

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5312720号
(P5312720)

(45) 発行日 平成25年10月9日(2013.10.9)

(24) 登録日 平成25年7月12日(2013.7.12)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 38/28	(2006.01)	A 6 1 K 37/26
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 0 7 K 14/62	(2006.01)	C 0 7 K 14/62

請求項の数 11 外国語出願 (全 71 頁)

(21) 出願番号	特願2001-316998 (P2001-316998)	(73) 特許権者	506292941
(22) 出願日	平成13年10月15日(2001.10.15)		バイオコン・リミテッド
(65) 公開番号	特開2003-113113 (P2003-113113A)		インド国、バンガロア 560100、エレクトロニクス・シティ、トゥエンティース・ケイエム・ホスール・ロード
(43) 公開日	平成15年4月18日(2003.4.18)	(74) 代理人	100099623
審査請求日	平成16年10月15日(2004.10.15)		弁理士 奥山 尚一
審査番号	不服2009-7568 (P2009-7568/J1)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成21年4月8日(2009.4.8)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	09/873899	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成13年6月4日(2001.6.4)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ヌノキリ・エヌ・エクウリベ アメリカ合衆国ノースカロライナ州275 11, ケアリー, コルツゲイト・ドライブ 216

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアルケレングリコールを含むインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物、これらの使用、及びこれらの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

結合体の実質的に純粋に単分散の混合物であって、それぞれの結合体が少なくとも1個のオリゴマーに結合したヒトインスリンを含み、それぞれのオリゴマーが少なくとも5個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と前記ポリエチレングリコール成分に共有結合している親油性成分を含み、前記親油性成分が1~2.8個の炭素原子を有する非置換のアルキル成分であり、前記実質的に純粋に単分散の混合物は、10,000よりも大きい分散係数(DC)：

【数1】

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

[式中、

n はサンプル中の異なる分子の数であり、

N_i はサンプル中の i 番目の分子の数であり、

M_i は i 番目の分子の質量である] を有する結合体の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 2】

前記分散係数は 1 0 0 , 0 0 0 よりも大きい、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 3】

前記分散係数は 5 0 0 , 0 0 0 よりも大きい、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 4】

少なくとも 1 個のオリゴマーが第 1 のオリゴマーと第 2 のオリゴマーであり、それぞれの結合体が前記第 1 のオリゴマーと前記第 2 のオリゴマーに結合したヒトインスリンを含み、

(a) 前記第 1 のオリゴマーはインスリンの L y s ^{B 2 9} で共有結合し、

(b) 前記第 2 のオリゴマーはインスリンの N 末端 A 1 または N 末端 B 1 で共有結合している請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 5】

前記混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のインビボ活性よりも大きなインビボ活性を有する、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 6】

前記混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のインビトロ活性よりも大きなインビトロ活性を有する、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 7】

前記混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する抵抗性と比較した場合、キモトリプシンによる分解に対する増大した抵抗性を有する、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 8】

前記実質的に純粋に単分散の混合物の被験体への投与が、前記混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物の被験体間変動よりも低い被験体間変動を生ずる、請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【請求項 9】

請求項 1 に記載される実質的に純粋に単分散の混合物および薬学的認容性のキャリアを含む薬学的組成物。

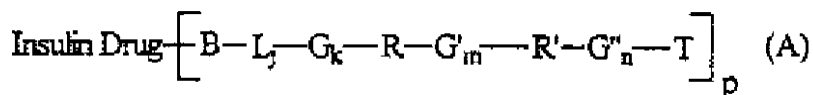
【請求項 10】

インスリン欠乏の治療のための医薬の製造における請求項 1 に記載の実質的に純粋に単分散の混合物の使用。

【請求項 11】

それぞれの結合体が、式：

【化 1】



[式中、

B は結合成分であり、

L はリンカー成分であり、

G、G' および G'' は個々に選択されるスペーサー成分であり、

R は親油性成分で、かつ R' はポリアルキレングリコール成分であるか、あるいは R' は親油性成分で、かつ R はポリアルキレングリコール成分であり、

10

20

30

40

50

Tは末端成分であり、
 j、k、mおよびnはそれぞれ0または1であり、
 pはインスリン薬物に結合されたオリゴマー数を表し、1から、インスリン薬物における求核性残基の数までの整数である]を有する請求項1に記載の実質的に純粋に単分散の混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物 - オリゴマー結合体、特にインスリン薬物 - オリゴマー結合体に関する 10

【背景技術】

【0002】

糖尿病、炭水素代謝の障害は、古代から知られている。糖尿病は、インスリンの不十分な産生またはインスリンに対する感度の低下から生じる。インスリン分子は、ジスルフィド結合により連結された2本の鎖のアミノ酸からなる(分子量6,000)。膵臓の島のβ細胞は、プロインスリンとして知られているインスリンの単鎖前駆体を分泌する。プロインスリンのタンパク質分解は、4個の塩基性アミノ酸(プロインスリン鎖中の数31、32、64及び65:それぞれ、Arg、Arg、Lys、Arg)と連結(「C」)ポリペプチドを除去する。得られる2本鎖のインスリン分子においては、A鎖はアミノ末端にグリシンを有し、B鎖はアミノ末端にフェニルアラニンを有する。 20

【0003】

インスリンは、単量体、二量体または3個の二量体から形成される6量体として存在する。この6量体は2つのZn²⁺原子と配位する。生物活性はこのモノマーに存在する。最近迄、ヒトの糖尿病を治療するのに、殆どウシ及びブタのインスリンのみが使用されたが、種間のインスリンの多数のバリエーションが知られている。ブタのインスリンはヒトインスリンに殆ど類似しているが、B鎖のC-末端にスレオニン残基でなくアラニンを有する点でのみ異なる。これらの差に拘わらず、哺乳類のインスリンは同等の比活性を有する。最近迄、動物の抽出物がこの疾患の治療に使用するすべてのインスリンを提供している。組み換え技術の進展によって、ヒトインスリンの商業的な規模での製造が可能である(例えば、Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN)から市販されているHumulin(登録商標)インスリン)。 30

【0004】

インスリンは、身体の大部分の細胞によるグルコースの正常な利用に必要である。糖尿病の人では、グルコースを使用する正常な能力が阻害され、それによって血糖レベルを上昇させる(高血糖症)。グルコースが血液中に蓄積するに従い、過剰なレベルの糖が尿中に排出する(糖尿)。糖尿病の他の症状は、尿の量と頻度の増加、喉のかわき、かゆみ、空腹、体重減少、及び衰弱を含む。

【0005】

2つのバリエーションの糖尿病がある。タイプIはインスリン-依存の真性糖尿病、すなわちIDDMである。IDDMは以前若年型糖尿病と呼ばれていた。IDDMでは、インスリンは膵臓から分泌されず、外部源から提供されなければならない。タイプIIの成人型糖尿病は、ある進行した病状ではインスリンを必要とするが、通常食事によりコントロールされ得る。 40

【0006】

1920年代においてインスリンが単離される前には、大多数の患者は発病後まもなく死んだ。糖尿病は、治療しないとケトーシス、血液中のケトンの蓄積、脂肪分解の生成物に至り、これに続いてむかつきと嘔吐を伴うアシドーシス(血液中での酸の蓄積)が起こる。炭水素及び脂肪の代謝障害による毒性生成物が蓄積するに従って、患者は糖尿病の昏睡におちいる。 50

【 0 0 0 7 】

糖尿病の治療は、通常、インスリンの規則的な注射を必要とする。糖尿病の治療としてのインスリンの使用は、B a n t i n gら（「真性糖尿病の治療における膵臓抽出物」、Can. Med. Assoc. J., 12: 141~146 (1922)）が膵臓からの活性抽出物が糖尿病の犬で治療効果を有することを示した、1922年にさかのぼる。同年における膵臓抽出物による糖尿病患者の治療は、劇的な、救命につながる臨床面での改善をもたらした。インスリン注射の不便さにより、インスリン投与と生物同化作用を改善するための多大な努力が行なわれた。

【 0 0 0 8 】

インスリンを経口投与により送達する試みが行なわれている。糖尿病患者で正常血糖を得るためのインスリンの経口投与に伴う問題は、医薬及び医療の文献によく記録されている。胃腸管中の消化酵素は、インスリンを急速に分解し、生物的に不活性な分解生成物となる。胃では、例えば、経口投与したインスリンは、酵素によるタンパク質分解と酸性分解を受ける。腸中での残存は、過剰なタンパク質分解により妨げられる。体腔中では、インスリンは、胃及び膵臓の酵素、エキソ及びエンドペプチダーゼ、及び刷子縁ペプチダーゼを含む、種々の酵素により攻撃される。この酵素の攻撃から生き残ったとしても、インスリンがインピボで受容体に達する前に越えなければならない生物的なバリアは、インスリンの経口投与を制限する。例えば、インスリンは膜透過性が低く、体腔から血液流中へと通過する能力が制限されている。

【 0 0 0 9 】

インスリン等の医薬活性ポリペプチドは、ポリエチレングリコールの多分散の混合物またはポリエチレングリコール含有のポリマーの多分散の混合物により結合体化されて、薬物-オリゴマー結合体の多分散の混合物を提供する。例えば、D a v i sらへの米国特許第4, 179, 337号は、インスリン等のポリペプチドをUnion Carbideにより供給されているMPEG-1900及びMPEG-5000等の種々のポリエチレングリコールにより結合体化することを提案している。

【 0 0 1 0 】

G r e e n w a l dへの米国特許第5, 567, 422号は、生物活性な求核物質を5, 000ダルトンの数平均分子量を有する、m-PEG-OH(Union Carbide)等のポリエチレングリコールと結合体化することを提案している。

【 0 0 1 1 】

E k w u r i b eへの米国特許第5, 359, 030号は、インスリン等のポリペプチドをポリエチレングリコール変成のグリコ脂質ポリマーとポリエチレングリコール変成の脂肪酸ポリマーにより結合体化することを提案している。各組み合わせから得られるポリマー数平均分子量は、約500から約10, 000ダルトンの範囲であることが好ましい。

【 0 0 1 2 】

ポリエチレングリコールは、通常、エチレンオキシドの塩基触媒開環重合により製造される。この反応は、水酸化カリウムを触媒として、エチレンオキシドをエチレングリコールに添加することにより開始される。この方法は、一定の範囲の分子量内の数平均分子量を有する、ポリエチレングリコールポリマーの多分散の混合物を生じる。例えば、S i g m a - A l d r i c h (M i l w a u k e e , W i s c o n s i n)により提供されるPEG製品は、PEG400 (M_n 380~420); PEG1, 000 (M_n 950~1, 050); PEG1, 500 (M_n 1, 400~1, 600); 及びPEG2, 000 (M_n 1, 900~2, 200)等の多分散の混合物で提供される。

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 3 】

オリゴマーがポリエチレングリコールを含む、インスリン-オリゴマー結合体の非多分散の混合物を提供することが望ましい。

【 0 0 1 4 】

10

20

30

40

50

ポリエチレングリコールを含むインスリンオリゴマー結合体の本発明の実施形態の非多分散の混合物は、同じ数平均分子量を有する類似の結合体の多分散の混合物よりも高いインビボ活性を呈することが思いがけなくも見出された。この増大した活性は、用量の必要条件を低下させる。更には、ポリエチレングリコールを含むインスリン - オリゴマー結合体の本発明の実施形態の非多分散の混合物は、通常、類似の結合体の多分散の混合物よりも腸消化のインビトロモデルで生き残るのに更に有効である。更には、また、ポリエチレングリコールを含むインスリン - オリゴマー結合体の本発明の実施形態の非多分散の混合物は、通常、類似の結合体の多分散の混合物よりも被験者間変動も少ない。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の実施形態によれば、ポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物をそれぞれが含む結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。このポリエチレングリコール成分は、好ましくは少なくとも2、3、あるいは4個のポリエチレングリコールサブユニットを有し、最も好ましくは少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。このオリゴマーは、好ましくは親油性成分を更に含む。このインスリン薬物は、好ましくはヒトインスリンである。このオリゴマーは、好ましくはヒトインスリンのLys^{B29}に共有結合で結合する。この結合体は、好ましくはこの結合体が水溶性であり、生体膜に浸透することが可能であるように両親媒性的にバランスしている。この混合物は、好ましくは単分散混合物であり、最も好ましくは純粋に単分散の混合物である。ある実施形態においては、このオリゴマーは、非加水分解性結合によりインスリンに共有結合で結合した第1のポリエチレングリコール成分と加水分解性結合により第1のポリエチレングリコール成分に共有結合で結合した第2のポリエチレングリコール成分とを含む。

【0016】

本発明の他の実施形態によれば、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有するメチル末端ポリエチレングリコール成分に、カルボン酸成分に遠位の末端で、共有結合で結合したヘキサ酸を含むオリゴマーのカルボン酸成分に、ヒトインスリンのLys^{B29}で共有結合で結合したヒトインスリンを各結合体が含む、結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。

【0017】

本発明のこれらの実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、多分散の混合物のそれと比較した場合、好ましくは改良された性質を有する。一つの実施形態においては、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、そしてこの混合物が実質的に単分散の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のインビボ活性よりも大きいインビボ活性を有する、結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。

【0018】

もう一つの実施形態においては、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、そしてこの混合物が実質的に単分散の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインビトロ活性よりも大きいインビボ活性を有する、結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。

【0019】

なお更にもう一つの実施形態においては、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、そしてこの混合物が実質的に単分散の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する抵抗性と比較した場合、キモトリプシンによる分解に対する増大した抵抗性を有する、結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。

【0020】

なお更にもう一つの実施形態においては、各結合体がポリエチレングリコール成分を含

10

20

30

40

50

むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、この混合物が実質的に単分散の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する、結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。

【0021】

本発明の実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、好ましくは2つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。更に好ましくは、本発明の実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、3つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。最も好ましくは、本発明の実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、4つの上述の性質をすべて有する。

【0022】

本発明の更に他の実施形態によれば、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、この混合物が約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、結合体の混合物が提供される。

【0023】

本発明のなお他の実施形態によれば、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、そしてこの混合物が10、000以上の分散度係数(DC)：

【数3】

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

(式中、

nはこのサンプル中の異なる分子数であり、

N_i はこのサンプル中のi番目の分子数であり、

M_i はi番目の分子の質量である)を有する、結合体の混合物が提供される。

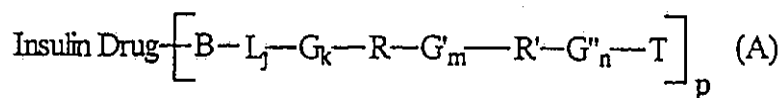
【0024】

本発明の他の実施形態によれば、各結合体がオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、同数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、結合体の混合物が提供される。

【0025】

本発明の更に他の実施形態によれば、各結合体が同じであり、そして式：

【化5】



(式中、

Bは結合成分であり、

Lはリンカー成分であり、

G、G'及びG''は個別に選ばれたスペーサー成分であり、

Rは親油性成分であり、R'はポリアルキレングリコール成分であるか、又はR'は親油性成分であり、そしてRはポリアルキレングリコール成分であり、

Tは末端成分であり、

j、k、m及びnはそれぞれ0または1であり、

pは1とインスリン薬物上の求核性残基の数との間の整数である)を有する、結合体の混合物が提供される。

【0026】

また、本発明の結合体混合物を含む医薬組成物並びに有効量のこのような医薬組成物を投与することにより、このような治療を必要とする被験者のインスリン欠乏を治療する方法も提供される。

【0027】

加えて、このような結合体混合物を合成する方法が提供される。

【0028】

本発明の実施形態のインスリン - オリゴマー結合体混合物は、慣用の多分散のインスリン - オリゴマー結合体混合物と比較した場合、増大したインピボ活性及び/または低下した被験者間変動及び/または低下したキモトリプシンによる分解を提供する。

10

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、ここで記述される好ましい実施形態に関して述べられる。しかしながら、これらの実施形態は本発明を例示する目的のものであり、クレームにより規定される本発明の範囲を限定するものと考えられるべきでないことを認識すべきである。

【0030】

ここで使用されるように、「非多分散の」という用語は、Davisらへの米国特許第4,179,337号;Greenwaldへの米国特許第5,567,422号;Greenwaldらへの米国特許第5,405,877号;及びEkwuribeへの米国特許第5,359,030号で記述されている、多分散の混合物と対照的な分散度を有する化合物の混合物を記述するのに使用される。

20

【0031】

ここで使用されるように、「実質的に単分散の」という用語は、この混合物中の化合物の少なくとも約95パーセントが同一の分子量を有する化合物の混合物を記述するのに使用される。

【0032】

ここで使用されるように、「単分散の」という用語は、この混合物中の化合物の約100パーセントの化合物が同一の分子量を有する化合物の混合物を記述するのに使用される。

【0033】

ここで使用されるように、「実質的に純粋に単分散の」という用語は、この混合物中の化合物の少なくとも約95パーセントの化合物が同一の分子量と同一の構造を有する、化合物の混合物を記述するのに使用される。このように、実質的に純粋に単分散の混合物は、実質的に単分散の混合物であるが、実質的に単分散の混合物は、必ずしも実質的に純粋に単分散の混合物ではない。

30

【0034】

ここで使用されるように、「純粋に単分散の」という用語は、この混合物中の化合物の約100パーセントの化合物が同一の分子量と同一の構造を有する、化合物の混合物を記述するのに使用される。このように、純粋に単分散の混合物は単分散の混合物であるが、単分散の混合物は、必ずしも実質的に純粋に単分散の混合物ではない。

40

【0035】

ここで使用されるように、「重量平均分子量」という用語は、この混合物中の所定の分子に対する重量分率にこの混合物中の各分子に対する分子量を掛けた積の合計として定義される。「重量平均分子量」は記号 M_w により表される。

【0036】

ここで使用されるように、「数平均分子量」という用語は、混合物の全重量を混合物中の分子数で割ったものとして定義され、記号 M_n により表される。

【0037】

ここで使用されるように、「分散度係数」(DC)という用語は、式：

【数4】

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

(式中、
nはサンプル中の異なる分子の数であり、
N_iはサンプル中のi番目の分子の数であり、
M_iはi番目の分子の質量である)
により定義される。

10

【0038】

ここで使用されるように、「被験者内変動」という用語は、この被験者が異なる時に同一用量の薬物または医薬組成物を投与された場合、同一被験者内に起こる活性の変動を意味する。

【0039】

ここで使用されるように、「被験者間変動」という用語は、各被験者が同一用量の一定の薬物または医薬配合物を投与された場合、2人あるいはそれ以上の間の活性の変動を意味する。

20

【0040】

ここで使用されるように、「インスリン薬物」という用語は、インスリンの全部あるいは一部の生物活性を有する薬物を意味する。

【0041】

ここで使用されるように、「インスリン」という用語は、天然、合成、あるいは遺伝子工学による原料により提供される、ヒトインスリン、ウシインスリン、ブタインスリンまたはクジラインスリンを意味する。

【0042】

ここで使用されるように、「インスリン類縁体 (Insulin analogs)」という用語は、インスリンの全部あるいは一部の活性を保ちながら、一つあるいはそれ以上のアミノ酸を置き換えたインスリンを意味する。この類縁体は、置換位置を添字として置換アミノ酸を記述し、続いてインスリンを表示することにより記述される。例えば、「Pro^{B29}インスリン、ヒト」は、ヒトインスリン分子のB29位置に通常見出されるリジンをプロリンにより置換したということの意味する。

30

【0043】

当業者ならば理解するように、インスリン類縁体を種々の手段により得ることができる。例として、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位等の構造を有する相互作用性な結合能力をそれ程失わずに、あるアミノ酸をインスリン構造中の他のアミノ酸に置換してもよい。インスリンの相互作用性能力と性質は、その生物学的機能の活性を規定するので、あるアミノ酸配列置換をアミノ酸配列で行って、それにも拘わらず似た性質のポリペプチドのままとすることができる。

40

【0044】

このような置換を行う場合、アミノ酸の疎水性親水性指標 (hydropathic index) を考慮してもよい。ポリペプチドに相互作用性の生物学的機能を付与する場合のアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該分野では一般的に理解されている。アミノ酸の相対的な疎水性親水性は、得られるポリペプチドの二次的な構造に寄与し、次には、これがこのタンパク質の他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することが認められている。各アミノ酸には、その疎水性と電荷性能を基準にして疎水性親水性指標が次のように割り当てられている：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シ

50

スチン (+ 2 . 5) ; メチオニン (+ 1 . 9) ; アラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; スレオニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロシン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタメート (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパルテート (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; 及びアルギニン (- 4 . 5) 。 当業者に理解されるように、あるアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標あるいは得点を有する他のアミノ酸により置換され、なお、類似の生物活性のポリペプチドを生じる、すなわち、なお機能的に同等なポリペプチドを得ることができる。このような変化を行う場合、疎水性親水性指標がお互いに ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、お互いに ± 1 以内であるものが特に好ましく、そしてお互いに ± 0 . 5 以内であるものが更に特に好ましい。

10

【 0 0 4 5 】

また、似たアミノ酸の置換を親水性を基準として有効に行うことができることも当業者では理解されている。米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号は、タンパク質の最大の局所的な平均の親水性がその隣接したアミノ酸の親水性により支配されて、このタンパク質の生物学的性質と相関することを規定している。米国特許第 4 , 5 5 4 , 1 0 1 号に詳述されているように、次の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (± 3 . 0) ; アスパルテート (+ 3 . 0 ± 1) ; グルタメート (+ 3 . 0 ± 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0 . 4) ; プロリン (- 0 . 5 ± 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) 。 当業者ならば理解するように、アミノ酸は、類似の親水性値を有するもう一つのアミノ酸に置換され、なお、生物学的に同等な、特に免疫的に同等なポリペプチドを得ることができる。このような変化においては、親水性値がお互いに ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、お互いに ± 1 以内であるものが特に好ましく、そしてお互いに ± 0 . 5 以内であるものが更に特に好ましい。

20

【 0 0 4 6 】

それゆえ、上記に詳述したように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、これらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。種々の前出の性能を考慮に入れた、例示の置換物 (すなわち、ポリペプチドの生物活性を著しく変えずに交換できるアミノ酸) は、当業者に既知であり、例えば：アルギニン及びリジン；グルタメート及びアスパルテート；セリン及びスレオニン；グルタミン及びアスパラギン；及びバリン、ロイシン及びイソロイシンを含む。

30

【 0 0 4 7 】

ここで使用されるように、「インスリンフラグメント」という用語は、インスリンの全部あるいは一部の活性を保持する、インスリン中に見出されるアミノ酸配列のセグメントを意味する。インスリンフラグメントは、アミノ酸配列中の位置を記述し、続いてアミノ酸を記述することにより示される。例えば、「B 2 5 - B 3 0 ヒトインスリン」フラグメントは、ヒトインスリンアミノ酸配列中の B 2 5、B 2 6、B 2 7、B 2 8、B 2 9 及び B 3 0 の位置に対応する、6 個のアミノ酸配列である。

40

【 0 0 4 8 】

ここで使用されるように、「インスリンフラグメント類縁体」という用語は、このセグメント中の一つあるいはそれ以上のアミノ酸をインスリンの全部あるいは一部の活性を保持しながら置換した、インスリン分子中に見出されるアミノ酸配列のセグメントを意味する。

【 0 0 4 9 】

ここで使用されるように、「PEG」という用語は、直鎖あるいは分岐鎖のポリエチレングリコールポリマーを指し、ポリエチレングリコール (m P E G) のモノメチルエーテルを含む。「PEGサブユニット」及びポリエチレングリコールサブユニットという用語

50

は、単一のポリエチレングリコール単位、すなわち - (C H ₂ C H ₂ O) - を指す。

【 0 0 5 0 】

ここで使用されるように、「親油性」という用語は、脂質中に溶解する能力及び/または生物膜への浸透、それとの相互作用及び/または横断の能力を意味し、そして「親油性成分」または「親油性基」という用語は、親油性であり、そして/またはもう一つの化学物質に結合する場合には、このような化学物質の親油性を増大させる成分を意味する。親油性成分の例は、限定するのではないが、アルキル、脂肪酸、脂肪酸のエステル、コレステリル、アダマンチルなどを含む。

【 0 0 5 1 】

ここで使用されるように、「低級アルキル」という用語は、1 から 5 個の炭素原子を有する置換あるいは非置換のアルキル成分を指す。

【 0 0 5 2 】

ここで使用されるように、「高級アルキル」という用語は、6 個あるいはそれ以上の炭素原子を有する置換あるいは非置換のアルキル成分を指す。

【 0 0 5 3 】

本発明の実施形態においては、インスリン - オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物が提供される。好ましくは、この混合物中の少なくとも約 9 6、9 7、9 8 あるいは 9 9 パーセントの結合体は同じ分子量を有する。更に好ましくは、この混合物は単分散の混合物である。なお更に好ましくは、この混合物は実質的に純粋に単分散の混合物である。更に好ましくは、この混合物中の少なくとも約 9 6、9 7、9 8 あるいは 9 9 パーセントの結合体は同じ分子量と同じ分子構造を有する。最も好ましくは、この混合物は純粋に単分散の混合物である。

【 0 0 5 4 】

このインスリン薬物は好ましくはインスリンである。更に好ましくは、このインスリン薬物はヒトインスリンである。しかしながら、例えば、プロインスリン、インスリン類縁体、インスリンフラグメント、及びインスリンフラグメント類縁体を含む、当業者に既知の種々のインスリン薬物からこのインスリン薬物を選んでもよいことを理解することができる。インスリン類縁体は、限定するのではないが、A s p^{B28}ヒトインスリン、L y s^{B28}ヒトインスリン、L e u^{B28}ヒトインスリン、V a l^{B28}ヒトインスリン、A l a^{B28}ヒトインスリン、A s p^{B28} P r o^{B29}ヒトインスリン、L y s^{B28} P r o^{B29}ヒトインスリン、L e u^{B28} P r o^{B29}ヒトインスリン、V a l^{B28} P r o^{B29}ヒトインスリン、A l a^{B28} P r o^{B29}ヒトインスリン、並びに上述の置換のガイドラインを用いて提供される類縁体を含む。インスリンフラグメントは、限定するのではないが、B 2 2 - B 3 0ヒトインスリン、B 2 3 - B 3 0ヒトインスリン、B 2 5 - B 3 0ヒトインスリン、B 2 6 - B 3 0ヒトインスリン、B 2 7 - B 3 0ヒトインスリン、B 2 9 - B 3 0ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、及びヒトインスリンのB鎖を含む。インスリンフラグメント中で上述の一つあるいはそれ以上のアミノ酸を置換することにより、インスリンフラグメント類縁体を提供することもできる。

