(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2012 年 12 月 20 日 (20.12.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/171429 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/555 (2006.01) *C08G 65/00* (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/075935

(22) 国际申请日: 2012 年 5 月 23 日 (23.05.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110158633.1 2011 年 6 月 14 日 (14.06.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **王亚里 (WANG, Yali)** [CA/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **吕爱锋 (LU, Aifeng)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **孙长安 (SUN, Changan)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **王瑞军 (WANG, Ruijun)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **李蕴波 (LI, Yunbo)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **房雷 (FANG, Lei)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **徐刚 (XU, Gang)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: **北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.)**; 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2012/171429 A1

(54) **Title**: POLYETHYLENE GLYCOL-INTERFERON CONJUGATE

(54) **发明名称** : 一种聚乙二醇干扰素偶联物

(57) **Abstract**: Disclosed are a polyethylene glycol-interferon conjugate, a preparation method thereof, and a pharmaceutical composition containing a therapeutically effective amount of the interferon conjugate and use thereof in the preparation of anti-viral, anti-tumour and immunomodulatory drugs.

(57) **摘要**: 本发明公开了一种聚乙二醇干扰素偶联物，其制备方法，以及含有治疗有效量的该干扰素偶联物的药物组合物，及其在制备抗病毒、抗肿瘤、免疫调节药物中的用途。

一种聚乙二醇干扰素偶联物

技术领域

本发明涉及一种聚乙二醇干扰素偶联物，该偶联物通过一种新颖的生物蛋白分子的聚乙二醇修饰技术合成，具有抗病毒感染、抗肿瘤、免疫调节等生物学活性，本发明的应用领域涉及生物化学、药物化学以及人类疾病的治疗。

背景技术

干扰素 (Interferon) 是一组具有多种功能的活性蛋白质，是一类重要的家族性细胞因子，具有广谱的抗病毒、抗细胞增殖、和免疫调节作用。哺乳动物的干扰素可以分为 α、β、γ、ω 等几种类型，其中 α 干扰素又可分十余种亚型，经大量临床研究证明 α 型干扰素是一种重要的抗病毒和抗肿瘤治疗药物。目前我国在临床使用最广泛的主要是重组人干扰素 α1b、α2b 和 α2a。另外，美国 Amgen 公司根据 13 种 α 型干扰素的基因序列同源性，设计出的一种全新的蛋白质工程药物干复津 (INFERGEN®，IFN-Con-1) 于 1997 年经 FDA 批准上市用于治疗丙型肝炎，其病毒活性是 α2b 干扰素的 5～10 倍。

但是，一般来说，许多有生物技术(如基因重组)表达所得的产品，包括干扰素，都是通过非肠道给药途径而进入生物体内发挥其药效作用。此类由非肠道给药的生物大分子药物产品通常存在下面的一些问题：(1) 生物大分子药物往往具有致敏性反应，生物体内产生的抗体会对生物体造成严重的伤害并影响治疗的进行；(2) 生物大分子药物本身因受到抗体的影响或因蛋白分解酶而引起的代谢作用，致使其生物半衰期大为缩短；(3) 生物大分子的稳定性差，保存困难。所以，无论是干扰素 α1b、α2b 和 α2a 还是干复津，作为蛋白质药物，由于稳定性差，血浆清除率高，体内半衰期短，易产生抗原抗体反应等，在临床治疗中受到很大的限制，这些缺点造成的结果是：需频繁注射干扰素才能达到有效的血浆治疗浓度；而且，每次注射后均会导致血液浓度的较大波动，形成药物浓度的峰值与谷值。这样就可能增加了治疗费用以及给药不便和不良反应的风险。因此，人们试图采用各种

药物传递技术 (Drug Delivery Technology)，来提高蛋白质药物的疗效。而目前在药物传递技术中研究最为广泛的是聚乙二醇修饰技术(PEGNOLOGY)。

1980 年，Davis 等人在美国专利 4,179,337 中公开了利用单一分子不同聚合度的聚乙二醇对蛋白药物进行的化学修饰，在保持药物的生物活性同时，药物的抗原性降低，Verones 等人在 Applied Biochem and Biotech 11,142(1985)上公开发表了用氯甲酸苯酯活化的聚乙二醇修饰核糖核酸酶和超氧化物歧化酶，增加了蛋白的生物半衰期。上述现有技术文献报导已表明聚乙二醇修饰技术的确可以解决非肠道给药生物大分子药物存在的一些问题。

目前，市场上已经有两种聚乙二醇化干扰素产品，分别是 Schering Plough 公司的 PEG-IFNα2b (PEG-INTRON) 与 Hoffman-la Roche 公司的 PEG-IFNα2a (PEGASYS)，提高了干扰素在体内的半衰期，达到每周注射一次，使得干扰素的生物利用度得到了一定程度的提升。这两个产品已占有国外干扰素市场 60%，获得了巨大的经济效益。

发明内容

本发明的目的在于提供一种生物学活性更好、生物利用度更高的的聚乙二醇修饰的干扰素偶联物，其结构如式（Ⅰ）所示：

$$P\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}X\text{-}S\text{-}Y\text{-}Q$$

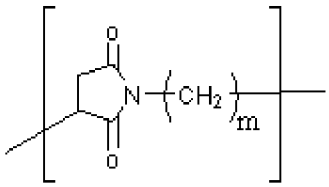
（Ⅰ）

其中，P 是干扰素，包括所有类型的干扰素，以及这些类型所有的亚类，以及不同类型和/或亚类干扰素组成的复合干扰素；P 可以是任何来源的，包括天然来源、组织培养或由基因重组技术得到的干扰素；P 优选天然的或人工重组的干扰素蛋白，更优选重组人干扰素，更优选重组人干扰素 α、β、γ 或 ω，最优选 α2b；P 既可通过本领域公开的技术制得，也可在市场上购得；

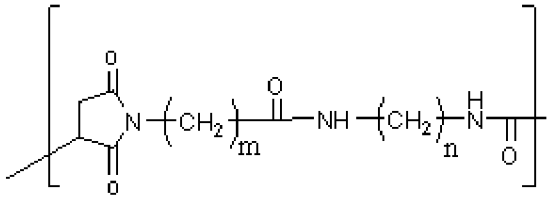
X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 选自 2～10 的整数，优选 1～4，进一步优选为 2；

Q 为甲氧基聚乙二醇，其平均分子量优选 5,000～40,000 道尔顿，更优选 20,000 道尔顿；

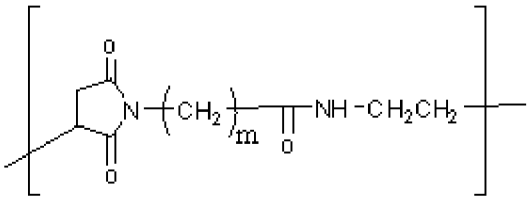
Y 选自 Y1～Y12，其中，m、n 各自独立地选自 2～10 的整数，优选为 2，



