

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-520241

(P2017-520241A)

(43) 公表日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/24	(2006.01)	C 1 2 N	9/24	Z N A
C 1 2 N 9/26	(2006.01)	C 1 2 N	9/26	Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
				4 B O 5 O

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2016-569720 (P2016-569720)	(71) 出願人	596118493
(86) (22) 出願日	平成27年5月27日 (2015. 5. 27)		アカデミア シニカ
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月23日 (2017. 1. 23)		ACADEMIA SINICA
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/032744		台湾, タイペイ 11529, ナンカン,
(87) 国際公開番号	W02015/184008		アカデミア ロード 128, セクション
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015. 12. 3)		2
(31) 優先権主張番号	62/003, 136		128 Sec 2, Academia
(32) 優先日	平成26年5月27日 (2014. 5. 27)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/003, 104	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成26年5月27日 (2014. 5. 27)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	62/003, 908		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成26年5月28日 (2014. 5. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

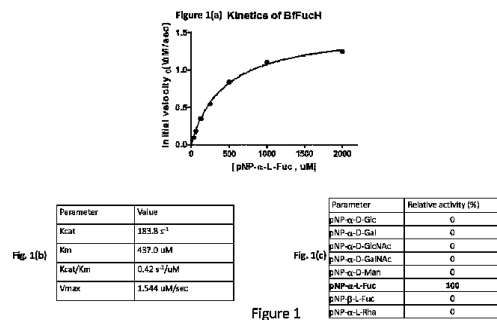
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Bacteroides由来のフコシダーゼおよびそれを使用する方法

(57) 【要約】

本開示は、 - ( 1 , 2 )、 - ( 1 , 3 )、 - ( 1 , 4 )、および - ( 1 , 6 ) フコシダーゼ活性を有する - フコシダーゼに関する。本開示は、 - フコシダーゼを含む組成物、ならびに - フコシダーゼを作製し、複合糖質における - ( 1 , 2 )、 - ( 1 , 3 )、 - ( 1 , 4 )、および/または - ( 1 , 6 ) 結合型フコースの切断において - フコシダーゼを使用する方法にも関する。したがって、本発明は、 *in vitro* でのフコースの改善された酵素加水分解のための組成物および方法を提供する。特に、本発明は、糖タンパク質の変性も機能悪化も起こさずに、天然糖タンパク質におけるコアフコースを効率的に切断するのに有用である。本発明の組成物および方法は、Fc融合タンパク質または治療用抗体などの抗体のFc糖鎖工学を促進し得る。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 または配列番号 2 との少なくとも 85% の配列同一性を有するポリペプチドを含む - フコシダーゼ、および少なくとも 1 つのグリコシダーゼを含む組成物。

## 【請求項 2】

前記 - フコシダーゼが配列番号 1 または配列番号 2 との少なくとも 88% の配列同一性を有する単離ポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記 - フコシダーゼが配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、請求項 1 から 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記 - フコシダーゼが配列番号 2 に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、請求項 1 から 2 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記グリコシダーゼがエンドグリコシダーゼである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記エンドグリコシダーゼが、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、EndoA、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、およびそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 4 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記グリコシダーゼがエキソグリコシダーゼである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記酵素が組換え *Bacteroides* - L - フコシダーゼである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記酵素が、複合糖質における N - および / または O - 結合型グリカン中に存在する - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および - (1, 6) 結合型フコースを加水分解し得る、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記 - フコシダーゼが 4 ~ 9 の最適 pH を有する、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

複合糖質における 1 つまたは複数のフコースを除去するための方法であって、前記複合糖質を、配列番号 1 または配列番号 2 との少なくとも 85% の配列同一性を有するポリペプチドを含む - フコシダーゼと接触させることを含む方法。

## 【請求項 12】

前記 - フコシダーゼが、配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 - フコシダーゼが、配列番号 2 に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記複合糖質が、 - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および - (1, 6) 結合型フコースから選択される 1 つまたは複数のフコースを含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記 - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および / または - (1, 6) 結合型フコースが、複合糖質における N - および / または O - 結合型グリカン中に存在する、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記複合糖質が糖脂質、糖タンパク質、オリゴ糖、または糖ペプチドである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記複合糖質が糖タンパク質である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記糖タンパク質がコアフコースを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記コアフコースがコア - (1, 3) 結合型フコースまたはコア - (1, 6) 結合型フコースである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

1 つまたは複数のエンドグリコシダーゼをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 21】

1 つまたは複数のエンドグリコシダーゼが、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、EndoA、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、およびそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年5月27日に提出された米国仮出願連続番号第 (USSN) 62 / 003, 136号、2014年5月27日に提出されたUSSN 62 / 003, 104号、2014年5月28日に提出されたUSSN 62 / 003, 908号、2014年7月2日に提出されたUSSN 62 / 020, 199号および2015年1月30日に提出されたUSSN 62 / 110, 338号への優先権の利益を主張する。これらそれぞれの内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

フコースは、複合糖質の多くのO - またはN - 結合型オリゴ糖構造体の重要な構成成分である。フコース含有グリカンは、発達およびアポトーシスを含めた多数の生物学的事象に参与しており、炎症、がん、および嚢胞性線維症の病理に参与している。複合糖質の脱フコシル化は、複合糖質の生物学的効果を理解するための重要なプロセスである。

【0003】

- L - フコシダーゼ ( - フコシダーゼ) は、主にガラクトースまたはN - アセチルグルコサミンに付加されているフコースの - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および - (1, 6) 結合を加水分解することによる、複合糖質の非還元末端からのフコース残基の除去を司るエキソグリコシダーゼである。

【0004】

ヒト血清IgGと治療用抗体はいずれも重度にフコシル化されていることが周知である。抗体依存性細胞傷害 (ADCC) は、治療用抗体の臨床的有効性を司る重要なエフェクター機能の1つであることが見出された。ADCCは、抗体Fc領域へのリンパ球受容体 (FcγR) の結合が引き金になって開始される。ADCC活性は、 - (1, 6) 結合を介してN - 結合型Fcオリゴ糖の最も内側のGlcNAcに付加されているフコースの量に依存する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

したがって、本発明は、in vitroでのフコースの改善された酵素加水分解のための組成物および方法を提供する。特に、本発明は、糖タンパク質の変性も機能悪化も起こさずに、天然糖タンパク質におけるコアフコースを効率的に切断するのに有用である。

10

20

30

40

50

本発明の組成物および方法は、Fc融合タンパク質または治療用抗体などの抗体のFc糖鎖工学を促進し得る。本発明によって、複合糖質上のフコース位置を識別するためのグリカン配列決定の応用を提供する。複合糖質は、糖脂質、糖タンパク質、オリゴ糖、または糖ペプチドであり得る。

【0006】

一態様では、本発明は、配列番号1との少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む - フコシダーゼに関する。一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号1との少なくとも88%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号1との配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号2との配列同一性を有するポリペプチドを含む。配列番号1および2は、88%の配列同一性を共有する。

10

【0007】

本明細書に記載されたフコシダーゼは、1つまたは複数の (1, 2)、 (1, 3)、 (1, 4)、および (1, 6) 結合型フコースを加水分解し得る。フコースは、複合糖質におけるN-および/またはO-結合型グリカン中に存在し得る。ある特定の実施形態では、 - フコシダーゼは、組換え *Bacteroides* - フコシダーゼである。

【0008】

好ましい実施形態では、 - フコシダーゼは、4~9の最適pHを示す。

【0009】

別の態様では、本発明は、上記の - フコシダーゼを含む組成物に関する。組成物は、少なくとも1つのグリコシダーゼをさらに含み得る。一部の実施形態では、グリコシダーゼは、エキソグリコシダーゼであり得る。エキソグリコシダーゼは、シアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、アルファ - フコシダーゼ、およびそれらの変異体を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、グリコシダーゼは、エンドグリコシダーゼであり得る。エンドグリコシダーゼは、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、Endo A、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo H、Endo M、Endo S、およびそれらの変異体を含むが、これらに限定されない。

