(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 38/28

(11) 공개번호 10-2004-0004692
(43) 공개일자 2004년01월13일

(21) 출원번호 10-2003-7015910
(22) 출원일자 2003년12월04일
번역문 제출일자 2003년12월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/017574
(87) 국제공개번호 WO 2002/98232
(86) 국제출원출원일자 2002년06월04일
(87) 국제공개일자 2002년12월12일

(30) 우선권주장 09/873,899 2001년06월04일 미국(US)

(71) 출원인 노벡스 코포레이션
미국 노쓰 캐롤라이나 27709-3940 리서치 트라이앵글 파크 피.오.박스 13940

(72) 발명자 익크유리브녹키리엔.
미국노쓰캐롤라이나27511캐리콜츠게이트드라이브216

프라이스크리스토퍼에이치.
미국노쓰캐롤라이나27516채플힐커먼스웨이200

안사리아슬람엠.
미국매릴랜드20852록빌빌리지스퀘어테라스12408아파트먼트101

오덴보우에이미엘.
미국노쓰캐롤라이나27560모리스빌퀘일하이불러바드4023

라드하크리쉬난발라싱암
미국노쓰캐롤라이나27514채플힐팀버할로우코트104아파트먼트338

(74) 대리인 이영필

심사청구 : 없음

(54) 폴리알킬렌 글리콜을 포함하는 인슐린 약물-올리고머접합체의 혼합물, 그 용도, 및 그 제조방법

요약

혼합물의 각각의 접합체가 폴리알킬렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체 혼합물을 개시한다. 상기 혼합물은 유사한 접합체의 다분산된 혼합물보다 더 큰 in vivo 활성을 나타낼 수 있다. 상기 혼합물은 또한 유사한 접합체의 다분산된 혼합물보다 장 소화의 in vitro 모델에서 활성을 유지하는데 더 효과적일 수 있다. 상기 혼합물은 또한 유사한 접합체의 다분산된 혼합물보다 개체간 변이성이 더 작을 수 있다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 약물-올리고머 접합체, 그리고 보다 구체적으로는 인슐린 약물-올리고머 접합체에 관한 것이다.

배경기술

탄수화물 대사 질환인 당뇨병은 아주 오래 전부터 알고 있는 질환이었다. 당뇨병은 인슐린의 불충분한 생산 및 인슐린에 대한 감도의 저하에서 기인한다. 인슐린 분자는 디설파이드 결합으로 연결된 두 개의 아미노산 체인으로 구성된다(mw 6,000). 췌장의 섬의 β-세포는 프로인슐린으로 알려져 있는 단일 체인의 인슐린 전구체를 분비한다. 프로인슐린의 단백질 분해로 4개의 염기성 아미노산(프로인슐린에서의 번호 31, 32, 64, 및 65: 각각 Arg, Arg, Lys, Arg)과 연결('C') 폴리펩티드가 제거된다. 그리하여 생성된 두 개 체인의 인슐린 분자에서, 체인 A는 아미노 말단에 글리신을 가지며, 체인 B는 아미노 말단에 페닐알라닌을 갖는다.

인슐린은 모노머, 다이머, 또는 다이머 세 개로 형성된 헥사머로서 존재할 수 있다. 헥사머는 두 개의 Zn^{2+} 와 함께 배위된다. 생물학적 활성은 모노머에 존재한다. 최근까지 소와 돼지의 인슐린이 인간의 당뇨병 치료에 전적으로 사용되었지만, 종간의 인슐린에는 수많은 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 돼지 인슐린이 인간 인슐린과 가장 유사하며, B-체인 C-말단에 쓰레오닌 잔기 대신 알라닌을 갖는다는 점에서만 차이가 있다. 이러한 차이에도 불구하고, 대부분의 포유류 인슐린은 필적할 만한 특이적 활성을 갖는다. 최근까지만 해도, 질병의 치료에 사용되는 모든 인슐린을 동물의 추출물로부터 얻었다. 재조합 기술의 출현으로 상업적 규모의 인간 인슐린(예: Humulin ™ 인슐린, Eli Lilly 및 Indianapolis, IN사 판매) 제조가 가능해졌다.

인슐린은 신체의 대부분의 세포에서 글루코오스을 정상적으로 이용하는데 필수적인다. 당뇨병을 앓고 있는 사람에서는, 글루코오스를 이용하는 정상적인 능력이 억제되고, 그리하여 혈당 수치가 증가한다(고혈당증). 글루코오스가 혈중에 쌓이게 되면, 과량의 당이 소변으로 배설된다(당뇨). 당뇨병의 다른 증상으로는 뇨량 및 뇨 빈도의 증가, 구갈, 소양증, 배고픔, 체중감소, 및 쇠약 증세가 있다.

당뇨병에는 두 가지 종류가 있다. Ⅰ형은 인슐린-의존성 당뇨병, 또는 IDDM 이다. IDDM은 이전에는 유년 발병형 당뇨병이라고 불렸다. IDDM에서는, 인슐린이 췌장으로부터 분비되지 않아서, 외부 공급원으로부터 제공되어야 한다. Ⅱ형 성인 발병형 당뇨병은 일부 진행된 경우에서는 인슐린 투여가 요구된다고 하더라도 식이에 의해 정상적으로 조절될 수 있다.

1920년대 인슐린이 분리되기 이전에, 대부분의 환자들은 발병 후 얼마되지 않아 사망하였다. 당뇨병을 치료하지 않으면, 지방 분해 산물인 케톤이 축적되는 케톤증이 유발되며; 그 이후에는 오심과 구토를 일으키는 산증(acidosis)이 나타나게 된다. 비정상적인 탄수화물 및 지방의 대사의 독성 산물이 계속해서 증가하기 때문에, 환자는 당뇨병성 혼수에 빠지게 된다.

당뇨병의 치료는 전형적으로 규칙적인 인슐린 주사를 필요로 한다. 당뇨병 치료에 인슐린을 사용한 것은 Banting 등('Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus,' Can. Med. Assoc. J. , **12** : 141-146(1992))이 췌장의 활성 추출물이 당뇨병을 앓고 있는 개에게 치료학적 효과를 갖는다는 것을 보여주었던 1922년으로 거슬러 올라간다. 같은 해에 췌장 추출물로 당뇨병 환자를 치료한 결과 매우 놀라운, 생명을 구하는 임상적 향상이 있었다. 인슐린 주사의 불편함 때문에, 인슐린 투여와 생물 동화작용(소화흡수)를 향상시키기 위한 막대한 노력을 기울여 왔다.

경구투여로 인슐린을 전달하기 위한 시도가 있어 왔다. 당뇨 환자에서 정상 혈당을 이루기 위해 인슐린을 경구로 투여하는 것의 문제점은 약제학 및 의학 서적에 잘 나와 있다. 위장관계의 소화 효소는 인슐린을 급속히 분해하여, 생물학적으로 활성이 없는 분해산물로 만든다. 예를 들어, 위에서는 경구투여된 인슐린이 효소에 의한 단백질 분해와 산성 분해를 겪게 된다. 장에서는 과도한 단백질 분해에 의해 활성이 유지되기 어렵다. 관강에서, 인슐린은 위장 및 췌장 효소, 엑소 및 엔도 펩티다아제, 그리고 브러쉬 보더 펩티다아제((brush border peptidase)를 포 함한 다양한 효소에 의해 공격을 받게 된다. 비록 인슐린이 이러한 효소의 공격에서 살아난다고 할지라도, 인슐린이 in vivo 수용체에 도달하기 전에 넘어야 하는 생물학적 장벽들이 인슐린의 경구투여를 제한할 수 있다. 예를 들어, 인슐린은 막투과성이 낮아, 관강으로부터 혈류로 통과하는 능력에 제한이 있다.

인슐린과 같이 약제학적으로 활성이 있는 폴리펩티드는 폴리에틸렌 글리콜의 다분산된(polydispersed) 혼합물 또는 폴리머를 함유하는 폴리에틸렌 글리콜의 다분산된 혼합물과 접합되어 다분산된 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공한다. 예를 들어, Davis 등의 미국특허 4,179,337은 인슐린과 같은 폴리펩티드를 Union Carbide에서 시판되는 MPEG-1900 및 MPEG-5000과 같은 다양한 폴리에틸렌 글리콜과 접합하는 것을 제안하였다.

Greenwald의 미국특허 5,567,422는 생물학적으로 활성이 있는 친핵체를 수평균 분자량이 5,000 달톤인 m-PEG-O

H(Union Carbide)와 같은 폴리에틸렌 글리콜과 접합하는 것을 제안하였다.

Ekwuribe의 미국특허 5,359,030은 인슐린과 같은 폴리펩티드를 폴리에틸렌 글리콜 변형 글리코리피드 폴리머 및 폴리에틸렌 글리콜 변형 지방산 폴리머와 접합하는 것을 제안하였다. 각각의 조합으로 얻어진 폴리머의 수평균 분자량은 약 500 내지 10,000 달톤의 범위인 것이 바람직하다.

폴리에틸렌 글리콜은 전형적으로는 염기 촉매로 이루어지는 에틸렌 옥사이드의 개환 중합반응(ring opening polymerization)으로 생성된다. 상기 반응은 촉매로서 수산화칼륨을 사용하고 에틸렌 옥사이드를 에틸렌 글리콜에 부가함으로써 개 시된다. 이 반응으로 주어진 수평균 분자량 범위 내의 수평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 폴리머의 다분산된 혼합물이 생성된다. 예를 들어, Milwaukee, Wisconsine의 Sigma-Aldrich에 의해 제공되는 PEG 제품은 PEG 400(Mn 380-420); PEG 1,000(Mn 950-1,050); PEG 1,500(Mn 1,400-1,600); 및 PEG 2,000(Mn 1,900-2,200)과 같은 다분산된 혼합물로 제공된다.

올리고머가 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 인슐린-올리고머 접합체의 비다분산된(non-polydispersed) 혼합물을 제공하는 바람직하다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명의 구현예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 인슐린-약물 올리고머 접합체의 비다분산된 혼합물이 동일한 수평균 분자량을 갖는 유사한 접합체의 다분산된 혼합물보다 더 큰 in vivo 활성을 나타낸다는 것을 예상치 않게 발견하였다. 이러한 현저한 활성은 더 낮은 투여량을 필요로 하게 된다. 더욱이, 본 발명의 구현예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 인슐린-올리고머 접합체의 비다분산된 혼합물은 전형적으로 유사한 접합체의 다분산된 혼합물보다 장 소화의 in vitro 모델에서 활성을 유지하는데 보다 효과적이다. 또한, 본 발명의 구현예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 인슐린-올리고머 접합체의 비다분산된 혼합물은 유사한 접합체의 비다분산된 혼합물보다 더 작은 개체간 변이성을 나타낸다.

본 발명의 구현예에 따르면, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 각각 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물 을 제공한다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 바람직하게는 2개, 3개, 또는 4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 상기 올리고머는 바람직하게는 친지성 모이어티를 더 포함한다. 상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인간 인슐린이다. 상기 올리고머는 바람직하게는 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 에 공유결합되어 있다. 상기 접합체는 바람직하게는 각각 양친매적으로 균형을 이루고 있어 각 접합체는 수용성이고 생물학적 막을 통과할 수 있다. 상기 혼합물은 바람직하게는 단순분산된 혼합물이며 가장 바람직하게는 순수하게 단순분산된 혼합물이다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머는 비가수분해성 결합에 의해 인슐린에 공유결합된 제 1 의 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 및 가수분해성 결합에 의해 제 1 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 공유결합된 제 2 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 카르복실산 모이어티의 원위 말단(distal end)에서 공유결합되어 있는 헥산산(hexanoic acid)을 포함하는 올리고머의 카르복실산 모이어티에 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 위치에서 공유결합되어 있는 인간 인슐린을 각각 포함하는 접합체의 단순분산된 혼합물을 제공한다.

본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 다분산된 혼합물의 그것에 비해 향상된 특성을 갖는다. 한 구현예에서, 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하 는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 상기 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린-약물 올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성보다 더 큰 in vivo 활성을 갖는다.

또 다른 구현예에서, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하며, 그 혼합물은 상기 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린-약물 올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다.

본 발명의 또 다른 구현예에서, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하며, 그 혼합물은 상기 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 키모트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는다.

또 다른 구현에에서, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하며, 상기 혼합물은 상기 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성 보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는다.

본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 바람직 하게는 상기 특성 중 두 가지 이상의 특성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 상기 특성 중 세 가지 이상의 특성을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 상기 네 가지 특성 모두를 갖는다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 혼합물을 제공하며, 그 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차를 갖는 분자량 분포를 갖는다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 혼합물을 제공하며, 그 혼합물은 하기 식으로 나타내는 분산계수(DC)가 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는다:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

상기 식에서,

n은 샘플 중의 서로 다른 분자들의 수이고;

N_i는 샘플 중의 i 번째 분자의 수이며;

M_i는 i 번째 분자의 질량이다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 올리고머에 결합된 인 슐린 약물을 포함하며 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 접합체 혼합물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 동일하며 하기 식을 갖는 접합체 혼합물을 제공한다:

$$\text{인슐린 약물}\left[-B-L_j-G_k-R-G'_m-R'-G''_n-T-\right]_p \quad (A)$$

상기 식에서,

B는 결합 모이어티이고;

L은 링커 모이어티이고;

G, G', 및 G'은 각각 선택된 tm페이서 모이어티이고;

R은 친지성 모이어티이고 R'은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이거나, R'은 친지성 모이어티이고 R은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이고;

T는 종결 모이어티이고;

j, k, m, 및 n은 각각 0 또는 1이며;

p는 1 내지 인슐린 약물에존재하는 친핵성 잔기의 수의 정수이다.

본 발명은 또한 본 발명의 접합체 조성물을 포함하는 약제학적 조성물과 그러한 약제학적 조성물을 유효량 투여함으로써 치료가 필요한 환자에게 인슐린 결핍증을 치료하는 방법을 제공한다. 또한, 그러한 접합체 혼합물을 합성하는 방법을 제공한다.

본 발명의 구현예에 따른 인슐린-올리고머 접합체 혼합물은 종래의 다분산된 인슐린-올리고머 접합체 혼합물에 비하여 in vivo 활성의 증가 및/또는 개체간 변이성의 감소 및/또는 키모트립신에 의한 분해의 감소를 나타낼 수 있다.

바람직한 구현예의 상세한 설명

여기에 기재된 바람직한 구현예와 관련하여 본 발명을 설명하고자 한다. 그러나, 이러한 구현예들은 본 발명을 설명하기 위한 것이지 청구항에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

본 명세서에서 사용된 용어 '비다분산'은 Davis 등의 미국특허 4,179,337; Greenwald의 미국특허 5,567,422; Greenwald 등의 미국특허 5,405,877; 및 Ekwuribe의 미국특허 5,359,030에 기재되어 있는 다분산된 혼합물과 대조적인 분산성을 갖는 화합물의 혼합물을 표현하기 위해 사용된다.

여기에 사용된 바와 같이, 용어 '실질적으로 단순분산된'은 혼합물에 존재하는 화합물의 약 95% 이상이 동일한 분자량을 갖는 화합물의 혼합물을 표현하기 위해 사용된다.

본 명세서에서 사용된 용어 '단순분산된'은 혼합물에 존재하는 화합물의 약 100%가 동일한 분자량을 갖는 화합물의 혼합물을 표현하기 위해 사용된다.

본 명세서에서 사용된 용어 '실질적으로 순수하게 단순분산된'은 혼합물에 존재하는 화합물의 약 95% 이상이 동일한 분자량을 가지며 동일한 분자구조를 갖는 화합물의 혼합물을 표현하기 위해 사용된다. 그러므로, 실질적으로 순수하게 단순분산된 혼합물은 실질적으로 단순분산된 혼합물이지만, 실질적으로 단순분산된 혼합물은 반드시 실질적으로 순수하게 단순분산된 혼합물인 것은 아니다.

본 명세서에서 사용된 용어 '순수하게 단순분산된'은 혼합물에 존재하는 화합물의 약 100%가 동일한 분자량을 가지며 동일한 분자구조를 갖는 화합물의 혼합물을 표현하기 위해 사용된다. 그러므로, 순수하게 단순분산된 혼합물은 단순분산된 혼합물이지만, 단순분산된 혼합물은 반드시 순수하게 단순분산된 혼합물인 것은 아니다.

본 명세서에서 사용된 용어 '중량평균 분자량'은 혼합물에서 주어진 분자의 무게 비율과 혼합물에서의 각각의 분자의 분자량을 곱한 것의 합으로서 정의된다. '중량평균 분자량'은 기호 M_w 로 표시된다.

본 명세서에서 사용된 용어 '수평균 분자량'은 혼합물의 총 무게를 혼합물에서의 분자의 숫자로 나눈 것으로 정의되며, 기호 M_n 으로 표시된다.

본 명세서에서 사용된 용어 '분산 계수'(DC)는 하기 식으로 정의된다:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

본 명세서에서 사용된 용어 '개체내 변이성'은 개체에게 서로 다른 시간에 동일한 용량의 약물 또는 약제학적 조성물을 투여할 때, 동일한 개체 내에서 일어나는 활성의 변화정도를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 '개체간 변이성'은 각각의 개체에 동일한 용량의 약물 또는 약제학적 조성물을 투여할 때, 둘 이상의 개체 내에서 일어나는 활성의 변화 정도를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 '인슐린 약물'은 인슐린의 생물학적 활성의 전부 또는 일부를 갖는 약물을 의미한다.

본 명세서에서 사용된 '인슐린'은 자연적으로, 합성에 의해, 또는 유전공학적 방법으로 제공된 인간 인슐린, 소 인슐린, 돼지 인슐린, 또는 고래 인슐린을 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어 '인슐린 유사체'는 인슐린 활성의 일부 또는 전부를 보유하면서 하나 이상의 아미노산이 치환된 인슐린을 의미한다. 상기 유사체는 치환 아미노산을 기재하고 치환 위치를 위첨자로서 함께 기재한 다음 인슐린을 기재함으로써 나타낸다. 예를 들어, 'ProB29 인슐린, 인간'은 인간의 인슐린 분자의 B29 위치에서 전형적으로 나타나는 라이신이 프롤린으로 치환된 것을 의미한다.

인슐린 유사체는 다양한 수단으로 얻을 수 있으며, 이러한 수단은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 공지되어 있다. 예를 들어, 인슐린 구조에서 예를 들어 항체의 항원-결합 부위, 또는 기질 분자의 결합 부위와 같은 구조와의 상호 결합 능력에 드러나는 정도의 손실 없이 소정의 아미노산은 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 인슐린의 상호작용 능력과 특성이 생물학적 기능적 활성을 결정하기 때문에, 소정의 아미노산 서열의 치환이 아미노산 서열에서 이루어질 수 있으며, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 폴리펩티드로 유지될 수 있다.

그러한 치환을 일으키는데 있어서, 아미노산의 수 치료 계수(hydropathic index)를 고려할 수 있다. 폴리펩티드에 상호작용적 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서 수 치료 아미노산 계수의 중요성은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 아미노산의 상대적인 수 치료 특성은 결과물인 폴리펩티드의 2차 구조에 기여하며, 그 결과 예를 들어, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과 같은 다른 분자와의 단백질의 상호작용을 결정한다. 각각의 아미노산은 예를 들어, 이소루신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5)과 같이 소수성 및 하전 특성에 기초하여 수 치료 계수가 부여된다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있는 바와 같이, 소정의 아미노산은 유사한 수 치료 계수 또는 스코어를 갖는 다른 아미노산으로 치환되어 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드로 유지될 수 있다, 즉 여전히 생물학적 기능상 동등한 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 그러한 변화를 만드는데 있어서, 수 치료 계수가 서로 ±2 내에 있는 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하며, 특히 바람직하게는 ±1, 훨씬 더 바람직하게는 ±0.5 내에 있는 아미노산으로 치환한다.

유사한 아미노산의 치환이 친수성을 기초로 하여 효과적으로 이루어질 수 있다는 것이 또한 알려져 있다. 그 전체로서 본 명세서에 통합되는 미국특허 4,554,101에는 인접하는 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 단백질의 최대 국소적인 평균 친수성은 단백질의 생물학적 특성과 관련이 있다고 개시되어 있다. 미국특허 4,554,101에 상세하게 기재되어 있는 바와 같이, 아미노산 잔기에 다음과 같 은 친수성 값이 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 리신(±3.0); 아스파테이트(+3.0±1); 글루타메이트(+3.0±1); 세린(+3.0); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5±1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있듯이, 아미노산은 유사한 친수성 값을 갖는 다른 아미노산으로 치환되어 여전히 생물학적으로 동등한, 특히 면역학적으로 동등한 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 그러한 변화에 있어서, 친수성 값이 서로 ±2 내에 있는 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하며, 특히 바람직하게는 ±1, 훨씬 더 바람직하게는 ±0.5 내에 있는 아미노산으로 치환한다.

상기 약술한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들어 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기초로 한다. 다양한 상기 특성을 고려한 예시적인 치환체(즉, 폴리펩티드의 생물학적 활성을 현저히 변화시키지 않으면서 치환될 수 있는 아미노산)는 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있으며, 그러한 예로는 아르기닌과 리신; 글루타메이트와 아스파테이트; 세린과 쓰레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신이 있다.

본 명세서에서 사용된 '인슐린 단편'은 인슐린의 활성 전부 또는 일부를 보유하는 인슐린에서 발견되는 아미노산 서열의 일부(segment)를 의미한다. 인슐린 단편은 아미노산 서열의 위치를 기재한 다음 아미노산을 기재함으로써 나타낸다. 예를 들어, 'B25-30 인간 인슐린' 단편은 인간 인슐린 아미노산의 B25, B26, B27, B28, B29, 및 B30 위치에 해당하는 여섯 개의 아미노산 서열일 것이다.

본 명세서에서 사용된 '인슐린 단편 유사체'는 인슐린 활성의 일부 또는 전부를 보유하면서 하나 이상의 아미노산이 치환된, 인슐린 분자에서 발견되는 아미노산 서열의 일부분을 말한다.

본 명세서에 사용된 용어 'PEG'는 선형 또는 분지형의 폴리에틸렌 글리콜 폴리머를 말하며, 폴리에틸렌 글리콜의 모노메틸에테르(mPEG)를 포함한다. 용어 'PEG 서브유닛' 및 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛은 단일의 폴리에틸렌 글리콜 유닛, 즉 -(CH $_2$ CH $_2$ O)-를 말한다.

본 명세서에 사용된 용어 '친지성'은 지질에 용해될 수 있는 능력 및/또는 생물막을 투과하고 함께 작용하고/거나 생물막을 통과하는 능력을 의미하고, 용어 '친지성 모이어티' 또는 '친지체(lipophile)'은 친지성이고/거나 다른 화학 물질과 결합할 때 그 화학 물질의 친지성을 증가시키는 모이어티를 의미한다. 친지성 모이어티의 예로는 알킬, 지방산, 지방산의 에스테르, 콜레스테릴, 아다만틸 등이 있으나 이에 한정되지 않는다.

본 명세서에 사용된 용어 '저급 알킬'은 1 개 내지 5 개의 탄소원자를 갖는 치환 또는 비치환된 알킬 모이어티를 말한다.

본 명세서에 사용된 용어 '고급 알킬'은 5 개 이상의 탄소원자를 갖는 치환 또는 비치환된 알킬 모이어티를 말한다.

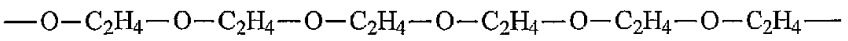
본 발명의 구현예에서, 인슐린-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 혼합물의 접합체 중 96, 97, 98, 또는 99% 이상이 동일한 분자량을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 혼합물은 단순분산된 혼합물이다. 더욱 바람직하게는, 상기 혼합물은 실질적으로 순수하게 단순분산된 혼합물이다. 더더욱 바람직하게는, 상기 혼합물의 접합체의 96, 97, 98, 또는 99%가 동일한 무게 및 동일한 분자구조를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 혼합물은 순수하게 단순분산된 혼합물이다.

상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인슐린이다. 보다 바람직하게는, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이다. 그러나, 인슐린 약물이 예를 들어, 프로인슐린, 인슐린 유사체, 인슐린 단편, 및 인슐린 단편 유사체를 포함한 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 다양한 인슐린 약물로부터 선택될 수 있다는 것을 알아야 한다. 인슐린 유사체로는 상기 치환 가이드라인을 이용하여 제공되는 유사체 뿐만 아니라 ASP ^{B28} 인간 인슐린, Lys ^{B28} 인간 인슐린, Leu ^{B28} 인간 인슐린, Val ^{B28} 인간 인슐린, Ala ^{B28} 인간 인슐린, Asp ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Lys ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Leu ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Val ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Ala ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편으로는 B22-B30 인간 인슐린, B23-B30 인간 인슐린, B25-B30 인간 인슐린, B26-B30 인간 인슐린, B27-B30 인간 인슐린, B29-B30 인간 인슐린, 인간 인슐린의 A 체인, 및 인간 인슐린의 B 체인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편 유사체는 인슐린 단편에서 상기한 바와 같이 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

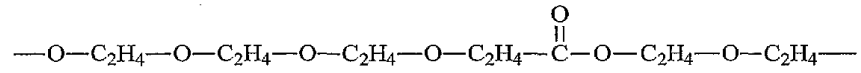
상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있는 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머의 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 5 또는 6개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게는 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 다른 모이어티를 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 부가적인 친수성 모이어티, 친지성 모이어티, 스페이서 모이어티, 링커 모이어티, 및 종결 모이어티가 있으나 이에 한정되지는 않는다. 상기 올리고머의 다양한 모이어티는 가수분해성 결합 또는 비가수분해성 결합에 의해 서로 공유결합된다.

상기 올리고머는 하나 이상의 부가적인 친수성 모이어티(즉, 폴리에틸렌 글리콜 이외의 모이어티)를 더 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 당, 폴리알킬렌 옥사이드, 및 폴리아민/PEG 코폴리머가 있으며 이에 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜이 폴리알킬렌 옥사이드일 경우, 부가적인 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티일 수 있다. 인접합 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 에테르 결합으로 연결된다면 동일한 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어, 모이어티



은 여섯 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다. 이 모이어티가 상기 올리고머의 유일한 친수성 모이어티라면, 상기 올리고머는 부가적인 친수성 모이어티를 함유하지 않을 것이다. 그들이 에테르 결합 이외의 결합으로 연결된다면, 인접한 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 서로 다른 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어,



는 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛과 두 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 부가적인 친수성 모이어티이다. 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하며 부가적인 친수성 모이어티를 포함하지 않는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 친지성 모이어티를 더 포함할 수 있다. 상기 친지성 모이어티는 바람직하게는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 알킬 모이어티 또는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 지방산 모이어티이다. 친지성 모이어티가 알킬 모이어티일 경우, 바람직하게는 1 개 내지 28개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 알킬 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 알킬 모이

어티는 2 개 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는다. 상기 친지성 모이어티가 지방산 모이어티일 경 우, 바람직하게는 2 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 천연 지방산 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 3 개 내지 14 개의 탄소 원자를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 4 개, 5 개, 또는 6 개 이상의 탄소 원자를 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 하나 이상의 스페이서 모이어티를 포함할 수 있다. 스페이서 모이어티는, 예를 들어 친수성 모이어티를 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 친지성 모이어티 또는 친수성 모이어티를 인슐린 폴리펩티드로부터 분리시키고, 제 1 친수성 또는 친지성 모이어티를 제 2 친수성 또는 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 또는 친수성 모이어티 또는 친지성 모이어티를 링커 모이어티로부터 분리시키는데 사용될 수 있다. 스페이서 모이어티는 바람직하게는 당, 콜레스테롤, 및 글리세린 모이어티로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 알킬 모이어티 및 지방산 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 종결 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 종결 모이어티는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이며, 보다 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 종결 모이어티는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 모이어티가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이지만, 상기 종결 모이어티는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 모이어티일 수 있다는 것을 알아야 하며, 이러한 예로는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 올리고머는 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 인슐린 약물은 가수분해성 결합(예: 에스테르 또는 카보네이트 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 프로드럭으로서 작용하는 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우에는(즉, 접합체가 인슐린 약물의 주요 작용기전을 통해 신체에 효과를 주는 능력이 결여된 경우), 하나 이상의 올리고머가 각각의 인슐린 약물-올리고머 접합체로부터 분리되기 때문에, 가수분해성 결합이 시간-방출성 또는 제어방출성 효과를 위해 주어진 시간에 걸쳐 인슐린 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구현에에서, 인슐린 약물은 비가수분해성 결합(예: 카바메이트, 아마이드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 비가수분해성 결합은, 인슐린 약물-올리고머 접합체를 연장된 시간 동안, 바람직하게는 2시간 이상동안 혈류를 순환시키고자 할 때 사용하는 것이 바람직하다. 올리고머를 인슐린 약물에 공유결합할 경우, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는, 인슐린 약물에 올리고머를 공유결합시키는데 사용되는 하나 이상의 결합 모이어티를 더 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 모이어티, 카보네이트 모이어티, 카바메이트 모이어티, 아마이드 모이어티, 및 이차 아민 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다. 올리고머의 하나이상의 모이어티가 인 슐린 약물에 공유결합될 수 있다.

상기 올리고머가 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합 되지만, 상기 올리고머는 비공유결합되어 비공유결합으로 접합된 인슐린 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있다는 것을 알아야 한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있듯이, 비공유결합에는 수소결합, 이온결합, 반데르발스 결합, 및 미셀 또는 리포좀 캡슐화가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구현예에 따르면, 올리고머는 적절히 제조되고, 변형하고 및/또는 적절히 작용기를 가하여 선택된 방법으로 비공유결합을 할 수 있는 능력(예: 수소결합 능력을 부여하는 것)을 부여할 수 있으며, 이는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 다양한 화합물로 유도될 수 있으며, 이러한 다양한 화합물로는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산, 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 실리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산, 및 아미노살리실산 유도체가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 결과 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합 할 수 있다. 그 결과 생성되는 복합체는 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이루는 것이 바람직하다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도될 수 있다. 적절한 산성 조건 하에서, 그 결과 생성된 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체 형성 결과 생성된 생성물은 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이룬다.

하나 이상의 올리고머(즉, 다수의 올리고머)는 인슐린 약물에 결합될 수 있다. 그러나, 다수의 올리고머가 서로 다르거나, 다수의 올리고머중 일부가 동일하거나 일부가 다를 수 있다. 다수의 올리고머가 인슐린 약물에 결합할 때, 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 가수분해성 결합으로 결합하고 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 비가수분해성 결합으로 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 다수의 올리고머를 인슐린 약물과 연결시키는 결합 모두가 가수분해성일 수 있지만, 예를 들어 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 신속하게 제거되도록 또는 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 서서히 제거되도록 다양한 가수분해성을 가질 수 있다.

상기 올리고머는 인슐린 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 인슐린 약물에 결합될 수 있으며, 그러한 친핵성 잔기의 예로는 친핵성 히드록실기 및/또는 아미노기가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 약물이 폴리펩티드일 경우, 친핵성 히드록실기는 예를 들어 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 수 있으며, 친핵성 아미노기는 예를 들어 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서, 및/또는 폴리펩티드의 하나이상의 N 말단에서 발견될 수 있다. 올리고머는 인슐린 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합될 때, 그러한 결합은 이차 아민을 형성한다. 상기 인슐린 약물이 인간 인슐린일 경우, 예를 들어 올리고머는 인슐린의 아미노 작용기에 결합될 수 있으며, 그러한 아미노 작용기로는 Gly^{A1} 의 아미노 작용기, Phe^{B1} 의 아미노 작 용기, 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기가 있다. 하나의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 두 개의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Phe^{B1} 의 아미노 작용기 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 하나 이상의 올리고머가 인간 인슐린에 결합되는 동안, 단일 접합된 인간 인슐린에서 보다 더 큰 활성이 관찰된다.

