

(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 2009/079910 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 17/08 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01) *A61P 7/06* (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2008/001909

222047 (CN)。吴文涛(WU, Wentao) [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]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。

(22) 国际申请日:

2008年11月24日 (24.11.2008)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

200710198751.9
2007年12月12日 (12.12.2007) 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)。

(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)。

(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。

(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, Changan) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。姜涛(JIANG, Tao) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu

(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,

[见续页]

(54) Title: AN ERYTHROPOIETIN MIMETIC PEPTIDE DERIVATIVES AND ITS PHARMACEUTICAL SALT, THE PREPARATION AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐和其制备方法与用途

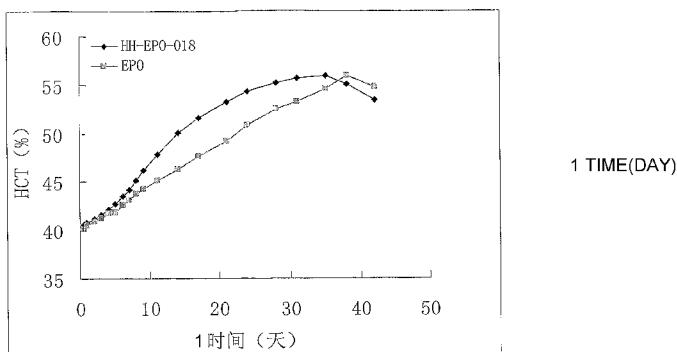


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: What is provided is an erythropoietin mimetic peptide derivatives defined as formula (I) and its pharmaceutical salt, the preparation thereof, wherein R1, R2, R3, R4, R5, n1, n2 are defined as described in description. A composition comprising of an erythropoietin mimetic peptide derivatives defined as formula (I) and its pharmaceutical salt. The uses of the derivatives and its pharmaceutical salt, as well as the uses of the composition described above in treatment of diseases characterized by a deficiency of erythropoietin or a low or defective red blood cell population. R1-R2-(CH₂)_{n1}-R3-(CH₂)_{n2}-R4-R5 (I)

[见续页]

WO 2009/079910 A1



SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, — 包括以电子形式分开公布的说明书序列表部分,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。 应要求可从国际局获得。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

(57) 摘要:

提供了一种通式为 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐以及它们的制备方法, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 n_1 、 n_2 如说明书所定义。还提供了一种含有通式 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物。提供的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐或含有促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物可在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中广泛应用。

促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐和其制备方法与用途

5

技术领域

本发明涉及一种能够和促红细胞生成素受体结合并激活促红细胞生成素受体或者能起促红细胞生成素激动作用的促红细胞生成素模拟肽衍生物及可药用盐，
10 具体地说，本发明涉及一种经活性甲氧基聚乙二醇修饰的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其制备方法；还涉及了使用上述模拟肽衍生物及可药用盐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方法。

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。
15 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即 α 型和 β 型，其中， α 型含 34% 的碳水化合物， β 型含 26% 的碳水化合物。
20 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 (1986) 免疫生物学 (Immunobiol) 72: 213-224)，
25 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)。

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具有一定疗效；此外，应用促红细胞生成素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。
30 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；促红细胞生成素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
35 119 亿美元，有巨大的市场容量。

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，促红细胞生成素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%。

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，促红细胞生成素由肝生成，然后逐渐向肾转移，出生后主要由肾小管间质细胞分泌。

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成功能性的血红蛋白，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。

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促红细胞生成素 (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)。

促红细胞生成素的部分生物学效应可以通过和细胞膜表面的受体内在作用来调节。起先，使用从小鼠的脾脏里分离出的未成熟的红细胞来研究细胞表面结合的促红细胞生成素蛋白时发现，这种蛋白是由两种多聚肽组成，其分子量大约为 85000~100000KD (Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690~3694)

由比较详细的叙述。促红细胞生成素的结合位点的数目也被计算出来了，大约每个细胞膜含有 800~1000 个位点。在这些结合位点中大约有 300 个结合位点的 K_d 水平为 90pM，而剩下的结合位点的结合力比较弱，大约有 570pM. 有研究表明从感染了 friend 病毒贫血株的小鼠的脾脏红细胞对 EPO 的响应情况发现，大约有 400 5 个结合位点，其中 K_d 水平高的为 100pM， K_d 水平低的为 800pM。

随后的工作就是两种促红细胞生成素受体被单个基因翻录，这个基因已经被克隆。例如，小鼠和人的促红细胞生成素受体的 DNA 序列以及编码肽的序列在 WO90/08822 中已经有叙述。目前的模型表明促红细胞生成素结合到促红细胞生成素受体导致了两个促红细胞生成素受体的活化和二聚，这种二聚进一步导致了信号传导的开始。10

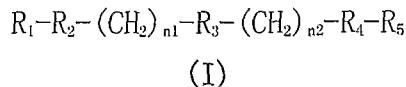
促红细胞生成素克隆基因的应用更有助于帮助寻找这些重要受体的激动剂和拮抗剂。某种程度上能够作用促红细胞生成素受体的肽已经被确定和叙述。特别是确定了一组含有主要肽段的肽，这些肽可以和促红细胞生成素受体结合并能刺激促红细胞生成素细胞的分化增殖。但是能够刺激红细胞增殖分化的肽的 EC50 却 15 很低，在 20nM 和 250nM 之间。因此这些肽在临床应用上受到了较大的限制，为了克服现有技术的不足，本发明提供了一种生物活性更好，生物利用度更高的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐以及它们的制备方法

发明内容

20 本发明在于提供一种生物活性更好，生物利用度更高的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐以及它们的制备方法。

本发明目的还在于提供一种含上述促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物，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。

25 本发明公开了一种通式为 (I) 的具有体内生物活性的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，



其中 R_1 、 R_5 选自具有体内生物学活性的促红细胞生成素模拟肽单体肽及其类似物；30 n_1 、 n_2 的数目各自独立的选自 0~10 的整数； R_2 、 R_4 选自 $-CO$ 、 $-CH_2$ ； R_3 选自 0、S、 CH_2 、 $N(CH_2)_{n3}NHR_6$ 、 $NCO(CH_2)_{n4}NHR_6$ 、 $CHOCONH(CH_2)_{n5}NHR_6$ 、 $CHSCON(CH_2)_{n6}NHR_6$ 或 $CHNHCON(CH_2)_{n7}NHR_6$ ；其中 n_3 的数目选自 1~10 的整数， n_4 的数目选自 2~10 的整数， n_5 的数目选自 2~10 的整数， R_6 选自 H 或甲氧基聚乙二醇衍生物。

在本方案中，一个优选实施方案是： R_1 、 R_5 各自独立的选自通式为 $Y_1X_1X_2X_3GX_4X_5TWX_6X_7Y_2Y_3$ 的具有体内生物学活性的促红细胞生成素模拟肽单体肽及其类似物，其中每个氨基酸均由一个标准单字母表示， R_1 、 R_5 的氨基酸序列可以是一

致或不一致，进一步优选 R_1 、 R_5 的氨基酸序列是一致的，并且 R_1 、 R_5 的 N 末端被乙酰化； X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 Y_3 各自独立的选自 20 个遗传性编码的 L-氨基酸或非天然氨基酸中的任意一个； Y_1 、 Y_2 各自独立的选自 20 个遗传性编码的 L-氨基酸或非天然氨基酸中任意一个或由这些氨基酸所组成的肽段； X_1 、 X_7 选自 C、K、D、E、
5 Orn 或 Hoc。

对上述优选的实施方案进一步优化， R_1 、 R_5 是通过二硫键或酰胺键环化的环肽；其中 R_1 、 R_5 如果是通过二硫键环化的环肽， X_1 、 X_7 分别独立的选自 C 或 Hoc；同样， R_1 、 R_5 如果是通过酰胺键环化的环肽， X_1 、 X_7 分别独立的选自 K、D、E 或 Orn。

在本方案中，包括上述优选的实施方案中， Y_3 优选自 K、H 或 R，进一步优选
10 Y_3 是 K。

在本方案中，包括上述优选的实施方案中， R_1 、 R_5 的氨基酸序列长度进一步优化，即优选自 13~40 个氨基酸，再优选的是 22 个氨基酸，更优选但不限于具有下述结构的环肽，最优选但不限于 N0:1~N0:8 环肽，即

Ac-GGLYADHYGPITWVKQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:1)
 Ac-GGLYADHYGPITWV-Orn-QPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:2)
 Ac-GGLYAKHYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:3)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:4)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:5)
 Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:6)
 Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:7)
 Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:8)
 Ac-GGLYADHYGPMTWVKQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:9)
 Ac-GGLYADHYGPMTWV-Orn-QPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:10)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPMTWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:11)
 Ac-GGTYSKHFGPMTWVDRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:12)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:13)
 Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:14)
 Ac-GGTYSCHFGPITWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:15)
 Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:16)
 Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:17)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:18)
 Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:19)
 Ac-GGTYSKHFGSMTWVERPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:20)
 Ac-GGTYRCMSGPMTWVCLPMAGGK-NH2(SEQ ID NO:21)
 Ac-GGTYRCMSGPPLTWVCLPMAGGK-NH2(SEQ ID NO:22)
 Ac-GGTYSCHFGAMTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:23)
 Ac-GGTYSCHFGAITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:24)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:25)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:26)
 Ac-GGMYSCRMGPMTWVCGPSRGKG-NH2(SEQ ID NO:27)
 Ac-GGMYSCRMGPLTWVCGPSRGKG-NH2(SEQ ID NO:28)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:29)或
 Ac-GGTYS-Hoc-HFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:30)。

在本方案中，有四个优选的实施方案分别是：

【1】 n_1, n_2 为 2, R_2, R_4 是 $-CO$, R_3 选自 $CH_2CONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, n_5 是 2, R_6 是 H 或甲氧基聚乙二醇衍生物。

【2】 n_1, n_2 为 1, R_2, R_4 是 $-CO$, R_3 选自 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, n_4 是 2, R_6 是 H 或甲氧基聚乙二醇衍生物。

5 【3】 n_1, n_2 为 2, R_2, R_4 是 $-CH_2$, R_3 选自 $CH_2CONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, n_5 是 2, R_6 是 H 或甲氧基聚乙二醇衍生物。

【4】 n_1, n_2 为 1, R_2, R_4 是 $-CH_2$, R_3 选自 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, n_4 是 2, R_6 是 H 或甲氧基聚乙二醇衍生物。

上述四个优选的实施方案属于并列关系, 不存在包含或递进关系。

10 对上述四个优选实施方案, 我们可以分别进一步优化, R_6 是甲氧基聚乙二醇衍生物, 最优选 R_6 是甲氧基聚乙二醇衍生物, 其中甲氧基聚乙二醇衍生物的分子量选自 5, 000~100, 000 道尔顿, 甲氧基聚乙二醇衍生物的结构选自分枝型或线型。

本方案中, 我们可通过进一步综合优选, 可分别获得下列四个优选实施方案:

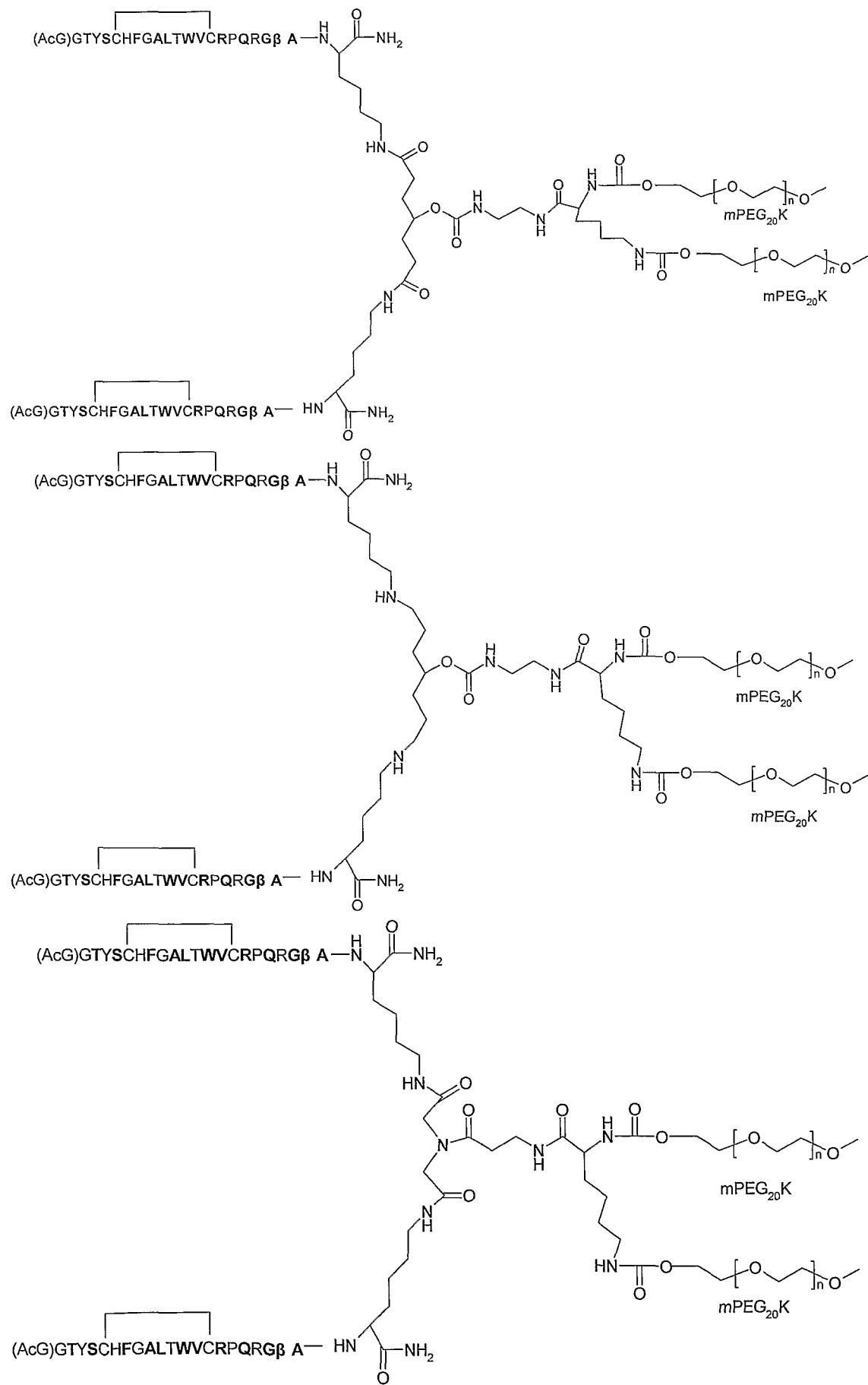
【1】 n_1, n_2 为 2, R_1, R_5 选自 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 、 $-CH_2$, 15 R_3 选自 $CH_2CONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, 其中 n_5 选自 2~10, 优选 2; R_6 是结构为线型、分子量为 20, 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物。

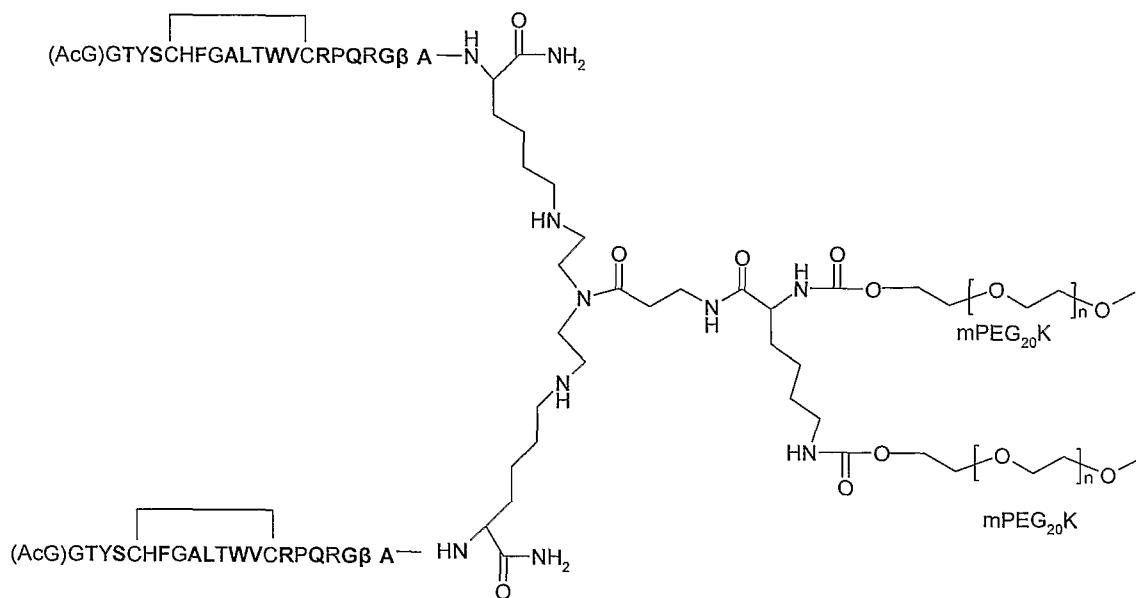
【2】 n_1, n_2 为 1, R_1, R_5 选自 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 、 $-CH_2$, R_3 选自 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, 其中 n_4 选自 2~10, 优选 2; R_6 是结构为线型、分子量为 20, 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物。

