



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511391 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 13

(21) 申请号 200780033741. 8

(22) 申请日 2007. 07. 25

(30) 优先权数据

06117830. 7 2006. 07. 25 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 03. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2007/002821 2007. 07. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02008/012528 EN 2008. 01. 31

(73) 专利权人 利普生技术有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 S · 杰因 张荣升

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 38/28 (2006. 01)

C07K 17/12 (2006. 01)

C07K 14/62 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005016974 A1, 2005. 02. 24,

WO 2005016974 A1, 2005. 02. 24,

Sato M et al. Site-Specific Introduction of Sialic Acid into insulin. 《Angew Chem Int ed》. 2004, 第 43 卷 1516-1520.

Sato M et al. Site-Specific Introduction of Sialic Acid into insulin. 《Angew Chem Int ed》. 2004, 第 43 卷 1516-1520.

Sato M et al. Site-Specific Introduction of Sialic Acid into insulin. 《Angew Chem Int ed》. 2004, 第 43 卷 1516-1520.

审查员 吕茂平

权利要求书 2 页 说明书 17 页

序列表 1 页 附图 15 页

(54) 发明名称

N 末端聚唾液酸化

(57) 摘要

本发明涉及一种包含蛋白质的多糖衍生物群的组合物, 其中所述蛋白质为胰岛素或胰岛素样蛋白质, 所述多糖是阴离子型并包含 2-125 个糖单元, 并且其中所述群基本上仅由所述蛋白质的 N 末端衍生物组成。所述多糖通常为 PSA。本发明还涉及包含所述新型化合物的组合物, 以及用于制备该新型化合物的方法。

1. 一种包含蛋白质的多糖衍生物群的组合物,其中所述蛋白质为胰岛素或胰岛素样蛋白质,所述多糖是聚唾液酸,其包含 20-125 个唾液酸单元,并且其中至少 85% 的所述蛋白质的衍生物群仅在 B 链的 N 末端衍生化,

其中所述胰岛素样蛋白质是胰岛素在核酸或氨基酸水平上具有 90% 或大于 90% 的序列相似性或同一性的同源物。

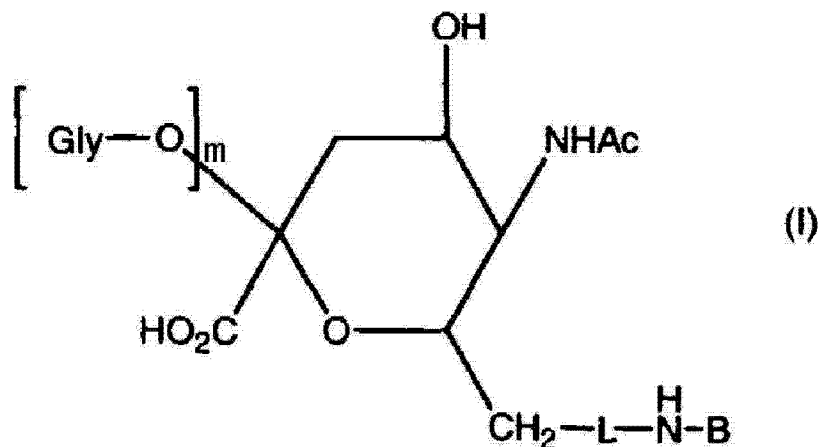
2. 根据权利要求 1 的组合物,其中至少 90% 的所述蛋白质的衍生物群仅在 B 链的 N 末端衍生化。

3. 根据权利要求 2 的组合物,其中至少 95% 的所述蛋白质的衍生物群仅在 B 链的 N 末端衍生化。

4. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述聚唾液酸基本上仅由唾液酸单元组成。

5. 根据权利要求 1-4 任一项的组合物,其中所述胰岛素或胰岛素样蛋白质被所述多糖在所述多糖的还原末端单元衍生化。

6. 根据权利要求 1-4 任一项的组合物,其中所述多糖衍生物具有通式(I)



其中 HNB 衍生自  $\text{B-NH}_2$ ,  $\text{B-NH}_2$  为胰岛素的或胰岛素样蛋白质的 B 链的 N 末端;

L 为一个键、一个衔接基团,或者包含一个多肽或一个合成寡聚体;

GlyO 为一个唾液酸单元;

其中如果存在所述衔接基团,则其具有通式  $\text{-Y-C(O)-R}^1\text{-C(O)-}$ ;

其中 Y 为  $\text{NR}^2$  或  $\text{NR}^2\text{-NR}^2$ ,  $\text{R}^1$  为选自以下的双官能有机基团:烷二基、亚

芳基、烷亚芳基、杂亚芳基和烷基杂亚芳基,它们中的任一种都可被羰基、酯、硫化物、醚、酰胺和 / 或胺键取代和 / 或间断;

且  $\text{R}^2$  为 H 或  $\text{C}_{1-6}$  烷基。

7. 根据权利要求 6 的组合物,其中 L 是一个键或者一个  $\text{-NH-C(=O)-R}^1\text{-C(=O)-}$  基团。

8. 根据权利要求 1-4 任一项的组合物,其中所述多糖包含 20-60 个唾液酸单元。

9. 根据权利要求 8 的组合物,其中所述多糖包含 40-50 个唾液酸单元。

10. 根据权利要求 1-4 任一项的组合物,其中所述多糖的多分散度低于 1.3。

11. 根据权利要求 10 的组合物,其中所述多糖的多分散度低于 1.2。

12. 根据权利要求 11 的组合物,其中所述多糖的多分散度低于 1.1。

13. 根据权利要求 1-4 任一项的组合物,所述组合物是一种药物组合物并且包含一种

或多种可药用赋形剂。

14. 根据权利要求 1-13 任一项的组合物用于制备治疗糖尿病的药物用途。

15. 一种用于产生胰岛素的或胰岛素样蛋白质的多糖衍生物的方法, 其中将阴离子多糖基本上仅与所述胰岛素的或胰岛素样蛋白质的 B 链的 N 末端胺发生化学反应, 所述阴离子多糖为包含 20-125 个唾液酸单元的聚唾液酸, 其中至少 85% 的衍生物群仅在所述 B 链的 N 末端衍生化, 并且

其中所述胰岛素样蛋白质是胰岛素在核酸或氨基酸水平上具有 90% 或大于 90% 的序列相似性或同一性的同源物。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中至少 90% 的所述蛋白质的衍生物群仅在所述 B 链的 N 末端衍生化。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中至少 95% 的所述蛋白质的衍生物群仅在所述 B 链的 N 末端衍生化。

18. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述阴离子多糖具有一个活性醛基, 所述醛基与所述胰岛素或胰岛素样蛋白质反应, 并且在还原条件下进行所述衍生化反应。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其中所述活性醛基位于所述多糖的非还原端。

20. 根据权利要求 18 的方法, 其中所述活性醛基位于所述多糖的还原端, 并且其非还原端已经被钝化, 以使它不能与所述胰岛素或胰岛素样蛋白质反应。

21. 根据权利要求 15-20 任一项的方法, 其中所述阴离子多糖或反应中间体在一种 pH 范围为 4.0-6.0 的酸性第一水性溶液中与所述胰岛素或胰岛素样蛋白质的末端胺基反应; 并且在 pH 范围为 6.5-8.5、较所述第一水性溶液高的 pH 的第二水性溶液中纯化所得到的多糖衍生物。

22. 根据权利要求 15-20 任一项的方法, 所述方法在存在制剂添加物的条件下进行。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述制剂添加物为磷酸钠。

## N 末端聚唾液酸化

[0001] 本发明涉及胰岛素的新型多糖衍生物以及用于产生这种衍生物的方法。所述衍生物可用于改良胰岛素的稳定性、药代动力学及药效学。

[0002] 糖尿病是一种碳水化合物代谢紊乱,由胰岛素产生不足或对胰岛素敏感性降低导致。胰岛素在胰脏朗格罕氏岛(islets of Langerhans)的 $\beta$ 细胞中合成,是体内大多数细胞正常利用葡萄糖所必需的。在患有糖尿病的人中,利用葡萄糖的正常能力受到抑制,从而增加了血糖水平(高血糖症)。

[0003] 有两种不同类型的糖尿病。I型是胰岛素依赖型糖尿病即IDDM。IDDM在以前指的是青少年型糖尿病。在IDDM中,胰脏不分泌胰岛素,必须通过外源来提供。II型成年型糖尿病通常可通过饮食进行控制,但在某些重症病例中需要胰岛素。

[0004] 在20世纪20年代胰岛素被分离之前,大多数患者在疾病发作后短时间内死去。未治疗的糖尿病会导致酮症——酮(脂肪分解的产物)在血液中积聚;随后是具有恶心和呕吐症状的酸中毒(酸在血液中积聚)。随着紊乱的糖代谢和脂肪代谢的毒性产物的持续积累,患者会发生糖尿病昏迷。

[0005] 糖尿病的治疗一般需要定期地注射胰岛素。这产生显著的、挽救生命的临床改良。然而,由于胰岛素注射的不便,大量努力聚焦于提高胰岛素的给药及生物同化。

[0006] 胰岛素分子由两条通过二硫键连接的氨基酸链细成(mw 5804)。胰岛 $[\beta]$ 细胞分泌单链的胰岛素前体——被称为胰岛素原。胰岛素原的蛋白酶解导致4个碱性氨基酸(胰岛素原链的31、32、64和65位;分别为Arg、Arg、Lys、Arg)以及连接(“C”)多肽被除去。在形成的双链胰岛素分子中,在A链氨基末端具有甘氨酸,在B链氨基末端具有苯丙氨酸。

[0007] 胰岛素可以以单体、二聚体或由三个二聚体形成的六聚体的形式存在。该六聚体与两个 $Zn^{2+}$ 原子络合。生物活性位于单体中。虽然直至最近几乎只有牛胰岛素和猪胰岛素被用于治疗人糖尿病,但是现有技术已知胰岛素在物种之间的许多不同。猪胰岛素与人胰岛素最相似,它与人胰岛素仅有的不同是B链C末端为丙氨酸残基而非苏氨酸残基。尽管有这些差异,但是大多数哺乳动物胰岛素具有相当的特异性活性。直至最近,动物提取物提供了所有用于治疗该疾病的胰岛素。重组技术的出现使得可以商业规模制造人胰岛素(例如Humulin(TM)胰岛素,可从印第安纳州印第安纳波利斯的Eli Lilly and Company购得)。

[0008] 已经进行衍生胰岛素的尝试来改良其药代动力学性质。在市场上有一种产品,即PEG-胰岛素(PEG-insulin)(Nektar Therapeutics)。PEG是一种中性、溶于水的无毒聚合物,它包含任意数目的环氧乙烷的重复单元。设计聚乙二醇化(PEGylation)来增加活性分子大小,并最终通过如下途径来改良药物性能:优化药代动力学;增加生物利用度;以及降低免疫原性和给药频率。PEG-胰岛素的设计和开发在W02004091494中被进一步描述。

[0009] 现有技术已知大量用于产生聚乙二醇化胰岛素衍生物的方法。Davis等人(美国专利4,179,337)描述PEG-胰岛素构建体的合成,他们使用三氯-s-三嗪(三聚氰氯(cyanuric chloride))作为PEG和蛋白之间的衔接物。他们遵循这样的合成方案,即过量的(50 $\times$ )三聚氰氯活化的PEG(2000Da)在硼酸盐缓冲液(pH9.2)中与胰岛素反应2小时。该发明的技术能够产生具有部分活性(约50%)的PEG-胰岛素轭合物,这种轭合物

是非免疫原性的和非抗原性的。Obermeier 等人（加拿大专利 1,156,217）发现，依照上文引用的 Davis 的专利制备 PEG-胰岛素轭合物产生了一种包含大约 50% 的三-PEG-胰岛素的轭合物的不均匀混合物，并且其他可能的 PEG-胰岛素衍生物结合物（单-PEG-胰岛素或双-PEG-胰岛素）在残基 PheB1 位置是未被取代的。

[0010] Obermeier 等人（加拿大专利 1,156,217）描述了专门在残基 PheB1 位置作出改进的 PEG-胰岛素轭合物的合成。他们发明的基础涉及，用有机溶剂（例如 DMF、DMSO、吡啶等）中的叔丁氧羰基（t-boc）或甲磺酰乙氧羰基（methanesulfonyl ethoxycarbonyl）（Msc）在碱性条件下保护残基 GlyA1 和 LysB29 位置的活性胺。从（单-、双-及三-）保护的胰岛素的复杂混合物中，通过常规的色谱技术分离了 N<sup>α</sup>A1, N<sup>ε</sup>B29-双-保护的胰岛素种类（N. sup. . alpha. A1, N. sup. . epsilon. B29-bis-protected-insulin species）。在分离之后，将所述纯 N<sup>α</sup>A1, N<sup>ε</sup>B29-双-保护的胰岛素与活化的（例如酸性氯化物或异氰酸盐）PEG 衍生物反应，随后使用肽化学的通用技术去除保护基团。该发明人观察到，GlyA1 和 LysB29 的氨基在碱性反应条件下比 PheB1 的氨基活性大。他们已经确定，其位点专一性 mPEG(1500)-B1-胰岛素轭合物对降低兔的血糖水平有 100% 的胰岛素效应（基于摩尔数计算）。

[0011] Geiger 等人（1980）和 Ehrat 等人（1983）描述了专门在残基 PheB1 位置作出改进的 PEG-胰岛素加合物，他们使用的保护 / 轭合 / 脱保护法与 Obermeier 等人、Geiger 等人和 Ehrat 等人描述的多步法相似，并观察到，PEG(1500)-B1-胰岛素轭合物有比天然胰岛素小得多的抗原性以及大得多的稳定性（对于肝酶）。其他 PEG-胰岛素制备法（Caliceti et al., 1999; Uchio et al., 1999; Hinds et al., 2002）具有以下特征之一：1) 以上文所述的基本的保护 / 轭合 / 脱保护三步法为核心，2) 形成所述胰岛素分子的非特异性改良，或者 3) 不能产生最有效的轭合物，即 PEG-B1-胰岛素。

