

(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:

2005年9月15日(15.09.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/084711 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 47/48, A61P 7/06

(21) 国际申请号: PCT/CN2005/000254

(22) 国际申请日: 2005年3月2日(02.03.2005)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410021953.2 2004年3月2日(02.03.2004) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 成都生物制品研究所(CHENGDU INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS) [CN/CN]; 中国四川省成都市东外包江桥, Sichuan 610023 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 葛永红(GE, Yonghong) [CN/CN]; 陈智勇(CHEN, Zhiyong) [CN/CN]; 曾献武(ZENG, Xianwu) [CN/CN]; 刘兰军(LIU, Lanjun) [CN/CN]; 中国四川省成都市东外包江桥, Sichuan 610023 (CN)。

(74) 代理人: 成都虹桥专利事务所(CHENGDU HONGQIAO PATENT LAW OFFICE); 中国四川省成都市永丰路2号超洋花园3幢505室, Sichuan 610041 (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。
- 包括经修改的权利要求。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A PEGYLATED RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN THAT HAS *IN VIVO* ACTIVITY

(54) 发明名称: 聚乙二醇修饰后具有体内生理活性的重组促红细胞生成素

(57) Abstract: The invention involves a kind of PEG conjugates of erythropoietin (PEG-EPOP). The recombinant erythropoietin, which has no *in vivo* activity so as not to be used as the medicament to treat anemia, is chemically modified with polyethylene glycol (PEG) to form the product having *in vivo* erythropoietic activity. In particular, the invention discloses that prokaryotic expression system expresses EPOP and produces PEG-EPOP with low cost to produce the medicament for treating anemia disease and stimulating red blood cells.

(57) 摘要

本发明涉及一种促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物(PEG-EPOP), 将无体内活性因而不具备作为贫血纠正药物使用价值的重组人促红细胞生成素蛋白(rhEPOP), 经聚乙二醇(PEG)化学修饰, 获得具有体内促红细胞生成活性的产物。本发明特别揭示了可以用原核表达系统获得低成本的EPOP, 由此获得低成本的PEG-EPOP, 生产治疗贫血性疾病药物及升高红细胞药物。



WO 2005/084711 A1

聚乙二醇修饰后具有体内生理活性的重组促红细胞生成素

所属技术领域

本发明涉及以聚乙二醇对无体内生理活性的重组促红细胞生成素蛋白 (EPOP) 进行修饰, 而获得的具有促红细胞生成作用的体内生理活性的结合物 (PEG-EPOP)。

背景技术

人红细胞生成素 (human Erythropoietin, hEPO) 是一种主要由肾脏合成并分泌的糖蛋白激素, 在胚胎期 EPO 产生于肝脏, 出生后 4 个月转由肾脏产生。其生理作用是刺激骨髓红细胞前体细胞的分化与增殖, 在红细胞发育成熟过程中起着重要的作用, 是红细胞生长的内源性调节剂。

早年从再生障碍性贫血病人的尿中、胎肾细胞的培养液中可获得较多的 hEPO, 但并不能满足临床需求。1985 年, 应用基因重组技术获得重组人 EPO (rhEPO), 开始了工业化生产 EPO 的历史, 使 EPO 在临床上广泛应用成为可能。1989 年 6 月美国 Amgen 公司生产的 rhEPO 正式获得美国 FDA 注册许可, 商品名为 “EPOGEN[®] EPOETIN ALFA”, 用于治疗慢性肾衰竭(CRF)合并贫血症, 取得了巨大的成功。目前世界上已有多家公司开发生产 rhEPO, 近十多年的临床应用的结果表明 rhEPO 的疗效显著, 副作用小, 是治疗各类贫血的特效药物, 也是当前最为成功的基因工程治疗药物。随着人们对 EPO 的研究日益深入, 其临床适应症将进一步扩大, 目前适用于: (1) 慢性肾衰合并贫血的治疗: 此类贫血的一个主要原因是 EPO 生成缺乏, EPO 可谓替代治疗方法, 其疗效达 95% 以上, 使血红蛋白含量 (Hb) 及红细胞压积 (Hct) 增高, 贫血改善, 出血时间缩短, 生活质量提高, 输血次数减少, 也有利于施行肾移植的病人; (2) 艾滋病 (AIDS) 病人伴贫血, 尤其应用 AZT 治疗的病人常易伴发贫血, EPO 治疗有效; (3) 肿瘤病人化疗所致贫血, 尤其使用顺铂常出现明显贫血, EPO 治疗有效; (4) 慢性病贫血, 如类风湿性关节炎、肿瘤病人, 当伴发贫血而需输血维持治疗者, EPO 可使部分病人减少输血的次数; (5) 造血干细胞疾病的贫血, 如骨髓增生异常综合征 (MDS)、再生障碍性贫血等的病人, 若需反复输血亦难以维持者, 可试用 EPO, 约 25%~30% 病人可使贫血改善, 减少输血次数; (6) 自体供血输注: 美国血库协会规定, 择期手术的病人, 如矫形手术者宜取自血贮存, 以备手术时输注, 术前 3 周开始用 EPO, Hb 上升明显时取血 400ml 贮存, 采集 3 次备用, 可以满足病人的需要。使用 EPO 可以提高贮血质量, 减少贮血数量; (7) 早产儿贫血的防治: 50~100IU/kg, 每周 3 次, 于出生后开始, 连用 4 周。可以预计: EPO 在一个相当长的时期内都将是贫血治疗的一线药物。

在采用蛋白质药物治疗过程中, 常因其较短的血浆半衰期而使其生物利用度降低, 这在 EPO 这样的激素类蛋白质上表现得尤为明显。机体通过肾脏细胞上的氧分压感受器调节 EPO 的分泌量, 通过肝细胞快速灭活释放到血浆中的 EPO, 由此建立维持红细胞压积相对恒定的灵敏调节机制: 既可在贫血时大量促进红细胞的释放, 又可防止过量释放红细胞造成血粘稠度过高等不利后果。在使用 rhEPO 对贫血疾病的治疗中, 此机制大大减低了 rhEPO 的生物利用度, 造成用药剂量的增加, 而由于 rhEPO 昂贵的价格也造成治疗费用的增加; 同时由于 EPO 受体数量的限制, 此机制也限制了加大用药剂量获得更高治疗效果的能力, 在实

