(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월09일
(11) 등록번호 10-0930606
(24) 등록일자 2009년12월01일

(51) Int. Cl.
A61K 38/23 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2003-7015912
(22) 출원일자 2002년06월04일
심사청구일자 2007년05월18일
(85) 번역문제출일자 2003년12월04일
(65) 공개번호 10-2004-0004694
(43) 공개일자 2004년01월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/017575
(87) 국제공개번호 WO 2002/98451
국제공개일자 2002년12월12일
(30) 우선권주장
09/873,777 2001년06월04일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US6191105 A*
WO0199714740 A1
WO0200078302 A1
WO0200009073 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
바이오콘 리미티드
인도 방갈로어 피.오. 560100 일렉트로닉 시티 제20 케이엠 호수르 로드
(72) 발명자
익크유리브녹키리엔.
미국노쓰캐롤라이나27511
캐리콜츠게이트드라이브216
프라이스크리스토퍼에이치.
미국노쓰캐롤라이나27516채플힐커먼스웨이200
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

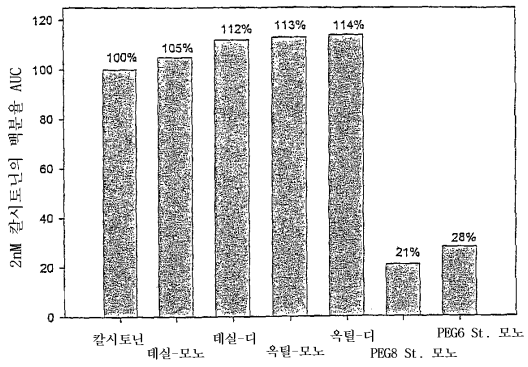
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이동욱

(54) 폴리알킬렌 글리콜을 포함하는 칼시토닌 약물-올리고머접합체의 혼합물, 그의 용도 및 그의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 혼합물 중의 각 접합체가 폴리알킬렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하는 접합체의 혼합물을 제공한다. 상기 혼합물은 개체에서 혈청 칼슘 수준을 10, 15 또는 심지어는 20 % 이상 강하시킬 수 있다. 더욱이, 상기 혼합물은 접합되지 않은 칼시토닌에 비하여 내장 소화의 인 비트로 모델에서 생존하는데 더 효과적일 수 있다. 더욱이, 상기 혼합물은 접합되지 않은 칼시토닌에 비하여 더 높은 생물이용성을 보인다.

대 표 도 - 도14



(72) 발명자

안사리아슬람엠.

미국매릴랜드20852록빌빌리지스퀘어테라스12408아파트먼트101

오덴보우에이미엘.

미국노쓰캐롤라이나27560
모리스빌퀘일하이불러바드4023

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

접합체의 혼합물로서, 각 접합체는 칼시토닌의 아민기를 통하여 제 1 올리고머 및 제 2 올리고머에 결합되어 있는 칼시토닌을 포함하고, 상기 혼합물은 혼합물 중의 화합물의 100%가 동일한 분자량을 갖는 혼합물이거나, 혼합물 중의 화합물의 95% 이상이 동일한 분자량 및 동일한 분자구조를 갖는 혼합물이고, 상기 올리고머는 2 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌글리콜 부위를 포함하고, 상기 제 1 올리고머는 칼시토닌의 Lys^{11}의 아민기에 공유결합되고 상기 제 2 올리고머는 칼시토닌의 Lys^{18}의 임의의 아민기에 공유결합되는 접합체의 혼합물.

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

제73항에 있어서, 상기 칼시토닌은 상기 올리고머의 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위에 공유적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 77

삭제

청구항 78

제73항에 있어서, 상기 올리고머는 C_{2-12} 알킬 또는 C_{3-14} 지방산인 소수성 부위(lipophilic moiety)를 더 포함하거나 각 올리고머는 동일한 분자 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 칼시토닌 또는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 상기 소수성 부위에 공유적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 80

삭제

청구항 81

7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 C_{3-14} 지방산의 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, C_{3-14} 카르복실산의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{11} 위치에서 공유적으로 결합되어 있고, 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 C_{3-14} 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, C_{3-14} 카르복실산의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{18} 위치에서 공유적으로 결합되어 있는 연어 칼시토닌을 각각 포함하는 접합체의 혼합물로서,

상기 접합체의 혼합물은 혼합물 중의 화합물이 95% 이상 동일한 분자량을 갖는 혼합물.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 접합체는 7개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, 옥타노인산의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{11} 위치에서 공유적으로 결합되어 있고, 7개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, 옥타노인산의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{18} 위치에서 공유적으로 결합되어 있는 연어 칼시토닌으로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼합물.

청구항 83

제73항 또는 제81항의 접합체의 혼합물을 포함하는 골다공증, 파제트병 또는 고칼슘혈증(hypercalcemia) 치료용 약학 조성물.

청구항 84

삭제

청구항 85

4개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌을 각각 포함하는 접합체의 혼합물로서, 상기 혼합물은 표준편차가 22 달톤보다 작은 분자량 분포를 갖는 것을 특징으로 하는 접합체의 혼합물.

청구항 86

2 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌을 각각 포함하는 접합체의 혼합물로서, 상기 혼합물은 하기 식으로 표시되는 분산계수(DC)(dispersity coefficient)가 10,000보다 큰 분산계수를 갖는 것을 특징으로 하는 접합체의 혼합물:

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

식 중, n은 시료 중의 다른 분자의 수;

Ni는 시료 중의 i 번째 분자의 수; 및

Mi는 i 번째 분자의 질량이다.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 분산 계수는 100,000 보다 큰 것을 특징으로 하는 접합체의 혼합물.

청구항 88

각 접합체가 동일한 분자량을 갖고 하기 식의 구조를 갖는 접합체의 혼합물:

$$\text{칼시토닌}\left[\text{B-L}_j\text{-G}_k\text{-R-G'}_m\text{-R'-G''}_n\text{-T}\right]_p \qquad (A)$$

식 중, B는 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부위 및 제2 아민 부위로 이루어진 군으로부터 선택된 결합 부위이고;

L은 C_{1-5}알킬 링커 부위이고;

G, G' 및 G''은 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로부터 개별적으로 선택된 스페이서 부위이고;

R은 C_{2-12} 알킬 또는 C_{3-14} 지방산인 소수성 부위(lipophilic moiety)이고 R'는 2 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$ 갖는 폴리알킬렌 글리콜 부위이거나, 또는 R'는 C_{2-12} 알킬 또는 C_{3-14} 지방산인 소수성 부위이고 R은 2 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌글리콜 부위이고;

T는 C_{1-5}알킬 또는 C_{1-5}알콕시 종결 부위(terminating moiety)이고;

j,k, m 및 n은 개별적으로 0 또는 1이고;

p는 1로부터 상기 칼시토닌 약물 상의 친핵성 잔기(nucleophilic residue)의 수까지의 정수이다.

청구항 89

하기 식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단분산된 혼합물을;

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

(식 중, R^1은 H 또는 친유성(lipophilic) 부위이고; m은 1 내지 25이고; X^+는 양이온이다.)

하기 식II의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 실질적으로 단분산된 혼합물과 반응시켜

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

(식 중, R^2는 H 또는 소수성 부위이고; Ms는 $CH_3S(O)_2-$ 이며; n은 1 내지 25이다)

하기 식III의 구조를 갖는 중합체를 포함하는 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하는 단계;

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

;

식III의 중합체를 포함하는 상기 실질적으로 단분산된 혼합물을 N-히드록시 숙시이미드와 반응시켜 칼시토닌과 반응할 수 있는 활성화된 중합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하는 단계; 및

상기 활성화된 중합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 칼시토닌과 반응시켜 m+n 개의 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌을 각각 포함하는 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하는 단계를 포함하는,

폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌을 각각 포함하는 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 합성하는 방법으로서,

상기 실질적으로 단분산된 혼합물은 혼합물 중의 화합물이 95% 이상 동일한 분자량을 갖는 혼합물인 방법.

청구항 90

삭제

청구항 91

제89항에 있어서, 상기 칼시토닌은 연어 칼시토닌이고, 활성화된 중합체의 상기 실질적으로 단분산된 혼합물을 연어 칼시토닌과 반응시키는 단계는, 상기 활성화된 중합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 상기 연어 칼시토닌의 Lys^{11} 및 Lys^{18}과 반응시켜 m+n 서브유니트 $-(CH_2CH_2O)-$를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 각각 포함하는 2개의 올리고머에 결합된 연어 칼시토닌을 각각 포함하는 이접합체(diconjugate)의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 약물-올리고머 접합체, 구체적으로는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 칼시토닌(calcitonin)은 (세포 표면상의 칼시토닌에 대한 수용체를 통하여) 파골세포(osteoclast)에 직접적으로 작용하는 것으로 여겨지는 짧은 반감기를 갖는 천연 호르몬이다. 이 작용에 의하여 파골세포성 골 흡수가 직접적으로 저해될 수 있으며, 그에 따라 저칼슘혈성(hypocalcemic) 및/또는 저인산혈성 (hypophosphatemic) 혈청 효과를 유발할 수 있다. 칼시토닌은 골다공증 및 파제트 병을 포함한 다양한 골질환을 치료하는데 유용할 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

<3> 골다공증은 골 조직이 정상적으로 광화되나(minerlalized), 골의 양이 감소하고 소주골(trabecular bone)의 구조적 견고성이 손상되는 골질환이다. 피질골(cortical bone)은 더 다공성이며 얇게 된다. 이로 인하여 뼈는 더 약화되고 더 골절하기 쉽게 된다. 미국에서 폐경기후 여성의 약 21%가 골다공증(저 골밀도)을 가지고 있고, 약 16%가 골절을 가지고 있다. 80세 이상의 여성에 있어서, 약 40 %는 관골(hip), 척추(vertebra), 팔(arm), 또는 골반(pelvis)의 골절을 경험한적이 있다. 노년 남녀의 인구는 증가하였고, 그에 따라 골다공증을 앓는 사람들의 수는 증가하고 있다.

<4> 피하 주사에 의하여 칼시토닌을 투여하면 골밀도를 상당히 개선시켜 준다; 그러나, 주사 부위에서의 통증, 홍조(flushing) 및 메스꺼움(nausea)을 포함한, 부작용이 높은 빈도로 보고되어, 본 약물의 사용을 제한할 수 있다.

<5> 뼈의 파제트병(Paget's disease)은 보통 노인에게 발생하는 기원이 알려지지 않은 대사성 골질환이다. 본 질병은 신체의 오래된 뼈를 용해시키고 새로운 뼈로 대체시키는 역할을 하는 뼈 세포가 통제를 벗어나게 되어 뼈의 형성이 증가되고 불규칙한 뼈를 형성시킨다. 일정한 기간에 걸쳐 상기 변형된(deformed) 새로운 뼈는 정상 뼈에 비하여 더 크고, 약하게 되며, 더 많은 혈관을 갖는다. 정상 뼈와는 달리, 상기 구조는 불규칙하고 그에 따라 더 약하기 때문에, 사소한 부상 후에도 골절되기 쉽다. 아주 약한 형태인 경우, 상기 파제트병은 어떠한 증상도 보이지 않는다. 좀더 심한 경우, 통증이 심하다. 본 질병의 무차별적 진행에 따라 뼈가 굽고, 두개골의 크기가

증가하고 척주(脊柱)(spinal column)가 휘어질 수 있다. 뼈가 확장되어감에 따라 인근 신경에 압력을 가하여 근육약화를 초래할 수 있다. 두개골이 심하게 확장된 경우, 이 압력에 의하여 청력상실(deafness), 시각 방해(disturbed vision), 어지러움 및 이명(tinnitus)이 야기될 수 있다.

<6> 칼시토닌은 파제트 병과 같은, 증가된 골격 리모델링 질환을 치료하는데 효과적일 수 있다. 파제트 병을 치료하는데 있어서, 칼시토닌을 만성적으로 사용하면, 증상의 장기적 감소를 초래할 수 있다; 그러나, 메스꺼움(nausea), 손팽대(hand swelling), 두드러기(urticaria) 및 내장 경련(intestinal cramping)을 포함한 칼시토닌 투여의 부작용이 포함될 수 있다.

<7> 다양한 문헌에서 칼시토닌과 같은 폴리펩티드를 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-함유 중합체의 다분산 혼합물과 접합하는 것이 제안되어 있다. 예를 들면, 에크우리베(Ekwuribe)의 미국특허 제5,359,030호에는 칼시토닌과 같은 폴리펩티드를 폴리에틸렌 글리콜 개질된 글리코리피드 중합체의 다분산 혼합물 및 폴리에틸렌 글리콜 개질된 지방산 중합체의 다분산 혼합물과 접합하는 것이 제안되어 있다. 각 조합으로부터 얻어지는 중합체의 수평균 분자량은 약 500 내지 약 10,000 달톤의 범위인 것이 바람직하다.

<8> 에크우리베(Ekwuribe)에 개시되어 있는 상기 중합체 혼합물 및 접합체의 다분산성(polydispersity)은 중합체 합성에 있어서 다분산된 폴리에틸렌 글리콜을 사용한 결과인 것처럼 보인다. PEG는 일반적으로 에틸렌옥사이드의 염기-촉매 개환 중합에 의하여 생산된다. 상기 반응은 촉매로서 포타슘 히드록사이드와 함께, 에틸렌옥사이드를 에틸렌 글리콜에 첨가함으로써 개시된다. 이 공정에 의하여 주어진 분자량 범위 내의 수평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 중합체의 다분산 혼합물이 생성된다. 예를 들면, 위스콘신주 밀워키 소재의 Sigma-Aldrich 사에 의하여 제공되는 PEG 산물은 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 다분산 혼합물로서 제공된다.

<9> 올리고머가 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 경우, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 비다분산된 혼합물을 제공하는 것이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

<10> 본 발명의 구체예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 10, 15 또는 20 % 이상 낮출 수 있다는 것이 예기치 않게 발견되었다. 더욱이, 본 발명의 구체예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 접합되지 않은 칼시토닌에 비하여 내장 소화(intestinal digestion)의 인 비트로 모델에서 생존하는데 더 효과적일 수 있다. 더욱이, 본 발명의 구체예에 따른 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 접합되지 않는 칼시토닌에 비하여 더 높은 생물이용성(bioavailability)을 보일 수 있다.

<11> 본 발명의 구체예에 따르면, 각 접합체가 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합되어 있는 칼시토닌 약물을 포함하는, 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공한다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 바람직하게는, 2, 3 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트, 가장 바람직하게는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다. 상기 올리고머는 바람직하게는, 소수성 부위(lipophilic moiety)를 더 포함한다. 상기 칼시토닌 약물은 바람직하게는 연어 칼시토닌이다. 올리고머는 바람직하게는 상기 연어 칼시토닌의 Lys^{11} 및 Lys^{18}에 결합되어 있다. 상기 접합체는 바람직하게는 양친매적으로(amphiphilically) 균형을 이루고 있어 상기 접합체는 수용성이고 생물학적 막을 투과할 수 있다.

<12> 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, 옥타노인산을 포함하는 제1 올리고머의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{11}에서 공유적으로 결합되어 있고, 7개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 메틸기로 종결되는 폴리에틸렌 글리콜 부위에 카르복실산 부위로부터 먼쪽 말단에서 공유적으로 결합되어 있는, 옥타노인산을 포함하는 제2 올리고머의 카르복실산 부위에 연어 칼시토닌의 Lys^{18}에서 공유적으로 결합되어 있는 연어 칼시토닌을 포함한다.

<13> 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 개체 내에서 혈청 칼슘 수준을 5 % 이상 감소시킬 수 있다.

<14> 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 상기 올리고머에 결합되지 않은 상기 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는다.

<15> 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 상기 올리고머에 결합되지 않은 상기 칼시토닌 약물의 생물효능(bioefficacy)에 비하여 더 높은 생물효능을 갖는다.

<16> 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 접합체의 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 표준편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는다.

<17> 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 접합체의 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 하기 식으로 표시되는 분산계수(DC)(dispersity coefficient)가 10,000보다 큰 분산계수를 갖는다:

<18>
$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

<19> 식 중, n은 시료 중의 다른 분자의 수;

<20> Ni는 시료 중의 i 번째 분자의 수; 및

<21> Mi는 i 번째 분자의 질량이다.

<22> 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 접합체의 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 동일한 수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는다.

<23> 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 접합체의 혼합물을 제공하며, 상기 각 접합체는 동일한 분자량을 갖고, 하기 식으로 표시된다:

<24>
$$\text{칼시토닌 약물}-\left[B-L_j-G_k-R-G'_m-R'-G''_n-T\right]_p \qquad (A)$$

<25> 식 중, B는 결합 부위(bonding moiety)이고;

<26> L은 링커 기(group)이고;

<27> G, G' 및 G''은 개별적으로 선택된 스페이서 기이고;

<28> R은 소수성 부위이고 R'는 폴리알킬렌 글리콜 기이거나, 또는 R'는 소수성 기이고 R은 폴리알킬렌 옥사이드 기이고;

<29> T는 종결 기(terminating group)이고;

<30> j,k, m 및 n은 개별적으로 0 또는 1이고;

<31> p는 1로부터 상기 칼시토닌 약물 상의 친핵성 잔기(nucleophilic residue)의 수까지의 정수이다.

<32> 본 발명은 또한 본 발명의 접합체 혼합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 효과적인 양의 상기 약제학적 조성물을 투여함으로써 골다공증 치료를 필요로하는 개체에서 골다공증을 치료하는 방법을 제공한다.

<33> 또한, 상기 접합체 혼합물을 합성하는 방법을 제공한다.

<34> 본 발명의 다른 구체예에 따른 칼시토닌-올리고머 접합체 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 20 %이상 강하시킬 수 있다: 더욱이, 상기 접합체는 접합되지 않은 칼시토닌에 비하여 내장 효소에 의한 분해의 감소 및/또는 생물이용성(bioavailability)의 증가를 초래한다.

<35> 본 발명을 이하 바람직한 구체예를 통하여 설명한다. 그러나, 이들 구체예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로만 제공되는 것으로 해석되어야 하며, 청구범위에 의하여 정의되는 바와 같은 본 발명의 범위를 한정하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

<36> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비분산된(non-polydispersed)"이라는 용어는 에크우리베(Ekwuribe)의 미국특허 제5,359,030호에 개시된 다분산(polydispersed) 혼합물과 대조적인 분산도를 갖는 화합물의 혼합물을 기술하기 위하여 사용된다.

<37> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 단분산된(substantially monodispersed)"이란 용어는 혼합물 중의 약 95%이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖는 화합물의 혼합물을 기술하기 위하여 사용된다.

<38> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "단분산된(monodispersed)"이란 용어는 혼합물 중의 약 100%의 화합물이 동일한 분자량을 갖는 화합물의 혼합물을 기술하기 위하여 사용된다.

<39> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 순수하게 단분산된(substantially purely monodispersed)"이라는 용어는 혼합물 중의 약 95%이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖고 동일한 분자 구조를 갖는 화합물의 혼합물을 기술하기 위하여 사용된다. 따라서, 실질적으로 순수하게 단분산된 혼합물은 실질적으로 단분산된 혼합물이나, 실질적으로 단분산된 혼합물은 반드시 실질적으로 순수하게 단분산된 혼합물인 것은 아니다.

<40> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "순수하게 단분산된(purely monodispersed)"이라는 용어는 혼합물 중의 약 100%의 화합물이 동일한 분자량을 갖고 동일한 분자 구조를 갖는 화합물의 혼합물을 기술하기 위하여 사용된다. 따라서, 순수하게 단분산된 혼합물은 단분산된 혼합물이나, 단분산된 혼합물은 반드시 순수하게 단분산된 혼합물인 것은 아니다.

<41> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "중량평균 분자량(weight average molecular weight)"이라는 용어는 혼합물 중의 주어진 분자에 대한 분율(fraction)과 혼합물 중의 각 분자에 대한 분자 질량을 곱한 값의 총합으로서 정의된다. 상기 "중량평균 분자량"은 기호 Mw로 표시된다.

<42> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "수평균 분자량(number average molecular weight)"이라는 용어는 혼합물의 총 중량을 혼합물 중의 분자의 수로 나눈 값으로서 정의되고, 기호 Mn으로 표시된다.

<43> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "분산계수(dispersity coefficient)" (DC)라는 용어는 하기 식으로 정의된다:

<44>
$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

<45> 식 중, n은 시료 중의 다른 분자의 수;

<46> Ni는 시료 중의 i 번째 분자의 수; 및

<47> Mi는 i 번째 분자의 질량이다.

<48> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "개체내 변이성(intra-subject variability)"이라는 용어는 개체가 다른 시간에 동일한 용량의 약물 또는 약제학적 조성물을 투여 받았을 경우 동일한 개체 내에서 일어나는 활성의 변이성을 의미한다.

<49> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "개체간 변이성(inter-subject variability)"이라는 용어는 각 개체가 동일한 용량의 주어진 약물 또는 약제학적 조성물을 투여 받을 경우 2 이상의 개체 사이에서의 활성의 변이성을 의미한다.

<50> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "생물효능(bioefficacy)"이라는 용어는 약물 또는 약물 접합체가 인 비보에서 하나이상의 소망의 수용체와 반응할 수 있는 능력을 의미한다.

<51> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "칼시토닌 약물(calcitonin drug)"이라는 용어는 칼시토닌의 생물학적 활성의 전부 또는 일부를 갖는 약물을 의미한다.

<52> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "칼시토닌(calcitonin)"이라는 용어는 천연, 합성 또는 유전공학적 기원에 의하여 제공되는 닭 칼시토닌, 뱀장어(eel) 칼시토닌, 인간 칼시토닌, 돼지 칼시토닌, 랫트 칼시토닌 또는 연어 칼시토닌을 의미한다.

<53> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "칼시토닌 유사체(calcitonin analog)"라는 용어는 칼시토닌의 활성의 일부 또는 전부를 유지하면서 하나이상의 아미노산이 치환된 칼시토닌을 의미한다. 상기 유사체는 치환 아미노산을 위첨자로 표시한 치환 위치와 함께 표시하고, 그 뒤에 상기 칼시토닌을 묘사함으로써 기술된다. 예를 들면, "Pro^{2} 칼시토닌, 인간"은 인간 칼시토닌 분자의 2 번 위치에서 일반적으로 발견되는 글리신이 프롤린으로 치환되었다는 것을 의미한다.

<54> 칼시토닌 유사체는 당업자에 의하여 이해될 수 있는, 다양한 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 예를 들면, 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자 상의 결합 부위와 같은 구조와의 상호작용성 결합능력(interactive binding capacity)의 상당한 손실 없이 예를 들면, 특정 아미노산이 상기 칼시토닌 구조 내에 다른 아미노산 대신에 치환될 수 있다. 칼시토닌의 생물학적 기능적 활성은 칼시토닌의 상기 상호작용 능력 및 특성에 의하여 정하여지기 때문에, 상기 아미노산 서열 내에서 특정 아미노산 서열의 치환이 일어남에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 폴리펩티드를 유지할 수 있다.

<55> 그러한 치환을 유발시키는데 있어서, 아미노산의 소수성 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 폴리펩티드에 상호작용성 생물학적 기능을 부여함에 있어서 소수성 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 당업계에 알려져 있다. 아미노산의 상대적 소수성 특성은 폴리펩티드의 2차 구조에 기여하고, 이는 다시 폴리펩티드와 다른 분자 예를 들면, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 한정한다. 각 아미노산에는 그 소수성 및 전하 특성에 기초하여 하기와 같이 소수성 지수가 할당되어 있다: 이소루신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴(cystine) (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-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); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5). 당업자에 의해서 이해되는 바와 같이, 특정 아미노산은 유사한 소수성 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산에 의해서 치환될 수 있으며, 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드, 즉 여전히 기능적으로 균등한 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 그와 같은 변화를 유발시키는데 있어서, 소수성 지수가 서로 ±2 이내에 있는 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하며, 서로 ±1 이내에 있는 아미노산이 더욱 바람직하고, 서로 ±0.5 이내에 있는 아미노산이 특히 더 바람직하다.

<56> 유사한 아미노산으로 치환하는 것은 또한 친수성에 기초하여 효과적으로 수행될 수 있다는 것도 당업계에 이해되고 있다. 미국특허 제4,554,101호에는 인접한 아미노산의 친수성에 의해서 지배되는, 단백질의 가장 큰 국부적 평균 친수성(thre greatest local average hydrophilicity)은 그 단백질의 생물학적 특성과 부합된다는 것을 개시하고 있다. 미국특허 제4,554,101호에 상세히 서술된 바와 같이, 하기 친수성 값이 아미노산 잔기들에 할당되었다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (±3.0); 아스파테이트 (+3.0 ±1); 글루타메이트 (+3.0 ±1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 ±1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루신 (-1.8); 이소루신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4). 당업자에 의해서 이해되는 바와 같이, 하나의 아미노산은 유사한 친수성 값을 갖는 다른 아미노산에 의해서 치환될 수 있으며, 여전히 생물학적으로 균등한 것, 더욱 구체적으로는 면역학적으로 균등한 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 그와 같은 변화들에 있어서, 그 친수성 수치가 서로에 대해서 ±2 이내에 있는 아미노산의 치환이 바람직하며, 서로에 대해서 ±1 이내에 있는 것이 더욱 바람직하고, 서로에 대해서 ±0.5 이내에 있는 것이 더더욱 바람직하다.

<57> 그러므로 상기에서 개괄한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 상기 아미노산 측쇄 치환의 상대적 유사성, 예를 들면, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 근거한다. 상기한 다양한 특성을 고려한 치환 (즉, 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유의하게 변화시키지 않고 교환된 아미노산)의 예는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면: 아르기닌과 라이신; 글루타메이트와 아스파테이트; 세린과 트레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 루신 및 이소루신이 포함된다.

<58> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "칼시토닌 단편(calcitonin fragment)"이라는 용어는 칼시토닌의 활성의 일부 또는 전부를 유지하는 칼시토닌에서 발견되는 아미노산 서열의 절편을 의미한다.

<59> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "칼시토닌 단편 유사체(calcitonin fragment analog)"라는 용어는 칼시토닌의

활성의 일부 또는 전부를 유지하면서, 상기 절편 내의 하나이상의 아미노산이 치환된 상기 칼시토닌 분자에서 발견되는 아미노산 서열의 절편을 의미한다.

<60> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "PEG"라는 용어는 직쇄 또는 분지쇄 폴리에틸렌 글리콜 중합체를 나타내는 것으로, 폴리에틸렌 글리콜의 모노메틸에테르(mPEG)를 포함한다. "PEG 서브유니트(PEG subunit)" 및 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트라는 용어는 단일 폴리에틸렌 글리콜 단위, 즉 $-(CH_2CH_2O)-$를 나타낸다.

<61> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "소수성(lipophilic)"이라는 용어는 지질에 용해될 수 있는 능력 및/또는 생물학적 막을 투과, 생물학적 막과 상호작용 및/또는 가로지를(traverse) 수 있는 능력을 의미하고, "소수성 부위(lipophilic moiety)" 또는 "소수체(lipophile)"라는 용어는 소수성인(lipophilic) 부위 및/또는 다른 화학물질(chemical entity)에 부착되었을 경우, 상기 화학물질의 소수성(lipophilicity)을 증가시키는 부위를 의미한다. 소수성 부위의 예에는, 알킬, 지방산, 지방산의 에스테르, 콜레스테릴, 아다만틸 등이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

<62> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "저급 알킬(lower alkyl)"이라는 용어는 1 내지 5개의 탄소원자를 갖는 치환 또는 비치환 알킬 부위를 나타낸다.

<63> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "고급 알킬(higher alkyl)"이라는 용어는 6개 이상의 탄소원자를 갖는 치환 또는 비치환 알킬 부위를 나타낸다.

<64> 본 발명의 구체예에 있어서, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공한다. 상기 단분산된 혼합물 중의 각 칼시토닌 약물-올리고머 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함한다. 바람직하게는, 상기 혼합물 중의 접합체의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 혼합물은 단분산된 혼합물이다. 더욱 더 바람직하게는, 상기 혼합물은 실질적으로 순수하게 단분산된 혼합물이다. 더욱 더 바람직하게는, 상기 혼합물 중의 접합체의 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상이 동일한 분자량을 갖고 동일한 분자 구조를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 혼합물은 순수하게 단분산된 혼합물이다.

<65> 상기 칼시토닌 약물은 바람직하게는 칼시토닌이다. 더욱 바람직하게는, 상기 칼시토닌 약물은 연어 칼시토닌이다. 그러나, 상기 칼시토닌 약물은 예를 들면, 칼시토닌 전구체 펩티드, 칼시토닌, 칼시토닌 유사체, 칼시토닌 단편, 및 칼시토닌 단편 유사체를 포함한, 당업자에게 알려진 다양한 칼시토닌 약물로부터 선택될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 칼시토닌 전구체 펩티드에는, 카타칼신(katacalcin) (PDN-21) (C-프로칼시토닌), 및 N-proCT (아미노-말단 프로칼시토닌 절단 펩티드), 인간을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다. 칼시토닌 단편은 칼시토닌 1-7, 인간; 및 칼시토닌 8-32, 연어를 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 단편 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 단편 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다.

<66> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 상기 올리고머의 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 2, 3 또는 4 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 5 또는 6 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이고, 가장 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 7 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다.

<67> 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위, 소수성 부위, 스페이서 부위, 링커 부위 및 종결 부위(terminating moieties)를 포함하는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 다른 부위를 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 올리고머 중의 다양한 부위는 가수분해성 또는 비가수분해성 결합에 의하여 서로 공유적으로 결합된다.

