

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021108.3

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/52 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 30 日

[11] 公开号 CN 1826131A

[22] 申请日 2004.5.27

[21] 申请号 200480021108.3

[30] 优先权

[32] 2003.5.30 [33] US [31] 60/475,074

[86] 国际申请 PCT/US2004/016670 2004.5.27

[87] 国际公布 WO2004/108667 英 2004.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.23

[71] 申请人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 C·T·普尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李 波 王景朝

权利要求书 6 页 说明书 23 页 附图 13 页

[54] 发明名称

利用转谷氨酰胺酶形成新的促红细胞生成素
缀合物

[57] 摘要

本发明提供了具有生物活性的促红细胞生成素(EPO)缀合物的组合物,其中采用转谷氨酰胺酶反应来共价地并位点特异性地缀合 EPO 分子到一种非抗原性的亲水聚合物上,其也可以共价连接到一种有机分子上,这两种修饰都增加了组合物的循环血清半衰期。

1. 一种具有促使骨髓细胞增加红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素缀合物及其药学上可接受的盐或酯，包括具有下式的部分：

5 EPO- [Gln-A-X-(M)_n]_y

其中 EPO 是具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物；Gln 是选自 EPO 一级序列中一个或多个谷氨酰胺残基的谷氨酰胺残基；y 是表示经修饰的谷氨酰胺残基数目的 1 到 7 的整数；A 是胺供体部分或羟基，X 是任选的亲水聚合物部分；M 是一种任选的有机分子，其特征在于它能够增加 EPO 分子的循环半衰期；以及 n 是 0 到 15 的整数。

2. 一种具有促使骨髓细胞增加红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素缀合物及其药学上可接受的盐或酯，包括具有下式的部分：

15 EPO- [Lys-Gln-Z-X-(M)_n]_y (II)

其中 EPO 是具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物；Lys 是选自 EPO 一级序列中一个或多个赖氨酸残基的赖氨酸残基；y 是表示经修饰的赖氨酸残基数目的 1 到 8 的整数；Gln 是谷氨酰胺残基；Z 是含有能够作为转谷氨酰胺酶受体的 Gln 残基的肽或蛋白质，X 是任选的亲水聚合物；M 是任选的有机分子，其特征在于它能够增加 EPO 分子的循环半衰期；N 是 0 到 15 的整数。

3. 权利要求 1 或 2 的促红细胞生成素缀合物，其促使骨髓细胞增加红细胞产量，并且所述增加在给予所述促红细胞生成素缀合物后持续的时间段比给予未缀合的促红细胞生成素后所见的更长。

4. 权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物，其中持续的效果是由于相对于未修饰哺乳动物促红细胞生成素增加了血清半衰期。

5. 权利要求 1 或 2 的促红细胞生成素缀合物，其中 M 是一到大约六个有机部分，各自独立选自脂肪酸基团、脂肪酸酯基团、脂或磷脂。

6. 权利要求 1 或 2 的促红细胞生成素缀合物，其中亲水聚合物是聚环氧烷。

7. 权利要求 1 或 2 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述促红细胞生成素或促红细胞生成素部分选自重组的以及非重组的哺乳动物促红细胞生成素。

8. 权利要求 6 的促红细胞生成素缀合物, 其中聚环氧烷是取代的聚环氧乙烷。

9. 权利要求 6 的促红细胞生成素缀合物, 其中聚环氧烷选自聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、烷基-聚环氧乙烷、双聚环氧乙烷以及聚环氧烷的共聚物或嵌段共聚物。

10. 权利要求 1 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物键合到成熟链 EPO 的 GLN 58、GLN 59、GLN65、GLN78、GLN 86、GLN92、GLN115 中的一到七个。

11. 权利要求 2 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物键合到成熟链 EPO 的 LYS 20、LYS 45、LYS 52、LYS 97、LYS 116、LYS 140、LYS 152、LYS 154 中的一到八个。

12. 权利要求 6 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的聚环氧烷是一种具有大约 200 到大约 100,000 的分子量的聚乙二醇均聚物。

13. 权利要求 1 和 2 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物基团是直链或支链聚烷二醇链、糖链、氨基酸链或者聚乙烯基吡咯烷酮链, 并且其中所述的亲水聚合物基团具有大约 800 到大约 120,000 道尔顿的分子量。

14. 权利要求 13 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物基团是具有大于 2,000 道尔顿分子量的直链或支链的聚烷二醇链。

15. 权利要求 13 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物基团是直链或支链的聚乙二醇链或者直链或支链的取代聚乙二醇链, n 是除了 0 之外的整数, 并且有机部分选自烷基、 C_6-C_{40} 的脂肪酸基团、 C_6-C_{40} 脂肪酸酯基团、脂基团以及磷脂基团。

16. 权利要求 13 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的亲水聚合物基团是末端取代的直链或支链的聚乙二醇链, 其用选自烷基、 C_6-C_{40} 脂肪酸基团、 C_6-C_{40} 的脂肪酸酯基团、脂基团以及磷脂基团的有机部分取代。

17. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述的有机部分是棕榈酰基。

18. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中有机部分是二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

19. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中亲水聚合物-有机部分共价键合到成熟链 EPO 的 GLN 58、GLN59、GLN65、GLN78、
5 GLN 86、GLN92、GLN 115 中的一到七个。

20. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中亲水聚合物-有机部分共价键合到成熟链 EPO 的 LYS 20、LYS 45、LYS 52、LYS 97、LYS 116、LYS 140、LYS 152、LYS 154 中的一到八个。

21. 权利要求 1 的缀合物, 其中 A 是胺供体转谷氨酰胺酶底物,
10 X 是 PEG 或其它水溶性聚合物并且是任选的, 以及 M 是生物素、丹磺酰基、或者其它赋予 EPO 能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的有机部分。

22. 权利要求 2 的缀合物, 其中 A 是含有谷氨酰胺的转谷氨酰胺酶底物, X 是 PEG 或其它水溶性聚合物并且是任选的, 以及 M 是生物素、丹磺酰基、或者其它赋予 EPO 能用于研究、诊断或治疗目的
15 的生物物理特性的有机部分。

23. 一种制备具有促红细胞生成素活性的下式的 EPO 缀合物及其药学上可接受的盐或酯的方法:



20 其中 EPO 是具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物; Gln 是选自 EPO 一级序列中一个或多个谷氨酰胺残基的谷氨酰胺残基; y 是表示经修饰的谷氨酰胺残基数目的 1 到 7 的整数; A 是胺供体部分或羟基, X 是任选的亲水聚合物部分; M 是任选的有机分子, 其特征在于
25 它能够增加 EPO 分子的循环半衰期; 以及 n 是 0 到 15 的整数; 该方法包括将具有水可接触的谷氨酰胺残基的促红细胞生成素或促红细胞生成素蛋白质与预先构建的式 $\text{A}-\text{X}(\text{M})_n$ 的亲水聚合物-有机部分复合物在形成 EPO-聚合物-有机部分缀合物的条件下接触, 所述复合物在转谷氨酰胺酶存在时能作为转谷氨酰胺酶底物起作用。

30 24. 权利要求 23 的方法, 其中所述的聚合物是聚环氧烷。

25. 权利要求 24 的方法, 其中所述聚环氧烷是 α -取代的聚环氧烷。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述聚环氧烷是聚乙二醇。

27. 权利要求 23 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是哺乳动物蛋白质。

28. 权利要求 23 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是细菌蛋白质。

29. 权利要求 23 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是原核生物蛋白质。

5 30. 权利要求 23 的方法, 其中 A 是胺供体转谷氨酰胺酶底物, X 是 PEG 或其它水溶性聚合物并且是任选的, 以及 M 是生物素、丹磺酰基、或者其它赋予 EPO 能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分。

10 31. 一种制备具有促红细胞生成素活性的下式的 EPO 缀合物及其药学上可接受的盐或酯的方法:

EPO- [Lys-Gln-Z-X-(M)_n]_y (II)

其中 EPO 是具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物; Lys 是选自 EPO 一级序列中一个或多个赖氨酸残基的赖氨酸残基; y 是表示经
15 修饰的赖氨酸残基数目的 1 到 8 的整数; Gln 是谷氨酰胺残基; Z 是含有能够作为转谷氨酰胺酶胺受体的 Gln 残基的肽或蛋白质, X 是任选的亲水聚合物; M 是任选的有机分子, 其特征在于它能够增加 EPO 分子的循环半衰期; N 是 0 到 15 的整数; 该方法包括将具有水可接触的赖氨酸残基的促红细胞生成素或促红细胞生成素蛋白质与预先构
20 建的式 Gln-Z-X(M)_n 的亲水聚合物-有机部分复合物在形成 EPO-聚合物-有机部分缀合物的条件下接触, 所述复合物在转谷氨酰胺酶存在时能作为转谷氨酰胺酶底物起作用。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述的聚合物是聚环氧烷。

25 33. 权利要求 32 的方法, 其中所述聚环氧烷是 α -取代的聚环氧烷。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述聚环氧烷是聚乙二醇。

35. 权利要求 31 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是哺乳动物蛋白质。

36. 权利要求 31 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是细菌蛋白质。

37. 权利要求 31 的方法, 其中转谷氨酰胺酶是原核生物蛋白质。

30 38. 权利要求 31 的方法, 其中 A 是含有能够作为胺受体转谷氨酰胺酶底物起作用的谷氨酰胺残基的肽、蛋白质或者其它聚合物, X 是 PEG 或其它水溶性聚合物并且是任选的, 以及 M 是生物素、丹磺

酰基、或者其它赋予 EPO 能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分。

39. 一种治疗贫血症的方法，包括给予治疗有效量的权利要求 1 或 2 的缀合物。

5 40. 权利要求 39 的方法，其中所述缀合物的特征在于其相对于未缀合的促红细胞生成素增加了血清半衰期。

41. 一种含有重组或非重组哺乳动物促红细胞生成素的促红细胞生成素蛋白质或蛋白质缀合物，其中残基 GLN 58、GLN59、GLN65、GLN78、GLN86、GLN92 和 GLN115 中的任意或所有残基通过重组、酶学或化学方法进行修饰以改变转谷氨酰胺酶底物性质，从而增加循环半衰期或者改变了所述促红细胞生成素蛋白质的生物活性。

42. 权利要求 41 的促红细胞生成素蛋白质或蛋白质缀合物，其中一个或多个所述的谷氨酰胺残基被化学修饰、去除或改变为另一个氨基酸，这样就增加、降低或者消除了谷氨酰胺残基作为转谷氨酰胺酶底物起作用的能力。

43. 一种含有重组或非重组哺乳动物促红细胞生成素的促红细胞生成素蛋白质或蛋白质缀合物，其中残基 LYS 20、LYS 45、LYS 52、LYS 97、LYS 116、LYS 140、LYS 152、LYS 154 中的任意或所有残基通过重组、酶学或化学方法进行修饰以改变转谷氨酰胺酶底物性质，从而增加循环半衰期或者改变了所述促红细胞生成素蛋白质的生物活性。

44. 一种含有重组或非重组哺乳动物促红细胞生成素的促红细胞生成素蛋白质或蛋白质缀合物，其中任意残基通过重组、酶学或化学方法进行修饰以影响转谷氨酰胺酶底物性质，从而增加循环半衰期或者改变了所述促红细胞生成素蛋白质的生物活性。

45. 权利要求 1 的促红细胞生成素缀合物，其中胺供体 A 含有第二官能团，允许通过化学方法将聚合物 X 和/或有机部分 M 缀合到所述第二官能团上。

46. 权利要求 45 的促红细胞生成素缀合物，其中第二官能团是硫醇、醛、酰肼、马来酰亚胺或者半胱氨酸基团。

47. 权利要求 2 的促红细胞生成素缀合物，其中胺供体 A 含有第二官能团，允许通过化学方法将聚合物 X 和/或有机部分 M 缀合到所

述第二官能团上。

48. 权利要求 47 的促红细胞生成素缀合物，其中第二官能团是硫醇、醛、酰肼、马来酰亚胺或者半胱氨酸基团。

利用转谷氨酰胺酶形成新的促红细胞生成素缀合物

发明领域

5 本发明涉及一种用酶学方法制备的新的促红细胞生成素制剂，该方法通过一级序列的突变将基团连接到其结构上或者改变其生物活性。特别地，本发明涉及具有改变的生理化学和药物动力学性质的促红细胞生成素缀合物的化合物。

发明背景

10 促红细胞生成素（EPO）是一种天然形成的糖蛋白，其功能是作为集落刺激因子并作为主要因子参与红细胞合成的调节。促红细胞生成素通过刺激骨髓中的前体细胞、促使它们分裂并分化成为成熟红细胞而起作用。这个过程在体内是严格控制的，这样红细胞在循环中的破坏或清除才能与新细胞的形成速度匹配。天然存在的 EPO 是在肾脏中产生的一种糖蛋白（Jacobs 等人，Nature 313 (6005), 806-810 (1985)。