본 발명의 인슐린 약물-올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 카르복실산과 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 실질적으로 단순분산된 올리고머 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 카르복실산의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 폴리에틸렌 글리콜의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 접촉시킴으로써 합성한다. 그런 다음, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 올리고머를 인슐린 약물과 반응하여 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 활성화시킨다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구현예를 도 3에 나타내었고 하기 실시예 11-18에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 4에 나타내었으며 하기 실시예 19-24에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 5에 나타 내었으며 하기 실시예 25-29에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 6에 나타내었으며 하기 실시예 30-31에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 7에 나타내었으며 하기 실시예 32-37에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 8에 나타내었으며 하기 실시예 38에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 9에 나타내었으며 하기 실시예 39에 기술하였다. 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 10에 나타내었으며 하기 실시예 40에 기술하였다.

활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 인슐린-약물 올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 인슐린 약물의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응할 수 있다. 바람직한 합성방법 하기 실시예 41에 기재하였다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있듯이, 반응조건(예: 선택된 몰비, 용매 혼합물, 및/또는 pH)은 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 인슐린 약물의 실질적으로 단순분산된 혼합물의 반응으로부터 생성되는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 실질적으로 단순분산된 혼합물이 되도록 조절되어야 한다. 예를 들어, 라이신의 아마노 작용기에서의 접합은 용액의 pH를 라이신의 pK_a 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 인슐린-약물 올리 고머의 접합체를 하기 실시예 50에 기재한 HPLC를 이용하여 분리하고 유리하여, 인슐린 약물-올리고머, 예를 들어 모노-, 디,- 또는 트리-접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공할 수 있다. 특정 유리된 접합체의 접합 정도(예: 유리된 접합체가 모노-, 디-, 또는 트리-접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 질량 분광분석법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 접합체 구조(예: 상기 올리고머가 Gly^{A1}, Phe^{B1}, 또는 Lys^{B29} 인간 인슐린 모노접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적인 효소 분해법(selective enzyme cleavage), 및/또는 엔도펩티다아제 분해법(endopeptidase cleavage)이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있는 바와 같이, 인슐린 약물의 하나 이상의 반응부위는 예를 들어 인슐린 약물을 N-tert-부톡시카르보닐(t-BOC) 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단 시약과 반응시킴으로써 차단시킬 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 인슐린 약물이 폴리펩티드이고, 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화된 접합체(즉, 친핵성 잔기 모두가 접하되지는 않는 접합체)를 형성하고자 할 때, 바람직하다. 그러한 차단 후에, 차단된 인슐린 약물의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 활성화된 올리고머의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응하 여, 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)을 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 모이어티를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후에, 인슐린 약물-올리고머 접합체는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 것과 같이 탈-차단을 시킬 수 있다. 필요하다면, 그런 다음 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 상기 방법과 같이 분리하여 인슐린 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 탈-차단하기 전에 분리시킬 수도 있다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 카르복실산 모이어티의 원위 말단(distal end)에서 공유결합되어 있는 헥산산(hexanoic acid)을 포함하는 올리고머의 카르복실산 모이어티에 인간 인슐린의 Lys^{B29} 위치에서 공유결합되어 있는 인간 인슐린을 각각

포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공한다. 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 각각의 접합체는 7개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 카르복실산 모이어티의 원위 말단(distal end)에서 공유결합되어 있는 헥산산(hexanoic acid)으로 구성되는 올리고머의 카르복실산 모이어티에 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 위치에서 공유결합되어 있는 인간 인슐린으로 구성된다.

본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 바람직 하게는 다분산된 혼합물의 그것과 비교할 때 향상된 특성을 갖는다. 예를 들어, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 바람직하게는 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성보다 큰 in vivo 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(제2판, 1991)에 기재되어 있는 겔 침투 크로마토그래피(gel permeation chromatography)와 같은 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또 다른 예로는, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

특정 혼합물의 in vitro 활성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 바람직하게는, in vitro 활성은 Molecular Devices Corporation of Sunnyvale, California에서 상업적으로 판매하 고 있는 Cytosensor ^{R} Microphysiometer를 이용하여 측정한다. 마이크로피지오미터(microphysiometer)는 트랜스웰(transwell)에 있는 배양된 세포에 부가되는 약물에 반응하는 세포외 산화 속도의 작은 변화를 모니터한다. 이러한 반응은 연구하고자 하는 분자의 활성에 비례한다. 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 in vitro 활성은 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 10% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성과 비교할 때, 더 증가된 키모트립신에 의한 분해 저항성을 갖는다. 키모트립신에 대한 저항성은 시험하고자 하는 분자를 하기 실시예 52에 개략적으로 나타낸 것과 유사한 방법을 이용하여 키모트립신에서 소화시킬 때 남아있는 물질의 백분율에 해당한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 20% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 개체간 변이성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 다음가 같이 계산한다. 약물반응곡선하 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저치 사이의 면적)을 각각의 개체에서 측정한다. 각각의 개체에서의 AUC를 합하고 그 합을 개체의 숫자로 나눔으로써 모든 개체에 대한 평균 AUC를 결정한다. 그런 다음, 개체의 AUC와 평균 AUC 간의 차이의 절대치를 각각의 개체에 대하여 결정한다. 그리하여 얻어진 그 차이의 절대적 수치를 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 사용한다. 더 낮은 값은 개체간 변이성이 더 낮다는 것을 나타내고, 더 높은 값은 개체간 변이성이 더 크다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 10% 이상 더 작다. 보다 바람직하게는, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 25% 이상 더 작다.

본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 바람직하게는 상기 특성중에서 2 개 이상의 특성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 상기 특성중에서 3 개 이상의 특성을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물은 상기 특성 4개 모두를 갖는다.

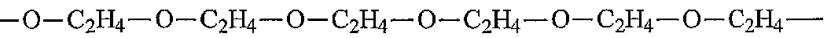
본 발명의 또 다른 구현예에서는, 약 22 달톤 미만의 표준편차를 갖는 분자량 분포를 갖는 접합체 혼합물을 제공한다. 그 혼합물의 각각의 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함한다. 표준편차는 바람직하게는 14 달톤 미만이며, 보다 바람직하게는 11 달톤 미만이다. 상기 분자량 분포는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있는 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(제2판, 1991)에 기재되어 있는 겔 침투 크로마토그래피(gel permeation chromatography)와 같은 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그런 다음, 분자량 분포의 표준편차를 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있는 통계학적 방법으로 결정할 수 있다.

상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인슐린이다. 보다 바람직하게는, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이다. 그러나, 인슐린 약물이 예를 들어, 프로인슐린, 인슐린 유사체, 인슐린 단편, 및 인슐린 단편 유사체를 포함한 당해 기술분야에서 통 상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 다양한 인슐린 약물로부터 선택될 수 있다는 것을 알아야 한다. 인슐린 유사체로는 상기 치환 가이드라인을 이용하여 제공되는 유사체 뿐만 아니라 ASP ^{B28} 인간 인슐린, Lys ^{B28} 인간 인슐린, Leu ^{B28} 인간 인슐린, Val ^{B28} 인간 인슐린, Ala ^{B28} 인간 인슐린, Asp ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Lys ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Leu ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Val ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Ala ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편으로는 B22-B30 인간 인슐린, B23-B30 인간 인슐린, B25-B30 인간 인슐린, B26-B30 인간 인슐린, B27-B30 인간 인슐린, B29-B30 인간 인슐린, 인간 인슐린의 A 체인, 및 인간 인슐린의 B 체인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편 유사체는 인슐린 단편에서 상기한 바와 같이 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

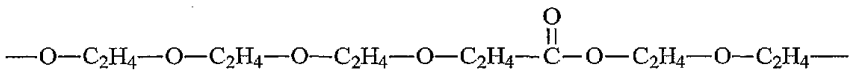
상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있는 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머의 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 5 또는 6개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게는 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 다른 모이어티를 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 부가적인 친수성 모이어티, 친지성 모이어티, 스페이서 모이어티, 링커 모이어티, 및 종결 모이어티가 있으나 이에 한정되지는 않는다. 상기 올리고머의 다양한 모이어티는 가수분해성 결합 또는 비가수분해성 결합에 의해 서로 공유결합된다.

상기 올리고머는 하나 이상의 부가적인 친수성 모이어티(즉, 폴리에틸렌 글리콜 이외의 모이어티)를 더 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 당, 폴리알킬렌 옥사이드, 및 폴리아민/PEG 코폴리머가 있으며 이에 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜이 폴리알킬렌 옥사이드일 경우, 부가적인 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티일 수 있다. 인접합 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 에테르 결합으로 연결된다면 동일한 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어, 모이어티



은 여섯 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다. 이 모이어티가 상기 올리고머의 유일한 친수성 모이어티라면, 상기 올리고머는 부가적인 친수성 모이어티를 함유하지 않을 것이다. 그들이 에테르 결합 이외의 결합으로 연결된다면, 인접한 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 서로 다른 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어,



는 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛과 두 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 부가적인 친수성 모이어티이다. 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하며 부가적인 친수성 모이어티를 포함 하지 않는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 친지성 모이어티를 더 포함할 수 있다. 상기 친지성 모이어티는 바람직하게는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 알킬 모이어티 또는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 지방산 모이어티이다. 친지성 모이어티가 알킬 모이어티일 경우, 바람직하게는 1개 내지 28개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 알킬 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 알킬 모이어티는 2 개 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는다. 상기 친지성 모이어티가 지방산 모이어티일 경우, 바람직하게는 2 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 천연 지방산 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 3 개 내지 14 개의 탄소 원자를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 4 개, 5 개, 또는

6 개 이상의 탄소 원자를 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 하나 이상의 스페이서 모이어티를 포함할 수 있다. 스페이서 모이어티는, 예를 들어 친수성 모이어티를 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 친지성 모이어티 또는 친수성 모이어티를 인슐린 폴리펩티드로부터 분리시키고, 제 1 친수성 또는 친지성 모이어티를 제 2 친수성 또는 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 또는 친수성 모이어티 또는 친지성 모이어티를 링커 모이어티로부터 분리시키는데 사용될 수 있다. 스페이서 모이어티는 바람직하게는 당, 콜레스테롤, 및 글리세린 모이어티로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 알킬 모이어티 및 지방산 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 종결 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 종결 모이어티는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이며, 보다 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 종결 모이어티는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 모이어티가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이지만, 상기 종결 모이어티는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 모이어티일 수 있다는 것을 알아야 하며, 이러한 예로는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 올리고머는 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 인슐린 약물은 가수분해성 결합(예: 에스테르 또는 카보네이트 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 프로드럭으로서 작용하는 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우에는(즉, 접합체가 인슐린 약물의 주요 작용기전을 통해 신체에 효과를 주는 능력이 결여된 경우), 하나 이상의 올리고머가 각각의 인슐린 약물-올리고머 접합체로부터 분리되기 때문에, 가수분해성 결합이 시간-방출성 또는 제어방출성 효과를 위해 주어진 시간에 걸쳐 인슐린 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구현에에서, 인슐린 약물은 비가수분해성 결합(예: 카바메이트, 아마 이드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 비가수분해성 결합은, 인슐린 약물-올리고머 접합체를 연장된 시간 동안, 바람직하게는 2시간 이상동안 혈류를 순환시키고자 할 때 사용하는 것이 바람직하다. 올리고머를 인슐린 약물에 공유결합할 경우, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는, 인슐린 약물에 올리고머를 공유결합시키는데 사용되는 하나 이상의 결합 모이어티를 더 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 모이어티, 카보네이트 모이어티, 카바메이트 모이어티, 아마이드 모이어티, 및 이차 아민 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다. 올리고머의 하나이상의 모이어티가 인슐린 약물에 공유결합될 수 있다.

상기 올리고머가 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합 되지만, 상기 올리고머는 비공유결합되어 비공유결합으로 접합된 인슐린 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있다는 것을 알아야 한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있듯이, 비공유결합에는 수소결합, 이온결합, 반데르발스 결합, 및 미셀 또는 리포좀 캡슐화가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구현예에 따르면, 올리고머는 적절히 제조되고, 변형하고 및/또는 적절히 작용기를 가하여 선택된 방법으로 비공유결합을 할 수 있는 능력(예: 수소결합 능력을 부여하는 것)을 부여할 수 있으며, 이는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 다양한 화합물로 유도될 수 있으며, 이러한 다양한 화합물로는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산, 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 실리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산, 및 아미노살리실산 유도체가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 결과 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합 할 수 있다. 그 결과 생성되는 복합체는 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이루는 것이 바람직하다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도될 수 있다. 적절한 산성 조건 하에서, 그 결과 생성된 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체 형성 결과 생성된 생성물은 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이룬다.

하나 이상의 올리고머(즉, 다수의 올리고머)는 인슐린 약물에 결합될 수 있다. 그러나, 다수의 올리고머가 서로 다르거나, 다수의 올리고머중 일부가 동일하거나 일부가 다를 수 있다. 다수의 올리고머가 인슐린 약물에 결합할 때, 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 가수분해성 결합으로 결합하고 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 비가수분해성 결합으로 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 다수의 올리고머를 인슐린 약물과 연결시키는 결합 모두가 가수분해성일 수 있지만, 예를 들어 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 신속하게 제거되도록 또는 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 서서히 제거되도록 다양한 가수분해성을 가질 수 있다.

상기 올리고머는 인슐린 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 인슐린 약물에 결합될 수 있으며, 그러한 친핵성 잔기의 예로는 친핵성 히드록실기 및/또는 아미노기 가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 약물이 폴리펩티드일 경우, 친핵성 히드록실기는 예를 들어 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 수 있으며, 친핵성 아미노기는 예를 들어 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서, 및/또는 폴리펩티드의 하나이상의 N 말단에서 발견될 수 있다. 올리고머는 인슐린 폴

리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합될 때, 그러한 결합은 이차 아민을 형성한다. 상기 인슐린 약물이 인간 인슐린일 경우, 예를 들어 올리고머는 인슐린의 아미노 작용기에 결합될 수 있으며, 그러한 아미노 작용기로는 Gly ^{A1} 의 아미노 작용기, Phe ^{B1} 의 아미노 작용기, 및 Lys ^{B29} 의 아미노 작용기가 있다. 하나의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Lys ^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 두 개의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Phe ^{B1} 의 아미노 작용기 및 Lys ^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 하나 이상의 올리고머가 인간 인슐린에 결합되는 동안, 단일 접합된 인간 인슐린에서 보다 더 큰 활성이 관찰된다.

약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 다양한 방법으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 올리고머의 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분 포를 갖는 카르복실산 혼합물과 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 혼합물을 접촉시킴으로써 합성한다. 그런 다음, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 상기 혼합물을 인슐린 약물과 반응하여 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 활성화시킨다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구현예를 도 3에 나타내었고 하기 실시예 11-18에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 4에 나타내었으며 하기 실시예 19-24에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 5에 나타내었으며 하기 실시예 25-29에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 6에 나타내었으며 하기 실시예 30-31에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 7에 나타내었으며 하기 실시예 32-37에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 8에 나타내었으며 하기 실시예 38에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 9에 나타내었으며 하기 실시예 39에 기술하였다. 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고 머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 10에 나타내었으며 하기 실시예 40에 기술하였다.

약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물의 혼합물과 반응시킨다. 바람직한 합성방법 하기 실시예 41에 기재하였다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있듯이, 반응조건(예: 선택된 몰비, 용매 혼합물, 및/또는 pH)은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물과 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물의 혼합물의 반응으로부터 생성되는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이 되도록 조절할 수 있다. 예를 들어, 라이신의 아마노 작용기에서의 접합은 용액의 pH를 라이신의 pK_a 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 인슐린-약물 올리고머의 접합체 혼합물을 예를 들어 실시예 50에 기재한 HPLC를 이용하여 분리하고 유리시켜, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체, 예를 들어 모노-, 디,- 또는 트리-접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 특정 유리된 접합체의 접합 정도(예: 유리된 접합체가 모노-, 디-, 또는 트리-접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명 할 수 있으며, 그러한 예로는 질량 분광분석법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 접합체 구조(예: 상기 올리고머가 Gly ^{A1}, Phe ^{B1}, 또는 Lys ^{B29} 인간 인슐린 모노접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적인 효소 분해법, 및/또는 엔도펩티다아제 분해법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있는 바와 같이, 인슐린 약물의 하나 이상의 반응부위는 예를 들어 인슐린 약물을 N-tert-부톡시카르보닐(t-BOC) 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단 시약과 반응시킴으로써 차단시킬 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 인슐린 약물이 폴리펩티드이고, 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화된 접합체(즉, 친핵성 잔기 모두가 접하되지는 않는 접합체)를 형성하고자 할 때, 바람직하다. 그러한 차단 후에, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 차단된 인슐린 약물의 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물과 반응하여, 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)을 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 모이어티를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후에, 인슐린 약물-올리고머 접합체는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 것과 같이 탈-차단을 시킬 수 있다. 필요하다면, 그런 다음 인슐린 약물- 올리고머 접합체의 혼합물을 상기 방법과 같이 분리하여 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 탈차단하기 전에 분리시킬 수도 있다.

본 발명의 구현예에 따른 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 다분산된 혼합물의 그것과 비교할 때 향상된 특성을 갖는다. 예를 들어, 약 22 달톤 미만의 표준편차의

분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성보다 큰 in vivo 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(제2판, 1991)에 기재되어 있는 겔 침투 크로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또 다른 예로는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물- 올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

특정 혼합물의 in vitro 활성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 바람직하게는, in vitro 활성은 Molecular Devices Corporation of Sunnyvale, California에서 상업적으로 판매하고 있는 Cytosensor ® Microphysiometer를 이용하여 측정한다. 마이크로피지오미터(microphysiometer)는 트랜스웰(transwell)에 있는 배양된 세포에 부가되는 약물에 반응하는 세포외 산화 속도의 작은 변화를 모니터한다. 이러한 반응은 연구하고자 하는 분자의 활성에 비례한다. 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 10% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐 린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성과 비교할 때, 더 증가된 키모트립신에 의한 분해 저항성을 갖는다. 키모트립신에 대한 저항성은 시험하고자 하는 분자를 하기 실시예 52에 개략적으로 나타낸 것과 유사한 방법을 이용하여 키모트립신에서 소화시킬 때 남아있는 물질의 백분율에 해당한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 20% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 개체간 변이성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 다음과 같이 계산한다. 약물반응 곡선하 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저치 사이의 면적)을 각각의 개체에서 측정한다. 각각의 개체에서의 AUC를 합하고 그 합을 개체의 숫자로 나눔으로써 모든 개체에 대한 평균 AUC를 결정한다. 그런 다음, 개체의 AUC와 평균 AUC 간의 차이의 절대치를 각각의 개체에 대하여 결정한다. 그리하여 얻어진 그 차이의 절대적 수치를 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 사용한다. 더 낮은 값은 개체간 변이성이 더 낮다는 것을 나타내고, 더 높은 값은 개체간 변이성이 더 크다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 10% 이상 더 작다. 보다 바람직하게는, 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 25% 이상 더 작다.

본 발명의 구현예에 따른 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 상기 특성중에서 2 개 이상의 특성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 상기 특성중에서 3 개 이상의 특성을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 약 22 달톤 미만의 표준편차의 분자량 분포를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 상기 특성 4개 모두를 갖는다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 혼합물을 제공하며, 그 혼합물은 하기 식으로 나타내는 분산계수(DC)가 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는다:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

상기 식에서,

n은 샘플 중의 서로 다른 분자들의 수이고;

N_i는 샘플 중의 i 번째 분자의 수이며;

M_i는 i 번째 분자의 질량이다.

상기 접합체 혼합물은 100,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 상기 접합체 혼합물의 분산계수는 500,000보다 더 크고, 가장 바람직하게는 상기 분산계수는 10,000,000보다 더 크다. 변수 n, Ni, 및 Mi는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법으로 결정될 수 있으나, 그러한 방법으로는 하기 실시예 49에 기재되어 있는 방법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인슐린이다. 보다 바람직하게는, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이다. 그러나, 인슐린 약물이 예를 들어, 프로인슐린, 인슐린 유사체, 인슐린 단편, 및 인슐린 단편 유사체를 포함한 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 다양한 인슐린 약물로부터 선택될 수 있다는 것을 알아야 한다. 인슐린 유사체로는 상기 치환 가이드라인을 이용하여 제공되는 유사체 뿐만 아니라 ASP ^{B28} 인간 인슐린, Lys ^{B28} 인간 인슐린, Leu ^{B28} 인간 인슐린, Val ^{B28} 인간 인슐린, Ala ^{B28} 인간 인슐린, Asp ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Lys ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Leu ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Val ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Ala ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편으로는 B22-B30 인간 인슐린, B23-B30 인간 인슐린, B25-B30 인간 인슐린, B26-B30 인간 인슐린, B27-B30 인간 인슐린, B29-B30 인간 인슐린, 인간 인슐린의 A 체인, 및 인간 인슐린의 B 체인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편 유사체는 인슐린 단편에서 상기한 바와 같이 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

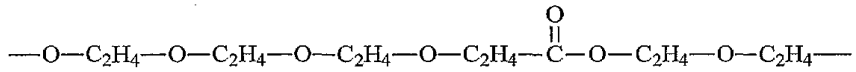
상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있는 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머의 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌글리콜 모이 어티는 5 또는 6개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게는 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 다른 모이어티를 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 부가적인 친수성 모이어티, 친지성 모이어티, 스페이서 모이어티, 링커 모이어티, 및 종결 모이어티가 있으나 이에 한정되지는 않는다. 상기 올리고머의 다양한 모이어티는 가수분해성 결합 또는 비가수분해성 결합에 의해 서로 공유결합된다.

상기 올리고머는 하나 이상의 부가적인 친수성 모이어티(즉, 폴리에틸렌 글리콜 이외의 모이어티)를 더 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 당, 폴리알킬렌 옥사이드, 및 폴리아민/PEG 코폴리머가 있으며 이에 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜이 폴리알킬렌 옥사이드일 경우, 부가적인 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티일 수 있다. 인접합 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 에테르 결합으로 연결된다면 동일한 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어, 모이어티

$$—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—$$

은 여섯 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다. 이 모이어티가 상기 올리고머의 유일한 친수성 모이어티라면, 상기 올리고머는 부가적인 친수성 모이어티를 함유하지 않을 것이다. 그들이 에테르 결합 이외의 결합으로 연결된다면, 인접한 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 서로 다른 모 이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어,



는 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛과 두 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 부가적인 친수성 모이어티이다. 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하며 부가적인 친수성 모이어티를 포함하지 않는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 친지성 모이어티를 더 포함할 수 있다. 상기 친지성 모이어티는 바람직하게는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 알킬 모이어티 또는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 지방산 모이어티이다. 친지성 모이어티가 알킬 모이어티일 경우, 바람직하게는 1 개 내지 28개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 알킬 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 알킬 모이어티는 2 개 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는다. 상기 친지성 모이어티가 지방산 모이어티일 경우, 바람직하게는 2 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 천연 지방산 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 3 개 내지 14 개의 탄소 원자를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 4 개, 5 개, 또는 6 개 이상의 탄소 원자를 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 하나 이상의 스페이서 모이어티를 포함할 수 있다. 스페이서 모이어티는, 예를 들어 친수성 모이어티를 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 친지성 모이어티 또는 친수성 모이어티를 인슐린 폴리펩티드로부터 분리시키고, 제 1 친수성 또는 친지성 모이어티를 제 2 친수성 또는 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 또는 친수성 모이어티 또는 친지성 모이어티를 링커 모이어티로부터 분리시키는데 사용될 수 있다. 스페이서 모이어티는 바람직하게는 당, 콜레스테롤, 및 글리세린 모이어티로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 알킬 모이어티 및 지방산 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 종결 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 종결 모이어티는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이며, 보다 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 종결 모이어티는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 모이어티가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이지만, 상기 종결 모이어티는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 모이어티일 수 있다는 것을 알아야 하며, 이러한 예로는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 올리고머는 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 인슐린 약물은 가수분해성 결합(예: 에스테르 또는 카보네이트 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 프로드럭으로서 작용하는 인슐린 약 물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우에는(즉, 접합체가 인슐린 약물의 주요 작용기전을 통해 신체에 효과를 주는 능력이 결여된 경우), 하나 이상의 올리고머가 각각의 인슐린 약물-올리고머 접합체로부터 분리되기 때문에, 가수분해성 결합이 시간-방출성 또는 제어방출성 효과를 위해 주어진 시간에 걸쳐 인슐린 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구현에에서, 인슐린 약물은 비가수분해성 결합(예: 카바메이트, 아마이드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 비가수분해성 결합은, 인슐린 약물-올리고머 접합체를 연장된 시간 동안, 바람직하게는 2시간 이상동안 혈류를 순환시키고자 할 때 사용하는 것이 바람직하다. 올리고머를 인슐린 약물에 공유결합할 경우, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는, 인슐린 약물에 올리고머를 공유결합시키는데 사용되는 하나 이상의 결합 모이어티를 더 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 모이어티, 카보네이트 모이어티, 카바메이트 모이어티, 아마이드 모이어티, 및 이차 아민 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다. 올리고머의 하나이상의 모이어티가 인슐린 약물에 공유결합될 수 있다.

상기 올리고머가 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합 되지만, 상기 올리고머는 비공유결합되어 비공유결합으로 접합된 인슐린 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있다는 것을 알아야 한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있듯이, 비공유결합에는 수소결합, 이온결합, 반데르발스 결합, 및 미셀 또는 리포좀 캡슐화가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구현예에 따르 면, 올리고머는 적절히 제조되고, 변형하고 및/또는 적절히 작용기를 가하여 선택된 방법으로 비공유결합을 할 수 있는 능력(예: 수소결합 능력을 부여하는 것)을 부여할 수 있으며, 이는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 다양한 화합물로 유도될 수 있으며, 이러한 다양한 화합물로는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산, 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 실리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산, 및 아미노살리실산 유도체가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 결과 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합 할 수 있다. 그 결과 생성되는 복합체는 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이루는 것이 바람직하다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도될 수 있다. 적절한 산성 조건 하에서, 그 결과 생성된 올리고머

는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체 형성 결과 생성된 생성물은 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이룬다.

하나 이상의 올리고머(즉, 다수의 올리고머)는 인슐린 약물에 결합될 수 있다. 그러나, 다수의 올리고머가 서로 다르거나, 다수의 올리고머중 일부가 동일하거나 일부가 다를 수 있다. 다수의 올리고머가 인슐린 약물에 결합할 때, 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 가수분해성 결합으로 결합하고 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 비가수분해성 결합으로 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 다수의 올리고머를 인슐린 약물과 연결시키는 결합 모두가 가수 분해성일 수 있지만, 예를 들어 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 신속하게 제거되도록 또는 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 서서히 제거되도록 다양한 가수분해성을 가질 수 있다.

상기 올리고머는 인슐린 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 인슐린 약물에 결합될 수 있으며, 그러한 친핵성 잔기의 예로는 친핵성 히드록실기 및/또는 아미노기가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 약물이 폴리펩티드일 경우, 친핵성 히드록실기는 예를 들어 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 수 있으며, 친핵성 아미노기는 예를 들어 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서, 및/또는 폴리펩티드의 하나이상의 N 말단에서 발견될 수 있다. 올리고머는 인슐린 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합될 때, 그러한 결합은 이차 아민을 형성한다. 상기 인슐린 약물이 인간 인슐린일 경우, 예를 들어 올리고머는 인슐린의 아미노 작용기에 결합될 수 있으며, 그러한 아미노 작용기로는 Gly^{A1} 의 아미노 작용기, Phe^{B1} 의 아미노 작용기, 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기가 있다. 하나의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 두 개의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Phe^{B1} 의 아미노 작용기 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 하나 이상의 올리고머가 인간 인슐린에 결합되는 동안, 단일 접합된 인간 인슐린에서 보다 더 큰 활성이 관찰된 다.

10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 다양한 방법으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 올리고머 혼합물은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 올리고머 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 카르복실산 혼합물과 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 혼합물을 접촉시킴으로써 합성한다. 그런 다음, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 혼합물의 올리고머를 인슐린 약물과 반응하여 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 활성화시킨다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구현예를 도 3에 나타내었고 하기 실시예 11-18에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 4에 나타내었으며 하기 실시예 19-24에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 5에 나타내었으며 하기 실시예 25-29에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 6에 나타내었으며 하기 실시예 30-31에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 7에 나타내었으며 하기 실시예 32-37에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 8에 나타내었으며 하기 실시예 38에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 9에 나타내었으며 하기 실시예 39에 기술하였다. 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 10에 나타내었으며 하기 실시예 40에 기술하였다.

10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물을, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물의 혼합물과 반응시킨다. 바람직한 합성방법을 하기 실시예 41에 기재하였다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있듯이, 반응조건(예: 선택된 몰비, 용매 혼합물, 및/또는 pH)은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물과 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물의 혼합물의 반응으로부터 생성되는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 혼합물이 되도록 조절할 수 있다. 예를 들어, 라이신의 아마노 작용기에서의 접합은 용액의 pH를 라이신의 pK_a 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 인슐린-약물 올리고머의 접합체 혼합물을 예를 들어 실시예 50에 기재한 HPLC를 이용하여 분리하고 유리시켜, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체, 예를 들어 모노-, 디,- 또는 트리-접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 특정 유리된 접합체의 접합 정도(예: 유리된 접합체가 모노-, 디-, 또는 트리-접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지 식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 질량 분광분석법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 접합체 구조(예: 상기 올리고머가 Gly^{A1}, Phe^{B1}, 또는 Lys^{B29} 인간 인슐린 모노접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적인 효소 분해법, 및/또는 엔도펩티다아제 분해법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있는 바와 같이, 인슐린 약물의 하나 이상의 반응부위는 예를 들어 인슐린 약물을 N-tert-부톡시카르보닐(t-BOC) 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단 시약과 반응시킴으로써 차단시킬 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 인슐린 약물이 폴리펩티드이고, 폴리펩티드

의 하나 이상의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화된 접합체(즉, 친핵성 잔기 모두가 접합되지는 않는 접합체)를 형성하고자 할 때, 바람직하다. 그러한 차단 후에, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 차단된 인슐린 약물의 혼합물은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머 혼합물과 반응하여, 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)을 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 모이어티를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후에, 인슐린 약물-올리고머 접합체는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 것과 같이 탈-차단을 시 킬 수 있다. 필요하다면, 그런 다음 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 상기 방법과 같이 분리하여 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 탈-차단하기 전에 분리시킬 수도 있다.

본 발명의 구현예에 따른 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 다분산된 혼합물의 그것과 비교할 때 향상된 특성을 갖는다. 예를 들어, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성보다 큰 in vivo 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(제2판, 1991)에 기재되어 있는 겔 침투 크로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또 다른 예로는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 약 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

특정 혼합물의 in vitro 활성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 바람직하게는, in vitro 활성은 Molecular Devices Corporation of Sunnyvale, California에서 상업적으로 판매하고 있는 Cytosensor ® Microphysiometer를 이용하여 측정한다. 마이크로피지오미터(microphysiometer)는 트랜스웰(transwell)에 있는 배양된 세포에 부가되는 약물에 반응하는 세포외 산화 속도의 작은 변화를 모니터한다. 이러한 반응은 연구하고자 하는 분자의 활성에 비례한다. 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 10% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성과 비교할 때, 더 증가된 키모트립신에 의한 분해 저항성을 갖 는다. 키모트립신에 대한 저항성은 시험하고자 하는 분자를 하기 실시예 52에 개략적으로 나타낸 것과 유사한 방법을 이용하여 키모트립신에서 소화시킬 때 남아있는 물질의 백분율에 해당한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 20% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 개체간 변이성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 다음과 같이 계산한다. 약물반응곡선하 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저치 사이의 면적)을 각각의 개체에서 측정한다. 각각의 개체에서의 AUC를 합하고 그 합을 개체의 숫자로 나눔으로써 모든 개체에 대한 평균 AUC를 결정한다. 그런 다음, 개체의 AUC와 평균 AUC 간의 차이의 절대치를 각각의 개체에 대하여 결정한다. 그리하여 얻어진 그 차이의 절대적 수치를 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 사용한다. 더 낮은 값은 개체간 변이성이 더 낮다는 것을 나타내고, 더 높은 값은 개체간 변이성이 더 크다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합

물의 개체간 변이성보다 약 10% 이상 더 작다. 보다 바람직하게는, 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 25% 이상 더 작다.

