

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】令和 2 年 6 月 25 日 (2020.6.25)

【公開番号】特開 2019-116500 (P2019-116500A)

【公開日】令和 1 年 7 月 18 日 (2019.7.18)

【年通号数】公開・登録公報 2019-028

【出願番号】特願 2019-64337 (P2019-64337)

【国際特許分類】

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/36 (2006.01)

A 6 1 K 38/37 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 K 47/60 (2017.01)

A 6 1 K 47/61 (2017.01)

A 6 1 K 47/58 (2017.01)

A 6 1 K 47/59 (2017.01)

C 0 7 K 1/16 (2006.01)

C 0 7 K 1/30 (2006.01)

C 0 7 K 1/34 (2006.01)

C 0 7 K 14/745 (2006.01)

C 0 7 K 14/755 (2006.01)

【 F I 】

A 6 1 K 45/00 Z N A

A 6 1 K 38/36

A 6 1 K 38/37

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 7/04

A 6 1 K 47/60

A 6 1 K 47/61

A 6 1 K 47/58

A 6 1 K 47/59

C 0 7 K 1/16

C 0 7 K 1/30

C 0 7 K 1/34

C 0 7 K 14/745

C 0 7 K 14/755

【誤訳訂正書】

【提出日】令和 2 年 5 月 13 日 (2020.5.13)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

出血性障害を治療するため修飾された治療用タンパク質を調製する方法であって、

a) pH 値が 5 . 0 ~ 8 . 0 になるように、前記治療用タンパク質を含む溶液の pH 値

を調整させることを含み、前記治療用タンパク質濃度が  $0.3 \text{ mg/ml} \sim 3.0 \text{ mg/ml}$  である、第 1 のステップと；

b) 前記治療用タンパク質において、1 つ以上の炭水化物を酸化させることを含み、酸化剤が、0.1 分～120 分の期間；2 ～37 の温度；光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、 $50 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$  の最終濃度をもたらすように、前記第 1 のステップ中の前記溶液に添加される、第 2 のステップと；

c) 0.5 時間～24 時間の期間、2 ～37 の温度；光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、前記治療用タンパク質を所望の過剰濃度の活性化水溶性ポリマーと接触させることを含み、前記過剰濃度が 1 倍モル過剰～300 倍モル過剰である、第 3 のステップと；

d) 前記第 3 のステップの前記溶液に、m - トルイジンを添加することを含み、前記 m - トルイジンが、0.1 分～30 分の期間；2 ～37 の温度；光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、 $1 \text{ mM} \sim 50 \text{ mM}$  の最終濃度をもたらすように添加される、第 4 のステップと；

e) 前記治療用タンパク質の 1 つ以上の酸化炭水化物への前記活性化水溶性ポリマーの複合化を可能にする条件下で、前記治療用タンパク質が、前記活性化水溶性ポリマーおよび m - トルイジンとともにインキュベートされ、前記条件が、0.5 時間～24 時間の期間、2 ～37 の温度；光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、オキシム連結が、前記酸化炭水化物部分と前記活性化水溶性ポリマー上の前記活性アミノオキシ基との間に形成され、前記オキシム連結の形成が、m - トルイジンによって触媒される、第 5 のステップと；

f) 前記第 5 のステップ中の前記治療用タンパク質の 1 つ以上の酸化炭水化物への前記活性化水溶性ポリマーの複合化が、L - システイン、メチオニン、グルタチオン、グリセロール、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (メタ重亜硫酸ナトリウム)、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、またはそれらの誘導体、クレゾール、イミダゾール、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される反応停止剤の添加によって停止され；前記反応停止剤が、5 分～120 分の期間；2 ～37 の温度；光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、 $1 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$  の最終濃度をもたらすように添加される、第 6 のステップと、

を含み、ステップ a) ～ e) が単一の容器で起こり、

前記修飾された治療用タンパク質が、前記オキシム連結を介して前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分へと複合化された活性化水溶性ポリマーを含み、

前記活性化水溶性ポリマーは、活性アミノオキシ基を含有し、炭水化物、ポリアルキレングリコール (PAG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリエチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリスチレン - コ - マレイン酸無水物、およびポリ (1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (PHF) からなる群から選択され；

前記治療用タンパク質が血液凝固タンパク質である、方法。

#### 【請求項 2】

出血性障害を治療するためのの修飾された治療用タンパク質を調製する方法であって、

a) pH 値が 6.0 になるように、前記治療用タンパク質を含む溶液の pH 値を調整させることを含み、前記治療用タンパク質濃度の初期濃度が  $1 \text{ mg/ml}$  である、第 1 のステップと；

b) 前記治療用タンパク質において、1 つ以上の炭水化物を酸化させることを含み、酸化剤が、10 分の期間、22 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む条件下で、 $400 \mu\text{M}$  の最終濃度をもたらすように、前記第 1 のステップ中の前記溶液に添加される、第 2 のステップと；

c) 15 分の期間、22 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む条件下で、前記治療用タンパク質を所望の過剰濃度の活性化水溶性ポリマーと接触させることを含

み、前記過剰濃度が50倍モル過剰である、第3のステップと；

d) 前記第3のステップの前記溶液に、m-トルイジンを添加することを含み、前記m-トルイジンが、15分の期間、22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む条件下で、10mMの最終濃度をもたらすように添加される、第4のステップと；

e) 前記治療用タンパク質の1つ以上の酸化炭水化物への前記活性化水溶性ポリマーの複合化を可能にする条件下で、前記治療用タンパク質が、前記活性化水溶性ポリマーおよびm-トルイジンとともにインキュベートされ、前記条件が、2時間の期間；22の温度；光の非存在下；および攪拌しながらを含む、オキシム連結が、前記酸化炭水化物部分と前記活性化水溶性ポリマー上の前記活性アミノオキシ基との間に形成され、前記オキシム連結の形成が、m-トルイジンによって触媒される、第5のステップと；

f) 前記第5のステップ中の前記治療用タンパク質の1つ以上の酸化炭水化物への前記活性化水溶性ポリマーの複合化が、L-システインの添加によって停止され；前記L-システインが、60分の期間、22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む条件下で、10mMの最終濃度をもたらすように添加される、第6のステップと、

を含み、ステップa)～e)が単一の容器で起こり、

前記修飾された治療用タンパク質が、前記オキシム連結を介して前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分へと複合化された活性化水溶性ポリマーを含み、

前記活性化水溶性ポリマーは、活性アミノオキシ基を含有し、炭水化物、ポリアルキレングリコール(PAG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、およびポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)からなる群から選択され；

前記治療用タンパク質が血液凝固タンパク質である、方法。

#### 【請求項3】

前記ポリアルキレングリコール(PAG)が、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(メトキシPEG)メタクリレート、またはポリプロピレングリコール(PPG)を含む、請求項1または2に記載の方法。

#### 【請求項4】

前記炭水化物が多糖類を含む、請求項1または2に記載の方法。

#### 【請求項5】

前記多糖類が、ポリシアル酸(PSA)、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デキストラン、またはカルボキシメチルデキストランを含む、請求項4に記載の方法。

#### 【請求項6】

前記治療用タンパク質が、第IX因子(FIX)、第VII因子(FVII)、第VIIa因子(FVIIa)、フォンヴィレブランド因子(VWF)、第FV因子(FV)、第X因子(FX)、第XI因子(XI)、第XII因子(XII)、トロンピン(FII)、プロテインC、プロテインS、tPA、PAI-1、および組織因子(TF)からなる群から選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項7】

前記治療用タンパク質が、FVIIa、FVII、FIXおよびVWFからなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

#### 【請求項8】

前記水溶性ポリマーがPEGまたはPSAである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項9】

前記酸化剤が過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO<sub>4</sub>)であり、10分の期間；22の温度；光の非存在下；および攪拌しながらを含む条件下で、400μM酸化剤の最終濃度をもたらす量で添加される、請求項1または請求項2に記載の方法。

## 【請求項 10】

m - トルイジンが、10 mM の濃度で提供される、請求項 1 または請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 11】

シアノホウ化水素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ )、アスコルビン酸 (ビタミン C)、および  $\text{NaBH}_3$  からなる群から選択される還元化合物を含む緩衝液中で前記修飾された治療用タンパク質をインキュベートすることによって、前記修飾された治療用タンパク質中のオキシム連結を還元するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記修飾された治療用タンパク質を精製するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記修飾された治療用タンパク質が、クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって精製される、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記クロマトグラフィが、疎水性相互作用クロマトグラフィ (HIC)、イオン交換クロマトグラフィ (IEC)、サイズ排除クロマトグラフィ (SEC)、親和性クロマトグラフィ、および逆相クロマトグラフィからなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