<68> 상기 올리고머는 당, 폴리알킬렌옥사이드, 및 폴리아민/PEG 공중합체를 포함한, 하나이상의 추가의 친수성 부위(즉, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위 외의 부위)를 더 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜은 폴리알킬렌 옥사이드이기 때문에, 상기 추가의 친수성 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위일 수 있다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합에 의하여 결합되는 경우, 동일한 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<69> —O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—

<70> 6개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 부위이다. 이 부위가 상기 올리고머 중의 유일한 친수성 부위이면, 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위를 포함하지 않을 것이다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합 이외의 다른 결합에 의하여 결합되는 경우, 다른 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<71> —O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—O—C_2H_4—C(=O)—O—C_2H_4—O—C_2H_4—

<72> 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖고 2개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 추가의 친수성 부위이다. 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하고, 추가의 친수성 부위를 포함하지 않는 것이다.

<73> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 소수성 부위를 더 포함할 수 있다. 상기 소수성 부위는 바람직하게는, 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 알킬 부위 또는 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 지방산 부위이다. 상기 소수성 부위가 알킬 부위인 경우, 바람직하게는 1 내지 28개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 알킬 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 알킬 부위는 2 내지 12개의 탄소원자를 갖는다. 상기 소수성 부위가 지방산 부위인 경우, 바람직하게는 2 내지 18개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 천연 지방산 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 지방산 부위는 3 내지 14개의 탄소원자를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 4, 5, 또는 6개 이상의 탄소원자를 갖는 것이다.

<74> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 스페이서 부위를 더 포함한다. 스페이서 부위는 예를 들면, 소수성 부위로부터 친수성 부위를 분리하기 위하여, 칼시토닌 약물로부터 소수성 부위 또는 친수성 부위를 분리하기 위하여, 제2 친수성 또는 소수성 부위로부터 제1 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여, 또는 링커 부위로부터 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 스페이서 부위는 바람직하게는 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

<75> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 올리고머를 상기 칼시토닌에 결합하는데 사용되는 하나이상의 링커 부위를 더 포함할 수 있다. 링커 부위는 바람직하게는 알킬 및 지방산 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다.

<76> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 결합되어 있지 않은 상기 올리고머의 하나이상의 말단에 하나이상의 종결 부위(terminating moiety)를 더 포함할 수 있다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이고, 더욱 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 종결 부위는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이나, 상기 종결 부위는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산을 포함한, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 다양한 부위가 될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<77> 상기 올리고머는 바람직하게는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합된다. 일부 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 가수분해성 결합(예를 들면, 에스테르 또는 카르보네이트 결합)을 사용하여 상기 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합(hydrolyzable coupling)은 전구약물(prodrug)로서 작용하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 특정 예에서, 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우(즉, 상기 접합체는 상기 칼시토닌 약물의 일차적 작용 기작을 통하여 신체(body)에 영향을 미칠 수 있는 능력이 결여되어 있다.), 가수분해성 결합은 경시-방출(time-release) 또는 제어된-방출(controlled release)효과를 얻기 위하여, 하나이상의 올리고머가 대응 칼시토닌 약물-올리고머 접합체로부터 잘려져 활성 약물을 제공함에 따라 주어진 기간에 걸쳐 상기 칼시토닌 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 비가수분해성 결합(예를 들면, 카르바메이트, 아미드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 상기 올리고머에 결합된다. 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 확장된 기간 동안, 바람직하게는 2 시간 이상 혈류 내에서 순환하도록 하는 것이 바람직한 경우, 비가수분해성 결합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 경우, 상기 올리고머는 상기 올리고머를 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 칼시토닌 약물과 공유적으로 결합하는데 사용되는 하나이상의 결합 부위(bonding moiety)를 더 포함한다. 결합 부위는 바람직하게는 공유 결합, 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부

위 및 2차 아민 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다. 상기 올리고머 상의 하나이상의 부위가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합될 수 있다.

<78> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 것이 바람직하나, 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 비공유적으로 결합되어 비공유적으로 접합된 칼시토닌 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비공유 결합에는, 수소 결합, 이온 결합, 반데르 발스 결합, 및 마이셀 또는 리포좀성 포집이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체예에 따르면, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 올리고머는 적합하게 제작, 개질 및/또는 적합하게 관능기화되어 선택된 방법으로 비공유 접합(conjugation)을 위한 능력이 부여된다 (예를 들면, 수소 결합 능력의 부여). 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산(bile acid), 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 살리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산 및 아미노살리실산 유도체를 포함한, 다양한 화합물로 유도체화될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 결합(복합체)될 수 있다. 상기 얻어지는 복합체는 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다. 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도체화될 수 있다. 적합한 산성 조건하에서, 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 접합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체화로부터 얻어지는 산물은 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다.

<79> 하나이상의 올리고머(즉, 복수의 올리고머)가 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 상기 복수의 올리고머는 바람직하게는 동일하다. 그러나, 상기 복수의 올리고머는 서로 다를 수 있고, 또는 복수의 올리고머의 일부는 동일할 수 있고 일부는 다를 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 복수의 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 결합되는 경우, 하나이상의 상기 올리고머를 가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키고, 하나이상의 상기 올리고머를 비가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 상기 복수의 올리고머를 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 모든 결합이 가수분해성일 수 있으나, 다양한 정도의 가수분해성을 가지고 있어 예를 들면, 하나이상의 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터 재빠르게 제거되고, 하나이상의 상기 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터 느리게 제거된다.

<80> 상기 올리고머는 친핵성 히드록실 기 및/또는 아미노 기를 포함한, 상기 칼시토닌 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우, 친핵성 히드록실 기는 예를 들면, 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발결될 수 있고, 친핵성 아미노기는 예를 들면, 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서 및/또는 하나이상의 상기 폴리펩티드의 N-말단에서 발견될 수 있다. 올리고머가 상기 칼시토닌 폴리펩티드의 하나이상의 N-말단에 결합되는 경우, 상기 결합(coupling)은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 상기 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, 예를 들면, 상기 올리고머는 Lys^{11}, Lys^{18} 및/또는 N-말단의 아미노 기를 포함한, 상기 연어 칼시토닌의 아미노 기에 결합될 수 있다. 하나이상의 올리고머가 상기 연어 칼시토닌에 결합될 수 있으나, 개선된 혈청 칼슘 강하(lowering) 능력과 같은 높은 생물효능이 올리고머가 Lys^{11} 및 Lys^{18}의 아미노 기에 결합되어 있는 이접합된 연어 칼시토닌에서 관찰된다.

<81> 본 발명의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 다양한 방법에 의하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물은 카르복실산의 실질적으로 단분산된 혼합물을 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 폴리에틸렌 글리콜의 실질적으로 단분산된 혼합물과 접촉시킴으로써 합성된다. 다음으로, 상기 실질적으로 단분산된 혼합물의 상기 올리고머는 활성화되어 칼시토닌 약물과 반응할 수 있어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있게 된다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 3에 도시되어 있고, 하기 실시예 11-18에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 4에 도시되어 있고, 하기 실시예 19-24에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 5에 도시되어 있고, 하기 실시예 25-29에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 6에 도시되어 있고, 하기 실시예 30-31에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 7에 도시되어 있고, 하기 실시예 32-37에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 8에 도시되어 있고, 하기 실시예 38에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 9에 도시

되어 있고, 하기 실시예 39에 개시되어 있다. 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 10에 도시되어 있고, 하기 실시예 40에 개시되어 있다.

<82> 활성화된 올리고머의 상기 실질적으로 단분산된 혼합물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 칼시토닌 약물의 실질적으로 단분산된 혼합물과 반응될 수 있다. 바람직한 합성은 하기 실시예 41에 개시되어 있다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 상기 반응 조건(예를 들면, 선택된 몰(molar) 비율, 용매 혼합물 및/또는 pH)을 제어하여 활성화된 올리고머의 상기 실질적으로 단분산된 혼합물과 칼시토닌 약물의 상기 실질적으로 단분산된 혼합물의 반응으로부터 얻어지는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 실질적으로 단분산된 혼합물이 되도록 할 수 있다. 예를 들면, 라이신 아미노 기에서의 접합은 반응액의 pH를 라이신의 pKa 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 예를 들면, HPLC를 이용하여 분리되어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체, 예를 들면, 모노-, 디-, 또는 트리-접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공할 수 있다. 특정한 분리된 접합체의 접합의 정도(예를 들면, 상기 분리된 분자가 모노-, 디- 또는 트리-접합체인지 여부)는 질량 분석(mass spectroscopy)을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 특정한 접합체 구조 (예를 들면, 상기 올리고머가 연어 칼시토닌 모노접합체(monoconjugate)의 Lys^{11}, Lys^{18} 또는 N-말단에 있는지 여부)는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적 효소 절단, 및/또는 엔도펩티다제 절단을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<83> 당업자에게 알려진 바와 같이, 상기 칼시토닌 약물 상의 하나이상의 반응 부위 (reaction site)는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물을 N-tert-부톡시카르보닐 (t-BOC), 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)과 같은 적합한 차단 시약(blocking reagent)과 반응시킴으로써, 차단될 수 있다. 이 공정은 바람직하게는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우, 상기 폴리펩티드의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (즉, 접합체 중의 모든 친핵성 잔기가 접합되어 있는 것은 아닌 접합체)를 형성하는 것이다. 그러한 차단 후, 차단된 칼시토닌 약물의 실질적으로 단분산된 혼합물은 활성화된 올리고머의 실질적으로 단분산된 혼합물과 반응하여 하나이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머를 갖고 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 부위(blocking moiety)를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후, 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체는 당업자에게 알려진 바와 같이 차단해제(deblock)될 수 있다. 필요하다면, 다음으로, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 상기한 바와 같이 분리되어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 차단해제되기 전에 분리될 수도 있다.

<84> 본 발명의 구체예에 따른 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 종래 혼합물의 특성에 비하여 개선된 특성을 갖는 것이다. 예를 들면, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 혈청 칼슘 수준을 5 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 10, 11, 12, 13 또는 14 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 더욱 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 15, 16, 17, 18 또는 19 % 이상 강하시킬 수 있는 것이며, 가장 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 20 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다.

<85> 또다른 실시예에서, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 상기 올리고머에 결합되어 있지 않은 상기 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 트립신 각각에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여, 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는 것이다. 키모트립신 또는 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 시험되어질 분자가 하기 실시예 51에 개괄한 과정을 이용하여 적용가능한 효소로 소화하였을 경우 잔존 백분율(%)에 해당한다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 15 % 이상 더 큰 것이다. 가장 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 20 % 이상 더 큰 것이다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립

신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 20 이상 % 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 30 % 이상 더 큰 것이다.

<86> 또다른 구체예로서, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 더 큰 생물효능을 갖는 것이다. 특정한 화합물의 생물효능은 그 곡선하의 면적(area-under-the-curve)(AUC) 값에 해당한다. 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 약 5 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다.

<87> 또다른 구체예로서, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 실질적으로 단분산된 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 인 비보 활성에 비하여 더 큰 인 비보 활성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 예를 들면, H. R. Allcock & F. W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402 (2판, 1991)에 개시되어 있는 바와 같은, 젤 투과 크로마토그래피(GPC)와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<88> 또다른 예로서, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 실질적으로 단분산된 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 인 비트로 활성에 비하여 더 큰 인 비트로 활성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<89> 또다른 실시예로서, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 실질적으로 단분산된 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여, 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<90> 또다른 실시예로서, 칼시토닌-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 실질적으로 단분산된 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 개체간 변이성에 비하여, 더 작은 개체간 변이성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 개체간 변이성은 당업자에게 알려진 바와 같이, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있다. 상기 개체간 변이성은 바람직하게는 다음과 같이 계산된다. 용량 반응 곡선 하의 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저값 사이의 면적)은 각 개체에 대하여 결정된다. 모든 개체에 대한 평균 AUC는 각 개체의 AUC를 더하고, 상기 합을 개체 수로 나눔으로써 결정된다. 다음으로, 상기 개체의 AUC와 상기 평균 AUC 사이의 차이의 절대값을 각 개체에 대하여 결정한다. 다음으로, 얻어진 상기 차이의 절대 값을 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값을 얻는다. 낮은 값은 개체간 변이성이 낮은 것을 나타내고, 높은 값은 개체간 변이성이 높은 것을 나나낸다.

<91> 본 발명의 구체예에 따른 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 바람직하게는 2 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 3 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 실질적으로 단분산된 혼합물은 4 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다.

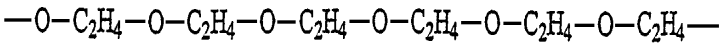
<92> 본 발명에 따른 다른 구체예에 있어서, 표준편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 접합체의 혼합물을 제공한다. 상기 혼합물 중의 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함한다. 상기 표준편차는 바람직하게는 약 14 달톤 보다 작고, 더욱 바람직하게는 약 11 달톤 보다 작다. 상기 분자량 분포는 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들면, H. R. Allcock & F. W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402 (2판, 1991)에 개시되어 있는 바와 같은, 젤 투과 크로마토그래피(GPC)와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 다음으로, 상기 분자량 분포의 표준편차는 당업자에게 알려진 바와 같은 통계적 방법에 의하여 결정될 수 있다.

<93> 상기 칼시토닌 약물은 바람직하게는 칼시토닌이다. 더욱 바람직하게는, 상기 칼시토닌 약물은 연어 칼시토닌이다. 그러나, 상기 칼시토닌 약물은 예를 들면, 칼시토닌 전구체 펩티드, 칼시토닌, 칼시토닌 유사체, 칼시토닌 단편, 및 칼시토닌 단편 유사체를 포함한, 당업자에게 알려진 다양한 칼시토닌 약물로부터 선택될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 칼시토닌 전구체 펩티드에는, 카타칼신(katacalcin) (PDN-21) (C-프로칼시토닌), 및 N-proCT (아미노-말단 프로칼시토닌 절단 펩티드), 인간을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다. 칼시토닌 단편은 칼시토닌 1-7, 인간; 및 칼시토닌 8-32, 연어를 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 단편 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 단편 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다.

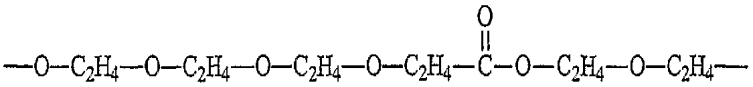
<94> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 상기 올리고머의 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 2, 3 또는 4 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 5 또는 6 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이고, 가장 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 7 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다.

<95> 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위, 소수성 부위, 스페이서 부위, 링커 부위 및 종결 부위(terminating moieties)를 포함하는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 다른 부위를 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 올리고머 중의 다양한 부위는 가수분해성 또는 비가수분해성 결합에 의하여 서로 공유적으로 결합된다.

<96> 상기 올리고머는 당, 폴리알킬렌옥사이드, 및 폴리아민/PEG 공중합체를 포함한, 하나이상의 추가의 친수성 부위(즉, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위 외의 부위)를 더 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜은 폴리알킬렌 옥사이드이기 때문에, 상기 추가의 친수성 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위일 수 있다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합에 의하여 결합되는 경우, 동일한 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<97> 

<98> 6개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 부위이다. 이 부위가 상기 올리고머 중의 유일한 친수성 부위이면, 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위를 포함하지 않을 것이다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합 이외의 다른 결합에 의하여 결합되는 경우, 다른 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<99> 

<100> 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖고 2개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 추가의 친수성 부위이다. 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하고, 추가의 친수성 부위를 포함하지 않는 것이다.

<101> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 소수성 부위를 더 포함할 수 있다. 상기 소수성 부위는 바람직하게는, 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 알킬 부위 또는 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 지방산 부위이다. 상기 소수성 부위가 알킬 부위인 경우, 바람직하게는 1 내지 28개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 알킬 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 알킬 부위는 2 내지 12개의 탄소원자를 갖는다. 상기 소수성 부위가 지방산 부위인 경우, 바람직하게는 2 내지 18개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 천연 지방산 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 지방산 부위는 3 내지 14개의 탄소원자를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 4, 5, 또는 6개 이상의 탄소원자를 갖는 것이다.

<102> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 스페이서 부위를 더 포함한다. 스페이서 부위는 예를 들면, 소수성 부위로부터 친수성 부위를 분리하기 위하여, 칼시토닌 약물로부터 소수성 부위 또는 친수성 부위를 분리하기 위하여, 제2 친수성 또는 소수성 부위로부터 제1 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여, 또는 링커 부위로부터 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 스페이서 부위는 바람

직하게는 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

<103> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 올리고머를 상기 칼시토닌에 결합하는데 사용되는 하나이상의 링커 부위를 더 포함할 수 있다. 링커 부위는 바람직하게는 알킬 및 지방산 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다.

<104> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 결합되어 있지 않은 상기 올리고머의 하나이상의 말단에 하나이상의 종결 부위(terminating moiety)를 더 포함할 수 있다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이고, 더욱 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 종결 부위는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이나, 상기 종결 부위는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산을 포함한, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 다양한 부위가 될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<105> 상기 올리고머는 바람직하게는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합된다. 일부 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 가수분해성 결합(예를 들면, 에스테르 또는 카르보네이트 결합)을 사용하여 상기 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합(hydrolyzable coupling)은 전구약물(prodrug)로서 작용하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 특정 예에서, 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우(즉, 상기 접합체는 상기 칼시토닌 약물의 일차적 작용 기작을 통하여 신체(body)에 영향을 미칠 수 있는 능력이 결여되어 있다.), 가수분해성 결합은 경시-방출(time-release) 또는 제어된-방출(controlled release)효과를 얻기 위하여, 하나이상의 올리고머가 대응 칼시토닌 약물-올리고머 접합체로부터 잘려져 활성 약물을 제공함에 따라 주어진 기간에 걸쳐 상기 칼시토닌 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 비가수분해성 결합(예를 들면, 카르바메이트, 아미드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 상기 올리고머에 결합된다. 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 확장된 기간 동안, 바람직하게는 2 시간 이상 혈류 내에서 순환하도록 하는 것이 바람직한 경우, 비가수분해성 결합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 경우, 상기 올리고머는 상기 올리고머를 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 칼시토닌 약물과 공유적으로 결합되는 사용되는 하나이상의 결합 부위(bonding moiety)를 더 포함한다. 결합 부위는 바람직하게는 공유 결합, 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부위 및 2차 아민 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다. 상기 올리고머 상의 하나이상의 부위가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합될 수 있다.

<106> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 것이 바람직하나, 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 비공유적으로 결합되어 비공유적으로 접합된 칼시토닌 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비공유 결합에는, 수소 결합, 이온 결합, 반데르 발스 결합, 및 마이셀 또는 리포좀성 포집이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체예에 따르면, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 올리고머는 적합하게 제작, 개질 및/또는 적합하게 관능기화되어 선택된 방법으로 비공유 접합(conjugation)을 위한 능력이 부여된다 (예를 들면, 수소 결합 능력의 부여). 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산(bile acid), 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 살리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산 및 아미노살리실산 유도체를 포함한, 다양한 화합물로 유도체화될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 결합(복합체)될 수 있다. 상기 얻어지는 복합체는 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다. 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도체화될 수 있다. 적합한 산성 조건하에서, 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 접합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체화로부터 얻어지는 산물은 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다.

<107> 하나이상의 올리고머(즉, 복수의 올리고머)가 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 상기 복수의 올리고머는 바람직하게는 동일하다. 그러나, 상기 복수의 올리고머는 서로 다를 수 있고, 또는 복수의 올리고머의 일부는 동일할 수 있고 일부는 다를 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 복수의 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 결합되는 경우, 하나이상의 상기 올리고머를 가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키고, 하나이상의 상기 올리고머를 비가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 상기 복수의 올리고머를 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 모든 결합이 가수분해성일 수 있으나, 다양한 정도의 가수분해성을 가지고 있어 예를 들면, 하나이상의 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터 재빠르게 제거되고, 하나이상의 상기 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터

느리게 제거된다.

<108> 상기 올리고머는 친핵성 히드록실 기 및/또는 아미노 기를 포함한, 상기 칼시토닌 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우, 친핵성 히드록실 기는 예를 들면, 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발결될 수 있고, 친핵성 아미노기는 예를 들면, 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서 및/또는 하나이상의 상기 폴리펩티드의 N-말단에서 발견될 수 있다. 올리고머가 상기 칼시토닌 폴리펩티드의 하나이상의 N-말단에 결합되는 경우, 상기 결합(coupling)은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 상기 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, 예를 들면, 상기 올리고머는 Lys^{11}, Lys^{18} 및/또는 N-말단의 아미노 기를 포함한, 상기 연어 칼시토닌의 아미노 기에 결합될 수 있다. 하나이상의 올리고머가 상기 연어 칼시토닌에 결합될 수 있으나, 개선된 혈청 칼슘 강하(lowering) 능력과 같은 높은 생물효능이 올리고머가 Lys^{11} 및 Lys^{18}의 아미노 기에 결합되어 있는 이접합된 연어 칼시토닌에서 관찰된다.

<109> 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 다양한 방법에 의하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 올리고머의 혼합물은 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 카르복실산의 혼합물을 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물과 접촉시킴으로써 합성된다. 다음으로, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 혼합물의 상기 올리고머는 활성화되어 칼시토닌 약물과 반응할 수 있어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있게 된다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 3에 도시되어 있고, 하기 실시예 11-18에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 4에 도시되어 있고, 하기 실시예 19-24에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 5에 도시되어 있고, 하기 실시예 25-29에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 6에 도시되어 있고, 하기 실시예 30-31에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 7에 도시되어 있고, 하기 실시예 32-37에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 8에 도시되어 있고, 하기 실시예 38에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 9에 도시되어 있고, 하기 실시예 39에 개시되어 있다. 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 10에 도시되어 있고, 하기 실시예 40에 개시되어 있다.

<110> 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 상기 혼합물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물의 혼합물과 반응된다. 바람직한 합성은 하기 실시예 41에 개시되어 있다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 상기 반응 조건(예를 들면, 선택된 몰(molar) 비율, 용매 혼합물 및/또는 pH)을 제어하여 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 상기 혼합물과 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 반응으로부터 얻어지는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 혼합물이 되도록 할 수 있다. 예를 들면, 라이신 아미노 기에서의 접합은 반응액의 pH를 라이신의 pKa 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 예를 들면, HPLC를 이용하여 분리되어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체, 예를 들면, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 모노-, 디-, 또는 트리-접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 특정한 분리된 접합체의 접합의 정도(예를 들면, 상기 분리된 분자가 모노-, 디- 또는 트리-접합체인지 여부)는 질량 분석(mass spectroscopy)을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 특정한 접합체 구조 (예를 들면, 상기 올리고머가 연어 칼시토닌 모노접합체(monoconjugate)의 Lys^{11}, Lys^{18} 또는 N-말단에 있는지 여부)는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적 효소 절단, 및/또는 엔도펩티다제 절단을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<111> 당업자에게 알려진 바와 같이, 상기 칼시토닌 약물 상의 하나이상의 반응 부위는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약

물을 N-tert-부톡시카르보닐 (t-BOC), 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)과 같은 적합한 차단 시약(blocking reagent)과 반응시킴으로써, 차단될 수 있다. 이 공정은 바람직하게는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우, 상기 폴리펩티드의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (즉, 접합체 중의 모든 친핵성 잔기가 접합되어 있는 것은 아닌 접합체)를 형성하는 것이다. 그러한 차단 후, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 차단된 칼시토닌 약물의 혼합물은 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 반응하여 하나이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머를 갖고 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 부위(blocking moiety)를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후, 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체는 당업자에게 알려진 바와 같이 차단해제(deblock)될 수 있다. 필요하다면, 다음으로, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 상기한 바와 같이 분리되어 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 차단해제되기 전에 분리될 수도 있다.

<112> 본 발명의 구체예에 따른 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 종래 혼합물의 특성에 비하여 개선된 특성을 갖는 것이다. 예를 들면, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혈청 칼슘 수준을 5 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 10, 11, 12, 13 또는 14 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 더욱 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 15, 16, 17, 18 또는 19 % 이상 강하시킬 수 있는 것이며, 가장 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 20 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다.

<113> 또다른 실시예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 상기 올리고머에 결합되어 있지 않은 상기 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 트립신 각각에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여, 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는 것이다. 키모트립신 또는 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 시험되어질 분자가 하기 실시예 51에 개괄한 과정과 유사한 과정을 이용하여 적용가능한 효소로 소화하였을 경우 잔존 백분율(%)에 해당한다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 15 % 이상 더 큰 것이다. 가장 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 20 % 이상 더 큰 것이다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 20 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성은 상기 올리고머와 접합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여 약 30 % 이상 더 큰 것이다.

<114> 또다른 구체예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 더 큰 생물효능을 갖는 것이다. 특정한 화합물의 생물효능은 그 곡선하의 면적(area-under-the-curve)(AUC) 값에 해당한다. 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 약 5 % 이상 더 큰 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 상기 올리고머와 결합되어 있지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능에 비하여 약 10 % 이상 더 큰 것이다.

<115> 또다른 구체예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 인 비보 활성에 비하여 더 큰 인 비보 활성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 예를 들면, H. R. Allcock & F. W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402 (2판, 1991)에 개시되어 있는 바와 같은, 젤 투과 크로마토그래피(GPC)와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수

있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<116> 또다른 구체예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 인 비트로 활성에 비하여 더 큰 인 비트로 활성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<117> 또다른 실시예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산된 혼합물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 저항성에 비하여, 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 증가된 저항성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<118> 또다른 실시예로서, 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물로서 동일한 수평균 분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산 혼합물의 개체간 변이성에 비하여, 더 작은 개체간 변이성을 갖는 것이다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 혼합물의 수평균 분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함한, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 개체간 변이성은 당업자에게 알려진 바와 같이, 다양한 방법에 의하여 측정될 수 있다. 상기 개체간 변이성은 바람직하게는 다음과 같이 계산된다. 용량 반응 곡선 하의 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선 및 기저 값 사이의 면적)은 각 개체에 대하여 결정된다. 모든 개체에 대한 평균 AUC는 각 개체의 AUC를 더하고, 상기 합을 개체 수로 나눔으로써 결정된다. 다음으로, 상기 개체의 AUC와 상기 평균 AUC 사이의 차이의 절대값을 각 개체에 대하여 결정한다. 다음으로, 얻어진 상기 차이의 절대 값을 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값을 얻는다. 낮은 값은 개체간 변이성이 낮은 것을 나타내고, 높은 값은 개체간 변이성이 높은 것을 나나낸다.

<119> 본 발명의 구체예에 따른 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 2 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 3 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 표준 편차가 약 22 달톤 보다 작은 분자량 분포를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 4 이상의 상기한 개선된 특성을 갖는 것이다.

<120> 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 접합체의 혼합물을 제공하며, 각 접합체는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고, 상기 혼합물은 하기 식으로 표시되는 분산계수(DC)가 10,000 보다 큰 혼합물이다.

<121>
$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} N_i M_i^2 \sum_{i=1}^{n} N_i - \left(\sum_{i=1}^{n} N_i M_i\right)^2}$$

<122> 식 중, n은 시료 중의 다른 분자의 수;

<123> Ni는 시료 중의 i 번째 분자의 수; 및

<124> Mi는 i 번째 분자의 질량이다.

<125> 접합체의 상기 혼합물은 바람직하게는 100,000 보다 큰 분산계수를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 접합체 혼합물의 분산계수는 500,000 보다 큰 것이고, 가장 바람직하게는, 상기 접합체 혼합물의 분산계수는 1,000,000 보다 큰 것이다. 변수 n, N, 및 Mi는 실시예 49에 개시된 방법을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 방법에 의하여 결정될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

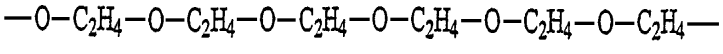
<126> 상기 칼시토닌 약물은 바람직하게는 칼시토닌이다. 더욱 바람직하게는, 상기 칼시토닌 약물은 연어 칼시토닌이다. 그러나, 상기 칼시토닌 약물은 예를 들면, 칼시토닌 전구체 펩티드, 칼시토닌, 칼시토닌 유사체, 칼시토닌

단편, 및 칼시토닌 단편 유사체를 포함한, 당업자에게 알려진 다양한 칼시토닌 약물로부터 선택될 수 있다는 것은 당업자라면 알 수 있다. 칼시토닌 전구체 펩티드에는, 카타칼신(katacalcin) (PDN-21) (C-프로칼시토닌), 및 N-proCT (아미노-말단 프로칼시토닌 절단 펩티드), 인간을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다. 칼시토닌 단편은 칼시토닌 1-7, 인간; 및 칼시토닌 8-32, 연어를 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 칼시토닌 단편 유사체는 상기한 바와 같이 칼시토닌 단편 중의 하나이상의 아미노산을 치환함으로써 제공되는 것일 수 있다.

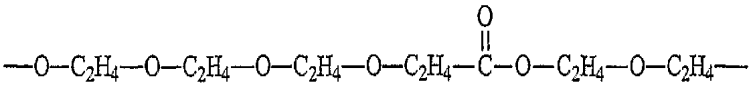
<127> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 다양한 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 상기 올리고머의 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 2, 3 또는 4 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 5 또는 6 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이고, 가장 바람직하게는, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위는 7 개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 것이다.

<128> 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위, 소수성 부위, 스페이서 부위, 링커 부위 및 종결 부위(terminating moieties)를 포함하는, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 다른 부위를 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 올리고머 중의 다양한 부위는 가수분해성 또는 비가수분해성 결합에 의하여 서로 공유적으로 결합된다.

