

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/211075 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 47/68 (2017.01) C12N 15/56 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12P 19/44 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/016786

(22) 国際出願日: 2022年3月31日(31.03.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

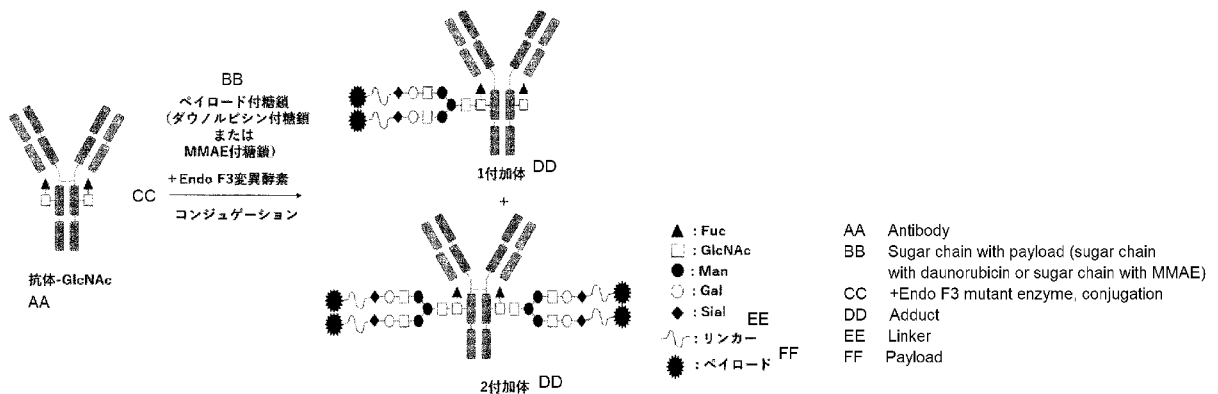
(30) 優先権データ:
特願 2021-061693 2021年3月31日(31.03.2021) JP

(71) 出願人: 日本マイクロバイオファーマ株式会社(MICROBIOPHARM JAPAN CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 日比野 和浩 (HIBINO Kazuhiro);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 永原 崇志(NAGAHARA Takashi);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 金森 聡(KANAMORI Satoshi);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 祐太郎(BABA Yutaro);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 成見 英樹(NARUMI Hideki);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 大原 啓一郎(OHARA Keiichiro);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目3番1号 日本マイクロバイオファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 西村 裕(NISHIMURA Yutaka);
〒1040031 東京都中央区京橋一丁目

(54) Title: METHOD FOR MANUFACTURING ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND ENZYME USED FOR SAME

(54) 発明の名称: 抗体薬物複合体の製造方法及びそれに用いる酵素



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a simpler ADC manufacturing method. The present invention provides a method for manufacturing an antibody-drug conjugate comprising a step for conjugating a sugar-chain homogenization antibody and a sugar-chain-bound drug, the sugar-chain-bound drug being one in which a drug is bound, via a linker, to a sugar chain in which a reducing terminal is oxazolinized. The sugar-chain homogenization antibody and the sugar-chain-bound drug can be handled using an endo-β-N-acetyl glucosaminidase mutant enzyme.

(57) 要約: よりシンプルなADC製法を提供する。下記の工程を含む、抗体薬物複合体の製造方法: 糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、コンジュゲーションする工程であって、糖鎖結合薬物が、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖にリンカーを介して薬物が結合したものである、工程。糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とは、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素により行うことができる。

3 番 1 号 日本マイクロバイオファーマ株式会社
社内 Tokyo (JP). 川▲崎▼ 真由(KAWASAKI
Mayu); 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5
2 番 1 号 静岡県公立大学法人静岡県立大学
内 Shizuoka (JP). 中野 祥吾(NAKANO Shogo);
〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5 2 番 1 号
静岡県公立大学法人静岡県立大学内 Shizuoka
(JP). 伊藤 創平(ITO Sohei); 〒4228526 静岡県
静岡市駿河区谷田 5 2 番 1 号 静岡県公立大
学法人静岡県立大学内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人:特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS
& CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8
番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：抗体薬物複合体の製造方法及びそれに用いる酵素 技術分野

[0001] 本発明は、抗体薬物複合体の製造方法に関する。また、その製造方法に用いるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの変異酵素に関する。

背景技術

[0002] 抗体薬物複合体(Antibody Drug Conjugates, 以下ADC)は、標的に特異的に結合する抗体に薬物を複合化したものである。例えば、がん細胞を標的とする抗体に強力な細胞殺傷作用を有するペイロードを複合化したADCは、がん細胞選択的に薬物(ペイロード)を送達することで、単体のペイロード使用に比べ、副作用となる全身毒性を大きく軽減し、効果的にがん細胞を殺傷できる。代表的なADCとして、抗HER2抗体のトラスツズマブにチューブリン阻害剤を複合化したT-DM1(カドサイラ(登録商標))があり、医薬品として承認されている(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。T-DM1は抗体上のLys残基にペイロードをランダムに結合しているため、ペイロードの抗体に対する結合位置や結合数が不均一な混合物として製造される。同様のADCとして、ゲムツズマブ オゾガマイシン(総称名：マイロターグ)(非特許文献4)、ブレンツキシマブ ベドチン(総称名：アドセトリス)(非特許文献5)等がある。

[0003] 近年、ADCの均質性が体内動態や薬物放出速度、薬効に影響することが報告されている(非特許文献6)。またADCの品質コントロールの観点からも、均質性の高いADC製造を目指し、位置選択的なペイロードの結合法が積極的に開発されている。その一つの手法として酵素を用いた抗体糖鎖への結合法がある。これまでに報告されているこの方法によるADC製造工程は次のとおりである：(1)不均一な抗体糖鎖の酵素による切断による、糖鎖の均一化(加水分解工程)、(2)糖鎖均一化抗体と別糖鎖の、酵素による結合(糖転移工程)、(3)別糖鎖のアジド基とペイロードの結合(化学反応工程)。

[0004] この方法で糖鎖の変換を目的とする場合、加水分解工程及び糖転移工程で

はエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼと呼ばれる酵素ファミリーが用いられる(非特許文献7)。エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは様々な種より分離され、抗体糖鎖の種類により使い分けられる。加水分解工程で用いられる代表的なエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼとしては、EndoA、EndoD、EndoM、EndoH、EndoF2、EndoF3、EndoE、EndoS、EndoS2等が挙げられる。

[0005] これらの内、EndoSの233番目のAspをGlnに置換したEndoS D233Q(特許文献1、非特許文献8)、EndoS2の184番目のAspをMet又はGlnに置換したEndoS2 D184M又はEndoS2 D184Q(特許文献2、非特許文献9)、EndoF3の165番目のAspをAla又はGlnに置換したEndoF3 D165A又はEndoF3 D165Q(特許文献3、非特許文献10)では、加水分解能が抑制されることが報告されている。またこれら変異酵素により、糖鎖均一化抗体(GlcNAc抗体)と糖鎖還元末端をオキサゾリン化した基質の糖転移が進行することが報告されている。

[0006] さらに、EndoS D233Qにより、GlcNAc抗体とアジド基を有する糖鎖還元末端をオキサゾリン化した基質に糖転移し、得られたコンジュゲート体のアジド基とペイロードの一種であるMMAEを化学結合し、均質なADCを作製したとの報告がある(非特許文献11、非特許文献12)。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1 : W02013/120066A1
特許文献2 : W02017/124084A1
特許文献3 : US2012/0226024A1

非特許文献

- [0008] 非特許文献1 : Nat.Biotechnol, 23, 1073-1078(2005)
非特許文献2 : Cancer Sci, 100, 1566-1572(2009)
非特許文献3 : Nat.Biotechnol, 23, 1137-1146(2005)
非特許文献4 : Clin Cancer Res, 7, 1490-1496(2001)
非特許文献5 : MAbs, 4, 458-465(2012)

非特許文献6 : Nat. Biotechnol, 26, 952-932(2008)

非特許文献7 : Chem. Soc. Rev, 46, 5128-5146(2017)

非特許文献8 : J. Am. Chem. Soc, 134, 12308-12318(2012)

非特許文献9 : J. Biol. Chem, 291, 16508-16518(2016)

非特許文献10 : J. Biol. Chem, 291, 9356-9370(2016)

非特許文献11 : Nat. Protoc, 6, 1183-1191(2011)

非特許文献12 : Bioconjug Chem, 30, 1343-1355(2019)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] これまでに報告されている糖鎖均一化抗体と酵素を用いるADCの製造工程は、抗体糖鎖の加水分解工程、糖鎖均一化抗体への糖転移工程、抗体-糖鎖へのペイロードの連結工程という3つの工程を要する。各工程でのADC精製も考慮した場合、ADC製造コストの増大、精製による抗体の性能及び機能低下が予想されるため、よりシンプルな製法が期待される。

[0010] 一般に、酵素反応は基質特異的である。そのため、基質となる糖鎖をペイロードで修飾したものを、糖転移酵素を用いて一段階で糖鎖均一化抗体に複合化しようとする、当該酵素の反応効率の著しい低下が予想される。実際、本発明者らはペプチド又は薬物で修飾した糖鎖を、様々な糖転移酵素により抗体に複合化することを試みたが、単純糖鎖を抗体に連結する場合と比較して、著しく反応効率が低下した。

[0011] 本発明は、ペイロードで修飾した糖鎖を、糖鎖均一化抗体に効率よく複合化しうる酵素を提供すること、及びこの酵素により、従来二工程を要した抗体とペイロードの複合化を、一工程で実施するADCの新規な製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、以下を提供する。

[1] 下記の工程を含む、抗体薬物複合体の製造方法：

糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、コンジュゲーションする工程であつ

て、

糖鎖結合薬物が、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖にリンカーを介して薬物が結合したものである、工程。

[2] 糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素によりコンジュゲーションする、1に記載の製造方法。

[3] エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素が、下記のいずれかのタンパク質である、2に記載の製造方法：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7) 配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からな

るタンパク質。

[0013] [4] リンカーが、生体内で開裂可能な構造を含む、1から3のいずれか1項に記載の製造方法。

[5] リンカーが、ペプチドを含む構造である、1から4のいずれか1項に記載の製造方法。

[6] リンカーが、一般式-E-D-C-B-A-で表される構造であり、ただしAは糖鎖に結合し、Eは薬物に結合する、1から5のいずれか1項に記載の製造方法

[式中、

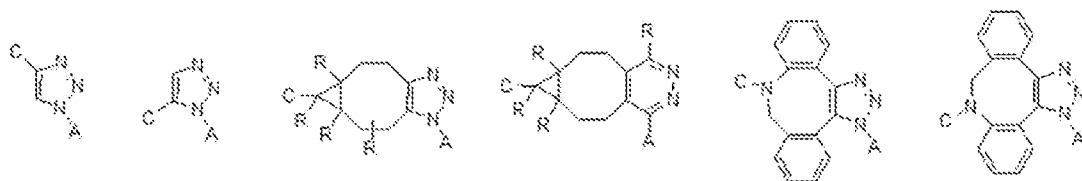
A、B、C、及びEが、各々独立に、アルキル基、エステル基、カルバモイル基、アルコシアルキル基、イミン基、ヒドラゾン基、アゾ基、スルホン基、芳香族基、及び単結合からなる群より選択され；

Dは、2-6個のアミノ酸残基からなるペプチドである。]

[7] Aは、 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-(CH_2)_{m2}-$ 、 $-(CH_2)_{m2}-$ 、又は単結合であり；

Bは、下記からなる群より選択されるいずれかであり

[化1]



[式中、Rは、それぞれ独立して、水素原子、炭素数1-4のアルキル、炭素数1-4のアルコキシ、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、又は NRR である。]；

Cは、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_{n2}-(CH_2)_{n3}-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-NH-(CH_2)_{n3}-C(O)-$ 、又は単結合であり、

Eは、 $-アミノベンジルアルコール-C(O)-$ 、 $NH-(CH_2)_0-$ 、又は単結合であり、

$m1$ は、1から12の整数であり、

$m2$ は、1から6の整数であり、

$n1$ は、1から6の整数であり、

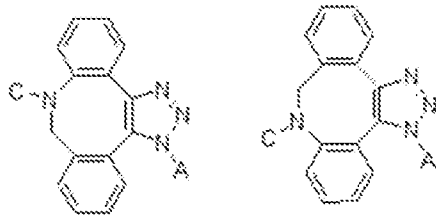
$n2$ は、1から12の整数であり、

$n3$ は、1から6の整数であり、

oは、1から6の整数である。]、6に記載の製造方法。

[8] Bが、

[化2]



のいずれかである、7に記載の製造方法。

[9] 薬物が、アンスラサイクリン類、アウリスタチン類、メイタンシン類、カンプトテシン類、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カリケアミシン類、及びデュオカルマイシン類からなる群より選択されるいずれかである、1から8のいずれか1項に記載の製造方法。

[10] 下記のいずれか一のタンパク質を含む、糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物との反応に用いるための酵素剤：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし2

33番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[11] 下記のいずれか一のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの、糖鎖均一化抗体と、糖鎖結合薬物との反応に用いるための酵素の製造における使用：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有す

るアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]pRSFDuet-1(Novagen)のマップ

[図2-1]pRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Qのマップ

[図2-2]pRSFDuet-1-EndoS D233Qのマップ

[図3]図3は抗体にEndoSを用い、抗体のN297結合糖鎖を加水分解し、得られた抗体-GlcNAcを示した模式図である。

[図4]図4はEndoF3変異酵素を用いたコンジュゲーションを模式的に示した図である。

[図5]図5はEndoF3変異酵素を用い、抗体-GlcNAcとダウノルビシン付糖鎖をコンジュゲーションし、取得したADCのHPLCクロマトグラムを示した図である。

[図6]図6はEndoF3変異酵素を用い、抗体-GlcNAcとMMAE付糖鎖をコンジュゲーションし、取得したADCのHPLCクロマトグラムを示した図である。

[図7]図7はEndoF3変異酵素を用い、抗体-GlcNAcとダウノルビシン付糖鎖をコンジュゲーションし、取得したADCのMSクロマトグラムを示した図である。

[図8]図8はEndoF3変異酵素を用い、抗体-GlcNAcとMMAE付糖鎖をコンジュゲーションし、取得したADCのMSクロマトグラムを示した図である。

[図9]EndoF3_D165Qのアミノ酸配列(SEQ ID NO:1)、EndoF3_D165Qの最適化塩基配列(SEQ ID NO:2)、Matlose Binding proteinのアミノ酸配列(SEQ ID NO:5)

[図10]pRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Qの全長塩基配列 (SEQ ID NO:10)

[図11]EndoS_D233Qのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:11)、EndoS_D233Qの最適化塩基配列 (SEQ ID NO:12)

[図12]pRSFDuet-1-EndoS D233Qの全長塩基配列 (SEQ ID NO:19)

[図13]AP3付糖鎖コンジュゲート(HPLC)

[図14]AP3付糖鎖コンジュゲート(MS)。

[図15]エキサテカン付糖鎖コンジュゲート(HPLC)

[図16]エキサテカン付糖鎖コンジュゲート(MS)

[図17]MMAE-PEG3付糖鎖コンジュゲート、及びMMAE-PEG4付糖鎖コンジュゲート(HPLC)

[図18]MMAE-PEG3付糖鎖コンジュゲート (MS)

[図19]MMAE-PEG4付糖鎖コンジュゲート(MS)

[図20]MMAE-GGFG付糖鎖コンジュゲート(HPLC)

[図21]MMAE-GGFG付糖鎖コンジュゲート(MS)

[図22]pRSFDuet-1-MBP-WP1328のマップ

[図23]WP1328の塩基配列 (SEQ ID NO:20)、WP1328のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:24)

[図24]pRSFDuet-1-MBP-WP1328の全塩基配列 (SEQ ID NO:23)

発明を実施するための形態

[0015] 発明は、下記の工程を含む、抗体薬物複合体(Antibody Drug Conjugates, 以下ADC)の製造方法に関する。本発明の製造方法は、糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、コンジュゲーションする工程を含む。糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とをコンジュゲーションする工程は、合成法又は酵素法により行うことができる。

[0016] [酵素]

コンジュゲーション工程を酵素法で行う場合、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素を用いることができる。本発明に関し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素というときは、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであって、加水分解能が抑制された変異酵素をいう。代表的なエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの例として、EndoA、EndoD、EndoM、EndoH、EndoF2、EndoF3、EndoE、EndoS、EndoS2が挙げられる。

[0017] 好ましい態様においては、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異

酵素のうち、EndoSの233番目のアスパラギン(D)を置換した変異酵素、EndoS2の184番目のアスパラギン(D)を置換した変異酵素、EndoF3の165番目のアスパラギン(D)を置換した変異酵素、好ましくはEndoSの233番目のアスパラギン(D)を置換した変異酵素、又はEndoF3の165番目のアスパラギン(D)を置換した変異酵素が用いられる。

[0018] より好ましいエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素の例は、下記のいずれか一のタンパク質からなる変異酵素である。

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7) 配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からな

るタンパク質。

[0019] エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素の別の例は、下記のいずれか一のタンパク質からなる変異酵素である。

(1)配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において165番目のグルタミン(Q)がアラニン(A)であるアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はQ又はAであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はQ又はAであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4)配列番号11のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はQであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はQであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0020] 配列表には、配列番号:1としてEndoF3の165番目をグルタミン(Q)に置換したEndoF3 D165Qのアミノ酸配列が示されている。また配列番号:11として、EndoSの233番目をグルタミン(Q)に置換したEndoS D233Qのアミノ酸配列が示されている。なお、以下では、本発明を、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素として、EndoF3 D165Q又はEndoS D233Qを用いた場合を例に説明することがあるが、当業者であれば、その説明を他の変異酵素を用い

た場合にも適宜当てはめて理解することができる。

[0021] コンジュゲーションに用いるエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素は、上述の変異酵素にさらに点変異が導入されたものであってもよい。このような例として、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において165番目のグルタミン(Q)がアラニン(A)である、アミノ酸配列からなるタンパク質であって、K81T、M97W、Y、F、V、G、S、又はQ、V129G、Q250I、N270R、L、又はT、及びY282Wからなる群から選択される少なくとも一つに相当する変異を有する、タンパク質からなる変異酵素が挙げられる。特に好ましい例として、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において165番目のグルタミン(Q)がアラニン(A)である、アミノ酸配列からなるタンパク質であって97番目の(M)を(G)に置換したEndoF3 D165Q/M97Gが挙げられる。

[0022] 本発明に関し、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素に関し、コンジュゲーション活性というときは、特に記載した場合を除き、糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とのコンジュゲーション反応を行ったときに、薬物が付加した抗体(付加体)を少なくとも20%生成できることをいう(100(%) - 残存率(%)が20%以上)。ここでいう率(%)は、コンジュゲーション反応液のHPLCクロマトグラムのピーク面積に基づき、計算できる。複数種類の付加体が生成する場合、例えば1付加体と2付加体が生成する場合は、すべての付加体を考慮する。具体的には、下記の式に基づいて計算できる。

[0023] 残存率(%) = [未反応の抗体のピーク面積値] / [(未反応の抗体のピーク面積値) + (付加体のピーク面積値 : 複数種類に付加体が生成する場合は各々のピーク面積値の合計) × 100

[0024] 1付加体変換率(%) = [1付加体のピーク面積値] / [(未反応の抗体のピーク面積値) + (1付加体のピーク面積値) + (2付加体のピーク面積値)] × 100

[0025] 2付加体変換率(%) = [2付加体のピーク面積値] / [(未反応の抗体のピーク面積値) + (1付加体のピーク面積値) + (2付加体のピーク面積値)] × 100

[0026] 本発明はまた、抗体薬物複合体の製造方法に用いることができるエンド-β

-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素をコードするポリヌクレオチドを提供する。すなわち、

下記のいずれかのタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7) 配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0027] 抗体薬物複合体の製造方法に用いることができるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素をコードするポリヌクレオチドの別の例は、下記

のいずれか一のタンパク質をコードする、ポリヌクレオチドである。

(1)配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において165番目のグルタミン(Q)がアラニン(A)であるアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はQ又はAであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はQ又はAであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4)配列番号11のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はQであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はQであり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0028] [抗体]

本発明に用いる抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれでもよいが、ヒト化抗体、又はヒト抗体であることが好ましい。用いる抗体はまた、修飾されていてもよく、ポテリジェント技術(IgGのFc領域のフコースを除去)により作成されたものであってもよい。

[0029] 抗体の一例は、抗HER2抗体である。抗HER2抗体は、リコンビナント抗HER2モノクローナル抗体であり、ヒトの定常領域を有するキメラ抗体、ヒト抗体のCDR(相補性決定領域)をヒト以外の動物の抗HER2抗体のCDRで移植したヒト

化抗体(CDR移植抗体)、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物であるヒト抗体が含まれるが、ヒト化抗体やヒト抗体が好ましい。完全ヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座の大部分が遺伝子導入されたマウスを免疫することにより作製することができる。好ましい抗HER2抗体として、ヒト化IgG1抗体であるトラスツズマブ(Trastuzumab)(ハーセプチン(登録商標))が挙げられる。

[0030] 本発明は、抗体医薬品として用いられている抗体に適用することができる。具体例としては、ibritumomabtixetan、iodine131、catumaxomab、blinatumomab、muromonab-CD3、abciximab、rituximab、basiliximab、infliximab、cetuximab、brentuximab、siltuximab、dinutuximab、obiltoxaximab、dacilizumab、palivizumab、gemtuzumab、alemtuzumab、omalizumab、efalizumab、bevacizumab、natalizumab、tocilizumab、ranibizumab、eculizumab、certolizumabpegol、mogamulizumab、pertuzumab、obinutuzumab、vedolizumab、pembrolizumab、idarucizumab、mepolizumab、elotuzumab、daratumumab、ixekizumab、reslizumab、adalimumab、panitumumab、golimumab、ustekinumab、canakinumab、ofatumumab、denosumab、ipilimumab、belimumab、raxibacumab、ramucirumab、nivolumab、secukinumab、evolocumab、alirocumab、及びnecitumumabを挙げることができる。

[0031] 本発明の製造方法に用いられる抗体のクラスの一例はIgGであり、サブクラスの一例は、IgG1である。

[0032] [薬物]

本発明には、薬物として、抗がん剤を用いることができる。抗がん剤の例として、チューブリン合成阻害剤(抗がん性植物アルカロイド)、トポイソメラーゼ阻害剤、核酸合成の阻害剤であるアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質抗がん剤、ホルモン製剤、白金製剤、非特異的抗悪性腫瘍剤等の公知の抗がん剤の他新規に開発される抗がん剤を含む。具体的には、アウリスタチン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンデシン、ドセタキセル水和物、パクリタキセル、酒石酸ビノレルビン、メイタンシノイド等のチ

ユーブリン合成阻害剤(抗がん性植物アルカロイド)；カンプトテシン、トポテカン、エトポシド、塩酸イリノテカン、塩酸ノギテカン等のトポイソメラーゼ阻害薬；シクロフォスファミド、イフォスファミド、メルファラン、チオテバ、ブスルファン、カルボコン、ダカルバジン、塩酸ニムスチン、ラニムスチン等のアルキル化剤；メトトレキサート、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、フルオロウラシル(5-FU)、テガフル、テガフルウラシル、カルモフル、ドキシフルリジン、シタラビンオクホスファート、ヒドロキシカルバミド、シタラビン、塩酸ゲムシタビン、リン酸フルダラビン、エノシタビン、ロイコボリン等の代謝拮抗剤；塩酸ドキソルビシン、塩酸イダルビシン、塩酸エピルビシン、塩酸ピラルビシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸アクラルビシン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、ネオカルチノスタチン、ジノスタチンシチマラマー等の抗がん性抗生物質；リン酸エストラムスチンタトリウム、フルタミド、ビカルタミド、酢酸ゴセレリン、酢酸ニュープロレリン、クエン酸タモキシフェン、塩酸フォドロゾール水和物、アナストロゾール、メピチオスタン、エピチオスタノール、酢酸メドロキシプロゲステロン等のホルモン製剤；シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン等の白金製剤；クレスチン、レンアチン、シゾフィラン、ウベニメクス等の非特異的抗悪性腫瘍剤；塩酸ミトキサントロン、塩酸プロカルバジン、ペントスタチン、ソブゾキサン、トレチノイン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトン、ミトタン、ポルフィマーナトリウム等が挙げられる。

[0033] 好ましい態様においては、薬物は、アンスラサイクリン類、アウリスタチン類、メイタンシン類、カンプトテシン類、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カリケアミシン類、及びデュオカルマイシン類からなる群より選択されるいずれかである。

[0034] アンスラサイクリン類の例として、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、PNU-159682、ピラルビシンが挙げられる。

アウリスタチン類の例として、チューブリン合成阻害剤であり、非常に強い抗腫瘍剤であるauristatin(アウリスタチン)が挙げられる。アウリスタチンには、monomethyl auristatin E (MMAE、モノメチルアウリスタチンE)、monomethyl auristatin D (MMAD、モノメチルアウリスタチンD)、monomethyl auristatin F (MMAF、モノメチルアウリスタチンF)等が含まれる。この中でも、monomethyl auristatin E (MMAE、モノメチルアウリスタチンE)が好ましい。

メイタンシン類の例として、アンサマイトシンP3 (AP3)、DM1、DM4が挙げられる。

カンプトテシン類の例として、Exatecan、SN-38、DXdが挙げられる。

その他の具体例として、PBD-dimer、カリケアミシン、Duocarmycinが挙げられる。

[0035] [リンカー]

本発明では、糖鎖結合薬物が、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖にリンカーを介して薬物が結合している。好ましい態様において、リンカーは、スペーサー(後述する-C-B-A-)と切断性部分(-E-D-)を含む。

[0036] スペーサーは、糖鎖と、リンカー(狭義、後述する-E-D-)と薬物との結合物を連結する部位である。結合基としては、アミド、エステル、アルコシキアルキル、カルバモイル、スルホン酸アミド、スルホン酸エステル、ホスホン酸アミド、ホスホン酸エステル、アルドイミン、ケトイミン、オキシム、及びアルキンとアジド等から形成されるクリック結合部位等が挙げられる。

[0037] クリック結合部位として代表的なものは、次の文献情報に挙げられる(Chem Rev.113, 4905-4979(2013)、Method Mol Biol.2078, 83-97(2020)、Chem .Soc.Rev.48, 4361-4374(2019)、Protein Cell.Jan ; 9(1), 33-46(2018))。このような結合部位の好ましい例としては、アルキンとアジドから形成される1, 2, 3-トリアゾール部位、DBCOとアジドから形成される1, 2, 3-トリアゾールを含む4環性部位が挙げられる。さらに好ましい例としてアジドから形成される1, 2, 3-トリアゾールを含む4環性部位が挙げられる。

[0038] また、ADC凝集性低下を目的として、リンカーの水溶性を向上させるため、一般的な手法として、PEG基を導入することが挙げられる。本製法ではスパーサーにPEG基を導入することが挙げられる。このようなPEGは直鎖であっても、分岐鎖であってもよく、好ましくは直鎖のPEGである。PEG鎖長は特に限定されず、例として、PEG2（数値は繰り返し数を表す。）、PEG3、PEG4、PEG5～12が挙げられる。

[0039] 切断性部分は、タンパク質の変性・分解を引き起こさない特定の条件において、切断可能な部位である。すなわち、生体内で開裂可能な構造を含む。タンパク質の変性・分解を引き起こさない特定の条件としては、酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群から選ばれる1種以上の物質による分解条件である（参考文献：Bioorg Med Chem, 20 571-582(2012)、J. Control. Release, 99, 423-434(2004)、Bioconjugate Chem, 28, 1906-1915(2017)）。このような切断部分としては、ジスルフィド結合、アセタール結合、ケタール結合、アルドイミン結合、ケトイミン結合、オキシム結合、エステル結合、アミド結合、カルバモイル結合、カーボネート結合、アルコキシアルキル結合、含スルホン結合、含ホスホン酸結合等が挙げられる。これら切断性部分の好ましい例として、2-6個のアミノ酸残基からなるペプチドが挙げられる。この例として、Val-Cit、Gly-Gly-Phe-Gly(GGFG)、Val-Ala、Lys-Phe(KF)、Gly-Gly-Val-Gly(GGVG)が挙げられる。

[0040] 好ましい態様において、リンカーは、一般式-E-D-C-B-A-で表される構造であり、ただしAは糖鎖に結合し、Eは薬物に結合する。

[0041] 式中、

A、B、C、及びEが、各々独立に、アルキル基、エステル基、カルバモイル基、アルコキシアルキル基、イミン基、ヒドラゾン基、アゾ基、スルホン基、芳香族基、及び単結合からなる群より選択され；

Dは、2-6個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

[0042] 式中、

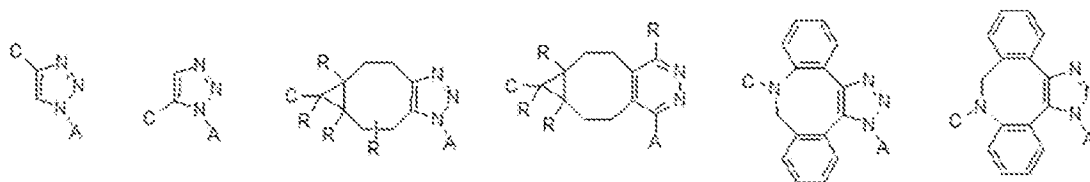
A、B、C、及びEはまた、各々独立に、 $-(CH_2)_{1-12}-$ 、 $-(CH_2)_{1-12}-O-C(=O)-$ 、 $(CH_2)_0-$

$_{12}$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-12}-(\text{CH}_2)_{1-12}-$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^1)-$ 又は $-(\text{CH}_2)_{1-12}-\text{N}(\text{R}^1)-$ （このとき R^1 は、水素原子、又は $-(\text{CH}_2)_{1-6}$ である。）、 $-\text{R}^2\text{C}=\text{N}-\text{NR}^3-$ 又は $-\text{R}^2\text{C}=\text{N}-\text{OR}^3-$ （このとき R^2 及び R^3 は、各々独立に、水素原子、又は $-(\text{CH}_2)_{1-6}$ である。）、 $-\text{N}=\text{N}-$ 、 $-\text{SO}_3-$ 、2価の芳香族炭化水素基（芳香族炭化水素環から2個の水素原子を除去して形成される基、例えばフェニレン、インデニレン、ナフチレン、フルオレニレン、フェナントレニレン、アントリレン及びピレニレン）、及び単結合からなる群より選択されていてもよい。

[0043] Aは、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{m1}-(\text{CH}_2)_{m2}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{m2}-$ 、又は単結合とすることができる。

[0044] Bは、下記からなる群より選択されるいずれかであってもよい。

[0045] [化3]



[0046] 式中、Rは、それぞれ独立して、水素原子、炭素数1-4のアルキル、炭素数1-4のアルコキシ、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、又は NRR である。

[0047] Cは、 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{n1}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{n1}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n2}-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{n1}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{C}(\text{O})-$ 、又は単結合であり、

Eは、 $-\text{アミノベンジルアルコール}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $\text{NH}-(\text{CH}_2)_o-$ 、又は単結合であり、

$m1$ は、1から12の整数であり、

$m2$ は、1から6の整数であり、

$n1$ は、1から6の整数であり、

$n2$ は、1から12の整数であり、

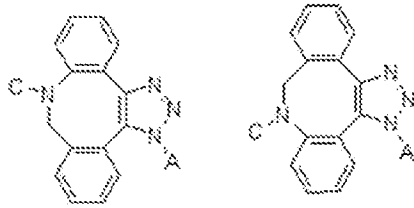
$n3$ は、1から6の整数であり、

o は、1から6の整数である。

[0048] Bは、下記のいずれかであってもよい。

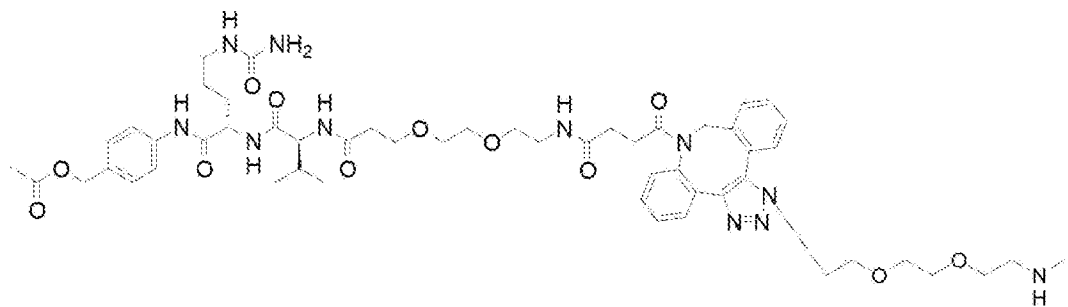
[0049]