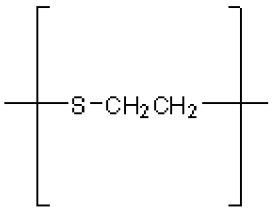
Y1



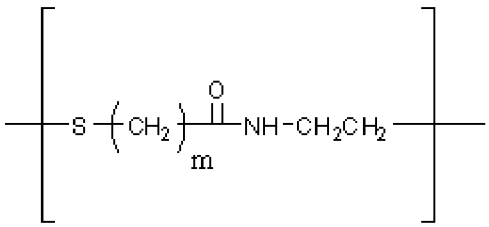
Y2



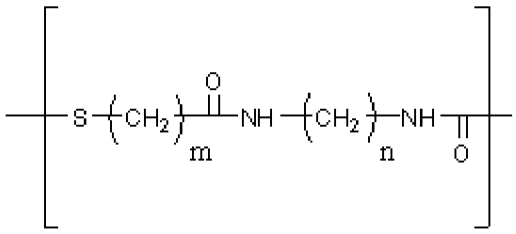
Y3



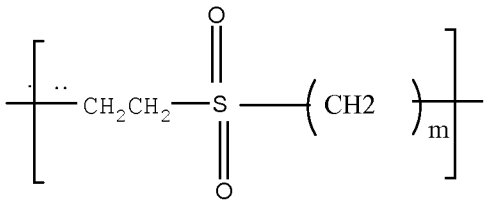
Y4



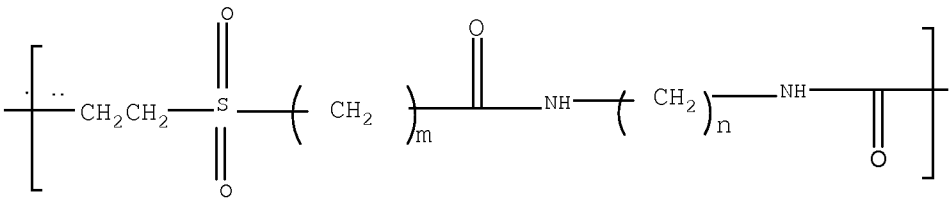
Y5



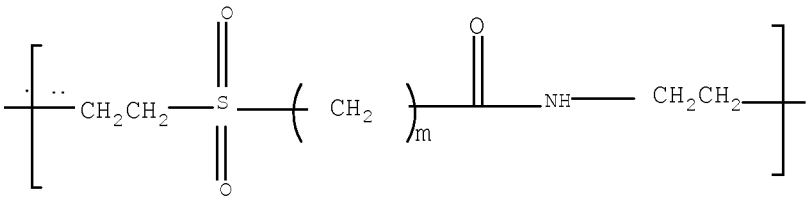
Y6



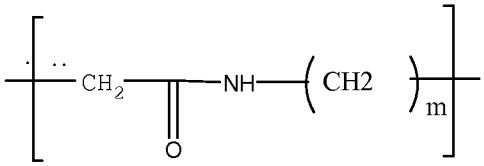
Y7



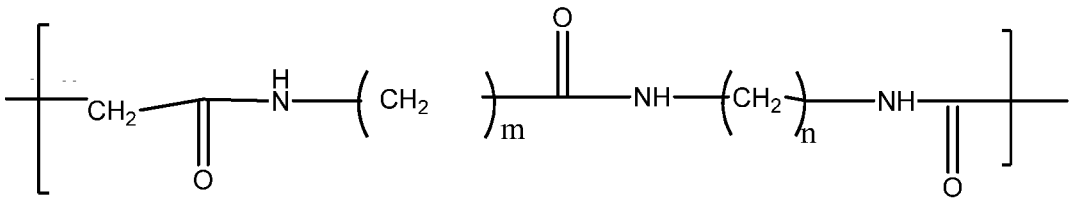
Y8



Y9

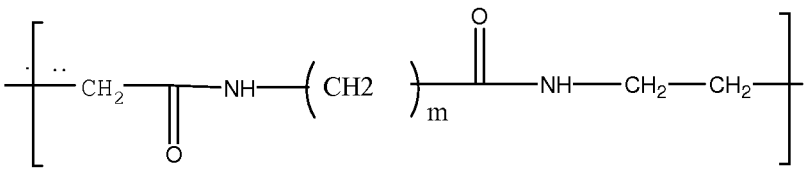


Y10



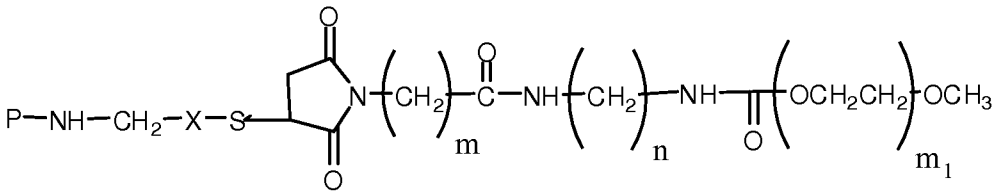
Y11

或



Y12。

具体而言，本发明提供一种结构通式为（Ⅱ）的偶联物：

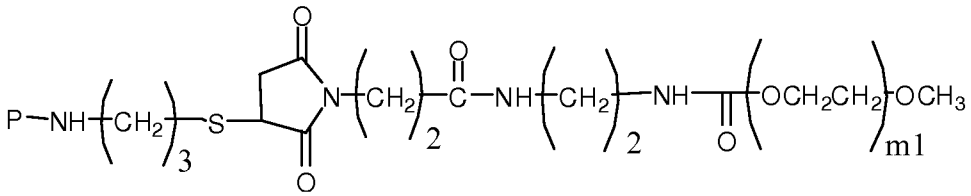


（Ⅱ）

其中 P 是指干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m、n 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

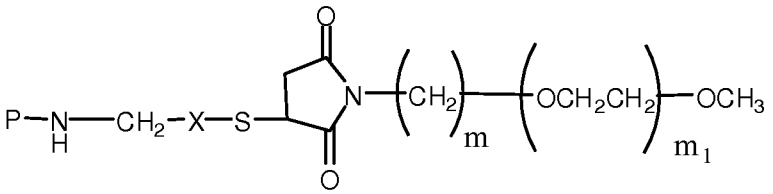
其中 X 优选为-$(CH_2)_k$-，k 的数目可进一步优选自 1～4，最优选的是 2。

对上述优选实施方案进一步优选，本发明还提供了最优选的一个实施方案，对应的结构式为：



m_1 选自 450～600 的整数，其中 P 是指干扰素，可进一步优选重组人干扰素，再优选重组人干扰素 α，最优选重组人干扰素 α2b。

本发明还提供一种结构通式为 (III) 的偶联物：

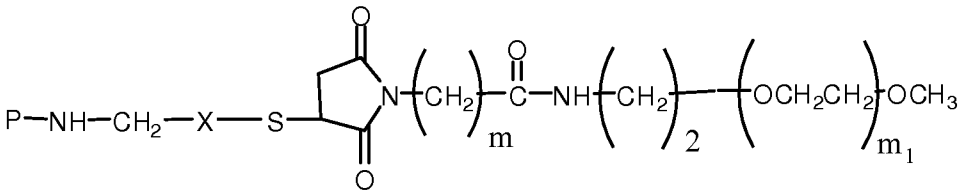


(III)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式 (III) 进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为 (Ⅳ) 的偶联物：

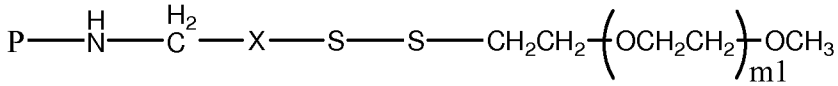


(Ⅳ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式 (Ⅳ) 进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为（Ⅴ）的偶联物：

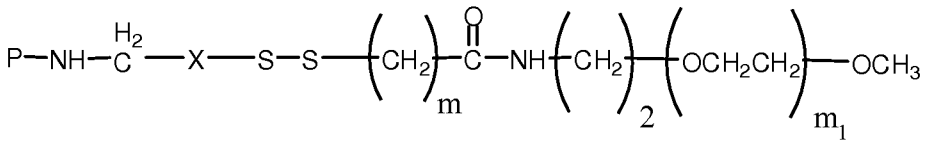


(Ⅴ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构通式为（Ⅴ）的偶联物进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为 (Ⅵ) 的偶联物：

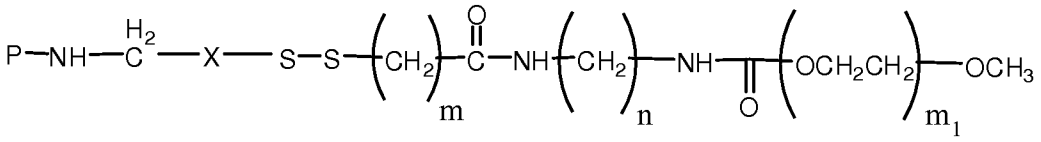


(Ⅵ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式 (Ⅵ) 进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2，m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为 (Ⅶ) 的偶联物：

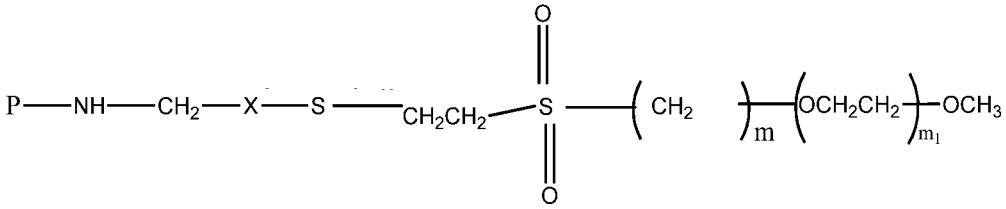


(Ⅶ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m、n 的数目各自独立地选自 2～10 的整数，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构通式为 (Ⅶ) 的偶联物进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m、n 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为(Ⅷ)的偶联物：

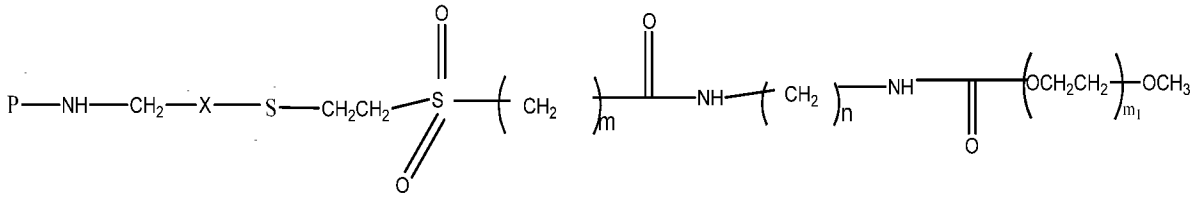


(Ⅷ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式 (Ⅷ) 进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为 (Ⅸ) 的偶联物：



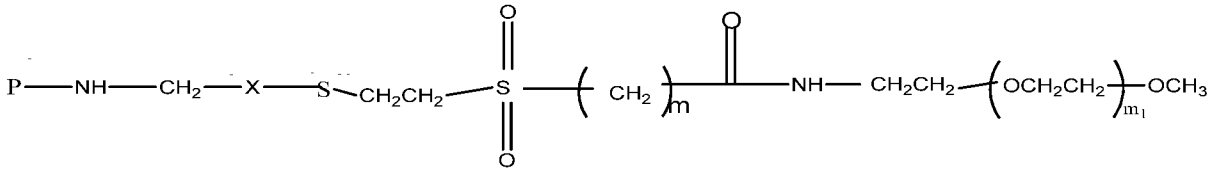
(Ⅸ)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m，n 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式 (Ⅸ) 进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时

满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m，n 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为（X）的偶联物：

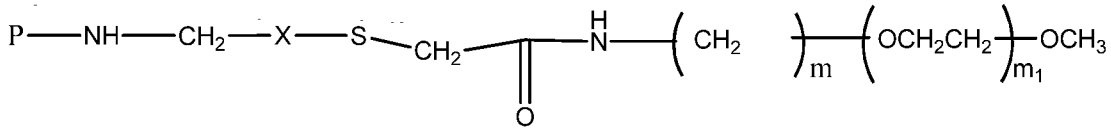


（X）

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10， m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构通式为（X）的偶联物进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2， m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为（XI）的偶联物：

