

【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】平成22年11月18日 (2010.11.18)

【公表番号】特表2010-505874(P2010-505874A)

【公表日】平成22年2月25日 (2010.2.25)

【年通号数】公開・登録公報2010-008

【出願番号】特願2009-531593(P2009-531593)

【国際特許分類】

C 0 7 K 1/20 (2006.01)

C 0 7 K 1/18 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 38/22 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 1/20

C 0 7 K 1/18

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 37/24

A 6 1 P 7/06

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年9月16日 (2010.9.16)

【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】

第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む組成物を製造する方法であって、前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートが、前記第 1 のポリペプチドに共有結合した第 1 の数のポリ(アルキレンオキシド)部分を含み、前記方法が、

(a) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)媒体と接触させること；および

(b) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から溶出させること

を含み、それによって前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む前記組成物を製造する方法。

【請求項 2】

前記混合物が第 2 のポリペプチドコンジュゲートを含み、前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートが、前記第 2 のポリペプチドに共有結合した第 2 の数のポリ(アルキレンオキシド)部分を含み、前記第 1 の数と前記第 2 の数が異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドが同一のアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートが第 1 のグリコシル化パターンを含み、前記第

1 のグリコシル化パターンが、前記第 1 のポリペプチドに共有結合した少なくとも 1 つのグリカン残基を含み、各グリカン残基が前記ポリ（アルキレンオキシド）部分のうちの少なくとも 1 つに場合によって結合している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、O - 結合または N - 結合グリカン残基を介して前記第 1 のポリペプチドに共有結合している、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記混合物が、第 3 のポリペプチドに共有結合した第 3 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含む第 3 のポリペプチドコンジュゲートを含み、前記第 3 のポリペプチドコンジュゲートが、第 2 のグリコシル化パターンを含み、前記第 2 のグリコシル化パターンが、前記少なくとも 1 つのグリカン残基の少なくとも 1 つのグリコシル部分により前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートの前記第 1 のグリコシル化パターンとは異なる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートの前記グリコシル化パターンが、実質的に一定の昆虫特異的グリコシル化パターンである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 H I C 媒体が、ブチル樹脂およびフェニル樹脂から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、ポリ（エチレングリコール）部分およびポリ（プロピレングリコール）部分から独立して選択されるメンバーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、約 1 k D a から約 2 0 0 k D a の間の分子量を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のポリペプチドが治療用ポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 のポリペプチドが、骨形成タンパク質 2（B M P - 2）、骨形成タンパク質 7（B M P - 7）、骨形成タンパク質 1 5（B M P - 1 5）、ニューロトロフィン - 3（N T - 3）、フォンウィルブランド因子（v W F）プロテアーゼ、顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、 γ - アンチトリプシン（ α - 1 プロテアーゼ阻害因子）、グルコセレブロシダーゼ、組織型プラスミノゲン活性化因子（T P A）、インターロイキン - 2（I L - 2）、レプチン、ヒルジン、ウロキナーゼ、ヒト D N a s e、インスリン、B 型肝炎表面タンパク質（H b s A g）、キメラジフテリア毒素 - I L 2、ヒト成長ホルモン（h G H）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（h C G）、甲状腺ペルオキシダーゼ（T P O）、アルファ - ガラクトシダーゼ、アルファ - L - イズロニダーゼ、ベータ - グルコシダーゼ、アルファ - ガラクトシダーゼ A、酸 - グルコシダーゼ（酸マルターゼ）、抗トロンピン I I I（A T I I I）、卵胞刺激ホルモン（F S H）、グルカゴン様ペプチド - 1（G L P - 1）、グルカゴン様ペプチド - 2（G L P - 2）、線維芽細胞成長因子 7（F G F - 7）、線維芽細胞成長因子 2 1（F G F - 2 1）、線維芽細胞成長因子 2 3（F G F - 2 3）、因子 V I I、因子 V I I I、B - ドメイン欠失因子 V I I I、完全長因子 V I I I を有する v W F - 因子 V I I I 融合タンパク質、B - ドメイン欠失因子 V I I I を有する v W F - 因子 V I I I 融合タンパク質、因子 I X、因子 X、因子 X I I I、プロキネチシン、エクステンジン - 4、C D 4、腫瘍壊死因子受容体（T N F - R）、 α - C D 2 0、P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1（P S G L - 1）、補体、トランスフェリン、グリコシル化依存細胞接着分子（G l y C A M）、神経細胞接着分子（N - C A M）、T N F 受容体 - I g G F c 領