[0012] Liu 等人（美国专利 6,323,311 B1）描述了一种可用于合成 PEG-B1-胰岛素轭合物的方法。该方法是 Obermeier 的保护 / 轭合 / 脱保护三步法的外延，但不需要在步骤之间分离反应中间体（即一锅式合成）。因此，将胰岛素在残基 GlyA1 和 LysB29 位置保护，立即与 PEG 反应，随后在分离任何种类之前进行脱保护。该发明人声称，他们的一锅式反应可以得到最多达 50% 正确位置的异构体（即 PEG-B1-胰岛素）及 30% 未反应胰岛素，未反应胰岛素可再循环用于后续的衍生化中。假定快速地进行这些构建体的制备，那也需耗时至少 5 天才能完成。另外，该发明需要大过量的 PEG 试剂来得到合意的结果。虽然该发明的产品可能是有效的，但是它们的制备仍需要蛋白质长时间在不利于蛋白质的环境中（高 pH 和低 pH）经历三个反应步骤。

[0013] 申请 US2007083006 中的发明通过提供一种简单制备高纯度胰岛素衍生物——胰岛素 B 链的 N 端（PheB1）在单个步骤中被特异性聚乙二醇化——的方法，克服了现有技术中聚乙二醇化胰岛素的方法的缺陷。与表明在 PheB1 位置聚乙二醇化为至少可能的反应产物的在先经验（例如 Caliceti et al., 1999, 见上文）不同，该专利方法通过控制特异性 pH 条件，应用金属离子螯合剂并添加有机溶剂，来增强 PheB1 氨基末端的相对反应性，该 PheB1 氨基末端变成聚乙二醇化的主要位点。考虑到在残基 PheB1 位置的位点特异性聚乙二醇化所赋予胰岛素的大量有利性质（例如减少免疫原性 / 抗原性；增加蛋白水解、化学和物理的稳定性；增加循环半衰期；增加水性的 / 有机的溶解度；完全生物活性），用于得到这种结果的简单、低成本且易于规模化的方法将是对现有技术的一项显著进步。

[0014] 由现有技术看来,需要提供这样的改良胰岛素衍生物,即其可用于人和动物治疗,具有优化的稳定性、半衰期和低毒性。我们已发现将 PSA 连接至胰岛素上会赋予这些性质。

[0015] 聚唾液酸 (PSA) 是由某些细菌菌株和哺乳动物某些细胞产生的天然存在的无支链的唾液酸聚合物。通过限制性酸解或用神经氨酸酶消化,或者通过对天然的、细菌源形式的聚合物进行分级,可产生各种聚合度的聚唾液酸:从  $n =$  约 80 或更多个唾液酸残基,至下限  $n = 2$ 。

[0016] 近些年,PSA 的生物学性质,特别是  $\alpha$ -2,8-连接的均聚聚唾液酸的生物学性质,被用于改良蛋白质和低分子量药物分子的药代动力学性质。聚唾液酸衍生化使许多治疗型蛋白包括过氧化氢酶和天冬酰胺酶的循环半衰期得到了显著的提高,并且使得在应用这些蛋白质时不用考虑已经存在的抗体,这些抗体是先前暴露于该治疗型蛋白而产生的一种不需要的(而且有时是不可避免的)结果[Fernandes and Gregoriadis,1996 and 1997]。所述  $\alpha$ -2,8-连接的聚唾液酸成为了使人关注的 PEG 替代物,它作为人体的天然部分是免疫系统不可见的生物可降解聚合物,而且可由组织神经氨酸酶降解为唾液酸,而唾液酸是一种无毒的糖类。

[0017] 我们在以前已经描述了将多糖(特别是 PSA)连接到治疗药剂如蛋白质上的方法[US-A-5846,951;WO-A-0187922]。这些方法中有一些是依赖于聚合物‘非还原端’的化学衍生化来产生在伯胺基位置反应的蛋白质反应活性醛基部分。由于含有邻二醇,非还原的唾液酸末端单元可以容易地(且选择性地)被高碘酸盐氧化而生成单醛形式,这种形式与蛋白质的反应活性更高,并且含有适宜的活性元件,用于通过还原性氨基化和其他化学作用将蛋白质连接。这一反应在图 1 和图 2 中进行了阐述,其中:

[0018] 图 1 显示了用高碘酸钠氧化多聚唾液酸(colominic acid)(源自大肠杆菌的  $\alpha$ -2,8-连接的 PSA),从而在非还原端形成一个有蛋白质活性的醛,和

[0019] 图 2 显示了用氰基硼氢化钠选择性地还原希夫碱,从而与蛋白质氨基生成一个稳定、不可逆的共价键。

[0020] 本发明人在以前的出版物(例如 Biochimica et Biophysica Acta(2003))已描述了聚唾液酸化胰岛素的合成。在该参考文献中,22kDa 和 39kDa 多聚唾液酸被氧化,并与重组人胰岛素的氨基反应。所使用 CA 的多分散度为 1.33 和 1.40,这样的多分散度对于治疗用途来说是太大的。

[0021] 在我们以前的专利申请(以 W02005/016974 公开)中,我们还描述了胰岛素-多聚唾液酸轭合物的合成。然而,在该申请中,所述轭合物并非都具有特异性 N 末端,从而形成了多种轭合物。

[0022] 例如,在上述常规轭合反应过程中,通过多聚唾液酸与氨基酸侧链的反应可能产生预期之外的副产物。这对于制备化学结构已知的轭合物来说足以成为问题,而化学结构已知的轭合物是监管机构对人和动物治疗用途所要求的。

[0023] 从多种预期之外的产物中纯化预期的反应产物(例如单多聚唾液酸化的产物)是不容易做到的,这是因为大多数的反应产物的物理化学性质是类似的。这意味着,诸如离子交换色谱和凝胶渗透色谱(它们分别基于电荷和大小进行分离)的技术将产生较弱的纯化谱。

[0024] 根据本发明的第一方面,我们提供了包含蛋白质的多糖衍生物群的组合物,其中

所述蛋白质为胰岛素或胰岛素样蛋白质,所述多糖是阴离子型并包含 2-125 个糖单元,并且其中所述群基本上仅由所述蛋白质的 N 末端衍生物组成。

[0025] 在下文中使用术语胰岛素时。我们还意在涵盖胰岛素样蛋白质。我们所指的胰岛素样蛋白质是指具有与胰岛素等效活性的蛋白质。胰岛素通常降低血糖浓度。它还增加单糖、氨基酸和脂肪酸的细胞通透性,并加速糖酵解、戊糖磷酸循环和肝中的糖原合成。优选地,胰岛素样蛋白质具有至少 35% (更优选至少 50%) 的 Swissprot 登记号为 P01308 的人胰岛素的活性。

[0026] 还可以使用上文详细描述的进行必需活性的胰岛素突变体。“胰岛素样”蛋白质还可以指“胰岛素同源物”。两个序列是否是同源的可使用相似性或同一性百分数来常规地进行计算,术语相似性和同一性在本领域中是熟知的。应将序列与 SEQ I. D. No. 1 比较,后者是未加工的人胰岛素前体。残基 25-54 对应于胰岛素 B 链,90-110 残基对应于胰岛素 A 链。同源序列还可以与活性类型的人胰岛素比较。

[0027] 同源优选具有等于或大于 50% 的核酸水平或氨基酸水平的相似性或同一性,更优选等于或大于 60%、70%、80%,更优选等于或大于 90%,例如 95% 或 99% 的核酸水平或氨基酸水平的相似性或同一性。现有的多种程序可计算相似性或同一性;优选的程序为 BLASTn、BLASTp 和 BLASTx 程序,以默认参数运行,可从 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 获取这些程序。例如,可以使用默认参数 (score (分值) = 100、word length (字长) = 11、expectation value (期望值) = 11、low complexity filtering (低复杂性过滤) = on (开)) 的 BLASTn 程序比较两个氨基酸序列。使用这些默认参数计算上述的同源性水平。

[0028] 所述胰岛素可以是天然的,即源自人或动物,或者是合成的,例如通过重组方法制备的。

[0029] 如本领域中所熟知的,胰岛素包含两条肽链。优选地,本发明中的所述胰岛素是在其 B 链的 N 末端被多糖衍生的。

[0030] 我们所指的“群”是在所述组合物中有多于一种的多糖衍生物。所述衍生物可包含相同或不同数目的糖单元。优选地,在所述组合物中的多糖的多分散度低于 1.3,更优选低于 1.1。

[0031] 在所述群中,基本上所有蛋白都仅在 N 末端被衍生化。因为在胰岛素中有两条肽链,所以有两个 N 末端单元。在所述群中,优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的 B 链在 N 末端被阴离子多糖衍生化。所述 A 链的 N 末端无需被衍生化。

[0032] 可以使用本领域中的标准技术例如肽图谱 (peptide mapping) 或埃德曼降解 (Edman Degradation) 确定所述 N 末端的衍生化程度。

[0033] 优选地,所述多糖具有至少 2 个,更优选至少 5 个,最优选至少 10 个例如至少 50 个的糖单元。

[0034] 所述阴离子多糖优选选自聚唾液酸、肝素、透明质酸和硫酸软骨素。优选地,所述多糖是聚唾液酸并且基本上仅由唾液酸单元组成。然而,在所述多糖分子中可以有唾液酸之外的单元。例如,唾液酸单元可以与其他糖单元交替出现。然而,所述多糖优选基本上仅由唾液酸单元组成。

[0035] 优选地,所述多糖具有一个末端唾液酸基团,并且如上文详细描述的,更优选为一个聚唾液酸,它是包含至少 2 个通过  $\alpha$ -2-8 或  $\alpha$ -2-9 键相互连接的唾液酸单元的多糖。适

宜的聚唾液酸具有的重量平均分子量介于 2-100kDa 之间,优选介于 1-35kDa 之间。最优选的聚唾液酸具有的分子量介于 10-20kDa 之间,通常约 14kDa。最优选的,所述聚唾液酸来源于细菌,例如来自大肠杆菌 K1、脑膜炎奈瑟氏菌 (*N. meningitidis*)、液化性摩拉克氏菌 (*Maraxellaliquefaciens*) 或铜绿巴斯德杆菌 (*Pasteurella aeruginosa*) 的多糖 B,或者来自大肠杆菌株 K92 的 K92 多糖。最优选来自大肠杆菌 K1 的多聚唾液酸。

[0036] 所述阴离子多糖(优选聚唾液酸)可以为盐的形式或者为游离酸的形式。它可以为水解的形式,从而使得从细菌源回收后分子量已降低。所述多糖(优选聚唾液酸)可以是很宽分子量范围的材料,例如具有超过 1.3 例如高达 2 或更高的多分散度。优选地,所述分子量的多分散度小于 1.3 或 1.2,优选小于 1.1,例如低至 1.01。

[0037] 本发明的化合物通常为胰岛素的聚唾液酸衍生物,并包含 2-125 个唾液酸单元。所述化合物更常见包含 10-80 个唾液酸单元,优选 20-60 个唾液酸单元,最优选 40-50 个唾液酸单元。

[0038] 在本发明的第一方面中的所述多糖衍生物可以是在胰岛素 N 末端和阴离子多糖之间共价连接的轭合物。所述多糖和所述胰岛素之间的其他联合方式包括静电吸引。但优选共价结合。所述共价键可以是羧基和胺基之间的酰胺键。所述胰岛素可共价结合于所述多糖的另一种键是通过希夫碱。用于轭合胺的合适基团在 WO 2006/016168 中有进一步的描述。

[0039] 在本发明中,所述多糖可以是天然存在的多糖,或者天然存在多糖的衍生物,例如通过糖残基上一个或多个活性基团的反应所衍生的多糖,或者在多糖链末端已共价连接有衍生基团的多糖。

[0040] 所述多糖可以经其还原的或非还原的末端单元连接至所述胰岛素上。

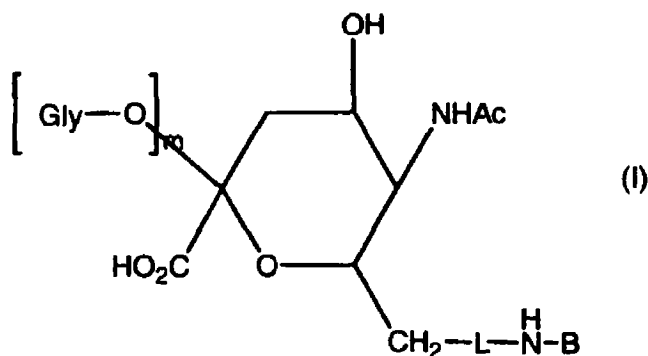
[0041] 用于将多糖连接至蛋白质的方法是本领域中熟知的,并且在 WO 92/22331 和 WO-A-0187922 中有更详细的描述。在本发明中优选的方法在下文有更详细的描述。在本申请的图 1 和图 2 中也描述了这些方法。

[0042] 所述多糖可以经其还原末端单元及非还原末端单元连接至所述胰岛素上。这意味着一个多糖链可连接有两个胰岛素蛋白质,即在其还原末端和非还原末端都被衍生。

[0043] 所述多糖可直接连接至所述胰岛素肽(即如图 1 和图 2 中所示),或者经一个衔接物连接至所述胰岛素肽。合适的衔接物来自 N-马来酰亚胺、乙烯基砒、N-碘乙酰胺、正吡啶(orthopyridyl)或含 N-羟基琥珀酰亚胺的试剂。所述衔接物还可以是生物稳定的或生物可降解的,并包含例如多肽或合成的寡聚物。所述衔接物可来自双官能部分,如 WO 2005/016973 中进一步描述的。合适的双官能试剂例如 Bis-NHS。该试剂可以具有通式  $Z-R^1-Z$ , 其中每个 Z 为可以相同或不同的官能基团,  $R^1$  为双官能有机基。优选地,  $R^1$  选自烷二基(alkanediyl)、亚芳基(arylene)、烷亚芳基(alkarylene)、杂亚芳基(heteroarylene)和烷基杂亚芳基(alkylheteroarylene),它们中的任一个都可被羰基、酯、硫化物、醚、酰胺和/或胺键取代及/或间断。特别优选  $C_3-C_6$  烷二基。  $R^1$  最优选对应于所述合适的双官能试剂的适当部分。

