



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0012576  
(43) 공개일자 2023년01월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
C12N 9/1051 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7044192
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월19일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/033150
- (87) 국제공개번호 WO 2021/236765  
국제공개일자 2021년11월25일
- (30) 우선권주장  
63/026,826 2020년05월19일 미국(US)  
63/108,741 2020년11월02일 미국(US)

- (71) 출원인  
모멘타 파머슈티컬스 인코포레이티드  
미국 뉴저지 08560 타이더스빌 토렌턴-하버턴 로  
드 1125
- (72) 발명자  
썬, 존  
미국 매사추세츠 02145 서머빌 유닛 2 다투머스  
스트리트 49
- (74) 대리인  
특허법인한성

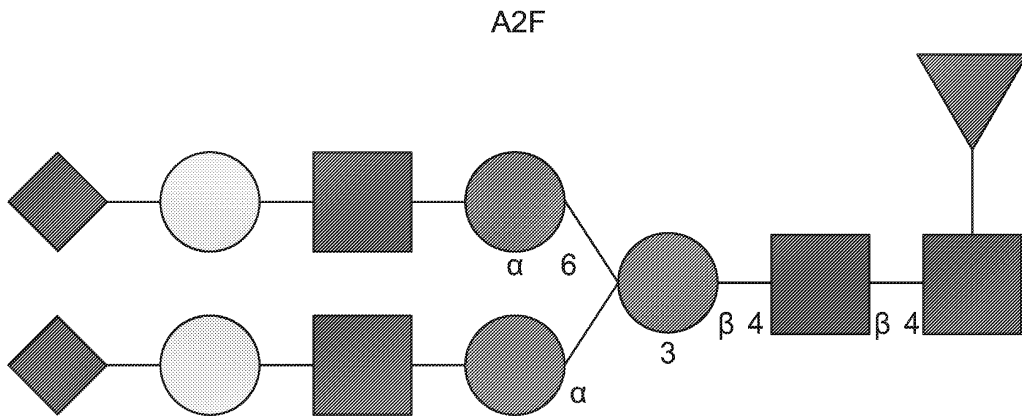
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 하이퍼-시알릴화 면역글로불린

(57) 요약

하이퍼시알릴화(hypersialylated) IgG의 제조 방법이 기재되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12P 21/005** (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하이퍼시알릴화(hypersialylated) IgG(hsIgG)의 생성 방법으로서,

(a) 폴링된 IgG 항체를 제공하는 단계;

(b)  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 폴링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, 갈락토실화된 IgG 항체를 생성하는 단계; 및

(c) ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분, CMP-NANA 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 갈락토실화된 IgG 항체를 인큐베이팅하여,

hsIgG를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 생성 방법.

#### 청구항 2

하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법으로서,

(a) 폴링된 IgG 항체를 제공하는 단계;

(b)  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분, CMP-NANA 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 폴링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, hsIgG 제제를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법.

#### 청구항 3

하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법으로서,

(a) 폴링된 IgG 항체를 제공하는 단계;

(b)  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 갈락토실화 반응 혼합물에서 상기 폴링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, 갈락토실화된 IgG 항체를 생성하는 단계;

(c) 상기 갈락토실화 반응 혼합물에 ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분 및 CMP-NANA 또는 이의 염을 첨가하여 시알릴화 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및