20 【3】 n_1, n_2 为 2, R_1, R_5 选自 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 、 $-CH_2$, R_3 选自 $CH_2CONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, 其中 n_5 选自 2~10, 优选 2; R_6 是结构为分枝型、分子量为 40, 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物。

【4】 n_1, n_2 为 1, R_1, R_5 选自 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 、 $-CH_2$, 25 R_3 选自 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, 其中 n_4 选自 2~10, 优选 2; R_6 是结构为分枝型、分子量为 40, 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物。

其中, 最终优选的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的结构选自:





本发明提供的促红细胞生成素模拟肽衍生物属于两性化合物，所属领域技术人员通过公知技术可使用酸性或碱性化合物与之反应成盐，通常采用的形成酸加成盐的酸为：

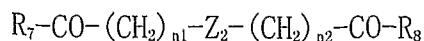
盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸；盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、三氟乙酸盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、盐酸盐、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、丁二酸盐、辛二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氨基苯甲酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、γ-羟基丁酸盐、甘醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、奈-1-磺酸盐、奈-2-磺酸盐、扁桃酸盐等，优选三氟乙酸盐。

碱性物质也可以和促红细胞生成素模拟肽衍生物成盐，这些碱性物质包括铵，碱金属或碱土金属的氢氧化物，以及碳酸盐、碳酸氢盐，典型的有氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、碳酸钠、碳酸钾等。

本发明还公开了上述促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的制备方案，包括以下步骤：

(1) 用基因工程或化学合成的方法制备 R₁、R₅，R₁、R₅选自有促红细胞生成素生物学功能的模拟肽单体肽及其类似物，

(2) 制备通式为 (II) 的功能小分子



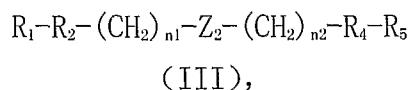
(II)

其中 n_1 、 n_2 的数目各自独立的选自 0~10 的整数；

R_7 、 R_8 选自 OH 或 H；

Z_2 选自 O、S、 CH_2 、 $N(CH_2)_{n_6}NHR_9$ 、 $NCO(CH_2)_{n_7}NHR_9$ 、 $CHOCONH(CH_2)_{n_8}NHR_9$ 、 $CHSCON(CH_2)_{n_8}NHR_9$ 或 $CHNHCON(CH_2)_{n_8}NHR_9$ ，其中 n_6 的数目选自 1~10 的整数， n_7 的数目选自 2~10 的整数， n_8 的数目选自 2~10 的整数， R_9 选自 Boc 或 Cbz，

5 (3) 将 R_1 、 R_5 与通式为 (II) 的功能小分子进行衍生，制备得通式 (III) 化合物；



10 其中 R_2 、 R_4 各自独立地选自 -CO 或 -CH₂，

(4) 脱去 Boc 或 Cbz 后，与活性甲氧基聚乙二醇通过共价键连接。

本发明还涉及了一种的药物组合物，包含：

(1) 治疗量的上述的一种通式为 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐；

15 (2) 药学可接受的药物载体。

本发明还公开了药物用途方案，即使用含有上述任意的治疗量的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐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20 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。

本发明提供的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐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。促红细胞生成素模拟肽衍生物和促红细胞生成素蛋白对25 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。

促红细胞生成素模拟肽单体肽的合成采用的是固相合成技术，其基本原理是：先将所要合成肽链的羟末端氨基酸的羟基以共价键的结构同一个不溶性的高分子30 树脂相连，然后以此结合在固相载体上的氨基酸作为氨基组份经过脱去氨基保护基并同过量的活化羧基组分反应，接长肽链。重复 (缩合 → 洗涤 → 去保护 → 洗涤 → 下一轮缩合) 操作，达到所要合成的肽链长度，最后将肽链从树脂上裂解下来，35 经过纯化等处理，即得所要的多肽。其中缩合和去保护反应步骤的中间控制采取的是茚三酮检测的方法，即当树脂肽链上有游离的氨基时，经茚三酮试剂检测会显蓝色，没有游离氨基时不显色 (茚三酮试剂本身为黄色)。因此在进行缩合反应完毕后，通过茚三酮检测，如果显黄色 (茚三酮试剂本身的颜色)，则说明本步偶合完毕可以进行下一个氨基酸的偶合前的脱保护操作，如果显蓝色，则证明肽链

上还有些游离氨基，需进一步的重复偶合或改变现有的缩合剂直至树脂肽经茚三酮检测为黄色。

单体肽的环化方法是本领域技术人员所熟知的，二硫键的环化主要是通过氧化剂使得单体肽中氨基酸侧链巯基氧化成二硫键，具体的方法有将单体肽放置于 5 DMSO 溶液中，或者放置于浓度为 5% 的碳酸氢胺溶液中自动氧化，或者加入 I_2 在醋酸溶液中氧化，优选加入 I_2 在醋酸溶液中氧化。酰胺键的环化主要是通过单体肽中氨基酸侧链的羧基和氨基在缩合剂存在的情况下形成酰胺键，加入的缩合剂为本领域技术人员所公知，通常有 DIC、EDC、HATU、Pybop 等。

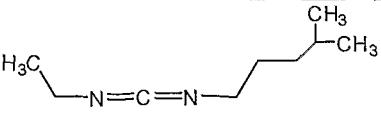
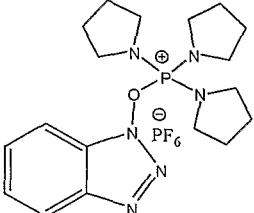
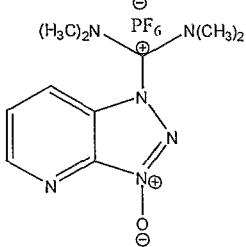
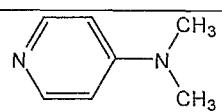
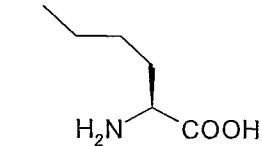
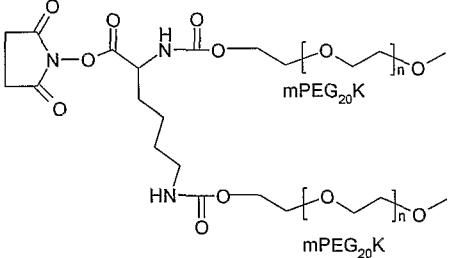
二聚肽的合成主要是通过促红细胞生成素模拟肽单体肽氨基酸残基侧链上的氨基与功能小分子形成-NH-CH₂-键或者-NH-CO-键的形式连接，本领域的技术人员可以很容易合成功能小分子，并将其与单体肽环肽通过已知的技术连接。

将二聚肽与活性甲氧基聚乙二醇衍生物进行衍生，反应体系可以选择在有机溶剂或可利用的缓冲体系里进行，在有机溶剂里进行二聚肽的聚乙二醇化反应时，可以加入但并不限于以下适量的碱，如三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、2, 4, 6 15 三甲基吡啶。在缓冲体系里进行聚乙二醇化衍生反应时，缓冲体系可以选择已知的可利用的各种缓冲液，优选 pH7.7 磷酸盐缓冲液。

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促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的生物学活性。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促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，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蛋白给药剂量为 240 μ /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。

本发明中使用到的代号与结构对应表：

缩写	英文名	结构式
Orn	L-Ornithine	
Hoc	L-Homocysteine	
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide	

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride	
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate	
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate Methanaminium	
DMAP	4-Dimethylaminopyridine	
Nle	norleucine	
mPEG ₂ -OSU(40k)	Branched Methoxy polyethylene glycol N-Hydroxysuccinimide(40k)	

附图说明

图 1：促红细胞生成素模拟肽衍生物 (HH-EPO-018) 对猕猴血细胞压积的影响。

图 2：促红细胞生成素模拟肽衍生物 (HH-EPO-018) 对猕猴血红蛋白含量的影响。

5

具体实施方式

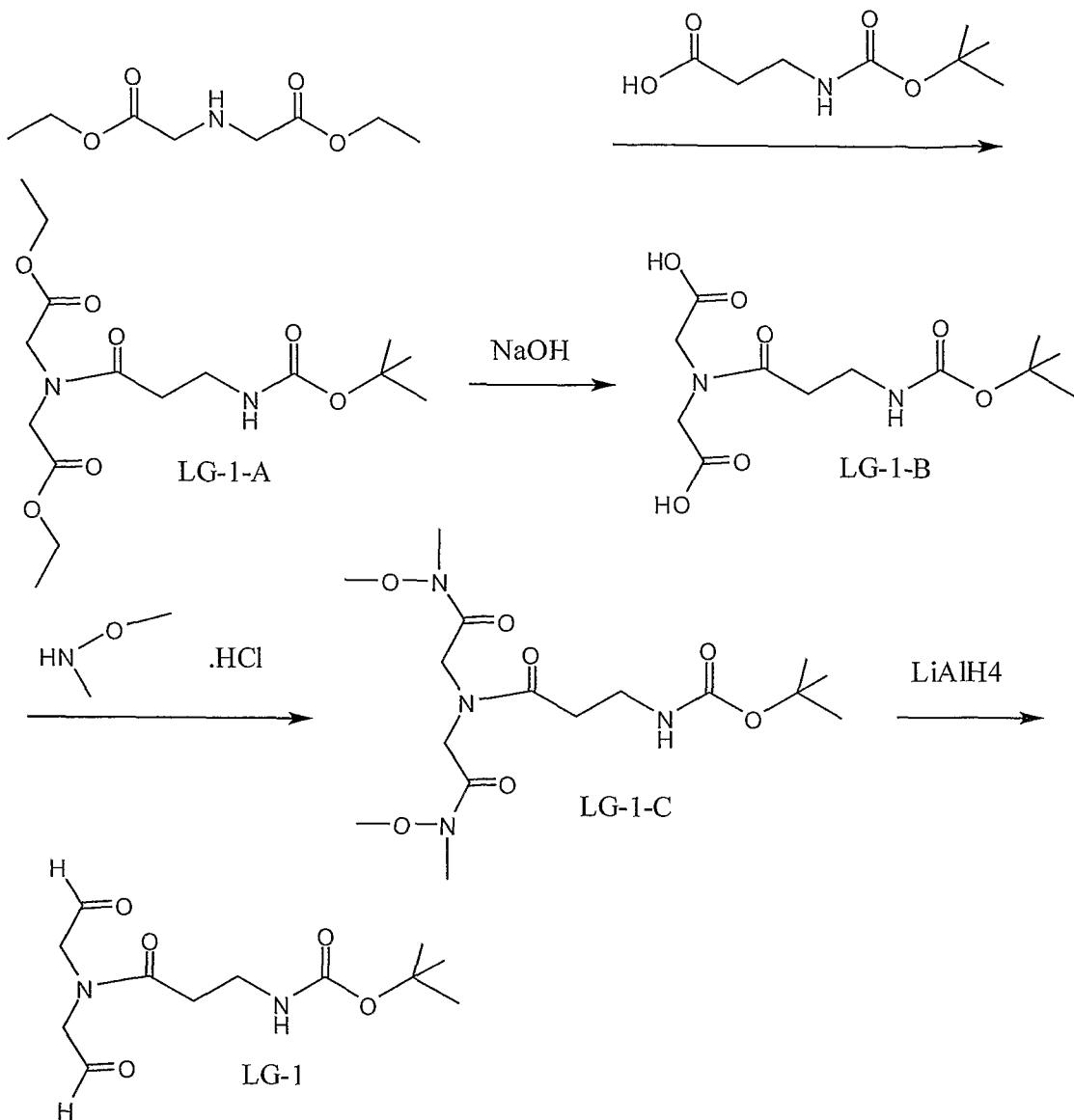
为了更详细地说明本发明，给出下列实例。但本发明的范围并非限定于此。

实施例一：促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽的合成

10 促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽的合成采用的是固相多肽合成的方法，这类多肽合成方法在许多文献中都有报道，可参见 stewart,J.M.,and Young,J.D.,solid phase peptide synthesis 2d edition,novabiochem peptide synthesis notes.本发明提供的

促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽采用手工合成的方法，树脂为 rink amind resin，所用的氨基酸衍生物的 α 氨基由 Fmoc (芴甲酰胺基) 保护，半胱氨酸侧链巯基、谷胺酰胺侧链氨基、组氨酸侧链咪唑基由 Trt (三苯甲基) 保护、精氨酸侧链胍基由 Pbf (2,2,4,6,7-五甲基二氢化苯并呋喃-5-磺酰基) 保护，色氨酸侧链吲哚基、赖氨酸侧链氨基由 Boc (叔丁氧羰基) 保护，苏氨酸侧链羟基、酪氨酸侧链苯酚基、丝氨酸侧链羟基由 tBu (叔丁基) 保护。将所要合成促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽肽链的 C 末端氨基酸的羧基以共价键的结构同高分子的不溶性树脂 (rink amind resin) 相连，然后以此结合在固相载体上的氨基酸作为氨基组份经过 20% 六氢吡啶/DMF 溶液脱去氨基保护基，然后和过量的氨基酸衍生物反应，接长肽链。重复 (缩合 \rightarrow 洗涤 \rightarrow 去保护 \rightarrow 洗涤 \rightarrow 下一轮缩合) 操作，达到所要合成的肽链长度，最后用三氟乙酸: 水: 乙二硫醇、三异丙基硅烷 = 92.5: 2.5: 2.5: 2.5 混合溶液将肽链从树脂上裂解下来，经乙醚沉降得到促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽粗品，单体肽粗品使用 C18 反相制备柱分离纯化，即得所要的促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽。其中缩合和去保护反应步骤的中间控制采取的是茚三酮检测的方法，即当树脂肽链上有游离的氨基时，经茚三酮试剂检测会显蓝色，没有游离氨基时不显色 (茚三酮试剂本身为黄色)。因此在进行缩合反应完毕后，通过茚三酮检测，如果显黄色 (茚三酮试剂本身的颜色)，则说明本步偶合完毕可以进行下一个氨基酸的偶合前的脱保护操作，如果显蓝色，则证明肽链上还有些游离氨基，需进一步的重复偶合或改变现有的缩合剂直至树脂肽经茚三酮检测为黄色。

实施例二：功能小分子 (LG-1) 的制备



第一步：LG-1-A 的制备

将亚胺基二乙酸二乙酯(10.0g,52.8mmol), Boc-β-丙氨酸(10.0g,52.8mmol), 溶于 100mL 二氯甲烷中,加入 DIC (8.0mL,52.8mmol),室温搅拌过夜,过滤反应液,滤液 5 依次用 100ml 饱和 NaHCO₃, 50ml 0.5N 的 HCl 溶液, 100ml 饱和食盐水洗涤, 分出有机层, 有机层用无水 MgSO₄ 干燥。过滤有机层, 浓缩, 得无色油状液体 **LG-1-A**:17g。

第二步：LG-1-B 的制备

10 将 17 克 **LG-1-A** 溶于 100mL MeOH: THF=1: 1 混合液, 再加入 25mL 水, 5g NaOH (125mmol)。室温搅拌 2h 后用 6N HCl 溶液调 pH 值到 1。用乙酸乙酯萃取反应液 4 次。有机层用盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压浓缩得到白色半固体。产物用 50mL 二氯甲烷溶解, 加入 300mL 正己烷, 溶液呈白色浆状。减压浓缩得白色固体 **LG-1-B**: 14g (收率约 90%)。

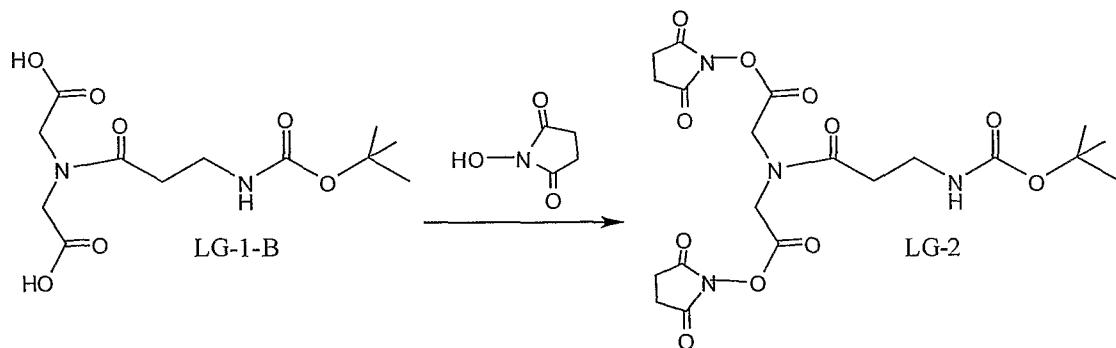
第三步：LG-1-C 的制备

将 7g LG-1-B (23mmol) 溶解在 80ml 四氢呋喃中，搅拌下加入 4.6g N,N-甲氨基甲基胺盐酸盐 (46mmol) 和 5.1g 三乙胺(51mmol)，再加入 4.4g DIC (32mmol), 4.7g HOBT (32mmol)，室温搅拌反应过夜。次日，反应液倒入水中，350ml 乙酸乙酯提取，有机层依次用 200ml 2N HCl 水溶液，200ml 饱和碳酸氢钠溶液，100ml 饱和食盐水洗涤, 分出有机层，有机层用无水硫酸镁干燥 2 小时后过滤，滤液经减压浓缩得油状物. 再经柱层析，收集目标产物 LG-1-C:4.2 g, 收率: 70%。