[0044] 优选的多糖衍生物具有通式 (I)

[0045]



[0046] 其中  $m$  至少为 1；

[0047] HNB 来自  $B-NH_2$ ，后者是胰岛素或胰岛素样肽的 N 末端；

[0048] L 为一个键、一个衔接基团，或者包含一个多肽或一个合成寡聚体；

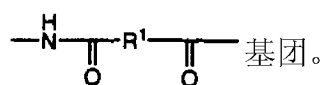
[0049] GlyO 为阴离子糖单元；

[0050] 其中如果存在衔接基团，其具有通式  $-Y-C(O)-R^1-C(O)-$ ；

[0051] 其中 Y 为  $NR^2$  或  $NR^2-NR^2$ ， $R^1$  为上文所述的双官能有机基；且  $R^2$  为 H 或  $C_{1-6}$  烷基。

[0052] 在本发明的该方面，所述胰岛素连接至所述多糖的非还原端。所述末端多糖单元是一个唾液酸单元。所述多糖中其他的糖单元由 GlyO 表示，并且可以相同或不同。合适的糖单元包括肝素、透明质酸或硫酸软骨素。

[0053] 如果所述胰岛素直接连接至所述多糖上，所述基团 L 是一个键。然而，或者所述基团 L 可来自 N-马来酰亚胺、乙烯基砜、N-碘乙酰胺、正吡啶或含 N-羟基琥珀酰亚胺的试剂。所述试剂可以具有上文定义的通式  $Z-R^1-Z$ 。在该实施方案中，L 通常为一个



[0054] 本发明的另一个方面是一种上文定义的组合物，它是一种药物组合物并且还包含一种或多种药用赋形剂。

[0055] 所述药物组合物可以为水性悬液的形式。水性悬液包含所述新型化合物，混合有适宜于制备水性悬液的赋形剂。所述药物组合物可以为一种无菌可注射的水性或均质悬液的形式。可依照现有技术使用合适的分散剂或湿润剂以及悬浮剂配制该悬液。

[0056] 对于人或兽医的用途，可以经口服、静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、鼻内、真皮内、局部或气管内给予药物组合物。

[0057] 所述组合物还可以包含制剂添加物。我们所指的制剂添加物是指能在体内或体外稳定所述胰岛素的赋形剂，如 Wang 等人 (1999) 所述。所述赋形剂可以是稳定剂、助溶剂或金属离子。制剂添加物的合适实例包括缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、盐、聚合物、金属离子、糖、多元醇或氨基酸的一种或多种。这些制剂添加物可单独使用，或者结合使用。

[0058] 稳定剂通常的作用是，通过对蛋白质的变性状态进行脱稳定化，导致解折叠蛋白质的吉布斯自由能变化增大。所述稳定剂优选是糖或多元醇，例如蔗糖、山梨糖醇、海藻糖、甘油、甘露醇、乳糖和乙二醇。一种稳定缓冲剂是磷酸钠。

[0059] 所述助溶剂优选为表面活性剂，优选非离子型表面活性剂。合适的实例包括吐温 (Tween) 80、吐温 20、吐温 40、Pluoronic F68、Brij 35 和曲拉通 X-100 (Triton X100)。

[0060] 所述金属离子优选是二价的。合适的金属离子包括  $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Fe^{2+}$ 。

- [0061] 所述制剂添加物还可以是选自 PSA、PEG 或羟基-β-环糊精的聚合物。
- [0062] 还可以使用例如间甲酚 (m-Cresol) 的防腐剂。
- [0063] 用作制剂添加物的合适氨基酸及氨基酸衍生物包括组氨酸、甘氨酸、其他类似氨基酸和天冬氨酸钠。
- [0064] 本发明的又一方面是在治疗中使用的上文所述的化合物。
- [0065] 根据本发明的又一方面,我们提供了一种产生胰岛素的或胰岛素样蛋白质的多糖衍生物的方法,其中包含 2-125 个糖单元的阴离子多糖基本上仅与所述胰岛素的或胰岛素样蛋白质的 N 末端胺进行化学反应。
- [0066] 短语“基本上仅与 N 末端胺进行化学反应”是指在衍生物的群中,至少 85%,更优选至少 90%,最优选至少 95% 的蛋白仅在其 N 末端胺位置衍生。优选地,这是在胰岛素 B 链的 N 末端胺位置。
- [0067] 通过该方法以及下文详述的任何优选实施方案获得的多糖衍生物也构成本发明的一部分。
- [0068] 我们已经开发了一种新方法用于将多糖耦合至蛋白质上,由此可利用蛋白质 N 末端的高反应性,并且该方法避免了使用以高碘酸盐氧化的天然多聚唾液酸对蛋白质进行还原性胺化的现有方法(图 1 和图 2)所产生的产物复杂性。
- [0069] 所述多糖还可以与修饰形式的胰岛素反应。例如,胰岛素上的一个或多个基团可以经化学转化 (chemical transformation),例如通过还原或氧化。例如,使用氧化条件可在胰岛素的末端氨基位置产生具有活性的羰基。
- [0070] 适合用于本发明的方法的多糖如前文对所述新型组合物所述的。
- [0071] 可以通过现有技术中所述的任一适合的方法制备本发明的化合物。例如,在我们以前的专利申请 WO 92/22331 中描述了一种通常的方法。
- [0072] 所述阴离子多糖通常在衍生胰岛素之前已被活化。例如它可具有一个活性醛基,并且可在还原条件下进行所述衍生化反应。通过对所述多糖的羟基进行受控氧化,可产生所述活性醛基。最优选在一个预备步骤中产生所述活性醛,其中所述多糖在受控的氧化条件下例如使用高碘酸钠,在水性溶液中进行反应。所述氧化优选是化学氧化,但是也可以使用能进行此步骤的酶。所述活性醛基可以位于所述多糖的非还原端或还原端。胰岛素(通常其 N 末端)然后可以与所述活性醛基反应以产生一种加合物,该加合物在被还原时可产生胰岛素的 N 末端衍生物。
- [0073] 所述多糖的活化将优选在这样的条件下进行,即使得基本上没有多糖主链的链中断裂,也就是说基本上没有减小分子量。合适的氧化剂为高钨酸盐 (perruthenate),或者优选为高碘酸盐。可以使用以下条件将氧化进行 1min 至 48 小时:1mM-1M 的高碘酸盐浓度范围、3-10 的 pH 范围、0-60°C 的温度范围。
- [0074] 用于衍生化反应的合适还原条件可利用氢与催化剂,或者优选氢化物例如硼氢化物。它们可以是被固定的,例如以安柏莱特 (Amberlite) (商标) 固载的硼氢化物。碱土金属氢化物例如硼氢化钠优选在以下条件下被用作还原剂:1 μM-0.1M 的浓度范围、4-10 的 pH 范围、0-60°C 的温度范围以及 1min-72 小时的时间范围。选择条件,使得起始材料上的侧翼羧基不被还原。其他合适的还原剂为酸性条件下的氰基硼氢化物,例如以聚合物固载的氰基硼氢化物或碱金属氰基硼氢化物、L-抗坏血酸、焦亚硫酸钠、L-selectride、三乙酰氧

基硼氢化物等。

[0075] 多糖的其他活性衍生物可被应用于本发明中,包括具有诸如 NHS 的侧翼官能基团的那些活性衍生物,如我们以前的专利申请 WO 06/00540 中所述的。

[0076] 在一个实施方案中,所述活性醛基位于所述多糖的还原端,并且其非还原端已经被钝化使得其不与所述胰岛素的侧翼基团反应。

[0077] 虽然多聚唾液酸还原端对目标蛋白质的活性是弱的,但是对于制备化学结构确定的轭合物却是足够麻烦的。

[0078] 适合于制备在多糖的还原末端具有活性醛的多糖的化学法在我们以前的申请 WO 05/016974 中有记载。该方法涉及一个预备选择氧化步骤,之后是还原,然后进一步氧化,以产生一种在还原端具有醛并且有钝化的非还原端的化合物。

[0079] WO 2005/016973 描述了用于轭合蛋白质的聚唾液酸衍生物,特别是那些具有游离巯基的药物的聚唾液酸衍生物。所述聚唾液酸化合物与异双官能试剂反应以引入一个侧翼官能基团用于位点特异性轭合巯基。本发明中使用的阴离子多糖也可以用异双官能试剂以这种方式衍生。

[0080] 在所述多糖与胰岛素反应之前可以将其衍生。例如,所述多糖可以与双官能试剂反应。

[0081] 所述多糖可以经过一个预备反应步骤,其中在末端糖(优选为唾液酸)上形成选自伯胺基团、仲胺基团及胍的基团,之后是其与双官能试剂反应的反应步骤,以形成一个反应中间体,如 WO 2006/016168 中进一步所述的。该中间体然后可以与胰岛素或胰岛素样肽反应。所述双官能试剂可具有通式  $Z-R^1-Z$ , 如上述。

[0082] 我们已经发现,某些反应条件促进胰岛素 N 末端位置的选择性衍生化。为了促进所述 N 末端的选择性反应,应在一种酸性 pH 的第一水性溶液中进行衍生化反应,然后应在比第一水性溶液 pH 更高的第二水性溶液中纯化所得到的多糖衍生物。对于酸性 pH,我们是指小于 7 的 pH。所述第一水性溶液的 pH 一般是 4.0–6.5 的范围,优选 4.0–6.0,所述第二水性溶液的 pH 是 6.5–9.0 的范围,优选 6.5–8.5 或 6.5–8.0。低 pH 的衍生化反应促进在所述蛋白质 N 末端——而不是在链的任何中间位点——的选择性衍生化。

[0083] 再者,我们已经发现,使用某些制剂添加物促进形成选择性的、稳定的、多糖胰岛素衍生物。所述制剂添加物可选自缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、盐、聚合物、金属离子、糖多元醇或氨基酸的一种或多种。它们可被添加至所述反应介质中,或者可作为稳定剂被添加至终产物组合物中。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂添加物为山梨糖醇、海藻糖或蔗糖。在另一个实施方案中,所述制剂添加物可以是非离子型表面活性剂。所述制剂添加物或者可以是选自 PSA、PEG 或羟基- $\beta$ -环糊精的聚合物。在另一个实施方案中,所述制剂添加物是二价金属离子。二价金属离子包括  $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$  或  $Fe^{2+}$ 。

[0085] 所述制剂添加物可以是缓冲剂。如果所述制剂添加物是缓冲剂,那么它优选是磷酸钠或乙酸钠。

[0086] 在本发明的方法中,纯化多糖衍生物可以使用本领域中已知的多种方法进行。合适纯化方法的实例包括 HIC(疏水相互作用色谱法)、SEC(尺寸排除色谱法)、HPLC(高效液相色谱)以及 IEC(离子交换色谱法)。

[0087] 可将具有较宽分子量分布的聚唾液酸群分级成具有较低多分散性的部分,即分级成具有不同平均分子量的部分。分级优选通过阴离子交换色谱进行,阴离子交换色谱用于洗脱合适的碱性缓冲剂,如我们以前的专利申请 WO 2005/016794 和 WO 2005/03149 中所述的。所述分级方法不但适用于所述衍生物,还适用于多糖起始材料。该技术因此可被应用于本发明的基本处理步骤之前或之后。优选地,所产生的胰岛素多糖衍生物具有小于 1.1 的多分散度。

[0088] 根据本发明对胰岛素进行衍生化会导致胰岛素半衰期增加、稳定性提高、免疫原性降低,以及 / 或者控制溶解性并因此控制生物利用度和药代动力学性质。该新方法对于产生单聚唾液酸化的胰岛素轭合物是特别有用的。

[0089] 通过实施例 1-6 并通过参考以下附图对本发明进行阐述:

[0090] 图 1 显示用高碘酸钠氧化多聚唾液酸(来自大肠杆菌的  $\alpha$ -2,8 连接的聚唾液酸);

[0091] 图 2 显示用氰基硼氢化钠选择性地还原希夫碱,以形成一个连接蛋白质氨基的稳定、不可逆的共价键;

[0092] 图 3 是 22kDa CA0- 重组人胰岛素轭合物在不同温度下的 SDS-PAGE;

[0093] 图 4 显示温度对衍生化程度的效应;

[0094] 图 5 是 27kDa CA0- 重组人胰岛素轭合物在不同摩尔比时的 SDS-PAGE;

[0095] 图 6 显示摩尔比对衍生化程度的效应;

[0096] 图 7 是 8 和 11kDa CA0- 重组人胰岛素轭合物的 SDS-PAGE;

[0097] 图 8 是 8kDa CA0- 重组人胰岛素制剂及胰岛素的 SE-HPLC;

[0098] 图 9 显示 10、15 和 21.5kDa CA0- 重组人胰岛素制剂的体内效力;

[0099] 图 10 显示用于纯化轭合物的用 IEC 或 HIC 的制备型 HPLC 实验装置;

[0100] 图 11 显示通过在 HiTrap Butyl FF 柱上的疏水相互作用色谱法纯化 CA0- 胰岛素轭合物;

[0101] 图 12 显示通过在 Hitrap Q FF 柱上的阴离子交换色谱法以 13kDa CA0 作为例子从 HIC 的峰 2 纯化 CA0- 胰岛素轭合物;

[0102] 图 13 显示 13KDa 和 27KDa CA0- 胰岛素轭合物的等电聚焦 (IEF) 凝胶;

[0103] 图 14 显示 CA0- 胰岛素轭合物在小鼠中的体内结果;以及

[0104] 图 15 显示埃德曼氨基酸降解的结果。

[0105] 实施例

[0106] 1. 蛋白和多聚唾液酸的确定

[0107] 通过间苯二酚法 [Svennerholm 1957] 用间苯二酚试剂进行聚唾液酸(如唾液酸)的定量测定,关于间苯二酚法也可参考 [Gregoriadis et.al., 1993; Fernandes and Gregoriadis, 1996, 1997]。用 BCA 比色法或 280nm 的 UV 吸光度测量蛋白质。