(d) 상기 시알릴화 반응 혼합물을 인큐베이팅하여,

hsIgG를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분은 **서열 번호 13**과 적어도 85% 동일한, 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분은 **서열 번호 19**와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 총 인큐베이션 시간은 72시간 미만인, 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물의 인큐베이션 시간은 40시간 미만인, 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 500 mM의 그리고 약 pH 5.5 내지 약 pH 8.5의 BIS-TRIS를 포함하는, 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 50 mM의 그리고 약 pH 7.3의 BIS-TRIS 완충액을 포함하는, 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 풀링된 IgG 항체는 약 pH 7.2의 BIS-TRIS 완충액을 추가로 포함하는 조성물로서 제공되는, 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 1 mM 내지 약 20 mM의  $MnCl_2$ 를 포함하는, 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 4.5 mM 내지 약 5.5 mM의  $MnCl_2$ 를 포함하는, 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 풀링된 IgG 항체 그램당 약 0.038 내지 약 0.046의 UDP-Gal 또는 이의 염을 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 IgG 항체 그램당 약 0.1425 내지 약 0.1575의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물은 인큐베이션 도중 추가의 CMP-NANA 또는 이의 염이 보충되는, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA 또는 이의 염의 총량은 약 0.1425 내지 약 0.1575인, 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 CMP-NANA의 총량은 7부 미만으로 상기 시알릴화 반응 혼합물에 첨가되는, 방법.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물은 풀링된 IgG 그램당 약 7.2 내지 약 8.8 U의 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는, 방법.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물은 폴링된 IgG 그래프당 약 17.1 내지 약 18.9 U의 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는, 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인큐베이션은 약 20℃ 내지 약 50℃에서 수행되는, 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인큐베이션은 약 37℃에서 수행되는, 방법.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IgG 항체는 적어도 1000명의 공여자로부터 단리된 IgG 항체를 포함하는, 방법.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IgG 항체의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% w/w는 IgG1 항체인, 방법.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 공여자 대상체의 적어도 90%는 바이러스에 노출되었던, 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암(arm) 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 80%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal

말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 32**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 90%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 상기 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는, 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

우선권 주장

[0002]

본 출원은 2020년 5월 19일자로 출원된 미국 임시 출원 제63/026,826호 및 2020년 11월 2일자로 출원된 미국 임시 출원 제63/108,741호의 이익을 주장한다. 상기의 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 하이퍼시알릴화 IgG의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005]

인간 공여자의 풀링된 혈장(적어도 1,000명의 공여자로부터 풀링된 혈장)으로부터 제조되는 정맥 면역글로불린(IVIg)은 다양한 면역성 장애를 치료하기 위해 사용된다. 그러나, IVIg 제제는 가변적 효능, 임상적 위험, 고비용, 및 제한된 공급과 같은 뚜렷한 한계점을 갖는다. 상이한 IVIg 제제는 흔히 임상적으로 상호교환가능한 제품으로 간주되지만, 선택된 임상 적용에서 내약성과 활성에 영향을 줄 수 있는 제제품에서 유의한 차이가 존재한다는 것이 잘 알려져 있다. 현재 최대 투여 요법에서, 단지 부분적이고 지속적이지 않은 반응만이 다수의 경우에 얻어진다. 또한, 고용량 IVIg 치료와 관련된 긴 주입 시간(4 내지 6시간)은 주입 센터에서 상당한 자원을 소모하고, 편리함 및 삶의 질과 같은 환자에서 보고된 결과에 부정적 영향을 미친다.

[0006]

Fc 도메인 시알릴화의 중요한 항염증성 역할의 확인은 보다 강력한 면역글로불린 요법을 개발하기 위한 기회를 제시했다. 시판 IVIg 제제는 일반적으로 존재하는 항체의 Fc 도메인 상에서 낮은 수준의 시알릴화를 보인다. 구체적으로, 이들은 Fc 영역 상의 분지형 글리칸의 낮은 수준의 디(di)-시알릴화를 보인다.

[0007]

문헌[Washburn et al.(*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: E1297-E1306 (2015))]은 높은 테트라-Fc-시알릴화된 IVIg를 생성하기 위한 제어된 시알릴화 방법을 설명하고, 방법이 지속적인 향상된 항염증성 활성을 갖는 생성물을 산출한다는 것을 보였다.

