

【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 3 年 11 月 11 日 (2021.11.11)

【公表番号】特表 2020-535199 (P2020-535199A)

【公表日】令和 2 年 12 月 3 日 (2020.12.3)

【年通号数】公開・登録公報 2020-049

【出願番号】特願 2020-518000 (P2020-518000)

【国際特許分類】

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/575 (2006.01)

C 0 7 K 14/54 (2006.01)

C 0 7 K 14/555 (2006.01)

C 0 7 K 14/61 (2006.01)

C 0 7 K 14/62 (2006.01)

C 0 7 K 14/605 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/635 (2006.01)

C 0 7 K 14/525 (2006.01)

C 0 7 K 14/745 (2006.01)

C 0 7 K 14/755 (2006.01)

C 0 7 K 14/52 (2006.01)

C 0 7 K 14/53 (2006.01)

C 0 7 K 14/585 (2006.01)

C 0 7 K 14/60 (2006.01)

C 0 7 K 14/65 (2006.01)

C 0 7 K 14/005 (2006.01)

C 0 7 K 14/49 (2006.01)

C 0 7 K 14/485 (2006.01)

C 0 7 K 14/48 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 0 7 K 1/00 (2006.01)

C 0 7 K 1/16 (2006.01)

C 0 7 K 1/18 (2006.01)

C 0 7 K 1/20 (2006.01)

C 0 7 K 1/22 (2006.01)

C 0 7 K 1/10 (2006.01)

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K 38/02 (2006.01)

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 38/28 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 19/00 Z N A

C 0 7 K 14/575

C 0 7 K 14/54

C 0 7 K 14/555

C 0 7 K	14/61	
C 0 7 K	14/62	
C 0 7 K	14/605	
C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	14/635	
C 0 7 K	14/525	
C 0 7 K	14/745	
C 0 7 K	14/755	
C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K	14/53	
C 0 7 K	14/585	
C 0 7 K	14/60	
C 0 7 K	14/65	
C 0 7 K	14/005	
C 0 7 K	14/49	
C 0 7 K	14/485	
C 0 7 K	14/48	
C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z
C 0 7 K	1/00	
C 0 7 K	1/16	
C 0 7 K	1/18	
C 0 7 K	1/20	
C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	1/10	
A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	39/395	V
A 6 1 K	38/28	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K	9/08	

## 【手続補正書】

【提出日】令和3年9月28日(2021.9.28)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域が非ペプチド性重合体リンカーを通じて連結された、タンパク質結合体。

【請求項2】

上記脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチドは、一つ以上の脂肪酸分子が生理活性ポリペプチドに結合されたものであり、上記改質に使用された脂肪酸分子は上記免疫グロブリンFc領域に連結されていないことを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質結合体

。

【請求項3】

上記生理活性ポリペプチドを改質した脂肪酸分子は、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、請求項1又は請求項2に記載のタンパク質結合体。

【請求項4】

上記非ペプチド性重合体リンカーが両末端の反応基を通じて脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域とそれぞれ共有結合で連結された、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項5】

上記免疫グロブリンFc領域が、非糖鎖化されることを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項6】

上記免疫グロブリンFc領域は、CH1、CH2、CH3及びCH4ドメインからなる群から選択される1個～4個のドメインからなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項7】

上記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ(hinge)領域をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項8】

上記免疫グロブリンFc領域が、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、これらの組み合わせ(combination)及びこれらのハイブリッド(hybrid)のFc領域からなる群から選択される免疫グロブリンFc断片である、請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項9】

上記免疫グロブリンFc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、これらの組み合わせ及びこれらのハイブリッドのFc領域からなる群から選択される、請求項1～8のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項10】

上記免疫グロブリンFc断片が、同一起源のドメインからなる単鎖免疫グロブリンで構成された二量体または多量体である、請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項11】

上記免疫グロブリンFc断片が、IgG4 Fc断片である、請求項1～10のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項12】

上記免疫グロブリンFc断片が、ヒト非糖鎖化IgG4 Fc断片である、請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項13】