域融合タンパク質、抗HER2モノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスに対するモノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質Fに対するモノクローナル抗体、TNF- α に対するモノクローナル抗体、糖タンパク質IIb/IIaに対するモノクローナル抗体、CD20に対するモノクローナル抗体、VEGF-Aに対するモノクローナル抗体、PSGL-1に対するモノクローナル抗体、CD4に対するモノクローナル抗体、 α -CD3に対するモノクローナル抗体、EGFに対するモノクローナル抗体、癌胎児性抗原(CEA)に対するモノクローナル抗体およびIL-2受容体に対するモノクローナル抗体から選択されるメンバーである、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記第1のポリペプチドがEPOである、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記EPOが、3つのポリ(エチレングリコール)部分に共有結合している、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記3つのポリ(エチレングリコール)部分のうちの少なくとも2つが、N-結合グリカンを通して前記EPOに共有結合している、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記EPOが配列番号1によるアミノ酸配列を含み、前記配列が、Arg¹³⁹からAla¹³⁹、Arg¹⁴³からAla¹⁴³、およびLys¹⁵⁴からAla¹⁵⁴からなる群から選択される少なくとも1つの変異を場合によって有する、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

前記ポリ(アルキレンオキシド)部分のうちの少なくとも1つが、グリコシル結合基を通して前記第1のポリペプチドに共有結合しており、前記グリコシル結合基が、前記第1のポリペプチドのアミノ酸残基に共有結合しているか、または前記第1のポリペプチドのグリコシル部分に共有結合している、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記グリコシル結合基が完全形のグリコシル結合基である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記完全形のグリコシル結合基が、GlcNH部分、GlcNAc部分、およびシアル酸部分から選択されるメンバーである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

(c) 前記第1のポリペプチドコンジュゲートをアニオン交換クロマトグラフィー媒体から溶出させること

をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

ステップ(c)がステップ(a)の前に実施される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

(d) 前記第1のポリペプチドコンジュゲートをカチオン交換クロマトグラフィー媒体から溶出させること

をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

ステップ(d)がステップ(b)の後に実施される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記第1のポリペプチドと、ポリ(アルキレンオキシド)部分に共有結合したグリコシル部分を有する修飾糖ヌクレオチドとを、グリコシルトランスフェラーゼの存在下、前記グリコシルトランスフェラーゼが前記グリコシル部分と前記第1のポリペプチドとの間に共有結合を形成するのに十分な条件下で、接触させることをさらに含み、それによって前記第1のポリペプチドコンジュゲートを形成する、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記グリコシル部分がシアル酸部分であり、前記グリコシルトランスフェラーゼがシアルトランスフェラーゼである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

昆虫細胞中で前記第 1 のポリペプチドを組換え発現させることをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

第 1 のポリペプチドに共有結合した第 1 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含む前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを、第 2 のポリペプチドに共有結合した第 2 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含む前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートから単離する方法であって、前記第 1 の数が 1 ～ 20 から選択され、前記第 2 の数が 0 ～ 20 から選択され、前記第 1 の数と前記第 2 の数とが異なり、前記方法が、

（a）前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートおよび前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートを含む混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）媒体と接触させること；および

（b）前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から溶出させること

を含み、それによって前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートから単離する方法。

【請求項 28】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、ポリ（エチレングリコール）部分およびポリ（プロピレングリコール）部分から独立して選択されるメンバーである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、約 1 kDa から約 200 kDa の間の独立して選択される分子量を有する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 のポリペプチドと前記第 2 のポリペプチドが同一のアミノ酸配列を有する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 のポリペプチドが治療用ポリペプチドである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 1 のポリペプチドが、骨形成タンパク質 2（BMP-2）、骨形成タンパク質 7（BMP-7）、骨形成タンパク質 15（BMP-15）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、フォンウィルブランド因子（vWF）プロテアーゼ、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、 γ_1 -アンチトリプシン（ α_1 -1プロテアーゼ阻害因子）、グルコセレブロシダーゼ、組織型プラスミノゲン活性化因子（TPA）、インターロイキン-2（IL-2）、レプチン、ヒルジン、ウロキナーゼ、ヒトDNase、インスリン、B型肝炎表面タンパク質（HbsAg）、キメラジフテリア毒素-IL-2、ヒト成長ホルモン（hGH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、アルファ-ガラクトシダーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ A、酸-グルコシダーゼ（酸マルターゼ）、抗トロンビンIII（ATIII）、卵巣刺激ホルモン（FSH）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2）、線維芽細胞成長因子 7（FGF-7）、線維芽細胞成長因子 21（FGF-21）、線維芽細胞成長因子 23（FGF-23）、因子VII、因子VIIII、B-ドメイン欠失因子VIIII、完全長因子VIIIIを有するvWF-因子VIIII融合タンパク質、B-ドメイン欠失因子VIIIIを有するvWF-因子VIIII融合タンパク質、因子IX、因子X、因子XIII、プロキネチシン、エクステンジン-4、CD4、腫瘍壊死因子受容体（TNF-R）、CD20、P-セレクチン糖タンパク質