第四步：LG-1 的制备

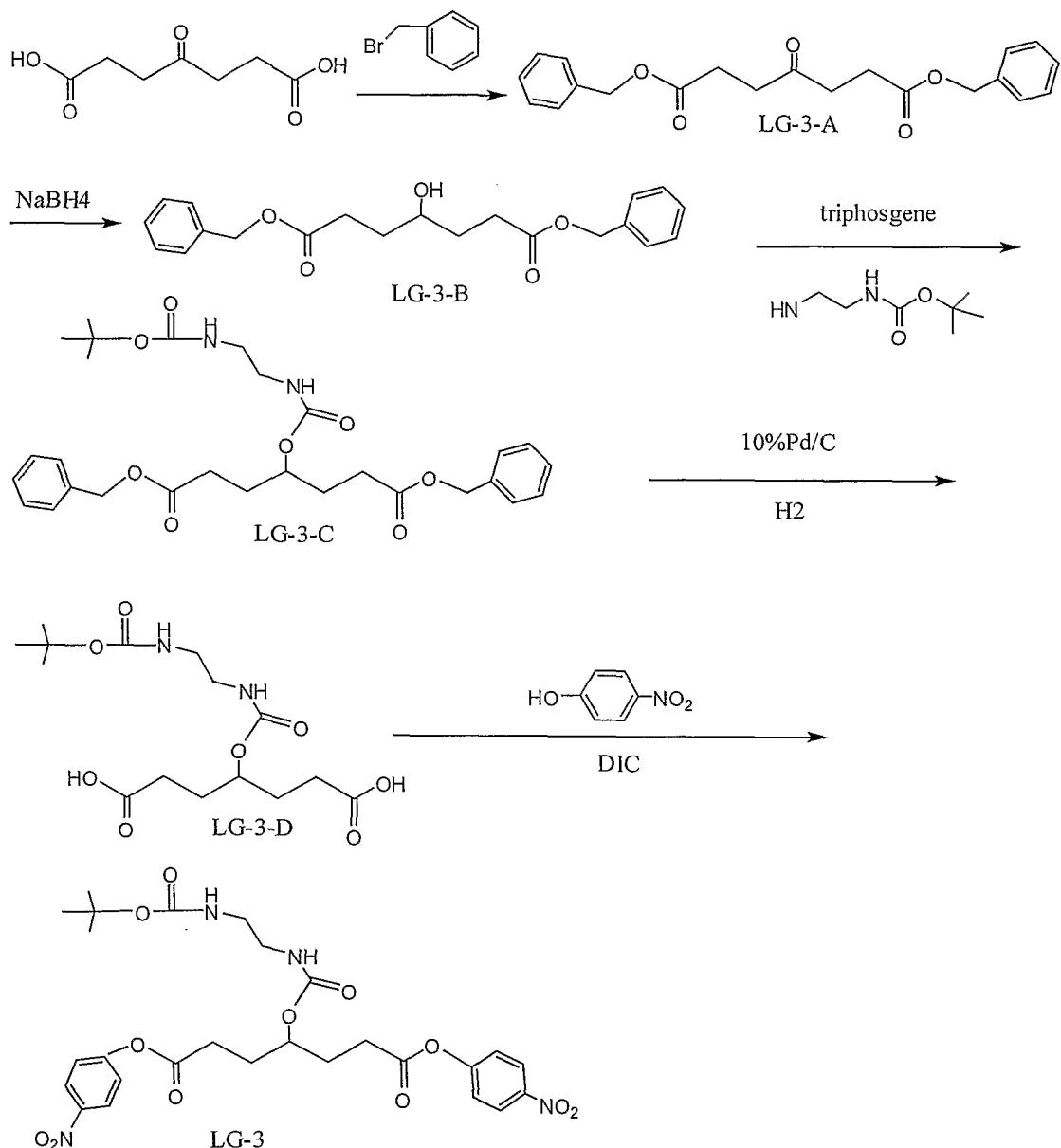
将 4.0g LG-1-C (10.2mmol)加入 60ml 四氢呋喃中溶解，冰盐浴冷却至零度，加入 LiAlH4(340mg,8.9mmol),在零度反应 30 分钟后，依次加入水 4ml, 15%NaOH 水溶液 4ml,过滤反应液，滤饼用四氢呋喃洗涤，浓缩至干，硅胶柱层析得 LG-1:1.63g(6mmol, 收率: 58.8%)

15 实施例三：功能小分子 (LG-2) 的制备



将 4g LG-1-B (13mmol) 溶于 100mL N,N—二甲基甲酰胺中，加入羟基琥珀酰亚胺 (3.1g, 21mmol), DIC (4mL, 26mmol) 和 DMAP (4-二甲基氨基吡啶) (12mg, 0.08mmol)。搅拌过夜，减压浓缩反应液。残余物溶于 80ml 乙酸乙酯，滤去不溶物。有机相依次用 40ml 饱和碳酸氢钠溶液，40ml 饱和食盐水，40ml 0.5N 的 HCl 溶液，40ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机层并用无水硫酸镁干燥。过滤有机层，滤液减压浓缩，得白色固体 LG-2: 4.4g (收率约为 68%)。

25 实施例四：功能小分子 (LG-3) 的制备



第一步：LG-3-A 的制备

7. 0g 戊酮庚二酸(0.04mol)溶解在 100ml 甲醇中，搅拌下加入 5% CsCO_3 甲醇溶液，控制加入的量使得反应液的 pH 为 8.5 左右（精密 pH 试纸测定），加毕后搅拌 30 分钟，然后过滤反应液，滤液真空浓缩得油状物，将油状物用约 100ml 的 DMSO, 升温至 60°C，加入 14g(0.08mol)溴苯，反应 8 小时后，过滤反应液，固体用少量乙醚洗涤，母液中加入 400ml 乙醚，用 200ml 饱和食盐水洗涤三次，分出有机层并用无水硫酸镁干燥 2 小时后过滤，滤液减压浓缩至原体积的 1/5 时，置于 -20 度冰柜中析晶过夜。次日，滤出固体，干燥，得白色固体 LG-3-A:10.5g。 (收率 74%)

第二步：LG-3-B 的制备

将 2g LG-3-A (0.0056mol)溶于 20ml 四氢呋喃中，溶液保持内温在小于-10 度，

搅拌加入 626mgNaBH₄ (0.0168mol), 反应 1 h 后. 加入 200ml 冷冻乙醚, 随后加入 150ml 饱和碳酸氢钠水溶液终止反应. 静止分层, 有机层用饱和食盐水洗涤一次后用无水 Na₂SO₄ 干燥 2 小时后过滤, 滤液减压浓缩, 得 LG-3-B: 1.9g (收率: 94.6%)。

5

第三步: LG-3-C 的制备

将 3.2g LG-3-B (0.009mol) 溶解在 50ml 二氯甲烷中, 零度以下搅拌加入 4.34g 三乙胺 (0.043mol)。将 1.33g(0.0045mol) 三光气溶解在 25ml 二氯甲烷中, 然后滴加到上述溶液中, 1 小时后加入 2.8g 叔丁氧羰基乙二胺。反应 3h 后, 用冰乙酸将 10 反应液调至中性, 此时有沉淀生成, 滤去沉淀, 滤液经减压浓缩至干后加入乙醚溶解, 再用 50ml 水洗涤三次, 50ml 饱和食盐水洗涤一次。分出有机层并用无水硫酸镁干燥 2 小时后过滤, 滤液减压浓缩得油. 油状物经硅胶柱层析纯化 (流动相: 石油醚: 乙酸乙酯=10:1)。合并收集目标产物, 浓缩得白色固体 LG-3-C: 1.5g(收率 38.8%)。

15

第四步: LG-3-D 的制备

将 13g LG-3-C (0.031mol) 溶解在 8ml 甲醇中, 搅拌下加入约 200mg 10% 钯碳, 常压通入 H₂ 反应 4h 后, 滤去活性碳, 滤液经浓缩后得油状物 LG-3-D :8.28g (收率: 96.7%)。

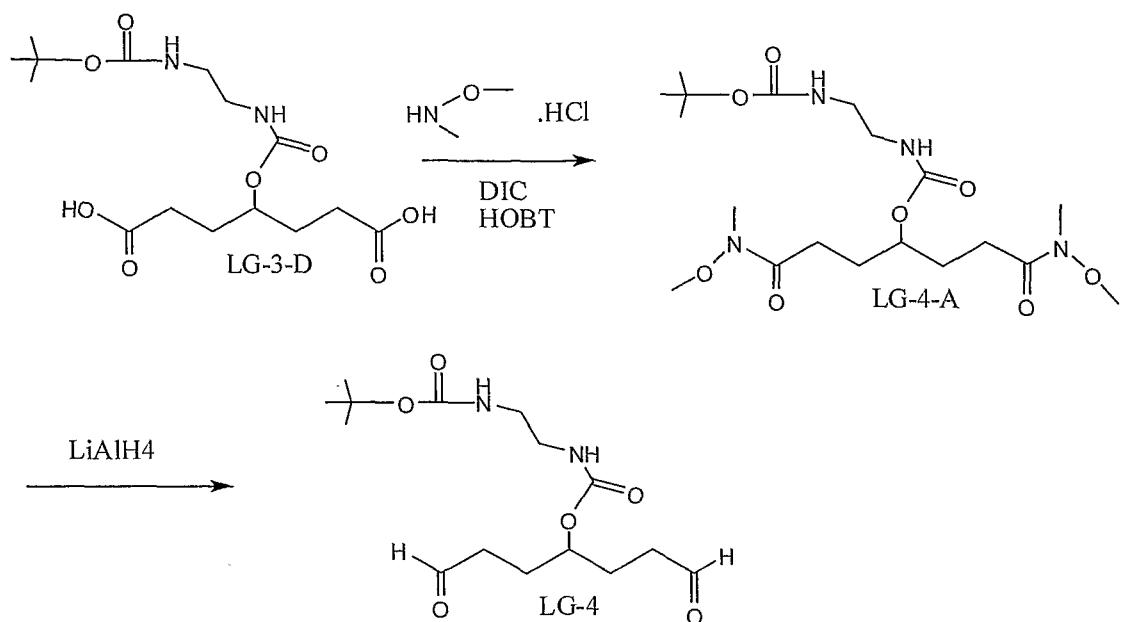
20

第五步: LG-3 的制备

将 5g LG-3-D (0.018mol) 溶解在 10ml THF 中, 加入 4.7g 对硝基苯酚 (0.043mol), 搅拌下加入 DIC 4.2g(0.043) 溶液。搅拌反应过夜。次日, 滤出产生的沉淀, 滤饼用少量乙酸乙酯洗涤, 滤液经减压浓缩至干, 向残余物中加入 100ml 25 乙酸乙酯并使其溶解, 再用 50ml 饱和食盐水洗涤一次, 分出有机层并用无水硫酸镁 干燥 2 小时后过滤, 滤液减压浓缩得油状物. 油状物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 正己烷/乙酸乙酯 20:1=10:1)。合并收集目标产物, 减压浓缩至干得白色固体 LG-3: 3.5g(收率: 32%)。

30

实施例五: 功能小分子 (LG-4) 的制备



第一步：LG-4-A 的制备

将 5g LG-3-D (0.018mol) 溶解在 60ml THF 中，搅拌下加入 3.51g N,N-甲氨基甲基胺盐酸盐 (0.036mol) 和 4.0g 三乙胺 (0.04mol)，再加入 3.4g DIC (0.027mol) 和 3.65g HOBT (0.027mol)，室温搅拌反应过夜。次日，将反应液冲入 200ml 水中，用乙酸乙酯提取二次，每次 200ml。合并有机层并依次用 50ml 2N HCl 溶液、100ml 饱和 NaHCO_3 溶液、100ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机层并用无水硫酸镁干燥 2 小时后过滤，滤液减压浓缩得油状物。油状物经柱层析纯化 (洗脱剂: 正己烷/乙酸乙酯 10:1)。合并目标组分并将减压浓缩得白色固体 LG-4-A：6.24g (收率：80%)。

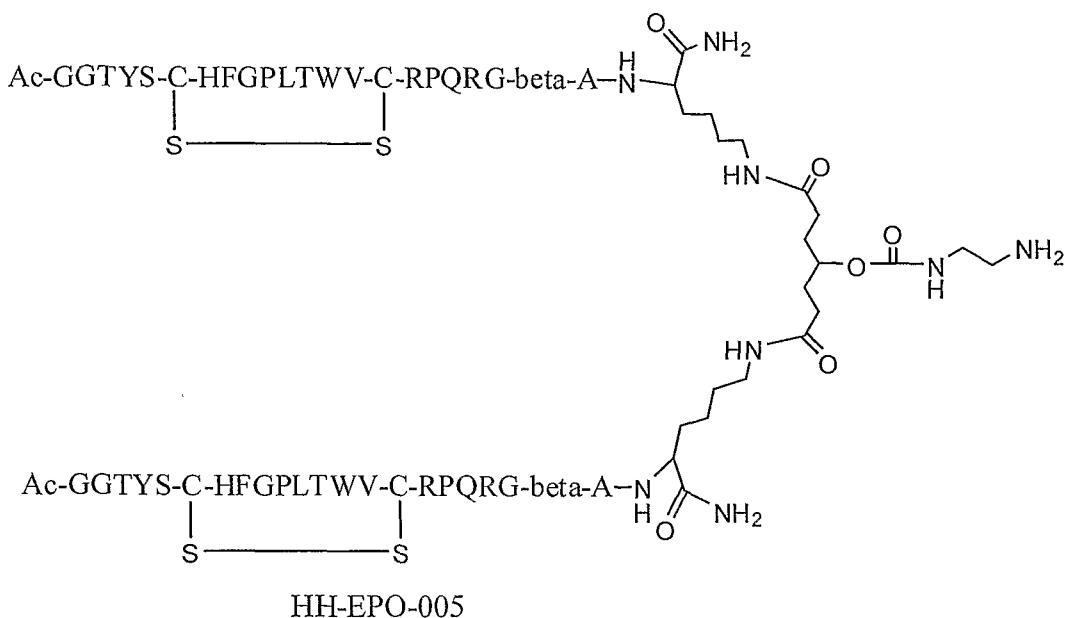
10

第二步：LG-4 的制备

将 4.0g LG-4-A (9mmol) 加入 50ml 四氢呋喃中溶解，冰盐浴冷却至零度下加入 300mg LiAlH_4 (7.9mmol)，保持零度反应 30 分钟后，向反应液中依次加入 0.3ml 水，0.9ml 15% NaOH 溶液，0.3ml 水，此时产生沉淀，过滤出沉淀物，滤饼用 20ml 四氢呋喃洗涤一次，合并滤液并经减压浓缩至干，残余物经柱层析纯化得 1.65g LG-4 (收率：55.5%)。

15

实施例六：HH-EPO-005 的制备



第一步：SEQ ID N0:5 环肽的制备

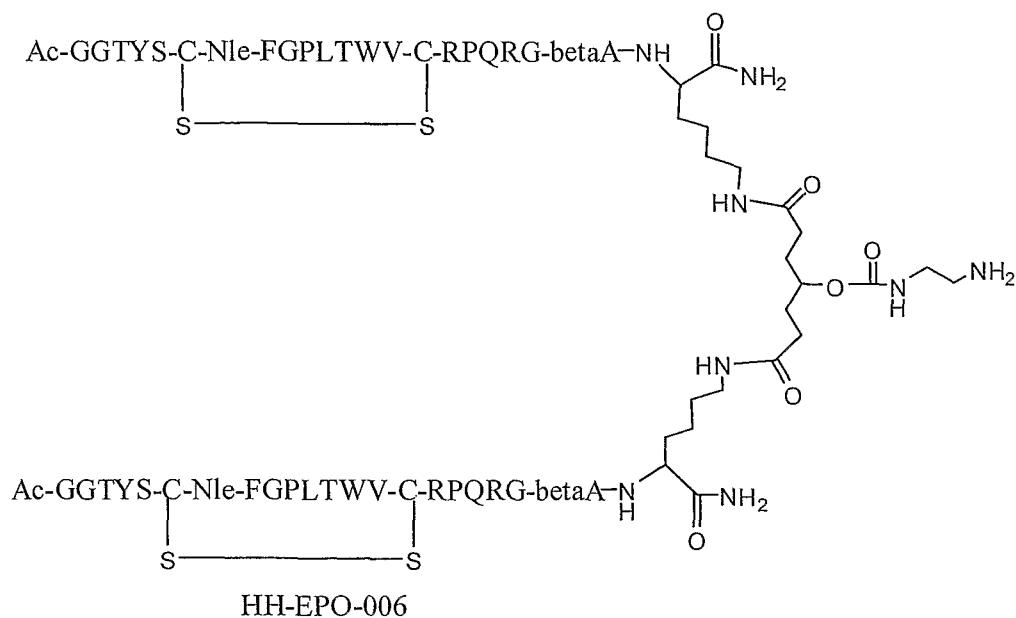
将 9g 促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽 SEQ ID N0:5 (按照实施例给出的方法合成) 溶于 3000ml 20% 冰醋酸中, 然后缓慢滴加 5% 碘甲醇溶液, 直到黄色不消失为止。反应液直接进行制备纯化, 采用反相色谱法, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥得