上記非ペプチド性重合体リンカーは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール-プロピレングリコール共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、キチン、ヒアルロン酸及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項14】

上記非ペプチド性重合体リンカーは、脂肪酸、脂肪酸誘導体またはポリエチレングリコールである、請求項1～13のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項15】

上記非ペプチド性重合体リンカーの両末端が、それぞれ免疫グロブリンFc領域のN末端、リジン残基、またはアルギニン残基と生理活性ポリペプチドのN末端、C末端、リジン残基、ヒスチジン残基またはシステイン残基、または各末端または残基の遊離反応基に結合されている、請求項1～14のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項16】

上記生理活性ポリペプチドが、ホルモン、サイトカイン、酵素、抗体、成長因子、転写調節因子、血液因子、ワクチン、構造タンパク質、リガンドタンパク質及び受容体からなる

群から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項17】

上記生理活性ポリペプチドは、ヒト成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、インターフェロン類、インターフェロン受容体類、コロニー刺激因子類、グルカゴン様ペプチド類(GLP-1など)、エキセンディン類(Exendin4など)、オキシントモジュリン、G-プロテイン関連受容体(G-protein-coupled receptor)、インターロイキン類、インターロイキン受容体類、酵素類、インターロイキン結合タンパク質類、サイトカイン結合タンパク質類、マクロファージ活性因子、マクロファージペプチド、B細胞因子、T細胞因子、タンパク質A、アレルギー抑制因子、細胞壊死糖タンパク質、免疫毒素、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、腫瘍抑制因子、転移成長因子、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、アルブミン、 $\gamma$ -ラクトアルブミン、アポリポタンパク質-E、赤血球生成因子、高糖鎖化赤血球生成因子、アンジオポエチン類、ヘモグロビン、トロンビン、トロンビン受容体活性ペプチド、トロンボモジュリン、血液因子VII、VIIa、VIII、IX、及びXIII、プラスミノーゲン活性因子、フィブリン結合ペプチド、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ヒルジン、タンパク質C、C-反応性タンパク質、レニン抑制剤、コラゲナーゼ抑制剤、スーパーオキシドディスムターゼ、レプチン、血小板由来成長因子、上皮細胞成長因子、表皮細胞成長因子、アンジオスタチン、アンジオテンシン、骨形成成長因子、骨形成促進タンパク質、カルシトニン、インスリン、アトリオペプチン、軟骨誘導因子、エルカトニン、結合組織活性因子、組織因子経路抑制剤、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、神経成長因子類、副甲状腺ホルモン、リラキシン、セクレチン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、副腎皮質ホルモン、グルカゴン、コレシストキニン、膵臓ポリペプチド、ガストリン放出ペプチド、コルチコトロピン放出因子、甲状腺刺激ホルモン、オートタキシン、ラクtofエリン、ミオスタチン、受容体類、受容体拮抗物質、細胞表面抗原、ウイルス由来ワクチン抗原、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片類及びそれぞれの誘導体からなる群から選択される、請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項18】

上記生理活性ポリペプチドは、ヒト成長ホルモン、インターフェロン-アルファ、顆粒球コロニー刺激因子、赤血球生成因子、血液因子、インスリン、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド類、エキセンディン類及びそれぞれの誘導体またはアナログからなる群から選択される、請求項1～17のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項19】

上記生理活性ポリペプチドはインスリンまたはそのアナログであり、上記生理活性ポリペプチドを改質した脂肪酸分子は脂肪酸または脂肪酸誘導体であり、上記非ペプチド重合体リンカーはポリエチレングリコールである、請求項1～18のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

【請求項20】

上記インスリンアナログは、インスリンB鎖の8番アミノ酸、インスリンB鎖の23番アミノ酸、インスリンB鎖の24番アミノ酸、インスリンB鎖の25番アミノ酸、インスリンA鎖の1番アミノ酸、インスリンA鎖の2番アミノ酸及びインスリンA鎖の19番アミノ酸からなる群から選択された一つのアミノ酸がアラニンに置換されたり、A鎖の14番アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギンに置換された、請求項18又は請求項19に記載のタンパク質結合体。

