

(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
2019 年 10 月 31 日 (31.10.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/205256 A1

(51) 国际专利分类号:

C08F 8/34 (2006.01) *C12P 19/12* (2006.01)
C08F 8/30 (2006.01) *A61K 31/727* (2006.01)
C08F 120/34 (2006.01) *A61K 47/58* (2017.01)
C12P 19/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/091475

(22) 国际申请日: 2018 年 6 月 15 日 (15.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201810399859.2 2018年4月28日 (28.04.2018) CN

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 陈敬华(CHEN, Jinghua); 中国江苏省无锡
市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。
蔡智(CAI, Zhi); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡
湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 闫映姝
(YAN, Yishu); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 南京经纬专利商标代理有限公司
(NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK
AGENCY CO., LTD); 中国江苏省南京市鼓楼区中
山路179号12楼B座, Jiangsu 210005 (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** SULFATED HEPARIN DISACCHARIDE-GRAFTED POLYMETHYLACRYLOYL ETHANOLAMINE AND
PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 一种硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺及其制备方法

(57) **Abstract:** The present invention belongs to the technical field of biomedicine. In particular, disclosed are heparin disaccharide-grafted polymethylacryloyl ethanolamine and a preparation method thereof. The method comprises the following steps: (1) performing enzymatic degradation of heparin to obtain a heparin disaccharide; (2) preparing monodisperse polymethylacryloyl ethanolamine having controlled molecular weight by a RAFT reaction; (3) grafting the heparin disaccharide to polymethylacryloyl ethanolamine through a linker at room temperature; and (4) subjecting heparin disaccharide-grafted polymethylacryloyl ethanolamine to sulfation.

(57) 摘要: 本发明属于生物医药技术领域, 具体公开了一种肝素二糖接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺及其制备方法, 包含如下步骤: (1) 酶法降解肝素得到肝素二糖; (2) 利用RAFT反应制备分子量可控且单分散的聚甲基丙烯酸酯乙醇胺; (3) 肝素二糖室温条件下通过连接剂接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺; (4) 肝素二糖接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺的硫酸化。



WO 2019/205256 A1

一种硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺及其制备方法

技术领域

本发明属于生物医用材料领域，具体涉及硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酸酯乙醇胺及其制备方法。

背景技术

肝素，常常存在于肥大细胞中，也存在于肺、血管壁、肠粘膜等组织中，由于其各种亲和力在临床中被广泛用作抗凝药物。肝素最为人所熟知的是它在血液凝固过程中的作用，但在生物活性功能中也能发挥其他作用比如抗炎、抗血管生成、及抗肿瘤作用。其中，肝素的抗肿瘤作用已经备受关注，许多研究已经证明了肝素能够抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。然而天然肝素是在结构上不均一的混合物，导致生物活性标准难以界定，构效关系和作用机理的研究非常困难。而天然肝素的强抗凝血活性可能会引发出血和血小板减少症等毒副作用。这限制了天然肝素的应用。此外，天然肝素的唯一来源是动物组织，具有可能带来病毒污染和不良反应的风险。而肝素在治疗中还可能会被肝素酶和其他酶在体内分解，导致失去生物活性。

肝素的抗凝血活性主要来自其包含的特定戊糖序列，该序列结构能够与抗凝血酶（AT-III）结合，活化抗凝血酶，由于肝素具有的抗凝血活性，所以大量使用肝素会引起出血和诱导血小板减少等作用；此外，研究人员发现，肝素的抗肿瘤活性与其抗凝血能力并没有直接关联，而是由于肝素糖环伴随的氢键形成，和肝素硫酸根负电荷的作用，使肝素能够结合肿瘤转移过程中起重要作用的蛋白质的结果。因此，低抗凝血肝素的开发引起了很大关注，尤其在抑制肿瘤生长和转移方面。

申请号 CN2012103286497 的中国专利申请公开了一种控制生产低分子量肝素的方法，利用肝素酶 I、II、III 中两种以上的肝素酶来降解肝素从而生产低分子量或超低分子量肝素，然而，由于肝素及其低分子量肝素结构的特异性和多分散性，导致副作用的风险高。