[0108] 2. 聚唾液酸的活化

[0109] 在 20°C 下将新鲜制备的 0.02M 的高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ) 溶液 (8 倍摩尔数过量) 与 CA 混合,并且在黑暗中将反应混合物磁力搅拌 15 分钟。然后将 2 倍体积的乙二醇添加至所述反应混合物中以耗尽过量的  $\text{NaIO}_4$ ,将所述混合物置于 20°C 下再搅拌 30 分钟。在 4°C 下,将所述氧化的多聚唾液酸 (CAO) 对 0.01% 碳酸铵缓冲液 (pH 7.4) 充分 (24h) 透析 (3.5KDa

截留分子量的透析袋)。超滤(大于 3.5kDa 的截留分子量)被用于浓缩透析袋中的 CAO 溶液。在浓缩至所需体积之后,将所述滤液低压冻干并置于 -40℃ 直至进一步使用。或者,通过乙醇沉淀(2 次)从所述反应混合物中回收 CAO。

#### [0110] 3. CA 和衍生物的氧化态的测定

[0111] 用 2,4-二硝苯基肼(2,4-DNPH)定量测定多聚唾液酸的氧化度,2,4-二硝苯基肼与羰基化合物相互作用会生成微溶的 2,4-二硝基苯基腙。在 2,4-DNPH 试剂(1.0ml)中加入未氧化的(CA)/氧化的(CAO),振荡溶液然后置于 37℃ 下直到观察到晶体沉淀[Shriner et. al., 1980]。利用一种这样的方法[Park and Johnson, 1949]测量了 CA 的氧化度(定量),即方法该基于在碱性溶液中将氰化铁离子还原为亚铁氰化铁(波斯蓝),然后在 630nm 下测量该亚铁氰化铁。在本实施例中,用葡萄糖作为标准。

#### [0112] 4. 凝胶渗透色谱法

[0113] 多聚唾液酸样品(CA 和 CAO)溶于含  $\text{NaNO}_3$  (0.2M) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10%; 5mg/ml) 中,并在 2×GMPWXL 柱上用色谱法分离,通过折光率(GPC 系统:VE1121 GPC 溶剂泵,VE3590 RI 检测器)检测,并用 Trisec 3 软件(Viscotek Europe Ltd)校正。样品(5mg/ml)用 0.45  $\mu\text{m}$  尼龙膜过滤,以 0.7cm/min 的速度过柱,以 0.2M  $\text{NaNO}_3$  和  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10%) 作为流动相。

#### [0114] 5. 多聚唾液酸稳定性

[0115] 用于化学法聚乙二醇化的规则不适用于聚唾液酸化,这是因为这些分子生理化学性质的差异。PSA 是一种对酸敏感的聚合物,在中性 pH 附近可稳定存在数周(图 3)。图 3 中的结果表明,CAO 在 pH 6.0 和 7.4 可稳定存在 8 天,在 pH 5.0 时缓慢降解(48 小时后,92% 的初始 MW),在 pH 4.0 时缓慢降解(48 小时后,70% 的初始 MW)。在本性上,聚唾液酸是高度亲水的,而 PEG 是双亲性分子。如果使用用于聚乙二醇化的条件进行聚唾液酸化,在多数情况下会观察到蛋白质的聚集及沉淀。

#### [0116] 6. N 末端蛋白质-CA 轭合物与制剂添加物的制备

##### [0117] 6.1 胰岛素-CA 轭合物的制备(N 末端方法)

[0118] 胰岛素(5804Da)以白色固体提供。将胰岛素溶解于最少的 100mM HCl 中,然后将其调节至所需的 pH 并置于冰上。需要添加用于轭合的 CAO 量根据下式计算:

[0119]

蛋白质的量 (g)

**CAO 重量 = (蛋白质的 MW) × (CAO 的 MW) × (CAO 过量的摩尔数)**

[0120] 称取所需的 CAO 量。将 CAO 溶解于 10mM NaOAc, pH 6.0 中,轻轻涡旋混合物直至所有 CAO 已溶解,然后或过滤至一个新的容器中以除去任何聚集/沉淀的物质。将所需量的胰岛素蛋白质溶液添加至所述 CAO 溶液中以获得 7.5 倍(小规模)和 5 倍(大规模)摩尔数过量的 CAO,并且在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下通过将所述反应混合物置于低速振荡器上轻轻混合。添加 100mg/ml  $\text{NaCNBH}_3$  溶液以在终反应混合物中含有 8mg/ml,轻轻混合并检查所述终反应混合物的 pH,如果需要则在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下用 0.5M NaOH/HCl 将 pH 调节至 6.0。最后用 10mM NaOAc, pH 6.0 调整所述反应物的体积,以得到所述反应混合物中 1mg/ml 的蛋白质浓度。将管子密封并在所需温度( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )下涡旋 24 小时。通过合适的方法(例如 pH 7.4 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液)终止所述反应,并将样品取出用于 SDS-PAGE(使用 18% 的 Tris 甘氨酸凝胶)、SE-HPLC(superose 12 柱),并检测反应混合物的 pH。为了消除任何的沉淀物,在

SE-HPLC 分析和纯化前将所述反应混合物在 13000rpm 下离心 5min, 优选的 SE-HPLC 的缓冲液为 0.1M 磷酸钠 (pH6.9)。

#### [0121] 6.2 优化

[0122] 用一定分子量范围的 CA0(10-30kda) 在胰岛素上进行还原性氨基化, 用于 N 末端衍生化和随机衍生化。研究了耦合反应的处理变量范围: 10-20 倍 (小规模) 和 5-10 倍 (大规模) CA0 摩尔数过量, 试剂 = 50-100mM NaCNBH<sub>3</sub>, 反应缓冲剂 = 10mM NaOAc pH 5.5-6.5, 温度 = 4±1℃, 时间 = 16-24 小时等。

[0123] 观察到的优化反应条件如下: CA0 = 7.5 倍 (小规模) 和 5 倍 (大规模) 摩尔数过量, 试剂 = 50mM NaCNBH<sub>3</sub>。反应缓冲剂 = 10mM NaOAc pH 5.5, 温度 = 4±1℃, 时间 = 24 小时。

#### [0124] 6.3 胰岛素-CA 耦合物 (N 末端方法) 的纯化和表征

[0125] 为了从混合物中除去游离的 CA0, 使用了 HIC (HiTrap Butyl FF)。使用浓缩 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (例如 3M)、20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 通过用最小体积来稀释胰岛素反应混合物制备加样溶液, 以得到所述加样溶液中 0.8M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。检查 pH, 应该为 7.4 或者用 0.5M HCl/NaOH 进行调节, 需要用 0.2 μm 的膜滤器过滤所述加样溶液。

[0126] 然后将该溶液加样至 (速率 = 0.5ml/min) 以 HIC 缓冲液 B (20mM 磷酸钠 + 0.8M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.4) 预先平衡的 HIC 柱上。收集所述加样部分 (每个部分为 1.5 倍柱体积) 并标记 (L1-Lx), 然后用 HIC 缓冲液 B (至少 5 倍柱体积; 速率 = 0.5ml/min; 1.5 倍柱体积的部分) 洗涤柱, 收集并标记 (W1-Wx)。将产物与 HIC 缓冲液 A (10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4) 洗脱 (速率 = 5ml/min), 并收集所述部分 (1 倍柱体积部分; 6 倍柱体积) 并标记 (E1-Ex)。如果两个连续部分中没有蛋白质成分 (UV280nm), 进行下一步骤。在纯化过程中将所述样品置于冰上。通过 UV (280nm) (1mg/ml 胰岛素在 280nm 下的消光系数为约 1.043) 分析蛋白质浓度。取所述样品用于 SDS-PAGE 和 SE-HPLC。

[0127] 含蛋白质部分的 HIC 部分经 IEC 缓冲液 A (20mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 洗涤, 以除去 Vivaspin 20 (MW: 5Kd) 中任何可能的硫酸铵。检查 pH, 并且如果需要将其调节至 pH 7.4。加样至以 IEC 缓冲液 A 预先平衡的 IEC 柱上。以如下的方式应用一个梯度系统:

[0128] 加样: 以 0.25ml/min 注入样品的 IEC 缓冲液 A 溶液, 3CV 的洗涤液

[0129] 洗涤: 梯度系统: IEC 缓冲液 A: 90%, AEX 缓冲液 B (20mM 磷酸盐缓冲液 + 1M NaCl, pH 7.4): 10%, 5CV 的梯度液 & 3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0130] IEC 缓冲液 A: 68%, IEC 缓冲液 B: 32%, 5 CV 的梯度液 & 3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0131] IEC 缓冲液 A: 35%, IEC 缓冲液 B: 65%, 5CV 的梯度液 & 3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0132] IEC 缓冲液 A: 0%, IEC 缓冲液 B: 100%, 5CV 的梯度液 & 3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0133] 将含有纯化的耦合物的 IEC 部分合并, 将缓冲液改变为 PBS 缓冲液进行洗涤以除去盐。在除去盐后调节 pH 至 7.4。然后在 4±1℃ 下浓缩该溶液, 通过 UV 光谱法 (280nm) 分析蛋白质浓度。耦合物经无菌过滤, 取所述样品用于活性测定, 并用于通过 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 的表征。如果需要, 则取出等分试样用于蛋白质测定及 CA 测定。剩余物在 4±1℃

下保存至进一步使用,并且通过 SE-HPLC 研究物理稳定性。

[0134] 多种方法影响胰岛素在溶液中的稳定性以及衍生化程度的效应已被研究。

[0135] 6.4 胰岛素-14 kDaCA 轭合物(单分散性)的制备

[0136] 胰岛素(5808Da)以白色固体提供。通过添加最少量 100mM HCl 的溶解胰岛素,然后调节至所需 pH 并置于冰上。需要添加用于轭合的 14kDa CA 量根据下式计算:

[0137]

蛋白质的量(g)

**14 kDa CAO 重量 = (蛋白质的MW) × (CAO 的 MW) × (CAO 过量的摩尔数)**

[0138] 称取所需的 14kDa CAO 量。将 14kDa CAO 溶解于 10mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.0 中,轻轻涡旋混合物直至所有 14kDa CAO 已溶解,然后或过滤至一个新的容器中以除去任何聚集的/沉淀的材料。将所需量的胰岛素蛋白质溶液添加至所述 14kDa CAO 溶液中获得 7.5 倍(小规模)和 5 倍(大规模)摩尔数过量的 14kDa CAO,并且在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下通过将所述反应混合物置于低速振荡器上轻轻混合。添加 100mg/ml  $\text{NaCNBH}_3$  溶液以在终反应混合物中含有 63.5mM 或 4mg/ml,轻轻混合并检查所述终反应混合物的 pH,如果需要则在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下用 0.5M NaOH/HCl 将 pH 调节至 6.0。最后用 10mM NaOAc, pH 6.0 调整所述反应物的体积,以得到所述反应混合物中 1mg/ml 的蛋白质浓度。将管子密封并在所需温度 ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 下涡旋 24 小时。通过合适的方法终止所述反应,并将样品取出用于 SDS-PAGE(使用 18%的 Tris 甘氨酸凝胶)、SE-HPLC(superose 12 柱),并检测反应混合物的 pH。为了消除任何的沉淀物,在 SE-HPLC 分析和纯化前将所述反应混合物在 13000rpm 下离心 5min,优选的 SE-HPLC 的缓冲液为 0.1M 磷酸钠 (pH 6.9)。

[0139] 6.5 优化

[0140] 用一定分子量范围的 CAO(10-30kda) 在胰岛素上进行还原性氨基化,用于 N 末端衍生化和随机衍生化。研究了轭合反应过程变化的范围:10-20 倍(小规模)和 5-10 倍(大规模)CAO 摩尔数过量;试剂 = 50-100mM  $\text{NaCNBH}_3$ ;反应缓冲剂 = 10mM 磷酸盐缓冲液, pH = 5-7.4;温度 =  $4-37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,时间 = 16-24 小时等。

[0141] 观察到的优化反应条件如下:CAO = 7.5 倍(小规模)和 5 倍(大规模)摩尔数过量,试剂 = 63.5mM  $\text{NaCNBH}_3$ (4mg/ml)。反应缓冲液 = 10mM NaOAc pH 6.0,温度 =  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,时间 = 24 小时。

[0142] 6.6 胰岛素-CA 轭合物(N末端方法)的纯化和表征

[0143] 为了从混合物中除去游离的 CAO,使用了 HIC。通过稀释最小体积的胰岛素反应混合物制备加样溶液,使用浓缩的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (例如 3M),20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH7.4)以得到所述加样溶液中 0.8M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。检查 pH,应该为 7.4 或者用 0.5M HCl/NaOH 调节,需要用 0.2  $\mu\text{m}$  的膜滤器过滤所述加样溶液。

[0144] 然后将该溶液加样至(速率 = 0.5ml/min)以 HIC 缓冲液 B(20mM 磷酸钠 + 0.8M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.4)预先平衡的 HIC 柱上。收集所述加样部分(每个部分 1.5 的柱体积)并标记(L1-Lx)。用缓冲液 B(至少 5 倍柱体积;速率 = 0.5ml/min;收集 1.5 倍柱体积的部分)洗涤柱,收集部分并标记(W1-Wx)。将产物与 HIC 缓冲液 A(10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4)洗脱(速率 = 5ml/min);收集部分(1 倍柱体积部分;6 倍柱体积)并标记(E1-Ex)。如果两个连续部分中没有蛋白质成分(UV280nm),进行下一步骤。在纯化过程中将所述样品

置于冰上。通过 UV(280nm) (1mg/ml 胰岛素在 280nm 下的消光系数为约 1.043) 分析蛋白质浓度。所述样品被用于 SDS-PAGE 和 SE-HPLC。