<129> 상기 올리고머는 당, 폴리알킬렌옥사이드, 및 폴리아민/PEG 공중합체를 포함한, 하나이상의 추가의 친수성 부위(즉, 상기 폴리에틸렌 글리콜 부위 외의 부위)를 더 포함할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜은 폴리알킬렌 옥사이드이기 때문에, 상기 추가의 친수성 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위일 수 있다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합에 의하여 결합되는 경우, 동일한 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<130> 

<131> 6개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 부위이다. 이 부위가 상기 올리고머 중의 유일한 친수성 부위이면, 상기 올리고머는 추가의 친수성 부위를 포함하지 않을 것이다. 이웃하는 폴리에틸렌 글리콜 부위는 에테르 결합 이외의 다른 결합에 의하여 결합되는 경우, 다른 부위인 것으로 여겨질 것이다. 예를 들면, 상기 부위는

<132> 

<133> 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖고 2개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 추가의 친수성 부위이다. 바람직하게는, 본 발명의 구체예에 따른 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하고, 추가의 친수성 부위를 포함하지 않는 것이다.

<134> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 소수성 부위를 더 포함할 수 있다. 상기 소수성 부위는 바람직하게는, 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 알킬 부위 또는 포화 또는 불포화, 직쇄 또는 분지쇄 지방산 부위이다. 상기 소수성 부위가 알킬 부위인 경우, 바람직하게는 1 내지 28개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 알킬 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 알킬 부위는 2 내지 12개의 탄소원자를 갖는다. 상기 소수성 부위가 지방산 부위인 경우, 바람직하게는 2 내지 18개의 탄소원자를 갖는 직쇄, 포화 또는 불포화 천연 지방산 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 지방산 부위는 3 내지 14개의 탄소원자를 갖는 것이다. 더욱 바람직하게는, 4, 5, 또는 6개 이상의 탄소원자를 갖는 것이다.

<135> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 하나이상의 스페이서 부위를 더 포함한다. 스페이서 부위는 예를 들면, 소수성 부위로부터 친수성 부위를 분리하기 위하여, 칼시토닌 약물로부터 소수성 부위 또는 친수성 부위를 분리하기 위하여, 제2 친수성 또는 소수성 부위로부터 제1 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여, 또는 링커 부위로부터 친수성 또는 소수성 부위를 분리하기 위하여 사용될 수 있다. 스페이서 부위는 바람직하게는 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

<136> 상기 올리고머는 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 올리고머를 상기 칼시토닌에 결합하는데 사용되는

하나이상의 링커 부위를 더 포함할 수 있다. 링커 부위는 바람직하게는 알킬 및 지방산 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다.

<137> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 결합되어 있지 않은 상기 올리고머의 하나이상의 말단에 하나이상의 종결 부위(terminating moiety)를 더 포함할 수 있다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이고, 더욱 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 부위이다. 더욱 바람직하게는, 상기 종결 부위는 메틸 또는 메톡시이다. 상기 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이나, 상기 종결 부위는 당, 콜레스테롤, 알콜, 및 지방산을 포함한, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 다양한 부위가 될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<138> 상기 올리고머는 바람직하게는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합된다. 일부 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 가수분해성 결합(예를 들면, 에스테르 또는 카르보네이트 결합)을 사용하여 상기 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합(hydrolyzable coupling)은 전구약물(prodrug)로서 작용하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 특정 예에서, 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우(즉, 상기 접합체는 상기 칼시토닌 약물의 일차적 작용 기작을 통하여 신체(body)에 영향을 미칠 수 있는 능력이 결여되어 있다.), 가수분해성 결합은 경시-방출(time-release) 또는 제어된-방출(controlled release)효과를 얻기 위하여, 하나이상의 올리고머가 대응 칼시토닌 약물-올리고머 접합체로부터 잘려져 활성 약물을 제공함에 따라 주어진 기간에 걸쳐 상기 칼시토닌 약물을 투여하는 것을 제공할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 상기 칼시토닌 약물은 비가수분해성 결합(예를 들면, 카르바메이트, 아미드, 또는 에테르 결합)을 이용하여 상기 올리고머에 결합된다. 상기 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 확장된 기간 동안, 바람직하게는 2 시간 이상 혈류 내에서 순환하도록 하는 것이 바람직한 경우, 비가수분해성 결합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 경우, 상기 올리고머는 상기 올리고머를 당업자에 의하여 이해되는 바와 같은 상기 칼시토닌 약물과 공유적으로 결합되는데 사용되는 하나이상의 결합 부위(bonding moiety)를 더 포함한다. 결합 부위는 바람직하게는 공유 결합, 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부위 및 2차 아민 부위로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이다. 상기 올리고머 상의 하나이상의 부위가 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합될 수 있다.

<139> 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 공유적으로 결합되는 것이 바람직하나, 상기 올리고머는 상기 칼시토닌 약물에 비공유적으로 결합되어 비공유적으로 접합된 칼시토닌 약물-올리고머 복합체를 형성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 비공유 결합에는, 수소 결합, 이온 결합, 반데르 발스 결합, 및 마이셀 또는 리포좀성 포집이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체예에 따르면, 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 올리고머는 적합하게 제작, 개질 및/또는 적합하게 관능기화되어 선택된 방법으로 비공유 접합(conjugation)을 위한 능력이 부여된다 (예를 들면, 수소 결합 능력의 부여). 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산(bile acid), 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 살리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산 및 아미노살리실산 유도체를 포함한, 다양한 화합물로 유도체화될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 결합(복합체)될 수 있다. 상기 얻어지는 복합체는 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다. 본 발명의 또다른 구체예에 따르면, 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도체화될 수 있다. 적합한 산성 조건하에서, 상기 얻어지는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 제품, 및/또는 약제학적 부형제와 비공유적으로 접합된 복합체를 형성할 수 있다. 그러한 복합체화로부터 얻어지는 산물은 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는 것이다.

<140> 하나이상의 올리고머(즉, 복수의 올리고머)가 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 상기 복수의 올리고머는 바람직하게는 동일하다. 그러나, 상기 복수의 올리고머는 서로 다를 수 있고, 또는 복수의 올리고머의 일부는 동일할 수 있고 일부는 다를 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 복수의 올리고머가 상기 칼시토닌 약물에 결합되는 경우, 하나이상의 상기 올리고머를 가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키고, 하나이상의 상기 올리고머를 비가수분해성 결합을 갖는 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 상기 복수의 올리고머를 상기 칼시토닌 약물에 결합시키는 모든 결합이 가수분해성일 수 있으나, 다양한 정도의 가수분해성을 가지고 있어 예를 들면, 하나이상의 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터 재빠르게 제거되고, 하나이상의 상기 올리고머는 체내에서 가수분해에 의하여 상기 칼시토닌 약물로부터 느리게 제거된다.

<141> 상기 올리고머는 친핵성 히드록실 기 및/또는 아미노 기를 포함한, 상기 칼시토닌 약물의 다양한 친핵성 잔기에서 상기 칼시토닌 약물에 결합될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티

드인 경우, 친핵성 히드록실 기는 예를 들면, 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 수 있고, 친핵성 아미노기는 예를 들면, 히스티딘 및/또는 라이신 잔기에서 및/또는 하나이상의 상기 폴리펩티드의 N-말단에서 발견될 수 있다. 올리고머가 상기 칼시토닌 폴리펩티드의 하나이상의 N-말단에 결합되는 경우, 상기 결합(coupling)은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 상기 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, 예를 들면, 상기 올리고머는 Lys^{11}, Lys^{18} 및/또는 N-말단의 아미노 기를 포함한, 상기 연어 칼시토닌의 아미노 기에 결합될 수 있다. 하나이상의 올리고머가 상기 연어 칼시토닌에 결합될 수 있으나, 개선된 혈청 칼슘 강하(lowering) 능력과 같은 높은 생물효능이 올리고머가 Lys^{11} 및 Lys^{18}의 아미노 기에 결합되어 있는 이접합된 연어 칼시토닌에서 관찰된다.

<142> 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 다양한 방법에 의하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 카르복실산 및 폴리에틸렌 글리콜로 구성되는 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 올리고머의 혼합물은 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 카르복실산의 혼합물을 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물과 접촉시킴으로써 합성된다. 다음으로, 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 혼합물의 상기 올리고머는 활성화되어 칼시토닌 약물과 반응할 수 있어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있게 된다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 3에 도시되어 있고, 하기 실시예 11-18에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 4에 도시되어 있고, 하기 실시예 19-24에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 5에 도시되어 있고, 하기 실시예 25-29에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 6에 도시되어 있고, 하기 실시예 30-31에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 일 구체예는 도 7에 도시되어 있고, 하기 실시예 32-37에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 다른 구체예는 도 8에 도시되어 있고, 하기 실시예 38에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 9에 도시되어 있고, 하기 실시예 39에 개시되어 있다. 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 단분산된 혼합물을 제공하기 위한 합성 경로의 또다른 구체예는 도 10에 도시되어 있고, 하기 실시예 40에 개시되어 있다.

<143> 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 상기 혼합물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에서 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물의 혼합물과 반응된다. 바람직한 합성은 하기 실시예 41에 개시되어 있다. 당업자에 의하여 이해되는 바와 같이, 상기 반응 조건(예를 들면, 선택된 몰(molar) 비율, 용매 혼합물 및/또는 pH)을 제어하여 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 상기 혼합물과 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물의 상기 혼합물의 반응으로부터 얻어지는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 혼합물이 되도록 할 수 있다. 예를 들면, 라이신 아미노 기에서의 접합은 반응액의 pH를 라이신의 pKa 아래로 유지함으로써 억제될 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 예를 들면, HPLC를 이용하여 분리되어 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체, 예를 들면, 모노-, 디-, 또는 트리-접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 특정한 분리된 접합체의 접합의 정도(예를 들면, 상기 분리된 분자가 모노-, 디- 또는 트리-접합체인지 여부)는 질량 분석(mass spectroscopy)을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 특정한 접합체 구조 (예를 들면, 상기 올리고머가 연어 칼시토닌 모노접합체(monoconjugate)의 Lys^{11}, Lys^{18} 또는 N-말단에 있는지 여부)는 서열분석, 펩티드 맵핑, 선택적 효소 절단, 및/또는 엔도펩티다제 절단을 포함한, 당업자에게 알려진 바와 같은 다양한 기법을 이용하여 결정 및/또는 확인될 수 있으나, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.

<144> 당업자에게 알려진 바와 같이, 상기 칼시토닌 약물 상의 하나이상의 반응 부위는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물을 N-tert-부톡시카르보닐 (t-BOC), 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)과 같은 적합한 차단 시약(blocking reagent)과 반응시킴으로써, 차단될 수 있다. 이 공정은 바람직하게는 예를 들면, 상기 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우, 상기 폴리펩티드의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (즉, 접합체 중의 모든 친핵성 잔기가 접합되어 있는 것은 아닌 접합체)를 형성하는 것이다. 그러한 차단 후, 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 차단된 칼시토닌 약물의 혼합물은 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 반응하여 하나이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머를 갖고 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 부위(blocking moiety)를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응 후, 상기 칼시토닌 약물

-올리고머 접합체는 당업자에게 알려진 바와 같이 차단해제(deblock)될 수 있다. 필요하다면, 다음으로, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 상기한 바와 같이 분리되어 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 또한, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 상기 혼합물은 차단해제되기 전에 분리될 수도 있다.

<145> 본 발명의 구체예에 따른 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 종래 혼합물의 특성에 비하여 개선된 특성을 갖는 것이다. 예를 들면, 10,000 보다 큰 분산계수를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혈청 칼슘 수준을 5 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 10, 11, 12, 13 또는 14 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다. 더욱 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 15, 16, 17, 18 또는 19 % 이상 강하시킬 수 있는 것이며, 가장 바람직하게는, 접합체의 상기 혼합물은 혈청 칼슘 수준을 20 % 이상 강하시킬 수 있는 것이다.

<146> 다른 실시예로서, 분산 계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해 내성에 비하여 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대하여 각각 개선된 내성을 나타낸다. 키모트립신 또는 트립신에 대한 내성은, 테스트되는 분자가 하기 실시예 51에 개시한 것과 유사한 방법에 의해 적용가능한 효소에서 소화될 때 남아있는 퍼센트에 해당한다. 바람직하기로는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 내성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 내성보다 약 15% 이상 더 크며, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 대한 분해 내성은 올리고머와 접합되지 않는 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해 내성보다 약 20% 이상 더 크다. 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해 내성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해 내성은 올리고머와 결합되지 않은 트립신에 의한 분해 내성보다 약 20% 이상 더 크며, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해 내성보다 약 30% 이상 더 크다.

<147> 또 다른 실시예로서, 분산 계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 올리고머에 결합하지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능 (bioefficacy)에 비해 더 높은 생물효능을 갖는다. 특정 화합물의 생물효능은 그의 용량반응곡선하의 면적(AUC) 값에 해당한다. 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 상기 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 10% 이상 더 크다.

<148> 또 다른 실시예로서, 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 인비보 활성(*in vivo* activity)은 바람직하게는 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 인비보 활성보다 더 크다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은, 예를 들면 참고문헌 [H.R.Allcock & F.W.Lampe, CONTEMPORAY POLYMER CHEMISTRY 394-402 (2nd edition, 1991)]에 개시된 것처럼 겔 투과 크로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 따라서 측정될 수 있다.

<149> 또 다른 실시예로서, 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 인비트로 활성(*in vitro* activity)은 바람직하게는 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 인비트로 활성보다 크다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<150> 또 다른 실시예로서, 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해 내성에 비하여 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대하여 개선된 내성을 나타낸다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<151> 또 다른 실시예로서, 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 개체간 변이성

(inter-subject variablity)은 바람직하게는 분산계수가 10,000 이상인 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 개체간 변이성보다 적다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 당업자라면 알고 있을 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 하기와 같이 산출된다. 각 개체에 대하여 용량반응곡선하의 면적(AUC) (즉, 용량반응 곡선과 기저값 사이의 면적)을 측정한다. 각 개체의 AUC들을 합하고 그 총합을 개체수로 나누어서 모든 개체들의 평균 AUC를 산출한다. 각 개체에 대하여 개체의 AUC와 평균 AUC 간의 차액의 절대값을 산출한다. 이어서, 얻어진 차액의 절대값을 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로서 수득한다. 이 값이 낮을수록 개체간 변이성은 낮아지고 이 값이 높을수록 개체간 변이성은 높아진다.

<152> 본 발명의 구현예에 따른 분산계수 10,000 이상의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 바와 같은 개선된 특성들중 2개 이상을 나타낸다. 보다 바람직하게는 본 발명의 구현예에 따른 분산계수 10,000 이상의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 전술한 개선된 특성들중 3개 이상을 나타낸다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따른 분산계수 10,000 이상의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 전술한 개선된 특성들중 4개 이상을 나타낸다.

<153> 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 각 접합체가 올리고머에 결합된 칼시토닌 약물을 포함하고 동일한 갯수의 폴리에틸렌글리콜 서브유니트를 갖는 접합체의 혼합물이 제공된다.

<154> 칼시토닌 약물은 바람직하게는 칼시토닌이다. 보다 바람직하게는, 칼시토닌 약물은 연어 칼시토닌(salmon calcitonin)이다. 그러나, 당업자들에게 알려져 있는 여러가지 칼시토닌 약물, 예를 들면, 칼시토닌 전구체 펩티드, 칼시토닌, 칼시토닌 유사체, 칼시토닌 단편, 및 칼시토닌 단편 유사체로부터 선택될 수 있다는 것으로 이해되어야 한다. 칼시토닌 전구체 펩티드는 카타칼신(PDN-21)(C-프로칼시토닌), 및 N-proCT(아미노-말단 프로칼시토닌 분해 펩티드), 인간을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 칼시토닌 유사체는 전술한 것과 같은 칼시토닌에서 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다. 칼시토닌 단편은 칼시토닌 1-7, 인간; 및 칼시토닌 8-32, 연어를 포함하는데, 이로써 한정되지는 않는다. 칼시토닌 단편 유사체는 전술한 바와 같은 칼시토닌 단편에서 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

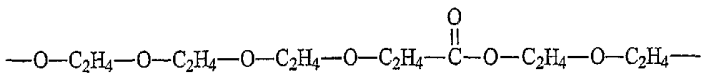
<155> 올리고머는 당업자들이 이해하듯이 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 여러가지 올리고머일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머의 폴리에틸렌 글리콜 부위는 2, 3 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는다. 보다 바람직하게는, 폴리에틸렌 글리콜 부위는 5 또는 6 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 가지며, 가장 바람직하게는, 폴리에틸렌 글리콜 부위는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는다.

<156> 올리고머는 당업자들이 이해하듯이 추가의 친수성 부위, 소수성 부위, 스페이서 부위, 링커 부위 및 종결 부위와 같은 하나 이상의 부위를 포함하는데 이로써 한정되지는 않는다. 올리고머 중의 각종 부위들은 가수분해성 또는 비가수분해성 결합에 의해 서로 공유결합된다.

<157> 올리고머는 당(sugar), 폴리알킬렌 옥사이드, 및 폴리아민/PEG 공중합체를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 하나 이상의 추가의 친수성 부위를 (예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 부위 외에) 더 포함할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜은 폴리알킬렌 옥사이드이기 때문에 추가의 친수성 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위일 수 있다. 인접한 폴리에틸렌 글리콜 부위들이 에테르 결합으로 연결된다면 이들은 동일한 부위로 간주될 것이다. 예를 들면, 하기의 부위:

<158> $-O-C_2H_4-O-C_2H_4-O-C_2H_4-O-C_2H_4-O-C_2H_4-O-C_2H_4-$

<159> 는 6개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 단일 폴리에틸렌 글리콜 부위이다. 만약 이러한 부위가 올리고머에서 유일한 친수성 부위라면 올리고머는 추가의 친수성 부위를 포함하지 않을 것이다. 인접한 폴리에틸렌 글리콜 부위들이 에테르 결합 이외의 결합에 의해 결합된다면 서로 다른 부위인 것으로 간주될 것이다. 예를 들어,

<160> 

<161> 는 4개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 부위와 두개의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 추가의 친수성 부위이다. 바람직하게는, 본 발명의 구현예들에 따른 올리고머들은 하나의 폴리에틸렌

글리콜 부위는 포함하고 추가의 친수성 부위는 포함하지 않는다.

<162> 당업자들이 이해하듯이 올리고머는 하나 이상의 소수성 부위를 더 포함할 수 있다. 소수성 부위는 바람직하게는 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지쇄의 알킬 부위, 또는 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지쇄의 지방산 부위이다. 소수성 부위가 알킬 부위인 경우에는 탄소수 1 내지 28인 직쇄의 포화 또는 불포화 알킬 부위인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 알킬 부위는 2 내지 12의 탄소수를 갖는다. 소수성 부위가 지방산 부위인 경우에는 탄소수가 2 내지 18인 직쇄의 불포 또는 불포화 천연 지방산 부위인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 지방산 부위는 3 내지 14의 탄소수를 갖는다. 가장 바람직하게는, 지방산 부위는 4, 5 또는 6 이상의 탄소 원자를 갖는다.

<163> 올리고머는 당업자들이 이해하듯이 하나 이상의 스페이서 부위를 더 포함할 수 있다. 스페이서 부위는, 예를 들면 소수성 부위로부터 친수성 부위를 분리할 때, 칼시토닌 약물로부터 소수성 부위 또는 친수성 부위를 분리할 때, 제2 친수성 또는 소수성 부위로부터 제1 친수성 또는 소수성 부위를 분리할 때, 또는 링커 부위로부터 친수성 부위 또는 소수성 부위를 분리할 때 사용된다. 스페이서 부위는 바람직하게는 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<164> 올리고머는 당업자들이 이해하듯이 올리고머를 칼시토닌 약물에 결합하는데 사용되는 하나 이상의 링커 부위를 더 포함할 수 있다. 링커 부위는 바람직하게는 알킬 및 지방산 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<165> 올리고머는 칼시토닌 약물에 결합되지 않는 올리고머의 하나 이상의 단부에 하나 이상의 종결 부위를 더 포함할 수 있다. 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이고, 더 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 부위이다. 가장 바람직하게는, 종결 부위는 메틸 또는 메톡시이다. 종결 부위가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이지만, 종결 부위는 당업자들이 이해하듯이 당, 콜레스테롤, 알콜 및 지방산을 포함하는 (그러나 이들로써 한정되지는 않는) 여러가지 부위일 수 있다.

<166> 올리고머는 바람직하게는 칼시토닌 약물에 공유결합된다. 일부 구현예들에 있어서는 칼시토닌 약물이 가수분해성 결합 (예를 들면, 에스테르 또는 카르보네이트 결합)에 의해 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 전구약물로서 작용하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 특정 예에 있어서, 예를 들어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우 (예를 들면 이 접합체가 칼시토닌 약물의 주작용 메카니즘을 통해 인체에 미치는 활성을 결여하는 경우)에 가수분해성 결합은, 하나 이상의 올리고머가 그의 각 칼시토닌 약물-올리고머 접합체로부터 분리하여 활성 약물을 제공함에 따라 소정의 시간에 걸쳐서 칼시토닌 약물을 투여하는 경시 방출 효과 또는 제어 방출 효과를 제공한다. 다른 구현예에 있어서, 칼시토닌 약물은 비가수분해성 결합 (예를 들면, 카르바메이트, 아미드 또는 에테르 결합)을 이용하여 올리고머에 결합된다. 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 장시간, 바람직하게는 2시간 이상 동안 혈류에서 순환시키고자 하는 경우에는 비가수분해성 결합을 이용하는 것이 바람직할 것이다. 올리고머가 칼시토닌 약물에 공유결합하는 경우에, 당업자들이 이해하듯이 올리고머는 칼시토닌 약물에 공유결합하는데 사용되는 하나 이상의 결합 부위를 더 포함한다. 결합 부위는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부위 및 제2 아민 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 올리고머 상의 하나 이상의 부위는 칼시토닌 약물에 공유결합될 수 있다.

<167> 올리고머는 바람직하게는 칼시토닌 약물에 공유결합되지만, 올리고머가 칼시토닌 약물에 비공유결합되어 비공유결합된 칼시토닌 약물-올리고머 복합체를 형성할 수도 있다는 것을 이해하여야 한다. 당업자들이 이해하듯이 비공유결합은 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 결합, 및 마이셀 또는 리포좀 캡슐화와 같은 것이 있는데, 이로써 한정되지는 않는다. 본 발명의 구현예에 따르면, 당업자들이 이해하듯이 올리고머는 적절하게 형성, 개질 및/또는 적절하게 관능화되어서 소정의 방법으로 비공유 접합체에 기능을 부여할 수 있다 (예를 들면 수소 결합 능력을 부여한다). 본 발명의 구현예에 따르면, 올리고머는 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 담즙산, 담즙산 유도체, 지방산, 지방산 유도체, 살리실산, 살리실산 유도체, 아미노살리실산, 및 아미노살리실산 유도체를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 화합물로 유도될 수 있다. 생성되는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물 및/또는 약제학적 부형제와 비공유결합 (복합체화)될 수 있다. 생성되는 복합체는 바람직하게는 균형잡힌 소수성 및 친수성 특성을 갖는다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면 올리고머는 아민 및/또는 알킬 아민으로 유도화될 수 있다. 적절한 산성 조건하에, 생성되는 올리고머는 약물 분자, 약제학적 생성물 및/또는 약제학적 부형제와 비공유 접합된 복합체를 생성할 수 있다. 그러한 복합화에 의해 생성되는 생성물은 바람직하게는 발란스된 소수성 및 친수성 특성을 갖는다.

<168> 하나 이상의 올리고머 (즉, 복수개의 올리고머)가 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 복수인 올리고머들은 바람직하게는 동일하다. 그러나, 복수의 올리고머들이 서로 다른 것일 수 있거나, 다르게는 복수의 올리고머중 일부

는 동일하고 나머지는 상이할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 복수개의 올리고머들이 칼시토닌 약물에 결합하는 경우에, 하나 이상의 올리고머가 가수분해성 결합에 의해 칼시토닌 약물에 결합되고 하나 이상의 올리고머가 비가수분해성 결합에 의해 칼시토닌 약물에 결합되는 것이 바람직하다. 다르게는, 복수개의 올리고머를 칼시토닌 약물에 결합하는 모든 결합이 가수분해도는 다르더라도 모두 가수분해성이어서, 예를 들면 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 칼시토닌으로부터 급속하게 분리되고 하나 이상의 올리고머는 체내에서 가수분해에 의해 칼시토닌 약물로부터 서서히 분리될 수 있다.

<169> 올리고머는 친핵성 하이드록실 관능기 및/또는 아미노 관능기를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 칼시토닌 약물의 각종 친핵성 잔기에서 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우에 친핵성 하이드록실 관능기는, 예를 들면 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 것이고, 친핵성 아미노 관능기는, 예를 들면 히스티딘 및/또는 리신 잔기 및/또는 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에서 발견될 수 있다. 올리고머가 칼시토닌 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합되는 경우, 결합은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, 예를 들면 올리고머는 Lys^{11}, Lys^{18} 및/또는 N-말단의 아미노 관능기들을 포함하는 연어 칼시토닌의 아미노 관능기에 결합될 수 있다. 하나 이상의 올리고머가 연어 칼시토닌에 결합될 수 있지만, 하나의 올리고머가 Lys^{11} 및 Lys^{18}의 아미노 관능기에 결합되는 경우에는 이접합된 연어 칼시토닌에 대해서 개선된 혈청 칼슘 저하 능력과 같은 보다 우수한 생물효능이 관찰된다.

<170> 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 여러가지 방법으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 카르복실산과 폴리에틸렌 글리콜로 이루어져 있으며 혼합물중 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 올리고머의 혼합물은, 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건하에 카르복실산의 혼합물을 혼합물중 각 폴리에틸렌 글리콜 분자가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물과 접촉시킴으로써 합성된다. 이어서, 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 혼합물중의 올리고머들을 활성화시켜서 상기 올리고머들이 칼시토닌 약물과 반응하여 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 일 구현예를 **도 3**에 도시하며, 하기 실시예 11 - 18에서 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 다른 구현예를 **도 4**에 도시하며 하기 실시예 19 - 24에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 5**에 도시하며 하기 실시예 25 - 29에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 6**에 도시하며 하기 실시예 30 - 31에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 다른 구현예를 **도 7**에 도시하며 하기 실시예 32 - 37에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 8**에 도시하며 하기 실시예 38에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 9**에 도시하며 하기 실시예 39에 개시한다. 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 다른 구현예를 **도 10**에 도시하며 하기 실시예 40에 개시한다.

<171> 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에 칼시토닌 약물과 반응시킨다. 바람직한 합성방법을 하기 실시예 41에 개시한다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 칼시토닌 약물의 혼합물의 반응으로부터 생성되는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 혼합물중 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 접합체의 혼합물이 되도록 반응 조건 (예를 들면, 선택된 몰비, 용매 혼합물 및/또는 pH)을 제어할 수 있다. 예를 들어, 리신의 아미노 관능기에서의 접합은 반응 용액의 pH를 리신의 pK_a 아래로 유지시킴으로써 억제될 수 있다. 다르게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을, 예를 들어 HPLC로 분리하여 혼합물중 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체, 예를 들면, 모노접합체, 이접합체 또는 삼접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 소정의 분리된 접합체의 접합도 (예를 들면, 분리된 분자가 모노접합체, 이접합체 또는 삼접합체인지 여부)는 당업자들이 이해하듯이 질량 분석법을

포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 기법을 이용하여 측정 및/또는 확인될 수 있다. 특정 접합체의 구조 (예를 들면, 올리고머가 Lys^{11}, Lys^{18} 또는 연어 칼시토닌 모노접합체의 N-말단에 있는지의 여부)는 서열 분석법, 펩티드 맵핑법, 선택적 효소 절단법, 및/또는 엔도펩티다제 절단법(endopeptidase cleavage)과 같이 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 당업자들이 알고 있는 여러가지 방법에 의해 측정 및/또는 확인될 수 있다.

<172> 당업자들이 이해하듯이, 칼시토닌 약물 상에 있는 하나 이상의 반응 위치를, 예를 들면 칼시토닌 약물을 N-3급-부톡시카르보닐(t-BOC), 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단제와 반응시킴으로써 차단시킬 수 있다. 이러한 반응은, 예를 들면 칼시토닌 약물이 폴리펩티드이고 폴리펩티드의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (예를 들면, 모든 친핵성 잔기가 접합되지는 않은 접합체)를 형성하고자 하는 경우에 바람직할 것이다. 이러한 차단 공정 이후에, 차단된 칼시토닌 약물의 혼합물을 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 반응시켜서 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)를 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 부위를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응후, 당업자들이 이해하는 것처럼 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 차단해제(de-blocked)할 수 있다. 필요에 따라서는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 전술한 대로 분리하여 혼합물중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 다르게는, 차단해제하기 전에 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 분리할 수 있다.

<173> 본 발명의 구현예들에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 종래의 혼합물에 비하여 개선된 특성을 갖는다. 예를 들어, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혈청 칼슘 농도를 적어도 5%까지 저하시킬 수 있다. 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 적어도 10, 11, 12, 13 또는 14%까지 저하시킬 수 있다. 보다 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 적어도 15, 16, 17, 18 또는 19%까지 저하시킬 수 있고, 가장 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 적어도 20%까지 저하시킬 수 있다.

<174> 다른 예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대한 내성에 비해 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대하여 각각 개선된 내성을 갖는다. 키모트립신 또는 트립신에 대한 내성은 테스트되는 분자가 하기 실시예 51에 개괄적으로 나타낸 것과 유사한 방법에 의하여 적용가능한 효소에서 소화될 때 남아있는 퍼센트에 해당한다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 10% 크다. 보다 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 15% 크고, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 20% 크다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합하지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 10% 크다. 보다 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합하지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 20% 크고, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합하지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 30% 크다.