リガンド - 1 (P S G L - 1)、補体、トランスフェリン、グリコシル化依存細胞接着分子 (G l y C A M)、神経細胞接着分子 (N - C A M)、T N F 受容体 - I g G F c 領域融合タンパク質、抗 H E R 2 モノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスに対するモノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質 F に対するモノクローナル抗体、T N F - に対するモノクローナル抗体、糖タンパク質 I I b / I I I a に対するモノクローナル抗体、C D 2 0 に対するモノクローナル抗体、V E G F - A に対するモノクローナル抗体、P S G L - 1 に対するモノクローナル抗体、C D 4 に対するモノクローナル抗体、a - C D 3 に対するモノクローナル抗体、E G F に対するモノクローナル抗体、癌胎児性抗原 (C E A) に対するモノクローナル抗体および I L - 2 受容体に対するモノクローナル抗体から選択されるメンバーである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第 1 のポリペプチドが E P O である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 E P O が、3 つのポリ (エチレングリコール) 部分に共有結合している、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 3 つのポリ (エチレングリコール) 部分のうちの少なくとも 2 つが、N - 結合グリカンを通じて前記 E P O に共有結合している、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 E P O が配列番号 1 によるアミノ酸配列を含み、前記配列が、A r g ^{1 3 9} から A l a ^{1 3 9}、A r g ^{1 4 3} から A l a ^{1 4 3}、および L y s ^{1 5 4} から A l a ^{1 5 4} からなる群から選択される少なくとも 1 つの変異を場合によって有する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 H I C 媒体が、ブチル樹脂およびフェニル樹脂から選択されるメンバーである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記ポリ (アルキレンオキシド) 部分のうちの少なくとも 1 つが、グリコシル結合基を通じて前記第 1 のポリペプチドに接続しており、前記グリコシル結合基が、前記第 1 のポリペプチドのアミノ酸残基に共有結合しているか、または前記第 1 のポリペプチドのグリコシル部分に共有結合している、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記グリコシル結合基が完全形のグリコシル結合基である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記完全形のグリコシル結合基が、G l c N H 部分、G l c N A c 部分、およびシアル酸部分から選択されるメンバーである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

(c) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートをアニオン交換クロマトグラフィー媒体から溶出させること

をさらに含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

ステップ (c) がステップ (a) の前に実施される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

(d) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記カチオン交換クロマトグラフィー媒体から溶出させること

をさらに含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 4 4】

ステップ (d) がステップ (b) の後に実施される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートが、実質的に一定の昆虫特異的グリコシル化バ

ターンを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 46】

前記第 1 のポリペプチドと、ポリ（アルキレンオキシド）部分に共有結合したグリコシル部分を有する修飾糖ヌクレオチドとを、グリコシルトランスフェラーゼの存在下、前記グリコシルトランスフェラーゼが前記グリコシル部分と前記第 1 のポリペプチドとの間に共有結合を形成するのに十分な条件下で、接触させることをさらに含み、それによって前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを形成する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 47】

前記グリコシル部分がシアル酸部分であり、前記グリコシルトランスフェラーゼがシアリルトランスフェラーゼである、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

昆虫細胞中で前記第 1 のポリペプチドを組換え発現させることをさらに含み、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記第 1 のポリペプチドとヌクレオチド糖とを、ヌクレオチド糖が基質である酵素の存在下、前記酵素が前記ヌクレオチド糖の前記糖と前記第 1 のポリペプチドとの間に共有結合を形成するのに十分な条件下で、接触させることをさらに含み、前記第 1 のポリペプチドが、グリコシル化および非グリコシル化から選択されるメンバーである、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

第 1 のエリスロポエチン（EPO）コンジュゲートを含む組成物を形成する方法であって、前記第 1 の EPO コンジュゲートが、前記 EPO に共有結合した第 1 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含み、前記方法が、