[化4]



[0050] 特に好ましい態様において、リンカーは、下記の構造からなる。

[0051] [化5]



[0052] 特に好ましい態様において、本発明の製造方法は、下記のように実施することができる。

(1)元々糖鎖構造が不均一な抗HER2抗体の糖鎖を切断する。糖鎖の切断は、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(EndoS)を用いて行うことができる。EndoSにより、抗体のFc領域のCHドメインに位置する297番目のアスパラギン(Asn)に結合しているN型複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)1残基を残して切断される。還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していても、結合していなくてもよい。この後、クロマトグラフィーを用いて、糖鎖が切断された抗体を精製すればよい。クロマトグラフィーとしては、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イ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等が挙げられる。

(2)(1)により取得した抗体-GlcNAcの糖鎖に糖鎖結合薬物をコンジュゲーションする。コンジュゲーションは、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素を用いて行うことができる。抗体-GlcNAcのFc領域のCHドメインに位

置する297番目のアスパラギン(Asn)に結合しているN型複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)1残基に糖鎖複合薬物の還元末端がオキサゾリン化されたN-アセチルグルコサミンが結合する。この後、クロマトグラフィーを用いて、糖鎖が切断された抗体を精製すればよい。クロマトグラフィーとしては、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イ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等が挙げられる。

[0053] [用語等]

本発明に関し、タンパク質又はアミノ酸配列について「1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」というときの置換等されるアミノ酸の個数は、特に記載した場合を除き、いずれのタンパク質においても、そのアミノ酸配列からなるタンパク質が所望の機能を有する限り特に限定されないが、1-750個、1-500個、1-250個、1-200個、1-150個、1-100個、1-50個、1-40個、1-30個、1-20個、1-15個、1-9個又は1-4個程度であるか、性質の似たアミノ酸への置換であれば、さらに多くの個数の置換等がありうる。このようなアミノ酸配列に係るポリヌクレオチド又はタンパク質を調製するための手段は、当業者にはよく知られている。

[0054] 本発明に関する説明において、アミノ酸又はアミノ酸残基については、特に記載した場合を除き、Aはアラニン、Cはシステイン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Fはフェニルアラニン、Gはグリシン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Kはリシン、Lはロイシン、Mはメチオニン、Nはアスパラギン、Pはプロリン、Qはグルタミン、Rはアルギニン、Sはセリン、Tはトレオニン、Uはセレノシステイン(3)、Vはバリン、Wはトリプトファン、Yはチロシンを表す。

[0055] 本発明に関し、塩基配列(ヌクレオチド配列ということもある。)又はアミノ酸配列について「同一性」というときは、特に記載した場合を除き、いずれの塩基配列又はアミノ酸配列においても、2つの配列を最適の態様で整列させた場合に、2つの配列間で共有する一致したヌクレオチド又はアミノ酸の個

数の百分率を意味する。すなわち、同一性＝(一致した位置の数/位置の全数)×100で算出でき、市販されているアルゴリズムを用いて計算することができる。また、このようなアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(1990)403-410に記載されるNBLAST及びXBLASTプログラム中に組込まれている。より詳細には、塩基配列又はアミノ酸配列の同一性に関する検索・解析は、当業者には周知のアルゴリズム又はプログラム(例えば、BLASTN、BLASTP、BLASTX、ClustalW)により行うことができる。プログラムを用いる場合のパラメーターは、当業者であれば適切に設定することができ、また各プログラムのデフォルトパラメーターを用いてもよい。これらの解析方法の具体的な手法もまた、当業者には周知である。同一性の計算には遺伝子情報処理ソフトウェア Genetyx(登録商標)(株式会社ゼネティックス)を用いてもよい。なお、同一性%を求める対象配列が、末端にタグ配列等の、比較する配列には存在しない付加配列を有する場合には、その付加配列部分は同一性%の計算には含めない。

[0056] 本発明に関し、塩基配列又はアミノ酸配列について、同一性というときは、特に記載した場合を除き、いずれの場合も、少なくとも50%、例えば60%以上、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは97.5%以上さらに好ましくは99%以上の配列の同一性を指す。

[0057] 本発明で用いるポリヌクレオチド又は遺伝子、及びタンパク質又は酵素は、当業者であれば、従来技術を利用して調製することができる。

実施例

[0058] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は市販されているか、又はよく知られた供給源から入手可能である。

[0059] 本明細書に記載されているタンパク濃度はBradford法(測定波長：595nm)にて測定した。

なお、以下の実施例においては下記の略号を使用する。

CDMBI : 2-Chloro-1, 3-dimethyl-1H-benzimidazol-3-ium chloride

HOAt : 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole

HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MMAE : Monomethyl Auristatin E

[0060] [実施例1 : EndoF3変異酵素の調製]

(1) pRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Qの調製

EndoF3 の塩基配列 (NZ_CP067018, locus_tag I6H88_03475 ; タンパク配列はWP_034868774.1) にD165Q変異を付与の上(EndoF3 D165Qのアミノ酸配列はSEQ ID NO:1)、E.coli発現用にコドン最適化した配列 (SEQ ID NO:2) を人工合成し(ThermoFisher Scientific社)、この配列をプライマーFEndoF3-Nterm MBP及びREndoF3-NtermMBPを用いたPCR(98℃10秒、60℃5秒、68℃8秒を30サイクル)により増幅した。

[0061] FEndoF3-NtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:3)

ACTATCGAGGGAAGGGCAACCGCACTGGCAGGTAGC

REndoF3-NtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:4)

CCAATTGAGATCTTCAGTTTTTAACGGCATCACGAACTG

[0062] 同様にpRSF-MBPベクター(pRSDuet-1、図2)のBglIIサイトにMaltose binding protein(アミノ酸配列はSEQ ID NO:5)及びFactor Xa切断配列ATCGAGGGAAGG(SEQ ID NO:6)(アミノ酸配列 : IEGR(SEQ ID NO:7))がクローニングされたベクターを、プライマーFNtermMBP及びRNtermMBPを用いたPCR (98℃10秒、60℃5秒、68℃8秒を30サイクル)により増幅した。

[0063] FNtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:8)

AGATCTCAATTGGATATCGG

RNtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:9)

CCTTCCCTCGATAGTCTGCGGTCTTTCAGGGC

[0064] 得られた2断片をIn-Fusion kit(TAKARA)を使用し、MBPのC末端にFactor Xa配列、その下流にN末シグナル配列を除去したEndoF3配列が配置されるよう

にクローニングした。得られたIn-Fusion溶液を用いてE. coli JM109(TAKARA)を形質転換し、37℃で終夜培養した。得られたコロニーに対してコロニーPCRを行い、ポジティブクローンからプラスミドとしてpRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Q (SEQ ID NO:10)を取得した。

[0065] (2)点変異導入構築

pRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Qに対し目的の点変異を導入するため、PCRを行った。PCRにより得られた断片にDpnIを0.001mL加え、37℃で1時間反応し、DNA断片を精製した。得られた断片をE. coli JM109にヒートショック法で導入し、次いでLK plateに塗布後、37℃で終夜培養し、コロニーを取得した。このコロニーをカナマイシン含有LB培地(3mL)に接種し、終夜培養後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systemsにてプラスミド抽出を行い、培養物からプラスミドDNA溶液0.05mLを取得した。

[0066] (3)形質転換

BL21(DE3)コンピテントセル(Novagen)(0.05mL)に上記プラスミド(0.001mL)を加え、0℃で20分静置後、42℃アルミブロックで45秒静置し、ヒートショック処理した。37℃に加温したSOC培地(0.45mL)を加え、37℃で1時間培養した。培養液を遠心分離(室温、6000g、3分)し、菌体を沈殿させた。上清(0.4mL)を除去後、菌体を再懸濁し、LB-Agarプレート(0.05mg/mLのカナマイシン含有)に播種し、37℃で終夜静置培養した。

[0067] (4)発現培養

Superbroth(10mL ; Bacto Trypton(32g)、BactoYeast Extract(5g)、NaCl(5g)、1M 水酸化ナトリウム水溶液(5mL)、純水(950mL)、0.05mg/mLのカナマイシン含有)に上記形質転換で得られたコロニー1つを加え、37℃で終夜培養した。500mLバッフル付フラスコ中のSuperbroth(200mL、0.05mg/mLのカナマイシン含有)に培養液(2mL)を加えた。37℃で6時間培養し、終濃度が1mMとなるようにIPTGを加え、37℃で終夜培養した。培養液を遠心分離(4℃、10000 rpm、5分)し、上清を除去し、菌体を回収した。

[0068] (5)不溶性画分の調製及びリフォールディング

菌体にBugBuster(40mL)、及びLysonase(0.04mL)を加え、ピペティングにより菌体を懸濁し、20分転倒混和した。この菌体懸濁液を遠心分離(室温、10000rpm、20分)し、上清を除去し、沈殿物を不溶性画分として取得した。この不溶性画分に0.15%CHAPS/20%酢酸溶液(40mL)を加えた。37℃で2.5時間転倒混和し、遠心分離(室温、10000rpm、10分)し、上清を取得した。Slide-A-Lyzer Dialysis Flask(20kDa MWCO; Thermo Fischer Scientific)にこの上清を加え、超純水に浸し、4℃で2日透析した(4時間以上の時間を空けて透析外液を3回交換)。さらに10mM Tris-HClバッファー(pH8.0)に浸し、4℃で終夜透析した。本溶液を50mM pH7.4 Tris-HClバッファーで限外濾過(Amicon Ultra 30kDa)により置換し、EndoF3変異酵素を取得した。

[0069] [実施例2: EndoS変異酵素の調製]

(1) プラスミド構築

EndoS の塩基配列 (CP043530, locus_tag MGAS2221_1552; タンパク配列は WP_011285695.1) にD233Q変異を付与の上(EndoS D233Qのアミノ酸配列はSEQ ID NO:11)、E.coli発現用にコドン最適化した配列 (SEQ ID NO:12) をN末端側及びC末端側の2つの部分に分割して人工合成した(ThermoFisher Scientific社)。この配列を鋳型にプライマーFEndoS_D233Q_His_pRSF及びRendoS_D233Q_frontでN末端側を増幅し、FendoS_D233Q_back及びREndoS_D233Q_His_pRSFを用いたPCR(98℃10秒、60℃5秒、68℃8秒を30サイクル)によりC末端側を増幅した。同様にpRSFDuet-1を、プライマーFpRSF_InF_His_BamHI及びRpRSF_InF_His_NcoIを用いたPCR(98℃10秒、60℃5秒、68℃8秒を30サイクル)により増幅した。

[0070] FendoSD233Q_His_pRSF (SEQ ID NO:13)

CACCATCATCACCACGATAAACATTTGTTGGTAAAAAG

RendoSD233Q_front (SEQ ID NO:14)

GCTAATTTTTTAAATTTATTTAGACCTTCTAAAC

FendSD233Q_back (SEQ ID NO:15)

GGTCTAAATAAATTTAAAAAATTAGCTCAATTAGACTTG

RendoSD233Q_His_pRSF (SEQ ID NO:16)

CTCGAATTCGGATCCTTATTTTTTTAGCAGCTGCC

FpRSF_InF_His_BamHI (SEQ ID NO:17)

GGATCCGAATTCGAGCTCG

RpRSF_InF_His_NcoI (SEQ ID NO:18)

GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCAT

[0071] 得られた3断片をIn-Fusion kit(TAKARA)を使用し、開始コドンのMetを除去の上でHisタグの下流にEndoS配列が配置されるようにクローニングした。得られたIn-Fusion溶液を用いてE. coli JM109(TAKARA)を形質転換し、37℃で終夜培養した。得られたコロニーに対してコロニーPCRを行い、ポジティブクローンからプラスミドとしてpRSFDuet-1-EndoSD233Q(SEQ ID NO:19)を取得した。

[0072] (2)形質転換

BL21(DE3)コンピテントセル(Novagen)(0.05mL)に上記プラスミド(0.001mL)を加え、0℃で20分静置後、42℃アルミブロックで45秒静置し、ヒートショック処理した。37℃に加温したSOC培地(0.45mL)を加え、37℃で1時間培養した。培養液を遠心分離(室温、6000g、3分)し、菌体を沈殿させた。上清(0.4mL)を除去後、菌体を再懸濁し、LB-Agarプレート(0.05mg/mLのカナマイシン含有)に播種し、37℃で終夜静置培養した。

[0073] (3)発現培養

Superbroth(10mL; Bacto Trypton(32g)、BactoYeast Extract(5g)、NaCl(5g)、1M 水酸化ナトリウム水溶液(5mL)、純水(950mL)、0.05mg/mLのカナマイシン含有)に上記形質転換で得られたコロニー1つを加え、37℃で終夜培養した。500mLバッフル付フラスコ中のSuperbroth(200mL、0.05mg/mLのカナマイシン含有)に培養液(2mL)を加えた。37℃で6時間培養し、終濃度が1mMとなるようにIPTGを加え、37℃で終夜培養した。培養液を遠心分離(4℃、10000rpm、5分)し、上清を除去し、菌体を回収した。

[0074] (4)EndoS D233Qの取得

菌体にBugBuster(5mL)、及びLysonase(0.5mL)を加え、ピペッティングにより菌体を懸濁し、20分転倒混和した。この菌体懸濁液を遠心分離(4℃、10000rpm、20分)し、上清を回収した。この上清に終濃度が1%になるようにStreptomycin sulfateを加え、4℃で終夜静置した。この懸濁液を遠心分離(4℃、10000rpm、20分)し、上清を回収した。この上清に終濃度が40%になるように硫酸アンモニウムを加え、0℃にて1時間静置した。この懸濁液を遠心分離(4℃、10000rpm、20分)し、上清を回収した。この上清に終濃度が60%になるように硫酸アンモニウムを加え、0℃にて1時間静置した。この懸濁液を遠心分離(4℃、10000rpm、20分)し、上清を回収した。この上清に終濃度が20%となるように1M pH7.5 Tris-HClバッファーを加え、カラムクトマトグラフィー(His Trap HP)にアプライし、精製し、EndoS D233Q(SEQ ID NO:11)を取得した。

[0075] [実施例3：抗体-GlcNAcの調製]

抗体-GlcNAcの調製の模式図を図3に示す。エッペンドルフチューブにて、抗HER2抗体0.050g(米国特許第5821337を参考に調製したもの。サブクラスはIgG₁。)を酢酸ナトリウムバッファー(GlycoBuffer 1; NEW ENGLAND BioLabs)にて置換し、0.3mLになるように本バッファーを加えた。その溶液にEndoS(0.025mL; NEW ENGLAND BioLabs)を加え、37℃で16時間インキュベーションした。反応溶液のEndoSをChitin Beads(NEW ENGLAND BioLabs)にて除去し、回収画分をアフィニティカラム(rProtein A Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア))にて精製した。50mM pH7.4 Tris-HClバッファーにて限外濾過(Amicon Ultra 30kDa)で置換し、抗体-GlcNAc(0.050g)を取得した。

[0076] [実施例4：EndoF3変異酵素活性、及びEndoS変異酵素活性の測定]

実施例1で調製したEndoF3変異酵素、又は実施例2で調製したEndoS変異酵素にて、実施例3で調製した抗体-GlcNAcと、ペイロード付糖鎖(後掲の製造例6のダウノルピシン付糖鎖、又は後掲の製造例11のMMAE付糖鎖)をコンジュゲーションした(後掲の実施例5及び6参照)。本コンジュゲーションの模式図を図4に示す。取得したコンジュゲーション体をHPLCにより測定した。以下にHPLC

分析条件を示す。

[0077] 使用カラム：AdvanceBio HIC

カラムサイズ：30 x 4.6 mm

充填剤粒子径：3.5 μm

移動相A：50 mM pH 7.4 リン酸ナトリウム水溶液

移動相B：2 M pH 7.0 硫酸アンモニウム水溶液

移動相C：2-プロパノール

[0078] LC条件：

グラジエントは以下の通り。

[0079] [表1]

時間 (min)	移動相A (%)	移動相B (%)	移動相C (%)
0	50	45	5
12	70	9	21
13	75	0	25
14	75	0	25
15	50	45	5
23	50	45	5

[0080] 分析時間：23 min

流速：0.50 mL/min, カラム温度：25°C, 検出波長：214 nm, 280nm インジェクション量：10 μL .

[0081] 各HPLCクロマトグラムにつき、EndoF3変異酵素によるダウノルビシン付糖鎖とのコンジュゲーションを図5、EndoF3変異酵素によるMMAE付糖鎖とのコンジュゲーションを図6に示した。得られたHPLCクロマトグラムより、未反応の抗体-GlcNAc、抗体-GlcNAc1分子とペイロード付糖鎖1分子がコンジュゲーションした1付加体、及び抗体-GlcNAc1分子とペイロード付糖鎖2分子がコンジュゲーションした2付加体を、分離したピークとして確認した。抗体-GlcNAc、1付加体、及び2付加体のピーク面積比から、下記式より、抗体-GlcNAc残存率、及びコンジュゲーション変換率を算出した。なお、変換率算出には、214 nmのピーク面積を利用した。

[0082] 抗体-GlcNAc残存率(%) = [抗体-GlcNAcのピーク面積値] / [(抗体-GlcNAcのピーク面積値) + (1付加体のピーク面積値) + (2付加体のピーク面積値)] × 100

[0083] 1付加体変換率(%) = [1付加体のピーク面積値] / [(抗体-GlcNAcのピーク面積値) + (1付加体のピーク面積値) + (2付加体のピーク面積値)] × 100

[0084] 2付加体変換率(%) = [2付加体のピーク面積値] / [(抗体-GlcNAcのピーク面積値) + (1付加体のピーク面積値) + (2付加体のピーク面積値)] × 100

[0085] また、各コンジュゲート体のインタクト質量分析を実施した。得られたMSクロマトグラムをデコンヴォリューション処理した。EndoF3変異酵素によるダウノルピシン付糖鎖とのコンジュゲーション結果を図7に、EndoF3変異酵素によるMMAE付糖鎖とのコンジュゲーション結果を図8に示した。

[0086] EndoF3変異酵素と同様にEndoS変異酵素についても活性を測定した。

[0087] ダウノルピシン付糖鎖の場合の各変異酵素の活性を下表に示した。

[0088] [表2]

EndoF3変異酵素活性及びEndoS変異酵素活性(ダウノルピシン付糖鎖の場合)

Endo F3変異酵素	残存率 (%)	変換率 (%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
D165Q	48	28	24
D165Q/V129G	64	25	11
D165Q/Q250I	80	17	3
D165Q/N270R	63	23	14
D165Q/N270L	80	20	0
D165Q/N270T	78	22	0
D165Q/K81T	67	20	13
D165Q/M97W	60	25	15
D165Q/M97Y	67	21	12
D165Q/M97F	63	23	14
D165Q/M97V	57	28	15
D165Q/M97G	45	25	30
D165Q/M97S	59	21	20
D165Q/M97Q	58	19	23
D165Q/Y282W	50	27	23
Endo S変異酵素	残存率 (%)	変換率 (%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
D233Q	64	21	15

[0089] EndoF3変異酵素のうち、D165Q/M97Gが最も残存率が低かった。この変異酵素は糖鎖構造が異なる場合でも同様に高い活性を示すことが期待できる。

[0090] ダウノルビシン付糖鎖の場合の各変異酵素の活性を下表に示した。

[0091] [表3]

EndoF3変異酵素活性及びEndoS変異酵素活性(MMAE付糖鎖の場合)

Endo F3変異酵素	残存率 (%)	変換率 (%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
D165Q	7	38	55
Endo S変異酵素	残存率 (%)	変換率 (%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
D233Q	0	14	86

[0092] EndoS変異酵素を用いた場合に、高い変換率が得られた。

[0093] [表4]

単糖糖鎖^{*1}及びリンカー付糖鎖^{*2}でのコンジュゲーションでの各酵素活性

酵素	脱糖鎖抗体+単糖糖鎖 変換率 (%)		脱糖鎖抗体+リンカー付糖鎖 変換率 (%)	
	1付加体	2付加体	1付加体	2付加体
Endo S D233Q	9	91	6	94
Endo S2 D184M	35	5	0	0
Endo F3 D165Q	50	30	50	0

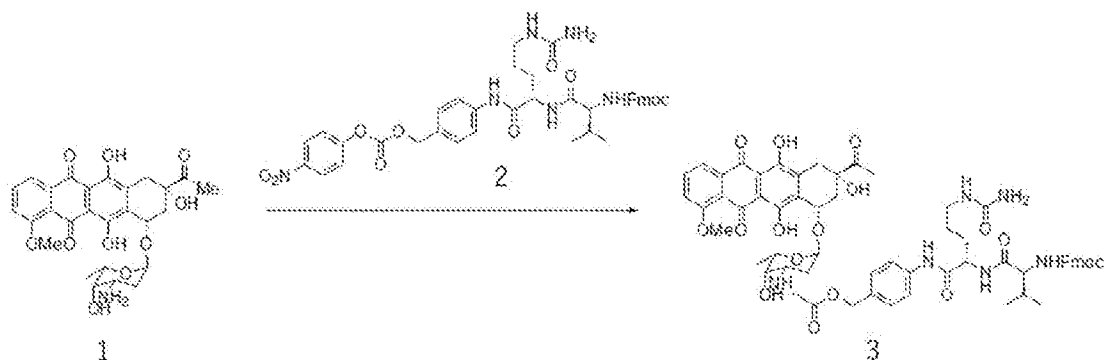
*1：何も結合していない還元末端がオキサゾリン化された糖鎖(化合物12又は化合物19において、ペイロードが付加されていないもの)

*2：糖鎖にリンカーが結合し、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖

[0094] EndoS2変異酵素でも一定程度の割合で変換が行えるが、EndoF3変異酵素及びEndoS変異酵素のほうが実験の条件では変換率が高かった。また、リンカー付き糖鎖をコンジュゲーションする場合よりもさらにペイロードが付加された糖鎖をコンジュゲーションする場合のほうが、変換率が劣ると予想されたが、ダウノルビシン付糖鎖、又はMMAE付糖鎖をコンジュゲーションする場合は、予想に反して変換率がより高いことが分かった。

[0095] [製造例1：化合物3]

[化6]

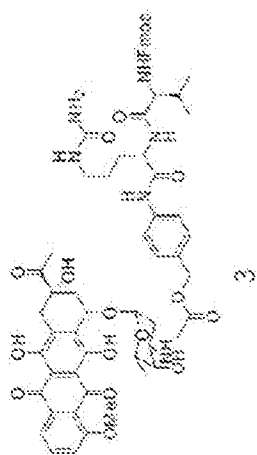
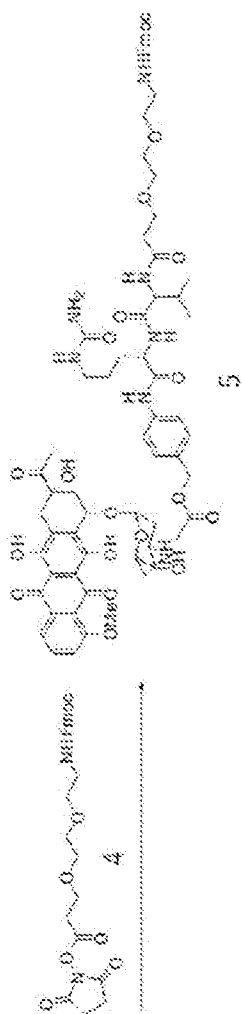


[0096] W02004/010957の方法で合成した化合物2(Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP) (0.99g)のDMF溶液(50mL)に化合物1(Daunomycin) (0.72g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.45mL)を加え、室温で19時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣をクロロホルムで洗浄し、濾過した。濾過物をDMFに溶解し、濾過後、溶解液を濃縮し、化合物3(1.43g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1155(M+H) $^{+}$

[0097] [製造例2：化合物5]

[化7]

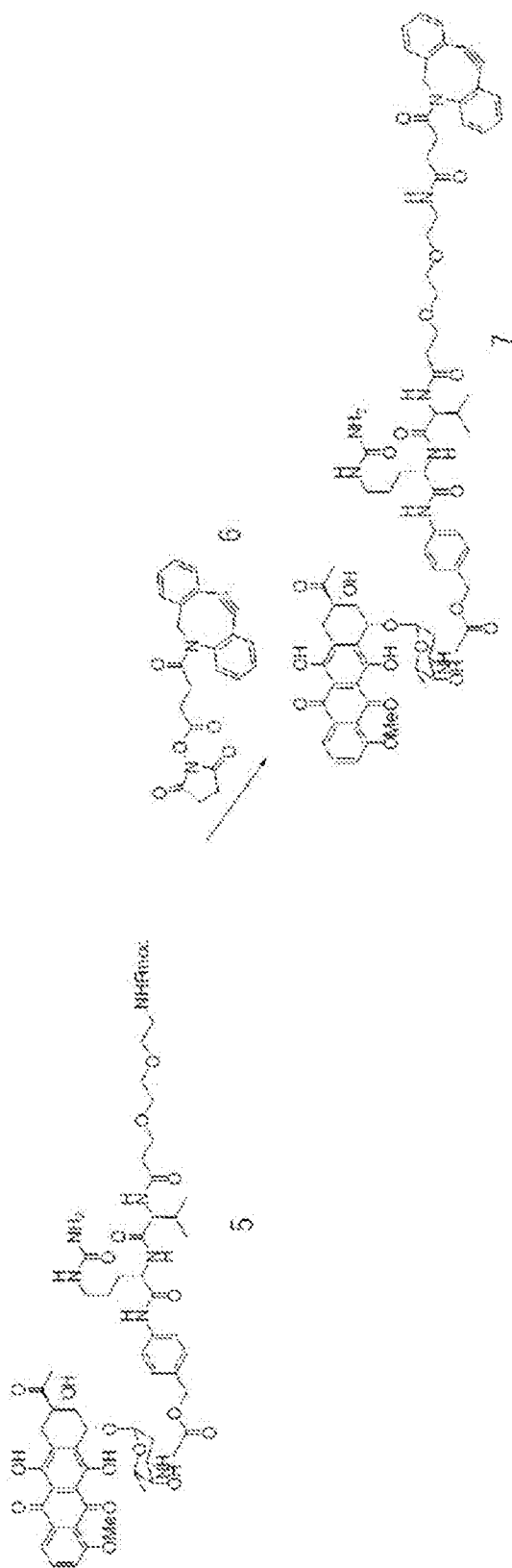


[0098] 化合物3 (1.43g)のDMF溶液(20mL)にジエチルアミン(0.5mL)を加え、室温で1.5時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を酢酸エチルで洗浄し、濾過し、濾過物(0.90g)を得た。得られた濾過物の内、0.40gをDMF(10mL)に溶解した。この溶液に化合物4(Fmoc-PEG₂-NHS ester) (0.38g)、及びジソプロピルエチルアミン(0.15mL)を加え、室温で17時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、得られた残渣をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20 : クロロホルム／メタノール=1／1)にて精製し、化合物5(0.45g)を得た。

MS(ESI)_{m/z} : 1315(M+H)⁺

[0099] [製造例3 : 化合物7]

[化8]

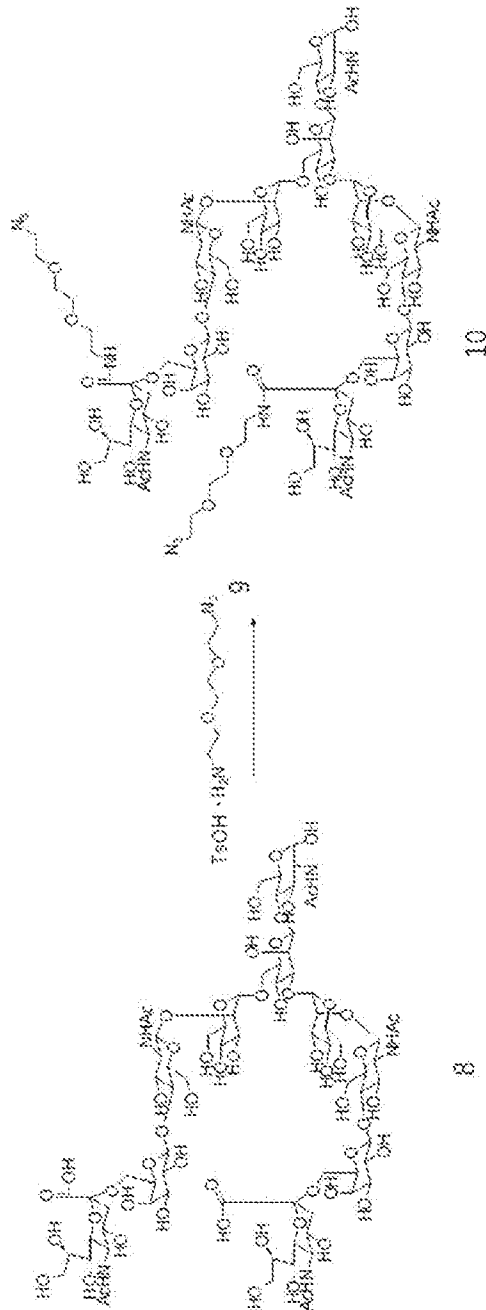


[0100] 化合物5(0.45g)のDMF溶液(15mL)にジエチルアミン(1.0mL)を加え、室温で30分攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルで洗浄し、濾過し、濾過物(0.30g)を得た。得られた濾過物の内、0.15gをDMF(15mL)に溶解した。この溶液に化合物6 (DBC0-NHS ester)(0.06g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.05mL)を加え、室温で4時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、得られた残渣をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20：クロロホルム／メタノール=1／1)にて精製し、化合物7(0.05g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1380(M+H)⁺

[0101] [製造例4：化合物10]

[化9]