20

【0010】

本発明の組成物は、*in vitro*での複合糖質の脱フコシル化を行うのに有用である。特に、本明細書に記載された組成物は、*in vitro*での糖タンパク質のコア脱フコシル化を行うのに有用である。一部の実施形態では、コア脱フコシル化は、コア (1, 6) 脱フコシル化である。ある特定の実施形態では、コア脱フコシル化は、コア (1, 3) 脱フコシル化である。脱フコシル化は、糖タンパク質の変性も機能悪化も起こさずに行われ得る。

30

【0011】

本発明の別の態様は、*in vitro*での複合糖質の脱フコシル化を行うための方法を提供する。本発明の方法は、複合糖質を、上記の本発明の - フコシダーゼと接触させるステップを含む。複合糖質は、 (1, 2)、 (1, 3)、 (1, 4)、および (1, 6) 結合型フコースから選択される1つまたは複数のフコースを含む。フコースは、複合糖質におけるN-および/またはO-結合型グリカン中に存在し得る。

40

【0012】

一部の実施形態では、複合糖質は、糖タンパク質である。一部の実施形態では、糖タンパク質は、コアフコースを含む。一部の実施形態では、コアフコースは、コア - (1, 3) 結合型フコースまたはコア - (1, 6) 結合型フコースである。

【0013】

一部の実施形態では、本方法は、複合糖質を、少なくとも1つのグリコシダーゼと接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、グリコシダーゼは、エンドグリコシダーゼである。エンドグリコシダーゼは、N-グリカンにおけるオリゴ糖の可変部分を切り取るために使用される。本明細書で使用されるエンドグリコシダーゼの例は、エンド -

50

ベータ-N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、Endo A、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo H、Endo M、Endo S、およびそれらの変異体を含むが、これらに限定されない。エキソグリコシダーゼ

【0014】

コア脱フコシル化に関して、複合糖質は、逐次または同時にエンドグリコシダーゼおよび - フコシダーゼで処理され得る。コア脱フコシル化は、コア (1, 3) 脱フコシル化または (1, 6) 脱フコシル化であり得る。

【0015】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の説明に記載されている。本発明の他の特性または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、および添付の特許請求の範囲からも明らかとなる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、BfFucHの生化学的性質を示す。

【0017】

【図2】図2(a)は、BfFucHのpHプロファイル、(b)は、BfFucHの酵素活性に及ぼす温度効果、(c)は、BfFucHの酵素活性に及ぼす金属イオン効果を示す。

【0018】

【図3】図3は、リツキサンに関するBfFucH処理の時間経過を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

非フコシル化抗体は、著しく増加した親和性でFcγRIII受容体に結合するので、Fcグリカンにコアフコース残基が無いことによって、IgGのADCC活性が実質的に増加することが公知である。FcγRIII結合およびADCCを改善するために、(1, 6)フコシルトランスフェラーゼの発現レベルを無効にするまたは低減させる産生細胞株の開発を含めた、いくつかの戦略が、IgGのフコシル化を低減させるために開発された。フコシル化を低減させるための代替の戦略は、RNAiを使用して(1, 6)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子をサイレンシングすることを含む。しかしながら、N-グリカンのコア脱フコシル化は、*in vitro*で酵素的に達成されることができていないが、これは、主に、N-グリカンが2つのFcドメイン間に埋め込まれているからである。酵素脱フコシル化効率は、立体障害によりはるかに低い。すなわち、フコース残基への - フコシダーゼの接近は、Fcドメインの部分によってブロックされている。

30

【0020】

いくつかの - フコシダーゼが当技術分野で公知である。例は、Turbo cornutus、Charonia lampas、Bacillus fulminans、Aspergillus niger、Clostridium perfringens、ウシの腎臓 (Glyko)、ニワトリの肝臓 (Tyagarajanら、1996年、Glycobiology 6巻: 83~93頁)からの - フコシダーゼおよびXanthomonas manihotis (Glyko、PROzyme)からの - フコシダーゼIIを含む。また、一部のフコシダーゼは、市販されている (特に、Glyko、Novato、Calif.; PROzyme、San Leandro、Calif.; Calbiochem-Novabiochem Corp.、San Diego、Calif.)。これらの - フコシダーゼのいずれも、まず糖タンパク質を変性させることなしには、N-結合型グリカンからコアフコースを効率的に切断することができない。

40

【0021】

WO2013/12066は、ウシの腎臓からの - フコシダーゼによる (Fuc 1, 6) GlcNAc-リツキシマブの脱フコシル化を開示した。WO2013/12066に記載されているように、(Fuc 1, 6) GlcNAc-リツキシマブの反応混合

50

物を、37 で20日間、ウシの腎臓からの  $\alpha$ -フコシダーゼ (Prozymeから市販されている) とインキュベートすることで、(Fuc 1, 6) GlcNAc-リッキシマブにおけるフコースを完全に除去した。免疫グロブリンの熱不安定は、当技術分野で公知である (Vermeerら、Biophys J. Jan 78巻: 394~404頁 (2000年))。Fab断片は、加熱処理に最も感受性である一方、Fc断片は、pHの減少に最も感受性である。WO2013/12066に記載されているような、37 で20日間などの長期の熱処理後に抗体がCD20への結合親和性を著しく失うことになると考えられている。

【0022】

現在公知の  $\alpha$ -フコシダーゼの制約は、いくつかのN-結合型グリカンの効果的な操作を妨げた。したがって、ヒト治療学の発達のためのFc融合タンパク質または抗体のFc糖鎖工学に適した新規な  $\alpha$ -フコシダーゼが依然として必要とされている。

10

【0023】

本開示は、N-結合型グリカンからコアフコースを効率的に切断することができる細菌  $\alpha$ -フコシダーゼの予想外の発見に関する。

【0024】

本開示は、N-結合型グリカンから複数のコアフコースを効率的に切断することができる細菌  $\alpha$ -フコシダーゼの予想外の発見に関する。

【0025】

一部の例では、 $\alpha$ -フコシダーゼは、Bacteroides fragilisからの  $\alpha$ -フコシダーゼ (BfFucH) であり得る。一部の例では、 $\alpha$ -フコシダーゼは、Bacteroides thetaiotaomicronからの  $\alpha$ -フコシダーゼ (BtFucH) であり得る。 $\alpha$ -フコシダーゼは、細菌、酵母、バキュロウイルス/昆虫、または哺乳動物細胞から発現され得る。一部の実施形態では、 $\alpha$ -フコシダーゼは、組換えBacteroides  $\alpha$ -フコシダーゼであり得る。一部の実施形態では、 $\alpha$ -フコシダーゼは、E. coliから発現される組換えBacteroides  $\alpha$ -フコシダーゼであり得る。