[0145] 含蛋白质部分的 HIC 部分经 IEC 缓冲液 A (20mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 洗涤, 以除去 Vivaspin 20 (MW :5Kd) 中任何可能的硫酸铵。检查 pH, 并且如果需要将其调节至 pH 7.4。加样至以 IEC 缓冲液 A 预先平衡的 IEC 柱上。以如下的方式应用一个梯度系统:

[0146] 加样: 以 0.25ml/min 注入样品的 IEC 缓冲液 A 溶液, 3CV 的洗涤液

[0147] 洗涤: 梯度系统: IEC 缓冲液 A :90%, AEX 缓冲液 B (20mM 磷酸盐缓冲液 +1M NaCl, pH 7.4) :10%, 5CV 的梯度液 &3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0148] IEC 缓冲液 A :68%, IEC 缓冲液 B :32%, 5CV 的梯度液 &3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0149] IEC 缓冲液 A :35%, IEC 缓冲液 B :65%, 5CV 的梯度液 &3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0150] IEC 缓冲液 A :0%, IEC 缓冲液 B :100%, 5CV 的梯度液 &3CV 的洗涤液, 流速: 0.25ml/min

[0151] 将含有纯化的轭合物的 IEC 部分合并, 将缓冲液改变为 PBS 缓冲液进行洗涤以除去盐。在除去盐后调节 pH 至 7.4。然后在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下浓缩该溶液, 通过 UV 光谱法 (280nm) 分析蛋白质浓度。轭合物经无菌过滤, 取所述样品用于测定活性, 并用于通过 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 的表征。如果需要, 则取出等分试样用于蛋白质测定及 CA 测定。剩余物在  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下保存至进一步使用, 并且通过 SE-HPLC 研究物理稳定性。

[0152] 多种方法影响胰岛素在溶液中的稳定性以及衍生化程度的效应已被研究。

[0153] 6.7 胰岛素制剂的 SE-HPLC

[0154] 在装配有 Jasco, AS-2057plus 冷却至  $4^\circ\text{C}$  的自动采样器, 以及 Jasco UV-975UV/VIS 探测器的液相色谱仪 (JASCO) 上进行 HPLC。通过 EZchrom Elite 软件在 IBM/PC 上记录数据。在 Superose 12 柱上, 用 0.1M 磷酸钠, pH 6.9 的等度洗脱流动相 (isocratic mobile phase) 分析 SEC 样品 (图 8)。图 8 仅显示了  $RT = 75.408$  位置的一个峰, 该峰由胰岛素产生。

[0155] 6.8 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 & 蛋白质印迹

[0156] 使用 18% 二甘氨酸甘氨酸凝胶 (triglycine gel) 进行 SDS-PAGE。使用还原性缓冲液或非还原性缓冲液稀释样品, 并将 5.0ug 蛋白质加样至每孔中。在甘油三酯 (triglycerine) 缓冲液体系中对凝胶进行电泳, 并用考马斯蓝 (Coomassie Blue) 进行染色 (图 5&7)。使用抗 PSA 抗体进行蛋白质印迹。图 4 显示了胰岛素制剂的 SDS-PAGE (位点特异性; N 末端)。

[0157] 6.9 27 和 13kDa CA0- 胰岛素的等电聚焦 (IEF) 凝胶

[0158] **Novex®** IEF 凝胶被用于确定胰岛素和 CA0- 胰岛素轭合物等电点的差异。以 0.5mg/ml 的浓度溶解样品。用 5ul Novex IEF 样品缓冲液 pH 3-10 (Novex IEF Sample Buffer pH 3-10) 稀释 5ul 样品, 然后将该蛋白质样品加样至凝胶。

[0159] 6.10 稳定性研究

[0160] 无菌胰岛素轭合物在 PBS 缓冲液中于  $4^\circ\text{C}$  下保存 6 周。每周进行所述样品的非变性 PAGE (Native-PAGE)。

[0161] 6.11 胰岛素制剂的体内效力

[0162] 使用 7-8 周龄的雌性 CD-1 小鼠研究了胰岛素制剂的体内效力,0.3IU 的蛋白质剂量 (相同活性) 皮下注射小鼠。将动物分成 7 组,每组 4 只,按照以下方式对每组的每只动物给予胰岛素制剂:胰岛素 (0.3IU/小鼠)、Lantus (Aventis) 胰岛素-PSA 轭合物 (14KDa)、PBS。从每只动物取一滴血液,并通过 ACCU-CHEK Active (Roche Diagnostics) 测量血糖。

[0163] 结果

[0164] CA 的活化及氧化程度的测定

[0165] 所使用的多聚唾液酸 (CA) 是一种  $\alpha$ -2,8-连接的 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 残基的线性均聚物。在室温下使用 20mM 高碘酸盐对多聚唾液酸进行氧化暴露 15min。通过凝胶渗透色谱分析高碘酸盐处理后内部  $\alpha$ -2,8 连接的 Neu5Ac 残基的完整性,将从所述氧化 (CAO) 材料获得的色谱与天然 CA 的色谱进行了比较。本发明人发现,氧化 CA 和天然 CA 呈现了几乎同样的洗脱谱,没有迹象表明所述连续氧化步骤会引起所述聚合物链的显著断裂。

[0166] 通过在碱性溶液中将氰化铁离子还原为亚铁氰化铁 (波斯蓝) [Park and Johnson, 1949],用葡萄糖作为标准定量测量了 CA 的氧化态。这表明,所述氧化多聚唾液酸被发现具有比化学计算量更多的还原剂 (> 100%),即 112 摩尔%的表观醛含量包含还原端半缩酮和引入醛 (在另一端) 的结合还原力。

[0167] 聚唾液酸化反应的优化

[0168] 使用 1mg 重组人胰岛素与 CAO 在不同温度以及反应物摩尔比和链长下优化聚唾液酸化条件。结果在图 5-12 中显示。在该反应过程中,4°C 明显是 CAO 和胰岛素稳定性的最适温度。然而,在更高温度下可获得更多轭合,7.5 : 1 的 CAO 与胰岛素的摩尔比更为有效。

[0169] 表 1 显示摩尔比对聚唾液酸化的效应

[0170]

|                       |                       |       |       |        |     |         |        |
|-----------------------|-----------------------|-------|-------|--------|-----|---------|--------|
| 孔编号                   | 1                     | 3     | 5     | 7      | 8   | 11      | 12     |
| 摩尔比                   | 1 : 1                 | 1 : 2 | 1 : 4 | Ma     | 胰岛素 | 1 : 7.5 | 1 : 10 |
| CAO MW                | 27 kDa CAO 与 100 CHO% |       |       |        |     |         |        |
| 胰岛素 (mg)              | 1                     | 1     | 1     | 1      |     | 1       |        |
| CAO (mg)              | 4.49                  | 8.98  | 17.96 | 33.675 |     | 44.9    |        |
| 终 NaCNBH <sub>3</sub> | 4 mg/ml               |       |       |        |     |         |        |
| 反应                    | 4                     |       |       |        |     |         |        |
| pH                    | 6                     |       |       |        |     |         |        |

[0171] 表 1

[0172] 在 PBS 对照的影响下,在图 9 中使用的轭合物中,21.5kd CAO-胰岛素对降低小鼠血糖具有最显著的效应。

[0173] 表 2 显示了不同链的 CAO-胰岛素轭合物的体内效力的 T-检验 (统计分析,成对检验)。

[0174]

| 时间 (分钟)       | 0.0 | 32.0 | 64.5 | 99.4 | 170.8 | 230.2 | 303.3 | 358.0 | 1354.9 |
|---------------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 13kDa CA0-胰岛素 |     | **   | ***  | ***  |       |       |       |       |        |
| 21kDa CA0-胰岛素 |     |      | ***  | ***  |       | *     |       |       |        |
| 27kDa CA0-胰岛素 |     | **   | ***  | **   |       | **    |       |       | **     |
| 32kDa CA0-胰岛素 |     | ***  | ***  | ***  |       |       |       |       | *      |
| 胰岛素           |     | ***  | ***  | ***  |       |       |       |       |        |

[0175] 表 2

[0176] 星号表示各组相对于 Tris 缓冲液差异的概率水平 : \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。

[0177]

|     | Lantus | 15KDa CA0-胰岛素 (Sigma) |
|-----|--------|-----------------------|
| 0   |        |                       |
| 30  | ***    | **                    |
| 60  | ***    | ***                   |
| 90  | **     | ***                   |
| 120 | *      | **                    |
| 150 |        | *                     |
| 210 |        |                       |
| 270 |        |                       |
| 330 |        |                       |

[0178] 表 3

[0179] 星号表示各组相对于 PBS 缓冲液差异的概率水平 : \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。

[0180] pH 对 15kDa CA0-胰岛素的体内效力还表明, pH 6.0 优于 7.4。因此在 pH 6.0 下进行了后面的实验。来自肽谱法和埃德曼降解的数据进一步证实, pH 6.0 的聚唾液酸化条

件的轭合物在胰岛素 B 链是被 N 末端特异性阻断的。

[0181] 胰岛素轭合物的制备、纯化和表征

[0182] 可成功轭合单分散 CAO- 胰岛素, 并通过规模化 HIC 和 IEC 纯化得到了高度纯化的轭合物。通过图 10 中表明的 IEC 和 HIC 联合装置与预备型 HPLC 设备, 改良了所述纯化效率。

[0183] 上文已经详述了这样的步骤, 即通过在降低的 pH (pH 6.0) 及  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  下进行反应, 以一种 N 末端选择性的方式制备并纯化多聚唾液酸 (CA) 轭合物。这涉及在存在氰基硼氢化钠的情况下进行轭合, 然后使用疏水相互作用色谱法 (HIC) 进行纯化以除去游离 CA (图 11), 然后通过离子交换色谱法 (IEC) 除去胰岛素 (图 12)。使用了较低 pH, 以有利于在胰岛素 B- 链的 N 末端 (PheB1) 选择性衍生化, 并且还为了在反应过程中使胰岛素的聚集最少化。最终的反应缓冲液的组成为 pH 6.0 的 10mM NaOAc 中 1mg/ml 胰岛素、8mg/ml NaCNBH3 和 5 倍摩尔数过量的 CAO。

[0184] 图 13 中的 13Kda 和 27Kda CAO- 胰岛素轭合物的等电聚焦 (IEF) 凝胶显示, 聚唾液酸化胰岛素的轭合物没有固定的等电点 (pI)。

[0185] 胰岛素-CA 轭合物的形成和稳定性被以下技术所证实: SE-HPLC (胰岛素-PSA 与胰岛素相比保留时间的变化; 以及两部分的共洗脱); 离子交换色谱 (轭合物在 IEC 柱上的结合), 以及聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE; 具有较高分子量种类的带的偏移)。

[0186] 用于体内效力 (在 CD-1 小鼠上, 平均 25g) 的胰岛素轭合物显示了比胰岛素更优的体内效力 (延长) 和钝性 (谱峰少)。所述轭合物降低血糖能力的延长与所述制剂中使用的聚合物的链长成比例, 如图 14 中所示。

[0187] 27KDa CAO- 胰岛素轭合物的稳定性研究表明, 在 40 天期间  $4^\circ\text{C}$  的保存过程中没有任何降解, 这是基于来自非变性-PAGE 的结果。

[0188] 对规模化制备及纯化的 14kDa- 胰岛素轭合物的表征

[0189] 在 700mg 胰岛素作为起始反应物的实例中, 使用规模化柱纯化得到了 230mg 14kDa CAO- 胰岛素 (蛋白质重量)。

[0190] 通过比较色谱, 图 15 中氨基酸量的变化显示了来自 N 末端的氨基酸。在 pH 7.4PBS 中 1mg/mL 的水性样品经水 100 倍稀释。取  $2\mu\text{L}$  的这种稀释溶液用于分析。结论是, 序列 G-I-V-E 可标识胰岛素的 A 链。无氨基酸 Phe/Val/Asn/Gln 表明胰岛素的 B 链是被 N 末端阻断的。

[0191] 在体外活性测定中发现 PSA 轭合物是有活性的。体内效力研究表明, PSA- 胰岛素轭合物大大优于胰岛素。

[0192] 参考文献

[0193] Geiger et al. (in D. Branderburg, and A. Wollmer (eds.), 1980, *Insulin: Chemistry, Structure, and Function of Insulin and Related Hormones*, Walter de Gruyter & Co., New York, P409-415,

[0194] Ehrat M., Luisi P. L., 1983, *Synthesis and spectroscopic characterization of insulin derivatives containing one or two poly(ethylene oxide) chains at specific positions*, *Biopolymers*, 22 :P 569-573,

[0195] Caliceti P, (1999) *Improvement of the physicochemical and*

biopharmaceutical properties of insulin by poly(ethyleneglycol) conjugation, STP Pharma Sciences 9 :P 107-113

[0196] Uchio, T., Baudys, M., Liu, F., Song, S. C., Kim, S. W., (1999) Site-specific insulin conjugates with enhanced stability and extended action profile., Advanced Drug Delivery Reviews, 35, P289-306

[0197] Hinds K., Koh J. J., Joss L., Liu F., Baudys M. Kim, S. W., (2000). " Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Insulin Conjugates, " Bioconjugate Chem., 11, 195-201

[0198] Hinds K. D.; Kim S. W. (2002), Advanced Drug Delivery Reviews, 54 :505-530,

[0199] Fernandes, A. I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, Biochimica et Biophysica Acta, 1293 (1996) 92-96

[0200] Fernandes, A. I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase : preparation, activity and pharmacokinetics, Biochimica et Biophysica Acta, 1341 (1997) 26-34.

[0201] Jain, S. et al Polysialylated insulin : synthesis, characterization and biological activity in vivo, Biochimica et Biophysica Acta, 1662 (2003) 42-49 ;

[0202] Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lifely, R., Polysialic acids : potential in drug delivery, FEBS Letters, 315 (1993) 271-276.

[0203] Park, J. T., Johnson, M. J., A submicrodetermination of glucose, Journal of Biological Chemistry, 181 (1949) 149-151.