본 발명의 구현예에 따른 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는 상기 특성중에서 2 개 이상의 특성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 상기 특성중에서 3 개 이상의 특성을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 10,000보다 더 큰 분산계수를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 상기 특성 4개 모두를 갖는다.

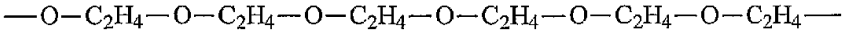
본 발명의 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하고 동일한 숫자의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 접합체의 혼합물을 제공한다.

상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인슐린이다. 보다 바람직하게는, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이다. 그러나, 인슐린 약물이 예를 들어, 프로인슐린, 인슐린 유사체, 인슐린 단편, 및 인슐린 단편 유사체를 포함한 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 다양한 인슐린 약물로부터 선택될 수 있다는 것을 알아야 한다. 인슐린 유사체로는 상기 치환 가이드라인을 이용하여 제공되는 유사체 뿐만 아니라 ASP ^{B28} 인간 인슐린, Lys ^{B28} 인간 인슐린, Leu ^{B28} 인간 인슐린, Val ^{B28} 인간 인슐린, Ala ^{B28} 인간 인슐린, Asp ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Lys ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Leu ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Val ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Ala ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편으로는 B22-B30 인간 인슐린, B23-B30 인간 인슐린, B25-B30 인간 인슐린, B26-B30 인간 인슐린, B27-B30 인간 인슐린, B29-B30 인간 인슐린, 인간 인슐린의 A 체인, 및 인간 인슐린의 B 체인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편 유사체는 인슐린 단편에서 상기한 바와 같이 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

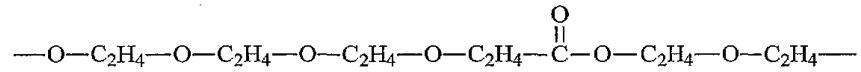
상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려져 있는 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머의 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 5 또는 6개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게 는 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 다른 모이어티를 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 부가적인 친수성 모이어티, 친지성 모이어티, 스페이서 모이어티, 링커 모이어티, 및 종결 모이어티가 있으나 이에 한정되지는 않는다. 상기 올리고머의 다양한 모이어티는 가수분해성 결합 또는 비가수분해성 결합에 의해 서로 공유결합된다.

상기 올리고머는 하나 이상의 부가적인 친수성 모이어티(즉, 폴리에틸렌 글리콜 이외의 모이어티)를 더 포함할 수 있으며, 그러한 예로는 당, 폴리알킬렌 옥사이드, 및 폴리아민/PEG 코폴리머가 있으며 이에 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜이 폴리알킬렌 옥사이드일 경우, 부가적인 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티일 수 있다. 인접합 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 에테르 결합으로 연결된다면 동일한 모이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어, 모이어티



은 여섯 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다. 이 모이어티가 상기 올리고머의 유일한 친수성 모이어티라면, 상기 올리고머는 부가적인 친수성 모이어티를 함유하지 않을 것이다. 그들이 에테르 결합 이외의 결합으로 연결된다면, 인접한 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 서로 다른 모 이어티로 여겨질 것이다. 예를 들어,



는 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛과 두 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 부가적인 친수성 모이어티이다. 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하며 부가적인 친수성 모이어티를 포함하지 않는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 친지성 모이어티를 더 포함할 수 있다. 상기 친지성 모이어티는 바람직하게는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 알킬 모이어티 또는 포화 또는 불포화의, 선형 또는 분지형의 지방산 모이어티이다. 친지성 모이어티가 알킬 모이어티일 경우, 바람직하게는 1

개 내지 28개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 알킬 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 알킬 모이어티는 2 개 내지 12 개의 탄소 원자를 갖는다. 상기 친지성 모이어티가 지방산 모이어티일 경우, 바람직하게는 2 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 선형의 포화 또는 불포화의 천연 지방산 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 3 개 내지 14 개의 탄소 원자를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 4 개, 5 개, 또는 6 개 이상의 탄소 원자를 갖는다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 하나 이상의 스페이서 모이어티를 포함할 수 있다. 스페이서 모이어티는, 예를 들어 친수성 모이어티를 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 친지성 모이어티 또는 친수성 모이어티를 인슐린 폴리펩티드로부터 분리시키고, 제 1 친수성 또는 친지성 모이어티를 제 2 친수성 또는 친지성 모이어티로부터 분리시키고, 또는 친수성 모이어티 또는 친지성 모이어티를 링커 모이어티로부터 분리시키는데 사용될 수 있다. 스페이서 모이어티는 바람직하게는 당, 콜레스테롤, 및 글리세린 모이어티로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 링커 모이어티는 바람직하게는 알킬 모이어티 및 지방산 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다.

상기 올리고머는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 하나 이상의 종결 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 종결 모이어티는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이며, 보다 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 종결 모이어티는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 모이어티가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이지만, 상기 종결 모이어티는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 모이어티일 수 있다는 것을 알아야 하며, 이러한 예로는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 올리고머는 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 인슐린 약물은 가수분해성 결합(예: 에스테르 또는 카보네이트 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 프로드럭으로서 작용하는 인슐린 약 물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우에는(즉, 접합체가 인슐린 약물의 주요 작용기전을 통해 신체에 효과를 주는 능력이 결여된 경우), 하나 이상의 올리고머가 각각의 인슐린 약물-올리고머 접합체로부터 분리되기 때문에, 가수분해성 결합이 시간-방출성 또는 제어방출성 효과를 위해 주어진 시간에 걸쳐 인슐린 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구현에에서, 인슐린 약물은 비가수분해성 결합(예: 카바메이트, 아마이드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 비가수분해성 결합은, 인슐린 약물-올리고머 접합체를 연장된 시간 동안, 바람직하게는 2시간 이상동안 혈류를 순환시키고자 할 때 사용하는 것이 바람직하다. 올리고머를 인슐린 약물에 공유결합할 경우, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는, 인슐린 약물에 올리고머를 공유결합시키는데 사용되는 하나 이상의 결합 모이어티를 더 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 모이어티, 카보네이트 모이어티, 카바메이트 모이어티, 아마이드 모이어티, 및 이차 아민 모이어티로 구성된 그룹에서 선택된다. 올리고머의 하나이상의 모이어티가 인슐린 약물에 공유결합될 수 있다.

상기 올리고머가 바람직하게는 인슐린 약물에 공유결합 되지만, 상기 올리고머는 비공유결합되어 비공유결합으로 접합된 인슐린 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있다는 것을 알아야 한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있듯이, 비공유결합에는 수소결합, 이온결합, 반데르발스 결합, 및 미셀 또는 리포좀 캡슐화가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구현예에 따르 면, 올리고머는 적절히 제조되고, 변형하고 및/또는 적절히 작용기를 가하여 선택된 방법으로 비공유결합을 할 수 있는 능력(예: 수소결합 능력을 부여하는 것)을 부여할 수 있으며, 이는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 다양한 화합물로 유도될 수 있으며, 이러한 다양한 화합물로는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산, 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 실리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산, 및 아미노살리실산 유도체가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 결과 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합 할 수 있다. 그 결과 생성되는 복합체는 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이루는 것이 바람직하다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도될 수 있다. 적절한 산성 조건 하에서, 그 결과 생성된 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체 형성 결과 생성된 생성물은 바람직하게는 친지성 및 친수성이 균형을 이룬다.

하나 이상의 올리고머(즉, 다수의 올리고머)는 인슐린 약물에 결합될 수 있다. 그러나, 다수의 올리고머가 서로 다르거나, 다수의 올리고머중 일부가 동일하거나 일부가 다를 수 있다. 다수의 올리고머가 인슐린 약물에 결합할 때, 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 가수분해성 결합으로 결합하고 하나 이상의 올리고머가 인슐린 약물과 비가수분해성 결합으로 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 다수의 올리고머를 인슐린 약물과 연결시키는 결합 모두가 가수 분해성일 수 있지만, 예를 들어 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 신속하게 제거되도록 또는 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 인슐린 약물로부터 서서히 제거되도록 다양한 가수분해성을 가질 수 있다.

상기 올리고머는 인슐린 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 인슐린 약물에 결합될 수 있으며, 그러한 친핵성 잔기의 예로는 친핵성 히드록실기 및/또는 아미노기가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 약물이 폴리펩티드일 경우, 친핵성 히드록실기는 예를 들어 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 수 있으며, 친핵성 아미노기는 예를 들어 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서, 및/또는 폴리펩티드의 하나이상의 N 말단에서 발견될 수 있다. 올리고머는 인슐린 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합될 때, 그러한 결합은 이차 아민을 형성한다. 상기 인슐린 약물이 인간 인슐린일 경우, 예를 들어 올리고머는 인슐린의 아미노 작용기에 결합될 수 있으며, 그러한 아미노 작용기로는 Gly^{A1} 의 아미노 작용기, Phe^{B1} 의 아미노 작용기, 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기가 있다. 하나의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 두 개의 올리고머가 인간 인슐린에 결합될 때, 상기 올리고머는 바람직하게는 Phe^{B1} 의 아미노 작용기 및 Lys^{B29} 의 아미노 작용기에 결합된다. 하나 이상의 올리고머가 인간 인슐린에 결합되는 동안, 단일 접합된 인간 인슐린에서 보다 더 큰 활성이 관찰된 다.

혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 다양한 방법으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성된 올리고머 혼합물은 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 카르복실산 혼합물을 혼합물의 각각의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 동일한 숫자의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 혼합물과 접촉시킴으로써 합성한다. 그런 다음, 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 혼합물의 올리고머를 인슐린 약물과 반응하여 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 활성화시킨다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구현예를 도 3에 나타내었고 하기 실시예 11-18에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물의 합성경로의 또 다른 구현예를 도 4에 나타내었으며 하기 실시예 19-24에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 5에 나타내었으며 하기 실시예 25-29에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 6에 나타내었으며 하기 실시예 30-31에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 7에 나타내었으며 하기 실시예 32-37에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 8에 나타내었으며 하기 실시예 38에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 9에 나타내었으며 하기 실시예 39에 기술하였다. 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예를 도 10에 나타내었으며 하기 실시예 40에 기술하였다.

혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 인슐린 약물의 혼합물과 반응시킨다. 바람직한 합성방법 하기 실시예 41에 기재하였다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있듯이, 반응조건(예: 선택된 몰비, 용매 혼합물, 및/또는 pH)은 혼합물의 각각의 올리고머가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 인슐린 약물의 혼합물의 반응으로부터 생성되는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서 브유닛을 갖는 접합체의 혼합물이 되도록 조절할 수 있다. 예를 들어, 라이신의 아마노 작용기에서의 접합은 용액의 pH를 라이신의 pK_a 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 인슐린-약물 올리고머의 접합체 혼합물을 예를 들어 실시예 50에 기재한 HPLC를 이용하여 분리하고 유리시켜, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체, 예를 들어 모노-, 디,- 또는 트리-접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 특정 유리된 접합체의 접합 정도(예: 유리된 접합체가 모노-, 디-, 또는 트리-접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 질량 분광분석법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 접합체 구조(예: 상기 올리고머가 Gly^{A1}, Phe^{B1}, 또는 Lys^{B29} 인간 인슐린 모노접합체인지 여부)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기술을 이용하여 결정하고/거나 증명할 수 있으며, 그러한 예로는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적인 효소 분해법, 및/또는 엔도펩티다아제 분해법이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 알고 있는 바와 같이, 인슐린 약물의 하나 이상의 반응부위는 예를 들어 인슐린 약물을 N-tert-부톡시카르보닐(t-BOC) 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단 시약과 반응시킴으로써 차단시킬 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 인슐린 약물이 폴리펩티드이고, 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화된 접합체(즉, 친핵성 잔기 모두가 접합되지는 않는 접합체)를 형성하고자 할 때, 바람직하다. 그러한 차단 후에, 혼합물의 각각의 올리고머를 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 반응시켜, 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)을 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 모이어티를 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후에, 인슐린 약물-올리고머 접합체는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 것과 같이 탈-차단을 시

킬 수 있다. 필요하다면, 그런 다음 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 상기 방법과 같이 분리하여 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 탈-차단하기 전에 분리시킬 수도 있다.

본 발명의 구현예에 따른 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 다분산된 혼합물의 그것과 비교할 때 향상된 특성을 갖는다. 예를 들어, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성보다 큰 in vivo 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유 닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(제2판, 1991)에 기재되어 있는 겔 침투 크로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또 다른 예로는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있듯이, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피(size execlusion chromatography)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

특정 혼합물의 in vitro 활성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 바람직하게는, in vitro 활성은 Molecular Devices Corporation of Sunnyvale, California에서 상업적으로 판매하고 있는 Cytosensor ® Microphysiometer를 이용하여 측정한다. 마이크로피지오미터(microphysiometer)는 트랜스웰(transwell)에 있는 배양된 세포에 부가되는 약물에 반응하는 세포외 산화 속도의 작은 변화를 모니터한다. 이러한 반응은 연구하고자 하는 분자의 활성에 비례한다. 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 in vitro 활성이 다분산된 혼합물의 in vitro 활성보다 약 10% 이상 더 크다.

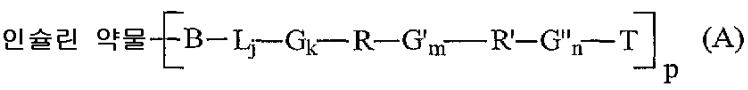
또 다른 예를 들면, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성과 비교할 때, 더 증가된 키모트립신에 의한 분해 저항성을 갖는다. 키모트립신에 대한 저항성은 시험하고자 하는 분자를 하기 실시예 52에 개략적으로 나타낸 것과 유사한 방법을 이용하여 키모트립신에서 소화시킬 때 남아있는 물질의 백분율에 해당한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성은 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 저항성보다 약 20% 이상 더 크다.

또 다른 예를 들면, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 알려져 있듯이, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 수평균 분자량과 다분산된 혼합물의 수평균 분자량은 다양한 방법으로 측정될 수 있으며, 그러한 예로는 크기 배제 크로마토그래피가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 개체간 변이성은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 다음과 같이 계산한다. 약물반응곡선하 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저치 사이의 면적)을 각각의 개체에서 측정한다. 각각의 개체에서의 AUC를 합하고 그 합을 개체의 숫자로 나눔으로 써 모든 개체에 대한 평균 AUC를 결정한다. 그런 다음, 개체의 AUC와 평균 AUC 간의 차이의 절대치를 각각의 개체에 대하여 결정한다. 그리하여 얻어진 그 차이의 절대적 수치를 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 사용한다. 더 낮은 값은 개체간 변이성이 더 낮다는 것을 나타내고, 더 높은 값은 개체간 변이성이 더 크다는 것을 나

타낸다. 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 10% 이상 더 작다. 보다 바람직하게는, 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 개체간 변이성은 다분산된 혼합물의 개체간 변이성보다 약 25% 이상 더 작다.

본 발명의 구현예에 따른 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 상기 특성중에서 2 개 이상의 특성을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 상기 특성중에서 3 개 이상의 특성을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 혼합물의 각각의 접합체가 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 상기 특성 4개 모두를 갖는다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 가지며 하기 식 A의 구조를 갖는 접합체 혼합물을 제공한다:



상기 식에서,

B는 결합 모이어티이고;

L은 링커 모이어티이고;

G, G', 및 G'은 개별적으로 선택된 스페이서 모이어티이고;

R은 친지성 모이어티이고 R'은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이거나, R'은 친지성 모이어티이고 R은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이고;

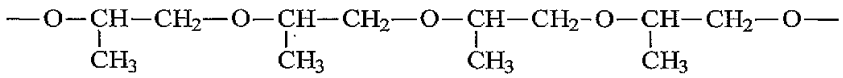
T는 종결 모이어티이고;

j, k, m, 및 n은 개별적으로 0 또는 1이며;

p는 1 내지 인슐린 약물 상의 친핵성 잔기의 수이다.

상기 인슐린 약물은 바람직하게는 인슐린이다. 보다 바람직하게는, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이다. 그러나, 인슐린 약물이 예를 들어, 프로인슐린, 인슐린 유사체, 인슐린 단편, 및 인슐린 단편 유사체를 포함한 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있는 다양한 인슐린 약물로부터 선택될 수 있다는 것을 알아야 한다. 인슐린 유사체로는 상기 치환 가이드라인을 이용하여 제공되는 유사체 뿐만 아니라 ASP ^{B28} 인간 인슐린, Lys ^{B28} 인간 인슐린, Leu ^{B28} 인간 인슐린, Val ^{B28} 인간 인슐린, Ala ^{B28} 인간 인슐린, Asp ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Lys ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Leu ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Val ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린, Ala ^{B28} Pro ^{B29} 인간 인슐린이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편으로는 B22-B30 인간 인슐린, B23-B30 인간 인슐린, B25-B30 인간 인슐린, B26-B30 인간 인슐린, B27-B30 인간 인슐린, B29-B30 인간 인슐린, 인간 인슐린의 A 체인, 및 인간 인슐린의 B 체인이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 인슐린 단편 유사체는 인슐린 단편에서 상기한 바와 같이 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

본 발명의 이러한 구현예에 따르면, 올리고머의 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4 이상의 폴리알킬렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 5 또는 6 이상의 폴리알킬렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 가장 바람직하게는 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 7 이상의 폴리알킬렌 글리콜 서브유닛을 갖는다. 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 폴리프로필렌 글리콜 모이어티, 또는 폴리부틸렌 글리콜 모이어티와 같은 저급 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이다. 보다 바람직하게는, 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 또는 폴리프로필렌 글리콜 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티이다. 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티가 폴리프로필렌 글리콜 모이어티일 경우, 그 모이어티는 바람직하게는 균일한(즉, 무작위가 아닌) 구조를 갖는다. 균일한 구조를 갖는 폴리프로필렌 글리콜 모이어티 의 예는 다음과 같다:



이러한 균일한 폴리프로필렌 글리콜 구조는 폴리프로필렌 글리콜 체인에 있는 각각의 산소 원자에 인접한 탄소원자가 단지 하나의 메틸이 치환된 것이라고 기재할 수 있다. 그러한 균일한 프로필렌 글리콜 모이어티는 친지성과 친수성 모두를 나타낼 수 있어 친지성 폴리머 모이어티를 사용하지 않고 양친매성 인슐린 약물-올리고머 접합체를 제공하는데 유용하다. 더욱이, 프로필렌 글리콜 모이어티의 이차 알콜 모이어티를 약물과 함께 결합함으로써 예를 들어 위에서 발견되는 트립신과 키모트립신과 같은 효소의해 유발되는 분해에 대하여 향상된 저항성을 갖는 인슐린 약물(예: 인간 인슐린)을 제공할 수 있다.

본 발명의 구현예에 따른 균일한 폴리프로필렌 글리콜은 바람직하게는 이하 설명하는 도 11 내지 13에 나타낸 방법과 같이 합성한다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 1,2-프로판디올 (53)을 일차 알콜 차단시약과 반응시켜 이차 알콜 연장 모노머(alcohol extension monomer) (54)를 생성시킨다. 상기 일차 알콜 차단시약은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 일차 알콜 차단시약일 수 있으며, 그러한 예로는 t-부틸디페닐실릴클로라이드 및 t-부틸디메틸실릴클로라이드와 같은 실릴클로라이드 화합물과 Ac_2O와 같은 에스테르화 시약이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 일차 알콜 차단시약은 t-부틸디페닐실릴클로라이드 또는 t-부틸디메틸실릴클로라이드와 같은 이차 알콜과 실질 적으로 반응성이 없는 일차 알콜 차단시약이다. 상기 이차 알콜 연장 모노머 (54)는 메탄술포닐 클로라이드($MeSO_2Cl$)과 반응하여 일차 연장 알콜 모노머 메실레이트 (55)를 생성할 수 있다.

또 다른 방법으로는, 이차 알콜 연장 모노머 (54)를 이차 알콜 차단시약과 반응시켜 화합물 (56)을 생성시킬 수 있다. 이차 알콜 차단시약은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 이차 알콜 차단시약일 수 있으며, 그러한 예로는 벤질 클로라이드가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 화합물 (56)은 B_1 탈차단시약과 반응시켜 차단 모이어티 B1을 제거하여 일차 알콜 연장 모노머 (57)를 생성할 수 있다. 상기 B1 탈차단시약은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 탈차단시약일 수 있다. 상기 일차 알콜이 에스테르를 형성함으로써 차단될 경우, B_1 탈차단시약은 염기(예: 탄산칼륨)와 같은 탈에스테르화 시약이다. 일차 알콜을 실릴클로라이드를 이용하여 차단시킬 경우, B_1 탈차단시약은 바람직하게는 테트라부틸암모늄 플루오라이드(TBAF)이다. 일차 알콜 연장 모노머 (57)은 메탄 술포닐 클로라이드와 반응시켜 이차 알콜 연장 모노머 메실레이트 (58)을 생성할 수 있다.

일차 알콜 연장 모노머 (primary alcohol extension monomer)(54)와 이차 알콜 연장 모노머(57)은 다음과 같이 캡핑(capping)될 수 있다. 이차 알콜 연장 모노머(54)는 캡핑시약(capping reagent)과 반응하여 화합물(59)를 형성할 수 있다. 상기 캡핑시약은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 메틸 클 로라이드 (methyl chloride)와 같은 알킬 할라이드 (alkyl halides)를 포함하는 다양한 캡핑시약일 수 있다. 화합물(59)는, 앞에서 설명된 바와 같이, B_1 탈차단시약(de-blocking agent)과 반응하여, 일차 알콜 캡핑 모노머 (primary alcohol capping monomer)(60)을 형성할 수 있다. 일차 알콜 캡핑 모노머(60)은, 메탄 술포닐 클로라이드 (methane sulfonyl chloride)와 반응하여, 이차 알콜 캡핑 모노머 메실레이트 (secondary alcohol capping monomer mesylate)(61)을 형성할 수 있다. 일차 알콜 연장 모노머(57)은 캡핑시약과 반응하여, 화합물(62)를 형성할 수 있다. 상기 캡핑시약은 앞에서 설명한 바와 같은 다양한 캡핑시약일 수 있다. 화합물(62)는, B_2 탈차단시약와 반응하여 차단 모이어티 (blocking moiety) B_2 를 제거하므로써, 이차 알콜 캡핑 모노머(63)을 형성할 수 있다. 상기 B_2 탈차단시약은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 팔라듐/활성탄 촉매 존재하의 H_2 를 포함하는 다양한 탈차단시약일 수 있다. 이차 알콜 캡핑 모노머는, 메탄 술포닐 클로라이드와 반응하여, 일차 알콜 캡핑 모노머 메실레이트 (64)를 형성할 수 있다. 도 11에 도시된 구현예가 캡핑 모노머의 합성을 보여주고 있지만, 캡핑 폴리머를 형성하기 위하여 유사한 반응이 수행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

일반적으로, 체인 연장(chain extensions)은, 일차 알콜 연장 모노머(57)과 같은 일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머를, 일차 알콜 연장 모노머 메실레이트(55)와 같은 일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머 메실레이트와 반응시켜 서, 여러가지 균일한 폴리프로필렌 체인 (uniform polypropylene chain)을 형성시키므로써 달성될 수 있으며, 또는, 이차 알콜 연장 모노머(54)와 같은 이차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머를, 이차 알콜 연장 모노머 메실레이트(58)과 같은 이차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머 메실레이트와 반응시키므로써 달성될 수 있다.

예를 들면, 도 12에서, 일차 알콜 연장 모노머 메실레이트(55)가 일차 알콜 연장 모노머(57)과 반응하여 다이머(dimer) 화합물(65)를 형성한다. 이와 달리, 이차 알콜 연장 모노머 메실레이트(58)이 이차 알콜 연장 모노머(54)와 반응하여, 다이머 화합물(65)를 형성할 수 있다. 다이머 화합물(65)의 B_1 차단 모이어티를, 앞에서 설명한 바와 같이, B_1 탈차단시약을 사용하여 제거하므로써, 일차 알콜 연장 다이머(66)을 형성할 수 있다. 일차 알콜 연장 다이머(66)은 메탄 술포닐 클로라이드와 반응하여, 이차 알콜 연장 다이머 메실레이트(67)을 형성할 수 있다. 이와 달리, 다이머 화합물(65)의 B_2 차단 모이어티를, 앞에서 설명한 바와 같이, B_2 탈차단시약을 사용하여 제거하므로써, 이차 알콜 연장 다이머(69)를 형성할 수 있다. 이차 알콜 연장 다이머(69)는 메탄 술포닐 클로라이드와 반응하여, 일차 알콜 연장 다이머 메실레이트(70)을 형성할 수 있다.

당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 다양한 다른 체인 길이를 얻기 위하여, 상기 체인연장 공정을 반복할 수 있다. 예를 들어, 도 13에 도시된 바와 같이, 일차 알콜 연장 다이머(66)은, 일차 알콜 연장 다이머 메실레이트(70)과 반응하여, 테트라머(tetramer) 화합물(72)를 형성할 수 있다. 도 13에 추가적으로 도시된 바 와 같이, 체인 연장 반응의 일반식은, 일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머(73)을 일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머 메실레이트(74)와 반응시켜서, 균일한 폴리프로필렌 폴리머(75)를 형성하는 것을 포함한다. m과 n의 값은 각각, 0 내지 1000 이상의 범위를 가질 수 있다. 바람직하게는, m과 n은 각각, 0 내지 50 일 수 있다. 도 13에 도시된 구현예가, 일차 알콜 연장 모노머 및/또는 폴리머가 일차 알콜 연장 모노머 및/또는 폴리머 메실레이트와 반응하는 것을 보여주고 있지만, 이차 알콜 연장 모노머 및/또는 폴리머와 이차 알콜 연장 모노머 및/또는 폴리머 메실레이트를 사용하는 유사한 반응이 수행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머의 말단, 또는, 일차 알콜 연장 모노머 또는 메실레이트의 말단은, 일차 알콜 캡핑 모노머 또는 폴리머 메실레이트, 또는, 일차 알콜 캡핑 모노머 또는 폴리머와, 각각 반응하여, 캡핑된 균일한 폴리프로필렌 체인을 형성한다. 예를 들면, 도 12에 도시된 바와 같이, 일차 알콜 연장 다이머 메실레이트(70)은 일차 알콜 캡핑 모노머(60)과 반응하여, 캡핑/차단된 일차 알콜 연장 트라이머(trimer)(71)을 형성한다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, B_1 차단 모이어티는 제거될 수 있으며, 그 결과 얻어지는 캡핑된 일차 알콜 연장 트라이머는 일차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머 메실레이트와 반응하여, 캡핑된 트라이머(71)의 체인을 연장할 수 있다.

이차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머의 말단, 또는, 이차 알콜 연장 모노머 또는 폴리머 메실레이트의 말단은, 이차 알콜 캡핑 모노머 또는 폴리머 메실레이 트, 또는, 이차 알콜 캡핑 모노머 또는 폴리머와, 각각 반응하여, 캡핑된 균일한 폴리프로필렌 체인을 형성할 수 있다. 예를 들면, 도 12에 도시된 바와 같이, 이차 알콜 연장 다이머 메실레이트(67)은 이차 알콜 캡핑 모노머(63)과 반응하여, 캡핑/차단된 이차 알콜 연장 트라이머(68)을 형성한다. B_2 차단 모이어티는 앞에서 설명한 바와 같이 제거될 수 있으며, 그 결과 얻어진 캡핑된 이차 알콜 연장 트라이머는 이차 알콜 연장 머(mer) 메실레이트와 반응하여, 캡핑된 트라이머(68)의 체인을 연장한다. 도 12에 도시된 합성들이, 다이머(dimer)와 캡핑 모노머가 반응하여 트라이머를 형성하는 것을 보여주고 있지만, 상기 캡핑 공정이, 균일한 폴리프로필렌 글리콜 모이어티의 합성과정의 임의의 시점에서 수행될 수 있으며, 또는, 이와 달리, 균일한 폴리프로필렌 글리콜 모이어티가 캡핑되지 않은 채로 형성될 수도 있다는 것이 이해되어야 한다. 도 12에 도시된 구현예가, 캡핑 모노머와의 합성에 의한 폴리부틸렌 올리고머의 캡핑을 보여주고 있지만, 본 발명의 폴리부틸렌 올리고머가, 앞의 도 11에서 설명된 바와 같이 캡핑시약을 사용하여 직접 (즉, 캡핑 모노머를 첨가하지 않고도) 캡핑될 수도 있다는 것이 이해되어야 한다.

본 발명의 구현예에 따른 균일한 폴리프로필렌 글리콜 모이어티는, 인슐린 약물, 카르복실산과 같은 친유성 모이어티, 및/또는 여러가지 다른 모이어티와 결합될 수 있으며, 이때, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티와 관련하여 본 명세서에서 설명된 것들을 포함하는 다양한 방법이 사용될 수 있다.

이러한 본 발명의 구현예들에 있어서, 상기 친유성 모이어티는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 친유성 모이어티이다. 상기 친유성 모이어티는 바람직하게는, 포화 또는 불포화, 선형 또는 분지형 알킬 모이어티이거나, 또는, 포화 또는 불포화, 선형 또는 분지형 지방산(fatty acid) 모이어티이다. 상기 친유성 모이어티가 알킬 모이어티인 경우에, 그것은 바람직하게는, 1 내지 28 개의 탄소원자를 갖는 선형, 포화 또는 불포화 알킬 모이어티이다. 더욱 바람직하게는, 상기 알킬 모이어티는 2 내지 12 개의 탄소원자를 갖는다. 상기 친유성 모이어티가 지방산 모이어티인 경우에, 그것은 바람직하게는, 2 내지 18 개의 탄소원자를 갖는 선형, 포화 또는 불포화 천연 지방산 (natural fatty acid) 모이어티이다. 더욱 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 3 내지 14 개의 탄소원자를 갖는다. 가장 바람직하게는, 상기 지방산 모이어티는 4, 5 또는 6 개 이상의 탄소원자를 갖는다.

이러한 본 발명의 구현예들에 있어서, 상기 스페이서(spacer) 모이어티, G, G' 및 G'는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 스페이서 모이어티이다. 스페이서 모이어티는 바람직하게는, 당(sugar), 콜레스테롤(cholesterol) 및 글리세린(glycerine) 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 이러한 구현예들의 올리고머는 스페이서 모이어티를 포함하지 않는다 (즉, 바람직하게는 k, m 및 n이 0 이다).

이러한 본 발명의 구현예들에 있어서, 상기 링커(linker) 모이어티 L은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 상기 올리고머를 상기 약물과 결합하기 위하여 사용될 수 있다. 링커 모이어티는 바람직하게는, 알킬 및 지방산 모이어티로 이루 어진 군으로부터 선택된다.

이러한 본 발명의 구현예들에 있어서, 종결 모이어티 (terminating moiety)는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이며, 더욱 바람직하게는 저급 알킬 (lower alkyl) 또는 저급 알콕시 (lower alkoxy) 모이어티이다. 가장 바람직하게는, 상기 종결 모이어티는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 모이어티가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 모이어티이지만, 상기 종결 모이어티는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 당(sugar), 콜레스테롤, 알콜(alcohols), 및 지방산을 포함하는 다양한 모이어티라는 것이 이해되어야 한다.

