

## (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  
2009年7月2日 (02.07.2009)

PCT

(10) 国际公布号  
WO 2009/079911 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 17/08 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)  
C07K 14/505 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 7/06 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2008/001921

(22) 国际申请日:

2008年11月25日 (25.11.2008)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

200710195311.8  
2007年12月10日 (10.12.2007) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 江苏豪森药业股份有限公司 (JIANGSU HANSEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 吕爱锋 (LÜ, Aifeng) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 孙长安 (SUN, Chang'an) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 王瑞军 (WANG, Ruijun) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 陈克然 (CHEN, Keran) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 李蕴波 (LI, Yunbo) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 王亚里 (WANG, Yali) [CN/CN]; 中

[见续页]

(54) Title: PEGYLATED ERYTHROPOIETIN CONJUGATE AND PREPARATION METHOD AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物和其制备方法与用途

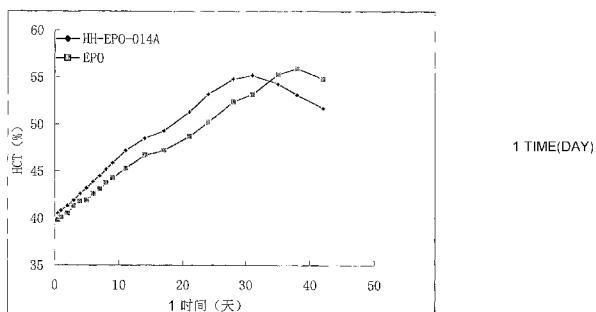


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: Provided is a pegylated erythropoietin conjugate having the general formula of rhuePO-NH-CH<sub>2</sub>-X-S-Y-mPEG. Also provided is a preparation method of the conjugate comprising carrying out reductive amination on erythropoietin and aldehyde compound containing protected sulfhydryl to form activated erythropoietin linked to -NH-CH<sub>2</sub>- bond, then carrying out methoxypolyethylene glycol derivative coupling reaction, thus obtaining the conjugate. The conjugate or pharmaceutical composition comprising the conjugate can be used for the treatment of diseases involving erythropoietin insufficiency or red blood cell insufficiency or defect.

(57) 摘要:

提供了一种通式为 rhuePO-NH-CH<sub>2</sub>-X-S-Y-mPEG 的聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物。还提供了该偶联物的制备方法, 包括让促红细胞生成素和含有已保护巯基的醛类物质发生还原胺化反应, 形成连接-NH-CH<sub>2</sub>-键的活化促红细胞生成素, 然后与甲氧基聚乙二醇衍生物进行偶联反应, 从而获得该偶联物。该偶联物或包含其的药物组合物可用于治疗缺乏红细胞生成素或红细胞缺少或缺陷的疾病。

WO 2009/079911 A1



国江苏省连云港市开发区第十工业小区, 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO,

RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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。

## 聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物和其制备方法与用途

### 5 技术领域

本发明涉及一种聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物，该偶联物具有提高体内血红蛋白含量和网织红细胞数目的生物学活性，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。

### 10 技术背景

促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是一种糖蛋白激素，分子量约 34kD。血浆中存在的促红细胞生成素由 165 个氨基酸组成，糖基化程度很高，糖基成分主要是唾液酸。根据碳水化合物含量不同，天然存在的促红细胞生成素分为两种类型， $\alpha$  型含 34% 的碳水化合物， $\beta$  型含 26% 的碳水化合物。两种类型在生物学特性、抗原性及临床应用效果上均相同。人类促红细胞生成素基因位于 7 号染色体长 22 区。1985 年其 cDNA 被成功克隆，并利用基因重组技术开始大批量生产重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHuEPO)，广泛用于临床。应用重组 DNA 技术已经生物合成出促红细胞生成素(Egrie, JC,Strickland, TW, Lane, J 等(986) 免疫生物学 (Immunobiol)72: 213-224)，其是插入到中国仓鼠的卵巢组织细胞(CHO 细胞) 中并且表达的克隆的人促红细胞生成素基因的产物。天然存在的人促红细胞生成素首先翻译成含有 166 个氨基酸并且 166 位是精氨酸的多肽链。在翻译后修饰中用羟肽酶裂解掉 166 位精氨酸。没有糖基的人 EPO 的多肽链的分子量是 18236Da .在完整的促红细胞生成素分子中，糖基占整个分子量的大约 40% (J.Biol.Chem.262: 12059)。

25 促红细胞生成素是最早应用于临床的细胞因子，是迄今所知作用最单一、且安全可靠的升血红蛋白制剂。对于肾贫血、再生障碍性贫血、多发性骨髓瘤及阵发性夜间血尿等均有一定疗效；此外，应用 EPO 还可减少手术中的输血量，并能在一定程度上纠正由恶性肿瘤、化疗及类风湿性关节炎引起的贫血。由于促红细胞生成素主要由肾小管内皮细胞产生，肾性疾患引起的贫血是促红细胞生成素的首选适应证；EPO 纠正肾性贫血的疗效几乎 100%，但并不能改善肾功能。促红细胞生成素的治疗安全、有效，适合长期治疗，也能避免血源紧张。在 2006 年的全球生物技术药市场上，促红细胞生成素类的重组药物占了 119 亿美元，有巨大的市场容量。

35 早在 1989 年，美国 FDA 就正式批准重组人促红素 (EPOGEN) 用于肾性贫血的治疗，但直到 1992 年才在我国上市。我国慢性肾炎的年发病率约为 0.25%，其中相当一部分患者最终会转为肾衰，每年的肾性 贫血患者约 50 -60 万。根据保守的用药量估算，如果按当前的价格 30-40 元/支，加上癌症相关性贫血等其他病

人的用药，国内市场容量约 12-16 亿元甚至更大(病人平均体重按 50Kg 计算)。自 20 世纪 90 年代后期，EPO 已进入我国重点城市医院畅销药品行列，2003 年在全国重点城市样本医院用药金额 6213 万元，排名第 56 位。2004 年，全国重点城市样本医院购药金额增长到 8049 万元，同比增长了 30%。

5 促红细胞生成素作为一种作用于骨髓造血细胞，促进红系祖细胞增生、分化，最终成熟的内分泌激素。对机体供氧状况发挥重要的调控作用。在胚胎早期，EPO 由肝生成，然后逐渐向肾转移，出生后主要由肾小管间质细胞分泌。

10 在促红细胞生成素诱导红组细胞分化过程中，球蛋白被诱导，这能使细胞吸收更多的铁合功能性的血红蛋白，这种功能性的血红蛋白可以和成熟的红血球中的氧结合，因此，红血球和血红蛋白在提供机体氧方面扮演了极其重要的角色。这一过程是由促红细胞生成素与红组细胞的表面受体之间的相互作用引起的。

当人体处于健康状态时，组织可以从已经存在的红血球中吸收足够多的氧，此时体内的促红细胞生成素浓度很低，这种正常的较低的促红细胞生成素浓度完全可以刺激促进由于年龄的问题而正常损失的红细胞。

15 20 25 30 35 当循环系统中的依靠红细胞进行氧输送的水平被降低进而出现缺氧情况时，促红细胞生成素在体内的数量将会增加，机体缺氧状态可以由以下原因引起的：过量的辐射、因高纬度或长期昏迷造成的氧摄入量减少、各种类型的贫血等等。作为对组织处于缺氧压力的应答，促红细胞生成素水平的提高可以刺激红组细胞的分化达到提高红细胞生成的能力。当体内的红细胞的数量大于正常组织的需求时，循环系统中促红细胞生成素的水平被降低。正是由于促红细胞生成素对于红细胞的生成有着至关重要的作用，因此这类激素对于治疗和诊断以红细胞生成低下和缺陷为特征的血液病方面有着很广泛的前景。最近的研究为推测促红细胞生成素疗法在多种疾病、紊乱和血液学异常情况中的效用提供了基础，这些疾病包括：慢性肾衰竭(CRF)患者贫血症的治疗中使用促红细胞生成素和在艾滋病和接受化疗的癌症患者贫血症的治疗中使用 EPO(Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI, 于：MB, Garnick 编著，临床应用中的促红细胞生成素—国际展望 (Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. Marcel Dekker; 1990:p301-324)。

但是当前可获得未被修饰的促红细胞生成素的血浆半衰期短，容易遭受蛋白酶降解，利用率不高，这些缺陷阻止它们取得最大的临床疗效。因此获得长效的促红细胞生成素已经成了各大研究机构及制药企业竞相研发的热点，如已经上市的 amgen 公司的长效促红细胞生成素产品 (aransp) 是通过基因工程的手段增加糖基化的位点数目，进而提高糖基化的程度，达到每两周注射一次，改善了促红细胞生成素在体内的半衰期，但是这种产品由于仍然无法避免体内蛋白酶的酶解影响，因此延长体内半衰期的程度有限，并且生产成本较高。