【請求項21】

(a) 1つ以上の脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド及び1つ以上の免疫グロブリンFc領域を両末端に反応基を有する1つ以上の非ペプチド性重合体リンカーを通じて共有結合で連結してタンパク質結合体を製造する段階;及び

(b) 上記(a)段階を通じて製造した非ペプチド性重合体リンカーを通じて共有結合で連結された、脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域を必須に含み、上記非ペプチド性重合体リンカーが免疫グロブリンFc断片に結合したタ

ンパク質結合体を分離する段階を含む、請求項1～20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体の製造方法。

【請求項22】

上記非ペプチド性重合体または脂肪酸分子の反応基は、アルデヒド基、マレイミド基及びスクシンイミド誘導体からなる群から選択される、請求項21に記載の製造方法。

【請求項23】

上記アルデヒド基は、プロピオンアルデヒド基またはブチルアルデヒド基である、請求項22に記載の製造方法。

【請求項24】

上記スクシンイミド誘導体が、スクシンイミジルカルボキシメチル、スクシンイミジル吉草酸、スクシンイミジルメチルブタン酸、スクシンイミジルメチルプロピオン酸、スクシンイミジルブタン酸、スクシンイミジルプロピオン酸、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはスクシンイミジルカルボネートである、請求項22に記載の製造方法。

【請求項25】

上記非ペプチド性重合体リンカーは、各末端にそれぞれアルデヒドグループ、マレイミド反応基またはスクシンイミド誘導体を有する、請求項21～24のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項26】

上記脂肪酸分子は、各末端にそれぞれアルデヒドグループ、マレイミド反応基またはスクシンイミド誘導体を有する、請求項21～25のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項27】

上記(a)段階は

(a1) 非ペプチド性重合体リンカーの一方の末端に免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドのいずれか一つと共有結合で連結して連結体を製造する段階;及び

(a2) 上記(a1)段階で製造した連結体を分離し、分離された連結体の非ペプチド性重合体リンカーまたは免疫グロブリンFc領域中の他の一つと共有結合で連結する段階を含む、請求項21～26のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項28】

上記(a1)段階で脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと非ペプチド性重合体リンカーの反応モル比は1:1～1:30であり、免疫グロブリンFc断片と非ペプチド性重合体リンカーの反応モル比が1:1～1:20である、請求項27に記載の製造方法。

【請求項29】

上記(a1)段階は、pH 4.0～9.0で行われることを特徴とする、請求項27に記載の製造方法。

【請求項30】

上記(a1)段階は、4.0～25℃で行われることを特徴とする、請求項27に記載の製造方法。

【請求項31】

上記(a1)段階で免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1～100mg/mlであることを特徴とする、請求項27～30のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項32】

上記(a2)段階において連結体:免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドの反応モル比が1:0.1～1:20であることを特徴とする、請求項27に記載の製造方法。

【請求項33】

上記(a2)段階は、pH 4.0～9.0で行われることを特徴とする、請求項27又は請求項32に記載の製造方法。

【請求項34】

上記(a2)段階は、4.0～25℃で行われることを特徴とする、請求項27又は請求項32に記載の製造方法。

## 【請求項 35】

上記(a2)段階において免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1～100mg/mlであることを特徴とする、請求項27～34のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 36】

上記(a1)段階及び(a2)段階が還元剤の存在の下で行われることを特徴とする、請求項27～35のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 37】

上記還元剤が、シアノ水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaCNBH}_3$ )、水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミノホウ酸塩及びピリジンホウ酸塩からなる群から選択される、請求項36に記載の製造方法。

## 【請求項 38】

上記(a2)段階において連結体を分離するために、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーから選択される精製方法を単独または複数で行う、請求項27に記載の製造方法。