已经利用重组 DNA 技术来生产促红细胞生成素，其通过克隆 EPO 基因并在中国仓鼠卵巢细胞中表达（Lin, US 5618698）。重组生产的 EPO 已经作为一种治疗各种形式贫血症的有效治疗试剂供应一段时间，所述贫血症包括与慢性肾衰竭、叠氮胸苷治疗的 HIV 感染患者以及骨髓抑制性化疗的癌症患者相关的贫血症。该糖蛋白经非胃肠给药，其在含有人血清白蛋白（HSA）为载体的常规缓冲水溶液中作为静脉（IV）或者皮下（SC）注射剂。这种制剂以 EPOGEN® 和 PROCRIT® 为商品名在美国市场上销售。这些产品含促红细胞生成素，呈 1 毫升不含防腐剂的单次给药规格或者 2ml 的含防腐剂的多次给药规格的小瓶。

在这些制剂被证明非常成功的同时，某些缺陷也与之关联起来。目前，诸如促红细胞生成素的蛋白质治疗剂的生物活性周期受到血浆的短半衰期和对蛋白酶降解易感性的限制。诸如 EPO 这样的治疗性蛋白质的短半衰期只有 4 小时，为了最大的临床功效，频繁给药成为必要。这对慢性状况的治疗是不利的，并可能导致不好的病人的依从性，因此达不到最佳效果。因而进行了很大努力来增加 EPO 的血浆

半衰期。

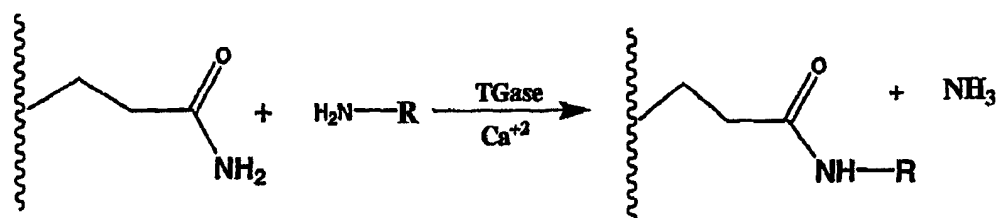
近年来，诸如聚乙二醇（PEG）的非抗原性水溶性聚合物被运用于对治疗和诊断有重大意义的多肽的共价修饰上。例如，PEG 共价连接到诸如白介素（Knauf, M. J.等人, J.Biol. Chem. 1988, 263, 15, 064; Tsutsumi, Y.等人, J. Controlled Release 1995, 33, 447）、干扰素（Kita, Y. 等人, Drug Des Delivery 1990, 6, 157）、过氧化氢酶（Abuchowski, A.等人, J. Biol Chem. 1977, 252, 3, 582）、超氧化物歧化酶（Beauchamp, C. O.等人, Anal Biochem. 1983, 131, 25）以及腺苷脱氨酶（Chen, R. 等人, Biochim, Biophys. Acta. 1981, 660, 293）的治疗性多肽上，已经报道了延长它们的体内半衰期、和/或降低它们的免疫原性和抗原性。

衍生的 PEG 化合物以前就已公开（US5438040, 1995 年 8 月 1 日，缀合物 - 稳定的多肽组合物、包含它的治疗性递送和诊断制剂以及制造和使用它的方法, N. N. Ekwuribe）。这种翻译后衍生的方法同样适用于 EPO。例如，WO94/28024 公开了一种具有促红细胞生成素活性的糖修饰的聚合物缀合物，其中 PEG 通过被氧化的糖连接。US 4904584 公开了删除赖氨酸的多肽变体的聚环氧烷缀合物，包括 EPO。WO 90/12874 描述了单甲氧基-PEG-EPO（mPEG-EPO）的制备，其中 EPO 包含了一个半胱氨酸残基，由基因工程导入，特定 PEG 试剂被共价连接到它上面。其它 PEG-EPO 组合物在 EP 605693、US 6,077,939、WO01/02017 和 EP 539167 中公开。

许多用纯化学方法通过缀合到 PEG 上（“PEG 化”）修饰蛋白质的方法都经常有一个受限制的方面，那就是没有可选择性并且经常会与存在于可接近的赖氨酸残基上和/或蛋白质的 N 端胺上的氨基不完全反应。其它的化学方法要求糖基的氧化作为修饰策略的一部分，这同样会导致不完全或不连续反应以及不明确的产物组合物。这样，考虑目前所拥有的选择，一种在温和的、位点特异性方式下修饰 EPO 的方法是更有利的。

转谷氨酰胺酶（TGases）[EC2.3. 2.13; 蛋白质-谷氨酰胺： γ -谷氨酰基转移酶]是催化钙依赖的酰基附加到伯胺上的蛋白质家族，其中肽结合的谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基团是酰基供体而伯氨基是酰基受体和胺供体。实际上，转谷氨酰胺酶通过催化相对蛋白质上的赖氨酸

酸和谷氨酰胺残基的酰胺键的形成而交联蛋白质。一个公知的例子就是纤维蛋白通过转谷氨酰胺酶因子 XIIIa 交联。这种键是稳定的并对蛋白酶有抗性，因此转谷氨酰胺酶通常被用来连接细胞的结构组分。除了以上所述的血浆形式外，转谷氨酰胺酶还在诸如肝脏、皮肤和细胞外液等组织中被发现 (Greenberg, C. S 等人. FASEB J. 1991, 5, 3071-3077)。转谷氨酰胺酶的原核生物形式也是公知的 (Ando, H. 等人. Agric.Biol. Chem 53(10), 2613-2617, 1989; Washizu, K. 等人. Biosci. Biotech. Biochem 58(1), 82-87, 1994)。转谷氨酰胺酶的特征是非常显著的，每个蛋白质作为胺受体的残基通常只有一个，或者有些情况下有两个谷氨酰胺残基。来自不同的哺乳动物组织和物种的转谷氨酰胺酶已被广泛研究 (Folk, J. E. 和 Chung, S. I. Adv. Enzym Molec. Biol. 1973, 38, 109-191; Folk, J. E. 和 Finlayson, J. S. Adv. Protein Chem. 1977, 31, 1-133; Folk, J. E 和 Cole, P. W. Biochim Biophys. Acta 1966, 122, 244-264; Folk, J. E.; Chung, S. I. Methods in Enzymology 1985, 113, 358-375;)。因此，转谷氨酰胺酶可以并且已经被用来在某些蛋白质上进行位点特异性的修饰谷氨酰胺残基 (US6010871; US6331422; US6322996)。



蛋白质

蛋白质

尽管有许多研究，但是关于转谷氨酰胺酶专一性的决定子的细节还很少被阐明。转谷氨酰胺酶在底物专一性上不同，但通常还没有鉴定出对于各个酶，作为含有或者接近底物残基的特定的序列基序的优先性 (Gorman, J. J.; Folk, J. E. J. Biol. Chem. 1981, 256, 2712-2715; Gorman, J. J.; Folk, J. E. J. Biol. Chem. 1980, 255, 419-427)。唯一确定的规则是谷氨酰胺残基必须与 N 端距离至少 3 个残基来作为任意转谷氨酰胺酶的底物。通常，谷氨酰胺重复都显示出可以加强在这

个重复中的谷氨酰胺残基的受体性质，谷氨酰胺残基的易接近性也显示出在决定它们作为转谷氨酰胺酶底物的能力方面非常重要 (Kahlem, P.等人. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 14580-14585)。

5 尽管转谷氨酰胺酶修饰的位点特异性性质从 20 世纪 60 年代就被人们所知，在食物稳定方面的工业用途也进行了实践，但它在治疗性蛋白质修饰方面的用途最近才开始被探索。利用转谷氨酰胺酶将 5000 道尔顿或更大的含有脂肪族氨基的聚合物连接到蛋白质连接的谷氨酰胺残基在最近被 Sato 等在 US 6,322,996 中公开。该专利也公开了工程化蛋白质使其包含附加 N 端或 C 端肽的方法，它们公知为利用转谷氨酰胺酶催化来随后连接大的聚合物之目的转谷氨酰胺酶底物。
10 IL-2 的 PEG 化已利用这些方法完成 (Sato, H.; Ikeda, M.; Suzuki, K.; Hirayama, K. Biochemistry 1996, 35, 13072- 13080)，利用细菌转谷氨酰胺酶将 IL-2 交联到各种其它蛋白质上同样得到了证实
15 (Takahara, Y.等人. US6010871)，以及将 XIIIa 因子用于组织工程的一种修饰的纤维蛋白基质的生产 (US6331422)。

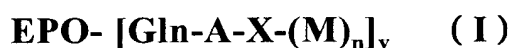
修饰或添加基序到天然存在的分子上将带来多种风险，这对那些正在进行目的是为治疗性蛋白质提供生产方法的基因工程技术实践的人员来说是公知的。这些效果中最明显的就是丧失或部分丧失生物活
20 性。在其它情况下，来自构建的表达载体在引入哺乳动物细胞系时，其表达水平低的无法接受。偶联或融合一种来自天然存在的蛋白质底物的已知底物序列的另一种方法可能产生抗原表位并在患者体内引起不必要的免疫反应，这基本上限制了治疗性蛋白质的长期功效。此外，利用攻击最具反应性的官能团赖氨酸的化学方法来修饰蛋白质也改变了蛋白质的等电点和 pKa。因此，当目的是提供安全并经济生产的产品时，明白这些限制是非常重要的。把谷氨酰胺的酰胺基转化为烷基
25 化胺并不会改变谷氨酰胺的等电点和电荷。这样，利用产生稳定共价键同时不会改变蛋白质的电荷的酶学方法是令人期望的。迄今为止，EPO 还没有被认为是一种天然的转谷氨酰胺酶底物，也没有描述过为了产生或消除 EPO 中的转谷氨酰胺酶底物位点而对分子重新工程化。
30

发明概述

本发明提供了一种具有生物活性的 EPO 缀合物的组合物，其中

EPO 是一种具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物，其中利用转谷氨酰胺酶反应来共价地并位点特异地将 EPO 分子缀合到非抗原性亲水性聚合物上，其也可以共价地连接到一个有机分子上，两种修饰都可以增加组合物的循环血清半衰期。

更特别的是，本发明的一个实施例涉及如下式所描述的 EPO 衍生物



其中 EPO 是一种具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物；Gln 是选自 EPO 一级序列中一个或多个谷氨酰胺残基的谷氨酰胺残基；y 是表示经修饰的谷氨酰胺残基数目的 1 到 7 的整数；A 是胺供体部分或羟基，X 是任选的亲水聚合物部分；M 是一种任选的可以增加构建体的循环半衰期的有机分子（包括肽和蛋白质）；以及 n 是 0 到 15 的整数。可以根据需要将 X 和 M 部分修饰为包括设计用于为偶联或化合价提供合适功能性的基团。

有机分子 M 是任选的，并且是共价连接到亲水性聚合物上的。M 选自能够增加所得到的构建体在体内的半衰期的有机部分，其包括脂肪酸、二羧酸、二羧酸的单酯或单酰胺、含有饱和脂肪酸的脂、含有不饱和脂肪酸的脂、含有饱和与不饱和脂肪酸混合物的脂、简单的碳水化合物、复杂的碳水化合物、碳环化合物（比如类固醇）、杂环化合物（比如生物碱）、氨基酸链、蛋白质、酶、酶辅因子或维生素。

亲水性聚合物优选诸如聚乙二醇这样的聚环氧烷。

本发明的另一个实施方案涉及如下式所描述的 EPO 衍生物



其中 EPO 是具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的促红细胞生成素或其药学上可接受的衍生物；Lys 是选自 EPO 一级序列中一个或多个赖氨酸残基的赖氨酸残基；y 是表示经修饰的赖氨酸残基数目的 1 到 8 的整数；Gln 是谷氨酰胺残基；Z 是含有能够作为转谷氨酰胺酶受体的 Gln 残基的肽或蛋白质，X 是任选的亲水聚合物；M 是任选的能够增加构建体的循环半衰期的有机分子（包括肽和蛋白质）；N 是 0 到 15 的整数。可以根据需要将 X 和 M

部分修饰为包括设计用于为偶联或化合价提供合适功能性的基团。

本发明也提供了制备缀合物的方法。这些方法包括利用转谷氨酰胺酶催化氨基供体或烷基胺-缀合物的酰基转移到未糖基化的或糖基化 EPO 或者具有促红细胞生成素活性的并具有谷氨酰胺残基的糖蛋白的一个或多个特定谷氨酰胺残基上的步骤。这些方法也包括利用转谷氨酰胺酶催化在 EPO 上的氨基供体的酰基转移到一个或多个在肽、蛋白质或其它聚合物中的谷氨酰胺残基上的步骤。