## 【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0011

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0011】

一実施形態において、水溶性ポリマーを治療用タンパク質の酸化炭水化物部分に複合化させる方法が提供され、本方法は、複合化を可能にする条件下で、酸化炭水化物部分を活性化水溶性ポリマーと接触させることを含み、水溶性ポリマーは、活性アミノオキシ基を含有し、ポリエチレングリコール (PEG)、分岐 PEG、Poly PEG (登録商標) (Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸 (PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン (HAS)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド (PAO)、ポリアルキレングリコール (PAG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート (MPC) からなる群から選択され、該炭水化物部分が、過ヨウ素酸ナトリウム ( $\text{NaIO}_4$ )、四酢酸鉛 ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、および過ルテニウム酸カリウム ( $\text{KRuO}_4$ ) からなる群から選択される酸化剤を含む緩衝液とともにインキュベーションすることによって酸化され、オキシム連結が、酸化炭水化物部分と水溶性ポリマー上の活性アミノオキシ基との間に形成され、前記オキシム連結の形成が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、および p-アニシジンからなる群から選択される求核触媒によって触媒される。

## 【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0012

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0012】

別の実施形態において、水溶性ポリマーを治療用タンパク質の酸化炭水化物部分に複合化させる方法が提供され、本方法は、複合化を可能にする条件下で、酸化炭水化物部分を活性化水溶性ポリマーと接触させることを含み、該治療用タンパク質は、第IX因子(FIX)、第VII因子(FVII)、第VIIa因子(FVIIa)、フォンヴィレブランド因子(VWF)、第FV因子(FV)、第XI因子(XI)、第XII因子(XII)、トロンピン(FII)、プロテインC、プロテインS、tPA、PAI-1、組織因子(TF)、ADAMTS13プロテアーゼ、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1(CSF-1)、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、EPO、インターフェロン(IFN-)、コンセンサスインターフェロン、IFN-、IFN-、IFN-、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-31、IL-32、IL-33、トロンボポエチン(TPO)、Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、アンジオポエチン様ポリペプチド1(ANGPTL1)、アンジオポエチン様ポリペプチド2(ANGPTL2)、アンジオポエチン様ポリペプチド3(ANGPTL3)、アンジオポエチン様ポリペプチド4(ANGPTL4)、アンジオポエチン様ポリペプチド5(ANGPTL5)、アンジオポエチン様ポリペプチド6(ANGPTL6)、アンジオポエチン様ポリペプチド7(ANGPTL7)、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオゲニン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、骨形態形成タンパク質1、骨形態形成タンパク質2、骨形態形成タンパク質3、骨形態形成タンパク質4、骨形態形成タンパク質5、骨形態形成タンパク質6、骨形態形成タンパク質7、骨形態形成タンパク質8、骨形態形成タンパク質9、骨形態形成タンパク質10、骨形態形成タンパク質11、骨形態形成タンパク質12、骨形態形成タンパク質13、骨形態形成タンパク質14、骨形態形成タンパク質15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、骨形態形成タンパク質受容体II、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン-1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子1、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、エピゲン、エピレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、線維芽細胞増殖因子11、線維芽細胞増殖因子12、線維芽細胞増殖因子13、線維芽細胞増殖因子16、線維芽細胞増殖因子17、線維芽細胞増殖因子19、線維芽細胞増殖因子20、線維芽細胞増殖因子21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、オンコスタチンM(OSM)、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血

血小板由来増殖因子 B B、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレ B 細胞増殖刺激因子、幹細胞因子 ( S C F )、幹細胞因子受容体、T N F、T N F 0、T N F 1、T N F 2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子 1、2、形質転換増殖因子 2、形質転換増殖因子 3、形質転換増殖因子 5、潜伏形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子結合タンパク質 I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I I、胸腺間質性リンパ球新生因子 ( T S L P )、I 型腫瘍壊死因子受容体、I I 型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質 ( P U P )、インスリン、レクチン リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、I g G、I g E、I g M、I g A、および I g D、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、D N A s e、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リポタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンピン、レプチン、ヒュミラ ( アダリムマブ )、P r o l i a ( デノスマブ )、E n b r e l ( エタネルセプト )、表 1 中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、水溶性ポリマーは、活性アミノオキシ基を含有し、ポリエチレングリコール ( P E G )、分岐 P E G、P o l y P E G ( 登録商標 ) ( W a r w i c k E f f e c t P o l y m e r s、C o v e n t r y, U K )、ポリシアル酸 ( P S A )、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン ( H A S )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド ( P A O )、ポリアルキレングリコール ( P A G )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ ( 1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール ) ( P H F )、2 - メタクリロイルオキシ - 2 ' - エチルトリメチルアンモニウムホスフェート ( M P C ) からなる群から選択され、該炭水化物部分は、過ヨウ素酸ナトリウム ( N a I O 4 )、四酢酸鉛 ( P b ( O A c ) 4 )、および過ルテニウム酸カリウム ( K R u O 4 ) からなる群から選択される酸化剤を含む緩衝液とともにインキュベーションすることによって酸化され、オキシム連結が、酸化炭水化物部分と水溶性ポリマー上の活性アミノオキシ基との間に形成され、前記オキシム連結の形成は、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される求核触媒によって触媒される。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 4 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 4 0】

更に別の実施形態において、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結の形成方法が提供され、本方法は、a) 過ヨウ素酸ナトリウム ( N a I O 4 )、四酢酸鉛 ( P b ( O A c ) 4 )、および過ルテニウム酸カリウム ( K R u O 4 ) からなる群から選択される酸化剤とともに該タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、b) 該オキシム連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結を形成するステップであって、活性アミノオキシ基を含有する

該水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）、分岐PEG、PolyPEG（登録商標）（Warwick Effect Polymers, Coventry, UK）、ポリシアル酸（PSA）、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン（HAS）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチランモニウムホスフェート（MPC）からなる群から選択され、該求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、およびp-アニシジンからなる群から選択される、オキシム連結を形成するステップと、を含む。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0041

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0041】

また別の実施形態において、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結の形成方法が提供され、本方法は、a) 過ヨウ素酸ナトリウム（NaIO<sub>4</sub>）、四酢酸鉛（Pb（OAc）<sub>4</sub>）、および過ルテニウム酸カリウム（KRuO<sub>4</sub>）からなる群から選択される酸化剤とともにタンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、b) 該オキシム連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結を形成するステップであって、治療用タンパク質が、第IX因子（FIX）、第VII因子（FVII）、第VIIa因子（FVIIa）、フォンヴィレブランド因子（VWF）、第FV因子（FV）、第XI因子（FX）、第XI因子（FXI）、第XII因子（FXII）、トロンビン（FII）、プロテインC、プロテインS、tPA、PAI-1、組織因子（TF）、ADAMTS13プロテアーゼ、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1（CSF-1）、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、EPO、インターフェロン（IFN-）、コンセンサスインターフェロン、IFN-、IFN-、IFN-、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-31、IL-32、IL-33、トロンボポエチン（TPO）、Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、アンジオポエチン様ポリペプチド1（ANGPTL1）、アンジオポエチン様ポリペプチド2（ANGPTL2）、アンジオポエチン様ポリペプチド3（ANGPTL3）、アンジオポエチン様ポリペプチド4（ANGPTL4）、アンジオポエチン様ポリペプチド5（ANGPTL5）、アンジオポエチン様ポリペプチド6（ANGPTL6）、アンジオポエチン様ポリペプチド7（ANGPTL7）、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子（VEGF）、アンジオゲニン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、骨形態形成タンパク質1、骨形態形成タンパク質2、骨形態形成タンパク質3、骨形態形成タンパク質4、骨形態形成タンパク質5、骨形態

