



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192684.2

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/68

[43]公开日 1996年7月10日

[22]申请日 94.5.24

[30]优先权

[32]93.5.24 [33]US[31]08/064,873

[86]国际申请 PCT/AU94/00274 94.5.24

[87]国际公布 WO94/27613 英 94.12.8

[85]进入国家阶段日期 96.1.4

[71]申请人 澳洲生物科技公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72]发明人 G·J·罗素-琼斯

S·W·韦斯特伍德

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 张元忠

A61K 38/16 A61K 47/48

权利要求书 10 页 说明书 21 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 维生素B₁₂介导的GCSF及EPO口腔释放系统

[57]摘要

本发明描述了 VB₁₂ 类似物和 GCSF 或 EPO 之间的配合物,其同时保持了配合物中 VB₁₂ 部分对固有因子(IF)的显著的亲合力以及配合物中 GCSF 或 EPO 部分的显著的生物活性。本发明也涉及了合成这些配合物的方法。通过利用间隔化合物在 VB₁₂ 部分与 GCSF 或 EPO 之间共价连接而至少部分实现此目的。配合物优选具有通式 V-X-A-Y-Z,其中 V 是维生素 B₁₂ 或维生素 B₁₂ 类似物或者衍生物,其通过 VB₁₂ 可啉环的羧酸酯侧基或通过中心钴原子与 X 连接或者与 VB₁₂ 分子引入的官能团连接;X 选自: -NHNH-, -NH-, -O-, -S-, -SS- 或 -CH₂-;以及 A 是任意一个取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的 C₁₋₅₀ 亚烷基、环烯或芳基,直链中一个或多个碳原子可被 N、O 或 S 任意取代,并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基和其它基团;Y 是一个在 A 和 Z 之间的共价键,其中 Y 选自 -NHCO-, -CONH-, -CONHNHCO-, -N=N-, -N=CH-, -NHCH₂-, -NHN=CH-, -NHNHCH₂-, -SS-, -SCH₂-, -CH₂S-, -NHCRNH-, -COO-,

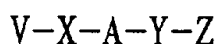
-OCO-, R 是 O, S 或 NH₂, 并且 Z 是 GCSF 或 EPO。本发明描述了可用于检测蛋白质或肽的隐埋硫醇基的试剂,所述试剂包括维生素 B₁₂(或其类似物)或更一般的能通过任意仪器或视觉检测的标记物的配合物,其为一个双基间隔物共价连接,所述间隔物具有能与所述蛋白质或肽中的游离硫醇形成共价键的末端活性基团。

权利要求书

1. 一种在GCSF和含有维生素B₁₂和维生素B₁₂类似物的载体（所述GCSF和所述载体通过双基间隔物共价连接）之间形成的配合物，所述配合物能以高度亲合力连接固有因子而保持GCSF的生物活性。

2. 权利要求1的配合物，其中所述载体通过：GCSF的Cys-17的二硫键、酰胺键、酰基酰肼键、亚胺键或脲键共价连接到GCSF上。

3. 权利要求1的配合物，具有通式：



其中：

V是维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物或者衍生物，其通过VB₁₂可啉环的羧酸酯侧基或通过中心钴原子与X连接或者与VB₁₂分子引入的官能团连接；

X选自：-NHNH-，-NH-，-O-，-S-，-SS-或-CH₂-；以及

A是任意一个取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的C₁₋₅₀亚烷基、环烯或芳基，直链中一个或多个碳原子可被N、O或S任意取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基和其它基团；Y是一个在A和Z之间的共价键，其中Y选自-NHCO-，-CONH-，-CONHNHCO-，-N=N-，-N=CH-，-NHCH₂-，-NHN=CH-，-NHNHCH₂-，-SS-，-SCH₂-，-CH₂S-，-NHCRNH-，[R是O，S或NH₂]，-COO-，-OCO-，并且Z是GCSF。

4. 权利要求1的配合物，其中所述维生素B₁₂类似物选自氰钴胺素（CN-Cb1）、水合钴胺素、腺苷钴胺素、甲基钴胺素、羟基钴胺素、（5-甲氧苄基）氰基钴胺素[(5-MeOBz)CN-Cb1]；上述物质的去二甲基、一乙酰胺及甲酰胺类似物；烷基链通过直接CoC共价键连接到可啉环上的烷基钴胺素；氯钴胺素、亚硫酸钴胺素、硝基钴胺素、硫氰酸钴胺素、苯并咪唑衍生物（包括5，6-二氯苯并咪唑、5-羟基苯并咪唑、三甲基苯并咪唑）；腺苷氰基钴胺素[(Ade)CN-Cb1]、钴胺素内酯、钴胺素内酰胺；VB₁₂或其类似物的N-酰苯胺、乙酰胺、一元羧酸和二元羧酸的衍生物；VB₁₂的一元、二元和三元羧酸衍生物；以及用锌或镍代替钴的VB₁₂类似物。

5. 权利要求1的配合物，其中所述维生素B₁₂类似物是一种其可啉环被一个不影响结合固有因子的取代基取代的类似物。

6. 权利要求1的配合物，其中所述GCSF与一种药用聚合物共价相连。

7. 权利要求6的配合物，其中的聚合物选自葡聚糖、菊粉、纤维素、淀粉及其衍生物、硫酸软骨素、聚[N- α -(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺]及其衍生物、苯乙烯-马来酐共聚物、二乙烯基醚-马来酐共聚物、聚赖氨酸、聚（谷氨酸）、聚（羟丙基谷氨酰胺）、聚（乳酸）、PEG与赖氨酸或其它氨基酸通过共价键形成的水溶性聚氨基甲酸乙酯及支链多肽。

8. 权利要求6的配合物，其中所述药用聚合物在人或动物体内可生物降解。

9. 一种制备在GCSF和选自维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物的载体之间的配合物的方法，其包括：将一种或两种所述载体和GCSF与具有末端活性基团的双基间隔物反应形成载体/连接物和/或GCSF连接物中间体，然后将各种组分一起反应得到GCSF和所述载体的配合物，其中各组分通过所述间隔物共价连接。

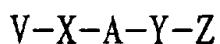
10. 权利要求9的方法，其中在配合物形成前将GCSF和/或所述载体修饰而得到至少一个能形成化学键的官能团。

11. 权利要求9的方法，其中所述载体通过GCSF的Cys-17的二硫键、酰胺键、酰基酰肼键、亚胺键或脲键共价连接到GCSF上。

12. 一种在EPO和含有维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物的载体之间形成的配合物，其中所述EPO和所述载体通过双基间隔物共价连接，所述配合物能以高度亲合力连接固有因子而保持EPO的生物活性。