本发明公开的内容包括了 EPO 作为转谷氨酰胺酶底物。本发明同样也包括一种改变 EPO 分子的方法，这个方法是通过重组或利用化学方法来突变，增加或修饰任意的谷氨酰胺残基或赖氨酸残基或者任意其它残基，以使 EPO 分子具有或提高作为转谷氨酰胺酶底物性质的能力，从而允许将 EPO 分子缀合到亲水性聚合物或者其它的含有胺供体或胺受体部分的有机部分上。因为转谷氨酰胺酶底物的性质可涉及蛋白质的生物活性，所以要通过重组或化学方法改善或减少 EPO 分子的转谷氨酰胺酶底物的性质。因此，根据本发明，EPO 分子可以被修饰以增加循环半衰期或提高哺乳动物促红细胞生成素或任意缀合物或突变的促红细胞生成素蛋白质的生物活性。

本发明也提供了治疗贫血症或与内源促红细胞生成素或红细胞生成减少相关的其他疾病或者期望增加红细胞的状况的方法。在本发明的这个方面，治疗包括给予需要这种治疗的哺乳动物有效量的所述缀合物。作为本发明的结果就是提供了在体内具有充分延长的促红细胞生成素活性的缀合物。

这里所公开的技术在提供增加了循环半衰期和改善了促红细胞生成潜能的 EPO 分子方面具有优势。此外，本发明中被修饰的 EPO 分子在缀合和/或突变被很好地控制以让最终产品被充分确定和表征方面也具有优势。

附图简要说明

图 1 显示了具有方框中的谷氨酰胺残基的人促红细胞生成素成熟链的氨基酸序列。

图 2 是 SDS-PAGE 凝胶照片，其中荧光标记的转谷氨酰胺酶底物丹磺酰尸胺 (DC) 在存在或不存在转谷氨酰胺酶的情况下与蛋白质一起温育。这个标记通过 UV 暴露来显示：第 1 道=分子量标记。第 2

道 = EPO + DC + TGase。第 3 和 4 道 = EPO + DC; 第 5 道 = EPO 标准; 第 6 道 = b-酪蛋白 + DC + TGase。b-酪蛋白是一种已知的转谷氨酰胺酶底物, 并被用作阳性对照。在第 2 道中的荧光 35 K 条带对应连接有一个或多个 DC 基团的 EPO。在第 2 道中, 更大的分子量条带可能对应 EPO 二聚物和三聚物。同样的凝胶被银染来鉴别分子量标记和其他非荧光条带。

图 3. (a) 脱糖基化 EPO、(b) 脱糖基化 EPO-尸胺-X-生物素 (应该看见+424 的添加)、(c) 脱糖基化 EPO-DC (应该看见+318 的添加) 和 (d) 脱糖基化 EPO-cbz (应该看见+319 的添加) 的 MALDI MS 分析。

图 4(a) EPO 的 Lys-C 消化 (对照); (b) EPO-X-生物素的 Lys-C 消化; (c) 脱糖基化 EPO 的 Lys-C 消化 (对照); (d) 脱糖基化 EPO-DC 的 Lys-C 消化的 MALDI TOF 质谱。

图 5. (a) 脱糖基化 EPO- (Cbz-QG) 批号 1; (b) 脱糖基化 EPO- (Cbz-QG) 批号 2; (c) 脱糖基化 EPO- (Cbz-QG) 批号 1 的 Lys-C 消化 batch#1; (d) 脱糖基化 EPO- (Cbz-QG) 批号 1 的 Lys-C 消化的 MALDI TOF 质谱。

图 6 显示了一幅吸光度与添加的用于与 EPO- (Cbz-QG) 或未修饰的 EPO (EPO-对照) 温育的 UT7 细胞造血作用的 EPO 种类的浓度的曲线图。

图 7 是银染的聚丙烯酰胺凝胶的照片, 它显示了尸胺-PEG (20K) 通过转谷氨酰胺酶的催化作用连接到 EPO 上: 第 1 道 = 分子量标记。第 2 道 = EPO + TGase + DC。第 3 道 = EPO 标准。第 4 道 = EPO + TGase (6 小时); 第 5 道 = EPO + TGase (22 小时); 第 6 和 7 道 = TGase (分别 6 小时和 22 小时); 第 8 道 = PEG (20K) - 尸胺; 第 9, 10 和 11 道 = EPO + PEG20K-尸胺 + TGase (分别 6 小时, 22 小时以及 22 小时 (减少))。注意, EPO + DC 样品过量加样, 这样 DC 的荧光信号才能最大化。

图 8 显示了 EPO + PEG20K-尸胺 + TGase 反应混合物的 SELDI-MS 中的强度与质荷比的记录曲线。在 51, 010 的峰值对应于 PEG 化的 EPO 产物。

图 9 显示了 EPO (第 1 道) 和纯 EPO-PEG5K-腐胺 (第 2 道)

的银染的 SDS-PAGE 凝胶 (4-20%)。注意非常少的未被修饰的 EPO 在 EPO-腐胺-PEG5K 样品中存在。

图 10 显示了 (EPO + PEG (5K) -腐胺+ TGase) 反应混合物的 SELDI-MS 中的强度与质荷比的记录曲线。

5 图 11 显示了纯化的 EPO-PEG (5K) -腐胺的 SELDI-MS 中的强度与质荷比的记录曲线。(注意 PEG 基团倾向于抑制电离, 因而峰值区域并不表示存在的每种物质的相对量。)

图 12 显示了一幅吸光度与添加的用于与 EPO-腐胺-PEG (5K) 或未修饰的 EPO (EPO-对照) 温育的 UT7 细胞的造血作用的 EPO 10 种类的浓度的曲线图。

图 13 显示了 EPO +腐胺-PEG-DSPE3.4K + TGase 反应 (55% 乙醇和 45% 转谷氨酰胺酶的反应缓冲液, pH 7.5) 的 SELDI-MS 中的强度与质荷比的记录曲线。28.8K 的峰值对应于未修饰的 EPO, 而 33.7K、37.5K 和 41.6K 的峰值对应于每个 EPO 增加了一个、两个和 15 三个腐胺-PEG-DSPE3.4K 部分。(注意 PEG 基团倾向于抑制电离, 因而峰值区域并不表示存在的每种物质的相对量。)

发明详述

EPO 主要在肾脏中产生, 其作用是通过结合到前体细胞上的受体二聚体而导致红细胞的分化以及随后的增殖 (Livnah, O.等人. 科学 (Science) 1999, 283, 987-990)。EPO 一级序列有 7 个谷氨酰胺残基 (SEQ ID NO: 1)。汇编的 NCBI 文档 P01588 记录了在前体蛋白质位置 85、86、92、105、113、119 和 142 的谷氨酰胺对应于成熟链的 58、59、65、78、86、92 和 115。这些都在图 1 中被显示出来。

EPO 通过两个结合面结合到受体上, 其中一个结合受体的亲和力比另外一个强。EPO 的晶体结构已经被分辨 (Syed, 等人. Nature 395 (6701), 511-516 (1998); Cheetham, J. C. 等人. Human Erythropoietin, NMR minimized average structure, 1998 年 9 月 8 日。蛋白质数据库 ID 1 BUY)。结合到其受体上的 EPO 的晶体结构也已经被描述 (见 Stroud, R. M.和 Reid, S. W., Erythropoietin 25 complexed with extracellular domains of erythropoietin receptor. 蛋白质数据库 ID1CN4)。在这个复合体中, EPO 上的八个赖氨酸残基中的四个与受体直接接触, 而 7 个谷氨酰胺残基中除了一个外, 其他 30

都是溶剂可接近的并只有 Gln78 显示与受体可能的相互作用。从这些观察可知,很显然在 EPO 上的谷氨酰胺残基为 PEG 或其它聚合物在不干扰受体结合的情况下进行连接提供了相当的可能性,同时在某种程度上赖氨酸残基没有区别的修饰大多数无疑受到结合的干扰。

- 5 尽管在 EPO 上存在的赖氨酸残基中有几个涉及受体结合,但如果 PEGs 或其他聚合物能被特异性修饰,其它的残基也能为它们的连接提供相当的可能性。因为转谷氨酰胺酶对在蛋白质上可以做为氨基供体底物位点的赖氨酸是非常具有选择性的,它们将被转谷氨酰胺酶选择性地靶向,所以利用转谷氨酰胺酶将聚合物连接到这些赖氨酸残基上的可能性是存在的。

- 10 因为转谷氨酰胺酶在许多哺乳动物体液和组织中都存在,EPO 是转谷氨酰胺酶底物这个发现显示了在体内的转谷氨酰胺酶-催化的反应可能影响含有来自包括谷氨酰胺和/或赖氨酸残基的哺乳动物促红细胞生成素的治疗性蛋白质的生物利用度和分布。因此,除去、掩蔽或修
- 15 饰这些残基来降低或消除其固有的转谷氨酰胺酶底物性质,这样能明显改变这种生物药剂的生物学性质并提高任何这种红细胞生成蛋白质的效能。这种修饰是由将所述谷氨酰胺和/或赖氨酸残基突变为其它 19 种天然生成氨基酸中的任何一种、化学修饰所述赖氨酸和/或谷氨酰胺残基,或连接小的酰基-供体底物或胺-供体到那些利用转谷氨酰胺酶
- 20 从而消除它们作为转谷氨酰胺酶底物的位点上形成的。同样地,一些残基已被建议来提高或降低肽或蛋白质中所含有的赖氨酸或谷氨酰胺残基的底物性质。因此,突变、增加或化学修饰其它在促红细胞生成素蛋白质序列内的残基能改善或降低包含在蛋白质一级氨基酸序列中的赖氨酸或谷氨酰胺残基的底物性质。在最近的论文(Dale, 等人,
- 25 Nature 415 (10), 175-179 (2002))中,作者指出 5-羟色胺是一种转谷氨酰胺酶底物,并通过转谷氨酰胺酶催化交联到表面蛋白而结合到活化的血小板上。转谷氨酰胺酶因子 XIII 和组织转谷氨酰胺酶在活化的血小板表面被识别。5-羟色胺交联到血小板表面增加了细胞表面上的促凝血蛋白质的保持。这个研究表明胞外转谷氨酰胺酶可以将含
- 30 有转谷氨酰胺酶底物位点的蛋白质交联到细胞表面,这种活性可以潜在地有助于蛋白质与其受体的结合。这说明如果转谷氨酰胺酶参与蛋白质与祖红细胞或其它的靶细胞系的结合,那么由 EPO 展示出来的

转谷氨酰胺酶底物性质可能与蛋白质的红细胞生成潜能直接相关。

EPO

用于修饰成生物活性形式 EPO 的起始材料优选促红细胞生成素或其具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产量的生物学性质的衍生物。EPO 糖蛋白可以从天然来源中获取或者利用在 U. S. 4,703,008; 5,441,868; 5,547,933; 5,618,698 和 5,621,080 中公开的已知方法来重组生产, 在此引入作为参考。也可以使用具有期望的生物学活性的促红细胞生成素的非糖基化形式或超糖基化形式。生产超糖基化 EPO 的方法在 WO0249673 和 EP640619 中教导过。

10 转谷氨酰胺酶

任何一种催化酰基从谷氨酰胺转移到受体的酶都适用于本发明。来自豚鼠肝脏的转谷氨酰胺酶特别合适, 并可以从例如 Sigma Chemical Co.、ICN Chemicals 这样的商业来源购买到。微生物来源的转谷氨酰胺酶也可以使用, 例如, 钙依赖的链轮丝菌属物种 (Streptovercillium sp.) 转谷氨酰胺酶或者来自 treptovercillium mobaraense(Ando 等人. Agric. Biol. Chem., 53(10), 2613-17, 1989)。

酰基受体/胺供体

转谷氨酰胺酶对伯胺供体具有广泛的专一性, 这些供体可以是含有伯胺的化合物, 或者是肽或蛋白质结合的赖氨酸的 ϵ -氨基。转谷氨酰胺酶的胺供体底物包括: 氨、羟胺、甲胺、乙醇胺、苯乙胺、组胺、精胺、亚精胺、尸胺、腐胺、蛋白质-或肽结合的赖氨酸基团, 如甘氨酸但并不是 L-酪氨酸的胺酰胺。N-(5-氨基戊烷基)-5-二甲氨基-1-萘基-磺酰胺(丹磺酰尸胺)是一种用于检测蛋白质底物的有用底物, 因为它有天然的荧光和非常好的作为胺供体的能力(参见 Folk 和 Chung, 1973, 同上)。