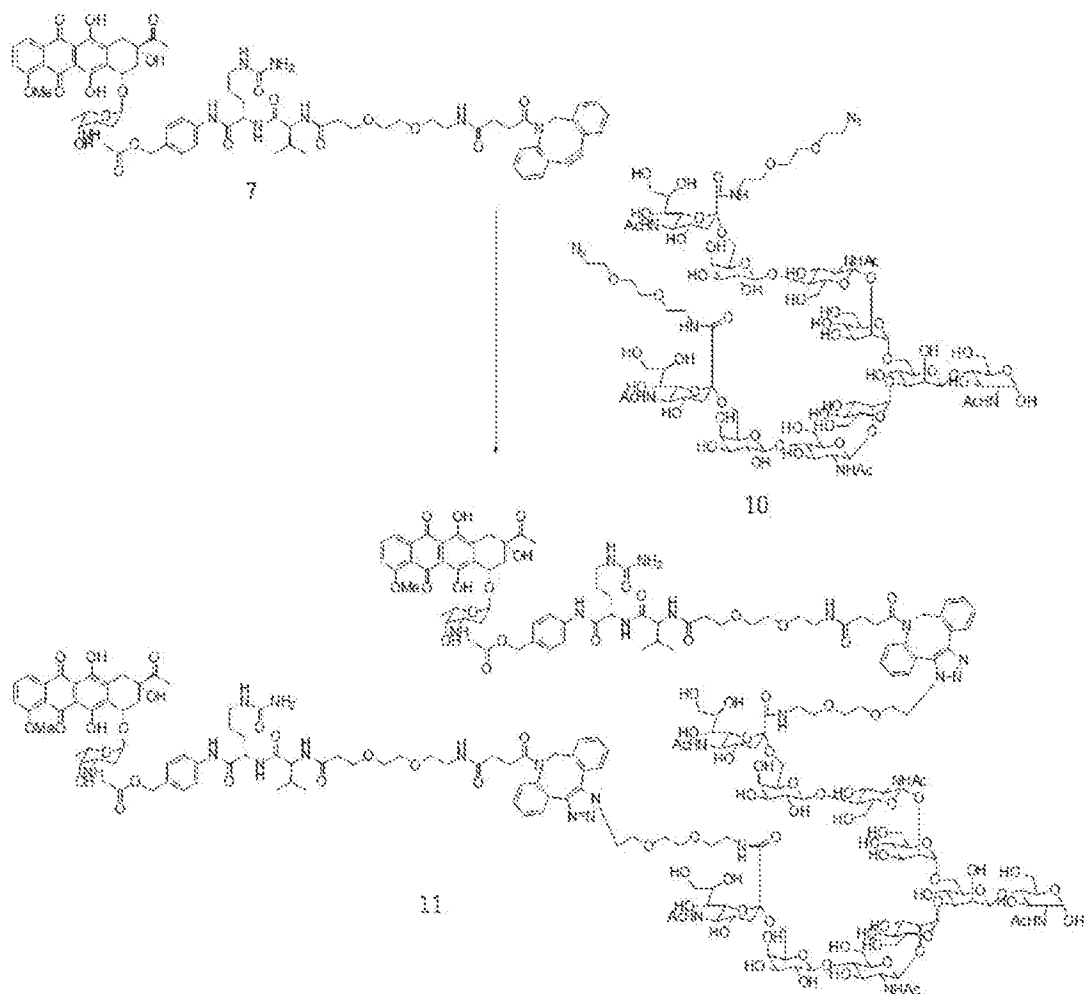


[0102] 化合物8 (α 2,6-シアリルグリカン) (0.10g)のDMF溶液(12mL)に化合物9 (A zido-PEG2-Amine · Tos-OH、東京化成工業株式会社) (0.88g)、及びDMT-MM(0.72g)を加え、37℃で終夜攪拌した。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20 ; メタノール)にて精製した。さらに取得した精製画分をワコーシルC-18にてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(水/アセトニトリル)で精製し、化合物10(0.11g)を得た。

MS(ESI) m/z : 2333(M+H) $^{+}$

[0103] [製造例5 : 化合物11]

[化10]

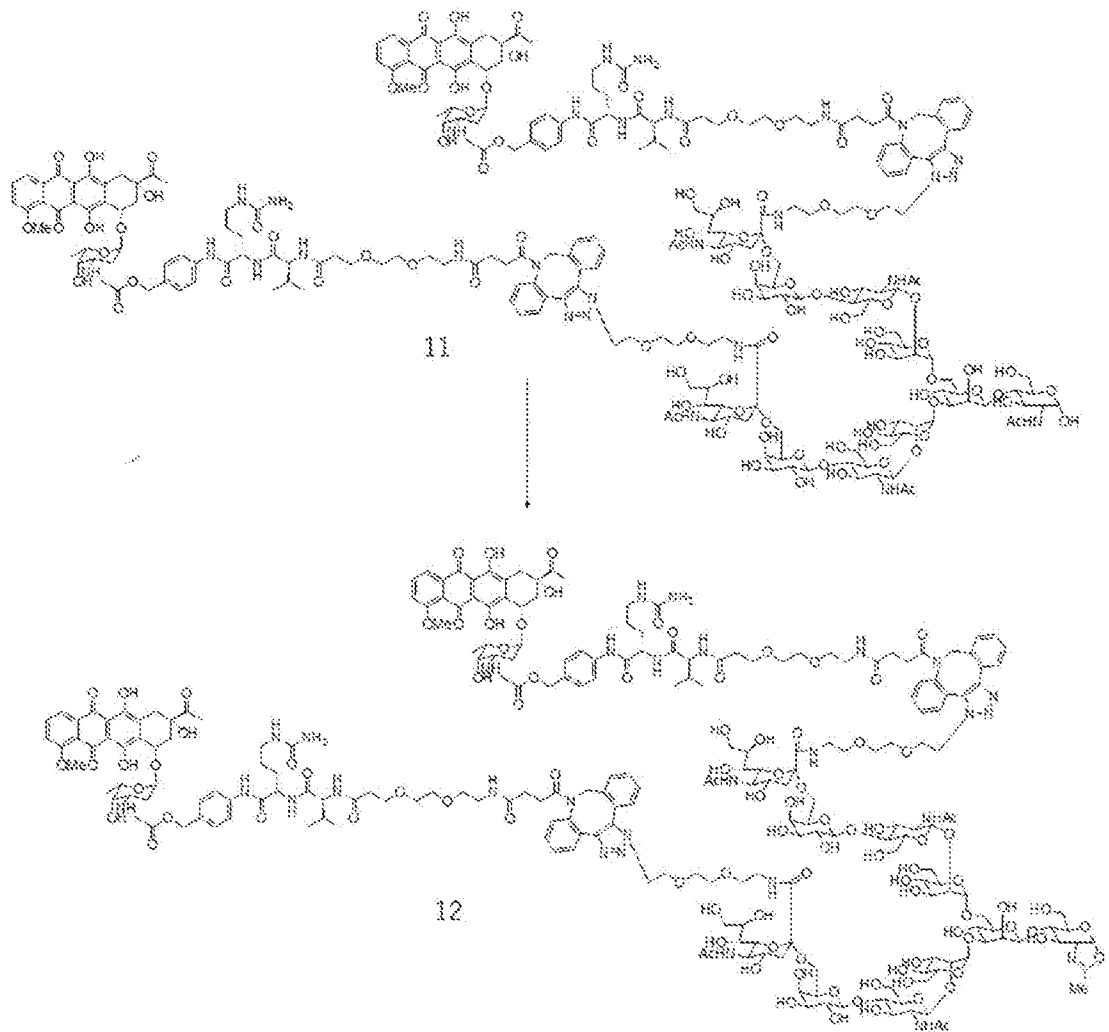


[0104] 化合物7(0.05g)のDMF溶液(10mL)に化合物10(0.02g)を加え、室温にて終夜撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(水／アセトニトリル)にて精製し、化合物11(0.03g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1698(M+3H) $^{3+}$ 、1274(M+4H) $^{4+}$

[0105] [製造例6 : 化合物12]

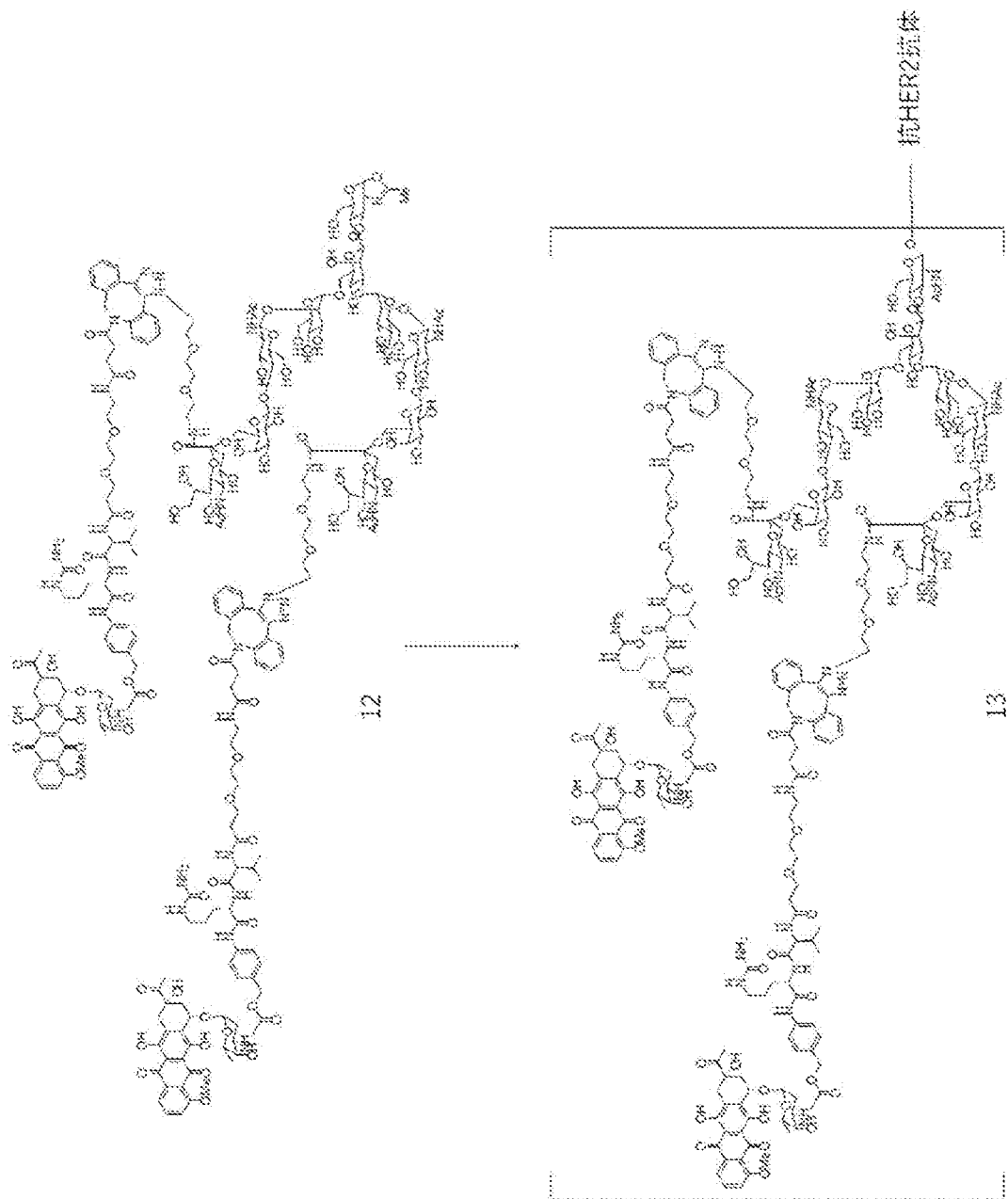
[化11]



[0106] 化合物11(0.02g)のDMF／水(1.5mL／1.5mL)混合溶液にCDMBI(0.02g)、及びトリエチルアミン(0.02mL)を加え、0℃で30分撹拌した。反応溶液をゲルろ過カラムクロマトグラフィー(LH-20：DMF)にて精製し、化合物12(0.01g)を得た。

[0107] [実施例5：抗体-GlcNAcとダウノルピシン付糖鎖のコンジュゲーション]

[化12]

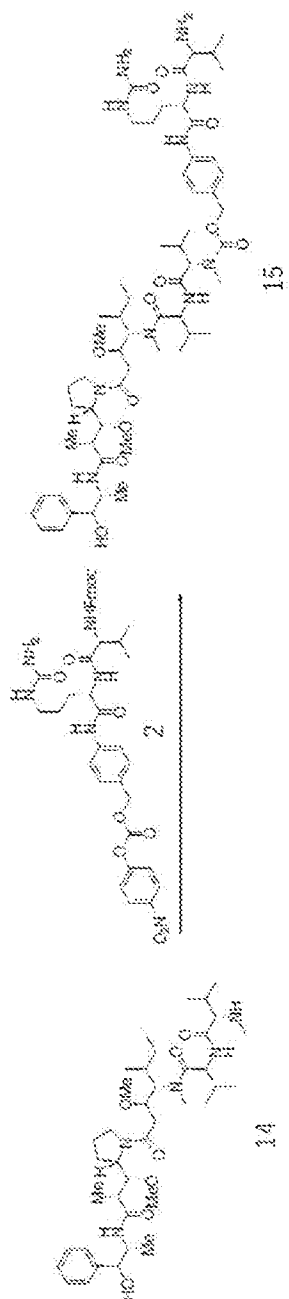


[0108] エッペンドルフチューブに変異酵素(実施例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、あるいは実施例2にて調製したEndoS変異酵素(0.003mg))、実施例3にて調製した抗体-GlcNAc(0.03mg)、及び化合物12/DMSO溶液(40mg/mL、0.001mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応溶液を37℃で3時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(Amicon Ultra 100kDa)し、50mM pH7.0

リン酸バッファーで置換し、取得した化合物13を分析した(図5、7)。

[0109] [製造例7：化合物15]

[化13]



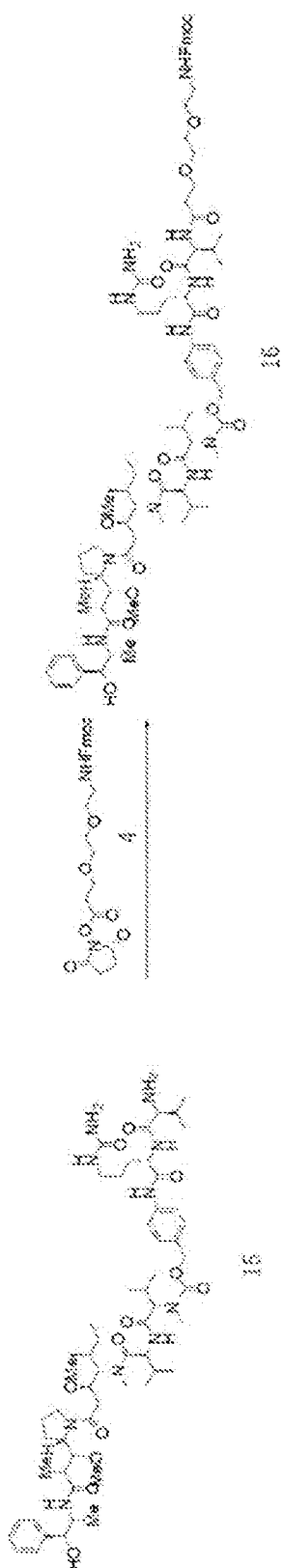
[0110] DMF(10mL)にHOBt(0.11g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.08mL)を加え、溶液Aを作製した。この溶液A(6.3mL)に化合物14 (Asta Tech, Inc.) (0.22g)、及び化合物2(0.22g)を溶解した。この反応溶液を室温で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(クロロホルム／酢酸エチ

ル)で精製し、化合物15(0.31g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1346(M+H)⁺

[0111] [製造例8 : 化合物16]

[化14]

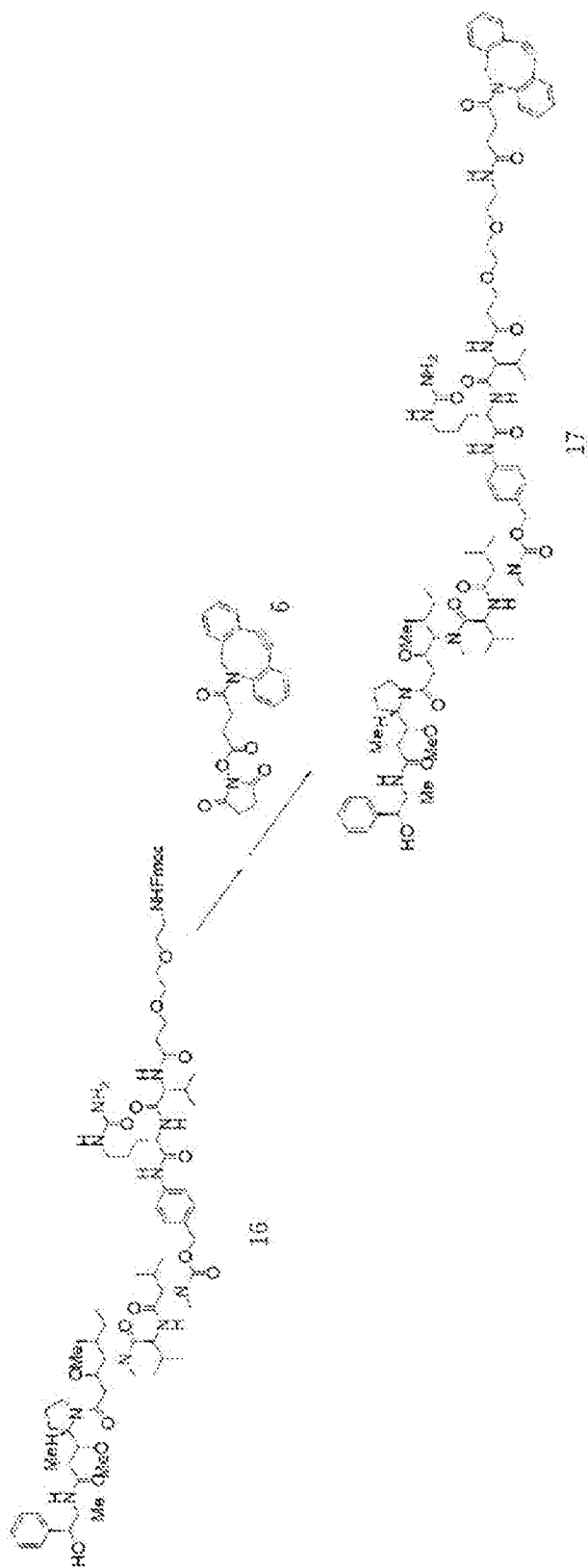


化合物15(0.31g)のDMF溶液(4.0mL)にジエチルアミン(1.0mL)を加え、室温で終夜撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(クロロホルム／酢酸エチル)で精製し、黄色固体(0.17g)を得た。得られた固体の内、0.11gを上記記載の溶液A(2.5mL)に溶解し、化合物4(0.11g)を加え、30℃で3時間撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／酢酸エチル)で精製し、化合物16(0.11g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1505(M+H)⁺

[0112] [製造例9：化合物17]

[化15]

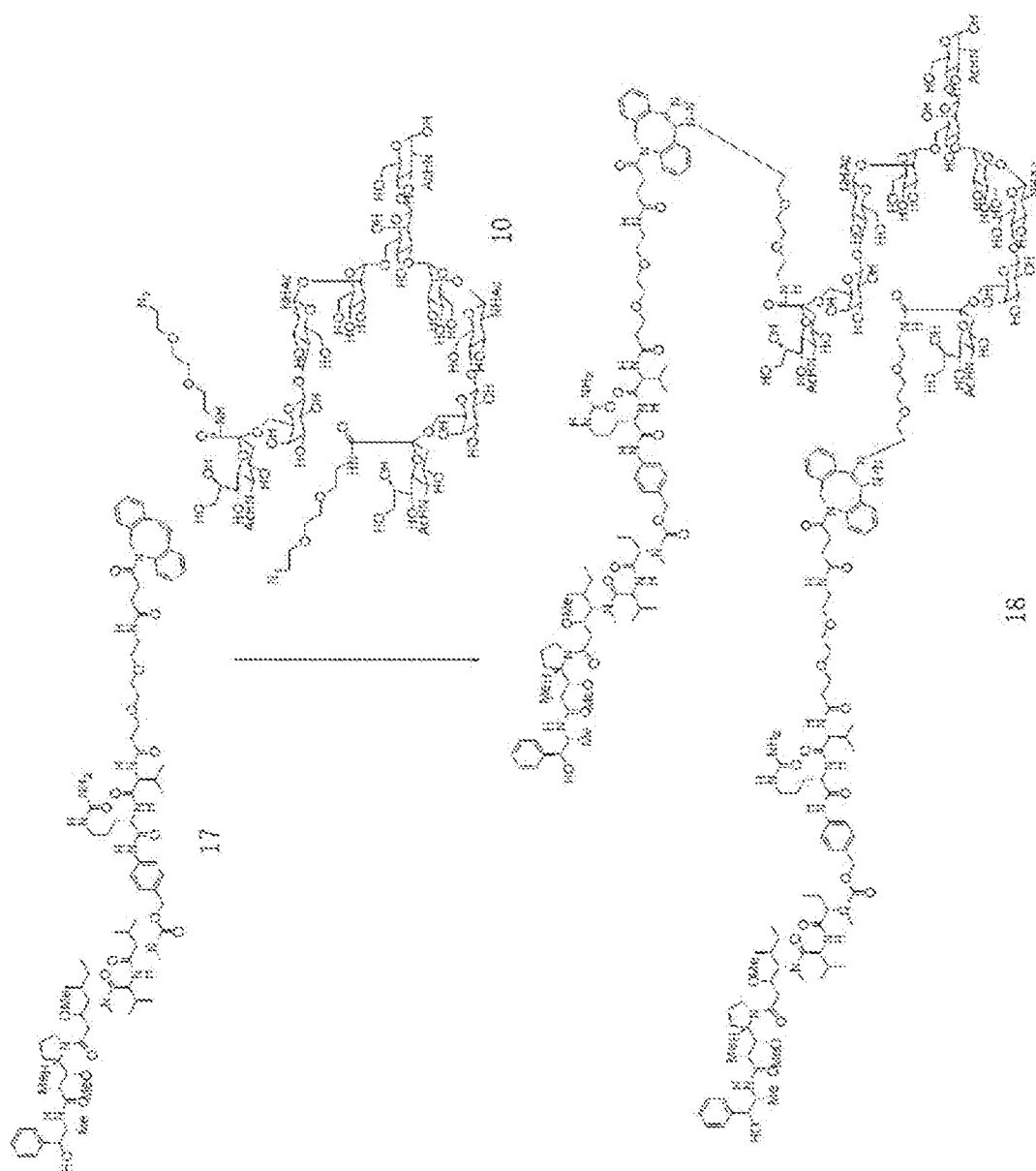


[0113] DMF(10mL)、HOAt(0.11g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.08mL)にて溶液Bを作製した。この溶液B(2.5mL)に化合物9(0.09g)、及び化合物6(0.03g)を溶解した。この反応溶液を30℃で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(クロロホルム/メタノール/エーテル)で精製し、化合物17(0.11g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1571(M+H) $^{+}$

[0114] [製造例10: 化合物18]

[化16]

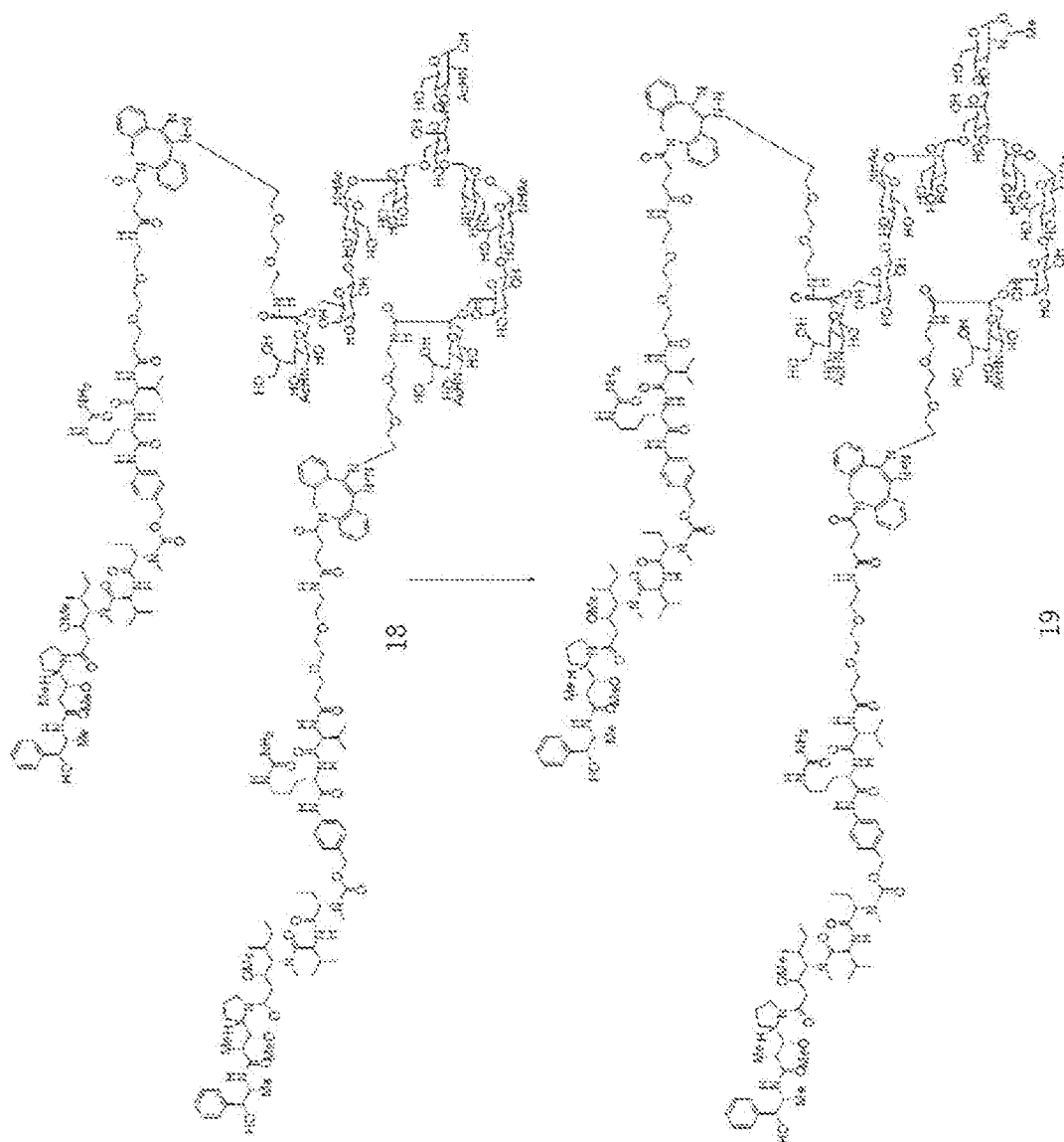


[0115] 化合物17(0.07g)のDMF溶液(1.5mL)に化合物10(0.02g)を加え、30℃で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、分取HPLC(メタノール／水)で精製し、化合物18(0.01g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1822($M+H+H+Na$)³⁺、1373($M+H+H+Na+Na$)⁴⁺

[0116] [製造例11：化合物19]

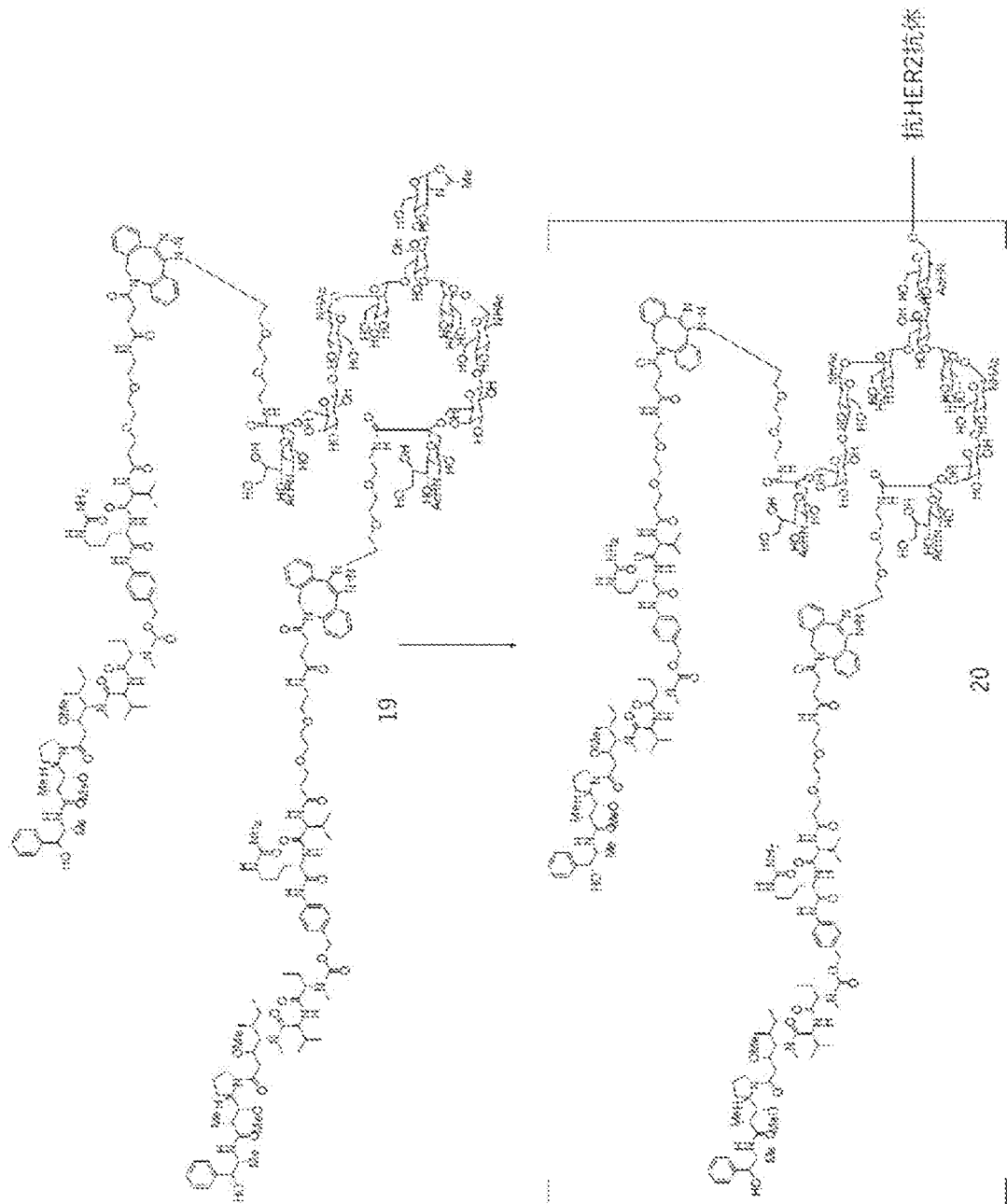
[化17]



[0117] 化合物18(0.004g)のDMF／水混合溶液(2.0mL／2.0mL)にCDMBI(0.01g)、及びトリエチルアミン(0.1mL)を加え、0℃で2時間攪拌した。この反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20：DMF)で精製し、化合物19(0.005g)を得た。

[0118] [実施例6：抗体-GlcNAcとMMAE付糖鎖のコンジュゲーション]

[化18]

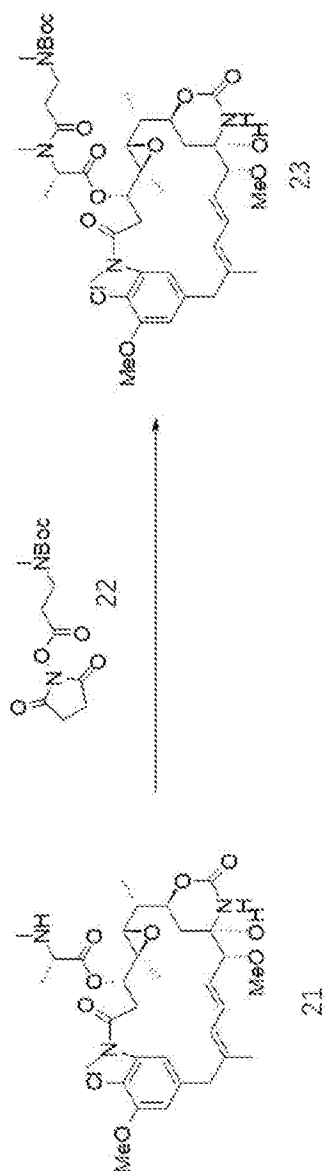


[0119] エッペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndoS変異酵素(0.003mg)、及び化合物19/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバ

ッファーを加えた。反応溶液を37℃で1.5時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物20を分析した(図6、8)。

[0120] [製造例12：化合物23]

[化19]



[0121] メイタンシノールを原料にW02014/145090にしたがって調製した化合物21(0.1g)のアセトニトリル/水混合溶液(6.0mL/2.0mL)に、W02014/145090にし