20

【0026】

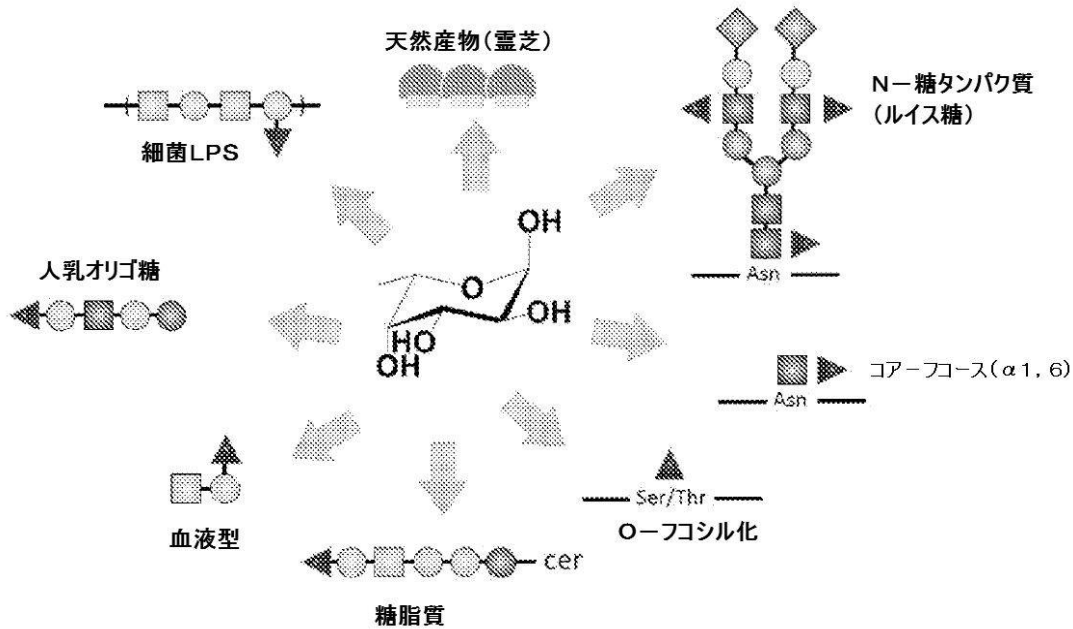
$\alpha$ -フコシダーゼは、1つまたは複数の (1, 2)、(1, 3)、(1, 4)、および (1, 6) 結合型フコースを加水分解し得る。フコースは、複合糖質におけるN-および/またはO-結合型グリカン中に存在し得る。フコースは、コア  $\alpha$ - (1, 3) フコースまたはコア  $\alpha$ - (1, 6) フコースであり得る。

30

【0027】

スキーム1は、様々なフコース含有複合糖質を示す。

## 【化 1】



10

## 【0028】

前記酵素に適した基質の例は、乳オリゴ糖、グロボHなどのがん関連炭水化物抗原、ルイス血液型 (a、b、x、y)、ならびにシアリルルイス a (SLe<sup>a</sup>) および x (SLe<sup>x</sup>) を含むが、これらに限定されない。当技術分野で公知の報告とは異なり、前記 - フコシダーゼは、末端シアル酸を切断することなく、シアリルルイス a (SLe<sup>a</sup>) および x (SLe<sup>x</sup>) を加水分解し得る。乳オリゴ糖は、 - (1, 2)、 - (1, 3) および / または - (1, 4) 結合型フコースを有し得る。

20

組成物

## 【0029】

本発明は、上記の - フコシダーゼの組成物にも関する。 - フコシダーゼは、配列番号 1 との少なくとも 85% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号 1 との少なくとも 88% の同一性を有するポリペプチド、またはその機能的変異体を含む。一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。配列番号 2 は、配列番号 1 との 88% の配列同一性を有する。

30

## 【0030】

本明細書に記載の変異ポリペプチドは、アミノ酸配列が配列番号 1 または 2 におけるものとは異なるが、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む酵素の同じまたは類似した機能を示すものである。

【表 1】

表1	
<p><b>配列番号1</b></p> <p>QQKYQPTEANLKARSEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWTMTNNNLNYKEYAKLAGGFYPSK            FDADKWVAAIKASGAKYICFTTRHHEGFSMFDTKYSDYNIVKATPFKRDRVVKELADACAKHG            IKLHFYYSHIDWYREDAPQGRTGRRTGRPNPKGDWKSYYQFMNNQLTELLTNYGPIGAIWFD            GWWQDINPDFDWELPEQYALIHRLQPAQLVGNHHQTFFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSG            QSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKTLIHLYLVKAAGKDANLLMNIGPQPDGELPEV            AVQRLKEVGEWMSKYGETIYGTRGGLVAPHDWGVTTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPIVDKK            VKKAVVFADKTPVRF'TKNKEGIVLELAKVPTDVDYVVELTID</p> <p><b>配列番号2</b></p> <p>QSSYQPGEENLKAREEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWTMTNNNLNYKEYAKLAGGFYPSK            FDADKWVAAIKASGAKYICLTSRHHDFSMFDTKYSDFNIVKATPFKRDIKELAAACSKQG            IKLHFYYSHLDWTREDYPWGRTGRGTGRSNPQGDWKSYYQFMNNQLTELLTNYGPGVIAIWF            GWWQDGNPGFNWELPEQYAMIHKLQPGCLIGNHHQTFFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSG            QSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKTLIHLYLVKAAGKNANLLMNIGPQPDGELPEV            AVQRLKEMGEWMNQYGETIYGTRGGAVAPHDWGVTTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPLADKK            VKKAVLFKNGTPVRF'TKNKEGVLLFTEIPKIDIDYVVELTID</p>	<p>10</p> <p>20</p>

【0031】

本明細書では、配列に関するパーセント(%)配列同一性は、必要な場合、配列をアラインし、ギャップを導入して、最大パーセント配列同一性を達成した後、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基の百分率として定義される。パーセント配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当技術分野の範囲内である様々な方法で、例えば、BLAST、ALIGNまたはMegalign(DNA STAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたる最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含めた、アラインメントを測定するための適切なパラメーターを決定し得る。

30

【0032】

本発明の - フコシダーゼのポリペプチドは、それらの単離または精製を補助するために誘導体化または修飾されることが理解されよう。したがって、本発明の一実施形態では、本発明における使用のためのポリペプチドは、分離手段に直接的または特異的に結合する能力があるリガンドを加えることによって誘導体化または修飾される。あるいは、ポリペプチドは、結合対のうちの1つのメンバーを加えることによって誘導体化または修飾され、分離手段は、結合対の他のメンバーを加えることによって誘導体化または修飾される試薬を含む。任意の適した結合対が使用され得る。本発明における使用のためのポリペプチドが結合対のうちの1つのメンバーを加えることによって誘導体化または修飾される好ましい実施形態では、ポリペプチドは、好ましくは、ヒスチジンタグをつけられているまたはビオチンタグをつけられている。典型的に、ヒスチジンまたはビオチンタグのアミノ酸コード配列は、遺伝子レベルで含まれており、タンパク質は、E. coliにおいて

40

50

組換えで発現される。ヒスチジンまたはピオチンタグは、ポリペプチドの一端に、N末端にまたはC末端に典型的に存在する。ヒスチジンタグは、6ヒスチジン残基から典型的になるが、それは、典型的に最大7、8、9、10または20アミノ酸のようにこれよりも長くても、または例えば5、4、3、2または1アミノ酸のように短くてもよい。さらに、ヒスチジンタグは、1つまたは複数のアミノ酸置換、好ましくは上記で定義した保存的置換を含有し得る。

組成物の適用

【0033】

本発明の組成物は、*in vitro*での複合糖質の脱フコシル化を行うために使用され得る。本発明の方法は、複合糖質を、上記の本発明の - フコシダーゼと接触させるステップを含む。複合糖質は、 - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および - (1, 6) 結合型フコースから選択される1つまたは複数のフコースを含む。フコースは、複合糖質におけるN - および / またはO - 結合型グリカン中に存在し得る。

10

【0034】

一部の実施形態では、複合糖質は、糖タンパク質である。一部の実施形態では、糖タンパク質は、コアフコースを含む。一部の実施形態では、コアフコースは、コア - (1, 3) 結合型フコースまたはコア - (1, 6) 結合型フコースである。

【0035】

一部の実施形態では、本方法は、複合糖質を、少なくとも1つのグリコシダーゼと接触させることをさらに含む。ある特定の実施形態では、グリコシダーゼは、エンドグリコシダーゼである。エンドグリコシダーゼは、N - グリカンにおけるオリゴ糖の可変部分を切り取るために使用される。本明細書で使用されるエンドグリコシダーゼの例は、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、Endo A、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo H、Endo M、Endo S、およびそれらの変異体を含むが、これらに限定されない。

20

【0036】

コア脱フコシル化に関して、複合糖質は、逐次または同時にエンドグリコシダーゼおよび - フコシダーゼで処理され得る。コア脱フコシル化は、コア (1, 3) 脱フコシル化または (1, 6) 脱フコシル化であり得る。

