

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039809.X

[51] Int. Cl.

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月24日

[11] 公开号 CN 1901934A

[22] 申请日 2004.12.10

[21] 申请号 200480039809.X

[30] 优先权

[32] 2003.12.19 [33] EP [31] 03104832.5

[86] 国际申请 PCT/EP2004/014105 2004.12.10

[87] 国际公布 WO2005/058347 英 2005.6.30

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.4

[71] 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 H·克利马 P·莱曼

R·罗迪格尔

R·瓦尔特-马特苏伊

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 凌立

权利要求书 3 页 说明书 21 页 序列表 2 页
附图 1 页

[54] 发明名称

促红细胞生成素在治疗慢性炎症性肠病中铁
分布紊乱中的用途

[57] 摘要

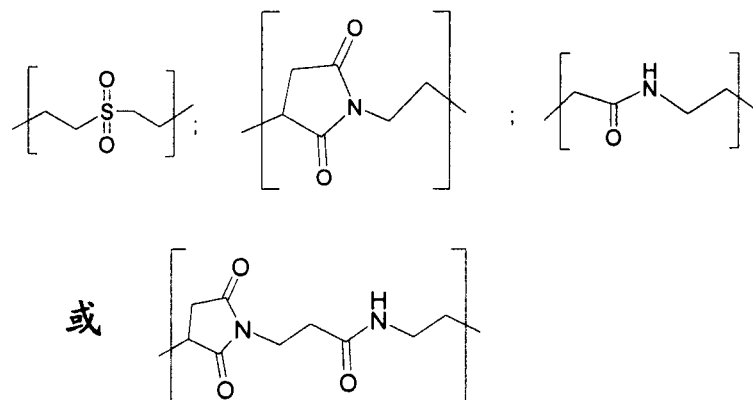
本发明涉及促红细胞生成素用于治疗慢性炎症
性肠病中铁分布紊乱的用途。

1. 促红细胞生成素蛋白在制备用于治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的药物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述慢性炎症性肠病是节段性肠炎。
3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述慢性炎症性肠病是ulzerosa结肠炎。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白是人促红细胞生成素。
5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白是 α 型重组人红细胞生成素或 β 型重组人红细胞生成素。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白通过内源性基因活化来表达。
7. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或氨基酸序列 SEQ ID NO:2。
8. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白含有通过加入1至6个糖基化位点而修饰的人促红细胞生成素的序列。
9. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白是 α 达贝泊汀。
10. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中如权利要求4至8中任一项所定义的促红细胞生成素蛋白是聚乙二醇化的。
11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述促红细胞生成素蛋白是缀合物,所述缀合物包含促红细胞生成素蛋白,其含有至少一个自由氨基,并且具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性,所述缀合物选自人促红细胞生成素及其类似物,其含有通过加入1至6个糖基化位点或至少一个糖基化位点的重排而修饰的人促红细胞生成素的序

列；所述促红细胞生成素蛋白以每一个聚（乙二醇）基团的-CO与所述氨基之一形成酰胺键而共价连接到式 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ 的n个聚（乙二醇）基团上；其中R是低级烷基；x是2或3；m是大约450至大约900；n是1至3；并且n和m的选择使得缀合物的分子量减去促红细胞生成素蛋白的分子量在20千道尔顿至100千道尔顿之间。

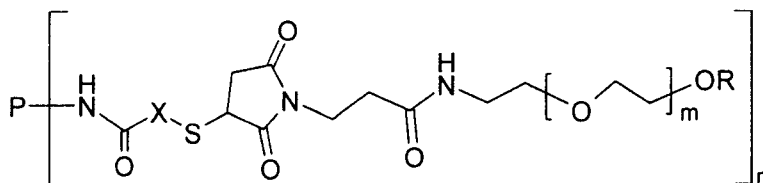
12. 根据权利要求11所述的用途，其中x是2，m是650至750，n是1且R是甲基。

13. 根据权利要求10所述的用途，其中所述促红细胞生成素蛋白是缀合物，所述缀合物包含促红细胞生成素蛋白，其含有至少一个自由氨基，并且具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性，所述缀合物选自人促红细胞生成素蛋白及其类似物，其含有通过加入1至6个糖基化位点而修饰的人促红细胞生成素蛋白的一级结构；所述促红细胞生成素蛋白与一个至三个低级氧烷基聚（乙二醇）基团共价连接，每一个聚（乙二醇）基团通过式 $\text{C}(\text{O})-\text{X}-\text{S}-\text{Y}$ 的连接剂，以连接剂的 $\text{C}(\text{O})$ 与所述氨基之一形成酰胺键而共价连接到促红细胞生成素蛋白上，X是 $-(\text{CH}_2)_k-$ 或 $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ ，k是1至10，Y是



每一个聚（乙二醇）部分的平均分子量在大约20千道尔顿至大约40千道尔顿之间且所述缀合物的分子量在大约51千道尔顿至大约175千道尔顿之间。

14. 根据权利要求13所述的用途，具有下式的促红细胞生成素缀合物：



其中 n 是 1 至 3 的整数； m 是 450-900 的整数； R 是低级烷基； X 是 $-(CH_2)_k-$ 或 $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ ， k 是 1 至 10， P 是促红细胞生成素蛋白的残基，其没有与 X 形成酰胺键的 n 个氨基。

15. 一种用于治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的方法，其包括施用有效量的促红细胞生成素蛋白。

16. 一种用于治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的药物，其特征在于含有有效量的促红细胞生成素蛋白。

17. 上面所定义的本发明。

促红细胞生成素在治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱中的用途

发明领域

本发明涉及促红细胞生成素的新用途，尤其是涉及慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的治疗。

技术背景

已知在多种疾病中铁代谢不正常。在贫血症中，由于体内总体缺铁，所以不能产生足够的血液。与铁有关的另一种代谢情况是血色素沉着病，其中体内铁的总浓度高于正常值，这导致多种情况，例如器官的破坏。

铁分布紊乱与上述贫血症和血色素沉着病不同，因为体内铁的总浓度是正常的。一方面，铁在各种不同器官中积累并可导致这些器官破坏，甚至损伤。另一方面，以正常量存在的铁在血液形成中的利用减少，从而产生继发反应 (secondary effect)，这与贫血症相关的那些效应相当。