13. 权利要求12的配合物，其中所述载体通过：酰胺键、酰基酰肼键、亚胺键或脲键共价连接到EPO上。

14. 权利要求12的配合物，具有通式：



其中：

V是维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物或者衍生物，其通过VB₁₂可啉环的羧酸酯侧基或通过中心钴原子与X连接或者与引入VB₁₂分子的官能团连接；

X选自：-NHNH-，-NH-，-O-，-S-，-SS-或-CH₂-；并且

A是任意一个取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的C₁₋₅₀亚烷基、环烯或芳基，直链中一个或多个碳原子可被N、O或S任意取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基和其它基团；Y是一个在A和Z之间的共价键，其中Y选自-NHCO-，-CONH-，-CONHNHCO-，-N=N-，-N=CH-，-NHCH₂-，-NHN=CH-，-NHNHCH₂-，-SS-，-SCH₂-，-CH₂S-，-NHCRNH-，[R是O，S或NH₂]，-COO-，-OCO-，并且Z是EP0。

15. 权利要求12的配合物，其中所述维生素B₁₂类似物选自氰钴胺素（CN-Cb1）、水合钴胺素、腺苷钴胺素、甲基钴胺素、羟基钴胺素、5-甲氧苄基（氰基）钴胺素[(5-MeOBz)CN-Cb1]；上述物质的去二甲基、一乙酰胺及甲酰胺类似物；烷基链通过直接CoC共价键连接到可啉环上的烷基钴胺素；氯钴胺素、亚硫酸钴胺素、硝基钴胺素、硫氰酸钴胺素、苯并咪唑（氰基）钴胺素衍生物（包括5，6-二氯苯并咪唑、5-羟基苯并咪唑、三甲基苯并咪唑）；腺苷氰基钴胺素[(Ade)CN-Cb1]、钴胺素内酯、钴胺素内酰胺；VB₁₂或其类似物的N-酰苯胺、乙酰胺、一元羧酸和二元羧酸的衍生物；VB₁₂的一元、二元和三元羧酸衍生物或者eVB₁₂的丙酰胺衍生物；以及用锌或镍代替钴的VB₁₂类似物。

16. 权利要求12的配合物，其中所述维生素B₁₂类似物是一种其可啉环被一个不影响结合固有因子的取代基取代的类似物。

17. 权利要求12的配合物，其中所述EP0与一种药用聚合物共价相连。

18. 权利要求17的配合物，其中的聚合物选自葡聚糖、菊粉、纤维素、淀粉及其衍生物、硫酸软骨素、聚[N- α -(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺]及其衍生物、苯乙烯-马来酐共聚物、二乙烯基醚-马来酐共聚物、聚赖氨酸、聚(谷氨酸)、聚(羟丙基谷氨酰胺)、聚(乳酸)、PEG与赖氨酸或其它氨基酸通过共价键形成的水溶性聚氨基甲酸乙酯及支链多肽。

19. 权利要求17的配合物，其中所述药用聚合物在人或动物体内可生物降解。

20. 一种在EP0和选自维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物的载体之间制备配合物的方法，其包括：将一种或两种所述载体和EP0与具有末端活性基团的双基间隔物反应形成载体/连接物和/或EP0连接物中间体，然后将各种组分一起反应得到EP0和所述载体的配合物，其中各组分通过所述间隔物共价连接。

21. 权利要求20的方法，其中在衍生化前将EP0和/或所述载体修饰而得到至少一个能形成化学键的官能团。

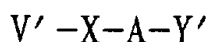
22. 权利要求20的方法，其中所述载体通过：酰胺键、酰基酰肼键、亚胺键或脲键共价连接到EP0上。

23. 一种用于检测蛋白质或肽的隐埋硫醇基的试剂，所述试剂包括维生素B₁₂（或其类似物）或更一般的能通过视觉或者仪器方法检测的标记物的配合物，其为一个双基间隔物共价

连接，所述间隔物具有能与所述蛋白质或肽中的游离硫醇形成共价键的末端活性基团。

24. 权利要求23的试剂，其中所述间隔物具有1 - 50个原子的骨架。

25. 权利要求23的试剂，具有通式



其中，

V' 是维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物，其通过VB₁₂可啉环的羧酸酯侧基或者通过中心钴原子与X连接，或连接到VB₁₂分子引入的官能团上，或者v' 是一个通过视觉或仪器方法可检测标记物；

X 选自 -NHCO-, -CONH-, -CONHNHCO-, -N=N-, -N=CH-, -NHCH₂-, -NHN=CH-, -NHNHCH₂-, -SS-, -SCH₂-, -CH₂S-, -NHCRNH-, [R是O, S或NH₂], -COO-, -OCO-;

A是一个任意取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的C₁ - 50亚烷基、环烯或芳基，链中一个或多个碳原子可被N、O或S任意选取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基或其它基团；Y' 是一个能与硫醇反应得到稳定共价键的官能团。

26. 权利要求25的试剂，其中Y' 选自碘乙酰基、溴乙酰基、氯乙酰基、马来酰亚氨基、3-羧基-4-硝基苯基二硫基或2-吡啶二硫基。

27. 权利要求23的试剂，其中所述标记物选自发色团、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、放射性同位素、胶体金属及非金属颗粒、染料颗粒、酶或底物、抗体或抗原、生物素、抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、胶乳颗粒、脂质体或其它含有信号产生物质的囊泡。

28. 一种药用组合物，其含有与药用载体或赋形剂任意结合的一种权利要求1至8或者12至19的配合物。

29. 一种对用GCSF或EPO治疗敏感的患者治疗的方法，其包括对所述患者给予治疗有效量的权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物，或者权利要求28的组合物。

30. 使用权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物生产药物的用途。

31. 使用权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物生产药物的用途。

说明书

维生素B₁₂介导的GCSF及EPO口腔释放系统

本发明背景

本发明涉及治疗物质粒细胞集落刺激因子（GCSF）和促红细胞生成素（EPO）的口腔释放，它通过将含有连接到维生素B₁₂（VB₁₂）或其类似物上的该物质的配合物给药。更具体地，本发明涉及合成这些配合物的方法以及加大每个VB₁₂载体分子释放GCSF或EPO的量的方法。

口腔释放体系是已知的，当前发明者之一进行的近期研究工作（描述于PCT申请W087/02251（PCT/AU86/0299）），其通过将活性物质连接到至少一个载体分子（VB₁₂或其类似物）上，可以通过将VB₁₂连接到固有因子（IF）上利用自然VB₁₂吸收系统将所得配合物从肠腔转运至循环系统。一旦释放入血清或淋巴引流系统，该配合物基本保留了原活性物质的生物活性。