（a）前記第 1 の EPO コンジュゲートを含む混合物をアニオン交換媒体と接触させること；

（b）前記第 1 の EPO コンジュゲートを前記アニオン交換媒体から溶出させて、前記第 1 の EPO コンジュゲートを含む第 1 の溶出液を形成すること；

（c）前記第 1 の溶出液を疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）媒体と接触させること；および

（d）前記第 1 の EPO コンジュゲートを前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から溶出させること

を含み、それによって前記第 1 の EPO コンジュゲートを含む組成物を形成する方法。

【請求項 51】

前記ステップ（a）の混合物が、前記 EPO に共有結合した第 2 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を有する第 2 の EPO コンジュゲートを含み、前記第 1 の数と前記第 2 の数とが異なる、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記第 1 の数が 3 であり、前記第 2 の数が 0、1、2 および 4 から選択されるメンバーである、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記第 2 の EPO コンジュゲートが、前記組成物中に約 10% 未満の濃度で存在する、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 54】

前記 HIC 媒体が、ブチル樹脂およびフェニル樹脂から選択されるメンバーである、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 55】

前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、ポリ（エチレングリコール）部分およびポリ（プロピレングリコール）部分から独立して選択されるメンバーである、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 56】

前記ポリ(アルキレンオキシド)部分の各々が、約1 kDaから約200 kDaの間の独立して選択される分子量を有する、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記第1のEPOコンジュゲートが、3つのポリ(エチレングリコール)部分を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項58】

前記3つのポリ(エチレングリコール)部分のうちの少なくとも2つが、N-結合グリカンを経して前記EPOに共有結合している、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記EPOが配列番号1によるアミノ酸配列を含み、前記配列が、Arg¹³⁹からAla¹³⁹、Arg¹⁴³からAla¹⁴³、およびLys¹⁵⁴からAla¹⁵⁴からなる群から選択される少なくとも1つの変異を場合によって有する、請求項50に記載の方法。

【請求項60】

前記EPOコンジュゲートが、グリコシル結合基を経して前記EPOに共有結合している少なくとも1つのポリ(アルキレンオキシド)部分を含み、前記グリコシル結合基が、前記EPOのアミノ酸残基に共有結合しているか、または前記EPOのグリコシル部分に共有結合している、請求項50に記載の方法。

【請求項61】

前記グリコシル結合基が完全形のグリコシル結合基である、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

前記完全形のグリコシル結合基が、GlcNH部分、GlcNAc部分、およびシアル酸部分から選択されるメンバーである、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

(e) 前記第1のEPOコンジュゲートをカチオン交換クロマトグラフィー媒体から溶出させること

をさらに含む、請求項50に記載の方法。

【請求項64】

ステップ(e)がステップ(d)の後に実施される、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記EPOが、実質的に一定の昆虫特異的グリコシル化パターンを含む、請求項50に記載の方法。

【請求項66】

前記EPOと、ポリ(アルキレンオキシド)部分に共有結合したグリコシル部分を有する修飾糖ヌクレオチドとを、グリコシルトランスフェラーゼの存在下、前記グリコシルトランスフェラーゼが前記グリコシル部分と前記EPOとの間に共有結合を形成するのに十分な条件下で、接触させることをさらに含む、それによって前記第1のEPOコンジュゲートを形成する、請求項50に記載の方法。

【請求項67】

前記グリコシル部分がシアル酸部分であり、前記グリコシルトランスフェラーゼがシアリルトランスフェラーゼである、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

昆虫細胞中で前記EPOを組換え発現させることをさらに含む、それによって前記EPOを含む昆虫細胞培養液を形成する、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

前記EPOを前記昆虫細胞培養液から単離することをさらに含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

単一の反応容器中で、前記EPOとヌクレオチド-N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)分子とヌクレオチドガラクトース(Gal)分子とを、GnT1およびGnT2

から選択される N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ、およびガラクトシルトランスフェラーゼの存在下、前記 N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼおよび前記ガラクトシルトランスフェラーゼが前記 E P O に共有結合した末端 - G l c N A c - G a l 部分を形成するのに十分な条件下で、接触させることをさらに含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 1】

第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む組成物であって、前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートが、第 1 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含み、前記ポリ（アルキレンオキシド）部分の各々が、完全形のグリコシル結合基を介して前記第 1 のポリペプチドに共有結合しており、前記組成物が、

（ a ）前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ H I C ）媒体と接触させること；および

（ b ）前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から溶出させ、それによって前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを含む前記組成物を製造すること