【0037】

本発明の方法は、モノクローナル抗体からFc糖鎖工学的に操作するのに有用であり得る。工学的に操作する例示的な方法は、例えば、その内容が参照によって本明細書に組み込まれているWongら、US SN 12 / 959, 351において記載されている。好ましくは、モノクローナル抗体は、治療用モノクローナル抗体である。一部の例では、均一にグリコシル化されたモノクローナル抗体を作製するための方法は、(a)モノクローナル抗体を、 - フコシダーゼおよび少なくとも1つのエンドグリコシダーゼと接触させ、それによって単一のN - アセチルグルコサミン (GlcNAc) を有する脱フコシル化抗体をもたらすステップ、および (b) 炭水化物部分を適した条件下でGlcNAcに加えるステップを含む。ある特定の実施形態では、グリカンは、エンド - GlcNAcase および例示的なフコシダーゼ、次いで、それに続く例示的なエンド - S変異体およびグリカンオキサゾリンでの処理によって調製され得る。

30

40

【0038】

特定の例では、本発明の方法によるモノクローナル抗体は、リツキシマブである。ある特定の実施形態では、本発明の方法による炭水化物部分は、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3$

50

) Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 6 ) Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 3 ) Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 6 ) Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 3 ) Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 6 ) Gal GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 3 ) Gal GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 6 ) Gal GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Sia ( 2 - 3 ) Gal GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc、Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc および Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>3</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc からなる群から選択される。

【0039】

一部の実施形態では、炭水化物部分は、糖オキサゾリンである。

【0040】

本発明の方法におけるステップ ( b ) は、糖鎖伸長につながり得る。糖鎖伸長のためある方法は、酵素触媒グリコシル化反応によるものである。グリコシル化反応は、付加反応であり、酸、水などのいかなる付随的な排除もなく進むので、酵素触媒グリコシル化反応の中で糖ドナーとして糖オキサゾリンを使用したグリコシル化がオリゴ糖を合成するのに有用であることは当技術分野で周知である。(Fujitaら、Biochim. Biophys. Acta 2001年、1528巻、9~14頁)

【0041】

ステップ ( b ) における適した条件は、少なくとも20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分、90分または100分、好ましくは60分未満の反応混合物のインキュベーションを含む。インキュベーションは、好ましくは室温で、より好ましくは約20、25、30、35、40 または45 で、最も好ましくは約37 で行われる。

【0042】

本明細書では、「フコース」および「L-フコース」という用語は、互換的に使用される。

【0043】

本明細書では、「コアフコース」および「コアフコース残基」という用語は、互換的に使用され、アスパラギン結合N-アセチルグルコサミンに結合した 1, 3 - 位または 1, 6 - 位におけるフコースを指す。

【0044】

本明細書では、「 - ( 1, 2 ) フコシダーゼ」という用語は、オリゴ糖からの - ( 1, 2 ) 結合型L-フコース残基の加水分解を特異的に触媒するエキソグリコシダーゼを指す。

【0045】

本明細書では、「 - ( 1, 4 ) フコシダーゼ」という用語は、オリゴ糖からの - ( 1, 4 ) 結合型L-フコース残基の加水分解を特異的に触媒するエキソグリコシダーゼを指す。

【0046】

本明細書では、「グリカン」という用語は、多糖、オリゴ糖または単糖を指す。グリカンは、糖残基のモノマーまたはポリマーであり得、直鎖状または分枝状であり得る。グリカンは、天然糖残基 (例えば、グルコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルノイラミン酸、ガラクトース、マンノース、フコース、ヘキソース、アラビノース、リボース、キシロースなど) および/または修飾糖 (例えば、2' -フルオロリボース、2' -デオキシリボース、ホスホマンノース、6'スルホN-アセチルグルコサミンなど) を含み得る。

【0047】

本明細書では、「N-グリカン」、「N-結合型グリカン」、「N-結合型グリコシル化」、「Fcグリカン」および「Fcグリコシル化」という用語は、互換的に使用され、

10

20

30

40

50

Fc含有ポリペプチドにおけるアスパラギン残基のアミド窒素に結合したN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)によって付加されたN-結合型オリゴ糖を指す。「Fc含有ポリペプチド」という用語は、Fc領域を含む、抗体などのポリペプチドを指す。

【0048】

本明細書では、「グリコシル化パターン」および「グリコシル化プロファイル」という用語は、互換的に使用され、酵素的または化学的に糖タンパク質または抗体から放出され、次いで、例えば、LC-HPLC、またはMALDI-TOF MSなどを使用して、それらの炭水化物構造に関して分析されるN-グリカン種の特徴的な「フィンガープリント」を指す。例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれたCurrent Analytical Chemistry、1巻、1号(2005年)、28~57頁における総説を参照されたい。

10

【0049】

本明細書では、「糖鎖工学的に操作されたFc」という用語は、本明細書で使用される場合、酵素的または化学的に改変されたまたは操作されたFc領域上のN-グリカンを指す。本明細書では、「Fc糖鎖工学」という用語は、糖鎖工学的に操作されたFcを作製するために使用される酵素プロセスまたは化学プロセスを指す。

【0050】

Fc領域のグリコシル化プロファイルの文脈における「均一な」、「一様な」、「一様に」および「均一性」という用語は、互換的に使用され、微量の前駆N-グリカンも有さない1つの望ましいN-グリカン種によって表された単一のグリコシル化パターンを意味することが意図されている。

20

【0051】

本明細書では、「IgG」、「IgG分子」、「モノクローナル抗体」、「免疫グロブリン」、および「免疫グロブリン分子」という用語は、互換的に使用される。本明細書では、「分子」は、抗原結合断片も含み得る。

【0052】

本明細書では、「複合糖質」という用語は、本明細書では、少なくとも1つの糖部分が少なくとも1つの他の部分に共有結合している全ての分子を包含する。用語は、例えばN-結合型糖タンパク質、O-結合型糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどを含めた、共有結合的に付加された糖部分を有する全ての生体分子を特に包含する。

30

【0053】

本明細書では、「糖脂質」という用語は、1つまたは複数の共有結合した糖部分(すなわち、グリカン)を含有する脂質を指す。糖部分は、単糖、二糖、オリゴ糖、および/または多糖の形であり得る。糖部分は、糖残基の単一の分岐していない鎖を含み得るか、または1つもしくは複数の分岐した鎖から構成され得る。ある特定の実施形態では、糖部分は、硫酸基および/またはリン酸基を含み得る。ある特定の実施形態では、糖タンパク質は、O-結合型糖部分を含み得る；ある特定の実施形態では、糖タンパク質は、N-結合型糖部分を含み得る。

【0054】

本明細書では、「糖タンパク質」という用語は、そこに共有結合的に付加された1つまたは複数のオリゴ糖鎖(例えば、グリカン)を含むアミノ酸配列を指す。例示的なアミノ酸配列は、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を含む。例示的な糖タンパク質は、グリコシル化抗体および抗体様分子(例えば、Fc融合タンパク質)を含む。例示的な抗体は、モノクローナル抗体および/またはその断片、ポリクローナル抗体および/またはその断片、ならびにFcドメイン含有融合タンパク質(例えば、IgG1のFc領域、またはそのグリコシル化部分を含む融合タンパク質)を含む。

40

【0055】

本明細書では、「N-グリカン」という用語は、複合糖質から放出されたが、窒素結合を介して複合糖質に以前は結合していた糖のポリマーを指す(以下のN-結合型グリカンの定義を参照されたい)。

50

## 【0056】

本明細書では、「O-グリカン」という用語は、複合糖質から放出されたが、酸素結合を介して複合糖質に以前は結合していた糖のポリマーを指す（以下のO-結合型グリカンの定義を参照されたい）。