与所有的蛋白质、肽和其它大的生物活性分子一样，在目前还没有GCSF或EPO的口腔释放的方法。口服给药的途径是释放药学活性药剂最优选的方式，而且任何一种能使这些蛋白质经口服进入人体的方法都会有一个大而有价值的市场。通过在VB₁₂和GCSF或EPO之间形成配合物而使其成为可能。

本发明概述

本发明一方面涉及在VB₁₂类似物和GCSF或EP0之间形成配合物以保持配合物中VB₁₂对固有因子（IF）的显著的亲合力，同时保持了配合物中GCSF或EP0的显著的生物活性。本发明也涉及合成这些配合物的方法。可通过利用间隔化合物在VB₁₂部分与GCSF或EP0之间共价连接而至少部分实现此目的。

优选实施方案的描述

本发明的一方面是提供一种包括至少一种连接至少一个载体分子（VB₁₂或VB₁₂类似物）的活性物质，其中载体在脊椎动物宿主中吸收和转运VB₁₂所必需的进行结合反应的能力及活性物质的活性都基本保持。这是通过在GCSF和选自VB₁₂或VB₁₂类似物的载体之间提供一种配合物而实现的，其中GCSF和载体通过一个双自由基间隔物共价连接，该配合物能以高度的亲合力连接到固有因子上，同时保持GCSF的生物活性。

配合物优选具有V-X-A-Y-Z的通式，其中V是保持IF亲和力的载体分子VB₁₂或其类似物（包括衍生物），Z是选自EP0或GCSF的活性物质，A是不同组成和长度的间隔臂，X是将V连接到A上的官能团，Y是将Z连接到A上的官能团。选择官能团X的性质、其连接V的位点以及间隔臂A的性质以加大配合物IF的亲合力。选择官能团Y、其连接Z的位点以及间隔臂A的性质以最大程度地维持Z的生物活性。

优选的X选自：-NHNH-，-NH-，-O-，-S-，-SS-或-CH₂-。A优选是一个任意取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的C₁-50亚烷基、环烯或芳基，直链中一个或多个碳原子可被N、O或

S任意取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基和其它基团。Y优选是一个在间隔物链A和蛋白质Z之间的共价键，其中Y选自-NHCO-，-CONH-，-CONHNHCO-，-N=N-，-N=CH-，NHCH₂-，-NHN=CH-，-NHNHCH₂-，-SS-，-SCH₂-，-CH₂S-，-NHCRNH-[其中R = O，S或NH₂]，-COO-，-OCO-，并且Z是GCSF或EP0。

本发明中，术语“活性物质”（即Z）包括粒细胞集落刺激因子（GCSF）或促红细胞生成素（EP0）所有的或部分的类似物、同系物、衍生物或者结合体。

载体是VB₁₂或VB₁₂类似物。VB₁₂类似物包括具有固有因子连接活性的VB₁₂（钴胺素）的任何变体或衍生物。优选的VB₁₂类似物包括水合钴胺素、腺苷钴胺素、甲基钴胺素、羟基钴胺素、氰基钴胺素、N-碳酰苯胺和5-甲氧苄基氰基钴胺素[(5-MeO)CN-Cb1]，以及所有上述物质的去二甲基、一乙基酰胺及甲酰胺类似物。其它类似物包括烷基钴胺素，其中烷基链通过直接CoC共价键连接到可啉环上。其它类似物包括氯钴胺素、亚硫酸钴胺素、硝基钴胺素、硫氰酸钴胺素、苯并咪唑（例如：5，6-二氯苯并咪唑、5-羟基苯并咪唑、三甲基苯并咪唑）氰钴胺素的衍生物以及腺苷氰基钴胺素[(Ade)CN-Cb1]、钴胺素内酯、钴胺素内酰胺以及VB₁₂或其类似物的N-酰苯胺、乙酰胺、一元羧酸和二元羧酸的衍生物。

优选的VB₁₂衍生物包括VB₁₂的一元、二元和三元羧酸衍生物或丙酰胺衍生物。载体也可包括用锌或镍代替钴的VB₁₂的类似物。VB₁₂或其类似物的可啉环可被任何不影响其连接IF的取

代基所取代，并且VB₁₂或其类似物的这些衍生物是本发明的一部分。具有可与间隔化合物反应的官能团的VB₁₂或其类似物的其它衍生物也是本发明的一部分。

优选配合物包括通过二硫键连接到VB₁₂的（二硫吡啶基丙酰胺）十二烷胺[DTP-十二烷胺]衍生物上的GCSF。

本发明另一优选的实施方案提供了一种制备含有通过二硫键连接VB₁₂的（二硫吡啶基丙酰胺）十二烷基环庚基己胺衍生物（DTP-十二烷胺VB₁₂的长链类似物，其对固有因子表现出高度亲合力）的GCSF的配合物的方法。

本发明另一优选的实施方案提供了一种制备含有通过二硫键连接VB₁₂的（二吡啶基丙酰胺）十二烷基碳酰胺甲基衍生物的GCSF的配合物的方法，其中间隔物通过轴向CoC键连接VB₁₂。

本发明另一优选的实施方案提供了一种制备含有至少一种活性化合物（其通过间隔物连接至少一个载体分子）的配合物的方法，载体分子是VB₁₂或其类似物，其中载体在脊椎动物宿主中吸收和转运VB₁₂所必需的进行结合反应的能力及活性物质的活性都基本保持，该方法包括一个或多个以下步骤：

- a) 活性物质和载体以及间隔化合物反应形成配合物；
- b) 活性物质和间隔物反应，然后其产物与载体反应形成配合物；
- c) 载体和间隔物反应，然后其产物与活性物质反应形成配合物；

d) 按照 (a)、(b) 或 (c) 的方法，但是在前一步附加一步化学修饰载体和/或活性物质，在载体和/或活性物质上得到一个可与间隔化合物反应的官能团；

e) 按照 (a)、(b)、(c) 或 (d) 的方法，但是在进行进一步反应前附加一步活性化合物或载体与聚合物载体的反应。优选聚合物载体同时连接到载体（或间隔物 - 载体）和活性物质或（间隔物 - 活性物质）上。