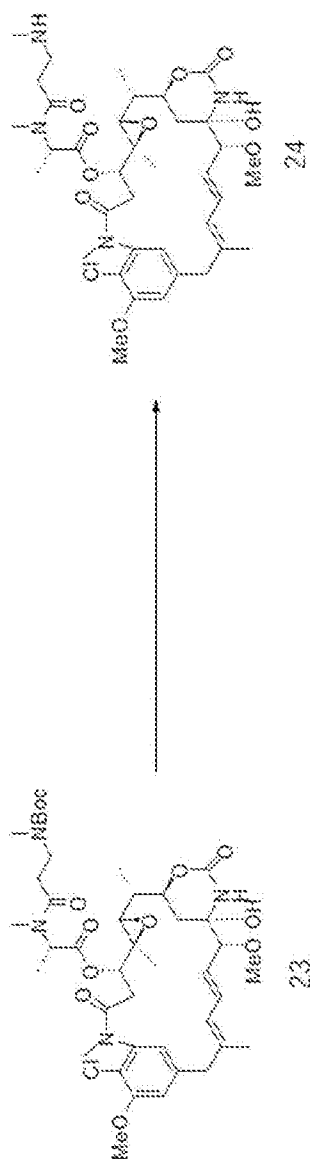
たがって調製した化合物22(0.3g)、及び1M 炭酸水素ナトリウム水溶液(0.5mL)を加え、室温で23時間攪拌した。この反応溶液を酢酸エチルで抽出し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル／メタノール)で精製し、化合物23(0.08g)を得た。

記載の調整法

MS(ESI) m/z : 835(M+H)⁺

[0122] [製造例13：化合物24]

[化20]

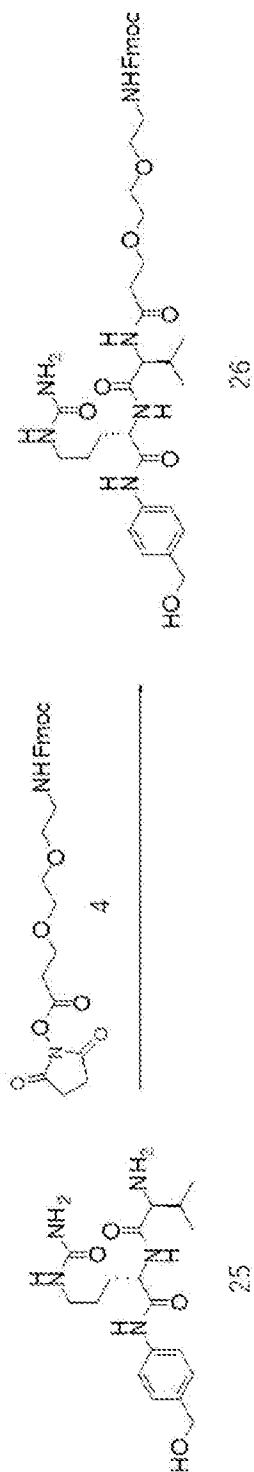


[0123] 化合物23(0.04g)のアセトニトリル／水混合溶液(3.0mL／1.0mL)にTFA(1.0mL)を加え、室温で30分撹拌した。この反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルム／メタノール混合溶媒(7／1)で抽出し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。有機層を減圧濃縮し、化合物24(0.04g)を得た。

MS(ESI)_{m/z} : 735(M+H)⁺

[0124] [製造例14：化合物26]

[化21]



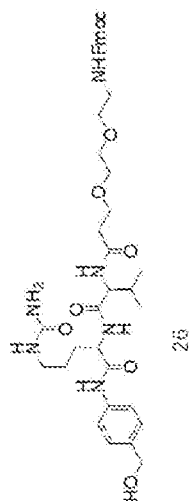
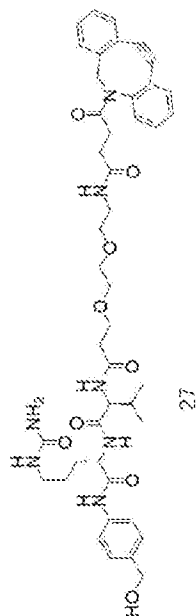
[0125] 化合物25(0.07g、MedChemExpress)のDMF溶液(5.0mL)に化合物4(0.07g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.04mL)を加え、室温で3時間攪拌した。この

反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し、化合物26(0.07g)を得た。

MS(ESI) m/z : 761 (M+H)⁺

[0126] [製造例15：化合物27]

[化22]

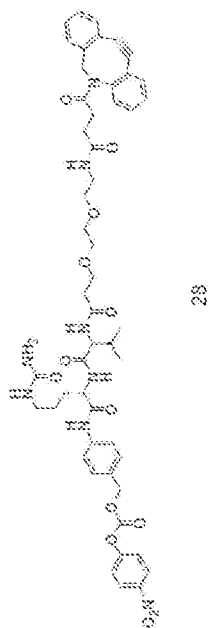


[0127] 化合物26(0.07g)のDMF溶液(5.0mL)にジエチルアミン(0.5mL)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣をDMF(5.0mL)に溶解し、DBC0-NHS(0.04g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.04mL)を加え、室温で終夜攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し、化合物27(0.07g)を得た。

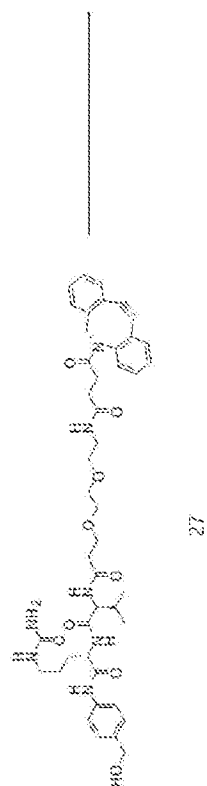
MS(ESI) m/z : 826(M+H)⁺

[0128] [製造例16：化合物28]

[化23]



28



27

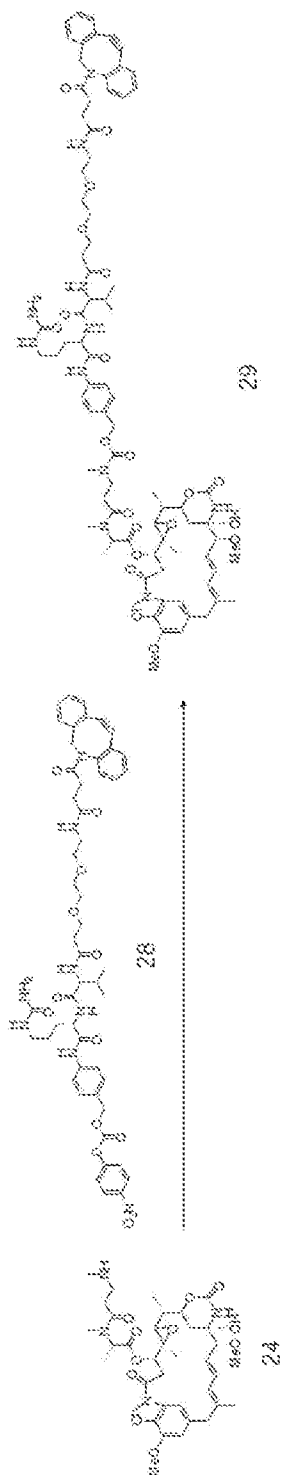
[0129] 化合物27(0.07g)のDMF溶液(5.0mL)に炭酸ビス(4-ニトロフェニル)(0.03g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.04mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し

、化合物28(0.07g)を得た。

MS(ESI) m/z : 991 (M+H) $^{+}$

[0130] [製造例17：化合物29]

[化24]

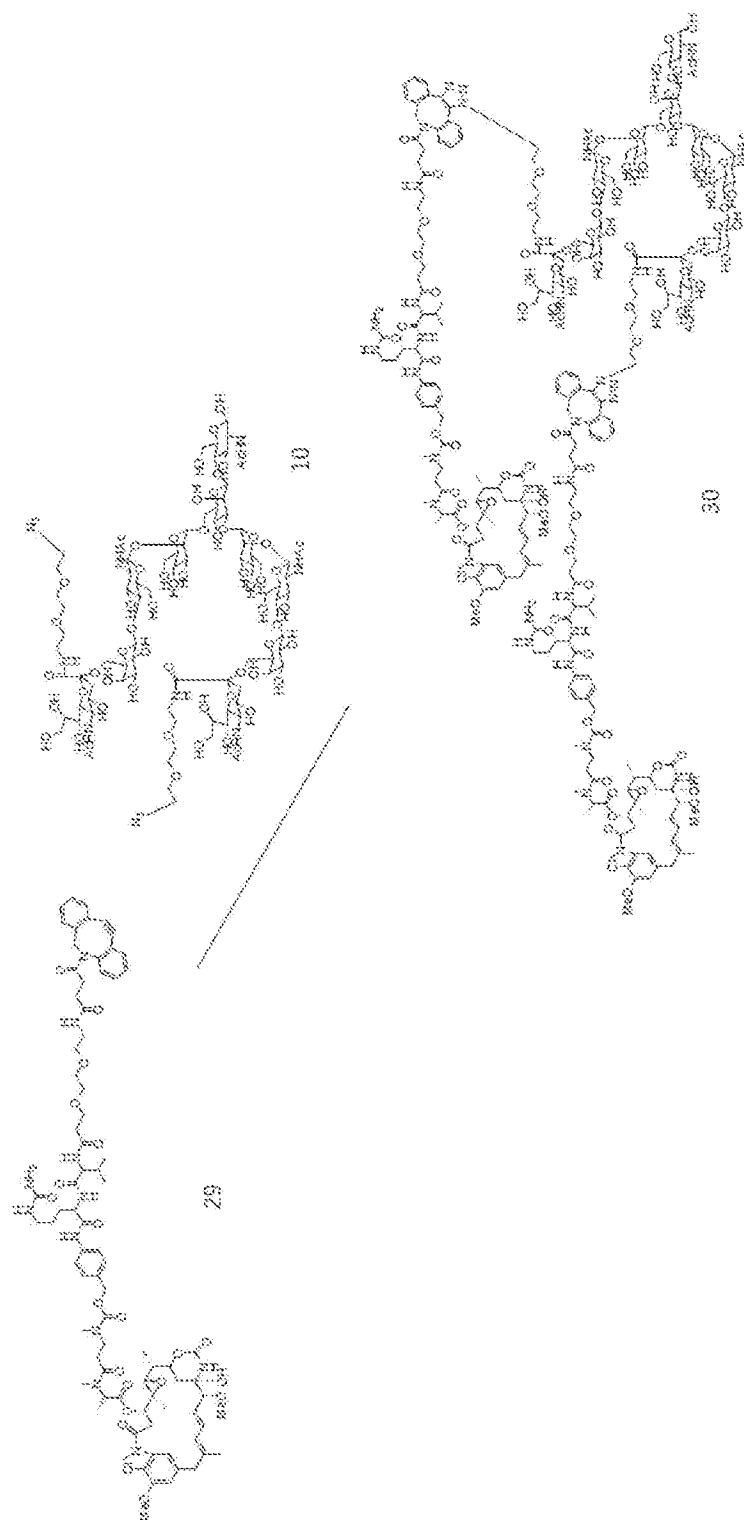


[0131] 化合物24(0.008g)のDMF溶液(0.9mL)に化合物28(0.01g)、及びトリエチルアミン(0.008mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニトリル／水)にて精製し、化合物29(0.011g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1587(M+H)⁺

[0132] [製造例18：化合物30]

[化25]



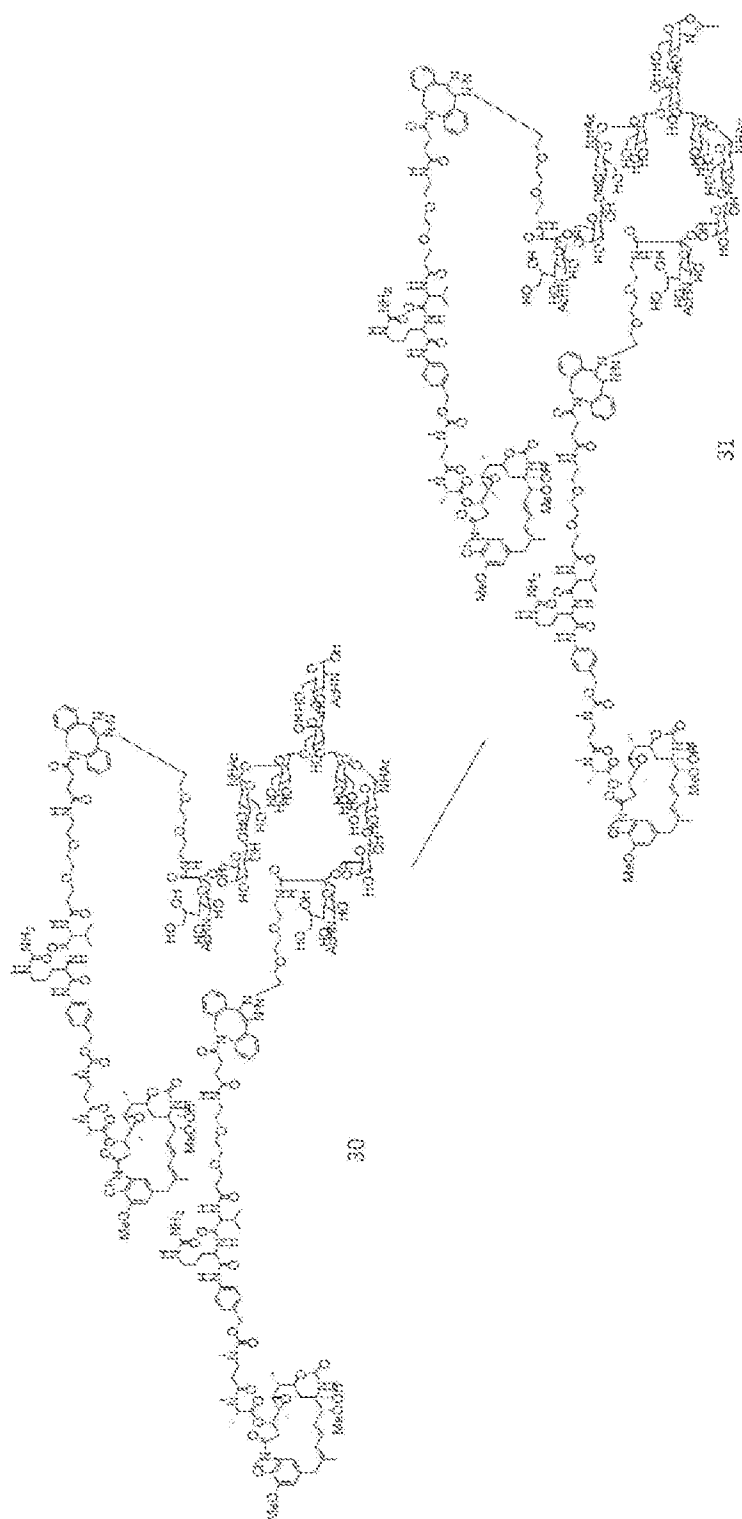
[0133] 化合物29(0.008g)のDMF溶液(1.6mL)に化合物10(0.002g)を加え、50℃で終夜撹拌した。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20:DMF)にて精製し

、化合物30(0.004g)を得た。

MS(EI) m/z : 1837(M+3H)³⁺, 1378(M+4H)⁴⁺

[0134] [製造例19：化合物31]

[化26]

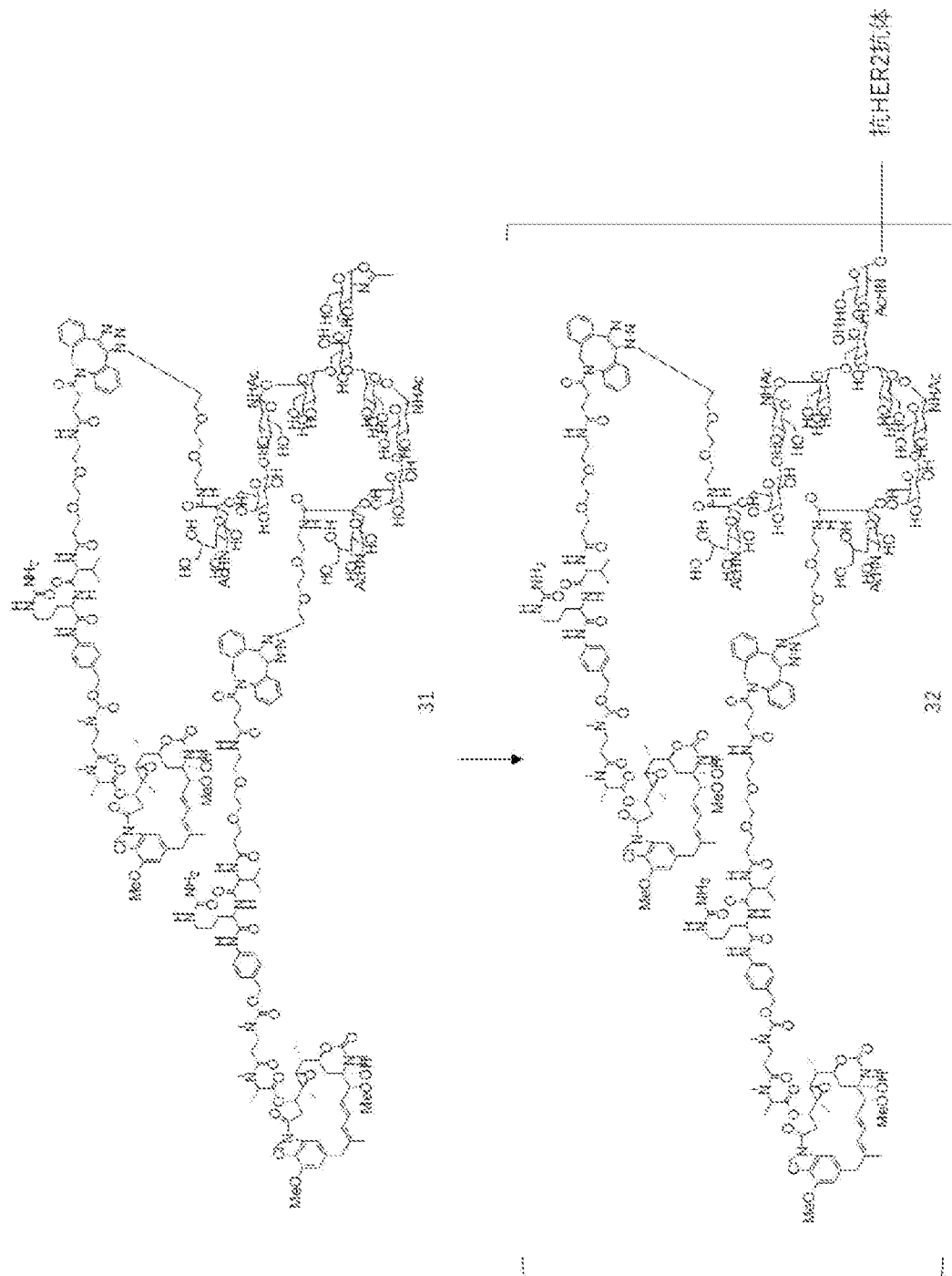


[0135] 化合物30(0.002g)のDMF／水混合溶液(0.5mL／0.5mL)にCDMBI(0.04g)、及びトリエチルアミン(0.002mL)を加え、0℃1時間攪拌した。この反応溶液をゲル

ろ過クロマトグラフィー(LH-20 : DMF)で精製し、化合物31(0.003g)を得た。

[0136] [実施例7：抗体-GlcNAcとメイタンシノイド付糖鎖のコンジュゲーション]

[化27]

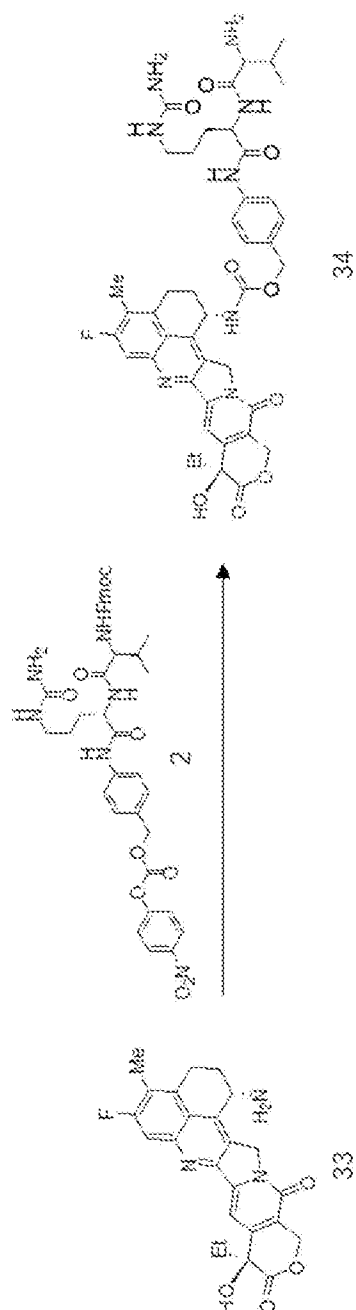


[0137] エッペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施

例1にて調製したEndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndoS変異酵素(0.003mg)、又は実施例12にて調製したWP1328酵素(0.003mg)、及び化合物31/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応溶液を30℃又は37℃で1.5-3.0時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物32を分析した(図13、14)。

[0138] [製造例20：化合物34]

[化28]



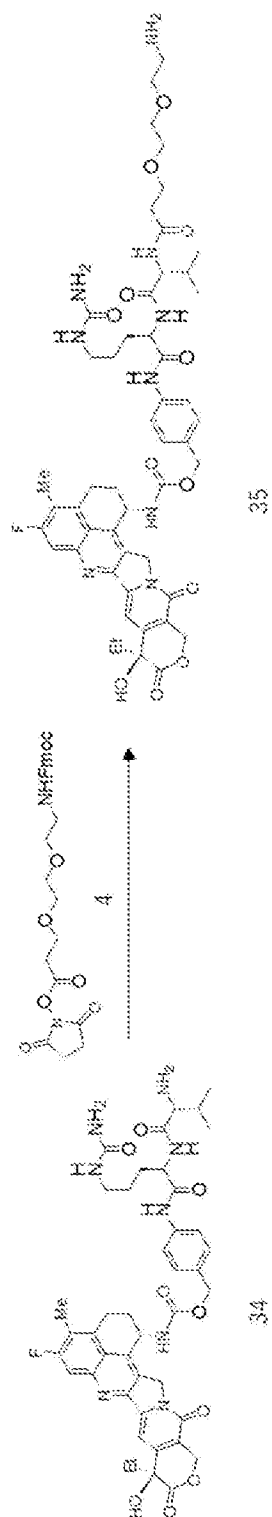
[0139] 化合物33(0.07g、MedChemExpress)のDMF溶液(5.0mL)に化合物2(0.04g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.04mL)、及びHOBt(0.02g)を加え、30℃で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し、得られた紫色固体にDMF(5.0mL)、及びジエチルアミン(0.1mL)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿

法(DMF／エーテル)にて精製し、さらにゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20:D
MF)にて精製し、化合物34(0.09g)を得た。

MS(ESI) m/z : 841 (M+H)⁺

[0140] [製造例21：化合物35]

[化29]



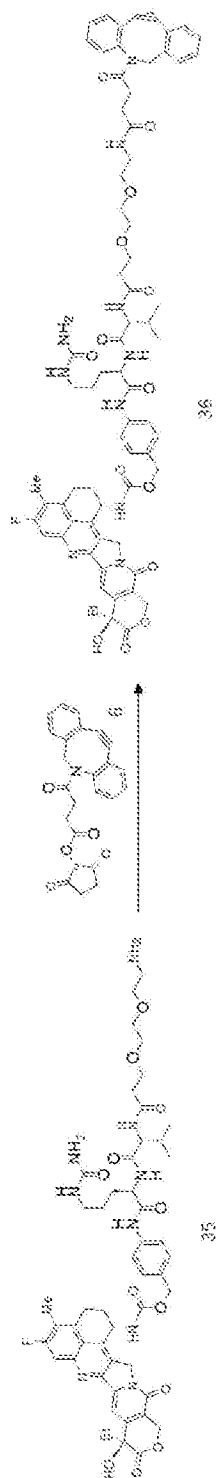
[0141] 化合物34(0.09g)のDMF溶液(5.0mL)に化合物4(0.03g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.02mL)、及びHOBt(0.01g)を加え、30℃で3時間攪拌した。反応溶

液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し、得られた紫色固体にDMF(5.0mL)、及びジエチルアミン(0.1mL)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)にて精製し、さらにゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20:DMF)にて精製し、化合物35(0.07g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1001(M+H)⁺

[0142] [製造例22：化合物36]

[化30]



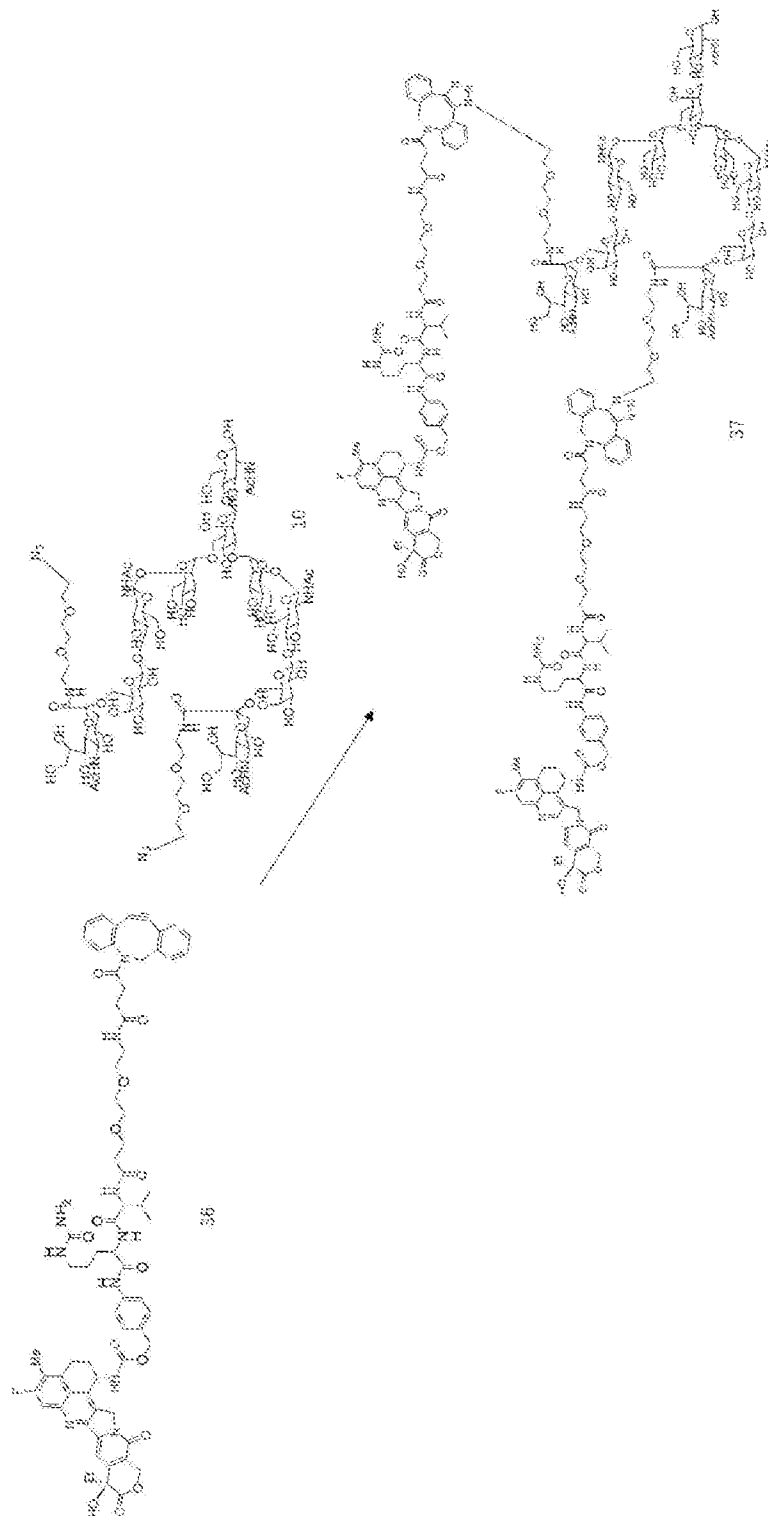
[0143] 化合物35(0.07g)のDMF溶液(5.0mL)に化合物6(DBCO-NHS ester、0.03g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.01mL)、及びHOBt(0.01g)を加え、30℃で1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を再沈殿法(DMF／エーテル)

にて精製し、化合物36(0.05g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1288(M+H) $^{+}$

[0144] [製造例23 : 化合物37]

[化31]

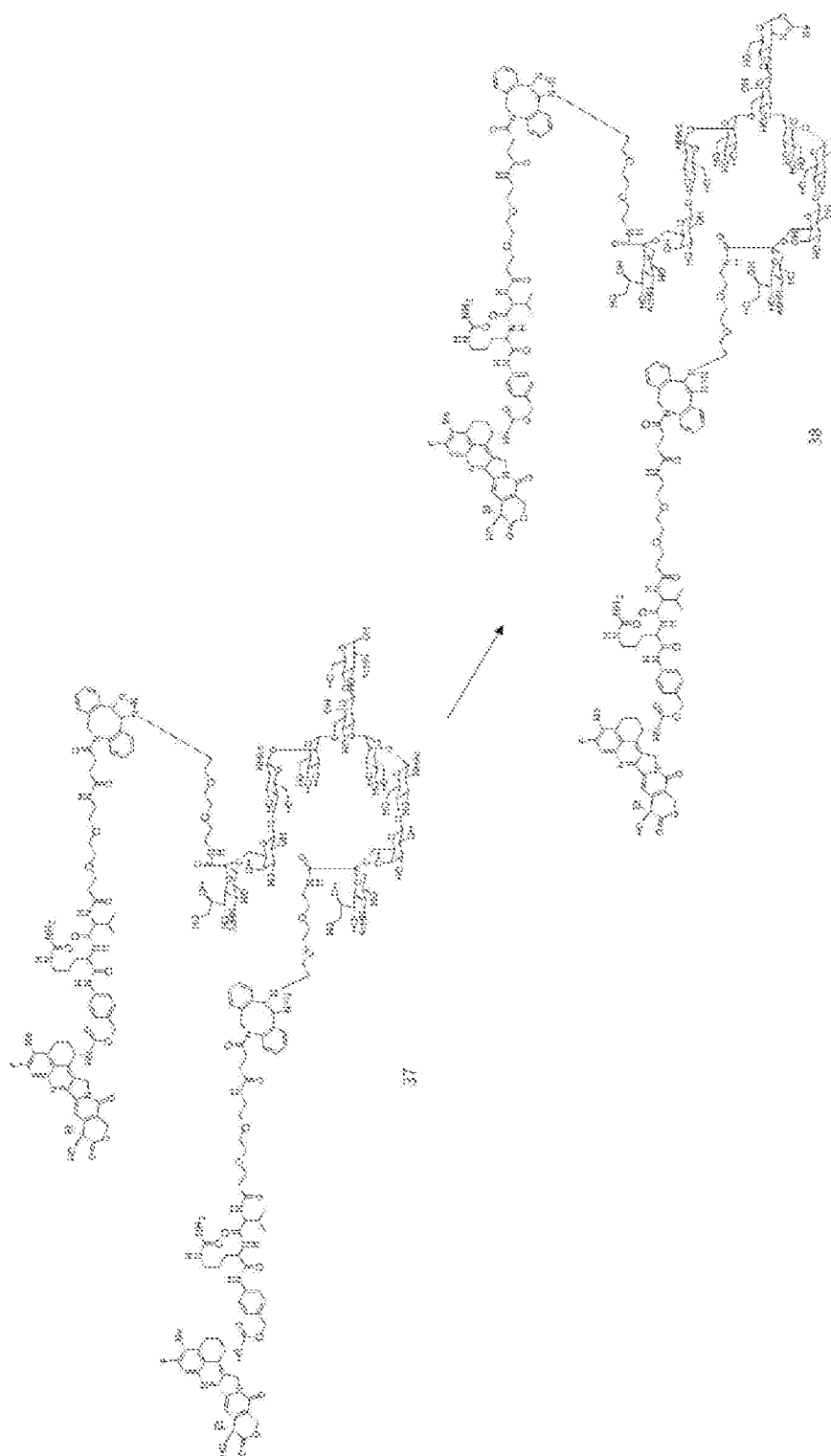


[0145] 化合物36(0.009g)のDMF溶液(3.0mL)に化合物10(0.005g)を加え、40℃で2時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニトリル／水)にて精製し、化合物37(0.003g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1637($M+3H$)³⁺, 1228($M+4H$)⁴⁺