## 【請求項 39】

上記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基がクォータナリーアンモニウム(Q)、クォータナリーアミノエチル(QAE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ポリエチレンジイミン(PEI)、ジメチルアミノメチル(DMAE)、またはトリメチルアミノエチル(TMAE)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項38に記載の製造方法。

## 【請求項 40】

上記カチオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基がメチルスルホネート(S)、スルホプロピル(SP)、カルボキシメチル(CM)、ポリアスパラギン酸(Poly aspartic acid)、スルホエチル(SE)、スルホプロピル(SP)、ホスフェート(P)またはスルホネート(S)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項38に記載の製造方法。

## 【請求項 41】

上記疎水性クロマトグラフィーの樹脂の作用基がフェニル(phenyl)、オクチル(octyl)、(イソ)プロピル(isopropyl)、ブチル(butyl)及びエチル(ethyl)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項38に記載の製造方法。

## 【請求項 42】

上記親和性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、プロテインA(proteinA)、ヘパリン(heparin)、ブルー(blue)、ベンザミジン(benzamidine)、金属イオン(コバルト、ニッケル、銅)及び非ペプチド性重合体リンカーの両末端がそれぞれ免疫グロブリンFc領域及び生理活性ポリペプチドと結合したタンパク質結合体の構成成分の一部あるいは全体に対する抗体からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項38に記載の製造方法。

## 【請求項 43】

上記サイズ排除クロマトグラフィーの樹脂がスーパーデックス(superdex)、セファクリル(sephacryl)、スーパーロース(superose)及びセファデックス(sephadex)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項38に記載の製造方法。

## 【請求項 44】

上記(b)段階のタンパク質結合体を分離する段階は、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーから選択される精製方法を単独または複数で行う、請求項21に記載の製造方法。

## 【請求項 45】

上記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基が、クォータナリーアンモニウム(Q)、クォータナリーアミノエチル(QAE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ポリエチレンジイミン(PEI)、ジメチルアミノメチル(DMAE)、またはトリメチルアミノエチル(TMAE)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項44に記載の製造方法。

**【請求項 46】**

上記カチオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基が、メチルスルホネート(S)、スルホプロピル(SP)、カルボキシメチル(CM)、ポリアスパラギン酸(Poly aspartic acid)、スルホエチル(SE)、スルホプロピル(SP)、ホスフェート(P)またはスルホネート(S)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項44に記載の製造方法。

**【請求項 47】**

上記疎水性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、フェニル(phenyl)、オクチル(octyl)、(イソ)プロピル(iso)propyl)、ブチル(butyl)及びエチル(ethyl)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項44に記載の製造方法。

**【請求項 48】**

上記親和性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、プロテインA(proteinA)、ヘパリン(heparin)、ブルー(blue)、ベンザミジン(benzamidine)、金属イオン(コバルト、ニッケル、銅)及び非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンFc領域及び脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと結合したタンパク質結合体の構成成分の一部あるいは全体に対する抗体からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項44に記載の製造方法。

**【請求項 49】**

上記サイズ排除クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、スーパーデックス(superdex)、セファクリル(sephacryl)、スーパーロース(superose)及びセファデックス(sephadex)からなる群から選択されるもののうちの一つである、請求項44に記載の製造方法。

**【請求項 50】**

上記(b)段階は、タンパク質結合体を構成する脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと免疫グロブリンFc領域が免疫グロブリンFc領域のN末端を通じて結合したタンパク質結合体を分離することを特徴とする、請求項21に記載の製造方法。

**【請求項 51】**

(a')非ペプチド性重合体の一方の末端に免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドのいずれか一つと共有結合で連結して連結体を製造する段階であって、脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと非ペプチド性重合体の反応モル比は1:1~1:30であり、免疫グロブリンFc領域と非ペプチド性重合体リンカーの反応モル比が1:1~1:20であり、還元剤が1~100mMの濃度で含まれ、pH 4.0~9.0、反応温度4.0~25℃で行われ、免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1~100mg/mlである段階；

