

明 細 書

発明の名称： 変異 F c 領域を含む抗体薬物コンジュゲート

技術分野

[0001] 本発明は、抗腫瘍活性を維持しつつ、安全性面で優れた分子、STING アゴニスト活性を有する環状ジヌクレオチド誘導体と変異 F c 領域を含む抗体又は該抗体の機能性断片とをリンカーを介して結合させた抗体薬物コンジュゲート、該抗体薬物コンジュゲートを含有する医薬組成物、変異 F c 領域を含む抗体、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含む N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子の製造方法等に関する。

背景技術

[0002] F c 領域は、抗体に長い血中半減期や抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞貪食 (ADCP) 等のエフェクター機能をもたらす。F c 領域が抗体医薬の大半で用いられる Ig G と呼ばれるサブクラスに由来する場合、エフェクター機能は F c 領域と F c γ 受容体 (F c γ R) と呼ばれる受容体ファミリーとの結合に依存する。しかしながら、F c γ R 結合活性はインフュージョンリアクションなど安全性リスクへの関与が示唆されていることなどから (非特許文献 1)、抗体医薬において望ましくない性質とされる場合も多い。

[0003] これまで、ヒト F c γ R に対する結合活性を減弱する様々な Ig G 型抗体の F c 領域上のアミノ酸置換が報告されている (例えば、特許文献 1 ~ 6 並びに非特許文献 2 及び 3)。

[0004] しかしながら、抗体に免疫細胞を賦活化する活性を有する薬物 (免疫賦活化剤) をコンジュゲートさせた抗体薬物コンジュゲートにおいては、抗体のエフェクター機能を低減させると薬効も低下することが報告されている (非特許文献 4 ~ 6、特許文献 3 6)。

[0005] STING (Stimulator of Interferon Genes) は、小胞体に局在する膜貫通型のアダプタータンパク質である (非

特許文献7)。STINGは、哺乳動物における自然免疫活性化の中枢分子として機能しており、細菌やウイルスのような病原体の進入に対する防御の最前線を担っている。STINGの活性化は、複数の細胞質DNAセンサーが、外因性及び内因性のDNAを感知した際のシグナルによって引き起こされることが知られている。細胞質DNAセンサーの中では、cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase) が重要なDNAセンサーと考えられている。cGASがDNAを感知すると環状ジヌクレオチド (2', 3'-cGAMP) が産生され、この2', 3'-cGAMPがSTINGに直接結合し、STINGを活性化させる (非特許文献8)。活性化したSTINGはゴルジ体へと移動し、そこでTBK1 (Tank-binding kinase 1) の自己リン酸化を促す。自己リン酸化して活性化したTBK1は、IRF3 (Interferon regulatory factor 3) 転写経路 (非特許文献9) 及びNF κ B転写経路 (非特許文献10) の両方を活性化し、インターフェロンやサイトカイン (I型IFN (Interferon)、IL-6 (Interleukin-6)、TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)) と呼ばれる炎症性タンパク質の産生を増加させる。これらのタンパク質は、複雑なカスケードを通じて病原体や癌細胞を破壊するT細胞を含む獲得免疫系を始動させる。

[0006] 最近の研究により、STINGは微生物に対する宿主防御だけでなく、抗腫瘍免疫を促進することが示された。例えば、STING欠損マウスに免疫原性腫瘍を移植した場合、腫瘍は、野生型マウスやTRIF (Toll/Interleukin-1 (IL-1) receptor domain containing adaptor-inducing interferon- β) 欠損マウスよりも急速に増殖する。また、STING欠損マウスでは、TLR (Toll-like receptor)、MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)、MAVS (Mitochondrial an

t i v i r a l - s i g n a l i n g p r o t e i n) 欠損マウスとは異なり、腫瘍に対する自発的なCD8⁺T細胞のプライミングも消失した。これは細胞質DNA感知により始動するSTING経路が腫瘍増殖の制御に関与していることを示唆している（非特許文献11）。他の研究では、STINGが放射線治療（非特許文献12）又は抗CD47抗体療法（非特許文献13）の抗腫瘍効果に必要であることも示されている。放射線又は抗CD47抗体で処置した後の、死んだ腫瘍細胞由来のDNAは、樹状細胞の細胞質へと移動してcGAS-STING経路を活性化した後、IFN産生を誘導して自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする。この研究は、STING経路によって活性化された樹状細胞を介在するクロスプライミングが腫瘍に対する獲得免疫を引き起こすために重要であることを示唆している。

[0007] 血管破壊剤として知られているフラボノイド系低分子化合物DMXAAは、マクロファージのI型IFNを誘導するため、マウス腫瘍モデルにおいて、強力な抗腫瘍活性を有することが示された（非特許文献14）。DMXAAは前臨床での優れた抗腫瘍効果から、非小細胞肺癌の免疫療法薬として期待されていたが、ヒトの臨床試験は失敗した（非特許文献15）。最近の研究により、DMXAAはマウスのSTINGに対する特異的なアゴニストであり、ヒトのSTINGに種交差性が無いため、結合できないことが明らかにされた（非特許文献16）。DMXAAは、結果的にヒトでは無効であったが、マウスモデルにおける研究により、低分子薬がSTINGを介在して、効果的にCD8⁺T細胞をプライミングし、抗腫瘍免疫を増強できることが示唆された。

[0008] 別の低分子化合物として、環状ジヌクレオチド（Cyclic dinucleotide、CDN）は、担がんマウスに投与するとSTING介在による抗腫瘍免疫応答が増強して腫瘍増殖が著しく阻害され、マウスの生存率を改善することが示された（非特許文献17）。CDNは、細菌由来の標準的な二つの3'-5'リン酸結合を有するCDN（cyclic-di-GMP, cyclic-di-AMP, 3', 3'-cGAMP）と、哺乳

動物のcGASが産生する非標準的な2' - 5' リン酸結合を有する混合結合型のCDN (2' , 3' - cGAMP) に分類される。最近の研究により、標準的なCDNよりも混合結合型のCDNの方が、多様なSTINGを普遍的に活性化可能であることが示されている(非特許文献18)。

[0009] 天然型のCDNは、多くの核酸分子のように血液中の核酸分解酵素によって速やかに分解されるため、そのままの形で投与することはできない。そのため、生体内でSTINGアゴニスト活性を有する合成低分子化合物が開発されている(例えば、特許文献8~33)。

[0010] 現在、抗腫瘍剤として臨床試験が進められているSTINGアゴニストのMIW-815 (ADU-S100、ML RR-S2 CDA又はML RR-CDA・2Na⁺と呼ばれることもある)は、腫瘍内に直接投与される。STINGアゴニストを腫瘍に直接投与する方法では、腫瘍内の限定した範囲にしか薬剤を投与できず、また、複数の遠隔転移腫瘍すべてに直接投与するのは困難であることから、治療可能な腫瘍が限定されてしまうという問題がある。非特許文献19には、ML RR-S2 CDA投与により抗腫瘍効果が示されたことが記載されるが、腫瘍内投与のみであり、全身投与(例えば、静脈内投与)による抗腫瘍効果は示されていない。非特許文献20には、STINGアゴニストのSB11285をマウス腫瘍モデルに静脈内投与すると抗腫瘍効果が示されたことが記載されるが、SB11285が具体的にどのような構造を有する化合物かは明らかにされていない。特許文献21には、免疫刺激化合物と抗体構築物とリンカーを含有するコンジュゲートが記載されているが、免疫刺激化合物としてSTINGアゴニストを用いたコンジュゲートの具体例は記載されていない。特許文献33には、特定の構造を有するCDNと抗体とをリンカーを介して結合させたコンジュゲートが記載されているが、コンジュゲートを*in vivo*で投与した実施例の記載がなく、コンジュゲートの抗腫瘍効果は確認されていない。特許文献34、35、37及び38には、免疫刺激化合物としてSTINGアゴニストを用いて抗体とリンカーを介して結合させたコンジュゲートが記載されてお

り、*in vivo*で投与した実施例の記載がある。

- [0011] 他方、医療用の抗体や抗体Fc領域を含む糖タンパク分子に付加する糖鎖を均一にする方法としては、酵素を使った糖鎖転移反応が知られており、特に、2種類のENGaseを使用して糖鎖をGlcNAcアクセプターに直接転移するワンポット法が知られている。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：国際公開第1988/07089号
特許文献2：国際公開第1999/51642号
特許文献3：国際公開第2000/42072号
特許文献4：国際公開第2013/092001号
特許文献5：国際公開第2015/109131号
特許文献6：国際公開第2020/086776号
特許文献7：国際公開第2013/118858号
特許文献8：国際公開第2014/099824号
特許文献9：国際公開第2014/179335号
特許文献10：国際公開第2014/189805号
特許文献11：国際公開第2014/189806号
特許文献12：国際公開第2015/074145号
特許文献13：国際公開第2015/185565号
特許文献14：国際公開第2016/096714号
特許文献15：国際公開第2016/012305号
特許文献16：国際公開第2016/145102号
特許文献17：国際公開第2017/027646号
特許文献18：国際公開第2017/027645号
特許文献19：国際公開第2017/075477号
特許文献20：国際公開第2017/093933号
特許文献21：国際公開第2017/100305号

特許文献22：国際公開第2017/123669号
特許文献23：国際公開第2017/161349号
特許文献24：国際公開第2017/175147号
特許文献25：国際公開第2017/175156号
特許文献26：国際公開第2018/009466号
特許文献27：国際公開第2018/045204号
特許文献28：国際公開第2018/060323号
特許文献29：国際公開第2018/067423号
特許文献30：国際公開第2018/065360号
特許文献31：国際公開第2014/093936号
特許文献32：国際公開第2018/009648号
特許文献33：国際公開第2018/100558号
特許文献34：国際公開第2021/202984号
特許文献35：国際公開第2022/097117号
特許文献36：国際公開第2019/084060号
特許文献37：国際公開第2020/050406号
特許文献38：国際公開第2021/177438号

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：J Immunotoxicol；5（1）：11－5（2008）
非特許文献2：Protein Eng Des Sel.；29（10）：457－66（2016）.
非特許文献3：J Biol Chem；292（5）：1865－75（2017）
非特許文献4：Nature Cancer 2021，2，18－33
非特許文献5：AACR 2021 Poster#1773
非特許文献6：Sean W. Smith，「SBT6050， a HER2-Directed TLR8 ImmunoTACTM Therap

eutic, is a Potent Human Myeloid Cell Agonist with Tumor-Localized Activity」, World ADC 2020

非特許文献7: Nature 2008, 455, 674-678

非特許文献8: Mol. Cell, 2013, 51, 226-235

非特許文献9: Science 2015a, 347, aaa2630

非特許文献10: J. Virol. 2014, 88, 5328-5341

非特許文献11: Immunity 2014, 41, 830-842

非特許文献12: Immunity 2014, 41, 843-852

非特許文献13: Nat. Med. 2015, 21, 1209-1215

非特許文献14: J. Immunol. 1994, 153, 4684-4693

非特許文献15: J. Clin. Oncol. 2011, 29, 2965-2971

非特許文献16: J. Immunol. 2013, 190, 5216-5225

非特許文献17: Sci. Rep. 2016, 6, 19049

非特許文献18: Mol. Cell, 2015, 59, 891-903

非特許文献19: Cell Rep. 2015, 11, 1018-1030

非特許文献20: AACR Tumor Immunology and Immunotherapy, 2017, Poster #A25

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 抗腫瘍活性を維持しつつ、安全性面で優れた分子の開発が望まれている。また、全身投与が可能であり、かつ、目的とする細胞や臓器（例えば、腫瘍部位）に特異的にSTINGアゴニストを送達することができる抗体薬物コンジュゲート及び該抗体薬物コンジュゲートを用いたSTINGアゴニスト活性が関連する疾患、例えば、免疫賦活化による治療が可能な疾患（例えば

、がん)の治療剤及び／又は治療法の開発が望まれている。さらに、均一な糖鎖構造を有するFc含有分子(特に、抗体)を製造する新規方法であって、特に糖鎖転移率が改善された方法を確立することが望まれている。

課題を解決するための手段

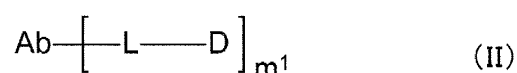
[0015] 本発明者らは、上記の課題を解決するため鋭意検討した結果、縮合三環性置換基を有することを特徴とするCDN誘導体と変異Fc領域を含む特定の抗体又は該抗体の機能性断片とをリンカーを介して結合させた抗体薬物コンジュゲートを見出し、該抗体薬物コンジュゲートを全身投与すると、抗原が発現している腫瘍で抗腫瘍効果が示されることを見出し、さらに安全性面に優れることを見出し、本発明を完成させた。さらに該変異Fc領域を含む特定の抗体が安全性面に優れることを見出し、またワンポット法を利用した改善されたFc含有分子(特に、抗体)の製造方法を見出し、本発明を完成させた。

[0016] すなわち本願発明は、以下に関するが、それらに限定されるものではない。

[1]

次式(II)：

[化1]



(式中、 m^1 は1から10の範囲であり、

Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片はリモデリングされた糖鎖を有していてもよく、該抗体又は該抗体の機能性断片のFc領域の234番目、235番目、及び265番目(すべてEUナンバリング)のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、ここで、抗体は、抗EGFR抗体又は抗CDH6抗体を示し、

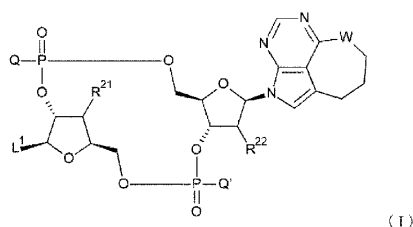
Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、

Abはそのアミノ酸残基から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデ

リングされた糖鎖からLに結合していてもよく、

Dは、次式（1）：

[化2]

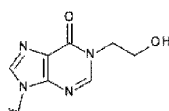


(ここで、

Lは、L'に含まれるヒドロキシ基と結合し、

L'は、以下の式：

[化3]



(ここで、波線は置換位置を示す)

の基を示し、

Q及びQ'は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はチオール基を示し、

R²¹及びR²²は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はフッ素原子を示し

、

Wは、-NH-又は硫黄原子を示す)

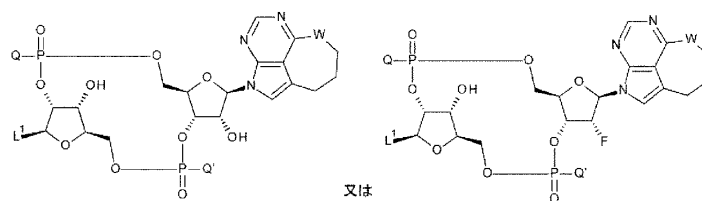
で表される化合物を示す)

で表される抗体薬物コンジュゲート。

[2]

Dが、以下の2式：

[化4]

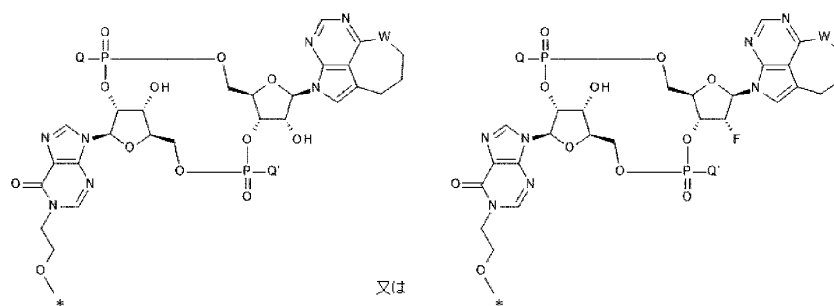


(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 及び W は、前に定義したとおりである)
 のいずれかで示される、[1]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[3]

D が、以下の2式：

[化5]

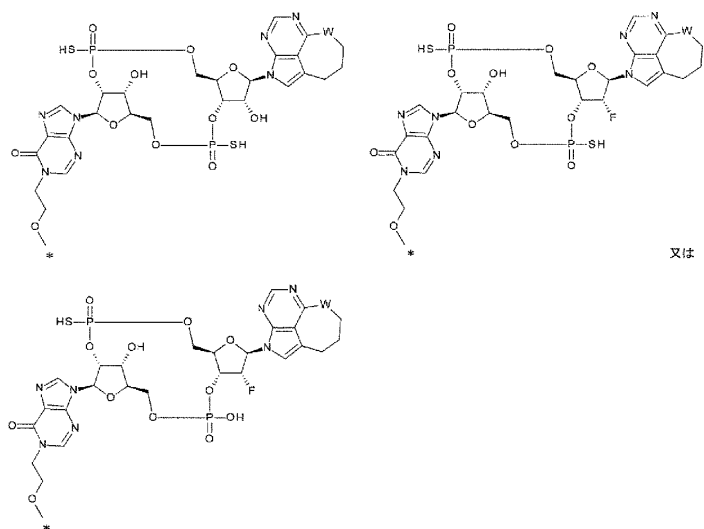


(ここで、アステリスクは L と結合していることを示し、 Q 、 Q' 及び W は、前に定義したとおりである)
 のいずれかで示される、[1]又は[2]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[4]

D が、以下の3式：

[化6]



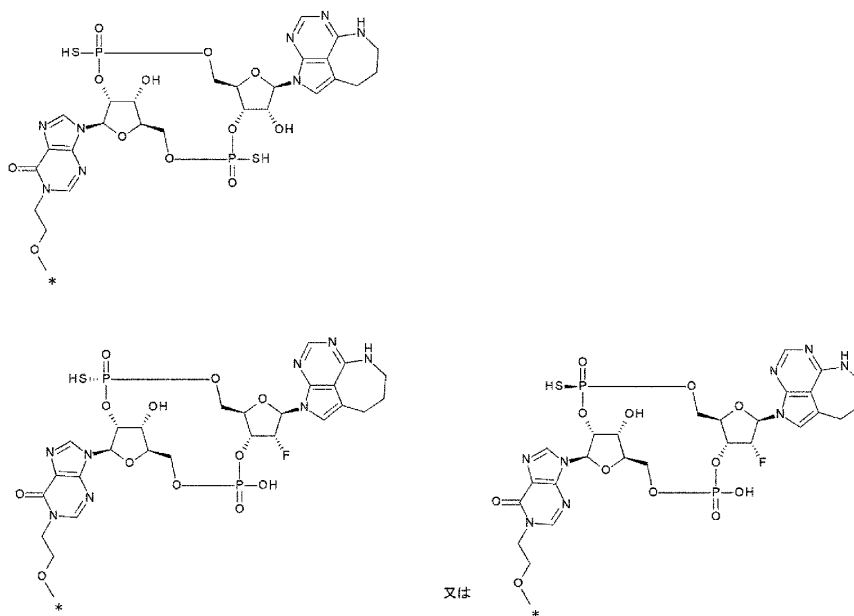
(ここで、アステリスクはLと結合していることを示し、Wは、前に定義したとおりである)

のいずれかで示される、[1]～[3]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[5]

Dが、以下の3式：

[化7]



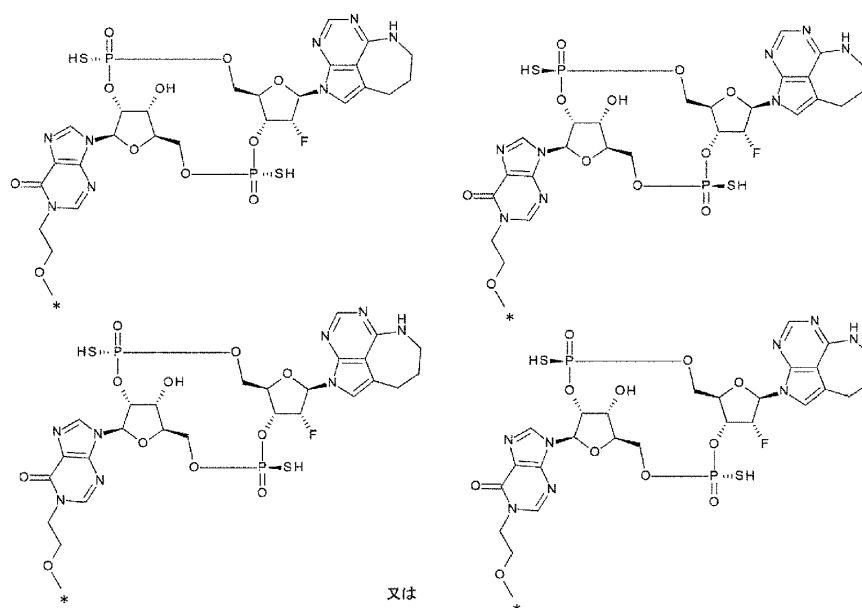
(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、[1]～[4]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[6]

Dが、以下の4式：

[化8]



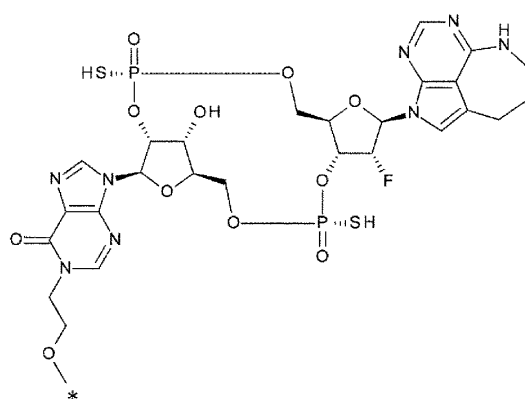
(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、〔１〕～〔４〕のいずれか１つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[7]

D が、次式：

[化9]



(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

で示される、〔1〕～〔4〕又は〔6〕のいずれか1つに記載の抗体薬物コ

ンジュゲート。

[8]

リンカーLが、 $-Lb-La-Lp-Lc-$ *で示され、

式中、アステリスクは、薬物Dと結合していることを示し、

Lpは、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示すか又は存在せず、

Laは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-CH_2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3$

$-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3$

$-CH_2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n$

$^3-CH_2-C(=O)-$ 、

$-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$ 、及び、

$-(CH_2)n^9-C(=O)-$

(ここで、 n^2 は1～3の整数を示し、 n^3 は1～5の整数を示し、 n^4 は0～2の整数を示し、 n^9 は2～7の整数を示す)、

Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサー又はLaとAbのシステイン残基を結合するスペーサーを示し、並びに、

Lcは、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-$ フェニル基 $-CH_2-O-C(=O)-$ 又は $-NH-$ ヘテロアリール基 $-CH_2-O-C(=O)-$ を示すか又は存在しない、

[1]～[7]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[9]

Lcが $-NH-CH_2-$ である、[8]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 0]

L_pが、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVA-$ 、 $-GGFM-$ 、 $-GGVCit-$ 、 $-GGFCit-$ 、 $-GGICit-$ 、 $-GGPL-$ 、 $-GGAQ-$ 又は $-GGPP-$ のいずれか一つである、[8] 又は [9] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 1]

L_pが、 $-GGFG-$ 又は $-GGPI-$ である、[1 0] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 2]

L_aが、以下：

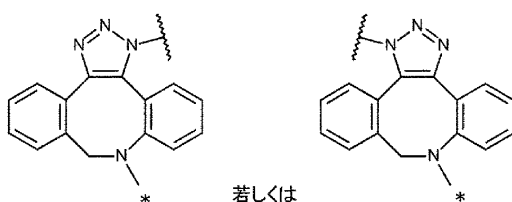
$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-$
 $-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2-$
 $-C(=O)-$ 、及び
 $-(CH_2)_5-C(=O)-$

からなる群から選択されるいずれか一つを示す、[8] ~ [1 1] のいずれか 1 つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 3]

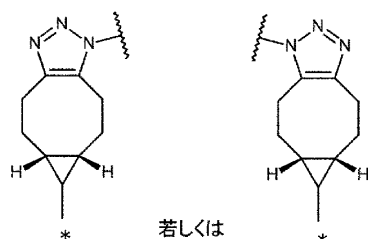
L_bが、次式：

[化10]



又は

[化11]

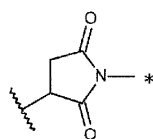


(上記で示されるL bの構造式において、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)のいずれかで示される、[8]～[12]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[14]

L bが、 $-(\text{スクシンイミド}-3\text{-イル}-\text{N})-$ であり、
ここで、 $-(\text{スクシンイミド}-3\text{-イル}-\text{N})-$ は、以下の構造式：

[化12]



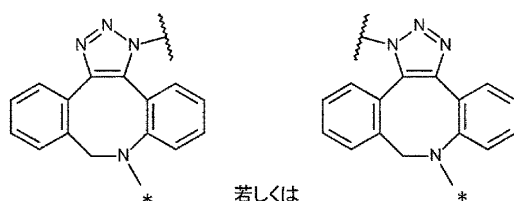
を示し、

ここで、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線は抗体のシステイン残基の側鎖とチオエーテルを形成して結合していることを示す、[8]～[12]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[15]

リンカーLが、 $-\text{L b}-\text{L a}-\text{L p}-\text{L c}-*$ で示され、
式中、アスタリスクは、薬物Dと結合していることを示し、
L pが、 $-\text{GGFG}-$ 、又は $-\text{GGPI}-$ であり、
L aが、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ を示し、
L bが、次式：

[化13]



(上記で示されるL bの構造式において、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)を示し、

L cが、 $\text{—NH—CH}_2\text{—}$ を示す、[8]～[13]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[16]

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から10の範囲である、[1]～[15]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[17]

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から5の範囲である、[16]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[18]

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から3、又は3から5の範囲である、[17]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[19]

抗体が、抗体のAsn297に結合する糖鎖(N297糖鎖)からLに結合している、[1]～[18]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

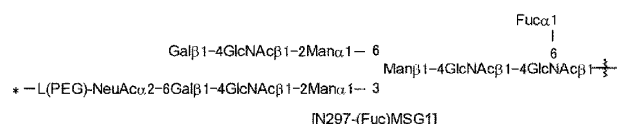
[20]

N297糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、[19]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 1]

N 2 9 7 糖鎖が、次式で示される構造を有する N 2 9 7 -(F u c) M S G 1 又は N 2 9 7 -(F u c) S G である、[1 9] 又は [2 0] に記載の抗体薬物コンジュゲート：

[化14]



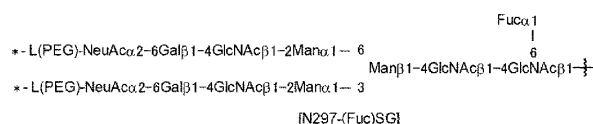
式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は 2 ~ 5 の整数である；

[化15]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

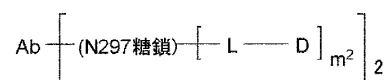
アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は 2 ~ 5 の整数である。

[2 2]

次式：

[化16]



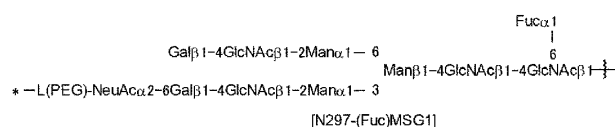
(式中、 m^2 は1又は2の整数を示し、

Lは、N297糖鎖とDを連結するリンカーであって、前に定義したとおりであり、

Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、ここで、抗体は、抗EGFR抗体又は抗CDH6抗体を示し、

N297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGであることを示し、

[化17]



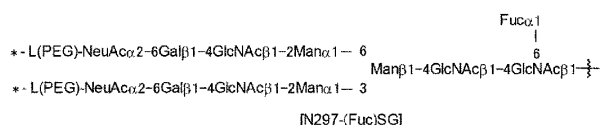
式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示し；

[化18]



式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

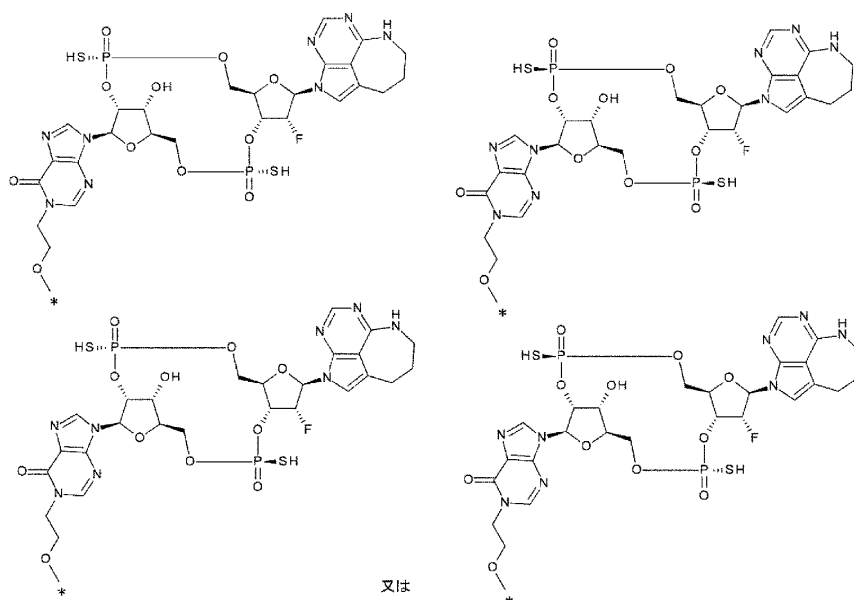
L (P E G) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL b の1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n は2~5の整数を示し、

Dは、以下の4式のいずれかで示され、

[化19]



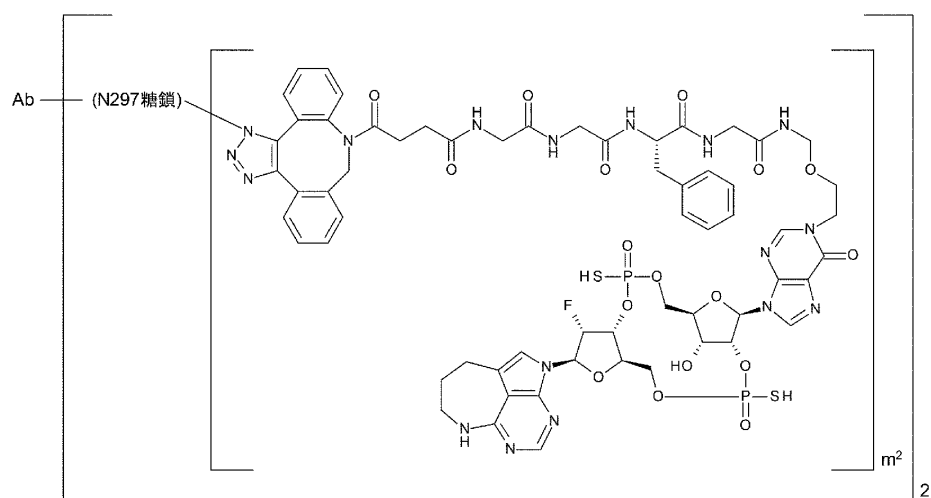
ここで、式中、アステリスクはLと結合していることを示す) で示される、

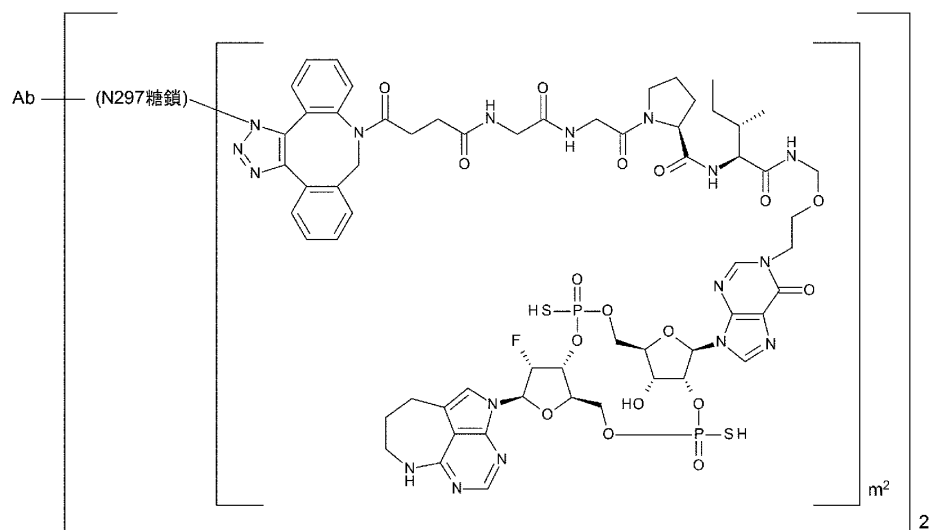
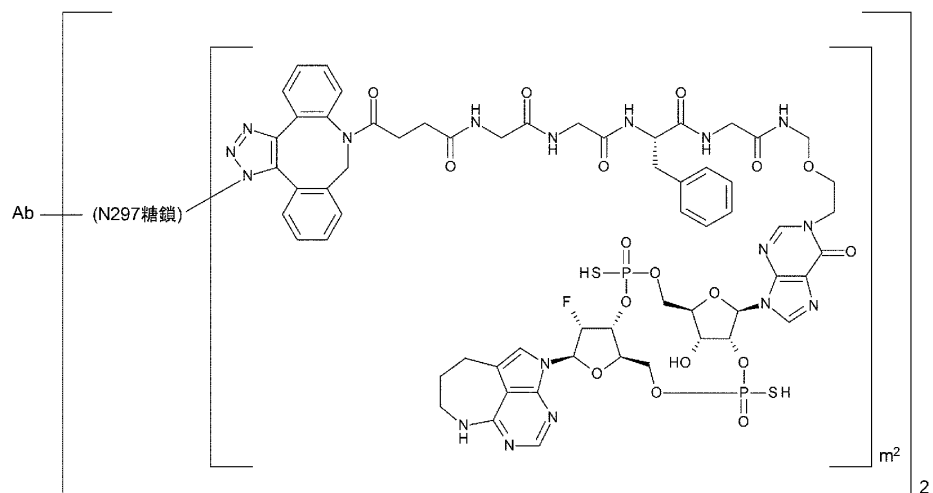
[19] ~ [21] のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[23]

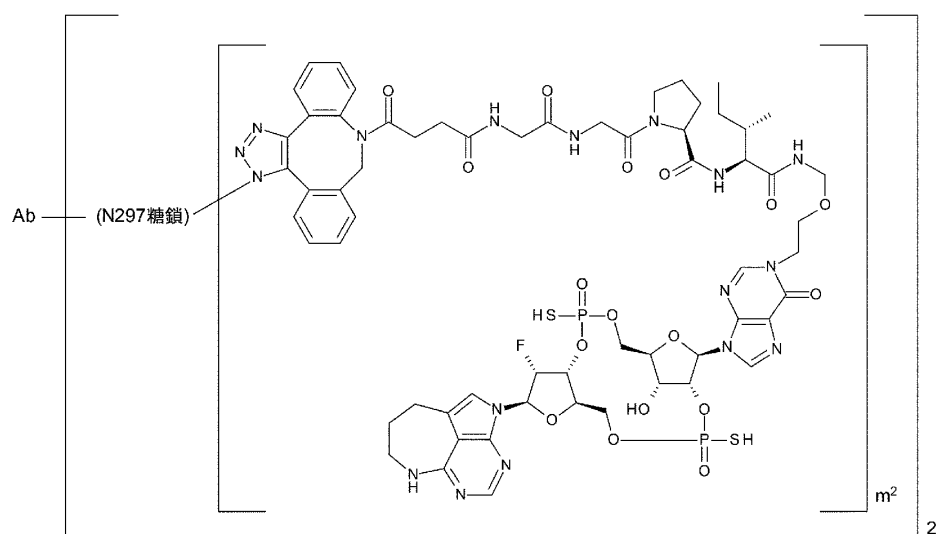
次式：

[化20]





若しくは



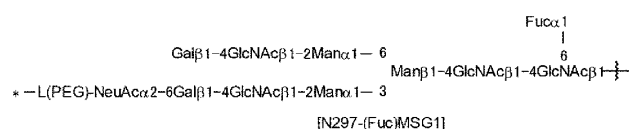
から選ばれ、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

A bは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、ここで、抗体は、抗EGFR抗体又は抗CDH6抗体を示し、

N297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

[化21]



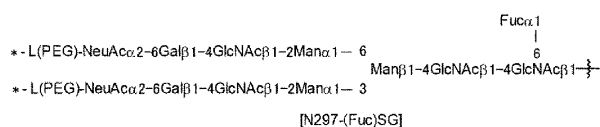
式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は 2 ～ 5 の整数を示し；

[化22]



式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

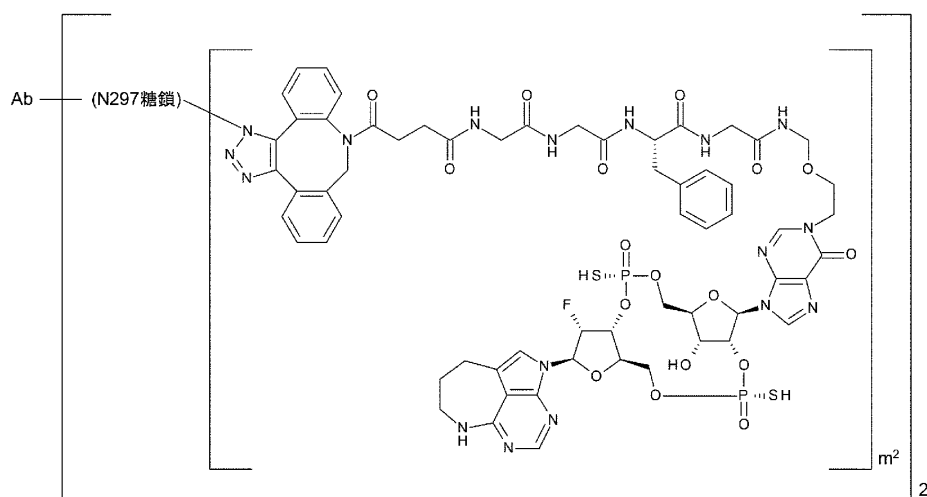
アスタリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

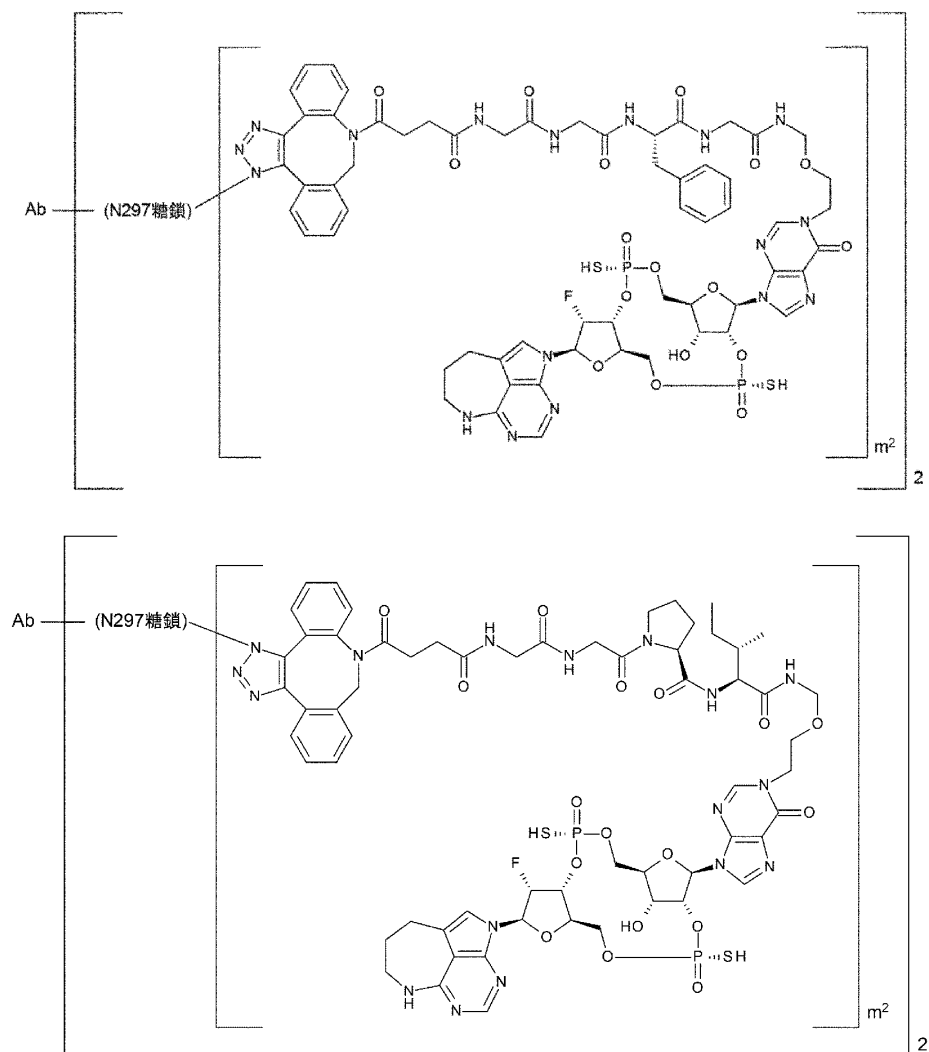
n⁵は2～5の整数を示す、[22]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 4]

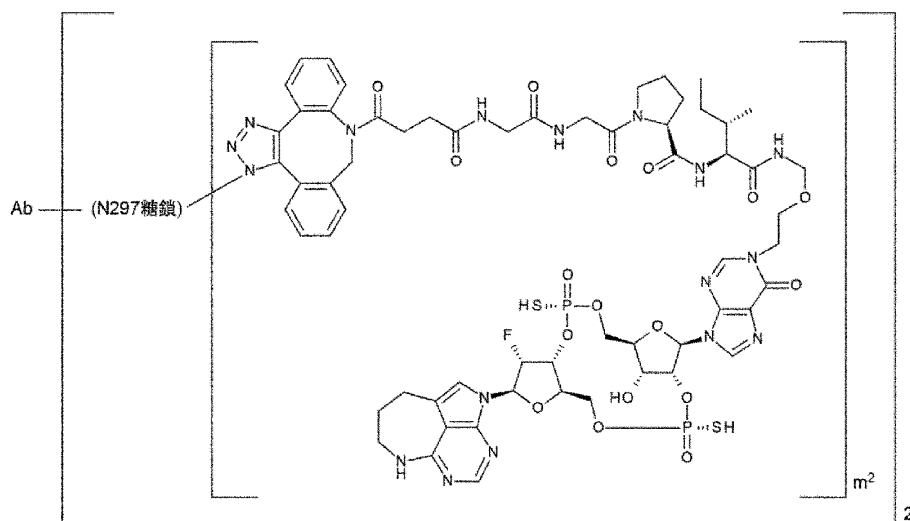
次式：

[化23]





若しくは



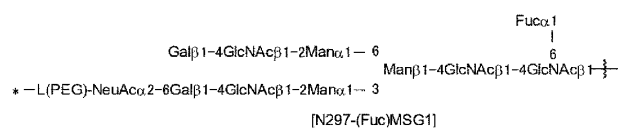
から選ばれ、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

A bは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片のF c領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yであり、ここで、抗体は、抗E G F R抗体又は抗C D H 6抗体を示し、

N 2 9 7糖鎖は、次式で示される構造を有するN 2 9 7－（F u c）M S G 1又はN 2 9 7－（F u c）S Gのいずれか一つであることを示し、

[化24]



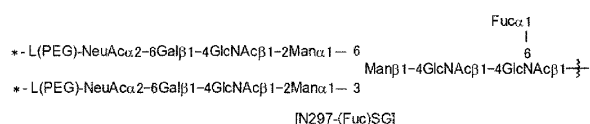
式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L（P E G）は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L（P E G）の右端のアミノ基がN 2 9 7糖鎖の β -M a nの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示し；

[化25]



式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示す、[23]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[25]

抗体が、抗EGFR抗体である、[1]～[24]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[26]

抗体が、抗CDH6抗体である、[1]～[24]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート。

[27]

抗体が、配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、或いは、前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体である、[25]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 8]

抗体が、配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 4 6 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は、前記抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体である、[2 6] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 9]

抗体が、配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である、[2 5] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[3 0]

抗体が、配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である、[2 6] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[3 1]

抗体が、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である、[2 5] に記載の抗体

薬物コンジュゲート。

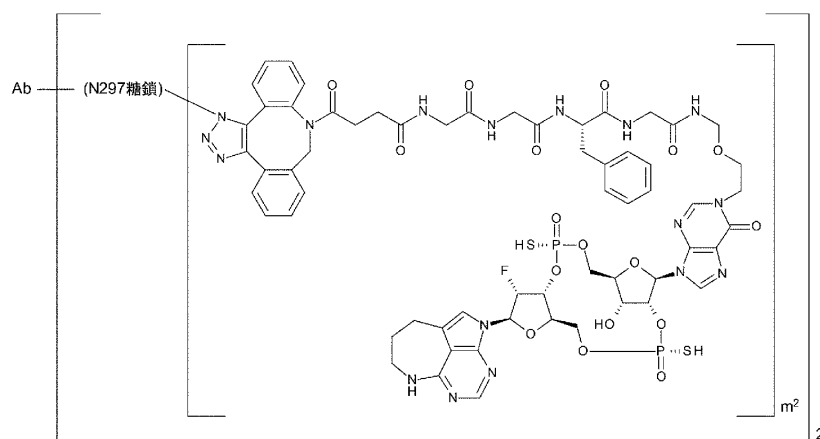
[3 2]

抗体が、配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 3 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 3 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である、[2 6] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

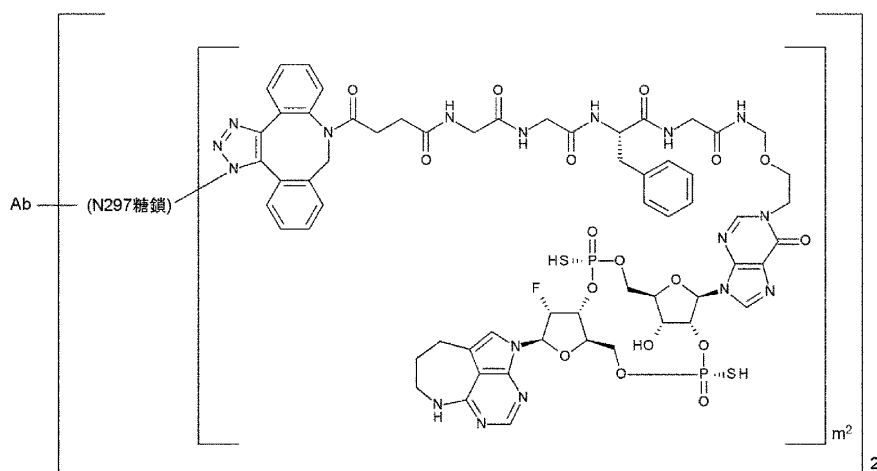
[3 3]

次式：

[化26]



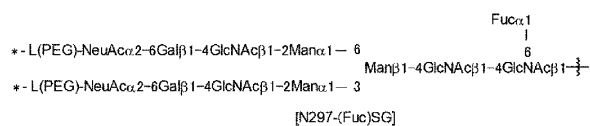
又は



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載の
アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載の
アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載の
アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；及び
前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ
酸残基が欠失した重鎖を含む抗体；

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化27]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、
該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖
の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボ
キシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL^bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

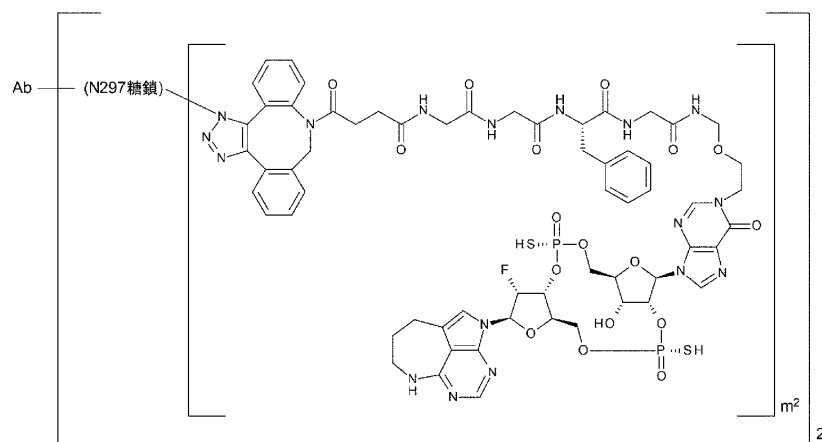
n⁵は3であり、及び

m²が2である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

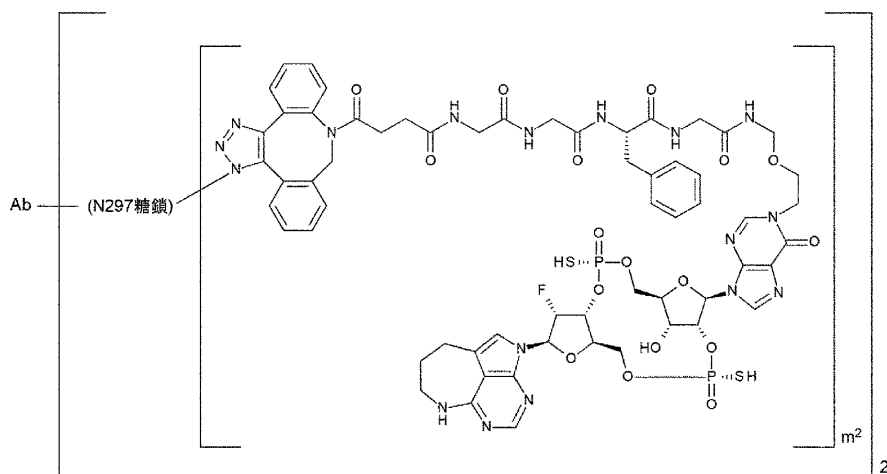
[34]

次式：

[化28]



又は



で表され、式中、Abは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

配列番号29に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び

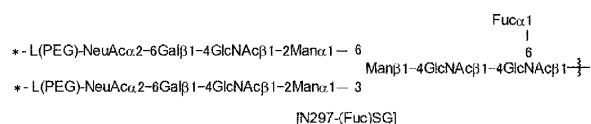
配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；及び

配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 45 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体の Fc 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及び Gly であり、

N297 糖鎖は、次式：

[化29]



（式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

L(PEG) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L(PEG) の右端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における Lb の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、

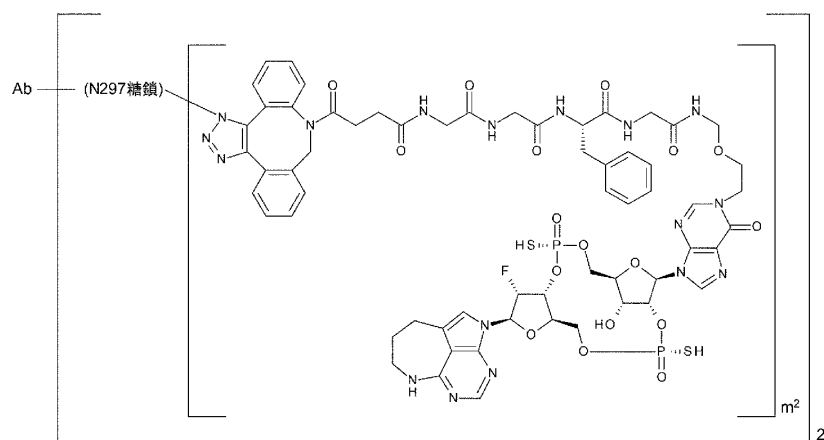
n は 3 であり、及び

m^2 が 2 である）で表される、抗体薬物コンジュゲート。

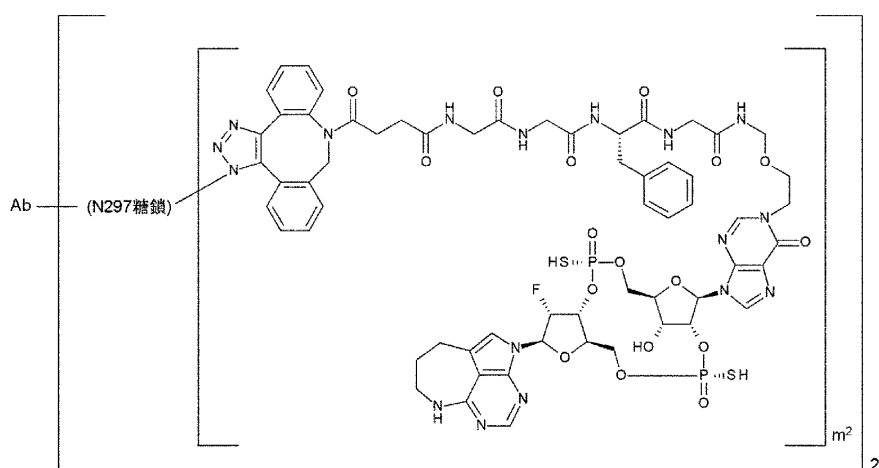
[35]

次式：

[化30]



又は



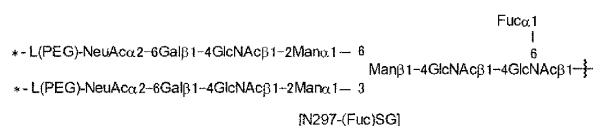
で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
 配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号24に記載
 のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号25に記載のアミノ酸
 配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ
 酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるC
 DRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含
 む重鎖を含んでなる抗体；及び
 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記

載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、

N297糖鎖は、次式：

[化31]



（式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

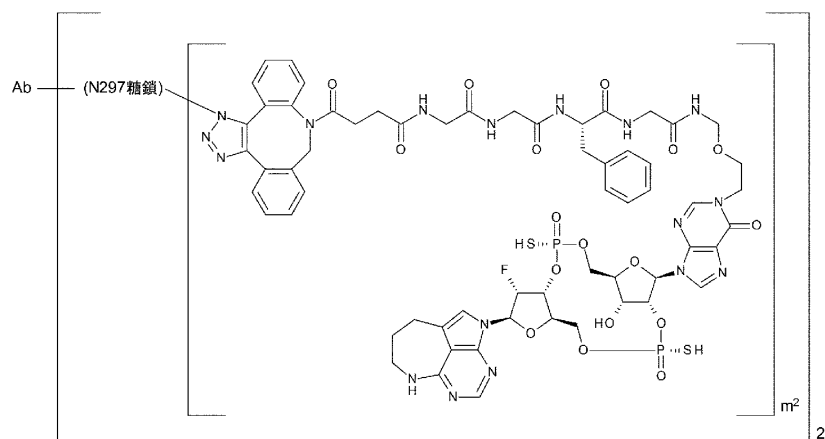
n^5 は3であり、及び

m^2 が2である）で表される、抗体薬物コンジュゲート。

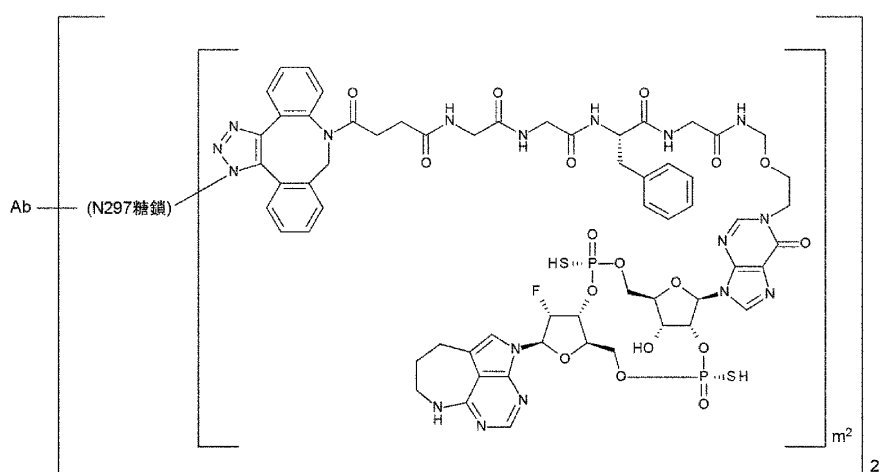
[36]

次式：

[化32]



又は

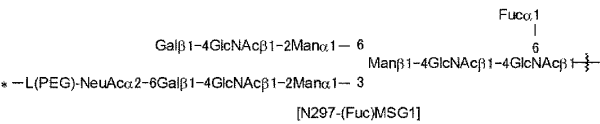


で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
 配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載の
 アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載の
 アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載の
 アミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；及び
 前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ

酸残基が欠失した重鎖を含む抗体；

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化33]

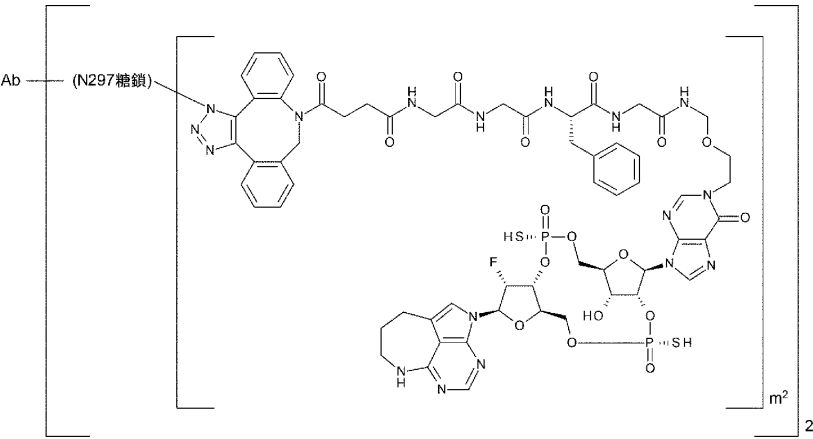


(式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、
L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の $\beta-\text{Ma n}$ の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、
アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、
 n^5 は 3 であり、及び
 m^2 が 1 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

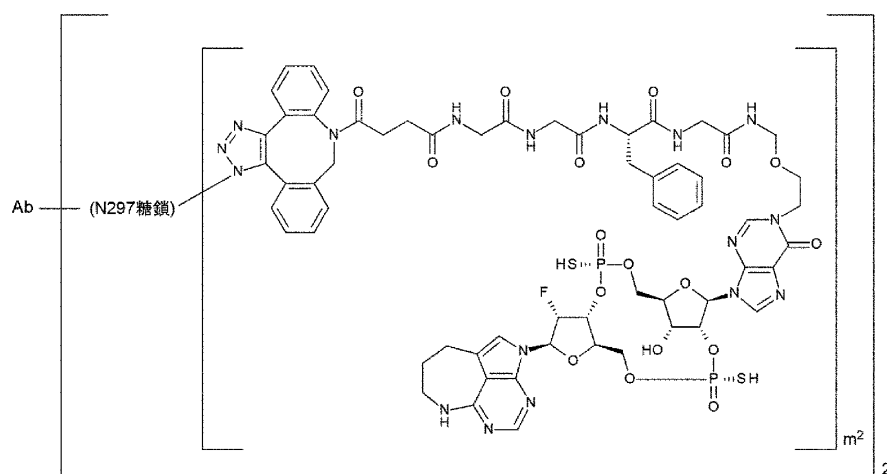
[3 7]

次式：

[化34]



又は



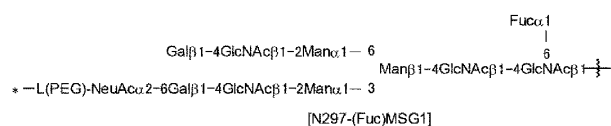
で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
配列番号29に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び
配列番号31に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含ん
でなる抗体；及び

配列番号43に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び
配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含ん
でなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEU
ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGly
であり、

N297糖鎖は、次式：

[化35]



（式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示
し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖のβ-Manの分岐鎖
の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボ

キシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

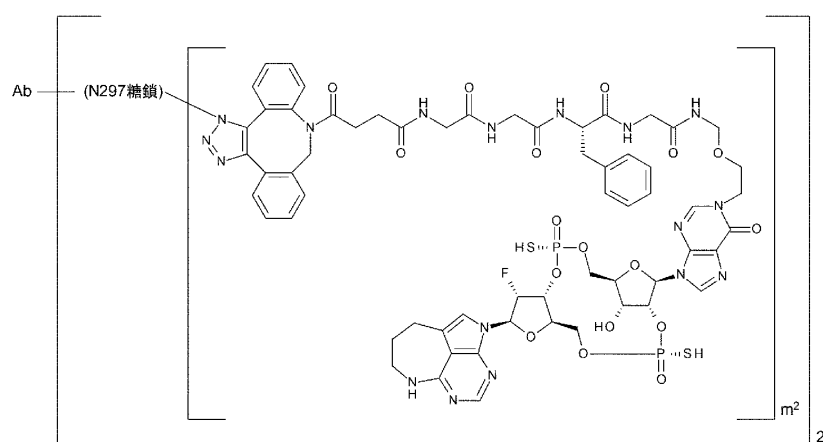
n^5 は3であり、及び

m^2 が1である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

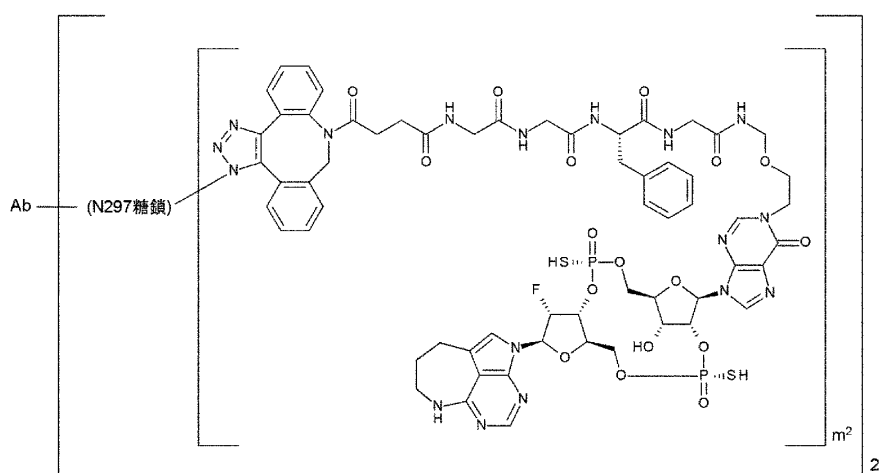
[38]