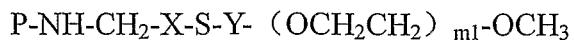
35

## 发明内容

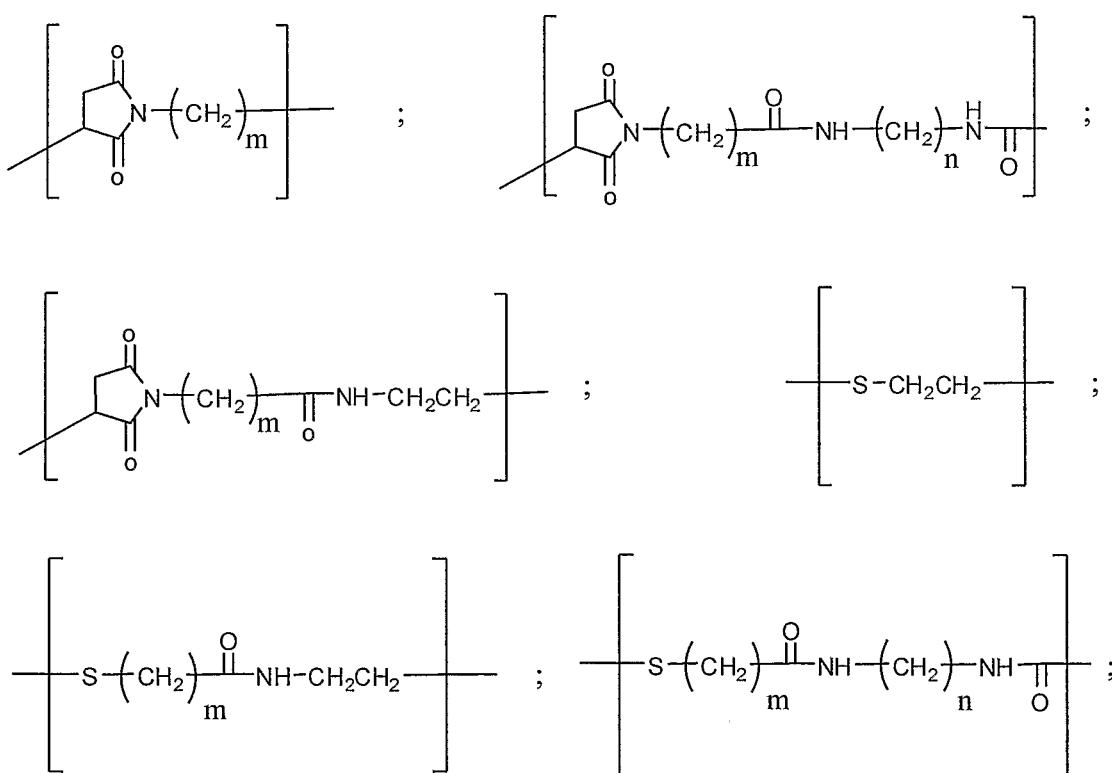
本发明的目的在于提供一种生物学活性更好，生物利用度更高的的聚乙二醇修饰的促红细胞生成素偶联物以及该偶联物的制备方法。

本发明目的还在于提供一种含有该被修饰的促红细胞生成素偶联物的药物组合物，用于治疗以缺乏红细胞生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病。

5 本发明所公开的一种新的聚乙二醇修饰的促红细胞生成素偶联物，其结构通式  
为



所述偶联物是由甲氧基聚乙二醇基团通过式-CH<sub>2</sub>-X-S-Y-中的-CH<sub>2</sub>-基团与促红细胞生成素的氨基形成-NH-CH<sub>2</sub>-键连接而得到，其中 P 是指重组人促红细胞生成素，X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目选自 2~10，m1 选自 100~2000 之间的整数，Y 选自：



其中  $m$ 、 $n$  的数目各自独立地选自  $2 \sim 10$ 。

15 其中重组人促红细胞生成素优选重组人促红细胞生成素  $\alpha$  或  $\beta$ ，特别是  $\alpha$ 。促  
红细胞生成素的制备是通过本领域公开的技术而得到。

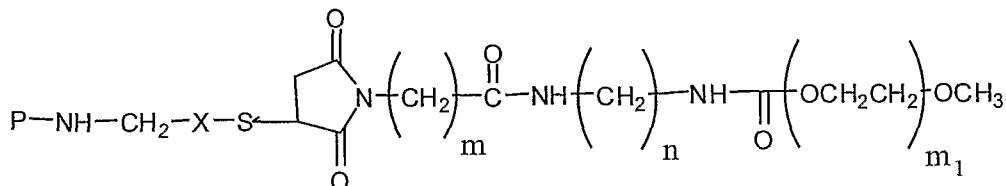
在本方案中，其中  $m, n$  优选的整数为 2。

在本方案中，其中 X 是  $-(CH_2)_k-$ ，k 选自 2~10。

在本方案中,  $k$  的数目优选 2~4, 进一步优选为 2。

20 在本方案中，甲氧基聚乙二醇基团的平均分子量优选为 5, 000~40, 000 道尔顿，进一步优选为 20, 000 道尔顿。

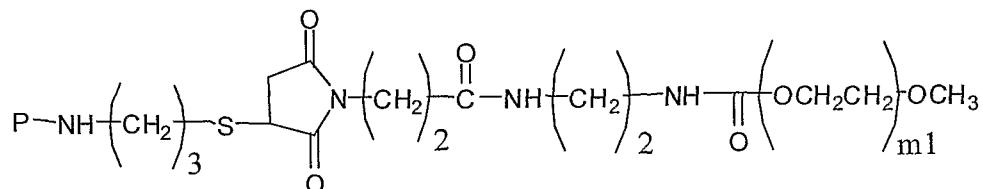
在本方案中，一个优选实施方案所对应的偶联物的结构式为：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素，X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目选自 2~10，m、n 的数目选自 2~10，m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

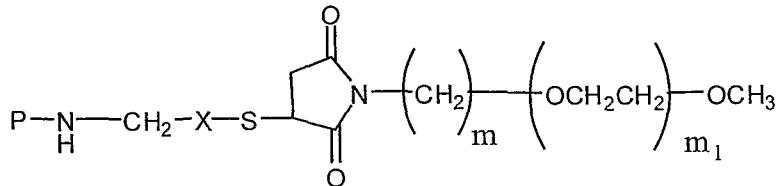
5 其中 X 优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目可进一步优选自 2~4，最优选的是 2。

进一步优选地，本发明的一个实施方案对应的结构式为：



m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数，其中 P 是指重组人促红细胞生成素，可进一步优选重组人促红细胞生成素 α 或 β，最优选 α。

10 本发明还提供一种如下结构通式的偶联物：

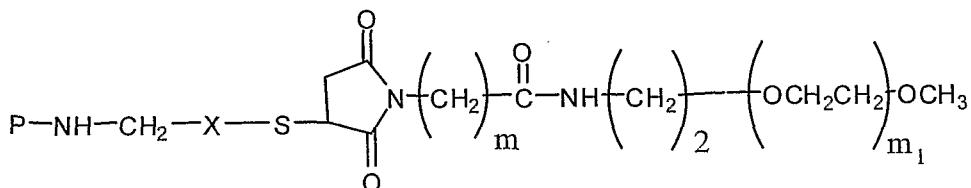


其中 P 是指重组人促红细胞生成素糖蛋白，X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目选自 2~10，m 的数目选自 2~10，m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

进一步优选地，该结构式中 P 是指重组人促红细胞生成素 α；X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，

15 其中 k 是 2；m 的数目选自 2；m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

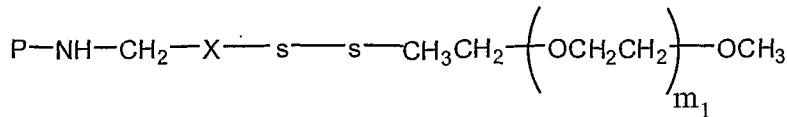
本发明还提供一种如下结构通式的偶联物：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素，X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目选自 2~10，m 的数目选自 2~10，m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

20 进一步优选，该结构式中 P 是指重组人促红细胞生成素 α；X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，其中 k 是 2；m 的数目选自 2；m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

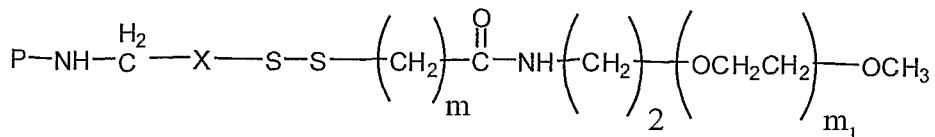
本发明还提供一种如下结构通式的偶联物：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素， X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-， k 的数目选自 2~10， m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

进一步优选地，该结构式中 P 是指重组人促红细胞生成素 α； X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，其中 k 是 2； m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