(b')上記(a')段階で製造した連結体を分離し、分離された連結体の非ペプチド性重合体リンカーの他方の末端に生理活性ポリペプチドまたは免疫グロブリンFc領域中、他の一つと共有結合で連結する段階であって、連結体と免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドリンカーの反応モル比が1:0.1~1:20であり、還元剤が1~100mMの濃度で含まれ、pH 4.0~9.0、反応温度4.0~25℃で行われ、免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1~100mg/mlである段階；及び

(c')上記(b')段階を通じて製造した共有結合で連結された脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド、非ペプチド性重合体リンカー及び免疫グロブリンFc領域を必須的に含み、上記脂肪酸分子が免疫グロブリンFcと結合したタンパク質結合体を分離する段階を含む、請求項1~20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体の製造方法。

**【請求項 52】**

請求項1~20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体を有効成分として含む生理活性ポリペプチドの生体内持続性及び安定性増加用薬学的組成物。

**【手続補正2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0168

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

## 【 0 1 6 8 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されうること理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は上記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

次に、本発明のまた別の好ましい態様を示す。

1．脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域が非ペプチド性重合体リンカーを通じて連結された、タンパク質結合体。

2．上記脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチドは、一つ以上の脂肪酸分子が生理活性ポリペプチドに結合されたものであり、上記改質に使用された脂肪酸分子は上記免疫グロブリンFc領域に連結されていないことを特徴とする、上記1に記載のタンパク質結合体。

3．上記生理活性ポリペプチドを改質した脂肪酸分子は、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、上記1又は上記2に記載のタンパク質結合体。

4．上記非ペプチド性重合体リンカーが両末端の反応基を通じて脂肪酸分子で改質された生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域とそれぞれ共有結合で連結された、上記1～3のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

5．上記免疫グロブリンFc領域が、非糖鎖化されることを特徴とする、上記1～4のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

6．上記免疫グロブリンFc領域は、CH1、CH2、CH3及びCH4ドメインからなる群から選択される1個～4個のドメインからなる、上記1～5のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

7．上記免疫グロブリンFc領域が、ヒンジ(hinge)領域をさらに含む、上記1～6のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

8．上記免疫グロブリンFc領域が、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、これらの組み合わせ(combination)及びこれらのハイブリッド(hybrid)のFc領域からなる群から選択される免疫グロブリンFc断片である、上記1～7のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

9．上記免疫グロブリンFc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、これらの組み合わせ及びこれらのハイブリッドのFc領域からなる群から選択される、上記1～8のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

10．上記免疫グロブリンFc断片が、同一起源のドメインからなる単鎖免疫グロブリンで構成された二量体または多量体である、上記1～9のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

11．上記免疫グロブリンFc断片が、IgG4 Fc断片である、上記1～10のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

12．上記免疫グロブリンFc断片が、ヒト非糖鎖化IgG4 Fc断片である、上記1～11のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

13．上記非ペプチド性重合体リンカーは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール-プロピレングリコール共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、脂肪酸、脂肪酸誘導体、キチン、ヒアルロン酸及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、上記1～12のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

14．上記非ペプチド性重合体リンカーは、脂肪酸、脂肪酸誘導体またはポリエチレングリコールである、上記1～13のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

15．上記非ペプチド性重合体リンカーの両末端が、それぞれ免疫グロブリンFc領域のN末端、リジン残基、またはアルギニン残基と生理活性ポリペプチドのN末端、C末端、リジン残基、ヒスチジン残基またはシステイン残基、または各末端または残基の遊離反応基に結合されている、上記1～14のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

16. 上記生理活性ポリペプチドが、ホルモン、サイトカイン、酵素、抗体、成長因子、転写調節因子、血液因子、ワクチン、構造タンパク質、リガンドタンパク質及び受容体からなる群から選択される、上記1～15のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