形成タンパク質 6、骨形態形成タンパク質 7、骨形態形成タンパク質 8、骨形態形成タンパク質 9、骨形態形成タンパク質 10、骨形態形成タンパク質 11、骨形態形成タンパク質 12、骨形態形成タンパク質 13、骨形態形成タンパク質 14、骨形態形成タンパク質 15、骨形態形成タンパク質受容体 I A、骨形態形成タンパク質受容体 I B、骨形態形成タンパク質受容体 I I、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン - 1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子 1、サイトカイン誘導好中球走化性因子 2、サイトカイン誘導好中球走化性因子 2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン 1、上皮増殖因子、エビゲン、エビレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子 4、線維芽細胞増殖因子 5、線維芽細胞増殖因子 6、線維芽細胞増殖因子 7、線維芽細胞増殖因子 8、線維芽細胞増殖因子 8 b、線維芽細胞増殖因子 8 c、線維芽細胞増殖因子 9、線維芽細胞増殖因子 10、線維芽細胞増殖因子 11、線維芽細胞増殖因子 12、線維芽細胞増殖因子 13、線維芽細胞増殖因子 16、線維芽細胞増殖因子 17、線維芽細胞増殖因子 19、線維芽細胞増殖因子 20、線維芽細胞増殖因子 21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体 1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体 2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子 I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 I I、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン - 3、ニューロトロフィン - 4、オンコスタチン M ( O S M )、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子 2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子 A 鎖、血小板由来増殖因子 A A、血小板由来増殖因子 A B、血小板由来増殖因子 B 鎖、血小板由来増殖因子 B B、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレ B 細胞増殖刺激因子、幹細胞因子 ( S C F )、幹細胞因子受容体、T N F、T N F 0、T N F 1、T N F 2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子 1、2、形質転換増殖因子 2、形質転換増殖因子 3、形質転換増殖因子 5、潜伏形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子結合タンパク質 I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I I、胸腺間質性リンパ球新生因子 ( T S L P )、I 型腫瘍壊死因子受容体、I I 型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質 ( P U P )、インスリン、レクチン、リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、I g G、I g E、I g M、I g A、および I g D、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、DNAse、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リボタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンピン、レプチン、ヒュミラ ( アダリムマブ )、P r o l i a ( デノスマブ )、E n b r e l ( エタネルセプト )、表 1 中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、活性アミノオキシ基を含有する該水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール ( P E G )、分岐 P E G、P o l y P E G ( 登録商標 ) ( W a r w i c k E f f e c t P o l y m e r s、C o v e n t r y, U K )、ポリシアル酸 ( P S A )、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン ( H A S )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、炭水化物、多糖類、ブルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド ( P A O )、ポリアルキレングリコール ( P A G )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリスチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリ ( 1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール ) ( P H F )、2 - メタクリロイルオキシ



- 2' - エチルトリメチルアンモニウムホスフェート (MPC) からなる群から選択され、求核触媒が、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される、オキシム連結を形成するステップと、を含む。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0042

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0042】

また別の実施形態において、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結の形成方法が提供され、本方法は、a) 過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>4</sub>)、酢酸鉛 (Pb(OAc)<sub>4</sub>)、および過ルテニウム酸カリウム (KRuO<sub>4</sub>) からなる群から選択される酸化剤を用いて該タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、b) ヒドラゾン連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間の該ヒドラゾン連結を形成するステップであって、活性ヒドラジド基を含有する該水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール (PEG)、分岐 PEG、Poly PEG (登録商標) (Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸 (PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン (HAS)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、炭水化物、多糖類、ブルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド (PAO)、ポリアルキレングリコール (PAG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリスチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリ (1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (PHF)、2 - メタクリロイルオキシ - 2' - エチルトリメチルアンモニウムホスフェート (MPC) からなる群から選択され、該求核触媒が、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される、ヒドラゾン連結を形成するステップと、を含む。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0043

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0043】

また別の実施形態において、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結の形成方法であって、本方法は、a) 過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>4</sub>)、四酢酸鉛 (Pb(OAc)<sub>4</sub>)、および過ルテニウム酸カリウム (KRuO<sub>4</sub>) からなる群から選択される酸化剤とともにタンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、b) ヒドラゾン連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーと

の間の該ヒドラゾン連結を形成するステップであって、治療用タンパク質が、第ⅠⅩ因子（FⅠⅩ）、第ⅤⅠⅠⅠ因子（FⅤⅠⅠⅠ）、第ⅤⅠⅠa因子（FⅤⅠⅠa）、フォンヴィレブランド因子（VWF）、第FⅤ因子（FⅤ）、第Ⅹ因子（FⅩ）、第ⅩⅠ因子（FⅩⅠ）、第ⅩⅠⅠ因子（FⅩⅠⅠ）、トロンピン（FⅠⅠ）、プロテインC、プロテインS、tPA、PAI-1、組織因子（TF）、ADAMTS13プロテアーゼ、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1（CSF-1）、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、EPO、インターフェロン（IFN-）、コンセンサスインターフェロン、IFN-、IFN-、IFN-、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-31、IL-32、IL-33、トロンボポエチン（TPO）、Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、アンジオポエチン様ポリペプチド1（ANGPTL1）、アンジオポエチン様ポリペプチド2（ANGPTL2）、アンジオポエチン様ポリペプチド3（ANGPTL3）、アンジオポエチン様ポリペプチド4（ANGPTL4）、アンジオポエチン様ポリペプチド5（ANGPTL5）、アンジオポエチン様ポリペプチド6（ANGPTL6）、アンジオポエチン様ポリペプチド7（ANGPTL7）、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子（VEGF）、アンジオゲニン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、骨形態形成タンパク質1、骨形態形成タンパク質2、骨形態形成タンパク質3、骨形態形成タンパク質4、骨形態形成タンパク質5、骨形態形成タンパク質6、骨形態形成タンパク質7、骨形態形成タンパク質8、骨形態形成タンパク質9、骨形態形成タンパク質10、骨形態形成タンパク質11、骨形態形成タンパク質12、骨形態形成タンパク質13、骨形態形成タンパク質14、骨形態形成タンパク質15、骨形態形成タンパク質受容体ⅠA、骨形態形成タンパク質受容体ⅠB、骨形態形成タンパク質受容体ⅠⅠ、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン-1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子1、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、エピゲン、エピレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、線維芽細胞増殖因子11、線維芽細胞増殖因子12、線維芽細胞増殖因子13、線維芽細胞増殖因子16、線維芽細胞増殖因子17、線維芽細胞増殖因子19、線維芽細胞増殖因子20、線維芽細胞増殖因子21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子Ⅰ、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子ⅠⅠ、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、オンコスタチンM（OSM）、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子BB、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子（SCF）、幹細胞因子受容体、TNF、TNF0、TNF1、TNF2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子1、2、形質転換増殖因子2、形質転換増殖因子3、形質転換増殖因子5、潜伏形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子結合タンパク質Ⅰ、形質転換増殖因子結合タンパク質ⅠⅠ、形質転換増殖因子結合タンパク質ⅠⅠⅠ、胸腺間質性リンパ球新生因子（TSLP）、Ⅰ型腫瘍壊死因子受容体、ⅠⅠ型腫瘍壊死因子

受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質（PUP）、インスリン、レクチン リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、IgG、IgE、IgM、IgA、およびIgD、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、DNAse、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リポタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンピン、レプチン、ヒュミラ（アダリムマブ）、Prolia（デノスマブ）、Enbrel（エタネルセプト）、表1中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、活性ヒドラジド基を含有する該水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール（PEG）、分岐PEG、PolyPEG（登録商標）（Warwick Effect Polymers, Coventry, UK）、ポリシアル酸（PSA）、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン（HAS）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（MPC）からなる群から選択され、求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、およびp-アニシジンからなる群から選択される、ヒドラゾン連結を形成するステップと、を含む。

#### 【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0048

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0048】

別の実施形態において、酸化水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール（PEG）、分岐PEG、PolyPEG（登録商標）（Warwick Effect Polymers, Coventry, UK）、ポリシアル酸（PSA）、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン（HAS）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（MPC）からなる群から選択され、該水溶性ポリマーが、酸化剤とともにインキュベーションすることによって酸化され、該水溶性ポリマーの非還元末端において、末端アルデヒド基を形成する、上述の方法が提供される。一実施形態において、水溶性ポリマーはPSAである。

#### 【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】 0 0 5 6

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 0 5 6 】

別の実施形態において、限外濾過 / 透析濾過 ( U F / D F ) によって複合化された治療用タンパク質を濃縮させることを更に含む、上述の方法が提供される。

本願は特定の実施形態において例えば以下の項目を提供する：

( 項目 1 )

水溶性ポリマーを治療用タンパク質の酸化炭水化物部分へ複合化させる方法であって、複合化を可能にする条件下で、前記酸化炭水化物部分を活性化水溶性ポリマーと接触させることを含む、

前記水溶性ポリマーが、活性アミノオキシ基を含有し、ポリエチレングリコール ( P E G )、分岐 P E G、P o l y P E G ( 登録商標 ) ( W a r w i c k E f f e c t P o l y m e r s、C o v e n t r y , U K )、ポリシアル酸 ( P S A )、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン ( H A S )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド ( P A O )、ポリアルキレングリコール ( P A G )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリスチレン - コ - マレイン酸無水物、ポリ ( 1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール ) ( P H F )、2 - メタクリロイルオキシ - 2 ' - エチルトリメチルアンモニウムホスフェート ( M P C ) からなる群から選択され、