【 0 0 5 5 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含む種々のオリゴマーであってもよい。好ましくは、このオリゴマーのポリエチレングリコール成分は、少なくとも2、3あるいは4個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。更に好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも5あるいは6個のポリエチレングリコールサブユニットを有し、最も好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。

【 0 0 5 6 】

このオリゴマーは、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、追加の親水性成分、親油性成分、スペーサー成分、リンカー成分、及び停止成分を含む、一つあるいはそれ以上の他の成分を含んでもよい。このオリゴマー中の種々の成分は、加水分解性あるいは非加水分解性結合のいずれかにより相互に共有結合で結合する。

10

20

30

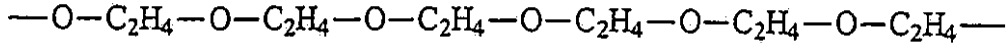
40

50

【 0 0 5 7 】

このオリゴマーは、限定するのではないが、糖、ポリアルキレンオキシド、及びポリアミン/PEGコポリマーを含む、一つあるいはそれ以上の追加の親水性成分（すなわち、ポリエチレングリコール成分に加えての成分）を更に含む。ポリエチレングリコールはポリアルキレンオキシドであるので、追加の親水性成分はポリエチレングリコール成分であってよい。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合により連結している場合には、同じ成分であると考えられる。例えば、成分

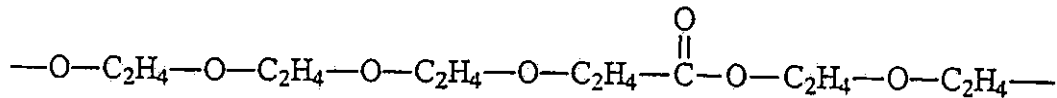
【 化 6 】



10

は、6個のポリエチレングリコールサブユニットを有する、単一のポリエチレングリコール成分である。この成分がこのオリゴマー中の唯一の親水性成分である場合には、このオリゴマーは追加の親水性成分を含まない。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合以外の結合により連結している場合には、異なる成分であると考えられる。例えば、成分

【 化 7 】



20

は、4個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と2個のポリエチレングリコールサブユニットを有する追加の親水性成分である。好ましくは、本発明の実施形態のオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含み、追加の親水性成分を含まない。

【 0 0 5 8 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上の親油性成分を更に含む。この親油性成分は、好ましくは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐のアルキル成分、あるいは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐の脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分である場合には、これらは、好ましくは1から28個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和のアルキル成分である。更に好ましくは、このアルキル成分は、2から12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分である場合、これは好ましくは2から18個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和である天然脂肪酸成分である。更に好ましくは、この脂肪酸成分は3から14個の炭素原子を有する。最も好ましくは、この脂肪酸成分は少なくとも4、5あるいは6個の炭素原子を有する。

30

【 0 0 5 9 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上のスペーサー成分を更に含む。例えば、スペーサー成分を使用して、親油性成分から親水性成分を分離するか、インスリン薬物から親油性成分または親水性成分を分離するか、第2の親水性あるいは親油性成分から第1の親水性あるいは親油性成分を分離するか、あるいはリンカー成分から親水性成分または親油性成分を分離することができる。スペーサー成分は、好ましくは糖、コレステロール及びグリセリン成分からなる群から選ばれる。

40

【 0 0 6 0 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に連結するのに使用される、一つあるいはそれ以上のリンカー成分を更に含んでよい。リンカー成分は、好ましくはアルキル及び脂肪酸成分からなる群から選ばれる。

【 0 0 6 1 】

このオリゴマーは、インスリン薬物に連結しない、一つあるいはそれ以上のオリゴマーの末端で一つあるいはそれ以上の末端成分を更に含んでなってもよい。この末端成分は、

50

好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、更に好ましくは低級アルキルまたは低級アルコキシ成分である。最も好ましくは、この末端成分はメチルまたはメトキシである。この末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分である一方、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、糖、コレステロール、アルコール、及び脂肪酸を含む、種々の成分であってもよいことを理解すべきである。

【0062】

このオリゴマーは、このインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する。ある実施形態においては、このインスリン薬物は、加水分解性結合（例えば、エステルあるいはカーボネート結合）を用いてオリゴマーに連結する。加水分解性の連結は、前駆薬物として作用するインスリン薬物 - オリゴマー結合体を提供する。例えばインスリン薬物オリゴマー結合体が不活性（すなわち、この結合体がインスリン薬物の主要な作用機構により身体に影響する能力を欠く）である場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーが各インスリン薬物 - オリゴマー結合体から開裂して、活性な薬物をもたらすのに従って、加水分解性の連結は、インスリン薬物を一定の時間にわたって投与する時間放出あるいは制御放出効果をもたらすことができる。他の実施形態においては、このインスリン薬物は、非加水分解性結合（例えば、カルバメート、アミド、またはエーテル結合）を用いて、オリゴマーに連結する。インスリン薬物 - オリゴマー結合体を血液流中で長時間、好ましくは少なくとも2時間循環させることが望ましい場合には、非加水分解性の結合の使用が好ましい。当業者ならば理解するように、このオリゴマーがインスリン薬物に共有結合で結合している場合、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に共有結合で連結するのに使用される、一つあるいはそれ以上の結合成分を更に含む。結合成分は、好ましくは共有結合、エステル成分、カーボネート成分、カルバメート成分、アミド成分及び2級アミン成分からなる群から選ばれる。オリゴマー上の一つ以上の成分がインスリン薬物に共有結合で結合してもよい。

【0063】

このオリゴマーがインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する一方で、このオリゴマーをインスリン薬物に非共有結合で結合して、非共有結合で結合体化したインスリン薬物 - オリゴマー錯体を形成することは理解されるべきである。当業者ならば理解するように、非共有結合の連結は、限定するのではないが、水素結合、イオン結合、ファンデアワールズ結合、及びミセルあるいはリポソームカプセル化を含む。本発明の実施形態によれば、当業者ならば理解するように、オリゴマーを好適に構成、変成し、及び/または適宜官能基化して、選ばれた方法で非共有結合の結合の能力（例えば、水素結合能力を賦与する）を賦与してもよい。本発明の他の実施形態によれば、限定するのではないが、アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、胆汁酸、胆汁酸誘導体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、サリチル酸、サリチル酸誘導体、アミノサリチル酸、及びアミノサリチル酸誘導体を含む、種々の化合物により、オリゴマーを誘導体とすることができる。得られるオリゴマーを薬物分子、医薬製品、及び/または医薬賦形剤と非共有結合により連結（錯体）することができる。得られる錯体は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。本発明の更に他の実施形態により、オリゴマーをアミン及び/またはアルキルアミンにより誘導体とすることができる。好適な酸性条件下で、得られるオリゴマーは、薬物分子、医薬製品及び/または医薬賦形剤と共に非共有結合により結合体化した錯体を形成することができる。このような錯体化から得られる製品は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。

【0064】

一つ以上のオリゴマー（すなわち、複数のオリゴマー）をインスリン薬物に連結してもよい。この複数のオリゴマーは、好ましくは同一である。しかしながら、この複数のオリゴマーはお互いに異なってよく、あるいは、この複数のオリゴマーの一部は同一でもよく、また一部は異なってよいことを理解すべきである。複数のオリゴマーをインスリン薬物に連結する場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーを加水分解性結合を有するインスリン薬物と連結し、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーを非加水分解性結合を

10

20

30

40

50

有するインスリン薬物と連結するのが好ましい。あるいは、この複数のオリゴマーをインスリン薬物に連結する結合のすべてが加水分解性であってもよいが、種々の程度の加水分解性を有し、例えば、一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から急速に取り外され、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から緩慢に取り外されるようであってもよい。

【0065】

限定するのではないが、求核性ヒドロキシル官能基及び/またはアミノ官能基を含む、インスリン薬物の種々の求核残基でこのオリゴマーをインスリン薬物と連結してもよい。インスリン薬物がポリペプチドである場合には、例えばセリン及び/またはチロシン残基で求核性ヒドロキシル官能基が見出され、そして例えばヒスチジン及び/またはリジン残基で、及び/またはポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端で求核性アミノ官能基が見出される。オリゴマーがインスリンポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端に連結している場合には、この連結は、好ましくは2級アミンを形成する。このインスリン薬物がヒトインスリンである場合には、例えばこのオリゴマーをG1y^{A1}のアミノ官能基、Phe^{B1}のアミノ官能基、及びLys^{B29}のアミノ官能基を含む、インスリンのアミノ官能基に連結してもよい。一つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。2つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはPhe^{B1}のアミノ官能基とLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。一つ以上のオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、モノ-結合体化したヒトインスリンについて高活性(改善されたグルコース低下能力)が観察される。

【0066】

本発明のインスリン薬物-オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物を種々の方法により合成することができる。例えば、オリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供するのに十分な条件下で、カルボン酸の実質的に単分散の混合物をポリエチレングリコールの実質的に単分散の混合物と接触させることにより、カルボン酸とポリエチレングリコールからなるオリゴマーの実質的に単分散の混合物が合成される。次に、実質的に単分散の混合物のオリゴマーが活性化され、インスリン薬物と反応して、インスリン薬物-オリゴマー結合体を提供することが可能になる。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路の一つの実施形態を図3に図示し、下記の例11~18で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路のもう一つの実施形態を図4に図示し、下記の例19~24で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路の更にもう一つの実施形態を図5に図示し、下記の例25~29で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図6に図示し、下記の例30~31で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路のもう一つの実施形態を図7に図示し、下記の例32~37で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路の更にもう一つの実施形態を図8に図示し、下記の例38で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図9に図示し、下記の例39で説明する。活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物を提供する合成経路のもう一つの実施形態を図10に図示し、下記の例40で説明する。

【0067】

活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物をインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供するのに十分な条件下で、インスリン薬物の実質的に単分散の混合物と反応させてもよい。好ましい合成を下記の例41で述べる。当業者ならば理解するように、この反応条件(例えば、選ばれたモル比、溶媒混合物及び/またはpH)をコントロールして、活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物とインスリン薬物の実質的に単分散の混合物との反応から得られるインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物が実質的に単分散の混合物であるようにできる。例えば、反応溶液のpHをリジンのpK_a以下

10

20

30

40

50

に維持することにより、リジンのアミノ官能基での結合を抑制することができる。あるいは、例えば例50で下記に述べるようにHPLCを用いて、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離、単離して、インスリン薬物-オリゴマー結合体、例えばモノ-、ジ-、またはトリ-結合体の実質的に単分散の混合物を提供することができる。限定するのではないが、質量分析を含む、当業者に公知の種々の方法を用いて、特定の単離した結合体の結合度（例えば、単離した分子がモノ-、ジ-、またはトリ-結合体であるかどうか）を求め、そして/または確認することができる。限定するのではないが、配列分析、ペプチドマッピング、選択的な酵素開裂、及び/またはエンドペプチダーゼ開裂を含む、当業者に公知の種々の方法を用いて、特定の結合体構造（このオリゴマーがG1y^{A1}、Phe^{B1}またはLys^{B29}でヒトインスリンモノ結合体であるかどうかを）を決定し、そして/または確認することができる。

10

【0068】

当業者ならば理解するように、例えば、このインスリン薬物とN-tert-ブトキシカルボニル(t-BOC)、またはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)(N-FMOC)等の好適な試剤とを反応させることにより、インスリン薬物上の一つあるいはそれ以上の反応部位をブロックすることができる。例えばインスリン薬物がポリペプチドである場合には、この方法が好ましく、そしてこのポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端でオリゴマーを有する、不飽和結合体（すなわち、すべての求核性残基が結合体化されてはいない結合体）を形成することが望ましい。このようなブロック化に続いて、このブロック化したインスリン薬物の実質的に単分散の混合物を活性化されたオリゴマーの実質的に単分散の混合物と反応させて、一つあるいはそれ以上の求核性残基に連結したオリゴマーを持ち、そして他の求核性残基に連結したブロック化成分を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供することができる。当業者ならば理解するように、この結合反応の後、このインスリン薬物オリゴマー結合体を脱ブロック化してもよい。必要ならば、次に、このインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を前述のようにして分離して、インスリン薬物-オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物を提供してもよい。あるいは、脱ブロック化に先立ってこのインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離してもよい。

20

【0069】

本発明の他の実施形態により、結合体の実質的に単分散の混合物が提供され、各結合体は、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有するメチル末端ポリエチレングリコール成分に、カルボン酸成分に遠位の末端で、共有結合で結合したヘキサ酸を含むオリゴマーのカルボン酸成分に、インスリンのLys^{B29}で共有結合で結合したヒトインスリンを含む。好ましくは、実質的に単分散の混合物中の各結合体は、7個のポリエチレングリコールサブユニットを有するメチル末端ポリエチレングリコール成分に、カルボン酸成分に遠位の末端で、共有結合で結合したヘキサ酸からなるオリゴマーのカルボン酸成分にインスリンのLys^{B29}で共有結合で結合したヒトインスリンからなる。

30

【0070】

本発明のこれらの実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、好ましくは多分散の混合物の性質に比較した場合、改善された性質を有する。例えば、インスリン薬物-オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物は、好ましくは実質的に単分散の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の多分散の混合物のインビボ活性よりも大きい、インビボ活性を有する。当業者ならば理解するように、実質的に単分散の混合物の数平均の分子量と多分散の混合物の数平均の重量を、限定するのではないが、例えば、H. R. Allcock & F. W. Lampe, *CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY* 394-402 (第2編、1991)に記述されているような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィ等のサイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により測定してもよい。

40

【0071】

もう一つの例として、インスリン薬物オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物は、

50

好ましくは実質的に単分散の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインビトロ活性よりも大きい、インビトロ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、実質的に単分散の混合物の数平均の分子量と多分散の混合物の数平均分子量を測定してもよい。

【0072】

当業者ならば理解するように、特定の混合物のインビトロ活性を種々の方法により測定してもよい。好ましくは、Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California) から市販されている Cytosensor (登録商標) 微小生理計 (Microphysiometer) を用いて、このインビトロ活性を測定する。この微小生理計は、培養用孔 (培養孔) 中の培養細胞に添加した薬物に应答する細胞外の酸性化の速度の小さな変化をモニターする。この应答は試験下の分子の活性に比例する。好ましくは、実質的に単分散の混合物のインビトロ活性は、多分散の混合物のインビトロ活性よりも少なくとも約 5 パーセント大きい。更に好ましくは、実質的に単分散の混合物のインビトロ活性は、多分散の混合物のインビトロ活性よりも少なくとも約 10 パーセント大きい。

10

【0073】

更にもう一つの例として、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物は、実質的に単分散の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性と比較した場合、好ましくはキモトリプシンによる分解に増大した耐性を有する。キモトリプシンに対する耐性は、下記の例 52 に概述したものと類似の方法を用いて、試験すべき分子をキモトリプシン中で消化した場合に、残存するパーセントに相当する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、実質的に単分散の混合物の数平均の分子量と多分散の混合物の数平均分子量を測定してもよい。好ましくは、実質的に単分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約 10 パーセント大きい。更に好ましくは、実質的に単分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約 20 パーセント大きい。

20

30

【0074】

なお更にもう一つの例として、好ましくはインスリン薬物 - オリゴマー結合体の実質的に単分散の混合物は、実質的に単分散の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、実質的に単分散の混合物の数平均の分子量と多分散の混合物の数平均分子量を測定してもよい。当業者ならば理解するように、この被験者間変動を種々の方法により測定してもよい。好ましくは、この被験者間変動を次のように計算する。用量応答曲線下の面積 (AUC) (すなわち、用量応答曲線とベースラインの間の面積) を各被験者について求める。各被験者の AUC を合計し、その合計を被験者の数で割ることにより、すべての被験者に対する平均の AUC を求める。次に、被験者の AUC と平均の AUC の間の差の絶対値を各被験者について求める。次に、得られる差の絶対値を足して、被験者間変動を表わす値を得る。低い値は低い被験者間変動を表わし、高い値は高い被験者間変動を表わす。好ましくは、実質的に単分散の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約 10 パーセント少ない。更に好ましくは、実質的に単分散の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約 25 パーセント少ない。

40

【0075】

本発明の実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、好ましくは 2 つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。更に好ましくは、本発明の実施形態の結合体の実質的に単分

50

散の混合物は、3つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。最も好ましくは、本発明の実施形態の結合体の実質的に単分散の混合物は、4つの上述の性質をすべて有する。

【0076】

本発明の更に他の実施形態においては、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、結合体の混合物が提供される。この混合物中の各結合体は、ポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結した、インスリン薬物を含む。この標準偏差は、好ましくは約14ダルトン未満であり、更に好ましくは約11ダルトン未満である。限定するのではないが、例えば、H. R. Allcock & F. W. Lampe, CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY 394~402 (第2編、1991) に記述されているような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィ等のサイズ排除クロマトグラフィを含む、当該分野の技術者に既知の種々の方法により、この分子量分布を測定することができる。次に、当業者ならば理解するように、この分子量分布の標準偏差を統計的な方法により求めることができる。

10

【0077】

このインスリン薬物は好ましくはインスリンである。更に好ましくは、このインスリン薬物はヒトインスリンである。しかしながら、例えば、プロインスリン、インスリン類縁体、インスリンフラグメント、及びインスリンフラグメント類縁体を含む、当業者に既知の種々のインスリン薬物からこのインスリン薬物を選んでもよいことを理解すべきである。インスリン類縁体は、限定するのではないが、Asp^{B28}ヒトインスリン、Lys^{B28}ヒトインスリン、Leu^{B28}ヒトインスリン、Val^{B28}ヒトインスリン、Ala^{B28}ヒトインスリン、Asp^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Lys^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Leu^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Val^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Ala^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、並びに上述の置換のガイドラインを用いて提供される類縁体を含む。インスリンフラグメントは、限定するのではないが、B22-B30ヒトインスリン、B23-B30ヒトインスリン、B25-B30ヒトインスリン、B26-B30ヒトインスリン、B27-B30ヒトインスリン、B29-B30ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、及びヒトインスリンのB鎖を含む。インスリンフラグメント中で上述の一つあるいはそれ以上のアミノ酸を置換することにより、インスリンフラグメント類縁体を提供してもよい。

20

【0078】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含む、種々のオリゴマーであってもよい。好ましくは、このオリゴマーのポリエチレングリコール成分は、少なくとも2、3あるいは4個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。更に好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも5あるいは6個のポリエチレングリコールサブユニットを有し、最も好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。

30

【0079】

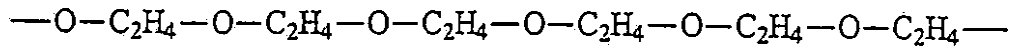
このオリゴマーは、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、追加の親水性成分、親油性成分、スペーサー成分、リンカー成分、及び末端成分を含む、一つあるいはそれ以上の他の成分を含んでなってもよい。このオリゴマー中の種々の成分は、加水分解性あるいは非加水分解性結合のいずれかにより相互に共有結合で結合する。

40

【0080】

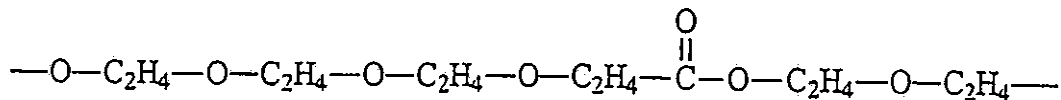
このオリゴマーは、限定するのではないが、糖、ポリアルキレンオキシド、及びポリアミン/PEGコポリマーを含む、一つあるいはそれ以上の追加の親水性成分(すなわち、ポリエチレングリコール成分に加えての成分)を更に含む。ポリエチレングリコールはポリアルキレンオキシドであるので、追加の親水性成分はポリエチレングリコール成分である。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合により連結している場合には、同じ成分であると考えられる。例えば、成分：

【化 8】



は、6個のポリエチレングリコールサブユニットを有する、単一のポリエチレングリコール成分である。この成分がこのオリゴマー中の唯一の親水性成分である場合には、このオリゴマーは追加の親水性成分を含まない。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合以外の結合により連結している場合には、異なる成分であると考えられる。例えば、成分：

【化 9】



は、4個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と2個のポリエチレングリコールサブユニットを有する追加の親水性成分である。好ましくは、本発明の実施形態のオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含み、追加の親水性成分を含まない。

【0081】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上の親油性成分を更に含む。この親油性成分は、好ましくは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐のアルキル成分、あるいは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐の脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分である場合には、これらは、好ましくは1から28個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和のアルキル成分である。更に好ましくは、このアルキル成分は、2から12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分である場合、これは好ましくは2から18個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和である天然脂肪酸成分である。更に好ましくは、この脂肪酸成分は3から14個の炭素原子を有する。最も好ましくは、この脂肪酸成分は少なくとも4、5あるいは6個の炭素原子を有する。

【0082】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上のスペーサー成分を更に含んでなってもよい。例えば、スペーサー成分を使用して、親油性成分から親水性成分を分離するか、インスリン薬物から親油性成分または親水性成分を分離するか、第2の親水性あるいは親油性成分から第1の親水性あるいは親油性成分を分離するか、あるいはリンカー成分から親水性成分または親油性成分を分離してもよい。スペーサー成分は、好ましくは糖、コレステロール及びグリセリン成分からなる群から選ばれる。

【0083】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に連結するのに使用する、一つあるいはそれ以上のリンカー成分を更に含む。リンカー成分は、好ましくはアルキル及び脂肪酸成分からなる群から選ばれる。

【0084】

このオリゴマーは、インスリン薬物に連結しない、一つあるいはそれ以上のオリゴマーの末端で一つあるいはそれ以上の末端成分を更に含んでなってもよい。末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、更に好ましくは低級アルキルまたは低級アルコキシ成分である。最も好ましくは、この末端成分はメチルまたはメトキシである。この末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分である一方、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、糖、コレステロール、アルコール、及び脂肪酸を含む、種々の成分であってもよいことを理解すべきである。

【0085】

このオリゴマーは、好ましくはこのインスリン薬物に共有結合で結合する。ある実施形態においては、このインスリン薬物は、加水分解性結合（例えば、エステルあるいはカー

10

20

30

40

50

ボネート結合)を用いてオリゴマーに連結する。加水分解性の連結は、前駆薬物として作用するインスリン薬物-オリゴマー結合体を提供する。例えばインスリン薬物-オリゴマー結合体が不活性(すなわち、この結合体がインスリン薬物の主要な作用機構により身体に影響する能力を欠く)である場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーが各インスリン薬物-オリゴマー結合体から開裂して、活性な薬物をもたらすのに従って、加水分解性の連結は、インスリン薬物を一定の時間にわたって投与する時間放出あるいは制御放出効果をもたらす。一つの実施形態においては、このインスリン薬物は、非加水分解性結合(例えば、カルバメート、アミド、またはエーテル結合)を用いて、オリゴマーに連結する。インスリン薬物-オリゴマー結合体を血液流中で長時間、好ましくは少なくとも2時間循環させることが望ましい場合には、非加水分解性結合の使用が好ましい。当業者ならば理解するように、このオリゴマーがインスリン薬物に共有結合で結合している場合、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に共有結合で連結するのに使用する、一つあるいはそれ以上の結合成分を更に含む。結合成分は、好ましくは共有結合の結合、エステル成分、カーボネート成分、カルバメート成分、アミド成分及び2級アミン成分からなる群から選ばれる。オリゴマー上の一つ以上の成分は、インスリン薬物に共有結合で結合してもよい。

10

【0086】

このオリゴマーはインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する一方で、このオリゴマーが、インスリン薬物に非共有結合で結合して、非共有結合で結合体化したインスリン薬物-オリゴマー錯体を形成することは理解されるべきである。当業者ならば理解するように、非共有結合の連結は、限定するのではないが、水素結合、イオン結合、ファンデアワールス結合、及びミセルあるいはリポソームカプセル化を含む。本発明の実施形態によれば、当業者ならば理解するように、オリゴマーを好適に構成、変成し、そして/または適宜官能基化して、選ばれた方法で非共有結合による結合の能力(例えば、水素結合能力を賦与する)を賦与してもよい。本発明の他の実施形態によれば、限定するのではないが、アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、胆汁酸、胆汁酸誘導体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、サリチル酸、サリチル酸誘導体、アミノサリチル酸、及びアミノサリチル酸誘導体を含む、種々の化合物により、オリゴマーを誘導体としてもよい。得られるオリゴマーを薬物分子、医薬製品、及び/または医薬賦形剤と非共有結合により連結(錯体)することができる。得られる錯体は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。本発明の更に他の実施形態によれば、オリゴマーをアミン及び/またはアルキルアミンにより誘導体としてもよい。好適な酸性条件下で、得られるオリゴマーは、薬物分子、医薬製品及び/または医薬賦形剤と共に非共有結合により結合体化した錯体を形成することができる。このような錯体化から得られる製品は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。

20

30

【0087】

一つ以上のオリゴマー(すなわち、複数のオリゴマー)をインスリン薬物に連結してもよい。この複数のオリゴマーは、好ましくは同一である。しかしながら、この複数のオリゴマーはお互いに異なってよく、あるいは、この複数のオリゴマーの一部は同じでもよく、また一部は異なってよいことを理解すべきである。複数のオリゴマーをインスリン薬物に連結する場合、一つあるいはそれ以上のオリゴマーを加水分解性結合でインスリン薬物と連結し、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーを非加水分解性結合でインスリン薬物と連結するのが好ましい。あるいは、この複数のオリゴマーをこのインスリン薬物に連結する結合のすべてが加水分解性であってもよいが、種々の程度の加水分解性を有し、例えば、この一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から急速に取り外され、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から緩慢に取り外されるようであってもよい。

40

【0088】

限定するのではないが、求核性ヒドロキシル官能基及び/またはアミノ官能基を含む、インスリン薬物の種々の求核残基でこのオリゴマーをインスリン薬物と連結してもよい。

50

インスリン薬物がポリペプチドである場合には、例えばセリン及び/またはチロシン残基で求核性ヒドロキシル官能基が見出され、そして例えばヒスチジン及び/またはリジン残基で、及び/またはポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端で求核性アミノ官能基が見出される。オリゴマーがインスリンポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端に連結している場合には、この連結は、好ましくは2級アミンを形成する。このインスリン薬物がヒトインスリンである場合には、例えばこのオリゴマーを、Gly^{A1}のアミノ官能基、Phe^{B1}のアミノ官能基、及びLys^{B29}のアミノ官能基を含む、インスリンのアミノ官能基に連結させてもよい。一つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結させる場合には、このオリゴマーは、好ましくはLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。2つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結させる場合には、このオリゴマーは、好ましくはPhe^{B1}のアミノ官能基とLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。一つ以上のオリゴマーをこのヒトインスリンに連結させる場合には、モノ-結合体化したヒトインスリンについて高活性(改善されたグルコース低下能力)が観察される。