[0146] [製造例24：化合物38]

[化32]

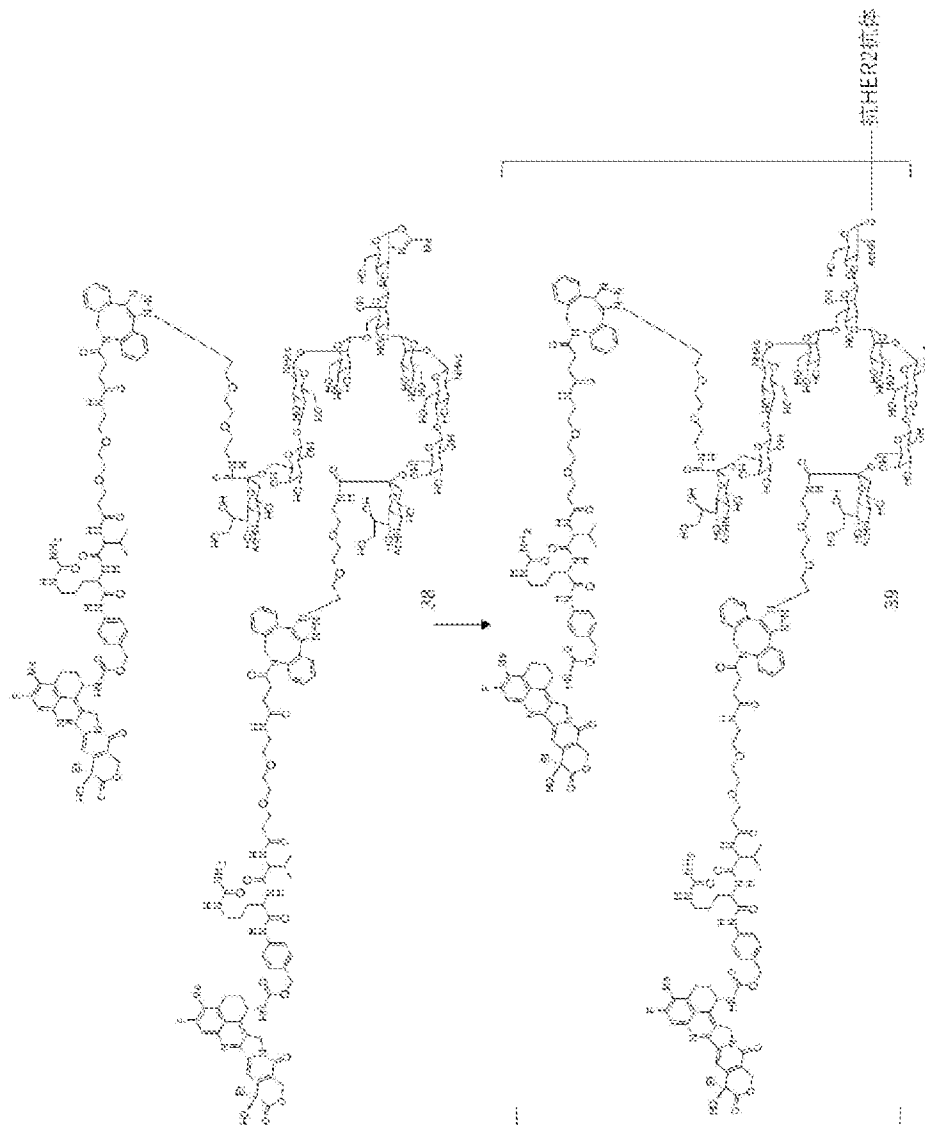


[0147] 化合物37(0.003g)のDMF／水混合溶液(1.0mL／1.0mL)にCDMBI(0.007g)、及びトリエチルアミン(0.001mL)を加え、0℃で30分攪拌した。この反応溶液を

ゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20 : DMF)で精製し、化合物38(0.003g)を得た。

[0148] [実施例8：抗体-GlcNAcとエキサテカン付糖鎖のコンジュゲーション]

[化33]

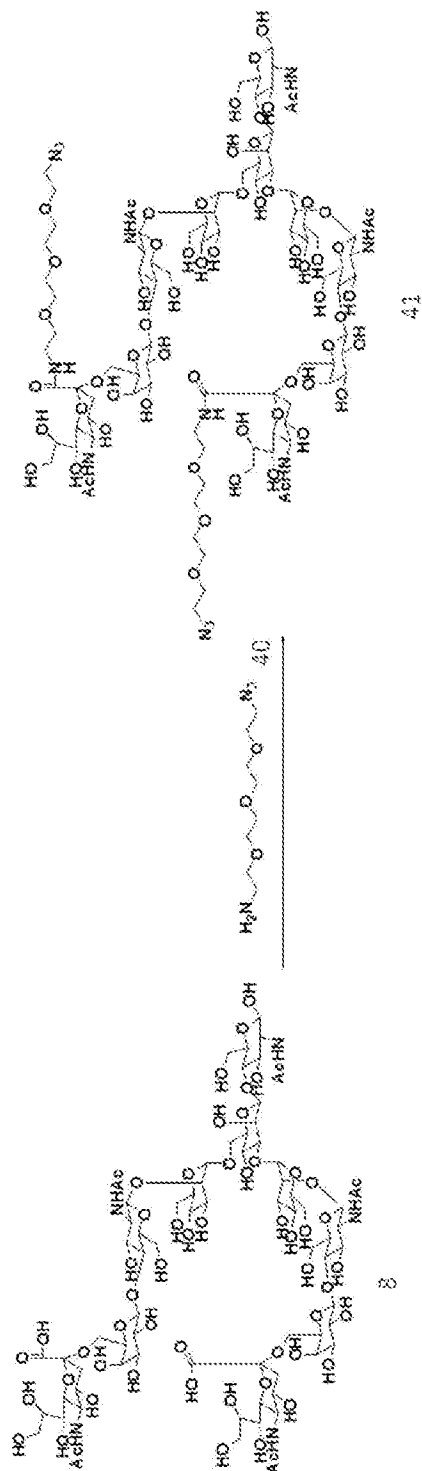


[0149] エッペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndo S変異酵素(0.003mg)、又は実施例12にて調製したWP1328酵素(0.003mg)、及び化合物38/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応

溶液を30℃又は37℃で1.5-3.0時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物39を分析した(図15、16)。

[0150] [製造例25：化合物41]

[化34]

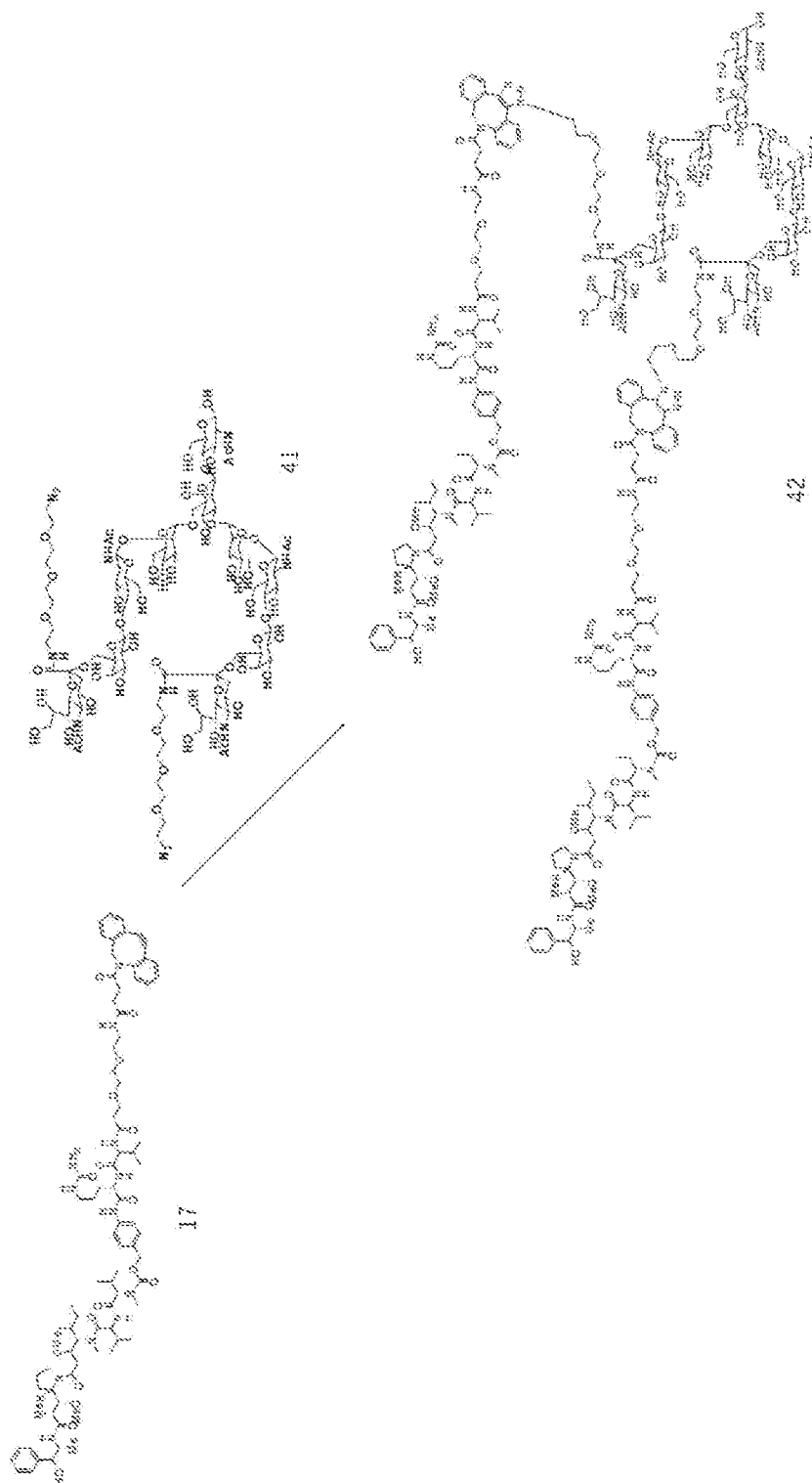


[0151] 化合物8(0.05g)のDMF溶液(6.0mL)に化合物40(Azido-PEG3-Amine、Combi-Blocks)(0.25g)、及びDMT-MM(0.34g)を加え、37℃で終夜撹拌した。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20：メタノール)にて精製した。さらに取得した精製画分をワコーシルC-18にてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(水／アセトニトリル)で精製し、化合物41(0.02g)を得た。

MS(ESI) m/z : 2422(M+H)⁺

[0152] [製造例26：化合物42]

[化35]



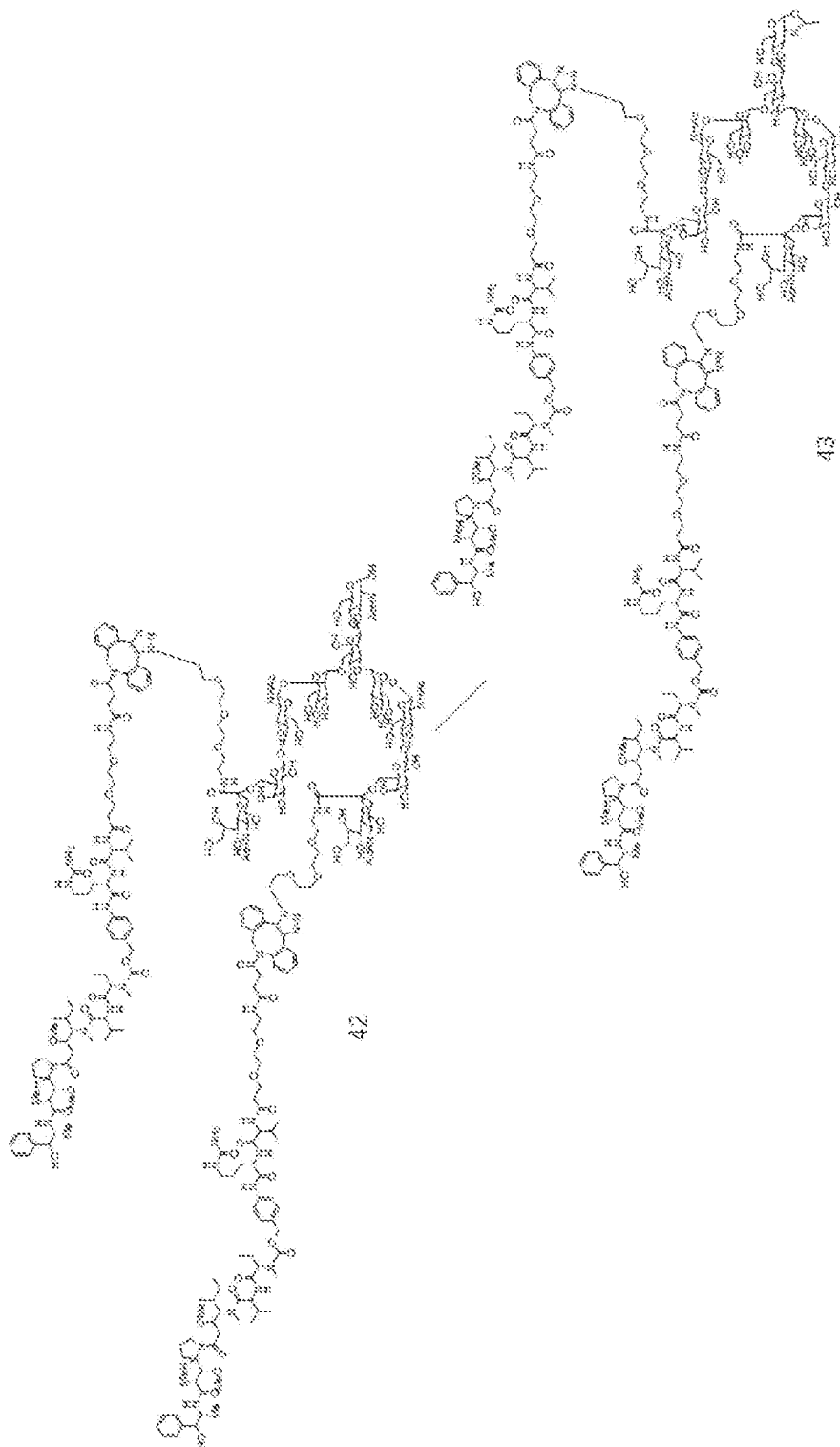
[0153] 化合物17(0.02g)のDMF溶液(3.0mL)に化合物41(0.006g)を加え、室温で22時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニトリ

ル／水)にて精製し、化合物42(0.004g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1855($M+3H$)³⁺, 1391($M+4H$)⁴⁺

[0154] [製造例27 : 化合物43]

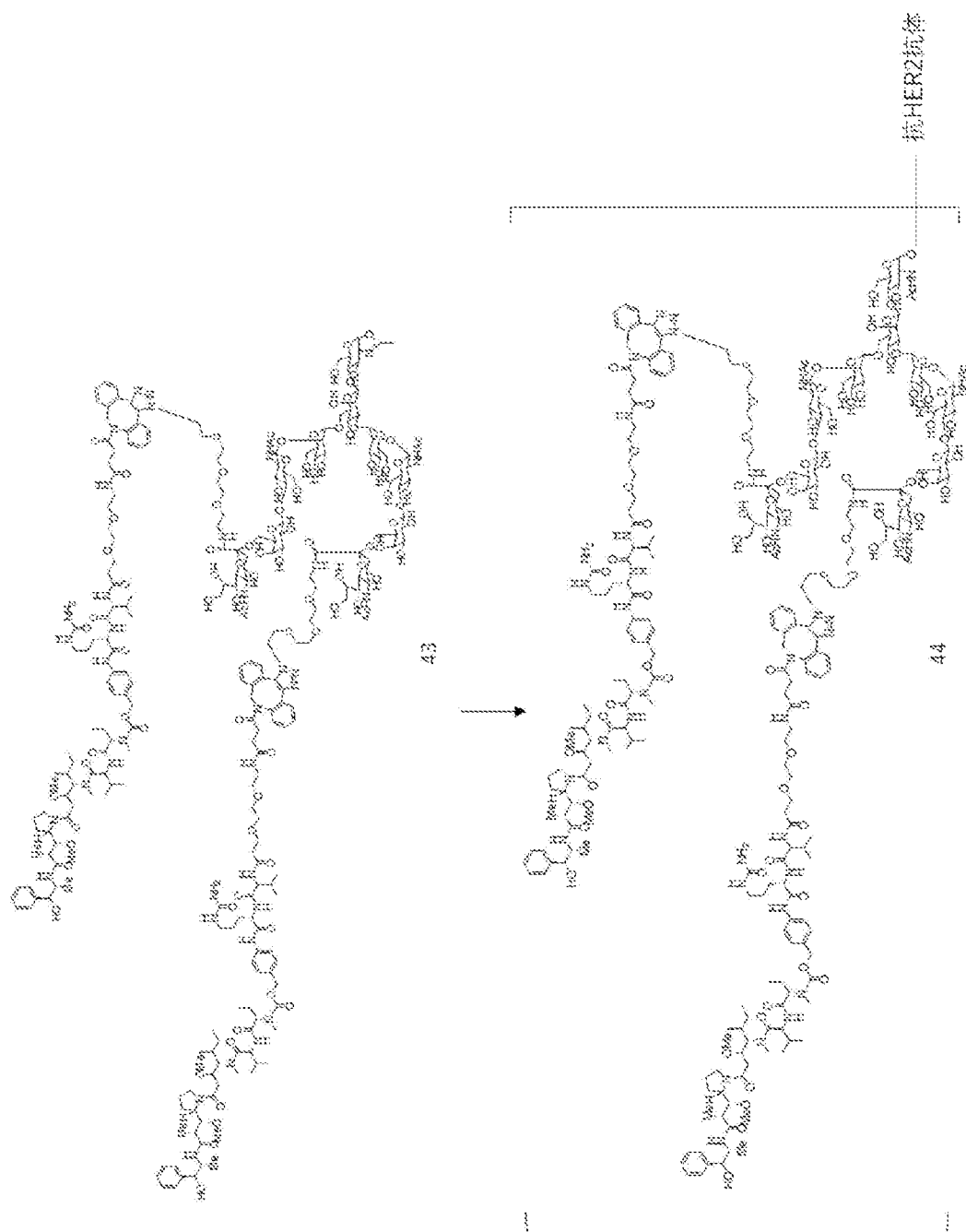
[化36]



[0155] 化合物42(0.004g)のDMF／水混合溶液(1.0mL／1.0mL)にCDMBI(0.008g)、及びトリエチルアミン(0.001mL)を加え、0℃で30分撹拌した。この反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20：DMF)で精製し、化合物43(0.004g)を得た。

[0156] [実施例9：抗体-GlcNAcとMMAE-PEG3付糖鎖のコンジュゲーション]

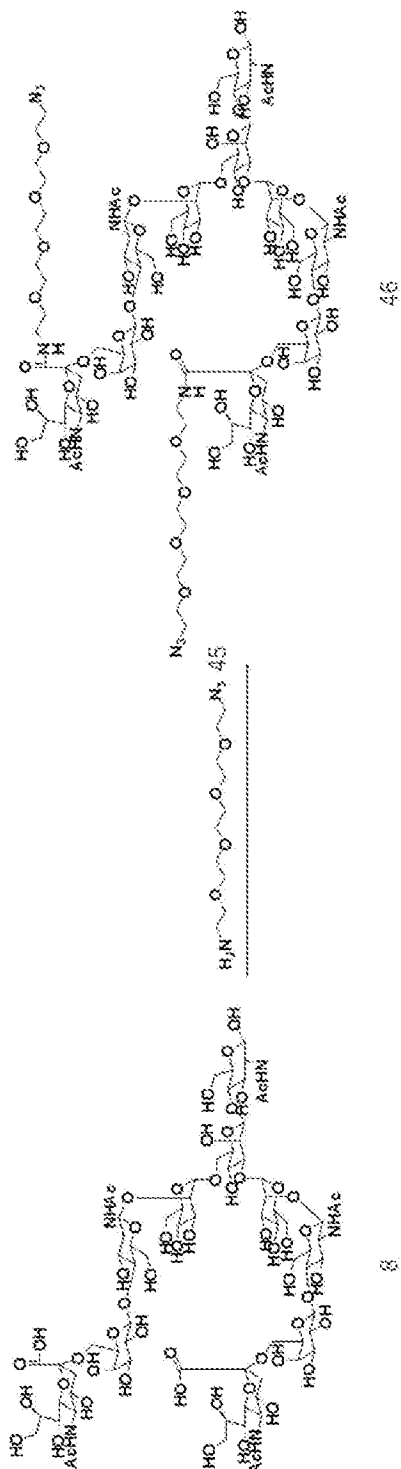
[化37]



[0157] エッペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndo S変異酵素(0.003mg)、又は実施例12にて調製したWP1328酵素(0.003mg)、及び化合物43/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応溶液を30℃又は37℃で1.5-3.0時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物44を分析した(図17、18、19)。

[0158] [製造例28：化合物46]

[化38]



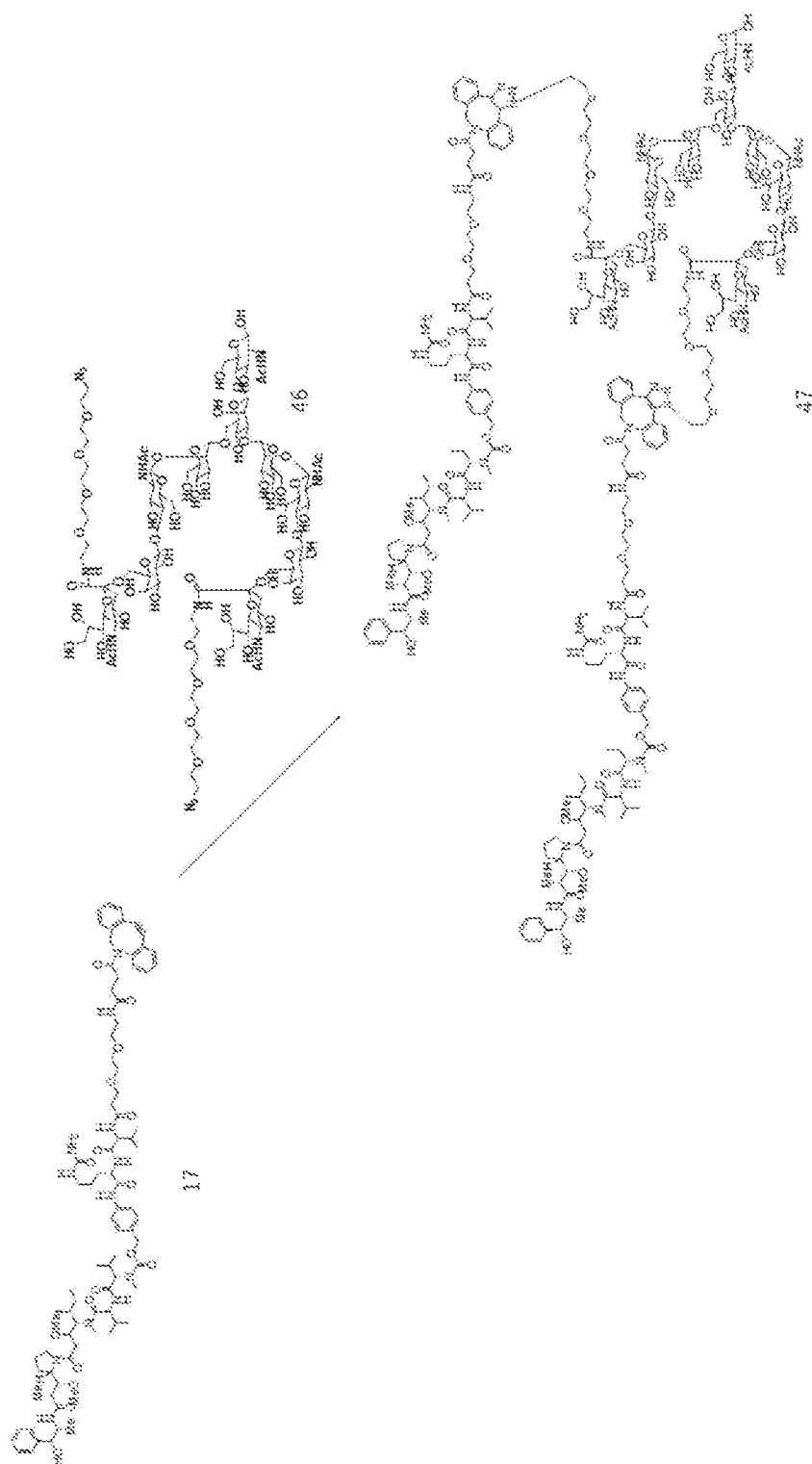
[0159] 化合物8(0.05g)のDMF溶液(6mL)に化合物45(Azido-PEG4-Amine、Combi-Blocks)(0.30g)、及びDMT-MM(0.34g)を加え、37℃で終夜攪拌した。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20：メタノール)にて精製した。さらに取得し

た精製画分をワコーシルC-18にてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(水／アセトニトリル)で精製し、化合物46(0.02g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1256(M+2H)²⁺, 837(M+3H)³⁺

[0160] [製造例29：化合物47]

[化39]



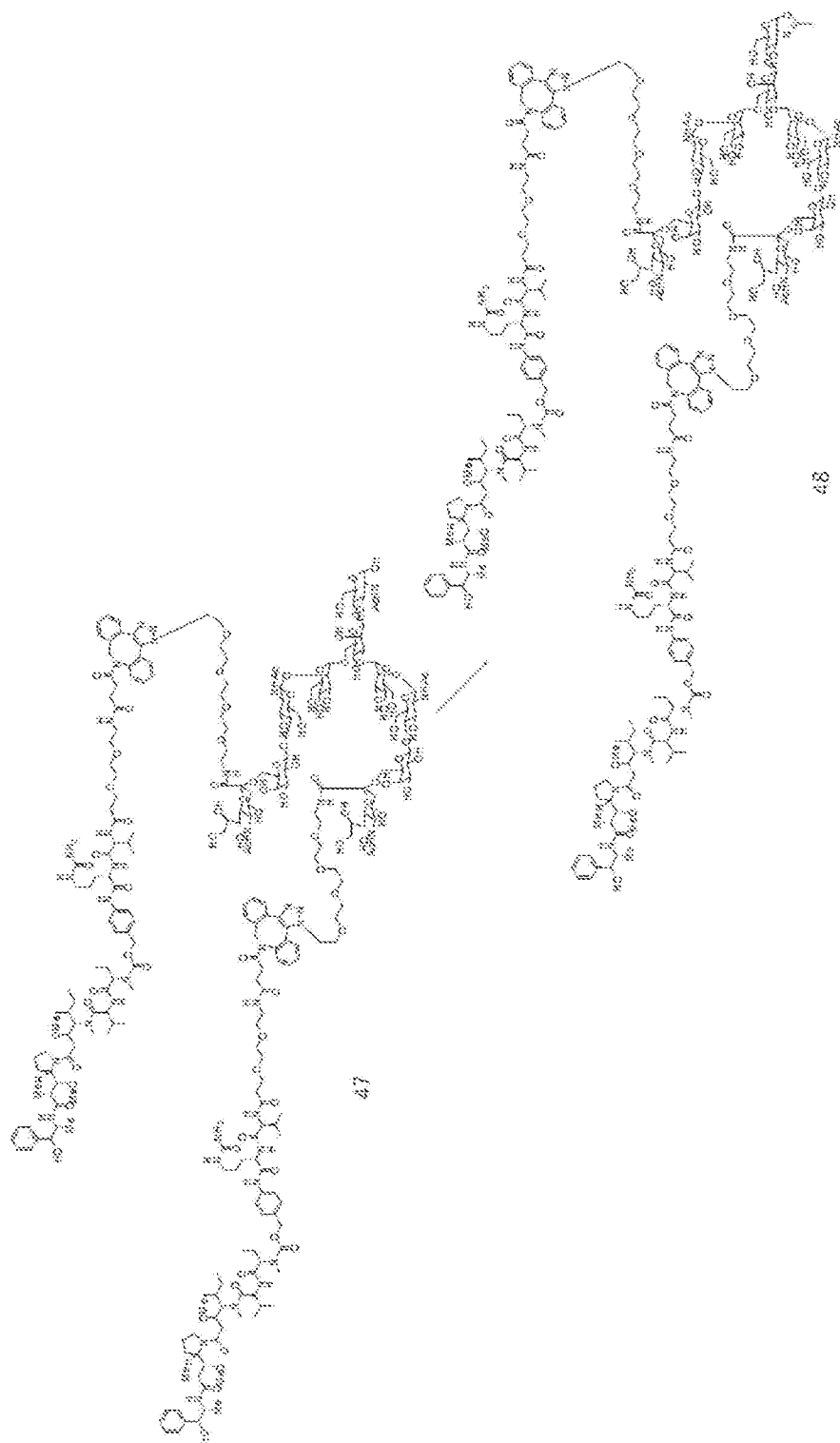
[0161] 化合物17(0.02g)のDMF溶液(3.0mL)に化合物41(0.006g)を加え、室温で17時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニトリ

ル／水)にて精製し、化合物47(0.007g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1884(M+3H)³⁺, 1413(M+4H)⁴⁺

[0162] [製造例30 : 化合物48]

[化40]

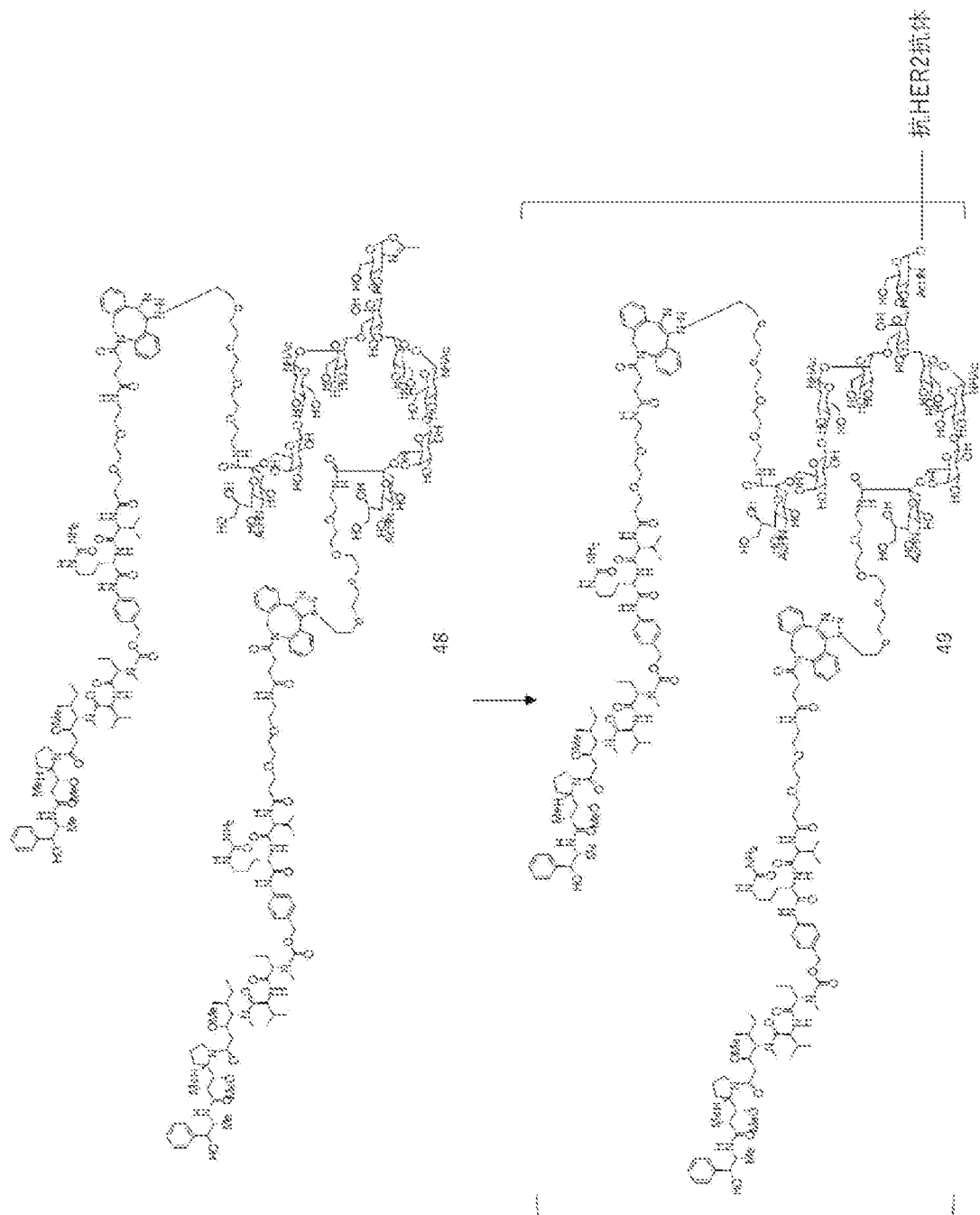


[0163] 化合物47(0.004g)のDMF／水混合溶液(0.5mL／0.5mL)にCDMBI(0.008g)、及びトリエチルアミン(0.001mL)を加え、0℃で30分攪拌した。この反応溶液を

ゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20 : DMF)で精製し、化合物48(0.004g)を得た。

[0164] [実施例10 : 抗体-GlcNAcとMMAE-PEG4付糖鎖のコンジュゲーション]

[化41]

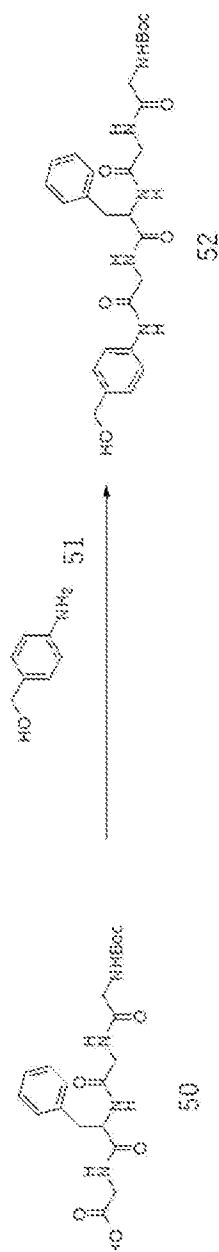


[0165] エピペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施

例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndo S変異酵素(0.003mg)、又は実施例12にて調製したWP1328酵素(0.003mg)、及び化合物48/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応溶液を30℃又は37℃で1.5-3.0時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物49を分析した(図E、G)。

[0166] [製造例31：化合物52]

[化42]

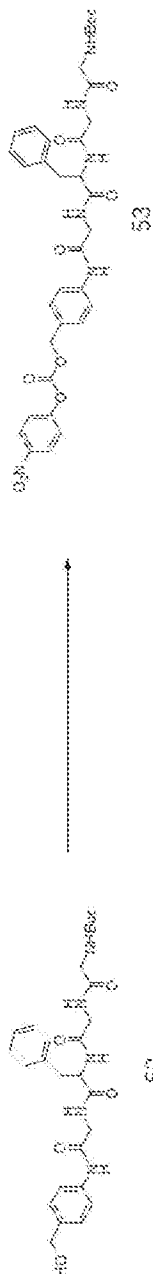


[0167] 化合物50(Boc-GGFG-OH、Broadpharm)(0.2g)のDMF溶液(2.0mL)に化合物51(4-アミノベンジルアルコール、0.1g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.3mL)、及びHATU(0.2g, 渡辺化学)を加え、室温で4時間攪拌した。反応溶液に0.1M塩酸を加え、クロロホルム／メタノール(9／1)混合溶媒にて抽出した。有機層を減圧濃縮し、化合物52(0.3g)を得た。

MS(ESI) m/z : 542 ($M+H$) $^{+}$

[0168] [製造例32：化合物53]

[化43]

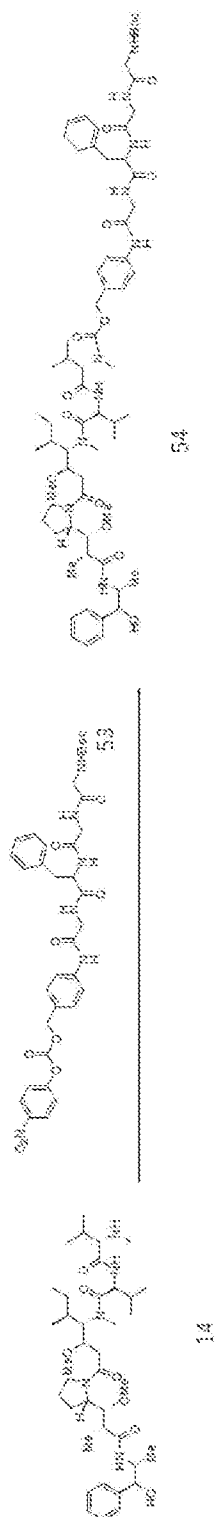


[0169] 化合物52(0.1g)のDMF溶液(5.0mL)に炭酸ビス(4-ニトロフェニル)(0.2g)、及びジイソプロピルエチルアミン(0.5mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、化合物53(0.1g)を得た。

MS(ESI) m/z : 707 ($M+H$)⁺

[0170] [製造例33：化合物54]

[化44]



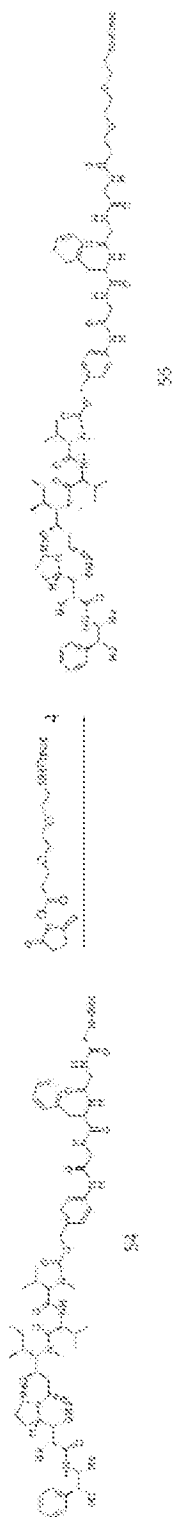
[0171] 化合物14(0.1g)のDMF溶液(5.0mL)に化合物53(0.1g)、ジイソプロピルエチルアミン(0.1 mL)、HOBt(0.2g)を加え、室温で48時間攪拌した。反応溶液を

減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ODS-A, アセトニトリル／水／ギ酸)にて精製し、化合物54(0.02g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1286 (M+H)⁺

[0172] [製造例34：化合物55]

[化45]



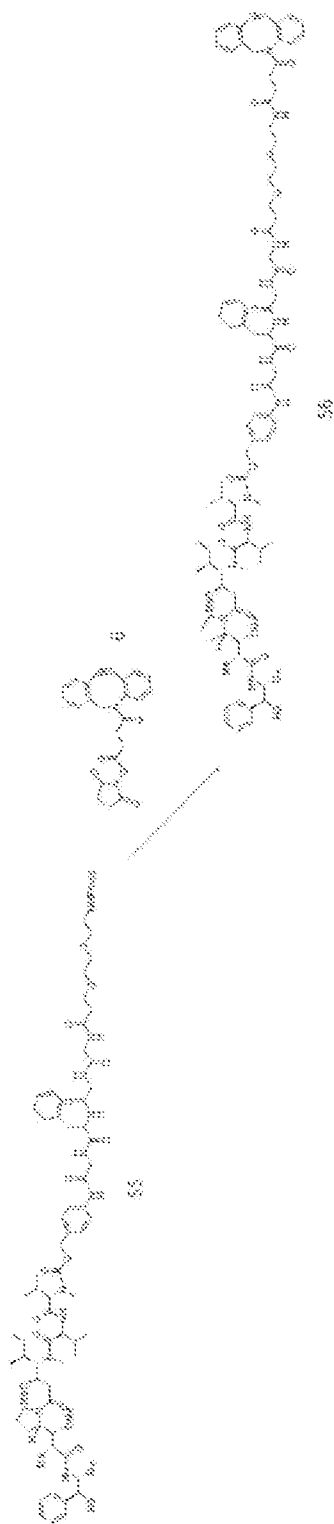
[0173] 化合物54(0.02g)のジクロロメタン溶液(5.0mL)にTFA(0.3mL)を加え、室温で3時間攪拌した。さらにジイソプロピルエチルアミン(0.6mL)、及び化合物4

(0.02g)を加え、室温で18時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニトリル／水／ギ酸)にて精製し、化合物55(0.006mg)を得た。

MS(ESI) m/z : 1567 (M+H)⁺

[0174] [製造例35：化合物56]

[化46]



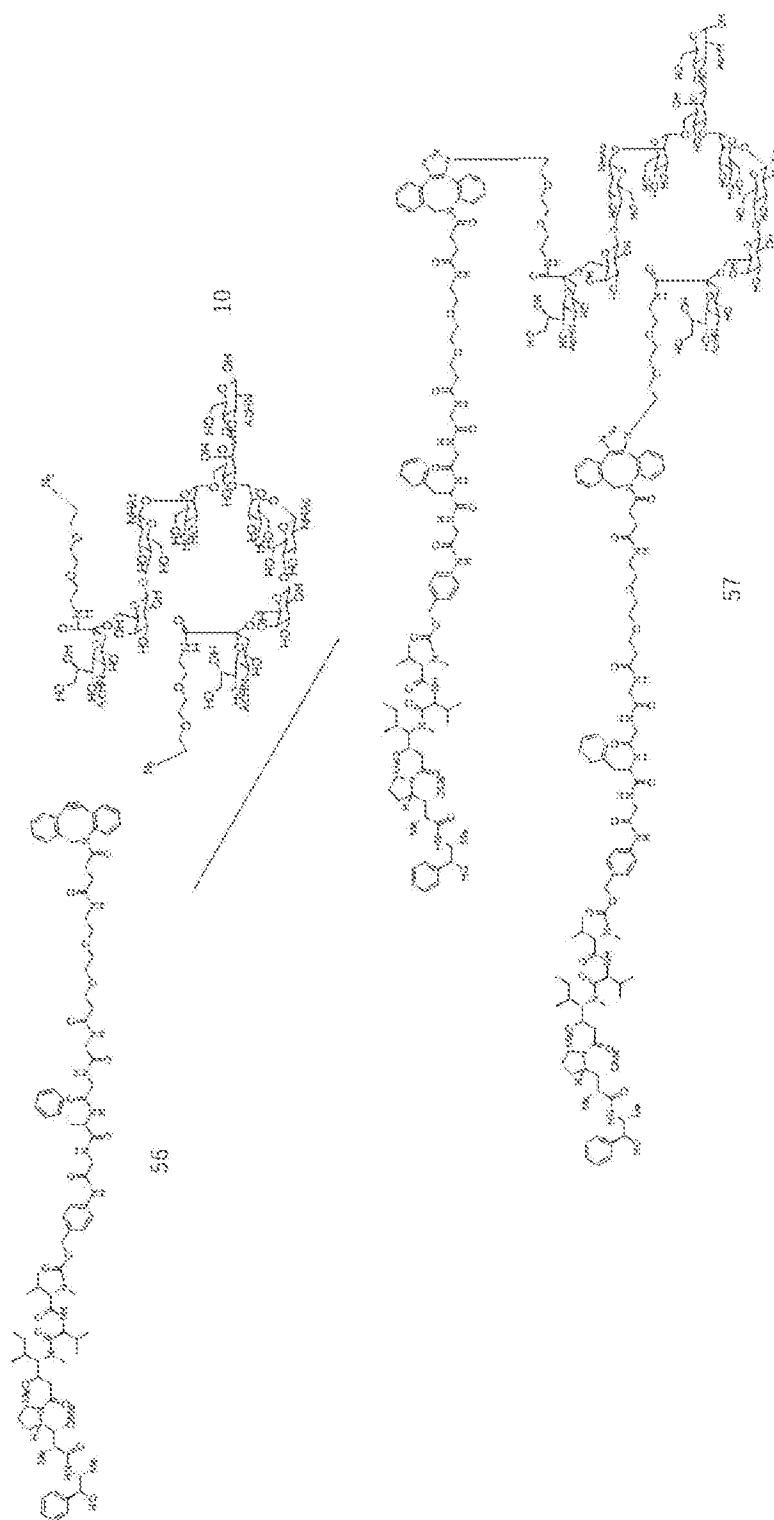
[0175] 化合物55(0.006g)のDMF溶液(1.0mL)にジエチルアミン(0.1mL)を加え、室温

で1時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣にDMF (1.0mL)、及び化合物6(DBCO-NHS、0.003mg)を加え、室温で17時間攪拌した。反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20 : DMF)にて精製し、化合物56(0.009mg)を得た。

MS(ESI) m/z : 1632 (M+H)⁺

[0176] [製造例36 : 化合物57]

[化47]



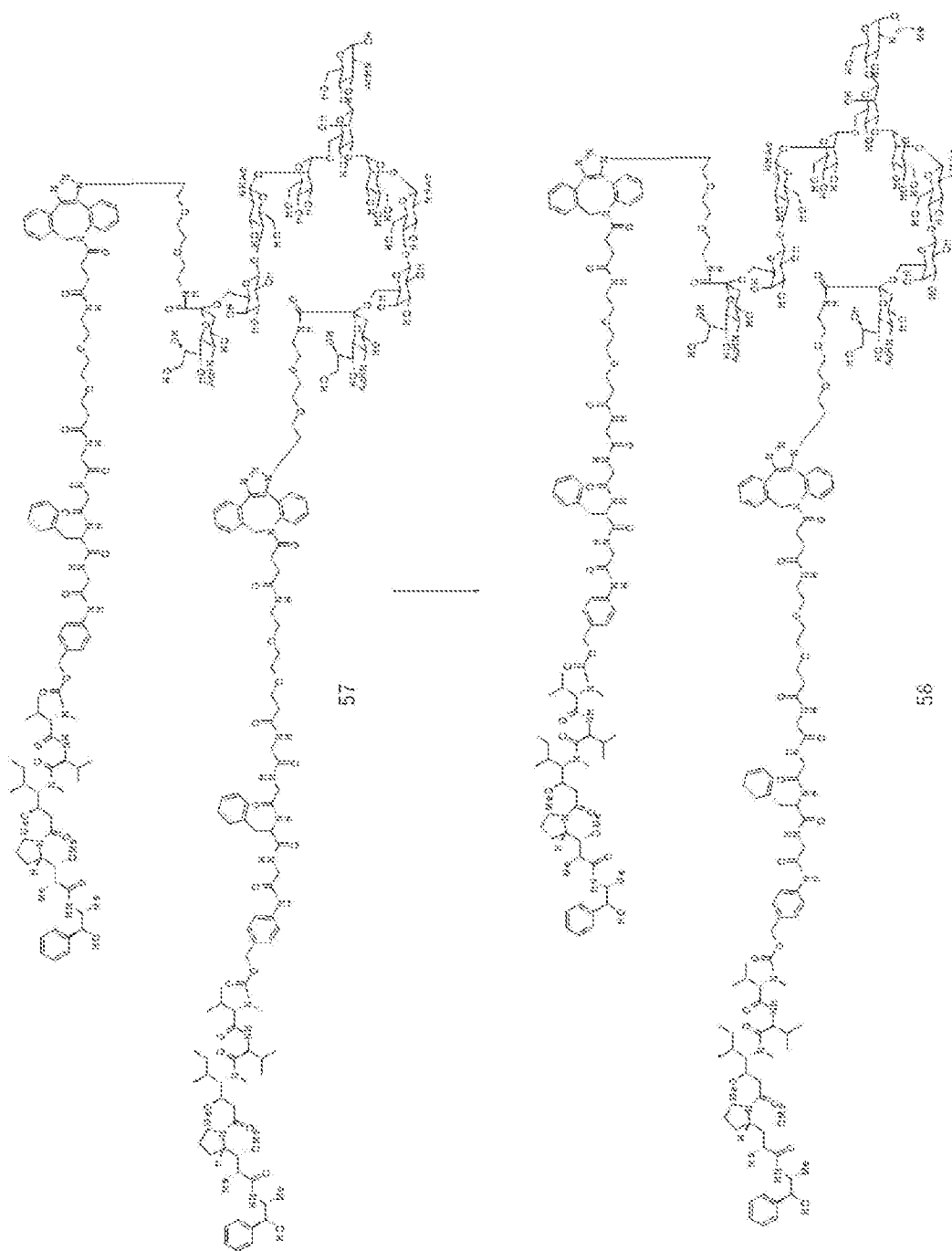
[0177] 化合物56(0.001g)のDMF溶液(0.5mL)に化合物10(0.007g)を加え、室温で24時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取HPLC(アセトニト

リル／水／ギ酸)にて精製し、化合物57(0.003g)を得た。

MS(ESI) m/z : 1867($M+3H$) $^{3+}$, 1400($M+4H$) $^{4+}$

[0178] [製造例37：化合物58]

[化48]

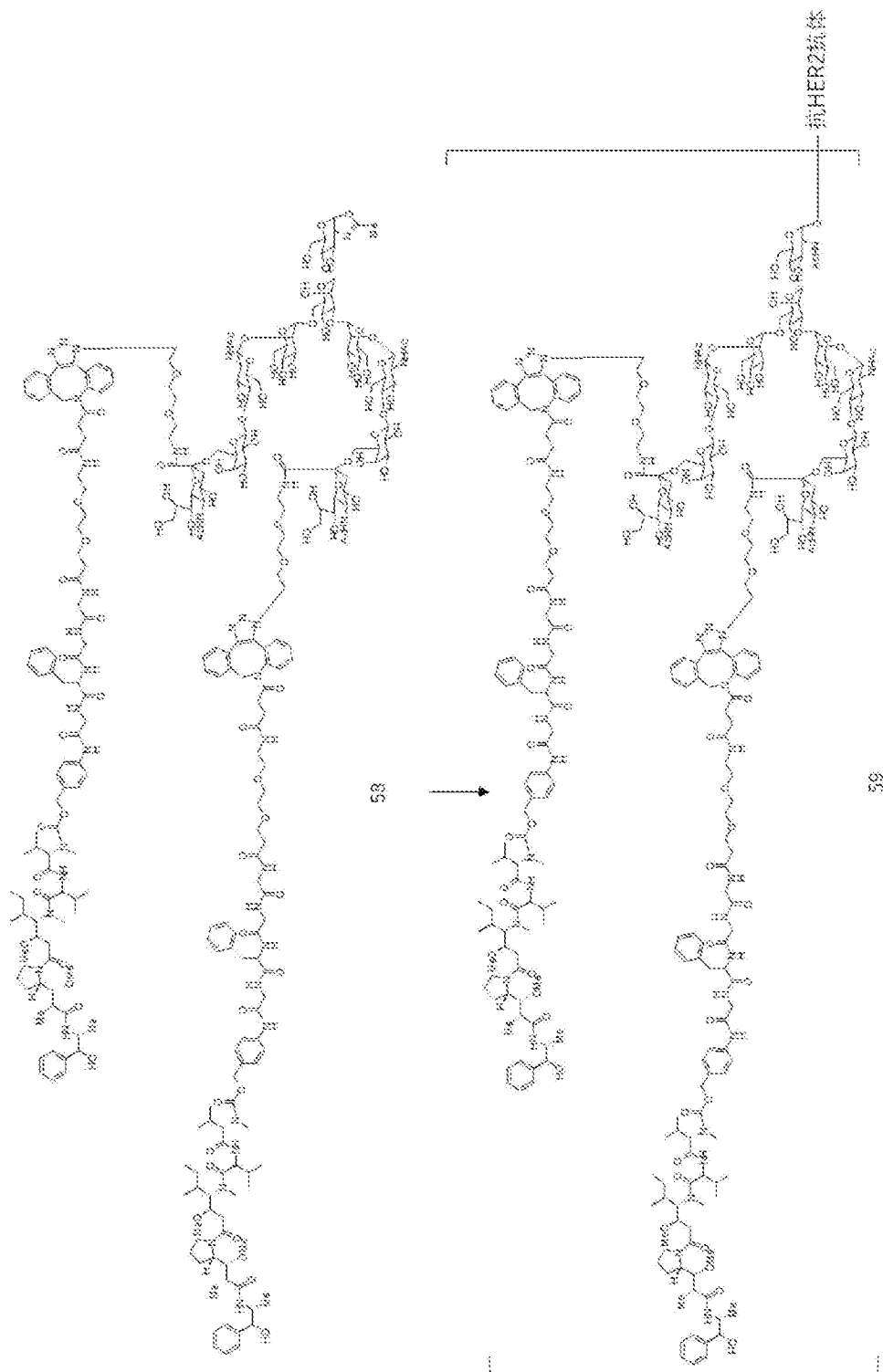


[0179] 化合物57(0.003g)のDMF／水混合溶液(0.5mL／0.5mL)にCDMBI(0.006g)、及

びトリエチルアミン(0.002mL)を加え、0℃で30分攪拌した。この反応溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(LH-20 : DMF)で精製し、化合物58(0.001g)を得た。

[0180] [実施例11 : 抗体-GlcNAcとMMAE-GGFG付糖鎖のコンジュゲーション]

[化49]



[0181] エッペンドルフチューブに実施例2で取得した抗体-GlcNAc(0.03mg)、実施例1にて調製した各EndoF3変異酵素(0.003mg)、又は実施例2にて調製したEndo

S変異酵素(0.003mg)、又は実施例12にて調製したWP1328酵素(0.003mg)、及び化合物58/DMSO溶液(40mg/mL、0.002mL)を加え、さらに、抗体-GlcNAc濃度が5.0mg/mLになるように50mM pH7.4 Tris-HClバッファーを加えた。反応溶液を30℃又は37℃で1.5-3.0時間インキュベーションした。反応溶液を限外濾過(アミコンウルトラ 100kDa)し、50mM pH7.0 リン酸バッファーで置換し、化合物59を分析した(図20、21)。

[0182] [表5]

MMAE付糖鎖でのコンジュゲーションでのEndo F3 D165Qの酵素活性

基質	残存率(%)	変換率(%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
MMAE付糖鎖	7	38	55

[0183] [表6]

各基質でのコンジュゲーションでのEndo S D233Qの酵素活性

基質	残存率(%)	変換率(%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
MMAE付糖鎖	6	15	79
AP-3付糖鎖	4	9	87
エキサデカン付糖鎖	10	7	83
MMAE-PEG3付糖鎖	3	14	83
MMAE-PEG4付糖鎖	1	10	89
MMAE-GGFG付糖鎖	6	13	81

[0184] [表7]

各基質でのコンジュゲーションでのWP1328の酵素活性

基質	残存率(%)	変換率(%)	
	抗体-GlcNAc	1付加体	2付加体
MMAE付糖鎖	9	36	54
AP-3付糖鎖	11	51	39
エキサデカン付糖鎖	7	5	88
MMAE-PEG3付糖鎖	3	40	57
MMAE-PEG4付糖鎖	5	40	55
MMAE-GGFG付糖鎖	13	42	45

[0185] [実施例12：WP1328酵素の調製]

(1) pRSFDuet-1-MBP-WP1328の調製

WP1328の塩基配列(タンパク配列はWP_069215570.1)をE.coli発現用にコードン最適化した配列(SEQ ID NO:20)を人工合成し(Genewiz社)、この配列をプライマーWP_1328_f及びWP_1328_rを用いたPCR(98℃10秒、60℃5秒、68℃30秒

を30サイクル)により増幅した。

[0186] WP1328_fの塩基配列 (SEQ ID NO:21)

ACTATCGAGGGAAGGAGTCGCGCGCTGGCG

WP1328_rの塩基配列 (SEQ ID NO:22)

ATCCAATTGAGATCTTCATTTACCGCGTTCTTAACGG

[0187] 同様にpRSF-1-MBPベクター(pRSDuet-1、図2)のBglIIサイトにMaltose binding protein(アミノ酸配列はSEQ ID NO:5)及びFactor Xa切断配列ATCGAGGGAAGG(SEQ ID NO:6)(アミノ酸配列: IEGR(SEQ ID NO:7))がクローニングされたベクターを、プライマーFNtermMBP及びRNtermMBPを用いたPCR (98°C10秒、60°C5秒、68°C30秒を30サイクル)により増幅した。

[0188] FNtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:8)

AGATCTCAATTGGATATCGG

RNtermMBPの塩基配列 (SEQ ID NO:9)

CCTTCCCTCGATAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGC

[0189] 得られた2断片をIn-Fusion kit(TAKARA)を使用し、MBPのC末端にFactor Xa配列、その下流にN末シグナル配列を除去したWP1328配列が配置されるようにクローニングした。得られたIn-Fusion溶液を用いてE. coli JM109(TAKARA)を形質転換し、37°Cで終夜培養した。得られたコロニーに対してコロニーPCRを行い、ポジティブクローンからプラスミドとしてpRSFDuet-1-MBP-WP1328 (SEQ ID NO: 8)を取得した。

配列表フリーテキスト

[0190] SEQ ID NO:1 EndoF3 D165Q

SEQ ID NO:2 EndoF3_D165Q

SEQ ID NO:3 FEndoF3-NtermMBP

SEQ ID NO:4 REndoF3-NtermMBP

SEQ ID NO:5 Matlose Binding protein

SEQ ID NO:6 Factor Xa

SEQ ID NO:7 Factor Xa

SEQ ID NO:8 FNtermMBP
SEQ ID NO:9 RNtermMBP
SEQ ID NO:10 pRSFDuet-1-MBP-EndoF3 D165Q
SEQ ID NO:11 EndoS D233Q
SEQ ID NO:12 EndoS_D233Q
SEQ ID NO:13 FendoS_D233Q_His_pRSF
SEQ ID NO:14 RendoS_D233Q_front
SEQ ID NO:15 FendS_D233Q_back
SEQ ID NO:16 RendoS_D233Q_His_pRSF
SEQ ID NO:17 FpRSF_InF_His_BamHI
SEQ ID NO:18 RpRSF_InF_His_NcoI
SEQ ID NO:19 pRSFDuet-1-EndoS_D233Q
SEQ ID NO:20 EndoF3 D165Q
SEQ ID NO:21 WP1328f
SEQ ID NO:22 WP1328r
SEQ ID NO:23 pRSFDuet-1-MBP-WP1328
SEQ ID NO:24 WP1328

請求の範囲

[請求項1] 下記の工程を含む、抗体薬物複合体の製造方法：

糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、コンジュゲーションする工程であって、

糖鎖結合薬物が、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖にリンカーを介して薬物が結合したものである、工程。

[請求項2] 糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物とを、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素によりコンジュゲーションする、請求項1に記載の製造方法。

[請求項3] エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異酵素が、下記のいずれかのタンパク質である、請求項2に記載の製造方法：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[請求項4] リンカーが、生体内で開裂可能な構造を含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項5] リンカーが、ペプチドを含む構造である、請求項1から4のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項6] リンカーが、一般式-E-D-C-B-A-で表される構造であり、ただしAは糖鎖に結合し、Eは薬物に結合する、請求項1から5のいずれか1項に記載の製造方法

[式中、

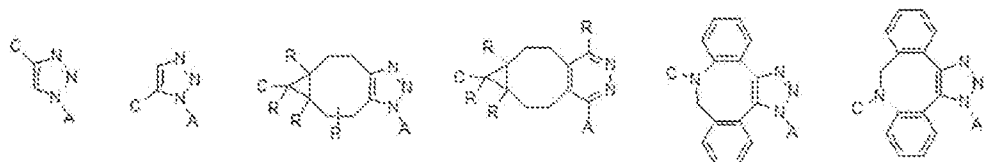
A、B、C、及びEが、各々独立に、アルキル基、エステル基、カルバモイル基、アルコキシアルキル基、イミン基、ヒドラゾン基、アゾ基、スルホン基、芳香族基、及び単結合からなる群より選択され；

Dは、2-6個のアミノ酸残基からなるペプチドである。]

[請求項7] Aは、 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-(CH_2)_{m2}-$ 、 $-(CH_2)_{m2}-$ 、又は単結合であり；

Bは、下記からなる群より選択されるいずれかであり

[化1]



[式中、Rは、それぞれ独立して、水素原子、炭素数1-4のアルキル、炭素数1-4のアルコキシ、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-CF_3$ 、又は NRR である。]；

Cは、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-NH-(CH_2CH_2O)_{n2}-(CH_2)_{n3}-C(O)-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_{n1}-C(O)-NH-(CH_2)_{n3}-C(O)-$ 、又は単結合であり

、

Eは、-アミノベンジルアルコール-C(0)-、NH-(CH₂)_o-、又は単結合であり、

m1は、1から12の整数であり、

m2は、1から6の整数であり、

n1は、1から6の整数であり、

n2は、1から12の整数であり、

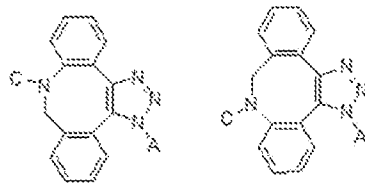
n3は、1から6の整数であり、

oは、1から6の整数である。]、請求項6に記載の製造方法。

[請求項8]

Bが、

[化2]



のいずれかである、請求項7に記載の製造方法。

[請求項9]

薬物が、アンスラサイクリン類、アウリスタチン類、メイタンシン類、カンプトテシン類、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カリケアミシン類、及びデュオカルマイシン類からなる群より選択されるいずれかである、請求項1から8のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項10]

下記のいずれか一のタンパク質を含む、糖鎖均一化抗体と糖鎖結合薬物との反応に用いるための酵素剤：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2) (1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(6)(4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7)配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

[請求項11]

下記のいずれか一のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの、糖鎖均一化抗体と、糖鎖結合薬物との反応に用いるための酵素の製造における使用：

(1) 配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(2)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(3)(1)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし165番目はD以外のアミノ酸で