前記炭水化物部分が、過ヨウ素酸ナトリウム ( N a I O <sub>4</sub> )、四酢酸鉛 ( P b ( O A c ) <sub>4</sub> )、および過ルテニウム酸カリウム ( K R u O <sub>4</sub> ) からなる群から選択される酸化剤を含む緩衝液とともにインキュベーションすることによって酸化され、

オキシム連結が、前記酸化炭水化物部分と前記水溶性ポリマー上の前記活性アミノオキシ基との間に形成され、

前記オキシム連結形成が、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される求核触媒によって触媒される、方法。

( 項目 2 )

水溶性ポリマーを治療用タンパク質の酸化炭水化物部分に複合化させる方法であって、複合化を可能にする条件下で、前記酸化炭水化物部分を活性化水溶性ポリマーと接触させることを含む、

前記治療用タンパク質が、第 I X 因子 ( F I X )、第 V I I I 因子 ( F V I I I )、第 V I I a 因子 ( F V I I a )、フォンヴィレブランド因子 ( V W F )、第 F V 因子 ( F V )、第 X 因子 ( F X )、第 X I 因子 ( F X I )、第 X I I 因子 ( F X I I )、トロンピン ( F I I )、プロテイン C、プロテイン S、t P A、P A I - 1、組織因子 ( T F )、A D A M T S 1 3 プロテアーゼ、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 1 1、コロニー刺激因子 - 1 ( C S F - 1 )、M - C S F、S C F、G M - C S F、顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F )、E P O、インターフェロン ( I F N - )、コンセンサスインターフェロン、I F N -、I F N -、I F N -、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 4、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 1 9、I L - 2 0、I L - 2 1、I L - 2 2、I L - 2 3、I L - 2 4、I L - 3 1、I L - 3 2、I L - 3 3、トロンボポエチン ( T P O )、A n g - 1、A n g - 2、A n g - 4、A n g - Y、アンジオポエチン様ポリペプチド 1 ( A N G P T L 1 )、アンジオポエチン様ポリペ

チド2 (ANGPTL2)、アンジオポエチン様ポリペプチド3 (ANGPTL3)、アンジオポエチン様ポリペプチド4 (ANGPTL4)、アンジオポエチン様ポリペプチド5 (ANGPTL5)、アンジオポエチン様ポリペプチド6 (ANGPTL6)、アンジオポエチン様ポリペプチド7 (ANGPTL7)、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子 (VEGF)、アンジオゲニン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、骨形態形成タンパク質1、骨形態形成タンパク質2、骨形態形成タンパク質3、骨形態形成タンパク質4、骨形態形成タンパク質5、骨形態形成タンパク質6、骨形態形成タンパク質7、骨形態形成タンパク質8、骨形態形成タンパク質9、骨形態形成タンパク質10、骨形態形成タンパク質11、骨形態形成タンパク質12、骨形態形成タンパク質13、骨形態形成タンパク質14、骨形態形成タンパク質15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、骨形態形成タンパク質受容体II、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン-1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子1、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、エピゲン、エピレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、線維芽細胞増殖因子11、線維芽細胞増殖因子12、線維芽細胞増殖因子13、線維芽細胞増殖因子16、線維芽細胞増殖因子17、線維芽細胞増殖因子19、線維芽細胞増殖因子20、線維芽細胞増殖因子21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、オノコスタチンM (OSM)、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子BB、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子 (SCF)、幹細胞因子受容体、TNF、TNF0、TNF1、TNF2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子1.2、形質転換増殖因子2、形質転換増殖因子3、形質転換増殖因子5、潜伏形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子結合タンパク質I、形質転換増殖因子結合タンパク質II、形質転換増殖因子結合タンパク質III、胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP)、I型腫瘍壊死因子受容体、II型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質 (PUP)、インスリン、レクチン、リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、IgG、IgE、IgM、IgA、およびIgD、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、DNAse、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リポタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンプオエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンプイン、レプチン、ヒュミラ (アダリムマブ)、Proliia (デノスマブ)、Enbrel (エタネルセプト)、表1中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、

前記水溶性ポリマーが活性アミノオキシ基を含有し、ポリエチレングリコール (PEG)、分岐PEG、PolyPEG (登録商標) (Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸 (PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン (HAS)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、炭水化物、多糖

類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド ( P A O )、ポリアルキレングリコール ( P A G )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ ( 1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール ) ( P H F )、2 - メタクリロイルオキシ - 2 ' - エチルトリメチルアンモニウムホスフェート ( M P C ) からなる群から選択され、

前記炭水化物部分が、過ヨウ素酸ナトリウム (  $\text{NaIO}_4$  )、四酢酸鉛 (  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  )、および過ルテニウム酸カリウム (  $\text{KRuO}_4$  ) からなる群から選択される酸化剤を含む緩衝液とともにインキュベーションすることによって酸化され、

オキシム連結が、前記酸化炭水化物部分と前記水溶性ポリマー上の前記活性アミノオキシ基との間に形成され、前記オキシム連結中、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される求核触媒によって形成が触媒される、方法。

( 項目 3 )

約 0 . 3 m g / m L ~ 約 3 . 0 m g / m L の初期濃度の前記治療用タンパク質を含む溶液が、前記活性化水溶性ポリマーと接触させる前に、p H 値が約 5 . 0 ~ 約 8 . 0 になるように調整される、項目 2 に記載の方法。

( 項目 4 )

前記治療用タンパク質の前記初期濃度が、約 1 . 0 m g / m L であり、前記 p H が、約 6 . 0 である、項目 3 に記載の方法。

( 項目 5 )

前記治療用タンパク質が、所望の過剰濃度の活性化水溶性ポリマーによって接触され、前記過剰濃度が、約 1 モル ~ 約 3 0 0 モル過剰である、項目 2 に記載の方法。

( 項目 6 )

前記過剰濃度が、約 5 0 倍のモル過剰である、項目 5 に記載の方法。

( 項目 7 )

前記治療用タンパク質が、約 0 . 5 時間 ~ 約 2 4 時間の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、前記活性化水溶性ポリマーとともにインキュベートされる、項目 5 に記載の方法。

( 項目 8 )

前記条件が、約 1 2 0 分の期間、約 2 2 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む、項目 7 に記載の方法。

( 項目 9 )

前記求核触媒が、約 0 . 1 分 ~ 約 3 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 1 . 0 m M ~ 約 5 0 m M の求核触媒の最終濃度をもたらす量で添加される、項目 2 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

前記求核触媒の前記最終濃度が、約 1 0 m M であり、前記条件が、最大約 1 5 分の期間、約 2 2 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

前記酸化剤が、約 0 . 1 分 ~ 1 2 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 5 0  $\mu$  M ~ 約 1 0 0 0  $\mu$  M の酸化剤の最終濃度をもたらす量で添加される、項目 2 に記載の方法。

( 項目 1 2 )

前記酸化剤の最終濃度が、約 4 0 0  $\mu$  M であり、前記条件が、約 1 0 分の期間、約 2 2 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む、項目 1 1 に記載の方法。

## (項目 1 3)

前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分への前記水溶性ポリマーの前記複合化が、L - システイン、メチオニン、グルタチオン、グリセロール、メタ重亜硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、またはそれらの誘導体、クレゾール、イミダゾール、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される反応停止剤の添加によって停止され、

前記反応停止剤が、約 5 分 ~ 約 1 2 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 1 m M ~ 約 1 0 0 m M の反応停止剤の最終濃度をもたらす量で添加される、項目 2 に記載の方法。

## (項目 1 4)

前記反応停止剤が、L - システインである、項目 1 3 に記載の方法。

## (項目 1 5)

前記 L - システインが、約 1 0 m M の最終濃度をもたらすように添加され、前記条件が、約 6 0 分の期間、約 2 2 の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む、項目 1 4 に記載の方法。

