



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102036687 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200980117687. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 05. 15

A61K 47/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/127, 928 2008. 05. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/003035 2009. 05. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/139905 EN 2009. 11. 19

(71) 申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 M·J·博萨德 H·加普 S·李

L·A·R·费尔南多

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

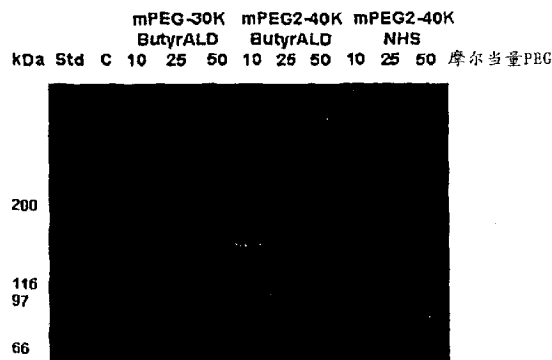
权利要求书 3 页 说明书 51 页 附图 1 页

(54) 发明名称

胆碱酯酶部分与聚合物的共轭物

(57) 摘要

在此提供了一个胆碱酯酶部分与一个或多个非肽水溶性聚合物的多种共轭物。典型地,该非肽水溶性聚合物是聚(乙二醇)或它的一种衍生物。除其他之外,在此还提供了包括这些共轭物的组合物、用于制造这些共轭物的方法、以及对患者给予这些组合物的方法。



1. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基,其中该胆碱酯酶部分的残基是通过在该胆碱酯酶部分残基内的半胱氨酸残基共价地附接到该水溶性聚合物上。

2. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该水溶性聚合物在共价地附接之前是一种带有马来酰亚胺基团的聚合物试剂。

3. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基,其中该水溶性聚合物是一种支链的水溶性聚合物。

4. 如权利要求 1、2、以及 3 的任一项所述的共轭物,其中该胆碱酯酶部分是乙酰胆碱酯酶。

5. 如权利要求 1、2、以及 3 的任一项所述的共轭物,其中该胆碱酯酶部分是丁酰胆碱酯酶。

6. 如权利要求 1、2、以及 3 的任一项所述的共轭物,其中该胆碱酯酶部分是重组制备的。

7. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、以及 7 的任一项所述的共轭物,其中该水溶性聚合物是一种选自下组的聚合物,该组的组成为:聚(氧化烯)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚噁唑啉、以及聚(丙烯酰吗啉)。

8. 如权利要求 7 所述的共轭物,其中该水溶性聚合物是一种聚(氧化烯)。

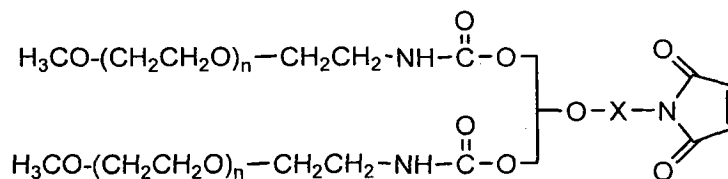
9. 如权利要求 8 所述的共轭物,其中该聚(氧化烯)是聚(乙二醇)。

10. 如权利要求 9 所述的共轭物,其中该聚(乙二醇)是用选自下组的一种封端部分封端的,该组的组成为:羟基、烷氧基、取代的烷氧基、链烯氧基、取代的链烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基以及取代的芳氧基。

11. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、以及 7 的任一项所述的共轭物,其中该水溶性聚合物聚(乙二醇)具有的重均分子量在从约 500 道尔顿到约 100,000 道尔顿的范围。

12. 如权利要求 1 所述的共轭物,其中在该胆碱酯酶部分内的半胱氨酸残基对应于丁酰胆碱酯酶的 Cys66。

13. 如权利要求 2 所述的共轭物,其中带有一个马来酰亚胺基团的该聚合物试剂具有以下结构:

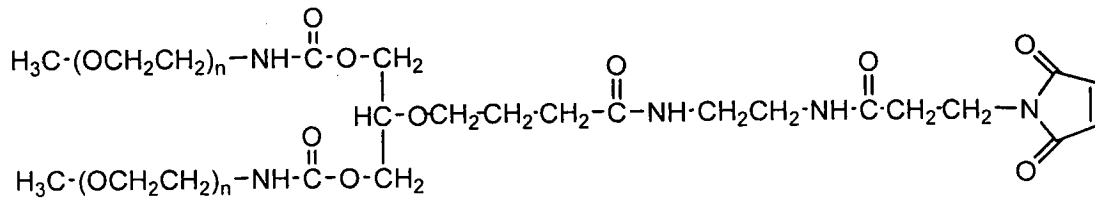


其中:

X 是一个间隔部分,该间隔部分包括一个或多个原子;并且

每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的一个整数。

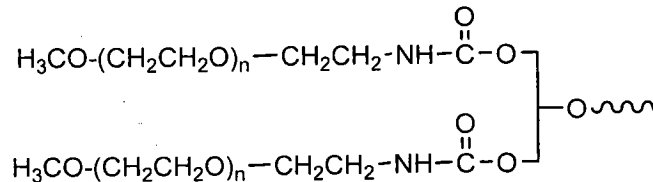
14. 如权利要求 13 所述的共轭物,其中带有一个马来酰亚胺基团的该聚合物试剂具有以下结构:



其中每个 (n) 独立地是具有从约 225 至 1930 的值的的一个整数。

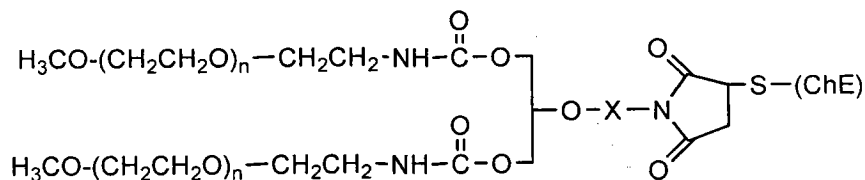
15. 如权利要求 14 所述的共轭物,其中每个 (n) 被限定为以便提供 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-$ 从而具有约 20kDa 的分子量。

16. 如权利要求 3 所述的共轭物,其中该支链的水溶性聚合物包括以下结构:



其中每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的的一个整数。

17. 如权利要求 1、2、或 3 的任一项所述的共轭物,具有以下结构:



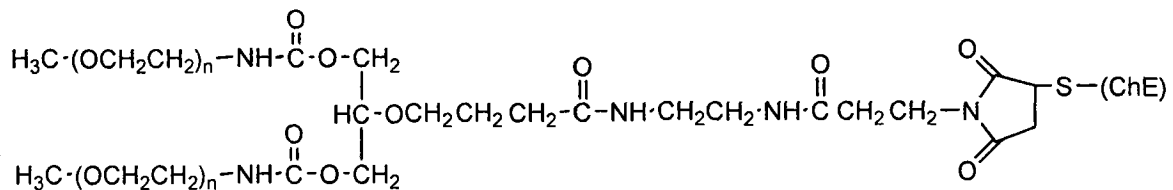
其中:

每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的的一个整数;

X 是一个间隔部分,该间隔部分包括一个或多个原子;并且

ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

18. 如权利要求 17 所述的共轭物,具有以下结构:



其中每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的的一个整数。

19. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、以及 7 的任一项所述的共轭物,其中该共轭物具有附接到该胆碱酯酶部分上的残基上的一个至两个水溶性聚合物。

20. 如权利要求 19 所述的共轭物,其中该共轭物具有附接到该胆碱酯酶部分上的残基上的两个水溶性聚合物。

21. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、以及 7 的任一项所述的共轭物,其中该胆碱酯酶部分的残基处于衍生自两个分离的胆碱酯酶部分的一种二聚体的形式。

22. 如权利要求 21 所述的共轭物,其中该共轭物具有附接到该胆碱酯酶部分上的残基上的两个水溶性聚合物,一个水溶性聚合物被附接到形成该二聚体的每一胆碱酯酶上。

23. 如权利要求 2 所述的共轭物,其中带有一个马来酰亚胺基团的该聚合物试剂具有

一个单一的马来酰亚胺基团。

24. 如权利要求 1、2、3、4、5、6、以及 7 的任一项所述的共轭物,其中该胆碱酯酶部分是糖基化的。

25. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基,其中该共轭物处于一种分离的并且单聚乙二醇化的形式。

26. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基,其中该水溶性聚合物在被共价地附接之前是带有一种马来酰亚胺基团的一种聚合物试剂。

27. 一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基,其中该胆碱酯酶部分是一种前体胆碱酯酶部分。

28. 一种药用组合物,该组合物包括如权利要求 1 至 27 的任一项所述的一种共轭物以及一种药学上可接受的赋形剂。

29. 一种用于制造共轭物的方法,该方法包括在共轭条件下使一种带有巯基反应性官能团的聚合物试剂与一个胆碱酯酶部分进行接触。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中该接触步骤是在大于 8.0 的 pH 下进行的。

31. 一种用于制造共轭物的方法,该方法包括:

(a) 在共轭条件下,将一种包括多个巯基选择性聚合物试剂分子的试剂组合物与包括多个胆碱酯酶部分的分子的一种胆碱酯酶部分组合物进行合并,以使处于二聚体形式的每个分子形成一种包括单共轭二聚体和双共轭二聚体的共轭物混合物;

(b) 使该共轭物混合物经受还原条件以形成一种还原的混合物,该还原的混合物包括还原的非共轭单体和还原的单共轭的单体;

(c) 将这些还原的单共轭单体从该还原的混合物分离以形成一种包括还原的单共轭单体的组合物;以及

(d) 从该包括还原的单共轭单体的组合物去除这些还原条件,由此形成一种双共轭二聚体的组合物。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其中包括还原的单共轭单体的组合物实质上不含还原的非共轭单体。

胆碱酯酶部分与聚合物的共轭物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 2008 年 5 月 16 日提交的美国临时申请序列号 61/127,928 的优先权的权益,其披露通过引用全文结合在此。

发明领域

[0003] 除其他之外,本发明的一个或多个实施方案总体上涉及包括一个胆碱酯酶部分(即具有至少一些类似于人胆碱酯酶的活性的一个部分)和一种聚合物的共轭物。另外,本发明(除其他之外)还涉及包括多种共轭物的组合物、用于合成共轭物的方法、以及给予一种组合物的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 人类神经系统通过专门的神经细胞的电信号传输来控制躯体的功能。然而就神经细胞之间的间隙(或在一种神经细胞和一种效应细胞之间)而言,信号的连续典型地是通过化学手段来实现的。通过神经间隙或“突触”的化学传递是通过一种被称为“神经递质”(可替代地被称为“神经介质”)的一种物质的释放来进行的。一旦释放,该神经递质通过扩散穿过突触并且通过结合至位于突触后细胞上的一种受体而激活(或抑制,取决于该系统)该突触后细胞。由此信号被传送到该突触后细胞,在该突触中的酶降解该神经递质以防止重复的信号转移到该突触后细胞。以这种方式,在神经系统内信号成功地进行传输。

[0006] 释放乙酰胆碱作为神经递质的神经细胞被称作胆碱能神经并且位于人类的周围神经系统和中枢神经系统二者中。乙酰胆碱参与了从专门的运动神经到骨骼肌以及大部分自主神经系统的信号传输,它控制(例如)与呼吸、循环、消化、出汗、以及代谢相关的平滑肌和腺体。在体内,乙酰胆碱被位于突触间隙的乙酰胆碱酯酶降解,并因此其效应受到控制。鉴于乙酰胆碱/乙酰胆碱酯酶系统在中枢神经系统中的普遍性,该系统的适当平衡和功能对于正常功能和健康是关键性的。

[0007] 乙酰胆碱/乙酰胆碱酯酶系统在中枢神经系统中的平衡可以通过暴露于一种乙酰胆碱酯酶抑制剂而被破坏,这会导致乙酰胆碱在突触间隙中的积聚。这种积聚进而导致连续的信号传播(典型地通过持久的去极化)并且伴随有效神经传输的破坏。如果允许这种破坏持续,可以引起许多有害的病况甚至死亡(如果严重的话)。

[0008] 邻异丙基甲基氟磷酸酯(O-Isopropylmethylphosphonofluoridate)(又称为“沙林”)及其他的在其类别中的有机磷酸酯是不可逆的胆碱酯酶抑制剂。这些有机磷酸酯通过共价结合到该酶中的一个丝氨酸残基(其形成乙酰胆碱正常地进行水解的位点)来抑制胆碱酯酶的活性。沙林是如此有力并且有效的胆碱酯酶类抑制剂,以致它已经被研制并且在军事领域中使用。其他的胆碱酯酶抑制剂已经在农业领域中被用作杀昆虫剂和灭害剂。

[0009] 暴露于胆碱酯酶抑制剂可以通过给予胆碱酯酶本身来进行补救。通过用胆碱酯酶有效地使该生物系统“饱和”,总的正常胆碱酯酶功能将实质上保持不受影响,因为即使一些胆碱酯酶活性通过该胆碱酯酶抑制剂而抑制,剩余胆碱酯酶活性的存在将使胆碱酯酶抑制剂暴露的效应最小化。对于意外暴露于有机磷酸酯以及在军事攻击(其中使用沙林或

类似的化学试剂)的防御中,这样一种途径将是有益的。一种重组形式的人丁酰胆碱酯酶(BChE)(一种天然发生的蛋白质)正在**PROTEXIA**[®]名下进行研发,它被用作神经毒剂攻击的战场伤亡或平民受害者的暴露前治疗和暴露后治疗。

[0010] 与过量给予具有胆碱酯酶活性的分子的相关的一个问题是这些基于蛋白的酶类本身在体内相对迅速地降解。将一种聚乙二醇衍生物附接至一种蛋白或聚乙二醇化作为一种延长蛋白质的体内半衰期的手段已经得到说明,由此产生延长的药理学活性。例如,美国专利申请号 2004/0147002 说明了化学改性的胆碱酯酶用于有机磷化合物的解毒的用途。

[0011] 尽管有这些共轭物,然而对于其他的胆碱酯酶共轭物仍保持着一种需要。因此,除其他之外,本发明的一个或多个实施方案是针对这类共轭物、连同包括这些共轭物的组合物以及如在此所说明的相关的方法,它们据信是新的并且完全未被本领域建议过。

[0012] 发明概述

[0013] 相应地,在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,它包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0014] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,它包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该胆碱酯酶部分的残基是通过在该胆碱酯酶部分的残基内的半胱氨酸残基而共价地附接到该水溶性聚合物上。

[0015] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,它包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该水溶性聚合物在共价附接前是一种带有马来酰亚胺基团的聚合物试剂。

[0016] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,它包括共价地附接(直接或通过一种由一个或多个原子组成的间隔部分)到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该胆碱酯酶部分是通过一种二硫键附接到该水溶性聚合物或间隔部分上。

[0017] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,它包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该胆碱酯酶部分是一种前体胆碱酯酶部分。

[0018] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种共轭物,包括共价地附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分的残基,其中该胆碱酯酶部分是一种成熟胆碱酯酶部分。

[0019] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种用于递送共轭物的方法,该方法包括对患者皮下给予一种组合物的步骤,该组合物包含一种胆碱酯酶的残基与一种水溶性聚合物的共轭物。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图 1 说明了根据实例 4、5、以及 6 制备的 rBChE 的共轭物溶液(更充分地说明于每一个这些实例中)的 SDS-PAGE 分析。C 标记的泳道是 rBChE 蛋白对照(未被聚乙二醇化)。用不同的活化 PEG 试剂将 rBChE 聚乙二醇化(如在泳道上指出的)。使用所说明的方法测试了三个摩尔当量浓度(10、25、50)的 PEG。对于每一试剂,PEG 试剂的 10 摩尔当量导致低至中等水平的聚乙二醇化,PEG 试剂的 25 摩尔当量导致中等至高水平的聚乙二醇化,并且 PEG 试剂的 50 摩尔当量导致非常高水平的聚乙二醇化。

[0022] 发明详细说明

[0023] 在详细地对本发明的一个或多个实施方案进行说明之前,应当理解本发明不局限于这些具体的聚合物、合成技术、胆碱酯酶部分、等等,因为这些都是可以变化。

[0024] 必须指出,如在本说明书和所提出的权利要求中所使用的,除非上下文另外明确指出,单数形式“一个”、“一种”、以及“该”包括复数的指代。因此,例如提及的“一种聚合物”包括了一种单一聚合物连同两种或更多种相同或不同的聚合物,提及的“一种任选的赋形剂”是指一种单一任选的赋形剂连同两种或更多种相同或不同的任选的赋形剂、等等。

[0025] 在对本发明的一个或多个实施方案进行说明和提出权利要求时,将根据以下所说明的定义来使用下列术语。

[0026] 如在此使用的,“PEG”、“聚乙二醇”以及“聚(乙二醇)”是可互换的并且包括任何的非肽的水溶性聚(氧化乙烯)。典型地,根据本发明的使用的 PEG 包括以下结构“ $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ”,其中(n)是2至4000。如在此使用的,PEG还包括“ $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ”和“ $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ”,取决于(例如在合成转化过程中)是否置换了末端氧。贯穿本说明书和权利要求,应当记住术语“PEG”包括具有不同末端或“封端”基团等的结构。术语“PEG”还表示一种聚合物,该聚合物包含大部分也就是大于50%的 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ 重复亚单位。关于具体形式,该PEG可以采取任何数量的多种分子量,连同结构或几何形状,如“支链的”、“直链的”、“分叉的”、“多功能的”等等,以下将非常详细地说明。

[0027] 如在此使用的,“封端的”以及“末端加帽的”可以互换使用来指具有封端部分的一种聚合物的末端或端点。典型地,尽管不是必须的,该封端部分包括一个羟基或 C_{1-20} 烷氧基,更优选一个 C_{1-10} 烷氧基,并且仍然更优选一个 C_{1-5} 烷氧基。因此,封端部分的例子包括:烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基以及苄氧基),连同芳基、杂芳基、环、杂环等等。必须记住,在聚合物中该封端部分可以包括一个或多个末端单体的原子[例如在 $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 和 $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 中的封端部分“甲氧基”]。另外,可以设想以上每个物质的饱和、不饱和、取代以及未取代的形式。此外,该封端基团还可以是一种硅烷。该封端基团还可以有利地包括一个可检出的标记物。当该聚合物具有包括一个可检出标记物的封端基团时,该聚合物所偶联的聚合物和/或部分(例如活性剂)的量或位置可以使用合适的检测器来确定。此类标记物包括,但不限于荧光增光剂、化学发光剂、在酶标记中使用的部分、比色标记物(例如染料)、金属离子、放射性部分等等。合适的检测器包括光度计、薄膜、分光计等等。该封端基团还可以有利地包括一种磷脂。当该聚合物具有一个包括磷脂的封端基团时,该聚合物以及生成的共轭物被赋予了独特的性质。示例性的磷脂包括但不限于选自称为磷脂酰胆碱的磷脂类别的那些。具体的磷脂包括但不限于选自下组的那些,该组的组成为:二月桂酰磷脂酰胆碱、二油烯基磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、山嵛酰基磷脂酰胆碱、花生酰基磷脂酰胆碱以及卵磷脂。

[0028] 就一种聚合物而言,“非天然发生的”表示一种聚合物尚未在自然界中以其整体被发现。然而,一种非天然发生的聚合物可以含有天然发生的一个或多个单体或单体的区段,只要整体的聚合物结构未在自然界中发现。

[0029] 正如在一种“水溶性聚合物”中的术语“水溶性的”,聚合物是在室温下在水中可溶的任何聚合物。典型地,一种水溶性聚合物在过滤后该同一溶液将传送至少约75%更优选至少约95%的光。在重量基础上,一种水溶性聚合物将优选为至少约35%(按重量计)可

溶于水、更优选至少约 50%（按重量计）可溶于水、仍然更优选约 70%（按重量计）可溶于水、以及仍然更优选约 85%（按重量计）可溶于水。然而最优选的是，水溶性聚合物在水中是约 95%（按重量计）可溶于水或在水中是完全可溶的。

[0030] 在水溶性聚合物（如 PEG）的情况下的分子量，可以被表示为一种数均分子量或一种重均分子量。除非另外指出，在此所有引用的分子量是指重均分子量。数均和重均分子量二者的确定可以使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术来测量。还可以使用其他的用于分子量值的测量的方法，如使用末端基团分析或依数性（例如冰点降低、沸点升高、或渗透压）的测量以确定数均分子量；或使用光散射技术、超速离心法、粘度测定法以确定重均分子量。本发明的聚合物典型地是多分散的（即该聚合物的数均分子量和重均分子量是不相等的），具有低的多分散性值（优选小于约 1.2、更优选小于约 1.15、仍然更优选小于约 1.10、仍然更优选小于约 1.05、并且最优选小于约 1.03）。

[0031] 当与一个具体的官能团联合使用时，术语“活性的”、“反应性的”或“活化的”是指一个反应性的官能团，该反应性的官能团容易地与一个亲电体或在另一个分子上的一个亲核体进行反应。这与反应要求强催化剂或高度不现实的反应条件的那些基团相反（即，“不反应的”或“惰性的”基团）。

[0032] 如在此使用的，术语“官能团”或其任何同义词旨在包括其受保护的形式以及未保护的形式。

[0033] 在此使用的术语“间隔部分”、“连接”、以及“连接物”是指一种键或一种原子或任选的用于连接互连部分（如一种聚合物区段的末端和一个胆碱酯酶部分、或一个胆碱酯酶部分的一种亲电体或亲核试剂）的原子的集合。该间隔部分可以是水解稳定的或可以包括一个生理学可水解的或酶可降解的连接。除非本文另外清楚地指出，一种间隔部分可任选地存在于一种化合物（例如所提供的共轭物，包括胆碱酯酶部分的残基以及可以直接或间接通过一种间隔部分附接的水溶性聚合物）的任何两个成分之间。