**발명의 내용**

[0008]

기질로서 CMP-NANA를 사용하여 ST6Gal에 의해 구동된 시알릴화 반응은 전체 디시알릴화 수준, 특정한 수준의 디시알릴화에 도달하는 시간, 특정한 전체 수준의 디시알릴화에 도달하는 데 요구된 효소 및 기질의 양으로 평가된지 여부에 관계 없이, 반응의 개선을 어렵게 한다는 특징을 갖는다. 예를 들어: (a) CMP-NANA는 완전히 안정하지 않고, 심지어 임의의 효소 부재 하에서도 자발적으로 가수분해될 것이고; (b) ST6Gal1은 분지형 글리칸 상의 Gal에 생산적 첨가 없이 CMP-NANA의 가수분해를 촉매화하는 것으로 여겨지고; (c) 효소적 첨가 또는 CMP-NANA 가수분해를 통해 발생된 부산물인 시티딘 모노포스페이트(CMP)는 ST6Gal1의 경쟁적 억제제로서 작용할 수 있고; (d) CMP는 새로 형성된 글리칸으로부터 NeuAc를 제거하기 위한 역 효소 반응을 촉매화하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 시간에 걸쳐, 부산물의 수준은 증가할 것이고, 이는 목적하는 시알릴화 반응을 늦추거나 심지어 역전시킬 수 있다.

[0009]

본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 역반응이 예를 들어 완충액으로서 MOPS인 것에 비해, 완충액으로서 BIS-TRIS일 때 훨씬 덜 바람직하다는 발견을 기초로 한다.

[0010]

따라서, 본원에 기재된 것은, (a) 풀링된 IgG 항체를 제공하는 단계; (b) β1,4-갈락토실트랜스퍼라아제

(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 풀링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, 갈락토실화된 IgG 항체를 생성하는 단계; 및 (c) ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분, CMP-NANA 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 갈락토실화된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, hsIgG를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 생성 방법이다.

- [0011] 또한, 본원에 기재된 것은, (a) 풀링된 IgG 항체를 제공하는 단계; (b)  $\beta$  1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분, CMP-NANA 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 풀링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, hsIgG 제제를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법이다.
- [0012] 또한, 본원에 기재된 것은:(a) 풀링된 IgG 항체를 제공하는 단계; (b)  $\beta$  1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT) 또는 이의 효소적 활성 부분, UDP-Gal 또는 이의 염, 비스 (2-히드록시에틸) 아미노트리스 (히드록시메틸)메탄 (BIS-TRIS) 완충액, 및  $MnCl_2$ 를 포함하는 갈락토실화 반응 혼합물에서 상기 풀링된 IgG 항체를 인큐베이팅하여, 갈락토실화된 IgG 항체를 생성하는 단계; (c) 갈락토실화 반응 혼합물에 ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분 및 CMP-NANA 또는 이의 염을 첨가하여 시알릴화 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및 (d) 시알릴화 반응 혼합물을 인큐베이팅하여, hsIgG를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)의 제조 방법이다.
- [0013] 일부 실시형태에서, B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분은 **서열 번호 13**과 적어도 85% 동일하다.
- [0014] 일부 실시형태에서, ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분은 **서열 번호 19**와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 총 인큐베이션 시간은 72시간 미만이다.
- [0016] 일부 실시형태에서, ST6Gal 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물의 인큐베이션 시간은 40시간 미만이다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 500 mM의 그리고 약 pH 5.5 내지 약 pH 8.5의 BIS-TRIS를 포함한다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 50 mM의 그리고 약 pH 7.3의 BIS-TRIS 완충액을 포함한다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 풀링된 IgG 항체는 약 pH 7.2의 BIS-TRIS 완충액을 추가로 포함하는 조성물로서 제공된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 1 mM 내지 약 20 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 각각의 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 4.5 mM 내지 약 5.5 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 풀링된 IgG 항체 그램당 약 0.038 내지 약 0.046의 UDP-Gal 또는 이의 염을 포함한다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 IgG 항체 그램당 약 0.1425 내지 약 0.1575의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물은 인큐베이션 도중 추가의 CMP-NANA 또는 이의 염이 보충된다.
- [0025] 일부 실시형태에서, CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA 또는 이의 염의 총량은 약 0.1425 내지 약 0.1575이다.
- [0026] 일부 실시형태에서, CMP-NANA의 총량은 7부 미만으로 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된다.
- [0027] 일부 실시형태에서, B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물은 풀링된 IgG 그램당 약 7.2 내지 또는 약 8.8 U의 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함한다.
- [0028] 일부 실시형태에서, ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함하는 반응 혼합물은 풀링된 IgG 그램당 약 17.1

내지 약 18.9 U의 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분을 포함한다.