10 SEQ ID N0:5 环肽 3.0g (收率: 15.6%)

第二步：HH-EPO-005 的制备

将 SEQ ID N0:5 环肽 3.0g(1.22mmol), 溶解在 150ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入三乙胺 147mg(1.46mmol), 368mg 功能小分子 (LG-3) (0.61mmol), 室温搅拌 15 反应 6 小时后减压浓缩出部分 N,N—二甲基甲酰胺, 向残余物中加入 200ml 乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 真空干燥得白色固体, 再将此白色固体溶解在 50ml 20 %三氟乙酸/二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 30 分钟后减压浓缩出部分溶剂, 残余物加入 200ml 的乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得白色固体, 白色固体经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-005 :1.0g(收率约 20 33%)。

实施例七：HH-EPO-006 的制备



第一步：SEQ ID N0:6 环肽的制备

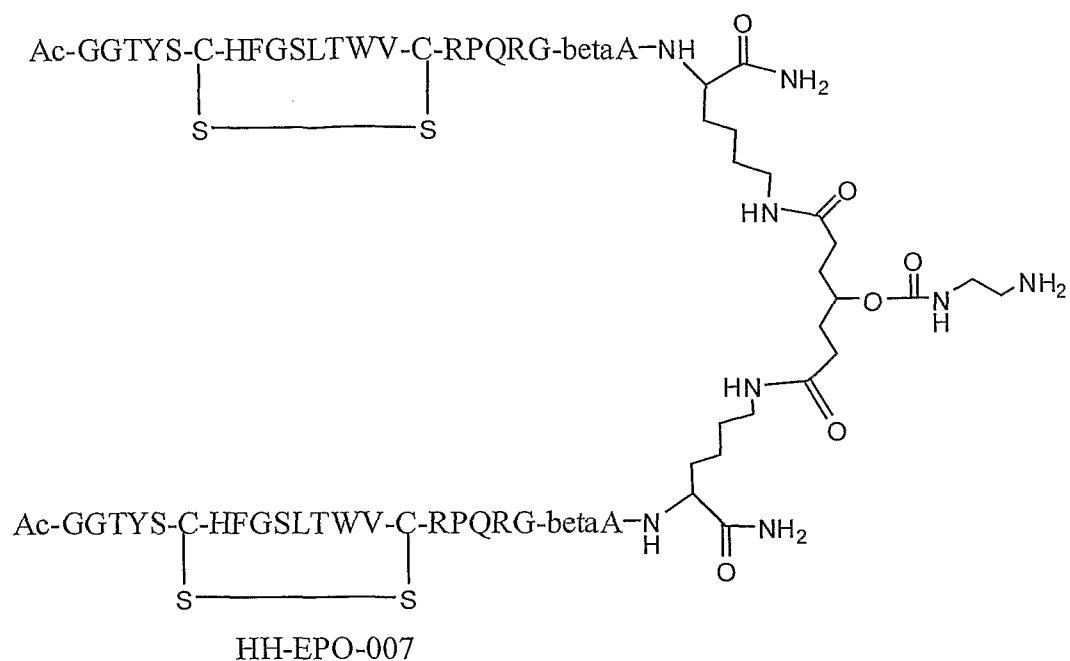
将 9g 促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽 SEQ ID N0:6 (按照实施例给出的方法合成) 溶于 3000ml 20% 冰醋酸中, 然后缓慢滴加 5% 碘甲醇溶液, 直到黄色不消失为止。反应液直接进行制备纯化, 采用反相色谱法, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥得

10 SEQ ID N0:6 环肽 3.0g (收率: 15.3%)

第二步：HH-EPO-006 的制备

将 SEQ ID N0:6 环肽 3.0g(1.23mmol), 溶解在 150ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入三乙胺 147mg(1.46mmol), 368mg 功能小分子 (LG-3) (0.61mmol), 室温搅拌 15 反应 6 小时后减压浓缩出部分 DMF, 向残余物中加入 200ml 乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 真空干燥得白色固体, 再将此白色固体溶解在 50ml 20% 三氟乙酸/二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 30 分钟后减压浓缩出部分溶剂, 残余物加入 200ml 的乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得白色固体, 白色固体经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-006 : 0.98g(收率约 32.7%)。

实施例八：HH-EPO-007 的制备



第一步：SEQ ID NO:7 环肽的制备

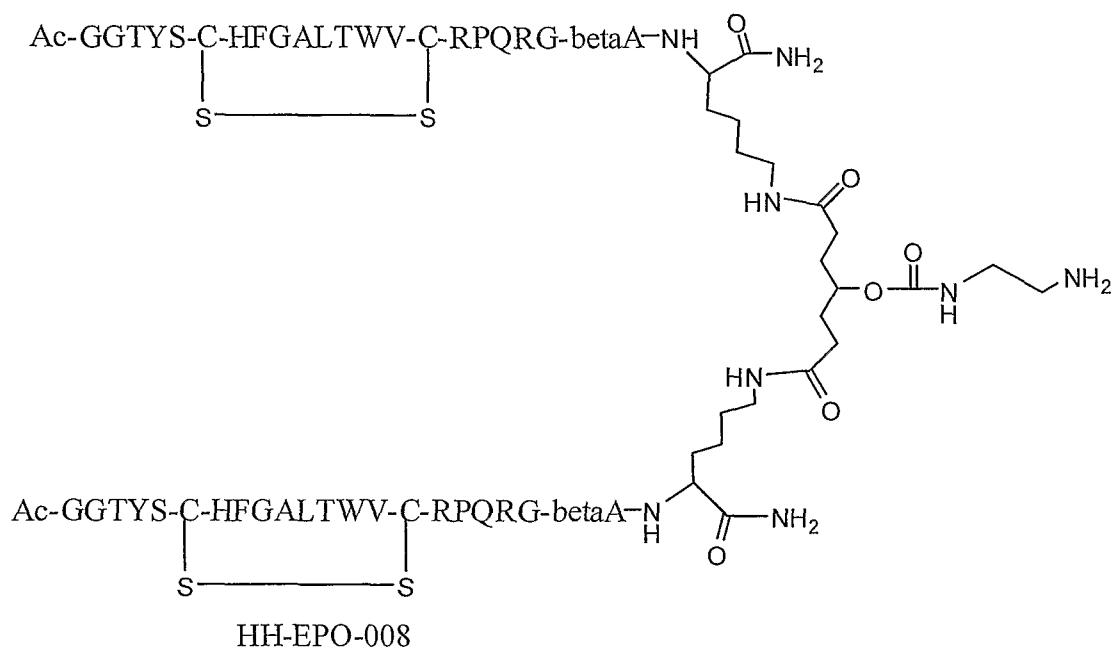
5 将 9g 促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽 SEQ ID NO:7 (按照实施例一给出的方法合成) 溶于 3000ml 20% 冰醋酸中, 然后缓慢滴加 5% 碘甲醇溶液, 直到黄色不消失为止。反应液直接进行制备纯化, 采用反相色谱法, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60 °C, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥得 SEQ ID NO:7 环肽 3.15g (收率: 16.4%)

10

第二步：HH-EPO-007 的制备

将 SEQ ID NO:7 环肽 3.0g(1.22mmol), 溶解在 150ml N,N—二甲基甲酰胺中, 15 加入三乙胺 147mg(1.46mmol), 368mg 功能小分子 (LG-3) (0.61mmol), 室温搅拌反应 6 小时后减压浓缩出部分 N,N—二甲基甲酰胺, 向残余物中加入 200ml 乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 真空干燥得白色固体, 再将此白色固体溶解在 50ml 20 % 三氟乙酸/二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 30 分钟后减压浓缩出部分溶剂, 残余物加入 200ml 的乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得白色固体, 白色固体经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60°C, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-007 :1.0g(收率约 20 33%)。

实施例九：HH-EPO-008 的制备



第一步：SEQ ID N0:8 环肽的制备

5 将 27g 促红细胞生成素模拟肽衍生物单体肽 SEQ ID N0:8(按照实施例一给出的方法合成)溶于 3000ml 20%冰醋酸中，然后缓慢滴加 5%碘甲醇溶液，直到黄色不消失为止。反应液直接进行制备纯化，采用反相色谱法，用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm)，柱温 60℃，检测波长为 214nm；以水(含 0.05%的三氟乙酸)和乙腈(含 0.05%的三氟乙酸)的不同比例为流动相，合并收集目标组分，减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥得 SEQ ID N0:8 环肽 9.3g (收率：15.7%)

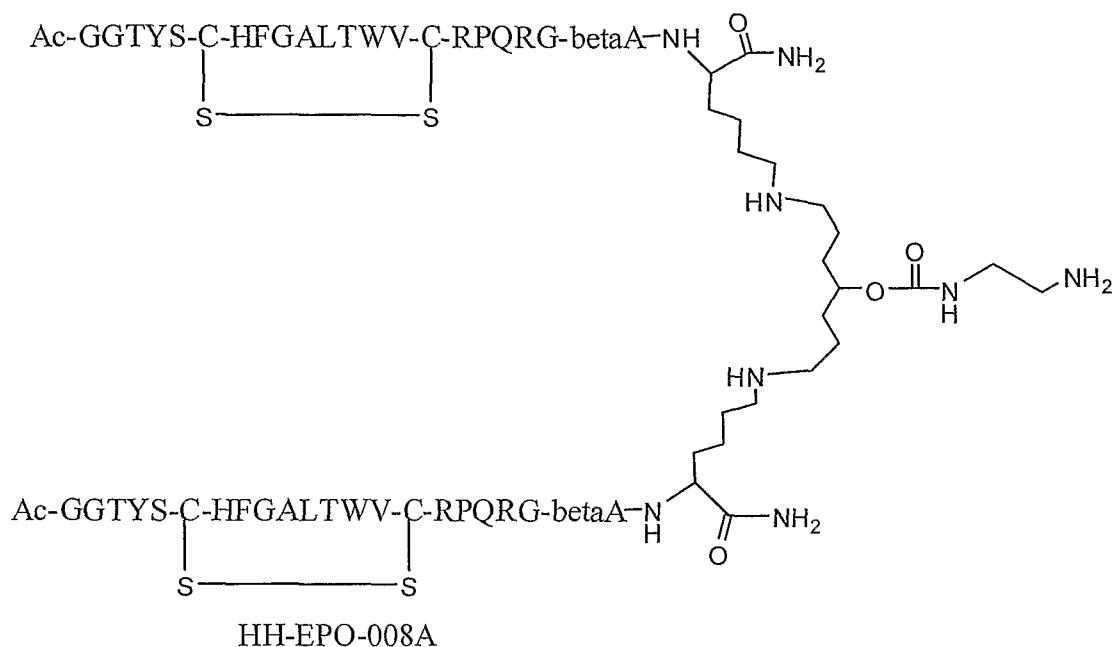
10

第二步：HH-EPO-008 的制备

15 将 SEQ ID N0:8 环肽 3.0g(1.22mmol)，溶解在 150ml N,N—二甲基甲酰胺中，加入三乙胺 147mg(1.46mmol), 368mg 功能小分子 (LG-3) (0.61mmol)，室温搅拌反应 6 小时后减压浓缩出部分 N,N—二甲基甲酰胺，向残余物中加入 200ml 乙醚，冰箱放置 2 小时后离心，真空干燥得白色固体，再将此白色固体溶解在 50ml 20 %三氟乙酸/二氯甲烷溶液中，室温搅拌 30 分钟后减压浓缩出部分溶剂，残余物加入 200ml 的乙醚，冰箱放置 2 小时后离心，经干燥得白色固体，白色固体经反相色谱法制备纯化，用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm)，柱温 60℃，检测波长为 214nm；以水(含 0.05%的三氟乙酸)和乙腈(含 0.05%的三氟乙酸)的不同比例为流动相，合并收集目标组分，减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-008 :1.12g(收率约 33%)。

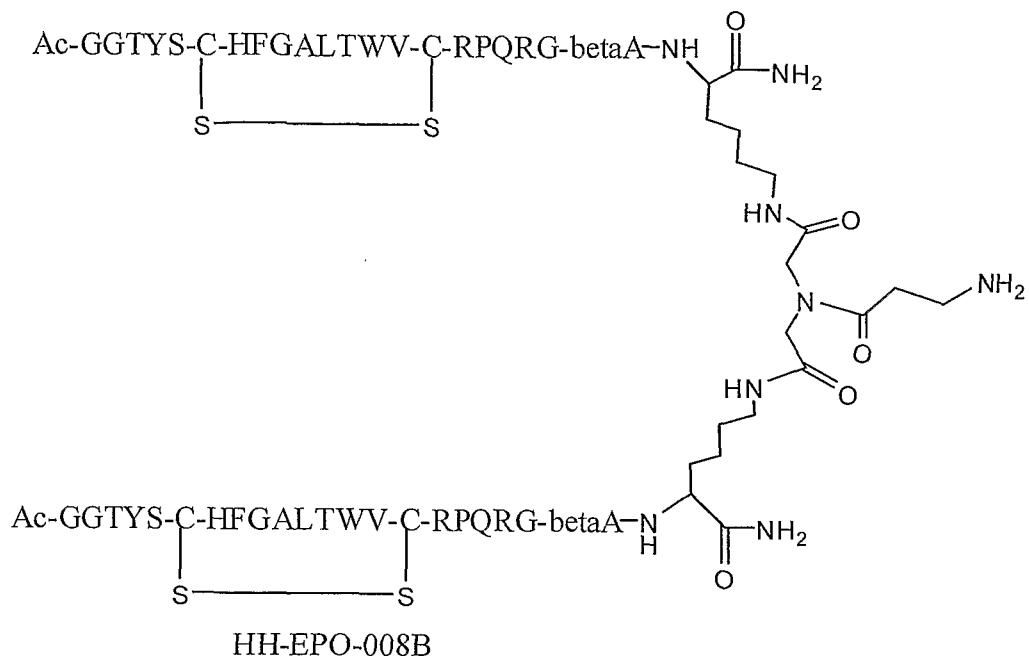
20

实施例十：HH-EPO-008A 的制备



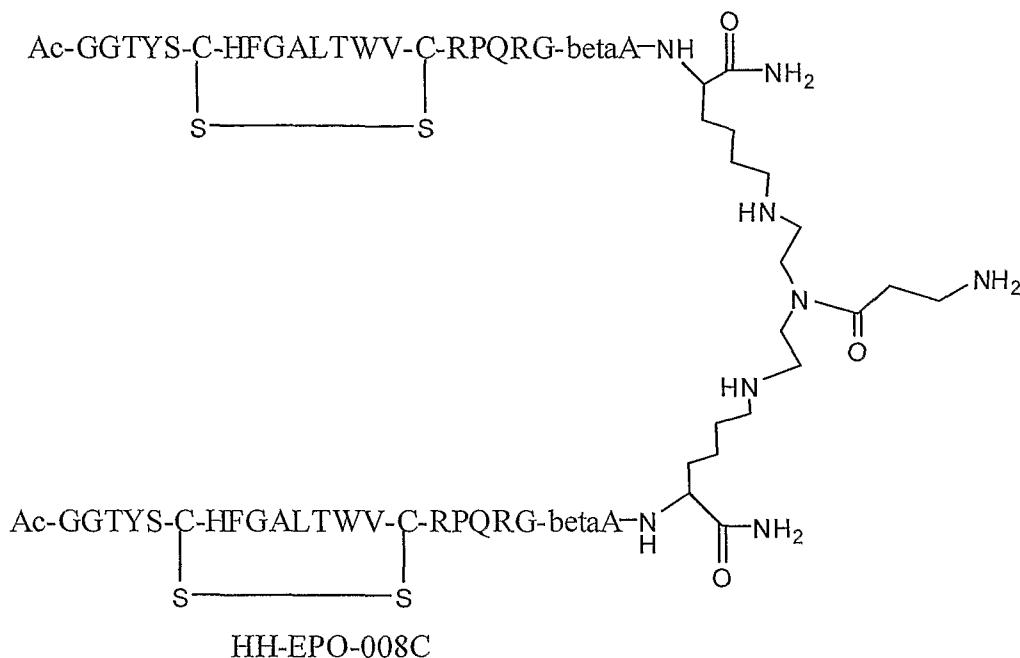
将 SEQ ID NO:8 环肽 3.0g(1.22mmol), 溶解在 150ml 20mmol 乙酸缓冲液(pH5.0) 中, 再加入 201mg 功能小分子 (LG-4) (0.61mmol) 和 10ml 乙腈, 室温搅拌反应 30 分钟后, 反应液经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 10 HH-EPO-008A: 0.75g(收率约 25%)。