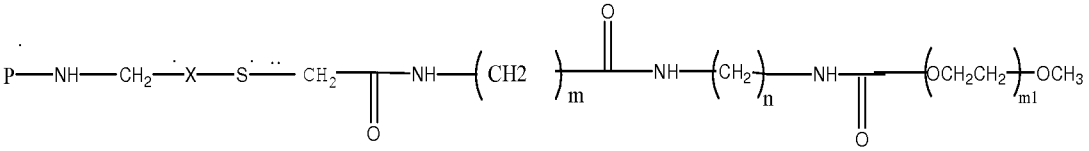


（XI）

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m 的数目选自 2～10，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构式（XI）进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2，m_1 选自 450～600 的整数。

本发明还提供一种结构通式为（XII）的偶联物：

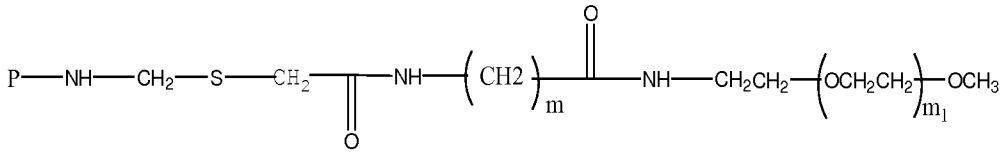


（XII）

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m、n 的数目各自独立地选自 2～10 的整数，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构通式为 (XII) 的偶联物进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m、n 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

发明还提供一种结构通式为 (XIII) 的偶联物：



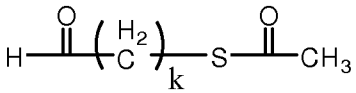
(XIII)

其中 P 是指重组人干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 的数目选自 1～10，m、n 的数目各自独立地选自 2～10 的整数，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

对结构通式为 (XIII) 的偶联物进一步优选，所对应的最优选实施方案需要同时满足以下条件：P 是指重组人干扰素 α；X 是-$(CH_2)_k$-，其中 k 是 2；m、n 的数目选自 2；m_1 选自 450～600 的整数。

本发明的又一目的在于提供一种制备所述干扰素偶联物的方法，该方法主要包括两个阶段：首先是干扰素和含有已保护巯基的醛类物质反应，形成通过-NH-CH_2-键连接的活化干扰素蛋白；然后，所述活化的干扰素脱保护，与活性甲氧基聚乙二醇衍生物偶联，通过分离而得到。具体而言，其步骤包括：

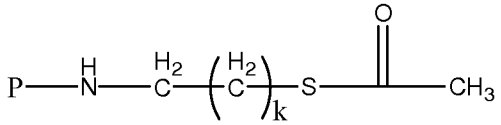
(1) 制备结构通式为 (XIV) 的小分子醛化合物：



(XIV)

其中 k 的数目选自 2～10，优选 2；

(2) 将结构通式为 (XIV) 的小分子醛化合物与干扰素在缓冲液里反应，并加入还原剂得到结构通式为 (XV) 的活化干扰素；

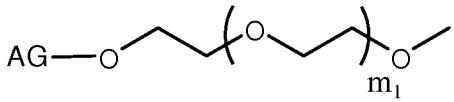


(XV)

其中 P 是指干扰素，优选重组人干扰素 α2b，缓冲液的 pH 选自 4.0～7.0，优选 4.5，还原剂可以是硼氰化钠、氰基硼氰化钠，优选氰基硼

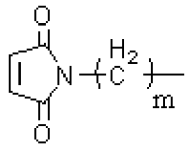
氰化钠；

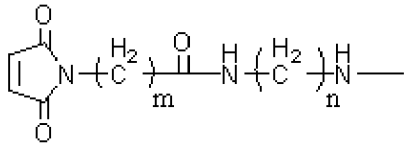
(3) 利用本领域公知的技术在含有活化干扰素的缓冲液里加入脱保护剂脱去结构通式为（XV）的活化干扰素的乙酰基保护基，随后加入结构通式为（XVI）的活化甲氧基聚乙二醇进行聚乙二醇化反应，

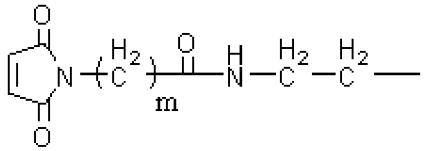


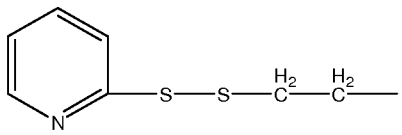
(XVI)

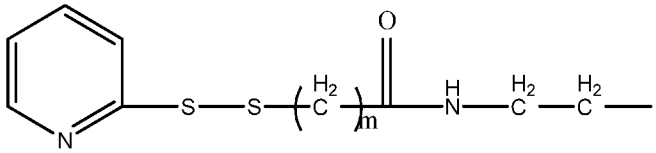
其中加入的脱保护剂优选羟胺；缓冲体系的 pH 选自 5.0～7.0，优选 pH6.2；AG 选自：

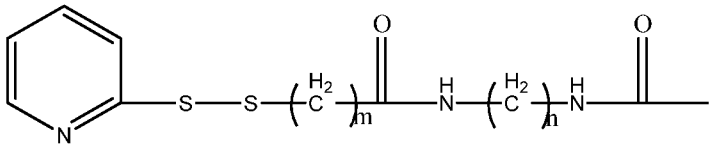


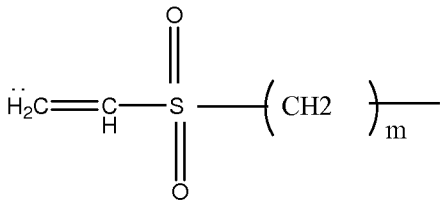


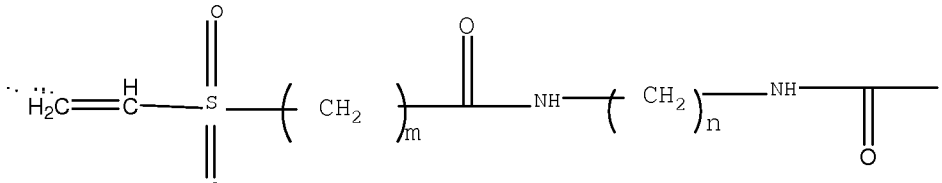


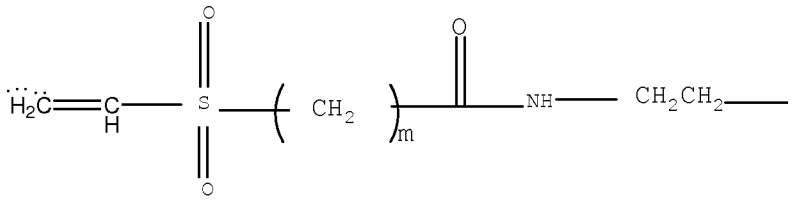


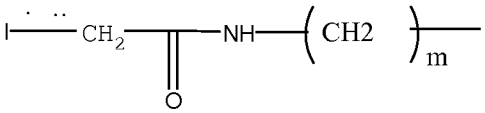


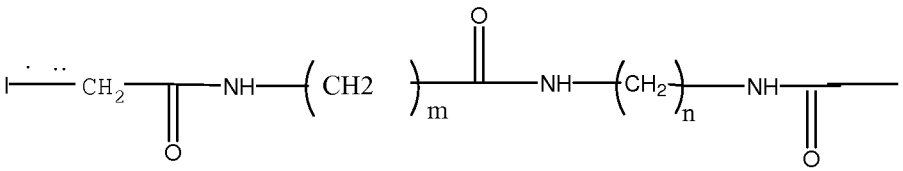


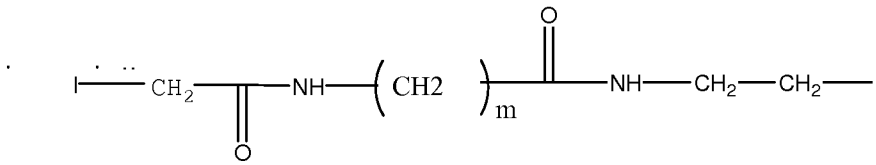












其中 m、n 的数目选自 2～10，优选 2；

(4) 聚乙二醇干扰素偶联物的纯化方法采用本领域技术人员公知的技术，如离子交换层析、凝胶层析。

本发明制备所述干扰素偶联物的方法中，结构通式为 (XⅣ) 的小分子醛化合物可按文献公开的已知方法制备，如 US4338435。

本发明的又一目的在于提供一种含有该被修饰的干扰素偶联物的药物组合物，其包含：(1) 本发明所提供的治疗量的聚乙二醇化干扰素偶联物；(2) 药学可接受的药物载体。本发明提供的干扰素偶联物可以通过本领域公知的方法用药学可接受载体或赋形剂制成适合注射的药物组合物，欲使用的药物组合物可制成制剂，并按与合适的医疗惯例一致的方式给药。本发明的化合物可以在含有 132 mM 氯化钠的 l0 mM 磷酸钠 / 钾缓冲液 pH7 中配制。任选地，药物组合物可以含有防腐剂。药物组合物可以含有不同量的干扰素，例如 10-1000 微克 / 毫升，例如 50 微克或 400 微克。

进一步，本发明的目的在于提供所述干扰素偶联物以及含有它们的药物组合物在制备抗病毒感染、抗肿瘤、免疫调节药物中的用途。上述疾病具体包括：慢性乙型肝炎、丙型肝炎和戊型肝炎等；病毒性疾病如带状疱疹、扁平和尖锐湿疣、乳头瘤病毒感染、流行性出血热和小儿呼吸道合胞病毒肺炎等；恶性肿瘤如毛细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、黑色素瘤、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、直肠癌、肝癌、肺癌等。