<175> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 더 높은 생물효능을 갖는다. 특정 화합물의 생물효능은 그 화합물의 용량반응곡선하의 면적(AUC)에 해당한다. 바람직하게는, 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 5% 크다. 보다 바람직하게는, 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 10% 크다.

<176> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고

머 접합체의 다분산성 혼합물보다 더 큰 인비보 활성을 갖는다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균 분자량은 겔 투과 트로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다 (참고문헌 [H.R.Allcock & F.W.Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(2nd ed., 1991]).

<177> 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물보다 더 큰 인비트로 활성을 갖는다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<178> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해 내성에 비하여 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대하여 개선된 내성을 나타낸다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<179> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 개체간 변이성은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 개체간 변이성보다 적다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 당업자들이 이해하고 있는 것처럼 개체간 변이성은 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 하기와 같이 산출된다. 용량반응곡선하의 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선과 기저값 사이의 면적)을 각 개체에 대해 측정한다. 각 개체의 AUC를 합한 다음, 개체수로 나누어서 모든 개체에 대한 평균 AUC를 측정한다. 개체의 AUC와 평균 AUC 사이의 차액의 절대값을 각 개체에 대해 측정한다. 얻어진 차액의 절대값을 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 수득한다. 이 값이 낮을수록 개체간 변이성은 낮아지고 이 값이 높을수록 개체간 변이성이 높아진다.

<180> 본 발명에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 개선된 특성중 2개 이상을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 개선된 특성중 3개 이상을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 갯수의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 개선된 특성중 4개 이상을 갖는다.

<181> 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 하기 식 A의 구조를 갖는 접합체의 혼합물이 제공된다:

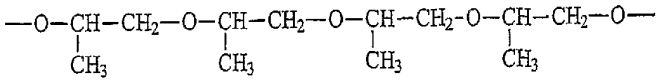
<182> 칼시토닌 약물-$\left[B\text{-}L_j\text{-}G_k\text{-}R\text{-}G'_m\text{-}R'\text{-}G''_n\text{-}T\right]_p$ (A)

<183> 식중, B는 결합 부위이고; L은 링커 부위이며; G, G' 및 G"는 스페이서 부위로부터 개별적으로 선택되고; R은 소수성 부위이고 R'는 폴리알킬렌 글리콜 부위이거나, R'는 소수성 부위이고 R은 폴리알킬렌 글리콜 부위이며; T는 종결 부위이고; j, k, m 및 n은 개별적으로 0 또는 1이며; p는 1 내지 칼시토닌 약물 상의 친핵성 잔기의 갯수 사이의 정수이다.

<184> 칼시토닌 약물은 바람직하게는 칼시토닌이다. 보다 바람직하게는 칼시토닌 약물은 연어 칼시토닌이다. 그러나, 당업자들에게 알려져 있는 다양한 칼시토닌 약물, 예를 들면, 칼시토닌 전구체 펩티드, 칼시토닌, 칼시토닌 유사체, 칼시토닌 단편, 및 칼시토닌 단편 유사체로부터 선택될 수 있다는 것으로 이해하여야 한다. 칼시토닌 전구체 펩티드는 카타칼신(PDN-21)(C-프로칼시토닌), 및 N-proCT(아미노-말단 프로칼시토닌 분해 펩티드), 인간을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 칼시토닌 유사체는 전술한 것과 같은 칼시토닌에서 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다. 칼시토닌 단편은 칼시토닌 1-7, 인간; 및 칼시토닌 8-32, 연어를 포함하는

데, 이로써 한정되지는 않는다. 칼시토닌 단편 유사체는 전술한 바와 같은 칼시토닌 단편에서 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 제공될 수 있다.

<185> 본 발명의 이들 구현예에 따르면, 올리고머의 폴리알킬렌 글리콜 부위는 바람직하게는 2, 3 또는 4 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는다. 보다 바람직하게는, 폴리에틸렌 글리콜 부위는 5 또는 6 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 가지며, 가장 바람직하게는, 폴리에틸렌 글리콜 부위는 7 이상의 폴리에틸렌 글리콜 서브유니트를 갖는다. 폴리알킬렌 글리콜 부위는 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 부위, 폴리프로필렌 글리콜 부위 또는 폴리부틸렌 글리콜 부위와 같은 저급 폴리알킬렌 글리콜 부위이다. 보다 바람직하게는, 폴리알킬렌 글리콜 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위 또는 폴리프로필렌 글리콜 부위이다. 가장 바람직하게는, 폴리알킬렌 글리콜 부위는 폴리에틸렌 글리콜 부위이다. 폴리알킬렌 글리콜 부위가 폴리프로필렌 글리콜 부위인 경우, 부위는 바람직하게는 불균일한 (즉, 랜덤하지 않은) 구조를 갖는다. 불균일한 구조를 갖는 예시적인 폴리프로필렌 글리콜 부위는 하기와 같다:

<186> 

<187> 이러한 불균일한 폴리프로필렌 글리콜 구조는 폴리프로필렌 글리콜 사슬에서 각 산소 원자에 인접한 탄소 원자에 단 하나의 메틸이 치환된 것으로 나타날 수 있다. 그러한 불균일한 폴리프로필렌 글리콜 부위는 소수성과 친수성 특성을 모두 나타낼 수 있으며, 따라서 소수성 중합체 부위를 사용하지 않고도 양쪽 친화성의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공하는데 유용할 것이다. 또한, 폴리프로필렌 글리콜 부위의 제2 알콜 부위가 칼시토닌 약물과 결합되면, 예를 들면 소화관에서 발견된 트립신 및 키모트립신과 같은 효소에 의해 야기되는 분해에 대해 개선된 내성을 나타내는 칼시토닌 약물 (예를 들면 연어 칼시토닌)을 제공할 수 있다.

<188> 본 발명의 구현예들에 따른 불균일한 폴리프로필렌 글리콜은 바람직하게는 지금부터 설명할 도 11 내지 13에 도시된 것처럼 합성될 수 있다. 도 11에 도시된 것처럼, 1,2-프로판디올(53)을 제1 알콜 차단제와 반응시켜서 제2 알콜 연장 단량체(54)를 수득한다. 제1 알콜 차단제는 당업자들이 이해하는 것처럼 t-부틸디페닐실릴클로라이드 및 t-부틸디메틸실릴클로라이드와 같은 실릴클로라이드 화합물, 및 Ac_2O와 같은 에스테르화제를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 제1 알콜 차단제일 수 있다. 바람직하게는, 제1 알콜 차단제는 제2 알콜과 실질적으로 반응하지 않는, t-부틸디페닐실릴클로라이드 또는 t-부틸디메틸실릴클로라이드와 같은 제1 알콜 차단제이다. 제2 알콜 연장 단량체(54)는 메탄설포닐 클로라이드($MeSO_4Cl$)와 반응하여 제1 연장 알콜 단량체 메실레이트(55)를 제공할 수 있다.

<189> 다르게는, 제2 알콜 연장 단량체(54)를 제2 알콜 차단제와 반응시켜서 화합물(56)을 제공할 수 있다. 제2 알콜 차단제는 당업자들이 이해하는 것처럼 벤질 클로라이드를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 제2 알콜 차단제일 수 있다. 화합물(56)을 B_1 차단해제제와 반응시켜서 차단 부위 B_1을 제거하고 제1 알콜 연장 단량체(57)를 제공할 수 있다. B_1 차단해제제는 당업자들이 이해하는 것처럼 각종 차단해제제로부터 선택될 수 있다. 에스테르 형성에 의해 제1 알콜이 차단되는 경우, B_1 차단해제제는 염기 (예를 들면, 탄산칼륨)과 같은 탈에스테르화제이다. 제1 알콜이 실릴클로라이드를 이용하여 차단되는 경우에 B_1 차단해제제는 바람직하게는 테트라부틸암모늄 플루오라이드(TBAF)이다. 제1 알콜 연장 단량체(57)를 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켜서 제2 알콜 연장 단량체 메실레이트(58)를 제공할 수 있다.

<190> 제1 알콜 연장 단량체(54) 및 제2 알콜 연장 단량체(57)를 하기와 같이 캡핑(capping)할 수 있다. 제2 알콜 연장 단량체(54)를 캡핑제(capping reagent)와 반응시켜서 화합물(59)을 제공할 수 있다. 캡핑제는 당업자들이 이해하듯이, 메틸 클로라이드와 같은 알킬 할라이드를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 캡핑제일 수 있다. 화합물(59)을 전술한 바와 같은 B_1 차단해제제와 반응시켜서 제1 알콜 캡핑 단량체(60)를 제공할 수 있다. 제1 알콜 캡핑 단량체(60)를 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켜서 제2 알콜 캡핑 단량체 메실레이트(61)를 제공할 수 있다. 제1 알콜 연장 단량체(57)를 캡핑제와 반응시켜서 화합물(62)을 제공할 수 있다. 캡핑제는 전술한 바와 같은 각종 캡핑제일 수 있다. 화합물(62)을 B_2 차단해제제와 반응시켜서 차단 부위 B_2를 제거하고 제2 알콜 캡핑 단량체(63)를 제공할 수 있다. B_2 차단해제제는 당업자들이 이해하는 것처럼 팔라듐/활성탄 촉매 존재하의 H_2를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 차단해제제일 수 있다. 제2 알콜 캡핑 단량체를 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켜서 제1 알콜 캡핑 단량체 메실레이트(64)를 제공할 수 있다. 도 11

에 도시된 구현예는 캡핑 단량체의 합성예를 나타내지만, 유사한 반응을 실시하여 캡핑 중합체를 제공할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<191> 통상, 사슬 연장 반응은 제1 알콜 연장 단량체(57)와 같은 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체를 제1 알콜 연장 단량체 메실레이트(55)와 같은 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트와 반응시켜서 각종 불균일한 폴리프로필렌 사슬을 제공하거나, 제2 알콜 연장 단량체(54)와 같은 제2 알콜 연장 단량체 또는 중합체를 제2 알콜 연장 단량체 메실레이트(58)와 같은 제2 알콜 연장 단량체 또는 중합체와 반응시킴으로써 실시될 수 있다.

<192> 예를 들어, 도 13에서, 제1 알콜 연장 단량체 메실레이트(55)를 제1 알콜 연장 단량체(57)와 반응시켜서 이량체 화합물(57)을 제공할 수 있다. 다르게는, 제2 알콜 연장 단량체 메실레이트(58)를 제2 알콜 연장 단량체(54)와 반응시켜서 이량체 화합물(65)을 제공할 수 있다. 이량체 화합물(65) 상의 B_1 차단 부위를 전술한 B_1 차단해제제로 제거하여 제1 알콜 연장 이량체(66)를 제공할 수 있다. 제1 알콜 연장 이량체(66)를 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켜서 제2 알콜 연장 이량체 메실레이트(67)를 제공할 수 있다. 다르게는, 이량체 화합물(65) 상의 B_2 차단 부위를 전술한 바와 같은 B_2 차단해제제로 제거하여 제2 알콜 연장 이량체(69)를 제공할 수 있다. 제2 알콜 연장 이량체(69)를 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켜서 제1 알콜 연장 이량체 메실레이트(70)를 제공할 수 있다.

<193> 당업자들이 이해하는 것처럼, 사슬 연장 반응을 반복하여 다른 사슬 길이에 도달할 수 있다. 예를 들어, 도 13에 도시된 것처럼, 제1 알콜 연장 이량체(66)를 제1 알콜 연장 이량체 메실레이트(70)와 반응시켜서 사량체 화합물(72)를 제공할 수 있다. 도 13에 더 도시된 것처럼, 일반적인 사슬 연장 반응식은 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체(73)를 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트(74)와 반응시켜서 불균일한 폴리프로필렌 중합체(75)를 제공하는 방법과 관련이 있다. m 및 n의 값은 각각 0 내지 1000 또는 그 이상의 범위에 있을 것이다. 바람직하게는, m 및 n은 각각 0 내지 50이다. 도 13에 도시된 구현예들은 제1 알콜 연장 단량체 및/또는 중합체가 제1 알콜 연장 단량체 및/또는 중합체 메실레이트와 반응하는 것을 나타내지만, 제2 알콜 연장 단량체 및/또는 중합체와 제2 알콜 연장 단량체 및/또는 중합체 메실레이트를 이용하여 유사한 반응을 실시할 수 있다는 것으로 이해되어야 한다.

<194> 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체의 말단 또는 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트의 말단을 제1 알콜 캡핑 단량체 또는 중합체 메실레이트 또는 제1 알콜 캡핑 단량체 또는 중합체와 각각 반응시켜서 불균일한 폴리프로필렌 사슬을 제공할 수도 있다. 예를 들어, 도 12에 도시된 것처럼, 제1 알콜 연장 이량체 메실레이트(70)를 제1 알콜 캡핑 단량체(60)와 반응시켜서 캡핑/차단된 제1 알콜 연장 삼량체(71)를 제공할 수 있다. 당업자들이 이해하듯이, B_1 차단 부위를 제거하고 생성되는 캡핑된 제1 알콜 연장 삼량체를 제1 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트와 반응시켜서 캡핑된 삼량체(71)의 사슬을 연장시킬 수 있다.

<195> 제2 알콜 연장 단량체 또는 중합체의 말단 또는 제2 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트를 제2 알콜 캡핑 단량체 또는 중합체 메실레이트 또는 제2 알콜 캡핑 단량체 또는 중합체와 각각 반응시켜서 캡핑된 불균일한 폴리프로필렌 사슬을 제공할 수 있다. 예를 들어, 도 12에 도시된 것처럼, 제2 알콜 연장 이량체 메실레이트(67)를 제2 알콜 캡핑 단량체(63)와 반응시켜서 캡핑/차단된 제1 알콜 연장 삼량체(68)를 제공할 수 있다. 전술한 대로 B_2 차단 부위를 제거하고 생성되는 캡핑된 제2 알콜 연장 삼량체를 제2 알콜 연장 단량체 또는 중합체 메실레이트와 반응시켜서 캡핑된 삼량체(68)의 사슬을 연장시킬 수 있다. 도 12에 도시된 합성 방법은 이량체를 캡핑 단량체와 반응시켜서 삼량체를 제공하는 것을 나타내지만, 캡핑 반응이 불균일한 폴리프로필렌 글리콜 부위의 합성중 어느 시점에서 실시되거나, 다르게는 캡핑되지 않은 불균일한 폴리프로필렌 글리콜 부위가 제공될 수 있다는 것으로 이해되어야 한다. 도 12에 도시된 구현예는 캡핑 단량체를 이용한 합성에 의해 폴리부틸렌 올리고머를 캡핑시키는 것을 나타내지만, 본 발명의 폴리부틸렌 올리고머가 도 11에 대해 전술한 것과 같은 캡핑제로 직접 (즉, 캡핑 단량체의 첨가 없이) 캡핑될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<196> 본 발명의 구현예들에 따른 불균일한 폴리프로필렌 글리콜 부위는 당업자들이 이해하듯이 폴리에틸렌 글리콜 부위에 대해 전술한 것과 같은 방법을 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 칼시토닌 약물, 카르복실산과 같은 소수성 부위, 및/또는 다른 여러가지 부위에 결합될 수 있다.

<197> 본 발명의 이들 구현예에 따르면, 소수성 부위는 당업자들이 이해하는 것처럼 소수성 부위이다. 소수성 부위는 바람직하게는 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지쇄의 알킬 부위, 또는 포화 또는 불포화된 직쇄 또는 분지쇄의 지방산 부위이다. 소수성 부위가 알킬 부위인 경우, 바람직하게는 포화 또는 불포화된 탄소수 1 내지 28의 직쇄 알킬 부위이다. 소수성 부위가 지방산 부위인 경우, 바람직하게는 포화 또는 불포화된 탄소수 2 내지 18의 직쇄

천연 지방산 부위이다. 보다 바람직하게는, 지방산 부위는 탄소수 3 내지 14이다. 가장 바람직하게는, 지방산 부위는 탄소수 4, 5 또는 6 이상이다.

<198> 본 발명의 이들 구현예에 따르면 스페이서 부위, G, G' 및 G"는 당업자들이 이해하는 것처럼 스페이서 부위이다. 스페이서 부위는 바람직하게는 당, 콜레스테롤 및 글리세린 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 이들 구현예의 올리고머는 스페이서 부위를 포함하지 않느다 (즉, k, m 및 n이 바람직하게는 0이다).

<199> 본 발명의 이들 구현예에 띠르면, 링커 부위, L은 당업자들이 이해하는 것처럼 올리고머를 약물과 결합하는데 사용될 수 있다. 링커 부위는 바람직하게는 알킬 및 지방산 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<200> 본 발명의 이들 구현예에 따르면, 종결 부위는 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이고, 보다 바람직하게는 저급 알킬 또는 저급 알콕시 부위이다. 가장 바람직하게는, 종결 부위는 메틸 또는 메톡시이다. 종결 부위가 바람직하게는 알킬 또는 알콕시 부위이지만, 종결 부위는 당업자들이 이해하는 것처럼 당, 콜레스테롤, 알콜 및 지방산을 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 부위일 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

<201> 본 발명의 이들 구현예에 따르면, 식 A의 구조중 괄호로 묶인 부분으로 표시되는 올리고머는 칼시토닌 약물에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 칼시토닌 약물은 가수분해성 결합 (예를 들면, 에스테르 또는 카르보네이트 결합)에 의해 올리고머에 결합된다. 가수분해성 결합은 전구약물로서 작용하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있다. 특정 예에 있어서, 예를 들어 칼시토닌 약물-올리고머 접합체가 불활성인 경우 (예를 들면 이 접합체가 칼시토닌 약물의 주작용 메카니즘을 통해 인체에 영향을 미치는 활성을 결여하는 경우)에 가수분해성 결합은, 하나 이상의 올리고머가 그의 각 칼시토닌 약물-올리고머 접합체로부터 분리하여 활성 약물을 제공함에 따라 소정의 시간에 걸쳐서 칼시토닌 약물을 투여하는 경시 방출 효과 또는 제어 방출 효과를 제공한다. 다른 구현예에 있어서, 칼시토닌 약물은 비가수분해성 결합 (예를 들면, 카르바메이트, 아미드 또는 에테르 결합)에 의해 올리고머에 결합된다. 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 장시간, 예를 들어 2시간 이상 동안 혈류에서 순환시키고자 하는 경우에는 비가수분해성 결합을 이용하는 것이 바람직할 것이다. 결합 부위, B는 당업자들이 이해하는 것처럼 올리고머를 칼시토닌 약물에 공유결합하는데 사용될 수 있는 여러가지 결합 부위일 수 있다. 결합 부위는 바람직하게는 공유결합(들), 에스테르 부위, 카르보네이트 부위, 카르바메이트 부위, 아미드 부위 및 제2 아민 부위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<202> 가변성인 p는 1 내지 칼시토닌 약물 상의 친핵성 잔기의 갯수 사이의 정수이다. p가 1보다 큰 경우, 하나 이상의 올리고머 (예를 들면 복수개의 올리고머)가 약물에 결합된다. 본 발명의 이들 구현예에 따르면, 복수인 올리고머들은 동일하다. 복수개의 올리고머들이 약물에 결합되는 경우에, 하나 이상의 올리고머가 가수분해성 결합에 의해 약물에 결합되고 하나 이상의 올리고머가 비가수분해성 결합에 의해 약물에 결합되는 것이 바람직하다. 다르게는, 복수개의 올리고머를 약물에 결합하는 모든 결합이 가수분해도는 다르더라도 모두 가수분해성이어서, 예를 들면 하나 이상의 올리고머가 체내에서 가수분해에 의해 칼시토닌으로부터 급속하게 분리되고 하나 이상의 올리고머는 체내에서 가수분해에 의해 칼시토닌 약물로부터 서서히 분리될 수 있다. 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, p는 바람직하게는 1 또는 2이고, 더 바람직하게는 2이다.

<203> 올리고머는 친핵성 하이드록실 관능기 및/또는 아미노 관능기를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 칼시토닌 약물의 각종 친핵성 잔기에서 칼시토닌 약물에 결합될 수 있다. 칼시토닌 약물이 폴리펩티드인 경우에 친핵성 하이드록실 관능기는, 예를 들면 세린 및/또는 티로신 잔기에서 발견될 것이고, 친핵성 아미노 관능기는, 예를 들면 히스티딘 및/또는 리신 잔기 및/또는 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에서 발견될 것이다. 올리고머가 칼시토닌 폴리펩티드의 하나 이상의 N-말단에 결합되는 경우, 결합은 바람직하게는 2차 아민을 형성한다. 칼시토닌 약물이 연어 칼시토닌인 경우, 예를 들면 올리고머는 Lys^{11}, Lys^{18} 및/또는 N-말단의 아미노 관능기들을 포함하는 연어 칼시토닌의 아미노 관능기에 결합될 수 있다. 하나 이상의 올리고머가 연어 칼시토닌에 결합될 수 있지만, 하나의 올리고머가 Lys^{11} 및 Lys^{18}의 아미노 관능기에 결합되는 경우에는 이중 결합된 연어 칼시토닌에 대해서 개선된 혈청 칼슘 저하 능력과 같은 보다 우수한 생물효능이 관찰된다.

<204> 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 여러가지 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 카르복실산과 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 올리고머의 혼합물은 올리고머의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에 카르복실산을 폴리에틸렌 글리콜의 혼합물과 접촉시킴으로써 합성된다. 이어서, 혼합물 중의 올리고머들이 칼시토닌 약물과 반응하여 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 제공할 수 있도록 상기 올리고머들을 활성화시킨다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리

고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 일 구현예를 **도 3**에 도시하며 하기 실시예 11 - 18에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 다른 구현예를 **도 4**에 도시하며 하기 실시예 19 - 24에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 5**에 도시하며 하기 실시예 25 - 29에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 6**에 도시하며 하기 실시예 30 - 31에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 7**에 도시하며 하기 실시예 32 - 37에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 8**에 도시하며 하기 실시예 38에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 9**에 도시하며 하기 실시예 39에 개시한다. 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머의 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 제공하는 합성 경로의 또 다른 구현예를 **도 10**에 도시하며 하기 실시예 40에 개시한다.

<205> 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물을 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공하기에 충분한 조건 하에 혼합물중 각 약물이 동일한 분자량을 갖는 칼시토닌 약물의 혼합물과 반응시킨다. 바람직한 합성 방법을 하기 실시예 41에 개시한다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 칼시토닌 약물의 혼합물의 반응으로부터 생성되는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머 구조를 갖는 접합체의 혼합물이 되도록 반응 조건(예를 들면, 선택된 몰비, 용매 혼합물 및/또는 pH)을 제어할 수 있다. 예를 들어, 리신의 아미노 관능기에서의 접합은 반응 용액의 pH를 리신의 pK_a 아래로 유지시킴으로써 억제될 수 있다. 다르게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은, 예를 들어 HPLC를 이용하여 분리되어 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체, 예를 들면, 모노접합체, 이접합체 또는 삼접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 소정의 분리된 접합체의 접합도 (예를 들면, 분리된 분자가 모노접합체, 이접합체 또는 삼접합체인지 여부)는 당업자들이 이해하는 것과 같이 질량 분석법과 같은 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 기법을 이용하여 측정 및/또는 확인될 수 있다. 특정 접합체의 구조 (예를 들면, 올리고머가 Lys^{11}, Lys^{18} 또는 연어 칼시토닌 모노접합체의 N-말단에 있는지의 여부)는 당업자들이 이해하는 것처럼 서열 분석법, 펩티드 맵핑법, 선택적 효소 절단법, 및/또는 엔도펩티다제 절단법(endopeptidase cleavage)과 같은 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정 및/또는 확인될 수 있다.

<206> 당업자들이 이해하듯이, 칼시토닌 약물 상에 있는 하나 이상의 반응 위치는, 예를 들면 칼시토닌 약물을 N-3급-부톡시카르보닐(t-BOC), 또는 N-(9-플루오레닐메톡시카르보닐)(N-FMOC)와 같은 적절한 차단제와 반응시킴으로써 차단될 수 있다. 이러한 반응은, 예를 들면 칼시토닌 약물이 폴리펩티드이고 폴리펩티드의 N-말단에 올리고머를 갖는 불포화 접합체 (예를 들면, 모든 친핵성 잔기가 접합되지는 않은 접합체)를 형성하고자 하는 경우에 바람직할 것이다. 이러한 차단 공정 이후에, 차단된 칼시토닌 약물의 혼합물을 혼합물 중의 각 올리고머가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 올리고머 구조를 갖는 활성화된 올리고머의 혼합물과 반응시켜서 하나 이상의 친핵성 잔기에 결합된 올리고머(들)를 가지며 다른 친핵성 잔기에 결합된 차단 부위를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 접합 반응후, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체는 당업자들이 이해하는 것처럼 차단해제(de-blocked)될 수 있다. 필요에 따라서는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 전술한 대로 분리하여 혼합물중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 제공할 수 있다. 다르게는, 차단해제하기 전에 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 분리할 수 있다.

<207> 본 발명의 구현예들에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 종래의 혼합물에 비하여 개선된 특성을 갖는다. 예를 들어, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혈청 칼슘 농도를 5% 이상 저하시킬 수 있다. 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 10, 11, 12, 13 또는 14% 이상 저하시킬 수 있다. 보다 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 15, 16, 17, 18 또는 19% 이상 저하시킬 수 있고, 가장 바람직하게는, 접합체의 혼합물은 혈청 칼슘 농도를 20% 이상 저하시킬 수 있다.

<208> 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 키모트립신 및/또는 크립신에 의한 분해에 대한 내성에 비해 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대해 각각 개선된 내성을 갖는다. 키모트립신 또는 트립신에 대한 내성은 테스트되는 분자가 하기 실시예 51에 개괄적으로 나타낸 것과 유사한 방법에 의하여 적용가능한 효소에서 소화될 때 남아있는 퍼센트에 해당한다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머에 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머에 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 15% 이상 더 크고, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머에 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 키모트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 20% 이상 더 크다. 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 10% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 20% 이상 더 크고, 가장 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성은 올리고머와 접합되지 않은 칼시토닌 약물의 혼합물의 트립신에 의한 분해에 대한 내성보다 약 30% 이상 더 크다.

<209> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 더 높은 생물효능을 갖는다. 특정 화합물의 생물효능은 그 화합물의 용량반응곡선하의 면적(AUC)에 해당한다. 바람직하게는, 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 5% 이상 더 크다. 보다 바람직하게는, 혼합물의 생물효능은 올리고머에 결합되지 않은 칼시토닌 약물의 생물효능보다 약 10% 이상 더 크다.

<210> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 인비보 활성은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 인비보 활성보다 크다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균분자량은 겔 투과 트로마토그래피와 같은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다 (참고문헌 [H.R.Allcock & F.W.Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394-402(2nd ed., 1991]).

<211> 다른 예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 인비트로 활성은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 인비트로 활성보다 크다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<212> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해 내성에 비하여 키모트립신 및/또는 트립신에 의한 분해에 대하여 개선된 내성을 나타낸다. 당업자들이 이해하듯이, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다.

<213> 또 다른 실시예로서, 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 개체간 변이성은 바람직하게는 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 동일한 수평균분자량을 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 다분산성 혼합물의 개체간 변이성보다 적다. 당업자들이 이해하는 것처럼, 혼합물의 수평균분자량은 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 (그러나 이로써 한정되지는 않는) 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 당업자들이 이해할 수 있는 것처럼 여러가지 방법에 의해 측정될 수 있다. 개체간 변이성은 바람직하게는 하기와 같이 산출된다. 용량반응곡선하의 면적(AUC)(즉, 용량-반응 곡선과 기저값 사이의 면적)을 각 개체에 대해 측정한다. 각 개체의 AUC를 합한 다음, 개체수로 나누어서 모든 개체에 대한 평균 AUC를 측정한다. 개체의 AUC와 평균 AUC 사이의 차액의 절대값을 각 개체에 대해 측정한다. 얻어진 차액의 절대값

을 합하여 개체간 변이성을 나타내는 값으로 수득한다. 이 값이 낮을수록 개체간 변이성은 낮아지고 이 값이 높을수록 개체간 변이성이 높아진다.

<214> 본 발명의 구현예에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 개선된 특성중 2개 이상을 갖는다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 전술한 개선된 특성중 3개 이상을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 구현예에 따라서 혼합물 중의 각 접합체가 동일한 분자량을 가지며 식 A의 구조를 갖는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 바람직하게는 전술한 개선된 특성중 4개 이상을 갖는다.

<215> 본 발명의 구현예에 따른 접합체 혼합물을 포함하는 약제학적 조성물도 제공된다. 전술한 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물은 공지의 방법에 따라서 약제학적 캐리어에 투여용으로 제조될 수 있다. 참고문헌 [Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (9^{th} Ed. 1995)] 참조. 본 발명의 구현예에 따른 약제학적 조성물을 제조함에 있어서, 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 약제학적으로 허용가능한 담체와 통상적으로 혼합한다. 물론 이 담체는 약제학적 조성물에서 다른 임의의 성분과 혼화성이 있는 것이어야 하며 환자에게 유해하지 않아야 한다. 담체는 고체이거나 액체이거나 양쪽 모두일 수 있으며, 바람직하게는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물과 함께, 상기 혼합물을 약 0.01 또는 0.5중량% 내지 약 95중량% 또는 99중량% 포함할 수 있는 단위 복용제, 예를 들면 타블렛으로서 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은, 임의로는 하나 이상의 보조 성분을 포함하는 성분들을 혼합하는 것을 포함하는 (그러나, 이로써 한정되지는 않는) 약학 분야에서의 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

<216> 본 발명의 구현예에 따른 약제학적 조성물은 경구 투여, 직장 투여, 국소 투여, (예를 들면 에어로졸을 통한) 흡입 투여, 비강 (예를 들면 혀밑) 투여, 질내 투여, 비경구 (예를 들면, 피하, 근육내, 피부내, 관절내, 흉막내, 복막내, 뇌내, 동맥내, 또는 정맥내) 투여, 국소 (예를 들면, 피부 및 기도 표면을 포함하는 점막 표면 모두) 투여 및 경피 투여용으로 적합한 것들을 포함하는데, 소정의 경우에 가장 적절한 경로는 치료되어야 하는 질병의 특성과 병세 및 사용되는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 특성 혼합물의 특성에 따라서 달라질 것이다.