实施例十一：HH-EPO-008B 的制备



将 SEQ ID NO:8 环肽 3.0g(1.22mmol), 溶解在 150ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入三乙胺 147mg(1.46mmol), 322mg 功能小分子 (LG-2) (0.61mmol), 室温搅拌反应 6 小时后减压浓缩出部分 N,N—二甲基甲酰胺, 向残余物中加入 200ml 乙醚, 5 冰箱放置 2 小时后离心, 真空干燥得白色固体, 再将此白色固体溶解在 50ml 20 %三氟乙酸/二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 30 分钟后减压浓缩出部分溶剂, 残余物加入 200ml 的乙醚, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得白色固体, 白色固体经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂 (Waters SymmetryShield™ RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 10 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-008 :1.3g(收率约 43%)。

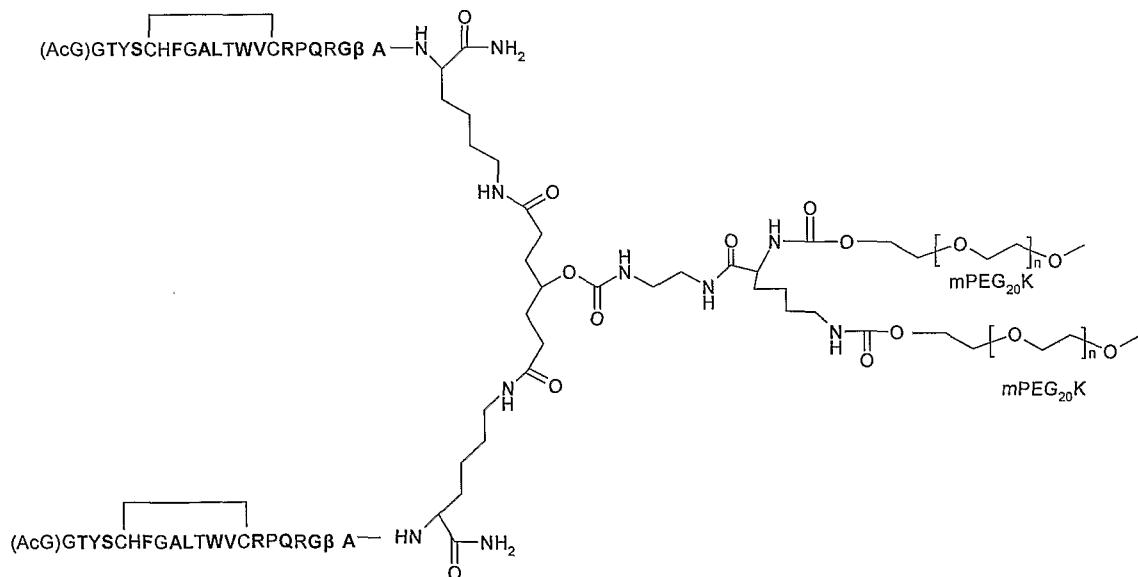
实施例十二：HH-EPO-008C 的制备



将 SEQ ID NO:8 环肽 3.0g(1.22mmol), 溶解在 150ml 20mmol 乙酸缓冲液(pH5.0) 中, 再加入 165mg 功能小分子 (LG-1) (0.61mmol) 和 10ml 乙腈, 室温搅拌反应 5 30 分钟后, 反应液经反相色谱法制备纯化, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-008C : 0.8g(收率约 27%)。

10

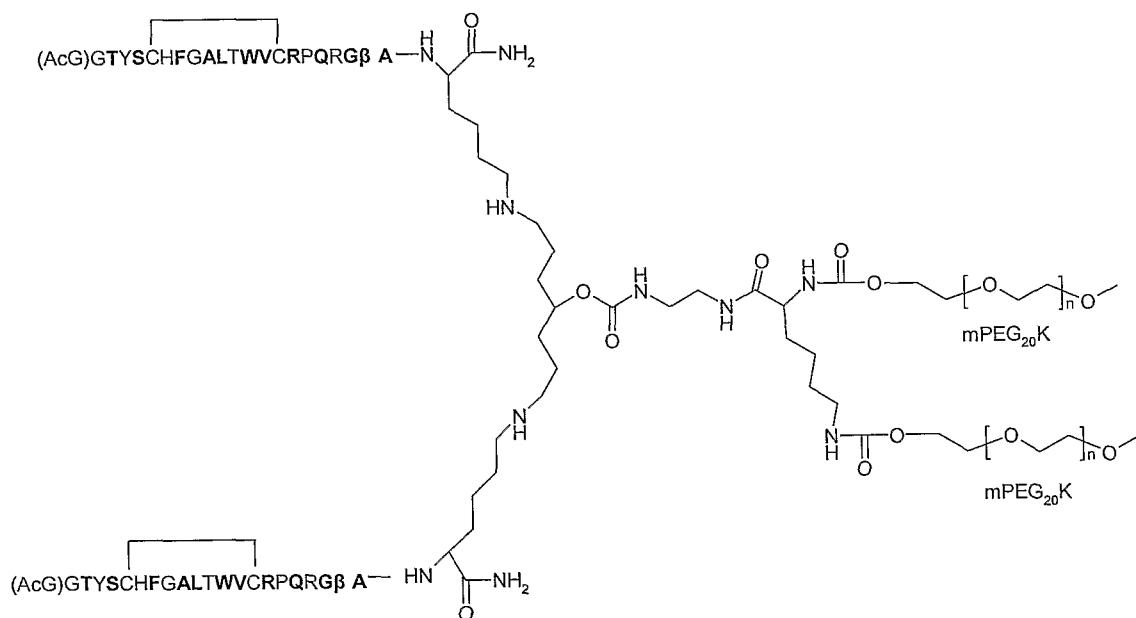
实施例十三: HH-EPO-018 的制备



将 0.5g HH-EPO-008 (0.98mmol) 溶解在 100ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入

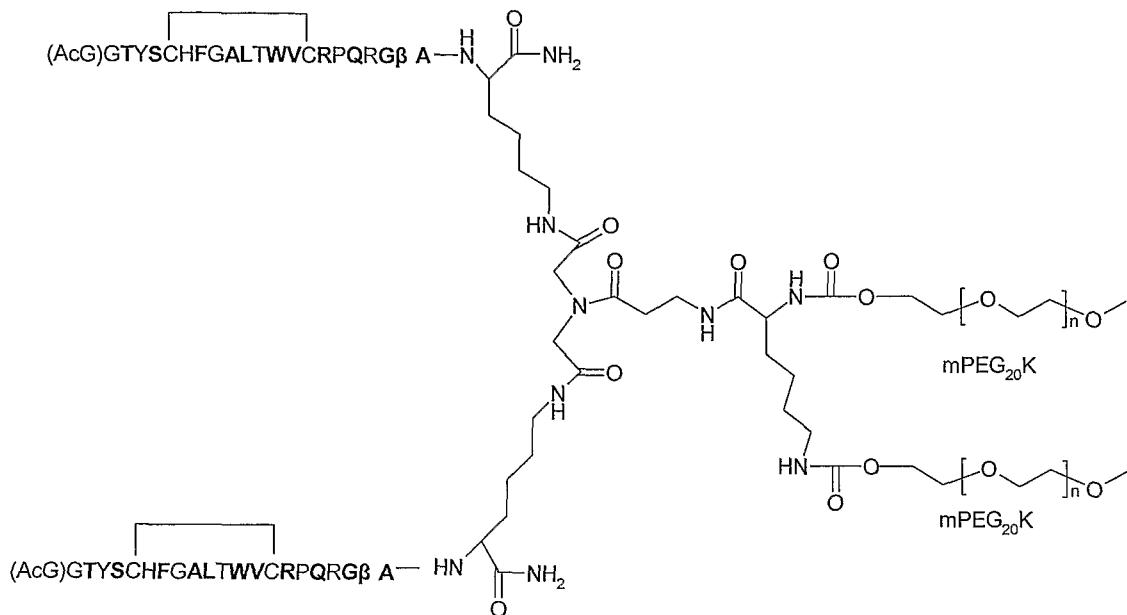
39.6mg 三乙胺 (0.196mmol), 3.8g mPEG₂-OSU(40K) (0.96mmol), 室温搅拌 6 小时。将反应液直接冲析入 600ml 冷乙醚中, 析出固体, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得 HH-EPO-018 粗品。采用反相色谱法纯化 HH-EPO-018 粗品, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-018 : 1.8g(收率约 47%)。

实施例十四: HH-EPO-018A 的制备



10 将 0.5g HH-EPO-008 (0.98mmol) 溶解在 100ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入 39.6mg 三乙胺 (0.196mmol), 3.8g mPEG₂-OSU(40K) (0.96mmol), 室温搅拌 6 小时。将反应液直接冲析入 600ml 冷乙醚中, 析出固体, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得 HH-EPO-018 粗品。采用反相色谱法纯化 HH-EPO-018 粗品, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 15 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-018A : 1.5g(收率约 39%)。

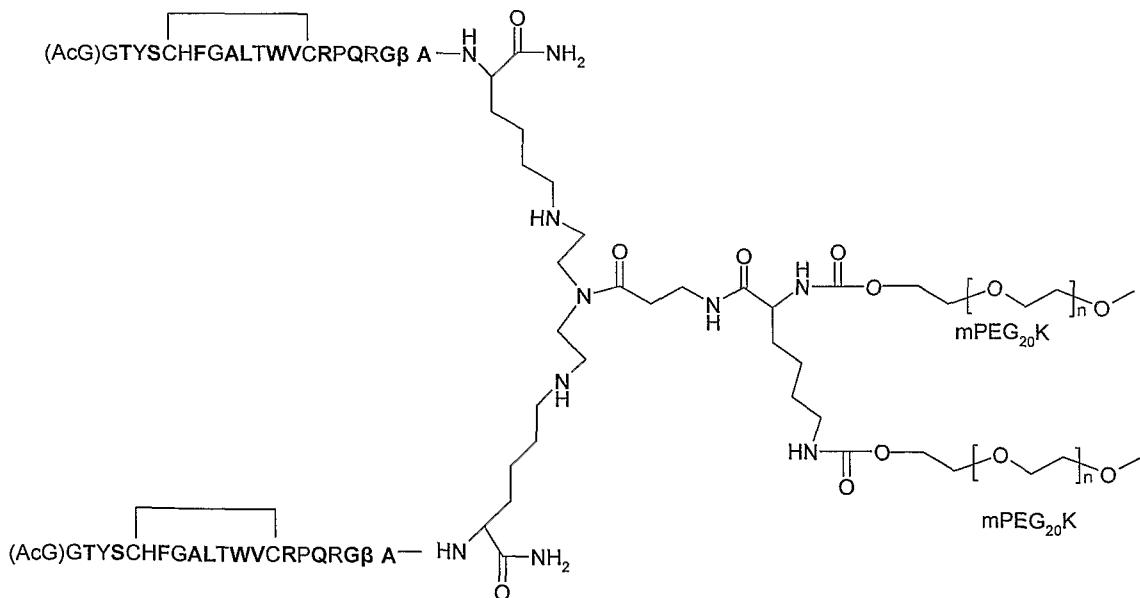
20 实施例十五: HH-EPO-018B 的制备



将 0.5g HH-EPO-008 (0.98mmol) 溶解在 100ml N,N—二甲基甲酰胺中，加入 39.6mg 三乙胺 (0.196mmol)，3.8g mPEG₂₀-OSU(40K) (0.96mmol)，室温搅拌 6 小时。将反应液直接冲析入 600ml 冷乙醚中，析出固体，冰箱放置 2 小时后离心，
 5 经干燥得 HH-EPO-018 粗品。采用反相色谱法纯化 HH-EPO-018 粗品，用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm，4.6*100mm)，柱温 60℃，检测波长为 214nm；以水 (含 0.05% 的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05% 的三氟乙酸) 的不同比例为流动相，合并收集目标组分，减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-018 : 1.7g(收率约 45%)。

10

实施例十六：HH-EPO-018C 的制备



将 0.5g HH-EPO-008 (0.98mmol) 溶解在 100ml N,N—二甲基甲酰胺中, 加入 39.6mg 三乙胺 (0.196mmol), 3.8g mPEG₂-OSU(40K) (0.96mmol), 室温搅拌 6 小时。将反应液直接冲析入 600ml 冷乙醚中, 析出固体, 冰箱放置 2 小时后离心, 经干燥得 HH-EPO-018 粗品。采用反相色谱法纯化 HH-EPO-018 粗品, 用十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(Waters SymmetryShieldTM RP18 3.5μm, 4.6*100mm), 柱温 60℃, 检测波长为 214nm; 以水 (含 0.05%的三氟乙酸) 和乙腈 (含 0.05%的三氟乙酸) 的不同比例为流动相, 合并收集目标组分, 减压蒸出大部分乙腈后经冷冻干燥 HH-EPO-018 : 1.4g(收率约 37%)。

10 实施例十七: 促红细胞生成素模拟肽衍生物对小鼠的作用

实验目的:

评价并比较促红细胞生成素模拟肽衍生物及促红细胞生成素蛋白对小鼠红细胞生成的影响。

15 材料及方法:

促红细胞生成素模拟肽衍生物 HH-EPO-001、HH-EPO-002、HH-EPO-003、HH-EPO-004、HH-EPO-005、HH-EPO-006、HH-EPO-007、HH-EPO-008、HH-EPO-015、HH-EPO-016、HH-EPO-017、HH-EPO-018 由江苏豪森药业股份有限公司提供; EPO: 购自沈阳三生制药有限责任公司; 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。

小鼠皮下注射促红细胞生成素模拟肽衍生物及促红细胞生成素蛋白, 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。

25 结果与讨论:

按照目前的给药方案, 促红细胞生成素模拟肽衍生物及促红细胞生成素蛋白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)。促红细胞生成素模拟肽衍生物和促红细胞生成素蛋白对成熟的红细胞、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、促红细胞生成素模拟肽衍生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	136.9 \pm 5.6
HH-EPO-005	10	4.5mg/kg, sc, d1-3	947.2 \pm 14.7
HH-EPO-006	10	4.5mg/kg, sc, d1-3	515.0 \pm 22.7

HH-EPO-007	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	553.5±26. 6
HH-EPO-008	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	908.1±21. 7
HH-EPO-015	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1146.9±176. 6
HH-EPO-016	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1796.4±304. 4
HH-EPO-017	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1208.9±178. 5
HH-EPO-018	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	2000.6±272. 0
HH-EPO-018A	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1889.3±252. 0
HH-EPO-018B	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1969.7±312. 0
HH-EPO-018C	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1879.3±162. 0
EPO	10	5μg/kg,sc,d1-3	483.9±146. 5

表二、促红细胞生成素模拟肽衍生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	血细胞压积	血红蛋白
			($\times 10^6/\mu\text{L}$, ±SD)	(%)	(%)
control	10	0.1%BSA in NS	9.6±0. 5	48.2±3. 0	14.8±0. 7
HH-EPO-005	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	10.1±0. 6	54.4±3. 2	16.3±0. 9
HH-EPO-006	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.6±0. 5	50.5±2. 8	15.3±0. 9
HH-EPO-007	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.1±3. 1	49.4±17. 1	14.8±4. 8
HH-EPO-008	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.6±0. 2	54.0±1. 7	16.1±0. 5
HH-EPO-015	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	10.0±0. 40	54.57±2. 50	15.01±0. 57
HH-EPO-016	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.88±0. 42	56.50±2. 95	13.24±4. 2
HH-EPO-017	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.70±0. 30	55.84±2. 33	14.93±0. 55
HH-EPO-018	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.69±0. 33	56.97±3. 13	13.22±2. 66
HH-EPO-018A	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.44±0. 65	54.47±2. 61	14.35±1. 35
HH-EPO-018B	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.77±0. 51	55.71±3. 31	13.72±2. 35
HH-EPO-018C	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	9.59±0. 53	54.98±2. 83	13.86±2. 47
EPO	10	5μg/kg,sc,d1-3	9.0±0. 6	46.2±2. 7	14.3±0. 7

5

表三、促红细胞生成素模拟肽衍生物对小鼠血小板、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 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
			($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)
control	10	0.1%BSA in NS	1078.0±151. 2	5.1±1. 5
HH-EPO-005	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1957.8±349. 5	4.2±1. 2
HH-EPO-006	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1087.8±118. 5	4.1±1. 2
HH-EPO-007	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	2082.1±863. 9	3.6±0. 8
HH-EPO-008	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1685.5±351. 3	2.9±0. 5
HH-EPO-015	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1106.6±170. 03	4.32±1. 29

HH-EPO-016	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1275.88±239.90	5.06±1.41
HH-EPO-017	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1109.60±130.73	4.25±1.65
HH-EPO-018	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1317.50±461.06	4.11±1.31
HH-EPO-018A	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1432.50±453.05	4.23±1.23
HH-EPO-018B	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1337.70±363.06	4.07±1.23
HH-EPO-018C	10	4.5mg/kg,sc,d1-3	1355.50±331.07	4.21±1.34
EPO	10	5μg/kg,sc,d1-3	1306.8±170.	4.0±0.9