## (項目 1 6)

a) p H 値が約 5 . 0 ~ 約 8 . 0 になるように、前記治療用タンパク質を含む溶液の前記 p H 値を調整させることを含み、前記治療用タンパク質濃度が、約 0 . 3 m g / m L ~ 約 3 . 0 m g / m L である、第 1 のステップと、

b) 前記治療用タンパク質において、1 つ以上の炭水化物を酸化させることを含み、前記酸化剤が、約 0 . 1 分 ~ 約 1 2 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 5 0  $\mu$  M ~ 約 1 0 0 0  $\mu$  M の最終濃度をもたらすように、前記第 1 のステップ中の前記溶液に添加される、第 2 のステップと、

c) 所望の過剰濃度の活性化水溶性ポリマーと前記治療用タンパク質を接触させることを含み、前記過剰濃度が、約 1 モル過剰 ~ 約 3 0 0 モル過剰であり、約 0 . 5 時間 ~ 約 2 4 時間の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下である、第 3 のステップと、

d) 前記第 3 のステップの前記溶液に、求核触媒を添加することを含み、前記求核触媒が、約 0 . 1 分 ~ 約 3 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 1 m M ~ 約 5 0 m M の最終濃度をもたらすように添加される、第 4 のステップと、

e) 前記治療用タンパク質が、前記治療用タンパク質の 1 つ以上の酸化炭水化物への前記活性化水溶性ポリマーの前記複合化を可能にする条件下で、前記活性化水溶性ポリマーおよび求核触媒とともにインキュベートされ、前記条件が、約 0 . 5 時間 ~ 約 2 4 時間の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、第 5 のステップと、

f) 第 5 のステップ中の前記治療用タンパク質の前記 1 つ以上の酸化炭水化物への前記水溶性ポリマーの前記複合化が、L - システイン、メチオニン、グルタチオン、グリセロール、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (メタ重亜硫酸ナトリウム)、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、またはそれらの誘導体、クレゾール、イミダゾール、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される反応停止剤の添加によって停止され、前記反応停止剤が、約 5 分 ~ 約 1 2 0 分の期間、約 2 ~ 約 3 7 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、約 1 m M ~ 約 1 0 0 m M の最終濃度をもたらすように添加される、第 6 のステップと、を含む、項目 2 に記載の方法。

## (項目 1 7)

前記第 1 のステップ中の前記治療用タンパク質の前記初期濃度が、約 1 m g / m L であり、前記 p H が、約 6 . 0 であり、

前記第 2 のステップ中の前記酸化剤の最終濃度が、約 4 0 0  $\mu$  M であり、前記第 5 のステップ中の前記条件が、約 1 0 分の期間、約 2 2 の温度、光の非存在下、および攪拌し

ながらを含み、

前記第3のステップ中の前記過剰濃度が、約50モル過剰であり、前記第3のステップ中の前記条件が、約15分の期間、約22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含み、

前記第4のステップ中の前記求核触媒の前記最終濃度が、約10mMであり、前記第4のステップ中の前記条件が、約15分の期間、約22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含み、

前記第5のステップ中の前記活性化水溶性ポリマーおよび求核触媒とともに前記治療用タンパク質をインキュベートする条件が、約2時間の期間、約22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含み、

前記第6のステップ中の前記反応停止剤が、L-システインであり、前記L-システインが、約10mMの最終濃度をもたらすように添加され、前記第6のステップ中の前記条件が、約60分の期間、約22の温度、光の非存在下、および攪拌しながらを含む、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記水溶性ポリマーがPSAである、項目2に記載の方法。

(項目19)

前記水溶性ポリマーがPEGである、項目2に記載の方法。

(項目20)

前記水溶性ポリマーがHESである、項目2に記載の方法。

(項目21)

前記水溶性ポリマーが、HASである、項目2に記載の方法。

(項目22)

前記PSAが約10～300個のシアル酸単位からなる、項目18に記載の方法。

(項目23)

前記治療用タンパク質がFIXである、項目2～22のいずれか1項に記載の方法。

(項目24)

前記治療用タンパク質がFVIIaである、項目2～22のいずれか1項に記載の方法。

。

(項目25)

前記治療用タンパク質がFVIIIである、項目2～22のいずれか1項に記載の方法。

。

(項目26)

前記酸化剤が過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )である、項目2～25のいずれか1項に記載の方法。

(項目27)

前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分が、前記血液凝固タンパク質の活性化ペプチド内に位置する、項目23～25のいずれか1項に記載の方法。

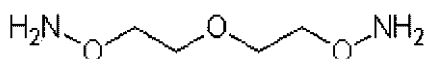
(項目28)

前記PSAが、活性化アミノオキシリンカーを、酸化PSAと反応させることによって、調製され、

前記アミノオキシリンカーが、

a) 式：

【化25】

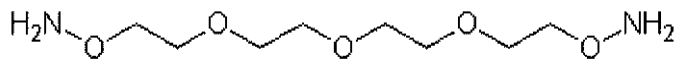


の3-オキサ-ペンタン-1,5-ジオキシアミンリンカー、

b) 式：

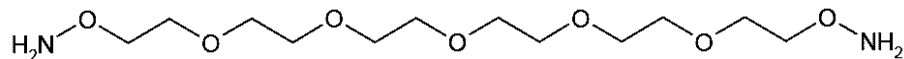


## 【化 2 6】



の 3, 6, 9 - トリオキサ - ウンデカン - 1, 11 - ジオキシアミンリンカー、および  
c) 式：

## 【化 2 7】



の 3, 6, 9, 12, 15 - ペナトキサ (penatoxa) - ヘプタデカン - 1, 17 - ジオキシアミンリンカーからなる群より選択され、

前記 PSA が、酸化剤とともにインキュベーションすることによって酸化され、前記 PSA の非還元末端において、末端アルデヒド基を形成する、項目 18 に記載の方法。

(項目 29)

前記アミノオキシリンカーが、3 - オキサ - ペンタン - 1, 5 - ジオキシアミンである、項目 28 に記載の方法。

(項目 30)

前記酸化剤が、 $\text{NaIO}_4$  である、項目 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 31)

前記求核触媒が、約 1 mM ~ 約 50 mM の濃度で提供される、項目 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 32)

前記求核触媒が、m - トルイジンである、項目 31 に記載の方法。

(項目 33)

前記 m - トルイジンが、約 10 mM の濃度で、複合化反応において存在する、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

シアノホウ化水素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ )、アスコルビン酸 (ビタミン C)、および  $\text{NaBH}_3$  からなる群から選択される還元化合物を含む緩衝液中で前記複合化された治療用タンパク質をインキュベートすることによって、前記複合化された治療用タンパク質中のオキシム連結を還元するステップを更に含む、項目 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 35)

前記還元化合物が、シアノホウ化水素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ ) である、項目 34 に記載の方法。

(項目 36)

前記複合化された治療用タンパク質を精製するステップを更に含む、項目 1 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 37)

前記複合化された治療用タンパク質が、クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって精製される、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記クロマトグラフィが、疎水性相互作用クロマトグラフィ (HIC)、イオン交換クロマトグラフィ (IEC)、サイズ排除クロマトグラフィ (SEC)、親和性クロマトグラフィ、および逆相クロマトグラフィからなる群から選択される、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

抗カオトロピック塩が、クロマトグラフィの負荷ステップおよびクロマトグラフィの洗浄ステップにおいて使用される、項目 38 に記載の方法。

(項目40)

前記クロマトグラフィが、カラムにおいて行われる、項目38に記載の方法。

(項目41)

前記カラムが、フェニル・セファロースFFおよびブチル・セファロースFFからなる群から選択されるクロマトグラフィ樹脂を含む、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記樹脂が、約5cm～約20cmの床高さでカラム中に存在する、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記床高さが、約10cmである、項目42に記載の方法。

(項目44)

流れ方向が、上向流に設定され、前記流速が、約0.2cm/分～約6.7cm/分である、1つ以上の洗浄ステップを含む、項目40に記載の方法。

(項目45)

前記流速が、約2cm/分である、項目44に記載の方法。

(項目46)

流れ方向が、下向流に設定され、前記流速が、約0.1cm/分～約6.7cm/分である、1つ以上の溶出ステップを含む、項目40～45のいずれか1項に記載の方法。

(項目47)

前記流速が、約1cm/分である、項目46に記載の方法。

(項目48)

限外濾過/透析濾過(UF/DF)によって、前記複合化された治療用タンパク質を濃縮させることを更に含む、項目36～47のいずれか1項に記載の方法。

(項目49)

前記治療用タンパク質の前記最終濃度が、約0.5～約3mg/mLである、項目36～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

前記治療用タンパク質が、約5～約11個の水溶性ポリマー部分を含む、項目36～49のいずれか1項に記載の方法。

(項目51)

前記複合化された治療用タンパク質が、クロマトグラフィを用いて精製され、抗カオトロピック塩が、負荷ステップおよび洗浄ステップにおいて使用され、前記方法が、流れ方向が、上向流に設定され、前記流速が、約0.2cm/分～約6.7cm/分である、1つ以上の洗浄ステップと、流れ方向が、下向流に設定され、前記流速が、約0.2cm/分～約6.7cm/分である、1つ以上の溶出ステップと、を含み、限外濾過/透析濾過(UF/DF)によって、前記複合化された治療用タンパク質を濃縮させることを更に含む、項目2に記載の方法。