<217> 경구 투여하기에 적합한 약제학적 조성물은 각각이 소정량의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 포함하는, 캡슐, 샤세(cachets), 로젠지(lozenges) 또는 타블렛과 같은 개별 단위에서; 분말제 또는 과립제(granules)로서; 수성 또는 비수성 액체 중의 현탁제 또는 용액으로서; 또는 유중수 또는 수중유 에멀션으로서 존재할 수 있다. 그러한 제제는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체와 (전술한 것처럼 하나 이상의 보조 성분을 포함할 수 있는) 적절한 담체를 결합하는 단계를 포함하는, 약학 분야의 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 통상, 본 발명의 구현예에 따른 약제학적 조성물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체, 또는 이들 모두와 균일하고 철저하게 혼합한 다음, 필요에 따라서는 생성되는 혼합물을 성형함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 타블렛은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 포함하는 분말 또는 과립을, 임의로는 하나 이상의 보조 성분들과 함께 압착 또는 몰딩함으로써 제조될 수 있다. 압착된 타블렛은 임의로는 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 및/또는 표면활성제/분산제(들)과 혼합된 분말 또는 과립과 같이 자유롭게 분산하는 형태의 혼합물을 적절한 기계에 넣어 압착함으로써 제조될 수 있다. 몰딩된 타블렛은 불활성 액체 결합제로 습윤된 분말 화합물을 적절한 기계에 넣어 몰딩함으로써 제조될 수 있다.

<218> 비강 (혀밑) 투여하기에 적절한 약제학적 조성물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 향미된 베이스, 통상 슈크로스 및 아카시아 또는 트래거캔트에 포함시킨 로젠지; 및 칼시토닌 약물-올리고머 접합체를 젤라틴 및 글리세린 또는 슈크로스 및 아카시아와 같은 불활성 베이스에 포함시킨 향정(pastilles)을 포함한다.

<219> 비경구 투여하기에 적합한 본 발명의 구현예의 약제학적 조성물은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 수성 및 비수성 주사용액을 포함하는데, 이 제제는 바람직하게는 피검체의 혈액과 등장성이다. 이들 제제는 조성물이 피검체의 혈액과 등장성이 되도록 하는 항산화제, 버퍼, 제균제 및 용질을 포함할 수 있다. 수성 및 비수성 살균 현탁제는 현탁화제 및 농후제를 포함할 수 있다. 조성물은 단위 용량 또는 복수 용량 용기, 예를 들면 밀폐된 앰플 및 바이알에 존재할 수 있으며, 사용 직전에 살균 액체 담체, 예를 들면 식염수 또는 주사용 물을 첨가하기만 하면 되는 동결 건조 상태로 보관될 수 있다. 예시적인 주사용액 및 현탁제는 멸균 분말, 과립 또는 전술한 종류의 타블렛으로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 칼시토닌 약물-올리고머 복합체를 밀폐된 용기에 단일 복용 형태로 포함하는 안정한 주사용 멸균 조성물이 제공될 수 있다. 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 화합물을 적절한 약제학적으로 허용가능한 담체로 재구성하여 투여 대상자에게 주사하기에 적합한 액체 조성물을 형성할 수

있는 동결건조물의 형태로 제공할 수도 있다. 단위 복용 형태는 통상 약 10㎎ 내지 약 10g의 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 포함한다. 이러한 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물이 실질적으로 물에 불용인 경우에는 생리학적으로 허용가능한 충분량의 유화제를 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 수성 담체에 유화시킬 수 있을 정도의 충분한 양만큼 사용할 수 있다. 그러한 유용한 유화제의 하나가 포스파티딜 콜린이다.

<220> 직장 투여하기에 적합한 약제학적 조성물을 바람직하게는 단위 용량 좌제로서 존재한다. 이들은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물을 하나 이상의 통상적인 고체 담체, 예를 들면 코코아 버터와 혼합한 다음, 생성되는 혼합물을 성형함으로써 제조된다.

<221> 피부에 국소 투여하기에 적합한 약제학적 조성물은 바람직하게는 연고, 크림, 로션, 페이스트, 겔, 스프레이, 에어로졸 또는 오일의 형태를 갖는다. 사용될 수 있는 담체에는 페트롤륨 젤리, 라올린, 폴리에틸렌 글리콜, 알콜, 경피 개선제, 및 이들중 두개 이상의 혼합물이 있다.

<222> 경피 투여하기에 적합한 약제학적 조성물은 투여 대상자의 표피와 장시간 동안 긴밀한 접촉을 유지하도록 고안된 개별 패치로서 존재할 수 있다. 경피 투여하기에 적합한 조성물은 이온이동법(iontophoresis)에 의해 전달될 수 있으며 (*Pharmaceutical Research* 3(6):318 (1986) 참조), 통상적으로는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물의 임의로 버퍼링된 수용액의 형태를 갖는다. 적절한 제제는 시트레이트 또는 비스/트리스 버퍼 (pH 6) 또는 에탄올/물을 포함하며, 0.1 내지 0.2M의 활성 성분을 포함한다.

<223> 이러한 약제학적 조성물을 유효량 투여하여 실제로 환자를 치료하는 골 질환 치료 방법도 제공된다. 골 질환은 바람직하게는 과다한 파골세포성 골 흡수(osteoclastic bone resorption) 및/또는 과칼슘성 혈청 효과(hyercalcemic serum effect)로서 특징지워진다. 본 발명의 방법에 의해 치료 및/또는 예방가능한 골 질환에는 골다공증, 파제트병(Paget's disease), 및 과다칼슘증이 있으나, 이로써 한정되지는 않는다.

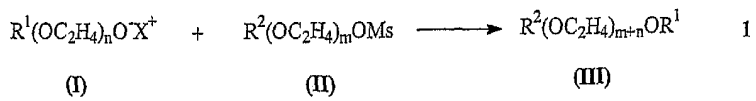
<224> 그의 이용이 본 발명의 범주에 속하는 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 유효량은 혼합물마다, 환자마다 다소 차이가 있을 것이며, 성별, 병세 및 전달 경로 등과 같은 요인에 따라 달라질 것이다. 그러한 용량은 당업자들에게 알려진 통상의 약제학적 방법에 따라서 결정될 수 있다. 일반적으로는, 약 0.1 내지 약 50㎎/㎏의 용량에서 치료 효능을 나타낼 것인데, 모든 중량은 칼시토닌 약물-올리고머 접합체의 혼합물 중량을 기초로 하여 산출된 값이다. 더 높은 농도에서는 독성의 우려 때문에 정맥 투여 용량을 약 10㎎/㎏까지의 낮은 용량으로 제한하는데, 모든 중량은 활성 염기의 중량을 기초로 하여 산출된 값이다. 경구 투여로는 약 10㎎/㎏ 내지 약 50㎎/㎏의 용량이 채택할 수 있다. 통상, 근육내 투여로는 약 0.5㎎/㎏ 내지 약 5㎎/㎏의 용량이 채택할 수 있다. 투여 주기는 통상 하루에 1회, 2회 또는 3회이거나, 증세를 제어할 필요가 있을 때이다. 다르게는, 약물-올리고머 접합체를 연속적으로 주입하여 투여할 수 있다. 치료 기간은 처리되어질 골 질환의 종류에 따라 달라질 것이며, 환자의 수명만큼이다.

<225> 본 발명의 구현예에 따른 접합체 혼합물의 합성 방법도 제공된다. 합성 경로에 대한 하기의 구현예는 단분산성 혼합물의 합성에 대해서만 개시하고 있지만 유사한 합성 경로를 본 발명의 구현예에 따른 다른 칼시토닌 약물-올리고머 접합체 혼합물을 합성하는데 이용할 수 있다.

<226> 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 중합체의 실질적인 단분산성 혼합물을 반응식 1에 도시한다.

반응식 1

<227>



<228> R^1은 H 또는 소수성 부위이다. R^1은 바람직하게는 H, 알킬, 아릴 알킬, 방향족 부위, 지방산 부위, 지방산 부위의 에스테르, 콜레스테릴 또는 아다만틸이다. R^1은 보다 바람직하게는 H, 저급 알킬 또는 방향족 부위이다. R^1은 가장 바람직하게는 H, 메틸 또는 벤질이다.

<229> 식 I에서, n은 1 내지 25이다. 바람직하게는 n은 1 내지 6이다.

<230> X^+는 양이온이다. 바람직하게 X^+은 화합물 중 강염기와 같은 양이온으로서, PEG 상의 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있다. 양이온의 예에는 소듐 이온, 포타슘 이온, 리튬 이온, 세슘 이온 및 탈륨 이온이 포함되나, 이

에 한정되지 않는다.

<231> R^2는 H 또는 소수성 부위이다. 바람직하게, R^2는 직쇄 또는 분지형 알킬, 아릴 알킬, 방향족 부위, 지방산 부위 또는 지방산 부위의 에스테르이다. 더욱 바람직하게, R^2는 저급 알킬, 벤질, 1 - 24개의 탄소 원자를 갖는 지방산 부위 또는 1 - 24 개의 탄소 원자를 갖는 지방산 부위의 에스테르이다. 가장 바람직하게, R^2는 메틸, 1 - 18 개의 탄소 원자를 갖는 지방산 부위 또는 1 - 18 개의 탄소 원자를 갖는 지방산 부위의 에스테르이다.

<232> 상기 화학식 2 중, m은 1 - 25이다. 바람직하게, m은 1 - 6이다.

<233> Ms는 메실레이트 부위이다(즉, $CH_3S(O_2)$-).

<234> 상기 반응식 1에 도시되어 있는 바와 같이, 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이 혼합물의 혼합물을 화학식 2의 구조를 갖는 화합물의 혼합물과 반응시켜, 화학식 3의 구조를 갖고 폴리에틸렌 글리콜 부위를 포함하는 폴리머의 혼합물을 얻는다. 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물의 혼합물은 실질적으로는 단분산성인 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 1의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99% 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖고, 더욱 바람직하게는 화학식 1의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다. 화학식 2의 화합물의 혼합물은 실질적으로는 단분산성인 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 2의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99% 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖고, 더욱 바람직하게는 화학식 2의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다. 화학식 3의 화합물의 혼합물은 실질적으로는 단분산성인 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 3의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99% 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게, 화학식 3의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다.

<235> 상기 반응식 1은 바람직하게는 약 0 - 약 40℃의 온도에서 수행되며, 더욱 바람직하게는 약 15 - 약 35℃에서 수행되며, 가장 바람직하게는 실온(약 25℃)에서 수행된다.

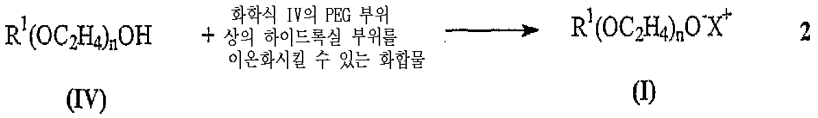
<236> 상기 반응식 1은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 다양한 반응 시간 동안 수행될 수 있다. 반응식 1은 바람직하게는 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 및 약 2, 4 또는 8 시간 동안 수행된다.

<237> 상기 반응식 1은 바람직하게는 비양성자성 용매에서 수행되며, 상기 비양성자성 용매에는 N,N-디메틸아세트아미드(DMA), N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸 술폭사이드(DMSO), 헥사메틸포스포르 트리아미드, 테트라하이드로푸란(THF), 디옥산, 디에틸 에테르, 메틸 t-부틸 에테르(MTBE), 톨루엔, 벤젠, 헥산, 펜탄, N-메틸피롤리디논, 테트라하이드로나프탈렌, 데카하이드로나프텔렌, 1,2-디클로로벤젠, 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논 또는 이의 혼합물이나, 이에 한정되지 않는다. 더욱 바람직하게, 상기 용매는 DMF, DMA 또는 톨루엔이다.

<238> 화학식 1의 화합물과 화학식 2의 화합물의 몰비는 바람직하게는 약 1:1보다 크다. 더욱 바람직하게, 몰비는 약 2:1 이상이다. 화학식 1의 화합물을 초과량으로 제공하여 실질적으로 화학식 2의 모든 화합물을 반응시킴으로써, 이하 설명될 화학식 3의 화합물을 회수할 수 있도록 한다.

<239> 화학식 1의 화합물은 바람직하게는 하기 반응식 2에 도시된 바와 같이 제조된다:

반응식 2

<240>


<241> R^1 및 X^+는 전술한 바와 같고, 화학식 4의 화합물의 혼합물은 실질적으로는 단분산성이며, 바람직하게는 상기 화학식 4의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상의 화합물이 동일한 분자량을 가지며: 더욱 바람직하게는 화학식 4의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다.

<242> 화학식 4의 화합물의 PEG 부위 상의 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있는 다양한 화합물은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있을 것이다. 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있는 화합물은 바람직하게는 강염기이다. 더욱 바람직하게, 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있는 화합물은 소듐 하이드라이드, 포타슘 하이드라이드, 소듐 t-부톡사이드, 포타슘 t-부톡사이드, 부틸 리튬(BuLi) 및 리튬 디이소프로필아민으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게, 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있는 화합물은 소듐

하이드라이드이다.

<243> 화학식 4의 화합물의 PEG 부위 상의 하이드록실 이온을 이온화시킬 수 있는 화합물과 화학식 4의 화합물의 몰비는 바람직하게는 약 1:1 이상이며, 더욱 바람직하게는 약 2:1 이상이다. 하이드록실 부위를 이온화시킬 수 있는 과량의 화합물을 제공하여, 화학식 4의 실질적인 모든 화합물을 반응시킴으로써, 화학식 1의 화합물을 제공한다. 따라서, 화학식 4의 화합물과 화학식 1의 화합물 모두가 반응 생성물 혼합물 중에 존재할 경우 발생할 수 있는 분리상의 곤란함을 피할 수 있다.

<244> 상기 반응식 2는 바람직하게는 약 0℃ - 약 40℃에서 수행되며, 더욱 바람직하게는 약 0℃ - 약 35℃에서 수행되며, 가장 바람직하게는 약 0℃ - 실온(약 25℃)에서 수행된다.

<245> 상기 반응식 2는 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 기간 동안 수행될 수 있다. 상기 반응식 2는 바람직하게는 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 및 약 2, 4 또는 8 시간 동안 수행된다.

<246> 반응식 2는 바람직하게는 비양성자성 용매에서 수행되며, 상기 비양성자성 용매에는 N,N-디메틸아세트아미드(DMA), N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸 술폭사이드(DMSO), 헥사메틸포스포르 트리아미드, 테트라하이드로푸란(THF), 디옥산, 디에틸 에테르, 메틸 t-부틸 에테르(MTBE), 톨루엔, 벤젠, 헥산, 펜탄, N-메틸피롤리디논, 디클로로메탄, 클로로포름, 테트라하이드로나프탈렌, 데카하이드로나프텔렌, 1,2-디클로로벤젠, 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논 또는 이의 혼합물이나, 이에 한정되지 않는다. 더욱 바람직하게, 상기 용매는 DMF, 디클로로메탄 또는 톨루엔이다.

<247> 화학식 2의 화합물은 바람직하게는 다음과 같은 반응식 3에 도시된 바와 같이 제조된다:

반응식 3

<248>

<249> R^2 및 Ms는 전술한 바와 같고, 화학식 5의 화합물은 화학식 5의 화합물의 실질적인 단분산성 혼합물로서 존재하며; 바람직하게는 화학식 5의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖고; 더욱 바람직하게는, 화학식 5의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다.

<250> Q는 할라이드이고, 바람직하게는 클로라이드 또는 플루오라이드이다.

<251> $CH_3S(O_2)Q$는 메탄술포닐 할라이드이다. 메탄술포닐 할라이드는 바람직하게는 메탄술포닐 클로라이드 또는 메탄술포닐 플루오라이드이다. 더욱 바람직하게, 메탄술포닐 할라이드는 메탄술포닐 클로라이드이다.

<252> 메탄 술포닐 할라이드와 화학식 5의 화합물의 몰비는 바람직하게는 약 1:1보다 크고, 더욱 바람직하게는 약 2:1 이상이다. 과량의 메탄 술포닐 할라이드를 제공하여, 화학식 5의 실질적인 모든 화합물을 반응시킴으로써 화학식 2의 화합물을 제공한다. 따라서, 화학식 5의 화합물과 화학식 2의 화합물 모두가 반응 생성물 혼합물에 존재하는 경우 발생할 수 있는 분리상의 곤란함을 피할 수 있다.

<253> 상기 반응식 3은 바람직하게는 약 -10℃ 내지 약 40℃에서 수행되며, 더욱 바람직하게는 약 0℃ 내지 35℃에서 수행되며, 가장 바람직하게는 약 0℃ 내지 실온(약 25℃)에서 수행된다.

<254> 상기 반응식 3은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 시간 동안 수행될 수 있다. 반응식 3은 바람직하게는 약 0.25, 0.5 또는 0.75 시간 및 약 2, 4 및 8 시간동안 수행된다.

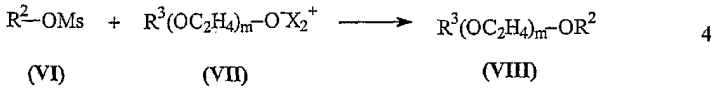
<255> 반응식 3은 바람직하게는 지방족 아민의 존재 하에서 수행되며, 상기 지방족 아민에는 모노메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 모노에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 모노이소프로필아민, 디이소프로필아민, 모노-n-부틸아민, 디-n-부틸아민, 트리-n-부틸아민, 모노사이클로헥실아민, 디사이클로헥실아민 또는 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 더욱 바람직하게, 지방족 아민은 트리에틸아민과 같은 3차 아민이다.

<256> 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 바와 같이, 화학식 5의 화합물의 실질적으로 단분산성인 다양한 혼합물은 입수가능한 것이다. 예를 들어, R^2가 H 또는 메틸인 경우, 화학식 5의 화합물은 각각 PEG 또는 mPEG 화합물이며, 이는 미국, 위스콘신주, Milwaukee 소재 Aldrich 사; 및 스위스 소재 Fluka 사, 및/또는 미

국, 오레곤주, Portland 소재, TCI America 사로부터 입수가능한 것이다.

<257> R^2가 예를 들면 고급 알킬, 지방산, 지방산의 에스테르, 콜레스테릴 또는 아다만틸과 같은 소수성 부위인 경우, 화학식 5의 화합물은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의하여 제공될 수 있다. 화학식 5의 화합물은 바람직하게는 다음과 같이 제공된다:

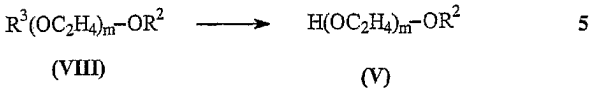
반응식 4



4

<258>

반응식 5



5

<259>

<260> R^2는 소수성 부위이고, 바람직하게는 고급 알킬, 지방산 에스테르, 콜레스테릴 또는 아다만틸이고, 더욱 바람직하게는 지방산의 저급 알킬 에스테르이고 가장 바람직하게는 1 - 18 개의 탄소 원자를 갖는 지방산의 에틸 에스테르이다.

<261> R^3는 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 바와 같이, H, 벤질, 트리틸, 테트라하이드로피란, 또는 알콜 보호기이다.

<262> X_2^+는 X^+와 관련하여 전술한 바와 같은 양이온이다.

<263> m의 값은 전술한 바와 같다.

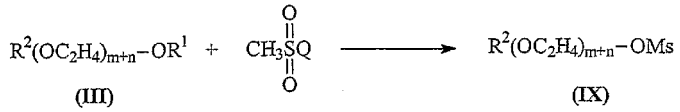
<264> 상기 반응식 4에 따라, 화학식 6의 화합물의 혼합물을 전술한 바와 같은 상기 반응식 1과 관련된 반응 조건과 유사한 반응 조건 하에서 화학식 7의 화합물의 혼합물과 반응시킨다. 화학식 6의 화합물의 혼합물은 실질적으로 단분산성인 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 6의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게, 화학식 6의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다. 화학식 7의 화합물의 혼합물은 실질적으로 단분산성 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 7의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상의 화합물이 동일한 분자량을 갖는다. 더욱 바람직하게, 화학식 7의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다.

<265> 상기 반응식 5에 따라, 화학식 8의 화합물은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 다양한 방법에 의하여 가수분해되어 R^3 부위가 알콜로 전환될 수 있다. R3가 벤질 또는 트리틸인 경우, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 바와 같이 바람직하게는 팔라듐-차콜(charcoal) 촉매의 존재 하에서 H2를 이용하여 가수분해된다. 물론, R3가 H인 경우, 상기 반응식 5는 불필요한 것이다.

<266> 화학식 6의 화합물은 상기 반응식 3과 관련하여 전술된 바와 같이 제공되거나 또는 입수가능한 것이다. 화학식 7의 화합물은 상기 반응식 2와 관련하여 전술된 바와 같이 제공될 수 있다.

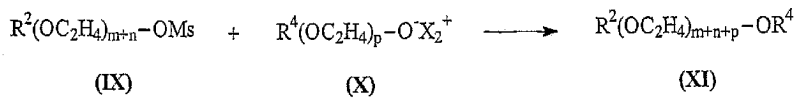
<267> PEG 부위를 포함하며 화학식 3의 구조를 갖는 폴리머의 실질적으로 단분산성인 혼합물을 상기 PEG 사슬을 신장시키기 위하여, PEG 부위를 포함하는 실질적으로 단분산성인 폴리머와 더 반응시킬 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 반응식이 사용될 수 있다:

반응식 6



<268>

반응식 7



(IX) (X) (XI)

<269>

<270> Ms, m 및 n은 상기 반응식 1과 관련하여 전술된 바와 같고; p는 n과 같으며, m 및 X_2^+는 상기 반응식 1과 관련하여 전술된 바와 같다. Q는 상기 반응식 3과 관련하여 전술된 바와 같다. R^2는 상기 반응식 1과 관련하여 전술된 바와 같고, 바람직하게는 저급 알킬이다. R^1은 H이다. 반응식 6은 바람직하게는 상기 반응식 3과 관련하여 전술된 바와 유사한 방법으로 수행된다. 반응식 7은 바람직하게는 상기 반응식 1과 관련하여 전술된 바와 동일한 방법으로 수행된다. 바람직하게, 화학식 3의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 또는 99 % 이상의 화합물이 동일한 분자량을 가지며, 보다 바람직하게 화학식 3의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다. 화학식 10의 화합물의 혼합물은 실질적으로 단분산성 혼합물이다. 바람직하게, 화학식 X의 화합물의 혼합물 중 약 96, 97, 98 및 99 % 이상의 화합물은 동일한 분자량을 가지며, 보다 바람직하게 화학식 X의 화합물의 혼합물은 단분산성 혼합물이다.

<271> 본 발명의 구현예에 따른 방법은 도 1에 도시된 반응식으로 설명되며, 이에 대하여 이하 설명한다. 실질적으로 단분산성인 폴리에틸렌 글리콜-함유 올리고머의 합성은 실질적으로 단분산성인 폴리에티렌 글리콜의 모노벤질 에테르 1의 제조부터 시작한다. 상업적으로 입수가능한 과량의 단분산성 폴리에틸렌 글리콜을 Coudert 등의 (*Synthetic Communications*, 16(1): 19-26(1986))에 기재된 바와 같이, 수성 소듐 하이드록사이드의 존재 하에서 벤질 클로라이드과 반응시킨다. 이후, NaH를 첨가하여 화합물 1의 소듐 염을 제조하고, 상기 소듐 염을 하이드록시알칼산 2의 에스테르로부터 합성된 메실레이트와 반응시킨다. 메실레이트의 치환 생성물 3을 촉매에 의한 수소화를 통하여 디벤질화시켜(debenzylated) 알콜 4을 얻는다. 메탄술포닐 클로라이드를 첨가하여 상기 알콜의 메실레이트 5를 제조할 수 있으며, 이를 실질적으로 단분산성인 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 모노메틸 에테르의 소듐 염과의 반응에서 친전자성(electrophil)로서 사용되어, 올리고머의 폴리에틸렌 글리콜 부분을 바람직한 길이로 확장시킴으로써, 신장된 에스테르 6을 얻는다. 에스테르는 산 7으로 수성 염기에서 가수분해될 수 있으며, 카르보디이미드와 N-하이드록시숙신이미드를 반응시킴으로써 활성화된 에스테르 8로 전환될 수 있다. 도 1에서 설명된 올리고머가 N-하이드록시숙신이미드를 이용하여 활성화되지만, 다른 다수의 시약이 본 발명의 올리고머를 활성화시키는데 사용될 수 있으며, 이러한 시약에는 파라-니트로페닐 클로로포르메이트, 페닐 클로로포르메이트, 3,4-페닐디클로로포르메이트 및 3,4-페닐디클로로포르메이트와 같은 활성 페닐 클로로포르메이트; 트레실레이션(tresylation); 및 아세탈 형성(acetal formation)이 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

<272> 도 1에 있어서, q는 1 - 24이다. 바람직하게, q는 1 - 18이고, q는 4 - 16이 보다 바람직하다. R^4는 가수분해를 수행하여 카로복실산을 제공할 수 있는 부위이다. R^4는 바람직하게는 저급 알킬이고 더욱 바람직하게는 에틸이다. 변수 n 및 m은 상기 반응식 1과 관련하여 전술한 바와 같다.

<273> 본원에 기재된 공정에 사용된 모든 출발 물질은 상업적으로 시판되는 것이거나 시판되고 있는 출발 물질을 이용하여 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 방법으로 제고될 수 있는 것이다.

<274> 이하 다음과 같은 실시예를 참고하여 본 발명을 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 태양을 설명하고자 하는 것이지 청구범위에 의하여 한정되는 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것이 아님을 알 수 있다.

실 시 예

<293> 실시예 1 - 10

<294> 다른 언급이 없는 한, 실시예 1 - 10의 반응을 자기 교반(magnetic stirring)하면서 질소 존재 하에서 수행하였다. "워크-업(work-up)"이란 용어는 유기 용매로 추출한 후, 포화 NaCl 용액으로 유기 상을 세척한 다음 건조($MgSO_4$ 이용)시키고, 증발(회전 증발기 이용)시키는 과정을 표시한 것이다. 박층 크로마토크래피법(thin layer chromatography)을 60 - 254 °F의 실리카 겔로 미리 코팅시킨 Merck 유리 플레이트에서 수행하고, 스팟(spot)을 요오드 증기를 이용하여 시각화하였다(visualize). Macromolecular Resources Colorado State University에서 모든 질량 스펙트럼은 측정되었으며, CO는 m/z(상대적인 강도) 단위로 조사하였다. 원소 분석 및 융점 측정은 미국, 테네시주, Knoxville, Galbraith Laboratories, Inc.사에서 수행하였다. 실시예 1 - 10은 도 2에

서 설명된 반응식을 참조한다.

<295> 실시예 1

<296> 8-메톡시-1-(메틸술포닐)옥시-3,6-디옥사옥탄(9)

<297> 건조 디클로로메탄(50mL) 중 비-다분산성 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 분자(4.00 mL, 4,19 g, 25.5 mmol)와 트리에틸아민(4.26 mL, 3.09 g, 30.6 mmol)의 용액을 아이스 배쓰에서 냉각시키고 질소 분위기 하에 두었다. 건조 디클로로메탄(20mL) 중 메탄술포닐 클로라이드(2.37mL, 3.51g, 30.6mmol)용액을 다른 깔때기를 이용하여 적가하였다. 상기 클로라이드의 첨가를 완결하고 10 분 후, 반응 혼합물로부터 아이스 배쓰를 분리하고 실온이 되도록 하였다. 상기 혼합물을 1 시간 더 교반한 후 TLC(용리액으로서 15%의 MeOH를 포함하는 $CHCl_3$를 사용함)를 수행하였더니, 잔류 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 검출되지 않았다.

<298> 반응 혼합물을 75mL의 디클로로메탄으로 희석시킨 다음, 포화 $NaHCO_3$, 물 및 브라인으로 차례로 세척하였다. 유기물을 Na_2SO_4로 건조시킨 다음, 진공 하에서 여과농축하여, 화학식 9의 비-다분산성 혼합물을 투명 오일(5.31g, 86%의 수율)로서 얻었다.

<299> 실시예 2

<300> 에틸렌 글리콜 모노 메틸 에테르(10)(m=4,5,6)

<301> N_2 하의 건조 DMF(25.7mL) 중 교반된 비-다분산성 화합물 11(35.7 mmol)의 용액에 미네랄 오일 중 NaH의 60% 분산액을 일부 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 그 결과 얻은 염 12에 건조 DMF(4ml) 중 비-다분산성 메실레이트 9(23.36) 용액을 싱글 포션으로 첨가하고, 상기 혼합물을 실온에서 3.5 시간동안 교반하였다. 반응 과정을 TLC(12% CH_3OH-CHCl)로 모니터링하였다. 반응 혼합물을 동량의 1N HCl로 희석시킨 다음, 에틸 아세테이트(2×20ml)로 추출하고 버렸다. 수용액을 추출한 다음 워크-업하여, 비-다분산성 폴리머 10(82 - 84%의 수율)을 얻었다.