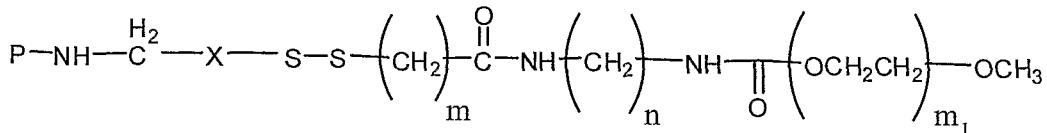
5 本发明还提供一种如下结构通式的偶联物：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素， X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-， k 的数目选自 2~10， m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

进一步优选地，该结构通式中 P 是指重组人促红细胞生成素 α； X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，其中 k 是 2； m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

10 本发明还提供一种如下结构通式的偶联物：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素， X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-， k 的数目选自 2~10， m、 n 的数目选自 2~10， m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

15 进一步优选地，该结构式中 P 是指重组人促红细胞生成素 α； X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，其中 k 是 2； m、 n 的数目选自 2； m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

本发明所公开的偶联物是促红细胞生成素通过连接体 (-CH<sub>2</sub>-X-S-Y-) 与甲氧基聚乙二醇基团共价连接进而被修饰，关键在于促红细胞生成素与连接体以形成-NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-键形式而连接，与未被修饰的促红细胞生成素相比，本发明提供的偶联物能够提高血浆的停留时间和循环半衰期，降低清除率，在体内的生物活性更高，并且具有和促红细胞生成素一样的用途。与以形成-NH-CO-键形式的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物相比具有反应位点更单一，质量更可控的优点。本发明提供的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物可以被用来治疗以缺乏红细胞生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病。

25

本发明还公开了上述偶联物的一种制备方法，包括以下步骤：首先是促红细胞生成素和含有已保护巯基的醛类物质发生还原胺化反应，形成通过-NH-CH<sub>2</sub>-键连接的活化促红细胞生成素，然后，将所述活化促红细胞生成素脱保护，与活性甲氧基聚乙二醇衍生物偶联，通过进一步的分离纯化而得到。

30

本发明还公开了一种药物组合物，包含：(1) 治疗量的上述聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物；(2) 药学可接受的药物载体。

本发明含有任意的上述治疗量的聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物用于治疗

以缺乏红细胞生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病。特别是治疗下述疾病：末期肾功能衰竭或透析；AIDS 相关性贫血，自身免疫性疾病，或恶性肿瘤；囊性纤维变性；早期早熟性贫血；与慢性炎性疾病相关的贫血；脊髓损伤；急性失血；衰老和伴有异常红细胞产生的肿瘤疾病。

5

### 促红细胞生成素的制备

促红细胞生成素的制备方法是通过内源基因激活表达蛋白质的方法，都是本领域公知的技术。其制备及治疗应用详细描述于美国专利 US5547933、US5621080 和 US5955422，EP-B0209539 和 EP-B0148605 和 EP-B0209539，以及 Huang,S.L.，  
10 美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) (1984)2708-2712 等。

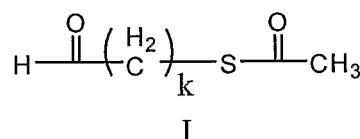
重组促红细胞生成素的纯化一般使用羟基磷灰石凝胶，离子交换层析，凝胶层析等本领域公知的纯化方法进行纯化，并在美国专利 No.5547933、5621080 和 5955422 等专利中均有详细描述；Nobuo,I.等，生物化学杂质 (J.Biochem) 107(1990)352-359 也描述了重组 EPO 的纯化方法。

15

### 聚乙二醇促红细胞生成素偶联物的制备

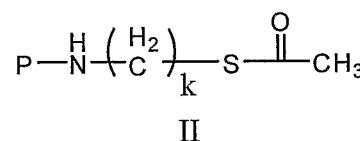
本发明提供一种制备聚乙二醇促红细胞生成素偶联物的制备方法，其步骤包括：

(1) 通过本领域技术人员所公知的技术制备结构通式 I 的小分子醛化合物，如将  
20 硫代乙酸与烯醛类化合物进行迈克尔加成反应：



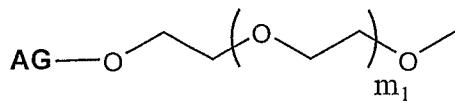
其中 k 的数目选自 2~10，优选 2；

(2) 将结构通式 I 的小分子醛化合物与促红细胞生成素在缓冲液里反应，并  
25 加入还原剂得到结构通式为 II 的活化促红细胞生成素；



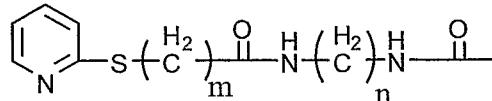
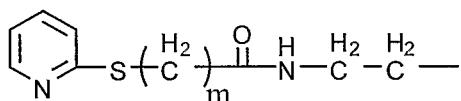
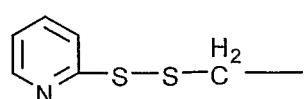
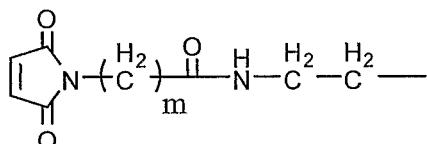
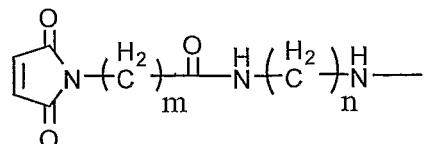
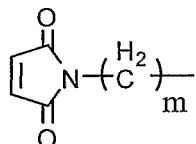
其中 P 是指重组人促红细胞生成素  $\alpha$  或  $\beta$ ，优选重组人促红细胞生成素  $\alpha$ ，缓冲液的 pH 选自 4.0~6.0，优选 6.0，还原剂可以是硼氰化钠、氰基硼氰化钠，优选  
30 氰基硼氰化钠；

(3) 利用本领域公知的技术在含有活化促红细胞生成素的缓冲液里加入脱保护剂，脱去结构通式为 (II) 的活化促红细胞生成素的乙酰基保护基，随后加入结构通式为 III 的活化甲氧基聚乙二醇进行聚乙二醇化反应。



III

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：



5

其中 m、n 的数目选自 2~10，优选 2；

(4) 聚乙二醇促红细胞生成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。

## 10 生物学活性的测试

通过本领域公知的各种测试可以测定促红细胞生成素或本发明提供的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物的生物学活性。体内活性的测试通过小鼠皮下注射促红细胞生成素及本发明提供的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物，连续三天，然后处死小鼠，取全血进行外周血细胞及网织红细胞计数，血细胞计数采用全自动血球计数仪计数。对猕猴静脉注射进行药效学研究，单次给药剂量 1.35mg/kg，作为对比药物使用的促红细胞生成素给药剂量为 240μg/kg，每周三次，连续给药六周，采集血样进行相关血液学指标分析。

通过对本发明提供的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物的测试数据表明：本发明提供的聚乙二醇促红细胞生成素偶联物能够明显刺激小鼠外周血网织红细胞计数的升高，说明它们刺激红细胞生成，同时还能够大大延长偶联物在体内的半衰期。聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对成熟的红细胞、血细胞压积、血红蛋白含量没有明显的影响，对外周血白细胞计数液没有明显影响。

## 药物组合物的制备

25 可以通过本领域公知的方法用药物可接受载体或赋形剂制成适合注射的药物组合物。用于配制本发明的产物的优选的药物可接受载体是人血清白蛋白，人血

浆蛋白质等。本发明的化合物可以在含有 132mm 氯化钠的 10mM 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促红细胞生成素，优选 10-1000 微克 / 毫升。

5 附图说明

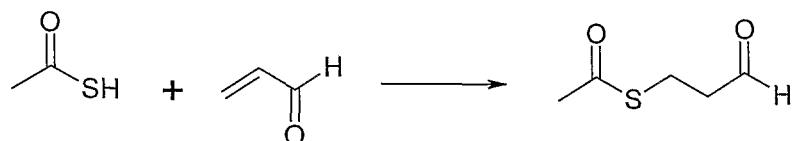
图 1：聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物 (HH-EPO-014A) 对猕猴血细胞压积的影响。

图 2：聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物 (HH-EPO-014A) 对猕猴血红蛋白含量的影响。