例如，可通过下述方法利用“e” VB₁₂ 的“e” 单酸形成这些配合物：(i) 通过弱酸水解氰钴胺素制备 VB₁₂ 的单酸衍生物并纯化一级水解产物；(ii) 修饰 e-单酸而得到通过间隔臂连接 eVB₁₂ 环的末端官能团；(iii) 将官能化的 eVB₁₂ 衍生物偶合到活性物质上的羧酸酯、胺、硫醇、羟基、酚基、醛或酮基团上或者其它原有或被化学引入的适当官能团上。可选择在其骨架末端具有适当官能团的间隔化合物，或者如果必要，可通过一般的化学合成反应将这些官能团引入。

本发明也包括聚合物载体的化学修饰以引入能直接与间隔化合物反应或与连接有活性物质的间隔化合物反应的官能团。所得的聚合物 - 活性物质中间体含有活性物质的许多分子，并且该中间体适于与载体偶合而得到能扩大活性物质释放的配合物。

本发明也涉及肽和蛋白质中未反应硫醇的修饰的一般方法，特别是那些不正常与溶于含水溶剂的试剂接触的硫醇，因为其隐埋在蛋白质的疏水部位。如果需要，接着将这些修饰的肽和蛋白质进行标记。

本发明也包括一种通式为 $V'-X-A-Y'$ 的试剂，其中 V' 是 VB_{12} 或 VB_{12} 类似物，其通过 VB_{12} 可啉环的羧酸酯侧基或者通过中心钴原子连接 X ，或连接到 VB_{12} 分子引入的官能团上，或者 v' 是一个标记物，其中“标记物”是指通过视觉或仪器方法可检测的任何物质。标记物可包括发色团、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、放射性同位素、胶体金属及非金属颗粒、染料颗粒、酶或底物、抗体或抗原、生物素、抗生物素蛋白和抗生蛋白链菌素、胶乳颗粒、脂质体或其它含有信号产生物质的囊泡等等。

X 选自 $-NHCO-$ ， $-CONH-$ ， $-CONHNHCO-$ ， $-N=N-$ ， $-N=CH-$ ， $-NHCH_2-$ ， $-NHN=CH-$ ， $-NHNHCH_2-$ ， $-SS-$ ， $-SCH_2-$ ， $-CH_2S-$ ， $-NHCRNH-$ [R 是 O ， S 或 NH_2]， $-COO-$ ， $-OCO-$ ； A 是一个任意取代、饱和或不饱和、支链或直链的 $C_1 - 50$ 亚烷基、环烯或芳基，链中一个或多个碳原子可被 N 、 O 或 S 任意取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基或其它基团； Y' 是一个能与硫醇反应得到稳定共价键的官能团，包括碘乙酰基、溴乙酰基、氯乙酰基、马来酰亚氨基、3-羧基-4-硝基苯基二硫基或2-吡啶二硫基，以及类似基团。

在此描述的配合物可以利用本领域熟知的载体和/或赋形剂制成药用或兽用组合物。用于本发明的适当的药物剂型实例描述于如 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 第10版，在此引为参考)。组合物可以是胶囊、片剂、缓释剂型、酞剂、凝胶剂、膏剂、肠溶包衣剂或其它本领域熟知的的适当剂型。

本发明的配合物及组合物可给需要用GCSF或EPO治疗的人或动物体给药。给药模式对本发明并不关键，可包括非肠道（静脉内、肌内或器官内注射）、口服、透皮、阴道、肛肠或其它本领域熟知的给药途径。本发明的配合物或化合物的治疗有效剂量是为特定疾病提供治疗。有效量视所治疗疾病的性质、医生或兽医的诊断及其它例如受治疗者的年龄、体重和/性别等因素而定。只是作为一个实例，根据本发明，配合物组合物的有效量可含有1ng至10g的本发明的配合物。

本发明也涉及所述配合物用于药物的制备，并且用于对GCSF或EPO敏感病症的治疗。

实现本发明的最佳方法

实施例

材料：VB₁₂由Rousell-Uclaf获得。GCSF和EPO从Amgen获得。

1-乙基-3-(二甲氨基丙基)碳化二亚胺·HCl（EDAC·HCl）由Biorad获得。3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺酯（SPDP）及6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺]己酸琥珀酰亚胺酯（LC-SPDP）由Pierce Chemical Co. 获得。所有其它试剂从Fluka获得。

实施例1：VB₁₂ - GCSF配合物

制备3类VB₁₂ - GCSF配合物：

- a) 通过一个酰胺键共轭，该酰胺键由碳化二亚胺（EDAC）介导将氨基末端的eVB₁₂衍生物偶合到GCSF的C - 末端或GCSF的羧酸酯侧链而形成。
- b) 通过一个二硫键共轭，该二硫键由硫醇插入反应在GCSF的17位Cys将游离硫醇插入eVB₁₂的（二硫吡啶基丙酰胺）末端衍生物的二硫键中形成。
- c) 通过一个酰肼共轭，该酰肼由EDAC - 介导将酰肼末端的eVB₁₂衍生物偶合到GCSF的C - 末端或GCSF的羧酸酯侧链而形成。

1.1 单羧酸 - VB₁₂ “e” 异构体的制备和纯化

将单羧酸维生素B₁₂的“e”异构体（以前叫做d异构体，但是由Anton与其合作者重新命名为e异构体（1980: J. Am. Chem. Soc. 102: 2215））通过Dowex 1X2 色谱及用乙腈的0.1%TFA梯度展开的半制备C-18 RP-HPLC从钴胺素酸水解中形成的b和d异构体中分离。

1.2 eVB₁₂氨基衍生物的制备

许多eVB₁₂的氨基衍生物通过将e异构体与下述物质反应而制备：

- i) 1, 2-二氨基乙烷
- ii) 1, 6-二氨基己烷
- iii) 1, 12-二氨基十二烷
- iv) 1, 3-二氨基-2-羟基丙烷

v) 1, 6-二氨基-3, 4-二硫代己烷 (a. k. a. 胱胺)

所有的反应都在pH6.5进行, 使用对e异构体20倍摩尔过量的二胺及20倍摩尔过量的EDAC。一个代表性的反应是, 将135 mg eVB₁₂溶于蒸馏水 (6ml) 中, 加入1.2ml 1.0M二胺, pH 6.5。然后加入无水EDAC (270mg), 反应混合液在室温下放置过夜。

通过在半制备C-4柱上进行反相色谱纯化所有的氨基衍生物, 使用含0.1% TFA的5-100% 乙腈梯度。洗脱下来的物质通过S-琼脂糖色谱进一步纯化。用0.1M HCl洗脱氨基衍生物, 随后萃取入苯酚中, 在苯酚相中加入二氯甲烷后反萃取入水中。然后通过冷冻干燥从水相中回收氨基-eVB₁₂衍生物。