【0089】

約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、結合体の実質的に単分散の混合物を種々の方法により合成することができる。例えば、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、オリゴマーの混合物を提供するのに十分な条件下で、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、カルボン酸の混合物と約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、ポリエチレングリコールの単分散の混合物とを接触させることにより、カルボン酸とポリエチレングリコールとからなる、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、オリゴマーの混合物が合成される。次に、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、混合物のオリゴマーは活性化され、インスリン薬物と反応して、インスリン薬物-オリゴマー結合体を提供することが可能である。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の一つの実施形態を図3に図示し、下記の例11~18に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のもう一つの実施形態を図4に図示し、下記の例19~24に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の更にもう一つの実施形態を図5に図示し、下記の例25~29に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図6に図示し、下記の例30~31に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のもう一つの実施形態を図7に図示し、下記の例32~37に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の更にもう一つの実施形態を図8に図示し、下記の例38に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図9に図示し、下記の例39に述べる。約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のもう一つの実施形態を図10に図示し、下記の例40に述べる。

【0090】

次に、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供するのに十分な条件下で、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物と約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物の混合物とを反応させる。好ましい合成を下記の例41に述べる。当業者ならば理解するように、この反応条件(例えば、選ばれたモル比、溶媒混合物及び/またはpH)をコントロールして、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する活性化されたオリゴマーの混合物と約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物の混合物との反応から得られるインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物が約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物の混合物であるようにすることができる。例えば

、反応溶液のpHをリジンの pK_a 以下に維持することにより、リジンのアミノ官能基での結合を抑制することができる。あるいは、例えば例50で下記に述べるようにHPLCを用いて、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離、単離して、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体、例えばモノ-、ジ-、またはトリ-結合体の実質的に単分散の混合物を提供することができる。限定するのではないが、質量分析を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の単離した結合体の結合度（例えば、単離した分子がモノ-、ジ-、またはトリ-結合体であるかどうか）を決定し、そして/または確認することができる。限定するのではないが、配列分析、ペプチドマッピング、選択的な酵素開裂、及び/またはエンドペプチダーゼ開裂を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の結合体構造（このオリゴマーがヒトインスリンのGly^{A1}、Phe^{B1}またはLys^{B29}でのモノ結合体であるかどうかを）を決定し、そして/または確認することができる。

10

【0091】

当業者ならば理解するように、例えば、このインスリン薬物とN-tert-ブトキシカルボニル(t-BOC)、またはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)(N-FMOC)等の好適な試剤とを反応させることにより、インスリン薬物上の一つあるいはそれ以上の反応部位をブロックしてもよい。例えばインスリン薬物がポリペプチドである場合には、この方法が好ましく、そしてこのポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端でオリゴマーを有する、不飽和結合体（すなわち、すべての求核性残基が結合体化されてはいない結合体）を形成することが望ましい。このようなブロック化に続いて、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有するこのブロック化されたインスリン薬物の混合物は、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、活性化されたオリゴマーの混合物と反応させて、一つあるいはそれ以上の求核性残基に連結したオリゴマーを持ち、また、他の求核性残基に連結したブロック化成分を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供することができる。当業者ならば理解するように、この結合反応の後、このインスリン薬物オリゴマー結合体を脱ブロック化してもよい。必要ならば、次に、このインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を前記のようにして分離して、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供してもよい。あるいは、脱ブロック化に先立ち、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離してもよい。

20

30

【0092】

約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、本発明のこれらの実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは多分散の混合物の性質に比較した場合、改善された性質を有する。例えば、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピボ活性よりも大きい、インピボ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、例えば、H.R. Allcock & F.W. Lampe, *CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY* 394~402 (第2編、1991)に記述されているような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィ等のサイズ排除クロマトグラフィを含む種々の方法により、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均の重量を測定することができる。

40

【0093】

もう一つの例として、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピボ活性よりも大きい、インピボ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ

50

排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。

【0094】

当業者ならば理解するように、特定の混合物のインビトロ活性を種々の方法により測定してもよい。好ましくは、Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California) から市販されている Cytosensor (登録商標) 微量生理計を用いて、このインビトロ活性を測定する。この微量生理計は、培養孔中の培養細胞に添加した薬物に反応する細胞外の酸性化の速度の小さな変化をモニターする。この反応は試験下の分子の活性に比例する。好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物のインビトロ活性は、この多分散の混合物のインビトロ活性よりも少なくとも約5パーセント大きい。更に好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物のインビトロ活性は、この多分散の混合物のインビトロ活性よりも少なくとも約10パーセント大きい。

10

【0095】

更にもう一つの例として、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性と比較した場合、好ましくはキモトリプシンによる分解に増大した耐性を有する。キモトリプシンに対する耐性は、下記の例52に概述したものと類似の方法を用いて、試験すべき分子をキモトリプシン中で消化した場合に、残存するパーセントに相当する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定してもよい。好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、この多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約10パーセント大きい。更に好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、この多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約20パーセント大きい。

20

30

【0096】

なお更にもう一つの例として、好ましくは約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の多分散の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均の分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。当業者ならば理解するように、この被験者間変動を種々の方法により測定することができる。好ましくは、この被験者間変動を次のように計算する。用量応答曲線下の面積(AUC)(すなわち、用量応答曲線とベースラインの間の面積)を各被験者について求める。各被験者のAUCを合計し、その合計を被験者の数で割ることにより、すべての被験者に対する平均のAUCを求める。次に、被験者のAUCと平均のAUCの間の差の絶対値を各被験者について求める。次に、得られる差の絶対値を足して、被験者間変動を表わす値を得る。低い値は低い被験者間変動を表わし、高い値は高い被験者間変動を表わす。好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、

40

50

この多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約10パーセント少ない。更に好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、この多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約25パーセント少ない。

【0097】

約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは2つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。更に好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、3つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。最も好ましくは、約22ダルトン未満の標準偏差の分子量分布を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、4つの上述の性質をすべて有する。

10

【0098】

本発明の更なる他の実施形態によれば、各結合体がポリエチレングリコール成分を含むオリゴマーに連結したインスリン薬物を含み、そしてこの混合物が10,000以上の分散度係数(DC)：

【数5】

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

20

(ここで、

nはこのサンプル中の異なる分子数であり、

N_i はこのサンプル中のi番目の分子の数であり、

M_i はi番目の分子の質量である)

を有する、結合体の混合物が提供される。結合体の混合物は、好ましくは100,000以上の分散度係数を有する。更に好ましくは、この結合体混合物の分散度係数は500,000以上であり、最も好ましくは、この分散度係数は10,000,000以上である。限定するのではないが、下記に例49に述べる方法を含めて、当業者ならば理解するような種々の方法により、変数、n、 N_i 、及び M_i を求めることができる。

30

【0099】

このインスリン薬物は、好ましくはインスリンである。更に好ましくは、このインスリン薬物はヒトインスリンである。しかしながら、例えば、プロインスリン、インスリン類縁体、インスリンフラグメント、及びインスリンフラグメント類縁体を含む、当業者に既知の種々のインスリン薬物からこのインスリン薬物を選んでもよいことを理解すべきである。インスリン類縁体は、限定するのではないが、Asp^{B28}ヒトインスリン、Lys^{B28}ヒトインスリン、Leu^{B28}ヒトインスリン、Val^{B28}ヒトインスリン、Ala^{B28}ヒトインスリン、Asp^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Lys^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Leu^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Val^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Ala^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、並びに上述の置換のガイドラインを用いて提供される類縁体を含む。インスリンフラグメントは、限定するのではないが、B22-B30ヒトインスリン、B23-B30ヒトインスリン、B25-B30ヒトインスリン、B26-B30ヒトインスリン、B27-B30ヒトインスリン、B29-B30ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、及びヒトインスリンのB鎖を含む。インスリンフラグメント中で上述の一つあるいはそれ以上のアミノ酸を置換することにより、インスリンフラグメント類縁体を提供することができる。

40

50

【0100】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含む、種々のオリゴマーであってもよい。好ましくは、このオリゴマーのポリエチレングリコール成分は、少なくとも2、3あるいは4個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。更に好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも5あるいは6個のポリエチレングリコールサブユニットを有し、最も好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。

【0101】

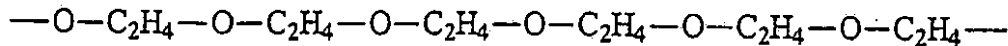
このオリゴマーは、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、追加の親水性成分、親油性成分、スペーサー成分、リンカー成分、及び末端成分を含む、一つあるいはそれ以上の他の成分を含んでなってもよい。このオリゴマー中の種々の成分は、加水分解性あるいは非加水分解性結合のいずれかにより相互に共有結合で結合する。

10

【0102】

このオリゴマーは、限定するのではないが、糖、ポリアルキレンオキシド、及びポリアミン/PEGコポリマーを含む、一つあるいはそれ以上の追加の親水性成分（すなわち、ポリエチレングリコール成分に加えての成分）を更に含む。ポリエチレングリコールはポリアルキレンオキシドであるので、追加の親水性成分はポリエチレングリコール成分である。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合により連結している場合には、同一成分であると考えられる。例えば、成分：

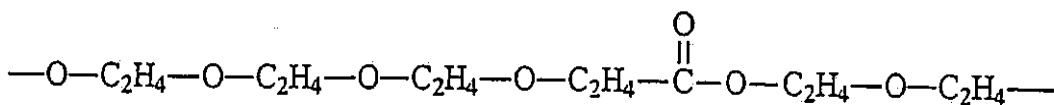
【化10】



20

は、6個のポリエチレングリコールサブユニットを有する、単一のポリエチレングリコール成分である。この成分がこのオリゴマー中の唯一の親水性成分である場合には、このオリゴマーは追加の親水性成分を含まない。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合以外の結合により連結している場合には、異なる成分であると考えられる。例えば、成分：

【化11】



30

は、4個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と2個のポリエチレングリコールサブユニットを有する追加の親水性成分である。好ましくは、本発明の実施形態のオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含み、追加の親水性成分を含まない。

【0103】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上の親油性成分を更に含む。この親油性成分は、好ましくは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐のアルキル成分、あるいは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐の脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分である場合には、これは、好ましくは1から28個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和のアルキル成分である。更に好ましくは、このアルキル成分は、2から12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分である場合、これは好ましくは2から18個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和である天然脂肪酸成分である。更に好ましくは、この脂肪酸成分は3から14個の炭素原子を有する。最も好ましくは、この脂肪酸成分は少なくとも4、5あるいは6個の炭素原子を有する。

40

【0104】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上のスペーサー成分を更に含む。例えば、スペーサー成分を使用して、親油性成分から親水性成分を分離

50

するか、インスリン薬物から親油性成分または親水性成分を分離するか、第2の親水性あるいは親油性成分から第1の親水性あるいは親油性成分を分離するか、あるいはリンカー成分から親水性成分または親油性成分を分離することができる。スペーサー成分は、好ましくは糖、コレステロール及びグリセリン成分からなる群から選ばれる。

【0105】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に連結するのに使用する、一つあるいはそれ以上のリンカー成分を更に含む。リンカー成分は、好ましくはアルキル及び脂肪酸成分からなる群から選ばれる。

【0106】

このオリゴマーは、インスリン薬物に連結しない1つあるいはそれ以上のオリゴマーの末端に、1つあるいはそれ以上の末端成分を更に含んでもよい。末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、更に好ましくは低級アルキルまたは低級アルコキシ成分である。最も好ましくは、この末端成分はメチルまたはメトキシである。この末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分である一方、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、糖、コレステロール、アルコール、及び脂肪酸を含む、種々の成分であってもよいことを理解すべきである。

【0107】

このオリゴマーは、このインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する。ある実施形態においては、このインスリン薬物は、加水分解性結合（例えば、エステルあるいはカーボネート結合）を用いてオリゴマーに連結する。加水分解性の連結は、前駆薬物として作用するインスリン薬物-オリゴマー結合体を提供する。例えば、インスリン薬物-オリゴマー結合体が不活性（すなわち、この結合体がインスリン薬物の主要な作用機構により身体に影響する能力を欠く）である場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーが各インスリン薬物-オリゴマー結合体から開裂して、活性な薬物をもたらすのに従って、加水分解性の連結は、インスリン薬物を一定の時間にわたって投与する時間放出あるいは制御放出効果をもたらす。他の実施形態においては、このインスリン薬物は、非加水分解性結合（例えば、カルバメート、アミド、またはエーテル結合）を用いて、オリゴマーに連結する。インスリン薬物-オリゴマー結合体を血液流中で長時間、好ましくは少なくとも2時間循環させることが望ましい場合には、非加水分解性結合の使用が好ましい。当業者ならば理解するように、このオリゴマーがインスリン薬物に共有結合で結合している場合、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に共有結合で連結するのに使用される、一つあるいはそれ以上の結合成分を更に含む。結合成分は、好ましくは共有結合の結合、エステル成分、カーボネート成分、カルバメート成分、アミド成分及び2級アミン成分からなる群から選ばれる。オリゴマー上の一つ以上の成分は、インスリン薬物に共有結合で結合してよい。

【0108】

このオリゴマーは、好ましくはインスリン薬物に共有結合で結合する一方で、このオリゴマーがインスリン薬物に非共有結合で結合して、非共有結合で結合体化したインスリン薬物-オリゴマー錯体を形成することを理解すべきである。当業者ならば理解するように、非共有結合の連結は、限定するのではないが、水素結合、イオン結合、ファンデアワールス結合、及びミセルあるいはリポソームカプセル化を含む。本発明の実施形態によれば、当業者ならば理解するように、オリゴマーを好適に構成、変性し、そして/または適宜官能基化して、選ばれた方法で非共有結合による結合の能力（例えば、水素結合能力を賦与する）を賦与してもよい。本発明の他の実施形態によれば、限定するのではないが、アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、胆汁酸、胆汁酸誘導体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、サリチル酸、サリチル酸誘導体、アミノサリチル酸、及びアミノサリチル酸誘導体を含む、種々の化合物により、オリゴマーを誘導体としてもよい。得られるオリゴマーを薬物分子、医薬製品、及び/または医薬賦形剤と非共有結合により連結（錯体）することができる。得られる錯体は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。本発明の更に他の実施形態によれば、オリゴマーをアミン及び/またはアルキルアミンにより誘

10

20

30

40

50

導体化してもよい。好適な酸性条件下で、得られるオリゴマーは、薬物分子、医薬製品及び/または医薬賦形剤と共に非共有結合により結合体化した錯体を形成することができる。このような錯体化から得られる製品は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。

【0109】

一つ以上のオリゴマー（すなわち、複数のオリゴマー）をインスリン薬物に連結してもよい。この複数のオリゴマーは、好ましくは同一である。しかしながら、この複数のオリゴマーはお互いに異なってよく、あるいは、この複数のオリゴマーの一部は同一でもよく、また一部は異なってよいことを理解すべきである。複数のオリゴマーをインスリン薬物に連結する場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーを加水分解性結合でインスリン薬物と連結し、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーを非加水分解性結合でインスリン薬物と連結するのが好ましい。あるいは、この複数のオリゴマーをこのインスリン薬物に連結させる結合のすべてが加水分解性であってもよいが、種々の程度の加水分解性を有し、例えば、この一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から急速に取り外され、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から緩慢に取り外されるようであってもよい。

【0110】

限定するのではないが、求核性ヒドロキシル官能基及び/またはアミノ官能基を含む、インスリン薬物の種々の求核残基でこのオリゴマーをインスリン薬物と連結してもよい。インスリン薬物がポリペプチドである場合には、例えばセリン及び/またはチロシン残基で求核性ヒドロキシル官能基が見出され、そして例えばヒスチジン及び/またはリジン残基で、及び/またはポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端で求核性アミノ官能基が見出される。オリゴマーがインスリンポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端に連結している場合には、この連結は、好ましくは2級アミンを形成する。このインスリン薬物がヒトインスリンである場合には、例えばこのオリゴマーをG1y^{A1}のアミノ官能基、Phe^{B1}のアミノ官能基、及びLys^{B29}のアミノ官能基を含む、インスリンのアミノ官能基に連結してもよい。一つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。2つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはPhe^{B1}のアミノ官能基とLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。一つ以上のオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、モノ-結合体化したヒトインスリンについて高活性（改善されたグルコース低下能力）が観察される。

【0111】

10,000以上の分散度係数を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を種々の方法により合成することができる。例えば、10,000以上の分散度係数を有する、オリゴマーの混合物を提供するのに十分な条件下で、10,000以上の分散度係数を有する、カルボン酸の混合物と10,000以上の分散度係数を有する、ポリエチレングリコールの混合物とを接触させることにより、10,000以上の分散度係数を有する、カルボン酸とポリエチレングリコールからなるオリゴマーの混合物が合成される。次に、10,000以上の分散度係数を有する、混合物のオリゴマーを活性化して、インスリン薬物と反応させて、インスリン薬物-オリゴマー結合体を提供することが可能である。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の一つの実施形態を図3に図示し、下記の例11~18に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のもう一つの実施形態を図4に図示し、下記の例19~24に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の更にもう一つの実施形態を図5に図示し、下記の例25~29に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図6に図示し、下記の例30~31に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成

経路のもう一つの実施形態を図7に図示し、下記の例32～37に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路の更にもう一つの実施形態を図8に図示し、下記の例38に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のな更にもう一つの実施形態を図9に図示し、下記の例39に述べる。10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供するための合成経路のな更にもう一つの実施形態を図10に図示し、下記の例40に述べる。

【0112】

次に、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供するのに十分な条件下で、10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物を10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物の混合物と反応させる。好ましい合成を下記の例41に述べる。当業者ならば理解するように、この反応条件(例えば、選ばれたモル比、溶媒混合物及び/またはpH)をコントロールして、10,000以上の分散度係数を有する活性化されたオリゴマーの混合物と10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物の混合物との反応から得られるインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物が10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物の混合物であるようにすることができる。例えば、反応溶液のpHをリジンの pK_a 以下に維持することにより、リジンのアミノ官能基での結合を抑制することができる。あるいは、例えば例50で下記に述べるようにHPLCを用いて、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離、単離して、例えば10,000以上の分散度係数を有する、モノ-、ジ-、またはトリ-結合体の実質的に単分散の混合物を提供することができる。限定するのではないが、質量分析を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の単離した結合体の結合度(例えば、単離した分子がモノ-、ジ-、またはトリ-結合体であるかどうか)を決定し、そして/または確認することができる。限定するのではないが、配列分析、ペプチドマッピング、選択的な酵素開裂、及び/またはエンドペプチダーゼ開裂を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の結合体構造(このオリゴマーがヒトインスリンのGly^{A1}、Phe^{B1}またはLys^{B29}でのモノ結合体であるかどうか)を決定し、そして/または確認することができる。

【0113】

当業者ならば理解するように、例えば、このインスリン薬物とN-tert-ブトキシカルボニル(t-BOC)、またはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)(N-FMOC)等の好適な試剤とを反応させることにより、インスリン薬物上の一つあるいはそれ以上の反応部位をブロックすることができる。例えばインスリン薬物がポリペプチドである場合には、この方法が好ましく、そしてこのポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端でオリゴマーを有する、不飽和結合体(すなわち、すべての求核性残基が結合体化されてはいない結合体)を形成することが望ましい。このようなブロック化に続いて、10,000以上の分散度係数を有する、このブロック化したインスリン薬物と10,000以上の分散度係数を有する、活性化されたオリゴマーの混合物とを反応させて、一つあるいはそれ以上の求核性残基に連結したオリゴマーを持ち、そして他の求核性残基に連結したブロック化成分を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供することができる。当業者ならば理解するように、この結合反応の後、このインスリン薬物オリゴマー結合体を脱ブロック化してもよい。必要ならば、次に、このインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を述べたように分離して、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を提供することができる。あるいは、脱ブロック化に先立ち、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を分離してもよい。

【0114】

10,000以上の分散度係数を有する、本発明のこれらの実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは多分散の混合物の性質に比較した場合、改善された性質を有する。例えば、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは10,000以上の分散度係数を有する、イン

10

20

30

40

50

スリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピボ活性よりも大きい、インピボ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、例えば、H. R. Allcock & F. W. Lampe, *CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY* 394 ~ 402 (第2編、1991) に記述されているような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィ等のサイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均の重量を測定することができる。

【0115】

もう一つの例として、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピトロ活性よりも大きい、インピトロ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。

10

【0116】

当業者ならば理解するように、特定の混合物のインピトロ活性を種々の方法により測定することができる。好ましくは、Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California) から市販されているCytosensor (登録商標) 微小生理計を用いて、このインピトロ活性を測定する。この微小生理計は、培養孔中の培養細胞に添加した薬物に応答する細胞外の酸性化の速度の小さな変化をモニターする。この応答は試験下の分子の活性に比例する。好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、この多分散の混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約5パーセント大きい。更に好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、この多分散の混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約10パーセント大きい。

20

【0117】

更にもう一つの例として、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性と比較した場合、好ましくはキモトリプシンによる分解に増大した耐性を有する。キモトリプシンに対する耐性は、下記の例52に概述したものと類似の方法を用いて、試験すべき分子をキモトリプシン中で消化した場合に、残存するパーセントに相当する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、この多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約10パーセント大きい。更に好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、この多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約20パーセント大きい。

30

40

【0118】

なお更にもう一つの例として、好ましくは10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 -

50

オリゴマー結合体の多分散の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物の数平均の分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定してもよい。当業者ならば理解するように、この被験者間変動を種々の方法により測定してもよい。好ましくは、この被験者間変動を次のように計算する。用量応答曲線下の面積(AUC)(すなわち、用量応答曲線とベースラインの間の面積)を各被験者について求める。各被験者のAUCを合計し、その合計を被験者の数で割ることにより、すべての被験者に対する平均のAUCを求める。次に、被験者のAUCと平均のAUCの間の差の絶対値を各被験者について求める。次に、得られる差の絶対値を足して、被験者間変動を表わす値を得る。低い値は低い被験者間変動を表わし、高い値は高い被験者間変動を表わす。好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約10パーセント少ない。更に好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約25パーセント少ない。

10

【0119】

10,000以上の分散度係数を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは2つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。更に好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、3つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。最も好ましくは、10,000以上の分散度係数を有する、本発明の実施形態のインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、4つの上述の性質をすべて有する。

20

【0120】

本発明の他の実施形態によれば、各結合体がオリゴマーと連結したインスリン薬物を含み、同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、結合体の混合物が提供される。

【0121】

このインスリン薬物は好ましくはインスリンである。更に好ましくは、このインスリン薬物はヒトインスリンである。しかしながら、例えば、プロインスリン、インスリン類縁体、インスリンフラグメント、及びインスリンフラグメント類縁体を含む、当業者に既知の種々のインスリン薬物からこのインスリン薬物を選んでもよいことを理解するべきである。インスリン類縁体は、限定するのではないが、Asp^{B28}ヒトインスリン、Lys^{B28}ヒトインスリン、Leu^{B28}ヒトインスリン、Val^{B28}ヒトインスリン、Ala^{B28}ヒトインスリン、Asp^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Lys^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Leu^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Val^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Ala^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、並びに上述の置換のガイドラインを用いて提供される類縁体を含む。インスリンフラグメントは、限定するのではないが、B22-B30ヒトインスリン、B23-B30ヒトインスリン、B25-B30ヒトインスリン、B26-B30ヒトインスリン、B27-B30ヒトインスリン、B29-B30ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、及びヒトインスリンのB鎖を含む。インスリンフラグメント中で上述の一つあるいはそれ以上のアミノ酸を置換することにより、インスリンフラグメント類縁体を提供してもよい。

30

40

【0122】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含む種々のオリゴマーであってもよい。好ましくは、このオリゴマーのポリエチレングリコール成分は、少なくとも2、3あるいは4個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。更に好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも5あるいは6個のポリエチレングリコールサブユニットを有し、最も好ましくは、このポリエチレングリコール成分は、少なくとも7個のポリエチレングリコールサブユニットを有する。

50

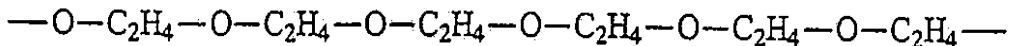
【 0 1 2 3 】

このオリゴマーは、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、追加の親水性成分、親油性成分、スペーサー成分、リンカー成分、及び末端成分を含む、一つあるいはそれ以上の他の成分を含んでなってもよい。このオリゴマー中の種々の成分は、加水分解性あるいは非加水分解性結合のいずれかにより相互に共有結合で結合する。

【 0 1 2 4 】

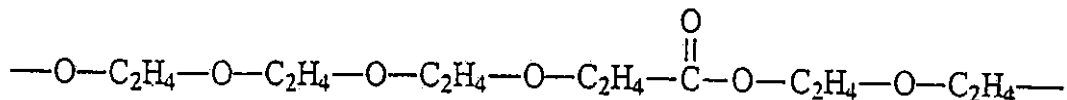
このオリゴマーは、限定するのではないが、糖、ポリアルキレンオキシド、及びポリアミン/PEGコポリマーを含む、一つあるいはそれ以上の追加の親水性成分（すなわち、ポリエチレングリコール成分に加えての成分）を更に含む。ポリエチレングリコールはポリアルキレンオキシドであるので、追加の親水性成分はポリエチレングリコール成分である。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合により連結している場合には、同じ成分であると考えられる。例えば、成分：

【 化 1 2 】



は、6個のポリエチレングリコールサブユニットを有する、単一のポリエチレングリコール成分である。この成分がこのオリゴマー中の唯一の親水性成分である場合には、このオリゴマーは追加の親水性成分を含まない。隣接したポリエチレングリコール成分は、エーテル結合以外の結合により連結している場合には、異なる成分であると考えられる。例えば、成分：

【 化 1 3 】



は、4個のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコール成分と2個のポリエチレングリコールサブユニットを有する追加の親水性成分である。好ましくは、本発明の実施形態のオリゴマーは、ポリエチレングリコール成分を含み、追加の親水性成分を含まない。

