

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410003602.9

[51] Int. Cl.

*C07K 17/02 (2006.01)*

*C08G 65/00 (2006.01)*

*A61K 38/22 (2006.01)*

*A61P 13/12 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1283664C

[22] 申请日 2000.6.29

[21] 申请号 200410003602.9

分案原申请号 00107889.5

[30] 优先权

[32] 1999.7.2 [33] US [31] 60/142, 254

[32] 1999.8.23 [33] US [31] 60/150, 225

[32] 1999.8.31 [33] US [31] 60/151, 548

[32] 1999.11.17 [33] US [31] 60/166, 151

[71] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 帕斯卡尔·塞巴斯蒂安·拜隆

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公  
司

代理人 王旭

权利要求书 1 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

促红血球生成素偶联物

[57] 摘要

本发明提供了一种促红血球生成素与聚(乙二醇)的偶联物, 它含有一种具有至少一个自由氨基基团并具有使骨髓细胞提高网状细胞和血红细胞产生的体内生物学活性的促红血球生成素糖蛋白, 该促红血球生成素糖蛋白选自人类促红血球生成素及其类似物, 该人类促红血球生成素类似物具有人类促红血球生成素的序列, 该序列通过加入 1 至 6 个糖基化位点或至少一个糖基化位点的重排而被修饰; 所说的糖蛋白与“n”个式  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  的聚(乙二醇)基团共价相连。

1. 一种含有偶联物的组合物, 所说的偶联物中的每一个含有一种具有至少一个自由氨基基团并具有使骨髓细胞提高网状细胞和血红细胞产生的体内生物学活性的促红血球生成素糖蛋白, 该促红血球生成素糖蛋白选自人类促红血球生成素及其类似物, 该人类促红血球生成素类似物具有通过加入1至6个糖基化位点或至少一个糖基化位点的重排而被修饰的人类促红血球生成素的序列; 所说的糖蛋白与“n”个式
- 5 -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OR的聚(乙二醇)基团共价相连, 其中每个聚(乙二醇)基团的-CO与所说的氨基之一形成酰胺键; 其中R是低级烷基; x是2或者3; m是从450至900; n是1至3; 并且n和m的选择应使该偶联物的分子量减去促红血球生成素糖蛋白的分子量是从20千道尔顿至100千道尔顿; 其中n是1的偶联物的百分比是至少90%。
- 10 2. 按照权利要求1所述的组合物, 其中, n是1的偶联物的百分比是至少92%。
3. 按照权利要求1的组合物, 其中, n是1的偶联物的百分比是至少96%。
4. 按照权利要求1的组合物, 其中, n是1的偶联物的百分比是从90%至96%。
- 20 5. 一种药物组合物, 含有权利要求1至4中任意一项所述的组合物和一种药学上可接受的赋形剂。
6. 权利要求1至4中任意一项所述的组合物在制备用于治疗或预防在慢性肾衰竭病人、AIDS中的贫血相关的疾病或用于治疗进行化疗的癌症病人的药物中的应用。
- 25 7. 用于治疗与慢性肾衰竭病人、AIDS和进行化疗的癌症患者的贫血相关的疾病的权利要求1至4中任意一项所述的组合物。

## 促红血球生成素偶联物

## 5 技术领域

本发明涉及促红血球生成素偶联物。

## 背景技术

红血球生成(Erythropoiesis)是指血红细胞的生成,以补偿细胞的损失。红血球生成是一种受控的生理机制,它提供足够的血红细胞用于组织供氧。天然状态下存在的人类促红血球生成素(hEPO)是由肾脏产生的,是一种刺激血红细胞生成的体液因子(Carnot, P和Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood(血液) 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, Wand Plzak, LF (1957) Nature(自然) 179: 633 1-4)。天然存在的EPO刺激骨髓中的定向类红细胞祖先的分裂和分化,并通过与类红细胞前体上的受体结合发挥其生物学活性(Krantz, BS (1991) Blood 77: 419)。

利用重组DNA技术通过生物合成已生产出了促红血球生成素(Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J 等 (1986) Immunobiol. 72: 2 13-224),它是插入在中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)并在其中表达的克隆的人类EPO基因的产物。主要的、完全加工形式的hEPO的一级结构示于SEQ ID NO:1。在Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup>和Cys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>之间有两个二硫键。没有糖基的EPO多肽链的分子量为18,236 Da。在完整的EPO分子中,约40%的分子量是由该蛋白质上在糖基化位点使该蛋白质糖基化的碳水化合物基团带来的(Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A和Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059)。

因为人类促红血球生成素在血红细胞生成中是必须的,这种激素可用于治疗其特征为血细胞生成低或缺陷型的血液疾病。在临床上,EPO被用于治疗慢性肾衰竭(CRF)病人的贫血(Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR 等 (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK 等 (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D 等 (1989) Ann. Intern. Med. 110:108-114),以及治疗化学治

疗中的AIDS和癌症病人的贫血(Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: p. 30 1-324)。但是, 由于其短的血浆半衰期和对蛋白酶降解的敏感性, 通过商业途径获得到蛋白质治疗剂, 例如EPO, 的生物利用率是有限的。这些缺点限制了它们临床利用的潜力。