这里, 水也能作为亲核试剂, 导致谷氨酰胺转化为谷氨酸, 在此情况下, 上述式 I 中的 A 部分是一个羟基部分。

参见例如 WO0179474 的氨基糖以及 JP2000300287 中的氨基烷基糖也显示出适合用作转谷氨酰胺酶催化的连接到蛋白质上的氨基供体。氨基糖是任何一种含有伯氨基的单糖、寡糖或多糖以及任何一种为引入一个氨基而利用还原性氨基化单糖、寡糖或多糖的方法制备的单糖、寡糖或多糖。一个有利的氨基糖实例是氨基山梨糖醇。

因此,任何一种上述的或相关的化合物都可以作为胺供体,以及进一步将它们自身修饰,以便转谷氨酰胺酶催化的转酰化反应有效地将需要添加到 EPO 结构上的基团缀合到所述谷氨酰胺残基上。特别优选的代表式 I 中的 A 部分的分子是:尸胺、腐胺、1,5-二氨基戊烷、1, 6- 二氨基己烷、1,7-二氨基庚烷或类似的二氨基烷烃。

酰基供体/氨基受体

如果赖氨酸残基作为转谷氨酰胺酶底物位点起作用,转谷氨酰胺酶就能够将含有谷氨酰胺的肽和蛋白质连接到蛋白质结构内的赖氨酸的 ϵ -氨基上。这样,根据上述 II, Z 表示含有能作为转谷氨酰胺酶受体的 Gln 残基的肽或蛋白质。显示出通过转谷氨酰胺酶催化作用交联到蛋白质结合的赖氨酸残基上的肽包括 TVQQEL、PGGQQIV、pEAQQIV、PKPQQFM、EAQQIVM 以及苄氧羰基 (Cbz) -QG 的多种衍生物 (Grootjans, 等人. JBC 270 (39), 22855-22858 (1995)), (Groenen 等人. Eur. J. Biochem. 205, 671-674 (1992)), (Gorman 等人. JBC 255 (2), 419-427 (1980))。诸如这些的肽就能共价连接到 PEG 或其它聚合物上,如上所述,然后通过转谷氨酰胺酶的催化作用连接到 EPO 或其它含有胺供体赖氨酸残基的蛋白质上。

水溶性聚合物

一种特别优选的水溶性聚合物是 PEG 几个种类中的一种。PEG 包含一个基本的碳单元, $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$, 并通过以下名称以各种形式出售:聚乙二醇 (Polyethylene glycol) (各种分子量); 聚环氧乙烷 (Poly Ethylene Oxide); Carbowax PEG (各种分子量); α -氢- ω -羟基聚 (氧-1,2-乙二醇); 乙氧基化的 1,2-乙二醇; 聚氧乙烯醚 (Polyoxyethylene ether); emkapol 200; gafanol e 200; pluriol e 200; polydiol 200; 聚乙二醇 (Polyethylene glycol); PEG; Polyox WSR-301; PEG 200; Macrogol 以及 Polyoxyethleneln。在本发明的那些方面使用了基于 PEG 的聚合物,它们优选具有从大约 200 到大约 100,000 道尔顿的平均分子量,并优选从大约 2,000 到大约 40,000 道尔顿。

可选择的水溶性聚物质包括了诸如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、多糖、淀粉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或其它类似的非免疫原性聚合物。本领域普通技术人员能够理解,前面所述的只不过是例证性的,并不打算限制在这里适用的非抗原聚合物的类型。

赋予延长的药物动力学体内半衰期的有机分子

有机部分可以连接到亲水性聚合物上，以增加包括脂肪酸、二羧酸、二羧酸的单酯或单酰胺、含有饱和脂肪酸的脂、含有不饱和脂肪酸的脂、含有饱和与不饱和脂肪酸混合物的脂、简单的碳水化合物、
5 复杂的碳水化合物、碳环化合物（如类固醇）、杂环化合物（如生物碱）、氨基酸链、蛋白质、酶、酶辅因子或者维生素的半衰期。

在一个实施方案中，亲水性聚合物基团被 1 到大约 6 个烷基、脂肪酸、脂肪酸酯、脂或磷脂基团取代（正如此处所述，例如式 I 和式 II）。优选地，被取代的亲水性聚合物基团是直链的或支链的 PEG。

10 优选地，被取代的亲水性聚合物基团是被脂肪酸、脂肪酸酯、脂或磷脂基团或者烷基末端取代的直链 PEG（如 PEG 二胺）。被烷基、脂肪酸、脂肪酸酯、脂或磷脂基团取代的亲水性聚合物可以使用合适的方法来制备。例如，修饰试剂可以用单保护的 PEG 二胺与活化的脂肪酸（例如棕榈酰氯）反应来制备。所得产物可以用来生产包含被脂肪酸基团取代的 PEG 的修饰 EPO。许多其它合适的合成方案都可以使用。例如，含有胺的聚合物可以被偶联到此处所述的脂肪酸或脂肪酸酯，在脂肪酸或脂肪酸酯上的活化的羧酸酯（如用 N, N'-羰基二咪唑活化的）可被偶联到聚合物的羟基上。这样，就可构建许多合适的具
15 有所期望的性质的直链或支链多聚体结构，并最终连接或修饰为含有可以作为转谷氨酰胺酶供体的伯胺、或含有可以作为转谷氨酰胺酶受体
20 的谷氨酰胺的肽或聚合物。

适用于本发明的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或者可以包含一个或多个不饱和单元。在一个优选的实施方案中，脂肪酸和脂肪酸酯包括大约 6 个到大约 40 个碳原子。适合用来在本发明的方法中修饰
25 EPO 的脂肪酸包括，例如 n-十二烷酸酯（C12，月桂酸酯）、n-十四烷酸酯（C14，豆蔻酸酯）、n-十六烷酸酯（C16，软脂酸酯）、n-十八烷酸酯（C18，硬脂酸酯）、n-二十烷酸酯（C20，花生酸酯）、n-二十二烷酸酯（C22，山萘酸酯）、n-三十烷酸酯（C30）、n-四十烷酸酯（C40）、顺- Δ^9 -十八碳烯酸酯（C18，油酸酯）、全顺式 $\Delta^{5,8,11,14}$ -
30 二十烷酸酯（C20，花生四烯酸酯）、辛二酸、十四碳二烯酸、十八碳二烯酸，二十二碳二烯酸以及类似物。合适的脂肪酸酯包括含有直链或支链低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可以包括 1 到大约 12 个

碳原子，优选 1 个到大约 6 个碳原子。用于修饰本发明蛋白质的合适的脂肪酸酯包括，例如甲基十八烷酸酯、乙基十八烷酸酯、丙基十八烷酸酯、丁基十八烷酸酯、仲丁基十八烷酸酯、叔丁基十八烷酸酯、新戊基十八烷酸酯、己基十八烷酸酯、甲基顺- Δ^9 -十八碳烯酸酯以及类似物。

用于转移到 EPO 的转谷氨酰胺酶底物的制备

这样，技术人员可以制备两个或三个或更多部分的缀合物连接到胺供体胺部分或连接到胺受体部分，所得到的复合物将作为转谷氨酰胺酶底物。

其它底物的制备优选逐步进行，并在最后一步得到一个单一的脱保护的或无保护的伯胺。因而，如果用诸如包括甲苯磺酸酯、甲磺酰酯、卤素（氯、溴、碘）、N-羧基琥珀酰亚胺酯（NHS）、取代的苯基酯、酰卤等亲电基团的胺反应基团用于偶联水溶性聚合物和有机分子，伯胺在大多数情况下必须被保护。其它缀合有机分子到聚合物上的方法是公知的，包括使用能与硫醇反应的试剂诸如马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯基、吡啶二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇（TNB-thiol）以及类似物。将这种硫醇反应基团引入分子的合适方法在现有技术中是公知的（比如参见 Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)）。醛或酮基官能团可以偶联到含有胺或酰胺的分子上，叠氮基可以与三价磷基团反应生成氨基磷酸酯或磷酰亚胺键。反应基团可以直接键合到亲水性聚合物、缀合物复合物或者通过连接部分如 C1-C12 烷基。如这里所使用的，“烷基”是指烷基链，其中一个或多个碳原子被诸如氧、氮或硫的杂原子任选地取代。合适的连接部分包括，例如四甘醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 以及 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。

包括连接部分的修饰试剂可以这样产生，比如通过将单-叔丁氧羰基-烷基二胺（如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷）与脂肪酸在存在 1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺（EDC）时进行反应以在游离胺和脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键。用三氟乙酸（TFA）处理可以使 Boc 保护基团从产物上除去以暴露可被偶联到另一个羧酸酯上的伯胺，或者可与马来酸酐反应、环化所得到的生成物以生成脂肪酸的

活化马来酰亚胺衍生物(参见,例如 Thompson 等人的 WO 92/16221, 其全部教导引入这里作为参考)。

衍生的促红细胞生成素化合物的例子:

5 M-PEG-A-EPO, 其中利用转谷氨酰胺酶将 M-PEG 连接到特定的谷氨酰胺或赖氨酸上, 其中 M 是脂、糖类、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或者蛋白质, 并且 A 是胺供体, 优选尸胺或腐胺, 或者是胺受体, 优选 1-30 个氨基酸的含有谷氨酰胺的短肽。

10 (M-PEG)₂-A-EPO, 其中 M-PEG 被酯化到 A 上的两个不同羧基, 其中 M 是脂、糖类、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或者蛋白质。用于酯化的具有两个不同羧基的 A 部分的合适例子包括甘油二酯或甘油三酸酯衍生物以及马来酸、柠康酸、谷氨酸或其它含有两个或多个羧基碳的聚合物的衍生物。同样也包括更高级的多聚物。

15 (M-PEG)₂-R-A-EPO, 其中(M-PEG)₂-R 是 A 上的两个不同羧基, 其中 M 是脂、糖类、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或者蛋白质, 并且 R 是一个增强化合价的构建体, 比如氨基酸的树枝状聚合物及类似物, 其含有用来连接多个(MPEG)₂ 或其它部分的多个官能团。同样也包括更高级的多聚物。

M-A-EPO, 其中 M 是蛋白质或肽, A 是所述蛋白质或肽上的赖氨酸侧链。

20 M-A-EPO, 其中 M 是蛋白质或肽, A 是所述蛋白质或肽上的谷氨酰胺侧链。

M-A-EPO, 其中 M 是脂, 并且 A 是胺受体, 优选含有谷氨酰胺的短肽。

M-A-EPO, 其中 M 是脂, A 是腐胺、尸胺或其它二氨基烷烃。

25 M-A-EPO, 其中 M 是生物素、丹磺酰或者其它给 EPO 赋予能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分, 并且 A 是腐胺、尸胺或其它合适的转谷氨酰胺酶的胺供体或胺受体底物。在生物素或另一个具有已知结合配偶体的部分被引入到这个缀合物时, 预期所述缀合物能以复合物的形式与其已知的结合配偶体如生物素-抗生物素蛋白复合物用于研究、诊断或治疗。

治疗用途

本发明的 EPO 制剂适合用作治疗血液病的非胃肠制剂, 所述血

液病的特征为低的或有缺陷的红细胞产生，如各种形式的贫血症，包括与慢性肾衰竭、叠氮胸苷治疗的 HIV 感染患者以及化疗的癌症病人相关联的贫血症。它也可以应用于治疗各种疾病状态、失调以及血液学方面不规律的状态，例如镰刀细胞病、 β -地中海贫血病、囊性纤维化病、妊娠和月经不调、早期早发贫血、脊髓损伤、宇航病、急性失血、衰老以及类似病症。它也可应用于期望增加红细胞的情形，例如外科手术前的患者。优选地，本发明的 EPO 组合物经非胃肠给药（例如 IV、IM、SC 和 IP）。有效剂量可望根据治疗的状况和给药途径进行相当程度的改变，不过预期在 0.1（约 7U）到 100（约 7000U） $\mu\text{g/kg}$ 体重的活性物质。治疗贫血状况的优选剂量是大约 300 单位/kg 每周三次。

药物组合物

根据本发明制备的促红细胞生成素糖蛋白产物可通过现有技术中公知的方法用药学可接受的载体或赋形剂制备成适于注射的药物组合物。例如，WO97/09996、WO97/40850、WO98/58660 以及 WO99/07401 中描述了合适的组合物。用于配制本发明产品的优选的药学可接受的载体包括人血清白蛋白、人血浆蛋白质等。本发明的化合物可以配在 pH 值为 7 的 10 mM 磷酸钠/钾的缓冲液中，其中含有张力试剂如 132 mM 氯化钠。任选地，药物组合物可含有防腐剂。药物组合物可含有不同量的促红细胞生成素产品，如 10-2000 $\mu\text{g/ml}$ ，如 50 μg 或 400 μg 。