至今还不知道慢性炎症性肠病患者受到铁分布紊乱影响的可能性很大。铁分布紊乱可以通过在铁质状态诊断中常用的多个参数来诊断。基于对铁蛋白和可溶性运铁蛋白受体的测定，可以评测慢性炎症性肠病患者体内铁的总浓度是否正常。如果是这种情况，那么网织红细胞中较低浓度的血红蛋白是铁分布紊乱的一个标志。另一个标志是患有慢性炎症性肠病并且表现出正常的总铁浓度的患者的持续/长期增高的 C 反应蛋白 (CRP) 浓度。诊断铁分布紊乱的一种方法已经由 P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger 描述，海报出现于 AACC/CSCC, 2001 年 7 月 29 日-8 月 2 日的年会, Chicago, Illinois。

迄今为止，仍然没有提出针对患有铁分布紊乱的慢性炎症性肠病患者的治疗。因此，本发明首要的问题是提供慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的

治疗，以便最小化或降低上面所提及的不利情况。令人惊讶地是已经发现促红细胞生成素对慢性炎症性肠病中铁分布紊乱具有有益作用。因此，根据本发明，通过提供促红细胞生成素用于治疗慢性炎症性肠病中的铁分布紊乱解决了这个问题。

发明内容

除非另外指明，阐明以下定义来解释并定义用于描述本发明的各种术语的含义和范围。

本文中使用的术语“低级烷基”表示具有1至6个碳原子的直链或支链烷基基团。低级烷基基团的实例包括甲基、乙基和异丙基，优选地是甲基。

本文中使用的术语“低级烷氧基”表示R'-O-基团，其中R'是如上面所描述的低级烷基。

术语“慢性炎症性肠病中的铁分布紊乱”是指发生在慢性炎症性肠病患者身上的铁分布紊乱。铁分布紊乱可以表征如上。具体而言，铁分布紊乱的特征在于具有如下参数：可溶性运铁蛋白受体的浓度[mg/L]除以铁蛋白浓度[$\mu\text{g/L}$]的对数的结果小于3.5，同时C反应蛋白的浓度大于5 mg/L。

术语“促红细胞生成素”或“促红细胞生成素蛋白”是指具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性的蛋白质，其选自人促红细胞生成素以及下面所定义的类似物。

术语“聚乙二醇化促红细胞生成素(Peg-EPO 或 PEG-EPO)”是指与一至三种下述聚乙烯衍生物共价连接的促红细胞生成素蛋白。

附图简述

图 1: 人 EPO (165 个氨基酸) 的一级结构 (SEQ ID NO:1)。

图 2: 人 EPO (166 个氨基酸) 的一级结构 (SEQ ID NO:2)。

更详细地说，本发明涉及促红细胞生成素在制备用于治疗慢性炎症

性肠病中铁分布紊乱的药物中的用途。慢性炎症性肠病的实例是，例如节段性肠炎 (morbus crohn)，也被称作克隆病 (crohn's disease)，以及 ulzerosa 结肠炎 (colitis ulzerosa)。在一个优选的实施方案中，本发明涉及上面所定义的用途，其中慢性炎症性肠病是节段性肠炎。在另一个优选的实施方案中，本发明涉及上面所定义的用途，其中慢性炎症性肠病是 ulzerosa 结肠炎。

本发明尤其可用于制备含有促红细胞生成素作为药物活性成分的药物组合物。术语“促红细胞生成素”或“促红细胞生成素蛋白”或“EPO”如下所述：具体而言这些术语指一种糖蛋白，例如人促红细胞生成素，例如含有 (SEQ ID NO: 1) 或 (SEQ ID NO: 2) 中所示的氨基酸序列或者与其基本上同源的氨基酸序列，其生物学特性与红细胞产生的刺激及骨髓中定向红系祖细胞的分裂和分化的刺激相关。正如此处所用，这些术语包括精心修饰的此类蛋白质，例如，通过定点诱变或随机通过突变进行修饰。这些术语也包括具有 1 至 6 个用于糖基化的额外位点的类似物；在糖蛋白的羧基末端上含有至少一个额外氨基酸的类似物，其中该额外氨基酸包含至少一个糖基化位点；以及具有含至少一个用于糖基化的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促红细胞生成素。在本发明的一个优选实施方案中，促红细胞生成素蛋白是人促红细胞生成素。

正如下面详细列出地，EPO 的制备和纯化在本领域是众所周知的。促红细胞生成素是指天然蛋白质或重组蛋白质，尤其是人的蛋白质，例如从任何常规来源(如组织、蛋白质合成、天然细胞或重组细胞的细胞培养物)获得的 α 型重组人红细胞生成素 (epoetin α) 或 β 型重组人红细胞生成素 (epoetin β)。具有促红细胞生成素活性的任何蛋白质都包括在其内，如突变蛋白或其他经修饰的蛋白质。在本发明的一个优选实施方案中，促红细胞生成素蛋白是 α 型重组人红细胞生成素或 β 型重组人红细胞生成素。重组的 EPO 可以通过重组 DNA 技术或通过内源基因活化，在 CHO-、BHK- 或 HeLa 细胞系中表达来制备。包括通过内源基因活化的蛋白质表达在本领域是熟知的，并且已经公开在，例如美国专利 5,733,761 号、5,641,670

号和 5,733,746 号中, 以及国际专利公开 WO 93/09222、WO 94/ 12650、WO 95/31560、WO 90/11354、WO 91/06667 和 WO 91/09955 中, 上述每篇文件的内容均被引入作为参考。上面定义的用途中红细胞生成蛋白优选通过内源基因活化来表达。用于制备促红细胞生成素糖蛋白产物的优选 EPO 种类是人 EPO 种类。更优选地, EPO 种类是含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的人 EPO, 更优选地是含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的人 EPO。因此, 本发明的一个优选实施方案涉及上述用途, 其中促红细胞生成素蛋白含有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