### 发明内容

本发明提供了一种促红血球生成素偶联物, 所说的偶联物含有一种具有至少一个自由氨基基团并具有使骨髓细胞提高网状细胞和血红细胞产生的体内生物学活性的促红血球生成素糖蛋白, 该促红血球生成素糖蛋白选自人类促红血球生成素及其类似物, 该人类促红血球生成素类似物具有人类促红血球生成素的序列, 该序列通过加入1至6个糖基化位点或至少一个糖基化位点的重排而被修饰; 所说的糖蛋白与“n”个式- $\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ 的聚(乙二醇)基团共价相连, 其中每个聚(乙二醇)基团的-CO (即羰基)与所说的氨基之一形成酰胺键; 其中R是低级烷基; x是2或者3; m是约450至约900; n是1至3; 并且n和m的选择应使该偶联物的分子量减去促红血球生成素糖蛋白是从20千道尔顿至100千道尔顿。本发明还提供了含有本文所述的偶联物的组合物, 其中, 该组合物中其中n是1的偶联物的百分比至少是百分之九十。

与没有修饰的EPO(即没有PEG相连的EPO)和常规的PEG-EPO偶联物相比, 本发明的偶联物在循环系统中的半衰期和在血浆中的存留时间延长, 并且在体内的临床活性提高。本发明的偶联物与EPO具有相同的用途。特别是, 本发明的偶联物与EPO治疗患者的方式相同通过刺激骨髓中定向类红细胞祖先的分裂和分化可用于治疗患者。

本发明提供了一种偶联物, 所说的偶联物含有一种具有至少一个自由氨基基团并具有使骨髓细胞提高网状细胞和血红细胞产生的体内生物学活性的促红血球生成素糖蛋白, 该促红血球生成素糖蛋白选自人类促红血球生成素及其类似物, 该人类促红血球生成素类似物具有人类促红血球生成素的序列, 该序列通过加入1至6个糖基化位点或至少一个糖基化位点的重排而被修饰; 所说的糖蛋白与“n”个式- $\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ 的聚(乙二醇)基团共价相连, 其中每个聚(乙二醇)基团的

-CO (即羧基)与所说的氨基之一形成酰胺键; 其中R是低级烷基; x是2或者3; m是约450至约900; n是1至3; 并且n和m的选择应使该偶联物的分子量减去促红血球生成素糖蛋白是从20千道尔顿至100千道尔顿。

已发现, 本发明的偶联物可以与非修饰的EPO相同的方式使用。但是, 本发明的偶联物在循环系统中的半衰期和在血浆中的存留时间延长, 清除率降低, 并且在体内的临床活性提高。由于这些性能得到改善, 本发明的偶联物可每周施用一次, 而不是像非修饰的EPO那样每周施用三次。施用频度的降低使患者更易于配合, 改善治疗效果, 以及改善患者的生活质量。与常规的与聚(乙二醇)相连的EPO的偶联物相比, 发现具有本发明的偶联物的分子量和连接结构的偶联物具有改善的效力, 稳定性, AUC, 循环半衰期, 并且成本下降。

本发明的偶联物可以与EPO相同的施用方式以治疗有效的量施用给患者。治疗有效量是用于在体内造成骨髓提高网状细胞和血红细胞产生所需要的偶联物的量。确切的偶联物的量依据待治疗的疾病的确切类型, 待治疗病人的状态, 以及该组合物中的其它成分对该因子所需的优选的量。例如可以施用, 例如每周一次, 每公斤体重0.01至10微克, 优选0.1至1微克。

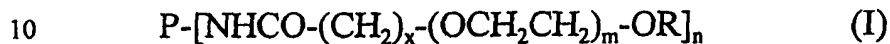
含有该偶联物的药物组合物可被配制成为通过多种方式使用的有效剂型, 从而施用给患有血红细胞产生过低或缺乏的血液疾病患者。该偶联物的平均治疗有效量可发生变化, 具体地说应基于医生的建议。

按照本发明制备的促红血球生成素糖蛋白可按照现有技术已知的方法使用药学上可接受的载体制备成适用于注射的药物组合物。例如, 适当的组合物描述于WO97/09996, WO97/40850, WO98/58660, 和WO99/07401。用于配制本发明的产品的药学上可接受的载体包括人血清白蛋白, 人血浆蛋白等。本发明的化合物可被配制在pH 7的含有一种渗透调节剂, 例如132 mM氯化钠, 的10 mM磷酸钠/钾缓冲液中。该药物组合物可任选地含有一种防腐剂。该药物组合物可含有不同量的促红血球生成素, 例如10-1000微克/ml, 例如50微克或400微克。

术语“促红血球生成素”或者“EPO”是指一种糖蛋白, 它具有(SEQ ID NO: 1)或者(SEQ ID NO: 2)所示的氨基酸序列或者或者与其基本上同

源的氨基酸序列，其生物学性能与刺激血红细胞产生和刺激骨髓中定向类红细胞祖先的分裂和分化相关。本文中适用的这一术语包括这样一种人为修饰的蛋白质，例如通过定点诱变或通过偶然的突变。这些术语也包括具有1至6个额外的糖基化位点的类似物，在该糖蛋白的羧基端具有至少一个额外的氨基酸的类似物，其中，该额外的氨基酸包括至少一个糖基化位点，以及包括至少一个糖基化位点重排的氨基酸序列的类似物。这些术语包括天然和重组产生的人类促红血球生成素。

本发明的促红血球生成素偶联物可由式I表示：



其中x, m, n和R与上述定义相同。在式I中，P是本文描述的促红血球生成素糖蛋白的残基，(即没有与示于式I中的羰基形成酰胺键的氨基基团)，它具有造成骨髓细胞提高网状细胞和血红细胞产生的体内生物学活性。