- [0029] 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 약 20℃ 내지 약 50℃에서 수행된다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 약 37℃에서 수행된다.
- [0031] 일부 실시형태에서, IgG 항체는 적어도 1000명의 공여자로부터 단리된 IgG 항체를 포함한다.
- [0032] 일부 실시형태에서, IgG 항체의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% w/w는 IgG1 항체이다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 공여자 대상체의 적어도 90%는 바이러스에 노출되었다.
- [0034] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0035] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0036] 일부 실시형태에서, hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암(arm) 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0037] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 80%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0038] 일부 실시형태에서, hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0039] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0040] 일부 실시형태에서, hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0041] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 적어도 90%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0042] 일부 실시형태에서, hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0043] 본원에 또한 기재된 것은 매우 높은 수준의 Fc 시알릴화, 특히 디(di)시알릴화(Asn297(EU 넘버링)에서의 글리칸의 알파 1,3 분지 및 알파 1,6 분지 둘 모두 상에서의 시알릴화)를 갖는 면역글로불린 G(IgG)의 제조 방법이다. 본원에 기재된 방법은 Fc 도메인 상의 분지형 글리칸의 70% 초과가 두 분지 상(즉, 알파 1,3 분지 및 알파 1,6 분지)에서 모두 시알릴화되는 하이퍼시알릴화 IgG(hsIgG)를 제공할 수 있다. HsIgG는 IgG 항체, 주로 IgG1 항체의 다양한 혼합물을 함유한다. 항체의 다양성이 높다. 예를 들어 풀링된 인간 혈장(예를 들어 적어도 1,000 내지 30,000명의 공여자로부터 풀링된 혈장)으로부터 hsIgG를 제조하는 데 사용된 면역글로불린이 수득될 수 있다. 면역글로불린은 시판 IVIg를 포함하여 IVIg로부터 수득될 수 있다. HsIgG는 IVIg보다 Fc 영역 상의 분지형 글리칸 상에서 훨씬 더 높은 수준의 시알산을 갖는다. 이는 구조 및 활성 모두에서 IVIg와 상이한 조성을 유도한다. HsIgG는 국제공개 WO 2014/179601호 또는 문헌[Washburn et al(*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: E1297-E1306 (2015))]에 기재된 것과 같이 제조될 수 있으며, 이의 모두는 본원에 참조로 포함되어 있다.
- [0044] 본원에 기재된 것은 개선된 hsIgG의 제조 방법이다.
- [0045] 본원에 기재된 것은, (a) IgG 항체의 혼합물을 제공하는 단계; (b) β1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 I(B4GalT) 및 UDP-Gal을 포함하는 반응 혼합물에서 IgG 항체의 혼합물을 인큐베이팅하여 갈락토실화된 IgG 항체를 생성하는 단계; (c) ST6Gal1 및 CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물에서 갈락토실화된 IgG 항체를 인큐베이팅하는 단계를 포함하며, 여기서 갈락토실화 반응 혼합물과 시알릴화 반응 혼합물은 비스(2-히드록시에틸)아미노트리스(히드록시에틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액을 포함하여 hsIgG 제제를 생성하는, 하이퍼시알릴화(hsIgG)의 제조 방법이다.
- [0046] 또한 기재된 것은, (a) IgG 항체의 혼합물을 제공하는 단계; (b) 비스(2-히드록시에틸)아미노트리스(히드록

시메틸)메탄(BIS-TRIS) 완충액에서,  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 I(B4GalT), UDP-Gal, ST6Gal1 및 CMP-NANA를 포함하는 반응 혼합물 중 IgG 항체의 혼합물을 적어도 24시간 동안 인큐베이팅하여 hsIgG 체제를 생성하는 단계를 포함하는, 하이퍼시알릴화(hsIgG)의 제조 방법이다.