干扰素或本发明提供的聚乙二醇干扰素偶联物的生物活性可由宿主细胞致病效应测试法的颜色反应而确定。宿主细胞致病效应(CytoPathic Effect,or CPE)测试法系由 Foti 提出(Methods in Enzymology,119,533,198)。本法利用人类宿主细胞经干扰素处理后产生抵抗病毒感染的活性而能防止细胞病变死亡的原理设计而成的一种简易快捷的颜色吸收反应测试方法。简单而言，宿主细胞在经干扰素处理后可抵抗病毒入侵因而可防止宿主细胞死亡。干扰素的抗病毒生物活性即可经由存活细胞所吸收的染料而直接定量测量。由此而来的采用细胞病变抑制法通过 WISH-VSV 系统测定干扰素的体外抗病毒活性，是本技术领域公知的方法，具体参照 2005 版《中华人民共和国药典》三部附录ⅩC“干扰素的生物活性测定”。

通过对本发明提供的聚乙二醇干扰素偶联物的测试数据表明：本发明提供的聚乙二醇干扰素偶联物可以达到修饰干扰素 α2b 分子表面氨基酸的目的且保留较多的干扰素 α2b 的生物活性并提供良好的药代特性。

在本发明所提供的化合物中，干扰素与连接体以-NH-CH_2-键形式连接，由此增强了 PEG 修饰反应的专一性。

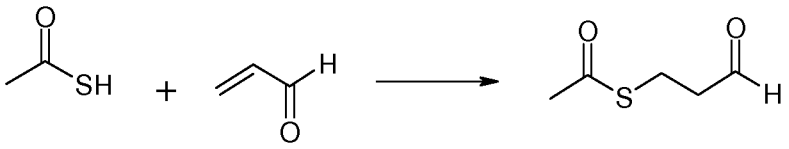
附图说明

图 1 是食蟹猴单次皮下给药相同剂量 HH-IFN-003 与 PEG-IFNα-2b（PegIntron，先灵葆雅）后的血清抗原浓度-时间变化比较图。

图 2 是食蟹猴单次皮下给药 10 μg·kg-1 HH-IFN-003 及 PegIntron 后血清抗病毒活性-时间变化的比较图。

具体实施方式

实施例 1：乙酰基巯基丙醛的制备

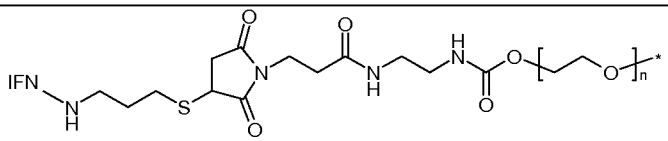
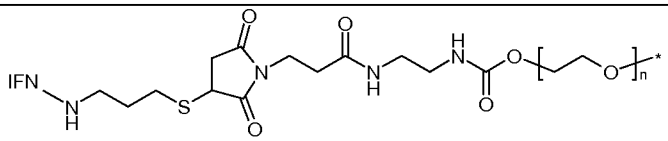
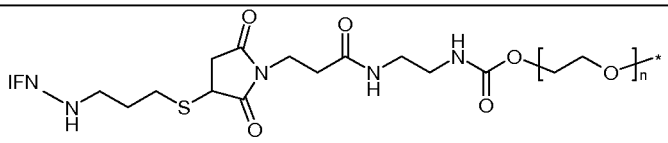


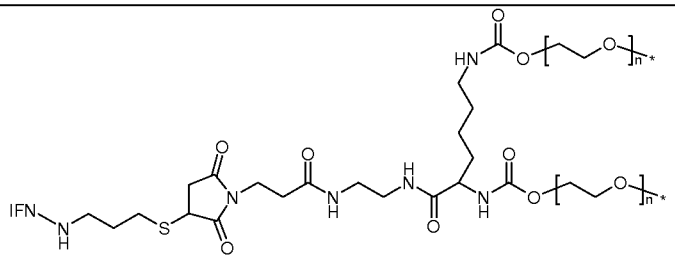
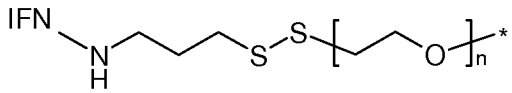
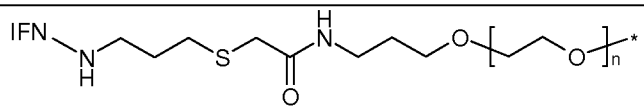
将 11.2 g (0.2mmol) 丙烯醛与干燥的 100 ml THF 加入到反应瓶中，冷却至 0℃，然后缓慢滴加 1.52 g (0.02 mol) 硫代乙酸/20 ml THF 的混合溶液。滴加完毕保温反应 2 小时后。35℃减压浓缩除去过量的丙烯醛。然后快速上柱 (洗脱液纯正己烷→正己烷/乙酸乙酯=50/1)，合并收集产物点，减压浓缩至干得油状液体 0.6 g。

实施例 2：活化干扰素的制备

取 600 mg 干扰素 α2b (来自上海恒瑞医药有限公司)，蛋白浓度为 1.0 mg/ml，共 600 ml，体系为 0.1 M 乙酸缓冲液，pH 4.5；取 39.6 mg 乙酰基巯基丙醛溶于 400 ul 乙腈后加入以上蛋白溶液；再称取 756 mg 氰基硼氢化钠加入上述反应液，并慢速搅拌反应，冰浴控制反应温度在 10°C，反应 4 小时；然后将反应液转入透析袋 (截留分子量 3500)，对 0.1 M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH 6.25 进行透析，以除掉过量的小分子醛，然后再加入羟胺脱去乙酰基，得活化干扰素。

说明：以下实施例（3~8）为将实施例 2 得到的活化干扰素用活性聚乙二醇修饰，并得到聚乙二醇干扰素的过程。目标物的代号及结构示意图见下表，其中 IFN 是活化干扰素 α2b：

代号	结构	备注
HH-IFN-001		PEG 分子量为 5kD
HH-IFN-002		PEG 分子量为 10kD
HH-IFN-003		PEG 分子量为 20kD

HH-IFN-004		PEG 分子量为 40kD
HH-IFN-005		PEG 分子量为 20kD
HH-IFN-006		PEG 分子量为 20kD

实施例 3：HH-IFN-001 的制备

通过实施例 2 得到的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1 M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH 6.25)，加入 0.25 g mPEG-马来酰胺 (5kD，来自 SUNBIO)， 搅拌反应 60 分钟；再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-001)，约 17.5mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 24.6KD。

实施例 4：HH-IFN-002 的制备

向实施例 2 得到的含有游离巯基的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH 6.25)，加入 0.5 g mPEG-马来酰胺 (10kD，来自 SUNBIO)，搅拌反应 60 分钟；再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-002)，约 15.3 mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 29.9KD。

实施例 5：HH-IFN-003 的制备

向实施例 2 得到的含有游离巯基的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH6.25)，加入 1.0 g

mPEG-马来酰胺 (20kD，来自 SUNBIO), 搅拌反应 60 分钟；再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-003)，约 16.0 mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 40.3KD。

实施例 6：HH-IFN-004 的制备

向实施例 2 得到的含有游离巯基的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1 M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH6.25)，加入 2.0 g mPEG-马来酰胺 (40kD，来自 SUNBIO)，拌反应 60 分钟，再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-004)，约 14.5 mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 60.1KD。

实施例 7：HH-IFN-005 的制备

向实施例 2 得到的含有游离巯基的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2mM EDTA，pH 6.25)，加入 1.0g mPEG-邻吡啶基-二硫化物 (20KD，来自 SUNBIO)，搅拌反应 60 分钟，再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-005)，约 16.0 mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 41.0KD。

实施例 8：HH-IFN-006 的制备

向实施例 2 得到的含有游离巯基的 100 mg 活化干扰素 α2b (1.0 mg/ml，0.1 M 磷酸钠盐缓冲液，含 2 mM EDTA，pH 6.25)，加入 1.0g 碘乙酰胺-mPEG (20KD，来自 NOF CORPORATION)，搅拌反应 60 分钟，再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5 mM，室温反应 30 分钟，以

反应掉蛋白上剩余的巯基；然后将反应液透析至 20 mM 乙酸缓冲液体系。

反应液使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 纯化，得到聚乙二醇化干扰素 (HH-IFN-006)，约 16.5 mg，经 MALDI-TOF-MS 检测分子量为 39.8KD。

实施例 9：干扰素 α2b 及 6 种聚乙二醇干扰素偶联物的体外抗病毒活性测试

采用细胞病变抑制法通过 WISH-VSV 系统测定干扰素体外抗病毒活性。

本实施例测定了 7 种干扰素 (或衍生物) 的体外抗病毒活性，具体包括：IFNα2b (上海恒瑞医药股份有限公司提供)、HH-IFN-001 (本发明实施例 3 制备)、HH-IFN-002 (本发明实施例 4 制备)、HH-IFN-003 (本发明实施例 5 制备)、HH-IFN-004 (本发明实施例 6 制备)、HH-IFN-005 (本发明实施例 7 制备)、HH-IFN-006 (本发明实施例 8 制备)。体外抗病毒活性测定结果见表 1：

表 1 体外抗病毒活性测定结果

名称	比活($\times 10^8$IU/mg)	活性保留(%)
IFNα2b	1.18	/
HH-IFN-001	0.18	15%
HH-IFN-002	0.15	13%
HH-IFN-003	0.13	11%
HH-IFN-004	0.08	7%
HH-IFN-005	0.12	10%
HH-IFN-006	0.11	9%

表 1 中数据显示，本发明所提供的聚乙二醇干扰素 α2b 偶联物与修饰前的干扰素 α2b 相比，仍保留有约 7-15%的抗病毒活性。

实施例 10：食蟹猴单次皮下给药受试品 HH-IFN-003 和参比品 PegIntron 后的血清抗原浓度和药代动力学比较实验

用 Hu-IFN-α ELISA 药盒可以测定血清中受试品 HH-IFN-003 和参比品 PegIntron 的浓度。Hu-IFN-α Immunoassay 是一种放大的双夹心抗体免疫分析法，试验操作步骤遵照药盒说明书，96 孔板预先用