10

具体实施方式

实施例 1：乙酰基巯基丙醛的制备

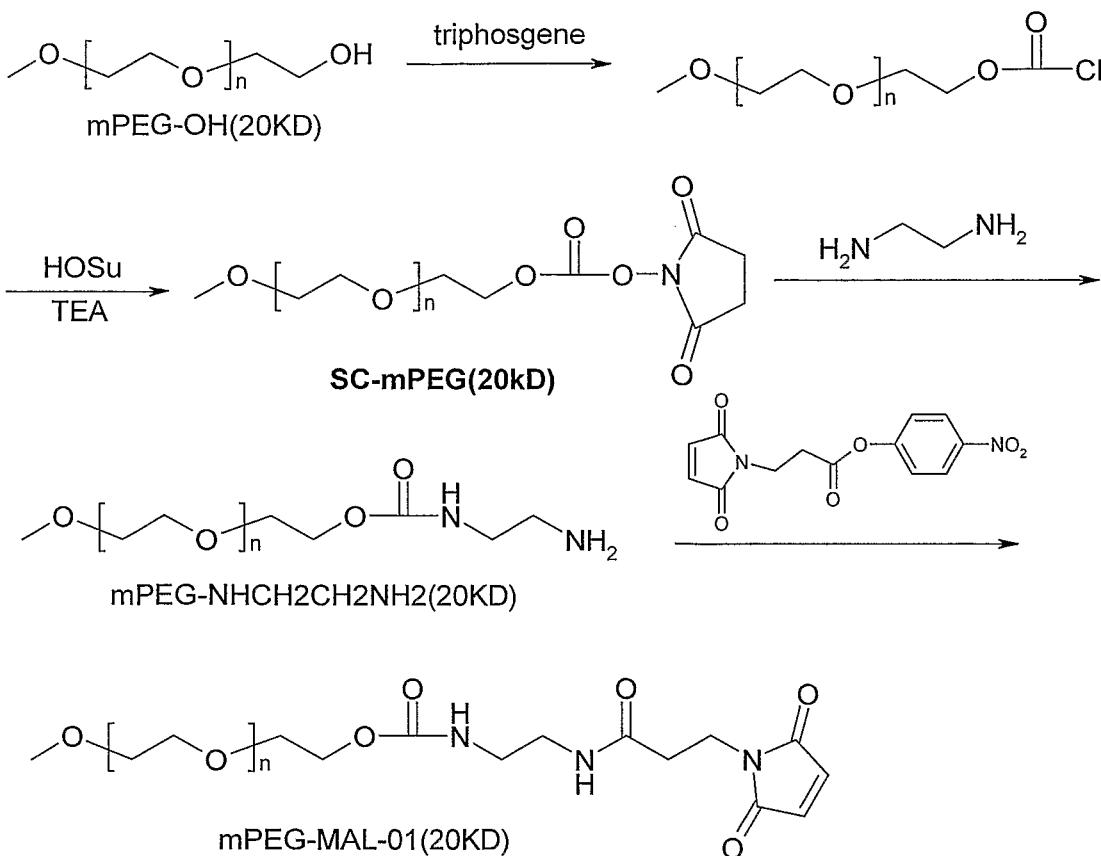


15

将 11.2 g (20mmol) 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 1.52g (0.2 mol) 硫代乙酸/20ml 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 0.6g。

20

实施例 2：mPEG-MAL-01(20kD)的制备



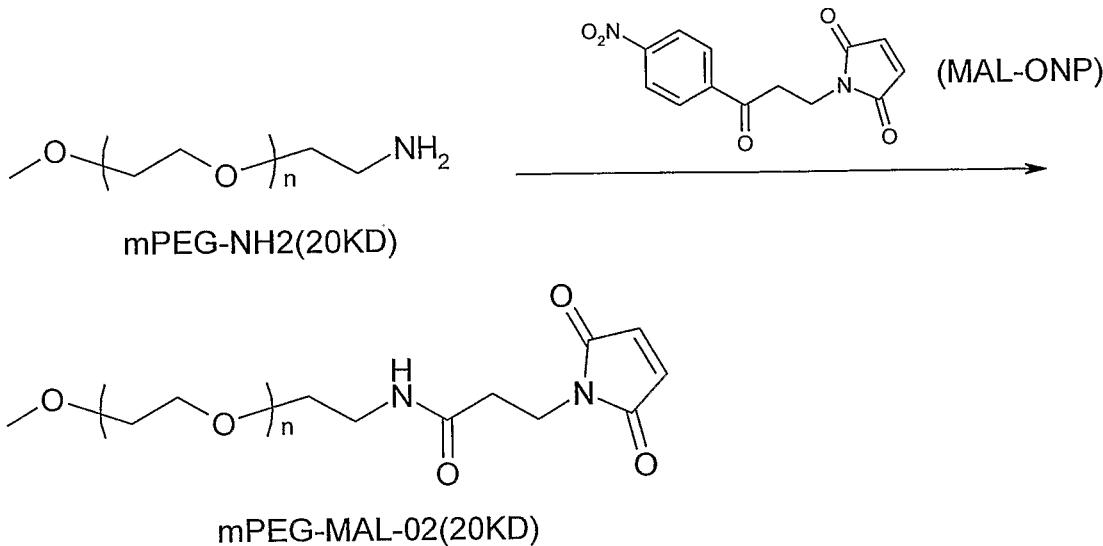
将 20g(1mmol)mPEG-OH(20kD)投入到 200ml 的单口瓶中，加入 100ml 甲苯，回流分水反应 2.5hr；然后蒸出甲苯，冷却至室温，再加入 100ml DCM，随后加入 5 1.18g(4mmol)的三光气(triphosgene)，室温密闭搅拌反应过夜；次日处理：将反应液于通风厨中冲析入 200ml 的无水乙醚中，过滤后真空干燥得白色固体 15g。将 15g 上步白色固体投入到 200ml 的单口瓶中，加入 100ml Toluene/DCM(2:1)的溶液，再加入 0.25g 的 HOSu，随后加入 0.3g 三乙胺，室温密闭搅拌反应 4hr (或过夜)；反应结束后，将反应液过滤，滤液直接冲析入 100ml 的无水乙醚中，过滤，真空 10 干燥得白色固体 14g，即为 SC-mPEG(20kD)；

将 1.4g 无水乙二胺用 50ml DCM 于 200ml 反应瓶中溶解，再取 14g SC-mPEG(20kD)溶解于 100ml 的 DCM 溶解后加入到上述乙二胺溶液中，反应过夜；次日停止反应过滤，滤液加入 500ml 的饱和食盐水洗涤，分出有机层，水层用 DCM 提取三次 (200ml×3)，合并有机层，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩至 100ml，于 500ml 无水乙醚中沉降析出固体，过滤，真空干燥得白色固体 13g，即为 mPEG-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(20kD)；

将 1.9g 的 MAL-ONP 用 50mL DCM 溶解，加入 0.04g 的三乙胺，再将 13g 的 mPEG-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(20kD)用 100ml 的新开的 DCM 溶解，然后加入上述 MAL-ONP 的 DCM 溶液中，室温反应过夜；次日减压浓缩出 DCM，残余物加入 200ml 的无水乙醚中，沉降析出固体，真空干燥得白色固体 12.5g，即为

mPEG-MAL-01(20kD)。

**实施例 3: mPEG-MAL-02(20kD)的制备**

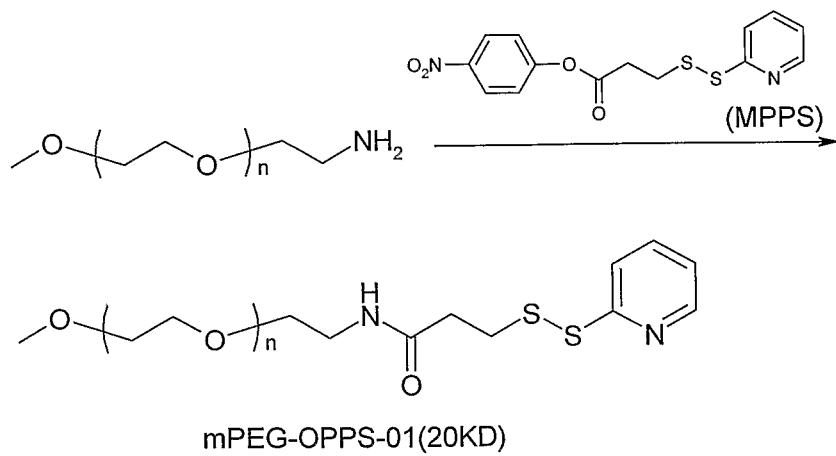


5

将 2.0g 的 MAL-ONP 用 50mL DCM 溶解，加入 0.05g 的三乙胺，再将 15g 的 mPEG-NH<sub>2</sub>(20kD) 用 100ml 的新开的 DCM 溶解，然后加入上述 MAL-ONP 的 DCM 溶液中，室温反应过夜；次日减压浓缩出 DCM，残余物加入 200ml 的无水乙醚中，沉降析出固体，真空干燥得白色固体 13g，即为 mPEG-MAL-02(20kD)。