最近几年，许多研究者还尝试使用化学法合成结构明确的肝素二糖和肝素衍生物以减弱抗凝血活性，然而，这种方法伴随着生产的高成本和合成的困难，硫

酸化程度的降低也减弱了肝素的抗肿瘤活性。因此去除具有抗凝能力的五糖序列，将确定组分的肝素二糖接枝在丙烯酸酯长链上并加以硫酸化，就有可能降低结构异质性，消除抗凝血活性，并提高其抗肿瘤活性，合成刷状具有抗肿瘤作用的肝素类似物大分子。

发明内容

针对现有问题的不足，本发明的目的是提供一种硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺及其制备方法；制备方法较为简单，具有原料低廉、反应条件温和易控等优点。

本发明解决其技术问题采用的技术方案是：

一种硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺，通过联用过量肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III，将天然肝素完全降解，分离制备得到天然二糖，将二糖接枝在特定分子量的丙烯酸酯长链上，加以硫酸化，得到具有良好化学稳定性，低抗凝血，优异生物相容性、抗肿瘤性能的一类肝素大分子。

上述硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法，包括如下步骤：

(1) 肝素二糖的制备与分离：首先加入过量肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 将天然肝素完全酶解；然后利用 G25、强阴离子色谱交换柱、G10 凝胶脱盐得肝素二糖；

(2) 聚甲基丙烯乙醇胺 (PAMA) 的合成：以乙醇胺盐酸盐、甲基丙烯酰氯为原料，合成甲基丙烯乙醇胺单体，再利用 RAFT 反应制备特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺；特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺通过 RAFT 反应实现，反应中通过控制添加引发剂、链转移剂添加量，同时控制反应条件实现分子量可控；

(3) 接枝反应：称取肝素二糖、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)，溶于 pH 5.4~5.6 的 MES 缓冲液，调节控制 pH 在 7.5~8.5，再加入聚甲基丙烯乙醇胺，室温下反应 8~12 h，反应液离心除沉淀后，透析，冻干，得肝素二糖接枝聚甲基丙烯乙醇胺 (GPHD)；

(4) 硫酸化反应：称取肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺、三氧化硫吡啶溶于超纯水中，调节 pH 至碱性，50~80℃ 反应 24 h，再用盐酸溶液中和，透析，

冻干，即得。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（1）中肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 的酶活添加比例为 1:1:1。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（2）中甲基丙烯酰乙醇胺的合成具体步骤为：称取乙醇胺盐酸盐与对苯二酚混合，70~80 °C 下加入甲基丙烯酰氯，反应 2 h。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（2）聚甲基丙烯乙醇胺的合成具体步骤为：按摩尔比 50~200:1:0.2 称取甲基丙烯乙醇胺、偶氮二异丁腈（AIBN）和 4-氰基戊酸二硫代苯甲酸（CTA），并溶于 N,N-二甲基甲酰胺（DMF），70~80 °C 氮气保护下反应 24 h，其中，AIBN 作为引发剂，CTA 作为聚合链转移剂。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（3）中，肝素二糖与 PAMA 的质量比 10~20:4~5，肝素二糖、EDC 和 NHS 的质量比为 1:1.25~3: 0.2~1.5。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（4）中，调节 pH 为 9.5~10.5，所用试剂为碳酸钠。

作为本申请的优选技术方案，所述步骤（2）中，特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺为分子量单分散的组分。

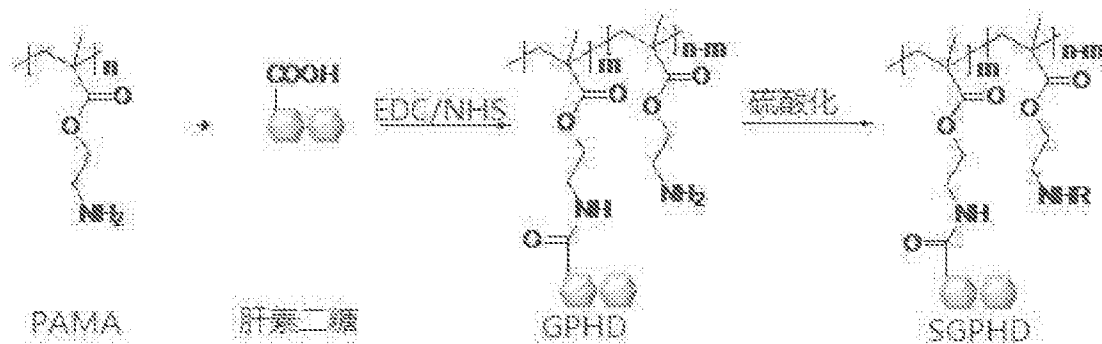
上述硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺在制备治疗抗肿瘤药物中的用途。

