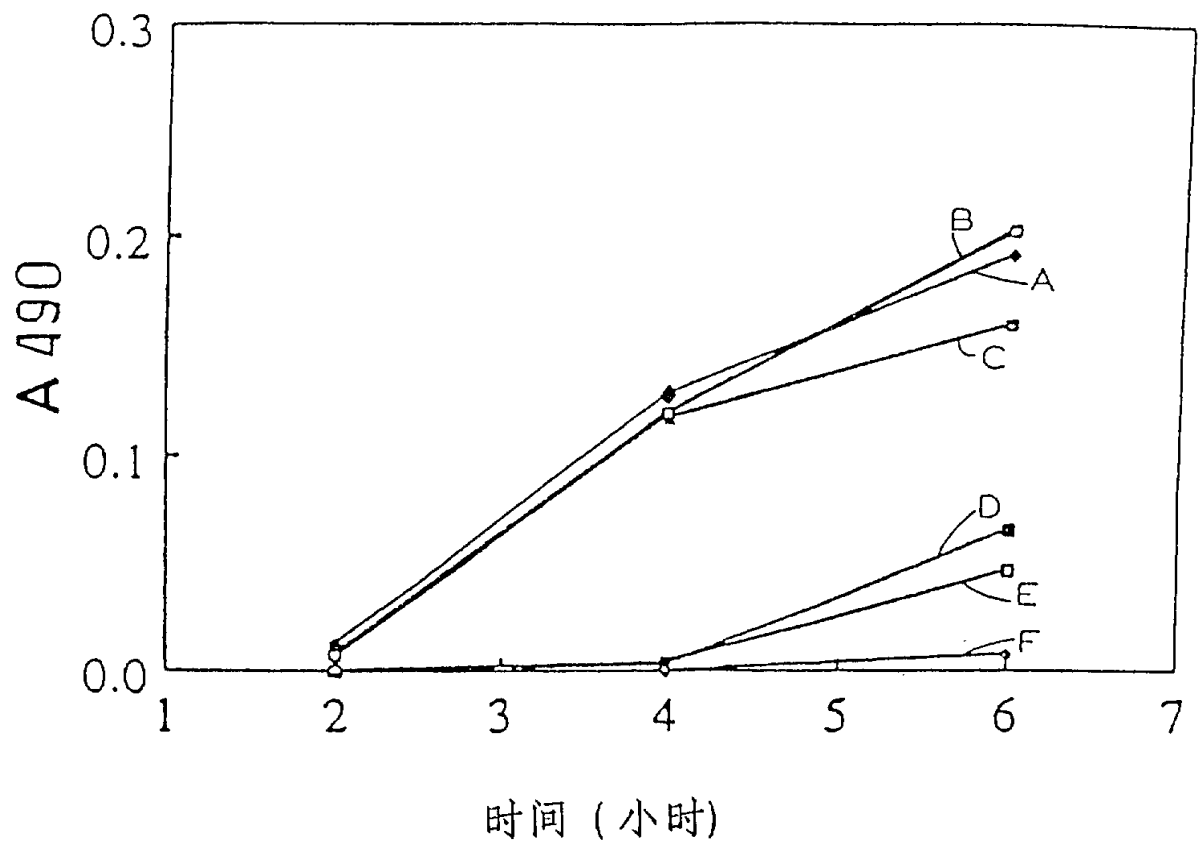


图 6

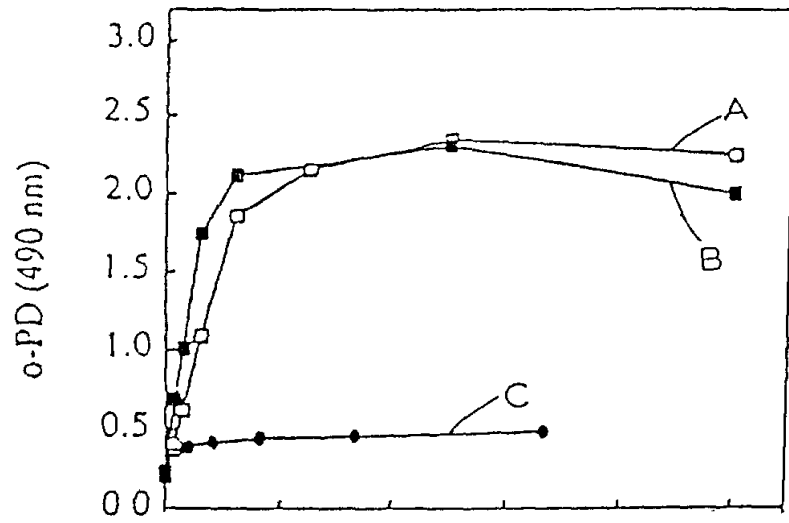


图 7