10

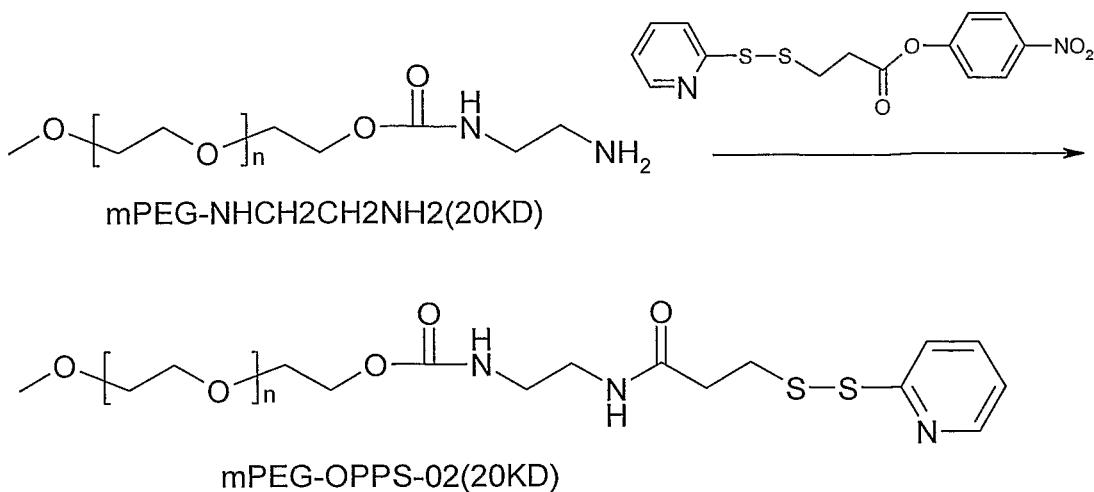
**实施例 4: mPEG-OPPS-01(20kD)的制备**



15

将 0.5g MPPS 用 50ml DCM 溶解，随后加入 0.05g 三乙胺和 20g mPEG-NH<sub>2</sub>(20kD)，室温搅拌反应过夜，次日减压浓缩出 DCM，残余物加入 200ml 的无水乙醚，析出固体，过滤，真空干燥得白色固体 19g，即为 mPEG-OPPS-01(20kD)。

**实施例 5: mPEG-OPPS-02(20kD)的制备**



将 0.5g MPPS 用 50ml DCM 溶解，随后加入 0.05g 三乙胺和 20g mPEG-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(20kD)，室温搅拌反应过夜，次日减压浓缩出 DCM，残余 5 物加入 200ml 的无水乙醚，析出固体，过滤，真空干燥得白色固体 18.5g，即为 mPEG-OPPS-02(20kD)。

#### 实施例 6：活化促红细胞生成素的制备

取促红细胞生成素原液 60 毫克，蛋白浓度为 1.5 毫克/毫升，共 40 毫升，体系为 0.1M 磷酸钠盐缓冲液，pH6.0；取 2.5 毫克乙酰基巯基丙醛溶于 80 微升乙腈后加入以上蛋白溶液；再称取 50 毫克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 24 小时；然后将反应液转入透析袋（截留分子量 3500），对 0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2mM EDTA, pH6.25 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，得活化促红细胞生成素。

15

#### 实施例 7：HH-EPO-014A 的制备

通过实施例 6 得到的 10mg 活化促红细胞生成素（1.4 毫克/毫升，0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2mM EDTA, pH6.25），加入 100 毫克 mPEG-MAL-01(20kD)。搅拌反应 60 分钟；再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM，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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲液体系。

反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200)，即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014A)，约 5mg。

#### 实施例 8：HH-EPO-014B 的制备

通过实施例 6 得到的含有游离巯基的 10mg 活化促红细胞生成素（1.4 毫克/毫升，0.1M 磷酸钠盐缓冲液，含 2mM EDTA, pH6.25），加入 100 毫克 mPEG-MAL-02(20kD)。搅拌反应 60 分钟（25°C）；再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM，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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲

液体系。

反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200), 即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014B), 约 5.5mg。

### 5 实施例 9: HH-EPO-014C 的制备

向实施例 6 得到的 10mg 活化促红细胞生成素 (1.4 毫克/毫升, 0.1M 磷酸钠盐缓冲液, 含 2mM EDTA, pH6.25) 溶液中加入 100 毫克 mPEG-MAL(20KD), 搅拌反应 60 分钟 (25°C), 再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM, 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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲液体系。

10 反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200), 即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014C), 约 6.2mg。

### 实施例 10: HH-EPO-014D 的制备

15 向实施例 6 得到的 10mg 活化促红细胞生成素 (1.4 毫克/毫升, 0.1M 磷酸钠盐缓冲液, 含 2mM EDTA, pH6.25) 溶液中加入 100 毫克 mPEG-OOPPS(20KD), 搅拌反应 60 分钟 (25°C), 再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM, 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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲液体系。

20 反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200), 即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014D), 约 6.0mg。

### 实施例 11: HH-EPO-014E 的制备

25 向实施例 6 得到的 10mg 活化促红细胞生成素 (1.4 毫克/毫升, 0.1M 磷酸钠盐缓冲液, 含 2mM EDTA, pH6.25) 溶液中加入 100 毫克 mPEG-OOPPS-01(20KD), 搅拌反应 60 分钟 (25°C), 再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM, 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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲液体系。

反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200), 即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014E), 约 5.6mg。

### 实施例 12: HH-EPO-014F 的制备

30 向实施例 6 得到的 10mg 活化促红细胞生成素 (1.4 毫克/毫升, 0.1M 磷酸钠盐缓冲液, 含 2mM EDTA, pH6.25) 溶液中加入 100 毫克 mPEG-OOPPS-02(20KD), 搅拌反应 60 分钟 (25°C), 再加入 N-甲基马来酰亚胺至浓度为 5mM, 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 20mM 乙酸—乙酸盐缓冲液体系。

35 反应液的纯化依次使用离子交换层析 (SP Sepharose H.P) 和凝胶层析 (Superdex 200), 即可得到聚乙二醇化促红细胞生成素 (HH-EPO-014F), 约 5.6mg。

## 实验例

## 实验例 1：聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对小鼠的作用

### 实验目的：

评价并比较聚乙二醇促红细胞生成素偶联物及促红细胞生成素蛋白对小鼠红细胞生成的影响。

5

### 材料及方法：

聚乙二醇促红细胞生成素偶联物 HH-EPO-014A、HH-EPO-014B、HH-EPO-014C、HH-EPO-014D、HH-EPO-014E、HH-EPO-014F 由江苏豪森药业股份有限公司提供；促红细胞生成素（阳性对照）：购自沈阳三生制药有限责任公司；10 昆明种小鼠，购自中科院上海实验动物中心，体重 25~30g，♀，各组动物数：10 只。

小鼠皮下注射聚乙二醇促红细胞生成素偶联物及促红细胞生成素，连续三天，然后处死小鼠，取全血进行外周血细胞及网织红细胞计数，血细胞计数用全自动血球计数仪计数。

15

### 结果与讨论：

按照目前的给药方案，聚乙二醇促红细胞生成素偶联物及促红细胞生成素均能明显刺激小鼠外周血网织红细胞计数的升高，说明它们刺激红细胞生成（见表一）。聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对成熟的红细胞、血细胞压积、血红蛋白含量没有明显的影响（见表二），对外周血白细胞计数液没有明显影响（见表三）。

表一、聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对小鼠网织红细胞生成的影响

分组	小鼠 (只)	给药剂量和方案	网织红细胞计数 ( $\times 10^9/L, \bar{x} \pm SD$ )
control	10	0.1%BSA in NS	177.6±55.2
HH-EPO-014A	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	826.1±25.1
HH-EPO-014B	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	810.2±58.3
HH-EPO-014C	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	765.3±67.5
HH-EPO-014D	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	652.1±81.3
HH-EPO-014E	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	647.5±24.1
HH-EPO-014F	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	586.0±32.4
EPO	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	360.6±27.0

表二、聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对小鼠红细胞生成、血细胞压积、血红蛋白含量的影响

分组	小鼠 (只)	给药剂量和方案	红细胞计数 ( $\times 10^6/\mu L, \bar{x} \pm SD$ )	血细胞压积 (%)	血红蛋白 (%)
control	10	0.1%BSA in NS	9.6±0.5	48.2±3.0	14.8±0.7
HH-EPO-014A	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	9.9±0.4	52.1±1.6	15.7±0.6
HH-EPO-014B	10	5 $\mu$ g/kg, sc, d1-3	9.3±0.1	53.0±1.5	15.7±0.7

HH-EPO-014C	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	9.6 $\pm$ 0.3	53.2 $\pm$ 1.4	15.1 $\pm$ 0.5
HH-EPO-014D	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	9.7 $\pm$ 0.1	50.0 $\pm$ 1.9	14.7 $\pm$ 0.7
HH-EPO-014E	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	9.1 $\pm$ 0.5	55.4 $\pm$ 1.2	16.5 $\pm$ 0.9
HH-EPO-014F	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	9.2 $\pm$ 0.6	56.5 $\pm$ 1.8	16.3 $\pm$ 0.7
EPO	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	9.0 $\pm$ 0.6	46.2 $\pm$ 2.7	14.3 $\pm$ 0.7