이러한 본 발명의 구현예들에 있어서, 상기 올리고머는, 화학식 A의 구조의 괄호로 묶인 부분에 의하여 표시되어 있

는데, 상기 인슐린 약제에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 상기 인슐린 약제는, 가수분해성 결합 (hydrolyzable bond)을 이용하여(즉, 에스테르(ester) 또는 카보네이트(carbonate) 결합을 이용하여), 상기 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은, 프로드러그(prodrug)로서 작용하는 인슐린 약제-올리고머 접합체(conjugate)를 제공할 수 있다. 어떤 경우에는, 예를 들면, 상기 인슐린 약제-올리고머 접합체가 비활성인 경우에(즉, 상기 접합체가 상기 인슐린 약제의 1차 작용기작을 통하여 신체에 영향을 주는 능력을 결여하는 경우), 가수분해성 결합은 시간-방출(time-release) 또는 제어-방출(controlled-release) 효과를 제공할 수 있는데, 그에 따라, 하나 이상의 올리고머가 그들 각각의 인슐린 약제-올리고머 접합체로부터 쪼개어져서 활성 약제가 생성되므로, 상기 인슐린 약제를 주어진 시간 구간에 걸쳐서 투여할 수 있게 된다. 다른 구현예에서는, 상기 인슐린 약제가, 비가수분해성 결합을 통하여 (예를 들면, 카바메이트(carbamate), 아미드(amide), 또는 에테르(ether) 결합을 통하여), 상기 올리고머에 결합된다. 상기 인슐린 약제-올리고머 접합체가 장기간 동안, 바람직하게는 2 시간 이상 동안, 혈류 속에서 순환하도록 하는 것이 바람직한 경우에는, 비가수분해성 결합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 결합 모이어티 (bonding moiety) B는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 다양한 결합 모이어티일 수 있다. 결합 모이어티는 바람직하게는, 공유결합, 에스테르 모이어티, 카보네이트 모이어티, 카바메이트 모이어티, 아미드 모이어티 및 2차 아민 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

상기 변수 p는 1 부터, 상기 인슐린 약제의 친핵성 잔기 (nucleophilic residues)의 수 까지의 정수이다. p가 1 보다 큰 경우에는, 하나 보다 많은 올리고머 (즉, 복수의 올리고머)가 상기 약제에 결합된다. 본 발명의 이러한 구현예에 있어서, 상기 복수의 올리고머는 동일한 것이다. 복수의 올리고머가 상기 인슐린 약제에 결합되는 경우에, 가수분해성 결합을 통하여 하나 이상의 올리고머를 상기 인슐린 약제에 결합시키고, 비가수분해성 결합을 통하여 하나 이상의 올리고머를 상기 인슐린 약제에 결합시키는 것이 바람직할 수 있다. 이와 달리, 상기 복수의 올리고머와 상기 인슐린 약제를 연결하는 모든 결합이 가수분해성일 수도 있으나, 다양한 가수분해도(degree of hydrolyzability)를 가질 수 있으며, 그에 따라, 예를 들면, 하나 이상의 올리고머는 신체 내에서의 가수분해에 의하여 상기 인슐린 약물로부터 신속하게 제거되며, 하나 이상의 올리고머는 신체 내에서의 가수분해에 의 하여 상기 인슐린 약물로부터 천천히 제거된다.

상기 올리고머는 상기 인슐린 약물와, 비제한적인 예로서, 친핵성 히드록실 작용기 (hydroxyl functions) 및/또는 아미노 작용기 (amino functions)를 포함하는 상기 인슐린 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 결합될 수 있다. 상기 인슐린 약물이 폴리펩티드(polypeptide)인 경우에는, 친핵성 히드록실 작용기가, 예를 들면, 세린(serine) 및/또는 티로신(tyrosine) 잔기에서 발견될 수 있으며, 친핵성 아미노 작용기는, 예를 들면, 히스티딘(histidine) 및/또는 라이신(lysine) 잔기에서, 및/또는 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단(N-termini)에서 발견될 수 있다. 올리고머가 상기 인슐린 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단과 결합되는 경우에는, 그 결합은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 상기 인슐린 약물이, 예를 들어, 사람 인슐린인 경우에는, 상기 올리고머는, Gly ^{A1} 의 아미노 작용기, Phe ^{B1} 의 아미노 작용기, 및 Lys ^{B29} 의 아미노 작용기를 포함하는 상기 인슐린의 아미노 작용기와 결합될 수 있다. 하나의 올리고머가 사람 인슐린과 결합되는 경우에는, 상기 올리고머는 바람직하게는, Lys ^{B29} 의 아미노 작용기와 결합된다. 두개의 올리고머가 사람 인슐린과 결합되는 경우에는, 상기 올리고머는 바람직하게는, Phe ^{B1} 의 아미노 작용기 및 Lys ^{B29} 의 아미노 작용기와 결합된다. 하나 보다 많은 올리고머가 사람 인슐린과 결합될 수 있지만, 단일-접합된 사람 인슐린 (mono-conjugated human insulin)의 경우에 더 높은 활성 (향상된 글루코스 강하 능력)이 발견된다.

인슐린 약물-올리고머 접합체들의 혼합물은, 상기 혼합물 중의 각각의 접합체가 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 구조를 갖는 경우에, 여러가지 방법에 의하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 카르복실산과 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 올리고머 혼합물은, 올리고머 혼합물을 형성하기에 충분한 조건하에서, 카르복실산의 혼합물을 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물과 접촉시키므로써 합성될 수 있다. 그리고 나서, 상기 혼합물의 올리고머는, 인슐린 약물-올리고머 접합체를 형성하기 위하여 인슐린 약물와 반응할 수 있도록, 활성화된다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 일 구현예가 도 3에 도시되어 있고 하기의 실시예 11~18에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 4에 도시되어 있고 하기의 실시예 19~24에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 5에 도시되어 있고 하기의 실시예 25~29에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 6에 도시되어 있고 하기의 실시예 30~31에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 7에 도시되어 있고 하기의 실시예 32~37에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 8에 도시되어 있고 하기의 실시예 38에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 9에 도시되어 있고 하기의 실시예 39에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다. 활성화된 올리고머 혼합물을 형성하기 위한 합성 경로의 또 다른 구현예가 도 10에 도시되어 있고 하기의 실시예 40에 설명되어 있는데, 이때, 각각의 올리고머는 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있다.

각각의 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있는 상기 활성화된 올리고머 혼합물은, 각각의 약물이 동일한 분자량을 갖고 있는 인슐린 약물 혼합물과, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 형성하기에 충분한 조건 하에서 반응하여, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 형성한다. 바람직한 합성이 하기의 실시예 41에 설명되어 있다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, (예를 들면, 선택된 몰비, 용매 혼합물 및/또는 pH와 같은) 반응조건을 제어하므로써, 각각의 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있는 상기 활성화된 올리고머 혼합물과 상기 인슐린 약물 혼합물의 반응으로부터 얻어진 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 접합체 혼합물이 되도록 할 수 있다. 예를 들면, 라이신의 아미노 작용기에서의 접합(conjugation)은, 반응 용액의 pH를 라이신의 pK_a 아래로 유지하므로써, 억제될 수 있다. 이와 달리, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은, 예를 들면, 하기의 실시예 50에 설명되어 있는 바와 같이 HPLC를 이용하여, 분리(separation) 및 단리(isolation)되어, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물, 예를 들어, 모노-(mono-), 디-(di-), 또는 트리-접합체(tri-conjugates)를 제공할 수 있으며, 이때, 상기 혼합물 중의 각각의 접합체는 동일한 수분자량을 가지며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있다. 특정 단리 접합체 (isolated conjugate)의 접합의 정도 (즉, 분리된 분자가 모노-, 디-, 또는 트리-접합체인지의 여부)는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 질량분석기(mass spectroscopy)를 포함하는 다양한 기법을 이용하여, 결정 및/또는 확인될 수 있다. 구체적인 접합체 구조 (즉, 상기 올리고머가 사람 인슐린 모노접합체의 Gly^{A1}, Phe^{B1} 또는 Lys^{B29} 에 있는지의 여부)는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비제한적인 예로서, 서열 분석 (sequence analysis), 펩티드 맵핑 (peptide mapping), 선택적 효소 절단 (selective enzymatic cleavage), 및/또는 엔도펩티다아제 절단 (endopeptidase cleavage)을 포함하는 다양한 기법을 이용하여, 결정 및/또는 확인될 수 있다.

당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 상기 인슐린 약물의 하나 이상의 반응부위(reaction sites)가, 예를 들면, 상기 인슐린 약물와 적합한 차단시약(blocking reagent)을 반응시키므로써, 차단될 수 있으며, 이때, 상기 차 단시약의 예로서는 N-터트-부톡시카르보닐 (N-tert-butoxycarbonyl (t-BOC)), N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐) (N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl) (N-FMOC)) 등이 있다. 이러한 공정은, 예를 들면, 상기 인슐린 약물이 폴리펩티드이고, 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에서 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (즉, 모든 친핵성 잔기가 접합된 것은 아닌 접합체)를 형성하는 것이 요구되는 경우에, 바람직할 수 있다. 그러한 차단 공정 다음에, 상기 차단된 인슐린 약물 혼합물은, 각각의 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 또한 화학식 A의 올리고머 구조를 갖고 있는 활성화 올리고머 혼합물과 반응하여, 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)를 갖고 있으며 또한 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 모이어티를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 형성한다. 접합 반응 후에, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 탈차단(de-blocking) 공정을 거칠 수 있다. 그리고 나서, 필요하다면, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 앞에서 설명된 바와 같이 분리되어, 각각의 접합체가 동일한 수분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 제공할 수 있다. 이와 달리, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 탈차단 공정 전에 분리될 수도 있다.

이러한 본 발명의 구현예들에 따른, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는, 다분산 혼합물 (polydispersed mixtures)의 경우와 비교하여 개선된 특성을 갖는다. 예를 들면, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화 학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 생체내 활성 보다 더 큰 생체내 활성 (in vivo activity)을 갖는다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과, 상기 다분산 혼합물의 수평균 분자량은, 비제한적인 예로서, 예를 들면 'H.R. Allcock amp; F.W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402 (2nd ed., 1991)'에 설명되어 있는 바와 같은, 겔침투크로마토그래피(gel permeation chromatography)와 같은 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography)를 포함하는 다양한 방법에 의하여, 측정될 수 있다.

또 다른 예로서, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 in vitro 활성 (in vitro activity) 보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과, 상기 다분산 혼합물의 수평균 분 자량은, 비제한적인 예로서, 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 다양한 방법에 의하여, 측정될 수 있다.

특정 혼합물의 in vitro 활성은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 여러가지 방법에 의하여 측정될 수 있다. 바람직하게는, in vitro 활성은, 미국 캘리포니아 서니베일(Sunnyvale)의 'Molecular Devices Corporation'으로부터 상업적으로 입수가능한 'Cytosensor ® Microphysiometer'를 사용하여 측정된다. 상기 마이크로피지오미터 (microphysiometer)는, 트랜스웰(transwell) 내의 배양세포에 투입되는 약물에 응답하는 세포외 산성화 (extracellular acidification) 속도의 작은 변화를 감시한다. 이러한 응답은 연구 대상 분자의 활성에 비례한다. 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 i

n vitro 활성은, 상기 다분산 혼합물의 in vitro 활성 보다 약 5 % 이상 더 크다. 더욱 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 in vitro 활성은, 상기 다분산 혼합물의 in vitro 활성 보다 약 10 % 이상 더 크다.

또 다른 예로서, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물- 올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 (degradation by chymotrypsin)에 대한 내성에 비하여, 키모트립신에 의한 분해에 대한 증가된 내성을 갖는다. 키모트립신에 대한 내성은, 하기의 실시예 52에서 개략적으로 설명된 것과 유사한 방법에 따라, 시험 대상 분자가 키모트립신 내에서 소화될 때 잔류하는 백분율에 상응한다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과, 상기 다분산 혼합물의 수평균 분자량은, 비제한적인 예로서, 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 다양한 방법에 의하여, 측정될 수 있다. 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체의 A 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은, 상기 다분산 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성 보다 약 10 % 이상 더 크다. 더욱 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체의 A 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은, 상기 다분산 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성 보다 약 20 % 이상 더 크다.

또 다른 예로서, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 개체간 변동성 보다 작은 개체간 변동성 (inter-subject variability)을 갖는다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 수평균 분자량과, 상기 다분산 혼합물의 수평균 분자량은, 비제한적인 예로서, 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 다양한 방법에 의하여, 측정될 수 있다. 개체간 변동성은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 여러가지 방법에 의하여 측정될 수 있다. 개체간 변동성은 바람직하게는 다음과 같이 계산된다. 용량반응곡선하 면적 (area under a dose response curve : AUC) (즉, 투여 응답 곡선과 기준선 값 사이의 면적)을 각각의 개체에 대하여 결정한다. 각 개체에 대한 AUC 값들을 더하고 그 합계를 개체의 수로 나누므로써, 모든 개체에 대한 평균 AUC를 결정한다. 그 다음, 개체의 AUC와 평균 AUC의 차이의 절대치를 각각의 개체에 대하여 결정한다. 그 다음, 이렇게 얻어진 차이의 절대치를 더하여, 개체간 변동성을 표시하는 값을 산출한다. 그 값이 작을 수록 개체간 변동성이 낮아지는 것이며, 그 값이 클 수록 개체간 변동성은 높아지는 것이다. 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변동성은, 상기 다분산 혼합물의 개체간 변동성 보다 약 10 % 이상 더 작다. 더욱 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 개체간 변동성은, 상기 다분산 혼합물의 개체간 변동성 보다 약 25 % 이상 더 작다.

본 발명의 구현예에 따른, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또 한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 바람직하게는, 앞에서 설명한 특성들의 둘 이상을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 앞에서 설명한 특성들의 셋 이상을 갖는다. 가장 바람직하게는, 각각의 접합체가 동일한 분자량을 갖고 있으며 또한 화학식 A의 구조를 갖고 있는 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 앞에서 설명한 특성들의 넷 모두를 갖는다.

본 발명은 또한, 본 발명의 구현예에 따른 접합체 혼합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 앞에서 설명한 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은, 공지된 기법에 따라 의약용 캐리어(carrier)로 투여될 수 있도록 제제화될 수 있다 ['Remington, The Science And Practice of Pharmacy, 9th Ed., 1995' 참조]. 본 발명의 구현예에 따른 약제학적 조성물 제조에 있어서, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 전형적으로, 특히, 의약적으로 허용되는 캐리어와 혼합된다. 물론, 상기 캐리어는, 상기 약제학적 조성물 내의 임의의 다른 구성성분과 융화성(compatibility)이 있다는 의미에서 허용가능하여야 하며, 개체(또는, 투여 대상)에게 해롭지 않아야 한다. 상기 캐리어는 고체 또는 액체이거나, 또는 둘다일 수 있으며, 바람직하게는, 예를 들면, 정제(tablets)와 같은 단위-투여량 제제 (unit-dose formulation)의 형태로, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 제제화되며, 이러한 제제는, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 약 0.01 또는 0.5 중량% 내지 약 95 또는 99 중량% 함유할 수 있다. 상기 약제학적 조성물은, 비제한적인 예로서, 선택적으로 하나 이상의 보조 성분을 포함하는 구성성분 들을 혼합하는 것을 포함하는, 공지된 임의의 제약 기법으로 제조될 수 있다.

본 발명의 구현예에 따른 상기 약제학적 조성물은, 경구투여(oral administration), 직장투여(rectal administration), 국소투여(topical administration), 흡입투여(inhalation administration) (예를 들면, 에어로졸(aerosol)을 통하여), 구강투여(buccal administration) (예를 들면, 설하투여), 질내투여(vaginal administration), 비경구투여(parenteral administration) (예를 들면, 피하(subcutaneous), 근육내(intramuscular), 피내(intradermal), 관절내(intraarticular

), 늑막내(intrapleural), 복강투여(intraperitoneal), 뇌내(intracerebral), 동맥내(intraarterial), 또는 정맥내(intravenous)), 국소투여(topical administration) (즉, 피부, 및 기도 표면을 포함하는 점막 표면), 및 경피투여(transdermal administration)에 적합한 것들을 포함하는데, 주어진 사례에 가장 적합한 경로는, 치료하고자 하는 상태의 성질과 심각성, 그리고 사용하고자 하는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 구체적인 혼합물의 성질에 의존할 것이다.

경구투여에 적합한 약제학적 조성물은, 캡슐(capsules), 카켓(cachets), 로젠지(lozenges), 또는 정제(tables)와 같은 불연속적 단위로 제공될 수 있고, 이들 각각은 소정량의 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 함유하며; 분말 또는 미립의 형태로서; 수계 또는 비수계 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서; 또는 물 속에 기름이 분산한 O/W형 에멀션 또는 기름 속에 물이 분산한 W/O형 에멀션으로서 제공될 수도 있다. 그러한 제제들은, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물과 적합한 캐리어를 조합시키는 단계를 포함하는 임의의 적합한 제약 기법으로 제조될 수 있다 (앞에서 언급한 바와 같이, 이것은 하나 이상의 보조 성분을 함유할 수도 있다). 대체적으로, 본 발명의 구현예에 따른 상기 약제학적 조성물은, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을, 액체 또는 미분된 고체 캐리어 또는 둘다와, 균일하고 긴밀하게 혼합하고, 그리고 나서 필요하다면 이렇게 얻어진 혼합물을 성형(shaping)하므로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 정제는, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 함유하며, 선택적으로 하나 이상의 보조 성분을 함유하는 분말(powder) 또는 과립(granules)을 압축(compressing) 또는 몰딩(molding)하므로써 제조될 수 있다. 압축 정제 (compressed tablets)는, 적합한 기계를 사용하여, 선택적으로 결합제, 윤활제, 불활성희석제(inert diluent), 및/또는 계면활성/분산제와 혼합된, 분말 또는 미립과 같은 유동형(free-flowing form)의 상기 혼합물을 압축하므로써 제조될 수 있다. 성형 정제 (molded tablets)는, 적합한 기계로, 비활성 액체 바인더로 적셔진 분말상태의 화합물을 몰딩하므로써 제조될 수 있다.

구강(설하)투여에 적합한 약제학적 조성물은, 대개 수크로스(sucrose) 및 아라비아고무(acacia) 또는 트라가칸타(tragacanth)와 같은 맛 또는 향이 있는 기재 내에 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 포함하는 로젠지; 젤라틴(gelatin) 및 글리세린(glycerin) 또는 수크로스(sucrose) 및 아라비아고무(acacia)와 같은 비활성 기재 내에 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 포함하는 파스틸(pastilles)을 포함한다.

본 발명의 구현예에 따른 비경구투여에 적합한 약제학적 조성물은, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 무균 수계 및 비수계 주사 용액을 포함하는데, 이 제제는 바람직하게는 투여 대상자의 혈액과 등장성(isotonic)이다. 이러한 조제는, 산화방지제, 버퍼(buffers), 정균제(bacteriostats), 및 상기 조성물에 투여 대상자의 혈액과의 등장성을 부여하는 용질을 함유할 수 있다. 수계 및 비수계 무균 현탁액은, 현탁화제(suspending agents) 및 점증제(thickening agents)를 포함할 수 있다. 상기 조성물은, 예를 들면, 밀봉된 앰풀(ampoules) 및 바이알(vials)과 같은, 단위투여량 또는 복수투여량의 용기에 담겨서 제공될 수 있으며, 사용 직전에 단지, 예를 들면, 식염수(saline) 또는 주사용수(water-for-injection)와 같은 무균 액체 캐리어의 첨가만을 요구하는 동결건조 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액이, 앞에서 설명한 종류의 무균성 분말, 과립 및 정제(tablets)로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 포함하는 주사가능하고 안정하며 무균상태인 조성물이, 단위 투여량의 형태로 밀봉된 용기 내에, 제공될 수 있다. 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물은 동결건조물(lyophilizate)의 형태로 제공되는데, 상기 동결건조물은 의약적으로 허용가능한 적합한 캐리어와 재조합(reconstitution)되어, 투여 대상자에게 주사하기에 적합한 액체 조성물을 형성할 수 있다. 상기 단위 투여량 형태는 전형적으로, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 약 10 mg 내지 약 10 g 포함한다. 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물이 실질적으로 수불용성인 경우에는, 생리학적으로 허용가능한 유화제(emulsifying agent)를, 수계 캐리어 내에서 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 유화시키기에 충분한 양으로, 사용할 수 있다. 그러한 유용한 유화제 중의 하나가 포스파티딜 콜린 (phosphatidyl choline)이다.

직장투여에 적합한 약제학적 조성물은 바람직하게는, 단위 투여량의 좌약으로서 제공된다. 이것은, 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 하나 이상의 통상적인 고체 캐리어, 예를 들면, 코코아 버터 (cocoa butter)와 혼합한 다음, 이렇게 얻어진 혼합물을 성형(shaping)하므로써 제조될 수 있다.

피부에 대한 국소투여에 적합한 약제학적 조성물은 바람직하게는, 연고(ointment), 크림(cream), 로숀(lotion), 페이스트(paste), 젤(gel), 스프레이(spray), 에어로졸(aerosol), 또는 오일(oil)의 형태를 취한다. 사용될 수 있는 캐리어로서는, 광유(petroleum jelly), 라놀린(lanoline), 폴리에틸렌 글리콜 화합물, 알콜 화합물, 경피성 강화제 (transdermal enhancers), 이들의 둘 이상의 조합 등이 있다.

경피투여에 적합한 약제학적 조성물은, 투여 대상자의 표피(epidermis)와의 긴밀한 접촉 상태로 장시간 동안 남아 있기에 적당한 분리성 패치 (discrete patches)로서 제공될 수 있다. 경피투여에 적합한 조성물은 또한, 전리요법(iontophoresis)에 의하여 투여(delivery)될 수 있으며 [Pharmaceutical Research 3 (6):318 (1986)], 전형적으로는 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 선택적으로 완충 수용액 (optionally buffered aqueous solution)의 형태를 취한다. 적합한 제제는, 구연산염(citrate) 또는 비스/트리스 버퍼 (bis/tris buffer) (pH 6) 또는 에탄올/물을 포함하며, 0.1 내지 0.2 M의 활성 성분을 함유한다.

본 발명은 또한, 그러한 약제학적 조성물의 유효량을 투여하므로써, 인슐린 결핍증 치료를 필요로 하는 치료대상자의 인슐린 결핍증을 치료하는 방법을 제공한다. 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 유효량은 (그것의 사용 방법도 본 발명의 범위 내에 있다), 혼합물 마다, 그리고 치료대상자 마다 어느 정도 달라질 것이며, 치료대상자의 연령 및 상태 그리고 투여경로(route of delivery)와 같은 인자에 의존할 것이다. 그러한 투여량은, 당업자에게 알려져 있는 통상적인 약물학적 절차에 의거해서, 결정될 수 있다. 일반적인 제안으로서, 약 0.1 내지 약 50 mg/kg의 투여량이면 치료 효능을 가질 것이며, 이때, 모든 중량은 상기 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물의 중량에 기초하여 계산된다. 더 높은 투여량에서의 독성 발생 우려가 있다면, 정맥 투여량을, 약 10 mg/kg 이하와 같은 더 낮은 수준으로 제한할 수 있으며, 이때, 모든 중량은 상기 활성 베이스 (active base)의 중량에 기초하여 계산된다. 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 투여량이, 경구투여용으로 사용될 수 있다. 전형적으로, 약 0.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg 의 투여량이, 근육내주사용으로 사용될 수 있다. 투여 빈도는 대개 1 일당 1 회, 2 회 또는 3 회이며, 상태 조절에 필요한 정도에 따라 증감될 수 있다. 이와 달리, 상기 약물-올리고머 접합체는, 연속주입(continuous infusion)에 의하여 투여될 수도 있다. 치료기간은 치료하고자 하는 인슐린 결핍증의 종류에 의존하며, 치료대상자의 평생동안 일 수도 있다.

본 발명은 또한, 본 발명의 구현예에 따른 접합체 혼합물을 합성하는 방법을 제공한다. 합성 경로에 관한 하기의 구현예가 실질적으로 단순분산된 혼합물 (monodispersed mixture)의 합성에 관한 것이지만, 유사한 합성 경로가, 본 발명의 구현예에 따른 다른 인슐린 약물-올리고머 접합체 혼합물을 합성하는 데에도 이용될 수 있다.

폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 폴리머의 실질적으로 단순분산 혼합물은, 반응식 1에 도시된 바와 같이 제공된다.

<반응식 1>

$R^1(OC_2H_4)_nO^-X^+ + R^2(OC_2H_4)_mOMs \text{----} > R^2(OC_2H_4)_{m+n}OR^1$

(I) (II) (III)

R^1 은 H 또는 친유성 모이어티이다. R^1 은 바람직하게는 H, 알킬, 아릴, 아릴 알킬, 방향족 모이어티, 지방산 모이어티, 지방산의 에스테르 모이어티, 콜레스테릴(cholesteryl), 또는 아다만틸(adamantyl)이다. R^1 은 더욱 바람직하게는 H, 저급 알킬, 또는 방향족 모이어티이다. R^1 은 가장 바람직하게는 H, 메틸(methyl), 또는 벤질(benzyl)이다.

상기 화학식 (I)에서, n은 1 내지 25이다. 바람직하게는 n은 1 내지 6이다.

X^+ 는 양이온이다. X^+ 는 바람직하게는, 강염기와 같은, PEG의 히드록시 모이어티 (hydroxyl moiety)를 이온화할 수 있는 화합물 중에 있는 임의의 양이온이다. 양이온의 비제한적인 예로서는, 나트륨 이온, 칼륨 이온, 리튬 이온, 세슘 이온, 탈륨 이온 등이 있다.

R^2 는 H 또는 친유성 모이어티이다. R^2 는 바람직하게는 선형 또는 분지형 알킬, 아릴 알킬, 방향족 모이어티, 지방산 모이어티, 또는 지방산의 에스테르 모이어티이다. R^2 는 더욱 바람직하게는 저급 알킬, 벤질, 1 내지 24 개의 탄소원자를 갖는 지방산 모이어티, 또는 1 내지 24 개의 탄소원자를 갖는 지방산의 에스테르 모이어티이다. R^2 는 가장 바람직하게는 메틸, 1 내지 18 개의 탄소원자를 갖는 지방산 모이어티, 또는 1 내지 18 개의 탄소원자를 갖는 지방산의 에틸에스테르 모이어티이다.

상기 화학식 (II)에서, m은 1 내지 25이다. 바람직하게는 m은 1 내지 6이다.

Ms는 메실레이트 모이어티이다 (즉, $CH_3S(O_2)$-).

반응식 1에서 도시된 바와 같이, 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물들의 혼합물이, 화학식 (II)의 구조를 갖는 화합물들의 혼합물과 반응하여, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하며 화학식 (III)의 구조를 갖는 폴리머들의 혼합물을 형성한다. 상기 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (I)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 가지며, 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (I)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다. 상기 화학식 (II)의 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산된 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (II)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 가지며, 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (II)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다. 상기 화학식 (III)의 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산된 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (III)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 가지며, 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (III)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다.

반응식 1의 반응은 바람직하게는, 약 0 ℃ 내지 약 40 ℃의 온도에서 수행되며, 더욱 바람직하게는 약 15 ℃ 내지 약

35 ℃의 온도에서 수행되며, 가장 바람직하게는 실온(약 25 ℃)의 온도에서 수행된다.

반응식 1의 반응은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 다양한 시간 구간 동안 수행될 수 있다. 반응식 1의 반응은 바람직하게는, 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 내지 약 2, 4 또는 8 시간의 시간 구간 동안 수행된다.

반응식 1의 반응은 바람직하게는, 비제한적인 예를 들면, N,N-디메틸아세트아미드 (N,N-dimethylacetamide : DMA), N,N-디메틸포름아미드 (N,N-dimethylformamide : DMF), 디메틸 술폭사이드 (dimethyl sulfoxide : DMSO), 헥사메틸포스포릭 트리아미드 (hexamethylphosphoric triamide), 테트라하이드로퓨란 (tetrahydrofuran : THF), 디옥산 (dioxane), 디에틸 에테르 (diethyl ether), 메틸 t-부틸 에테르 (methyl t-butyl ether : MTBE), 톨루엔, 벤젠, 헥산, 펜탄, N-메틸피롤리디논 (N-methylpyrollidinone), 테트라하이드로나프탈렌 (tetrahydronaphthalene), 데카하이드로나프탈렌 (decahydronaphthalene), 1,2-디클로로벤젠 (1,2-dichlorobenzene), 1,3-디메틸-2-이미드아졸리디논 (1,3-dimethyl-2-imidazolidinone), 또는 이들의 혼합물과 같은, 비양성자성 용매 (aprotic solvent) 중에서 수행된다. 더욱 바람직하게는, 상기 용매는 DMF, DMA 또는 톨루엔이다.

상기 화학식 (I)의 화합물의, 상기 화학식 (II)의 화합물에 대한, 몰비는 바람직하게는 약 1:1 보다 더 크다. 더욱 바람직하게는, 상기 몰비는 약 2:1 이상 이다. 상기 화학식 (I)의 화합물을 과잉으로 제공하므로써, 실질적으로 모든 화학식 (II)의 화합물이 반응하도록 보장할 수 있으며, 이는, 뒤에서 논의되는 바와 같이, 상기 화학식 (III)의 화합물의 회수 단계에서 도움이 된다.

상기 화학식 (I)의 화합물은 바람직하게는, 반응식 2에서 도시되는 바와 같이 제조된다.

<반응식 2>

(IV)

$R^1(OC_2H_4)_nOH$ + [화학식 (IV)의 PEG 모이어티의 히드록시 모이어티를 이온화

시킬 수 있는 화합물] -----> $R^1(OC_2H_4)_nO^-X^+$

(I)

R^1 및 X^+ 는 앞에서 설명된 바와 같고, 화학식 (IV)의 화합물들의 혼합물은 실질적으로 단순분산된 상태인데; 바람직하게는, 상기 화학식 (IV)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 가지며; 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (IV)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다.

상기 화학식 (IV)의 화합물의 PEG 모이어티의 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 다양한 화합물은 당업자에 의하여 이해되는 바와 같다. 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 상기 화합물은 바람직하게는 강염기이다. 더욱 바람직하게는, 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 상기 화합물은, 소듐 하이드라이드 (sodium hydride), 포태슘 하이드라이드 (potassium hydride), 소듐 t-부톡사이드 (sodium t-butoxide), 포태슘 t-부톡사이드 (potassium t-butoxide), 부틸 리튬 (butyl lithium : BuLi), 및 리튬 디이소프로필아민 (lithium diisopropylamine)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 상기 화합물은 더욱 바람직하게는 소듐 하이드라이드이다.

상기 화학식 (IV)의 화합물의 PEG 모이어티의 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 화합물의, 상기 화학식 (IV)의 화합물에 대한, 몰비는 바람직하게는 약 1:1 이상이며, 더욱 바람직하게는 약 2:1 이상 이다. 상기 히드록시 모이어티를 이온화시킬 수 있는 화합물을 과잉으로 제공하므로써, 실질적으로 모든 화학식 (IV)의 화합물이 반응하여 화학식 (I)의 화합물을 형성하도록 보장할 수 있다. 그리하여, 만약 화학식 (IV)의 화합물과 화학식 (I)의 화합물 둘다가 반응생성물 혼합물에 존재한다면 발생할 수 있는 분리의 어려움이 회피될 수 있다.

반응식 2의 반응은 바람직하게는, 약 0 ℃ 내지 약 40 ℃의 온도에서 수행되며, 더욱 바람직하게는 약 0 ℃ 내지 약 35 ℃의 온도에서 수행되며, 가장 바람직하게는 약 0 ℃ 내지 실온(약 25 ℃)의 온도에서 수행된다.

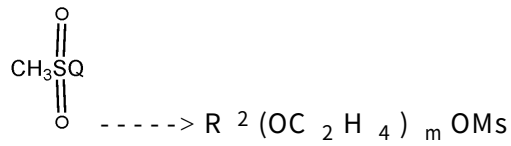
반응식 2의 반응은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 다양한 시간 구간 동안 수행될 수 있다. 반응식 2의 반응은 바람직하게는, 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 내지 약 2, 4 또는 8 시간의 시간 구간 동안 수행된다.