IFN-α的单抗包被，分别加入受试品 HH-IFN-003 和参比品 PegIntron, 孵育一定时间，洗板，加抗体稀释液，封板，室温孵育，再洗板，另加入携有 HRP（辣根过氧化物酶）耦合物，封板，室温孵育，彻底洗板，最后加入显色底物室温避光孵育直到出现颜色；加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450 nm 波长处的光吸收值。光吸收值的对数值与样品中 HH-IFN-003 和 PegIntron 的浓度对数值呈正相关，对浓度对数和光吸收值对数进行双对数线性回归，绘制标准曲线，计算未知样品浓度。

实验结果：与单次皮下给药先灵葆雅公司参比品组 PegIntron，10 μg·kg-1 相比，HH-IFN-003 受试品组各时间点血清抗原浓度在数值上均大于 PegIntron 组（见图 1），AUC(0-96h)，和 AUC(0-inf)均高于 PegIntron 组，药代动力学参数见表 2。表面单次皮下给药后，HH-IFN-003 的体内暴露量要高于 PegIntron。

表 2 食蟹猴单次皮下注射受试品 HH-IFN-003 与 PegIntron 药代动力学参数比较

参 数	单位	受试品 HH-IFN-003 $10\mu g\cdot kg^{-1}$	PegIntron $10\ \mu g\cdot kg^{-1}$
$AUC_{(0-96h)}$	$ng\cdot h\cdot mL^{-1}$	1167.0 ±146.5	782.9 ±304.2
$AUC_{(0-inf)}$	$ng\cdot h\cdot mL^{-1}$	1187.3 ±146.1	803.2 ±304.4

实施例 11：食蟹猴单次皮下给药 10 $\mu g\cdot kg^{-1}$ HH-IFN-003 及 PegIntron 后血清抗病毒活性比较实验

PEG-IFNα-2b与IFNα-2b活性测定方法采用细胞病变抑制试法（CPE法），以WISH细胞作为病毒的宿主细胞（易感细胞），细胞受到病毒感染攻击后会产生细胞病变效应（CPE），细胞发生病变，死亡，并从培养皿底部脱落。在抗病毒活性药物的干预下，未发生病变的细胞附着在培养皿上，利用结晶紫染料，可使活细胞染色，再用脱色液将染料脱出，通过测定其OD值来反映细胞附着在培养皿上的存活状态。

将处于对数生长期的WISH细胞消化，用含10％FBS的MEM培养液调整细胞浓度，接种于96孔培养板中，37℃，5％CO2，孵育24小时。以PBS清洗后，分别加入以2％FBS的MEM培养液稀释调配的含有受试品HH-IFN-003或参比品PegIntron的血清样本，每个浓度设三复孔，并设无药物对照孔，继续培养24小时。加入以2％FBS的MEM培养液稀释调配的100倍TCID50（50%细胞感染量）的病毒，并设无病毒感染正常细胞孔和病毒感染对照组，继续培养24小时，中性红染色后甲醛固定，洗涤后用脱色液溶解，在540nm处得到吸光度(OD)值。根据不同稀释度的待测样品抵抗病毒感染发生的细胞病变(CPE)的保护能力，计算出干扰素抵抗病毒感染抑制率（%），并得到半数有效保护浓度（EC50）。

实验结果：食蟹猴单次皮下给药 $10\mu g\cdot kg^{-1}$ HH-IFN-003后各时间点血清抗病毒活性的绝对值高于同剂量的PegIntron。见表3、图2。这个结果表明，由于HH-IFN-003血药浓度要高于同剂量的PegIntron，因此其体内的抗病毒药效也优于PegIntron。

表 3 食蟹猴皮下给药单剂量 PegIntron 以及 HH-IFN-003 后血清抗病毒活性-时间变化的比较

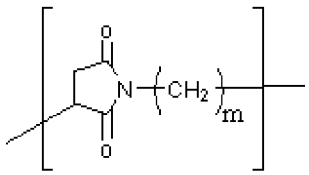
时间点	抗病毒活性 ($IU\cdot mL^{-1}$)	
	10 $\mu g.kg^{-1}$ HH-IFN-003	10 $\mu g.kg^{-1}$ PegIntron
0	ND	ND
4	184.7±89.7	164.7±36.9
12	223.0±132.4	210.7±30.9
24	180.7±113.4	122.7±17.9
48	24.0±12.0	19.7±7.4
96	5.0±1.0	3.3±3.2

权利要求书

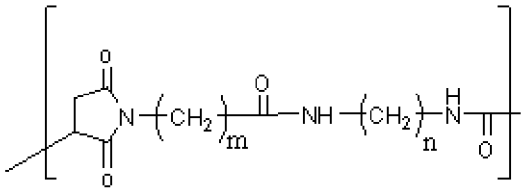
1、一种结构如式(I)所示的干扰素偶联物，

$$P\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}X\text{-}S\text{-}Y\text{-}Q \quad (I)$$

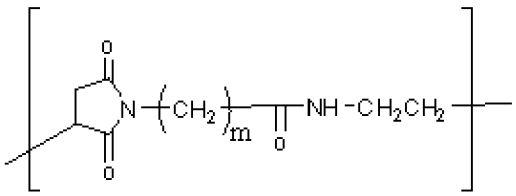
其中，P 是干扰素；X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 选自 1～10 的整数；Q 是甲氧基聚乙二醇；Y 选自 Y1～Y12：