表三、聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对小鼠血小板、白细胞生成的影响

分组	小鼠 (只)	给药剂量和方案	血小板 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	白细胞 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
control	10	0.1%BSA in NS	1078.0 $\pm$ 151.2	5.1 $\pm$ 1.5
HH-EPO-014A	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1372.5 $\pm$ 135	4.2 $\pm$ 1.5
HH-EPO-014B	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1350.8 $\pm$ 327	4.2 $\pm$ 1.1
HH-EPO-014C	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1207 $\pm$ 237	5.0 $\pm$ 2.2
HH-EPO-014D	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1325 $\pm$ 223	5.5 $\pm$ 1.2
HH-EPO-014E	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1457.6 $\pm$ 247.6	4.2 $\pm$ 1.2
HH-EPO-014F	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1186.8 $\pm$ 218.6	4.1 $\pm$ 1.2
EPO	10	5 $\mu$ g/kg,sc,d1-3	1306.8 $\pm$ 170.	4.0 $\pm$ 0.9

## 实验例 2：聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对猕猴的作用

## 5 实验目的：

评价聚乙二醇促红细胞生成素偶联物对猕猴红细胞生成的影响

## 材料及方法：

聚乙二醇促红细胞生成素偶联物 HH-EPO-014A，由江苏豪森药业股份有限公司提供；促红细胞生成素（阳性对照）：购自沈阳三生制药有限责任公司。使用前以含 0.1%BSA 的生理盐水稀释。

猕猴，体重 5.5~8.5kg，雌雄不限，购自苏州西山中科实验动物中心。猕猴根据基础血红蛋白分组，每组三只。HH-EPO-014A, 1.35mg/kg，静脉注射一次；EPO 240 $\mu$ g/kg，三次/周，连续给药 6 周，每周测 1~2 次血液学指标

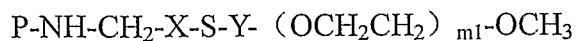
15

## 结果及讨论：

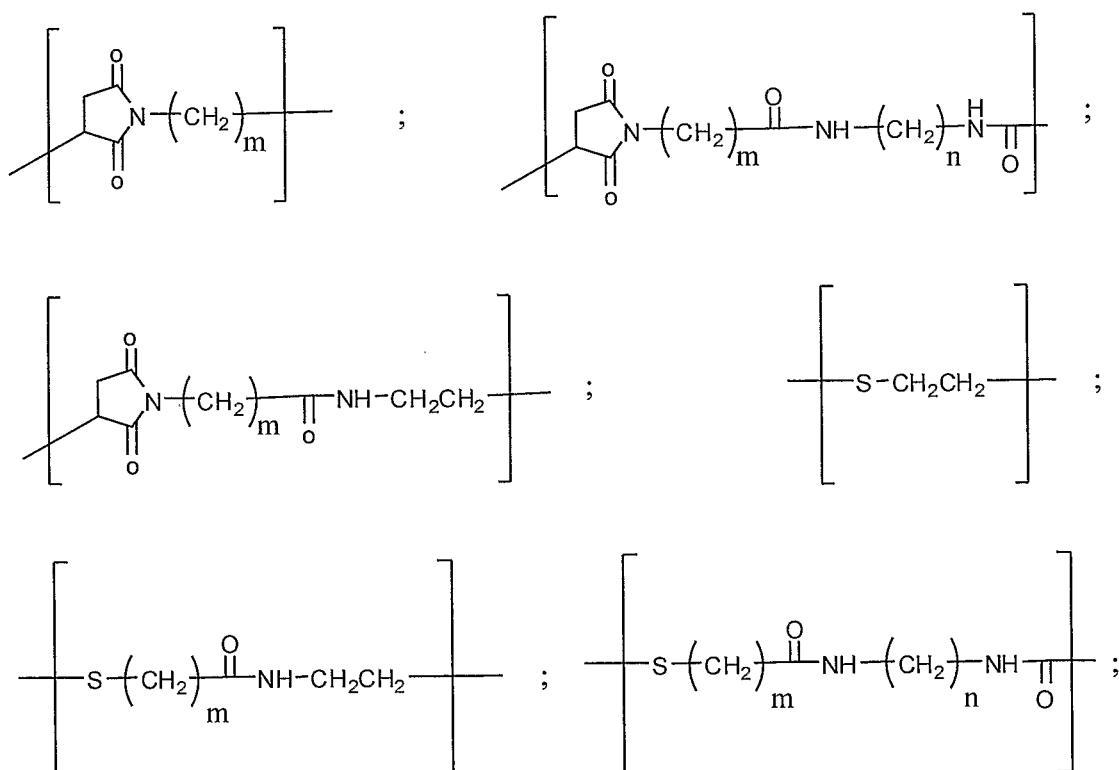
HH-EPO-014A 单次静脉注射导致猕猴外周血血红蛋白含量上升，血细胞压积升高，说明 HH-EPO-014A 刺激血红蛋白生成，该刺激作用在给药 35 天后达到顶峰，随后缓慢下降，对血红蛋白的刺激作用大约为 33%。阳性对照促红细胞生成素同样升高猕猴外周血血红蛋白含量，升高血细胞压积，其作用在停药后缓慢减弱。按照目前的给药方案，单次静脉注射 HH-EPO-014A 和多次连续静脉注射促红细胞生成素对猕猴血红蛋白生成的刺激作用相当（见附图 1、2）。

## 权利要求书：

1. 一种聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物，其结构通式为



5 所述偶联物是由甲氧基聚乙二醇基团通过式-CH<sub>2</sub>-X-S-Y-中的-CH<sub>2</sub>-基团与促红细胞生成素的氨基形成-NH-CH<sub>2</sub>-键连接而得到，其中 P 是指重组人促红细胞生成素，X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 的数目选自 2~10 的整数，m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，Y 选自：



10 其中 m、n 的数目各自独立地选自 2~10 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于所述重组人促红细胞生成素是

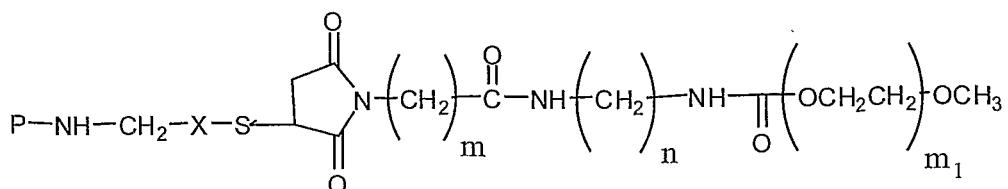
重组人促红细胞生成素 α 或 β，优选重组人促红细胞生成素 α。

15 3. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于 Y 中的 m=2，n=2。

4. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于 X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，k 选自 2~10 的整数，优选 2~4 的整数，最优选为 2。

20 5. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于所述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。

6. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于偶联物的结构式为：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素；

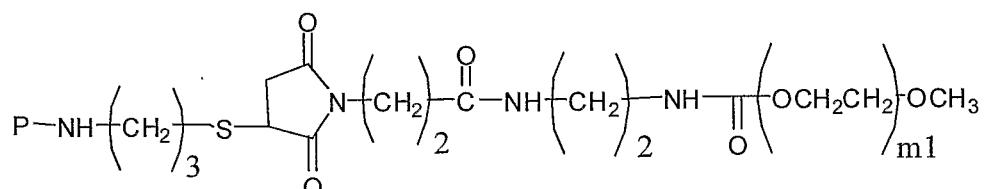
X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-，优选是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-；

5 k 的数目选自 2~10 的整数，优选 2~4 的整数，最优选为 2；

m、n 选自 2~10 的整数；

m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数。

7. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于偶联物的结构式

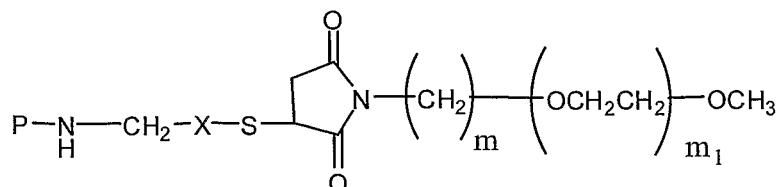


其中 m<sub>1</sub> 选自 450~600 的整数。

8. 根据权利要求 6 所述的偶联物，其特征在于所述重组人促红细胞生成素是重组人促红细胞生成素 α 或 β，优选重组人促红细胞生成素 α。

15

9. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其结构式为：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素，优选重组人促红细胞生成素 α；

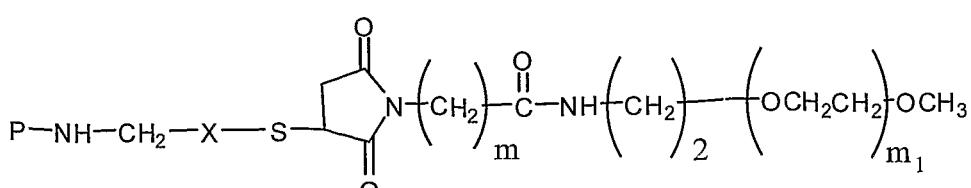
X 是-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-或-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-；