[0034] “烷基”是指一个烃链，典型地长度范围从大约 1 至 15 个原子。此类烃链优选是（但并非必须）饱和的并且可以是支链的或直链的，尽管典型地直链是优选的。示例性的烷基基团包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、3-甲基戊基等等。如在此使用的，“烷基”包括环烷基连同含有烷基的亚环烷基。

[0035] “低级烷基”是指含有从 1 至 6 个碳原子的烷基基团，并且可以是直链或支链的，如例证如下：甲基、乙基、正丁基、异丁基、以及叔丁基。

[0036] “环烷基”是指一个饱和的或不饱和的环烃链、包括桥接、稠合、或螺旋的环状化合物，优选地由 3 至大约 12 个碳原子（更优选 3 至大约 8 个碳原子）组成。“亚环烷基”是指一种插进一种烷基链的环烷基基团（通过在该环系中的任何两个碳与该链的结合）。

[0037] “烷氧基”是指一个 -OR 基团，其中 R 是烷基或取代的烷基，优选 C₁-C₆ 烷基（例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等）。

[0038] 作为在例如“取代的烷基”中的术语“取代的”是指用一个或多个非干扰性取代基取代的一个部分（例如一个烷基基团），这些取代基如是（但不限于）：烷基、C₃-C₈ 环烷基（例如环丙基、环丁基等等）；卤素例如氟、氯、溴、以及碘；氰基；烷氧基、低级苯基；取代的苯基；等等。“取代的芳基”是具有一个或多个非干扰性基团作为取代基的芳基。对于在一个苯基环上的取代，这些取代基可以是处于任何的方位（即邻位、间位、或对位）。

[0039] “非干扰性取代基”是那些基团,当这些基团在存在于一个分子中时,典型地是与包含在该分子之内的其他的官能团不反应的。

[0040] “芳基”表示一个或多个芳族环,各自有 5 或 6 个核心碳原子。芳基包括多种芳基环,这些芳基环可以是稠合的(如在萘基中)或未稠合的(如在联苯基中)。芳基环还可以用一个或多个环烃、杂芳基、或杂环来稠合或未稠合。如在本文中使用的“芳基”包括杂芳基。

[0041] “杂芳基”是一种含有从一个至四个杂原子(优选硫、氧、或氮、或它们的一种组合)的芳基基团。杂芳基环还可以用一个或多个环烃、杂环、芳基、或杂芳基环稠合。

[0042] “杂环”或“杂环的”表示 5 至 12 个原子(优选 5 至 7 个原子)的一个或多个环,它具有或不具有不饱和或芳香性并且具有至少一个非碳的环原子。优选的杂原子包括硫、氧、以及氮。

[0043] “取代的杂芳基”是具有一个或多个非干扰性基团作为取代基的杂芳基。

[0044] “取代的杂环”是具有从非干扰性取代基形成的一个或多个侧链的一种杂环。

[0045] 如在此使用的一种“有机基团”将包括烷基、取代的烷基、芳基、以及取代的芳基。

[0046] “亲电体”和“亲电子基团”是指一种离子或原子或原子的集合,它们可以是离子的,具有一个亲电子中心,即一个寻求电子的或能够与一个亲核体反应的中心。

[0047] “亲核体”和“亲核基团”是指一种离子或原子或原子的集合,这些亲核体可以是离子的,具有一个亲核中心,即寻求一个亲电子中心或具有一种亲电体的中心。

[0048] 一种“生理学上可裂开的”或“可水解的”或“可降解的”键是与水在生理条件下进行反应(即水解)的一种键。一种键在水中水解的趋势将不仅取决于连接两个中心原子的连接的总体类型,而且还取决于附接在这些中心原子上的取代基。适当的水解不稳定或弱水解的连接包括但不限于:羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、以及寡聚核苷酸。

[0049] 一种“酶可降解的连接”表示经历一种或多种酶降解的一个连接。

[0050] 一种“水解稳定的”连接或键是指在水中实质上稳定的一种化学键,典型地是一种共价键,也就是说,经一个延长的时间段在生理条件下不会经历任何可观程度的水解。水解稳定的连接的实例包括但不限于以下各项:碳-碳键(例如在一个脂肪链中)、醚类、酰胺类、氨基甲酸酯类等。总体上,一种水解稳定的连接是在生理条件下显示出每天小于大约 1% 至 2% 的水解率的一种连接。代表性的化学键的水解率可以在最标准的化学教科书中发现。

[0051] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可以在本发明的组合物中可任选地包括而不会引起对患者的显著有害的毒性作用的一种赋形剂。“药理学上有效的量”、“生理学上有效的量”以及“治疗上有效的量”在此互换地使用,表示需要的一种聚合物-(胆碱酯酶部分)共轭物的量,以在血流或在靶组织中提供一个该共轭物(或对应于非共轭的胆碱酯酶部分)的所希望的水平。精确的量将取决于多个因素,例如具体的胆碱酯酶部分、该治疗组合物的成分以及特征、预期的患者群、患者的个体因素等,并且可以容易地由本领域的普通技术人员基于在此提供的信息来确定。

[0052] “多功能的”表示一种聚合物,该聚合物具有三个或更多个官能团包含在其中,其中这些官能团可以是相同的或不同的。本发明的多功能聚合物试剂将会典型地包含从大约

3-100 个官能团、或从 3-50 个官能团、或从 3-25 个官能团、或从 3-15 个官能团、或从 3 至 10 个官能团、或将在该聚合物主链内包含 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个官能团。

[0053] 如在此所使用的,术语“胆碱酯酶部分”是指具有人胆碱酯酶活性的一个部分。该胆碱酯酶部分还将具有至少一个适合与一种聚合物试剂反应的亲电子基团或亲核基团。此外,术语“胆碱酯酶部分”包括在共轭之前的胆碱酯酶部分连同继共轭之后的胆碱酯酶部分残基二者。如将在以下进一步详细说明,在本领域中的一个普通技术人员可以确定任何给定的部分是否具有胆碱酯酶活性。包括对应于 SEQ ID NO :1 至 2 任一项的一种氨基酸序列的蛋白质是一种胆碱酯酶部分,连同与其实质上同源的任何蛋白质或多肽,可以作为一种胆碱酯酶抑制剂的底物。如在此使用的术语“胆碱酯酶部分”包括专门修饰的这类蛋白,例如通过位点定向诱变或偶然突变。这些术语还包括具有从 1 至 6 个额外的糖基化位点的类似物、在该蛋白的羧基末端具有至少一个额外的氨基酸的类似物(其中这种或这些额外的氨基酸包括至少一个糖基化位点)、以及具有一个氨基酸序列(该氨基酸序列包括至少一个糖基化位点)的类似物。该术语包括天然的和重组产生的部分二者。

[0054] 术语“实质上同源的”表示一种具体的目标序列,例如从一种参比序列通过一种或多种取代、缺失、或添加而变化的一种突变体序列,其净效应不会导致在该参比序列与对象序列之间的不利的功能性差异。为了本发明的目的,具有大于 95 百分比的同源性、等效的生物学性质、以及等效的表达特征的序列被认为是实质上同源的。为了确定同源性,应当忽视该成熟序列的平截。具有低一些程度的同一性、可比生物活性、以及等效的表达特征的序列被认为是实质性的等效物。用于在此使用的示例性的胆碱酯酶部分包括那些与 SEQ ID NO :1 实质上同源的序列。

[0055] 该术语“片段”表示具有一个胆碱酯酶部分的一个部分或片段的氨基酸序列的任何蛋白质或多肽,并且它具有 β 胆碱酯酶的生物活性。这些片段包括通过胆碱酯酶部分的蛋白分解性降解而产生的蛋白质或多肽连同由在本领域中的常规方法通过化学合成而产生的蛋白质或多肽。典型地,通过例如使用基于培养细胞系或组织培养的方法的酶活性或抑制活性来测量酶活性。

[0056] 术语“患者”是指一个患有有一种可以通过给予一种活性剂(例如共轭物)来防止或治疗的病症或有该病症的倾向的一个活的生物体,并且包括人和动物两者。

[0057] “任选的”或“任选地”表示随后所说明的情况可能发生或可能不发生,这样使得该说明包括其中该情况发生时的例子和其中该情况不发生的例子。

[0058] “实质上”意思指接近总的或完全的,例如满足以下一项或多项:大于 50%、51%或更高、75%或更高、80%或更高、90%或更高、以及 95%或更高的情况。

[0059] 将在肽中的氨基酸残基缩写如下:苯丙氨酸是 Phe 或 F;亮氨酸是 Leu 或 L;异亮氨酸是 Ile 或 I;甲硫氨酸是 Met 或 M;缬氨酸是 Val 或 V;丝氨酸是 Ser 或 S;脯氨酸是 Pro 或 P;苏氨酸是 Thr 或 T;丙氨酸是 Ala 或 A;酪氨酸是 Tyr 或 Y;组氨酸是 His 或 H;谷氨酰胺是 Gln 或 Q;天冬酰胺是 Asn 或 N;赖氨酸是 Lys 或 K;天冬氨酸是 Asp 或 D;谷氨酸是 Glu 或 E;半胱氨酸是 Cys 或 C;色氨酸是 Trp 或 W;精氨酸是 Arg 或 R;并且甘氨酸是 Gly 或 G。

[0060] 转向于本发明的一个或多个实施方案,在此提供了一种共轭物,包括共价地附接到(直接或通过一种间隔部分)一种水溶性聚合物的一个胆碱酯酶部分的残基。本发明的这些共轭物将具有一种或多种以下特征。

[0061] 胆碱酯酶部分

[0062] 如先前所陈述,该共轭物总体上包括共价地附接到(直接或通过一种间隔部分)一种水溶性聚合物的胆碱酯酶部分的一个残基。如在此所使用的,术语“胆碱酯酶部分”应当是指在共轭之前的胆碱酯酶部分连同继附接到一种非肽水溶性聚合物上之后的胆碱酯酶部分。然而可以理解的是,当将该最初的胆碱酯酶部分附接到一种非肽水溶性聚合物上时,该胆碱酯酶部分由于与对于该聚合物的连接相关的一个或多个共价键的存在而轻微地改变。通常地,附接在另一个分子上的该胆碱酯酶部分的这种轻微改变的形式被称为该胆碱酯酶部分的一个残基。

[0063] 该胆碱酯酶部分可以衍生自非重组方法和衍生自重组方法,并且在这点上本发明不受限制。此外,该胆碱酯酶部分可以来自于人源、动物源、以及植物源。

[0064] 可以非重组地衍生出该胆碱酯酶部分。例如,可能从生物系统分离丁酰胆碱酯酶。例如像在美国专利号 5,272,080 中所解释的,可以通过单独将血浆成分 IV-4 或与成分 IV-1 的混合物经阴离子交换色谱法与亲和色谱法二者生产出具有至少 90% 纯度的丁酰胆碱酯酶。

[0065] 该胆碱酯酶部分可以衍生于重组方法。例如,美国专利号 5,248,604 和 5,595,903 说明了基于重组的用于生产有酶活性的人胆碱酯酶的方法。通过这些参考文件中说明的方法而获得的胆碱酯酶部分可以作为用于制备在此所说明的这些共轭物的胆碱酯酶部分。

[0066] 该胆碱酯酶部分可以在细菌[如大肠杆菌,参见例如 Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21(3):295-311]、哺乳动物[参见例如 Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304]、酵母[例如巴斯德毕赤酵母,参见例如 Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1):121-129]、以及植物[参见例如 Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] 表达系统中表达。该表达可以通过外源性表达(当宿主细胞天然含有所希望的遗传密码时)或通过内源性表达而发生。已经说明了丁酰胆碱酯酶在转基因哺乳动物中的生产。例如参见美国专利申请公开号 2004/0016005。

[0067] 虽然基于重组的用于制备蛋白质的方法可以不同,这些重组方法典型地包括构建编码所希望的多肽或片段的核酸、将该核酸克隆进入一种表达载体、转化一种宿主细胞(例如植物、细菌、酵母、转基因动物细胞、或哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞或幼仓鼠肾细胞)、以及表达该核酸以产生所希望的多肽或片段。对于那些本领域中的普通技术人员而言,在体外以及在原核和真核宿主细胞中生产和表达重组多肽的方法是已知的。

[0068] 为了协助重组多肽的鉴定和纯化,可以将编码一种表位标签或其他亲合结合序列的核酸序列插入或添加入具有该编码序列的框内,由此产生一种由所希望的多肽与适于结合的多肽组成的融合蛋白。可以通过以下步骤对融合蛋白进行鉴定和纯化:首先使含有该融合蛋白的混合物穿过一种亲和柱[带有直接针对在该融合蛋白中的表位标签或其他结合序列的结合部分(如抗体)],由此将融合蛋白结合在柱内。其后,可以通过用适当的溶液(例如酸)洗涤该柱以释放所结合的融合蛋白以回收这种融合蛋白。还可以通过以下步骤鉴定和纯化该重组多肽:溶解宿主细胞,分离(例如通过尺寸排阻色谱法)该多肽,并且收集该多肽。鉴定和纯化重组多肽的这些及其他方法对于本领域中的那些普通技术人员而言是已知的。然而在本发明的一个或多个实施方案中,优选的是该胆碱酯酶部分不是处于一种融合蛋白的形式。

[0069] 取决于用于表达具有胆碱酯酶活性的蛋白质的系统,该胆碱酯酶部分可以是未糖基化的或糖基化的,并且可以使用二者。亦即该胆碱酯酶部分可以是未糖基化的或该胆碱酯酶部分可以是糖基化的。在本发明的一个或多个实施方案中,优选的是该胆碱酯酶部分是糖基化的(优选在4个糖基化位点)。例如,还优选的是使寡聚糖链在各糖基化位点以甘露糖封端。

[0070] 为了聚合物容易附接到在氨基酸侧链内的原子,可以有利地修饰胆碱酯酶部分以包括和/或取代一个或多个氨基酸残基,例如赖氨酸、半胱氨酸和/或精氨酸。胆碱酯酶部分的取代的一个实例被说明于Fischer等人的(1995)(1995)Biotechnol. Appl. Biochem. 21(3):295-311。另外,可以修饰胆碱酯酶部分以包括一种非天然发生的氨基酸残基。用于添加氨基酸残基以及非天然发生的氨基酸残基的技术对于那些在本领域中的普通技术人员而言是熟知的。参见J. March, Advanced organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)。

[0071] 另外,可以有利地修饰胆碱酯酶部分以包括一种官能团的附接(通过添加含有氨基酸残基的官能团除外)。例如,可以修饰该胆碱酯酶部分以包括一种巯基。另外,可以修饰该胆碱酯酶部分以包括一个N端 α 碳。另外,可以修饰该胆碱酯酶部分以包括一个或多个碳水化合物部分。在本发明的一些实施方案中,优选的是该胆碱酯酶部分不被修饰为包括一种巯基和/或一个N端 α 碳。

[0072] 在文献中说明了示例性的胆碱酯酶部分,例如美国专利申请公开号2002/0119489、2006/0263345、以及2008/0213281。优选的胆碱酯酶部分包括那些具有包括选自下组的序列的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:1至2,以及与以上序列基本同源的序列。一种优选的胆碱酯酶部分具有与人乙酰胆碱酯酶对应的氨基酸序列。另一种优选的胆碱酯酶具有与人丁酰胆碱酯酶对应的氨基酸序列,例如在**PROTEXIA**[®]名称(PharmAthene Inc., Annapolis, MD)下研制的人丁酰胆碱酯酶的重组形式。公认的是乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶两者都以多种分子形式存在,这些分子形式由不同数量的催化亚单位和非催化亚单位组成。然而在人体中,这二种酶都由约600个氨基酸的亚单位组成,并且两者都被糖基化。乙酰胆碱酯酶可以通过它的对乙酰胆碱底物的高特异性以及对选择性抑制剂的敏感性而与密切相关的丁酰胆碱酯酶相区别。虽然乙酰胆碱酯酶主要用于在体内水解乙酰胆碱,丁酰胆碱酯酶的具体功能尚不清楚。无论如何,术语“乙酰胆碱酯酶”和“丁酰胆碱酯酶”包括每一酶内的所有分子形式。在一些实例中,胆碱酯酶部分将处于一种“单体”形式,其中相应肽的一个单一表达组织成一种离散单元。在其他的实例中,胆碱酯酶部分将处于一种“二聚体”的形式(例如重组人丁酰胆碱酯酶的一种二聚体),其中该蛋白的两个单体形式是彼此相关的(例如通过二硫键)。例如,在重组人丁酰胆碱酯酶的一种二聚体的情形中,该二聚体可以是由每一单体的571位Cys残基形成的二硫键而处于两个彼此相关的单体的形式。

[0073] 另外,可以使用具有胆碱酯酶活性的一种蛋白的前体形式。

[0074] 上述序列的任何截短形式、杂交变体、以及肽模拟物也可以用作胆碱酯酶部分。上述任何维持至少一定程度的胆碱酯酶活性的生物学活性片段、缺失变体、取代变体或添加变体也可以用作胆碱酯酶部分。

[0075] 对于任何给定的肽或蛋白部分,可能会确定该部分是否具有胆碱酯酶活性。本

领域中体外测定胆碱酯酶活性的各种方法的说明参见例如 Lockridge et al. (1978) J. Biol. Chem. 253:361-366, Lockridge et al. (1997) Biochemistry 36:786-795, Plattborze et al. (2000) Biotechnol. Appl. Biochem. 31:226-229, and Blong et al. (1997) Biochem. J. 327:747-757。可以通过使用 Ellman 的活性测定法 [Ellman et al. (1961) Biochem. Pharmacol. 7:88] 测定样品的酶活性的胆碱酯酶活性的存在。胆碱酯酶活性的水平可以通过用 2mM 依可碘酯作为底物的非变性 4% -30% 聚丙烯酰胺梯度凝胶进行估计 (如在前的 Lockridge 等人中的说明), 其中这种方法是对使用 2mM 丁酰硫代胆碱作为底物 [来自 Karnovsky et al. (1964) J. Histochem. Cytochem. 12:219] 的同样测定的一种改进。使用这些方法, 所感兴趣的部分的催化性质 (包括 K_m 、 V_{max} 、以及 k_{cat} 值) 可以使用丁酰硫代胆碱或乙酰硫代胆碱作为底物而确定。在本领域中已知的其他方法, 包括量电法、分光光度法、色谱法、以及辐射测量方法, 也可以用于评估胆碱酯酶功能。

[0076] 水溶性聚合物

[0077] 如以前的论述, 每一共轭物包括附接到一种水溶性聚合物上的一个胆碱酯酶部分。关于该水溶性聚合物, 该水溶性聚合物是非肽的、无毒的、非天然发生的、并且是生物相容的。关于生物相容性, 如果与活组织有关 (如对患者给药) 的与一种物质的单独使用或与另一种物质 (例如一种活化剂, 如一种胆碱酯酶部分) 一起使用相关的有益作用超过由临床医生 (例如医师) 评估的任何有害作用, 则认为该物质是生物相容的。关于非免疫原性, 如果一种物质在体内的有意使用不产生一种不希望的免疫应答 (如抗体的形成), 或者如果产生一种免疫应答, 这种应答通过临床医生的评估不被认为是临床上显著或重要的, 则认为该物质是非免疫原性的。特别优选的是该非肽水溶性聚合物是生物相容的并且是非免疫原性的。

[0078] 此外, 该聚合物的典型特征是具有从 2 至大约 300 个末端。这类聚合物的实例包括但不限于: 聚 (亚烷基乙二醇), 比如聚乙二醇 (“PEG”)、聚 (丙二醇) (“PPG”)、乙二醇与丙二醇等的共聚物、聚 (氧乙烯醇)、聚 (烯醇)、聚 (乙烯基吡咯烷酮)、聚 (羟烷基甲基丙烯酸酰胺)、聚 (甲基丙烯酸羟烷酯)、聚 (糖类)、聚 (α -羟酸)、聚 (乙醇醇)、聚磷酸、聚噁唑啉 (“POZ”) (说明于 WO 2008/106186 中)、聚 (N-丙烯酰吗啉), 以及任何上述的组合。

[0079] 该水溶性聚合物不局限于一种具体的结构, 并且可以是直链的 (例如一种末端加帽的例如烷氧基 PEG 或双功能 PEG)、支链的或多臂的 (例如叉状 PEG 或附接到一种多元醇芯的 PEG)、一种树枝状的 (或星形的) 结构, 各具有或没有一个或多个可降解的连接。此外, 该水溶性聚合物的内部结构可以是以任意数量的重复模式组织的, 并且可以选自下组, 其组成为: 均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚物、无规三聚物、以及嵌段三聚物。

[0080] 典型地, 活化的 PEG 及其他活化的水溶性聚合物 (即聚合物试剂) 是用一种适当的适合于结合到胆碱酯酶部分上的一个希望的位点的活化基团而活化的。因此, 聚合物试剂将具有一种用于与该胆碱酯酶部分反应的反应基团。用于将这些聚合物结合到活性部分的代表性聚合物试剂以及方法在本领域中是已知的, 并且进一步说明于 Zalipsky, S., 等人的 “Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides” in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical

Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York(1992), 以及 Zalipsky(1995) Advanced Drug Reviews¹⁶:157-182。适合于结合至一个胆碱酯酶部分的示例性的活化基团除其他之外包括:羟基、马来酰亚胺、酯、乙缩醛、缩酮、胺、羧基、醛、醛水合物、酮、烯基酮、硫酮、巯基、乙烯砜、肼。

[0081] 典型地,在共轭物中的水溶性聚合物的重均分子量是从大约 100 道尔顿至大约 150,000 道尔顿。然而重均分子量的示例性的范围包括在从大于 5,000 道尔顿到约 100,000 道尔顿的范围、在从约 6,000 道尔顿到约 90,000 道尔顿的范围、在从约 10,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿的范围、在从约 20,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿的范围、在从约 53,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿的范围、在从约 25,000 道尔顿到约 120,000 道尔顿的范围、在从约 29,000 道尔顿到约 120,000 道尔顿的范围、在从约 35,000 道尔顿到约 120,000 道尔顿的范围、以及在从约 40,000 道尔顿到约 120,000 道尔顿的范围。对于任何给定的水溶性聚合物,具有在一个或多个这些范围的分子量的 PEG 是优选的。

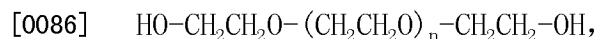
[0082] 水溶性聚合物的示例性的重均分子量包括约 100 道尔顿、约 200 道尔顿、约 300 道尔顿、约 400 道尔顿、约 500 道尔顿、约 600 道尔顿、约 700 道尔顿、约 750 道尔顿、约 800 道尔顿、约 900 道尔顿、约 1,000 道尔顿、约 1,500 道尔顿、约 2,000 道尔顿、约 2,200 道尔顿、约 2,500 道尔顿、约 3,000 道尔顿、约 4,000 道尔顿、约 4,400 道尔顿、约 4,500 道尔顿、约 5,000 道尔顿、约 5,500 道尔顿、约 6,000 道尔顿、约 7,000 道尔顿、约 7,500 道尔顿、约 8,000 道尔顿、约 9,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿、约 11,000 道尔顿、约 12,000 道尔顿、约 13,000 道尔顿、约 14,000 道尔顿、约 15,000 道尔顿、约 20,000 道尔顿、约 22,500 道尔顿、约 25,000 道尔顿、约 30,000 道尔顿、约 35,000 道尔顿、约 40,000 道尔顿、约 45,000 道尔顿、约 50,000 道尔顿、约 55,000 道尔顿、约 60,000 道尔顿、约 65,000 道尔顿、约 70,000 道尔顿、以及约 75,000 道尔顿。也可以使用具有任何上述的总分子量的水溶性聚合物的支链形式(例如由两个 20,000 道尔顿聚合物组成的一种支链的 40,000 道尔顿的水溶性聚合物)。在一个或多个实施方案中,该共轭物将不具有直接或间接与一种具有小于约 6,000 道尔顿重均分子量的一种 PEG 附接的任何 PEG 部分。

[0083] 在用作该聚合物时,PEG 将典型地包括多种 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ 单体 [或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ 单体,取决于该 PEG 是如何定义的]。如本说明自始至终使用的,重复单元的数量是通过在“ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ”中的下标“n”识别的。因此典型地,(n) 的值落在一个或多个以下范围内:从 2 到约 3400、从 100 到约 2300、从 100 到约 2270、从 136 到约 2050、从 225 到约 1930、从 450 到约 1930、从 1200 到约 1930、从 568 到约 2727、从 660 到约 2730、从 795 到约 2730、从 795 到约 2730、从 909 到约 2730、以及从 1,200 到约 1,900。对于任何给定的其分子量是已知的聚合物,可能通过该聚合物的总的重均分子量除以该重复单元的分子量而确定重复单元(即“n”)的数量。

[0084] 用于本发明中的一种特别优选的聚合物是一种封端的聚合物,即具有至少一个用相对惰性的基团封端的末端的一种聚合物,如一种低级 C_{1-6} 烷氧基,虽然也可以使用一个羟基基团。例如当该聚合物是 PEG 时,优选使用一种甲氧基 PEG(通常称为 mPEG),它是一种线性型的 PEG,其中该聚合物的一个末端是一种甲氧基 $(-\text{OCH}_3)$ 基团,而另一个末端是一个羟基或可以任选地化学修饰的其他官能团。

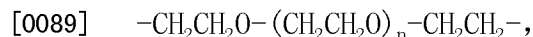
[0085] 在本发明的一个或多个实施方案中有用的一个形式中,游离的或未结合的 PEG 是

一种在每一末端用羟基终止的线性聚合物：



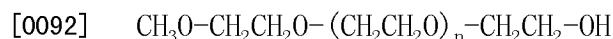
[0087] 其中典型地 (n) 的范围是从零至大约 4,000。

[0088] 上述聚合物, α -、 Ω -二羟基聚(乙二醇), 可以表示为 HO-PEG-OH 的简要形式, 其中应当理解的是该 -PEG- 符号可以代表以下结构单位：



[0090] 其中 (n) 是如以上定义的。

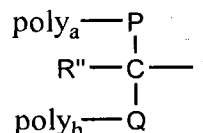
[0091] 在本发明的一个或多个实施方案中有用的 PEG 的另一个类型是甲氧基 -PEG-OH 或简要的 mPEG, 其中一个末端是相对惰性的甲氧基, 而另一个末端是一个羟基基团。给出 mPEG 的结构如下：



[0093] 其中 (n) 是如以上定义的。

[0094] 多臂或支链的 PEG 分子, 如在美国专利号 5,932,462 中所说明, 也可以用作 PEG 聚合物。例如, PEG 可以具有以下结构：

[0095]



[0096] 其中：

[0097] poly_a 和 poly_b 是 PEG 主链 (相同或不同), 如甲氧基聚(乙二醇)；

[0098] R'' 是一种不反应的部分, 如 H、甲基或一种 PEG 主链；并且

[0099] P 和 Q 是不反应的连接。在一个优选的方案中, 该支链的 PEG 聚合物是甲氧基聚(乙二醇)双取代的赖氨酸。取决于使用的特异性胆碱酯酶部分, 可以进一步修饰该双取代的赖氨酸的反应性酯官能团以形成一种适合于在该胆碱酯酶部分内与靶基团反应的官能团。

[0100] 另外, 该 PEG 可以包括一种叉状 PEG。一种叉状 PEG 的一个实例由以下结构表示：

[0101]

Z

[0102]

/

PEG-X-CH

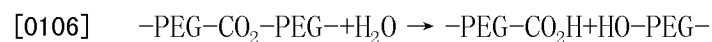
\

Z

[0103] 其中 :X 是一个或多个原子的一种间隔部分, 并且每一个 Z 是由定义长度的原子链连接至 CH 的一种活化的末端基团。国际专利申请公开文件 W0 99/45964 披露了能够在本发明的一个或多个实施方案中使用的不同的叉状 PEG 结构。将该 Z 官能团连接到支链碳原子的原子链作为一种限制基团, 并且可以包括例如：烷基链、醚链、酯链、酰胺链、以及它们的组合。

[0104] 该 PEG 聚合物可以包括具有反应基团（如羧基）的一种悬垂 PEG 分子，其沿着该 PEG 的长度而不是在该 PEG 的末尾共价地附接。该悬垂反应基团可以直接或经一种间隔部分（如一种亚烷基基团）附接到该 PEG。

[0105] 除了以上说明的 PEG 形式外，还可以用在该聚合物中的一个或多个弱的或可降解的连接来制备该聚合物，包括任何以上说明的聚合物。例如，可以用在经历水解的该聚合物中的酯键制备 PEG。如以下所示，这种水解导致该聚合物裂解成较低分子量的片段：



[0107] 其他的水解地可降解连接，有用于作为在一种聚合物主链内的可降解连接和 / 或作为对于一个胆碱酯酶部分的可降解连接包括：碳酸酯连接；亚胺连接，例如从一种胺与一种醛的反应生成（参见例如 Ouchiet al. (1997) Polymer Preprints 38(1):582-3）；磷酸酯连接，例如通过一种醇与一种磷酸酯基团反应形成；脘连接，典型地由一种酰肼与一种醛反应形成；缩醛连接，典型地由在一种醛与一种醇之间反应形成；原酸酯连接，例如由在一种甲酸酯与一种醇之间反应形成；酰胺连接，由一种胺基团在例如一种聚合物（如 PEG）的一个末端与另一个 PEG 链的羧基基团之间形成；氨基甲酸乙酯连接，由一种具有一个末端异氰酸酯基团的 PEG 与一种 PEG 醇反应形成；肽连接，由一种胺基团在例如一种聚合物（如 PEG）的一个末端与一种肽的一个羧基之间形成；以及寡聚核苷酸连接，例如由在一种聚合物末端的一个亚磷酰胺基团与在一种寡聚核苷酸的 5' 羟基基团形成。

[0108] 该共轭物的这些任选的特征，即，向该聚合物链或该胆碱酯酶部分引进一个或多个可降解连接，可以提供对于该共轭物给药的最终希望的药理特性的额外控制。例如，可以给予一种大的并且相对惰性的共轭物（即具有附接到其上的一个或多个高分子量 PEG 链，例如具有一个或多个大于约 10,000 分子量的 PEG 链，其中该共轭物实质上不具有生物活性），它被水解以产生一种生物活性共轭物（具有最初 PEG 链的一部分）。以这种方式，可以更有效地调整该共轭物的这些性质以便随着时间的推移平衡该共轭物的生物活性。

[0109] 与该共轭物相关的水溶性聚合物还可以是“可裂开的”。即该水溶性聚合物裂开（经水解、酶处理、或其他），由此生成该非共轭的胆碱酯酶部分。在一些例子中，该可裂开的聚合物在体内从该胆碱酯酶部分分开，没有留下该水溶性聚合物的任何片段。在其他的例子中，可裂开的聚合物在体内从该胆碱酯酶部分分开，留下一一种来自该水溶性聚合物的相对小的片段（例如一种琥珀酸酯标签）。示例性的可裂开的聚合物包括通过一种碳酸酯连接而附接到该胆碱酯酶部分上的一种。

[0110] 在本领域中的那些普通技术人员将认识到上述讨论涉及的非肽水溶性聚合物决不是详尽的而只是说明性的，而且应当考虑具有如以上说明的品质的所有聚合材料。如在此所使用的术语“聚合物试剂”总体上是指一种整个分子，它可以包括一种水溶性聚合物区段和一种官能团。

[0111] 如以上说明的，本发明的一种共轭物包括共价地附接到一个胆碱酯酶部分的一种水溶性聚合物。典型地，对于任何给定的共轭物，将有共价地附接到具有胆碱酯酶活性的一个或多个部分的一个至三个水溶性聚合物。然而在一些例子中，该共轭物可以具有 1、2、3、4、5、6、7、8 或更多个各自附接到一个胆碱酯酶部分的水溶性聚合物。任何给定的水溶性聚合物可以共价地附接到该胆碱酯酶部分上的一种氨基酸，或当该胆碱酯酶部分是（例如）一种糖蛋白时，共价地附接到该胆碱酯酶部分上的一种碳水化合物。例如可以

使用唾液酸叠氮化物化学的代谢功能化 [Luchansky et al. (2004) *Biochemistry* 43(38) : 12358-12366] 或其他适当的方法 (如使用缩水甘油) 进行与一种碳水化合物的附接, 以促进醛基的引进 [Heldt et al. (2007) *European Journal of organic Chemistry* 32 : 5429-5433]。

[0112] 在该具有胆碱酯酶活性的部分内与该聚合物的具体连接取决于许多因素。这些因素包括, 例如所采用的具体的连接化学、该具体的胆碱酯酶部分、在该胆碱酯酶部分内可用的官能团 (附接到一种聚合物上或转变成适当的附着位点)、在该胆碱酯酶部分内额外反应性官能团的存在等等。

[0113] 本发明的这些共轭物可以是 (虽然不是必需) 前体药物, 表示在该聚合物与该胆碱酯酶部分之间的连接是水解地可降解的以允许该母体部分的释放。示例性的可降解连接包括羧化物酯、磷酸酯、硫酯、酸酐类、缩醛类、缩酮类、酰氧基烷基醚、亚胺类、原酸酯类、肽类、以及寡核苷酸类。这些连接可以使用在本领域中通常采用的结合方法通过适当修饰该胆碱酯酶部分和 / 或聚合物试剂而容易地制备, 该胆碱酯酶部分是: 例如蛋白质的羧基 C 端、或一种氨基酸 (如包含在该蛋白质内的丝氨酸或苏氨酸) 的侧链羟基基团、或在碳水化合物内的一种相似功能性。然而最优选的是可水解的连接, 其容易地由一种适当活化的聚合物与包含在该具有胆碱酯酶活性的部分内的一种非修饰官能团的反应而形成。

[0114] 可替代地, 还可以采用一种水解稳定的连接, 如一种酰胺、乌拉坦 (又称为氨基甲酸酯)、胺、硫醚 (又称为硫化物)、或脲 (又称为尿素) 连接作为用于结合该胆碱酯酶部分的连接。此外, 一种优选的水解稳定的连接是一种酰胺。在一个方法中, 带有一种活化酯的水溶性聚合物可以与在该胆碱酯酶部分上的一种胺基团反应从而产生一种酰胺连接。

[0115] 这些共轭物 (与一种非共轭的胆碱酯酶部分相反) 可以具有或不具有一种可测量程度的胆碱酯酶活性。也就是说, 依照本发明的一种聚合物 - 胆碱酯酶部分共轭物将具有从大约 0.1% 到约 100% 的任何量的未修饰的母体胆碱酯酶部分的生物活性。在一些例子中, 该聚合物 - 胆碱酯酶部分共轭物可以具有大于 100% 的未修饰的母体胆碱酯酶部分的生物活性。优选的, 具有很少或没有胆碱酯酶活性的共轭物含有将该聚合物连接到该部分的一种可水解的连接, 这样使得无论在该共轭物中活性的缺乏 (或相对缺乏) 与否, 一旦该可水解的连接被水性诱导裂开, 则释放出该活性母体分子 (或其一种衍生物)。这样的活性可以使用一种适当的体内或体外模型而确定, 取决于所采用的具有胆碱酯酶活性的该具体部分的已知活性。

[0116] 对于具有一种水解地稳定的连接 (将该具有胆碱酯酶活性的部分结合到该聚合物上) 的共轭物, 该共轭物将典型地具有一种可测量程度的生物活性。例如, 典型地这类共轭物的特征是具有满足一个或多个以下百分数的生物活性 (相对于非共轭的胆碱酯酶部分): 至少约 2%、至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97%、至少约 100%、以及超过 105% (当在一种适当的如在本领域中熟知的那些模型中测量时)。优选地, 具有一种水解地稳定的连接 (例如一种酰胺连接) 的共轭物将具有至少一定程度的具有胆碱酯酶活性的未修饰的母体部分的生物活性。

[0117] 现在将说明依照本发明的示例性的共轭物, 其中该胆碱酯酶部分是一种蛋白质。典型地, 这种蛋白质预期共用 (至少部分地) 与提供于 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO 2 的序

列相似的一种氨基酸序列。因此,虽然将在 SEQ ID NO:1 或 2 内针对特定位点或原子作出标注,这种标注仅仅是为了方便并且将使在本领域中的一个普通技术人员能够容易地确定在具有胆碱酯酶活性的其他部分中的对应位置或原子。具体地,本说明书在此提供的天然人胆碱酯酶通常适用于任何上述的片段、缺失变体、取代变体或添加变体。

[0118] 在胆碱酯酶部分上的氨基基团提供了在该胆碱酯酶部分与水溶性聚合物之间的附着点。通过使用提供于 SEQ ID NO:1 至 2 的氨基酸序列,显然的是在每一可供共轭使用的具有一种 ϵ -氨基酸的氨基酸序列中有若干赖氨酸残基。此外,任何蛋白质的 N 端胺也可以用作附着点。

[0119] 有许多与一个胆碱酯酶部分的可用胺类形成共价连接的适当的聚合物试剂的实例。将具体的实例连同对应的共轭物一起提供于以下表 1 中。在该表中,变量 (n) 代表重复单体单元的数量并且“-NH-(ChE)”代表在共轭到聚合物试剂后的胆碱酯酶部分的残基。虽然在表 1 中呈现出每一聚合物部分以“CH₃”基团封端 [例如 (OCH₂CH₂)_n 或 (CH₂CH₂O)_n], 其对应的其他基团 (如 H 和苄基) 可以被取代。

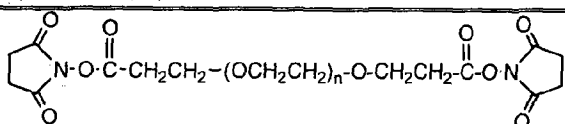
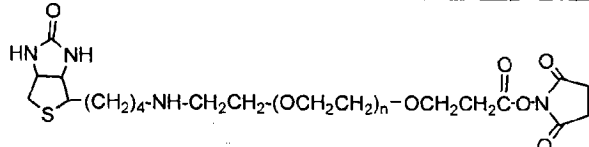
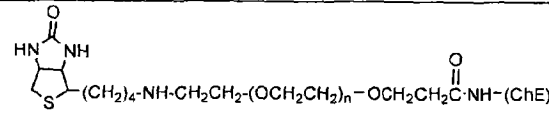
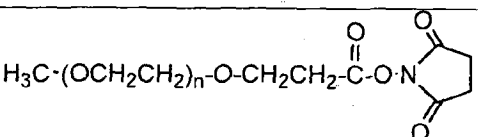
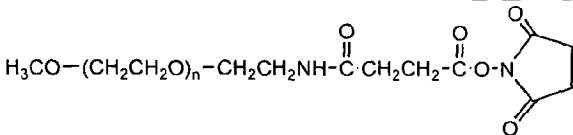
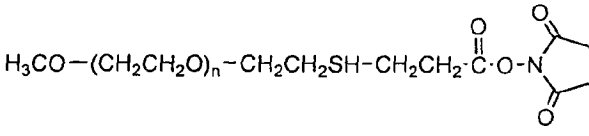
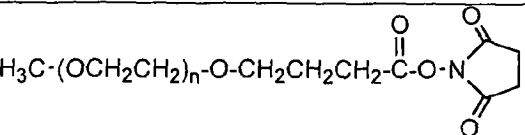
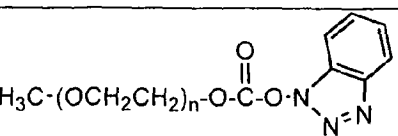
[0120] 表 1

[0121] 胺选择性聚合物试剂和从此形成的胆碱酯酶部分共轭物

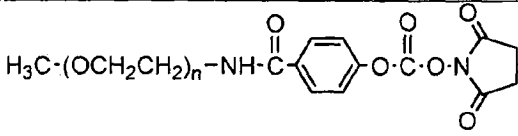
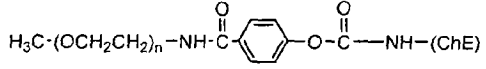
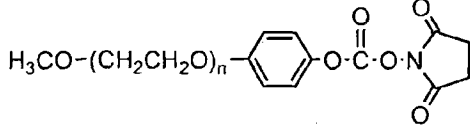
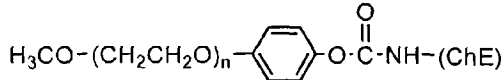
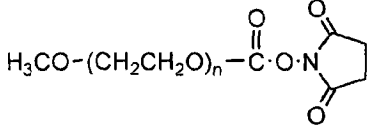
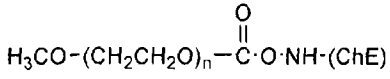
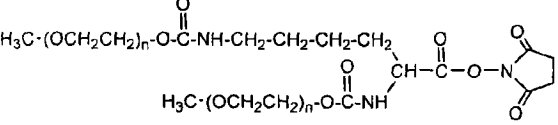
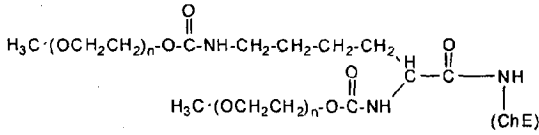
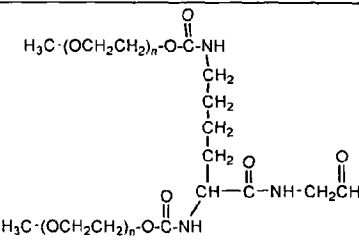
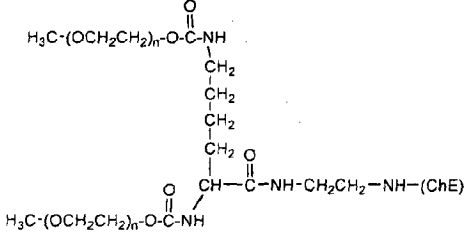
[0122]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagdown \\ \diagup \end{array}$ <p>mPEG-氧基羰基咪唑试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>氨基甲酸酯连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ <p>mPEG 硝基苯基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>氨基甲酸酯连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3$ <p>mPEG-三氯苯基碳酸酯试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>氨基甲酸酯连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \diagup \end{array}$ <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>