次式：

[化36]



又は



で表され、式中、Abは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号24に記

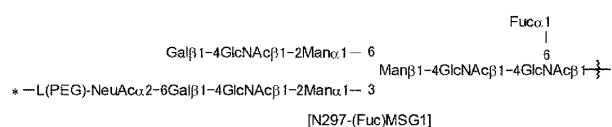
載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；及び

配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、

N297糖鎖は、次式：

[化37]



（式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

n^5 は3であり、及び

m^2 が1である）で表される、抗体薬物コンジュゲート。

[3 9]

[1] ～ [3 8] のいずれか 1 つに記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、S T I N G アゴニスト。

[4 0]

[1] ～ [3 8] のいずれか 1 つに記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、医薬組成物。

[4 1]

[1] ～ [3 8] のいずれか 1 つに記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、抗腫瘍剤。

[4 2]

腫瘍が、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（G I S T）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、肉腫、E G F R 変異陽性がん又は E G F R 下流シグナルに変異を有するがんである、[4 1] に記載の抗腫瘍剤。

[4 2 - 2]

腫瘍が C D H 6 陽性がんである、[4 1] に記載の抗腫瘍剤。

[4 2 - 3]

腫瘍が卵巣がん又は腎がんである、[4 1] 又は [4 2 - 2] に記載の抗腫瘍剤。

[4 3]

[1] ～ [3 8] のいずれか 1 つに記載の抗体薬物コンジュゲート、[3 9] に記載の S T I N G アゴニスト、[4 0] に記載の医薬組成物及び [4 1]、[4 2]、[4 2 - 2] 又は [4 2 - 3] に記載の抗腫瘍剤からなる群から選択されるいずれかを投与することを含む、がんの治療方法。

[4 4]

がんが、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（GIST）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髄腫、肉腫、EGFR変異陽性がん又はEGFR下流シグナルに変異を有するがんである、[4 3] に記載の方法。

[4 4 - 2]

がんがCDH6陽性がんである、[4 3] に記載の方法。

[4 4 - 3]

がんが卵巣がん又は腎がんである、[4 3] 又は [4 4 - 2] に記載の方法。

[4 5]

(A) 配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号24に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである抗体；又は

(B) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH

3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである抗体。

[45-2]

(A) 配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号24に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、EGFRへの結合活性を有する抗体；又は

(B) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、CDH6への結合活性を有する抗体。

[46]

(A) 配列番号29に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号31に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである抗体；又は

(B) 配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 45 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の Fc 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及び Gly である抗体。

[46-2]

(A) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の Fc 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及び Gly であり、EGFR への結合活性を有する抗体；又は

(B) 配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 45 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の Fc 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及び Gly であり、CDH6 への結合活性を有する抗体。

[47]

(A) 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 32 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 33 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、；

(B) 配列番号 44 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 46 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は

(C) (A) ~ (B) のいずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の 1 つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体。

[47-2]

(A) 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 32 に

記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含み、EGFRへの結合活性を有する抗体；

(B) 配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含み、CDH6への結合活性を有する抗体、又は

(C) (A)～(B)のいずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体。

[48]

他の医薬と組み合わせて投与される、[40]に記載の医薬組成物、又は[41]、[42]、[42-2]若しくは[42-3]に記載の抗腫瘍剤。

[49]

他の医薬を含む、[40]に記載の医薬組成物、又は[41]、[42]、[42-2]若しくは[42-3]に記載の抗腫瘍剤。

[50]

[1]～[38]のいずれか1つに記載の抗体薬物コンジュゲート、[39]に記載のSTINGアゴニスト、[40]に記載の医薬組成物及び[41]、[42]、[42-2]又は[42-3]に記載の抗腫瘍剤からなる群から選択されるいずれかが、他の医薬と組み合わせて投与される、[43]、[44]、[44-2]又は[44-3]に記載の方法。

[51]

[45]、[45-2]、[46]、[46-2]、[47]及び[47-2]のいずれか1つに記載の抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

[52]

[51]に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

[53]

[5 2] に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[5 4]

[5 3] に記載の宿主細胞を培養することを含む培養方法。

[5 5]

[5 3] に記載の宿主細胞を培養する工程と該培養工程において得られた培養物から目的の抗体を採取することを含む抗体の製造方法。

[5 6]

以下の工程 1 を含む、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含む N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子の製造方法：

(工程 1) N 2 9 7 結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコア G I c N A c を有する F c 含有分子であるアクセプター分子と、還元末端が活性化されていない G I c N A c を含む糖鎖を含む糖鎖ドナー分子とを、

・ F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖を基質とするエンドー β - N - アセチルグルコサミニダーゼ (酵素 - A) ；

・ 糖鎖ドナー分子の糖鎖を基質とするエンドー β - N - アセチルグルコサミニダーゼ (酵素 - B) ；及び

・ 一価の塩、有機溶媒、界面活性剤、糖類、アミノ酸類、又はこれらのいずれかの組み合わせから選択される添加剤

の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程。

[5 7]

さらに、以下の工程 2 を含む、[5 6] に記載の方法。

(工程 2) 前記反応混合液を、酸性条件下で陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体に接触させ、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含む N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子を回収する工程。

[5 8]

F c 含有分子が抗体又は該抗体の機能性断片であって、該抗体又は該抗体の機能性断片の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目 (すべ

てEUナンバリング)のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである、[56]又は[57]に記載の方法。

[59]

添加剤が一価の塩である、[56]～[58]のいずれか1つに記載の方法。

[60]

添加剤が一価のアルカリ金属塩である、[56]～[59]のいずれか1つに記載の方法。

[61]

添加剤が塩化ナトリウムである、[56]～[60]のいずれか1つに記載の方法。

[62]

添加剤が50～1000mMの一価の塩である、[56]～[61]のいずれか1つに記載の方法。

[63]

添加剤が500mM以下の塩化ナトリウムである、[56]～[62]のいずれか1つに記載の方法。

[64]

工程1の反応時間が16時間から24時間の間である、[56]～[63]のいずれか1つに記載の方法。

[65]

Fc含有分子が抗体であり、当該抗体が配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む、[56]～[64]のいずれか1つに記載の方法。

[66]

Fc含有分子が抗体であり、当該抗体が配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む、[56]～[64]のいずれか1つに記載の方法。

発明の効果

[0017] 本発明により、抗腫瘍活性を維持しつつ、安全性面で優れた分子が提供される。また、本発明により、全身投与することができ、かつ、抗原が発現している腫瘍で抗腫瘍効果を示す、新規抗体薬物コンジュゲートが提供される。さらに、本発明により、ワンポット法を利用した改善されたFc含有分子（特に、抗体）の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]本発明の抗体薬物コンジュゲート（(I I)の分子）である、SG型糖鎖リモデリング抗体から得られた抗体薬物コンジュゲート（図1Aの(I I)の分子）及びMSG型糖鎖リモデリング抗体から得られた抗体薬物コンジュゲート（図1Bの(I I)の分子）を模式的に表したものである。（a）は薬物D、（b）はリンカーL、（c）はPEGリンカー（L（PEG））、（d）はN297糖鎖（ここで、白色の円はNeuAc（Sia）、白色の六角形はMan、黒色の六角形はGlcNAc、白色のひし形はGal、及び白色の逆三角形はFuc）をそれぞれ表す。白色の五角形は、リンカーL由来のアルキンとPEGリンカー由来のアジド基が反応して生成したトリアゾール環を表す。Y字型は、抗体Abを表す。PEGリンカーは、非還元末端に位置するシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合を介して連結している。このような表示方法は、特に言及がない限り、本明細書の全体を通じて適用される。

[図2]本発明の抗体薬物コンジュゲートの製造中間体である、（Fuc α 1, 6）GlcNAc-抗体（図2Aの(I I I)の分子）、SG型糖鎖リモデリング抗体（図2Bの(I V)の分子）、及びMSG型糖鎖リモデリング抗体（図2Cの(I V)の分子）の構造を示す模式図である。全ての図において、Y字型は図1と同様に抗体Abを表す。図2Aにおいて、（e）は、Fucの1位と、GlcNAcの6位において α グリコシド結合した二糖からなるN297糖鎖を示す。図2B及びCにおいて、（d）は図1と同様のN297糖鎖を表し、（f）はアジド基を有するPEGリンカーであり、末端

にリンカーLとの結合に供されるアジド基を表す。アジド基を有するPEGリンカーの結合様式は、図1のPEGリンカーと同様である。

[図3]動物細胞で産生された抗体からSG型糖鎖リモデリング抗体及びMSG型糖鎖リモデリング抗体を製造する工程の模式図である。図中の分子(III)及び(IV)は、図2と同様に、(Fuc α 1,6)GlcNAc-抗体及びSG型糖鎖リモデリング抗体又はMSG型糖鎖リモデリング抗体をそれぞれ表す。(V)の分子は動物細胞で産生された抗体であり、N297糖鎖が不均一な分子の混合物である。図3Aは、(V)の不均一なN297糖鎖を、EndoSのような加水分解酵素で処理することで、均一な(Fuc α 1,6)GlcNAc-抗体(III)が作製される工程を示す。図3Bは、抗体(III)のN297糖鎖のGlcNAcに対して、EndoS D233Q/Q303L変異体のような糖転移酵素を用いて、SG型糖鎖ドナー分子を糖鎖転移させることで、(IV)のSG型糖鎖リモデリング抗体が作製される工程を示す。図3Cは、図3Bと同様に、抗体(III)に対して、MSG型糖鎖ドナー分子を糖鎖転移させることで(IV)のMSG型糖鎖リモデリング抗体が作製される工程を示す。ここで用いられるSG型糖鎖ドナー分子及びMSG型糖鎖ドナー分子は、各々の非還元末端のシアル酸がアジド基を有するPEGリンカーで修飾されたものであり、作製されるSG型N297糖鎖リモデリング抗体及びMSG型N297糖鎖リモデリング抗体においても、図2B及びCで示したとおり、非還元末端のシアル酸が同様の修飾を受けたものとなる。

[図4]抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。薬物平均結合数は約4である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒三角線は抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1投与群、黒丸線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図5]抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1の静脈内投与による抗腫瘍

効果を示す。薬物平均結合数は約4である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図6]抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。薬物平均結合数は約2である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒三角線は抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2投与群、黒丸線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図7]抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート2の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。薬物平均結合数は約2である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図8]抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。薬物平均結合数は約4である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図9]抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。薬物平均結合数は約4である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図10]抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1、抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白丸線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1投与群、白逆三角線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図11]抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2、抗E

G F R 抗体 3 - C D N コンジュゲート 2 のレポーター細胞に対する活性を示す。図中の黒三角線は抗 E G F R 抗体 3 - C D N コンジュゲート添加群、黒丸線は抗 E G F R 抗体 1 - C D N コンジュゲート添加群、破線は薬物平均結合数が約 2 の C D N コンジュゲート 2、実線は薬物平均結合数が約 4 の C D N コンジュゲート 1 を示す。縦軸はカウント値、横軸は濃度を示している。

[図12]抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 1、抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 2 のレポーター細胞に対する活性を示す。図中の黒三角線は抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート添加群を示す。破線は薬物平均結合数が約 2 の C D N コンジュゲート 2、実線は薬物平均結合数が約 4 の C D N コンジュゲート 1 を示す。縦軸はカウント値、横軸は濃度を示している。

[図13]抗 E G F R 抗体 1 - C D N コンジュゲート 1 の腫瘍再移植試験における抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm³) を示している。

[図14]抗 E G F R 抗体 1 - C D N コンジュゲート 2 の腫瘍再移植試験における抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm³) を示している。

[図15A]各抗体 - C D N コンジュゲートのヒト全血試験におけるサイトカイン産生を示す。縦軸はサイトカイン量、横軸は各抗体 - C D N コンジュゲートの F c 部位を示している。サイトカイン量は L o g スケール (L o g a r i t h m i c S c a l e) の標準線を用いて数値を算出した。

[図15B]各抗体 - C D N コンジュゲートのヒト全血試験におけるサイトカイン産生を示す。縦軸はサイトカイン量、横軸は各抗体 - C D N コンジュゲートの F c 部位を示している。サイトカイン量は L i n e a r スケール (L i n e a r S c a l e) の標準線を用いて数値を算出した。

[図16A]図 1 6 A は、I g G 2 型の抗体である抗 E G F R 抗体 (I g G 2) (抗 E G F R 抗体 B)、その F c 部分を I g G 1 型に置き換えた F c 置換体 (I g G 1 W T) (抗 E G F R 抗体 A)、I g G 1 W T の F c 部分に L 2 3 4 A / L 2 3 5 A (L A L A) 変異を導入した変異体 (改変抗 E G F R 抗体 3)、L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / D 2 6 5 G (L A L A - D G) 変異を導入

入した変異体（改変抗EGFR抗体1）のヒトFcγRIに対する結合活性をSPR法で評価した時のグラフである。横軸は抗体濃度、縦軸はその抗体濃度に対して得られたRU（Response Unit）値を表す。

[図16B]図16Bは、図16Aで用いた抗体群のヒトFcγRIIaに対する結合活性をSPR法で評価した時のグラフである。横軸は抗体濃度、縦軸はその抗体濃度に対して得られたRU値を表す。

[図16C]図16Cは、図16Aで用いた抗体群のヒトFcγRIIb/cに対する結合活性をSPR法で評価した時のグラフである。横軸は抗体濃度、縦軸はその抗体濃度に対して得られたRU値を表す。

[図16D]図16Dは、図16Aで用いた抗体群のヒトFcγRIIIaに対する結合活性をSPR法で評価した時のグラフである。横軸は抗体濃度、縦軸はその抗体濃度に対して得られたRU値を表す。

[図16E]図16Eは、図16Aで用いた抗体群のヒトFcγRIIIbに対する結合活性をSPR法で評価した時のグラフである。横軸は抗体濃度、縦軸はその抗体濃度に対して得られたRU値を表す。

[図17A]図17Aは、図16Aで用いた抗体群とこれらの抗体群にDAR2またはDAR4にてSTING AGONISTをコンジュゲートした抗体薬物コンジュゲート（DAR2：抗EGFR抗体B-CDNコンジュゲート2、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2、改変抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2、またはDAR4：抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1、改変抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1）についてヒトFcγRIに対する結合活性をSPR法で評価した時の、抗体濃度4.7 μMに対して得られたRU値を示したグラフである。

[図17B]図17Bは、図17Aで用いた抗体群についてヒトFcγRIIaに対する結合活性をSPR法で評価した時の、抗体濃度4.7 μMに対して得られたRU値を示したグラフである。

[図17C]図17Cは、図17Aで用いた抗体群についてヒトFcγRIIb/

cに対する結合活性をSPR法で評価した時の、抗体濃度4.7 μ Mに対して得られたRU値を示したグラフである。

[図17D]図17Dは、図17Aで用いた抗体群についてヒトFc γ R111aに対する結合活性をSPR法で評価した時の、抗体濃度4.7 μ Mに対して得られたRU値を示したグラフである。

[図17E]図17Eは、図17Aで用いた抗体群についてヒトFc γ R111bに対する結合活性をSPR法で評価した時の、抗体濃度4.7 μ Mに対して得られたRU値を示したグラフである。

[図18]図18は、抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1 (IgG1 WT)、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1 (LALA)、改変抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1 (LALA-DG)の T_m 値を示した表である。また、抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1と各種抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート1の T_m 値の差(ΔT_m)も示した。

[図19]図19は、(a)ヒトSTING 野生型のアミノ酸配列(配列番号1)、(b)ヒトSTING REF変異型(R232H)のアミノ酸配列(配列番号3)、及び(c)ヒトSTING HAQ変異体(R71H, G230A, R293Q)のアミノ酸配列(配列番号5)を示す。

[図20]図20は、(a)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号23)、(b)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRL2のアミノ酸配列(配列番号24)、(c)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRL3のアミノ酸配列(配列番号25)、(d)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRH1のアミノ酸配列(配列番号26)、(e)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRH2のアミノ酸配列(配列番号27)、及び(f)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)のCDRH3のアミノ酸配列(配列番号28)を示す。

[図21-1]図21-1は、(a)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1~3)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号29)、(b)抗EGFR抗体

(改変抗EGFR抗体1～3)の軽鎖のアミノ酸配列(配列番号30)、(c)抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1～3)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号31)を示す。

[図21-2]図21-2は、(d)抗EGFR抗体LALA-DG変異体(改変抗EGFR抗体1)の重鎖のアミノ酸配列(配列番号32)、(e)抗EGFR抗体LALA-DG変異体(改変抗EGFR抗体2)の重鎖のアミノ酸配列(配列番号33)、及び(f)抗EGFR抗体Aの重鎖のアミノ酸配列(配列番号34)を示す。

[図21-3]図21-3は、(g)抗EGFR抗体B(Vectibix)の重鎖のアミノ酸配列(配列番号35)、及び(h)抗EGFR抗体LALA変異体(改変抗EGFR抗体3)の重鎖のアミノ酸配列(配列番号36)を示す。

[図22]図22は、(a)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号37)、(b)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRL2のアミノ酸配列(配列番号38)、(c)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRL3のアミノ酸配列(配列番号39)、(d)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRH1のアミノ酸配列(配列番号40)、(e)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRH2のアミノ酸配列(配列番号41)、及び(f)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)のCDRH3のアミノ酸配列(配列番号42)を示す。

[図23]図23は、(a)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号43)、(b)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)の軽鎖のアミノ酸配列(配列番号44)、(c)抗CDH6抗体(改変抗CDH6抗体1)の重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号45)、(d)抗CDH6抗体LALA-DG変異体(改変抗CDH6抗体1)の重鎖のアミノ酸配列(配列番号46)を示す。

[図24]図24は、抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH

6 抗体 1-CDN コンジュゲート 2 の静脈内投与後に腫瘍が完全に退縮したマウスの左腋窩部に CT 26, WT-hCDH6 を再移植した際の、抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3) を示している。

[図25]図 25 は、抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 1 及び抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 2 の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図26]図 26 は、抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 1 の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図27]図 27 は、抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 2 の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図28]図 28 は、抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 1 の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図29]図 29 は、抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 2 の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図30]図 30 は、野生型 Endo-S のアミノ酸配列 (配列番号 47) を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図31]図 31 は、野生型 Endo-S2 のアミノ酸配列 (配列番号 48) を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図32]図 32 は、野生型 Endo-Si のアミノ酸配列 (配列番号 49) を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を

加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図33]図33は、野生型E n d o - Mのアミノ酸配列（配列番号50）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図34]図34は、野生型E n d o - R pのアミノ酸配列（配列番号51）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図35]図35は、野生型E n d o - C Cのアミノ酸配列（配列番号52）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図36]図36は、野生型E n d o - O mのアミノ酸配列（配列番号53）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図37]図37は、野生型E n d o - S dのアミノ酸配列（配列番号54）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図38]図38は、野生型E n d o - S zのアミノ酸配列（配列番号55）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

[図39]図39は、野生型E n d o - S eのアミノ酸配列（配列番号56）を示す。酵素の触媒活性中心部位に相当するアミノ酸残基を太字下線、変異を

加えることで酵素活性を制御できることが期待できるアミノ酸残基を太字で示した。

発明を実施するための形態

[0019] 一態様において、本発明は、標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子であって、当該変異Fc領域は、野生型Fc領域と比較して少なくとも3つのアミノ酸置換を含み、並びに、当該分子は、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して低減されたヒトFcγ受容体への結合性を有し、低減された炎症性サイトカイン産生能を有し、並びに、同等又は増強された*in vivo*抗腫瘍活性を有する、分子に関する。

[0020] 本明細書において、「標的分子結合部分」とは、任意の標的分子、好ましくはヒト疾患に關与する標的分子に結合する部分 (*m o i e t y*) を意味する。当該部分としては、抗体、抗体の機能性断片、抗体の抗原結合断片、非免疫グロブリンタンパク質又はその断片、受容体タンパク質、リガンドタンパク質、プロテイン・スキュッフォールド等のタンパク質 (ポリペプチド)、アプタマー、アンチセンス等の核酸分子、有機合成低分子化合物、天然に存在する低分子化合物等を例示することができ、好ましくは、抗体、抗体の機能性断片、又は抗体の抗原結合断片を挙げることができ、さらに好ましくは抗体又は抗体の機能性断片を挙げることができ、特に好ましくは抗体を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。本発明の一態様において、「標的分子結合部分」がFc領域を内包する場合 (たとえば、「標的分子結合部分」が抗体である場合)、標的分子結合部分に内包されるFc領域が変異Fc領域であってよい。言い換えれば、本発明の一態様において、変異Fc領域は、標的分子結合部分に内包されていてもよい。

[0021] 「抗体」、「抗体の機能性断片」及び「抗体の抗原結合断片」については、後に詳述する。

[0022] 本発明において、「免疫賦活化」とは、何らかの形で、単球、マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞、NK細胞、好中球等の抗腫瘍免疫に關与する免疫細胞の活性化を引き起こすことをいい、例えばサイトカイン及びケ

モカインの産生、免疫活性化マーカーの発現上昇、免疫抑制性マーカーの発現低下、細胞内シグナル伝達系のリン酸化等の変化、遺伝子発現の変化等、あらゆる免疫細胞の構造や機能上の変化を引き起こすことをいう。また、腫瘍細胞が抗腫瘍免疫を誘導する変化を引き起こすことも含み、例えば免疫細胞を賦活化又は遊走を誘導するサイトカイン及びケモカインの産生、免疫細胞に対する感受性亢進等を誘導することをいう。

[0023] 本発明において、「免疫賦活化剤」は、上記において規定した免疫賦活化をもたらすあらゆる物を意味する。本発明の一態様において、免疫賦活化剤は、好ましくは、STINGアゴニスト、TLR1～10アゴニスト、CLITAアゴニスト、NALPsアゴニスト、NOD1アゴニスト、NOD2アゴニスト、NLRC3アゴニスト、NLRP1～14アゴニスト、DEC205アゴニスト、MMRアゴニスト、Dectin1アゴニスト、Dectin2アゴニスト、Mincleアゴニスト、DC-SIGNアゴニスト、DNGR-1アゴニスト、MBLアゴニスト、AIM2アゴニスト、MDA-5アゴニスト、RIG-Iアゴニスト、AhRAゴニストであり、より好ましくはTLR3アゴニスト、TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、TLR9アゴニスト、RIG-Iアゴニスト、STINGアゴニストであり、特に好ましくはSTINGアゴニストである。

[0024] 本明細書において、「Fc領域」は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域であって、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含有する領域を意味する。本発明の一態様において、「Fc領域」は、ヒンジドメインの少なくとも一部を含む。本発明の別の態様において、「Fc領域」は、ヒンジドメインの少なくとも一部、2つのCH2ドメイン及び2つのCH3ドメインを含む。「Fc領域」は、通常、2本又はそれ以上の免疫グロブリン重鎖のC末端領域がS-S結合で結合しているホモ及びヘテロ2量体又は多量体を意味するが、これらが一本鎖を形成している一本鎖Fc領域（scFc）であってもよい。

[0025] 一態様において、本発明の「変異Fc領域」は、野生型Fc領域と比較し

て少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。本発明の一態様において、「野生型Fc領域」及び「変異Fc領域」は、あらゆる生物種に由来するものであってよいが、好ましくは、ヒト、サル（カニクイザル、アカゲザル、コモンマーモセット、リスザル等を例示できるがそれらに限定されない）、マウス、ラット、ウサギに由来するものであり、より好ましくは、ヒト又はサルに由来するものであり、特に好ましくはヒトに由来するものである。本発明の一態様において、「野生型Fc領域」及び「変異Fc領域」は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgYのいずれの免疫グロブリン分子に由来するものであってよいが、好ましくは、IgGに由来するものである。また、サブクラスとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2のいずれであってもよいが、IgG1、IgG2又はIgG4が好ましく、IgG1又はIgG4がより好ましく、IgG1が特に好ましい。したがって、本発明の一態様において、「野生型Fc領域」及び「変異Fc領域」におけるFc領域は、ヒトIgG1 Fc領域又はヒトIgG4 Fc領域であり、好ましくは、ヒトIgG1 Fc領域である。

[0026] 上記のとおり、本発明の一態様において、変異Fc領域は、野生型Fc領域と比較して少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。当該少なくとも3つのアミノ酸置換は、変異Fc領域のヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインのいずれか1つ又は2つ以上に存在していてよいが、好ましくは、変異Fc領域のCH2ドメインに存在する。本発明の一態様において、当該少なくとも3つのアミノ酸置換は、変異Fc領域の234番、235番、265番（全てEUナンバリングによる）の3つの位置に存在する。本発明のさらなる一態様において、当該少なくとも3つのアミノ酸置換は、好ましくは、234Ala、235Ala、及び265Gly（全てEUナンバリングによる）を含む。本発明においては、かかる234Ala、235Ala、及び265Gly（全てEUナンバリングによる）からなるFc領域における変異は、「LALA-DG」、「L234A/L235A/D265G」、「-L234A、L235A、D265G」等とも表記され得る。

[0027] 本発明の一態様において、標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、追加的なFc領域を含んでいてもよく、当該追加的なFc領域は、変異Fc領域であってよい。本発明の別の態様において、「変異Fc領域」は、2つのCH2ドメインを含み、前記2つのCH2ドメインのうち的一方又は両方に、前記少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。

[0028] 一態様において、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して、低減されたヒトFcγ受容体への結合性を有する。本明細書において、「野生型Fc領域を有する対応する分子」とは、変異Fc領域ではなく、野生型Fc領域を含むこと以外は、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子と同一又は同等である分子を意味する。本明細書において、「ヒトFcγ受容体」（「ヒトFcγR」とも表記される）は、FcγRI（CD64）（アイソフォームFcγRIa、FcγRIb、及びFcγRIcを含む）、FcγRII（CD32）（アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131（H型）及びR131（R型）を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1及びFcγRIIb-2を含む）、及びFcγRIIcを含む）、並びに、FcγRIII（CD16）（アイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158及びF158を含む）、FcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1及びFcγRIIIb-NA2を含む）、及びFcγRIIIcを含む）からなる群から選択される1つまたは複数の受容体を意味する。本発明の一態様において、「ヒトFcγ受容体」は、上記に挙げた9つのアイソフォームのうち、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、又は全てのアイソフォームであり、好ましくは、ヒトFcγRI、ヒトFcγRIIa、ヒトFcγRIIb/c、ヒトFcγRIIIa及びヒトFcγRIIIbからなる群から選択される1つまたは複数の受容体であり、さらに好ましくは、ヒトFcγRIである。アナライトのヒトFcγ受容体への結合性は、既知のあらゆる

る方法を用いて決定することができ、たとえば、表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance、SPR）法により決定することができる。本発明の一態様において、アナライトのヒトFc γ 受容体への結合性は、抗His抗体を固定化したセンサーチップ上にリガンドとしてHisタグ付きのヒトFc γ 受容体を捕捉させた後、アナライトをセンサーチップに添加してリガンド・アナライト間の相互作用を表面SPR法により測定することにより決定でき、具体的には、本明細書の試験例15～20において開示したような方法を用いて決定することができる。

[0029] 一態様において、本発明の標的分子結合部分が抗体であり、変異Fc領域が抗体に内包されている場合、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、親抗体と同程度にヒトFc γ 受容体への結合性が低減されている。一態様において、ヒトFc γ 受容体への結合性の低減は、エフェクター機能の低減を意味する。

[0030] 一態様において、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して、低減された炎症性サイトカイン産生能を有する。本発明において、「炎症性サイトカイン」は、炎症反応又は炎症症状を引き起こすか又は促進するサイトカインを意味する。本発明の一態様において、「炎症性サイトカイン」は、炎症反応又は炎症症状を引き起こすか又は促進するサイトカインであって、被験物質によってその産生が必要以上に亢進することが予期されていない、又は、望まれていないサイトカインを意味する。たとえば、本明細書の試験例14のように、標的分子結合部分の標的となるがん細胞が存在しない状況で産生が亢進されるサイトカインは、一般に、その産生が必要以上に亢進することが予期されていない、又は、望まれていないサイトカインに該当することから、本発明における「炎症性サイトカイン」に包含され得る。本発明の一態様において、「炎症性サイトカイン」は、インターロイキン、TNF- α 、TNF- β 、インターフェロン、ケモカインであり、好ましくは、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10、CCL2、CCL4、IFN-

γ であり、特に好ましくは、IL-6である。被験物質（たとえば、本発明の変異Fc領域を含む分子）の炎症性サイトカイン産生能は、既知のあらゆる方法を用いて決定することができ、たとえば、ELISAなどの免疫アッセイにより決定することができる。本発明の一態様において、被験物質の炎症性サイトカイン産生能は、本明細書の試験例14において開示したような方法を用いて決定することができる。

[0031] 一態様において、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して、同等又は増強された*in vivo*腫瘍活性を有する。

[0032] 本明細書において、「がん」、「癌」及び「腫瘍」は同じ意味に用いている。

[0033] 本発明において、「抗腫瘍効果」とは、薬物により腫瘍細胞に対して直接的又は間接的に影響することで、腫瘍の減少又は退縮を誘導することをいう。例えば、腫瘍細胞に対して薬物が直接的な傷害を与える、腫瘍細胞が薬物の刺激によって抗腫瘍免疫を賦活化する、腫瘍細胞へ送達された薬物が細胞外へ放出等され腫瘍細胞周辺の抗腫瘍免疫が賦活化すること等により、腫瘍細胞数の減少、及び傷害、又は腫瘍の退縮を引き起こすことを抗腫瘍効果という。

[0034] 被験物質の*in vivo*抗腫瘍活性は、既知のあらゆる方法を用いて決定することができ、たとえば、本明細書の試験例3～9において開示したような方法を用いて決定することができる。

[0035] 一態様において、本発明の標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して同等又は向上した熱安定性を有し、好ましくは、向上した熱安定性を有する。上記のような分子の熱安定性は、既知のあらゆる方法を用いて決定することができるが、たとえば、これを含む溶液を調製し、温度上昇させた時の当該溶液の熱容量 C_p ($\text{kcal/mol/}^\circ\text{C}$) の変化を調べることによって決定することができ、具体的には、本明細書の試験例21において開示したような方

法を用いて決定することができる。熱容量変化を示す曲線のピークは抗体の各ドメインの熱変性を示しており、一般にC H 2、F a b、C H 3の順に熱変性のピークが観察される（B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 3 5 5 , 7 5 1 - 7 5 7 (2 0 0 7) ）。したがって、変異を導入したドメインの熱変性中点（ T_m ）を熱変性のピークから算出し、変異F c領域を含む分子と、野生型F c領域を有する対応する分子とを比較することによって、熱安定性の変化を決定することができる。なお、本明細書では、熱容量変化を示す曲線のピークトップの温度を T_m とする。本明細書においては、 T_m 値の変化量（ ΔT_m ）が1℃未満であれば、両者の熱安定性は同等であると判断し、1℃以上向上している場合、変異F c領域を含む分子は、野生型F c領域を有する対応する分子と比較して向上した熱安定性を有すると判断する。たとえば、変異がC H 2ドメインに存在する場合、C H 2ドメインにおけるピークトップの T_m の変化量（ ΔT_m ）が1℃未満であれば、両者の熱安定性は同等であると判断し、1℃以上向上している場合、変異F c領域を含む分子は、野生型F c領域を有する対応する分子と比較して、向上した熱安定性を有すると判断する。

[0036] 一態様において、変異F c領域が、2 3 4 A l a、2 3 5 A l a、及び2 6 5 G l y（E Uナンバリング）のアミノ酸置換を含む場合、本発明の標的分子結合部分、変異F c領域及び免疫賦活化剤を含む分子は、薬効を保持したまま安全性面でも優れており、また、親抗体と同程度にエフェクター機能が低減されている。また、一態様において、変異F c領域が、2 3 4 A l a、2 3 5 A l a、及び2 6 5 G l y（E Uナンバリング）のアミノ酸置換を含む場合、本発明の標的分子結合部分、変異F c領域及び免疫賦活化剤を含む分子は熱安定性にも優れている。

[0037] 一態様において、本発明は、上記において説明してきた標的分子結合部分、変異F c領域及び免疫賦活化剤を含む分子を含む医薬組成物に関する。本発明の一態様において、当該医薬組成物は、抗腫瘍剤である。「医薬組成物」については、後に詳述する。

[0038] 一態様において、本発明は、STINGアゴニスト活性を有するCDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート及びその使用に関する。該CDN誘導体は、STINGアゴニスト活性を有し、免疫細胞を賦活化してインターフェロンやサイトカインの産生を誘導する。また、該CDN誘導体は、当該免疫細胞の賦活化により抗腫瘍効果を発揮する。一態様において、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、該CDN誘導体と標的細胞（例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞）を認識し結合できる抗体とを任意のリンカーを介して連結することにより作製され、全身投与し得る。全身投与の具体例としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられる。なお、当該抗体薬物コンジュゲートは、上記において説明してきた標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子の一態様として位置付けることができる。

[0039] STING (Stimulator of Interferon Genes) とは、小胞体に局在する膜貫通型のアダプタータンパク質である。STINGには、先天的な多型が高い頻度で存在することが知られている (PLOS One、2013 Oct、21、8 (10)、e77846)。STING変異型としては、例えば、232番目のアミノ酸がアルギニン (R) からヒスチジン (H) に変異したR232H変異や、71番目のアルギニン (R) がヒスチジン (H) に、230番目のグリシン (G) がアラニン (A) に、293番目のアルギニン (R) がグルタミン (Q) に変異したHAQ変異が知られている。このようなSTINGの多型では、STINGアゴニスト刺激により誘導されるサイトカイン産生量等の応答の強さに違いがあることが知られている (Genes and Immunity、2011、12、263-269)。そのため、ヒトにおいて安定してSTINGアゴニストが作用するためには、各STINGの型に対して活性を有することが望ましい。

[0040] 本発明において、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や

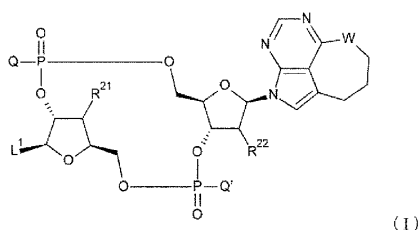
塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。

[0041] 本発明において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0042] <1. CDN誘導体>

CDN誘導体は、次式(1)：

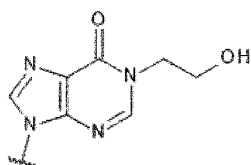
[0043] [化38]



で示される構造を有する。

[0044] L¹は、以下の式で表される基

[0045] [化39]



である。

Q及びQ'は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はチオール基を示す。好ましくは、Q及びQ'は、ともにチオール基である。

[0046] R²¹及びR²²は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はフッ素原子を示す。R²¹は、好ましくは、ヒドロキシ基である。R²²は、好ましくは、フッ素原子である。

[0047] Wは、-NH-又は硫黄原子である。Wは、好ましくは、-NH-である。

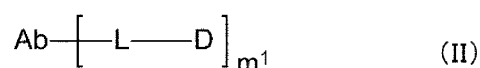
[0048] 該CDN誘導体の製造方法は、後述する<3. 製造方法>に記載する。

[0049] <2. 抗体薬物コンジュゲート>

一態様において、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、前述のCDN誘導体と標的細胞（例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞）を認識し結合できる抗体とが任意のリンカーを介して連結された抗体薬物コンジュゲートとして全身投与が可能である。なお、本明細書において、これ以降、単に「本発明の抗体薬物コンジュゲート」と言及する場合、原則として、前述のCDN誘導体を薬物部分として含む抗体薬物コンジュゲートを意味するが、例外的に、それに加えて、前述の「標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子」を意味することもある。

[0050] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、次式（II）：

[0051] [化40]



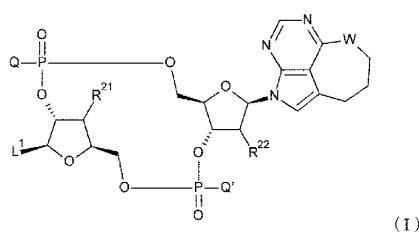
で示される。 m^1 は1から10の範囲であり、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数を示す。Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、Dは上述したCDN誘導体（本明細書中、CDN誘導体が抗体薬物コンジュゲートの一部として使用される場合、単に「薬物」とも称する）を示す。

[0052] 薬物Dは、免疫細胞を賦活化する活性、具体的には、STINGアゴニスト活性を有する化合物である。薬物Dは、リンカーの一部又は全部が標的細胞（例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞）内で切断されると、本来の構造で遊離し、免疫賦活化効果が発揮される。免疫細胞に対する標的細胞の感受性亢進又は標的細胞を介した免疫細胞の賦活化により、目的の機能が発揮される。目的の機能としては、STINGアゴニスト活性に関連する機能であれば特に限定されないが、好ましくは、抗腫瘍活性である。すなわち、腫瘍を標的とする抗体（例えば、抗EGFR抗体、抗CDH6抗体）に任意のリンカーを介して連結された薬物Dは、標的の細胞又は組織に送達され、リンカーの一部又は全部が切断され、免疫細胞に対する標的細胞の感受性亢進又は標的細胞を介した免疫細胞の賦活化（例えば、インターフェロンやサイトカイン

の産生)を通じて抗腫瘍効果を発揮する。

[0053] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに結合される薬物Dは、次式(Ⅰ)：

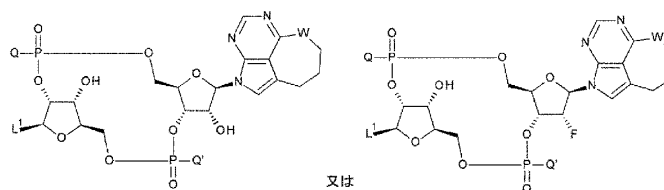
[0054] [化41]



(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 、 R^{21} 、 R^{22} 及び W は、上記<1. CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の2式：

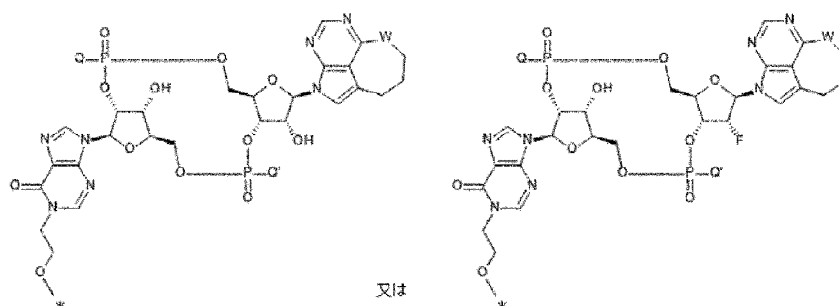
[0055] [化42]



(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 、及び W は、上記<1. CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

[0056] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の2式：

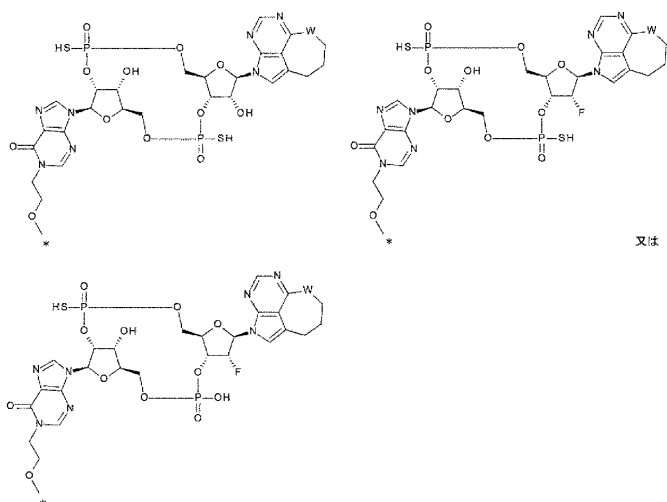
[0057] [化43]



(ここで、アステリスクはLと結合していることを示し、Q、Q'、及びWは、上記<1. CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

[0058] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の3式：

[0059] [化44]

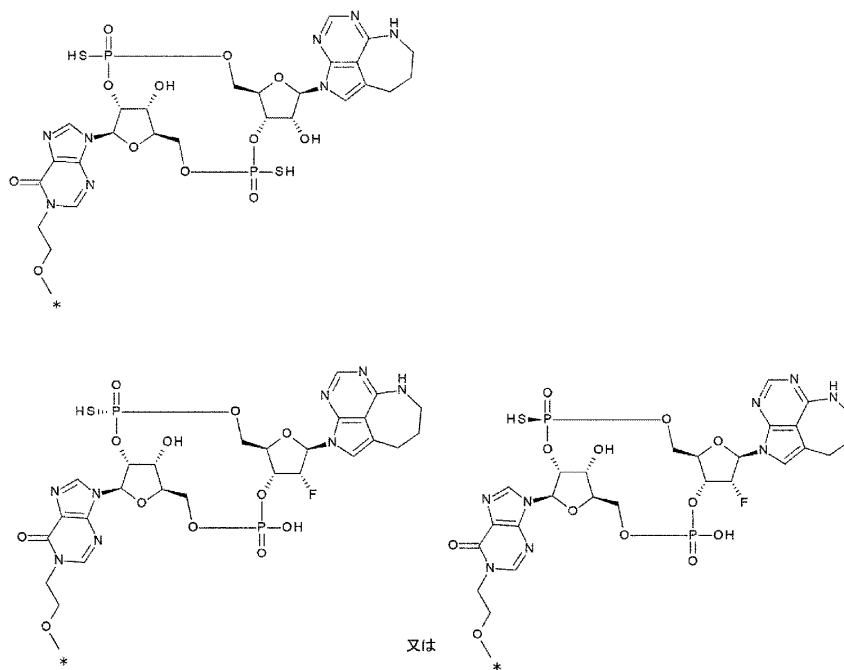


(ここで、アステリスクはLと結合していることを示し、Wは、上記<1. CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

[0060] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の3式：

[0061]

[化45]



(ここで、アステリスクはLと結合していることを示す)で示される。

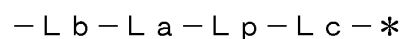
[0062] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の4式：

[0063]

一構造について説明する。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーは、抗体と薬物とを連結させるリンカーとして当業者が理解するものであれば特に限定されない。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーとしては、例えば、Protein Cell、2018、9(1):33-46、Pharm Res、2015、32:3526-3540、又はInt. J. Mol. Sci.、2016、17、561に記載されるリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。リンカーは、生体内で切断されるリンカーであっても、生体内で切断されないリンカーであってもよいが、好ましくは、生体内で切断されるリンカーである。

[0067] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーとしては、例えば、薬物を抗体のFc部分の糖鎖又はリモデリングされた糖鎖に結合させる（本明細書中、「糖鎖コンジュゲーション」という場合がある）リンカー（例えば、WO2018/003983に記載される）、又は薬物を抗体の任意のアミノ酸残基（例えば、システイン残基又はリシン残基）に結合させるリンカー（例えば、WO2014/057687に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。薬物を抗体の任意のアミノ酸残基に結合させるリンカーとしては、好ましくは、Abのシステインのスルフヒドリル基（SH基）とチオエーテル結合する場合（本明細書中、「システインコンジュゲーション」という場合がある）又はAbのリシンのアミノ基（NH₂基）とアミド結合する場合（本明細書中、「リシンコンジュゲーション」という場合がある）が挙げられ、好ましくは、システインコンジュゲーションである。

[0068] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される好ましいリンカーLは、次の式で表される。



（ここで、アステリスクは、薬物Dと結合していることを示す）で示される。

[0069] まず、Lpについて説明する。Lpは、生体内又は標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカー（以下、本明細書中、ペプチドリンカ

ーともいう)を示すか、又は存在しない。

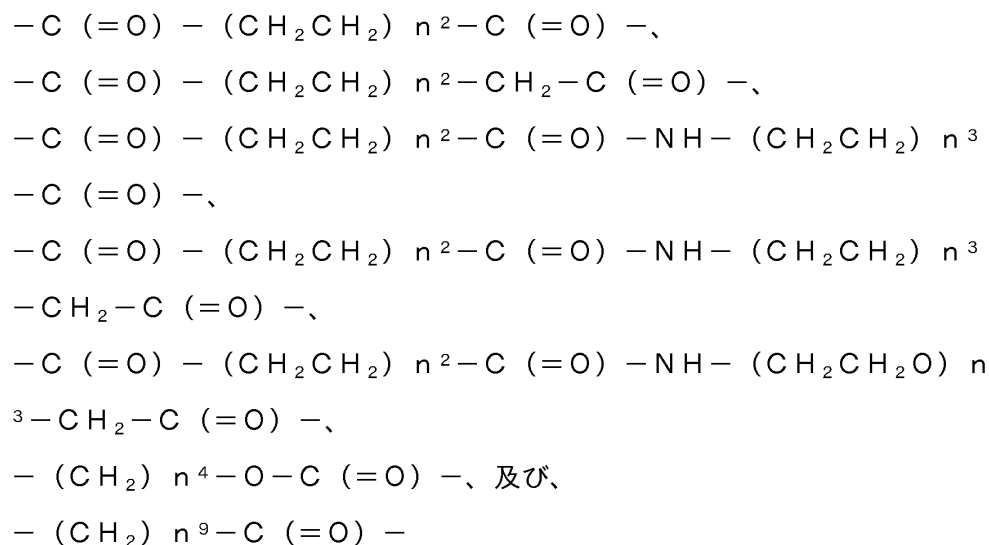
[0070] L pは、例えば、ペプチダーゼやエステラーゼ等の酵素の作用によって、切断される。L pは、2から7個（好ましくは、2から4個）のアミノ酸で構成されるペプチドである。L pは、そのN末端において後述するL aの右端のカルボニル基とアミド結合を形成し、C末端においてL cのアミノ基（ $-NH-$ ）とアミド結合を形成する。前記ペプチダーゼ等の酵素によって、L pのC末端側のアミド結合が切断される。

[0071] L pを構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、Lー又はDーアミノ酸であり、好ましくはLーアミノ酸である。また、 α -アミノ酸の他、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸等の構造のアミノ酸であってもよく、さらには、例えば、N-メチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸であってもよい。L pのアミノ酸配列は、特に限定されないが、構成するアミノ酸として、グリシン（G l y ; G）、バリン（V a l ; V）、アラニン（A l a ; A）、フェニルアラニン（P h e ; F）、グルタミン酸（G l u ; E）、イソロイシン（I l e ; I）、プロリン（P r o ; P）、シトルリン（C i t）、ロイシン（L e u ; L）、メチオニン（M e t ; M）、セリン（S e r ; S）、リシン（L y s ; K）、及びアスパラギン酸（A s p ; D）等を挙げることができる。これらのうちで好ましくは、グリシン（G l y ; G）、バリン（V a l ; V）、アラニン（A l a ; A）、フェニルアラニン（P h e ; F）、シトルリン（C i t）、イソロイシン（I l e ; I）、プロリン（P r o ; P）である。これらのアミノ酸は重複してもよく、任意に選択されたアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。また、アミノ酸の種類によって、薬物遊離のパターンをコントロールすることができる。

[0072] L pの具体例としては、例えば、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVA-$ 、 $-GGFM-$ 、 $-GGVCit-$ 、 $-GGFCit-$ 、 $-GGICit-$ 、 $-GGPL-$ 、 $-GGAQ-$ 、 $-GGPP-$ を挙げることができる。リンカーL pは、好ましくは、 $-GGFG-$ 又は $-GGPI-$ であり、より

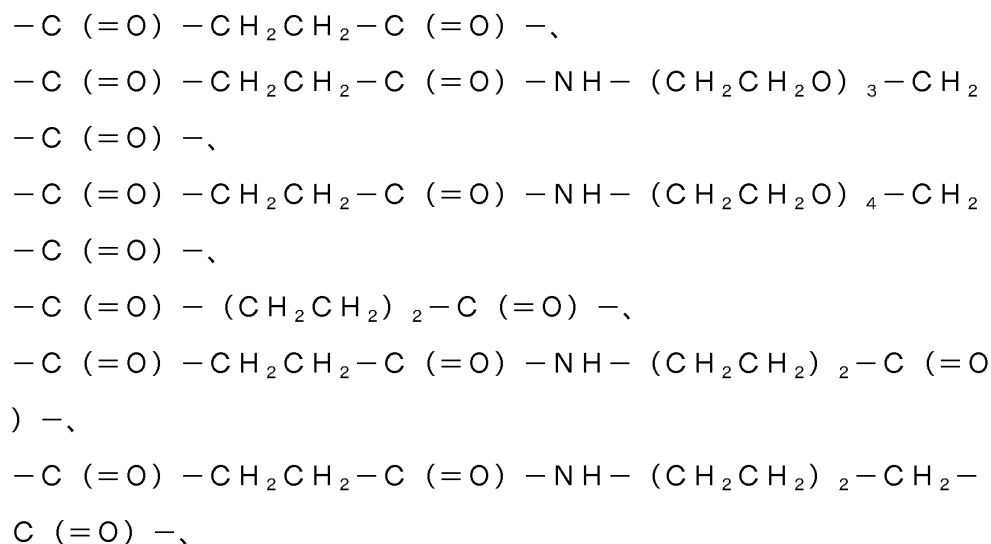
好ましくは $-GGFG-$ である。

[0073] 次に、 La について説明する。 La は、以下：



(ここで、式中、 n^2 は 1～3 の整数 (好ましくは、1 又は 2) を示し、 n^3 は 1～5 の整数 (好ましくは、2～5 の整数、より好ましくは、3 又は 4) を示し、 n^4 は 0～2 の整数 (好ましくは、0 又は 1) を示し、 n^9 は 2～7 の整数 (好ましくは、2～5 の整数、より好ましくは、2、3 又は 5) を示す) からなる群から選択されるいずれか一つを示す。

[0074] La は、好ましくは、以下：



$-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び
 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$

からなる群から選択されるいずれか一つを示す。

[0075] La は、より好ましくは、

$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2-$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は
 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$

である。

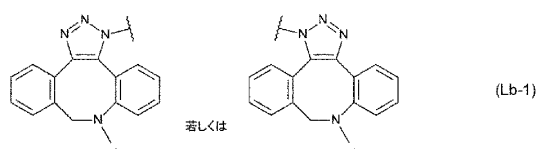
[0076] La は、さらに好ましくは、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ である。

[0077] 次に、 Lb について説明する。 Lb は、糖鎖コンジュゲーションのリンカーに使用されるスペーサー（本明細書中、「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」ともいう）、又はシステインコンジュゲーションのリンカーに使用されるスペーサー（本明細書中、「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」ともいう）を示す。

[0078] < Lb が「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合>

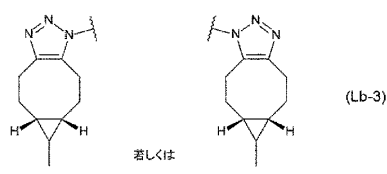
Lb が「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合、 Lb は、特に限定されないが、例えば、次式で示されるスペーサーが挙げられる。

[0079] [化48]



又は

[0080] [化49]



[0081] 上記で示されるそれぞれの構造式において、アステリスク（*）はL aの左端の—（C=O）—、—CH₂—又は—OC（=O）—と結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す。

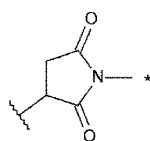
[0082] L bにL b-1又はL b-3を選択する場合、トリアゾール環部位は、幾何異性構造を有し、1つのL b中に、2種類の構造のうちのいずれか一方を含むか、又はそれらの混合物を含む。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、抗体1分子に複数の薬物を結合させることができる。抗体1分子に複数の薬物を結合させる場合、L bも複数存在することになる（例えば、後述する<3. 製造方法>のE法に示した抗体薬物コンジュゲートの模式図（1 e）を参照のこと）。L bがL b-1又はL b-3から選択され、そのL bが抗体1分子に対し複数存在する場合（例えば、後述するm²が1又は2の場合）、それぞれのL bにおいて、トリアゾール環部位は幾何異性構造を有し、1つのL b中に、2種類の構造のうちのいずれか一方を含むか、又はそれらの混合物を含む。

[0083] <L bが「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合>

L bが、「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合、L bは、特に限定されないが、例えば、—（スクシンイミド-3-イル-N）—が挙げられる。本発明において、「—（スクシンイミド-3-イル-N）—」は、次式：

[0084]

[化50]

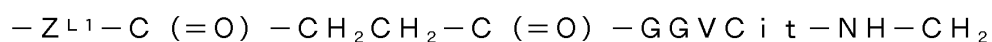


で示される構造を有する。上記で示される構造式において、アスタリスクは L a と結合していることを示し、波線は抗体のシステイン残基の側鎖とチオエーテルを形成して結合していることを示す。

[0085] 次に、L c について説明する。L c は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-$ フェニル基 $-\text{CH}_2-\text{O}$ ($\text{C}=\text{O}$) $-$ 又は $-\text{NH}-$ ヘテロアリール基 $-\text{CH}_2-\text{O}$ ($\text{C}=\text{O}$) $-$ を示すか、あるいは、存在しない。ここで、フェニル基としては、好ましくは、1, 4-フェニル基であり、ヘテロアリール基として好ましくは、2, 5-ピリジル基、3, 6-ピリジル基、2, 5-ピリミジル基又は2, 5-チエニル基である。L c は、好ましくは、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ であるか、又は存在しない。

[0086] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるより好ましいリンカーLは、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」である場合、

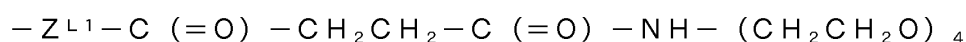
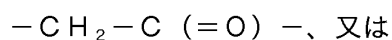
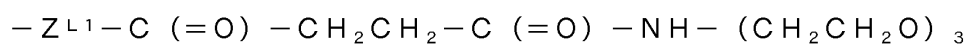
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGFG}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGVA}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGVCit}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGFCit}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGICit}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGFM}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGPI}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGLM}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{FG}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{VA}-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、
- $-\text{Z}^{\text{L1}}-\text{C}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{=O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、



—、

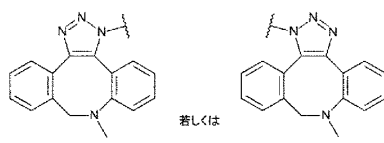


—、

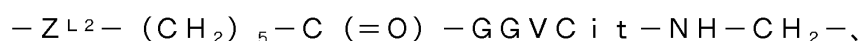
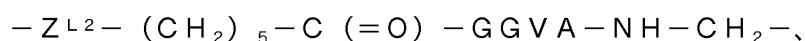
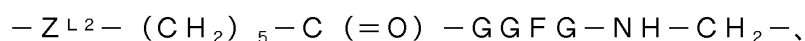
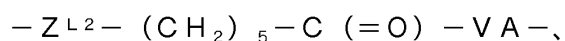
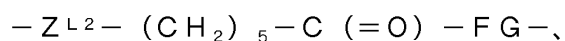
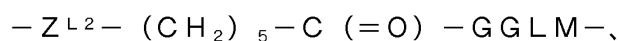
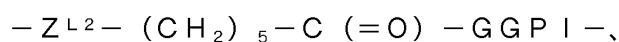
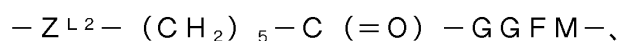
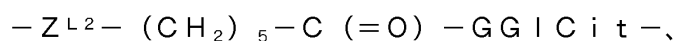
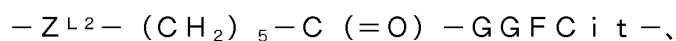
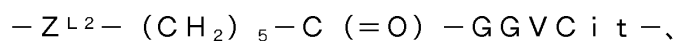
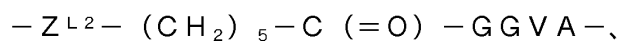
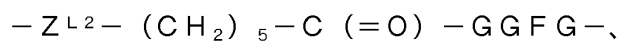


(ここで、 Z^{L1} は、上記**Lb**の以下で示される構造式：

[0087] [化51]



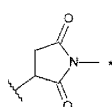
を示す)であり、あるいは薬物と抗体の結合様式が「システインコンジュゲーション」である場合、



$-Z^{L2}-(CH_2)_5-C(=O)-GGFCit-NH-CH_2-$ 、
 $-Z^{L2}-(CH_2)_5-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$ 、又は
 $-Z^{L2}-(CH_2)_5-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2-C(=O)-$ 、

(ここで、 Z^{L2} は、上記L bの以下で示される構造式：

[0088] [化52]

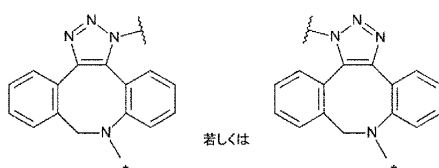


で示される－(スクシンイミド－3－イル－N)－を示す。)である。

[0089] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるさらに好ましいリンカーLは、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」であり、

$-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-$ 、
 又は
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-CH_2-$ 、
 (ここで、 Z^{L1} は、上記L bの以下で示される構造式：

[0090] [化53]



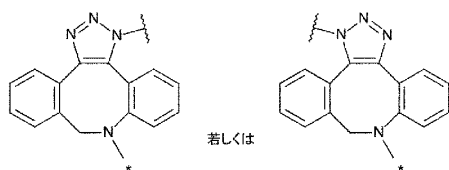
を示す)である。

[0091] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるさらにより好ましいリンカーLは、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」であり、

$-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-$ 、
 (ここで、 Z^{L1} は、上記L bの以下で示される構造式：

[0092]

[化54]

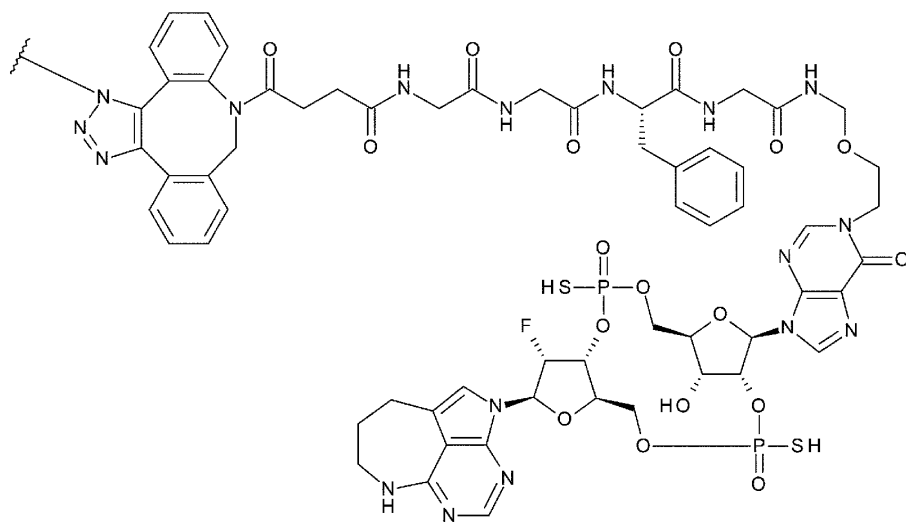


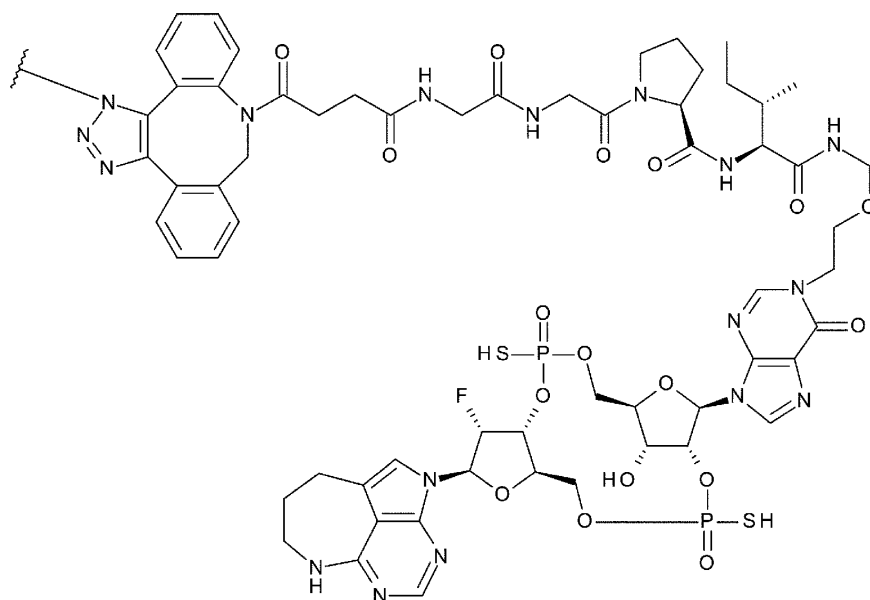
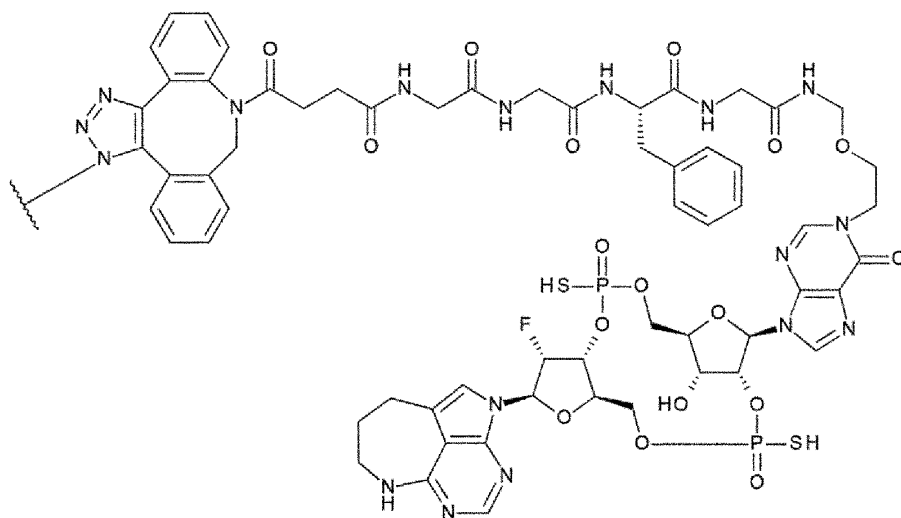
を示す)である。