20 k 的数目选自 2~10 的整数，优选为 2；

m 选自 2~10 的整数，优选为 2；

m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，优选自 450~600 的整数。

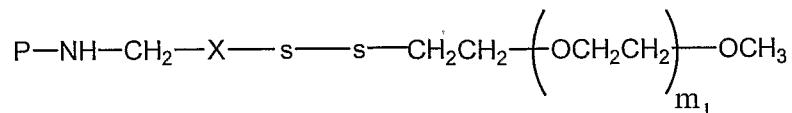
10. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其结构式为：



25

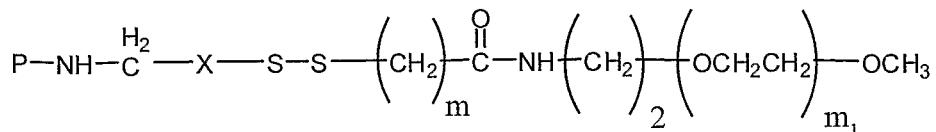
其中 P 是指重组人促红细胞生成素，优选是重组人促红细胞生成素  $\alpha$ ；  
 X 是- $(CH_2)_k$ -或- $CH_2(OCH_2CH_2)_k$ -，优选是 X 是- $(CH_2)_2$ -；  
 k 选自 2~10 的整数；  
 m 选自 2~10，优选为 2；  
 5 m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，优选自 450~600 的整数。

11. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于偶联物的结构式为：



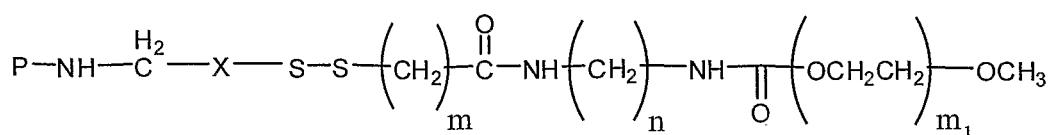
其中 P 是指重组人促红细胞生成素，优选是重组人促红细胞生成素  $\alpha$ ；  
 10 X 是- $(CH_2)_k$ -或- $CH_2(OCH_2CH_2)_k$ -，优选是 X 是- $(CH_2)_2$ -；  
 k 选自 2~10 的整数；  
 m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，优选自 450~600 的整数。

12. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其特征在于偶联物的结构式为：



15 其中 P 是指重组人促红细胞生成素，优选是重组人促红细胞生成素  $\alpha$ ；  
 X 是- $(CH_2)_k$ -或- $CH_2(OCH_2CH_2)_k$ -，优选是 X 是- $(CH_2)_2$ -；  
 k 的数目选自 2~10 的整数；  
 m 选自 2~10 的整数，优选为 2；  
 20 m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，优选自 450~600 的整数。

13. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其结构式为：



其中 P 是指重组人促红细胞生成素，优选是重组人促红细胞生成素  $\alpha$ ；  
 25 X 是- $(CH_2)_k$ -或- $CH_2(OCH_2CH_2)_k$ -，优选是 X 是- $(CH_2)_2$ -；  
 k 的数目选自 2~10 的整数；  
 m、n 选自 2~10 的整数，优选为 2；  
 m<sub>1</sub> 选自 100~2000 之间的整数，选自 450~600 的整数。

30 14. 一种制备权利要求 1~13 任意一项所述偶联物的方法，包括以下步骤：

(1) 促红细胞生成素和含有已保护巯基的醛类物质发生还原胺化反应，形成

通过-NH-CH2-键连接的活化促红细胞生成素；

(2) 所述活化促红细胞生成素脱保护，与活性甲氧基聚乙二醇衍生物偶联。

15. 一种药物组合物，包含：

5 (1) 治疗量的如权利要求 1~13 任意一项所述的聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物，和  
(2) 药学可接受的药物载体。

16. 根据权利要求 1~13 任意一项所述的偶联物在制备用于治疗以缺乏红细胞  
10 生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病的药物中的用途。

17. 根据权利要求 15 所述的药物组合物在制备用于治疗以缺乏红细胞生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病的药物中的用途。

15 18. 根据权利要求 16 或 17 所述的用途，其特征在于缺乏红细胞生成素或红细胞群缺少或缺陷为特征的疾病是末期肾功能衰竭或透析；AIDS 相关性贫血，自身免疫性疾病，或恶性肿瘤；囊性纤维变性；早期早熟性贫血；与慢性炎性疾病相关的贫血；脊髓损伤；急性失血；衰老和伴有异常红细胞产生的肿瘤疾病。

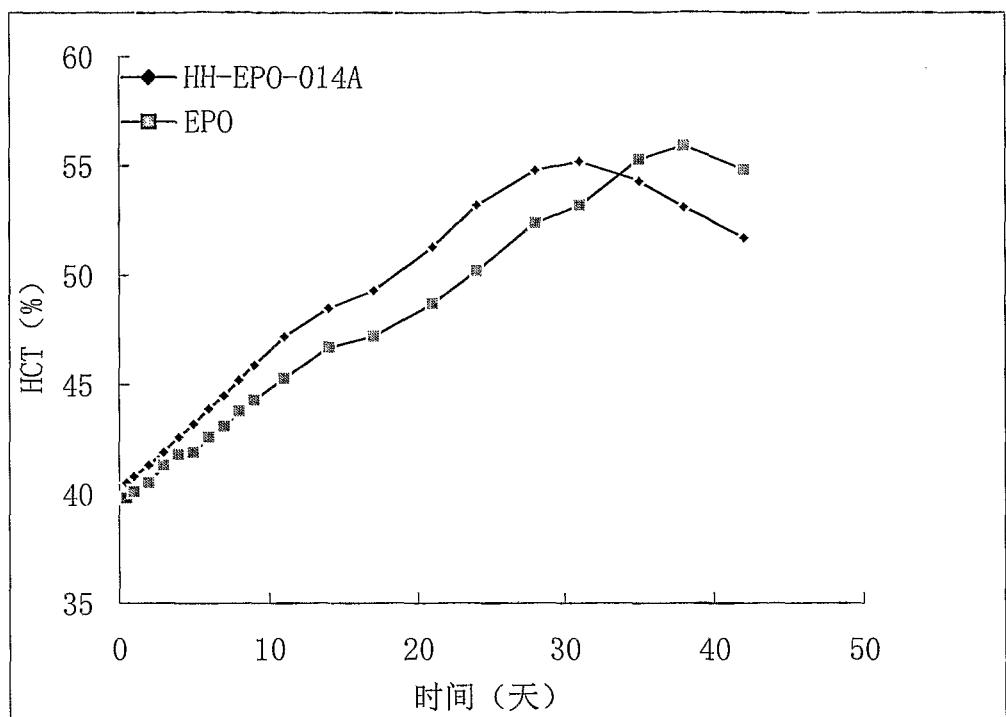


图 1

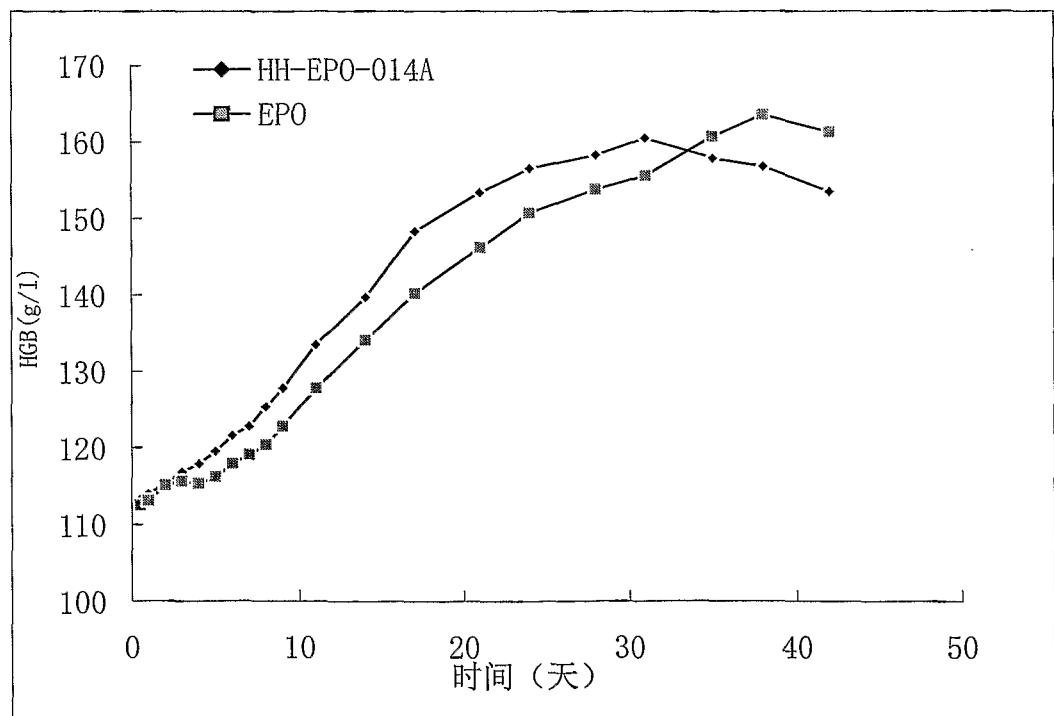


图 2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/001921

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See 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; 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)