17. 上記生理活性ポリペプチドは、ヒト成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ペプチド、インターフェロン類、インターフェロン受容体類、コロニー刺激因子類、グルカゴン様ペプチド類(GLP-1など)、エキセンディン類(Exendin4など)、オキシントモジュリン、G-プロテイン関連受容体(G-protein-coupled receptor)、インターロイキン類、インターロイキン受容体類、酵素類、インターロイキン結合タンパク質類、サイトカイン結合タンパク質類、マクロファージ活性因子、マクロファージペプチド、B細胞因子、T細胞因子、タンパク質A、アレルギー抑制因子、細胞壊死糖タンパク質、免疫毒素、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、腫瘍抑制因子、転移成長因子、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、アルブミン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、アポリポタンパク質-E、赤血球生成因子、高糖鎖化赤血球生成因子、アンジオポエチン類、ヘモグロビン、トロンピン、トロンピン受容体活性ペプチド、トロンボモジュリン、血液因子VII、VIIa、VIII、IX、及びXIII、プラスミノゲン活性因子、フィブリン結合ペプチド、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ヒルジン、タンパク質C、C-反応性タンパク質、レニン抑制剤、コラゲナーゼ抑制剤、スーパーオキシドディスムターゼ、レプチン、血小板由来成長因子、上皮細胞成長因子、表皮細胞成長因子、アンジオスタチン、アンジオテンシン、骨形成成長因子、骨形成促進タンパク質、カルシトニン、インスリン、アトリオペプチン、軟骨誘導因子、エルカトニン、結合組織活性因子、組織因子経路抑制剤、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、神経成長因子類、副甲状腺ホルモン、リラキシン、セクレチン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、副腎皮質ホルモン、グルカゴン、コレシストキニン、膵臓ポリペプチド、ガストリン放出ペプチド、コルチコトロピン放出因子、甲状腺刺激ホルモン、オートタキシン、ラクtofelin、ミオスタチン、受容体類、受容体拮抗物質、細胞表面抗原、ウイルス由来ワクチン抗原、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片類及びそれぞれの誘導体からなる群から選択される、上記1～16のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

18. 上記生理活性ポリペプチドは、ヒト成長ホルモン、インターフェロン-アルファ、顆粒球コロニー刺激因子、赤血球生成因子、血液因子、インスリン、オキシントモジュリン、グルカゴン様ペプチド類、エキセンディン類及びそれぞれの誘導体またはアナログからなる群から選択される、上記1～17のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

19. 上記生理活性ポリペプチドはインスリンまたはそのアナログであり、上記生理活性ポリペプチドを改質した脂肪酸分子は脂肪酸または脂肪酸誘導体であり、上記非ペプチド重合体リンカーはポリエチレングリコールである、上記1～18のいずれか一項に記載のタンパク質結合体。

20. 上記インスリンアナログは、インスリンB鎖の8番アミノ酸、インスリンB鎖の23番アミノ酸、インスリンB鎖の24番アミノ酸、インスリンB鎖の25番アミノ酸、インスリンA鎖の1番アミノ酸、インスリンA鎖の2番アミノ酸及びインスリンA鎖の19番アミノ酸からなる群から選択された一つのアミノ酸がアラニンに置換されたり、A鎖の14番アミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギンに置換された、上記18又は上記19に記載のタンパク質結合体。

21. (a) 1つ以上の脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド及び1つ以上の免疫グロブリンFc領域を両末端に反応基を有する1つ以上の非ペプチド性重合体リンカーを通じて共有結合で連結してタンパク質結合体を製造する段階;及び

(b) 上記(a)段階を通じて製造した非ペプチド性重合体リンカーを通じて共有結合で連結された、脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド及び免疫グロブリンFc領域を必須に含み、上記非ペプチド性重合体リンカーが免疫グロブリンFc断片に結合したタンパク質結合体を分離する段階を含む、上記1～20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体の製造方法。