1.3 2-氨基乙基-eVB₁₂与GCSF的共轭

将2-氨基乙基-eVB₁₂ (26.5mg, 18 μ mol) 的2ml GCSF (6mg/ml, 0.63 μ mol) 溶液冷却至4℃。加入一等分新制的EDAC溶液 (100mg/ml, 120 μ l, 63 μ mol)。24小时后, 在4℃加入第2等分新制的EDAC溶液。反应在4℃进行共48小时, 然后通过交联葡聚糖G-50上, 以2.5%乙酸洗脱进行色谱分离将未反应的2-氨基乙基-eVB₁₂从共轭物和聚集体中分离。

1.4 胱胺基-eVB₁₂与GCSF的共轭

将盐酸胱胺基-eVB₁₂ (30mg, 20 μ mol) 的2.5ml GCSF (6mg/ml, 0.80 μ mol) 溶液在4℃用一等分新制的含水EDAC溶液 (20mg/ml, 75 μ l, 8 μ mol) 处理。4.5小时、7小时和24小

时后，另外加入等分的新制EDAC溶液（20mg/ml，75 μ l，8 μ mol）。反应在48℃进行共48小时，然后通过交联葡聚糖G-50上，以2.5%乙酸洗脱进行色谱分离将未反应的氨基-eVB₁₂从共轭物中分离。

1.5 氨基乙基-eVB₁₂的3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺衍生物的制备

通过将SPDP与下述物质反应制备氨基-eVB₁₂的二硫吡啶基衍生物：i) 2-氨基乙基-eVB₁₂

ii) 6-氨基己基-eVB₁₂

iii) 12-氨基十二烷基-eVB₁₂

一个代表性的反应是，将末端氨基-eVB₁₂溶于50mg/ml 0.1M的PO₄缓冲液（pH 7.5，含有0.1M NaCl）中。将SPDP溶于50mg/ml丙酮中，并且将800 μ l该溶液加到氨基-eVB₁₂中。于室温反应过夜后，将DTP-氨基-eVB₁₂通过RP-HPLC在半制备C₄柱上纯化，然后冷冻干燥。

1.6 DTP-氨基-eVB₁₂与GCSF的共轭

最初与AMGEN的谈话表明，他们发现不可能用标准硫醇修饰剂来修饰未变性GCSF中的游离半胱氨酸。最初用DTP-氨基乙基-eVB₁₂的实验表明，在没有胍存在时可能获得约20%用VB₁₂取代的GCSF；在4M胍存在下，这一水平可升至>80%。因此可确定，如果将一个较长的间隔物用于共轭，在没有胍存在时利用DTP-氨基-eVB₁₂接近游离的硫醇是可能的。

第二系列的实验中，将GCSF与DTP-氨基乙基、DTP-氨基己基和DTP-氨基十二烷基-eVB₁₂在有或没有4M胍的0.1M乙酸钠缓冲液（pH 4.0）存在下反应。

用不同DTP-氨基-eVB₁₂-间隔物配合物取代GCSF的程度如下表所示：

表1

间隔物	胍	+ 胍
DTP-氨基乙基	37.5%	89.3%
DTP-氨基己基	45.5%	95.2%
DTP-氨基十二烷基	100.0%	100.0%

从表1可看出，利用长链的十二烷基-间隔物可以不使用胍而共轭GCSF中隐埋的硫醇。

最初试图用eVB₁₂的吡啶基二硫代丙酰胺-氨基乙基衍生物共轭GCSF中的游离硫醇基，在没有胍存在下只获得约20 - 40 % 低度的共轭。加入4M胍（终浓度）将共轭效率提高至80 % 以上。制备长链的、更疏水的eVB₁₂衍生物，吡啶基二硫代丙酰胺-十二烷基eVB₁₂在4℃ 24小时后得到100 % 取代的GCSF而不需要加入胍。在此反应中硫醇互换化学的应用证明是有利的，因为在可降低GCSF进行自发聚集程度的pH值下eVB₁₂的共轭化是出乎意料的成功。共轭物质的色谱分离导致共轭物从游离eVB₁₂中的基线分离。

这种类型的方法可普遍应用于发展可检测、定量和/或修饰蛋白质及肽中硫醇基的试剂，这些蛋白质和肽在此认为是化学惰性的。

1.7 扩大DTP-氨基十二烷基-eVB₁₂与GCSF的共轭

随着DTP-十二烷基-间隔物共轭的最初成功，将反应如下扩大：

在2.5ml GCSF（6mg/ml；15mg）中加入1.6ml DTP-氨基十二烷基-eVB₁₂（10mg/ml的2.5%乙酸溶液）。该反应在4℃进行48小时，然后通过交联葡聚糖G-25上，以2.5%乙酸洗脱进行色谱将未反应的eVB₁₂从共轭物中分离。用YM 10膜在AMICON正压池中沉淀、浓缩含有GCSF的部分，并且用无菌蒸馏水渗析72小时。

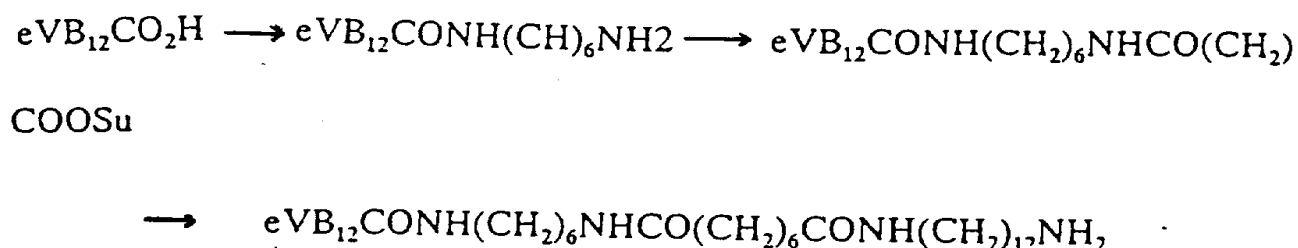
1.8 DTP-十二烷基环庚基己基-eVB₁₂试剂的制备

尽管DTP-十二烷基-eVB₁₂可有效地与GCSF反应得到一个稳定的、确定特征的配合物，但该物质具有低IF亲合力（约原始eVB₁₂的2-3%）。通过合成一个DTP-十二烷基胺基-eVB₁₂的加长间隔物类似物来制备提高IF亲合力的配合物。合成这一类似物使用相同的SPDP化学通过GCSF的半胱氨酸共轭，但是用一个较长的间隔臂连接eVB₁₂。正如所预料，其得到的共轭物的IF亲合力显著高于通过GCSF与DTP-十二烷基-eVB₁₂制备的共轭物的IF亲合力（见表2）。

这一间隔物通过eVB₁₂的e-羧酸酯与下列物质的连续反应而制备:

- i) 1,6-二氨基己烷和EDAC (得到6-氨基己基 eVB₁₂)
- ii) 辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS) (得到单琥珀酰亚胺基环庚基己基-eVB₁₂)
- iii) 1,12-二氨基十二烷 (得到12-氨基十二烷基环庚基-eVB₁₂)

即:



所得间隔物 (大于2倍氨基十二烷基-eVB₁₂的长度) 用SPDP在末端氨基衍生化, 并通过如下描述的方法偶合GCSF。

1.9 DTP-十二烷基环庚基己基-eVB₁₂与GCSF的偶合

将DTP-十二烷基环庚基己基-eVB₁₂溶液 (9mg, 7 μmol) 用乙酸 (100 μl) 提取, 并用水稀释至1ml。将此溶液加入5ml冷却至4℃的GCSF溶液 (4mg/ml, 0.5 μmol) 中。于4℃放置反应混合液144小时, 然后用标准方法处理。

1.10 eVB₁₂羧酸酯的酰肼衍生物的制备

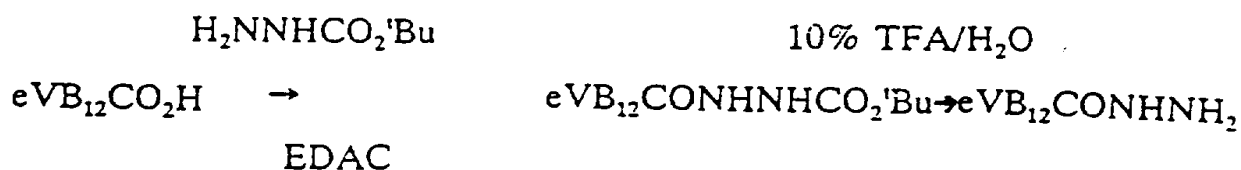
制备两个eVB₁₂羧酸酯的酰肼衍生物以通过与EDAC反应偶合GCSF的羧基。所用的两个酰肼衍生物及其（简写）化学结构为：

a) 酰肼基-eVB₁₂ (= eVB₁₂-CONHNH₂)

b) 己二酰 - 酰肼基 -eVB₁₂ (= eVB₁₂-CONHNHCO(CH₂)₄CONHNH₂)

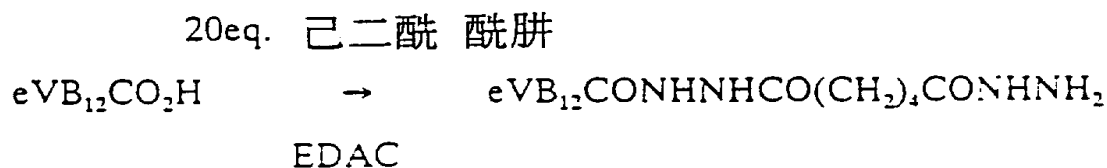
1.10i 酰肼基-eVB₁₂

这一试剂通过两步合成制备，其包括将叔丁基carbazate偶合到eVB₁₂羧酸酯上，随后除去tBoc基团而得到游离的酰肼。



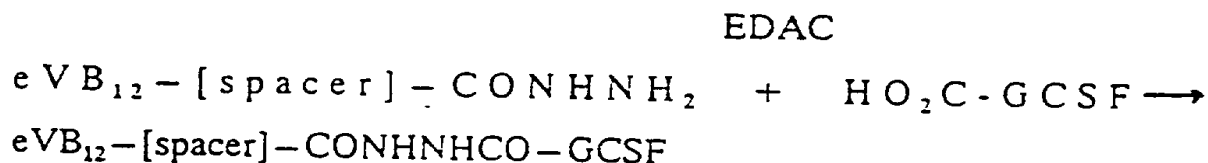
1.10ii 己二酰-酰肼基-eVB₁₂

这一试剂通过将EDAC加入到该酸和20倍过量的己二酰酰肼的混合液中从eVB₁₂羧酸一步制备而得。



EDAC - 介导的酰肼基-eVB₁₂类似物偶合到GCSF羧酸酯支链很容易进行，与相应的氨基eVB₁₂衍生物与GCSF的共轭相比仅需要极少量的eVB₁₂衍生物和EDAC。这用酰肼的相对碱性（pKa 2.6）与胺（pKa 8-9）相比较很容易解释。在发生GCSF偶合的pH（4-5），酰肼eVB₁₂衍生物主要以活性的、非质子化的形式存在，而氨基-eVB₁₂衍生物则主要以非活性的、质子化形式存在。

所用的偶合反应为：



1.11 酰肼-eVB₁₂与GCSF的共轭

将酰肼eVB₁₂（8.9mg, 6.5 μmol）溶液的5mlGCSF溶液（4mg/ml, 1.05 μmol）冷却至4℃，加入一等分EDAC溶液（50mg/ml, 40 μl, 10 μmol）。5小时后，加入相同等分的新制EDAC溶液并将反应混合液于4℃放置过夜。通过在交联葡聚糖G-50上，以2.5%乙酸洗脱进行色谱分离将共轭物从未反应的eVB₁₂及其它试剂中除去。

1.12 己二酰酰肼基-eVB₁₂与GCSF的共轭

将己二酰酰肼基eVB₁₂（10mg, 6.6 μmol）溶液的3mlGCSF溶液（4mg/ml, 0.64 μmol）冷却至4℃，加入一等分EDAC溶液（50mg/ml, 40 μl, 10 μmol）。5小时后，加入20 μl等分的

新制EDAC溶液 (50mg/ml, 20 μ ml, 5 μ mol) 并将反应混合液于4℃放置过夜。通过在交联葡聚糖G-50上, 以2.5%乙酸洗脱进行色谱分离将共轭物从未反应的eVB₁₂及其它试剂中除去。

1.13 聚-GCSF-HPMA-eVB₁₂配合物的制备

可合成两个N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺 (HPMA) 共聚物作为与GCSF和eVB₁₂结合及衍生化的聚合物骨架。非生物降解的聚合物骨架 (HPMA-GG) 可通过HPMA与N-异丁烯酰基-N-甘氨酸甘氨酸对硝基苯基酯的游离基共聚作用而合成。生物降解的聚合物 (HPMA-FALG) 可利用 Rejmanova 及其合作者的方法 [Rejmanova, P, Obereigner, B and Kopecek, J, 1981 Makromol Chem 182:1899-1915] 通过HPMA与N-异丁烯酰基甘氨酸酰苯基丙氨酸酰亮氨酸甘氨酸对硝基苯酚酯的游离基共聚作用而合成。为了将GCSF和eVB₁₂结合到聚合物上, 聚合物首先与10摩尔过量的氨基十二烷基-eVB₁₂及二硫代吡啶基十二烷基环庚基-己胺 (1: 10 摩尔: 摩尔) 混合物反应过夜。未反应的硝基苯基酯通过加入1-氨基-2-丙醇进行氨解。修饰后的聚合物通过在琼脂糖6B上进行色谱而纯化。将二硫代吡啶基十二烷基环庚基己基修饰的eVB₁₂-取代的聚合物溶液溶于2.5%乙酸中, 并与GCSF反应。反应混合液在4℃放置144小时, 然后GCSFeVB₁₂-取代的聚合物通过在琼脂糖6B上进行色谱而纯化。

第2部分: eVB₁₂-EP0配合物

制备3类eVB₁₂-EP0配合物:

(a) 通过一个酰胺键共轭，该酰胺键由EDAC - 介导将氨基-eVB₁₂衍生物偶合到EP0的C - 末端、EP0天冬氨酸/谷氨酸残基的羧酸酯侧链或EP0碳水化合物部分的唾液酸残基的羧酸酯基而形成。

(b) 通过一个酰肼键共轭，该酰肼键由EDAC - 介导将酰肼-eVB₁₂衍生物偶合到EP0天冬氨酸/谷氨酸残基的羧酸酯侧链或EP0碳水化合物部分的唾液酸残基的羧酸酯基而形成。

(c) 通过一个在酰肼基-eVB₁₂衍生物和醛基（由高碘酸氧化EP0的碳水化合物残基形成）之间的腙键共轭。

2.1 2-氨基乙基-eVB₁₂与EP0的共轭

将 2-氨基乙基-eVB₁₂（8mg, 5.7 μmol）与EP0（27mg/ml, 200 μl, 0.18 μmol）的混合液冷却至4℃，加入一等份EDAC溶液（10mg/ml, 100 μl, 5 μmol）。反应混合液于4℃放置64小时，最后通过在交联葡聚糖-75柱上进行筛析色谱而纯化。用含有Tris（pH 7.5, 10mM; NaCl, 100mM）的缓冲液洗脱得到纯化的EP0-eVB₁₂配合物。

2.2 肼氨基-eVB₁₂与EP0的共轭

将6-氨基-3,4-二硫代己基酰胺-eVB₁₂（12mg, 8.1 μmol）与EP0（13.5mg/ml, 500 μl, 0.23 μmol）的混合液冷却至4℃，加入一等份EDAC溶液（10mg/ml, 250 μl, 13 μmol）。反应混合液于4℃放置48小时，最后通过在交联葡聚糖

- 75柱上进行筛析色谱而纯化。用含有Tris (pH 7.5, 10mM) / NaCl (100mM) 的缓冲液洗脱得到纯化的EP0-eVB₁₂配合物。

2.3 EADC - 介导的酰肼-eVB₁₂与EP0的共轭

将酰肼 VB₁₂ (10mg, 7.3 μ mol) 溶液的 7ml EP0 溶液 (2.6mg/ml, 0.6 μ mol) 冷却至4℃, 加入一等份EDAC溶液 (20mg/ml, 50 μ l, 5 μ mol)。5小时后, 加入第二份新制的EDAC溶液 (10mg/ml, 25 μ l, 1.3 μ mol), 反应混合液于4℃放置过夜。通过在G - 50柱上进行筛析色谱将共轭物纯化。用含有Tris (pH 7.5, 10mM; NaCl, 100mM) 的缓冲液洗脱得到纯化的EP0-eVB₁₂配合物。

2.4 EAAC - 介导的己二肼-酰肼-eVB₁₂与EP0的共轭

将己二肼-酰肼-eVB₁₂ (11mg, 7.3 μ mol) 溶液的 4ml EP0 溶液 (2.6mg/ml, 0.35 μ mol) 冷却至4℃, 加入一等份EDAC溶液 (10mg/ml, 100 μ l, 5 μ mol)。反应混合液于4℃放置过夜。通过在G - 50柱上进行筛析色谱将共轭物纯化。用含有Tris (pH 7.5, 10mM) / NaCl (100mM) 的缓冲液洗脱得到纯化的EP0-eVB₁₂配合物。

2.5 高碘酸介导的酰肼 - eVB₁₂ 与 EP0 的共轭

将含水EP0溶液 (6.4mg/ml, 1.56ml, 0.33 μ mol) 冷却至4℃, 加入新制的高碘酸钠溶液 (25mM, 360 μ l)。在4℃轻轻搅拌该溶液15分钟, 加入1,2-亚乙基二醇 (5 μ l) 将过量的

高碘酸骤冷。该溶液用3 l pH5.6, 10mM的NaOAc缓冲液渗析过夜。将酰肼-eVB₁₂ (7.5mg, 5 μmol) 的蒸馏水 (200 μl) 溶液加至氧化的EPO溶液中, 于4℃放置反应混合液7小时。通过在G-75交联葡聚糖上进行筛析色谱 (SEC) 将共轭物从未反应的酰肼中分离。用含有Tris (pH 7.5, 10mM) /NaCl (100mM) 的缓冲液洗脱得到纯化的EPO-eVB₁₂配合物。

2.6 聚-EPO-HPMA-eVB₁₂的制备

可合成两个N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺 (HPMA) 共聚物作为与 EPO 和eVB₁₂结合及衍生化的聚合物骨架。非生物降解的聚合物骨架 (HPMA-GG) 可通过HPMA与N-异丁烯酰基-N-甘氨酸甘氨酸对硝基苯基酯的游离基共聚作用而合成。生物降解的聚合物 (HPMA-GFALG) 可利用Rejmanova及其合作者的方法 [Rejmanova, P, Obereigner, B and Kopecek, J, 1981 Makromol Chem 182:1899-1915] 通过HPMA与N-异丁烯酰基甘氨酸酰苯基丙氨酸酰亮氨酸甘氨酸对硝基苯酚酯的游离基共聚作用而合成。为了将 EPO 和eVB₁₂结合到聚合物上, 将聚合物与10摩尔过量的氨基十二烷基-eVB₁₂及6-(3-酰肼基丙酰胺)-1-氨基-3,4-二硫代己烷 (1: 10 摩尔: 摩尔) 混合物反应过夜。未反应的硝基苯基酯通过加入1-氨基-2-丙醇进行氨解。修饰后的聚合物通过在琼脂糖6B上进行色谱而纯化。通过加入EDAC将EPO共价连接到6-(3-酰肼基丙酰胺)-1-氨基-3,4-二硫代己烷修饰的eVB₁₂-取代的聚合物上。反应混合液在4℃放置18小

时，然后EPO-eVB₁₂-取代的聚合物通过在琼脂糖6B上进行色谱而纯化。

实施例3:

选择适当长度和官能度的双基间隔物以使所得GCSF或EPO eVB₁₂配合物具有最佳的固有因子（IF）亲合力。作为实例，下表所示改变间隔物的长度和官能度对不同配合物及VB₁₂衍生物的结果。

实施例中所指的不同eVB₁₂类似物及配合物的IF亲合力示于表2中。特别地，在GCSF-二硫代丙酰胺[12-氨基十二烷基酰胺]-eVB₁₂（在1.7中制备）和GCSF-二硫代丙酰胺[12-氨基十二烷基-环庚基-己基酰胺]-eVB₁₂（在1.9中制备）中，IF亲合力有显著增加。这种IF亲和力的增加可能是由于后者配合物中间隔臂长度的增加。

表2

VB₁₂类似物及配合物的相对固有因子亲合力

eVB ₁₂ 类似物或配合物	IF亲合力
eVB ₁₂ 羧酸酯	35 %
2-氨基乙酰胺eVB ₁₂	48 %
6-氨基己酰胺eVB ₁₂	91 %
12-氨基十二烷酰胺eVB ₁₂	74 %
12-氨基十二烷基-环庚基-己基酰胺- eVB ₁₂	82 %

二硫代丙酰胺[2-氨基乙酰胺]-eVB ₁₂	6%
二硫代丙酰胺[6-氨基己酰胺]-eVB ₁₂	7%
二硫代丙酰胺[6-氨基己酰胺]-eVB ₁₂	11%
GCSF-二硫代丙酰胺[12-氨基十二烷酰胺]-eVB ₁₂	3%
GCSF-二硫代丙酰胺-12-氨基十二 烷基-环庚基-己基酰胺eVB ₁₂	28%
酰肼基-eVB ₁₂	100%
己二肼二酰肼基-eVB ₁₂	44%
GCSF-酰基酰肼基-eVB ₁₂	10%
GCSF-酰基[己二肼二酰肼]-eVB ₁₂	7%
EP0-酰基酰肼基-eVB ₁₂	6%
EP0-酰基[己二肼二酰肼基]-eVB ₁₂	11%

IF亲合力由eVB₁₂衍生物相对于天然的、未修饰的VB₁₂的亲合力的百分比表示。

权 利 要 求 书

按照条约第 19 条的修改

17. 权利要求12的配合物，其中所述EP0与一种药用聚合物共价相连。

18. 权利要求17的配合物，其中的聚合物选自葡聚糖、菊粉、纤维素、淀粉及其衍生物、硫酸软骨素、聚[N- α -(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺]及其衍生物、苯乙烯-马来酐共聚物、二乙烯基醚-马来酐共聚物、聚赖氨酸、聚(谷氨酸)、聚(羟丙基谷氨酰胺)、聚(乳酸)、PEG与赖氨酸或其它氨基酸通过共价键形成的水溶性聚氨基甲酸乙酯及支链多肽。

19. 权利要求17的配合物，其中所述药用聚合物在人或动物体内可生物降解。

20. 一种在EP0和选自维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物的载体之间制备配合物的方法，其包括：将一种或两种所述载体和EP0与具有末端活性基团的双基间隔物反应形成载体/连接物和/或EP0连接物中间体，然后将各种组分一起反应得到EP0和所述载体的配合物，其中各组分通过所述间隔物共价连接。

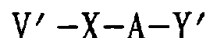
21. 权利要求20的方法，其中在衍生化前将EP0和/或所述载体修饰而得到至少一个能形成化学键的官能团。

22. 权利要求20的方法，其中所述载体通过：酰胺键、酰基酰肼键、亚胺键或腙键共价连接到EP0上。

23. 一种用于检测蛋白质或肽的隐埋硫醇基的方法，所述方法包括使用如维生素B₁₂（或其类似物）或更一般的能通过视觉或者仪器方法检测的标记物的配合物，其与一个双基间隔物共价连接，所述间隔物具有能与所述蛋白质或肽中的游离硫醇形成共价键的末端活性基团。

24. 权利要求23的方法，其中所述间隔物具有1 - 50个原子的骨架。

25. 权利要求23的方法，其中所述试剂具有通式



其中，

V' 是维生素B₁₂或维生素B₁₂类似物，其通过VB₁₂可啉环的羧酸酯侧基或者通过中心钴原子与X连接，或连接到VB₁₂分子引入的官能团上，或者v' 是一个通过视觉或仪器方法可检测标记物；

X 选自 -NHCO-, -CONH-, -CONHNHCO-, -N=N-, -N=CH-, -NHCH₂-, -NHN=CH-, -NHNHCH₂-, -SS-, -SCH₂-, -CH₂S-, -NHCRNH-, [R是O, S或NH₂], -COO-, -OCO-;

A是一个任意取代的、饱和或不饱和的、支链或直链的C₁ - 50亚烷基、环烯或芳基，链中一个或多个碳原子可被N、O或S任意取代，并且其中任意选择的取代基选自羰基、羧基、羟基、氨基或其它基团；Y' 是一个能与硫醇反应得到稳定共价键的官能团。

26. 权利要求25的方法，其中Y' 选自碘乙酰基、溴乙酰基、氯乙酰基、马来酰亚氨基、3-羧基-4-硝基苯基二硫基或2-吡啶二硫基。

27. 权利要求23的方法，其中所述标记物选自发色团、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物、放射性同位素、胶体金属及非金属颗粒、染料颗粒、酶或底物、抗体或抗原、生物

素、抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、胶乳颗粒、脂质体或其它含有信号产生物质的囊泡。

28. 一种药用组合物，其含有与药用载体或赋形剂任意结合的一种权利要求1至8或者12至19的配合物。

29. 一种对用GCSF或EPO治疗敏感的患者治疗的方法，其包括对所述患者给予治疗有效量的权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物，或者权利要求28的组合物。

30. 使用权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物生产药物的用途。

31. 使用权利要求1至8或12至19任意一项中的配合物生产药物的用途。