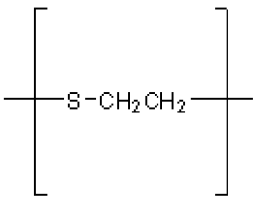
Y1



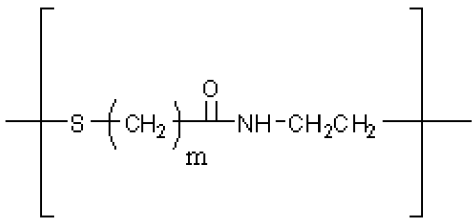
Y2



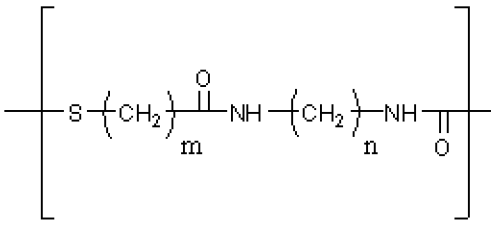
Y3



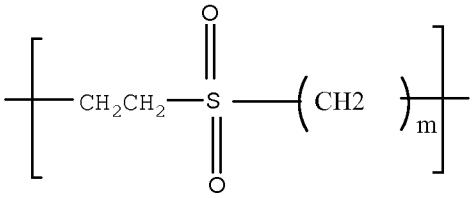
Y4



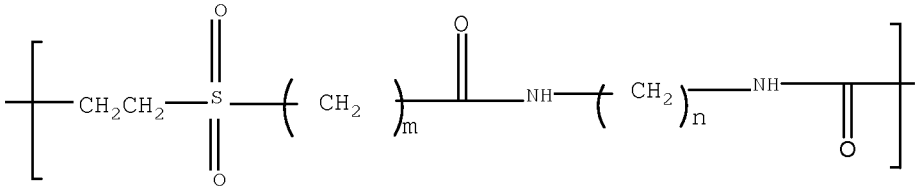
Y5



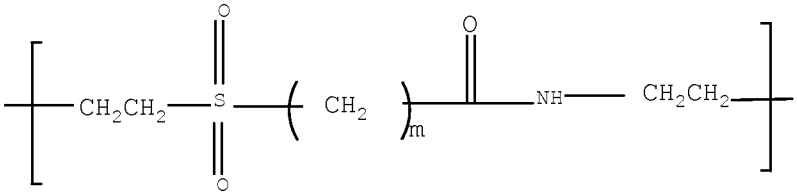
Y6



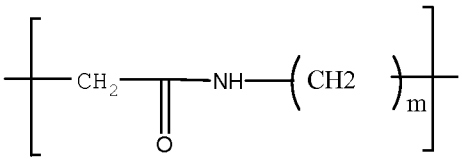
Y7



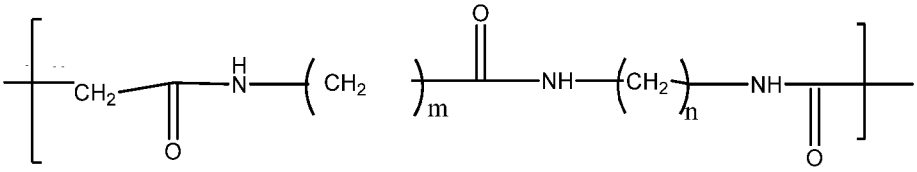
Y8



Y9

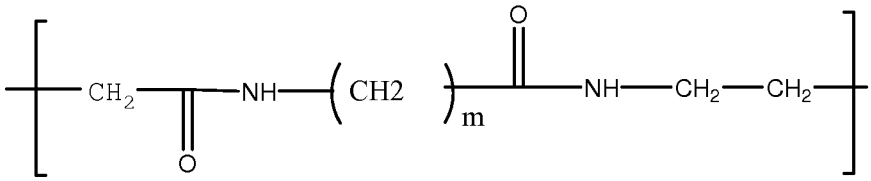


Y10



Y11

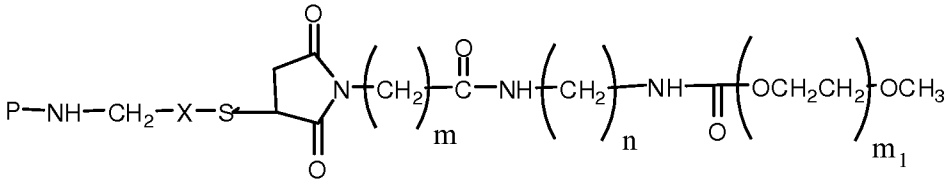
或



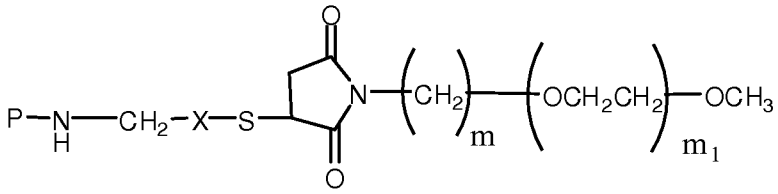
Y12

其中 m、n 各自独立地选自 2～10 之间的整数。

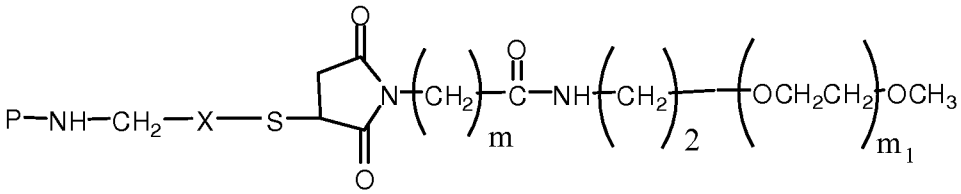
2、根据权利要求 1 所述的干扰素偶联物，其特征在于，所述偶联物选自式 (Ⅱ)～(ⅩⅢ) 所示化合物：



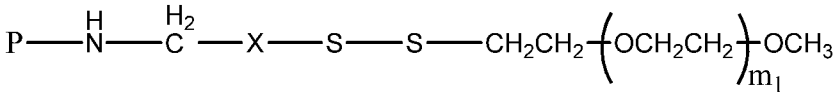
(Ⅱ)



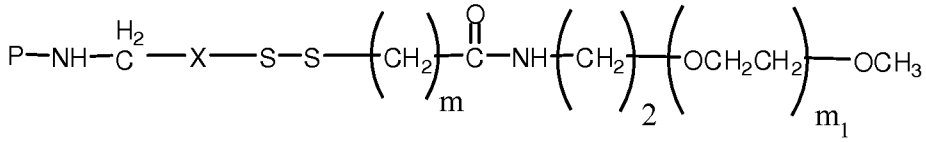
(Ⅲ)



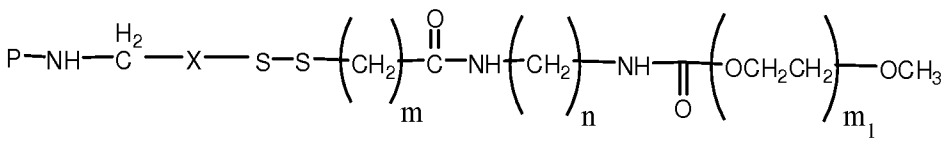
(Ⅳ)



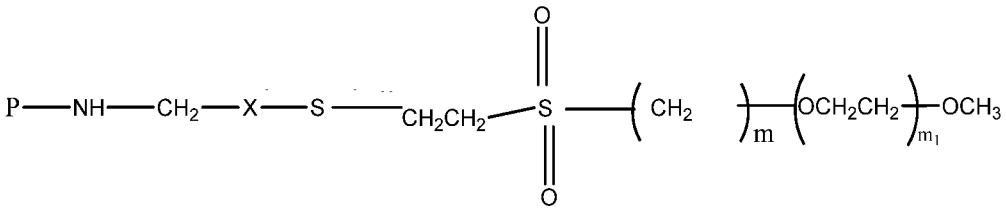
(Ⅴ)



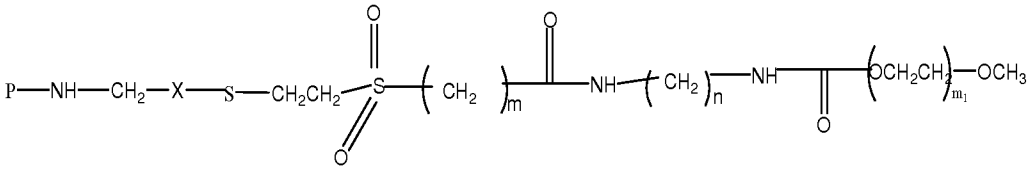
(Ⅵ)



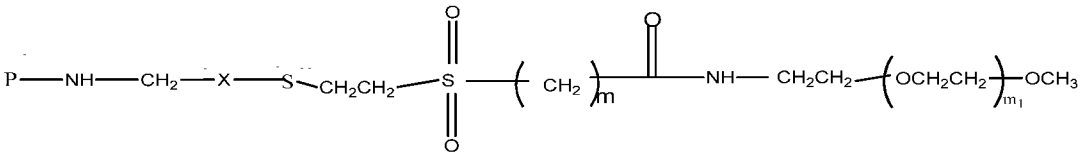
(Ⅶ)



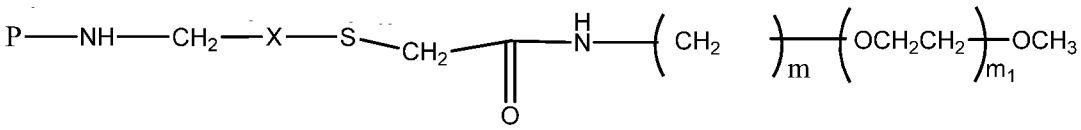
(Ⅷ)



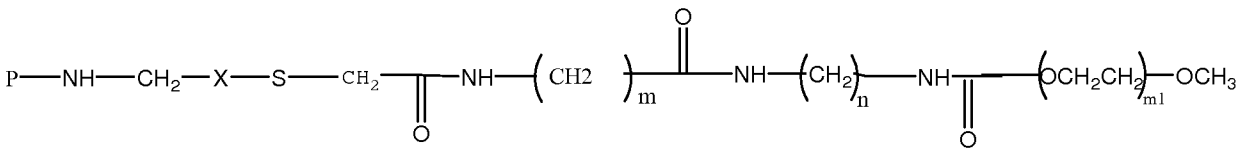
(Ⅸ)



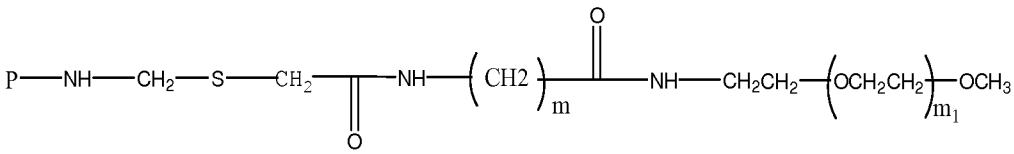
(Ⅹ)



(Ⅺ)



(Ⅻ)



(ⅩⅢ)

其中，P 是干扰素，X 是-$(CH_2)_k$-或-$CH_2(OCH_2CH_2)_k$-，k 选自 1～10，m、n 各自独立地选自 2～10 之间的整数，m_1 选自 100～2000 之间的整数。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的干扰素偶联物，其特征在于，所

述干扰素选自所有类型的干扰素及其亚类中的任意一种，或者不同类型和/或亚类干扰素组成的复合干扰素。

4、根据权利要求 3 所述的干扰素偶联物，其特征在于，所述干扰素是重组人干扰素 α、β、γ 或 ω，优选重组人干扰素 α，更优选重组人干扰素 α2b。

5、根据权利要求 4 所述的干扰素偶联物，其特征在于，m=2，n=2。

6、根据权利要求 5 所述的干扰素偶联物，其特征在于，X 是 $-(CH_2)_k-$，k 为 1～4 之间的整数，优选 k=2。

7、根据权利要求 6 所述的干扰素偶联物，其特征在于，m_1 选自 450-600 之间的整数。

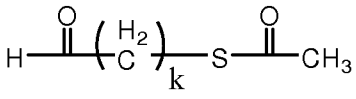
8、根据权利要求 7 所述的干扰素偶联物，其特征在于，每个甲氧基聚乙二醇基团的平均分子量为 5,000-40,000 道尔顿，优选为 20,000 道尔顿。

9、一种制备权利要求 1-8 任意一项所述干扰素偶联物的方法，其包括以下步骤：

1) 干扰素和含有已保护巯基的醛类物质反应，形成通过 $-NH-CH_2-$ 键连接的活化干扰素蛋白；

2) 所述活化的干扰素蛋白脱保护，与活性甲氧基聚乙二醇衍生物偶联。

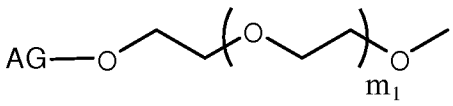
10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于所述醛类物质是式 (XIV) 的小分子醛化合物，



(XIV)

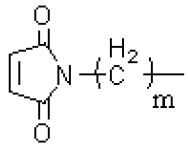
其中 k 的数目选自 2～10 之间的整数，优选 2。

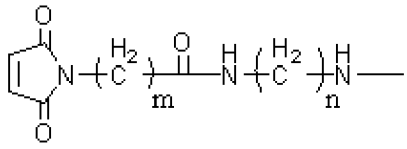
11、根据权利要求 9 或 10 所述的方法，其特征在于所述活性甲氧基聚乙二醇衍生物是通式为 (XVI) 的活化甲氧基聚乙二醇，

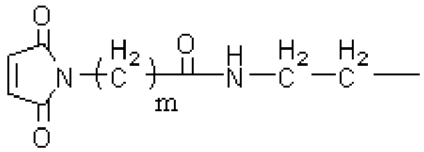


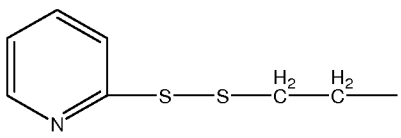
(XVI)