22. 上記非ペプチド性重合体または脂肪酸分子の反応基は、アルデヒド基、マレイミド

基及びスクシンイミド誘導体からなる群から選択される、上記21に記載の製造方法。

23．上記アルデヒド基は、プロピオンアルデヒド基またはブチルアルデヒド基である、上記22に記載の製造方法。

24．上記スクシンイミド誘導体が、スクシンイミジルカルボキシメチル、スクシンイミジル吉草酸、スクシンイミジルメチルブタン酸、スクシンイミジルメチルプロピオン酸、スクシンイミジルブタン酸、スクシンイミジルプロピオン酸、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはスクシンイミジルカルボネートである、上記22に記載の製造方法。

25．上記非ペプチド性重合体リンカーは、各末端にそれぞれアルデヒドグループ、マレイミド反応基またはスクシンイミド誘導体を有する、上記21～24のいずれか一項に記載の製造方法。

26．上記脂肪酸分子は、各末端にそれぞれアルデヒドグループ、マレイミド反応基またはスクシンイミド誘導体を有する、上記21～25のいずれか一項に記載の製造方法。

27．上記(a)段階は

(a1)非ペプチド性重合体リンカーの一方の末端に免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドのいずれか一つと共有結合で連結して連結体を製造する段階;及び

(a2)上記(a1)段階で製造した連結体を分離し、分離された連結体の脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの他方の末端に生理活性ポリペプチドまたは免疫グロブリンFc領域中の他の一つと共有結合で連結する段階を含む、上記21～26のいずれか一項に記載の製造方法。

28．上記(a1)段階で脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと非ペプチド性重合体リンカーの反応モル比は1:1～1:30であり、免疫グロブリンFc断片と非ペプチド性重合体の反応モル比が1:1～1:20である、上記27に記載の製造方法。

29．上記(a1)段階は、pH 4.0～9.0で行われることを特徴とする、上記28に記載の製造方法。

30．上記(a1)段階は、4.0～25℃で行われることを特徴とする、上記27に記載の製造方法。

31．上記(a1)段階で免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1～100mg/mlであることを特徴とする、上記27～30のいずれか一項に記載の製造方法。

32．上記(a2)段階において連結体:免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドの反応モル比が1:0.1～1:20であることを特徴とする、上記27に記載の製造方法。

33．上記(a2)段階は、pH 4.0～9.0で行われることを特徴とする、上記27又は上記32に記載の製造方法。

34．上記(a2)段階は、4.0～25℃で行われることを特徴とする、上記27又は上記32に記載の製造方法。

35．上記(a2)段階において免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1～100mg/mlであることを特徴とする、上記27～34のいずれか一項に記載の製造方法。

36．上記(a1)段階及び(a2)段階が還元剤の存在の下で行われることを特徴とする、上記27～35のいずれか一項に記載の製造方法。

37．上記還元剤が、シアノ水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaCNBH}_3$ )、水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミンホウ酸塩及びピリジンホウ酸塩からなる群から選択される、上記36に記載の製造方法。

38．上記(a2)段階において連結体を分離するために、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーから選択される精製方法を単独または複数で行う、上記27に記載の製造方法。

39．上記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基がクオータナリーアンモニウム(Q)、クオータナリーアミノエチル(QAE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ポリエチレンイ

ミン(PEI)、ジメチルアミノメチル(DMAE)、またはトリメチルアミノエチル(TMAE)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記38に記載の製造方法。

40．上記カチオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基がメチルスルホネート(S)、スルホプロピル(SP)、カルボキシメチル(CM)、ポリアスパラギン酸(Poly aspartic acid)、スルホエチル(SE)、スルホプロピル(SP)、ホスフェート(P)またはスルホネート(S)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記37に記載の製造方法。

41．上記疎水性クロマトグラフィーの樹脂の作用基がフェニル(phenyl)、オクチル(octyl)、(イソ)プロピル(iso)propyl)、ブチル(butyl)及びエチル(ethyl)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記38に記載の製造方法。

42．上記親和性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、プロテインA(proteinA)、ヘパリン(heparin)、ブルー(blue)、ベンザミジン(benzamidine)、金属イオン(コバルト、ニッケル、銅)及び脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの両末端がそれぞれ免疫グロブリンFc領域及び生理活性ポリペプチドと結合したタンパク質結合体の構成成分の一部あるいは全体に対する抗体からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記38に記載の製造方法。

