

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-509476
(P2023-509476A)

(43)公表日 令和5年3月8日(2023.3.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	4 B 0 5 0	
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	4 B 0 6 4	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	4 B 0 6 5	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	4 C 0 8 5	
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	4 H 0 4 5	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全81頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-541612(P2022-541612)	(71)出願人	517252624
(86)(22)出願日	令和3年1月5日(2021.1.5)		アイジーエム バイオサイエンシズ イン
(85)翻訳文提出日	令和4年8月12日(2022.8.12)		コーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/012192		アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォル
(87)国際公開番号	WO2021/141902		ニア州 マウンテン ビュー イースト ミ
(87)国際公開日	令和3年7月15日(2021.7.15)		ドルフィールド ロード 3 2 5
(31)優先権主張番号	62/957,745	(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和2年1月6日(2020.1.6)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100102118
	米国(US)		弁理士 春名 雅夫
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100160923
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 山口 裕孝
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100119507
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 刑部 俊
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100142929
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高度にシアリル化された多量体結合分子

(57)【要約】

本開示は、高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を提供し、当該集団は、I g M抗体、I g M様抗体、または他のI g M由来の結合分子を含み、当該結合分子の集団は、通常の血清I g Mに見られるよりも高いレベルのシアリル酸含有量を有する。そのような高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成する方法も提供される。

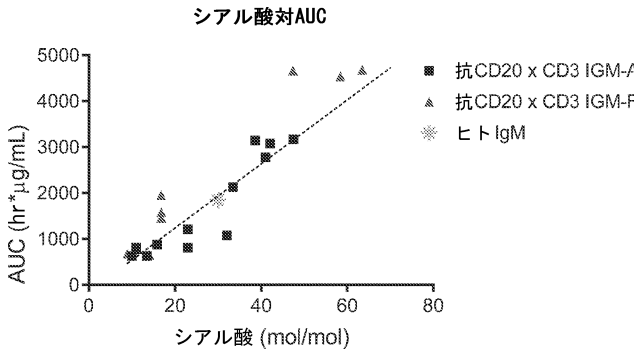
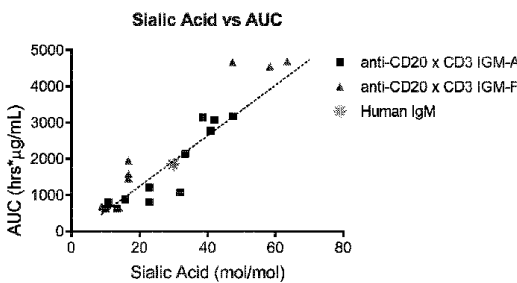


FIG. 15



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多量体結合分子のモノクローナル集団であって、各結合分子が 10 個または 12 個の IgM 由来重鎖を含み、前記 IgM 由来重鎖が、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 IgM 重鎖定常領域を含み、各 IgM 重鎖定常領域が、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つのアスパラギン (N) - 結合型グリコシル化モチーフを含み、N - 結合型グリコシル化モチーフがアミノ酸配列 N - X₁ - S / T を含み、配列中、N はアスパラギンであり、X₁ はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ S / T はセリンまたはトレオニンであり、各 IgM 重鎖定常領域上の前記 N - 結合型グリコシル化モチーフの少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つが複合型グリカンで占められており、前記結合分子のモノクローナル集団が前記結合分子 1 モルあたり少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 55、少なくとも 60、または少なくとも 65 モルのシアル酸を含む、前記多量体結合分子のモノクローナル集団。

10

【請求項 2】

結合分子 1 モルあたり約 40 ~ 約 70、約 40 ~ 約 60、約 40 ~ 約 55、約 40 ~ 約 50、約 50 ~ 約 70、約 60 ~ 約 70 モルのシアル酸を含む、請求項 1 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 3】

前記 IgM 重鎖定常領域が、配列番号 1 (対立遺伝子 IGHM*03) または配列番号 2 (対立遺伝子 IGHM*04) のアミノ酸 46 (モチーフ N1)、アミノ酸 209 (モチーフ N2)、アミノ酸 272 (モチーフ N3)、アミノ酸 279 (モチーフ N4)、及びアミノ酸 440 (モチーフ N5) に対応するアミノ酸位置から開始する 5 つの N - 結合型グリコシル化モチーフ N - X₁ - S / T を含む、ヒト IgM 重鎖定常領域またはそのバリエーションである、請求項 1 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

20

【請求項 4】

細胞株改変、インビトロ糖鎖工学、またはそれらの任意の組み合わせの方法によって生成される、請求項 1 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 5】

前記細胞株改変が、前記結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株にシアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をトランスフェクトし、それにより、前記シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する改変細胞株を生成することを含む、請求項 4 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

30

【請求項 6】

インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む、請求項 4 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 7】

前記シアリルトランスフェラーゼが、ヒト β - ガラクトシド α - 2, 6 - シアリルトランスフェラーゼ 1 (ST6GAL1) (配列番号 3) の可溶性バリエーションを含み、かつ／または前記シアル酸基質が、シチジン-リン酸-N-アセチル-ノイラミン酸 (CMP-NANA) を含む、請求項 6 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

40

【請求項 8】

結合分子：シアル酸基質の質量比が約 1 : 4 ~ 約 40 : 1 であり、かつ／または結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 80 : 1 ~ 約 5000 : 1 である、請求項 6 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 9】

前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及び前記シアル酸基質と接触させることが、約 2 °C から約 40 °C での、少なくとも 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、24 時間、36 時間、または 48

50

時間の接触を含む、請求項 6 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 10】

各結合分子が、それぞれ 5 つまたは 6 つの二価 I g M 結合ユニットを含む五量体または六量体 I g M 抗体であり、各結合ユニットが、バリエーション I g M 定常領域のアミノ末端側に位置する V H を各々含む 2 つの I g M 重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する軽鎖可変ドメイン (V L) を各々含む 2 つの免疫グロブリン軽鎖とを含み、前記 V H と前記 V L が結合して前記標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを形成する、請求項 1 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 11】

各結合分子が、五量体であり、かつ J 鎖またはその機能的断片またはその機能的バリエーションをさらに含む、請求項 10 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

10

【請求項 12】

前記 J 鎖が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む成熟ヒト J 鎖、またはその機能的断片、またはその機能的バリエーションである、請求項 11 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 13】

前記バリエーション J 鎖またはその機能的断片が、配列番号 6 の野生型成熟ヒト J 鎖のアミノ酸 Y 102 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を含む、請求項 11 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

20

【請求項 14】

配列番号 6 の Y 102 に対応する前記アミノ酸が、アラニン (A) に置換されている、請求項 13 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 15】

前記 J 鎖が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 16】

前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションが、異種部分をさらに含む改変された J 鎖であり、前記異種部分が、前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合またはコンジュゲートしている、請求項 11 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 17】

前記異種部分が、前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合しているポリペプチドである、請求項 16 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

30

【請求項 18】

前記異種ポリペプチドが、少なくとも 5 個のアミノ酸であるが 25 個以下のアミノ酸を含むペプチドリンカーを介して前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合している、請求項 17 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 19】

前記異種ポリペプチドが、前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションの N 末端、前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションの C 末端、あるいは前記 J 鎖またはその断片もしくはバリエーションの N 末端及び C 末端の両方に融合しており、前記 N 末端及び前記 C 末端の両方に融合している前記異種ポリペプチドが同じであっても異なってもよい、請求項 17 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

40

【請求項 20】

前記異種ポリペプチドが s c F v 断片を含む、請求項 17 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 21】

前記異種 s c F v 断片が C D 3 ε に結合する、請求項 20 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【請求項 22】

請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の結合分子のモノクローナル集団と、薬学的に許

50

容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 23】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の結合分子のモノクローナル集団を生成する、組換え宿主細胞。

【請求項 24】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の結合分子のモノクローナル集団を生成する方法であって、請求項 22 に記載の宿主細胞を培養することと、前記結合分子の集団を回収することを含む、前記方法。

【請求項 25】

高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成する方法であって、前記結合分子のモノクローナル集団を発現する細胞株を提供することと、前記細胞株を培養することと、前記結合分子のモノクローナル集団を回収することとを含み、各結合分子が 10 個または 12 個の IgM 由来重鎖を含み、前記 IgM 由来重鎖が、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 IgM 重鎖定常領域を含み、各 IgM 重鎖定常領域が、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つのアスパラギン (N) - 結合型グリコシル化モチーフを含み、N - 結合型グリコシル化モチーフが、アミノ酸配列 N - X₁ - S / T を含み、配列中、N はアスパラギンであり、X₁ はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ S / T はセリンまたはトレオニンであり、前記集団内の各 IgM 重鎖定常領域上の前記 N - 結合型グリコシル化モチーフの平均で少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つが、複合型グリカンで占められており、前記細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、グリカン 1 つあたり少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つのシアル酸末端単糖を含む複合型グリカンを濃縮するように最適化されている、前記方法。

10

20

【請求項 26】

前記細胞株、前記回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、結合分子 1 モルあたり少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 60、もしくは少なくとも 65 モルのシアル酸を含むか、または結合分子 1 モルあたり約 40～約 70、約 40～約 60、約 40～約 55、約 40～約 50、約 50～約 70、約 60～約 70 モルのシアル酸を含む、結合分子のモノクローナル集団をもたらすように最適化されている、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記 IgM 重鎖定常領域が、配列番号 1 (対立遺伝子IGHM*03) または配列番号 2 (対立遺伝子IGHM*04) のアミノ酸 46 (モチーフ N1)、アミノ酸 209 (モチーフ N2)、アミノ酸 272 (モチーフ N3)、アミノ酸 279 (モチーフ N4)、及びアミノ酸 440 (モチーフ N5) に対応するアミノ酸位置から開始する 5 つの N - 結合型グリコシル化モチーフ N - X₁ - S / T を含む、ヒト IgM 重鎖定常領域に由来する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

提供される前記細胞株が、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現するように改変されている、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記回収プロセスが、前記結合分子のモノクローナル集団をインビトロ糖鎖工学に供することを含み、前記インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

前記シアリルトランスフェラーゼが、ヒト β - ガラクトシド α - 2, 6 - シアリルトランスフェラーゼ 1 (ST6GAL1) (配列番号 3) の可溶性バリエーションを含み、かつ／または前記シアル酸基質が、シチジナーリン酸 (CMP) - N - アセチル - ノイラミン酸 (CMP - NANA) を含む、請求項 29 に記載の方法。

50

【請求項 3 1】

結合分子：シアル酸基質の質量比が約 1：4～約 40：1 であり、かつ／または結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 80：1～約 5000：1 である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及び前記シアル酸基質と接触させることが、約 2℃から約 40℃での、少なくとも 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、24 時間、36 時間、または 48 時間の接触を含む、請求項 29～31 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020 年 1 月 6 日に出願された米国特許仮出願連続番号 62／957，745 の権益を主張し、その出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2021 年 1 月 5 日に作成された ASCII コピーは、028WO1-Sequence-Listing と名付けられ、92，335 バイトのサイズである。

20

【背景技術】

【0003】

背景

IgA 及び IgM 抗体などの多量体化することができる抗体及び抗体様分子は、例えば、免疫腫瘍学及び感染性疾患の分野で、特異性の改善、結合力の改善、及び複数の結合標的への結合能を可能にする有望な薬物候補として浮上している。例えば、米国特許第 9，951，134 号（特許文献 1）、同第 9，938，347 号（特許文献 2）、同第 10，351，631 号（特許文献 3）、同第 10，400，038 号（特許文献 4）、同第 10，570，191 号（特許文献 5）、同第 10，604，559 号（特許文献 6）、同第 10，618，978 号（特許文献 7）、同第 10，689，449 号（特許文献 8）、及び同第 10，787，520 号（特許文献 9）、米国特許出願公開第 2019-0330374 号（特許文献 10）同第 2019-0330360 号（特許文献 11）同第 2019-0338040 号（特許文献 12）同第 2019-0338041 号（特許文献 13）同第 2019-0185570 号（特許文献 14）及び同第 2019-0002566 号（特許文献 15）同第 2020-0239572 号（特許文献 16）、ならびに PCT 公開 WO2018／187702（特許文献 17）及び WO2019／165340（特許文献 18）を参照されたい。それらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0004】

40

多価抗体の薬物動態（PK）と薬力学（PD）は複雑であり、モノクローナル抗体の翻訳と翻訳後の両方の構造、及びそれが標的とする生理学的システムに依存する。さらに、異なる抗体クラスは、典型的には、異なる細胞及び生理学的システムを介して対象内で処理される。例えば、IgG 抗体クラスの血清半減期は 20 日であるが、IgM 及び IgA 抗体の半減期はわずか約 5～8 日である（Brekke, O.H., and I. Sandlie, Nature Reviews Drug Discovery 2:52-62 (2003)（非特許文献 1））。

【0005】

抗体または他の生物療法薬の PK の重要な決定要因の 1 つは、そのレベルとグリコシル化のタイプである（Higel, F. et al. Eur. J. Pharm. B

50

i o p h a r m . 1 3 9 : 1 2 3 - 1 3 1 (2 0 1 9) (非 特 許 文 献 2)) 。 抗 体 の 特 定 の 残 基 に 共 有 結 合 し て い る 糖 部 分 と そ の 誘 導 体 は 、 ア シ ア ロ 糖 タ ン パ ク 質 (A S G P) 受 容 体 な ど の 受 容 体 に よ っ て ど の よ う に 認 識 さ れ る か を 決 定 し 、 転 じ て 体 循 環 か ら ど れ だ け 早 く 除 去 さ れ る か を 決 定 す る 。 各 I g M 重 鎖 定 常 領 域 に は 、 ア ス パ ラ ギ ン - (N -) 結 合 型 グ リ コ シ ル 化 の 5 つ の 部 位 が あ り 、 J 鎖 に は 1 つ の N - 結 合 型 グ リ コ シ ル 化 部 位 が あ る 。 し た が っ て 、 I g M を 含 む 五 量 体 の J 鎖 に は 、 最 大 5 1 個 の グ リ カ ン 部 分 が 含 ま れ 、 複 雑 な グ リ コ シ ル 化 プ ロ フ ァ イ ル が 生 じ る (H e n n i c k e , J . , e t a l . , A n a l . B i o c h e m . 5 3 9 : 1 6 2 - 1 6 6 (2 0 1 7) (非 特 許 文 献 3)) 。 グ リ カ ン の 複 雑 さ は 、 均 一 に グ リ コ シ ル 化 さ れ た 材 料 の 製 造 を 困 難 に す る 可 能 性 が あ る 。

10

【 0 0 0 6 】

多量体抗体の設計が進歩したにもかかわらず、これらの分子の物理的、薬物動態学的、及び薬力学的特性を操作できるようになる必要性が残存する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 9 , 9 5 1 , 1 3 4 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 9 , 9 3 8 , 3 4 7 号

【 特許文献 3 】 米国特許第 1 0 , 3 5 1 , 6 3 1 号

【 特許文献 4 】 米国特許第 1 0 , 4 0 0 , 0 3 8 号

20

【 特許文献 5 】 米国特許第 1 0 , 5 7 0 , 1 9 1 号

【 特許文献 6 】 米国特許第 1 0 , 6 0 4 , 5 5 9 号

【 特許文献 7 】 米国特許第 1 0 , 6 1 8 , 9 7 8 号

【 特許文献 8 】 米国特許第 1 0 , 6 8 9 , 4 4 9 号

【 特許文献 9 】 米国特許第 1 0 , 7 8 7 , 5 2 0 号

【 特許文献 1 0 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 3 3 0 3 7 4 号

【 特許文献 1 1 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 3 3 0 3 6 0 号

【 特許文献 1 2 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 3 3 8 0 4 0 号

【 特許文献 1 3 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 3 3 8 0 4 1 号

【 特許文献 1 4 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 1 8 5 5 7 0 号

30

【 特許文献 1 5 】 米国特許出願公開第 2 0 1 9 - 0 0 0 2 5 6 6 号

【 特許文献 1 6 】 米国特許出願公開第 2 0 2 0 - 0 2 3 9 5 7 2 号

【 特許文献 1 7 】 W O 2 0 1 8 / 1 8 7 7 0 2

【 特許文献 1 8 】 W O 2 0 1 9 / 1 6 5 3 4 0

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 B r e k k e , O H . , a n d I . S a n d l i e , N a t u r e R e v i e w s D r u g D i s c o v e r y 2 : 5 2 - 6 2 (2 0 0 3)

【 非特許文献 2 】 H i g e l , F . e t a l . E u r . J . P h a r m . B i o p h a r m . 1 3 9 : 1 2 3 - 1 3 1 (2 0 1 9)

40

【 非特許文献 3 】 H e n n i c k e , J . , e t a l . , A n a l . B i o c h e m . 5 3 9 : 1 6 2 - 1 6 6 (2 0 1 7)

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

概要

本明細書で提供されるのは、多量体結合分子のモノクローナル集団であって、各結合分子が 1 0 個または 1 2 個の I g M 由来重鎖を含み、I g M 由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 I g M 重鎖定常領域を含み、各 I g M 重鎖定常領域は、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つのアスパラギン (N) - 結合型グリコシル化モチーフを含み

50

、N-結合型グリコシル化モチーフはアミノ酸配列 $N-X_1-S/T$ を含み、配列中、N はアスパラギンであり、 X_1 はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつ S/T はセリンまたはトレオニンであり、各 IgM 重鎖定常領域上の N-結合型グリコシル化モチーフの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つが複合型グリカンで占められており、結合分子のモノクローナル集団が結合分子1モルあたり少なくとも35モルのシアル酸を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも124、少なくとも130、少なくとも140、または少なくとも146モルのシアル酸を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、または少なくとも65モルのシアル酸を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり約40～約70、約40～約60、約40～約55、約40～約50、約50～約70、約60～約70モルのシアル酸を含む。

10

【0011】

いくつかの実施形態では、IgM重鎖定常領域は、配列番号1（対立遺伝子IGHM*03）または配列番号2（対立遺伝子IGHM*04）のアミノ酸46（モチーフN1）、アミノ酸209（モチーフN2）、アミノ酸272（モチーフN3）、アミノ酸279（モチーフN4）、及びアミノ酸440（モチーフN5）に対応するアミノ酸位置から開始する5つのN-結合型グリコシル化モチーフ $N-X_1-S/T$ を含む、ヒトIgM重鎖定常領域またはそのバリエーションである。いくつかの実施形態では、モチーフN1、N2、及びN3は、複合型グリカンによって占められている。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、細胞株改変、インビトロ糖鎖工学、またはそれらの任意の組み合わせの方法によって生成される。

【0013】

いくつかの実施形態では、細胞株改変は、結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株にシアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をトランスフェクトし、それにより、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する改変細胞株を生成することを含む。いくつかの実施形態では、シアリルトランスフェラーゼは、ヒトβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）（配列番号3）を含む。いくつかの実施形態では、細胞株改変は、結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株にガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をトランスフェクトし、それにより、ガラクトシルトランスフェラーゼを過剰発現する改変細胞株を生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒトβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4（B4GALT4）（配列番号4）を含む。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、シアリルトランスフェラーゼは、ヒトβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）（配列番号3）の可溶性バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ST6GAL1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸xから406を含み、ここで、xは、27から120までの整数である。いくつかの実施形態では、ST6GAL1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸120～406、115～406、110～406、109～406、105～406、100～406、95～406、90～406、89～406、88～406、87～406、86～406、85～406、84～406、83～406、82～406、81～406、80～406、75～406、70～406、65～406、60～406、55～406

40

50

、50～406、45～406、40～406、35～406、30～406、または27～406を含む。いくつかの実施形態では、シアル酸基質は、シチジナーリン酸-N-アセチル-ノイラミン酸(CMP-NANA)を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質の質量比は、約1：4～約40：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80：1～約5000：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約500：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約500：62.5：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約2000：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約2000：500：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80：500：1である。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることは、少なくとも30分間の接触を含む。いくつかの実施形態では、接触させることは、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、24時間、36時間、または48時間の接触を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることは、約2℃～約40℃で起こる。いくつかの実施形態では、接触させることは、15℃～約37℃、15℃～約30℃、または15℃～約25℃で起こる。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団をガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒトβ-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4(B4GALT4)(配列番号4)の可溶性バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、B4GALT4の可溶性バリエーションは、配列番号4のアミノ酸xから344を含み、ここで、xは、39から120までの整数である。いくつかの実施形態では、B4GALT4の可溶性バリエーションは、配列番号4のアミノ酸120～344、115～344、110～344、105～344、100～344、95～344、90～344、85～344、80～344、75～344、70～344、65～344、60～344、55～344、50～344、45～344、40～344、または39～344を含む。いくつかの実施形態では、ガラクトース基質は、ウリジン二リン酸-α-D-ガラクトース(UDP-Gal)を含む。いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることは、可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることの前にまたは同時に起こる。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、各結合分子は多重特異性であり、各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している2つ以上の結合ドメインは、異なる標的に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している結合ドメインは、同じ標的に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している結合ドメインは同一である。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、抗体由来の抗原結合ドメインである。いくつかの実施形態では、各結合分子は、それぞれ5つまたは6つの二価IgM結合ユニットを含む五量体または六量体IgM抗体であり、各結合ユニットは、バリエーションIgM定常領域のアミノ末端側に位置するVHを各々含む2つのIgM重鎖と、免疫グロブリン軽鎖

50

定常領域のアミノ末端側に位置する軽鎖可変ドメイン（V_L）を各々含む2つの免疫グロブリン軽鎖とを含み、V_HとV_Lが結合して標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、各結合分子のそれぞれの抗原結合ドメインは、同じ標的に結合する。いくつかの実施形態では、各結合分子のそれぞれの抗原結合ドメインは同一である。

【0020】

いくつかの実施形態では、標的は、標的エピトープ、標的抗原、標的細胞、標的器官、または標的ウイルスである。

【0021】

いくつかの実施形態では、各結合分子は、五量体であり、かつJ鎖またはその機能的断片またはその機能的バリエーションをさらに含む。いくつかの実施形態では、J鎖は、配列番号6のアミノ酸配列を含む成熟ヒトJ鎖、またはその機能的断片、またはその機能的バリエーションである。いくつかの実施形態では、J鎖は、配列番号6のアミノ酸49に対応するアミノ酸位置から開始する、N-結合型グリコシル化モチーフN-X₁-S/T（モチーフN6）を含む。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、J鎖は、1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いてバリエーションJ鎖と同一である参照J鎖と比較して1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む機能的バリエーションJ鎖であり、結合分子のモノクローナル集団は、バリエーションJ鎖における1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いて同一であり、同じ動物種に対して同一の方法を使用して投与される参照IgM由来の結合分子と比較して、対象動物への投与時に血清半減期の増加を示す。いくつかの実施形態では、バリエーションJ鎖またはその機能的断片は、参照J鎖と比較して、1つ、2つ、3つ、または4つの単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションJ鎖またはその機能的断片は、配列番号6の野生型成熟ヒトJ鎖のアミノ酸Y102に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を含む。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、配列番号6のY102に対応するアミノ酸は、アラニン（A）に置換されている。いくつかの実施形態では、J鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、J鎖またはその断片もしくはバリエーションは、異種部分をさらに含む改変されたJ鎖であり、異種部分は、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合またはコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、異種部分は、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合しているポリペプチドである。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合している。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも5個であるが、25個以下のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、GGGGSGGGSGGGGS（配列番号43）からなる。

【0025】

40

いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、J鎖またはその断片もしくはバリエーションのN末端、あるいは、J鎖またはその断片もしくはバリエーションのC末端に融合している。いくつかの実施形態では、同じであっても異なってもよい異種部分が、J鎖またはその断片もしくはバリエーションのN末端及びC末端に融合している。

【0026】

いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドの抗原結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗原結合断片はscFv断片である。いくつかの実施形態では、異種scFv断片は、CD3εに結合する。いくつかの実施形態では、改変されたJ鎖は、配列番号36（V15J）、配列番号37（V15J*）、配列番号38（SJ*）

50

）、配列番号 31 (A-55-J*)、配列番号 32 (A-56-J*)、配列番号 33 (A-57-J*)、配列番号 34 のアミノ酸 20~420 (VJH)、配列番号 35 のアミノ酸 20~420 (VJ*H)、あるいは、それぞれ、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 を含む、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 のアミノ酸配列を含む抗 CD3ε の scFv にペプチドリンカーを介して融合している配列番号 6、または 7 のアミノ酸配列を含む。

【0027】

本明細書に開示される結合分子のモノクローナル集団と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物もまた本明細書に提供される。

【0028】

本明細書に開示される結合分子のモノクローナル集団を生成する組換え宿主細胞もまた本明細書に提供される。

【0029】

本明細書で開示される宿主細胞を培養することと、結合分子の集団を回収することとを含む、本明細書で開示される結合分子のモノクローナル集団を生成する方法も本明細書にさらに提供される。

【0030】

高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成するための方法であって、結合分子のモノクローナル集団を発現する細胞株を提供することと、細胞株を培養することと、結合分子のモノクローナル集団を回収することとを含み、各結合分子が、10個または12個のIgM由来重鎖を含み、IgM由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化IgM重鎖定常領域を含み、各IgM重鎖定常領域は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアスパラギン(N)-結合型グリコシル化モチーフを含み、N-結合型グリコシル化モチーフは、アミノ酸配列N-X₁-S/Tを含み、配列中、Nはアスパラギンであり、X₁はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつS/Tはセリンまたはトレオニンであり、集団内の各IgM重鎖定常領域上のN-結合型グリコシル化モチーフの平均で少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つは、複合型グリカンで占められており、細胞株、培養条件、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、グリカン1つあたり少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つのシアル酸末端単糖を含む複合型グリカンを濃縮するように最適化されている、方法も本明細書に提供される。

【0031】

高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成する方法であって、結合分子のモノクローナル集団を発現する細胞株を提供することと、細胞株を培養することと、結合分子のモノクローナル集団を回収することとを含み、各結合分子が、10個または12個のIgM由来重鎖を含み、IgM由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化IgM重鎖定常領域を含み、各IgM重鎖定常領域は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアスパラギン(N)-結合型グリコシル化モチーフを含み、N-結合型グリコシル化モチーフは、アミノ酸配列N-X₁-S/Tを含み、配列中、Nはアスパラギンであり、X₁はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつS/Tはセリンまたはトレオニンであり、集団内の各IgM重鎖定常領域上のN-結合型グリコシル化モチーフの平均で少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つは、複合型グリカンで占められており、細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、グリカン1つあたり少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つのシアル酸末端単糖を含む複合型グリカンを濃縮するように最適化されている、方法も本明細書に提供される。

【0032】

いくつかの実施形態では、細胞株、培養条件、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、結合分子1モルあたり少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なく

10

20

30

40

50

とも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、50、
少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100
、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも124、少なくとも130、少なく
とも140、または少なくとも146モルのシアル酸を含む結合分子のモノクローナル集
団をもたらすように最適化される。いくつかの実施形態では、細胞株、回収プロセス、ま
たはそれらの組み合わせは、結合分子1モルあたり少なくとも10、少なくとも15、少
なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少
なくとも45、少なくとも50、または少なくとも60モルシアル酸を含む結合分子のモ
ノクローナル集団をもたらすように最適化される。いくつかの実施形態では、細胞株、回
収プロセス、またはそれらの組み合わせは、結合分子1モルあたり少なくとも30、少な
くとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、または少なくとも60
モルのシアル酸を含む結合分子のモノクローナル集団をもたらすように最適化される。い
くつかの実施形態では、細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、結合分子
1モルあたり約40～約70、約40～約60、約40～約55、約40～約50、約5
0～約70、約60～約70モルのシアル酸を含む結合分子のモノクローナル集団をもた
らすように最適化される。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、IgM重鎖定常領域は、配列番号1（対立遺伝子IGHM*
03）または配列番号2（対立遺伝子IGHM*04）のアミノ酸46（モチーフN1）
、アミノ酸209（モチーフN2）、アミノ酸272（モチーフN3）、アミノ酸279
（モチーフN4）、及びアミノ酸440（モチーフN5）に対応するアミノ酸位置から開
始する5つのN-結合型グリコシル化モチーフN-X₁-S/Tを含む、ヒトIgM重鎖
定常領域に由来する。いくつかの実施形態では、結合分子の集団中のモチーフN1、N2
、及びN3のうちの平均で1つ、2つ、または3つ全てが、複合型グリカンによって占め
られている。

20

【0034】

いくつかの実施形態では、提供される細胞株は、シアリルトランスフェラーゼを過剰発
現するように改変される。いくつかの実施形態では、シアリルトランスフェラーゼは、ヒ
トβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）（配
列番号3）を含む。

30

【0035】

いくつかの実施形態では、回収プロセスは、結合分子のモノクローナル集団をインビト
ロ糖鎖工学に供することを含む。いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合
分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触
させることを含む。いくつかの実施形態では、シアリルトランスフェラーゼは、ヒトβ-
ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）（配列番号
3）の可溶性バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ST6GAL1の可溶性バリ
アントは、配列番号3のアミノ酸xから406を含み、ここで、xは、27から120ま
での整数である。いくつかの実施形態では、ST6GAL1の可溶性バリエーションは、配列
番号3のアミノ酸120～406、115～406、110～406、109～406、
105～406、100～406、95～406、90～406、89～406、88～
406、87～406、86～406、85～406、84～406、83～406、8
2～406、81～406、80～406、75～406、70～406、65～406
、60～406、55～406、50～406、45～406、40～406、35～4
06、30～406、または27～406を含む。いくつかの実施形態では、シアル酸基
質は、シチジン-リン酸-N-アセチル-ノイラミン酸（CMP-NANA）を含む。

40

【0036】

いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質の質量比は、約1：4～約40：1
である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は約
80：1～約10000：1である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトラ

50

ンスフェラーゼの質量比は、約 500 : 1 である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約 500 : 62.5 : 1 である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約 2000 : 1 である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約 2000 : 500 : 1 である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比は、約 80 : 1 である。いくつかの実施形態では、結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼのモル比は、約 80 : 500 : 1 である。

【0037】

いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることは、少なくとも 30 分間の接触を含む。いくつかの実施形態では、接触させることは、少なくとも 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、24 時間、36 時間、または 48 時間の接触を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることは、約 2℃～約 40℃で起こる。いくつかの実施形態では、接触させることは、15℃～約 37℃、15℃～約 30℃、または 15℃～約 25℃で起こる。

【0038】

いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団をガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒト β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ 4 (B4GALT4) (配列番号 4) の可溶性バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ガラクトース基質は、ウリジンニリン酸- α -D-ガラクトース (UDP-Gal) を含む。いくつかの実施形態では、ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることは、可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることの前にまたは同時に起こる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図 1】図 1A は、「単純な」グリカンの構造を示す。図 1B は、オリゴマンノースグリカンの例示的な構造を示す。図 1C は、複合型グリカンの例示的な構造を示す。図 1D は、ハイブリッドグリカンの例示的な構造を示す。単糖：暗い円＝マンノース；明るい円＝ガラクトース；正方形＝N-アセチルグルコサミン；ダイヤモンド＝N-アセチルノイラミン酸（シアル酸または NANA）；三角形＝フコース。派生元：Varki, A., and Schauer, R., *Essentials of Glycobiology*, 3rd Edition, Chapter 8, Consortium of Glycobiology (2009)。