【 0 1 2 5 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上の親油性成分を更に含む。この親油性成分は、好ましくは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐のアルキル成分、あるいは飽和あるいは不飽和の、直鎖あるいは分岐の脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分である場合には、これは、好ましくは1から28個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和のアルキル成分である。更に好ましくは、このアルキル成分は2から12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分である場合、これは好ましくは2から18個の炭素原子を有する、線状の、飽和あるいは不飽和である天然脂肪酸成分である。更に好ましくは、この脂肪酸成分は3から14個の炭素原子を有する。最も好ましくは、この脂肪酸成分は、少なくとも4、5あるいは6個の炭素原子を有する。

【 0 1 2 6 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、一つあるいはそれ以上のスペーサー成分を更に含む。例えば、スペーサー成分を使用して、親油性成分から親水性成分を分離するか、インスリン薬物から親油性成分または親水性成分を分離するか、第2の親水性あるいは親油性成分から第1の親水性あるいは親油性成分を分離するか、あるいはリンカー成分から親水性成分または親油性成分を分離してもよい。スペーサー成分は、好ましくは糖、コレステロール及びグリセリン成分からなる群から選ばれる。

【 0 1 2 7 】

当業者ならば理解するように、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に

10

20

30

40

50

連結するのに使用する、一つあるいはそれ以上のリンカー成分を更に含む。リンカー成分は、好ましくはアルキル及び脂肪酸成分からなる群から選ばれる。

【0128】

このオリゴマーは、インスリン薬物に連結しない、一つあるいはそれ以上のオリゴマーの末端で一つあるいはそれ以上の末端成分を更に含んでなってもよい。末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、更に好ましくは低級アルキルまたは低級アルコキシ成分である。最も好ましくは、この末端成分はメチルまたはメトキシである。この末端成分は、好ましくはアルキルあるいはアルコキシ成分である一方、当業者ならば理解するように、限定するのではないが、糖、コレステロール、アルコール、及び脂肪酸を含む、種々の成分であってもよいことを理解すべきである。

10

【0129】

このオリゴマーは、このインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する。ある実施形態においては、このインスリン薬物は、加水分解性結合（例えば、エステルあるいはカーボネート結合）を用いてオリゴマーに連結する。加水分解性の連結は、前駆薬物として作用するインスリン薬物-オリゴマー結合体を提供する。例えばインスリン薬物-オリゴマー結合体が不活性（すなわち、この結合体がインスリン薬物の主要な作用機構により身体に影響する能力を欠く）である場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーが各インスリン薬物-オリゴマー結合体から開裂して、活性な薬物をもたらすのに従って、加水分解性の連結は、インスリン薬物を一定の時間にわたって投与する時間放出あるいは制御放出効果をもたらす。他の実施形態においては、このインスリン薬物は、非加水分解性結合（例えば、カルバメート、アミド、またはエーテル結合）を用いて、オリゴマーに連結する。インスリン薬物-オリゴマー結合体を血液流中で長時間、好ましくは少なくとも2時間循環させることが望ましい場合には、非加水分解性結合の使用が好ましい。当業者ならば理解するように、このオリゴマーがインスリン薬物に共有結合で結合している場合、このオリゴマーは、このオリゴマーをインスリン薬物に共有結合で連結するのに使用される、一つあるいはそれ以上の結合成分を更に含む。結合成分は、好ましくは共有結合の結合、エステル成分、カーボネート成分、カルバメート成分、アミド成分及び2級アミン成分からなる群から選ばれる。オリゴマー上の一つ以上の成分は、インスリン薬物に共有結合で結合してもよい。

20

【0130】

このオリゴマーはインスリン薬物に好ましくは共有結合で結合する一方で、このオリゴマーをインスリン薬物に非共有結合で結合して、非共有結合で結合体化したインスリン薬物-オリゴマー錯体を形成することを理解すべきである。当業者ならば理解するように、非共有結合の連結は、限定するのではないが、水素結合、イオン結合、ファンデアワールズ結合、及びミセルあるいはリポソームカプセル化を含む。本発明の実施形態によれば、当業者ならば理解するように、オリゴマーを好適に構成、変成し、そして/または適宜官能基化して、選ばれた方法で非共有結合の結合能力（例えば、水素結合能力を賦与する）を賦与してもよい。本発明の他の実施形態によれば、限定するのではないが、アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、胆汁酸、胆汁酸誘導体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、サリチル酸、サリチル酸誘導体、アミノサリチル酸、及びアミノサリチル酸誘導体を含む、種々の化合物により、オリゴマーを誘導体としてもよい。得られるオリゴマーを薬物分子、医薬製品、及び/または医薬賦形剤と非共有結合により連結（錯体）することができる。得られる錯体は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。本発明の更に他の実施形態によれば、オリゴマーをアミン及び/またはアルキルアミンにより誘導体としてもよい。好適な酸性条件下で、得られるオリゴマーは、薬物分子、医薬製品及び/または医薬賦形剤と共に非共有結合により結合体化した錯体を形成することができる。このような錯体化から得られる製品は、好ましくはバランスのとれた親油性及び親水性性質を有する。

30

40

【0131】

一つ以上のオリゴマー（すなわち、複数のオリゴマー）をインスリン薬物に連結しても

50

よい。この複数のオリゴマーは、好ましくは同一である。しかしながら、この複数のオリゴマーはお互いに異なってよく、あるいは、この複数のオリゴマーの一部は同一でもよく、また一部は異なってよいことを理解すべきである。複数のオリゴマーをインスリン薬物に連結する場合には、一つあるいはそれ以上のオリゴマーを加水分解性結合を有するインスリン薬物と連結し、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーを非加水分解性結合を有するインスリン薬物と連結するのが好ましい。あるいは、この複数のオリゴマーをこのインスリン薬物に連結する結合のすべては、加水分解性であってもよいが、種々の程度の加水分解性を有し、例えば、この一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から急速に取り外され、そして一つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内で加水分解によりインスリン薬物から緩慢に取り外されるようにしてもよい。

10

【0132】

限定するのではないが、求核性ヒドロキシル官能基及び/またはアミノ官能基を含む、インスリン薬物の種々の求核残基でこのオリゴマーをインスリン薬物と連結してもよい。インスリン薬物がポリペプチドである場合には、例えばセリン及び/またはチロシン残基で求核性ヒドロキシル官能基が見出され、そして例えばヒスチジン及び/またはリジン残基で、及び/またはポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端で求核性アミノ官能基が見出される。オリゴマーがインスリンポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN-末端に連結している場合には、この連結は、好ましくは2級アミンを形成する。このインスリン薬物がヒトインスリンである場合には、例えばこのオリゴマーをGly^{A1}のアミノ官能基、Phe^{B1}のアミノ官能基、及びLys^{B29}のアミノ官能基を含む、インスリンのアミノ官能基に連結してもよい。一つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。2つのオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、このオリゴマーは、好ましくはPhe^{B1}のアミノ官能基とLys^{B29}のアミノ官能基に連結する。一つ以上のオリゴマーをこのヒトインスリンに連結する場合には、モノ-結合体化したヒトインスリンについて高活性(改善されたグルコース低下能力)が観察される。

20

【0133】

この混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、オリゴマーの混合物を種々の方法により合成してもよい。例えば、この混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、オリゴマーの混合物を提供するのに十分な条件下で、カルボン酸の混合物と、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコールの混合物とを接触させることにより、カルボン酸と、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するポリエチレングリコールとからなるオリゴマーの実質的に単分散の混合物が合成される。次に、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するオリゴマー混合物が活性化され、インスリン薬物と反応して、インスリン薬物-オリゴマー結合体を提供することが可能になる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路の一つの実施形態を図3に図示し、下記の例11~18で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路のもう一つの実施形態を図4に図示し、下記の例19~24で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路の更にもう一つの実施形態を図5に図示し、下記の例25~29で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路のなご更にもう一つの実施形態を図6に図示し、下記の例30~31で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路のもう一つの実施形態を図7に図示し、下記の例32~37で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供す

30

40

50

る合成経路の更にもう一つの実施形態を図8に図示し、下記の例38で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図9に図示し、下記の例39で述べる。混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物を提供する合成経路のなお更にもう一つの実施形態を図10に図示し、下記の例40で述べる。

【0134】

インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を提供するのに十分な条件下で、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する活性化されたオリゴマーの混合物とインスリン薬物の混合物とを反応させる。好ましい合成を下記の例41で述べる。当業者ならば理解するように、この反応条件（例えば、選ばれたモル比、溶媒混合物及び/またはpH）をコントロールして、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、活性化されたオリゴマーの混合物とインスリン薬物の混合物との反応から得られるインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物が、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する結合体の混合物であるようにしてもよい。例えば、反応溶液のpHをリジンの pK_a 以下に維持することにより、リジンのアミノ官能基での結合を抑制してもよい。あるいは、例えば例50で下記に述べるようにHPLCを用いて、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を分離、単離して、インスリン薬物 - オリゴマー結合体、例えば混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、モノ - 、ジ - 、またはトリ - 結合体のインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を提供してもよい。限定するのではないが、質量分析を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の単離した結合体の結合度（例えば、単離した分子がモノ - 、ジ - 、またはトリ - 結合体であるかどうか）を決定し、そして/または確認してもよい。限定するのではないが、配列分析、ペプチドマッピング、選択的な酵素開裂、及び/またはエンドペプチダーゼ開裂を含む、当業者ならば理解するような種々の方法を用いて、特定の結合体構造（このオリゴマーがヒトインスリンのGly^{A1}、Phe^{B1}またはLys^{B29}でのモノ結合体であるかどうかを）を決定し、そして/または確認してもよい。

【0135】

当業者ならば理解するように、例えば、このインスリン薬物とN - tert - ブトキシカルボニル（t - BOC）、またはN - （9 - フルオレニルメトキシカルボニル）（N - FMOC）等の好適な試剤とを反応させることにより、インスリン薬物上の一つあるいはそれ以上の反応部位をブロックしてもよい。例えばインスリン薬物がポリペプチドである場合には、この方法が好ましく、そしてこのポリペプチドの一つあるいはそれ以上のN - 末端でオリゴマーを有する、不飽和結合体（すなわち、すべての求核性残基が結合体化されてはいない結合体）を形成することが望ましい。このようなブロック化に続いて、このブロック化したインスリン薬物の混合物と、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、活性化されたオリゴマーの混合物とを反応させて、一つあるいはそれ以上の求核性残基と連結し、他の求核性残基と連結したブロック成分を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を提供してもよい。当業者ならば理解するように、この結合反応の後、このインスリン薬物 - オリゴマー結合体を脱ブロック化してもよい。必要ならば、次に、このインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を前記のようにして分離して、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体混合物を提供してもよい。あるいは、脱ブロック化に先立ち、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を分離してもよい。

【0136】

混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、本発明のこれらの実施形態のインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは多分散の混合物の性質に比較した場合、改善された性質を有する。例えば、混合物中の各結合体

10

20

30

40

50

が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピボ活性よりも大きい、インピボ活性を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、例えば、H. R. Allcock & F. W. Lampe, *CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY* 394 ~ 402 (第2編、1991) に記述されているような、ゲルパーミエーションクロマトグラフィ等のサイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、混合物中の各オリゴマーが同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均重量を測定することができる。

10

【0137】

もう一つの例として、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマーの混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のインピトロ活性よりも大きい、インピトロ活性を有する。当業者ならば理解するように、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により測定することができる。

20

【0138】

当業者ならば理解するように、特定の混合物のインピトロ活性を種々の方法により測定することができる。好ましくは、Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California) から市販されている Cytosensor (登録商標) 微量生理計を用いて、このインピトロ活性を測定する。この微量生理計は、培養孔中の培養細胞に添加した薬物に応答する細胞外の酸性化の速度の小さな変化をモニターする。この応答は試験下の分子の活性に比例する。好ましくは、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、この多分散の混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約5パーセント大きい。更に好ましくは、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、この多分散の混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約10パーセント大きい。

30

【0139】

更にもう一つの例として、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性と比較した場合、好ましくはキモトリプシンによる分解に増大した耐性を有する。キモトリプシンに対する耐性は、下記の例52に概述したものと類似の方法を用いて、試験すべき分子をキモトリプシン中で消化した場合に、残存するパーセントに相当する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。好ましくは、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約10パーセント大きい。更に好ましくは、混合物中の各結合体が同じ数のポリエチレングリコールサブユ

40

50

ニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散の混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約20パーセント大きい。

【0140】

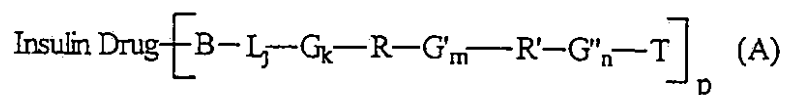
なお更にもう一つの例として、好ましくは、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均の分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する。当業者ならば理解するように、限定するのではないが、サイズ排除クロマトグラフィを含む、種々の方法により、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量とこの多分散の混合物の数平均分子量を測定することができる。当業者ならば理解するように、この被験者間変動を種々の方法により測定することができる。好ましくは、この被験者間変動を次のように計算する。用量応答曲線下の面積 (AUC) (すなわち、用量応答曲線とベースラインの間の面積) を各被験者について求める。各被験者のAUCを合計し、その合計を被験者の数で割ることにより、すべての被験者に対する平均のAUCを求める。次に、被験者のAUCと平均のAUCの間の差の絶対値を各被験者について求める。次に、得られる差の絶対値を足して、被験者間変動を表わす値を得る。低い値は低い被験者間変動を表わし、高い値は高い被験者間変動を表わす。好ましくは、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約10パーセント少ない。更に好ましくは、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有するインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散の混合物の被験者間変動よりも少なくとも約25パーセント少ない。

【0141】

混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、本発明の実施形態のインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、好ましくは2つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。更に好ましくは、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、本発明の実施形態のインスリン薬物オリゴマー結合体の混合物は、3つあるいはそれ以上の上述の性質を有する。最も好ましくは、混合物中の各結合体と同じ数のポリエチレングリコールサブユニットを有する、本発明の実施形態のインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、4つすべての上述の性質を有する。

【0142】

本発明のさらに他の実施形態によると、各結合体と同じ分子量を有し、また、式A：
【化14】



(式中、

Bは結合成分であり、

Lはリンカー成分であり、

G、G'、G''は個々に選択されるスペーサー成分であり、

Rが親油性成分であって、R'がポリアルキレングリコール成分であるか、あるいはR'が親油性成分であって、Rがポリアルキレングリコール成分であり、

Tは末端成分であり、

j、k、m、nはそれぞれ0あるいは1であり、

pは、1とインスリン薬物上にある求核残基の数との間にある整数である)の構造を有する複数の結合体の混合物が提供される。

【0143】

インスリン薬物は好適にはインスリンである。さらに好適には、そのインスリン薬物はヒトインスリンである。しかし、インスリン薬物は、例えば、プロインスリン、インスリン類縁体、インスリンフラグメント、インスリンフラグメント類縁体を含む当業者には公知のさまざまなインスリン薬物から選択されるものが良いと理解されるべきである。インスリン類縁体には、上述されている置換ガイドラインを用いてもたらされた類縁体とともに、Asp^{B28}ヒトインスリン、Lys^{B28}ヒトインスリン、Leu^{B28}ヒトインスリン、Val^{B28}ヒトインスリン、Ala^{B28}ヒトインスリン、Asp^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Lys^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Leu^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Val^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリン、Ala^{B28}Pro^{B29}ヒトインスリンが含まれるが、しかし、これらに限定されるものではない。インスリンフラグメントには、B22 - B30ヒトインスリン、B23 - B30ヒトインスリン、B25 - B30ヒトインスリン、B26 - B30ヒトインスリン、B27 - B30ヒトインスリン、B29 - B30ヒトインスリン、ヒトインスリンのA鎖、ヒトインスリンのB鎖が含まれるが、しかしこれらに限定されるものではない。インスリンフラグメント類縁体は、インスリンフラグメントにおいて、上述されているように、1つあるいはそれ以上のアミノ酸を置換することにより供給されることが可能である。

10

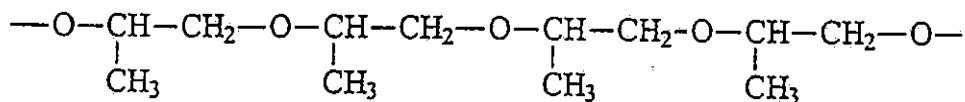
【0144】

本発明のこれらの実施形態によると、オリゴマーのポリアルキレングリコール成分は好適には、少なくとも2、3ないしは4ポリアルキレングリコールサブユニットを有する。さらに好適には、ポリアルキレングリコール成分は少なくとも5ないしは6ポリアルキレングリコールサブユニットを有し、さらに好適には、ポリエチレングリコール成分が少なくとも7ポリアルキレングリコールサブユニットを有する。ポリアルキレングリコール成分は好適には、ポリエチレングリコール成分、ポリプロピレングリコール成分あるいはポリブチレングリコール成分などの低級ポリアルキレングリコール成分である。さらに好適には、ポリアルキレングリコール成分はポリエチレングリコール成分あるいはポリプロピレングリコール成分である。もっとも好適には、ポリアルキレングリコール成分がポリエチレングリコール成分である。ポリアルキレングリコール成分がポリプロピレングリコール成分である場合には、その成分は好適には、均一な（すなわち、ランダムではない）構造を有する。均一な構造を有する1つの例示的なポリプロピレングリコール成分は以下：

20

30

【化15】



のようなものである。この均一なポリプロピレングリコール構造は、ポリプロピレングリコール連鎖において、各酸素原子に隣接して、たった1つのメチル置換された炭素原子を有するように説明されている場合がある。こうした均一なポリプロピレングリコール成分は親油性と親水性特性の両方を示し、また従って、親油性ポリマー成分を使用せずに両親媒性インスリン薬物オリゴマー結合体を供給する際に有用である場合がある。さらに、1つの薬物にポリプロピレングリコール成分の第二級アルコール成分を結合させることにより、腸で発見された、例えば、トリプシンやキモトリプシンなどの酵素より引き起こされる分解に対して改善された抵抗力を備えた、インスリン薬物（例えば、ヒトインスリン）が供給される。

40

【0145】

本発明の実施形態による均一なポリプロピレングリコールは好適には、ここで説明される、図11~13に図示説明されているように、合成される。図11に図示説明されているように、第二級アルコール延長モノマー54を供給するために、1,2-プロパンジオール53は第一級アルコールブロック試薬と反応させる。第一級アルコールブロック試薬は、塩化t-ブチルジフェニルシリル、塩化t-ブチルジメチルシリル、Ac₂Oなどの

50

エステル化試薬などの塩化シリル化合物が含まれるが、しかしこれらに限定されるものではない。第一級アルコールブロック試薬は好適には、塩化 *t*-ブチルジフェニルシリルあるいは塩化 *t*-ブチルジメチルシリルなどの第二級アルコールとは実質的に反応しない第一級アルコールブロック試薬である。第二級アルコール延長モノマー(54)は、第一級アルコール延長モノマーメシラート55を供給するために、塩化メタンスルホニル(MeSO₂Cl)と反応させることができる。

【0146】

代替的には、化合物56を供給するために、第二級アルコール延長モノマー54は第二級アルコールブロック試薬と反応させることができる。第二級アルコールブロック試薬は、塩化ベンジルに限定されるものではないがしかしそれを含む、当業者には理解されるであろうさまざまな第二級アルコールブロック試薬であり得る。化合物56は、ブロック成分B₁を除去し、また第一級アルコール延長モノマー57を供給するために、B₁脱ブロック試薬と反応させることができる。B₁脱ブロック試薬は、当業者には理解されるであろうさまざまな脱ブロック試薬から選択することができる。第一級アルコールがエステルを形成することによりブロックされた場合は、B₁脱ブロック試薬は、塩基(例えば、炭酸カリウム)などの脱エステル化試薬である。第一級アルコールが塩化シリルを用いてブロックされた場合は、B₁脱ブロック試薬が好適にはテトラブチルアンモニウムフッ化物(TBAF)である。第二級アルコール延長モノマーメシラート58を供給するために、第一級アルコール延長モノマー57は、塩化メタンスルホニルと反応させることができる。

【0147】

第二級アルコール延長モノマー54および第一級アルコール延長モノマー57は、以下のようにキャップされる。化合物59を供給するために、第二級アルコール延長モノマー54は、キャップ試薬(capping reagent)と反応させることができる。キャップ試薬は、塩化メチルなどのハロゲン化アルキルに限定されるものではないが、それを含む、当業者には理解されるであろうさまざまなキャップ試薬であり得る。第一級アルコールキャップモノマー60を供給するために、化合物59は、B₁脱ブロック薬物と反応させることができる。第二級アルコールキャップモノマーメシラート61を供給するために、第一級アルコールキャップモノマー60は、塩化メタンスルホニルと反応させることができる。第一級アルコール延長モノマー57は、化合物62を供給するために、キャップ試薬と反応させることができる。キャップ試薬は上述されているようにさまざまなキャップ試薬であり得る。ブロック成分B₂を除去し、また第二級アルコールキャップモノマー63を供給するために、化合物62はB₂脱ブロック試薬と反応させることができる。B₂脱ブロック試薬は、パラジウム/活性炭素触媒の存在下のH₂に限定されるものではないが、それを含む、当業者には理解されるであろうさまざまな脱ブロック薬物であり得る。第一級アルコールキャップモノマーメシラート64を供給するために、第二級アルコールキャップモノマーは、塩化メタンスルホニルと反応させることができる。図11に図示説明されている実施形態は、キャップモノマーの合成を示しているが、これは、同様の反応が、キャップモノマーを供給するために行われ得ると理解されるべきものである。

【0148】

一般的には、さまざまな均一なポリプロピレン連鎖を生じるために、第一級アルコール延長モノマー57などの第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーを、第一級アルコール延長モノマーメシラート55などの第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーメシラートと反応させることにより、あるいは、第二級アルコール延長モノマー54などの第二級アルコール延長モノマーあるいはポリマーを、第二級アルコール延長モノマーメシラート58などの第二級アルコール延長モノマーあるいはポリマーメシラートと反応させることにより、連鎖延長を実施することができる。

【0149】

例えば、図12においては、ダイマー化合物65を供給するために、第一級アルコール延長モノマーメシラート55は、第一級アルコール延長モノマー57と反応させる。あるいは、ダイマー化合物65を供給するために、第二級アルコール延長モノマーメシラ

10

20

30

40

50

ト58は、第二級アルコール延長モノマー54と反応させることができる。第一級アルコール延長ダイマー66を供給するために、ダイマー化合物65上にあるB₁ブロック成分は、上述されているように、B₁脱ブロック試薬を使用して除去することができる。第二級アルコール延長ダイマーメシラート67を供給するために、第一級アルコール延長ダイマー66は、塩化メタンスルホニルと反応させることができる。あるいは、第二級アルコール延長ダイマー69を供給するために、ダイマー化合物上にあるB₂ブロック成分は、前述されているようにB₂脱ブロック試薬を使用して除去することができる。第一級アルコール延長ダイマーメシラート70を供給するために、第二級アルコール延長ダイマー69は塩化メタンスルホニルと反応させることができる。

【0150】

当業者には理解されるであろうが、連鎖延長プロセスは、さまざまなその他の連鎖の長さを達成するために、繰り返すことができる。例えば、図13に図示説明されているように、テトラマー化合物72を供給するために、第一級アルコール延長ダイマー66は、第一級アルコール延長ダイマーメシラート70と反応させることが可能である。さらに図13に図示説明されているように、一般的な連鎖延長反応図式には、均一なポリプロピレンポリマー75を供給するために、第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマー73を第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーメシラート74と反応させるステップが含まれる。mとnの値はそれぞれ、0~1000以上の範囲にあり得る。好適には、mとnは、それぞれ0~50である。図13に図示説明されている実施形態は第一級アルコール延長モノマーおよび/またはポリマーメシラートと反応させた第一級アルコール延長モノマーおよび/またはポリマーを示しているが、これは、同様の反応が、第二級アルコール延長モノマーおよび/またはポリマーと第二級アルコール延長モノマーおよび/またはポリマーメシラートを使用して実施することが可能である。

【0151】

第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーの末端、あるいは第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーメシラートの末端は、キャップされた均一ポリプロピレン連鎖を供給するために、第一級アルコールキャップモノマーあるいはポリマーメシラートあるいは第一級アルコールキャップモノマーあるいはポリマーとそれぞれ反応させることが可能である。例えば、図12に図示説明されているように、第一級アルコール延長ダイマーメシラート70は、キャップされた/ブロックされた第一級アルコール延長トリマー71を供給するために、第一級アルコールキャップモノマー60と反応させる。当業者には理解されることであろうが、B₁ブロック成分は除去され、またその結果生じるキャップされた第一級アルコール延長トリマーは、キャップされたトリマー71の連鎖を延長するために、第一級アルコール延長モノマーあるいはポリマーメシラートと反応させることが可能である。

【0152】

第二級アルコール延長モノマーあるいはポリマーの末端あるいは第二級アルコールキャップモノマーあるいはポリマーメシラートは、キャップされ均一なポリプロピレン連鎖を供給するために、それぞれ、第二級アルコールキャップモノマーあるいはポリマーメシラートあるいは第二級アルコールキャップモノマーあるいはポリマーと反応させることが可能である。例えば、図12に図示説明されているように、第二級アルコール延長ダイマーメシラート67は、キャップされ/ブロックされた第一級アルコール延長トリマー68を供給するために、第二級アルコールキャップモノマー63と反応させる。B₂ブロック成分は前述されているように除去され、またその結果生じるキャップされた第二級アルコール延長トリマーは、そのキャップされたトリマー68の連鎖を延長するために、第二級アルコール延長merメシラートと反応させることが可能である。図12に図示説明されている合成は、トリマーを供給するためのキャップモノマーとダイマーとの反応を示しているが、これは、そのキャッププロセスが均一なポリプロピレングリコール成分の合成におけるどの時点でも実施できるか、あるいは、均一なポリプロピレングリコール成分がキャップされないように供給できると理解されるべきものである。図12に図示説明されてい

10

20

30

40

50

る実施形態が、キャップモノマーとの合成によりポリブチレンオリゴマーのキャッピングを示しているが、これは、本発明のポリブチレンオリゴマーが、図11の中で前述されているように、キャップ試薬を使用して、直接キャップする(すなわち、キャップモノマーを添加せずに)ことが可能であると理解されるべきものである。