作为本申请的优选技术方案，所述的肿瘤是黑色素瘤。

本发明所述的大分子是由肝素酶降解的肝素二糖，与氨基聚丙烯酸酯连接，一端反应基团是羧基，一端反应基团是氨基，通过形成酰胺键相连，合成的具有抗转移活性的类肝素含糖大分子。

本发明实施例中，硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺对肿瘤细胞迁移、穿膜能力的抑制作用，与肝素相比都显示出更强的抑制作用，且体外抗凝活性测定显示，其基本消除了抗凝血活性，非常具有发展潜力。

其具体合成路线如下：



本发明通过联用肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III，将天然肝素完全降解，经 G25 凝胶初步过滤分离，强阴离子色谱交换柱分离制备得到天然二糖，G10 凝胶脱盐后，将二糖接枝在特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺长链上，加以硫酸化，得到具有良好化学稳定性，低抗凝血，优异生物相容性、抗肿瘤性能的一类肝素大分子。

本发明提供的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺以及制备方法，与现有技术相比，具有以下优点：

- (1) 本发明首先从天然肝素酶解获得二糖原料，免去了化学法合成肝素糖单元的繁琐，同时也消除了肝素抗凝血活性中心的数量，极大地降低了抗凝血活性；
- (2) 本发明的肝素二糖是天然二糖，具有安全性；高分子和肝素的选择均具有高度的生物安全性做前提；
- (3) 本发明将肝素二糖接枝在 PAMA 上，形成“糖簇效应”，产品也呈现低毒性和可忽略的抗凝血活性；
- (4) 本发明用硫酸化提高提高了产物活性位点的电荷密度，提高了抗转移活性；
- (5) 制备方法较为简单，具有原料低廉、反应条件温和易控等优点。

附图说明

图 1 为由肝素二糖的强阴离子交换色谱图；

图 2 为特定分子量聚甲基丙烯乙醇胺的 GPC 分子量测定图；

图 3 为采用划痕实验检测肝素和硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺对 B16 黑色素瘤细胞迁移的抑制情况；其中，Control 代表无药物添加的空白对照组，Heparin 代表肝素，SGPHD 代表硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺；图为 0h 与 24h 后药物存在时细胞划痕愈合情况的对比；

图 4 为采用划痕实验检测肝素和硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺

对 B16 黑色素瘤细胞穿膜的抑制情况；其中，Control 代表无药物添加的空白对照组，Heparin 代表肝素，SGPHD 代表硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明做进一步详细说明。所用试剂或者仪器设备未注明生产厂商的，均视为可以通过商业购买的常规产品。

实施例 1：

1. 酶法降解制备肝素二糖

将 6g 肝素溶解于 120 mL 包含 5mM CaCl₂, 20 mM NaCl 的 pH 7.4 Tris 缓冲液中，加入肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III 各 10 IU，置于 37 °C 摇床 150 转/分钟震荡反应 24 h。反应结束后，反应液被煮沸 3 min 使酶失活，5000 r/min 离心 15 min，取上清液冻干，得到肝素寡糖，本实施例通过提高温度使酶失活。

2. G25 凝胶初步过滤分离

Sephadex G-25 经处理，装成 1.2×100 cm 的玻璃层析柱。将冻干寡糖使用超纯水配置成 40 mg/mL 溶液，上样 1 mL，使用 1 mL/min 超纯水流速洗脱，使用紫外检测器监测 232 nm 吸收波长曲线，分管收集各峰并冻干。