[0204] Shriner, R. L., Fuson, R. D. C., Curtin, D. Y., Morill, T. C., The Systematic Identification of Organic Compounds, 6th ed., Wiley, New York, 1980.

[0205] Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acid II : A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, Biochimica et Biophysica Acta, 24 (1957) 604-611.

[0206] Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, 185 (1999) 129-188.

## 序列表

<110> 利普生技术有限公司

<120>N 末端聚唾液酸化

<130>HMJ04374W0

<150>EP06117830.7

<151>2007-07-25

<160>1

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>110

<212>PRT

<213> 人 (homo sapiens)

<400>1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Leu | Trp | Met | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Leu | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Trp | Gly | Pro | Asp | Pro | Ala | Ala | Ala | Phe | Val | Asn | Gln | His | Leu | Cys | Gly |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Ser | His | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val | Cys | Gly | Glu | Arg | Gly | Phe |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| Phe | Tyr | Thr | Pro | Lys | Thr | Arg | Arg | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gln | Val | Gly |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| Gln | Val | Glu | Leu | Gly | Gly | Gly | Pro | Gly | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu |
| 65  |     |     |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |
| Ala | Leu | Glu | Gly | Ser | Leu | Gln | Lys | Arg | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Ile | Cys | Ser | Leu | Tyr | Gln | Leu | Glu | Asn | Tyr | Cys | Asn |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |

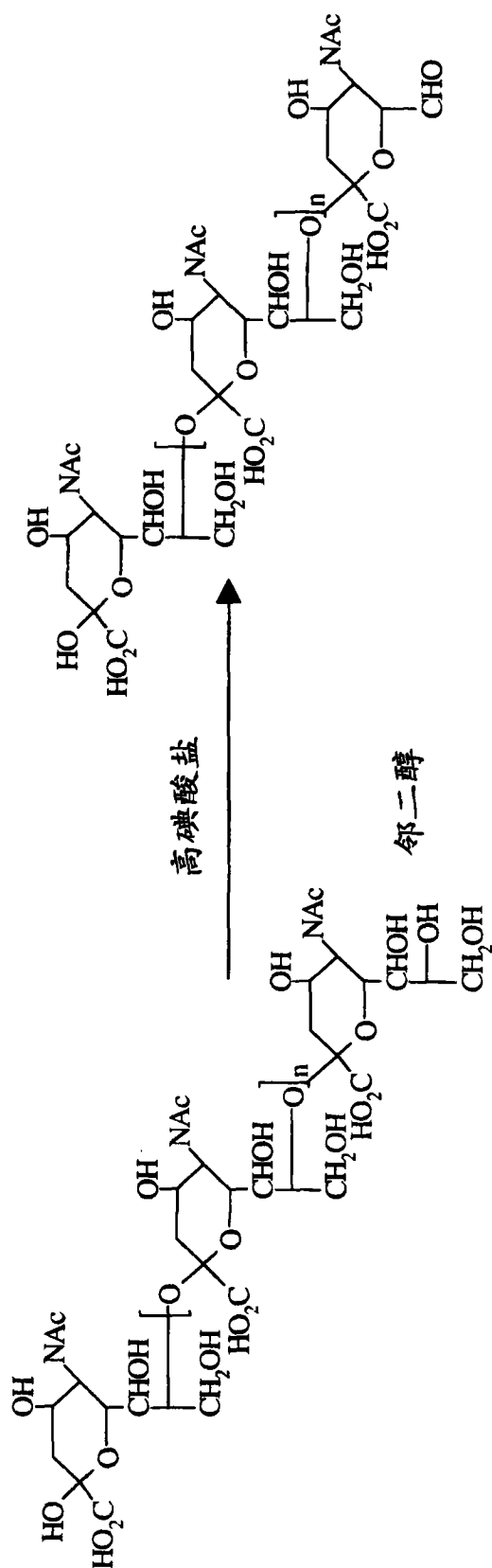


图 1

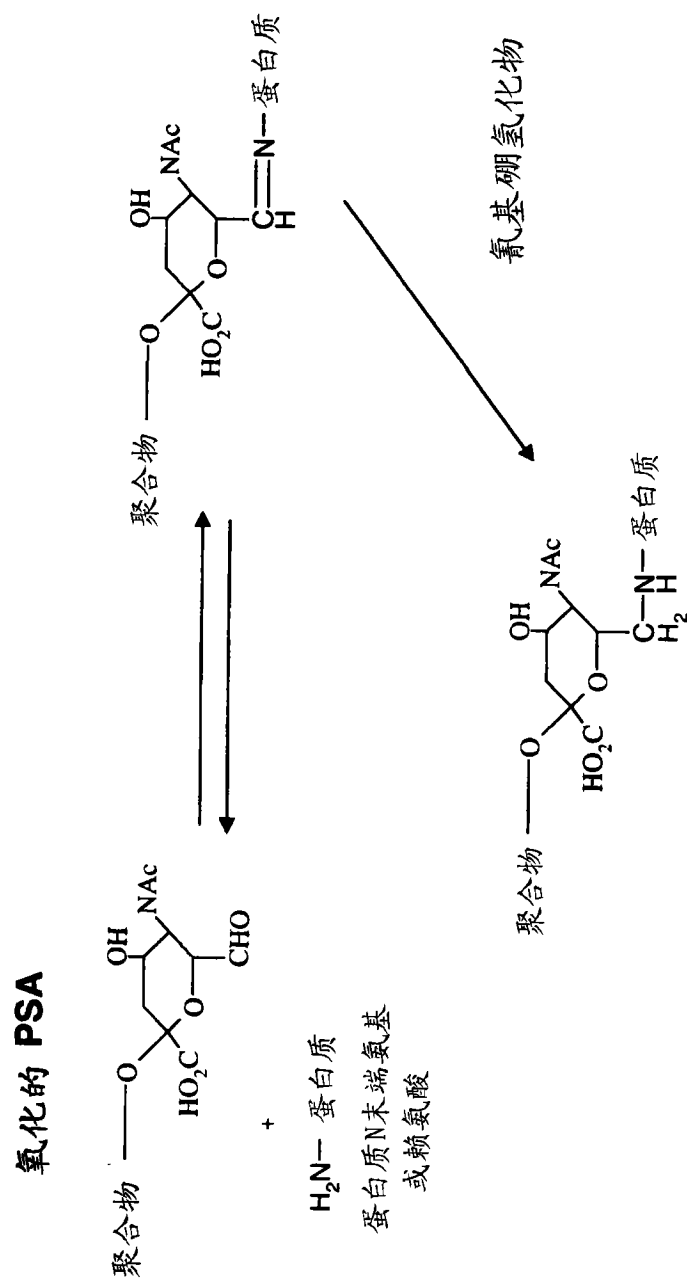


图 2

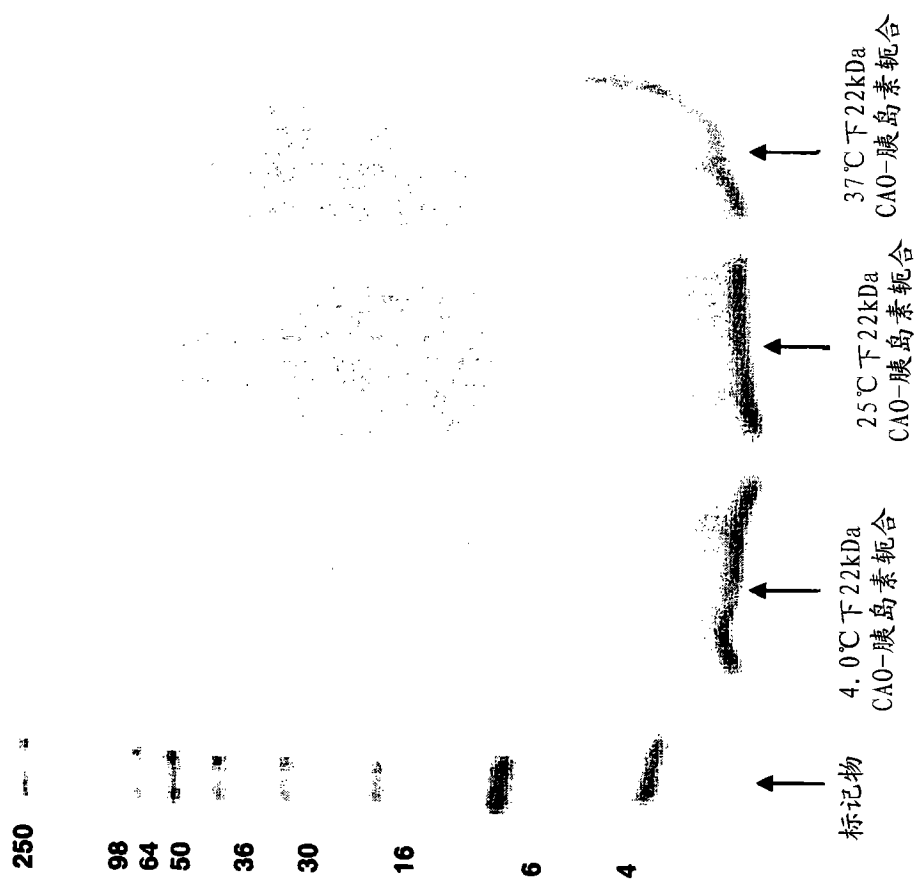


图 3

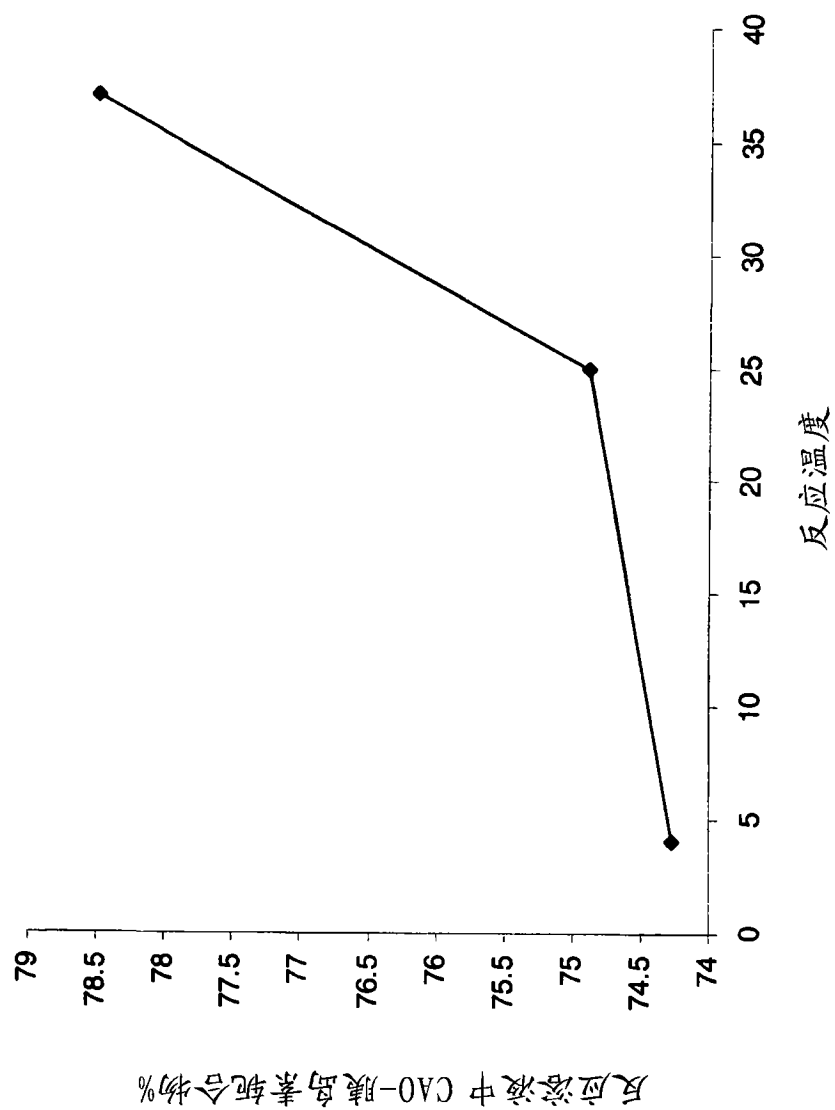


图 4



图 5

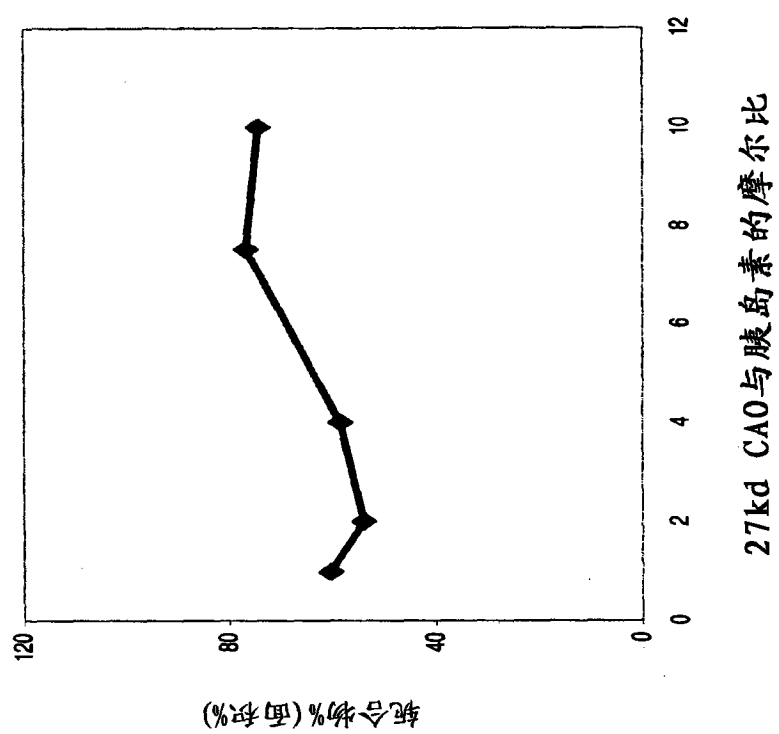


图 6

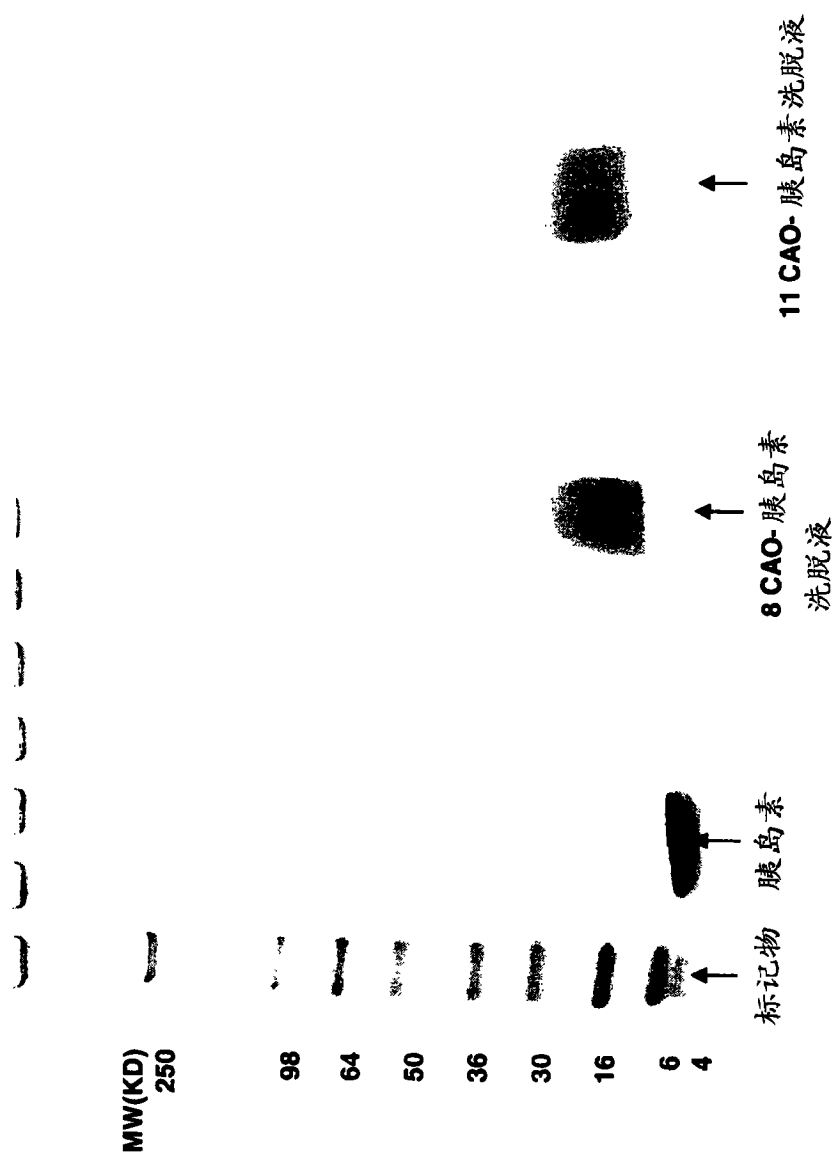


图 7

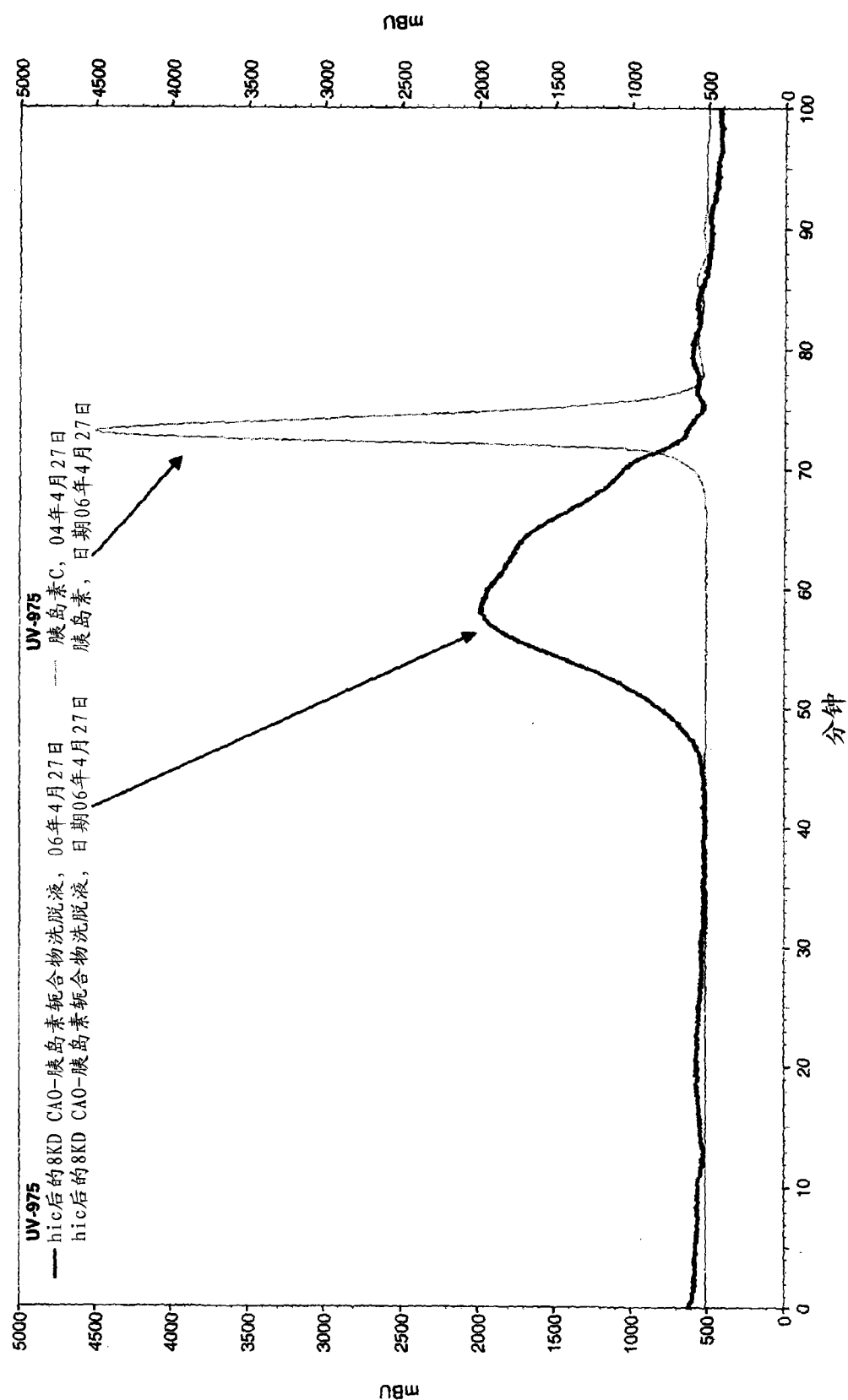


图 8