【0153】

本発明の実施形態による均一なポリプロピレングリコール成分は、当業者には理解されるであろうさまざまな方法により、インスリン薬物、カルボン酸などの親油性成分および/またはさまざまな他の成分と結合させることが可能であるが、その方法は、ポリエチレングリコール成分に関して本出願で説明されているものに限定されるものではないが、それらを含むものである。

10

【0154】

本発明のこれらの実施形態によると、親油性成分は当業者には理解されるであろう親油性成分である。この親油性成分は好適には、飽和あるいは不飽和で、直鎖あるいは枝分れアルキル成分あるいは飽和あるいは不飽和、直鎖あるいは枝分れ脂肪酸成分である。親油性成分がアルキル成分である場合は、それは好適には、1~28個の炭素原子を有する直鎖状、飽和、あるいは不飽和アルキル成分である。さらに好適には、アルキル成分は2~12個の炭素原子を有する。親油性成分が脂肪酸成分である場合は、それは好適には、直鎖状、飽和あるいは不飽和で、2~18個の炭素原子を有する天然の脂肪酸成分である。さらに好適には、脂肪酸成分は3~14個の炭素原子を有する。もっとも好適には、脂肪酸成分が少なくとも4、5あるいは6個の炭素原子を有する。

20

【0155】

本発明のこれらの実施形態によると、スペーサー成分G、G'、G"は、当業者には理解されるであろうスペーサー成分である。スペーサー成分は好適には、糖、コレステロール、グリセリン成分から成る群から選択される。好適には、これらの実施形態のオリゴマーには、スペーサー成分は含まない(すなわち、k、m、およびnは好適には0である)。

【0156】

本発明のこれらの実施形態によると、リンカー成分、Lは、当業者には理解されるであろう薬物とオリゴマーを結合させるのに使用されることが可能である。リンカー成分は好適には、アルキルおよび脂肪酸成分から成る群から選択される。

【0157】

本発明のこれらの実施形態によると、末端成分は好適にはアルキルあるいはアルコキシ成分であり、またさらに好適には低級アルキルあるいは低級アルコキシ成分である。もっとも好適には、末端成分はメチルあるいはメトキシである。末端成分は好適にはアルキルあるいはアルコキシ成分であるが、それは、その末端成分が糖、コレステロール、アルコール、脂肪酸に限定されるものではないが、しかしそれらを含む、当業者には理解されるであろうさまざまな成分であり得ると理解されるべきものである。

30

【0158】

本発明のこれらの実施形態によると、式Aの構造の括弧で囲われている成分で表わされているオリゴマーは、インスリン薬物に共有的に結合される。いくつかの実施形態では、インスリン薬物は、加水分解性結合(例えば、エステルあるいはカーボネート結合)を使用してオリゴマーに結合される。加水分解性結合はプロドラッグとして作用するインスリン薬物オリゴマー結合体をもたらす。ある例では、例えば、インスリン薬物オリゴマー結合体が不活性である(その結合体がインスリン薬物の作用の第一次機構により身体に影響を及ぼす能力に欠ける)場合は、1つあるいはそれ以上のオリゴマーが、それぞれのそのインスリン薬物-オリゴマー結合体から開裂してその活性薬物を供給するにつれて、そのインスリン薬物を一定の時間にわたり投与するので、加水分解性結合は時間をかけた放出あるいは制御放出効果を生じることが可能である。他の実施形態では、インスリン薬物は非加水分解性結合を利用してそのオリゴマーに結合される(例えば、カルバメート、アミドあるいはエステル結合)。そのインスリン薬物-オリゴマー結合体を、血流中で、長時間、好適には少なくとも2時間循環させることが望ましい場合は、非加水分解性結合の使

40

50

用が好ましい。結合成分Bは、当業者には理解されるであろうさまざまな結合成分であり得る。結合成分は好適には、共有結合、エステル成分、カーボネート成分、カルバメート成分、アミド成分、第二級アミン成分から成るグループから選択される。

【0159】

変数pは1からインスリン薬物上にある求核残基の数までの整数である。pが1よりも大きい場合、1つより多いオリゴマー（すなわち、複数のオリゴマー）がそのインスリン薬物に結合される。本発明のそれらの実施形態によると、複数のオリゴマーは同じものである。複数のオリゴマーがそのインスリン薬物に結合される場合は、加水分解性結合によりそのインスリン薬物に1つあるいはそれ以上のオリゴマーを結合させ、また、1つあるいはそれ以上のオリゴマーをそのインスリン薬物に非加水分解性結合で結合させることが好ましいものであり得る。あるいは、そのインスリン薬物に複数のオリゴマーを結合させるすべての結合が、加水分解型であってもよいが、さまざまな程度の加水分解性を有し、例えば、1つあるいはそれ以上のオリゴマーが体内の加水分解によりそのインスリン薬物から急速に除去され、また1つあるいはそれ以上のオリゴマーはゆっくりとそのインスリン薬物から体内の加水分解により除去されるようであってもよい。

10

【0160】

限定されるものではないが、求核性ヒドロキシル官能基および/またはアミノ官能基を含む、インスリン薬物のさまざまな求核残基でこのオリゴマーをインスリン薬物に結合させてもよい。そのインスリン薬物がポリペプチドである場合は、求核性ヒドロキシル官能基は、例えば、セリンおよび/またはチロシン残基で見つけることが可能であり、また、求核性アミノ官能基は、例えば、ヒスチジンおよび/またはリシン残基、および/または1つあるいはそれ以上のポリペプチドのN末端で見つけることが可能である。オリゴマーは、インスリンポリペプチドのその1つあるいはそれ以上のN末端に結合される場合は、その結合は好適には、第二級アミンを形成する。そのインスリン薬物がヒトインスリンである場合は、例えば、そのオリゴマーは、G1y^{A1}のアミノ官能基、Phe^{B1}のアミノ官能基、Lys^{B29}のアミノ官能基を含む、インスリンのアミノ官能基に結合させることが可能である。1つのオリゴマーがそのヒトインスリンに結合される場合は、オリゴマーは好適には、Lys^{B29}のアミノ官能基に結合される。2つのオリゴマーがそのヒトインスリンに結合される場合は、そのオリゴマーは好適には、Phe^{B1}のアミノ官能性およびLys^{B29}のアミノ官能性に結合される。1つより多いオリゴマーがそのヒトインスリンに結合させることができる場合であっても、さらに高い活性（改善されたグルコース低下能力）が、モノ結合体化したヒトインスリンで観察される。

20

30

【0161】

混合物における各結合体が同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、さまざまな諸方法により合成することができる。例えば、カルボン酸およびポリエチレングリコールから成るオリゴマーの混合物が、オリゴマーの混合物を供給するのに十分な条件下で、カルボン酸の混合物とポリエチレングリコールの混合物とを接触させることにより合成される。混合物のオリゴマーは、次いで活性化され、インスリン薬物と反応して、インスリン薬物-オリゴマー結合体を供給することができる。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路の1つの実施形態が図3に図示説明され、またこれ以降の例11~18において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のもう1つの実施形態が図4に図示説明され、またこれ以降の例19~24において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のさらにもう1つの実施形態が図5に図示説明され、またこれ以降の例25~29において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のその上もう1つの実施形態が図6に図示説明され、またこれ以降の例30~31において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴ

40

50

マーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のもう1つの実施形態が図7に図示説明され、またこれ以降の例32～37において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のさらにもう1つの実施形態が図8に図示説明され、またこれ以降の例38において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路の上もう1つの実施形態が図9に図示説明され、またこれ以降の例39において説明される。各オリゴマーが同じ分子量を有し、また、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物を供給するための合成経路のもう1つの実施形態が図10に図示説明され、またこれ以降の例40において説明される。

10

【0162】

各オリゴマーが同じ分子量を有し、また式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマーの混合物と、混合物中の各薬物が、インスリン薬物-オリゴマー結合体を供給するために十分な条件下で同じ分子量を有するインスリン薬物の混合物とを反応させる。1つの好適な合成は、例41とそれ以降に説明されている。当業者には理解されるであろうが、反応条件(例えば、選択されたモル比、溶媒混合液および/あるいはpH)は、各オリゴマーが同じ分子量で、式Aのオリゴマーの構造を有する活性化オリゴマー混合物とインスリン薬物の混合物との反応から生じるインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物が、各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有する結合体の混合物であるように制御することが可能である。例えば、リシンのアミノ官能基での結合は、リシンの pK_a よりも下に反応溶液のpHを維持することにより抑制することが可能である。あるいは、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、混合物中の各結合体と同じ数の分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体、例えば、モノ-、ジ-又はトリ結合体の混合物を供給するために例50において、以下に説明されているように、例えば、HPLCを利用して分離および単離することが可能である。特定の単離された結合体の結合の程度(例えば、その単離された分子がモノ、ジあるいはトリ結合体であるかどうか)を、質量スペクトルに限定されるものではないが、しかしそれを含む、当業者には理解されるであろうさまざまな技術を利用して測定するおよび/または証明することが可能である。特定の結合体構造(例えば、そのオリゴマーがヒトインスリン単量体結合体のGly^{A1}、Phe^{B1}あるいはLys^{B29}にあるかどうか)を、配列分析、ペプチド地図作成、選択的酵素切断および/またはエンドペプチターゼ切断に限定されるものではないが、しかしこれらを含む当業者には理解されるであろうさまざまな技術を利用して測定するおよび/または証明することが可能である。

20

30

【0163】

当業者には理解されるであろうが、インスリン薬物上にある1つあるいはそれ以上の反応部位は、例えば、N-tert-ブトキシカルボニル(t-BOC)、N-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)(N-FMOC)などの適当なブロック試薬とそのインスリン薬物とを反応させることにより、ブロックすることが可能である。このプロセスは、例えば、このインスリン薬物がポリペプチドであり、また、そのポリペプチドの1つあるいはそれ以上のN末端にオリゴマーを有する不飽和結合体(すなわち、全求核残基が結合されていない結合体)を形成することが望まれる場合には、好適なものになり得る。こうしたブロッキングに従って、ブロックされたインスリン薬物の混合物は、その混合物中の各オリゴマーが同じ分子量を有し、また式Aのオリゴマー構造を有する活性化オリゴマーの混合物と反応させて、1つあるいはそれ以上の求核残基にオリゴマーが結合され、他の求核残基には、ブロック成分が結合されたインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を供給することができる。結合反応後、そのインスリン薬物-オリゴマー結合体は、当業者には理解されるであろうやり方で、脱ブロックすることが可能である。必要な場合には、インスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物は、その後、その混合物中の各結合体が、同じ数の分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物-オリゴマー結合体の混合物を供給するために、上述されているように分離することが可能である。あるいは、イ

40

50

ンスリン薬物 - オリゴマー結合体を、脱ブロックする前に分離することもできる。

【0164】

混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有する、本発明のこれらの実施形態によるインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、多分散混合物のそれらに比較した場合に、改善された特性を有する。例えば、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は好適には、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数の平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のインピボ活性よりも大きなインピボ活性を有する。当業者には理解されるであろうが、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量、および多分散混合物の数平均重量は、例えば、H. R. Allcock & F. W. Lampe, *Contemporary Polymer Chemistry* 394 ~ 402 (第2版、1991) に説明されているように、ゲルパーミエーションクロマトグラフィなどサイズ排除クロマトグラフィに限定されるものではないが、それを含む、さまざまな方法により測定することが可能である。

10

【0165】

もう1つの例、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同数の平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のインピボ活性よりも大きなインピボ活性を有する。当業者には理解されるであろうが、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量および多分散混合物の数平均重量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィなどサイズ排除クロマトグラフィに限定されるものではないが、それを含む、さまざまな方法により測定することが可能である。

20

【0166】

特定の混合物のインピトロ活性は、当業者には理解されるであろうさまざまな方法により測定することが可能である。好適には、インピトロ活性はカリフォルニア州サニーベール市のMolecular Devices Corporationから市販されていて入手可能であるCytosensor (登録商標) 微小生理計 (Microphysiometer) を使用して測定される。微小生理計は、培養孔中の培養細胞に添加された薬物に反応して細胞外酸性化の速度における小さな変化をモニターする。この反応は試験下の分子の活性に比例している。好適には、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、多分散混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約5%大きい。さらに好適には、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また、式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物のインピトロ活性は、多分散混合物のインピトロ活性よりも少なくとも約10%大きい。

30

【0167】

混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性と比較した場合に、キモトリプシンによる分解に対し増大された耐性を有する。キモトリプシンに対する耐性は、以下の例52に概要されているものと同様の手順を用いて、試験される分子がキモトリプシンの中で加水分解されるときに残るパーセントに相当する。当業者には理解されるであろうが、混合物中の各結合体と同じ分子量を有し、また式Aの構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量および多分散混合物の数平均重量は、サイズ排除クロマトグラフィに限定されるものではないが、し

40

50

かしそれを含むさまざまな方法により測定することが可能である。好適には、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の A 混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性よりも少なくとも約 10 パーセント大である。さらに好適には、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の A 混合物のキモトリプシンによる分解に対する耐性は、多分散混合物のキモトリプシンによる分解に対する抵抗よりも少なくとも約 20 パーセント大である。

【0168】

その上さらにもう 1 つの例として、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は好適には、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物と同じ数平均分子量を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の多分散混合物の被験者間変動よりも少ない被験者間変動を有する。当業者には理解されるであろうが、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の数平均分子量および多分散混合物の数平均重量は、サイズ排除クロマトグラフィに限定されるものではないが、しかしそれを含むさまざまな方法により測定することが可能である。当業者には理解されるであろうさまざまな方法により、その被験者間変動は測定することが可能である。被験者間変動は好適には以下のように計算される。用量応答曲線下面積 (AUC) (すなわち、その用量応答曲線とベースラインの間の面積) が各被験者について測定される。全被験者についての平均曲線下面積は、各被験者の曲線下面積を加算し、またその加算合計を被験者数で割ることにより求められる。被験者の曲線下面積と平均曲線下面積の間の差の絶対値はその後に各被験者について求められる。この得られた差の絶対値はその後に合算されて、被験者間変動を表わす値となる。低い値は低い被験者間変動を表わし、また高い値は高い被験者間変動を表わす。好適には、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散混合物の被験者間変動よりも少なくとも約 10 パーセント小である。さらに好適には、混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の被験者間変動は、多分散混合物の被験者間変動よりも少なくとも約 25 パーセント小である。

【0169】

本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、2 つあるいはそれ以上の上述されている特性を有する。さらに好適には、本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、3 つあるいはそれ以上の前記の特性を有する。もっとも好適には、本発明の実施形態による混合物中の各結合体が同じ分子量を有し、また式 A の構造を有するインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、好適には、全部で 4 つあるいはそれ以上の前述の特性を有する。

【0170】

本発明の実施形態による結合体混合物を含む製薬組成物も提供される。前記のインスリン薬物 - オリゴマー結合体は、公知の技術により製薬キャリア中への投与用に製剤化することが可能である。これについては、例えば、Remington 編の The Science And Practice of Pharmacy (第 9 版、1995 年刊) を参照されたい。本発明の実施形態による製薬組成物の製造においては、インスリン薬物 - オリゴマー結合体は、典型的には、とりわけ、薬学的に許容できるキャリアと混合される。そのキャリアは、もちろん、その製薬組成物中のその他のいずれとも適合するという意味で受入れ可能でなければならず、また、その被験者に対して有害なものであってはならない。キャリアは固体あるいは液体、あるいは両方であり得るものであり、また、好適には、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の、約 0.01 又は 0.5 重量% から約 95 重量% 又は 99 重量% までを含有することが可能な用量単位製剤、例えば、錠剤

10

20

30

40

50

として処方される。製薬組成物は、1つあるいはそれ以上の補助成分を任意に含む成分を混合するステップに限定されるものではないが、しかしこれを含む、薬学の周知技術のいずれかにより調製される。

【0171】

本発明の実施形態による製薬組成物は、経口、直腸内、局所、吸入（例えば、エアゾールによる）、頬内（例えば、舌下）、腔内、非経口（例えば、皮下、筋内、皮内、関節腔内、胸膜腔内、腹腔内、大脳内、動脈内あるいは静脈内）、局所（すなわち、気道表面を含む皮膚と粘膜表面の両方）、経皮的投与に適しているが、任意のケースにおけるもっとも適当な経路は、治療されている状態の性質および重篤度や、使用されているインスリン薬物 - オリゴマー結合体の特定の混合物の性質による。

10

【0172】

経口投与に適している製薬組成物は、粉末あるいは顆粒、水溶性あるいは非水溶性の液体中の溶液あるいは懸濁液、あるいは水中油あるいは油中水エマルジョンといったような形で、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の所定量をそれぞれ含んでいる、カプセル、カシェ剤、舐剤あるいは錠剤などの別々のユニットの中に存在しているものであってよい。こうした製剤は、インスリン薬物 - オリゴマー結合体と適当なキャリアとの混合物（これには、上で特記しているように1つあるいはそれ以上の補助成分が含まれる）を結合させるステップを含む薬学のいずれかの適当な方法により調製され得る。一般的には、本発明の実施形態による製薬組成物は、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を、液体あるいは微細に分割された固体キャリア、あるいは両方と均一にまた堅く混ぜ合わせるにより調製され、また、必要な場合には、生じた混合物を形作りする。例えば、錠剤は任意には1つあるいはそれ以上の補助成分とともに、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を含む粉末あるいは顆粒を圧縮あるいは成形することにより調製することが可能である。圧縮錠剤は、適当な機械で、任意に結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤および/または表面活性/分散剤と混合される粉末あるいは顆粒のような易流動性形態にある混合物を圧縮することにより、調製することが可能である。成形錠剤は、適当な機械で、不活性液体結合剤により湿らせた粉末化合物を成形することにより作成することが可能である。

20

【0173】

頬内（舌下）投与に適している製薬組成物には、通常はショ糖およびアカシア（アラビアゴム）あるいはトラガカントである香料ベースのインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を含む舐剤、およびゼラチンおよびグリセリンあるいはショ糖およびアカシアのような不活性ベースのインスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を含む香錠が含まれる。

30

【0174】

非経口投与に適している本発明の実施形態による製薬組成物は、その製剤が好適にはその対象となるレシピエントの血液と好適には等張性である、インスリン薬物 - オリゴマー結合体混合物の無菌水溶性および非水溶性注射溶液から成る。これらの製剤には、組成物を対象となるレシピエントの血液と等張性にする抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、溶質が含まれ得る。水溶性および非水溶性無菌懸濁液には、懸濁薬物と増粘剤が含まれ得る。その組成物には、単位/用量あるいは複数回用量のコンテナ、例えば、密封アンプルおよびバイアル中に存在し得るし、また、使用直前に無菌液体キャリア、例えば、生理食塩水あるいは注射用水を付加するだけが必要な凍結乾燥状態で貯蔵され得る。即時調合注射溶液および懸濁液は、前記の種類は無菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。例えば、密封コンテナ中の単位用量形態で、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を含む注射可能で、安定していて、無菌である組成物が提供され得る。インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物は、凍結乾燥剤の形態で供給され、これは、被験者への注射に適する液体組成物を形成するために、適当な薬学的に許容できるキャリアにより再構成され得る。単位用量形態は、典型的には、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の約10mg ~ 約10gを含む。インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物が実質的に水溶性である場合には、生理学的に受入れ可能である乳化剤の十分量が、水溶性キャリアの中のインスリ

40

50

ン薬物 - オリゴマー結合体の混合物を乳化するのに十分な量で用いられ得る。こうした有用な乳化剤の1つはホスファチジルコリンである。

【0175】

直腸内投与に適している製薬組成は好適には、単位用量坐薬として提供される。これらは、1つあるいはそれ以上の通常の固体キャリア、例えば、ココアバターと、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物とを混合し、次いで、生じた混合物を形作ることにより調製され得る。

【0176】

皮膚への局所的適用に適している製薬組成物は、好適には、軟膏剤、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアゾールあるいは油の形態をとる。使用され得るキャリアには、石油ゼリー、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、経皮促進剤および2つあるいはそれ以上のそれらの組み合わせが含まれる。

10

【0177】

経皮投与に適している製薬組成物は、期間延長のためにレシピエントの上皮と密接に接触して残るように適応される個別のパッチとして提供され得る。経皮投与に適している組成はまた、イオン泳動（例えば、Pharmaceutical Research 3(6):318(1986)を参照されたい）によりデリバリーすることが可能であり、また典型的には、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の任意に緩衝された水溶液の形態をとる。適当な製剤は、クエン酸塩、あるいはビス/トリス緩衝液（pH6）あるいはエタノール/水を含み、また0.1~0.2Mの活性成分が含まれる。

20

【0178】

こうした製薬組成物の効果的な量を投与することにより、こうした治療を必要としている被験者におけるインスリン欠乏を治療する諸方法もまた提供される。その使用が本発明の範囲内にある、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の任意の混合物の有効量は、混合物及び被験者によりいくらか変化し、また、年齢や被験者の状態やデリバリーの経路などの要素によるであろう。こうした投与は当業者には公知の日常的な薬理学的手順により決めることができる。一般的な提案として、インスリン薬物 - オリゴマー結合体の混合物の重量に基づいて計算される全重量で、約0.1~約50mg/kgの投与量が治療上の効果を有している。非常に高い値になると関係してくる毒性は、活性ベースの重量に基づいて計算された全重量で、約10mg/kgまでといった低い値に静脈内投与を制限することが可能である。約10mg/kgから約50mg/kgの投与量は、経口投与に用いられ得る。典型的には、約0.5mg/kg~約5mg/kgの投与量は、筋肉注射に用いられる。投与の回数は、通常は1日当たり1回、2回あるいは3回あるいは、その状態を制御するのに必要な回数である。あるいは、その薬物 - オリゴマー結合体は連続輸液により投与することが可能である。治療期間は、治療されているインスリン欠乏のタイプに依存し、その被験者の生涯の長きにわたって治療されることが多い。

30

【0179】

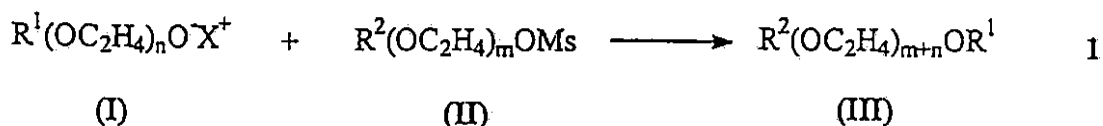
本発明の実施形態による結合体混合物を合成する諸方法もまた提供される。合成経路の以下の実施形態は、実質的に単分散混合物の合成に関しているが、同様の合成経路が、本発明の実施形態によるその他のインスリン薬物 - オリゴマー結合体を合成するために利用され得る。

40

【0180】

ポリエチレングリコールから成るポリマーの実質的に単分散混合物が、反応1に説明されているように提供される。すなわち、

【化16】



50

【 0 1 8 1 】

R¹はHあるいは親油性成分である。R¹は好適にはH、アルキル、アリールアルキル、芳香族成分、脂肪酸成分、脂肪酸成分のエステル、コレステリルあるいはアダマンチルである。R¹はさらに好適には、H、低級アルキル、あるいは芳香族成分である。R¹は最も好適にはH、メチル、あるいはベンジルである。

【 0 1 8 2 】

式Iでは、nは1～25である。好適にはnは1～6である。

【 0 1 8 3 】

X⁺は陽イオンである。好適にはX⁺は、PEG上のヒドロキシル成分をイオン化することができる強塩基などの化合物中のいずれかの陽イオンである。陽イオンの例には、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン、セシウムイオン、タリウムイオンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 1 8 4 】

R²はHあるいは親油性成分である。R²は好適には直鎖状あるいは枝分かれしたアルキル、アリールアルキル、芳香族成分、脂肪酸成分あるいは脂肪酸成分のエステルである。R²はさらに好適には低級アルキル、ベンジル、1～24個の炭素原子を有する脂肪酸成分、あるいは1～24個の炭素原子を有する脂肪酸成分のエステルである。R²はもっとも好適には、メチル、1～18個の炭素原子を有する脂肪酸成分、あるいは1～18個の炭素原子を有する脂肪酸成分のエチルエーテルである。

【 0 1 8 5 】

式IIでは、mは1～25である。好適には、mは1～6である。

20

【 0 1 8 6 】

M_sはメシラート成分(すなわち、CH₃S(O₂)-)である。

【 0 1 8 7 】

反応1に説明されているように、式Iの構造を有する化合物の混合物は、ポリエチレングリコール成分から成り、また式IIIの構造を有するポリマーの混合物を供給するために、式IIの構造を有する化合物の混合物と反応させる。式Iの構造を有する化合物の混合物は実質的に単分散混合物である。好適には、式Iの化合物の混合物中にある化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントが、同じ分子量を有し、また、さらに好適には、式Iの化合物の混合物は、実質的には単分散混合物である。式IIの化合物の混合物は実質的には単分散混合物である。好適には、式IIの化合物の混合物中にある化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントが、同じ分子量を有し、また、さらに好適には、式IIの化合物の混合物は、実質的には単分散混合物である。式IIIの化合物の混合物は実質的には単分散混合物である。好適には、式IIIの化合物の混合物中にある化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントが、同じ分子量を有する。さらに好適には、式IIIの化合物の混合物は、単分散混合物である。

30

【 0 1 8 8 】

反応1は好適には約0 と約40 の間で行われ、さらに好適には、約15 と約35 の間で行われ、また、もっとも好適には、室温にて(およそ25)行われる。

40

【 0 1 8 9 】

反応1は、当業者には理解されるであろうさまざまな期間で行われる。反応1は好適には、約0.25、0.5あるいは0.75時間および約2、4あるいは8時間の間にある期間で行われる。

【 0 1 9 0 】

反応1は好適には、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサメチルリン酸トリアミド、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサソラン、ジエチルエーテル、メチルt-ブチルエーテル(MTBE)、トルエン、ベンゼン、ヘキサン、ペンタン、N-メチルピロリジン、テトラヒドロナフタレン、デカヒドロナフタレン、1,2-ジクロロベンゼン、1

50

、3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノン、あるいはそれらの混合物などの非プロトン性溶媒中で実施されるが、これらに限定されるものではない。さらに好適には、その溶媒はDMF、DMAあるいはトルエンである。