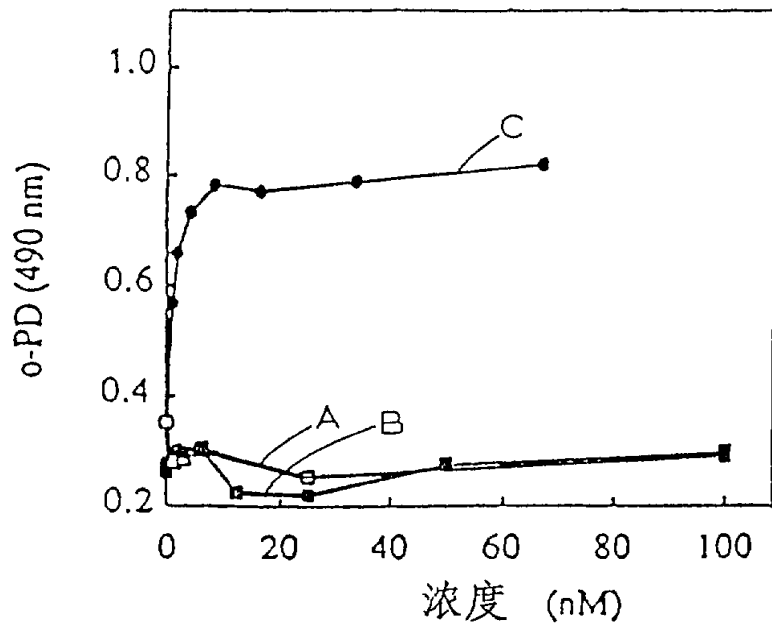


图 8

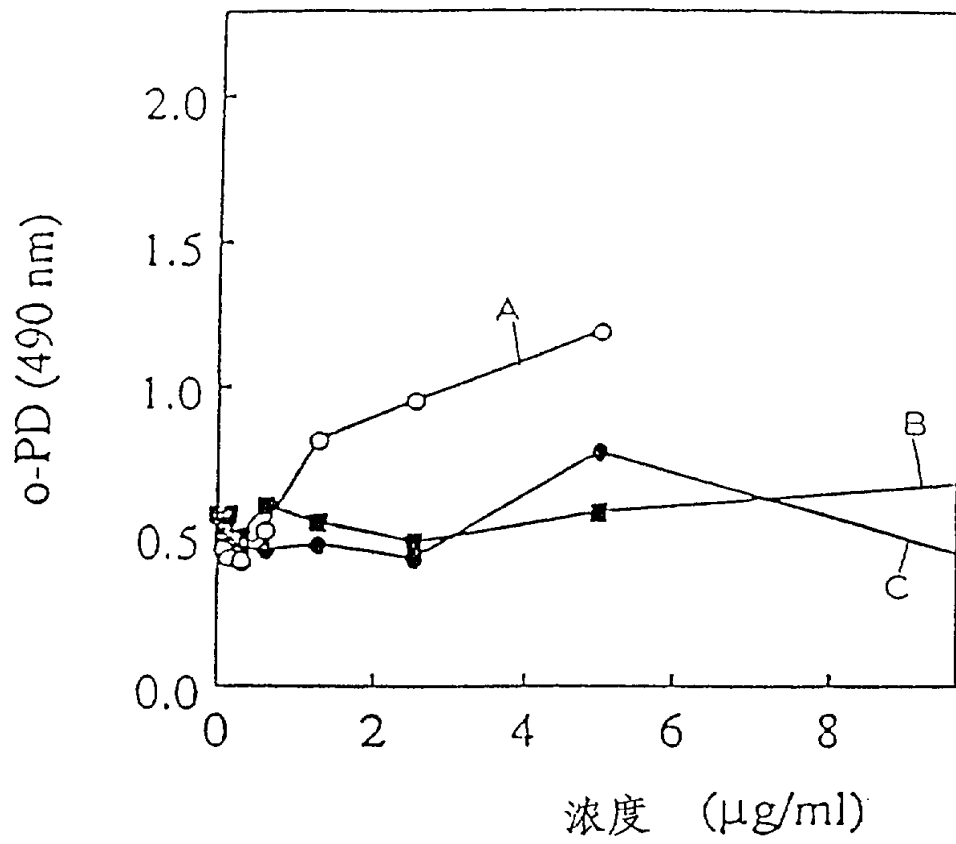


图 9

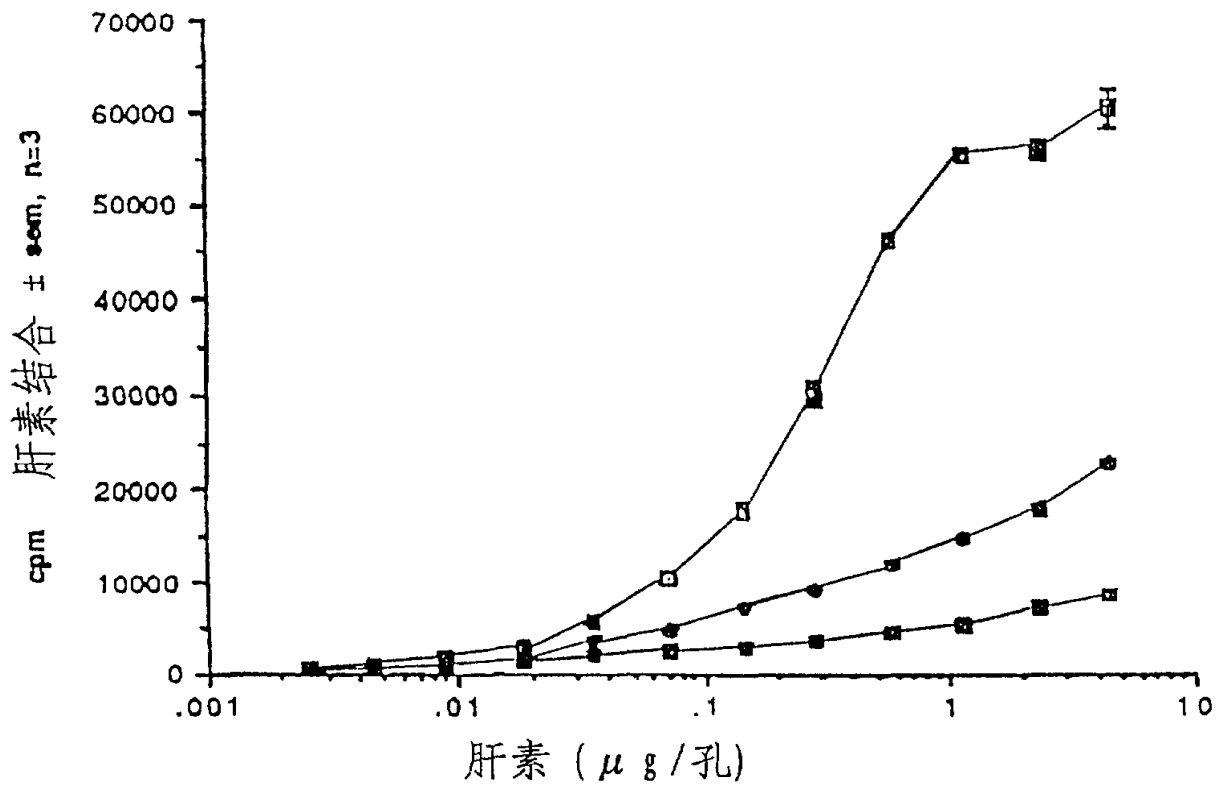


图 10

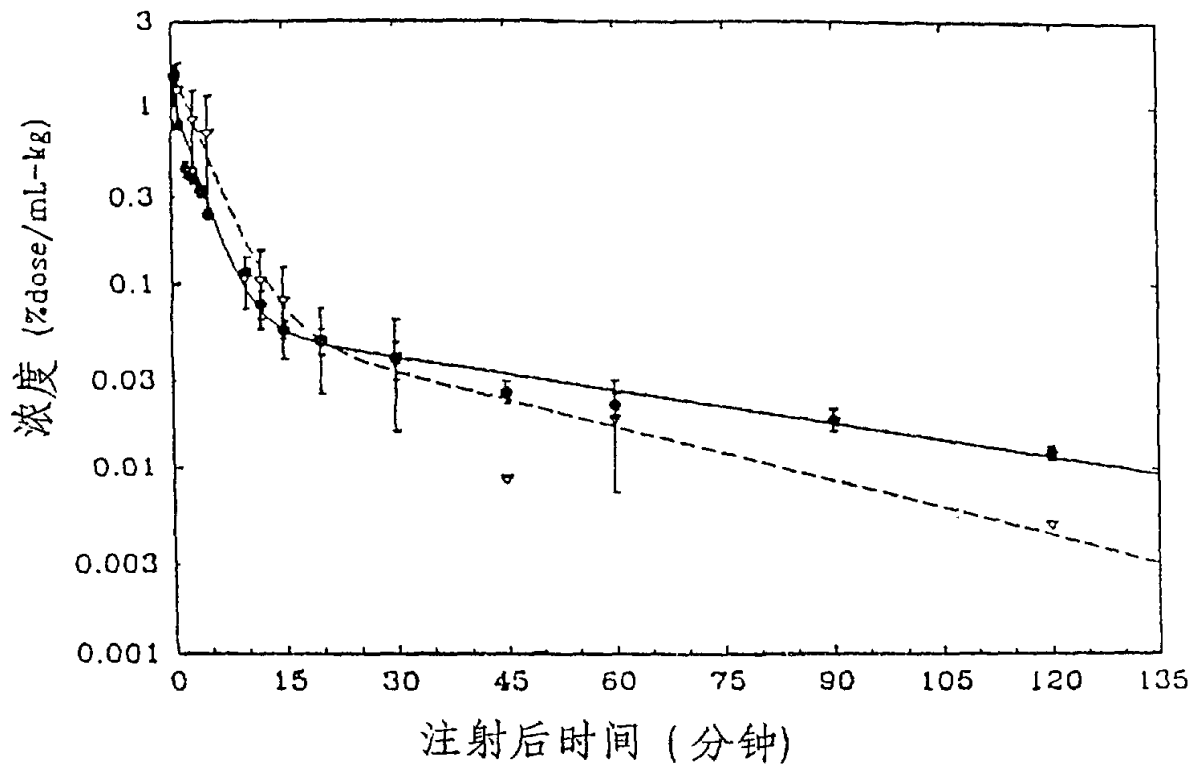


图 11