を含む方法により製造され、

前記第 1 のポリペプチドが、エリスロポエチン（ E P O ）、骨形成タンパク質 2（ B M P - 2 ）、骨形成タンパク質 7（ B M P - 7 ）、骨形成タンパク質 1 5（ B M P - 1 5 ）、ニューロトロフィン - 3（ N T - 3 ）、フォンウィルブランド因子（ v W F ）プロテアーゼ、顆粒球コロニー刺激因子（ G - C S F ）、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（ G M - C S F ）、インターフェロナルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、 γ - アンチトリプシン（ α - 1 プロテアーゼ阻害因子）、グルコセレブロシダーゼ、組織型プラスミノゲン活性化因子（ T P A ）、インターロイキン - 2（ I L - 2 ）、レプチン、ヒルジン、ウロキナーゼ、ヒト D N a s e、インスリン、B 型肝炎表面タンパク質（ H b s A g ）、キメラジフテリア毒素 - I L 2、ヒト成長ホルモン（ h G H ）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ h C G ）、甲状腺ペルオキシダーゼ（ T P O ）、アルファ - ガラクトシダーゼ、アルファ - L - イズロニダーゼ、ベータ - グルコシダーゼ、アルファ - ガラクトシダーゼ A、酸 - グルコシダーゼ（酸マルターゼ）、抗トロンビン I I I（ A T I I I ）、卵胞刺激ホルモン（ F S H ）、グルカゴン様ペプチド - 1（ G L P - 1 ）、グルカゴン様ペプチド - 2（ G L P - 2 ）、線維芽細胞成長因子 7（ F G F - 7 ）、線維芽細胞成長因子 2 1（ F G F - 2 1 ）、線維芽細胞成長因子 2 3（ F G F - 2 3 ）、因子 X、因子 X I I I、プロキネチシン、エクステンジン - 4、C D 4、腫瘍壊死因子受容体（ T N F - R ）、 α - C D 2 0、P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1（ P S G L - 1 ）、補体、トランスフェリン、グリコシル化依存細胞接着分子（ G l y C A M ）、神経細胞接着分子（ N - C A M ）、T N F 受容体 - I g G F c 領域融合タンパク質、抗 H E R 2 モノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスに対するモノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質 F に対するモノクローナル抗体、T N F - α に対するモノクローナル抗体、糖タンパク質 I I b / I I I a に対するモノクローナル抗体、C D 2 0 に対するモノクローナル抗体、V E G F - A に対するモノクローナル抗体、P S G L - 1 に対するモノクローナル抗体、C D 4 に対するモノクローナル抗体、 α - C D 3 に対するモノクローナル抗体、E G F に対するモノクローナル抗体、癌胎児性抗原（ C E A ）に対するモノクローナル抗体および I L - 2 受容体に対するモノクローナル抗体から選択されるメンバーである組成物。

【請求項 7 2】

請求項 7 1 に記載の組成物および薬学的に許容できる担体を含む医薬製剤。

【請求項 7 3】

第 1 のポリペプチドに共有結合した第 1 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含む前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを、前記第 2 のポリペプチドに共有結合した第 2 の数のポリ（アルキレンオキシド）部分を含む第 2 のポリペプチドコンジュゲートから単離することを含む方法により製造された、単離された前記第 1 のポリペプチドコンジュゲ

ートであって、前記第 1 の数が 1 ~ 20 から選択され、前記第 2 の数が 0 ~ 20 から選択され、前記第 1 の数と前記第 2 の数とが異なり、前記単離が、

(a) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートおよび前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートを含む混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 媒体と接触させること；および

(b) 前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から溶出させ、それによって前記第 1 のポリペプチドコンジュゲートを前記第 2 のポリペプチドコンジュゲートから分離すること