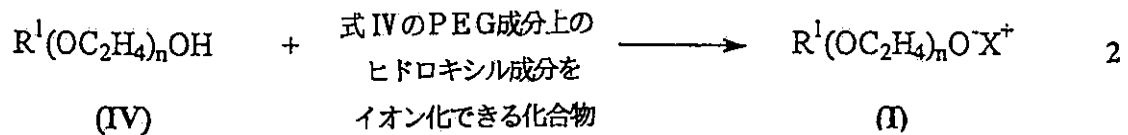
【0191】

式IIの化合物に対する式Iの化合物のモル比は好適には、約1：1よりも大きい。さらに好適には、そのモル比は少なくとも約2：1である。式Iの化合物を過剰に供給することにより、式IIの化合物の全てが実質的に反応し、以下に論じられているように、式IIIの化合物の回収において助けとなることができる。

【0192】

式Iの化合物は、好適には、反応2：

【化17】



に説明されているように作成される。

【0193】

R¹とX⁺は、前記のものであり、また式IVの化合物の混合物は実質的に単分散である。好適には、式IVの化合物の混合物における化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントは同じ分子量を有し、またさらに好適には、式IVの化合物の混合物は単分散である。

【0194】

式IVの化合物のPEG成分上のヒドロキシ成分をイオン化することができるさまざまな化合物は当業者には理解されるであろう。ヒドロキシ成分をイオン化することができる化合物は好適には、強塩基である。さらに好適には、ヒドロキシ成分をイオン化することができる化合物は、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムt-ブトキシド、カリウムt-ブトキシド、ブチルリチウム(BuLi)、リチウムジイソプロピルアミンから成るグループから選択される。ヒドロキシ成分をイオン化することができるその化合物はさらに好適には水素化ナトリウムである。

【0195】

式IVの化合物に対する式IVの化合物のPEG上のヒドロキシ成分をイオン化することができる化合物のモル比は好適には、少なくとも約1：1よりも大きい。さらに好適には、そのモル比は少なくとも約2：1である。ヒドロキシ成分をイオン化することができる化合物を過剰供給することにより、式VIの化合物の全てを実質的に反応させて、式Iの化合物を供給することが確実なものとなる。従って、式IVの化合物と式Iの化合物の両方が反応産物混合において存在した場合に起こり得る分離困難は、回避することが可能である。

【0196】

反応2は好適には約0 と約40 の間で行われ、さらに好適には、約15 と約35 の間で行われ、また、もっとも好適には、室温にて(およそ25)行われる。

【0197】

反応2は、当業者には理解されるであろうさまざまな期間で行われる。反応2は好適には、約0.25、0.5あるいは0.75時間および約2、4あるいは8時間の間にある期間で行われる。

【0198】

反応2は好適には、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサメチルリン酸トリアミド、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、ジエチルエーテル、メチルt-ブチル

10

20

30

40

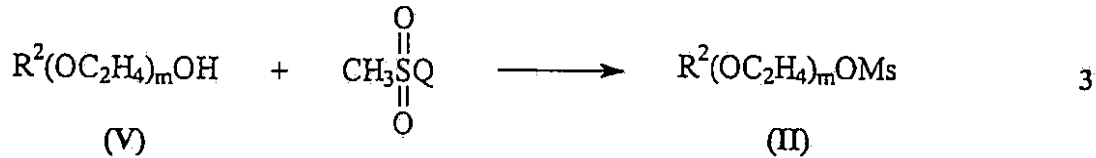
50

エーテル (M T B E)、トルエン、ベンゼン、ヘキサン、ペンタン、N - メチルピロリジノン、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロナフタレン、デカヒドロナフタレン、1, 2 - ジクロロベンゼン、1, 3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノン、あるいはそれらの混合物などの非プロトン性溶媒の中で実施され、溶媒は、これらに限定されるものではない。さらに好適には、その溶媒は D M F、D M A あるいはトルエンである。

【 0 1 9 9 】

式 I I の化合物は好適には、反応 3 :

【 化 1 8 】



10

に説明されているように作成される。

【 0 2 0 0 】

R²とM s は、前記のものを表し、また式 V の化合物の混合物は実質的に単分散として存在する。好適には、式 V の化合物の混合物における化合物の少なくとも約 9 6、9 7、9 8 あるいは 9 9 パーセントは同じ分子量を有し、またさらに好適には、式 V の化合物の混合物は単分散である。

20

【 0 2 0 1 】

Q はハロゲン化物であり、好適には塩化物あるいはフッ化物である。

【 0 2 0 2 】

C H₃ S (O₂) Q はハロゲン化メタンスルホニルである。そのハロゲン化メタンスルホニルは好適には、塩化メタンスルホニルあるいはフッ化メタンスルホニルである。

【 0 2 0 3 】

式 V の化合物に対するハロゲン化メタンスルホニルのモル比は好適には、少なくとも約 1 : 1 よりも大きい。さらに好適には、そのモル比は少なくとも約 2 : 1 である。ハロゲン化メタンスルホニルを過剰供給することにより、式 V の化合物の全てが実質的に反応して、式 I I の化合物が生じることが確実となる。従って、式 V の化合物と式 I I の化合物の両方が反応産物混合において存在した場合に起こり得る分離困難は、回避することが可能である。

30

【 0 2 0 4 】

反応 3 は好適には約 - 1 0 と約 4 0 の間で行われ、さらに好適には、約 1 0 と約 3 5 の間で行われ、また、もっとも好適には、室温にて (およそ 2 5) 行われる。

【 0 2 0 5 】

反応 3 は、当業者には理解されるであろうさまざまな期間で行われる。反応 3 は好適には、約 0 . 2 5、0 . 5 あるいは 0 . 7 5 時間および約 2、4 あるいは 8 時間の間にある期間で行われる。

【 0 2 0 6 】

反応 3 は好適には、モノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、モノエチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、モノイソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、モノ - n - ブチルアミン、ジ - n - ブチルアミン、トリ - n - ブチルアミン、モノクロロヘキシルアミン、ジクロロヘキシルアミン、あるいはそれらの混合物を含む脂肪族アミンの存在下で実施されるが、脂肪族アミンは、これらに限定されるものではない。さらに好適には、脂肪族アミンは、トリエチルアミンなどの第三級アミンである。

40

【 0 2 0 7 】

当業者には理解されるであろうが、式 V の化合物のさまざまな実質的に単分散混合物は市販されており、入手可能である。例えば、R²が H あるいはメチルであり、式 V の化合物がそれぞれ P E G あるいは m P E G 化合物である場合には、それらは、市販されており

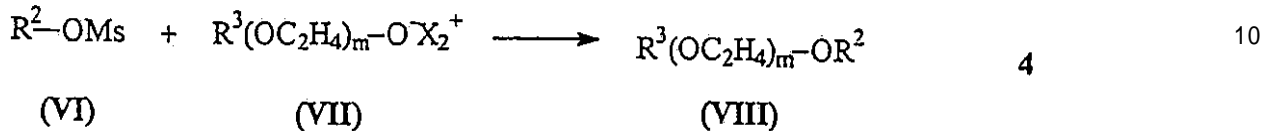
50

、ミシガン州ミルウォーキー市のAldrich社、スイスのFluka社および/またはオレゴン州ポートランド市のTCIアメリカから入手可能である。

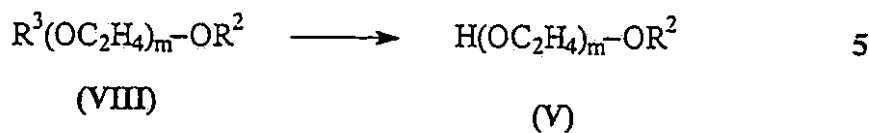
【0208】

R²が例えば、高級アルキル、脂肪酸、脂肪酸のエステル、コレステリルあるいはアダマンチルなどの親油性成分である場合は、式Vの化合物は当業者には理解されるであろうさまざまな方法により供給することが可能である。式Vの化合物は好適には以下のように提供される。すなわち、

【化19】



【化20】



【0209】

R²は、親油性成分であり、好適には高級アルキル、脂肪酸のエステル、コレステリルあるいはアダマンチルであり、さらに好適には、脂肪酸の低級アルキルエステルであり、またもっとも好適には、1~18個の炭素原子を有する脂肪酸のエチルエステルである。

【0210】

R³は、H、ベンジル、トリチル、テトラヒドロピラン、あるいは当業者には理解されるであろうその他のアルコール保護基である。

【0211】

X₂⁺はX⁺に関して前記される、陽イオンである。

【0212】

mの値は前記のものを表す。

【0213】

反応4に関しては、式V Iの化合物の混合物は、反応1に参照して前記されているものと同様の反応条件下で、式V I Iの化合物の混合物と反応させる。式V Iの化合物の混合物は実質的に単分散混合物である。好適には、式V Iの化合物の混合物における化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントは同じ分子量を有する。さらに好適には、式V Iの化合物の混合物は単分散である。式V I Iの化合物の混合物は実質的には単分散である。好適には、式V I Iの化合物の混合物における化合物の少なくとも約96、97、98あるいは99パーセントは同じ分子量を有する。さらに好適には、式V I Iの化合物の混合物は単分散である。

【0214】

反応5に関しては、式V I I Iの化合物は、当業者には理解されるであろうさまざまな方法によりR³成分をアルコールに変換するために加水分解され得る。R³はベンジルあるいはトリチルである場合は、加水分解は好適には、当業者には公知のものであるパラジウム-チャコール触媒の存在下でH₂を使用して行われる。もちろん、R³はHである場合は、反応5は不必要である。

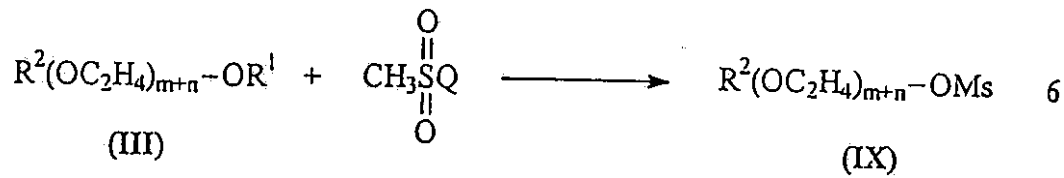
【0215】

式V Iの化合物は市販されており、入手可能であり、あるいは反応3に関し、前記されたようにして製造されることが可能である。式V I Iの化合物は反応2に関して前記されたようにして製造されることが可能である。

【0216】

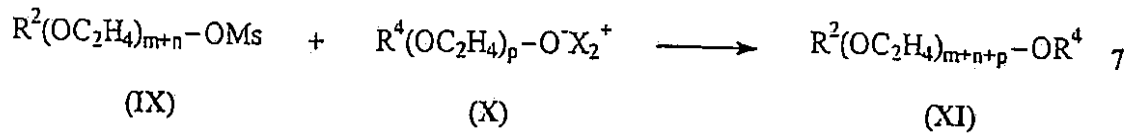
P E G成分から成り、また上の式 I I I の構造を有するポリマーの実質的に単分散混合物は、さらに、P E G鎖を延長するために、その他の、P E G成分から成る実質的に単分散ポリマーと反応させることができる。例えば、以下の図式：

【化 2 1】



10

【化 2 2】



を用いることが可能である。

【0 2 1 7】

M s , m と n は反応 1 に関し、前記されたものである。p は n と m と同様であり、また X₂⁺ は、反応 1 に関して、前記された X⁺ と同様である。Q は反応 3 に関し、前記されたものである。R² は反応 1 に関し、前記されたものであり、また好適には低級アルキルである。R¹ は H である。反応 6 は好適には、反応 3 に関して、前記されたものと同様なやり方で行われる。反応 7 は好適には、反応 1 に関して前記されているものと同様なやり方で行われている。好適には、式 I I I の化合物の混合物における化合物の少なくとも約 9 6、9 7、9 8 あるいは 9 9 パーセントは同じ分子量を有し、また、さらに好適には、式 I I I の化合物の混合物は単分散である。式 X の化合物の混合物は実質的には単分散である。好適には、式 X の化合物の混合物における化合物の少なくとも約 9 6、9 7、9 8 あるいは 9 9 パーセントは同じ分子量を有し、また、さらに好適には、式 X の化合物の混合物は単分散である。

20

30

【0 2 1 8】

本発明の実施形態によるプロセスは、ここで説明される、図 1 に示されている図式により図示説明される。実質的な単分散ポリエチレングリコール含有オリゴマーの合成は、実質的には単分散ポリエチレングリコールであるモノベンジルエーテル (1) の作成により始まる。市販されていて入手可能な実質的な単分散ポリエチレングリコールの過剰量を、C o u d e r t r a (S y n t h e t i c C o m m u n i c a t i o n s , 1 6 (1) : 1 9 ~ 2 6 (1 9 8 6)) により説明されているように、水溶性水酸化ナトリウムの存在下で塩化ベンジルと反応させる。1 のナトリウム塩はその後に、N a H を添加することにより、作成され、またこのナトリウム塩は、ヒドロキシアルカン酸のエステル (2) から合成されるメシラートと反応することが可能となる。アルコール (4) を得るために、メシラートの置換の産物 (3) が接触水素添加により脱ベンジル化される。このアルコールのメシラート (5) は、塩化メタンシルホニルを加えることにより製造でき、また、実質的な単分散ポリエチレングリコール誘導体のモノエチルエーテルのナトリウム塩との反応で求電子試薬として使用され、それによって、オリゴマーのポリエチレングリコール成分を延長させて所望の長さにし、延長されたエステルを得る (6) 。このエステルは、水溶性塩基の中で加水分解されて酸 (7) になり、また、カルボジイミドと N - ヒドロキシスクシンイミドと反応することにより活性化されたエステル (8) に転換される。図 1 に図示説明されているオリゴマーが N - ヒドロキシスクシンイミドを使用して活性化されるが、これは、クロロギ酸パラ - ニトロフェニル、3 , 4 - クロロギ酸フェニル、3 , 4 - フェニルジクロロギ酸塩などの活性クロロギ酸フェニル、トリチル化、およびアセタール形成

40

50

を含むさまざまな他の試薬を、本発明のオリゴマーを活性化するのに使用でき、試薬は、これらに限定されるものではないことは理解されるべきことである。

【0219】

その上さらに図1を参照すると、 q は1~24である。好適には、 q は1~18であり、また q はさらに好適には、4~16である。 R^4 はカルボン酸を供給するために、加水分解を受けることが可能な成分である。 R^4 は好適には低級アルキルであり、またさらに好適にはエチルである。変数 n と m は反応1に関し、前記されたものである。

【0220】

本出願で説明されている手順で使用される全ての出発原料は市販されていて入手可能なものか、あるいは市販されていて入手可能な出発原料を使用して当業者に公知の方法により作成することができる。

10

【0221】

ここでは、本発明は以下の例に参照して説明される。これらの例は本発明の実施形態を説明するという目的のためのものであり、請求項により定義されているような本発明の範囲を制限するものではない。

【0222】

[実施例]

例1~10

例1~10における反応は、別に指定しない限り窒素下で磁気攪拌しながら行った。「処理」は、有機溶媒で抽出して、NaCl飽和溶液で有機相を洗浄し、乾燥させて(MgSO₄)、蒸発させる(ロータリーエバポレーター)ことを示す。シリカゲル60°F-254を下塗りしたMerckガラス板を用いて薄相クロマトグラフィーを行い、スポットをヨウ素蒸気によって視覚化した。すべての質量スペクトルは、Macromolecular Resources Colorado State University, COが測定し、 m/z (相対強度)の順に報告されている。元素分析および融点は、テネシー州、ノックスヴィルのGalbraith Laboratories, Inc.が行った。例1~10は、図2に示す図式に関連している。

20

【0223】

例1

8-メトキシ-1-(メチルスルホニル)オキシ-3,6-ジオキサオクタン(9)乾燥ジクロロメタン(50mL)中の非多分散トリエチレングリコールモノメチルエーテル分子(4.00mL、4.19g、25.5mmol)およびトリエチルアミン(4.26mL、3.09g、30.6mmol)の溶液を氷浴で冷却し、窒素雰囲気下に置いた。乾燥ジクロロメタン(20mL)中の塩化メタンスルホニル(2.37mL、3.51g、30.6mmol)の溶液を添加漏斗から一滴ずつ添加した。その塩化物の添加が完了した10分後、反応混合物を氷浴から取出し、放置して室温になるようにした。混合物をさらに1時間攪拌し、この時、TLC(溶離剤として、15%のMeOHを伴うCHCl₃)は、トリエチレングリコールモノメチルエーテルが残っていないことを示した。

30

【0224】

別の75mLのジクロロメタンを用いて反応混合物を希釈し、飽和NaHCO₃、水、そしてブラインで順次洗浄した。有機物をNa₂SO₄を用いて乾燥させて、濾過し、真空下で濃縮して、化合物9の非多分散混合物を透明油状物として得た(5.31g、86%)。

40

【0225】

例2

エチレングリコールモノメチルエーテル(10)($m=4, 5, 6$)

N₂下、乾燥DMF(25.7mL)中の非多分散化合物11(35.7mmol)の攪拌溶液に、鉱物油中のNaH60%分散液を少しずつ添加し、混合物を室温で1時間攪拌した。この塩12に、乾燥DMF(4mL)中の非多分散メシレート9(23.36)

50

の溶液を一度に添加し、混合物を室温で3.5時間攪拌した。反応の進行は、TLC(12%CH₃OH-CHCl₃)によってモニターした。反応混合物を同量の1N HClで希釈し、酢酸エチル(2×20mL)で抽出して捨てた。水溶液の抽出および処理によって、非多分散ポリマー10を得た(収率82~84%)。

【0226】

例3

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21-ヘプタオキサドコサノール(10)(m=4)
油状物; Rf 0.46(メタノール:クロロホルム=3:22); MS m/z C₁₅H₃₂O₈についての計算値 340.21(M⁺+1)、実測値 341.2。

【0227】

例4

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサペンタコサノール(10)(m=5)
油状物; Rf 0.43(メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C₁₇H₃₆O₉についての計算値 384.24(M⁺+1)、実測値 385.3。

【0228】

例5

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサオクタコサノール(10)(m=6)
油状物; Rf 0.42(メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C₁₉H₄₀O₁₀についての計算値 428.26(M⁺+1)、実測値 429.3。

【0229】

例6

20-メトキシ-1-(メチルスルホニル)オキシ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサエイコサン(14)

非多分散化合物14は、9について説明したように、アルコール13(m=4)および塩化メタンスルホニルから定量収率で、油状物として得た; Rf 0.4(酢酸エチル:アセトニトリル=1:5); MS m/z C₁₇H₃₇O₁₀についての計算値 433.21(M⁺+1)、実測値 433.469。

【0230】

例7

エチレングリコールモノメチルエーテル(15)(m=3, 4, 5)

非多分散化合物15は、化合物10について上で説明した手順を用いて、ジオールから調製した。

【0231】

例8

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサヘンエコサノール(15)(m=3)

油状物; Rf 0.41(メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C₂₁H₄₄O₁₁についての計算値 472.29(M⁺+1)、実測値 472.29。

【0232】

例9

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサテトラトリコサノール(15)(m=4)

油状物; Rf 0.41(メタノール:クロロホルム=6:10); MS m/z C₂₃H₄₈O₁₂についての計算値 516.31(M⁺+1)、実測値 516.31。

【0233】

例10

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-ドデカオキサヘプタトリコサノール(15)(m=5)

10

20

30

40

50

油状物；Rf 0.41 (メタノール：クロロホルム = 6 : 10)；MS m/z C₂₅H₅₂O₁₃についての計算値 560.67 (M⁺+1)、実測値 560.67。

【0234】

例11～18は、図3に示す図式に関連している。

【0235】

例11

ヘキサエチレングリコールモノベンジルエーテル(16)

4 mLの水に3.99 g (100 mmol)のNaOHを溶解することによって調製した水酸化ナトリウム水溶液を、非多分散ヘキサエチレングリコール(28.175 g、25 mL、100 mmol)にゆっくりと添加した。塩化ベンジル(3.9 g、30.8 mmol、3.54 mL)を添加して、反応混合物を攪拌しながら100 に18時間加熱した。その後、反応混合物を冷却して、ブライン(250 mL)で希釈し、塩化メチレン(200 mL × 2)で抽出した。有機相を集めて、ブレインで一回洗浄し、Na₂SO₄を用いて乾燥させて、濾過し、真空下で濃縮して、暗褐色油状物にした。粗生成混合物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、溶離勾配：酢酸エチル 9 / 1の酢酸エチル/メタノール)によって精製して、8.099 g (70%)の非多分散16を黄色油状物として生じた。

10

【0236】

例12

6-メチルスルホニルオキシヘキサン酸エチル(17)

乾燥ジクロロメタン(75 mL)中の非多分散6-ヒドロキシヘキサン酸エチル(50.76 mL、50.41 g、227 mmol)の溶液を氷浴で冷却し、窒素雰囲気下に置いた。トリエチルアミン(34.43 mL、24.99 g、247 mmol)を添加した。乾燥ジクロロメタン(75 mL)中の塩化メタンスルホニル(19.15 mL、28.3 g、247 mmol)の溶液を、添加漏斗から一滴ずつ添加した。混合物を3時間半攪拌し、放置して、氷浴が溶けるにつれてゆっくりと室温にした。シリカゲルを通して混合物を濾過し、濾液を、水、飽和NaHCO₃、水そしてブラインで順次洗浄した。有機物をNa₂SO₄を用いて乾燥させて、濾過し、真空下で濃縮して淡黄色油状物にした。粗生成物の最終精製をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、1 / 1のヘキサン/酢酸エチル)によって達成して、非多分散生成物(46.13 g、85%)を透明無色油状物として得た。FAB MS：m/e 239 (M+H)、193 (M-C₂H₅O)。

20

30

【0237】

例13

6{2-[2-(2-{2-[2-(2-ベンジルオキシエトキシ)エトキシ]エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-ヘキサン酸エチルエステル(18)

水素化ナトリウム(3.225 gまたは60%油状物分散液、80.6 mmol)を80 mLの無水トルエンに懸濁させて、窒素雰囲気下に置き、氷浴で冷却した。80 mLの乾燥トルエン中の非多分散アルコール16(27.3 g、73.3 mmol)の溶液をNaH懸濁液に添加した。混合物を0 で30分間攪拌し、放置して室温にして、もう5時間攪拌した。この間に、混合物は、透明な褐色溶液になった。80 mLの乾燥トルエン中の非多分散メシレート17(19.21 g、80.6 mmol)を、NaH/アルコール混合物に添加し、溶液を集めて、室温で3日間攪拌した。50 mLのメタノールを用いて反応混合物の反応を停止させて、塩基性アルミナを通して濾過した。濾液を真空下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、溶離勾配：3 / 1の酢酸エチル/ヘキサン 酢酸エチル)によって精製して、非多分散生成物を淡黄色油状物として生じた(16.52 g、44%)。FAB MS：m/e 515 (M+H)。

40

【0238】

例14

6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-ヘキサン酸エチルエステル(19)

50

非多分散ベンジルエーテル18(1.03g、2.0mmol)を25mLのエタノールに溶解した。この溶液に、270mgの10%Pd/Cを添加し、混合物を水素雰囲気下に置いて、4時間撹拌した。この時、TLCは、出発原料の完全消失を示した。Celite545を通して反応混合物を濾過して、触媒を除去し、濾液を真空下で濃縮して、非多分散表題化合物を透明油状物として生じた(0.67g、79%)。FAB MS: m/e 425 (M+H)、447 (M+Na)。

【0239】

例15

6 - { 2 - [2 - (2 - { 2 - [2 - (2 - メチルスルホニルエトキシ) エトキシ] エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ } - ヘキサン酸エチルエステル (20)

非多分散アルコール19(0.835g、1.97mmol)を3.5mLの乾燥ジクロロメタンに溶解して、窒素雰囲気下に置いた。トリエチルアミン(0.301mL、0.219g、2.16mmol)を添加し、混合物を氷浴で冷却した。2分後、塩化メタンスルホニル(0.16mL、0.248g、2.16mmol)を添加した。混合物を15分間、0で撹拌し、その後、室温で2時間撹拌した。シリカゲルを通して反応混合物を濾過して、塩化トリエチルアンモニウムを除去し、濾液を、水、飽和NaHCO₃、水そしてブラインで順次洗浄した。有機物をNa₂SO₄を用いて乾燥させ、濾過して、真空下で濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、9/1の酢酸エチル/メタノール)によって精製して、非多分散化合物20を透明油状物として得た(0.819g、83%)。FAB MS: m/e 503 (M+H)。

【0240】

例16

6 - (2 - { 2 - [2 - (2 - { 2 - [2 - (2 - メトキシエトキシ) エトキシ] エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ } - エトキシ) - ヘキサン酸エチルエステル (21)

NaH(88mgの60%油中分散液、2.2mmol)を、N₂下で無水トルエン(3mL)に懸濁させ、0に冷却した。トルエンとの共沸蒸留によって乾燥させた非多分散ジエチレングリコールモノメチルエーテル(0.26mL、0.26g、2.2mmol)を添加した。反応混合物を放置して室温に温め、4時間撹拌した。この間に、濁ったグレーの懸濁液が透明になり、黄色になり、そしてその後、褐色に変わった。2.5mLの乾燥トルエン中のメシレート20(0.50g、1.0mmol)を添加した。室温で一晩撹拌した後、2mLのメタノールの添加によって反応を停止させ、得られた溶液は、シリカゲルを通して濾過した。濾液を真空下で濃縮した。FAB MS: m/e 499 (M+H)、521 (M+Na)。分取クロマトグラフィー(シリカゲル、19/3のクロロホルム/メタノール)によりさらに精製することによって、非多分散生成物を透明黄色油状物として生じた(0.302g、57%)。FAB MS: m/e 527 (M+H)、549 (M+Na)。

【0241】

例17

6 - (2 - { 2 - [2 - (2 - { 2 - [2 - (2 - メトキシエトキシ) エトキシ] エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ } - エトキシ) - ヘキサン酸 (22)

非多分散エステル21(0.25g、0.046mmol)を0.71mLの1N NaOH中で、18時間撹拌した。18時間後、混合物を真空下で濃縮して、アルコールを除去し、残留物をさらなる10mLの水に溶解した。その水溶液を2N HClでpH2に酸性化し、その生成物をジクロロメタン(30mL×2)に抽出した。その後、有機相を集めて、ブライン(25mL×2)で洗浄し、Na₂SO₄を用いて乾燥させて、濾過し、真空下で濃縮して、非多分散表題化合物を黄色油状物として生じた(0.147g、62%)。FAB MS: m/e 499 (M+H)、521 (M+Na)。

【0242】

例18

10

20

30

40

50

6 - (2 - { 2 - [2 - (2 - { 2 - [2 - (2 - メトキシエトキシ) エトキシ] エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ } - エトキシ) - ヘキサノ酸 2 , 5 - ジオキソ - ピロリジン - 1 - イルエステル (2 3)