3. 强阴离子交换色谱检测二糖组分

采用 HPLC 法，色谱条件为：ProPac SAX-10 色谱柱，以 20 mM–1.5 M pH 3.5 的 NaCl 溶液为流动相梯度洗脱，流速 0.5 mL/min，柱温 25 °C。分别上样分管收集的肝素二糖样品 20 μL，监测洗脱曲线，确定包含二糖组分，如图 1 所示，1-8 峰分别为肝素结构中包含的八种二糖。

4. G10 凝胶脱盐

将检测到的肝素二糖组分 40 °C 旋转蒸发浓缩后，使用 1.2×100 cm Sephadex G10 柱脱盐，流动相为超纯水，流速为 1 mL/min。脱盐二糖再次旋转蒸发浓缩后，冻干待用。

5. 甲基丙烯酰乙醇胺单体的合成

将 1 g 干燥的乙醇胺盐酸盐与 30 mg 对苯二酚混合，置于 25 mL 圆底烧瓶中，80 °C 加热搅拌状态下，滴入 2 mL 甲基丙烯酰氯，70~80 °C 冷凝回流搅拌反应 2 h；向溶化的产物加入 3 mL 四氢呋喃溶解，使用 100 mL 乙醚 8000 r/min 沉淀离

心；沉淀用乙醚洗三次，真空干燥得到甲基丙烯酰乙醇胺单体。

6. 特定分子量聚甲基丙烯乙醇胺的合成

将 662 mg 甲基丙烯乙醇胺、4.24 mg AIBN、0.821 mg 4-氰基戊酸二硫代苯甲酸溶于 5 mL 无水 DMF，加入聚合管。聚合管使用液氮冷却，抽真空后解冻，置换高纯氮气，重复三次。聚合管 70-80 °C 油浴搅拌反应 24 h 后，使用 100 mL 乙醇沉淀，再使用乙醇洗三次，将沉淀出的聚合物真空干燥。聚合物分子量使用 GPC 测定（图 2），结果显示聚合物为分子量单分散的组分。

7. 肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺

取 200 mg 混合肝素二糖、47 mg NHS 与 257 mg EDC 溶于 50 mL pH 5.5 MES 缓冲液，室温下搅拌 30 min。使用三乙胺调节 pH 到 8，再加入 50 mg 聚甲基丙烯乙醇胺，室温搅拌反应 8h。反应液离心除去沉淀，使用截留分子量 3000 透析袋透析，冻干得到产物肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺。

8. 肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的硫酸化

取二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺 50 mg，三氧化硫吡啶 75 mg，溶于 5 mL 超纯水中，使用碳酸钠调节 pH 为 9.5~10.5，反应液在 50~80 °C 氮气氛下搅拌反应 24h 后使用 0.1M 盐酸溶液中和，使用截留分子量 3000 透析袋透析，冻干得到产物硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺。

性能测试

1. 硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺体外对肿瘤细胞迁移能力的抑制作用

将易转移的 B16 黑色素瘤细胞接种在 24 孔板上，密度为 5×10^4 /孔。待孔中细胞密度大于 90% 后，使用 200 μ L 枪头于每孔细胞层上平行画出划痕。使用 PBS 清洗两次，更换为无血清培养基，同时分组加入肝素（512mg/L），不同浓度的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺（128mg/L、256mg/L 和 512mg/L），继续培养 24h，观察并拍照划痕愈合情况。

结果如图 3 显示，没有加药处理的 B16 黑色素瘤细胞层划痕经过 24 h 后基本愈合，说明其原本的迁移能力很强。而加入肝素和硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺均对这种愈合有明显的抑制作用，而且硫酸化肝素二糖接枝聚甲基

丙烯酰乙醇胺对 B16 黑色素瘤细胞迁移的抑制能力更强。

2. 硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺体外对肿瘤细胞穿膜能力的抑制作用

于 24 孔板各孔分别加入 700μL 含有不同浓度的肝素和硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺 (128mg/L、256mg/L 和 512mg/L) 的培养基, 装置 Transwell 小室。向每个小室上层接种 100μL 密度为 1×10^6 /mL 的 B16 黑色素瘤细胞悬浮液, 继续培养 24 h 后, 使用棉签擦去小室上层的 B16 黑色素瘤细胞, 并使用 0.1%结晶紫溶液对穿过小室膜的 B16 黑色素瘤细胞染色, PBS 清洗残余染料三次后, 观察并拍照细胞穿膜情况。