另外, 促红细胞生成素可以是含有 1 至 6 个用于糖基化的额外位点的糖蛋白类似物。因此, 本发明也涉及前述用途, 其中促红细胞生成素蛋白含有通过添加 1 至 6 个糖基化位点而修饰的人促红细胞生成素的序列。含有一个或多个寡糖基团的蛋白质的糖基化沿着多肽骨架在特定位点上发生, 并大大影响蛋白质的物理特性, 如蛋白质的稳定性、分泌作用、亚细胞定位和生物活性。糖基化通常有两种类型。O-连接寡糖连接到丝氨酸或苏氨酸残基上, N-连接寡糖连接到天冬酰胺残基上。在 N-连接寡糖和 O-连接寡糖上均发现的一类寡糖是 N-乙酰神经氨酸(唾液酸), 它是含有 9 个或更多个碳原子的氨基糖家族。唾液酸通常是 N-连接和 O-连接寡糖上的末端残基, 这是由于其带有负电荷, 赋予糖蛋白酸性特性。具有 165 个氨基酸的人促红细胞生成素含有三个 N-连接寡糖链和一个 O-连接寡糖链, 其构成糖蛋白总分子量的大约 40%。N-连接糖基化在第 24、38 和 83 位的天冬酰胺残基上发生, O-连接糖基化在第 126 位的丝氨酸残基上发生。寡糖链以末端唾液酸残基修饰。从糖基化的促红细胞生成素上酶促除去所有唾液酸残基导致体内活性的丧失, 但体外活性没有丧失, 这是由于促红细胞生成素的唾液酸化阻止了它与肝结合蛋白的结合以及随后的清除。

术语“促红细胞生成素”包括人促红细胞生成素的类似物, 其在人促红细胞生成素的氨基酸序列上具有一个或多个改变, 这导致用于唾液酸连接位点数量的增加。这些糖蛋白类似物可以通过含有氨基酸残基的添加、

缺失或取代的定点诱变产生，这增加或改变了适于糖基化的位点。唾液酸水平比人促红细胞生成素中所发现的更高的糖蛋白类似物是通过添加糖基化位点产生的，这些位点不会干扰生物活性所需要的二级或三级构象。本发明的糖蛋白也包括在糖基化位点上糖类连接水平增加的类似物，其通常包括与 N-连接或 O-连接位点非常接近的位点上的一个或多个氨基酸的取代。本发明的糖蛋白也包括多种类似物，其含有从促红细胞生成素的羧基末端延伸出的、并且提供至少一个额外的糖类位点的一个或多个氨基酸。本发明的组合物的促红细胞生成素蛋白也包括含有一种氨基酸序列的类似物，所述氨基酸序列包括至少一个用于糖基化的重排。这种糖基化位点的重排包括人促红细胞生成素中的一个或多个糖基化位点的删除及一个或多个非天然发生的糖基化位点的添加。增加促红细胞生成素上糖链的数量，从而每个促红细胞生成素分子的唾液酸数量可以使其具有有利的特性，如增加的可溶性、对蛋白水解更大的抗性、降低的免疫原性、增加的血清半衰期和增加的生物活性。在 Elliot 的欧洲专利申请 640 619 中更详细地公开了含有额外糖基化位点的促红细胞生成素类似物，该申请公开于 1995 年 3 月 1 日。

在一个优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含具有含至少一个用于糖基化的额外位点的氨基酸序列的促红细胞生成素蛋白，例如，但不限于，包含通过以下修饰而被修饰的人促红细胞生成素序列的促红细胞生成素，所述修饰选自：

Asn³⁰Thr³²;

Asn⁵¹Thr⁵³;

Asn⁵⁷Thr⁵⁹;

Asn⁶⁹;

Asn⁶⁹Thr⁷¹;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;

Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
Thr¹²⁵; 及
Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

此处用于氨基酸序列修饰的符号是指，用上标数字表示的相应未修饰蛋白质（例如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的 hEPO）的位置变成直接位于各自上标数字之前的氨基酸。

促红细胞生成素蛋白也可以是在糖蛋白的羧基末端含有至少一个额外的氨基酸的类似物，其中额外的氨基酸包含至少一个糖基化位点。额外的氨基酸可以包括来源于人绒毛膜促性腺激素羧基末端的肽片段。优选地，该糖蛋白是选自如下的类似物：(a)含有氨基酸序列 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln 的人促红细胞生成素，其从羧基末端延伸；(b)在 (a) 中进一步包含 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO 的类似物；和 (c)在 (a) 中进一步包含 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO 的类似物。

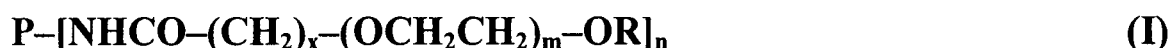
促红细胞生成素蛋白也可以是具有含至少一个用于糖基化的重排的氨基酸序列的类似物。该重排可以包括人促红细胞生成素中任何一个 N-连接糖类的位点的删除及人促红细胞生成素氨基酸序列第 88 位上的 N-连接糖类的位点的添加。优选地，该糖蛋白是选自 Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO 和 Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO 的类似物。其他的类似物是 α 达贝泊汀 (darbepoetin α)。前述用途中优选的促红细胞

生成素是 α 达贝泊汀。

更特别地，如上所述的本发明的药物组合物的促红细胞生成素蛋白也包括其聚乙二醇化衍生物。促红细胞生成素的聚乙二醇化衍生物及其制备在本领域是已知的且描述于，例如 WO 01/02017、EP-A-1064951、EP-A-539,167、EP-A-605,963、WO 93/25212、WO 94/20069、WO 95/11924、美国专利 5,56、EP-A-584,876、WO 92/16555、WO 94/28024、WO 97/04796、美国专利 5,359,030 号和 5,681,811 号、美国专利 4,179,337 号、日本专利、WO 98/32466、美国专利 5,324,650 号中。优选地，上述用途中促红细胞生成素是聚乙二醇化的。聚乙二醇化促红细胞生成素种类的一个优选的实施方案是指下面描述的衍生物。

因此，本发明也涉及上述用途，其中促红细胞生成素蛋白是缀合物，所述缀合物包括如上所述的促红细胞生成素蛋白，其含有至少一个自由氨基，并具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性，所述缀合物选自人促红细胞生成素及其类似物，其含有通过增加 1 至 6 个糖基化位点或至少一个糖基化位点重排而修饰的人促红细胞生成素序列；所述促红细胞生成素以每一个聚（乙二醇）基团的 $-\text{CO}$ （即羰基）与所述氨基之一形成酰胺键而共价连接到式 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ 的 n 个聚（乙二醇）基团上；其中 R 是低级烷基； x 是 2 或 3； m 是大约 450 至大约 900； n 是 1 至 3；并且 n 和 m 的选择使得缀合物的分子量减去促红细胞生成素蛋白的分子量在 20 千道尔顿至 100 千道尔顿之间。本发明进一步提供了含有此处描述的缀合物的药物组合物，其中 n 为 1 的缀合物的百分比为组合物的所有缀合物的至少 90%，优选地是至少 92%，更优选地是 96%。