非多分散酸 2 2 (0 . 2 0 9 g , 0 . 4 2 m m o l) を 4 m L の乾燥ジクロロメタンに溶解し、既に N H S (N - ヒドロキシスクシンイミド) (5 7 . 8 m g , 0 . 5 0 2 m m o l) と E D C (塩酸 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイジド) (9 8 . 0 m g , 0 . 5 0 2 m m o l) が入っている乾燥フラスコに、N₂雰囲気下で添加した。溶液を室温で一晩攪拌し、シリカゲルを通して濾過して、過剰の試薬を除去し、E D C から尿素を生成した。濾液を真空下で濃縮して、非多分散成生物を暗黄色油状物として生じた (0 . 2 3 5 g , 9 4 %) 。 F A B M S : m / e 5 9 6 (M + H) , 6 1 8 (M + N a) 。

10

【 0 2 4 3 】

例 1 9 ~ 2 4 は、図 4 に示す図式に関連している。

【 0 2 4 4 】

例 1 9

トリエチレングリコールモノメチルエーテルのメシレート (2 4)

氷浴で 0 °C に冷却した C H₂C l₂ (1 0 0 m L) の溶液に、非多分散トリエチレングリコールモノメチルエーテル (2 5 g , 0 . 1 5 m m o l) を添加した。その後、トリエチルアミン (2 9 . 5 m L , 0 . 2 2 m o l) を添加して、溶液を 1 5 分間、0 °C で攪拌し、続いて、塩化メタンスルホニル (1 3 . 8 m L , 0 . 1 8 m o l , 2 0 m L の C H₂C l₂ に溶解) を一滴ずつ添加した。反応混合物を 3 0 分間、0 °C で攪拌し、放置して室温に温め、その後、2 時間攪拌した。C e l i t e (~ 2 0 0 m L の C H₂C l₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過し、その後、H₂O (3 0 0 m L) 、 5 % N a H C O₃ (3 0 0 m L) 、 H₂O (3 0 0 m L) 、飽和 N a C l (3 0 0 m L) で洗浄して、M g S O₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させた。その後、油状物を ~ 2 時間、真空ライン上に配置して、確実に乾燥させ、非多分散表題化合物を黄色油状物として生じた (2 9 . 1 5 g , 収率 8 0 %) 。

20

【 0 2 4 5 】

例 2 0

ヘプタエチレングリコールモノメチルエーテル (2 5)

T H F (1 L) 中の非多分散テトラエチレングリコール (5 1 . 5 g , 0 . 2 7 m m o l) の溶液に、カリウム t - ブトキシド (1 4 . 8 g , 0 . 1 3 m o l , ~ 3 0 分間かけて少しずつ) を添加した。次に、反応混合物を 1 時間攪拌し、その後、T H F (9 0 m L) に溶解した 2 4 (2 9 . 1 5 g , 0 . 1 2 m o l) を一滴ずつ添加し、反応混合物を一晩攪拌した。C e l i t e (~ 2 0 0 m L の C H₂C l₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過し、乾燥するまで蒸発させた。その後、油状物を H C l (2 5 0 m L , 1 N) に溶解し、酢酸エチル (2 5 0 m L) で洗浄して、過剰の 2 4 を除去した。残存する 2 4 を除去するために、酢酸 (1 2 5 m L) での追加洗浄が必要なこともある。2 5 の大部分が水性相から除去されるまで、水性相を C H₂C l₂ (1 2 5 m L 量) で繰返し洗浄した。最初の抽出は、2 4 , 2 5 , および二結合副生成物を含有するであろうから、H C l (1 2 5 m L , 1 N) で逆抽出しなければならない。有機相を集めて、乾燥するまで蒸発させた。その後、得られた油状物を C H₂C l₂ (1 0 0 m L) に溶解し、2 5 が除去されるまで、H₂O (5 0 m L 量) で繰返し洗浄した。水性画分を集め、全量 5 0 m L 、溶液が濁ってくるまで N a C l を添加し、その後、C H₂C l₂ (2 x 5 0 0 m L) で洗浄した。有機相を集めて、M g S O₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、非多分散表題化合物を油状物として生じた (1 6 . 9 g , 収率 4 1 %) 。確実に高純度にするために、一段階以上の精製手順を繰り返すことが望ましいこともある。

30

40

【 0 2 4 6 】

例 2 1

8 - プロモオクタネート (2 6)

50

エタノール(100 mL)中の8-ブロモオクタン酸(5.0 g、22 mmol)の溶液に、 H_2SO_4 (0.36 mL、7.5 mmol)を添加し、反応物を攪拌しながら3時間加熱して還流させた。粗反応混合物を室温に冷却し、 H_2O (100 mL)、飽和 $NaHCO_3$ (2×100 mL)、 H_2O (100 mL)で洗浄して、 $MgSO_4$ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、透明油状物が得られた(5.5 g、収率98%)。

【0247】

例22

MPEG7-C8エステルの合成(27)

エーテル(90 mL)中の非多分散化合物25(3.0 g、8.8 mmol)の溶液に、カリウムt-ブトキシド(1.2 g、9.6 mmol)を添加し、反応混合物を1時間攪拌した。その後、エーテル(10 mL)に溶解した非多分散化合物26(2.4 g、9.6 mmol)を一滴ずつ添加し、反応混合物を一晩攪拌した。Celite(200 mL以下の CH_2Cl_2 で洗浄したもの)を通して粗反応混合物を濾過し、乾燥するまで蒸発させた。得られた油状物を酢酸エチルに溶解し、 H_2O (2×200 mL)で洗浄して、 $MgSO_4$ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させた。カラムクロマトグラフィー(シリカ、酢酸エチル対酢酸エチル/メタノール、10:1)を実施し、非多分散表題化合物を透明油状物として得た(0.8438 g、収率19%)。

10

【0248】

例23

MPEG7-C8酸(28)

非多分散化合物27(0.70 g、1.4 mmol)の油状物に、1Nの $NaOH$ (2.0 mL)を添加し、反応混合物を4時間攪拌した。粗反応混合物を濃縮し、酸性化(pH~2)して、 $NaCl$ で飽和し、 CH_2Cl_2 (2×50 mL)で洗浄した。有機相を集め、飽和 $NaCl$ で洗浄して、 $MgSO_4$ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、非多分散表題化合物を透明油状物として得た(0.35 g、収率53%)。

20

【0249】

例24

MPEG7-C8酸の活性化(29)

非多分散mPEG7-C8酸28(0.31 g、0.64 mmol)を3 mLの無水塩化メチレンに溶解し、その後、無水塩化メチレン中のN-ヒドロキシスクシンイミド(0.079 g、0.69 mmol)とEDCI·HCl(135.6 mg、0.71 mmol)の溶液を添加した。反応物を数時間攪拌し、その後、1Nの HCl 、水で洗浄して、 $MgSO_4$ を用いて乾燥させ、濾過して、濃縮した。粗材料をカラムクロマトグラフィーによって精製し、濃縮して、非多分散表題化合物を透明油状物として得、減圧により乾燥させた。

30

【0250】

例25~29は、図5に示す図式に関連している。

【0251】

例25

10-ヒドロキシデカノート(30)

エタノール(100 mL)中の非多分散10-ヒドロキシデカン酸(5.0 g、26.5 mmol)の溶液に、 H_2SO_4 (0.43 mL、8.8 mmol)を添加し、反応物を攪拌しながら3時間加熱して還流させた。粗反応混合物を室温に冷却し、 H_2O (100 mL)、飽和 $NaHCO_3$ (2×100 mL)、 H_2O (100 mL)で洗浄して、 $MgSO_4$ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、非多分散表題化合物が透明油状物として生じた(6.9 g、収率98%)。

40

【0252】

例26

10-ヒドロキシデカノートのメシレート(31)

CH_2Cl_2 (27 mL)の溶液に、非多分散10-ヒドロキシデカノート30(5.

50

6 g、26 mmol) を添加し、氷浴で 0 °C に冷却した。その後、トリエチルアミン (5 mL、37 mmol) を添加し、反応混合物を 15 分間、0 °C で攪拌した。その後、CH₂Cl₂ (3 mL) に溶解した塩化メチルスルホニル (2.7 mL、24 mmol) を添加し、反応混合物を 0 °C で 30 分間攪拌して、氷浴を取り外し、反応物をさらに 2 時間、室温で攪拌した。Celite (80 mL の CH₂Cl₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過し、濾液を、H₂O (100 mL)、5% NaHCO₃ (2 × 100 mL)、H₂O (100 mL)、飽和 NaCl (100 mL) で洗浄して、MgSO₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、非多分散表題化合物を黄色がかった油状物として得た (7.42 g、収率 97%)。

【0253】

10

例 27

MPEG₇-C₁₀エステル (32)

テトラヒドロフラン (100 mL) 中の非多分散ヘプタエチレングリコールモノメチルエーテル 25 (2.5 g、7.3 mmol) の溶液に、水素化ナトリウム (0.194 g、8.1 mmol) を添加し、反応混合物を 1 時間攪拌した。その後、テトラヒドロフラン (10 mL) に溶解した非多分散 10-ヒドロキシデカノートのメシレート 31 (2.4 g、8.1 mmol) を一滴ずつ添加して、反応混合物一晩攪拌した。Celite (200 mL 以下の CH₂Cl₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過して、乾燥するまで蒸発させた。得られた油状物を酢酸エチルに溶解し、H₂O (2 × 200 mL) で洗浄して、MgSO₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、クロマトグラフィー (シリカ、10:1 の酢酸エチル/メタノール) に付し、クロマトグラフィー (シリカ、酢酸エチル) に付して、非多分散表題化合物を透明油状物として得た (0.570 g、収率 15%)。

20

【0254】

例 28

MPEG₇-C₁₀酸 (33)

非多分散 MPEG₇-C₁₀エステル 32 (0.570 g、1.1 mmol) の油状物に、1 N の NaOH (1.6 mL) を添加し、反応混合物を一晩攪拌した。粗反応混合物を濃縮し、酸性化 (pH ~ 2) して、NaCl で飽和し、CH₂Cl₂ (2 × 50 mL) で洗浄した。有機相を集め、飽和 NaCl (2 × 50 mL) で洗浄して、MgSO₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させて、非多分散表題化合物を透明油状物として得た (0.340 g、収率 62%)。

30

【0255】

例 29

MPEG₇-C₁₀酸の活性化 (34)

上の例 24 で説明したものに類似した手順を用いて、非多分散酸 33 を活性化した。

【0256】

例 30 および 31 は、図 6 に示す図式に関連している。

【0257】

例 30

40

C18 (PEG6) オリゴマー (36) の合成

非多分散塩化ステアロイル 35 (0.7 g、2.31 mmol) を、ベンゼン中の PEG6 (5 g、17.7 mmol) とピリジン (0.97 g、12.4 mmol) の混合物にゆっくりと添加した。反応混合物を数時間 (5 時間以内) 攪拌した。展開溶媒として酢酸エチル/メタノールを用いる TLC によって、反応を追跡した。その後、反応混合物を水で洗浄し、MgSO₄ を用いて乾燥させて、濃縮し、減圧によって乾燥させた。精製非多分散化合物 36 を FABMS によって分析した: m/e 549 / M⁺H。

【0258】

例 31

C18 (PEG6) オリゴマーの活性化

50

非多分散 C 1 8 (P E G 6) オリゴマーの活性化は、二段階で行った。

1) 非多分散ステアロイル - P E G 6 3 6 (0 . 8 g , 1 . 4 6 m m o l) をトルエンに溶解して、ホスゲン溶液 (1 0 m L , トルエン中 2 0 %) に添加し、これを氷浴で冷却した。反応混合物を 0 で 1 時間、その後、室温で 3 時間攪拌した。その後、ホスゲンおよびトルエンを蒸留して除去し、残留非多分散ステアロイル P E G 6 クロロホルメート 3 7 を P₂O₅ を用いて一晩乾燥させた。

2) 無水塩化メチレン中の非多分散ステアロイル P E G 6 クロロホルメート 3 6 (0 . 7 8 g , 1 . 2 7 m m o l) と T E A (1 2 8 m g , 1 . 2 7 m m o l) の溶液に、塩化メチレン中の N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) の溶液を添加した。反応混合物を 1 6 時間攪拌し、その後、水で洗浄して、M g S O₄ を用いて乾燥させ、濾過して、濃縮し、減圧によって乾燥させて、非多分散活性化 C 1 8 (P E G 6) オリゴマー 3 8 が得られた。

10

【 0 2 5 9 】

例 3 2 ~ 3 7 は、図 7 に示す図式に関連している。

【 0 2 6 0 】

例 3 2

テトラエチレングリコールモノベンジルエーテル (3 9)

非多分散テトラエチレングリコールの油状物 (1 9 . 4 g , 0 . 1 0 m m o l) に、N a O H の溶液 (4 . 0 m L 中 4 . 0 g) を添加して、反応物を 1 5 分間攪拌した。塩化ベンジル (3 . 5 4 m L , 3 0 . 8 m m o l) を添加し、反応混合物を 1 0 0 に加熱して、一晩攪拌した。反応混合物を室温に冷却して、飽和 N a C l (2 5 0 m L) で希釈し、C H₂C l₂ (2 x 2 0 0 m L) で洗浄した。有機相を集め、飽和 N a C l で洗浄して、M g S O₄ で乾燥させ、クロマトグラフィー (シリカ、酢酸エチル) に付して、非多分散表題化合物を黄色油状物として得た (6 . 2 1 g , 収率 7 1 %) 。

20

【 0 2 6 1 】

例 3 3

テトラエチレングリコールモノベンジルエーテルのメシレート (4 0)

C H₂C l₂ (2 0 m L) の溶液に、テトラエチレングリコールモノベンジルエーテル 3 9 (6 . 2 1 g , 2 2 m m o l) を添加し、氷浴で 0 に冷却した。その後、トリエチルアミン (3 . 2 m L , 2 4 m m o l) を添加し、反応混合物を 1 5 分間、0 で攪拌した。その後、C H₂C l₂ (2 m L) に溶解した塩化メタンスルホニル (1 . 7 m L , 2 4 m m o l) を添加し、反応混合物を 0 で 3 0 分間攪拌して、氷浴を取り外し、反応物を室温でさらに 2 時間攪拌した。C e l i t e (8 0 m L の C H₂C l₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過して、濾液を H₂O (1 0 0 m L) 、 5 % N a H C O₃ (2 x 1 0 0 m L) 、 H₂O (1 0 0 m L) 、 飽和 N a C l (1 0 0 m L) で洗浄し、M g S O₄ で乾燥させた。得られた黄色油状物を活性炭 (1 0 g) を含むシリカのパッドを用いたクロマトグラフィーに付して、非多分散表題化合物を透明油状物として得た (7 . 1 0 g , 収率 8 9 %) 。

30

【 0 2 6 2 】

例 3 4

オクタエチレングリコールモノベンジルエーテル (4 1)

水素化ナトリウム (0 . 4 3 g , 1 8 m m o l) を含有するテトラヒドロフラン (1 4 0 m L) の溶液に、テトラヒドロフラン (1 0 m L) 中の非多分散テトラエチレングリコール (3 . 5 g , 1 8 m m o l) の溶液を一滴ずつ添加して、反応混合物を 1 時間攪拌した。その後、テトラヒドロフラン (1 0 m L) に溶解したテトラエチレングリコールモノベンジルエーテルのメシレート 4 0 (6 . 0 g , 1 6 . 5 m m o l) を一滴ずつ添加して、反応混合物を一晩攪拌した。C e l i t e (2 5 0 m L の C H₂C l₂ で洗浄したもの) を通して粗反応混合物を濾過し、濾液を H₂O で洗浄して、M g S O₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させた。得られた油状物をクロマトグラフィー (シリカ、1 0 : 1 の酢酸エチル / メタノール) に付し、クロマトグラフィー (シリカ、2 5 : 1 のクロロホルム / メタ

40

50

ノール)に付して、非多分散表題化合物を透明油状物として得た(2.62g、収率34%)。

【0263】

例35

ステアレートPEG8-ベンジル(43)の合成

非多分散オクタエチレングリコールモノベンジルエーテル41(0.998g、2.07mmol)とピリジン(163.9mg、2.07mmol)の攪拌冷却溶液に、ベンゼン中の非多分散塩化ステアロイル42(627.7mg、2.07mmol)を添加した。反応混合物を一晩(18時間)攪拌した。翌日、反応混合物を水で洗浄し、MgSO₄を用いて乾燥させて、濃縮し、減圧によって乾燥させた。その後、粗生成物を、10%メタノール/90%クロロホルムを用いるフラッシュシリカゲルカラムのクロマトグラフィーに付した。生成物を含有する画分を集めて、濃縮し、減圧によって乾燥させて、非多分散表題化合物を得た。

10

【0264】

例36

ステアレート-PEG8-ベンジルの水添分解

非多分散ステアレート-PEG8-ベンジル43(0.854g、1.138mmol)のメタノール溶液に、Pd/C(10%) (活性炭上10重量%のパラジウム)を添加した。反応混合物を一晩(18時間)、水素下で攪拌した。その後、溶液を濾過し、濃縮して、10%メタノール/90%クロロホルムを用いるフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製し、R_f=0.6の画分を回収して、濃縮し、乾燥させて、非多分散酸44を得た。

20

【0265】

例37

C18(PEG8)オリゴマーの活性化

例31においてステアレート-PEG6について説明したように、非多分散ステアレート-PEG8オリゴマーの二段階活性化を行って、非多分散活性化C18(PEG8)オリゴマー45を得た。

【0266】

例38

活性化トリエチレングリコールモノメチルオリゴマーの合成

以下の説明は、図8に示す図式に関係している。20%のホスゲンを含有するトルエンの溶液(100mL、約18.7g、189mmolのホスゲン)をN₂雰囲気下で0に冷却した。非多分散mTEG(トリエチレングリコール、モノメチルエーテル、7.8g、47.5mmol)を25mLの無水酢酸エチルに溶解し、冷却したホスゲン溶液に添加した。混合物を1時間、0で攪拌し、その後、放置して室温に温め、さらに2時間半攪拌した。残存するホスゲン、酢酸エチルおよびトルエンを減圧蒸留によって除去して、非多分散mTEGクロロホルムート46が透明油状物性残留物として残った。

30

【0267】

非多分散残留物46を50mLの乾燥ジクロロメタンに溶解し、これにTEA(トリエチルアミン、6.62mL、47.5mmol)およびNHS(N-ヒドロキシスクシンイミド、5.8g、50.4mmol)を添加した。混合物を室温、乾燥雰囲気下で、20時間攪拌し、この間に、大量の白色沈殿が出現した。混合物を濾過してこの沈殿物を除去し、真空下で濃縮した。得られた油状物47をジクロロメタンに取り、冷脱イオン水で2回、1NのHClで2回、そしてブラインで1回洗浄した。有機物をMgSO₄を用いて乾燥させ、濾過して、濃縮し、非多分散表題化合物を透明な淡黄色油状物として得た。必要な場合には、溶離剤としてEtOAcを用いるシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによってNHSエステルをさらに精製してもよい。

40

【0268】

例39

50

活性化パルミテート - T E Gオリゴマーの合成

以下の説明は、図9に示す図式に関係している。非多分散無水パルミチン酸(5g、10mmol)を乾燥THF(20mL)に溶解し、室温で撹拌した。撹拌溶液に、3mol過剰のピリジンを追加し、続いて非多分散トリエチレングリコール(1.4mL)を添加した。この反応混合物を1時間撹拌した(反応の進行をTLC(3:7の酢酸エチル:クロロホルム)によってモニターした)。反応終了時、THFを除去し、生成物を10% H_2SO_4 酸と混合して、酢酸エチル(3×30mL)で抽出した。集めた抽出物を水、ブラインで順次洗浄して、 $MgSO_4$ を用いて乾燥させ、蒸発させて、非多分散成生物48を得た。DMF(~10mL)中のN,N'-ジスクシンイミジルカーボネート(3mmol)の溶液を、10mLの無水DMF中の非多分散成生物48(1mmol)の溶液に、撹拌しながら添加する。水素化ナトリウム(3mmol)を反応混合物にゆっくりと添加する。反応混合物を数時間(例えば5時間)撹拌する。ジエチルエーテルを添加して、活性オリゴマーを沈殿させる。この工程を3回繰返し、最終的には生成物を乾燥させる。

【0269】

例40

活性ヘキサエチレングリコールモノメチルオリゴマーの合成

以下の説明は、図10に示す図式に関係している。非多分散活性ヘキサエチレングリコールモノメチルエーテルは、例39の非多分散トリエチレングリコールと類似に調製した。ホスゲン20%のトルエン溶液(35mL、6.66g、67.4mmolのホスゲン)を、 N_2 雰囲気下、氷/塩水浴で冷却した。非多分散ヘキサエチレングリコール50(1.85mL、2.0g、6.74mmol)を5mLの無水EtOAcに溶解し、注射器によってホスゲン溶液に添加した。反応混合物を氷浴内で1時間撹拌し続け、取出して、さらに室温で2.5時間撹拌した。ホスゲン、EtOAcおよびトルエンを減圧蒸留によって除去して、非多分散化合物51が透明油状物性残留物として残った。

【0270】

非多分散残留物51を20mLの乾燥ジクロロメタンに溶解し、乾燥させた不活性雰囲気下に置いた。トリエチルアミン(0.94mL、0.68g、6.7mmol)、そしてその後、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド、0.82g、7.1mmol)を添加し、反応混合物を室温で18時間撹拌した。シリカゲルを通して混合物を濾過して、白色沈殿を除去し、真空下で濃縮した。残留物をジクロロメタンに取り、冷水で2回、1NのHClで2回、そしてブラインで1回洗浄した。その有機物を Na_2SO_4 を用いて乾燥させ、濾過して、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、EtOAc)によって最終精製を行って、UV活性非多分散NHSエステル52を得た。

【0271】

例41

インスリン - オリゴマー結合体の合成

22±4における25mLのジメチルスルホキシド(純度>99%)中のヒトインスリン(亜鉛または亜鉛不含、乾燥重量を基準にして、2g、0.344mmol)に、8mLのトリエチルアミン(純度>99%)を添加した。得られた混合物を5~10分間、22±4で撹拌した。前記に、22±4、撹拌下で、7.5mLのアセトニトリル中の前記例18の活性化オリゴマー(活性化100%を基準にして、0.188g、0.36mmol)を迅速に添加した。溶液を45分間撹拌し、温度を27以下に維持しながら、酢酸溶液で反応を停止させた。HPLC分析によって反応をモニターした。この反応条件は、B29位で単一結合したPEG7-ヘキシル-インスリン(B29単一結合PEG7-ヘキシル-インスリン)を収率40~60%で生成する。粗反応混合物(B29単一結合のPEG7-ヘキシル-インスリン40~60%、未反応のインスリン8~25%、関連物質15~35%)を透析するかまたはダイアフィルトレーションして(3000~3500の分子量削除、MWCO)、有機溶媒と低分子量不純物を除去し、酢酸アンモニウム緩衝液を交換して、冷凍乾燥させた。

【0272】

10

20

30

40

50

B 2 9 位で単一結合する P E G 7 - ヘキシル - インスリンの結合反応を H P L C 分析によってモニターした。この H P L C 分析法には、内径 1 5 0 × 3 . 9 mm、5 μ m、3 0 0 の Waters Delta - Pak C 1 8 カラムを用いた。溶媒系は、溶媒 B (5 0 / 5 0 のメタノール / 水中の 0 . 1 % T F A) と溶媒 D (メタノール中の 0 . 1 % T F A) から成った。勾配系は、以下のとおりであった。

【 0 2 7 3 】

【表 1】

時間 (分)	溶剤 B (%)	溶剤 D (%)	流量 (mL/分)
最初(0)	100	0	1.00
20	40	60	1.00
25	100	0	1.00

10

【 0 2 7 4 】

例 4 2

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 2 4 の活性化オリゴマーと結合させる。

【 0 2 7 5 】

例 4 3

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 3 1 の活性化オリゴマーと結合させる。

20

【 0 2 7 6 】

例 4 4

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 3 7 の活性化オリゴマーと結合させる。

【 0 2 7 7 】

例 4 6

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 3 8 の活性化オリゴマーと結合させる。

【 0 2 7 8 】

例 4 7

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 3 9 の活性化オリゴマーと結合させる。

30

【 0 2 7 9 】

例 4 8

例 4 1 の手順を用いて、ヒトインスリンを例 4 0 の活性化オリゴマーと結合させる。

【 0 2 8 0 】

例 4 9

ヒトインスリン - オリゴマー結合体の混合物に関する分散係数の測定

ヒトインスリン - オリゴマー結合体の混合物に関する分散係数は、以下のように測定する。例えば、上の例 4 1 で説明したようなヒトインスリン - オリゴマー結合体の混合物を提供する。混合物の第一サンプルを H P L C によって精製して、サンプル中の種々のヒトインスリン - オリゴマー結合体を分離し、単離する。各単離画分が、純粋に単一分散した結合体の混合物を含有すると仮定すると、「n」は、回収される画分の数に等しい。混合物は、以下の結合体を一つ以上含むことができる。これらの結合体は、結合位置を規定し、続いて結合度：G l y ^{A1} - 結合；P h e ^{B1} - 結合；L y s ^{B29} - 結合；G l y ^{A1}、P h e ^{B1} 二結合；G l y ^{A1}、L y s ^{B29} 二結合；P h e ^{B1}、L y s ^{B29} 二結合；および / または G l y ^{A1}、P h e ^{B1}、L y s ^{B29} 三結合を規定することによって説明される。混合物の各単離画分は、質量分光法によって分析して面分の質量を決定し、これによって、各単離画分をモノ、ジまたはトリ結合体として分類することができ、サンプルにおける各結合体についての変数「M_i」の値を提供することができる。

40

【 0 2 8 1 】

混合物の第二サンプルを H P L C によって分析して、H P L C トレースを提供する。モ

50

ル吸光度が結合の結果として変化しないと仮定すると、混合物中の特定の結合体の重量パーセントは、HPLCトレースのすべてのピークの下での総面積のパーセンテージとして、特定の結合体に対応するHPLCトレースのピークの下での面積によって提供される。サンプルを回収し、乾燥するまで冷凍乾燥させて、サンプルの無水のグラム重量を測定する。サンプルのグラム重量にサンプル中の各成分の重量パーセントを掛けて、サンプル中の各結合体のグラム重量を決定する。特定の結合体（第*i*番目の結合体）について、変数「 N_i 」は、サンプル中の特定の結合体のグラム重量を、特定の結合体の質量、上で測定した M_i 、で割り、割った答えにアボガドロ数（ $6.02205 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$ ）を掛けて、もともと、サンプル中の特定の結合体の分子数、 N_i を得る。その後、各結合体について測定した n 、 M_i 、および各結合体について決定した N_i を用いて、分散係数を計算する。