<302> 실시예 3

<303> 3,6,9,12,15,18,21-헵타옥사도코산올(10)(m=4)

<304> 오일; Rf 0.46 (메탄올:클로로포름=3:22); $C_{15}H_{32}O_8$ 340.21(M++1)에 대하여 산출된 MS m/z은 341.2임.

<305> 실시예 4

<306> 3,6,9,12,15,18,21,24-헵타옥사펜타코산올(10)(m=5)

<307> 오일; Rf 0.43 (메탄올:클로로포름=6:10); $C_{17}H_{36}O_9$ 384.24(M++1)에 대하여 산출된 MS m/z은 385.3임.

<308> 실시예 5

<309> 3,6,9,12,15,18,21,24,27-노나옥사옥타코산올(10)(m=6)

<310> 오일; Rf 0.42 (메탄올:클로로포름=6:10); $C_{19}H_{40}O_{10}$ 428.26(M++1)에 대하여 산출된 MS m/z은 429.3임.

<311> 실시예 6

<312> 20-메톡시-1-(메틸술포닐)옥시-3,6,9,12,15,18-헥사옥사에이코산(14)

<313> 비-다분산성 화합물 14를 알콜 13(m=4)과 화합물 9에 대하여 기재된 메탄술포닐 클로라이드로부터 정량적 수율로 얻었는데, 상기 알콜은 Rf 0.4(에틸 아세테이트:아세토니트릴=1:5); $C_{17}H_{37}O_{10}$ 433.21(M^++1)에 대하여 산출한 MS m/z는 433.469였다.

<314> 실시예 7

<315> 에틸렌 글리콜 모노 메틸 에테르(15)(m=3,4,5)

<316> 비-다분산성 화합물 15를 화합물 10에 대하여 전술한 바와 같은 과정을 이용하여 디올로부터 제조하였다.

<317> 실시예 8

<318> 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사헤네이코산올(15)(m=3)

<319> 오일; Rf 0.41 (메탄올:클로로포름=6:10); $C_{21}H_{44}O_{11}$ 472.29(M^+ +1)에 대하여 산출된 MS m/z은 472.29임.

<320> 실시예 9

<321> 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-우네카옥사테트라트리코산올(15)(m=4)

<322> 오일; Rf 0.41 (메탄올:클로로포름=6:10); $C_{23}H_{48}O_{12}$ 516.31(M^+ +1)에 대하여 산출된 MS m/z은 516.31임.

<323> 실시예 10

<324> 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-도데카옥사테헵타트리코산올(15)(m=5)

<325> 오일; Rf 0.41 (메탄올:클로로포름=6:10); $C_{25}H_{52}O_{13}$ 560.67(M^+ +1)에 대하여 산출된 MS m/z은 560.67임.

<326> 실시예 11 - 18은 도 3에 설명된 반응식을 참고한다.

<327> 실시예 11

<328> 헥사에틸렌 글리콜 모노벤질 에테르(16)

<329> 4ml의 물에 3.99g(100mmol)의 NaOH를 용해시켜 제조된 소듐 하이드록사이드 수용액을 비-다분산성 헥사에틸렌 글리콜(28.175g, 25ml, 100mmol)에 천천히 첨가하였다. 벤질 클로라이드(3.9g, 30.8mmol, 3.54ml)를 첨가하고 상기 반응 혼합물을 18시간 동안 교반하면서 100℃까지 가열하였다. 이 후, 반응 혼합물을 냉각시킨 다음, 브라인(250ml)로 희석시키고 메틸렌 클로라이드(200ml×2)로 추출하였다. 회수한 유기층을 브라인으로 1회 세척한 다음, Na_2SO_4로 건조시키고, 진공 하에서 여과 및 농축시켜, 짙은 갈색 오일을 얻었다. 조 생성 혼합물을 새 크로마토그래피(실리카 겔, 기울기 용출액:에틸 아세테이트 9/1 에틸 아세테이트/메탄올)를 통하여 정제하여, 8.099g(70%)의 비-다분산성 화합물 16을 황색 오일로 얻었다.

<330> 실시예 12

<331> 에틸 6-메틸술포닐옥시헥사노에이트(17)

<332> 건조 디클로로메탄(75ml) 중의 비-다분산성 에틸 6-하이드록시헥사노에이트 (50.76g, 50.41g, 227mmol) 용액을 아이스 배쓰에서 냉각시키고 질소 분위기 하에 두었다. 트리에틸아민(34.43ml, 24.99g, 247mmol)을 첨가하였다. 건조 디클로로메탄(75ml) 중 메탄술포닐 클로라이드(19.15ml, 28.3g, 247mmol)용액을 다른 깔때기를 이용하여 적가하였다. 상기 혼합물을 3.5 시간 동안 교반한 다음, 아이스 배쓰를 녹이면서 천천히 실온이 되게 하였다. 혼합물을 실리카 겔을 통하여 여과한 다음, 여과물을 물, 포화 $NaHCO_3$, 물 및 브라인으로 차례로 세척하였다. 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 하에서 여과 및 농축시켜, 옅은 황색 오일을 얻었다. 조 생성물을 새 크로마토크래피(실리카 겔, 1/1 헥산/에틸 아세테이트)로 최종 정제하여 비-다분산성 생성물(46.13g, 85%의 수율)을 무색의 투명한 오일로서 얻었다. FAB MS: m/e 239 (M+H), 193(M-C_2H_5O).

<333> 실시예 13

<334> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-벤질옥시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(18)

<335> 소듐 하이드라이드(3.225g 또는 60% 오일 분산액, 80.6mmol)을 80ml의 무수 톨로엔 중에 현탁시키고, 질소 분위기 하에 둔 다음 아이스 배쓰에서 냉각시켰다. 80ml의 건조 톨루엔 중 비-다분산성 알콜 16(27.3g, 73.3mmol)의 용액을 NaH 현탁액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, 실온이 되도록 한 다음 5시간 더 교반하였더니 상기 혼합물은 투명한 갈색 용액이 되었다. 80ml의 건조 톨루엔 중 비-다분산성 메실레이트 17(19.21g, 80.6mmol)를 NaH/알콜 혼합물에 첨가하여, 회수한 용액을 실온에서 3일 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 50ml 메탄올로 급냉시킨 다음 염기성 알루미나를 이용하여 여과하였다. 여과물을 진공 하에서 농축시킨 다음 새 크로마토크래피(실리카 겔, 기울기 용출액: 에틸 아세테이트로 3/1 에틸 아세테이트/헥산)로 정제하여 비-다분산성 생성물을 옅은 황색 오일로서 얻었다(16.52g, 44%의 수율). FAB MS: *m/e* 515(M+H),

<336> 실시예 14

<337> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(19)

<338> 비-다분산성 벤질 에테르 18(1.03g, 2.0mmol)을 25ml의 에탄올에 용해시켰다. 상기 용액에 270mg의 10% Pd/C를 첨가한 다음, 이 혼합물을 수소 분위기 하에 두고 4 시간 동안 교반하였더니, TLC 결과 출발 물질은 전혀 검출되지 않았다. 반응 혼합물을 Celite 545를 이용하여 여과하여 촉매를 분리하고, 여과물을 진공 하에서 농축시켜 비-다분산성 표제 화합물을 투명한 오일로서 얻었다(0.67g, 79%). FAB MS: m/e 425(M+H), 447(M+Na).

<339> 실시예 15

<340> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메틸술포닐에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(20)

<341> 비-다분산성 알콜 19(0.835g, 1.97mmol)를 3.5ml의 건조 디클로로메탄에 용해시키고 질소 분위기 하에 두었다. 트리에틸아민(0.301ml, 0.219g, 2.16mmol)을 첨가하고, 이 혼합물을 아이스 배쓰에서 냉각시켰다. 2 분 후, 메탄술포닐 클로라이드(0.16ml, 0.248g, 2.16mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 15분 동안 교반한 다음, 2 시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 실리카 겔을 이용하여 여과하여 트리에틸암모늄 클로라이드를 분리하고, 여과물을 물, 포화 $NaHCO_3$, 물 및 브라인으로 차례대로 세척하였다. 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 다음 진공 하에서 여과 및 농축시켰다. 잔기를 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 9/1 에틸 아세테이트/메탄올)를 이용하여 정제하여 비-다분산성 화합물 20을 투명한 오일(0.891g, 83%의 수율)로서 얻었다. FAB MS: *m/e* 503 (M+H)

<342> 실시예 16

<343> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 에틸 에스테르(21)

<344> N_2 하에서 무수 톨루엔(3ml)에 NaH(오일 중 60% 분산액 88mg, 2.2mmol)을 현탁시키고 0℃까지 냉각시켰다. 톨루엔과의 공비 증류를 통하여 건조된 비-다분산성 디에틸렌 글리콜 모노에틸렌 에테르(0.26ml, 0.26g, 2.2mol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 가온시킨 다음, 4 시간 동안 교반하였더니, 탁한 회색 현탁액이 투명한 황색이 된 다음 갈색이 되었다. 2.5ml의 건조 톨루엔 중 메실레이트 20(0.50g, 1.0mmol)을 첨가하였다. 실온에서 밤새도록 교반한 다음, 상기 반응물을 2ml의 메탄올을 첨가함으로써 급냉시키고 이로부터 생성된 용액을 실리카 겔을 이용하여 여과하였다. 여과물을 진공 하에서 농축시켰더니, FAB MS: m/e 499(M+H), 521(M+Na). 프리퍼레이토리 크로마토그래피(preparatory chromatography:실리카 겔, 19/3 클로로포름/메탄올)로 추가로 정제하여 비-다분산성 생성물을 투명한 황색 오일(0.302g, 57%의 수율)로서 얻었다. FAB MS: *m/e* 527 (M+H), 549(M+Na).

<345> 실시예 17

<346> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산(22)

<347> 비-다분산성 에스테르 21(0.25g,0.46mmol)을 0.71ml의 1N NaOH에서 18시간 동안 교반하였다. 18 시간 후, 혼합물을 진공 하에서 농축시켜 알콜을 제거하고 잔기를 10 ml의 물에 더 용해시켰다. 상기 수용액을 2 N HCl을 이용하여 pH 2로 산성화시키고 그 생성물을 디클로로메탄(30ml×2)로 추출하였다. 회수된 유기물을 이후 브라인(25ml×2)로 세척한 다음 Na2SO4로 건조시키고, 진공 하에서 여과 및 농축시켜, 비-다분산성의 표제 화합물을 황색 오일(0.47g, 62%의 수율)로서 얻었다. FAB MS: *m/e* 499(M+H), 521(M+Na).

<348> 실시예 18

<349> 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-메톡시에톡시)에톡시]에톡시}-에톡시)-에톡시]-에톡시}-헥산산 2,5-디옥소-피롤리딘-1-일 에스테르(23)

<350> 비-다분산성 산 22(0.209g, 0.42mmol)을 4ml의 건조 디클로로메탄에 용해시키고, N_2 분위기 하 NHS(N-하이드록시숙신이미드)(57.8mg, 0.502mmol) 및 EDC(1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드)(98.0mg, 0.502mmol)이 함유되어 있는 건조 플라스크에 첨가하였다. 용액을 실온에서 밤새도록 교반하고, 실리카 겔을 통하여 여과하여 과량의 시약 및 EDC로부터 형성된 우레아를 제거하였다. 여과물을 진공 하에서 농축시켜 비-다분산성 생성물을 짙은 황색 오일(0.235g, 94%의 수율)로서 얻었다. FAB MS: *m/e* 596(M+H), 618(M+Na).

<351> 실시예 19 - 24는 도 4에 설명된 반응식을 참조한다.

<352> 실시예 19

<353> 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르의 메실레이트(24)

<354> 아이스 배쓰에서 0℃로 냉각된 CH_2Cl_2(100mL)용액에 비-다분산성 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(25g, 0.15mol)을 첨가하였다. 이후, 트리에틸아민 (29.5mL, 0.22mol)을 첨가하고 이 용액을 15분동안 0℃에서 교반한 다음, 메탄술포닐 클로라이드(13.8mL, 0.18mol, 20mL의 CH_2Cl_2에 용해되어 있음)를 적가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 0℃에서 교반한 다음 실온으로 가온시킨 후, 2 시간 동안 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2 ~200mL로 세척하였음)를 이용하여 여과한 다음, H_2O(300mL), 5% $NaHCO_3$(300mL), H_2O(300mL), 포화 NaCl(300mL)로 세척하고, $MgSO_4$ 로 건조시키고 건조를 위하여 증발시켰다. 오일을 진공 하에 약 2 시간 동안 두어 완전히 건조시켜 비-다분산성의 표제 화합물을 황색 오일로서 얻었다(29.15g, 80%의 수율).

<355> 실시예 20

<356> 헵타에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르(25)

<357> THF(1L) 중 비-다분산성 테트라에틸렌 글리콜(51.5g, 0.27mol) 용액에 포타슘 t-부톡사이드(14.8g, 0.13mol, ~30분 이상 동안 조금씩 첨가)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반한 다음 THF(90mL) 중 용해된 화합물 24(29.15g, 0.12mol)를 적가하고, 반응 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH2Cl2, ~200mL)를 이용하여 여과한 다음 증발시켜 건조시켰다. 이 후, 오일을 HCl(250mL, 1N)에 용해시키고 에틸 아세테이트(250mL)로 세척하여 과량의 화합물 24를 제거하였다. 에틸 아세테이트(125mL)로 더 세척하여 잔류 화합물 24를 제거할 수 있다. 수성 상을 CH_2Cl_2(125mL의 부피)로 반복하여 세척하여, 화합물 25의 대부분을 상기 수성 상으로부터 분리하였다. 제1 추출물은 화합물 24, 25를 포함할 것이고, 부산물과 탈결합(dicoupled)할 것이므로, 다시 HCl(125mL, 1N)로 다시 추출하여야 한다. 유기층을 수거 및 증발시켜 건조시켰다. 이로부터 생성된 오일을 CH_2Cl_2(100mL)에 용해시키고 H_2O(50mL 부피임)로 반복적으로 세척하여, 화합물 25를 제거하였다. 수성 부분(fraction)을 수거하였더니 총 부피는 500mL였으며, 용액이 탁하게 될 때까지 NaCl을 첨가한 다음 CH_2Cl_2(2×500mL)로 세척하였다. 유기층을 회수하여, $MgSO_4$로 건조시키고, 증발시켜 더 건조시켜, 비-다분산성의 표제 화합물을 오일(16.9g, 41% 수율)로서 얻었다. 고순도를 얻기 위하여 하나 이상의 정제 단계를 반복하는 것이 바람직하다.

<358> 실시예 21

<359> 8-브로모옥토아네이트(26)

<360> 에탄올(100mL) 중 8-브로모옥탄산(5.0g, 22mmol)의 용액에 H_2SO_4(0.36mL, 7.5mmol)을 첨가하고 상기 반응 혼합물을 3 시간 동안 교반하면서 환류 가열하였다. 조 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, H2O(100mL), 포화 $NaHCO_3$(2×100mL), H_2O(100mL)로 세척한 다음, 증발시켜 건조시켜, 투명한 오일(5.5g, 98%의 수율)을 얻었다.

<361> 실시예 22

<362> MPEG7-C8 에스테르의 합성(27)

<363> 에테르(90mL) 중 비-다분산성 화합물 25(3.0g, 8.8mmol)의 용액에 포타슘 t-부톡사이드(1.2g, 9.6mmo)을 첨가하고, 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 에테르(10mL) 중 용해된 비-다분산성 화합물 26(2.4g, 9.6mmo)을 적가하고, 반응 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, ~200mL로 세척함)를 이용하여 여과한 다음 증발시켜 건조시켰다. 이로부터 생성된 오일을 에틸 아세테이트에 용해시키고 H_2O(2×200mL)로 세척한 다음, $MgSO_4$로 건조시킨 다음 증발시켜 건조시켰다. 컬럼 크로마토그래피(Silica, 에틸 아세테이트에서 에틸 아세테이트/메탄올, 10:1)를 수행하여 비-다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(0.843g, 19%의 수율)로 얻었다.

<364> 실시예 23

<365> MPEG7-C8 산(28)

<366> 비-다분산성 화합물 27(0.70g, 1.4mmol)의 오일에 1N NaOH(2.0mL)을 첨가하고 상기 반응 혼합물을 4 시간 동안

교반하였다. 조 반응 혼합물을 농축시킨 다음 산성화(pH~2)시키고, NaCl로 포화시킨 다음 CH_2Cl_2(2×50mL)로 세척하였다. 유기층을 수거하여, 포화 NaCl로 세척한 다음 $MgSO_4$로 건조시킨 다음 증발 및 건조시켜 비-다분산성인 표제 화합물을 투명한 오일(0.35g, 53%의 수율)로서 얻었다.

<367> 실시예 24

<368> MPEG7-C8 산의 활성화(29)

<369> 비-다분산성 MPEF7-C8-산 28(0.31g, 0.64mmo)을 3ml의 무수 메틸렌 클로라이드에 용해시킨 다음 무수 메틸렌 클로라이드 중 N-하이드로시숙신이미드(0.079g, 0.69mmo) 및 EDCI·HCl(135.6mg, 0.71mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 몇 시간 동안 교반한 다음 1N HCl, 물로 세척하고, $MgSO_4$ 상에서 건조시킨 다음 여과 및 농축시켰다. 조 물질을 컬럼 크로마토그래피로 정제한 다음 농축시켜, 비-다분산성인 표제 화합물을 투명한 오일로서 얻었으며, 이를 진공 하에서 건조시켰다.

<370> 실시예 25 - 29는 도 5에 설명된 반응식을 참조한다.

<371> 실시예 25

<372> 10-하이드록시데카노에이트(30)

<373> 에탄올(100mL) 중 비-다분산성 10-하이드록시데카논산(5.0g, 26.5mmo)의 용액을 H_2SO_4(0.43mL, 8.8mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 3 시간 동안 교반하면서 환류 가열하였다. 조 반응 생성물을 실온으로 냉각시키고 H_2O(100mL), 포화 $NaHCO_3$(2×100mL), H_2O(100mL)로 세척하고 $MgSO_4$로 건조시킨 다음 증발 및 건조시켜, 비-다분산성인 표제 화합물을 투명한 오일(6.9g, 98%의 수율)로서 얻었다.

<374> 실시예 26

<375> 10-하이드록시데카노에이트의 메실레이트(31)

<376> CH_2Cl_2(27mL)의 용액에 비-다분산성 10-하이드록시데카노에이트 30(5.6g, 26mmol)을 첨가하고 아이스 배쓰에서 0℃까지 냉각시켰다. 이 후, 트리에틸아민(5mL, 37mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 15분 동안 0℃에서 교반하였다. 이 후, CH_2Cl_2에 용해된 메탄술포닐 클로라이드(2.7mL, 24mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, 아이스 배쓰를 제거한 다음 반응 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 더 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, 80mL로 세척하였음)를 이용하여 여과하고 여과물을 H_2O(100mL), 5% $NaHCO_3$(2×100mL), H_2O(100mL), 포화 NaCl(100mL)로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시킨 다음, 증발건조시켜 비-다분산성인 표제 화합물을 황색 오일로서 얻었다(7.42g, 97%의 수율).

<377> 실시예 27

<378> MPEG7-C10 에스테르(32)

<379> 테트라하이드로푸란(100mL) 중 비-다분산성 헵타에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르 25(2.5g, 7.3mmo)의 용액을 소듐 하이드라이드(0.194g, 8.1mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 테트라하이드로푸란(10mL)에 용해된 비-다분산성 10-하이드록시데카노에이트 31(2.4g, 8.1mmol)의 메실레이트를 적가하고, 반응 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2~200mL)를 이용하여 여과하고 증발건조시켰다. 이로부터 생성된 오일을 에틸 아세테이트에 용해시키고 H_2O(2×200mL)로 세척한 다음, $MgSO_4$로 탈수시키고, 증발건조시킨 다음 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트/메탄올, 10:1)를 수행하고 다시 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트)를 수행하여, 비-다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(0.570g, 15%의 수율)로 얻었다.

<380> 실시예 28

<381> MPEG7-C10 산(33)

<382> 비-다분산성 MPEG7-C10 에스테르 32(0.570g, 1.1mmol)을 1N NaOH(1.6mL)에 첨가하고 반응 혼합물을 밤새도록 교반하였다. 조 반응 혼합물을 농축시키고, 산성화(pH~2)시킨 다음 NaCl로 포화시키고, $MgSO_4$로 탈수시킨 후 증발건조시켜, 비-다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(0.340g, 62%의 수율)로 얻었다.

<383> 실시예 29

<384> MPEG7-C10 산의 활성화(34)

<385> 비-다분산성 산 33을 실시예 24에 기재된 방법과 유사한 방법을 이용하여 활성화시켰다.

<386> 실시예 30 - 31은 도 6에 기재된 반응식을 참조한다.

<387> 실시예 30

<388> C18(PEG6) 올리고머의 합성(36)

<389> 비-다분산성 스테아로일 클로라이드 35(0.7g, 2.31mmo)을 벤젠 중 PEG6(5g, 17.7mmo) 및 피리딘(0.97g, 12.4mmo)의 혼합물에 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 몇(~5) 시간 동안 교반하였다. 반응물에 대하여 현상 용매로서 에틸아세테이트/메탄오을 사용하는 TLC를 실시하였다. 이 후, 반응 혼합물을 물로 세척하고, $MgSO_4$ 상에서 탈수시킨 다음 진공 하에서 농축 및 건조시켰다. 정제된 비-다분산성 화합물 36을 분석하였더니, FABMS:m/e 549/M+H였다.

<390> 실시예 31

<391> C18(PEG6) 올리고머의 활성

<392> 비-다분산성 C18(PEG6)올리고머를 하기 2 단계로서 활성화시켰다:

<393> 1) 비-다분산성 스테아로일-PEG6 36(0.8g, 1.46mmo)을 톨루엔에 용해시키고, 포스겐 용액(10ml, 톨루엔 중 20%)에 첨가한 다음 아이스 배쓰로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 0℃에서 교반한 다음 3 시간 동안 실온에서 교반하였다. 이 후, 포스겐 및 톨루엔을 증류시키고 잔류 비-다분산성 스테아로일 PEG6 클로로포르메이트 37을 P205에서 밤새도록 건조시켰다.

<394> 2) 무수 메틸렌 클로라이드 중 비-다분산성 스테아로일 PEG6 클로로포름 36(0.78g, 1.27mmo) 및 TEA(128mg, 1.27mmo)용액에 메틸렌 클로라이드 중 N-하이드록시 숙신이미드(NHS) 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 16 시간 동안 교반한 다음, 물로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시킨 다음 진공 하에서 여과, 농축 및 건조시켜, 비-다분산성인 활성 C18(PEG6)올리고머 38를 얻었다.

<395> 실시예 32 - 37은 도 7에 설명된 반응식을 참조한다.

<396> 실시예 32

<397> 테트라에틸렌 글리콜 모노벤질에테르(39)

<398> 비-다분산성 테트라에틸렌 글리콜(19.4g, 0.10mol)의 오일을 NaOH(4.0mL 중 4.0g)용액을 첨가하고 반응물을 15분 동안 교반하였다. 이후 벤질 클로라이드(3.54g, 30.8mmol)를 첨가하고, 밤새도록 교반하면서 반응 혼합물을 100℃까지 가열하였다. 반응 혼합물을 실온까지 냉각시키고, 포화 NaCl(250mL)로 희석시키고 CH_2Cl_2(2×200mL)로 세척하였다. 유기층을 회수하고 포화 NaCl로 세척한 다음, $MgSO_4$로 탈수하고 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트)를 실시하여, 비-다분산성인 표제 화합물을 황색 오일(6.21g, 71%의 수율)로서 얻었다.

<399> 실시예 33

<400> 테트라아세틸렌 글리콜 모노벤질에테르의 메실레이트(40)

<401> CH_2Cl_2(20mL) 용액에 비-다분산성 테트라에틸렌 글리콜 모노벤질에테르 39(6.21g, 22mmol)을 첨가하고 아이스 배쓰에서 0℃까지 냉각시켰다. 이 후, 트리에틸아민(3.2mL, 24mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 15분 동안 0℃에서 교반하였다. 이 후, CH_2Cl_2(2mL)에 용해된 메탄술포닐 클로라이드(1.7mL, 24mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 30분 동안 0℃에서 교반한 다음, 아이스 배쓰를 분리하고 반응물을 실온에서 2 시간 더 교반하였다. 조반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, 80mL로 세척하였음)를 이용하여 여과하고, 여과물을 H_2O(100mL), 5%의 $NaHCO_3$(2×100mL), H_2O(100mL), 포화 NaCl(100mL)로 세척하고 $MgSO_4$로 탈수하였다. 이로부터 생성된 황색 오일에 대하여 활성탄(10g)을 포함하는 실리카 패드 상에서 크로마토그래피를 실시하여, 비-다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(7.10g, 89%의 수율)로서 얻었다.

<402> 실시예 34

<403> 옥타에틸렌 글리콜 모노벤질에테르(41)

<404> 소듐 하이드라이드(0.43g, 18mmol)를 함유하는 테트라하이드로푸란(140mL)의 용액에 테트라하이드로푸란(10mL) 중 비-다분산성 테트라에틸렌 글리콜(3.5g, 18mmol)용액을 적가하고, 이 반응 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 이 후, 테트라하이드로푸란(10mL)에 용해된 비-다분산성 테트라에틸렌 글리콜 모노벤질에테르 40(6.0g, 16.5mmol)의 메실레이트를 적가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 조 반응 혼합물을 Celite(CH_2Cl_2, 250mL로 세척됨)를 이용하여 여과하고, 여과물을 H2O로 세척한 다음, $MgSO_4$로 탈수시킨 후 증발 건조시켰다. 그 결과 생성된 오일에 크로마토그래피(실리카, 에틸 아세테이트/메탄올 10:1)를 실시하고 다른 크로마토그래피(실리카, 클로로포름/메탄올, 25:1)를 또 실시하여 비-다분산성인 표제 화합물을 투명 오일(2.62g, 34%의 수율)로 얻었다.

<405> 실시예 35

<406> 스테아레이트 PEG8-벤질(43)의 합성

<407> 비-다분산성 옥타에틸렌 글리콜 모노벤질에테르 41(0.998g, 2.07mmol) 및 피리딘(163.9mg, 2.07mmol)의 교반시킨 냉각 용액에 벤젠 중 비-다분산성 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 진공 하에서 농축 및 건조시켰다. 이 후, 10% 메탄올/90% 클로로포름을 이용하여 조 생성물에 대하여 플래쉬 실리카 겔 컬럼 상에서 크로마토그래피를 실시하였다. 생성물을 포함하는 부분을 회수하여 진공 하에서 농축 및 건조시켜 비-다분산성인 표제 화합물을 얻었다.

<408> 실시예 36

<409> 스테아레이트-PEG8-벤질의 가수분해

<410> 비-다분산성 스테아레이트-PEG8-벤질 43(0.854g, 1.138mmol)의 메탄올 용액에 Pd/C(10%)(팔라듐, 활성탄 상 10 중량%임)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새(18시간) 수소 하에서 교반하였다. 이 후, 상기 용액을 여과 및 농축시키고, 10% 메탄올/90% 클로로포름을 이용하여 플래쉬 실리카 겔 컬럼 상에서 크로마토그래피를 수행하여, Rt=0.6인 부분(fraction)을 회수하여 농축 및 건조시켜, 비-다분산성 산 44를 얻었다.

<411> 실시예 37

<412> C18(PEG8)올리고머의 활성화

<413> 비-다분산성 스테아레이트-PEG8 올리고머의 2 단계 활성화를 상기 실시예 31의 스테아레이트-PEG6에 대하여 전술된 바와 같이 수행하여, 비-다분산성 활성화된 C18(PEG8)올리고머 45를 얻었다.

<414> 실시예 38

<415> 활성 트리에틸렌 글리콜 모노메틸 올리고머의 합성

<416> 하기 기재 사항은 도 8에서 설명된 반응식을 참조한다. 20% 포스겐(100mlm, 약 18.7g, 189mmol의 포스겐)을 함유하는 톨루엔 용액을 N_2 분위기 하에서 0℃로 냉각시켰다. 비-다분산성 MTEG(트리에틸렌 글리콜, 모노메틸 에테르, 7.8g, 47.5mmol)을 25mL의 무수 에틸 아세테이트에 용해시킨 다음 냉각된 포스겐 용액에 첨가하였다. 혼합물을 1 시간 동안 0℃에서 교반한 다음, 실온으로 가온시키고 다시 2.5시간 동안 교반하였다. 잔류 포스겐, 에틸 아세테이트 및 톨루엔을 진공 중류를 통하여 제거하여, 비-다분산성 mTEG 클로로포름 46을 투명한 오일 잔기로 얻었다.

<417> 비-다분산성 잔기 46을 50mL의 건조 디클로로메탄에 용해시키고, 이를 TEA(트리에틸아민, 6.62mL, 47.5mmol) 및 NHS(N-하이드록시숙신이미드, 5.8g, 50.4mmol)에 첨가하였다. 혼합물을 건조 분위기 하 실온에서 20 시간 동안 교반하였는데, 이 때 다량의 백색 침전물이 생성되었다. 혼합물을 여과하여 상기 침전물을 분리하여 진공 하에서 농축시켰다. 그 결과 생성된 오일 47을 디클로로메탄에 넣고 차가운 탈이온수로 2회, 1N HCl로 2회 및 브라인으로 1회 세척하였다. 유기물을 $MgSO_4$로 탈수시킨 다음 여과 및 농축시켜, 비-다분산성인 표제 화합물을 밝은 황색의 투명한 오일로서 얻었다. 필요하다면, NHS 에스테르를 EtOAc를 용출액으로 이용하는 실리카 겔 상 플래쉬 크로마토그래피를 이용하여 더 정제할 수 있다.