반응식 2의 반응은 바람직하게는, 비제한적인 예를 들면, N,N-디메틸아세트아미드 (DMA), N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디메틸 술폭사이드 (DMSO), 헥사메틸포스포릭 트리아미드, 테트라하이드로퓨란 (THF), 디옥산, 디에틸 에테르, 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE), 톨루엔, 벤젠, 헥산, 펜탄, N-메틸피롤리디논, 디클로로메탄 (dichloromethane),

클로로포름, 테트라하이드로나프탈렌, 데카하이드로나프탈렌, 1,2-디클로로벤젠, 1,3-디메틸-2-이미드아졸리디논, 또는 이들의 혼합물과 같은, 비양성자성 용매 중에서 수행된다. 더욱 바람직하게는, 상기 용매는 DMF, 디클로로메탄 또는 톨루엔이다.

화학식 (II)의 화합물은 바람직하게는 반응식 3에서 도시되는 바와 같이 제조된다.

<반응식 3>



(V) (II)

R^2 및 Ms는 앞에서 설명된 바와 같고, 화학식 (V)의 화합물은, 화학식 (V)의 화합물들의 실질적 단순분산된 혼합물로서 존재하는데; 바람직하게는, 상기 화학식 (V)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 가지며; 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (V)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다.

Q는 할라이드(halide)이며, 바람직하게는 클로라이드(chloride) 또는 플루오라이드(fluoride)이다.

$CH_3S(O_2)Q$는 메탄술포닐 할라이드 (methanesulfonyl halide)이다. 상기 메탄술포닐 할라이드는 바람직하게는 메탄술포닐 클로라이드 또는 메탄술포닐 플루오라이드이다. 더욱 바람직하게는, 상기 메탄술포닐 할라이드는 메탄술포닐 클로라이드이다.

상기 메탄술포닐 할라이드의, 화학식 (V)의 화합물에 대한, 몰비는 바람직하게는 약 1:1 보다 더 크며, 더욱 바람직하게는 약 2:1 이상이다. 상기 메탄술포닐 할라이드를 과잉으로 제공하므로써, 실질적으로 모든 양의 화학식 (V)의 화합물이 반응하여 화학식 (II)의 화합물을 형성하도록 보장할 수 있다. 그리하여, 만약 화학식 (V)의 화합물과 화학식 (II)의 화합물 둘다가 반응생성물 혼합물에 존재한다면 발생할 수 있는 분리의 어려움이 회피될 수 있다.

반응식 3의 반응은 바람직하게는, 약 -10 ℃ 내지 약 40 ℃의 온도에서 수행 되며, 더욱 바람직하게는 약 0 ℃ 내지 약 35 ℃의 온도에서 수행되며, 가장 바람직하게는 약 0 ℃ 내지 실온(약 25 ℃)의 온도에서 수행된다.

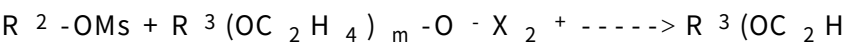
반응식 3의 반응은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이 다양한 시간 구간 동안 수행될 수 있다. 반응식 3의 반응은 바람직하게는, 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 내지 약 2, 4 또는 8 시간의 시간 구간 동안 수행된다.

반응식 3의 반응은 바람직하게는, 비제한적인 예로서, 모노메틸아민 (monomethylamine), 디메틸아민 (dimethylamine), 트리메틸아민 (trimethylamine), 모노에틸아민 (monoethylamine), 디에틸아민 (diethylamine), 트리에틸아민 (triethylamine), 모노이소프로필아민 (monoisopropylamine), 디이소프로필아민 (diisopropylamine), 모노-n-부틸아민 (mono-n-butylamine), 디-n-부틸아민 (di-n-butylamine), 트리-n-부틸아민 (tri-n-butylamine), 모노시클로헥실아민 (monocyclohexylamine), 디시클로헥실아민 (dicyclohexylamine), 또는 이들의 혼합물을 포함하는 지방족 아민의 존재하에서 수행된다. 더욱 바람직하게는, 상기 지방족 아민은 트리에틸아민과 같은 3급 아민이다.

당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 화학식 (V)의 화합물들의 여러가지 실질적 단순분산된 혼합물은 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, R^2 가 H 또는 메틸인 경우에, 상기 화학식 (V)의 화합물은 각각 PEG 또는 mPEG 화합물이며, 이들은 'Aldrich (Milwaukee, Wisconsin)'사, 'Fluka (스위스)'사, 및/또는 'TCI America (Portland, Oregon)'사로부터 상업적으로 입수가능하다.

R^2 가, 예를 들면, 고급 알킬, 지방산, 지방산의 에스테르, 콜레스테릴, 또는 아다만틸과 같은 친유성 모이어티인 경우에는, 상기 화학식 (V)의 화합물은, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 다양한 방법에 의하여 제공될 수 있다. 화학식 (V)의 화합물은 바람직하게는 다음과 같이 제공된다:

<반응식 4>



(VI) (VII) (VIII)

<반응식 5>

$R^3(OC_2H_4)_m-OR^2$ -----> $H(OC_2H_4)_m-OR^2$

(VIII) (V)

R^2 는 친유성 모이어티이며, 바람직하게는 고급 알킬, 지방산 에스테르, 콜레스테릴, 또는 아다만틸이며, 더욱 바람직하게는 지방산의 저급 알킬 에스테르이며, 가장 바람직하게는 1 내지 18 개의 탄소원자를 갖는 지방산의 에틸 에스테르이다.

R^3 는 H, 벤질, 트리틸 (trityl), 테트라하이드로피란 (tetrahydropyran), 또는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 기타 알콜 보호기이다.

X_2^+ 는, 앞에서 X^+ 와 관련하여 설명된 것과 같은 양이온이다.

m값은 앞에서 설명된 바와 같다.

반응식 4에 있어서, 화학식 (VI)의 화합물들의 혼합물은, 화학식 (VII)의 화합물들의 혼합물과, 앞에서 반응식 (I)과 관련하여 설명된 것과 유사한 반응 조건 하에서 반응한다. 상기 화학식 (VI)의 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산된 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (VI)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (VI)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다. 상기 화학식 (VII)의 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산된 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (VII)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (VII)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다.

반응식 5에 있어서, 상기 화학식 (VIII)의 화합물은 가수분해되어 R^3 모이어티를 알콜로 전환시키며, 이때, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 여러가지 방법이 사용될 수 있다. R^3 가 벤질 또는 트리틸인 경우에는, 상기 가수분해 반응은 바람직하게는, 당업자에게 알려져 있는 바와 같은 팔라듐-차콜(charcoal) 촉매의 존재하에서 H_2 를 이용하여 수행된다. 물론, R^3 가 H인 경우에는, 반응식 5의 반응은 필요하지 않다.

상기 화학식 (VI)의 화합물은 상업적으로 입수가능하며, 또는, 앞에서 반응식 3과 관련하여 설명된 바와 같이 제공될 수도 있다. 상기 화학식 (VII)의 화합물 은 상업적으로 입수가능하며, 또는, 앞에서 반응식 2와 관련하여 설명된 바와 같이 제공될 수 있다.

PEG 모이어티를 포함하며 화학식 (III)의 구조를 갖는 폴리머의 실질적 단순분산된 혼합물은, PEG 체인을 확장시키기 위하여, PEG 모이어티를 포함하는 다른 실질적 단순분산된 폴리머와 추가적으로 반응될 수 있다. 예를 들면, 다음과 같은 반응과정이 사용될 수 있다:

<반응식 6>

$R^2(OC_2H_4)_{m+n}-OR^1$ + CH_3SO_2 -----> $R^2(OC_2H_4)_{m+n}-OMs$

(III) (IX)

<반응식 7>

$R^2(OC_2H_4)_{m+n}-OMs + R^4(OC_2H_4)_p-O^-X_2^+$ -----> $R^2(OC_2H_4)_{m+n+p}-OR^4$

(IX) (X) (XI)

Ms, m 및 n은 앞에서 반응식 1과 관련하여 설명된 바와 같다. p는 n 및 m과 유사하며, X_2^+ 는 앞에서 반응식 1과 관련하여 설명된 바와 있는 X^+ 와 유사하다. Q는 앞에서 반응식 3과 관련하여 설명된 바와 같다. R^2 는 앞에서 반응식 1과 관련하여 설명된 바와 같으며, 바람직하게는 저급 알킬이다. R^1 은 H이다. 반응식 6의 반응은 바람직하게는, 앞에서 반응식 3과 관련하여 설명된 것과 유사한 방식으로 수행된다. 반응식 7의 반응은 바람직하게는, 앞에서 반응식 1과 관련하여 설명된 것과 유사한 방식으로 수행된다. 바람직하게는, 상기 화학식 (III)의 화합물들의 혼합물 중

의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (III)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다. 상기 화학식 X의 화합물들의 혼합물은 실질적 단순분산된 혼합물이다. 바람직하게는, 상기 화학식 (X)의 화합물들의 혼합물 중의 상기 화합물들의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 상기 화학식 (X)의 화합물들의 혼합물은 단순분산된 혼합물이다.

본 발명의 구현예에 따른 방법의 반응과정이 도 1에 도시되어 있으며, 이하에서는 이에 관하여 설명한다. 실질적 단순분산된 폴리에틸렌 글리콜-함유 올리고머의 합성은, 실질적 단순분산된 폴리에틸렌 글리콜의 모노벤질 에테르 (monobenzyl ehter)(1)의 제조로부터 시작된다. 상업적으로 입수가능한 실질적 단순분산된 폴리에틸렌 글리콜의 과잉량을, 코우더(Coudert) 등이 설명한 바와 같이, 수산화나트륨 수용액의 존재하에서, 벤질 클로라이드 (benzyl chloride)와 반응시킨다 [Synthetic Communications, 16(1): 19~26 (1986)]. 그리고 나서, (1)의 나트륨염이, NaH의 첨가에 의하여 제조되며, 이 나트륨염은, 하이드록시알카노익 액시드 (hydroxyalkanoic acid)의 에스테르로부터 합성된 메실레이트 (2)와 반응하게 된다. 상기 메실레이트의 치환반응(displacement)의 생성물 (3)은, 접촉수소화반응 (catalytic hydrogenation)을 통하여 탈벤질화(debenzylation)되어, 알콜(4)을 형 성한다. 이 알콜의 메실레이트(5)는, 메탄술포닐 클로라이드의 첨가에 의하여 제조될 수 있으며, 실질적 단순분산된 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 모노메틸 에테르의 나트륨염과의 반응에서 친전자체(electrophile)로서 사용될 수 있고, 그리하여, 상기 올리고머의 폴리에틸렌 글리콜 부위를 원하는 길이 까지 확장시켜서, 연장된 에스테르(6)을 형성한다. 상기 에스테르는 염기 수용액 중에서 가수분해되어 산(7)을 형성한 다음, 카보디이미드(carbodiimide) 및 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide)와의 반응에 의하여 활성화된 에스테르(8)로 변형된다. 도 1에 도시된 상기 올리고머가 N-하이드록시숙신이미드를 사용하여 활성화되지만, 본 발명의 올리고머를 활성화시킬 수 있는 기타 다양한 시약이 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 하며, 그러한 시약의 비제한적인 예로서는, para-니트로페닐 클로로포르메이트 (para-nitrophenyl chloroformate), 페닐 클로로포르메이트, 3,4-페닐디클로로포르메이트 (3,4-phenyldichloroformate), 및 3,4-페닐디클로로포르메이트 (3,4-phenyldichloroformate)와 같은 활성 페닐 클로로포르메이트 화합물 (active phenyl chloroformates); 트레실레이션 (tresylation); 및 아세탈 포메이션 (acetal formation) 등이 있다.

도 1에 있어서, q는 1 내지 24 이다. 바람직하게는, q는 1 내지 18 이다. 더욱 바람직하게는, q는 4 내지 16 이다. R^4는, 가수분해반응을 겪으므로써 카르복실산을 형성할 수 있는 모이어티이다. R^4는 바람직하게는 저급 알킬이며, 더욱 바람직하게는 에틸(ethyl)이다. 변수 m과 n은 앞에서 반응식 1과 관련하여 설명된 바와 같다.

본 명세서에서 설명된 과정에서 사용되는 모든 개시 물질은 상업적으로 입수가능하거나, 당업계에 알려진 방법에 의하여 상업적으로 입수가능한 개시 물질로부터 제조될 수 있다.

이하에서는, 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기의 실시예는 본 발명의 태양을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위는, 하기의 실시예로 제한되지 않고, 청구범위에 의하여 정의된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 구현예에 따른 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 및 지방산 모이어티를 포함하는 활성화된 폴리머의 혼합물을 합성하기 위한 일반적인 방법을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 구현예에 따른 mPEG의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 mPEG7-헥실 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 mPEG7-옥틸 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 mPEG-데실 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 스테아레이트-PEG6 올리고머의 혼 합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 스테아레이트-PEG8 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 PEG3 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 9는 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 팔미테이트-PEG3 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 구현예에 따른 활성화된 PEG6 올리고머의 혼합물을 합성하는 방법을 나타낸다.

도 11은 본 발명의 구현예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 모노머를 합성하는 방법을 나타낸다.

도 12는 본 발명의 구현예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 폴리머를 합성하는 방법을 나타낸다.

도 13은 본 발명의 구현예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 폴리머를 합성하는 방법을 나타낸다.

도 14는 Cytosensor ^{R} Microphysiometer로 획득된 결과의 비교를 나타내며, 이는 단순히 비교 목적으로 제공되며 본 발명의 일부를 형성하지 않는 다분산된 혼합물과 인슐린과 비교하여 본 발명의 구현예에 따른 인슐린-올리고머 접합체의 혼합물의 활성을 나타낸다.

도 15는 본 발명의 구현예에 따른 인슐린-올리고머 접합체의 키모트립신 분해를, 단순히 비교 목적으로 제공되며 본 발명의 일부를 형성하지 않는 종래의 인슐린-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물과 비교하여 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 구현예에 따른 mPEG7-헥실-인슐린, 단일접합체 혼합물의 절식한 비글에서의 혈장 글루코오스에 대한 효과를 나타낸다.

도 17은 비교 목적으로 본 발명의 일부가 아닌 mPEG7평균-헥실-인슐린, 단일접합체의 다분산된 혼합물의 절식한 비글에서의 혈장 글루코오스에 대한 효과를 나타낸다.

도 18은 절식한 비글에게 투여된, 본 발명의 구현예에 따른 mPEG4-헥실-인슐린 단일접합체의 혼합물의 개체간 변이성을 나타낸다.

도 19는 절식한 비글에게 투여된, 본 발명의 구현예에 따른 mPEG7-헥실-인슐린 단일접합체의 혼합물의 개체간 변이성을 나타낸다.

도 20은 절식한 비글에게 투여된, 본 발명의 구현예에 따른 mPEG10-헥실-인슐린 단일접합체의 혼합물의 개체간 변이성을 나타낸다.

도 21은 비교목적으로 절식한 비글에게 투여된, 본 발명의 일부가 아닌, mPEG7 $_{평균}$ -헥실-인슐린 단일접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성을 나타낸다.

실시예

실시예 1 ~ 10

실시예 1 ~ 10의 반응들은 달리 언급되지 않으면 자기교반(magnetic stirring)을 하는 질소분위기하에서 실시되었다. '워크-업(work-up)'은 유기용매로 추출, 포화 NaCl 용액으로 유기층 수세, 탈수($MgSO_4$), 및 증발(로타리 증발기)을 나타낸다. 실리카 겔 60°F-254로 예비코팅된 Merck 유리판으로 박막 크로마토그래피(TLC)를 실시하였으며 요오드 증기에 의하여 스폿(spot)을 시각화하였다. 모든 질량 스펙트럼 분석은 Macromolecular Resources Colorado State University, Co에 의하여 측정되었으며, m/z의 순서(상대 강도)로 보고되었다. 원소분석 및 융점 측정은 테네시주, Knoxville, Galbraith Laboratories, Inc.에 의하여 수행되었다. 실시예 1-10은 도 2에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 1

8-메톡시-1-(메틸술포닐)옥시-3,6-디옥사옥탄(9)

건조 디클로로메탄(50 mL)중의 비다분산성(non-polydispersed) 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 분자(4.00 mL, 4.19 g, 25.5 mmol) 및 트리에틸아민(4.26 mL, 3.09 g, 30.6 mmol)의 용액을 얼음 배스내에서 냉각시키고 질소 분위기하에 두었다. 건조 디클로로메탄(20 mL)중의 메탄술포닐 클로라이드(2.37 mL, 3.51 g, 30.6 mmol) 용액을 부가 펀넬로부터 적가하였다. 상기 클로라이드 부가를 끝내고 10분 후, 반응 혼합물을 얼음 배스로부터 꺼내어 실온으로 하였다. 이 혼합물을 1시간 더 교반하였다. 이때의 TLC(용리액으로서 15% MeOH를 포함하는 $CHCl_3$)는 잔류 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 보이지 않았다.

상기 반응 혼합물을 디클로로메탄 75 mL로 희석하고 포화 $NaHCO_3$, 물 및 염 수로 차례로 수세하였다. 상기 유기물을 Na_2SO_4로 건조하고, 여과하고 진공하에서 농축하여 투명한 오일로서 화합물 9의 비다분산 혼합물을 얻었다(5.31g, 86%).

실시예 2

에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(10)(m=4,5,6)

건조 DMF(25.7 mL) 중의 비다분산성 화합물 11(35.7 mmol)의 교반 용액에 질소 기체하에서 광물유중의 60% NaH 분산액을 가하고, 상기 혼합액을 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 이 염 12에 건조 DMF(4 mL) 중의 비다분산성 메실레이트 9(23.36)의 용액을 가하고, 이 혼합물을 3.5시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 진행은 TLC(12% CH_3OH-$CHCl_3$)로 모니터링하였다. 상기 반응혼합물을 동량의 1N HCl로 희석하고, 에틸 아세테이트(2×20ml)로 추출하고 버렸다. 수성 용액을 추출하고 워크-업하여 비다분산성 폴리머 10(82-84% 수율)을 얻었다.

실시예 3

3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사도코사놀(10)(m=4)

오일; Rf 0.46(메탄올 : 클로로포름 = 3:22); $C_{15}H_{32}O_8$ 의 계산 MS m/z 340.21(M^++1), 실측 341.2.

실시예 4

3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사펜타코사놀(10)(m=5)

오일; Rf 0.43(메탄올 : 클로로포름 = 6:10); $C_{17}H_{36}O_9$ 의 계산 MS m/z 384.24(M^++1), 실측 385.3.

실시예 5

3,6,9,12,15,18,21,24,27-노나옥사옥타코사놀(10)(m=6)

오일; Rf 0.42(메탄올 : 클로로포름 = 6:10); $C_{19}H_{40}O_{10}$ 의 계산 MS m/z 428.26(M^++1), 실측 429.3.

실시예 6

20-메톡시-1-(메틸술포닐)옥시-3,6,9,12,15,18-헥사옥사에이코산(14)

상기 알콜 14(m=4) 및 메탄술포닐 클로라이드로부터 9에 대하여 설명된 바와 같이하여 비다분산성 화합물 14를 정량 수율(quantitative yield)로 오일로서 얻었다. 오일; Rf 0.4(에틸 아세테이트 : 아세토니트릴 = 1:5); $C_{17}H_{37}O_{10}$ 의 계산 MS m/z 433.21(M^++1), 실측 433.469.

실시예 7

에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(15)(m=3,4,5)

화합물 10에 대하여 위에서 설명한 수순을 이용하여 디올 화합물로부터 비다분산성 화합물 15를 얻었다.

실시예 8

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사헤네이코사놀(15)(m=3)

오일; Rf 0.41(메탄올 : 클로로포름 = 6:10); $C_{21}H_{44}O_{11}$ 의 계산 MS m/z 472.29(M^++1), 실측 472.29.

실시예 9

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-우네카옥사테트라트리코사놀(15)(m=4)

오일; Rf 0.41(메탄올 : 클로로포름 = 6:10); $C_{23}H_{48}O_{12}$ 의 계산 MS m/z 516.31(M^++1), 실측 516.31.

실시예 10

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-도데카옥사헵타트리코사놀(15)(m=5)

오일; Rf 0.41(메탄올 : 클로로포름 = 6:10); $C_{25}H_{52}O_{13}$ 의 계산 MS m/z 560.67(M^{+} +1), 실측 560.67.

실시예 11-18은 도 3에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 11

헥사에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르(16)

4 ml 물중에 3.99 g(100 mmol) NaOH를 용해시켜 준비된 수산화 나트륨 수용액을 서서히 비다분산성 헥사에틸렌 글리콜(28.175 g, 25 ml, 100 mmol)에 가하였다. 벤질 클로라이드(3.9 g, 30.8 mmol, 3.54 ml)를 가하고 반응 혼합물을 18시간 동안 교반하면서 100℃로 가열하였다. 이어서 반응혼합물을 냉각시키고 염수(250 ml)로 희석시키고 메틸렌 클로라이드(200 ml x 2)로 추출하였다. 유기층을 염수로 한번 수세하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과한 후 진공중에서 농축시켜서 어두운 갈색 의 오일을 얻었다. 이 조생성물(crude product) 혼합물을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 구배용리: 에틸 아세테이트에서 9/1 에틸 아세테이트/메탄올)로 정제하여 비다분산성 16을 노란색 오일로서 8.099 g (70 %)의 수율로 얻었다.

실시예 12

에틸 6-메틸술포닐옥시헥사노에이트(17)

건조 디클로로메탄(75 ml)중의 비다분산성 에틸 6-하이드록시헥사노에이트 (50.76 ml, 50.41 g, 227 mmol) 용액을 얼음 배스내에서 냉각시키고 질소 분위기하에 두었다. 트리에틸아민(34.43 ml, 24.99 g, 247 mmol)을 가하였다. 건조 디클로메탄(75 ml)중의 메탄술포닐 클로라이드(19.15 ml, 28.3 g, 247 mmol) 용액을 부가 펀넬로부터 적가하였다. 상기 혼합물을 3시간 반 동안 교반한 후, 얼음배스가 녹음에 따라 서서히 실온으로 하였다. 이 혼합물을 실리카 겔을 통하여 여과하고, 여과액을 물, 포화 $NaHCO_3$, 물 및 염수로 차례로 수세하였다. 상기 유기물을 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 진공하에서 농축하여 희미한 노란색(pale yellow) 오일을 얻었다. 이 조생성물을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 1/1 헥산/에틸 아세테이트)로 최종정제하여 비다분산성 생성물(46.13 g, 85 %)을 투명, 무색 오일로서 얻었다. FAB MS: m/e 239 (M+H), 193(M-C_2H_5O).

실시예 13

6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-벤질옥시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-

에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(18)

소디움 하이드라이드(60 % 오일 분산액 3.225 g, 80.6 mmnol)을 무수 톨루엔 80 ml 중에 현탁시키고 질소 분위기하에 두고 이어서 얼음 배스에서 냉각시켰다. 건조 톨루엔 80 ml 중의 비분산된 알콜 16(27.3 g, 73.3 mmol)의 용액을 상기 NaH 현탁액에 가하였다. 이 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, 실온으로 한 후 다시 5시간 동안 교반하였다. 이 시간 동안 상기 혼합물은 투명한 갈색 용액이 되었다. 상기 건조 톨루엔 80 ml 중의 비분산된 메실레이트 17(19.21 g, 80.6 mmol)을 상기 NaH/알콜 혼합물에 가하고, 이 혼합 용액을 3일 동안 실온에서 교반하였다. 이 반응 혼합물을 50 ml 메탄올로 반응을 정지시키고 염기성 알루미나를 통하여 여과하였다. 이 여과액을 진공중에서 농축시키고 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 구배용리: 3/1 에틸 아세테이트/헥산에서 에틸 아세테이트)로 정제하여 비다분산성 생성물을 희미한 노란색 오일로서(16.52 g, 44%) 얻었다. FAB MS: m/e 515 (M+H).

실시예 14

6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-

에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(19)

비다분산성 벤질 에테르 18(1.03 g, 2.0 mmol)을 25 ml 에탄올 중에 용해시켰다. 이 용액에 270 mg 1O % Pd/C을 가하고, 이 혼합물을 수소분위기하에 두고 4시간 동안 교반시켰다. 이때, TLC에 의하여 상기 출발물질이 완전히 사라진 것을 알았다. 반응혼합물을 Celite 545를 통하여 여과시켜서 상기 촉매를 제거하고, 여과액을 진공중에서 농축하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일(0.67 g, 79 %)로서 얻었다. FAB MS: m/e 425(M+H), 447(M+Na).

실시예 15

6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메틸술포닐에톡시)에톡시]에톡시}-

에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(20)

비다분산성 알콜 19(0.835 g, 1.97 mmol)를 3.5 ml 건조 디클로로메탄 중에 용해시키고 질소분위기하에 두었다. 트리에틸아민(0.301 ml, 0.219 g, 2.16 mmol)을 가하고 이 혼합물을 얼음배스에서 냉각시켰다. 2분 후, 상기 메탄술포닐 클로라이드(0.16 ml, 0.248 g, 2.16 mmol)을 가하였다. 상기 혼합물을 0°C에서 15분 동안 교반하고 이어서 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이 반응 혼합물을 실리카 겔을 통하여 여과하여 트리에틸암모늄 클로라이드를 제거하고, 여과액을 물, 포화 $NaHCO_3$, 물 및 염수로 차례로 수세하였다. 상기 유기물을 Na_2SO_4로 건조하고, 여과하고 진공하에서 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 9/1 에틸 아세테이트/메탄올)로 정제하여 비다분산성 화합물 20을 투명한 오일(0.819 g, 83 %)로서 얻었다. FAB MS: m/e 503 (M+H).

실시예 16

6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-에톡시}-에톡시)-

에톡시]-에톡시}-에톡시)헥산산 에틸 에스테르(21)

질소 분위기하에서 NaH(60 % 오일 분산액 88 mg, 2.2 mmol)를 무수 톨루엔 3 ml 중에 현탁시키고 0°C로 냉각시켰다. 톨루엔과의 공비증류에 의하여 건조시켜 둔 비다분산성 디에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(0.26 ml, 0.26 g, 2.2 mmol)을 가하 였다. 이 반응혼합물을 실온으로 한 후 4시간 동안 교반하였다. 이 시간 동안 이 혼탁한 회색 현탁액이 투명한 노란색이 된 후 다시 갈색으로 되었다. 2.5 ml 건조 톨루엔 중의 메실레이트 20(0.50 g, 1.0 mmol)을 가했다. 밤새 실온에서 교반한 후, 2 ml 메탄올을 가하여 반응을 정지시키고 얻어진 용액을 실리카 겔을 통하여 여과하였다. 이 여과액을 진공중에서 농축시켰다. FAB MS: m/e 499(M+H), 521 (M+Na). 분취용 크로마토그래피(preparatory chromatography)(실리카 겔, 19/3 클로로포름/메탄올)에 의하여 추가적으로 정제하여 비다분산성 생성물을 투명한 노란색 오일(0.302 g 57 %)로서 얻었다. FAB MS: m/e 527 (M+H), 549 (M+Na).

실시예 17

6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-에톡시}-

에톡시)-에톡시]-에톡시}-에톡시)-헥산산(22)

비다분산성 에스테르 21 (0.25 g, 0.46 mmol)을 1 N NaOH 0.71 ml중에서 18시간 동안 교반하였다. 18시간 후, 이 혼합물을 진공중에서 농축하여 상기 알콜을 제거하고 잔류물을 물 10 ml를 더 가하여 용해시켰다. 이 수용액을 2 N HCl로 pH 2로 산성화하고 이 생성물을 디클로로메탄(30 ml x 2)내로 추출하였다. 이 혼합된 유기물을 이어서 염수(25 ml x 2)로 수세하고, Na_2SO_4로 건조하고, 여과하고 진공중에서 농축하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 노란색 오일(O. 147 g, 62 %)로서 얻었다. FAB MS: m/e 499 (M+H), 521 (M+Na).

실시예 18

6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]-에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-에톡시)-헥산산 2,5-디옥소-피롤리딘-1-일 에스테르(23)

비다분산성 산 22 (0.209 g, 0.42 mmol)을 건조 디클로로메탄 4 ml 내에 용해시키고, 질소 분위기하에서 NHS(N-하이드록시숙신이미드)(57.8 mg, 0.502 mmol) 및 EDC (1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드) (98.0 mg, 0.502 mmol)을 포함하는 건조 플라스크에 가하였다. 이 용액을 밤새 실온에서 교반하고 실리카 겔을 통하여 여과하여 과잉 반응시약 및 EDC로부터 형성된 요소를 제거하였다. 여과액을 진공중에서 농축하여 상기 비다분산성 화합물을 어두운 노란색 오일(0.235 g, 94 %)로서 얻었다. FAB MS: m/e 596 (M+H), 618 (M+Na).

실시예 19-24은 도 4에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 19

트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르의 메실레이트(24)

얼음배스에서 0°C로 냉각된 CH_2Cl_2 용액(100 mL)에 비다분산성 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(25 g, 0.15 mol)을 가하였다. 이어서 트리에틸아민(29.5 mL, 0.22 mol)을 가하고 이 용액을 0°C에서 15분 동안 교반하였다. 이어서 메탄술포닐 클로라이드(13.8 mL, 0.18 mol, 20 mL CH_2Cl_2에 용해됨)을 적가하였다. 이 반응혼합물을 0°C에서 30분 동안 교반하고, 실온으로 하고, 이어서 2시간 동안 교반하였다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2 ~ 2

00 mL로 세척)를 통하여 여과하고, 이어서 H_2O(300 mL), 5% $NaHCO_3$ (300 mL), H_2O (300 mL), 포화 NaCl (300 mL)로 세척하 고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하였다. 이 오일을 진공라인내에 약 2시간 동안 두어 건조를 확실히 하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 노란색 오일(29.15 g, 80% 수율)로서 얻었다.

실시예 20

헵타에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(25)

THF(1 L) 중의 비다분산성 테트라에틸렌 글리콜(51.5 g, 0.27 mol)의 용액에 포타슘 t-부톡사이드(14.8 g, 0. 13 mol, ~3 0분간에 걸쳐 조금씩)을 가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하고 이어서 THF(90 mL) 중에 용해된 화합물 **24** (29.15 g, 0.12 mol)를 적가한 후 이 반응혼합물을 밤새 교반하였다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2 ~ 200 mL로 세척)를 통하여 여과하고 증발시켜서 건조하였다. 이 오일을 이어서 HCl(250 mL, 1 N)에 용해시키고 에틸 아세테이트(250 mL)로 세척하여 과잉의 **24** 를 제거하였다. 잔류 **24** 를 제거하기 위하여 에틸 아세테이트(125 mL)로 추가적으로 세척하는 것이 필요할 수 있다. 대부분의 **25** 가 수상으로부터 제거될 때까지 수상을 CH_2Cl_2 (125 mL 부피)로 반복적으로 세척하였다. 최초 추출물은 **24** , **25** 및 디커플링(dicoupling)된 부산물을 포함할 것이므로 HCl(125 mL, 1 N)로 역추출되어야 한다. 유기층을 합한 후 증발시켜서 건조하였다. 이어서 얻어진 오일을 CH_2Cl_2 (100 mL)로 용해시키고 **25** 가 제거될 때까지 H_2O (50 mL 부피)로 반복적으로 수세하였다. 상기 수성분획을 합치고(총부피 500 mL) 이 용액이 뿌옅케 될 때까지 NaCl을 가하고 이어서 CH_2Cl_2 (2×500 mL)로 세척하였다. 상기 유기층을 합치고 $MgSO_4$ 로 탈수시키고 증발시켜서 상기 비다분산성 표제 화합물을 오일(16.9 g, 41% 수율)로서 얻었다. 고순도를 보장하기 위하여 상기 정제 과정을 1회 이상의 단계를 반복하는 것이 바람직할 수 있다.

실시예 21

8-브로모옥토아네이트(26)

에탄올(100 mL) 중의 8-브로모옥탄산(5.0 g, 22 mmol)의 용액에 H_2SO_4 (0.36 mL, 7.5 mmol)을 가하고 이 반응혼합물을 3시간 동안 교반하면서 가열하였다. 이 조반응혼합물을 실온으로 냉각하고 H_2O(100 mL), 포화 $NaHCO_3$ (2×100 mL), H_2O (100 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하여 투명한 오일(5.5 g, 98% 수율)을 얻었다.