【図 2】図 2A は、N-アセチルノイラミン酸（シアル酸または NANA）の構造を示す。図 2B は、シチジン-リン酸 N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NANA) の構造を示す。

【図 3A】ヒト IgM 重鎖の空間充填モデルであり、5つの N 結合型グリコシル化部位の位置を示す。

【図 3B】ヒト IgM 重鎖定常領域アミノ酸配列（対立遺伝子IGHM*04、配列番号 2）と、マウス (GenBank: CAC20701.1、配列番号 46) 及びカニクイザル (GenBank: EHH62210.1、配列番号 47) のアミノ酸 14～487 のものとのアラインメントを示す。アスパラギン (N) -結合型グリコシル化モチーフに対応するアミノ酸は四角で囲まれている。

【図 4】様々な濃度の短縮型ヒト α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ (ST6) による処理から生じる抗 CD20×CD3 IgM-A のシアリル化の量を示す。

【図 5】2つの異なる IgM 抗体、抗 DR5 IgM-B 及び抗 DR5 IgM-C のインビトロシアリル化を示す。

10

20

30

40

50

【図6】マウスモデルにおける抗CD20×CD3 IGM-A及び抗CD20×CD3 IGM-A-GEM抗体の薬物動態を示す。

【図7】サブクロンのSNA-Iレクチン標識を示す。フルオレセインイソチオシアネート(FITC)にコンジュゲートしたSNA-1レクチンで細胞を標識した。サイトメーターで測定した488em/530exからのシグナルの幾何平均をそれぞれのサブクロンごとに示す。

【図8】図8Aは、2, 6-シアリルトランスフェラーゼプール及び2つのサブクロン(25及び47)で実行された発酵から精製されたタンパク質について、製造者の使用説明書に従って視覚化及び画像化された、還元された変性BioRad(登録商標)CriterionTGX Stain-Free Precastゲルを示す。図8Bは、ピ

10

オチン化SNA-Iレクチンを使用した、図8Aと同じタンパク質のウェスタンブロットを示す。ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ融合物をブロットに使用した。

【図9】図9A～9Bは、抗CD20×CD3 IGM-A生成細胞株の3Lバイオリアクターからの発酵比較データを示す。2つの曲線は、2, 6-シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を持たない対照の親細胞株と、2, 6-シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を有するサブクロン25を用いた生産実行のものについて示される。図9Aは、実行中の生細胞密度(VCD)を示す。図9Bは、細胞株の生存率を示す。図9Cは、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって決定された力価を示す。図9Dは、精製されたIgMで測定されたシアル酸の比率を示す。

【図10】図10Aは、2, 6-シアリルトランスフェラーゼをトランスフェクトしたCHO細胞クローンについての96ウェルレベルでのスクリーニングのプロットを示す。図10Bは、細胞表面の2, 6-シアル酸レベルのサイトメトリーに基づく分析のプロットを示す。

20

【図11】図11Aおよび11Bは、それぞれ、トランスフェクトされていない細胞の2, 3-シアル酸および2, 6-シアル酸のレベルを示す。図11Cは、トランスフェクトされていない細胞とトランスフェクトされた細胞の2, 3-シアル酸と2, 6-シアル酸のレベルを比較している。

【図12】ある範囲のシアル酸レベルを有する様々な量の抗体によるT細胞活性化を示す。

【図13】図13A～13Bは、さまざまな量のST6及びCMP-NANAによる、さまざまな温度での抗CD20×CD3-IGM-Aのシアリル化の時間経過を示す。

30

【図14】さまざまな量のST6及びCMP-NANAによる、室温での抗CD20×CD3-IGM-Aのシアリル化の時間経過を示す。

【図15】様々な抗体についてシアル酸レベルと結果として生じるAUC_{0-∞}の比較を示す。

【図16】カニクイザルモデルにおける抗CD20×CD3 IGM-F(SA18)及び抗CD20×CD3 IGM-F-GEM(SA51)抗体の薬物動態を示す。

【図17】図17Aは、抗CD20×CD3-IGM-F(SA9もしくは18)または抗CD20×CD3-IGM-F-GEM(SA51)の投与後のそれぞれの時点でのカニクイザルのB細胞の相対数を示す。図17Bは、抗CD20×CD3-IGM-F(SA9もしくは18)または抗CD20×CD3-IGM-F-GEM(SA51)の投与後にカニクイザルのB細胞が回復し始めた日を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0040】

詳細な説明

定義

本明細書で使用される場合、用語「1つの(a)」または「1つの(an)」の実体は、その実体の1つ以上を指し、例えば、「結合分子(binding molecule)」は、1つ以上の結合分子を表すと理解される。そのようなとき、用語「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」は、本明

50

細書において互換的に使用され得る。

【0041】

さらに、「及び／または」は、本明細書で使用される場合、他のものを伴ってまたは伴わずに、2つの特定の特徵または構成要素のそれぞれの具体的な開示として受け取られるべきである。したがって、本明細書で「A及び／またはB」等の語句で使用される場合、「及び／または」という用語は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）を含むことを意図する。同様に、「A、B、及び／またはC」等の語句で使用される場合、「及び／または」という用語は、次の実施形態のそれぞれを包含することを意図する：A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

10

【0042】

別途定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、本開示の関連する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及び the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、本開示で使

20

【0043】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの Systeme International de Unites (SI) で承認された形式で示される。数値範囲は範囲を定義する数を含む。別途示されない限り、アミノ酸配列はアミノからカルボキシの方向で左から右に書かれる。本明細書で提供される見出しは、本明細書全体を参照することによって得られることができる様々な実施形態または本開示の実施形態を限定するものではない。したがって、すぐ下に定義されている用語は、明細書全体を参照することによってより完全に定義されている。

【0044】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、単数形の「ポリペプチド」及び複数形の「ポリペプチド」を包含し、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結した単量体（アミノ酸）からなる分子を指すことを意図する。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖または複数の鎖を指し、特定の長さの生成物を指すものではない。したがって、2つ以上のアミノ酸の鎖または複数の鎖を指すのに使用されるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義に含まれ、用語「ポリペプチド」は、任意のこれらの用語の代わりに使用され得る。「ポリペプチド」という用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、及び既知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、または非天然アミノ酸による修飾を含むがこれらに限定されないポリペプチドの発現後修飾の生成物を指すことを意図する。ポリペプチドは、生物学的供給源に由来するか、または組換え技術によって生成され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されるわけではない。それは化学合成によることを含む任意の方法で生成することができる。

30

40

【0045】

本明細書に開示されるポリペプチドは、約3個以上、5個以上、10個以上、20個以上、25個以上、50個以上、75個以上、100個以上、200個以上、500個以上、1,000個以上、または2,000個以上のアミノ酸のサイズであり得る。ポリペプチドは、必ずしもそのような構造を有するわけではないが、定義された三次元構造を有することができる。定義された三次元構造を有するポリペプチドは、フォールディングされ

50

たと称され、定義された三次元構造を有しないが、むしろ多数の異なる立体配座をとることができるポリペプチドは、フォールディングされていないと称される。本明細書で 사용되는場合、糖タンパク質という用語は、アミノ酸、例えばセリンまたはアスパラギンの酸素含有または窒素含有の側鎖を介してタンパク質に付着している少なくとも1つの炭水化物部分に結合されたタンパク質を指す。アスパラギン（N）－結合型グリカン、本開示の他の場所でより詳細に記載されている。

【0046】

「単離された」ポリペプチドまたはその断片、バリエーション、もしくは誘導体とは、その天然の環境にはないポリペプチドを意図する。特定の精製レベルが求められるわけではない。例えば、単離されたポリペプチドはその天然のまたは自然な環境から取り出され得る。いずれかの適切な技法によって、分離、分画または部分的もしくは実質的に精製された天然のポリペプチドまたは組み換えポリペプチドと同様に、宿主細胞で発現させた組み換え生成されたポリペプチドとタンパク質は、本開明細書に開示されるとき、単離されているものとみなす。

【0047】

本明細書で 사용되는場合、「天然に存在しないポリペプチド」という用語またはその任意の文法上の変化形は、裁判官、または行政機関もしくは司法機関によって「天然に存在する」と判定もしくは解釈されるかまたはその可能性があるポリペプチドの形態を明示的に除外するが、ただしこのような形態のみを除外する、条件付き定義である。

【0048】

本明細書に開示される他のポリペプチドは、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、またはバリエーション、及びこれらの任意の組み合わせである。本明細書に開示される場合、「断片」、「バリエーション」、「誘導体」、及び「類似体」という用語は、対応する天然の抗体またはポリペプチドの特性のうちの少なくともいくつか、例えば、抗体に特異的に結合することを保持する任意のポリペプチドを含む。ポリペプチドの断片は、本明細書の他の場所で論じられている特異的抗体断片に加えて、例えば、タンパク質分解断片、ならびに欠失断片を含む。例えばポリペプチドのバリエーションには、上述の断片が含まれ、また、アミノ酸の置換、欠失、または挿入による改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。特定の実施形態では、バリエーションは天然に存在しないものであり得る。天然に存在しないバリエーションは、当該技術分野で既知の変異導入技法を用いて生成することができる。バリエーションポリペプチドは、保存的または非保存的なアミノ酸の置換、欠失、または付加を含み得る。誘導体は、元のポリペプチドには見られない追加的な特徴を示すように改変されたポリペプチドである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。本明細書で 사용되는場合、ポリペプチドの「誘導体」はまた、官能性側鎖の反応によって化学的に誘導体化された1つ以上のアミノ酸を有する本発明のポリペプチドも指すことができる。「誘導体」としても含まれるのはまた、20個の標準アミノ酸のうちの1つ以上の誘導体を含むポリペプチドである。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンの代わりになり得；5-ヒドロキシリジンはリジンの代わりになり得；3-メチルヒスチジンはヒスチジンの代わりになり得；ホモセリンはセリンの代わりになり得；オルニチンはリジンの代わりになり得る。

【0049】

「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸が類似の側鎖を有する別のアミノ酸で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義され、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。例えば、チロシンをフェニルアラニンに置換することは、保

存的置換である。特定の実施形態では、本開示のポリペプチド、結合分子、及び抗体の配列における保存的置換は、抗体が結合する抗原に対する、ポリペプチド、結合分子、または抗体が結合する抗原の結合を阻害しない。抗原結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 及びBurks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:.412-417 (1997)を参照されたい）。
【0050】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単一の核酸及び複数の核酸を包含することを意図し、単離された核酸分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA)、cDNA、またはプラスミドDNA (pDNA)を指す。ポリヌクレオチドは、従来のホスホジエステル結合または非従来の結合（例えば、ペプチド核酸 (PNA)に見られるようなアミド結合）を含み得る。「核酸」または「核酸配列」という用語は、ポリヌクレオチドに存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNAの断片を指す。

【0051】

「単離された」核酸またはポリヌクレオチドは、その天然の環境から分離された任意の形態の核酸またはポリヌクレオチドを意図する。例えば、ゲル精製されたポリヌクレオチド、またはベクターに含まれるポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、「単離された」とみなされるであろう。また、クローニングのための制限部位を有するように操作されたポリヌクレオチドセグメント、例えば、PCR産物も、「単離された」とみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞中に維持された組換えポリヌクレオチド、または緩衝液もしくは生理食塩水などの非天然溶液中の精製された（部分的または実質的に）ポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子は、インビボまたはインビトロのポリヌクレオチドのRNA転写産物を含み、転写産物は、天然に見られるものではない。単離されたポリヌクレオチドまたは核酸には、合成的に生成されたそのような分子がさらに含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの調節エレメントであり得るか、またはそれらを含み得る。

【0052】

本明細書で使用される場合、「天然に存在しないポリヌクレオチド」という用語またはその任意の文法上の変化形は、裁判官、または行政機関もしくは司法機関によって「天然に存在する」と判定もしくは解釈されるかまたはその可能性がある核酸またはポリヌクレオチドの形態を明示的に除外するが、ただしこのような形態のみを除外する、条件付き定義である。

【0053】

本明細書で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の部分である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)はアミノ酸に翻訳されず、コード領域の一部とみなすことができるが、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどの隣接配列は、コーディング領域の一部ではない。2つ以上のコード領域は、単一のポリヌクレオチドコンストラクト、例えば、単一のベクター上、または別個のポリヌクレオチドコンストラクト、例えば、別個の（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含み得るか、または2つ以上のコード領域を含むことができ、例えば、単一のベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードすることができる。さらに、ベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、別のコード領域に融合しているかまたは融合していない異種コード領域を含み得る。異種コード領域としては、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメインなどの特殊なエレメントまたはモチーフをコードするものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つまたは複数のコード領域に作動可能に結合するプロモーター及び／または他の転写または翻訳制御エレメントを含むことができる。作動可能な結合は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現を調節配列（複数可）の影響または制御下に置くような方法で、1つ以上の調節配列と結合する場合である。2つのDNA断片（ポリペプチドコード領域及びそれに結合するプロモーターなど）が「作動可能に連結する」とは、プロモーター機能の誘導が、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、ならびに2つのDNA断片間の連結の性質が、遺伝子産物の発現を導く発現調節配列の能力を妨害しない場合、または転写されるDNAテンプレートの能力を妨害しない場合、である。したがって、プロモーターがポリペプチドをコードする核酸と作動可能に結合しているのは、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合である。プロモーターは、所定の細胞においてDNAの実質的な転写を誘導する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターに加えて、他の転写制御エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルは、細胞特異的転写を誘導するためにポリヌクレオチドと作動可能に結合させることができる。

10

【0055】

種々の転写制御領域が当業者に知られている。これらには、サイトメガロウイルス（イントロンAと組み合わせた最初期プロモーター）、シミアンウイルス40（初期プロモーター）、及びレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルスなど）由来のプロモーター及びエンハンサーセグメントなどであるがこれらに限定されない、脊椎動物細胞で機能する転写制御領域が含まれるが、これらに限定されない。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、ウサギβグロビンなどの脊椎動物遺伝子に由来する領域、及び真核細胞での遺伝子発現を制御できる他の配列が挙げられる。さらなる好適な転写制御領域としては、組織特異的プロモーター及びエンハンサー、ならびにリンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモーター）が挙げられる。

20

【0056】

同様に、種々の翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終止コドン、及びピコルナウイルスに由来するエレメント（特に、CITE配列とも呼ばれる配列内リボソーム進入部位またはIRES）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0057】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNA、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、またはリボソームRNAの形態であり得る。

【0058】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と結合することができ、これは、本明細書に開示されるように、ポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドの分泌を指示する。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を横切る成長タンパク質鎖の輸送が開始されると成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者であれば、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドは、ポリペプチドのN末端に融合しているシグナルペプチドを有し得、これは、完全または「全長」ポリペプチドから切断され、ポリペプチドの分泌形態または「成熟」形態を生成することを認識している。特定の実施形態では、天然シグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖のシグナルペプチドが使用されるか、またはそれに作動可能に結合されるポリペプチド分泌を指示する能力を保持するその配列の機能的誘導体を使用される。代替的に、異種哺乳動物シグナルペプチドまたはその機能的誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子（

40

50

TPA) またはマウス β -グルクロニダーゼのリーダー配列で置換することができる。

【0059】

本明細書で使用される場合、「結合分子」という用語は、その最も広い意味において、受容体または標的、例えば、エピトープまたは抗原決定基に対して特異的に結合する分子を指す。本明細書でさらに記載されるように、結合分子は、本明細書に記載の1つ以上の「結合ドメイン」、例えば、本明細書に記載の「抗原結合ドメイン」を含むことができる。結合分子の非限定的な例は、抗原特異的結合を保持する本明細書に詳細に記載される抗体または抗体様分子である。特定の実施形態では、「結合分子」は、本明細書に詳細に記載される抗体または抗体様分子または抗体由来分子を含む。

【0060】

本明細書で使用される場合、「結合ドメイン」または「抗原結合ドメイン」という用語（互換的に使用され得る）は、標的、例えばエピトープ、ポリペプチド、細胞、または器官に特異的に結合するのに必要かつ十分である、結合分子、例えば抗体または抗体様分子または抗体由来分子の領域を指す。例えば、「Fv」、例えば、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、2つの別個のポリペプチドサブユニットまたは一本鎖のいずれかとして、「結合ドメイン」であるとみなされる。その他の結合ドメインとしては、非限定的に、ラクダ種に由来する抗体の単ドメイン重鎖可変領域(VHH)、またはフィブロネクチンシヤフォールド内で発現する6個の免疫グロブリン相補性決定領域(CDR)が挙げられる。本明細書に記載の「結合分子」または「抗体」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ以上の「抗原結合ドメイン」を含むことができる。

【0061】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、本明細書では互換的に使用することができる。抗体（または本明細書に開示されるその断片、バリエーション、もしくは誘導体、例えば、IgM様抗体）は、少なくとも重鎖（例えば、ラクダ種に由来する）の可変領域、または少なくとも重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的十分に理解されている。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)を参照されたい。別段の記載がない限り、「抗体」という用語は、抗体の小さな抗原結合断片からフルサイズの抗体、例えば、2つの完全な重鎖及び2つの完全な軽鎖を含むIgG抗体、4つの完全な重鎖及び4つの完全な軽鎖を含み、J鎖及び／または分泌コンポーネントを含むIgA抗体、あるいは、10個もしくは12個の完全な重鎖及び10個もしくは12個の完全な軽鎖を含み、任意選択でJ鎖もしくはその機能的断片もしくはバリエーションを含む、IgM由来結合分子、例えば、IgM抗体もしくはIgM様抗体に及ぶ範囲のあらゆるものを包含する。

【0062】

「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に区別することができる様々な広いクラスのポリペプチドを包む。当業者であれば、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)に分類され、それらの間にいくつかのサブクラス（例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ または $\alpha 1 \sim \alpha 2$)が存在することを理解するであろう。抗体の「アイソタイプ」をそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEとして決定するのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンのサブクラス（サブタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂などは、十分に特徴づけられており、機能的な特殊化をもたらすことが知られている。これらの免疫グロブリンのそれぞれの改変バージョンは、本開示を考慮すれば当業者に容易に認識可能であり、したがって、本開示の範囲内である。

【0063】

軽鎖は、 κ または λ (κ 、 λ)のいずれかに分類される。それぞれの重鎖クラスはカップまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般に、免疫グロブリンが、例

10

20

30

40

50

例えば、ハイブリドーマ、B細胞、または遺伝的に改変された宿主細胞によって発現される
とき、軽鎖と重鎖は互いに共有結合し、2つの重鎖の「テール」部分は共有ジスルフィド
結合または非共有結合によって互いに結合する。重鎖において、アミノ酸配列は、Y配置
の分岐した末端のN末端から各鎖の底部のC末端まで伸びている。特定の抗体、例えば、
IgG抗体の基本構造は、ジスルフィド結合により共有結合して「Y」構造を形成する2
個の重鎖サブユニット及び2個の軽鎖サブユニットを含み、本明細書においてこの構造は
「H2L2構造」または「結合ユニット」とも呼ばれる。

【0064】

「結合ユニット」という用語は、本明細書では結合分子の一部、例えば、抗体、抗体様
分子、または抗原由来分子、その抗原結合断片、またはその多量体化断片を指すために使
用され、これは、標準的な「H2L2」免疫グロブリン構造、すなわち、2つの重鎖また
はその断片、及び2つの軽鎖またはその断片に対応する。特定の実施形態では、例えば、
結合分子が二価のIgG抗体またはその抗原結合断片である場合、「結合分子」及び「結
合ユニット」という用語は等価である。他の実施形態では、例えば、結合分子が多量体、
例えば、二量体IgA抗体もしくはIgA様抗体、五量体IgM抗体もしくはIgM様抗
体、または六量体IgM抗体もしくはIgM様抗体、またはそれらの任意の誘導体である
場合、結合分子は、2つ以上の「結合ユニット」を含む。IgA二量体の場合には2個、
IgM五量体または六量体の場合には、それぞれ5個または6個である。結合ユニットは
、全長抗体の重鎖及び軽鎖を含む必要はないが、典型的には二価であり、すなわち、上で
定義されるように、2つの「抗原結合ドメイン」を含む。本明細書で使用される場合、本
開示で提供される特定の結合分子は「二量体」であり、IgA定常領域またはその多量体
化断片を含む2つの二価結合ユニットを含む。本開示で提供される特定の結合分子は「五
量体」または「六量体」であり、IgM定常領域またはその多量体化断片もしくはバリア
ントを含む5個または6個の二価結合ユニットを含む。2個以上、例えば、2個、5個、
または6個の結合ユニットを含む結合分子、例えば、抗体または抗体様分子または抗原由
来結合分子は、本明細書では「多量体」と呼ばれる。

【0065】

本明細書で使用される場合、「J鎖」という用語は、そのアミノ酸配列が配列番号6と
して提示されている成熟ヒトJ鎖を含む、任意の動物種のIgMまたはIgA抗体のJ鎖
、その任意の機能的断片、その誘導体、及び／またはそのバリエーションを指す。種々のJ鎖
バリエーション及び改変されたJ鎖誘導体が本明細書に開示される。当業者が認識するように
、「機能的断片」または「機能的バリエーション」は、IgM重鎖定常領域と結合して五量体
IgM抗体を形成することができるそれらの断片及びバリエーションを含む。

【0066】

「改変されたJ鎖」という用語は、異種の部分、例えば、異種のポリペプチド、例えば
、J鎖配列に導入された外因性抗原結合ドメインまたは機能的ドメインを含むJ鎖ポリペ
プチドの誘導体を指すために本明細書で使用される。導入は、異種ポリペプチドもしくは
他の部分の直接的もしくは間接的融合を含む手段、またはペプチドもしくは化学リンカー
を介した接着による手段を含む、任意の手段によって達成することができる。「改変され
たヒトJ鎖」という用語は、非限定的に、異種部分、例えば、異種ポリペプチド、例えば
、外因性結合ドメインの導入によって改変された、配列番号6のアミノ酸配列の天然配列
ヒトJ鎖、またはその機能的断片またはその機能的バリエーションを包含する。特定の実施形
態では、異種部分は、IgMの五量体への効率的な重合体化、及びそのような重合体の標
的への結合を妨害しない。例示的な改変されたJ鎖は、例えば、米国特許第9,951,
134号、同第10,400,038号、及び同第10,618,978号、ならびに米
国特許出願公開番号US-2019-0185570に見出すことができ、これらのそれ
ぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0067】

本明細書で使用される場合、「IgM由来結合分子」という用語は、総称的に、天然Ig
M抗体、IgM様抗体、ならびに、抗体抗原結合ドメインまたはそのサブユニットの代

10

20

30

40

50

わりに非抗体結合ドメイン及び／または機能的ドメインを含む他のIgM由来結合分子、ならびにそれらの任意の断片、例えば、多量体化断片、バリエント、またはその誘導体を指す。

【0068】

本明細書で使用される場合、「IgM様抗体」という用語は、一般に、例えば、J鎖と結合して、五量体または六量体を形成する能力を依然として保持する、バリエント抗体、または抗体由来結合分子を指す。IgM様抗体または他のIgM由来結合分子は、典型的には、IgM定常領域の少なくともC μ 4-t μ pドメインを含むが、同じ種由来または異なる種由来の他の抗体アイソタイプ、例えば、IgGからの重鎖定常領域ドメインを含み得る。IgM様抗体または他のIgM由来結合分子は、同様に、IgM様抗体が六量体及び／または五量体を形成可能である限り、1つ以上の定常領域ドメインが欠失している断片であってもよい。したがって、IgM様抗体または他のIgM由来結合分子は、例えば、ハイブリッドIgM／IgG抗体であり得るか、またはIgM抗体の「多量体化断片」であり得る。

10

【0069】

「価数」、「二価」、「多価」という用語、及び文法的な同義語は、例えば、所与の結合分子、例えば、抗体、抗体由来分子、もしくは抗体様分子における、または所与の結合ユニットにおける、抗原結合ドメインの数を指す。そのため、所与の結合分子、例えば、IgM抗体、IgM様抗体、他のIgM由来結合分子、またはその多量体化断片に対する「二価」、「四価」、及び「六価」という用語は、それぞれ2つの抗原結合ドメイン、4つの抗原結合ドメイン、及び6つの抗原結合ドメインの存在を示す。各結合ユニットが二価である典型的なIgM抗体、または他のIgM由来結合分子は10または12の価数を有することができる。二価または多価の結合分子、例えば、抗体または抗体由来分子は、単一特異性、すなわち、全ての抗原結合ドメインが同じであってもよく、二重特異性または多重特異性、例えば、2つ以上の抗原結合ドメインが異なる、例えば、同じ抗原上の異なるエピトープに結合するか、または完全に異なる抗原に結合するものであってもよい。

20

【0070】

「エピトープ」という用語は、抗体、抗体様分子または抗体由来分子の抗原結合ドメインに特異的に結合することができる任意の分子決定基を含む。特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面グルーピングを含むことができ、特定の実施形態では、3次元構造特性、及び／または特定の電荷特性を有することができる。エピトープは、抗体の抗原結合ドメインによって結合される標的の領域である。

30

【0071】

「標的」という用語は、結合分子、例えば抗体、抗体様分子、または抗体由来分子によって結合され得る物質を含むように最も広い意味で使用される。標的は、例えば、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、もしくは他の分子、またはそのような分子上の最小限のエピトープであり得る。さらに、「標的」は、結合分子、例えば抗体、抗体様分子、または抗体由来分子によって結合され得るエピトープを含む、細胞、器官、または生物、例えば、動物、植物、微生物、もしくはウイルスであり得る。

40

【0072】

抗体、抗体様分子、または抗体由来分子の軽鎖と重鎖はいずれも、構造的相同性及び機能的相同性の領域に分類される。「定常」及び「可変」という用語は、機能的に使用される。この点において、可変軽鎖(VL)部分と可変重鎖(VH)部分の両方の可変ドメインが、抗原認識及び特異性を決定することが理解されよう。逆に、軽鎖の定常領域(CL)及び重鎖の定常領域(例えば、CH1、CH2、CH3、またはCH4)は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインのナンバリングは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠位になるにつれて増加する。N末端側部分は可変領域であり、C末端側部分は定常領域であり、CH3(または、例えばIgMの場合はCH4)ドメイン及びCLドメインは

50

実際に、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0073】

「全長 I g M 抗体重鎖」とは、N 末端から C 末端への方に、抗体重鎖可変ドメイン（VH）、抗体定常重鎖定常ドメイン 1（CM1 または C μ 1）、抗体重鎖定常ドメイン 2（CM2 または C μ 2）、抗体重鎖定常ドメイン 3（CM3 または C μ 3）、及びテールピースを含み得る抗体重鎖定常ドメイン 4（CM4 または C μ 4）を含むポリペプチドである。

【0074】

上記のように、可変領域（複数可）は、結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、または抗原由来分子が、抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合するのを可能にする。すなわち、結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、または抗体由来分子の VL ドメイン及び VH ドメイン、または相補性決定領域（CDR）のサブセットは、抗原結合ドメインを形成するように組み合わせられる。より具体的には、抗原結合ドメインは、VH 鎖及び VL 鎖のそれぞれの上の 3 つの CDR によって定義することができる。特定の抗体は、より大きな構造を形成する。例えば、I g M は、5 つまたは 6 つの H2L2 結合ユニットと、任意選択でジスルフィド結合を介して共有結合した J 鎖を含む 5 量体または 6 量体の分子を形成できる。

【0075】

抗体の抗原結合ドメインに存在する 6 個の「相補性決定領域」または「CDR」は、抗体が水性環境におけるその三次元配置を仮定するとき、抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置するアミノ酸の短い非連続配列である。「フレームワーク」領域と呼ばれる、抗原結合ドメイン中の残りのアミノ酸は、少ない分子間変動を示している。フレームワーク領域は主に β シート構造を採用し、CDR は β シート構造を連結し、そしていくつかの場合では β シート構造の一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有相互作用によって正しい向きに CDR を配置することをもたらす足場を形成するように作用する。配置された CDR によって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、その同族エピトープへの抗体の非共有結合を促進する。それぞれ、CDR 及びフレームワーク領域を構成するアミノ酸は、様々な異なる方法で定義されているため、当業者によって、任意の所与の重鎖または軽鎖可変領域について、容易に同定することができる（参照によりその全ての内容が本明細書に組み込まれる、"Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U. S. Department of Health and Human Services, (1983); 及び Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987) を参照されたい）。

【0076】

当該技術分野で使用及び／または許容される用語の定義が 2 つ以上ある場合、本明細書で使用される用語の定義は、そうでないと明示的に述べられていない限り、そのような意味の全てを含むことを意図する。具体的な例は、重鎖と軽鎖のポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続な抗原結合部位を記載する用語「相補性決定領域」（「CDR」）の使用である。これらの特定の領域は、例えば、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) and by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) により記載され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。Kabat と Chothia の定義には、互いに対して比較した場合のアミノ酸の重複またはサブセットが含まれる。それにもかかわらず、抗体またはそのバリエーションの CDR を指す定義（または当業者に既知の他の定義）のいずれかの適用は、別段の指示がない限り、本明細書で定義及び使用される用語の範囲内にあることが意図される。上記の引用参考文献のそれぞれによって定義される CDR を包含する適切な

10

20

30

40

50

アミノ酸を、比較として以下の表 1 に示す。特定の C D R を包含する正確なアミノ酸番号は、C D R の配列及びサイズに依存して変動するであろう。当業者は、抗体の可変領域のアミノ酸配列を考慮して、どのアミノ酸が特定の C D R を含むかを日常的に決定することができる。

【 0 0 7 7 】

(表 1) C D R の定義 *

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

10

* 表 1 中の全ての C D R 定義のナンバリングは K a b a t e t a l . (下記参照) によって示されるナンバリング慣例に従う。

【 0 0 7 8 】

また、抗体可変領域は、例えば、IMGT 情報システム (i m g t _ d o t _ c i n e s _ d o t _ f r /) (IMGT (登録商標) / V - Q u e s t) を用いて分析して、C D R を含めた可変領域セグメントを同定することもできる (例えば、B r o c h e t e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 3 6 : W 5 0 3 - 5 0 8 , 2 0 0 8 を参照されたい)。

20

【 0 0 7 9 】

K a b a t e t a l . は、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列のためのナンバリングシステムも定義した。当業者は、配列自体を超えたいかなる実験データにも頼ることなく、この「K a b a t ナンバリング」のシステムをあらゆる可変ドメイン配列に明白に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「K a b a t ナンバリング」は、K a b a t e t a l . , U . S . D e p t . o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , " S e q u e n c e o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t " (1 9 8 3) に示されるナンバリングシステムを指す。しかしながら、K a b a t ナンバリングシステムの使用が明示的に述べられない限り、本開示における全てのアミノ酸配列について連続したナンバリングが使用される。