あり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

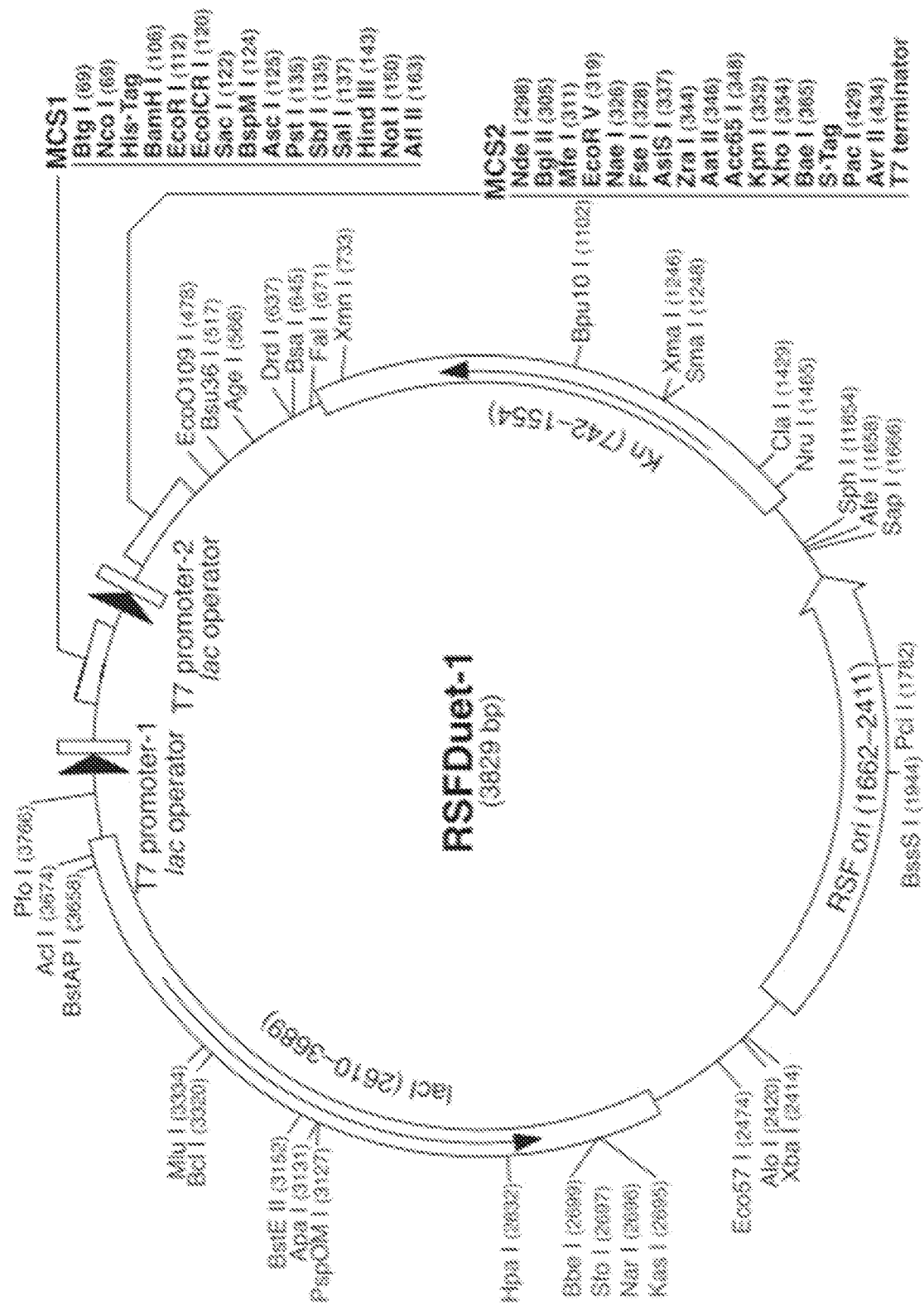
(4) 配列番号11のアミノ酸配列、又は配列番号11のアミノ酸配列において、233番目がD以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質；

(5) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

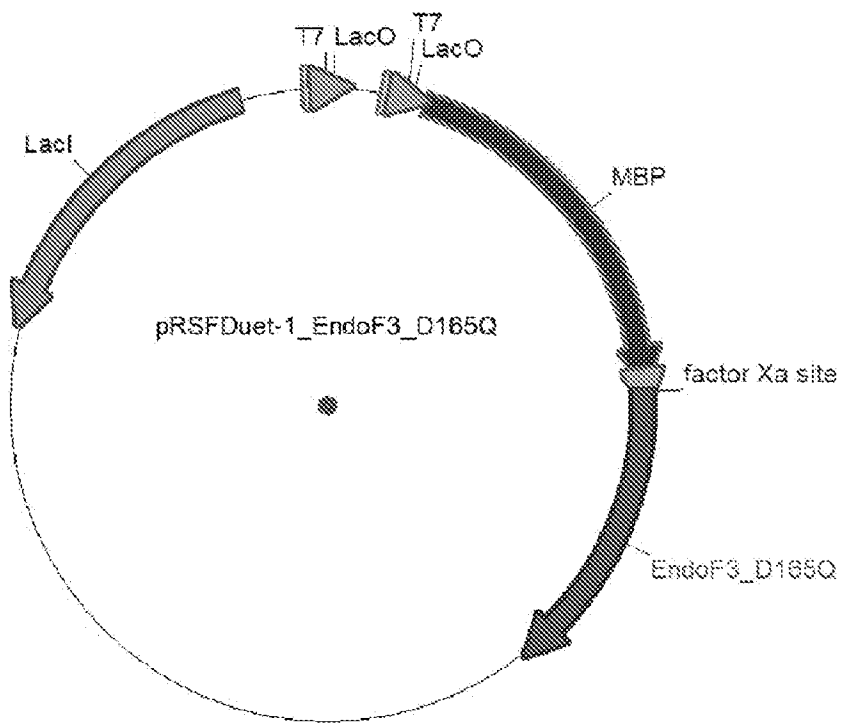
(6) (4)に記載のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、ただし233番目はD以外のアミノ酸であり、かつコンジュゲーション活性を有する、タンパク質；

(7) 配列番号24のアミノ酸配列、又は配列番号24のアミノ酸配列において、165番目がアスパラギン酸(D)以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

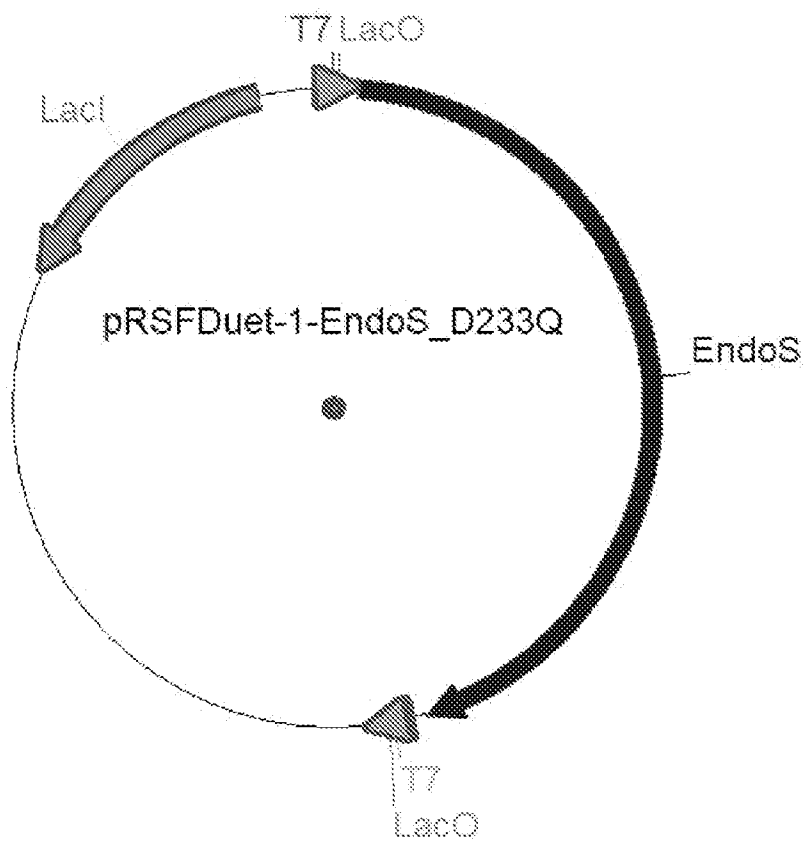
[図1]



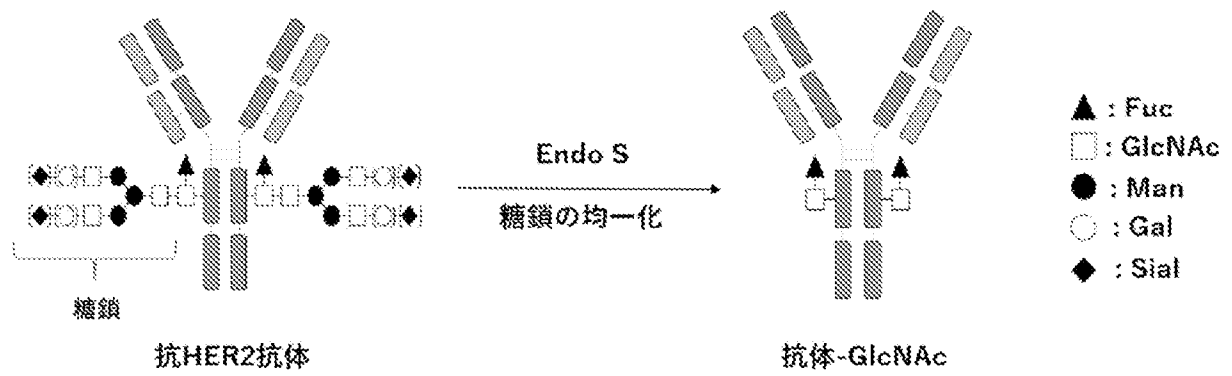
[図2-1]



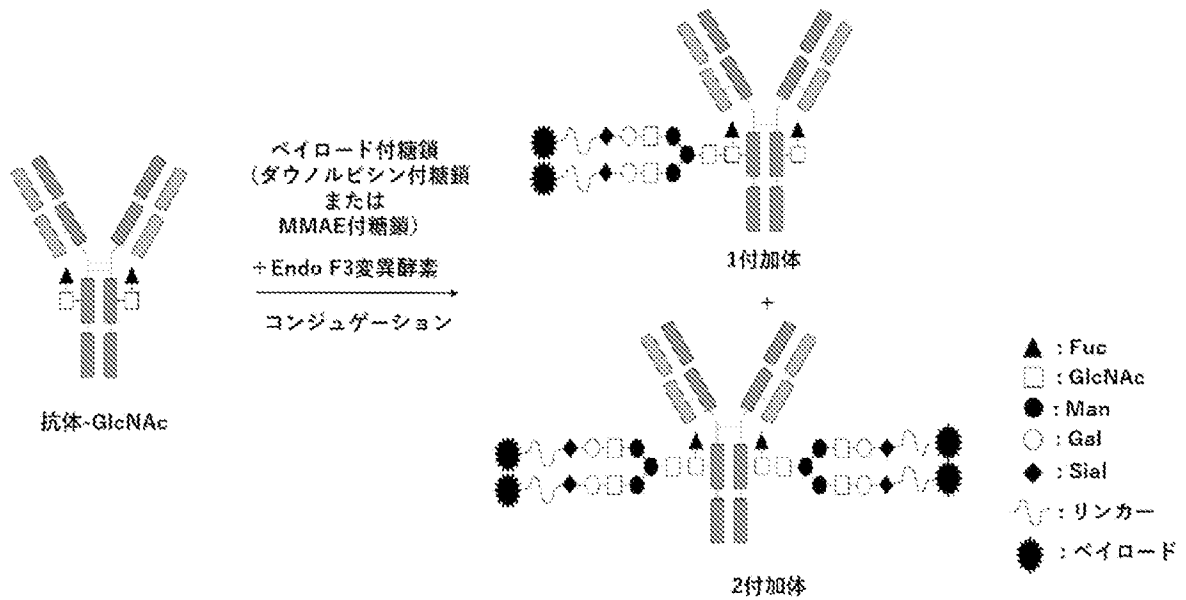
[図2-2]



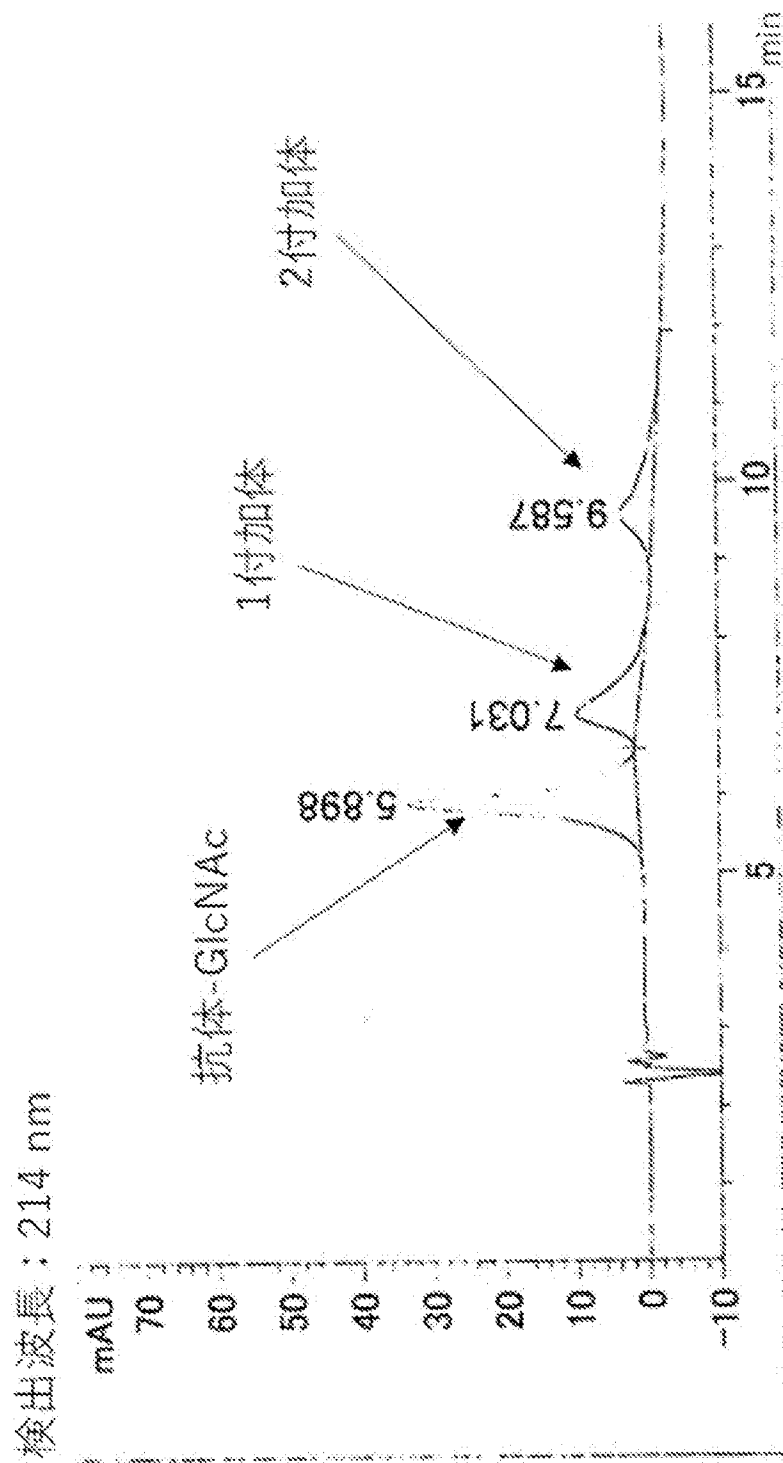
[図3]



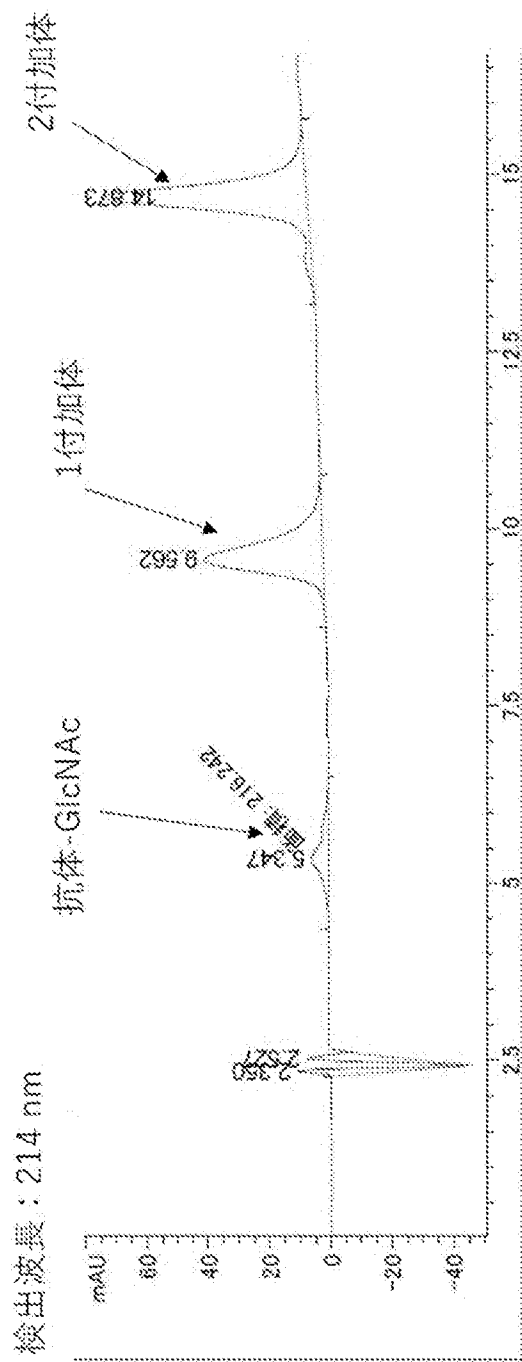
[図4]



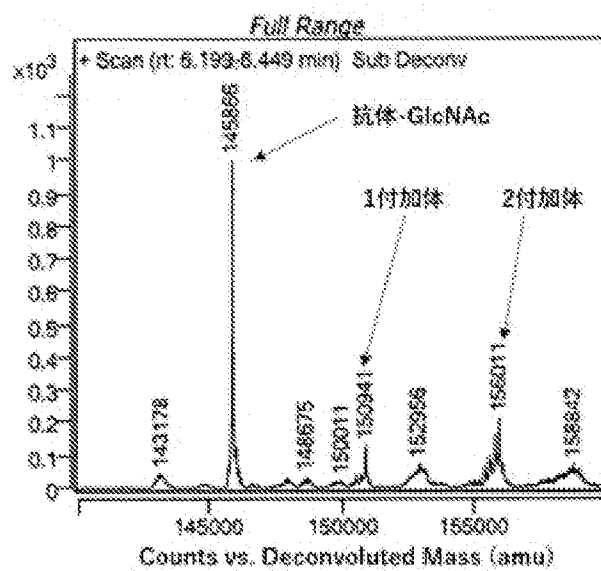
[図5]



[図6]

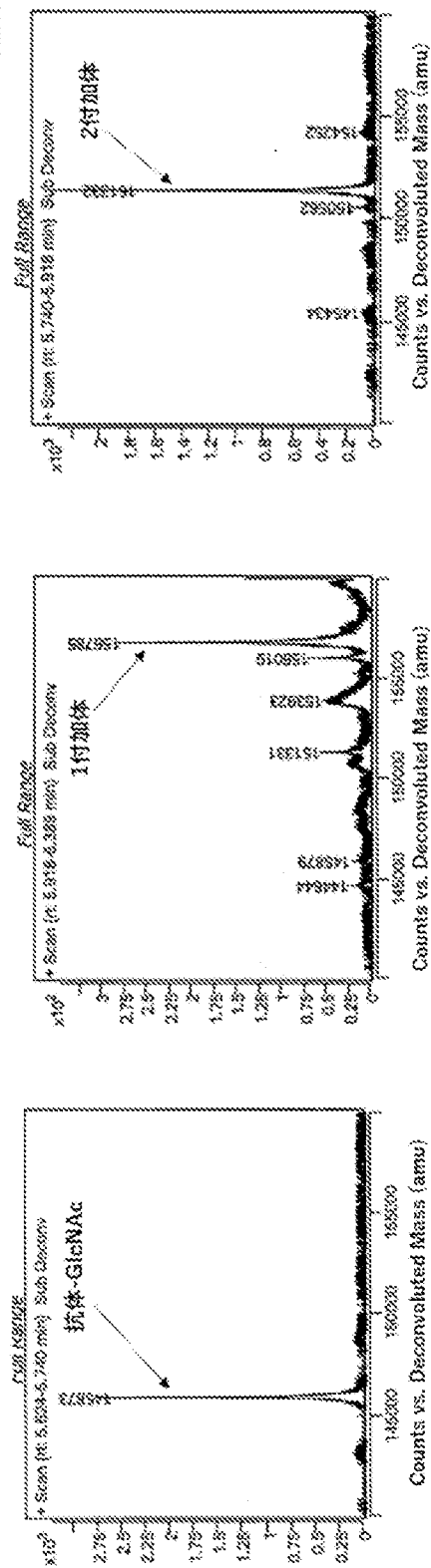


[図7]



- (1付加体) - (抗体-GlcNAc) =
5,071 : Calculated (m/z)
5,075 : Deconvolution data (m/z)
- (2付加体) - (抗体-GlcNAc) =
10,142 : Calculated (m/z)
10,143 : Deconvolution data (m/z)

[図8]



- (1付加体) - (抗体-GlcNAc) =
5,452 : Calculated (m/z)
5,459 : Deconvolution data (m/z)
- (2付加体) - (抗体-GlcNAc) =
10,904 : Calculated (m/z)
10,912 : Deconvolution data (m/z)

[図9]

EndoF3_D165Qのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1)

MKKIFFAQCISILLMLGSCSKMTEDMTPESVNKEASVKSATALAGSNGVC
 IAYYITDGRNPTEFKLKDIPDKVDMVILFGLKYWSLQDITKLPGGTGMMGS
 FKSYPDLDLQIRSLQSRGIKVLQNIDDVSWQSSKPGGFASAAAYGDAIK
 SIVIDKWKLDGISLQIEHSGAKPNPIPTFPGYAATGYNGWYSGSMAATPA
 FLNVISELTKYFGTTAPNNKQLQIASGIDVYAWNKIMENFRNNFNYIQLO
 SYGANVSRITQLMMNYATGTNKIFASKMVFEGAYAEGGTNQANDVEVAKWTP
 TQGAKGEMMIYTYNSNVSYANAVRDAVKN

EndoF3_D165Qの最適化塩基配列 (SEQ ID NO:2)

GCAACCGCACTGGCAGGTAGCAATGGTGTTTGTATTGCCTATTATATCACCGATGGTCGTAACCCGA
 CCTTCAAACCTGAAAGATATTCGGGATAAAGTGGACATGGTGATTCTGTTGGTCTGAAATATTGGAG
 CCTGCAGGATACACCAAACCTGCCTGGTGGCACCAGGTATGATGGGTAGCTTTAAAGTTATAAAGAT
 CTGGACACCCAGATTCGTAGCCTGCAGAGCCGTGGTATTAAAGTGCTGCAGAATATTGATGATGATG
 TTAGCTGGCAGAGCAGCAAACCTGGTGGTTTTGCAAGCGCAGCAGCATATGGTGATGCAATTAAAG
 CATCGTGATCGACAAATGGAACTGGATGGTATTAGTCTGCAGATTGAACATAGCGGTGCAAAACCG
 AATCCGATTCCGACCTTCCGGGTTATGCAGCAACCGGTTATAATGGTTGGTATAGCGGTAGCATGG
 CAGCAACACCGGCATTCTGAATGTTATTAGCGAACTGACCAAATATTTCCGGCACCACCGCACCGAA
 TAACAAACAGCTGCAGATCGCAAGCGGTATTGATGTTTATGCATGGAACAAGATCATGGAAAACCTC
 CGCAACAACCTTCAACTATATTAGCTGCAGTCTTATGGTGCCAATGTTAGTCTGATCCAGCTGATGA
 TGAATTATGCAACCGGCACCAACAAAATTCCGGCAAGCAAAATGGTTTTTGGTGCATATGCCGAAGG
 TGGCACCAATCAGGCAAATGATGTTGAAGTGGCAAAATGGACCCCGACACAGGGTGCAAAAGGTGGT
 ATGATGATTTATACCTATAACAGCAATGTGAGCTATGCCAATGCAGTTCGTGATGCCGTAAAAACT
 GA

Matlose Binding proteinのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:5)

MKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHFDKLEEKFPQVAATGDGPDIIIFWAHDR
 FGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIP
 ALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIK
 NKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGIN
 AASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIATMENAQKGEIMPNI
 QMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQT

[图10]

pRSEFduet-1-MBP-EndoF3 D165Qの全長塩基配列 (SEQ ID NO:10)

[illegible]

[図11]

EndoS_D233Qのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:11)

MUKHLVVKRTLQCVCAATIMGAALATNHDULNTVKAASEKTVQVQKGLPSTLSTLHYLSSENSKEKEEELSKAGQESQVY
KEILAKAQCAQKACAGELAKMKLFKEKLFMKPLHGLPLYGCTYFTTWHUMTSDPTEKDKVNSNGELEKEVULAFIFHDWTKD
YSLFWKELATKHVPKLNKQGTTRVIRFTTPWRFLAQGDNSGIAEDTSKYPNTEGKMKALAKAIVDEYVYKYNLDGLDQV
ERDSIPKVDYKEDTAGVERSIQVFEERISKLIGPKGVKSPFLIMDSTYADKNPLIEGAPYINLLVQVYVGSQSENG
GWEPVSHRPEKTMEEHMQGNSKYIPPEQYMIQFNFYSENAQEGNLWYDINGPFDUEKANGINTDITGTRASRYANWQV
FTGGVFGGIFSYAIDRDGVABQPKFYANLFEFFDIAFDNIENSDYSVSKALNTVMLEIFESYULIDEKDFPDKALREAVN
AQVSTRKQDLERFNQTLRLINFAIQSLEGLNKFKKLAQLDLIGLSRIFKILDRSVLPANMKPKKDTLETVLETYYEYDK
EEPATIPVSLXVSGILTGLKELDLSPGKSTLAGLDAATLTSLEKVDISGNFLDLAPGTENRQIFDTMLSTISNRYGS
NEQTVKFDKQKPTGHIYPUTYGTSLRLPVANEKVBLQSQLLFGTIVTNQGTLINSEADYKAYQNHFIAGPSFVLSNVHY
NNFFVSYHNTYKVTIDSTLGTTFDTLATIAGEETDYVDFFSPADKTKANSTAKVIVGDEPTMMVNLAEGATVIGGSAD
PVNARKVFDQCLCSETUNISLQWDSQSIHFKLKEDDLIKHWPFFNDSARNPETTNKPIQKASLQIFNIEDYNLDMLL
ENPNKFDDEKTYWITVDTYSAGGEPATAFSNTLNHITSKYWRVVEFTKGDYSSPVVVELQLLQVPLENADTIMKTVTT
AKELSQQVUKTFBQKMLDELKIKEMALETSLNSKIFDVTAINANAGVLKDCIEKFLKLLK

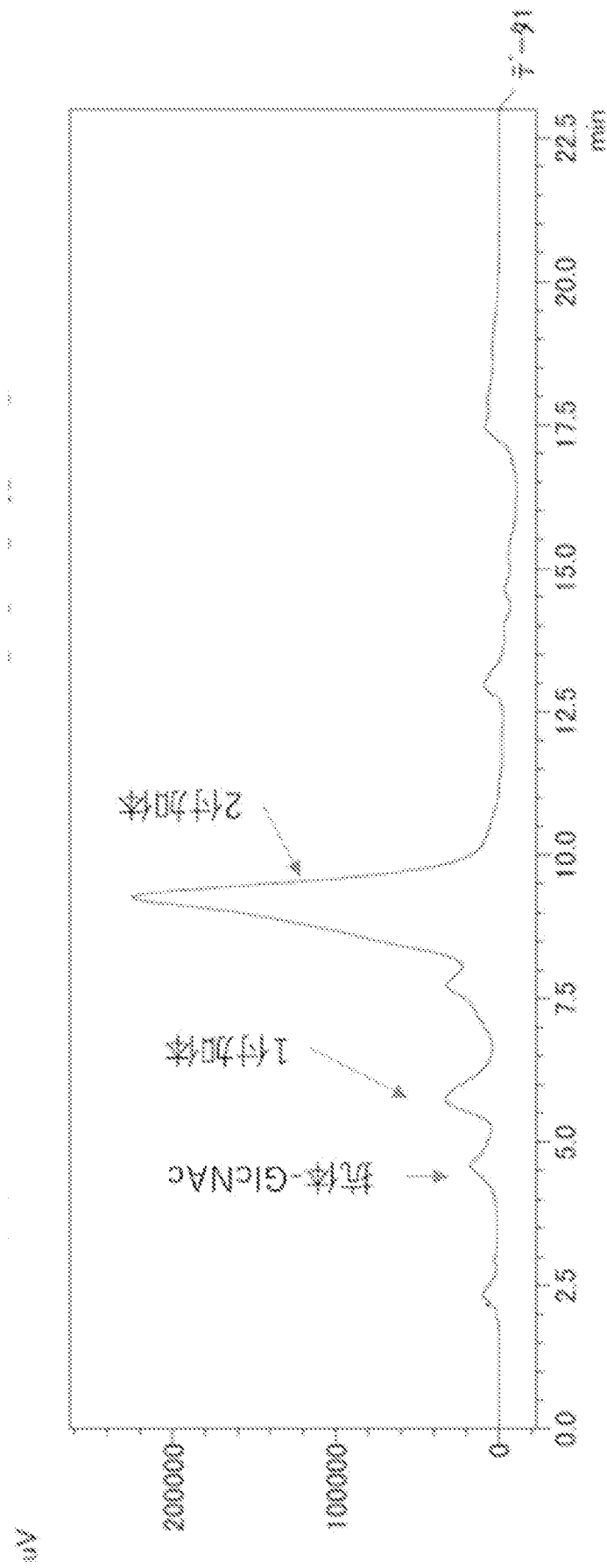
EndoS_D233Qの最適化塩基配列 (SEQ ID NO:12)

ATGGATAAACATTTTGTGGTAAAAAGAACACTAGGGTGTGTTTGTGCTGCAACGTTGATGGGAGCTGCCTTAGCGACC
CACCATGATTCACTCAATACTGTAAAAGCGGAGGAGAAGACTGTTTCAGGTTGAGAAAGGATTACCTTCTATCGATAGC
TTGCATTATCTGTGAGAGAATAGCAAAAAGAATTTAAAGAAGAACTCTCAAAAGCGGGGCAAGAATCTCAAAAGGTC
AAAGAGATATTAGCAAAAGCTCAGCAGGCAGATAAACAAGCTCAAGAACTTGCCAAAATGAAAATTCCTGAGAAAATA
CCGATGAAACCGTTACATGGTCTCTCTACGGTGGTTACTTTAGAACTTGGCATGACAAAACATCAGATCCAACAGAA
AAAGACAAAAGTTAACTCGATGGGAGAGCTTCTAAAGAAGTAGATCTAGCCCTTTATTTTCCACGATTGGACAAAAGAT
TATAGCCCTTTTTTGGAAAGAATTTGGCCACCAAAACATGTGCCAAAGTTAAACAAGCAAGGGACACGTGTCTATTGCTACC
ATTCATGCGCTTTTCTAGCTGGGGGTGATAACAGTGGTATTTGCAGAAAGATACCAAGTAAATACCCAAATACACCAGAG
GGAAATAAAGCTTTAGCCAAAGCTATTGTTGATGAATATGTTTATAAATACAACTTGATGGCTTAGATGTGCAAGTT
GAACATGATAGTATTTCCAAAAGTTGACAAAAAAGAAGATACAGCAGGCGGTAGAACGCTCTATTCAAGTGTTTGAAGAA
ATTGGGAAATTAATTGGACCAAAAGGTGTTGATAAATCGCGGTATTATTTATGATAGCACCTACATGGCTGATAAAA
AACCCTATGATTGAGCGAGGAGCTCCTTATATTAATTTATTTACTGGTACAGGTCTATGGTTTACAAGGAGAGAAAGGT
GGTTGGGAGCCTGTTTCTAATCGACCTGAAAAACAATGGAAGAACGATGGCAAGGTTATAGCAAGTATATTTCTCCT
GAACAATACATGATTGGTTTTTTCTTCTATGAGGAAAATGCTCAAGAAGGGAATCTTTGGTATGATATTAATTTCTCGC
AAGGACGAGGACAAAGCAAATGGAATTAACACTGACATAACTGGAACGCGTGCCGACGCTATGCAAGGTGGCAACCT
AAGACAGGTGGGGTTAAGGGAGGTATCTTCTCCTACGCTATTGACCGAGATGGTGTAGCTCATCAACCTAAAAAATAT
GCTAAACAGAAAGAGTTTAAAGGACGCACTGATAACATCTTCCACTCAGATTATAGTGTCTCCAAGGCATTAAAGACA
GTTATGCTAAAGATAAGTCGTATGATCTGATTGATGAGAAAGATTTCCAGATAAGGCTTTCCGAGAAAGCTGTGATG
CGCGAGGTTGGAACCGAAGAGGTGATTTGGAACGTTTCAATGGCACATTACGATTGGATAATCCAGGATTCAAAAGT
TTAGAAGGTCTAAATAAATTTAAAAAATTAGCTCAATTAGACTTGATTGGCTTATCTCGCATTACAAAAGCTCGACCGT
TCTGTTTTACCCGCTAATATGAAGCCAGGCAAAAGATACCTTGGAAACAGTTCTTGAACCTATAAAAAGGATAACAAA
GAAGAACCTGCTACTATCCACAGTATCTTTGAAGGTTTCTGTTTAACTGGTCTGAAAGAATTAGATTTGTGAGGT
TTTGACCGTGAAACCTTGGCTGGTCTTGATGCGGCTACTCTAACGTCTTTAGAAAAAGTTGATATTTCTGGCAACAAA
CTTGATTTGGCTCCAGGAACAGAAAAATCGACAAATTTTTGATACTATGCTATCAACTATCAGCAATCATGTTGGAAGC
AATGAACAAACAGTGAAATTTGACAAAGCAAAAACCAACTGGGCATTACCCAGATACCTATGGGAAAACTAGTCTGCGC
TTACCACTGGCAAATGAAAAAGTTGATTTGCAAAGCCAGCTTTTGTGTTGGGACTGTGACAAATCAAGGAACCTAATC
AATAGCGAAGCAGACTATAAGGCTTACCAAAATCATAAAATTTGCTGGACGTAGCTTTGTTGATTCAAACATATCATTA
AATAACTTTAAAGTTTCTTATGAGAACTATAACGTTAAAGTAACTGATTCCACATTGGGAACCACTACTGACAAAACG
CTAGCAACTGATAAAGAAGAGACCTATAAGGTTGACTTCTTTAGCCACAGAGATAAGACAAAAGCTGTTTCATACTGCT
AAAGTGATTGTTGGTGACGAAAAAACCATGATGGTTAATTTGGCAGAAGGCGCAACAGTTATTGGAGGAAGTGCTGAT
CCTGTAAATGCAAGAAAGGTATTGATGGGCAACTGGGCGAGTGAAGTGAATATCTCTTTAGGATGGGATTCTAAG
CAAGTATTATATTTAAATGAAAGAAGATGGATTAAATAAAGCAATGGCGTTTCTTCAATGATTGAGCCCCGAAATCCT
GAGACAAACCAATAAACCTATTGAGGAAGCAAGTCTACAAATTTTTAATATCAAAGATTATAATCTAGATAATTTGTTG
GAAAATCCCAATAAATTTGATGATGAAAAATATTGGATTACTGTAGATACTTACAGTGCACAAGGAGAGAGAGCTACT
GCATTCAGTAATACATTAAATAATATTACTAGTAAATATTGGCAGTTGTCTTTGATACTAAAGGAGATAGATATAGT
TCGCGAGTAGTCCCTGAAGTCCAAATTTTAGGTTATCCGTTACCTAACGCCGACACTATFCATGAAAACAGTAAGTACT
GCTAAAGAGTTATCTCAACAAAAAGATAAGTTTTCTCAAAAGATGCTTGATGAGTTAAAAATAAAGAGATGGCTTTA
GAACTTCTTTGAACAGTAAGATTTTGTGATGTAAGTCTATTAATGCTAATGCTGGAGTTTGAAGAGTTGTATTGAG
AAAAGGCAGCTGCTAAAAAATAA