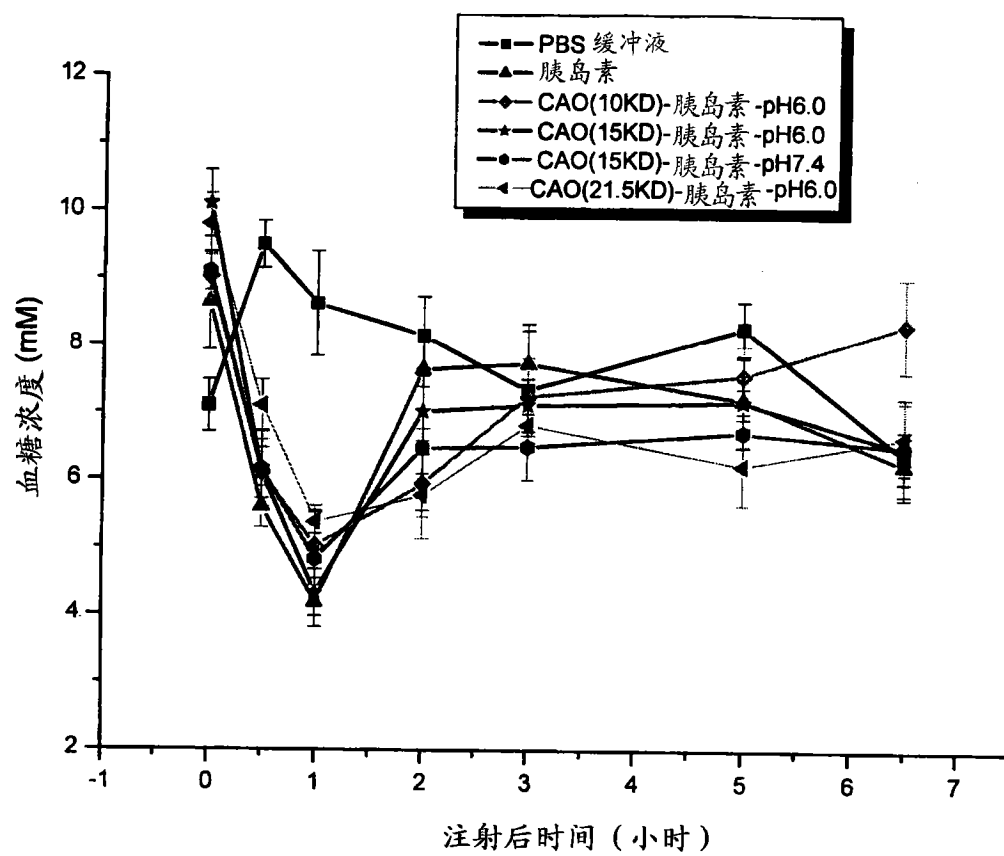


图 9

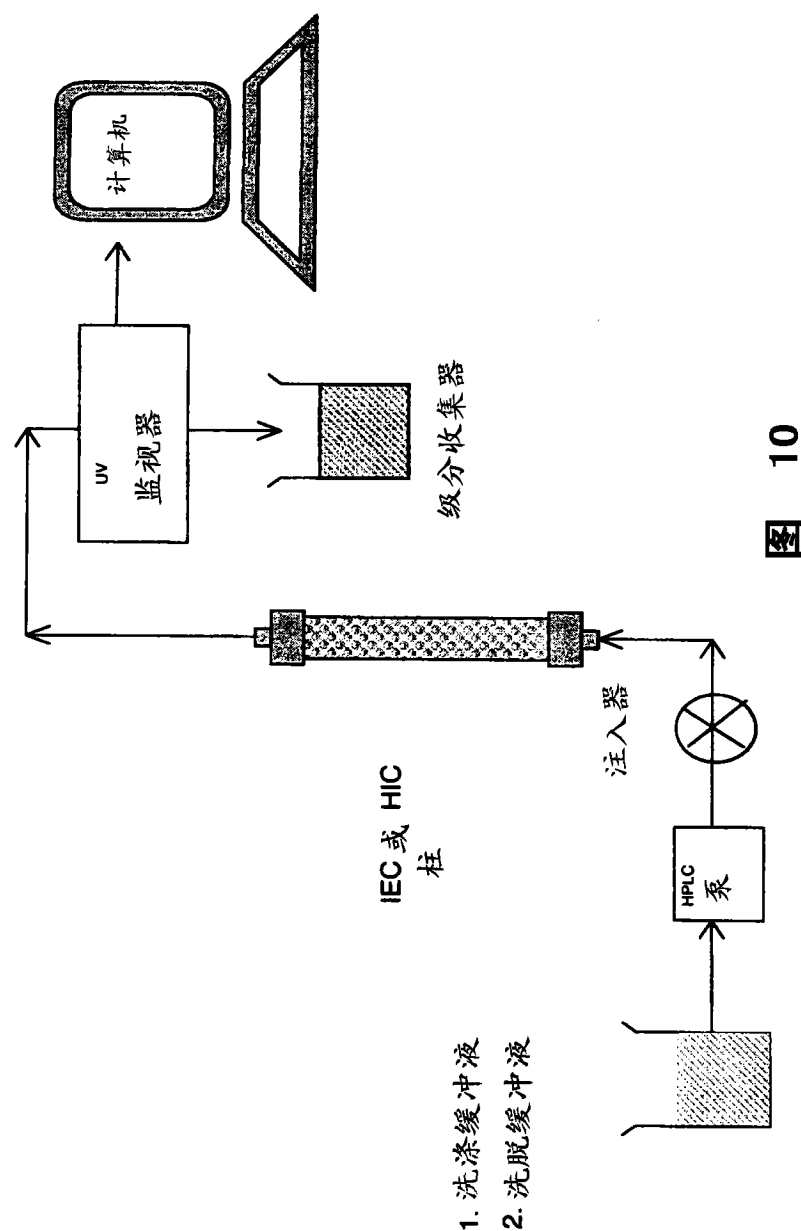


图 10

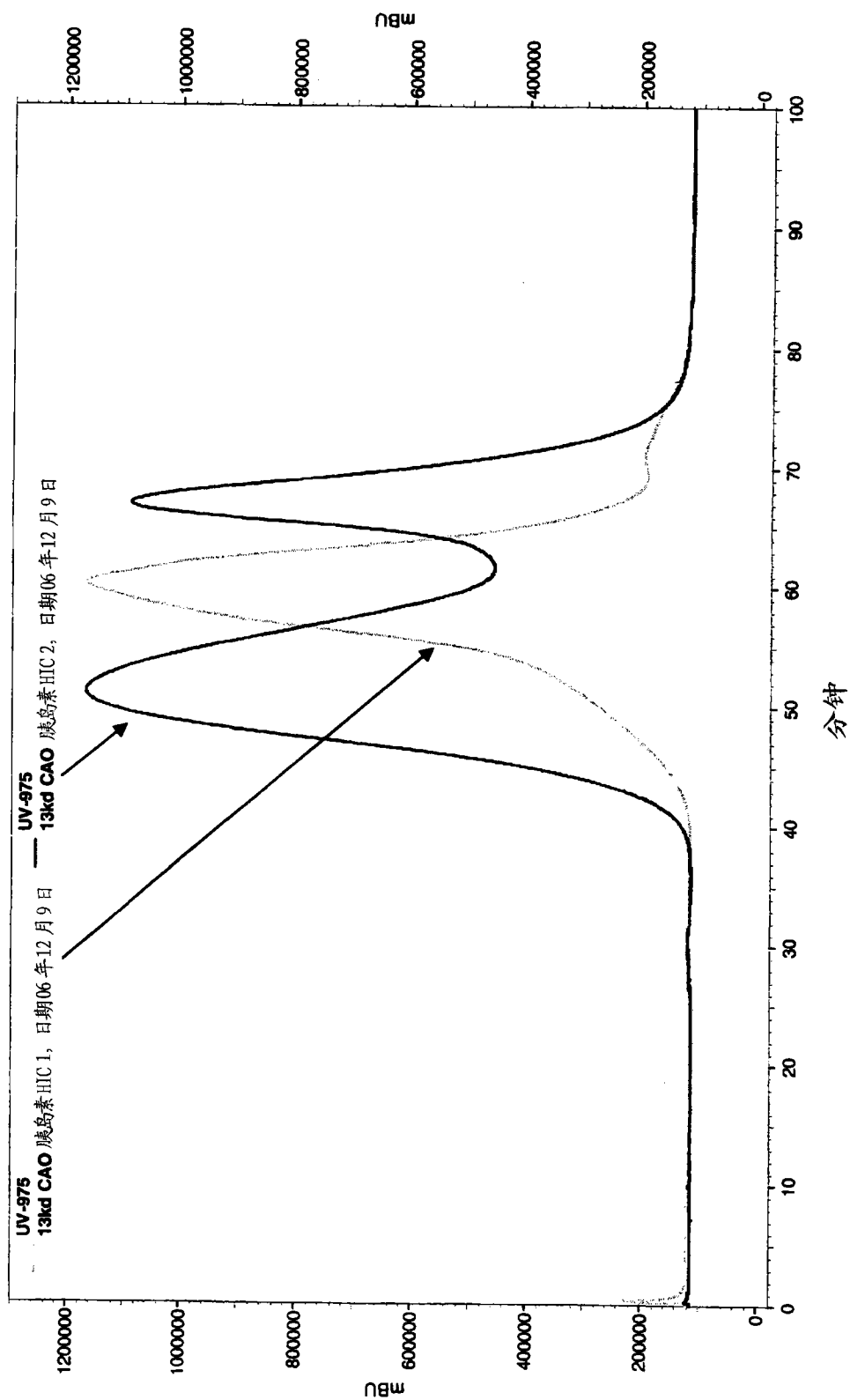


图 11

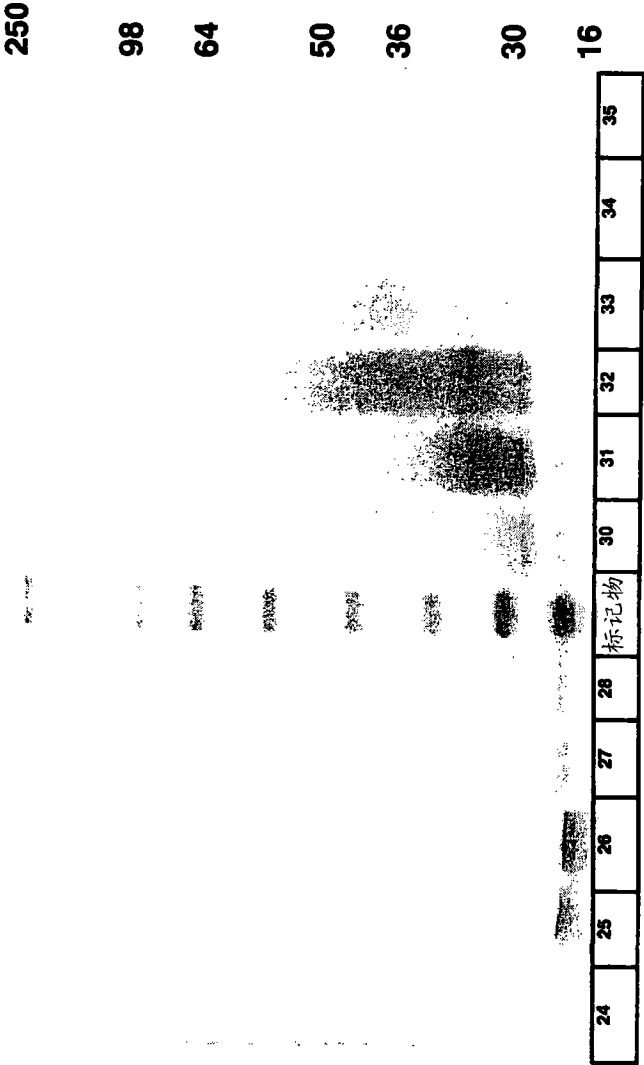


图 12

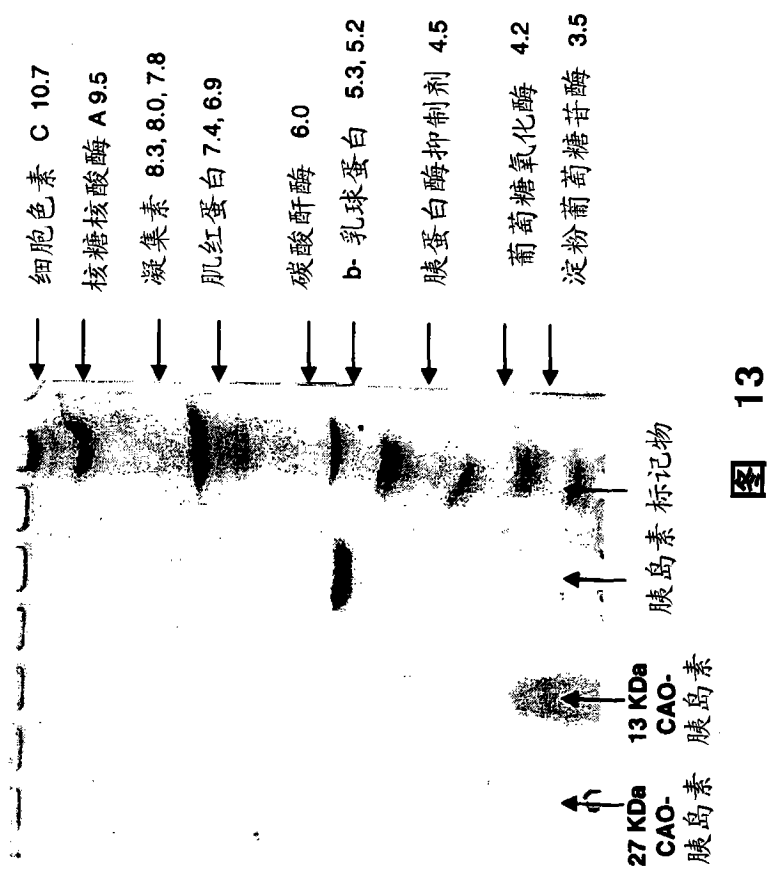


图 13

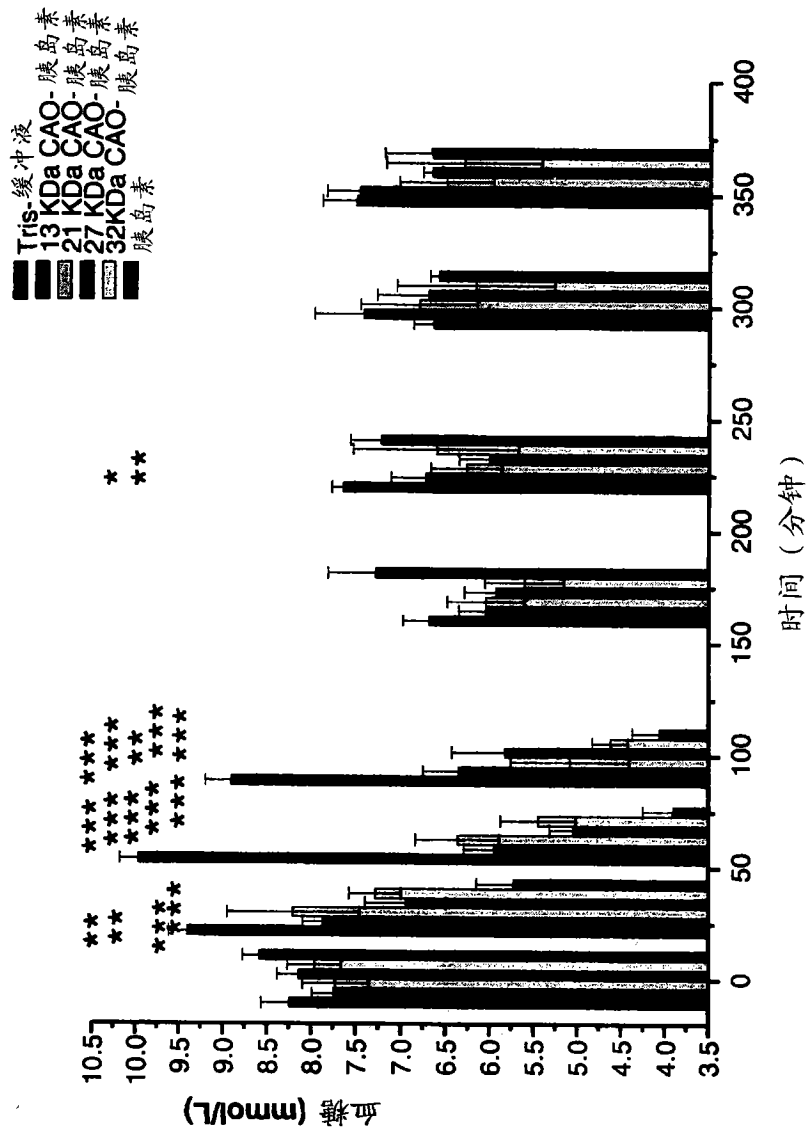


图 14

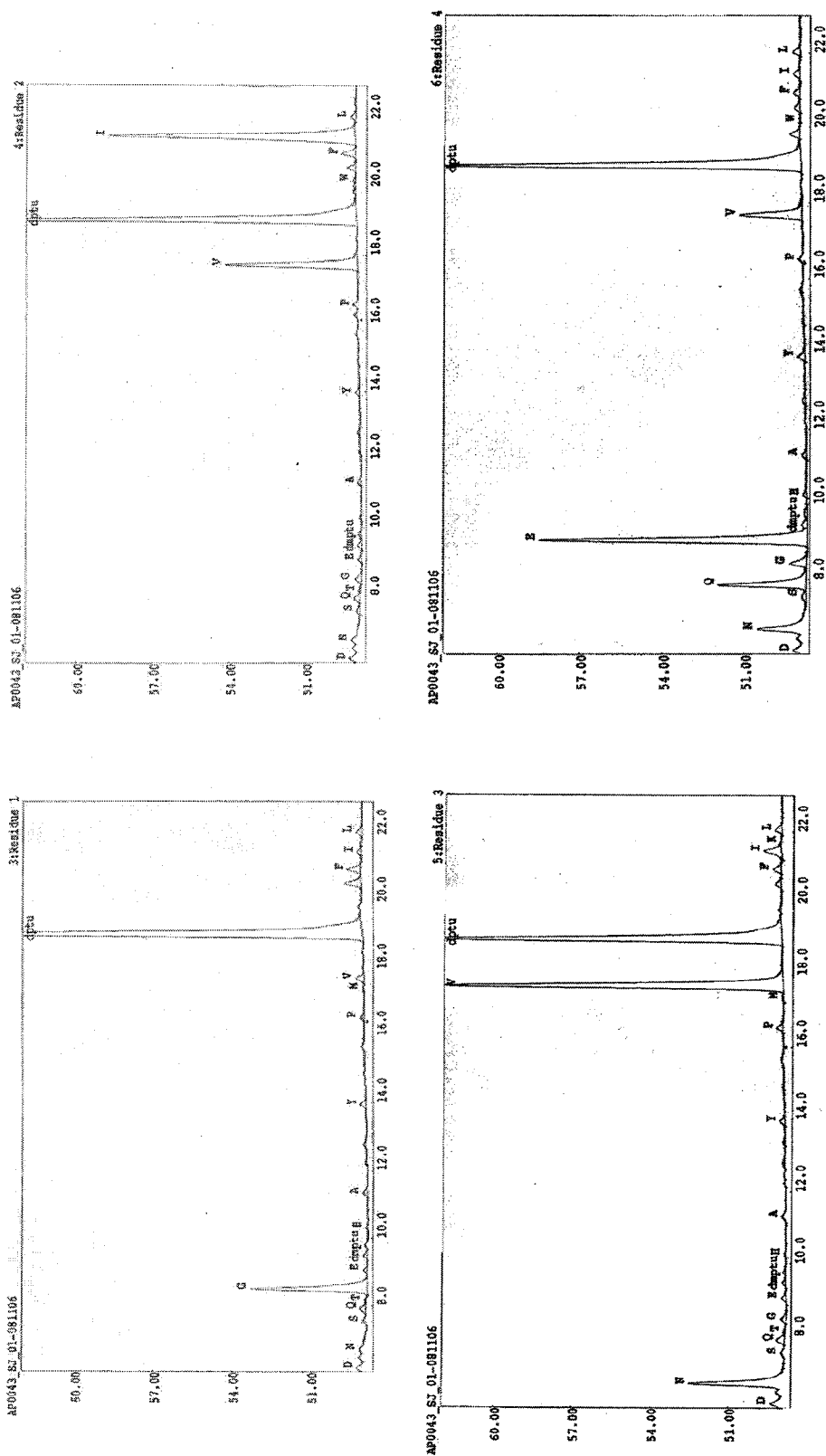


图 15