30

【 0 0 8 0 】

ヒト I g M 定常ドメインに対する K a b a t ナンバリングシステムは、K a b a t , e t . a l . " T a b u l a t i o n a n d A n a l y s i s o f A m i n o a c i d a n d n u c l e i c a c i d S e q u e n c e s o f P r e c u r s o r s , V - R e g i o n s , C - R e g i o n s , J - C h a i n , T - C e l l R e c e p t o r s f o r A n t i g e n , T - C e l l S u r f a c e A n t i g e n s , β - 2 M i c r o g l o b u l i n s , M a j o r H i s t o c o m p a t i b i l i t y A n t i g e n s , T h y - 1 , C o m p l e m e n t , C - R e a c t i v e P r o t e i n , T h y m o p o i e t i n , I n t e g r i n s , P o s t - g a m m a G l o b u l i n , α - 2 M a c r o g l o b u l i n s , a n d O t h e r R e l a t e d P r o t e i n s , " U . S . D e p t . o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s (1 9 9 1) に見出すことができる。I g M 定常領域は、連続的に (すなわち、アミノ酸番号 1 が、定常領域の第 1 のアミノ酸から開始する)、または K a b a t ナンバリングスキームを用いることによって付番され得る。ヒト I g M 定常領域の 2 つの対立遺伝子の連続的なナンバリング (本明細書で配列番号 1 (対立遺伝子 I G H M * 0 3) 及び配列番号 2 (対立遺伝子 I G H M * 0 4) として提示される) と、K a b a t システムによるナンバリングとの比較が下記に記載され

40

50

る。下線付きのアミノ酸残基は、K a b a tシステムにおいては考慮されない（下記の二重下線付きの「X」は、セリン（S）（配列番号1）またはグリシン（G）（配列番号2）であり得る）。

I g M重鎖についての連続的（配列番号1または配列番号2）／K A B A Tナンバリングキー

```
1/127 GSASAPTLFP LVSCENSESPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI
51/176 SSTRGFPSVL RGGKYAATSQ VLLPSKDVMQ GTDEHVVCKV QHPNGNKEKN
101/226 VPLPVIAELP PKVSVFVPPR DGFFGNPRKS KLICQATGFS PRQIQVSWLR
151/274 EGKQVGSGVT TDQVQAEAKE SGPTTYKVTS TLFIKESDWL XQSMFTCRVD
201/324 HRGLTFQONA SSMCVPDQDT AIRVFAIPPS FASIFLTGST KLTCLVTDLT
251/374 TYDSVTISWT RQNGEAVKTH TNISESHRNA TFSAVGEASI CEDDWNNGER
301/424 FTCTVTHIDL PSPLKQTISR PKGVALHRPD VYLLPPAREQ LNLRESATIT
351/474 CLVTGFSPAD VFVQWMQRGQ PLSPEKYVTS APMPEPQAPG RYFAHSILTV
401/524 SEEWNTGET YTCVVAHEAL PNRVTERTV D KSTGKPTLYN VSLVMSDTAG
451/574 TCY
```

10

20

【0081】

結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、または抗体由来分子、その抗原結合断片、バリエーション、または誘導体、及び／またはその多量体化断片としては、非限定的に、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、F a b、F a b'、及びF (a b')₂、F d、F v s、一本鎖F v (s c F v)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合F v (s d F v)、V LドメインまたはV Hドメインのいずれかを含む断片、F a b発現ライブラリーによって生成される断片が挙げられる。S c F v分子は当該技術分野で知られており、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。

30

【0082】

「特異的に結合する」とは、一般に、結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体が、その抗原結合ドメインを介しエピトープに結合し、その結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間に何らかの相補性を伴うことを意味する。この定義によれば、結合分子、例えば抗体、抗体様分子、または抗体由来分子は、その抗原結合ドメインを介して、ランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易にエピトープに結合する場合に、そのエピトープに対して「特異的に結合する」と言われる。「特異性」という用語は、本明細書では、特定の結合分子が特定のエピトープに結合する相対的親和性を限定するために使用される。例えば、結合分子「A」は、所与のエピトープに対して結合分子「B」よりも高い特異性を有するとみなすことができ、または結合分子「A」は、関連するエピトープ「D」に対するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言うことができる。

40

【0083】

結合分子、例えば、本明細書に開示される抗体またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体は、 5×10^{-2} 秒⁻¹、 10^{-2} 秒⁻¹、 5×10^{-3} 秒⁻¹、 10^{-3} 秒⁻¹、 5×10^{-4} 秒⁻¹、 10^{-4} 秒⁻¹、 5×10^{-5} 秒⁻¹、または 10^{-5} 秒⁻¹、 5×10^{-6} 秒⁻¹、 10^{-6} 秒⁻¹、 5×10^{-7} 秒⁻¹、または 10^{-7} 秒⁻¹以下のオフレート(k (o f f))で標的抗原に結合すると言することができる。

【0084】

結合分子、例えば、本明細書に開示される抗体またはその断片、バリエーション、もしくは

50

誘導体は、標的抗原に対し、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上のオンレート ($k(\text{on})$) で結合すると言することができる。

【0085】

結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体が、参照抗体または抗原結合断片の所与のエピトープとの結合をある程度遮断する範囲において、そのエピトープに優先的に結合する場合、参照抗体または抗原結合断片のそのエピトープとの結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害は、当該技術分野で既知の任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイによって決定され得る。結合分子は、所与のエピトープに対する参照抗体または抗原結合断片の結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言することができる。

10

【0086】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、個々のエピトープと、1つ以上の抗原結合ドメイン、例えば、免疫グロブリン分子の抗原結合ドメインとの結合の強さの尺度を指す。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988) の27~28頁を参照されたい。本明細書で使用される場合、「結合力」という用語は、抗原結合ドメインの集団と抗原との間における複合体の全体的安定性を指す。例えば、Harlowの29~34ページを参照されたい。結合力は、特定のエピトープを有する集団内の個々の抗原結合ドメインの親和性と、さらに免疫グロブリンと抗原との結合価との両方に関連する。例えば、2価のモノクローナル抗体と、高度に反復するエピトープ構造、例えば、ポリマーとの間の相互作用は、高い結合力の1つと考えられる。2価のモノクローナル抗体と、細胞表面に高密度で存在する受容体との間の相互作用も、高い結合力を有すると考えられる。

20

【0087】

本明細書で開示される結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体は、その交差反応性の観点からも説明または特定することができる。本明細書で使用される場合、「交差反応性」という用語は、ある抗原に特異的な結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体が第2の抗原と反応する能力を指し、2つの異なる抗原物質間の関連性の尺度である。したがって、結合分子は、その形成を誘導したエピトープ以外のエピトープに結合する場合、交差反応性である。交差反応性エピトープは、一般に、誘導性エピトープと同じ相補的構造特徴の多くを含み、場合によっては、実際には元のものよりも良好に適合することができる。

30

【0088】

結合分子、例えば、抗体またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体もまた、抗原へのそれらの結合親和性に関して記載または特定することができる。例えば、結合分子は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 10^{-2} M 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 10^{-3} M 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 10^{-4} M 、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 10^{-5} M 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 10^{-8} M 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、または 10^{-15} M 以下の解離定数すなわち K_D で抗原に結合することができる。

40

【0089】

一本鎖抗体または他の結合ドメインを含む「抗原結合性抗体断片」は、単独で、または以下の：ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、もしくはCH4ドメイン、J鎖、または分泌コンポーネント、のうちの1つ以上と組み合わせて存在する場合もある。また、可変領域（複数可）と、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、もしくはCH4ドメイン、J鎖、または分泌コンポーネントのうちの1つ以上との任意の組み合わせを含むことができ

50

る抗原結合断片も含まれる。結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、鳥類及び哺乳類を含めた任意の動物起源由来のものとすることができる。抗体は、例えば、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリの抗体であり得る。別の実施形態では、可変領域は、起源が軟骨魚類（*condri c t h o i d*）（例えば、サメ由来）であり得る。本明細書で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、また、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つ以上のヒト免疫グロブリンに対しトランスジェニックな動物から単離された抗体を含み、後述のように、及び例えば *K u c h e r l a p a t i e t a l .* による米国特許第5,939,598号に記載されているように、場合によっては内在的免疫グロブリンを発現することがあり、また発現しないこともある。本開示の実施形態によれば、本明細書に提供されるようなIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子は、IgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子が多量体、例えば、六量体または五量体を形成することを可能にするのに十分な抗体の抗原結合断片、例えばs c F v断片を含み得る。本明細書で使用される場合、そのような断片は「多量体化断片」を含む。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書で使用される場合、「重鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含み、結合分子、例えば、重鎖サブユニットを含む抗体、抗体様分子、または抗体由来分子は、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中部、及び／または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはそれらのバリエーションもしくは断片のうちの少なくとも1個を含むことができる。例えば、結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、抗体由来分子、またはその断片、例えば、多量体化断片、バリエーション、もしくは誘導体は、非限定的に、VHドメインに加えて、CH1ドメイン；CH1ドメイン、ヒンジ、及びCH2ドメイン；CH1ドメイン及びCH3ドメイン；CH1ドメイン、ヒンジ、及びCH3ドメイン；またはCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含むことができる。特定の実施形態では、結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、または抗原由来分子、またはその断片、例えば、多量体化断片、バリエーション、もしくは誘導体は、VHドメインに加えて、CH3ドメイン及びCH4ドメイン；またはCH3ドメイン、CH4ドメイン、及びJ鎖を含み得る。さらに、本開示で使用するための結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、または抗体由来分子は、特定の定常領域部分、例えば、CH2ドメインの全部または一部が欠如してもよい。当業者は、このようなドメイン（例えば、重鎖サブユニット）が、元の免疫グロブリン分子とはアミノ酸配列が異なるように改変されてもよいことを理解するであろう。本開示の実施形態によれば、本明細書に提供されるようなIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子は、IgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子が多量体、例えば、六量体または五量体を形成することを可能にするのに十分なIgM重鎖定常領域の部分を含む。本明細書で使用される場合、そのような断片は「多量体化断片」を含む。

【0091】

本明細書で使用される場合、「軽鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。軽鎖サブユニットは少なくともVLを含み、さらに、CL（例えば、CκまたはCλ）ドメインを含んでもよい。

【0092】

結合分子、例えば、抗体、抗体様分子、抗体由来分子、その抗原結合断片、バリエーション、もしくは誘導体、またはその多量体化断片は、結合分子が認識または特異的に結合する標的、例えば抗原のエピトープ（複数可）または一部（複数可）の観点から説明または特定することができる。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的抗原の一部は、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的抗原は、単一のエピトープまたは少なくとも2個のエピトープを含むことができ、抗原のサイズ、立体構造、及びタイプに応じて、任意の数のエピトープを含むことができる。

【0093】

本明細書で使用される場合、「ジスルフィド結合」という用語は、例えば、ポリペプチドのシステイン残基における、2個の硫黄原子の間に形成された共有結合を含む。アミノ酸システインは、第二のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成することができるチオール基を含む。ジスルフィド結合は、「鎖内」、すなわち、単一のポリペプチドまたはポリペプチドサブユニットにおいてシステイン残基に結合するものであり得るか、または「鎖間」、すなわち、2個の別々のポリペプチドサブユニット、例えば、抗体重鎖及び抗体軽鎖を、抗体重鎖、またはIgMもしくはIgA抗体重鎖定常領域及びJ鎖に連結するものであり得る。

【0094】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応領域または部位が第1の種から得られるかまたは誘導され、定常領域（無傷、部分的、または改変され得る）が第2の種から得られる抗体を指す。いくつかの実施形態では、標的結合領域または部位は、非ヒト起源（例えば、マウスまたは霊長類）であり、定常領域はヒトである。

【0095】

「多重特異性抗体」または「二重特異性抗体」という用語は、単一の抗体分子内の、2つ以上の異なるエピトープに対する抗原結合ドメインを有する抗体、抗体様分子、または抗体由来分子を指す。標準的な抗体構造に追加される他の結合分子は、2つの結合特異性を用いて構築され得る。二重特異性または多重特異性抗体によるエピトープ結合は、同時または連続的である可能性がある。トリオーマとハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌することのできる細胞株の2つの例である。二重特異的抗体は、組換え手段によって構築することもできる。（Strohlein and Heiss, Future Oncol. 6:1387-94 (2010); Mabry and Snavely, IDrugs. 13:543-9 (2010)）。二重特異的抗体はダイアボディであってもよい。

【0096】

本明細書で使用される場合、「操作された抗体」という用語は、可変ドメイン、定常領域、及び／またはJ鎖が、1つ以上のアミノ酸の少なくとも部分的な置換によって改変されている抗体を指す。特定の実施形態では、既知の特異性の抗体からのCDR全体を、異種抗体のフレームワーク領域に移植することができる。代替のCDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはサブクラスの抗体から誘導し得るが、CDRは、異なるクラスの抗体、例えば異なる種からの抗体からも誘導することができる。既知の特異性を有する非ヒト抗体からの1つ以上の「ドナー」CDRがヒト重鎖または軽鎖フレームワーク領域に移植される操作された抗体は、本明細書では「ヒト化抗体」と呼ばれる。特定の実施形態では、全てのCDRがドナー可変領域からの完全なCDRで置き換えられるわけではないが、それでもドナーの抗原結合能力をレシピエントの可変ドメインに移行させることができる。例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、及び同第6,180,370号に記載の説明を考慮すれば、これは十分に当業者の技能範囲内であり、日常的な実験を行うことにより、または試行錯誤試験により、機能的操作された抗体またはヒト化抗体が得られる。

【0097】

本明細書で使用される場合、「操作された」という用語は、合成手段による核酸またはポリペプチド分子の操作（例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、ペプチド、核酸、もしくはグリカンの酵素的もしくは化学的カップリング、またはこれらの技術のいくつかの組み合わせによる）を含む。

【0098】

本明細書で使用される場合、「連結されている」、「融合している」、もしくは「融合」という用語、または他の文法上の同義語は、互換的に使用することができる。これらの用語は、化学的コンジュゲーションまたは組換え手段を含むあらゆる手段による、2つ以上の要素、または構成要素と一緒に結合することを指す。「インフレーム融合」は、2つ

10

20

30

40

50

以上のポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（ORF）を、元のORFの翻訳的リーディングフレームを維持する方法で、結合して連続したより長いORFを形成することを指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされたポリペプチドに対応する2個以上のセグメントを含む単一のタンパク質である（これらのセグメントは、自然界では通常そのように連結されることはない）。リーディングフレームは、融合しているセグメント全体にわたってこのように連続的に作製されるものの、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列によって、物理的または空間的に分離され得る。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合することができるが、「融合」CDRが連続的なポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも1個の免疫グロブリンフレームワーク領域または追加のCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって分離することができる。

10

【0099】

ポリペプチドの文脈において、「直鎖配列」または「配列」とは、アミノ末端からカルボキシル末端へ方向におけるポリペプチド内のアミノ酸の順序であり、配列内で互いに隣り合ったアミノ酸は、ポリペプチドの一次構造内で連続している。ポリペプチドの別の部分に対し「アミノ末端側」または「N末端側」であるポリペプチドの部分は、連続したポリペプチド鎖において先に現れる部分である。同様に、ポリペプチドの別の部分に対し「カルボキシル末端側」または「C末端側」であるポリペプチドの部分は、連続したポリペプチド鎖において後に現れる部分である。例えば、典型的な抗体において、可変領域は、定常領域に対して「N末端」であり、定常領域は、可変領域に対して「C末端」である。

20

【0100】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、遺伝子が生化学物質、例えばポリペプチドを生成するプロセスを指す。このプロセスには、遺伝子ノックダウン、ならびに一過性発現と安定発現の両方を含むがこれらに限定されない、細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の発現が含まれる。これには、遺伝子のRNA、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）への転写、及びそのようなmRNAのポリペプチド（複数可）への翻訳が含まれるが、これらに限定されない。最終的な所望の生成物が生化学物質である場合、発現にはその生化学物質及び任意の前駆体の作成が含まれる。遺伝子の発現は「遺伝子産物」を生成する。本明細書で使用される場合、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNA、または転写産物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載の遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解切断などを有するポリペプチドをさらに含む。

30

【0101】

「N-結合型オリゴ糖」、「N-結合型糖」、「N-結合型グリカン」という用語または他の類似または文法的バリエーションは、アスパラギン残基を介してペプチド骨格に結合しているオリゴ糖鎖を意味する。全てのN-結合型オリゴ糖は、「単純なオリゴ糖」とも呼ばれる、Man₃GlcNAc₂の共通の五糖コアを有している。図1Aを参照されたい。N-結合型糖鎖は、一般に3つのタイプに分類できる。（1）マンノース残基のみがコアに結合しているオリゴマンノース（図1B）；（2）N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GlcNAcT）によって開始される「アンテナ」がコアに付着している複合体（図1C）；（3）マンノース残基のみがコアのMan α 1-6アームに結合し、1つまたは2つのアンテナがMan α 1-3アームにあるハイブリッド（図1D）。例えば、Varki, A., and Schauer, R., *Essentials of Glycobiology*, 3d Edition, Chapter 8, Consortium of Glycobiology (2009)を参照されたい。

40

【0102】

「グリコシルトランスフェラーゼ」という用語は、単糖部分をヌクレオチド糖からオリゴ糖などのアクセプター分子に転移することができる酵素を意味する。そのようなグリコ

50

シルトランスフェラーゼの例としては、グルコシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、及びシアリルトランスフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。これらの酵素は典型的には、細胞のゴルジ器官に存在するタイプII膜タンパク質であり、酵素の活性部分はゴルジ内腔に存在する。グリコシルトランスフェラーゼ触媒作用では、単糖基質単位であるグルコース (Glc)、ガラクトース (Gal)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、グルクロン酸 (GlcUA)、ガラクトン酸 (GalUA) 及びキシロースはウリジン二リン酸 (UDP) - α -D 誘導体として活性化され；アラビノースはUDP - β -L 誘導体として活性化され；マンノース (Man) とフコースはそれぞれGDP - α -D と GDP - β -L 誘導体として活性化され；シアル酸 (= β -D-Neu5Ac；= Neu5Ac；= SA；= NANA) は、シアル酸のCMP 誘導体として活性化される。例えば、米国特許出願公開番号US 2017/0298405を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0103】

「シアル酸」という用語は、9炭素のカルボキシル化糖のファミリーの任意のメンバーを意味する。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチルノイラミン酸 (2-ケト-5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノヌロピラノス-1-オン酸 (しばしばNeu5Ac、NeuAc、またはNANAと略される)) である。図2A、例えば、: Varki, A., and Schauer, R., *Essentials of Glycobiology*, 3d Edition, Chapter 14, Consortium of Glycobiology (2009) を参照されたい。

【0104】

シアリルトランスフェラーゼ (= 「ST」) は、ドナー基質から、例えば、糖タンパク質のN-結合型グリカンの末端単糖アクセプター基へのシアル酸残基の転移を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである。ヒトST種を含む哺乳動物のシアリルトランスフェラーゼは、シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸 (= CMP - β -D-Neu5Ac；= CMP - Neu5Ac；= CMP - NANA；= CMP - シアル酸；= CMP - SA、図2B) である一般的なドナー基質を使用する。「クリック」ケミストリーによるグリカン標識に使用されるアジド-CMP - シアル酸を含むがこれらに限定されない他の機能的同等物が知られている。例えば、Moh, et al., *Anal. Biochem.* 584:11385 (2019) を参照されたい。シアル酸残基 (またはその機能的同等物) の受容体部位への転移及び共有結合は、「シアリル化 (sialylation)」及び「シアリル化 (sialylation)」とも呼ばれる。

【0105】

末端シアル酸残基は、様々な結合、例えば、(i) ガラクトースに結合した $\alpha 2 \rightarrow 3$ ($\alpha 2, 3$) または (ii) ガラクトースに結合した $\alpha 2 \rightarrow 6$ ($\alpha 2, 6$) によってガラクトース残基に結合することができる。シアリルトランスフェラーゼ酵素は、一般に、そのそれぞれの単糖アクセプター基質に従って、及びそれが触媒するグリコシド結合の位置に従って、命名及び分類される。例示的な真核生物シアリルトランスフェラーゼとしては、(i) ST3Gal (例えば、CHO細胞に見られる)、及び(ii) ヒト細胞に見られるST6Galが挙げられる。「ST3」への略記は、特に $\alpha 2, 3$ シアリル化を触媒するシアリルトランスフェラーゼを包含する。「ST6」への略記は、特に $\alpha 2, 6$ シアリル化を触媒するシアリルトランスフェラーゼを包含する。

【0106】

二糖部分 β -D-ガラクトシル-1, 4-N-アセチル- β -D-グルコサミン (= Gal β 1, 4GlcNAc) は、糖タンパク質のN-結合型グリカンのアンテナの頻繁なシアル酸アクセプターである。さらに、末端Gal β 1, 4GlcNAc部分は、ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素活性、例えば、ヒト β -1, 4-ガラクトシルトランスフ

ェラーゼ 4 (=「h B 4 G A L T 4」) の結果として、特定の標的糖タンパク質で生成され得る。酵素 β -ガラクトシド- α 2, 6-シアリルトランスフェラーゼ (=「S T 6 G a l」) は、グリカンまたはグリカンの分岐、またはアンテナの末端 G a l β 1, 4 G l c N A c アクセプター部分の α 2, 6-シアリル化を触媒することができる。

【0107】

S T 6 G a l 酵素の活性は、N e u 5 A c 残基のグリカンまたはグリカンのアンテナの末端 G a l β 1, 4 G l c N A c の一部である遊離ガラクトシル残基の C 6 ヒドロキシル基への転移を触媒し、それによってグリカンに G a l β 1, 4 G l c N A c 部分のガラクトシル残基に α 2 $\rightarrow$ 6 結合している末端シアル酸残基を形成する。

【0108】

ヒト β -ガラクトシド- α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ I の野生型ポリペプチド (h S T 6 G a l -I、UniProtKB/Swiss-Prot: P15907.1) は、配列番号 3 として示されている。哺乳動物のシアリルトランスフェラーゼは、他の哺乳動物のゴルジ体に存在するグリコシルトランスフェラーゼと、細胞質の N 末端テール、膜貫通領域、可変長のステム領域、及びゴルジ器官の内腔の C 末端触媒ドメインを備えた II 型構造を共有している。h S T 6 G A L -1 の細胞質領域は配列番号 3 のアミノ酸 1~9 を含み、膜貫通領域は配列番号 3 のアミノ酸 10~26 を含み、内腔領域は配列番号 3 のアミノ酸 27~406 を含む。h S T 6 G a l -I の可溶性バリエーションは、少なくとも膜貫通領域を欠き、さらに酵素が触媒活性を保持していることを条件として N 末端細胞質領域及び管腔領域の一部を欠く可能性がある。特定の実施形態では、S T 6 G A L 1 の可溶性バリエーションは、配列番号 3 のアミノ酸 x から 406 を含み得、ここで、x は、27 から 120 までの整数である。例えば、S T 6 G A L 1 の可溶性バリエーションは、配列番号 3 のアミノ酸 120~406、115~406、110~406、109~406、105~406、100~406、95~406、90~406、89~406、88~406、87~406、86~406、85~406、84~406、83~406、82~406、81~406、80~406、75~406、70~406、65~406、60~406、55~406、50~406、45~406、40~406、35~406、30~406、または 27~406 を含み得る。米国特許出願第 2017/0298405 号は、配列番号 3 のアミノ酸 90~109 が、遊離 CMP の存在下で酵素に追加のシアリダーゼ活性を付与することを報告している

【0109】

ヒト β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ 4 の野生型ポリペプチド (h B 4 G A L T 4、UniProtKB/Swiss-Prot: O60513.1) は配列番号 4 として示されている。この酵素は同様に、細胞質の N 末端領域、膜貫通領域、可変長のステム領域、及びゴルジ器官の内腔の C 末端触媒領域を備えたタイプ II 構造を持っている。h B 4 G A L T 4 の細胞質領域は、配列番号 4 のアミノ酸 1~12 を含み、膜貫通領域は配列番号 4 のアミノ酸 13~38 を含み、内腔領域は、配列番号 4 のアミノ酸 39~344 を含む。h B 4 G A L T 4 の可溶性バリエーションは、少なくとも膜貫通領域を欠き、さらに酵素が触媒活性を保持しているという条件で、N 末端細胞質領域及び内腔領域の一部を欠いている可能性がある。特定の実施形態では、h B 4 G A L T 4 の可溶性バリエーションは、配列番号 4 のアミノ酸 x から 344 を含むことができ、ここで、x は、39 から 120 までの整数である。例えば、h B 4 G A L T 4 の可溶性バリエーションは、配列番号 4 のアミノ酸 120~344、115~344、110~344、105~344、100~344、95~344、90~344、85~344、80~344、75~344、70~344、65~344、60~344、55~344、50~344、45~344、40~344、または 39~344 を含み得る。

【0110】

「治療すること」または「治療」または「治療する」または「緩和すること」または「緩和する」などの用語は、存在している診断された病的状態または障害の症状を治癒、減速、軽減、及びまたはその進行を停止もしくは減速する治療手段を指す。「予防する」、

10

20

30

40

50

「予防」、「回避する」、「阻止」などの用語は、診断されていない標的とされる病的状態または障害の発症を予防する予防的または予防的な措置を指す。したがって、「治療を必要とするもの」には、障害を既に有するもの、及び／または障害を有する傾向にあるものが含まれる。

【0111】

本明細書で使用される場合、「血清半減期」または「血漿半減期」という用語は、投与後に、薬物、例えば、抗体、抗体様分子、または抗体由来の分子もしくは断片、例えば本明細書に記載の多量体化断片などの結合分子の血清中または血漿中の濃度が50%低下するのにかかる時間（例えば、分、時間、または日単位）を指す。下記の2つの半減期が記載され得る：中央コンパートメント、例えば、静脈内送達の場合は血液から末梢コンパートメント（例えば、組織または臓器）への薬物の再分布プロセスに起因する血漿中濃度の低下速度である、アルファ半減期、 α 半減期、または $t_{1/2\alpha}$ 、及び排泄または代謝プロセスに起因する低下速度である、ベータ半減期、 β 半減期、または $t_{1/2\beta}$ 。

10

【0112】

本明細書で使用される場合、「血漿中薬物濃度－時間曲線下面積」または「AUC」という用語は、ある用量の薬物を投与した後の薬物への実際の身体曝露を反映し、 $\text{mg} \cdot \text{h} / \text{L}$ 単位で表される。この曲線下面積は、例えば、0時間（ t_0 ）から無限大時間（ ∞ ）まで測定され、身体からの薬物の排出速度及び投与された用量に依存する。

【0113】

本明細書で使用される場合、「平均滞留時間」または「MRT」という用語は、薬物が体内に留まる平均的な時間の長さを指す。

20

【0114】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」とは、任意の対象を意味する。特定の実施形態では、対象は、診断、予後、または治療が望まれる哺乳動物対象である。哺乳動物対象は、ヒト、飼育動物、家畜、及び動物園、スポーツ、またはペットの動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ブタ、ウシ、クマなどを含む。

【0115】

本明細書で使用される場合、「治療法から利益を得る対象」という用語として、所与の治療薬、例えば1つ以上の抗原結合ドメインを含む抗体などの結合分子の投与から利益を得るであろう、全ての予期的対象の中からの対象のサブセットを指す。このような結合分子、例えば、抗体は、例えば、診断手順及び／または疾患の治療もしくは防止のために使用することができる。

30

【0116】

IgM抗体、IgM様抗体、及びIgM由来結合分子、ならびにそれらの分子の集団

IgMは、抗原による刺激に応答してB細胞によって生成される最初の免疫グロブリンである。天然に存在するIgMは、血清中におよそ $1.5 \text{ mg} / \text{mL}$ で自然に存在し、半減期は5日である。IgMは、五量体または六量体分子であり、したがって、5個または6個の結合ユニットが含まれる。IgM結合ユニットは典型的には、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含む。IgG重鎖定常領域には3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を含むが、IgMの重（ μ ）定常領域にはさらに、第4の定常ドメイン（CH4）を含み、C末端側の「テールピース」（tp）が含まれる。ヒトIgM定常領域は、典型的には、配列番号1（例えば、GenBankアクセッション番号pir||S37768、CAA47708.1、及びCAA47714.1、対立遺伝子IGHM*03と同一）、または配列番号2（例えば、GenBankアクセッション番号sp|P01871.4、対立遺伝子IGHM*04と同一）のアミノ酸配列を含む。ヒトC μ 1領域は、配列番号1または配列番号2のおよそアミノ酸5～およそアミノ酸102の範囲にあり、ヒトC μ 2領域は、配列番号1または配列番号2のおよそアミノ酸114～およそアミノ酸205の範囲にあり、ヒトC μ 3領域は、配列番号1または配列番号2のおよそアミノ酸224～およそアミノ酸319の範囲にあり、C μ 4領域は、配列番号1または配列

40

50

番号 2 のおよそアミノ酸 329～およそアミノ酸 430 の範囲にあり、テールピースは、配列番号 1 または配列番号 2 のおよそアミノ酸 431～およそアミノ酸 453 の範囲にある。

【0117】

わずかな配列バリエーションを有するヒト IgM 定常領域の他の形態及び対立遺伝子が存在し、これには、GenBank アクセッション番号 CAB37838.1 及び pir | MHHU が含まれるが、これらに限定されない。本開示の他の場所に記載され、特許請求される配列番号 1 または配列番号 2 に対応する位置におけるアミノ酸置換、挿入、及び／または欠失は、同様に、代替のヒト IgM 配列、及び他の種の IgM 定常領域アミノ酸配列に組み込むことができる。

10

【0118】

本明細書に提供されるようなヒト IgM 定常領域、及び同様に特定の非ヒト霊長類 IgM 定常領域は、典型的には、5 個の天然に存在するアスパラギン (N) - 結合型グリコシル化モチーフまたは部位を含む。図 3 A 及び 3 B を参照されたい。本明細書で使用される場合、「N-結合型グリコシル化モチーフ」は、アミノ酸配列 N-X₁-S/T を含むか、またはそれからなり、配列中、N はアスパラギンであり、X₁ は、プロリン (P) を除く任意のアミノ酸であり、S/T はセリン (S) またはトレオニン (T) である。グリカンは、アスパラギン残基の窒素原子に接着している。例えば、Drickamer K, Taylor ME (2006), Introduction to Glycobiology (2nd ed.) Oxford University Press, USA を参照されたい。N-結合型グリコシル化モチーフは、配列番号 1 または配列番号 2 のヒト IgM 重鎖定常領域において生じ、46 位 (「N1」)、209 位 (「N2」)、272 位 (「N3」)、279 位 (「N4」)、及び 440 位 (「N5」) で開始する。これらの 5 個のモチーフは、非ヒト霊長類 IgM 重鎖定常領域において保存されており、5 個のうちの 4 個は、マウス IgM 重鎖定常領域において保存されている。例えば、図 3 B を参照されたい。