43．上記サイズ排除クロマトグラフィーの樹脂がスーパーデックス(superdex)、セファクリル(sephacryl)、スーパーロース(superose)及びセファデックス(sephadex)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記38に記載の製造方法。

44．上記(b)段階のタンパク質結合体を分離する段階は、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーから選択される精製方法を単独または複数で行う、上記21に記載の製造方法。

45．上記アニオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基が、クオータナリーアンモニウム(Q)、クオータナリーアミノエチル(QAE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ポリエチレンジイミン(PEI)、ジメチルアミノメチル(DMAE)、またはトリメチルアミノエチル(TMAE)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記44に記載の製造方法。

46．上記カチオン交換クロマトグラフィー樹脂の作用基が、メチルスルホネート(S)、スルホプロピル(SP)、カルボキシメチル(CM)、ポリアスパラギン酸(Poly aspartic acid)、スルホエチル(SE)、スルホプロピル(SP)、ホスフェート(P)またはスルホネート(S)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記44に記載の製造方法。

47．上記疎水性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、フェニル(phenyl)、オクチル(octyl)、(イソ)プロピル(iso)propyl)、ブチル(butyl)及びエチル(ethyl)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記44に記載の製造方法。

48．上記親和性クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、プロテインA(proteinA)、ヘパリン(heparin)、ブルー(blue)、ベンザミジン(benzamidine)、金属イオン(コバルト、ニッケル、銅)及び非ペプチド性重合体の両末端がそれぞれ免疫グロブリンFc領域及び脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと結合したタンパク質結合体の構成成分の一部あるいは全体に対する抗体からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記44に記載の製造方法。

49．上記サイズ排除クロマトグラフィーの樹脂の作用基が、スーパーデックス(superdex)、セファクリル(sephacryl)、スーパーロース(superose)及びセファデックス(sephadex)からなる群から選択されるもののうちの一つである、上記44に記載の製造方法。

50．上記(b)段階は、タンパク質結合体を構成する脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと免疫グロブリンFc領域が免疫グロブリンFc領域のN末端を通じて結合したタンパク質結合体を分離することを特徴とする、上記21に記載の製造方法。

51．(a')非ペプチド性重合体の一方の末端に免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドのいずれか一つと共有結合で連結して連結体を製造する段階であって、脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドと非ペプチド性重合体の反応モル比は1:1~1:30であり、免疫グロブリンFc領域と非ペプチド性重合体リンカーの反応モル比が1:1~1:20であり、還元剤が1~100mMの濃度で含まれ、p

H 4.0 ~ 9.0、反応温度4.0 ~ 25 で行われ、免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1 ~ 100mg/mlである段階；

(b')上記(a')段階で製造した連結体を分離し、分離された連結体の非ペプチド性重合体リンカーの他方の末端に生理活性ポリペプチドまたは免疫グロブリンFc領域中、他の一つと共有結合で連結する段階であって、連結体と免疫グロブリンFc領域または生理活性ポリペプチドリンカーの反応モル比が1:0.1 ~ 1:20であり、還元剤が1 ~ 100mMの濃度で含まれ、p

H 4.0 ~ 9.0、反応温度4.0 ~ 25 で行われ、免疫グロブリンFc領域または脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチドの反応濃度が0.1 ~ 100mg/mlである段階；及び

(c')上記(b')段階を通じて製造した共有結合で連結された脂肪酸分子が連結されている形態の生理活性ポリペプチド、非ペプチド性重合体リンカー及び免疫グロブリンFc領域を必須的に含み、上記脂肪酸分子が免疫グロブリンFcと結合したタンパク質結合体を分離する段階を含む、上記1 ~ 20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体の製造方法。

5 2 . 上記1 ~ 20のいずれか一項に記載のタンパク質結合体を有効成分として含む生理活性ポリペプチドの生体内持続性及び安定性増加用薬学的組成物。