更特别地，上述缀合物可以由式 (I) 表示



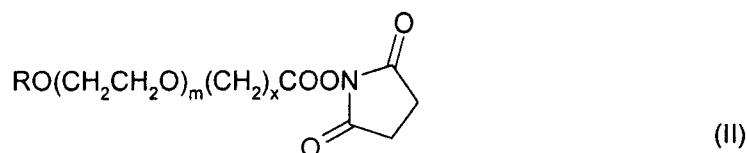
其中 P 是此处描述的促红细胞生成素蛋白的残基（即没有与式 I 中所示的羰基形成酰胺键的一个或多个氨基），具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性；其中 R 是低级烷基； x 是 2 或 3； m 是

大约 450 至大约 900; n 是 1 至 3; 对 n 和 m 的选择使得缀合物的分子量减去促红细胞生成素糖蛋白的分子量在 20 千道尔顿至 100 千道尔顿之间。根据本发明, R 是任何低级烷基。其中 R 是甲基的缀合物是优选的。

符号“ m ”表示聚(环氧乙烷)基团中的环氧乙烷残基(OCH_2CH_2)的数目。环氧乙烷的单个 PEG(聚乙二醇)亚单元的分子量为大约 44 道尔顿。因此, 缀合物的分子量(除去 EPO 的分子量)依赖于数值“ m ”。在本发明的缀合物中, “ m ”是大约 450 至大约 900(相当于分子量为大约 20 kDa 至大约 40 kDa), 优选地是大约 650 至大约 750(相当于分子量为大约 30 kDa)。对数值 m 的选择使得本发明的所得到的缀合物具有与未修饰的 EPO 相当的生理活性, 其活性可以是与未修饰 EPO 的相应活性相同、更大或其一部分的活性。“大约”某个数量的分子量表示该分子量在通过常规分析技术确定的数量的合理范围之内。对数值“ m ”如此选择, 是为了与促红细胞生成素糖蛋白共价连接的每一个聚(乙二醇)基团的分子量在大约 20kDa 至大约 40kDa 之间, 优选是大约 30kDa。

在本发明的缀合物中, 数值“ n ”是与促红细胞生成素蛋白的自由氨基(包括氨基酸赖氨酸的 ϵ -氨基和/或 N 端氨基)通过酰胺键共价结合的聚(乙二醇)基团的数目。本发明的缀合物中, 每个 EPO 分子可以具有 1 个、2 个或 3 个 PEG 基团。“ n ”是 1 至 3 之间的整数, 优选地“ n ”是 1 或 2, 更优选地“ n ”是 1。上面描述的缀合物中的优选的缀合物包括其中 x 是 2, m 是 650 至 750, n 是 1 并且 R 是甲基的化合物。

通过式 II 的化合物与促红细胞生成素糖蛋白的缩合, 式(I)的化合物可以从已知的聚合材料制备:

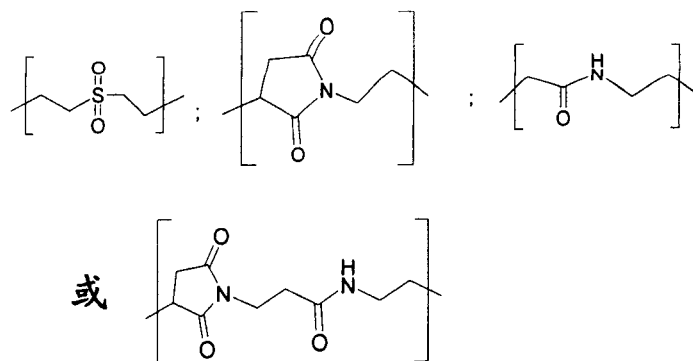


其中 R 和 m 如上所述。其中 x 是 3 的式 II 化合物是聚(乙二醇)的 α -低级烷氧基, 丁酸琥珀酰亚胺酯(低级烷氧基-PEG-SBA)。其中 x 是 2

的式 II 化合物是聚(乙二醇)的 α -低级烷氧基, 丙酸琥珀酰亚胺酯(低级烷氧基-PEG-SPA)。可以使用胺与活化酯反应形成酰胺的任何常规方法。在上述反应中例证性的琥珀酰亚胺酯是导致酰胺形成的离去基团。使用诸如式 II 化合物的琥珀酰亚胺酯与蛋白质产生缀合物公开于美国专利 5,672,662 中, 出版于 1997 年 9 月 30 (Harris 等人)。

人 EPO 含有 9 个自由氨基, 即 N 端氨基加上 8 个赖氨酸残基的 ϵ -氨基。当聚乙二醇化试剂与式 II 的 SBA 化合物化合时, 已经发现在 pH 7.5 下, 蛋白质: PEG 比率为 1: 3 以及反应温度为 20-25 $^{\circ}$ C 时, 产生了单聚乙二醇化种类、双聚乙二醇化种类和痕量的三聚乙二醇化种类的混合物。当聚乙二醇化试剂是式 II 的 SPA 化合物时, 在除了蛋白质: PEG 比率为 1: 2 之外的相似条件下, 主要产生单聚乙二醇化种类。聚乙二醇化 EPO 可以以混合物使用, 或者以阳离子交换层析分离的不同聚乙二醇化种类使用。通过控制反应条件(例如反应物的比例、pH、温度、蛋白质浓度、反应时间等等), 可以改变不同聚乙二醇化物质种类的相对量。

本发明的另一个优选实施方案涉及上面定义的用途, 其中促红细胞生成素蛋白是缀合物, 所述缀合物包括如上面所定义的促红细胞生成素蛋白, 其含有至少一个自由氨基且具有促使骨髓细胞增加网织红细胞和红细胞产生的体内生物活性, 所述缀合物选自人促红细胞生成素蛋白及其类似物, 其含有通过添加 1 至 6 个糖基化位点修饰的人促红细胞生成素蛋白的一级结构; 所述促红细胞生成素蛋白与一至三个低级烷氧基聚(乙二醇)基团共价连接, 每一个聚(乙二醇)基团通过式 $-C(O)-X-S-Y-$ 的连接剂, 以连接剂的 C(O) 与所述氨基之一形成酰胺键而共价连接到促红细胞生成素蛋白上, X 是 $-(CH_2)_k-$ 或 $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k 是 1 至 10, Y 是