20

【0119】

組換え及び血清由来のヒト IgM に関する研究では、ヒト IgM 重鎖の N1、N2、及び N3 モチーフが主に複合型 N-グリカンで装飾されているが、常にではなく、N4 及び N5 モチーフが主にオリゴマンノース型 N-グリカンで装飾されているが、常にではない。例えば、Moh, E. S. X., et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 27:1143-1155 (2016) and Hennicke, J., et al., Anal. Biochem. 539:162-166 (2017) を参照されたい。

30

【0120】

各 IgM 重鎖定常領域は、結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメイン、例えば、scFv または VHH、または抗原結合ドメインのサブユニット、例えば、VH 領域と結合 (associate) していてもよい。他の実施形態では、結合ドメインは、非抗体結合ドメイン、例えば、受容体エクソドメイン、そのリガンドまたは受容体結合断片、サイトカインまたはその受容体結合断片、増殖因子またはその受容体結合断片、神経伝達物質またはその受容体結合断片、ペプチドもしくはタンパク質ホルモンまたはその受容体結合断片、免疫チェックポイントモジュレーターリガンドまたはその受容体結合断片、あるいは細胞外マトリックスタンパク質の受容体結合断片であってよい。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT 出願公開番号 WO2020/086745 を参照されたい。

40

【0121】

5 個の IgM 結合ユニットは、追加の小さなポリペプチド鎖 (J 鎖)、またはその機能的断片、バリエーション、もしくは誘導体と複合体を形成して、五量体の IgM 抗体または IgM 様抗体を形成することができる。ヒト J 鎖の前駆体型は配列番号 5 として示される。シグナルペプチドは配列番号 5 のアミノ酸 1～およそアミノ酸 22 まで、成熟ヒト J 鎖は

50

配列番号 5 のおよそアミノ酸 23 ～およそアミノ酸 159 まで延びる。成熟ヒト J 鎖は配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。

【0122】

例示的なバリエーション及び改変 J 鎖は、本明細書の他の場所に提供されている。J 鎖がない場合、IgM 抗体または IgM 様抗体は、典型的には、最大 12 個の抗原結合ドメインを含む六量体に組み立てられる。J 鎖を有する場合、IgM 抗体または IgM 様抗体は、典型的には、最大 10 個の抗原結合ドメイン、または J 鎖が追加の抗原結合ドメイン（複数可）を含む 1 つ以上の異種ポリペプチドを含む改変された J 鎖である場合、それ以上を含む五量体に組み立てられる。五量体または六量体の IgM 抗体または IgM 様抗体への 5 個または 6 個の IgM 結合ユニットの組み立ては、C μ 4 とテールピースドメインを含むと考えられる。例えば、Braathen, R., et al., J. Biol. Chem. 277: 42755-42762 (2002) を参照されたい。したがって、本開示において提供される五量体または六量体の IgM 抗体は、典型的には、少なくとも C μ 4 及び／またはテールピースドメイン（本明細書ではまとめて C μ 4-tp と称される）を含む。したがって、IgM 重鎖定常領域の「多量体化断片」は、少なくとも C μ 4-tp ドメインを含む。IgM 重鎖定常領域は、C μ 3 ドメインもしくはその断片、C μ 2 ドメインもしくはその断片、C μ 1 ドメインもしくはその断片、及び／または他の IgM もしくは他の IgM 重鎖ドメインを追加的に含み得る。特定の実施形態では、本明細書で提供される IgM 由来結合分子、例えば、IgM 抗体、IgM 様抗体、または他の IgM 由来結合分子は、完全な IgM 重（ μ ）鎖定常ドメイン、例えば、配列番号 1 もしくは配列番号 2、またはそのバリエーション、誘導体、もしくは類似体、例えば本明細書に提供されるものを含み得る。

【0123】

特定の実施形態では、本開示は、多量体、例えば、五量体または六量体の結合分子のモノクローナル集団を提供し、各結合分子は、10 または 12 個の IgM 由来重鎖を含み、IgM 由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 IgM 重鎖定常領域を含む。これらの実施形態は、本開示の他の場所で詳細に説明されている。特定の実施形態では、本開示は、5 または 6 個の二価結合ユニットを含み、各結合ユニットは、抗原結合ドメインまたはそのサブユニットにそれぞれ結合している 2 個の IgM もしくは IgM 様の重鎖定常領域またはその量体化断片もしくはバリエーションを含む、IgM 抗体、IgM 様抗体、または他の IgM 由来結合分子のモノクローナル集団を提供する。特定の実施形態では、各結合ユニットに含まれる 2 つの IgM 重鎖定常領域は、ヒト重鎖定常領域である。

【0124】

本開示で提供される IgM 抗体、IgM 様抗体、他の IgM 由来結合分子、または多量体結合分子のモノクローナル集団が五量体である場合、IgM 抗体、IgM 様抗体、他の IgM 由来結合分子、または多量体結合分子のモノクローナル集団に含まれる分子は、典型的には、J 鎖、またはその機能的断片もしくはバリエーションをさらに含む。特定の実施形態では、J 鎖は、本明細書の他の場所に記載されているように、J 鎖に結合した 1 つ以上の異種部分をさらに含む改変された J 鎖またはそのバリエーションである。特定の実施形態では、J 鎖は、本明細書の他の場所で論じられるように、本明細書に提供される IgM 抗体、IgM 様抗体、他の IgM 由来結合分子、または多価結合分子のモノクローナル集団の血清半減期に影響を及ぼす、例えば、増強するように変異され得る。特定の実施形態では、J 鎖は、本開示の他の場所で論じられるように、グリコシル化に影響を及ぼすように変異させることができる。

【0125】

IgM 重鎖定常領域は、C μ 1 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、C μ 2 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、C μ 3 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、及び／または C μ 4 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーションのうちの 1 つ以上を含むことができるが、ただし、定常領域は、IgM、IgM 様抗体、または

他の I g M 由来結合分子において所望の機能を果たすことができ、例えば、第 2 の I g M 定常領域と会合して、1 つ、2 つ、またはそれ以上の抗原結合ドメイン（複数可）を有する結合ユニットを形成し、かつ／または他の結合ユニット（五量体の場合、J 鎖）と会合して、六量体または五量体を形成することができという条件である。特定の実施形態では、個々の結合ユニット内の 2 つの I g M 重鎖定常領域またはその断片もしくはバリエーションはそれぞれ、C μ 4 ドメインまたはその断片もしくはバリエーション、テールピース（t p）またはその断片もしくはバリエーション、あるいは C μ 4 ドメイン、T P、またはそれらの断片もしくはバリエーションの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態では、個々の結合ユニット内の 2 つの I g M 重鎖定常領域またはその断片もしくはバリエーションは、それぞれ、C μ 3 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、C μ 2 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、C μ 1 ドメインもしくはその断片もしくはバリエーション、またはこれらの任意の組み合わせをさらに含む。

10

【0126】

改変された J 鎖

特定の実施形態では、本明細書に提供される、五量体の I g M 由来結合分子、例えば I g M または I g M 様抗体は、I g M 抗体、I g M 様抗体、他の I g M 由来結合分子、または多量体結合分子のモノクローナル集団の結合標的（複数可）に結合する能力を妨げることなく、例えば、異種部分、または 2 つ以上の異種部分、例えば、ポリペプチドの導入によって改変され得る。例えば、米国特許第 9, 951, 134 号、同第 10, 400, 038 号、及び同第 10, 618, 978 号、ならびに米国特許出願公開番号 U S - 2019-0185570 を参照されたい。これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。したがって、本開示に提供される I g M 抗体、I g M 様抗体、または本明細書の他の場所に記載されるような多量体 I g M または I g M 様抗体を含む多量体結合分子のモノクローナル集団は、例えば、融合または化学的にコンジュゲートして、J 鎖またはその断片もしくはバリエーションに導入される、異種部分、例えば、異種ポリペプチドを含む、改変された J 鎖またはその機能的断片もしくはバリエーションを含むことができる。特定の実施形態では、異種部分は、J 鎖とインフレームで融合したか、または J 鎖またはその断片もしくはバリエーションと化学的にコンジュゲートしたペプチドまたはポリペプチド配列であり得る。特定の実施形態では、異種ポリペプチドは、リンカー、例えば、典型的には少なくとも 5 アミノ酸であるが、25 個以下のアミノ酸からなるペプチドリンカーを介して、J 鎖またはその機能的断片に融合している。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、G G G G S（配列番号 41）、G G G G S G G G G S（配列番号 42）、G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 43）、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 44）、または G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 45）からなる。特定の実施形態では、異種部分は、J 鎖にコンジュゲートした化学的部分であり得る。J 鎖に結合される異種部分は、結合部分、例えば、抗体またはその抗原結合断片、例えば、単鎖 F v（s c F v）分子、サイトカイン、例えば、I L - 2 または I L - 15（例えば、P C T 出願公開番号 W O 2020 / 086745 を参照されたい、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、I g M 抗体、I g M 様抗体、他の I g M 由来結合分子、または多量体結合分子のモノクローナル集団のヒトの半減期を増加させることができる安定化ペプチド、例えば、血清アルブミン（H S A）または H S A 結合分子、あるいはポリマーまたは細胞毒素などの異種化学部分を含むことができるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0127】

いくつかの実施形態では、改変された J 鎖は抗原結合ドメインを含むことができ、抗原結合ドメインとしては、非限定的に、標的抗原に対し特異的に結合することができるポリペプチドが挙げられる。特定の実施形態では、改変された J 鎖と結合している抗原結合ドメインは、本明細書の他の場所に記載される抗体またはその抗原結合断片であり得る。特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、例えば、ラクダ科抗体または軟骨魚類（c o n d r i c t h o i d）抗体由来の、s c F v 抗原結合ドメインまたは一本鎖結合ドメイン

50

であり得る。抗原結合ドメインは、J鎖の機能または結合しているIgMまたはIgA抗体の機能を妨害することなく、抗原結合ドメインのその結合標的への結合を可能にする任意の位置でJ鎖に導入することができる。挿入位置としては、非限定的に、C末端もしくはその付近、N末端もしくはその付近、またはJ鎖の三次元構造に基づいてアクセス可能な内部の位置が挙げられる。特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号6のシステイン残基92と101との間で配列番号6の成熟ヒトJ鎖に導入され得る。さらなる実施形態では、抗原結合ドメインは、グリコシル化部位またはその近くで配列番号6のヒトJ鎖に導入され得る。さらなる実施形態では、抗原結合ドメインは、C末端から約10アミノ酸残基以内、またはN末端から約10アミノ酸残基以内で配列番号15のヒトJ鎖に導入され得る。

10

【0128】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子のバリエーションJ鎖またはその機能的断片は、成熟した野生型ヒトJ鎖（配列番号6）のアミノ酸Y102に対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を含む。

「成熟した野生型ヒトJ鎖のアミノ酸Y102に対応するアミノ酸」とは、ヒトJ鎖におけるY102に相同である任意の種のJ鎖の配列におけるアミノ酸を意味する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開番号US 2020-0239572を参照されたい。配列番号6におけるY102に対応する位置は、少なくとも43の他の種のJ鎖アミノ酸配列において保存されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,951,134号の図4を参照されたい。配列番号6のY102に対応する位置における特定の変異は、特定の免疫グロブリン受容体、例えば、ヒトまたはマウスFcαμ受容体、マウスFcμ受容体、及び／またはヒトまたはマウス高分子Ig受容体（pIg受容体）の、変異型J鎖を含むIgM五量体への結合を阻害することができる。配列番号6のY102に対応するアミノ酸での変異を含むIgM抗体、IgM様抗体、他のIgM由来結合分子、または多重体化結合分子のモノクローナル集団は、動物に投与された場合、置換を除いて同一である、同じ方法で同じ種に投与される対応する抗体、抗体様分子、結合分子、または結合分子のモノクローナル集団よりもの血清半減期が改善されている。特定の実施形態では、配列番号6のY102に対応するアミノ酸は、任意のアミノ酸に置換され得る。特定の実施形態では、配列番号6のY102に対応するアミノ酸は、アラニン（A）、セリン（S）、またはアルギニン（R）に置換され得る。特定の実施形態では、配列番号6のY102に対応するアミノ酸は、アラニンに置換され得る。特定の実施形態では、J鎖またはその機能的断片もしくはバリエーションはバリエーションヒトJ鎖であり、本明細書で「J*」と称され、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0129】

IgM由来結合分子の高度にシアリル化された集団

本開示は、多量体結合分子のモノクローナル集団を提供し、各結合分子は、標的に結合する結合ドメインとそれぞれ結合しているグリコシル化IgM重鎖定常領域またはその多量体化断片を含む、10個または12個のIgM由来重鎖を含む。特定の実施形態では、各IgM重鎖定常領域は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアスパラギン（N）-結合型グリコシル化モチーフを含み、N-結合型グリコシル化モチーフは、アミノ酸配列N-X₁-S/Tを含み、配列中、Nはアスパラギンであり、X₁はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、S/Tはセリンまたはトレオニンである。特定の実施形態では、各IgM重鎖定常領域上のN-結合型グリコシル化モチーフの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つは、本明細書の他の場所で定義されるような複合型グリカンによって占められている。ヒトまたは非ヒト霊長類IgM重鎖定常領域は、典型的には、5つのN-結合型グリコシル化モチーフN1～N5を含むが、前述のように、N4及びN5は、典型的には、複合オリゴ糖ではなく、主にオリゴマンノース型オリゴ糖によって占められるが、常にではない。したがって、特定の実施形態では、各IgM重鎖定常領域上のN-結合グリコシル化モチーフのうちの少なくとも3つ（例えば、N1、N2、及びN

40

50

3) は、複合型グリカンによって占められている。

【0130】

特定の実施形態では、本開示によって提供される結合分子のモノクローナル集団は、通常の循環中のIgM抗体について観察または測定されるレベルよりも高いシアリル化のレベルを含み、すなわち、提供される結合分子のモノクローナル集団は、シアリル化の天然に存在しないレベルを含む。本発明者らによって測定されるとき（例えば、実施例4を参照されたい）、通常の循環から単離されたヒトIgM抗体のシアリル化の平均レベルは、IgM 1モルあたり約30～32モルのシアル酸である。したがって、本開示は、結合分子1モルあたり少なくとも33モル、少なくとも34モル、または少なくとも35モルのシアル酸を含む、上記のような多量体結合分子のモノクローナル集団を提供する。シアル酸残基は典型的には、複合型グリカンの末端単糖であり、単一のオリゴ糖グリカンには、オリゴ糖のアンテナの数に応じて、例えば1、2、3、または4つのシアル酸単糖を含めることができる。特定の実施形態では、提供される結合分子のモノクローナル集団は、より高いレベルのシアリル化を含むことができ、例えば、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも124、少なくとも130、少なくとも140、または146モルのシアル酸を含むことができる。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり33～146モルのシアル酸、例えば、結合分子1モルあたり33～130、33～120、33～110、33～100、33～90、33～80、33～70、33～60、33～50、35～130、35～120、35～110、35～100、35～90、35～80、35～70、35～60、35～50、45～130、45～120、45～110、45～100、45～90、45～80、45～70、45～60、45～50、50～130、50～120、50～110、50～100、50～90、50～80、50～70、または50～60モルのシアル酸を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり、約35～約40、約35～約45、約35～約50、約35～約55、約35～約60、約35～約65、約35～約70、約40～約45、約40～約50、約40～約55、約40～約60、約40～約65、約40～約70、約45～約50、約45～約55、約45～約60、約45～約65、約45～約70、約50～約55、約50～約60、約50～約65、約50～約70、約55～約60、約55～約65、約55～約70、約60～約65、約60～約70、または約65～約70モルのシアル酸を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクローナル集団は、結合分子1モルあたり約40～約55モルのシアル酸を含む。本明細書の実施例に示されるように、結合分子1モルあたり35モルのシアル酸を超えるシアル酸レベルを有する結合分子のモノクローナル集団は、より低いレベルのシアル酸を有する同じ結合分子と比較して、結合分子の薬物動態特性を改善した。特定の例では、結合分子のモノクローナル集団を作製して使用することが望ましい場合があり、シアル酸レベルは、結合分子1モルあたり約40から約55モルのシアル酸など、可能な最大レベルではない。そのような分子は、異なる溶解性、製造の容易さ、及び／または免疫原性などの他の望ましい特性を有し得る。

【0131】

本開示によって提供されるように、提供される結合分子の集団におけるそれぞれのIgM由来重鎖は、グリコシル化されたIgMまたはIgM由来重鎖定常領域またはその多量体化断片もしくは誘導体を含み、これは全長IgM重鎖定常領域、IgM重鎖定常領域の多量体化断片、あるいは目的の標的に特異的に結合する結合ドメイン（例えば、抗体抗原結合ドメイン）と結合している、多量体化に必要なIgM重鎖定常領域の少なくとも最小部分を含むハイブリッド定常領域であり得る。特定の実施形態では、IgM重鎖定常領域は、配列番号1（対立遺伝子IGHM*03）または配列番号2（対立遺伝子IGHM*04）のアミノ酸46（モチーフN1）、アミノ酸209（モチーフN2）、アミノ酸272（モチーフN3）、アミノ酸279（モチーフN4）、及びアミノ酸440（モチー

フ N 5) に対応するアミノ酸位置から開始する最大 5 つの N-結合型グリコシル化モチーフ N-X₁-S/T を含む、ヒト IgM 重鎖定常領域に由来する。標的に結合する結合ドメインは、例えば、抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインのサブユニット、例えば、抗体の重鎖可変領域 (VH) であり得る。本開示は、目的の任意の標的に結合する結合分子に関する。

【0132】

本開示によって提供される結合分子のモノクローナル集団は、結合分子の集団を発現する細胞株への改変を含むがこれらに限定されない、下流の処理中の結合分子のモノクローナル集団のインビトロ糖鎖工学により、またはこれらの任意の組み合わせ、または他の方法を含む、多くの異なる方法で生成され得る。

【0133】

特定の実施形態では、提供される多量体結合分子の高度にシアリル化されたモノクローナル集団は、細胞株改変を介して生成される。本開示によって提供されるような結合分子のモノクローナル集団のシアリル化を増加させるための細胞株改変には、結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株に、グリコシルトランスフェラーゼ、例えば、ガラクトシルトランスフェラーゼ (α -2, 6 及び/または α -2, 3 連結を介したシアル酸残基のためのアクセプター残基を提供するため、例えば、図 1C 及び 1D を参照されたい)、及び/またはさらなるシアリルトランスフェラーゼをコードする 1 つ以上の遺伝子をトランスフェクトし、これらの酵素を過剰発現する細胞株を生成 (グリコシルトランスフェラーゼ「ノックイン」) し、それによって、CMP-NANA 基質またはその誘導体から適合性のあるアクセプターオリゴ糖へのシアル酸単糖の転移を促進する細胞株の能力の能力を改善及び/または高めることが含まれるが、これに限定されない。他の細胞株の改変には、細胞株によって通常生成されるシアリダーゼ酵素の欠失または「ノックアウト」が含まれる。様々なグルコシルトランスフェラーゼを「ノックイン」するための方法が実施例に記載されており、そうでなければ当業者にはよく知られている。同様に、例えば、細胞株中のシアリダーゼをコードする遺伝子を「ノックアウト」するための方法は、当業者に容易に利用可能である。

【0134】

例示的なシアリルトランスフェラーゼは、ST6GAL1 ととも呼ばれるヒト β -ガラクトシド α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ 1 (配列番号 3) である。「ノックイン」できる他のシアリルトランスフェラーゼには、ヒト β -ガラクトシド α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ-II (ST6GALII)、及び 4 つの β -ガラクトシド α 2-3-シアリルトランスフェラーゼ (ST3GAL-III) のいずれかが含まれる。例示的なガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒト β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ 4 (B4GALT4) (配列番号 4) である。

【0135】

特定の実施形態では、提供される多量体結合分子の高度にシアリル化されたモノクローナル集団は、糖鎖工学を介して生成され、例えば、下流の処理中に結合分子のモノクローナル集団にシアル酸残基を付加することによって、例えば、糖鎖工学処理された IgM 抗体、IgM 様抗体、または IgM 由来結合分子 (GEM) のモノクローナル集団を生成する。特定の実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団を、可溶性シアリルトランスフェラーゼ (または固体支持体に付着した可溶性シアリルトランスフェラーゼ) 及びシアル酸基質 (例えば、シチジン-リン酸 (CMP)-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NANA)) を含む基質と、シアル酸が CMP-NANA から結合分子の集団上の複合型グリカン上のガラクトース残基に移動する条件下接触させることを含む。接触させることは、タンパク質精製の 1 つ以上のステップで発生する可能性があり、その後、可溶性シアリルトランスフェラーゼは、後続の精製ステップによって、または酵素が結合している固体支持体から結合分子の集団を分離することによって除去できる。

【0136】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、G E Mの生成に使用されるシアリルトランスフェラーゼバリエーションは、ヒトβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1 (S T 6 G A L 1) (配列番号3)の可溶性バリエーションであり得る。例えば、シアリルトランスフェラーゼは、配列番号3の膜貫通領域を除外する(例えば、配列番号3のアミノ酸10~26を除外する)、または配列番号3の細胞質領域と膜貫通領域の両方を除外する(例えば、配列番号3のアミノ酸1~9と配列番号3のアミノ酸10~26を除外する)が、タンパク質の触媒活性を維持する、S T 6 G A L 1のバリエーションであり得る。特定の実施形態では、S T 6 G A L 1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸xから406を含み、ここで、xが、27から120までの整数である。例えば、S T 6 G A L 1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸120~406、115~406、110~406、109~406、105~406、100~406、95~406、90~406、89~406、88~406、87~406、86~406、85~406、84~406、83~406、82~406、81~406、80~406、75~406、70~406、65~406、60~406、55~406、50~406、45~406、40~406、35~406、30~406、または27~406を含み得る。特定の実施形態ではシアル酸基質はシチジル-リン酸(C M P)-N-アセチルノイラミン酸(=C M P-β-D-Neu5Ac; =C M P-Neu5Ac; =C M P-NANA; =C M P-シアル酸; =C M P-SA、図2B)を含む。機能的誘導体には、「クリック」ケミストリーによるグリカン標識に使用されるアジド-C M P-シアル酸が挙げられるが、これに限定されない。

10

20

【0137】

本発明者らは、多数のグリカン(五量体の場合は51、六量体の場合は60)にもかかわらず、I g G抗体の糖鎖工学に必要とされるより高い量と比較して、低濃度のS T 6 G A L 1の可溶性バリエーションでI g M抗体の効率的かつ高レベルのシアリル化を実施できることを観察した。例えば、I g M抗体の効率的なシアリル化は、I g M抗体と可溶性シアリルトランスフェラーゼの約5000:1または2000:1の質量比で、及びI g M抗体とシアル酸基質と可溶性シアリルトランスフェラーゼの約5000:2500:1または2000:500:1の質量比で実施された(過剰量のシアル酸基質が提供される)。これは、I g M抗体と可溶性シアリルトランスフェラーゼの約200:1もしくは80:1のモル比、またはI g M抗体とシアル酸基質と可溶性シアリルトランスフェラーゼの約200:2500:1もしくは80:500:1のモル比と計算される。特定の実施形態では、I g M抗体とシアリルトランスフェラーゼのモル比は、少なくとも約50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1、105:1、110:1、115:1、120:1、125:1、130:1、135:1、140:1、145:1、150:1、175:1、または200:1である。いくつかの実施形態では、結合分子:シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80:1~約5000:1であり得る。いくつかの実施形態では、結合分子:シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80:1~約100:1、約80:1~約250:1、約80:1~約500:1、約80:1~約750:1、約80:1~約1000:1、約80:1~約1250:1、約80:1~約1500:1、約80:1~約1750:1、約80:1~約2000:1、約80:1~約2500:1、約80:1~約3000:1、約80:1~約3500:1、約80:1~約4000:1、約80:1~約4500:1、約250:1~約500:1、約250:1~約750:1、約250:1~約1000:1、約250:1~約1250:1、約250:1~約1500:1、約250:1~約1750:1、約250:1~約2000:1、約250:1~約2500:1、約250:1~約3000:1、約250:1~約3500:1、約250:1~約4000:1、約250:1~約4500:1、約250:1~約5000:1、約500:1~約750:1、約500:1~約1000:1、約500:1~約1250:1、約500:1~約1500:1、約500:1~約1750:1、約500:1~約2000:1、約500:1~約2500:1、約500:1~約3000

30

40

50

：1、約500：1～約3500：1、約500：1～約4000：1、約500：1～約4500：1、約500：1～約5000：1、約1000：1～約1250：1、約1000：1～約1500：1、約1000：1～約1750：1、約1000：1～約2000：1、約1000：1～約2500：1、約1000：1～約3000：1、約1000：1～約3500：1、約1000：1～約4000：1、約1000：1～約4500：1、約1000：1～約5000：1、約1500：1～約1750：1、約1500：1～約2000：1、約1500：1～約2500：1、約1500：1～約3000：1、約1500：1～約3500：1、約1500：1～約4000：1、約1500：1～約4500：1、約1500：1～約5000：1、約2000：1～約2500：1、約2000：1～約3000：1、約2000：1～約3500：1、約2000：1～約4000：1、約2000：1～約4500：1、約2000：1～約5000：1、約2500：1～約3000：1、約2500：1～約3500：1、約2500：1～約4000：1、約2500：1～約4500：1、約2500：1～約5000：1、約3000：1～約3500：1、約3000：1～約4000：1、約3000：1～約4500：1、約3000：1～約5000：1、約3500：1～約4000：1、約3500：1～約4500：1、約3500：1～約5000：1、約4000：1～約4500：1、または約4000：1～約5000：1であり得る。これは、IgG抗体のインビトロシアリル化に必要なはるかに大量の酵素とは対照的であり、3：1のIgG抗体とシアリルトランスフェラーゼのモル比が推奨されている。例えば、custombiotech.roche.comで入手可能なMalik, S., and Thomann, M., (2016) *In Vitro Glycoengineering – Suitability for BioPharma manufacturing*, Application Noteを参照されたい。

10

20

【0138】

本発明者らはまた、多数のグリカン（五量体の場合は51、六量体の場合は60）にもかかわらず、IgG抗体の糖鎖工学に必要とされるより高い量と比較して、低濃度のシアル酸基質でIgM抗体の効率的かつ高レベルのシアリル化を実施できることを観察した。いくつかの実施形態では、シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約1：4～約3000：1、例えば、約1：4～約1：1、約1：4～約5：1、約1：4～約50：1、約1：4～約100：1、約1：4～約500：1、約1：4～約1000：1、約1：4～約1500：1、約1：4～約2000：1、約1：4～約2500：1、約1：1～約5：1、約1：1～約10：1、約1：1～約50：1、約1：1～約100：1、約1：1～約500：1、約1：1～約1000：1、約1：1～約1500：1、約1：1～約2000：1、約1：1～約2500：1、約1：1～約3000：1、約2：1～約5：1、約2：1～約10：1、約2：1～約50：1、約2：1～約100：1、約2：1～約500：1、約2：1～約1000：1、約2：1～約1500：1、約2：1～約2000：1、約2：1～約2500：1、約2：1～約3000：1、約5：1～約10：1、約5：1～約50：1、約5：1～約100：1、約5：1～約500：1、約5：1～約1000：1、約5：1～約1500：1、約5：1～約2000：1、約5：1～約2500：1、約5：1～約3000：1、約10：1～約50：1、約10：1～約100：1、約10：1～約500：1、約10：1～約1000：1、約10：1～約1500：1、約10：1～約2000：1、約10：1～約2500：1、約10：1～約3000：1、約50：1～約100：1、約50：1～約500：1、約50：1～約1000：1、約50：1～約1500：1、約50：1～約2000：1、約50：1～約2500：1、約50：1～約3000：1、約100：1～約500：1、約100：1～約1000：1、約100：1～約1500：1、約100：1～約2000：1、約100：1～約2500：1、約100：1～約3000：1、約500：1～約1000：1、約500：1～約1500：1、約500：1～約2000：1、約500：1～約2500：1、約500：1～約3000：1、約1000：1～約1500：1、約1000：1～約2000：1、約1000

30

40

50

：１～約２５００：１、約１０００：１～約３０００：１、約１５００：１～約２０００：１、約１５００：１～約２５００：１、約１５００：１～約３０００：１、約２０００：１～約２５００：１、約２０００：１～約３０００：１、または約２５００：１～約３０００：１であり得る。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約８０：１、約１００：１、約２５０：１、約５００：１、約７５０：１、約１０００：１、約１２５０：１、約１５００：１、約１７５０：１、約２０００：１、約２５００：１、約３０００：１、約３５００：１、約４０００：１、約４５００：１、もしくは約５０００：１であり得；及び／またはシアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約５：１、約１０：１、約５０：１、約１００：１、約５００：１、約１０００：１、約１５００：１、約２０００：１、約２５００：１、もしくは約３０００：１であり得る。

10

【０１３９】

いくつかの実施形態では、抗体：シアル酸基質の質量比は、約１：１～約４０：１、例えば、約１：１～約２：１、約１：１～約４：１、約１：１～約６：１、約１：１～約８：１、約１：１～約１０：１、約１：１～約１５：１、約１：１～約２０：１、約２：１～約４：１、約２：１～約６：１、約２：１～約８：１、約２：１～約１０：１、約２：１～約１５：１、約２：１～約２０：１、約２：１～約４０：１、約４：１～約６：１、約４：１～約８：１、約４：１～約１０：１、約４：１～約１５：１、約４：１～約２０：１、約４：１～約４０：１、約６：１～約８：１、約６：１～約１０：１、約６：１～約１５：１、約６：１～約２０：１、約６：１～約４０：１、約８：１～約１０：１、約８：１～約１５：１、約８：１～約２０：１、約８：１～約４０：１、約１０：１～約１５：１、約１０：１～約２０：１、約１０：１～約４０：１、約１５：１～約２０：１、約１５：１～約４０：１、または約２０：１～約４０：１であり得る。

20

【０１４０】

本発明者らはさらに、IgM抗体の効率的かつ高レベルのシアリル化が、IgG抗体の糖鎖工学に使用されたものよりも広い範囲の温度及びより長い期間で実施できることを観察した。いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と、少なくとも３０分間、例えば、少なくとも４５分間、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも７時間、少なくとも１０時間、少なくとも１２時間、少なくとも１８時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、または少なくとも４８時間、接触させることを含む。いくつかの実施形態では、接触させることは、約３０分間～約４８時間、例えば約３０分間～約４時間、約３０分間～約５時間、約３０分間～約６時間、約３０分間～約７時間、約３０分間～約１０時間、約３０分間～約１２時間、約３０分間～約１８時間、約３０分間～約２４時間、約３０分間～約３６時間、約２時間～約４８時間、約３時間～約６時間、約３時間～約１０時間、約３時間～約１２時間、約３時間～約１８時間、約３時間～約２４時間、約３時間～約３６時間、約３時間～約４８時間、約４時間～約１０時間、約４時間～約１２時間、約４時間～約１８時間、約４時間～約２４時間、約４時間～約３６時間、約４時間～約４８時間、約５時間～約１０時間、約５時間～約１２時間、約５時間～約１８時間、約５時間～約２４時間、約５時間～約３６時間、約５時間～約４８時間、約７時間～約１０時間、約７時間～約１２時間、約７時間～約１８時間、約７時間～約２４時間、約７時間～約３６時間、約７時間～約４８時間、約１０時間～約１８時間、約１０時間～約２４時間、約１０時間～約３６時間、約１０時間～約４８時間、約１２～約１８時間、約１２時間～約２４時間、約１２時間～約３６時間、約１２時間～約４８時間、約１８時間～約２４時間、約１８時間～約３６時間、約１８時間～約４８時間、約２４時間～約３６時間、約２４時間～約４８時間、または約３６時間～約４８時間起こる。