实施例十八：促红细胞生成素模拟肽衍生物对猕猴的作用

实验目的：

5 评价促红细胞生成素模拟肽衍生物对猕猴红细胞生成的影响。

材料及方法：

促红细胞生成素模拟肽衍生物 HH-EPO-018，由江苏豪森药业股份有限公司提供；

促红细胞生成素：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。

10 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-018 1.35mg/kg，静脉注射一次；EPO 240μ/kg，三次/周，连续给药五周，每周测 1~2 次血液学指标。

15 结果及讨论：

HH-EPO-018 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-018 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 20 目前的给药方案，HH-EPO-018 和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）。

实施例十九：评价并比较促红细胞生成素模拟肽衍生物 HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B 与阳性对照 AF37702 对小鼠生成作用的影响

25 材料及方法：HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702，均由江苏豪森药业股份有限公司提供。其中 AF37702 也是促红细胞生成素模拟肽衍生物，为 Affymax 公司产品(商品名：Hematide)。样品使用前以含 0.1% BSA 的生理盐配制。昆明种小鼠，购自中国科学院上海实验动物中心，体重 25±2 g，♀，各组动物数：10 只。动物经适应后，皮下注射 HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702，第 1 次给药后第 6 天处死小鼠，取全血进行外周血细

胞及网织红细胞计数。血细胞计数用 ADVIA 全自动血球计数仪计数。

结果与讨论：HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702 单次皮下注射均明显升高小鼠外周血网织红细胞百分比及计数；其中 HH-EPO-018B 作用相对较强；HH-EPO-018、AF37702 作用次之；HH-EPO-015 作用最弱；HH-EPO-018、

AF37702 作用基本相当（见表四）。HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702 升高小鼠外周血血细胞压积和血红蛋白含量，它们作用基本相当，但对小鼠外周血红细胞计数均没有明显影响（见表五）。

表四：HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702 对小鼠外周血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 ($\bar{x} \pm SD$)	网织红细胞计数 ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm SD$)
			($\bar{x} \pm SD$)	($\times 10^9/L, \bar{x} \pm SD$)
control	10	0.1%BSA in NS	2.8 \pm 1.0	195.0 \pm 73.1
HH-EPO-015	10	2.5mg/kg,sc,d1	6.9 \pm 2.1**	511.9 \pm 191.7**
HH-EPO-015	10	5.0 mg/kg,sc,d1	8.9 \pm 2.4**	558.9 \pm 230.5**
HH-EPO-018	10	2.5mg/kg,sc,d1	16.2 \pm 3.5**	1137.3 \pm 240.2**
HH-EPO-018	10	5.0 mg/kg,sc,d1	16.0 \pm 3.2**	1113.2 \pm 210.7**
HH-EPO-018B	10	2.5mg/kg,sc,d1	19.0 \pm 8.9**	1336.5 \pm 629.0**
HH-EPO-018B	10	5.0 mg/kg,sc,d1	20.0 \pm 5.3**	1440.3 \pm 416.5**
AF37702	10	2.5mg/kg,sc,d1	13.5 \pm 4.1**	865.2 \pm 291.4**
AF37702	10	5.0mg/kg,sc,d1	17.2 \pm 5.3**	1202.8 \pm 355.4**

10 **P<0.01 vs control

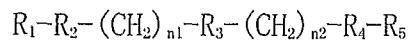
表五：HH-EPO-015、HH-EPO-018、HH-EPO-018B、AF37702 对小鼠外周血红细胞生成、血细胞压积、血红蛋白含量的影响

分组	小鼠 (只)	给药剂量和方案	红细胞计数 ($\times 10^6/uL, \bar{x} \pm SD$)	血细胞压积 ($\times 10^9/L, \bar{x} \pm SD$)	血红蛋白 (g/dL)
			($\times 10^6/uL, \bar{x} \pm SD$)	($\times 10^9/L, \bar{x} \pm SD$)	(g/dL)
control	10	0.1%BSA in NS	6.9 \pm 0.5	38.6 \pm 2.8	12.5 \pm 0.9
HH-EPO-015	10	2.5mg/kg,sc,d1	7.5 \pm 0.3	42.7 \pm 1.8*	14.3 \pm 0.6**
HH-EPO-015	10	5.0 mg/kg,sc,d1	6.3 \pm 1.7	36.5 \pm 9.9	13.1 \pm 4.5
HH-EPO-018	10	2.5mg/kg,sc,d1	7.0 \pm 0.3	40.6 \pm 1.6	13.3 \pm 2.2
HH-EPO-018	10	5.0 mg/kg,sc,d1	7.0 \pm 0.3	41.5 \pm 1.2*	14.2 \pm 0.8**
HH-EPO-018B	10	2.5mg/kg,sc,d1	6.6 \pm 1.4	39.0 \pm 7.7	14.2 \pm 0.6**
HH-EPO-018B	10	5.0 mg/kg,sc,d1	7.0 \pm 0.4	41.6 \pm 2.6*	14.4 \pm 0.9**
AF37702	10	2.5mg/kg,sc,d1	7.1 \pm 0.4	41.9 \pm 3.1*	14.1 \pm 1.1**
AF37702	10	5.0mg/kg,sc,d1	7.2 \pm 0.3	42.5 \pm 3.4*	14.0 \pm 0.8**

*P<0.05, **P<0.01 vs control

权利要求书：

1、一种通式为 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐,



5 (I)

其中 R_1 、 R_5 选自促红细胞生成素模拟肽单体肽及其类似物； n_1 、 n_2 各自独立地选自 0~10 的整数； R_2 、 R_4 各自独立地选自 -CO 或 -CH₂ ； R_3 选自 O 、 S 、 -CH₂- 、 N(CH₂)_{n_3}NHR₆ 、 NCO(CH₂)_{n_4}NHR₆ 、 CHOCO NH(CH₂)_{n_5}NHR₆ 、 CHSCON(CH₂)_{n_5}NHR₆ 或 CHNHCON(CH₂)_{n_5}NHR₆ ， 其中 n_3 选自 1~10 的整数， n_4 选自 2~10 的整数， n_5 选自 2~10 的整数， R_6 选自 H 或甲 10 氧基聚乙二醇衍生物。

2、根据权利要求 1 所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R_1 、 R_5 各自独立的选自通式为 $Y_1X_1X_2X_3GX_4X_5TWX_6X_7Y_2Y_3$ 的促红细胞生成素模拟肽单体肽或其类似物，其中该类似物中每个氨基酸均由一个标准单字母表示； X_2 、 X_3 、 15 X_4 、 X_5 、 X_6 、 Y_3 各自独立的选自 20 个遗传性编码的 L- 氨基酸或非天然氨基酸中的任意一个； Y_1 、 Y_2 各自独立的选自 20 个遗传性编码的 L- 氨基酸或非天然氨基酸中任意一个或由这些氨基酸所组成的肽段； X_1 、 X_7 选自 C 、 K 、 D 、 E 、 Orn 或 Hoc 。

3、根据权利要求 2 所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 20 R_1 、 R_5 的氨基酸序列是一致的或不一致的。

4、根据权利要求 1~3 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R_1 、 R_5 的 N 末端被乙酰化。

25 5、根据权利要求 1~4 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R_1 、 R_5 为形成二硫键的环肽。

6、根据权利要求 2 所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 Y_3 选自 K 、 H 或 R ，优选 Y_3 是 K 。

30 7、根据权利要求 1~6 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R_1 、 R_5 的氨基酸序列的长度为 13~40 个氨基酸，优选为 22 个氨基酸。

35 8、根据权利要求 1~7 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用

盐，其特征在于 R₁、R₅选自具有如下序列 SEQ ID No1-No30 结构的环肽：

Ac-GGLYADHYGPITWVKQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:1)
 Ac-GGLYADHYGPITWV-Orn-QPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:2)
 Ac-GGLYAKHYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:3)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:4)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:5)
 Ac-GGTYS-Nle-FGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:6)
 Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:7)
 Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:8)
 Ac-GGLYADHYGPMTWVKQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:9)
 Ac-GGLYADHYGPMTWV-Orn-QPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:10)
 Ac-GGLYA-Orn-HYGPMTWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:11)
 Ac-GGTYSKHFGPMTWVDRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:12)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:13)
 Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:14)
 Ac-GGTYSCHFGPITWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:15)
 Ac-GGTYS-Nle-FGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:16)
 Ac-GGTYS-Nle-FGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:17)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:18)
 Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:19)
 Ac-GGTYSKHFGSMTWVERPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:20)
 Ac-GGTYRC~~SMG~~GPMTWVCLPMAGGK-NH2(SEQ ID NO:21)
 Ac-GGTYRC~~SMG~~GPLTWVCLPMAGGK-NH2(SEQ ID NO:22)
 Ac-GGTYSCHFGAMTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:23)
 Ac-GGTYSCHFGAITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:24)
 Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:25)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:26)
 Ac-GGMYS~~CRM~~GPMTWVCGPSRGKG-NH2(SEQ ID NO:27)
 Ac-GGMYS~~CRM~~GPLTWVCGPSRGKG-NH2(SEQ ID NO:28)
 Ac-GGTYSCHFGPLTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:29)或
 Ac-GGTYS-Hoc-HFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH2(SEQ ID NO:30)。

9、根据权利要求 1~7 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R₁、R₅各自独立的选自具有如下序列 SEQ ID NO:1~NO:8 结构的环肽，

Ac-GGLYADHYGPITWVKQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:1)

Ac-GGLYADHYGPITWV-Orn-QPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:2)

Ac-GGLYAKHYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:3)

Ac-GGLYAA-Orn-HYGPITWVDQPLRGKG-NH2(SEQ ID NO:4)

Ac-GGTYSCNle-FGPLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:5)

Ac-GGTYSCNle-FGPLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:6)

Ac-GGTYSCNle-FGSLTWVCRPQRG-β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:7)或

Ac-GGTYSCNle-FGALTWVCRPQRG-β Ala-K-NH2(SEQ ID NO:8)。

5 10、根据权利要求 1~9 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物选自下列肽，其中

n₁、n₂是 2， R₂、R₄是-CO， R₃是 CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆， n₅是 2；

n₁、n₂是 1， R₂、R₄是-CO， R₃是 NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆， n₄是 2；

n₁、n₂是 2， R₂、R₄是-CH₂， R₃是 CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆， n₅是 2； 或者

10 n₁、n₂是 1， R₂、R₄是-CH₂， R₃是 NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆， n₄是 2。

11、根据权利要求 10 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R₆是 H。

15 12、根据权利要求 10 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于 R₆是甲氧基聚乙二醇衍生物，优选甲氧基聚乙二醇衍生物分子量为 5,000~100,000 道尔顿。

20 13、根据权利要求 12 所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于所述的甲氧基聚乙二醇衍生物的结构为分枝型或线型，优选甲氧基聚乙二醇衍生物的结构为线型、分子量为 20,000 道尔顿，或者甲氧基聚乙二醇衍生物的结构为分枝型、分子量为 40,000 道尔顿。

25 14、根据权利要求 1~13 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物选自下列肽，其中 n₁、n₂是 2， R₁、R₅选自序列 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8， R₂、R₄选自-CO 或-CH₂， R₃是 CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆，其中 n₅选自 2~10 的整数； R₆是结构为线型、分子量为 20,

000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物；

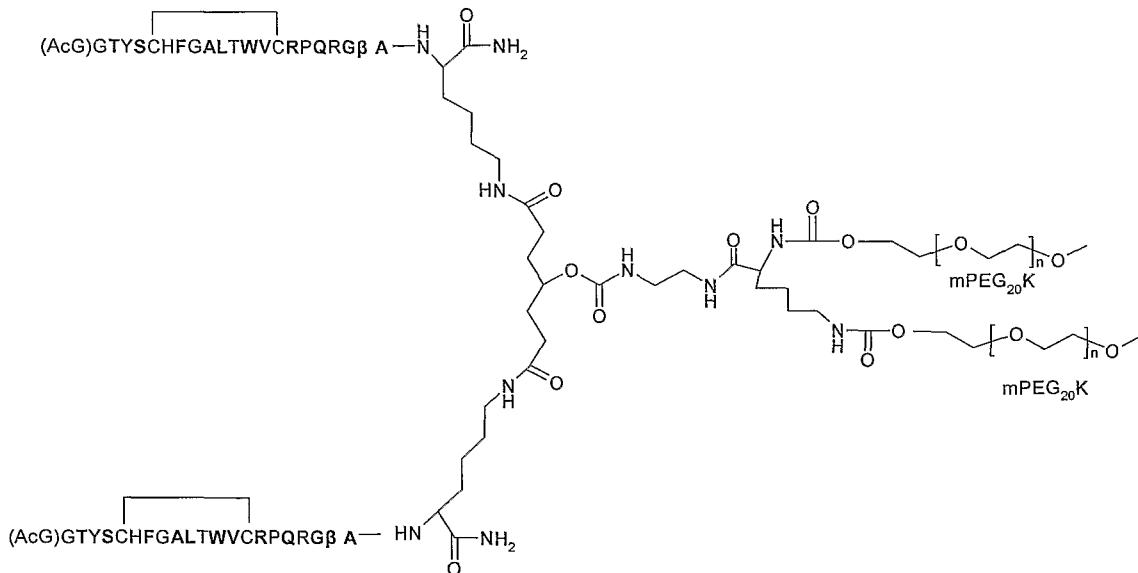
n_1, n_2 是 1, R_1, R_5 选自序列 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 或 $-CH_2$, R_3 是 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, 其中 n_4 选自 2~10 的整数; R_6 是结构为线型、分子量为 20, 000 道尔顿的甲氨基聚乙二醇衍生物;

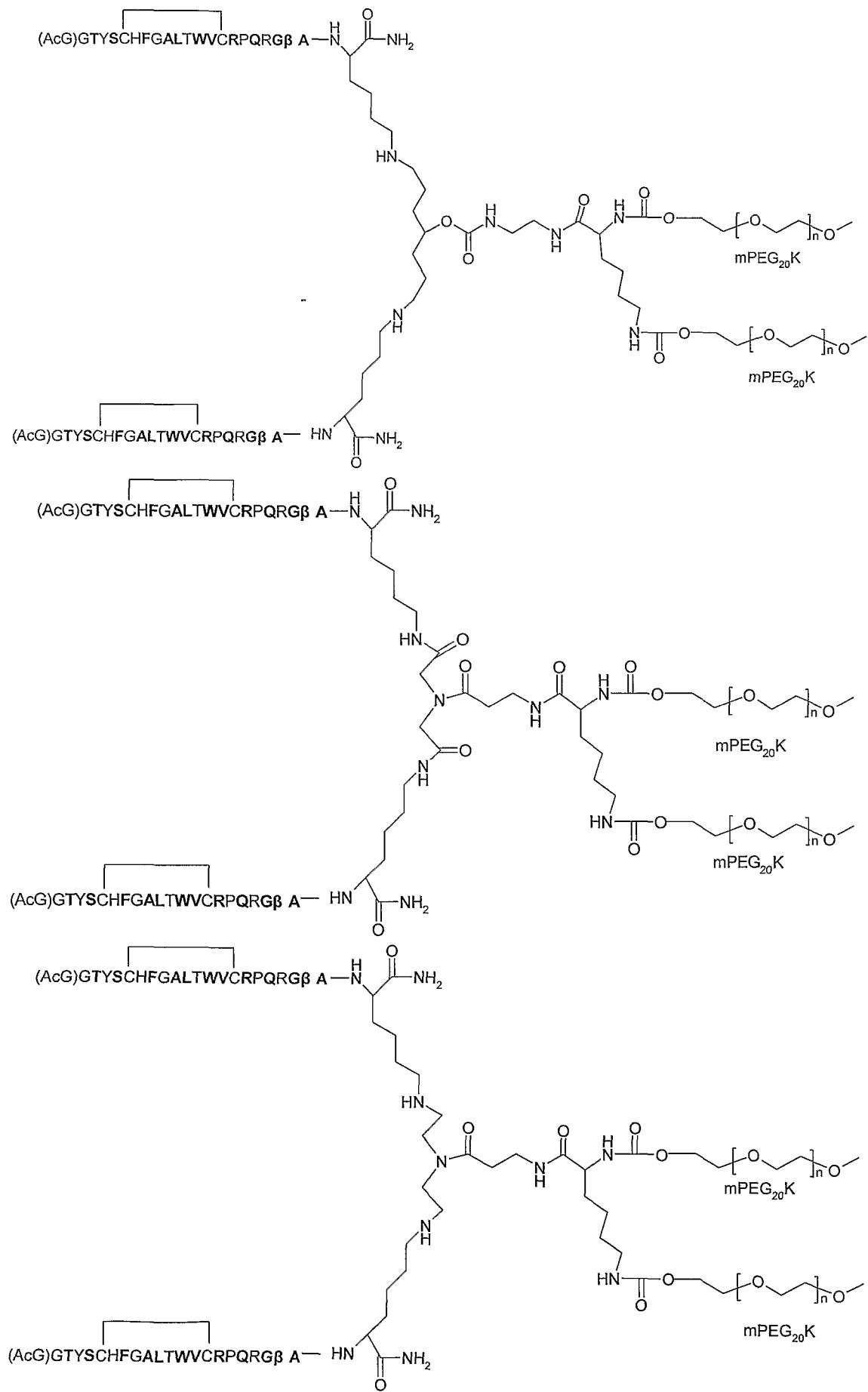
5 n_1, n_2 是 2, R_1, R_5 选自序列 SEQ ID 1~SEQ ID 8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 或 $-CH_2$, R_3 是 $CHOCONH(CH_2)_{n_5}NHR_6$, 其中 n_5 选自 2~10 的整数; R_6 是结构为分枝型、分子量为 40, 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物; 或者

n_1, n_2 是 1, R_1, R_5 选自序列 SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:8, R_2, R_4 选自 $-CO$ 或 $-CH_2$, R_3 是 $NCO(CH_2)_{n_4}NHR_6$, 其中 n_4 选自 2~10 的整数; R_6 是结构为分枝型、分子量为 40,