[0093] 上記の「好ましいリンカーL」、「より好ましいリンカーL」、「さらに好ましいリンカーL」及び「さらにより好ましいリンカーL」における右端は、薬物Dと結合している。

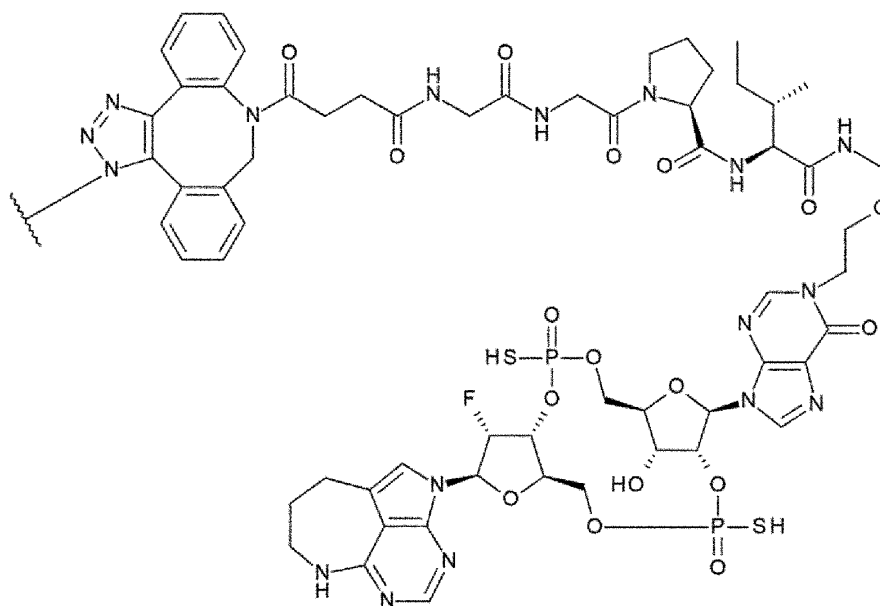
[0094] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカーLー薬物D」は、好ましくは、以下の4式：

[0095] [化55]





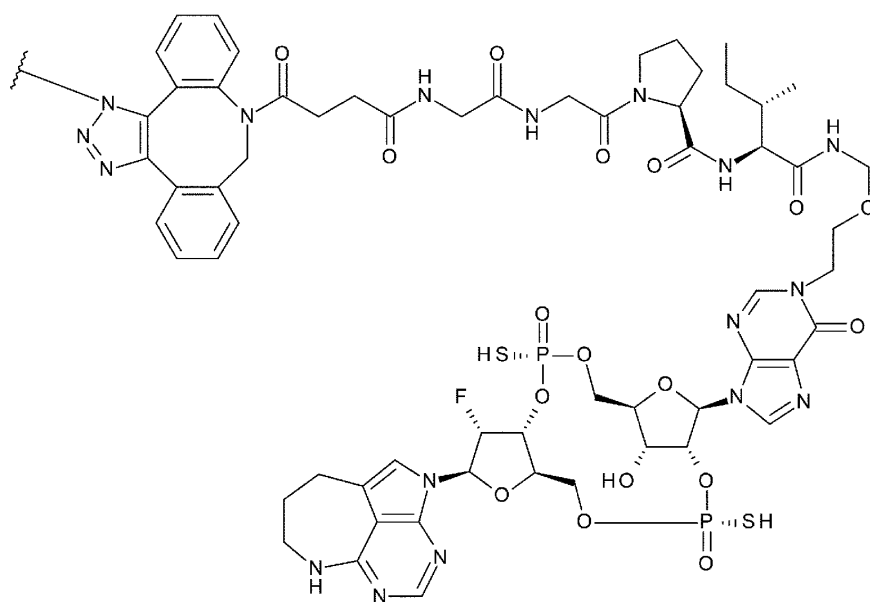
又は



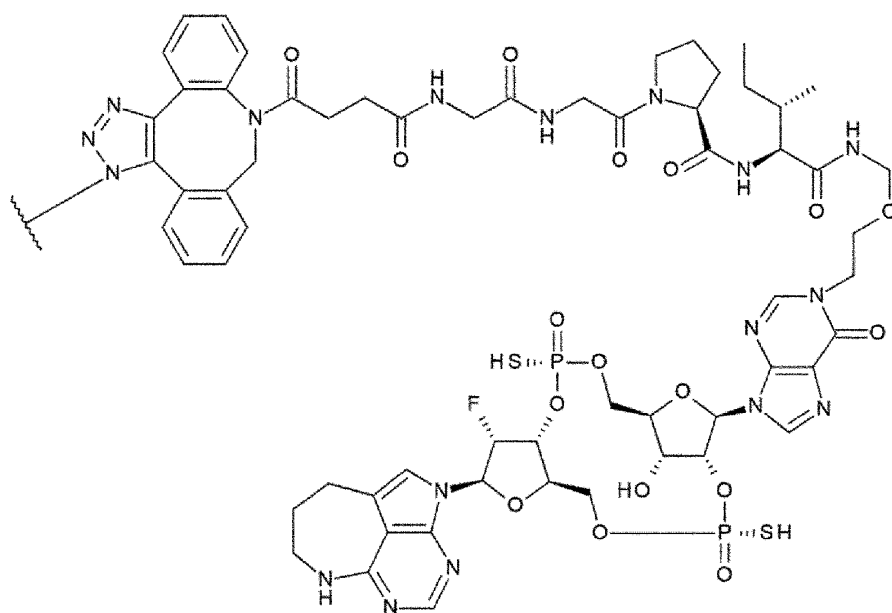
（ここで、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す）で示される。

[0096] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカー-薬物D」は、より好ましくは、以下の4つの式：

[0097]



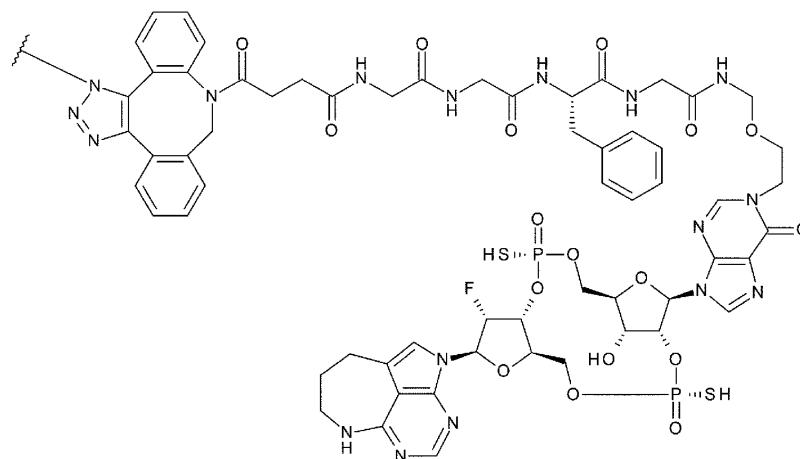
又は



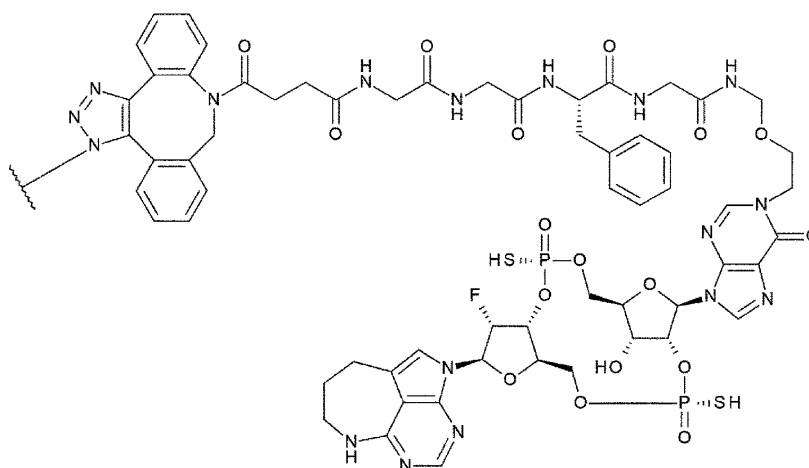
(ここで、波線は、A bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)で示される。

[0098] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカーLー薬物D」は、さらに好ましくは、以下の式：

[0099] [化57]



又は



（ここで、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す）で示される。

[0100] <2. 2. 抗体及びその糖鎖修飾>

<2. 2. 1 抗体>

本明細書において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列が含まれるヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列、またはその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配

列が含まれるヌクレオチド配列またはその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、mRNA、cDNA、RNA等は「遺伝子」の意味に含まれる。

[0101] 本明細書において、「ヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」と「核酸」は同義であり、例えば、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライマー等も「ヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」の意味に含まれる。

[0102] 本明細書においては、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0103] 本明細書において、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0104] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体の機能性断片は、IgG重鎖のFc領域においてよく保存されたN結合型糖鎖による修飾を受けるアスパラギン（Asn297）及びその周辺のアミノ酸を保持し、且つ抗原との結合能を有している機能性断片を含む。

[0105] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体は、免疫グロブリンを意味し、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子である。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体として、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgYのいずれのクラスでもよいが、IgGが好ましい。また、サブクラスとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2のいずれであってもよいが、IgG1、IgG2又はIgG4が好ましく、IgG1又はIgG4がより好ましく、IgG1が特に好ましい（IgG重鎖のFc領域にADCC及びADCP活性に

影響する変異を持つ抗体を含む)。したがって、本発明の一態様において、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体は、IgG1又はIgG4、好ましくはIgG1であり、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体の機能性断片はIgG1又はIgG4、好ましくはIgG1である抗体の機能性断片である、

[0106] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は該抗体の機能性断片は、234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである、変異Fc領域を含む。ここで、本明細書において、アミノ酸残基のナンバリングは、特段の留保がない限り、EU index又はEUNanバリング（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85）に従うものとする。

[0107] 本発明の一態様において、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体がIgG1であるか、又は、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体の機能性断片が、IgG1である抗体の機能性断片である場合、変異Fc領域は、IgG1 LALA-DG変異（IgG1-L234A、L235A、D265G）を含む。

[0108] 従来、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、エフェクター機能を調整することが知られており（WO88/07089、WO94/28027、WO94/29351参照）、特に、エフェクター機能を低減させることにより、腫瘍部位以外の免疫細胞を活性化してしまう可能性を回避できることも知られていたが、他方、免疫細胞を賦活化する活性を有する薬物を使用したコンジュゲート体においては、抗体のエフェクター機能を低減させると薬効も低下することが報告されていた（非特許文献4～6）。

[0109] 本発明の一態様において、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は抗体の機能性断片に、上記において言及したFc領域における変異を含ませ

た場合、薬効を保持したまま、エフェクター機能を低減できる。また、本発明の一態様において、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は抗体の機能性断片に、上記において言及したFc領域における変異を含ませた場合、当該抗体薬物コンジュゲートは、野生型Fc領域を有する対応する抗体薬物コンジュゲートと比較して、低減されたヒトFc γ 受容体への結合性を有し、低減された炎症性サイトカイン産生能を有し、及び／又は、同等又は増強された*in vivo*抗腫瘍活性を有する。ここで、「野生型Fc領域を有する対応する抗体薬物コンジュゲート」とは、変異Fc領域ではなく、野生型Fc領域を含むこと以外は、本発明の抗体薬物コンジュゲートと同一又は同等である分子を意味する。

[0110] さらに、本発明の一態様において、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は該抗体の機能性断片に、上記において言及したFc領域における変異を含ませた場合、当該抗体薬物コンジュゲートは、上記において言及したFc領域における変異を含ませた抗体（親抗体；当該抗体薬物コンジュゲートの作製に使用した抗体）と同程度にエフェクター機能が低減されている。加えて、本発明の一態様において、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は抗体の機能性断片に、上記において言及したFc領域における変異を含ませた場合、当該抗体薬物コンジュゲートは、野生型Fc領域を有する対応する分子と比較して、同等の又は向上した熱安定性を有し、特に、抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体又は抗体の機能性断片に、L A L A - D G変異を含ませた場合、当該抗体薬物コンジュゲートは、野生型Fc領域を有する対応する抗体薬物コンジュゲートと比較して、向上した熱安定性を有する。なお、一般に、IgG2抗体は、IgG1抗体に比べてエフェクター機能が低いことが知られている（Front. Immunol. 2014, 5, 520）。

[0111] 本発明の一態様において、変異Fc領域が、L A L A - D G変異を含む場合、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、薬効を保持したまま安全性面でも優れており、また、親抗体と同程度にエフェクター機能が低減されている。

また、一態様において、変異Fc領域が、LALA-DG変異を含む場合、本発明の抗体薬物コンジュゲートは熱安定性にも優れている。

[0112] 抗体の定常領域には複数のアロタイプがあることが知られている。例えばIgG1重鎖についてはG1m17、G1m3、G1m1、G1m2が挙げられる。本発明で使用する抗体の定常領域としては、特に限定されないが、G1m17又はG1m3を用いるのが好ましい。Fab領域を持たないFcのアミノ酸配列はG1m17とG1m3で共通であり、Fab領域を持たないFcのLALA-DG変異体においても、LALA変異体と比較してFcγR結合活性の減弱効果と熱安定性の向上を示したことから（data not shown）、本発明の分子（特に、抗体や抗体薬物コンジュゲート）が有するFcγR結合活性の減弱効果と熱安定性の向上効果はG1m17とG1m3のアロタイプに依らないと考えられる。

[0113] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（CDR：Complementarity determining region）があることが知られている。CDRは、超可変領域（hypervariable region）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0114] なお、本明細書中、抗体の可変領域に含まれるCDRのアミノ酸配列は、KABATの定義（KABAT et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD.（

1991))に従って決定される。

- [0115] 抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明に使用される抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体には、ラット抗体、マウス抗体、ウサギ抗体等の非ヒト動物由来のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、それらの機能性断片、又はそれらの修飾体が含まれる。
- [0116] 抗体は、好ましくは、腫瘍細胞又は免疫細胞を標的にする抗体であるが、これらに限定されない。抗体は、より好ましくは、腫瘍細胞を標的にする抗体である。
- [0117] 腫瘍細胞を標的にする抗体が使用される場合、抗体としては、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、さらには腫瘍細胞を傷害する特性の一又はそれ以上の特性を備えていることが好ましい。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物は、STINGアゴニスト活性を有する。該薬物は、インターフェロン制御因子3(interferon regulatory factor-3(IRF3))のシグナルを活性化してインターフェロンを誘導する。従って、本発明の抗体薬物コンジュゲートに腫瘍細胞を標的にする抗体が使用される場合、抗体薬物コンジュゲートは体内に投与された後、腫瘍部位に送達され、腫瘍細胞内に取り込まれたあとペプチダーゼ等によってリンカー部分が切断されて薬物部分が遊離する。遊離した薬物部分はSTINGアゴニスト活性を通じて免疫細胞に対する腫瘍細胞の感受性を亢進するとともに抗腫瘍免疫を賦活化し、抗腫瘍効果を発揮させると考えられる。あるいは、腫瘍細胞に集積した抗体薬物コンジュゲートが内在化されなくても、腫瘍細胞及び／又は抗体薬物コンジュゲートが貪食作用等によって免疫細胞に取り込まれ、STINGアゴニスト活性を通じて抗腫瘍免疫を賦活化し、抗腫瘍

効果を発揮させることも考えられる。

- [0118] 抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、(1) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761）、(2) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）又は(3) 治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ（Bio Techniques 28:162-165, January 2000）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。
- [0119] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに腫瘍細胞を標的とした抗体を用いる場合、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。
- [0120] 薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性は、腫瘍細胞への細胞傷害活性、抗細胞効果、腫瘍体積の退縮をいう。公知の*in vitro*又は*in vivo*の評価系を用いて、抗腫瘍活性を確認することができる。
- [0121] 薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの作用及び免疫賦活化活性は、免疫細胞に対する腫瘍細胞の感受性亢進又は腫瘍細胞を介した免疫細胞の賦活化をいう。公知の*in vitro*又は*in vivo*の評価系を用いて、薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの作用及び免疫賦活化活性を確認することができる。
- [0122] 本発明で利用できる*in vitro*又は*in vivo*の評価系としては、試験例3、4、5及び6に記載の、マウス大腸がん細胞株CT26.WTにヒトEGFR遺伝子を導入したCT26.WT-hEGFR細胞が皮下移植されたBALB/cマウスの系、試験例7に記載の、ヒト肺がん細胞株

PC-9細胞が皮下移植されたBALB/c-mouseの系、試験例8に記載の、ヒト肺がん細胞株NCI-H358が皮下移植されたBALB/c-mouseの系、試験例9に記載の、CT26.WTにヒトCDH6遺伝子を導入したCT26.WT-hCDH6細胞が皮下移植されたBALB/c-mouseの系、試験例10に記載の、THP1レポーター細胞とヒト肺がん細胞株HCC827との共培養アッセイ系、試験例11に記載の、THP1レポーター細胞とヒト卵巣がん細胞株OVCAR4との共培養アッセイ系、試験例12及び13に記載の、CT26.WT細胞が再度皮下移植されたBALB/c-mouseの系、試験例14に記載の、ヒト全血を用いたアッセイ系等を例示することができるが、それらに限定されるものではない。

[0123] 本発明に使用される抗体としては、例えば、抗CDH6抗体、抗EGFR抗体が挙げられる。

[0124] 本発明に使用される抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0125] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497、Kennett, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0126] なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[0127] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体は公知の方法（例えば

、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 81, 6851
－6855, (1984)、Nature (1986) 321, p. 522
－525、WO90/07861) に従って取得することができる。

[0128] 例えば、抗EGFR抗体(WO1998/050433、WO2002/
092771等)、抗CDH6抗体(WO2018/212136等)は、
公知の手段によって取得することができる。

[0129] 本発明に使用される抗EGFR抗体は、特に制限はないが、例えば、以下
の特性を有するものが望ましい。

(1) EGFRに特異的に結合する抗EGFR抗体。

(2) ヒトEGFRの細胞外ドメインに結合する上記(1)に記載の抗体。

(3) 前記抗体がモノクローナル抗体である上記(1)又は(2)に記載の
抗体。

(4) マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒトモノク
ローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体である、上記(1)～(3)の
いずれかに記載の抗体。

(5) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びA
DCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(4)に記載の抗体
。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、Fc領域の23
4番目、235番目、及び265番目(すべてEUナンバリング)のアミノ酸
残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである、上記(4)に記載
の抗体。

(7) 配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号30に
記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化またはヒトモノクロー
ナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(8) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号30に
記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化またはヒトモノクロー
ナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(9) 配列番号32又は33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖に含まれる重鎖可変領域及び配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖に含まれる軽鎖可変領域を含んでなるヒト化またはヒトモノクローナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(10) 配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号24に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなるヒト化またはヒトモノクローナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(11) 重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失している上記(1)～(10)のいずれかに記載の抗体。

(12) 上記(1)～(11)のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

[0130] 抗EGFR抗体としては、例えば、panitumumab、nimotuzumab、cetuximab、ametumumab (SY-101)、SYN-004、SCT-200、tomuzotuximab、GC-1118、GR-1401、depatuxizumab (ABT-806)、Serc lutamab、AMG595、matuzumabを挙げることができ、好適にはpanitumumab、ABT806を挙げることができる。

[0131] 本発明に使用される抗CDH6抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

(1) CDH6に特異的に結合する抗CDH6抗体。

(2) ヒトCDH6の細胞外ドメインに結合する上記(1)に記載の抗体。

(3) 前記抗体がモノクローナル抗体である上記(1)又は(2)に記載の抗体。

(4) マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体である、上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(4)に記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、Fc領域の234番目、235番目、及び265番目(すべてEUナンバリング)のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである、上記(5)に記載の抗体。

(7) 配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化またはヒトモノクローナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(8) 配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖に含まれる重鎖可変領域及び配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖に含まれる軽鎖可変領域を含んでなるヒト化またはヒトモノクローナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(9) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなるヒト化またはヒトモノクローナル抗体である上記(6)に記載の抗体。

(10) 重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失している上記(1)～(9)のいずれかに記載の抗体。

(11) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

[0132] 抗CDH6抗体としては、例えば、WO2018212136に記載の配列番号61の21～233番目に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体(抗体X)、NOV0712、LTV977を挙げることができ、好適には抗体Xを挙げることができる。

[0133] 本発明に使用される抗体は、上記の抗体の重鎖及び／又は軽鎖と比較して80%乃至99%のアミノ酸同一性を有する抗体であってもよい。ここで「同一性」なる用語は、当分野で使用される一般的な定義を有するものとする。同一性の%は、2つのアミノ酸配列をアミノ酸の一致度が最大となるように整列(アラインメント)させたときの総アミノ酸数(ギャップを含む。)あたりの同一アミノ酸数のパーセンテージを指す。このような同一性は、一般的には80%以上の同一性であり、好ましくは90、91、92、93又は94%以上の同一性であり、より好ましくは95、96、97又は98%以上の同一性であり、さらに好ましくは99%以上の同一性である。また、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列に1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の各種作用を有する抗体を選択することが可能である。置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基数は、一般的には10アミノ酸残基以下であり、好ましくは5乃至6アミノ酸残基以下であり、より好ましくは2乃至3アミノ酸残基以下であり、さらに好ましくは1アミノ酸残基である。

[0134] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体では、その重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており(Journal of Chromatography A, 705: 129-134(1995))、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリ

シン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている (Analytical Biochemistry, 360: 75-83(2007))。しかし、これらの重鎖配列の欠失又は修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能 (補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等) には影響を及ぼさない。したがって、本発明で使用する抗体には、当該欠失又は修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれる。よって、本発明の一態様において、抗体は、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体である。この文脈において、「1つ又は数個のアミノ酸残基」とは、好ましくは、1~10個のアミノ酸残基、1~9個のアミノ酸残基、1~8個のアミノ酸残基、1~7個のアミノ酸残基、1~6個のアミノ酸残基、1~5個のアミノ酸残基、1~4個のアミノ酸残基、1~3個のアミノ酸残基、1又は2個のアミノ酸残基、又は1個のアミノ酸残基を意味する。本発明の一態様において、本発明で使用する抗体には、重鎖カルボキシル末端において1又は2のアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体 (例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖) 等も包含される。但し、カルボキシル末端の欠失又は修飾 (アミド化) 等が、抗原結合能及びエフェクター機能に大きな影響を与えない限り、本発明で使用する抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明で使用する抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明で使用する抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明で使用する抗体は、好ましくは、2本の重鎖の双方でカルボキシル末端のひとつのアミノ酸残基が欠失しているものを挙げることができる。

[0135] <2. 2. 2 ポリヌクレオチド等>

本発明の一態様において、上記において記述してきた抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドが提供される。たとえば、本発明の一態様に

において、上記〔45〕～〔47〕（〔45-2〕、〔46-2〕及び〔47-2〕も含む）のいずれか1つに記載の抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドが提供される。

[0136] 本発明の一態様において、上記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターが提供される。当該発現ベクターとしては、特に制限はなく、上記ポリヌクレオチドの発現を可能とするあらゆるプラスミド、ウイルス等のベクターを利用することができる。このような発現ベクターの構築方法としては、既知のあらゆる方法を利用することができるが、例えば、野生型のFc領域の遺伝子を含む動物細胞発現ベクターをテンプレートとし、KOD-Plus-Mutagenesis Kit（TOYOBO社）を用いてFc領域に所望のエフェクターレス化変異をPCRにて導入する、もしくは、所望のエフェクターレス化変異を含むFc領域の遺伝子を合成し、ライゲーション反応によって動物細胞発現ベクターに組み込むといった方法を例示することができる。

[0137] 本発明の一態様において、上記発現ベクターにより形質転換された宿主細胞が提供される。当該宿主細胞としては、特に制限はなく、上記発現ベクターに含まれるポリヌクレオチドを発現できる、あらゆる種類の真核細胞及び原核細胞を利用することができる。本発明の一態様において、本発明の宿主細胞は、真核細胞であり、例えば、動物細胞、植物細胞、真核微生物を挙げることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Cell(1981)23, p.175-182、ATCC CRL-1650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No.CRL-1658）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1980)77, p.4126-4220）、FreeStyle 293F細胞（Invitrogen社）、リンパ球、ミエローマ等を挙げることができる。本発明の別の一態様において、本発明の宿主細胞は、原核細胞であり、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

[0138] 本発明の一態様において、上記宿主細胞を培養することを含む培養方法が

提供される。当該培養方法としては、上記宿主細胞が目的の抗体を発現できるものであれば、特に制限はなく、その培養条件等は、使用する宿主細胞や発現ベクターの種類等に応じて、適宜決定することができる。

[0139] 本発明の一態様において、上記宿主細胞を培養する工程と該培養工程において得られた培養物から目的の抗体を採取することを含む抗体の製造方法が提供される。上記「宿主細胞を培養する工程」としては、上記宿主細胞が目的の抗体を発現できるものであれば、特に制限はなく、その培養条件等は、使用する宿主細胞や発現ベクターの種類等に応じて、適宜決定することができる。また、「該培養工程において得られた培養物から目的の抗体を採取する」工程としても、特に制限はなく、使用する宿主細胞や発現ベクターの種類等や目的の抗体の性質等に応じて、適宜決定することができる。当該抗体の製造方法としては、本明細書の実施例 13、14 において言及したとおり、ベクティビックス点滴静注 100mg 審査結果報告書（平成 22 年 3 月 5 日 医薬食品局審査管理課）に記載されている製造方法や、WO 2018/212136 に記載されている製造方法を挙げることができるが、これらには限定されない。

[0140] <2. 2. 3 抗体の糖鎖リモデリング>

近年、不均一な抗体の糖鎖を、酵素反応によってリモデリングし、官能基を有する糖鎖を均一に導入する方法が報告されている（ACS Chem. Biol. 2012, 7, 110-122, ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7, 1005-1008）。この糖鎖リモデリング技術を用いて、部位特異的に薬物を導入し、均一な ADC を合成する試みもなされている（Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2233-2242, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367, US 2016361436）。

[0141] 糖鎖のリモデリングは、まず加水分解酵素を利用して、蛋白質（抗体等）に付加されている不均一な糖鎖を末端の GlcNAc のみ残して切除し、GlcNAc が付加した均一な蛋白質部分を調製する（以下、「アクセプター

」という)。次に、別途調製した任意の糖鎖を用意し（以下、「ドナー」と言う）、このアクセプターとドナーとを、糖転移酵素を用いて連結する。これにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖蛋白質を合成できる。

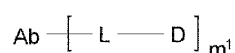
[0142] 本発明において、「糖鎖」とは、2つ以上の単糖がグリコシド結合により結合された構造単位を意味する。具体的な単糖や糖鎖を、例えば“GlcNAc”、“SG”のように、略号として標記することがある。構造式中でこれらの略号で記載した場合、還元末端で別の構造単位とのグリコシド結合に帰属する酸素原子又は窒素原子は、特別な定義がある場合を除き、当該糖鎖を表す略号には含まれないものとして表示される。

[0143] 本発明において、糖鎖の基本単位となる単糖の記載は、別に定める場合を除き、便宜上、その環構造において、環を構成する酸素原子に結合し、且つ、ヒドロキシ基（又はグリコシド結合に帰属する酸素原子）と直接結合した炭素原子を1位（シアル酸においてのみ2位）として表記する。実施例化合物の名称は、化学構造全体として付されたものであり、このルールは必ずしも適用されない。

[0144] 本発明において、糖鎖を記号（例えば、SG、MSG、GlcNAc等）として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N-又はO-グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。

[0145] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、次式：

[0146] [化58]



で示され、抗体Ab又はその機能性断片は、そのアミノ酸残基（例えば、システイン、リシン等）の側鎖から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合している。

[0147] 本発明におけるAbの糖鎖は、N結合型糖鎖やO結合型糖鎖であり、好ましくは、N結合型糖鎖である。

[0148] N結合型糖鎖はNグリコシド結合、O結合型糖鎖はOグリコシド結合により、抗体のアミノ酸側鎖と結合している。

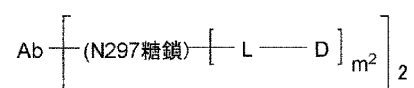
[0149] 本発明におけるAbは、IgGであり、好ましくは、IgG1、IgG2又はIgG4であり、より好ましくは、IgG1又はIgG4であり、特に好ましくは、IgG1である。

[0150] IgGはその重鎖のFc領域における297番目のアスパラギン残基（以下、「Asn297又はN297」という）によく保存されたN結合型糖鎖（以下、「Asn297糖鎖又はN297糖鎖」という）を有しており、抗体分子の活性や動態等に寄与することが知られている（Eon-Duval, A. et al, Biotechnol. Prog. 2012, 28, 608-622、Sanglier-Cianferani, S., Anal. Chem. 2013, 85, 715-736）。

[0151] IgGの定常領域におけるアミノ酸配列はよく保存されており、Edelmanらの報告（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 63, 78-85, (1969)）において、それぞれのアミノ酸がEU番号（EU INDEX）で特定されている。例えば、Fc領域においてN結合型糖鎖が付加するAsn297は、EU番号において297位に相当するものであり、分子の断片化や領域欠損によって実際のアミノ酸位置が変動した場合であってもEU番号で表示することによってアミノ酸が一義的に特定される。

[0152] 下図は本発明の抗体薬物コンジュゲートが抗体又はその機能性断片の前記N297糖鎖からLに結合している場合を示す。

[0153] [化59]



なお、当該リモデリングされた糖鎖を有する抗体を糖鎖リモデリング抗体という。

[0154] SGP ($\alpha 2, 6$ -SGP) は、Sialylglycopeptide

の略であり、N結合型糖ペプチドの代表的なものである。SGPは、例えば、WO2011/027868に記載の方法に従って、鶏卵の卵黄より単離、精製することができる。また、SGPの精製品が東京化成工業及び伏見製薬所から販売されている。本明細書において、SGPの糖鎖部分をSGと表記し、SGの還元末端のGlcNAcが一つ欠損した糖鎖をSG(10)と表記する。SG(10)は、例えば、梅川らの報告(Biochim. Biophys. Acta 2010, 1800, 1203-1209)を参照して、SGPの酵素的な加水分解により調製することができる。また、SG(10)も東京化成工業及び伏見製薬所から購入することができる。

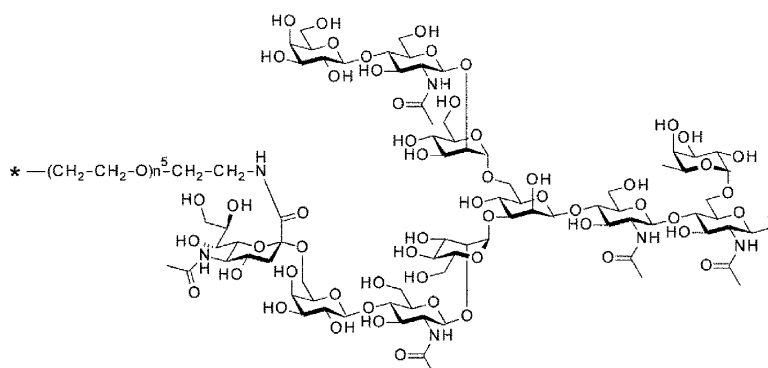
[0155] 本明細書において、SG(10)の β -Manの分岐鎖のいずれか一方のみで非還元末端のシアル酸が欠失した糖鎖構造をMSG(9)と表記し、分岐鎖の1-3糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG1、分岐鎖の1-6糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG2、とそれぞれ表記する。

[0156] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリモデリングされた糖鎖は、N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、又はN297-(Fuc)MSG1とN297-(Fuc)MSG2の混合物であり、好ましくは、N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2であり、より好ましくはN297-(Fuc)SG又はN297-(Fuc)MSG1である。

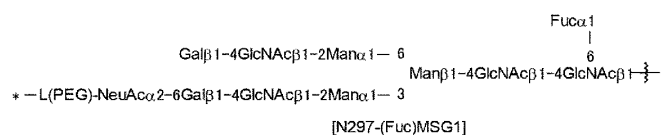
[0157] N297-(Fuc)SGは以下の構造式又は配列式で示される。

[0158]

[化62]



[0163] [化63]



[0164] 上記式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

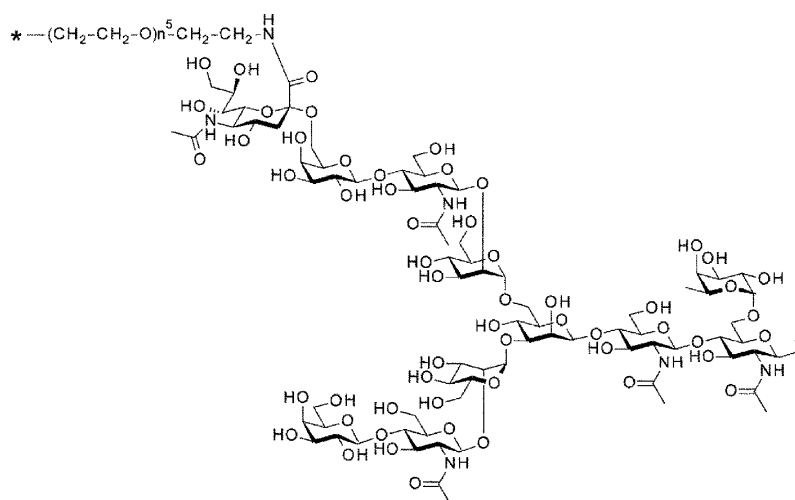
アステリスクは、前記リンカー L、特にリンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、

ここで、 n^5 は、2~10 の整数であり、好ましくは、2~5 の整数である。

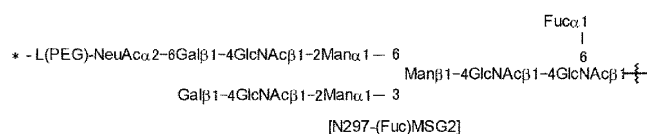
[0165] N 2 9 7 - (F u c) M S G 2 は以下の構造式又は配列式で示される。

[0166]

[化64]



[0167] [化65]



[0168] 上記式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーL、特にリンカーLにおけるL b の1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

ここで、 n^5 は2~10の整数であり、好ましくは、2~5の整数である。

[0169] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN 2 9 7 糖鎖が、N 2 9 7-(F u c) S Gである場合、抗体一分子は重鎖を2つ有しているため、抗体薬物コンジュゲートは4つのリンカーL及び4つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=2$)となる(図1 A参照)。すなわち、抗体薬物コンジュゲ

ートにおける重鎖1つあたりの薬物Dの結合数は2つである。

[0170] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖が、N297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2又はそれらの混合物である場合、抗体一分子は重鎖を2つ有しているため、抗体薬物コンジュゲートは2つのリンカーL及び2つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=1$)となる(図1B参照)。すなわち、抗体薬物コンジュゲートにおける重鎖1つあたりの薬物Dの結合数は1つである。

[0171] N297糖鎖は、好ましくは、N297-(Fuc)SGもしくはN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2であり、より好ましくは、N297-(Fuc)SG又はN297-(Fuc)MSG1であり、さらに好ましくはN297-(Fuc)SGである。

[0172] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖がN297-(Fuc)SGもしくはN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2である場合、均一性の高い抗体薬物コンジュゲートを取得することができる。

[0173] <3. 製造方法>

本発明のCDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体の代表的な製造方法を説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、「式(1)の化合物」、「化合物(1)」等と称する。また、これ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0174] 下記のA法～E法において、置換基 L^1 は、前記と同義である。置換基 L^2 は、下記(i)又は(ii)：

(i) Lと結合するとき、 L^2 は、 $-NHR'$ 、ヒドロキシC1-C6アルキル基又はアミノC1-C6アルキル基を示し、ここで、 R' は、水素原子、C1-C6アルキル基、C2-C6アルケニル基、C2-C6アルキニル基又はC3-C6シクロアルキル基を示し、該C1-C6アルキル基、C2-C6アルケニル基又はC2-C6アルキニル基は、1から6個のハロゲ

ン原子で置換されてもよい；又は

(i i) Lと結合しないとき、 L^2 は、水素原子又はハロゲン原子を示す

、

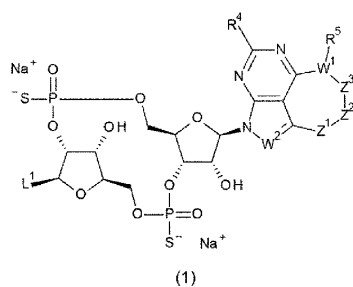
から選択される基を示す。置換基 W^1 は、 $-NH-$ 又は硫黄原子を示す。置換基 W^2 は、 $-CH=$ を示す。置換基 $Z^1 \sim Z^3$ は、一緒になって、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ を示す。置換基 $R^1 \sim R^3$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、 $-OR'$ 、 $-OC(=O)R'$ 、 $-N_3$ 、 $-NHR'$ 、 $-NR'R''$ 又は $-NHC(=O)R'$ （ここで、 R' は、前に定義した通りであり、 R'' は、 $C1-C6$ アルキル基、 $C2-C6$ アルケニル基、 $C2-C6$ アルキニル基又は $C3-C6$ シクロアルキル基を示す）を示す。置換基 R^4 は、水素原子を示す。置換基 R^5 は、 W^1 が窒素原子のとき、 R^5 は水素原子を示し、 W^1 が酸素原子のとき、 R^5 は存在しない。置換基 R^a 、 R^c 、 R^e 及び R^g は、天然型 α -アミノ酸の側鎖を示す。例えば、メチル基、イソプロピル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、ベンジル基等である。 PRO^1 は、第一級アルコールの保護基を示す。好適には、 $4, 4'$ -ジメトキシトリチル基、 4 -メトキシトリチル基等である。 PRO^2 、 PRO^3 、 PRO^7 、 PRO^8 は、第二級アルコールの保護基を示す。好適には*tert*-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリルオキシメチル基、ベンゾイル基、 2 -ニトロベンジル基、 4 -メトキシテトラヒドロピラン- 4 -イル基等である。 PRO^6 はカルボン酸の保護基を示す。好適には、*tert*-ブチル基、ベンジル基等である。 PRO^5 、 PRO^9 は、アミンの保護基を示す。 PRO^5 は、好適には、*tert*-ブチルオキシカルボニル基、 9 -フルオレニルメチルオキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、 $2, 2, 2$ -トリクロロエトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等であり、 PRO^9 は、好適には、 9 -フルオレニルメチルオキシカルボニル基又は 2 -(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基である。 PRO^4 は、アルコール又はアミンの保護基を示す。アルコールの場合、好適には*tert*-ブチルジメチルシリル基、ベンゾイル基等であり、アミンの場合、好適には 2 -(トリメチル

シリル) エトキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、*tert*-ブチルオキシカルボニル基等である。Q^aは酸素原子又は硫黄原子を示し、Q^bはヒドロキシ基又はチオール基を示す。Q^{a'}及びQ^{b'}は、それぞれ独立して、負に荷電した酸素原子(O⁻)又は硫黄原子(S⁻)を示す。R^x及びR^yは、それぞれ独立して、ハロゲン原子又は-O-PRO²を示す。nは1から3の整数を示す。

[0175] A法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される(1)で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA法に従って製造することができる。

[0176] [化66]

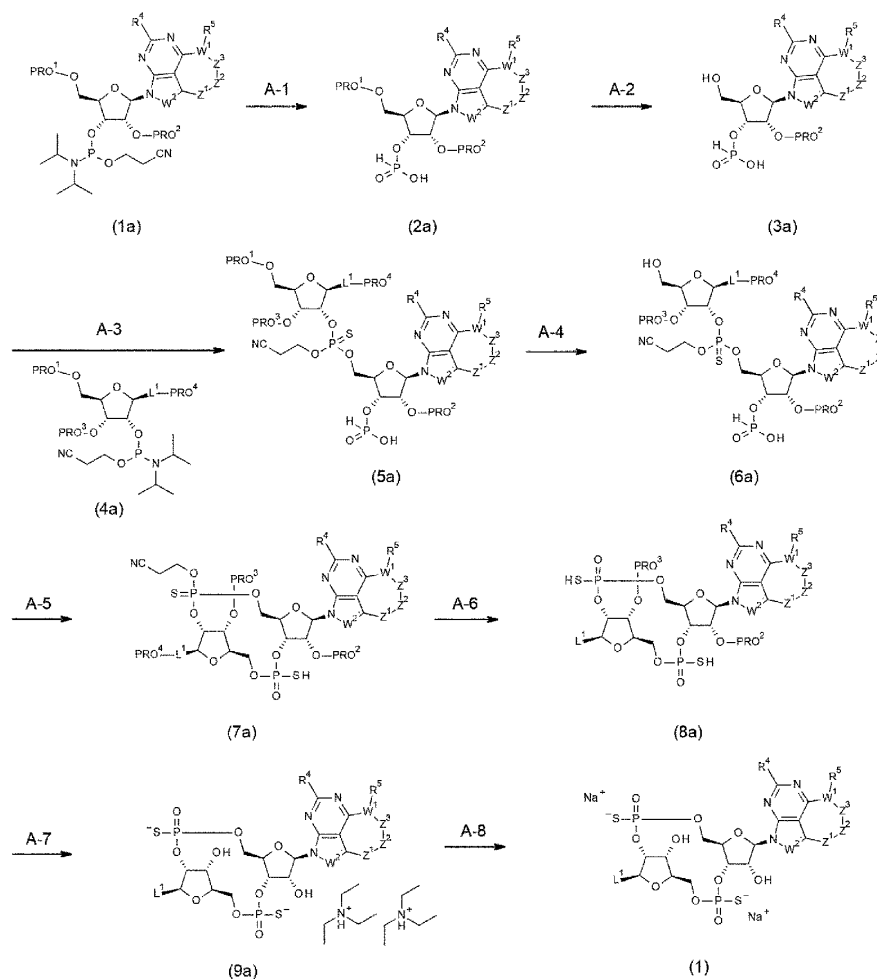


[0177] 本製造法は一般式(1)で表される化合物を製造するための方法である。

本製造法のA-1工程からA-5工程まではワンポット合成が可能であるが、これは、Gaffneyらの報告(Org. Lett. 2010, 12, 3269-3271)を参照して実施することができる。

[0178]

[化67]



[0179] (A-1工程)

本工程は、式(1a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて加水分解反応とシアノエチル基の除去を連続して行うことにより、式(2a)の化合物を製造する工程である。化合物(1a)を溶媒(アセトニトリル、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド又はそれらの混合溶媒)中で、 -10°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 15°C から 35°C までに於いて、水及び酸(ピリジントリフルオロ酢酸塩、4,5-ジシアノイミダゾール、1H-テトラゾール等)で処理することにより加水分解反応を実施した。化合物(1a)1モルに対して、水は2モルから過剰モ

ル、好ましくは2モルから10モル用い、酸は1モルから過剰モル、好ましくは1モルから5モル用いた。反応時間は1分から3時間、好ましくは5分から30分間である。次いで、この反応液に塩基（tert-ブチルアミン等）を添加してシアノエチル基を除去した。塩基は、化合物（1a）1モルに対して過剰モル、好ましくは30モルから50モル用いた。反応時間は、5分から6時間、好ましくは15分から1時間である。反応液を減圧下で濃縮して、化合物（2a）の粗体を得た。化合物（2a）の粗体は、精製せずに次の工程へと進めることができる。

[0180] （A-2工程）

本工程は、式（2a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式（3a）の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、必要に応じて、アセトニトリルを用いて1回から3回共沸し、式（2a）の粗体を乾燥させた。PRO¹が4, 4'-ジメトキシトリチル基の場合、化合物（2a）を溶媒（ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等）中で、-10℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは15℃から35℃までに於いて、水と酸（ジクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等）で処理することにより4, 4'-ジメトキシトリチル基を除去した。化合物（2a）1モルに対して、水は過剰モル、好ましくは10モルから20モル用い、酸は、反応に用いる溶媒で1%から50%（v/v）、好ましくは5%から10%（v/v）まで希釈し、その希釈溶液を過剰モル、好ましくは5モルから15モル用いた。反応時間は1分から3時間、好ましくは5分から30分間である。反応液にピリジンを加えて反応停止処理をした。ピリジンは用いた酸を十分中和できる量、好ましくは酸1モルに対して2モルから10モル用いた。反応液を減圧下で濃縮して、化合物（3a）の粗体を得た。化合物（3a）の粗体を、脱水アセトニトリルを用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物（3a）の0.01Mから1Mのアセトニトリル溶液を得た。得られたアセトニトリル溶液を、そのまま次の工程へと進めた。

[0181] (A-3工程)

本工程は、式(3a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(4a)の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の硫化反応を連続して行うことにより、式(5a)の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、化合物(4a)を、脱水アセトニトリルを用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物(4a)の0.01Mから1Mのアセトニトリル溶液を調製した。この溶液に乾燥剤(粉末状又はペレット状のモレキュラーシーブス3Aもしくはモレキュラーシーブス4A)を添加し、溶液を使用するまで窒素又はアルゴン雰囲気下で保存した。化合物(3a)のアセトニトリル溶液に、5℃から35℃までに於いて、共沸により乾燥させた化合物(4a)のアセトニトリル溶液を添加することによりカップリング反応を実施した。反応時間は、1分から24時間、好ましくは5分から6時間である。次いで、この反応液に硫化剤(N,N-ジメチル-N'-(3-スルファニリデン-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン等)を添加して硫化反応を実施した。硫化剤は化合物(3a)1モルに対して1モルから5モル、好ましくは1モルから2モル用いた。反応時間は5分から24時間、好ましくは30分から6時間である。反応液を減圧下で濃縮して、化合物(5a)の粗体を得た。得られた化合物(5a)の粗体は、そのまま次の工程へと進めた。

[0182] (A-4工程)

本工程は、式(5a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式(6a)の化合物を製造する工程である。PRO¹が4,4'-ジメトキシトリチル基の場合、化合物(5a)の化合物を溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等)中で、-10℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは15℃から35℃までに於いて、水と酸(ジクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等)で処理することにより4,4'-ジメトキシトリチル基を除去した。化合物(5a)1モルに対し

て、水は過剰モル、好ましくは10から20モルを用い、酸は、反応に用いる溶媒で1%から50% (v/v)、好ましくは5%から10% (v/v) まで希釈し、その希釈溶液を過剰モル、好ましくは5モルから15モル用いた。反応時間は1分間から3時間、好ましくは5分間から30分間である。反応液にピリジンを加えて反応停止処理をした。ピリジンは用いた酸を十分中和できる量、好ましくは酸1モルに対して10モルから200モル用いた。反応液を減圧下で濃縮して、化合物(6a)の粗体を得た。得られた化合物(6a)の粗体を、そのまま次の工程へと進めた。

[0183] (A-5工程)

本工程は、式(6a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と硫化反応を連続して行い、式(7a)の化合物を製造する工程である。化合物(6a)をピリジンに溶解後、減圧下で濃縮して0.01Mから0.5Mのピリジン溶液を調製した。このピリジン溶液に、5℃から35℃までに於いて、脱水縮合剤(2-クロロ-5,5-ジメチル-1,3,2λ⁵-ジオキサホスフィナン-2-オン等)を添加することにより環化反応を実施した。脱水縮合剤は、化合物(6a)1モルに対して、1モルから過剰モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は1分間から6時間、好ましくは5分間から1時間である。次いで、この反応液に水と硫化剤(3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン、N,N-ジメチル-N'-(3-スルファニリデン-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド等)とを添加して硫化反応を実施した。化合物(6a)1モルに対して、水は過剰モル、好ましくは30モルから50モル用い、硫化剤は1モルから5モル、好ましくは1モルから2モル用いた。反応時間は5分間から12時間、好ましくは30分間から3時間である。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液(0.1Mから1Mまで)に加えた後、15分間から24時間攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒(酢酸エチル、ジエチルエーテル、トルエン又はそれらの混合溶媒)で1回から5回抽出した後、抽出液を併せて無水塩(無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム)で乾燥

した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール、酢酸エチル／メタノール、ヘキサン／酢酸エチル等〕、C 1 8 シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（7 a）を2種類以上のジアステレオマー混合物又は2種類以上の純粋なジアステレオマーとして得た。本工程では多くの場合、2種類のジアステレオマーが得られるが、原料（1 a）及び（4 a）に依存して、更に1種類又は2種類のジアステレオマーが得られることもある。得られた化合物（7 a）が複数のジアステレオマー混合物であっても、それ以上の精製をせずに次の工程へと進めることができる。

[0184] （A－6工程）

本工程は、式（7 a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてシアノエチル基及び全てのアシル系保護基を同時に除去し、式（8 a）の化合物を製造する工程である。本工程は、必要に応じてオートクレーブ中、又はシールドチューブ中で実施した。P R O⁴がベンゾイル基の場合、化合物（7 a）の化合物を溶媒（メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン又はそれらの混合溶媒）中で、5℃から反応に用いる溶媒の沸点までに於いて、28%（v／v）アンモニア水で処理することによりシアノエチル基とベンゾイル基を除去した。アンモニアは、化合物（7 a）1モルに対して過剰モル、好ましくは300モルから3000モル用いた。反応時間は30分間から96時間、好ましくは2時間から48時間である。必要に応じて反応液を濃縮し、残留物を分取H P L C〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕、C 1 8 シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（8 a）を得た。得られた化合物（8 a）がジアステレオマー混合物であっても、それ以上の精製をせずに次の工程へと進めることができる。また、本工程では精製をせずにそのまま次の工程へと進めることもできる。

[0185] （A－7工程）

本工程は、式（８a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて全てのシリル系保護基を同時に除去し、式（９a）の化合物を製造する工程である。PRO²及びPRO³がtert-ブチルジメチルシリル基の場合、化合物（８a）を、５℃から１００℃まで、好ましくは３５℃から６０℃までに於いて、直接トリエチルアミン三フッ化水素酸塩で処理することによりtert-ブチルジメチルシリル基を除去した。トリエチルアミン三フッ化水素酸塩は、化合物（８a）１モルに対して過剰モル、好ましくは１００から２００モル用いた。反応時間は３０分間から２４時間、好ましくは２時間から１２時間である。反応液を室温まで冷却後、反応液に氷冷した１M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液とトリエチルアミンの３：１から１０：１（v/v）の混合溶液を少しずつ注いで反応停止処理をした。必要に応じて、反応液を氷冷した１M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液とトリエチルアミンの混合溶液に注いでもよい。この場合は、反応容器をアセトニトリルと水で洗浄した。トリエチルアミンは反応液の液性を弱塩基性へと変化させられる十分量、好ましくはトリエチルアミン三フッ化水素酸塩１モルに対して、トリエチルアミンを約２モル用いる。反応液の有機溶媒成分を減圧下で留去した後、残留した水溶液を分取HPLC〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（９a）を単一のジアステレオマーとして得た。

[0186] （A－８工程）

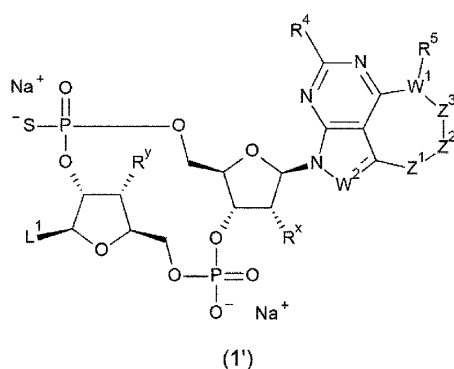
本工程は、式（９a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてイオン交換し、式（１）の化合物を製造する工程である。陽イオン交換樹脂（BTAG（登録商標）５０W-X2レジン，１００－２００メッシュ，水素型）を純水に懸濁させ、空のカラムカートリッジに充填した。陽イオン交換樹脂は、重量比で化合物（９a）の１０倍から５０倍量用いた。過剰の純水を自然流下させた後、１M水酸化ナトリウム水溶液を３カラム体積自然流下させ、次いで、６カラム体積の純水を自然流下させた。化合物（９a）

を約3カラム体積の純水に溶解して、カラムにチャージした。化合物が純水に溶解しにくい場合は、少量の有機溶媒（アセトニトリル、メタノール等）との混合液を用いてもよい。自然流下した溶液を分取後、更に6カラム体積の純水等で溶出し、画分を分取した。目的物を含む画分を併せて凍結乾燥し、化合物（1）を単一のジアステレオマーとして得た。

[0187] A' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1'）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA'法に従って製造することができる。

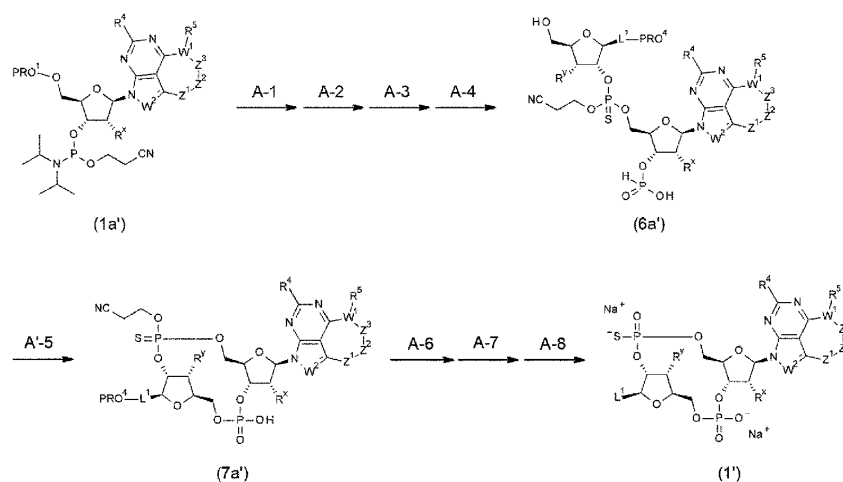
[0188] [化68]



[0189] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1'）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1'）の化合物はA法A-5工程を以下に示すA'-5工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0190]

[化69]



[0191] (A' - 5 工程)

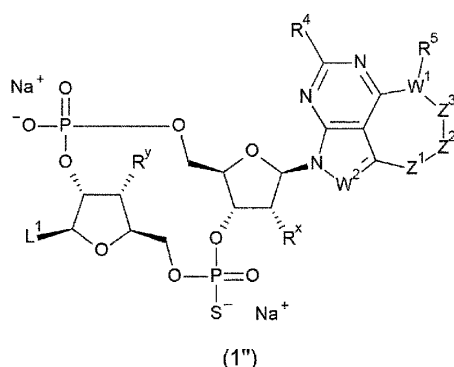
本工程は、式(6a')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と酸化反応を連続して行い、式(7a')の化合物を製造する工程である。化合物(6a')をピリジンに溶解後、減圧下で濃縮して0.01Mから0.5Mのピリジン溶液を調製した。このピリジン溶液に、5℃から35℃までに於いて、脱水縮合剤(2-クロロ-5,5-ジメチル-1,3,2λ⁵-ジオキサホスフィナン-2-オン等)を添加して環化反応を実施した。脱水縮合剤は、化合物(6a')1モルに対して、1モルから過剰モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は1分から6時間、好ましくは5分から1時間である。次いで、この反応液に水と酸化剤(ヨウ素等)を添加して酸化反応を実施した。化合物(6a')1モルに対して、水は0モルから過剰モル、好ましくは30モルから50モル用い、酸化剤は2モルから10モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は5分から12時間、好ましくは30分から3時間である。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液(0.1Mから1Mまで)に加え、15分から24時間攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒(酢酸エチル、ジエチルエーテル、トルエン又はそれらの混合溶媒)で1回から5回抽出した後、抽出液を併せて無水塩(無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム)で乾燥し

た。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール、酢酸エチル／メタノール、ヘキサン／酢酸エチル等〕、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（7a'）を得た。

[0192] A' ' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1' '）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA' '法に従って製造することができる。

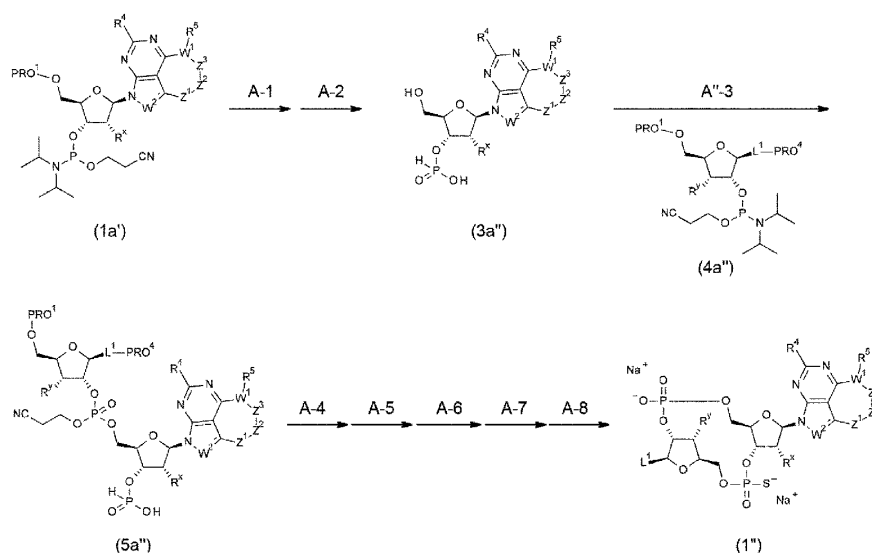
[0193] [化70]



[0194] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1' '）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1' '）の化合物は、A法のA-3工程を以下に示すA' '-3工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0195]

[化71]



[0196] (A' ' - 3 工程)

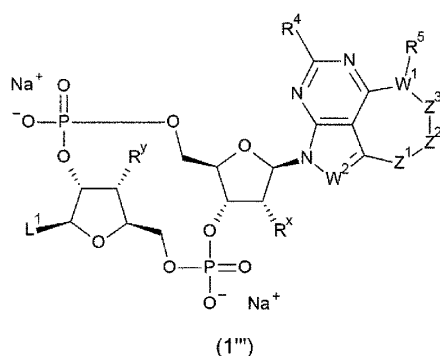
本工程は、式 (3 a' ') の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式 (4 a' ') の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の酸化反応を連続して行うことにより、式 (5 a' ') の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、化合物 (4 a' ') を、脱水アセトニトリルを用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物 (4 a' ') の0.01 Mから1 Mのアセトニトリル溶液を調製した。この溶液に乾燥剤（粉末状又はペレット状のモレキュラーシーブス3 Aもしくはモレキュラーシーブス4 A）を添加し、溶液を使用するまで窒素又はアルゴン雰囲気下で保存した。化合物 (3 a' ') のアセトニトリル溶液に、5℃から35℃までに於いて、共沸により乾燥させた化合物 (4 a' ') のアセトニトリル溶液を添加することによりカップリング反応を実施した。反応時間は、1分間から24時間、好ましくは5分間から6時間である。次いで、この反応液に酸化剤（t e r t -ブチルヒドロペルオキシド等）を添加して酸化反応を実施した。酸化剤は化合物 (3 a' ') 1モルに対して1モルから5モル、好ましくは2モルから3モル用いた。反応時

間は5分間から24時間、好ましくは30分間から6時間である。反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、10分間から12時間攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒（ジクロロメタンとメタノールの混合溶媒等）で1回から5回抽出した後、抽出液を併せて無水塩（無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム）で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮し、化合物（5a'）の粗体を得た。得られた化合物（5a'）の粗体をそのまま次の工程へと進めた。

[0197] A' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1'）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA'法に従って製造することができる。