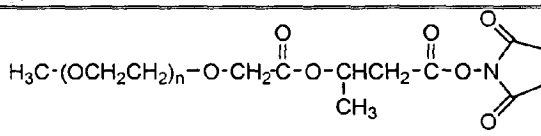
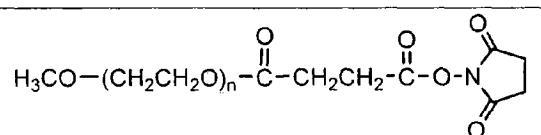
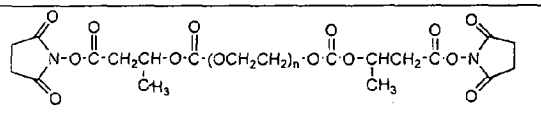
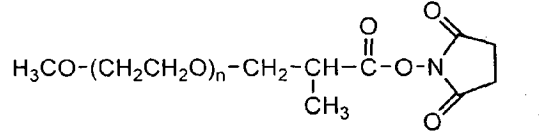
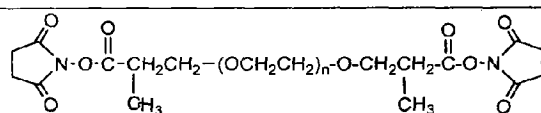
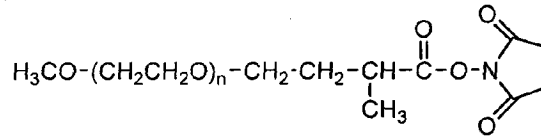
[0123]

聚合物试剂	对应的共轭物
 <p>同双功能 PEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$(ChE) - NH - C(=O) - CH_2CH_2 - (OCH_2CH_2)_n - O - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>酰胺连接</p>
 <p>杂合的双功能的 PEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	 <p>酰胺连接</p>
 <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$H_3C - (OCH_2CH_2)_n - O - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>酰胺连接</p>
 <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$H_3CO - (CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2NH - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>酰胺连接</p>
 <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$H_3CO - (CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2SH - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>酰胺连接</p>
 <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$H_3C - (OCH_2CH_2)_n - O - CH_2CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>酰胺连接</p>
 <p>mPEG-苯并三唑碳酸酯试剂</p>	$H_3C - (OCH_2CH_2)_n - O - C(=O) - NH - (ChE)$ <p>氨基甲酸酯连接</p>

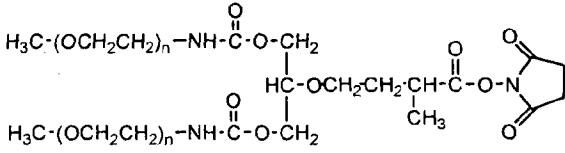
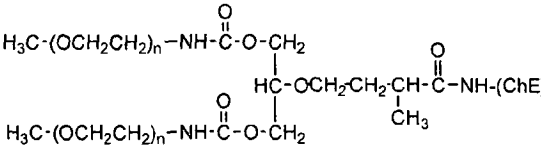
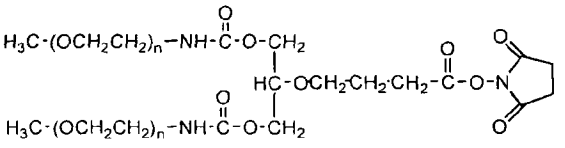
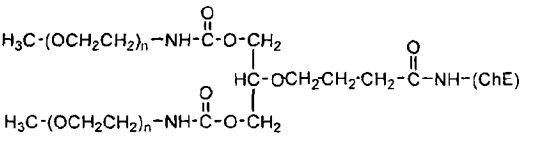
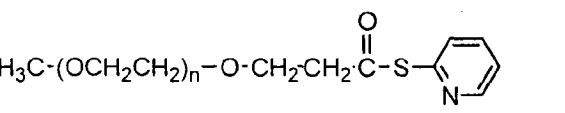
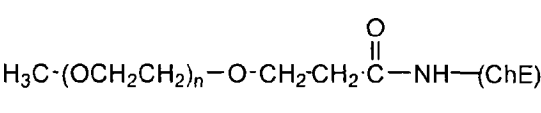
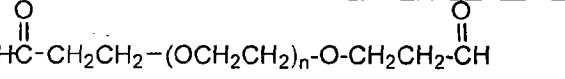
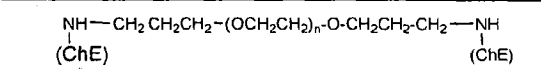
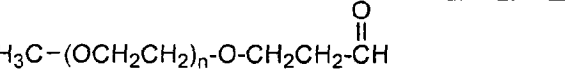
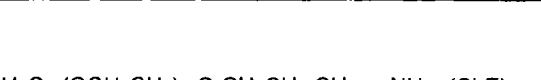
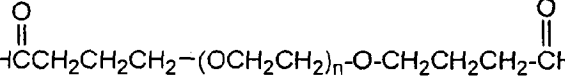
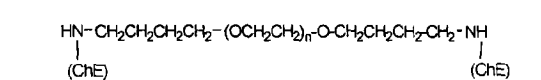
[0124]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{ChE})$  <p>氨基甲酸酯连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{ChE})$  <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{NH}-(\text{ChE})$  <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N})$  <p>支链 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{ChE}))$  <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH})$  <p>支链 mPEG2-醛试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE})$  <p>仲胺连接</p>

[0125]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>
 <p>同双功能 PEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$(\text{ChE})-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>
 <p>同双功能 PEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯试剂</p>	$(\text{ChE})-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}$  <p>mPEG-琥珀酰亚胺基试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>酰胺连接</p>

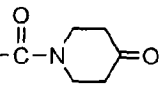
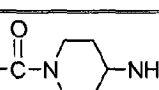
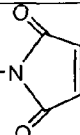
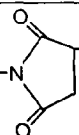
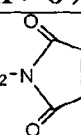
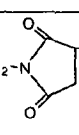
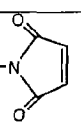
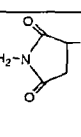
[0126]

聚合物试剂	对应的共轭物
<p>支链 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂</p> 	<p>酰胺连接</p> 
<p>支链 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂</p> 	<p>酰胺连接</p> 
<p>mPEG-硫酯试剂</p> 	<p>酰胺连接(典型地与具有一种 N 端半胱氨酸或组氨酸的胆碱酯酶部分)</p> 
<p>同双功能 PEG 丙醛试剂</p> 	<p>仲胺连接</p> 
<p>mPEG 丙醛试剂</p> 	<p>仲胺连接</p> 
<p>同双功能 PEG 丁醛试剂</p> 	<p>仲胺连接</p> 

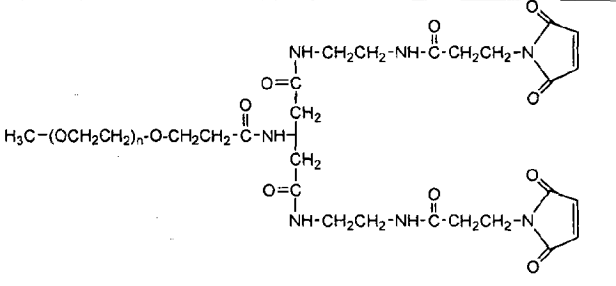
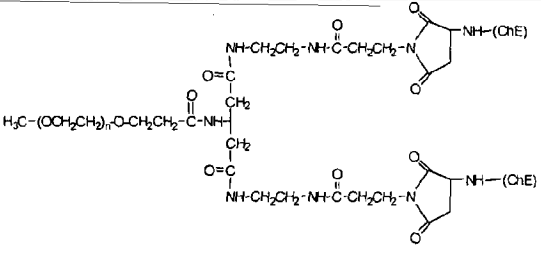
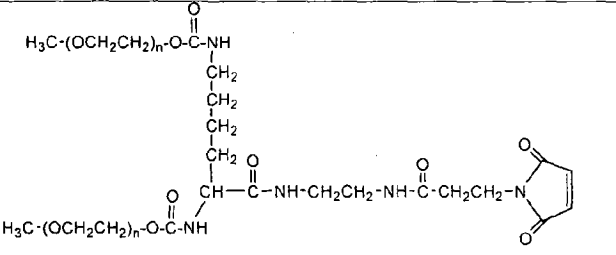
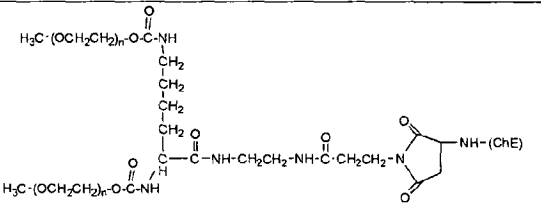
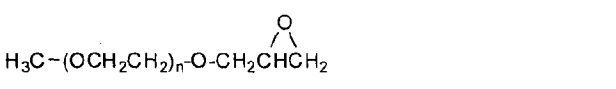
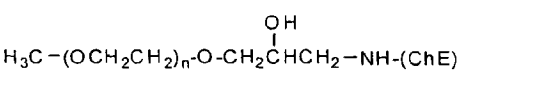
[0127]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}$ <p>mPEG 丁醛试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>仲胺连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H}$ <p>mPEG 丁醛试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>仲胺连接</p>
$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HN} \\ \\ (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} \end{array}$ <p>同双功能 PEG 丁醛试剂</p>	$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE}) \\ \\ \text{HN} \\ \\ (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE}) \end{array}$ <p>仲胺连接</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \\ \\ \text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} \end{array}$ <p>支链 mPEG2 丁醛试剂</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \\ \\ \text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE}) \end{array}$ <p>仲胺连接</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ <p>支链 mPEG2 丁醛试剂</p>	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE}) \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ <p>仲胺连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{OCH}_2\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ <p>mPEG 缩醛试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE})$ <p>仲胺连接</p>

[0128]

聚合物试剂	对应的共轭物
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$ </p> <p>mPEG 哌啶酮试剂</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$  $-\text{NH}-(\text{ChE})$</p> <p>仲胺连接 (至仲碳原子)</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$</p> <p>mPEG 甲基酮试剂</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$</p> <p>仲胺连接 (至仲碳原子)</p>
<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$</p> <p>mPEG 三氟乙基磺酸酯试剂</p>	<p>$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{ChE})$</p> <p>仲胺连接</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ </p> <p>mPEG 马来酰亚胺试剂 (在一定的反应条件下, 如 $\text{pH} > 8$)</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  $-\text{NH}-(\text{ChE})$</p> <p>仲胺连接</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ </p> <p>mPEG 马来酰亚胺试剂 (在一定的反应条件下, 如 $\text{pH} > 8$)</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  $-\text{NH}-(\text{ChE})$</p> <p>仲胺连接</p>
<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ </p> <p>mPEG 马来酰亚胺试剂 (在一定的反应条件下, 如 $\text{pH} > 8$)</p>	<p>$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  $-\text{NH}-(\text{ChE})$</p> <p>仲胺连接</p>

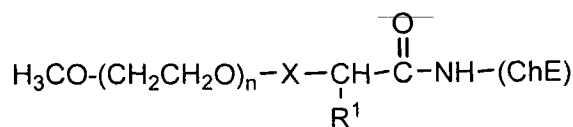
[0129]

聚合物试剂	对应的共轭物
 <p>mPEG 叉状马来酰亚胺试剂 (在一定的反应条件下, 如 pH > 8)</p>	 <p>仲胺连接</p>
 <p>支链 mPEG2 马来酰亚胺试剂 (在一定的反应条件下, 如 pH > 8)</p>	 <p>仲胺连接</p>
 <p>mPEG 环氧化物试剂 (在一定的反应条件下, 如 pH > 8)</p>	 <p>仲胺连接</p>

[0130] 可以通过许多种技术来完成一种聚合物试剂与一个胆碱酯酶部分的氨基基团的共轭。在一个方法中, 一个胆碱酯酶部分可以共轭至用一种琥珀酰亚胺衍生物 (或其他的活化酯基, 其中可以使用类似于对于这些可替代的含有活化酯基的聚合物试剂所说明的那些方法) 功能化的一种聚合物试剂。在这个方法中, 可以将带有一种琥珀酰亚胺衍生物的聚合物在水性培养基 (在 pH 7 至 9.0 下) 中附接至胆碱酯酶部分, 虽然使用不同的反应条件 (例如一种较低的 pH 如 6 至 7、或不同的温度、和 / 或小于 15°C) 可以产生该聚合物与在该胆碱酯酶部分上不同位置的附接。另外, 可以通过使一个胺基封端的非肽水溶性聚合物与带有一个活化羧酸基团的一个胆碱酯酶部分反应形成一个酰胺连接。

[0131] 一种示例性的共轭物包括以下结构:

[0132]



[0133] 其中:

[0134] (n) 是具有从约 2 至 4000 的值得一个整数;

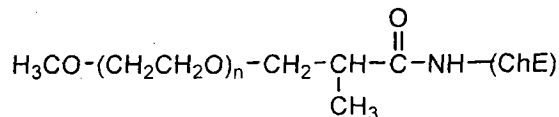
[0135] X 是一个间隔部分；

[0136] R¹ 是一个有机基团；并且

[0137] ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0138] 本发明的另一个示例性的共轭物包括以下结构：

[0139]

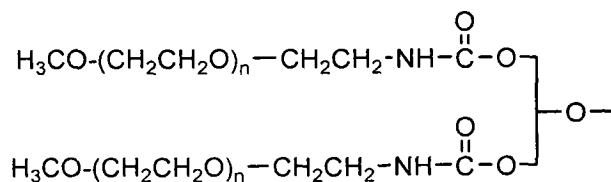


[0140] 其中 (n) 是具有从 2 到 4000 的值的一个整数并且 ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0141] 对于将胆碱酯酶部分共轭到聚合物试剂上有用的另一个典型方法是使用还原性胺化以将一个胆碱酯酶部分的伯胺共轭至用一种酮、醛、或其水合形式（例如酮水合物、醛水化合物）功能化的一种聚合物试剂。在这种方法中，来自胆碱酯酶部分的伯胺与醛或酮（或对应的一种水合醛或酮的含有羟基的基团）的羰基反应，由此形成一种希夫碱。然后依次通过使用一种还原剂（如氢化硼钠）可以将该希夫碱还原成一种稳定的共轭物。选择性反应（例如在 N 端）是可能的，特别是用以一种酮或一种 α-甲基支链醛和 / 或在特定反应条件下（例如降低的 pH）功能化的聚合物。

[0142] 其中水溶性聚合物是一种分枝形式的本发明的示例性的共轭物包括其中该水溶性聚合物包含以下结构的那些：

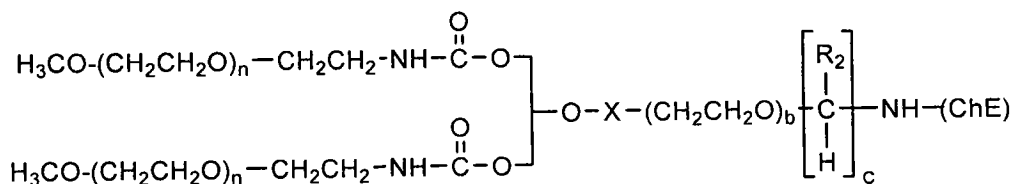
[0143]



[0144] 其中每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的一个整数。

[0145] 本发明的示例性的共轭物包括以下结构：

[0146]



[0147] 其中：

[0148] 每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的一个整数；

[0149] X 是间隔部分；

[0150] (b) 是具有 2 至 6 的一个值的一个整数；

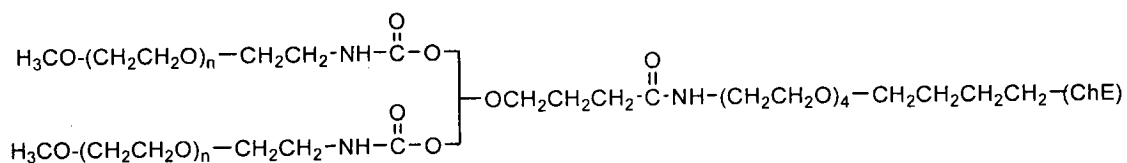
[0151] (c) 是具有 2 至 6 的一个值的一个整数；

[0152] R², 在每次出现时, 独立地是 H 或低级烷基；并且

[0153] ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0154] 本发明的一种示例性的共轭物包括以下结构：

[0155]



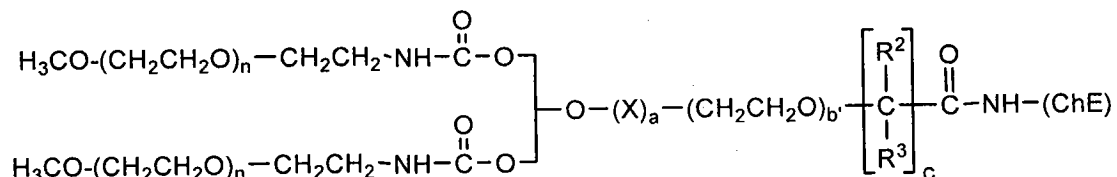
[0156] 其中：

[0157] 每个 (n) 独立地是具有从 2 至 4000 的值的一个整数；并且

[0158] ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0159] 本发明的另一个示例性的共轭物包括以下结构：

[0160]



[0161] 其中：

[0162] 每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的一个整数；

[0163] (a) 是 0 或 1；

[0164] X, 当存在时, 是一个间隔部分, 该间隔部分包括一个或多个原子；

[0165] (b') 是 0 或具有 1 至 10 的一个值的一个整数；

[0166] (c) 是具有 1 至 10 的一个值的一个整数；

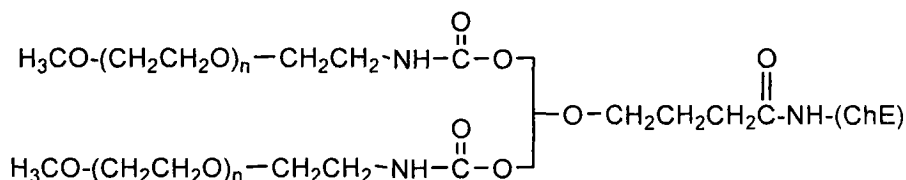
[0167] R², 在每次出现时, 独立地是 H 或一种有机基团；

[0168] R³, 在每次出现时, 独立地是 H 或一种有机基团；并且

[0169] ChE 是一个胆碱酯酶部分的一个残基。

[0170] 本发明的一种示例性的共轭物包括以下结构：

[0171]



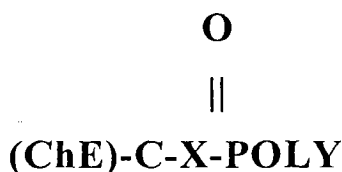
[0172] 其中：

[0173] 每个 (n) 独立地是具有从 2 至 4000 的值的一个整数；并且

[0174] ChE 是胆碱酯酶部分的一个残基。

[0175] 羧基基团代表可以作为在该胆碱酯酶部分上的一个附着点的另一个官能团。该共轭物将包括以下结构：

[0176]



[0177] 其中 (ChE) 和相邻羰基与含有羧基的胆碱酯酶部分对应, X 是一种连接, 优选一种杂原子 (选自 O、N(H)、以及 S), 并且 POLY 是一种水溶性聚合物 (如 PEG), 任选地以一个封

端部分中终止。

[0178] 该 C(O)-X 连接产生于带有末端官能团的一种聚合物的衍生物与含有羧基的胆碱酯酶部分之间的反应。正如以上的讨论,这种特定的连接将取决于所使用的官能团的类型。如果该聚合物是末端功能化的或用一种羟基基团“活化的”,则该生成的连接将是一种羧酸酯,并且 X 将是 O。如果该聚合物主链是用一种巯基被功能化的,则该生成的连接将是一种硫酯,并且 X 将是 S。当采用某些多臂、支链的、或分叉的聚合物时,该 C(O)X 部分特别是该 X 部分可以是相对更复杂的并且可以包括一种较长的连接结构。

[0179] 包含一种酰肼部分的水溶性衍生物对于在一种羰基与羧酸的共轭也是有用的。就不含一种羰基部分或一种羧酸的胆碱酯酶部分而言,可以使用在本领域中的普通技术人员已知的技术添加一个。例如可以通过还原一种羧酸(例如 C 端羧酸)和/或通过提供该胆碱酯酶部分的糖基化的或醚化的(其中所添加的糖具有一个羰基部分)形式来引入一个羰基部分。关于含有一种羧酸的胆碱酯酶部分,可以在一种偶联剂(如 DCC)存在下将一种 PEG-肼试剂共价地附接到该胆碱酯酶部分[例如 mPEG-OCH₂C(O)NHNH₂+HOC(O)-(ChE) 产生 mPEG-OCH₂C(O)NHNHC(O)-ChE]。以下表 2 提供了含有一种酰肼部分的水溶性衍生物的具体实例连同这些对应的共轭物。另外,含有一种活化酯(如一种琥珀酰亚胺基基团)的任何水溶性衍生物可以通过使该含有活化酯的水溶性聚合物衍生物与肼(NH₂-NH₂)或肼基甲酸叔丁酯[NH₂NHCO₂C(CH₃)₃]反应而转化成含有一种酰肼部分。在该表中,变量(n)代表重复单体单元的数量并且“= C-(ChE)”代表在共轭到聚合物试剂之后胆碱酯酶部分的残基。任选地,可以使用一种适当的还原剂还原脞连接。虽然在表 2 中呈现出每个聚合物部分以“CH₃”基团封端[例如 (OCH₂CH₂)_n 或 (CH₂CH₂O)_n],其对应的其他的基团(如 H 和苄基)可以被取代。

[0180] 表 2

[0181] 羧基特异性聚合物试剂和从此形成的胆碱酯酶部分共轭物

[0182]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-肼试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脞连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-肼试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脞连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-肼试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脞连接</p>

[0183]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脲连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脲连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脲连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{GC})$ <p>脲连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-(\text{ChE})$ <p>脲连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}_2$ <p>mPEG-胍试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{ChE})$ <p>C(O)NHNHC(O)连接</p>