10 000 道尔顿的甲氧基聚乙二醇衍生物。

15、根据权利要求 1~14 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其特征在于所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐为

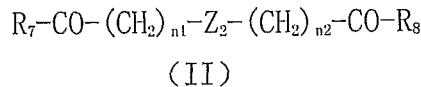




16、一种制备权利要求 1~15 任意一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的方法，包括以下步骤：

(1) 制备 R_1H 、 R_5H ，其中 R_1 、 R_5 选自促红细胞生成素模拟肽单体肽及其类似物，

(2) 制备通式为 (II) 的功能小分子



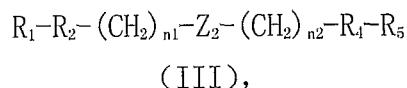
其中 n_1 、 n_2 各自独立地选自 0~10 的整数；

R_7 、 R_8 选自 OH 或 H；

Z_2 选自 O、S、 CH_2 、 $N(CH_2)_{n_6}NHR_9$ 、 $NCO(CH_2)_{n_7}NHR_9$ 、 $CHOCONH(CH_2)_{n_8}NHR_9$ 、 $CHSCON(CH_2)_{n_8}NHR_9$

10 或 $CHNHCON(CH_2)_{n_8}NHR_9$ ，其中 n_6 为选自 1~10 的整数， n_7 为选自 2~10 的整数， n_8 为选自 2~10 的整数， R_9 选自 Boc 或 Cbz，

(3) 将 R_1 、 R_5 与通式为 (II) 的功能小分子进行酰胺化反应或还原胺化反应，制备得通式 (III) 化合物，



其中 R_2 、 R_4 各自独立地选自 -CO 或 - CH_2 ，

(4) 脱去 Boc 或 Cbz 后，与活性甲氧基聚乙二醇衍生物进行酰胺化反应。

17、根据权利要求 16 所述的制备方法，其特征在于所述的通式 (II) 中，

20 n_1 、 n_2 是 1 或 2， R_7 、 R_8 选自 OH， Z_2 选自 $NCO(CH_2)_{n_7}NHR_9$ 或 $CHOCONH(CH_2)_{n_8}NHR_9$ ， n_7 选自 2~10 的整数， n_8 选自 2~10 的整数， R_9 是 Boc；或者

n_1 、 n_2 是 1 或 2， R_7 、 R_8 选自 H， Z_2 选自 $NCO(CH_2)_{n_7}NHR_9$ 或 $CHOCONH(CH_2)_{n_8}NHR_9$ ， n_7 选自 2~10 的整数， n_8 选自 2~10 的整数， R_9 是 Boc。

25 18、一种药物组合物，包含：

(1) 治疗量的如权利要求 1~15 任一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，和

(2) 药学可接受的药物载体。

30 19、根据权利要求 1~15 中任一项所述的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐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。

35 20、根据权利要求 18 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。

21、根据权利要求 19 或 20 所述的用途，其特征在于所述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。

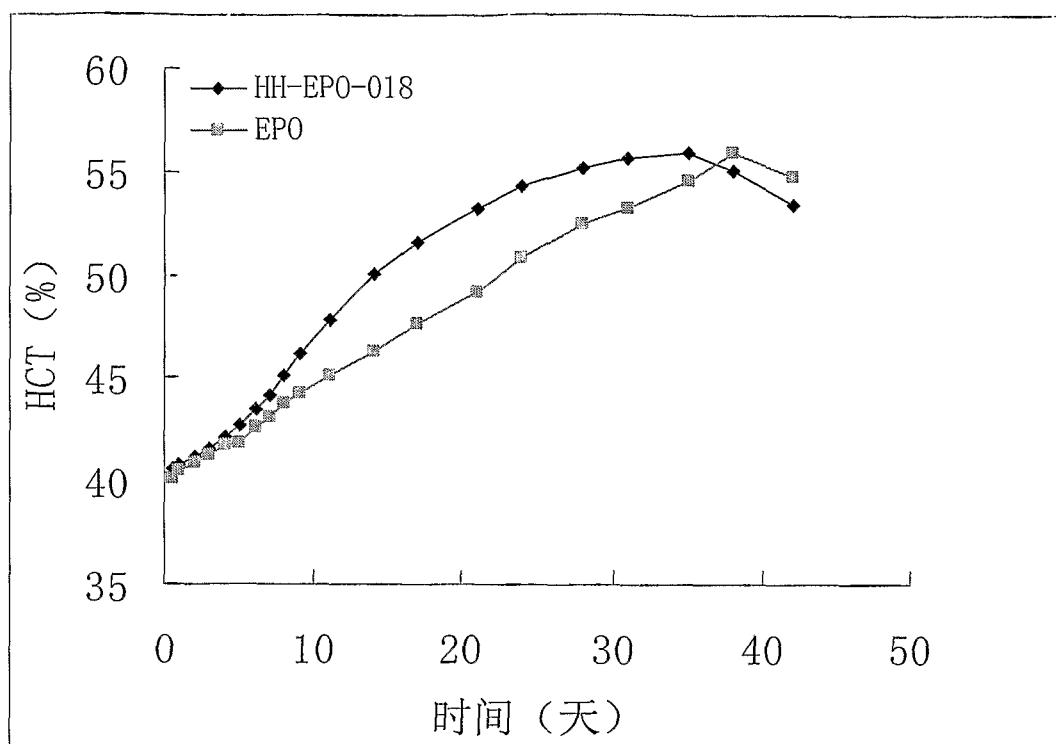


图 1

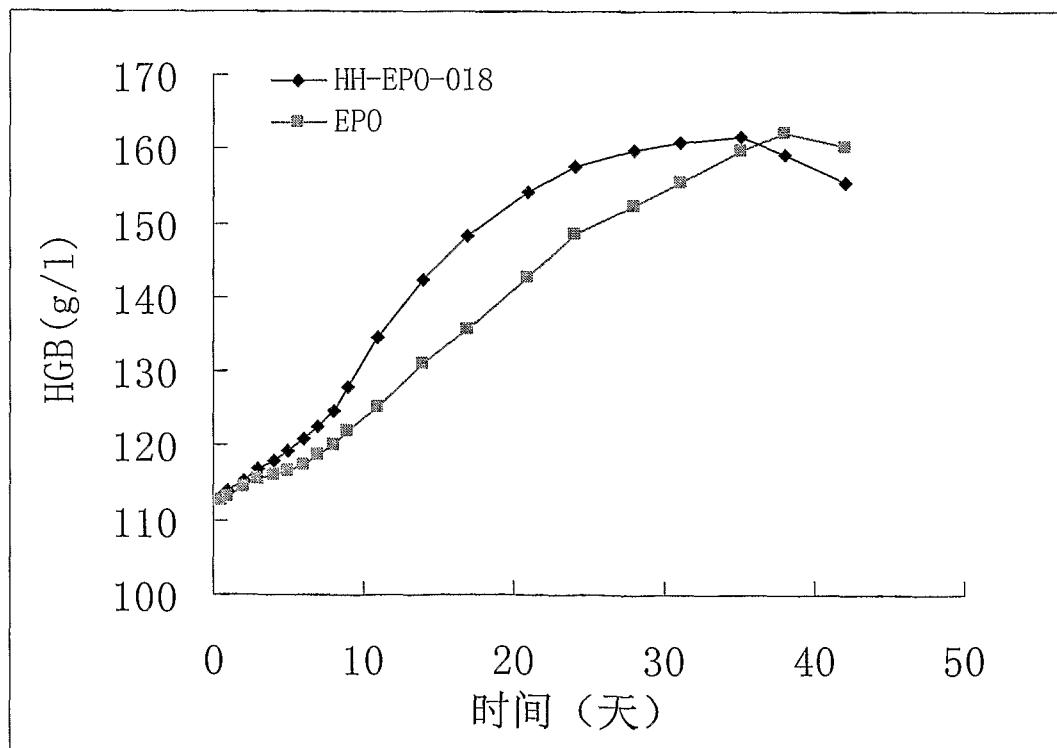


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001909

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)

WPI; EPODOC; PAJ; CPRS; CNKI; BIOSIS; MEDLINE and keywords:
erythropoietin?, EPO, PEG, polyethyleneglycol, polyethylene w glycol, mPEG, peptide?, dimmer+, AFFYMAX INC, inventors, et al
EMBI, Unipot: SEQ ID NO:1-30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006062685 A2 (AFFY-N) 15 Jun. 2006 (15.06.2006) IDA-PEG2-Lys in page11, page 13, lines7-9, page 14, lines 7-12, page 15, line 20 to page 16, line 9, page 16, line 2, page 18, line 20 to page 19, line 5, pages 28-30 of the description, figures 1A-1L of the description, claims 15-22 and 34-58	1-21
X	WO2006060148 A2 (AFFY-N) 8 Jun. 2006 (08.06.2006) IDA-PEG2-Lys in page11, page 13, lines7-9, page 14, lines 7-12, page 15, line 20 to page 16, line 9, page 16, line 2, page 18, line 20 to page 19, line 5, pages 28-30 of the description, figures 1A-1K of the description, claims	1-21

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
12 Feb. 2009 (12.02.2009)

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. 86-10-62019451

Authorized officer

YU,Qun

Telephone No. (86-10)62411103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/001909

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1820024 A (AFFY-N) 16 Aug. 2006 (16.08.2006)	1,4,5,7,10-13,17-21;
Y	claims 1-11 and 15-26, pages 11-18 and 31-46 of the description	2,3,6,8,9,14,15
X	CN1823087 A (AFFY-N) 23 Aug. 2006 (23.08.2006)	1,4,5,7,10-13,17-21;
Y	claims 50-70 and 72, page 11, the last paragraph, page14, page15, the last paragraph to page 16, the first paragraph	2,3,6,8,9,14,15
Y	CN 1823088 A (AFFY-N) 23 Aug. 2006 (23.08.2006)	1-21
	claims 1-22, 28-37 and 49-61, pages 17-18 and 33-42 of the description	
Y	JOHNSON D L ET AL Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity. 1997, vol.4, no.12, pages 939-950, ISSN 1074-5521	1-21
	Abstract, table 1	
A	CN1680449 A (CHEN-N) 12 Oct. 2005 (12.10.2005)	1-21
	the whole document	
A	CN1226176 A (JOHJ-ORTH) 18 Aug. 1999(18.08.1999)	1-21
	the whole document	
A	CN 1338463 A (SANS-N) 06 Mar. 2002 (06.03.2002)	1-21
	Page 5, table 1, EPO mimetic peptide 1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/001909

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/001909

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/001909

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2006062685 A2	15.06.2006	US2008108564 A1	08.05.2008
WO2006060148 A2	08.06.2006	EP1814910A2	08.08.2007
		NO20072888 A	09.08.2007
		INKOLNP200701986E	10.08.2007
		KR20070108140 A	08.11.2007
		CN101142234 A	12.03.2008
		MXPA07005777 A	01.08.2007
		AU2005310189	08.06.2006
		JP2008519858 T	12.06.2008
CN1823088A	23.08.2006	WO2004101611 A2	25.11.2004
		EP1625156 A2	15.02.2006
		NO20055847 A	13.02.2006
		BRPI0411172 A	18.07.2006
		AU2004238868 A	25.11.2004
		MXPA05012313 A	01.04.2006
		KR20060022655 A	10.03.2006
		INKOLNP200502493E	15.09.2006
		ZA200509971 A	29.11.2006
		US2007027074 A1	01.02.2007
		JP2007530439 T	01.11.2007
CN1823087 A	23.08.2006	WO2004101606 A2	25.11.2004
		US2005137329 A1	23.06.2005
		US2006040858 A1	23.02.2006
		EP1629007 A2	01.03.2006
		NO20055852 A	13.02.2006
		BRPI0411155 A	11.07.2006
		US7084245 B2	01.08.2006
		AU2004238870 A1	25.11.2004
		MXPA05012316 A	01.04.2006
		KR20060022239 A	09.03.2006
CN1226176 A	18.08.1999	WO9805363 A2	12.02.1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/001909

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		AU3908597 A	25.02.1998
		NO990465 A	23.03.1999
		BRPI9711009 A	17.08.1999
		EP0964702 A2	22.12.1999
		NZ333993 A	28.01.2000
		JP2000515553T	21.11.2000
		KR20000029673 A	25.05.2000
		MX9901184 A1	01.03.2000
		AU4808201 A	02.08.2001
		RU2199347 C2	27.02.2003
		MX220285 B	07.05.2004
		AU778790B2	23.12.2004
		EP0964702 B1	04.10.2006
		DE69736780 E	16.11.2006
		EP1731174 A2	13.12.2006
		ES2273373	01.05.2007
		DE69736780 T2	06.09.2007
CN1680449 A	12.10.2005	WO2005084711 A1	15.09.2006
		CN100362019 C	16.01.2008
CN1820024 A	16.08.2006	WO2004101600 A2	25.11.2004
		US2005107297 A1	19.05.2005
		EP1626983 A2	22.02.2006
		NO20055849 A	13.02.2006
		BRPI0411160 A	11.07.2006
		AU2004238869 A1	25.11.2004
		MXPA05012315 A	01.04.2006
		KR20060028675 A	31.03.2006
		INKOLNP200502500E	15.09.2006
		ZA200509969 A	27.12.2006
		JP2007530440T	01.11.2007
CN1338463 A	06.03.2002	CN1169827C	06.10.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001909

Continuation of: Classification of subject

C07K17/08 (2006.01) i

C07K14/505 (2006.01) i

A61K47/48(2006.01) i

A61P7/06(2006.01) i

Continuation of : Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group 1: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:1 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 2: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:2 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 3: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:3 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 4: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:4 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 5: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:5 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 6: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:6 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 7: claims 1-14(partly),16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:7 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 8: claims 1-14(partly),15,16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:8 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 9: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:9 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 10: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:10 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001909

Group 11: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:11 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 12: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:12 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 13: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:13 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 14: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:14 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 15: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:15 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 16: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:16 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 17: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:17 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 18: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:18 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 19: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:19 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 20: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:20 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 21: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:21 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 22: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:22 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 23: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:23 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001909

Group 24: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:24 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 25: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:25 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 26: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:26 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 27: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:27 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 28: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:28 and mPEG derivatives, its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 29: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivatives of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:29 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

Group 30: claims 1-8(partly), 10-13(partly), 16-21(partly), refers to covalent derivative of erythropoietin mimetic peptide which has SEQ ID NO:30 and mPEG derivatives and its pharmaceutical salt, the preparation, composition and uses thereof,

The reasons for which the above inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows: the common or corresponding technical feature among these 30 group inventions is: covalent derivative of erythropoietin mimetic peptide and mPEG derivatives, however such kind of covalent derivatives have been disclosed in prior arts, such as in WO2006/062685 A2. thus the above common or corresponding technical feature can't become the special technical feature. therefore there doesn't exist a common or corresponding special technical feature among the 30 group inventions.