<418> 실시예 39

<419> 활성 팔미테이트-TEG 올리고머의 합성

<420> 하기 기재 사항은 도 9에서 설명된 반응식을 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 공정을 TLC; 에틸 아세테이트-클로로포름; 3:7로 모니터링하였음). 반응이 종결될 무렵, THF를 제거하고 생성물을 10% H2SO4산과 혼합하고 에틸 아세테이트(3×30mL)로 추출하였다. 회수된 추출물을 물, 브라인으로 차례로 세척하고, $MgSO_4$로 탈수시킨 다음, 증발건조시켜, 비-다분산성 생성물 48을 얻었다. DMF(~10mL) 중 N,N'-디숙신이미딜 카보네이트(3mmol) 용액을 10mL의 무수 DMF 중 비-다분산성 생성물 48(1mmol)용액에 교반하면서 첨가하였다. 소듐 하이드라이드(3mmol)을 상기 반응 혼합물에 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 몇 시간(예를 들면, 5 시간) 동안 교반하였다. 디에틸 에테르를 첨가하여 활성 올리고머를 침전시켰다. 상기 과정을 3회 반복하고 생성물을 최종적으로 건조시켰다.

<421> 실시예 40

<422> 활성 헥사에틸렌 글리콜 모노메틸 올리고머의 합성

<423> 하기 기재 사항은 도 10에서 설명된 반응식을 참조한다. 비-다분산성 활성 헥사에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 상기 실시예 38의 비-다분산성 트리에틸렌 글리콜의 에테르와 유사하게 제조하였다. 톨루엔 용액 중 20% 포스겐(35mL, 6.66g, 67.4mmol 포스겐)을 N2 분위기 하 아이스/염 물 배쓰에서 냉각시켰다. 비-다분산성 헥사에틸렌 글리콜 50(1.85mL, 2.0g, 6.74mmol)을 5mL의 무수 EtOAc에 용해시키고 주사기(syringe)를 이용하여 포스겐 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 아이스 베쓰에서 1 시간 동안 계속 교반한 다음, 상기 아이스 배쓰를 분리한 다음 실온에서 2.5시간 더 교반하였다. 포스겐, EtOAc 및 톨루엔을 진공 증류시켜 분리하여, 비-다분산성 화합물 51을 투명한 오일 잔기로 얻었다.

<424> 비-다분산성 잔기 51을 20mL 건조 디클로로메탄에 용해시키고 건조 불활성 분위기 사에 두었다. 트리에틸아민(0.94mL, 0.68g, 6.7mmol)를 첨가한 다음, NHS(N-하이드록시 숙신이미드, 0.82g, 7.1mmol)을 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실리카 겔을 통해 여과시켜 백색의 침전물을 분리하고 진공 하에서 농축시켰다. 잔류물을 디클로로메탄에 용해시키고 차가운 물로 2회, 1N HCl로 2회 및 브라인으로 1회 세척하였다. 유기물을 Na2SO4로 탈수시킨 다음, 여과 및 농축시켰다. 플래쉬 크로마토그래피(실리카 겔, EtOAc)를 이용하여 최종 정제하여, UV 활성 비-다분산성 NHS 에스테르 52를 얻었다.

<425> 실시예 41

<426> 150mg의 연어 칼시토닌(MW 3432, 0.043mmol)을 30㎖의 무수 DMF에 용해시켰다. 이어서, 무수 THF(2㎖)에 용해시킨 실시예 24의 활성화 올리고머(42mg, 0.067mmol)과 TEA(35㎕)를 가했다. 반응물을 1시간 동안 교반한 다음, 물 중의 0.1% TFA 2㎖로 급냉(quenching)시켰다. 이어서, 반응물을 HPLC하였다. 이어서, 반응 혼합물을 농축한 다음, 분취용 HPLC (RC Vydac C18 Protein and peptide, 1 x 25 컬럼, 물/아세토니트릴 - 0.1% TFA, 280nm에서 검출)로 정제하였다. 모노 접합체 및 이접합체에 대한 두개의 피크가 분리되었다. 샘플을 MALDI-MS로 분석하였다. PEG7-옥틸-sCT, 모노접합체에 대한 MS: 3897. PEG7-옥틸-sCT, 이접합체에 대한 MS: 4361.

<427> 실시예 42

<428> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 29에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다. PEG7-옥틸-sCT, 모노접합체에 대한 MS: 3926. PEG7-옥틸-sCT, 이접합체에 대한 MS: 4420.

<429> 실시예 43

<430> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 31에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다. PEG7-옥틸-sCT, 모노접합체에 대한 MS: 4006. PEG7-옥틸-sCT, 이접합체에 대한 MS: 4582.

<431> 실시예 44

<432> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 37에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다. 스테아레이트-PEG8-sCT, 모노접합체에 대한 MS: 4095.

<433> 실시예 45

<434> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 18에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다.

<435> 실시예 46

<436> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 18에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다.

<437> 실시예 47

<438> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 39에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다.

<439> 실시예 48

<440> 실시예 41의 방법을 사용하여 실시예 40에 따른 활성화 올리고머로 연어 칼시토닌을 접합한다.

<441> 실시예 49 : 연어 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물에 대한 분산계수의 결정

<442> 연어 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물에 대한 분산계수는 하기와 같이 결정하였다. 연어 칼시토닌-올리고머 접합체의 혼합물은, 예를 들면, 상기 실시예 41에 개시된 바와 같이 하여 얻었다. 상기 혼합물의 제1 시료를 HPLC를 통하여 정제하여 상기 시료 중의 다양한 연어 칼시토닌-올리고머 접합체를 분리하였다. 각 분리된 분획(fraction)은 접합체의 순수하게 단분산된 혼합물을 포함하는 것으로 가정하에서, "n"은 수집된 분획의 수와 같다. 상기 혼합물은 하나이상의 하기 접합체를 포함할 수 있으며, 이들 접합체는 접합체 위치와 접합의 정도를 표기하여 기술되어 있다: Lys^{11} 모노접합체; Lys^{18} 모노접합체; N-말단 모노접합체; $Lys^{11,18}$ 이접합체; Lys^{11}, N-말단 이접합체; Lys^{18}, N-말단 이접합체; 및/또는 $Lys^{11,18}$, N-말단 삼접합체. 상기 혼합물의 각 분리된 분획은 질량 분석(mass spectroscopy)을 통하여 분석하여 상기 분획의 질량을 결정한다. 그에 따라 각 분리된 분획이 모노-, 디-, 또는 삼중- 접합체로 분류되어지고, 상기 시료 중의 각 접합체에 대한 변수 "Mi"의 값을 제공할 수 있게 된다.

<443> 상기 혼합물의 제2 시료는 HPLC를 통하여 분석되어 HPLC 트레이스(trace)를 제공한다. 몰 흡광도(molar absorptivity)는 상기 접합의 결과로서 변하지 않는다는 가정하에서, 상기 혼합물 중의 특정한 접합체의 중량 퍼센트(%)는 상기 HPLC 트레이스의 모든 피크 하의 총 면적의 백분율로서 상기 특정한 접합체에 해당하는 상기 HPLC 트레이스의 피크하의 면적에 의하여 제공된다. 상기 시료를 수집하고 냉동건조하여 상기 시료의 무수 그람 중량을 결정한다. 상기 시료의 그람 중량을 상기 시료 중의 각 성분의 중량 퍼센트와 곱하여 상기 시료 중의 각 접합체의 그람 중량을 결정한다. 상기 변수 "Ni"는 상기 시료 중의 특정한 접합체의 그람 중량을 상기 특정한 접합체의 질량으로 나누고, 지수를 아보가드로 수(6.02205 x 10 23 $mole^{-1}$)를 곱하여 상기 시료 중의 상기 특정한 접합체 (i 번째 접합체)의 분자 수, Ni 및 상기에서 결정된 Mi를 얻는다. 다음으로, 각 접합체에 대하여 결정한 n, Mi 및 각 접합체에 대하여 결정한 Ni를 사용하여 분산계수를 결정한다.

<444> 실시예 50 : Cytosensor® 연구

<445> ATCC로부터 구입한 포유동물 도관 암세포 주(ductal carcinoma cell line)인 T-47D 세포를 러닝 버퍼(Molecular Devices of Sunnyvale, 캘리포니아 사로부터 구입한 저-완충된(low-buffered), 무혈청, 무비카르보네이트 RPMI 1640 배지) 중에 $1x10^7$ cells/mL 밀도로 현탁하였다. 다음으로, 약 100,000 세포를 10㎕ 방울(droplet)로 아가로즈 세포 포집(entrapment) 배지에 고정하고 사이토센서(cytosensor) 캡슐 컵 중의 두 개의 3-㎛ 폴리카르보네이트 막 사이에 끼웠다. 다음으로, Cytosensor® Microphysiometer 상의 센서 챔버 내에 놓여진 사이토센서 캡슐 컵을 pH-감수성 검출기에 아주 가깝게 근접하도록 하였다. 다음으로, 흐름을 중단시키는 30-초 간격 동안을 제외하고 러닝 버퍼를 100 ㎕/min의 속도로 세포를 가로질러 펌프하여 공급하고, 상기 센서 챔버 내의 상기 러닝 버퍼의 산성화(acidification)를 측정하였다. 산성화 속도는 매 2분 마다 결정하였다. 상기 센서 챔버의 온도는 37 ℃이었다. 기저(basal) 산성화 속도를 모니터링하는 실험을 시작하기 전의 2-3 시간 동안 상기 센서 챔버 내에서 세포를 평형화하였다. 다음으로, 세포를 다양한 nM 농도로 러닝 버퍼 중에 희석된 시험 화합물 (연어 칼시토닌 또는 옥틸-디-칼시토닌)에 노출시켰다. 시험 화합물에 세포를 노출시키는 것은 각 2 분 펌프 주기의 처음 40초 동안 반복적인 양상으로 총 20분 동안 수행되었다. 이렇게 함으로써 세포를 시험 화합물에 충분하게 노출시켜 세포 대사에서 수용체-매개 반응을 유도하도록 한 후 약 50 초 동안 화합물을 포함하지 않은 러닝 버퍼를 흘려주었다. 이 과정에 의하여 산성화 속도를 측정하기 전에 상기 센서 챔버로부터 (러닝 버퍼 자체만의 pH에 비하여 다소 낮은 pH을 가진) 시험 용액을 씻어 내었다. 따라서, 상기 산성화 속도는 순수한 세포 활성의 측정이었다. PEG7-octyl-sCT, 모노접합체(monoconjugate) (Octyl-Mono); PEG7-decyl-sCT,

모노접합체 (Decyl-Mono); PEG7-decyl-sCT, 이접합체(diconjugate) (Decyl-Di); 스테아레이트-PEG6-sCT, 모노접합체 (PEG6 St. Mono); 및 스테아레이트-PEG8-sCT, 모노접합체 (PEG8 St. Mono)에 대한 데이터를 얻기 위하여 비슷한 과정을 이용하였다. 데이터는 각 사에토센서 챔버 산성화 속도 그래프에 대하여 곡선하 면적(Area Under the Curve) (AUC)을 계산함으로써 화합물의 상대적 활성에 대하여 분석하고, 동일한 실험 조건하에서 수행된 복수의 실험으로부터 얻어진 평균 AUC를 나타내는 도 14에 도시된 바 차트로서 플로팅하였다.

<446> 실시예 51 : 효소 안정성

<447> 동결건조된 분말로서 공급된 화합물을 10 mM 포스페이트 버퍼 pH 7.4 중에 재현탁한 다음, HPLC에 의한 농도 결정을 수행하였다. 상기 포스페이트 버퍼는 각 특정한 내장(gut) 효소의 활성에 최적인 pH를 갖는 용액을 제조하기 위하여 사용하였다. 제조된 상기 화합물의 분액을 1.7 mL 마이크로센트리퓨지 튜브에 옮기고 37 ℃ 물탕에서 15 분 동안 흔들어 주어 화합물이 온도에 평형화되도록 하였다. 15분 후, 적당한 농축된 내장 효소 2 ㎕를 각 튜브에 첨가하여 소망의 최종 농도가 되도록 하였다. 키모트립신 및 트립신을 1 mM HCl 중에 재현탁하였다. 또한, 대조군으로서, 화합물을 2 ㎕의 1 mM HCl로 처리하였다. 첨가 직후, 100 ㎕의 시료를 대조군 튜브로부터 꺼내고, 25 ㎕의 키모트립/트립신 반응정지(quenching) 용액 (1:1 1% TFA:이소프로판올) 중 어느 하나로 반응을 정지시켰다(quenched). 이 시료를 T=0 분으로 사용하였다. 시료 채취 과정은 사용되는 내장 효소에 따라서 다양한 시간 간격으로 반복하였다. 키모트립신은 15, 30 및 60 분에 시료를 채취하였다. 트립신은 30, 60, 120 및 180 분에 시료를 채취하였다. 일단 모든 점들이 얻어지면, 최종 시료를 대조군 튜브로부터 꺼내어 관찰된 분해가 온도 또는 버퍼와 관련이 없다는 것을 확인하였다. 상기 키모트립신 및 트립신 시료는 HPLC 바이알에 직접적으로 수집될 수도 있다. 각 시료에 대하여 AUC를 결정하기 위하여 RP-HPLC (아세토니트릴 구배)를 사용하였으며, % 분해(degradation)를 상기 T=0 분 대조군으로부터 근거하여 계산하였다. 상기 결과를 하기 표 1 내지 4에 나타내었다.

<448> 표 1. PEG7-Octyl-연어 칼시토닌, 이접합체(Diconjugate)의 0.5 U/mL 키모트립신 소화 후의 % 잔류량

<449>

시간	제제화되지 않음				버퍼 제제		
15	63	71	68	69	88	86	88
30	34	48	50	46	73	88	86
60	6	15	20	15	61	69	84
	대조군				대조군		
60	104	88	97	103	116	104	101

<450> 표 2. 연어 칼시토닌의 0.5 U/mL 키모트립신 소화 후의 % 잔류량

<451> (비교 목적용; 본 발명의 일부분이 아님)

<452>

시간	제제화 되지 않음					버퍼 제제		
10	73							
15	-	55	62	35	66	59	91	92
30	30	26	40	13	42	54	86	87
60	1.6	5	12	1	12	55	82	85
	대조군					대조군		
60	-	100	93	45	100	102	98	103

<453> 표 3. PEG7-Octyl-연어 칼시토닌, 이접합체(Diconjugate)의 1 U/mL 트립신 소화 후의 % 잔류량

<454>

시간	제제화되지 않음			
30	87	89	83	90
60	78	86	76	85
120	72	82	68	78
180	-	81	61	73
	대조군			
60		103	100	
120	106	105	99	
180		104	99	

<455> 표 4. 연어 칼시토닌의 1 U/mL 트립신 소화 후의 % 잔류량

<456> (비교 목적용; 본 발명의 일부분이 아님)

<457>

시간	제제화되지 않음			
30	80	50	82	87
60	66	28	69	76
120	44	7	46	59
180	-	2	31	46
	대조군			
60		41	101	
120	69	16	102	
180		7	101	

<458> 실시예 52 : 활성 및 개체간 변이성

<459> 체중 20-25 g의 수컷 CF-1 생쥐 (Charles River, Raleigh, N.C.)를 빛-(12:12의 L:D 주기, 0600 h에서 빛을 가함), 온도-(21-23℃), 및 습도-(40-60% 상대습도) 제어된 방 안의 녹벡스 사육장(Nobex vivarium)에 사육하였다. 동물들은 자유로이 실험실 먹이(PMI Nutrition) 및 수도물에 접근할 수도록 하였다. 생쥐를 실험 일 이전 48-72 시간 동안 사육 조건에 순응되도록 하였다.

<460> 투여하기 전에, 생쥐를 밤새 굶기고 물을 임의로(ad libitum)로 공급하였다. 생쥐를 시간 점 당 5 마리의 군으로 임의로 분배하고, 본 발명에 따른 PEG7-octyl-sCT, 이접합체(diconjugate) (Octyl Di) 또는 비교 목적으로 연어 칼시토닌 (sCT 또는 칼시토닌)을 단일 경구 용량으로 투여하였다. 경구 용량은 하기 0.2 ㎍/ml 포스페이트-버퍼된 PEG7-octyl-sCT, 이접합체, 제제를 10 mL/kg로 가비징 바늘(gavaging needle) (Popper #18, 허브(hub)로부터 베벨(bevel)까지 5 cm)을 이용하여 투여하였다:

<461>

성분	양
PEG7-octyl-sCT,이접합체	20 ㎍
소듐-콜레이트	2.5 g
소듐-데옥시-콜레이트	2.5 g
소듐 포스페이트 버퍼, 100 mM, pH 7.4	q.s. to 100 g

<462> 상기 버퍼된 제제를 깨끗한 테어드(tared) 유리 비커 중에 80 ml의 포스페이트 버퍼를 첨가함으로써 제조하였다. 상기 소듐 콜레이트를 용해될 때까지 교반하면서 상기 포스페이트 버퍼에 천천히 첨가하였다. 다음으로, 상기 데옥시 콜레이트를 첨가하고, 용해될 때까지 교반을 계속하였다. 20 ㎍과 등가인 상기 PEG7-octyl-sCT, 이접합체, 용액을 첨가하였다. 마지막으로, 상기 남은 포스페이트 버퍼를 첨가하여 최종 무게 100 g이 되게 하였다. 비히클(Vehicle)-제어 생쥐를 모든 실험에서 사용하였다. 용량-반응 곡선은 투여 후 단일 시간 점 60 분을 사용하여 제작하였다. 이들 곡선을 도 15-18에 나타내었다.

<463> 적당한 시간 점에서, 생쥐를 에테르-마취시키고, 하대 정맥(vena cavae)을 적출하고, 혈액 시료를 25-게이지 바늘이 구비된 주사기(syringe)를 통하여 얻었다. 혈액 분액을 22 ℃에서 1 시간 동안 응고시키고, 혈청을 제거하여 깨끗한 용기에 피펫으로 옮겼다. 총 혈청 칼슘을 보정된 Vitros DT60 II 분석기를 사용하여 각 동물에 대하여 결정하였다.

<464> 혈청 칼슘 데이터를 플롯팅하고 약리동력학 변수(pharmacokinetic parameter)를 SigmaPlot 소프트웨어(4.1 판)를 사용하여 곡선-맞춤 기법을 통하여 결정하였다. 평균 및 표준편차(또는 표준 오차)를 계산하고 플롯팅하여, 투여 군 중의 효과 차이를 결정하였다. 다양한 접합체에 대한 평균 혈청 칼슘 데이터는 하기 표 5에 나타내었다.

<465> 표 5.

<466>

접합체	분산(dispersity)	2.0 ㎍/kg 용량에서 % 기저선 칼슘 강하(drop)
PEG7-Octyl-sCT, 이접합체	단분산된 혼합물	21.0
스테아레이트-PEG6-sCT, 이접합체	단분산된 혼합물	16.0
PEG7-Decyl-sCT, 모노접합체	단분산된 혼합물	11.5
스테아레이트-PEG8-sCT, 이접합체	단분산된 혼합물	11.0
PEG7-Decyl-sCT, 이접합체	단분산된 혼합물	8.3

<467> PEG7-octyl-sCT 및 PEG7-decyl-sCT 모노- 및 이-접합체의 인 비트로 활성과 비교할될만하지 않을 수 있는 상기 실시예 50에서 결정된 바와 같은 인 비트로 활성에도 불구하고, 상기 스테아레이트-PEG6-sCT, 이접합체, 및 스테아레이트-PEG8-sCT, 이접합체는, PEG7-octyl-sCT 및 PEG7-decyl-sCT, 모노- 및 이-접합체에 대하여 관찰된 인 비보 활성에 비교될만한 인 비보 활성 (상기 표 5로부터 % 기저 칼슘 강하에 의하여 입증되는 바와 같이)을 갖는 것처럼 보인다. 특정한 이론에 한정하고자 하는 것은 아니나, 스테아레이트 함유 접합체의 상기 개선된 인 비보 활성은 이들 접합체가 인 비보에서 가수분해되어 활성 연어 칼시토닌 또는 활성 연어 칼시토닌-PEG 접합체를 제공하는 것을 나타내는 것일 수 있다.

<468> 본 명세서에서, 본 발명의 전형적인 바람직한 구체예를 개시하였으며, 비록 특정한 용어를 사용하였으나, 이들은 단지 일반적이고 서술적 의미로서만 사용되었고, 하기 청구범위에 개시한 발명의 범위를 한정하고자 하는 의도로 사용되지 않았다.

도면의 간단한 설명

<275> 도 1은 본 발명의 구체예에 따른 폴리에틸렌 글리콜 부위 및 지방산 부위를 포함하는 활성화된 중합체의 혼합물을 합성하기 위한 일반식을 나타내는 것이다.

<276> 도 2는 본 발명의 구체예에 따른 mPEG의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<277> 도 3은 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 mPEG7-헥실 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<278> 도 4는 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 mPEG7-옥틸 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<279> 도 5는 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 mPEG-데실 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<280> 도 6은 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 스테아레이트-PEG6 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<281> 도 7은 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 스테아레이트-PEG8 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<282> 도 8은 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 PEG3 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<283> 도 9는 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 팔미테이트-PEG3 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<284> 도 10은 본 발명의 구체예에 따른 활성화된 PEG6 올리고머의 혼합물을 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<285> 도 11은 본 발명의 구체예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 단량체를 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<286> 도 12는 본 발명의 구체예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 중합체를 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<287> 도 13은 본 발명의 구체예에 따른 다양한 프로필렌 글리콜 중합체를 합성하기 위한 식을 나타내는 것이다.

<288> 도 14는 접합되지 않은 칼시토닌과 본 발명의 구체예에 따른 칼시토닌-올리고머 접합체의 다양한 혼합물에 대한

평균 AUC의 비교를 나타내는 것으로서, 비교의 목적으로만 제공되고 본 발명의 일부분을 형성하지 않는 것이다.

<289> 도 15는 칼시토닌에 대한 용량-반응 곡선과 비교한 본 발명의 구체예에 따른 mPEG7-옥틸-칼시토닌 이접합체의 혼합물에 대한 용량-반응 곡선을 나타낸 것으로서, 비교의 목적으로만 제공되고 본 발명의 일부분을 형성하지 않는 것이다.

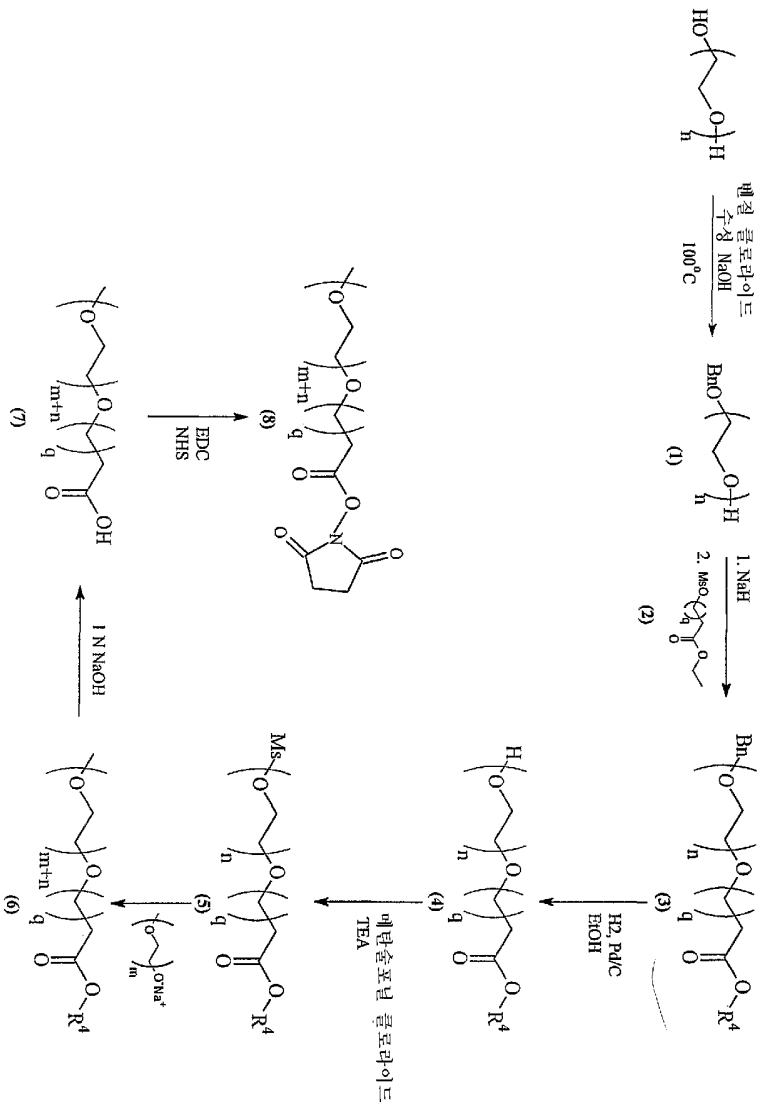
<290> 도 16은 본 발명의 구체예에 따른 mPEG7-옥틸-칼시토닌 이접합체의 혼합물을 경구 투여한 후의 용량-반응 곡선을 나타내는 것이다.

<291> 도 17은 본 발명의 구체예에 따른 mPEG7-옥틸-칼시토닌 이접합체의 혼합물을 피하 투여한 후의 용량-반응 곡선을 나타내는 것이다.

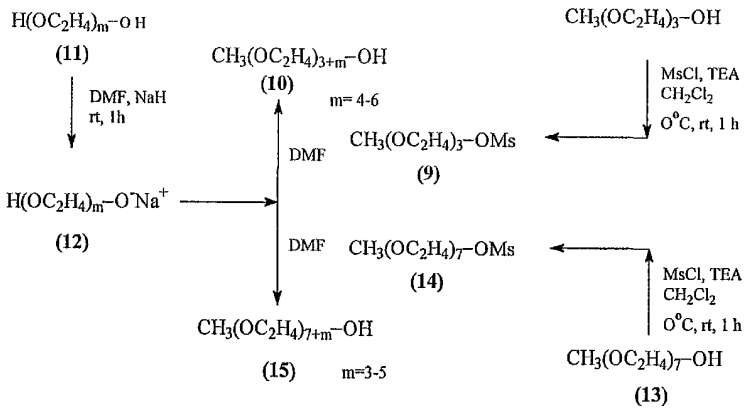
<292> 도 18은 연어 칼시토닌을 피하 투여한 후의 용량-반응 곡선을 나타내는 것으로서, 비교의 목적으로만 제공되고 본 발명의 일부분을 형성하지 않는 것이다.