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE and keywords: polyethylene glycol, PEG, erythropoietin, EPO, alkylat+, aldehyde etc.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	CN 1359392 A (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F) 17 Jul. 2002(17.07.2002)	
Y	claims 1-20 and 29-36, page 3, lines 20-29 of the description	1-5, 9-10, 14-18
A	the whole document	6-8, 11-13

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

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search  
10 Feb. 2009(10.02.2009)Date of mailing of the international search report  
**26 Feb. 2009 (26.02.2009)**Name and mailing address of the ISA/CN  
The State Intellectual Property Office, the P.R.China  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China  
100088  
Facsimile No. 86-10-62019451Authorized officer  
LIN, Junkai  
Telephone No. (86-10)62411095

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/001921

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROBERTS, M. J. et al Chemistry for peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Reviews. 2002, vol. 54, No. 4, pages 459-476, ISSN 0169-409X  page 462, right column, line 1-page 466, left column, line 5	1-5, 9-10, 14-18
Y	FU, Z. M. et al The research progress of protein and peptide site-PEGylation. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences. April 2007, vol. 31, No. 2, pages 178-182, ISSN 1000-5501  page 179	1-5, 9-10, 14-18
A	CN 1680449 A (CHENGDU BIOLOGICAL PROD INST) 12 Oct. 2005(12.10.2005)  the whole document	1-18
A	US 20040122164 A1 (NHO K H) 24 Jun. 2004(24.06.2004)  the whole document	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2008/001921

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1359392 A	17.07.2002	WO 0102017 A2	11.01.2001
		AU 6429900 A	22.01.2001
		US 6340742 B1	22.01.2002
		NO 20016304 A	19.02.2002
		EP 1196443 A2	17.04.2002
		BRPI 0012138 A	07.05.2002
		KR 20020026514 A	10.04.2002
		HU 0201971 A2	30.09.2002
		CZ 20014682 A3	13.11.2002
		JP 2003503464 T	28.01.2003
		ZA 200110097 A	28.05.2003
		MXPA 01012974 A	01.08.2002
		AU 768452 B	11.12.2003
		NZ 516170 A	27.02.2004
		EP 1196443 B1	26.05.2004
		DE 60011087 E	01.07.2004
		RU 2232163 C2	10.07.2004
		ES 2220501 T3	16.12.2004
		DE 60011087 T2	16.06.2005
		INCHENP 200101842 E	04.03.2005
		CA 2378533 C	14.02.2006
		CN 1194014 C	23.03.2005
		MX 232018 B	09.11.2005
		KR 100510624 B	31.08.2005
		PH 1200001735 B1	08.07.2005
		IL 146956 A	31.10.2006
		TW 266637 B1	21.11.2006
CN 1680449 A	12.10.2005	WO 2005084711 A1	15.09.2005
		CN 100362019 C	16.01.2008

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2008/001921

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 20040122164 A1	24.06.2004	WO 03049699 A2	19.06.2003
		US 2003153694 A1	14.08.2003
		KR 20030048293 A	19.06.2003
		AU 2002357806 A1	23.06.2003
		US 2004034188 A1	19.02.2004
		US 2004147687 A1	29.07.2004
		EP 1507755 A2	23.02.2005
		US 6916962 B2	12.07.2005
		US 6956135B2	18.10.2005
		AU 2002357806 A8	03.11.2005
		US 7041855 B2	09.05.2006
		KR 100488351 B	11.05.2005

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/001921

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 17/08 (2006.01) i

C07K 14/505 (2006.01) i

A61K 47/48 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i

A61P 11/00 (2006.01) i

A61P 13/12 (2006.01) i

A61P 25/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 37/00 (2006.01) i

**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类表(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; 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) )

CPRS; CNKI 和关键词: 聚乙二醇, PEG, 促红细胞生成素, EPO, 烷基化, 醛等;

WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE 和关键词: polyethylene glycol, PEG, erythropoietin, EPO, alkylat+, aldehyde 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
Y	CN 1359392 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 17.7 月 2002(17.07.2002) 权利要求 1-20 和 29-36, 说明书第 3 页第 20-29 行	1-5, 9-10, 14-18
A	全文	6-8, 11-13
Y	ROBERTS, M. J. 等 Chemistry for peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Reviews. 2002, 第 54 卷, 第 4 期, 第 459-476 页, ISSN 0169-409X 第 462 页右栏第 1 行-第 466 页左栏第 5 行	1-5, 9-10, 14-18

 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

“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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

10.2 月 2009(10.02.2009)

国际检索报告邮寄日期

26.2 月 2009 (26.02.2009)

中华人民共和国国家知识产权局(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

林峻凯

电话号码: (86-10) 62411095

## C(续). 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
Y	付正明等, 蛋白质多肽药物聚乙二醇定点修饰的研究进展, 军事医学科学院院刊, 4月 2007, 第31卷, 第2期, 第178-182页, ISSN 1000-5501 第 179 页	1-5, 9-10, 14-18
A	CN 1680449 A (成都生物制品研究所) 12.10 月 2005(12.10.2005) 全文	1-18
A	US 20040122164 A1 (NHO K H) 24.6 月 2004(24.06.2004) 全文	1-18

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2008/001921**

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 1359392 A	17.07.2002	WO 0102017 A2	11.01.2001
		AU 6429900 A	22.01.2001
		US 6340742 B1	22.01.2002
		NO 20016304 A	19.02.2002
		EP 1196443 A2	17.04.2002
		BRPI 0012138 A	07.05.2002
		KR 20020026514 A	10.04.2002
		HU 0201971 A2	30.09.2002
		CZ 20014682 A3	13.11.2002
		JP 2003503464 T	28.01.2003
		ZA 200110097 A	28.05.2003
		MXPA 01012974 A	01.08.2002
		AU 768452 B	11.12.2003
		NZ 516170 A	27.02.2004
		EP 1196443 B1	26.05.2004
		DE 60011087 E	01.07.2004
		RU 2232163 C2	10.07.2004
		ES 2220501 T3	16.12.2004
		DE 60011087 T2	16.06.2005
		INCHENP 200101842 E	04.03.2005
		CA 2378533 C	14.02.2006
		CN 1194014 C	23.03.2005
		MX 232018 B	09.11.2005
		KR 100510624 B	31.08.2005
		PH 1200001735 B1	08.07.2005
		IL 146956 A	31.10.2006
		TW 266637 B1	21.11.2006
CN 1680449 A	12.10.2005	WO 2005084711 A1	15.09.2005
		CN 100362019 C	16.01.2008
US 20040122164 A1	24.06.2004	WO 03049699 A2	19.06.2003
		US 2003153694 A1	14.08.2003
		KR 20030048293 A	19.06.2003
		AU 2002357806 A1	23.06.2003
		US 2004034188 A1	19.02.2004
		US 2004147687 A1	29.07.2004
		EP 1507755 A2	23.02.2005

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2008/001921**

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US 6916962 B2	12.07.2005
		US 6956135B2	18.10.2005
		AU 2002357806 A8	03.11.2005
		US 7041855 B2	09.05.2006
		KR 100488351 B	11.05.2005

主题的分类

C07K 17/08 (2006.01) i

C07K 14/505 (2006.01) i

A61K 47/48 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i

A61P 11/00 (2006.01) i

A61P 13/12 (2006.01) i

A61P 25/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 37/00 (2006.01) i

[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 200880021159.4

[51] Int. Cl.

C07K 17/08 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 31 日

[11] 公开号 CN 101687934A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.11.25

[21] 申请号 200880021159.4

[30] 优先权

[32] 2007.12.10 [33] CN [31] 200710195311.8

[86] 国际申请 PCT/CN2008/001921 2008.11.25

[87] 国际公布 WO2009/079911 中 2009.7.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.21

[71] 申请人 江苏豪森药业股份有限公司

地址 222047 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区

[72] 发明人 吕爱锋 孙长安 王瑞军 陈克然

李蕴波 王亚里

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

代理人 程伟

[54] 发明名称

聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物和其制备方法与用途

[57] 摘要

提供了一种通式为  $rhuEPO - NH - CH_2 - X - S - Y - mPEG$  的聚乙二醇化促红细胞生成素偶联物。还提供了该偶联物的制备方法，包括让促红细胞生成素和含有已保护巯基的醛类物质发生还原胺化反应，形成连接  $- NH - CH_2 -$  键的活化促红细胞生成素，然后与甲氧基聚乙二醇衍生物进行偶联反应，从而获得该偶联物。该偶联物或包含其的药物组合物可用于治疗缺乏红细胞生成素或红细胞缺少或缺陷的疾病。