30

40

【０１４１】

いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と、約２℃～約４０℃、例えば約２℃

50

～約 37℃、2℃～約 30℃、2℃～約 25℃、2℃～約 22℃、2℃～約 20℃、2℃～約 10℃、約 4℃～約 40℃、約 4℃～約 37℃、4℃～約 30℃、4℃～約 25℃、4℃～約 22℃、4℃～約 20℃、4℃～約 10℃、約 10℃～約 40℃、約 10℃～約 37℃、10℃～約 30℃、10℃～約 25℃、10℃～約 22℃、10℃～約 20℃、約 20℃～約 40℃、約 20℃～約 37℃、20℃～約 30℃、20℃～約 25℃、20℃～約 22℃、約 22℃～約 40℃、約 22℃～約 37℃、22℃～約 30℃、22℃～約 25℃、約 25℃～約 40℃、約 25℃～約 37℃、25℃～約 30℃、約 30℃～約 40℃、または約 30℃～約 37℃の温度で接触させることを含む。いくつかの実施形態では、インビトロ糖鎖工学は、約 15℃～約 25℃の温度で、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む。

10

【0142】

特定の実施形態では、インビトロシアリル化は、十分な数のガラクトースアクセプター残基が、IgM、IgM様、またはIgM由来の結合分子の提供されたモノクローナル集団の複合型グリカン上に存在することを確実にすることによって増強され得る。ST6GAL1は、シアル酸単糖をCMP-NANAから、 α -2, 6結合を介して分子のグリカン上のガラクトースアクセプター残基に転移する。結合分子のモノクローナル集団に存在するグリカン上の十分な数のアクセプターガラクトース残基を保証するために、GEMの生成は、シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質との接触の前または同時に、結合分子のモノクローナル集団をガラクトシルトランスフェラーゼ、例えば、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4 (B4GALT4) (配列番号4)の可溶性バリエーション及びガラクトース基質、例えば、ウリジン-ニリン酸- α -D-ガラクトース (UDP-Gal)と接触させることをさらに含むことができる。例えば、シアリルトランスフェラーゼは、配列番号4の膜貫通領域を除外する (例えば、配列番号4のアミノ酸13～38を除外する)、または、配列番号4の細胞質領域と膜貫通領域の両方を除外する (例えば、配列番号4のアミノ酸1～12と配列番号4のアミノ酸13～38を除外する) が、タンパク質の触媒活性を維持する、B4GALT4のバリエーションであり得る。特定の実施形態では、B4GALT4の可溶性バリエーションは、配列番号4のアミノ酸xから344を含み、ここで、xが、39から120までの整数である。例えば、B4GALT4の可溶性バリエーションは、配列番号4のアミノ酸120～344、115～344、110～344、105～344、100～344、95～344、90～344、85～344、80～344、75～344、70～344、65～344、60～344、55～344、50～344、45～344、40～344、または39～344を含む。特定の実施形態では、ガラクトース基質は、UDP-Galを含む。

20

30

【0143】

提供される結合分子のモノクローナル集団におけるIgM重鎖定常領域はそれぞれ、結合ドメインまたはそのサブユニット、例えば、抗体抗原結合ドメイン、例えば、scFv、VHH、または抗体抗原結合ドメインのVHサブユニットと結合しており、結合ドメインは目的の標的に特異的に結合する。特定の実施形態では、標的は、標的エピトープ、標的抗原、標的細胞、標的器官、または標的ウイルスである。標的としては、腫瘍抗原、他の腫瘍性標的、免疫チェックポイント阻害剤などの免疫腫瘍性標的、感染細胞の表面に発現するウイルス抗原などの感染性疾患標的、血液脳関門輸送に関与する標的抗原が、神経変性疾患及び神経炎症性疾患に関与する標的抗原、ならびにそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な標的及びそのような標的に結合する結合ドメインは、本明細書の他の場所で提供され、例えば、米国特許出願公開番号US2019-0330360、US2019-0338040、US2019-0338041、US2019-0330374、US2019-0185570、US2019-0338031、またはUS2020-0239572、PCT公開番号WO2018/017888、WO2018/017889、WO2018/017761、WO2018/017763、またはWO2018/187702、及びWO2019/165340、または米国特許第9,951,134号、第9,938,347号、第8,377,435

40

50

号、第9, 458, 241号、第9, 409, 976号、第10, 400, 038号、第10, 351, 631号、第10, 570, 191号、第10, 604, 559号、第10, 618, 978号、第10, 689, 449号、または第10, 787, 520号に見出すことができる。これらの出願及び特許のそれぞれは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0144】

特定の実施形態では、提供される多量体結合分子の集団は、多重特異性、例えば、二重特異性、三重特異性、または四特異性であり、各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している2つ以上の結合ドメインは、異なる標的に特異的に結合する。特定の実施形態では、多量体結合分子の提供された集団の結合ドメインは全て、同じ標的に特異的に結合する。特定の実施形態では、提供される多量体結合分子の集団の結合ドメインは同一である。そのような場合、例えば、異なる特異性を有する結合ドメインが本明細書の他の場所に記載されるように改変されたJ鎖の一部である場合、多量体結合分子の集団は依然として二重特異性であり得る。特定の実施形態では、結合ドメインは、抗体由来の抗原結合ドメイン、例えば、IgM重鎖定常領域に結合しているscFvまたはIgM重鎖定常領域に結合している抗体結合ドメインのVHサブユニットである。

【0145】

特定の実施形態では、各結合分子は、それぞれ5つまたは6つの二価IgM結合ユニットを含む五量体または六量体IgM抗体であり、各結合ユニットは、バリエーションIgM定常領域のアミノ末端側に位置するVHを各々含む2つのIgM重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する軽鎖可変ドメイン(VL)を各々含む2つの免疫グロブリン軽鎖とを含み、VHとVLが結合して標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを形成する。特定の実施形態では、各結合分子のそれぞれの抗原結合ドメインは、同じ標的に結合する。特定の実施形態では、各結合分子のそれぞれの抗原結合ドメインは同一である。

【0146】

特定の実施形態では、標的は、腫瘍特異的抗原、すなわち、腫瘍もしくはがん細胞上でのみ大部分発現されるか、または成人の正常な健康な細胞において検出不可能なレベルでのみ発現され得る標的抗原である。特定の実施形態では、標的は、腫瘍関連抗原、すなわち、健康な細胞とがん性細胞の両方に発現されるが、正常な健康な細胞よりもがん性細胞においてはるかに高密度で発現される標的抗原である。例示的な腫瘍特異的及び腫瘍関連抗原としては、非限定的に、B細胞成熟抗原(BCMA)、CD19、CD20、上皮増殖因子受容体(EGFR)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2、ErbB2とも呼ばれる)、HER3(ErbB3)、受容体チロシンキナーゼErbB4、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA4)、プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)、プログラム死リガンド1(PD-L1)、血管内皮増殖因子(VEGF)、VEGF受容体-1(VEGFR1)、VEGFR2、CD52、CD30、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、CD38、ガングリオシドGD2、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーメンバー7(SLAMF7)の自己リガンド受容体、血小板由来増殖因子受容体A(PDGFRα)、CD22、FLT3(CD135)、CD123、MUC-16、がん胎児性抗原関連細胞接着分子1(CEACAM-1)、メソテリン、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー2(Trop-2)、グリピカン-3(GPC-3)、ヒト血液型Hタイプ1三糖(Globo-H)、シアリルTn抗原(STn抗原)、及びCD33が挙げられる。当業者は、これらの標的抗原が多く異なる名称によって文献に現れるが、これらの周知の治療標的は、オンラインで入手可能なデータベース、例えば、EXPASy.orgを使用して容易に識別することができることを理解するであろう。

【0147】

他の腫瘍関連または腫瘍特異的抗原としては、非限定的に、DLL4、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、JAG1、JAG2、c-Met、IGF-1R、Patched、Hedgehogファミリーポリペプチド、WNTファミリー

ポリペプチド、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、LRP5、LRP6、IL-6、TNF α 、IL-23、IL-17、CD80、CD86、CD3、CEA、Muc16、PSCA、CD44、c-Kit、DDR1、DDR2、RSP01、RSP02、RSP03、RSP04、BMPファミリーポリペプチド、BMPRIa、BMPRIb、またはTNFスーパーファミリー受容体タンパク質、例えばTNFR1(DR1)、TNFR2、TNFR1/2、CD40(p50)、Fas(CD95、Apo1、DR2)、CD30、4-1BB(CD137、ILA)、TRAILR1(DR4、Apo2)、DR5(TRAILR2)、TRAILR3(DcR1)、TRAILR4(DcR2)、OPG(OCIF)、TWEAKR(FN14)、LIGHTR(HVEM)、DcR3、DR3、EDAR、及びXEDARが挙げられる。

10

【0148】

特定の実施形態では、多量体結合分子のモノクローナル集団は、それぞれ5つまたは6つの二価IgM結合ユニットをそれぞれ含む五量体または六量体のIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子の集団を含む。特定の実施形態によれば、各結合ユニットは、バリエーションIgM定常領域のアミノ末端側に位置するVHを各々有する本明細書に記載の2つのIgM重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域、例えばカッパまたはラムダ定常領域のアミノ末端側に位置する軽鎖可変ドメイン(VL)を各々有する2つの免疫グロブリン軽鎖とを含む。提供されたVHとVLは結合して、目的の標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを形成する。特定の実施形態では、5つまたは6つのIgM結合ユニットは同一である。

20

【0149】

多量体IgM抗体、IgM様抗体、またはIgM由来結合分子の集団が五量体であるこれらの実施形態では、それぞれの抗体または結合分子は、本明細書の他の場所に記載のJ鎖、またはその機能的断片、またはその機能的バリエーションをさらに含むことができる。例えば、J鎖は、配列番号6のアミノ酸配列を含む成熟したヒトJ鎖、またはその機能的断片、またはその機能的バリエーションであり得る。当業者であれば、この文脈での「機能的断片」または「機能的バリエーション」が、IgM結合単位、例えば、IgM重鎖定常領域と会合して、五量体IgM抗体、IgM様抗体、またはIgM由来結合分子を形成し得る、これらの断片及びバリエーションを含むことを認識するであろう。

30

【0150】

特定の実施形態では、五量体IgM由来結合分子、例えば、本明細書で提供されるIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子のJ鎖は、1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いてバリエーションJ鎖と同一である参照J鎖と比較して、1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む機能的バリエーションJ鎖である。例えば、特定のアミノ酸の置換、欠失、または挿入によって、対象動物に投与されると、バリエーションJ鎖における1つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いて同一であり、同じ動物種に対して同一の方法を使用して投与される参照IgM由来結合分子と比較して、血清半減期の増加を示すIgM由来結合分子をもたらすことができる。特定の実施形態では、バリエーションJ鎖は、参照J鎖と比較して、1つ、2つ、3つ、または4つの単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含むことができる。

40

【0151】

本明細書の他の場所で詳細に説明するように、特定の実施形態では、本明細書で提供される五量体IgM由来結合分子、例えば、IgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子のバリエーションJ鎖またはその機能的断片は、野生型成熟ヒトJ鎖(配列番号6)のアミノ酸Y102に対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を含む。Y102は、例えばアラニンなどの任意のアミノ酸で置換できる。特定の実施形態では、バリエーションヒトJ鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含むことができる。配列番号7のアミノ酸配列を有するJ鎖は、場合によっては、「J*」として言及される。

【0152】

50

バリエーションまたは野生型アミノ酸配列のいずれかを有する、五量体IgM由来結合分子例えば、本明細書で提供されるIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子のJ鎖または断片は、異種部分をさらに含む「改変されたJ鎖」であり得、異種部分は、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに融合またはコンジュゲートしている。例示的であるが非限定的な異種部分は、例えば、米国特許第9,951,134号及び同第10,618,978号、ならびに米国特許出願公開番号2019/0185570に提供されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、異種部分は、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに、またはその内部に融合しているポリペプチドである。異種ポリペプチドは、場合によっては、ペプチドリンカーを介して、J鎖またはその断片もしくはバリエーションに、またはその内部に融合することができる。任意の適切なリンカーを使用することができ、例えば、ペプチドリンカーは、少なくとも5アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、及び少なくとも20アミノ酸、少なくとも30アミノ酸以上などを含むことができる。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、25以下のアミノ酸を含む。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、5アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、または25アミノ酸からなり得る。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシン及びセリン、例えば、(GGGGS)_n (配列番号48)を含み、ここで、Nは、1、2、3、4、5、またはそれ以上であり得る。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、GGGGS (配列番号41)、GGGGSGGGGS (配列番号42)、GGGGSGGGGS (配列番号43)、GGGGSGGGGS (配列番号44)、またはGGGGSGGGGS (配列番号45)からなる。特定の実施形態では、異種ポリペプチドは、J鎖またはその断片もしくはバリエーションのN末端、J鎖またはその断片もしくはバリエーションのC末端、あるいはJ鎖またはその断片もしくはバリエーションのN末端とC末端の両方に融合し得る。特定の実施形態では、異種ポリペプチドは、J鎖内で内部的に融合し得る。特定の実施形態では、異種ポリペプチドは、結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインであり得る。例えば、異種ポリペプチドは、抗体、抗体のサブユニット、または抗体の抗原結合断片、例えば、scFv断片であり得る。特定の実施形態では、結合ドメイン、例えば、scFv断片は、エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞に結合することができる。特定の実施形態では、結合ドメイン、例えば、scFv断片は、細胞傷害性T細胞上のCD3、例えば、CD3εに特異的に結合することができる。特定の特別な実施形態では、本明細書で提供される五量体IgM由来結合分子の改変されたJ鎖は、配列番号36 (V15J) または配列番号37 (V15J*) のアミノ酸配列、あるいは、マウス抗体SP34 (VH=配列番号14 VL=配列番号18) の6つの相補性決定領域、それぞれ配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、及び配列番号21のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3のアミノ酸配列を含む抗CD3ε scFv抗原結合ドメインを含むJ鎖、例えば、配列番号39のアミノ酸配列を含む改変されたJ鎖SJ*を含む。他のヒト化SP35抗体としては、改変されたJ鎖A-55-J* (配列番号31)、A-56-J* (配列番号32)、及びA-57-J* (配列番号33) に組み込まれる、A-55 (WO2018208864のそれぞれ配列番号22、23、及び24)、A-56 (WO2018208864のそれぞれ配列番号25、26、及び27)、またはA-57 (WO2018208864のそれぞれ配列番号28、29、及び30) のVH及びVLまたはscFv配列が含まれる。特定の実施形態では、本明細書で提供される改変されたJ鎖は、例えば、抗CD3ε scFv結合ドメイン由来のJ鎖の反対側の末端に接着した追加の異種部分をさらに含むことができる。例えば、改変されたJ鎖は、ヒト血清アルブミンタンパク質をさらに含むことができる。例としては、VJH (配列番号34) 及びVJ*H (配列番号35) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0153】

血清半減期が延長されたIgM由来結合分子

本明細書で提供される高度にシアリル化されたIgM抗体、IgM様抗体、またはIg

M由来の結合分子のモノクローナル集団は、血清半減期を増強するようにさらに操作することができる。IgM由来結合分子の血清半減期を延長し得る例示的なIgM重鎖定常領域変異は、米国特許出願公開番号2020-0239572に開示され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、明細書に提供されるような高度にシアリル化されたIgM抗体、IgM様抗体、IgM由来結合分子のバリエーションIgM重鎖定常領域は、野生型ヒトIgM定常領域（例えば、配列番号1または配列番号2）のアミノ酸S401、E402、E403、R344、及び／またはE345に対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸置換を含み得る。「野生型ヒトIgM定常領域のアミノ酸S401、E402、E403、R344、及び／またはE345に対応するアミノ酸」とは、ヒトIgM定常領域におけるS401、E402、E403、R344、及び／またはE345に相同である、任意の種のIgM定常領域の配列におけるアミノ酸を意味する。特定の実施形態では、配列番号1または配列番号2のS401、E402、E403、R344、及び／またはE345に対応するアミノ酸は、任意のアミノ酸、例えば、アラニンに置換され得る。

10

【0154】

野生型J鎖は、典型的には、1つのN-結合グリコシル化部位を含む。特定の実施形態では、本明細書で提供される五量体IgM由来結合分子のバリエーションJ鎖またはその機能的断片は、例えば、成熟ヒトJ鎖（配列番号42）またはJ*（配列番号43）のアミノ酸49（モチーフN6）に対応するアミノ酸位置から開始する、アスパラギン（N）結合グリコシル化モチーフN-X₁-S/Tに変異を含み、式中、Nはアスパラギンであり、X₁は、プロリンを除く任意のアミノ酸であり、S/Tはセリンまたはトレオニンであり、この変異は、そのモチーフにおけるグリコシル化を防止する。米国特許出願公開番号2020-0239572で実証されるように、この部位でのグリコシル化を防止する変異は、対象動物へ投与されると、バリエーションJ鎖におけるグリコシル化を防止する変異または変異を除いて同一であり、同じ動物種に対して同一の方法を使用して投与される参照IgM由来結合分子と比較して、血清半減期の増加を示す、本明細書で提供されるIgM由来結合分子、例えばIgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子の集団をもたらすことができる。

20

【0155】

例えば、特定の実施形態では、本明細書に提供されるJ鎖を含む結合分子のバリエーションJ鎖またはその機能的断片は、配列番号6または配列番号7のアミノ酸N49またはS51の対応するアミノ酸位置においてアミノ酸置換を含み得るが、S51に対応するアミノ酸がトレオニン（T）に置換されていないという条件であるか、あるいは、バリエーションJ鎖は、配列番号6または配列番号7のアミノ酸N49とS51の両方の対応するアミノ酸位置においてアミノ酸置換を含む。特定の実施形態では、配列番号6または配列番号7のアミノ酸N49の対応する位置は、任意のアミノ酸、例えば、アラニン（A）、グリシン（G）、トレオニン（T）、セリン（S）、またはアスパラギン酸（D）に置換されている。特定の実施形態では、配列番号6または配列番号7のN49に対応する位置は、アラニン（A）に置換され得る。特定の実施形態では、配列番号6または配列番号7のN49に対応する位置は、アスパラギン酸（D）に置換され得る。

30

40

【0156】

CDC活性が低下したバリエーションヒトIgM定常領域

本明細書で提供されるIgM由来結合分子、例えば、IgM抗体、IgM様抗体、または他のIgM由来結合分子のモノクローナル集団は、補体依存性細胞傷害性（CDC）活性の低減を付与する変異を除いて、対応する参照ヒトIgM定常領域と同一である、IgM抗体またはIgM様抗体の参照集団と比較して、補体の存在下での細胞に対するCDC活性の低下を示すように操作することができる。これらのCDC変異は、本明細書に提供されるように、血清半減期の増加を付与するために、任意の変異と組み合わせることができる。「対応する参照ヒトIgM定常領域」とは、CDC活性に影響を及ぼす定常領域における改変または複数の改変を除いて、バリエーションIgM定常領域と同一であるヒトIg

50

M定常領域またはその一部、例えばC μ 3ドメインを意味する。特定の実施形態では、バリエーションヒトIgM定常領域は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT公開番号WO/2018/187702に記載されるように、野生型ヒトIgM定常領域と比較して、例えばC μ 3ドメインにおいて、1つ以上のアミノ酸置換を含む。CDCを測定するためのアッセイが当業者に周知されており、例示的なアッセイが、例えば、PCT公開番号WO/2018/187702に記載されている。

【0157】

特定の実施形態では、減少したCDC活性を付与するバリエーションヒトIgM定常領域は、配列番号1または配列番号2の位置P311での野生型ヒトIgM定常領域に対応するアミノ酸置換を含む。他の実施形態では、本明細書で提供されるバリエーションIgM定常領域は、配列番号1または配列番号2の位置P313での野生型ヒトIgM定常領域に対応するアミノ酸置換を含む。他の実施形態では、本明細書で提供されるバリエーションIgM定常領域は、配列番号1または配列番号2の位置P311及び配列番号1または配列番号2のP313での野生型ヒトIgM定常領域に対応する置換の組み合わせを含む。これらのプロリン残基は、任意のアミノ酸、例えば、アラニン、セリン、またはグリシンで独立して置換することができる。特定の実施形態では、CDC活性の低下を付与するバリエーションヒトIgM定常領域は、配列番号22または配列番号23の位置K315での野生型ヒトIgM定常領域に対応するアミノ酸置換を含む。リジン残基は、任意のアミノ酸、例えば、アラニン、セリン、グリシン、またはアスパラギン酸で独立して置換され得る。特定の実施形態では、CDC活性の低下を付与するバリエーションヒトIgM定常領域は、配列番号22または配列番号23の位置K315での野生型ヒトIgM定常領域に対応するアスパラギン酸によるアミノ酸置換を含む。

【0158】

宿主細胞

特定の実施形態では、本開示は、本明細書で提供されるような結合分子の高度にシアリル化されたモノクローナル集団を生成することができる宿主細胞を提供する。特定の態様において、そのような宿主細胞はST6GAL1及び／またはB4GALT4を過剰発現する。本開示はまた、本明細書で提供されるような結合分子のモノクローナル集団を生成する方法を提供し、この方法は、提供される宿主細胞を培養することと、結合分子の集団を回収することとを含む。

【0159】

IgM抗体、IgM様抗体、またはIgM由来結合分子の高度にシアリル化された集団を生成するための方法

本開示はさらに、本開示に詳細に記載されるような高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成するための方法を提供し、この方法は、結合分子のモノクローナル集団を発現する細胞株を提供することと、細胞株を培養することと、結合分子のモノクローナル集団を回収することとを含む。特定の実施形態では、各結合分子は、10個または12個のIgM由来重鎖を含み、IgM由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化IgM重鎖定常領域またはその多量体化断片を含み、各IgM重鎖定常領域は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアスパラギン(N)-結合型グリコシル化モチーフを含み、N-結合型グリコシル化モチーフはアミノ酸配列N-X₁-S/Tを含み、配列中、Nはアスパラギンであり、X₁はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、S/Tはセリンまたはトレオニンである。本明細書で提供されるように、集団中の各IgM重鎖定常領域上のN-結合型グリコシル化モチーフのうちの平均で少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つが複合型グリカンで占められ、細胞株、培養条件、回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、グリカン1つあたり少なくとも1つ、2つ、少なくとも3つ、または4つのシアル酸末端単糖を含む複合型グリカンを濃縮するように最適化されている。

【0160】

特定の実施形態では、細胞株、培養条件、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、結合分子1モルあたり少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも124、少なくとも130、少なくとも140、または少なくとも146モルのシアル酸を含む結合分子のモノクロール集団をもたらすように提供される方法に従って最適化することができる。特定の実施形態では、細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせは、結合分子1モルあたり少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、または少なくとも60モルのシアル酸を含む結合分子のモノクロール集団をもたらすように提供される方法に従って最適化される。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクロール集団は、結合分子1モルあたり、約35～約40、約35～約45、約35～約50、約35～約55、約35～約60、約35～約65、約35～約70、約40～約45、約40～約50、約40～約55、約40～約60、約40～約65、約40～約70、約45～約50、約45～約55、約45～約60、約45～約65、約45～約70、約50～約55、約50～約60、約50～約65、約50～約70、約55～約60、約55～約65、約55～約70、約60～約65、約60～約70、または約65～約70モルのシアル酸を含む。いくつかの実施形態では、結合分子のモノクロール集団は、結合分子1モルあたり約40～約55モルのシアル酸を含む。提供される方法によれば、IgM重鎖定常領域は、配列番号1（対立遺伝子IGHM*03）または配列番号2（対立遺伝子IGHM*04）のアミノ酸46（モチーフN1）、アミノ酸209（モチーフN2）、アミノ酸272（モチーフN3）、アミノ酸279（モチーフN4）、及びアミノ酸440（モチーフN5）に対応するアミノ酸位置から開始する5つのN-結合型グリコシル化モチーフN-X₁-S/Tを含む、ヒトIgM重鎖定常領域に由来し得る。特定の実施形態では、結合分子の集団中のモチーフN1、N2、及びN3のうちの、平均で1つ、2つ、または3つ全てが、提供される方法によってシアリル化することができる複合型グリカンによって占められている。

10

20

30

40

50

【0161】

特定の実施形態では、提供される方法に従って培養された細胞株は、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現するように改変されている。特定の実施形態では、過剰発現されたシアリルトランスフェラーゼは、2, 6-シアリルトランスフェラーゼである。特定の実施形態では、過剰発現されたシアリルトランスフェラーゼは、ヒトβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）である。特定の実施形態では、過剰発現されたシアリルトランスフェラーゼは、2, 3-シアリルトランスフェラーゼである。提供された方法に従って培養された細胞株はまた、ガラクトシルトランスフェラーゼを過剰発現するように改変され得る。特定の実施形態では、過剰発現されたガラクトシルトランスフェラーゼは、ヒトβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4（B4GALT4）である。提供された方法に従って培養された細胞株はまた、UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ/MannNAcキナーゼ酵素（GNE）、例えば、Q、W、またはL変異などのR263またはR266変異を含むGNE；α-マンノシダーゼII；N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-I（GNT-I）；N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-IV（GNT-IV）；N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V（GNT-V）；CMP-シアル酸シンターゼ（CMP-SAS）、CMP-シアル酸トランスポーター（CMP-SAT）、またはそれらの任意の組み合わせを過剰発現するように改変することができる。特定の実施形態では、提供される方法に従って培養された細胞株はまた、特定のシアリダーゼの発現を遮断するように改変され得る。特定の実施形態では、提供された方法に従って培養された細胞株はまた、ノイラミニダーゼの発現を遮断するように改変され得る。

【0162】

提供される方法の特定の実施形態では、回収プロセスは、多量体結合分子のモノクロール

ナル集団を下流処理中に糖鎖工学に供して、例えば、糖鎖工学処理されたIgM抗体、IgM様抗体、またはIgM由来結合分子、すなわち「GEM」のモノクローナル集団を生成することを含む。特定の実施形態では、GEMは、高度にシアリル化されており、例えば、結合分子1モルあたり少なくとも35モルのシアリ酸を保有している。GEMの生成は、本明細書の他の場所で詳細に説明されており、GEMの生成のありとあらゆる態様は、提供される方法に含めることができる。特定の実施形態では、GEMの生成は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアリ酸基質と接触させることを含む。特定の実施形態では、シアリルトランスフェラーゼは、ヒトβ-ガラクトシドα-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1 (ST6GAL1) (配列番号3) の可溶性バリエーションを含み得る。特定の実施形態では、ST6GAL1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸xから406を含み、ここで、xが、27から120までの整数である。例えば、ST6GAL1の可溶性バリエーションは、配列番号3のアミノ酸120～406、115～406、110～406、109～406、105～406、100～406、95～406、90～406、89～406、88～406、87～406、86～406、85～406、84～406、83～406、82～406、81～406、80～406、75～406、70～406、65～406、60～406、55～406、50～406、45～406、40～406、35～406、30～406、または27～406を含み得る。特定の実施形態では、シアリ酸基質は、シチジナーリン酸-N-アセチル-ノイラミン酸 (CMP-NANA)、またはその誘導体を含み得る。

10

20

【0163】

本明細書の他の場所に記載されるように、本発明者らは、高度にシアリル化されたIgM抗体、IgM様抗体、またはIgM由来の結合分子の生成は、IgGをシアリル化するための同等の方法よりもはるかに少ない酵素を必要とすることを発見した。例えば、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80：1～約5000：1であり得る。いくつかの実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約80：1～約100：1、約80：1～約250：1、約80：1～約500：1、約80：1～約750：1、約80：1～約1000：1、約80：1～約1250：1、約80：1～約1500：1、約80：1～約1750：1、約80：1～約2000：1、約80：1～約2500：1、約80：1～約3000：1、約80：1～約3500：1、約80：1～約4000：1、約80：1～約4500：1、約80：1～約5000：1、約250：1～約500：1、約250：1～約750：1、約250：1～約1000：1、約250：1～約1250：1、約250：1～約1500：1、約250：1～約1750：1、約250：1～約2000：1、約250：1～約2500：1、約250：1～約3000：1、約250：1～約3500：1、約250：1～約4000：1、約250：1～約4500：1、約250：1～約5000：1、約500：1～約1000：1、約500：1～約1250：1、約500：1～約1500：1、約500：1～約1750：1、約500：1～約2000：1、約500：1～約2500：1、約500：1～約3000：1、約500：1～約3500：1、約500：1～約4000：1、約500：1～約4500：1、約500：1～約5000：1、約1000：1～約1250：1、約1000：1～約1500：1、約1000：1～約1750：1、約1000：1～約2000：1、約1000：1～約2500：1、約1000：1～約3000：1、約1000：1～約3500：1、約1000：1～約4000：1、約1000：1～約4500：1、約1000：1～約5000：1、約1500：1～約1750：1、約1500：1～約2000：1、約1500：1～約2500：1、約1500：1～約3000：1、約1500：1～約3500：1、約1500：1～約4000：1、約1500：1～約4500：1、約1500：1～約5000：1、約2000：1～約2500：1、約2000：1～約3000：1、約2000：1～約3500：1、約2000：1～約4000：1、約2000：1～約4500：1、約2000：1～約5000：1、約2500：1～約3000：1、約2500：1～約3500：1、約2500：1～約

30

40

50

4000:1、約2500:1～約4500:1、約2500:1～約5000:1、約3000:1～約3500:1、約3000:1～約4000:1、約3000:1～約4500:1、約3000:1～約5000:1、約3500:1～約4000:1、約3500:1～約4500:1、約3500:1～約5000:1、約4000:1～約4500:1、または約4000:1～約5000:1であり得る。特定の実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比は、約200:1、175:1、150:1、155:1、140:1、135:1、130:1、125:1、120:1、115:1、110:1、105:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、または50:1であり得る。例えば、結合分子：シアリル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約2000:500:1であり得る。特定の実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比は、約200:1、175:1、150:1、155:1、140:1、135:1、130:1、125:1、120:1、115:1、110:1、105:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、または50:1であり得る。特定の実施形態では、結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比は、約80:1であり得る。本明細書の他の場所に述べられるように、GEMの生成は、結合分子のモノクロナル集団を、ガラクトシルトランスフェラーゼ、例えば、ヒトβ-1, 4ガラクトシルトランスフェラーゼ4 (B4GALT4) (配列番号4) の可溶性バリエーション及びガラクトース基質、例えばウリジン二リン酸-α-D-ガラクトース (UDP-Gal) と接触させることをさらに含み得る。ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることは、可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアリル酸基質と接触させることの前にまたは同時に起こり得る。