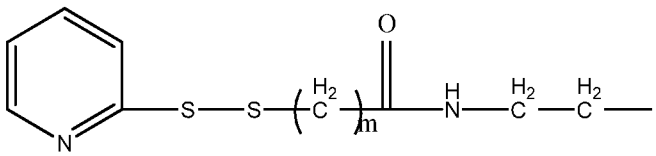
AG 选自：

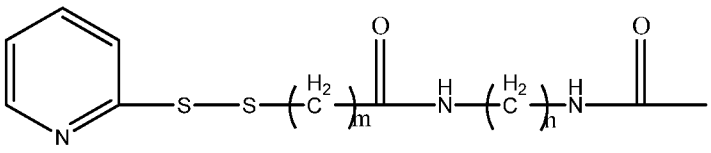


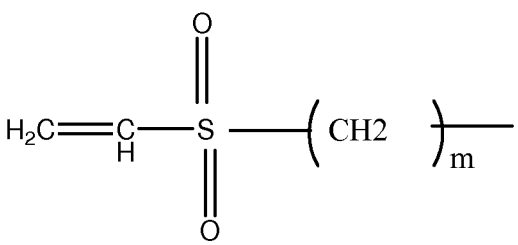


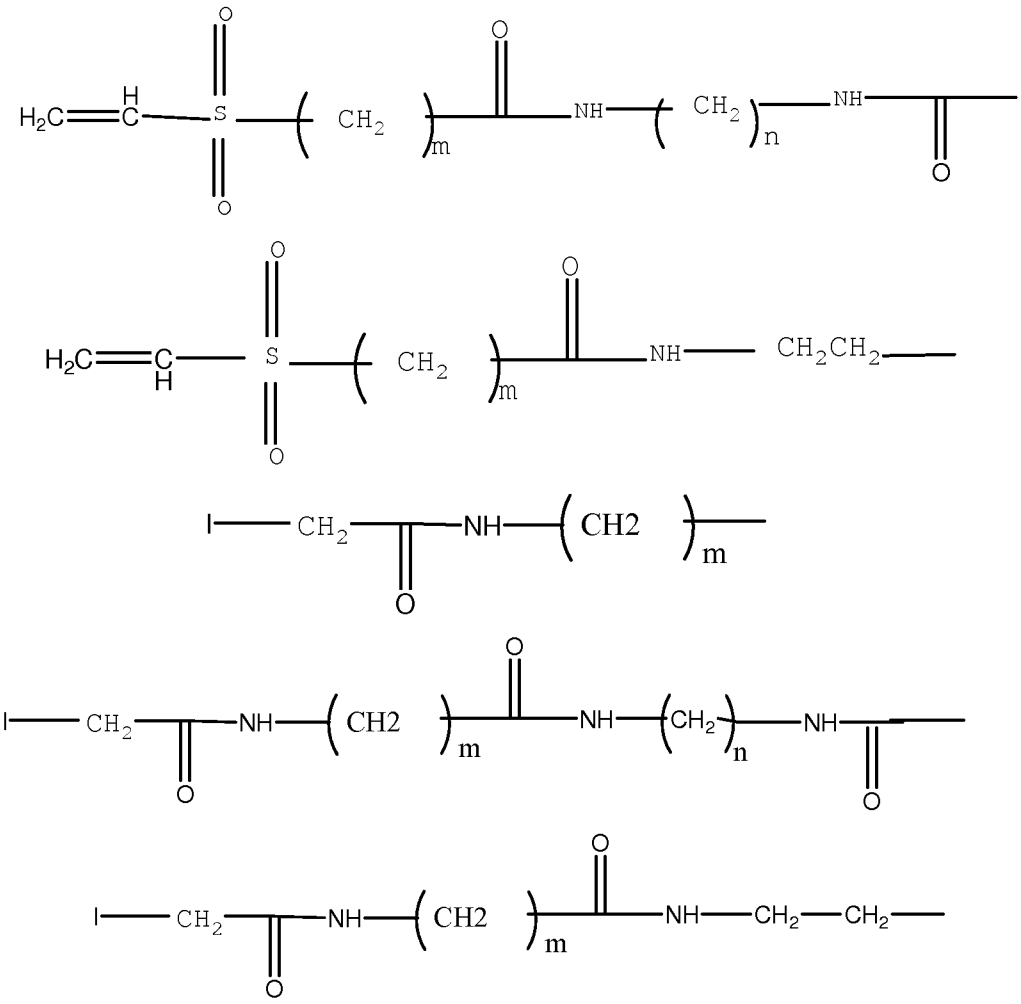








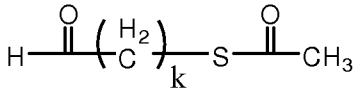




其中 m、n 的数目选自 2～10 之间的整数，优选 2。

12、根据权利要求 9 所述的方法，包括以下步骤：

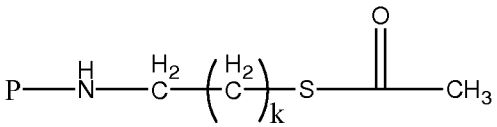
(1) 制备结构通式为（XⅣ）的小分子醛化合物，



（XⅣ）

其中 k 的数目选自 2～10 之间的整数，优选 2；

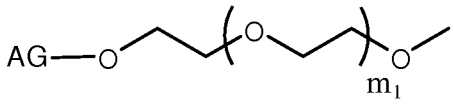
(2) 将结构通式为（XⅣ）的小分子醛化合物与干扰素在缓冲液里反应，并加入还原剂得到结构通式为（XⅤ）的活化干扰素，



（XⅤ）

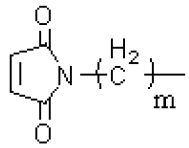
其中 P 是指干扰素，优选重组人干扰素 α2b；

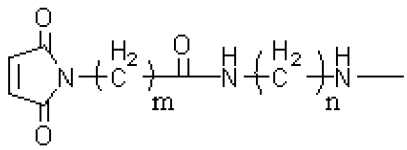
(3)在含有活化干扰素的缓冲液里加入脱保护剂脱去结构通式为(ＸＶ)的活化干扰素的乙酰基保护基，随后加入结构通式为(ＸVI)的活化甲氧基聚乙二醇进行聚乙二醇化反应，得到聚乙二醇干扰素偶联物，

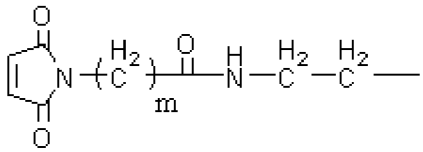


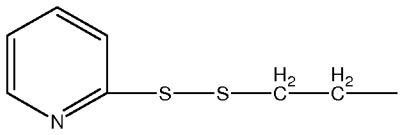
(ＸVI)