## 【0057】

本明細書では、野生型酵素の機能的変異体は、野生型対応物と同じ酵素活性を有し、例えば、野生型対応物のアミノ酸配列と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、高アミノ酸配列相同性を典型的に共有する。2つのアミノ酸配列の「パーセント同一性」は、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：5873～77頁、1993年において修正された、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻：2264～68頁、1990年のアルゴリズムを使用して決定される。かかるアルゴリズムは、Altschulら J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁、1990年のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。BLASTタンパク質探索が、目的のタンパク質分子と相同であるアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3で行われ得る。ギャップが2つの配列間に存在する場合、Gapped BLASTがAltschulら、Nucleic Acids Res. 25巻（17号）：3389～3402頁、1997年において記載されたように利用され得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターが使用され得る。機能的変異体は、1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、欠失、または置換を含めた、様々な変異を有し得る。かかる変異体は、野生型酵素の酵素活性に必須ではない領域における変異をしばしば含有し、機能的ドメインにおける変異を含有し得ないか、または保存的アミノ酸置換のみを含有し得る。当業者は、保存的アミノ酸置換が、機能的に同等の変異体を提供するためにリポ酸リガーゼミュータントにおいて行われ得る、すなわち、変異体は、特定のリポ酸リガーゼミュータントの機能的能力を保持することを理解するはずである。

## 【0058】

本明細書では、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が行われるタンパク質の相対的電荷またはサイズ特徴を改変しないアミノ酸置換を指す。変異体は、かかる方法をまとめている参考文献、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual、J. Sambrookら、eds.、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989年、またはCurrent Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、John Wiley & Sons、Inc.、New Yorkにおいて見出されるものなどの当業者に公知のポリペプチド配列を改変するための方法に従って調製され得る。アミノ酸の保存的置換は、以下の群内のアミノ酸間で行われる置換を含む：(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N；および(g) E、D。脱グリコシル系に關与する酵素の任意のものは、通例のテクノロジーによって調製され得る。一例では、酵素は、天然供給源から単離される。他の例では、酵素は、通例の組換えテクノロジーによって調製される。必要な場合、標的酵素のコード配列は、酵素を作製するために使用される宿主細胞に基づいてコドン最適化に供され得る。例えば、E. coli細胞が組換えテクノロジーによって酵素を作製するための宿主として使用される場合、その酵素をコードする遺伝子は、それがE. coliにおいて共通して使用されるコドンを含むように修飾され得る。本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の説明に記載されている。本発明の他の特性または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、および添付の特許請求の範囲からも明らかとなる。

## 【0059】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれている。以下の実

施例において開示された技法は、本発明の実行においてよく機能することが本発明者によって発見された技法を表し、したがって、その実行のための好ましいモードを構成すると考えられ得ることが当業者によって認識されるはずである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、開示されている特定の実施形態に多くの変更を加えることができ、そうしても本発明の精神および範囲から逸脱することなく同じまたは類似した結果を得ることを認識すべきである。

【実施例】

【0060】

(実施例1)

タンパク質発現構築物

- フコシダーゼを、それぞれ、*Bacteroides fragilis* NCTC 9343 ゲノムDNA (ATCC 25285) および *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (ATCC 29148) からPCRによって増幅し、内部AcTEVプロテアーゼ切断部位を有するN末端ポリヒスチンを有するpET47b+ (EMD Biosciences, San Diego, CA) 中にクローニングした。EndoF1 (GenBank: AAA24922.1)、EndoF2 (GenBank: AAA24923.1)、EndoF3 (GenBank: AAA24924.1)、EndoH (GenBank: AAA26738.1) およびPNGase F (Genbank: GenBank: J05449.1) などの研究に使用された他の酵素を*E. coli*にコドン最適化し、それぞれ、N末端においてMBP融合を有するpET28a中にクローニングした。クローンの全ての配列をApplied Biosystems 3730 DNA Analyzerによって最初に確認した。

【0061】

*E. coli*におけるタンパク質発現構築物に使用されたプライマーを以下の表に列挙する。

【表2-1】

配列番号	プライマー <sup>a</sup>	配列 (5'→3')	制限酵素部位	ゲノムまたはcDNAプールからの遺伝子供給源
配列番号1	<i>BfFucH</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TCTCAGCAAAAGTATCAACCGACA <sup>b</sup>	AsiSI	<i>Bacteroides fragilis</i> ( <i>BfFucH</i> , 例えば、GenBank受託番号YP_212855.1)
配列番号2	<i>BfFucH</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTCAATTGTAAGTTCTACCA	PmeI	
配列番号3	<i>BtFucH</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TCTCAGTCTTCTTACCAGCCTGGT	AsiSI	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ( <i>BtFucH</i> , 例えば、GenBank受託番号AAO76949.1)
配列番号4	<i>BtFucH</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTCAATTGTAAGTTCTACAAC	PmeI	
配列番号5	<i>EndoF1</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGAICGCT</u> GCGGTTACCGGTACCACCA	AsiSI	<i>Elizabethkingia miricola</i> (例えば、GenBank受託番号AAA24922.1)
配列番号6	<i>EndoF1</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACCAGTCTTTAGAGTACGGGG	PmeI	

【表 2 - 2】

配列番号	プライマー <sup>a</sup>	配列 (5'→3')	制限酵素部位	ゲノムまたはcDNAプールからの遺伝子供給源
配列番号 7	<i>EndoF2</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGGTTAACCTGTCTAACCT	AsiSI	Elizabethkingia miricola (例えば、GenBank受託番号 AAA24923.1)
配列番号 8	<i>EndoF2</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACGGGTTCAATGATTTTGATCAG	PmeI	Elizabethkingia miricola (例えば、GenBank受託番号 AAA24923.1)
配列番号 9	<i>EndoF3</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGACCGCGCTGGCGGGTT	AsiSI	Elizabethkingia miricola (例えば、GenBank受託番号 AAA24924.1)
配列番号 10	<i>EndoF3</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTTTTTAACCGCGTCACGAAC	PmeI	Elizabethkingia miricola (例えば、GenBank受託番号 AAA24924.1)
配列番号 11	<i>EndoH-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGCCGGCGCCGGTTAAACA	AsiSI	Streptomyces plicatus (例えば、GenBank受託番号 AAA26738.1)
配列番号 12	<i>EndoH-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACGGGGTACGAACCGCTTCAG	PmeI	Streptomyces plicatus (例えば、GenBank受託番号 AAA26738.1)
配列番号 13	<i>endoS-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TACCCACCATGATTCACTCAAT	AsiSI	Streptococcus pyogenes (例えば、GenBank受託番号 AAK34539.1)
配列番号 14	<i>endoS-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTATTTTTTAGCAGCTGCCTTTTC	PmeI	Streptococcus pyogenes (例えば、GenBank受託番号 AAK34539.1)
配列番号 15	<i>PNGase F-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGCCGGCGGACAACACCGT	AsiSI	Chryseobacterium meningosepticum (例えば、GenBank受託番号 J05449.1)
配列番号 16	<i>PNGase F-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTTGGTAACAACCGGCGCAGA	PmeI	Chryseobacterium meningosepticum (例えば、GenBank受託番号 J05449.1)

10

20

30

## 【 0 0 6 2 】

<sup>a</sup> 各遺伝子のコード配列を増幅するためのフォワード ( F ) およびリバース ( R ) P C R 反応のための一対のプライマー。

## 【 0 0 6 3 】

<sup>b</sup> 太字を有する下線は、制限酵素認識部位を意味する。

## 【 0 0 6 4 】

<sup>c</sup> E . c o l i に関するコドン最適化。例えば、Puigboら、Nucleic Acids Research ( 2 0 0 7 年 ) 3 5 卷 ( S 2 号 ) : W 1 2 6 ~ W 1 3 0 頁を参照されたい。