[0184] 包含在该胆碱酯酶部分之内的巯基可以作为该水溶性聚合物的有效附接位点。具体而言,当该胆碱酯酶部分是一种蛋白质时半胱氨酸残基提供巯基。然后可以使在这类半胱氨酸残基中的这些巯基与一种活化 PEG 反应,这种活化 PEG 对于与巯基的反应是特异性的,例如,一种马来酰亚胺基聚合物或如在美国专利号 5,739,208 以及在 WO01/62827 中说明的其他的衍生物。另外,可以使一种保护的巯基结合进入一种活化糖蛋白的寡聚糖侧链,随后用一种巯基反应性水溶性聚合物脱保护。

[0185] 以下表 3 中提供了具体的试剂实例连同对应的共轭物。在该表中,变量 (n) 代表重复单体单元的数量并且“-S-(ChE)”代表在共轭到水溶性聚合物之后的胆碱酯酶部分残基。虽然在表 3 中呈现出每个聚合物部分以“CH₃”基团封端 [例如 (OCH₂CH₂)_n 或 (CH₂CH₂O)_n], 其对应的其他的基团 (如 H 和苄基) 可以被取代。

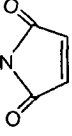
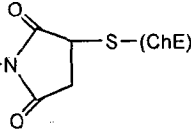
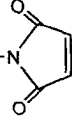
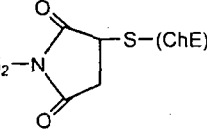
[0186] 关于示例性的胆碱酯酶部分对应的 SEQ ID NO:1 至 2,可以看出有许多含有巯基

的半胱氨酸残基。因此,优选的巯基附着位点与这七个半胱氨酸残基之一有关。虽然优选的是不破坏任何二硫键,在一个或多个这些半胱氨酸残基的侧链内附接一种聚合物并且保留一种活性是可能的。附接一种水溶性聚合物的优选位置是对应于 SEQ ID NO :2 的 Cys66 的含有巯基的半胱氨酸残基。另外,有可能使用常规合成技术添加一个半胱氨酸残基至该胆碱酯酶部分。例如参见在 W090/12874 中所说明的用于添加半胱氨酸残基的步骤,其中这类步骤可以适应于一个胆碱酯酶部分。另外,还可以使用常规的基因工程方法将一个半胱氨酸残基引进胆碱酯酶部分。然而在一些实施方案中,优选的是不引进一种额外的半胱氨酸残基和 / 或巯基。


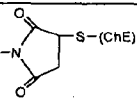
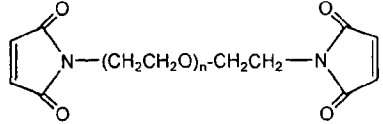
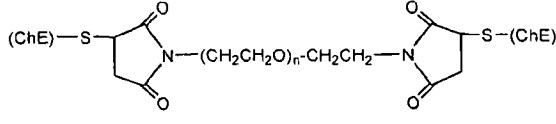
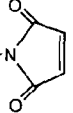
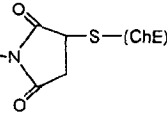

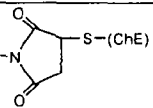
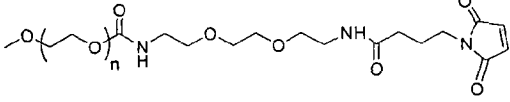
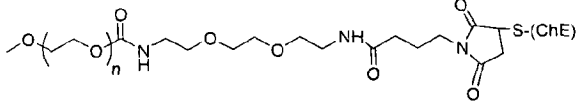

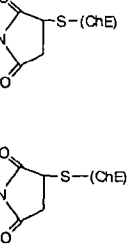

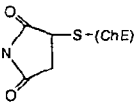
[0187] 表 3

[0188] 巯基选择性聚合物试剂和从此形成的胆碱酯酶部分共轭物



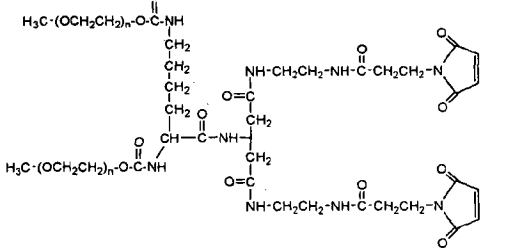
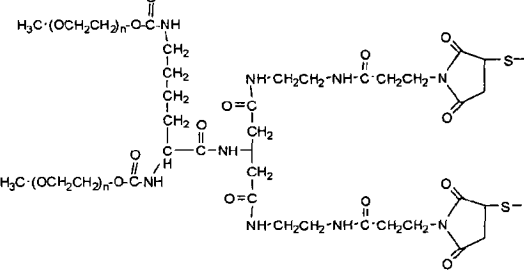
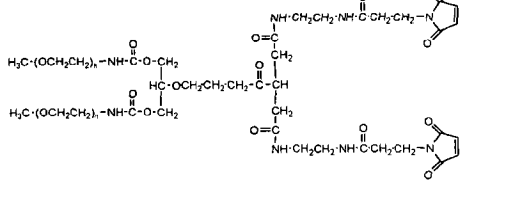
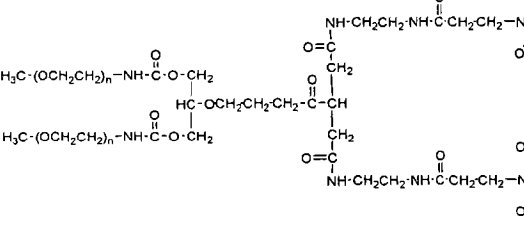
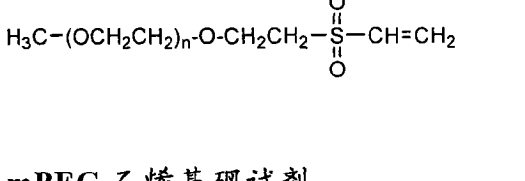
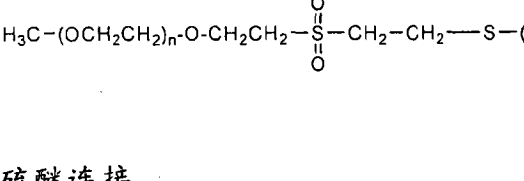

[0189]

聚合物试剂	对应的共轭物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>

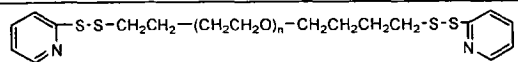
[0190]

<p>聚合物试剂</p> $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	<p>对应的共轭物</p> $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>
 <p>同双功能的 mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	 <p>硫醚连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>
 <p>mPEG 马来酰亚胺试剂</p>	 <p>硫醚连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>mPEG 叉状马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>支链 mPEG2 马来酰亚胺试剂</p>	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  <p>硫醚连接</p>

[0191]

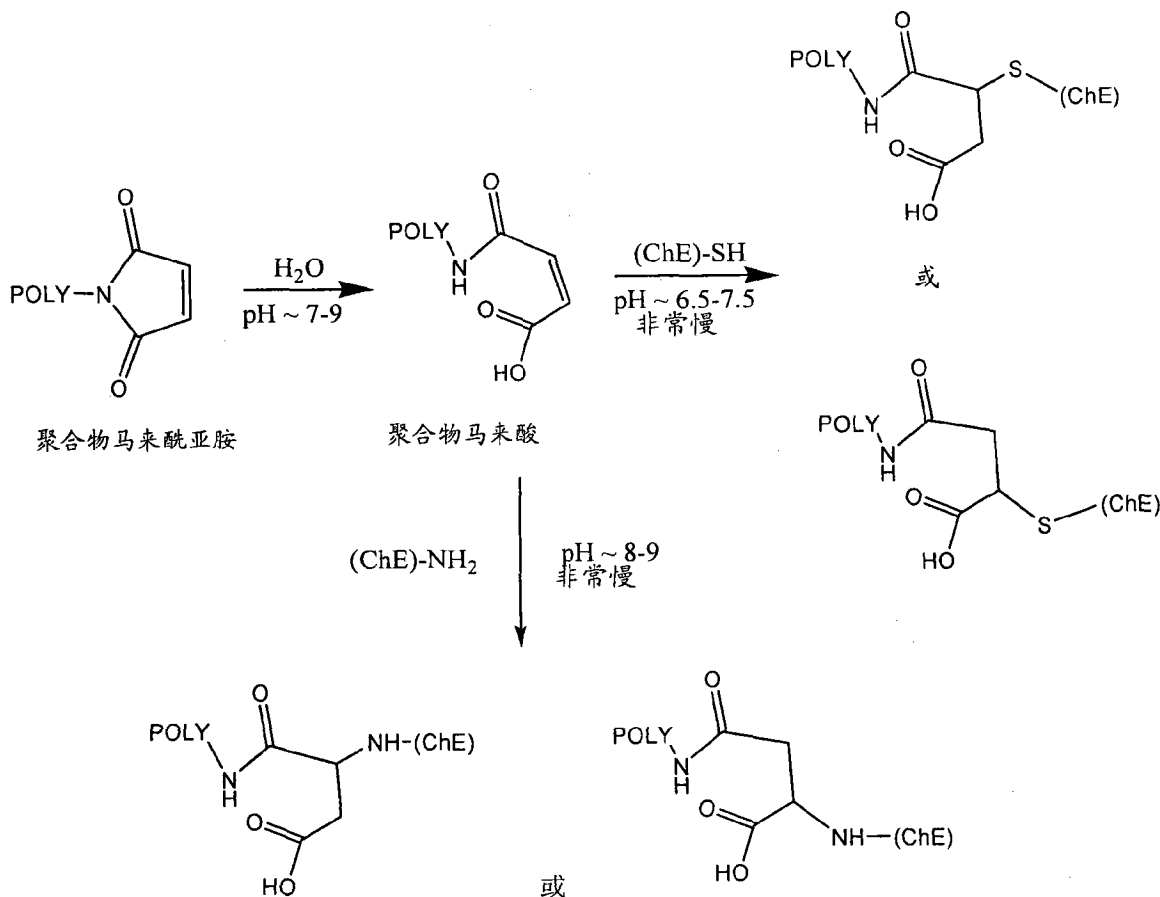
<p>聚合物试剂</p>	<p>对应的共轭物</p>
<p> $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$  </p>	<p> $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$  </p>
<p>支链 mPEG2 马来酰亚胺试剂</p> 	<p>硫醚连接</p> 
<p>支链 mPEG2 叉状马来酰亚胺试剂</p> 	<p>硫醚连接</p> 
<p>支链 mPEG2 叉状马来酰亚胺试剂</p> 	<p>硫醚连接</p> 
<p>mPEG 乙烯基砜试剂</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	<p>硫醚连接</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-(\text{ChE})$
<p>mPEG 巯基试剂</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$	<p>二硫键</p> $\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{ChE})$
<p>同双功能 PEG 巯基试剂</p> $\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SH}$	<p>二硫键</p> $(\text{ChE})-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{ChE})$
<p>mPEG 二硫化物试剂</p> $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ 	<p>二硫键</p> $\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{ChE})$

[0192]

聚合物试剂	对应的共轭物
 <p>同双功能二硫化物试剂</p>	$(\text{ChE})\text{-S-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-S-(ChE)}$ <p>二硫键</p>

[0193] 关于从带有一个或多个马来酰亚胺官能团（无论该马来酰亚胺是否与在胆碱酯酶部分上的胺或巯基反应）的水溶性聚合物形成的共轭物，该水溶性聚合物的一个或多个对应的马来酰胺酸形式也可以与该胆碱酯酶部分反应。在某些条件之下（例如约 7-9 的 pH 以及在水的存在下），该马来酰亚胺环将“开放”以形成对应的马来酰胺酸。该马来酰胺酸随后可以与一个胆碱酯酶部分的一个胺或巯基反应。示例性的基于马来酰胺酸的反应用图解法显示如下。POLY 代表该水溶性聚合物，并且 (ChE) 代表胆碱酯酶部分。

[0194]



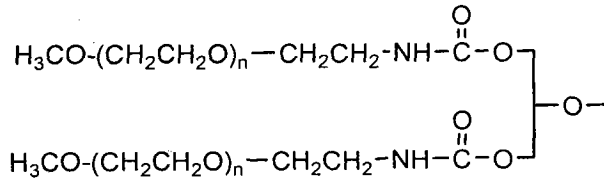
[0195] 依照本发明的一种代表性的共轭物可以具有以下结构：

[0196] $\text{POLY-L}_{0,1}\text{-C(O)Z-Y-S-S-(ChE)}$

[0197] 其中 POLY 是一种水溶性聚合物，L 是一种任意的连接物，Z 是一种选自下组的杂原子，该组的组成为：O、NH、以及 S，并且 Y 是选自下组，其组成为： C_{2-10} 烷基、 C_{2-10} 取代的烷基、芳基、以及取代的芳基，并且 (ChE) 是一个胆碱酯酶部分。可以与一个胆碱酯酶部分反应并且产生这种类型的共轭物的聚合物试剂说明在美国专利申请公开号 2005/0014903 中。

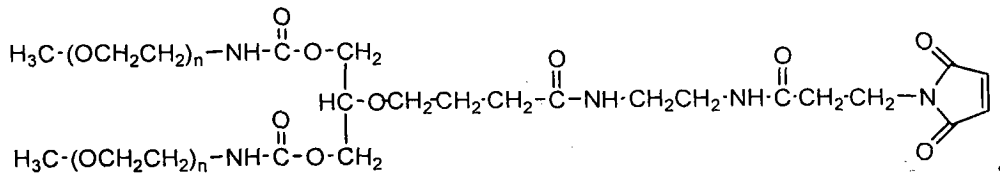
[0198] 如先指出的,其中水溶性聚合物是一种分枝形式的本发明的示例性的共轭物将具有包括以下结构的水溶性聚合物的分枝形式:

[0199]



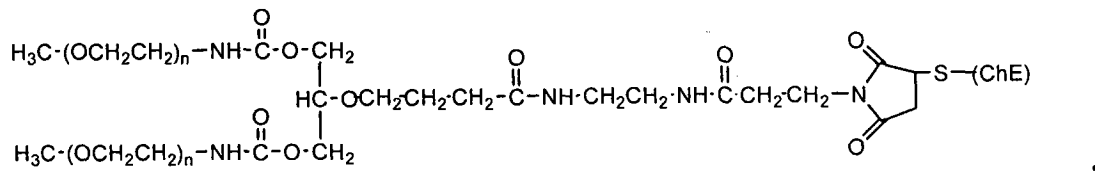
[0200] 其中每个 (n) 独立地是具有从约 2 至 4000 的值的的一个整数。使用以下试剂制备具有分支形式的水溶性聚合物的示例性共轭物:

[0201]



[0202] 由此形成具有以下结构的一种共轭物:

[0203]



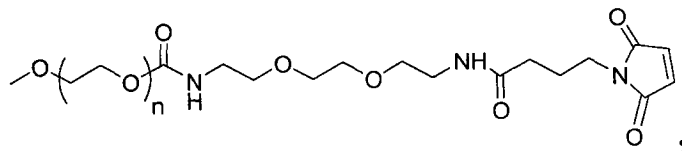
[0204] 其中:

[0205] (对于每个结构) 每个 (n) 独立地是具有从 2 至 4000 的值的的一个整数;并且

[0206] ChE 是胆碱酯酶部分的一个残基。

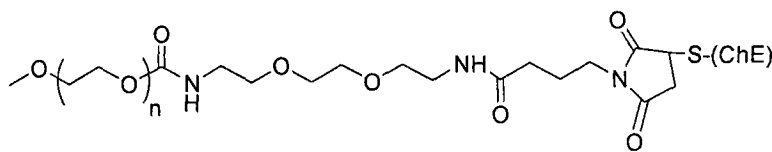
[0207] 可以使用以下一种试剂而形成一种额外的示例性的共轭物:

[0208]



[0209] 由此形成具有以下结构的一种共轭物:

[0210]



[0211] 其中:

[0212] (对于每个结构) (n) 独立地是具有从 2 至 4000 的值的的一个整数;并且

[0213] ChE 是胆碱酯酶部分的一个残基。

[0214] 可以使用巯基选择性聚合物以多种方式形成共轭物并且在这点上不限制本发明。例如,将任选地在一种适当的缓冲液中(如果需要,包括含有胺的缓冲剂)的胆碱酯酶部分置于在约 7-8 的 pH 下的一种水介质中,并且加入摩尔过量的巯基选择性聚合物试剂。允许

该反应进行约 0.5 到 2 小时,虽然大于 2 小时(如 5 小时、10 小时、12 小时、以及 24 小时)的反应时间是有用的(如果测定的聚乙二醇化产量相对低)。在这种方法中采用的示例性的聚合物试剂是带有选自下组的一种反应基团的聚合物试剂,该组的组成为:马来酰亚胺、砜(如乙烯砜)、以及巯基(例如功能化的巯基如邻吡啶基或“OPSS”)。

[0215] 如在先指出的,一种巯基选择性聚合物试剂(例如一种带有马来酰亚胺官能团的聚合物试剂)可用于形成一种具有胆碱酯酶部分的共轭物。例如,巯基选择性聚合物试剂与胆碱酯酶部分的一种二聚体形式(例如,重组人 BChE 的二聚体形式)有可能在共轭条件下反应。假定在胆碱酯酶部分中与 Cys66 对应的位置是选择性共轭的,则形成一种混合物,其中该混合物包括一种在构成二聚体的一个单体亚单位的 Cys66 处附接的单共轭二聚体和一种在构成二聚体的两个单体亚单位的每一 Cys66 处附接的双共轭二聚体(例如,包括在构成二聚体的一个单体亚单位的 Cys66 处附接的单聚乙二醇化的二聚体以及在构成二聚体的两个单体亚单位的每一 Cys66 处附接的二聚乙二醇化的二聚体的一种混合物)。

[0216] 在另一个示例性的方法中,有可能在用于制备共轭物的方法中进行一个还原步骤。可以使用本领域中的普通技术人员已知的技术进行一个还原步骤。例如,可以通过使一种蛋白质经历还原条件(例如添加一种还原剂如 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、或三(2-羧乙基)膦)进行还原步骤。

[0217] 在其中进行一个还原步骤的那些例子中,可以在初始共轭反应之前或在初始共轭反应之后(例如用一种后续纯化和/或一种后续共轭)进行该还原步骤。

[0218] 例如,在其中还原步骤是在初始共轭反应之后进行的一个方法中,可以用以上说明的混合物进行还原步骤,该混合物即包括一种在构成二聚体的一个单体亚单位的 Cys66 处附接的单共轭二聚体和一种在构成二聚体的两个单体亚单位的每一 Cys66 处附接的双共轭二聚体的一种混合物(例如,包括在构成二聚体的一个单体亚单位的 Cys66 处附接的单聚乙二醇化的二聚体以及在构成二聚体的两个单体亚单位的每一 Cys66 处附接的二聚乙二醇化的二聚体的一种混合物)。上述混合物的还原结果是一种还原的混合物,该混合物包括非共轭单体以及单共轭单体。其后,可以使用本领域已知的技术(如离子交换色谱法)纯化该还原的混合物以便实质上分离非共轭单体和单共轭单体从而形成实质上包括非共轭单体的一种组合物以及包括单共轭单体的一种组合物。其后,有可能从实质上包括单共轭单体的组合物除去还原条件(例如除去或分离还原剂,例如通过利用离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、透析过滤等等),从而再生二硫键以形成例如包括双共轭二聚体(例如二聚乙二醇化的二聚体)的一种组合物。任选地可以在还原条件去除之后进行一种正切流动过滤(“TFF”)步骤以浓缩包括单共轭单体的组合物,以有利于增加双共轭二聚体的形成率。上述方法的有益之处在于:相对高的产率,例如 50% 以上的双共轭二聚体(例如二聚乙二醇化的二聚体)、简化的产物鉴定、以及相对减少对聚合物试剂的需要。

[0219] 关于在此以及在别处说明的那些聚合物试剂可以购自商业来源或从可商购的起始材料制备。另外,在文献中说明了用于制备这些聚合物试剂的方法。

[0220] 在胆碱酯酶部分与非肽水溶性聚合物之间的附接可以是直接的(其中没有介入原子位于该胆碱酯酶部分与该聚合物之间),或是间接的(其中一个或多个原子位于该胆碱酯酶部分与该聚合物之间)。关于间接附接,一种“间隔部分”用作在胆碱酯酶部分的残基与水溶性聚合物之间的连接物。构成该间隔部分的一个或多个原子可以包括一个或多个

碳原子、氮原子、硫原子、氧原子、以及它们的组合。该间隔部分可以包括一种酰胺、仲胺、氨基甲酸酯、硫醚、和 / 或二硫基。具体的间隔部分的非限制性实例包括选自下组的那些：该组的组成为： $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-O-C(O)-NH-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$ 、 $-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-O-CH_2-$ 、 $-C(O)-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-C(O)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-C(O)-NH-[CH_2]_h-(OCH_2CH_2)_j-$ 、二价环烷基基团、 $-O-$ 、 $-S-$ 、一种氨基酸、 $-N(R^6)-$ 、以及上述的任何两种或多种的组合，其中 R^6 是 H 或选自下组的一个有机基团，该组的组成为：烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、炔基、取代的炔基、芳基以及取代的芳基，(h) 是 0 至 6，并且 (j) 是 0 至 20。其他的具体的间隔部分具有以下结构： $-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ 、 $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ 、以及 $-O-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ ，其中每个亚甲基的下标值是指包含在该结构中的亚甲基的数量，如 $(CH_2)_{1-6}$ 是指该结构可以包含 1、2、3、4、5、或 6 个亚甲基。额外的，任何上述间隔部分可以进一步包括一种氧化乙烯寡聚体链，该寡聚体链包括 1 到 20 个氧化乙烯单体单位 [即、 $-(CH_2CH_2O)_{1-20}$]。即该氧化乙烯寡聚体链可以存在于该间隔部分之前或之后，并且任选地在由两个或更多个原子组成的一种间隔部分的任何两个原子之间。并且，如果该寡聚体与一种聚合物区段邻接并且仅代表该聚合物区段的一个延伸，则将不会认为该寡聚体链是该间隔部分的一部分。