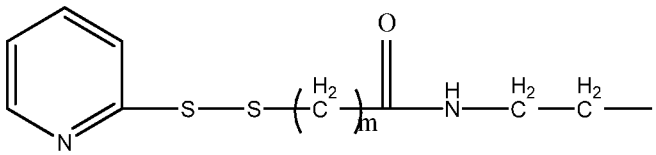
AG 选自：

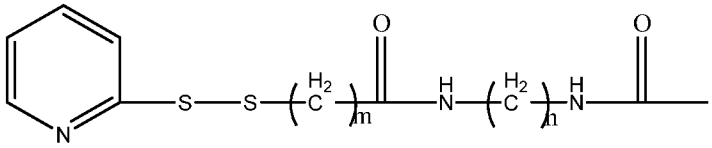


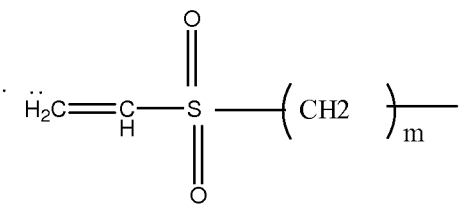


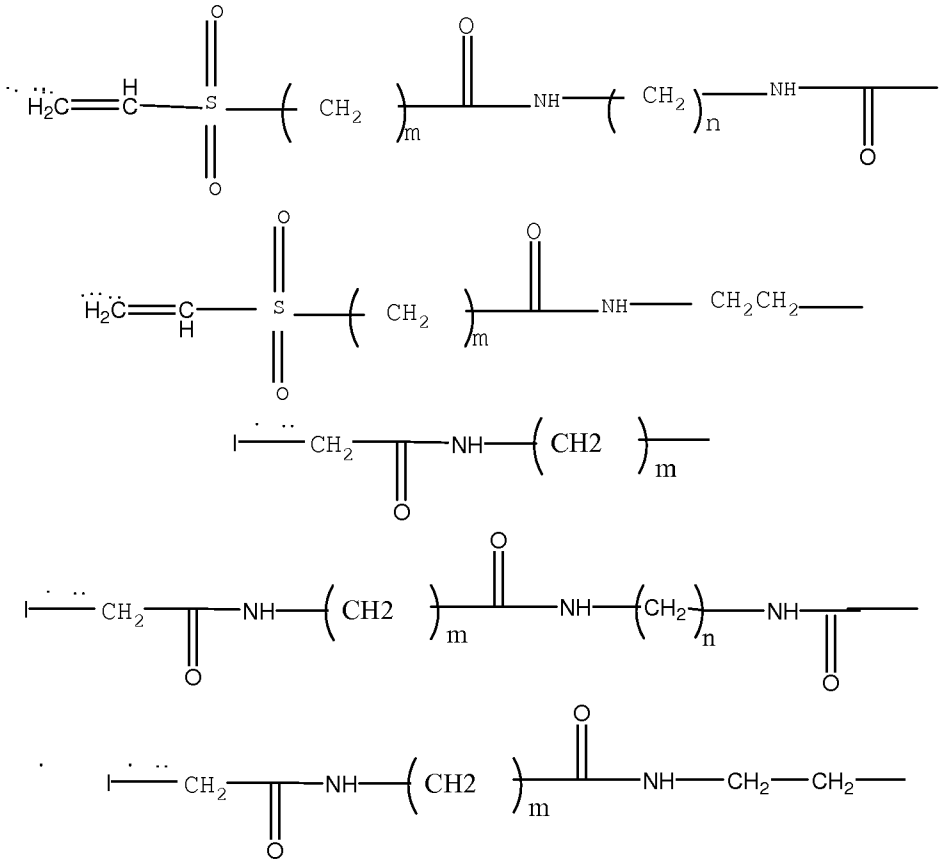












其中 m、n 的数目选自 2～10 之间的整数，优选 2；

(4) 纯化聚乙二醇干扰素偶联物。

13、一种药物组合物，其包含：

1) 如权利要求 1-8 任意一项所述的治疗有效量的聚乙二醇化干扰素偶联物；

2) 药学可接受的药物载体。

14、权利要求 1-8 所述的聚乙二醇化干扰素偶联物，权利要求 10 所述的药物组合物，在制备抗病毒、抗肿瘤、免疫调节药物中的用途；优选在制备治疗慢性乙型肝炎、丙型肝炎和戊型肝炎、带状疱疹、扁平和尖锐湿疣、乳头瘤病毒感染、流行性出血热、小儿呼吸道合胞病毒肺炎、毛细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、黑色素瘤、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、直肠癌、肝癌、肺癌的药物中的用途。

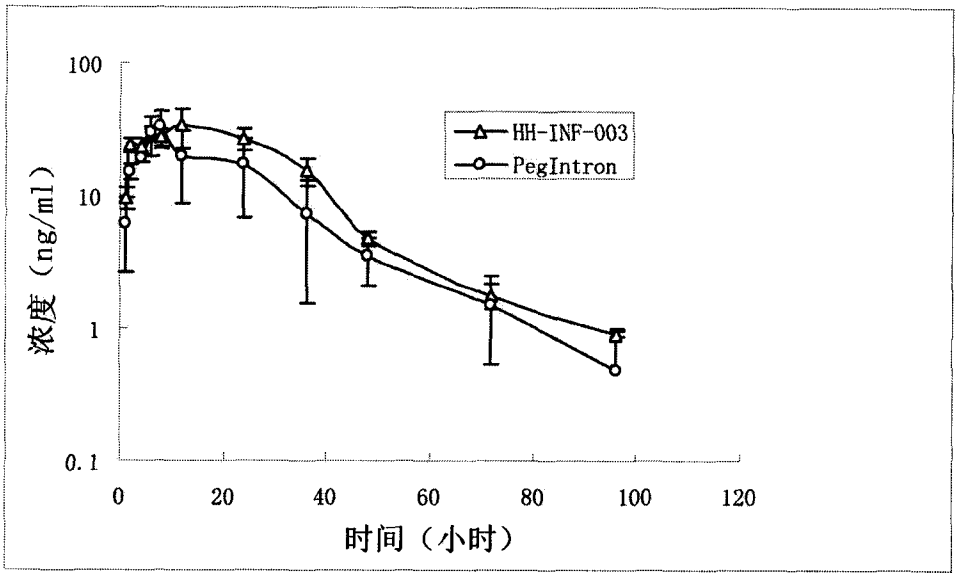

100
10
1
0.1
浓度（ng/ml）
HH-INF-003
PegIntron
0
20
40
60
80
100
120
时间（小时）

图 1

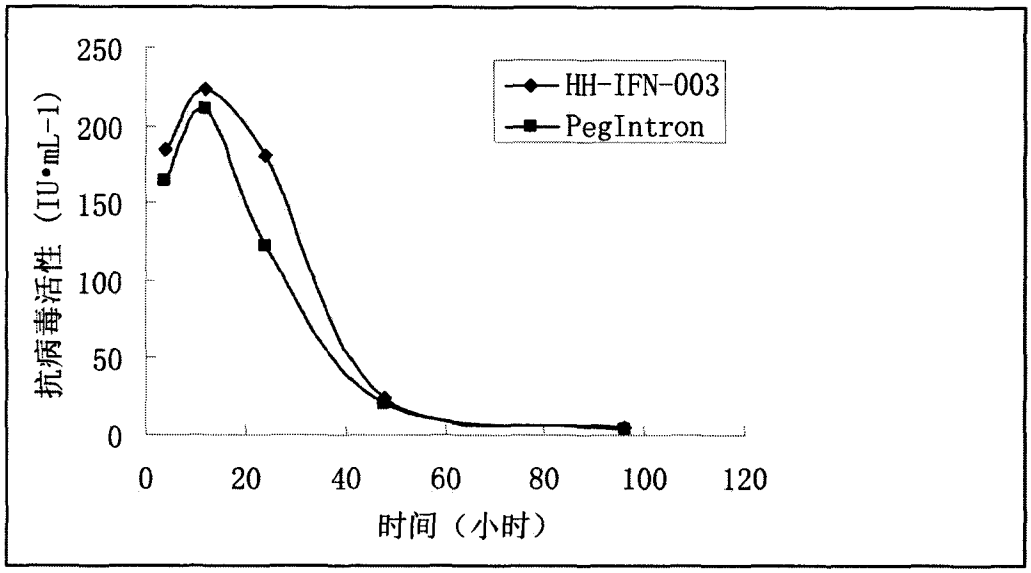

250
200
150
100
50
0
抗病毒活性（IU•mL-1）
HH-IFN-003
PegIntron
0
20
40
60
80
100
120
时间（小时）

图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/075935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K/-; C07K 14/555; C07K14/56; C07K14/565; C07K14/57; C07K17/08; C08G 65/00; A61K 38/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; CNPLUS; REGISTRY; interferon; conjugate; PEG; PEO; polyethylene oxide; polyethylene glycol; IFN; thiol; sulfide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1754889 A (EGEN CORP.) 05. April 2006 (05. 04. 2006) p.14, description, line 1 – p. 17, line 2 and fig. 2A and fig. 2B	1-14
A	WO2004087739 A1 (HANMI PHARM. CO. LTD., et al.) 14. October 2004 (14. 10. 2004) description, p. 2, line 15 – p. 5, line 18 and example 3	1-14
A	CN 1654478 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO. LT., et al.) 17. August 2005 (17. 08. 2005) description, p. 5, line 8 - p. 7, line 10 and examples 1-3	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30. July 2012 (30. 07. 2012)	30. August 2012 (30. 08. 2012)

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	FENG, Zhiqiang Telephone No. (86-10)82246898

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/075935

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1754889 A	05. 04. 2006	WO2006004959 A2	12. 01. 2006
		CA2572751 A1	12. 01. 2006
		AU2005260664 A1	12. 01. 2006
		US2006029573 A1	09. 02. 2006
		EP1771197A2	11. 04. 2007
		JP2008509889A	03. 04. 2008
WO2004087739 A1	14. 10. 2004	KR20040086930 A	13. 10. 2004
		KR100507796 B1	17. 08. 2005
		EP1613644 A1	11. 01. 2006
		US2006276586 A1	07. 12. 2006
		JP2007528347 A	11. 10. 2007
CN 1654478 A	17. 08. 2005	CN100355784 C	19. 12. 2007
		WO2005077421 A1	25. 08. 2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/075935

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07K 14/555 (2006.01) i
C07K 17/08 (2006.01) i
C08G 65/00 (2006.01) i
A61K 38/21 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/075935

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K/-; C07K 14/555; C07K 14/56; C07K 14/565; C07K 14/57; C07K 17/08; C08G 65/00; A61K 38/21

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; CAPLUS; REGISTRY; interferon; conjugate; PEG; PEO; polyethylene oxide; polyethylene glycol; IFN; thiol; sulfide; 干扰素；偶联物；聚乙二醇；聚乙烯醇；硫；醛；恒瑞；王亚里；吕爱锋；孙长安；王瑞军；李蕴波；房雷

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1754889 A (深圳科兴生物工程有限公司) 05. 4 月 2006 (05. 04. 2006) 说明书第 14 页第 1 行-第 17 页第 2 行，图 2A 和 2B	1-14
A	WO2004087739 A1 (HANMI PHARM. CO. LTD., et al.) 14. 10 月 2004 (14. 10. 2004) 说明书第 2 页第 15 行-第 5 页第 18 行，实施例 3	1-14
A	CN 1654478 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 17. 8 月 2005 (17. 08. 2005) 说明书第 5 页第 8 行-第 7 页第 10 行，实施例 1-3	1-14

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
30. 7 月 2012 (30. 07. 2012)	**30.8 月 2012 (30.08.2012)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 **封志强** 电话号码：(86-10) **82246898**

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/075935

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1754889 A	05. 04. 2006	WO2006004959 A2	12. 01. 2006
		CA2572751 A1	12. 01. 2006
		AU2005260664 A1	12. 01. 2006
		US2006029573 A1	09. 02. 2006
		EP1771197A2	11. 04. 2007
		JP2008509889A	03. 04. 2008
WO2004087739 A1	14. 10. 2004	KR20040086930 A	13. 10. 2004
		KR100507796 B1	17. 08. 2005
		EP1613644 A1	11. 01. 2006
		US2006276586 A1	07. 12. 2006
		JP2007528347 A	11. 10. 2007
CN 1654478 A	17. 08. 2005	CN100355784 C	19. 12. 2007
		WO2005077421 A1	25. 08. 2005

续 **A. 主题的分类：**

C07K 14/555 (2006.01) i

C07K 17/08 (2006.01) i

C08G 65/00 (2006.01) i

A61K 38/21 (2006.01) n