15 在本发明的优选的实施方案中，R是甲基。优选m是约650至约750，和n优选是1。

在本发明的最优选的实施方案中，R是甲基，m是约650至约750，和n是1，即上述的偶联物具有下式：



其中m是650至750，n是1和P与上述定义相同。优选m的平均值为约680。

25 优选上述定义的偶联物的糖蛋白是人类促红血球生成素。上述的人类促红血球生成素及其类似物可通过内源基因的激活作用来表达。优选人类促红血球生成素糖蛋白SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的那些，最优选SEQ ID NO:1的那些。

而且，P可以选自促红血球生成素的残基和它的具有1至6个额外的糖基化位点的类似物。如下文所述，EPO的制备和纯化在现有技术中是已知的。EPO是指天然的或重组的蛋白质，优选人类的蛋白质，它可从任意一种常规的来源得到，例如组织，蛋白质合成，用天然的或重组的

细胞进行的细胞培养。任何一种具有EPO活性的蛋白质，例如突变蛋白或以其它的方式修饰的蛋白质均包括在本发明的范围内。重组的EPO可通过在CHO-, BHK-或者HeLa细胞系中，通过重组DNA技术或通过内源基因的激活进行表达来制备。通过内源基因的激活对蛋白质，包括EPO，  
5 的表达是现有技术中已知的技术，它们公开于，例如U.S. Patents Nos. 5,733,761, 5,641,670, 和5,733,746, 和国际专利申请Nos. WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667和WO 91/09955, 其内容引入本文作为参考。用于制备促红血球生成素糖蛋白产品的优选的EPO为人类的EPO。优选该EPO为具有SEQ ID NO:1或者SEQ ID  
10 NO:2, 更优选具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的人类EPO。

在一个实施方案中，P可以是具有1至6个额外的糖基化位点的糖蛋白类似物的残基。用一个或多个寡糖基团对蛋白质的糖基化发生在多肽骨架上的特定的位点，并极大地影响该蛋白质的物理性质，例如蛋白质的稳定性，分泌性，亚细胞定位和生物活性。糖基化通常为两种类型。  
15 O-连接的寡糖连接在丝氨酸或者苏氨酸残基上，N-连接的寡糖连接在天冬酰胺残基上。存在于N-连接的和O-连接的寡糖的一种类型的寡糖是N-乙酰神经氨酸(唾液酸)，它是一个含有9个或更多个碳原子的氨基糖的家族。唾液酸通常是N-连接的和O-连接的寡糖的末端残基，并且，由于它携带负电荷，从而赋予糖蛋白酸性。人类促红血球生成素具有165个氨  
20 基酸，含有三个N-连接的和有一个O-连接的寡糖链，该寡糖链占约40%的糖蛋白的总分子量。N-连接的糖基化发生在位于位点24, 38,和83 的天冬酰胺残基上，O-连接的糖基化发生在位于位点126的丝氨酸残基上。该寡糖链被末端唾液酸残基修饰。从糖基化的促红血球生成素酶切除所有的唾液酸残基导致体内活性的丧失，但不造成体外活性的丧失，因为促  
25 红血球生成素的唾液酸化防止了它被肝结合蛋白质的结合，以及随后的清除。

本发明的糖蛋白包括人类促红血球生成素的类似物，它在人类促红血球生成素的氨基酸序列中具有一个或多个变化，从而导致唾液酸连接位点的数目提高。这些糖蛋白类似物可通过定点诱变产生，例如氨基酸  
30 残基的增加，缺失，或替换，从而提高或改变可进行糖基化的位点的。

具有高于人类促红血球生成素的唾液酸水平的糖蛋白类似物是通过增加糖基化位点产生的，而不影响该蛋白质生物活性所需的二级或三级结构。本发明的糖蛋白也包括在糖基化位点具有提高的水平的碳水化合物连接的类似物，这通常涉及在临近N-连接的或者O-连接的位点一个或多个氨基酸的替换。本发明的糖蛋白也包括从促红血球生成素的所基末端具有一个或多个氨基酸延伸并提供至少一个额外的碳水化位点的类似物。本发明的糖蛋白也包括具有一种包括至少一个糖基化位点重排的氨基酸序列的类似物。这种糖基化位点的重排涉及在人类促红血球生成素中一个或多个糖基化位点的缺失，以及一个或多个非天然存在的糖基化位点的增加。增加促红血球生成素上碳水化合物链的数目，并因而增加每个促红血球生成素分子中唾液酸的数目可带来几个优点，例如稳定性提高，对蛋白酶裂解的抗性提高，免疫原性降低，血清半衰期延长，和生物活性提高。具有额外的糖基化位点的促红血球生成素类似物公开于Elliot的欧洲专利申请640 619，公开日1995年3月1日。

在优选的实施方案中，本发明的糖蛋白含有一种氨基酸序列，它包括至少一个额外的糖基化位点，例如，但不限于，含有通过选自下组的修饰而被修饰的人类促红血球生成素的序列的促红血球生成素：

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;  
Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;  
Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;  
Asn<sup>69</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;



Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
 Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
 Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
 5 Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
 Thr<sup>125</sup>; 和  
 Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>。

在本文中使用的用于表示氨基酸序列修饰的符号是指由上标数字表示的相应的没有修饰的蛋白质(例如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2的hEPO)的位点被改变为紧接在各个上标数字之前的氨基酸。