40

タンパク質発現および精製

## 【 0 0 6 5 】

タンパク質発現構築物を、16 で 2 4 時間、0 . 2 m M イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド ( I P T G ) を使用して、タンパク質発現のために B L 2 1 ( D E 3 ) ( E M D B i o s c i e n c e s , S a n D i e g o , C A ) に形質転換した。細胞をマイクロフルイダイザーによって破壊し、次いで、遠心分離した。上清を収集し、N i - N T A アガロースカラム ( Q I A G E N G m b H , H i l d e n , G e r m a n y ) 上にロードし、10 倍の洗浄緩衝液 ( リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 7 . 0 ) 、 3 0 0 m M 塩化ナトリウム、および 1 0 m M イミダゾール ) で洗浄した。溶出を 2 倍の溶出緩衝液 ( リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 7 . 0 ) 、 3 0 0 m M 塩化ナトリウム、および 2 5 0 m

50

Mイミダゾール)によって行い、その後、Amicon Ultra-15 10K (EMD Millipore Chemicals, Billerica, MA)によって反応緩衝液への緩衝液交換を行った。タンパク質純度をSDS-PAGEによって調べ、定量的タンパク質濃度をQubit (登録商標) Protein Assay Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA)によって測定した。Ni-NTAカラム精製が後に続き、hisタグを有する組換えフコシダーゼは、95%を超える純度で60mg/Lの収量をもたらした。タンパク質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを用いたBrandford (Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)の方法によって決定した。酵素の純度および分子質量をSDS-PAGEによって調べた。

10

## 【0066】

Bacteroides fragilisからの精製フコシダーゼは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において、47.3 kDaの理論上の分子量に近い、約50 kDaの分子質量を示した。

(実施例2)

酵素アッセイ

酵素の特徴

## 【0067】

酸性条件 (pH 4.0 ~ 6.0) における最適pHを有する、哺乳動物または細菌からのフコシダーゼとは異なり、BfFucHは、緩やかな条件 (pH 7.0 ~ 7.5) で事前によく形成された。さらに、BfFucHは、いくつかの二価金属イオンによって影響されず、金属イオンを外から加えても活性に影響しなかった。しかしながら、Ni<sup>2+</sup>は、酵素活性を60%劇的に低減させ得る。また、Zn<sup>2+</sup>およびCu<sup>2+</sup>は、酵素活性を完全に無効にし得る。キレート剤EDTAは、酵素活性に及ぼす効果を示さず、これは、金属イオンが触媒反応に関与しないことを示している。酵素は、室温および4℃で機能的に活性かつ安定である。

20

N-結合型グリカン (glycas) に及ぼす酵素活性

## 【0068】

本明細書に記載されたフコシダーゼは、N-グリカンにおけるフコース位置を決定するために使用され得る。種々の位置で付加された様々なフコースを有するN-グリカンに及ぼすBfFucH加水分解活性を評価した。2つの合成糖ペプチド、0800Fおよび0823Fを調製した。両方の糖ペプチドは、グリコシル化部位で外側のGlcNAcおよび最も内側のGlcNAcに結合したフコースをそれぞれ有する。

30

## 【0069】

酵素アッセイは、フコースが試料0800Fにおける外側のGlcNAcからのみ放出され、フコースが最も内側のGlcNAcに結合している糖ペプチド0823Fにおいては放出されないことを明らかにした。この結果は、N-グリカンにおけるG0構造の立体障害がフコースをフコシダーゼ加水分解から遮蔽かつ保護し得ることを示した。対照的に、0823Fがワンポット反応において同時にBfFucHおよびエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (EndoM) で処理された場合、コアフコースは、容易に除去される。この結果は、β-フコシダーゼがグリカンに結合したフコースの位置を識別するために使用され得ることを示した。

40

オリゴ糖に及ぼす酵素活性

## 【0070】

E. coli株の血清型O86、O128、およびO111のリポ多糖 (LPS) は、様々な単糖、例えば、Gal、GalNAc、およびフコースを含有する。ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FDH) 共役アッセイによって、本発明者らは、BfFucHがL-フコースをE. coli O128: B12株のLPSから用量依存的に遊離させ得ることを確認した。本発明者らは、2'-フコシルラクトース (2'FL)、3'-フコシルラクトース (3'FL)、ラクト-N-フコペンタオースI (LNPTI)、グロボH、ル

50

イス<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>)、ルイス<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>)、ルイス<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>)、ルイス<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>)、シアリルルイス<sup>a</sup> (SLe<sup>a</sup>)、シアリルルイス<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>)、およびpNP (パラ - ニトロフェノール) - - L - フコシドを含めた様々な基質に及ぼす酵素の酵素活性も試験した。結果は、 - フコシダーゼが全ての基質を加水分解することができることを示した。

(実施例3)

糖タンパク質のコア脱フコシル化

【0071】

*Aleuria aurantia*は、フコースに関する特異的プローブとして広く使用されているフコース特異的レクチン(AAL)を有する。AALは、複合オリゴ糖および複合糖質上のフコースおよび末端フコース残基を認識し、これに特異的に結合する。AALは、コア脱フコシル化を決定するために使用され得る。エンドグリコシダーゼは、N - グリカンにおけるオリゴ糖の可変部分を切り取るのに有用である。エンドグリコシダーゼ(EndoF1、EndoF2、EndoF3およびEndoH)のカクテルの処理後、抗体(ヒュミラまたはリツキサン)は、高AAL - プロットイングシグナルを示し、これは、抗体におけるコアフコースの存在を示している。しかしながら、エンドグリコシダーゼ(EndoF1、EndoF2、EndoF3およびEndoH)のカクテルおよびBfFucHの組合せの処理後、抗体(ヒュミラまたはリツキサン)は、コアフコースの加水分解によりAAL - プロットイングシグナルを失った。これらの結果は、BfFucHがコア脱フコシル化に活性であることを実証した。

材料および方法

【0072】

他に断らない限り、全ての化合物および試薬をSigma - AldrichまたはMerckから購入した。抗腫瘍壊死因子 - アルファ(TNF)抗体、アダリムマブ(Humira(登録商標))を(North Chicago, IL)から購入した。抗ヒトCD20マウス/ヒトキメラIgG1リツキシマブ(Rituxan(登録商標))をGenentech, Inc. (South San Francisco, CA) / IDEC Pharmaceutical (San Diego, CA)から購入した。TNF受容体 - Fc融合タンパク質エタネルセプト(Enbrel(登録商標))をWyeth Pharmaceuticals (Hampshire, UK)から購入した。エボエチンベータ(Recormon(登録商標))をHoffmann - La Roche Ltd (Basel, Switzerland)から購入した。インターフェロン1a(Rebif(登録商標))をEMD Serono, Inc. (Boston, MA)から購入した。

【0073】

パラ - ニトロフェニル - または - 単糖、ルイス糖、血液型糖および人乳オリゴ糖をCarbosynth Limited. (Berkshire, UK)から購入した。IgG Fc領域に対する一次抗体、Recormon(登録商標)、およびRebif(登録商標)をChemicon(EMD Millipore Chemicals, Billerica, MA)から購入した。ビオチン化*Aleuria Aurantia*レクチン(AAL)およびHRPコンジュゲートストレプトアビジンをVector Laboratory (Burlingame, CA)から購入した。タンパク質プロット上の化学発光をImageQuant LAS 4000生体分子撮像システムを使用して可視化し、定量化した。

BfFucH活性分析方法

【0074】

酵素活性を、標準アッセイ条件として、基質としてpNP - - L - Fuc (p - ニトロフェニル - - L - Fuc)を使用して、50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0において25で測定した。 - L - フコシダーゼ活性の1つの単位を25での50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0における1分あたりのpNP - - L - Fuc

10

20

30

40

50

からの  $1 \mu\text{mol}$  の pNP および Fuc の形成として定義した。ミカエリス定数 ( $K_m$ )、代謝回転数 ( $K_{cat}$ ) および  $V_{max}$  の値を、GraphPad Prism v5 ソフトウェア (La Jolla, CA) によって非線形回帰分析によって、ミカエリスメンテン式から pNP - L - Fuc に関して計算した。