添加诸如生育酚、丁基化羟甲苯、丁基化羟基苯甲醚、抗坏血酸棕榈酸酯的抗氧化剂或者诸如乙二胺四乙酸二钠的乙二胺四乙酸盐，该组合物的稳定性可以被进一步增强，其中乙二胺四乙酸盐额外结合可能存在的重金属。此外，该组合物还可以通过添加防腐剂来增强稳定性，例如苯甲酸以及如对羟基苯甲酸甲酯和/或对羟基苯甲酸丙酯这样的对羟基苯甲酸酯。

对特征为低的或者有缺陷的红细胞产生的血液病的治疗

本发明中的促红细胞生成素糖蛋白产物的给药导致人体内红细胞的形成。因此，促红细胞生成素糖蛋白产物的给药补充了对红细胞的产生很重要的这种 EPO 蛋白质。含有促红细胞生成素糖蛋白产物的药学组合物可配制成有效强度，足以通过各种方法给药于正经受特征为低的或有缺陷的红细胞产生的血液病的人患者，这些特征是状况或

疾病的单独的或者部分的特征。可以通过诸如皮下注射、静脉注射或者肌肉注射等注射方法来给药。促红细胞生成素糖蛋白产品的平均量可能会变化，特别地应当基于合格的医师的建议和处方。缀合物的精确量要优先考虑诸如被治疗状况的确切类型、被治疗病人的状况以及组合物的其它成分等因素。比如，0.01 到 10 μ g 每千克体重，优选 0.1 到 10 μ g 每千克体重，可以一个星期给药一次。

这种应用的全部过程都参考了各种出版物。这些出版物的公开内容引入这里是为了更充分地描述现有技术状态。

本发明通过下面的实施例进一步进行阐述，这些实施例的存在是以例证本发明化合物和组合物的制备为目的的，而不是限制性的。从最初的实验看，在 EPO 上的 7 个谷氨酰胺的至少 2 个、并且可能 3 个能作为转谷氨酰胺酶底物。肽图谱显示 Gln115 可以作为转谷氨酰胺酶的可预见的酰基供体，其它 6 个谷氨酰胺残基中的至少一个同样也可以。利用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将 PEG 基团和含有脂肪基团的脂肪胺连接到 EPO 上已经被实现，这证明，随着 5 千道尔顿 PEG 基团的连接，EPO 将保留其活性的大约 40%。已知的一种转谷氨酰胺酶的酰基供体底物 Cbz-QG 的连接以及随后的肽图谱表明，EPO 上 Lys45 可作为非常有效的转谷氨酰胺酶可预见的胺供体底物，并且 Lys154 也可作为胺供体位点。

实施例 1

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将丹磺酰-尸胺底物缀合到人促红细胞生成素上

重组人 EPO (rhEPO) (10 μ M) 与丹磺酰-尸胺 (DC) (Sigma, St Louis, MO) (3 mM) 和转谷氨酰胺酶 (Sigma, St Louis, MO) (0.15 U/ml) 在 100 mM Tris (pH 7.5) 和 10 mM CaCl₂ 中于 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时。丹磺酰-尸胺是公知的转谷氨酰胺酶底物，其提供容易跟踪反应的荧光标记。反应混合物进行 SDS-PAGE，结果示于图 2。EPO 带的荧光证明了 DC 通过转谷氨酰胺酶的连接，还表明在 EPO 上存在胺受体位点。产物在用 PBS 平衡的 Zorbax GF-250 XL HPLC 柱上纯化。

凝胶中的荧光二聚体和荧光三聚体的存在表明，通过提供一个赖

氨基酸底物来交联一个或多个 EPO 中的谷氨酰胺残基，EP 可自己作为转谷氨酰胺酶底物。这些带的荧光和交联的事实增加了至少 EPO 上的两个不同的谷氨酰胺残基可以作为转谷氨酰胺酶酰基-供体位点的可能性。

5

实施例 2

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将尸胺-X-生物素底物缀合到人促红细胞生成素上

重组人 EPO (rhEPO) (50-100 μ M) 与尸胺-X-生物素 (Biotium, Hayward, CA) (30 mM) 和转谷氨酰胺酶 (Sigma, St Louis, MO) (0.15 U/ml) 在 100 mM Tris (pH 7.5) 和 10 mM CaCl_2 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 小时。产物在用 PBS 平衡的 Zorbax GF-250 XL HPLC 柱上纯化。

实施例 3

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将 Cbz-QG 底物缀合到人促红细胞生成素上

重组人 EPO (rhEPO) (1.96 mg/ml) 与 N- α -苄氧羰基谷氨酰甘氨酸 (Cbz-QG) (15 mM) (Sigma, St Louis, MO) 和转谷氨酰胺酶 (Sigma, St Louis, MO) (0.15 U/ml) 在 100 mM Tris (pH 7.5) 和 10mM CaCl_2 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 小时。产物在用 PBS 平衡的 Zorbax GF-250 XL HPLC 柱上纯化。

实施例 4

EPO-DC, EPO-尸胺-X-生物素和 EPO- (Cbz-QG) 的表征和肽图谱

为了脱糖基化, 将 50 μ l rhEPO 或 缀合物 (0.2-2mg/ml) 加入 50 μ l RapiGest (Waters Corp., Milford, MA) (2mg/ml 于 PBS 中) 中稀释。向其中加入 10 μ l NP-40 去污剂溶液 (15%), PNGase F、唾液酸酶 A 和 O-聚糖酶 (Prozyme, San Leandro, CA) 各 10 μ l。溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 总共温育 96 小时。完整质谱是通过将样品与芥子酸在水/乙腈为 1: 1 的溶液 (+ 0.1% 三氟乙酸) 中混合、并在 MALDI MS 板上点样、随后在 ABI Voyager DE-STR MALDI-TOF MS 上分析而获得

的。蛋白质是以线性模式用 25000 V 的高压电来分析的 (图 3 和 5)。在这之后各自用 50 μ L 与 5 μ L 45 mM DTT 混合, 将溶液在 65 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。然后加入 5 μ L 100 mM 碘乙酰胺, 将溶液在室温下置于黑暗中温育 20 分钟。然后加入 5 μ L Lys-C 内切蛋白酶 (Calbiochem, San Diego, CA) (1.3 μ g/ μ L), 将溶液在 37 $^{\circ}$ C 温育 20-24 小时。利用反相 HPLC 和 Waters Symmetry300 1 $\times$ 50 mm C18 柱将每种蛋白质消化物分开。每种分开的消化物都在 MALDI 平板上自动点样并分析。饱和的 α -氰基-4-羟基肉桂酸/二羟基苯甲酸 (α -氰基/DHB) 混合基质被用于电离 (图 4)。

图 3 显示 EPO 脱糖基化样品和每个缀合物的完整质谱。(B) 图片显示一个在 18725 的小峰值, 对应于添加了一个尸胺-X-生物素部分 (计算的分子量偏移 = +424)。(C) 图片显示一个在 18603 的峰值, 对应于添加了一个丹磺酰-尸胺部分 (计算的分子量偏移 = +317)。(C) 图片显示一个在 18592 的峰值, 对应于添加了一个 Cbz- QG 肽 (计算的分子量偏移 = +319)。根据这些数据, Cbz- QG 的结合比丹磺酰-尸胺或尸胺-X-生物素更有效率。不过, 在这三个例子中, EPO 都显示了转谷氨酰胺酶底物的结合。

图 4 显示 EPO-尸胺-X-生物素和 EPO-DC 的 Lys-C 消化的质谱图。在(A)图片和(B)图片上的峰值 1958 对应于含有 EPO 残基 98-116。箭头显示的这个峰值对应于添加尸胺-X-生物素到肽上。这表明 Gln115 作为转谷氨酰胺酶底物位点, 因为 Gln115 是这个肽中唯一的 Gln 残基、并且转谷氨酰胺酶将只结合尸胺到 Gln 残基上。图 4 的 (C) 图片和 (D) 图片显示脱糖基化 EPO 和 EPO-DC 的 Lys-C 消化的 MALDI MS。5038 附近的峰值对应于 EPO 的残基 53-97 (计算分子量 = 5024.8)。(D) 图片上的峰值 5357 对应于分子量偏移 319, 表示了一个丹磺酰尸胺部分被结合到蛋白质该区域的一个残基上。因为这个肽含有 6 个谷氨酰胺, 这个被修饰的残基身份就不能被确定。

图 5 的 (A) 图片和 (B) 图片显示两批不同的脱糖基化 rhEPO- (Cbz-QG) 的 MALDI TOF 质谱。18580 附近的峰值对应于一个 Cbz-QG (计算分子量偏移 = +319) 部分结合到 rhEPO, 两个质谱图都显示大多数的蛋白质在两批中都被修饰, 并且结合此肽到 rhEPO 是相当有再现性的。(C) 图片和 (D) 图片显示了脱糖基化 rhEPO-

(Cbz-QG) 的 Lys-C 消化的 MALDI TOF 质谱。(C) 图片显示的峰值 4046 对应于在 Lys45 上带有一个额外的 Cbz-QG 部分的 EPO 残基 21 - 52 (计算分子量= 4032.1)。Lys-C 没有因为修饰而在 Lys45 裂解。

(D) 组显示的峰值 1807 对应于带有额外 Cbz- QG 基团的残基 153 - 165 (计算分子量= 1802.6)。在这个肽中, Lys154 没有因为结合 Cbz-QG 而裂解, 表明 Lys154 是被修饰的。

要得到这里所描述的 MALDI TOF 质谱, 大分子量窗口是必要的。因此, 在光谱中观察到了明显的偏移。由于这个原因, 通过比较每个单独样品中观察到的未修饰 EPO 的分子量, 计算了缀合物的分子量改变。把完整、脱糖基化样品的质谱数据和 Lys-C 消化数据合起来看, 证实 Gln115 既被尸胺-X-生物素修饰, 又被丹磺酰-尸胺修饰, 且至少有一个 rhEPO 上的其它 Gln 残基在转谷氨酰胺酶存在时接受了丹磺酰-尸胺修饰。数据也显示 rhEPO 上的 Lys45 和 Lys154 在转谷氨酰胺酶存在时接受 Cbz-QG 修饰, 并在两批的分析中, 最高达 90% 的蛋白质被修饰。

实施例 5

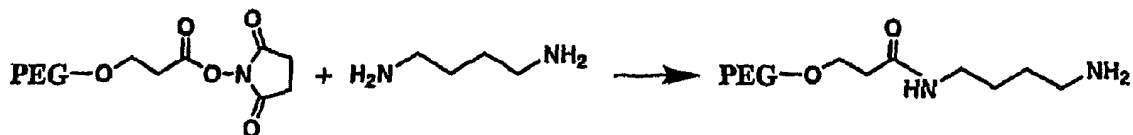
rhEPO- (Cbz-QG) 的 UT7 分析

UT7 分析是在 rhEPO-(Cbz-QG) 上如下进行的: 在分析前将 UT7 细胞在含 L-glu 和 5% FBS 而不含 Epo 的 IMDM 中饥饿 24 小时。将细胞漂洗并在每孔中铺 30,000 个细胞。加入 EPO (20-0.01952 ng/mL) 和 rhEPO- (Cbz-QG) (20-0.01952ng/mL) 的稀释液并重复分析。平板在 37℃ 温育 48 小时, 用 Promega's MTS 溶液分析, 在间隔 1、2 和 3 个小时读取 OD 读数。用 SoftMax Pro 对数值进行背景校正。平均背景值是 0.293。分析显示缀合物的活性大概比未被修饰的 EPO 少 4 倍 (见图 6), 这说明修饰没有在与受体结合显著相关的残基上发生。这就意味着 Lys45 或 Lys154 的修饰并不与活性的显著丧失相关, 并暗示着其它的修饰或突变能够在这些位点上进行而不会显著影响 rhEPO 结合其受体的能力。

实施例 6

尸胺-PEG (20K) 的合成

尸胺-PEG (20K) 是用商业上可获得的试剂合成的。25 mg 尸胺
 盐酸盐 (Sigma, St. Louis, MO) 溶解于 5 毫升的 PBS 溶液并调节 pH
 值到 7。向其中加入 25 mg 的 mPEG (20K) -琥珀酰亚氨基丙酸酯
 (Shearwater Corp., Huntsville, Alabama), 反应在 22℃ 温育 2 小
 5 时。反应混合物用溶于水的 0.1% 乙酸透析并冻干。