10

20

【0164】

いくつかの実施形態では、シアリル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比は、約5:1～約3000:1、例えば、約5:1～約10:1、約5:1～約50:1、約5:1～約100:1、約5:1～約500:1、約5:1～約1000:1、約5:1～約1500:1、約5:1～約2000:1、約5:1～約2500:1、約10:1～約50:1、約10:1～約100:1、約10:1～約500:1、約10:1～約1000:1、約10:1～約1500:1、約10:1～約2000:1、約10:1～約2500:1、約10:1～約3000:1、約50:1～約100:1、約50:1～約500:1、約50:1～約1000:1、約50:1～約1500:1、約50:1～約2000:1、約50:1～約2500:1、約50:1～約3000:1、約100:1～約500:1、約100:1～約1000:1、約100:1～約1500:1、約100:1～約2000:1、約100:1～約2500:1、約100:1～約3000:1、約500:1～約1000:1、約500:1～約1500:1、約500:1～約2000:1、約500:1～約2500:1、約500:1～約3000:1、約1000:1～約1500:1、約1000:1～約2000:1、約1000:1～約2500:1、約1000:1～約3000:1、約1500:1～約2000:1、約1500:1～約2500:1、約1500:1～約3000:1、約2000:1～約2500:1、約2000:1～約3000:1、または約2500:1～約3000:1であり得る。

30

40

【0165】

いくつかの実施形態では、抗体：シアリル酸基質の質量比は、約1:1～約40:1、例えば、約1:1～約2:1、約1:1～約4:1、約1:1～約6:1、約1:1～約8:1、約1:1～約10:1、約1:1～約15:1、約1:1～約20:1、約2:1～約4:1、約2:1～約6:1、約2:1～約8:1、約2:1～約10:1、約2:1～約15:1、約2:1～約20:1、約2:1～約40:1、約4:1～約6:1、約4:1～約8:1、約4:1～約10:1、約4:1～約15:1、約4:1～約20:1、約4:1～約40:1、約6:1～約8:1、約6:1～約10:1、約6:1～

50

約 15 : 1、約 6 : 1 ~ 約 20 : 1、約 6 : 1 ~ 約 40 : 1、約 8 : 1 ~ 約 10 : 1、約 8 : 1 ~ 約 15 : 1、約 8 : 1 ~ 約 20 : 1、約 8 : 1 ~ 約 40 : 1、約 10 : 1 ~ 約 15 : 1、約 10 : 1 ~ 約 20 : 1、約 10 : 1 ~ 約 40 : 1、約 15 : 1 ~ 約 20 : 1、約 15 : 1 ~ 約 40 : 1、または約 20 : 1 ~ 約 40 : 1 であり得る。

【0166】

いくつかの実施形態では、方法は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と、少なくとも 30 分間、例えば、少なくとも 45 分間、少なくとも 1 時間、少なくとも 2 時間、少なくとも 3 時間、少なくとも 4 時間、少なくとも 5 時間、少なくとも 6 時間、少なくとも 7 時間、少なくとも 10 時間、少なくとも 12 時間、少なくとも 18 時間、少なくとも 24 時間、少なくとも 36 時間、または少なくとも 48 時間、接触させることを含む。いくつかの実施形態では、接触させることは、約 30 分間 ~ 約 48 時間、例えば約 30 分間 ~ 約 4 時間、約 30 分間 ~ 約 5 時間、約 30 分間 ~ 約 6 時間、約 30 分間 ~ 約 7 時間、約 30 分間 ~ 約 10 時間、約 30 分間 ~ 約 12 時間、約 30 分間 ~ 約 18 時間、約 30 分間 ~ 約 24 時間、約 30 分間 ~ 約 36 時間、約 2 時間 ~ 約 48 時間、約 3 時間 ~ 約 6 時間、約 3 時間 ~ 約 10 時間、約 3 時間 ~ 約 12 時間、約 3 時間 ~ 約 18 時間、約 3 時間 ~ 約 24 時間、約 3 時間 ~ 約 36 時間、約 3 時間 ~ 約 48 時間、約 4 時間 ~ 約 10 時間、約 4 時間 ~ 約 12 時間、約 4 時間 ~ 約 18 時間、約 4 時間 ~ 約 24 時間、約 4 時間 ~ 約 36 時間、約 4 時間 ~ 約 48 時間、約 5 時間 ~ 約 10 時間、約 5 時間 ~ 約 12 時間、約 5 時間 ~ 約 18 時間、約 5 時間 ~ 約 24 時間、約 5 時間 ~ 約 36 時間、約 5 時間 ~ 約 48 時間、約 7 時間 ~ 約 10 時間、約 7 時間 ~ 約 12 時間、約 7 時間 ~ 約 18 時間、約 7 時間 ~ 約 24 時間、約 7 時間 ~ 約 36 時間、約 7 時間 ~ 約 48 時間、約 10 時間 ~ 約 18 時間、約 10 時間 ~ 約 24 時間、約 10 時間 ~ 約 36 時間、約 10 時間 ~ 約 48 時間、約 12 ~ 約 18 時間、約 12 時間 ~ 約 24 時間、約 12 時間 ~ 約 36 時間、約 12 時間 ~ 約 48 時間、約 18 時間 ~ 約 24 時間、約 18 時間 ~ 約 36 時間、約 18 時間 ~ 約 48 時間、約 24 時間 ~ 約 36 時間、約 24 時間 ~ 約 48 時間、または約 36 時間 ~ 約 48 時間起こる。

【0167】

いくつかの実施形態では、方法は、結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と、約 2 °C ~ 約 40 °C、例えば約 2 °C ~ 約 37 °C、2 °C ~ 約 30 °C、2 °C ~ 約 25 °C、2 °C ~ 約 22 °C、2 °C ~ 約 20 °C、2 °C ~ 約 10 °C、約 4 °C ~ 約 40 °C、約 4 °C ~ 約 37 °C、4 °C ~ 約 30 °C、4 °C ~ 約 25 °C、4 °C ~ 約 22 °C、4 °C ~ 約 20 °C、4 °C ~ 約 10 °C、約 10 °C ~ 約 40 °C、約 10 °C ~ 約 37 °C、10 °C ~ 約 30 °C、10 °C ~ 約 25 °C、10 °C ~ 約 22 °C、10 °C ~ 約 20 °C、約 20 °C ~ 約 40 °C、約 20 °C ~ 約 37 °C、20 °C ~ 約 30 °C、20 °C ~ 約 25 °C、20 °C ~ 約 22 °C、約 22 °C ~ 約 40 °C、約 22 °C ~ 約 37 °C、22 °C ~ 約 30 °C、22 °C ~ 約 25 °C、約 25 °C ~ 約 40 °C、約 25 °C ~ 約 37 °C、25 °C ~ 約 30 °C、約 30 °C ~ 約 40 °C、または約 30 °C ~ 約 37 °C の温度で接触させることを含む。

【0168】

本開示は、別段の指示がない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換え DNA、及び免疫学の従来的技法を採用し、このような技法は当業者の技能の範囲内である。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Green and Sambrook, ed. (2012) Molecular Cloning A Laboratory Manual (4th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover and B. D. Hames, eds., (1995) DNA Cloning 2d Edition (IRL Press), Volumes 1-4; Gait, ed. (1990) Oligonucleotide Synthesis (IRL Pres

s) ; Mullis et al. 米国特許第 4, 683, 195 号、Hames and Higgins, eds. (1985) Nucleic Acid Hybridization (IRL Press) ; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation (IRL Press) ; Freshney (2016) Culture Of Animal Cells, 7th Edition (Wiley-Blackwell) ; Woodward, J., Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1985) ; Perbal (1988) A Practical Guide To Molecular Cloning; 2d Edition (Wiley-Interscience) ; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory) ; S. C. Makrides (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells (Elsevier Science) ; Methods in Enzymology, Vols. 151-155 (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London) ; Weir and Blackwell, eds. ; 及び in Ausubel et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons) を参照されたい。

10

20

30

40

【0169】

抗体工学の一般原理は、例えば、Strohl, W. R., and L. M. Strohl (2012), Therapeutic Antibody Engineering (Woodhead Publishing). に記載されている。タンパク質工学の一般原理は、例えば、Park and Cochran, eds. (2009), Protein Engineering and Design (CDC Press) に記載されている。免疫学の一般原理は、例えば、Abbas and Lichtman (2017) Cellular and Molecular Immunology 9th Edition (Elsevier) に記載されている。さらに、当該技術分野で知られている免疫学の標準的方法は、例えば、Current Protocols in Immunology (Wiley Online Library) ; Wild, D. (2013), The Immunoassay Handbook 4th Edition (Elsevier Science) ; Greenfield, ed. (2013), Antibodies, a Laboratory Manual, 2d Edition (Cold Spring Harbor Press) ; 及び Ossipow and Fischer, eds., (2014), Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Humana Press) で得ることができる。

【0170】

上で引用される全ての参照文献、及び本明細書で引用される全ての参照文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0171】

例示的な実施形態

提供される実施形態の中には、以下のものがある。

【0172】

実施形態 1. 多量体結合分子のモノクローナル集団であって、各結合分子が 10 個または 12 個の IgM 由来重鎖を含み、前記 IgM 由来重鎖は、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 IgM 重鎖定常領域を含み、各 IgM 重

50

鎖定常領域は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアスパラギン（N）－結合型グリコシル化モチーフを含み、N－結合型グリコシル化モチーフはアミノ酸配列N－X1－S／Tを含み、Nはアスパラギン、X1はプロリン以外の任意のアミノ酸、及びS／Tはセリンまたはトレオニンであり、各IgM重鎖定常領域上の前記N－結合型グリコシル化モチーフの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つが複合型グリカンで占められており、前記結合分子のモノクローナル集団が結合分子1モルあたり少なくとも35モルのシアル酸を含む、前記結合分子のモノクローナル集団。

【0173】

実施形態2． 結合分子1モルあたり少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、または少なくとも65モルのシアル酸を含む、実施形態1に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0174】

実施形態3． 結合分子1モルあたり約40～約70、約40～約60、約40～約55、約40～約50、約50～約70、約60～約70モルのシアル酸を含む、実施形態1に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0175】

実施形態4． 前記IgM重鎖定常領域が、配列番号1（対立遺伝子IGHM*03）または配列番号2（対立遺伝子IGHM*04）のアミノ酸46（モチーフN1）、アミノ酸209（モチーフN2）、アミノ酸272（モチーフN3）、アミノ酸279（モチーフN4）、及びアミノ酸440（モチーフN5）に対応するアミノ酸位置から開始する5つのN－結合型グリコシル化モチーフN－X1－S／Tを含む、ヒトIgM重鎖定常領域またはそのバリエーションである、実施形態1～3のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0176】

実施形態5． モチーフN1、N2、及びN3が複合型グリカンによって占められている、実施形態4に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0177】

実施形態6． 細胞株改変、インビトロ糖鎖工学、またはそれらの任意の組み合わせの方法によって生成される、実施形態1～5のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0178】

実施形態7． 前記細胞株改変が、前記結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株にシアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をトランスフェクトし、それにより、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する改変細胞株を生成することを含む、実施形態6に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0179】

実施形態8． 前記シアリルトランスフェラーゼがヒトβ－ガラクトシドα－2，6－シアリルトランスフェラーゼ1（ST6GAL1）（配列番号3）を含む、実施形態7に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0180】

実施形態9． 前記細胞株改変が、前記結合分子のモノクローナル集団を生成する細胞株にガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をトランスフェクトし、それにより、ガラクトシルトランスフェラーゼを過剰発現する改変細胞株を生成することをさらに含む、実施形態7または実施形態8に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0181】

実施形態10． 前記ガラクトシルトランスフェラーゼがヒトβ－1，4－ガラクトシルトランスフェラーゼ4（B4GALT4）（配列番号4）を含む、実施形態9に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0182】

10

20

30

40

50

実施形態 11. インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む、実施形態 6～10 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0183】

実施形態 12. 前記シアリルトランスフェラーゼがヒト β -ガラクトシド α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ 1 (ST6GAL1) (配列番号 3) の可溶性バリエーションを含む、実施形態 11 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0184】

実施形態 13. 前記 ST6GAL1 の可溶性バリエーションが、配列番号 3 のアミノ酸 x から 406 を含む、ここで、x が、27 から 120 までの整数である、実施形態 12 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0185】

実施形態 14. 前記 ST6GAL1 の可溶性バリエーションが、配列番号 3 のアミノ酸 120～406、115～406、110～406、109～406、105～406、100～406、95～406、90～406、89～406、88～406、87～406、86～406、85～406、84～406、83～406、82～406、81～406、80～406、75～406、70～406、65～406、60～406、55～406、50～406、45～406、40～406、35～406、30～406、または 27～406 を含む、実施形態 13 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0186】

実施形態 15. 前記シアル酸基質がシチジナーリン酸-N-アセチル-ノイラミン酸 (CMP-NANA) を含む、実施形態 11～14 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0187】

実施形態 16. 結合分子：シアル酸基質の質量比が約 1：4～約 40：1 である、実施形態 11～15 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0188】

実施形態 17. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 80：1～約 5000：1 である、実施形態 11～16 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0189】

実施形態 18. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 2000：1 である、実施形態 11～17 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0190】

実施形態 19. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 2000：500：1 である、実施形態 18 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0191】

実施形態 20. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比が約 80：1 である、実施形態 11～17 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0192】

実施形態 21. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼのモル比が約 80：500：1 である、実施形態 20 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0193】

実施形態 22. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 500：1 である、実施形態 11～17 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0194】

実施形態 23. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約 500：62.5：1 である、実施形態 22 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0195】

実施形態 24. 前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフ

10

20

30

40

50

ェラーゼ及び前記シアル酸基質と前記接触させることが、少なくとも30分間の接触を含む、実施形態11～23のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0196】

実施形態25. 前記接触させることが、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、24時間、36時間、または48時間の接触を含む、実施形態24に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0197】

実施形態26. 前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及び前記シアル酸基質と前記接触させることが、約2℃～約40℃で起こる、実施形態11～25のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0198】

実施形態27. 前記接触させることが15℃～約37℃、15℃～約30℃、または15℃～約25℃で起こる、実施形態26に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0199】

実施形態28. インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることを含む、実施形態11～27のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0200】

実施形態29. 前記ガラクトシルトランスフェラーゼがヒトβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4 (B4GALT4) (配列番号4) の可溶性バリエーションを含む、実施形態28に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0201】

実施形態30. 前記B4GALT4の可溶性バリエーションが、配列番号4のアミノ酸xから344を含み、ここで、xが、39から120までの整数である、実施形態29に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0202】

実施形態31. 前記B4GALT4の可溶性バリエーションが、配列番号4のアミノ酸120～344、115～344、110～344、105～344、100～344、95～344、90～344、85～344、80～344、75～344、70～344、65～344、60～344、55～344、50～344、45～344、40～344、または39～344を含む、実施形態30に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0203】

実施形態32. 前記ガラクトース基質がウリジン二リン酸-α-D-ガラクトース (UDP-Gal) を含む、実施形態28～31のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0204】

実施形態33. 前記ガラクトシルトランスフェラーゼ及び前記ガラクトース基質と前記接触させることが、前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と前記接触させることの前または同時に起こる、実施形態28～32のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0205】

実施形態34. 各結合分子が多重特異性であり、各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している2つ以上の結合ドメインが異なる標的に特異的に結合する、実施形態1～33のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0206】

実施形態35. 各結合分子のIgM重鎖定常領域に結合している前記結合ドメインが同じ標的に特異的に結合する、実施形態1～33のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0207】

10

20

30

40

50

実施形態 36. 各結合分子の I g M 重鎖定常領域に結合している前記結合ドメインが同一である、実施形態 35 の結合分子のモノクローナル集団。

【0208】

実施形態 37. 前記結合ドメインが抗体由来の抗原結合ドメインである、実施形態 34～36 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0209】

実施形態 38. 各結合分子が、それぞれ 5 つまたは 6 つの二価 I g M 結合ユニットを含む五量体または六量体 I g M 抗体であり、各結合ユニットが、バリエーション I g M 定常領域のアミノ末端側に位置する V H を各々含む 2 つの I g M 重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する軽鎖可変ドメイン (V L) を各々含む 2 つの免疫グロブリン軽鎖とを含み、前記 V H と V L が結合して前記標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを形成する、実施形態 37 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0210】

実施形態 39. 各結合分子の各抗原結合ドメインが同じ標的に結合する、実施形態 38 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0211】

実施形態 40. 各結合分子の各抗原結合ドメインが同一である、実施形態 39 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0212】

実施形態 41. 前記標的が標的エピトープ、標的抗原、標的細胞、標的器官、または標的ウイルスである、実施形態 1～40 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0213】

実施形態 42. 各結合分子が、五量体であり、かつ J 鎖またはその機能的断片またはその機能的バリエーションをさらに含む、実施形態 1～41 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0214】

実施形態 43. 前記 J 鎖が、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む成熟ヒト J 鎖、またはその機能的断片、またはその機能的バリエーションである、実施形態 42 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0215】

実施形態 44. 前記 J 鎖が配列番号 6 のアミノ酸 49 に対応する位置から開始する N-結合型グリコシル化モチーフ N-X1-S/T (モチーフ N6) を含む、実施形態 43 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0216】

実施形態 45. 前記 J 鎖が、1 つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いてバリエーション J 鎖と同一である参照 J 鎖と比較して前記 1 つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む機能的バリエーション J 鎖であり、前記結合分子のモノクローナル集団が、前記バリエーション J 鎖における前記 1 つ以上の単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を除いて同一であり、同じ動物種に対して同一の方法を使用して投与される参照 I g M 由来の結合分子と比較して、対象動物への投与時に血清半減期の増加を示す、実施形態 42～44 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0217】

実施形態 46. 前記バリエーション J 鎖またはその機能的断片が、前記参照 J 鎖と比較して 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つの単一アミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む、実施形態 45 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0218】

実施形態 47. 前記バリエーション J 鎖またはその機能的断片が、配列番号 6 の野生型成熟ヒト J 鎖のアミノ酸 Y102 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を含む、実施形態 45 または実施形態 46 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0219】

実施形態48. 配列番号6のY102に対応する前記アミノ酸が、アラニン(A)に置換されている、実施形態47に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0220】

実施形態49. 前記J鎖が、配列番号7のアミノ酸配列を含む、実施形態48に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0221】

実施形態50. 前記J鎖またはその断片もしくはバリエントが、異種部分をさらに含む改変されたJ鎖であり、前記異種部分が、前記J鎖またはその断片もしくはバリエントに融合またはコンジュゲートしている、実施形態42～49のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

10

【0222】

実施形態51. 前記異種部分が、前記J鎖またはその断片もしくはバリエントに融合しているポリペプチドである、実施形態50に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0223】

実施形態52. 前記異種ポリペプチドが、ペプチドリinkerを介して前記J鎖またはその断片もしくはバリエントに融合している、実施形態51に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0224】

実施形態53. 前記ペプチドリinkerが、少なくとも5個であるが、25個以下のアミノ酸を含む、実施形態52に記載の結合分子のモノクローナル集団。

20

【0225】

実施形態54. 前記ペプチドリinkerがGGGSGGGSGGGGS(配列番号43)からなる、実施形態52または実施形態53に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0226】

実施形態55. 前記異種ポリペプチドが、前記J鎖またはその断片もしくはバリエントのN末端、あるいは、前記J鎖またはその断片もしくはバリエントのC末端に融合している、実施形態51～54のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0227】

実施形態56. 同じであっても異なってもよい異種部分が、J鎖またはその断片もしくはバリエントのN末端及びC末端に融合している、実施形態51～55のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

30

【0228】

実施形態57. 前記異種ポリペプチドが結合ドメインを含む、実施形態51～56のいずれか1つに記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0229】

実施形態58. 前記異種ポリペプチドの前記抗原結合ドメインが、抗体またはその抗原結合断片である、実施形態57に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0230】

実施形態59. 前記抗原結合断片が、scFv断片である、実施形態58に記載の結合分子のモノクローナル集団。

40

【0231】

実施形態60. 前記異種scFv断片がCD3εに結合する、実施形態59に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0232】

実施形態61. 前記改変されたJ鎖が、配列番号36(V15J)、配列番号37(V15J*)、配列番号38(SJ*)、配列番号31(A-55-J*)、配列番号32(A-56-J*)、配列番号33(A-57-J*)、配列番号34のアミノ酸20～420(VJH)、配列番号35のアミノ酸20～420(VJ*H)、あるいは、そ

50

れぞれ、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 を含む、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 のアミノ酸配列を含む抗 CD3ε の scFv にペプチドリinker を介して融合している配列番号 6、または 7 のアミノ酸配列を含む、実施形態 60 に記載の結合分子のモノクローナル集団。

【0233】

実施形態 62. 実施形態 1～61 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【0234】

実施形態 63. 実施形態 1～61 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団を生成する、組換え宿主細胞。 10

【0235】

実施形態 64. 実施形態 1～61 のいずれか 1 つに記載の結合分子のモノクローナル集団を生成する方法であって、実施形態 62 に記載の宿主細胞を培養することと、前記結合分子の集団を回収することを含む、前記方法。

【0236】

実施形態 65. 高度にシアリル化された多量体結合分子のモノクローナル集団を生成する方法であって、前記結合分子のモノクローナル集団を発現する細胞株を提供することと、前記細胞株を培養することと、前記結合分子のモノクローナル集団を回収することとを含み、各結合分子が 10 個または 12 個の IgM 由来重鎖を含み、前記 IgM 由来重鎖が、標的に特異的に結合する結合ドメインにそれぞれ結合しているグリコシル化 IgM 重鎖定常領域を含み、各 IgM 重鎖定常領域が、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つのアスパラギン (N) -結合型グリコシル化モチーフを含み、N-結合型グリコシル化モチーフが、アミノ酸配列 N-X1-S/T を含み、N はアスパラギン、X1 はプロリン以外の任意のアミノ酸、及び S/T はセリンまたはトレオニンであり、前記集団内の各 IgM 重鎖定常領域上の前記 N-結合型グリコシル化モチーフの平均で少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つが、複合型グリカンで占められており、前記細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、グリカン 1 つあたり少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つのシアル酸末端単糖を含む複合型グリカンを濃縮するように最適化されている、前記方法。 20 30

【0237】

実施形態 66. 前記細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、結合分子 1 モルあたり少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 60、もしくは少なくとも 65 モルのシアル酸を含む、結合分子のモノクローナル集団をもたらすように最適化されている、実施形態 65 に記載の方法。

【0238】

実施形態 67. 前記細胞株、回収プロセス、またはそれらの組み合わせが、結合分子 1 モルあたり約 40～約 70、約 40～約 60、約 40～約 55、約 40～約 50、約 50～約 70、約 60～約 70 モルのシアル酸を含む結合分子のモノクローナル集団をもたらすように最適化されている、実施形態 66 に記載の方法。 40

【0239】

実施形態 68. 前記 IgM 重鎖定常領域が、配列番号 1 (対立遺伝子IGHM*03) または配列番号 2 (対立遺伝子IGHM*04) のアミノ酸 46 (モチーフ N1)、アミノ酸 209 (モチーフ N2)、アミノ酸 272 (モチーフ N3)、アミノ酸 279 (モチーフ N4)、及びアミノ酸 440 (モチーフ N5) に対応するアミノ酸位置から開始する 5 つの N-結合型グリコシル化モチーフ N-X1-S/T を含む、ヒト IgM 重鎖定常領域に由来する、実施形態 65～67 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0240】

実施形態 69. 前記結合分子の集団中のモチーフ N1、N2、及び N3 のうちの、平均で 1 つ、2 つ、または 3 つ全てが、複合型グリカンによって占められている、実施形態 50

68に記載の方法。

【0241】

実施形態70. 提供される前記細胞株が、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現するように改変されている、実施形態65～69のいずれか1つに記載の方法。

【0242】

実施形態71. 前記シアリルトランスフェラーゼがヒト β -ガラクトシド α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1 (ST6GAL1) (配列番号3)を含む、実施形態70に記載の方法。

【0243】

実施形態72. 前記回収プロセスが、前記結合分子のモノクローナル集団をインビトロ糖鎖工学に供することを含む、実施形態65～71のいずれか1つに記載の方法。

【0244】

実施形態73. 前記インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と接触させることを含む、実施形態72に記載の方法。

【0245】

実施形態74. 前記シアリルトランスフェラーゼが、ヒト β -ガラクトシド α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ1 (ST6GAL1) (配列番号3)の可溶性バリエーションを含む、実施形態73に記載の方法。

【0246】

実施形態75. 前記ST6GAL1の可溶性バリエーションが、配列番号3のアミノ酸xから406を含み、ここで、xが、27から120までの整数である、実施形態74に記載の方法。l

【0247】

実施形態76. 前記ST6GAL1の可溶性バリエーションが、配列番号3のアミノ酸120～406、115～406、110～406、109～406、105～406、100～406、95～406、90～406、89～406、88～406、87～406、86～406、85～406、84～406、83～406、82～406、81～406、80～406、75～406、70～406、65～406、60～406、55～406、50～406、45～406、40～406、35～406、30～406、または27～406を含む、実施形態75に記載の方法。

【0248】

実施形態77. 前記シアル酸基質がシチジナーリン酸(CMP)-N-アセチルノイラミン酸(CMP-NANA)を含む、実施形態73～75のいずれか1つに記載の方法。

【0249】

実施形態78. 結合分子：シアル酸基質の質量比が約1:4～約40:1である、実施形態73～77のいずれか1つに記載の方法。

【0250】

実施形態79. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約80:1～約10000:1である、実施形態73～78のいずれか1つに記載の方法。

【0251】

実施形態80. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約2000:1である、実施形態73～79のいずれか1つに記載の方法。

【0252】

実施形態81. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約2000:500:1である、実施形態80に記載の方法。

【0253】

実施形態82. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼのモル比が約80:1である、実施形態73～79のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0254】

実施形態83. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼのモル比が約80：500：1である、実施形態82に記載の方法。

【0255】

実施形態84. 結合分子：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約500：1である、実施形態73～79のいずれか1つに記載の方法。

【0256】

実施形態85. 結合分子：シアル酸基質：シアリルトランスフェラーゼの質量比が約500：62.5：1である、実施形態84に記載の方法。

【0257】

実施形態86. 前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及び前記シアル酸基質と前記接触させることが、少なくとも30分間の接触を含む、実施形態73～85のいずれか1つに記載の方法。

【0258】

実施形態87. 前記接触させることが、少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、24時間、36時間、または48時間の接触を含む、実施形態86に記載の方法。

【0259】

実施形態88. 前記結合分子のモノクローナル集団を前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及び前記シアル酸基質と前記接触させることが、約2℃～約40℃で起こる、実施形態73～87のいずれか1つに記載の方法。

【0260】

実施形態89. 前記接触させることが15℃～約37℃、15℃～約30℃、または15℃～約25℃で起こる、実施形態88に記載の方法。

【0261】

実施形態90. インビトロ糖鎖工学が、前記結合分子のモノクローナル集団を可溶性ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と接触させることを含む、実施形態73～77のいずれか1つに記載の方法。

【0262】

実施形態91. 前記ガラクトシルトランスフェラーゼがヒトβ-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4 (B4GALT4) (配列番号4) の可溶性バリエーションを含む、実施形態90に記載の方法。

【0263】

実施形態92. 前記ガラクトース基質がウリジンリシン酸-α-D-ガラクトース (UDP-Gal) を含む、実施形態90または実施形態91に記載の方法。

【0264】

実施形態93. 前記ガラクトシルトランスフェラーゼ及びガラクトース基質と前記接触させることが、前記可溶性シアリルトランスフェラーゼ及びシアル酸基質と前記接触させることの前または同時に起こる、実施形態90～92のいずれか1つに記載の方法。

【0265】

以下の実施例は、例示のために提供されるものであり、限定のためのものではない。

【実施例】

【0266】

実施例1-材料及び方法

IgM抗体の集団

以下に記載されている場合を除き、これらの実験は、野生型ヒトIgM定常領域（例えば、配列番号1または配列番号2）及び配列番号8の抗CD20 V_H領域を含むIgM重鎖と、配列番号9の抗CD20 V_L領域を含む軽鎖と、配列番号34のアミノ酸20～420を含むCD3に結合する改変されたJ鎖とを含む、IgM二重特異性抗体CD20×CD3 IGM-Aのモノクローナル集団で実施された。CD20×CD3 IGM

10

20

30

40

50

ー A は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開番号 U S - 2 0 1 8 - 0 2 6 5 5 9 6 - A 1 に詳細に記載されている。糖鎖工学処理された I g M 抗体、I g M 様抗体、または I g M 由来の結合分子は、糖鎖工学の方法に関係なく、実施例を通して「G E M」と呼ばれる。

【0267】

I g M 抗体集団の糖鎖工学

様々な対照とともに、以下の実施例に示されるように、様々な量のヒト α -2, 6 シアリルトランスフェラーゼの短縮型 (Roche Diagnostics, Inc. から入手可能な「短縮型ヒト ST6」(材料番号 07012250103 または材料番号 08098174103)) または Agilent からの (部品番号 GKT-S26) を、I g M 抗体の部分的に精製されたモノクローナル集団、例えば抗 CD20 $\times$ CD3 IGM-A と 50 mM の Tris-アセテート (pH 7.5) に溶解したさまざまな量のシチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸ナトリウム塩 (CMP-NANA) とを含む 20 μ l の反応溶液に添加した。別段示されない限り、反応は 37 $^{\circ}$ C で 8 時間実行させた。-20 $^{\circ}$ C で凍結することにより反応を停止させた。ST6 で処理された I g M 集団は、さらなる分析の前に、例えばアニオン交換クロマトグラフィー及び／または混合モードクロマトグラフィーによってさらに精製された。

【0268】

総シアル酸の定量

シアル酸 (NANA) アッセイキット (Agilent AdvanceBio Total Sialic Acid Quantitation Kit) は、糖タンパク質から遊離または放出されたシアル酸 (N-アセチルノイラミン酸 (NANA)) を測定する。このアッセイでは、遊離シアル酸の酸化により中間体が生成され、化学量論的にプロブと反応して、吸光度 (OD = 530 nm) または蛍光 (励起／発光 (Ex/Em) = 530 / 590 nm) で検出できる生成物が生成される酵素結合反応を使用する。このキットは、シアル酸を 40 pmol ~ 1,000 pmol の線形範囲で測定し、検出感度は I g M 抗体の 0.15 mg / ml の濃度である。キットは製造者の推奨に従って使用された。簡潔に述べると、試料をシアリダーゼ A で 2 時間消化した。ウシフェチニン対照タンパク質を陽性対照として使用し、予想範囲は 9.6 ~ 13.9 mol / mol であった。シアル酸標準は、蛍光測定用に次の pmol を使用して調製した：1,000、500、250、及び 0 pmol。次に、以下の表 2 に従って、変換と発色の混合を調製した。