BfFucH の最適 pH の活性測定

【0075】

フコシダーゼ活性に関する最適 pH を、酢酸ナトリウム、MES、MOPS、HEPES、トリス-HCl、CHES 緩衝液を含めた pH 範囲 4.0 ~ 10.0 において上記の標準酵素アッセイにおいて決定した。全ての反応を統計的評価のために三連で行った。

BfFucH の最適二価金属イオンの活性測定

【0076】

金属要求性に関するアッセイを標準アッセイ条件において行った。酵素を、EDTA の存在および非存在下で、5 mM の最終濃度で金属イオン ( $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、または  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ ) と混合した。全ての反応を統計的評価のために三連で行った。

BfFucH の最適温度の活性測定

【0077】

酵素の活性に及ぼす温度の効果を、十分な量の精製フコシダーゼをリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) において pNP - L - Fuc とインキュベートすることによって決定した。アッセイ構成を保持するために、全ての構成成分をよく混合し、10 分間アッセイ温度で予熱し、反応を酵素を加えることによって開始し、一定温度において多モードプレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices) によって記録した。温度は、4 から 80 にわたった。全ての反応を、統計的評価のために三連で行った。

フコース脱水素酵素に基づく (FDH) アッセイ

【0078】

フコース脱水素酵素に基づくアッセイを以前の報告からわずかに修正した。NADP+ とのみ活性であり反応する、Sigma-Aldrich によって販売されている Pseudomonas sp から他のフコース脱水素酵素とは異なり、Mesorhizobium loti から FDH の組換え型は、NAD+ とのみ機能性である。形成された NADH を、25 で多モードプレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices) によって 340 nm で励起した際、約 450 nm での NADPH 蛍光によって測定した。この方法を使用することによって、ルイス糖および人乳オリゴ糖 (HMO) などの様々なオリゴ糖におけるフコシル-コンジュゲートを 5 分以内に定量化した。

免疫グロブリン G、Fc-融合タンパク質、EPO、インターフェロン (IFN-1a) およびインフルエンザ血球凝集素 (HA) のモノ-GlcNAc または GlcNAc- (Fuc-1, 6) の生成

【0079】

全ての糖タンパク質を反応緩衝液 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) によって緩衝液交換した。最初に、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH および EndoS (1 mg/mL) を含むエンドグリコシダーゼカクテル溶液を、糖タンパク質の Asn に結合した GlcNAc を除く全ての N-グリカン鎖を除去するために加え、その後、適した量のフコシダーゼを加えた。糖タンパク質の GlcNAc に結合したコア-フコースを完全に除去するために、37 で 48 時間インキュベートする。

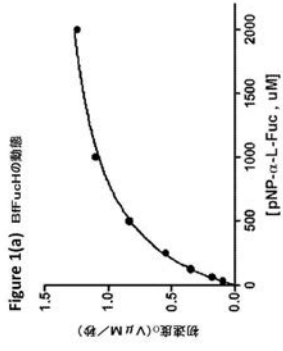
10

20

30

40

【 図 1 】



パラメーター	値	相対活性 (%)
pNP- $\alpha$ -D-Glc	183.8 s <sup>-1</sup>	0
pNP- $\alpha$ -D-Gal	437.0 $\mu$ M	0
pNP- $\alpha$ -D-GlcNAc	0.42 s <sup>-1</sup> / $\mu$ M	0
pNP- $\alpha$ -D-GalNAc	1.544 $\mu$ M/秒	100
pNP- $\alpha$ -D-Man		0
pNP- $\alpha$ -L-Fuc		0
pNP- $\beta$ -L-Fuc		0
pNP- $\alpha$ -L-Rha		0

Fig. 1(c)

パラメーター	値
Kcat	183.8 s <sup>-1</sup>
Km	437.0 $\mu$ M
Kcat/Km	0.42 s <sup>-1</sup> / $\mu$ M
Vmax	1.544 $\mu$ M/秒

Fig. 1(b)

Figure 1

【 図 2 】

FIG 2 (a) BIFuclHのpHプロファイル

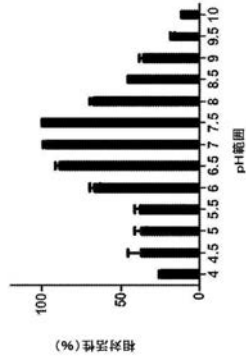


FIG 2 (c) フコジンゲーゼ、BIFuclHにおける金属イオン影響

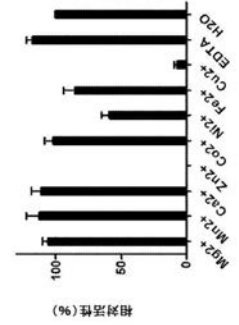
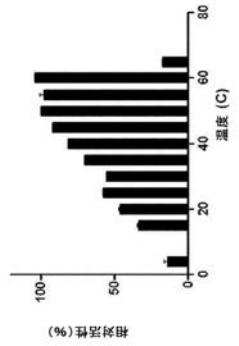


FIG 2 (b) 種々の温度でのBIFuclHのpHプロファイル



【 図 3 】

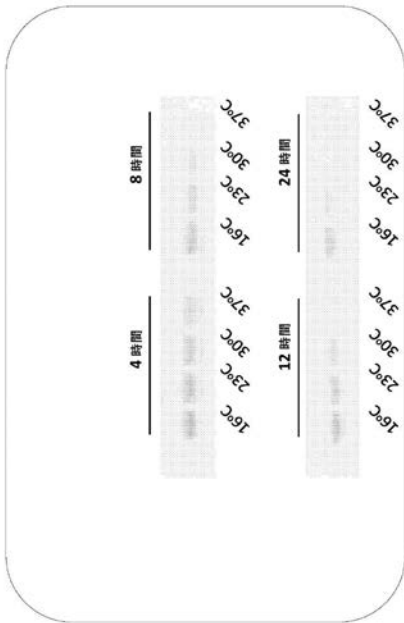


Figure 3

## 【配列表】

2017520241000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年1月26日(2017.1.26)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の説明に記載されている。本発明の他の特性または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、および添付の特許請求の範囲からも明らかとなる。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

配列番号1または配列番号2との少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む - フコシダーゼ、および少なくとも1つのグリコシダーゼを含む組成物。

(項目2)

前記 - フコシダーゼが配列番号1または配列番号2との少なくとも88%の配列同一性を有する単離ポリペプチドを含む、項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記 - フコシダーゼが配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、項目1から2に記載の組成物。

(項目4)

前記 - フコシダーゼが配列番号2に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、項目1から2に記載の組成物。

(項目5)

前記グリコシダーゼがエンドグリコシダーゼである、項目1に記載の組成物。

(項目6)

前記エンドグリコシダーゼが、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、EndoA、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、およびそれらの変異体からなる群から選択される、項目4に記載の組成物。

(項目7)

前記グリコシダーゼがエキソグリコシダーゼである、項目1に記載の組成物。

(項目8)

前記酵素が組換え *Bacteroides* - L - フコシダーゼである、項目1に記載の組成物。

(項目9)

前記酵素が、複合糖質におけるN - および/またはO - 結合型グリカン中に存在する - (1,2)、 - (1,3)、 - (1,4)、および - (1,6) 結合型フコースを加水分解し得る、項目1に記載の組成物。

(項目10)

前記 - フコシダーゼが4~9の最適pHを有する、項目1に記載の組成物。

(項目11)

複合糖質における1つまたは複数のフコースを除去するための方法であって、前記複合糖質を、配列番号1または配列番号2との少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドを含む - フコシダーゼと接触させることを含む方法。

(項目12)

前記 - フコシダーゼが、配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペ

チドを含む、項目 10 に記載の方法。

(項目 13)

前記 - フコシダーゼが、配列番号 2 に記載されたアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む、項目 10 に記載の方法。

(項目 14)

前記複合糖質が、 - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および - (1, 6) 結合型フコースから選択される 1 つまたは複数のフコースを含む、項目 10 に記載の方法。