际的治疗中,大多数情况下需采用每周 3 剂的治疗方案,只在贫血症状纠正后的维持治疗中可视情形降低用药剂量及用药频次至每周 2 剂或每周 1 剂。

EPO 分子是一种含唾液酸的酸性糖蛋白,对热(在 80°C 条件下不变性)和酸碱(稳定范围在 PH 3.5~10.0 之间)较为稳定。蛋白质肽链中 Cys¹⁶¹与 Cys⁷、Cys²⁹和 Cys³³之间分别形成两对二硫键,其中 Cys⁷和 Cys¹⁶¹之间的二硫键对于 EPO 的生物活性至关重要,如果二硫键被还原,EPO 将丧失其生物活性。EPO 分子的四个糖基化位点分别在 Asn³⁸、Asn²⁴、Asn⁸³和 Ser¹²⁶上,前三者为 N-糖链,后者为 O-糖链。糖链的分枝程度不同,有双末梢、三末梢或四末梢,其中四末梢最为常见。研究结果表明,糖链的分枝程度对 EPO 在体内的生物活性有影响,N-端糖链的高度分枝对其维持生物体内生物活性是必要的。去唾液酸或去糖基化不影响在体外的生物活性,但却大大缩短了在体内的半衰期(主要经肝细胞吸附代谢),结果完全丧失了在体内的生物学活性。只有 EPO 分子被充分糖基化后,才能在体内表现出生物活性。因此糖链结构的存在对 EPO 在体内的生物活性至关重要。也就是说只有真核细胞表达的 EPO 在体内才具有生物活性。由于 EPO 糖基结构部分占整个分子量的 30~40%且有高度的不均一性,其糖链分枝程度的不同使 EPO 的分子量在 30~40KD 之间 (Wasley LC, Linderberg G, Fishman L, et al. *The importance of N- and O- linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and vivo biological activities of erythropoietin. Blood, 1991, 77(3): 419-434.*)。众多关于 EPO 的研究均证实了以上结论,因此普遍的观点认为重组 EPO 必须以真核细胞表达,如文献马培奇。《促红细胞生成素及其临床应用与市场前景》。《中国医药情报》1999 年第 5 卷第 1 期, P11)。

基于以上对自然 hEPO 的认识,目前用于药物生产的 rhEPO 均采用真核细胞表达系统,而对 EPO 特性及药效改进的研究也集中于采用真核细胞表达系统所获得的 rhEPO 上。为增加 rhEPO 的药效,目前有两种较成功的方法,一是对现有的 rhEPO 进行化学修饰,如在 00898956 专利申请中,公开一种 EPO 与 PEG 的偶联物,其通过将 EPO 糖蛋白共价连接 1~3 个低级烷氧基聚乙二醇(PEG)基团进行修饰,而提高了 EPO 的循环半衰期和血浆滞留时间,并降低了 EPO 的清除率和提高其体内活性。另一是通过基因工程的方法改变 EPO 肽链中的部份氨基酸以增加糖基化位点进而增加糖基化程度,参见美国专利 US5856298 以及 Amgen Inc. One Amgen Center Drive Thousand Oaks, California 产品 Aranesp™ 说明书。

尽管以上改进取得了明显增加 rhEPO 血浆半衰期的效果,但其依然是采用现行 rhEPO 药品生产工艺所用的真核细胞表达系统,生产成本应与现行产品相当。

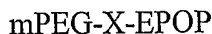
在申请人的另一个较早的专利申请中(申请号:200410021859.7),通过对已知的 hEPO 基因的碱基序列进行重新设计,消除大肠杆菌稀有密码子,而代之以大肠杆菌偏爱密码子,并适量调整 GC 含量,成功地构建了可在原核系统(例如大肠杆菌中)高效表达的重组基因和载体系统。虽然表达的重组人促红细胞生成素蛋白(EPOP)由于缺乏糖基化修饰而在体内不具有生理活性,但原核系统生产成本大大低于真核系统,这样制备的无体内活性的 EPOP 可用于例如制备 EPO 肽链蛋白试剂、也可用于免疫动物的 EPO 抗原;或制备成 EPO 阳性对照标准品,用于 EPO 免疫检测的试剂盒,如反相血凝、放射免疫、酶联免疫等方法。

发明内容

本发明提供一种 PEG-EPOP 结合物，采用无糖基化因而无体内活性的促红细胞生存素（EPO）蛋白（EPOP），如：本发明提供的由原核表达系统获得无体内生物活性的 EPO 蛋白，再利用 PEG 对 EPOP 进行化学修饰，获得具有体内促红细胞生成作用生理活性的产物（PEG-EPOP）。

本发明还提供 PEG-EPOP 结合物在制备治疗贫血性疾病药物及升高红细胞药物中的用途。

根据本发明的一方面，提供式（I）结构的 PEG-EPOP 结合物：



(I)

式（I）中，mPEG 的分子结构式为 $\text{CH}_3-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_k$ ，其中 k 为 100~1000 的整数，分子量为 5000~40000 道尔顿；X 为 NH 或 O，表明 PEG 对 EPOP 化学修饰的共价连接方式；

EPOP 为重组 EPO 蛋白，为无体内生物活性的 EPO 蛋白，与天然 EPO 或真核表达系统表达获得的重组 EPO 相比缺少糖链部份，在动物实验中观察不到促红细胞生成的体内生理活性，但是具有 EPO 特有的体外细胞学活性。

本发明中所指无体内生理活性或无体内生物活性，是指按一般治疗使用剂量，在实验动物体内用目前已知的检测方法，检测不出明显的促红细胞生长的生理作用，即 EPOP 不具备作为贫血纠正药物使用的价值；当然，不排除采用更大剂量或更高灵敏度的检测方法可检测到较微弱体内活性的可能。

在本发明中，无体内生理活性的 EPOP 可以有多种来源，凡肽链结构与天然 EPO 相近的同源肽链，无论是人工合成的，还是通过原核系统或真核系统表达的，甚至经过改造的，例如在本发明实施例 1、2 中通过原核系统表达的具有 166 个氨基酸或 167 个氨基酸的肽链，因为缺乏糖链而不具备体内生理活性，都可以作为本发明 PEG 修饰的原料，从而获得具有体内生理活性的产物。