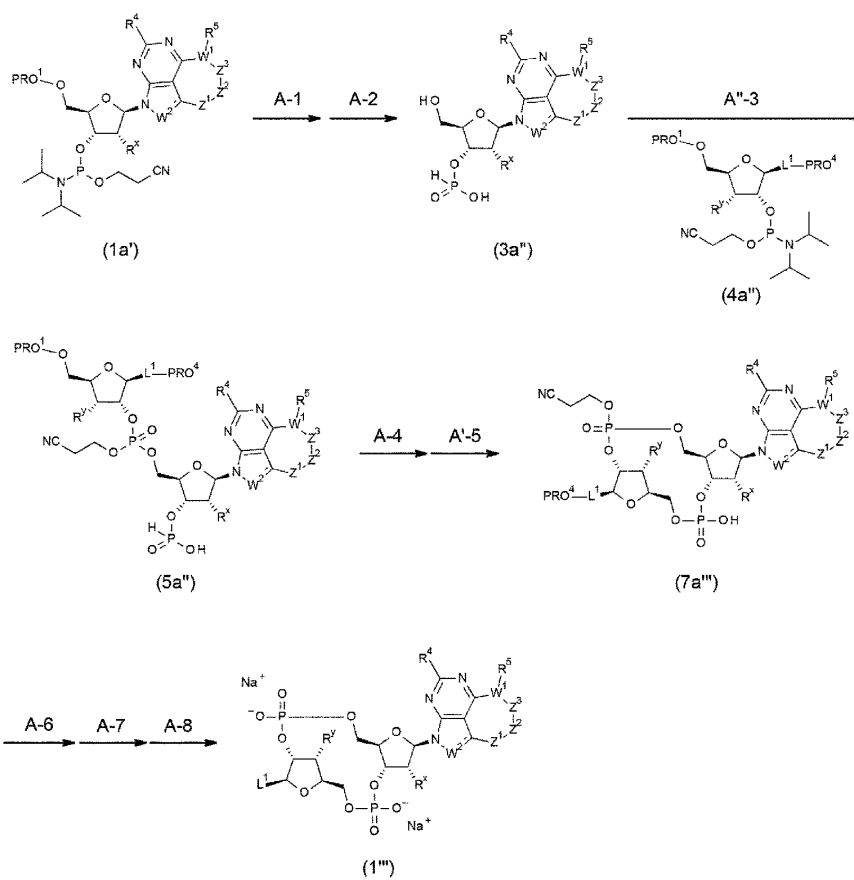
[0198] [化72]



[0199] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1'）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1'）の化合物は、A法のA-3工程をA'-3工程に、A-5工程をA'-5工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0200]

[化73]

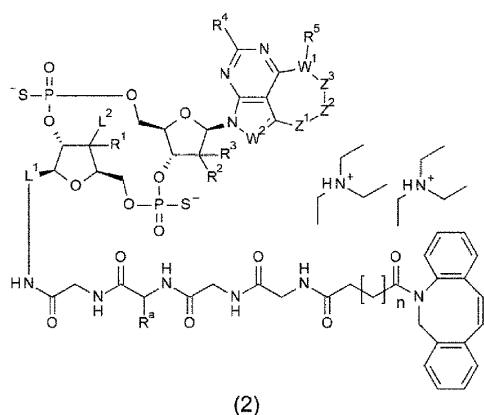


[0201] B法：コンジュゲーション前駆体（糖鎖コンジュゲーション）

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（2）で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するB法に従って製造することができる。

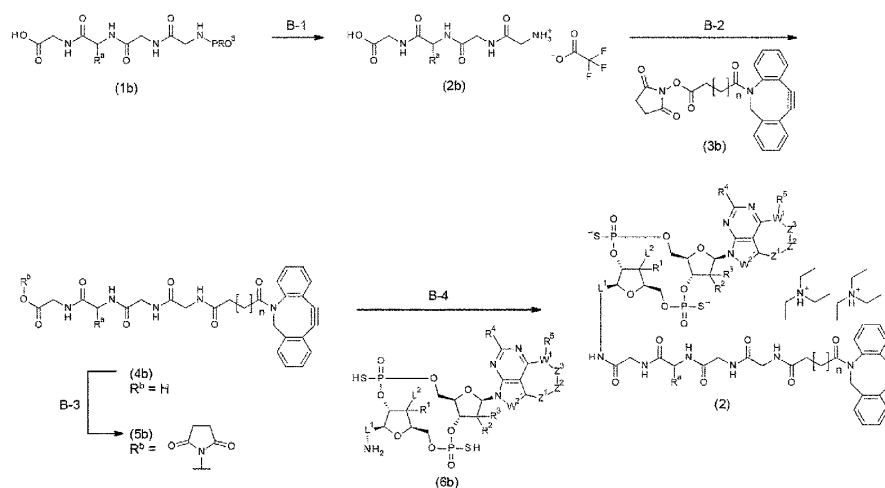
[0202]

[化74]



[0203] 本製造法は、 L^1 の任意の位置に $-NH_2$ が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体(2)を製造するための方法である。

[0204] [化75]



[0205] (B-1工程)

本工程は、式(1b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去することにより、式(2b)の化合物を製造する工程である。P R O⁵が t e r t -ブチルオキシカルボニル基の場合、化合物(1b)を溶媒(ジクロロメタン、ジオキサン、アセトニトリル、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、又はそれらの混合溶媒)中で、 $-10^{\circ}C$ から反応に用いる溶媒の

沸点まで、好ましくは15℃から35℃までに於いて、トリフルオロ酢酸で処理することにより保護基を除去した。トリフルオロ酢酸は、化合物(1b)1モルに対して過剰モル、好ましくは20モルから50モル用いた。反応時間は5分間から24時間、好ましくは30分間から6時間である。反応液を減圧下で濃縮した後、トルエンに懸濁させて再度減圧下で濃縮した。この操作を2回から5回繰り返した。溶媒(ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル又はそれらの混合溶媒)を加えてスラリー状にした後、固体を濾取し、化合物(2b)の粗体を得た。化合物(2b)の粗体は、これ以上の精製をせずに次の工程へと進めた。

[0206] (B-2工程)

本工程は、式(2b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(3b)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(4b)の化合物を製造する工程である。化合物(2b)を溶媒(N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、N,N-ジメチルアセトアミド、アセトニトリル等)中で、5℃から35℃までに於いて、塩基(トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等)及び化合物(3b)と反応させることによりアミド化を実施した。化合物(2b)1モルに対して、塩基は1モルから5モル用い、化合物(3b)は0.5モルから1.5モル用いた。反応時間は10分間から72時間、好ましくは1時間から24時間である。反応液を有機溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノール又はその混合溶媒)と水又は酸性水溶液(0.1から1Mの塩酸、クエン酸水溶液等)との二層に注ぎ、有機溶媒で1回から5回抽出した。抽出液を併せて飽和食塩水で洗浄後、無水塩(無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム)で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。なお、上記分液操作を省略し、反応液をそのまま減圧下で濃縮して次のシリカゲルカラム精製へと進めることもできる。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタン/メタノール、酢酸エチル/メタノール等]で精製し、化合物(4b)を得た。必要に応じて、得られた化合物(4b)を良

溶媒（酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、メタノール又はそれらの混合溶媒）に溶解した後、貧溶媒（ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン等）を加えて再沈殿し、固体を濾取することで純度を上げることができる。

[0207] (B-3工程)

本工程は、式(4b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことによって、式(5b)の化合物を製造する工程である。化合物(4b)を、溶媒(N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、アセトニトリル等)中で、5℃から35℃までに於いて、N-ヒドロキシスクシンイミド及び縮合剤(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等)と反応させることによりエステル化を実施した。N-ヒドロキシスクシンイミド及び縮合剤は、化合物(4b)1モルに対して、それぞれ1モルから3モル用いた。反応時間は30分から72時間、好ましくは2時間から24時間である。反応液を有機溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル又はその混合溶媒)で薄めた後、氷水で3回から5回洗浄した。有機層を無水塩(無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム)を用いて乾燥した。乾燥剤を濾去した後、濾液を減圧下で濃縮して化合物(5b)の粗体を得た。必要に応じて、得られた化合物(5b)をC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔アセトニトリルのみ〕で精製してもよい。また、得られた化合物(5b)を良溶媒(酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン又はそれらの混合溶媒)に溶解した後、貧溶媒(ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン等)を加えて再沈殿し、固体を濾取することで純度を上げることができる。

[0208] (B-4工程)

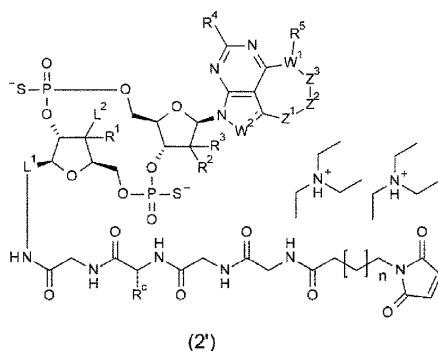
本工程は、式(5b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式(6b)の化合物との縮合反応を行うことにより、式(2)の化合物を製造する工程である。化合物(6b)を溶媒中(N,N-ジメチルホルムアミ

ド、N，N－ジメチルアセトアミド、N－メチルピロリドン、アセトニトリル等）で、－１０℃から１００℃まで、好ましくは１５℃から３５℃までに於いて、塩基（トリエチルアミン、N，N－ジイソプロピルエチルアミン等）及び化合物（５b）と反応させることにより縮合反応を実施した。化合物（６b）１モルに対して、塩基は２モルから５モル用い、化合物（５b）は１モルから２モル用いた。反応時間は５分間から２４時間、好ましくは１時間から６時間である。反応液にベンジルアミンを加えて反応停止処理をした。ベンジルアミンは化合物（６b）１モルに対して４モルから１０モル用いた。必要に応じて反応液を減圧下で部分的に濃縮し、残留した溶液を分取ＨＰＬＣ〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕、Ｃ１８シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（２）を得た。

[0209] B' 法：コンジュゲーション前駆体（システインコンジュゲーション）

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（２'）で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するB' 法に従って製造することができる。

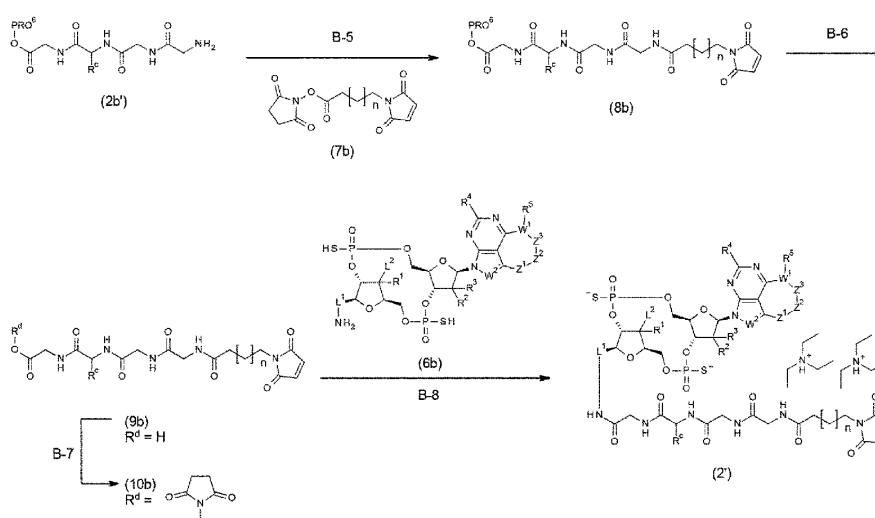
[0210] [化76]



[0211] 本製造法は、L¹の任意の位置に－NH₂が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体（２'）を製造するための方法である。

[0212]

[化77]



[0213] (B-5工程)

本工程は、式(2b')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(7b)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(8b)の化合物を製造する工程である。塩基を使用しないこと以外は、B法B-2工程に記載された手法に従って化合物(8b)を得た。

[0214] (B-6工程)

本工程は、式(8b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去することにより式(9b)の化合物を製造する工程である。PRO⁶がtert-ブチル基の場合、精製操作にシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール〕を用いること以外は、B法B-1工程に記載された手法にしたがって化合物(9b)を得た。

[0215] (B-7工程)

本工程は、式(9b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことにより、式(10b)の化合物を製造する工程である。B法B-3工程に記載された手法に従って化合物(10b)を得た。

[0216] (B-8工程)

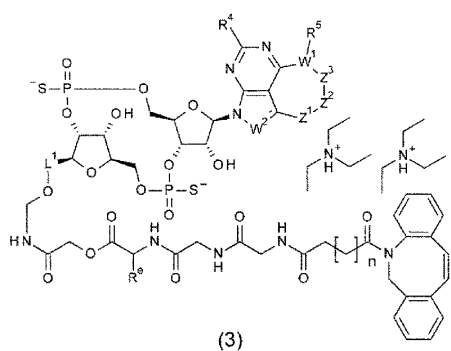
本工程は、式(6b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、

式（１０ｂ）の化合物との縮合反応を行うことによって、式（２'）の化合物を製造する工程である。Ｂ法Ｂ－４工程に記載された手法に従って化合物（２'）を得た。

[0217] Ｃ法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（３）で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するＣ法に従って製造することができる。

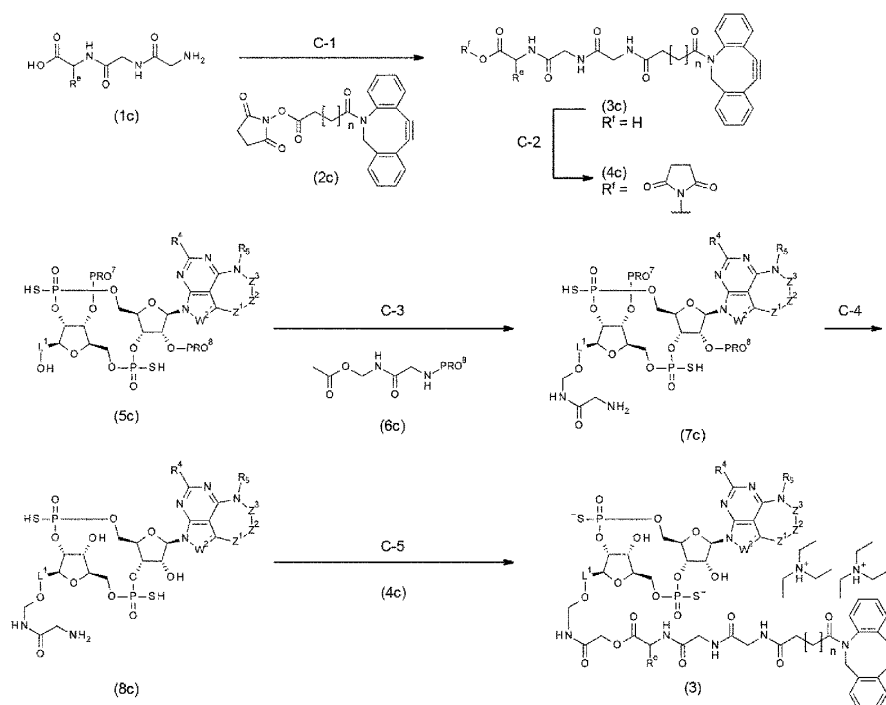
[0218] [化78]



[0219] 本製造法は、 L^1 の任意の位置にヒドロキシ基が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体（３）を製造するための方法である。

[0220]

[化79]



[0221] (C-1工程)

本工程は、式(1c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(2c)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(3c)の化合物を製造する工程である。B法B-2工程に記載された手法に従って化合物(3c)を得た。

[0222] (C-2工程)

本工程は、式(3c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことにより、式(4c)の化合物を製造する工程である。B法B-3工程に記載された手法に従って化合物(4c)を得た。

[0223] (C-3工程)

本工程は、式(5c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(6c)の化合物とのカップリング反応(アミノメチレン化)と得られたカップリング体の脱保護を連続して行うことによって、式(7c)の化合物を

製造する工程である。PRO⁹が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基の場合、化合物(5c)を、テトラヒドロフラン中で、5℃から35℃までに於いて化合物(6c)及び酸(p-トルエンスルホン酸等)と反応させることによりアミノメチレン化を実施した。化合物(5c)1モルに対して、化合物(6c)は1モルから20モル、好ましくは2モルから10モル用い、酸は0.05モルから過剰モル、好ましくは0.1モルから3モル用いた。反応時間は30分間から72時間、好ましくは2時間から24時間である。次いで、反応液に塩基(1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等)を加え、脱保護を実施した。反応液が懸濁している場合には、必要に応じて溶媒(N,N-ジメチルホルムアミド等)を追加して溶解させた後に反応させることができる。塩基は化合物(5c)1モルに対して過剰モル、好ましくは5モルから20モル用いた。反応時間は10分間から24時間、好ましくは2時間から12時間である。反応液に水を加え、そのままC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[緩衝液/アセトニトリル等]で精製し、化合物(7c)を得た。

[0224] (C-4工程)

本工程は、式(7c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去し、式(8c)の化合物を製造する工程である。PRO⁷及びPRO⁸がtert-ブチルジメチルシリル基の場合、A法A-7工程に記載された手法に従って化合物(8c)を得た。

[0225] (C-5工程)

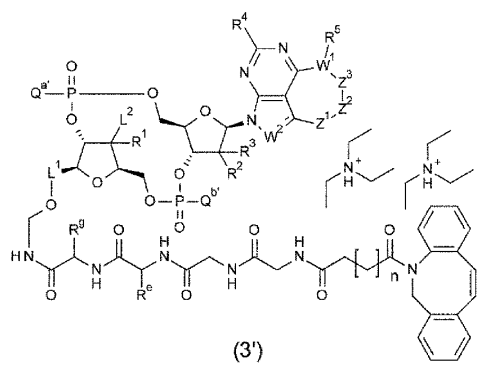
本工程は、式(8c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式(4c)の化合物との縮合反応を行うことによって、式(3)の化合物を製造する工程である。B法B-4工程に記載された手法に従って化合物(3)を得た。

[0226] C'法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される(3')で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するC'法に従って製造することができ

る。

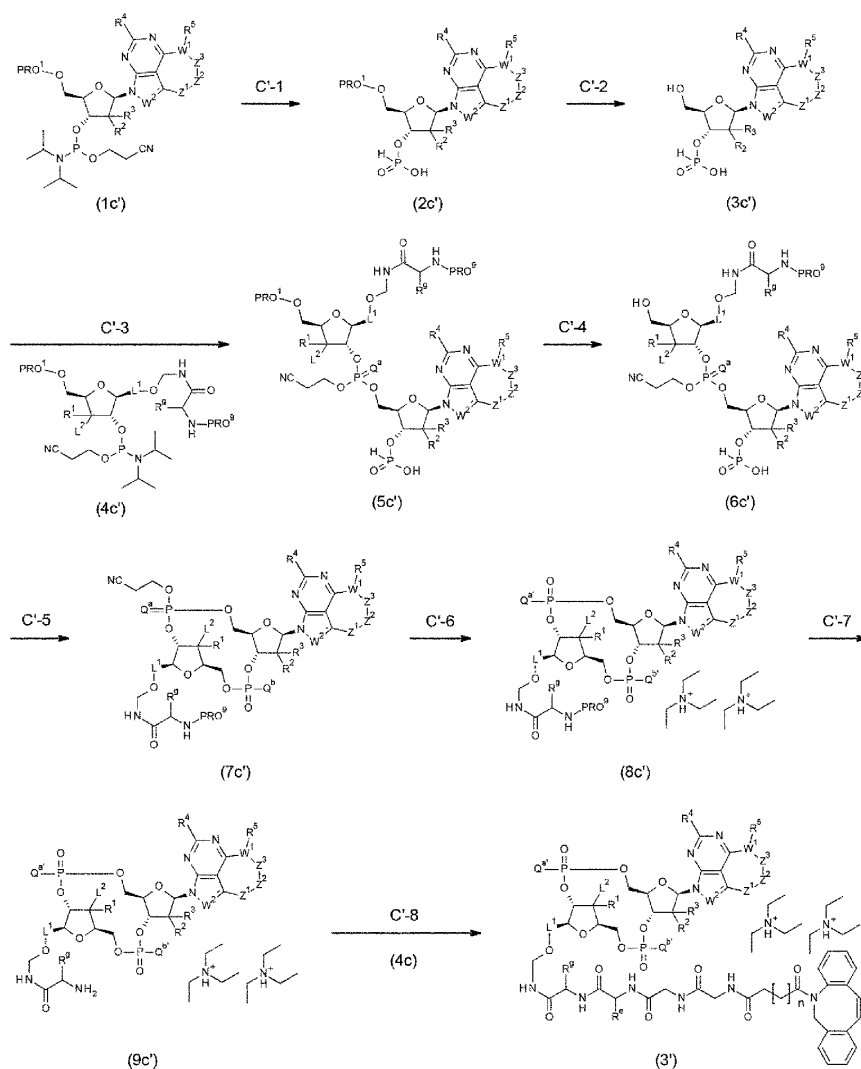
[0227] [化80]



[0228] 本製造法は、L¹の任意の位置にヒドロキシ基が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体（3'）を製造するための方法である。

[0229]

[化81]



[0230] (C' - 1 工程)

本工程は、式 (1 c') の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて加水分解反応とシアノエチル基の除去を連続して行うことにより、式 (2 c') の化合物を製造する工程である。A 法 A - 1 工程に記載された手法に従って化合物 (2 c') を得た。

[0231] (C' - 2 工程)

本工程は、式 (2 c') の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒ

ドロキシ基の保護基を除去し、式（3 c'）の化合物を製造する工程である。
。A法A-2工程に記載された手法に従って化合物（3 c'）を得た。

[0232] （C' - 3工程）

本工程は、式（3 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式（4 c'）の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の硫化反応又は酸化反応を連続して行うことにより、式（5 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-3工程又はA'法A'-3工程に記載された手法に従って化合物（5 c'）を得た。

[0233] （C' - 4工程）

本工程は、式（5 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式（6 c'）の化合物を製造する工程である。
。A法A-4工程に記載された手法に従って化合物（6 c'）を得た。

[0234] （C' - 5工程）

本工程は、式（6 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と硫化反応又は酸化反応を連続して行い、式（7 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-5工程又はA'法A'-5工程に記載された手法に従って化合物（7 c'）を得た。

[0235] （C' - 6工程）

本工程は、式（7 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてシアノエチル基及び全てのアシル系保護基を同時に除去し、式（8 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-6工程に記載された手法に従って化合物（8 c'）を得た。

[0236] （C' - 7工程）

本工程は、式（8 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて全てのシリル系保護基を同時に除去し、式（9 c'）の化合物を製造する工程である。PRO⁹が2-（トリメチルシリル）エトキシカルボニル基の場合、化合物（8 c'）を、5℃から100℃まで、好ましくは35℃から60℃までに於いて、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液

で処理することにより、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基を除去した。フッ化テトラブチルアンモニウムは、化合物(8c') 1モルに対して過剰モル、好ましくは10から30モル用いた。反応時間は1時間から48時間、好ましくは4時間から24時間である。反応液に緩衝液を加えて希釈後、必要に応じて有機溶媒成分を減圧下で留去した。残留物を分取HPLC[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物(9c')を得た。

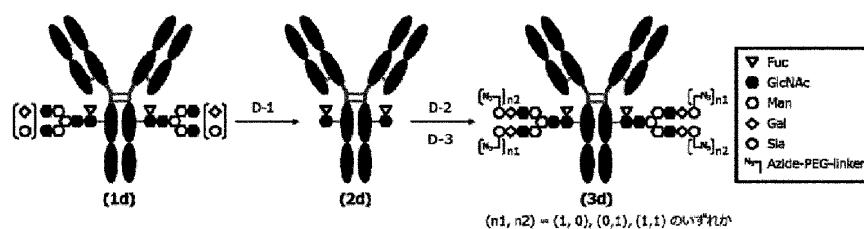
[0237] (C' - 8工程)

本工程は、式(9c')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式(4c)の化合物との縮合反応を行うことによって、式(3')の化合物を製造する工程である。B法B-4工程に記載された手法に従って化合物(3')を得た。

[0238] D法：糖鎖リモデリング抗体の製造

糖鎖リモデリング抗体は、例えばWO2018/003983、WO2020/050406、WO2021/177438、WO2022/050300、PLOS ONE 2018, 13, e0193534などに記載の方法に準じて、次式に示す方法で製造することができる。

[0239] [化82]



[0240] (D - 1工程)

本工程は、目的の抗体に対して、公知の酵素反応を用いて抗体重鎖のアミノ酸配列297番目のアスパラギンに結合するN結合型糖鎖(N297結合

糖鎖)の還元末端キトビオース構造のGlcNAc β 1-4GlcNAc間のグリコシド結合を加水分解により切断し、糖鎖切断抗体を製造する工程である。目的の抗体(1d)(10mg/mL)を緩衝液(リン酸緩衝液等)中、0℃から40℃までにおいて、野生型EndoS酵素等の加水分解酵素を用いて還元末端のキトビオース構造のGlcNAc β 1と4GlcNAc間のグリコシド結合の加水分解反応を実施した。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。野生型EndoS酵素は抗体(1d)100mgに対して、0.1mgから10mg、好ましくは0.1mgから3mgを用いた。反応終了後、アフィニティークロマトグラフィー(HiTrap rProtein A FF(5ml)(GEヘルスケア製))及び/又はハイロドキシアパタイトカラム(Bio-Scale Mini CHT Type Iカートリッジ(5ml)(BIO-RAD製))で精製し、(Fuc α 1, 6)GlcNAc抗体(2d)を得た。

[0241] (D-2工程)

本工程は、D-1工程で得られた(Fuc α 1, 6)GlcNAc抗体(2d)に対し、公知の酵素反応を用いてアジド基を含むPEGリンカーを有するSG型又はMSG(MSG1、MSG2)型糖鎖オキサゾリン体(以下、「アジド糖鎖オキサゾリン体」)を結合させ、糖鎖リモデリング抗体(3d)を製造する工程である。

[0242] 抗体(2d)を緩衝液(リン酸緩衝液等)中、0℃から40℃までにおいて、EndoS(D233Q/Q303L)等の糖転移酵素存在下、アジド糖鎖オキサゾリン体と反応させることで、糖鎖転移反応を実施した。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。EndoS酵素(D233Q/Q303L)は抗体100mgに対して、1mgから10mg、好ましくは1mgから3mgを用い、アジド糖鎖オキサゾリン体は2当量から過剰当量、好ましくは4当量から20当量用いた。反応終了後、アフィニティークロマトグラフィー(HiTrap rProtein A FF(5ml)(GEヘルスケア製))及びハイロドキシアパタイトカラ

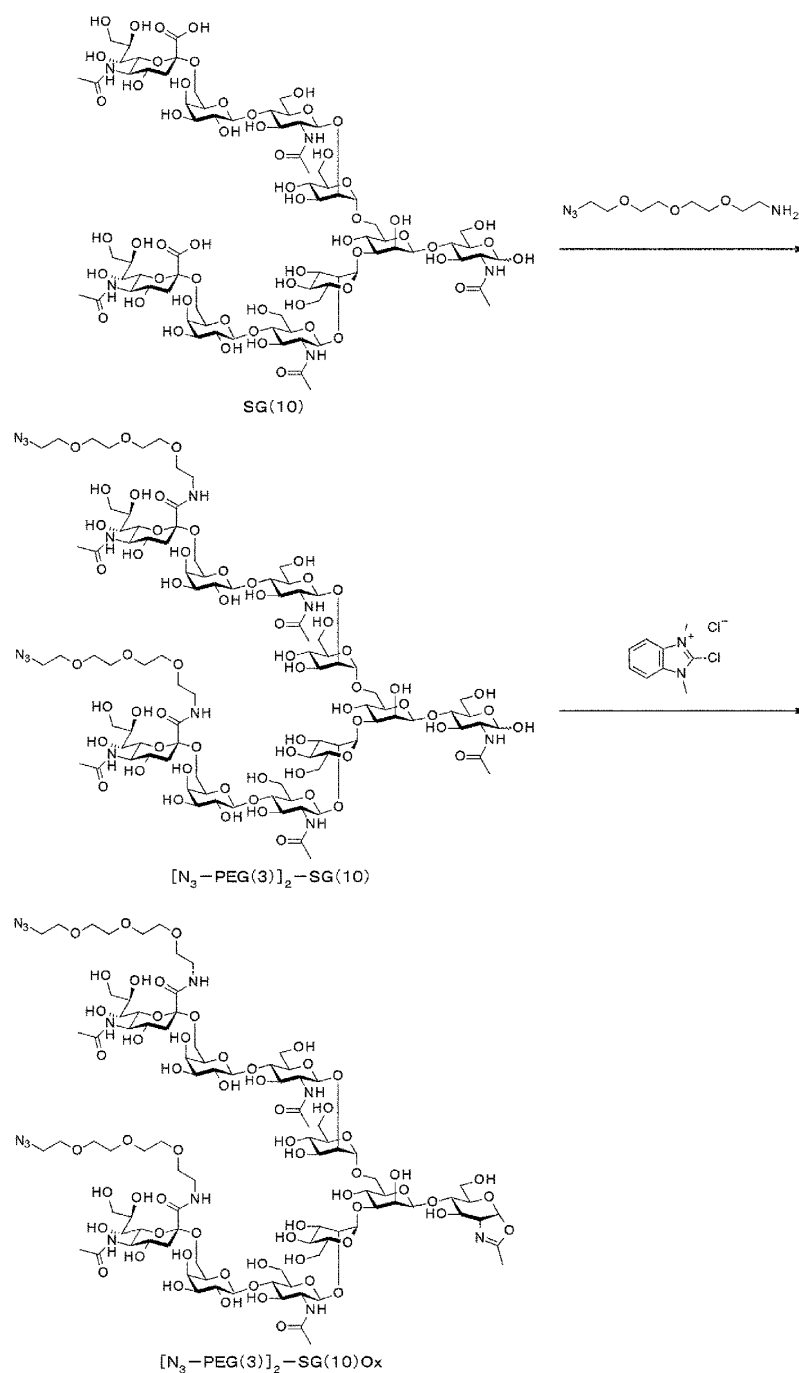
μ (Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ (5 ml) (BIO-RAD 製)) で精製し、糖鎖リモデリング抗体 (3 d) を得た。

[0243] 上記の糖鎖リモデリング抗体の調製において、抗体水溶液の濃縮、濃度測定、並びにバッファー交換は、後述の共通操作 A から C に従って行うことができる。

[0244] なお、SG 型のアジド糖鎖オキサゾリン体は WO 2018/003983 に記載の方法に準じて合成した。一例として $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)-Ox$ (WO 2018/003983 に記載の化合物 1-10) の合成方法を次式に示す。

[0245]

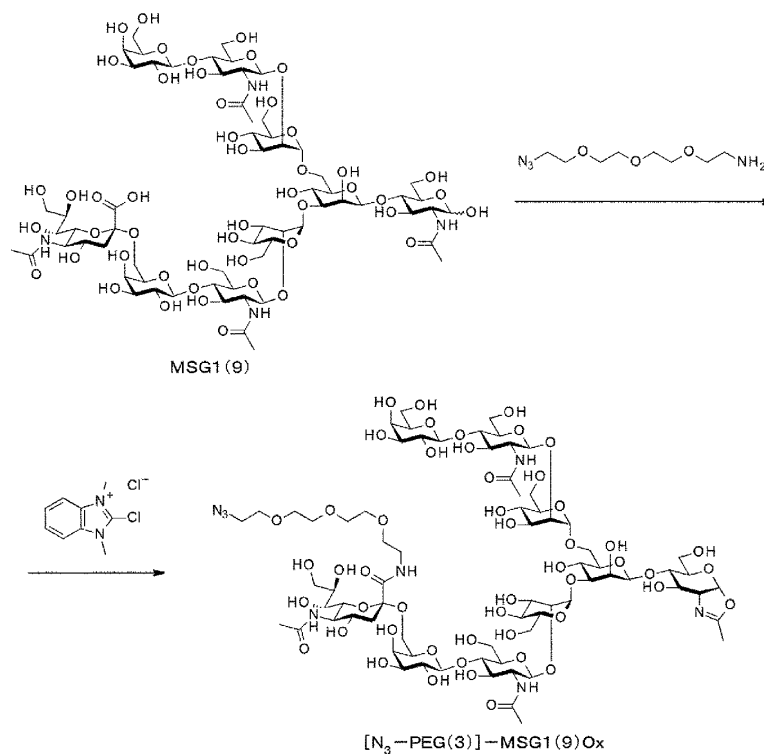
[化83]



[0246] MSG型のアジド糖鎖オキサゾリン体もWO2018/003983に記載の方法に準じて合成した。一例として [N₃-PEG(3)]-MSG1 (

9) -Ox (WO 2018/003983に記載の化合物1-11)の合成方法を次式に示す。

[0247] [化84]



[0248] (D-3工程)

本工程は、D-1工程で得られた(Fuc α 1,6)GlcNAc抗体(2d)に対し、2種類のEndo酵素を使用した糖鎖転移反応により、糖鎖リモデリング抗体(3d)を製造する工程である。2種類の酵素を同時に用いることで、還元末端が活性化されていないSGPや(SG)Asnなどを糖鎖ドナーとして、抗体のN297糖鎖へ、直接糖鎖転移させることができる。

[0249] 使用する2種類のEndo酵素に関して、酵素-B(EndoM様酵素)及び酵素-A(EndoS様酵素)を適切に組合せることができる。

[0250] 酵素-Bとしては、EndoM、EndoOm、EndoCCとその加水分解活性を低下させたEndoM変異体、EndoOm変異体、EndoC

C変異体などを例示できる。酵素-Bとして好ましいものは、EndoM N175Q、EndoCC N180H、EndoOm N194Qである。

[0251] 酵素-Aとしては、EndoS、EndoS2 (EndoS49) 及びそれらの加水分解活性を低下させたEndoS変異体、EndoS2 (EndoS49) 変異体などを例示できる。酵素-Aとして好ましいものは、EndoS D233Q、EndoS D233Q/Q303L、EndoS D233Q/E350A、EndoS D233Q/E350Q、EndoS D233Q/E350D、EndoS D233Q/E350N、EndoS D233Q/D405A、EndoS2 D184M、EndoS2 T138Qなどである。

[0252] 糖鎖ドナーとしては、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-Asn-PEG(3)-N_3$ 、 $[N_3-PEG(3)]-MSG1-Asn-PEG(3)-N_3$ 、 $[N_3-PEG(3)]-MSG2-Asn-PEG(3)-N_3$ などを用いることができる。

[0253] 抗体(2d)を緩衝液(トリス緩衝液等)中、酵素-B (EndoM様酵素) 及び酵素-A (EndoS様酵素) の糖転移酵素存在下、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-Asn-PEG(3)-N_3$ と反応させることで、糖鎖転移反応を実施する。反応温度は、用いる酵素の至適温度に応じて適宜選択することができるが、通常15～50℃であり、好ましくは、25～40℃である。反応時間は、2時間～48時間の間で、適宜選択できる。反応終了後、反応スケールに適した精製方法(アフィニティークロマトグラフィー、ハイロドキシアパタイトカラムなど)や限外ろ過方法(限外ろ過膜)を選択し、糖鎖リモデリング抗体(3d)を得ることができる。

[0254] 上記の糖鎖リモデリング抗体の調製において、抗体水溶液の濃縮、濃度測定、並びにバッファー交換は、後述の共通操作AからCに従って行うことができる。

[0255] なお、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-Asn-PEG(3)-N_3$ は

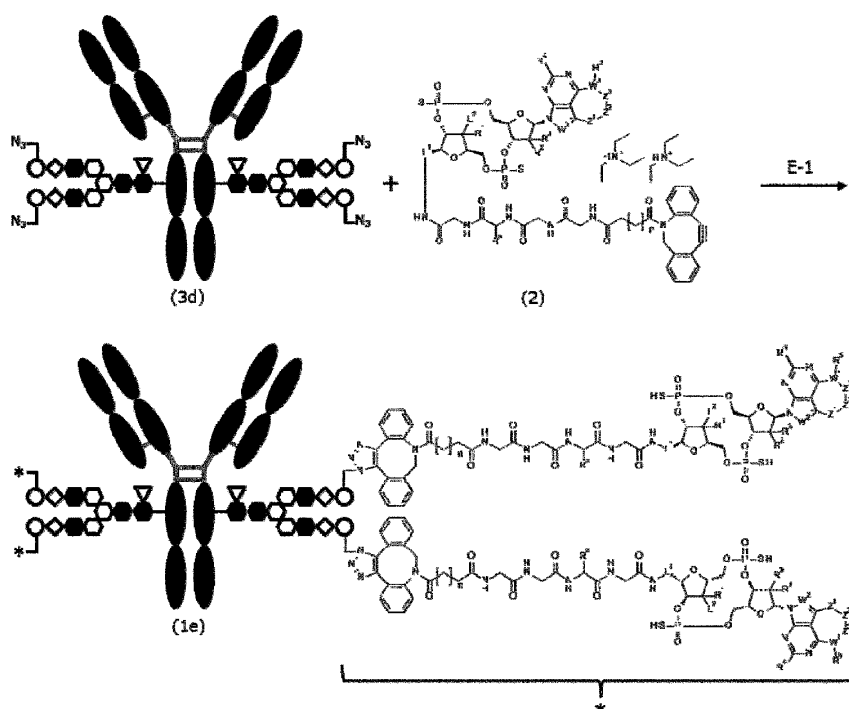
、WO2018/003983に記載の方法に準じて合成する。WO2018/003983に記載の工程1-2Aにおいて、Fmoc-(SG)-Asn (1S2S-11NC-Asn-Fmoc、糖鎖工学研究所製)から調製したFmoc-(SG)-Asnフリー体と11-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカン-1-アミンと反応させて([N₃-PEG(3)]₂-SG)-Asn-PEG(3)-N₃(WO2018/003983に記載の化合物1-13)を得ることができる。

[0256] MSG型の糖鎖ドナー [N₃-PEG(3)]-MSG1-Asn-PEG(3)-N₃、[N₃-PEG(3)]-MSG2-Asn-PEG(3)-N₃もWO2019065964の実施例154の工程1から工程3に記載の方法に準じて合成できる。

[0257] なお、D-3工程は、後述の<5. Fc含有分子の製造方法>の記載に沿って実行することもできる。

[0258] E法：抗体と薬物のコンジュゲーション（糖鎖コンジュゲーション1）

[0259] [化85]



(ここで、抗体薬物コンジュゲート (1 e) の左側の2つのアステリスク (＊) は右側のアステリスクで示される薬物リンカー部分を示す。)

本製造法は、D法D-2工程で得られた糖鎖リモデリング抗体 (3 d) と B法B-4工程で得られたコンジュゲーション前駆体 (2) をSPAAC (strain-promoted azide-alkyne cyclo addition: J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15046-15047) 反応により結合させ、抗体薬物コンジュゲート (1 e) を製造する方法である。

[0260] (E-1工程)

糖鎖リモデリング抗体 (3 d) の緩衝溶液 (リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等) と、コンジュゲーション前駆体 (2) を適当な溶媒 (ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、プロピレングリコール又はそれらの混合溶媒) に溶解させた溶液を混合することで、SPAAC反応を実施した。コンジュゲーション前駆体 (2) は、糖鎖リモデリング抗体 (3 d) 1モルに対して、2モルから過剰モル、好ましくは4モルから30モルであり、有機溶媒の比率は、抗体の緩衝溶液に対し1%から200% (v/v) が好ましい。反応温度は0℃から37℃、好ましくは15℃から25℃であり、反応時間は1時間から150時間、好ましくは6時間から72時間である。反応溶液のpHは5から9が好ましい。反応溶液を後述の共通操作Dに記載の方法に従って精製し、抗体薬物コンジュゲート (1 e) を得た。

[0261] E' 法: 抗体と薬物のコンジュゲーション (システインコンジュゲーション)

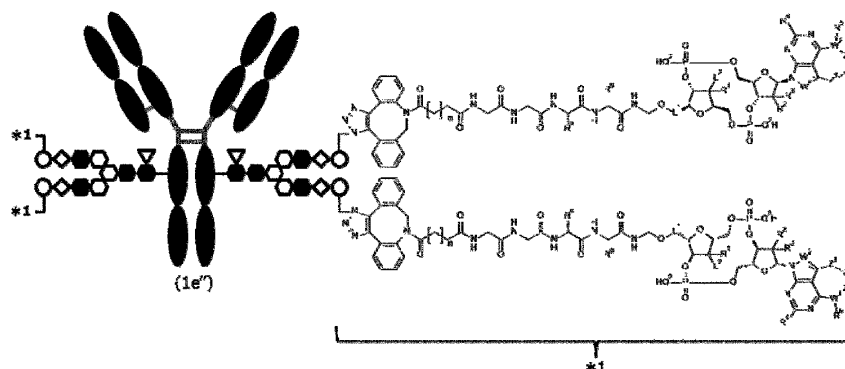
システインコンジュゲーションを有する本発明の抗体薬物コンジュゲートは、参考例3等に従って調製した目的の抗体とB'法B-8工程で得られたマレイミド基を有するコンジュゲーション前駆体 (2') を用いて、WO 2014/057687などに記載の方法に準じて製造することができる。

[0262] E'' 法: 抗体と薬物のコンジュゲーション (糖鎖コンジュゲーション2

)

E法において、コンジュゲーション前駆体(2)をC'法C'－8工程で得られたコンジュゲーション前駆体(3')に変えることによって、次式に示す抗体薬物コンジュゲート(1e'')を得た。

[0263] [化86]



(ここで、抗体薬物コンジュゲート(1e'')の左側の2つのアステリスク(*)には右側のアステリスクで示される薬物リンカー部分を示す。)

[0264] 抗体薬物コンジュゲートは、後述の共通操作DからGによってバッファー交換、精製、抗体濃度の測定及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体薬物コンジュゲートの同定を行うことができる。

[0265] F法：変異Fc領域を含む抗体の製造

変異Fc領域を含む抗体は、Fcエフェクターレス化変異体動物細胞発現ベクターを用いて公知の方法で作製することができる。Fcエフェクターレス化変異体動物細胞発現ベクターを構築する方法としては例えば以下の方法が挙げられる。

[0266] Fcエフェクターレス化変異体動物細胞発現ベクターの構築

野生型のFc領域の遺伝子を含む動物細胞発現ベクターをテンプレートとし、KOD－Plus－Mutagenesis Kit (TOYOBO社)を用いてFc領域に所望のエフェクターレス化変異をPCRにて導入する。もしくは、所望のエフェクターレス化変異を含むFc領域の遺伝子を合成し、ライゲーション反応によって動物細胞発現ベクターに組み込む場合

もある。

[0267] なお、本発明のCDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体は、WO2022163846を参照して製造することもできる。また、本発明における標的分子結合部分、変異Fc領域及び免疫賦活化剤を含む分子であって、上記CDN誘導体以外の免疫賦活化剤を含む分子については、上記において記載した製造方法を適宜、既知の方法を参照して改変するか、又は、既知の方法を参照すること等によって、製造することができる。

[0268] 共通操作A：抗体水溶液の濃縮

Amicon（登録商標）Ultra遠心式フィルターデバイス（50,000 NMWL, Merck Millipore Ltd.）に抗体又は抗体薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.）を用いた遠心操作（2000Gから4000Gで5分間から20分間遠心）により、抗体及び抗体薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

[0269] 共通操作B：抗体の濃度測定

UV測定器（Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Inc.）を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる280nm吸光係数（ $1.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から $1.8 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）を用いた。

[0270] 共通操作C：抗体のバッファー交換

抗体水溶液に緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）、リン酸緩衝液（pH 6.0）等）を加え、共通操作Aに記載の方法に従って濃縮した。この操作を数回行った後、共通操作Bに記載の方法に従って抗体濃度を測定した。この抗体緩衝溶液に、適宜緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）、リン酸緩衝液（pH 6.0）等）を加えて、目的の濃度（例えば、約 10 mg/mL ）の抗体緩衝溶液を調製した。

[0271] 共通操作D：抗体薬物コンジュゲートの精製（ゲル濾過クロマトグラフィー）

酢酸緩衝液（10 mM Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH 5.5；本明細書ではABSと称する）又はそれ以外の適当な緩衝液でNAPカラム（NAP-5, NAP-10, NAP-25（GEヘルスケア製））を平衡化させた。このNAPカラムに、抗体薬物コンジュゲート反応溶液をチャージし、メーカー規定量の緩衝液を自然流下させ、抗体画分を分取した。この画分を再度NAPカラムにチャージし、メーカー規定量の緩衝液を自然流下させ、抗体画分を分取した。この操作を合計2回から3回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーやジメチルスルホキシド、プロピレングリコールを除いた抗体薬物コンジュゲートを得た。必要に応じて、共通操作A及びCにより抗体薬物コンジュゲート溶液の濃度を調節した。

[0272] 共通操作E：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（UV法）

抗体薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、吸光光度計（UV/VIS Spectrometer Lambda 25, PerkinElmer, Inc.）を用いて、抗体薬物コンジュゲート水溶液の280 nm及び250 nmの二波長における吸光度を測定した後に、下記の計算を行うことで算出することができる。ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい（吸光度の加成性）ことから、抗体と薬物とのコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

$$A_{280} = A_{D, 280} + A_{A, 280} = \epsilon_{D, 280} C_D + \epsilon_{A, 280} C_A \quad \text{式 (I)}$$

$$A_{250} = A_{D, 250} + A_{A, 250} = \epsilon_{D, 250} C_D + \epsilon_{A, 250} C_A \quad \text{式 (II)}$$

ここで、 A_{280} は280 nmにおける抗体薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 A_{250} は250 nmにおける抗体薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 $A_{A, 280}$ は280 nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{A, 250}$ は250 nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{D, 280}$ は280 nmにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、 $A_{D, 250}$ は250 nmにおけるコンジュ

ゲート前駆体の吸光度を示し、 $\epsilon_{A, 280}$ は280 nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{A, 250}$ は250 nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{D, 280}$ は280 nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{D, 250}$ は250 nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 C_A は抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、 C_D は抗体薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。ここで、 $\epsilon_{A, 280}$ 、 $\epsilon_{A, 250}$ 、 $\epsilon_{D, 280}$ 、 $\epsilon_{D, 250}$ は、事前に用意した値（計算推定値又は実測値）が用いられる。例えば、 $\epsilon_{A, 280}$ は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423）によって推定することができる。 $\epsilon_{A, 250}$ は、抗体のUV測定から得られた実測値と $\epsilon_{A, 280}$ の推定値から計算した値を用いた。実施例において、抗EGFR抗体1のモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=203460$ 及び $\epsilon_{A, 250}=70151$ 又は63837を用いた。抗EGFR抗体2のモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=203460$ 及び $\epsilon_{A, 250}=63051$ 又は63370を用いた。抗EGFR抗体3のモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=203460$ 及び $\epsilon_{A, 250}=62692$ 又は63853を用いた。抗EGFR抗体Aのモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=203460$ 及び $\epsilon_{A, 250}=69640$ を用いた。抗EGFR抗体Bのモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=197750$ 及び $\epsilon_{A, 250}=66256$ を用いた。抗CDH6抗体1のモル吸光係数は、 $\epsilon_{A, 280}=223400$ 及び $\epsilon_{A, 250}=74671$ 又は71530を用いた。 $\epsilon_{D, 280}$ 及び $\epsilon_{D, 250}$ は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。実施例におけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数は、都度UV測定で得た。抗体薬物コンジュゲート水溶液の A_{280} 及び A_{250} を測定し、これらの値を式（I）及び（II）に代入して連立方程式を解くことによって、 C_A 及び C_D を求めることができる。さらに C_D を C_A で除することによって、抗体一分子あたりの薬物平均結合数を求めることができる。

[0273] 共通操作F：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（逆相高速液体クロマトグラフィー法：R P－H P L C）

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作Eに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー分析によって求めることができる。

[0274] [F－1. H P L C分析用サンプルの調製（抗体薬物コンジュゲートの還元）]

抗体薬物コンジュゲート溶液（約1 m g / m L、6 0 μ L）をジチオトレイトール（D T T）水溶液（1 0 0 m M、1 5 μ L）と混合した。混合物を3 7℃で3 0分間インキュベートして、抗体薬物コンジュゲートのL鎖及びH鎖間のジスルフィド結合を切断した。この反応溶液をそのままH P L C分析に用いた。

[0275] [F－2. H P L C分析]

代表的な分析条件は下記の通り。

H P L Cシステム：A g i l e n t 1 2 9 0 H P L Cシステム（A g i l e n t T e c h n o l o g i e s）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：2 8 0 n m）

カラム：A c q u i t y B E H P h e n y l（2. 1×5 0 m m、1. 7 μ m、W a t e r s 製）

カラム温度：7 5℃

流速：0. 8 m L / m i n

サンプル注入量：1 0 μ L

移動相A：0. 1 %トリフルオロ酢酸（T F A），1 5 %イソプロピルアルコール水溶液

移動相B：0. 0 7 5 % T F A，1 5 %イソプロピルアルコールアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム（移動相B）：1 4 %－3 6 %（0分－1 5分），

36%–80% (15–17分), 80%–14% (17分–17.1分)
 , 14%–14% (17.1分–23分)

[0276] [F-3. データ解析]

[F-3-1] SPAAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、薬物の結合していない抗体のL鎖(L0)及びH鎖(H0)に対して、薬物の結合したH鎖(薬物が一つ結合したH鎖:H1、薬物が二つ結合したH鎖:H2)は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、原則的にL0、H0、H1、H2の順に溶出される。L0及びH0との保持時間を比較することにより検出ピークをL0、H0、H1、H2のいずれかに割り当てることができる。システインコンジュゲーションの場合も同様に、薬物の結合したL鎖(薬物が一つ結合したL鎖:L1)と薬物の結合したH鎖(薬物が一つ結合したH鎖:H1、薬物が二つ結合したH鎖:H2、薬物が三つ結合したH鎖:H3)は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、原則的にL0、L1、H0、H1、H2、H3の順に溶出される。L0及びH0との保持時間を比較することにより検出ピークをL0、L1、H0、H1、H2、H3のいずれかに割り当てることができる。

[0277] [F-3-2] 薬物リンカーにUV吸収があるため、SPAAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、薬物リンカーの結合数に応じて、H鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積の補正を行った。L鎖にも薬物が結合するシステインコンジュゲーションの場合は、L鎖に対しても同様にピーク面積の補正を行った。

[0278] [数1]

$$\text{H鎖ピーク面積補正值 (HPA}_i\text{)} = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{H鎖のモル吸光係数}}{\text{H鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0279] ここで、各抗体におけるL鎖及びH鎖のモル吸光係数(280nm)は、共通操作Eに記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。抗EGFR抗体1, 2, 3, Aの場合、L鎖のモル吸光係数として23232を、H

鎖のモル吸光係数として78498を用いた。抗EGFR抗体Bの場合、L鎖のモル吸光係数として23232を、H鎖のモル吸光係数として75642を用いた。抗CDH6抗体1の場合、L鎖のモル吸光係数として31712を、H鎖のモル吸光係数として79988を用いた。薬物リンカーのモル吸光係数(280nm)は、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用い、システインコンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体をメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をスクシンイミドチオエーテルに変換した化合物の実測値を用いた。

[0280] [F-3-3] ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比(%)を下式に従って計算した。

[0281] [数2]

$$\text{H鎖ピーク面積比}(\% \text{HPA}_i) = \frac{\text{HPA}_i}{\text{HPA}_0 + \text{HPA}_1 + \text{HPA}_2} \times 100$$

[0282] [F-3-4] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数(DAR)を、下式に従って計算した。

[0283] [数3]

$$\text{薬物平均結合数 (DAR)} = \frac{0 \times \% \text{HPA}_0 + 1 \times \% \text{HPA}_1 + 2 \times \% \text{HPA}_2}{100} \times 2$$

[0284] [F-3-5] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を、下式に従って計算した。

[0285] [数4]

$$\text{抗体濃度} (C_A) [\text{mg/mL}] = \frac{\text{抗体薬物複合体の吸光度} \times \text{希釈倍数} \times \text{抗体の分子量}}{\text{抗体のモル吸光係数} + \text{薬物平均結合数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0286] ここで抗体薬物複合体の吸光度(280nm)は、抗体薬物コンジュゲート水溶液の実測値を用いた。希釈倍数は、吸光度を測定する際に抗体薬物コンジュゲート水溶液を何倍に希釈したかを示し、通常4倍希釈である。抗体のモル吸光係数(280nm)は、共通操作Eに記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。薬物平均結合数は[F-3-4]で得られた値を

用いた。薬物リンカーのモル吸光係数（280 nm）は、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用い、システインコンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体をメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をスクシンイミドチオエーテルに変換した化合物の実測値を用いた。

[0287] 共通操作G：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（疎水性相互作用－高速液体クロマトグラフィー法：HIL-HPLC）

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作E及びFに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー分析によって求めることができる。

[0288] [G-1. HPLC分析用サンプルの調製]

抗体薬物コンジュゲート溶液（約1 mg/mL、60 µL）をそのままHPLC分析に用いた。

[0289] [G-2. HPLC分析]

代表的な分析条件は下記の二通り。

HPLCシステム：SHIMADZU CBM-20A（島津製作所）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）

カラム：TSK-gel Butyl-NPR（4.6×100 mm，2.5 µm，TOSOH製）

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相A：1.5 M硫酸アンモニウム含有25 mMリン酸緩衝液（pH=7.0）

移動相B：25 mMリン酸緩衝液（pH=7.0）／イソプロピルアルコール混合液（3：1）

流速：0.8 mL/min

サンプル注入量：15 µL

グラジエントプログラム（移動相B）：10%－15%（0分－5分），1

5%－65%（5分－20分）

又は

HPLCシステム：SHIMADZU CBM-20A（島津製作所）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280nm）

カラム：PolyPROPYL A（4.6×100mm，3μm，1500Å，PolyLC製）

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相A：1.5M硫酸アンモニウム含有20mMリン酸緩衝液（pH＝7.4）

移動相B：20mMリン酸緩衝液（pH＝7.4）

流速：0.8mL/min

サンプル注入量：15μL

グラジエントプログラム（移動相B）：40%－80%（0分－20分）

[0290] [G-3. データ解析]

[G-3-1] 抗体に結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、原則的にDAR＝0、DAR＝2、DAR＝4の順に溶出される。DAR＝0との保持時間を比較することにより、検出ピークをDAR＝2及びDAR＝4のいずれかに割り当てることができる。抗体や薬物リンカーの種類に依存してDAR＝1及びDAR＝3のピークが検出されることもある。検出ピークのDARは、HIL-HPLCで当該ピークを分画後、マスペクトルを測定して推定することもある。

[0291] [G-3-2] 薬物リンカーにUV吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、抗体及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行った。

[0292] [数5]

$$\text{抗体ピーク面積補正值 (WPA;)} = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{抗体のモル吸光係数}}{\text{抗体のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0293] ここで、抗体のモル吸光係数（280nm）は、共通操作Eに記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。薬物リンカーのモル吸光係数（280nm）は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用いた。

[0294] [G-3-3] ピーク面積補正值合計に対する抗体ピーク面積比（%）を下式に従って計算した。

[0295] [数6]

$$\text{抗体ピーク面積比 (\%WPA}_i\text{)} = \frac{WPA_i}{WPA_0 + WPA_1 + WPA_2 + WPA_3 + WPA_4} \times 100$$

[0296] [G-3-4] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算した。

[0297] [数7]

$$\text{薬物平均結合数 (DAR)} = \frac{0 \times \%WPA_0 + 1 \times \%WPA_1 + 2 \times \%WPA_2 + 3 \times \%WPA_3 + 4 \times \%WPA_4}{100}$$

[0298] [G-3-5] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度は、[F-3-5]に記載の式に従って計算した。その際、薬物平均結合数は[G-3-4]で得られた値を用いた。

[0299] 本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体には、立体異性体あるいは不斉炭素原子に由来する光学異性体、幾何異性体、互変異性体又はd体、l体、アトロプ異性体等の光学異性体が存在することもあるが、これらの異性体、光学異性体及びこれらの混合物のいずれも本発明に含まれる。

[0300] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体1分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体1分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数（DAR）として特定することができる。抗体分子への環状ジヌクレオチド誘導体の結合数はコントロール可能であり、1抗体あたりの薬物平均結合数として、1から10の範囲の環状ジヌクレオチド誘導体を結合させることができるが

、好ましくは1から8個であり、より好ましくは1から5個であり、さらに好ましくは2から4個である。本発明において、平均薬物結合数と薬物平均結合数は同じ意味を持ち、相互に置き換えることができる。

[0301] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体A bが、抗体A bのリモデリングされた糖鎖からLに結合している場合、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体重鎖1つあたりの薬物結合数 m^2 は1または2の整数である。当該糖鎖がN297糖鎖であり、糖鎖がN297-(Fuc)SGの場合、 m^2 は2であり、DARは3～5の範囲（好ましくは、3.2～4.8の範囲であり、より好ましくは、3.5～4.2の範囲）である。N297糖鎖がN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2又はN297-(Fuc)MSG1とN297-(Fuc)MSG2の混合物の場合、 m^2 は1であり、DARは1～3の範囲（好ましくは、1.0～2.5の範囲、より好ましくは、1.2～2.2の範囲）である。

[0302] なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、環状ジヌクレオチド誘導体の結合数をコントロールした抗体を取得することができる。

[0303] なお、本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体は、大気中に放置したり、又は再結晶することにより、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物及び塩も本発明に含まれる。

[0304] 本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体が、アミノ基等の塩基性基を有する場合、所望により医薬的に許容される塩とすることができる。そのような塩としては、例えば塩酸塩、ヨウ化水素酸塩等のハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、磷酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩等の低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等のアリールスルホン酸塩；ギ酸塩、酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び

オルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩等のアミノ酸塩を挙げることができる。

[0305] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、リン酸基及び／又はチオリン酸基をその構造に含むため、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。また、その製造中間体が、カルボキシ基等の酸性基を有する場合も、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。医薬的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩等の無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジリエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-N-(2-フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩等の有機アミン塩、等を挙げることができる。

[0306] 本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体は、空気中の水分を吸収すること等により水和物として存在することもある。本発明の溶媒和物としては、医薬的に許容し得るものであれば特に限定されないが、具体的には、水和物、エタノール和物、2-プロパノール和物等が好ましい。また、本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体中に窒素原子が存在する場合にはN-オキシド体となってもよく、これら溶媒和物及びN-オキシド体も本発明の範囲に含まれる。また、本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体中に硫黄原子が存在する場合にはスルホキシド体となってもよく、これら溶媒和物及びスルホキシド体も本発明の範囲に含まれる。

[0307] また、本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体を構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位

体としては、例えば、重水素（ 2H ）、トリチウム（ 3H ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）または炭素-14（ ^{14}C ）等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム（ 3H ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）または炭素-14（ ^{14}C ）のような放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、*in vivo*画像診断剤として有用である。本発明の抗体薬物コンジュゲートの全ての同位体変異種は、放射性であると否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

[0308] <4. 医薬>

本発明の抗体薬物コンジュゲートは、がん細胞に対して抗腫瘍免疫活性又は細胞傷害活性を示し、安全性面でも優れていることから、医薬として、特にがんに対する治療剤及び／又は予防剤、又は抗腫瘍剤として使用することができる。さらに、本発明の抗体医薬コンジュゲートは、医薬として、感染症に対する治療剤及び／または予防剤として使用することができる。また、本発明の一態様において、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、熱に対する安定性の高い医薬として使用することができる。

[0309] 本発明の抗体薬物コンジュゲートが適用されるがんの種類としては、肺がん（非小細胞肺がん、小細胞肺がん等）、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍等）、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（*Gastrointestinal Stromal Tumor*、*GIST*）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、有棘細胞がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、肉腫等を挙げることができる。また、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、EGFR陽性がん、又はCDH6陽性がんに適用することができる。EGFR陽性がんとは、EGFRを発現しているがん

であり、肺がん（非小細胞肺がん、小細胞肺がん等）、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍等）、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、子宮頸がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質性腫瘍（GIST）、胆のうがん、胆管がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、胸腺がん、小腸がん等が挙げられる。CDH6陽性がんとは、CDH6を発現しているがんであり、肺がん（非小細胞肺がん、小細胞肺がん等）、腎がん、尿路上皮がん、卵巣がん（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍等）、膵がん、子宮体がん、子宮頸がん、甲状腺がん、中皮腫、胆のうがん、胆管がん、Sarcoma等が挙げられる。さらに、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、EGFRシグナル変異陽性がんに適用することができる。EGFRシグナル変異陽性がんには、EGFRに変異を有するがん（EGFR変異陽性がん）及びEGFRシグナル分子に変異を有するがん（EGFR下流シグナルに変異を有するがん）が含まれる。EGFRに変異を有するがんとしては、エクソン18～21の少なくともひとつの変異を含む肺がん、頭頸部がん等を挙げることができる。好ましくはエクソン19変異を有する肺がんである。EGFRシグナル分子に変異を有するがんとしては、RAS、RAF、PI3Kなどのうち少なくともひとつに変異を含むがんを挙げることができる。好ましくはRAS（KRAS, NRAS, HRAS）のうち少なくともひとつに変異を含む肺がん、大腸がん、すい臓がん等のRAS変異がんを挙げることができる。より好ましくはKRAS変異を有する肺がん又は大腸がんであり、さらに好ましくはKRAS変異を有する肺がんである。本発明の抗体薬物コンジュゲートが適用されるがんとしては、治療対象となるがんにおいて抗体薬物コンジュゲート中の抗体が認識できる蛋白質を発現しているがんであればこれらに限定されることはない。

[0310] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、哺乳動物はより好ましくはヒトである。

- [0311] 本発明の抗体薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。
- [0312] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む医薬組成物として投与され得る。例えば、上記医薬組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水および油（石油、動物、植物、または合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など））を含む）を含む。水は、上記医薬組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。その処方は、投与の態様に対応する。
- [0313] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗体薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入またはボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記抗体薬物コンジュゲートの投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。
- [0314] 代表的実施形態において、上記抗体薬物コンジュゲートを含む医薬組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬組成物はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプ

ルまたはサシェなどの密封してシールされた容器中の凍結乾燥粉末または無水の濃縮物として、別個に、または単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬組成物が注入によって投与される予定である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水または食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬組成物が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。上記医薬組成物は、溶液として提供される場合もある。