[0047] 다양한 실시형태에서: B4GalT는 **서열 번호 13**과 적어도 85% 동일하고; ST6Gal1은 **서열 번호 19**와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 단계 (b)는 적어도 8, 12, 18, 24, 30, 또는 40시간 동안 수행되고; 단계 (c)는 적어도 8, 12, 18, 24, 30, 또는 40시간 동안 수행되고; 단계 (c)는 단계 (a)의 반응 혼합물에 ST6Gal1 및 CMP-NANA를 첨가하는 것을 포함하고; 반응은 10 내지 500 mM의 그리고 pH 5.5 내지 8.5의 BIS-TRIS에서 수행되고; 반응 혼합물은 1 내지 20 mM의  $MnCl_2$ 를 포함하고; UDP-Gal은 5  $\mu$ M의 UDP-Gal/g IgG 항체로 존재하고; CMP-NANA는 5  $\mu$ M의 CMP-NANA/g IgG 항체로 존재하고; 인큐베이션은 20°C 내지 50°C에서 수행되고; 인큐베이션은 30°C 내지 45°C에서 수행되고; IgG 항체는 적어도 1000명의 공여자로부터 단리된 IgG 항체를 포함하고; IgG 항체의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% w/w는 IgG1 항체이고; 공여자 대상체의 적어도 90%는 바이러스에 노출되었고; hsIgG 제조에서 분지형 글리칸은 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는  $\alpha$ 1,3 분지 및  $\alpha$ 1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖고; hsIgG 체제 중 분지형 Fc 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는  $\alpha$ 1,3 분지 및  $\alpha$ 1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖고; Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc- $\alpha$  2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는  $\alpha$ 1,3 아암 및  $\alpha$ 1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖고; Fc 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc- $\alpha$  2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는  $\alpha$ 1,3 아암 및  $\alpha$ 1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖고; 단계 (a)에서 인큐베이션은 12 내지 30시간이고; 단계 (a)에서 인큐베이션은 20 내지 40시간이다.

[0048] 하이퍼시알릴화된 IgG에서, Fc 영역 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%(예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 94%, 95%, 97%, 98% 내지 최대 100% 포함)는 NeuAc- $\alpha$  2,6-Gal 말단 연결을 이용하여 디-시알릴화된다(즉,  $\alpha$ 1,3 분지 및  $\alpha$ 1,6 아암 둘 모두 상에서). 일부 실시형태에서, Fc 영역 상의 분지형 글리칸의 50% 미만(예를 들어, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만)는 NeuAc- $\alpha$  2,6-Gal 말단 연결을 이용하여 모노-시알릴화된다(즉,  $\alpha$ 1,3 분지 단독 또는  $\alpha$ 1,6 분지 단독 상에서 시알릴화됨).

[0049] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 혈장, 예를 들어 인간 혈장으로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드는 압도적으로 IgG 폴리펩티드(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 이의 혼합물)이지만, 미량의 다른 면역글로불린 서브클래스를 함유하는 미량의 다른 물질이 존재할 수 있다.

[0050] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 영역, 예를 들어 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 제공하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 영역(본원에서  $V_H$ 로 약칭됨), 및 경쇄(L) 가변 영역(본원에서  $V_L$ 로 약칭됨)을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 영역과 2개의 경쇄(L) 가변 영역을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, 단일 사슬 항체, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, 및 dAb 단편)뿐만 아니라 완전 항체, 예를 들어 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM형의 온전한 면역글로불린(뿐만 아니라 이의 서브유형)을 포함한다. 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 유형일 수 있다.

[0051] 본원에서 사용된 용어 "불변 영역"은 항체의 하나 이상의 불변 영역 면역글로불린 도메인에 상응하거나, 이로부터 유래된 폴리펩티드를 지칭한다. 불변 영역은 하기 면역글로불린 도메인 중 임의의 것 또는 전부를 포함할 수 있다: C<sub>H</sub>1 도메인, 힌지 영역, C<sub>H</sub>2 도메인, C<sub>H</sub>3 도메인(IgA, IgD, IgG, IgE, 또는 IgM 유래), 및 C<sub>H</sub>4 도메인(IgE 또는 IgM 유래).