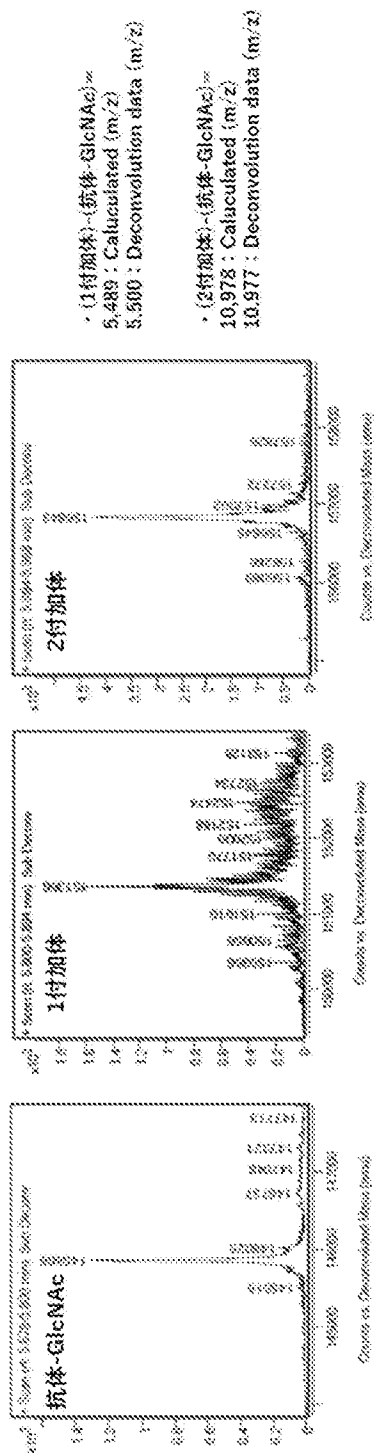
[illegible]

[図13]

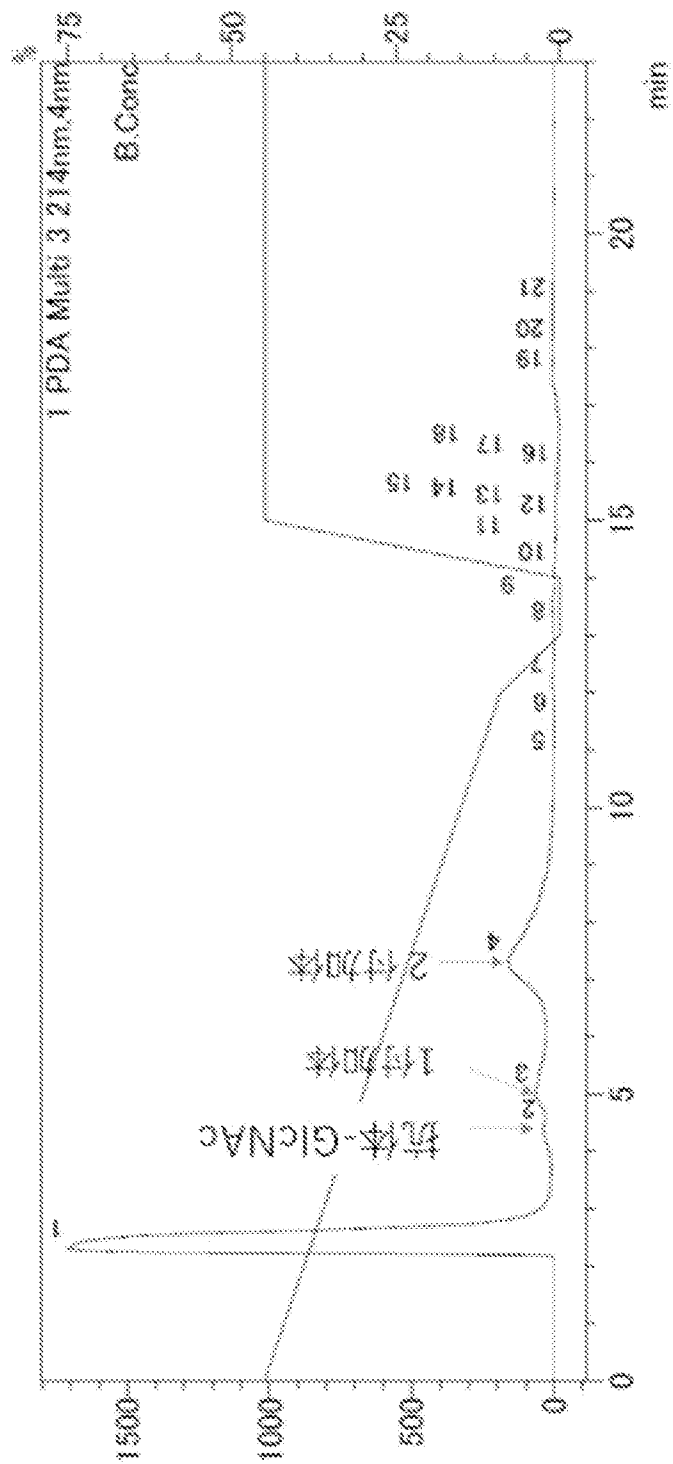
AP-3付糖鎖コンジュゲート (HPLC)



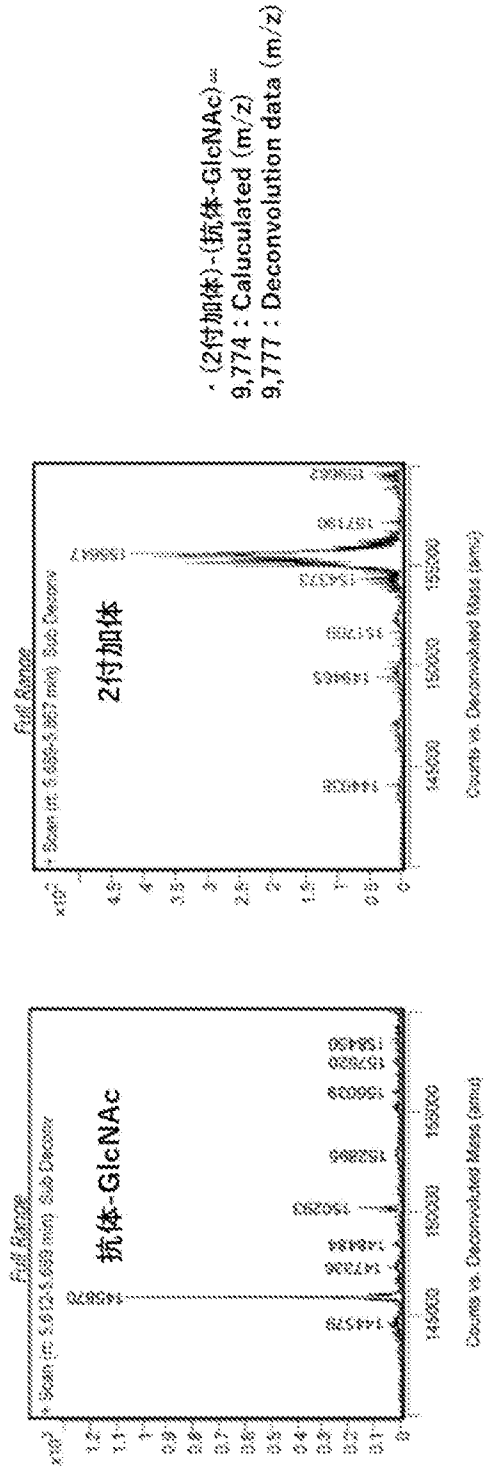
[図14]



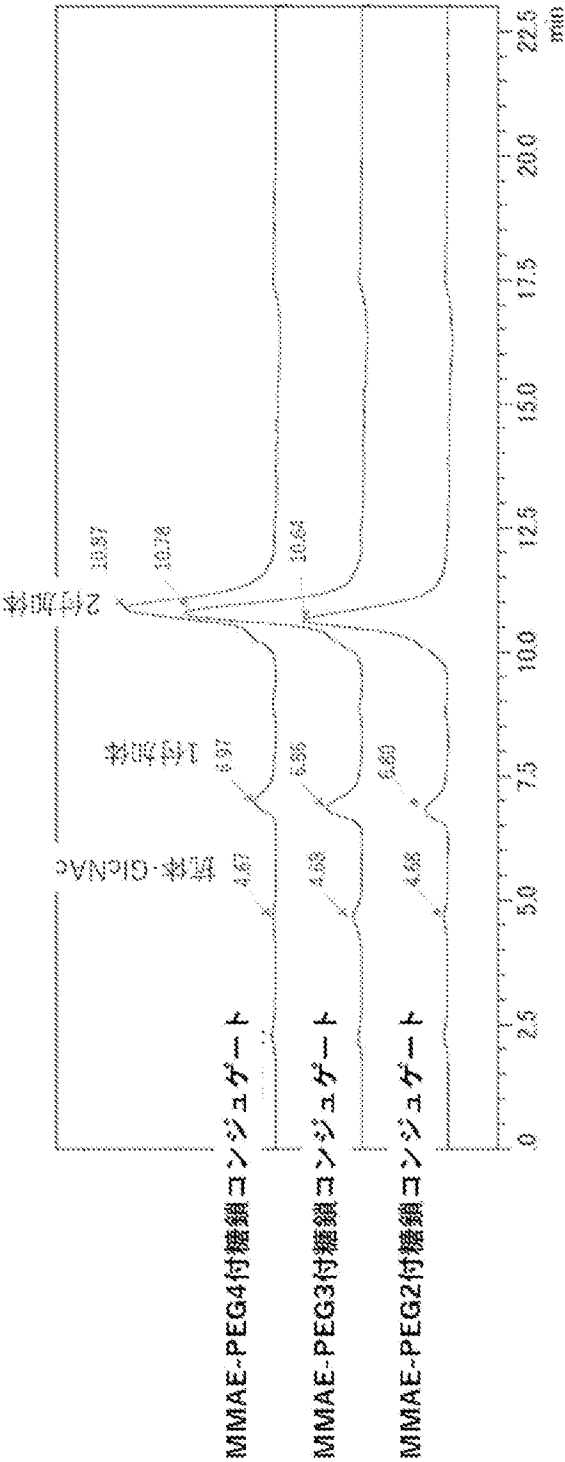
[図15]



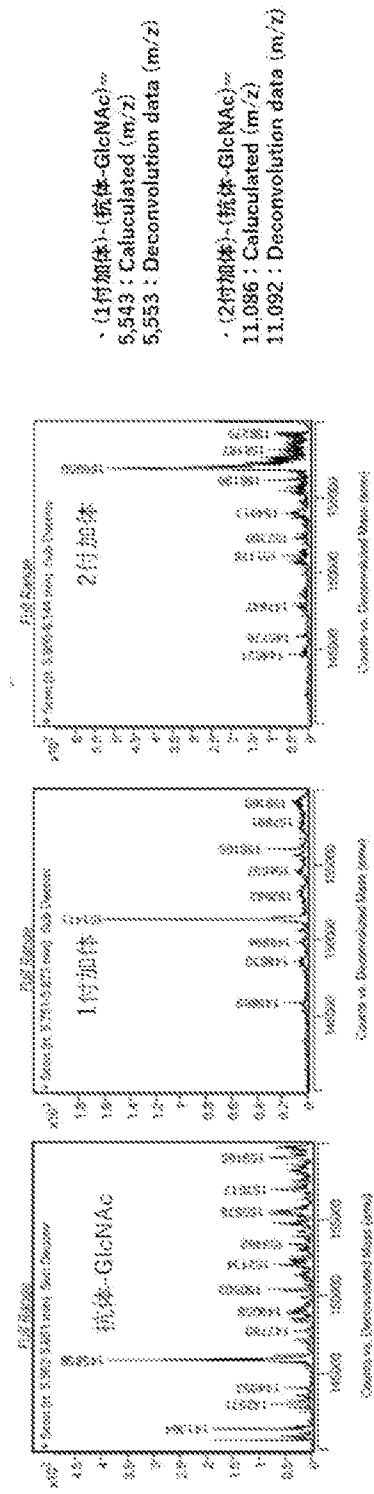
[図16]



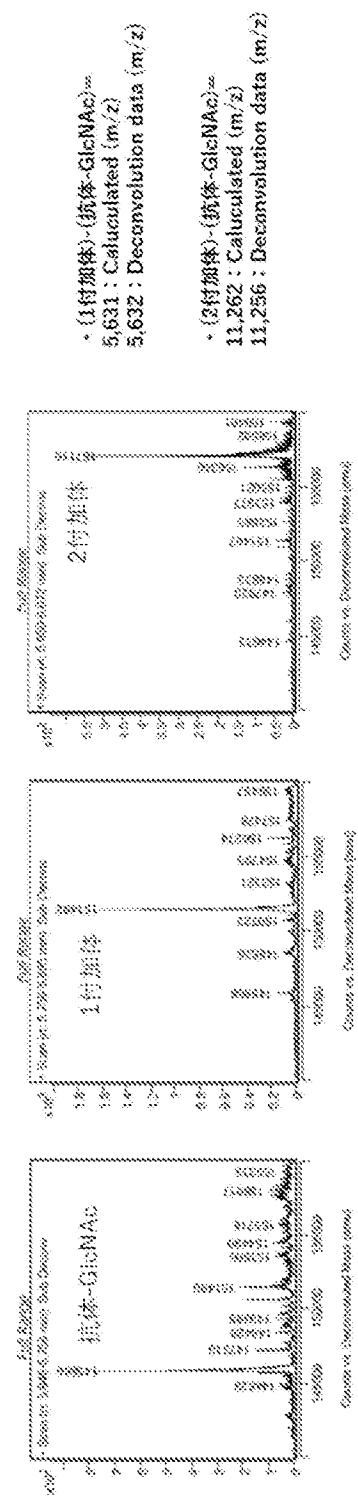
[図17]



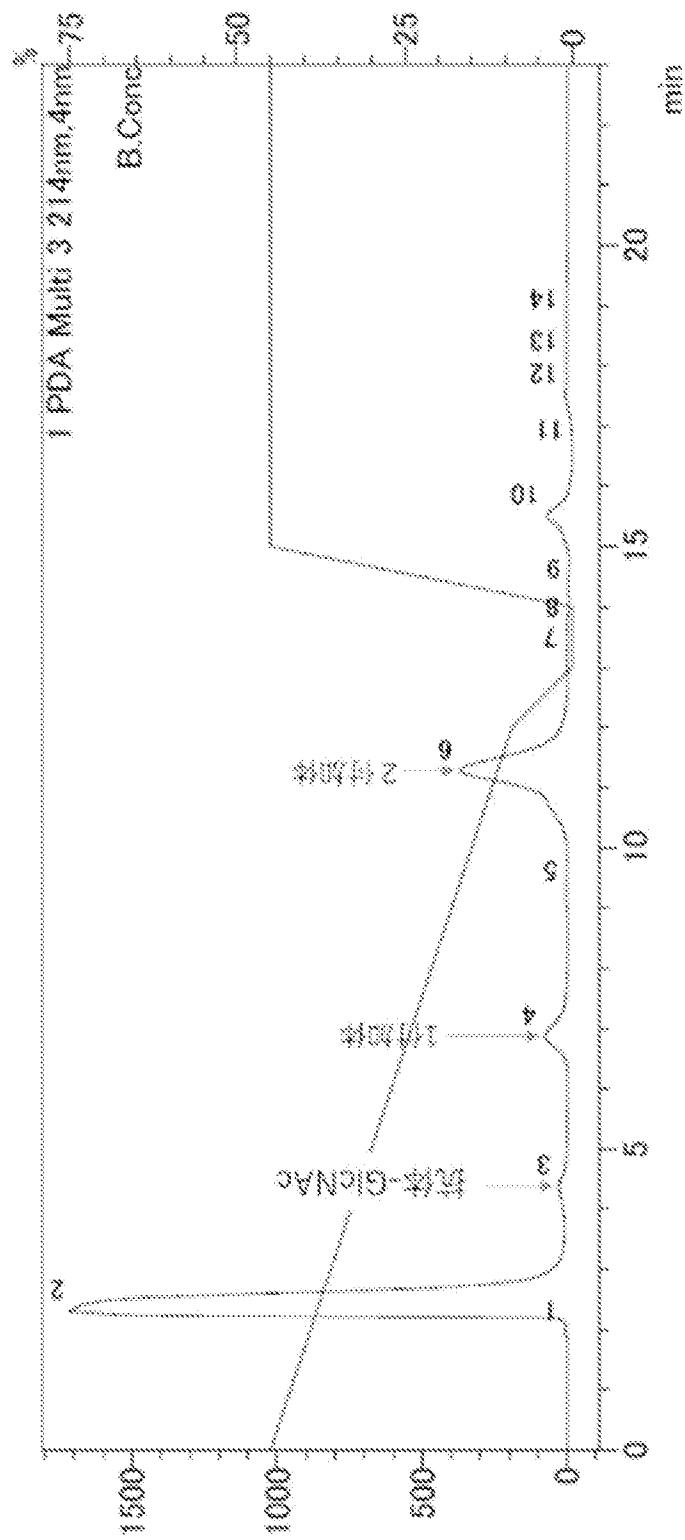
[図18]



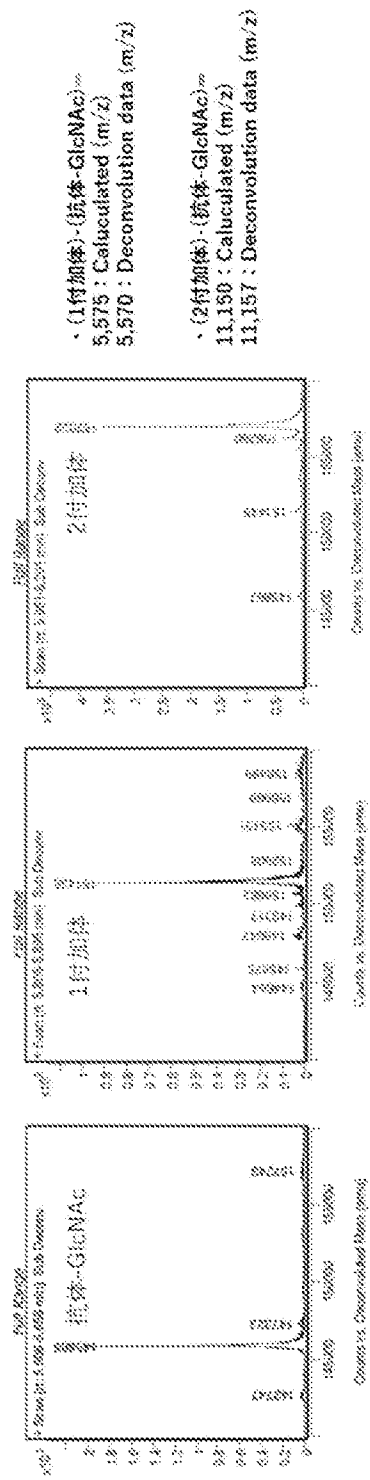
[図19]



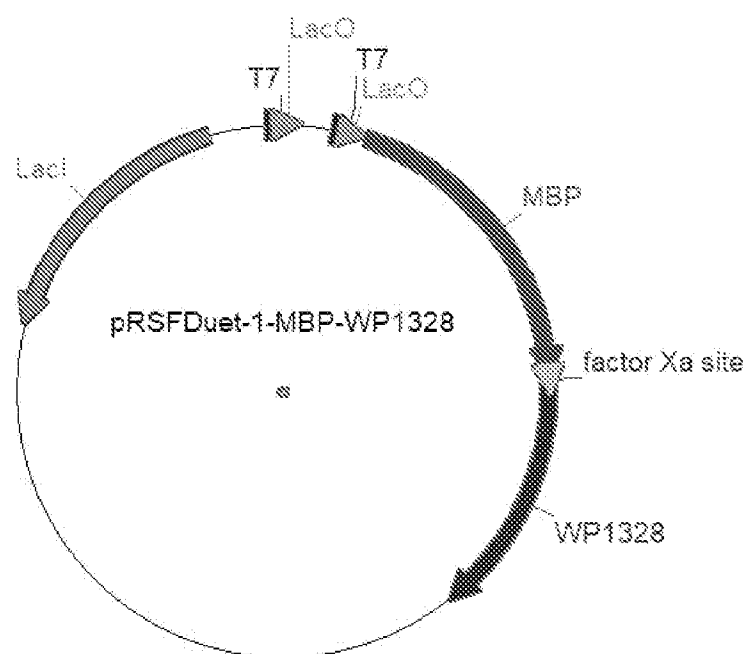
[図20]



[図21]



[図22]



[図23]

WP1328の塩基配列 (SEQ ID NO:20)

ATGAAAAAATTTTTCTGGCCCAGCTGAGCGTGCTGTTTCTGCTGATTCTGGGTGCGTGCAGCAAAA
TGAGCGAAGATCTGGCCCCGAGACCAGCGATAAAATTACGGCCACCAGTAGTCGCGCGCTGGCGGG
CAACAATGGCGTGTGCATCGCGTACTACATCACCGACGGCCGAATCCGAGCTTCAAGCTGAAGGAT
ATCCCGGATGGTGTTGACATGGTGATTCTGTTCCGGTCTGAAGTACTGGAGTCTGCAAGATACCACCA
AACTGAAACCGGGCACCGATATGATGAGCAGCTTCACGAGCTACAAAGATCTGGACAACCAGATCCG
TAGTCTGCAGAGCCGCGGCATCAAAGTGCTCCAGAACATCGACGACGACGTTAGCTGGCAGAGCAGC
AAGCCGGGCGGCTTTGCGAGTGCCGCCGCGTATGGTGACGCCATCAAGAGCATCGTGATCGATAAGT
GGAAGCTGGACGGCATTAGTCTGCAAGTTGAACACAGCGGCGCGAAACCAAATCCGATCCCGACCTT
TCCGGGTTATGCGGCCACCGGCTATAATGGCTGGTACAGCGGTAGCATGGCCGCGACCCCAAGATTT
CTGAACGTGATCCGCGAGCTCACGAAATACTTCGGTACCACCGCCCCGAACAATAAACAGCTGCAGA
TCGCCAGCGGCATCGATGTGTACAGCTGGAATAAAATTATGGAAAACCTCCGCACCAACTTCAACTA
CATCCAGCTCCAGAGCTACGGTGCGAACGTTAGTCGCACGACGCTGATGATGAACACGCCACCGGC
ACGAACAAAATCCCGGCGAACAAGATGGTGTTCCGGCGCCTACGCGGAAGGTGGTACCAACCAAGCCA
ACGACGTGCTGGTTGCGAAATGGGTTCCGAGCCAAGGCGCCAAAGGCGGCATGATGATTTACACCTA
CAACAGCAACGTGAACTATGCCAACGCCGTTAAGAACGCGGTGAAA

WP1328のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:24)

MKKIFLAQLSVLFLILGACSKMSEDLAPETSDKITATSSRALAGNNGVC
IAYYITDGRNPSFKLKDIPDGVDMVILFGLKYWSLQDTTKLKPGTDMMS
FTSYKDLNQIRSLQSRGIKVLQNIDDDVSWQSSKPGGFASAAAYGDAIK
SIVIDKWKLDGISLQVEHSGAKPNPIPTFPGYAATGYNGWYSGSMAATPE
FLNVIRELTKYFGTTAFNNKQLQIASGIDVYSWNKIMENFRNFNFIQLQ
SYGANVSRRTTLMNNYATGTNKIPANKMVFAYAEAGGTNQNANDVLVAKWVP
SQGAKGGMIIYTYNSNVNYANAVKNAVK

[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/68(2017.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C12N 9/24**(2006.01)i; **C12N 15/56**(2006.01)i; **C12P 19/44**(2006.01)i; **C07K 16/30**(2006.01)n

FI: A61K47/68 ZNA; A61K39/395 C; A61K39/395 L; A61P35/00; C12N9/24; C12N15/56; C12P19/44; C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K47/68; A61K39/395; A61P35/00; C12N9/24; C12N15/56; C12P19/44; C07K16/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022

Registered utility model specifications of Japan 1996-2022

Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/010559 A1 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 19 January 2017 (2017-01-19)	11
A	particularly, sequence no. 1, examples	1-10
Y	GIDDENS, J. P. et al. Endo-F3 Glycosynthase Mutants Enable Chemoenzymatic Synthesis of Core-fucosylated Triantennary Complex Type Glycopeptides and Glycoproteins. J Biol Chem. 2016, 291(17), pages 9356-9370	11
A	abstract	1-10
Y	Accession Number: P36913, entry version 106, UniProtKB/Swiss-Prot [online] (retrieved on 31 May 2022) 02 December 2020, retrieved from the Internet <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/P36913.txt?version=106 >	11
A	particularly, sequence	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

31 May 2022

Date of mailing of the international search report

14 June 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016786

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Accession Number: A0A1V3U698, entry version 27, UniProtKB/TrEMBL [online] (retrieved on 31 May 2022) 10 February 2021, retrieved from the Internet <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1V3U698.txt?version=27 > particularly, sequence	11
A		1-10
A	JP 2019-206491 A (INSTITUTE OF PHYSICAL & CHEMICAL RESEARCH) 05 December 2019 (2019-12-05) entire text	1-11
A	WO 2020/196475 A1 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 01 October 2020 (2020-10-01) entire text	1-10
A	CN 107778372 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 March 2018 (2018-03-09) entire text	1-11
P, X	JP 2021-145548 A (NOGUCHI INSTITUTE) 27 September 2021 (2021-09-27) particularly, sequence no. 1, examples	11
P, A	水野真盛, 他10名, PEG化2糖オキサゾリン誘導体を用いた抗体薬物複合体(ADC)前駆体の合成, 第40回日本糖質学会年会要旨集, 15 October 2021, pages 114, 3B-06, (MIZUNO, Mamoru et al. Synthesis of antibody-drug conjugate (ADC) precursor using PEGylated disaccharide oxazoline derivative. Proceedings of The 40th Annual Meeting of Japanese Society of Carbohydrate Research.) entire text	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/016786

Box No. I **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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/016786

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2017/010559	A1	19 January 2017	US 2018/0208915 A1 particularly, sequence no. 1, examples EP 3323886 A1 KR 10-2018-0030536 A CN 108026518 A	
JP	2019-206491	A	05 December 2019	(Family: none)	
WO	2020/196475	A1	01 October 2020	EP 3949987 A1 entire text CN 113631190 A KR 10-2021-0141630 A	
CN	107778372	A	09 March 2018	WO 2018/036403 A1 entire text	
JP	2021-145548	A	27 September 2021	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 47/68(2017.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 9/24(2006.01)i; C12N 15/56(2006.01)i; C12P 19/44(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)n FI: A61K47/68 ZNA; A61K39/395 C; A61K39/395 L; A61P35/00; C12N9/24; C12N15/56; C12P19/44; C07K16/30		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K47/68; A61K39/395; A61P35/00; C12N9/24; C12N15/56; C12P19/44; C07K16/30		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2017/010559 A1（第一三共株式会社）19.01.2017（2017-01-19） 特に、配列番号1、実施例	11 1-10
Y A	GIDDENS, J. P. et al., Endo-F3 Glycosynthase Mutants Enable Chemoenzymatic Synthesis of Core-fucosylated Triantennary Complex Type Glycopeptides and Glycoproteins, J Biol Chem., 2016, 291(17), pp.9356-9370 要約	11 1-10
Y A	Accession Number: P36913, entry version 106, UniProtKB/Swiss-Prot[online] (retrived on 2022 May 31), 2020.12.02, retrieved from the Internet <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/P36913.txt?version=106 > 特に、配列	11 1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 31.05.2022		国際調査報告の発送日 14.06.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 渡邊 潤也 4U 3131 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Accession Number: A0A1V3U698, entry version 27, UniProtKB/TrEMBL[online] (retrived on 2022 May 31), 2021.02.10, retrieved from the Internet <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1V3U698.txt?version=27> 特に、配列	11
A		1-10
A	JP 2019-206491 A (国立研究開発法人理化学研究所) 05.12.2019 (2019 - 12 - 05) 全文	1-11
A	WO 2020/196475 A1 (第一三共株式会社) 01.10.2020 (2020 - 10 - 01) 全文	1-10
A	CN 107778372 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09.03.2018 (2018 - 03 - 09) 全文	1-11
P, X	JP 2021-145548 A (公益財団法人野口研究所) 27.09.2021 (2021 - 09 - 27) 特に、配列番号1, 実施例	11
P, A	水野 真盛, 他10名, PEG化2糖オキサゾリン誘導体を用いた抗体薬物複合体(ADC)前駆 体の合成, 第40回日本糖質学会年会要旨集, 2021.10.15, p.114, 3B-06 全文	1-11

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/016786

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/010559	A1	19.01.2017	US 2018/0208915 A1 特に、配列番号1, 実施例 EP 3323886 A1 KR 10-2018-0030536 A CN 108026518 A	
JP	2019-206491	A	05.12.2019	(ファミリーなし)	
WO	2020/196475	A1	01.10.2020	EP 3949987 A1 全文 CN 113631190 A KR 10-2021-0141630 A	
CN	107778372	A	09.03.2018	WO 2018/036403 A1 全文	
JP	2021-145548	A	27.09.2021	(ファミリーなし)	