该糖蛋白也可以是在该糖蛋白的羧基末端具有至少一个额外的氨基酸的类似物, 其中, 该额外的氨基酸包括至少一个糖基化位点, 即上述的偶联物也指这样一种化合物, 其中该糖蛋白具有一种序列, 该序列含
 15 有人类促红血球生成素的序列和在人类促红血球生成素序列的羧基末端的第二序列, 其中, 该第二序列含有至少一个糖基化位点。该额外的氨基酸可含有一种衍生于人绒毛膜促性腺激素的羧基末端的肽片段。优选该糖蛋白是一种选自下组的类似物: (a) 具有氨基酸序列, Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
 20 Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO:3) 的人类促红血球生成素, 从羧基端延伸; (b) 还含有Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPO的(a)中的类似物; 和(c)还含有Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPO的(a)中的类似物。

该糖蛋白也可以是具有这样一种氨基酸序列的类似物, 该氨基酸序列包括至少一个糖基化位点的重排。这种重排可以含有人类促红血球生成素中N-连接的碳水化位点中的任意一个的缺失, 和在人类促红血球生成素的氨基酸序列的第88位增加一个N-连接的碳水化位点。优选该促红
 25 血球生成素是一种选自下组的类似物: Gln<sup>24</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPO; Gln<sup>38</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPO;和Gln<sup>83</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>EPO。

本文中所使用的“低级烷基”是指具有1至6个碳原子的直链或支链
 30 的烷基基团。低级烷基基团的例子包括甲基, 乙基和异丙基。按照本发

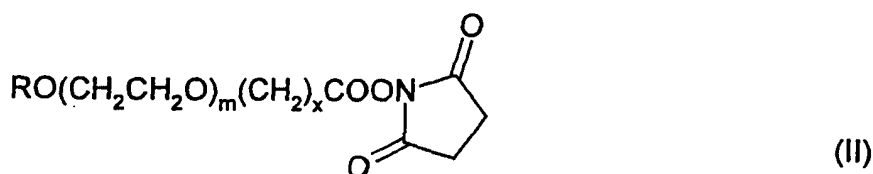
明, R是任意一种低级烷基。优选其中R是甲基的偶联物。

符号“m”表示在聚(氧化乙烯)基团(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)中氧化乙烯残基的数目。氧化乙烯的一个单一的PEG亚基具有约44道尔顿的分子量。因而, 该偶联物的分子量(不包括EPO的分子量)依赖于“m”的数量。在本发明的偶联物中, “m”是从约450至约900(相应于约20 kDa至约40 kDa的分子量), 优选从约650至约750(相应于约30 kDa的分子量)。数字m的选择应使得到的本发明的偶联物具有与非修饰的EPO相当的生理活性, 该活性可以代表与相应的非修饰的EPO的活性相同的、更高的活性, 或者是该活性的一部分。分子量为“约”某一数值是指该分子量是在通过常规分析技术确定的这一数量的一个合理的范围内。“m”的选择应使与促红血球生成素糖蛋白共价相连的每个聚(乙二醇)基团的分子量是从约20 kDa至约40 kDa, 优选约30 kDa。

在本发明的偶联物中, 数字“n”是与促红血球生成素的自由氨基(包括赖氨酸的ε-氨基和/或氨基端氨基基团)通过酰胺键共价相连的聚乙二醇基团的数目。本发明的偶联物每分子的EPO具有一个, 两个, 或三个PEG基团。“n”是从1至3的整数, 优选“n”是1或2, 最优选“n”是1。

式I的化合物可通过式II的化合物与促红血球生成素糖蛋白缩合从已知的聚合物材料制备:

20



其中, R和m如上文所述。其中x是3的式II的化合物是聚(乙二醇)的α-低级烷氧基, 丁酸琥珀酸亚胺基酯(低级烷氧基-PEG-SBA)。其中x是2的式II的化合物是聚(乙二醇)的α-低级烷氧基, 丙酸琥珀酸亚胺基酯(低级烷氧基-PEG-SPA)。可使用任何一种常规的将活化的酯与一种胺反应形成一种酰胺的方法。在上述的反应中, 所列举的琥珀酸亚胺基酯是一种造成酰胺形成的离去基团。使用例如式II的化合物的琥珀酸亚胺基酯

来生产与蛋白质的偶联物的方法公开于U.S. Patent No. 5,672,662, 1997年9月30日授权(Harris, 等)。

人类EPO含有9个自由氨基基团, 氨基端氨基基团加上8个赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基基团。当PEG化试剂(pegylation reagent)与式II的SBA化合物结合时, 发现在pH 7.5, 蛋白质:PEG比率为1:3, 和反应温度为20-25°C时, 产生单-, 二-, 和痕量的三-PEG化的产物的混合物。当PEG化试剂是式II的SPA化合物时, 在除了蛋白质:PEG比率为1:2外相似条件下, 主要产生了单-PEG化的产物。PEG化的EPO可以混合物的形式施用, 或者以阳离子交换层析分离的不同的PEG化的产物的形式使用。通过操纵反应条件(即, 反应试剂的比率, pH, 温度, 蛋白质浓度, 反应时间等), 不同的PEG化的(pegylated)的产物可以变化。

人类促红血球生成素 (EPO)是一种刺激红细胞生成的人类糖蛋白。其制备和治疗应用描述于例如U.S. Patent Nos. 5,547,933和5,621,080, EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539和EP-B 0411 678以及Lai, P.H. 等, J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, an Sasaki, H. 等, J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076。用于治疗应用的促红血球生成素可通过重组方式生产(EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539和Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. 等 (1986) Immunobiol. 72: 2 13-224)。