[0052] 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역"은 2개의 "Fc 폴리펩티드"의 이량체를 지칭하고, 각각의 "Fc 폴리펩티드"는 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, "Fc 영역"은 하나 이상의 디설파이드 결합, 화학적 링커, 또는 펩티드 링커로 연결된 2개의 Fc 폴리펩티드를 포함한다. "Fc 폴리펩티드"는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 두 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 세 불변 영역 면역글로불린 도메인을 지칭하고, 또한 이들 도메인에 대한 가요성 힌지 N-말단 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. IgG의 경우, "Fc 폴리펩티드"는 면역글로불린 도메인 C<sub>γ</sub>2(C<sub>γ</sub>2) 및 C<sub>γ</sub>3(C<sub>γ</sub>3) 및 C<sub>γ</sub>1(C<sub>γ</sub>1) 및 C<sub>γ</sub>2 사이의 힌지의 하부 부분을 포함한다. Fc 폴리펩티드의 경계는 가변적일 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 폴리펩티드는 통상적으로 P232에서 이의 카복실-말단으로 개시되는 잔기를 포함하도록 정의되고, 여기서 넘버링은 EU 시스템(문헌[Edelman et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)])에 따른다. IgA의 경우, "Fc 폴리펩티드"는 면역글로불린 도메인 C<sub>α</sub>2(C<sub>α</sub>2) 및 C<sub>α</sub>3(C<sub>α</sub>3) 및 C<sub>α</sub>1(C<sub>α</sub>1) 및 C<sub>α</sub>2 사이의 힌지의

하부 부분을 포함한다. Fc 영역은 합성, 재조합, 또는 천연 공급원, 예컨대 IVIg로부터 발생된 것일 수 있다.