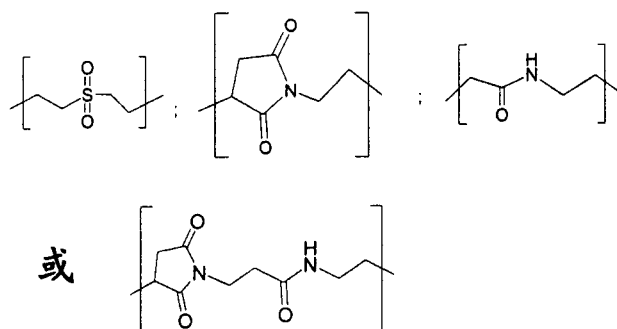
每一个聚(乙二醇)部分的平均分子量在大约 20 千道尔顿至大约 40 千道尔顿之间, 缀合物的分子量是大约 51 千道尔顿至大约 175 千道尔顿之间。

该促红细胞生成素种类也可以通过式 (III) 表示

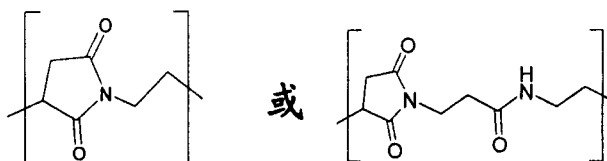


其中 R 可以是任何低级烷基。优选的低级烷基是甲基。X 可以是 $-(CH_2)_k-$ 或 $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, 其中 k 是 1 至大约 10。优选地, k 是 1 至大约 4, 更优选地, k 是 1 或 2。最优选地, X 是 $-(CH_2)$ 。

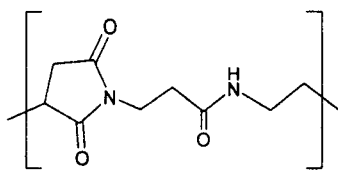
在式 1 中, Y 是



优选地



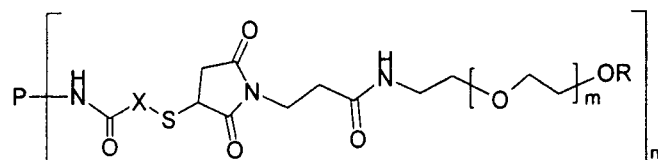
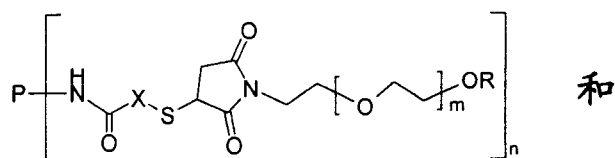
更优选地



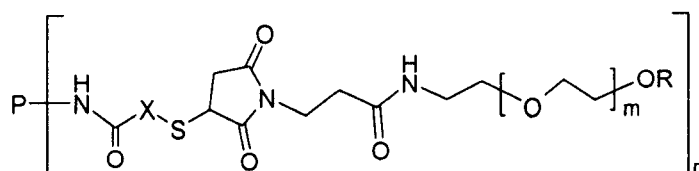
在式(III)中,数值 m 的选择使得所得到的式(III)缀合物具有与未修饰的 EPO 相当的生理活性,该活性可以是与未修饰 EPO 的相应活性相同、更大或其一部分的活性。 m 表示 PEG 单元中的环氧乙烷残基的数目。单个 PEG 亚单位的 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-$ 分子量为大约 44 道尔顿。因此,该缀合物的分子量(除去 EPO 的分子量)取决于 m 的数值。“大约”某个数量的分子量指该分子量在通过常规分析技术确定的数量的合理范围之内。 m 是大约 450 至大约 900 (相当于 20 至 40 kDa 之间的分子量)之间的整数, m 优选在大约 550 至大约 800 (大约 24 至 35 kDa) 之间, m 最优选在大约 650 至大约 700 (大约 29 至大约 31 kDa) 之间。

在式(III)中,数值 n 是通过酰胺键与 PEG 单元共价连接的促红细胞生成素中的氨基酸赖氨酸的 ϵ -氨基的数目。本发明的缀合物中每个 EPO 分子可以具有 1 个、2 个或 3 个 PEG 单元。 n 是 1 至 3 范围内的整数, n 优选是 1 或 2, n 最优选是 1。

式(III)的优选促红细胞生成素蛋白由下式表示:

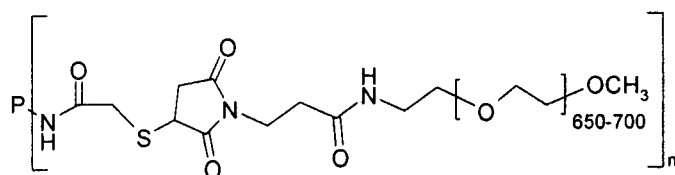
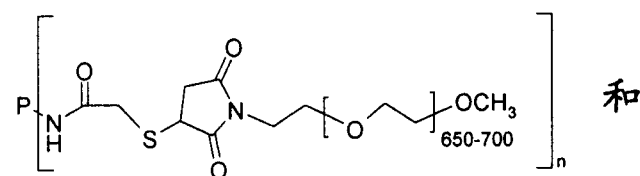


在本发明的最优选的实施方案中，促红细胞生成素缀合物通过下式表示：

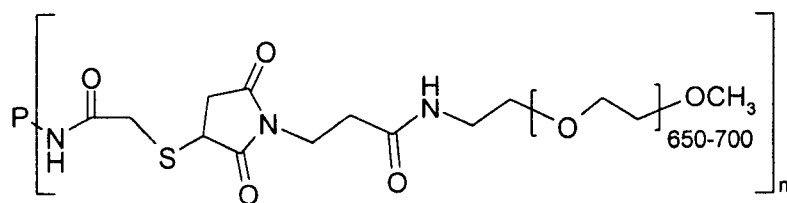


其中，在上式中 n 是 1 至 3 的整数； m 是 450 至 900 的整数； R 是低级烷基； X 是 $-(\text{CH}_2)_k-$ 或 $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$ ， P 是促红细胞生成素蛋白残基，其没有与 X 形成酰胺键的一个或多个氨基。