在无血清培养基中表达和制备促红血球生成素的方法描述于, 例如, WO 96/35718, Burg, 公开于1996年11月14日。和欧洲专利申请No. 513 738, Koch, 公开日为1992年6月12日。除了上述的文献外, 已知可进行含有EPO基因的重组CHO细胞的无血清发酵。该方法描述于例如EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678以及Kawamoto, T. 等, Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J.和Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0481 791, EP-A 0307247, EP-A 0343635, WO 88/00967。

在EP-A 0 267 678中描述了一种在S-琼脂糖上的离子交换层析, 一种在C<sub>8</sub>柱上的制备性反相HPLC和一种凝胶过滤层析用于无血清培养中制备的EPO在透析后进行纯化。在这一方面, 凝胶过滤层析步骤可被快流

S-琼脂糖 (S-Sepharose fast flow)上的离子交换层析替换。也有人提议在离子交换层析之前进行在蓝色 Trisacryl柱上的染料层析。

一种纯化重组的EPO的方法描述于Nobuo, I. 等, J. Biochem. 107 (1990) 352-359。在这一方法中, 在纯化步骤前EPO是用Tween® 20, 苯甲基磺酰氯, 乙基马来亚酰胺, 抑胃酶肽A, 硫酸铜和草氨酸处理的。  
5 包括WO 96/35718, Burg, 公开于1996年11月14日, 的出版物公开了一种在无血清发酵方法中(EPOsf) 制备促红血球生成素的方法。

EPO和本发明的EPO偶联物的比活性可通过多种已知的方法进行测定。本发明的纯化的EPO蛋白质的生物活性时, 通过注射将该EPO蛋白质施用给病人与没有注射的对照组相比导致骨髓细胞提高网状细胞和血  
10 红细胞的生成。本发明中得到的或纯化的EPO蛋白质, 或其片段的生物学活性可按照Annable, 等, Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112和Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)的方法进行测定。另一个用于测定EPO蛋白质的活性的方法, normocythaemic 小鼠检测  
15 (normocythaemic mouse assay),该方法描述于实施例4。

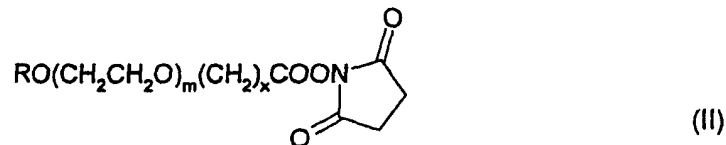
本发明提供了一种由上述的偶联物组成的组合物。一种含有至少90%的单-PEG偶联物, 即其中n是1, 是通过实施例5所示的方法制备的。通常促红血球生成素糖蛋白的单-PEG偶联物是所期望的, 因为它们与二-PEG偶联物相比具有较高的生物活性。单-PEG偶联物的百分含量以及单  
20 -和二-PEG产物的比率可被控制, 通过收集在洗脱峰周围较宽的级分来降低组合物中单-PEG的百分率, 或者通过收集较窄的级分来提高组合物中单-PEG的百分率。约90%的单-PEG偶联物是产率和活性之间较好的平衡。有时可能需要其中例如至少92%或至少96%的偶联物为单-PEG产物(n等于1)的组合物。在本发明的一个实施方案中, 其中n是1的偶联物的百分  
25 分率为90%至96%。

本发明也提供了一种由一种偶联物或如上说述的组合物以及一种药学上可接受的载体的药物组合物。

本发明的偶联物和组合物特别适用于制备用于治疗或防治与慢性肾衰竭病人(CRF), AIDS相关的贫血的疾病的药物, 以及用于治疗进行化  
30 疗的癌症病人的药物。

本发明的另一个实施方案是一种用于防治和/或治疗涉及慢性肾衰竭病人(CRF), AIDS和进行化疗的癌症病人的贫血的方法, 包括向患者施用上述的组合物的步骤。

5 本发明还涉及一种用于制备上述的化合物的方法, 包括将式II的化合物:



10

与一种促红血球生成素进行缩合, 其中R, m和x 与上述定义相同。

本发明也涉及用于治疗与慢性肾衰竭病人(CRF), AIDS以及进行化疗的癌症病人相关的贫血的、上述的化合物。

15 参照下述实施例进一步描述本发明, 这些实施例不限定本发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1: 人类EPO的发酵和纯化

20

#### a) 接种体的制备和发酵

将一小瓶来源于产生EPO的CHO细胞系(可使用ATCC CRL8695, 公开于EP 411678 (Genetics Institute))的Working Cell Bank从液氮罐的气相  
25 中取出。将细胞转移至玻璃转瓶中, 并被培养在湿润的二氧化碳培养箱中的碳酸氢盐缓冲的培养基中。用于接种体制备和发酵的典型的无血清培养基公开于欧洲专利申请513 738, Koch, 公开日为1992年6月12日, 或者WO 96/35718, Burg, 公开日1996年11月14日, 例如含有培养基DMEM/F12 (例如JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, order  
30 No. 57-736), 还含有碳酸氢钠, L+谷氨酰胺, D+葡萄糖, 重组胰岛素,