[0221] 组合物

[0222] 这些共轭物典型地是一种组合物的一部分。总体上，该组合物包括复数个共轭物，优选（虽然不是必需的）每一共轭物包含相同的胆碱酯酶部分（即在该整体的组合物内，仅仅发现一个类型的胆碱酯酶部分）。另外，该组合物可以包括复数个共轭物，其中任何给定的共轭物包含选自下组的一个部分，该组的组成为：两个或更多个不同的胆碱酯酶部分（即在该整体的组合物内，发现两个或更多个不同的胆碱酯酶部分）。然而最佳地，在该组合物中实质上全部共轭物（例如在该组合物中 85% 或更多的这些复数个共轭物）都各自包含相同的胆碱酯酶部分。

[0223] 该组合物可以包括一个单一的共轭物种类（例如一个单聚乙二醇化的共轭物，其中该单一的聚合物附接在该组合物中的实质上所有共轭物的相同的位置上），或共轭物种类的一种混合物（例如单聚乙二醇化的共轭物的一种混合物，其中该聚合物的附接发生在

不同的位点,和 / 或单聚乙二醇化的、二聚乙二醇化的、以及三聚乙二醇化的共轭物的一种混合物)。这些组合物还可以包括其他的共轭物,这些共轭物具有四个、五个、六个、七个、八个或更多个聚合物附接到任何给定的具有胆碱酯酶活性的部分。另外,本发明包括这样的实例,其中该组合物包括复数个共轭物,每一共轭物包括共价地附接到一个胆碱酯酶部分的一个水溶性聚合物,连同包括两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、或更多个共价地附接到一个胆碱酯酶部分的水溶性聚合物。

[0224] 关于在该组合物中的这些共轭物,该组合物将满足一个或多个以下特征:至少约 85% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到四个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 85% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到三个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 85% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到两个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 85% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 95% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到五个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 95% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到四个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 95% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到三个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 95% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到两个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 95% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 99% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到五个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 99% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到四个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 99% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到三个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;至少约 99% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一到两个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物;以及至少约 99% 的在该组合物中的这些共轭物将具有一个附接到该胆碱酯酶部分上的聚合物。应当理解的是聚合物的涉及范围,例如从“x 到 y 聚合物”考虑了包括 x 到 y 的聚合物(即,例如“从一个到三个聚合物”考虑了一个聚合物、两个聚合物、以及三个聚合物,“从一个到两个聚合物”考虑了一个聚合物以及两个聚合物等等)。

[0225] 在一个或多个实施方案中,优选的是该含有共轭物的组合物不含或实质上不含白蛋白。还优选的是该组合物不含或实质上不含不具有胆碱酯酶活性的蛋白质。因此,优选的是该组合物是 85%、更优选 95%、以及最优选 99% 不含白蛋白。此外,优选的是该组合物是 85%、更优选 95%、以及最优选 99% 不含不具有胆碱酯酶活性的任何蛋白质。就白蛋白存在于该组合物中而言,本发明的示例性的组合物是实质上不含这样一种共轭物,该共轭物含有将一个胆碱酯酶部分的残基连接到白蛋白的一种聚乙二醇聚合物。

[0226] 可以通过选择适当的聚合物试剂、聚合物试剂与该胆碱酯酶部分的比率、温度、pH 条件、以及该共轭反应的其他方面来实现对于任何给定部分的所希望的聚合物数量的控制。另外,可以通过纯化手段来实现减少或消除不希望的共轭物(例如那些具有四个或更多个附接聚合物的共轭物)。

[0227] 例如,可以纯化该聚合物-胆碱酯酶部分共轭物以获得 / 分离出不同的共轭的种类。特别地,可以纯化该产物混合物以便获得平均数为任意地从一个、两个、三个、四个、五个、或更多个 PEG(每个胆碱酯酶部分),典型地一个、两个、或三个 PEG(每个胆碱酯酶部分)。用于最终共轭反应混合物的纯化的策略将取决于多种因素,例如包括:所采用的聚合

物试剂的分子量、具体的胆碱酯酶部分、所希望的给药方案、以及一种或多种单独的共轭物的残余活性和体内特性。

[0228] 如果需要,可以使用凝胶过滤色谱法和 / 或离子交换色谱法分离具有不同分子量的共轭物。也就是说,基于它们的分子量差异(其中该差异实质上与水溶性聚合物部分的平均分子量对应),用凝胶过滤色谱法来分馏不同数量的聚合物与胆碱酯酶部分的比率(例如,1-mer、2-mer、3-mer、等等,其中“1-mer”表示1个聚合物对胆碱酯酶部分、“2-mer”表示两个聚合物对胆碱酯酶部分等等)。例如,在一个示例性的反应中,其中将一个35,000道尔顿的蛋白质随机共轭到具有约20,000道尔顿的分子量的一种聚合物试剂,所产生的反应混合物可能含有未修饰的蛋白质(具有约35,000道尔顿的分子量)、单聚乙二醇化的蛋白质(具有约55,000道尔顿的分子量)、二聚乙二醇化的蛋白质(具有约75,000道尔顿的分子量)等等。

[0229] 虽然这种方法可用于分离PEG及其他具有不同分子量的聚合物-胆碱酯酶部分共轭物,总体上这种方法对于分离在该胆碱酯酶部分内具有不同聚合物附着位点的位置同种型是无效的。例如,可以使用凝胶过滤色谱法从PEG 1-mers、2-mers、3-mers等等的混合物使它们彼此分离,虽然回收的每一共轭物组合物可能含有附接在胆碱酯酶部分内的不同的反应基团(例如赖氨酸残基)的一种或多种PEG。

[0230] 凝胶过滤柱适合于进行这种类型的分离,包括可以从Amersham Biosciences(Piscataway, NJ)获得的Superdex™以及Sephadex™柱。一种具体柱子的选择将取决于所希望的分馏所希望的范围。总体上使用一种适当的缓冲液(如磷酸盐、乙酸盐等)进行洗脱。可以通过许多不同的方法分析收集的部分,例如(i)用于蛋白质含量的在280nm下的吸光度、(ii)使用牛血清清蛋白(BSA)作为标准的基于染料的蛋白质分析、(iii)用于PEG含量的碘试验(Sims et al. (1980) Anal. Biochem, 107:60-63)、(iv)十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE),随后用碘化钡染色、以及(v)高效液相色谱法(HPLC)。

[0231] 通过反相色谱法(使用一种反相高效液相色谱法(RP-HPLC),使用一种适当的柱子(例如一种C18或C3柱子,在商业上可从诸如Amersham Biosciences或Vydac公司获得的)、或通过离子交换色谱法(使用一种离子交换柱,例如可以从Amersham Biosciences获得的Sephacrose™离子交换柱)进行位置同种型的分离。或可以使用方法以分离具有相同分子量的聚合物活性剂异构体(即位置同种型)。

[0232] 实质上不含蛋白质(即不具有胆碱酯酶活性)的组合物是优选的。另外,优选的组合物实质上不含所有其他的非共价键附着的水溶性聚合物。然而在一些情况下,该组合物可以含有一种聚合物-胆碱酯酶部分共轭物以及非共轭胆碱酯酶部分的混合物。

[0233] 任选地,本发明的组合物进一步包括一种药学上可接受的赋形剂。如果需要,可以将该药学上可接受的赋形剂加入到一种共轭物以形成一种组合物。

[0234] 示例性的赋形剂包括但不限于选自下组的那些,该组的组成为:碳水化合物、无机盐类、抗微生物剂、抗氧化剂类、表面活性剂类、缓冲剂类、酸类、碱类以及它们的组合。

[0235] 一种碳水化合物,如一种糖、一种衍生的糖(如糖醇、醛糖酸)、一种酯化的糖、和 / 或一种糖聚合物可以作为一种赋形剂存在。具体的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖类,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖以及类似物;二糖类,例如乳糖、蔗

糖、海藻糖、纤维二糖、以及类似物；多糖类，例如棉子糖、松三糖、麦芽糊精、葡聚糖、淀粉、以及类似物；以及糖醇类，例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇（葡糖醇）、吡喃山梨糖醇（pyranosyl sorbitol）、肌醇、以及类似物。

[0236] 该赋形剂还可以包括无机盐或缓冲液，例如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、以及它们的组合。

[0237] 该组合物还可以包括一种抗微生物剂用于防止或阻止微生物生长。适合于本发明的一个或多个实施方案的抗微生物剂的非限制性的例子包括氯化苄烷铵、苄索氯铵、苯甲醇、西吡氯铵、三氯叔丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞（thimersol）、以及它们的组合。

[0238] 在该组合物中还可以存在一种抗氧化剂。抗氧化剂类被用来防止氧化反应，由此防止该共轭物或该制剂的其他组分变坏。用于本发明的一个或多个实施方案的合适的抗氧化剂包括例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸钠、焦亚硫酸钠、以及它们的组合。

[0239] 一种表面活性剂可以作为一种赋形剂存在。示例性的表面活性剂包括：聚山梨醇酯类，例如“吐温 20”和“吐温 80”以及普卢兰尼克例如 F68 和 F88（两者都自 BASF、Mount Olive、New Jersey 可得）；山梨聚糖酯类；类脂，例如磷脂，例如卵磷脂以及其他磷脂酰胆碱，磷脂酰乙醇胺（虽然优选地不是脂质体形式），脂肪酸以及脂肪酸酯；类固醇，例如胆固醇；以及螯合剂，例如 EDTA、锌以及其他此类合适的阳离子。

[0240] 酸或碱在该组合物中可以作为一种赋形剂存在。可以在本发明中使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些酸，该组的组成为：盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、马来酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸、以及它们的组合。合适的碱的例子包括但不限于选自下组的碱，该组的组成为：氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、甲酸钾（potassium fumarate），以及它们的组合。

[0241] 在该组合物中的共轭物的量（即在活性剂与聚合物试剂之间形成的共轭物）将取决于多个因素而改变，但是当该组合物储存在一个单位剂量容器（即一个小瓶）中时它最佳地是一个治疗上有效的剂量。另外，可以将该药物制剂装在一个注射器中。治疗上有效的剂量可以通过重复地给予渐增量的共轭物进行实验性地确定以便确定哪一个量产生临床上所希望的终点。

[0242] 在组合物中任何单独的赋形剂的量都将取决于该赋形剂的活性以及该组合物的具体需要而改变。典型地，任何单独的赋形剂的最佳量都是通过常规实验来确定，即通过制备含有不同量的赋形剂（范围从低至高）的组合物、检查稳定性以及其他参数、并且然后确定获得最佳性能且没有显著不良作用时的范围。

[0243] 然而，总体上该赋形剂将在该组合物中以按重量计约 1% 至约 99%、优选按重量计从约 5% 至约 98%，更优选按重量计从约 15% 至约 95% 的赋形剂的量存在，其中浓度最优选是小于按重量计 30%。

[0244] 这些上述的药用赋形剂连同其他的赋形剂一起被说明于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”，19th ed., Williams & Williams, (1995), the “Physician’s Desk Reference”，52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 以及 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition,

AmericanPharmaceutical Association, Washington, D. C. ,2000。

[0245] 这些组合物涵盖所有类型的配制品并且尤其是那些适于注射的类型,例如可以将其连同液体复原(reconstituted)的粉剂或冻干物(lyophilate)。用于将固体组合物在注射之前进行复原的合适的稀释剂的实例包括抑菌性注射用水、在水中的5%的右旋糖、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水以及它们的组合。关于液体药用组合物,溶液以及悬浮液是预想的。

[0246] 本发明的一个或多个实施方案的这些组合物典型地是(虽然不是必需)通过注射给药并且因此总体上在立即给药之前是液体溶液或悬浮液。该药物制剂还可以采取其他的形式,如糖浆、乳剂、软膏、片剂、粉剂等等。还包括其他给药模式,例如肺部、直肠、经皮、经粘膜、口腔、鞘内、皮下、动脉内等等。

[0247] 本发明还提供了向患有病症(对用共轭物治疗有反应)的患者给予如在此提供的共轭物的方法。该方法包括总体上经注射向患者给予一个治疗有效量的共轭物(优选作为一种药物组合物的部分来提供)。如在先说明的,可以将这些共轭物注射(例如肌内地、皮下地、以及胃肠外地)。用于肠胃外给药的适当的配制品类型包括:准备好的注射液、用于在使用前与一种溶剂组合的干粉、准备好的注射悬浮液、用于在使用前与一种载体组合的干燥的不溶的组合物、以及除了别的以外用于在给药前稀释的乳剂和液体浓缩物。

[0248] 给药的方法可以用来治疗通过给予该共轭物可以得到治疗或防止的任何病症。本领域的普通技术人员理解一种具体的共轭物可以有效地治疗的那些病症。例如,这些共轭物可以单独使用或与其他药物疗法组合使用以治疗遭受暴露于有机磷酸酯的患者。有利的是,可以在另一个活化剂的给药之前、同时、或之后将该共轭物给予患者。

[0249] 待给予的实际剂量可以改变,这取决于受试者的年龄、重量以及总体病症,连同待处理的病症的严重程度,健康专家的判断、以及有待给予的共轭物。治疗有效的量对于本领域普通技术人员是已知的和/或说明于相关的文件和文献中。总体来说,一个治疗上有效的量的范围是从约0.001mg至100mg,优选它的剂量是从0.01mg/天至75mg/天,并且更优选它的剂量是从0.10mg/天至50mg/天。一种给定的剂量可以是定期给予直到例如有机磷中毒的症状减轻和/或被完全消除。

[0250] 任何给定的共轭物的单位计量(再次,优选地作为一种药物制剂的一部分来提供)可以按不同的给药方案来确定,这取决于临床医生的判断、患者的需要,等等。具体的剂量方案对于本领域普通技术人员是已知的或可以使用常规的方法在实验上进行确定。示例性的给药方案包括(不限于):每日给药一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次、以及其任何组合。一旦达到临床终点,则停止该组合物的给药。

[0251] 给予在此所说明的某些共轭物的一个优点在于:当一种水解地降解的连接被包含在胆碱酯酶部分的残基与水溶性聚合物之间时,单独的水溶性聚合物部分可以裂开。在由于该聚合物的大小从体内清除是潜在的一个问题时,这样的一种结果是有利的。最佳地,通过使用生理学上可裂开的和/或酶可降解的连接(如酰胺、碳酸酯或含有酯的连接)有利于每一水溶性聚合物部分的裂解。以这种方式,可以通过选择该聚合物的分子大小以及将提供所希望的清除性质的官能团的类型而调整该共轭物的清除率(通过单独的水溶性聚合物部分的裂解)。本领域的普通技术人员可以确定聚合物的适当的分子大小以及可裂开的官能团。例如,本领域的普通技术人员使用常规实验可以通过对具有不同聚合物重量和

可裂开的官能团的多种聚合物衍生物的第一次制备而确定一个适当的分子大小以及可裂开的官能团,然后,通过将该聚合物衍生物给予一位患者并且周期性进行血液和/或尿的取样来获得该清除率曲线(例如通过周期性血液或尿取样)。对于每种测试的共轭物,一旦得到了一系列的清除特征曲线,就可以鉴别出一种合适的共轭物。

[0252] 应当理解,虽然已经在优选的具体的实施方案中一起说明了本发明,上文说明连同下述的这些实例旨在展示而非限制本发明的范围。在本发明的范围内的其他方面、优点以及变更对于本发明所涉及的本领域的普通技术人员而言将是清楚的。

[0253] 在本文中引用的所有文章、书籍、专利、及其他的出版物通过引用将其全文结合在此。

[0254] 实验

[0255] 除非另外指明,本发明的实践中将采用有机合成、生物化学、蛋白质纯化、以及类似的常规技术,这些常规技术在本领域的技术范围之内。此类技术在文献中进行了充分地解释。例如参见 J. March, *Advanced organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), *supra*。

[0256] 在以下预示的例子中,关于使用的数字(例如量、温度等),已经作出努力以确保其准确,但仍应考虑到有某些实验误差和偏差。除非另外指明,温度是以摄氏度(°C)并且压强是在或接近大气压(在海平面)。以下各实例被认为对于进行在此说明的一个或多个实施方案的本领域中的一个普通技术人员是有指导性的。

[0257] 获得包括与氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 对应的胆碱酯酶部分(成熟蛋白质序列)的一种水溶液(“储备溶液”),以用于这些实例中。该储备溶液的浓度在 1mg/mL 与 100mg/mL 之间变化。

[0258] SDS-PAGE 分析

[0259] 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)使用 the Invitrogen NuPAGE 系统以及 Novex 3-8% Tris-乙酸盐预制凝胶(Invitrogen, Carlsbad, CA)分析样品。将样品制备、负载在该凝胶上并且如制造商的说明进行电泳。

[0260] 阴离子交换色谱法

[0261] 使用标准方法制备具有大约 100ml 柱床体积的 A Q-FFSephrose (GE Healthcare) 阴离子交换柱。将该柱子连接到一个 GE Healthcare (Chalfont St. Giles, 英国) AKTA 基本的或更高级别的系统以纯化制备的 PEG-rChE 共轭物。对于该纯化过程的细节说明如下。

[0262] RP-HPLC 分析

[0263] 在一个 Agilent (Santa Clara, CA) 1100HPLC 系统上进行反相色谱法(RP-HPLC)分析。使用一种 Agilent Zorbax 300SB-C8 (P/N863973-906, 4.6X 150mm, 3.5 μm 颗粒大小, 300A 孔径大小) 柱子对样品进行分析。该柱子的流率是 0.5ml/分钟, 该流动相是在水中(溶剂 A) 的 0.1% TFA 以及在乙腈(溶剂 B) 中的 0.1% TFA。

[0264] 实例 1A-1D

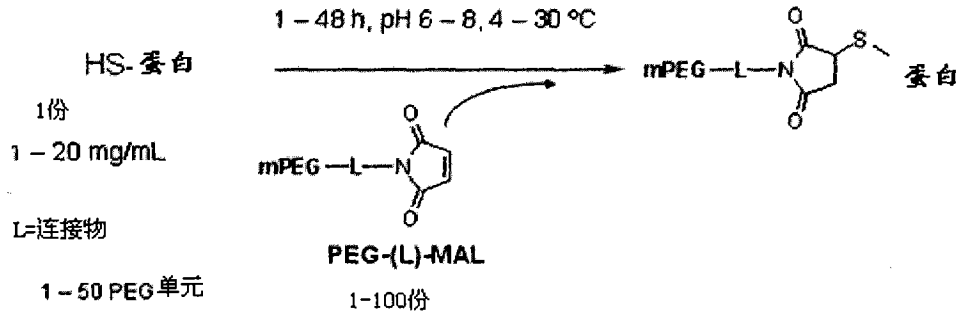
[0265] 通过半胱氨酸侧链的共轭

[0266] 如在先的陈述,一个胆碱酯酶部分通过含有巯基的半胱氨酸侧链的共轭理想地保留了现有的二硫键。关于成熟形式的丁酰胆碱酯酶,存在一个单一的半胱氨酸残基(Cys66),即一个非二硫键影响的半胱氨酸。Lockridge et al. (1987) *J. Biol.*

Chem. 262(27):12945-12952. Lockridge 等人还报道这种半胱氨酸不是通过烷化可修饰的,大概是因为这种半胱氨酸被“埋藏”在该蛋白质的二级和三级结构内的缘故。因此,在这个位置共轭的能力将是出乎意料的。

[0267] 使用以下略述的总体方法进行实例 1A 至 1D。

[0268]

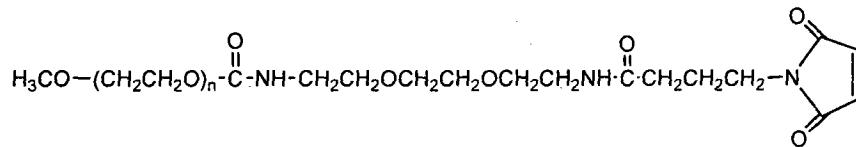


[0269] 该蛋白的重组形式作为一种具有两个相同的亚单位的同源二聚体而存在,该两个相同的亚单位由在每个亚单位的 Cys571 之间的单一二硫键连接。该方法说明了保持蛋白质为一种二聚体的条件下,通过每单体蛋白质单位添加一种试剂以实现一种相对高水平的聚乙二醇化的条件。以这种方式,将每一相同的亚单位实质上在 Cys66 位置而不是 Cys571 位置聚乙二醇化。

[0270] 实例 1A

[0271] 用带有一个马来酰亚胺基团的直链的 20kDa PEG 聚乙二醇化 rBChE

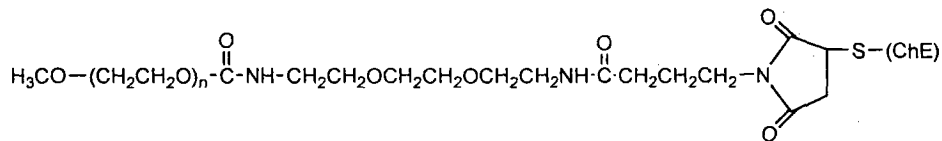
[0272]