【0269】

(表 2) シアル酸定量アッセイ

ウェルの数	変換試薬溶液 (μ L)	HRP 溶液 (μ L)	SAQ 緩衝液 C (μ L)	SAQ 色素 (μ L)	合計 (μ L)	ウェルの数
n	30/試料	15/試料	5/試料	5/試料	55	N
16	480	240	80	80	880	16
36	1080	540	180	180	1980	36
48	1440	720	240	240	2640	48

【0270】

シアル酸がシアリダーゼ A 消化によって放出されると、N-アセチルノイラミンアルドラーゼが反応を触媒してピルビン酸を形成する。次いで、反応は、ピルビン酸オキシダーゼを触媒として使用する追加のステップを経て、過酸化水素を形成し、これは、色素と 1 : 1 複合体を形成して、蛍光レポーター色素を形成する。この色素は、蛍光検出によって読み取ることができる (Ex/Em = 530 / 590 nm)。次いでこれは相関してシアル酸標準曲線からシアル酸レベル mol / mol をもたらす。

【0271】

実施例 2：I g M 抗体集団のシアリル化に対する $\alpha-2, 6$ シアリルトランスフェラーゼ濃度の効果

実施例 1 に記載されているように、さまざまな量の切断型ヒト ST 6 を、 $60 \mu\text{g}$ の抗 CD 20 $\times$ CD 3 I G M - A ($3 \text{ mg} / \text{ml}$) と $30 \mu\text{g}$ のシチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸ナトリウム塩 (CMP-NANA、 $1.5 \text{ mg} / \text{ml}$) を含む $20 \mu\text{l}$ の反応溶液に添加した。得られたシアリル化を実施例 1 に記載されているように定量化し、切断型ヒト ST 6 濃度と比較したシアリル化の量を図 4 に示す。

【0272】

これらの結果は、 $1.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (I g M と切断型ヒト ST 6 の 80 : 1 というモル比) という低い ST 6 濃度を使用して、 $40 \text{ mol} / \text{mol}$ の SA レベルを生成するために使用でき、切断型ヒト ST 6 濃度が $30 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上 (I g M と切断型ヒト ST 6 の約 4 : 1 以上というモル比) に増加すると、 $60 \text{ mol} / \text{mol}$ を超える SA レベルを生成することができる。

【0273】

実施例 3：他の I g M 抗体のシアリル化

上記で開発したインビトロシアリル化手順を他の I g M 抗体に適用できるかどうかを判断するために、五量体抗 DR 5 I G M - B (VH : 配列番号 10、VL : 配列番号 : 11、米国特許第 7, 521, 048 号を参照されたい) 及び六量体抗 DR 5 I G M - C (VH : 配列番号 12、VL : 配列番号 13、米国特許第 7, 790, 165 を参照されたい) である、組換え I g M 抗体を発現する他の 2 つの CHO 細胞株を、実施例 1 に記載のようにシアリル化及び分析した。 $20 \mu\text{l}$ の反応には、 $0.28 \mu\text{g}$ の切断型ヒト ST 6 (最終濃度 $14 \mu\text{g} / \text{ml}$) と $60 \mu\text{g}$ の抗 DR 5 I G M - B または抗 DR 5 I G M - C (約 8 : 1 の I g M と切断型ヒト ST 6 のモル比) が含まれ、 $30 \mu\text{g}$ の CMP-NANA を使用した。切断型ヒト ST 6 を使用しない対照反応も実行された。得られたシアリル化は、実施例 1 に記載されているように決定され、それぞれの条件のシアリル化の量は、図 5 及び表 3 に示されている。

【0274】

(表 3) 抗 DR 5 抗体のシアリル化

抗体	条件	SA (mol/mol)
抗DR5 IGM-B	ST6なし	16
抗DR5 IGM-B-GEM	+ ST6	52
抗DR5 IGM-C	ST6なし	9
抗DR5 IGM-C-GEM	+ ST6	52

【0275】

実施例 4：ヒト血清 I g M のシアリル化レベル

ヒト血清 I g M (Sigma から入手、カタログ番号 I 8260-25 mg) のシアリル化レベルは、実施例 1 で説明したように、シアル酸 (NANA) アッセイキット (Agilent Advance Bio 総シアル酸定量キット) を使用して決定した。

【0276】

シアル酸がシアリダーゼ A 消化によって放出されると、N-アセチルノイラミンアルドラーゼが反応を触媒してピルビン酸を形成する。次いで、反応は、ピルビン酸オキシダーゼを触媒として使用する追加のステップを経て、過酸化水素を形成し、これは、色素と 1 : 1 複合体を形成して、蛍光レポーター色素を形成する。この色素は、蛍光検出によって読み取ることができる ($E x / E m = 530 / 590 \text{ nm}$)。次いでこれは相関してシアル酸標準曲線からシアル酸レベル mol / mol をもたらす。結果として生じるシアリル化の量を表 4 に示す。

【0277】

(表 4) ヒト血清 I g M のシアル酸含有量

10

20

30

40

50

抗体	SA (mol/mol)
ヒト血清IgM	30

【0278】

実施例5：IGM抗体に対するシアリル化の増加の効果

この実施例の実験で使用された糖鎖工学処理されたIgM CD20×CD3 IGM-A（「抗CD20×CD3 IGM-A-GEM」）材料は、IgM1モルあたり約37モルのシアリ酸を有しており、実施例1に記載されるように調製された。糖鎖工学処理されていないIGM CD20×CD3 IGM-Aは、IgM1モルあたり約14モルのシアリ酸を有していた。

10

【0279】

補体依存性細胞傷害性

CD20を発現するRamos（ATCCカタログ番号CRL-1596）細胞は、10%熱不活化ウシ胎仔血清（Gibcoカタログ番号16140-071）を補充されたRPMI（Invitrogen）で培養された。Ramos細胞（50,000）を96ウェルプレートに10μl/ウェル容量で播種した。細胞は、実施例1に記載されているような、インビトロでシアリル化された抗CD20×CD3 IGM、または抗CD20×CD3 IGM-Aの2つの異なるロットの段階希釈で処理された（「抗CD20×CD3 IGM-A-GEM」）。全ての抗体希釈は、10%熱不活化血清を補充したRPMI培地で実施した。ヒト血清補体（Quidelカタログ番号A113）を、抗体処理細胞に10μl/ウェル容量で5%最終濃度で添加した。反応混合物を37℃で4時間インキュベートした。それぞれのウェル内に存在する細胞培養培地の量と等しい量のCELLTITER GLO（登録商標）（Promegaカタログ番号G7572）試薬を添加した。プレートを2分間振とうし、室温で10分間インキュベートし、Envisioマルチモードリーダー（Perkin Elmer）でウェルあたり0.1秒の積分時間を使用して発光を測定した。GraphPad Prismと、上下の値をそれぞれ100及び0%実現可能性に固定した4パラメーターフィットを使用してデータを分析した。最大応答の半分（EC₅₀）をもたらし抗体の濃度をそれぞれの条件について計算し、表5に示す。インビトロシアリル化は、補体依存性細胞傷害性に感知できるほどの影響を及ぼさなかった。

20

30

【0280】

（表5）CDC活性

試料	EC ₅₀ (pM)
抗CD20 x CD3 IGM-A	260
抗CD20 x CD3 IGM -A-GEM	230

【0281】

T細胞活性化

抗CD20×CD3 IGM-A-GEMまたは抗CD20×CD3 IGM-AによるT細胞活性化（TCA）は、抗原陽性のJurkatベースのレポーター細胞の存在下で発光ベースの読み出しを使用して決定された。操作されたJurkatT細胞（Promega J1601 部品番号J131A）及びRamos細胞は、10%熱不活化ウシ胎仔血清（Gibcoカタログ番号16140-071）を補充されたRPMI（Invitrogen）で培養された。Ramosセル（7500セル/ウェル、10μlの容量）を白い384ウェルアッセイプレートに加えた。次に、抗CD20×CD3 IGM-A-GEMまたは抗CD20×CD3 IGM-Aの段階希釈液を10μlの容量でRamos細胞に添加した。操作されたJurkat細胞（25000細胞/ウェル、20μlの容量）を混合物に加え、最終容量を40μlにした。混合物を5%CO₂とともに37℃で16時間インキュベートした。次いで、細胞混合物をルシフェリンを含む20

40

50

μLの溶解バッファー（Promega、CELLTITER-GLO（登録商標））と混合して、ルシフェラーゼレポーター活性を測定した。光出力はEnVisionプレートリーダーで測定した。EC₅₀は、Prismソフトウェアを使用した4パラメーターカーブフィットによって決定された。

【0282】

EC₅₀をそれぞれの条件について計算し、表6に示す。インビトロシアリル化は、T細胞活性化に感知できるほどの影響を及ぼさなかった。

【0283】

（表6）T細胞活性化

試料	EC ₅₀ (pM)
抗CD20 x CD3 IGM-A	29
抗CD20 x CD3 IGM-A-GEM	22

10

【0284】

インビトロでのB細胞殺傷

Ramos、CD19+CD20+B細胞株は、細胞追跡色素（Oregon Green 488、ThermoFisher、カタログ番号C34555）で標識され、次いで、連続希釈された抗CD20 x CD3 IGM-Aまたは抗CD20 x CD3 IGM-A-GEMとともに、初代ヒトCD8+T細胞（Precision for Medicine、カタログ番号84300；ネガティブセクション）と37℃、5%CO₂で48時間、共培養された。細胞を回収し、7-AAD（BD Biosciences、カタログ番号559925）で染色し、フローサイトメトリーで分析して生存B細胞を評価した。EC₅₀をそれぞれの条件について計算し、表7に示す。インビトロシアリル化は、B細胞を殺傷する抗体の能力に感知できるほどの影響を及ぼさなかった。

20

【0285】

（表7）T細胞依存性B細胞殺傷

試料	最大(%)	EC ₅₀ (pM)
抗CD20 x CD3 IGM-A	94.5	6.57
抗CD20 x CD3 IGM-A-GEM	94.8	7.99

30

【0286】

薬物動態

薬物動態パラメーターは、以下のようにインビボマウスモデルでさまざまなIgM抗体について測定された。Balb/cマウスに静脈内注入により、5mg/kgの抗CD20 x CD3 IGM-Aまたは抗CD20 x CD3 IGM-A-GEM抗体のいずれかを注射した。血液試料は、それぞれの抗体について合計10または12の時点で収集され、それぞれの時点で2匹のマウスが使用された。それぞれのマウスは、顔面静脈から一度出血し（100μL）、その後、終末心臓穿刺によってもう一度出血した（最大取得可能、約500μL）。標準的なELISAアッセイを使用して、それぞれの時点での血中のそれぞれの抗体の血清濃度を測定した。品質メトリクスは、全てのELISA、及びT₁/2-α、T₁/2-β、及び時間ゼロから無限大までの濃度曲線の下面積（AUC_{0-∞}、でμg/ml*hr単位で測定された）を含むPKパラメーターは、標準のカーブフィッティング手法（WinNonLin, Phoenix Software）を使用して導出された。曲線下面積（AUC）を含むPK結果を図6に示す。

40

【0287】

実施例6：シアリル化を増加させる細胞株操作

GACACC Kozak配列、α-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ（ST6）配列番号3（NCBI参照配列：sp|P15907.1）をコードする配列、ハイグロマイシンマーカ選択を含むベクターは、標準的な方法で生成された。ベクターを、抗CD20 x CD3 IGM-Aを発現する安定したCHOサブクローンにエレクトロポレー

50

ションした。選択及び回収後、得られたプールを、384ウェルプレートへの限界希釈によってサブクローン化した。表現型スクリーニングは、サブクローン化された細胞をフルオレセインイソチオシアネート（FITC）にコンジュゲートしたSNA-1で標識することによって行われた。SNA-1は2,6-シアル酸に特異的なレクチンである。細胞自体は、FACS緩衝液で洗浄した直後に標識された。蛍光レベルが検出され、その結果を図7に示す。60個のサブクローンのうち4個だけが、陽性対照として使用されたHEK293細胞のシグナルを超えるシグナルを生成した。さらなる研究のために、2つのサブクローン25及び47が回収された。

【0288】

サブクローン25及び47のゲノムにおけるST6の存在を検出するために、表8のプライマーを使用してQPCR分析を行った。

【0289】

（表8）QPCRアッセイで使用されるプライマー

プライマー1	GAC CGA CGT GTG CTA CTA TTA C (配列番号: 39)
プライマー2	GAG GTG CTT CAC GAG ATT CTT (配列番号 40)

【0290】

これらのプライマーは、ST6遺伝子のコード配列（CDS）で表される。両方のサブクローンは38サイクルまでに陽性反応を示したが、CHO細胞コントロールはそうではなかった。

【0291】

ウエスタンブロットを実施して、小規模発酵から発現及び精製された抗CD20×CD3 IGM-A抗体中の2,6結合シアル酸を検出した。還元された変性ゲル（BioRad（登録商標）CriterionTGXステインフリープレキャストゲル）は、製造者の使用説明書に従って視覚化及び画像化された。得られた画像を図8Aに示す。次いで、ゲルをビオチン化SNA-Iレクチンとストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ融合タンパク質で処理し、画像化した。得られた画像を図8Bに示す。

【0292】

選択されたサブクローンは、検出可能なレベルの2,6-シアル酸を有していた。一方、サブクローンが由来するCHO細胞の安定したプールはそうではなかった。

【0293】

サブクローン25は、2,6-シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を有しない細胞で生成された親の抗CD20×CD3 IGM-Aに対して比較研究を行うことができるように、3リットルのバイオリアクター生産の実行のために拡大増殖された。図9A～Dは、生細胞密度（図9A）、細胞生存率（図9B）、抗CD20×CD3 IGM-Aの生成（図9C）、及び抗CD20×CD3 IGM-A 1モルあたりのシアル酸のモル数に関して培養がどのように行われたかを示す（図9D）。サブクローン25は、8日目までに親細胞株よりも25%少ない抗CD20×CD3 IGM-Aを生成したが（図9C）、シアル酸含有量は2倍を超え、上昇したままであった（図9D）。12日目のデータは、サブクローン25が500 µg/mlを生成したことを示し（図9C）、IGMのシアル酸含有量は37 mol/molであった（図9D）。

【0294】

実施例7：2,6-シアル酸ノックイン親細胞株

α-2,6-シアリルトランスフェラーゼ（NCBI参照配列：NP_775324.1）とハイグロマイシンマーカースelectionを安定して挿入するためのベクターは、商用ベンダーによって生成された。ベクターをCHO懸濁液細胞株にエレクトロポレーションした。得られた安定したプールをクローン化し、384個のクローンを拡大増殖させてサイトメトリーでスクリーニングした。細胞表面ベースの標識は、Cy5色素に化学的にコンジュゲートした2,6-シアル酸特異的レクチン（SNA-1）を使用して行われたこのアッセイの結果を図10Aに示す。スクリーニングに基づいて、よく増殖し、レクチン標識レ

10

20

30

40

50

ベルが高い 48 クローンを、24 ディープウェルプレートに拡大し、37℃、5% CO₂、及び湿度 80% のインキュベーター内で 300 RPM で振とうした。48 個のクローンがディープウェルプレートで拡大増殖し、上位の 22 個を振とうフラスコに移した後、同じ 2, 6-シアル酸スクリーニングを行った。

【0295】

細胞密度が 100 万～400 万細胞／mL にあるときに、選択した 22 のクローンを再度スクリーニングした。この場合のレクチン標識レベルを、それらがアッセイされた時点での培養物の対応する生存率とともに図 10B に示す。

【0296】

振とうフラスコ分析に基づいて、最初に 2～4 個の対照 IgM をトランスフェクションすることによって評価するために 6 つのクローンを選択した。親の CHO 細胞株にも同じ 4 つの対照 IgM をトランスフェクトし、比較の基礎として使用した。トランスフェクション後、選択した 6 つのクローンのうち 4 つは、トランスフェクション後またはトランスフェクション前に回復できなかったか、増殖の問題があった。トランスフェクション後に生存することができた 2 つのクローン（2B4 及び 2C2）は、1 つのケースを除く全てのケースで高い力価を示し、全てのケースで、親 CHO 細胞株の IgM よりも高いシアル酸含有量を示した。表 9 は、親細胞株を 2 つの 2, 6-シアルルトランスフェラーゼクローンと比較した 7 日間のバッチ発酵の結果を示している。シアル酸含有量は、収穫後に精製されたタンパク質から決定された。4 つの異なる IgM が 2B4 と親細胞株にトランスフェクトされ、これらの IgM のうちの 2 つは 2C2 にもトランスフェクトされた。

【0297】

（表 9）回収された発酵物から精製されたタンパク質の回収力価データとシアル酸レベル

IgM	クローン 2B4				クローン 2C2			
	力価 (mg/mL)	親と 比較した 力価の 差の倍率	シアル酸 (mol/mol)	親と 比較した シアル酸の 差の倍率	力価 (mg/mL)	親と 比較した 力価の 差の倍率	シアル酸 (mol/mol)	親と 比較した シアル酸の 差の倍率
1	2875	1.3	51.3	1.7				
2	1078	1.6	46.0	1.5	379	0.6	37.2	1.2
3	752	1.6	41.4	1.6	727	1.5	40.0	1.5
4	1500	1.3	31.8	1.4				

【0298】

クローンをさらに特徴づけるために、2, 6-シアル酸及び 2, 3-シアル酸レベルをサイトメトリーによって細胞表面で測定した。測定は、いずれかの形態のシアル酸に特異的な蛍光標識レクチンを使用して行われた。ラベリングが実施された時点では、全ての生存率は 95% を超えていた。HEK293 細胞、CHO 親細胞株、選択されたクローン、及び IgM トランスフェクトクローンは全て同じ方法で分析された。図 11A 及び 11B はそれぞれの、トランスフェクトされていない細胞の 2, 3-シアル酸及び 2, 6-シアル酸レベルを示す。図 11C は、トランスフェクトされていない親細胞と 2B4 細胞と IgM 4 番をトランスフェクトされた親細胞と 2B4 細胞の 2, 3-シアル酸と 2, 6-シアル酸のレベルを比較している。図 11A に示すデータは、CHO 親細胞が、HEK293 細胞または 2, 6-シアルルトランスフェラーゼをトランスフェクトしたクローンよりも高い 2, 3-シアル酸レベルを有していたことを示している。図 11B に示すデータは、クローンにおける 2, 6-シアル酸レベルが、CHO 親のレベルをはるかに超えて上昇したことを示している。図 11C は、IgM をトランスフェクトした細胞株が高レベルの 2, 6-シアル酸を保持していることを示している。

【0299】

実施例 8：さまざまな条件下でのインビトロシアル化

表 10 に示す比率で IgM 抗体とシチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミ

ン酸ナトリウム塩（CMP-NANA、1.5 mg/ml）を含む反応溶液に、さまざまな量の切断型ヒトST6を添加した。それぞれの反応の持続時間と温度、及び結果として生じるシアリル化（実施例1で記載したように定量化）も表10に示されている。室温（RT）は15～25℃である。

【0300】

（表10）インビトロシアリル化条件と結果

条件番号	反応中の抗体	温度 (°C)	時間 (h)	抗体: CMP-NANA: ST6 (質量)	シアル酸 (mol/mol)
1	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	24	-	20
2	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	24	6:3:1	62
3	標的1 IGM-D	37	6	-	27
4	標的1 IGM-D	37	6	500:1000:1	47
5	標的2 IGM-E	37	6	-	32
6	標的2 IGM-E	37	6	100:50:1	62
7	抗CD20 x CD3 IGM-F	37	7	-	20
8	抗CD20 x CD3 IGM-F	37	7	100:50:1	54
9	抗CD20 x CD3 IGM-F	37	7	100:50:1	64
10	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	100:50:1	53
11	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	100:25:1	51
12	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	100:10:1	51
13	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	1000:500:1	42
14	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	1000:250:1	41
15	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	1000:100:1	44
16	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	20	100:50:1	48
17	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	20	500:62.5:1	51
18	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	20	1000:500:1	42
19	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	20	-	16
20	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	10000:5000:1	34
21	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	3000:1500:1	39
22	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	1000:500:1	42
23	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	21	100:50:1	48
24	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	20	-	15
25	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	7	100:50:1	54
26	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	20	100:50:1	59
27	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	22	1000:50:1	52
28	抗CD20 x CD3 IGM-A	4	8	100:50:1	53
29	抗CD20 x CD3 IGM-A	15	48	100:50:1	54
30	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	24	100:50:1	50
31	抗CD20 x CD3 IGM-A	37	24	5000:2500:1	45
32	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	48	100:50:1	54
33	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	48	250:125:1	50
34	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	48	1000:500:1	45
35	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	48	2500:1250:1	44
36	抗CD20 x CD3 IGM-A	RT	48	5000:2500:1	40

10

20

30

40

【0301】

条件1及び2の抗体を、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、動的光散乱（DLS）、ハイブリッドゲル、還元ゲル、及び実施例3に記載のCDC及びTCAアッセイで比較したところ、インビトロでのシアリル化によってSECプロファイル、動的半径、または抗体の移動度は変化せず、抗体は、同様の活性TCA及びCDC活性を示した（データ示さず）。

【0302】

50

条件 19～23 からの抗体はまた、実施例 3 に記載された T C A アッセイによって比較され、データは、図 12 に示される。アッセイされた全ての抗体は、同様の T C A 活性を示した。

【0303】

条件 29～31 の抗体の S A レベルは、反応中の設定された時点でモニターされた。48 時間にわたる、または最初の 15 時間にわたる S A レベルが、それぞれ、図 13 A 及び 13 B にプロットされている。100 : 50 : 1 の抗体 : C M P - N A N A : S T - 6 の質量比では、1 時間で最大のシアリル化に達し、37℃と15℃の間でほとんど差が観察されなかった。

【0304】

条件 32～36 の抗体の S A レベルは、反応中の設定された時点でモニターされた。48 時間にわたる S A レベルが図 14 にプロットされている。100 : 50 : 1 の抗体 : C M P - N A N A : S T - 6 の質量比では、R T で 18 時間までに 60 mol / mol S A を超えるシアリル化を達成し、R T で最大 48 時間は大幅に低下しなかった。250 : 125 : 1 の抗体 : C M P - N A N A : S T - 6 の質量比では、S A レベルの上昇が遅くなり、36 時間後に 60 mol / mol S A を超えた。全ての比率で、36 時間までの R T で有意な脱シアリル化は観察されなかった。5000 : 2500 : 1 の抗体 : C M P - N A N A : S T - 6 の質量比で、40 mol / mol S A が達成され、抗体集団は可能な限りの最大限までシアリル化されなかった。

【0305】

実施例 9 : 高いシアル酸レベルの I g M 抗体の薬物動態

薬物動態パラメーターは、以下のようにインビボマウスモデルでさまざまな I g M 抗体について測定された。B a l b / c マウスに、さまざまなシアル酸レベルの抗 C D 20 × C D 3 I G M - A、抗 C D 20 × C D 3 I G M - A - G E M 抗体、さまざまなシアル酸レベルの抗 C D 20 × C D 3 I G M - F、抗 C D 20 × C D 3 I G M - F - G E M 抗体、またはヒト血清 I g M の 5 mg / kg を静脈内注入により注射した。血液試料は、それぞれの抗体について合計 10 または 12 の時点で収集され、それぞれの時点で少なくとも 2 匹のマウスが使用された。それぞれのマウスは、顔面静脈から一度出血し (100 μ L)、その後、終末心臓穿刺によってもう一度出血した (最大取得可能、約 500 μ L)。標準的な E L I S A アッセイを使用して、それぞれの時点での血中のそれぞれの抗体の血清濃度を測定した。品質メトリクスは、全ての E L I S A、及び T₁ / 2 - α、T₁ / 2 - β、及び時間ゼロから無限大までの濃度曲線の下面積 (AUC_{0-∞}、で μ g / ml * hr 単位で測定された) を含む P K パラメーターは、標準のカーブフィッティング手法 (W i n N o n L i n, P h o e n i x S o f t w a r e) を使用して導出された。それぞれの抗体について得られたシアル酸レベル及び結果として生じる AUC_{0-∞} を図 15 に示す。

【0306】

実施例 10 : カニクイザルにおいて高いシアル酸レベルの活性を有する I g M 抗体

薬物動態パラメーター及び細胞マーカーは、以下のように、インビボカニクイザルモデルにおいて I g M 抗体について測定された。カニクイザル霊長類に抗 C D 20 × C D 3 I G M - F (S A 18 mol / mol) (2 匹の動物)、抗 C D 20 × C D 3 I G M - F (S A 9 mol / mol) (2 匹の動物)、または抗 C D 20 × C D 3 I G M - F - G E M (S A 51 mol / mol) (4 匹の動物) の抗体の 10 mg / kg を注射した。血液サンプルは、それぞれの抗体について合計 12 の時点で収集された。標準的な E L I S A アッセイを使用して、それぞれの時点での血中のそれぞれの抗体の血清濃度を測定した。品質メトリクスは、全ての E L I S A、及び T₁ / 2 - α、T₁ / 2 - β、及び時間ゼロから無限大までの濃度曲線の下面積 (AUC_{0-∞}、で μ g / ml * hr 単位で測定された) を含む P K パラメーターは、標準のカーブフィッティング手法 (W i n N o n L i n, P h o e n i x S o f t w a r e) を使用して導出された。フローサイトメトリーを使用して細胞マーカーを測定した。抗 C D 20 × C D 3 I G M - F (S

10

20

30

40

50

A 18 mol/mol) 及び4つの抗CD20×CD3 IGM-F-GEM (SA 51 mol/mol) で処理された動物は図16に示されている。高シアル酸抗体のAUC_{0-∞}は、低シアル酸抗体の2倍であった。それぞれの時点でのB細胞の相対数が図17Aに示され、B細胞が回復し始めた日が図17Bに示されている。

【0307】

実施例11：複数の酵素によるインビトロシアリル化

ガラクトシル化とシアリル化の組み合わせをシアリル化のみと比較した。

【0308】

シアリル化は、120 µgの抗CD20×CD3 IGM-A抗体を1 mol/mol SAまたは21 mol/mol SA、60 µgのCMP NANA、及び20 µgのST6 (6:3:1のIGM: CMP NANA: ST6の質量比) と混合することによってのみ完了した。次いで、試料を37℃で24時間インキュベートした。

10

【0309】

ガラクトシル化とシアリル化の組み合わせは、1 µgのβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、60 µgのUDP-ガラクトース、60 µgの抗CD20×CD3 IGM-A抗体を1 mol/mol SAまたは21 mol/mol SA (60:60:1のIGM: UDP-ガラクトース: β-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼの質量比) と混合することで完了した。混合物を37℃で7時間インキュベートした。次いで、30 µgのCMP NANAと1 µgのST6を混合物に添加し、37℃で20時間インキュベートした。

20

【0310】

結果として得られたシアル酸レベルを表11に示す。

【0311】

(表11) ガラクトシル化を伴うかまたは伴わないシアリル化後のシアル酸レベル

出発物質	処理	シアル酸 (mol/mol)
抗CD20 x CD3 IGM-A 1 mol/mol SA	シアリル化のみ	44
抗CD20 x CD3 IGM-A 1 mol/mol SA	ガラクトシル化とシアリル化	65
抗CD20 x CD3 IGM-A 21 mol/mol SA	シアリル化のみ	60
抗CD20 x CD3 IGM-A 21 mol/mol SA	ガラクトシル化とシアリル化	65

30

【0312】

本開示の幅及び範囲は、上述の例示的な実施形態または実施例のうちのいずれかによって限定されるべきではないが、以下の特許請求の範囲及びそれらの均等物に従ってのみ定義されるべきである。

【0313】

(表12) 本開示中の配列

40

配列 番号	ニックネーム (出典)	配列
1	ヒトIgM 定常領域 IMGT 対立遺伝子 IGHM*03 (GenBank: pir S37768)	GSASAPTLFPLVSCENSFSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPS VLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQGTDEHVVCVQHPNGNKEKNVLPVIAELPPKVSFV VPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPT TYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFA SIFLTKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKHTHNI SESHNPATFSAVGEASI CEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSP LKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESAT ITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWN TGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
2	ヒトIgM 定常領域 IMGT 対立遺伝子 IGHM*04 (GenBank: sp P01871.4)	GSASAPTLFPLVSCENSFSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPS VLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQGTDEHVVCVQHPNGNKEKNVLPVIAELPPKVSFV VPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPT TYKVTSTLTIKESDWLQSMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFA SIFLTKSTKLTCLVTDLT TYDSVTISWTRQNGEAVKHTHNI SESHNPATFSAVGEASI CEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSP LKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESAT ITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWN TGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
3	ヒトST6Gal I、 シアリル トランス フェラーゼ 1 (GenBank: sp P15907.1)	MIHTNLKKKFSCCVLFVLLFAVICVWKEKKKGSYYDSFKLQTKFQVLKSLGKLAMGS DSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNY LSMNKYKVS YKGP GPGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFNTSEWEGYLPKESI RTKAGPWGRCAVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQDVGTKTTIRLM NSQLVTTEKRFLKDSLYNEGILIVWDP SVYHSDI PKWYQNP DYNFFNNYKTYRKLHPN QPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEI QPNPPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEF LPSKR KTDVCYYYQKF FDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC
4	ヒトB4GALT4、 ヒトβ1,4 ガラクトシル トランス フェラーゼ (GenBank: sp O60513)	MGFNLTFFHLSYKFRLLLLLTCLTVVGWATSNYFVGAIQEI PKAKEFMANFHKTLLIG KGKTLTNEASTKKVELDNCP SVSPYLRGQSKLI FKPDLTLEEVQAENPKVSRGRYRPQ ECKALQRVAILVPHRNREKHLMYLLEHLHPFLQRQQLDYGIYVIHQAEKGKFNRAKLL NVGYLEALKEENWDCFI FHDVDLV PENDINGLYKCEEHPKHLVVG RNSTGYRLRYSGYF GGVTALSREQFFKVNGFSNNYWGWGGE DDLRLRVELQRMKISRPLPEVGKYTMVFHT RDKGNEVNAERMKLLHQVSRVWRTDGLSSCSYKLVSV EHNPLYINITVDFWFGA
5	ヒトJ鎖前駆体	MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVER NIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDE DSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MVETALTPDACYPD
6	成熟ヒトJ鎖	QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLR TRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPL VYGGETK MVETALTPDACYPD
7	J鎖Y102A変異	QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLR TRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPL VYGGETK MVETALTPDACYPD
8	抗CD20 x CD3 IGM-A VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDT RYSPSFQGQVTISADKSIT TAYLQWSSLKASDTAMYYCARHPSYSGSGSPNFDYWGQGT LTVSS