亚硒酸钠, 二氨基丁烷, 氢化可的松, 硫酸亚铁(II), 天冬酰胺, 天冬氨酸, 丝氨酸和一种哺乳动物细胞的稳定剂, 例如聚乙烯基醇, 甲基纤维素, 葡聚糖, 聚乙二醇, Pluronic F68, 血浆增容剂聚明蚀肽 (HEMACCEL®)或者聚乙烯基吡咯烷酮(WO 96/35718)。

- 5 通过显微镜检查污染的微生物的存在, 并检测细胞密度。在每一个分级步骤中进行这些检测。

在最初的生长期后, 将细胞培养物用新鲜的培养基进行稀释, 达到最初的细胞密度, 并进行另一个生长周期。重复这一过程, 直至达到每玻璃转瓶约2升的培养体积。在进行约12次加倍后, 得到1至5升的培养物, 然后将其用作10升接种发酵罐的接种体。

10 在3-5天后, 10升发酵罐的培养物可被用作100升接种发酵罐的接种体。

再过3-5天后, 100升发酵罐的培养物可被用作1000升生产发酵罐的接种体。

15

#### b) 收获和细胞分离

使用一种分批重新补料方法(batch refeed process), 即, 当达到所需的细胞浓度时, 收获约80%的培养物。将剩余的培养物用新鲜的培养基重新装满并培养至下一次收获。一个生产周期是有最多10次随后的收获组成的: 9个部分收获和1个在发酵最后的完全收获。每3-4天收获一次。

20 将测定后的收获物转移到一个冷却的容器中。通过离心或过滤除去细胞并将废弃。将离心步骤中的含有EPO的上清液进行在线过滤并将其收集到一个第二冷却的容器中。在纯化过程中每次的收获物是分别处理的。

25

纯化EPO-蛋白质的一个典型的过程描述于WO 96/35718, Burg, 公开日1996年11月14日。下文描述该纯化过程。

#### a) 蓝色琼脂糖层析(Blue Sepharose Chromatography)

蓝色琼脂糖(Blue Sepharose)(Pharmacia)是由琼脂糖珠组成的,其表面上共价连接了Cibacron蓝色染料。由于EPO与蓝色琼脂糖的结合强于大多数的非蛋白质污染物,一些蛋白质类杂质和PVA,EPO可在这一步骤中富集。蓝色琼脂糖珠的洗脱是通过提高盐浓度以及pH来进行的。

5 柱中装载了80-100升的蓝色琼脂糖,用NaOH再生,并用平衡缓冲液进行平衡(氯化钠/钙和醋酸钠)。装入酸化的和过滤的发酵罐上清液。在装载完成后,首先将柱用含有较高氯化钠浓度的相似的缓冲液洗涤,然后用Tris-碱缓冲液洗涤。用Tris-碱缓冲液洗脱产物,并按照总洗脱图谱以一个单一的级分收集。

10

#### b) Butyl Toyopearl 层析

Butyl Toyopearl 650 C (Toso Haas)是一种聚苯乙烯基的基质,在其上共价偶联了脂肪丁基-残基。由于EPO与这种胶的结合强于大多数的杂质和PVA,用含有异丙醇的缓冲液进行洗脱。

15

柱中装载了30-40升的Butyl Toyopearl 650 C,用NaOH再生,用Tris-碱缓冲液洗涤并用含有异丙醇的Tris-碱缓冲液进行平衡。

将蓝色琼脂糖洗脱物调整至柱平衡缓冲液中的异丙醇的浓度并加样到柱上。然后,将柱用含有提高的异丙醇浓度的平衡缓冲液洗涤。用洗脱缓冲液洗脱产物(具有高的异丙醇含量的Tris-碱缓冲液),并按照总洗脱图谱以一个单一的级分收集。

20

#### c) Hydroxyapatite Ultrogel 层析

25 Hydroxyapatite Ultrogel (Biosepra) 是由羟基磷灰石组成的,它被整合在琼脂糖中,以改善机械性能。EPO对羟基磷灰石具有低的亲合性,因而与蛋白质杂质相比可在低磷酸盐浓度下洗脱。

柱中装载了30-40升的Hydroxyapatite Ultrogel(Biosepra),用磷酸钾/氯化钙缓冲液和NaOH,然后用Tris-碱再生。然后用含有低浓度的异丙醇和氯化钠的Tris-碱缓冲液进行平衡。

30

将含有EPO的Brtyl Toyopearl层析的洗脱液装载到柱上。然后，将柱用平衡缓冲液和没有异丙醇和氯化钠的Tris-碱缓冲液洗涤。用含有低浓度的磷酸钾的Tris-碱缓冲液洗涤产物，并按照总洗脱图谱以一个单一的级分收集。

5

d) 在Vydac C4上的反相HPLC

RP-HPLC材料Vydac C4 (Vydac)是由硅胶颗粒组成的，其表面上携带有C4-烷链。从蛋白质杂质中分离EPO是基于疏水相互作用的强度不同。在稀释的三氟乙酸中以乙腈进行梯度洗脱。

制备性HPLC是使用不锈钢柱(装有2.8 至 3.2 升的Vydac C4 硅胶)进行的。通过加入三氟乙酸酸化Hydroxyapatite Ultrogel洗脱液，并加样到Vydac C4 柱上。对于洗涤和洗脱，使用一种在稀释的三氟乙酸中的乙腈梯度。收集级分，并立即用磷酸盐缓冲液进行中和。将IPC限度范围内的EPO级分合并。