を含み、前記第 1 のポリペプチドが、エリスロポエチン (EPO)、骨形成タンパク質 2 (BMP-2)、骨形成タンパク質 7 (BMP-7)、骨形成タンパク質 15 (BMP-15)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、フォンウィルブランド因子 (vWF) プロテアーゼ、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、 γ_1 -アンチトリプシン (γ_1 -1 プロテアーゼ阻害因子)、グルコセレブロシダーゼ、組織型プラスミノゲン活性化因子 (TPA)、インターロイキン-2 (IL-2)、レプチン、ヒルジン、ウロキナーゼ、ヒト DNase、インスリン、B 型肝炎表面タンパク質 (HbsAg)、キメラジフテリア毒素-IL-2、ヒト成長ホルモン (hGH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、アルファ-ガラクトシダーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼ A、酸-グルコシダーゼ (酸マルターゼ)、抗トロンピン III (ATIII)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)、線維芽細胞成長因子 7 (FGF-7)、線維芽細胞成長因子 21 (FGF-21)、線維芽細胞成長因子 23 (FGF-23)、因子 X、因子 XIII、プロキネチシン、エクステンジン-4、CD4、腫瘍壊死因子受容体 (TNF-R)、 α -CD20、P-セレクトリン糖タンパク質リガンド-1 (PSGL-1)、補体、トランスフェリン、グリコシル化依存細胞接着分子 (GlyCAM)、神経細胞接着分子 (NCAM)、TNF 受容体-IgGFc 領域融合タンパク質、抗 HER2 モノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスに対するモノクローナル抗体、呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質 F に対するモノクローナル抗体、TNF- α に対するモノクローナル抗体、糖タンパク質 IIb/IIIa に対するモノクローナル抗体、CD20 に対するモノクローナル抗体、VEGF-A に対するモノクローナル抗体、PSGL-1 に対するモノクローナル抗体、CD4 に対するモノクローナル抗体、 α -CD3 に対するモノクローナル抗体、EGF に対するモノクローナル抗体、癌胎児性抗原 (CEA) に対するモノクローナル抗体および IL-2 受容体に対するモノクローナル抗体から選択されるメンバーである単離された第 1 のポリペプチドコンジュゲート。

【請求項 74】

請求項 73 に記載された単離されたポリペプチドコンジュゲートおよび薬学的に許容できる担体を含む医薬製剤。

【請求項 75】

第 1 のエリスロポエチン (EPO) コンジュゲートを含む組成物であって、前記第 1 の EPO コンジュゲートが、完全形のグリコシル結合基を介して前記 EPO に共有結合した第 1 の数のポリ (アルキレンオキシド) 部分を含み、前記組成物が、

(a) 前記第 1 の EPO コンジュゲートを含む混合物をアニオン交換媒体と接触させること；

(b) 前記第 1 の EPO コンジュゲートを前記アニオン交換媒体から溶出させて、前記第 1 の EPO コンジュゲートを含む第 1 の溶出液を形成すること；

(c) 前記第 1 の溶出液を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 媒体と接触させること；および

(d) 前記疎水性相互作用クロマトグラフィー媒体から前記第 1 の EPO コンジュゲートを溶出させること

を含む方法によって製造される組成物。

【請求項 7 6】

請求項 7 5 に記載の組成物および薬学的に許容できる担体を含む医薬製剤。

【請求項 7 7】

赤血球産生不全を特徴とする状態を治療するための医薬製剤であって、前記状態を寛解させるのに有効な量の請求項 7 1 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 7 8】

赤血球産生不全を特徴とする状態を治療するための医薬製剤であって、前記状態を寛解させるのに有効な量の請求項 7 3 に記載の単離されたポリペプチドコンジュゲートを含む医薬製剤。

【請求項 7 9】

赤血球産生不全を特徴とする状態を治療するための医薬製剤であって、前記状態を寛解させるのに有効な量の請求項 7 5 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 8 0】

組織傷害を治療するための医薬製剤であって、前記傷害が、虚血、外傷、炎症および毒性物質との接触から選択されるメンバーにより引き起こされ、前記組織傷害に関連する損傷を寛解させるのに有効な量の請求項 7 1 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 8 1】

組織傷害を治療するための医薬製剤であって、前記傷害が、虚血、外傷、炎症および毒性物質との接触から選択されるメンバーにより引き起こされ、前記組織傷害に関連する損傷を寛解させるのに有効な量の請求項 7 3 に記載の単離されたポリペプチドコンジュゲートを含む医薬製剤。

【請求項 8 2】

組織傷害を治療するための医薬製剤であって、前記傷害が、虚血、外傷、炎症および毒性物質との接触から選択されるメンバーにより引き起こされ、前記組織傷害に関連する損傷を寛解させるのに有効な量の請求項 7 5 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 8 3】

哺乳動物において赤血球産生を増強するための医薬製剤であって、請求項 7 1 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 8 4】

哺乳動物において赤血球産生を増強するための医薬製剤であって、請求項 7 3 に記載の単離されたポリペプチドコンジュゲートを含む医薬製剤。

【請求項 8 5】

哺乳動物において赤血球産生を増強するための医薬製剤であって、請求項 7 5 に記載の組成物を含む医薬製剤。