10

20

30

40

50

配列番号	ニックネーム (出典)	配列
9	抗CD20 x CD3 IGM-A VL	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISN RFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCVQATQFPLTFGGGTKVEIK
10	抗DR5 IgM- B VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYT YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGDSMITTDYWGQGTTLVT VSSA
11	抗DR5 IgM- B VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYSSYRTFGQGTKVEIK
12	抗DR5 IgM- C VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLECIGHIHNSGT TYYNPSLKSrvTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGDDYYGMDVWGQGT TVTVSS
13	抗DR5 IgM- C VL	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQGISRSLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK
14	SP34 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWG QGTTLVTVSS
15	SP34 VH CDR1	GFTFNTYAMN
16	SP34 VH CDR2	ARIRSKYNNYATYYADSVKD
17	SP34 VH CDR3	VRHGNFNGNSYVSWFAY
18	SP34 VL	QAVVTQESALTTSPGETVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAP GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
19	SP34 VL CDR1	RSSTGAVTTSNYAN
20	SP34 VL CDR2	GTNKRAP
21	SP34 VL CDR3	ALWYSNL
22	A-55-VH (WO2018208864)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTTLVTVSS
23	A-55-VL (WO2018208864)	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAP GVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
24	A-55-scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL
25	A-56-VH (WO2018208864)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTTLVTVSS
26	A-56-V (WO2018208864)	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAP GVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
27	A-56-scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL
28	A-57-VH (WO2018208864)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHANFGAGYVSWFAHWG QGTTLVTVSS
29	A-57-VL (WO2018208864)	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAP GVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
30	A-57-scFv	>Adi26957_scFv EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHANFGAGYVSWFAHWG QGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLSVSPGGTVTTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVDPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL

10

20

30

40

50

配列 番号	ニックネーム (出典)	配列
31	A-55-J*	>X26955J(Y102A) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDITYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIV TATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD
32	A-56-J*	>X26956J(Y102A) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDITYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHGNFQGGYVSWFAHWG QGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIV TATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD*
33	A-57-J*	>X26957J(Y102A) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDITYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMESLRAEDTAVYYCVRHANFGAGYVSWFAHWG QGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQQTTPGQAPRGLIGGTDKRAPGVPDRFSGSLLGDKAALTITGAQAEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIV TATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD*
34	VJH (WT J)	MGWSYIILFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQ APGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCA RSAYYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCSASSSVSYMNWYQQKPKGAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSIQ PEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKC ARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCD PTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTP DACYPDGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFE DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPE LLFFAKRYKAAFTGCCAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQD SISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVVEEPQ NLIKQNCLEFLKQLGEYKFNQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
35	VJ*H (WT J)	MGWSYIILFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQ APGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCA RSAYYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCSASSSVSYMNWYQQKPKGAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSIQ PEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGQEDERIVLVDNKCKC ARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCD PTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTP DACYPDGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFE DHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPE LLFFAKRYKAAFTGCCAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKGERAF KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQD SISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVVEEPQ NLIKQNCLEFLKQLGEYKFNQALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE

10

20

30

40

50

配列番号	ニックネーム (出典)	配列
		FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
36	成熟V15J (「WT」または 野生型)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYT HYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGTILV TVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQKP GKAPKRLIYDTSKLASGVP SRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTF GGGTKEIKGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIV ERNIRIIVPLNNRENISDPTSPRLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNIC DEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD
37	成熟 V15J*	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYT HYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGTILV TVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQKP GKAPKRLIYDTSKLASGVP SRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTF GGGTKEIKGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIV ERNIRIIVPLNNRENISDPTSPRLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNIC DEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD
38	SJ*	>SJ* (S= 抗 CD3 scfv SP34) MGWSYIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILVTVSSGGGSGGGSGGGSGQAVVTQESALTTSPG ETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKA ALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGSGGGSGQEDERIV LVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPRLRTRFVYHLS DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCATYDRNKCYTAVVPLVYGGETK MOVETALTPDACYPD
39	ST6 QPCR プライマー1	GAC CGA CGT GTG CTA CTA TTA C
40	ST6 QPCR プライマー2	GAG GTG CTT CAC GAG ATT CTT
41	「5」 ペプチドリンカー	GGGGS
42	「10」 ペプチドリンカー	GGGSGGGGS
43	「15」 ペプチドリンカー	GGGSGGGSGGGGS
44	「20」 ペプチドリンカー	GGGSGGGSGGGSGGGGS
45	「25」 ペプチドリンカー	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
46	マウス IgM重鎖 定常領域 (CAC20701.1)	ASQSFNVPFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTVEVIQGIPTFP TLRTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIPAVAEMNPNVNV FVPPRDGFSGPAPRKSKLICEATNFTPKPITVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGST PQTYKVISLTITSEIDWLNLVYTCRVDHRGLTFLKNVSSSTCAASPTDILNFTIPPS FADIFLSKSNLTCLVSNLATYETLSISWASQSGEPLETKIKIMESHNGTFSAGKVA SVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDLPSPQKKFISKPNVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRES ATVTCLVKGFSPADISVQWKQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTHSILTVTEEE WNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVDKSTGKPTLYNVSLIMSDTGGTCY
47	カニクイザル 推定IgM 定常領域 配列 (EHH62210.1)	ESAGPFKWEPSVSSPNAPLDTNEVAVGCLAQDFLPDSITFSWKFKNNSDISKGVWGFP SVLRGGKYAATSQVLLASKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEQNVPLPVVAERPPNVSV FVPPRDGFVGNPRESKLICQATGFSPRQIEVSWLRDQKQVSGGITTDRVEAEAKESGP TTFKVTSTLTVSRDWLSQSVFTCRVDHRGLTFQKNVSSVCGPNPDTAIRVFAIPPSF ASIFLTSTKLTCLVTDLATYDSVTITWTRQNGEALKTHTNISESHNGTFSAVGEAS ICEDDWSGERFRCTVTHTDLPSPQKQTSRPGKGVAMHRPDVYLLPPAREQLNLRESA TITCLVTGFSPADIFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPGAPGRYFAHSILTVSEEDW NTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVILWTTTSTFVALFVLTLLY SGIVTFIKVR

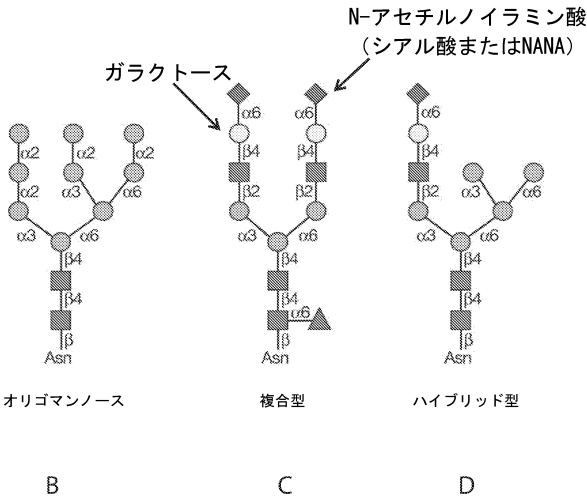
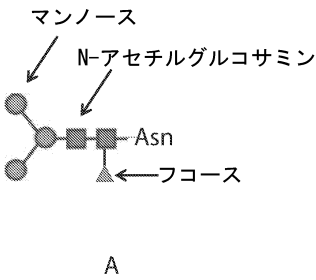
10

20

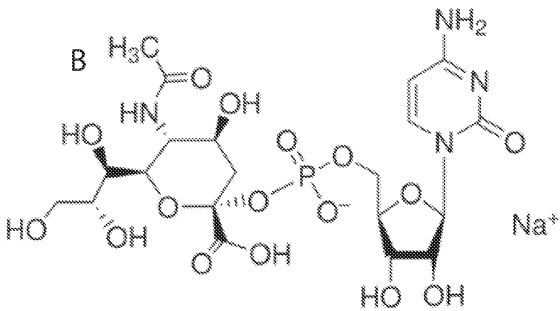
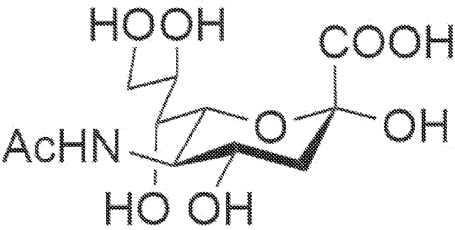
30

40

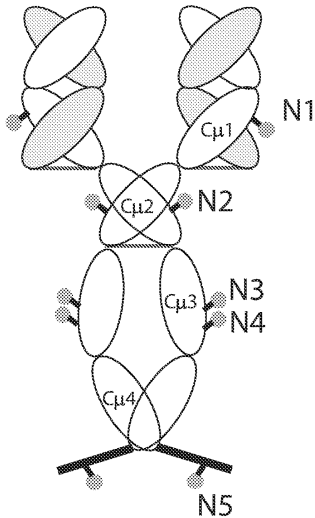
【図面】
【図 1】



【図 2】
A



【図 3 A】



テールピース
グリコシル化部位

【図 3 B】

			N1		
ヒト	GSASAPTLFPLVSCENSPDTSVAVGCLAQDFLPDSITFCWKYFNHNS	DISS-TRGFPSPV	59		
マウス	ASQSFFNVFPLVSCESPLSDNNLVAMGCLARDLPSTISFTWNYQNTFVIOGIFTEFTFL		60		
カニクイザル	ESAGPFWKPEVSYPSPNAPLDTNEVAVGCLAQDFLPDSITFCWKYFNHNS	DISKGVWGFSPV	60		
ヒト	LKGGKYAATSQVLLPSKIDVMQGTDEHVVCVKVQHPFNKNKEQNVPLPVIAELPKVSVFVFP		119		
マウス	RTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDYLVCYIHYGGKRDRLVPIPAVAEMNNVNVFVFP		120		
カニクイザル	LKGGKYAATSQVLLASKIDVMQGTDEHVVCVKVQHPFNKNKEQNVPLPVIAEERFPNVSVFVFP		120		
ヒト	RDGFFGN-PRKSKLICQATGFS	PRQIQVSWLRGKQVGS	GVTTDQVAAEAKESGPTTYKV	178	
マウス	RDGFGSPAPRKSKLICATNFTPKFITVSWLRDGLKVESGTTDPVTIENKGSTPQTYKV		180		
カニクイザル	RDGFGVN-PRKSKLICQATGFS	PRQIEVSWLRDGLKQVGS	GITTDRVEAEAKESGPTTFKV	179	
ヒト	TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRLTFQ	N2	NASPMCVDPDQTAIRVFAIPFSPASIFLT	237	
マウス	1STLTISEIDWLNLVYTCRVDHRLTFQLNVSTCAASPTDILNFTIPFSPADIFLS		239		
カニクイザル	TSTLTVSRERDWSQSVFTCRVDHRLTFQ	N2	NVSVCGSPNPDTAIRVFAIPFSPASIFLT	238	
ヒト	KSTKLTCLVTLDTYDSVTISWTRQNGEAVKTHN	N3	N4	ESHSNATFSAVGEASICEDDWS	297
マウス	KSANLTCLVSNLATYETLSISWASQSGEPLETKIKIMESH	N3	N4	NGTFSAKGVASVCVEDWNN	299
カニクイザル	KSTKLTCLVTLDTYDSVTITWTRQNGEALKTHN	N3	N4	ESHSNATFSAVGEASICEDDWS	298
ヒト	GERFCTCTVTHTDLPSPKQTI			SRPKGVAMHRPDVYLLPFAEQNLNRESATITCLVTGFS	357
マウス	PKEFVCTVTHRDLPSPQKFKISKFNKVHPPAVYLLPFAEQNLNRESATITCLVKGFS				359
カニクイザル	GERFCTCTVTHTDLPSPKQTI			SRPKGVAMHRPDVYLLPFAEQNLNRESATITCLVTGFS	358
ヒト	PADVFVQWQMGQPLSPEKYVTSAFMPPEQAPGRYFAHSILT			VSEEWNTGETYTCVVAH	416
マウス	PADISVQWQKQGLLPQEKYVTSAPMPPEQAPGRYFTHSILT			VSEEWNSGETYTCVVGH	419
カニクイザル	PADIFVQWQMGQPLSPEKYVTSAFMPPEQAPGRYFAHSILT			VSEEDWNTGETYTCVVAH	418
ヒト	EALPNKRVTEPTVDKSTGKFTLN	N5		VSFV-----MSDTAGTCY-----	452
マウス	EALPHLVTEPTVDKSTGKFTLN	N5		VSFV-----MSDTGGTCY-----	455
カニクイザル	EALPNKRVTEPTVDKSTGKFTLN	N5		VSFVILWTLTSTFVALFVTLTLLYSIGVITFKVR----	474

10

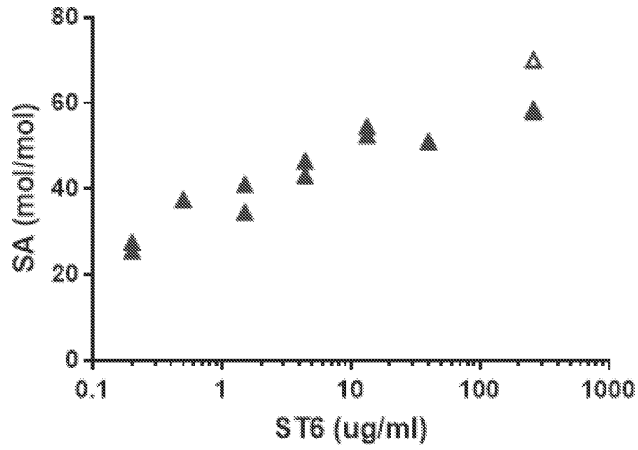
20

30

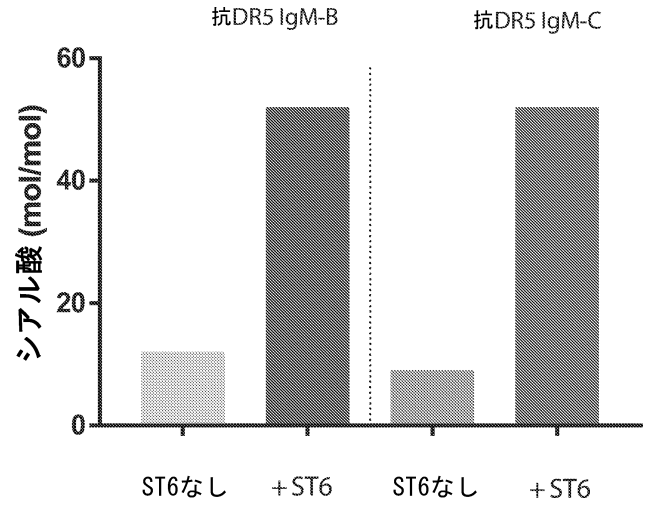
40

50

【図 4】

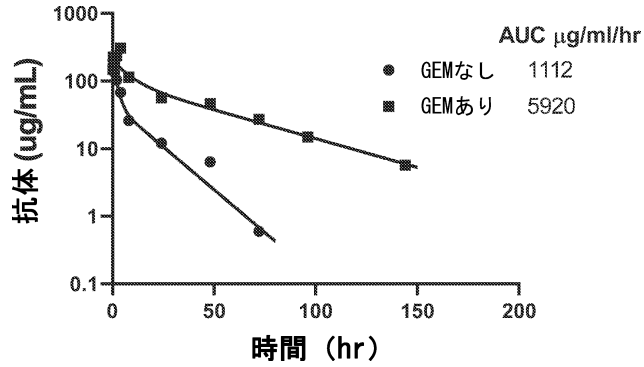


【図 5】

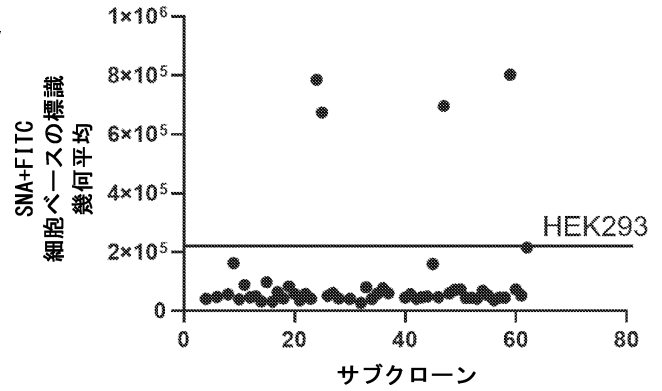


10

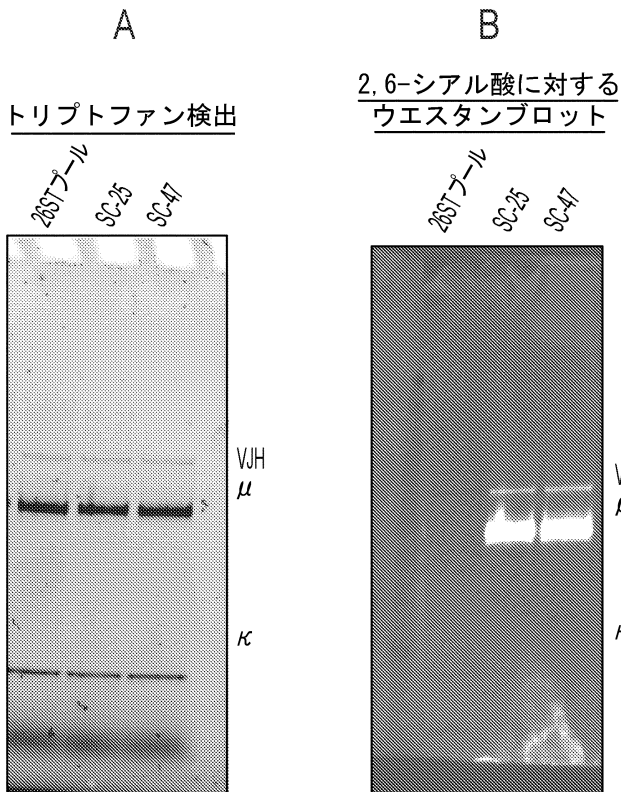
【図 6】



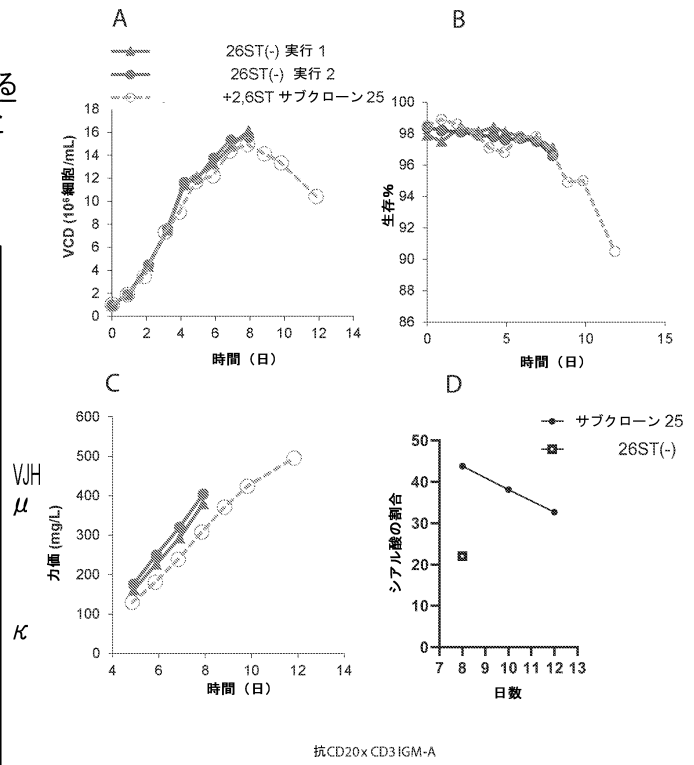
【図 7】



【図 8】



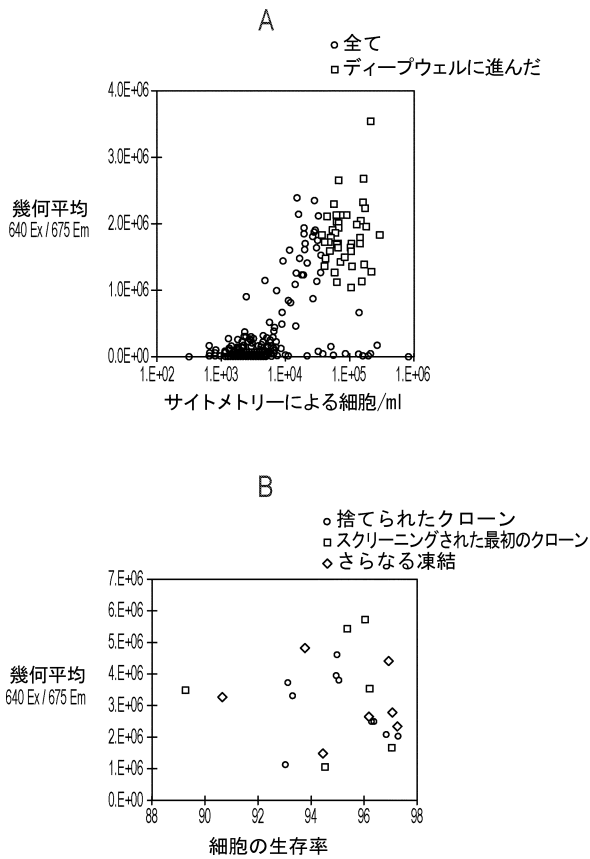
【図 9】



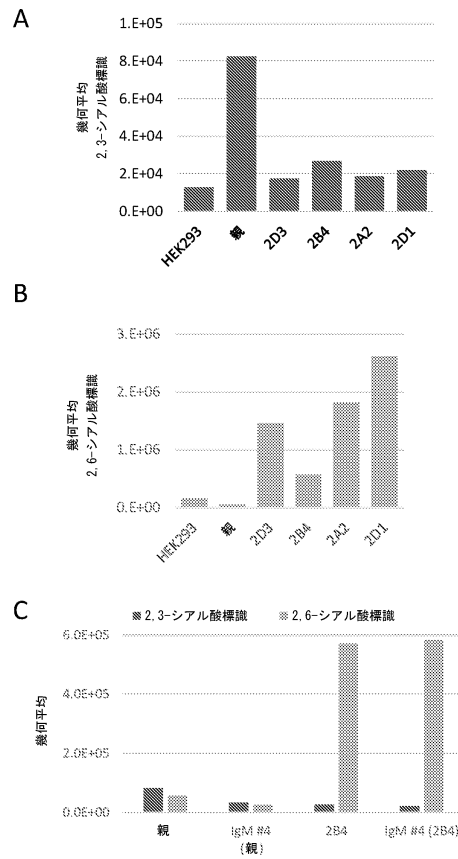
10

20

【図 10】



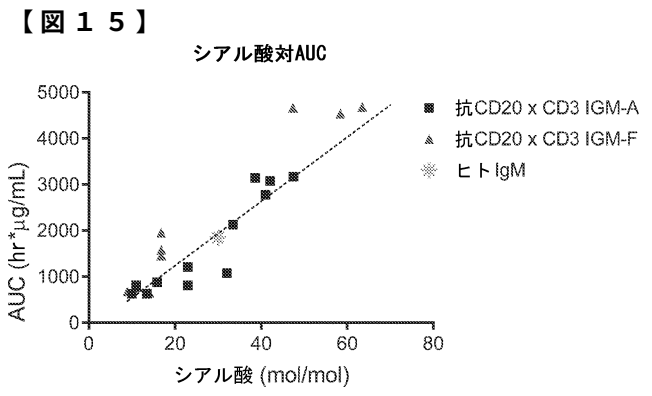
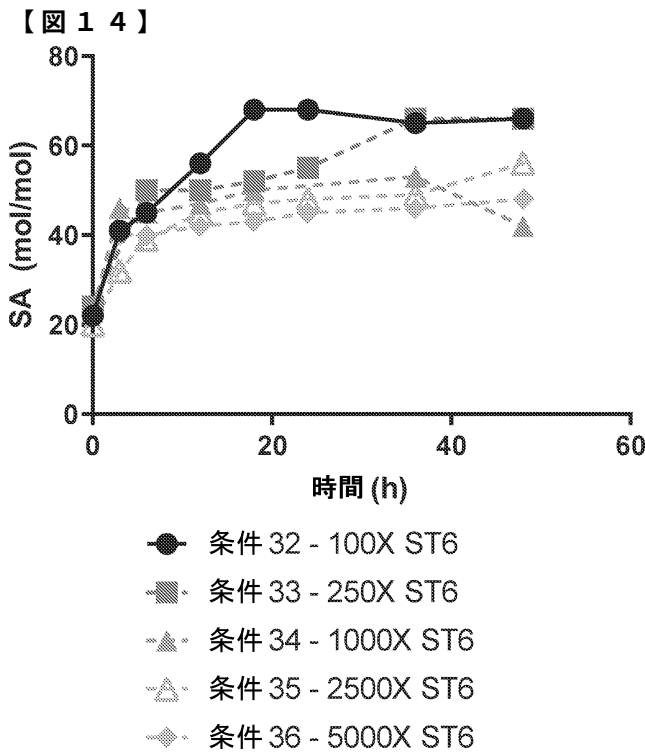
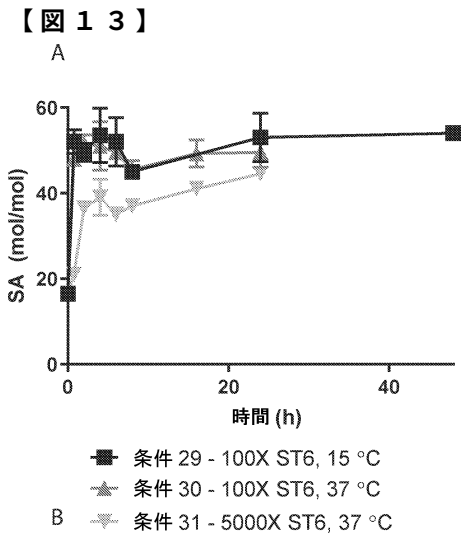
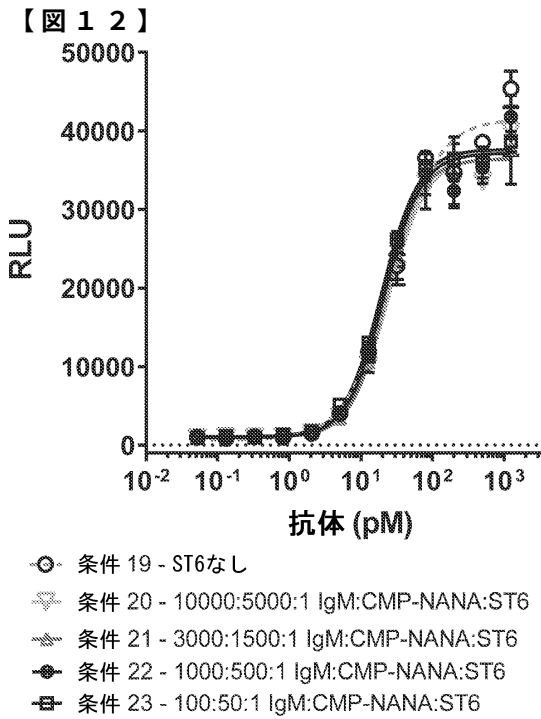
【図 11】



30

40

50



10

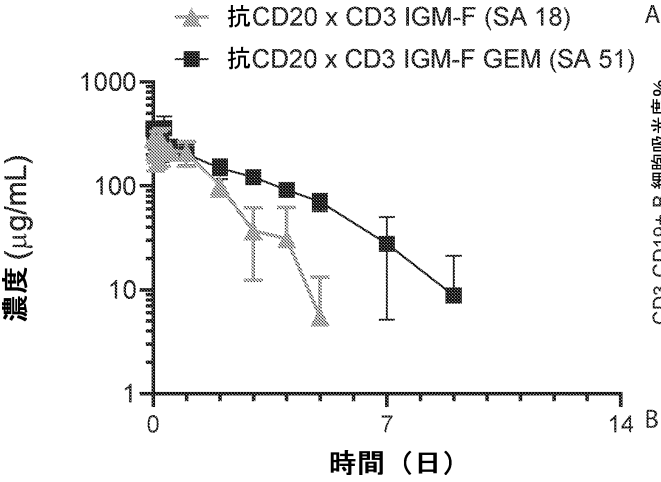
20

30

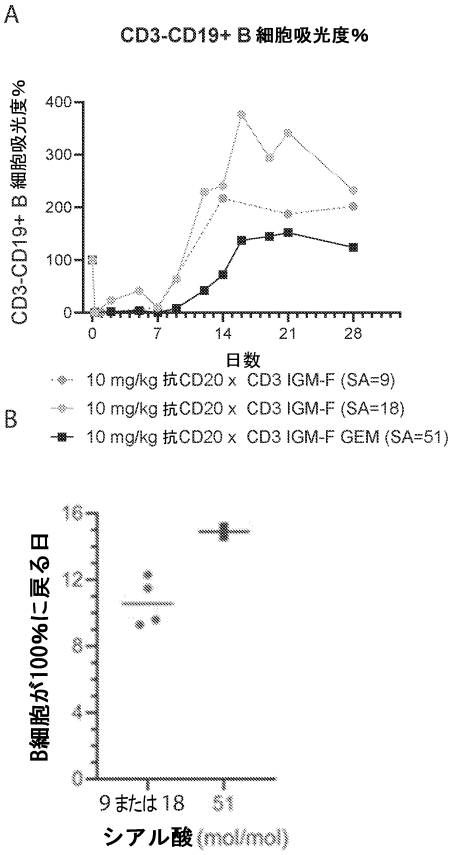
40

50

【図 1 6】



【図 1 7】



【配列表】

2023509476000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/012192
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395 (2021.01) CPC - A61K 2039/505; C07K 2317/41; C07K 2317/52 (2021.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) see Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched see Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) see Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0349662 A1 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC.) 07 December 2017 (07.12.2017) entire document	1, 2, 4, 22, 23, 25, 26
Y		3, 5-21, 27-32
Y	WQ 2019/169314 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 06 September 2019 (06.09.2019) entire document	3, 10-21, 27
Y	US 2010/0105106 A1 (RONIN et al) 29 April 2010 (29.04.2010) entire document	5-9, 28-32
A	US 2015/0166679 A1 (HIMMLER) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-23, 25-32
A	US 2019/0055546 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 21 February 2019 (21.02.2019) entire document	1-23, 25-32
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2021		Date of mailing of the international search report APR 14 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/012192

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-40 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/012192

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 キート ブルース

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

(72)発明者 バリガ ラメシュ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 2 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ホプキンズ アベニュー 2
2 3 7

(72)発明者 アフメド サチ

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

(72)発明者 カーリン ケヴィン

アメリカ合衆国 9 5 0 7 0 カリフォルニア州 サラトガ ディアパーク コート 2 0 5 3 2

(72)発明者 ヒントン ポール

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

(72)発明者 スミス マーク

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(72)発明者 サイニ アブネシュ
アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(72)発明者 トラン フェン
アメリカ合衆国 9 5 1 1 8 カリフォルニア州 サンノゼ ブーレ ドライブ 1 3 9 9
(72)発明者 ピーターソン マーヴィン
アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州 マウンテン ビュー イースト ミドルフィールド
ロード 3 2 5 アイジーエム バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
F ターム (参考) 4B050 CC04 DD11 LL01
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 BB37 CC23 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA74