C5 补体抑制剂 OmCI 的重组表达、纯化和活性研究

汪燕丹[1,2]，上官雯雯[2,3]，路建光[2,4]，黄宗庆[4]，化浩举[4]，蒋宝明[4]，冯　军[2,4]*

（1. 浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心，浙江杭州 310014；2. 中国医药工业研究总院，上海 201203；3. 复旦大学药学院，上海 201203；4. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：OmCI（*Ornithodoros moubata* complement inhibitor，**1**）是靶向补体 C5 的药物，用于治疗补体介导的疾病。该研究建立了 **1** 的重组、表达、分离、纯化方法，并对其进行活性验证。采用重组大肠埃希菌高密度发酵技术，以胞外可溶形式表达 **1**，融合蛋白的发酵表达产量为 317 mg/L。发酵上清经调酸预处理、酶切去除标签蛋白，阴离子交换色谱、反相色谱纯化后得到纯度为 98.2%的目的蛋白，总收率为 62.8%。目的蛋白经质谱验证，相对分子质量正确；采用体外补体经典途径的抑制试验测得 IC_{50} 值为 8.59 nmol/L，与补体 C5 的结合常数（K_D）为 4.74 nmol/L，证明其在大肠埃希菌中成功表达，且具有 C5 抑制活性。该研究为 C5 补体抑制剂类药物的高效制备提供了参考。

关键词：C5 补体抑制剂（OmCI）；重组表达；发酵；纯化；活性试验

中图分类号：Q816；Q815　　**文献标识码**：C　　**文章编号**：1001-8255(2024)07-0940-08

引用：汪燕丹，上官雯雯，路建光，等．C5 补体抑制剂 OmCI 的重组表达、纯化和活性研究［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(7): 940-947. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.07.007

Recombinant Expression, Purification and Activity of Complement C5 Inhibitor OmCI

WANG Yandan[1,2], SHANGGUAN Wenwen[2,3], LU Jianguang[2,4], HUANG Zongqing[4], HUA Haoju[4], JIANG Baoming[4], FENG Jun[2,4]*

(*1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014; 2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 4. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: *Ornithodoros moubata* complement inhibitor (OmCI, **1**) is a complement C5 inhibitor for the treatment of complement-mediated diseases. In this study, a recombination, expression, isolation and purification method of **1** was established, and activity of the obtained **1** was verified. The protein was expressed in extracellular soluble form by high density fermentation technique of recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*), and the yield of fusion protein was 317 mg/L. The fermentation supernatant was pretreated by acid-adjusted clarification, enzyme digestion to remove the tagged proteins. Then it was purified by anion-exchange chromatography and reversed-phase chromatography to get the target protein with a purity of 98.2%, and the total yield was 62.8%. The relative molecular weight of target protein was verified to be correct by mass spectrometry. According to the results of the *in vitro* complement classical pathway inhibition assay, the IC_{50} and the binding constant (K_D) to complement C5 were 8.59 and 4.74 nmol/L, respectively. The results proved that **1** was successfully expressed in *E. coli* and exhibited C5 inhibitory activity. This study provides a reference for the efficient preparation of complement C5 inhibitors.

Key Words: *Ornithodoros moubata* complement inhibitor (OmCI); recombinant expression; fermentation; purification; activity test

补体是人体内对免疫系统有补充作用的一组球蛋白，多由肝脏分泌或由巨噬细胞裂解产生[1]。绝大多数补体成分以无活性酶前体的形式存在，被激活后会引发炎症反应，溶解非自身细胞[2]。当补体被过度激活时，会造成局部组织破坏，引发许多罕见病，如一些眼部疾病、牙周疾病、自身免疫疾病和肾脏疾病等。由于C5位于补体激活通路的末端，因此可通过抑制其活性达到抑制整个补体通路的目的。目前上市的C5靶向药物只有依库珠单抗（eculizumab，Alexion Pharma公司，商品名Soliris）和瑞武丽珠单抗（ravulizumab，Alexion Pharma公司，商品名Ultomiris）2种单抗类药物，被批准用于治疗阵发性夜间血红蛋白尿（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria，PNH）[3]。

据统计[4]，PNH患者年平均治疗费用达38万美元以上，治疗费用昂贵且可用药物种类少。OmCI（*Ornithodoros moubata* complement inhibitor，**1**）是一种相对分子质量约为17 000，从软蜱物种*Ornithodoros moubata*的唾液中分离出来的蛋白质，可与C5的C5d和Cub结构域结合，抑制C5的裂解。**1**具有紧密的折叠结构，中央为1个八链反平行β-桶，两侧是C端α-螺旋，并由3对二硫键稳定[5]。不同于依库珠单抗，**1**具有双重功能，除了可以靶向C5外，还可以高亲和力捕获促炎症因子白三烯B4（leukotriene B4，LTB4），具有抗炎功能[6]，开发价值较高。**1**被开发用于PNH、造血干细胞移植相关血栓性微血管病（transplantation-associated thrombotic microangiopathy，TA-TMA）等疾病的治疗，目前正处于临床Ⅲ期试验中。

目前尚无完整**1**制备方法的相关报道。已有的制备方法多是利用大肠埃希菌包涵体表达，不利于二硫键的正确折叠和配对[7]。本研究以大肠埃希菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）为工程宿主制备**1**，将**1**和腺苷三磷酸结合盒（ATP-binding cassette，ABC）转运蛋白融合表达并分泌至胞外。在此过程中，**1**分子内的3对二硫键可自发形成。融合蛋白经酶切去除标签后得**1**粗品，再经过纯化得高纯度**1**。

1 仪器与试药

5BG-900型5 L机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；SCG-100型蛋白纯化系统（苏州赛普仪器有限公司）；SpectraMax i3x型多功能酶标仪（美国美谷分子仪器有限公司）；Powerpac Basic型垂直电泳仪（美国Bio-Rad有限公司）；ZHWY-2112B型振荡培养箱（上海知楚仪器有限公司）；ACP-1010D型13K中空纤维超滤膜（旭化成株式会社）；Avanti J-25型离心机、Microfuge 20R型离心机（美国Beckman公司）；Alliance e2695-2489型高效液相色谱仪、Xevo G2-XS QTof型高分辨质谱仪、Acquity QDa型质谱检测器（美国Waters公司）；Biacore 8000（GE Healthcare公司）；0.22 μm水系微孔过滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）。

硫酸卡那霉素（纯度98.0%，批号A715BA0002）、氯霉素（chloramphenicol，CPL，纯度98.0%，批号A795BA0236）、人类C5蛋白（纯度>95.0 %，批号20230120）均购自武汉艾美捷科技有限公司；异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside，IPTG，纯度99.0 %，批号H425BA0014）和BCA蛋白定量检测试剂盒均购于生工生物工程（上海）股份有限公司；巴比妥酸（纯度99.0 %，批号75833B）、三氟乙酸（TFA，纯度99.5 %，批号C12228043）均购自上海泰坦科技股份有限公司；脱纤维绵羊血红细胞（河南跃驰生物技术有限公司，批号20230712）；溶血素（兔抗绵羊红细胞抗体，纯度99.9%，批号20230322）、豚鼠血清（纯度99.0%，批号20230617）均购自北京博尔西科技有限公司；PAGE凝胶快速制备试剂盒、双色预染蛋白Marker（相对分子质量10 000～250 000）均购于上海雅酶生物医药科技有限公司；其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

E. coli DMR605菌株由本实验室构建保存。

2 方法与结果

2.1 培养基及主要溶液的配制

LB培养基：大豆蛋白胨10 g/L、酵母抽提物5 g/L、氯化钠10 g/L；用4 mol/L氢氧化钠调至pH 7.0；121 ℃灭菌30 min。

收稿日期：2024-01-08

作者简介：汪燕丹（1998—），女，硕士研究生，专业方向：微生物及生化药学。

通信作者：冯 军（1971—），男，研究员，从事蛋白质及多肽药物的开发与研究。

E-mail：fengjdmr@163.com

发酵培养基：甘油 30 g/L，二水合枸橼酸钠 5.9 g/L，硫酸铵 5.2 g/L，十二水合磷酸氢二钠 8.6 g/L，二水合磷酸二氢钠 4.4 g/L，氯化钾 4.0 g/L，无水硫酸镁 1.0 g/L，无水氯化钙 0.25 g/L；用 5 mol/L 氢氧化钠调节至 pH 7.0；121 ℃灭菌 30 min。

补料培养基：75%甘油，0.2%无水氯化钙，0.7%无水硫酸镁；121 ℃灭菌 30 min。

微量元素：一水合枸橼酸 104 g/L，二水氯化钙 5.22 g/L，七水硫酸锌 2.06 g/L，四水硫酸锰 2.72 g/L，五水硫酸铜 0.81 g/L，七水硫酸钴 0.42 g/L，六水氯化铁 10.06 g/L，硼酸 0.03 g/L，二水合钼酸钠 0.02 g/L ； 2 ～ 8 ℃放置备用。

2.2 含量测定方法

色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相 A 为含 25 mmol/L 十二水合磷酸氢二钠 (PB) 的 0.1%（体积分数）三乙胺水溶液，B 为 80%（体积分数）的乙腈溶液，梯度洗脱程序如表 1 所示；流速 1 mL/min；检测波长 215 nm；柱温 45 ℃；进样量 10 μL。

表 1　梯度洗脱程序

Tab.1　Gradient Elution Procedure

t/min	A/%	B/%
0	80	20
4	80	20
8	61.5	38.5
24	57.5	42.5
25	20	80
26	80	20
34	80	20

根据酶切后底物减少和产物增加的对应关系，用产物增加量可推算出底物的减少量，即可算出蛋白的表达量。计算公式如式①所示。

$$c_x=\frac{S_x\times c_s}{S_s} \qquad ①$$

式中：S_x 为供试品溶液的峰面积 /(mV·s)；S_s 为 **1** 对照品溶液的峰面积 /(mV·s)；c_x 为供试品溶液的含量 /(g·L^{-1})；c_s 为 **1** 对照品溶液的含量 /(g·L^{-1})。

结果显示，初始发酵条件下融合蛋白表达量为 185 mg/L。该融合蛋白后续也被用于工艺优化中作为标准对照品。

2.3 高密度发酵 **1**

2.3.1 高密度发酵工艺

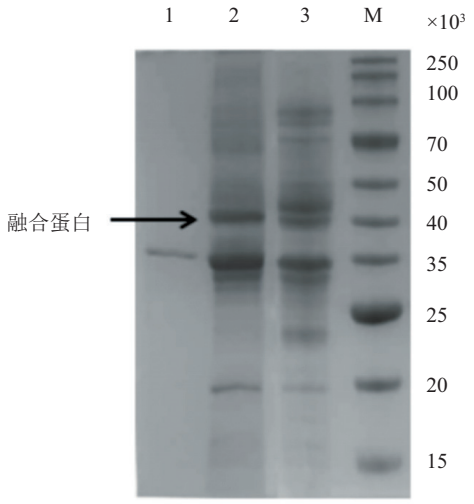
取 －80 ℃冷藏保存的重组 *E. coli* DMR605 菌株，按体积分数 2% 的接种量接种于 LB 培养基 30 mL 中，并加入终质量浓度为 25 μg/mL 的硫酸卡那霉素和 25 μg/mL 的 CPL，于 37 ℃、220 r/min 摇床培养约 4 h 至 $OD_{600\ nm}$ 为 1.5 ～ 3，作为种子液。种子液经镜检显示无污染后，以 3%的接种量转接至 5 L 发酵罐中，培养基加量为 3 L，设置发酵罐温度为 37 ℃、空气流量为 3 L/min、初始转速为 400 r/min，pH 控制在 7.0 左右。

在发酵过程中，依次通过提高转速、增加通气量、提高罐压等方法保持溶氧量 (dissolved oxygen，DO)>30%。当 $OD_{600\ nm}$ 达到 25 ～ 35、溶氧量和 pH 值都迅速上升时，开始缓慢滴加补料，调控补料速度为 30 mL/h。当培养至 $OD_{600\ nm}$ 为 40 ～ 50 时，加入终浓度为 8% 的阿拉伯糖和 0.7% 的硫酸镁；当培养至 $OD_{600\ nm}$ 为 70 ～ 80 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导，并调整补料速度为 12 mL/h，温度为 25 ℃。诱导培养 20 h 后结束发酵，15 ℃离心 (6 500×*g*) 20 min，收集发酵上清。

对所得发酵上清液进行 SDS-PAGE 检测，点样量为 5 μL。结果如图 1 所示，诱导后发酵上清液和诱导后抽提液均在相对分子质量 43 000 处呈现 1 条明显的蛋白条带，与 DMR605 融合蛋白的理论相对分子质量相符，说明重组菌经 IPTG 诱导后有表达，并且主要以胞外可溶的形式表达。

2.3.2 高密度发酵工艺优化

为了进一步提高融合蛋白的表达量，接下来对发酵参数进行优化。在原发酵工艺的基础上采用单因素试验分别考察了诱导溶氧量、诱导温度、诱导剂浓度和诱导时菌体密度 4 个因素的影响。分别设定 DO 为小于 20%、20%～ 50%、50%～ 80%和大于 80%，诱导温度为 20、25、30、37 ℃，IPTG 诱导剂浓度为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L，诱导菌体密度 $OD_{600\ nm}$ 为 40±5、60±5、80±5、100±5、120±5，其余条件同“**2.3.1**”项下，并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，计算各条件下的融合蛋白表达



1—未诱导发酵上清液；2—诱导后发酵上清液；3—诱导后抽提液；M—标准蛋白质。

图 1 *E. coli* 表达 1 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE Analysis of **1** Expressed by *E. coli*

量，结果如图 2、3 所示。

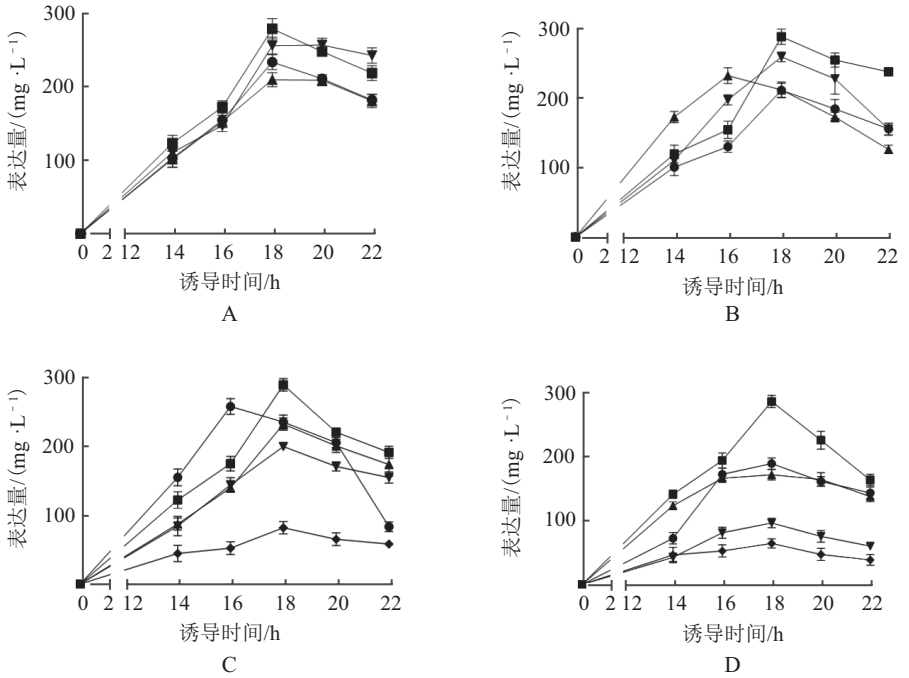
以融合蛋白表达量高为目标，得优化发酵工艺参数为：诱导溶氧 20%～50%，诱导温度 25 ℃，诱导剂浓度 0.1 mmol/L，诱导 $OD_{600\ nm}$ 为 60。对以上优选参数进行发酵验证，得到融合菌株的表达量为 (317±12) mg/L (n=3)。

2.4. 预处理及分离纯化

2.4.1 预处理及酶切

首先利用调酸的方式对含有 **1** 的发酵液进行预处理工艺探索。按“**2.3.1**”项下方法，以优化工艺高密度发酵，得 **1** 发酵液。用 2 mmol/L 盐酸调节 **1** 发酵液 pH 值分别至 5.5、5.0、4.5、4.0、3.0，离心 (6 500×g) 10 min，取上清液，进行 SDS-PAGE 检测。结果如图 4 所示，调至 pH 4.0～4.5 时，可去除大量杂蛋白及高聚物，且蛋白损失量较少。

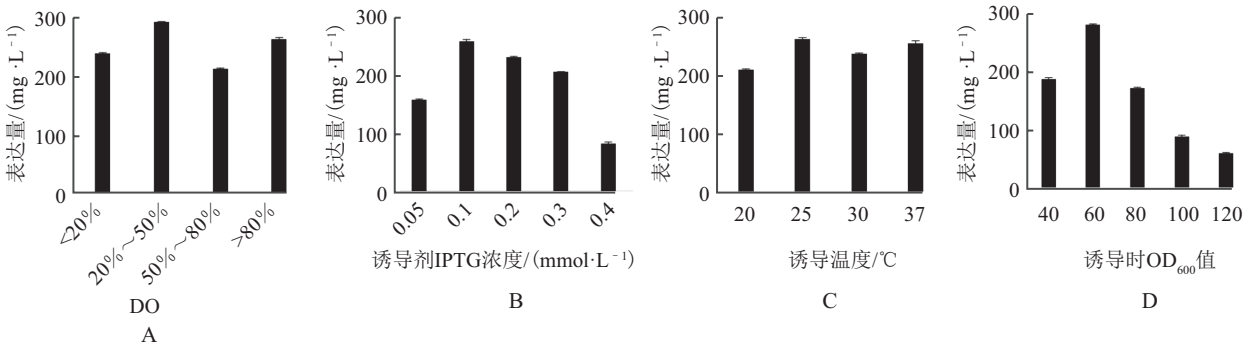
酶切：取 **1** 发酵液，用 2 mmol/L 盐酸调至 pH



A—诱导溶氧 (●—DO<20%；■—DO 为 20%～50%；▲—DO 为 50%～80%；▼—DO>80%)；B—诱导温度 (●—20 ℃；■—25 ℃；▲—30 ℃；▼—37 ℃)；C—诱导剂浓度 (●—0.05 mmol/L；■—0.1 mmol/L；▲—0.2 mmol/L；▼—0.3 mmol/L；◆—0.4 mmol/L)；D—诱导时菌体密度 (●—$OD_{600\ nm}$=40；■—$OD_{600\ nm}$=60；▲—$OD_{600\ nm}$=80；▼—$OD_{600\ nm}$=100；◆—$OD_{600\ nm}$=120)。

图 2 不同条件下表达量随时间变化图 (n=3)

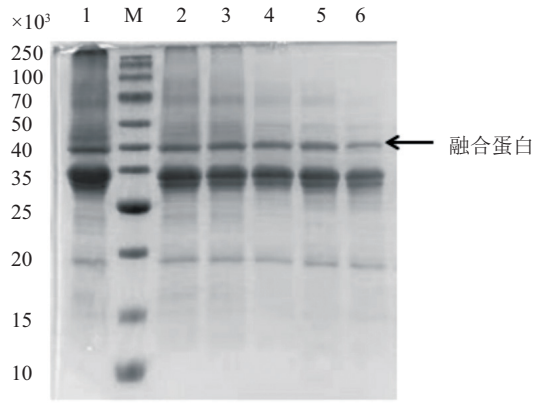
Fig.2 Changes of Expression over Time under Different Conditions (n=3)



A—诱导溶氧；B—诱导温度；C—诱导剂浓度；D—诱导时菌体密度。

图 3　不同诱导条件下最高表达量对比（*n*=2）

Fig.3　Comparison of the Highest Expression under Different Induction Conditions (*n*=2)



M—标准蛋白质；1—发酵上清液；2—发酵上清液调至 pH 5.5 澄清；3—发酵上清液调至 pH 5.0 澄清；4—发酵上清液调至 pH 4.5 澄清；5—发酵上清液调至 pH 4.0 澄清；6—发酵上清液调至 pH 3.0 澄清。

图 4　不同 pH 预处理所得上清液的 SDS-PAGE 电泳分析结果

Fig.4　SDS-PAGE Analysis Results of Supernatant Obtained from Different pH Pretreatment

4.0 ～ 4.5 后，离心 (6 500×*g*) 10 min，取上清液，添加质量浓度 1%的活性炭吸附发酵上清液中的色素。然后将发酵上清通过截留分子量为 13 000 的中空纤维管式超滤系统进行超滤浓缩，并置换到 25 mmol/L 的 PB 溶液中，加入 2 mmol/L 的 $CaCl_2$、10 u/mg 的肠激酶，于 25 ℃、pH 8.0 条件下酶切 10 h。

2.4.2　分离纯化

酶切后的样品调至 pH 6.5，经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤后进行分离纯化。用流动相 A (25 mmol/L 的 PB 溶液，pH 6.5) 平衡阴离子交换色谱柱 (HiTrap Q HP，5 mL)，上样 100 mL 后用流动相 B（含 25 mmol/L PB 和 1 mol/L 氯化钠的水溶液，pH 6.5）进行梯度洗脱 [B 1%～ 100%，20 个柱体积 (CV)；B 100%，4 个 CV], 收集并检测洗脱样品，合并含有 **1** 的洗脱液，即得阴离子交换色谱纯化样品，纯度为 68.5%。

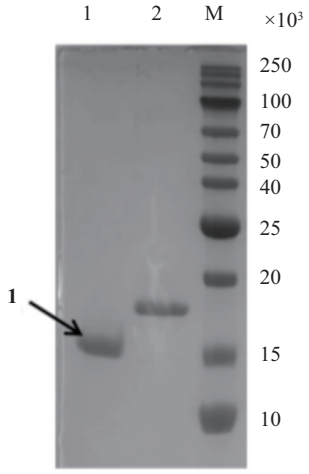
经阴离子交换一步纯化后的样品经反相色谱进一步纯化。

反相色谱条件：色谱柱 Kromasil 300-10-C_4 柱 (10 mm×250 mm)；流动相 A 为 25 mmol/L 的 PB 溶液 (pH 6.5)，B 为 80%的乙腈溶液，梯度洗脱 (0—6 min，B 0—25%；6—46 min，B 25%—35%；46—55 min，B 35%—65%)；检测波长 215 和 280 nm；流速 5 mL/min；收集体积 每管 5 mL。

将得到的产物进行合并，即得纯化后的 **1**。取 **1** 和加 10 mmol/L 的二硫苏糖醇 (dithiothreitol，DTT，还原剂）的 **1** 进行 SDS-PAGE 分析，点样量为 5 μL，结果如图 5 所示。纯化后的 **1** 在 16 000 附近呈现单一的蛋白条带，并在加入还原剂的 **1** 条带上移，说明二硫键打开，与理论值相符。

2.5　纯度分析和质谱鉴定

取浓缩后的样品，进行 RP-HPLC 检测。色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相 A 为含 25 mmol/L PB 的 0.1%（体积分数）三乙胺溶液，B 为 80%（体积分数）的



1—纯化 **1**；2—纯化 **1**+DTT；M—标准蛋白质。

图 5 纯化后 1 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.5 SDS-PAGE Analysis of Purified **1**

乙腈溶液，梯度洗脱（0—4 min，A 80%；4—24 min，A 80%—40%；24—26 min，A 40%—20%；26—29 min，A 20%—80%）；柱温 45 ℃；检测波长 215 nm；流速 1.0 mL/min。检测结果如图 6 A 所示，主峰呈现单一的峰，纯度为 98.2%。

采用液相色谱 - 质谱联用（LC-MS）对 **1** 和经 10 mmol/L 的 DTT 还原后的 **1** 样品进行分析。

色谱条件：色谱柱 YMC Triart Bio C_4 柱（3.0 mm×100 mm，1.9 μm）；柱温 50 ℃；流速 0.5 mL/min；检测波长 全波长检测；流动相 A 为体积分数 0.1%的甲酸水溶液，B 为体积分数 0.1%的甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—1 min，A 90%；1—9 min，A 90%—30%；9—9.5 min，A 30%；9.5—10 min，A 30%—90%）；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 ESI 电离源；检测模式 正离子模式；质量扫描范围 *m/z* 50 ～ 1 500；离子源温度 120 ℃；锥孔电压 40 V；毛细管电压 正极 3.0 kV；碰撞气 Ar；脱溶剂气 N_2；脱溶剂流速 600 L/h；脱溶剂温度 250 ℃；锥孔气 N_2；锥孔气流速 100 L/h；碰撞电压 30 eV；数据采集模式 MS 模式。

检测数据采用 UniDec 8.0 软件进行去卷积化分析。结果如图 6B、C 所示，**1** 相对分子质量为 16 779；根据图 6D 可知，3 对二硫键还原后 **1** 的相对分子质量为 16 785。二者均与理论值一致。

2.6 1 的活性测定

2.6.1 经典途径补体活性（CH50）测定

补体能使溶血素致敏的绵羊红细胞（SRBC）发生溶血，当致敏的绵羊红细胞浓度恒定时，溶血程度与补体含量和补体活性成正比关系[8]。根据这一原理测试了 **1** 结合补体抑制细胞溶血的能力。

依次用 GVBE 缓冲液（0.1%明胶，5 mmol/L 巴比妥酸，145 mmol/L NaCl，10 mmol/L EDTA；pH 7.4）和 GVB^{2+} 缓冲液（0.1%明胶，5 mmol/L 巴比妥酸，145 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L $MgCl_2$，0.15 mmol/L $CaCl_2$；pH 7.4）洗涤绵羊血后，用 GVB^{2+} 缓冲液将血液稀释到每 1 mL 含 1×10^9 个细胞，即得溶血素敏化红细胞（EA）。取 EA，37 ℃孵育 1 h。然后将孵育后的致敏 EA 95 μL、豚鼠血清（效价为 1 u）95 μL 以及不同浓度的 **1**（稀释浓度为 60 ～ 0.2 nmol/L）10 μL 混合，在 37 ℃下孵育 0.5 h，离心（2 500×*g*）10 min，收集上清液至 96 孔板。同时配制 EA 100 μL 与水 100 μL 的混合液作为 100%溶血对照；EA 100 μL 与 GVB^{2+} 缓冲液 100 μL 的混合液作为空白对照；EA 95 μL、豚鼠血清 95 μL 和 PBS 10 μL 的混合液作为阴性对照；EA 95 μL、灭活豚鼠血清 95 μL（56 ℃，0.5 h）和 PBS 10 μL 的混合液作为阳性对照。所有样品采用酶标仪在 412 nm 处测定吸光值，并按式②计算抑制率，结果如图 7 所示。每组样品测试至少重复检测 3 次。使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行非线性回归拟合，计算得 **1** 抑制红细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）为 8.59 nmol/L，和文献[6]报道的（7.10±0.3）nmol/L 接近，且 R^2=0.990 5，曲线拟合度好，表明其具有较好的抑制溶血的能力，同时也证明了其 3 对二硫键的正确配对。

$$抑制率/\% = 1 - \frac{(A_{测量} - A_{阳性})/(A_{100\%\ lysis} - A_{空白})}{(A_{阴性} - A_{阳性})/(A_{100\%\ lysis} - A_{空白})} \qquad ②$$

2.6.2 1 与 C5 结合活性试验

利用表面等离子体共振（surface plasmon resonance，SPR）法进行实时亲和力测量。将人补体 C5 蛋白用 PBS 稀释至 10 μg/mL，在 pH 2.5、温度 25 ℃的条件下固定在 CM5 传感器芯片上，过程中用流速为 10 μL/min 的 1×PBS（pH 7.4）缓冲液连续冲洗 200 s，

至配体密度为 7 760 共振单元 (RU)。随后，用 0.02% PBST（含 0.02% Tween 的 PBS 溶液）配制不同浓度的 **1** 工作液进行试验，结合和离解分别进行 120 s，不同浓度的 **1** 测量间隔用 2 mmol/L $MgCl_2$ 溶液再生 30 s，以中断 OmCI 蛋白和 C5 之间的强静电相互作用。通过对注入 3 次缓冲空白溶液确定的平均基线进行校正，对在线控制的空白通道测量的相应信号进行扣除，将数据拟合到双分子络合物形成的 Langmuir 1 ∶ 1 绑定模型中，利用 BiaEvaluation Software 2.0 软件评估确定动力学参数，结果如表 2 所示。

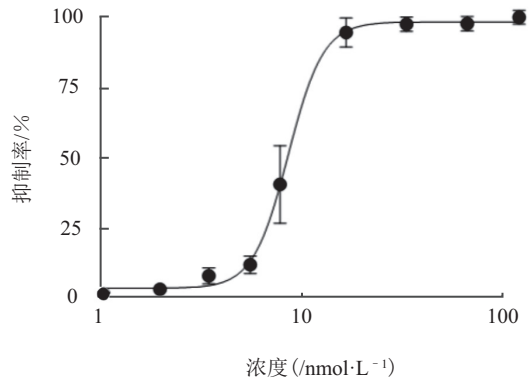


图 7　1 在豚鼠血清中的抑制率 - 浓度曲线（*n*=3）

Fig.7　The Inhibition Rate-concentration Curve of **1** in Guinea Pig Serum (*n*=3)

表 2　1 与 C5 结合 K_D 值

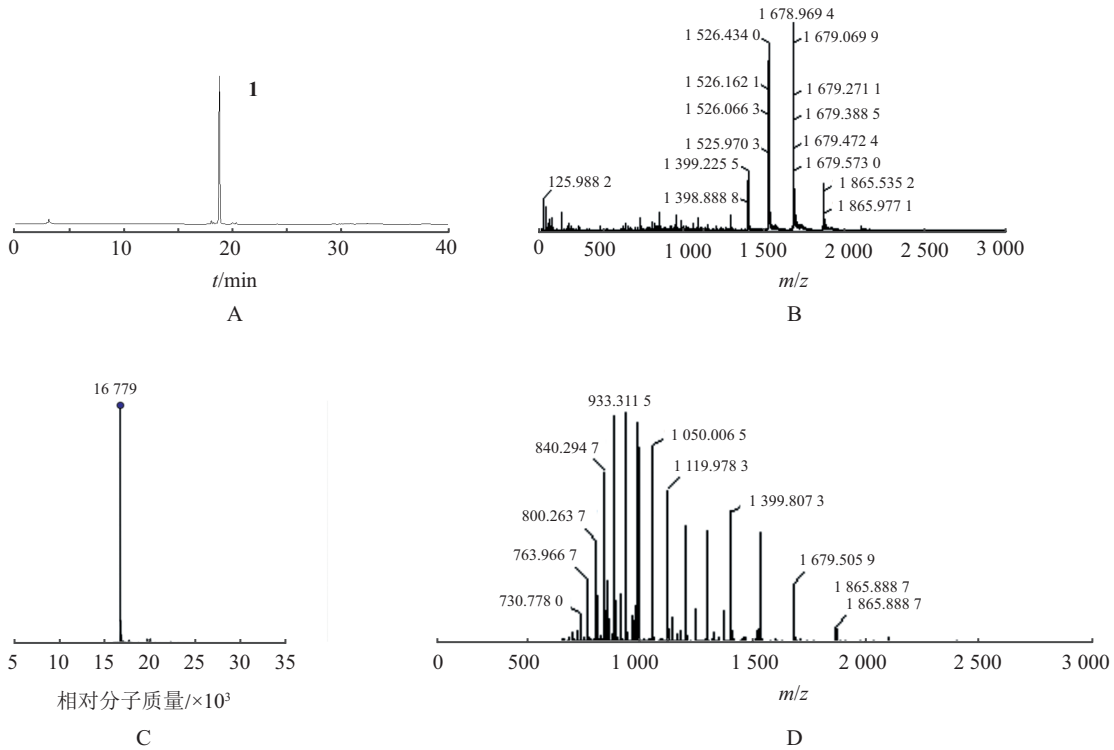
Tab.2　K_D Value of **1** Combined with C5

参数	数值
K_D/(nmol·L^{-1})	4.74
K_a/(mol·L^{-1}·s^{-1})	3.10×10^5
K_d/(s^{-1})	1.47×10^{-3}
R^2	0.992 1

经计算，**1** 的 K_D 值为 4.74 nmol/L，在文献[1]报道的 K_D 值范围（1 ～ 18.5 nmol/L）内，且卡方拟合结果可信，这说明其结合 C5 的能力良好。

3　讨论

随着第一代人源化 C5 抑制剂依库珠单抗的问世[9]，人们对补体药物的研究更加深入。补体药物



A—RP-HPLC 谱图；B—**1** 质谱图；C—经去卷积化处理后的 **1** 质谱图；D—经 10 mmol/L 的 DTT 还原后 **1** 的质谱图。

图 6　纯化后 1 的 RP-HPLC 谱图和质谱图

Fig.6　RP-HPLC Chromatogram and Mass Spectra of Purified **1**

的适应证范围也越来越广，目前约有200种在研药物用于不同适应证的开发。其中，**1**被证明具有广泛的跨物种活性[10]，可协同作用于C5和LTB4，达到同时抑制补体活性和抗炎的效果。而且**1**高度可溶且稳定性良好，有利于可溶表达，形成稳定的三级结构。此外，部分亚洲PNH患者具有C5遗传变异，会干扰依库珠单抗与C5的结合，而临床研究[11]结果显示**1**对这类患者有效。除了PNH外，**1**对于大疱性类天疱疮、特应性角膜结膜炎、血栓性微血管病均有较好的治疗效果。

在现有的文献[2,6]报道中，**1**的制备工艺复杂、制备周期长，且产量普遍较低。例如：基于Wacker GmbH的专利[12]对*E. coli*进行改良后的发酵工艺最高产量是0.4 mg/L[6]。本研究采用普通*E. coli*表达**1**，产量可达120 mg/L，远高于0.4 mg/L。ABC转运蛋白是一类跨膜蛋白，通过ATP水解成ADP产生的能量，特异性地实现底物逆浓度梯度运输[13]。本研究借助ABC转运蛋白实现以胞外可溶的方式表达融合蛋白，在确保分子内3对二硫键自发形成的基础上，有效降低了目的蛋白分离、纯化的难度。

目前，国内关于**1**的制备研究报道很少，本研究探索得到一条高效、稳定、低成本的C5补体抑制剂的制备工艺路线，并对产物的补体活性、C5结合活性进行表征，证明了其有效性，为后续**1**类药物的生产制备及性能改造提供了研究基础。

参考文献：

[1] COSS S L, ZHOU D L, CHUA G T, *et al*. The complement system and human autoimmune diseases [J]. *J Autoimmun*, 2023, **137**: 102979.

[2] FRYE A M, HART T M, TUFTS D M, *et al*. A soft tick *Ornithodoros moubata* salivary protein OmCI is a potent inhibitor to prevent avian complement activation [J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2020, **11**(2): 101354.

[3] SYED S, KHAN R, KHURRAM F, *et al*. Treatment of eculizumab refractory paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a systematic review about current treatment options and future direction [J]. *SAGE Open Med*, 2023, **11**: 20503121231181267.

[4] TOMAZOS I, SIERRA J R, JOHNSTON K M, *et al*. Cost burden of breakthrough hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving ravulizumab versus eculizumab [J]. *Hematology*, 2020, **25**(1): 327-334.

[5] ROVERSI P, LISSINA O, JOHNSON S, *et al*. The structure of OmCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system [J]. *J Mol Biol*, 2007, **369**(3): 784-793.

[6] KUHN N, SCHMIDT C Q, SCHLAPSCHY M, *et al*. PASylated coversin, a C5-specific complement inhibitor with extended pharmacokinetics, shows enhanced anti-hemolytic activity *in vitro* [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(10): 2359-2371.

[7] PALMA A, RETTENBACHER LA, MOILANEN A, *et al*. Biochemical analysis of *Komagataella phaffii* oxidative folding proposes novel regulatory mechanisms of disulfide bond formation in yeast [J]. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 14298.

[8] BLOM A M, VOLOKHINA E B, FRANSSON V, *et al*. A novel method for direct measurement of complement convertases activity in human serum [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, **178**(1): 142-153.

[9] PATRIQUIN C J, KUO K H M. Eculizumab and beyond: the past, present, and future of complement therapeutics [J]. *Transfus Med Rev*, 2019, **33**(4): 256-265.

[10] HEPBURN N J, WILLIAMS A S, NUNN M A, *et al*. *In vivo* characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata* [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(11): 8292-8299.

[11] SCHOLS S, NUNN M A, MACKIE I, *et al*. Successful treatment of a PNH patient non-responsive to eculizumab with the novel complement C5 inhibitor coversin (nomacopan) [J]. *Br J Haematol*, 2020, **188**(2): 334-337.

[12] LEONHARTSBERGER S. *E. Coli* expression system efficiently secretes recombinant proteins into culture broth [J]. *BioProcess Int*, 2006, **4**: 64-66.

[13] 刘艳青，赵永芳. ABC转运蛋白结构与转运机制的研究进展 [J]. 生命科学, 2017, **29**(3): 223-229.