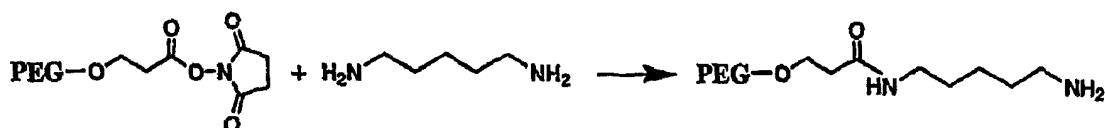
(PEG-SPA)

(尸胺)

实施例 7

10 腐胺-PEG (20K) 的合成

腐胺-PEG (20K) 是通过溶解 300 mg 腐胺盐酸盐 (Sigma, St.
 Louis, MO) 于 10 ml 的 PBS 溶液中并调节 pH 值到 7 而合成的。加
 入 100mg mPEG (5K) -琥珀酰亚氨基丙酸酯 (Shearwater Corp.,
 Huntsville, Alabama), 在 22℃ 反应 2 小时。反应混合物用溶于水的
 15 0.1% 乙酸透析并冻干。



(PEG-SPA)

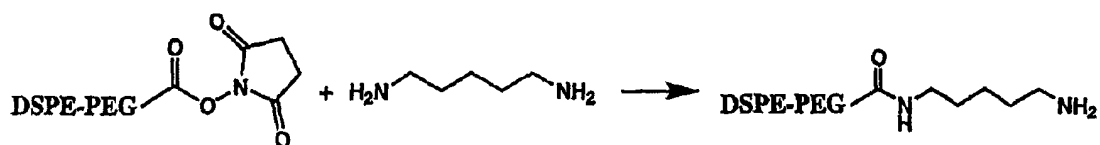
(腐胺)

实施例 8

20 腐胺-PEG-DSPE (3.4K) 的合成

腐胺-PEG-DSPE(3.4K) 是通过溶解 176.5 mg 腐胺于 1.765 ml PBS
 (pH 7.4) 中而合成的。将 13.5 mg NHS-PEG-DSPE (3.4K)
 (Shearwater Corp., Huntsville, Alabama) 溶于 1ml 的乙醇/PBS (1:
 1) 中。然后逐滴加入 1ml 的 NHS- PEG-DSPE 溶液到 1.704ml 的腐
 25 胺溶液中, 并在 22℃ 下反应搅拌 4 小时, 然后在用 0.1% 醋酸 (pH 4.5)

平衡的 Zorbax GF-250 XL 柱上纯化。

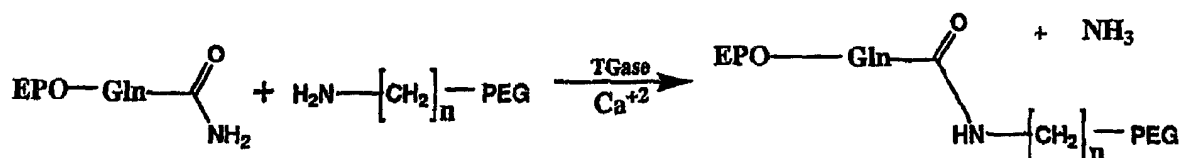


(DSPE-PEG-NHS) (腐胺)

5 实施例 7

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将尸胺-PEG (20K) 底物缀合到人促红细胞生成素上

除用 3.3 mM 尸胺-PEG (20K) 代替 DC 外, 用实施例 1 所述条件将尸胺-PEG(20K)与 EPO 反应。图 7 显示了反应产物的 SDS-PAGE 凝胶, 图 8 显示产物的 SELDI 质谱。两者都显示尸胺-PEG (20K) 被连接到 EPO 上。SELDI-MS 样品是通过用 C-4 zip tips (来自 Millipore) 脱盐并用标准程序在金 SELDI 芯片上点样而制备的。



15 实施例 8

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将腐胺-PEG (5K) 底物缀合到人促红细胞生成素上

除用 5 mM PEG (5K) -腐胺代替 PEG (20K) 尸胺外, 用实施例 7 中所述的条件将腐胺-PEG (5K) 与 EPO 反应。腐胺是公知的比尸胺更好的转谷氨酰胺酶底物 (Folk 和 Chung, 1973, 同上)。图 9 显示了与 EPO 贮存液相对照的纯化 EPO-腐胺-PEG(5K)的 SDS-PAGE 凝胶 (4-20%), 图 10 显示由 EPO + TGase + 腐胺-PEG (5K) 组成的反应混合物的 SELDI-MS, 图 11 显示纯化的 EPO-腐胺-PEG (5K) 的 SELDI-MS。这些数据显示腐胺-PEG (5K) 被成功缀合到 EPO 上, 并且纯化 EPO 腐胺-PEG (5K) 只含有很少量的未修饰 EPO。SELDI 样品是通过在 H-4 SELDI 芯片上点样、用 3 μl 水漂洗并加 1 μl 饱和

芥子酸而制备的。UT7 分析是在 EPO-腐胺-PEG (5K) 上如下进行的：在分析前将 UT7 细胞在含 L-glu 和 5% FBS 而不含 EPO 的 IMDM 中饥饿 24 小时。将细胞漂洗并在每个孔中铺 30,000 个细胞。加入 EPO (2.5-0.0025ng/mL) 和 EPO-PEG (20-0.01952ng/mL) 的稀释液并重复分析。平板在 37℃ 下温育 48 小时，用 Promega's MTS 溶液分析，在间隔 1、2 和 3 个小时读取 OD 读数。用 SoftMax Pro 对数值进行背景校正。平均背景值是 0.293。分析显示缀合物的活性大概比未被修饰的 EPO 少 2.5 倍 (见图 12)，这说明修饰没有在与受体结合显著相关的残基上发生。最有可能的是，活性损失是由于 PEG 在空间上干扰结合界面。

实施例 9

用豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶将腐胺-PEG-DSPE (3.4K) 底物缀合到人促红细胞生成素上

腐胺-PEG-DSPE (3.4K) (5.1 mM) 与在改变浓度的乙醇 (最高达 55%) 中的 EPO (4.8 μ M) 和 100 mM Tris (pH 7.5) 中的转谷氨酰胺酶 (0.15 U/ml) 和 10 mM 氯化钙温育。SELDI-MS 表明，在 55% 的乙醇时，最多 3 个腐胺-PEG-DSPE (3.4K) 部分被连接到每个 EPO 上 (见图 13)，尽管反应体积不够用来定量被修饰 EPO 的百分比。这些数据同样也证实了最多 3 个在 EPO 上的谷氨酰胺残基在这些条件下可以作为转谷氨酰胺酶底物。SELDI 样品是通过在 H-4 SELDI 芯片上点样、用 3 μ l 水和 1 μ l 饱和芥子酸漂洗而制备的。

这些实施例显示 EPO 上至少有 3 个谷氨酰胺残基可以作为连接小分子、PEG 基团 (从 5K-20K)、PEG 化的脂以及经过转谷氨酰胺酶催化的蛋白质的位点。证实了 PEG 化的构建体的生物活性，并且显示出仅有稍微的降低。如果是由于任何这些修饰而使循环半衰期显著改进，当与被修饰的蛋白质的潜在改善的药物动力学相比，这种活性的稍微降低无关紧要。

实施例 10

转谷氨酰胺酶受体底物的合成及连接到 rhEPO

含有至少一个谷氨酰胺残基的肽是通过标准固相 Fmoc 化学方法

合成的。在合成完成之后，肽树脂用哌啶脱保护，进行漂洗，并与 PEG 或其它含有活化酯的聚合物反应。反应完成之后，用标准 TFA 条件将肽-PEG 缀合物从树脂中裂解，在醚中沉淀。肽-PEG 缀合物然后通过反相 HPLC 被纯化并冻干。

- 5 重组人 EPO (rhEPO) (10 μ M) 与肽-PEG 缀合物 (15 mM) 和转谷氨酰胺酶 (Sigma, St Louis, MO) (0.15 U/ml) 在 100 mM Tris (pH 7.5) 和 10 mM 氯化钙中于 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时。反应混合物进行 SDS-PAGE，产物在用 PBS 平衡的 Zorbax GF-250 XL HPLC 柱上纯化。

10

实施例 11

UT7 细胞增殖分析

- UT7 细胞是一种已经适应于成为 EPO 依赖的人白血病细胞系 (Komatsu, N., 等人. 血液 (Blood) 82 (2), 456-464, 1993)。UT7
15 细胞在 PBS 中漂洗 3 次，并在分析前进行 EPO 饥饿 24 小时。UT7 细胞在含有添加的 L-谷氨酰胺和 5% FBS (15Q) 的 IMDM 培养基中饥饿。细胞在 50ml DPBS 中漂洗一次，在 DPBS 中悬浮时计数，并悬浮于最终浓度为 6×10^5 个细胞/mL 的适当培养基中 (产生的最终浓度为每孔 30000 个细胞)。EPO 标准样是通过将 EPO 的贮存液 (1.7
20 mg/mL) 稀释到 0.85 μ g/mL (2 μ L 加入 4 mL 培养基中) 而制备的。贮存液稀释 2:340 到 5 ng/mL，紧接着 1:2 连续稀释，使其浓度降到 I5Q 培养基中的 0.0098 ng/mL。所得稀释液提供了浓度为 2.5 ng/mL 到 0.0024ng/mL 的标准样。测试样品用类似的方法稀释。将 50 μ L 的 UT-7 细胞悬浮液等份试样转移到相应的孔中，并且将平板在 37 $^{\circ}$ C 温育 48
25 小时。细胞增殖是使用 Promega's MTS 溶液来评估的，每孔加 20 μ L。在加入 MTS1 小时后开始读数。

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNFYA WKRMEVGQQA 60
VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQFWEP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQKEAIS 120
PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR 166