为了低成本地获得大量无体内活性的 EPO 蛋白，在本发明的一个实施方案中，首先构建可利用大肠杆菌系统高效表达的重组 EPO 基因和工程菌，其表达的重组 EPOP 无体内活性，然后以此 EPOP 为基础，用 PEG₂NHS-20K 对其进行化学修饰，经修饰后的 PEG-EPOP 结合物在动物体内表现出明显的促红细胞生成的体内生理活性。

本发明采用原核表达系统获得无体内生物活性的 EPOP，再采用 PEG 对 EPOP 进行化学修饰，获得 PEG-EPOP 结合物，并在动物实验中观察到具有体内活性。如以此 PEG-EPOP 结合物制成治疗贫血性疾病的药物，因原核表达系统在生产成本和规模成本上显著降低，比真核表达系统具有的巨大优势，可明显地降低病人的治疗用药费用。

附图说明

图1为重组EPOP原核表达系统质粒构建图。

图2 PEG-EPO体内生理活性检测实验，用R-500分析仪测定网织红细胞百分数：图中：纵坐标为网织红细胞百分数，横坐标为采血时间（1、2、3、4 分别

代表于注射样品后第四、五、六、七日采血)

0#: 阴性对照

1#: rhEPO 阳性对照

2#: 重组 EPOP, 未修饰对照

5 3#: PEG-EPOP 结合物, 修饰后产物

图 3 为两种氨基酸序列 (167AA 和 166AA) 的 EPO 蛋白表达对照图;

图中: 1: 密码修改后, 表达的 167AA (含 167 位 Arg) 样品

2: 密码修改后, 表达的 166AA (不含 167 位 Arg) 样品

3: 1 之诱导表达前对照样品

10 4: 2 之诱导表达前对照样品

具体实施方式

下面结合附图, 通过对本发明较佳实施方式的详细描述, 说明但不限制本发明。

【实施例 1】由原核表达系统表达的重组 EPOP 的制备

15 1. 菌株及质粒

质粒 PBV₂₂₀ 全长 3.66Kb, 串联噬菌体 P_LP_R 启动子, 下游为核糖体基因终止信号, 氨苄青霉素抗性, 制备方法见含 P_LP_R 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用, 病毒学报, 1990, 6 (2): 11, 该质粒由作者赠送。大肠杆菌菌株 DH₅α 购自于 GIBCO 公司 DH₅α 标准株。

20 2. 工具酶及试剂

限制性内切酶 BamH I、EcoRI、T4 连接酶以及 Taq DNA 聚合酶购于 Roche 公司, 质粒纯化试剂盒 (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System) 购于 Promega 公司, 蛋白分子量标记购于华美公司, 其它试剂均为国产分析纯试剂。

25 3. 人促红细胞生成素基因的合成

人体内表达的 EPO 分子是由 166 个氨基酸构成的糖基化蛋白质, 在后加工修饰过程中其 C-末端 Arg¹⁶⁶ 位被切除, 成为由 165 个氨基酸组成的成熟 hEPO。hEPO 的 cDNA 序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 其蛋白质一级结构的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2。其中大肠杆菌稀有密码子的比例占到 12%。为了让基因最佳化表达, 我们通过对基因的重新设计和合成, 消除稀有密码子而利用最佳化密码子。将 hEPO 中的绝大部分稀有密码子替换成大肠杆菌偏爱密码子, 并适量调整 GC 含量, 同时在目的基因片段的两端增加 3 个酶切位点: EcoR I: GAATTC; Nde I: CATATG; BamH I: GGATCC。密码替换前后对照如表 1 中所示, 替换后合成的序列中编码序列如 SEQ ID NO. 3 所示。由于大肠杆菌基因表达以甲硫氨酸起始, 实际得到的肽链在 SEQ ID NO. 2 序列 N 端多一个甲硫氨酸, 共 167 个氨基酸的肽链, 蛋白一级结构没有其它改变。

30

35

表 1 hEPO 基因密码替换前后对照表

| | |
|---------|---|
| 替换前 | |
| 替换后 | <u>GAATTC</u> AATG |
| 替换前 1 | <u>GCCCCA</u> CC <u>CGCT</u> CA <u>CTGT</u> GACAGCCGAG <u>TCTCT</u> GGAGAGGTACCTC <u>TT</u> |
| 替换后 1 | <u>GC</u> TCCGCCCGCTGATCTGTGATGATAGCCG <u>TGT</u> TCTGGAA <u>CGT</u> TACCTGCT |
| 替换前 51 | GGAGGCCAAAGGAGGCCGAGAAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCA |
| 替换后 51 | GGAG <u>GC</u> TAAAGAGCTGA <u>AA</u> CAATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCA |
| 替换前 101 | GCTTGAATGAGAAATATCACTGTCCAGACATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCG |
| 替换后 101 | GCTTGAACGMAAACATCACTGT <u>CC</u> GGATACCAAAGTTAA <u>TT</u> CTATGCT |
| 替换前 151 | TGGAAGAGGATGGAGGTCCGGCAGCAGGCCGTAGAAAGTCTGGCAGGGCCT |
| 替换后 151 | TGGA <u>AC</u> GTATGGA <u>AGT</u> TGGTCAGCAGGCTGTAGAAAGTTGGCAGGGCCT |
| 替换前 201 | GGCCCTGCTGTCCGAAAGCTGTCTGCGTGGCCAGGCTCTGCTGGTAACT |
| 替换后 201 | GGC <u>T</u> CTGCTGTCGAAAGCTGT <u>CT</u> TGCGTGGCCAGGCTCTGCTGGTAACT |
| 替换前 251 | CTTCCAGCCGTGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGT <u>C</u> AGT |
| 替换后 251 | CTAGCCAGCCGTGGAA <u>CCCC</u> CTGCAGCTGCACGTTGGATAAAGCTGT <u>TA</u> GT |
| 替换前 301 | GGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGCTCTGGAGCCAGAAAGGA |
| 替换后 301 | GGCCTGCGTAGCCTGACCCTGCTGCTGGTGGTCTGGGAGCTCAGAA <u>GA</u> |
| 替换前 351 | AGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCA |
| 替换后 351 | AGC <u>TA</u> TACAGCCCTCCGGATGCGGCTTCAGCTGCTCCGCTGCGTACCATCA |
| 替换前 401 | CTGCTGACACTTTCGGCAAACCTCTCCGAGTCTACTCCAA <u>TT</u> CTCCCGG |
| 替换后 401 | CTGCTGATACTTTCGGTAAACTGTTCGGTGT <u>TA</u> CAGCAACTTCCTGCGT |
| 替换前 451 | GGAAAGCTGAAAGCTGTACACAGGGGAGCCCTGCAGGACAGGGGACAGATG |
| 替换后 451 | GGAA <u>AA</u> CTGAA <u>ACT</u> GTACACCCGGTGA <u>AG</u> CTTGCCGTACCCGGTGC <u>TT</u> G |
| 替换前 501 | A |
| 替换后 501 | AGGATCC |