(項目 15)

前記 - (1, 2)、 - (1, 3)、 - (1, 4)、および / または - (1, 6) 結合型フコースが、複合糖質における N - および / または O - 結合型グリカン中に存在する、項目 12 に記載の方法。

(項目 16)

前記複合糖質が糖脂質、糖タンパク質、オリゴ糖、または糖ペプチドである、項目 10 に記載の方法。

(項目 17)

前記複合糖質が糖タンパク質である、項目 14 に記載の方法。

(項目 18)

前記糖タンパク質がコアフコースを含む、項目 15 に記載の方法。

(項目 19)

前記コアフコースがコア - (1, 3) 結合型フコースまたはコア - (1, 6) 結合型フコースである、項目 16 に記載の方法。

(項目 20)

1 つまたは複数のエンドグリコシダーゼをさらに含む、項目 10 に記載の方法。

(項目 21)

1 つまたは複数のエンドグリコシダーゼが、エンド - ベータ - N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、Endo A、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo H、Endo M、Endo S、およびそれらの変異体からなる群から選択される、項目 18 に記載の方法。

#### 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

本発明の - フコシダーゼのポリペプチドは、それらの単離または精製を補助するために誘導体化または修飾され得ることが理解されよう。したがって、本発明の一実施形態では、本発明における使用のためのポリペプチドは、分離手段に直接的または特異的に結合する能力があるリガンドを加えることによって誘導体化または修飾される。あるいは、ポリペプチドは、結合対のうちの 1 つのメンバーを加えることによって誘導体化または修飾され、分離手段は、結合対の他のメンバーを加えることによって誘導体化または修飾される試薬を含む。任意の適した結合対が使用され得る。本発明における使用のためのポリペプチドが結合対のうちの 1 つのメンバーを加えることによって誘導体化または修飾される好ましい実施形態では、ポリペプチドは、好ましくは、ヒスチジントグをつけられているまたはピオチントグをつけられている。典型的に、ヒスチジンまたはピオチントグのアミノ酸コード配列は、遺伝子レベルで含まれており、タンパク質は、E . c o l i i において組換えで発現される。ヒスチジンまたはピオチントグは、ポリペプチドの一端に、N 末端にまたは C 末端に典型的に存在する。ヒスチジントグは、6 ヒスチジン残基から典型的になる (配列番号 19) が、それは、典型的に最大 7、8、9、10 または 20 アミノ酸の

ようにこれよりも長くても、または例えば5、4、3、2または1アミノ酸のように短くてもよい。さらに、ヒスチジンタグは、1つまたは複数のアミノ酸置換、好ましくは上記で定義した保存的置換を含有し得る。

組成物の適用

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

E. coliにおけるタンパク質発現構築物に使用されたプライマーを以下の表に列挙する。

【表2-1】

配列番号	プライマー <sup>a</sup>	配列 (5'→3')	制限酵素部位	ゲノムまたはcDNAプールからの遺伝子供給源
配列番号 3	<i>BfFucH</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TCAGCAAAAGTATCAACCGACA <sup>b</sup>	AsiSI	Bacteroides fragilis ( <i>BfFucH</i> , 例えば、GenBank受託番号YP_212855.1)
配列番号 4	<i>BfFucH</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTCAATTGTAAGTTCTACCA	PmeI	
配列番号 5	<i>BtFucH</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TCAGTCTTCTTACCAGCCTGGT	AsiSI	Bacteroides thetaiotaomicron ( <i>BtFucH</i> , 例えば、GenBank受託番号AAO76949.1)
配列番号 6	<i>BtFucH</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTCAATTGTAAGTTCTACAAC	PmeI	
配列番号 7	<i>EndoF1</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGGTTACCGGTACCACCA	AsiSI	Elizabethkingia miricola (例えば、GenBank受託番号AAA24922.1)
配列番号 8	<i>EndoF1</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACCAGTCTTTAGAGTACGGGG	PmeI	

【表 2 - 2】

配列番号	プライマー <sup>a</sup>	配列 (5'→3')	制限酵素部位	ゲノムまたはcDNAプールからの遺伝子供給源
配列番号 9	<i>EndoF2</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGGTTAACCTGTCTAACCT	AsiSI	Elizabethkingia miricola
配列番号 10	<i>EndoF2</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACGGGTTTCATGATTTTGATCAG	PmeI	(例えば、GenBank受託番号 AAA24923.1)
配列番号 11	<i>EndoF3</i> -F	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGACCGCGCTGGCGGGTT	AsiSI	Elizabethkingia miricola
配列番号 12	<i>EndoF3</i> -R	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTTTTTAACCGCGTCACGAAC	PmeI	(例えば、GenBank受託番号 AAA24924.1)
配列番号 13	<i>EndoH-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGCCGGCGCCGGTTAAACA	AsiSI	Streptomyces plicatus
配列番号 14	<i>EndoH-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTACGGGGTACGAACCGCTTCAG	PmeI	(例えば、GenBank受託番号 AAA26738.1)
配列番号 15	<i>endoS-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TACCCACCATGATTCACTCAAT	AsiSI	Streptococcus pyogenes
配列番号 16	<i>endoS-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTATTTTTTTAGCAGCTGCCTTTTC	PmeI	(例えば、GenBank受託番号 AAK34539.1)
配列番号 17	<i>PNGase F-F</i>	TTCAGGGAG <u>GCGATCGC</u> TGCGCCGGCGGACAACACCGT	AsiSI	Chryseobacterium
配列番号 18	<i>PNGase F-R</i>	GTCATTAC <u>GTTTAAAC</u> TTAGTTGGTAACAACCGGCGCAGA	PmeI	meningosepticum (例えば、GenBank受託番号 J05449.1)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/032744
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 9/24 (2015.01) CPC - C12N 9/24 (2015.09) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/70, 31/715, 31/736, 36/074; C07H 3/06, 11/00; C08B 37/00; C12N 1/20, 9/14, 9/24, 15/09, 15/31; C12P 19/04, 19/14 (2015.01) CPC - A61K31/715, 39/00; C12N 9/2402; C12P 19/04, 19/14 (2015.09) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K31/715, 39/00; C12N 9/2402; C12P 19/04, 19/14 (2015.09) (keyword delimited) USPC - 514/23, 25, 54, 61, 62 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search terms used: α-fucosidase FUCA FUCA1 glycan degradation hydrolyze% hydrolysis degrad* reduc* fucose EndoA EndoF1 EndoF2 EndoF3 EndoH EndoM EndoS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y Y A A A P, X	US 7,090,973 B1 (BRETON) 15 August 2006 (15.08.2006) entire document  US 5,395,541 A (CARPENTER et al) 07 March 1995 (07.03.1995) entire document  WO 2011/005756 A1 (PURETECH VENTURES, LLC et al) 13 January 2011 (13.01.2011) entire document  MACFARLANE et al. "Formation of glycoprotein degrading enzymes by Bacteroides fragilis," FEMS Microbiology Letters, 01 January 1991 (01.01.1991), Vol. 77, Iss.2-3, Pgs. 289-294. entire document  US 6,984,630 B1 (DESCAMPS et al) 10 January 2006 (10.01.2006) entire document  WO 2015/026484 A1 (ACADEMIA SINICA et al) 26 February 2015 (26.02.2015) entire document	1, 2, 7-10 5 5 1, 2, 5, 7-21 1, 2, 5, 7-21 1, 2, 5, 7-21 1, 2, 5, 7-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 September 2015		Date of mailing of the international search report 02 OCT 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/032744

## Box No. 1 - Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-18 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/032744

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: 3, 4, 6  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/020,199

(32)優先日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/110,338

(32)優先日 平成27年1月30日(2015.1.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウォン, チ - フェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタ フェ, ピー.オー. ボックス 8154

(72)発明者 ツァイ, ツン - イ

台湾 11529 タイペイ, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2, アカデミア シニカ 気付

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD02 LL01