실시예 22

MPEG7-C8 에스테르(**27**)의 합성

에테르(90 mL) 중의 비다분산성 화합물 **25** (3.0 g, 8.8 mmol)의 용액에 포타슘 t-부톡사이드(1.2 g, 9.6 mmol)을 가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 이어서 에테르(10 mL) 중에 용해된 비다분산성 화합물 **26** (2.4 g, 9.6 mmol)을 적가한 후 이 반응혼합물을 밤새 교반하였다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2 ~ 200 mL로 세척)를 통하여 여과하고 증발시켜서 건조하였다. 얻어진 오일을 에틸 아 세테이트에 용해시키고 H_2O(2×200 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하였다. 컬럼 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트에서 에틸 아세테이트/메탄올, 10:1)에 의하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일 (0.843 g, 19% 수율)로서 얻었다.

실시예 23

MPEG7-C8산(**28**)

비다분산성 화합물 **27** (0.70 g, 1.4 mmol)의 오일에 1N NaOH (2.0 mL)를 가하고 이 반응 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 이 조반응혼합물을 농축하고, 산성화하고(pH~2), NaCl로 포화시키고, CH_2Cl_2 (2×50 mL)로 세척하였다. 유기층을 합한 후 포화 NaC1로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일 (O.35 g, 53 % 수율)로서 얻었다.

실시예 24

MPEG7-C8산(**29**)의 활성화

비다분산성 MPEG7-C8산 **28** (0.31 g, 0.64 mmol)을 무수 메틸렌 클로라이드 3ml 중에 용해시키고 이어서 무수 메틸렌 클로라이드 중의 N-하이드록시숙신이미드(0.079g, 0.69 mmol) 및 EDCI-HCl(135.6 mg, 0.71 mmol)의 용액을 가하였다. 수시간 교반하여 반응을 진행시키고, 이어서 1N HCl, 물로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고, 여과하고 농축시켰다. 조생성물을 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하고, 농축하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한

오일로서 얻고 진공건조하였다.

실시예 25 ~ 29는 도 5에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 25

10-하이드록시데카노에이트(30)

에탄올(100 mL) 중의 10-하이드록시데칸산(5.0 g, 26.5 mmol)의 용액에 H_2SO_4 (0.43 mL, 8.8 mmol)을 가하고 3시간 동안 교반하면서 환류가열하여 반응을 진행하였다. 이 조반응혼합물을 실온으로 냉각시키고 H_20(100 mL), 포화 $NaHCO_3$ (2×100 mL), H_20 (100 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 그리고 증발시켜서 건조하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일(6.9 g, 98% 수율)로서 얻었다.

실시예 26

10-하이드록시데카노에이트의 메실레이트(31)

CH_2Cl_2 용액(27 mL)에 비다분산성 10-하이드록시데카노에이트 30 (5.6 g, 26 mmol)을 가하고 얼음배스에서 0 ℃로 냉각하였다. 이어서 트리에틸아민(5 mL, 37 mmol)을 가하고 이 반응 혼합물을 0℃에서 15분 동안 교반하였다. 이어서 CH_2Cl_2 (3 mL)에 용해된 메탄술포닐 클로라이드(2.7 mL, 24 mmol)을 가하고, 이 반응 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, 얼음 배스를 제거하고, 실온에서 2시간 동안 더 교반하여 반응을 진행시켰다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, 80 mL)를 통하여 여과하고, 여과액을 H_20(100 mL), 5% $NaHCO_3$ (2×100 mL), H_20(100 mL), 포화 NaCl (100 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고, 증발시켜서 건조하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 노란색을 띤 오일(7.42 g, 97% 수율)로서 얻었다.

실시예 27

$MPEG_7$-C_{10} 에스테르(**32**)의 합성

테트라하이드로퓨란(100 mL) 중의 비다분산성 헵타에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 **25** (2.5 g, 7.3 mmol)의 용액에 소디움 하이드라이드(0. 194 g, 8.1 mmol) 을 가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 이어서 테트라하이드로퓨란(10 mL) 중에 용해된 비다분산성 10-하이드록시데카노에이트의 메실레이트 **31** (2.4 g, 8.1 mmol)을 적가한 후 이 반응혼합물을 밤새 교반하였다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2 ~ 200 mL로 세척)를 통하여 여과하고 증발시켜서 건조하였다. 얻어진 오일을 에틸 아세테이트에 용해시키고 H_20(2×200 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하고, 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트/메탄올, 10:1)하고, 또 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트)하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일(0.570 g, 15% 수율)로서 얻었다.

실시예 28

$MPEG_7$-C_{10} 산(**33**)의 합성

비다분산성 $MPEG_7$-C_{10} 에스테르 **32** (0.570 g, 1.1 mmol)의 오일에 1N NaOH (1.6 mL)를 가하고 이 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 이 조반응혼합물을 농축하 고, 산성화하고(pH~2), NaCl로 포화시키고, CH_2Cl_2 (2×50 mL)로 세척하였다. 유기층을 합한 후 포화 NaC1(2×50 mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 탈수하고 증발시켜서 건조하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일 (O.340 g, 62 % 수율)로서 얻었다.

실시예 29

$MPEG_7$-C_{10} 산(**34**)의 활성화

상기 비다분산성 **33** 을 실시예 24에서 설명한 방법과 유사한 과정을 이용하여 활성화시켰다.

실시예 30 및 31은 도 6에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 30

C18(PEG6) 올리고머(**36**)의 합성

비다분산성 스테아로일 클로라이드 35(0.7g, 2.31 mmol)를 벤젠 중의 PEG6(5 g, 17.7 mmol)와 피리딘(0.97g, 12.4 mmol)의 혼합물에 서서히 가하였다. 이 반응혼합물을 몇시간(~5) 동안 교반하였다. 전개용매로서 에틸 아세테이트/메탄올을 이용하여 TLC에 의하여 이 반응을 모니터링하였다. 반응혼합물을 물로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수하고, 진공하에서 농축 및 건조하였다. 정제된 비다분산성 화합물 **36** 을 FABMS에 의하여 분석하였다: m/e 549/ M^+H.

실시예 31

C18(PEG6) 올리고머의 활성화

비다분산성 C18(PEG6) 올리고머의 활성화를 이하의 2단계에 의하여 수행하였다:

1) 비다분산성 스테아로일-PEG6 **36** (0.8 g, 1.46 mmol)을 톨루렌 중에 용해시키고 얼음배스로 냉각된 포스겐(phosgene) 용액(10 ml, 20 % in toluene)에 가하였다. 이 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하고 이어서 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 포스겐과 톨루엔을 증류제거하고, 잔류하는 비다분산성 스테아로일-PEG6 클로로포르메이트 **37** 을 P_2O_5로 밤새 건조하였다.

2) 무수 메틸렌 클로라이드 중의 비다분산성 스테아로일-PEG6 클로로포르메이트 **37** (0.78g, 1.27 mmol)과 TEA(128 mg, 1.27 mmol)의 용액에 메틸렌 클로라이드 중의 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 용액을 가하였다. 이 반응 혼합물을 16시간 동안 교반하고, 물로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수하고, 여과하고, 진공하에서 농축 및 건조하여 비다분산성 활성화된 C18(PEG6) 올리고머 **38** 을 얻었다.

실시예 32 및 37은 도 7에 도시된 방법을 참조한다.

실시예 32

테트라에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르(39)

비다분산성 테트라에틸렌 글리콜(19.4 g, 0.1O mol)의 오일에 NaOH 용액 (4.0 g in 4.0 mL)을 가하고, 이 반응혼합물을 15분 동안 교반하였다. 이어서 벤질 클로라이드(3.54 mL, 30.8 mmol)을 가하고, 이 반응 혼합물을 100°C로 가열하고 밤새 교반하였다. 이 반응 혼합물을 실온으로 냉각하고, 포화 NaCl(250 mL)로 희석하 고, CH_2Cl_2 (2 x 200 mL)로 세척하였다. 유기층을 합치고, 포화 NaCl로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시키고, 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트)하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 노란색 오일(6.21 g, 71% 수율)로서 얻었다.

실시예 33

테트라에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르의 메실레이트(40)

CH_2Cl_2 용액(20 mL)에 비다분산성 테트라에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르 39 (6.21g, 22mmol)를 가하고 얼음배스에서 0°C로 냉각하였다. 이어서 트리에틸아민(3.2 mL, 24 mmol)을 가하고 이 반응 혼합물을 0°C에서 15분 동안 교반하였다. 이어서 CH_2Cl_2 (2 mL)에 용해된 메탄술포닐 클로라이드(1.7 mL, 24 mmol)를 가하고 이 반응혼합물을 0°C에서 30분 동안 교반하고, 얼음 배스를 제거하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2로 세척, 80 mL)를 통하여 여과하고, 여과액을 H_20(100 mL), 5% $NaHCO_3$ (2×100 mL), H_20(100 mL), 포화 NaCl(100 mL)로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수하였다. 얻어진 노란색 오일을 활성탄소(10 g)를 포함하는 실리카 패드상에서 크로마토그래피하여 상기 비다분산성 표제 화합물을 투명한 오일(7.10 g, 89% 수율)로서 얻었다.

실시예 34

옥타에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르(41)

소디움 하이드라이드(0.43g, 18mmol)를 함유하는 테트라하이드로퓨란(140mL)의 용 액에 테트라하이드로퓨란(10 mL) 중의 비다분산성 테트라에틸렌 글리콜(3.5g, 18mmol)용액을 적가하고, 이 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 이 후, 테트라하이드로퓨란(10mL)에 용해된 비다분산성 테트라에틸렌 글리콜 모노벤질에테르 40(6.0g, 16.5mmol)의 메실레이트를 적가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 조반응혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, 250mL로 세척됨)를 통하여 여과하고, 여과액을 H_2O로 세척한 다음, $MgSO_4$로 탈수시킨 후 증발건조시켰다. 그 결과 생성된 오일에 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트/메탄올 10:1)를 실시하고 또 크로마토그래피(실리카, 클로로포름/메탄올, 25:1)를 실시하여 비다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(2.62g, 34%의 수율)로 얻었다.

실시예 35

스테아레이트 PEG8-벤질(43)의 합성

비-다분산성 옥타에틸렌 글리콜 모노벤질에테르 41(0.998g, 2.07mmol) 및 피리딘(163.9mg, 2.07mmol)의 교반시킨 냉각 용액에 벤젠 중의 비다분산성 스테아로일 클로라이드 42(627.7mg, 2.07mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새(18시간 동안) 교반하였다. 다음 날, 반응 혼합물을 물로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시킨 다음 진공하에서 농축 및 건조시켰다. 이 후, 10% 메탄올/90% 클로로포름을 이용하여 조 생성물에 대하여 플래시 실리카겔 컬럼 상에서 크로마토그래피를 실시하였다. 생성물을 포함하는 분획을 회수하여 진공하에서 농축 및 건조시켜 비다분산성인 표제 화합물을 얻었다.

실시예 36

스테아레이트-PEG8-벤질의 수소화분해

비-다분산성 스테아레이트-PEG8-벤질 43(0.854g, 1.138mmol)의 메탄올 용액에 Pd/C(10%)(팔라듐, 활성탄소상에 10중량%임)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새(18시간) 수소하에서 교반하였다. 이 후, 상기 용액을 여과 및 농축시키고, 10% 메탄올/90% 클로로포름을 이용하여 플래시 컬럼 크로마토그래피를 수행하여, Rt=0.6인 분획(fraction)을 회수하여 농축 및 건조시켜, 비다분산성 산 44를 얻었다.

실시예 37

C18(PEG8) 올리고머의 활성화

비-다분산성 스테아레이트-PEG8 올리고머의 2 단계 활성화를 실시예 31의 스테아레이트-PEG6에 대하여 전술된 바와 같이 수행하여, 비다분산성 활성화된 C18(PEG8) 올리고머 45를 얻었다.

실시예 38

활성 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 올리고머의 합성

하기 기재 사항은 도 8에 도시된 방법을 참조한다. 20% 포스겐(100mlm, 약 18.7g, 189mmol의 포스겐)을 함유하는 톨루엔 용액을 N_2 분위기 하에서 0℃로 냉각시켰다. 비다분산성 MTEG(트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르, 7.8g, 47.5mmol)을 25mL의 무수 에틸 아세테이트에 용해시키고 상기 냉각된 포스겐 용액에 가하였다. 이 혼합물을 1 시간 동안 0℃에서 교반한 다음, 실온으로 하고 다시 2.5시간 동안 교반하였다. 잔류 포스겐, 에틸 아세테이트 및 톨루엔을 진공 증류를 통하여 제거하여, 비다분산성 MTEG 클로로포름 46을 투명한 오일 잔류물로 얻었다.

비다분산성 잔류물 46을 50mL의 건조 디클로로메탄에 용해시키고, 이를 TEA(트리에틸아민, 6.62mL, 47.5mmol) 및 NHS(N-하이드록시숙신이미드, 5.8g, 50.4mmol)에 첨가하였다. 이 혼합물을 건조 분위기하의 실온에서 20 시간 동안 교반하였는데, 이 때 다량의 백색 침전물이 생성되었다. 이 혼합물을 여과하여 상기 침전물을 분리하여 진공하에서 농축시켰다. 그 결과 생성된 오일 47을 디클로로메탄에 취하고 차가운 탈이온수로 2회, 1N HCl로 2회 및 염수로 1회 세척하였다. 유기물을 $MgSO_4$로 탈수시킨 다음 여과 및 농축시켜, 비-다분산성인 표제 화합물을 옅은 노란색의 투명한 오일로서 얻었다. 필요하다면, NHS 에스테르를 EtOAc를 용출액으로 이용하는 실리카 겔상에서 플래시 크로마토그래피를 이용하여 더 정제할 수 있다.

실시예 39

활성 팔미테이트-TEG 올리고머의 합성

하기 기재 사항은 도 9에 도시된 방법을 참조한다. 비-다분산성 팔미트 무수물(5g; 10mmol)을 건조 THF(20mL)에 용해시키고 실온에서 교반하였다. 교반된 용액에 3mol 과량의 피리딘을 첨가한 다음 비-다분산성 트리에틸렌 글리콜(1.4mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다(반응 진행을 TLC; 에틸 아세테이 트-클로로포름; 3:7로 모니터링하였음). 반응이 종결될 무렵, THF를 제거하고 생성물을 10% H_2SO_4와 혼합하고 에틸 아세테이트(3×30mL)로 추출하였다. 회수된 추출물을 물, 염수로 차례로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시킨 다음, 증발건조시켜, 비다분산성 생성물 48을 얻었다. DMF(~10mL) 중의 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트(3mmol) 용액을 10mL의 무수 DMF 중의 비-다분산성 생성물 48(1mmol)용액에 교반하면서 첨가하였다. 소디움 하이드라이드(3mmol)을 상기 반응 혼합물에 서서히 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 몇 시간(예를 들면, 5 시간) 동안 교반하였다. 디에틸 에테르를 첨가하여 활성 올리고머를 침전시켰다. 상기 과정을 3회 반복하고 생성물을 최종적으로 건조시켰다.

실시예 40

활성 헥사에틸렌 글리콜 모노메틸 올리고머의 합성

하기 기재 사항은 도 10에 도시된 방법을 참조한다. 상기 실시예 39에서의 비다분산성 트리에틸렌 글리콜의 경우와 유사하게 비다분산성 활성 활성 헥사에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 제조하였다. 20% 포스겐(35 mL, 6.66 g, 67.4 mmol phosgene)을 함유하는 톨루엔 용액을 N_2 분위기 하에서 얼음/소금 배스에서 0°C로 냉각시켰다. 비다분산성 헥사에틸렌 글리콜 50(1.85 mL, 2.0 g, 6.74 mmol)을 5mL의 무수 EtOAc에서 용해시키고 주사기를 통하여 상기 포스겐 용액에 가하였다. 이 반응 혼합물을 1 시간 동안 얼음배스에서 교반한 다음, 얼음배스를 제거하고 실온에서 다시 2.5시간 동안 교반하였다. 포스겐, EtOAc 및 톨루엔을 진공 증류를 통하 여 제거하여, 비다분산성 화합물 51을 투명한 오일성 잔류물로 얻었다.

비다분산성 잔류물 51를 20mL의 건조 디클로로메탄에 용해시키고, 건조한 불활성 분위기하에 두었다. TEA(0.94 mL, 0.68 g, 6.7 mmol) 및 이어서 NHS(N-하이드록시숙신이미드, 0.82 g, 7.1 mmol)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 이 혼합물을 실리카 겔을 통하여 여과하여 백색 침전물을 분리하고 진공중에서 농축시켰다. 이 잔류물을 디클로로메탄에 취하고 냉수로 2회, 1N HCl로 2회 및 염수로 1회 세척하였다. 유기물을 Na_2SO_4로 탈수시킨 다음 여과 및 농축시켰다. 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, EtOAc)로 최종 정제하여 UV 활성 비다분산성 NHS 에스테르 52를 얻었다.

실시예 41

인슐린-올리고머 접합체의 합성

25 mL 디메틸설폭사이드(>99%순도) 중의 인간 인슐린(아연 또는 무아연, 2g, 건조중량기준 0.344 mmol)에 22.4°C에서 8 mL 트리에틸아민(>99%순도)을 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 22.4°C에서 10분 동안 교반하였다. 이에 7.5 mL 아세토니트릴 중의 상기 실시예 18의 활성 올리고머(O.188 g, 100% 활성을 기준으로 0.36 mmol)를 22.4°C에서 교반하면서 신속히 첨가하였다. 이 용액을 45분 동안 교반하고 온도를 27°C 이하로 유지하면서 아세트산 용액으로 반응을 정지시켰다. 반응을 분석 HPLC로 모니터링하였다. 이 반응 조건은 B29 포지션에서 모노접합된 PEG7-헥실-인슐린(PEG7-hexyl-insulin, B29 monoconjugated)을 40-60%의 수율로 생성한다. 이 조반응혼합물(PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체 40-60%, 미반응 인슐린 8-25%, 관련 물질(related substances) 15-35%)을 투석 또는 다이아필터(3000-3500 분자량 컷오프, MWCO)하여 유기 용매와 작은 분자량의 불순물을 제거하고, 암모늄 아세테이트 버퍼에 대하여 교환되고, 동결건조하였다.

B29 포지션에서 모노접합되는 PEG7-헥실-인슐린의 접합반응은 분석 HPLC로 모니터링하였다. 이 분석 HPLC 방법은 Waters Delta-Pak C18 컬럼, 150 x 3.9 mm I.D., 5㎛, 300Å을 사용하였다. 용매 시스템은 용매 B : 50/50 메탄올/물 중의 0.1% TFA, 및 용매 D : 메탄올 중의 0.1% TFA로 이루어졌다. 구배 시스템은 아래와 같았다.

시간(분)	% 용매 B	% 용매 D	유속(mL/분)
초기(0)	100	0	1.00
20	40	60	1.00
25	100	0	1.00

실시예 42

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 24의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 43

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 31의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 44

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 37의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 46

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 38의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 47

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 39의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 48

실시예 41의 과정을 이용하여 인간 인슐린을 실시예 40의 활성 올리고머와 접합하였다.

실시예 49

인간 인슐린-올리고머 접합체 혼합물의 분산 계수(Dispersity Coefficient) 측정

인간 인슐린-올리고머 접합체 혼합물의 분산 계수를 다음과 같이 평가하였다. 인간 인슐린-올리고머 접합체 혼합물을 예를 들면, 실시예 41에 기재된 바와 같이 준비하였다. 상기 혼합물의 제1 샘플을 HPLC를 이용하여 정제하여, 샘플 중 다양한 인간 인슐린-올리고머 접합체를 분리하였다. 분리된 분획(fraction)이 완전히 단분산성인 접합체 혼합물을 함유하는 것으로 가정하면, 'n'은 회수된 분획의 수와 같다. 이 혼합물은 다음 접합체의 하나 이상을 포함할 수 있는데, 이 접합체는 접합 포지션과 접합도에 의하여 기술된다: Gly ^{A1} 모노접합체; Phe ^{B1} 모노접합체; Lys ^{B29} 모노접합체; Gly ^{A1}, Phe ^{B1} 디접합체(diconjugate); Gly ^{A1}, Lys ^{B29} 디접합체; Phe ^{B1}, Lys ^{B29} 디접합체; 및/또는 Gly ^{A1}, Phe ^{B1}, Lys ^{B29} 트리접합체(triconjugate). 혼합물의 분리된 각 분획을 질량 분석기를 이용하여 분석함으로써 분획의 질량을 측정하여, 분리된 각 분획을 모노-, 디-, 트리-접합체로 분류하고 샘플의 각 분획의 변수 'M_i' 값을 구하였다.

혼합물의 제2 샘플을 HPLC를 이용하여 분석하여 HPLC 트레이스(trace)를 제공하였다. 몰 흡광도(molar absorptivity)는 접합의 결과로 변화하지 않는다고 가정하면, 혼합물 중 특정 접합체의 중량%는 HPLC 트레이스의 모든 피크 아래의 전체 면적에 대한 특정 접합체에 해당하는 HPLC 트레이스의 피크 아래의 면적의 비율로서 제공된다. 샘플을 회수하고 동결건조하여 샘플의 무수 중량을 측정하였다. 샘플의 g 중량을 샘플 중의 각 성분의 중량%와 곱하여 샘플 중의 각 접합체의 g 중량을 산출하였다. 샘플중의 특정 접합체(i번째 접합체)의 변수 'N_i'는 다음과 같이 구했다. 즉, 샘플 중의 특정 접합체의 g 중량을 이 특정 접합체의 질량, 위에서 측정된 M_i, 으로 나누어 얻은 값을 아보가르도 수(6.02205×10^{23} mole $^{-1}$)로 곱하면 샘플중의 특정 접합체의 분자수 N_i를 얻었다. 이어서 n, 각 접합체에 대하여 측정된 M_i 및 각 접합체에 대하여 산출된 N_i를 이용하여 분산 계수를 계산하였다.

실시예 50

조혼합물(crude mixture)로부터 B29 개질된 PEG7-헥실-인슐린 모노접합체의 정제

B29 모노접합된 PEG7-헥실-인슐린을 실시예 41의 조혼합물로부터 분취용 HPLC 시스템을 이용하여 정제하였다. 동결건조된 조혼합물(0.5g, 조성: PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체 40-60 %, 미반응 인슐린 8-25%, 관련 물질 15-35 %)을 pH 7.4의 0.01M 암모늄 아세테이트 버퍼 5-10mL에 용해시키고 0.5% 트리에틸아민/0.5% 인산 버퍼 TEAP A로 평형을 이루고 있는 C-18 역상(reverse phase) HPLC 컬럼(150 x 3.9 mm)에 충전하였다. 이 컬럼을 TEAP A와 TEAP B(80% 아세토니트릴 및 20% TEAP A) 용매 시스템을 이용하는 구배 흐름(gradient flow)으로 용출시켰다. 조혼합물로부터 PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체의 분취용 HPLC 정제을 위한 구배 시스템은 다음과 같았다.

시간(분)	% TEAP A	% TEAP B	유속(mL/분)
초기(0)	70	30	30
45	64	36	30
105	60	40	30
115	40	60	30
125	15	85	30
135	15	85	30

HPLC에 의하여 분획들을 분석하였다. PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체의 순도가 >97%인 생성물 분획을 풀링(pooling)하였다. 암모늄 아세테이트 버퍼(0.01 M, pH 7.4)에 대하여 투석 또는 다이아필터(MWCO 3000-3500)하여 용출 버퍼 및 용매를 제거하고, 암모늄 아세테이트 버퍼로 교환하고, 동결건조하여 PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체(순도가 >97%)의 하얀 분말을 얻었다.

반응을 모니터하기 위하여 실시예 41에서 이용된 방법에서와 동일한 컬럼 및 용매 시스템을 이용하는 분석 HPLC 방법으로 PEG7-헥실-인슐린, B29 모노접합체를 분석하였다. 그러나, 구배 조건은 아래와 같았다.

시간(분)	% 용매 B	% 용매 D	유속(mL/분)
초기(0)	100	0	1.00
30	10	90	1.00
35	100	0	1.00

실시예 51

사이토센서 연구(Cytosensor Studies)

약 18시간 동안 혈청이 제거된 상태에 있던 Colo 205 (ATCC제의 직장 아데노 카시노마(colorectal adenocarcinoma) 세포, 카탈로그 #CCL-222) 세포를 3:1 Cytosensor 저농도 버퍼(low buffer) RPMI-1640 배지 : Cytosensor 아가로즈 포집 배지에 현탁시키고, lOO,000세포/10㎕ 방울로 Cytosensor 캡슐내에 시딩하였다. Cytosensor 상에서 저농도 버퍼 RPMI-1640 배지로 분당 100㎕의 유속으로 약 3시간 동안 기저 산성화속도가 안정화될 때까지 세포들을 평형을 유지하도록 하였다. 인슐린 약물(인슐린 또는 인슐린 접합체)를 저농도 버퍼 RPMI-1640 배지에서 50nM로 희석하여 20분 동안 분당 100㎕의 유속으로 셀에 가하였다. 이후, 이 약물 용액을 회수하고 저농도 버퍼 배지 만의 연속 흐름하에서 셀을 다시 관류하였다. 산성화 속도가 기저 수준으로 다시 돌아올 때(약물 용액을 가한 후 약 1 시간)까지 데이타를 계속 수집하였다. 이 결과는 도 14에 도시되어 있다. 도 14에 이용된 바와 같이, 인슐린은 인간 인슐린이다; PEG4는 mPEG4-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이다; PEG10은 mPEG10-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이 다; PEG7은 mPEG7-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이다; $PEG7_{AVG}$ 는 $mPEG7_{AVG}$ -헥실-인슐린, 단일접합체의 다분산성 혼합물이다.

실시예 52

효소 안정성

쉐이킹 워터 배스에서 키모트립신 소화를 pH 7.4, 37℃의 인산염 버퍼에서 실시하였다. 인슐린/인슐린 접합체 농도는 0.3 mg/mL였다. 키모트립신 농도는 2 Unit/mL였다. 100㎕ 샘플들을 표시된 시각에서 제거하고 0.1% 트리플루오로아세트산:이소프로필 알콜의 1:1 혼합물 25㎕로 반응을 정지시켰다. 샘플들을 역상 HPLC에 의하여 분석하고 인슐린/인슐린 접합체의 상대 농도를 곡선하면적을 계산함으로써 측정하였다.

도 15에서 이용된 바와 같이, 인슐린은 인간 인슐린이다; PEG4는 mPEG4-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이다; PEG10은 mPEG10-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이다; PEG7은 mPEG7-헥실-인슐린, 단일접합체의 비다분산성 혼합물이다; $PEG7_{AVG}$ 는 $mPEG7_{AVG}$ -헥실-인슐린, 단일접합체의 다분산성 혼합물이다.

실시예 53

용량 의존 활성

제제를 평가하기 위한 효과적인 동물 모델로서 정상의 단식시킨 비글개(beagle dogs)를 사용한다. 다양한 제제의 효능을 평가하기 위하여 이들 개 에게 0.25 mg/kg ~ 1.0 mg/kg의 인슐린 접합체를 투여한다. 이 모델은 본 발명에 따른 인슐린 접합체가 본 발명에 속하지 않으며 비교 목적을 위하여 제공되는 다분산성 인슐린 접합체보다 용량 의존적인 방식으로 더 낮은 글루코스 레벨을 제공하는 것을 증명하기 위하여 이용되었다.

개 실험을 위한 규정에 의하면 약물이 투여되기 직전인 0분에서 혈중 글루코스를 측정한다. 이어서 고상 경구투여 형태의 제제를 이어서 개의 입속으로 삽입한다. 혈액을 15, 30, 60 및 120분에서 채취하여 글루코스 수준을 측정하고 그래프화한다. 글루코스 수준이 낮을 수록 인슐린 접합체의 활성은 더 좋은 것이다. 도 16에서, 본 발명의 접합체의 글루코스 강하, 즉 활성은 투여량 의존적으로 나타났다. 비교 목적으로, 도 17은 본 발명에 속하지 않는 캡슐 제제의 다분산된 인슐린 접합체의 글루코스 강하는 본 발명의 접합체 보다 덜 투여량 의존적이다.

실시예 54

활성 및 개체간 변이성(Activity and Inter-Subject Variability)

제제를 평가하기 위한 효과적인 동물 모델로서 정상의 단식시킨 비글견(beagle dogs)을 사용한다. 다양한 제제의 효능을 평가하기 위하여 이들 개에게 0.25 mg/kg 의 인슐린 접합체를 투여한다. 이 모델은 본 발명에 따른 인슐린 접합체가 본 발명에 속하지 않으며 비교 목적을 위하여 제공되는 다분산성 인슐린 접합체 보다 더 낮은 개체간 변이성 및 더 좋은 활성을 제공하는 것을 증명하기 위하여 이용되었다.

개 실험을 위한 규정에 의하면, 약물이 투여되기 직전인 0분에서 혈중 글루 코스를 측정한다. 이어서 액상 경구투여 형태의 제제를 개 입 뒷부분에 주사하였다. 각 경우에 개에게 이 용액 0.25 mg/kg을 투여하였다. 혈액을 15, 30, 60 및 120분에서 채취하여 글루코스 수준을 측정하고 그래프화한다. 글루코스 수준이 낮을수록 인슐린 접합체의 활성은 더 좋은 것이다. 도 18, 19 및 20에서, PEG4-헥실-인슐린, 단일접합체; PEG7-헥실-인슐린, 단일접합체; 및 PEG10-헥실-인슐린, 단일접합체 각각에 대하여 얻은 결과는 이들 본 발명의 PEG 접합체가 본 발명에 속하지 않으며 비교 목적으로 제공되는 PEG7 $_{평균}$-헥실-인슐린, 단일접합체에 대한 도 21에 나타난 결과 보다 개체간 변이성이 작고 활성이 높은 것을 나타낸다.

본 명세서에서 본 발명의 통상적이며 바람직한 구현예가 개시되었고 특정 용어가 사용되었지만, 이들은 포괄적이고 기술적인 의미에서 사용되었으며 제한적인 목적으로 사용되지 않았으므로 본 발명의 범위는 다음의 청구의 범위에 기재되어 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
하기 식으로 표시되는 분산계수(DC)(dispersity coefficient)가 10,000보다 큰 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 각각 포함하는 접합체의 혼합물:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

상기 식에서,

n은 샘플 중의 서로 다른 분자들의 수이고;

N_i는 샘플 중의 i 번째 분자의 수이며;

M_i는 i 번째 분자의 질량이다.

청구항 2.
제1항에 있어서, 상기 분산계수는 100,000보다 큰 것임을 특징으로 하는 혼합물.

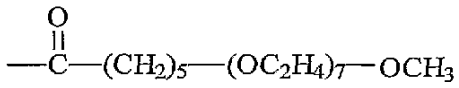
청구항 3.
제1항에 있어서, 상기 분산계수는 500,000보다 큰 것임을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 4.
제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 2, 3 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 5.
제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 5 또는 6 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 6.
제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 7.
제1항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이고, 상기 올리고머는 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 에 공유결합되어 있으며, 하기 식으로 표시되는 것을 특징으로 하는 혼합물:



청구항 8.
제1항에 있어서, 상기 혼합물은 상기 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성 보다 더 큰 in vivo 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 9.
제1항에 있어서, 상기 혼합물은 상기 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성 보다 더 큰 in vitro 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 10.
제1항에 있어서, 상기 혼합물은 상기 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 키모트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 11.
제1항에 있어서, 상기 혼합물은 상기 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성 보다 더 작은 개체간 변이성을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 12.
제1항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 인슐린인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 13.
제12항에 있어서, 상기 올리고머는 상기 인슐린의 아민기 기에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 14.
제13항에 있어서, 상기 아민기는 상기 인슐린의 Lys ^{B29} 에 위치하는 것을 특징 으로 하는 혼합물.