15

e) DEAE琼脂糖层析

DEAE琼脂糖(Pharmacia)材料是由与琼脂糖珠的表面共价相连的二乙基氨基乙基基团组成的。EPO与DEAE基团的结合是由离子相互作用介导的。乙腈和三氟乙酸流经柱时不被保留。在这些物质被洗涤之后，通过用低pH的乙酸盐缓冲液洗涤柱除去痕量的杂质。然后将柱用中性磷酸盐缓冲液洗涤并用逐渐提高离子强度的缓冲液洗脱EPO。

20

将柱用DEAE Sepharose fast flow进行装填。将柱体积进行调整以保证EPO装载量是在3-10 mg EPO/ml胶的范围内。将柱用水和平衡缓冲液进行洗涤(磷酸钠/钾)。用合并的HPLC洗脱液级分加样并将柱用平衡缓冲液进行洗涤。然后将柱用洗涤缓冲液(醋酸钠缓冲液)进行洗涤，再用平衡缓冲液洗涤。然后，用洗脱缓冲液(氯化钠，磷酸钠/钾)洗脱EPO，并按照总洗脱图谱以一个单一的级分收集。

25

将DEAE琼脂糖柱的洗脱液调整至特定的导电率。将得到的药物进

30



行无菌过滤，装入聚四氟乙烯瓶中，并保存在-70℃。

### 实施例 2:用mPEG-SBA对EPO进行PEG化

5 按照实施例1的无血清方法 (EPOsf)纯化的EPO通过分析方法确定为均一的，并显示出由8个同型组成的典型的同种型。通过normocythaemic小鼠检测具有190,000 IU/mg的比活。所使用的PEG化试剂为甲氧基-PEG-SBA，它是一种其中R是甲基；x是3；和m是从650至750(平均约680，相应于平均分子量约30 kDa)的式II的化合物。

10

#### PEG化反应(pegylation reaction)

向100毫克的EPOsf (9.71 ml的10.3 mg/ml EPOsf贮存液，5.48微摩尔)中，加入10 ml的含有506 mg的30kDa甲氧基-PEG-SBA (16.5微摩尔) (得  
15 自Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama)的0.1 M的磷酸钾缓冲液，pH 7.5 并在室温(20-23℃)下混合2小时。最终的蛋白质浓度为5 mg/ml，并且蛋白质:PEG试剂的比率为1:3。2小时后，通过用冰醋酸将pH调整至4.5终止反应，并贮存在-20℃，直至纯化。

#### 20 纯化

1. 偶联物混合物: 将约28 ml的SP-SEPHAROSE FF(磺基-丙基阳离子交换树脂)装入AMICON玻璃柱(2.2 x 7.5 cm)，并用20 mM乙酸盐缓冲液pH 4.5在流速为150 ml/小时的条件下进行平衡。将含有30 mg蛋白质的  
25 6 ml反应混合物用平衡缓冲液稀释5倍，并加样到柱上。没有吸附的材料用缓冲液洗去，并将吸附的PEG偶联物混合物用平衡缓冲液中的0.175 M NaCl从柱中洗脱。没有修饰的EPOsf仍保留在柱上，并用750 mM NaCl洗脱。将柱用初始缓冲液重新平衡。通过SDS-PAGE对样品进行分析并测定它们的PEG化的程度。发现0.175M NaCl洗脱液含有单-，以及二-和  
30 痕量的三-PEG化的(pegylated)产物，而750 mM NaCl洗脱液含有非修饰

## 的EPOsf

2. 二-PEG和单-PEG-EPOsf: 在前一个步骤中从柱中洗脱出的纯化的偶联物混合物用缓冲液稀释4倍, 并被重新加样到柱上, 如前文所述进行洗涤。分别用0.1M NaCl和0.175 M NaCl从柱中洗脱出了二-PEG-EPOsf和单-PEG-EPOsf。也用750mM NaCl进行洗脱, 洗脱出任何非修饰的EPOsf。

或者, 将反应混合物用乙酸盐缓冲液稀释5倍并加样到SP-琼脂糖柱(约0.5 mg蛋白质/ml胶)上。洗涤柱, 如前文所述洗脱出单-PEG-EPOsf,二-PEG-EPOsf和非修饰的EPOsf。

## 结果

通过化学偶联一种线性PEG分子合成出PEG-EPOsf, 其数均分子量为30 kDa。PEG-EPOsf衍生于EPOsf的伯氨基基团和30 kDa PEG-丁酸的琥珀酰亚胺酯衍生物之间的反应, 得到一种酰胺键。

结果总结于表1。由单-和二-PEG-EPOsf组成的纯化的偶联物混合物通过SDS-PAGE分析不含有非修饰的EPOsf。偶联物混合物占23.4 mg或者初始材料的78%。阳离子交换层析分离单-和二-PEG-EPOsf表明, 在偶联物混合物中单- 与二-PEG的比率几乎是1:1。在反应完成后, 各种组分的比率为单: 二: 非修饰的=40: 38: 20(%)。总产率几乎是定量的。

表1, EPOsf PEG化的结果

样品	蛋白质(mg)	产率(%)
Rxn. Mix.	30	100
单-	12.0	40
二-	11.4	38
非修饰的	6.0	20
偶联物混合物	23.4	78

### 实施例 3: 用mPEG-SPA的EPO的PEG化

将实施例2中使用的EPOsf 的另一个等分试样与30 kDa 甲氧基-PEG-SPA (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama)反应。反应是在蛋白质: 试剂比率为1: 2的条件下进行的, 纯化是按照实施例2的方法进行的。主要制备除了单-PEG化的产物。