其他优选的促红细胞生成素糖蛋白产物通过下式表示：



更优选的促红细胞生成素糖蛋白产物通过下式表示：



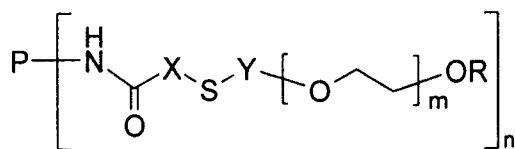
这些促红细胞生成素蛋白可以制备如下:

(a) 将式 $P-[NH_2]_n$ 表示的促红细胞生成素蛋白的氨基酸赖氨酸的 ϵ -氨基与式 $Z-CO-X-S-Q$ 表示的双功能试剂共价反应, 形成下式表示的具有酰胺键的中间产物:



其中 P 是少了形成酰胺键的氨基的促红细胞生成素蛋白; n 是 1 至 3 的整数; Z 是反应基, 例如羧基-NHS 酯; X 是 $-(CH_2)_k-$ 或 $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, 其中 k 是 1 至大约 10; Q 是保护基团, 像烷酰基, 例如乙酰基。

(b) 将来自步骤 (a) 的具有酰胺键的中间产物与式 $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ 代表的活化聚(乙二醇)衍生物共价反应, 形成下式代表的促红细胞生成素糖蛋白产物:

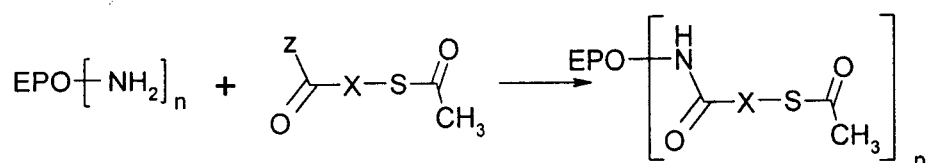


其中 W 是 Y 的巯基反应形式; m 是大约 450 至大约 900 的整数; R 是低级烷基; 并且 Y 如上面所定义。

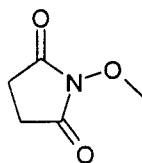
在该实施方案中, 双功能试剂优选地是 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯或 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯, Z 优选地是 N-羟基-琥珀酰

亚胺，活化聚(乙二醇)衍生物 $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ 优选选自碘代-乙酰基-甲氧基-PEG，甲氧基-PEG-乙烯砷以及甲氧基-PEG-马来酰亚胺。

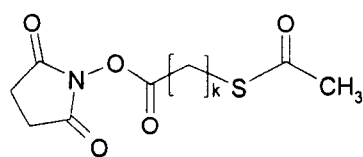
更详细地，将式(III)的促红细胞生成素蛋白通过巯基团与 EPO 的共价连接(“活化”)及将所得到的活化 EPO 与聚(乙二醇)(PEG)衍生物的缀合来制备。根据本发明，聚乙二醇化 EPO 制备的第一个步骤包括巯基团的共价连接(通过 EPO 的 NH_2 -基团)。EPO 的活化用带有受保护的巯基团及额外的反应基团的双功能试剂进行，例如分别是活化酯(例如琥珀酰亚胺酯)、酐、磺酸的酯、羧酸和磺酸的卤化物。该巯基团通过本领域已知的基团保护，例如乙酰基基团。这些双功能试剂能通过形成酰胺键而与氨基酸赖氨酸的 ϵ -氨基反应。该反应的第一个步骤如下所示：



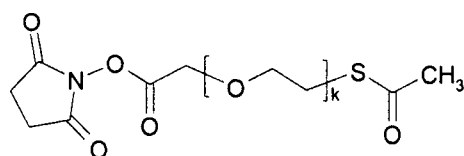
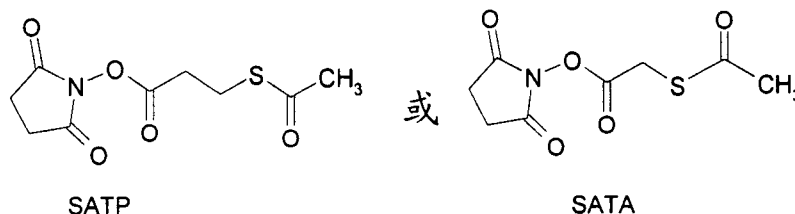
EPO、n 和 X 如上面所定义，Z 是本领域已知的反应基，例如下式的 N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)取代基：



在优选实施方案中，赖氨酸 ϵ -氨基的活化通过与具有琥珀酰亚胺部分的双功能试剂的反应进行。该双功能试剂可以带有不同的间隔基种类，例如 $(CH_2)_k$ - 或 $-CH_2-(O-CH_2-CH_2-)_k$ -部分，其中 k 是 1 至大约 10，优选地是 1 至大约 4，更优选地是 1 或 2，最优选地是 1。这些试剂的实例是 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯(SATP)和 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)



乙酰硫代烷基-羧基-NHS-酯，如同



2-(乙酰基硫代)-(乙氧基)_k-乙酸-NHS-酯

k 如上面所定义。

该双功能试剂的制备在本领域是已知的。2-(乙酰基硫代)-(乙氧基)_k-乙酸-NHS-酯 (2-(acetylthio)-ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-esters) 的前体描述于 DE-3924705 中, 而衍生为乙酰基硫代化合物描述于 March, J., *Advanced Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 1977, 375-376 中。SATA 可以商购 (Molecular Probes, Eugene, OR, 美国 和 Pierce, Rockford, IL)。

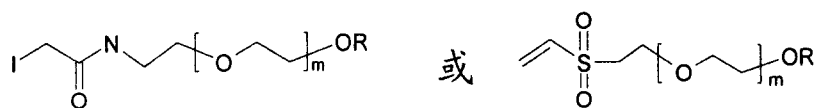
被添加到 EPO 分子上的巯基基团的数量可以通过调节反应参数来选择, 即蛋白质 (EPO) 浓度和蛋白质/双功能试剂的比率。优选地, EPO 通过每个 EPO 分子共价连接 1 至 5 个巯基基团来活化, 更优选地是每个 EPO 分子 1.5 至 3 个巯基基团。这些范围是指巯基基团在 EPO 蛋白总体中的统计学分布。

该反应在, 例如在 pH 6.5-8.0 的含水的缓冲溶液中进行, 例如在 10 mM 磷酸钾、50 mM NaCl、pH 7.3 中进行。双功能试剂可以加入到 DMSO 中。在反应完成后, 优选在 30 分钟后, 通过加入赖氨酸终止反应。过量的双功