청구항 15.
제12항에 있어서, 상기 접합체는 제 1 올리고머 및 제 2 올리고머를 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 16.
제15항에 있어서, 상기 제1 올리고머는 인슐린의 Lys ^{B29} 에 공유결합되어 있고, 상기 제2 올리고머는 상기 인슐린의 N-말단 A1 또는 N-말단 B1에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 17.
제1항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 상기 올리고머에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 18.
제1항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 가수분해성 결합에 의하여 상기 올리고머에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 19.
제1항에 있어서, 상기 인슐린은 상기 올리고머의 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 20.
제19항에 있어서, 상기 올리고머는 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 공유 결합되어 있는 친지성 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 21.
제1항에 있어서, 상기 올리고머는 친지성 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 22.
제21항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 상기 친지성 모이어티에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 23.
제21항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 상기 친지성 모이어티에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 24.
제1항에 있어서, 상기 접합체는 제 1 올리고머 및 제 2 올리고머를 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 25.
제24항에 있어서, 상기 제1 및 제2 올리고머는 동일한 것임을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 26.
제1항에 있어서, 상기 올리고머는 비가수분해성 결합에 의하여 상기 인슐린에 공유결합되어 있는 제1 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 및 가수분해성 결합에 의하여 상기 제1 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 공유결합되어 있는 제2 폴리에틸렌 글 리콜 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 27.
제26항에 있어서, 상기 올리고머는 상기 제 2 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 공유결합되어 있는 친지성 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 28.
제1항에 있어서, 상기 접합체는 각각 양친매적으로 균형을 이루고 있어 각 접합체는 수용성이고 생물학적 막을 통과할 수 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 29.
제1항에 따른 상기 혼합물; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 30.
하기 식으로 표시되는 분산계수(DC)(dispersity coefficient)가 10,000보다 큰, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 각각 포함하는 접합체의 혼합물을 유효량만큼 개체에 투여하여 인슐린 결핍증을 치료하는 단계를 포함하는. 인슐린 결핍증 치료를 필요로 하는 개체에서 인슐린 결핍증을 치료하는 방법:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

상기 식에서,

n은 샘플 중의 서로 다른 분자들의 수;

N_i는 샘플 중의 i 번째 분자의 수; 및

M_i는 i 번째 분자의 질량이다.

청구항 31.
각 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 공유결합되어 있는 인슐린 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물.

청구항 32.
제31항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 2, 3 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 33.
제31항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 5 또는 6 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 34.
제31항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 35.
제31항에 있어서, 상기 혼합물 중의 상기 접합체의 약 96, 97, 98 또는 99% 이상이 동일한 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 36.
제31항에 있어서, 상기 혼합물은 단순분산되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 37.
제31항에 있어서, 상기 혼합물은 실질적으로 순수하게 단순분산된 혼합물임을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 38.
제31항에 있어서, 상기 혼합물 중의 상기 접합체의 약 96, 97, 98 또는 99% 이상이 동일한 분자량과 동일한 분자 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 39.
제31항에 있어서, 상기 혼합물은 순수하게 단순분산된 혼합물임을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 40.
7이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 카르복실산 모이어티의 원위 말단(distal end)에서 공유결합되어 있는 카르복실산의 카르복실산 모이어티에 인간 인슐린의 Lys^{B29} 위치에서 공유결합되어 있는 인간 인슐린을 각각 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물.

청구항 41.
제40항에 있어서, 상기 접합체는 각각 7개 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 카르복실산 모이어티의 원위 말단에서 공유결합되어 있는 헥사노인산의 카르복실산 모이어티에 인간 인슐린의 Lys^{B29} 위치에서 공유결합되어 있는 인간 인슐린으로 각각 구성되는 것을 특징으로 하는 실질적으로 단순분산된 혼합물.

청구항 42.
폴리에틸렌 글리콜를 포함하는 올리고머에 공유결합되어 있는 인슐린 약물을 각각 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물로서, 상기 혼합물은 상기 실질적으로 단순분산된 혼합물과 동일한 수평균 분자량을 갖는 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vivo 활성 보다 더 큰 in vivo 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물.

청구항 43.
제42항에 있어서, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 in vitro 활성 보다 더 큰 in vitro 활성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 44.
제42항에 있어서, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 키모트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

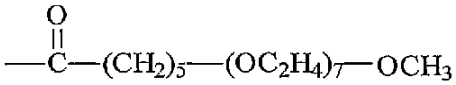
청구항 45.
제42항에 있어서, 인슐린 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 개체간 변이성 보다 더 작은 개체간 변이성을 더 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 46.
폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 공유결합되어 있는 인슐린 약물을 각각 포함하는 접합체의 혼합물로서, 상기 혼합물은 표준편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 47.
제46항에 있어서, 상기 분자량 분포의 표준편차는 약 14 달톤 미만인 것을 특징으로 하는 혼합물.

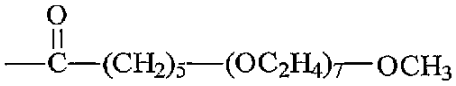
청구항 48.
제46항에 있어서, 상기 분자량 분포의 표준편차는 약 11 달톤 미만인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 49.
제 46 항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이고 각각의 올리고머는 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 에 공유결합되며 하기 식을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

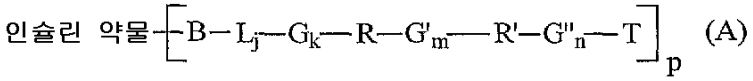


청구항 50.
각각의 접합체가 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하고 동일한 수의 폴 리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 접합체의 혼합물.

청구항 51.
제 50 항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이고 각각의 올리고머는 인간 인슐린의 Lys ^{B29} 에 공유결합되며 하기 식을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.



청구항 52.
각각의 접합체는 동일하며 하기 식 (A)를 갖는 접합체의 혼합물:



상기 식에서,

B는 결합 모이어티이고;

L은 링커 모이어티이고;

G, G', 및 G'은 각각 선택된 스페이서 모이어티이고;

R은 친지성 모이어티이고 R'은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이거나, R'은 친지성 모이어티이고 R은 폴리알킬렌 글리콜 모이어티이고;

T는 종결 모이어티이고;

j, k, m, 및 n은 각각 0 또는 1이며;

p는 1 내지 인슐린 약물에 존재하는 친핵성 잔기의 수의 정수이다.

청구항 53.
제52항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜기는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 54.
제53항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 2, 3, 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 55.
제53항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 5 또는 6 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 56.
제53항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜 모이어티는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 57.
제53항에 있어서,

R은 알킬 또는 알킬렌이고;

R'은 7 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이고;

T는 알킬이고;

j는 1이며;

k, m, 및 n은 0인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 58.
제53항에 있어서,

B는 카르보닐이고;

R은 C_5 알킬렌이고;

R'은 7 개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이고;

T는 메톡시이며;

k, m, 및 n은 0인 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 59.
식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 식 III의 구조를 갖는 폴리머를 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 생성시키기에 충분한 조건 하에서 식 II의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응시키는 단계

$$R^1(OC_2H_4)_m\text{-}O^-X^+ \qquad (I)$$

$$R^2(OC_2H_4)_n\text{-}OMs \qquad (II)$$

$R^2(OC_2H_4)_{m+n}$-OR^1 (III);

상기 식에서,

R^1 은 H 또는 친지성 모이어티이고, m은 1 내지 25이며, X^+ 는 양이온이며,

R^2 는 H 또는 친지성 모이어티이고, n은 1 내지 25이다;

상기 식 III의 폴리머를 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 활성화시켜 인슐린 약물과 반응할 수 있는 활성화된 폴리머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 생성시키는 단계; 및

상기 활성화된 폴리머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 각각 m+n 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는 접합체의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 생성시키기에 조건 하에서 인슐린 약물의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응시키는 단계를 포함하는, 각각의 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인슐린 약물을 포함하는, 실질적으로 단순분산된 접합체 혼합물을 합성하는 방법.

청구항 60.
제 59 항에 있어서, 상기 R^2 는 지방산 모이어티 또는 지방산 모이어티의 에스테르인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.
제 60 항에 있어서, 상기 지방산 모이어티 또는 지방산 모이어티의 에스테르는 길이상 5개 이상의 탄소 원자를 갖는 알킬 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.
제 59 항에 있어서, 상기 R^1 은 메틸기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.
제 59 항에 있어서,

식 V의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 식 II의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 메탄술포닐 할라이드와 반응시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

$R^2(OC_2H_4)_n$-OH (V)

$R^2(OC_2H_4)_n$-OMs (II)

청구항 64.
제63항에 있어서,

식 VI의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 식 VIII의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 생성시키기에 충분한 조건 하에서 식 VII의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응시키는 단계

R^2-OMs (VI)

$R^3(OC_2H_4)_m$-$O^-X_2^+$ (VII)

$R^3(OC_2H_4)_m$-OR^2 (VIII);

상기 식에서,

R^2 는 친지성 모이어티이고,

R^3 는 벤질, 트리틸, 또는 THP이며; X^+ 는 양이온이다;

식 VIII의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 식 V의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에서 반응시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

$$R^2(OC_2H_4)_m\text{-}OH \qquad (V)$$

청구항 65.
제59항에 있어서, 식 IV의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을, 식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단순분산된 혼합물을 생성시키기에 충분한 조건 하에서 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

$$R^1(OC_2H_4)_n\text{-}OH \qquad (IV)$$

$$R^1(OC_2H_4)_n\text{-}O^-X^+ \qquad (I)$$

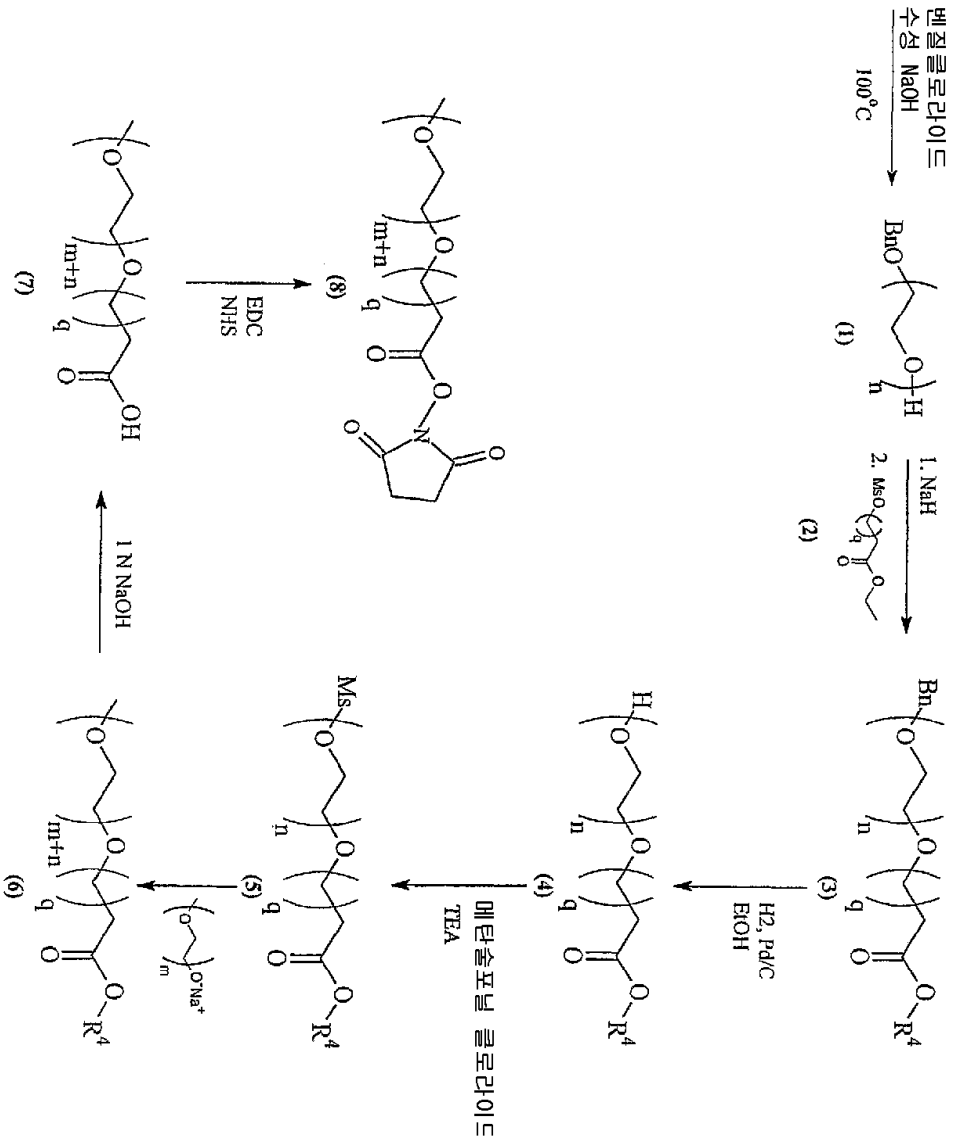
청구항 66.
제59항에 있어서, 실질적으로 단순분산된 혼합물의 활성화는 식 III의 폴리머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 N-히드록시 숙신이미드와 반응시켜 인슐린 약물과 반응할 수 있는 활성화된 폴리머를 생성시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67.
제59항에 있어서, 상기 인슐린 약물은 인간 인슐린이고, 상기 활성화된 폴리머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 인슐린의 실질적으로 단순분산된 혼합물과 반응시키는 단계는,

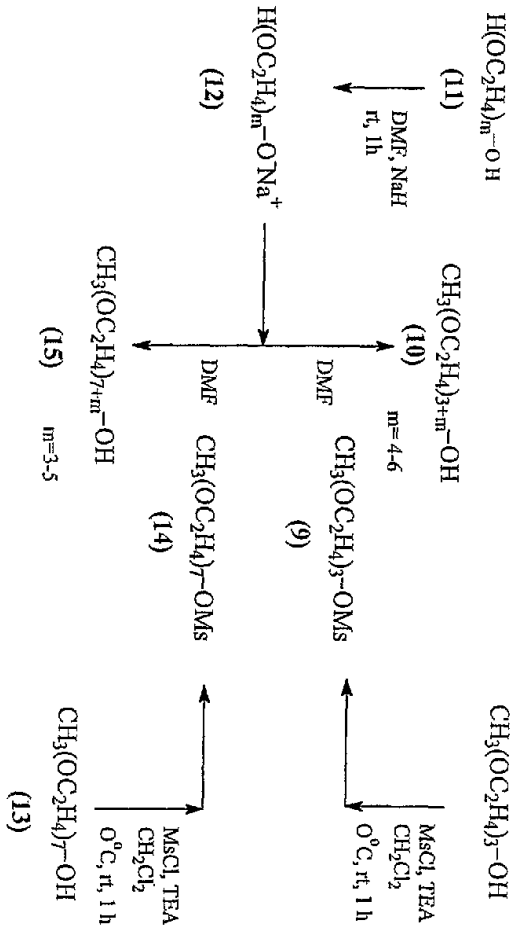
상기 활성화된 폴리머의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 인간 인슐린의 Lys^{B29} 와 반응시켜, 각각의 접합체가 m+n 서브유닛을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 올리고머에 결합된 인간 인슐린을 포함하는 모노접합체(monoconjugate)의 실질적으로 단순분산된 혼합물을 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

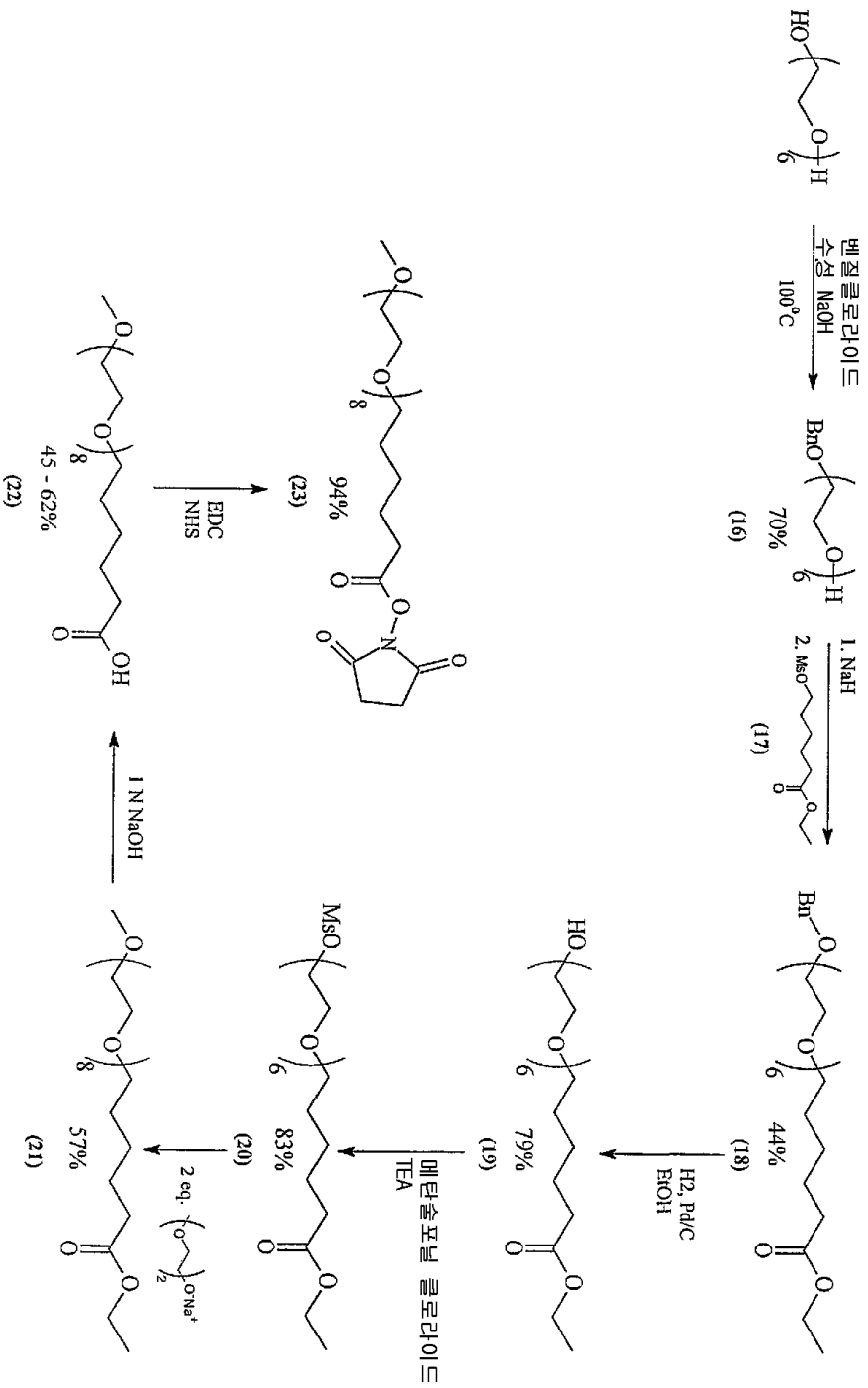
도면1


벤질클로라이드
수성 NaOH
100°C
1. NaH
2. MsO
H2, Pd/C
EtOH
메탄술포닐 클로라이드
TEA
1 N NaOH
EDC
NHS

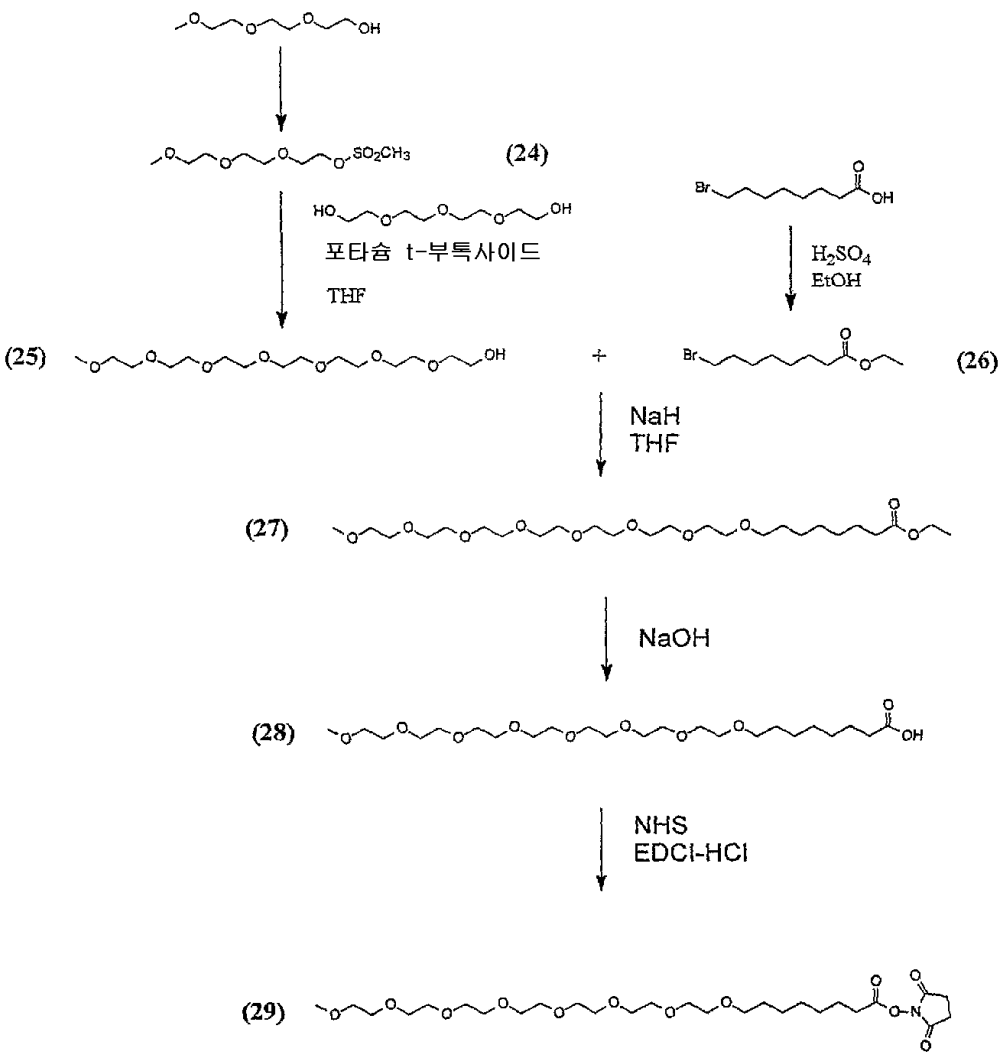
도면2


H(OC2H4)m–OH
(11)
DMF, NaH
rt, 1h
H(OC2H4)m–O⁻Na⁺
(12)
CH3(OC2H4)3+m–OH
(10)
m= 4-6
MsCl, TEA
CH2Cl2
0°C, rt, 1 h
CH3(OC2H4)3–OMs
(9)
DMF
CH3(OC2H4)3–OH
CH3(OC2H4)7–OMs
(14)
MsCl, TEA
CH2Cl2
0°C, rt, 1 h
CH3(OC2H4)7–OH
(13)
DMF
CH3(OC2H4)7+m–OH
(15)
m=3-5

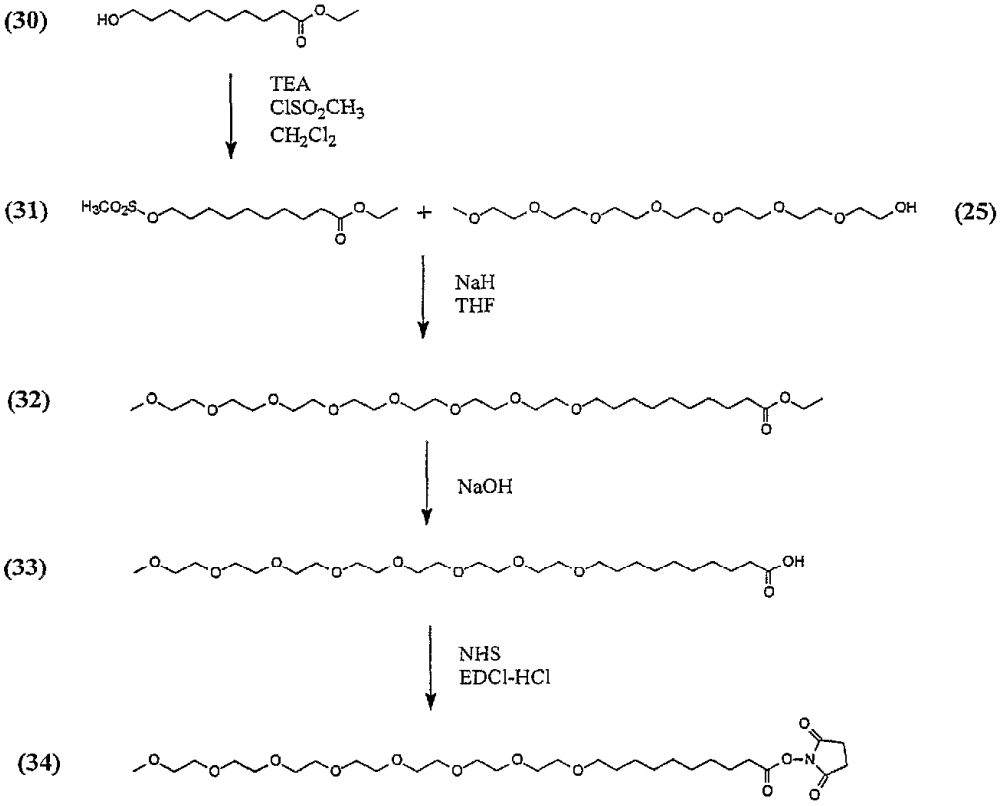
도면3


벤질클로라이드
수성 NaOH
100°C
70%
(16)
1. NaH
2. MsO
(17)
44%
(18)
H2, Pd/C
EtOH
79%
(19)
메탄술포닐 클로라이드
TEA
83%
(20)
2 eq.
57%
(21)
1 N NaOH
45 - 62%
(22)
EDC
NHS
94%
(23)

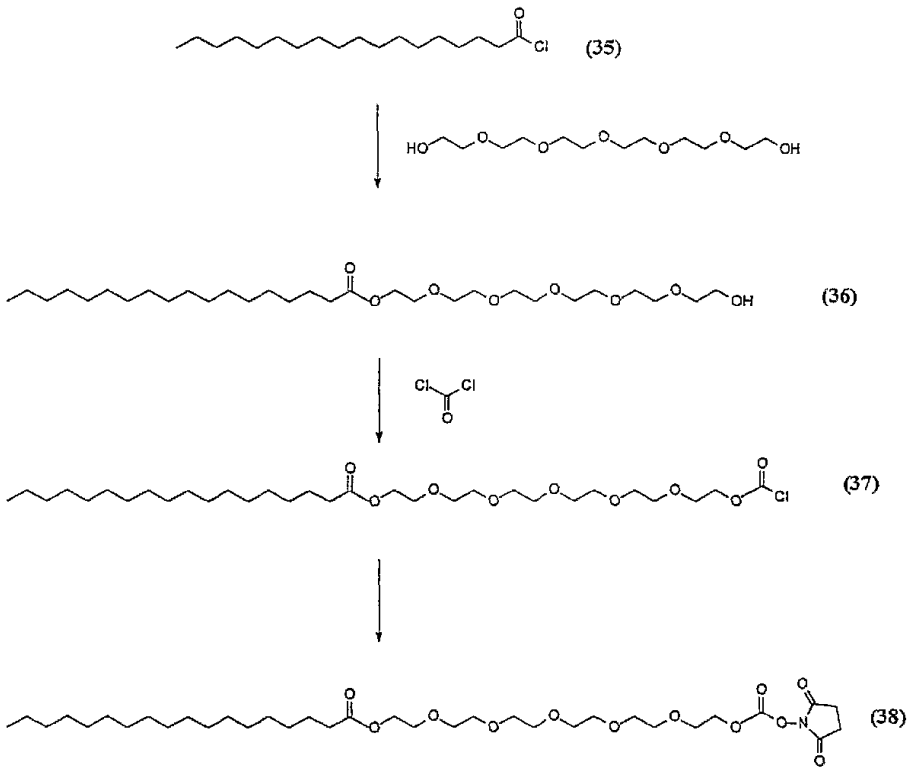
도면4


(24)
포타슘 t-부톡사이드
THF
H_2SO_4
EtOH
(25)
(26)
NaH
THF
(27)
NaOH
(28)
NHS
EDCI-HCl
(29)

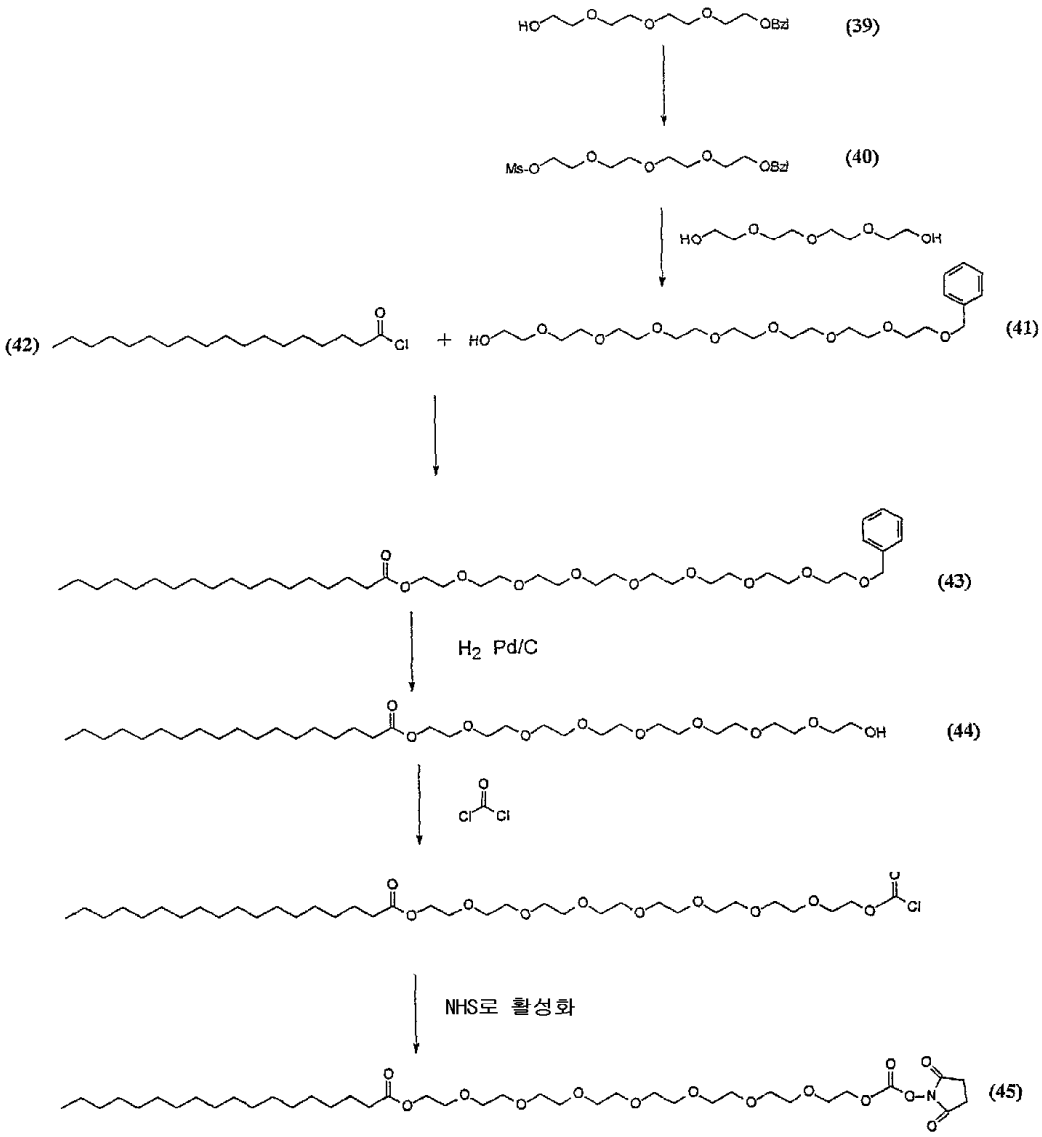
도면5


(30)
HO
O
O
TEA
ClSO2CH3
CH2Cl2
(31)
H3CO2S
O
O
+
O
O
O
O
O
O
OH
(25)
NaH
THF
(32)
O
O
O
O
O
O
O
O
O
O
O
O
NaOH
(33)
OH
NHS
EDCl-HCl
(34)
O
N