### 实施例 4: 通过normocythaemic小鼠测试测定 PEG化的(pegylated) EPO的体内活性

10

Normocythaemic小鼠生物检测是现有技术已知的(Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2))和Ph. Eur. BRP的促红血球生成素的专著中的一个方法。将样品用BSA-PBS稀释。正常健康小鼠, 7-15周龄, 腹膜下施用0.2 ml的EPO-级分, 它含有非PEG化的EPO或者实施例2或者3中的三-, 二-或者单-PEG化的(pegylated) EPO。在6天的时间内, 通过尾静脉穿孔抽血, 并将其稀释, 使1微升的血存在于1 ml的0.15微摩尔的丫啶橙染色溶液中。染色时间为3至10分钟。在荧光显微镜下在一个流式细胞计数器中, 通过分析红色荧光柱状图进行网状细胞计数。网状细胞计数是以绝对值表示的(被分析的每30,000个血细胞)。对于给出的数值, 每组每天由5个小鼠组成, 并对小鼠仅抽血一次。

在另一个试验中, 对小鼠施用单剂量的非修饰的EPO (25 ng的EPO), 实施例2的PEG(SBA)-EPO混合物(10 ng的偶联物), 实施例2的单-和二-PEG化的(pegylated)EPO(10 ng的偶联物), 实施例3的PEG(SPA)-EPO(10 ng的偶联物),和缓冲液。结果示于表2。结果显示, 与使用剂量为25 ng的非修饰的EPO相比, 每个小鼠使用相同剂量(10 ng), PEG化的(pegylated)EPO产物具有优良的活性和长的半衰期, 这是通过网状细胞计数的显著提高和网状细胞计数的最大值的变化的变化表明的。

表2

	EPO (非修饰的)	30 kDa SPA PEG	单 30K SBA	二 30K SBA	PEG-EPO SBA偶联物 混合物	对照 缓冲液
72小时	1000	1393	1411	994	1328	857
96小时	500	1406	1501	926	1338	697
120小时	约200	1100	1182	791	944	701
144小时	约0	535	607	665	660	708

### 实施例 5: 主要为单-PEG-EPO的制备

#### 5 PEG化反应(pegylation reaction)

在按照实施例1的方法制备的100 mM磷酸钾缓冲液pH 7.5中的100 mg (5.48微摩尔)的EPOsf中加入溶解在3ml 1 mM HCl中的329 mg (10.96微摩尔)的30 kDa PEG-SBA试剂。加入足量的100 mM的磷酸钾缓冲液pH 7.5, 使反应混合物的体积为20 ml。最终蛋白质浓度为5 mg/ml, 以及蛋白质:PEG试剂的比率为1:2。在常温下(20 - 22°C)将反应混合物混合2小时。2小时后, 通过用冰醋酸将pH调整至4.5终止反应, 并贮存在-20°C, 直至纯化。

#### 15 纯化

将上述步骤中的反应混合物用10 mM醋酸钠, pH 4.5, 进行1: 5稀释, 并加样到装填在4.2 x 19 cm柱中的300 ml SP-Sephrose FF (磺基丙基阳离子交换树脂)中。将该柱预先用相同的缓冲液平衡。用一个Gilson UV监视器在280 nm监视柱流出物, 并用一个Kipp和Zonen记录仪记录。将柱用300 ml或1床层体积的平衡缓冲液洗涤, 除去过量的试剂、反应副产物和寡聚PEG-EPO。然后用2床体积的100 mM NaCl洗涤, 除去二-PEG-EPO。然后用200 mM NaCl洗脱单-PEG-EPO。在单-PEG-EPO的洗脱过

- 程中，弃去最初的50 ml的蛋白峰，收集作为150 ml级分的单-PEG-EPO。仍保留在柱上的非修饰的EPOsf用750 mM NaCl洗脱。所有的洗脱缓冲液是在平衡缓冲液中制备的。所有的洗脱样品通过SDS-PAGE并通过高效尺寸排阻层析(SEC)进行分析。然后将不含有可检测到的非修饰的
- 5 EPOsf、从150 ml级分得到的单-PEG-EPO合并物浓缩至约4.5至7.5 mg/ml并过滤进贮存缓冲液，10 mM磷酸钾，100 mM NaCl，pH 7.5。浓缩/过滤是使用Millipore Labscale™ TFF System和截留50 kDa分子的Millipore Pellicon XL Biomax 50膜在常温下进行的。将浓缩的单-PEG-EPO进行无菌过滤并贮存在-20℃。
- 10 约75%的EPOsf被PEG化(pegylated)。在纯化后，总产率为约30%单-PEG-EPO，不含有可检测到的非修饰的EPOsf，和约25%的二-PEG-EPO。剩余的蛋白质为寡聚物和非PEG化的EPOsf。从150 ml级分得到的单-PEG-EPO 合并物含有约90%的单-PEG-EPO和约10%的二-PEG-EPO。

## 序列表

&lt;110&gt; 霍夫曼-拉罗奇有限公司

&lt;120&gt; 促红细胞生成素与聚乙二醇的偶联物

&lt;130&gt; IN040102

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 165

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His
			20					25					30		
Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
		35					40					45			
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp
	50					55					60				
Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp
				85					90					95	
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
			100					105					110		
Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
		115					120					125			
Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
	130					135					140				

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp  
 165

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
 65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 165

<210> 3

---

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
1                   5                   10                   15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
          20                   25