4. 序列合成方法:

方法参考 *Jelenkovic G, Billings S, Chen Q, et al. Transformation of eggplant with synthetic ccrvIIIa gene produces a high level of resistance to the Colorado potato beetle. J Amer Soc Hort Sci, 1998. 123(1):19~25*, 采用全基因合成的方法, 首先使用设计软件设计长度约为 80nt 的 oligo, 这些 oligo 之间互相形成约 18nt 的 overlap, 然后进行多轮 PCR 扩增后得到全长基因, 电泳回收后进行克隆, 再测序得到序列正确的克隆。

为了合成表达成熟 hEPO 的 165 个氨基酸 (由 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列缺少第 166 位精氨酸) 的基因序列, 设计如下两条引物, 用 PCR 法从含有经密码替换后的 EPO 基因的质粒中重新扩增出缺少第 166 位精氨酸密码 (CGT) 的 EPO 基因 (如 SEQ ID NO. 4 所示的表达 165 个氨基酸的基因序列), 按上述方法同样获高效表达, 见图 3。同样, 在大肠杆菌中表达的肽链为 N 端增加一个甲硫氨酸共 166 个氨基酸的肽链。

引物: 5' GAG GAA TTC ATA TGG CTC CGC CGC GTC TG 3'
5' CAG CTG GGA TCC TCA ATC ACC GGT ACG GCA 3'

5. 重组质粒构建和筛选鉴定

将经测序正确的目的基因用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 双酶切得到编码序列 (SEQ ID NO. 4), 电泳后回收后与用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 同样双酶切的 PBV₂₂₀ 质粒连接。连接产物转化大肠杆菌 DH₅α, 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板得转化子。挑取转化子, 提取质粒, 用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 双酶切分析, 筛选含有 hEPO 基因片段的重组质粒转化子。

重组质粒的构建路线见图 1。

6. EPO 基因在大肠杆菌中的表达

将重组子接种于 5ml LB 培养基中, 在 30°C, 180rpm 摇床培养 14h 左右。然后以 1:30 的比例转入 LB 培养基中, 30°C 培养 4h 左右 ($A_{600} \approx 0.8$ 时)。再以 42°C 诱导培养 4h。取培养物 1ml, 离心后进行 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定所表达的蛋白质。

7. 高密度发酵培养的培养基及培养条件:

7.1. LB 种子培养基: 每立升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 5g, PH7.0, 高压灭菌, 使用时加入氨苄青霉素至 100ug/ml。

7.2. 发酵用培养基: 每 10L 含 K₂HPO₄ 12g, KH₂PO₄ · 3H₂O 20g, NaCl 20g, MgSO₄ · 7H₂O 10g, 葡萄糖 500g, 酵母粉 480g, 蛋白胨 430g, 高压灭菌后使用。

7.3. 发酵培养: 将保存的菌种划平皿, 挑取单个菌落, 接种于 LB 种子培养基中, 培养 14~16h 后, 再以 1:30 的比例扩大培养 12h。然后接种于 NBS MPP-40 发酵罐中培养, 在培养过程中每间隔 1 个小时补料一次, 并根据菌体生长情况调整 PH 和氧溶解度 (DO)。

8. 纯化:

发酵产物按照本领域技术人员已知的方法分离、纯化蛋白, 如文献 *Asn to Lys mutations at three sites which are N-glycosylated in the mammalian protein decrease the aggregation of Escherichia coli-derived erythropoietin, Protein Engineering*,

1. 交换缓冲体系（超滤法）：

用预先经 0.5mol/L NaOH 除热原处理过的超滤器浓缩重组人促红细胞生成素半成品，并对 PH8.5、50.0mmol/L 磷酸盐缓冲液透滤 4 次，并用相同缓冲液调整蛋白浓度为 1mg/ml。

5 2. 重组 EPO 的化学修饰反应

取重组 EPO 样品（1mg/ml）20ml，加入 PEG₂NHS-20K 100 毫克（PEG₂NHS 为 NEKTAR 公司产品，产品使用说明见 Nektar Molecule Engineering CATALOG 2003），25°C 缓慢搅拌下反应 30min，加 Gly400 毫克终止反应。

10 在化学修饰中，重组 EPO 样品的蛋白浓度可以采用 0.01~5 mg/ml，优选 0.1~1 mg/ml，在本发明中最优选 1mg/ml。活化 PEG 酯与被修饰蛋白的摩尔比为 1：1~1：10 或更高，如采用 PEG₂NHS-20K 重量比约为 2：1~1：5，在本发明中优选重量比为 1：5。

3. 分离及纯化

3.1. Superdex 200 分子筛层析柱：柱大小(26cm×100cm)

15 3.2. 清洗及平衡：用无热原水洗层析柱，流速 8~10ml/min，用 5 倍柱床体积清洗，然后用 5 倍柱床体积的平衡缓冲液（0.2mol/L NaCl 20mmol/L 柠檬酸缓冲液 PH7.0）平衡柱。

20 3.3. 上样及洗脱：将促红细胞生成素修饰反应混合物样品进样，进样后用缓冲液（0.2mol.dm-3 NaCl 20mmol.dm-3 柠檬酸缓冲液 PH7.0）洗脱，OD280nm 检测。分别收集第一峰（PEG-EPOP 结合物）和第二峰（未反应 EPOP）。