[0315] 本発明の医薬組成物は本発明の抗体薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、本発明の抗体薬物コンジュゲート及び他の医薬（癌治療剤を含む）を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、1つ又は2つ以上の他の医薬（癌治療剤を含むがそれに限定されない。）と共に（同時に、別々にもしくは一方を他方の後に）、又は組み合わせて、投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させたり、安全性を向上させたりすることができる。このような目的で使用される他の医薬は、抗体薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような他の癌治療剤として、ホルモン調整薬（LH-RHアナログであるリユープロレリン等、ゴセレリン、エストラムスチン、エストロジェン拮抗薬であるタモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）、キナーゼ阻害剤、PARP阻害剤、骨破壊抑制剤、骨形成促進剤、転移抑制剤、抗制御性T細胞薬（抗GITR抗体、抗GARP抗体、抗TIGIT抗体、抗CCR8抗体等）、免疫活性化剤（抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2アナログ、サイトカイン、TLRアゴニスト等）、免疫調節剤（抗CD47抗体、抗SIRP α 抗体、抑制性ミエロイド調整剤等）、ADCC（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity）活性、ADCP（Anti

body Dependent Cellular Phagocytosis) 活性または補体活性をもつ抗体医薬、BiTE (Bispecific T-cell engagers)、光力学療法を組み合わせたADC等、さらに抗腫瘍ワクチン、抗腫瘍細胞治療 (CAR-T、TCR-T、樹状細胞、NK細胞等)、抗腫瘍細菌治療、抗腫瘍ウイルス治療等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。さらに、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、本発明の他の抗腫瘍活性を有する抗体薬物コンジュゲートと共に投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させることができる。また、本発明の抗体薬物コンジュゲートは薬物だけでなく、抗腫瘍効果をもたらす治療、例えば放射線、重量子線、外科的手術、骨髄移植等との併用によって抗腫瘍効果を増強させることができるが、抗腫瘍効果を有する治療であれば限定されることはない。

[0316] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0317] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗体薬物コンジュゲートは、抗体薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数 (K_d 値) の点において、親和性が高い (K_d 値が低い) ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約 $0.001 \sim 100 \text{ mg/kg}$ を1回あるいは1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

[0318] <5. Fc含有分子の製造方法>

本発明の一態様においては、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子の製造方法が提供される。

[0319] 本発明の一態様において、以下の工程1を含む、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子の製造方法が提供される。

(工程1) N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアG1cNAcを有するFc含有分子であるアクセプター分子と、還元末端が活性化されていないG1cNAcを含む糖鎖を含む糖鎖ドナー分子とを、

- ・ Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とするエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ(酵素-A)；

- ・ 糖鎖ドナー分子の糖鎖を基質とするエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ(酵素-B)；及び

- ・ 一価の塩、有機溶媒、界面活性剤、糖類、アミノ酸類、又はこれらのいずれかの組み合わせから選択される添加剤

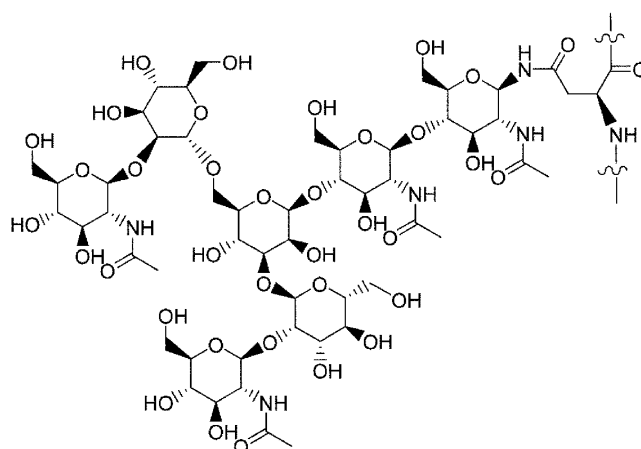
の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程。

[0320] <N297結合糖鎖>

本発明の一態様において、「N297結合糖鎖」とは、IgG重鎖の297番目のAsnの側鎖に結合している状態のN結合型糖鎖を意味し、また、任意の手法でIgG重鎖のN結合型糖鎖の付加位置を変更した場合であっても、N結合型糖鎖が酵素-Aの作用を受ける限りN297結合糖鎖に含まれるものとする。例えば、本発明の一態様において、IgG重鎖を断片化した場合、当該Asnを含むペプチド断片において、対応するAsnに結合している状態の糖鎖であっても、N297結合糖鎖に含まれる。通常、動物等で産生されたIgGにおけるN297結合糖鎖は、下記式(1)又は(11)の構造からなる基本構造を有しており、その非還元末端は、さらに化学修飾されていてもよく、例えばGalやシアル酸が付加していてもよい。

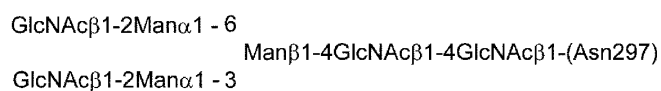
[0321]

[化87]



(I)

[0322] [化88]



(I I)

[0323] 細胞が産生するIgGのN297結合糖鎖の多くは、この基本構造において、その還元末端のGlcNAc（コアGlcNAc）、非還元末端、分岐糖などにおいてさらに糖鎖が結合したものを含み、糖鎖構造の多様性を有している。N297結合糖鎖は、コアGlcNAcの6位にフコース（Fuc）が $\alpha 1, 6$ 結合したコアフコースを有する構造（（Fuc $\alpha 1, 6$ ）GlcNAc）を有していてもよい。分岐糖であるManにおいては、その5位にさらにGlcNAcを含む糖鎖が結合した3分岐型の糖鎖を形成している場合もある。非還元末端のGlcNAcにおいては、ガラクトース（Gal）やシアル酸（Sia）を含む糖鎖がさらに結合している場合もある。

[0324] <糖鎖ドナー分子>

本発明の一態様において、「糖鎖ドナー分子」（「糖鎖供与体」ともいう）とは、アクセプター分子に糖鎖を供与する分子を意味する。

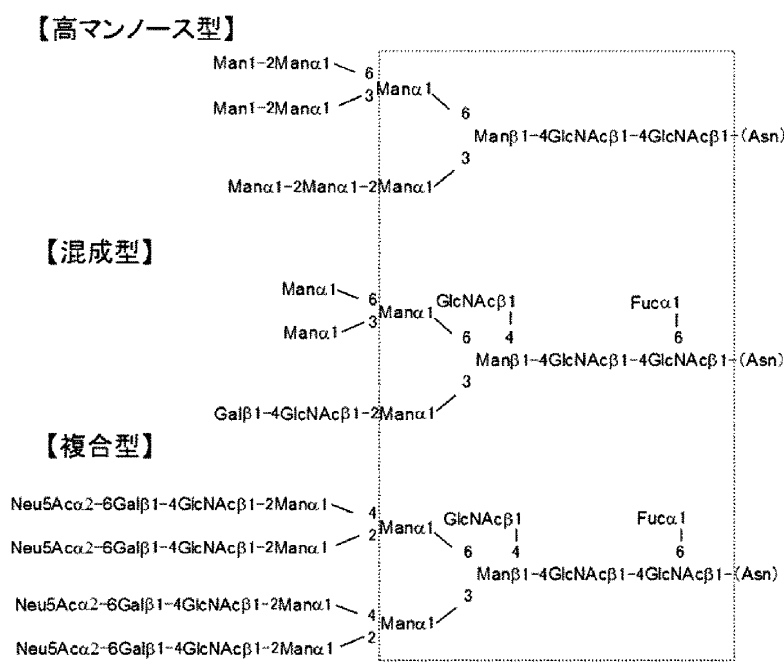
[0325] 創薬を目的とした糖鎖リモデリングに用いる場合、ヒトへ適用した際に問

題の少ないヒト型糖鎖、又は、ヒト適合型糖鎖を有する糖鎖ドナー分子を採用することが好ましい。このような糖鎖は、ヒトの体内で抗原性を示さないことが知られている糖鎖であり、N-結合型糖鎖では、ハイマンノース型、混成（ハイブリッド）型、複合（コンプレックス）型などが知られている。これら3つには共通の基本構造がある。ハイマンノース型は、還元末端に近い位置にあるマンノース（ β マンノース）から枝分かれした2つの分岐鎖（1-3鎖、1-6鎖）に、複数のマンノースが連続したマンノースリッチ構造を有する糖鎖である。混成型とは、還元末端に近い位置にあるマンノース（ β マンノース）から枝分かれした2つの分岐鎖（1-3鎖、1-6鎖）のうち、一方がGlcNAcを有する構造となったものである。複合型とは、還元末端に近い位置にあるマンノース（ β マンノース）から枝分かれした2つの分岐鎖（1-3鎖、1-6鎖）にGlcNAcを有する構造となったものであり、ガラクトースの有無、シアル酸の有無、さらにこれらの結合異性や位置異性を含む多彩な構造を有するものである。複合型糖鎖としては2分岐型、3分岐型又は4分岐型のものが知られている。

[0326] 以下に、ハイマンノース型、混成型及び複合型の構造の例を示す。なお、これらの共通の基本構造を、点線四角で示す（点線四角内には、 β マンノースの4位に導入されたGlcNAc（バイセクティングGlcNAc）を含む構造と、含まない構造が混在するが、本明細書においては、いずれも共通の基本構造を指すものとする）。

[0327]

[化89]

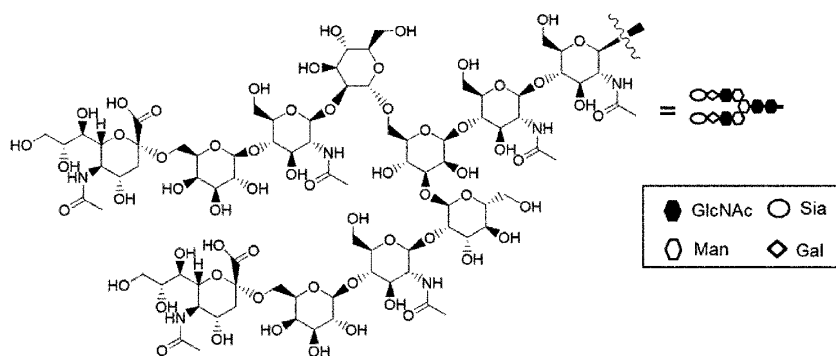


[0328] 本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子における糖鎖部分は、ハイマンノース型糖鎖、混成型糖鎖及び複合型糖鎖のいずれであってもよいが、好ましくは、ハイマンノース型糖鎖又は複合型糖鎖であり、特に好ましくは、複合型糖鎖である。したがって、本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子は、複合型糖鎖を含む。また、本発明において、複合型糖鎖は、2分岐型、3分岐型又は4分岐型のいずれであってもよいが、好ましくは、本発明の糖鎖ドナー分子は、2分岐型の複合型糖鎖を含む。

[0329] 本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子は、糖鎖の還元末端が活性化されていないGlcNAcを有する糖鎖含有分子であり、好ましくは、SGP、(SG-)Asn、(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asn若しくは(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asnの混合物を挙げることができる。これらの糖鎖部分は、N-結合型糖鎖の代表であり、以下の構造式及び配列式で示される構造からなるシアリルグリカン(Sialyl Glycan、以下、「SG」という)を含む。還元末端側糖鎖の結合様式をN-結合型からO-結合型へと変更しても良い。なお、本明細書において、特別

な記載がない限り、アミノ酸の側鎖において糖鎖と連結した場合の部分構造は、側鎖部分を括弧で表示し、上記のように、例えば、「(SG-)Asn」のように表記するものとする。

[0330] [化90]



[0331] [化91]

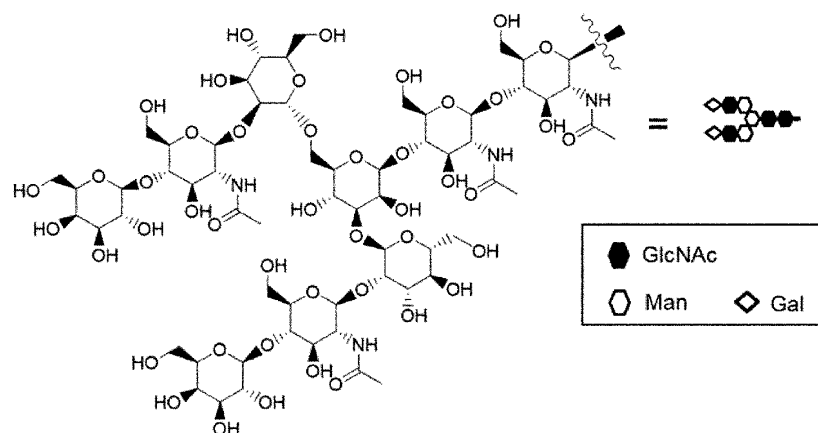


(式中、「-(N/O)」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

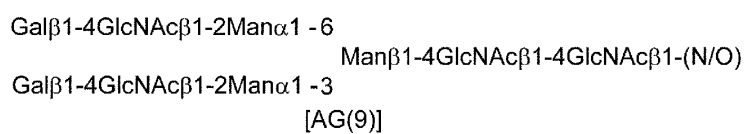
[0332] 本発明で用いることができる糖鎖ドナー分子における糖鎖部分の具体例として、SGをノイラミニダーゼ処理し、2つの非還元末端のNeuAcを欠失させたAG(9) (以下の構造式及び配列式のAG(9))、AG(9)をガラクトシダーゼ処理し、2つの非還元末端のGalを欠失させたAG(7) (以下構造式及び配列式のAG(7))、などを例示することができる。

[0333]

[化92]

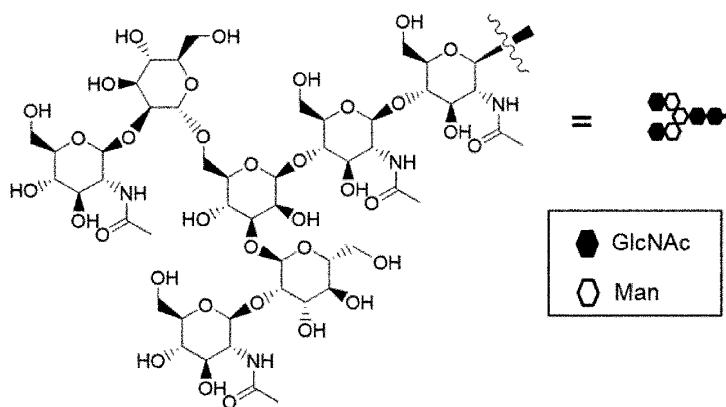


[0334] [化93]

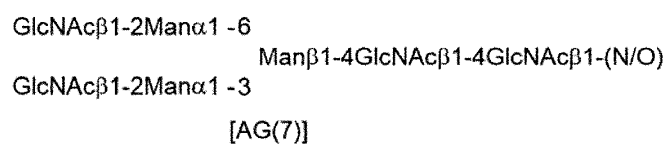


(式中、「-(N/O)」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0335] [化94]



[0336] [化95]

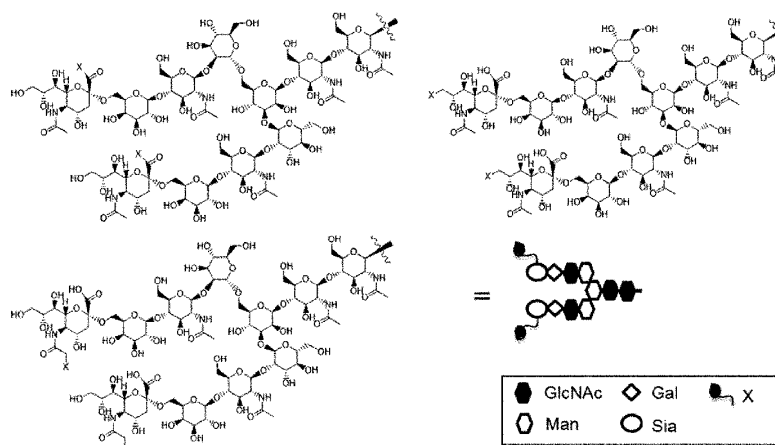


(式中、「 $-(N/O)$ 」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

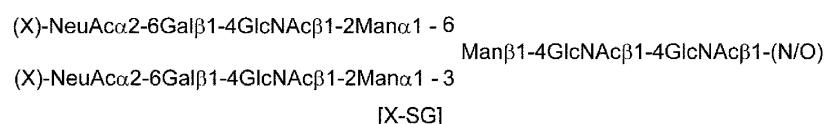
[0337] 本発明において、糖鎖ドナー分子は、化学修飾されていてもよく、例えば、非還元末端が化学修飾されていてもよい。

[0338] 本発明で用いることができる非還元末端が化学修飾されていてもよい糖鎖ドナー分子における糖鎖部分の例として、野生型のシアル酸上の部位が任意の置換基により化学修飾されている誘導体（S G型）が挙げられる。

[0339] [化96]



[0340] [化97]



(式中、Xは、 β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸上に導入された置換基を表し、有機合成化学の分野で公知の様々な方法を適用して合成できる置換基であり、抗体-薬物コンジュゲート合成に応用されている結合法に使用される置換基を参考に(Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2198-2215)して、例えば、アセチレン基、アジド基(N_3 -)、ジベンジルシクロオクテン(DBCO)基、ビシクロ[6.1.0]ノン-4-エン(BCN)基、1,2,4,5-テトラジン環を含む構造、アルデヒド基、SH基、メチルスルフ

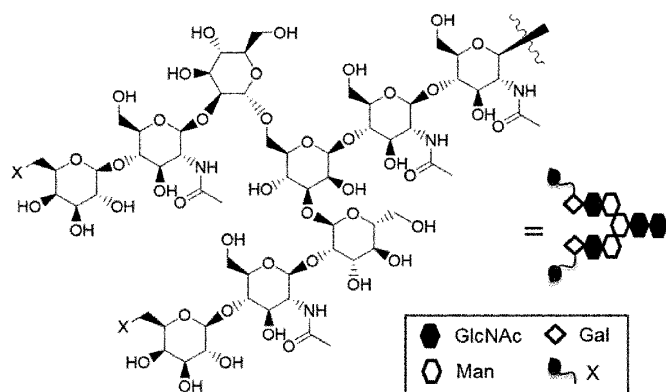
オニルトリアゾール基など、を挙げることができ、好ましくは、アセチレン基、アジド基 (N_3 -)、さらに好ましくは、アジド基 (N_3 -) を有する置換基を挙げることができるが、これらに限定されない。また、「アジド基 (N_3 -) を有する置換基」としては、例えば、 N_3 を有するポリエチレングリコールリンカー、すなわち、リンカー構造に含まれるエチレングリコール単位 ($-CH_2-CH_2-O-$) の個数の上限は約 20 個以下であり、好ましくは約 11 個以下であり、より好ましくは約 7 個以下であり、「アジド基 (N_3 -) を有する置換基」としては、例えば、 N_3 を有するポリエチレングリコールリンカー (例えば、35-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサペンタトリアコンタン-1-アミノ基、32-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30-デカオキサドトリアコンタン-1-アミノ基、29-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27-ノナオキサノナコサン-1-アミノ基、26-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサヘキサコサン-1-アミノ基、23-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21-ヘプタオキサトリコサン-1-アミノ基、20-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサエイコサン-1-アミノ基、17-アジド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデカン-1-アミノ基、14-アジド-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカン-1-アミノ基、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミノ基、2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチルアミノ基、2-(アジドエトキシ)エチルアミノ基、2-アジドエチルアミノ基、2-[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]-N-[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エトキシ]エチル]エタンアミン基など、直鎖状の置換基、あるいは、1, 3-ビス[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エトキシ]プロパン-2-アミノ基、3-[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エトキシ]-2-[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エトキシ]メチル]プロパン-1-アミノ基など

分岐している置換基等)を挙げることができるが、これらに限定されない。
式中、「 $-(N/O)$ 」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

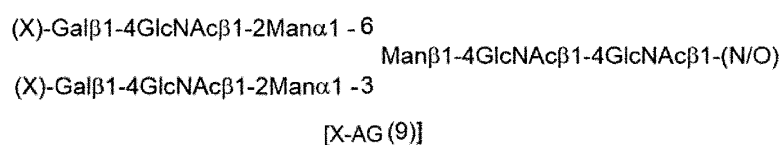
[0341] ここに示したX-S G型の構造のうち、 β -Manの分岐鎖の1-6鎖側の化学修飾シアル酸が欠損した構造であるX-MSG 1型、1-3鎖側の化学修飾シアル酸が欠損した構造であるX-MSG 2型も、非還元末端が化学修飾されていてもよい糖鎖ドナー分子における糖鎖部分の例として挙げられる。

[0342] さらに、化学修飾されてもよい部位は、シアル酸以外でも考えられ、以下、AG(9)型の誘導体、AG(7)型の誘導体が挙げられる。

[0343] [化98]



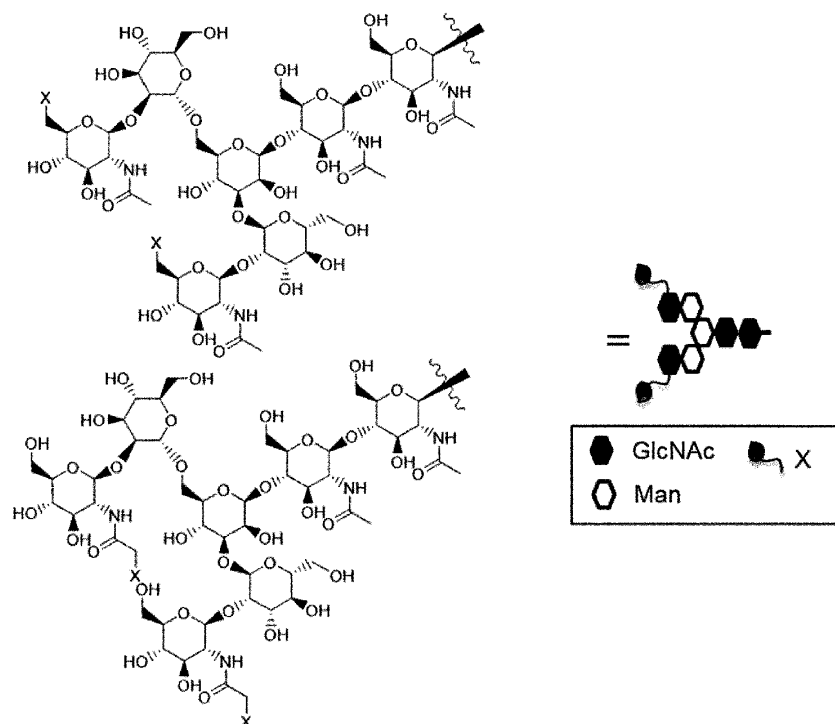
[0344] [化99]



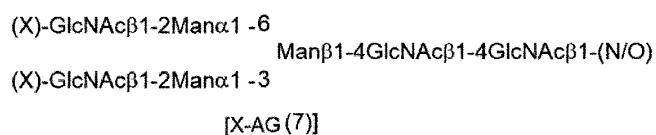
(式中、Xは、 β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のガラクトース上に導入された置換基を表し、具体的には、上記において規定したものと同一意味を表す。式中、「 $-(N/O)$ 」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0345]

[化100]



[0346] [化101]

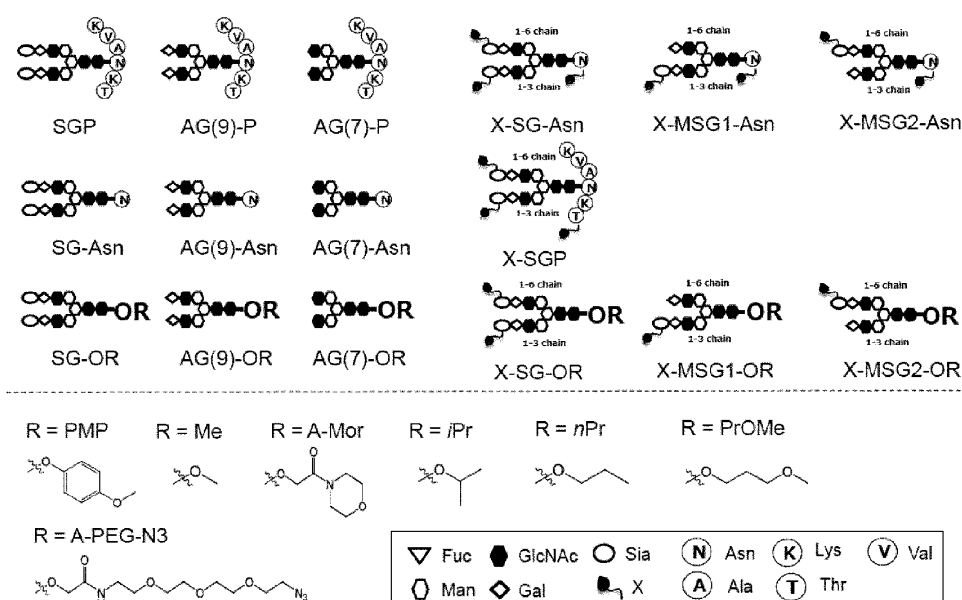


(式中、Xは、 β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のGlcNAc上に導入された置換基を表し、具体的には、上記において規定したものと同一意味を表す。式中、「-(N/O)」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0347] ここに示したX-AG(9)型の構造のうち、 β -Manの分岐鎖の1-6鎖側の化学修飾ガラクトースが欠損した構造、1-3鎖側の化学修飾ガラクトースが欠損した構造、あるいは、X-AG(7)型の構造のうち、 β -Manの分岐鎖の1-6鎖側の化学修飾GlcNAcが欠損した構造、1-3鎖側の化学修飾GlcNAcが欠損した構造についても、ドナー分子における糖鎖部分の例として挙げられる。

[0348] 本発明の糖鎖ドナー分子は、好ましくは、非還元末端が化学修飾されていても良いSGP、AG(9)-P、AG(7)-P、SG-Asn、AG(9)-Asn、AG(7)-Asn、SG-OR、AG(9)-OR、AG(7)-OR、(MSG1)-Asn、(MSG2)-Asn、(MSG1)-Asnと(MSG2)-Asnの混合物、MSG1-OR、MSG2-OR、又はMSG1-ORとMSG2-ORの混合物を挙げることができ、又は、以下に示した構造を有する糖鎖ドナー分子を挙げることができる。

[0349] [化102]



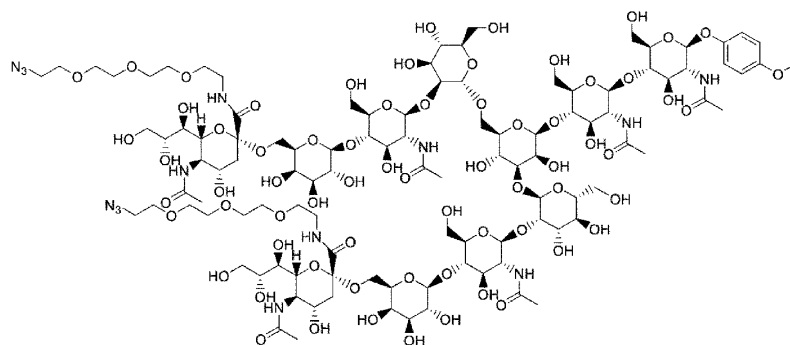
[0350] なお、以上の構造式中、「P」はSGPに由来するペプチド部分を示し、「X」は、上記において規定したものと同一意味を表す。本発明の糖鎖ドナー分子として、さらに好ましくは、N-結合型糖鎖を含むものとして、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-P-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-N₃の混合物を挙げることができ、O-結合型

糖鎖を含むものとして、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ 、又は $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ と $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ の混合物を挙げることができる。

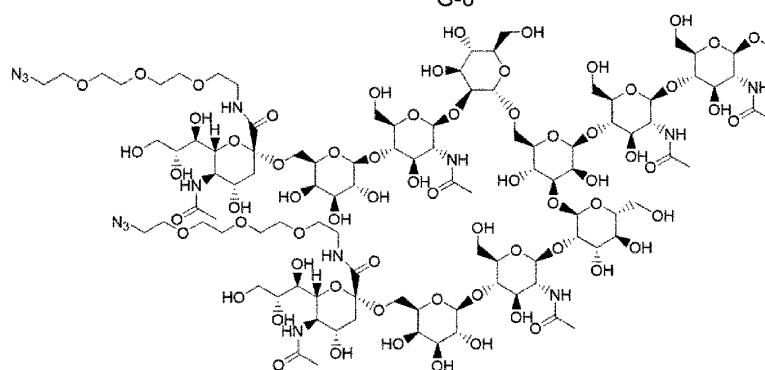
[0351] 上記の化学式において、「R」は、少なくとも一つの炭素原子を介して酸素原子に連結する任意の置換基を示し、好ましくは、C1～C6アルキル基又は置換されていても良いアリール基を示す。「C1～C6アルキル基」とは、炭素数1～6の直鎖又は分岐鎖のアルキル基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル、n-ペンチル基、n-ヘキシル等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、「アリール基」としては、例えば、フェニル基、ベンジル基、インデニル基、ナフチル基、フルオレニル基、アントラニル基、フェナンスレニル基等を挙げることができるが、これらに限定されない。アリール基の置換基としては、C1～C6アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基、イソプロポキシ基等）、C1～C6アルキル基（例えば、メチル基、エチル基等）、ハロゲン基を挙げることができるが、これらに限定されない。置換されているアリール基としては、パラメトキシフェニル基、パラメチルフェニル基等を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の一態様において、「R」は、PMP、Me、A-Mor、iPr、nPr、PrOMe及びA-PEG-N₃（Aは、グリコール酸ユニット中のアセチル基、すなわち、アノマー水酸基と、MorまたはPEG中のアミノ基に挟まれた部分を表す）からなる群より選択される。

[0352] さらに、本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子として、好ましくは、以下の糖鎖ドナー分子を挙げることができる。

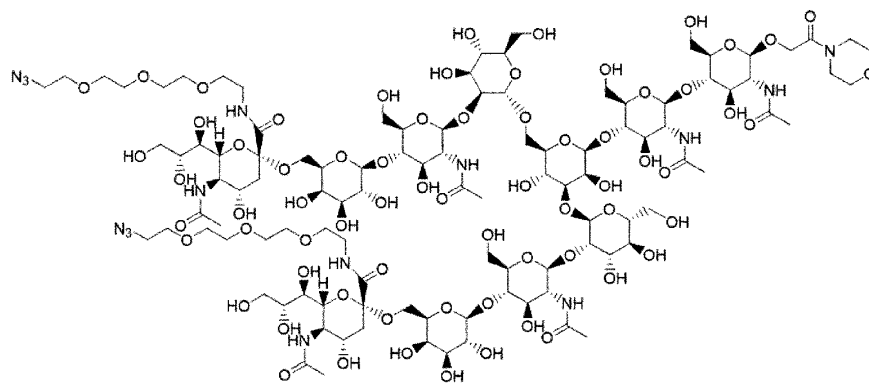
[化103]



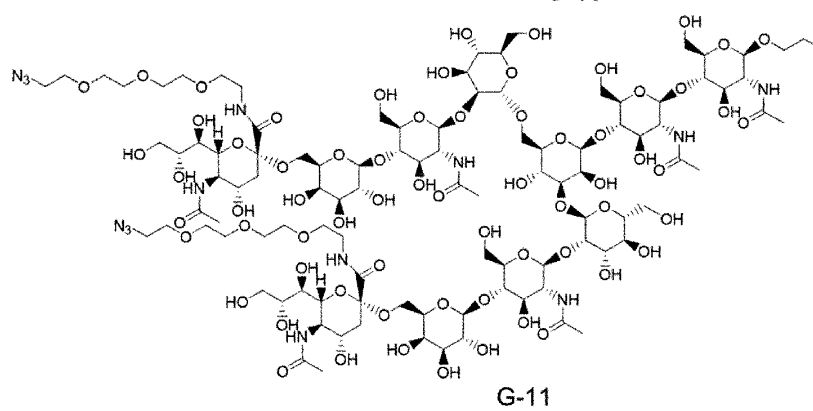
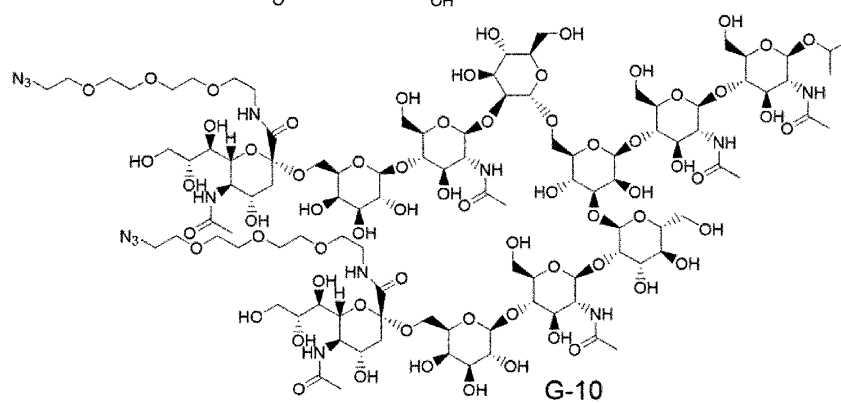
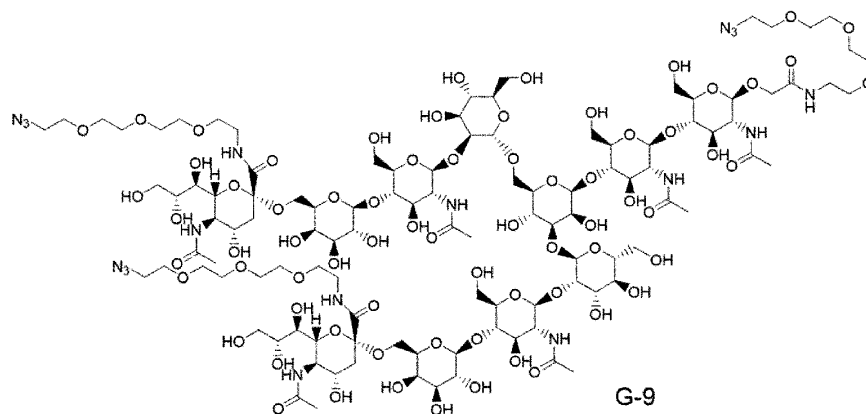
G-6

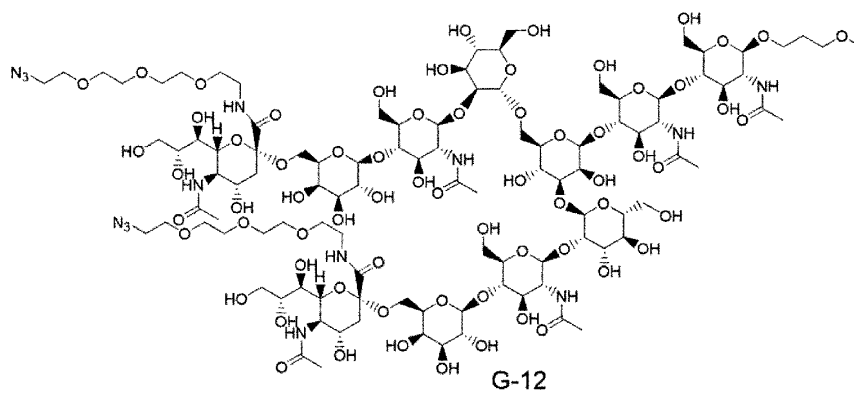


G-7

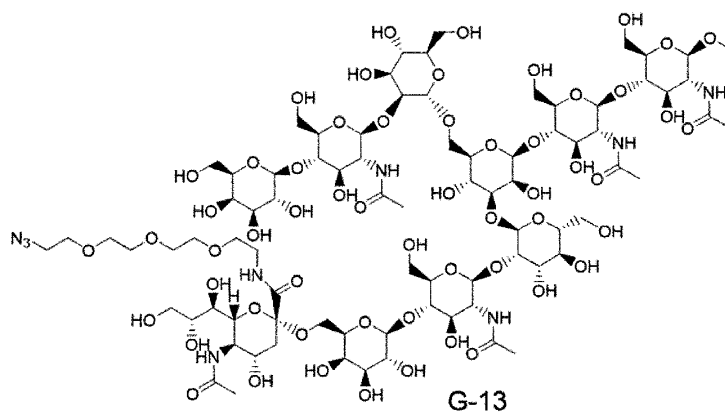


G-8

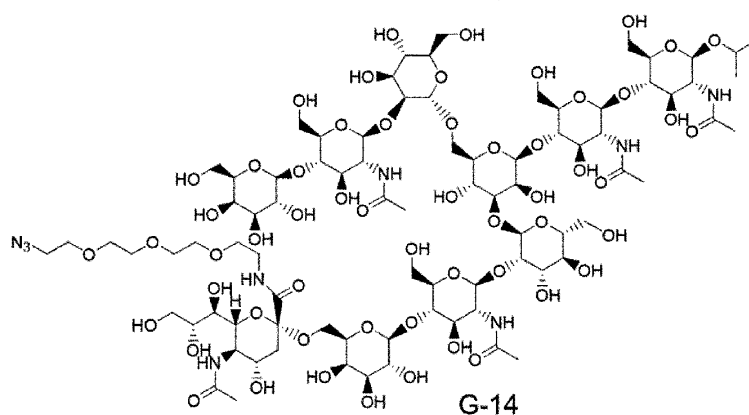




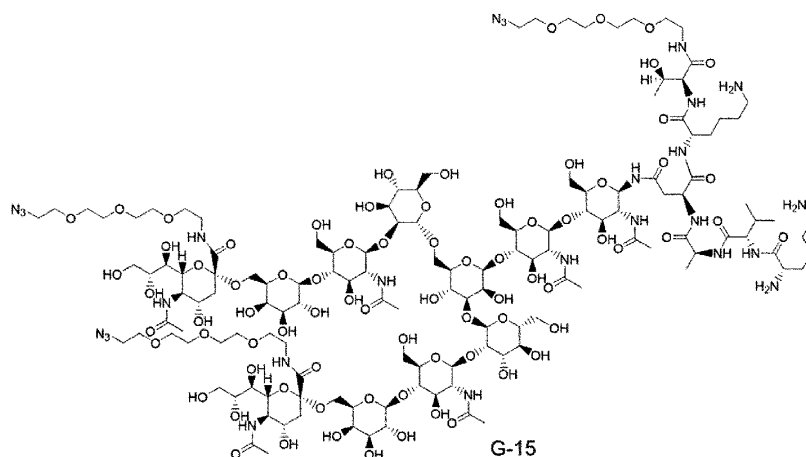
G-12



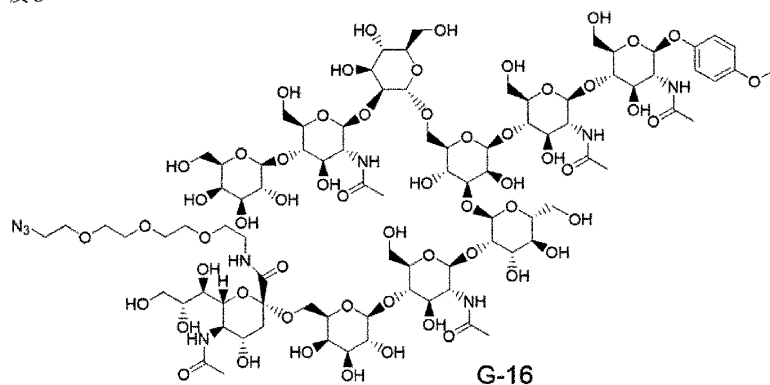
G-13



G-14



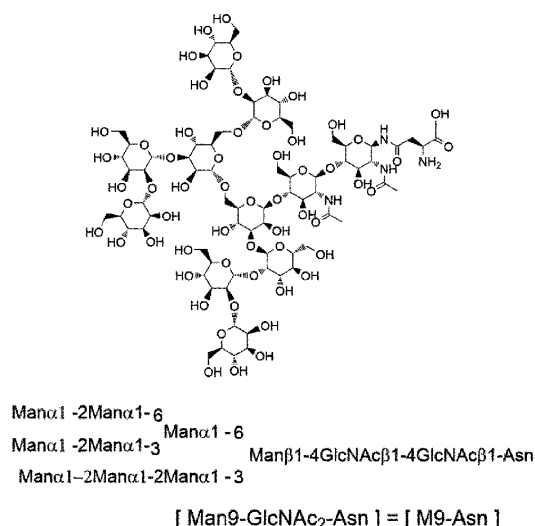
及び



- [0353] 本発明の糖鎖ドナー分子は、使用する酵素－Aと酵素－Bの組み合わせ等の諸条件に応じて、適宜、選択することが好ましい。
- [0354] 本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子は、ハイマンノース型糖鎖を含む。このような糖鎖ドナー分子としては、以下の構造を有するMan 9－GlcNAc₂－Asn（「M9－Asn」）や、M9－Asnからマンノースが1つ、2つ、あるいは3つ欠損した構造を有するMan 8－GlcNAc₂－Asn（「M8－Asn」）、Man 7－GlcNAc₂－Asn（「M7－Asn」）、Man 6－GlcNAc₂－Asn（「M6－Asn」）を挙げることができるが、これらには限定されない。

[0355]

[化104]



[0356] 糖鎖ドナー分子は、適宜、市販品を購入するか、あるいは、既知の方法を利用又は応用することにより作製することができる。

[0357] <Fc含有分子>

本発明の一態様において、「Fc含有分子」（「Fc領域含有分子」と称することもある）とは、Fc領域を含有する分子を示し、例えば、抗体（免疫グロブリン）、Fc-融合タンパク質、Fc断片等（又はFc含有断片）を例示することができる。抗体以外のFc含有断片としては、CLCH、例えば、IgG（特に、IgG型のモノクローナル抗体）のFc断片や定常領域のみからなるCLCH（特許文献1）、Fc断片を含むバイスペシフィック抗体（Expert Opin Ther Pat. 2018 28, 251-276）、等を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の一態様において、Fc含有分子は、抗体又は該抗体の機能性断片であり、当該抗体又は機能性断片としては、上記において言及してきた全てのものを挙げることができる。したがって、たとえば、本発明の一態様において、Fc含有分子は、Fc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyである抗体又は該抗体の機能性断片であり、本発明の別の一態様にお

いて、Fc含有分子は、配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体であり、本発明の更なる別の態様において、Fc含有分子は、配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体である。

[0358] <アクセプター分子とは>

本発明の一態様において、「アクセプター分子」とは、糖鎖ドナー分子から糖鎖を受領する分子を意味する。アクセプター分子として典型的なものは、モノクローナル抗体に由来する、コアFucが結合していてもよいコアGlcNAcのみからなるN297結合糖鎖を有するIgG又はそのFc断片である。なお、本明細書において、「コアFuc」（又は、「コアフコース」）とは、上記コアGlcNAcに結合しているフコースを意味するものとする。コアGlcNAcには、その由来となる抗体又はその産生方法に応じて、コアFucが結合していても良く、結合していなくても良い。したがって、本発明の一態様において、アクセプター分子は、N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有するFc含有分子（例えば、抗体又はそのFc含有断片）であり、好ましくは、GlcNAc若しくは(Fuc α 1, 6)GlcNAcからなるN297結合糖鎖を有するFc含有分子（例えば、抗体又はそのFc含有断片）を挙げることができる。アクセプター分子の由来としては様々なモノクローナル抗体又は糖鎖含有分子若しくはFc領域含有分子（例えば、Fc、重鎖から可変領域を欠失させた定常領域のみからなるCHと軽鎖の定常領域のみからなるCLと組み合わせたCLCHなど）を利用することができる。本発明のアクセプター分子は、好ましくは(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–IgG（例えば、(Fuc α 1, 6)GlcNAc–mAb1）、(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–Fc、(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–CLCH、GlcNAc–mAb4などが挙げられる。

[0359] 発明の一態様において、N297結合糖鎖を有するFc含有分子は、抗体

由来とすることができる。

[0360] アクセプター分子は、適宜、市販品として購入するか、あるいは、既知の方法を利用又は応用することにより作製することができる。アクセプター分子は、典型的には、糖鎖改変（糖鎖リモデリングともいう）の対象となるFc含有分子（典型的には、IgG型のモノクローナル抗体又は当該抗体のFc断片や定常領域のみからなるCLCH等のFc含有分子）のN297結合糖鎖を、N297結合糖鎖のコアキトビオース構造におけるGlcNAc間の1,4-グリコシド結合（ $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ）を特異的に加水分解する活性を保持したENGaseで処理することにより調製することができる。この場合、ENGaseとしては、Endo-Si WT、Endo-A、Endo-D、Endo-E、Endo-F3、Endo-H、Endo-S、Endo-S2、Endo-Siをはじめ様々なものを利用することができる。したがって、本発明の一態様において、アクセプター分子は、工程1において使用する酵素-A（糖鎖ドナー分子における糖鎖をアクセプター分子に転移する活性を有する酵素）と同一又は異なる酵素を、原料となるFc含有分子（糖鎖改変の対象となるFc含有分子であって、典型的には、宿主細胞由来のN297結合糖鎖、不均一なN297結合糖鎖、又は宿主細胞由来の不均一なN297結合糖鎖を有するFc含有分子）と反応させる等といった手法により、工程1における糖鎖転移反応とは、独立した工程において準備することのできる。また、工程1で利用できる酵素-Aの特徴として、「加水分解活性が残存していてもよい」がある。このため、これらのENGaseで事前に処理する代わりに、酵素-Aが宿主細胞由来の不均一な糖鎖を有するFc含有分子に作用することで、*in situ*でアクセプター分子を調製してもよい。したがって、本発明の一態様において、アクセプター分子は、原料となるFc含有分子（糖鎖改変の対象となるFc含有分子であって、典型的には、宿主細胞由来のN297結合糖鎖、不均一なN297結合糖鎖、又は宿主細胞由来の不均一なN297結合糖鎖を有するFc含有分子）に、酵素-Aを作用させることで、*in situ*及び／

又はワンポットで調製される。また、糖鎖改変（糖鎖リモデリング）に用いられるIgG又はFc含有分子は、好ましくは同一のアミノ酸配列からなるIgG重鎖に由来し、N297結合糖鎖を有する形で産生されたものであればよい。その産生方法は限定されるものではなく、通常知られたモノクローナル抗体の生産方法により産生されたIgG、IgGのCLCH、又は、それを酵素処理して得られたFc断片などを利用することができる。また、このようなIgG又はFc断片は、異なる生産方法や異なるロットで得られたサンプルの混合物を採用してもよい。

[0361] <エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ>

「エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ」とは、ENGase: Endo-β-N-acetylglucosaminidaseとしても知られている糖加水分解酵素であり、糖鎖構造中のキトビオース構造の切断、及び結合生成を担う。また、その由来により、呼び方が異なる。本明細書においては、Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とするエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを「酵素-A」と呼び、糖鎖ドナー分子の糖鎖、例えば、フコースを有さない糖鎖原料（例えば、SGP）の糖鎖を基質とするエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを「酵素-B」と呼ぶ。以下、本発明における酵素-A及び酵素-Bについて説明する。

[0362] <酵素-A>

「酵素-A」は、Fc含有分子（例えば、抗体）のN297結合糖鎖を基質とするエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを意味する。酵素-Aは、一般に、Fc含有分子と親和性の高いドメインと、糖鎖と親和性の高いドメインと、糖鎖転移反応触媒ドメインを含み、典型的には、Fc含有分子（例えば、抗体）のN297結合糖鎖を基質として、加水分解活性と糖鎖転移活性を併せ持つものであるが、本発明において重要なのは、糖鎖ドナー分子における糖鎖（特に、化学的手法、あるいは酵素学的手法で活性化された糖鎖）を、アクセプター分子に転移する活性であるから、加水分解活性については、減弱又は消失していてもよい。むしろ、強い加水分解活性を保持

する酵素は、糖鎖転移活性によりアクセプター分子のコアGlcNAcに転移させた糖鎖をも基質として加水分解する可能性があるため、本発明における酵素-Aの加水分解活性は、相対的に低減されていることが好ましい。なお、上記のとおり、酵素-Aに加水分解活性が残存している場合、工程1におけるアクセプター分子を別途調製することなく、工程1における同一反応槽内で*in situ*で調製し得るという利点を享受し得る。したがって、本発明の一態様において、酵素-Aは、Fc含有分子の糖鎖に作用できる活性（特に、Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とする糖鎖転移活性）を有するものであり、また、本発明の別の一態様においては、酵素-Aは、Fc含有分子の糖鎖に作用できる活性を有しており、かつ、加水分解活性を残留しているか、又は、加水分解活性を消失しているものである。

[0363] 酵素-Aの加水分解活性は、糖鎖における共通の基本構造中のコアキトビオースに含まれる β 1, 4グリコシド結合を特異的に加水分解する活性を意味し、特に、Fc含有分子のN297結合糖鎖における共通の基本構造中のコアキトビオースに含まれる β 1, 4グリコシド結合を特異的に加水分解する活性を意味する。

[0364] 酵素-Aの糖鎖転移活性は、N297にコアGlcNAc（コアフコースが付加していても、付加していなくても良い）のみを有するFc部位を含むアクセプター分子に、上記糖鎖ドナー分子の還元末端をグリコシド結合させる活性を意味する。

[0365] 本発明における酵素-Aとしては、例えば、Endo-S (*Streptococcus pyogenes*由来酵素) (Collin M and Olsen A., EMBO J. 2001, 20, 3046-3055、及びGoodfellow JJ, et al., J Am Chem Soc. 2012, 134, 8030-8033参照)、EndoS2若しくはEndoS49 (Sjogren J, et al., Biochem J. 2013, 455, 107-118、及びShivatare SS, et al., Chem Commu

n (Camb). 2018, 54, 6161-6164 参照)、Endo-F3 (Flavobacterium meningosepticum 由来酵素) (Huang W, et al., Chembiochem. 2011, 12, 932-941、及び Giddens J P, et al., J Biol Chem. 2016, 291, 9356-9370 参照)、又はこれらの変異酵素を挙げることができる。また、本発明における酵素-Aとしては、Streptococcus iniae (Pier GB and Madin SH., Int J Syst Bacteriol. 1976 26, 545-553 参照) に由来するエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (以下、「Endo-Si」と呼び、そのアミノ酸配列 (配列番号49) を図32に示す)、又はその変異酵素を挙げることができる。さらに、本発明における酵素-Aとしては、Storeptococcus 属のゲノム情報から、その配列が特定される酵素 (Vincent P. Richard, et al., Genome Biol. Evol. 2014, 6, 741-753 参照)、又はその変異酵素を挙げることができる。

[0366] 本発明の酵素-Aは、上記の特性を有するものであれば、実施例で使した具体的な酵素に限定されるものではなく、天然から分離された酵素であっても、本発明の酵素の配列情報に基づき人為的に作製又は改変された酵素であっても良い。天然から分離する場合、その分離源とする生物種は特に限定されないが、好ましくは細菌である。

[0367] Endo-Si の活性ドメイン及び Carbohydrate-binding module (CBM) は、結晶構造解析が行われている Endo S (B. Trastoy et al., PNAS (2014) vol 111, No. 18, pp 6714-6719) との配列比較から、それぞれ、配列番号49のアミノ酸番号106~447及びアミノ酸番号762~897の領域であると推察され、この2つが加水分解活性及び／又は転移活性と、抗体との相互作用に重要な部位であると考えられる。したがって、

本発明の酵素－Aとして、配列番号49のアミノ酸番号106～447及び／又はアミノ酸番号762～897に記載のアミノ酸配列を含み、好ましくは、配列番号49のアミノ酸番号106～897に記載のアミノ酸配列を含み、より好ましくは配列番号49のアミノ酸番号106～928に記載のアミノ酸配列を含み、さらに好ましくは配列番号49のアミノ酸番号34～928に記載のアミノ酸配列を含み、かつ、糖鎖転移活性を示すポリペプチドが挙げられる。

[0368] 上記のとおり、エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼは、通常、加水分解活性と糖鎖転移活性を併せ持つところ、強い加水分解活性を保持する酵素は、糖鎖転移活性によりアクセプター分子（N297結合糖鎖としてコアGlcNAcを有する抗体若しくはそのFc領域含有分子）のコアGlcNAcに転移させた糖鎖をも基質として加水分解し、所望の糖鎖転移体を適切に取得できない場合がある。そのため、糖鎖リモデリング抗体若しくは糖鎖修飾化合物の合成においては、糖鎖転移活性との比較において加水分解活性を相対的に低下させた変異酵素が有用である。したがって、本発明の一態様において、酵素－Aは、Endo-S、Endo-S-2、Endo-Si、Endo-Sd、Endo-Se、又はEndo-Szの変異酵素であり、かつその対応する野生型酵素より低い加水分解活性を有する変異酵素であり、好ましくは、図30～図32及び図37～図39において太字で示したアミノ酸残基を適宜置換した変異酵素であり、特に好ましくは、Endo-S D233Q、Endo-S D233Q/Q303L、Endo-S D233Q/E350A、Endo-S D233Q/E350Q、Endo-S D233Q/E350D、Endo-S D233Q/E350N、Endo-S D233Q/D405A、Endo-Si D241Q、Endo-Si D241Q/Q311L、Endo-Si D241Q/E360Q、Endo-Si D241M、Endo-Si D241M/Q311L、Endo-Si D241M/E360Q、Endo-Si T190Q、Endo-Si T190/D241Q、Endo-Si

T190Q/D241M、Endo-Si D241X₁ (X₁は、K、R及びD以外のいずれかのアミノ酸残基を示し、具体的には、A、N、C、Q、E、G、H、I、L、M、F、P、S、T、W、Y、又はV、好ましくは、A、Q、E、H、I、L、M、F、P、S、T、W、Y、又はVを示す)、Endo-Si T190X₂ (X₂は、F、H、K、M、Q、R、W又はYのアミノ酸残基を示す)、Endo-Si Q311X₃ (X₃は、F、N、又はYのアミノ酸残基を示す)、Endo-Si E360K、Endo-S2 D184M、Endo-S2 T138Q、Endo-S2 D184Q、Endo-S2 D184Q/Q250L、Endo-S2 D184Q/E289Q、Endo-S2 D184M/Q250L、Endo-S2 D184M/E289Q、Endo-S2 D182Q、Endo-S2 D226Q、Endo-S2 T227Q、Endo-S2 T228Q、Endo-Sd D232Q、Endo-Sd D232M、Endo-Sd D232Q/Q302L、Endo-Sd D232M/Q302L、Endo-Se D233Q、Endo-Se D233M、Endo-Se D233Q/Q303L、Endo-Se D233M/Q303L、Endo-Sz D234Q、Endo-Sz D234M、Endo-Sz D234Q/Q304L、又はEndo-Sz D234M/Q304Lを挙げることができるが、これらに限定されない。また、酵素-Aは、上記において言及した特定の変異に加えて、さらなる変異が加えられていてもよく、例えば、特許文献（国際公開2022/050300号）などを参考に、本酵素活性に影響しない範囲で、1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個又は1個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は、付加していてもよい。また、酵素-Aのアミノ酸配列としては、特許文献（国際公開2022/050300号）などを参考に、特定の変異アミノ酸残基以外のアミノ酸残基に対して少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%、96%、97%、98%もしくは99%以上の相同性もしくは

は同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0369] <酵素－B>

「酵素－B」は、糖鎖ドナー分子の糖鎖を基質とするエンドー β －N－アセチルグルコサミニダーゼ、特に、糖鎖ドナー分子の糖鎖を基質とするがN297結合糖鎖を基質としない（言い換えれば、N297結合糖鎖への反応性が低い、好ましくは反応性が極めて低い）エンドー β －N－アセチルグルコサミニダーゼを意味するものである。酵素－Bが基質とする糖鎖ドナー分子上の糖鎖部分は、ハイマンノース型糖鎖、混成型糖鎖及び複合型糖鎖のいずれであってもよいが、好ましくは、ハイマンノース型糖鎖又は複合型糖鎖であり、特に好ましくは、複合型糖鎖である。したがって、本発明の一態様において、酵素－Bが基質とする糖鎖ドナー分子上の糖鎖部分は、ハイマンノース型糖鎖又は複合型糖鎖であり、好ましくは、複合型糖鎖である。また、本発明において、複合型糖鎖は、2分岐型、3分岐型又は4分岐型のいずれであってもよいが、好ましくは、酵素－Bが基質とする糖鎖ドナー分子上の糖鎖部分は、2分岐型の複合型糖鎖である。本発明の一態様において、酵素－Bは、フコースを有さない糖鎖原料（SGP等の糖ペプチドや糖タンパク質）を基質とするエンドー β －N－アセチルグルコサミニダーゼであり、好ましくは、フコースを有さない2分岐型の複合型糖鎖を含む糖鎖原料を基質とするエンドー β －N－アセチルグルコサミニダーゼである。

[0370] 本発明の酵素－Bとしては、酵素－Aの存在下、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖を含む糖鎖ドナー分子に作用することで、当該還元末端が糖鎖転移反応に利用可能な状態となった活性化中間体を生成し、結果的に、酵素－Aによる糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖のアクセプター分子への糖鎖転移反応を促進する性質を持つ酵素であることが好ましい。ここで、酵素－B自身の糖鎖転移活性が、糖鎖ドナー分子を活性化する能力と相関があると考えられることから、本発明の一態様において、酵素－Bは、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子（例えば、SGP）の糖鎖を基質とするが、N297結合糖鎖を基質としないエンドー β －N－アセチルグルコサミニダーゼである。

－β－N－アセチルグルコサミニダーゼの中から、GlcNAcを有するアクセプター（例えば、1－メチルエチル－2－（アセチルアミノ）－2－デオキシ－β－D－グルコピラノシド、2－（アセチルアミノ）－2－デオキシ－β－D－グルコピラノシド等のGlcNAc誘導体）への糖鎖転移活性を指標として、選択することができる。したがって、本発明の一態様において、酵素－Bは、SGPからGlcNAc誘導体への糖鎖転移活性を有する酵素である。

[0371] 酵素－Bによる、糖鎖ドナー分子の活性化作用は、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子に作用し、当該還元末端が糖鎖転移反応に利用可能な状態となった活性化中間体を生成するというものであるところ、酵素－Bによる加水分解活性が高い場合、活性化中間体は、酵素－Aを介して、アクセプター分子と反応するのではなく、反応系に存在するH₂O分子と反応し、多数の遊離糖鎖が生成されるおそれがある。したがって、本発明における酵素－Bは、糖鎖活性化作用との比較において、相対的に低減された加水分解活性を有するものが好ましい。

[0372] 本発明の酵素－Bとしては、例えば、Endo-M (*Mucor hiemalis* 由来酵素) (Yamamoto K, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 1994, 203, 244–252、及びUmekawa M, et al., *J. Biol Chem.* 2021, 285, 511–521 参照)、Endo-CC (*Coprinopsis cinerea* 由来酵素) (Eshima Y, et al., *PLoS One.* 2015, 10, e0132859 参照)、Endo-Om (*Ogataea minuta* 由来酵素) (Murakami S, et al., *Glycobiology.* 2013, 23, 736–744 参照)、Endo-Rp (*Rhizomucor pusillus* 由来酵素) (WO2018101454)、又はそれらの変異酵素（好ましくは、野生型と比較して加水分解活性を低下させた変異酵素）が挙げられる。本発明の一態様において、

酵素-Bは、Endo-M、Endo-Om、Endo-CC、又はEndo-Rpの変異酵素であって、かつその対応する野生型酵素より低い加水分解活性を有する変異酵素であり、好ましくは、図33～図36において太字で示したアミノ酸残基を適宜置換した変異酵素であり、特に好ましくは、Endo-Rp N172Q、Endo-Rp N172H、Endo-Rp N172A、Endo-Rp N172C、Endo-Rp N172D、Endo-Rp N172E、Endo-Rp N172G、Endo-Rp N172I、Endo-Rp N172L、Endo-Rp N172M、Endo-Rp N172P、Endo-Rp N172S、Endo-Rp N172T、Endo-Rp N172V、Endo-Rp W278F/S216V、Endo-Rp W278F/N246D、Endo-Rp W278F/D276N、Endo-Rp W278F/A310D、Endo-Rp W278F/N172D/F307Y、Endo-Rp W278F/N172D/F307H、Endo-Rp W278F/N172D/A310D、Endo-Rp W214F/F307Y/L306I、Endo-M N175Q、Endo-M N175Q/Y217F、Endo-CC N180H及びEndo-Om N194Qからなる群から選択される酵素を挙げることができるが、これらに限定されない。また、酵素-Bは、上記において言及した特定の変異に加えて、さらなる変異が加えられていてもよく、例えば、特許文献（国際公開2022/050300号）などを参考に、本酵素活性に影響しない範囲で、1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個又は1個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は、付加していてもよい。また、酵素-Bのアミノ酸配列としては、特許文献（国際公開2022/050300号）などを参考に、特定の変異アミノ酸残基以外のアミノ酸残基に対して少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%、96%、97%、98%もしくは99%以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0373] 本発明に係る製造方法の典型的な実施態様において、酵素－Aと酵素－Bは、それぞれ別分子として工程1に添加されるが、酵素－Aと酵素－Bは、それぞれ所望の役割を果たす限り、直接的又は間接的に結合した状態において反応系に添加されてもよい。したがって、本発明の一態様において、酵素－Aと酵素－Bは、直接的又は間接的に化学的に結合した状態として反応系に添加されてもよく、例えば、両分子は、任意の固相担体に固定化された固定化酵素や、任意のアミノ酸、PEGなどのポリマー、オリゴマーリンカーなどで結合された融合タンパク質の状態として反応系に添加されてもよい。言い換えれば、本発明の一態様において、酵素－Aと酵素－Bとは、直接的又は間接的に化学的に結合されており（＝酵素－Aと酵素－Bとは、融合されており）、例えば、任意の固相担体に固定化された固定化酵素や、任意のアミノ酸、PEGなどのポリマー、オリゴマーリンカーなど、好ましくは、アミノ酸リンカーで結合された融合タンパク質として反応系に添加され得る。なお、本発明においては、酵素－A、酵素－Bが、欠失のない全長分子ではなく、機能断片であったとしても、当該機能断片が所望の機能を有する限り、当該断片も酵素－A、酵素－Bの一態様としてみなす。よって、本発明における酵素－Aと酵素－Bは、例えば、「酵素－A」と「酵素－B」、「酵素－Aの機能を有する酵素断片」と「酵素－Bの機能を有する酵素断片」、「酵素－A」と「酵素－Bの機能を有する酵素断片」、及び、「酵素－Aの機能を有する酵素断片」と「酵素－B」が、直接的又は間接的に化学結合した状態も含む。「酵素－Aの機能を有する酵素断片」としては、上記した酵素－A、あるいは、Endo-B11 (GenBank Accession number: ACJ53522.1)、Endo-B12 (GenBank Accession number: BAJ71450.1)、Endo-BT-3987 (GenBank Accession number: AAO79092.1)、Endo-E (GenBank Accession number: AAR20477.1)、Endo-F (GenBank Accession number: AAA24922.1)、Endo-F2 (Ge

nBank Accession number: AAA24923.1)、Endo-F3 (GenBank Accession number: AAA24924.1)、Endo-CoM (GenBank Accession number: XP006673222.1)、Endo-SB (GenBank Accession number: BBB35949.1)の全長配列から特定の機能配列に断片化したアミノ酸配列であり、かつ特定の変異が加えられていてもよいアミノ酸配列を有する断片を挙げることができる。