能试剂通过本领域已知的方法分离，例如通过透析或柱过滤。添加到 EPO 中的巯基基团的平均数量可以通过光度测定方法确定，该方法描述于，例如 Grasetti, D.R. 和 Murray, J.F. 在 *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41—49 (1967) 中。

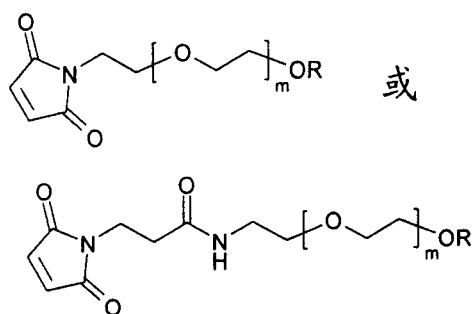
上述反应之后是已活化的聚(乙二醇)(PEG) 衍生物的共价缀合。合适的 PEG 衍生物是平均分子量为大约 20 至大约 40 kDa 的活化 PEG 分子，更优选地是大约 24 至大约 35 kDa 的活化 PEG 分子，最优选地是大约 30 kDa 的活化 PEG 分子。

活化的 PEG 衍生物在本领域是已知的且描述于，例如 Morpurgo, M. 等人针对 PEG-乙烯砜的 *J. Bioconj. Chem.* (1996) 7, 第 363 ff 页中。直链和支链 PEG 种类适合于制备式 1 的化合物。反应性 PEG 试剂的实例是碘代-乙酰基-甲氧基-PEG 和甲氧基-PEG-乙烯砜：

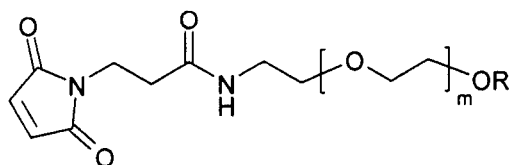


这些碘代-活化物质的应用在本领域是已知的且描述于，例如 Hermanson, G. T. 在 *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) 第 147-148 页中进行的描述。

更优选地，该 PEG 种类通过马来酰亚胺活化，使用(低级烷氧基-PEG-马来酰亚胺)，如甲氧基-PEG-马来酰亚胺 (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.)。低级烷氧基-PEG-马来酰亚胺的结构如下：



R 和 m 如上所定义的，优选地



巯基保护基团原位裂解之后，与低级烷氧基-PEG-马来酰亚胺的缀合反应在含水缓冲溶液中进行，所述含水缓冲溶液是例如 10 mM 磷酸钾、50 mM NaCl、2 mM EDTA、pH 6.2。保护基团的裂解可以如此进行，例如，在 25℃、pH 6.2 下与 DMSO 中的羟胺进行大约 90 分钟。对于 PEG 修饰，活化 EPO/低级-烷氧基-PEG-马来酰亚胺的摩尔比应该是大约 1: 3 至大约 1: 6，优选是 1: 4。反应通过加入半胱氨酸以及剩余的巯基 (-SH) 基团与 N-甲基马来酰亚胺或其他能形成二硫键的适当化合物的反应来终止。由于任何剩余的活性巯基基团与诸如 N-甲基马来酰亚胺的保护基团或其他合适的保护基团反应，本发明的缀合物中的 EPO 糖蛋白可能含有这类保护基团。通常，此处描述的过程将产生具有由不同数目的保护基团保护的、可变数目的巯基的分子混合物，这依赖于糖蛋白上不与 PEG-马来酰亚胺发生缀合的活化巯基基团的数目。

尽管当 N-甲基马来酰亚胺被用于封闭聚乙二醇化蛋白质上的剩余巯基基团时，其形成相同类型的共价键，但二硫化物化合物将以分子内硫化物/二硫化物交换反应导致封闭试剂的二硫桥连偶合 (bridged coupling)。用于该类型封闭反应的优选封闭试剂是氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、半胱氨酸和胱胺。尽管被引入聚乙二醇化蛋白质中的半胱氨酸没有额外的净电荷，但是使用封闭试剂 GSSG 或胱胺导致额外的负电荷或正电荷。

包括单-、二-和三-聚乙二醇化 EPO 种类分离的式 (III) 化合物的进一步纯化可以通过本领域已知的方法进行，例如柱层析。

聚乙二醇化的促红细胞生成素衍生物优选含有至少 90% 的单-PEG 缀

合物。通常，期望是促红细胞生成素糖蛋白的单-PEG 缀合物，这是由于它们易于具有比二-PEG 缀合物更高的活性。单-PEG 缀合物的百分比以及单-和二-PEG 种类的比率可以通过在洗脱峰值附近集中更宽的级分从而降低单-PEG 的百分比，或通过集中在洗脱峰值附近更窄级分从而增加组合物中单-PEG 的百分比来控制。大约 90% 的单-PEG 缀合物是产率和活性的良好平衡。有时，期望的组合物是其中例如至少 92% 或至少 96% 的缀合物是单-PEG ($n=1$) 的组合物。在本发明的一个实施方案中，其中 n 为 1 的缀合物的百分比是 90% 至 96%。

包含聚乙二醇化促红细胞生成素的药物组合物在本领域中是已知的且已描述于，例如国际专利申请 WO 01/87329 中。如上面所定义，每毫升这些组合物可以包含 10-10000 μg 促红细胞生成素蛋白。优选地，每毫升组合物包含 10-1000 μg ，例如 10、50、100、400、800 或 2500 μg 。进一步，每毫升这些组合物可以包含 10 μg -10000 μg 促红细胞生成素蛋白、10-200 mmol/l 硫酸盐、10-50 mmol/l 磷酸盐、pH 6.0 至 6.5。该组合物也可以包含高达 20 mM 的甲硫氨酸、1-5 % 的多元醇 (w/v)、高达 0.1% 的普流尼克 (pluronic) F68 (普流尼克 F68)(w/v) 以及任选地高达 1 mM 的 CaCl_2 。该组合物一个实例是每毫升包含 10 μg 至 10000 μg 促红细胞生成素蛋白、40 mmol/l 硫酸盐、10 mmol/l 磷酸盐、3% 甘露醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68(w/v)、pH 6.2。在另一个方案中，每毫升该组合物可以包含 10 μg 至 10000 μg 促红细胞生成素蛋白、10 至 100 mmol/l NaCl、10 至 50 mmol/l 磷酸盐、pH 6.0-7.0、任选地 1-5% (w/v) 的多元醇。进一步，该组合物可以包含高达 20 mM 的甲硫氨酸、高达 0.1% 普流尼克 F68 (w/v) 以及任选地 7.5 $\mu\text{mol/l}$ CaCl_2 。特别地，每毫升该组合物可以包含 10 μg 至 10000 μg 促红细胞生成素蛋白、100 mmol/l NaCl、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68 (w/v) 和 10 mmol/l 磷酸盐、pH 7.0。