(項目52)

前記クロマトグラフィが、疎水性相互作用クロマトグラフィ(HIC)であり、前記1つ以上の洗浄ステップの流速が、約2cm/分であり、前記1つ以上の溶出ステップの流速が、約1cm/分である、項目51に記載の方法。

(項目53)

項目1～52のいずれか1項に記載の方法によって産生される、修飾された治療用タンパク質。

(項目54)

治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結の形成方法であって、

a) 過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )、四酢酸鉛( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、および過ルテニウム酸カリウム( $\text{KRuO}_4$ )からなる群から選択される酸化剤とともに前記タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させ

るステップと、

b) 前記オキシム連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結を形成するステップであって、

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール (PEG)、分岐 PEG、Poly PEG (登録商標) (Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸 (PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン (HAS)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド (PAO)、ポリアルキレングリコール (PAG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート (MPC) からなる群から選択され、

前記求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、および p-アニシジンからなる群から選択される、オキシム連結を形成するステップと、を含む、方法。

(項目 55)

治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結の形成方法であって、

a) 過ヨウ素酸ナトリウム ( $\text{NaIO}_4$ )、四酢酸鉛 ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、および過ルテニウム酸カリウム ( $\text{KRuO}_4$ ) からなる群から選択される酸化剤とともに前記タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、

b) 前記オキシム連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分と、活性アミノオキシ基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のオキシム連結を形成するステップであって、

前記治療用タンパク質が、第 I X 因子 (FIX)、第 V I I I 因子 (FVIIII)、第 V I I a 因子 (FVIIa)、フォンヴィレブランド因子 (VWF)、第 F V 因子 (FV)、第 X 因子 (FX)、第 X I 因子 (FXI)、第 X I I 因子 (FXII)、トロンビン (FII)、プロテイン C、プロテイン S、tPA、PAI-1、組織因子 (TF)、ADAMTS 13 プロテアーゼ、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1 (CSF-1)、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、EPO、インターフェロン (IFN-)、コンセンサスインターフェロン、IFN-、IFN-、IFN-、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-31、IL-32、IL-33、トロンボポエチン (TPO)、Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、アンジオポエチン様ポリペプチド 1 (ANGPTL1)、アンジオポエチン様ポリペプチド 2 (ANGPTL2)、アンジオポエチン様ポリペプチド 3 (ANGPTL3)、アンジオポエチン様ポリペプチド 4 (ANGPTL4)、アンジオポエチン様ポリペプチド 5 (ANGPTL5)、アンジオポエチン様ポリペプチド 6 (ANGPTL6)、アンジオポエチン様ポリペプチド 7 (ANGPTL7)、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子 (VEGF)、アンジオゲニン、アクチビン A、アクチビン B、アクチビン C、骨形態形成タンパク質 1、骨形態形成タンパク質 2、骨形態形成タンパク質 3、骨形態形成タンパク

質 4、骨形態形成タンパク質 5、骨形態形成タンパク質 6、骨形態形成タンパク質 7、骨形態形成タンパク質 8、骨形態形成タンパク質 9、骨形態形成タンパク質 10、骨形態形成タンパク質 11、骨形態形成タンパク質 12、骨形態形成タンパク質 13、骨形態形成タンパク質 14、骨形態形成タンパク質 15、骨形態形成タンパク質受容体 I A、骨形態形成タンパク質受容体 I B、骨形態形成タンパク質受容体 I I、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン - 1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子 1、サイトカイン誘導好中球走化性因子 2、サイトカイン誘導好中球走化性因子 2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン 1、上皮増殖因子、エピゲン、エピレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子 4、線維芽細胞増殖因子 5、線維芽細胞増殖因子 6、線維芽細胞増殖因子 7、線維芽細胞増殖因子 8、線維芽細胞増殖因子 8 b、線維芽細胞増殖因子 8 c、線維芽細胞増殖因子 9、線維芽細胞増殖因子 10、線維芽細胞増殖因子 11、線維芽細胞増殖因子 12、線維芽細胞増殖因子 13、線維芽細胞増殖因子 16、線維芽細胞増殖因子 17、線維芽細胞増殖因子 19、線維芽細胞増殖因子 20、線維芽細胞増殖因子 21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体 1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体 2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子 I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子 I I、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン - 3、ニューロトロフィン - 4、オンコスタチン M ( O S M )、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子 2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子 A 鎖、血小板由来増殖因子 A A、血小板由来増殖因子 A B、血小板由来増殖因子 B 鎖、血小板由来増殖因子 B B、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレ B 細胞増殖刺激因子、幹細胞因子 ( S C F )、幹細胞因子受容体、T N F、T N F 0、T N F 1、T N F 2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子 1 . 2、形質転換増殖因子 2、形質転換増殖因子 3、形質転換増殖因子 5、潜伏形質転換増殖因子 1、形質転換増殖因子結合タンパク質 I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I、形質転換増殖因子結合タンパク質 I I I、胸腺間質性リンパ球新生因子 ( T S L P )、I 型腫瘍壊死因子受容体、I I 型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質 ( P U P )、インスリン、レクチン、リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、I g G、I g E、I g M、I g A、および I g D、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、DNAse、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リボタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンプオエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンプイン、レプチン、ヒュミラ ( アダリムマブ )、P r o l i a ( デノスマブ )、E n b r e l ( エタネルセプト )、表 1 中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール ( P E G )、分岐 P E G、P o l y P E G ( 登録商標 ) ( W a r w i c k E f f e c t P o l y m e r s、C o v e n t r y , U K )、ポリシアル酸 ( P S A )、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン ( H A S )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド ( P A O )、ポリアルキレングリコール ( P A G )、ポリプロピレングリコール ( P P G )、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ ( 1 -

ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート(MPC)からなる群から選択され、

前記求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、およびp-アニシジンからなる群から選択される、オキシム連結を形成するステップと、を含む、方法。

(項目56)

治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結の形成方法であって、

a) 過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )、四酢酸鉛( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、および過ルテニウム酸カリウム( $\text{KRuO}_4$ )からなる群から選択される酸化剤とともに前記タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、

b) 前記ヒドラゾン連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する前記活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結を形成するステップであって、

活性ヒドラジド基を含有する前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール(PEG)、分岐PEG、PolyPEG(登録商標)(Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸(PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン(HAS)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド(PAO)、ポリアルキレングリコール(PAG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート(MPC)からなる群から選択され、

前記求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、およびp-アニシジンからなる群から選択される、ヒドラゾン連結を形成するステップと、を含む、方法。

(項目57)

治療用タンパク質の酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結の形成方法であって、

a) 過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )、四酢酸鉛( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、および過ルテニウム酸カリウム( $\text{KRuO}_4$ )からなる群から選択される酸化剤とともに前記タンパク質をインキュベートすることによって、治療用タンパク質の炭水化物成分を酸化させるステップと、

b) 前記ヒドラゾン連結の形成を可能にする条件下で、求核触媒の存在下で、前記治療用タンパク質の前記酸化炭水化物部分と活性ヒドラジド基を含有する前記活性化水溶性ポリマーとの間のヒドラゾン連結を形成するステップであって、

前記治療用タンパク質が、第IX因子(FIX)、第VII因子(FVII)、第VIIa因子(FVIIa)、フォンヴィレブランド因子(VWF)、第FV因子(FV)、第XI因子(XI)、第XI因子(XI)、第XI因子(XI)、トロンピン(FII)、プロテインC、プロテインS、tPA、PAI-1、組織因子(TF)、ADAMTS13プロテアーゼ、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1(CSF-1)、M-CSF