图 1

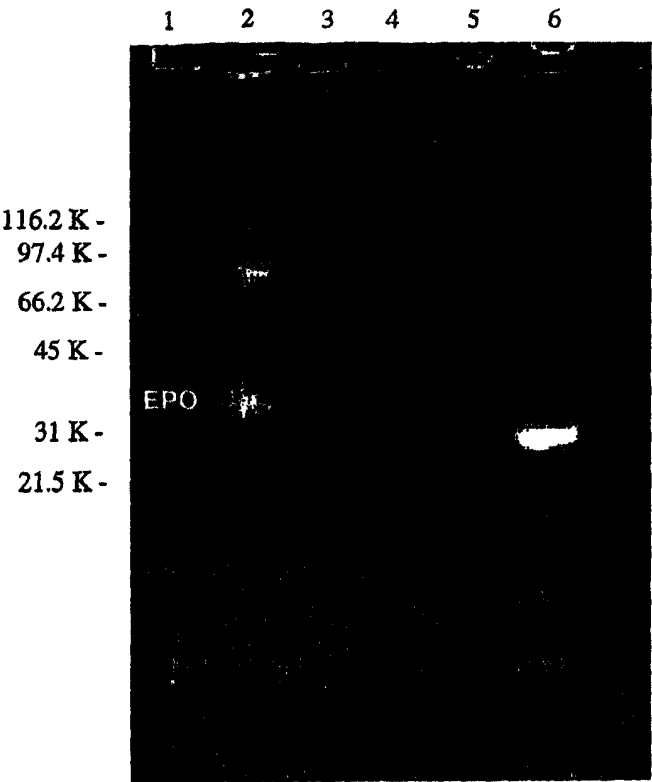


图 2

CEN-5027PCT

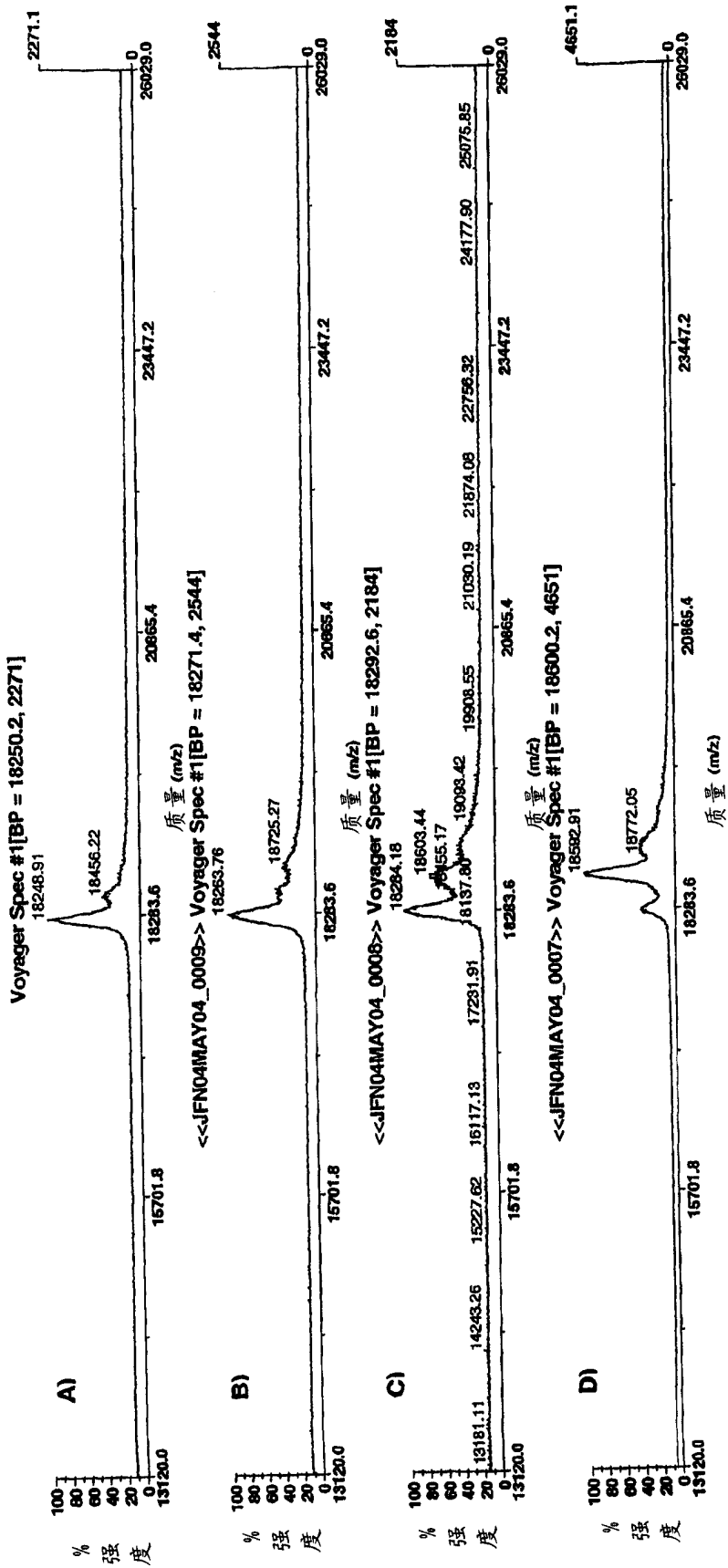


图 3

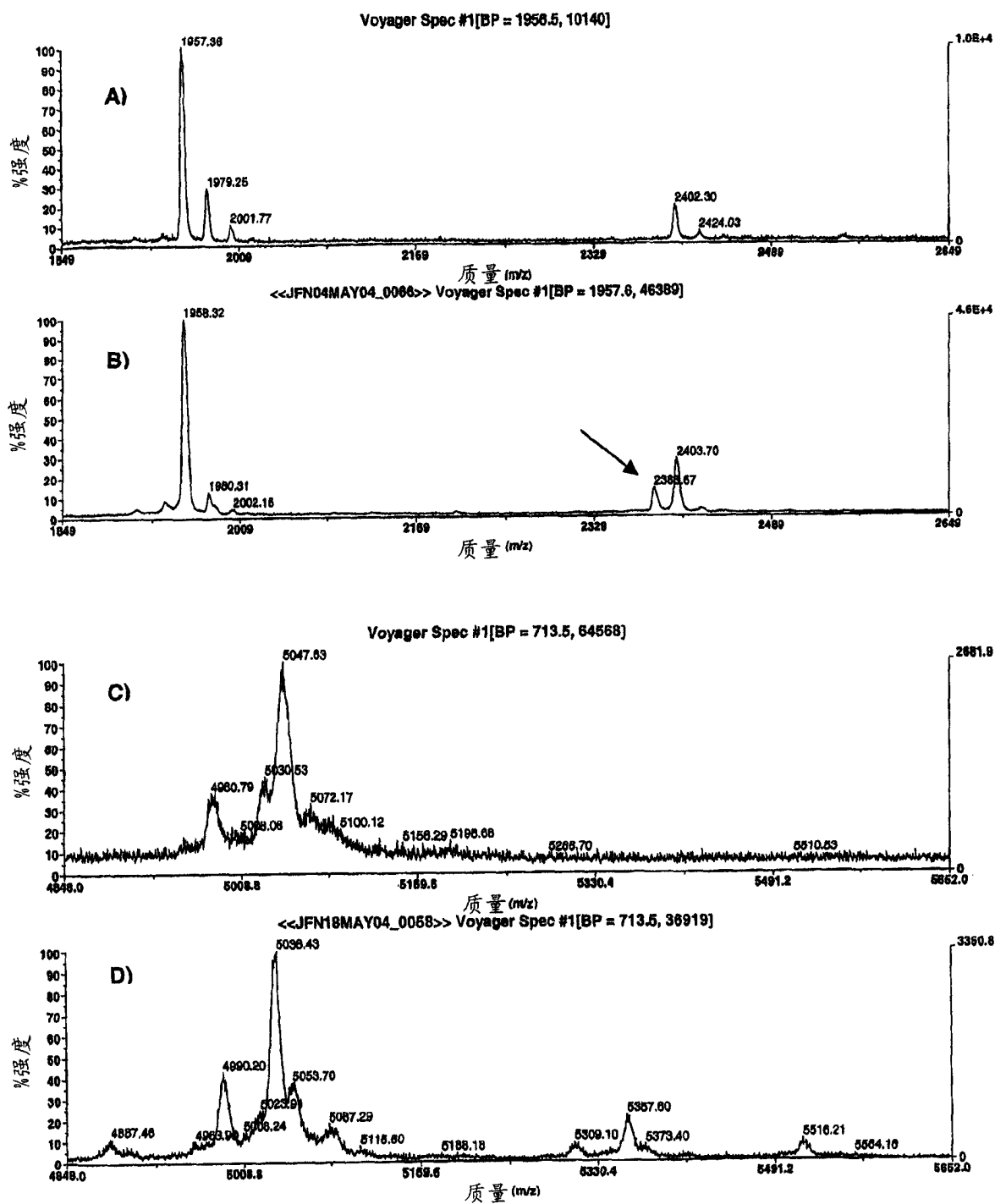


图 4

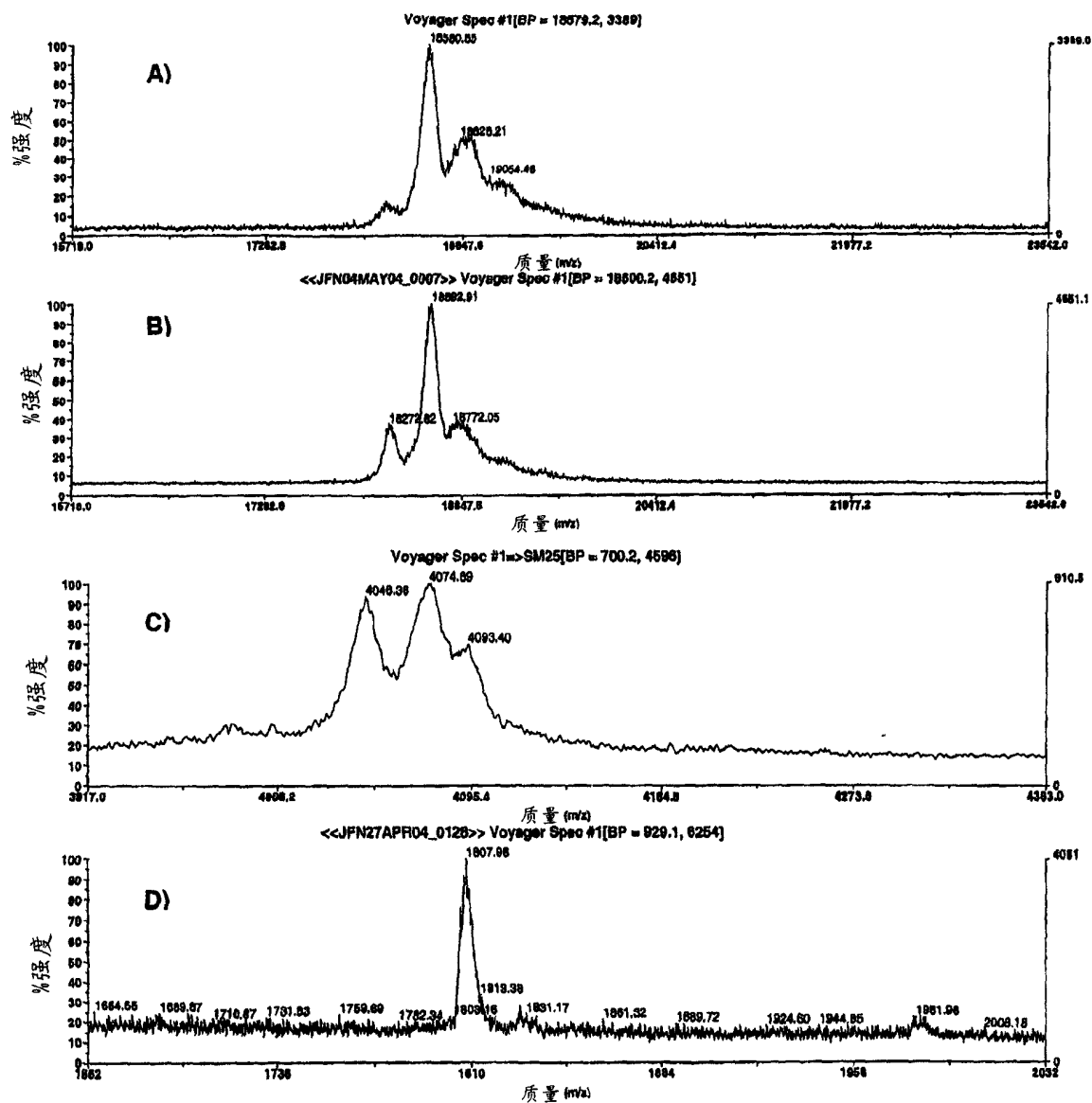


图 5

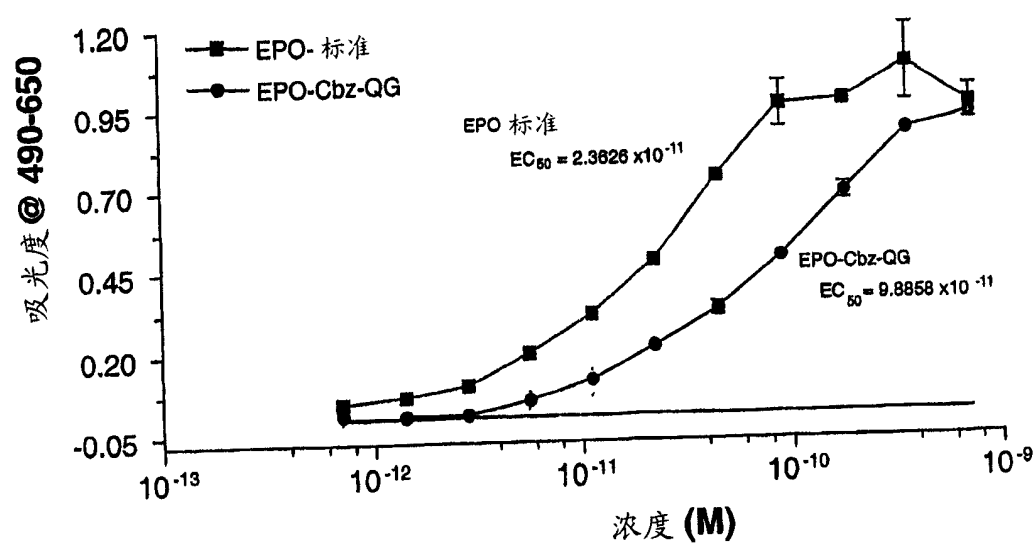


图 6

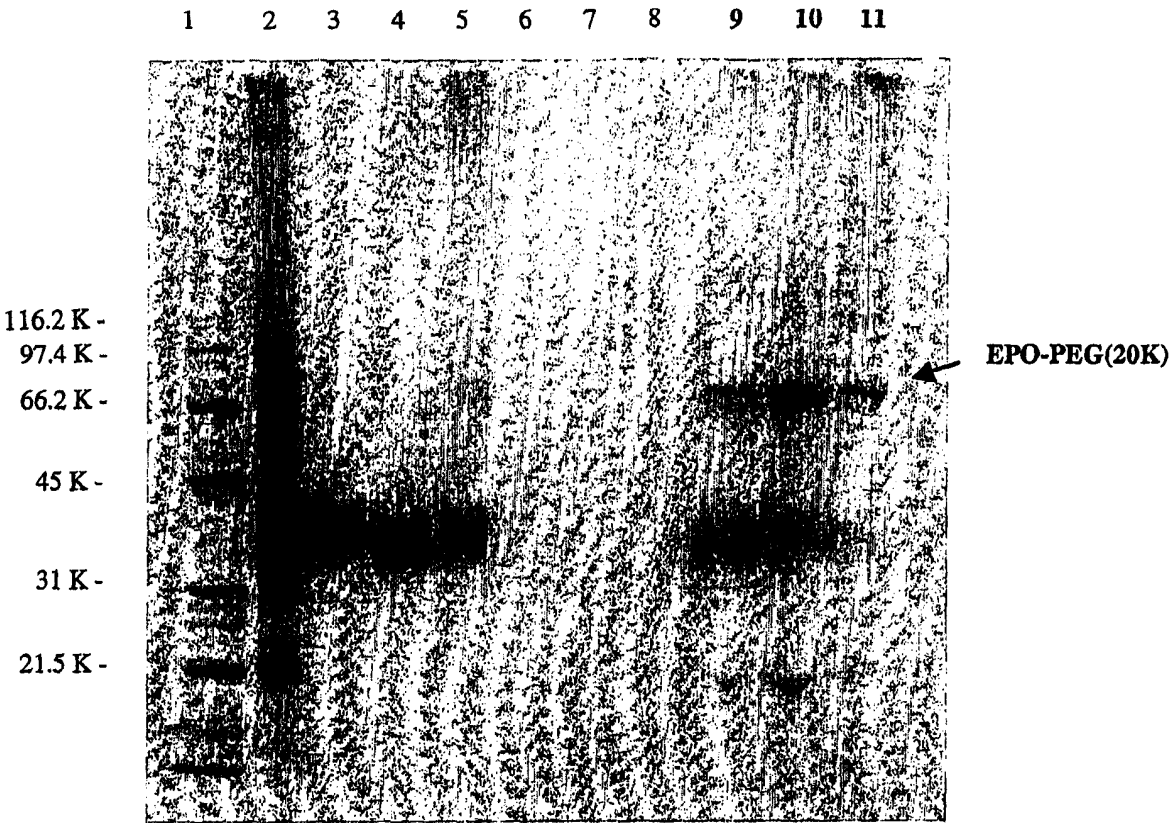