- [0053] 본원에서 사용된 "글리칸"은 당류이고, 이는 당 잔기의 단량체 또는 중합체, 예컨대 적어도 3개의 당일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. "글리칸"은 천연 당 잔기(예를 들어, 글루코오스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸 뉴라민산, 갈락토오스, 만노오스, 푸코오스, 헥소오스, 아라비노오스, 리보오스, 자일로오스 등) 및/또는 개질된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보오스, 2'-데옥시리보오스, 포스포만노오스, 6'설폰 N-아세틸글루코사민 등)을 포함할 수 있다. 용어 "글리칸"은 당 잔기의 동중중합체 및 이종중합체를 포함한다. 용어 "글리칸"은 또한 (예를 들어, 폴리펩티드, 당지질, 프로테오글리칸 등의) 글리코콘주게이트의 글리칸 성분을 포함한다. 용어는 또한 글리코콘주게이트로부터 분열되었거나 아니면 이로부터 방출된 글리칸을 포함하는 자유 글리칸을 포함한다.
- [0054] 본원에서 사용된 용어 "당단백질"은 하나 이상의 당 모이어티(즉, 글리칸)에 공유 결합된 펩티드 백본을 함유하는 단백질을 지칭한다. 당 모이어티(들)는 단당류, 이당류, 올리고당류, 및/또는 다당류 형태일 수 있다. 당 모이어티(들)는 당 잔기의 단일 미분지형 사슬을 포함할 수 있거나 하나 이상의 분지형 사슬을 포함할 수 있다. 당단백질은 0-연결된 당 모이어티 및/또는 N-연결된 당 모이어티를 함유할 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용된 "IVIg"는 적어도 1,000명의 인간 공여자의 혈장으로부터 추출된 모든 4개의 IgG 서브그룹을 포함한 풀링된, 다가 IgG의 제제이다. IVIg는 면역 결핍 환자에 대한 혈장 단백질 대체 요법으로서 승인된다. IVIg Fc 글리칸 시알틸화의 수준은 IVIg 제제 중에서 다르지만, 일반적으로 20% 미만이다. 디시알틸화의 수준은 일반적으로 20%보다 훨씬 낮다. 본원에서 사용된 용어 "IVIg 유래"는 IVIg의 조작으로부터 유도된 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, IVIg(예를 들어, 시알틸화된 IgG가 풍부) 또는 변형된 IVIg(예를 들어, 효소적으로 시알틸화된 IVIg IgG)로부터 정제된 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0056] 본원에서 사용된 "Fc 폴리펩티드의 N-글리코실화 부위"는 글리칸이 N-연결되는 Fc 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기를 지칭한다. 일부 실시형태에서, Fc 영역은 Fc 폴리펩티드의 이량체를 함유하고, Fc 영역은 각각 Fc 폴리펩티드 상에 있는 2개의 N-글리코실화 부위를 포함한다.
- [0057] 본원에서 사용된 "분지형 글리칸의 퍼센트(%)"는 존재하는 글리칸의 총 물에 대한 글리칸 X의 물수를 지칭하고, 여기서 X는 논의되는 글리칸을 나타낸다.
- [0058] 용어 "약학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"은 본원에 기재된 장애 또는 상태를 갖는 환자의 치료에 효과적인 양(예를 들어, 용량)을 지칭한다. 또한, 본원에서 "약학적 유효량"은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 1회 용량 또는 임의의 투여량 또는 경로로 취해진, 목적하는 치료 효과를 제공하는 양으로 해석될 수 있다고 이해되어야 한다.
- [0059] "약학적 제제" 및 "약학적 제품"은 제제 또는 제품 및 사용 지침서를 함유하는 키트에 포함될 수 있다.
- [0060] "약학적 제제" 및 "약학적 제품"은 일반적으로 최종 사진결정된 수준의 시알틸화가 달성되었고, 공정 불순물을 갖지 않는 조성물을 지칭한다. 이를 위해, "약학적 제제" 및 "약학적 제품"은 ST6Gal1 및/또는 시알산 공여자(예를 들어, 시티딘 5'-모노포스포-N-아세틸 뉴라민산) 또는 이의 부산물(예를 들어, 시티딘 5'-모노포스페이트)을 실질적으로 갖지 않는다.
- [0061] "약학적 제제" 및 "약학적 제품"은 일반적으로 재조합인 경우, 당단백질이 제조된(예를 들어, 소포체 또는 세포질 단백질 및 RNA) 세포의 다른 성분을 실질적으로 갖지 않는다.
- [0062] "정제된"(또는 "단리된")이란 천연 환경에서 존재하는 다른 성분으로부터 제거되거나 분리되는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 단리된 폴리펩티드는 이것이 제조된(예를 들어, 소포체 또는 세포질 단백질 및 RNA) 세포의 다른 성분으로부터 분리되는 것이다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 다른 핵 성분(예를 들어, 히스톤) 및/또는 업스트림 또는 다운스트림 핵산으로부터 분리되는 것이다. 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제시된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 천연 환경에 존재하는 다른 성분을 적어도 60%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 갖지 않을 수 있다.
- [0063] 본원에서 사용된 용어 "시알틸화된"은 말단 시알산을 갖는 글리칸을 지칭한다. 용어 "모노-시알틸화된"은 예를 들어 α1,3 분지 또는 α1,6 분지 상에 하나의 말단 시알산을 갖는 분지형 글리칸을 지칭한다. 용어 "디-시알틸화된"은 두 아암, 예를 들어 α1,3 아암 또는 α1,6 아암 둘 모두 상에 말단 시알산을 갖는 분지형 글리칸을 지칭한다.

**도면의 간단한 설명**

[0064]

도 1은 2개의 N-아세틸글루코사민 및 3개의 만노오스 잔기를 포함하는 짧은, 분지형 코어 올리고당류를 보여준다. 분지 중 하나는 당업계에서 "α1,3 아암"으로 지칭되고, 두번째 분지는 "α1,6 아암"으로 지칭된다. 사각형: N-아세틸글루코사민; 진회색 원: 만노오스; 연회색 원: 갈락토오스; 다이아몬드: N-아세틸뉴라민산; 삼각형: 푸코오스.