、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、EPO、インターフェロン(IFN- )、コンセンサスインターフェロン、IFN- 、IFN- 、IFN- 、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-31、IL-32、IL-33、トロンボポエチン(TPO)、Ang-1、Ang-2、Ang-4、Ang-Y、アンジオポエチン様ポリペプチド1(ANGPTL1)、アンジオポエチン様ポリペプチド2(ANGPTL2)、アンジオポエチン様ポリペプチド3(ANGPTL3)、アンジオポエチン様ポリペプチド4(ANGPTL4)、アンジオポエチン様ポリペプチド5(ANGPTL5)、アンジオポエチン様ポリペプチド6(ANGPTL6)、アンジオポエチン様ポリペプチド7(ANGPTL7)、ビトロネクチン、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオゲニン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、骨形態形成タンパク質1、骨形態形成タンパク質2、骨形態形成タンパク質3、骨形態形成タンパク質4、骨形態形成タンパク質5、骨形態形成タンパク質6、骨形態形成タンパク質7、骨形態形成タンパク質8、骨形態形成タンパク質9、骨形態形成タンパク質10、骨形態形成タンパク質11、骨形態形成タンパク質12、骨形態形成タンパク質13、骨形態形成タンパク質14、骨形態形成タンパク質15、骨形態形成タンパク質受容体IA、骨形態形成タンパク質受容体IB、骨形態形成タンパク質受容体II、脳由来神経栄養因子、カルジオトロフィン-1、繊毛様神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子受容体、クリプト、クリプティック、サイトカイン誘導好中球走化性因子1、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、サイトカイン誘導好中球走化性因子2、内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、エピゲン、エピレグリン、上皮誘導好中球誘引物質、線維芽細胞増殖因子4、線維芽細胞増殖因子5、線維芽細胞増殖因子6、線維芽細胞増殖因子7、線維芽細胞増殖因子8、線維芽細胞増殖因子8b、線維芽細胞増殖因子8c、線維芽細胞増殖因子9、線維芽細胞増殖因子10、線維芽細胞増殖因子11、線維芽細胞増殖因子12、線維芽細胞増殖因子13、線維芽細胞増殖因子16、線維芽細胞増殖因子17、線維芽細胞増殖因子19、線維芽細胞増殖因子20、線維芽細胞増殖因子21、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア細胞株誘導好中球因子受容体1、グリア細胞株誘導好中球因子受容体2、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、増殖関連タンパク質、ヘパリン結合上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、肝細胞癌由来増殖因子、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II、インスリン様増殖因子結合タンパク質、ケラチノサイト増殖因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体、神経増殖因子、神経増殖因子受容体、ニューロポエチン、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、オノコスタチンM(OSM)、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子BB、血小板由来増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子(SCF)、幹細胞因子受容体、TNF、TNF0、TNF1、TNF2、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子、形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子1.2、形質転換増殖因子2、形質転換増殖因子3、形質転換増殖因子5、潜伏形質転換増殖因子1、形質転換増殖因子結合タンパク質I、形質転換増殖因子結合タンパク質II、形質転換増殖因子結合タンパク質III、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)、I型腫瘍壊死因子受容体、II型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化剤受容体、ホスホリパーゼ活性化タンパク質(PUP)、インスリン、レクチン、リシン、プロラクチン、絨毛性ゴナドトロピン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織プラスミノゲン活性化因子、IgG、IgE、IgM、IgA、およびIgD、-ガラクトシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、DNase、フェチュイン、黄体形成ホルモン、エストロゲン、インスリン、アルブミン、リボタンパク質、フェトプロテイン、トランスフェリン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、インテグリン、トロンピン、レプチン、

ヒュミラ（アダリムマブ）、P r o l i a（デノスマブ）、E n b r e l（エタネルセプト）、表 1 中のタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは変異体からなる群から選択され、

活性ヒドラジド基を含有する前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール（PEG）、分岐 PEG、Poly PEG（登録商標）（Warwick Effect Polymers、Coventry, UK）、ポリシアル酸（PSA）、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン（HAS）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（MPC）からなる群から選択され、

前記求核触媒が、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、スルファニル酸、o-アミノベンズアミド、o-トルイジン、m-トルイジン、p-トルイジン、o-アニシジン、m-アニシジン、および p-アニシジンからなる群から選択される、ヒドラゾン連結を形成するステップと、を含む、方法。

（項目 58）

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、

a) 約 1 分間～約 24 時間の期間、約 2 ～約 37 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、酸化水溶性ポリマーと活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したオキシム連結の形成を可能にする条件下で、活性アミノオキシ基を含む前記活性化アミノオキシリンカーとともに、前記酸化水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートし、それによって、活性アミノオキシ基を含有する水溶性ポリマーを形成することと、

b) クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって、活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを精製することと、を含む、方法によって調製される、項目 1～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

（項目 59）

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、

a) 約 1 分間～約 24 時間の期間、約 2 ～約 37 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、酸化水溶性ポリマーと活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したオキシム連結の形成を可能にする条件下で、活性アミノオキシ基を含む前記活性化アミノオキシリンカーとともに、前記酸化水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートし、それによって、活性アミノオキシ基を含有する水溶性ポリマーを形成することと、

b) 約 1 分間～約 24 時間の期間、約 2 ～約 37 の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、酸化水溶性ポリマーと活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したアルコキサミン（alkoxamine）連結の形成を可能にする条件下で、還元剤とともに、ステップ a) の活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートすることと、

c) クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって、活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを精製することと、を含む、方法によって調製される、項目 1～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

（項目 60）

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、

a) 約 1 分間～約 24 時間の期間、約 2 ～約 37 の温度、光の存在または非存在下

、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、酸化水溶性ポリマーと活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したオキシム連結の形成を可能にする条件下で、活性アミノオキシ基を含む前記活性化アミノオキシリンカーとともに、前記酸化水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートし、それによって、活性アミノオキシ基を含有する水溶性ポリマーを形成することと、

b) 約1分間～約24時間の期間、約2～約37の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、求核触媒とともに、ステップa)の活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートすることと、

c) クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって、活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを精製することと、を含む、方法によって調製される、項目1～52のいずれか1項に記載の方法。

(項目61)

活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーが、

a) 約1分間～約24時間の期間、約2～約37の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、酸化水溶性ポリマーと活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したオキシム連結の形成を可能にする条件下で、活性アミノオキシ基を含む前記活性化アミノオキシリンカーとともに、前記酸化水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートし、それによって、活性アミノオキシ基を含有する水溶性ポリマーを形成することと、

b) 約1分間～約24時間の期間、約2～約37の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む条件下で、求核触媒とともに、ステップa)の活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートすることと、

c) 約1分間～約24時間の期間、約2～約37の温度、光の存在または非存在下、および攪拌しながらまたは攪拌なしを含む、前記酸化水溶性ポリマーと前記活性化アミノオキシリンカーとの間の安定したアルコキサミン(alkoxamine)連結の形成を可能にする条件下で、還元剤とともに、ステップb)の活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを含む溶液をインキュベートすることと、

d) クロマトグラフィ、濾過、および沈殿からなる群から選択される方法によって、活性アミノオキシ基を含有する前記水溶性ポリマーを精製することと、を含む、方法によって調製される、項目1～52のいずれか1項に記載の方法。

(項目62)

前記酸化水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール(PEG)、分岐PEG、PolyPEG(登録商標)(Warwick Effect Polymers, Coventry, UK)、ポリシアル酸(PSA)、デンプン、ヒドロキシアルキルデンプン(HAS)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド(PAO)、ポリアルキレングリコール(PAG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート(MPC)からなる群から選択され、前記水溶性ポリマーが、酸化剤とともにインキュベーションすることによって酸化され、前記水溶性ポリマーの非還元末端において、末端アルデヒド基を形成する、項目58～61のいずれか1項に記載の方法。

(項目63)

前記水溶性ポリマーが、PSAである、項目62に記載の方法。



(項目 6 4)

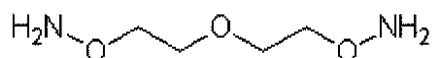
前記酸化剤が、 $\text{NaIO}_4$  である、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記アミノオキシリンカーが、

a) 式：

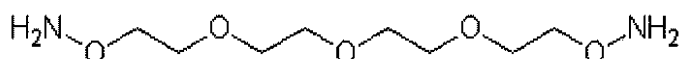
【化 2 8】



の 3 - オキサ - ペンタン - 1 , 5 - ジオキシアミンリンカー、

b) 式：

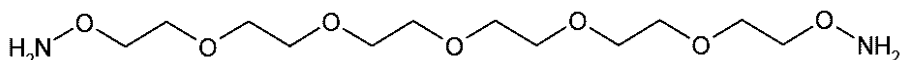
【化 2 9】



の 3 , 6 , 9 - トリオキサ - ウンデカン - 1 , 1 1 - ジオキシアミンリンカー、および

c) 式：

【化 3 0】



の 3 , 6 , 9 , 1 2 , 1 5 - ペナトキサ ( penatoxa ) - ヘプタデカン - 1 , 1 7 - ジオキシアミンリンカーからなる群から選択される、項目 5 8 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記還元剤が、シアノホウ化水素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ )、アスコルビン酸 (ビタミン C)、および  $\text{NaBH}_3$  からなる群から選択される、項目 5 9 および 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記還元剤が、シアノホウ化水素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ ) である、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記求核触媒が、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、スルファニル酸、o - アミノベンズアミド、o - トルイジン、m - トルイジン、p - トルイジン、o - アニシジン、m - アニシジン、および p - アニシジンからなる群から選択される、項目 6 0 および 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記求核触媒が、m - トルイジンである、項目 6 8 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記求核触媒が、約 1 . 0 m M ~ 約 5 0 m M の求核触媒の最終濃度をもたらす量で添加される、項目 6 8 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 1)