【实施例 3】PEG-EPOP 结合物动物体内促红细胞生成活性的测定之一

1. 实验方法：参考《检测 EPO 体内生物学活性的网织红细胞法的建立 王箐舟、程雅琴 中国生物制品学杂志 1997 年第 10 卷第 1 期》，与文中略有不同的是按作者推荐，现采用仅注射一剂第四日采血的方法。

25 1.1. 重组 EPOP 样品：依实施例 1 方法表达制备的 EPO 蛋白提纯样品，含有 N 端的甲硫氨酸及 C 端的精氨酸，共长 167 个氨基酸的肽链，UT-7 检测细胞活性为 44000IU/ml；

30 1.2. PEG-EPOP 结合物样品：参照实施例 2 方法制备的 PEG 修饰后的 PEG-EPOP 结合物样品，在本次实验中的具体方法为：5ML 前述重组 EPOP 样品中加入 PEG₂NHS-20K 50 毫克，修饰反应完全后未经分离及纯化，置 4 度保存供动物实验用。

1.3. 实验动物：Balb/C 纯系小鼠，体重约 20 克。

1.4. 样品以 20mM 磷酸盐缓冲液 50 倍稀释，各样品组以背部皮下注射 0.2ml，每组 3 只，给药后第四日眼眶静脉采血，涂片染色，测网织红百分数。

35 2. 结果：

2.1. 重组 EPOP：2.6%、3.4%、3.7%，均值为 3.2%

2.2. PEG-EPOP：9.7%、7.9%、7.5%，均值为 8.4%

2.3. 阴性对照：2.3%、3.9%、3.4%，均值为 3.2%（历史值）

40 在动物实验中，原核表达的重组 EPOP 样品未能检测出促红细胞生成作用，而同样量的 PEG 修饰后 PEG-EPOP 结合物样品有明显的促红细胞生成作用。说明重组 EPOP 样品可以通过 PEG 修饰获得原不具有的促红细胞生成素的体内活

性。因此，本实验的结果说明没有体内活性而有体外细胞活性的 EPO 蛋白可以通过 PEG 修饰获得促红细胞生成素的体内活性。

【实施例 4】PEG-EPOP 结合物动物体内促红细胞生成活性的测定之二

1. 实验方法：参考实施例 3，每只腹部皮下注射 0.2ml，以 R-500 分析仪代替涂片染色测网织红细胞百分数，并测定注射后第四、五、六、七日的结果。
 - 1.1. 0#：阴性对照共 4 只，注射生理盐水；
 - 1.2. 1#：rhEPO 阳性对照，采用上海复星科技生物克隆公司 rhEPO 产品贻宝，批号 20040101，2000IU/瓶，2ml 生理盐水溶解，取 200ul，加生理盐水 4.8ml 稀释，浓度为 40IU/ml，分 4 组每组 4 只。
 - 1.3. 2#：重组 EPOP，未修饰对照样品。依实施例 1 方法表达制备的 EPO 蛋白提纯样品，含有 N 端的甲硫氨酸不含 C 端的精氨酸，共长 166 个氨基酸的肽链，UT-7 检测细胞活性为 30000IU/ml，100 倍稀释，浓度 300IU/ml。分 4 组每组 4 只。
 - 1.4. 3#：PEG-EPOP 结合物，前述 2#样品的修饰后产物，修饰方法同实施例 3，同 2#样品稀释分组。

2. 实验结果：

见图 2，本次实验中重组 EPOP 仅检测出微弱的体内活性，而在 PEG-EPOP 结合物中测出明显的体内活性。

上述实施例表明，无体内活性的 EPOP，经过本发明方法修饰后的产物，具有良好的体内促红细胞生成的活性，由于成本低廉，应用前景好。

本发明涉及的肽链包括具有天然 EPO 氨基酸顺序的肽链以及为各种目的改进的同源肽链，如：按本发明中提出的具有 166 个氨基酸（如果从 N 端的第一位甲硫氨酸 MET 起算应为 167 个氨基酸，本发明的实施例表明具有该甲硫氨酸的 EPOP 仍具有理论上应有的体外细胞学活性及 PEG 修饰后的体内生理活性）的天然表达序列以及表达的模拟后加工中切去 Arg¹⁶⁶的天然肽链，或为它种目的改变部分氨基酸的肽链，如：减少糖基化位点以增加肽链稳定性等等，只要该 EPO 同源肽链在体内不能表现或仅能表现微弱的 EPO 生理活性，经 PEG 修饰后获得较强的体内生理活性，均在本发明的范围内。

本发明涉及的修饰试剂为活化 PEG 酯，也可采用其它的方法将 PEG 链与 EPOP 的肽链共价偶联，包括其它种类的活化基团，或对 EPOP 肽链的相应位点也进行活化，以及单链、双链或多链的多种结构的 mPEG，同样在本发明的范围内。

很显然，以上对本发明的详细描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求所定义的范围。

权利要求

1、一种促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于将无体内活性的重组人促红细胞生成素蛋白经聚乙二醇化学修饰，获得具有体内促红细胞生成活性的产物。

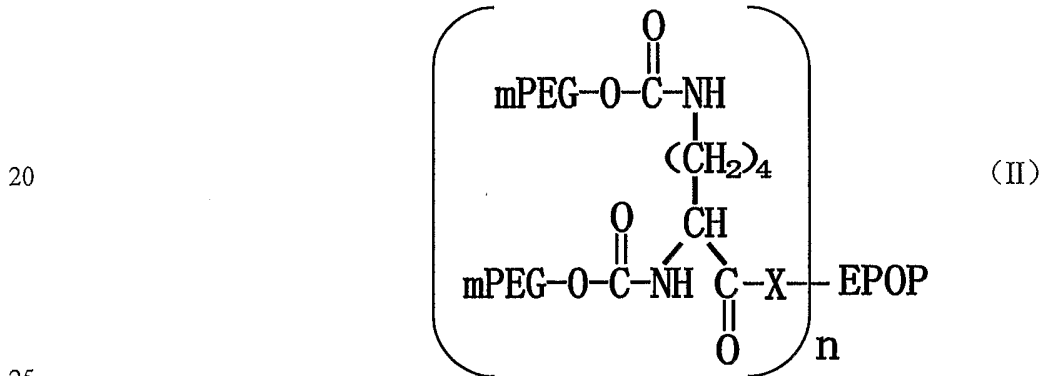
2、权利要求 1 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于其具有式 (I) 结构：