また、「酵素-Bの機能を有する酵素断片」としては、上記した酵素-Bの触媒活性ドメインあるいは、Endo-A (GenBank Accession number: AAD10851.1)、Endo-CE (GenBank Accession number: BAB84821.1)、Endo-Tsp1006 (GenBank Accession number: CCY37287.1)、Endo-Tsp1263 (GenBank Accession number: CDD88945.1)、Endo-Tsp1457 (GenBank Accession number: CDD89351.1)、Endo-BB (GenBank Accession number: AAN25135.1)、Endo-BH (GenBank Accession number: BAB04504.1)、Endo-BN (GenBank Accession number: WP_007484749.1)、Endo-CC1 (GenBank Accession number: XP_001839402.1)、Endo-CC2 (GenBank Accession number: XP_002911817.1)、Endo-D (GenBank Accession number: AAK74656.1)、Endo-Pm (GenBank Accession number: ADK97032.1)の全長配列から特定の機能配列に断片化したアミノ酸配列であり、かつ特定の変異が加えられていてもよいアミノ酸配列を有する断片を挙げることができる。例えば、酵素-A、酵素-B、各々の機能配列に関して、特許文献（国際公開2022/050300号）

などを参考に、上記機能に影響しない範囲で、1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個又は1個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、及び／又は、付加していてもよく、また、各々のアミノ酸配列としては、特許文献（国際公開2022/050300号）などを参考に、活性に影響する特定のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基に対して少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%、96%、97%、98%もしくは99%以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0374] 酵素－Aと酵素－Bの組み合わせとしては、それぞれの役割を果たす酵素－Aと酵素－Bであれば、任意の組み合わせを使用することができる。例えば、以下の表に記載した酵素－Aと酵素－Bの任意の組み合わせを使用することができる。

[0375]

[表1]

	酵素－A		酵素－B
A-1	Endo-Si D241M Q311L	B-1	Endo-Rp N172H
A-2	Endo-Si D241Q	B-2	Endo-Rp N172Q
A-3	Endo-Si D241Q E360Q	B-3	Endo-Rp N172V
A-4	Endo-Si D241M	B-4	Endo-M N175Q
A-5	Endo-Si D241Q Q311L	B-5	Endo-M N175Q Y217F
A-6	Endo-Si D241M E360Q		
A-7	Endo-Si WT		
A-8	Endo-S D233Q E350Q		
A-9	Endo-S WT		
A-10	Endo-S2 D184M		
A-11	Endo-S2 T138Q		
A-12	Endo-S2 WT		

	酵素－A		酵素－A
A-13	Endo-Si T190F	A-26	Endo-Si D241L
A-14	Endo-Si T190H	A-27	Endo-Si D241P
A-15	Endo-Si T190K	A-28	Endo-Si D241R
A-16	Endo-Si T190M	A-29	Endo-Si D241S
A-17	Endo-Si T190Q	A-30	Endo-Si D241T
A-18	Endo-Si T190R	A-31	Endo-Si D241V
A-19	Endo-Si T190W	A-32	Endo-Si D241W
A-20	Endo-Si T190Y	A-33	Endo-Si D241Y
A-21	Endo-Si D241A	A-34	Endo-Si Q311F
A-22	Endo-Si D241E	A-35	Endo-Si Q311K
A-23	Endo-Si D241F	A-36	Endo-Si Q311N
A-24	Endo-Si D241H	A-37	Endo-Si Q311Y
A-25	Endo-Si D241I	A-38	Endo-Si E360K

	酵素－A
A-39	Endo-S2 D184M/Q250L
A-40	Endo-S2 D184Q/Q250L
A-41	Endo-Sd WT
A-42	Endo-Se WT
A-43	Endo-Se D233M
A-44	Endo-Sz WT
A-45	Endo-Sz D234M
A-46	Endo-Sz D234M/Q304L

[0376] また、上記のとおり、酵素－Aと酵素－Bとが融合されている場合、当該酵素－Aと酵素－Bとしては、それぞれの役割を果たす限り、任意の組み合わせを使用することができる。より具体的には、例えば、酵素－AはEndo-Si変異体であり酵素－BはEndo-Rp変異体であり、例えば、酵素－AはEndo-Si D241M/Q311LあるいはEndo-Si D241Q/Q311Lであり、酵素－BはEndo-Rp N172HあるいはEndo-Rp N172Vである。さらに別の具体的態様として

は、融合酵素はEndo-Rp N172HとEndo-Si D241M/Q311Lとの融合タンパク質、Endo-Rp N172VとEndo-Si D241Q/Q311Lとの融合タンパク質、又は、Endo-Si D241Q/Q311LとEndo-Rp N172Vであり、例えば、以下の表に記載した「酵素-A」-「酵素-B」融合タンパク酵素、「酵素-B」-「酵素-A」融合タンパク酵素を挙げることができる。

[0377] [表2]

	「酵素-A」-「酵素-B」融合タンパク酵素 あるいは、「酵素-B」-「酵素-A」融合タンパク酵素
BA-1	[Endo-Rp N172H]-[Endo-Si D241M/Q311L]
BA-2	[Endo-Rp N172V]-[Endo-Si D241Q/Q311L]

[0378] 酵素-Aと酵素-Bとの融合タンパク質は、非特許文献（Joaquim, et al., Processes, 2022, 10, 494.）などを参考に、常法に従って製造することができ、例えば、酵素-Aと酵素-Bを任意の固相担体に物理的、または化学的相互作用を介して結合させることで製造できる。あるいは、非特許文献（F Grueninger-Leitch, et al., Protein Sci. 1996, 12, 2617-22、および、Emily MK, et al., Protein Eng Des Sel. 2005, 10, 497-501）、および特許文献（WO2017137459）などを参考に、融合タンパク質を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることができる。すなわち、酵素-Aと酵素-Bをコードする遺伝子を結合させた後、遺伝子操作によって酵素-Aと酵素-Bに由来する機能を持つ単一の酵素を宿主細胞に産生させることができる。このように遺伝子操作によって融合酵素を宿主細胞に生産させる場合、酵素-Aと酵素-Bを別々に準備する必要がなく、準備すべき酵素の数を減らすことができるため、酵素の製造コストならびに労力を削減でき得る。酵素-Aと酵素-Bとをアミノ酸からなるリンカーを介して結合させる場合、リンカーは、一態様において、一または複数のアミノ酸から構成され、非特許文献（Chen, et al., Adv Drug Deli

v Rev. 2013 Oct 15; 65(10): 1357-1369.)などを参考に、当該技術分野で知られる典型的な性質を有しているものが使用でき、柔軟あるいはリジッドなリンカー、切断可能または切断不可能な性質なリンカーでもよく、長いあるいは短いリンカーを使用可能である。一態様においてリンカーは、アミノ酸配列断片として、(SGGS) n 、(GGGS) n 、(GGGGS) n 、(G) n 、(EAAAK) n 、(EF) n 、又は(GGS) n 或いはこれらの組合せを含むことができる(n は1～30の整数であり、好ましくは1～20の整数であり、さらに好ましくは1～10の整数であり、より好ましくは1～6の整数である)。また、リンカーには、ポリヒスチジンタグ、HAタグ、FLAGタグ、CBDタグ、Fcタグ、GSTタグなど、精製タグとして常用されるアミノ酸配列を含めることができる。一態様において精製タグはポリヒスチジンタグ、HAタグ、FLAGタグ、Fcタグ、GSTタグであり、好ましくはポリヒスチジンタグ、HAタグ、FLAGタグ、CBDタグであり、さらに好ましくはポリヒスチジンタグ、FLAGタグであり、より好ましくはポリヒスチジンタグである。

[0379] <添加剤>

本発明の一態様において、上記工程1は、アクセプター分子と糖鎖ドナー分子とを、酵素-A、酵素-B及び特定の添加剤の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程である。添加剤は、静電相互作用、疎水相互作用、溶媒効果等を介して、ワンポット反応における糖鎖転移率に正の影響を与え得る。特に、Fc含有分子（典型的には抗体）のFc領域に変異がある場合、Fc領域の立体構造が変わり、糖鎖転移率が変動する場合があります、たとえば、アクセプター分子として使用する抗体のFc領域に何らかの変異がある場合、当該変異がない場合と比較して、糖鎖転移率が下がり得る。添加剤は、アクセプター分子として使用するFc含有分子（典型的には抗体）の糖鎖転移率の調節に有用であり、アクセプター分子として使用するFc含有分子（典型的には抗体）のFc領域に変異があり、当該Fc領域の変異に起因して糖鎖

転移率が下がり得る場合にとりわけ有用である。

- [0380] 本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、一価の塩である。本明細書において、「一価の塩」とは、一価の陰イオン、あるいは一価の陽イオンを含む塩を意味する。一価の塩としては、無機塩（塩化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム、ヨウ化カリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化リチウム、臭化カリウム、フッ化ナトリウム、およびフッ化カリウム等のアルカリ金属塩、フッ化アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩等）や、有機塩（酢酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等）を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、塩化ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、塩化リチウム又は酢酸ナトリウムであり、好ましくは、塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム又は酢酸ナトリウムである。本発明の別の態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、一価のアルカリ金属塩であり、好ましくは、塩化ナトリウム、酢酸カリウム、塩化リチウム又は酢酸ナトリウムであり、さらに好ましくは、塩化ナトリウムである。
- [0381] 本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、有機溶媒である。工程 1 にて使用できる有機溶媒としては、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのような極性プロトン性溶媒、1-ブタノール、2-プロパノール、1-プロパノール、エタノール、メタノールのような極性プロトン性溶媒を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の一態様において、工程 1 にて使用する有機溶媒は、エタノール又はジメチルスルホキシドである。
- [0382] 本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、界面活性剤である。工程 1 にて使用できる界面活性剤としては、陰イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、両性界面活性剤を挙げることができるが、これらに限定されない。陰イオン系界面活性剤としては、オクタン酸ナトリウム、デカン酸ナトリウムのようなカルボン酸型、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、1-オクタンスルホン酸ナトリウムのようなスル

ホン酸型、ラウリル硫酸ナトリウム、ミリスチル硫酸ナトリウムのような硫酸エステル型、及びラウリルリン酸、ラウリルリン酸ナトリウムのようなリン酸エステル型の界面活性剤を挙げることができ、陽イオン系界面活性剤としては、塩化テトラメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムのような第4級アンモニウム塩型、モノメチルアミン塩酸塩、ジメチルアミン塩酸塩のようなアルキルアミン塩型、及び塩化ブチルピリジニウム、塩化セチルピリジニウムのようなピリジン環含有型の界面活性剤を挙げることができ、非イオン系界面活性剤としては、ラウリン酸グリセリン、ソルビタン脂肪酸エステルのようなエステル型、ポリエチレングリコール（ポリエチレングリコール2000、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール11000、ポリエチレングリコール20000等）、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルのようなエーテル型、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート65、ポリソルベート80等）のようなエステルエーテル型、ラウリン酸ジエタノールアミド、オレイン酸ジエタノールアミドのようなアルカノールアミド型、オクチルグルコシド、デシルグルコシドのようなアルキルグリコシド型、及びセタノール、ステアリルアルコールのような高級アルコール型の界面活性剤を挙げることができ、両性界面活性剤としては、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタインのようなアルキルベタイン型、コカミドプロピルベタイン、コカミドプロピルヒドロキシスルタインのような脂肪酸アミドプロピルベタイン型、ラウロイルグルタミン酸ナトリウム、ラウロイルグルタミン酸カリウムのようなアミノ酸型、及びラウリルジメチルアミンN-オキシド、オレイルジメチルアミンN-オキシドのようなアミノオキシド型の界面活性剤を挙げることができる。本発明の一態様において、工程1にて使用する界面活性剤は、非イオン系界面活性剤であり、本発明の別の態様において、工程1にて使用する界面活性剤は、エーテル型又はエステルエーテル型の非イオン系界面活性剤であり、本発明の更

なる別の一態様において、工程 1 にて使用する界面活性剤は、ポリエチレングリコール又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、好ましくは、ポリエチレングリコール 6000 又はポリソルベート 20 である。

[0383] 本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、糖類である。工程 1 にて使用できる糖類としては、単糖、二糖、オリゴ糖（本明細書では、三糖以上の糖をオリゴ糖と呼ぶ）、デオキシ糖、ウロン酸、アミノ糖、糖アルコール、ラクトン、多糖を挙げることができるが、これらに限定されない。工程 1 にて添加剤として使用される単糖としては、グリセルアルデヒドのようなアルドトリオース、エリトロース、トレオースのようなアルドテトロース、リボース、キシロースのようなアルドペントース、グルコース、マンノース、ガラクトースのようなアルドヘキソース、ジヒドロキシアセトンのようなケトトリオース、エリトルロースのようなケトテトロース、キシロロース、リブロースのようなケトペントース、フルクトース、ソルボースのようなケトヘキソースを挙げることができる。なお、工程 1 の酵素-Bとして Endo-Rp 酵素（変異体を含む）を使用する場合、グルコースは Endo-Rp 酵素が活性化した糖鎖のアクセプターとなる可能性があるため、糖鎖転移率を下げる場合がある。したがって、本発明の一態様において、工程 1 にて添加剤として使用する糖類は、グルコースを含まない。工程 1 にて添加剤として使用される二糖としては、トレハロース、イソトレハロース、コージビオース、ソホロース、ニゲロース、ラミナリビオース、マルトース、セロビオース、イソマルトース、ゲンチオビオース、ラクトース、スクロースなど、オリゴ糖としては、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖など、デオキシ糖としては、デオキシリボース、フコースなど、ウロン酸としては、グルクロン酸、ガラクツロン酸など、アミノ糖としては、グルコサミン、ガラクトサミン糖など、糖アルコールとしては、グリセリン、キシリトール、ソルビトールなど、ラクトンとしては、アスコルビン酸、グルクロノラクトンなど、多糖としては、デンプン、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、セルロース、ペクチン、グルコマンナンなどを挙げることができる。

本発明の一態様において、工程 1 にて使用する糖類は、単糖、二糖又はアミノ糖であり、本発明の別の態様において、工程 1 にて使用する糖類は、二糖又はアミノ糖であり、本発明の更なる別の態様において、工程 1 にて使用する糖類は、トレハロース又はソルビトールである。

[0384] 本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤は、アミノ酸類である。工程 1 において添加剤として使用できるアミノ酸類としては、アミノ基とカルボキシ基の両方の官能基を持つ有機化合物であれば特に限定されないが、好ましくは、アルギニン、ヒスチジン、リシンなどの塩基性アミノ酸、グルタミン酸、アスパラギン酸などの酸性アミノ酸、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システインなどの中性極性アミノ酸、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アラニン、グリシン、プロリンなどの中性非極性アミノ酸を例示することができる。本発明の一態様において、工程 1 において添加剤として使用するアミノ酸類は、塩基性アミノ酸であり、好ましくは、アルギニン、ヒスチジン又はリシンであり、さらに好ましくは、アルギニン又はヒスチジンである。また、工程 1 において添加剤として使用できるアミノ酸類は、塩の形態で添加されてもよく、例えば、塩基性アミノ酸であるアルギニン、ヒスチジン又はリシンは、塩酸塩として添加することができる。よって、本発明の一態様において、工程 1 において添加剤として使用するアミノ酸類は、アルギニン塩酸塩、ヒスチジン塩酸塩又はリシン塩酸塩であり、さらに好ましくは、アルギニン塩酸塩又はヒスチジン塩酸塩である。

[0385] 工程 1 にて使用する添加剤の濃度は、添加剤を加えることでFc含有分子や酵素を沈殿させない限りにおいて、すなわち、ワンポット反応の反応性が残存する限り、任意に設定でき、例えば、本明細書の実施例 15-3 において記載した方法を使用又は応用することによって、設定することができる。本発明の一態様において、工程 1 にて使用する添加剤が一価の塩（例えば、塩化ナトリウム）である場合、その濃度は 1500 mM 以下、1000 mM 以下、900 mM 以下、800 mM 以下、700 mM 以下、600 mM 以下

、500mM以下、450mM以下、400mM以下、350mM以下、300mM以下、250mM以下、200mM以下、150mM以下、100mM以下又は50mM以下であり、本発明の別の態様において、工程1にて使用する添加剤が一価の塩（例えば、塩化ナトリウム）である場合、その濃度は1mM以上、5mM以上、10mM以上、20mM以上、30mM以上、40mM以上、50mM以上、100mM以上、150mM以上、200mM以上、250mM以上、300mM以上、350mM以上、400mM以上、450mM以上、500mM以上、600mM以上、700mM以上、800mM以上、900mM以上又は1000mM以上であり、本発明の更なる別の態様において、工程1にて使用する添加剤が一価の塩（例えば、塩化ナトリウム）である場合、その濃度は上記において例示したいずれかの上限と下限に挟まれる任意の濃度範囲内に設定することができ、例えば、1～700mM、10～600mM、100～550mM、又は50～1000mMの範囲内に設定することができる。

本発明の一態様において、添加剤は事前に含まれていてもよいし、工程1において添加されていてもよい。

[0386] 本発明の一態様において、工程1にて使用する添加剤が有機溶媒（例えば、エタノールやDMSO）である場合、その濃度は0.1～20%v/vであり、好ましくは0.2～10%v/vであり、より好ましくは0.3～5%v/vであり、さらに好ましくは0.4～3%v/vであり、特に好ましくは0.5～2%v/vであり、最も好ましくは約1%v/vである。

[0387] 本発明の一態様において、工程1にて使用する添加剤が界面活性剤（例えば、ポリエチレングリコール6000やポリソルベート20）である場合、その濃度は0.1～20%v/vであり、好ましくは0.2～10%v/vであり、より好ましくは0.3～5%v/vであり、さらに好ましくは0.4～3%v/vであり、特に好ましくは0.5～2%v/vであり、最も好ましくは約1%v/vである。

[0388] 本発明の一態様において、工程1にて使用する添加剤が糖類（例えば、ト

レハロース又やソルビトール)である場合、その濃度は1 mM～10 Mであり、好ましくは5～1000 mMであり、より好ましくは10～500 mMであり、さらに好ましくは15～200 mMであり、特に好ましくは20～100 mMであり、最も好ましくは約40 mMである。

[0389] 本発明の一態様において、工程1にて使用する添加剤がアミノ酸類(例えば、アルギニン塩酸塩やヒスチジン塩酸塩)である場合、その濃度は1 mM～10 Mであり、好ましくは5～1000 mMであり、より好ましくは10～500 mMであり、さらに好ましくは15～200 mMであり、特に好ましくは20～100 mMであり、最も好ましくは約40 mMである。

[0390] <工程1>

本発明の一態様において、工程1は、アクセプター分子と糖鎖ドナー分子とを、酵素-A、酵素-B及び特定の添加剤の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程である。当該工程1の反応条件としては、還元末端が活性化されていないGlcNAcを糖鎖ドナー分子として用いる既知の糖鎖転移反応の反応条件に準じて、又は、既知の糖鎖転移反応の反応条件を利用又は応用することによって、適宜選択することができる。

[0391] 工程1の反応は、緩衝液中で行うことが好ましく、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子の分解を促進しない条件下で行うことが望ましい。この観点から、本発明の一態様において、工程1の反応系内のpHは、5.8～9.5の間で適宜選択でき、好ましくは6.2～8.5、より好ましくは6.5～8.0、さらに好ましくは6.5～7.5の範囲である。緩衝液は、リン酸緩衝液(pH 6.0～7.5)、MOPS-NaOH緩衝液(pH 6.5～8.0)、トリス塩酸緩衝液(pH 7.0～9.0)などから適宜選ぶことが可能であり、好ましくは、トリス塩酸緩衝液(pH 7.0～9.0)である。酵素を安定化させる目的で、反応液中に酵素反応を阻害しない更なる添加剤を加えてもよい。

[0392] 反応温度は、4℃から50℃の間で適宜選択できるが、好ましくは15℃～45℃であり、より好ましくは20℃～40℃であり、さらに好ましくは

25℃～40℃である。

- [0393] 反応時間は、10分から96時間の間で適宜選択できるが、好ましくは、0.5時間～80時間であり、より好ましくは、2時間～70時間、さらに好ましくは4時間～60時間、特に好ましくは6～48時間又は8～30時間であり、最も好ましくは16～24時間である。反応液の少量を経時的に採取し、糖鎖転移反応の進行度を確認しながら反応の終了を判断してもよい。一般に、糖鎖転移反応の進行度は、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）、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、全自動電気泳動システム、あるいは液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）などによりモニタリングすることができ、例えば、糖鎖リモデリング抗体を重鎖と軽鎖にフラグメント化した後、全自動電気泳動システムを用いて、N297結合糖鎖が付加している重鎖側のみ保持時間が変化することを確認することで、モニタリングすることができる。
- [0394] 工程1は、糖鎖ドナー分子の糖鎖を、アクセプター分子であるN297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体若しくはそのFc領域含有分子に直接転移するワンポット法として行うことができる。
- [0395] 還元末端がオキサゾリン化された糖鎖を含む糖鎖ドナー分子を用いる糖鎖リモデリングにおいては、アクセプター分子中のLysに対してEndo酵素非介在型の化学反応である糖化（Glycation）が進行しやすくなることから、反応液中の抗体濃度を低く設定することが常用されている。他方、還元末端が活性化されていないGlnNAcを含む糖鎖ドナー分子を用いる場合、糖化の原因である、化学的に合成されたオキサゾリン体溶液を添加しないため、糖化を懸念する必要がなく、よって、比較的高濃度のアクセプター分子濃度を採用することができる。むしろ、分子間の接触頻度が高まるという観点から、高濃度のアクセプター分子を添加することが効果的である。したがって、工程1におけるアクセプター分子濃度は、既知の方法に準じて適宜設定することができるが、例えば、工程1の反応系内最終アクセプ

ター分子濃度の上限値としては、 200 mg/mL 、好ましくは 160 mg/mL 、より好ましくは 120 mg/mL 、さらに好ましくは 100 mg/mL 、特に好ましくは 80 mg/mL を挙げることができ、下限値としては、 10 mg/mL 、好ましくは 14 mg/mL 、より好ましくは 18 mg/mL 、さらに好ましくは 20 mg/mL を挙げることができ、濃度範囲としては、上記において言及した上限値及び下限値のそれぞれの任意の組み合わせ、又は、 $10\text{ mg/mL} \sim 200\text{ mg/mL}$ 、好ましくは $14\text{ mg/mL} \sim 160\text{ mg/mL}$ 、より好ましくは $18\text{ mg/mL} \sim 120\text{ mg/mL}$ 、さらに好ましくは $20\text{ mg/mL} \sim 100\text{ mg/mL}$ 、特に好ましくは $20\text{ mg/mL} \sim 80\text{ mg/mL}$ を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0396] 工程1における、糖鎖ドナー分子の添加量としては、既知の方法を利用又は応用することにより適宜設定することができる。例えば、本発明の一態様において、工程1において添加（使用）される糖鎖ドナー分子の量の下限値としては、アクセプター分子1当量に対して、2当量、3当量、4当量、5当量、6当量、7当量、8当量、9当量、10当量、11当量、12当量、13当量、14当量、15当量、16当量、17当量、18当量、19当量又は20当量を挙げることができ、糖鎖ドナー分子の量の上限値としては、300当量、200当量、150当量、100当量、90当量、80当量、75当量、70当量、65当量、60当量、55当量、45当量、40当量、35当量、30当量、25当量又は20当量を挙げることができるが、これらに限定されない。また、工程1において添加（使用）される糖鎖ドナー分子の量の範囲としては、上記において言及した上限値及び下限値のそれぞれの任意の組み合わせ、又は、アクセプター分子1当量に対して、5～80当量、好ましくは7～60当量、より好ましくは8～50当量、特に好ましくは10～40当量を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0397] 本発明の一態様において、工程1の糖鎖転移率としては、任意の数値を設定でき、例えば、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70

%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上又は95%以上を設定することができ、他方、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下又は60%以下に設定することもできる。本発明の一態様において、工程1の糖鎖転移率は、80%を超えるものであり、好ましくは、85%を超えるものであり、特に好ましくは90%を超えるものである。なお、上記「糖鎖転移率」は、常法に従って決定することができ、例えば、実施例15-2Bにおいて開示した全自動電気泳動システムを用いて決定することができる。なお、糖鎖転移率の測定のタイミングは使用する酵素によって異なるが、1分以上100時間以内、好ましくは1時間以上80時間以内、より好ましくは2時間以上72時間以内である。

[0398] なお、工程1において使用するアクセプター分子は、工程1とは独立した別個の調製方法において調製することができる。したがって、本発明の一態様において、本発明の方法は、工程1に先立ち、アクセプター分子を別個に調製する工程をさらに含む。この態様において、アクセプター分子は、たとえば、工程1において使用する酵素-A（糖鎖ドナー分子における糖鎖をアクセプター分子に転移する活性を有する酵素）と同一又は異なる酵素を、原料となるFc含有分子（糖鎖改変の対象となるFc含有分子であって、典型的には、宿主細胞由来のN297結合糖鎖、不均一なN297結合糖鎖、又は宿主細胞由来の不均一なN297結合糖鎖を有するFc含有分子）と反応させる等といった手法により、工程1における糖鎖転移反応とは、独立した工程において準備することができる。本発明の一態様において、アクセプター分子は、たとえば、糖鎖改変の対象となるFc含有分子のN297結合糖鎖を、N297結合糖鎖のコアキトビオース構造におけるGlcNAc間の1,4-グリコシド結合（ $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ）を特異的に加水分解する活性を保持したENGaseで処理すること等により調製することができる。

[0399] あるいは、工程1で使用する酵素-Aに加水分解活性が残存している場合

、工程 1 におけるアクセプター分子は、工程 1 と同一槽内において *in situ* で調製することができる。したがって、本発明の工程 1 は、アクセプター分子が *in situ* で調製される態様を含む。この態様では、工程 1 に先立って、アクセプター分子を別個に調製する工程を省略できることから、製造工程が簡略化される。当該製造工程の簡略化は、当該別工程において使用した *ENGase* を除去する工程も不要となり、さらに、当該別工程において生じた比較的不安定なアクセプター分子を分離・精製するといった処置も必要なくなるため、非常に有益である。また、原料となる *Fc* 含有分子の *N297* 結合糖鎖を加水分解する酵素と、糖鎖ドナー分子における糖鎖を転移するための酵素として、同一の酵素－A を使用するため、使用される酵素の数・種類を低減できるという製造工程上の利点も享受し得る（この点は、酵素－A と酵素－B の融合タンパク質を用いた場合、さらに顕著となる）。この態様では、工程 1 において、糖鎖ドナー分子から糖鎖を直接的に受領する分子であるアクセプター分子そのものではなく、糖鎖改変の対象となる *Fc* 含有分子（典型的には、*IgG* 型のモノクローナル抗体又は当該抗体の *Fc* 断片や定常領域のみからなる *CLCH* 等の *Fc* 含有分子）を反応系に投入する。このような原料として投入するための *Fc* 含有分子の *N297* 結合糖鎖としては、目的物である糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖とは異なるものであれば、特に制限ないが、典型的には、当該 *Fc* 含有分子を製造する際に使用した宿主細胞由来の *N297* 結合糖鎖、不均一な *N297* 結合糖鎖、又は当該宿主細胞由来の不均一な *N297* 結合糖鎖を挙げることができる。このような *Fc* 含有分子を工程 1 の反応系に投入すると、酵素－A の加水分解活性により、*Fc* 含有分子の *N297* 結合糖鎖のコアキトビオース構造における *GlcNAc* 間の 1, 4－グリコシド結合 ($\text{GlcNAc} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$) が特異的に加水分解され、アクセプター分子が *in situ* で生成する。続いて、酵素－A の糖鎖転移活性により、当該 *in situ* で生成したアクセプター分子に、糖鎖ドナー分子の糖鎖が転移することにより、目的物である糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含む *N297* 結合糖鎖を有

するFc含有分子がワンポットで製造される。この態様では、アクセプター分子は*in situ*で生成されるものの、単離・精製はされないため、あたかも、原料として投入したFc含有分子のN297結合糖鎖が、ワンステップで糖鎖ドナー分子由来の糖鎖に直接交換されたように見える。そのため、本明細書では、このような態様を、適宜、「N297結合糖鎖の直接交換反応」と呼ぶ。

[0400] N297結合糖鎖の直接交換反応においては、特段制限なく、上述したようなあらゆる種類の糖鎖ドナー分子を使用することができる。なお、N297結合糖鎖の直接交換反応における反応温度等の諸条件については、上記のとおりであるが、反応時間については、アクセプター分子を別個に調製する工程を含む態様と比較して、長い時間を設定することが好ましい。

[0401] 本発明の一態様において、Fc含有分子の製造方法は、工程1にて得られた反応混合液から、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子を回収する工程をさらに含む。当該回収は、本分野で周知の方法又はそれを応用した方法により適宜実施することができるが、とりわけ、以下において言及する工程2により実施することが好ましい。よって、本発明の一態様において、Fc含有分子の製造方法は、さらに、以下において言及する工程2を含む。

[0402] <工程2>

本発明の一態様において、工程2は、工程1で得た反応混合液を、酸性条件下で陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体に接触させ、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子を回収する工程であり、好ましくは、工程1で得た反応混合液を、酸性条件下で陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体に接触させ、反応混合液に含まれる糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子を、一部又は全部が未反応のFc含有分子（アクセプター分子）から単離し、回収する工程である。本発明の一態様において、工程2は、工程1で得た反

応混合液をそのまま負荷液とするか、又は反応混合液に適宜、緩衝液を追加することにより、負荷液を調製し、当該負荷液を、酸性条件下で陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体に接触させることで、未反応のアクセプター分子を当該媒体に選択的に吸着させ、他方、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子を含む素通り液を回収することで、当該Fc含有分子を選択的に回収する工程である。

[0403] 工程2においては、目的物である糖鎖が付加されたFc含有分子と未反応のFc含有分子（アクセプター分子）を分離できるため、工程1にて少量の糖鎖ドナー分子のみを使用した場合であっても高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を製造することができる。本着想においては、工程1にて用いる糖鎖ドナー分子の使用量を抑制しつつ、高い糖鎖転移率の糖鎖構造を有するFc含有分子を製造するには、工程2が高い選択性と回収率を有している必要がある。選択性が低い場合は、目的物である糖鎖が付加されたFc含有分子を未反応のFc含有分子（アクセプター分子）から単離できないため、糖鎖転移率を高めることができず、また、回収率が低い場合は、Fc含有分子の収量を増やすためには工程1にてアクセプター分子の仕込み量を増やす必要があるため、結果として糖鎖ドナー分子の使用量が増大する。また、本発明を工業スケールでの医療用の抗体の製造方法として応用する場合は、工程2にて目的物である抗体を所望の生物学的な活性を保ったまま効率的に単離できる必要がある。

[0404] 従来の単離技術としては、N297結合糖鎖が付加された抗体中に含まれる糖鎖が付加されていない（コアGlcNAcを有さない）抗体を検出する分析手法としてキャピラリーゲル電気泳動法（CE-SDS）が知られている（Richard R. Rustandiら、Electrophoresis, 2008 Sep; 29(17): 3612-20）。本手法は、還元条件下でフラグメント化した抗体の重鎖を分子の流体力学的サイズに応じて単離することができる一方で、前処理の過程で抗体が変性し生物学的

な活性を失うほか、微細なキャピラリーに充填した媒体により抗体を単離するため、処理能が数百 μ g程度に限られている。また、ENGaseを用いて調製したコアGlcNAcを有する抗体を、ENGaseを作用させる前のN297結合糖鎖を有する抗体から単離する分析手法として、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を用いた方法が知られている（Matthew Aら、Measuring the Glycan Occupancy of Intact mAbs using HILIC and Detection by Intrinsic Fluorescence）。本手法は、抗体のフラグメント化を必要とせず、N297結合糖鎖を有する抗体とコアGlcNAcを有する抗体を分離できる一方で、加熱と有機溶媒への暴露により抗体が変性し生物学的な活性を失うほか、単離には高理論段数の分析用カラムや超高速液体クロマトグラフィー装置（UHPLC）を必要とするため、処理能が数百 μ g程度に限られている。また、ENGaseを用いて調製したコアGlcNAcを有する抗体を、ENGaseを作用させる前のN297結合糖鎖を有する抗体から単離する分析手法として、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた方法が知られている（Masaki Kurogouchiら、PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0132848 July 22, 2015、及びShiyi Wangら、Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 6496–6502）。本手法は、抗体を変性させずにN297結合糖鎖を有する抗体とコアGlcNAcを有する抗体を分離できる一方で、高分解能の分離を達成するには高理論段数の分析用カラムを用い、2液を複雑なプログラムで混合するグラジエント溶出方式を必要とし、処理能が数百 μ g程度に限られているほか、満足のいく収率が得られない欠点があった。したがって、本発明以前においては、工業スケールでの単離・精製目的に適用できる、糖鎖付加の有無に応じて抗体を単離する方法は、一切報告されていなかった。

[0405] このような状況下にあつて、本発明者らは、反応混合液を、酸性条件下で

陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体に接触させるという極めてシンプルな方法で、目的物である糖鎖が付加されたFc含有分子を変性させることなく選択的に高収率で単離・精製できることを見出したものである。

[0406] 工程2は、陽イオン交換クロマトグラフィー又はマルチモードクロマトグラフィーにおける常法に従い、実施することができる。例えば、工程1で得た反応混合液を、酸性を示す緩衝液と混合することで負荷液を得て、当該負荷液を、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体を充填したカラムに通液することで、カラムに吸着した分子と、素通りした分子を分離することができる。工程2では、続けて、平衡化液（又は洗浄液）を通液することで、カラムに非特異的に吸着した分子を洗い流した上で、溶出液（又は再生液）を通液することで、カラムに特異的に吸着した分子を溶離させることができる。工程2では、その後、適宜、定置洗浄目的で、クリーニング液を通液することができる。

[0407] 工程2において、陽イオン交換クロマトグラフィー又はマルチモードクロマトグラフィーは酸性条件下で実行される。本発明の一態様において、工程2における負荷液（又は負荷液及び平衡化液）は酸性のpHを有する。工程2においては、負荷液（又は負荷液及び平衡化液）のpHが低いほど糖鎖転移率の向上効果が高く、pHの増加に伴って糖鎖転移率の向上効果が低下する傾向が見られる。本発明の一態様において、「酸性条件」は、所期の単離を達成できる限り、任意の酸性pH（＜7.0）を使用することができ、例えば、下限値（負荷液及び平衡化液のpHの下限値）としては、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9及び4.0から選択される任意のpHを採用することでき、上限値（負荷液及び平衡化液のpHの上限値）としては5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6及び3.5から選択される任意のpHを採用することができる。また、「酸性条件」にお

ける pH の範囲（負荷液及び平衡化液の pH の範囲）としては、上記において言及した上限値及び下限値のそれぞれの任意の組み合わせ、又は、2.5～5.0、好ましくは3.0～4.8、さらに好ましくは3.3～4.7、特に好ましくは3.4～4.6、最も好ましくは3.5～4.5を挙げることができるが、これらに限定されない。したがって、本発明の一態様において、工程2における酸性条件は、pH 2.5～5.0、好ましくはpH 3.0～4.8、さらに好ましくはpH 3.3～4.7、特に好ましくはpH 3.4～4.6、最も好ましくはpH 3.5～4.5の範囲を意味する。

[0408] 工程2では、工程1で得た反応混合液をそのままカラムに通液するための負荷液とするか、反応混合液に適宜、緩衝液を追加することにより、負荷液を調製することができる。負荷液を調製するための緩衝液としては、負荷液が酸性のpHを有する限り、あらゆる緩衝液を使用することができるが、例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、フタル酸緩衝液を挙げることができる。

[0409] また、負荷液に、適宜、塩を加えることにより、所期の塩濃度を有するように調整することもできる。負荷液を調製するための塩としては、所期の単離を達成できる限り、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムを挙げることができる。また、塩濃度としては、例えば、30～2000mM、好ましくは150～1000mM、より好ましくは200～750mM、さらに好ましくは280～600mM、特に好ましくは310～500mMを挙げることができる。なお、負荷液における塩濃度は、最終的な目的物の収率や純度に影響を及ぼし、また、その最適塩濃度は、目的物や陽イオン交換クロマトグラフィー媒体又はマルチモードクロマトグラフィー媒体の種類に応じて変化することから、所与のクロマトグラフィー環境に応じて、最適な塩濃度を採用することが好ましい。

[0410] 負荷液におけるFc含有分子の濃度は、所期の単離を達成できる限り、特に限定されないが、例えば、0.1～100mg/mL、好ましくは0.5～50mg/mL、より好ましくは1.5～30mg/mL、さらに好まし

くは2～20mg/mL、特に好ましくは3～10mg/mLを挙げることができる。また、媒体に通液する負荷液自体の体積としては、常法に従って、媒体の体積等に応じて適宜決定することができる。

[0411] 工程2における、平衡化液としては、単離前に媒体内のpH及び塩濃度を平衡化し、また、媒体に吸着した分子を実質的に単離することなく、媒体に非特異的に吸着した分子を洗い流すことができるものであれば、あらゆる物を使用することができる。平衡化液として使用できる緩衝液や、平衡化液中の塩濃度については、負荷液についての言及を参照されたい。平衡化液の通液量については、常法に従って、媒体の体積等に応じて適宜決定でき、例えば、1～100カラム容量(CV)、好ましくは5～50CV、より好ましくは8～40CV、さらに好ましくは10～30CV、特に好ましくは12～20CVを挙げることができるが、これらには限定されない。

[0412] 工程2における、溶出液は、媒体に吸着した分子を溶離できるものであるが、あらゆる物を使用でき、クリーニング液は、媒体を定置洗浄(CIP)できるものであれば、あらゆる物を使用できる。したがって、溶出液やクリーニング液については、既知の方法に準じて、又は、既知の方法を応用することで、適宜決定することができる。

[0413] 本発明における製造方法では、工程2の終了後の糖鎖転移率としては、任意の数値を設定でき、例えば、85%以上、90%以上又は95%以上を設定することができる。本発明の一態様において、工程2の糖鎖転移率は、90%を超えるものであり、好ましくは、95%を超えるものであり、特に好ましくは99%を超えるものである。また、工程2の工程収率としても任意の数値を設定できるが、上述のとおり工程2の工程収率を高めるほど工程1の糖鎖ドナー分子使用量を削減できることからより高い工程収率が望ましい。ただし、所期の単離を達成できる限り、工程収率は特に限定されず、例えば、1～99%、好ましくは5～95%、より好ましくは20～95%、特に好ましくは40～90%を挙げることができる。

[0414] 本発明において、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体とは、陽イオン交

換基を有する媒体を意味する。陽イオン交換クロマトグラフィー媒体は、その表面にスルホン酸基 ($R-SO_3H$) が結合した強酸型と、カルボキシル基 ($R-COOH$)、フェノール性ヒドロキシル基 ($R-OH$)、ホスホン酸基 [$R-P(=O)(OH)_2$]、あるいは、ホスフィン酸基 [$R-P(=O)(OH)-R$] が結合した弱酸型に分類される。したがって、本発明の一態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体は、強酸型若しくは弱酸型の媒体であり、及び／又は陽イオン交換基として、スルホン酸基、カルボキシル基、フェノール性ヒドロキシル基、ホスホン酸基、又はホスフィン酸基を有する媒体である。具体的なイオン交換クロマトグラフィー媒体の形態としては、粒子状、メンブレン状、モノリス状、板状、チップ状、繊維状、等のいずれでもよいが、媒体に吸着させる分子の特性の観点から、粒子状、メンブレン状、モノリス状などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0415] 粒子状の陽イオン交換クロマトグラフィー媒体として、SP sepharose FF (Cytiva)、SOURCE 15S (Cytiva)、Capto S Impact (Cytiva)、Eshmuno CP-FT (Merck)、Exhmuno CPX (Merck)、POROS HS (Thermo)、POROS XS (Thermo)、Nuvi a HR-S (BIO-RAD)、Cellufine Max GS (JNC) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0416] メンブレン状の陽イオン交換クロマトグラフィー媒体として、Sartobind S (Sartorius)、Mustang S (Pall) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0417] モノリス状の陽イオン交換クロマトグラフィー媒体として、CIM monolith SO3 (BIA Separation) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0418] 工程2の陽イオン交換クロマトグラフィーは、既知の装置を使用して実行することができ、このような装置としては、AKTA avant 25 (Cytiva) を挙げることができるが、これに限定されない。また、工程2の陽

イオン交換クロマトグラフィーにおける、移動相の流速は、常法に従って適宜決定できる。

[0419] 本発明において、マルチモードクロマトグラフィー媒体とは、陽イオン交換基及び陽イオン交換基とは相違する作用が可能な官能基を少なくとも1種含み、一実施態様では相違する作用が可能な官能基は疎水性相互作用が可能な官能基である。陽イオン交換基としては、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体で言及のものと同様のものが挙げられる。また、マルチモードクロマトグラフィー媒体の形態としては、陽イオン交換クロマトグラフィー媒体で言及のものと同様のものが挙げられる。マルチモードクロマトグラフィー媒体として、Capto (TM) MMCやTOYOPEARL (TM) MX-TRP-650Mなどが挙げられるが、これらに限定されない。工程2のマルチモードクロマトグラフィーは、既知の装置を使用して実行することができる。また、工程2のマルチモードクロマトグラフィーにおける、移動相の流速は、常法に従って適宜決定できる。

[0420] 以下本発明を実施例にて説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

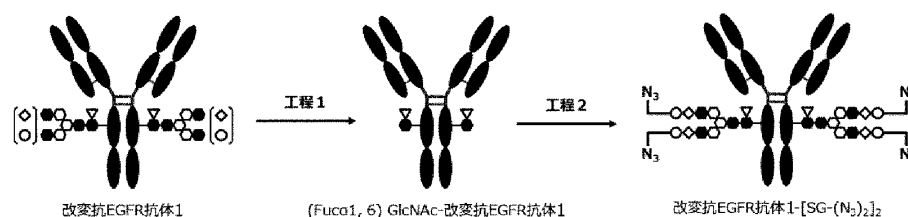
実施例

[0421] 実施例1：糖鎖リモデリング抗体1の合成

改変抗EGFR抗体1-[SG-(N₃)₂]₂の調製

[合成スキーム]

[化105]



(工程1)

(Fucα1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体1の調製

実施例13に従って調製した改変抗EGFR抗体1のリン酸緩衝生理食塩

水溶液（14.5 mL, 14.9 mg/mL, pH 6.0）に、野生型 Endo S のリン酸緩衝生理食塩水溶液（0.140 mL, 7.70 mg/mL）を加え、37℃で4時間振盪した。反応の進行具合を Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム（Agilent Technologies 製）で確認した。反応終了後、以下の方法に従い、アフィニティークロマトグラフィーによる精製とハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。

[0422] （1）アフィニティークロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant 25（GE ヘルスケア製）

カラム：HiTrap rProtein A FF（5 mL）（GE ヘルスケア製）

流速：5 mL/min（チャージ時は1.25 mL/min）

カラムへの結合時には、反応液を直接カラムに添加し、結合バッファー〔20 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）〕を1.25 mL/min で2 CV 流し、更に5 mL/min で5 CV 流した。中間洗浄時には、洗浄溶液〔20 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）、0.5 M 塩化ナトリウム溶液〕を15 CV 流した。溶出時には、溶出バッファー（IgG Elution buffer, Thermo scientific 製）を6 CV 流した。溶出液を1 M トリス緩衝液（pH 9.0）で直ちに中和した。目的物を含むフラクションを共通操作 C に記載の方法に従い、5 mM リン酸緩衝液、50 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）溶液（pH 6.8）へのバッファー交換を行った。得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作 B に記載の方法に従って測定し、粗精製された標題抗体溶液（8.5 mL, 22.13 mg/mL）を得た。

[0423] （2）ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant 25

カラム：Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ（5 mL）（BIO-RAD 製）

流速：5 mL/min（チャージ時は1.25 mL/min）

上記（1）で得られた溶液をカラムへ添加し、A液〔5 mMリン酸緩衝液，50 mM MES溶液（pH 6.8）〕を1.25 mL/minで2 CV流し、更に5 mL/minで3 CV流した。その後、A液とB液〔5 mMリン酸緩衝液，50 mM MES溶液（pH 6.8）、2 M塩化ナトリウム溶液〕を用いて、溶出した。溶出条件は、A液：B液＝100：0～0：100（5 CV）である。さらに、洗浄溶液〔500 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）〕を5 CV流した。目的物を含むフラクションを共通操作Cに記載の方法に従い、20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）へのバッファー交換を行った。得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作Bに記載の方法に従って測定し、標題抗体の20 mMリン酸緩衝溶液（14.5 mL，12.93 mg/mL，pH 6.0）を得た。

[0424]（工程2）

改変抗EGFR抗体1－〔SG－（N₃）₂〕₂の調製

上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝溶液（14.5 mL，12.93 mg/mL，pH 6.0）に〔N₃－PEG（3）〕₂－SG（10）Ox（44 mg）とEndoS（D233Q/Q303L）のリン酸緩衝生理食塩水溶液（0.781 mL，4.8 mg/mL）を加え、30℃で3時間振盪した。反応の進行具合をAgilent 2100バイオアナライザ電気泳動システムで確認した。〔N₃－PEG（3）〕₂－SG（10）Ox（4.2 mg）を追加して30℃で1.5時間振盪後、〔N₃－PEG（3）〕₂－SG（10）Ox（8.4 mg）を再度追加して30℃で2時間振盪した。反応終了後、上記工程1と同様にアフィニティークロマトグラフィーによる精製とヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を行った。目的物を含むフラクションを共通操作Cに記載の方法に従って、リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）へのバッファー交換を行った。得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作Bに記載の方法に従って測定し、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（14.5 mL，11.04 mg/mL，pH 6.0）

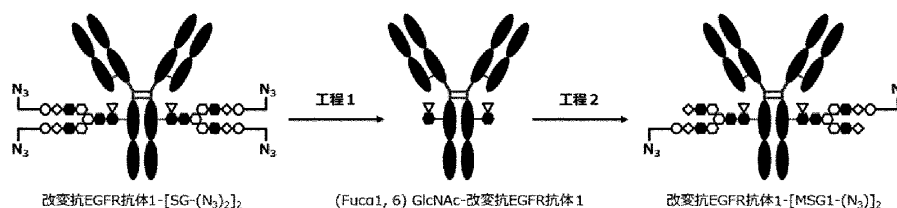
を得た。

[0425] 実施例 2：糖鎖リモデリング抗体 2 の合成

改変抗EGFR抗体 1－[MSG1－(N₃)]₂の調製

[合成スキーム]

[化106]



(工程 1)

(Fucα1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体 1 の調製

糖鎖リモデリング抗体 1 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (9.0 mL, 11.04 mg/mL, pH 6.0) を用いて、実施例 1 工程 1 と同様の操作を行い、標題抗体の 20 mM リン酸緩衝溶液 (9 mL, 9.11 mg/mL, pH 6.0) を得た。

[0426] (工程 2)

改変抗EGFR抗体 1－[MSG1－(N₃)]₂の調製

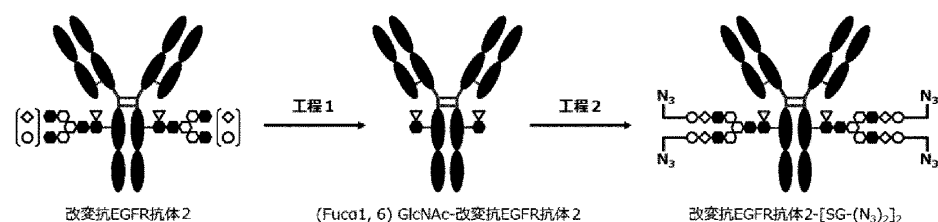
上記工程 1 で得られた抗体の 20 mM リン酸緩衝溶液 (9 mL, 9.11 mg/mL, pH 6.0) と [N₃－PEG (3)]－MSG1 (9) Ox (13 mg) の水 (0.130 mL) 溶液を用いて、実施例 1 工程 2 と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (4 mL, 13.33 mg/mL, pH 6.0; 1 mL, 19.13 mg/mL, pH 6.0) を得た。

[0427] 実施例 3：糖鎖リモデリング抗体 3 の合成

改変抗EGFR抗体 2－[SG－(N₃)₂]₂の調製

[合成スキーム]

[化107]



(工程1)

(Fucα1, 6) GlcNAc-改変抗EGFR抗体2の調製

実施例13に従って調製した改変抗EGFR抗体2のリン酸緩衝生理食塩水溶液(20 mL, 11.25 mg/mL, pH 6.0)を用いて、実施例1工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝溶液(17 mL, 12.06 mg/mL, pH 6.0)を得た。

[0428] (工程2)

改変抗EGFR抗体2-[SG-(N₃)₂]₂の調製

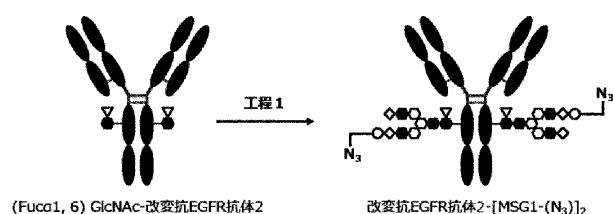
上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝溶液(8.5 mL, 12.06 mg/mL, pH 6.0)と[N₃-PEG(3)]₂-SG(10) Ox(40.8 mg)を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(8 mL, 11.09 mg/mL, pH 6.0)を得た。

[0429] 実施例4：糖鎖リモデリング抗体4の合成

改変抗EGFR抗体2-[MSG1-(N₃)]₂の調製

[合成スキーム]

[化108]



(工程1)

改変抗EGFR抗体2- $[\text{MSG1}-(\text{N}_3)]_2$ の調製

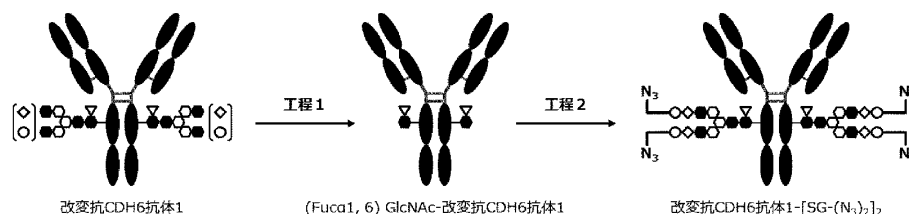
実施例3工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液(8.5mL, 12.06mg/mL, pH6.0)と $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]\text{-MSG1}(9)\text{Ox}(19\text{mg})$ の水(0.190mL)溶液を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(8.5mL, 10.58mg/mL, pH6.0)を得た。

[0430] 実施例5：糖鎖リモデリング抗体5の合成

改変抗CDH6抗体1- $[\text{SG}-(\text{N}_3)]_2$ の調製

[合成スキーム]

[化109]



(工程1)

(Fuca1, 6) GlcNAc-改変抗CDH6抗体1の調製

実施例14に従って調製した改変抗CDH6抗体1のリン酸緩衝生理食塩水溶液(20.0mL, 13.90mg/mL, pH6.0)を用いて、実施例1工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝溶液(16mL, 15.12mg/mL, pH6.0)を得た。

[0431] (工程2)

改変抗CDH6抗体1- $[\text{SG}-(\text{N}_3)]_2$ の調製

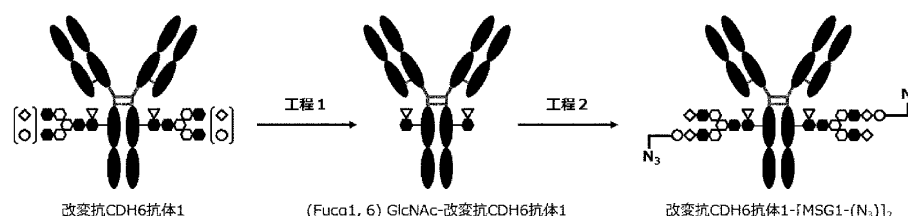
上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液(9.0mL, 15.12mg/mL, pH6.0)と $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG}(10)\text{Ox}(49.5\text{mg})$ を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(9mL, 13.23mg/mL, pH6.0)を得た。

[0432] 実施例6：糖鎖リモデリング抗体6の合成

改変抗CDH6抗体1-[MSG1-(N₃)]₂の調製

[合成スキーム]

[化110]



(工程 1)

(Fucα1, 6) GlcNAc-改変抗CDH6抗体1の調製

実施例5工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝溶液 (17mL, 14.85mg/mL, pH6.0)を得た。

[0433] (工程 2)

改変抗CDH6抗体1-[MSG1-(N₃)]₂の調製

上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液 (2.7mL, 14.85mg/mL, pH6.0) と [N₃-PEG (3)]-MSG1 (9) O× (7.5mg) の水 (0.075mL) 溶液を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (3mL, 11.28mg/mL, pH6.0)を得た。

[0434] 実施例7：抗体薬物コンジュゲート1の合成 (抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1の合成の合成)

糖鎖リモデリング抗体1のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (2.00mL, 11.04mg/mL, pH6.0) をプロピレングリコール (1.00mL) で希釈した。この溶液に薬物リンカー17a (ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N-[4-(11, 12-ジデヒドロベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14-(6, 7

, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノー-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エトキシ) メチル] グリシニアミド。WO 2020/050406に記載の方法で製造した。) の10 mMジメチルスルホキシド溶液 (0.122 mL, 抗体1分子に対して8当量) とプロピレングリコール (0.878 mL) の混合液を加え、チューブローテーター (MTR-103, アズワン株式会社) を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液 (12.0 mL) を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度: 1.38 mg/mL

抗体収量: 16.58 mg (75%)

薬物平均結合数: 3.7

[0435] 実施例8: 抗体薬物コンジュゲート2の合成 (抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2の合成)

糖鎖リモデリング抗体2のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (1.00 mL, 13.33 mg/mL, pH 6.0) と薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.074 mL) を用いて、実施例7に記載された方法に従って操作 (反応・精製・分析) を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液 (6.5 mL) を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度: 1.57 mg/mL

抗体収量: 10.23 mg (77%)

薬物平均結合数: 1.9

[0436] 実施例9: 抗体薬物コンジュゲート3の合成 (抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1の合成)

糖鎖リモデリング抗体3のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (2.00 mL, 1

1. 09 mg/mL, pH 6.0) と薬物リンカー 17a のジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.123 mL) を用いて、実施例 7 に記載された方法に従って操作 (反応・精製・分析) を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートの ABS 溶液 (12 mL) を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度: 1.40 mg/mL

抗体収量: 16.77 mg (76%)

薬物平均結合数: 3.8

[0437] 実施例 10: 抗体薬物コンジュゲート 4 の合成 (抗 EGF R 抗体 2-CDN コンジュゲート 2 の合成)

糖鎖リモデリング抗体 4 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (2.00 mL, 10.58 mg/mL, pH 6.0) と薬物リンカー 17a のジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.117 mL) を用いて、実施例 7 に記載された方法に従って操作 (反応・精製・分析) を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートの ABS 溶液 (12 mL) を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度: 1.45 mg/mL

抗体収量: 17.46 mg (82%)

薬物平均結合数: 1.9

[0438] 実施例 11: 抗体薬物コンジュゲート 5 の合成 (抗 CDH6 抗体 1-CDN コンジュゲート 1 の合成)

糖鎖リモデリング抗体 5 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (2.00 mL, 13.23 mg/mL, pH 6.0) と薬物リンカー 17a のジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.146 mL) を用いて、実施例 7 に記載された方法に従って操作 (反応・精製・分析) を行い、抗体薬物コンジュゲートの ABS 溶液 (12 mL) を得た。この溶液を疎水性相互作用クロマトグラフィーで精製した。目的物を含むフラクションを NAP カラムで ABS にバッファー交換した後、共通操作 A に記載の方法に従って濃縮し、目的とする抗体薬物コンジュゲートの ABS 溶液 (7.5 mL) を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.20 mg/mL

抗体収量：9.02 mg (34%)

薬物平均結合数：3.8

[疎水性相互作用クロマトグラフィーの精製条件]

精製装置：AKTA avant 25

カラム：HiTrap Butyl HP (5 mL) (GE ヘルスケア製)

流速：5 mL/min (チャージ時は2.5 mL/min)

移動相A：1.5 M硫酸アンモニウム含有25 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)

移動相B：25 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) / イソプロピルアルコール
混合液 (3 : 1)

グラジエントプログラム (移動相B)：0% (2 CV), 40% (3 CV),
50% (3 CV), 60% (3 CV), 100% (5 CV)

[0439] 実施例12：抗体薬物コンジュゲート6の合成 (抗CDH6抗体1-CDN
コンジュゲート2の合成)

糖鎖リモデリング抗体6のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (2.00 mL, 1.71 mg/mL, pH 6.0) と薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.097 mL) を用いて、実施例7に記載された方法に従って操作 (反応・精製・分析) を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液 (12 mL) を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.56 mg/mL

抗体収量：18.68 mg (80%)

薬物平均結合数：1.8

[0440] 実施例13：抗EGFR抗体A及び抗EGFR抗体1～3の作製

抗EGFR抗体A及び抗EGFR抗体1～3 (本明細書中、改変抗EGFR抗体1～3ともいう) は、ベクティビックス点滴静注100 mg 審査結果報告書 (平成22年3月5日 医薬食品局審査管理課) を参照して作製した

。本実施例で使用した抗EGFR抗体Aは、アイソタイプがIgG1である。抗EGFR抗体1、3は抗EGFR抗体Aに、それぞれ、LALA-DG変異、LALA変異を導入して作製した。抗EGFR抗体2は、アイソタイプがIgG1であり、LALA-DG変異を有する。本実施例で使用した抗EGFR抗体A及び抗EGFR抗体1～3の軽鎖アミノ酸配列（配列番号30）及び、抗EGFR抗体1の重鎖アミノ酸配列（配列番号32）、抗EGFR抗体2の重鎖アミノ酸配列（配列番号33）、抗EGFR抗体Aの重鎖アミノ酸配列（配列番号34）、抗EGFR抗体3の重鎖アミノ酸配列（配列番号36）を図21-1、図21-2及び図21-3に示す。本実施例で使用した抗EGFR抗体A及び抗EGFR抗体1～3のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号23）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号24）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号25）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号26）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号27）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号28）を図20に示す。

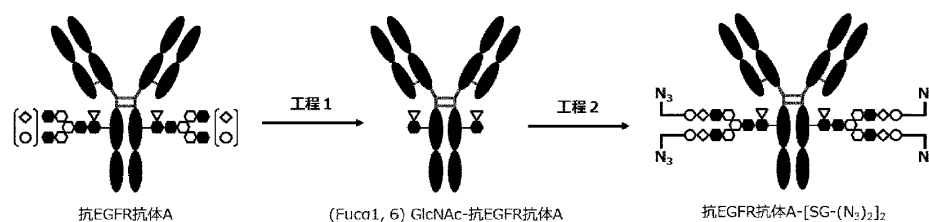
[0441] 実施例14：抗CDH6抗体1の作製

抗CDH6抗体1（本明細書中、改変抗CDH6抗体1ともいう）はWO 2018/212136を参照して作製した。本実施例で使用した抗CDH6抗体1は、アイソタイプがIgG1であり、LALA-DG変異を有する。本実施例で使用した抗CDH6抗体1の軽鎖アミノ酸配列（配列番号44）及び抗CDH6抗体1の重鎖アミノ酸配列（配列番号46）、を図23に示す。本実施例で使用した抗CDH6抗体1のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号37）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号38）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号39）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号40）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号41）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号42）を図22に示す。

[0442] 参考例1：糖鎖リモデリング抗体7の合成

抗EGFR抗体A-[SG-(N₃)₂]₂の調製
[合成スキーム]

[化111]



(工程1)

(Fucα1, 6) GlcNAc-抗EGFR抗体Aの調製

実施例13に従って調製した抗EGFR抗体Aのリン酸緩衝生理食塩水溶液(9.5 mL, 14.1 mg/mL, pH 6.0)を用いて、実施例1工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝溶液(7.5 mL, 15.93 mg/mL, pH 6.0)を得た。

[0443] (工程2)

抗EGFR抗体A-[(SG-(N₃)₂)₂]の調製

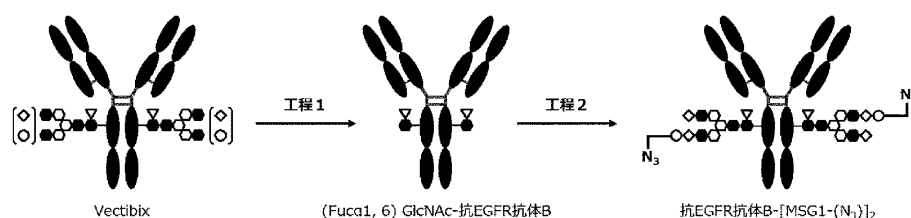
上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝溶液(7.5 mL, 15.93 mg/mL, pH 6.0)と[N₃-PEG(3)]₂-SG(10) O×(30.4 mg)を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(3 mL, 11.10 mg/mL, pH 6.0)を得た。

[0444] 参考例2：糖鎖リモデリング抗体8の合成

抗EGFR抗体B-[(MSG1-(N₃))₂]の調製

[合成スキーム] 以下の図は1 g G2を示す。

[化112]



(工程1)

(Fuc α 1, 6) GlcNAc-抗EGFR抗体Bの調製

市販のベクティビックス点滴静注（武田薬品工業）（100mg／5mL）をNAPカラム（NAP-25 columns（GEヘルスケア製））でバッファー交換し、抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（7.0mL, 13.73mg／mL, pH6.0）を得た。この抗体溶液（3.5mL）を用いて、実施例1工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝溶液（5mL, 8.49mg／mL, pH6.0）を得た。

[0445]（工程2）

抗EGFR抗体B-〔MSG1-（N₃）〕₂の調製

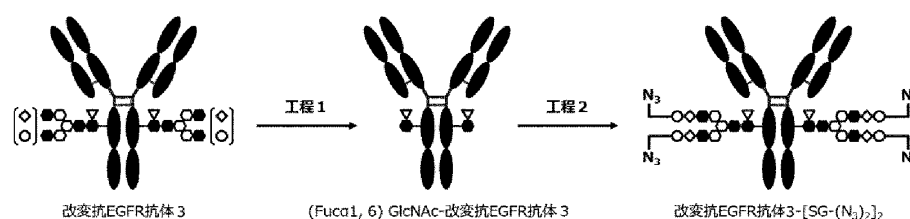
上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液（4.5mL, 8.49mg／mL, pH6.0）と〔N₃-PEG（3）〕-MSG1（9）O×（7.6mg）の水（0.076mL）溶液を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（2.5mL, 12.90mg／mL, pH6.0）を得た。

[0446] 参考例3：糖鎖リモデリング抗体9の合成

改変抗EGFR抗体3-〔SG-（N₃）₂〕₂の調製

〔合成スキーム〕

[化113]



（工程1）

(Fuc α 1, 6) GlcNAc-改変抗EGFR抗体3の調製

実施例13に従って調製した改変抗EGFR抗体3のリン酸緩衝生理食塩水溶液（10mL, 14.00mg／mL, pH6.0）を用いて、実施例1工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝溶液（7.5mL, 16.70mg／mL, pH6.0）を得た。

[0447] (工程2)

改変抗EGFR抗体3- $[\text{SG}-(\text{N}_3)_2]_2$ の調製

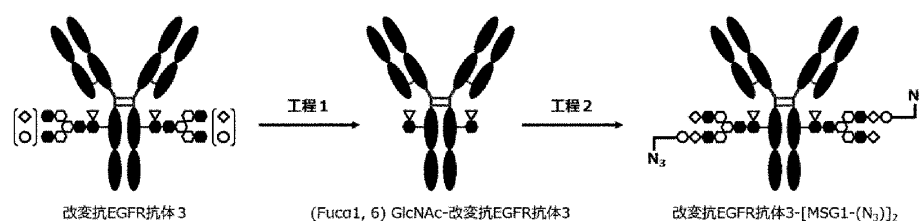
上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液(7.5mL, 16.70mg/mL, pH6.0)と $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]_2-\text{SG}(100 \times (29 \text{ mg}))$ を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(10mL, 10.49mg/mL, pH6.0)を得た。

[0448] 参考例4：糖鎖リモデリング抗体10の合成

改変抗EGFR抗体3- $[\text{MSG1}-(\text{N}_3)]_2$ の調製

[合成スキーム]

[化114]



(工程1)

(Fucα1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体3の調製

参考例3工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝溶液(7.5mL, 14.51mg/mL, pH6.0)を得た。

[0449] (工程2)

改変抗EGFR抗体3- $[\text{MSG1}-(\text{N}_3)]_2$ の調製

上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝溶液(7.5mL, 14.51mg/mL, pH6.0)と $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]-\text{MSG1}(90 \times (17.3 \text{ mg}))$ の水(0.173mL)溶液を用いて、実施例1工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(7.5mL, 13.34mg/mL, pH6.0)を得た。

[0450] 参考例5：抗体薬物コンジュゲート7の合成(抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1の合成)

糖鎖リモデリング抗体7のリン酸緩衝生理食塩水溶液（2.00 mL, 1.10 mg/mL, pH 6.0）と薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.123 mL）を用いて、実施例7に記載された方法に従って操作（反応・精製・分析）を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（12 mL）を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.39 mg/mL

抗体収量：16.70 mg（75%）

薬物平均結合数：3.7

[0451] 参考例6：抗体薬物コンジュゲート8の合成（抗EGFR抗体B-CDNコンジュゲート1の合成）

糖鎖リモデリング抗体8のリン酸緩衝生理食塩水溶液（0.50 mL, 2.90 mg/mL, pH 6.0）と薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.036 mL）を用いて、実施例7に記載された方法に従って操作（反応・精製・分析）を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートのPBS溶液（3.5 mL, pH 7.4）を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.06 mg/mL

抗体収量：3.72 mg（58%）

薬物平均結合数：1.9

[0452] 参考例7：抗体薬物コンジュゲート9の合成（抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1の合成）

糖鎖リモデリング抗体9のリン酸緩衝生理食塩水溶液（1.00 mL, 0.49 mg/mL, pH 6.0）と薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.058 mL）を用いて、実施例7に記載された方法に従って操作（反応・精製・分析）を行い、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.12 mg/mL

抗体収量：7.26 mg（69%）

薬物平均結合数：3.5

- [0453] 参考例8：抗体薬物コンジュゲート10の合成（抗EGFR抗体3-CDN
コンジュゲート2の合成）

糖鎖リモデリング抗体10のリン酸緩衝生理食塩水溶液（1.00mL，
13.34mg/mL，pH6.0）と薬物リンカー17aのジメチルスル
ホキシド溶液（10mM，0.074mL）を用いて、実施例7に記載され
た方法に従って操作（反応・精製・分析）を行い、目的とする抗体薬物コン
ジュゲートのABS溶液（6.5mL）を得た。分析結果は以下の通り。

抗体濃度：1.68mg/mL

抗体収量：10.91mg（82%）

薬物平均結合数：1.9

- [0454]（参考例9：ML-RR-CDA・2Na⁺の合成）

本明細書で、リファレンス化合物として使用したML-RR-CDA・2
Na⁺は、特許文献10（WO2014/189805）に記載された方法に
従って合成した。

（参考例10：2', 3'-cGAMPの合成）

- [0455] 本明細書で、リファレンス化合物として使用した2', 3'-cGAMP
は、cGASを用いてATPとGTPから酵素的に合成した。cGASの調
製及び酵素反応は、文献記載の方法（Immunity, 2013, 39,
1019-1031、Cell Rep. 2014, 6, 421-430）
を適宜改変して実施した。精製は、弱塩基性陰イオン交換樹脂（DIAION
WA10）及び合成吸着剤（SEPA BEADS SP207SS）を
用いたカラムクロマトグラフィーにより実施した。

- [0456]（試験例1）レポーター細胞を用いたSTINGアゴニスト活性評価

＜レポータージーンアッセイ＞

ヒトSTINGアゴニスト活性は、STING経路の下流にあるインター
フェロン制御因子3（interferon regulatory fa
ctor-3（IRF3））の経路の活性化を確認できるTHP1-Dua

ITM細胞（HAQ変異型）（InvivoGen, CA, US）を用いて評価した。

[0457] アッセイは以下のように実施した。96ウェルプレートに被験化合物を分注し、続いてレポーター細胞を添加し刺激を開始した。37℃、5%CO₂環境下で24時間培養した後の遠心上清を回収した。回収した上清を384ウェルプレートへ添加し、QUANTI-Luc（InvivoGen）溶液を添加した。よく混和した後、プレートリーダーを用いて発光を測定した。

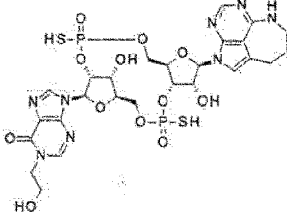
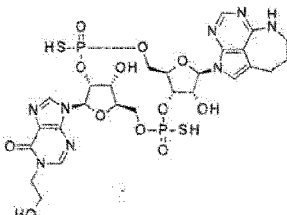
1. 37から100μMのML-RR-CDA・2Na⁺（Compound 21 in WO2014/189805）を処理した細胞における最大カウント値を100%、PBSで処理した細胞でのカウントを0%とし、被験化合物が50%のカウントを得るのに必要な濃度をEC50（μM）値として算出した。表5に被験化合物の構造式とNMRデータを、表4にヒトSTINGアゴニスト活性試験の結果を示す。なお、被験化合物は、上記<3. 製造方法>又はWO2020/050406に従い製造することができる。

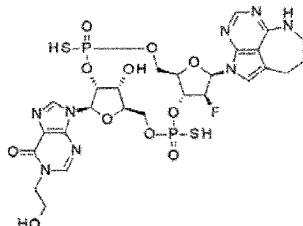
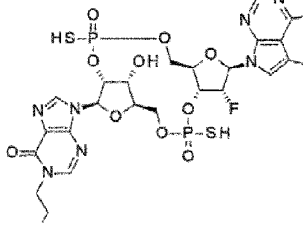
[0458]

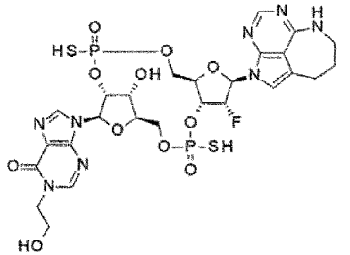
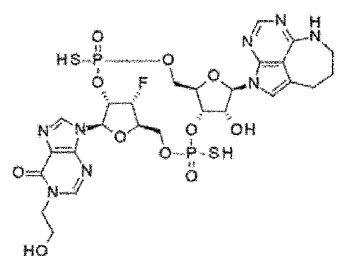
[表3]

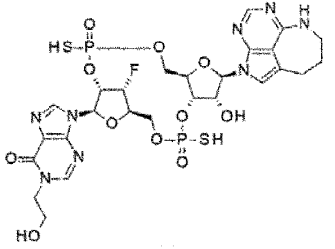
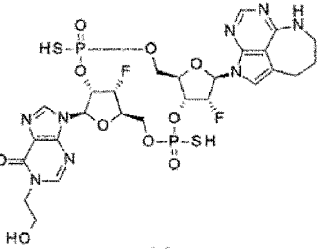
化合物番号	THP1-Dual細胞 IRF EC50 (μ M)
6 a	0. 6
6 b	2. 1
3 3 a	0. 1 8
3 4 a	0. 2 0
3 4 b	0. 5 5
3 9 a	0. 1 9
3 9 b	0. 4 1
4 4 a	0. 2 1
4 4 b	0. 3 5
4 8 a	0. 0 3 5
4 8 b	0. 0 3 9
5 2 a	0. 3 1
5 2 b	0. 4 6
5 3 a	6. 0
5 4	4. 0
ML-RR-CDA $\cdot$ 2Na ⁺	4. 2
2' 3' -c GAMP	2 1. 8

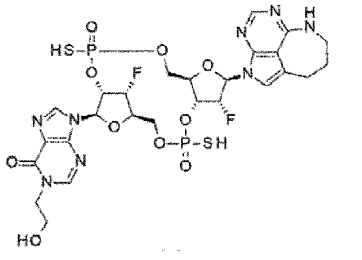
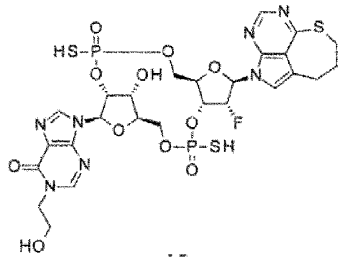
[表4]

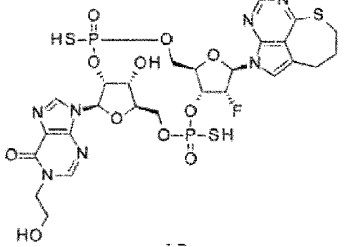
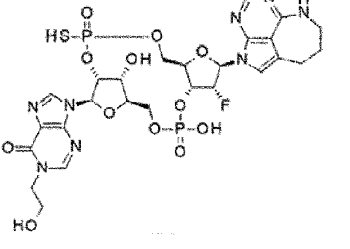
化合物番号 構造式	¹ H-NMR (CD ₃ OD)
6 a 	δ : 8. 6 3 (1H, s) , 8. 2 2 (1H, s) , 8. 0 2 (1H, s) , 7. 1 1 (1H, s) , 6. 3 0-6. 2 4 (2H, m) , 5. 4 6 -5. 3 7 (1H, m) , 5. 2 3-5. 1 5 (1H, m) , 4. 8 3-4. 7 9 (1H, m) , 4. 7 8-4. 7 4 (1H, m) , 4. 5 3-4 . 4 2 (2H, m) , 4. 3 5-4. 1 6 (3H , m) , 4. 1 6-3. 9 7 (3H, m) , 3. 8 3-3. 7 8 (2H, m) , 3. 5 2-3. 4 7 (2H, m) , 2. 8 8-2. 8 1 (2H, m) , 2. 0 3-1. 9 5 (2H, m)
6 b 	δ : 8. 7 2 (1H, s) , 8. 2 3 (1H, s) , 8. 0 2 (1H, s) , 7. 1 1 (1H, s) , 6. 3 0 (2H, d d, J=13. 6, 7. 6 Hz) , 5. 4 8-5. 3 9 (2H, m) , 4 . 7 8 (1H, d d, J=6. 7, 4. 2 Hz) , 4. 5 1-4. 2 8 (5H, m) , 4. 2 6-4. 1 3 (2H, m) , 4. 0 6-4. 0 0 (1 H, m) , 3. 9 3-3. 8 6 (1H, m) , 3 . 8 5-3. 8 0 (2H, m) , 3. 5 2-3. 4 7 (2H, m) , 2. 9 4-2. 8 8 (2H, m) , 2. 0 5-1. 9 7 (2H, m)

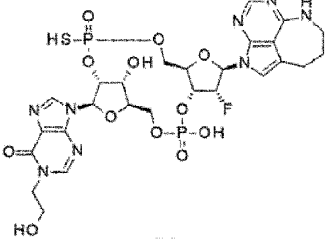
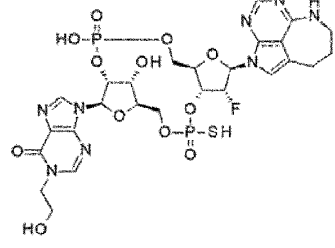
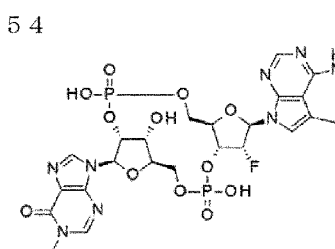
33 a 	δ : 8.67 (1H, s), 8.24 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.05 (1H, s), 6.73 (1H, dd, $J=23.9, 2.7$ Hz), 6.28 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 5.43–5.24 (3H, m), 4.77–4.72 (1H, m), 4.51–4.32 (4H, m), 4.26–4.12 (2H, m), 4.06–3.91 (2H, m), 3.82 (2H, t, $J=5.1$ Hz), 3.50 (2H, t, $J=5.1$ Hz), 2.92–2.85 (2H, m), 2.06–1.97 (2H, m)
34 a 	δ : 8.58 (1H, m), 8.11 (1H, m), 8.03 (1H, s), 7.11 (1H, s), 6.47 (1H, d, $J=17.5$ Hz), 6.26 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 5.53–5.36 (2H, m), 5.29–5.17 (1H, m), 4.77 (1H, d, $J=4.2$ Hz), 4.54–4.46 (1H, m), 4.44–4.38 (1H, m), 4.35–4.32 (1H, m), 4.30–4.25 (2H, m), 4.25–4.16 (1H, m), 4.06–3.99 (1H, m), 3.96–3.85 (1H, m), 3.82–3.71 (2H, m), 3.54–3.42 (2H, m), 2.77–2.68 (1H, m), 2.66–2.55 (1H, m), 2.02–1.81 (2H, m)

34 b 	δ : 8.61 (1H, m), 8.16 (1H, m), 8.02 (1H, m), 7.36 (1H, s), 6.49 (1H, dd, $J=16.0, 2.1$ Hz), 6.28 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 5.56–5.33 (3H, m), 4.58–4.49 (2H, m), 4.45–4.37 (2H, m), 4.31–4.27 (1H, m), 4.25–4.16 (1H, m), 4.10–3.98 (3H, m), 3.80 (2H, t, $J=5.1$ Hz), 3.48 (2H, dd, $J=6.7, 3.6$ Hz), 2.90–2.72 (2H, m), 2.00–1.90 (2H, m)
39 a 	δ : 8.66 (1H, m), 8.26 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.09 (1H, s), 6.29–6.24 (2H, m), 5.68–5.45 (2H, m), 5.26–5.18 (1H, m), 4.78–4.73 (1H, m), 4.62–4.42 (3H, m), 4.26–3.98 (5H, m), 3.85–3.78 (2H, m), 3.53–3.47 (2H, m), 2.91–2.84 (2H, m), 2.04–1.96 (2H, m)

3 9 b 	δ : 8. 73 (1H, m) , 8. 25 (1H, s) , 8. 02 (1H, s) , 7. 10 (1H, br s) , 6. 33 (1H, d, J=6. 7 Hz) , 6. 28 (1H, d, J=9. 1 Hz) , 5. 65–5. 50 (1H, m) , 5. 49–5. 43 (1H, m) , 5. 31 (1H, dd, J=5. 4, 3. 6 Hz) , 4. 79 (1H, dd, J=6. 3, 4. 5 Hz) , 4. 62–4. 34 (4H, m) , 4. 27–4. 14 (2H, m) , 4. 08–4. 01 (1H, m) , 3. 93–3. 87 (1H, m) , 3. 86–3. 80 (2H, m) , 3. 53–3. 47 (2H, m) , 2. 95–2. 89 (2H, m) , 2. 06–1. 97 (2H, m)
4 4 a 	δ : 8. 63 (1H, s) , 8. 16 (1H, s) , 8. 03 (1H, s) , 7. 08 (1H, s) , 6. 47 (1H, dd, J=17. 5, 1. 8 Hz) , 6. 27 (1H, d, J=7. 9 Hz) , 5. 64–5. 36 (3H, m) , 5. 31–5. 20 (1H, m) , 4. 62–4. 50 (2H, m) , 4. 44–4. 39 (1H, m) , 4. 32–4. 12 (3H, m) , 4. 10–4. 03 (1H, m) , 3. 99–3. 91 (1H, m) , 3. 83–3. 72 (2H, m) , 3. 52–3. 46 (2H, m) , 2. 78–2. 72 (2H, m) , 2. 04–1. 85 (2H, m)

4 4 b 	δ : 8. 69 (1H, s) , 8. 21 (1H, s) , 8. 03 (1H, s) , 7. 25 (1H, s) , 6. 49 (1H, dd, J=15. 1, 3. 0Hz) , 6. 28 (1H, d, J=9. 1Hz) , 5. 64–5. 28 (4H, m) , 4. 61–4. 39 (4H, m) , 4. 26–4. 17 (1H, m) , 4. 13–3. 95 (3H, m) , 3. 84–3. 77 (2H, m) , 3. 53–3. 45 (2H, m) , 2. 92–2. 77 (2H, m) , 2. 02–1. 92 (2H, m)
4 8 a 	δ : 8. 55 (1H, brs) , 8. 41 (1H, s) , 8. 09 (1H, brs) , 7. 51 (1H, s) , 6. 58 (1H, d, J=16. 9 Hz) , 6. 25 (1H, d, J=7. 9 Hz) , 5. 55–5. 34 (2H, m) , 5. 30–5. 17 (1H, m) , 4. 74 (1H, d, J=4. 2 Hz) , 4. 55–4. 47 (1H, m) , 4. 46–4. 40 (1H, m) , 4. 37–4. 30 (2H, m) , 4. 28–4. 16 (2H, m) , 4. 05–3. 99 (1H, m) , 3. 90–3. 70 (3H, m) , 3. 28–3. 20 (1H, m) , 3. 18–3. 10 (1H, m) , 2. 91–2. 82 (1H, m) , 2. 76–2. 64 (1H, m) , 2. 33–2. 22 (1H, m) , 2. 21–2. 09 (1H, m)

48 b 	δ : 8.60 (1H, s), 8.41 (1H, s), 8.16 (1H, s), 7.72 (1H, s), 6.60 (1H, d, $J=15.7$ Hz), 6.28 (1H, d, $J=7.9$ Hz), 5.61–5.33 (3H, m), 4.59–4.49 (2H, m), 4.48–4.39 (2H, m), 4.34–4.27 (1H, m), 4.25–4.16 (1H, m), 4.11–3.99 (3H, m), 3.86–3.75 (2H, m), 3.25–3.11 (2H, m), 3.05–2.90 (2H, m), 2.35–2.17 (2H, m)
52 a 	δ : 8.55 (1H, m), 8.15 (1H, m), 8.03 (1H, s), 7.14 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 6.46 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 6.28 (1H, d, $J=7.9$ Hz), 5.50–5.29 (2H, m), 5.16–5.04 (1H, m), 4.74–4.69 (1H, m), 4.40–4.18 (6H, m), 4.13–4.07 (1H, m), 4.02–3.91 (1H, m), 3.84–3.74 (2H, m), 3.53–3.43 (2H, m), 2.81–2.63 (2H, m), 2.02–1.85 (2H, m)

5 2 b 	δ : 8. 58 (1H, d, $J=3.0$ Hz) , 8. 19 (1H, d, $J=2.4$ Hz) , 8. 03 (1H, s) , 7. 40 (1H, s) , 6. 49 (1H, dd, $J=16.3, 1.8$ Hz) , 6. 29 (1H, d, $J=8.5$ Hz) , 5. 51–5. 22 (3H, m) , 4. 59–4. 55 (1H, m) , 4. 43–4. 17 (5H, m) , 4. 14–4. 01 (3H, m) , 3. 85–3. 78 (2H, m) , 3. 51–3. 44 (2H, m) , 2. 90–2. 75 (2H, m) , 1. 99–1. 90 (2H, m)
5 3 a 	δ : 8. 58 (1H, s) , 8. 12 (1H, s) , 8. 02 (1H, s) , 7. 13 (1H, s) , 6. 47 (1H, d, $J=18.1$ Hz) , 6. 27 (1H, d, $J=8.5$ Hz) , 5. 41 (1H, dd, $J=51.7, 3.9$ Hz) , 5. 29–5. 16 (2H, m) , 4. 58–4. 52 (2H, m) , 4. 36–4. 17 (5H, m) , 4. 05–3. 90 (2H, m) , 3. 82–3. 71 (2H, m) , 3. 52–3. 43 (2H, m) , 2. 76–2. 63 (2H, m) , 2. 02–1. 85 (2H, m)
5 4 	δ : 8. 56 (1H, s) , 8. 19 (1H, s) , 8. 03 (1H, s) , 7. 10 (1H, s) , 6. 46 (1H, d, $J=18.7$ Hz) , 6. 31 (1H, d, $J=8.5$ Hz) , 5. 51–5. 32 (1H, m) , 5. 24–5. 01 (2H, m) , 4. 61–4. 56 (1H, m) , 4. 41–4. 21 (5H, m) , 4. 21–3. 97 (3H, m) , 3. 87–3. 75 (2H, m) , 3. 54–3. 41 (2H, m) , 2. 83–2. 67 (2H, m) , 2. 02–1. 85 (2H, m)

[0459] ^1H -NMRスペクトルは、JEOL ECS-400 (400MHz)、Varian 400-MR (400MHz) 又はVarian Unity Inova 500 (500MHz) を用いて測定した。

[0460] この結果、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される化合物がヒトSTINGに対するアゴニスト活性を有することが明らかとなった。また、マウスSTINGに対しても、既存のCDNと同等以上のアゴニスト活性を確認した(WO2020/050406)。

[0461] (試験例2) リコンビナントSTING C末結合ドメイン蛋白質を用いたthermal shift assay

(i) 各種発現プラスミドの構築

<ヒトTMEM173発現Plasmidの構築>

ヒトSTING (本明細書中、ヒトTMEM173と称することもある) の哺乳動物細胞発現用プラスミドは、232番目のアルギニン(R) がヒスチジン(H) に変異した(本明細書中、H232変異又はREF変異という) ヒトTMEM173 cDNA Clone (Accession NM_198282.3, H232 (REF) 変異型STING発現プラスミド) (GeneCopoeia, MD, US) を購入した。ヒトH232 (REF) 変異型STINGのアミノ酸配列を配列番号3に、ヌクレオチド配列を配列番号4に示す。また、H232変異型STING発現プラスミドを鋳型とし、Inverse PCR法に基づく部位特異的変異導入を行って野生型STINGおよびHAQ (R71H, G230A及びR293Q) 変異型STINGの発現プラスミドを作製した。ヒト野生型STINGのアミノ酸配列を配列番号1に、ヌクレオチド配列を配列番号2に示し、ヒトHAQ変異型STINGのアミノ酸配列を配列番号5に、ヌクレオチド配列を配列番号6に示す。また、ヒトの野生型STING、REF変異型STING、HAQ変異型STINGのアミノ酸配列を図21に示す。

[0462] <リコンビナントSTING C末結合ドメイン蛋白質発現プラスミドなどの構築>

ヒトSTING C末結合ドメイン (aa139-342) 蛋白質 (UniProt entry Q86WV6) cDNAは、全長のヒトTMEM173 cDNA clone発現プラスミド (野生型、H232変異型およびHAQ変異型) から2種類のPrimer (5'-ACCTGTATTTTCAGGGCCTGGCCCCAGCTGAGATCTCTG-3' (hST Fw_v2) (配列番号21) 及び5'-CAGAATTTCGCAAGCTTTTAAGTAACCTCTTCCTTTTTCCTCCTGC-3' (hST Rv_V3) (配列番号22)) を用いたPCRで作製した。PCR産物は、N末にヒスチジン6塩基からなる6xHisタグ、Avidinタグ及びTEVプロテアーゼ切断サイトを有するよう、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用して大腸菌発現用ベクターであるpET15bへ挿入し、pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒト野生型、pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトREF変異型及びpET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトAQ変異型の発現プラスミドを構築した。

[0463] マウスSTING C末結合ドメイン (aa138-341) 蛋白質 (UniProt entry Q3TBT3) 発現用cDNAには、マウスTMEM173 cDNA配列から138番目から341番目のアミノ酸に該当するcDNAをeurofins Genomicsで人工合成したものを使用した。マウスSTINGのアミノ酸配列を配列番号7に、ヌクレオチド配列を配列番号8に示す。合成したcDNAは、N末にヒスチジン6塩基からなる6xHisタグ、Avidinタグ及びTEVプロテアーゼ切断サイトを有するようIn-Fusion HD Cloning Kitを使用して大腸菌発現用ベクターであるpET15bへ挿入し、pET15b-HisAviTEV-mSTING (138-341) マウス野生型の発現プラスミドを構築した。

pCDF__Duet-1ベクターに人工合成した大腸菌BirA (Uni

Prot entry P06709) cDNAを挿入し、pCDF__Duet-1 BirA (1-321) 発現プラスミドを構築した。

[0464] (ii) STING C末結合ドメイン蛋白質の調製法

作製した各pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) (ヒト野生型 (Hu-WT)、ヒトREF変異型 (Hu-REF) 及びヒトAQ変異型 (Hu-AQ) のSTING C末結合ドメイン蛋白質) 発現プラスミド及びpET15b-HisAviTEV-mSTING (138-341) (マウス野生型 (Ms-WT) のSTING C末結合ドメイン蛋白質) 発現プラスミドはそれぞれ、pCDF__Duet-1 BirA (1-321) 発現プラスミドと同時にCompetent E. coli Rosetta 2 (DE3) (Merck Millipore, MA, US) に形質転換し、各HisAviTEV-STING発現株を作製した。これらの発現株を100 µg/mLアンピシリン、50 µg/mLストレプトマイシン、及び30 µg/mLカナマイシンを含むTB培地に添加し、37℃で培養後、100 µM IPTGで誘導発現しさらに16℃で培養した。

[0465] 培養液を遠心し、得られた菌体を凍結融解した。超音波破碎により蛋白質を抽出し、遠心を経て上清を回収した。得られた上清をAKTAexpressクロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, IL, US) を用いてHisTrap FFカラム (GE Healthcare) で精製し、Superdex200 16/60カラム (GE Healthcare) に通して溶出した。SECで目的分子量の蛋白質を含む画分回収し、His-Avi-TEV-hSTING (139-342) ヒト野生型蛋白質、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトREF変異型蛋白質、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトAQ変異型蛋白質及びHis-Avi-TEV-mSTING (138-341) マウス野生型蛋白質として回収した。

[0466] HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒト野生型蛋白質

のアミノ酸配列を配列番号9、HisAviTEV-hSTING(139-342) ヒトREF変異型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号10、HisAviTEV-hSTING(139-342) ヒトAQ変異型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号11、His-Avi-TEV-mSTING(138-341) マウス野生型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号12に示す。

[0467] (iii) STING結合試験

STING C末結合ドメイン蛋白質への化合物の結合性は、蛋白質の熱変性温度の上昇を指標とするthermal shift assayにより行った。

[0468] 詳細には、384ウェルのリアルタイムPCRプレートへ被験化合物(最終濃度0.5mM)、SYPRO Orange(最終濃度20×濃度)とSTING蛋白質を混合し、プレートシェーカーを用いて混和した。リアルタイムPCRシステムにより、温度を毎秒0.03℃の速度で25℃から95℃まで上昇させ、蛋白質の熱変性温度をSYPRO Orangeが発する蛍光を指標に測定した。蛍光強度の増加速度が最大値を示す温度として T_m (the midpoint of the unfolding transition)(℃)を求めた。各化合物の T_m 値から、化合物無添加ウェルの T_m 値を差し引くことで、被験化合物による T_m のシフトを ΔT_m (℃)として算出した。STING蛋白質に対する結合試験の結果を表6に示す。

[0469]

[表5]

化合物番号	ΔT_m (°C)			
	Hu-WT	Hu-REF	Hu-AQ	Ms-WT
6 a	10.6	5.7	14.8	15.7
6 b	8.4	3.4	11.3	12.9
34 a	14.7	8.8	18.9	20.3
34 b	12.0	6.5	14.0	16.7
39 a	10.4	5.7	12.9	15.0
39 b	8.9	3.7	10.5	13.1
44 a	13.4	8.7	18.2	19.3
44 b	11.4	6.2	14.3	17.0
48 a	15.9	9.3	22.2	16.0
48 b	14.0	7.3	17.8	15.8
52 a	10.9	5.6	13.5	14.3
52 b	9.2	4.4	10.8	12.3
53 a	9.6	5.4	11.6	14.3
54	8.3	3.4	9.8	12.1
ML-RR-CDA · 2Na ⁺	7.0	2.7	12.7	15.2
2' 3' -c GAMP	13.7	4.1	24.3	25.8

[0470] この結果、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される化合物がヒトの野生型STING及び変異型STING、マウスの野生型STINGに対して結合活性を有することが明らかとなった。

[0471] (試験例3) 抗腫瘍試験(1)

American Type Culture Collection社より購入したマウス大腸がん細胞株CT26。WTに抗EGFR抗体のエピトープ部位をヒト型に置換したヒトマウスキメラEGFR遺伝子を導入したCT26。WT-chimeraEGFR細胞を作成した。

CT26。WT-chimeraEGFR細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートは1.0mg/kgの用量で、Day7に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は8匹とした。

結果を図4に示す。図中の抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1はFc部位にLALA-DG変異を有し、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1はFc部位にLALA変異を有する、いずれも薬物平均結合数が約4の抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、黒三角線は抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1投与群、黒丸線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。これに対し、全ての抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート投与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約4であり、Fc部位に各変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートのいずれについても強い抗腫瘍効果が確認された。その抗腫瘍効果は同等であった。

[0472] (試験例4) 抗腫瘍試験(2)

CT26、WT-chimeraEGFR細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートは1.0mg/kgの用量で、Day7に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図5に示す。図中の抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1はFc部位にLALA-DG変異を有する薬物平均結合数が約4の抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート投与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約4であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0473] (試験例5) 抗腫瘍試験(3)

CT26, WT-chimeraEGFR細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートは2.0mg/kgの用量で、Day 7に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6あるいは8匹とした。

結果を図6に示す。図中の抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2はFc部位にLALA-DG変異を有し、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2はFc部位にLALA変異を有する、いずれも薬物平均結合数が約2の抗体-CDNコンジュゲートである。

図中の黒四角線はビヒクル群、黒三角線は抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2投与群、黒丸線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。これに対し、全ての抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート投与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2であり、Fc部位に各変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートのいずれについても強い抗腫瘍効果が確認された。その抗腫瘍効果は同等であった。

[0474] (試験例6) 抗腫瘍試験(4)

CT26, WT-chimeraEGFR細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートは2.0mg/kgの用量で、Day 7に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図7に示す。図中の抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート2はFc部位にLALA-DG変異を有する薬物平均結合数が約2の抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート2投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート投

与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0475] (試験例7) 抗腫瘍試験(5)

European Collection of Authenticated Cell Cultures社より購入したEGFRエクソン19欠失変異を有するヒト肺がん細胞株PC-9細胞をBALB/c-nuマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートは0.5 mg/kgの用量で、Day 8に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図8に示す。図中の抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1はFc部位にLALA-DG変異を有する薬物平均結合数が約4の抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、EGFRエクソン19欠失変異を有する肺がん腫瘍に対して、薬物平均結合数が約4であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0476] (試験例8) 抗腫瘍試験(6)

American Type Culture Collection社より購入したKRAS G12C変異陽性のヒト肺がん細胞株NCI-H358細胞をBALB/c-nuマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、22日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1は0.5 mg/kgの用量で、Day 22に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図9に示す。図中の抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1はFc部位にLALA-DG変異を有する薬物平均結合数が約4の抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート1投与群で腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、KRAS G12C変異陽性の肺がん腫瘍に対して、薬物平均結合数が約4であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0477] (試験例9) 抗腫瘍試験(7)

CT26、WTにヒトCDH6遺伝子を導入したCT26、WT-hCDH6細胞を作成した。

CT26、WT-hCDH6細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、8日後に無作為に群分けを実施した。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1は1.2 mg/kgの用量で、抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2は2.4 mg/kgの用量で、Day 8に計1回尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は8匹とした。

結果を図10に示す。図中の抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2は薬物平均結合数が約2の抗体-CDNコンジュゲートであり、図中の抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1は薬物平均結合数が約4の抗体-CDNコンジュゲートである。いずれもFc部位にLALA-DG変異を有する。図中の黒四角線はビヒクル群、白丸線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1投与群、白逆三角線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群の平均腫瘍体積を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約4及び約2であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0478] (試験例10) レポーター細胞を用いた抗体-CDNコンジュゲートの活性評価(1)

American Type Culture Collection社より購入したヒト肺がん細胞株HCC827細胞及びTHP1-Dual™細胞(InvivoGen, CA, US)を用いて評価した。

アッセイは以下のように実施した。96ウェルプレートにHCC827細胞を播種し、37℃、5%CO₂環境下で24時間培養した。続いて、レポーター細胞と被験化合物を添加し、刺激を開始した。48時間後、遠心上清を回収し、QUANTI-Luc(InvivoGen)を用いて発光を測定した。

結果を図11に示す。図中の黒三角線は抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート添加群、黒丸線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート添加群の平均カウント値を示す。破線は薬物平均結合数が約2のCDNコンジュゲート2、実線は薬物平均結合数が約4のCDNコンジュゲート1を示す。縦軸はカウント値、横軸は濃度を示している。全ての抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート添加群は顕著にレポーター活性を誘導した。

以上より、Fc部位にLALA-DG変異を有する各抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートのいずれについてもレポーター活性が確認された。

[0479] (試験例11) レポーター細胞を用いた抗体-CDNコンジュゲートの活性評価(2)

National Cancer Instituteより購入したヒト卵巣がん細胞株OVCAR4細胞及びTHP1-Dual™細胞(InvivoGen, CA, US)を用いて評価した。

アッセイは以下のように実施した。96ウェルプレートにOVCAR4細胞を播種し、37℃、5%CO₂環境下で24時間培養した。続いて、レポ

ーター細胞と被験化合物を添加し、刺激を開始した。48時間後、遠心上清を回収し、QUANT I-Luc (InvivoGen) を用いて発光を測定した。

結果を図12に示す。図中の黒三角線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート添加群を示す。実線は薬物平均結合数が約4のCDNコンジュゲート1、破線は薬物平均結合数が約2のCDNコンジュゲート2の平均カウント値を示す。縦軸はカウント値、横軸は濃度を示している。全ての抗CDH6抗体-CDNコンジュゲート添加群は顕著にレポーター活性を誘導した。

以上より、Fc部位にLALA-DG変異を有する各抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートのいずれについてもレポーター活性が確認された。

[0480] (試験例12) 腫瘍再移植試験(1)

(試験例3) 抗腫瘍試験(1)と同様の抗腫瘍試験を実施した。抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1は1.0mg/kgの用量で、Day7に計1回尾静脈内投与した。これらの群のうち完全に腫瘍が退縮したマウスについて、Day80にCT26.WT細胞をBALB/cマウスの左腋窩部に皮下移植した。

Day99における結果を図13に示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)を示している。各ドットは各個体の腫瘍体積を示し、図中の横線は中央値を示す。同週齢のコントロール群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約4であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1について長期に亘る抗腫瘍免疫が確立していることが確認された。

[0481] (試験例13) 腫瘍再移植試験(2)

(試験例5) 抗腫瘍試験(3)と同様の抗腫瘍試験を実施した。抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2は1.0mg/kgもしくは2.0mg/kgの用量で、Day7に計1回尾静脈内投与した。これらの群のうち完

全に腫瘍が退縮したマウスについて、Day 80にCT26、WT細胞をBALB/cマウスの左腋窩部に皮下移植した。

Day 100における結果を図14に示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)を示している。各ドットは各個体の腫瘍体積を示し、図中の横線は中央値を示す。同週齢のコントロール群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2であり、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2について長期に亘る抗腫瘍免疫が確立していることが確認された。

[0482] (試験例14) ヒト全血を用いたサイトカイン産生試験

ヒト新鮮末梢血を採取し、96ウェルプレートに添加した。続いて、薬物平均結合数が約4の化合物については $10\mu\text{g/mL}$ 、薬物平均結合数が約2の化合物については $20\mu\text{g/mL}$ の濃度で被験化合物を添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 環境下で24時間培養した。遠心後、血漿を回収し、AlphaLISA (PerkinElmer) を用いてIL-6濃度を測定した。

Logスケール (Logarithmic Scale) の標準線を用いて数値を算出した結果を図15Aに、Linearスケール (Linear Scale) の標準線を用いて数値を算出した結果を図15Bに示す。数値の傾向はLogスケールでもLinearスケールでも同様のことがいえる。算出された数値としては、Linearスケールの方が正確な濃度を表す。縦軸はIL-6濃度(pg/mL)を示している。横軸は各抗体-CDNコンジュゲートが有するFc部位の変異を示している。WTはFc部位の変異がないことを示している。抗EGFR抗体B-CDNコンジュゲートはIgG2抗体を用いた抗体-CDNコンジュゲートであり、その他はIgG1抗体を用いた抗体-CDNコンジュゲートである。IgG2抗体もしくはIgG1抗体かつFc部位における変異なし(WT)、LALA変異を有する抗体-CDNコンジュゲート添加群に対し、IgG1抗体かつLALA-

D G変異を有する抗体1-CDNコンジュゲート添加群においてサイトカイン産生は著しく抑制された。この結果は薬物平均結合数が約2の抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート、薬物平均結合数が約4の抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲートと同様であった。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲートにおいても薬物平均結合数が約2もしくは薬物平均結合数が約4でありIgG1抗体かつLALA-DG変異を有する抗体-CDNコンジュゲート添加群においてサイトカイン産生は著しく抑制された。

以上より、各抗体-CDNコンジュゲートを投与した際のサイトカイン産生を抑制する目的には、IgG1抗体を用いたLALA-DG変異が優れていることが確認された。本試験におけるサイトカイン産生は図17に示されるFcγR結合活性と相関していた。

一方、Fc部位に変異を有するNaked IgG1抗体（CDNコンジュゲート無し）を同様に試験した場合、サイトカイン産生に明確な差は認められなかった（data not shown）。よって当該抗体をコンジュゲート化することにより、抗体のFcγR結合活性を感度よく評価できることが判明した。本評価系を用いて、抗体のエフェクター機能を低減させた、安全な抗体薬物コンジュゲートを取得できた。

[0483] （試験例15）エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRI結合活性評価

Biacore T200（Cytiva社）を用いて、種々のエフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRIに対する結合活性を評価した。評価にはIgG2型の抗体である抗EGFR抗体（抗EGFR抗体B）、そのFc部分をIgG1型に置き換えたFc置換体（IgG1 WT）（抗EGFR抗体A）、IgG1 WTのFc部分にL234A/L235A（LALA）変異を導入した変異体（改変抗EGFR抗体3）、L234A/L235A/D265G（LALA-DG）変異を導入した変異体（改変抗EGFR抗体1）を用いた。本試験例で用いた抗EGFR抗体Bは、市販のベクティビックス点滴静注（武田薬品工業）（100mg/5m

L) を Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (50K、メルク製) でバッファー交換し、HBS-EP + 溶液として得た。抗His抗体を固定化したセンサーチップ上にリガンドとしてHisタグ付きのヒトFcγRIを捕捉させた後、アナライトとして各種抗EGFR抗体をセンサーチップに添加してリガンド・アナライト間の相互作用を表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance、SPR) 法により測定した。Anti-6X His tag 抗体 [AD1. 1. 10] (abcam社) をキット説明書に従い Sensor Chip CM5 (Cytiva社) 上に固定化し、HBS-EP + (GE Healthcare社) で $10\mu\text{g/mL}$ に調製した Recombinant Human Fc gamma RI/CD64 Protein (R&D systems社) を上記センサーチップに $10\mu\text{L/min}$ で 60 秒間接触させることにより捕捉させた。その後、HBS-EP + で各濃度に調製した抗EGFR抗体をセンサーチップに流速 $30\mu\text{L/min}$ で 120 秒間添加した。図16Aに抗体の濃度 (0. 3、0. 4、0. 6、0. 9、1. 3、2. 0、3. 1、4. 7 μM) に対する結合レスポンス (Resonance Unit、RU) の値をプロットしたグラフを示した。また、図17Aのグラフに抗体濃度 4. 7 μM に対するRU値を示した。

ヒトFcγRIへの結合を示すRU値は IgG1 WT >> LALA >> IgG2 > LALA-DG であった。

[0484] (試験例16) エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIa結合活性評価

Biacore T200を用い、試験例15に記載した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIaに対する結合活性を評価した。リガンドとしてヒトFcγRをセンサーチップ上に直接固定化した後、アナライトとして各種抗EGFR抗体をセンサーチップに添加してリガンド・アナライト間の相互作用をSPR法により測定した。ヒトFcγRIIaとしてRecombina

nt Human Fc gammaRIIA/CD32a (R167) Protein (R&D systems社) をキット説明書に従い Sensor Chip CM5 上に固定化した。その後、HBS-EP+ で各濃度に調製した抗EGFR抗体を上記センサーチップに流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で 120 秒間添加した。図16BにヒトFcγRIIaをリガンドとして用いた時の、各抗体の濃度 (0.9、1.3、2.0、3.1、4.7 μM) に対するRU値をプロットしたグラフを示した。また、図17Bのグラフに抗体濃度 4.7 μM に対するRU値を示した。

ヒトFcγRIIaへの結合を示すRU値はIgG1 WT > IgG2 > LALA > LALA-DGであった。

[0485] (試験例17) エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIb/c結合活性評価

試験例16と同様の方法で、試験例15に記載した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIb/cに対する結合活性を評価した。ヒトFcγRIIb/cとしてRecombinant Human Fc gamma RIIB/C (CD32b/c) Protein (R&D systems社) を用いた。図16CにヒトFcγRIIb/cをリガンドとして用いた時の、各抗体の濃度 (0.9、1.3、2.0、3.1、4.7 μM) に対するRU値をプロットしたグラフを示した。また、図17Cのグラフに抗体濃度 4.7 μM に対するRU値を示した。

ヒトFcγRIIb/cへの結合を示すRU値はIgG1 WT > IgG2 > LALA > LALA-DGであった。

[0486] (試験例18) エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIIa結合活性評価

試験例16と同様の方法で、試験例15に記載した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIIaに対する結合活性を評価した。ヒトFcγRIIIaとしてRecombinant Human Fc gamma RIIIA/CD16a protein (R&D systems社) を用いた。図1

6DにヒトFcγRIIIaをリガンドとして用いた時の、各抗体の濃度（0.9、1.3、2.0、3.1、4.7 μM）に対するRU値をプロットしたグラフを示した。また、図17Dのグラフに抗体濃度4.7 μMに対するRU値を示した。

ヒトFcγRIIIaへの結合を示すRU値はIgG1 WT>LALA>IgG2>LALA-DGであった。

[0487]（試験例19） エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIIb結合活性評価

試験例16と同様の方法で、試験例15に記載した抗EGFR抗体のヒトFcγRIIIbに対する結合活性を評価した。ヒトFcγRIIIbとしてRecombinant Human Fc gamma RIIIB/CD16b Protein（R&D systems社）を用いた。図16EにヒトFcγRIIIbをリガンドとして用いた時の、各抗体の濃度（0.9、1.3、2.0、3.1、4.7 μM）に対するRU値をプロットしたグラフを示した。また、図17Eのグラフに抗体濃度4.7 μMに対するRU値を示した。

ヒトFcγRIIIbへの結合を示すRU値はIgG1 WT>LALA≒IgG2≒LALA-DGであった。

[0488]（試験例20） エフェクターレス変異を導入した抗EGFR抗体とCDNのコンジュゲート体の各種ヒトFcγR結合活性評価

試験例15～19と同様の方法で、試験例15に記載した抗EGFR抗体とCDNのコンジュゲート体（DAR2：抗EGFR抗体B-CDNコンジュゲート2、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート2、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート2、またはDAR4：抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1）について各種ヒトFcγRに対する結合活性を評価した。図17A～Eのグラフに各種ヒトFcγRをリガンドとして用いた時の抗体濃度4.7 μMに対するRU値を示した。

CDNコンジュゲート化およびDARの増加はエフェクターレス変異体間でのRU値の大きさの序列に影響しなかった。したがって、抗体-CDNコンジュゲート体のヒトFcγR結合活性は基本的に親抗体のヒトFcγR結合活性に依存すると考えられた。

また、IgG1 WTの抗体及びFc部位にLALA変異有する抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートでは、親抗体よりもFcγRI結合活性が上昇する傾向が見られ、DARの増加によりさらに上昇する傾向にあった。一方で、Fc部位にLALA-DG変異を有する抗体-薬物コンジュゲートでは親抗体と同様の低いFcγRI結合活性を維持したままであった(図17A)。以上から、抗体のエフェクター機能を親抗体と同程度に低減させた抗体薬物コンジュゲートを取得する目的では、LALA-DG変異体が好ましいと考えられた。

[0489] (試験例21) エフェクターレス技術を導入した抗EGFR抗体とCDNのコンジュゲート体の熱安定性評価

MicroCal VP-Capillary DSC System (Malvern社)を用いて、抗EGFR抗体とCDNのコンジュゲート体(抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1)の熱安定性を評価した。25mM Histidine、5w/v% Sorbitol (pH5.5)を用いて抗体濃度0.5mg/mLに調製した各種抗EGFR抗体-CDNコンジュゲート1について、昇温速度60°C/hrで20°Cから120°Cまで温度上昇させた時の熱容量 C_p (kcal/mol/°C)の変化を調べた。この熱容量変化を示す曲線のピークは抗体の各ドメインの熱変性を示しており、一般にCH2、Fab、CH3の順に熱変性のピークが観察される(Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, 751-757 (2007))。図18の表中にこれらの抗体のCH2のピークトップの温度(T_m)の値と抗EGFR抗体Aからの T_m 値の変化量(ΔT_m)を示した。

抗EGFR抗体A-CDNコンジュゲート1、抗EGFR抗体3-CDNコンジュゲート1の熱安定性は同程度であった。一方、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート1の熱安定性はその他の抗体よりも T_m 値が4℃以上高かった。

[0490] (試験例22) 腫瘍再移植試験(3)

(試験例9) 抗腫瘍試験(7)と同様の抗腫瘍試験を実施した。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2は、それぞれ1.2mg/kg及び2.4mg/kgの用量で、Day7に一回尾静脈内投与した。これらの群のうち、完全に腫瘍が退縮したマウスについて、Day84にCT26.WT-hCDH6細胞を左腋窩部に皮下移植した。コントロール群は週齢の一致した未処置BALB/cマウスを用いた。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2のDay98における結果を図24に示す。縦軸は腫瘍体積(mm³)を示している。各ドットは各個体の腫瘍体積を示し、図中の横線は中央値を示す。同週齢のコントロール群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2、4で、Fc部分に変異を有する各抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートのいずれについても抗腫瘍免疫が確立していることが確認された。

[0491] (試験例23) 抗腫瘍試験(8)

ATCC社より購入したヒト腎がん細胞株A498細胞をBALB/c-nuマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day0)、20日後に無作為に群分けを実施した。各抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートは薬物平均結合数4、2について0.3mg/kg、0.6mg/kgの用量で、計1回、尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図25示す。図中の抗体はすべてFc部位にLALA-DG変異を

有する。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2の薬物平均結合数はそれぞれ4、2である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1投与群、黒三角線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、全ての抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2、4であり、Fc部位に各変異を有する抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートのいずれについても強い抗腫瘍効果が確認された。

[0492] (試験例24) 抗腫瘍試験(9)

ATCC社より購入したヒト腎がん細胞株786-O細胞をBALB/c-nuマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、28日後に無作為に群分けを実施した。各抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートは薬物平均結合数に関わらず0.1 mg/kgの用量で、計1回、尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図26、27に示す。図中の抗体はすべてFc部位にLALA-DG変異を有する。抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1及び抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2の薬物平均結合数はそれぞれ4、2である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート1投与群、黒三角線は抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、全ての抗CDH6抗体1-CDNコンジュゲート投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約2、4であり、Fc部位に各変異を有する抗CDH6抗体-CDNコンジュゲートのいずれについても強い抗腫瘍効果が確認された。

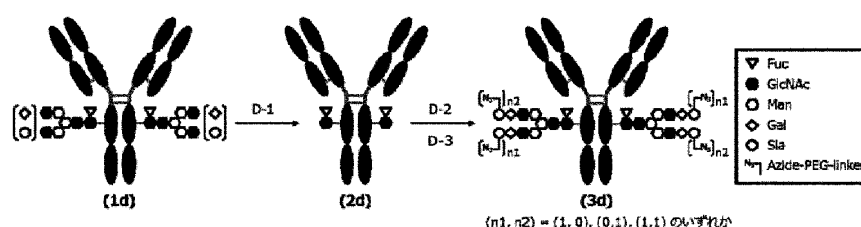
[0493] (試験例 25) 抗腫瘍試験 (10)

A T C C 社より購入したヒト卵巣がん細胞株 O V - 9 0 細胞を B A L B / c - n u マウスの右腋窩部に皮下移植し (D a y 0)、7 もしくは 15 日後に無作為に群分けを実施した。抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 1 は薬物平均結合数が約 4 であり、0.3 m g / k g の用量で、抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 2 は薬物平均結合数が約 2 であり、0.6 m g / k g の用量で、計 1 回、尾静脈内投与した。各群のマウス匹数は 6 匹とした。

結果を図 28、29 に示す。図中の抗体はすべて F c 部位に L A L A - D G 変異を有する。抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 1 及び抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 2 の薬物平均結合数はそれぞれ 4、2 である。図中の黒四角線はビヒクル群、黒丸線は抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 1 投与群、黒三角線は抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート 2 投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (m m ³)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、全ての抗 C D H 6 抗体 1 - C D N コンジュゲート投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、薬物平均結合数が約 2、4 であり、F c 部位に各変異を有する抗 C D H 6 抗体 - C D N コンジュゲートのいずれについても強い抗腫瘍効果が確認された。

[0494] 実施例 15 : ワンポット法による、改変抗 E G F R 抗体 2 - [S G - (N ₃)₂]₂、あるいは改変抗 C D H 6 抗体 1 - [S G - (N ₃)₂]₂ の製造法 [化115]



[0495] 2 種類の E n d o 酵素を同時に用いることで、還元末端が活性化されてい

ない糖鎖ドナーを、抗体のN297糖鎖へ、直接糖鎖転移させることを特徴とする「ワンポット法」（特許文献：WO2018003983、WO2022050300、非特許文献：PLOS ONE 2018, 13, e0193534）を実行した。当該方法は、「D法：糖鎖リモデリング抗体の製造」の（D-3工程）として採用することもできる。具体的には、ワンポット法を用いて、（2d）から（3d）を含む反応液を準備した後に、適切な方法で精製することで、目的物である（3d）を調製できる。

一般的に、ワンポット法では、上記文献に記載のあるような任意の酵素と糖鎖ドナー分子を適宜組み合わせ使用できるが、以下の実施例では、上記文献に記載のある酵素の中から、その代表例を各1つ選んだ。また、アクセプター分子の代表例として、（Fuc α 1, 6）GlcNAc-改変抗EGFR抗体2及び（Fuc α 1, 6）GlcNAc-改変抗CDH6抗体1を選んだ。更に、糖鎖ドナー分子には、上記文献に記載ない糖鎖ドナー分子（G-10）を選んだ（表7）。

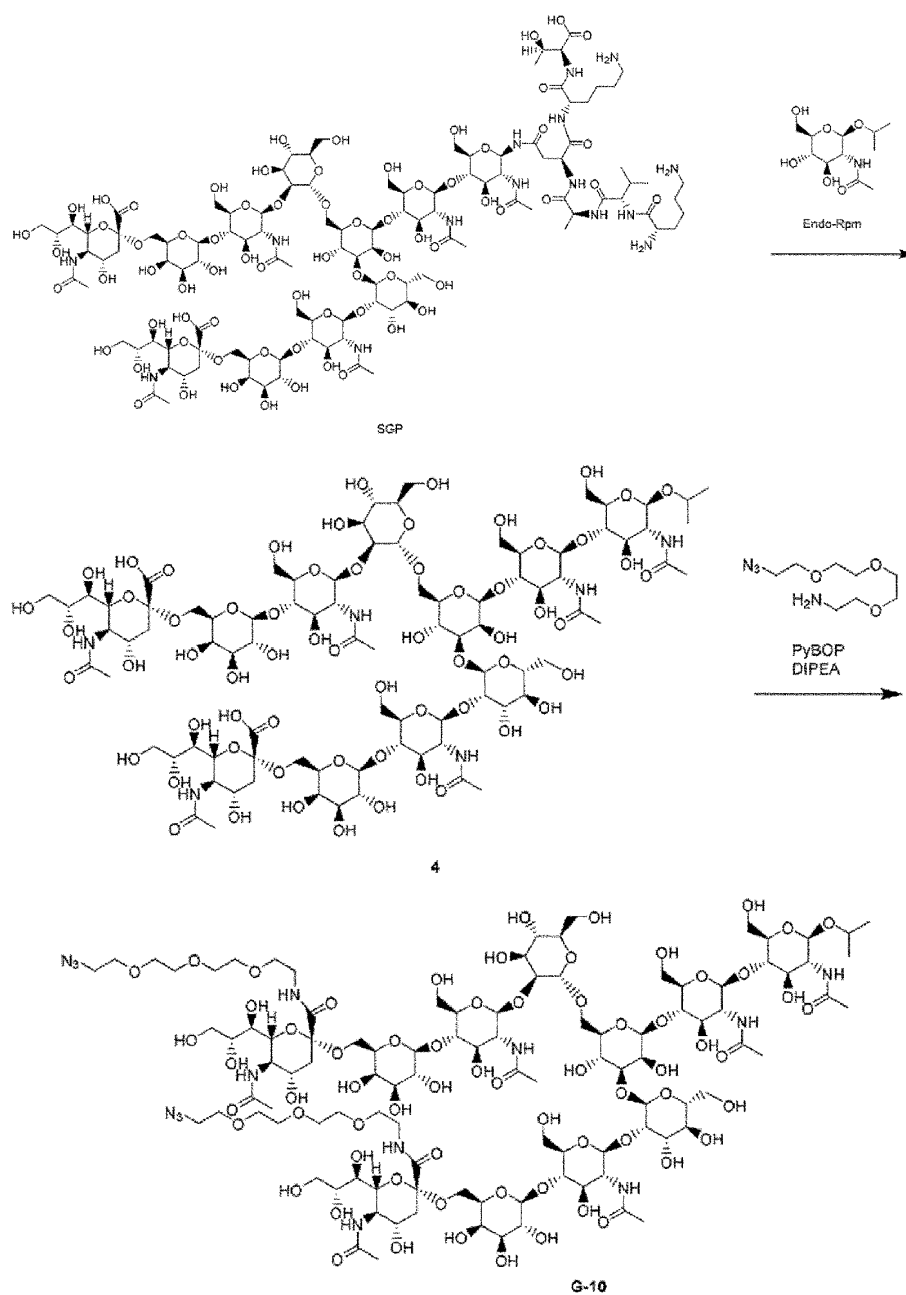
[表6]

表7 ワンボット反応で使用する酵素溶液、アクセプター溶液と糖鎖ドナー分子

酵素	アミノ酸配列	調製例
Endo-Si酵素 (D241M/ Q311L)		WO2022050300に記載される方法を参考にして、Endo-Si酵素を作製し、酵素濃度3mg/mL〜10mg/mLの溶液(PBS(-) (富士フイルム和光純薬))とする。
Endo-Rp酵素 (N172H)		WO2018101454に記載される方法を参考にして、Endo-Rp酵素を作製し、酵素濃度3mg/mL〜6mg/mLの溶液(50mM Tris, 150mM NaCl, pH8.0)とする。
アクセプター分子	アミノ酸配列	調製例
(Fucα1,6) GlcNAc-改変 抗EGFR抗体2	配列番号30(軽鎖) 配列番号33(重鎖)	実施例3の工程1の方法に従って作製できる溶液に対して、限外ろ過膜を用いて緩衝液交換し、抗体濃度90mg/mL以上の50mM トリス塩酸緩衝溶液(pH7.25)溶液とする。
(Fucα1,6) GlcNAc-改変 抗CDH6抗体1	配列番号44(軽鎖) 配列番号46(重鎖)	実施例5の工程1の方法に従って作製できる溶液に対して、限外ろ過膜を用いて緩衝液交換し、抗体濃度90mg/mL以上の50mM トリス塩酸緩衝溶液(pH7.25)溶液とする。
糖鎖ドナー分子	糖鎖構造	合成法の例
G-10	O結合型糖鎖	実施例15-1に記載した

[0496] 実施例15-1：糖鎖ドナー分子の合成 (G-10)

[化116]



[0497] (15-1a) [糖鎖交換反応]

SGP (20.0g) 及び 1-Methylethyl 2-(acetyl amino)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (36.8g, 20equiv) をリン酸緩衝液 (280mL、pH5

、5、0、2 mol/L) に溶解した後、50℃に加温した。この混合溶液に、Endo-Rp N172H (9.1 mg) を加え、そのままの温度で72時間攪拌した。

[精製]

反応終了後、室温にて反応液をろ過した。このろ液の一部について Sartocn Hydrosart-2kDa (Sartorius)、次いで Amberlite (登録商標) IR120 H form (Merck) で精製した後、凍結乾燥により固形物4 (3.72 g from SGP 5.6 g) を得た。

[0498] (15-1b) [縮合反応]

工程 (15-1a) で得た固形物4 (3.0 g) をDMF (59.1 mL) と精製水 (0.9 mL) を用いて、溶解したのち、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.03 g、7.94 mmol)、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (867 mg、3.97 mmol) を加えた。この溶液に1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (6.20 g、11.9 mmol) を20℃にて3回に分けて添加後、そのままの温度で23時間攪拌した。

[精製]

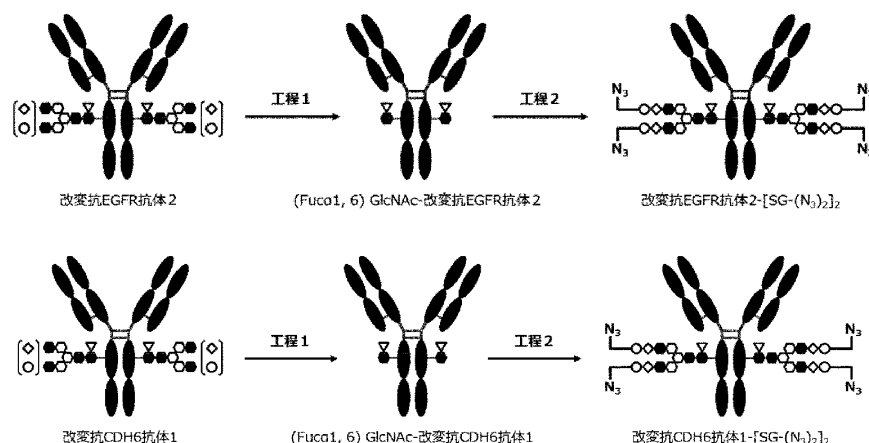
反応後、反応液を精製水で希釈した後、Sartocn Hydrosart-2kDa (Sartorius) で精製し濃縮した。この濃縮液を、アセトニトリルと水を溶離液とし、カラムにはYMC-Actus Triart Prep C18-S (ワイエムシ社製) を用いて分離精製を行った。UV検出 (210 nm) によって検出されたメインピークを回収し、減圧濃縮し、目的化合物G-10 (2.77 g) を得た。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₃H₁₇₆N₁₄O₆₆:

[M+2H]²⁺ 1333.5496 (most abundant mass), Found 1333.5450

[0499] 実施例 15-2：改変抗EGFR抗体2- $[\text{SG}-(\text{N}_3)_2]_2$ 、あるいは改変抗CDH6抗体1- $[\text{SG}-(\text{N}_3)_2]_2$ を含む反応液の調製

[化117]



[0500] (15-2a) [糖鎖転移反応]

下記に示すいずれかのプロトコルで糖鎖転移反応を実施した。また、添加剤含有液を加える場合の注意点として、添加剤を加えることで抗体や酵素を沈殿させないことを考慮した濃度設定とし、さらに、緩衝液のpHが変わらないように事前調製した添加剤水溶液を加えた。

[0501] [糖鎖転移反応標準プロトコル1]

(Fucα1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体2 (3mg)、糖鎖ドナー分子G-10 (20当量)、Endo-Simulant (以下、「Endo-Sim」とも呼ぶ、1.6%w/w)、Endo-Rpmulant (以下、「Endo-Rpm」とも呼ぶ、0.2%w/w)と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25)を加え、必要に応じて表8に示す含有量の添加剤含有液を適量加え、総量液量50μLとし、30℃で28時間反応させた。

反応開始後、16時間、18時間、20時間、22時間、24時間にサンプリングした。サンプリング時には反応液を一部抜き取り、含有抗体濃度が1mg/mLになるように精製水で希釈し、LabChip分析開始時まで

凍結保管した。

[0502] [糖鎖転移反応標準プロトコル2]

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-改変抗CDH6抗体1 (15mg)、糖鎖ドナー分子G-10 (25当量)、Endo-Sim (1.6%w/w)、Endo-Rpm (0.2%w/w)と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25)を加え、必要に応じて表9示す含有量の添加剤含有液を適量加え、総量液量300 μ Lとし、30℃で20時間反応させた。

反応開始後、16時間、18時間、20時間にサンプリングした。サンプリング時には反応液を一部抜き取り、LabChip分析開始時まで凍結保管した。

[0503] (15-2b) [LabChip分析を用いた糖鎖転移率測定] 糖鎖転移反応の進行具合をタンパク質のゲル電気泳動法を用いて確認した (WO2013/120066、Huang W, et al., J Am Chem Soc. 2012, 134, 12308-12318)。タンパク質の全自動電気泳動システムとして、装置にはLabChip GX II (PerkinElmer製)、試薬はProtein Express Assay LabChip及びProtein Express Reagent Kit (PerkinElmer製)を用いた。

前述した [糖鎖転移反応標準プロトコル] に従い、サンプリング液をLabChip分析すると、そのエレクトロフェログラムから、未反応物と糖鎖転移体が分離したピークとして確認される。未反応物と糖鎖転移体のピーク面積比から糖鎖転移率を下記算出式により算出した。

[0504] 糖鎖転移率 (%) = $\frac{[\text{糖鎖転移抗体由来のH鎖のピーク面積}]}{[\text{未反応物由来のH鎖ピーク面積}] + [\text{糖鎖転移抗体由来のH鎖のピーク面積}]} \times 100$

[0505] (Fuc α 1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体2、あるいは、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-改変抗CDH6抗体1に用いた各反応条件

に対して、各反応時間における糖鎖転移率を算出した（表8）

[表7]

表8

実施例/ 参考例	抗体	添加剤 (系内濃度)	糖鎖転移率 (%)				
			16h	18h	20h	22h	24h
15-2-1	(F u c α 1, 6) G l c N A c - 改変抗E G F R抗 体2	-	75.6	76.6	77.0	77.5	77.6
15-2-2		NaCl (0.5M)	83.2	85.2	86.8	86.9	83.8
15-2-3		CH ₃ COOK (0.5M)	85.1	84.3	82.9	82.8	82.2
15-2-4		CH ₃ COONH ₄ (0.5M)	81.0	83.1	84.1	81.4	85.1
10-1		CaCl ₂ /2H ₂ O (0.04M)	31.0	34.3	38.0	41.6	45.1
15-2-5		LiCl (0.1M)	78.6	79.9	80.2	81.0	80.9
15-2-6		CH ₃ COONa (0.04M)	77.4	79.0	79.5	80.4	79.5
10-2		MgCl ₂ /6H ₂ O (0.04M)	62.6	67.1	70.6	74.3	76.6
10-3		MgSO ₄ (0.04M)	63.5	69.0	71.2	73.5	75.7
10-4		MnSO ₄ /5H ₂ O (0.04M)	20.6	22.8	24.6	31.2	30.4
15-2-7		NH ₄ SO ₄ (0.04M)	75.1	77.3	77.9	73.4	77.5
10-5		Glucose (0.04M)	32.7	33.4	33.9	34.3	34.5
15-2-8		Sorbitol (0.04M)	76.0	77.2	78.5	78.2	79.4
15-2-9		Trehalose/2H ₂ O (0.04M)	75.9	77.2	78.8	78.6	79.1
15-2-10		Arg-HCl (0.04M)	77.4	79.9	80.7	81.5	82.0
15-2-11		His-HCl /H ₂ O (0.04M)	77.9	79.4	79.4	79.4	79.8
15-2-12		DMSO (1%v/v)	77.5	78.5	79.3	79.2	79.7
15-2-13		PEG6000 (1%v/v)	80.1	79.9	80.4	80.2	80.5
15-2-14		Tween20 (1%v/v)	77.4	78.9	76.9	78.8	78.8
15-2-15		EtOH (1%v/v)	77.1	77.8	78.6	78.9	78.5

[表8]

表9

実施例	抗体	添加剤 (系内濃度)	糖鎖転移率 (%)		
			16h	18h	20h
15-2-16	(F u c α 1, 6) G l c N A c - 改変抗CDH6抗体1	-	80.5	81.6	82.8
15-2-17		NaCl (0.3M)	87.4	88.0	88.2

[0506] 使用する抗体や糖鎖ドナー分子に適切な分子種（以降、添加剤）が介在すると、静電相互作用、疎水相互作用、溶媒効果等が加わることで、添加剤を添加しない場合に比べて、ワンポット反応における糖鎖転移率に正あるいは負の影響が出ることが期待される。

[0507] 反応効率を改善させる効果がある添加剤であれば、任意の分子を添加することができるが、ここでは、その代表例として、無機塩（塩化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、塩

化マグネシウム)、有機塩(酢酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム)、有機溶媒(エタノール、ジメチルスルホキシド)、界面活性剤(ポリソルベート20、PEG6000)、糖類(グルコース、ソルビトール、トレハロース)、アミノ酸類(アルギニン、ヒスチジン)などを用いて、その添加効果の有無を確認した(表8、9)。

[0508] 添加剤を加えることで、糖鎖転移率が大幅に改善する場合があることを確認した。特に一価のアルカリ金属塩、特に、塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸カリウムはその効果は高い。

[0509] 参考例10-1及び参考例10-4より、2価の金属イオンは、酵素の構造、すなわち反応活性に負の影響を与える因子となり、所期の反応進行を阻害したと考えられる。

[0510] また、参考例10-5より、グルコースはEndo-Rp酵素が活性化した糖鎖に関して、その糖鎖アクセプターとなる可能性があるため、反応進行を阻害したと考えられる。一方で、2糖構造中に α -グルコースが含まれるトレハロースの場合や、グルコースが還元されて完全に直鎖状になったソルビトールの場合、反応進行を阻害せず、むしろ糖鎖転移率を改善した(実施例15-2-8、実施例15-2-9)。

[0511] 実施例15-3:ワンボット法に使用する添加剤の濃度設定法

添加剤の濃度は、添加剤を加えることで抗体や酵素を沈殿させない限りにおいて、すなわち、ワンボット反応の反応性が残存する限り、任意に設定できる。ここでは添加剤の代表例として、塩化ナトリウムを用い、具体的な設定法の一例を示す。

[0512] [糖鎖転移反応標準プロトコル3]

(Fuc α 1,6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体2(3mg)、糖鎖ドナー分子G-10(25当量)、Endo-Sim(1.6%w/w)、Endo-Rpm(0.2%w/w)と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液(pH 7.25)を加え、必要に応じて表10に示す含有量の添加剤含有液を適量加え、総量液量50 μ Lとし、30℃で24時間反応させた

。

反応開始後、１８時間、２２時間、２４時間にサンプリングした。サンプリング時には反応液を一部抜き取り、含有抗体濃度が１ｍｇ／ｍＬになるように精製水で希釈し、ＬａｂＣｈｉｐ分析開始時まで凍結保管した。反応終了後、（１５－２ｂ）に記載した方法に従って、（Ｆｕｃα１，６）ＧｌｃＮＡｃ－改変抗ＥＧＦＲ抗体２に用いた各反応条件に対して、各反応時間における糖鎖転移率を算出した（表１０）

[表9]

表１０

	抗体	糖鎖ドナー分子 (当量)	添加剤 (系内濃度)	糖鎖転移率（％）		
				18h	22h	24h
15-3-1	(Fucα1, 6) GlcNAc－ 改変抗EGFR抗体2	G-10 (25eq.)	－	81.3	81.3	81.8
15-3-2		G-10 (25eq.)	NaCl (0.15M)	86.6	86.8	87.3
15-3-3		G-10 (25eq.)	NaCl (0.30M)	88.0	88.3	88.9
15-3-4		G-10 (25eq.)	NaCl (0.45M)	89.1	89.9	90.2
15-3-5		G-10 (25eq.)	NaCl (0.60M)	90.5	91.1	91.5

[0513] 実施例１５－３の結果より、添加剤に塩化ナトリウムを選んだ場合、反応系内の塩濃度が高いほど、糖鎖転移率に改善傾向が確認された。同様にして、使用したい添加剤の種類に応じて、使用する添加剤の至適塩濃度を設定することができる。

[0514] 以上より当業者であれば、本明細書を参考して、糖鎖転反応率を改善する性質を有する添加剤の構造を特定することができる。したがって、実施例１５－２や実施例１５－３に記載のない任意の添加剤を、最適濃度でワンポット法に使用して、目的物である改変抗EGFR抗体２－[SG－(N₃)₂]₂、あるいは改変抗CDH6抗体１－[SG－(N₃)₂]₂を含む反応溶液を調製し、その後、適切な方法で精製してもよい。

産業上の利用可能性

[0515] 本発明により、強いSTINGアゴニスト活性を有し、強い抗腫瘍効果を示すCDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲートが提供される。該抗体薬物コンジュゲートは、STINGアゴニスト活性が関連する疾患（例えば、がん）の治療剤として有用である。また、本発明により、糖鎖ドナー分子に由

来する糖鎖を含むN297結合糖鎖を有するFc含有分子の新規製造方法が提供される。

配列表フリーテキスト

[0516] 配列番号1：ヒト野生型STINGのアミノ酸配列

配列番号2：ヒト野生型STINGのヌクレオチド酸配列

配列番号3：ヒトH232(REF)変異型STINGのアミノ酸配列

配列番号4：ヒトH232(REF)変異型STINGのヌクレオチド酸配列

配列番号5：ヒトHAQ変異型STINGのアミノ酸配列

配列番号6：ヒトHAQ変異型STINGのヌクレオチド酸配列

配列番号7：マウスSTINGのアミノ酸配列

配列番号8：マウスSTINGのヌクレオチド酸配列

配列番号9：HisAviTEV-hSTING(139-342)ヒト野生型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号10：HisAviTEV-hSTING(139-342)ヒトREF変異型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号11：HisAviTEV-hSTING(139-342)ヒトAQ変異型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号12：His-Avi-TEV-mSTING(138-341)マウス野生型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号13～22：プライマーの配列

配列番号23：抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1～3)のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号24：抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1～3)のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号25：抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1～3)のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号26：抗EGFR抗体(改変抗EGFR抗体1～3)のCDRH1

のアミノ酸配列

配列番号27：抗EGFR抗体（改変抗EGFR抗体1～3）のCDRH2

のアミノ酸配列

配列番号28：抗EGFR抗体（改変抗EGFR抗体1～3）のCDRH3

のアミノ酸配列

配列番号29：抗EGFR抗体（改変抗EGFR抗体1～3）の軽鎖可変領

域のアミノ酸配列

配列番号30：抗EGFR抗体（改変抗EGFR抗体1～3）の軽鎖のアミ

ノ酸配列

配列番号31：抗EGFR抗体（改変抗EGFR抗体1～3）の重鎖可変領

域のアミノ酸配列

配列番号32：抗EGFR抗体LALA-DG変異体（改変抗EGFR抗体

1）の重鎖のアミノ酸配列

配列番号33：抗EGFR抗体LALA-DG変異体（改変抗EGFR抗体

2）の重鎖のアミノ酸配列

配列番号34：抗EGFR抗体Aの重鎖のアミノ酸配列

配列番号35：抗EGFR抗体B（Vectibix）の重鎖のアミノ酸配

列

配列番号36：抗EGFR抗体LALA変異体（改変抗EGFR抗体3）の

重鎖のアミノ酸配列

配列番号37：抗CDH6抗体（改変抗CDH6抗体1）のCDRL1のア

ミノ酸配列

配列番号38：抗CDH6抗体（改変抗CDH6抗体1）のCDRL2のア

ミノ酸配列

配列番号39：抗CDH6抗体（改変抗CDH6抗体1）のCDRL3のア

ミノ酸配列

配列番号40：抗CDH6抗体（改変抗CDH6抗体1）のCDRH1のア

ミノ酸配列

配列番号 4 1 : 抗 C D H 6 抗体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の C D R H 2 のアミノ酸配列

配列番号 4 2 : 抗 C D H 6 抗体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の C D R H 3 のアミノ酸配列

配列番号 4 3 : 抗 C D H 6 抗体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号 4 4 : 抗 C D H 6 抗体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の軽鎖のアミノ酸配列

配列番号 4 5 : 抗 C D H 6 抗体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号 4 6 : 抗 C D H 6 抗体 L A L A - D G 変異体 (改変抗 C D H 6 抗体 1) の重鎖の配列番号 4 7 : 野生型 E n d o - S のアミノ酸配列

配列番号 4 8 : 野生型 E n d o - S 2 のアミノ酸配列

配列番号 4 9 : 野生型 E n d o - S i のアミノ酸配列

配列番号 5 0 : 野生型 E n d o - M のアミノ酸配列

配列番号 5 1 : 野生型 E n d o - R p のアミノ酸配列

配列番号 5 2 : 野生型 E n d o - C C のアミノ酸配列

配列番号 5 3 : 野生型 E n d o - O m のアミノ酸配列

配列番号 5 4 : 野生型 E n d o - S d のアミノ酸配列

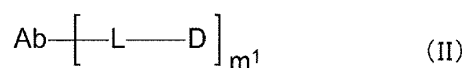
配列番号 5 5 : 野生型 E n d o - S z のアミノ酸配列

配列番号 5 6 : 野生型 E n d o - S e のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 次式 (I) :

[化1]



(式中、 m^1 は1から10の範囲であり、

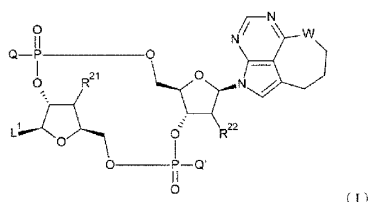
A bは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片はリモデリングされた糖鎖を有していてもよく、該抗体又は該抗体の機能性断片のF c領域の234番目、235番目、及び265番目(すべてEUナンバリング)のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yであり、ここで、抗体は、抗E G F R抗体又は抗C D H 6抗体を示し、

Lは、A bとDを連結するリンカーを示し、

A bはそのアミノ酸残基から直接Lに結合するか、A bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合していてもよく、

Dは、次式 (I) :

[化2]



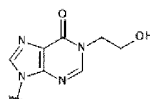
(I)

(ここで、

Lは、L¹に含まれるヒドロキシ基と結合し、

L¹は、以下の式 :

[化3]



(ここで、波線は置換位置を示す)

の基を示し、

Q及びQ' は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はチオール基を示し、

R^{2 1}及びR^{2 2}は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はフッ素原子を示し、

Wは、－NH－又は硫黄原子を示す)

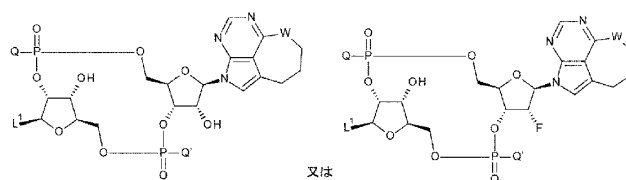
で表される化合物を示す)

で表される抗体薬物コンジュゲート。

[請求項2]

Dが、以下の2式：

[化4]



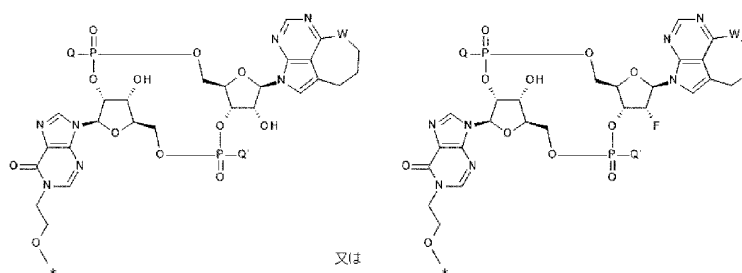
(ここで、L¹、Q、Q' 及びWは、前に定義したとおりである)

のいずれかで示される、請求項1に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項3]

Dが、以下の2式：

[化5]



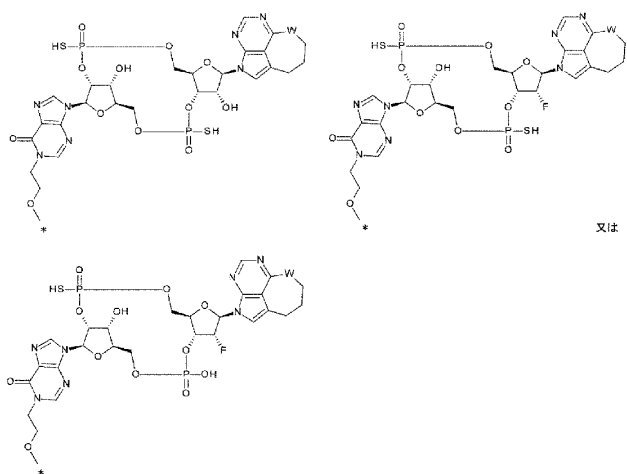
(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示し、Q、Q' 及びWは、前に定義したとおりである)

のいずれかで示される、請求項1又は2に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項4]

Dが、以下の3式：

[化6]



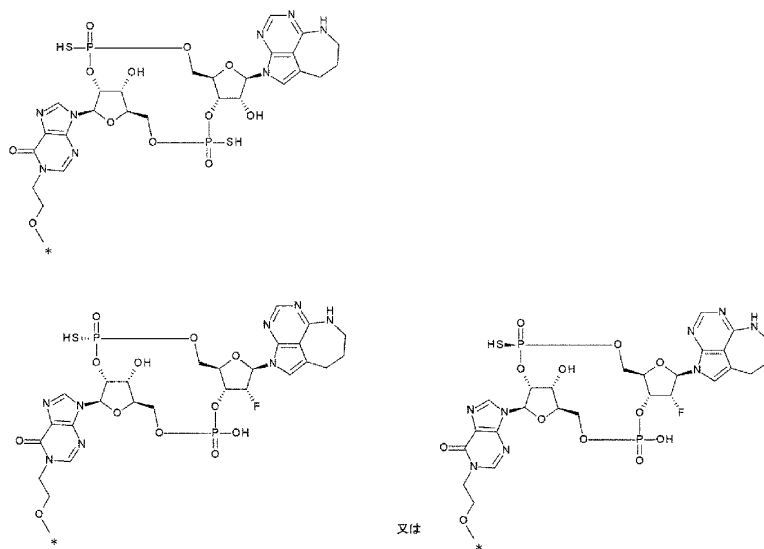
(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示し、Wは、前に定義したとおりである)

のいずれかで示される、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項5]

Dが、以下の3式：

[化7]

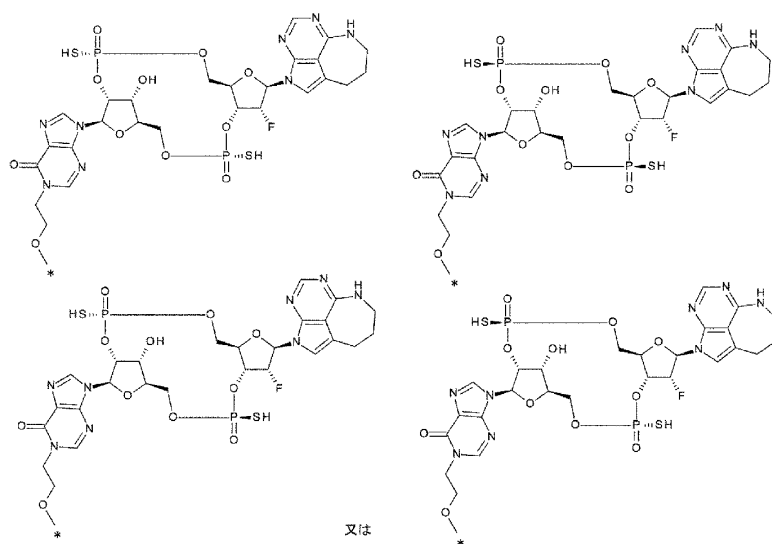


(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項 6] D が、以下の 4 式：

[化 8]

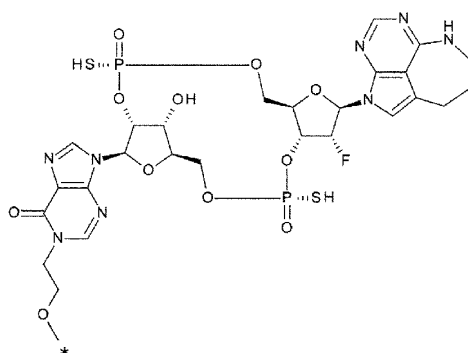


(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項 7] D が、次式：

[化 9]



(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

で示される、請求項 1 ～ 4 又は 6 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コ

ンジュゲート。

[請求項8]

リンカーLが、 $-Lb-La-Lp-Lc-*$ で示され、

式中、アスタリスクは、薬物Dと結合していることを示し、

Lpは、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示すか又は存在せず、

Laは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-CH_2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-CH_2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-C(=O)-$ 、

$-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$ 、及び、

$-(CH_2)n^9-C(=O)-$

(ここで、 n^2 は1～3の整数を示し、 n^3 は1～5の整数を示し、 n^4 は0～2の整数を示し、 n^9 は2～7の整数を示す)、

Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサー又はLaとAbのシステイン残基を結合するスペーサーを示し、並びに、

Lcは、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-$ フェニル基 $-CH_2-O$ ($C=O$) $-$ 又は $-NH-$ ヘテロアリール基 $-CH_2-O$ ($C=O$) $-$ を示すか又は存在しない、

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項9]

Lcが $-NH-CH_2-$ である、請求項8に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項10]

Lpが、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVA-$ 、 $-GGFM$

－、－GGVCit－、－GGFCit－、－GGICit－、－GGPL－、－GGAQ－又は－GGPP－のいずれか一つである、請求項8又は9に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項11] Lpが、－GGFG－又は－GGPI－である、請求項10に記載の抗体薬物コンジュゲート。

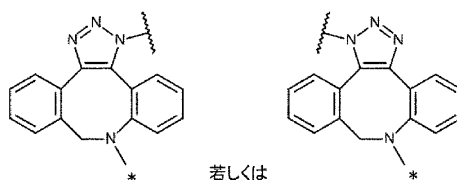
[請求項12] Laが、以下：

－C(=O)－CH₂CH₂－C(=O)－、
 －C(=O)－CH₂CH₂－C(=O)－NH－(CH₂CH₂O)₃－CH₂－C(=O)－、
 －C(=O)－CH₂CH₂－C(=O)－NH－(CH₂CH₂O)₄－CH₂－C(=O)－、及び
 －(CH₂)₅－C(=O)－

からなる群から選択されるいずれか一つを示す、請求項8～11のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

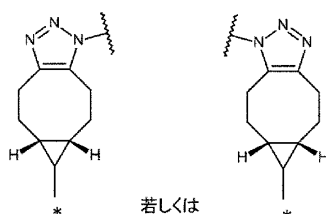
[請求項13] Lbが、次式：

[化10]



又は

[化11]

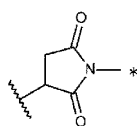


(上記で示されるLbの構造式において、アスタリスクはLaと結合

していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)のいずれかで示される、請求項8～12のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項14]

L bが、－(スクシンイミド－3－イル－N)－であり、
ここで、－(スクシンイミド－3－イル－N)－は、以下の構造式：
[化12]



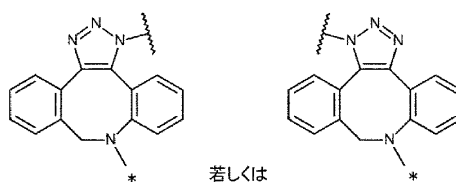
を示し、

ここで、アステリスクはL aと結合していることを示し、波線は抗体のシステイン残基の側鎖とチオエーテルを形成して結合していることを示す、請求項8～12のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項15]

リンカーLが、－L b－L a－L p－L c－*で示され、
式中、アステリスクは、薬物Dと結合していることを示し、
L pが、－GGFG－、又は－GGPI－であり、
L aが、－C(=O)－CH₂CH₂－C(=O)－を示し、
L bが、次式：

[化13]



(上記で示されるL bの構造式において、アステリスクはL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)を示し、

L cが、－NH－CH₂－を示す、請求項8～13のいずれか1項

に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項16] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から10の範囲である、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項17] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から5の範囲である、請求項16に記載の抗体薬物コンジュゲート。

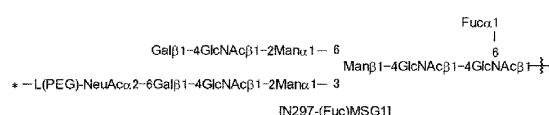
[請求項18] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から3、又は3から5の範囲である、請求項17に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項19] 抗体が、抗体のAsn297に結合する糖鎖(N297糖鎖)からLに結合している、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項20] N297糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、請求項19に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項21] N297糖鎖が、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGである、請求項19又は20に記載の抗体薬物コンジュゲート：

[化14]



式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

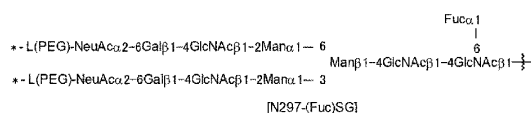
L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

及び

n^5 は 2 ～ 5 の整数である；

[化15]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$
H-を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -
M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシ
アル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

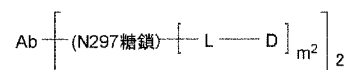
アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリ
アゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、
及び

n^5 は 2 ～ 5 の整数である。

[請求項22]

次式：

[化16]



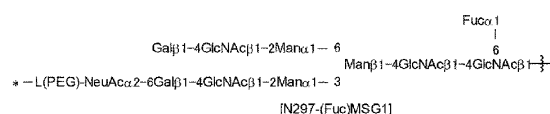
(式中、 m^2 は 1 又は 2 の整数を示し、

L は、N 2 9 7 糖鎖と D を連結するリンカーであって、前に定義し
たとおりであり、

A b は、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の
機能性断片の F c 領域の 2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び 2 6 5 番目（
すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l
a、及び G l y であり、ここで、抗体は、抗 E G F R 抗体又は抗 C D
H 6 抗体を示し、

N 2 9 7 糖鎖は、次式で示される構造を有する N 2 9 7 - (F u c)
M S G 1 又は N 2 9 7 - (F u c) S G であることを示し、

[化17]



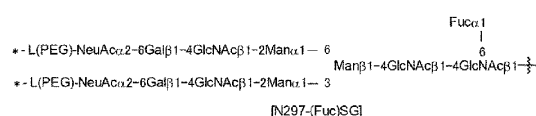
式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n は 2 ~ 5 の整数を示し；

[化18]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

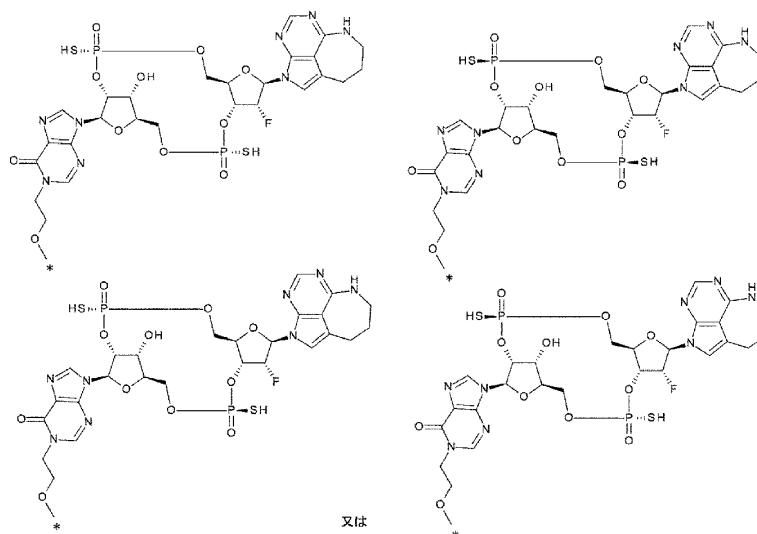
L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n は 2 ~ 5 の整数を示し、

D は、以下の 4 式のいずれかで示され、

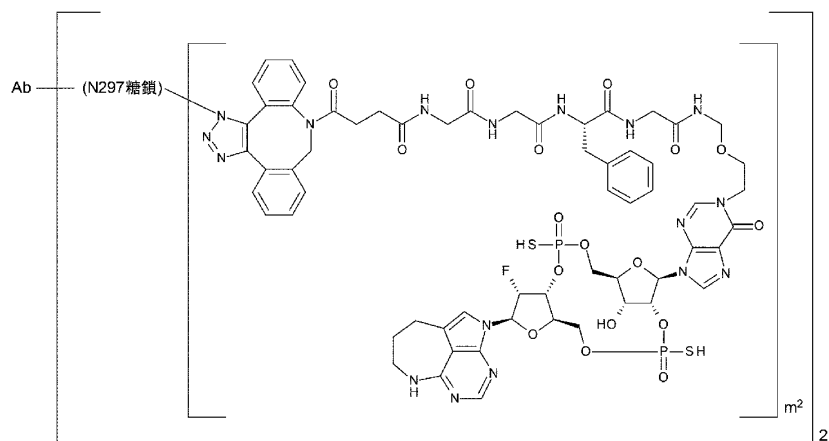
[化19]

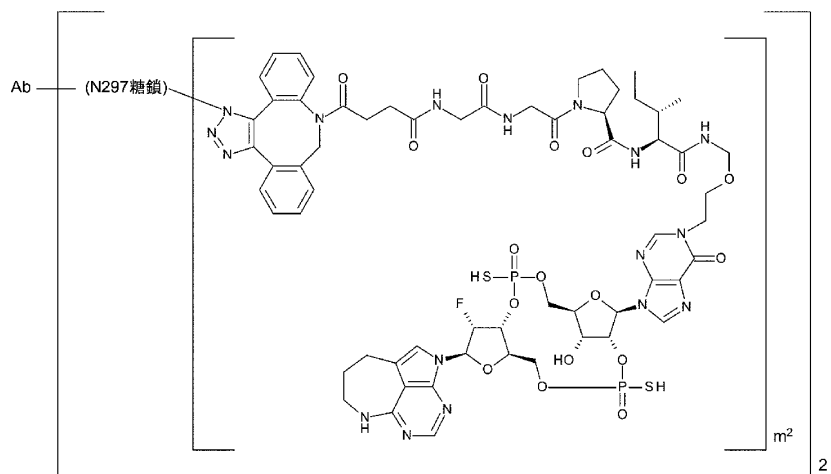
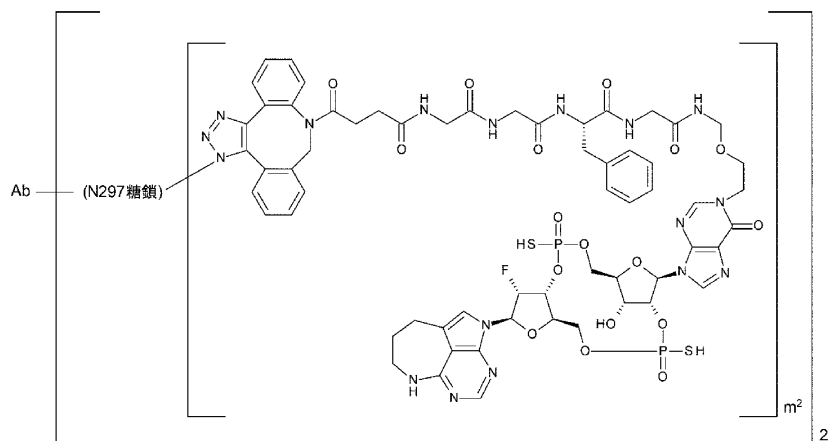


ここで、式中、アスタリスクはLと結合していることを示す)で示される、請求項19～21のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

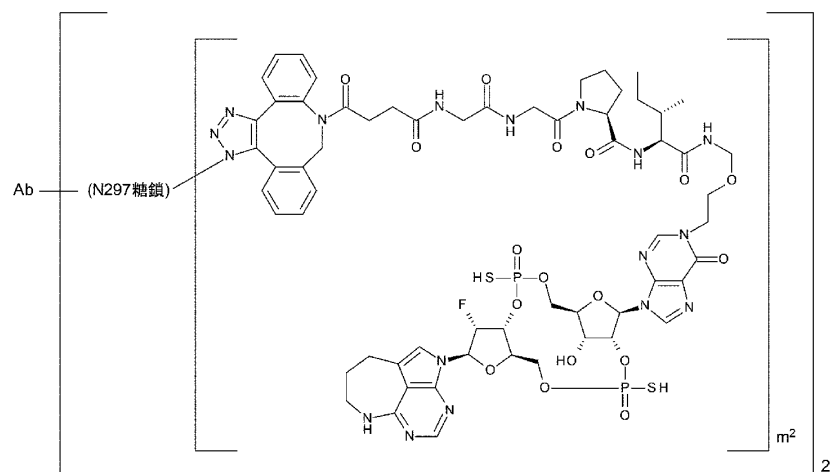
[請求項23] 次式：

[化20]





又は



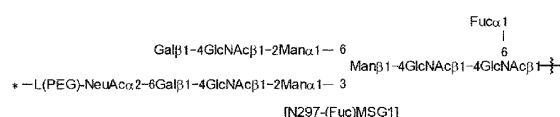
から選ばれ、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

A bは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片のF c領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yであり、ここで、抗体は、抗E G F R抗体又は抗C D H 6抗体を示し、

N 2 9 7糖鎖は、次式で示される構造を有するN 2 9 7 - (F u c) M S G 1又はN 2 9 7 - (F u c) S Gのいずれか一つであることを示し、

[化21]



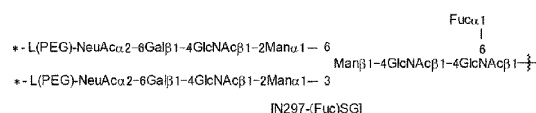
式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ H-を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7糖鎖の β -M a nの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示し；

[化22]



式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$

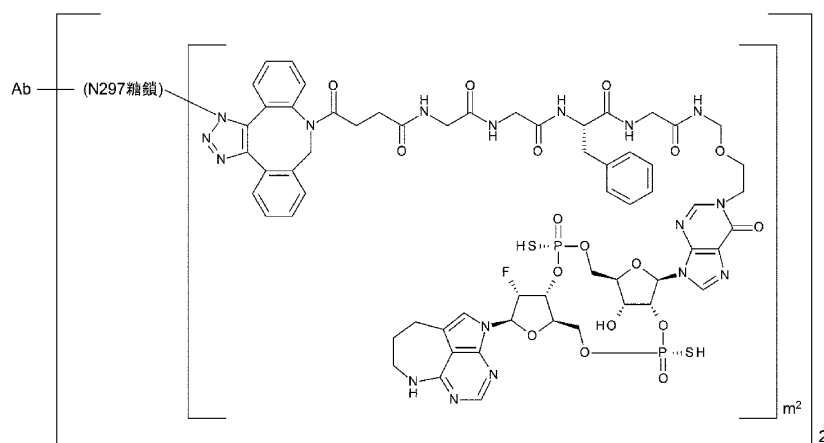
Hーを示し、該L（PEG）の右端のアミノ基がN297糖鎖のβ-Ma nの分岐鎖の1－3鎖側及び1－6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

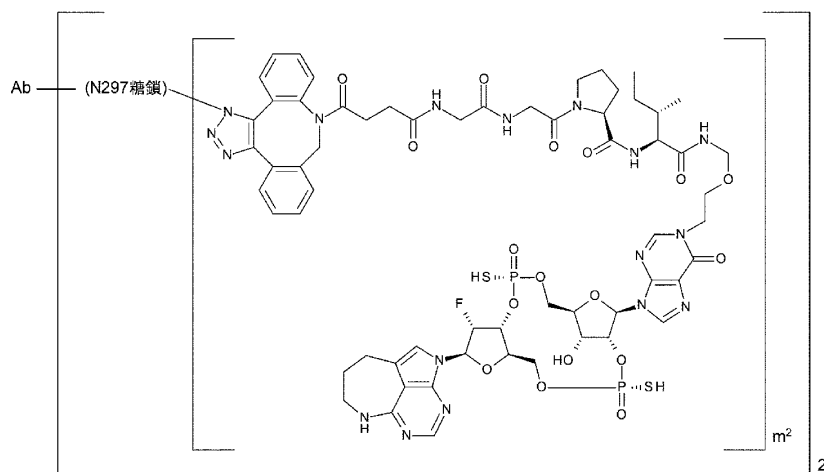
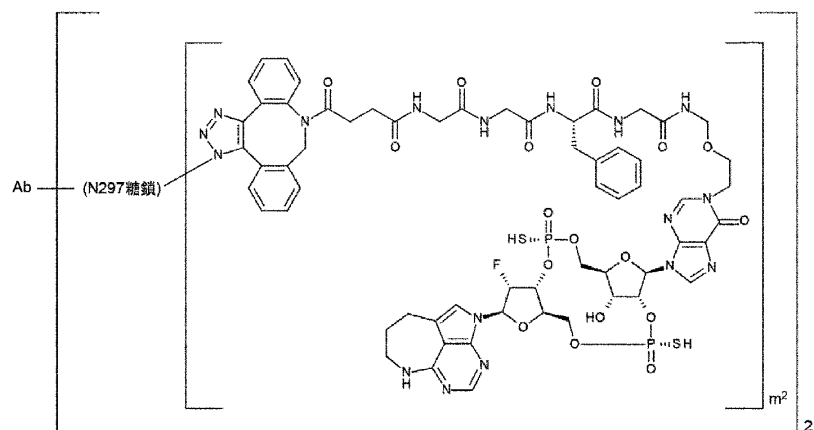
アステリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1，2，3－トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示す、請求項22に記載の抗体薬物コンジュゲート。

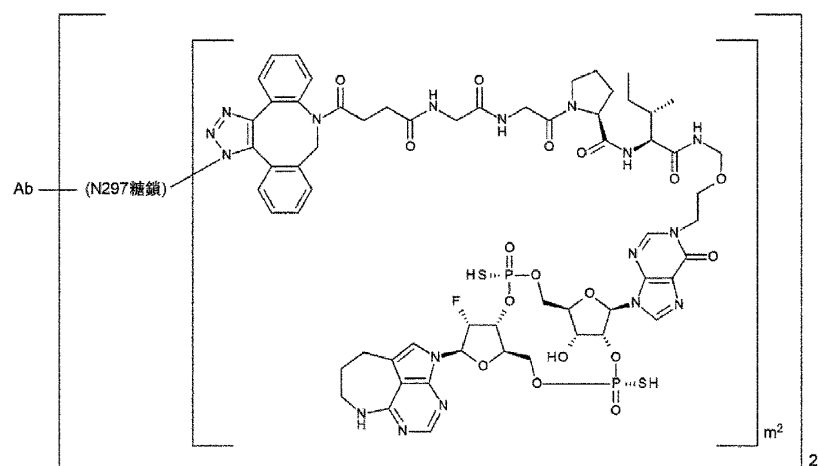
[請求項24] 次式：

[化23]





若しくは



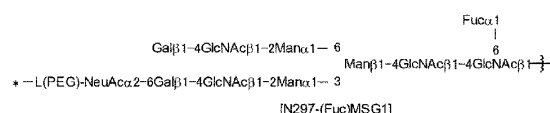
から選ばれ、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

A bは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体又は該抗体の機能性断片のF c領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yであり、ここで、抗体は、抗E G F R抗体又は抗C D H 6抗体を示し、

N 2 9 7糖鎖は、次式で示される構造を有するN 2 9 7 - (F u c) M S G 1又はN 2 9 7 - (F u c) S Gのいずれか一つであることを示し、

[化24]



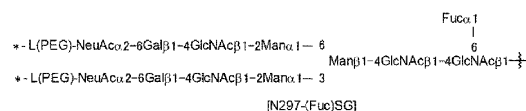
式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7糖鎖の β -M a nの分岐鎖の1-3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカーLにおけるL bの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n^5 は2～5の整数を示し；

[化25]



式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$

Hーを示し、該L（PEG）の右端のアミノ基がN297糖鎖のβ-Mannの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、及び

n⁵は2～5の整数を示す、請求項23に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項25] 抗体が、抗EGFR抗体である、請求項1～24のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項26] 抗体が、抗CDH6抗体である、請求項1～24のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項27] 抗体が、配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、或いは、前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体である、請求項25に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項28] 抗体が、配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は、前記抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体である、請求項26に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項29] 抗体が、配列番号29に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号31に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）の

アミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yである、請求項 2 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

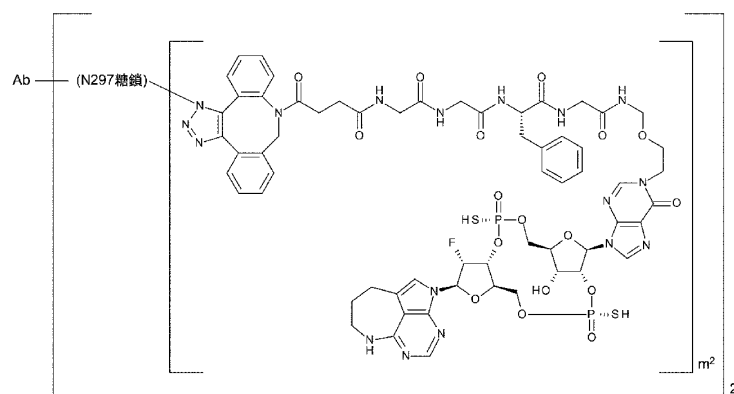
[請求項30] 抗体が、配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のF c領域の2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び2 6 5 番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yである、請求項 2 6 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項31] 抗体が、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 1、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 2、及び配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 3を含む軽鎖、並びに、配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 1、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 2、及び配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のF c領域の2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び2 6 5 番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yである、請求項 2 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

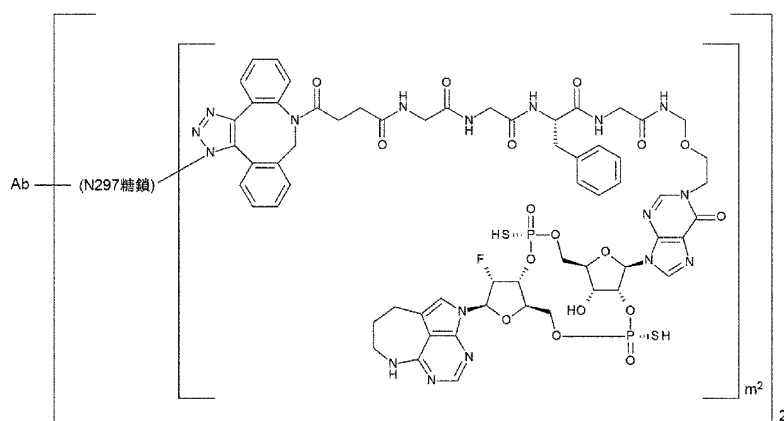
[請求項32] 抗体が、配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 1、配列番号 3 8 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 2、及び配列番号 3 9 に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 3を含む軽鎖、並びに、配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 1、配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 2、及び配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列からなるC D R H 3を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体のF c領域の2 3 4 番目、2 3 5 番目、及び2 6 5 番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yである、請求項 2 6 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[請求項33] 次式：

[化26]



又は



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し

、
配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

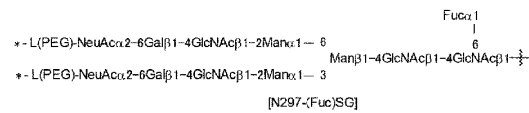
配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；及び

前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個

のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体；

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化27]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

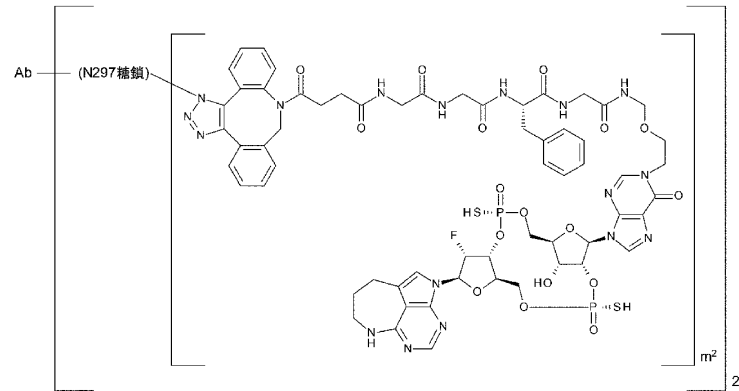
アスタリスクは、前記リンカーLにおけるL b の1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、
 n^5 は3であり、及び

m^2 が2である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

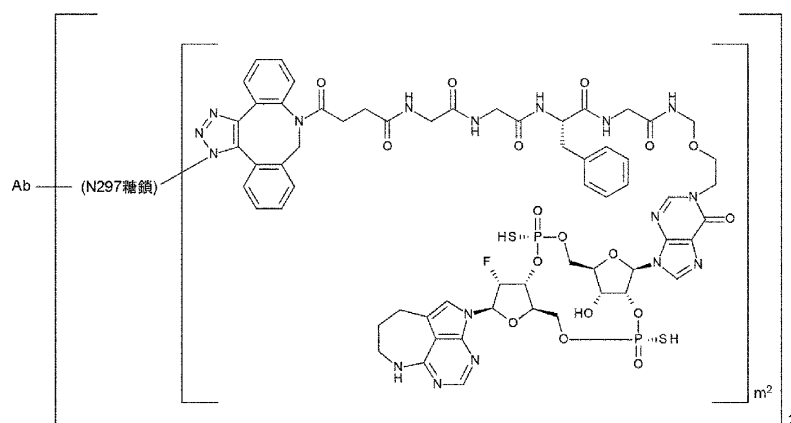
[請求項34]

次式：

[化28]



又は



で表され、式中、 A_b は以下の群から選択されるいずれか一つを示し

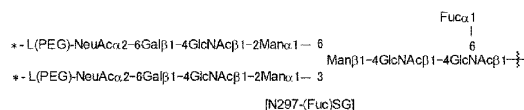
配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；及び

配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 45 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化29]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

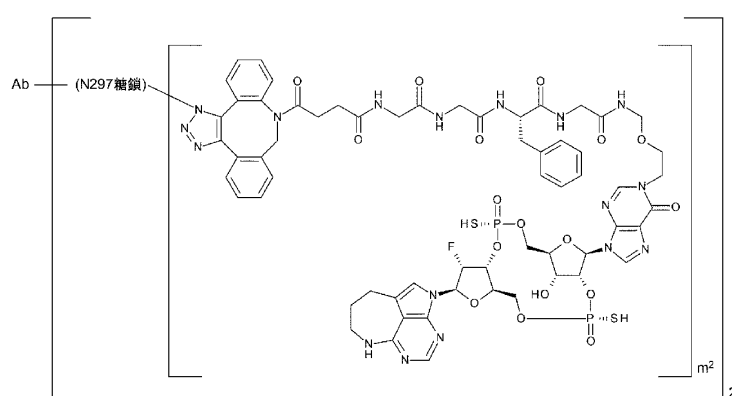
L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシ

アル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、
 アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリ
 アゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、
 n^5 は 3 であり、及び
 m^2 が 2 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

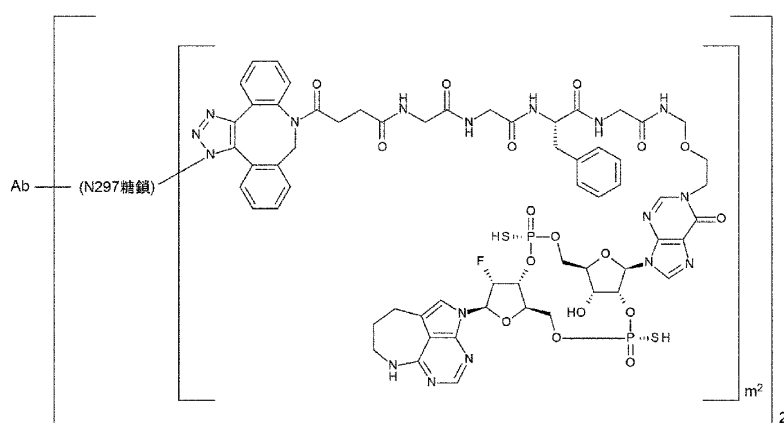
[請求項35]

次式：

[化30]



又は



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し

、

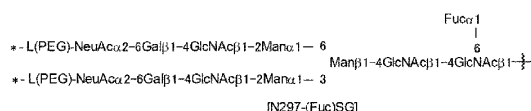
配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 2
 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 2 5 に記

載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；及び配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化31]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

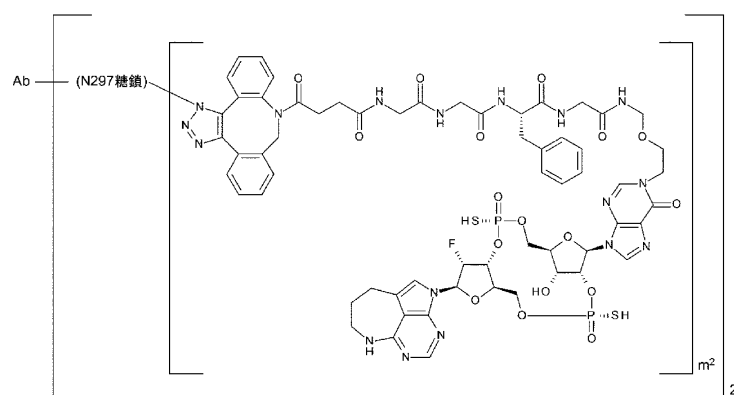
アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリ
アゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、
n⁵は3であり、及び

m^2 が2である)で表される、抗体薬物コンジュゲート。

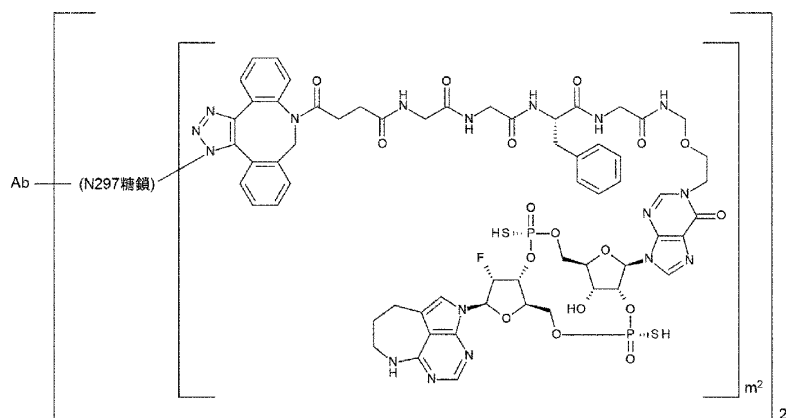
[請求項36]

次式：

[化32]



又は



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し

、

配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

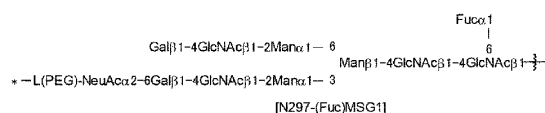
配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；及び

前記いずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体；

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化33]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

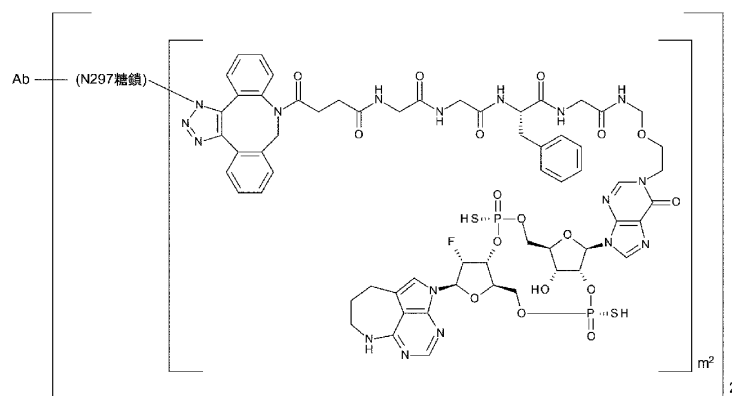
アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリ
アゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、
n⁵は3であり、及び

m^2 が1である)で表される、抗体薬物コンジュゲート。

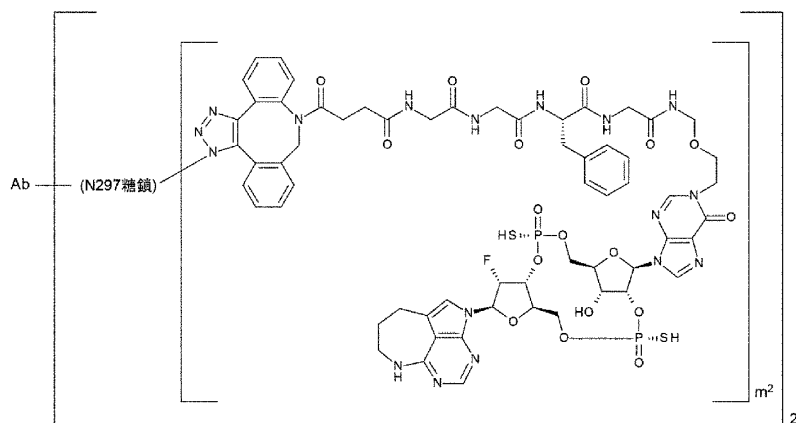
[請求項37]

次式：

[化34]



又は



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し

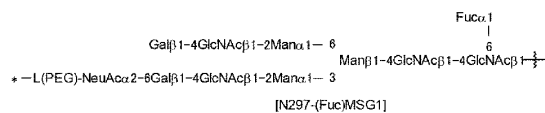
、
配列番号29に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号31に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；及び

配列番号43に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のF c領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及びG l yであり、

N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化35]



（式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシ

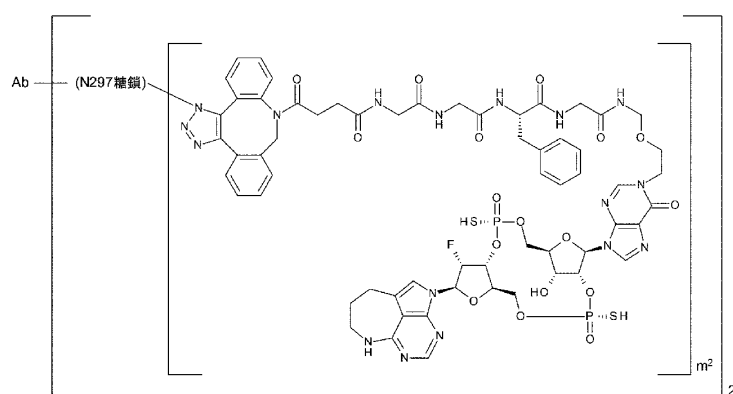
アル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリ
アゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、
 n^5 は 3 であり、及び

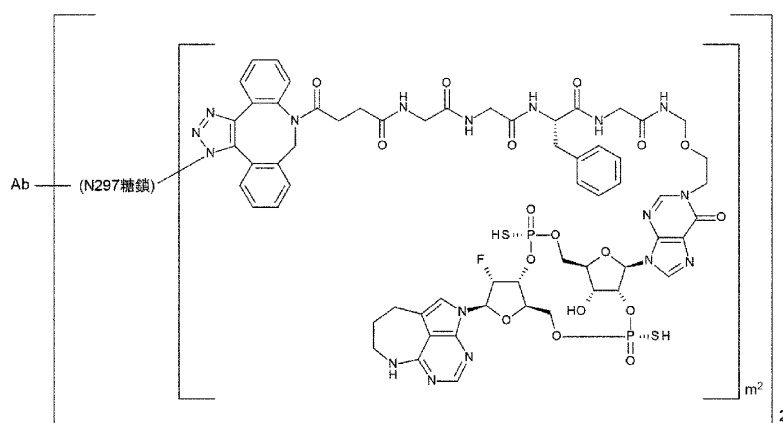
m^2 が 1 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート。

[請求項 38] 次式：

[化 36]



又は



で表され、式中、A b は以下の群から選択されるいずれか一つを示し

、

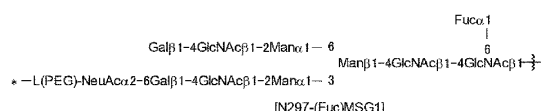
配列番号 23 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 2
4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 25 に記

載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；及び配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

該抗体のFc領域の234番目、235番目、及び265番目（すべてEUナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、Ala、Ala、及びGlyであり、

N297糖鎖は、次式：

[化37]



（式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L(PEG)の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLにおけるLbの1, 2, 3-トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、 n^5 は3であり、及び

m^2 が1である）で表される、抗体薬物コンジュゲート。

[請求項39]

請求項1～38のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲートを

含有する、S T I N G アゴニスト。

- [請求項40] 請求項1～38のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、医薬組成物。
- [請求項41] 請求項1～38のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、抗腫瘍剤。
- [請求項42] 腫瘍が、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（G I S T）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、肉腫、E G F R 変異陽性がん又はE G F R 下流シグナルに変異を有するがんである、請求項41に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項43] 請求項1～38のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート、請求項39に記載のS T I N G アゴニスト、請求項40に記載の医薬組成物及び請求項41又は42に記載の抗腫瘍剤からなる群から選択されるいずれかを投与することを含む、がんの治療方法。
- [請求項44] がんが、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、肝細胞がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（G I S T）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、肉腫、E G F R 変異陽性がん又はE G F R 下流シグナルに変異を有するがんである、請求項43に記載の方法。
- [請求項45] (A) 配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるC D R L 1、配列

番号 24 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 25 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 26 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 27 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 28 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である抗体；又は

（B）配列番号 37 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 38 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 39 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 40 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 41 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 42 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である抗体。

[請求項 46]

（A）配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である抗体；又は

（B）配列番号 43 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 45 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体であって、該抗体の F c 領域の 234 番目、235 番目、及び 265 番目（すべて EU ナンバリング）のアミノ酸残基が、それぞれ、A l a、A l a、及び G l y である抗体。

- [請求項47] (A) 配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号32に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は配列番号30に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、；
- (B) 配列番号44に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は
- (C) (A)～(B)のいずれか一つの抗体において、カルボキシル末端の1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失した重鎖を含む抗体。
- [請求項48] 他の医薬と組み合わせて投与される、請求項40に記載の医薬組成物、又は請求項41もしくは42に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項49] 他の医薬を含む、請求項40に記載の医薬組成物、又は請求項41もしくは42に記載の抗腫瘍剤。
- [請求項50] 請求項1～38のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート、請求項39に記載のSTINGアゴニスト、請求項40に記載の医薬組成物及び請求項41又は42に記載の抗腫瘍剤からなる群から選択されるいずれかが、他の医薬と組み合わせて投与される、請求項43又は44に記載の方法。