限外濾過 / 透析濾過 ( U F / D F ) によって、前記複合化された治療用タンパク質を濃縮させることを更に含む、項目 5 8 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【誤訳訂正 1 0】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 5 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

## 【 0 0 5 8 】

治療用タンパク質の薬理学的および免疫学的特性は、化学修飾、およびポリエチレングリコール（PEG）、分岐PEG、ポリシアル酸（PSA）、ヒドロキシアルキルデンブロン（HAS）、ヒドロキシエチルデンブロン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンブロン、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（MPC）等のポリマー化合物との複合化によって改善することができる。得られる複合体の特性は、一般に、ポリマーの構造および大きさに強く左右される。したがって、画定された狭い大きさの分布を有するポリマーが、通常、当該技術分野において好ましいとされる。PEG等の合成ポリマーは、狭い大きさの分布で容易に製造することができ、一方、PSAは、狭い大きさの分布を有する最終PSA調製をもたらすような様式で精製することができる。加えて、画定されたポリマー鎖および狭い大きさの分布を有するPEG化試薬は、市場に出回っており、手頃な価格で市販されている。

## 【 誤訳訂正 1 1 】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 3 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【 0 1 3 9 】

さらなる態様として、本発明は、対象に投与するためのその使用を促進する様式で梱包された本発明の組成物を含むキットを含む。一実施形態において、かかるキットは、本明細書に説明される化合物または組成物（例えば、複合化された治療用タンパク質を含む組成物）を含み、それは密封ボトルまたは器等の容器に梱包され、方法を実践する上での化合物または組成物の使用法を説明するラベルがその容器に貼られているか、パッケージに含まれる。一実施形態において、キットは、複合化された治療用タンパク質を含む組成物を有する第1の容器、および第1の容器内の組成物のための生理的に許容される再構成溶液を有する第2の容器を含有する。一態様では、化合物または組成物は、単位容量形態で梱包される。キットは、特定の投与経路に従い組成物を投与するための好適な装置を更に含んでもよい。好ましくは、キットは、治療用タンパク質またはペプチド組成物の使用法を説明するラベルを含有する。

水溶性ポリマー

一態様では、提供される治療用タンパク質誘導体（即ち、複合化された治療用タンパク質）分子は、ポリエチレングリコール（PEG）、分岐PEG、ポリシアル酸（PSA）、ヒドロキシアルキルデンブロン（HAS）、ヒドロキシエチルデンブロン（HES）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンブロン、デキストラン、カルボキシメチル-デキストラン、ポリアルキレンオキシド（PAO）、ポリアルキレングリコール（PAG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（PHF）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（MPC）が挙げられるが、これらに限定されない、水溶性ポリマーに結合される。本発明の一実施形態

において、水溶性ポリマーは、350～120,000、500～100,000、1000～80,000、1500～60,000、2,000～45,000 Da、3,000～35,000 Da、および5,000～25,000 Daの範囲の分子量を有する、シアル酸分子からなる。水溶性ポリマーの結合は、タンパク質への直接結合によって、またはリンカー分子を介して実行することができる。化学的リンカーの一例は、炭水化物-選択的ヒドラジドおよびスルフヒドリル反応マレイミド基を含有する、MBPH(4-[4-N-マイレインイミドフェニル]酪酸ヒドラジド)である(Chamow et al., J Biol Chem 1992; 267: 15916-22)。他の例示的および好ましいリンカーは、下に説明される。

#### 【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0181

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0181】

種々の実施形態において、治療用タンパク質は、修飾されて、グリコシル化部位(即ち、天然のグリコシル化部位以外の部位)が導入される。かかる修飾は、当該技術分野で公知の標準分子生物学的技術を用いて達成されてもよい。その上、1つまたは複数の炭水化物部分を介する水溶性ポリマーへの複合化の前に、治療用タンパク質は、インビボまたはインビトロでグリコシル化されてもよい。これらのグリコシル化部位は、水溶性ポリマーとのタンパク質の複合化のための標的として機能することができる(米国特許出願第20090028822号、米国特許出願第2009/0093399号、米国特許出願第2009/0081188号、米国特許出願第2007/0254836号、米国特許出願第2006/0111279号、およびDeFrees S. et al., Glycobiology, 2006, 16, 9, 833-43)。例えば、インビボで天然にグリコシル化されないタンパク質(例えば糖タンパク質ではないタンパク質)は、上述の通り、修飾され得る。

#### E. アミノオキシ連結

本発明の一実施形態において、オキシム基を形成するための、アルデヒド(例えば過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化後の炭水化物部分上)とのヒドロキシルアミンまたはヒドロキシルアミン誘導体の反応が、血液凝固タンパク質の複合体の調製に適用される。例えば、糖タンパク質(例えば本発明に従う治療用タンパク質)は、まず、過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )等の酸化剤で酸化される(Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10、およびVan Lenten L and Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94)。糖タンパク質の過ヨウ素酸塩酸化は、1928年の過ヨウ素酸塩との隣接ジオールの酸化に説明された古典的マラブレード反応に基づいて、活性アルデヒド基を形成する(Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96)。かかる酸化剤のさらなる例は、四酢酸鉛( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、酢酸マンガン( $\text{MnO}(\text{Ac})_3$ )、酢酸コバルト( $\text{Co}(\text{OAc})_2$ )、酢酸タリウム( $\text{TlOAc}$ )、硫酸セリウム( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ )(米国特許第4,367,309号)、または過ルテニウム酸カリウム( $\text{KRuO}_4$ )(Marko et al., J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2)である。「酸化剤」とは、炭水化物中の隣接ジオールを酸化し、それによって、生理学的反応条件下で、活性アルデヒド基を生成することが可能な温和な酸化化合物を意味する。

#### 【誤訳訂正13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】 0 1 8 4

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 1 8 4 】

本発明の種々の実施形態において、本明細書に説明するアミノオキシ技術に従う治療用タンパク質（例えば、F V I I I、F V I I a、またはF I X）の酸化炭水化物部分に連結される水溶性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール（P E G）、分岐P E G、ポリシアル酸（P S A）、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸塩、デルマタン硫酸塩、デンプン、デキストラン、カルボキシメチル-デキストラン、ポリアルキレンオキシド（P A O）、ポリアルキレングリコール（P A G）、ポリプロピレングリコール（P P G）ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（P V A）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ（1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（P H F）、2-メタクリロイルオキシ-2'-エチルトリメチルアンモニウムホスフェート（M P C）が挙げられるが、これらに限定されない。

求核触媒

本明細書に説明される通り、治療用タンパク質への水溶性ポリマーの複合化は、アニリンによって触媒され得る。アニリンは、アルデヒドおよびケトンの水性反応を強く触媒し、ヒドラゾンおよびオキシム等の安定したイミンを形成する。以下の略図は、無触媒反応とアニリン触媒オキシムライゲーション反応を比較する（K o h l e r J J , C h e m B i o C h e m 2 0 0 9 ; 1 0 : 2 1 4 7 - 5 0）：

【誤訳訂正 1 4】

【訂正対象書類名】 明細書

【訂正対象項目名】 0 1 8 7

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 0 1 8 7 】

本発明の求核触媒は、オキシムライゲーション（例えばアミノオキシ連結を使用）またはヒドラゾン形成（例えばヒドラジド化学を使用）において有用である。本発明の種々の実施形態において、求核触媒は、複合化反応において0.1、0.2、0.3、0.5、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、または50 mMの濃度で提供される。一実施形態において、求核触媒は、1~10 mMで提供される。本発明の種々の実施形態において、複合化反応のpH範囲は、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、および7.5である。一実施形態において、pHは、5.5~6.5である。

複合化タンパク質の精製

種々の実施形態において、酸化剤でインキュベートされているタンパク質および/または本開示に従って水溶性ポリマーで複合化されている治療用タンパク質の精製が望ましい。多くの精製技術が、当該技術分野で知られており、これには、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、および親和性クロマトグラフィ、またはそれらの組み合わせ等のクロマトグラフ法、濾過法、ならびに沈殿法（Guide to Protein Purification, Meth. Enzymology Vol 463 (edited by Burgess RR and Deutscher MP), 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press 2009）が挙げられるが、これらに限定されない。