结果如图 4 显示, 肝素和硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺均对这种穿膜运动有明显的抑制作用, 且硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺显示出了更强的抑制能力。

3. 硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺体外抗凝活性测定

硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺体外抗凝活性使用欧洲药典 7.0 版本的底物显色法测定。6.05 g/L Tris 溶液被盐酸调节 pH 至 8.4 作为稀释液。160μL 不同浓度的药物与过量的抗凝血酶 AT-III 以及 20μL 人血清在 37 °C 水浴 60 s 后, 加入 40 μL 2mM 凝血因子 Xa (S-2765) 或 IIa (S-2238) 显色底物, 10-30 s 时间段测定 405 nm 处吸收。使用肝素标准品 (220 U/mg) 按上述方法测定不同浓度肝素的抗 Xa 或 IIa 活性, 并绘制标准曲线, 根据标准曲线, 计算硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的抗 Xa 或 IIa 活性。

表 1 硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺 (SGPHD) 及作为对照组的肝素、肝素二糖体外抗凝活性

名称	抗 Xa 能力 (IU/mg)	FL (%)	抗 IIa 能力 (IU/mg)	FL (%)
肝素	221.85±3.63	1.62	229.80±10.91	4.61
肝素二糖	3.13±0.49	15.80	8.91±1.13	13.22
SGPHD	3.45±0.67	21.89	8.36±1.07	12.37

由表 1 可以看出,硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺具有与肝素二糖相当的抗凝血能力,比肝素低 50 倍以上,因此,当用作抗肿瘤药物时,可忽略 SGPHD 的出血风险;肝素的抗凝血活性由单链糖蛋白抗凝血酶III介导,该活性主要来源于 NA/NS 混合区域中特异性的可与抗凝血酶特异性结合的五糖序列,由于 SGPHD 的肝素二糖不含有上述五糖结构,所以 SGPHD 理论上可以降低其抗凝血活性。

由以上的性能测试数据可以看出,SGPHD 对抑制 B16 细胞迁移、侵入和粘附与肝素相比显示了更强的作用,同时还消除了肝素抗凝血活性中心的数量,极大地降低了抗凝血活性,这些结果对抗肿瘤药物的进一步合理设计与应用产生重要影响。

本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下,本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求为保护范围。

权利要求书

1. 一种硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺，其特征在于，通过联用过量肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III，将天然肝素完全降解，分离制备得到天然二糖，将二糖接枝在特定分子量的聚甲基丙烯酰乙醇胺长链上，加以硫酸化，即得。

2. 权利要求 1 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 肝素二糖的制备与分离：首先加入过量肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 将天然肝素完全酶解；然后利用 G25、强阴离子色谱交换柱、G10 凝胶脱盐得肝素二糖；

(2) 聚甲基丙烯乙醇胺的合成：以乙醇胺盐酸盐、甲基丙烯酰氯为原料，合成甲基丙烯乙醇胺单体，再利用 RAFT 反应制备特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺；

(3) 接枝反应：称取肝素二糖、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺，溶于 pH 5.4~5.6 的 MES 缓冲液，调节控制 pH 在 7.5~8.5，再加入聚甲基丙烯乙醇胺，室温下反应 8~12 h，反应液离心除沉淀后，透析，冻干，得肝素二糖接枝聚甲基丙烯乙醇胺；

(4) 硫酸化反应：称取肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺、三氧化硫吡啶溶于超纯水中，调节 pH 至碱性，50~80 °C 反应 24 h，再用盐酸溶液中和，透析，冻干，即得。

3. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 的酶活添加比例为 1:1:1。

4. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法，其特征在于，所述步骤 (2) 中甲基丙烯酰乙醇胺的合成具体步骤为：称取乙醇胺盐酸盐与对苯二酚混合，70~80 °C 下加入甲基丙烯酰氯，反应 2 h。

5. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法，其特征在于，所述步骤 (2) 聚甲基丙烯乙醇胺的合成具体步骤为：按摩尔比 50~200:1:0.2 称取甲基丙烯乙醇胺、偶氮二异丁腈和 4-氰基戊酸二硫代苯甲酸，并溶于 N,N-二甲基甲酰胺，70~80 °C 氮气保护下反应 24 h。

6. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (3) 中, 肝素二糖与聚甲基丙烯乙醇胺的质量比 10~20:4~5, 肝素二糖、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺的质量比为 1:1.25~3:0.2~1.5。

7. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (4) 中, 调节 pH 为 9.5~10.5, 所用试剂为碳酸钠。

8. 根据权利要求 2 所述的硫酸化肝素二糖接枝聚甲基丙烯酰乙醇胺的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (2) 中, 特定分子量的聚甲基丙烯乙醇胺为分子量单分散的组分。

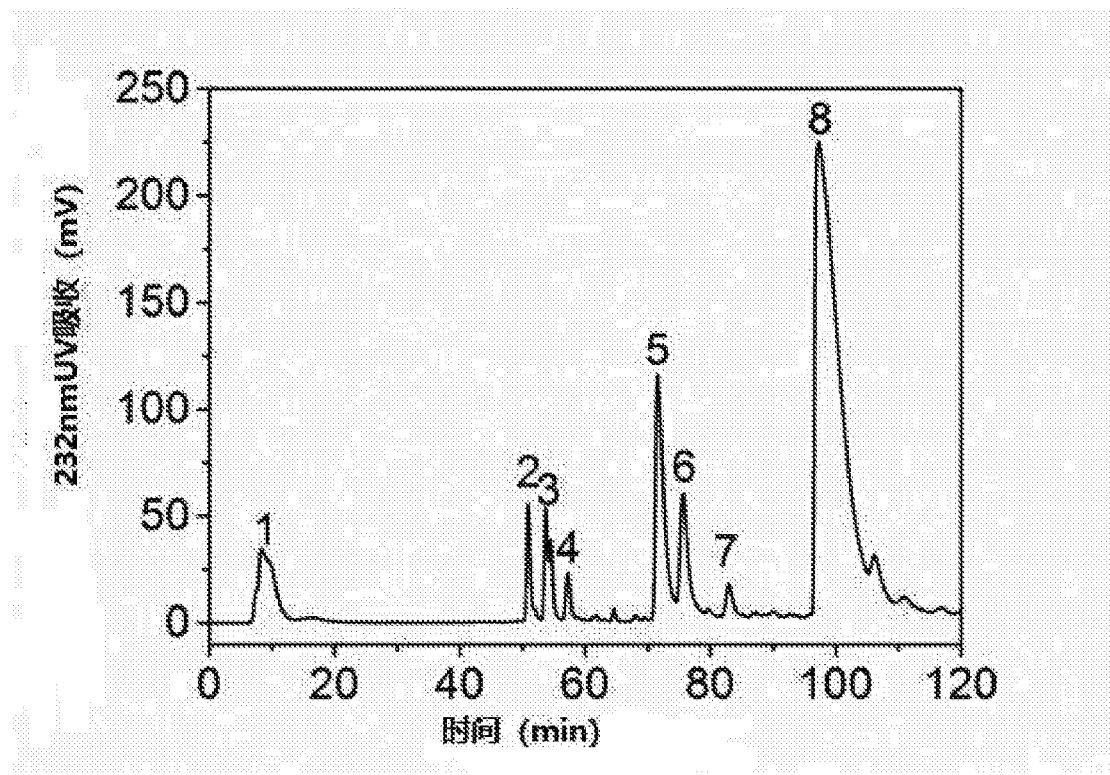


图 1

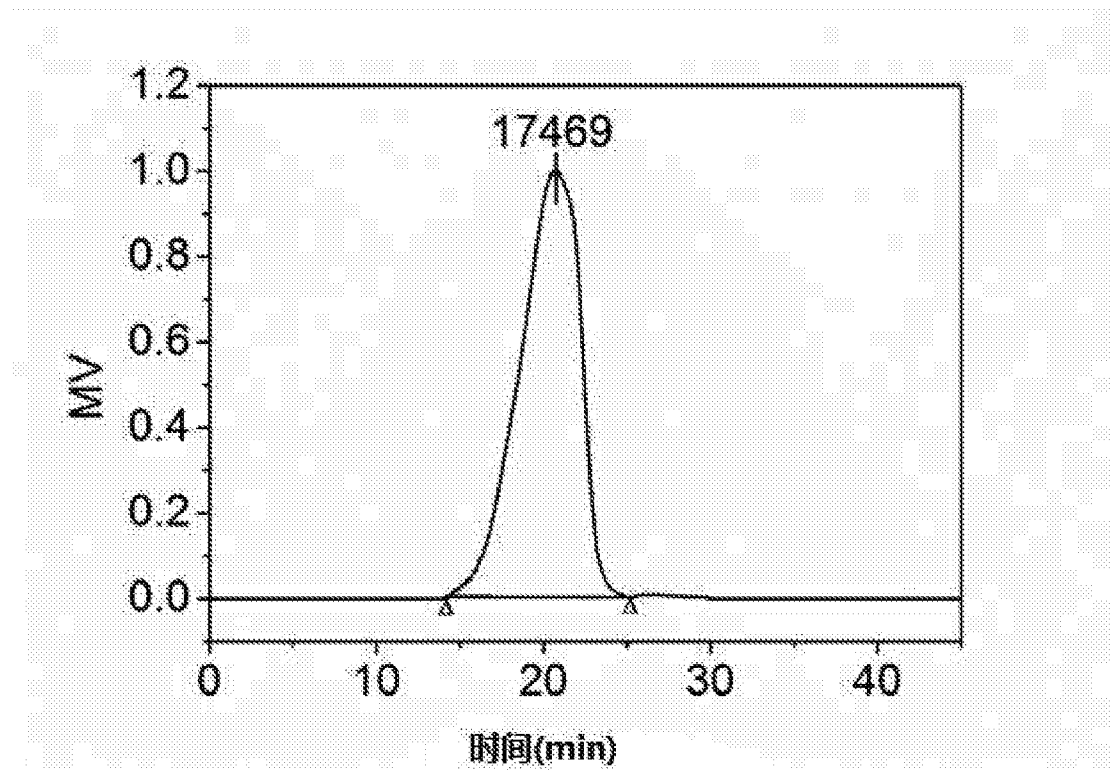


图 2

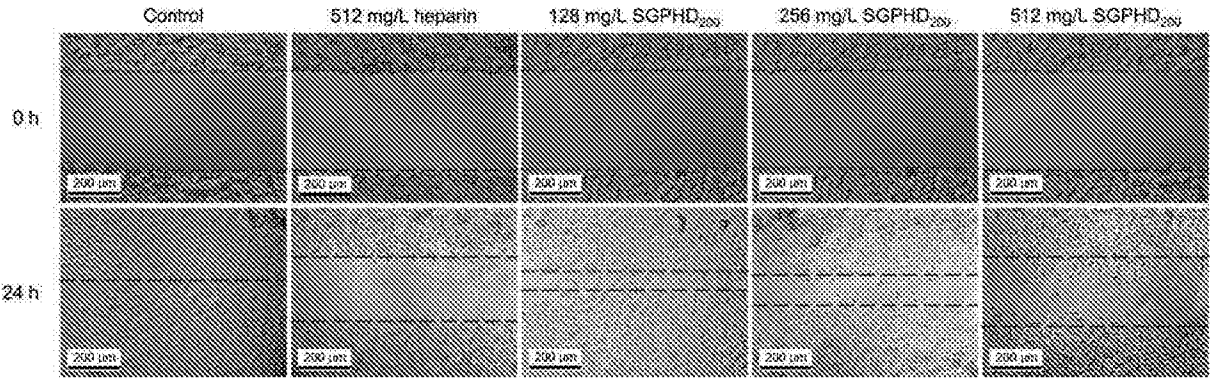


图 3

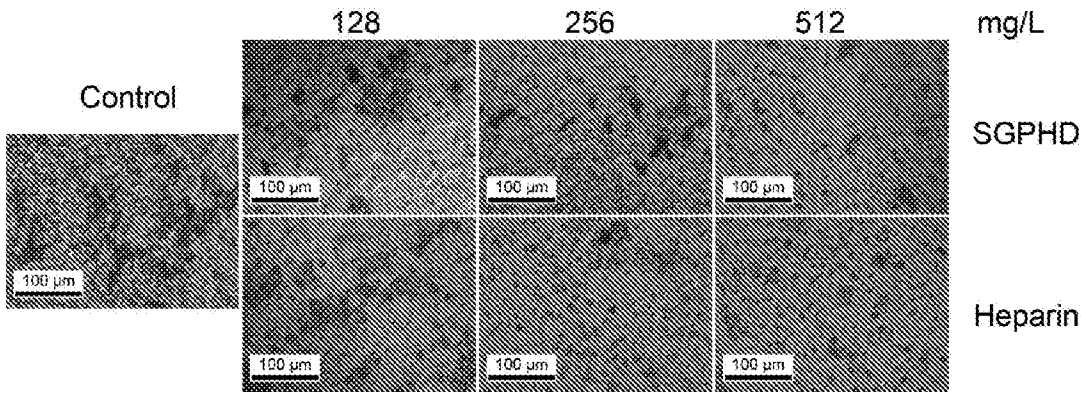


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08F 8/34(2006.01)i; C08F 8/30(2006.01)i; C08F 120/34(2006.01)i; C12P 19/14(2006.01)i; C12P 19/12(2006.01)i;
A61K 31/727(2006.01)i; A61K 47/58(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

C08F; C12P; A61K; A61P

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)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA and
Keywords: 肝素, 肝素酶, 二糖, 聚甲基丙烯酰乙醇胺, 聚合物, 接枝, 硫酸化, 酰胺键, heparin, heparinase, disaccharide,