式 (I) 中，mPEG 的分子结构式为 $CH_3-(CH_2CH_2O)_k$ 其中 k 为 100~1000 的整数，使结合物的 mPEG 部分分子量为 5000~40000 道尔顿；

X 为 NH 或 O，代表 PEG 对 EPOP 化学修饰的共价连接方式；EPOP 代表无体内活性的重组人促红细胞生成素蛋白。

3、权利要求 2 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于其具有式 (II) 结构：



式 (II) 中，n 为 1~5 的整数，代表 PEG 对 EPOP 的修饰程度；mPEG 的分子结构式为 $CH_3-(CH_2CH_2O)_k$ 其中 k 为 100~1000 的整数，为 i 与 j 之和，使结合物的 mPEG 部分分子量为 5000~40000 道尔顿；

X 为 NH 或 O，代表 PEG 对 EPOP 化学修饰的共价连接方式；EPOP 代表无体内活性的重组人促红细胞生成素蛋白。

4、权利要求 2 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于所述 EPOP 是由原核表达系统表达的。

5、权利要求 4 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于所述 EPOP 是由大肠杆菌表达系统表达的。

6、权利要求 1 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物在治疗贫血性疾病药物中的应用。

7、权利要求 1 所述的促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物在制备升高红细胞药物中的应用。

经修改的权利要求

[国际局收到日：2005年7月19日 (19.07.2005);
将原始权利要求1-7用新的权利要求1-6替换(共1页)]

权利要求

- 1、一种具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于其具有式 (I) 结构：



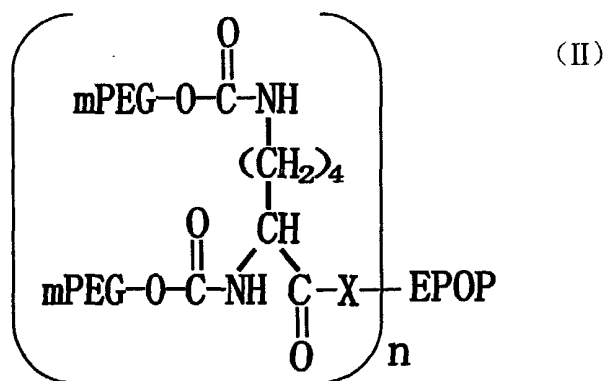
式 (I) 中，mPEG 的分子结构式为 $\text{CH}_3-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_k$

其中 k 为 100~1000 的整数，使结合物的 mPEG 部分分子量为 5000~40000 道尔顿；

X 为 NH 或 O，代表 PEG 对 EPOP 化学修饰的共价连接方式；

EPOP 代表无体内活性的重组人促红细胞生成素蛋白。

- 2、权利要求 2 所述的具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于其具有式 (II) 结构：



式 (II) 中，n 为 1~5 的整数，代表 PEG 对 EPOP 的修饰程度；

mPEG 的分子结构式为 $\text{CH}_3-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_k$

其中 k 为 100~1000 的整数，为 i 与 j 之和，使结合物的 mPEG 部分分子量为 5000~40000 道尔顿；

X 为 NH 或 O，代表 PEG 对 EPOP 化学修饰的共价连接方式；

EPOP 代表无体内活性的重组人促红细胞生成素蛋白。

- 3、权利要求 2 所述的具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于是用 PEG2-NHS-20K 修饰 EPOP 得到的。

- 4、权利要求 1-3 任一项所述的具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物，其特征在于所述 EPOP 是由大肠杆菌表达系统表达的。

- 5、权利要求 1-3 任一项所述的具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物在治疗贫血性疾病药物中的应用。