10

【0282】

例50

粗混合物からのB29変性PEG7-ヘキシル-インスリンモノ結合体の精製

分取HPLCシステムを用いて、例41の粗混合物からB29-結合のPEG7-ヘキシル-インスリンを精製した。冷凍乾燥粗混合物（0.5g、組成：B29-結合のPEG7-ヘキシル-インスリン40~60%、未反応のインスリン8~25%、関連物質15~35%）を5~10mLの0.01M酢酸アンモニウム緩衝液、pH7.4に溶解し、0.5%トリエチルアミン/0.5%リン酸緩衝液TEAP Aで平衡させたC-18逆相HPLCカラム（150×3.9mm）に充填した。カラムは、TEAP AおよびTEAP B（80%アセトニトリルおよび20%TEAP A）溶媒系を用いて、勾配流で溶離した。粗混合物からのB29-結合のPEG7-ヘキシル-インスリンを分取HPLC精製するための勾配系は、以下のとおりであった。

20

【0283】

【表2】

時間 (分)	%TEAP A	%TEAP B	流量 (mL/分)
最初(0)	70	30	30
45	64	36	30
105	60	40	30
115	40	60	30
125	15	85	30
135	15	85	30

30

画分をHPLCによって分析し、B29モノ結合体のPEG7-ヘキシル-インスリンの純度が97%より高い生成物面分をプールした。酢酸アンモニウム緩衝液（0.01M、pH7.4）に対する透析またはダイアフィルトレーション（MWCO 3000~3500）によって溶離緩衝液および溶媒を除去して、酢酸アンモニウム緩衝液に交換し、冷凍乾燥させて、B29モノ結合体のPEG7-ヘキシル-インスリンの白色粉末を得た（純度>97%）。

40

【0284】

反応をモニターするために例41で用いた方法と同じカラムおよび溶媒系を用いるHPLC分析法を、B29モノ結合体のPEG7-ヘキシル-インスリンの分析に用いた。しかし、勾配条件は以下のとおりであった。

【表 3】

時間 (分)	溶剤 B (%)	溶剤 D (%)	流量 (mL/分)
最初(0)	100	0	1.00
30	10	90	1.00
35	100	0	1.00

【0285】

10

例 5 1

サイトセンサ (Cytosensor) の研究

約 18 時間、血清剥奪した Colo 25 (ATCC からの結腸直腸腺癌細胞、カタログ番号 # CCL - 222) 細胞を、3 : 1 のサイトセンサ低緩衝 RPMI - 1640 媒質 : サイトセンサガロースエントラップメント媒質に懸濁させて、細胞 100,000 個 / 小滴 10 μ m で、サイトセンサカプセルカップに播種した。細胞は、サイトセンサ上で、基準酸性化率が安定するまで、約 3 時間、1 分につき 100 μ L の流量で、低緩衝 RPMI - 1640 媒質に平衡させた。インスリン薬物 (インスリンまたはインスリン結合体) は、低緩衝 RPMI - 1640 媒質中 50 nM に希釈して、100 μ L / 分で 20 分間、細胞に適用した。この暴露の後、薬物溶液を使用をやめて、細胞を再び低緩衝媒質単独の連続流のもとで灌流させた。酸性化率が基準レベルに戻るまで (薬物溶液の適用から約 1 時間)、データの回収を継続した。結果を図 14 に示す。図 14 で用いるインスリンは、ヒトインスリンであり、PEG 4 は、mPEG 4 - ヘキシル - インスリンモノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 10 は、mPEG 10 - ヘキシル - インスリンモノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 7 は、mPEG 7 - ヘキシル - インスリンモノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 7_{AVG} は、mPEG 7_{AVG} - ヘキシル - インスリンモノ結合体の多分散混合物である。

20

【0286】

例 5 2

酵素安定性

キモトリプシンの消化を pH 7.4 のリン酸緩衝液中、37 $^{\circ}$ C、振盪水浴内で行った。インスリン / インスリン結合体濃度は、0.3 mg / mL であった。キモトリプシン濃度は、2 単位 / mL であった。100 μ L のサンプルを指示された時点で除去し、0.1% トリフルオロ酢酸 : イソプロピルアルコールの 1 : 1 混合物 25 μ L で反応を停止させた。逆相 HPLC によってサンプルを分析し、曲線の下 の面積を計算することによって、インスリン / インスリン結合体の相対濃度を決定した。

30

【0287】

図 15 に用いるインスリンは、ヒトインスリンであり、PEG 4 は、mPEG 4 - ヘキシル - インスリン、モノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 10 は、mPEG 10 - ヘキシル - インスリン、モノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 7 は、mPEG 7 - ヘキシル - インスリン、モノ結合体の非多分散混合物であり、PEG 7_{AVG} は、mPEG 7_{AVG} - ヘキシル - インスリン、モノ結合体の多分散混合物である。

40

【0288】

例 5 3

用量依存活性

製剤を評価するために有効な動物モデルには、絶食させた正常なビーグル犬を用いる。これらのイヌに 0.25 mg / kg ~ 1.0 mg / kg のインスリン結合体を投与して、多様な製剤の有効性を評価する。このモデルを用いて、本発明によるインスリン結合体が、本発明の一部ではなく比較のため提供する多分散インスリン結合体に比べて、良好な用量依存様式で、低いグルコースレベルをもたらすことを実証した。

50

【0289】

イヌの実験用プロトコルにより、薬物を投与する直前の時間0における血液グルコース測定が求められる。その後、固体経口剤形の製剤をイヌの口に挿入する。15、30、60および120分で採血し、グルコースレベルを測定してグラフにする。グルコースレベルが低いほど、インスリン結合体の活性は良好である。図16には、本発明の結合体のグルコース低下、従って活性低下は、用量依存性であることが示されている。比較のために、図17は、本発明の一部ではないカプセル製剤における多分散インスリン結合体のグルコース低下が、本発明の結合体に比べて用量依存性が低いことを示している。

【0290】

例54

活性および被験者間変動

製剤を評価するために有効な動物モデルには、絶食させた正常なビーグル犬を用いる。これらのイヌに0.25mg/kgのインスリン結合体を投与して、多様な製剤の有効性を評価する。このモデルを用いて、本発明によるインスリン結合体が、本発明の一部ではないが、比較のために提供する多分散インスリン結合体に比べて、低い被験者間変動および良好な活性をもたらすことを実証した。

【0291】

イヌの実験用プロトコルにより、薬物を投与する直前の時間0における血液グルコース測定が求められる。その後、液体経口剤形の製剤をイヌの口の奥に噴射する。各ケースにおいて、イヌは、この溶液の0.25mg/kgを摂取した。15、30、60および120分で採血し、グルコースレベルを測定してグラフにする。グルコースレベルが低いほど、インスリン結合体の活性は良好である。図18、19および20において、PEG4-ヘキシル-インスリン、モノ結合体；PEG7-ヘキシル-インスリン、モノ結合体；およびPEG10-ヘキシル-インスリン、モノ結合体、それぞれを用いて得られた結果は、本発明のこれらのPEG結合体が、本発明の一部ではなく比較のために提供する多分散PEG_{7AVG}-ヘキシル-インスリン、モノ結合体に関する図21に示されている結果に比べて、被験者間変動が小さく、活性が高くなることを示している。

【0292】

本明細書に、本発明の典型的な好ましい実施形態を開示した。特定の用語を用いたが、それらは、一般のおよび説明的な意味で用いられており、前記の請求範囲に示された、本発明の範囲を制限するためのものではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ポリエチレングリコール成分と脂肪酸成分を含む活性化されたポリマーの本発明の実施形態の混合物を合成する包括的な図式を図示する。

【図2】 本発明の実施形態のmPEGの混合物を合成する図式を図示する。

【図3】 本発明の実施形態の活性化されたmPEG7-ヘキシルオリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図4】 本発明の実施形態の活性化されたmPEG7-オクチルオリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図5】 本発明の実施形態の活性化されたmPEG-デシルオリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図6】 本発明の実施形態の活性化されたステアレート-PEG6オリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図7】 本発明の実施形態の活性化されたステアレート-PEG8オリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図8】 本発明の実施形態の活性化されたPEG3オリゴマー混合物を合成する図式を図示する。

【図9】 本発明の実施形態の活性化されたパルミテート-PEG3オリゴマーの混合物を合成する図式を図示する。

【図10】 本発明の実施形態の活性化されたPEG6オリゴマーの混合物を合成する図

10

20

30

40

50

式を図示する。

【図11】 本発明の実施形態の種々のプロピレングリコールモノマーを合成する図式を図示する。

【図12】 本発明の実施形態の種々のプロピレングリコールポリマーを合成する図式を図示する。

【図13】 本発明の実施形態の種々のプロピレングリコールポリマーを合成する図式を図示する。

【図14】 化合物の活性を示すCytosensor（登録商標）微小生理計を用いて、比較目的で提供され、本発明の成分を構成しない多分散の結合体混合物及びインスリンと比較して、本発明の実施形態のインスリン-オリゴマー結合体の混合物に関し得られた結果を図示する。

10

【図15】 比較目的で提供され、本発明の成分を構成しない慣用のインスリン-オリゴマー結合体の多分散の混合物に対する、本発明の実施形態のインスリン-オリゴマー結合体のキモトリプシン分解の比較を図示する。

【図16】 本発明の実施形態のモノ結合体のmPEG7-ヘキシルインスリンの混合物の絶食させたビーグル犬の血漿グルコースに及ぼす影響を図示する。

【図17】 本発明の成分を構成しない、モノ結合体のmPEG7_{avg}-ヘキシルインスリンの多分散の混合物の絶食させたビーグル犬の血漿グルコースに及ぼす影響を図示する。

【図18】 絶食させたビーグル犬に投与した本発明の実施形態のモノ結合体のmPEG4-ヘキシルインスリンの混合物の被験者間変動を図示する。

20

【図19】 絶食させたビーグル犬に投与した本発明の実施形態のモノ結合体のmPEG7-ヘキシルインスリンの混合物の被験者間変動を図示する。

【図20】 絶食させたビーグル犬に投与した本発明の実施形態のモノ結合体のmPEG10-ヘキシルインスリンの混合物の被験者間変動を図示する。

【図21】 絶食させたビーグル犬に投与した本発明の成分を構成しない、モノ結合体のmPEG7_{avg}-ヘキシル-インスリンの混合物の被験者間変動を図示する。

【 図 1 】

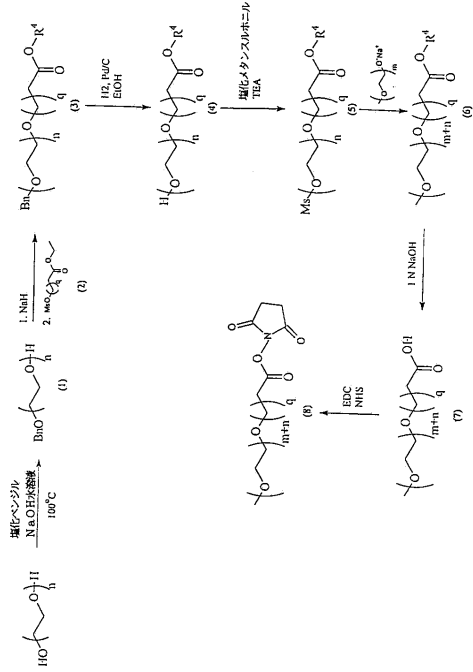


Figure 1

【 図 2 】

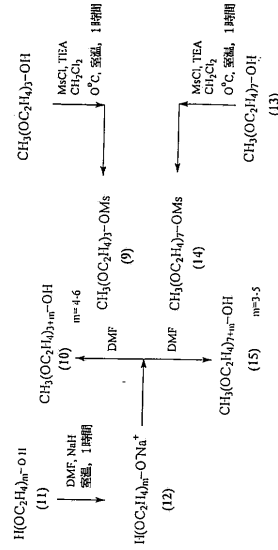


Figure 2

【 図 3 】

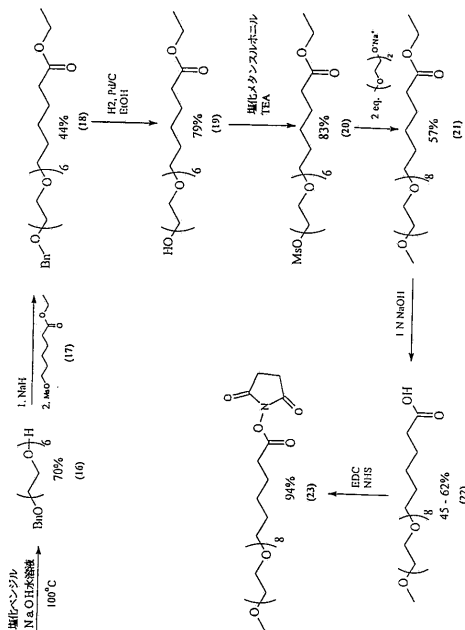


Figure 3

【 図 4 】

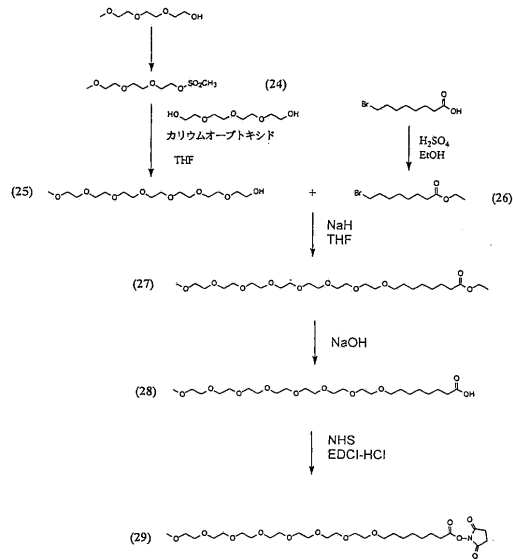


Figure 4

【 図 5 】

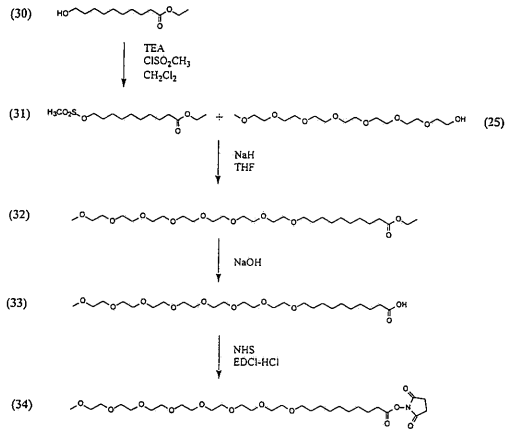


Figure 5

【 図 6 】

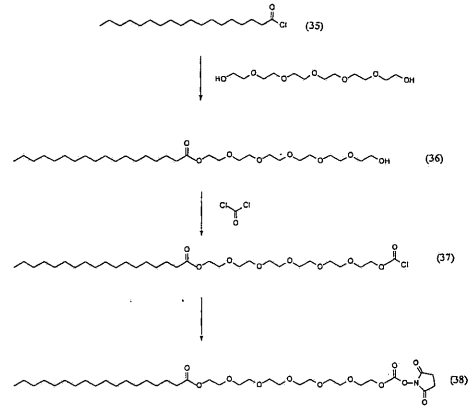


Figure 6

【 図 7 】

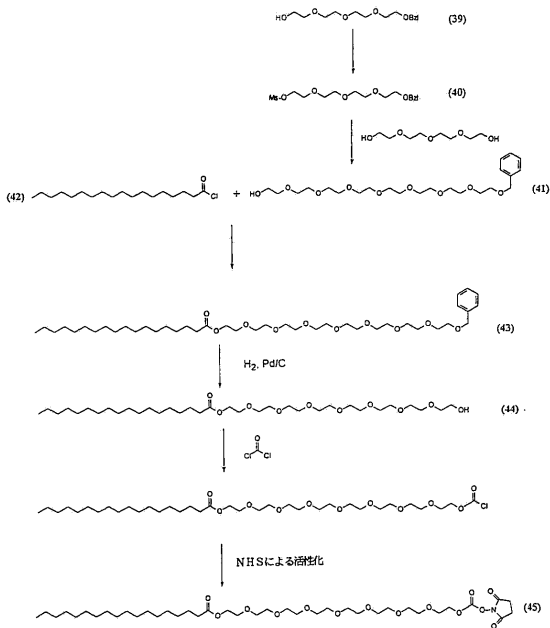


Figure 7

【 図 8 】

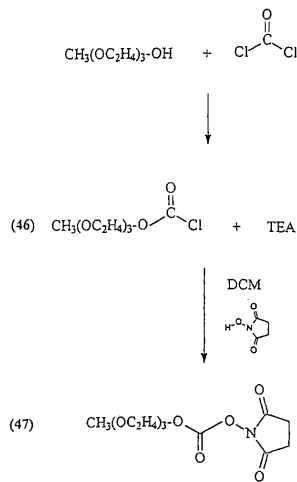


Figure 8

【 図 9 】

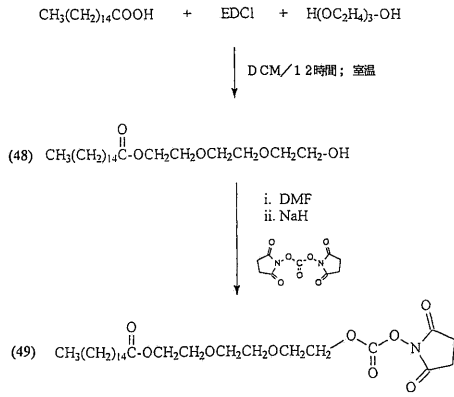


Figure 9

【 図 10 】

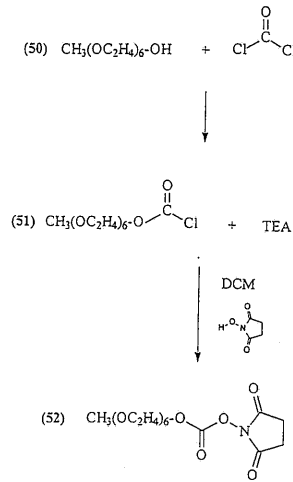


Figure 10

【 図 11 】

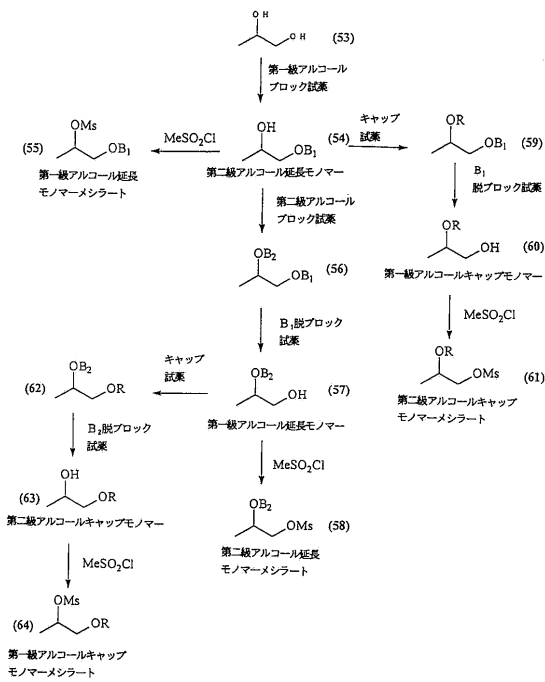


Figure 11

【 図 12 】

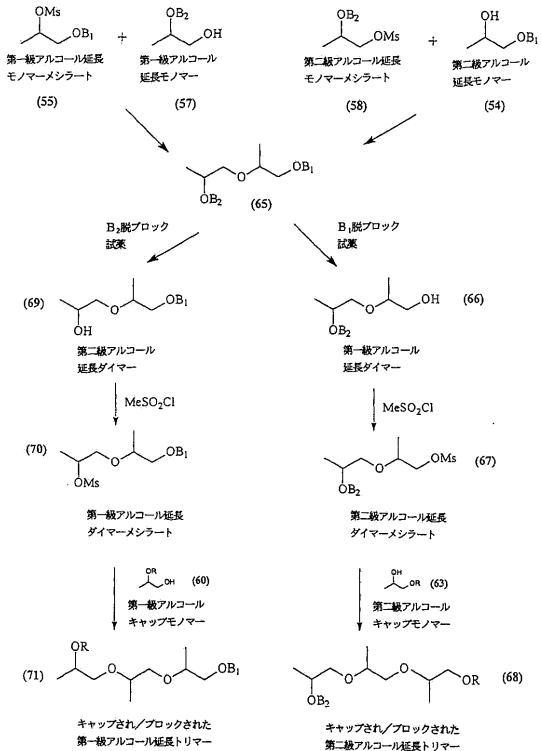


Figure 12

【 図 13 】

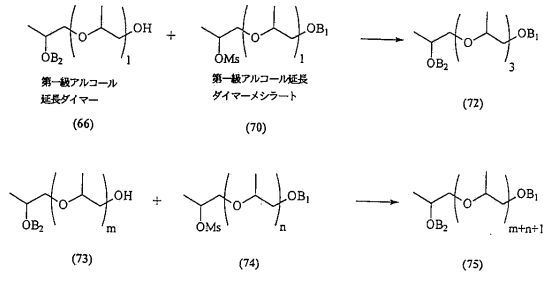


Figure 13

【 図 14 】

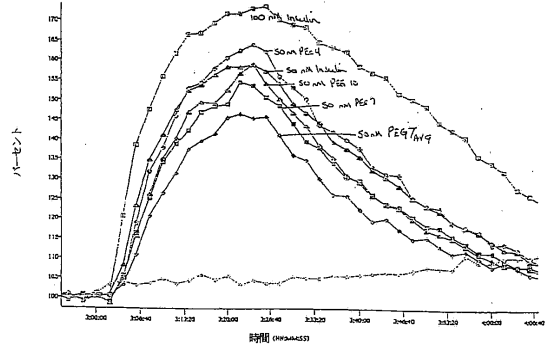


Figure 14

【 図 15 】

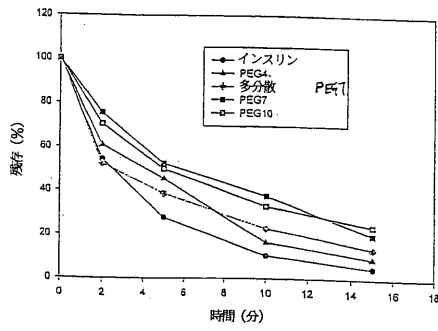


Figure 15

【 図 16 】

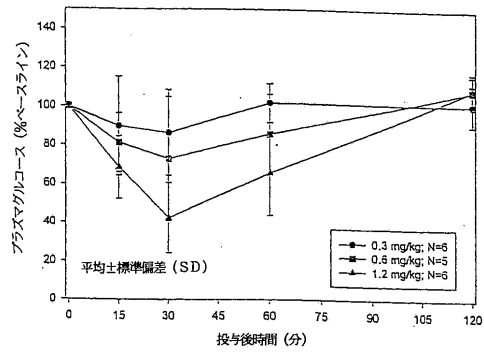


Figure 16

【 図 17 】

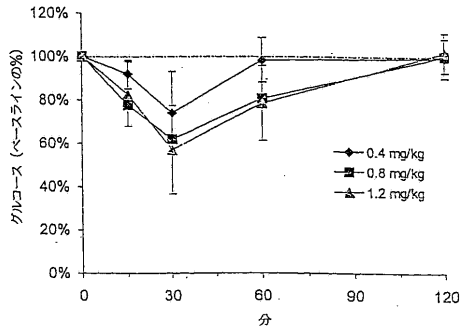


Figure 17

【 図 18 】

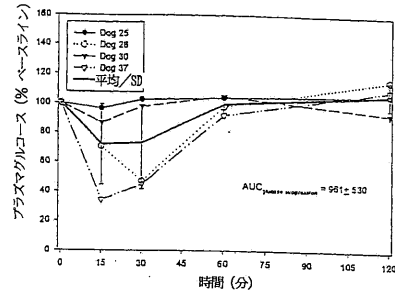


Figure 18

【 図 19 】

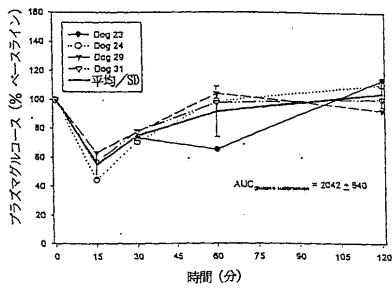


Figure 19

【 図 20 】

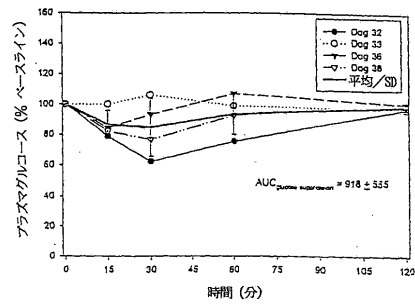


Figure 20

【 図 21 】

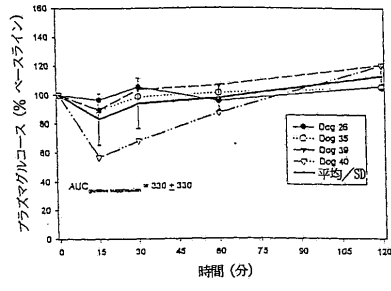


Figure 21

フロントページの続き

- (72)発明者 クリストファー・エイチ・ブライス
アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27516, チャペル・ヒル, コモンズ・ウェイ 200
- (72)発明者 アスラム・エム・アンサリ
アメリカ合衆国メリーランド州 20852, ロックヴィル, ヴィレッジ・スクエア・テラス 12408, アパートメント 101
- (72)発明者 バラシンガム・ラダクリシュナン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27514, チャペル・ヒル, ティンバー・ホロウ・コート 104, #338
- (72)発明者 エイミー・エル・オーデンボウ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27560, モーリスヴィル, ケイル・ハイ・ブルヴァード 4023

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 穴吹 智子

審判官 岩下 直人

(56)参考文献 特許第 (JP, B2) 4113778

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K37/26

A61K47/48