도면

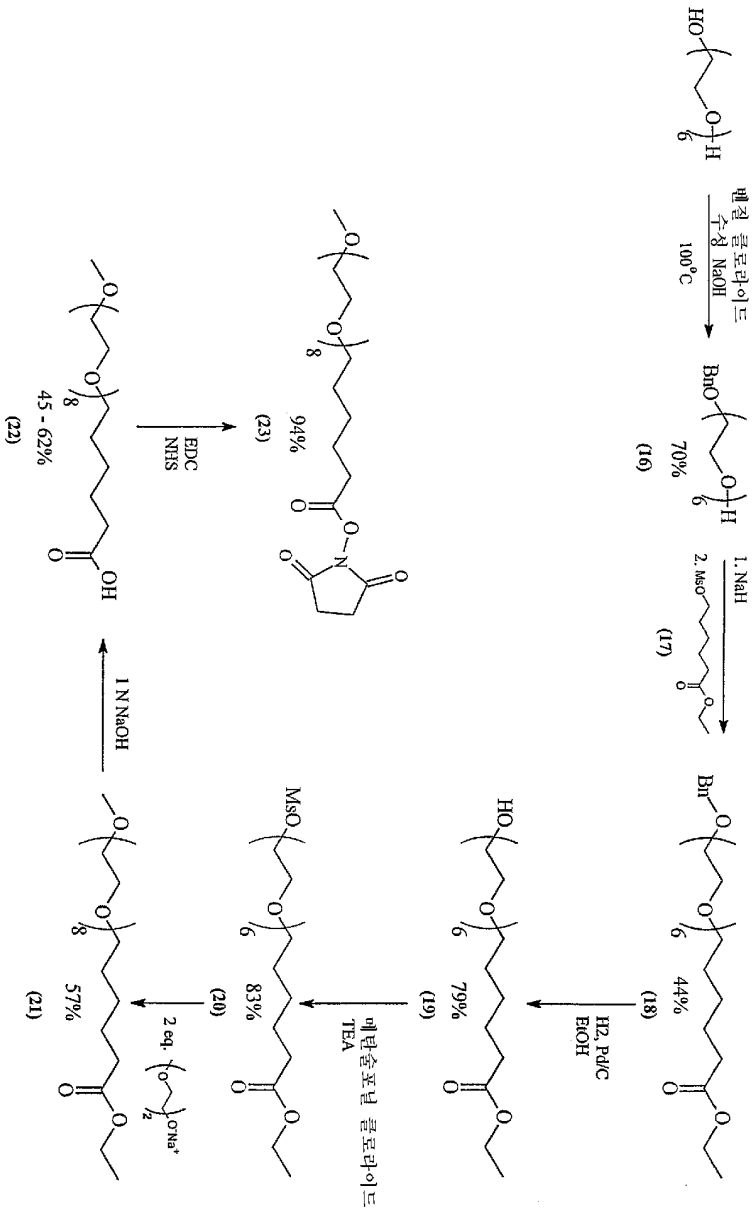
도면1



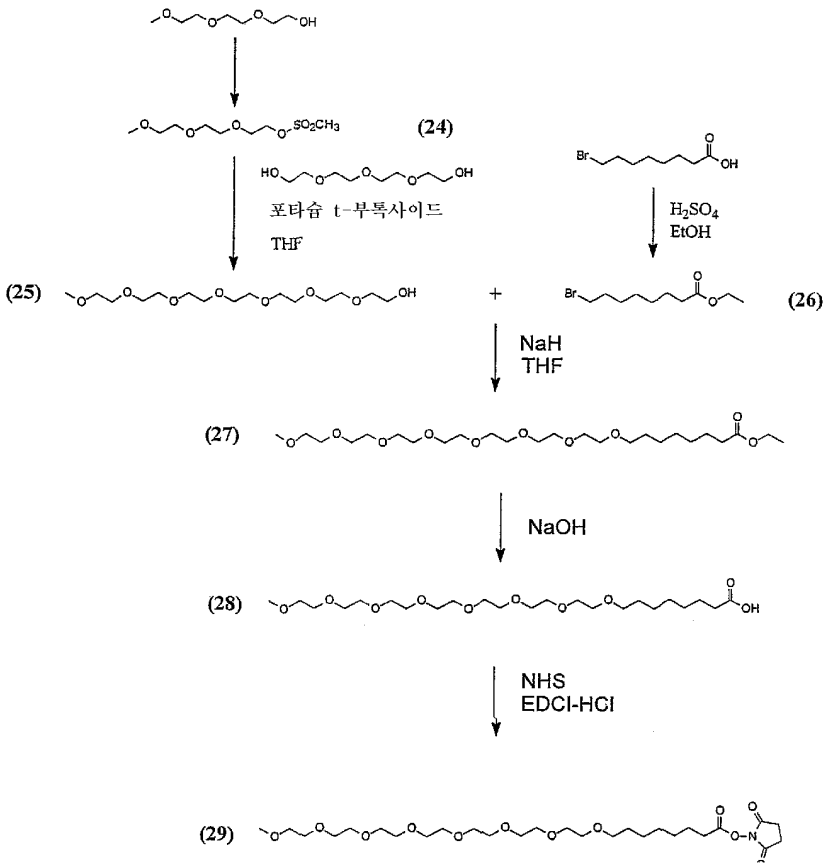
도면2


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

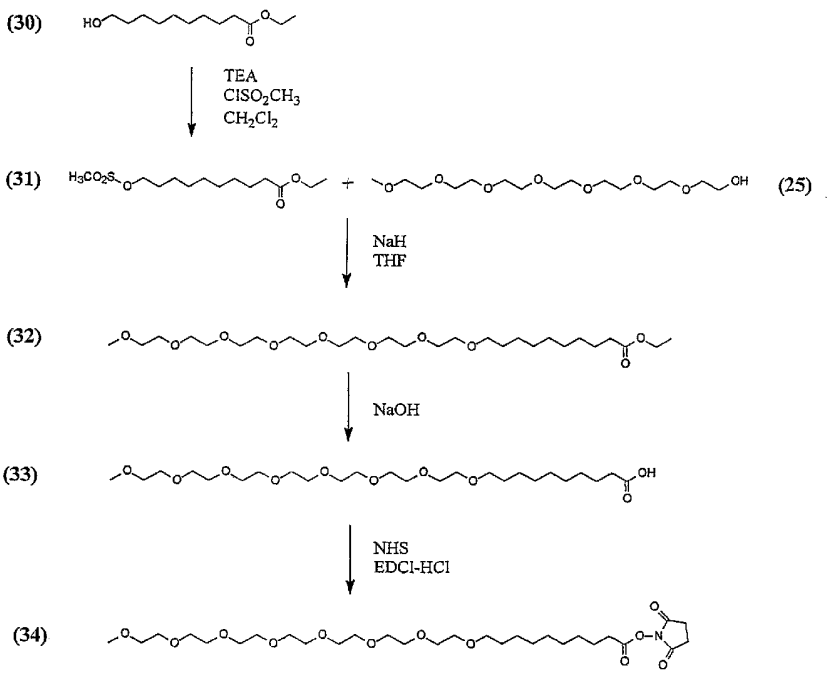
도면3


HO
6
H
벤질 클로라이드
수성 NaOH
100°C
BnO
70%
(16)
1. NaH
2. MsO
(17)
O
O
Bn
44%
(18)
H2, Pd/C
EtOH
HO
79%
(19)
MsO
83%
(20)
메탄술폰산 클로라이드
TEA
2 eq.
O
O-Na+
2
8
57%
(21)
1 N NaOH
45 - 62%
(22)
EDC
NHS
94%
(23)
N
O

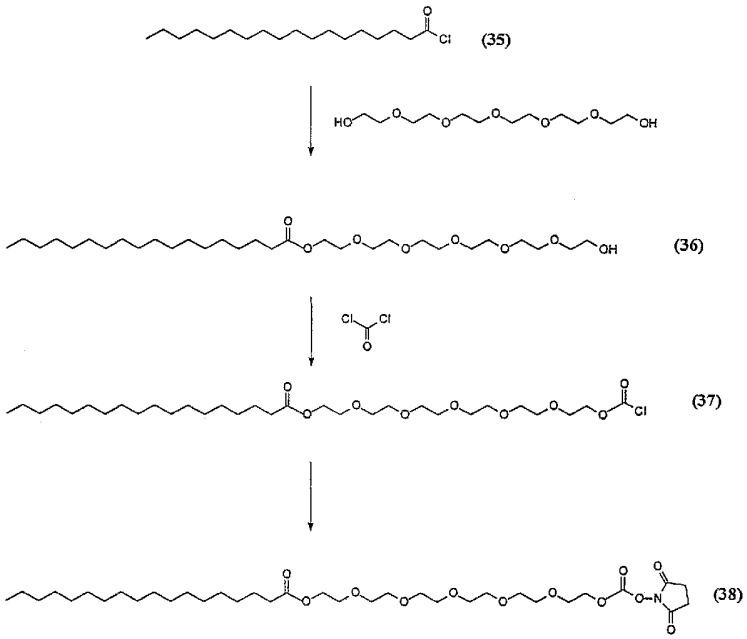
도면4


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

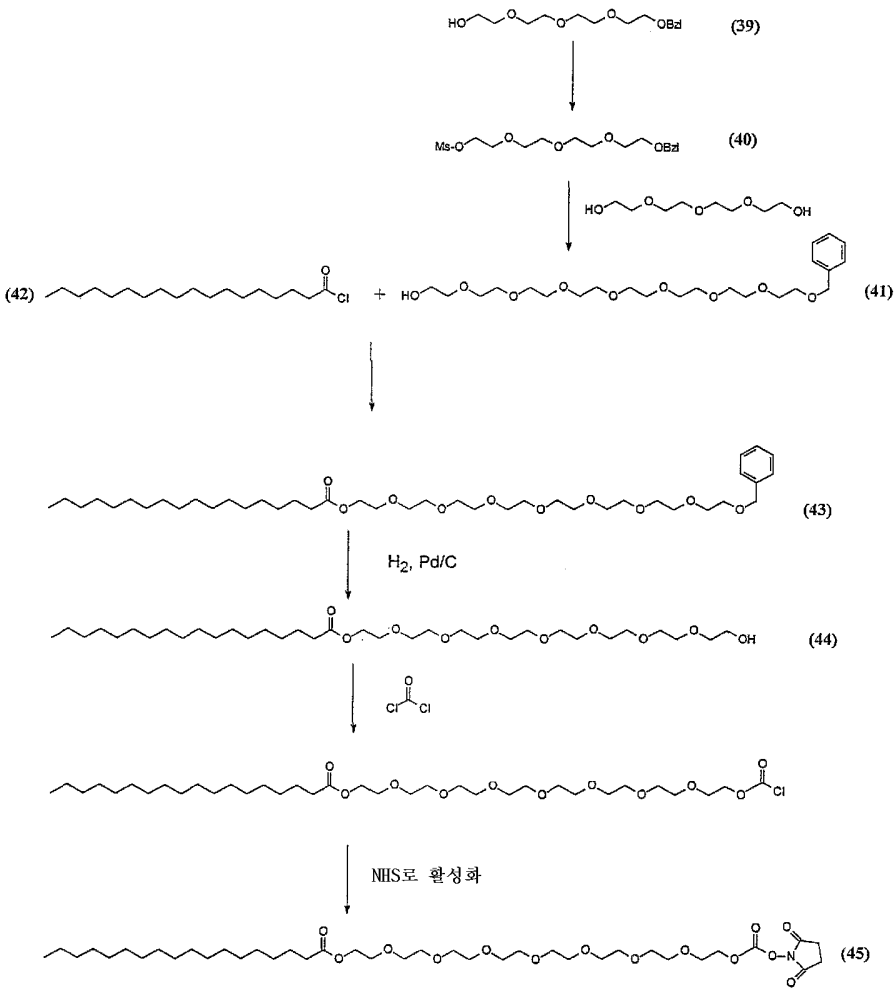
도면5


(30)
TEA
$ClSO_2CH_3$
CH_2Cl_2
(31)
(25)
NaH
THF
(32)
NaOH
(33)
NHS
EDCI-HCl
(34)

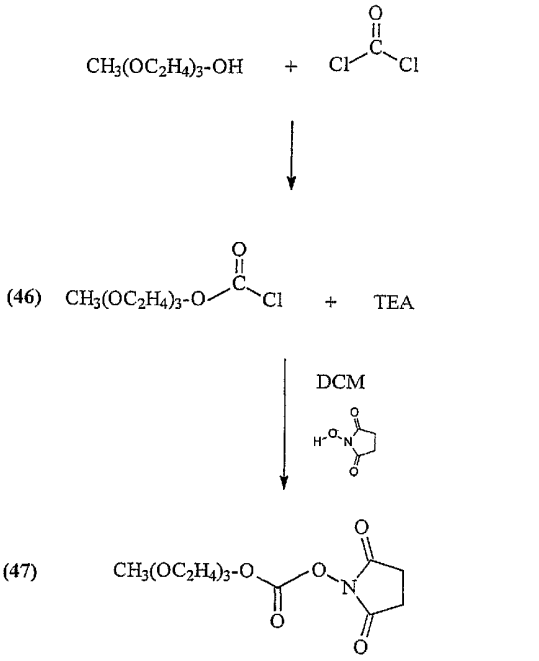
도면6



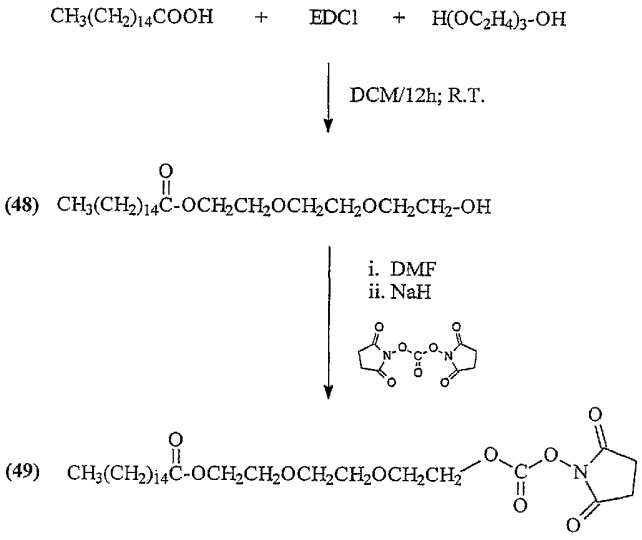
도면7



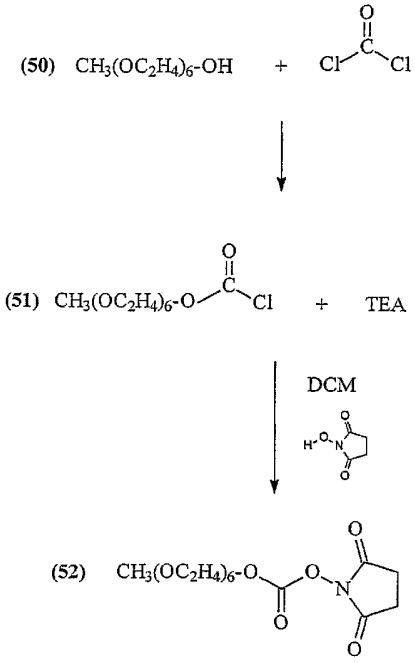
도면8


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

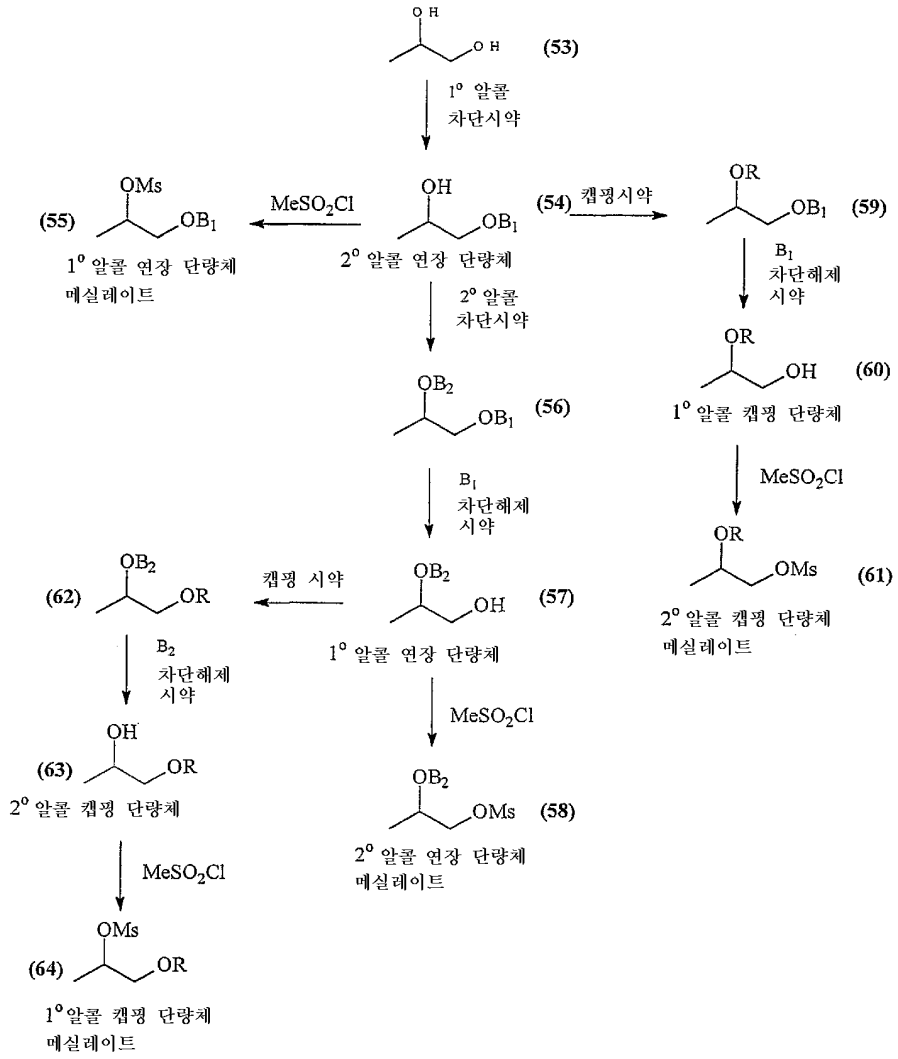
도면9


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
O
N

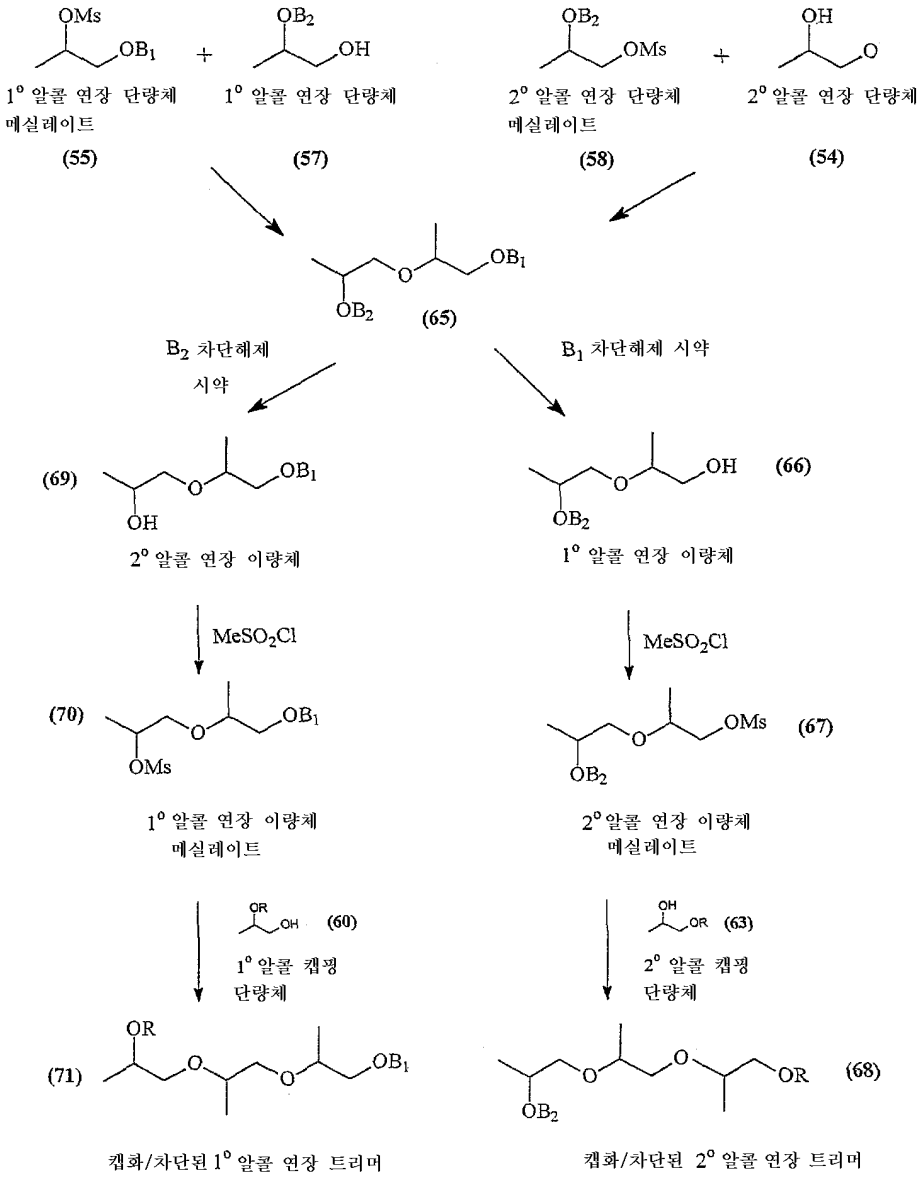
도면10


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

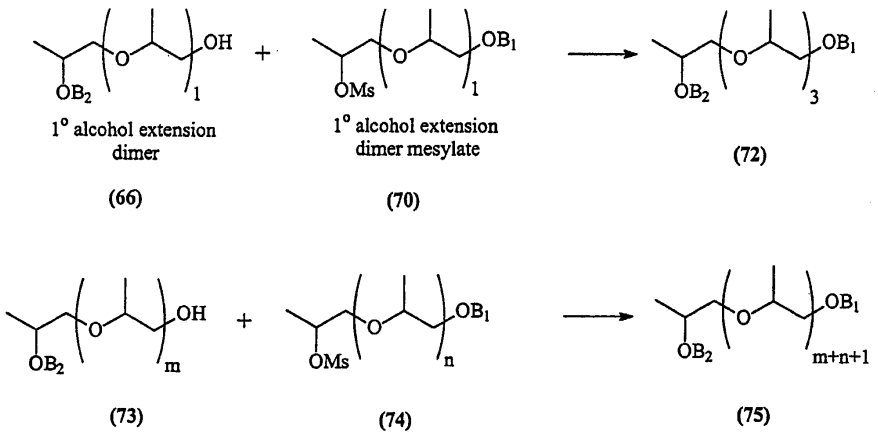
도면11


(53)
1° 알콜
차단시약
(55)
MeSO2Cl
(54) 캡핑시약
(59)
1° 알콜 연장 단량체
메실레이트
2° 알콜 연장 단량체
B1
차단해제
시약
2° 알콜
차단시약
(56)
(60)
1° 알콜 캡핑 단량체
MeSO2Cl
B1
차단해제
시약
(61)
2° 알콜 캡핑 단량체
메실레이트
(62)
캡핑 시약
(57)
1° 알콜 연장 단량체
B2
차단해제
시약
MeSO2Cl
(63)
2° 알콜 캡핑 단량체
(58)
2° 알콜 연장 단량체
메실레이트
MeSO2Cl
(64)
1°알콜 캡핑 단량체
메실레이트

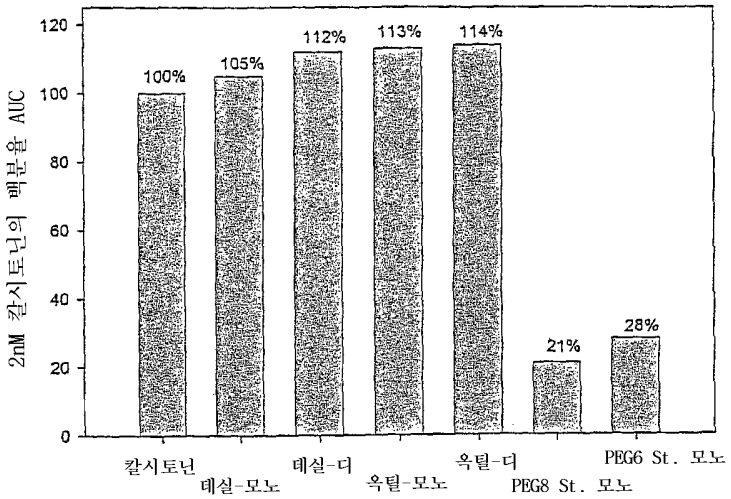
도면12


OMs
OB1
1° 알콜 연장 단량체 메실레이트
(55)
+
OB2
OH
1° 알콜 연장 단량체
(57)
OB2
OMs
2° 알콜 연장 단량체 메실레이트
(58)
+
OH
O
2° 알콜 연장 단량체
(54)
OB1
O
OB2
(65)
B2 차단해제 시약
B1 차단해제 시약
(69)
OB1
O
OH
2° 알콜 연장 이량체
OH
O
OB2
(66)
1° 알콜 연장 이량체
MeSO2Cl
(70)
OB1
O
OMs
1° 알콜 연장 이량체 메실레이트
MeSO2Cl
OMs
O
OB2
(67)
2° 알콜 연장 이량체 메실레이트
OR
OH
(60)
1° 알콜 캡핑 단량체
OH
OR
(63)
2° 알콜 캡핑 단량체
(71)
OR
O
O
OB1
캡화/차단된 1° 알콜 연장 트리머
OR
O
O
OB2
(68)
캡화/차단된 2° 알콜 연장 트리머

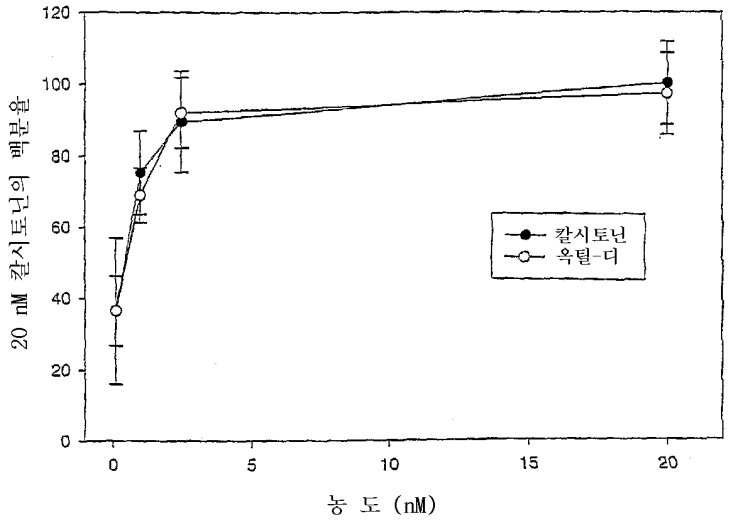
도면13


OH
OB2
1
OB1
OMs
1
OB1
OB2
3
1° alcohol extension dimer
(66)
1° alcohol extension dimer mesylate
(70)
(72)
OH
OB2
m
OB1
OMs
n
OB1
OB2
m+n+1
(73)
(74)
(75)

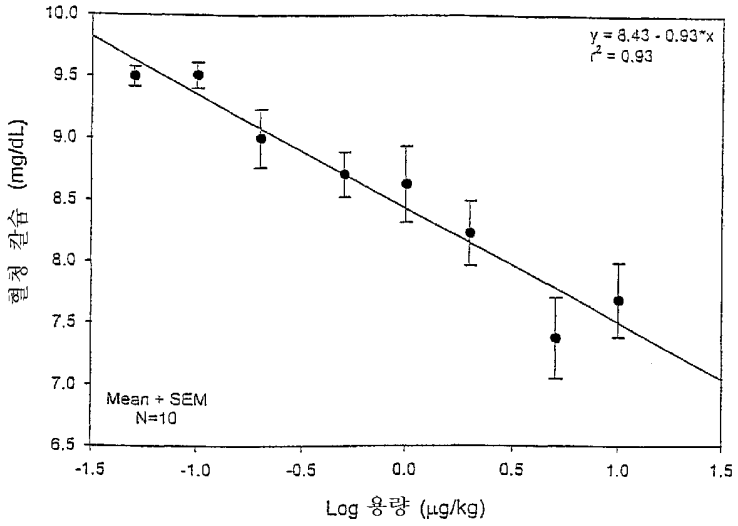
도면14


2nM 칼시토닌의 백분율 AUC
120
100
80
60
40
20
0
100%
105%
112%
113%
114%
21%
28%
칼시토닌
데실-모노
데실-디
옥틸-모노
옥틸-디
PEG8 St. 모노
PEG6 St. 모노

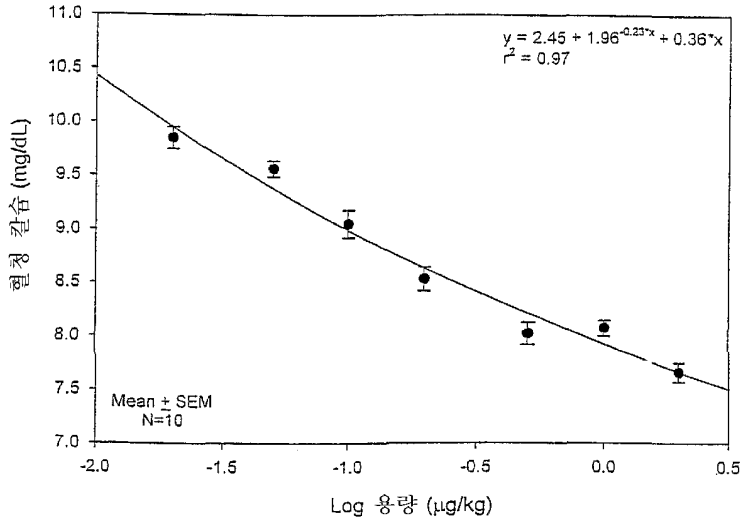
도면15


120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
20 nM 칼시토닌의 백분율
농 도 (nM)
칼시토닌
옥틸-D

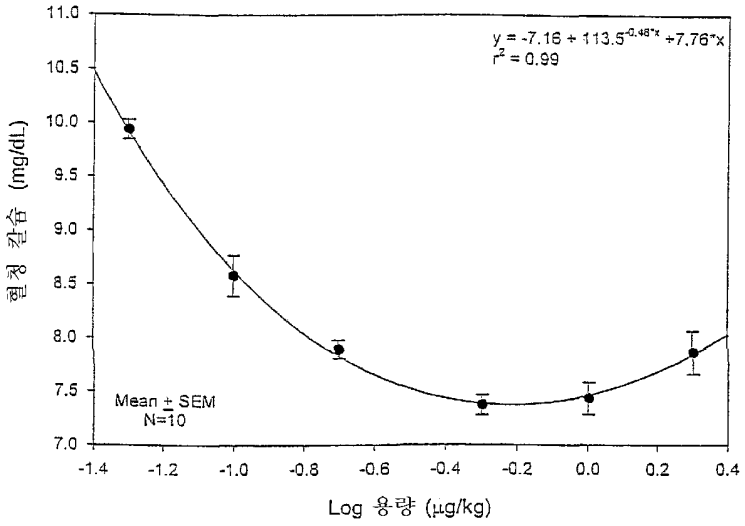
도면16


10.0
9.5
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
혈청 칼슘 (mg/dL)
Log 용량 (μg/kg)
y = 8.43 - 0.93*x
r² = 0.93
Mean + SEM
N=10

도면17


y = 2.45 + 1.96^-0.23*x + 0.36*x
r^2 = 0.97
Mean ± SEM
N=10
혈청 칼슘 (mg/dL)
Log 용량 (μg/kg)
11.0
10.5
10.0
9.5
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
-2.0
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5

도면18


y = -7.16 + 113.5^-0.48*x +7.76*x
r^2 = 0.99
Mean ± SEM
N=10
혈청 칼슘 (mg/dL)
Log 용량 (μg/kg)
11.0
10.5
10.0
9.5
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
-1.4
-1.2
-1.0
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4