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))

WPI; EPODOC; PAJ; BIOSIS; MEDLINE 和关键词: erythropoietin?, EPO, PEG, polyethyleneglycol, polyethylene glycol, mPEG, peptide?, dimmer+, AFFYMAX INC, 等

CNKI; CPRS 和关键词: 发明人, 促红细胞生成素, EPO, 聚乙二醇, PEG, 甲氧基聚乙二醇, mPEG, 二聚体, 二聚肽, 肽二聚体, 等

EMBI, Uniprot, 中国专利生物序列检索系统:

SEQ ID NO:1-30

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
X	WO 2006062685 A2 (AFFY-N) 15.6 月 2006 (15.06.2006) 说明书第 11 页 IDA-PEG2-Lys, 第 13 页 7-9 行, 第 14 页 7-12 行, 第 15 页第 20 行到第 16 页第 9 行, 第 16 页第 2 行, 第 18 页第 20-第 19 页第 5 行, 第 28-30 页, 说明书附图 1A-1L, 权利要求 15-22, 34-58	1-21
X	WO2006060148 A2 (AFFY-N) 8.6 月 2006 (08.06.2006) 说明书第 11 页 IDA-PEG2-Lys, 第 13 页 7-9 行, 第 14 页 7-12 行, 第 15 页第 20 行到第 16 页第 9 行, 16 页第 2 行, 第 18 页第 20-第 19 页第 5 行, 第 28-30 页, 说明书附图 1A-1K, 权利要求书	1-21

 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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期 12.2 月 2009 (12.02.2009)	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 于群 电话号码: (86-10) 62411103

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
X	CN1820024 A (阿费麦克斯公司) 16.8 月 2006 (16.08.2006)	1,4,5,7,10-13,17-21;
Y	权利要求 1-11, 15-26, 说明书第 11—18 页, 第 31-46 页	2,3,6,8,9,14,15
X	CN1823087 A (阿费麦克斯公司) 23.8 月 2006(23.08.2006)	1,4,5,7,10-13,17-21;
Y	权利要求 50-70, 72, 说明书第 11 页最后一段, 第 14 页, 第 15 页最后一段到第 16 页第一段	2,3,6,8,9,14,15
Y	CN 1823088 A (阿费麦克斯公司) 23.8 月 2006 (23.08.2006) 权利要求 1-22, 28-37, 49-61, 说明书第 17-18 页, 第 33 页-42 页	1-21
Y	JOHNSON D L ET AL Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity. 1997 年, 第 4 卷, 第 12 期, 第 939-950 页, ISSN 1074-5521 摘要, 表 1	1-21
A	CN1680449 A (成都生物制品研究所) 12.10 月 2005 (12.10.2005) 全文	1-21
A	CN1226176 A (奥索.麦克尼尔药品公司) 18.8 月 1999(18.08.1999) 全文	1-21
A	CN 1338463 A(沈阳三生制药股份有限公司)06.3 月 2002(06.03.2002) 说明书第 5 页, 表一, EPO 类多肽 1	1-21

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第1页第1(b)项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

序列表
 与序列表相关的表格

b. 材料的形式

纸件形式
 电子形式
c. 提交/提供时间

包括于已提交的国际申请。
 以电子形式与国际申请一起提交。
 为检索之用随后提交本国际检索单位。

2. 另外, 在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下, 提供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

2. 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

发明1: 权利要求1-14(部分), 16-21(部分), 涉及序列为SEQ ID NO:1D的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明2: 权利要求1-14(部分), 16-21(部分), 涉及序列为SEQ ID NO:2的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明3: 权利要求1-14(部分), 16-21(部分), 涉及序列为SEQ ID NO:3的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明4: 权利要求1-14(部分), 16-21(部分), 涉及序列为SEQ ID NO:4的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

(参见补充页)

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:
4. 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/001909

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2006062685 A2	15.06.2006	US2008108564 A1	08.05.2008
WO2006060148 A2	08.06.2006	EP1814910A2	08.08.2007
		NO20072888 A	09.08.2007
		INKOLNP200701986E	10.08.2007
		KR20070108140 A	08.11.2007
		CN101142234 A	12.03.2008
		MXPA07005777 A	01.08.2007
		AU2005310189	08.06.2006
		JP2008519858 T	12.06.2008
CN1823088A	23.08.2006	WO2004101611 A2	25.11.2004
		EP1625156 A2	15.02.2006
		NO20055847 A	13.02.2006
		BRPI0411172 A	18.07.2006
		AU2004238868 A	25.11.2004
		MXPA05012313 A	01.04.2006
		KR20060022655 A	10.03.2006
		INKOLNP200502493E	15.09.2006
		ZA200509971 A	29.11.2006
		US2007027074 A1	01.02.2007
		JP2007530439 T	01.11.2007
CN1823087 A	23.08.2006	WO2004101606 A2	25.11.2004
		US2005137329 A1	23.06.2005
		US2006040858 A1	23.02.2006
		EP1629007 A2	01.03.2006
		NO20055852 A	13.02.2006
		BRPI0411155 A	11.07.2006
		US7084245 B2	01.08.2006
		AU2004238870 A1	25.11.2004
		MXPA05012316 A	01.04.2006
		KR20060022239 A	09.03.2006
CN1226176 A	18.08.1999	WO9805363 A2	12.02.1998
		AU3908597 A	25.02.1998
		NO990465 A	23.03.1999
		BRPI9711009 A	17.08.1999
		EP0964702 A2	22.12.1999
		NZ333993 A	28.01.2000
		JP2000515553T	21.11.2000
		KR20000029673 A	25.05.2000

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/001909

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		MX9901184 A1	01.03.2000
		AU4808201 A	02.08.2001
		RU2199347 C2	27.02.2003
		MX220285 B	07.05.2004
		AU778790B2	23.12.2004
		EP0964702 B1	04.10.2006
		DE69736780 E	16.11.2006
		EP1731174 A2	13.12.2006
		ES2273373	01.05.2007
		DE69736780 T2	06.09.2007
CN1680449 A	12.10.2005	WO2005084711 A1	15.09.2006
		CN100362019 C	16.01.2008
CN1820024 A	16.08.2006	WO2004101600 A2	25.11.2004
		US2005107297 A1	19.05.2005
		EP1626983 A2	22.02.2006
		NO20055849 A	13.02.2006
		BRPI0411160 A	11.07.2006
		AU2004238869 A1	25.11.2004
		MXPA05012315 A	01.04.2006
		KR20060028675 A	31.03.2006
		INKOLNP200502500E	15.09.2006
		ZA200509969 A	27.12.2006
		JP2007530440T	01.11.2007
CN1338463 A	06.03.2002	CN1169827C	06.10.2004

续：主题分类：

C07K17/08 (2006.01) i

C07K14/505 (2006.01) i

A61K47/48(2006.01) i

A61P7/06(2006.01) i

续：第III栏，关于发明单一性的规定：

发明 5：权利要求 1-14 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:5 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 6：权利要求 1-14 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:6 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 7：权利要求 1-14 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:7 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 8：权利要求 1-14 (部分)，15, 16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:8 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 9：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:9 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 10：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:10 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 11：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:11 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 12：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:12 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 13：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:13 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 14：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:14 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 15：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:15 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 16：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:16 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 17：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:17 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 18：权利要求 1-8 (部分)，10-13 (部分)，16-21 (部分)，涉及序列为 SEQ ID NO:18 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐，其制备方法，含有其的药物组合物，及其用途；

发明 19: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:19 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 20: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:20 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 21: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:21 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 22: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:22 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 23: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:23 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 24: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:24 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 25: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:25 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 26: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:26 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 27: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:27 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 28: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:28 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 29: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:29 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

发明 30: 权利要求 1-8 (部分), 10-13 (部分), 16-21 (部分), 涉及序列为 SEQ ID NO:30 的促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物及其可药用盐, 其制备方法, 含有其的药物组合物, 及其用途;

上述 30 组发明之间相同或相应的技术特征为: 促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇衍生物的共价衍生物。然而, 促红细胞生成素模拟肽与甲氧基聚乙二醇的共价偶联物在现有技术的多篇文献中已经被披露, 例如 WO2006062685 A2 中, 因此上述相同或相应的技术特征不能够构成特定技术特征。因此, 这 30 组发明之间不具有相同或相应的特定技术特征, 不具有单一性, 不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

更正本

(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 2009/079910 A8

(51) 国际专利分类号:

C07K 17/08 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)

[CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。

(21) 国际申请号:

PCT/CN2008/001909

(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)。

(22) 国际申请日:

2008年11月24日 (24.11.2008)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

200710198751.9 2007年12月12日 (12.12.2007) 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): 吕爱峰 (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)。 姜涛 (JIANG, Tao) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市开发区第十工业小区, Jiangsu 222047 (CN)。 吴文涛 (WU, Wentao) [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)

(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)。

[见续页]

(54) Title: AN ERYTHROPOIETIN MIMETIC PEPTIDE DERIVATIVES AND ITS PHARMACEUTICAL SALT, THE PREPARATION AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐和其制备方法与用途

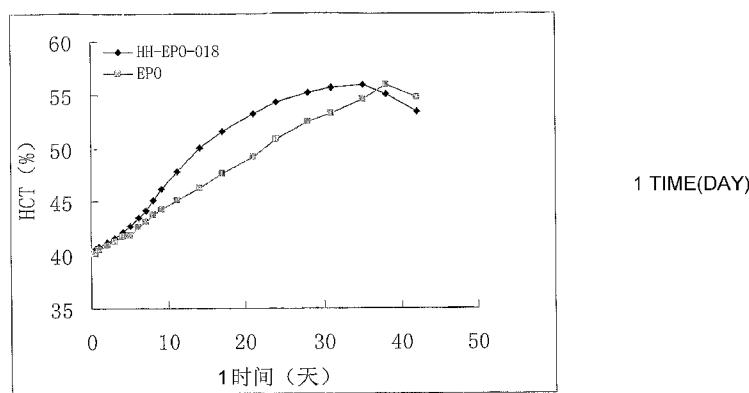


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: What is provided is an erythropoietin mimetic peptide derivatives defined as formula (I) and its pharmaceutical salt, the preparation thereof, wherein R1, R2, R3, R4, R5, n1, n2 are defined as described in description. A composition comprising of an erythropoietin mimetic peptide derivatives defined as formula (I) and its pharmaceutical salt. The uses of the derivatives and its pharmaceutical salt, as well as the uses of the composition described above in treatment of diseases characterized by a deficiency of erythropoietin or a low or defective red blood cell population. R1- R2-(CH₂)ⁿ¹-R3-(CH₂)ⁿ²-R4-R5 (I)

[见续页]

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(48) 更正本的公布日:

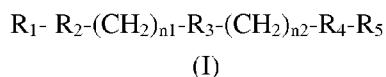
2009 年 11 月 19 日

(15) 更正内容:

见 2009 年 11 月 19 日 公布的公告

(57) 摘要:

提供了一种通式为 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐以及它们的制备方法, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 n_1 、 n_2 如说明书所定义。还提供了一种含有通式 (I) 的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物。提供的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐或含有促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物可在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中广泛应用。



序列表

5 <110> 江苏豪森药业股份有限公司

10 <120> 促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐和其制备方法与用途

15 <130> 78017CPCT

20 <150> CN200710198751.9

25 <151> 2007-12-12

30 <160> 30

35 <170> PatentIn version 3.4

40 <210> 1

45 <211> 22

50 <212> PRT

55 <213> 人工序列

60 <220>

65 <221> 乙酰化

70 <222> (1)..(1)

75 <220>

80 <221> 酰胺键

85 <222> (6)..(15)

90 <400> 1

95 Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Lys Gln
1 5 10 15

100 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
20

105 <210> 2

110 <211> 22

115 <212> PRT

120 <213> 人工序列

125 <220>

130 <221> 乙酰化

135 <222> (1)..(1)

140 <220>

145 <221> 酰胺键

150 <222> (6)..(15)

155 <220>

160 <221> MISC_FEATURE

165 <222> (15)..(15)

170 <223> Xaa=Orn

175 <400> 2

180 60

Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Xaa Gln
 1 5 10 15

5 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

10 <210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

15 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

20 <220>
 <221> 酰胺键
 <222> (6)..(15)

<400> 3

25 Gly Gly Leu Tyr Ala Lys His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

30 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

35 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

40 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

45 <220>
 <221> 酰胺键
 <222> (6)..(15)

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=Orn

<400> 4

55 Gly Gly Leu Tyr Ala Xaa His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

60 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

5 <210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

10 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

15 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

25 <400> 5
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

30 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

35 <210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

40 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

45 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

50 <400> 6
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Xaa Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

55 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

60 <210> 7

<211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

5

<220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

10

<220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

20

<400> 7
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ser Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

25

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

30

<210> 8
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

35

<220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

40

<220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

<400> 8

50

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

55

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

60

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT

5 <213> 人工序列

5 <220>

5 <221> 乙酰化

5 <222> (1)..(1)

10 <220>

10 <221> 酰胺键

10 <222> (6)..(15)

15 <400> 9

15 Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Lys Gln

15 1 5 10 15

20 Pro Leu Arg Gly Gly Lys

20 20

25 <210> 10

25 <211> 22

25 <212> PRT

25 <213> 人工序列

30 <220>

30 <221> 乙酰化

30 <222> (1)..(1)

35 <220>

35 <221> 酰胺键

35 <222> (6)..(15)

40 <220>

40 <221> MISC_FEATURE

40 <222> (15)..(15)

40 <223> Xaa=Orn

45 <400> 10

45 Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Xaa Gln

45 1 5 10 15

50 Pro Leu Arg Gly Gly Lys

50 20

55 <210> 11

55 <211> 22

55 <212> PRT

55 <213> 人工序列

60 <220>

60 <221> 乙酰化

60 <222> (1)..(1)

5 <220>
 <221> 酰胺键
 <222> (6)..(15)

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=Orn

 15 <400> 11

 Gly Gly Leu Tyr Ala Xaa His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

 20 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

 25 <210> 12
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 30 <220>
 <221> 酰胺键
 <222> (6)..(15)

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

 40 <400> 12

 Gly Gly Thr Tyr Ser Lys His Phe Gly Pro Met Thr Trp Val Asp Arg
 1 5 10 15

 45 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

 50 <210> 13
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 55 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

 60 <220>
 <221> 二硫键

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15, 21)
 <223> 第 15 位 Xaa=高半胱氨酸; 第 21 位 Xaa=bAla
 10 <400> 15
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Xaa Arg
 1 5 10 15
 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 15 20
 <210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 20
 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)
 25
 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7, 15, 21)
 <223> 第 7 位 Xaa=Nle; 第 15 位 Xaa=高半胱氨酸; 第 21 位 Xaa=bAla
 35 <400> 16
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Xaa Phe Gly Pro Met Thr Trp Val Xaa Arg
 1 5 10 15
 40
 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 15
 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 50
 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)
 55 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (7, 21)
 <223> 第 7 位 Xaa=Nle; 第 21 位 Xaa=bAla

<400> 17

5 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Xaa Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

10 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 18

15 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

20 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

25 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

<400> 18

35 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

40 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 19

45 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

50 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

55 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

<400> 19

5 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ser Ile Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

10 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

15 <210> 20
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

20 <220>
<221> 乙酰化
<222> (1)..(1)

25 <220>
<221> 酰胺键
<222> (6)..(15)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Xaa=bAla

30 <400> 20

35 Gly Gly Thr Tyr Ser Lys His Phe Gly Ser Met Thr Trp Val Glu Arg
1 5 10 15

40 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

45 <210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

50 <220>
<221> 乙酰化
<222> (1)..(1)

55 <220>
<221> 二硫键
<222> (6)..(15)

60 <400> 21

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Leu
1 5 10 15

Pro Met Ala Gly Gly Lys
20

5 <210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

10 <220>
<221> 乙酰化
<222> (1)..(1)

15 <220>
<221> 二硫键
<222> (6)..(15)

20 <400> 22
Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Leu
1 5 10 15

25 Pro Met Ala Gly Gly Lys
20

30 <210> 23
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

35 <220>
<221> 乙酰化
<222> (1)..(1)

40 <220>
<221> 二硫键
<222> (6)..(15)

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Xaa=bAla

50 <400> 23
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Met Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

55 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

60 <210> 24
<211> 22
<212> PRT

<213> 人工序列

5 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

10 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

20 <400> 24

 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Ile Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

25 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

30 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

35 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)

40 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla

50 <400> 25

 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

55 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

60 <210> 26
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

5 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)
 10 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)
 15 <400> 26
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15
 20 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 25 20
 25 <210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 30 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)
 35 <220>
 <221> 二硫键
 <222> (6)..(15)
 40 <400> 27
 Gly Gly Met Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gly
 1 5 10 15
 45 Pro Ser Arg Gly Gly Lys
 20
 50 <210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 55 <220>
 <221> 乙酰化
 <222> (1)..(1)
 60 <220>
 <221> 二硫键

<222> (6)..(15)

<400> 28

5 Gly Gly Met Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gly
1 5 10 15

10 Pro Ser Arg Gly Gly Lys
20

<210> 29

<211> 22

15 <212> PRT

<213> 人工序列

20 <220>

<221> 乙酰化

<222> (1)..(1)

25 <220>

<221> 二硫键

<222> (6)..(15)

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 29

35 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Xaa Arg
1 5 10 15

40 Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 30

<211> 22

45 <212> PRT

<213> 人工序列

50 <220>

<221> 乙酰化

<222> (1)..(1)

55 <220>

<221> 二硫键

<222> (6)..(15)

60 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6, 21)

<223> 第 6 位 Xaa=高半胱氨酸；第 21 位 Xaa=bAla
60

<400> 30

Gly Gly Thr Tyr Ser Xaa His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

5

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

10

[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 200880014247.1

[51] Int. Cl.

C07K 17/08 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月17日

[11] 公开号 CN 101675080A

[22] 申请日 2008.11.24

[21] 申请号 200880014247.1

[30] 优先权

[32] 2007.12.12 [33] CN [31] 200710198751.9

[86] 国际申请 PCT/CN2008/001909 2008.11.24

[87] 国际公布 WO2009/079910 中 2009.7.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.30

[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 姜 涛 吴文涛
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

促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐
和其制备方法与用途

[57] 摘要

提供了一种通式为(I)的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐以及它们的制备方法，其中R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、n₁、n₂如说明书所定义。还提供了一种含有通式(I)的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物。提供的促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐或含有促红细胞生成素模拟肽衍生物及其可药用盐的药物组合物可在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中广泛应用。R₁—R₂—(CH₂)_{n1}—R₃—(CH₂)_{n2}—R₄—R₅(I)。