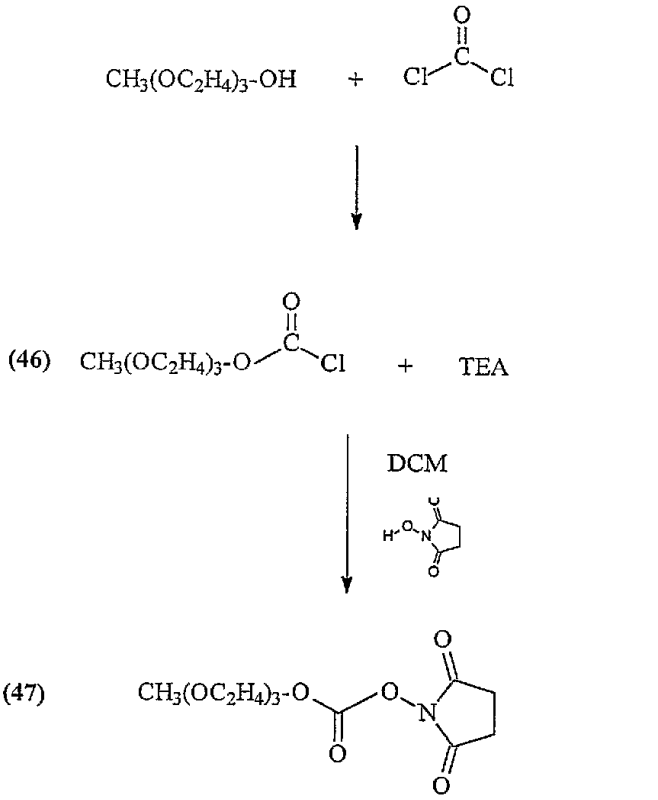
도면6


Cl
O
(35)
HO
OH
(36)
Cl
Cl
O
(37)
(38)
N

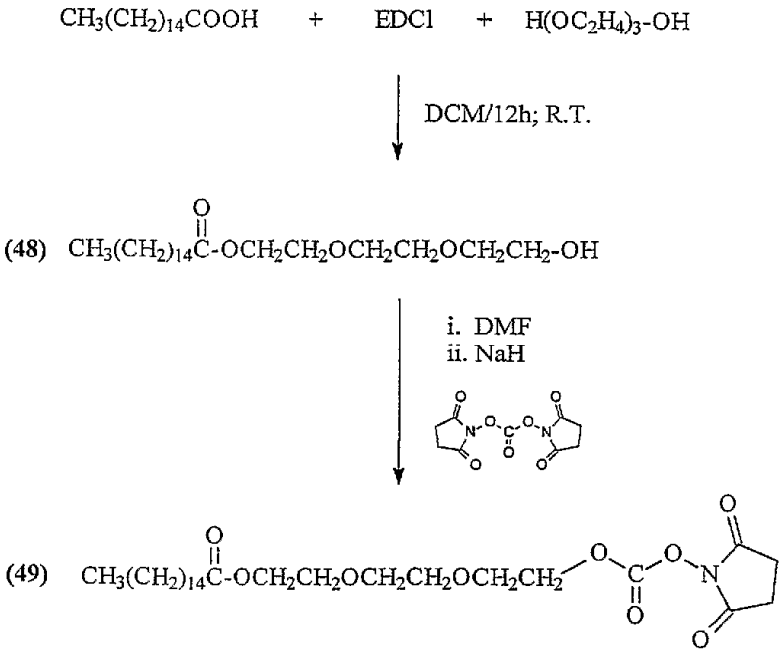
도면7


HO
OBzl
(39)
Ms-O
OBzl
(40)
HO
OH
(42)
Cl
+
HO
(41)
(43)
H2 Pd/C
OH
(44)
Cl
Cl
Cl
NHS로 활성화
(45)

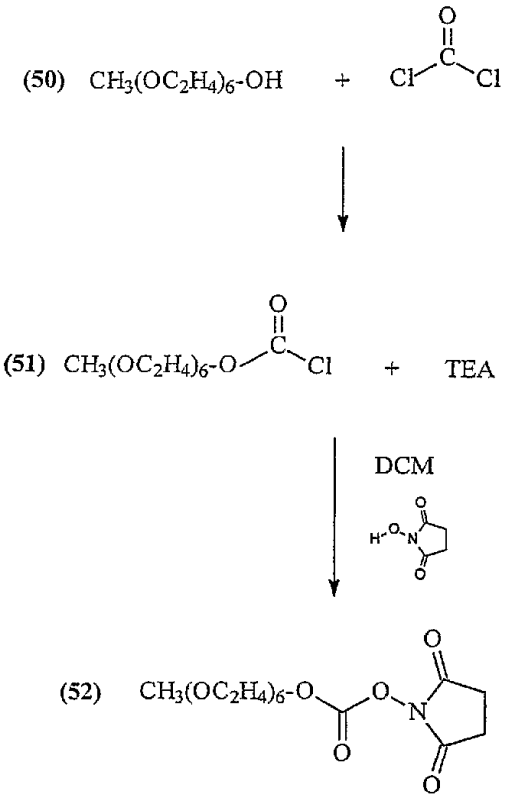
도면8


CH3(OC2H4)3-OH
+
Cl
Cl
(46)
CH3(OC2H4)3-O
Cl
+
TEA
DCM
(47)
CH3(OC2H4)3-O
O
N

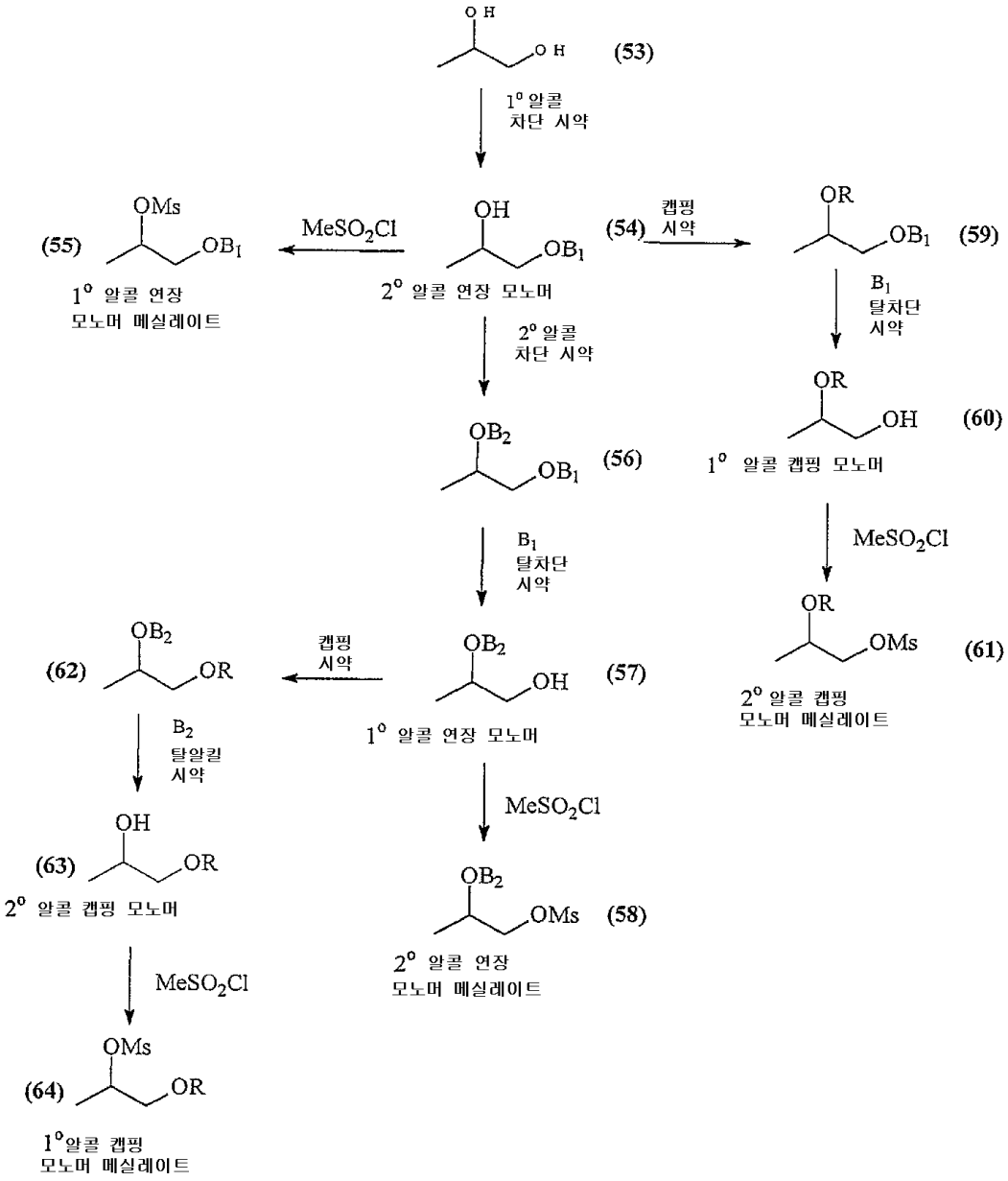
도면9


CH3(CH2)14COOH
+
EDCl
+
H(OC2H4)3-OH
DCM/12h; R.T.
(48)
CH3(CH2)14C-OCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2-OH
i. DMF
ii. NaH
(49)
CH3(CH2)14C-OCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2

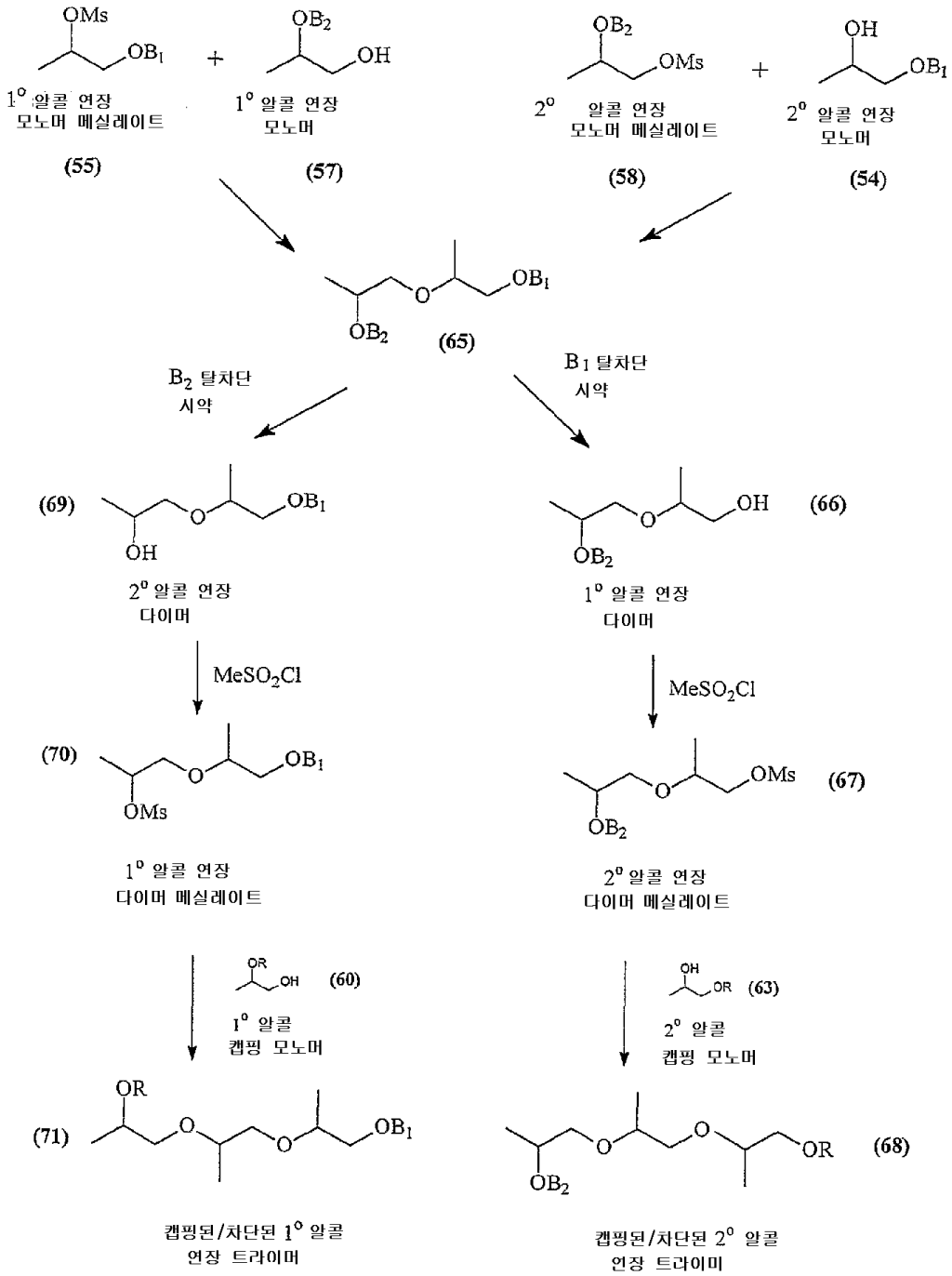
도면10


(50) CH3(OC2H4)6-OH + Cl C Cl
(51) CH3(OC2H4)6-O C Cl + TEA
DCM
(52) CH3(OC2H4)6-O O N

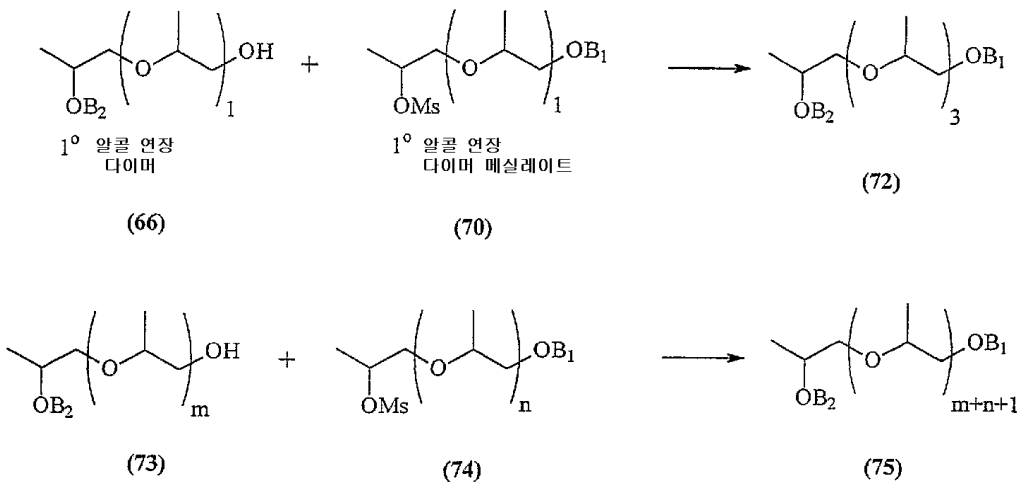
도면11


(53)
1° 알콜 차단 시약
(55)
MeSO2Cl
(54)
캡핑 시약
(59)
1° 알콜 연장 모노머 메실레이트
2° 알콜 연장 모노머
B1 탈차단 시약
2° 알콜 차단 시약
(60)
1° 알콜 캡핑 모노머
(56)
MeSO2Cl
B1 탈차단 시약
(61)
2° 알콜 캡핑 모노머 메실레이트
(62)
캡핑 시약
(57)
B2 탈알킬 시약
1° 알콜 연장 모노머
MeSO2Cl
(63)
2° 알콜 캡핑 모노머
(58)
2° 알콜 연장 모노머 메실레이트
MeSO2Cl
(64)
1°알콜 캡핑 모노머 메실레이트

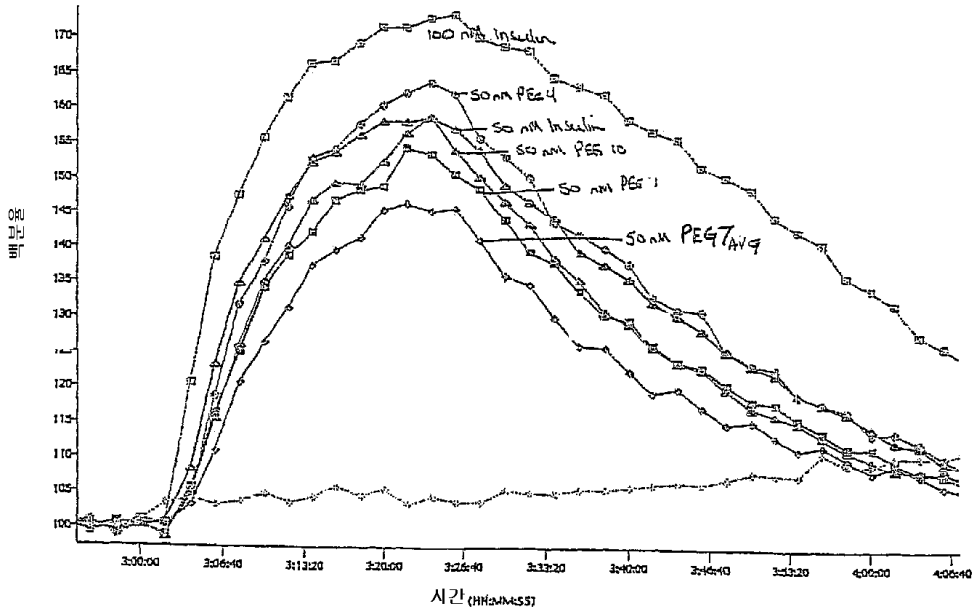
도면12


OMs
OB1
1° 알콜 연장 모노머 메실레이트
(55)
OB2
OH
1° 알콜 연장 모노머
(57)
OB2
OMs
2° 알콜 연장 모노머 메실레이트
(58)
OH
OB1
2° 알콜 연장 모노머
(54)
OB1
OB2
(65)
B2 탈차단 시약
B1 탈차단 시약
(69)
OB1
OH
2° 알콜 연장 다이머
(66)
OH
OB2
1° 알콜 연장 다이머
MeSO2Cl
MeSO2Cl
(70)
OB1
OMs
1° 알콜 연장 다이머 메실레이트
(67)
OMs
OB2
2° 알콜 연장 다이머 메실레이트
OR
OH
(60)
1° 알콜 캡핑 모노머
OH
OR
(63)
2° 알콜 캡핑 모노머
(71)
OR
OB1
캡핑된/차단된 1° 알콜 연장 트라이머
OB2
OR
(68)
캡핑된/차단된 2° 알콜 연장 트라이머

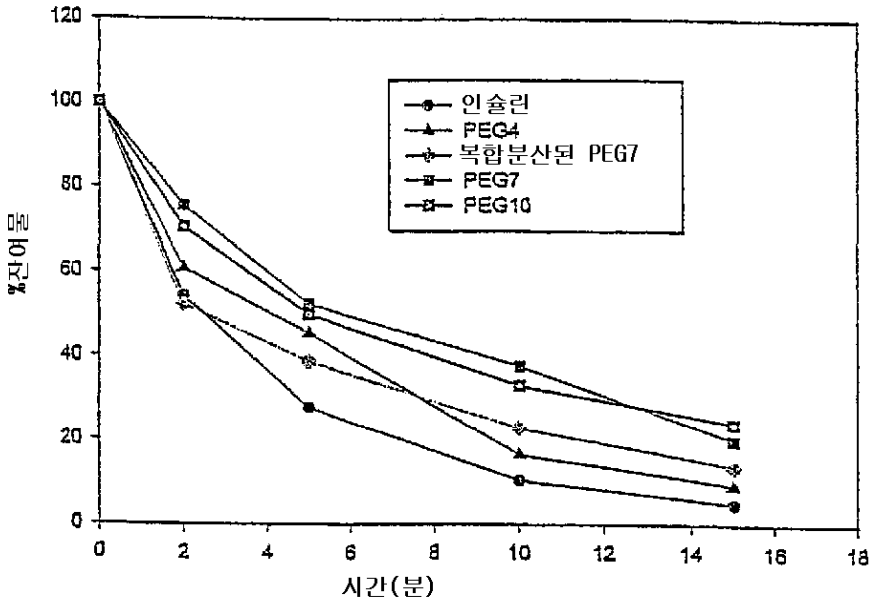
도면13


OH
OB2
1
OB1
OMs
1
OB1
OB2
3
1° 알콜 연장 다이머
1° 알콜 연장 다이머 메실레이트
(66)
(70)
(72)
OH
OB2
m
OB1
OMs
n
OB1
OB2
m+n+1
(73)
(74)
(75)

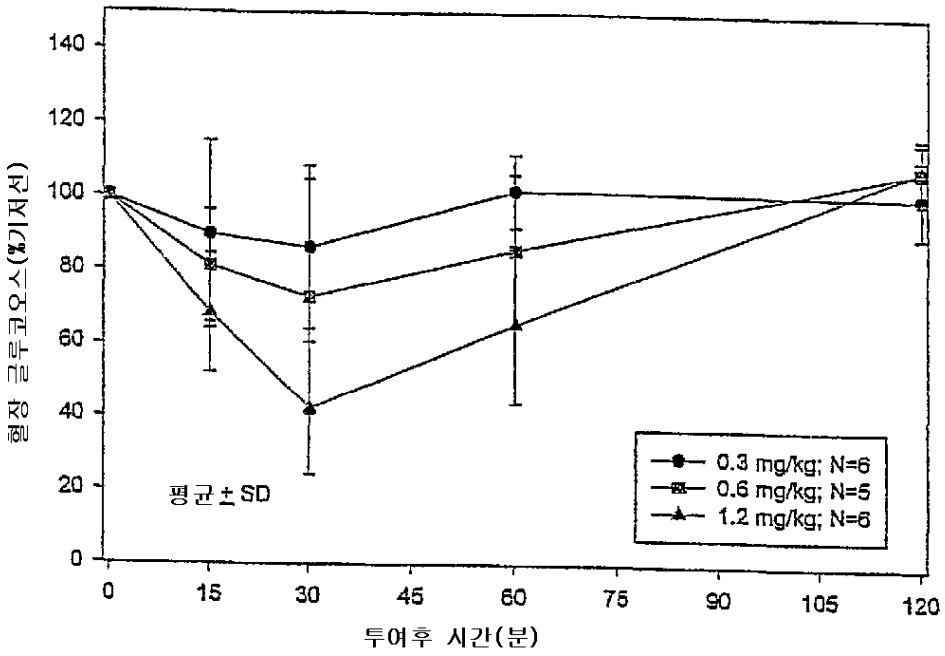
도면14


100 nM Insulin
50 nM PEG4
50 nM Insulin
50 nM PEG 10
50 nM PEG
50 nM PEG7Avg
혈당
시간 (HH:MM:SS)

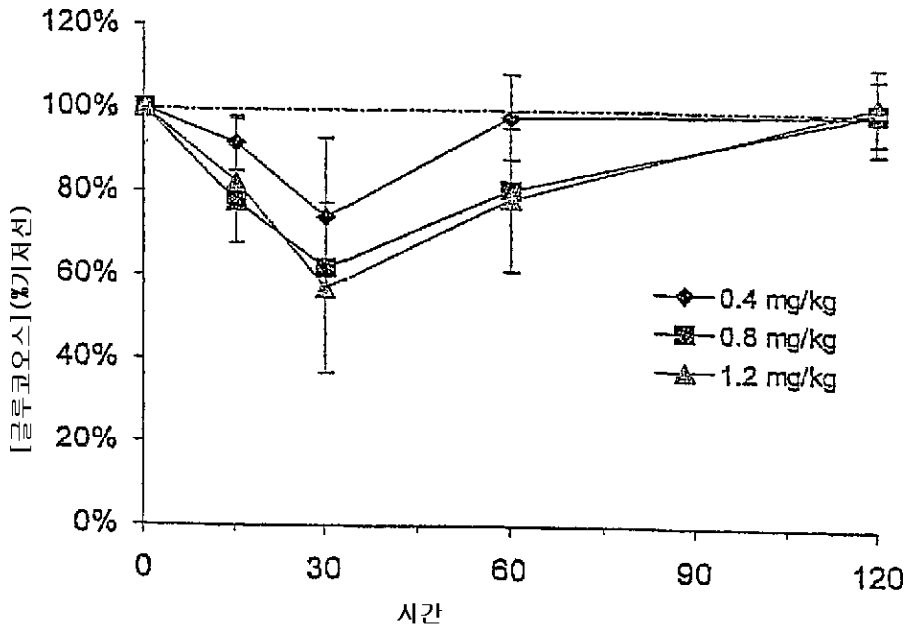
도면15


120
100
80
60
40
20
0
%잔여물
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
시간(분)
인슐린
PEG4
복합분산된 PEG7
PEG7
PEG10

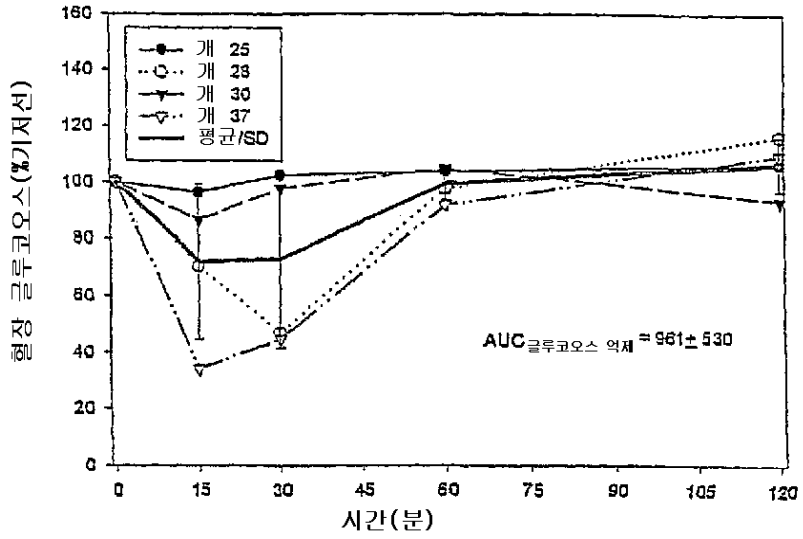
도면16


140
120
100
80
60
40
20
0
혈장 글루코오스(%기저선)
0
15
30
45
60
75
90
105
120
투여후 시간(분)
평균±SD
0.3 mg/kg; N=6
0.6 mg/kg; N=5
1.2 mg/kg; N=6

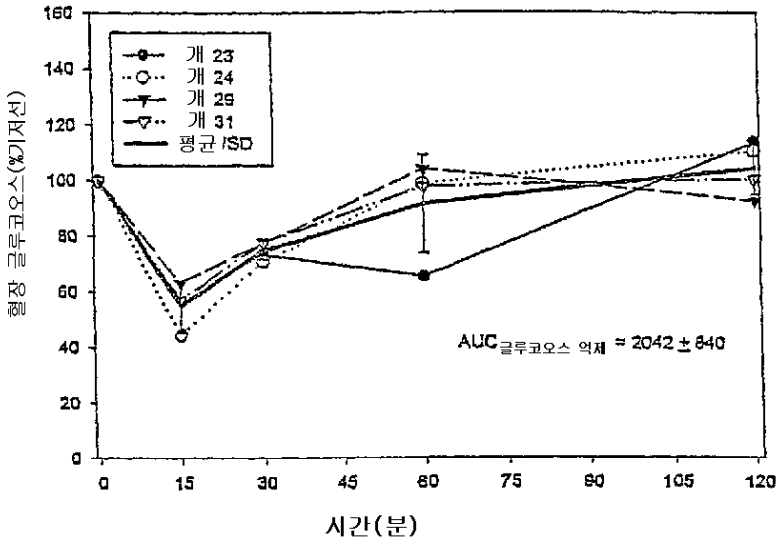
도면17


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
[글루코오스](%기저선)
0
30
60
90
120
시간
0.4 mg/kg
0.8 mg/kg
1.2 mg/kg

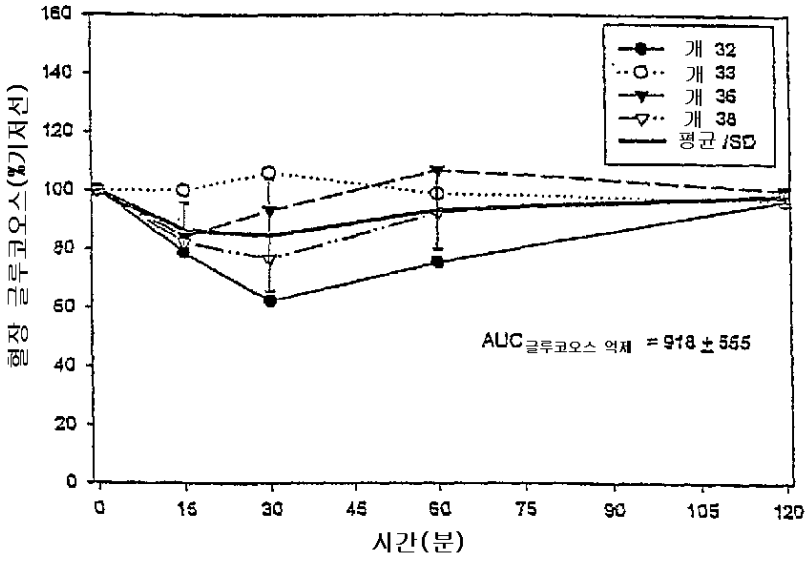
도면18


160
140
120
100
80
60
40
20
0
혈장 글루코오스(%기저선)
0
15
30
45
60
75
90
105
120
시간(분)
개 25
개 28
개 30
개 37
평균/SD
AUC글루코오스 억제 = 961±530

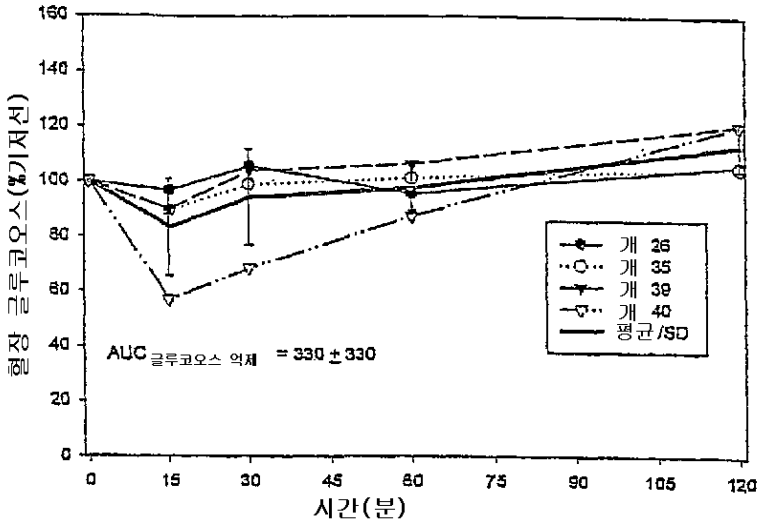
도면19


개 23
개 24
개 29
개 31
평균 /SD
혈장 글루코오스(%기저선)
AUC글루코오스 억제 = 2042 ± 840
시간(분)

도면20


개 32
개 33
개 36
개 38
평균 /SD
혈장 글루코오스(%기저선)
AUC글루코오스 억제 = 918 ± 565
시간(분)

도면21


혈장 글루코오스(%기저선)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
15
30
45
60
75
90
105
120
시간(분)
AUC 글루코오스 억제 = 330 ± 330
개 26
개 35
개 39
개 40
평균/SD