本发明也涉及上述组合物，其每毫升包含 10 μg 至 10000 μg 促红细胞生成素蛋白、10 至 50 mmol/l 精氨酸、pH 6-pH 6.5、10 至 100 mmol/l 硫酸钠。此外，该组合物可以包含高达 20 mM 的甲硫氨酸、高达 0.1% 的普

流尼克 F68 (w/v)、任选地高达 1 mmol/l 的 CaCl_2 及任选地 1-5 % (w/v) 的多元醇。特别地, 每毫升该组合物可以包含 10 μg 至 10000 μg 促红细胞生成素蛋白、40 mmol/l 精氨酸、pH 6.2、30 mmol/l 硫酸钠、3 % 甘露醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68(w/v) 以及任选地 1 mmol/l CaCl_2 。

本发明的一个优选实施方案指包含如下成分的组合物: 10 至 10000 $\mu\text{g/ml}$ 促红细胞生成素, 优选为 25 至 2500 $\mu\text{g/ml}$ 促红细胞生成素, 及

a) 10 mM 磷酸钠/磷酸钾、100 mM NaCl、pH 7.0, 或

b) 10 mM 磷酸钠、120 mM 硫酸钠、pH 6.2, 或

c) 10 mM 磷酸钠、40 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、pH 6.2, 或

d) 10 mM 磷酸钠、40 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68 (w/v)、pH 6.2, 或

e) 40 mM 精氨酸、30 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、pH 6.2, 或

f) 40 mM 精氨酸、30 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68 (w/v)、pH 6.2。

在最优选的实施方案中, 这些组合物包含的促红细胞生成素蛋白的数量为 50、100、400、800 或 2500 $\mu\text{g/ml}$ 。该最优选的组合物包含 10 mM 磷酸钠、40 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68 (w/v)、pH 6.2; 或者包含 40 mM 精氨酸、30 mM 硫酸钠、3% 甘露糖醇 (w/v)、10 mM 甲硫氨酸、0.01% 普流尼克 F68 (w/v)、pH 6.2。这些组合物进一步的细节可以从 WO 01/87329 获知。

本发明也涉及用于治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的方法, 该方法包括施用有效量的如上面所定义的促红细胞生成素蛋白。进一步, 本发明涉及用于治疗慢性炎症性肠病中铁分布紊乱的药物, 其特征在于含有有效量的促红细胞生成素蛋白。慢性炎症性肠病的实例是, 例如节段性肠炎, 也被称作克隆病, 以及 *ulzerosa* 结肠炎。在上面所提及的方法和药物的内容中, 节段性肠炎是慢性炎症性肠病的优选形式。Ulzerosa 结肠炎是慢性

炎症性肠病的另一种优选形式。如上所述的优选方法和药物是其中促红细胞生成素蛋白是如上所定义的那些。

根据本发明，EPO 或 EPO 缀合物的比活性可以通过本领域已知的多种测定方法确定。本发明的纯化 EPO 蛋白的生物活性是通过注射将 EPO 蛋白施用给人类病人，导致与未注射的或对照组的实验对象相比，骨髓细胞中网织红细胞和红细胞的产生增加的生物活性。根据本发明获得和纯化的 EPO 蛋白或其片段的生物活性，可以通过根据 Annable 等人, Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112 和 Pharm. Europa Spec Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)的方法测试。用于测定 EPO 蛋白活性的另一种生物学测定法，即正常细胞毒性血性小鼠测定法 (normocythaemic mouse assay) 在本领域有所描述 (例如 Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2) 和 Ph. Eur. BRP.中的促红细胞生成素专论)。

参考下面的实施例，本发明将更加易于理解，这些实施例例证性地说明了本发明，但没有将本发明限制于此。

实施例

实施例 1

通过测定下述参数，检查一位患有 *ulzerosa* 结肠炎的中年妇女的铁分布紊乱，这些参数为 CRP (C 反应蛋白)、铁蛋白和可溶性运铁蛋白受体 - 正如 P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger 所描述的，海报出现在 AACC/CSCC, 2001 年 7 月 29 日-8 月 2 日的年会, Chicago, Illinois。这些结果表明了铁分布紊乱。该病人皮下使用 150/U kg Recormon™(市售的促红细胞生成素蛋白)进行治疗，每周两次，最多 12 周。然后，上述参数的测定表明铁质缺乏病症的改善。

实施例 2

通过测定下述参数，检查一位患有节段性结肠炎的中年妇女的铁分布紊乱，这些参数为 CRP (C 反应蛋白)、铁蛋白和可溶性运铁蛋白受体-正如

P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger 所描述的, 海报出现在 AACC/CSCC, 2001 年 7 月 29 日-8 月 2 日的年会, Chicago, Illinois。这些结果表明了铁分布紊乱。该病人皮下使用 150/U kg Recormon™(市售的促红细胞生成素蛋白)进行治疗, 每周两次, 最多 12 周。然后, 上述参数的测定表明铁质缺乏病症的改善。

(1) 基本信息:

(i) 申请人:

- (A) 姓名: 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司 (F. Hoffmann-La Roche AG)
 (B) 街道: 格兰扎克尔街124号 (124 Grenzacherstrasse)
 (C) 城市: 巴赛尔 (Basle)
 (E) 国家: 瑞士
 (F) 邮政编码 (ZIP): CH-4070
 (G) 电话: (61) 688 11 11
 (H) 电传: (61) 688 13 95
 (I) 电报: 962 292 hlr ch

(ii) 发明名称: 新药物组合物

(iii) 序列数: 2

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
 (B) 计算机: IBM PC 兼容
 (C) 操作系统: WORD
 (D) 软件: PatentIn 版本 2.0

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 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> 智人

<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

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

图 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

图 2