图 7

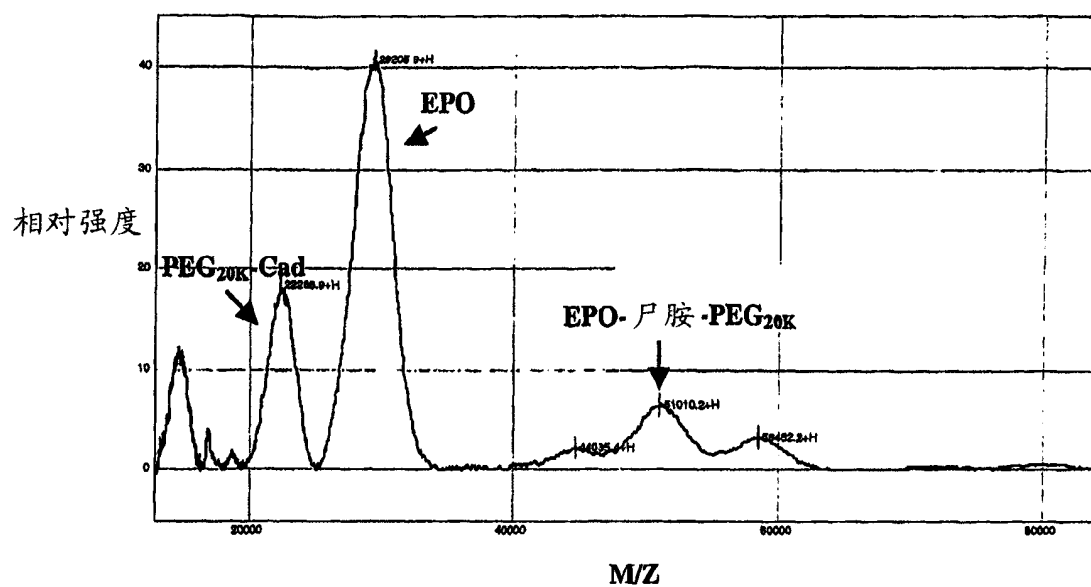


图 8

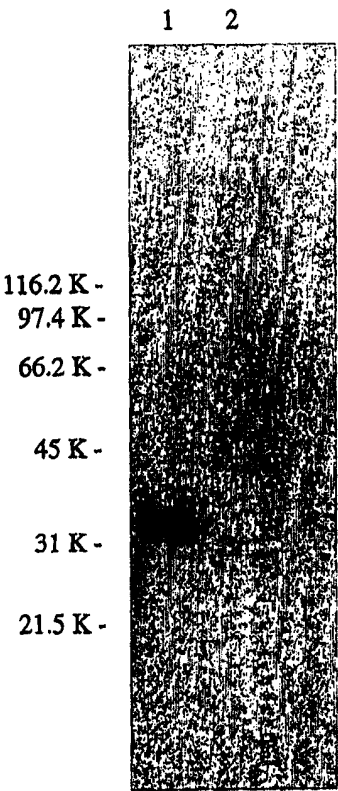


图 9

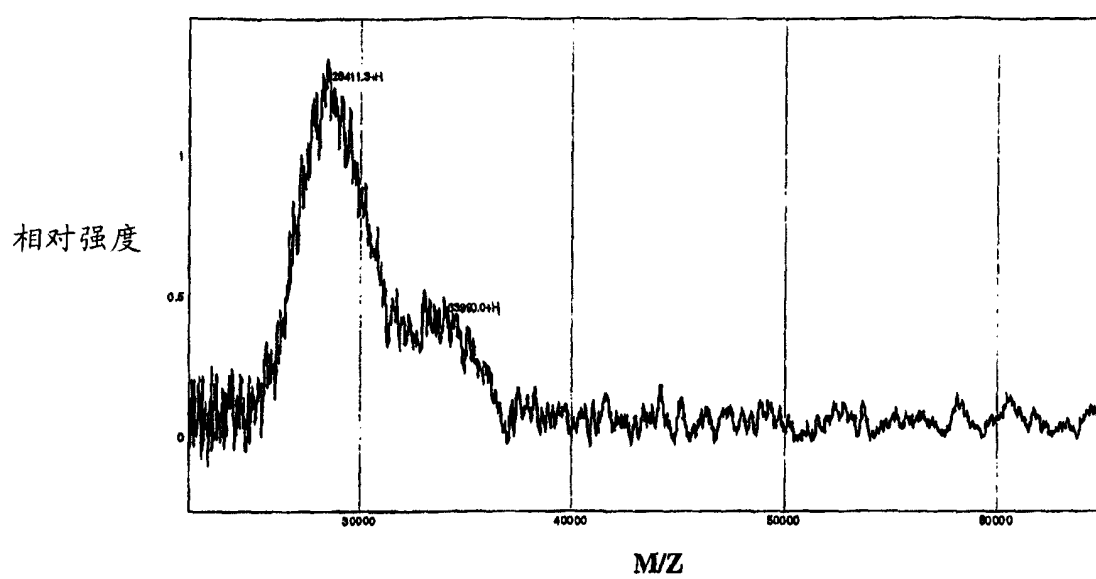


图 10

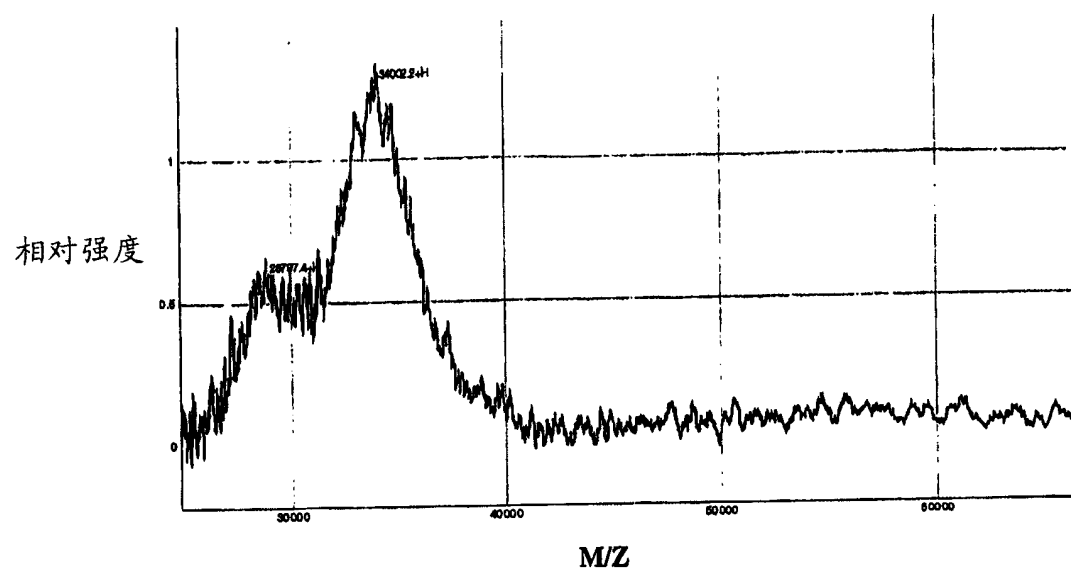


图 11

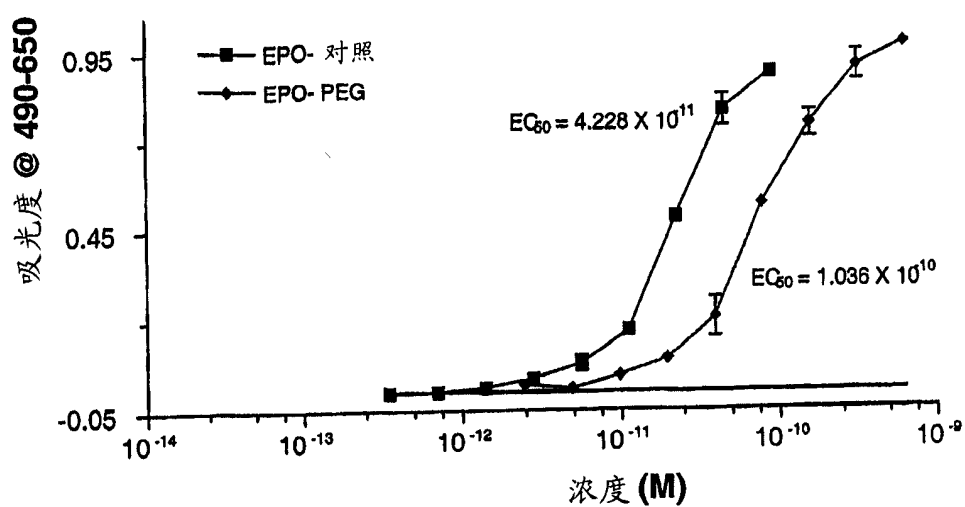


图 12

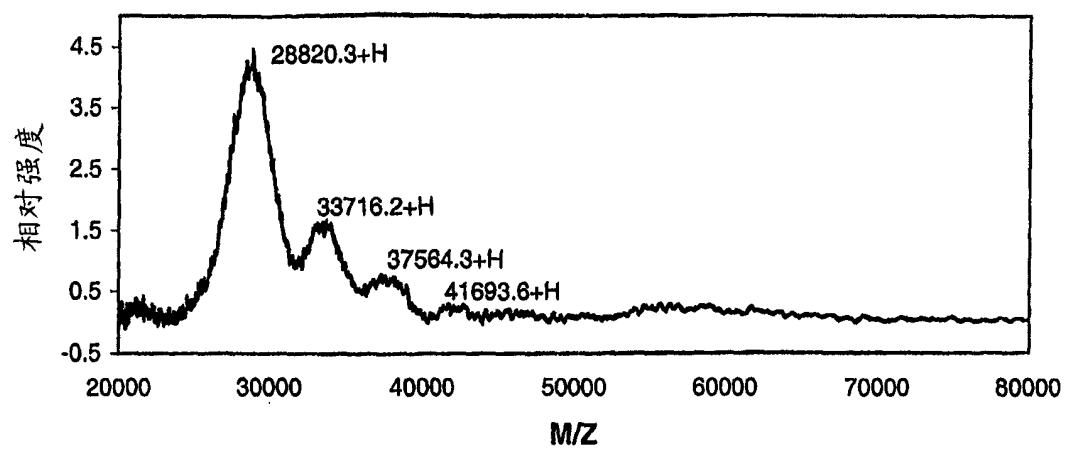


图 13