polymethacryloylethanolamine, PAMA, polymer, poly+, grafted, sulfated, GPHD, SGPHD, amide bond, 陈敬华, 蔡智, 闫昶
姝, et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017113197 A1 (SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 06 July 2017 (2017-07-06) see entire document	1-8
A	CN 105891343 A (YANTAI DONGCHENG PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 24 August 2016 (2016-08-24) see entire document	1-8
A	CN 104892807 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 09 September 2015 (2015-09-09) see entire document	1-8



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

20 December 2018

Date of mailing of the international search report

24 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/091475

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017113197	A1	06 July 2017	EP	3398971	A1	07 November 2018
CN	105891343	A	24 August 2016	None			
CN	104892807	A	09 September 2015	CN	104892807	B	24 May 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/091475

A. 主题的分类

C08F 8/34(2006.01)i; C08F 8/30(2006.01)i; C08F 120/34(2006.01)i; C12P 19/14(2006.01)i; C12P 19/12(2006.01)i; A61K 31/727(2006.01)i; A61K 47/58(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

C08F; C12P; A61K; A61P

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))

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; CA和检索词: 肝素, 肝素酶, 二糖, 聚甲基丙烯酰乙醇胺, 聚合物, 接枝, 硫酸化, 酰胺键, heparin, heparinase, disaccharide, polymethacryloylethanolamine, PAMA, polymer, poly+, grafted, sulfated, GPHD, SGPHD, amide bond, 陈敬华, 蔡智, 闫映姝, 等

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	WO 2017113197 A1 (深圳市海普瑞药业集团股份有限公司) 2017年 7月 6日 (2017 - 07 - 06) 参见全文	1-8
A	CN 105891343 A (烟台东诚药业集团股份有限公司) 2016年 8月 24日 (2016 - 08 - 24) 参见全文	1-8
A	CN 104892807 A (江南大学) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 参见全文	1-8

☐ 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

2018年 12月 20日

国际检索报告邮寄日期

2019年 1月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
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

何睿

电话号码 (86-10)-62411106

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/091475

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017113197	A1	2017年 7月 6日	EP	3398971	A1	2018年 11月 7日
CN	105891343	A	2016年 8月 24日	无			
CN	104892807	A	2015年 9月 9日	CN	104892807	B	2017年 5月 24日