- 6、权利要求 1-3 任一项所述的具有体内活性的原核表达系统表达的重组促红细胞生成素蛋白的聚乙二醇结合物在制备升高红细胞药物中的应用。

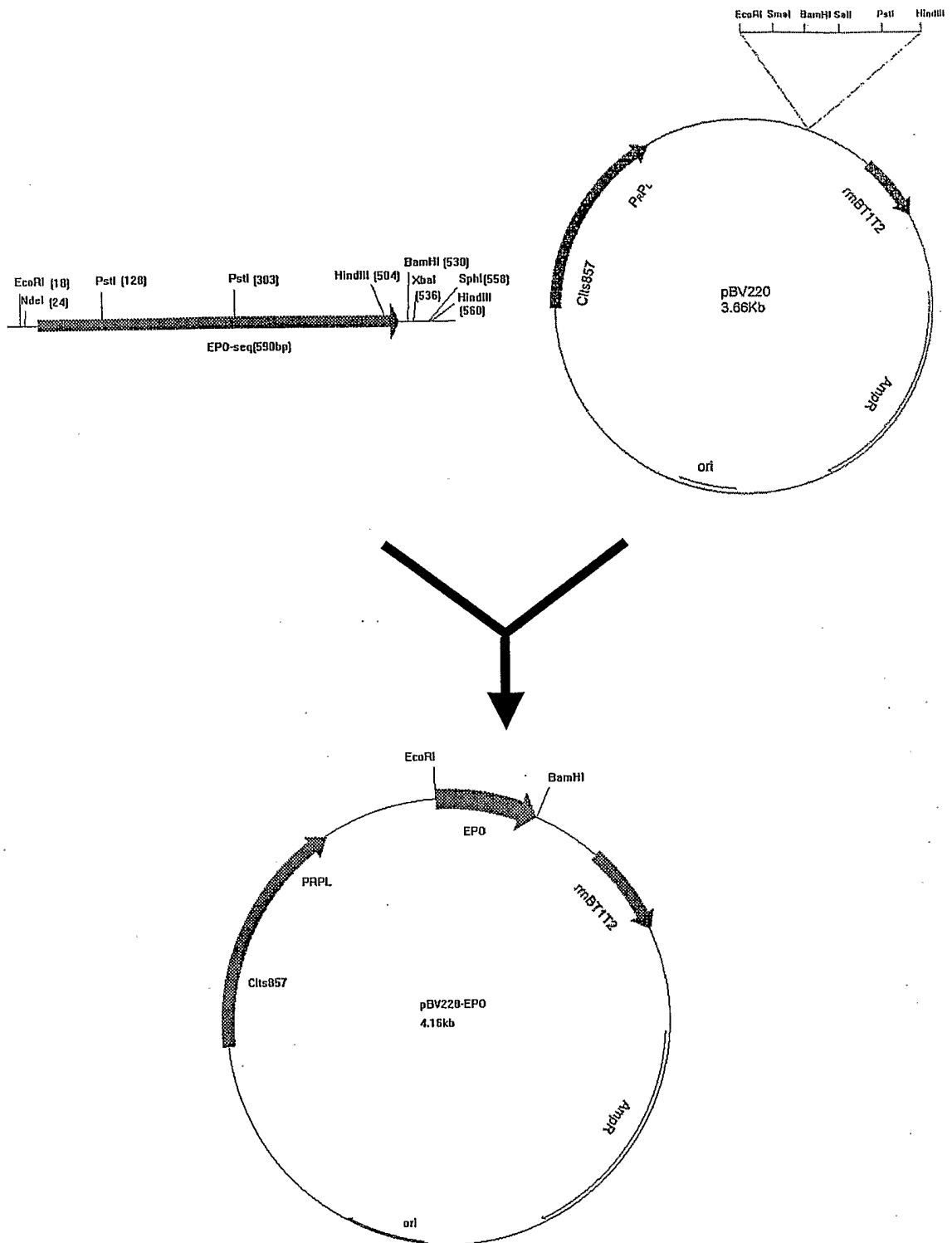
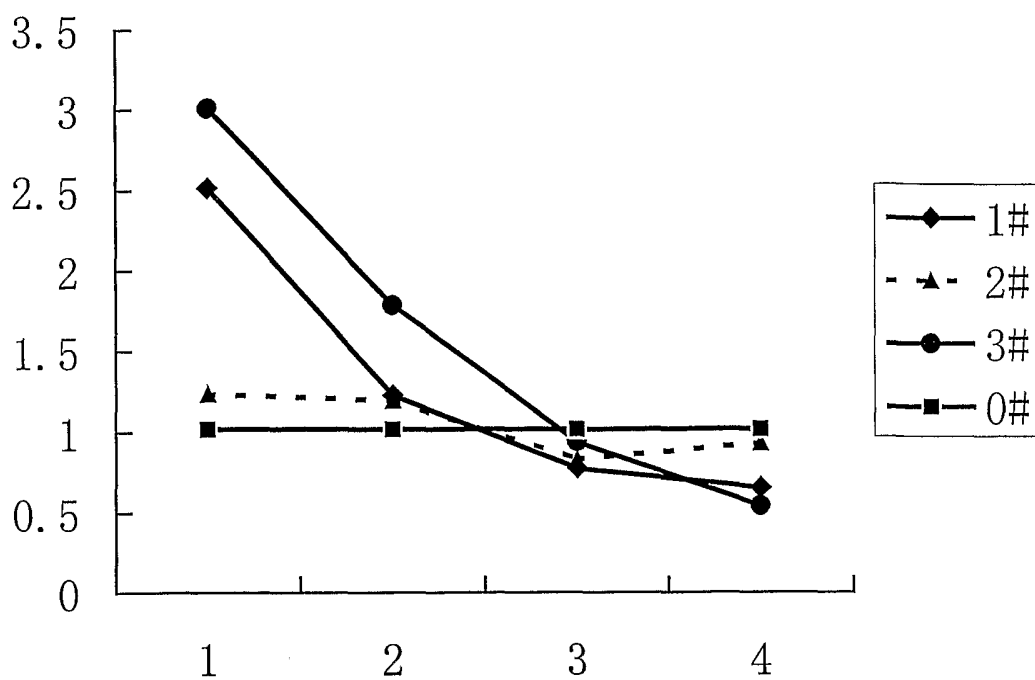


图 1



- 图 2

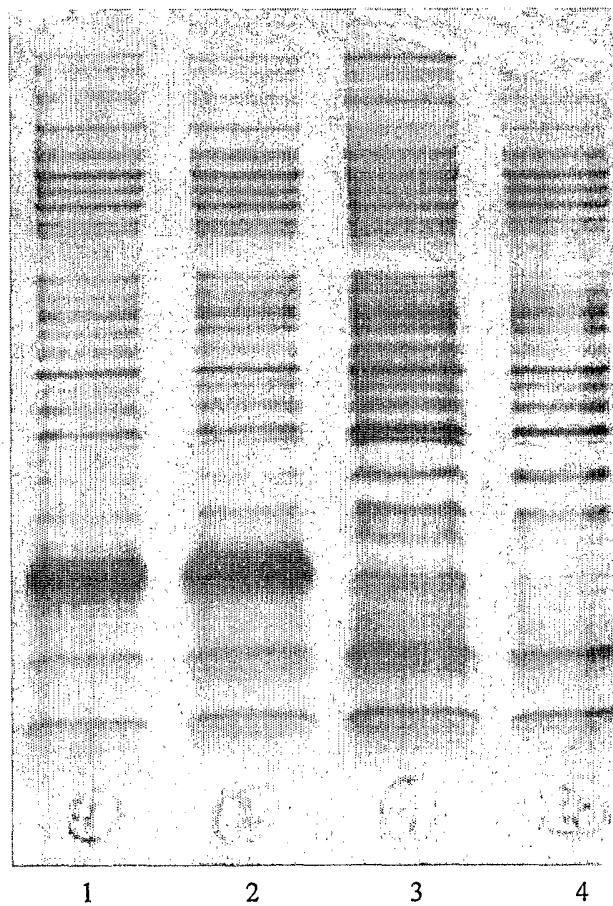


图 3

重组人促红细胞生成素. ST25
SEQUENCE LISTING

<110> 成都生物制品研究所
 <120> 聚乙二醇修饰后具有体内生理活性的重组促红细胞生成素
 <130> 2905
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial (人工序列)

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(501)
 <223> 编码人重组人促红细胞生成素基因

 <400> 1
 gcc cca cca cgc ctc atc tgt gac agc cga gtc ctg gag agg tac ctc 48
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

 ttg gag gcc aag gag gcc gag aat atc acg acg ggc tgt gct gaa cac 96
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30

 tgc agc ttg aat gag aat atc act gtc cca gac acc aaa gtt aat ttc 144
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45

 tat gcc tgg aag agg atg gag gtc ggg cag cag gcc gta gaa gtc tgg 192
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

 cag ggc ctg gcc ctg ctg tgc gaa gct gtc ctg cgg ggc cag gcc ctg 240
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80

 ttg gtc aac tct tcc cag ccg tgg gag ccc ctg cag ctg cat gtg gat 288
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95

 aaa gcc gtc agt ggc ctt cgc agc ctc acc act ctg ctt cgg gct ctg 336
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

 gga gcc cag aag gaa gcc atc tcc cct cca gat gcg gcc tca gct gct 384
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125

 cca ctc cga aca atc act gct gac act ttc cgc aaa ctc ttc cga gtc 432
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

 tac tcc aat ttc ctc cgg gga aag ctg aag ctg tac aca ggg gag gcc 480
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

 tgc agg aca ggg gac aga tga 501
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

 <210> 2
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial (人工序列)

 <400> 2

重组人促红细胞生成素. ST25

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

<210> 3
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial (人工序列)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(501)

<400> 3
 gctccgccgc gctgatctg tgatagccgt gttctggaac gttacctgct ggaagctaaa 60
 gaagctgaaa acatcagcac gggctgtgct gaacctgca gcctgaacga aaacatcact 120
 gttccggata ccaaagttaa cttctatgct tggaacgta tggaagtgg tcagcagct 180
 gtagaagttt ggcaggcct ggctctgctg tcggaagctg ttctgctgg ccaggctctg 240
 ctggttaact ctagccagcc gtgggaacc ctgcagctgc acgtggataa agctgttagt 300
 ggctctgcgta gcctgaccac tctgctgctg gctctggag ctcagaaga agctatcagc 360
 cctccggatg cggcttcagc tgetccgctg cgtaccatca ctgctgatac tttccgtaaa 420
 ctgttccgtg tttacagcaa cttctgctg ggaaaactga aactgtacac cggatgaagct 480
 tgccgtaccg gtgatcgttg a 501

重组人促红细胞生成素-ST25

<210> 4
<211> 498
<212> DNA
<213> Artificial (人工序列)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(498)

<400> 4
gctccgccgc gtctgatctg tgatagccgt gttctggaac gttacctgct ggaagctaaa 60
gaagctgaaa acatcacgac gggctgtgct gaacactgca gcctgaacga aaacatcact 120
gttccggata ccaaagttaa cttctatgct tggaaacgta tggaagttgg tcagcaggct 180
gtagaagttt ggcagggcct ggctctgctg tcggaagctg ttctgcgtgg ccaggctctg 240
ctggttaact ctagccagcc gtgggaacct ctgcagctgc acgtggataa agctgttagt 300
ggcctgcgta gcctgaccac tctgctgcgt gctctgggag ctcaaaaaga agctatcagc 360
cctccggatg cggcttcagc tgctccgctg cgtacatca ctgctgatac tttccgtaaa 420
ctgttccgtg tttacagcaa cttctctgct ggaaaactga aactgtacac cgggtgaagct 480
tgccgtaccg gtgattga 498

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2005/000254

| | | | | |
|---|---|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;">Int. Cl⁷ A61K47/48, A61P7/06</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p> | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p style="text-align: center;">Int. Cl⁷ A61K, C12N, C07K, A61P7</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p style="text-align: center;">Epoque(WPI, EPODOC, PAJ), Medline, Biological Abstracts</p> | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | |
| X | Int J Hematol. July 1998; 68(1):1-18 FRANCIS, GE, et al. "PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques". | 1-7 | | |
| X | WO A 0032772 (ELI LILLY). 08. June 2000 p.8 1.9-p.9 1.20, p.12 1.7-13 | 1-7 | | |
| X | WO A 2004009627 (CANGENE CORPORATION). 29. Jan. 2004 p.8 1.1-10, p.9 1.15-27, p.19 1.20-p.22 1.29, p.19 1.20-p.22 1.29 | 1-7 | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | |
| <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table> | | | <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | | |
| Date of the actual completion of the international search 12. April 2005 | | Date of mailing of the international search report 19 · MAY 2005 (19 · 05 · 2005) | | |
| 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 <p style="text-align: right;">WU, Yongqing</p> Telephone No. (86-10)62085070 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2005/000254

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|------------------|-----------------|------------------|
| WO A 0032772 | 08. June 2000 | JP T 2002531089 | 24. Sept. 2002 |
| | | AU A 200023469 | 19. June 2000 |
| | | EP A 1135493 | 26. Sept. 2001 |
| WO A 2004009627 | 29. Jan. 2004 | AU A 2003246486 | 09. Feb. 2004 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2005/000254

A. 主题的分类

Int. Cl⁷ A61K47/48, A61P7/06

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)

Int. Cl⁷ A61K, C12N, C07K, A61P7

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))

Epoque(WPI, EPODOC, PAJ), 医学文摘(Medline), 生物文摘(Biological Abstracts)

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 | Int J Hematol. 7 月 1998; 68(1):1-18 FRANCIS, GE, 等. "PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques". | 1-7 |
| X | WO A 0032772 (ELI LILLY). 08. 6 月 2000 第 8 页第 9 行-第 9 页第 20 行, 第 12 页第 7-13 行 | 1-7 |
| X | WO A 2004009627 (CANGENE CORPORATION). 29. 1 月 2004 第 8 页第 1-10 行, 第 9 页第 15-27 行, 第 19 页第 20 行-第 22 页第 29 行, 第 19 页第 20 行-第 22 页第 29 行 | 1-7 |

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. 4 月 2005

国际检索报告邮寄日期

19. 5 月 2005 (10. 05. 2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

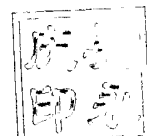
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

吴永庆

电话号码: (86-10)62085070



国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2005/000254

| 检索报告中引用的 专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|------------------|--------------|---|--|
| WO A 0032772 | 08. 6 月 2000 | JP T 2002531089 AU A 200023469 EP A 1135493 | 24. 9 月 2002 19. 6 月 2000 26. 9 月 2001 |
| WO A 2004009627 | 29. 1 月 2004 | AU A 2003246486 | 09. 2 月 2004 |