

明 細 書

発明の名称： F c 含有分子の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、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、当該製造方法において好適に使用される新規糖鎖ドナー分子、及び N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子の単離方法等に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、重鎖分子中の F c 領域に位置する 2 9 7 番目の A s n 側鎖に結合した N 結合型糖鎖（N 2 9 7 結合糖鎖）を有する糖タンパク分子である。抗体は、基礎研究や医療分野において重要な分子であり、特に抗体医薬としての研究開発が盛んに進められており、糖鎖の様々な影響が明らかにされつつある（非特許文献 1）。現在、主に使われている医療用抗体は、I g G クラスの分子であり、このような抗体は、一般的に C H O 細胞や N S O 細胞に代表される培養動物細胞を用いて産生される。これら動物細胞で産生される抗体の N 2 9 7 結合糖鎖は b i a n t e n n a r y 複合型糖鎖であるが、コアフコースや末端のシアル基やガラクトシル基、そして b i s e c t i n g G l c N A c において不均一である（非特許文献 2）。抗体の N 2 9 7 結合糖鎖が、A D C C 活性（A n t i b o d y - D e p e n d e n t C e l l - M e d i a t e d C y t o t o x i c i t y）や C D C 活性（C o m p l e m e n t - D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y）を含むエフェクター活性に大きく影響することが明らかになっており（非特許文献 3、非特許文献 4）、血中半減期にも影響を及ぼす可能性が指摘されている（非特許文献 5）。また、N 2 9 7 結合糖鎖の非還元末端が 2, 6 - s i a l y l 化された抗体が I V I G（i n t r a v e n o u s i m m u n o g l o b u l i n）における主要薬効成分であることが明らかになっている（非特許文献 6）。更に、近年、化学修飾した糖鎖をリンカーとした抗体薬物複

合体やペプチドーFc複合体が開発されている（特許文献1～4、非特許文献7～9）。

[0003] 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いる（非特許文献10～12）。糖鎖転移反応には、単独のENGaseを用いて還元末端をオキサゾリン化した糖鎖をGlcNAc（N-アセチルグルコサミン）アクセプターに転移する方法（特許文献5～6、非特許文献10～11）と、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（非特許文献12、特許文献1）。

[0004] これまで、前者のオキサゾリン体（還元末端が活性化されている糖鎖ドナー分子）を利用する糖鎖転移反応が広く用いられてきた。しかしながら、水溶液中で不安定なオキサゾリン体を糖鎖ドナー分子に使用する場合、その不安定性から酵素非介在型の化学反応である抗体Lysへの糖化反応（Glycation）が進行することが知られている（非特許文献7、9）。これを解決する一つの方法として、還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子を利用する方法であるワンポット法が提案された。しかしながら、高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を取得するためには、大量の糖鎖ドナー分子使用量、100当量から300当量が必要とされた（特許文献1、非特許文献12）。また、このワンポット法で使用されるENGaseとしては、Endo-S変異酵素と、Endo-M変異酵素若しくはEndo-CC変異株の2種類の酵素の組合せが知られているが、糖鎖ドナー分子使用量を削減すると、糖鎖転移率が低くなることも確認されている。

[0005] 均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を医療用途にて用いる場合は、その製造コストを抑えるために高額な原料である糖鎖ドナー分子の使用量が低減されていることが望ましい。エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いてFc含有分子の糖鎖を均一にする方法において、糖鎖転移反応の効率を改善し、より少ない糖鎖ドナー分子使用量で高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を得るには、加水分解活性の抑えられた糖鎖転移酵素を

探索するアプローチが考えられる。一方で、ワンポット法において、既に加水分解活性が抑制された変異酵素が選択されていた場合、同様のアプローチにて糖鎖ドナー分子の使用量を低減することは非常にハードルが高い。また、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、由来となった生物種ごとに異なる基質特異性を有しており、目的に応じて使い分ける必要があるため、同アプローチの場合、加水分解活性の抑制具合に応じて使用できる酵素の組み合わせが限定されてしまう。このため、残存加水分解活性や酵素種に関わらず、幅広い選択肢からエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼを自由を選択しつつ、より少ない糖鎖ドナー分子使用量で高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を得る方法が望まれていた。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開2018/003983号
特許文献2：国際公開2018/090045号
特許文献3：国際公開2019/065964号
特許文献4：国際公開2020/050406号
特許文献5：国際公開2017/124084号
特許文献6：国際公開2018/039373号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Arnold JN, et al., Annu Rev Immunol. 2007, 25, 21-50
非特許文献2：Jefferis R, Biotechnol Prog. 2005, 21, 11-16
非特許文献3：Nimmerjahn F, et al., Nat Rev Immunol. 2008, 8, 34-47
非特許文献4：Jefferis R, Nat Rev Drug Discov. 2009, 8, 226-234
非特許文献5：Bumbaca D, et al., AAPS J. 2

012, 14, 554-558

非特許文献6: Anthony RM, et al., Science. 2008, 320, 373-376

非特許文献7: Parsons TB, , et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2016, 55, 2361-2367

非特許文献8: Iwamoto M, et al., Bioconjugate Chem. 2018, 29, 2829-2837

非特許文献9: Manabe S, et al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 1343-1355

非特許文献10: Wang LX, Trends Glycosci Glycotechnol. 2011, 23, 33-52

非特許文献11: Huang W, et al., J Am Chem Soc. 2012, 134, 12308-12318

非特許文献12: Iwamoto M, et al., PLoS ONE 2018, 13, e0193534

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、可能な限り少ない糖鎖ドナー分子使用量で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方法であって、残存加水分解活性や酵素種に関わらず幅広い選択肢から使用する酵素を自由に選択できる方法確立することや、当該方法において好適に使用できる新規糖鎖ドナー分子を提供すること、及びこのようなFc含有分子を選択的に単離する方法確立すること等を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、糖鎖転移反応で使用するエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ（ワンポット法においては、2つ以上のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの組

み合わせ)に関わらず、少ない糖鎖ドナー分子使用量であっても中程度以上の糖鎖転移率を有するFc含有分子が得られる反応条件を設定できること、及び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糖鎖転移反応混合液を接触させることで、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)を単離でき、結果的に、高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を収率よく回収できることを見出した。この知見を活かして、可能な限り少ない糖鎖ドナー分子使用量で、高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を取得する製造法を見出し、また、この製造法であれば、ワンポット法において、幅広い選択肢からエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの組み合わせを選択できること、また、それらのうちの特定の組み合わせの酵素を用いた糖鎖転移反応に適した新規な糖鎖ドナー分子を見出し、さらに、上述の酸性条件下での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用いた単離工程が、Fc含有分子の製造法のみならず、単に、所期のFc含有分子の単離にも適用できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] 本発明は、以下の発明を提供する。

[1]

以下の工程1及び2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：

[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GlcNAcを有するFc含有分子であるアクセプター分子と、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-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(酵素-A)の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、

[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N297結合糖鎖を有するFc含有分子を回収

する工程。

[2]

糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む、
[1]に記載の方法。

[3]

工程1が、アクセプター分子と糖鎖ドナー分子とを、酵素-A及び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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程である、[2]に記載の方法。

[4]

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）が、酵素-Aの存在下、糖鎖ドナー分子に作用することで、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、[3]に記載の方法。

[5]

酵素-Bが、SGPからGlcNAc誘導体への糖鎖転移活性を有する酵素である、[3]又は[4]に記載の方法。

[6]

酵素-Bが、Endo-M、Endo-om、Endo-CC、又はEndo-Rpの変異酵素であり、当該変異酵素は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、[3]～[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7]

酵素-Bが、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、E

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、[3]～[6]のいずれか一項に記載の方法。

[8]

酵素-Aと酵素-Bとが、融合されている、[3]～[7]のいずれか一項に記載の方法。

[9]

工程1において、アクセプター分子1当量に対して2当量から40当量の糖鎖ドナー分子が使用される、[1]～[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10]

工程1において、糖鎖転移率が80%を超える、[1]～[9]のいずれか一項に記載の方法。

[11]

糖鎖ドナー分子が有する糖鎖が、非還元末端が化学修飾されていても良いN-結合型糖鎖又はO-結合型糖鎖である、[1]～[10]のいずれか一項に記載の方法。

[12]

糖鎖ドナー分子が、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)-

A s n の混合物、MSG 1-OR、MSG 2-OR、又はMSG 1-ORとMSG 2-ORの混合物であり、式中、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である、[11]に記載の方法。

[13]

Rが、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、[12]に記載の方法。

[14]

Rが、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、及びn-ヘキシル基からなる群より選択されるか、又は、C1～C6アルコキシ基、C1～C6アルキル基、又はハロゲン基で置換されていてもよいフェニル基、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、及びフェナンスレニル基からなる群より選択される、[13]に記載の方法。

[15]

Rが、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、[12]～[14]のいずれか一項に記載の方法。

[16]

糖鎖ドナー分子が、（[N₃-PEG（3）]₂-SG）-P-PEG（3）-N₃、（[N₃-PEG（3）]₂-SG）-A s n-PEG（3）-N₃、（[N₃-PEG（3）]-MSG1）-A s n-PEG（3）-N₃、（[N₃-PEG（3）]-MSG2）-A s n-PEG（3）-N₃、又は（[N₃-PEG（3）]-MSG1）-A s n-PEG（3）-N₃と（[N₃-PEG（3）]-MSG2）-A s n-PEG（3）-N₃の混合物である[11]又は[12]に記載の方法。

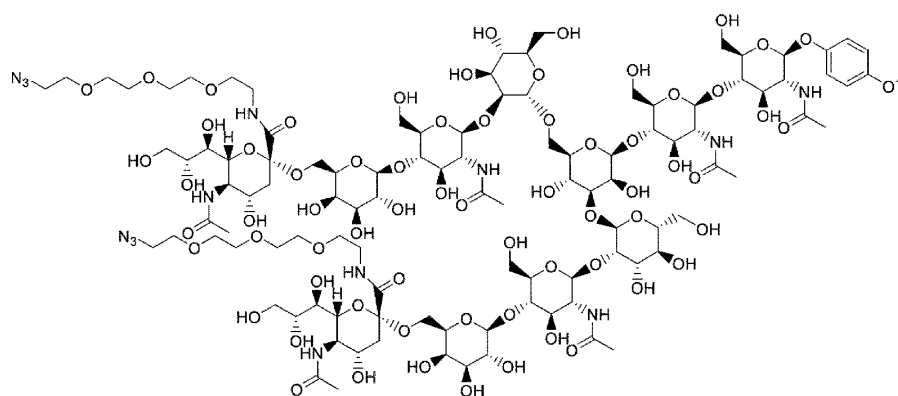
[17]

糖鎖ドナー分子が、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ 、又は $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ と $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ の混合物である、[12]～[15]のいずれか一項に記載の方法。

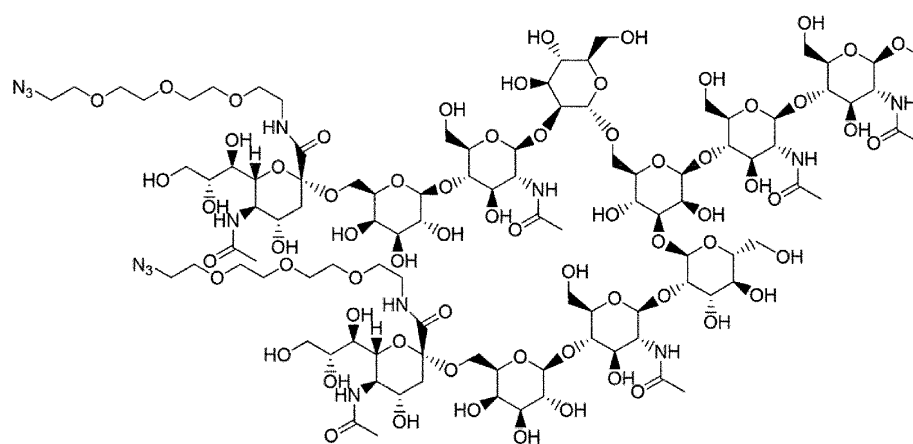
[18]

糖鎖ドナー分子が、以下の式：

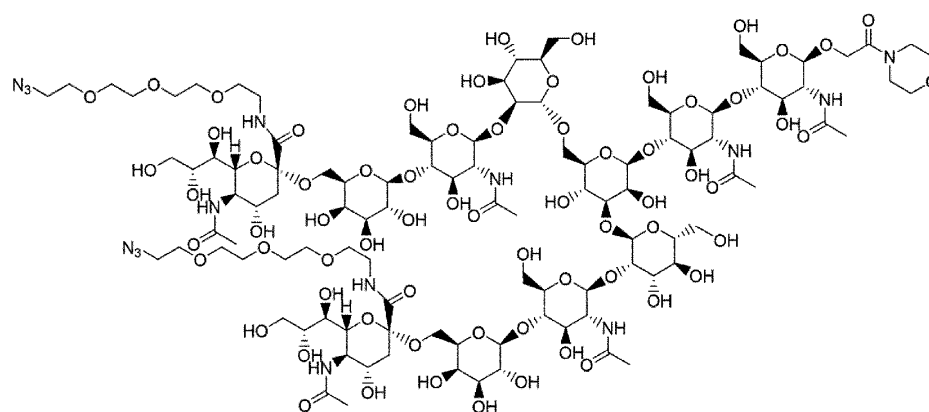
[0011] [化1]



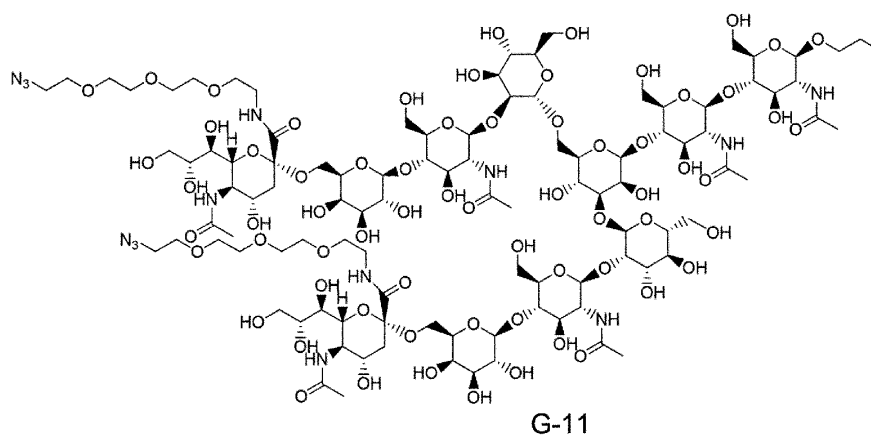
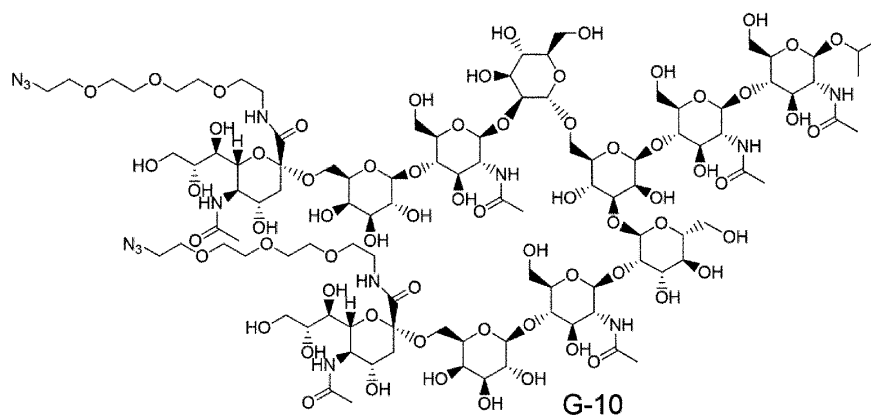
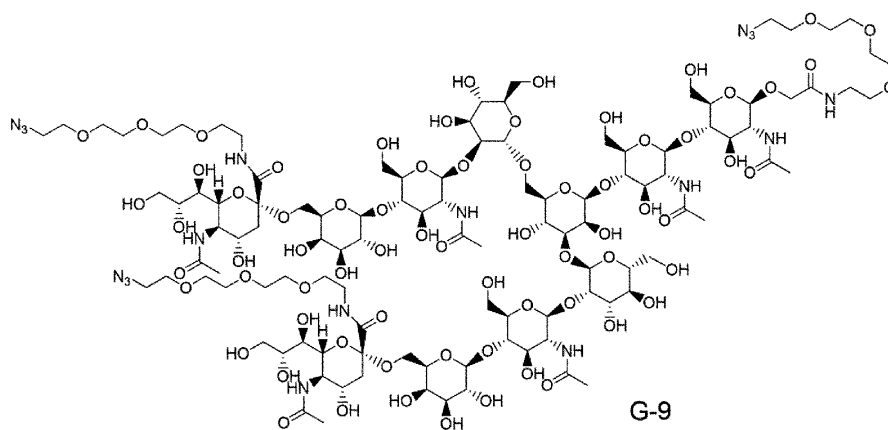
G-6

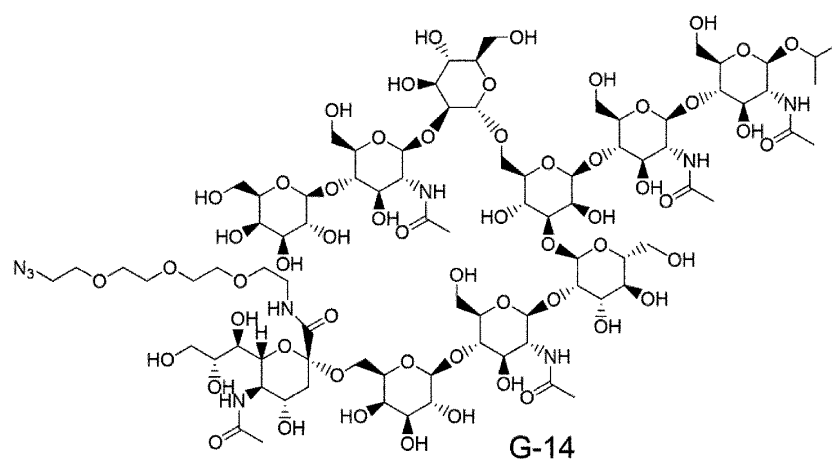
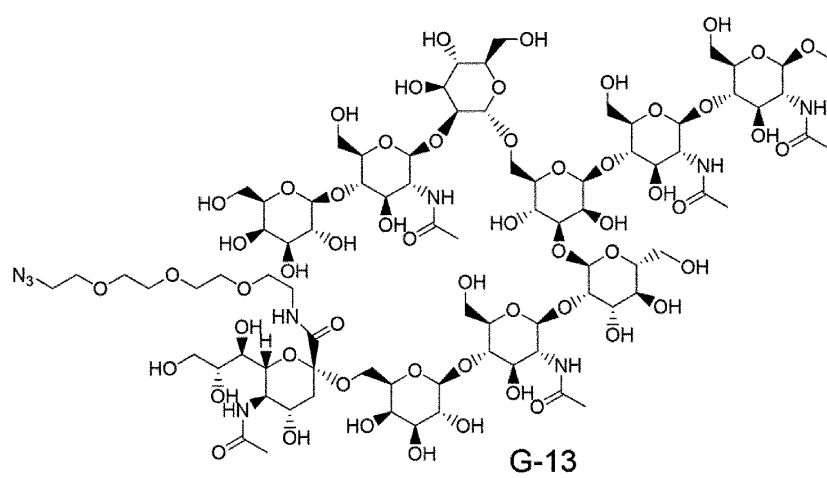
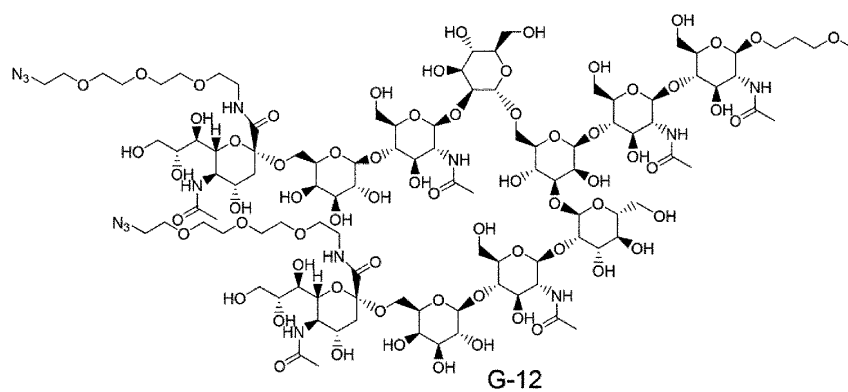


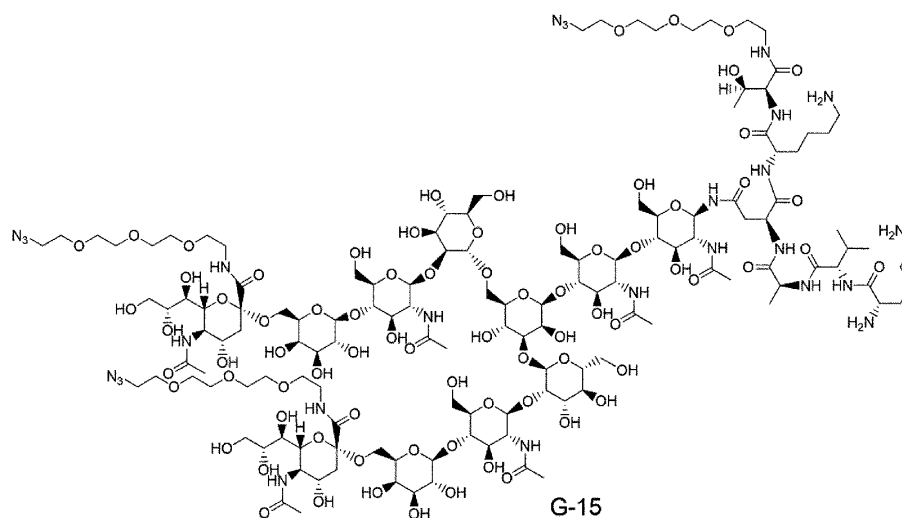
G-7



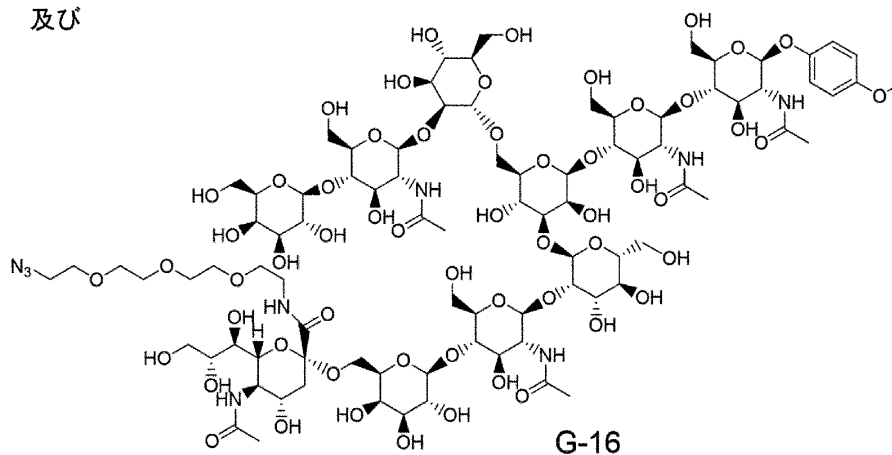
G-8







及び



からなる群より選択される式によって表される化合物である、[11]～[17]のいずれか一項に記載の方法。

[19]

Fc含有分子が、免疫グロブリン、CLCH又はFc含有断片である、[1]～[18]のいずれか一項に記載の方法。

[20]

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）が、Fc含有分子の糖鎖に作用できる、加水分解活性が残留していてもよい酵素である、[1]～[19]のいずれか一項に記載の方法

。

[21]

酵素-Aが、Endo-S、Endo-S2、Endo-Si、Endo-Se、Endo-Sd、又はEndo-Szの変異酵素であり、当該変異酵素は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、[1]～[20]のいずれか一項に記載の方法。

[22]

酵素-Aが、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-S2 D184M、Endo-S2 T138Q、Endo-S2 D184Q/Q250L、Endo-S2 D184M/Q250L、Endo-Se D233M、Endo-Sz D234M、Endo-Sz D234M/Q304L、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)、又はEndo-Si E360Kである、[21]に記載の方法。

[23]

工程1の反応系内pHが、6.5から8.0の範囲である、[1]～[22]のいずれか一項に記載の方法。

[24]

工程 1 の反応系内最終アクセプター分子濃度が、 20 mg/mL 以上 100 mg/mL 以下である、[1] ～ [23] のいずれか一項に記載の方法。

[25]

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素通り画分に、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、[1] ～ [24] のいずれか一項に記載の方法。

[26]

工程 2 における酸性条件が $pH\ 3.5$ から 4.5 の範囲を意味する、[1] ～ [25] のいずれか一項に記載の方法。

[27]

クロマトグラフィー媒体が粒子状、メンブレン状、又はモノリス状である、[1] ～ [26] のいずれか一項に記載の方法。

[28]

クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、[1] ～ [27] のいずれか一項に記載の方法。

[29]

糖鎖が、アジド基 (N_3-) を有する置換基で化学修飾されている非還元末端を有し、当該方法が、更に、当該糖鎖のアジド基 (N_3-) に、アルキン構造を有する分子を反応させる工程を含む、[1] ～ [28] のいずれか一項に記載の方法。

[30]

アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫賦活化剤、毒素、光感受性物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸分子、核酸、抗原、ビタミン、及びホルモンから選択される、[29] に記載の方法。

[31]

化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシ

ン、オーリスタチン、タキサン及びこれらの誘導体から選択される、[30]に記載の方法。

[32]

免疫賦活化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、及びA2ARアンタゴニストから選択される、[30]に記載の方法。

[33]

アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、[29]～[32]のいずれか一項に記載の方法；

(A) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[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-バリル-N-[4-({[(11' S, 11a' S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{ [(11a S)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル]-L-アラニンアミド、

(B) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[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-バリル-N-[4-({[(11' S, 11' a S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(3-{ [(11a S)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロポキシ)-5'-オキソ-11', 11' a'-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-カルボニル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド、

(C) N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6 H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N- {4- [({ [(1 1' S, 1 1 a' S) -1 1' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(1 1 a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 1 1 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ) ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1 1' , 1 1 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -1 0' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、

(D) N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6 H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N- {4- [({ [(1 1' S, 1 1 a' S) -1 1' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(1 1 a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 1 0' , 1 1' , 1 1 a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ) ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1 1' , 1 1 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -1 0' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、
並びに、

(E) (ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6 H) -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- [(5 R, 7 R, 8 R, 1 2 a R, 1 4 R, 1 5 R, 1 5 a R, 1 6 R) -1 5-フルオロ-1 6-ヒドロキシ-2, 1 0-ジオキソ-2, 1 0-ジスルフィド-1 4- (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2 H-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-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] グリシンアミド。

[34]

[1] ~ [33] のいずれか一項に記載の方法によって製造された、Fc含有分子。

[35]

N297結合糖鎖を有するFc含有分子の単離方法であって、前記Fc含有分子と1つ以上の不純物を含む溶液を、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、不純物を選択的に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トラップさせる工程、又は前記Fc含有分子を選択的に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トラップさせる工程を含む、前記方法。

[36]

N297結合糖鎖が、複合型糖鎖を含む、[35]に記載の方法。

[37]

N297結合糖鎖が、フコースが付加していてもよいコアGlcNAcではなく、及び、前記1つ以上の不純物が、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を有する以外は前記Fc含有分子と同一である分子を含む、[35]又は[36]に記載の方法。

[38]

クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、[35] ~ [37] のいずれか一項に記載の方法。

[39]

以下の工程1及び2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含有分子の単離方法：

[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 l 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、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-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（酵素-A）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、

[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 含有分子を単離する工程。

[40]

クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、[39]に記載の方法。

[41]

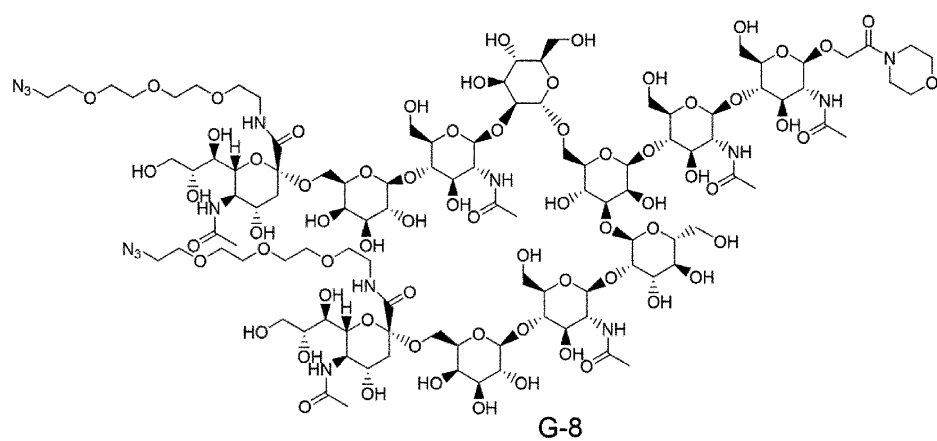
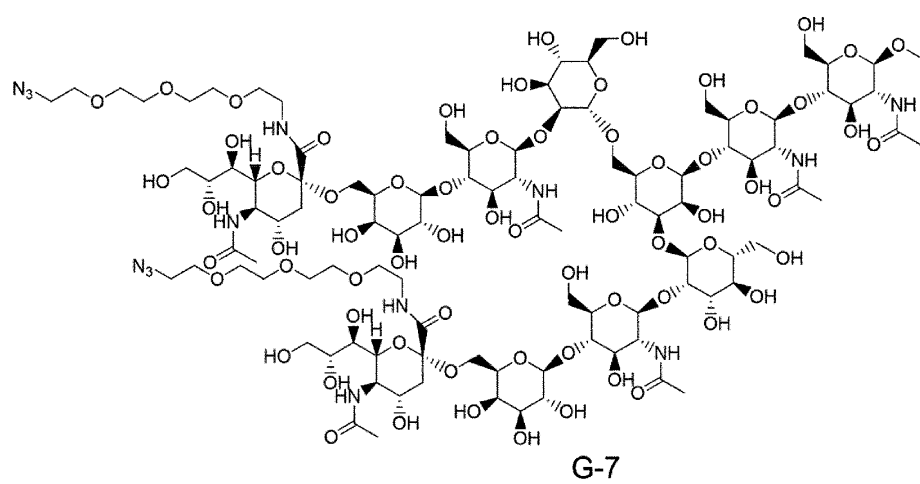
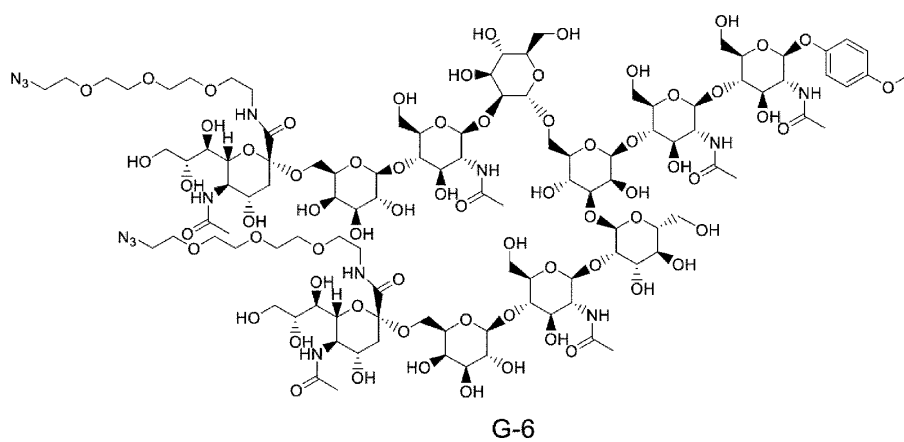
N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子が、抗 H E R 2 抗体、抗 H E R 3 抗体、抗 D L L 3 抗体、抗 F A P 抗体、抗 C D H 1 1 抗体、抗 C D H 6 抗体、抗 A 3 3 抗体、抗 C a n A g 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 3 0 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C D 5 6 抗体、抗 C D 7 0 抗体、抗 C D 9 8 抗体、抗 T R O P 2 抗体、抗 C E A 抗体、抗 C r i p t o 抗体、抗 E p h A 2 抗体、抗 G 2 5 0 抗体、抗 M U C 1 抗体、抗 G P N M B 抗体、抗 I n t e g r i n 抗体、抗 P S M A 抗体、抗 T e n a s c i n - C 抗体、抗 S L C 4 4 A 4 抗体、抗 M e s o t h e l i n 抗体、抗 E N P P 3 抗体、抗 C D 4 7 抗体、抗 E G F R 抗体、抗 G P R 2 0 抗体、及び抗 D R 5 抗体からなる群から選択される抗体に由来する、[1]～[40]のいずれか一項に記載の方法または F c 含有分子。

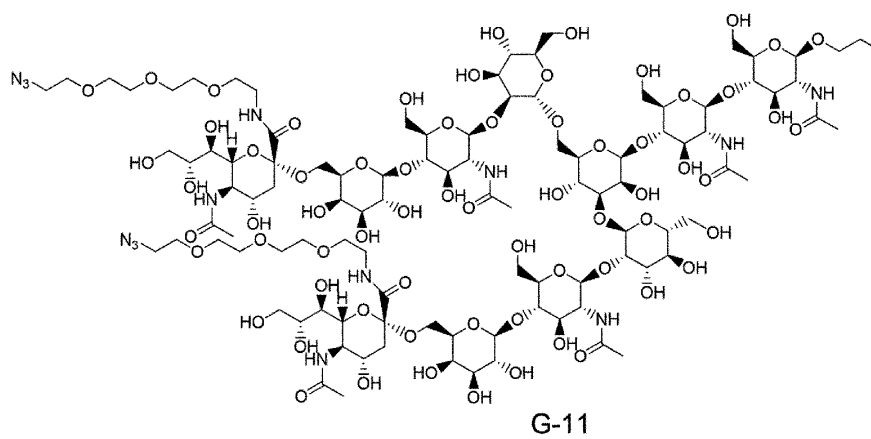
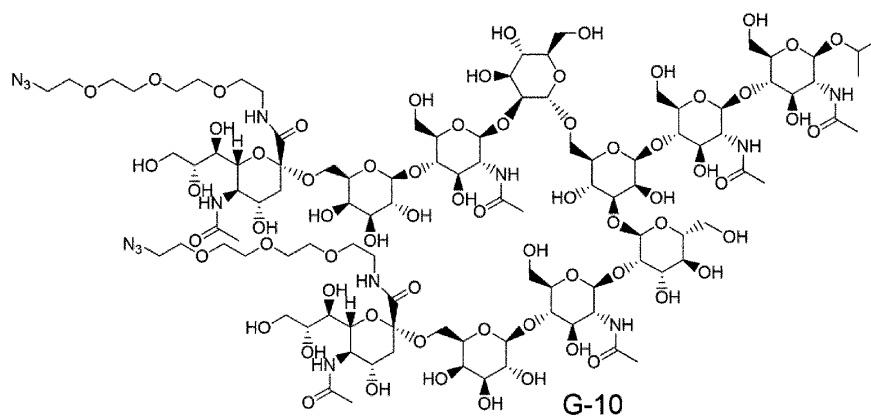
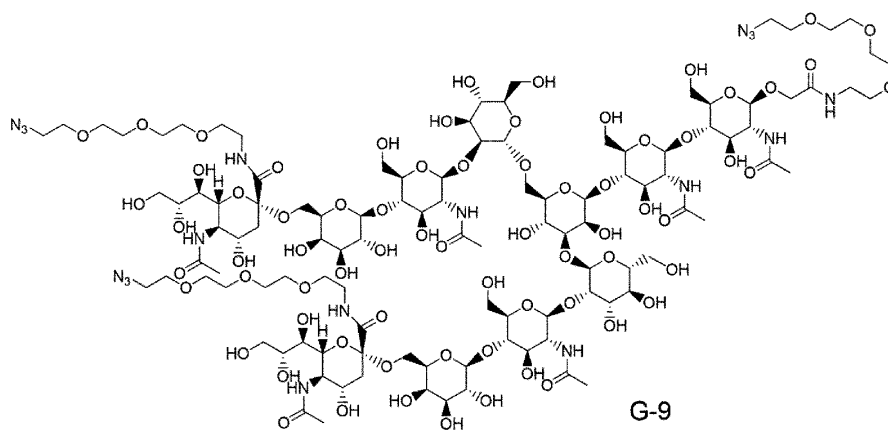
[42]

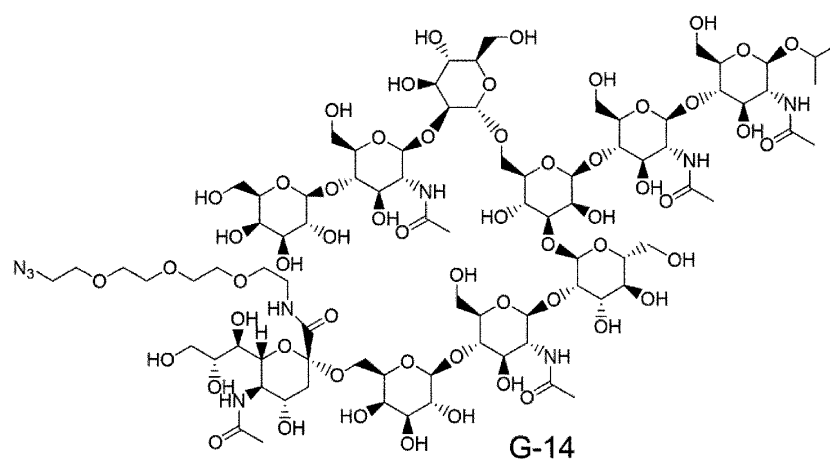
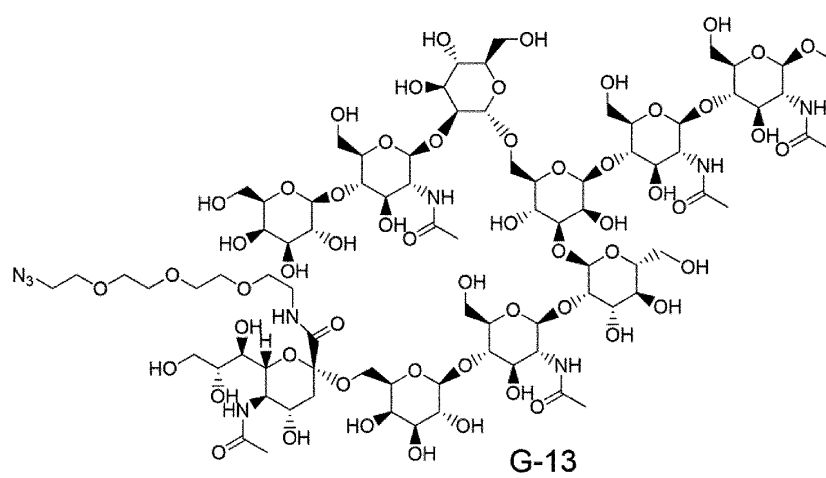
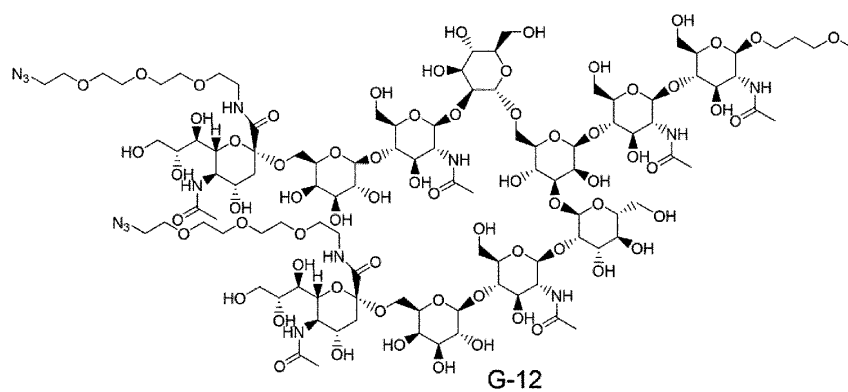
以下の式：

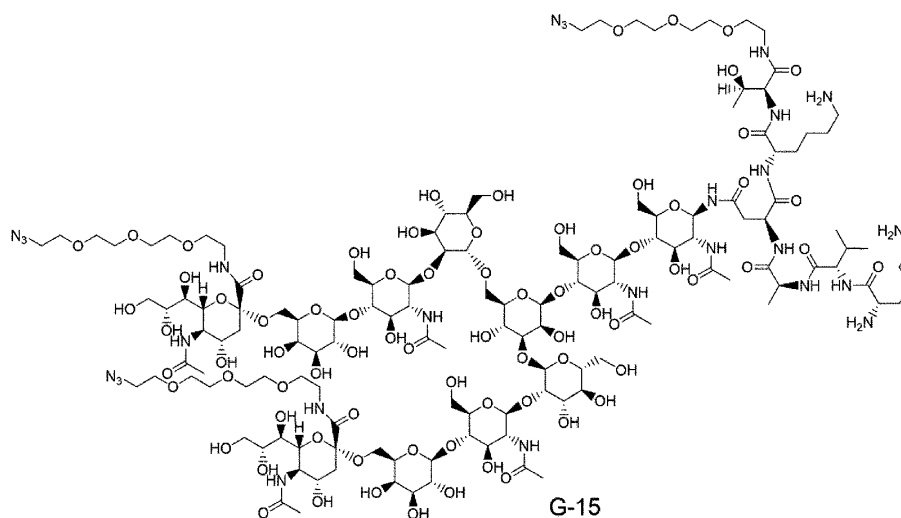
[0012]

[化2]

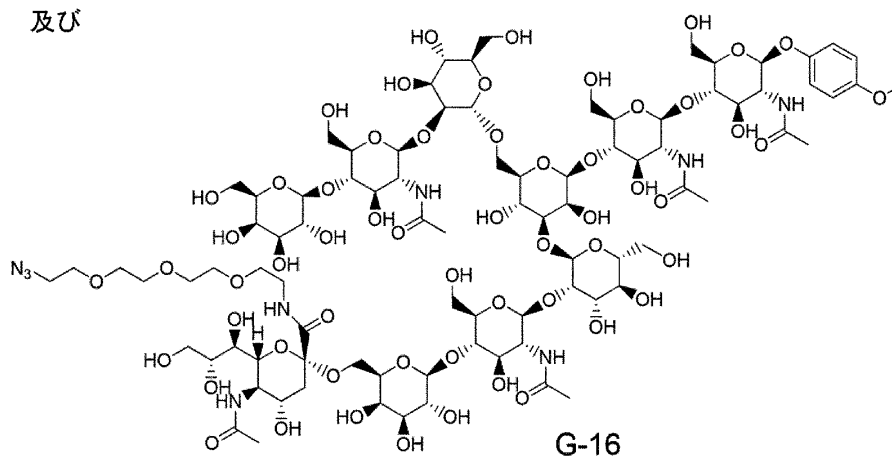








及び



からなる群より選択される式によって表される化合物。

[4 3]

酵素－Aと酵素－Bとの融合タンパクであって、

酵素－Aは、Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とするエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼであり、

酵素－B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の糖鎖を基質とするが、前記N297結合糖鎖を基質としない、又は、前記N297結合糖鎖への反応性が低いエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼである、融合タンパク。

発明の効果

[0013] 本発明における製造方法では、酸性条件下での陽イオン交換クロマトグラフィーにより、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、可能な限り少ない糖鎖ドナー分子使用量で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可能となる。また、特に、本発明における製造方法をワンポット法に適用する場合、上記の単離工程にて、所期のFc含有分子の純度を高めることができるため、糖鎖転移反応そのものの効率を極度に高める必要がなくなり、結果的に、Fc含有分子のN297結合糖鎖に対して糖鎖転移活性を示す酵素Aと、糖鎖ドナー分子における糖鎖を活性化する性質を示す酵素Bを、幅広い選択枝から自由に選択することが可能となる。つまり、酵素の生産性、及び物性という視点から、大量製造プロセスに適した酵素を自由に設定することが可能となる。

また、本発明の製造方法をワンポット法に適用する場合、糖鎖ドナー分子として、化学的に還元末端が活性化されていないN-結合型糖鎖、あるいはO-結合型糖鎖の中から自由に選択することが可能となる。つまり、化学的に還元末端が活性化されているオキサゾリン体を糖鎖ドナー分子として設定する場合と異なり、中性付近の水溶液中で自然分解せず、Fc含有分子中のLysと直接化学結合を形成しない、化学的に安定な構造を有する糖鎖ドナー分子を設定することが可能となる。

以上のことから、均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を、効率よく取得するための糖鎖ドナー分子必要量の削減が可能となり、糖鎖リモデリングされたFc含有分子の製造コストの低減につながる。

[0014] また、本発明の一態様では、ワンポット法における糖鎖転移反応、特に、特定のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの組み合わせを用いた糖鎖転移反応に適した新規な糖鎖ドナー分子が提供され、さらに、本発明の別の一態様では、所期のFc含有分子を不純物から単離することを含む、新規単離方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]アクセプター分子（（Fuc α 1, 6）GlcNAc-mAb）、糖鎖ドナー分子（X-SG-Z）、酵素-A、及び酵素-Bを混合したワンポット反応における、糖鎖転移反応の模式図である。

[図2]糖鎖ドナー分子代表例の構造式一覧である

[図3]糖鎖ドナー分子、及びG-1、G-3、あるいは、G-4のいずれかを使用した場合の糖鎖転移反応の模式図である。

[図4]糖鎖ドナー分子、及びG-1からG-17のいずれかを使用した場合の糖鎖転移反応の模式図である。

[図5]ワンポット反応の競合反応となる加水分解反応の模式図である。

[図6]酵素-Aを用いたmAb2の加水分解活性反応の模式図である。

[図7]野生型Endo-Sのアミノ酸配列（配列番号69）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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8]野生型Endo-S2のアミノ酸配列（配列番号70）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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9]野生型Endo-Siのアミノ酸配列（配列番号71）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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10]野生型Endo-Mのアミノ酸配列（配列番号72）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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11]野生型Endo-Rpのアミノ酸配列（配列番号73）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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12]野生型E n d o - C Cのアミノ酸配列（配列番号74）である。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13]野生型E n d o - O mのアミノ酸配列（配列番号75）である。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14]抗C D 7 0抗体1軽鎖のアミノ酸配列（配列番号1）及び抗C D 7 0抗体1重鎖のアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

[図15]抗C D 7 0抗体2軽鎖のアミノ酸配列（配列番号3）及び抗C D 7 0抗体2重鎖のアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

[図16]抗T R O P 2抗体1軽鎖のアミノ酸配列（配列番号5）及び抗T R O P 2抗体1重鎖のアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

[図17]抗T R O P 2抗体2軽鎖のアミノ酸配列（配列番号7）及び抗T R O P 2抗体2重鎖のアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

[図18]抗E G F R抗体1軽鎖のアミノ酸配列（配列番号9）及び抗E G F R抗体1重鎖のアミノ酸配列（配列番号10）を示す。

[図19]抗E G F R抗体2の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号11）及び抗E G F R抗体2の重鎖のアミノ酸配列（配列番号12）を示す。

[図20]抗C D 7 0抗体1のC D R L 1アミノ酸配列（配列番号13）、抗C D 7 0抗体1のC D R L 2アミノ酸配列（配列番号14）、抗C D 7 0抗体1のC D R L 3アミノ酸配列（配列番号15）、抗C D 7 0抗体1のC D R H 1アミノ酸配列（配列番号16）、抗C D 7 0抗体1のC D R H 2アミノ酸配列（配列番号17）、及び抗C D 7 0抗体1のC D R H 3アミノ酸配列（配列番号18）を示す。C D R配列はK a b a tの定義により決定した。

[図21]抗C D 7 0抗体2のC D R L 1アミノ酸配列（配列番号19）、抗C

D70抗体2のCDRL2アミノ酸配列（配列番号20）、抗CD70抗体2のCDRL3アミノ酸配列（配列番号21）、抗CD70抗体2のCDRH1アミノ酸配列（配列番号22）、抗CD70抗体2のCDRH2アミノ酸配列（配列番号23）、及び抗CD70抗体2のCDRH3アミノ酸配列（配列番号24）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。

[図22]抗TROP2抗体1のCDRL1アミノ酸配列（配列番号25）、抗TROP2抗体1のCDRL2アミノ酸配列（配列番号26）、抗TROP2抗体1のCDRL3アミノ酸配列（配列番号27）、抗TROP2抗体1のCDRH1アミノ酸配列（配列番号28）、抗TROP2抗体1のCDRH2アミノ酸配列（配列番号29）、及び抗TROP2抗体1のCDRH3アミノ酸配列（配列番号30）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。

[図23]抗TROP2抗体2のCDRL1アミノ酸配列（配列番号31）、抗TROP2抗体2のCDRL2アミノ酸配列（配列番号32）、抗TROP2抗体2のCDRL3アミノ酸配列（配列番号33）、抗TROP2抗体2のCDRH1アミノ酸配列（配列番号34）、抗TROP2抗体2のCDRH2アミノ酸配列（配列番号35）、及び抗TROP2抗体2のCDRH3アミノ酸配列（配列番号36）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。

[図24]抗EGFR抗体1のCDRL1アミノ酸配列（配列番号37）、抗EGFR抗体1のCDRL2アミノ酸配列（配列番号38）、抗EGFR抗体1のCDRL3アミノ酸配列（配列番号39）、抗EGFR抗体1のCDRH1アミノ酸配列（配列番号40）、抗EGFR抗体1のCDRH2アミノ酸配列（配列番号41）、及び抗EGFR抗体1のCDRH3アミノ酸配列（配列番号42）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。

[図25]抗EGFR抗体2のCDRL1アミノ酸配列（配列番号43）、抗EGFR抗体2のCDRL2アミノ酸配列（配列番号44）、抗EGFR抗体2のCDRL3アミノ酸配列（配列番号45）、抗EGFR抗体2のCDR

H1 アミノ酸配列（配列番号46）、抗EGFR抗体2のCDRH2アミノ酸配列（配列番号47）、及び抗EGFR抗体2のCDRH3アミノ酸配列（配列番号48）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。
[図26]トラスツマブ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号49）及びトラスツマブ重鎖のアミノ酸配列（配列番号50）を示す。

[図27]改変HER2抗体の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号49）及び改変HER2抗体の重鎖のアミノ酸配列（配列番号51）を示す。

[図28]ペルツマブ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号52）及びペルツマブ重鎖のアミノ酸配列（配列番号53）を示す。

[図29]改変HER2抗体2の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号52）及び改変HER2抗体2の重鎖のアミノ酸配列（配列番号54）を示す。

[図30]抗CDH6抗体の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号55）及び抗CD33抗体の重鎖のアミノ酸配列（配列番号56）を示す。

[図31]ペルツマブのCDRL1アミノ酸配列（配列番号57）、ペルツマブのCDRL2アミノ酸配列（配列番号58）、ペルツマブのCDRL3アミノ酸配列（配列番号59）、ペルツマブのCDRH1アミノ酸配列（配列番号60）、ペルツマブのCDRH2アミノ酸配列（配列番号61）、及びペルツマブのCDRH3アミノ酸配列（配列番号62）を示す。CDR配列はIMGTの定義により決定した。

[図32]抗CDH6抗体のCDRL1アミノ酸配列（配列番号63）、抗CDH6抗体のCDRL2アミノ酸配列（配列番号64）、抗CDH6抗体のCDRL3アミノ酸配列（配列番号65）、抗CDH6抗体のCDRH1アミノ酸配列（配列番号66）、抗CDH6抗体のCDRH2アミノ酸配列（配列番号67）、及び抗CDH6抗体のCDRH3アミノ酸配列（配列番号68）を示す。CDR配列はKabatの定義により決定した。

[図33]野生型Endo-Sdのアミノ酸配列（配列番号76）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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]野生型 E n d o - S z のアミノ酸配列（配列番号 7 7）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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]野生型 E n d o - S e のアミノ酸配列（配列番号 7 8）である。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、実施例で使用した変異酵素において置換したアミノ酸残基、又は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]配列番号 7 9 の配列（[E n d o - S i D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L] - [E n d o - R p N 1 7 2 V] の融合タンパク質）を示す図である。実施例で記載した融合タンパク質において置換したアミノ酸残基を太字で示し、アミノ酸リンカー配列を下線で示した。

[図37]配列番号 8 0 の配列（[E n d o - R p N 1 7 2 V] - [E n d o - S i D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L] の融合タンパク質）を示す図である。実施例で使用した融合タンパク質において置換したアミノ酸残基を太字で示し、アミノ酸リンカー配列を下線で示した。

[図38]配列番号 8 1 の配列（[E n d o - R p N 1 7 2 H] - [E n d o - S i D 2 4 1 M / Q 3 1 1 L] の融合タンパク質）を示す図である。実施例で使用した融合タンパク質において置換したアミノ酸残基を太字で示し、アミノ酸リンカー配列を下線で示した。

発明を実施するための形態

[0016] 以下に、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、分子中に含まれるアミノ酸の表記法は、本分野の慣例に従い、変異箇所を示す場合は野生型のアミノ酸の一文字表記とその番号（例えば、2 4 1 番目の A s p であれば「D 2 4 1」）により表す。また、変異については、野生型のアミノ酸の一文字表記、その番号及び変異後のアミノ酸の一文字表記（例えば、2 4 1 番目の A s p が G l n に置換された変異

は「D 2 4 1 Q」) により表す。また、変異を有する特定の変異体は、分子名と変異（例えば、E n d o - S i の 2 4 1 番目 A s p が G l n に置換された変異体は、「E n d o - S i D 2 4 1 Q」) により表し、複数の変異を有する場合は、変異の間を「/」で区切る形（例えば、E n d o - S i D 2 4 1 Q において、3 1 1 番目の G l n が L e u に置換された追加変異を有する変異体は、「E n d o - S i D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L」) と表す。

[0017] 本発明の一態様において、以下の工程 1 及び 2 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が提供される。

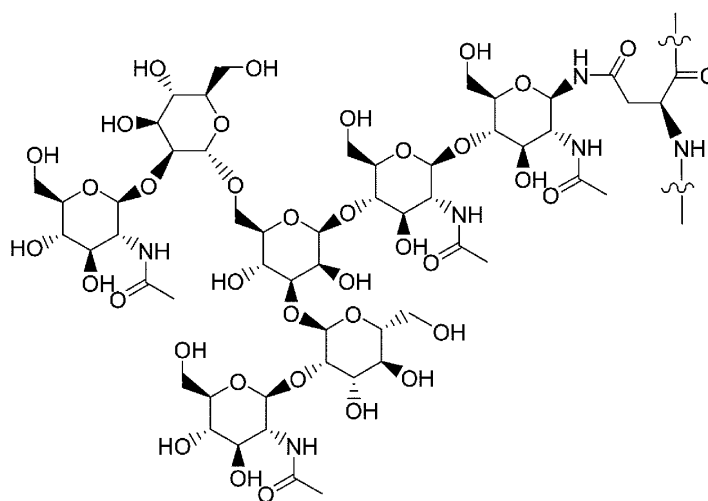
〔工程 1〕 N 2 9 7 結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコア G l c N A c を有する F c 含有分子であるアクセプター分子と、糖鎖を含む糖鎖ドナー分子とを、F c 含有分子の N 2 9 7 結合糖鎖を基質とするエンドー β - N - アセチルグルコサミニダーゼ（酵素 - A）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、

〔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。

[0018] < N 2 9 7 結合糖鎖 >

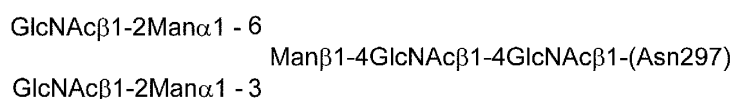
本発明において、「N 2 9 7 結合糖鎖」とは、I g G 重鎖の 2 9 7 番目の A s n の側鎖に結合している状態の N 結合型糖鎖を意味し、また、任意の手法で I g G 重鎖の N 結合型糖鎖の付加位置を変更した場合であっても、N 結合型糖鎖が酵素 - A の作用を受ける限り N 2 9 7 結合糖鎖に含まれるものとする。例えば、本発明の一態様において、I g G 重鎖を断片化した場合、当該 A s n を含むペプチド断片において、対応する A s n に結合している状態の糖鎖であっても、N 2 9 7 結合糖鎖に含まれる。通常、動物等で産生された I g G における N 2 9 7 結合糖鎖は、下記式 (I) 又は (I I) 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 G a l やシアル酸が付加していてもよい。

[0019] [化3]



(I)

[0020] [化4]



(I I)

[0021] 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む、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。

[0022] <糖鎖ドナー分子>

本発明において、「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。

[0023] 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

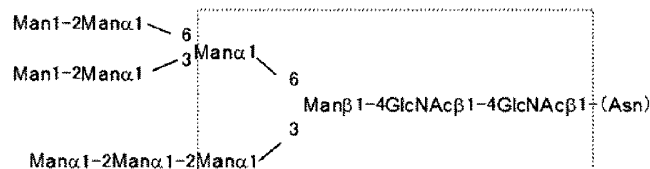
題の少ないヒト型糖鎖、又は、ヒト適合型糖鎖を有する糖鎖ドナー分子を採用することが好ましい。このような糖鎖は、ヒトの体内で抗原性を示さないことが知られている糖鎖であり、N-結合型糖鎖では、ハイマンノース型、混成（ハイブリッド）型、複合（コンプレックス）型などが知られている。これら3つには共通の基本構造がある。ハイマンノース型は、還元末端に近い位置にあるマンノース（ β マンノース）から枝分かれした2つの分岐鎖（1-3鎖、1-6鎖）に、複数のマンノースが連続したマンノースリッチ構造を有する糖鎖である。混成型とは、還元末端に近い位置にあるマンノース（ β マンノース）から枝分かれした2つの分岐鎖（1-3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。

[0024] 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）。

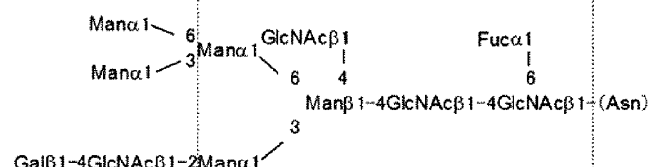
[0025]

[化5]

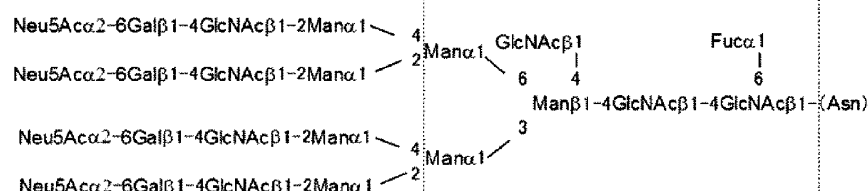
【高マンノース型】



【混成型】



【複合型】



[0026] 本発明において、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。

[0027] 本発明の一態様において、本発明における糖鎖ドナー分子は、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、又は糖鎖の還元末端が活性化されたGlcNAc（例えば、オキサゾリン化されたGlcNAc）を有する糖鎖含有分子である。本明細書において、化学的な手法で合成された糖鎖ドナー分子の還元末端の活性化とは、糖鎖ドナー分子の還元末端のアノマー位の反応性が化学的に高められた状態を指し、典型的には

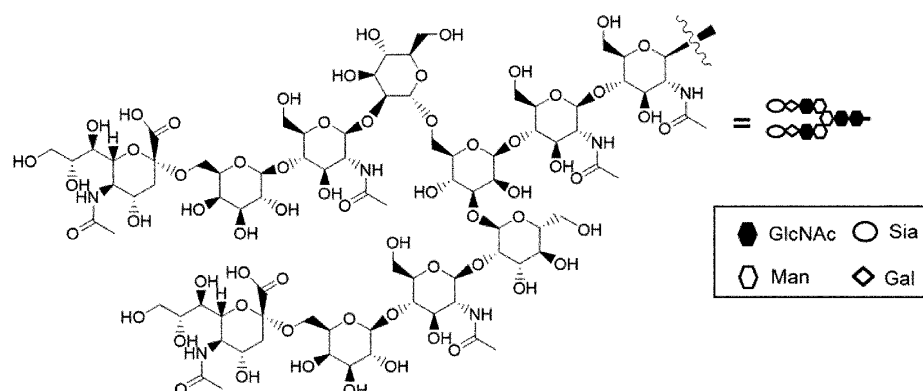
、当該アノマー位がオキサゾリン化又はハロゲン化されている状態を指す。
すなわち、活性化された糖鎖ドナー分子単独で単離精製が可能な状態を指す。
。

一方、酵素－Bが、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、酵素－Aが、当該糖鎖ドナー分子を所期の糖鎖転移反応に利用可能な状態とする活性化とは、糖鎖ドナー分子の還元末端のアノマー位の反応性が酵素学的に高められた状態を指す。すなわち、活性化中間体が生成することを意味し、活性化された糖鎖ドナー分子単独では単離精製が不可能な状態を指す。

[0028] 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。また本明細書において、SG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といい、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ものとする。

[0029]

[化6]



[0030] [化7]

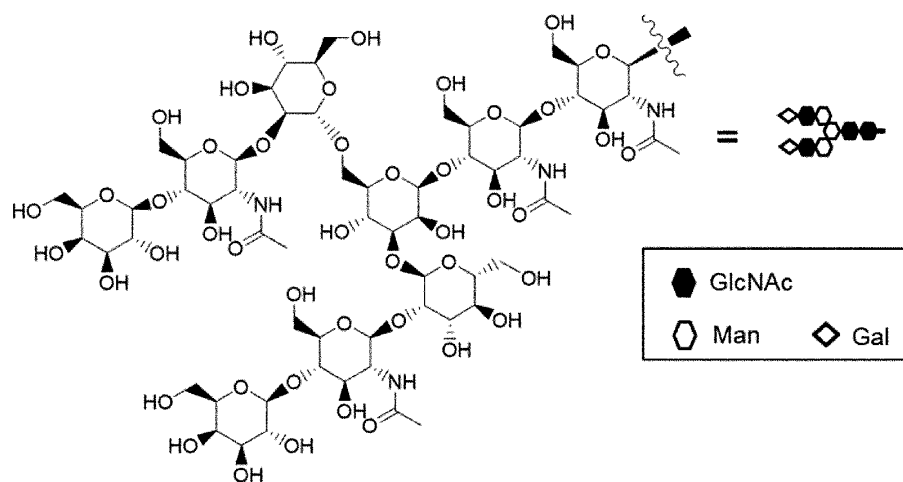


(式中、「 -(N/O) 」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0031] 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。

[0032]

[化8]



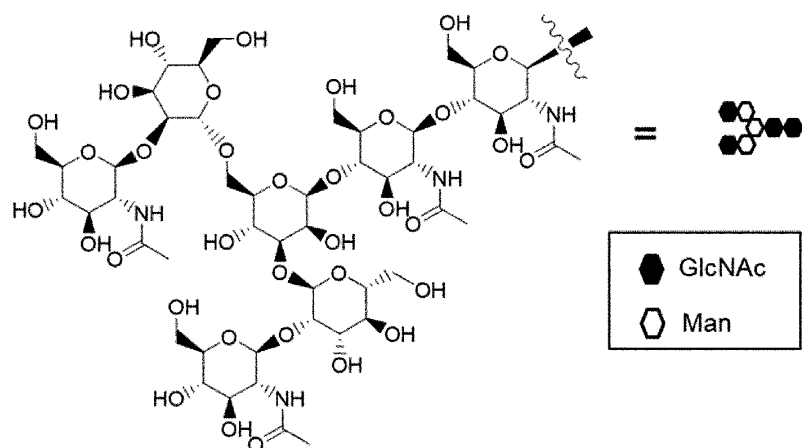
[0033] [化9]

Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-(N/O)Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3

[AG(9)]

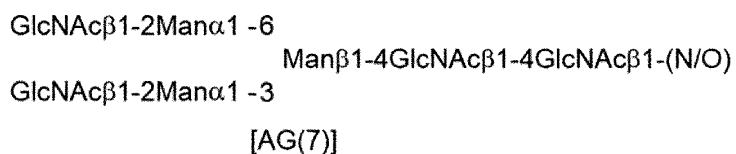
(式中、「-(N/O)」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0034] [化10]



[0035]

[化11]

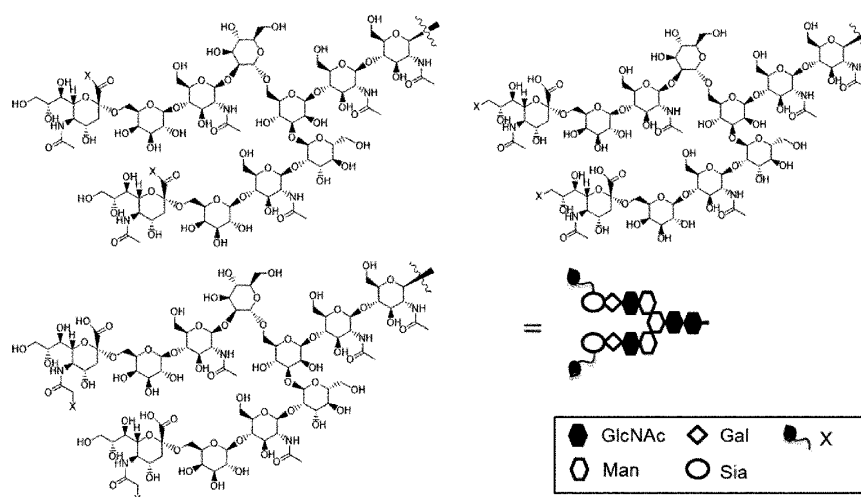


(式中、「 $-(N/O)$ 」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

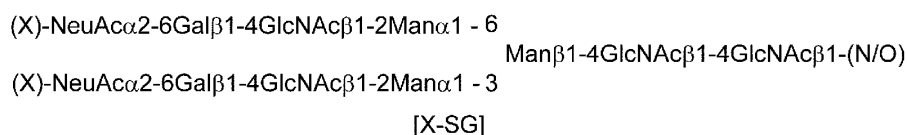
[0036] 本発明において、糖鎖ドナー分子は、化学修飾されていてもよく、例えば、非還元末端が化学修飾されていてもよい。

[0037] 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。

[0038] [化12]



[0039] [化13]



(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

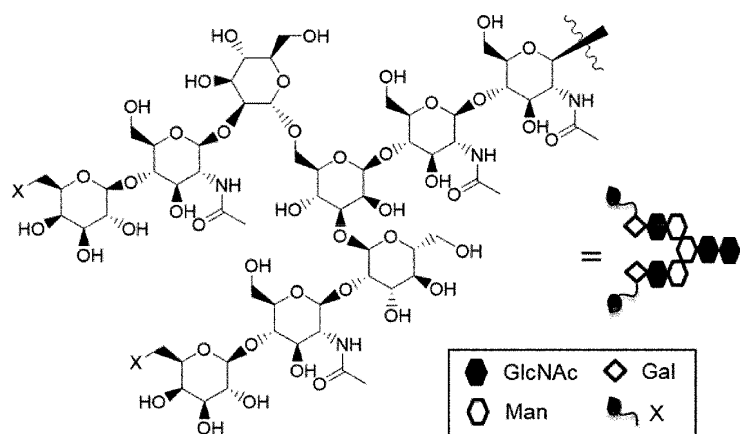
ート合成に応用されている結合法に使用される置換基を参考に (Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2198-2215) して、例えば、アセチレン基、アジド基 (N_3 -)、ジベンジルシクロオクテン (DBCO) 基、ビスクロ [6. 1. 0] ノン-4-エン (BCN) 基、1, 2, 4, 5-テトラジン環を含む構造、アルデヒド基、SH基、メチルスルフォニルトリアゾール基など、を挙げることができ、好ましくは、アセチレン基、アジド基 (N_3 -)、さらに好ましくは、アジド基 (N_3 -) を有する置換基を挙げることができるが、これらに限定されない。また、「アジド基 (N_3 -) 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-((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-アミノ基などを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。)

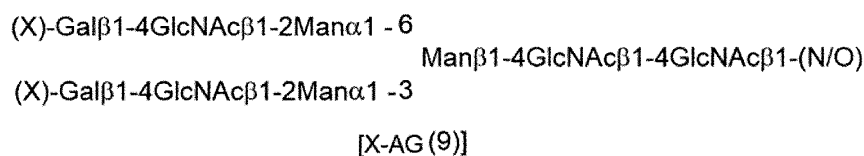
[0040] ここに示したX-SG型の構造のうち、 β -Manの分岐鎖の1-6鎖側の化学修飾シアル酸が欠損した構造であるX-MSG1型、1-3鎖側の化学修飾シアル酸が欠損した構造であるX-MSG2型も、非還元末端が化学修飾されていてもよい糖鎖ドナー分子における糖鎖部分の例として挙げられる。

[0041] 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。

[0042] [化14]

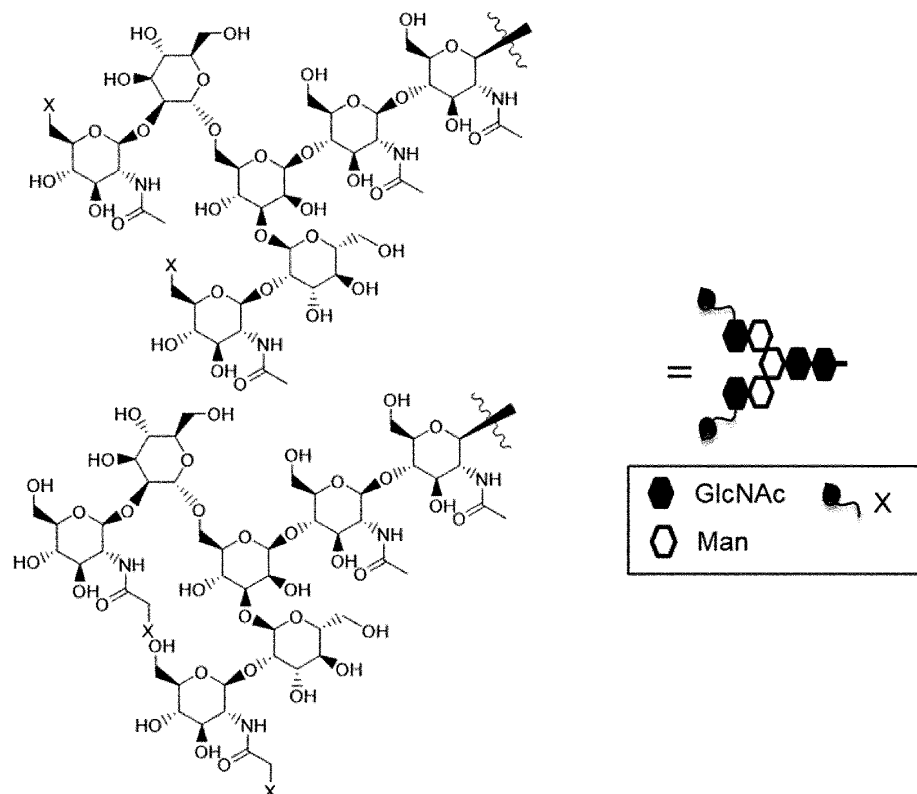


[0043] [化15]

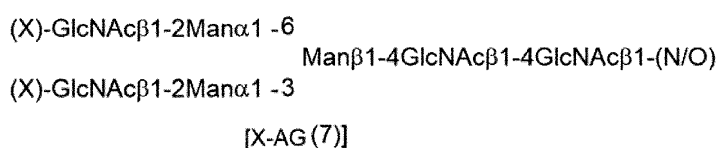


(式中、Xは、 β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のガラクトース上に導入された置換基を表し、具体的には、上記において規定したものと同じ意味を表す。式中、「-(N/O)」は、N原子又はO原子とグリコシド結合することを示す。)

[0044] [化16]



[0045] [化17]



(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じ意味を表す。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。)

[0046] 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。

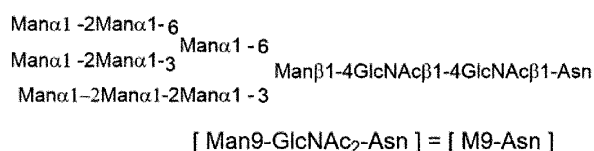
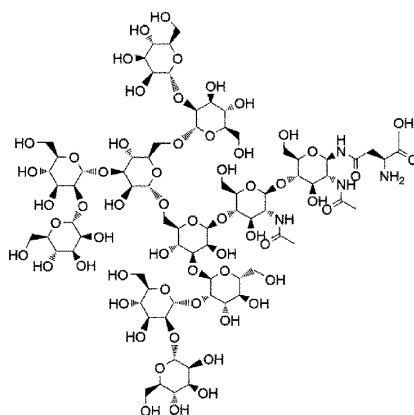
[0047] 本発明の糖鎖ドナー分子は、好ましくは、非還元末端が化学修飾されていても良いSGP、AG(9)-P、AG(7)-P、SG-Asn、AG(9)-Asn、AG(7)-Asn、SG-OR、AG(9)-OR、AG(7)-OR、(MSG1)-Asn、(MSG2)-Asn、(MSG1)-Asnと(MSG2)-Asnの混合物、MSG1-OR、MSG2-OR、又はMSG1-ORとMSG2-ORの混合物を挙げることができ、又は、図2に示した構造を有する糖鎖ドナー分子を挙げることができる。なお、以上の構造式中、「P」はSGPに由来するペプチド部分を示し、図2における「X」は、上記において規定したものと同一意味を表す。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、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-OR、([N₃-PEG(3)]-MSG1)-OR、([N₃-PEG(3)]-MSG2)-OR、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1)-ORと([N₃-PEG(3)]-MSG2)-ORの混合物を挙げることができる。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、＜新規糖鎖ドナー分子＞の章において具体的に開示する新規糖鎖ドナー分子を挙げるこ

とができる。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。

[0048] 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。

[0049] 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Man9-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Man8-GlcNAc₂-Asn（「M8-Asn」）、Man7-GlcNAc₂-Asn（「M7-Asn」）、Man6-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。

[0050] [化18]



[0051] 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たGlcNAc、好ましくは、オキサゾリン化されたGlcNAcを有する糖鎖含有分子である。このような糖鎖ドナー分子としては、多様な糖鎖構造の分子を用いることができる。このような糖鎖ドナー分子の例としては、SG-Ox（「Ox」はオキサゾリンを示す）、MSG1-Ox、MSG2-Ox若しくはMSG1-OxとMSG2-Oxの混合物を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0052] 糖鎖の還元末端が活性化されたGlcNAcを有する糖鎖含有分子も、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と同様、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。非還元末端の化学修飾としては、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について言及したものと同様の修飾を挙げることができ、例えば、 $([\text{N}_3-\text{PEG}(3)]_2-\text{SG})-\text{Ox}$ 、 $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]-\text{MSG1}-\text{Ox}$ 、 $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]-\text{MSG2}-\text{Ox}$ 、又は $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]-\text{MSG1}-\text{Ox}$ と $[\text{N}_3-\text{PEG}(3)]-\text{MSG2}-\text{Ox}$ の混合物を挙げることができるが、これらに限定さ

れない。

[0053] 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、例えば、実施例7又は参考例23-1に示した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。

[0054] <Fc含有分子>

本発明において、「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。本発明における抗体（免疫グロブリン）としては、IgG、IgA、IgM、IgE及びIgDのいずれであってもよく、また、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよく、さらに、天然由来のものであっても、合成したものであってもよいが、好ましくはIgG、特にIgG型のモノクローナル抗体を挙げることができる。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。

[0055] <アクセプター分子とは>

本発明において、「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、図4の（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（特許文献1）。

[0056] 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、抗体としては、例えば、抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗DLL3抗体、抗FAP抗体、抗CDH11抗体、抗CDH6抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体、抗CEA抗体、抗Crypto抗体、抗EphA2抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GP NMB抗体、抗Integrin抗体、抗PSMA抗体、抗Tenascin-C抗体、抗SLC44A4抗体、抗Mesothelin抗体、抗ENPP3抗体、抗CD47抗体、抗EGFR抗体、抗GPR20抗体又は抗DR5抗体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体として、好ましくは、抗HER2抗体（例えば、トラスツズマブ又はペルツズマブ）、抗CDH6抗体、抗CD33抗体、抗EphA2抗体、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、又は抗EGFR抗体であり、より好ましくは、抗HER2抗体、抗CDH6抗体、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、又は抗EGF

R抗体である。

[0057] 上記抗体は、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。

[0058] 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。

[0059] 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。本発明において、「宿主細胞」は、動物細胞、植物細胞、大腸菌、酵母など、タンパク質産生に通常用いられる細胞等を適宜選択できる。

[0060] 上記抗体はヒト化抗体でもよく、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。

[0061] 例えば、抗HER2抗体（US5821337、WO2004/008099、WO2020/050406等）、抗CD33抗体（WO2014/057687、WO2020/050406等）、抗EphA2抗体（WO2009/028639、WO2020/050406等）、抗CDH6抗体（WO2018/212136、WO2020/050406等）、抗CD70抗体（WO2004/073656、WO2007/038637、

WO 2021/177438等)、抗TROP2抗体(WO 2015/098099、WO 2021/177438等)、抗EGFR抗体(WO 1998/050433、WO 2002/092771、WO 2021/177438等)は、公知の手段によって取得することができる。

[0062] 以下、抗体の詳細を説明するが、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おり、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を用いることが好ましい。また、本発明の抗体のアイソタイプとしてIgG1を用いる場合は、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可能であり、一態様としては、抗体依存性細胞傷害活性を増強若しくは減弱、抗体依存性細胞媒介食作用を増強若しくは減弱、又は、補体依存性細胞傷害活性を増強若しくは減弱することができ、変異体の一態様としては、野生型ヒトIgG1の定常領域のアミノ酸配列のうちEU index (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85)により特定される234位のロイシン及び235位のロイシンがそれぞれアラニン及びアラニンに置換されたもの、又は、EU indexにより特定される234位のロイシン、235位のロイシン及び329位のプロリンがそれぞれアラニン、アラニン、及びアラニンに置換されたものを挙げることができる。また、本発明で使用する抗体について重鎖の一方又は両方のカルボキシル末端において1つ又は2つのアミノ酸が欠失しているものとすることができる。

[0063] 上記抗HER2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) 以下の特性を有することを特徴とする抗HER2抗体；

(a) HER2に特異的に結合する。

(b) HER2と結合することによってHER2発現細胞に内在化する活

性を有する。

(2) HER2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) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラ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)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)に記載の抗体。

(7) 配列番号50に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号49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モノクローナル抗体である上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(8) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUIンデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。

(9) 配列番号51に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号49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モノクローナル抗体である上記(8)に記載の抗体。

(10) 配列番号53に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号52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モノクローナル抗体である上記(1)～(4)に記載の抗体。

(11) 配列番号54に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号52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モノクローナル抗体である上記(8)に記載の抗体。

(12) 配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号59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60に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号61に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号62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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(8)に記載の抗体。

(13) 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)～(12)のいずれかに記載の抗体。

(14) 上記(1)～(13)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。

[0064] 本発明の抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの製造に使用される抗CD70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) CD70に特異的に結合する抗CD70抗体。

(2) CD70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) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラ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)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)に記載の抗体。

(7) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。

(8) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号1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モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(9) 配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号3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モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(10) 配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号15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16に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号18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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)に記載の抗体。

(11) 配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号20に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号21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22に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号24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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)に記載の抗体。

(12) 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)～(11)のいずれかに記載の抗体。

(13) 上記(1)～(12)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。

[0065] 本発明の抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの製造に使用される抗TRO P2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) TROP2に特異的に結合する抗TROP2抗体。

(2) TROP2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) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する、上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラ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)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)に記載の抗体。

(7) 配列番号6に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号5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モノクローナル抗体である上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(8) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。

(9) 配列番号8に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号7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モノクローナル抗体である上記(8)に記載の抗体。

(10) 配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号27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28に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号29に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号30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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(8)に記載の抗体。

(11) 配列番号31に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号32に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号33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34に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号35に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号36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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(8)に記載の抗体。

(12) 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)～(11)のいずれかに記載の抗体。

(13) 上記(1)～(12)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。

[0066] 本発明の抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの製造に使用される抗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) 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) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラ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)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)に記載の抗体。

。

(7) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデック

スにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。

(8) 配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号9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モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(9) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号11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モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(10) 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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)に記載の抗体。

(11) 配列番号43に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号44に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号45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46に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号47に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号48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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)に記載の抗体。

(12) 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)～(11)のいずれかに記載の抗体。

(13) 上記(1)～(12)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。

[0067] 本発明の抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの製造に使用される抗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) 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) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。
- (5) マウスモノクローナル抗体、キメラ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)～(4)のいずれかに記載の抗体。
- (6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及びADCP活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)に記載の抗体。
- (7) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。
- (8) 配列番号56に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号55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モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。
- (9) 配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号65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66に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号67に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号68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モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)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。

[0068] 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、例えば、実施例1において言及する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でできる。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。

[0069] <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。

[0070] <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GⅠcNAc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。

[0071] 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。酵素－Aの加水分解活性の反応模式図を図5、図6に示す。

[0072] 酵素－Aの糖鎖転移活性は、N297にコアGⅠcNAc（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（還元末端が活性化されたGⅠcNAc、若しくは還元末端が活性化されていないGⅠcNAcを有する糖鎖含有分子）の還元末端をグリコシド結合させる活性を意味する。糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていないGⅠcNAcを含む場合における、酵素－Aの糖鎖転移活性の反応模式図を図1に示す。

- [0073] 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 Commun (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 JP, 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71) を図9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、*Streptococcus* 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。
- [0074] 本発明の酵素-Aは、上記の特性を有するものであれば、実施例で利用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。

[0075] 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EndoS (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71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71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71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71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71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。

[0076] 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、EndoS-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7~図9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、En

do-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～数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同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0077] なお、本発明において、「数個」とは、30個もしくは20個以下の整数を意味し、好ましくは10個以下の整数を意味し、さらに好ましくは5個以下の整数を意味し、最も好ましくは4個、3個、2個又は1個を意味する。

[0078] <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。

[0079] 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GlnNAc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。

[0080] 酵素-Bによる、糖鎖ドナー分子の活性化作用は、図1に示すとおり、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。

[0081] 本発明の酵素-Bとしては、例えば、Endo-M (Mucor hiei m al i s 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 (Coprinosia 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10~図13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～数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。

[0082] 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 (GenBank 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_00748474

9. 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～数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。

[0083] 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。

[0084]

[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

[0085] 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

D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L であり、酵素－B は E n d o－R p N 1 7 2 H あるいは E n d o－R p N 1 7 2 V である。さらに別の具体的態様としては、融合酵素は E n d o－R p N 1 7 2 H と E n d o－S i D 2 4 1 M / Q 3 1 1 L との融合タンパク質、E n d o－R p N 1 7 2 V と E n d o－S i D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L との融合タンパク質、又は、E n d o－S i D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L と E n d o－R p N 1 7 2 V 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。

[0086] [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〕

[0087] 酵素－A と酵素－B との融合タンパク質は、非特許文献（J o a q u i m , e t a l . , P r o c e s s e s . 2 0 2 2 , 1 0 , 4 9 4 . ）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 G r u e n i n g e r－L e i t c h , e t a l . , P r o t e i n S c i . 1 9 9 6 , 1 2 , 2 6 1 7－2 2、および、E m i l y M K , e t a l . , P r o t e i n E n g D e s S e l . 2 0 0 5 , 1 0 , 4 9 7－5 0 1）、および特許文献（WO 2 0 1 7 1 3 7 4 5 9）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 Deliv 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、(EFF)_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。

[0088] <工程1>

本発明に係る製造方法において、工程1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含有分子であるアクセプター分子と、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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程である。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及び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）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たGlcNAc（

オキサゾリン化されたGlcNAc等)若しくは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(例えば、特許文献3)。

[0089] 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た、若しくは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、糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む場合、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。また、糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されたGlcNAcを含む場合、工程1の反応系内のpHは、5.5～8.0の間で適宜選択でき、好ましくは6.0～7.5、より好ましくは6.2～7.5、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(pH6.0～7.5)、MOPS-NaOH緩衝液(pH6.5～8.0)、トリス塩酸緩衝液(pH7.0～9.0)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(pH7.0～9.0)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添加剤を加えてもよい。

[0090] 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。

[0091] 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時間であり、最も好ましくは8～30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。

[0092] 糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む場合、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。この態様においては、工程1は、酵素-Aに加え、上述した酵素-Bも必要とする。

[0093] 実施例8において詳述するとおり、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。したがって、本発明に係る製造方法において、糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されたGlcNAcを含む場合、工程1では、比較的低いアクセプター分子濃度を採用することが好ましい。このような実施態様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として、0.6mg/mL～18mg/mL、好ましくは1.2mg/mL～16mg/mL、より好ましくは3mg/mL～14mg/mL、さらに好ましくは4.2mg/mL～13.2mg/mL、特に好ましくは6mg/mL～12mg/mLを挙げることができる。

[0094] 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、糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む場合、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、200mg/mL、好ましくは160mg/mL、より好ましくは120mg/mL、さらに好ましくは100mg/mL、特に好ましくは80mg/mLを挙げることができ、下限値としては、10mg/mL、好ましくは14mg/mL、より好ましくは18mg/mL、さらに好ましくは20mg/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、10mg/mL～200mg/mL、好ましくは14mg/mL～160mg/mL、より好ましくは18mg/mL～120mg/mL、さらに好ましくは20mg/mL～100mg/mL、特に好ましくは20mg/mL～80mg/mLを挙げることができるが、これらに限定されない。

[0095] 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。特に、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を用いる糖鎖リモデリング反応では、糖鎖ドナー分子の添加量は、糖鎖転移率に影響を及ぼすことから、従来、比較的多量の糖鎖ドナー分子（100～300当量、特許文献1、非特許文献12）を使用することが通常であった。他方、上述のとおり、本発明における製造方法では、酸性条件下での陽イオン交換クロマトグラフィーにより、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の糖鎖転移反応そのものの効率を極度に高める必要はなく、よって、糖鎖ドナー分子の添加量を、比較的小量とすることができる。糖鎖ドナー分子は高価であることが多いため、この利点は、高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を取得する

ために、大量の糖鎖ドナー分子使用量を必要とする、ワンポット法において特に有用である。したがって、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值としては、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值としては、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。

[0096] 上述のとおり、本発明における製造方法では、酸性条件下での陽イオン交換クロマトグラフィーにより、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の糖鎖転移反応そのものの効率を極度に高める必要はない。したがって、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、糖鎖転移反応そのものの効率を極度に高める必要はないという観点から、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

8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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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、たとえば、糖鎖の還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子と、糖鎖の還元末端が活性化されている糖鎖ドナー分子のいずれも使用することができる。しかしながら、還元末端が活性化されている糖鎖（例えば、還元末端がオキサゾリン化された糖鎖）を糖鎖ドナー分子として用いる場合、糖鎖が水中で速やかに加水分解され、抗体への反応性を失うため、短時間で反応を完結させる必要があるという制約があるため、N297結合糖鎖の直接交換反応においては、糖鎖の還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子を使用することが好ましい。したがって、本発明の一態様において、N297結合糖鎖の直接交換反応において使用される糖鎖ドナー分子は、糖鎖の還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子である。言い換えれば、本発明の一態様において、工程1が、アクセプター分子が*in situ*で調製される態様を含む場合、工程1で使用する糖鎖ドナー分子は、糖鎖の還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子である。このような糖鎖ドナー分子としては、制限はなく、例えば、＜新規糖鎖ドナー分子＞の章において具体的に開示する新規糖鎖ドナー分子を挙げることができる。例えば、糖鎖ドナー分子にG-1を選んだ場合、Fc含有分子-[SG]₂が得られ、糖鎖ドナー分子にG-4、G-13、G-14、あるいはG-16を選んだ場合、Fc含有分子-[X-MSG1]₂が得られ、さらに、糖鎖ドナー分子にG-3、G-6、G-7、G-8、G-9、G-10、G-11、G-12、あるいはG-15を選んだ場合、Fc含有分子-[X-SG]₂が得られる。

[0100] 他方、N297結合糖鎖の直接交換反応において、還元末端が活性化されている糖鎖（例えば、還元末端がオキサゾリン化されている糖鎖）を糖鎖ドナー分子として用いる場合、上記のとおり、糖鎖が水中で速やかに加水分解され、抗体への反応性を失うため、短時間で反応を完結させる必要があるという制約がある。*in situ*でアクセプター分子を調製する場合、短時間でアクセプター分子を生成させるには原料として投入するFc含有分子の濃度を高めることが想起されるが、この濃度が高すぎると、還元末端が活性

化されている糖鎖と原料として投入したFc含有分子の接触頻度が高まり、酵素非介在型の糖化（Glycation）が優位に進行する可能性がある。よって、還元末端が活性化されている糖鎖を用いてN297結合糖鎖の直接交換反応を行うには、糖化反応を抑制するため、原料として投入するFc含有分子濃度を低く設定することが好ましい。あるいは、短時間でアクセプター分子を生成させ、活性化糖鎖（例えば、オキサゾリン化糖鎖）の加水分解を避けて短時間に反応を完結させるため、N297結合糖鎖の加水分解活性がより強い酵素-Aを用いることが好ましい。なお、非特許文献（Xiao Zhang, et al., ACS Chem Biol. 2021, 11, 2502-2514）、および特許文献（WO2022226420）においては、宿主細胞由来の不均一な糖鎖を有する抗体に対してオキサゾリン化した2糖と野生型Endo-S2を加え、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖を高い糖鎖転移率で抗体に付加できることが報告されている。当該報告においては、抗体に転移された2糖オキサゾリン由来の糖鎖がEndo-S2の加水分解活性に耐性をもつため、加水分解活性の高い野生型Endo-S2を用いて短時間で反応を完結させることが可能とされている。したがって、本発明におけるN297結合糖鎖の直接交換反応においても、このような既知の方法を利用して、反応に使用する糖鎖ドナー分子や酵素-Aを適宜選択することができる。

[0101] 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。

[0102] <工程2>

本発明に係る製造方法において、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。

[0103] 上述のとおり、本発明における製造方法では、工程2において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し、目的とする効果が得られない。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。

[0104] 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 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。

[0105] このような状況下にあって、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。

[0106] 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。

[0107] 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。本発明における「酸性条件」としては、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、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、pH2.5～5.0、好ましくはpH3.0～4.8、さらに好ましくはpH3.3～4.7、特に好ましくはpH3.4～4.6、最も好ましくはpH3.5～4.5の範囲を意味する。

[0108] 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。

[0109] 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。

- [0110] 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。
- [0111] 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。
- [0112] 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。
- [0113] 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。

- [0114] 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、膜状、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、膜状、モノリス状などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0115] 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。
- [0116] 膜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。

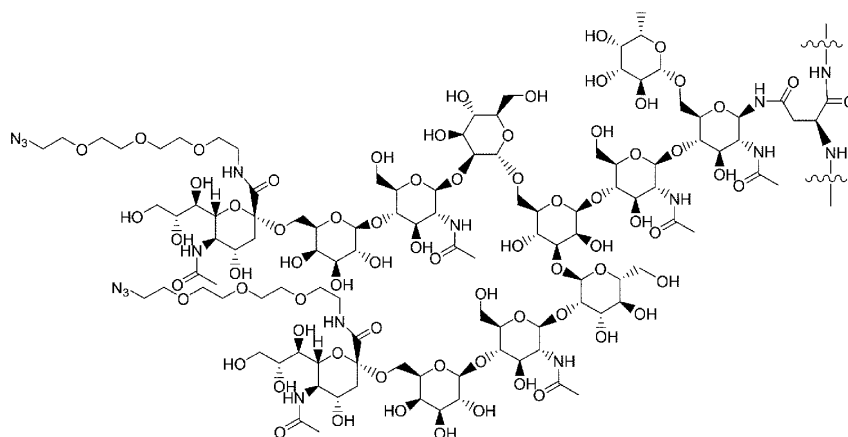
- [0117] モノリス状の陽イオン交換クロマトグラフィー媒体として、C I M m o n o l i t h S O 3 (B I A S e p a r a t i o n) などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0118] 工程2の陽イオン交換クロマトグラフィーは、既知の装置を使用して実行することができ、このような装置としては、A K T A a v a n t 2 5 (C y t i v a) を挙げることができるが、これに限定されない。また、工程2の陽イオン交換クロマトグラフィーにおける、移動相の流速は、常法に従って適宜決定できる。
- [0119] 本発明において、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、C a p t o (T M) M M C や T O Y O P E A R L (T M) M X - T R P - 6 5 0 M 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。

[0120] <コンジュゲート>

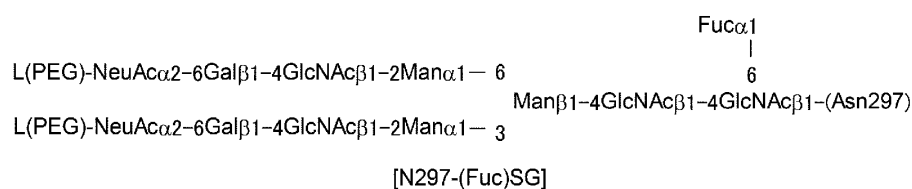
本発明の工程1及び工程2を介して得られたFc含有分子は、更に化学的に若しくは生化学的に修飾することができる。前述した糖鎖ドナー分子の構造式中Xの部分に、アジド基(N_3-)を有する置換基、例えば、 N_3 を有するポリエチレングリコールリンカー(L(PEG))を有する糖鎖ドナー分子を用いることで、糖鎖の非還元末端にアジド基を有するFc含有分子、例えば、以下の式で表される、 $N297-(Fuc)SG-L(PEG)_2$ 、 $N297-(Fuc)MSG1-L(PEG)$ 又は $N297-(Fuc)MSG$

2-L (PEG) の構造を有するFc含有分子を作製できる。

[0121] [化19]

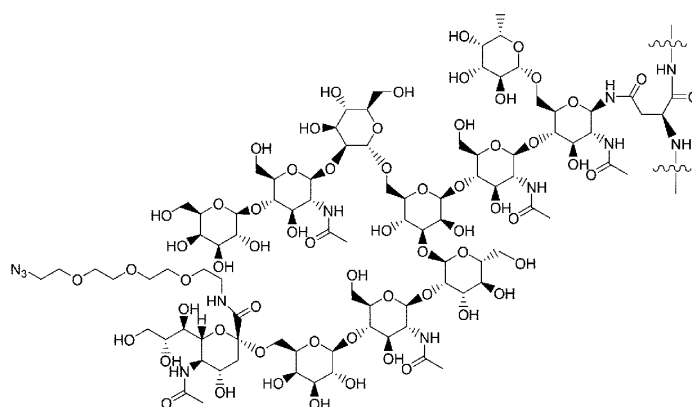


[0122] [化20]



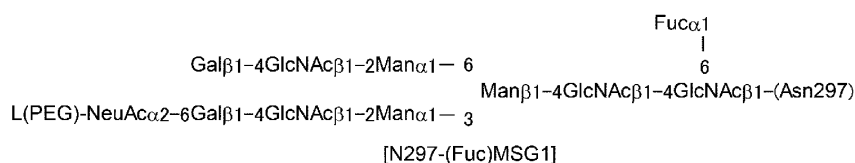
(式中、L (PEG) は、 β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位に結合したカルボニル基と結合することを表す。L (PEG) は、エチレングリコール構造を含み、他の結合構造及び／又は修飾構造を含んでも良いリンカー構造である。)

[0123] [化21]



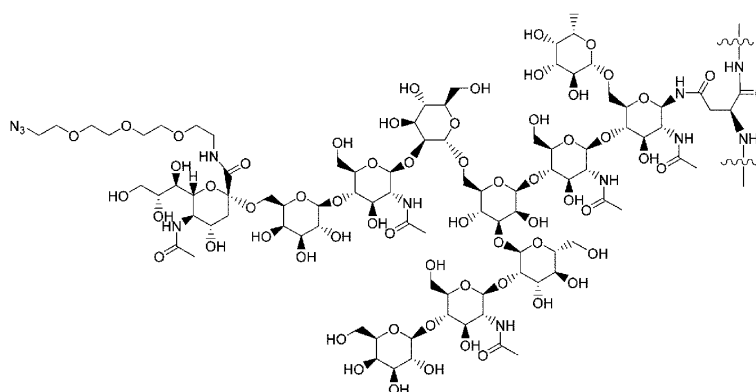
[0124]

[化22]

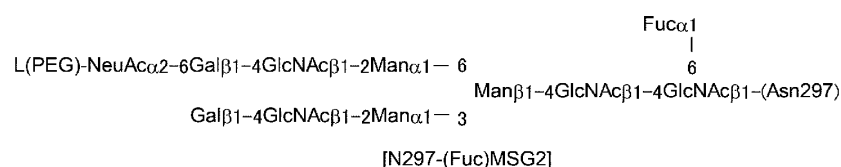


(式中、L (P E G) は、 β -M a n の分岐鎖の 1 - 3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位に結合したカルボニル基と結合することを表す。L (P E G) は、エチレングリコール構造を含み、他の結合構造及び／又は修飾構造を含んでいても良いリンカー構造である。)

[0125] [化23]



[0126] [化24]



(式中、L (P E G) は、 β -M a n の分岐鎖のうち 1 - 6 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位に結合したカルボニル基と結合することを表す。L (P E G) は、エチレングリコール構造を含み、他の結合構造及び／又は修飾構造を含んでいても良いリンカー構造である。)

[0127] アジド基 (N_3 -) は、(ヘテロ)シクロアルキニル基(例えば、D B C O (D i b e n z o c y c l o o c t y n e))等のアルキン構造と反応させることにより、1, 2, 3-トリアゾール環を形成する(S P A A C (s t

rain-promoted alkyne azide cycloaddition: Agard NJ, et al., J Am Chem Soc. 2004, 126, 46, 15046-15047)。したがって、本発明の一態様において、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖が、アジド基 (N_3-) を有する置換基で化学修飾されている非還元末端を有するか、あるいは、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖自体はアジド基を有さないが、工程 1 又は工程 2 の後に、当該糖鎖の非還元末端にアジド基を有する置換基を導入した場合、本発明に係る製造方法は、更に、当該糖鎖のアジド基 (N_3-) に、アルキン構造を有する分子を反応させる工程を含むことができる。本明細書では、このようにして、アルキン構造を有する分子と結合した状態の Fc 含有分子を、「コンジュゲート」とよぶことがある。なお、本発明の工程 1 及び工程 2 を介して得られた Fc 含有分子を、SPAAC 以外の反応により、他分子と複合体化したものも、「コンジュゲート」とよぶことがある。

[0128] アルキン構造を有する分子としては、例えば、(ヘテロ) シクロアルキニル基を有し、かつ、所望の活性を有する分子を挙げることができ、好ましくは、薬学的に活性な化合物（例えば、化学療法剤、分子標的薬、免疫賦活化剤（例えば、STING アゴニスト（WO2020/050406、WO2014/099824、WO2014/179335、WO2014/189805、WO2014/189806、WO2015/074145、WO2015/185565、WO2016/096714、WO2016/012305、WO2016/145102、WO2017/027646、WO2017/027645、WO2017/075477、WO2017/093933、WO2017/100305、WO2017/123669、WO2017/161349、WO2017/175147、WO2017/175156、WO2018/009466、WO2018/045204、WO2018/060323、WO2018/067423、WO2018/065360、WO2014/093936、WO2018/

009648、WO2018/100558)、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤、スムーズン(smoothen)阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド及び抗がんワクチン、アジュバント、脂質、リポソーム、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、抗原、ビタミン、ホルモン等)を例示できるが、これらに限定されない。化学療法剤若しくは毒素としては、カンプトテシン(例えば、WO2014/057687)、ピロロベンゾジアゼピン(例えば、WO2013/173496、WO2014/130879、WO2017/004330、WO2017/004025、WO2017/020972、WO2016/036804、WO2015/095124、WO2015/052322、WO2015/052534、WO2016/011519、WO2015/052321、WO2015/031693、WO2011/130613、WO2019/065964)、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体を挙げることができるが、これらに限定されない。また、免疫賦活化剤としては、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、及びA2ARアンタゴニストを例示できるが、これらに限定されない。アルキン構造を有する分子としては、好ましくは、以下の(A)～(E)からなる群から選択される分子を挙げることができる:

(A) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[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-バリル-N-{4-[({ [(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{ [(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][

1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、

(B) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - [4 - ({ [(11' S, 11' a S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - (3 - { [(11 a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5, 10, 11, 11 a - テトラヒドロ - 1 H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ} プロポキシ) - 5' - オキソ - 11', 11' a - ジヒドロ - 1' H, 3' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] - L - アラニンアミド、

(C) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5', 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 11', 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、

(D) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5', 10', 11', 11 a' - テトラヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾ

ジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 1 1' , 1 1 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1 , 2' - ピロロ [2 , 1 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン] - 1 0' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、並びに、

(E) (ビス (N , N - ジエチルエタンアミニウム) N - [4 - (1 1 , 1 2 - ジデヒドロジベンゾ [b , f] アゾシン - 5 (6 H) - 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 - [(5 R , 7 R , 8 R , 1 2 a R , 1 4 R , 1 5 R , 1 5 a R , 1 6 R) - 1 5 - フルオロ - 1 6 - ヒドロキシ - 2 , 1 0 - ジオキソ - 2 , 1 0 - ジスルフィド - 1 4 - (6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 2 H - 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 - 2 H , 1 0 H , 1 2 H - 5 , 8 - メタノ - 2 λ 5 , 1 0 λ 5 - フロ [3 , 2 - l] [1 , 3 , 6 , 9 , 1 1 , 2 , 1 0] 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 - 1 H - プリン - 1 - イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

[0129] 上記において記述してきた製造方法により製造される F c 含有分子もまた、本発明の範囲内である。したがって、本発明は、その一態様において、上記において記述してきた製造方法により製造される F c 含有分子を包含する。

[0130] <単離方法>

本発明者らにおいて発見した、所期の糖鎖を有する糖タンパク質（特に、N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子）と、当該糖鎖を有さない糖タンパク質とを、酸性条件下での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より分離できるという知見は、上記において述べてきたような製造方法とは独立して、単に、目的糖タンパク質を単離する用途にも適用できる。したがって、本発明の一態様において、糖タンパク質（特に、N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子）の単離方法であって、前記糖

タンパク質（Fc含有分子）と1つ以上の不純物を含む溶液を、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、不純物を選択的に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トラップさせる工程を含む、単離方法が提供される。本発明の一態様において、当該単離方法は、前記糖タンパク質（Fc含有分子）と1つ以上の不純物を含む溶液を、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、不純物を選択的に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トラップさせ、他方、当該媒体に選択的にはトラップされない、所期の糖鎖を有する糖タンパク質（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、当該糖タンパク質（Fc含有分子）を選択的に回収する工程を含む、単離方法である。

[0131] 本発明における単離方法の一態様において、糖タンパク質は、Fc含有分子であり、典型的には、N297結合糖鎖を有するFc含有分子である。N297結合糖鎖は、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、複合型糖鎖である。したがって、本発明の一態様において、N297結合糖鎖は、複合型糖鎖である。また、所期の糖鎖を有する糖タンパク質（例えば、N297結合糖鎖を有するFc含有分子）から分離すべき不純物としては、典型的には、目的物である糖タンパク質（Fc含有分子）とは、糖鎖（例えば、N297結合糖鎖）の構造が異なるか、あるいは、糖鎖（例えば、N297結合糖鎖）を欠失している以外は、糖タンパク質（Fc含有分子）と同一構造を有する分子を挙げることができる。例えば、目的物であるFc含有分子におけるN297結合糖鎖が、フコースが付加していてもよいコアG1cNAcではない場合（例えば、N297結合糖鎖が、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かである場合）、前記1つ以上の不純物は、N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアG1cNAcを有する以外は前記Fc含有

分子と同一である分子を含む。

[0132] 本発明に係る単離方法は、必ずしも、Fc含有分子の製造方法の一工程として組み込まれる必要はないという点を除いては、基本的に、本発明に係る製造方法の工程2と同一である。したがって、上記工程2に関して言及してきたことは、本発明に係る単離方法を実施する際にもそのまま適用される。

[0133] また、本発明に係る単離方法は、所期の糖鎖転移反応と組み合わせることもできる。したがって、本発明の一態様において、以下の工程1及び2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含有分子の単離方法が提供される。

[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、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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、

[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N297結合糖鎖を有するFc含有分子を単離、回収又は単離回収する工程。

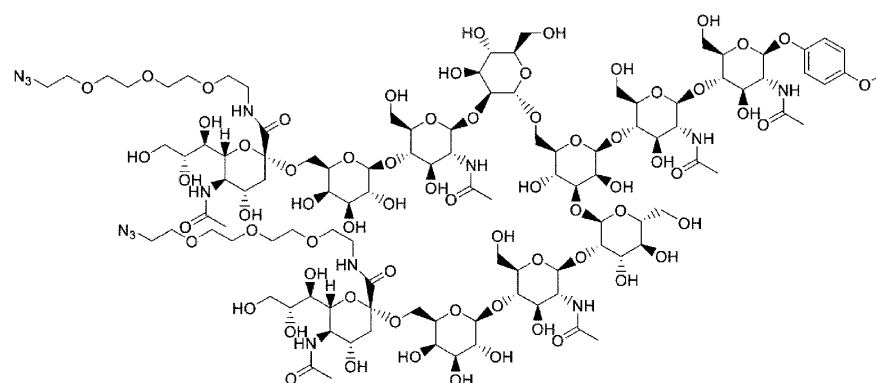
当該単離方法における工程1及び2は、上記において記述してきた本発明に係る製造方法の工程1及び工程2と同一である。したがって、上記工程1及び工程2に関して言及してきたことは、当該単離方法を実施する際にもそのまま適用される。

[0134] <新規糖鎖ドナー分子>

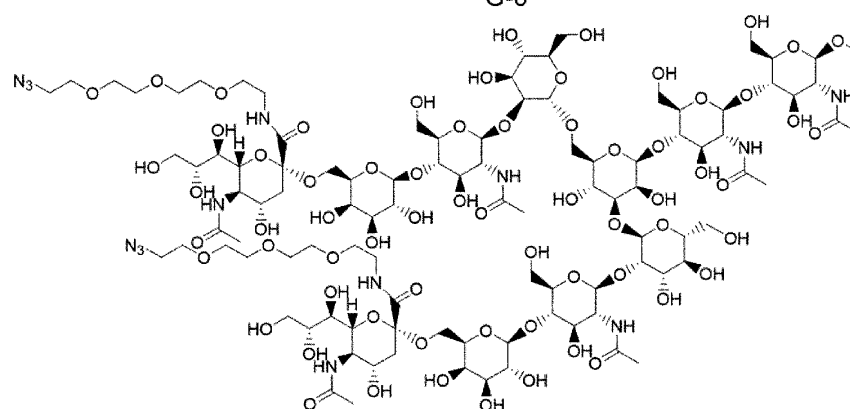
本発明のさらなる別の一態様において、以下の式：

[0135]

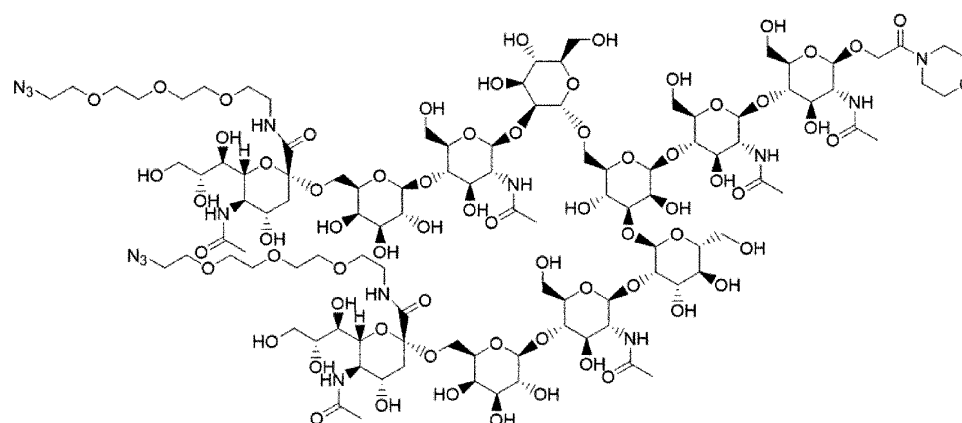
[化25]



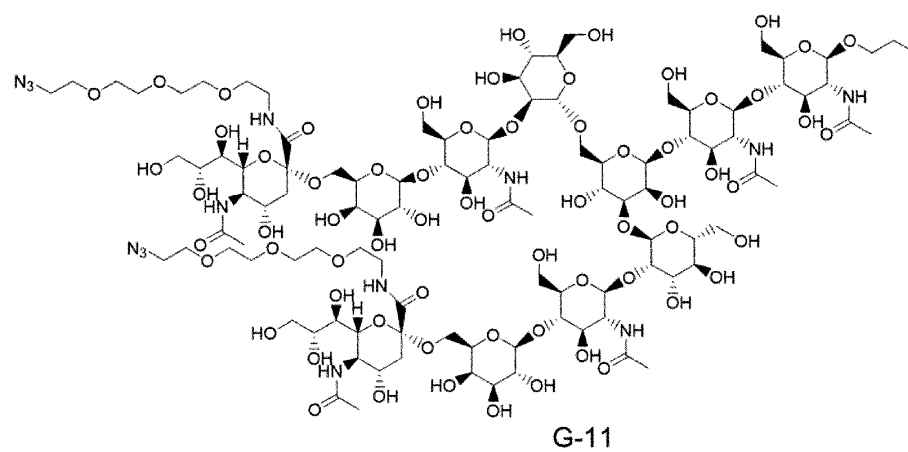
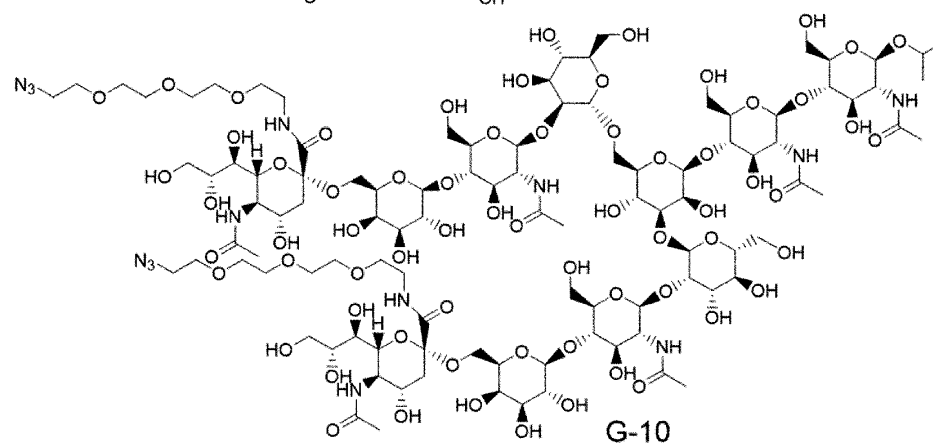
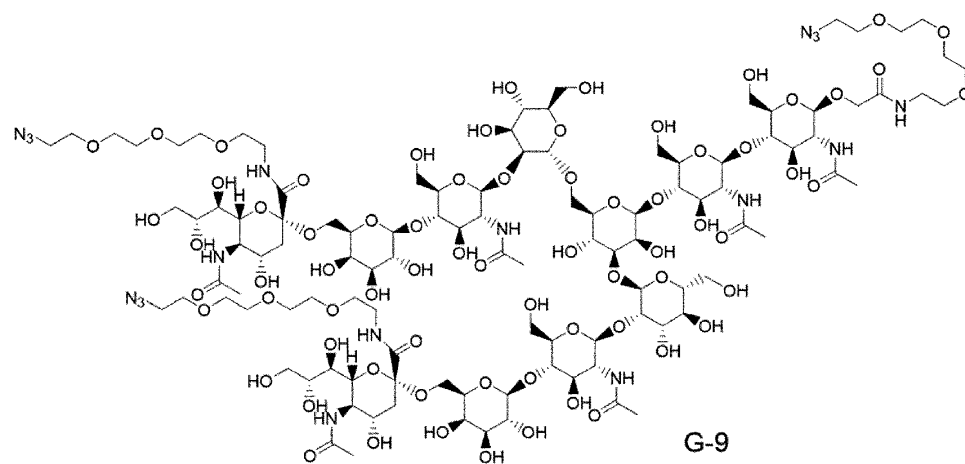
G-6

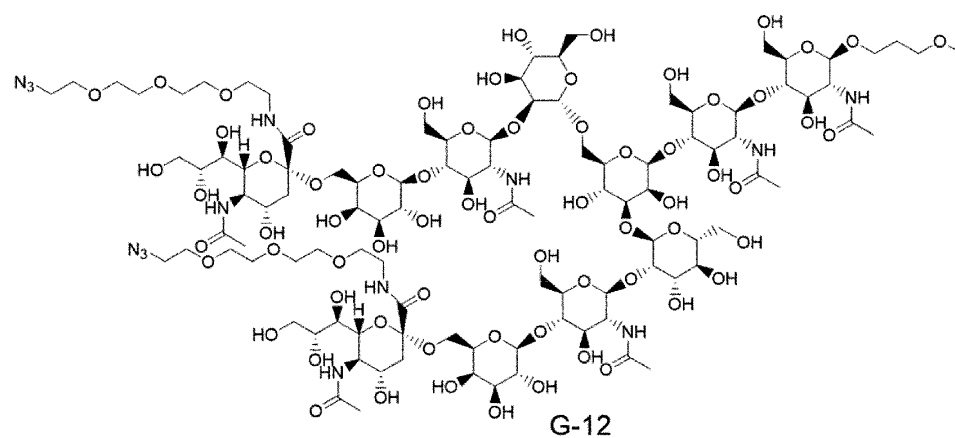


G-7

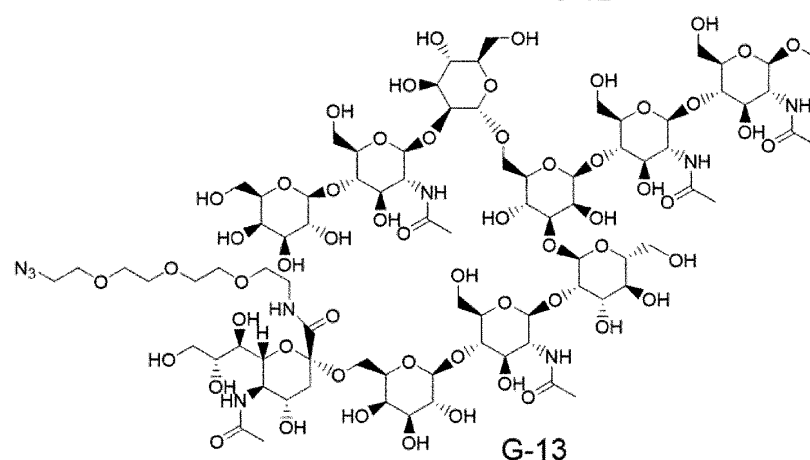


G-8

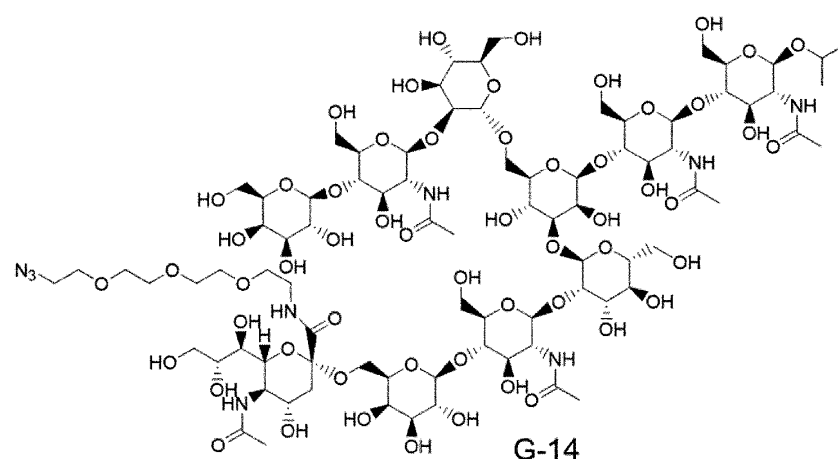




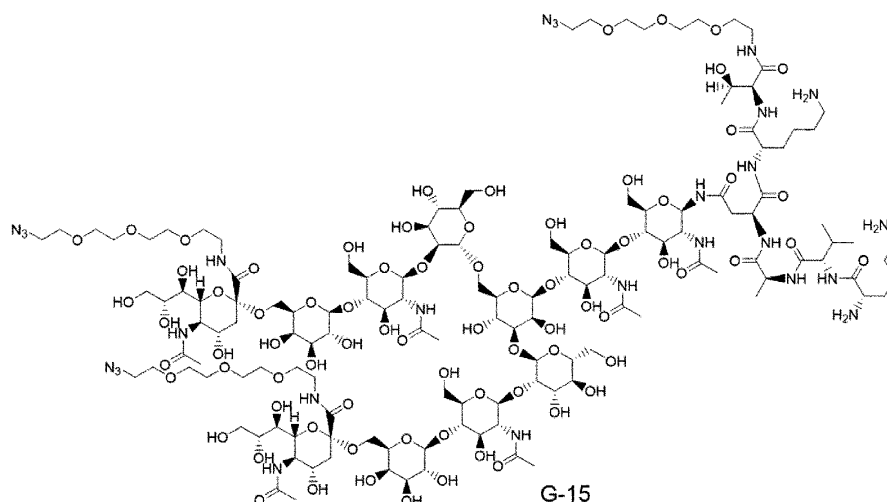
G-12



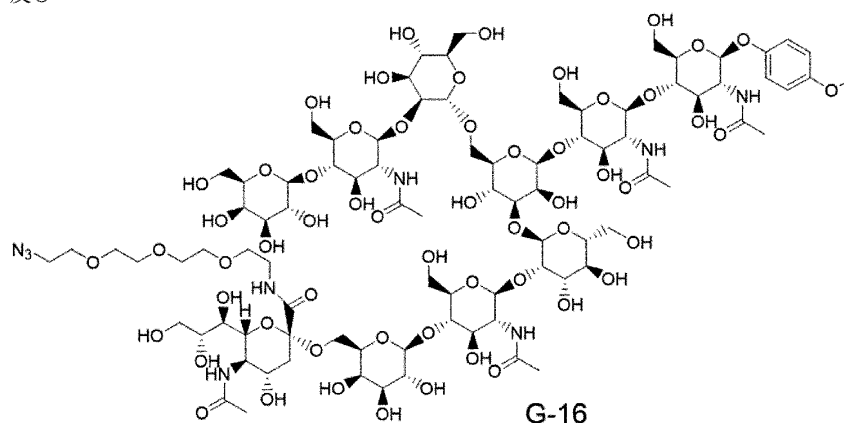
G-13



G-14



及び



からなる群より選択される式によって表される新規糖鎖ドナー分子が提供される。以下の実施例において具体的に記載するとおり、これらの新規糖鎖ドナー分子は、本発明に係る製造方法において好適に使用できることが実証されているが、それ以外の糖鎖リモデリング反応（糖鎖転移反応）にも使用できることが期待できる。本発明に係る製造方法において上記新規糖鎖ドナー分子を使用する場合、各糖鎖ドナー分子は、実施例における試験結果を参照しながら、使用する酵素－Aと酵素－Bの組み合わせに対する相性等を勘案し、適宜決定することが好ましい。

[0136] <抗体－免疫賦活化剤コンジュゲート（R_p，R_p－X₁..._n）の製造方法>

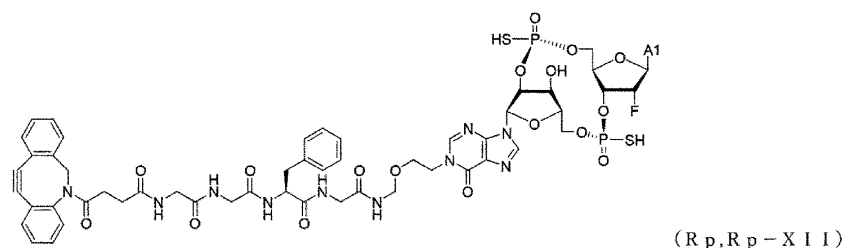
本発明の一態様において、

〔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 l 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、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）及び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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程であって、前記 F c 含有分子が抗体であり、前記糖鎖ドナー分子が式 G - 1 0 によって表される化合物である工程、

〔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、並びに

〔工程 3〕 当該糖鎖のアジド基（N₃-）に、以下の式（R_p, R_p-X I I）:

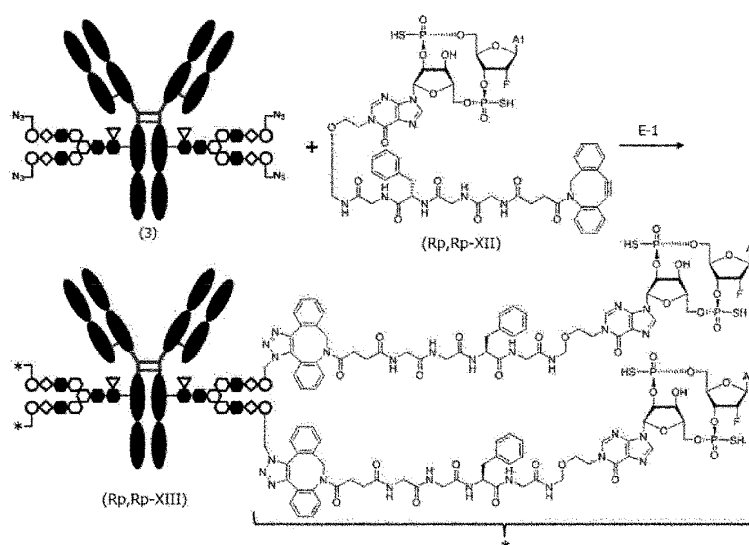
[0137] [化26]



で表される C y c l i c d i n u c l e o t i d e (CDN) コンジュゲート前駆体を環化付加反応により結合させる工程を含む、抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート（R_p, R_p-X I I I）の製造方法が提供される。当該製造方法において、工程 1 及び工程 2 は、上記＜工程 1＞及び＜工程 2＞の章において言及してきたことが、そのまま適用される。したがって、以下において工程 3 及び本発明の方法により製造される抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートについて詳述する。

[0138] 工程 3 は、以下の模式図により示される。

[0139] [化27]



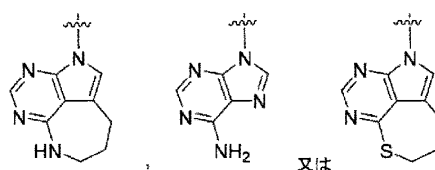
(式中、

(3) は、工程2において得られた、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含有分子を模式的に示したものであり、

抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート (Rp, Rp-XIII) 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CDN-リンカー部分を示し、及び

A1は、

[0140] [化28]



のいずれかを示す)。

[0141] 抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート (Rp, Rp-XIII) は、工程2において得られたFc含有分子(3)とCDNコンジュゲート前駆体 (Rp, Rp-XII) を環化付加反応により結合させ、製造することができる。CDNコンジュゲート前駆体 (Rp, Rp-XII) は、WO2020/0

50406、WO2021/177438、又はWO2022/163846を参照して製造することができる。環化付加反応としては、例えばDiels-Alder反応、及び1,3-双極子環化付加反応が挙げられ、好ましくは1,3-双極子環化付加反応を用いて製造する。1,3-双極子環化付加反応としては、例えば、アジドと末端アルキンとの環化付加反応、及びSPAAC（歪み促進型アジド-アルキン付加環化反応 strain-promoted azide-alkyne cycloaddition: J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15046-15047）反応が挙げられ、好ましくはSPAAC反応を用いて製造する。したがって、本発明の一態様において、工程3は、工程2において得られたFc含有分子(3)とCDNコンジュゲート前駆体(Rp, Rp-XII)を、SPAAC反応により結合させる工程を含む。

[0142] (E-1工程)

以下において、工程3におけるSPAAC反応について記述する。工程2において得られたFc含有分子(3)の緩衝溶液（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等）と、CDNコンジュゲート前駆体(Rp, Rp-XII)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反応を実施できる。CDNコンジュゲート前駆体(Rp, Rp-XII)は、Fc含有分子(3)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、Fc含有分子(3)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。適宜、反応溶液を後述の共通操作Dに記載の方法に従って単離し、抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート(Rp, Rp-XIII)を得ることができる。

[0143] 抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートは、後述の共通操作DからGによってバッファー交換、単離、抗体濃度の測定及び抗体一分子あたりの免疫賦活化剤平均結合数の測定を行い、抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの同定を行うことができる。

[0144] 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－免疫賦活化剤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－免疫賦活化剤コンジュゲート溶液を濃縮できる。

[0145] 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うことができる。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 $1.8\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ）を用いる。

[0146] 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する。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する。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できる。

[0147] 共通操作D：抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの単離（ゲル濾過クロマトグラフィー）

酢酸緩衝液（ $10\text{ mM Acetate Buffer}$, $5\% \text{ Sorbitol}$, 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））を平衡化させる。このNAPカラムに、抗体-免疫賦活化剤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、抗体画分を分取する。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、抗体画分を分取する。この操作を合計2回から3回繰り返すことで、未結合の免疫賦活化剤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-免疫賦活化剤コンジュゲートを得ることができる。必要に応じて、共通操作A及びCにより抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート溶液の濃度を調節できる。

- [0148] 共通操作E：抗体-免疫賦活化剤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免疫賦活化剤平均結合数の測定（UV法）

抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートにおける結合免疫賦活化剤濃度は、WO2020/050406、WO2021/177438に記載の方法に準じて、吸光光度計（UV/VIS Spectrometer Lambda 25, PerkinElmer, Inc.）を用いて、抗体-免疫賦活化剤コンジュゲート水溶液の280nm及び250nmの二波長における吸光度を測定することにより算出することができる。

- [0149] 共通操作F：抗体-免疫賦活化剤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免疫賦活化剤平均結合数の測定（逆相高速液体クロマトグラフィー法：RP-HPLC）

抗体-免疫賦活化剤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免疫賦活化剤平均結合数は、前述の共通操作Eに加え、WO2020/050406、WO2021/177438に記載の方法に準じて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。

- [0150] 共通操作G：抗体-免疫賦活化剤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免疫賦活化剤平均結合数の測定（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-免疫賦活化剤コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あた

りの免疫賦活化剤平均結合数は、前述の共通操作E及びFに加え、WO 2020/050406、WO 2021/177438に記載の方法に準じて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。

[0151] 上記において記述してきた製造方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートもまた、本発明の範囲内である。したがって、本発明は、その一態様において、上記において記述してきた製造方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートを包含する。

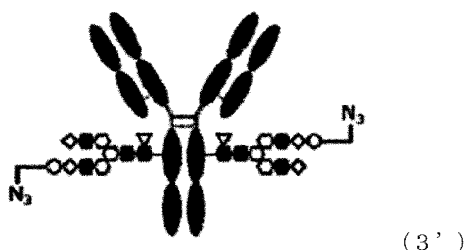
[0152] 本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートには、立体異性体あるいは不斉炭素原子に由来する光学異性体、幾何異性体、互変異性体又はd体、l体、アトロプ異性体等の光学異性体が存在することもあるが、これらの異性体、光学異性体及びこれらの混合物のいずれも本発明に含まれる。

[0153] 本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートにおいて、抗体1分子への免疫賦活化剤の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートの製造は、免疫賦活化剤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、異なる数の免疫賦活化剤が結合した混合物として得られるのが通常である。しかしながら、本発明の方法では、工程1及び2において、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ため、結果的に、免疫賦活化剤の結合数が均一な抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートを高純度で得ることができる。抗体1分子への免疫賦活化剤の結合数は平均値、すなわち、平均免疫賦活化剤結合数(DAR: Drug to Antibody Ratio)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抗体あたりの免疫賦活化剤平均結合数として、1から4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2から4個であり、より好ましくは3から4個、さらに好ましくは3.2から4個、特に好ましくは3.5から4個である。

。

- [0154] 本発明のさらなる別の一態様において、上記〔工程 1〕の糖鎖ドナー分子を式 G-10 の代わりに G-14 を使用すること以外は上記方法と同様にし、1 抗体あたりの免疫賦活化剤平均結合数として、1 から 3 の範囲の環状ジヌクレオチド誘導体を結合させた抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートの製造方法が提供される。この場合、工程 2 において得られる Fc 含有分子は、(3) ではなく、以下の (3') により示される構造を有する。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 抗体あたりの免疫賦活化剤平均結合数は、好ましくは 1.0 から 2.5 個であり、より好ましくは 1.2 ~ 2.2 の範囲である。

[0155] [化29]



- [0156] 本発明の方法により製造される抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートは、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包含される。
- [0157] 本発明の方法により製造される抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートは、アミノ基等の塩基性基を有しているため、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、燐酸塩等の無機酸塩；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、酢酸、りんご酸、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。

[0158] 本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートは、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。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、tert－ブチルアミン塩、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’－ジベンジル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。

[0159] 本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートは、空气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－免疫賦活化剤コンジュゲート中には窒素原子が存在するため、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－免疫賦活化剤コンジュゲートには硫黄原子が存在するため、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。

[0160] また、本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートには、種々の放射性又は非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の方法により製造される抗体－免疫賦活化剤コンジュゲートを構成する原子の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（

125I)又は炭素-14(14C)等を挙げることができる。また、本発明の方法により製造される抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートは、例えば、トリチウム(3H)、ヨウ素-125(125I)又は炭素-14(14C)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、治療又は予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体-免疫賦活化剤コンジュゲートの全ての同位体変異種は、放射性である与否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

[0161] <酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質及び当該融合タンパク質を用いたFc含有分子の製造方法>

本発明のさらなる一態様において、酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質が提供される。本明細書において、酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質とは、酵素-Aと酵素-Bが直接的又は間接的に結合している状態のタンパク質を意味する。本発明の一態様において、酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質は、酵素-Aと酵素-Bの両方が任意の固相担体に固定化された固定化酵素であり、また、本発明の別の態様において、酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質は、酵素-Aと酵素-Bとが直接結合されているか、あるいは、任意のリンカー、例えば、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を介して結合されている融合タンパク質である。酵素-Aと酵素-Bの融合タンパク質において使用される酵素-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。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。

[0162] [表3]

	[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]

[0163] 酵素－Aと酵素－Bの融合タンパク質は、Fc含有分子の製造において使用される場合、製造工程において調製・準備すべき酵素の数を減らせる等といった利点をもたらす得、これは、本発明の工程2とは独立して得られる利点である。よって、本発明の一態様において、以下の工程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GlcNAcを有するFc含有分子であるアクセプター分子と、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）と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）の融合タンパク質の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、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。当該工程1'において使用されるアクセプター分子や糖鎖ドナー分子や、反応条件等は、いずれも上記において工程1について説明してきたものをそのまま適用できる。また、工程1'に工程2を後続させることで、より高い糖鎖転移率を達成することもできる。

実施例

[0164] 以下、実施例を用いて、本発明を具体的に説明する。実施例に示されたものは、本発明の実施形態の一例であり、本発明はこれに限定されるものではない。

[0165] 本明細書に記載されているタンパク質濃度は、超微量分光光度計Nano Drop8000（Thermo Fisher Scientific製）、あるいは紫外可視分光光度計システムSoloVPE（C Technologies製）を用いて定量した。

実施例中のSGP（シアリルグリコペプチド）は、WO2017110984の実施例1に記載された方法、あるいは、WO2014208742の実施例1に記載された方法で作製できる。実施例中のAG(9)－Pは、WO2014115797の実施例1－17の工程1－17Aに記載された方法で作製できる。実施例中のAG(7)－Pは、WO2014115797

の実施例 1-17 の工程 1-17 B に記載された方法で作製できる。

実施例中の $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-Asn-PEG(3)-N_3$ は、WO 2018003983 の実施例 1-12、工程 1-12 A に記載された方法で作製できる。実施例中の $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-N_3$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-N_3$ は、WO 2019065964 の実施例 154 の工程 3 に記載された方法で作製できる。

実施例中の mAb1 は、Trastuzumab を示す。 $(Fuc\alpha 1, 6)GlcNAc-mAb1$ は、WO 2017010559 の実施例 3 に記載された方法で作製できる Trastuzumab の糖鎖加水分解体を示す。実施例中の mAb2 は、WO 2019065964 の実施例 136 に記載された方法及び WO 2019065964 内の配列番号 36 及び 52 で作製できる抗体を示す。 $(Fuc\alpha 1, 6)GlcNAc-mAb2$ は、WO 2019065964 の実施例 61 の工程 1 に記載された方法で作製できる糖鎖加水分解体 $(Fuc\alpha 1, 6)GlcNAc$ -抗 CLDN6 抗体 (H1L1) を示す。実施例中 $mAb2-[MSG1-N_3]_2$ は、WO 2019065964 の実施例 61 の工程 2 に記載された方法で作製できる抗 CLDN6 抗体 (H1L1) $-[MSG1-N_3]_2$ を示す。実施例中の mAb3 は、WO 2020050406 の参考例 5 に記載された方法及び WO 2020050406 内の配列番号 28 及び 30 で作製できる改変 HER2 抗体 2 を示す。 $(Fuc\alpha 1, 6)GlcNAc-mAb3$ は、WO 2020050406 の実施例 85 の工程 1 に記載された方法で作製できる糖鎖加水分解体 $(Fuc\alpha 1, 6)GlcNAc$ -改変抗 HER2 抗体 2 を示す。実施例中 $mAb3-[SG-N_3]_2$ は、WO 2020050406 の実施例 85 の工程 2 に記載された方法で作製できる改変抗 HER2 抗体 $-[MSG1-N_3]_2$ を示す。

糖鎖加水分解、及び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 (WO 2013/120066、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。

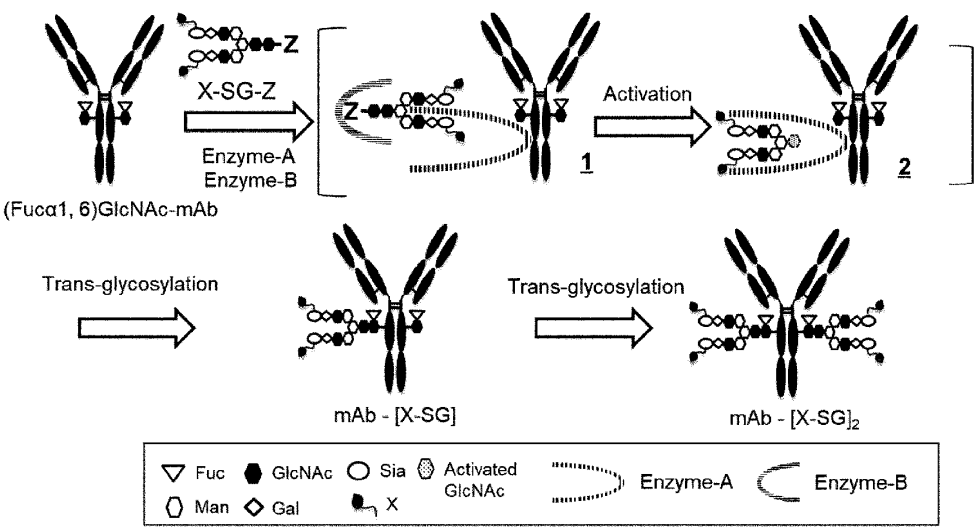
[0166] <実施例1> 酵素-Aと酵素-Bの選択方法

酵素-Aと酵素-Bが協奏的に働くと、化学的に活性化されていない糖鎖ドナー分子から、その糖鎖ユニットの、Fc含有分子のGlcNAc（アクセプター分子）への直接転移が可能となる。本実施例では、酵素-Aは、Fc含有分子と親和性のあるドメインと、糖鎖と親和性のあるドメインと、糖鎖転移反応触媒領域を有する酵素であり、また、酵素-Bは、フコースを有さない2分岐糖鎖ドナー分子から、酵素-AがFc含有分子への糖鎖転移反応に利用可能な状態（活性化中間体）に活性化する酵素である（以下の模式図又は図1参照）。実施例8以降で組み合わせることができる酵素-Aと酵素-Bの一般的な性質、効果的な反応条件を確認するため、実施例2から実施例6で調製する酵素を、以下の表Y-1にデザインした。

それぞれの役割を果たす酵素-Aと酵素-Bであれば、酵素種は限定されず、それらを任意に組み合わせることで、所望の糖鎖転移体を得ることができる。

酵素-Aの代表例として、加水分解活性は残存するものの、対応するそれぞれの野生型酵素よりも加水分解活性が抑えられていることが期待できるEndo-S変異体の代表例、Endo-S2変異体の代表例、及びEndo-Si変異体の代表例を選択した。酵素-B自身の糖鎖転移活性は、糖鎖ドナー活性化能力と相関があると考えられることから、酵素-Bの代表例として、フコースを有さない2分岐糖鎖ドナー分子であるSGPからGlcNAc誘導体への糖鎖転移活性が知られているEndo-M変異体の代表例、及びEndo-Rp変異体の代表例を選択した。

[0167] [化30]



[0168] 上記模式図及び図 1 中、シアル酸上のXは、水素原子を含む任意の置換基を示す。例えば、Xは、PEG－azideである。図中、糖鎖還元末端のZは、任意の置換基であり、好ましくは、窒素原子あるいは酸素原子を介して結合されるNHR、ORで示される。例えば、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置換基である。

[0169] [表4]

	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		

表 Y－1. 実施例 2 から実施例 6 で調製する酵素

[0170] <実施例2> E n d o - S i 酵素の調製

(実施例2-1) E n d o - S i 酵素の発現

配列番号3に対応する遺伝子をコードしたE n d o - S i 発現プラスミドをメタノール資化性酵母*Ogataea minuta*に導入することで、E n d o - S i 産生株を得た。続いて、振盪培養条件下又は通気攪拌培養条件下でのメタノール誘導によるE n d o - S i タンパク質の発現を行った。振盪培養の場合、500ml容バッフルフラスコ(CORNING, 431401)を用いて、植菌後1日目にメタノール誘導、植菌後3日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。通気攪拌培養の場合、3L培養槽(エイブル, BMS-03KP3加圧型)を用いて、植菌後1日目にメタノール誘導、植菌後2日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。

[0171] (実施例2-2) E n d o - S i 酵素の精製

実施例2-1で集菌した菌体を、Yeast Buster Protein Extraction Reagent (Merck, 71186)又は高圧ホモジナイザーを用いて破碎し、遠心分離を行った上清をC a p t o C h e l a t i n g、C a p t o D E A E及びC a p t o P h e n y l I m p R e s (C y t i v a)を組み合わせて精製した。最後にA m i c o n U l t r a - 1 5, 3 0 k D a (M e r c k)でPBS(-) (富士フイルム和光純薬)にバッファーを置換して酵素液を得た。

[0172] [表5]

表Z1. E n d o - S i 酵素溶液

酵素-A溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
Si-001-1	D241M Q311L	3.98	5.3
Si-001-2	D241M Q311L	4.07	225.5
Si-002	D241Q	3.99	4.8
Si-003	D241Q E360Q	3.95	13.1
Si-004	D241M	3.99	6.1
Si-005	D241Q Q311L	3.98	11.6
Si-006	D241M E360Q	3.96	6.9
Si-007	Wild Type (WT)	4.02	27.5

[0173] <実施例3> E n d o - R p 酵素の調製

(実施例 3-1) Endo-Rp 酵素の発現

配列番号 5 に対応する遺伝子をコードした Endo-Rp 発現プラスミドをメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* に導入することで、Endo-Rp 産生株を得た。続いて、振盪培養条件下又は通気攪拌培養条件下でのメタノール誘導による Endo-Rp タンパク質の発現を行った。振盪培養の場合、1000 ml 容バッフルフラスコ (CORNING, 431403) を用いて、植菌後 1 日目にメタノール誘導、植菌後 2 日目か 3 日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。通気攪拌培養の場合、3 L 培養槽 (エイブル, BMS-03KP3 加圧型) を用いて、植菌後 1 日目にメタノール誘導、植菌後 4 日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。

[0174] (実施例 3-2) Endo-Rp 酵素の精製

実施例 3-1 で集菌した菌体を Yeast Buster Protein Extraction Reagent (Merck, 71186) 又は高圧ホモジナイザーを用いて破碎し、遠心分離を行った上清を Cpto Chelating、POROS 50 HQ (Thermo Fisher Scientific) 及び Cpto MMC (Cytiva) のいずれか二つ、あるいは全てを使用して精製し、酵素液を得た。一部については、Amicon Ultra-15, 30 kDa (Merck) での濃縮あるいはバッファー交換を行い、酵素液を得た。

[0175] [表6]

表 Z 2. Endo-Rp 酵素溶液

酵素-B 溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
Rp-001-1	N172H	2.79	2.7
Rp-001-2	N172H	2.80	15.3
Rp-001-3	N172H	4.07	86.1
Rp-002	N172Q	3.84	3.5
Rp-003	N172V	2.89	4.24

[0176] <実施例 4> Endo-S2 酵素の調製

(実施例 4-1) Endo-S2 酵素の発現

配列番号2に対応する遺伝子をコードしたE n d o - S 2発現プラスミドをメタノール資化性酵母O g a t a e a m i n u t aに導入することで、E n d o - S 2産生株を得た。続いて、振盪培養条件下でのメタノール誘導によるE n d o - S 2タンパク質の発現を行った。振盪培養には1000ml容バッフルフラスコ(CORNING, 431403)を用いて、植菌後1日目にメタノール誘導、植菌後3日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。

[0177] (実施例4-2) E n d o - S 2酵素の精製

実施例4-1で集菌した菌体を、Y e a s t B u s t e r P r o t e i n E x t r a c t i o n R e a g e n t (M e r c k, 71186)を用いて破碎し、遠心分離を行った上清をC a p t o C h e l a t i n gを用いて精製した。最後にA m i c o n U l t r a - 1 5, 3 0 k D a (M e r c k)でPBS(-) (富士フイルム和光純薬)にバッファーを置換して酵素液を得た。

[0178] [表7]

表Z3. E n d o - S 2酵素溶液

酵素-A溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
S2-001	D184M	4.00	1.54
S2-002	T138Q	4.00	0.75
S2-003	Wild Type (WT)	3.74	1.8

[0179] <実施例5> E n d o - S 酵素の調製

(実施例5-1) E n d o - S 酵素の発現

配列番号1に対応する遺伝子をコードしたE n d o - S発現プラスミドをメタノール資化性酵母O g a t a e a m i n u t aに導入することで、E n d o - S産生株を得た。続いて、通気攪拌培養条件下でのメタノール誘導によるE n d o - S蛋白質の発現を行った。42L培養槽(I n f o r s H T)を用いて、植菌後一日目にメタノール誘導、植菌後4日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。

[0180] (実施例5-2) E n d o - S 酵素の精製

実施例5-1で集菌した菌体を高圧ホモジナイザーにより破碎し、遠心分

離を行った上清をC a p t o C h e l a t i n g、C a p t o M M C (C y t i v a)、及びP O R O S 5 0 H Q (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)を用いた精製を組み合わせで精製した。最後にP e l l i c o n 3 c a s s e t t e, 3 0 k D a (M e r c k)でP B S (－) (M e r c k)にバッファーを置換して酵素液を得た。

[0181] [表8]

表Z 4. E n d o－S酵素溶液

酵素-A溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
S-001	D233Q E350Q	3.9	863.6
S-002	Wild Type (WT)	4.1	2021.2

[0182] <実施例6> E n d o－M酵素の調製

(実施例6－1) E n d o－M酵素の発現

配列番号4に対応する遺伝子をコードしたE n d o－M発現プラスミドをメタノール資化性酵母O g a t a e a m i n u t aに導入することで、E n d o－M産生株を得た。続いて、通気攪拌培養条件下でのメタノール誘導によるE n d o－Mタンパク質の発現を行った。通気攪拌培養には3 L培養槽（エイブル、B M S－0 3 K P 3加圧型）を用いて、植菌後1日目にメタノール誘導、植菌後2日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。

[0183] (実施例6－2) E n d o－M酵素の精製

実施例6－1で集菌した菌体をY e a s t B u s t e r P r o t e i n E x t r a c t i o n R e a g e n t (M e r c k, 7 1 1 8 6)を用いて破碎し、遠心分離を行った上清をC a p t o C h e l a t i n g及びC a p t o D E A E (C y t i v a)で精製した。最後にバッファー組成を5 0 m M T r i s, 1 5 0 m M N a C l, 3 0 % G l y c e r o l, p H 8. 0とし、酵素液を得た。

[0184] [表9]

表Z 5. E n d o－M酵素溶液

酵素-B溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
M-001	N175Q	4.14	7.0
M-002	N175Q Y217F	4.06	14.8

[0185] <実施例7>糖鎖供与体の合成

本発明の糖鎖供与体は、後述する方法（糖鎖原料、あるいは糖鎖中間体の酵素変換、及び化学変換）に従って製造することができる。各反応終了後、各反応の目的化合物は常法に従って、反応混合物から採取される。例えば、反応混合物を適宜中和し、また、不溶物が存在する場合にはろ過により除去し、溶剤を留去することによって得られる。得られた化合物は、必要ならば、常法、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーで分離・精製することができる。あるいは、再沈殿、再結晶、限外ろ過により精製することができる。

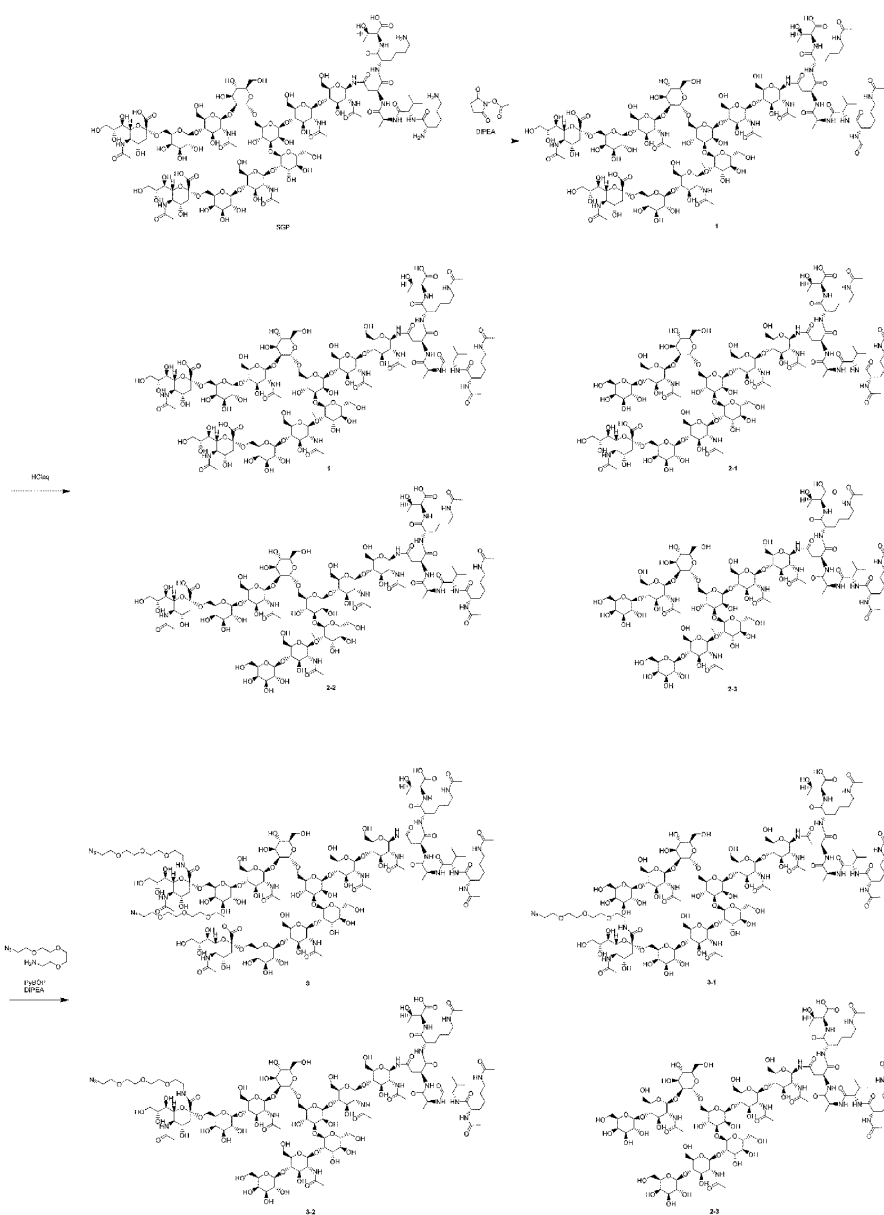
本明細書に記載されている糖鎖誘導体の質量は、次の方法で確認した。装置には、Q Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc製)、Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc製) 及びCORETECS UPLC C18 (Waters Inc製) (1.6 μ m、2.1 x 50mm) を使用し、移動相Aにはアセトニトリル、移動相Bには0.1%ギ酸添加水溶液を利用し、移動相Aが4分間で2%から95%に変化するグラジエントにて使用し、流速0.4 mL/min、40°Cにて分析した。

又は、装置には、Xevo G2-XS Family mass spectrometer (Waters製)、ACQUITY BEH C18 (Waters製) (1.7 μ m、2.1 x 50mm) を使用し、移動相Aにはアセトニトリル、移動相Bには10mM酢酸アンモニウム水溶液を利用し、移動相Aが5分間で1%から30%に変化するグラジエントにて使用し、流速0.8 mL/min、40°Cにて分析した。

[0186] (実施例7-1) 糖鎖供与体原料（糖鎖原料3，糖鎖原料3-1）の合成
(合成スキーム)

[0187]

[化31]



[0188] (7-1 a) [N-アセチル化及び加水分解反応]

SGP (G-1) (25.0 g) を精製水 (100 mL) に溶解し、アセトニトリル (50 mL) に溶解した N, N-ジイソプロピルエチルアミン (6.77 g)、アセトニトリル (50 mL) に溶解した N-(アセトキシカルボニルオキシ) スクシンイミド (8.22 g) を順次加えて、室温で 2 時

間攪拌した。反応終了を確認した後、水酸化ナトリウム水溶液（5 N、25 mL）を加え、1時間攪拌した。

この液を冷却後、pHメーターで確認しながら、塩酸（5 N、36.6 g）を加え、pH 2.20に調整した後、温度を57–59℃に保ち、3時間半攪拌した。室温に冷却した後、pHメーターで確認しながら水酸化ナトリウム水溶液（5 N、25 mL）を加え、pH 5.98に調整した。

[0189] [精製]

pH 5.98に調整した液のうちSGP 14 g分に相当する分を、SEPHADEX G-25 Fine（GEヘルスケアジャパン）を用いて精製した（溶出液には精製水を用いた）。目的物を含むフラクションを回収し、減圧濃縮及び凍結乾燥により、糖鎖原料1、糖鎖原料2-1、糖鎖原料2-2、糖鎖原料2-3の混合物である固形物（13.5 g）を得た。

[0190] (7-1 b) [縮合反応]

工程（7-1 a）で得られた固形物（11.0 g）をDMF（121.0 mL）、DMSO（33.0 mL）に溶解し、N、N-ジイソプロピルエチルアミン（3.16 g、24.4 mmol）、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン（5.33 g、24.4 mmol）を順次加え、-7℃に冷却した。この混合液に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（12.72 g、24.4 mmol）のDMF（22.0 mL）溶液を15分かけて加えた後、-5℃付近で1時間攪拌した

[0191] [粗精製]

反応終了後、反応液を室温に上げ、エタノール（550 mL）に滴下した。さらに反応容器をエタノール（110 mL）で洗浄し、洗いこんだ。生じたスラリーをろ取し、ケーキをエタノール（110 mL）で洗浄した後、室温で減圧乾燥を行い、反応粗体15.7 gを得た。

この反応粗体に精製水（198 g）を加え溶解した。わずかに残った残渣をろ過して除き、得られたろ液を減圧濃縮した後、精製水で88 gに調整し

た。この水溶液をエタノール（５５０ｍＬ）に滴下し、さらに水溶液を精製水（２２ｍＬ）で洗いこんだ。生じたスラリーをろ取し、ケーキをエタノール（２７５ｍＬ）と精製水（５５ｍＬ）の混合液で洗浄することで湿固体（１６２．０ｇ）を得た。これを精製水（２２０ｍＬ）に溶解した後、減圧濃縮により半分量に濃縮し、エタノールを除去した。これを凍結乾燥することにより、糖鎖原料３、糖鎖原料３－１、糖鎖原料３－２、糖鎖原料２－３の混合物である粗体（８．８１ｇ）を得た。

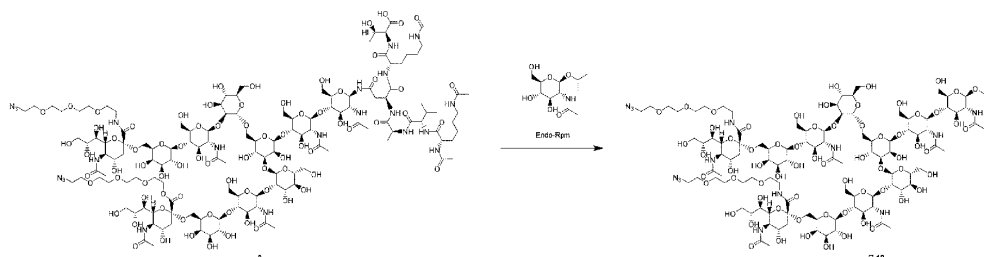
[0192]（７－１ｃ）[Triart C18を用いた、糖鎖原料３と糖鎖原料３－１の分取]

工程（７－１ｂ）に記載された方法で得たスケールが異なる２つのロットの混合品、すなわち、糖鎖原料３、糖鎖原料３－１、糖鎖原料３－２、糖鎖原料２－３の混合物である粗体（計１０．０５ｇ）を、アセトニトリルと精製水を溶離液とし、装置にはK-Prep Lab 100G（ワイエムシ社製）、カラムにはTriart C18（ワイエムシ社製）を使用し、分離精製を行った。UV検出（２１０nm）によって検出されたメインピークを回収し、減圧濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥し、目的化合物 糖鎖原料３（２．０９ｇ）、目的化合物 糖鎖原料３－１（２．０２ｇ）を白色粉末として得た。

[0193]（実施例７－５）糖鎖供与体の合成（G-10）

G-10の合成方法１

[0194] [化32]



[0195]（７－５－１）[糖鎖交換反応]

工程（７－１ｃ）で得た糖鎖原料３（２００mg）及び１-Methyl

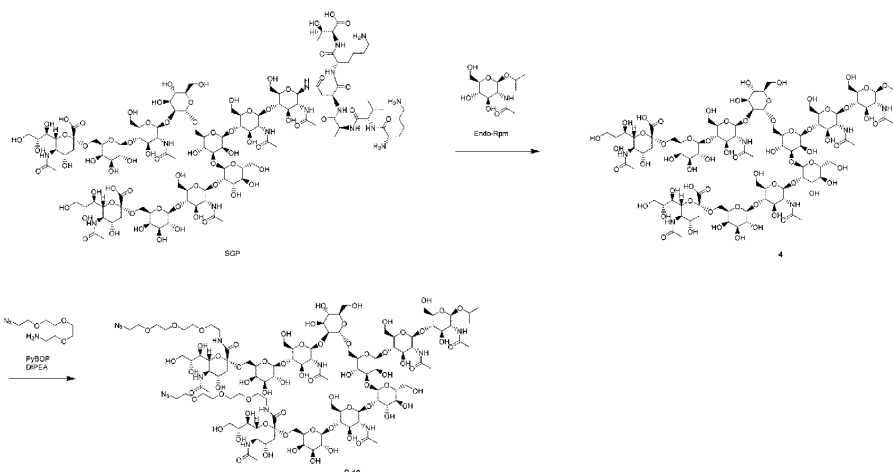
ethyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (733mg、50equiv) をリン酸緩衝液 (0.5mL、pH6.7、0.2mol/L) に溶解した後、50℃に加温した。この混合溶液にEndo-Rp N172Q (1.3mg) を加え、そのままの温度で90時間振とうした。

[0196] [精製]

反応終了後、室温にて反応液に精製水8mLを加えたのち、不溶物をろ過して除いた。このろ液を、アセトニトリルと水を溶離液として、カラムにYMC-Actus Triart C18 (ワイエムシ社製) を用いて分離精製を行った。UV検出 (210nm) によって検出されたメインピークを回収し、減圧濃縮、凍結乾燥により目的物G-10 (82mg) を得た。
ESI-MS: Calcd for C₁₀₃H₁₇₆N₁₄O₆₆:
[M+2H]²⁺ 1333.5496 (most abundant mass), Found 1333.5450

[0197] G-10の合成方法2

[0198] [化33]



[0199] (7-5-2a) [糖鎖交換反応]

SGP (G-1) (20.0g) 及び 1-Methylethyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- β -D-glucopyr

anoside (36.8 g, 20 equiv) をリン酸緩衝液 (280 mL, pH 5.5, 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。

[0200] [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 Sartocon 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。

[0201] (7-5-2b) [縮合反応]

工程 (7-5-2a) 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。

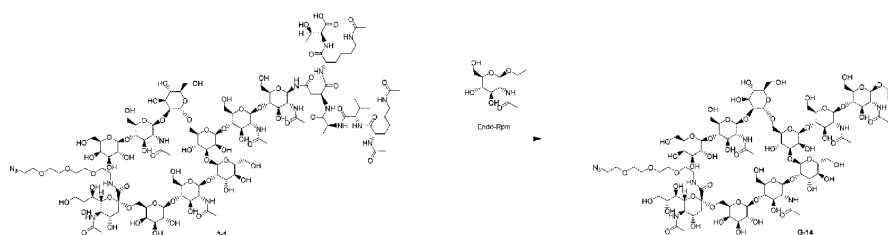
[0202] [精製]

反応後、反応液を精製水で希釈した後、Sartocon 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。

[0203] (実施例7-9) 糖鎖供与体の合成 (G-14)

G-14の合成方法1

[0204] [化34]



[0205] (7-9-1) [糖鎖交換反応]

工程(7-1c)で合成した糖鎖原料3-1(400mg)、1-Methyl ethyl 2-(acetyl amino)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside(679mg、20equiv)及びEndo-Rp N172Q(4.2mg)をリン酸緩衝液(13.0mL、pH6.8、0.2mol/L)中で50℃に加温した。そのままの温度で6日間振とうした。

[0206] [精製]

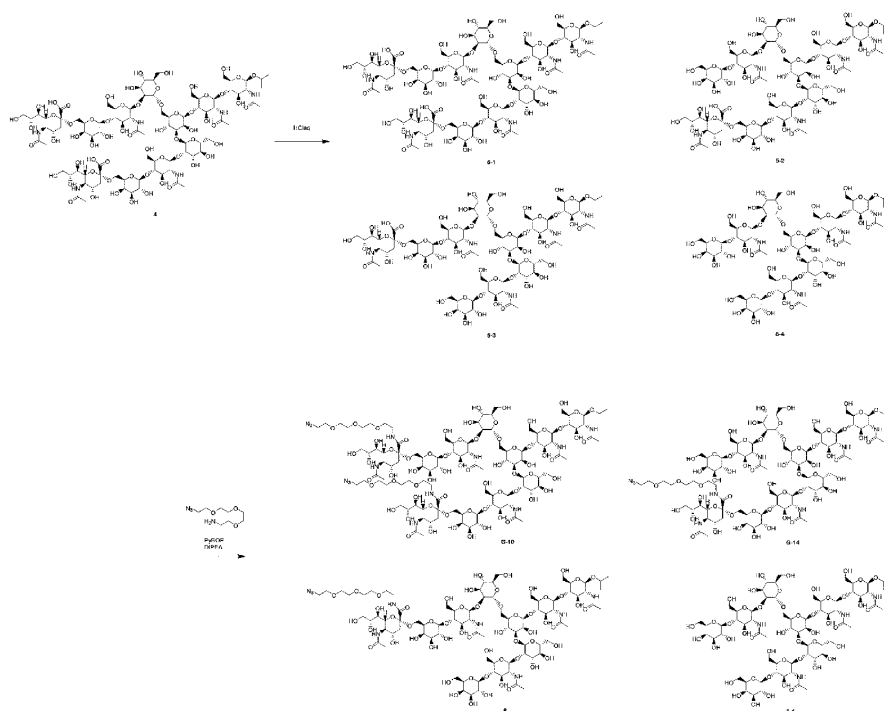
反応終了後、室温にて反応液を精製水で希釈し、不溶物をろ過して除いた。Vivaspin 15R, 2,000 MWCO Hydrosart (Sartorius)で精製し濃縮した。この濃縮液を、アセトニトリルと水を溶離液とし、カラムにはSfaer C18 (バイオタージ社製)を用いて分離精製を行った。UV検出(210nm)によって検出されたメインピークを回収し、減圧濃縮し、目的化合物G-14(174mg)を得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{84}H_{143}N_9O_{56}$: $[M+2H]^{2+}$ 1087.9382 (most abundant mass), Found 1087.9357

[0207] G-14の合成方法2

[0208]

[化35]



[0209] (7-9-2 a) [加水分解反応]

工程(7-5-2 a)で得た固形物4(1.0g)に水(20mL)を加えて溶解した後、希塩酸(1.0mol/L)を用いてpHを2.5に調整した。この水溶液を60℃に加温し、そのままの温度で90分攪拌した。

[0210] [精製]

反応終了後、室温に冷却した後、NaOH水溶液(1mol/L)を用いてpH7.0に調整した。Sartoon Hydrosart-2kDa(Sartorius)を用いて精製した後、凍結乾燥により糖鎖原料5-1、糖鎖原料5-2、糖鎖原料5-3、糖鎖原料5-4の混合物である固形物(1.06g)を得た。

[0211] (7-9-2 b) [縮合反応]

工程(7-9-2 a)で得た糖鎖原料5-1、糖鎖原料5-2、糖鎖原料5-3、糖鎖原料5-4の混合物である固形物(0.8g)にDMF(8.0mL)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.13g、1.0mmol)

o l) を加え、0℃に冷却した。このスラリー溶液に、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (0.23 g、1.0 mmol) と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 (0.55 g、1.0 mmol) を順次加えた。0℃で30分攪拌した後、室温にて1.5時間攪拌した。スラリーが溶解しないため、再度、0℃に冷却しN, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.13 g、1.0 mmol)、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (0.23 g、1.0 mmol)、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 (0.55 mg、1.0 mmol) を順次加えた。室温にて13.5時間攪拌した後、0℃に冷却し、さらに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 (0.41 g、0.78 mmol)、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (57 mg、0.26 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (33 mg、0.26 mmol) を順次加えた。室温で1時間攪拌し、水 (68 mL) を加え反応を停止し、G-14、G-10、糖鎖原料6、糖鎖原料5-4を含む反応液を得た。

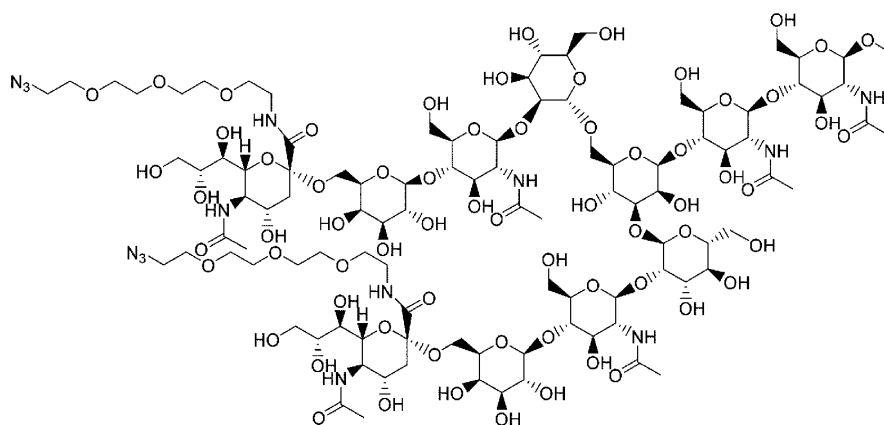
[0212] [精製]

この反応液を精製水でさらに希釈した後、Sartocon Hydro sart-2 kDa (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Triart C18 (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、減圧濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥し、目的化合物G-14 (98 mg) を白色粉末として得た。

(実施例7-2) 糖鎖供与体の合成 (G-7)

[0213]

[化36]

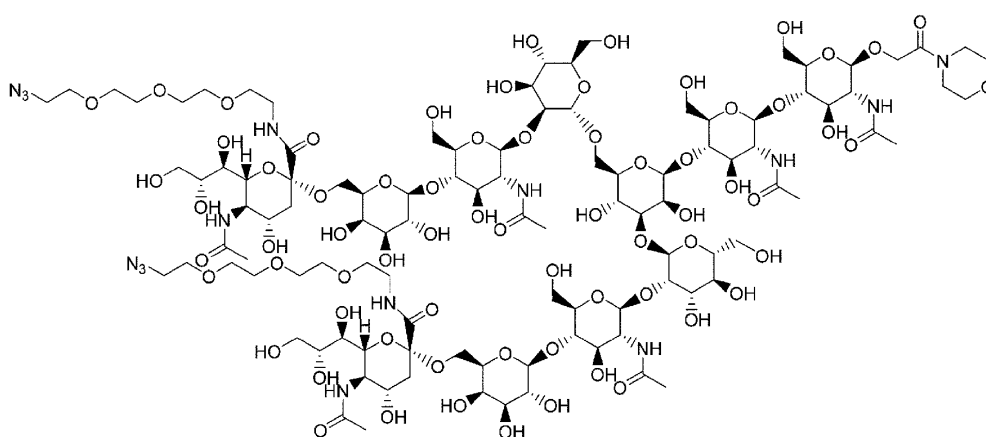


[0214] 工程 (7-1c) で合成した糖鎖3 (200mg) 及びMethyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (655mg, 50equiv) を用いて、「G-10の合成方法1」に記載した工程 (7-5-1) と同様の方法で、G-7 (64.9mg) を得た。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₁H₁₇₂N₁₄O₆₆:
 [M+2H]²⁺ 1319.5340 (most abundant mass), Found 1319.5292

[0215] (実施例7-3) 糖鎖供与体の合成 (G-8)

[0216] [化37]



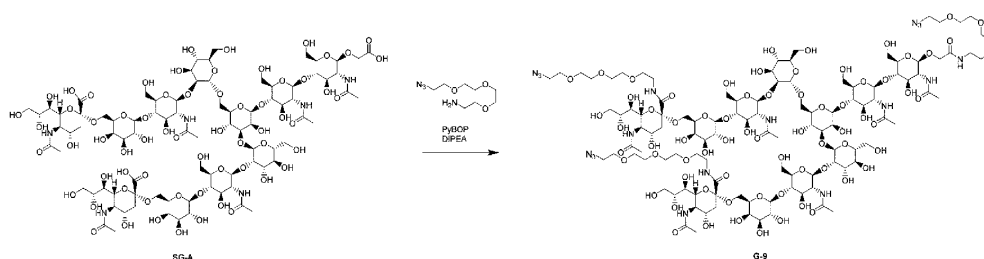
[0217] 工程 (7-1c) で合成した糖鎖3 (100mg) 及び2-(Morph

olin-4-yl)-2-oxoethyl 2-(acetlylamin
no)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (19
4mg、20equiv) を用いて、「G-10の合成方法1」に記載した
工程(7-5-1)と同様の方法で、G-7(32.0mg)を得た。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₆H₁₇₉N₁₅O₆₈:
[M+2H]²⁺ 1376.0578 (most abundant m
ass), Found 1376.0525

[0218] (実施例7-4) 糖鎖供与体の合成(G-9)

[0219] [化38]



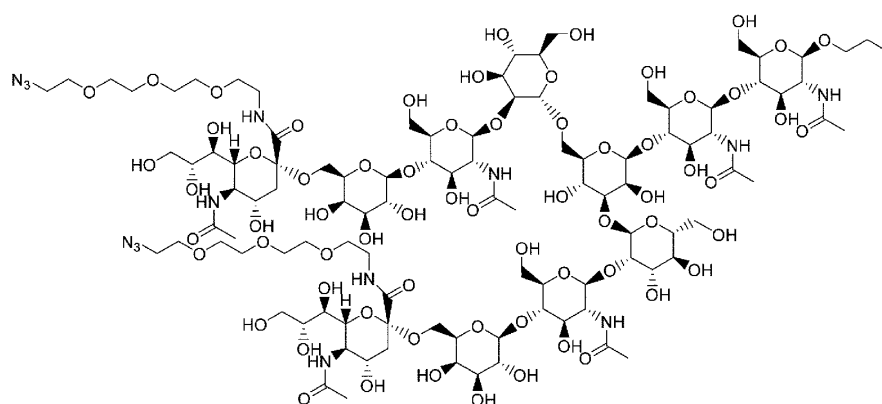
[0220] 原料としてSG-A(30mg)を使用すること以外は、「G-10の合
成方法2」に記載した工程(7-5-2b)と同様の方法で、G-9(23
.8 mg)を得た。

ESI-MS: Calcd for C₁₁₀H₁₈₈N₁₈O₇₀:
[M+2H]²⁺ 1441.5925 (most abundant m
ass), Found 1733.78.

[0221] (実施例7-6) 糖鎖供与体の合成(G-11)

[0222]

[化39]

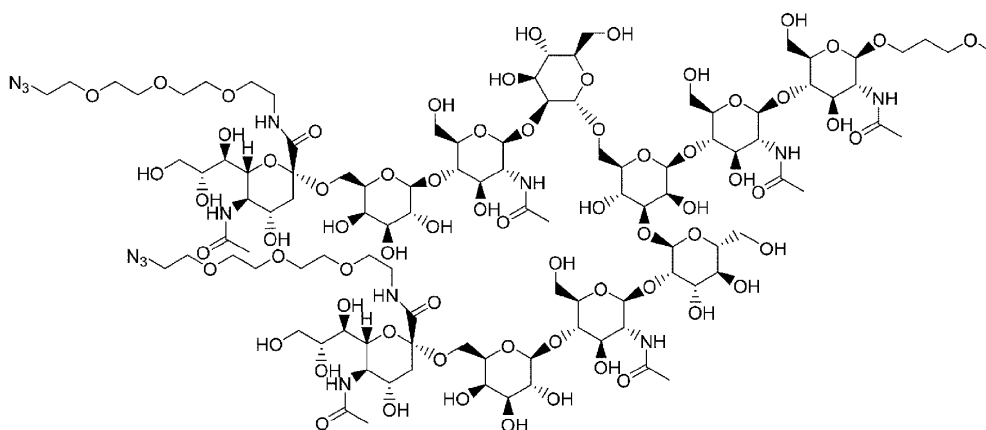


[0223] 工程(7-1c)で合成した糖鎖3(200mg)及びPropyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranoside(733mg、50equiv)を用いて、「G-10の合成方法1」に記載した工程(7-5-1)と同様の方法で、G-11(80.9mg)を得た。

ESI-MS: Calcd for C₁₀₃H₁₇₆N₁₄O₆₆:
[M+2H]²⁺ 1333.5496 (most abundant mass), Found 1333.5471

[0224] (実施例7-7) 糖鎖供与体の合成(G-12)

[0225] [化40]



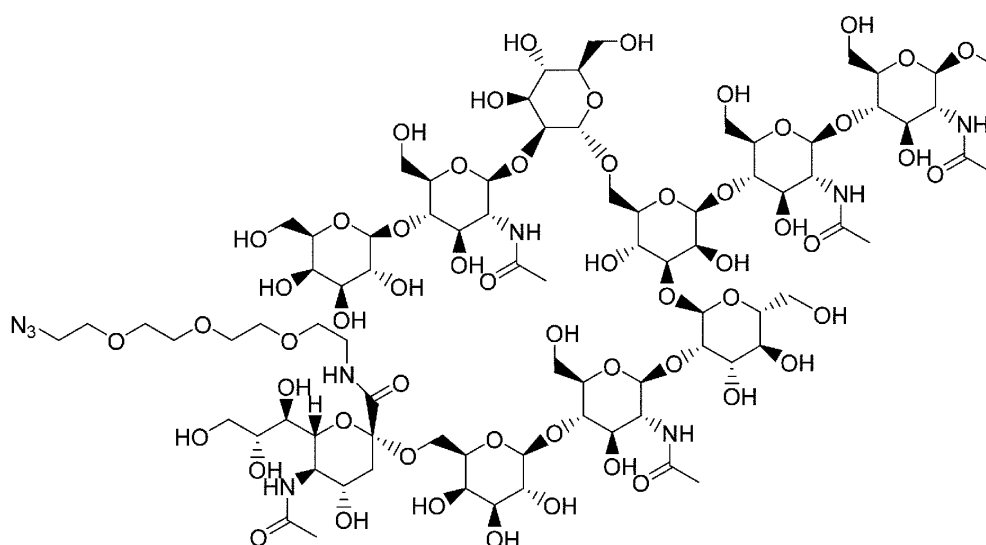
[0226] 工程(7-1c)で合成した糖鎖3(200mg)及び3-Methoxypropyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-β-

D-glucopyranoside (816mg, 50equiv) を用いて、「G-10の合成方法1」に記載した工程(7-5-1)と同様の方法で、G-12 (70.0mg) を得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{104}H_{178}N_{14}O_{67}$:
 $[M+2H]^{2+}$ 1348.5549 (most abundant mass), Found 1348.5491

[0227] (実施例7-8) 糖鎖供与体の合成 (G-13)

[0228] [化41]



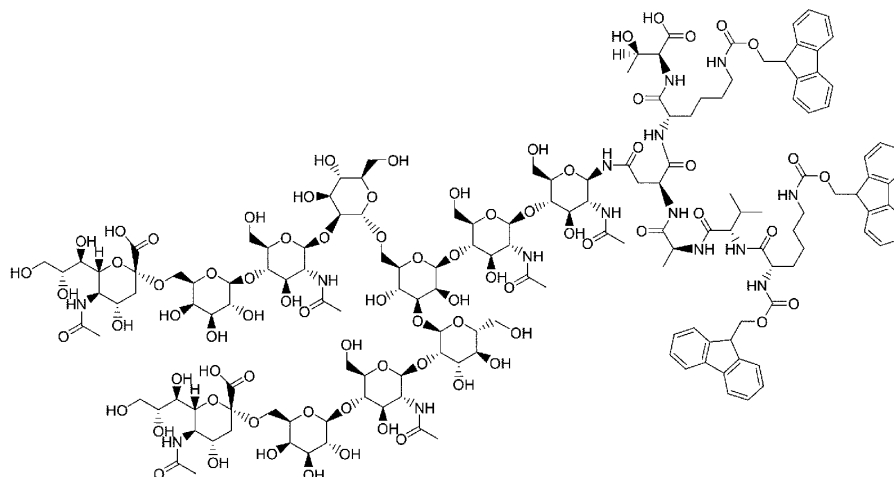
[0229] 工程(7-1c)で合成した糖鎖3-1 (150mg) 及びMethyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (569mg, 50equiv) を用いて、「G-14の合成方法1」に記載した工程(7-9-1)と同様の方法で、G-13 (50.0mg) を得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{82}H_{139}N_9O_{56}$: $[M+2H]^{2+}$ 1073.9226 (most abundant mass), Found 1073.9198

[0230] (実施例7-10) $[N_3-PEG(3)]_2-SGP-PEG(3)-N_3$ (糖鎖供与体G-15) の合成

(7-10a) SGP-tri-Fmoc体の合成

[0231] [化42]



[0232] [アミノ基のFmoc保護]

SGP (200 mg) のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 (2.1 ml) / 蒸留水 (0.7 ml) 混合溶液に、N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニルオキシ]スクシンイミド (188 mg、0.56 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.12 ml、0.70 mmol) を加えて、室温で30分攪拌した。

[0233] [粗精製]

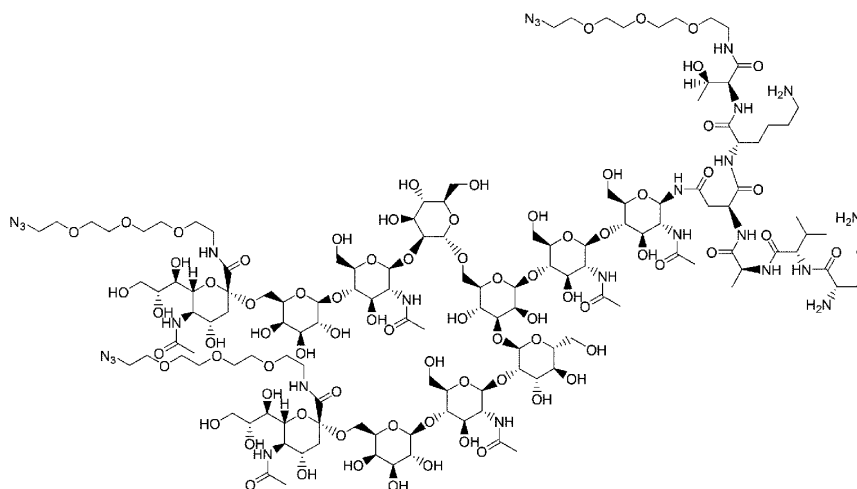
反応終了後、反応液をあらかじめジエチルエーテル (30 ml) を加えた遠沈管 (50 ml) に移した。小型遠心機 (日立工機、CF16RX II) を利用して、2層に分離し、上澄みを取り除いた。この操作を2回繰り返した。続いて、メチルアルコール (2 ml) を加え、酢酸エチル (20 ml) を加え、小型遠心機 (日立工機、CF16RX II) を用いて、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。この操作を2回繰り返した。続いて、適量のジエチルエーテルで固形物を洗浄した後に、減圧下乾燥し、目的化合物を含む固形物 (412 mg) を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

ESI-MS: Calcd for $C_{157}H_{219}N_{15}O_{76}$:

$[M+3H]^{3+}$ 1178.13 (most abundant mass), Found 1178.13.

[0234] (7-10b) $[N_3-PEG(3)]_2-SGP-PEG(3)-N_3$ (糖鎖供与体G-15) の合成

[0235] [化43]



[0236] [縮合反応]

工程 (7-10a) で得られた固形物 (412 mg) と、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 (243 mg、0.47 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (6.7 ml) 混合液に、11-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカン-1-アミン (127 mg、0.58 mmol) N,N-ジメチルホルムアミド (1.6 ml) 溶液と、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 ml、1.40 mmol) を加えて、37℃で1.5時間攪拌後、室温で19時間攪拌した。

[0237] [粗精製]

反応終了後、反応液 (2.5 mL) をあらかじめジエチルエーテル (35 ml) を加えた遠沈管 (50 ml) に移した。小型遠心機 (日立工機、CF16RX II) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。この操作を反応液がなくなるまで繰り返した。続いて、メチルアルコール (3

m l) を加え、沈殿物をスパーテルで砕いた。その後、酢酸エチル (30 m l) を加え、固形物を析出させた後に、小型遠心機 (日立工機、CF16RX 11) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。この操作を3回繰り返した。続いて、適量のジエチルエーテルで固形物を洗浄した後に、減圧下乾燥し、固形物を得た。

[0238] [Fmoc基の脱保護]

上記固形物に、N, N-ジメチルホルムアミド (5.0 m l) とピペリジン (0.35 m l) を加え、37℃で4時間攪拌した。その後、N, N-ジメチルホルムアミド (3.3 m l) を加え、室温で16時間攪拌した。

[0239] [粗精製]

反応終了後、反応液 (2.5 mL) をあらかじめジエチルエーテル (35 m l) を加えた遠沈管 (50 m l) に移した。小型遠心機 (日立工機、CF16RX 11) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。この操作を反応液がなくなるまで繰り返した。続いて、メチルアルコール (8 m l) を加え、沈殿物をスパーテルで砕いた。その後、酢酸エチル (16 m l) を加え、固形物を析出させた後に、小型遠心機 (日立工機、CF16RX 11) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。この操作を2回繰り返した。続いて、適量のジエチルエーテルで固形物を洗浄した後に、減圧下乾燥し、固形物を得た。

[0240] [精製]

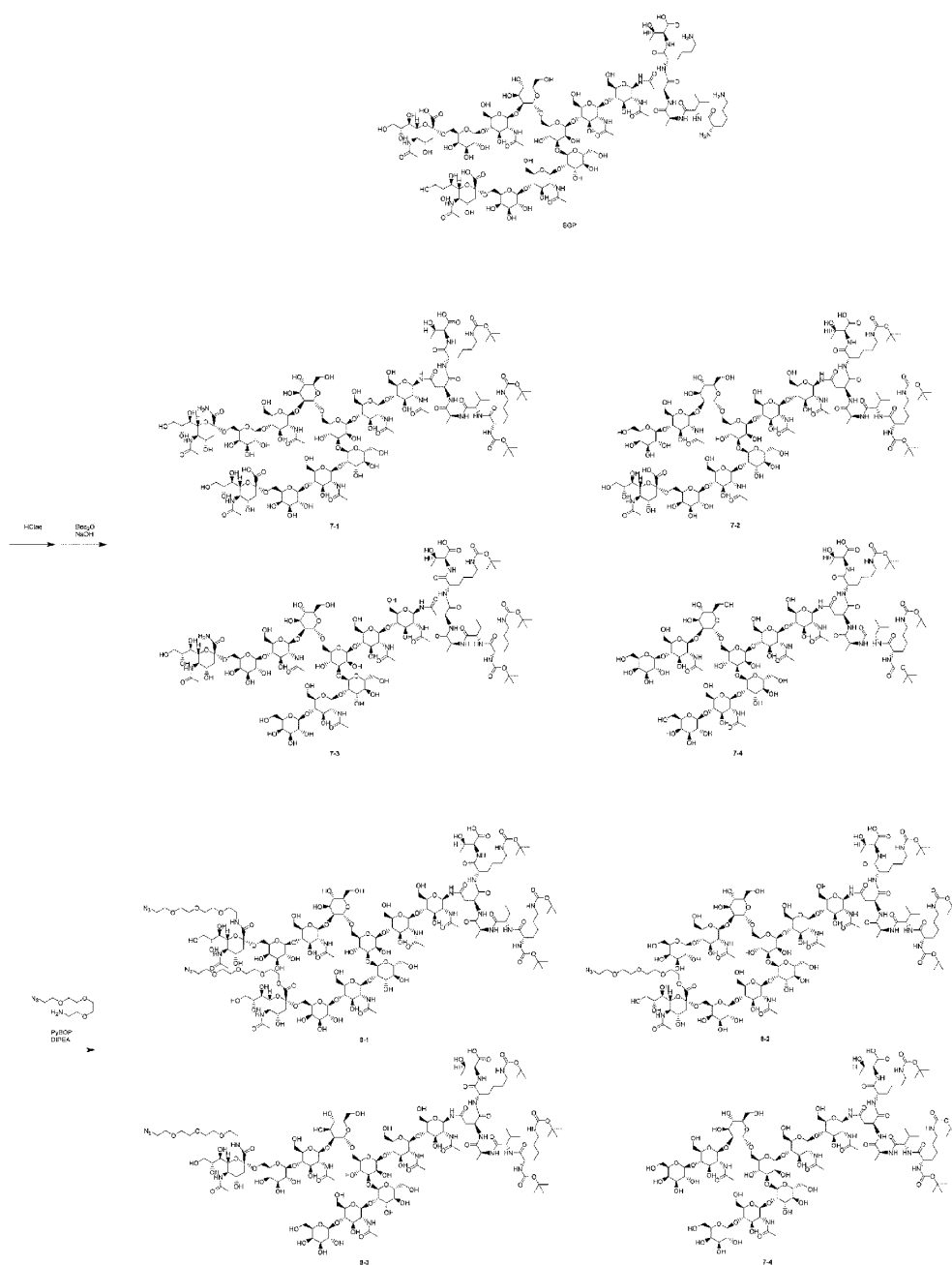
得られた固形物を0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解させた。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはPurify-Rp2 (昭光サイエンティフィック製) を使用し、カラムにはInertsil ODS-3 (GLサイエンス製) を使用した。溶出中にUV検出 (220 nm) された目的物を含むフラクションを凍結乾燥した。もう一度蒸留水に溶解し、凍結乾燥前に、適量のアンモニア水を加えて、酸性でないことを確認して再凍結乾燥し、目的化合物G-15 (90 mg) を凍結乾燥粉末として得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{136}H_{237}N_{27}O_{76}$:
[M+2H]²⁺ 1733.78 (most abundant mass), Found 1733.78.

[0241] (実施例 7-11) 糖鎖供与体原料 (糖鎖原料 8-1, 糖鎖原料 8-2, 糖鎖原料 8-3) の混合液の調製

[0242]

[化44]



[0243] (7-11a) [加水分解反応及びN-Boc化]

SGP (G-1) (10.0 g) を精製水 (100 mL) に溶解し、pH メーターで確認しながら塩酸 (1 N) を加え、pH 2.4 に調整した後、温度を 60℃ に保ち、3 時間攪拌した。室温に冷却した後、pH メーターで確

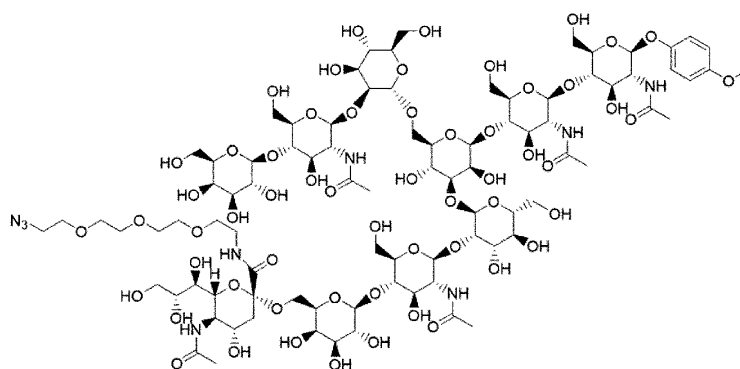
認しながら水酸化ナトリウム水溶液（１Ｎ）を加え、ｐＨ ７．５に調整した。
この溶液の５分の１量に対し、二炭酸-tert-ブチル（７０８ｍｇ）をテトラヒドロフラン（６ｍＬ）に溶解して加えた後、水酸化ナトリウム水溶液（１Ｎ）を加え、ｐＨ １２に調整し２時間攪拌した。さらに、二炭酸-tert-ブチル（３５９ｍｇ）を加え、水酸化ナトリウム水溶液（１Ｎ、２．３ｍＬ）を加え、さらに３時間攪拌した。塩酸（１Ｎ）を加え、ｐＨ ８に調整し、糖鎖原料 ７－１、糖鎖原料 ７－２、糖鎖原料 ７－３、糖鎖原料 ７－４を含む溶液を得た。

[0244] （７－１１ｂ） [縮合]

工程（７－１１ａ）で得られた糖鎖原料 ７－１、糖鎖原料 ７－２、糖鎖原料 ７－３、糖鎖原料 ７－４を含む溶液の２分の１量に対し、DMF（１０ｍＬ）を加えた後、アセトニトリル（１０ｍＬ）を加え、アセトニトリルを減圧留去する操作を４回繰り返し、脱水操作を行った。得られたDMF溶液に、１１-アジド-３，６，９-トリオキサウンデカン-１-アミン（０．４６ｇ）を加え、０℃に冷却した。続いて、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（１．０９ｇ）を加えた後、室温で１時間攪拌し、糖鎖原料 ８－１、糖鎖原料 ８－２、糖鎖原料 ８－３、糖鎖原料 ７－４を含む溶液を得た。

[0245] （実施例 ７－１２）糖鎖供与体の合成（Ｇ－１６）

[0246] [化45]



[0247] （７－１２ａ） [糖鎖変換反応]

工程 (7-11b) で得られた糖鎖原料 8-2 を含む混合物の溶液を Amicon Ultra-15, 3kDa (Merck) を用いてリン酸緩衝液 (9.2 mL、pH 6.7、0.2 mol/L) に置換した。この溶液に 4-Methoxyphenyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (280 mg、7 equiv)、トルエン (1.2 mL)、Endo-Rp N172Q (2.6 mg) を加え、温度を 50°C に保ち、150 時間攪拌した。

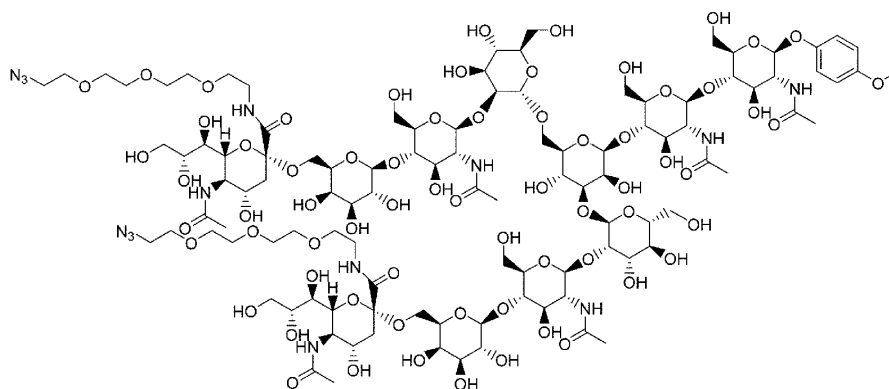
[0248] (7-12b) [精製]

工程 (7-12a) で得られたこの反応液の 3 分の 1 について、アセトニトリルと水を溶離液とし、カラムに X-Bridge C18 (Waters 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目的物のピークを回収し、減圧濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥し、目的化合物 G-16 (16.3 mg) を白色粉末として得た。

ESI-MS: Calcd for C₈₈H₁₄₃N₉O₅₇: [M + 2H]²⁺ 1119.94 (most abundant mass),
Found 1119.93

[0249] (実施例 7-13) 糖鎖供与体の合成 (G-6)

[0250] [化46]



[0251] (7-13) [糖鎖交換反応]

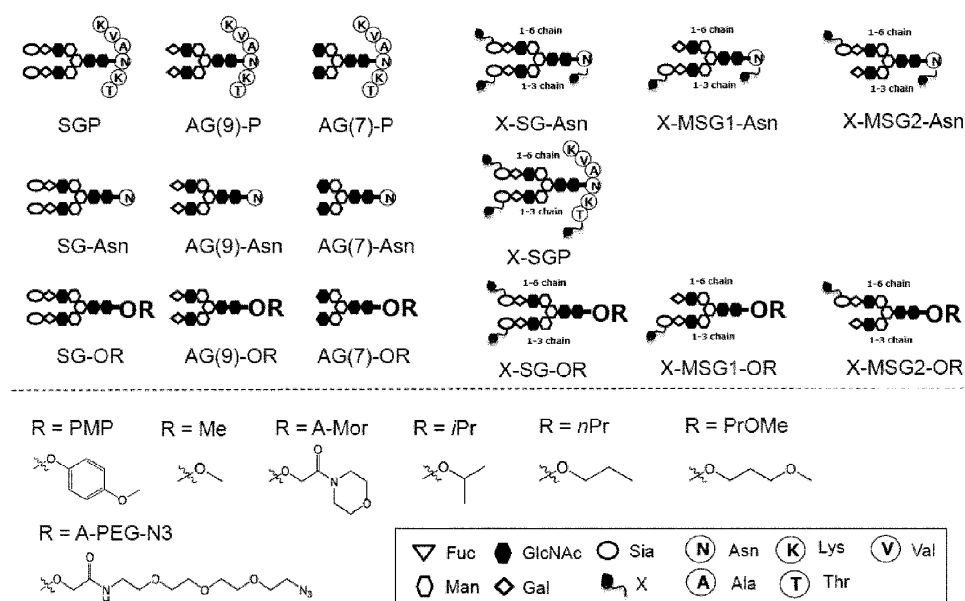
工程 (7-1c) で得た糖鎖原料 3 (100 mg) 及び 4-Methoxyphenyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- β

−D−glucopyranoside (182mg、20equiv)
を用いて「G−10の合成方法1」に記載した工程(7−5−1)と同様の
方法で、G−6(35mg)を得た。

ESI−MS: Calcd for C₁₀₇H₁₇₆N₁₄O₆₇:
[M+2H]²⁺ 1365.55 (most abundant mass)
, Found 1365.54

[0252] 今回着想した図1に示した形で直接糖鎖転移反応が進行する場合、酵素−
Bが認識する2分岐糖鎖構造であれば、非還元末端側の構造をN結合型に限
定する必要はなく、任意の構造で目的の反応が進行すると考えられる。例え
ば、以下又は図2に示した構造を糖鎖供与体として利用できる。

[0253] [化47]



[0254] そこで、以下の実施例では、下記糖鎖誘導体を適宜使用した。

[0255]

[表10]

表Z 6. 糖鎖供与体

糖鎖供与体	構造	作製方法
G-1	SGP	WO 2 0 1 7 1 1 0 9 8 4 の実施例 1 に記載された方法、あるいは、WO 2 0 1 4 2 0 8 7 4 2 の実施例 1
G-2	AG (9)P	WO 2 0 1 4 1 1 5 7 9 7 の実施例 1-17 の工程 1-17 A
G-3	X-SG-Asn	WO 2 0 1 8 0 0 3 9 8 3 の実施例 1-12、工程 1-12 A
G-4	X-MSG1-Asn	WO 2 0 1 9 0 6 5 9 6 4 の実施例 154 の工程 3
G-5	X-MSG2-Asn	WO 2 0 1 9 0 6 5 9 6 4 の実施例 154 の工程 3
G-6	X-SG-OPMP	実施例 7-13
G-7	X-SG-OMe	実施例 7-2
G-8	X-SG-OA-Mor	実施例 7-3
G-9	X-SG-OA-PEG (3)-N ₃	実施例 7-4
G-10	X-SG-OiPr	実施例 7-5
G-11	X-SG-OnPr	実施例 7-6
G-12	X-SG-OPrOMe	実施例 7-7
G-13	X-MSG1-OMe	実施例 7-8
G-14	X-MSG1-OiPr	実施例 7-9
G-15	X-SGP	実施例 7-10
G-16	X-MSG1-OPMP	実施例 7-12
G-17	AG (7)P	WO 2 0 1 4 1 1 5 7 9 7 の実施例 1-17 の工程 1-17 B

(上記表中Xは、N₃-PEG (3)を表す)

[0256] <実施例 8> 「工程 1」の反応条件：抗体濃度

一般的に広く使用されている糖鎖供与体、化学的に合成されたオキサゾリン体を用いた場合には、抗体中の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が報告されている。更に、この副反応を抑えるためには、弱酸性 (pH 6.50) で反応させ、オキサゾリン体溶液を繰り返し添加して反応させる、つまり反応液を希釈する、ことが推奨された (Ref. Bioconjugate Chemistry 2019 30 (5), 1343-1355)。この報告では、反応液中の抗体濃度は40 μM以下に設定されていた。また、化学的に合成されたオキサゾリン体を用いた糖鎖転移反応の詳細プロトコルに関する報告においても、濃度に関して「final concentration: Herceptin=10mg/ml」と記載されている (Ref. Nature Protocols volume 12, pages 1702-1721 (2017))。このように、反応総液量を減らすこと、つまり高濃度抗体溶液で糖鎖転移反応を実施するという発想は、抗体への

糖鎖転移反応において、一般的ではない。

一方、今回着想した図1に示した形で直接糖鎖転移反応が進行する場合、反応溶液の総量を減らすこと、すなわち、分子間の接触頻度が高まる条件、高濃度で反応させることは非常に効果的である。表Z6に代表される安定な糖鎖供与体と抗体を高濃度で混合しても、化学反応の一種である糖化（Glycation）は起こらない。図1における「工程1」の反応条件では、上記副反応の原因となってい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からである。

本発明における製造方法で適応可能な反応系中のアクセプター分子（例えば、抗体）濃度は限定されないが、実施例8では、反応系中のアクセプター分子（抗体）濃度に関わらず糖鎖転移反応にて中程度（＞80％）以上の糖鎖転移率の抗体が得られることを確認するため、系内の抗体濃度を20mg/mL～80mg/mLに設定した。

[0257]（実施例8－1）反応系中抗体濃度20mg/mLの場合

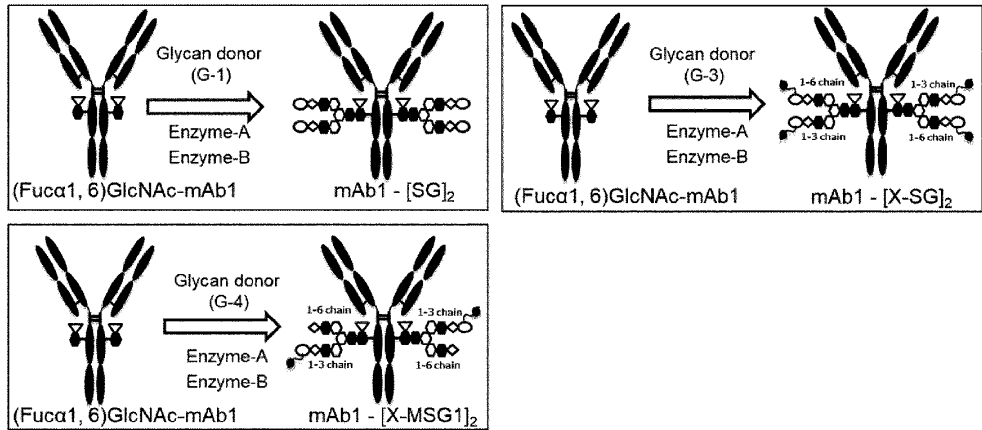
〔糖鎖転移反応標準プロトコル1〕

（Fuc α 1, 6）GlcNAc－mAb1（6mg）、糖鎖供与体（20当量）、酵素－A（1.6～1.7％w/w）、酵素－B（0.2％w/w）と、適量の50mMトリス－塩酸緩衝溶液（pH 7.25）を加え、総量液量300 μ Lとし、30℃で28時間反応させた。反応開始後、2時間、4時間、6時間、8時間、24時間、28時間にサンプリングした。反応終了後、反応液のpHを測定した。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。

糖鎖転移反応標準プロトコル1に従って、糖鎖転移反応させ、サンプリング液を準備した。ここでは、参考例1で準備したアクセプター分子溶液1－1を使用した。実施例2で準備した酵素－A溶液（Si－001－2）、あるいは実施例5で準備した酵素－A溶液（S－001）のいずれかを使用した。実施例3で準備した酵素－B溶液（Rp－001－2）を使用した。表

Z 6 に従い準備した糖鎖供与体 G-1、G-3、あるいは、G-4 のいずれかを使用した。各実験に使用した糖鎖供与体の構造に応じて、以下の模式図又は図 3 に示した糖鎖転移反応が進行する。

[0258] [化48]



[0259] [L a b C h i p 分析を用いた糖鎖転移率測定]

前述した方法に従い、サンプリング液をL a b C h i p 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。

$$\text{糖鎖転移率 (\%)} = \left[\frac{\text{[糖鎖転移抗体由来のH鎖のピーク面積]}}{\{ \text{[未反応物由来のH鎖ピーク面積]} + \text{[糖鎖転移抗体由来のH鎖のピーク面積]} \}} \right] \times 100$$

[0260] (F u c α 1 , 6) G l c N A c - m A b 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 Z 7.) 。

[0261]

[表11]

表 Z 7

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
8-1-1	mAb1 (20)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	7.3	12.5	18.0	24.7	80.2	88.4
8-1-2	mAb1 (20)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	7.6	19.5	31.6	44.9	88.3	89.3
8-1-3	mAb1 (20)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	11.1	26.3	45.1	59.9	96.3	96.2
8-1-4	mAb1 (20)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	4.7	12.1	18.8	23.0	68.0	76.8
8-1-5	mAb1 (20)	G-3 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	4.5	10.8	18.9	26.0	70.2	73.1
8-1-6	mAb1 (20)	G-4 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	7.4	14.4	21.5	29.1	64.1	66.1
8-1-7	mAb1 (20)	G-1 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	15.4	32.8	49.4	65.1	>99.9	96.5
8-1-8	mAb1 (20)	G-3 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	16.8	39.2	59.4	73.7	88.6	87.7
8-1-9	mAb1 (20)	G-4 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	24.0	49.4	68.3	80.3	89.0	87.9

[0262] 使用する酵素-Aのポテンシャルに応じて、実施例8-1-4、実施例8-1-5、実施例8-1-6のように糖鎖転移率が28時間までに80%を超えない場合がある。このような場合、使用する糖鎖供与体量を増やすと、転移効率が改善することが予想される。実施例8-1-7、実施例8-1-8、実施例8-1-9では、それぞれ、実施例8-1-4、実施例8-1-5、実施例8-1-6で使用した〔糖鎖転移反応標準プロトコル1〕において、糖鎖供与体を20当量から40当量に変更した。予想通りに、糖鎖転移率が改善した。このように、酵素の組み合わせを変えず、かつ最終抗体濃度を変えずに糖鎖転移率を改善したい場合、糖鎖供与体量を倍にするだけよいことがわかる。

[0263] (実施例8-2) 反応系中抗体濃度40mg/mLの場合

糖鎖転移反応標準プロトコル1の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル2に従って、実施例8-1と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0264] [糖鎖転移反応標準プロトコル 2]

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (6 mg)、糖鎖供与体 (20 当量)、酵素-A (1.6~1.7%w/w)、酵素-B (0.2%w/w) と、適量の 50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量 150 μ L とし、30℃で 28 時間反応させた。反応開始後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、28 時間にサンプリングした。反応終了後、反応液の pH を測定した。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 1 mg/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。

[0265] (実施例 8-1) と同様にして、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 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 Z8)。

[0266] [表 12]

表 Z8

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
8-2-1	mAb1 (40)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	17.9	35.4	57.7	74.7	98.7	99.2
8-2-2	mAb1 (40)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	18.2	44.3	66.2	79.8	94.1	93.8
8-2-3	mAb1 (40)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	19.8	48.6	71.4	86.3	97.3	97.0
8-2-4	mAb1 (40)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	11.7	24.0	36.1	49.4	96.0	96.3
8-2-5	mAb1 (40)	G-3 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	13.1	33.0	52.4	67.9	88.3	86.6
8-2-6	mAb1 (40)	G-4 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	18.6	39.4	58.0	72.0	85.7	83.7

[0267] (実施例 8-3) 反応系中抗体濃度 60 mg/mL の場合

糖鎖転移反応標準プロトコル 1 の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル 3 に従って、実施例 8-1 と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip 分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0268] [糖鎖転移反応標準プロトコル 3]

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (6 mg)、糖鎖供与体 (2

0当量)、酵素-A (1.6~1.7%w/w)、酵素-B (0.2%w/w)と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液(pH 7.25)を加え、総量100 μ Lとし、30℃で28時間反応させた。反応開始後、2時間、4時間、6時間、8時間、24時間、28時間にサンプリングした。反応終了後、反応液のpHを測定した。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。

[0269] 実施例8-1と同様にして、(Fuc α 1,6)GlcNAc-mAb1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Z9)。

[0270] [表13]

表Z9

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
8-3-1	mAb1 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	22.2	62.4	75.2	90.5	98.8	99.2
8-3-2	mAb1 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	29.8	64.5	83.7	91.4	95.1	94.4
8-3-3	mAb1 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	36.8	78.6	95.3	98.5	98.1	97.6
8-3-4	mAb1 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	17.7	39.6	60.6	77.5	97.7	97.9
8-3-5	mAb1 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	25.9	60.3	81.4	89.8	90.3	88.6
8-3-6	mAb1 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	33.3	67.7	85.7	91.3	89.4	86.4

[0271] (実施例8-4) 反応系中抗体濃度80mg/mLの場合

糖鎖転移反応標準プロトコル1の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル4に従って、実施例8-1と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0272] [糖鎖転移反応標準プロトコル4]

(Fuc α 1,6)GlcNAc-mAb1 (6mg)、糖鎖供与体 (20当量)、酵素-A (1.6~1.7%w/w)、酵素-B (0.2%w/w)と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液(pH 7.25)を加え

、総量液量 75 μ L とし、30℃で 28 時間反応させた。反応開始後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、28 時間にサンプリングした。反応終了後、反応液の pH を測定した。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 1 mg/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。ただし、ここでは、参考例 1 で準備したアクセプター分子溶液 1-2 を使用した。

[0273] (実施例 8-1) と同様にして、Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb 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 Z10)。

[0274] [表14]

表 Z10

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
8-4-1	mAb1 (80)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	25.4	57.2	82.9	95.5	98.7	99.0
8-4-2	mAb1 (80)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	49.9	84.7	94.1	96.3	95.7	95.1
8-4-3	mAb1 (80)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	64.6	96.6	99.0	98.8	98.1	>99.9
8-4-4	mAb1 (80)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	28.1	62.0	85.5	96.0	98.2	97.3
8-4-5	mAb1 (80)	G-3 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	42.9	81.7	92.7	94.2	90.7	88.6
8-4-6	mAb1 (80)	G-4 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	48.0	84.9	93.3	94.2	89.8	87.3

[0275] 実施例 8 では、代表的な酵素と代表的な糖鎖供与体の組み合わせで、主に糖鎖供与体量を 20 当量に固定して、28 時間までの糖鎖転移率を確認した。どの酵素の組み合わせの場合でも、反応系内の最終抗体濃度が高いほど、糖鎖転移率が高くなることがわかる。また、反応系中の抗体濃度に関わらず糖鎖転移反応にて中程度 (>80%) 以上の糖鎖転移率の抗体が得られることが確認できる。

[0276] <実施例 9> 「工程 1」の反応条件：糖鎖当量

本発明における製造方法に適応可能な反応系中の抗体濃度は限定されないが、実施例 9 では、反応系中に加える糖鎖ドナー分子の量に関わらず糖鎖転

移反応にて中程度 (> 80%) 以上の糖鎖転移率の抗体が得られることを確認するため、系内に加える糖鎖当量を 10 当量～40 当量に設定した。

[0277] (実施例 9-1) 抗体に対して、10 当量の糖鎖を使用する場合

糖鎖転移反応標準プロトコル 1 の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル 5 に従って、実施例 8-1 と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip 分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0278] [糖鎖転移反応標準プロトコル 5]

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (6 mg)、糖鎖供与体 (10 当量)、酵素-A (1.6～1.7% w/w)、酵素-B (0.2% w/w) と、適量の 50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量液量 100 μ L とし、30℃で 28 時間反応させた。反応開始後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、28 時間にサンプリングした。反応終了後、反応液の pH を測定した。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 1 mg/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。

[0279] ここでは、参考例 1 で準備したアクセプター分子溶液 1-1 を使用した。実施例 2 で準備した酵素-A 溶液 (Si-001-2)、あるいは実施例 5 で準備した酵素-A 溶液 (S-001) のいずれかを使用した。実施例 3 で準備した酵素-B 溶液 (Rp-001-2) を使用した。表 Z6 に従い準備した糖鎖供与体 G-1、G-3、あるいは、G-4 のいずれかを使用した。各実験に使用した糖鎖供与体の構造に応じて、前述した図 3 の糖鎖転移反応が進行する。

[0280] 実施例 8-1 と同様にして、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 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 Z11)。

[0281]

[表15]

表 Z 1 1

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
9-1-1	mAb1 (60)	G-1 (10eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	7.6	16.4	24.4	31.5	84.3	90.5
9-1-2	mAb1 (60)	G-3 (10eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	9.8	22.2	35.9	48.4	88.6	89.6
9-1-3	mAb1 (60)	G-4 (10eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	13.4	29.0	48.7	61.7	96.2	96.1
9-1-4	mAb1 (60)	G-1 (10eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	5.0	13.1	19.3	26.2	72.6	79.7
9-1-5	mAb1 (60)	G-3 (10eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	7.8	18.9	31.4	43.5	81.4	82.0
9-1-6	mAb1 (60)	G-4 (10eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	9.7	23.2	35.8	48.7	82.1	81.9
9-1-7	mAb1 (80)	G-1 (10eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	14.0	26.3	38.4	50.6	93.8	94.3

[0282] 実施例 9-1-4 のように糖鎖転移率が 28 時間までに 80% を超えない場合、最終抗体濃度を高くすると、転移率が改善すると予想される。そこで、実施例 9-1-7 では、実施例 8-4 で使用した「糖鎖転移反応標準プロトコル 4」で、糖鎖供与体（20 当量）から糖鎖供与体（10 当量）に変更した条件で反応させた。予想通りに、糖鎖転移率が改善した。このように、糖鎖当量数を変えずに糖鎖転移率を改善したい場合、反応系内の最終抗体濃度を高くするとよい。

[0283] （実施例 9-2）抗体に対して、30 当量の糖鎖を使用する場合

糖鎖転移反応標準プロトコル 1 の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル 6 に従って、実施例 8-1 と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip p 分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0284] 「糖鎖転移反応標準プロトコル 6」

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (6 mg)、糖鎖供与体 (30 当量)、酵素-A (1.6~1.7% w/w)、酵素-B (0.2% w/w) と、適量の 50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量液量 100 μ L とし、30℃ で 28 時間反応させた。反応開始後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、24 時間、28 時間にサンプリングした。反

応終了後、反応液のpHを測定した。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1 mg/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。

[0285] 実施例8-1と同様にして、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1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Z12)。

[0286] [表16]

表Z12

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
9-2-1	mAb1 (60)	G-1 (30eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	50.5	89.2	99.0	99.2	99.3	99.3
9-2-2	mAb1 (60)	G-3 (30eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	68.1	92.8	96.8	97.3	96.1	95.7
9-2-3	mAb1 (60)	G-4 (30eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	78.4	98.7	98.9	98.8	98.3	98.2
9-2-4	mAb1 (60)	G-1 (30eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	39.5	79.9	96.6	98.5	98.3	98.3
9-2-5	mAb1 (60)	G-3 (30eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	62.0	93.4	96.2	96.0	93.0	92.3
9-2-6	mAb1 (60)	G-4 (30eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	62.8	94.9	96.8	96.6	94.2	93.6

[0287] (実施例9-3) 抗体に対して、40当量の糖鎖を使用する場合

糖鎖転移反応標準プロトコル1の代わりに、糖鎖転移反応標準プロトコル7に従って、実施例8-1と同様にして、糖鎖転移反応させ、LabChip分析を用いた糖鎖転移率を測定した。

[0288] [糖鎖転移反応標準プロトコル7]

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (6 mg)、糖鎖供与体 (40 当量)、酵素-A (1.6~1.7 %w/w)、酵素-B (0.2 %w/w) と、適量の50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量100 μ Lとし、30℃で28時間反応させた。反応開始後、2時間、4時間、6時間、8時間、24時間、28時間にサンプリングした。反応終了後、反応液のpHを測定した。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1 mg/mLになるように精製水で希釈し、LabChip

h i p 分析開始時まで凍結保管した。

[0289] 実施例 8-1 と同様にして、(F u c α 1, 6) G l c N A c - m A b 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 Z 1 3)。

[0290] [表17]

表 Z 1 3

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
9-3-1	mAb1 (60)	G-1 (40eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	78.1	99.4	99.6	99.5	99.5	>99.9
9-3-2	mAb1 (60)	G-3 (40eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	88.4	97.4	97.9	97.8	96.5	96.1
9-3-3	mAb1 (60)	G-4 (40eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	95.0	98.9	98.9	98.8	98.0	98.5
9-3-4	mAb1 (60)	G-1 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	65.7	98.0	99.0	99.0	98.6	98.5
9-3-5	mAb1 (60)	G-3 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	88.2	97.2	96.9	96.5	93.7	93.0
9-3-6	mAb1 (60)	G-4 (40eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	89.5	97.5	97.1	96.8	94.6	94.1

[0291] 実施例 9 では、代表的な酵素と代表的な糖鎖供与体の組み合わせで、主に反応系内の最終抗体濃度を 60 mg / mL に固定し、糖鎖供与体量を変更することで、28 時間までの糖鎖転移率を確認した。どの酵素の組み合わせの場合でも、糖鎖供与体使用量が高いほど、糖鎖転移率が高くなることを確認した。また、反応系中に加えた糖鎖当量に関わらず糖鎖転移反応にて中程度 (>80%) 以上の糖鎖転移率の抗体が得られることが確認できる。

実験例 8 と実験例 9 より、「工程 1」では、糖鎖供与体使用量と反応系内最終抗体濃度を適宜調節することで、高い糖鎖転移率を達成できる。

続いて、以下、実施例 10 では、主に糖鎖供与体使用量 (20 当量) と反応系内最終抗体濃度 (60 mg / mL) を固定し、利用可能な糖鎖供与体の構造と酵素の組み合わせを確認した。

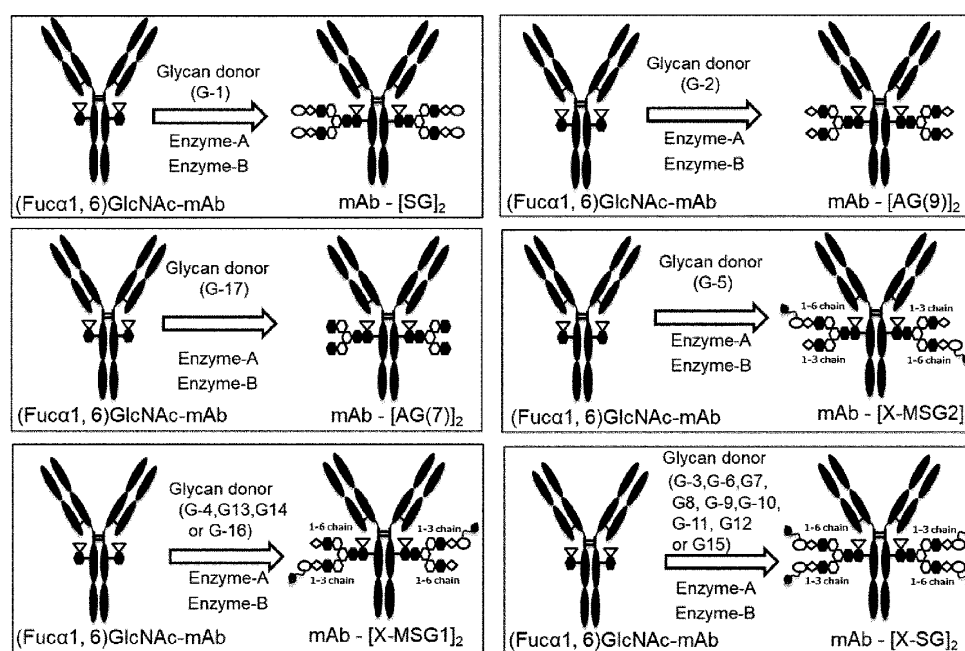
[0292] <実施例 10> 「工程 1」の反応条件：酵素-A と酵素-B の組み合わせ

(実施例 8-3) で使用した糖鎖転移反応標準プロトコル 3 に従って、糖鎖転移反応させ、(実施例 8-1) と同様にして、L a b C h i p 分析を用

いて糖鎖転移率を測定した。

ここでは、表 Z 1 4 に記載した組み合わせで、適宜、アクセプター分子溶液、酵素-A 溶液、酵素-B 溶液、及び、糖鎖供与体を使い分けた。具体的には、参考例 1 から参考例 3 で準備したアクセプター分子溶液 1-1、2-1、2-2、あるいは 3-1 のいずれか一つを使用した。実施例 2、あるいは実施例 5 で準備した酵素-A 溶液のいずれか一つを使用した。実施例 3、あるいは実施例 6 で準備した酵素-B 溶液のいずれか一つを使用した。表 Z 6 に従い準備した糖鎖供与体 G-1 から G-17 のいずれか一つを使用した。各実験に使用した糖鎖供与体の構造に応じて、以下の模式図又は図 4 の糖鎖転移反応が進行する。

[0293] [化49]



[0294] (実施例 8-1)と同様にして、(Fucα1,6)GlcNAc-mAb 1、あるいは (Fucα1,6)GlcNAc-mAb 2、あるいは (Fucα1,6)GlcNAc-mAb 3 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 Z 1 4)。

[0295]

[表18]

表 Z 1 4

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
10-1	mAb1 (60)	G-2 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	65.3	97.0	99.1	98.8	98.6	98.7
10-2	mAb1 (60)	G-5 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	60.6	91.2	96.8	97.5	96.4	96.2
10-3	mAb1 (60)	G-14 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	22.0	53.1	76.6	91.3	98.3	98.4
10-4	mAb1 (60)	G-16 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	44.3	85.4	97.7	98.6	98.4	98.6
10-5	mAb1 (60)	G-17 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	92.1	97.1	96.9	96.2	92.3	91.8
10-6	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	39.2	36.6	62.2	81.6	99.3	99.3
10-7	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172V	27.5	60.5	82.3	92.6	98.0	97.7
10-8	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172Q	16.7	38.3	59.5	75.5	97.3	97.3
10-9	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q	80.3	94.6	96.9	97.3	95.8	95.5
10-10	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q Y217F	29.3	65.7	88.8	97.0	99.0	99.4
10-11	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	19.2	44.0	67.7	84.9	97.7	97.5
10-12	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241M	Endo-Rp N172H	20.6	47.3	70.7	85.0	94.4	93.7
10-13	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241QE360Q	Endo-Rp N172H	19.5	46.1	70.8	88.4	98.8	98.6
10-14	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241ME360Q	Endo-Rp N172H	20.8	48.2	73.2	89.4	97.7	97.4
10-15	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241QQ311L	Endo-Rp N172H	17.0	39.1	60.1	79.8	99.1	99.4
10-16	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	11.9	29.5	48.1	65.1	97.2	97.0
10-17	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172V	24.5	56.8	80.2	91.7	96.5	96.3

10-18	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172Q	14.9	35.7	56.7	72.9	95.7	95.3
10-19	mAb2 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172V Y214F	24.3	56.5	81.3	93.5	97.8	97.7
10-21	mAb2 (60)	G-2 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	60.2	93.0	97.8	97.9	97.4	97.3
10-22	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	32.0	68.5	85.7	91.9	94.0	93.2
10-23	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172V	38.7	66.0	77.2	82.4	83.8	81.7
10-24	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172Q	34.0	61.1	73.1	78.2	81.1	78.8
10-25	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q	65.9	79.1	82.9	84.0	75.8	73.1
10-26	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q Y217F	29.9	64.2	81.8	89.2	92.7	92.0
10-27	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	35.0	72.4	88.7	92.0	88.9	85.7
10-28	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241M	Endo-Rp N172H	34.6	66.9	80.8	84.3	77.6	74.2
10-29	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241QE360Q	Endo-Rp N172H	37.7	77.7	91.9	94.2	91.1	89.6
10-30	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241ME360Q	Endo-Rp N172H	38.3	75.7	87.7	89.5	83.7	81.0
10-31	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241QQ311L	Endo-Rp N172H	27.2	56.5	74.7	84.7	94.3	93.6
10-32	mAb2 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	22.0	52.5	72.7	84.0	89.7	88.5
10-33	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	44.6	83.3	96.6	98.1	97.5	97.1
10-34	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172V	56.0	86.5	93.9	95.2	92.5	91.4
10-35	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172Q	56.9	85.6	92.8	94.2	91.0	89.8
10-36	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q	83.9	91.6	92.6	92.3	83.8	81.2
10-37	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q Y217F	57.8	92.5	98.0	98.3	97.4	96.9
10-38	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	35.4	70.0	84.2	87.7	78.0	76.1

10-39	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241M	Endo-Rp N172H	27.0	49.3	59.3	62.3	58.2	54.4
10-40	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241QE360Q	Endo-Rp N172H	46.2	83.6	91.9	92.6	88.1	85.7
10-41	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241ME360Q	Endo-Rp N172H	32.5	56.4	64.9	68.1	63.8	59.6
10-42	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241QQ311L	Endo-Rp N172H	45.0	88.5	98.0	98.7	97.9	97.7
10-43	mAb2 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	28.1	61.4	81.6	90.2	89.4	88.1
10-44	mAb2 (60)	G-5 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	69.4	93.6	97.1	97.6	96.1	95.4
10-45	mAb2 (60)	G-6 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	17.7	53.7	79.9	91.7	98.2	98.0
10-46	mAb2 (60)	G-6 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-M N175Q Y217F	9.6	23.5	39.1	54.1	94.5	95.1
10-47	mAb2 (60)	G-6 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	16.2	41.7	63.6	79.0	93.2	92.4
10-48	mAb2 (60)	G-7 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	1.2	3.3	7.1	11.3	65.5	73.8
10-49	mAb2 (60)	G-8 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	9.8	35.8	60.9	79.5	97.9	97.6
10-50	mAb2 (60)	G-8 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	9.4	23.1	38.0	52.0	89.7	89.9
10-51	mAb2 (60)	G-9 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	28.4	71.8	91.1	96.8	98.1	98.0
10-52	mAb2 (60)	G-9 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	21.1	51.8	73.9	85.9	92.5	91.8
10-53	mAb2 (60)	G-10 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	9.8	32.6	59.8	78.8	98.1	98.0
10-54	mAb2 (60)	G-10 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	9.3	23.3	38.4	54.1	90.5	90.5
10-55	mAb2 (60)	G-11 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	4.6	12.9	27.1	43.7	95.9	96.8
10-56	mAb2 (60)	G-11 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	6.2	15.2	25.1	35.9	85.4	87.3
10-57	mAb2 (60)	G-12 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	4.1	13.7	28.8	45.6	96.4	97.0
10-58	mAb2 (60)	G-12 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	6.5	16.0	26.7	38.3	86.7	88.1
10-59	mAb2 (60)	G-13 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	9.9	10.6	16.3	23.8	70.4	77.7

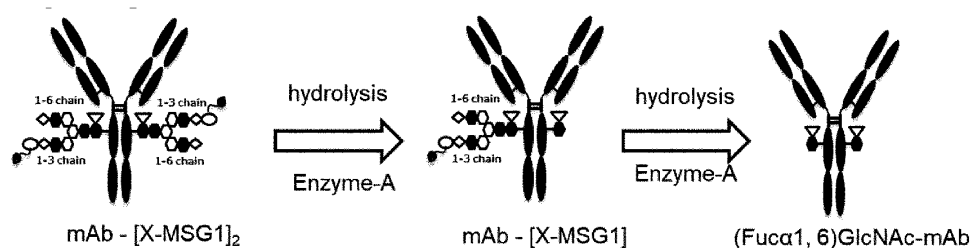
10-60	mAb2 (60)	G-14 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	24.2	50.7	74.5	90.0	97.9	97.7
10-61	mAb2 (60)	G-14 (20eq.)	Endo-S D233QE350Q	Endo-Rp N172H	14.3	35.4	56.2	72.4	93.0	92.5
10-62	mAb2 (60)	G-15 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	20.4	46.4	66.9	80.4	93.9	93.9
10-63	mAb2 (60)	G-16 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	41.0	77.0	94.1	97.3	97.1	97.0
10-64	mAb2 (60)	G-17 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	88.8	94.3	94.1	93.3	87.5	86.4
10-65	mAb3 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	9.3	24.6	44.8	63.8	99.3	99.5
10-66	mAb3 (60)	G-2 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	44.8	80.0	96.0	98.0	97.8	97.6
10-67	mAb3 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	22.4	56.9	81.1	91.7	96.9	96.5
10-68	mAb3 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	34.6	76.6	95.9	99.0	98.9	98.7
10-69	mAb3 (60)	G-5 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	59.0	90.5	96.9	97.8	96.7	96.4
10-70	mAb3 (60)	G-13 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	4.0	8.2	13.3	18.8	67.0	76.3
10-71	mAb3 (60)	G-14 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	18.1	44.2	67.6	85.4	98.5	98.3
10-72	mAb3 (60)	G-15 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	14.7	35.4	55.1	70.5	94.5	94.5
10-73	mAb3 (60)	G-16 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	33.3	69.9	91.2	97.4	97.6	97.4
10-74	mAb3 (60)	G-17 (20eq.)	Endo-Si D241MQ311L	Endo-Rp N172H	86.2	94.9	95.1	94.9	91.2	90.3

[0296] 実施例 10 では、利用可能な糖鎖供与体の構造と酵素の組み合わせを比較し、いずれの組み合わせにおいても糖鎖転移反応にて中程度 (>80%) 以上の糖鎖転移率の抗体が得られることが確認できる。

[0297] (酵素-Aの残留加水分解活性)

今回着想した図 1 に示した形で直接糖鎖転移反応が進行する場合、「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と、例えば、mAb-[X-MSG1]₂が目的物となる場合には、以下の模式図又は図 5 の加水分解反応が競合すると考えられる。つまり、使用する酵素-Aの残留加水分解活性が野生型酵素と同等かそれ以上の場合、見かけ上の糖鎖転移率は低くなる。

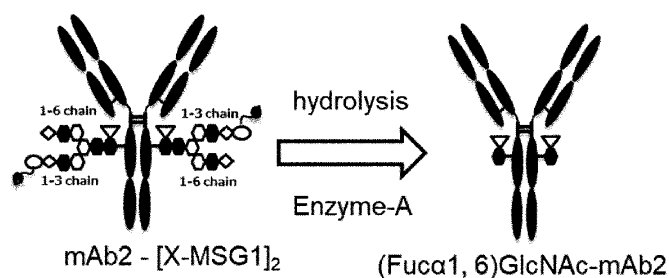
[0298] [化50]



[0299] 「工程 1」で使用可能な酵素として、E n d o - S 変異体、E n d o - S 2 変異体、及び E n d o - S i 変異体を任意に選択することができる。任意の変異体として好ましい残存加水分解活性の程度の指標を明確にするため、実施例 1 1 の実験を実施した。

[0300] (実施例 1 1) m A b 2 - [M S G 1 - N ₃] ₂ の加水分解

[0301] [化51]



[0302] [加水分解反応標準プロトコル 1]

m A b 2 - [M S G 1 - N ₃] ₂ (0 . 2 m g) 、と酵素 - A (2 . 0 % w / w) 、適量の 5 0 m M トリス - 塩酸緩衝溶液 (p H 7 . 2 5) を加え、総量 2 1 μ L とし、3 0 ° C で 2 4 時間反応させた。反応開始後、4 時間と 2 4 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 1 m g / m L になるように精製水で希釈し、L a b C h i p 分析開始時まで凍結保管した。

ここでは、加水分解反応標準プロトコル 1 に従って、加水分解し、サンプリング液を準備した。ここでは、参考例 7 で準備した抗体溶液 7 - 1 を使用した。実施例 2、実施例 4、あるいは実施例 5 で準備した酵素 - A 溶液のいずれか一つを使用した。

[0303] [L a b C h i p 分析を用いた糖鎖転移率測定]

前述した方法に従い、サンプリング液をL a b C h i p 分析すると、そのエレクトロフェログラムから、未反応物と加水分解体が分離したピークとして確認される。未反応物と加水分解体のピーク面積比から加水分解率を、下記算出式により算出した。

$$\text{加水分解率 (\%)} = \left\{ \left[\text{加水分解体由来のH鎖のピーク面積} \right] / \left\{ \left[\text{未反応物由来のH鎖ピーク面積} \right] + \left[\text{加水分解体由来のH鎖のピーク面積} \right] \right\} \right\} \times 100$$

[0304] m A b 2 - [M S G 1 - N ₃] ₂ に用いた各反応条件に対して、各反応時間における加水分解率を算出した（表 Z 1 5）。

[0305] [表19]

表 Z 1 5

実施例	酵素-A	反応液pH, 温度	加水分解率 (%)	
			4h	24h
11-1	Endo-Si D241MQ311L	7.25, 30°C	10.1	21.2
11-2	Endo-Si D241Q	7.25, 30°C	42.9	96.6
11-3	Endo-Si D241Q E360Q	7.25, 30°C	31.4	71.2
11-4	Endo-Si D241M	7.25, 30°C	87.0	99.3
11-5	Endo-Si D241Q Q311L	7.25, 30°C	8.4	22.6
11-6	Endo-Si D241M E360Q	7.25, 30°C	73.1	> 99.9
11-7	Endo-S D233Q E350Q	7.25, 30°C	9.0	54.0
11-8	Endo-S2 D184M	7.25, 30°C	> 99.9	> 99.9
11-9	Endo-S2 T138Q	7.25, 30°C	> 99.9	> 99.9
11-10	Endo-Si WT	7.25, 30°C	98.4	99.7
11-11	Endo-S WT	7.25, 30°C	> 99.9	> 99.9
11-12	Endo-S2 WT	7.25, 30°C	> 99.9	> 99.9

[0306] 「工程 1」で高い糖鎖転移率が期待できる酵素は、反応開始 4 時間時点において、その野生型酵素と比べて、加水分解率が低いことが確認された。また、反応開始 24 時間時点において、その野生型酵素と比べて、おおむね加水分解率が低いものが多いが、中には同等の加水分解率を示す変異体も含まれていた。

一方で、E n d o - S 2 D 1 8 4 M や E n d o - S 2 T 1 3 8 Q は、オキサゾリン体を糖鎖供与体にした場合、糖鎖転移率が高くなることが報告

されている。しかしながら、オキサゾリン体非存在下で、糖鎖転移抗体と反応させた場合、反応開始4時間時点、及び反応開始24時間時点において、それらの野生型酵素とほぼ同じ加水分解活性を示した。

[0307] 実施例10、実施例11、及び参考例8の結果から、「工程1」で使用する酵素は、「反応開始4時間時点の加水分解率が90%未満」であり、「反応開始24時間時点の加水分解率が99.9%未満」を指標にして、任意に選択してよいことがわかる。

[0308] <実施例12>「工程1」と「工程2」の組み合わせの効果確認

実施例12では、「工程1」の条件に関わらず「工程2」で糖鎖転移率を向上できるか検証した。

本発明における製造方法が適応可能なアクセプター分子種（抗体種）、糖鎖供与体種、酵素種は限定されないが、いくつかのパターンで「工程1」と「工程2」の組み合わせの効果を確認する目的で、表Z16に記載した組み合わせ、すなわち、糖鎖供与体5種類、抗体3種類、酵素-A3種類、酵素-B2種を代表例に選んだ。また、使用する糖鎖供与体量を10当量、あるいは20当量とした。

[0309] [負荷液調製の標準プロトコル1（工程1）]

<工程1>

アクセプター分子（Fuc α 1,6）GlcNAc-mAbと、10当量、20当量、あるいは60当量の糖鎖ドナー分子と、1.6%（w/w）の酵素-Aと、0.2%（w/w）の酵素-Bとの混合液に、適量の50mM トリス-塩酸緩衝溶液（pH 7.25）を加え、抗体の終濃度が20mg/mLあるいは60mg/mLになるように、反応液量を調整した。続いて、その反応液を30℃でインキュベートし、反応開始28時間後に反応を終了した。

<サンプリング>

反応終了後、糖鎖転移率を測定する目的で、極微量の反応液をサンプリングし、抗体濃度が1mg/mLになるように精製水で希釈した後、L a b C

h i p 分析開始まで凍結保管した。

＜負荷液の p H、塩濃度調整＞

続いて、反応液に 1 0 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 3. 9)、1 M 塩化ナトリウム水溶液、1 M 塩酸、精製水を加えてカラム負荷液を調製した。負荷液は抗体濃度が 5 m g / m L となり、かつ、各実験のカラム平衡化液と同じ p H 及び塩化ナトリウムの終濃度となるように調製した。負荷液の調製後、負荷液の糖鎖転移率を確認することを目的として、0. 5 m L をサンプリングした。

[0310] ここでは、表 Z 1 6 に記載した組み合わせで、適宜、アクセプター分子溶液、酵素－A 溶液、及び、糖鎖供与体を使い分けた。具体的には、参考例 4 で準備したアクセプター分子溶液 4－1、参考例 5 で準備したアクセプター分子溶液 5－1、あるいは参考例 6 で準備したアクセプター分子溶液 6－1 のいずれか一つを使用した。実施例 2 で準備した酵素－A 溶液 (S i－0 0 1－2)、あるいは、実施例 5 で準備した酵素－A 溶液 (S－0 0 1) のいずれか一つを使用した。実施例 3 で準備した酵素－B 溶液 (R p－0 0 1－3)、あるいは、実施例 6 で準備した酵素－B 溶液 (M－0 0 2) のいずれか一つを使用した。表 Z 6 に従い準備した糖鎖供与体 G－1、G－3、G－4、G－1 0、あるいは G－1 6 のいずれか一つを使用した。

[0311] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 1 (工程 2)]

装置 : A K T A a v a n t 2 5 (C y t i v a 製)

カラム : P O R O S X S (1 m l) (T h e r m o F i s h e r 製)

流速 : 0. 3 m l / m i n

負荷液調製の標準プロトコル 1 に従って準備した負荷液約 7 0 m L をカラムに通液 (サンプル通液) した後に、平衡化液 (5 0 m M 酢酸バッファー、4 4 5 m M 塩化ナトリウム水溶液、p H 3. 8) を 1 5 C V (カラム洗浄) 流した。その後、カラム再生目的で、溶出液 (5 0 m M 酢酸バッファー、1 M 塩化ナトリウム水溶液、p H 4. 0) を 8 C V 流した。最後に、定置洗浄 (C I P) 目的で、クリーニング液 (5 0 m M 酢酸バッファー、

0.5 M水酸化ナトリウム水溶液)を3 CV流した。

目的物は280 nmにおける吸光度により検出し、素通り液は50 mA U / 2 mm UVセル以上の場合に回収し、1 Mトリス溶液を加えてpH 5.0-5.4に調整し、素通り画分とした。また、平衡化液によるカラム洗浄工程においては5 CV通液した洗浄液を1つの容器に回収し、洗浄画分とした。この回収液に関して、紫外可視分光光度計システムSoloVPE (C Technologies製)で抗体濃度、及びマイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムLabChip GX (Perkin Elmer製)を用いて糖鎖転移率を確認した。

[0312]

[表20]

表 Z 1 6

実施例	反応条件				糖鎖転移率 (%)			収率 (%)	
	抗体 (濃度)	糖鎖 (当量)	酵素 A	酵素 B	負荷液	素通り液	洗浄液	素通り液	洗浄液
12-1	mAb-1 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	98.8	99.8	86.5	75.62	3.91
12-2	mAb-2 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	97.9	99.7	99.1	78.27	2.86
12-3	mAb-2 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Endo-S D233Q/E 350Q	Endo-Rp N172H	89.3	98.1	84.0	68.18	2.00
12-4	mAb-2 (60 mg/mL)	G-3 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	84.7	94.6	81.8	65.54	1.34
12-5	mAb-2 (60 mg/mL)	G-4 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	92.2	98.9	85.6	68.51	2.52
12-6	mAb-2 (60 mg/mL)	G-10 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	88.5	96.4	82.7	67.01	1.88
12-7	mAb-2 (60 mg/mL)	G-16 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	94.9	99.6	93.1	68.88	2.69
12-8	mAb-3 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	97.8	99.6	98.9	75.09	2.65
12-9	mAb-2 (20 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-Rp N172H	93.6	98.5	89.6	73.30	1.67
12-10	mAb-2 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Endo-Si D241M/Q 311L	Endo-M N175Q/Y 217F	95.6	99.3	93.7	73.02	2.52

[0313] ここで示したように、10当量あるいは20当量の糖鎖ドナー分子を用いて「工程1」を実施した後に「工程2」を実施した結果、「工程1」で用いる抗体、酵素、糖鎖の種類に関わらず、「工程2」の素通り液中に負荷液よりも糖鎖転移率の向上した抗体を回収することができた。これにより、「工程1」と「工程2」の組み合わせで、可能な限り少ない糖鎖ドナー分子使用量（40当量以下、好ましくは、10当量から20当量）で、高純度の均一な糖鎖構造を有するFc含有分子を取得することが可能であることが示された。また、実施例12-2、実施例12-8のように条件によっては洗浄液

中にも負荷液よりも糖鎖転移率の向上した抗体が回収されることを確認した。このため、回収率を高めることを目的に必要な応じて回収液と洗浄液を混合できると考えられる。

[0314] [糖鎖リモデリング抗体、及びアクセプター分子の質量分析]

実施例 12 で得られた回収液に含まれる糖鎖リモデリング抗体分子のうち、代表的な化合物、及び各化合物調製に使用したアクセプター分子を次の方法で確認した。糖鎖リモデリング抗体分子を重鎖と軽鎖の複合体の状態、あるいは重鎖と軽鎖にフラグメント化した状態で分析カラムで分離し、質量分析計に導入した。装置には、Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific Inc 製)、Vanquish Flex UHPLC システム (Thermo Fisher Scientific Inc 製) 及び MAbPac RP (Thermo Fisher Scientific Inc 製) (5 μ m、2.1 $\times$ 50 mm) を使用し、移動相 A には水 / 0.1 % ギ酸 / 0.02 % トリフルオロ酢酸溶液、移動相 B にはアセトニトリル / 0.1 % ギ酸 / 0.02 % トリフルオロ酢酸添溶液を利用し、移動相 A が 10 分間で 20 % から 50 % に変化するグラジエントを使用し、流速 0.4 mL / min、80 $^{\circ}$ C にて分析した。

[0315]

[表21]

表 Z 1 7

化合物	目的化合物	ESI-MS
12-1	mAb1-[SG] ₂	Calculated mass for compound 12-1 (-Lys), M = 149872.15 :found (m/z), 149872.51 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of compound 12-1 (-Lys), M = 51509.27 :found(m/z), 51508.95 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of compound 12-1, M = 23442.93 : found(m/z), 23441.83 (deconvolution data).
12-2	mAb2-[SG] ₂	Calculated mass for compound 12-2 (-Lys, pyrGlu), M = 150208.18 :found(m/z), 150210.63 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of compound 12-2 (-Lys, pyrGlu), M = 51494.07 :found(m/z), 51493.06 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of compound 12-2, M = 23626.14 : found(m/z), 23625.13 (deconvolution data).
12-6	mAb2-[X-SG] ₂	Calculated mass for compound 12-6 (-Lys, pyrGlu), M = 151008.28 :found(m/z), 151009.65 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of compound 12-6 (-Lys, pyrGlu), M = 51894.13 :found(m/z), 51893.73 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of compound 12-6, M = 23626.14 : found(m/z), 23625.35 (deconvolution data).
12-7	mAb2-[X-MSG1] ₂	Calculated mass for compound 12-7 (-Lys, pyrGlu), M = 150025.84 :found(m/z), 150027.12 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of compound 12-7 (-Lys, pyrGlu), M = 51402.90 :found(m/z), 51402.41 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of compound 12-7, M = 23626.14 : found(m/z), 23625.21 (deconvolution data).
12-8	mAb3-[SG] ₂	Calculated mass for of compound 12-8 (-Lys), M = 149789.95 :found(m/z), 149790.65 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of compound 12-8 (-Lys), M = 51385.05 :found(m/z), 51384.65 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of compound 12-8, M = 23526.06 : found(m/z), 23525.04 (deconvolution data).

12-1のアクセプター分子	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb1	Calculated mass for acceptor compound of 12-1 (-Lys), M = 145864.57 :found(m/z), 145867.03 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of acceptor compound 12-1 (-Lys), M = 49505.48 :found(m/z), 49506.16 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of acceptor compound 12-1, M = 23442.93 : found(m/z), 23442.45 (deconvolution data).
12-2、6、7のアクセプター分子	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb2	Calculated mass for acceptor compound 12-2, 6, 7 (-Lys, pyroGlu), M = 146200.60 :found(m/z), 146204.52 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of acceptor compound 12-2, 6, 7 (-Lys, pyroGlu), M = 49490.28 :found(m/z), 49490.81 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of acceptor compound 12-2, 6, 7 M = 23626.14 : found(m/z), 23625.74 (deconvolution data).
12-8のアクセプター分子	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb3	Calculated mass for acceptor compound 12-8 (-Lys), M = 145782.37 :found(m/z), 145784.64 (deconvolution data).
		Calculated mass for the heavy chain of acceptor compound 12-8 (-Lys), M = 49381.25 :found(m/z), 49381.97 (deconvolution data).
		Calculated mass for the light chain of acceptor compound 12-8, M = 23526.06 : found(m/z), 23525.89 (deconvolution data).

上記において「X」は、N₃-PEG（3）を表す。

[0316] <実施例 1 3>陽イオン交換クロマトグラフィー媒体の種類の検討

実施例 1 3 では、実施例 1 2 で示した糖鎖転移率の向上効果が特定のクロマトグラフィー媒体に依存しないことを確認した。ここでは、実施例 1 2 で使用した負荷液調製の標準プロトコル 1 に従って準備した負荷液を、抗体製造に一般的に用いられる陽イオン交換クロマトグラフィー媒体に負荷した。本発明における方法が粒子状、メンブレン状、モノリス状など幅広い陽イオン交換クロマトグラフィー媒体に適用可能であることを示すため、各種の媒体のうち代表的な製品を実験に用いたが、本発明における陽イオン交換クロマトグラフィー媒体はこれらに限定されるものではない。

[0317] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 2（工程 2）]

実施例 1 2 で示した [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 1（工程 2）] のうち、「陽イオン交換クロマトグラフィー媒体」の種類を、POROS XS（1ml）（Thermo Fisher 製）から、CEX 粒子（POROS HS（1mL、Thermo Fisher 製）

、SOURCE 15S (1.66 mL、Cytiva製)、Eshmun
o CP-FT (1 mL、Merck製)、CEXメンブレン (Sart
obind S (1 mL、Sartorius製)、Mustang S (0.86 mL、Pall製)、あるいはCEXモノリス (CIM monolith SO3 (1 mL、BIA Separations製)) に変更した。更に、前述の媒体に適した操作条件で、表Z17に示す各実験を実施した。すなわち、バッファあるいは負荷液は、CEX粒子に対しては接触時間3分 (0.3 mL/minあるいは0.55 mL/min)、CEXメンブレンに対しては5メンブレン体積 (MV) /min (5 mL/minあるいは4.3 mL/min)、CEXモノリスに対しては接触時間1分 (1 mL/min) の流速で通液した。平衡化液を5 CVあるいは5~15 MV送液して平衡化した後、CEX媒体に対して前述の負荷液を負荷した。負荷液は、POROS HS、Eshmun o CP-FT、Sartobind S、CIM monolith SO3に対しては約29 mL、SOURCE 15Sに対しては49 mL、Mustang Sに対しては25 mLを負荷した。カラム負荷液及び平衡化液のpHは用いる担体に応じてpH3.7あるいはpH3.8とし、塩濃度は280~445 mMの範囲で設定した。5~15 CVあるいは15 MVの平衡化液でカラムを洗浄した後、5~8 CVあるいは8~50 MVの溶出液 (50 mM酢酸バッファ、1 M塩化ナトリウム溶液、pH4.0) でCEX媒体を再生した。目的物は280 nmにおける吸光度により検出し、素通り液は50 mAU/2 mm UVセル以上の場合に5 mLずつ分画して回収し、各画分を1つに混合した後、1 Mトリス溶液を加えてpH5.0~5.4に調整し、素通り画分とした。また、平衡化液によるカラム洗浄工程においては5 CVあるいは5 MV通液した洗浄液を1つの容器に回収し、洗浄画分とした。

[0318]

[表22]

表 Z 1 8

実施例	反応条件		単離条件			糖転移率 (%)			収率 (%)	
	抗体 (濃度)	糖鎖 (当量)	CEX 媒体	pH	塩濃度 (mM)	負荷液	素通り液	洗浄液	素通り液	洗浄液
13-1	mAb-2 (20 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	POROS HS (粒子)	3.8	445	85	96.6	80.1	59.16	4.9
13-2	mAb-2 (20 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	SOURCE 15S (粒子)	3.7	280	87.6	96.9	83.7	62.37	4.43
13-3	mAb-2 (20 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	Eshmuno CP-F T (粒子)	3.7	320	89.4	91.7	82.5	77.16	5.15
13-4	mAb-2 (20 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	Sartobind S (Membrane)	3.8	350	87.5	92.5	88.8	63.82	10.36
13-5	mAb-2 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	Mustang S (Me mbrene)	3.7	445	97.6	98.4	97.2	70.08	6.14
13-6	mAb-2 (60 mg/mL)	G-1 (10 eq.)	CIM monolith	3.7	445	98.2	98.9	95.2	76.4	5.28

[0319] ここで示したように、実施例 1 2 で使用したクロマトグラフィー媒体以外の媒体を使用した場合であっても糖鎖転移率を向上できることが確認された。

[0320] <実施例 1 4>クロマトグラフィー操作条件の検討

「工程 2」の糖鎖転移率向上効果が期待できる単離条件を明確にするため、2 種類の C E X 媒体を用いて各種の単離条件で反応液を処理した。

[0321] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 3 (工程 2)]

装置: AKTA avant 25 (Cytiva 製)

カラム: POROS HS (Thermo Fisher 製)、SOURCE 15S (Cytiva 製)

単離条件は、実施例 1 3 で使用した [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 2 (工程 2)] に従った。ただし、pH、及び塩濃度は、表 Z 1 9 に設定した条件で、各実験を実施した。すなわち、カラム負荷液及び平衡化液の pH を pH 3.5 ~ 5.0、塩濃度を 310 ~ 500 mM の範囲とした。また、平衡化液によるカラム洗浄工程においては 5 CV 通液したうちの最初の 1 CV 分を容器に回収し、洗浄画分とした。

[0322] [表23]

表 Z 1 9

実施例	単離条件			糖転移率 (%)			収率 (%)	
	CEX 媒体	pH	塩濃度 (mM)	負荷 液	素通り 液	洗浄 液	素通 り液	洗浄 液
14-1	POROS HS	3.8	460	96.3	99.6	98.0	64.30	4.07
14-2	POROS HS	3.8	480	96.1	99.2	96.1	66.45	4.87
14-3	POROS HS	3.8	490	96.2	99.0	97.2	72.47	3.25
14-4	POROS HS	3.8	500	96.5	98.4	96.7	75.84	3.44
14-5	POROS HS	3.9	480	97.1	97.8	95.9	81.92	2.95
14-6	POROS HS	4.0	460	92.0	92.6	92.8	83.30	3.45
14-7	POROS HS	4.5	460	91.3	91.8	91.7	88.40	6.70
14-8	SOURCE 15S	3.7	310	96.4	98.4	96.6	76.80	4.20
14-9	SOURCE 15S	3.7	320	96.1	98.5	96.3	72.36	6.03
14-10	SOURCE 15S	3.7	330	96.4	97.7	96.1	75.94	5.05
14-11	POROS HS	5.0	460	91.1	90.2	89.9	86.90	2.51
14-12	POROS HS	3.5	460	92.6	99.4	99.3	43.36	0.97

[0323] ここで示したように、いずれのCEX媒体を用いた場合も、負荷液及び平衡化液のpHが糖鎖転移率の向上効果と収率に影響を与えることを確認した。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した。一般的には、抗体の陽イオン交換クロマトグラフィー精製では負荷液及び平衡化液のpHにはpH4.5～6.0の範囲が選択されるが (Groenberg A, Optimizing Cation-Exchange Chromatography with High-Throughput Process Development for mAb Purification, Biopharm Int. 2015; 28: 44-47、及びThermo Fisher Scientific. POROS XS and HS 50 chromatography resins. [In

ternet]. Thermo Fisher Scientific Inc; c2016 [cited 2022 Jan 13]. 3 p. Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/POROS-viral-clearance-CEX-app-note.pdf> POROS XS and HS 50 chromatography resins. Viral clearance capability of cation exchange and recommendations)、本実験では、pH 5.0では糖鎖転移率の向上効果が全く見られず、糖鎖転移率を向上させるにはpH 5.0より低いpH（例えば、pH 3.5～4.5）の範囲で単離を行うことが重要であった。

また、pHと同様に塩濃度が糖鎖転移率の向上効果と収率に影響を与えることを確認した。

[0324] <実施例15>「工程1」に関する応用例（酵素、糖鎖ドナー分子、糖鎖アクセプター分子）

（実施例15a）実施例15で使用する酵素-Aの調製

実施例11と参考例8から、適切な加水分解残存活性を有する酵素を「工程1」に使用する酵素-Aとして採用できることが示唆された。そこで、Endo-SやEndo-S2と同様の性質を示すことが知られているEndo-Se、Endo-Sd、Endo-Szを工程1に使用できるか検証した。酵素は、配列番号76～78に対応する遺伝子をコードしたプラスミドをメタノール資化性酵母Ogataea minutaに導入し、実施例2、実施例4、実施例5と同様に調製した（表Z20）。

[0325]

[表24]

表 Z 2 0. E n d o - S 2 酵素、E n d o - S d 酵素、E n d o - S e 酵素、及び E n d o - S z 酵素溶液

酵素-A 溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
S2-001	Endo-S2 D184Q Q250L	6.26	0.80
S2-005	Endo-S2 D184M Q250L	7.52	1.10
Sd-001	Endo-Sd WT	9.50	0.43
Se-001	Endo-Se D233M	7.98	0.27
Se-002	Endo-Se WT	8.82	0.30
Sz-001	Endo-Sz D234M	8.11	0.34
Sz-002	Endo-Sz D234M Q304L	7.98	0.31
Sz-003	Endo-Sz WT	8.06	0.26

[0326] (実施例 1 5 b) m A b 2 - [M S G 1 - N ₃] ₂ の加水分解

「工程 1」で使用可能な酵素として好ましい残存加水分解活性の程度の指標を明確にするため、

表 Z 2 1 に示す実験を実施した。

実施例 1 5 a で調製した酵素-A を用い、実施例 1 1 と同様にして、各反応時間における加水分解率を算出した (表 Z 2 1)。ただし、抗体溶液 7 - 1 の代わりに、7 - 2 を使用した。

[0327] [表25]

表 Z 2 1

実施例	酵素-A	反応液 pH, 温度	加水分解率 (%)	
			4h	24h
15-1	Endo-S2 D184Q Q250L	7.25, 30°C	15.7	52.1
15-2	Endo-S2 D184M Q250L	7.25, 30°C	22.3	69.3
15-3	Endo-Sd WT	7.25, 30°C	>99.9	>99.9
15-4	Endo-Se D233M	7.25, 30°C	34.8	>99.9
15-5	Endo-Se WT	7.25, 30°C	>99.9	>99.9
15-6	Endo-Sz D234M	7.25, 30°C	34.1	98.3
15-7	Endo-Sz D234M Q304L	7.25, 30°C	8.4	28.1
15-8	Endo-Sz WT	7.25, 30°C	>99.9	>99.9

[0328] (実施例 1 5 c) 「工程 1」の反応条件：酵素-A と酵素-B の組み合わせ

(実施例 8 - 2) に記載した [糖鎖転移反応標準プロトコル 2] に従って、糖鎖転移反応を実行し、サンプリング液を準備した。その後、(実施例 8 - 1) と同様にして、各反応時間における糖鎖転移率を算出した (表 Z 2 2)。ただし、各実験に使用した糖鎖供与体や糖鎖当量、酵素は、適宜、表 Z

22に表記したものに変更した。また、実施例15-19から実施例15-21では、アクセプター分子として、参考例22で調製したGlcNAc-mAb4、(Fuc α 1,6)GlcNAc-Fc-A、(Fuc α 1,6)GlcNAc-CLCH-Aを使用した。

[0329] [表26]

表Z22

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
15-9	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N 175Q	88.0	86.7	84.1	83.0	64.5	59.4
15-10	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 T138Q	Endo-M N 175Q	72.2	73.7	68.4	63.1	33.6	28.7
15-11	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M/Q250L	Endo-M N 175Q	98.4	99.7	99.8	99.6	99.2	98.8
15-12	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-M N 175Q	98.4	99.8	98.4	99.8	99.5	98.9
15-13	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-Se D233M	Endo-Rp N172V	34.3	63.8	83.1	91.8	95.2	94.6
15-14	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-Sz D234M	Endo-Rp N172V	52.2	87.4	96.5	97.3	96.4	95.9
15-15	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-Sz D234M/Q304L	Endo-Rp N172V	40.8	75.0	93.1	98.0	98.2	98.1
15-16	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-Si D241Q/Q311L	Endo-Rp N172V	32.4	68.9	89.7	96.8	99.6	99.7
15-17	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-Si D241 M	Endo-Rp N172V	75.2	97.0	96.9	97.1	95.2	95.2
15-18	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S D233Q /E350Q	Endo-Rp N172V	68.3	98.2	99.4	98.6	99.0	98.7
15-19	mAb4 (40)	SG-1 (40eq.)	Endo-Si D241Q/Q311L	Endo-Rp N172V	63.2	91.1	96.6	97.5	97.6	97.5
15-20	Fc-A (40)	SG-1 (40eq.)	Endo-Si D241Q/Q311L	Endo-Rp N172V	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	91.2	N. A.
15-21	CLCH (40)	SG-1 (40eq.)	Endo-Si D241Q/Q311L	Endo-Rp N172V	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	90.6	N. A.

ただし、実施例15-20、および15-21では、反応開始24時間後にはのみ糖鎖転移率を評価したため、その他の反応時間はN. A. と表記した。

[0330] ここで示したように、酵素-AにEndo-S2 T138Qを用いた場合（実施例15-10）を除き、いずれの酵素の組み合わせにおいても糖鎖転移反応にて中程度（＞80％）以上の糖鎖転移率の抗体が得られることを確認した。参考例8で示すとおり、Endo-S2 T138Qを用いる場合も、糖鎖供与体の使用量を増やす、残存加水分解活性を低減する変異を導

入することで中程度以上の糖鎖転移率の抗体を得ることが可能と推察される。本実施例においては、代表的な酵素の組み合わせを評価することを目的として酵素－AとしてEndo－S、Endo－Si、Endo－S2、Endo－Se、Endo－Szを用いたが、実施例11に記載のとおり、本発明における酵素－Aはこれらに限定されず、残存加水分解活性を指標に目的に応じて任意に選択できる。また、実施例15－19から実施例15－21に示したとおり、フコースレス抗体、Fc断片、及び「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とを組み合わせたCLCH」を用いた場合も、中程度(>80%)以上の糖鎖転移率が得られた。このことから、本発明の「工程1」は、Fc含有分子の種類は抗体に限定されず、幅広いFc含有分子に応用可能であることが実証された。

[0331] (実施例15d) 酵素－A／酵素－B融合タンパク酵素の調製

化学的、あるいは遺伝子工学的な手法により2つ以上のタンパク質またはタンパク質断片を結合させ、1つの融合タンパク質として機能させる方法が知られている。例えば、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)において、エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼに精製タグとして炭水化物結合モジュールあるいはグルタチオン S-トランスフェラーゼを融合させた例が報告されている。また、特許文献(WO2017137459)において、基質選択性の異なるエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ同士を融合した酵素(Endo－SとEndo－H、あるいはEndo－F3とEndo－Hの融合タンパク質など)を用い、ハイマンノース型糖鎖および複合型糖鎖など、基本構造の異なる糖鎖が付加された抗体から単一のステップで糖鎖が切断された抗体を得る方法が報告されている。一方で、糖鎖ドナー分子からアクセプター分子に糖鎖を転移させる反応を効率化することを目的に融合タンパク質を用いた例はこれまで報告されていない。本明細書に記

載のとおり、本発明において、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。ここでは、代表として、酵素－Bと酵素－Aを連続したアミノ酸残基を含むリンカーにより結合した融合タンパク質を調製し、反応性を確認した。融合タンパク質は、配列番号80～81に対応する遺伝子をコードした発現プラスミドをメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* に導入することで産生株を得た。メタノール誘導によるタンパク質の発現では、振盪培養の場合、バッフルフラスコを用いて植菌後1日目にメタノール誘導、植菌後3日目に培養を終了し、遠心分離にて菌体を集菌した。集菌した菌体を、Yeast Buster（登録商標） Protein Extraction Reagent（Merck, 71186）を用いて破碎し、遠心分離を行った上清をCapto Chelatingを用いて精製した。最後にAmicon Ultra-15, 30kDa（Merck）でPBS（－）（富士フイルム和光純薬）にバッファーを置換して酵素液を得た。

[0332] [表27]

表Z23. 酵素－B／酵素－A融合タンパク酵素溶液

酵素溶液	酵素-B/酵素-A 融合タンパク酵素	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
F-001	[Endo-Rp N172H]- [Endo-Si D 241M/Q311L]	8.08	0.38
F-002	[Endo-Rp N172V]- [Endo-Si D 241Q/Q311L]	8.00	0.36

[0333] （実施例15e）mAb2－[MSG1－N₃]₂の加水分解

「工程1」で使用可能な酵素として好ましい残存加水分解活性の程度の指標を明確にするため、

表Z24に示す実験を実施した。

実施例15dで調製した酵素を用い、実施例11と同様にして、各反応時間における加水分解率を算出した（表Z24）。

[0334]

[表28]

表 Z 2 4

実施例	酵素-B/酵素-A 融合タンパク酵素	反応液pH, 温度	加水分解率 (%)	
			4h	24h
15-22	[Endo-Rp N172H]- [Endo-Si D241M/Q311L]	7.25, 30°C	8.7	33.2
15-23	[Endo-Rp N172V]- [Endo-Si D241Q/Q311L]	7.25, 30°C	20.4	68.1

[0335] (実施例 15 f) 酵素-B/酵素-A融合タンパク酵素の反応例

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (1 mg)、糖鎖供与体 (20 当量)、酵素-B/酵素-A融合タンパク (3.2% w/w) と、適量の 50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量液量 16.7 μ L とし、30°C で 24 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。反応終了後、反応液の pH を測定した。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 1 mg/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。

その後、(実施例 8-1) と同様にして、各反応時間における糖鎖転移率を算出した (表 Z 25)。ただし、各実験に使用した糖鎖供与体や糖鎖当量、酵素は、適宜、表 Z 25 に表記したものに変更した。

[0336] [表29]

表 Z 2 5

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-B/酵素-A 融合タンパク酵素	糖鎖転移率 (%)				
				16h	18h	20h	22h	24h
15-24	mAb1 (60)	G-1 (20eq.)	[Endo-Rp N172H]- [Endo-Si D241M/Q311L]	97.6	97.3	97.3	97.3	97.2
15-25	mAb1 (60)	G-1 (20eq.)	[Endo-Rp N172V]- [Endo-Si D241Q/Q311L]	72.4	73.9	74.1	74.4	76.3

[0337] ここで示したように、酵素-Bと酵素-Aをアミノ酸で結合した融合タンパク質を用いた場合も、2種類の酵素を別分子として工程 1 に添加した場合 (実施例 10) と同様に、所望の糖鎖が付加された抗体を得ることができた。また、配列番号 79 についても、上記手順に従い配列番号 80 及び 81 の融合タンパク質と同様に融合タンパク質を調製することができる。本実施例

においては、代表的な融合タンパク質の例として、それぞれの酵素の全長をアミノ酸により直接結合した融合タンパク質を用いたが、本発明における融合タンパク質はこれに限定されない。

[0338] <実施例 16> 「工程 2」の応用例

(実施例 16-1) 陽イオン-疎水マルチモード樹脂を用いた精製

実施例 12 で示した糖鎖転移率の向上効果が、陽イオン-疎水マルチモード樹脂を用いた場合にも得られることを確認した。

ここでは、下記の負荷液調製の標準プロトコル 2 に従って準備した負荷液を、抗体製造に一般的に用いられる陽イオン-疎水マルチモード樹脂に負荷した。市販の代表的な製品を実験に用いたが、本発明における陽イオン-疎水マルチモード樹脂はこれらに限定されるものではない。

[0339] [負荷液調製の標準プロトコル 2 (工程 1)]

<工程 1>

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1 (アクセプター分子溶液、2000mg) と、20 当量の糖鎖ドナー分子 (G-1) と、1.6% (w/w) の酵素-A (S-001) と、0.2% (w/w) の酵素-B (M-001) との混合液に、適量の 50mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、抗体の終濃度が 60mg/mL になるように、反応液量を調整した。続いて、その反応液を 30℃ でインキュベートし、反応開始 24 時間後に反応を終了し、精製実験を開始するまで凍結保管した。

[0340] <サンプリング>

反応終了後、糖鎖転移率を測定する目的で、極微量の反応液をサンプリングし、抗体濃度が 1mg/mL になるように精製水で希釈した後、LabChip 分析開始まで凍結保管した。

[0341] [陽イオン-疎水マルチモードクロマトグラフィーの標準プロトコル 1 (工程 2)]

装置: AKTA avant 25 (Cytiva 製)

カラム (いずれも容量 1mL): Capto MMC Impress (C

y t i v a 製)、E s h m u n o C M X (M e r c k 製)、N u v i a c P r i m e (B I O - R A D L a b o r a t o r i e s 製)

流速：0.3 ml/min

負荷液調製の標準プロトコル2に従って準備した反応液に100 mM酢酸緩衝液(pH 3.9)、1 M塩化ナトリウム水溶液、1 M塩酸、精製水を加えてカラム負荷液を調製した。負荷液は抗体濃度が5 mg/mLとなり、かつ、各実験のカラム平衡化液と同じpH及び塩化ナトリウムの終濃度となるように調製した。負荷液の調製後、負荷液の糖鎖転移率を確認することを目的として、0.5 mLをサンプリングした。調製した負荷液約30 mLをカラムに通液(サンプル通液)した後に、平衡化液(50 mM 酢酸バッファ、490 mM 塩化ナトリウム水溶液、pH 3.8)を5 CV流した(カラム洗浄)。その後、カラム再生目的で、溶出液(50 mM 酢酸バッファ、1 M塩化ナトリウム水溶液、pH 4.0))を5 CV流した。最後に、定置洗浄(CIP)目的で、クリーニング液(0.5 M水酸化ナトリウム水溶液)を3 CV流した。サンプル通液時のカラム素通り液中の目的物は280 nmにおける吸光度により検出し、50 mAU/2 mm UVセル以上の場合に回収し、1 Mトリス溶液を加えてpH 5.0-5.4に調整し、回収液とした。この回収液に関して、紫外可視分光光度計システムS o l o V P E (C T e c h n o l o g i e s 製)で抗体濃度、及びマイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムL a b C h i p G X (P e r k i n E l m e r 製)を用いて糖鎖転移率を確認した(表Z26)。

[0342]

[表30]

表 Z 2 6

実施例	反応条件		媒体	糖転移率 (%)		収率 (%)
	抗体 (濃度)	糖鎖 (当量)		負荷液	回収液	
16-1-1	mAb-1 (60 mg/mL)	G-1 (20 eq.)	Capto MMC Impress	96.1	98.6	41.26
16-1-2			Eshmuno CMX	96.1	98.2	49.97
16-1-3			Nuvia cPrime	96.1	98.3	48.32

[0343] ここで示したように、陽イオン疎水マルチモード樹脂を用いた場合にも糖鎖転移率の向上効果が得られることが確認された。

[0344] (実施例 16-2) 結合／溶出モードで精製した方法との比較

目的物を陽イオン交換カラムに吸着させた後、溶出液を通液して溶出画分に回収した場合も、糖鎖転移率の向上効果が得られることを確認した。実施例 12 に記載したように目的物を陽イオン交換カラム素通り画分に回収する方法と直接比較するため、同じ方法（負荷液調製の標準プロトコル 2（工程 1））で調製した反応液を用い、陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 4、あるいは陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 5 にて精製を行った。

[0345] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 4（工程 2）]

装置：AKTA avant 25（Cytiva 製）

カラム：Mono S（1 ml）（Cytiva 製）

流速：0.3 ml/min

負荷液調製の標準プロトコル 2 に従って準備した反応液に対し、11 倍量の平衡化液（50 mM 酢酸バッファー、pH 3.8、pH 4.0、あるいは pH 4.2）を加えてカラム負荷液を調製した。負荷液を表 Z 27 に従った負荷量となるようにカラムに通液し、目的物をカラムに吸着させた。平衡化液を 5 CV 流してカラムを洗浄した後、溶出液（50 mM 酢酸バッファー、1 M 塩化ナトリウム水溶液、pH は平衡化液に合わせた）を用いて塩

化ナトリウムの直線的濃度勾配（20CVで0～100%）により目的物をカラムから溶出させた。溶出液中の目的物は280nmにおける吸光度により検出し、20mAU/2mm UVセル以上の場合に0.5mlずつ分画した。この分画液に関して、紫外可視分光光度計システムSoloVPE（C Technologies製）で抗体濃度、及びマイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムLabChip GX（Perkin Elmer製）を用いて糖鎖転移率を確認し、負荷液と比較して糖鎖転移率が向上している画分のみを混合し、回収液とした（表Z27）。

[0346] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル5（工程2）]

装置：AKTA avant 25（Cytiva製）

カラム：MonoS（1ml）（Cytiva製）

流速：0.3ml/min

負荷液調製の標準プロトコル2に従って準備した反応液に対し、100mM酢酸緩衝液（pH 3.9）、1M塩化ナトリウム水溶液、1M塩酸、精製水を加えてカラム負荷液を調製した。負荷液は抗体濃度が5mg/mLとなり、かつ、各実験のカラム平衡化液と同じpH及び塩化ナトリウムの終濃度となるように調製した。負荷液約30mLをカラムに通液（サンプル通液）した後に、平衡化液（50mM 酢酸バッファー、490mM 塩化ナトリウム水溶液、pH 3.8）を5CV流した（カラム洗浄）。その後、カラム再生目的で、溶出液（50mM 酢酸バッファー、1M塩化ナトリウム水溶液、pH 4.0）を5CV流した。最後に、定置洗浄（CIP）目的で、クリーニング液（0.5M水酸化ナトリウム水溶液）を3CV流した。サンプル通液時のカラム素通り液中の目的物は280nmにおける吸光度により検出し、50mAU/2mm UVセル以上の場合に回収し、1Mトリス溶液を加えてpH 5.0～5.4に調整し、回収液とした。この回収液に関して、紫外可視分光光度計システムSoloVPE（C Technologies製）で抗体濃度、及びマイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムLabChip GX（Perkin Elmer製）を用いて

糖鎖転移率を確認した（表 Z 2 7）。

[0347] [表31]

表 Z 2 7

実施例	精製条件			糖転移率 (%)		収率 (%)
	精製方法	pH	負荷液量 (mL)	負荷液	回収液	
16-2-1	結合/溶出 (プロトコル4)	4.2	1.0	96.1	97.8	36.90
16-2-2	結合/溶出 (プロトコル4)	4.0	1.0	96.1	98.8	18.01
16-2-3	結合/溶出 (プロトコル4)	3.8	1.0	96.1	99.4	5.59
16-2-4	結合/溶出 (プロトコル4)	4.2	4.0	96.1	98.2	29.31
16-2-5	結合/溶出 (プロトコル4)	4.2	6.4	96.1	98.0	25.29
16-2-6	素通り (プロトコル5)	3.8	29.8	96.1	98.4	83.38

[0348] ここで示したように、目的物を陽イオン交換カラムに吸着させた後、溶出液を通液して溶出画分に回収した場合も、糖鎖転移率の向上効果が得られることを確認した。また、目的物を素通り画分に回収する場合（実施例 1 4）と同様に、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ことを確認した。

[0349] （実施例 1 6 – 3）オキサゾリン法を用いて、反応液を準備した場合

実施例 1 2 で示した糖鎖転移率の向上効果が、工程 1 の糖鎖供与体にオキサゾリン体を用いた場合にも得られることを確認した。まず、工程 1 における糖鎖供与体の適切な使用量を確認した。

[0350] [負荷液調製の標準プロトコル 3（工程 1）]

<工程 1>

(F u c α 1 , 6) G l c N A c – m A b 1（アクセプター分子溶液、6

mg) と、糖鎖供与体 N₃-PEG (3)]-MSG1 (9)-Ox (以下、適宜「N₃-MSG1-Ox」と表記する、特許文献：WO2019065964) (2当量、4当量、6当量、8当量、あるいは10当量)、酵素-A (0.5%w/w) と、適量の50mMトリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総液量300μLとし、30℃で2時間反応させた。

[0351] <サンプリング>

反応終了後、糖鎖転移率を測定する目的で、極微量の反応液をサンプリングし、抗体濃度が1mg/mLになるように精製水で希釈した後、マイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システムLabChip GX (Perkin Elmer製) を用いて糖鎖転移率を確認した (表Z28)。

[0352] [表32]

表 Z 2 8

実施例	反応条件		糖転移率 (%)
	糖鎖	糖鎖量 (当量)	
16-3-1	N ₃ -MSG1-Ox	2	77.2
16-3-2		4	99.4
16-3-3		6	>99.9
16-3-4		8	>99.9
16-3-5		10	>99.9

[0353] 表Z28で示した結果から、工程1にて4当量以上の糖鎖供与体 N₃-MSG1-Oxを用いた場合は糖鎖転移率が非常に高くなるため、工程2で糖鎖転移率の向上効果を評価するのに適さないと考えられた。このため、工程1にて2当量の糖鎖供与体 N₃-MSG1-Oxを用いて工程2の負荷液を調製した。

[0354] [負荷液調製の標準プロトコル4 (工程1)]

 [負荷液調製の標準プロトコル3 (工程1)] のうち、(Fuca1, 6

) G l c N A c - m A b 1 (アクセプター分子溶液) の添加量を 150 mg に、糖鎖供与体 N₃-M S G 1 - O x の添加量を 2 当量に変更した。更に、反応総液量を 7.5 ml とした。

[0355] <負荷液の pH、塩濃度調整>

続いて、反応液に 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.9)、1 M 塩化ナトリウム水溶液、1 M 塩酸、精製水を加えてカラム負荷液を調製した。負荷液は抗体濃度が 5 mg/mL となり、かつ、各実験のカラム平衡化液と同じ pH 及び塩化ナトリウムの終濃度となるように調製した。負荷液の調製後、負荷液の糖鎖転移率を確認することを目的として、0.5 mL をサンプリングした。

[0356] [陽イオン交換クロマトグラフィーの標準プロトコル 5 (工程 2)]

装置: AKTA avant 25 (Cytiva 製)

カラム: POROS HS (1 ml) (Thermo Fisher 製)

流速: 0.3 ml/min

負荷液調製の標準プロトコル 4 に従って準備した負荷液約 20 mL をカラムに通液 (サンプル通液) した後に、平衡化液 (50 mM 酢酸バッファー、490 mM 塩化ナトリウム水溶液、pH 3.8) を 5 CV 流した (カラム洗浄)。その後、カラム再生目的で、溶出液 (50 mM 酢酸バッファー、1 M 塩化ナトリウム水溶液、pH 4.0) を 5 CV 流した。最後に、定置洗浄 (CIP) 目的で、クリーニング液 (0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液) を 3 CV 流した。サンプル通液時のカラム素通り液、およびカラム洗浄時の洗浄液に含まれる目的物は、280 nm における吸光度により検出し、50 mAU/2 mm UV セル以上の場合に回収し、1 M トリス溶液を加えて pH 5.0-5.4 に調整し、それぞれ素通り液および洗浄液とした。これらの回収液に関して、紫外可視分光光度計システム SoloVPE (Technologies 製) で抗体濃度、及びマイクロチップ型キャピラリー全自動電気泳動システム LabChip GX (Perkin Elmer 製) を用いて糖鎖転移率を確認した。(表 Z29)

[0357] [表33]

表 Z 2 9

実施例	反応条件		糖転移率 (%)			収率 (%)	
	抗体	糖鎖	負荷液	素通り液	洗浄液	素通り液	洗浄液
	(濃度)	(当量)					
16-3-6	mAb-1 (20 mg/mL)	N ₃ -MSG1-Ox (2 eq.)	77.5	84.1	82.3	84.78	1.74

[0358] ここで示したように、工程 1 の糖鎖供与体にオキサゾリン体を用いた場合でも工程 2 にて糖鎖転移率の向上効果が得られることが確認された。

[0359] 本発明に利用可能な酵素 A は、既知の酵素、及びその変異体に限定されない。実施例 1 に記載した要件を満たせば、任意の酵素が選択できる。既知の酵素配列情報をもとにして、新たに変異体を探索しても良い。そこで、実施例 17 から実施例 19 に、「工程 1」に利用可能な酵素 A のアミノ酸変異確認方法（以下、「アミノ酸変異確認法」と呼ぶ）を示す。

[0360] <実施例 17> E n d o - S i 単変異体の調製

ここでは網羅的探索法を示すため、E n d o - S i の触媒活性ドメインに着目した。変異位置アミノ酸の単独変異での活性を解析するため、E n d o - S i 単変異体（D 2 4 1 X、T 1 9 0 X、Q 3 1 1 X、E 3 6 0 X）を調製した。

T 1 9 0 の単変異体、及び実施例 1 でデザインした変異体以外の D 2 4 1、Q 3 1 1、E 3 6 0 各単変異体について、実施例 2 に記載の方法に準じて調製した（表 Z 3 1）。ただし、反応スケールが異なるため、培養時には 500 mL あるいは 1000 mL 容バッフルフラスコの代わりに、96 穴ディープウェルプレートを使用し、精製時には、C a p t o C h e l a t i n g の代わりに、H i s タグ精製キット C a p t u r e m H i s - T a g g e d P u r i f i c a t i o n（C l o n t e c h 社）を使用し、簡易精製した。

[0361]

[表34]

表 Z 3 1

酵素-A溶液	変異体	濃度 (mg / mL)	容量 (mL)
Si-008	T190A	0.258	0.066
Si-009	T190R	0.328	0.061
Si-010	T190N	0.310	0.061
Si-011	T190C	0.348	0.059
Si-012	T190D	0.268	0.060
Si-013	T190E	0.244	0.058
Si-014	T190G	0.215	0.056
Si-015	T190H	0.504	0.056
Si-016	T190I	0.423	0.058
Si-017	T190K	0.241	0.055
Si-018	T190L	0.285	0.055
Si-019	T190M	0.440	0.057
Si-020	T190F	0.082	0.059
Si-021	T190P	0.142	0.060
Si-022	T190S	0.143	0.055
Si-023	T190W	0.132	0.058
Si-024	T190Y	0.357	0.062
Si-025	T190V	0.138	0.062
Si-026	T190Q	0.349	0.062
Si-027	D241A	0.107	0.052
Si-028	D241R	0.098	0.052
Si-029	D241N	0.053	0.047
Si-030	D241C	0.048	0.050
Si-031	D241E	0.088	0.075
Si-032	D241G	0.085	0.054
Si-033	D241H	0.479	0.054
Si-034	D241I	0.106	0.065
Si-035	D241L	0.455	0.053
Si-036	D241K	0.259	0.048
Si-037	D241F	0.216	0.054
Si-038	D241P	0.119	0.056
Si-039	D241S	0.226	0.058
Si-040	D241T	0.252	0.054
Si-041	D241W	0.288	0.056

Si-042	D241Y	0.113	0.054
Si-043	D241V	0.255	0.062
Si-044	Q311A	0.648	0.065
Si-045	Q311R	0.161	0.076
Si-046	Q311N	0.441	0.066
Si-047	Q311C	0.207	0.063
Si-048	Q311D	0.587	0.064
Si-049	Q311E	0.539	0.069
Si-050	Q311G	0.238	0.060
Si-051	Q311H	0.365	0.060
Si-052	Q311I	0.397	0.055
Si-053	Q311K	0.147	0.058
Si-054	Q311M	0.615	0.063
Si-055	Q311F	0.123	0.058
Si-056	Q311P	0.583	0.067
Si-057	Q311S	0.115	0.058
Si-058	Q311T	1.037	0.057
Si-059	Q311W	0.151	0.060
Si-060	Q311Y	0.239	0.052
Si-061	Q311V	0.305	0.065
Si-062	Q311L	0.491	0.067
Si-063	E360A	0.158	0.062
Si-064	E360R	0.156	0.063
Si-065	E360N	0.430	0.058
Si-066	E360C	0.514	0.062
Si-067	E360D	0.474	0.062
Si-068	E360H	0.203	0.060
Si-069	E360I	0.164	0.065
Si-070	E360K	0.154	0.078
Si-071	E360L	0.349	0.063
Si-072	E360M	0.223	0.074
Si-073	E360P	0.238	0.070
Si-074	E360S	0.098	0.070
Si-075	E360T	0.120	0.071
Si-076	E360W	0.086	0.068
Si-077	E360Y	0.102	0.066
Si-078	E360V	0.215	0.070

[0362] <実施例 18> mAb2 - [MSG1 - N₃]₂ の加水分解

次に Endo-Si WT と比べて同等以下の残存加水分解活性を有する酵素を絞り込む方法を示す。ここで用いる抗体には、糖鎖が付加されている抗体であれば、任意の抗体を用いて良い。

mAb2 - [MSG1 - N₃]₂ (50 μg)、実施例 17 で準備した Endo-Si 単変異体 (1 μg) 及び 50 mM Tris-HCl バッファー

(pH 7.25) を含む計 23.2 μ L の反応液を調製し、30℃で反応させた。反応開始後、1 時間、4 時間及び 24 時間の反応液をサンプリングした。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 1 mg/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。実施例 11 と同様にして、各反応時間における加水分解率を算出した。この試験を計 2 回実施した (表 Z32)。

[0363] [表35]

表 Z 3 2

実施例	酵素-A	使用した 酵素A溶 液	加水分解率 (%) [1回目 / 2回目]		
			1h	4h	24h
18-1	Endo-Si T190A	Si-008	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-2	Endo-Si T190C	Si-011	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-3	Endo-Si T190D	Si-012	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-4	Endo-Si T190E	Si-013	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-5	Endo-Si T190F	Si-020	6.5 / 16.3	33.9 / 47.8	92.8 / >99.9
18-6	Endo-Si T190G	Si-014	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-7	Endo-Si T190H	Si-015	86.2 / 82.3	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-8	Endo-Si T190I	Si-016	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-9	Endo-Si T190K	Si-017	2.0 / 4.0	11.2 / 4.4	28.2 / 30.9
18-10	Endo-Si T190L	Si-018	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-11	Endo-Si T190M	Si-019	91.4 / 91.3	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-12	Endo-Si T190N	Si-029	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-13	Endo-Si T190P	Si-021	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-14	Endo-Si T190Q	Si-026	60.2 / 70.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-15	Endo-Si T190R	Si-009	2.1 / 4.1	14.3 / 6.1	36.7 / 34.5
18-16	Endo-Si T190S	Si-022	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-17	Endo-Si T190V	Si-025	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-18	Endo-Si T190W	Si-023	7.8 / 14.0	34.5 / 37.0	85.3 / 82.0
18-19	Endo-Si T190Y	Si-024	12.5 / 22.3	54.6 / 56.6	94.1 / 95.2
18-20	Endo-Si D241A	Si-027	64.4 / 62.8	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-21	Endo-Si D241C	Si-030	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-22	Endo-Si D241E	Si-031	37.7 / 48.2	97.0 / 97.0	> 99.9 / >99.9
18-23	Endo-Si D241F	Si-037	0.9 / <0.1	2.2 / 4.1	15.8 / 8.9
18-24	Endo-Si D241G	Si-032	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-25	Endo-Si D241H	Si-033	2.3 / <0.1	4.1 / 9.0	25.2 / 16.9
18-26	Endo-Si D241I	Si-034	8.1 / 11.0	32.6 / 45.2	> 99.9 / >99.9
18-27	Endo-Si D241K	Si-036	0.7 / <0.1	0.8 / 1.7	<0.1 / 0.6
18-28	Endo-Si D241L	Si-035	4.5 / 4.4	15.1 / 24.8	74.9 / 77.2
18-29	Endo-Si D241N	Si-029	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9

18-30	Endo-Si D241P	Si-038	2.4 / <0.1	8.1 / 15.6	60.6 / 62.7
18-31	Endo-Si D241R	Si-028	0.6 / <0.1	0.7 / 2.0	2.2 / 0.8
18-32	Endo-Si D241S	Si-039	87.2 / 93.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-33	Endo-Si D241T	Si-040	35.0 / 37.3	> 99.9 / 94.2	> 99.9 / >99.9
18-34	Endo-Si D241V	Si-043	30.5 / 36.8	96.0 / 91.9	96.0 / >99.9
18-35	Endo-Si D241W	Si-041	1.0 / <0.1	2.4 / 4.8	34.7 / 15.0
18-36	Endo-Si D241Y	Si-042	0.8 / <0.1	1.5 / 3.0	10.4 / 9.0
18-37	Endo-Si Q311A	Si-044	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-38	Endo-Si Q311C	Si-047	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-39	Endo-Si Q311D	Si-048	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-40	Endo-Si Q311E	Si-049	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-41	Endo-Si Q311F	Si-064	5.0 / 3.6	24.4 / 24.4	> 99.9 / 94.0
18-42	Endo-Si Q311G	Si-050	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-43	Endo-Si Q311H	Si-051	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-44	Endo-Si Q311I	Si-052	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-45	Endo-Si Q311K	Si-053	4.7 / 3.9	32.0 / 28.7	> 99.9 / 93.5
18-46	Endo-Si Q311L	Si-062	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-47	Endo-Si Q311M	Si-054	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-48	Endo-Si Q311N	Si-046	46.8 / 52.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-49	Endo-Si Q311P	Si-056	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-50	Endo-Si Q311R	Si-045	0.7 / <0.1	0.8 / 2.8	2.0 / 3.8
18-51	Endo-Si Q311S	Si-057	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-52	Endo-Si Q311T	Si-058	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-53	Endo-Si Q311V	Si-061	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-54	Endo-Si Q311W	Si-059	0.7 / <0.1	3.7 / 1.5	9.2 / 4.5
18-55	Endo-Si Q311Y	Si-060	1.3 / <0.1	5.0 / 4.8	26.0 / 26.6
18-56	Endo-Si E360A	Si-063	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-57	Endo-Si E360C	Si-066	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-58	Endo-Si E360D	Si-067	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-59	Endo-Si E360H	Si-068	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-60	Endo-Si E360I	Si-069	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-61	Endo-Si E360K	Si-070	71.3 / 94.5	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-62	Endo-Si E360L	Si-071	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-63	Endo-Si E360M	Si-072	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-64	Endo-Si E360N	Si-065	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-65	Endo-Si E360P	Si-073	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-66	Endo-Si E360R	Si-064	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-67	Endo-Si E360S	Si-074	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-68	Endo-Si E360T	Si-075	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-69	Endo-Si E360V	Si-078	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9
18-70	Endo-Si E360W	Si-076	55.8 / 71.6	88.8 / 97.2	> 99.9 / >99.9
18-71	Endo-Si E360Y	Si-077	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9	> 99.9 / >99.9

[0364] この評価では、E n d o - S i W Tと比べて同等以下の残存加水分解活性を有する酵素に絞り込むことが可能である。「1時間時点で加水分解率が>99.9%を示した酵素」は、実施例11で測定したE n d o - S i W Tの加水分解活性と比較して、同等以上の残存加水分解活性を示すと判定で

きる。そこで、「1時間時点で加水分解率が>99.9%を示さなかった酵素」について、実施例19の評価を実施した。

[0365] <実施例19>糖鎖供与体G-1 (SGP) を用いた糖転移反応確認

次に、「工程1」に採用可能な酵素のアミノ酸変異を特定する方法を示す。

(Fuc α 1,6)GlcNAc-mAb2 (50 μ g)、糖鎖供与体G-1 (122.72 μ g、50当量)、実施例17で準備したEndo-Si単変異体 (2 μ g)、実施例3-2で調製したEndo-Rp N172H (5.7 μ g)、及び50mM Tris-HClバッファー (pH7.25) を含む計28 μ Lの反応液を調製し、30℃で反応させた。

反応開始後、4時間、8時間及び24時間の反応液をサンプリングした。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。実施例8-1と同様にして、各反応時間における糖鎖転移率を算出した。(表Z33)。

[0366]

[表36]

表 Z 3 3

実施例	酵素-A	使用した 酵素A溶液	糖鎖転移率 (%)		
			4h	8h	24h
19-1	Endo-Si T190F	Si-020	21.2	47.4	75.4
19-2	Endo-Si T190H	Si-015	37.0	61.3	65.5
19-3	Endo-Si T190K	Si-017	11.2	30.4	61.5
19-4	Endo-Si T190M	Si-019	40.3	64.4	69.6
19-5	Endo-Si T190Q	Si-026	32.7	61.9	74.2
19-6	Endo-Si T190R	Si-009	9.0	27.6	56.4
19-7	Endo-Si T190W	Si-023	27.6	58.3	87.9
19-8	Endo-Si T190Y	Si-024	42.1	73.9	88.2
19-9	Endo-Si D241A	Si-027	27.9	51.1	70.7
19-10	Endo-Si D241E	Si-031	26.7	43.4	48.5
19-11	Endo-Si D241F	Si-037	<0.1	4.2	19.4
19-12	Endo-Si D241H	Si-033	39.4	63.2	87.0
19-13	Endo-Si D241I	Si-034	48.1	74.2	50.0
19-14	Endo-Si D241K	Si-036	<0.1	<0.1	<0.1
19-15	Endo-Si D241L	Si-035	57.7	81.9	91.6
19-16	Endo-Si D241P	Si-038	34.0	61.8	84.9
19-17	Endo-Si D241R	Si-028	<0.1	2.5	4.0
19-18	Endo-Si D241S	Si-039	34.3	54.4	59.4
19-19	Endo-Si D241T	Si-040	50.2	74.8	77.9
19-20	Endo-Si D241V	Si-043	59.2	86.4	89.6
19-21	Endo-Si D241W	Si-041	10.3	23.6	49.3
19-22	Endo-Si D241Y	Si-042	12.8	28.6	52.6
19-23	Endo-Si Q311F	Si-064	5.7	15.1	29.2
19-24	Endo-Si Q311K	Si-053	<0.1	<0.1	4.8
19-25	Endo-Si Q311N	Si-046	34.4	62.5	81.1
19-26	Endo-Si Q311R	Si-045	<0.1	<0.1	<0.1
19-27	Endo-Si Q311W	Si-059	<0.1	<0.1	<0.1
19-28	Endo-Si Q311Y	Si-060	<0.1	5.7	10.8
19-29	Endo-Si E360K	Si-070	2.6	7.5	15.0
19-30	Endo-Si E360W	Si-076	<0.1	<0.1	<0.1

[0367] 表 Z 3 3 の結果より、次のことが確認された。

「D 2 4 1 に単変異を入れる場合」

酵素Aとして利用可能なE n d o - S i 単変異体は、必ずしもD 2 4 1 X₁が、X₁ = QあるいはX₁ = Mに限定されず、一態様としては、X₁ = KとX₁ = Rを除く、任意のアミノ酸が考えられる。

「D 2 4 1 に単変異を入れない場合」

ここでは、代表例として、T 1 9 0 X₂、Q 3 1 1 X₃、E 3 6 0 X₄の3カ所について、網羅的な解析を実施した。一態様としては、T 1 9 0 X₂は、X₂ =

F、H、K、M、Q、R、W、Yが考えられ、 $Q\ 3\ 1\ 1\ X_3$ は、 $X_3=F、N、$
Yが考えられ、 $E\ 3\ 6\ 0\ X_4$ は、 $X_4=K$ が考えられる。

実施例19の実験は、極小スケールで実施するため、反応中抗体濃度は、
実施例8から実施例10で実施した反応中抗体濃度と比べて、著しく低く、
4.46mg/mLであった。実施例8で示したように反応中抗体濃度を高
くすると、糖鎖転移率が向上することを考慮すると、各酵素に最適な条件を
用いれば、一態様としては、24時間時点で糖鎖転移率が<0.1%の酵素
を除く大部分の酵素は、「工程1」に採用可能と考えられる(表Z34)。

[0368] [表37]

表Z34 アミノ酸変異確認法により、効果が高いと考えられるアミノ酸変異

	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

[0369] 同様にして、Endo-Siの触媒活性中心付近の全てのアミノ酸の単変
異網羅的解析は可能である。従って、「工程1」に利用可能な酵素Aの触媒
活性ドメインに、任意のアミノ酸変異が含まれてよい。

さらに、この方法は、Endo-Si、Endo-S、Endo-S2に
限定されず、Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とするエンドβ-N
ーアセチルグルコサミニダーゼ全てに対して利用可能である。従って、工程
1に利用可能な酵素Aは、本発明の実施例に記載された特定のEndo-S
i変異体、Endo-S変異体、Endo-S2変異体、Endo-Se変
異体、Endo-Sd変異体、Endo-Sz変異体に限定されない。当業
者であれば、本明細書を参考にして、本実施例、及び明細書中に例示記載の

ない、実施例 1 に記載した要件を満たす酵素－A の構造を特定できる。従って、実施例 1 に記載した要件を満たせば、「工程 1」には任意の酵素が選択できる。

[0370] <実施例 20> 宿主細胞由来 N 2 9 7 糖鎖の直接交換反応

前述の実施例で示したように、本発明では、加水分解活性が残存している酵素を酵素－A として選択できる。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、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により *in situ* で調製することができる。また、*in situ* で調製されたアクセプター分子に対し、実施例 10 など で示したように糖鎖ドナー分子から糖鎖を転移させ、所望の糖鎖が均一に付加した抗体を得ることができる。

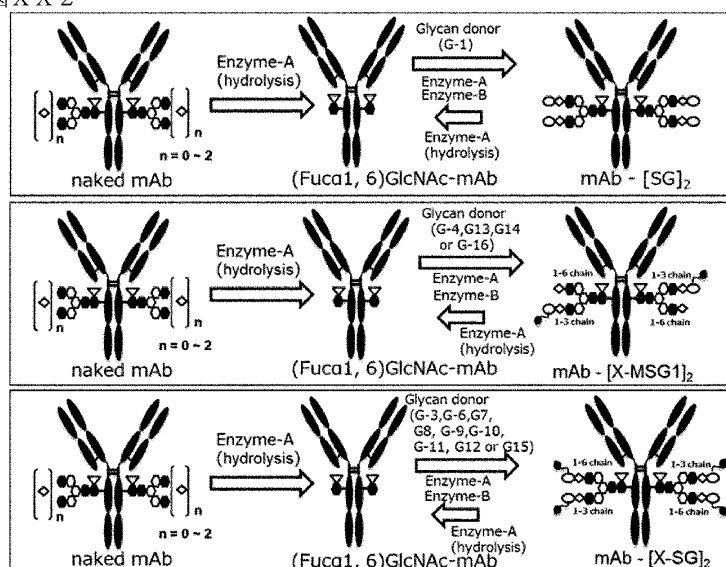
[0371] 具体的には、宿主細胞由来の N 2 9 7 結合糖鎖を有する抗体に対し、酵素－A、酵素－B、および糖鎖ドナー分子を加えることで、糖鎖ドナー分子に由来する所望の糖鎖が均一に付加された抗体を得ることができる。本着想においては、酵素－A は宿主細胞由来の N 2 9 7 結合糖鎖に対する加水分解反応と、糖鎖ドナー分子の糖転移反応の両方の作用を同一反応槽内で示す。つまり、まず、酵素－A が宿主細胞由来の N 2 9 7 結合糖鎖を有する抗体に作用し、宿主細胞由来の N 2 9 7 結合糖鎖を加水分解することでアクセプター分子が *in situ* で発生する。続いて、同一の反応槽内で酵素－B の作用により活性化された糖鎖ドナー分子に対しても酵素－A が作用し、アクセプター分子に糖鎖を転移することができる。本項で記述した一連の反応を以後、「宿主細胞由来 N 2 9 7 糖鎖の直接交換反応」と表記する。

[0372] 宿主細胞由来 N 2 9 7 糖鎖の直接交換反応では、図 x x 2 に示すとおり、宿主細胞由来の N 2 9 7 結合糖鎖を所望の糖鎖構造に置換できると考えられる。例えば、糖鎖ドナー分子に G－1 を選んだ場合、mAb－[SG]₂ が得られると考えられる。また、糖鎖ドナー分子に G－4、G－13、G－14、あるいは G－16 を選んだ場合は mAb－[X-MSG1]₂ が得られると考えられ、さらに、糖鎖ドナー分子に G－3、G－6、G－7、G－8、G

－9、G－10、G－11、G－12、あるいはG－15を選んだ場合、 $mAb - [X-SG]_2$ が得られると考えられる。

[0373] [化52]

図 X X 2



[0374] [N 2 9 7 糖鎖の直接交換反応標準プロトコル 1]

宿主細胞由来のN 2 9 7 結合糖鎖が不均一に付加された抗体 (n a k e d m A b 1、1 2 m g)、糖鎖供与体G－1、G－10あるいはG－16 (4 0 当量)、酵素－A (1. 6 % w / w)、酵素－B (0. 2 % w / w) と、適量の5 0 m M トリス－塩酸緩衝溶液 (p H 7. 2 5) を加え、総量液量2 0 0 μ Lとし、3 0 $^{\circ}$ Cで7 2 時間反応させた。反応開始後、2 4 時間、4 8 時間、7 2 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1. 5 m g / m Lになるように5 0 m M トリス－塩酸緩衝溶液 (p H 7. 2 5) で希釈し、分析開始時まで凍結保管した。質量分析、及び／あるいは、L a b C h i p 分析を用いて、宿主細胞由来のN 2 9 7 結合糖鎖が所望の糖鎖に交換されていることを確認した。

[0375] [質量分析]

糖鎖リモデリング抗体分子を重鎖と軽鎖にフラグメント化した状態で分析カラムで分離し、質量分析計に導入した。フラグメント化のための還元剤と

して、TCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン）を使用した。これにより、糖鎖転移反応で抗体に導入された糖鎖ドナー由来の糖鎖部位N₃基に対してStaudinger反応も進行し、NH₂基まで還元された質量がメインのピークとして観測された。

装置には、Q Exactive（Thermo Fisher Scientific Inc製）、Ultimate3000 UHPLCシステム（Thermo Fisher Scientific Inc製）及びPLRP-S 1000A（Agilent Technologies製）（8μm、2.1×50mm）を使用し、移動相Aには水／0.1％ギ酸／0.02％トリフルオロ酢酸溶液、移動相Bにはアセトニトリルを利用し、移動相Aが4分間で20％から50％に変化するグラジエントを使用し、流速0.6mL／min、60℃にて分析し、デコンボリューションされたスペクトルを得た（表Z36）。

[0376] [表38]

表 Z 3 5 宿主細胞由来H鎖由来MSピーク（実測値）、及び反応進行時H鎖由来MSピーク（理論値）

目的化合物	ESI-MS for the heavy chain (-Lys)
naked mAb1	found, M = 50556.59, 50600.70 (most abundant), 50630.62, 50762.43 (deconvolution data)
加水分解体 (Fucα1,6)GlcNAc-mAb1	Calculated mass, M = 49505.48
糖鎖転移体 mAb1-[SG] ₂	Calculated mass, M = 51509.27
糖鎖転移体 mAb1-[X-MSG1] ₂	Calculated mass, M = 51418.25
糖鎖転移体 mAb1-[X-SG] ₂	Calculated mass, M = 51909.75

[0377] 上記において「X」は、N₃-PEG（3）を表す。ただし、N₃基がNH₂基まで還元されたピークとして検出される場合は、N₃基1つあたり、窒素原子2個分と水素原子2個分の変化を加味した数値（26Da程度）が理論値との差として観測される。

[0378]

[表39]

表 Z 3 6 宿主細胞由来 N 2 9 7 糖鎖直接交換反応液中に観測された主な H 鎖由来 M S ピーク、及び糖鎖転移率

実施例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	時間	ESI-MS for the heavy chain (-Lys) (deconvolution data)	糖鎖転移率 (%)
20-1	naked m Ab1 (60)	G-1 (40eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	24h	found, M=51507.61 (most abundant)	98.0
					48h	found, M=51507.66 (most abundant)	97.1
					72h	found, M=51507.71 (most abundant)	96.0
20-2	naked m Ab1 (60)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	24h	found, M=49504.86, 51507.64 (most abundant)	67.1
					48h	found, M=49504.54 (most abundant), 51507.21	46.9
					72h	found, M=49504.77 (most abundant), 51507.48	32.0
20-3	naked m Ab1 (60)	G-16 (40eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	24h	found, M=49505.05, 51390.82 (most abundant)	88.3
					48h	found, M=49504.89, 51391.06 (most abundant)	84.7
					72h	found, M=49505.42, 51390.54 (most abundant)	77.8
20-4	naked m Ab1 (60)	G-16 (40eq.)	Endo-Si D241M/ Q311L	Endo-Rp N172H	24h	found, M=50600.57, 51390.48 (most abundant)	77.2
					48h	found, M=51390.46 (most abundant)	97.3
					72h	found, M=49503.51, 51390.68 (most abundant)	96.2
20-5	naked m Ab1 (60)	G-10 (40eq.)	Endo-Si D241Q	Endo-Rp N172H	24h	found, M=49504.88, 51856.33 (most abundant)	90.8
					48h	found, M=49504.68,	88.6

						51856.35 (most abundant)	
					72h	found, M=49504.78, 51856.78 (most abundant)	84.5
20-6	naked m Ab1 (60)	G-10 (40eq.)	Endo-Si D241M/ Q311L	Endo-Rp N172H	24h	found, M=49504.59, 50601.57 51855.76 (most abundant)	67.3
					48h	found, M=49504.32, 51856.08 (most abundant)	93.9
					72h	found, M=49504.33, 51856.11 (most abundant)	92.9

[0379] naked mAb1 は、宿主細胞由来の N297 結合糖鎖が不均一に付加された抗体であるため、MS 分析において H 鎖に宿主細胞由来 N297 糖鎖が付加した構造が、複数の MS ピークとして確認された（表 Z36）。実施例 20-1 に着目すると、反応開始 24 時間時点で、宿主細胞由来の N297 結合糖鎖はほぼ加水分解され、G-1 由来の糖鎖構造に置き換わっていた。これは、反応液中の抗体の主な構造が mAb1-[SG]₂であることを示す。一方、実施例 20-2 に着目すると、反応開始 24 時間時点で、宿主細胞由来の N297 結合糖鎖はほぼ加水分解され、G-1 由来の糖鎖構造、及びその加水分解体の構造に置き換わっていた。これは、反応液中の抗体の主な構造が mAb1-[SG]₂、及び (Fucα1, 6) GlcNAc-mAb1であることを示す。

続いて、糖鎖供与体として G-16 を用いた実施例 20-3 と実施例 20-4、あるいは、糖鎖供与体として G-10 を用いた実施例 20-5 と実施例 20-6 に着目すると、それぞれ、G-16 由来の糖鎖構造、及び、G-10 由来の糖鎖構造としての MS ピークが検出された。また、Endo-Si D241Q よりも更に残存加水分解活性が弱い Endo-Si D241M/Q303L を用いた場合においても、直接交換反応開始 48 時間時点で、既に宿主細胞由来 N297 糖鎖はほぼ加水分解された。これは、反応液中の抗体の主な構造が mAb1-[X-SG]₂、及び (Fucα1, 6) G

l c N A c - m A b 1、あるいは、m A b 1 - [X - M S G 1] ₂、及び (F u c α 1, 6) G l c N A c - m A b 1であることを示す。ここで示したように、宿主細胞由来の不均一な糖鎖を有する抗体に酵素-Aを作用させた場合にも、糖鎖ドナー分子に由来する糖鎖が均一に付加された抗体を得ることができた。また、異なる酵素や糖鎖ドナー分子の組み合わせを用いた場合にも同様の結果が得られることを確認した。実施例19までに得られた結果を考慮すると、本実施例に記載されている組合せの酵素や糖鎖ドナー分子を用いる場合、宿主細胞由来N297糖鎖の直接交換反応も「工程1」に含まれることが実証された。

さらに、当業者であれば、本明細書を参考して、本実施例、及び明細書中に例示記載のない、実施例20に記載した要件を満たす酵素-A、酵素-Bや糖鎖ドナー分子の構造を特定できる。従って、宿主細胞由来N297糖鎖の直接交換反応を「工程1」に採用する場合には、任意の酵素、糖鎖ドナー分子が選択できる。

[0380] <参考例>

以下において、参考例を提示する。本明細書において、参考例は、本発明の範囲外の態様を開示するものではなく、あくまで、参考として、各種アクセプター分子、抗体、糖鎖ドナー分子等の製造例や、それらを用いた試験例、本発明の応用的な実施態様等を開示するものである。

[0381] 直接糖鎖転移反応にアクセプター分子として使用する (F u c α 1, 6) G l c N A c - F c 含有分子溶液 (アクセプター分子溶液)、加水分解反応に使用する抗体 - [M S G 1 - N₃] ₂ 溶液 (抗体溶液)、及び抗体 - [S G - N₃] ₂ 溶液 (抗体溶液) を、以下の方法で調製した。

[0382] (参考例1) (F u c α 1, 6) G l c N A c - m A b 1 溶液の調製 (1)

WO2017010559の実施例3に記載された方法で作製できる (F u c α 1, 6) G l c N A c - m A b 1 を含有する溶液を、限外ろ過膜である A m i c o n U l t r a - 1 5, 3 0 k D a (M e r c k) と、5 0 m M トリス塩酸 (pH 7. 5) を用いた濃縮透析 (U F D F) で緩衝液交換

し、表Y-2に示す(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb溶液(アクセプター分子溶液1-1、アクセプター分子溶液1-2)を準備した。

[0383] (参考例2) (Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2溶液の調製(1)

WO2019065964の実施例61の工程1に記載された方法で作製できる(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2を含有する溶液を、限外ろ過膜であるAmicon Ultra-15, 30kDa(Merck)と、50mM トリス塩酸(pH7.5)を用いた濃縮透析(UFDF)で緩衝液交換し、表Y-2に示す(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb溶液(アクセプター分子溶液2-1、アクセプター分子溶液2-2)を準備した。

[0384] (参考例3) (Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb3溶液の調製(1)

WO2020050406の実施例85の工程1に記載された方法で作製できる(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb3を含有する溶液を、限外ろ過膜であるAmicon Ultra-15, 30kDa(Merck)と、50mM トリス塩酸(pH7.5)を用いた濃縮透析(UFDF)で緩衝液交換し、表Y-2に示す(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb溶液(アクセプター分子溶液3-1)を準備した。

[0385] (参考例4) (Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb1溶液の調製(2)

(参考例1)で使用した50mM トリス塩酸(pH7.5)の代わりに、50mM トリス塩酸(pH7.25)を用い、(参考例1)と同様にし、表Y-2に示す(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb溶液(アクセプター分子溶液4-1)を準備した。

[0386] (参考例5) (Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2溶液の調製(2)

(参考例2)で使用した50mM トリス塩酸(pH7.5)の代わりに、50mM トリス塩酸(pH7.25)を用い、(参考例2)と同様にし、表Y-2に示す(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb溶液(アクセプター分子溶液5-1)を準備した。

[0387] (参考例6) (Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb3溶液の調製(2)

(参考例3) で使用した50 mM トリス塩酸 (pH 7.5) の代わりに、50 mM トリス塩酸 (pH 7.25) を用い、(参考例3) と同様にして、表Y-2に示す (Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb溶液 (アクセプター分子溶液6-1) を準備した。

[0388] (参考例7) mAb2-[MSG1-N₃]₂溶液の調製

WO 2019065964の実施例61の工程2に記載された方法で作製できるmAb2-[MSG1-N₃]₂を含有する溶液を、限外ろ過膜であるAmicon Ultra-15, 30 kDa (Merck) と、50 mM トリス塩酸 (pH 7.25) を用いた濃縮透析 (UFDF) で緩衝液交換し、表Y-2に示すmAb2-[MSG1-N₃]₂溶液 (抗体溶液7-1及び抗体溶液7-2) を準備した。

[0389] [表40]

表Y-2 試液の調製

溶液名	Fc含有分子	濃度(mg/mL)	容量(mL)
アクセプター分子溶液1-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb1	106.40	26.05
アクセプター分子溶液1-2	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb1	156.38	2.50
アクセプター分子溶液2-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb2	91.83	7.99
アクセプター分子溶液2-2	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb2	103.5	3.51
アクセプター分子溶液3-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb3	92.86	1.85
アクセプター分子溶液4-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb1	92.46	7.76
アクセプター分子溶液4-2	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb1	98.42	34.30
アクセプター分子溶液5-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb2	91.27	155.07
アクセプター分子溶液6-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc-mAb3	90.11	3.79
抗体溶液 7-1	mAb2-[MSG1-N ₃] ₂	10.00	0.2
抗体溶液 7-2	mAb2-[MSG1-N ₃] ₂	35.10	0.125

[0390] (参考例8) Endo-S2変異体の反応性確認

実施例で使用した標準プロトコルのいずれかに従い、下記表Z38に示したとおり、適宜条件を設定した。(Fuc α 1,6)GlcNAc-mAb 1 (6 mg) に対して、各種糖鎖供与体 (10 当量~40 当量、あるいは100 当量)、酵素-A (0.8 %w/w)、酵素-B (0.2 %w/w)、適量の50 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加えて、総量液量 100~300 μ L とし、30℃で28時間反応させた。反応開始後、2時間、4時間、6時間、8時間、24時間、28時間にサンプリングした。反応終了後、反応液のpHを測定した。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1 mg/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。実施例と同様にして、糖鎖転移率を測定した。

[0391]

[表41]

表 Z 3 8

参考 例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	24h	28h
8-1	mAb1 (20)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	62.2	77.1	75.2	71.6	52.3	47.1
8-2	mAb1 (40)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	80.1	83.7	81.3	78.1	58.2	54.1
8-3	mAb1 (60)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	64.0	54.9	89.5	88.0	83.8	82.8
8-4	mAb1 (80)	G-1 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	88.2	87.8	85.4	83.2	65.6	61.5
8-5	mAb1 (60)	G-1 (10eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	24.2	42.0	47.1	47.7	24.4	19.3
8-6	mAb1 (60)	G-3 (10eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	5.6	6.0	5.3	4.1	0.8	0.5
8-7	mAb1 (60)	G-4 (10eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	7.6	6.7	5.5	4.7	6.3	0.8
8-8	mAb1 (60)	G-1 (20eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	54.6	69.6	68.8	66.3	36.7	30.5
8-9	mAb1 (60)	G-3 (20eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	18.5	17.0	14.1	10.6	2.0	0.9
8-10	mAb1 (60)	G-4 (20eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	20.9	16.9	13.0	12.1	3.7	0.4
8-11	mAb1 (60)	G-1 (30eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	78.9	81.3	78.9	76.5	53.2	44.9
8-12	mAb1 (60)	G-3 (30eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	31.2	23.3	19.3	26.9	3.2	1.3
8-13	mAb1 (60)	G-4 (30eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	26.6	19.1	15.8	12.1	2.0	1.2
8-14	mAb1 (60)	G-3 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	4.6	1.6	37.8	26.6	21.5	18.3
8-15	mAb1 (60)	G-4 (40eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	32.7	23.3	22.3	15.5	1.8	2.2
8-16	mAb1 (60)	G-3 (100eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	63.7	50.8	44.3	35.9	18.0	14.2
8-17	mAb1 (60)	G-4 (100eq.)	Endo-S2 D184M	Endo-M N175Q	71.3	61.7	54.7	46.0	28.2	24.7

[0392] 実施例 11 で示したように、残存加水分解活性が野生型とほぼ同等の Endo-S2 D184M に、糖鎖未修飾の G-1 を糖鎖供与体とした場合は、[工程 1] において適切な条件を設定すれば、80%を超える糖鎖転移率を達成できる。

一方、化学修飾された糖鎖供与体を使用した場合は、一旦糖鎖が転移した

抗体が、残存加水分解活性が野生型とほぼ同等のEndo-S2 D184 Mで容易に加水分解をうけるため、40当量以下の糖鎖供与体使用量で糖鎖転移率が80%を超えなかった。しかしながら、参考例8-16や参考例8-17の結果より、糖鎖供与体の使用量を増やせば、糖鎖転移率が改善する傾向が確認された。このような場合、残存加水分解活性を低減する変異を導入することで、「工程1」に採用することが可能であると期待できる。

[0393] 参考例9：抗CD70抗体1の作製

抗CD70抗体1はWO2004/073656を参照して作製した。当該抗CD70抗体1は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異（IgG1-L234A、L235A）を有する。当該抗CD70抗体1の軽鎖アミノ酸配列（配列番号1）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号2）を図14に示す。配列番号1（図14）に示される軽鎖配列中で、1～112番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号2（図14）に示される重鎖配列中で、1～118番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号13）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号14）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号15）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号16）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号17）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号18）を図20に示す。

[0394] 参考例10：抗CD70抗体2の作製

抗CD70抗体2はWO2007/038637を参照して作製した。当該抗CD70抗体2は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。当該抗CD70抗体2の軽鎖アミノ酸配列（配列番号3）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号4）を図15に示す。配列番号3（図15）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号4（図15）に示される重鎖配列中で、1～118番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号19）、CDRL2のアミノ酸

配列（配列番号20）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号21）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号22）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号23）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号24）を図21に示す。

[0395] 参考例11：抗TROP2抗体1の作製

抗TROP2抗体1はWO2015/098099を参照して作製した。当該抗TROP2抗体1は、アイソタイプがIgG1である。当該抗TROP2抗体1の軽鎖アミノ酸配列（配列番号5）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号6）を図16に示す。配列番号5（図16）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号6（図16）に示される重鎖配列中で、1～121番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号25）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号26）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号27）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号28）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号29）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号30）を図22に示す。

[0396] 参考例12：抗TROP2抗体2の作製

抗TROP2抗体1はWO2015/098099を参照して作製した。当該抗TROP2抗体1は、アイソタイプがIgG1である。抗TROP2抗体2は、抗TROP2抗体1にLALA変異を導入した。当該抗TROP2抗体2の軽鎖アミノ酸配列（配列番号7）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号8）を図17に示す。配列番号7（図17）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号8（図17）に示される重鎖配列中で、1～121番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号31）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号32）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号33）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号34）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号35）、及びC

DRH3のアミノ酸配列（配列番号36）を図23に示す。

[0397] 参考例13：抗EGFR抗体1の作製

抗EGFR抗体1は、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）を参照して作製した。当該抗EGFR抗体1は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。当該抗EGFR抗体1の軽鎖アミノ酸配列（配列番号9）及び重鎖アミノ酸配列を（配列番号10）を図18に示す。配列番号9（図18）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号10（図18）に示される重鎖配列中で、1～119番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体の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24に示す。CDR配列はWO1998/050433を参照した。

[0398] 参考例14：抗EGFR抗体2の作製

抗EGFR抗体2はWO2002/092771を参照して作製した。当該抗EGFR抗体2は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。当該抗EGFR抗体2の軽鎖アミノ酸配列（配列番号11）及び重鎖アミノ酸配列を（配列番号12）を図19に示す。配列番号11（図19）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号12（図19）に示される重鎖配列中で、1～116番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号43）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号44）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号45）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号46）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号47）、及びCDRH3のアミノ酸配列（配列番号48）を図25に示す。

[0399] 参考例 15 : 抗HER2抗体の作製

本明細書において、「トラスツズマブ」はHERCEPTIN（登録商標）、huMAb4D5-8、rhumaB4D5-8と呼ばれることもあり、配列番号49に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号50に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有するヒト化IgG1抗体である。アミノ酸配列はUS5821337を参照した。トラスツズマブの軽鎖アミノ酸配列（配列番号49）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号50）を図26に示す。

[0400] 抗HER2抗体は、トラスツズマブの重鎖アミノ酸配列のEUインデックス234番目及び235番目のロイシン（L）をアラニン（A）に変異（本明細書中、LALA変異ともいう）させた、トラスツズマブの定常領域改変IgG1抗体（本明細書中、改変抗HER2抗体ともいう）を設計し、作製することができる。改変抗HER2抗体の軽鎖アミノ酸配列（配列番号49）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号51）を図27に示す。

[0401] 参考例 16 : 抗HER2抗体2の作製

「ペルツズマブ」はPERJETA（登録商標）と呼ばれることもあり、配列番号52に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号53に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を有するヒト化IgG1抗体である。アミノ酸配列はWO2004/008099を参照した。本明細書では抗HER2抗体2ともいう。ペルツズマブの軽鎖アミノ酸配列（配列番号52）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号53）を図28に示す。配列番号52（図28）に示される軽鎖配列中で、1～108番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号53（図28）に示される重鎖配列中で、1～119番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域であり、当該可変領域の位置はIMGTの定義により決定した。

[0402] 抗HER2抗体2は、LALA変異に加え、重鎖アミノ酸配列のEUインデックス214番目のリシン（K）をアルギニン（R）に変異させたG1m3アロタイプの定常領域を有する抗HER2抗体2を設計し、作製することができる（本明細書中、改変抗HER2抗体2ともいう）。当該改変抗HER

R 2 抗体 2 の軽鎖アミノ酸配列（配列番号 5 2）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号 5 4）を図 2 9 に示す。当該抗体の C D R L 1 のアミノ酸配列（配列番号 5 7）、C D R L 2 のアミノ酸配列（配列番号 5 8）、C D R L 3 のアミノ酸配列（配列番号 5 9）、C D R H 1 のアミノ酸配列（配列番号 6 0）、C D R H 2 のアミノ酸配列（配列番号 6 1）、及び C D R H 3 のアミノ酸配列（配列番号 6 2）を図 3 1 に示す。配列番号 5 2（図 2 9）に示される軽鎖配列中で、1～108 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号 5 4（図 2 9）に示される重鎖配列中で、1～119 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域であり、当該可変領域の位置は I M G T の定義により決定した。

[0403] 参考例 1 7：抗 C D H 6 抗体の作製

抗 C D H 6 抗体は W O 2 0 1 8 / 2 1 2 1 3 6 を参照して作製することができる。当該抗 C D H 6 抗体は、アイソタイプが I g G 1 であり、L A L A 変異に加え、重鎖アミノ酸配列の E U インデックス 3 2 9 番目のプロリン（P）をグリシン（G）にした変異を有する。当該抗 C D H 6 抗体の軽鎖アミノ酸配列（配列番号 5 5）及び重鎖アミノ酸配列を（配列番号 5 6）を図 3 0 に示す。配列番号 5 5（図 3 0）に示される軽鎖配列中で、1～107 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、配列番号 5 6（図 3 0）に示される重鎖配列中で、1～122 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域である。当該抗体の C D R L 1 のアミノ酸配列（配列番号 6 3）、C D R L 2 のアミノ酸配列（配列番号 6 4）、C D R L 3 のアミノ酸配列（配列番号 6 5）、C D R H 1 のアミノ酸配列（配列番号 6 6）、C D R H 2 のアミノ酸配列（配列番号 6 7）、及び C D R H 3 のアミノ酸配列（配列番号 6 8）を図 3 2 に示す。

[0404] 参考例 1 8：「工程 1」の応用法例示 1

近年、E n d o - S 2 W T で分解され難い糖鎖構造を、F c 含有分子である抗体に転移させる例が報告された〔非特許文献：A C S C h e m . B i o l . 2 0 2 1 , 2 5 0 2 - 2 5 1 4 . 、非特許文献：A c t a

Pharm., Sin., B 2022, 2417-2428]。このことから、糖鎖ドナー分子の構造を適宜選ぶことで、野生型酵素を用いた場合でも、アクセプター分子に糖鎖ドナー分子由来の糖鎖が転移した所望の生成物を得ることができる。例えば、これらの報告に記載されている糖鎖オキサゾリン体の構造を参考にして、還元末端側にGlcNAcを一つ伸張したオキサゾリン化されていないO結合型糖鎖ドナー分子あるいはN結合型糖鎖ドナー分子を準備し、さらに本明細書の条件を参考にして、これら糖鎖供与体のO結合型糖鎖あるいはN結合型糖鎖に作用できる適切な酵素－Bの存在下、野生型の酵素－Aを作用させることで所期の生成物を含む反応液を得ることが可能である。したがって、このような応用例は、本発明の「工程1」に含まれる。また、当業者であれば、本明細書を参考して、本実施例、及び明細書中に例示記載のない、協奏的に働く酵素－Aと酵素－Bの構造を特定でき、例えば、Endo-S2、Endo-S、Endo-Siなどから選ばれた野生型の酵素－A、および、Endo-M、Endo-Rp、Endo-CC（配列番号6）、Endo-Om（配列番号7）、Endo-A（GenBank Accession number: AAD10851）、Endo-CE（GenBank Accession number: BAB84821）、Endo-Tsp1006（GenBank Accession number: CCY37287）、Endo-Tsp1263（GenBank Accession number: CDD88945）、Endo-Tsp1457（GenBank Accession number: CDD89351）、Endo-BB（GenBank Accession number: AAN25135）、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 Accessi

on number: XP_002911817.1)、Endo-D (GenBank Accession number: AAK74656.1)、あるいはEndo-Pm (GenBank Accession number: ADK97032.1) などから選ばれた酵素-Bが挙げられる。

[0405] 参考例19: 「工程1」の応用法例示2

本明細書の実験例では、*in vitro*反応での例のみを示したが、抗体の生産細胞に酵素-Aと酵素-Bを共発現させた場合も、生産細胞内で図1あるいは図XX2と同様の状況が再現されることが期待される。当業者であれば、本明細書を参考して共発現の条件を適宜設定することで、所期の生成物を含む反応液（培養液中でも目的の反応が進行する場合、反応液に該当する）を得ることが可能である。したがって、このような応用例は本発明の「工程1」に含まれる。

[0406] 参考例20: 「工程1」の応用法例示3

本発明の酵素-Aは、Fc含有分子の糖鎖に作用できる酵素である。例えば、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 (GenBank Accession number: AA24923.1)、Endo-F3 (GenBank Accession number: AAA24924.1)、Endo-CoM (GenBank Accession number: XP006673222)、あるいはEndo-SB (GenBank Accession number: BBB35949) などのアミノ酸配列を部分的に含む酵素

(以下、酵素－A断片)に対して、抗体のFc断片に親和性のある構造を導入した場合、本発明の酵素－Aとして働くことが期待される。

オキサゾリン体を糖鎖供与体とし、Endo－F3変異体を用いる場合、Endo－Sなどと比べ、より多い糖鎖量や酵素量が必要であるという点、すなわち大量製造の観点から効率が良くないことが知られていた(非特許文献：J. Biol. Chem. 2016, 9356－9370)。一方、Endo－F3変異体にFc結合性ペプチドを付与することにより、抗体Fc部分に効率的に糖鎖を転移させることが可能になることが報告されている(非特許文献：Org. Biomol. Chem. 2022, 3086－3095)。このことから、Endo－F3－Fc結合性ペプチド複合体は、Endo－Sと同様の働きをする、すなわち、酵素－A断片とFc結合性構造を組み合わせることで、人工的にFc含有分子の糖鎖に作用できる酵素を作製できることが示された。人工的に作製した酵素－Aを用いる場合でも、当業者であれば、本明細書を参考して、本実施例、及び明細書中に例示記載のない、酵素－Aの構造並びに協奏的に働く酵素－Aと酵素－Bの構造を特定し、所期の生成物を含む反応液を得ることが可能である。したがって、このような応用例は、本発明の「工程1」に含まれる。(ただし、Fc結合性構造とは、Fc断片に親和性を示す任意のペプチド、核酸、低分子などである。)

[0407] 参考例21：「工程1」の応用法例示4

本発明の糖鎖ドナー分子は、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含み、非還元末端が化学修飾されていても良いN－結合型糖鎖又はO－結合型糖鎖である。糖鎖ドナー分子は本明細書の実施例で使用された糖鎖に限定されず、3分岐型糖鎖構造、4分岐型糖鎖構造、ペイロードが搭載された糖鎖構造などを有する糖鎖ドナー分子にも応用できることが合理的に期待される。すなわち、前述の糖鎖ドナー分子に対して作用できる酵素－Bと、酵素－Aを適宜選択することで、目的の糖鎖転移反応が進行する。

例えば、Endo－Sまたはその変異体、Endo－S2またはその変異

体、あるいはEndo-F3またはその変異体を、目的に応じて適宜用いると、3分岐型糖鎖オキサゾリン、あるいは4分岐型糖鎖オキサゾリンあるいは、ペイロードが搭載された糖鎖オキサゾリン体を糖鎖ドナーに用いた場合、所期の化合物を取得できることが報告された（非特許文献：Bioorg. Med. Chem., 2018, 1347-1355.、J. Biol. Chem., 2016, 16508-16518、Acta Pharm. Sin. B 2022, 2417-2428、特許文献：WO2017124084、US2019002542、JP2021-145548）。このことから、本明細書を参考して条件を適宜利用することで、Endo-S2は、GlcNAcを含むFc含有分子に対して作用し、3分岐型糖鎖、4分岐型糖鎖、あるいはペイロードが搭載された糖鎖を導入するための酵素-Aとして働くことが期待できる。すなわち、3分岐型糖鎖構造、4分岐型糖鎖構造、ペイロードが搭載された糖鎖構造などを有する糖鎖ドナー分子を用いた場合でも、当業者であれば、本明細書を参考して、本実施例、及び明細書中に例示記載のない、酵素-Aの構造並びに協奏的に働く酵素-Aと酵素-Bの構造を特定し、所期の生成物を含む反応液を得ることが可能である。したがって、このような応用例は「工程1」に含まれる。

[0408] 参考例22 実施例15、および実施例20に使用する抗体溶液の調製

抗体には入手可能なTrastuzumab、あるいはMogamulizumab（ポテリジオ20mg、協和キリン株式会社）を用い、限外ろ過膜であるAmicon Ultra-15, 30kDa（Merck）と、50mM トリス塩酸（pH7.25）を用いた濃縮透析（UFDF）で緩衝液交換し、表Y-3に示す抗体溶液を準備した。

また、WO2017010559の実施例3に記載された方法に準じて、抗体にはMogamulizumab（ポテリジオ20mg、協和キリン株式会社）を用い、野生型Endo-Sで糖鎖を切断し、精製後、限外ろ過膜であるAmicon Ultra-15, 30kDa（Merck）と、5

0 mM トリス塩酸 (pH 7.25) を用いた濃縮透析 (UFDF) で緩衝液交換し、アクセプター分子溶液 9-1 を準備した。

さらに、WO 2018003983 の実施例 3-9A に記載された方法で調製した (Fuc α 1, 6) GlcNAc-Fc-A 溶液を用い、限外ろ過膜である Amicon Ultra-500, 10 kDa (Merck) と、50 mM トリス塩酸 (pH 7.25) を用いた濃縮透析 (UFDF) で緩衝液交換し、表 Y-3 に示すアクセプター分子溶液 10-1 を準備した。

WO 2018003983 の実施例 3-3A に記載された方法で調製した (Fuc α 1, 6) GlcNAc-CLCH-A 溶液を用い、限外ろ過膜である Amicon Ultra-500, 10 kDa (Merck) と、50 mM トリス塩酸 (pH 7.25) を用いた濃縮透析 (UFDF) で緩衝液交換し、表 Y-3 に示すアクセプター分子溶液 11-1 を準備した。

[0409] [表42]

表 Y-3

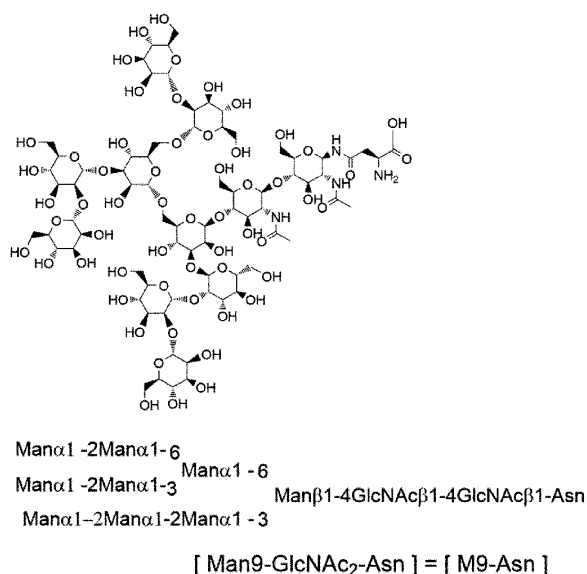
溶液名	Fc含有分子	濃度 (mg/mL)	容量 (mL)
抗体溶液 8-1 (Trastuzumab)	naked -mAb1	95.32	3.5
アクセプター分子溶液 9-1	GlcNAc-mAb4	90.75	0.080
アクセプター分子溶液 10-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc- Fc-A	118.16	0.10
アクセプター分子溶液 11-1	(Fuc α 1, 6) GlcNAc- CLC H-A	108.89	0.10

[0410] 参考例 23 糖鎖供与体 G-18 (M9-Asn、M8-Asn、M7-Asn、M6-Asn の混合物) の調製と [工程 1] の確認

参考例 23-1 糖鎖供与体 G-18 の調製

[0411]

[化53]



[0412] 大豆粉末には、[M9-Asn]の構造が含まれることが知られている（非特許文献：Chem. Biol. 2004, 127-134）。M8-Asn、M7-Asn、あるいはM6-Asnは、それぞれ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。

[0413] [不溶性成分の除去（1）]

市販品である大豆粉末（Soybean Flour Type1, 1Kg、Sigma-Aldrich製）を0.15N 水酸化ナトリウム水溶液（5L）に懸濁させ、120分間攪拌した後に、遠心分離（8000rpm、30分）し、上清1（3.8L）を回収した。

[0414] [水溶性成分の除去]

続いて、上清1に硫酸アンモニウム（1.14Kg）を加えた。その後、遠心分離（8000rpm、30分）し、上清2を取り除き沈殿物1を得た。

[0415] [不溶性成分の除去（2）]

沈殿物1を0.15N 水酸化ナトリウム水溶液（4L）に溶解させた後に、適量の5N塩酸を加えてpH5.0に調整した。その後、遠心分離（8

000 rpm、30分)し、上清3を取り除き沈殿物2を得た。

[0416] [酵素反応]

沈殿物2を0.15N 水酸化ナトリウム水溶液(3L)に溶解させた後に、適量の5N塩酸を加えてpH5.0に調整した。その後、Actinase AS(300g、科研製薬製)を加えた後に、37℃で48時間攪拌した。反応終了後、適量の5N塩酸を加えてpH5.0に調整し、混合液を減圧下セライトろ過(プリコート:セライト505, ボディフィード:セライト545)し、ろ液A(2.7L)を得た。

[0417] [不溶性成分の除去(3)]

ろ液A(2.7L)に対して、3倍量のアセトンを添加し、生じた沈殿物3を回収する目的で、遠心分離(8000 rpm、30分)し、上清4と分離した。続いて、分離した上清4に対して、1回目と同量のアセトンを添加し、生じた沈殿物4を回収する目的で、遠心分離(8000 rpm、30分)し、上清5と分離した。1回目の操作、及び2回目の操作で得られた沈殿物3と沈殿物4を一つにまとめ、蒸留水(2L)に溶解した。続いて、減圧下ろ過(ろ紙:ADVANTEC No. 2)し、ろ液Bを得た。

[0418] [不溶性成分の除去(4)]

ろ液Bから減圧下アセトンを除去した後に、適量の5N塩酸を加えてpH3.0に調整した後に、減圧下セライトろ過(プリコート:セライト505, ボディフィード:セライト545)し、ろ液C(1.5L)を得た。

[0419] [粗精製(1):カラム精製]

ろ液C(1.5L)をSEPABEADS SP207(200mL、三菱ケミカル製)を充填したカラムに通液し、通過液を回収した。その後、蒸留水を加え、5.0Lにメスアップし、カラム処理液(5.0L)を得た

[0420] [粗精製(2):膜精製]

カラム処理液(5.0L)を限外ろ過膜(Hydrosart 2 kDa, 0.1 m²、ザルトリウス製)を用いて、蒸留水10Lを加水しながら限外ろ過し、限外ろ過処理液(3L)を得た。

[0421] [抽出物の取得]

限外ろ過処理液（3 L）に対して、2倍量のアセトンを添加し、生じた沈殿物5を回収する目的で、遠心分離（8000 rpm、30分）し、上清6と分離した。続いて、分離した上清6に対して、1回目と同量のアセトンを添加し、生じた沈殿物6を回収する目的で、遠心分離（8000 rpm、30分）し、上清7と分離した。1回目の操作、及び2回目の操作で得られた沈殿物5と沈殿物6を一つにまとめ、凍結乾燥し、抽出物（78.6 g）を得た。

[0422] [カラム精製]

0.1%のギ酸を含む蒸留水とアセトニトリルを溶離液とし、装置にはAgilent 1100シリーズLC（Agilent technologies製）、カラムにはHypercarb（20φ x 150 mm、Thermo Fisher Scientific Inc製）を使用し、上記で得られた抽出物の一部（約20 g）の分離精製を行った。MS検出によって検出されたメインピークを回収し、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥粉末を蒸留水に溶解させ、適量のアンモニア水を加えて、pH 7.0に調整した。その後、再び凍結乾燥し、糖鎖原料G-18（46.7 mg）を凍結乾燥粉末として得た。

[0423] [質量分析]

装置には、Agilent 1200（Agilent technologies製）、Orbitrap Elite（Thermo Fisher Scientific Inc製）及びHypercarb（Thermo Fisher Scientific Inc製）（5 μm、4.6 x 150 mm）を使用し、移動相Aには水、移動相Bにはアセトニトリルを利用し、移動相Bが15分間で5%から15%に変化するグラジエントを使用し、流速1.0 mL/min、40℃にて分析した。主に、4つのピークが確認された。

[0424] ESI-MS: Calcd for M9-Asn C₇₄H₁₂₂N₄

O58: [M-2H]²⁻ 997.34 (most abundant mass), Found 997.34.

[0425] Man8GlcNAc2-Asn [M8-Asn] は、M9-Asnの非還元末端側マンノースが1つ欠損した構造である。

ESI-MS: Calcd for M8-Asn C₆₈H₁₁₂N₄

O53: [M-2H]²⁻ 916.31 (most abundant mass), Found 916.31.

[0426] Man7GlcNAc2-Asn [M7-Asn] は、M9-Asnの非還元末端側マンノースが2つ欠損した構造である。

ESI-MS: Calcd for M7-Asn C₆₂H₁₀₂N₄

O48: [M-2H]²⁻ 835.28 (most abundant mass), Found 835.28.

[0427] Man6GlcNAc2-Asn [M6-Asn] は、M9-Asnの非還元末端側マンノースが3つ欠損した構造である。

ESI-MS: Calcd for M6-Asn C₆₂H₁₀₂N₄

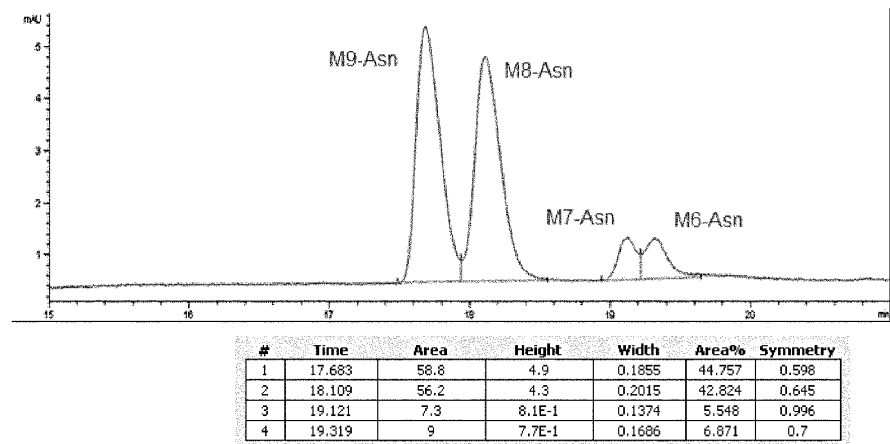
O48: [M-2H]²⁻ 754.26 (most abundant mass), Found 754.26.

[0428] [HPLC分析]

装置には、Agilent 1260 (Agilent technologies製)、及びHypercarb (Thermo Fisher Scientific Inc製) (5 μm、4.6×150mm) を使用し、移動相Aには水、移動相Bにはアセトニトリルを利用し、移動相Bが20分間で5%から15%に変化するグラジェントを使用し、流速1.0 mL/min、40℃にて分析した。主に、4つのピークが確認された。

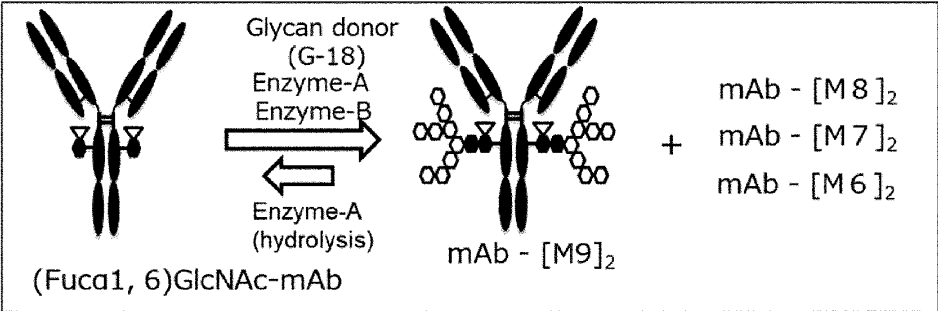
[0429]

[表43]



[0430] 参考例 2 3－2 糖鎖供与体 G－1 8 を用いた糖鎖転移反応

[化54]



(図中M8、M7、あるいはM6は、それぞれM9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。)

[0431] (Fucα1, 6)GlcNAc-mAb1 (0.6 mg)、糖鎖供与体 (40 当量)、酵素－A (0.8～1.6 %w/w)、酵素－B (0.02 %～0.2 %w/w) と、適量の 50 mM トリス－塩酸緩衝溶液 (pH 7.25) を加え、総量液量 15 μL とし、30℃で24 時間反応させた。反応開始後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、22 時間、24 時間にサンプリングした。反応終了後、反応液の pH を測定した。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 1 mg/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。

(実施例 8－1) と同様にして、(Fucα1, 6)GlcNAc-mAb1 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 Z Z 1 7）。

[0432] [表44]

表 Z Z 1 7

参考 例	抗体 (mg/mL)	糖鎖 供与体	酵素-A	酵素-B	糖鎖転移率 (%)					
					2h	4h	6h	8h	22h	24h
23-1	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-Rp N172H (0.2%)	30.3	33.8	32.4	28.2	12.3	11.2
23-2	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-Rp N172H (0.1%)	18.5	29.9	36.6	39.5	36.3	34.9
23-3	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-Rp N172H (0.02%)	7.1	9.9	12.2	14.8	28.1	28.8
23-4	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-M N 175Q (0.2%)	13.8	15.1	15.0	13.3	7.2	6.9
23-5	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-M N 175Q (0.1%)	17.5	20.5	20.4	19.0	11.2	10.4
23-6	mAb1 (40)	G-18	Endo-S2 D184Q/Q250L	Endo-M N 175Q (0.02%)	10.2	14.2	17.5	19.8	26.1	26.4

[0433] 実施例 23-1 から実施例 23-6 の結果より、「酵素-B の添加比率を変えること」、すなわち、「酵素-B による糖鎖ドナー分子の活性化の速度を変えること」で、最大転移率に影響がでることを確認した。

[0434] 「工程 1」に利用可能な酵素-B の本質は、フコースを有さない糖鎖ドナー分子から、酵素-A が Fc 含有分子への糖鎖転移反応に利用可能な状態（活性化中間体）に活性化する能力である。一方、酵素-A による糖鎖転移反応は、実施例 11 で示したように、その生成物である糖鎖転移体の加水分解反応と必ず競合する。このような環境下、もし、酵素-B による糖鎖ドナー分子の活性化の速度が十分でない場合、期待される糖鎖転移率は低くなることが予想される。

これを解決するには、糖鎖ドナー分子の糖鎖構造に応じて、酵素-B を適宜使い分ける必要がある。Endo-M や Endo-Rp の変異体を変更する他、例えば、Endo-A (GenBank Accession number: AAD10851)、Endo-CE (GenBank Ac

cession number: BAB84821)、Endo-Tsp1006 (GenBank Accession number: CCY37287)、Endo-Tsp1263 (GenBank Accession number: CDD88945)、Endo-Tsp1457 (GenBank Accession number: CDD89351)、Endo-BB (GenBank Accession number: AAN25135)、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)、あるいはEndo-Pm (GenBank Accession number: ADK97032.1)をスクリーニングし、G-18に適した酵素-Bの構造を特定することにより、より高い糖鎖転移率が得られることが合理的に予想される。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程 1 及び 2 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 l 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、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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、
- 〔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。
- [請求項2] 糖鎖ドナー分子が、還元末端が活性化されていない G l c N A c を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 工程 1 が、アクセプター分子と糖鎖ドナー分子とを、酵素 - A 及び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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程である、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項4] 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）が、酵素 - A の存在下、糖鎖ドナー分子に作用することで、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、請求項 3 に記載の方法。
- [請求項5] 酵素 - B が、S G P から G l c N A c 誘導体への糖鎖転移活性を有する酵素である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。
- [請求項6] 酵素 - B が、E n d o - M、E n d o - O m、E n d o - C C、又は E n d o - R p の変異酵素であり、当該変異酵素は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、請求項 3 ～ 5 のいずれか一

項に記載の方法。

- [請求項7] 酵素－Bが、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、請求項3～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 酵素－Aと酵素－Bとが、融合されている、請求項3～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 工程1において、アクセプター分子1当量に対して2当量から40当量の糖鎖ドナー分子が使用される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 工程1において、糖鎖転移率が80%を超える、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 糖鎖ドナー分子が有する糖鎖が、非還元末端が化学修飾されていても良いN－結合型糖鎖又はO－結合型糖鎖である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 糖鎖ドナー分子が、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-As_n、AG(9)-As_n、AG(7)-As_n、SG-OR、AG(9)-OR、AG(7)-OR、(MSG1)-As_n、(MSG2)-As_n、(MSG1)-As_nと(MSG2)-As_nの混合物、MSG1-OR、MSG2-OR、又はMSG1-ORとMSG2-ORの混合物であり、式中、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である、請求項11に記載の方法。

[請求項13] Rが、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、請求項12に記載の方法。

[請求項14] Rが、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、及びn-ヘキシル基からなる群より選択されるか、又は、C1～C6アルコキシ基、C1～C6アルキル基、又はハロゲン基で置換されていてもよいフェニル基、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、及びフェナンスレニル基からなる群より選択される、請求項13に記載の方法。

[請求項15] Rが、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、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

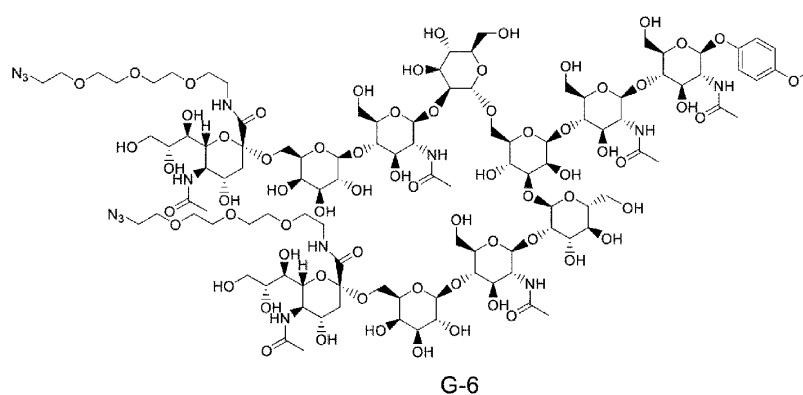
[請求項16] 糖鎖ドナー分子が、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-P-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-As_n-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1)-As_n-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2)-As_n-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1)-As_n-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2)-As_n-PEG(3)-N₃の混合物である請求項11又

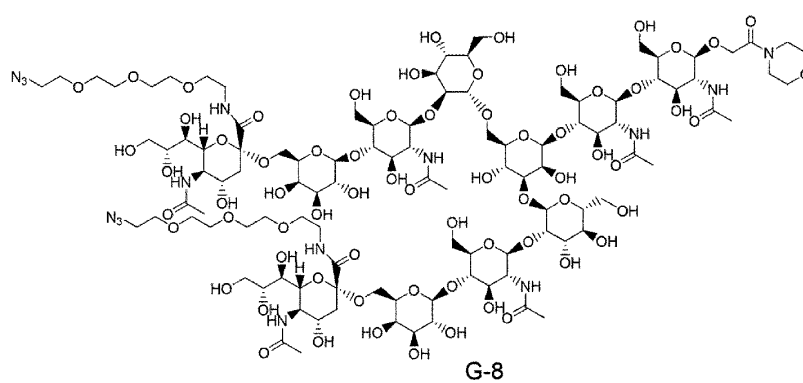
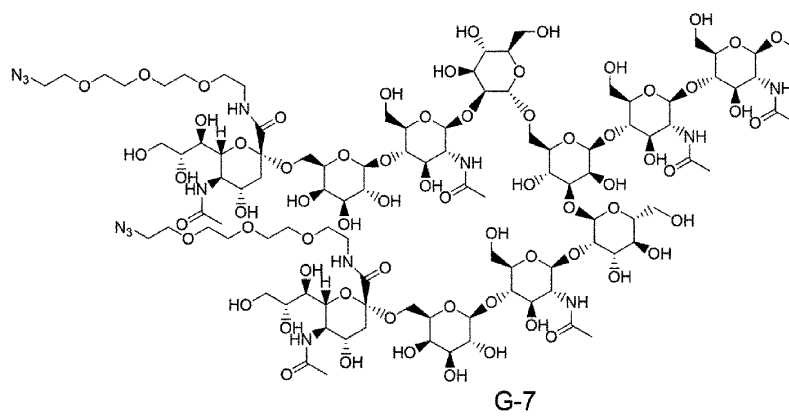
は 1 2 に記載の方法。

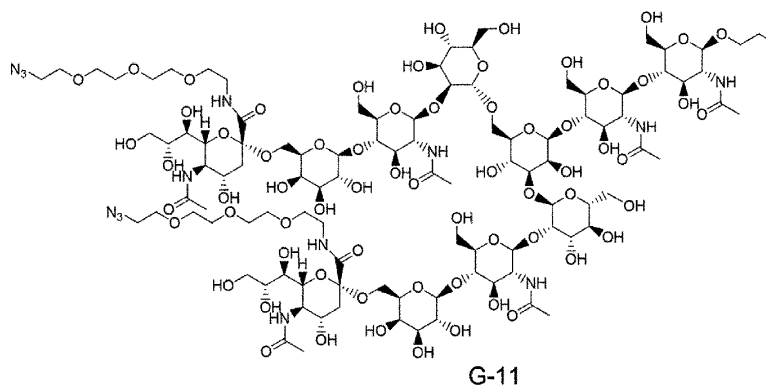
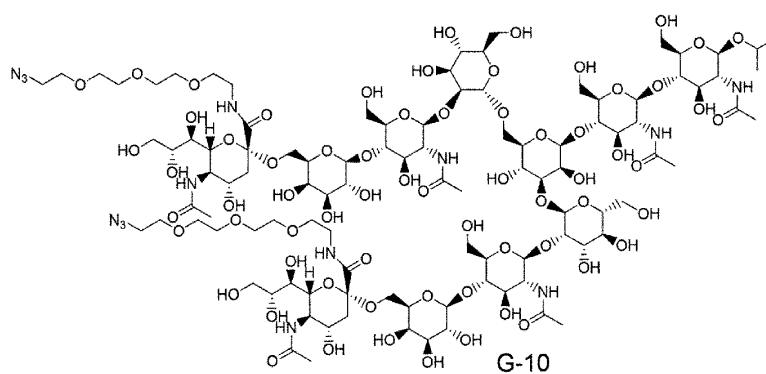
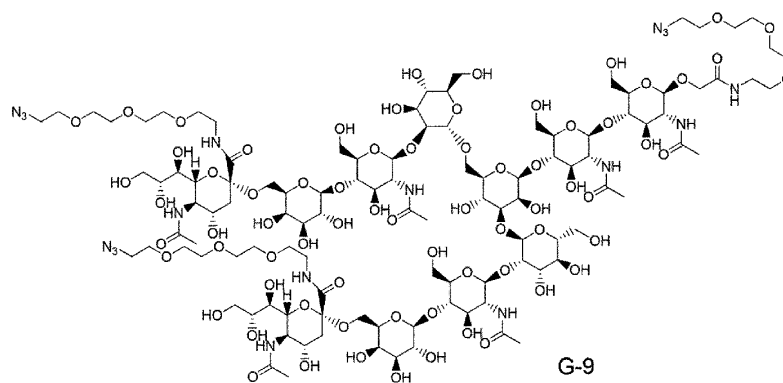
[請求項17] 糖鎖ドナー分子が、 $([N_3-PEG(3)]_2-SG)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ 、 $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ 、又は $([N_3-PEG(3)]-MSG1)-OR$ と $([N_3-PEG(3)]-MSG2)-OR$ の混合物である、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

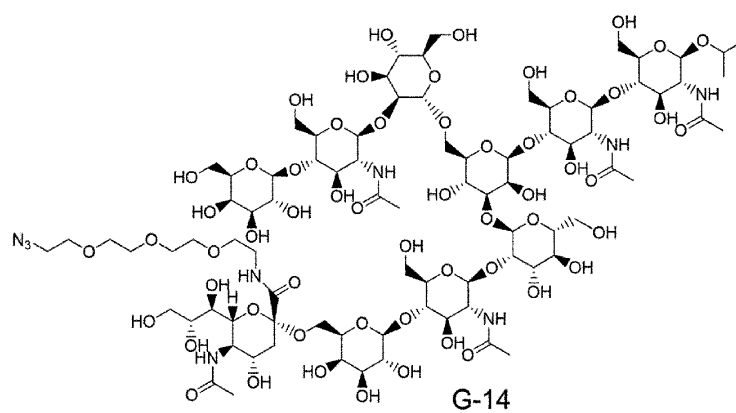
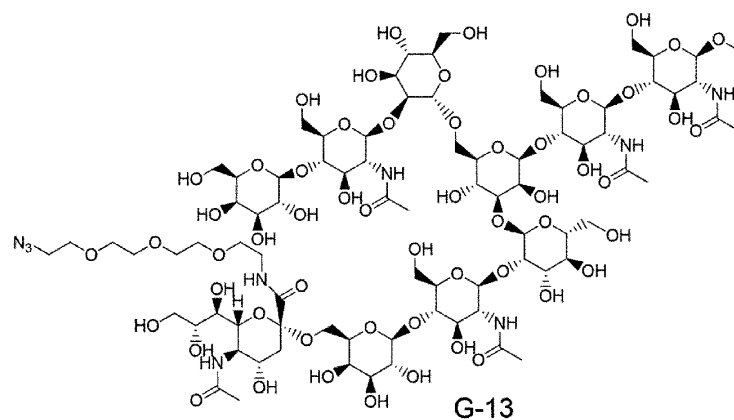
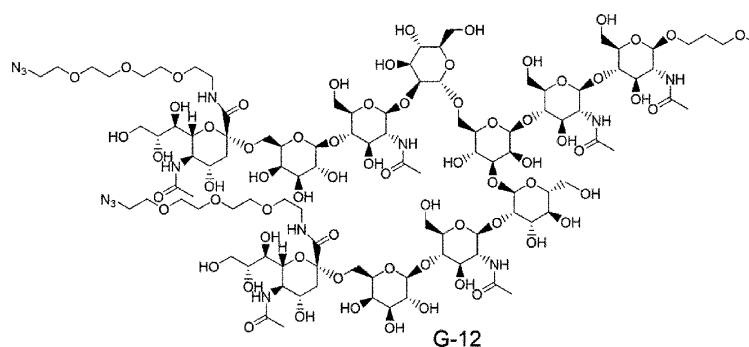
[請求項18] 糖鎖ドナー分子が、以下の式：

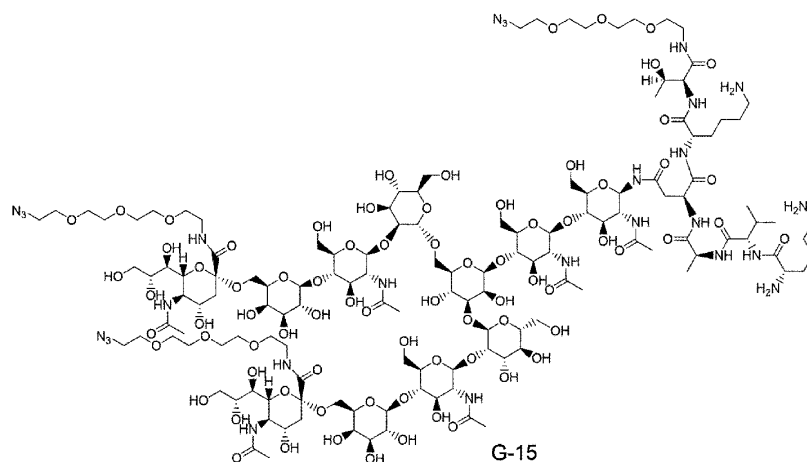
[化1]



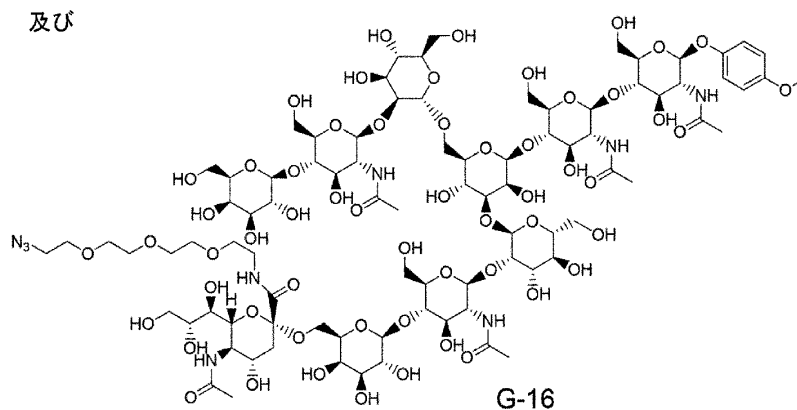








及び



からなる群より選択される式によって表される化合物である、請求項 11～17 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] Fc含有分子が、免疫グロブリン、CLCH又はFc含有断片である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] 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）が、Fc含有分子の糖鎖に作用できる、加水分解活性が残留していてもよい酵素である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

[請求項21] 酵素-Aが、Endo-S、Endo-S2、Endo-Si、Endo-Se、Endo-Sd、又はEndo-Szの変異酵素であり、当該変異酵素は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、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

[請求項22] 酵素-Aが、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-S2 D184M、Endo-S2 T138Q、Endo-S2 D184Q/Q250L、Endo-S2 D184M/Q250L、Endo-Se D233M、Endo-Sz D234M、Endo-Sz D234M/Q304L、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)、又はEndo-Si E360Kである、請求項21に記載の方法。

[請求項23] 工程1の反応系内pHが、6.5から8.0の範囲である、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

[請求項24] 工程1の反応系内最終アクセプター分子濃度が、20mg/mL以上100mg/mL以下である、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

[請求項25] 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素通り画分に、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、請求項1～24

のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項26] 工程2における酸性条件がpH3.5から4.5の範囲を意味する、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項27] クロマトグラフィー媒体が粒子状、メンブレン状、又はモノリス状である、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項28] クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項29] 糖鎖が、アジド基(N_3 -)を有する置換基で化学修飾されている非還元末端を有し、当該方法が、更に、当該糖鎖のアジド基(N_3 -)に、アルキン構造を有する分子を反応させる工程を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項30] アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫賦活化剤、毒素、光感受性物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸分子、核酸、抗原、ビタミン、及びホルモンから選択される、請求項29に記載の方法。
- [請求項31] 化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサン及びこれらの誘導体から選択される、請求項30に記載の方法。
- [請求項32] 免疫賦活化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、及びA2ARアンタゴニストから選択される、請求項30に記載の方法。
- [請求項33] アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、請求項29～32のいずれか一項に記載の方法；
 (A) N -[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[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-バリル-N-{4-[({[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c]

[1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、

(B) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [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-バリル-N-[4-({[(11' S, 11' a S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{ [(11a S)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11' a'-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H)-カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド、

(C) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [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-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11a' S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(5-{ [(11a' S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-5', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル] オキシ} ペンチル) オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、

(D) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾ

シン-5 (6 H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-
 ル-L-バリル-N- {4- [({ [(1 1' S, 1 1 a' S) - 1
 1' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(1 1 a'
 S) - 7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 1 0' , 1 1' , 1 1
 a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -
 ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル]
 オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1 1' , 1 1 a' -ジ
 ヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2,
 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -1 0' (5' H) -イル]
 カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、並
 びに、

(E) (ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6 H) -
 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- [(5 R, 7 R, 8 R, 1 2 a R, 1 4
 R, 1 5 R, 1 5 a R, 1 6 R) -1 5-フルオロ-1 6-ヒドロキ
 シ-2, 1 0-ジオキソ-2, 1 0-ジスルフィド-1 4- (6, 7
 , 8, 9-テトラヒドロ-2 H-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-2 H, 1 0 H, 1 2 H
 -5, 8-メタノ-2 λ^5 , 1 0 λ^5 -フロ [3, 2-1] [1, 3
 , 6, 9, 1 1, 2, 1 0] 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-1 H-プリン-
 1-イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

[請求項34] 請求項1～33のいずれか一項に記載の方法によって製造された、
 F c 含有分子。

[請求項35] N 2 9 7 結合糖鎖を有する F c 含有分子の単離方法であって、前記
 F c 含有分子と1つ以上の不純物を含む溶液を、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、不純物を選択的に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トラップさせる工程、又は前記Fc含有分子を選択的に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トラップさせる工程を含む、前記方法。

[請求項36] N297結合糖鎖が、複合型糖鎖を含む、請求項35に記載の方法

。

[請求項37] N297結合糖鎖が、フコースが付加していてもよいコアGlcNAcではなく、及び、前記1つ以上の不純物が、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を有する以外は前記Fc含有分子と同一である分子を含む、請求項35又は36に記載の方法。

[請求項38] クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

[請求項39] 以下の工程1及び2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含有分子の単離方法：

[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GlcNAcを有するFc含有分子であるアクセプター分子と、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）の存在下で反応させ、反応混合液を得る工程、

[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N297結合糖鎖を有するFc含有分子を単離する工程。

[請求項40] クロマトグラフィー媒体が陽イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項39に記載の方法。

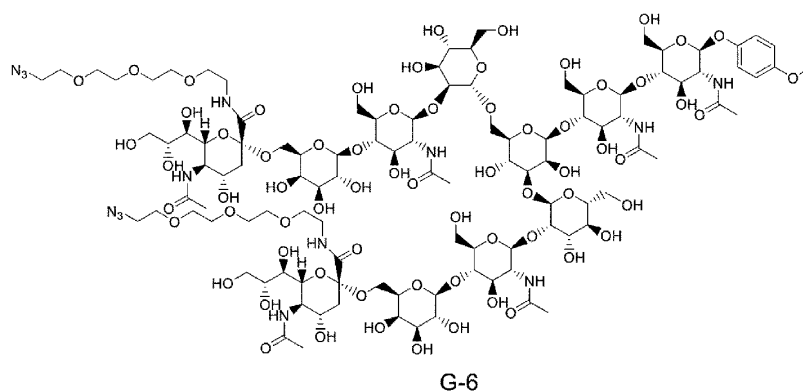
[請求項41] N297結合糖鎖を有するFc含有分子が、抗HER2抗体、抗H

ER3抗体、抗DLL3抗体、抗FAP抗体、抗CDH11抗体、抗CDH6抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体、抗CEA抗体、抗Crypto抗体、抗EphA2抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗Integrin抗体、抗PSMA抗体、抗Tenascin-C抗体、抗SLC44A4抗体、抗Mesothelin抗体、抗ENPP3抗体、抗CD47抗体、抗EGFR抗体、抗GPR20抗体、及び抗DR5抗体からなる群から選択される抗体に由来する、請求項1～40のいずれか一項に記載の方法またはFc含有分子。

[請求項42]

以下の式：

[化2]

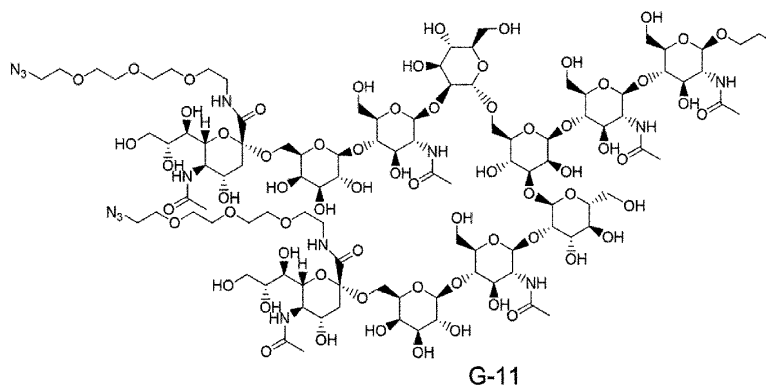
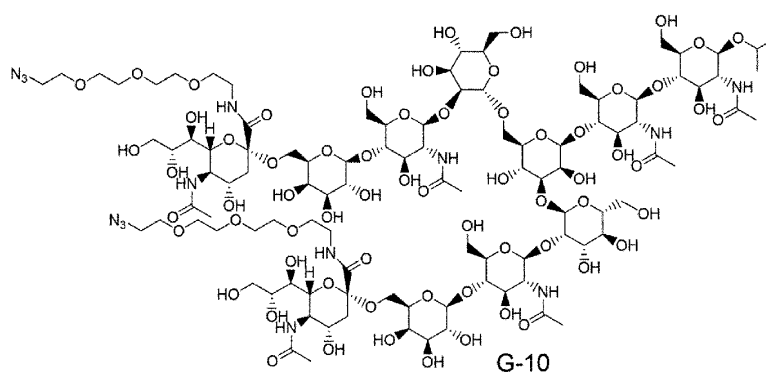
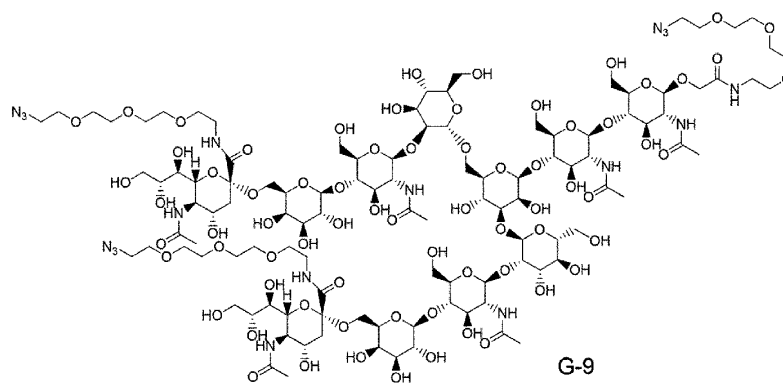


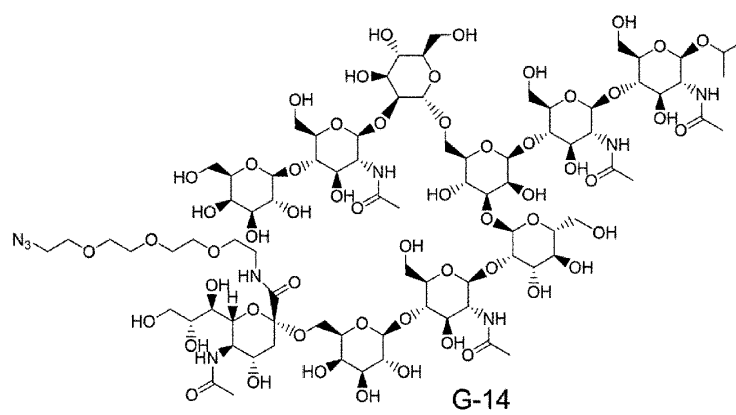
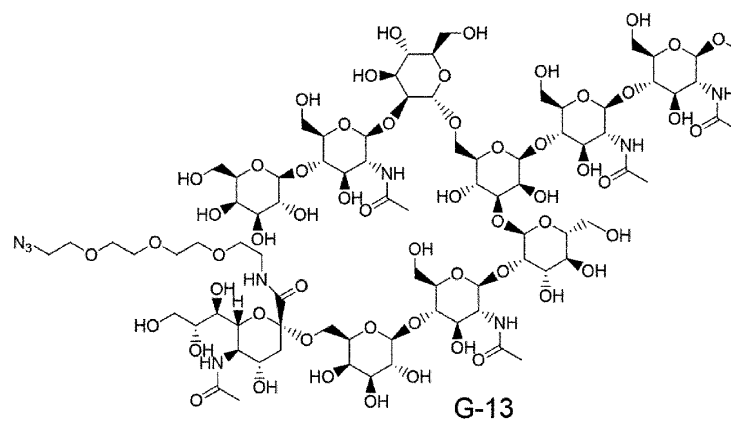
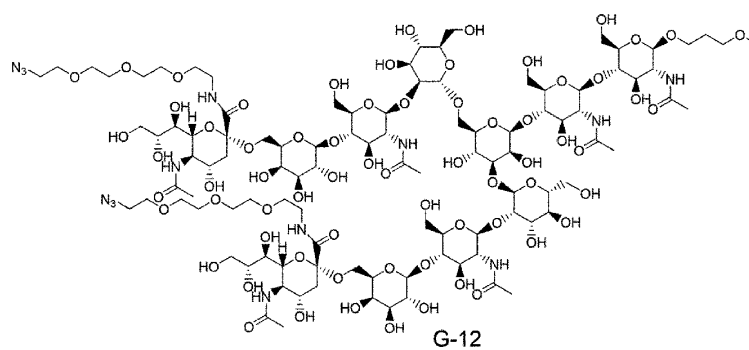
G-7

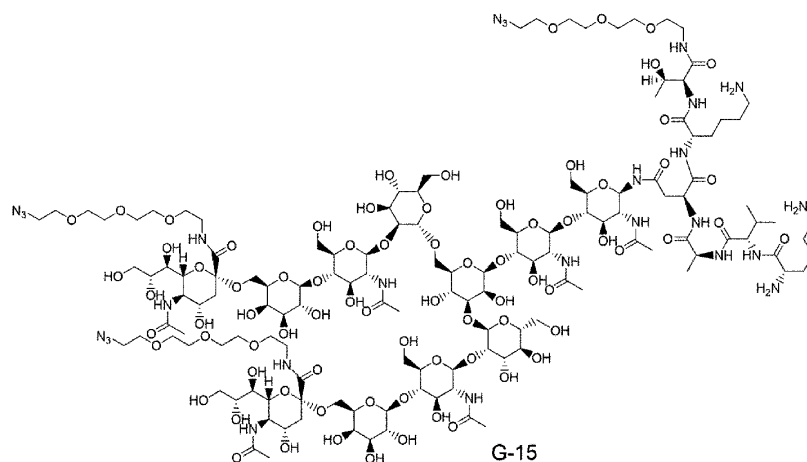
The chemical structure of G-8 is a complex branched oligosaccharide. It features a central core of glucose and mannose residues. The structure is highly branched, with multiple glucose units linked by α and β glycosidic bonds. Key features include:

- Azidoethylamine groups:** Two terminal azidoethylamine chains ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) are attached to the structure.
- N-Acetylglucosamine (GlcNAc) residues:** Several GlcNAc units are present, some with N-acetyl groups (NHCOCH_3).
- Hydroxyl groups:** Numerous hydroxyl groups are distributed across the sugar rings, indicating a high degree of hydrophilicity.
- Linkages:** The structure shows a variety of glycosidic linkages, including α 1-2, α 1-3, α 1-4, α 1-6, and β 1-2 linkages.

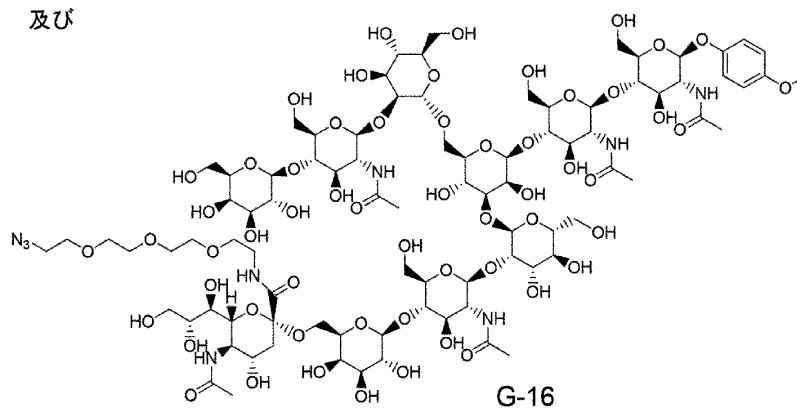
G-8







及び



からなる群より選択される式によって表される化合物。

[請求項43]

酵素－Aと酵素－Bとの融合タンパクであって、

酵素－Aは、Fc含有分子のN297結合糖鎖を基質とするエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼであり、

酵素－Bは、糖鎖の還元末端が活性化されていないG1cNAcを有する糖鎖含有分子の糖鎖を基質とするが、前記N297結合糖鎖を基質としない、又は、前記N297結合糖鎖への反応性が低いエンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼである、融合タンパク。