[0273] 带有一个马来酰亚胺基团的 20kDa PEG

[0274] (n 限定为提供一种大约 20kDa PEG)

[0275]



[0276] 实例 1A 共轭物

[0277] (每一个 n 限定为提供一种大约 20kDa PEG)

[0278] 该丁酰胆碱酯酶蛋白储备溶液的起始浓度是 $\pm 90 \text{ mg/ml}$, 并且将该蛋白溶解在含有 10 mM NaPO_4 (pH 7.4)、 1 mM EDTA 、以及 35 mM NaCl 的缓冲液中。将 1 克蛋白 (11 mL 的上述储备溶液) 用 8.1 mL 的稀释缓冲液 (2 mM NaPO_4 , 1 mM EDTA (pH 7.4)) 稀释, 这样使得该最终的蛋白浓度是 $52-53 \text{ mg/mL}$ 。

[0279] 在搅拌该蛋白溶液的同时, 加入 0.74 mL 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (1 M tris , pH 8.2)。随后加入 0.238 mL 的三羟甲基氨基甲烷碱 (1 M Tris 碱)。所生成的溶液的 pH 是 8.30。

[0280] 在一个分离容器中将 PEG 试剂以一个等于 6 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG

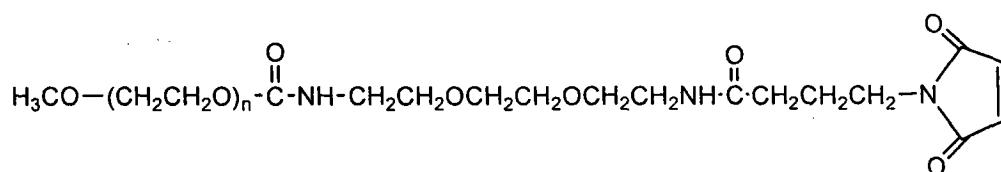
稀释缓冲液 (2mM NaPO₄, 1mM EDTA, pH 6.1) 中成为 16.7% (w/v) 的溶液。在搅拌该蛋白溶液的同时将该 PEG 试剂溶液加至该稀释的蛋白溶液。此后将这种混合物称为聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下搅拌该聚乙二醇化反应物六小时。

[0281] 在这一时间之后, 将 PEG 试剂以一个等于 4 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液中制成第二种 PEG 试剂溶液。在持续搅拌该聚乙二醇化反应物的同时, 将这种额外的 PEG 试剂溶液加至该聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下将该聚乙二醇化反应物搅拌额外的 6-18 小时。然后将该聚乙二醇化反应物储存在 4°C 下直到纯化聚乙二醇化产物为止 (但是通常在 48 小时内)。

[0282] 实例 1B

[0283] 用带有一个马来酰亚胺基团的一种直链的 30kDa PEG 对 rBChE 的聚乙二醇化

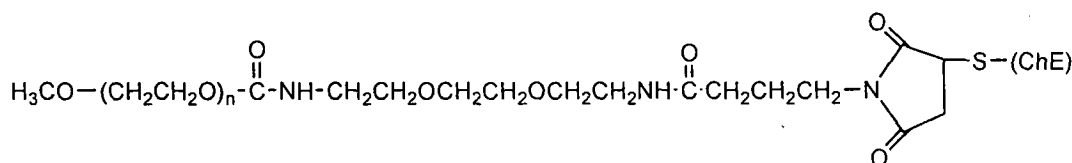
[0284]



[0285] 带有一个马来酰亚胺基团的 30kDa PEG

[0286] (n 限定为提供一种大约 30kDa PEG)

[0287]



[0288] 实例 1B 共轭物

[0289] (n 限定为提供一种大约 30kDa PEG)

[0290] 该丁酰胆碱酯酶蛋白储备溶液的起始浓度是 ±90mg/ml, 并且将该蛋白溶解在含有 10mM NaPO₄ (pH 7.4)、1mM EDTA、以及 35mM NaCl 的缓冲液中。将 1 克蛋白 (11mL 的上述储备溶液) 用 8.1mL 的稀释缓冲液 (2mM NaPO₄, 1mM EDTA (pH 7.4)) 稀释, 这样使得该最终的蛋白浓度是 52-53mg/mL。

[0291] 搅拌这种蛋白溶液的同时, 加入 0.74mL 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (1M tris, pH 8.2)。随后加入 0.238mL 的三羟甲基氨基甲烷碱 (1M Tris 碱)。所生成的溶液的 pH 是 8.30。

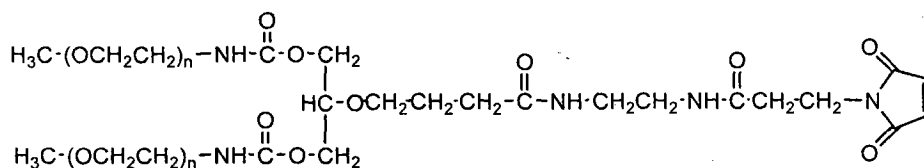
[0292] 在一个分离容器中将 PEG 试剂以一个等于 6 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液 (2mM NaPO₄, 1mM EDTA, pH 6.1) 中成为 16.7% (重量容量比) 的溶液。搅拌该蛋白溶液的同时将该 PEG 试剂溶液加至该稀释的蛋白溶液。此后将这种混合物称为聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下将该聚乙二醇化反应物搅拌六小时。

[0293] 在这一时间之后, 通过将 PEG 试剂以一个等于 4 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液中制成第二种 PEG 试剂溶液。在持续搅拌该聚乙二醇化反应物的同时, 将这种额外的 PEG 试剂溶液加至该聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下将该聚乙二醇化反应物搅拌额外的 6-18 小时。然后将该聚乙二醇化反应物储存在 4°C 下直到纯化聚乙二醇化产物为止 (但是通常在 48 小时之内)。

[0294] 实例 1C

[0295] 用带有一个马来酰亚胺基团的一种支链的 40kDa PEG 对 rBChE 的聚乙二醇化

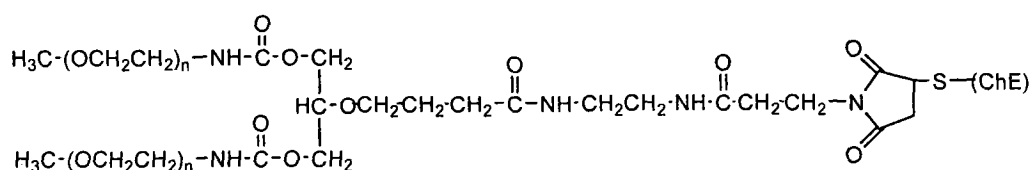
[0296]



[0297] 带有一个马来酰亚胺基团的支链的 40k Da PEG

[0298] (每一个 n 限定为提供一种大约 20kDa PEG)

[0299]



[0300] 实例 1C 共轭物

[0301] (每一个 n 限定为提供一种大约 20kDa PEG)

[0302] 该丁酰胆碱酯酶蛋白储备溶液的起始浓度是 $\pm 90\text{mg/ml}$, 并且将该蛋白溶解在含有 10mM NaPO_4 (pH 7.4)、 1mM EDTA 、以及 35mM NaCl 的缓冲液中。将 1 克蛋白 (11mL 的上述溶液) 用 8.1mL 的稀释缓冲液 (2mM NaPO_4 , 1mM EDTA (pH 7.4)) 稀释, 这样使得该最终的蛋白浓度是 $52\text{--}53\text{mg/mL}$ 。

[0303] 当搅拌这种蛋白溶液的同时, 加入 0.74mL 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (1M tris , pH 8.2)。随后加入 0.238mL 的三羟甲基氨基甲烷碱 (1M Tris 碱)。所生成的溶液的 pH 是 8.30。

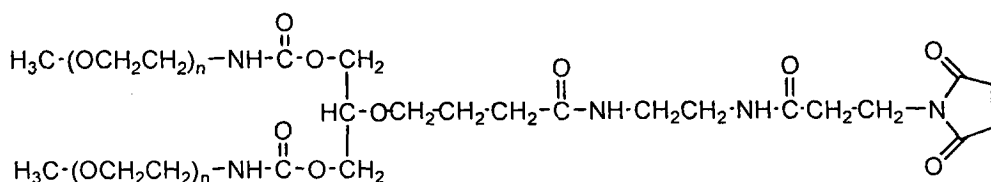
[0304] 在一个分离容器中将 PEG 试剂以一个等于 6 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液 (2mM NaPO_4 , 1mM EDTA , pH 6.1) 中成为 16.7% (w/v) 的溶液。当搅拌该蛋白溶液的同时将该 PEG 试剂溶液加至该稀释的蛋白溶液。此后将这种混合物称为聚乙二醇化反应物。允许在室温下 (22°C) 将该聚乙二醇化反应物搅拌 6 小时。

[0305] 在这一时间之后, 通过将 PEG 试剂以一个等于 4 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液中制成第二种 PEG 试剂溶液。在持续搅拌该聚乙二醇化反应物的同时, 将这种额外的 PEG 试剂溶液加至该聚乙二醇化反应物。允许在室温下将该聚乙二醇化反应物搅拌额外的 6-18 小时 (22°C)。然后将该聚乙二醇化反应物储存在 4°C 下直到纯化该聚乙二醇化产物为止 (但是通常在 48 小时之内)。

[0306] 实例 1D

[0307] 用带有一个马来酰亚胺基团的一种支链的 60kDa PEG 对 rBChE 的聚乙二醇化

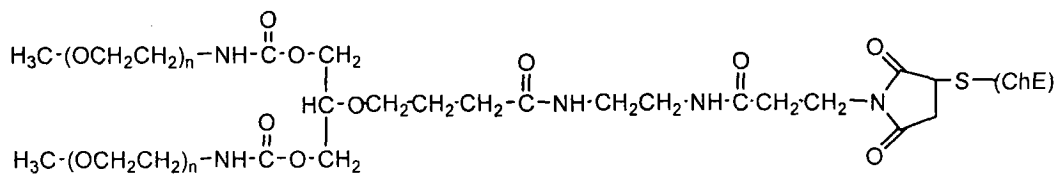
[0308]



[0309] 带有一个马来酰亚胺基团的支链的 60kDa PEG

[0310] (每一个 n 限定为提供一种大约 30kDa PEG)

[0311]



[0312] 实例 1D 共轭物

[0313] (每一个 n 限定为提供一种大约 30kDa PEG)

[0314] 该丁酰胆碱酯酶蛋白储备溶液的起始浓度是 $\pm 90\text{mg/ml}$, 并且将该蛋白溶解在含有 10mM NaPO_4 (pH 7.4)、 1mM EDTA 、以及 35mM NaCl 的缓冲液中。将 1 克蛋白 (11mL 的上述储备溶液) 用 8.1mL 的稀释缓冲液 (2mM NaPO_4 , 1mM EDTA (pH 7.4)) 稀释, 这样使得该最终的蛋白浓度是 $52\text{--}53\text{mg/mL}$ 。

[0315] 当搅拌这种蛋白溶液的同时, 加入 0.74mL 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (1M tris , pH 8.2)。随后加入 0.238mL 的三羟甲基氨基甲烷碱 (1M Tris 碱)。所生成的溶液的 pH 是 8.30。

[0316] 在一个分离容器中将 PEG 试剂以一个等于 6 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液 (2mM NaPO_4 , 1mM EDTA , pH 6.1) 中成为 16.7% (w/v) 的溶液。当搅拌该蛋白溶液的同时将该 PEG 试剂溶液加至该稀释的蛋白溶液。此后将这种混合物称为聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下将该聚乙二醇化反应物搅拌六小时。

[0317] 在这一时间之后, 通过将 PEG 试剂以一个等于 4 摩尔当量的该蛋白量的量溶解在 PEG 稀释缓冲液中制成第二种 PEG 试剂溶液。在持续搅拌该聚乙二醇化反应物的同时, 将这种额外的 PEG 试剂溶液加至该聚乙二醇化反应物。允许在室温 (22°C) 下将该聚乙二醇化反应物搅拌额外的 6-18 小时。然后将该聚乙二醇化反应物储存在 4°C 下直到纯化聚乙二醇化产物为止 (但是通常在 48 小时之内)。

[0318] 实例 2

[0319] 实现 65% -70% 聚乙二醇化产率的可替代的聚乙二醇化条件

[0320] 使用 mPEG-40k- 马来酰亚胺

[0321] 对于这种聚乙二醇化反应物的反应时间是六天, 在 10°C 下使用一个磁性的搅拌棒和板进行搅拌。

[0322] 在搅拌下以分批模式将 PEG 试剂加至一种储备溶液, 如以下表 4 所示每天加入干燥的 1 摩尔当量的 PEG 试剂。

[0323] 为了实现一个高水平的聚乙二醇化 (即关于单体, $> 65\%$ 聚乙二醇化), 保持蛋白质的浓度在最高的可能的水平。在这些条件下, 由于一种可逆的蛋白质聚集体的形成, 该反应混合物是“乳状的 / 混浊的”。然而, 如果加入了超过 PEG 的 1 摩尔当量 (没有聚乙二醇化反应物的最小限度稀释), 则聚集体太大 (凭经验确定) 并且降低了聚乙二醇化效率。因此, 在干燥 PEG 的加入之前, 用如以下表 4 所示的缓冲液将该聚乙二醇化反应物稀释。

[0324] 为了该 PEG 试剂的添加 (其中还添加了反应物稀释缓冲液), 还可以在添加该混合物至该聚乙二醇化反应物之前将该 PEG 试剂溶解在该缓冲液中。

[0325] 以 83mg/mL 的起始浓度将该蛋白溶解在缓冲液中, 该缓冲液含有: 10mM NaPO_4 (pH

7.3)、1mM EDTA、以及 35mM NaCl (反应物稀释缓冲液), 并且以下说明的聚乙二醇化的反应物量为 20 克的 rhBChE 蛋白在 241mL 的起始体积中。

[0326] 根据在表 4 中列出的说明在室温下加入缓冲液和 PEG 试剂。

[0327] 表 4

[0328] 添加说明

[0329]

天	加入的反应物稀释缓冲液 (mL)	添加的 PEG 试剂 (克)
0	0	10.35
1	160	10.35
2	160	10.35
3	160	10.35
4	160	10.35
5	0	10.35
6	通过储藏在 4°C 下使反应停止	-

[0330] 在这一反应之后, 如在实例 3 中的说明纯化该聚乙二醇化蛋白。

[0331] 实例 3

[0332] 二 - 聚乙二醇化二聚体的纯化

[0333] 在实例 1A-1D 和实例 2 中所说明的聚乙二醇化方法产生一种蛋白质溶液, 其中关于该蛋白质的单体形式, 有 65% 至 70% 的该蛋白被聚乙二醇化。将该蛋白还原成单体后, 通过 RP-HPLC 分析聚乙二醇化反应物。然而, 来自这种反应物的所希望的生物形式是二 - 聚乙二醇化二聚体, 并且这种聚乙二醇化反应物没有产生完全聚乙二醇化的二聚体。进一步加入 PEG 试剂可以轻微地增加聚乙二醇化的水平, 但是最后的聚乙二醇化的适度增加将被这种 PEG 试剂的成本增加抵消。反应混合物的分析显示出大约 50% 的这种反应混合物是处于单 - 聚乙二醇化二聚体的形式, 并且 45% 处于二 - 聚乙二醇化二聚体的形式。此外, 纯化后, 仅仅 30% 至 35% 的二 - 聚乙二醇化二聚体可以被回收。这种回收的水平太低而不能用于一种经济上可行的工艺。

[0334] 因此说明了一种方法, 其中可以将存在于单 - 聚乙二醇化二聚体部分中的该蛋白质的实质上所有的单 - 聚乙二醇化单体的形式回收并且转化成二 - 聚乙二醇化二聚体。这种方法能够使总工艺产率至少为 55% 至 60%。

[0335] 为了纯化 1 克聚乙二醇化反应物, 填充了一种 22mm 直径的阴离子交换柱 (Q-sepharose fast flow) (使用在本领域中的那些普通技术人员已知的方法), 这样使得柱床体积将产生一个 5mg/mL 的蛋白荷载。在色谱缓冲液 A (10mM NaPO₄ (pH 7.8)、1mM EDTA、5mM 半胱氨酸) 中平衡该柱子。

[0336] 通过加入聚乙二醇化反应物的 1 体积的还原缓冲液 (10mM NaPO₄ (pH 7.8)、1mM

EDTA、20mM 半胱氨酸) 并且在室温中孵育一小时, 将在聚乙二醇化反应物中的蛋白质还原成单体形式。

[0337] 其后, 加入聚乙二醇化反应物的 7 体积的色谱缓冲液 A 和聚乙二醇化反应物的 1 体积的水, 生成一种 10 倍稀释的最初的聚乙二醇化反应物。

[0338] 对一种适当的色谱仪进行程序设计, 以便将全部稀释的聚乙二醇化反应物加载于该柱子上并且用两个柱床体积的色谱缓冲液 A 将任何未结合的蛋白洗出。其后, 使用若干梯度步骤来洗脱 BChE 的聚乙二醇化单体。

[0339] 梯度步骤 1 是一种超过 2.5 柱床体积的色谱缓冲液 B (相当于缓冲液 A 但还含有 0.5M NaCl) 的从 0 至 25% 的连续梯度。收集这些部分。

[0340] 梯度步骤 2 是一个 2.5 柱床体积的 25% 缓冲液 B 的保持步骤。收集这些部分。

[0341] 梯度步骤 3 是一个到 100% B 的直接步骤, 随后为一个 2 柱床体积的 100% 缓冲液 B (梯度步骤 4) 的保持步骤。收集这些部分。

[0342] 在梯度步骤 1 与 2 的过程中, 经一个宽峰将单 - 聚乙二醇化单体进行洗脱。在梯度步骤 4 的过程中洗脱出非 - 聚乙二醇化单体。

[0343] 使用标准方法使该柱子再生。

[0344] 将适当的部分汇集并且使用正切流动过滤 (TFF) 和如该过滤装置的制造商所说明的标准方法进行缓冲液的更换 / 浓缩。

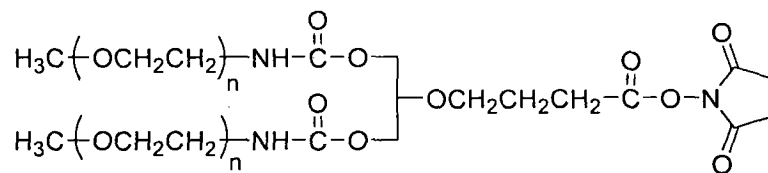
[0345] 通过 TFF 使这种单 - 聚乙二醇化单体溶液浓缩至 25mg/mL 的蛋白浓度, 并且应用 TFF 缓冲液 (10mM NaPO₄ (pH 7.5)、1mM EDTA、35mM NaCl) 的七倍缓冲液体积变化。使用一种 0.22 μm 的过滤装置将这种溶液过滤消毒。

[0346] 在这一点上, 已经从该蛋白质溶液除去 (通过 TFF 工艺) 用于还原该蛋白质为单体的半胱氨酸并且在室温下孵育 48 小时, 随后保存在 4°C 下允许该蛋白质的二聚体形式再生。因此最终产物是该蛋白质的二 - 聚乙二醇化二聚体形式。

[0347] 实例 4

[0348] 用支链 mPEG-N 羟基琥珀酰亚胺衍生物 (40kDa) 聚乙二醇化 rChE

[0349]



[0350] 将聚乙二醇化反应物设计成这样使得在添加所有反应组分与缓冲剂以后, 最终的 rChE 浓度是 2.5mg/ml。将在氩下在 -20°C 下保存的 PEG2-NHS (40kDa) 加温至环境温度。以一个等于 10-50 摩尔当量的有待聚乙二醇化的 rChE 的量称出 PEG 试剂, 并且溶解在 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 和 1mM EDTA 中从而形成一种 12% 的试剂溶液。将该 12% PEG 试剂溶液快速加至储备 rChE 溶液的等分部分, 并且在室温下搅拌 3 至 18 小时以允许 mPEG2-NHS 与 rChE 通过一种酰胺键结合, 从而生成一种共轭物溶液。用一种赖氨酸溶液 (pH 7.5) 使该共轭物溶液骤冷这样使得最终的赖氨酸的摩尔浓度是该 PEG 试剂的摩尔浓度的 10 至 100 倍。

[0351] 发现 mPEG-2NHS 提供了一种相对大分子体积的活性 N 羟基琥珀酰亚胺 (“NHS”)

酯,它选择性地与赖氨酸以及末端胺反应。

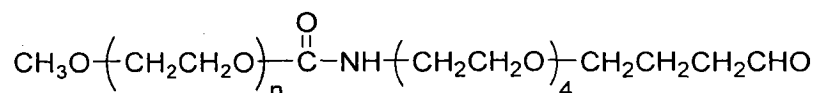
[0352] 使用这种相同的方法,使用具有其他重均分子量的 mPEG2-NHS 制备了其他的共轭物。

[0353] 实质上依照在这一实例中列出的步骤制备了使用 PEG2NHS (40kDa) 的共轭物,其中在三个分离的企图中使用了 10、25、以及 50 摩尔当量的 PEG2NHS (40kDa)。生成的共轭物溶液的 SDS PAGE 分析提供于图 1 中。

[0354] 实例 5

[0355] 用直链的 mPEG- 丁醛衍生物 (30kDa) 聚乙二醇化 rChE

[0356]



[0357] 直链的 mPEG- 丁醛衍生物 (30kDa) (“mPEG-ButyrALD”)

[0358] 将聚乙二醇化反应物设计成这样使得在加入所有反应组分与缓冲剂以后,最终的 rChE 浓度是 2.5mg/ml。将在氩下在 -20℃ 下保存的 PEG2-ButyrALD (30kDa) 加温至环境温度。以一个等于 10-50 摩尔当量的有待聚乙二醇化的 rChE 的量称出 PEG 试剂,并且溶解在 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 和 1mM EDTA 中从而形成一种 12% 的试剂溶液。将该 12% PEG 试剂溶液加至储备 rChE 溶液的等分部分并且搅拌 15 至 30 分钟。然后将一种还原剂氰基硼氢化钠 (NaCNBH₃) 以相对于该 PEG 试剂的 10 至 100 摩尔过量加入,并且在室温下搅拌该反应物 5 至 18 小时以确保通过一种仲胺连接的结合,由此形成一种共轭物溶液。

[0359] 发现了 mPEG ButyrALD 的醛基与 rChE 相关的伯胺反应,并且通过一种还原剂如氰基硼氢化钠的还原,通过仲胺共价地键合至它们。

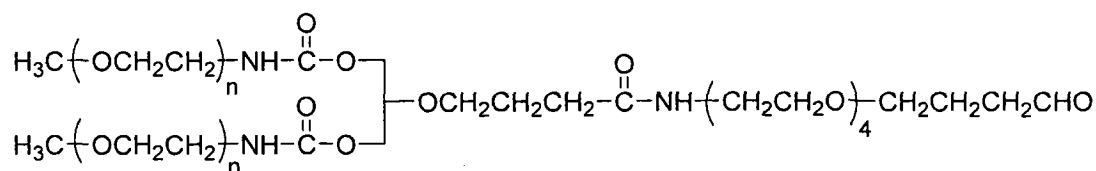
[0360] 使用这种相同的方法,使用具有其他重均分子量的 mPEG2-BuryrALD 制备了其他的共轭物。

[0361] 实质上依照在这一实例中列出的步骤制备了使用 mPEG-ButyrALD (30kDa) 的共轭物,其中在三个分离的企图中使用了 10、25、以及 50 摩尔当量的 mPEG-ButyrALD (30kDa)。生成的共轭物溶液的 SDS PAGE 分析提供于图 1 中。

[0362] 实例 6

[0363] 用支链 mPEG- 丁醛衍生物 (40kDa) 聚乙二醇化 rChE

[0364]



[0365] 支链 mPEG- 丁醛衍生物 (40kDa) (“mPEG2-ButyrALD”)

[0366] 将聚乙二醇化反应物设计成这样使得在添加所有反应组分与缓冲剂以后,最终的 rChE 浓度是 2.5mg/ml。将在氩下在 -20℃ 下保存的 mPEG2-ButyrALD (40kDa) 加温至环境温度。以一个等于 10-50 摩尔当量的有待聚乙二醇化的 rChE 的量称出 PEG 试剂,并且溶解在 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 和 1mM EDTA 中从而形成一种 12% 的试剂溶液。将该 12% PEG 试剂溶液加至储备 rChE 溶液的等分部分并且搅拌 15 至 30 分钟。然后将一种还原剂氰

基硼氢化钠 (NaCNBH₃) 以相对于该 PEG 试剂的 10 至 100 摩尔过量加入, 并且在室温下搅拌该反应物 5 至 18 小时以确保通过一种仲胺连接的结合, 由此形成一种共轭物溶液。

[0367] 发现了 mPEG2-ButyrALD 的醛基与 rChE 相关的伯胺反应, 并且通过一种还原剂如氰基硼氢化钠的还原, 通过仲胺共价地键合至它们。

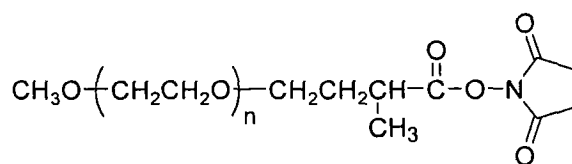
[0368] 使用这种相同的方法, 使用具有其他重均分子量的 mPEG2-ButyrALD 制备了其他的共轭物。

[0369] 实质上依照在这一实例中列出的步骤制备了使用 mPEG2-ButyrALD (40kDa) 的共轭物, 其中在三个分离的企图中使用了 10、25、以及 50 摩尔当量的 mPEG2-ButyrALD (40kDa)。生成的共轭物溶液的 SDS PAGE 分析提供于图 1 中。

[0370] 实例 7

[0371] 用直链的 mPEG-琥珀酰亚胺基 α-甲基丁酸酯衍生物 (30kDa) 聚乙二醇化 rChE

[0372]



[0373] 直链的 mPEG-琥珀酰亚胺基 α-甲基丁醇酯衍生物 (30kDa) (“mPEG-SMB”)

[0374] 将聚乙二醇化反应物设计成这样使得在加入所有反应组分与缓冲剂以后, 最终的 rChE 浓度是 2.5mg/ml。将在氩下在 -20°C 下保存的 PEG2-SMB (30kDa) 加温至环境温度。以一个等于 10-50 摩尔当量的有待聚乙二醇化的 rChE 的量称出 PEG 试剂, 并且溶解在 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 和 1mM EDTA 中从而形成一种 12% 的试剂溶液。将该 12% PEG 试剂溶液加至储备 rChE 溶液的等分部分并且在室温下搅拌 5 至 18 小时, 由此产生一种共轭物溶液。用一种赖氨酸溶液 (pH 7.5) 使该共轭物溶液骤冷这样使得最终的赖氨酸摩尔浓度是该 PEG 试剂摩尔浓度的 10 至 100 倍。

[0375] 发现了 mPEG-SMB 衍生物提供了一种空间位阻的活性 NHS 酯, 它选择性地与赖氨酸以及末端胺反应。

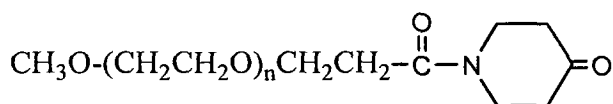
[0376] 使用这种相同的方法, 使用具有其他重均分子量的 mPEG2-SMB 制备了其他的共轭物。

[0377] 实例 8

[0378] 用 mPEG-PIP (20kDa) 聚乙二醇化 rChE

[0379] 该聚合物试剂的基本结构提供如下:

[0380]



[0381] $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$ 含水的形式

[0382] 将聚乙二醇化反应物设计成这样使得在加入所有反应组分与缓冲剂以后, 最终的 rChE 浓度是 2.5mg/ml。将在氩下在 -20°C 下保存的 PEG2-PIP (20kDa) 加温至环境温度。以一个等于 10-50 摩尔当量的有待聚乙二醇化的 rChE 的量称出 PEG 试剂, 并且溶解在 20mM

磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 和 1mM EDTA 中从而形成一种 12% 的试剂溶液。将该 12% PEG 试剂溶液加至储备 rChE 溶液的等分部分并且搅拌 15 至 30 分钟。然后将一种还原剂氰基硼氢化钠 (NaCNBH₃) 以相对于该 PEG 试剂的 10 至 100 摩尔过量加入, 并且在室温下搅拌该反应物 5 至 18 小时以确保通过一种仲胺连接的结合 (至仲碳原子), 由此形成一种共轭物溶液。用一种赖氨酸溶液 (pH 7.5) 使该共轭物溶液骤冷这样使得最终的赖氨酸摩尔浓度是该 PEG 试剂摩尔浓度的 10 至 100 倍。

[0383] 发现 mPEG-PIP 的酮基与 rChE 相关的伯胺反应, 并且通过一种还原剂如氰基硼氢化钠的还原, 通过仲胺共价地键合至它们。

[0384] 使用这种相同的方法, 使用具有其他重均分子量的 mPEG-PIP 制备了其他的共轭物。

[0385] 实例 9

[0386] 示例性的 (rChE)-PEG 共轭物的活性

[0387] 确定了在上述实例中说明的 (rChE)-PEG 共轭物的活性。所有这些 rChE 共轭物被认为是药理学活性的。

[0388] <110>NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

[0389] Bossard, Mary J

[0390] Zappe, Harold

[0391] Lee, Seo ju

[0392] Fernando, Lal A. R.

[0393] <120>胆碱酯酶部分与聚合物的共轭物

[0394] <130>SHE0169. PCT

[0395] <140> 仍未指定

[0396] <141>2009-05-15

[0397] <150>US 61/127, 928

[0398] <151>2008-05-16

[0399] <160>2

[0400] <170>PatentIn 版本 3.4

[0401] <210>1

[0402] <211>602

[0403] <212>PRT

[0404] <213> 未知

[0405] <220>

[0406] <223> 未知起源

[0407] <400>1

[0408] Met His Ser Lys Val Thr Ile Ile Cys Ile Arg Phe Leu Phe Trp Phe

[0409] 1 5 10 15

[0410] Leu Leu Leu Cys Met Leu Ile Gly Lys Ser His Thr Glu Asp Asp Ile

[0411] 20 25 30

[0412] Ile Ile Ala Thr Lys Asn Gly Lys Val Arg Gly Met Asn Leu Thr Val

[0413]	35	40	45	
[0414]	Phe Gly Gly Thr Val Thr Ala Phe Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Gln Pro			
[0415]	50	55	60	
[0416]	Pro Leu Gly Arg Leu Arg Phe Lys Lys Pro Gln Ser Leu Thr Lys Trp			
[0417]	65	70	75	80
[0418]	Ser Asp Ile Trp Asn Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Ser Cys Cys Gln Asn			
[0419]	85	90	95	
[0420]	Ile Asp Gln Ser Phe Pro Gly Phe His Gly Ser Glu Met Trp Asn Pro			
[0421]	100	105	110	
[0422]	Asn Thr Asp Leu Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Val Trp Ile Pro			
[0423]	115	120	125	
[0424]	Ala Pro Lys Pro Lys Asn Ala Thr Val Leu Ile Trp Ile Tyr Gly Gly			
[0425]	130	135	140	
[0426]	Gly Phe Gln Thr Gly Thr Ser Ser Leu His Val Tyr Asp Gly Lys Phe			
[0427]	145	150	155	160
[0428]	Leu Ala Arg Val Glu Arg Val Ile Val Val Ser Met Asn Tyr Arg Val			
[0429]	165	170	175	
[0430]	Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ala Leu Pro Gly Asn Pro Glu Ala Pro Gly			
[0431]	180	185	190	
[0432]	Asn Met Gly Leu Phe Asp Gln Gln Leu Ala Leu Gln Trp Val Gln Lys			
[0433]	195	200	205	
[0434]	Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asn Pro Lys Ser Val Thr Leu Phe Gly			
[0435]	210	215	220	
[0436]	Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val Ser Leu His Leu Leu Ser Pro Gly			
[0437]	225	230	235	240
[0438]	Ser His Ser Leu Phe Thr Arg Ala Ile Leu Gln Ser Gly Ser Phe Asn			
[0439]	245	250	255	
[0440]	Ala Pro Trp Ala Val Thr Ser Leu Tyr Glu Ala Arg Asn Arg Thr Leu			
[0441]	260	265	270	
[0442]	Asn Leu Ala Lys Leu Thr Gly Cys Ser Arg Glu Asn Glu Thr Glu Ile			
[0443]	275	280	285	
[0444]	Ile Lys Cys Leu Arg Asn Lys Asp Pro Gln Glu Ile Leu Leu Asn Glu			
[0445]	290	295	300	
[0446]	Ala Phe Val Val Pro Tyr Gly Thr Pro Leu Ser Val Asn Phe Gly Pro			
[0447]	305	310	315	320
[0448]	Thr Val Asp Gly Asp Phe Leu Thr Asp Met Pro Asp Ile Leu Leu Glu			
[0449]	325	330	335	
[0450]	Leu Gly Gln Phe Lys Lys Thr Gln Ile Leu Val Gly Val Asn Lys Asp			
[0451]	340	345	350	

[0452] Glu Gly Thr Ala Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp
 [0453] 355 360 365
 [0454] Asn Asn Ser Ile Ile Thr Arg Lys Glu Phe Gln Glu Gly Leu Lys Ile
 [0455] 370 375 380
 [0456] Phe Phe Pro Gly Val Ser Glu Phe Gly Lys Glu Ser Ile Leu Phe His
 [0457] 385 390 395 400
 [0458] Tyr Thr Asp Trp Val Asp Asp Gln Arg Pro Glu Asn Tyr Arg Glu Ala
 [0459] 405 410 415
 [0460] Leu Gly Asp Val Val Gly Asp Tyr Asn Phe Ile Cys Pro Ala Leu Glu
 [0461] 420 425 430
 [0462] Phe Thr Lys Lys Phe Ser Glu Trp Gly Asn Asn Ala Phe Phe Tyr Tyr
 [0463] 435 440 445
 [0464] Phe Glu His Arg Ser Ser Lys Leu Pro Trp Pro Glu Trp Met Gly Val
 [0465] 450 455 460
 [0466] Met His Gly Tyr Glu Ile Glu Phe Val Phe Gly Leu Pro Leu Glu Arg
 [0467] 465 470 475 480
 [0468] Arg Asp Asn Tyr Thr Lys Ala Glu Glu Ile Leu Ser Arg Ser Ile Val
 [0469] 485 490 495
 [0470] Lys Arg Trp Ala Asn Phe Ala Lys Tyr Gly Asn Pro Asn Glu Thr Gln
 [0471] 500 505 510
 [0472] Asn Asn Ser Thr Ser Trp Pro Val Phe Lys Ser Thr Glu Gln Lys Tyr
 [0473] 515 520 525
 [0474] Leu Thr Leu Asn Thr Glu Ser Thr Arg Ile Met Thr Lys Leu Arg Ala
 [0475] 530 535 540
 [0476] Gln Gln Cys Arg Phe Trp Thr Ser Phe Phe Pro Lys Val Leu Glu Met
 [0477] 545 550 555 560
 [0478] Thr Gly Asn Ile Asp Glu Ala Glu Trp Glu Trp Lys Ala Gly Phe His
 [0479] 565 570 575
 [0480] Arg Trp Asn Asn Tyr Met Met Asp Trp Lys Asn Gln Phe Asn Asp Tyr
 [0481] 580 585 590
 [0482] Thr Ser Lys Lys Glu Ser Cys Val Gly Leu
 [0483] 595 600
 [0484] <210>2
 [0485] <211>574
 [0486] <212>PRT
 [0487] <213>未知
 [0488] <220>
 [0489] <223>未知起源
 [0490] <400>2

[0491] Glu Asp Asp Ile Ile Ile Ala Thr Lys Asn Gly Lys Val Arg Gly Met
 [0492] 1 5 10 15
 [0493] Asn Leu Thr Val Phe Gly Gly Thr Val Thr Ala Phe Leu Gly Ile Pro
 [0494] 20 25 30
 [0495] Tyr Ala Gln Pro Pro Leu Gly Arg Leu Arg Phe Lys Lys Pro Gln Ser
 [0496] 35 40 45
 [0497] Leu Thr Lys Trp Ser Asp Ile Trp Asn Ala Thr Lys Tyr Ala Asn Ser
 [0498] 50 55 60
 [0499] Cys Cys Gln Asn Ile Asp Gln Ser Phe Pro Gly Phe His Gly Ser Glu
 [0500] 65 70 75 80
 [0501] Met Trp Asn Pro Asn Thr Asp Leu Ser Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn
 [0502] 85 90 95
 [0503] Val Trp Ile Pro Ala Pro Lys Pro Lys Asn Ala Thr Val Leu Ile Trp
 [0504] 100 105 110
 [0505] Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Gln Thr Gly Thr Ser Ser Leu His Val Tyr
 [0506] 115 120 125
 [0507] Asp Gly Lys Phe Leu Ala Arg Val Glu Arg Val Ile Val Val Ser Met
 [0508] 130 135 140
 [0509] Asn Tyr Arg Val Gly Ala Leu Gly Phe Leu Ala Leu Pro Gly Asn Pro
 [0510] 145 150 155 160
 [0511] Glu Ala Pro Gly Asn Met Gly Leu Phe Asp Gln Gln Leu Ala Leu Gln
 [0512] 165 170 175
 [0513] Trp Val Gln Lys Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asn Pro Lys Ser Val
 [0514] 180 185 190
 [0515] Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val Ser Leu His Leu
 [0516] 195 200 205
 [0517] Leu Ser Pro Gly Ser His Ser Leu Phe Thr Arg Ala Ile Leu Gln Ser
 [0518] 210 215 220
 [0519] Gly Ser Phe Asn Ala Pro Trp Ala Val Thr Ser Leu Tyr Glu Ala Arg
 [0520] 225 230 235 240
 [0521] Asn Arg Thr Leu Asn Leu Ala Lys Leu Thr Gly Cys Ser Arg Glu Asn
 [0522] 245 250 255
 [0523] Glu Thr Glu Ile Ile Lys Cys Leu Arg Asn Lys Asp Pro Gln Glu Ile
 [0524] 260 265 270
 [0525] Leu Leu Asn Glu Ala Phe Val Val Pro Tyr Gly Thr Pro Leu Ser Val
 [0526] 275 280 285
 [0527] Asn Phe Gly Pro Thr Val Asp Gly Asp Phe Leu Thr Asp Met Pro Asp
 [0528] 290 295 300
 [0529] Ile Leu Leu Glu Leu Gly Gln Phe Lys Lys Thr Gln Ile Leu Val Gly

[0530]	305	310	315	320
[0531]	Val Asn Lys Asp Glu Gly Thr Ala Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly			
[0532]		325	330	335
[0533]	Phe Ser Lys Asp Asn Asn Ser Ile Ile Thr Arg Lys Glu Phe Gln Glu			
[0534]		340	345	350
[0535]	Gly Leu Lys Ile Phe Phe Pro Gly Val Ser Glu Phe Gly Lys Glu Ser			
[0536]		355	360	365
[0537]	Ile Leu Phe His Tyr Thr Asp Trp Val Asp Asp Gln Arg Pro Glu Asn			
[0538]		370	375	380
[0539]	Tyr Arg Glu Ala Leu Gly Asp Val Val Gly Asp Tyr Asn Phe Ile Cys			
[0540]	385	390	395	400
[0541]	Pro Ala Leu Glu Phe Thr Lys Lys Phe Ser Glu Trp Gly Asn Asn Ala			
[0542]		405	410	415
[0543]	Phe Phe Tyr Tyr Phe Glu His Arg Ser Ser Lys Leu Pro Trp Pro Glu			
[0544]		420	425	430
[0545]	Trp Met Gly Val Met His Gly Tyr Glu Ile Glu Phe Val Phe Gly Leu			
[0546]		435	440	445
[0547]	Pro Leu Glu Arg Arg Asp Asn Tyr Thr Lys Ala Glu Glu Ile Leu Ser			
[0548]		450	455	460
[0549]	Arg Ser Ile Val Lys Arg Trp Ala Asn Phe Ala Lys Tyr Gly Asn Pro			
[0550]	465	470	475	480
[0551]	Asn Glu Thr Gln Asn Asn Ser Thr Ser Trp Pro Val Phe Lys Ser Thr			
[0552]		485	490	495
[0553]	Glu Gln Lys Tyr Leu Thr Leu Asn Thr Glu Ser Thr Arg Ile Met Thr			
[0554]		500	505	510
[0555]	Lys Leu Arg Ala Gln Gln Cys Arg Phe Trp Thr Ser Phe Phe Pro Lys			
[0556]		515	520	525
[0557]	Val Leu Glu Met Thr Gly Asn Ile Asp Glu Ala Glu Trp Glu Trp Lys			
[0558]		530	535	540
[0559]	Ala Gly Phe His Arg Trp Asn Asn Tyr Met Met Asp Trp Lys Asn Gln			
[0560]	545	550	555	560
[0561]	Phe Asn Asp Tyr Thr Ser Lys Lys Glu Ser Cys Val Gly Leu			
[0562]		565	570	

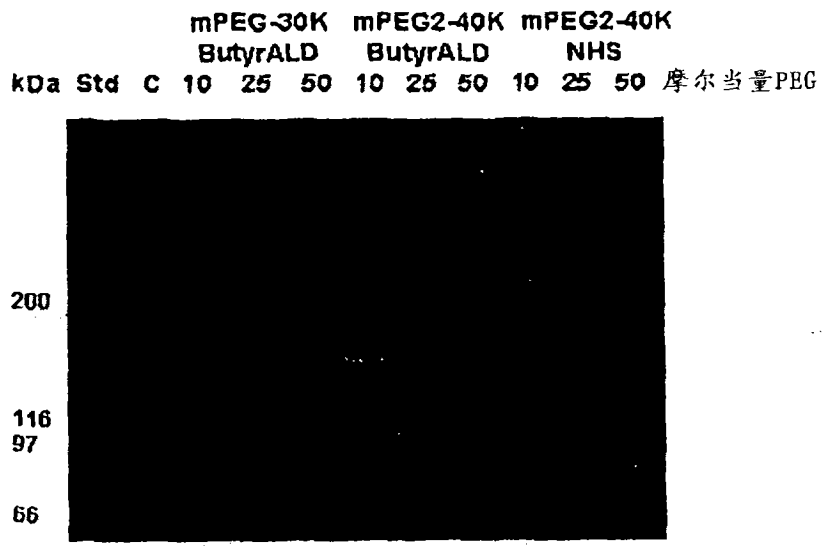


图 1