도 2는 IVIg에 존재하는 일반적인 Fc 글리칸을 보여준다. 사각형: N-아세틸글루코사민; 진회색 원: 만노오스; 연회색 원: 갈락토오스; 다이아몬드: N-아세틸뉴라민산; 삼각형: 푸코오스.

도 3은 면역글로불린, 예를 들어 IgG 항체가 어떻게 갈락토실화 단계 이후 시알릴화 단계를 수행함으로써 시알릴화될 수 있는지를 보여준다. 사각형: N-아세틸글루코사민; 진회색 원: 만노오스; 연회색 원: 갈락토오스; 다이아몬드: N-아세틸뉴라민산; 삼각형: 푸코오스.

도 4는 IVIg와 개시되는 반응에 대한 IgG-Fc 글리칸 프로파일의 대표적 예의 반응 생성물을 보여준다. 좌측 패널은 IgG를 hsIgG로 변형시키기 위한 효소적 시알릴화 반응의 개략도이고; 우측 패널은 개시 IVIg 및 hsIgG에 대한 IgG Fc 글리칸 프로파일이다. 좌측에서부터 우측의 막대는 각각 IgG1, IgG2/3, 및 IgG3/4에 해당한다.

도 5는 다양한 pH에서 다양한 완충액과 Fc 함유 단백질의 시알릴화 결과로서 A2F 형성 수준을 보여준다.

도 6은 다양한 pH에서 다양한 완충액과 Fc 함유 단백질의 시알릴화 결과로서 1,6-A1F 형성 수준을 보여준다.

도 7a는 IVIg의 시알릴화 및 갈락토실화에 대한 높은 MnCl<sub>2</sub> 농도의 효과를 보여준다. 좌측에서부터 우측의 막대는 G1F+NeuAc; G1+NeuAc이다.

도 7b는 IVIg의 시알릴화 및 갈락토실화에 대한 높은 MnCl<sub>2</sub> 농도의 효과를 보여준다. 좌측에서부터 우측의 막대는 5 mM; 10 mM; 20 mM; 40 mM; 61 mM이다.

도 8은 IVIg의 다시알릴화에 대한 높은 MnCl<sub>2</sub> 농도의 효과를 보여준다.

도 9는 IVIg의 갈락토실화에 대한 10 mM 이하의 MnCl<sub>2</sub> 농도의 효과를 보여준다(MnCl<sub>2</sub> 농도로 그룹핑됨).

도 10은 시간에 의해 그룹핑된 IVIg의 갈락토실화에 대한 10 mM 이하의 MnCl<sub>2</sub> 농도의 효과를 보여준다.

도 11은 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG1 갈락토실화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 12는 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG1 시알릴화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 13은 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG2/3 갈락토실화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 14는 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG2/3 시알릴화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 15는 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG3/4 갈락토실화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 16은 글리코펩티드 LCMS에 의한 IgG3/4 시알릴화에 대한 염의 효과를 보여준다.

도 17은 UDP-Gal에서 UMP 및 UDP로의 전환에 대한 스킴을 보여준다.

도 18은 UDP-Gal의 비특이적 분해가 IVIg의 갈락토실화에서 검출될 수 있다는 것을 입증한다.

도 19는 UDP-Gal의 비특이적 분해가 IVIg의 갈락토실화에서 검출될 수 있다는 것을 입증한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0065]

항체는 Fab 도메인 상에서 이의 중쇄의 불변 영역의 보존된 위치에서 글리코실화된다. 예를 들어, 인간 IgG 항체는 CH2 도메인의 Asn297에서 단일 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는다. 각각의 항체 이소타입은 불변 영역에서 별도의 다양한 N-연결된 탄수화물 구조를 갖는다. 인간 IgG의 경우, 코어 올리고당류는 일반적으로 GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc로 이루어지고, 이때 외부 잔기의 개수는 상이하다. 개별 IgG 중 변이는 하나 또는 두 개의 말단 GlcNAc에서의 갈락토오스 및/또는 갈락토오스-시알산의 부착을 통해 또는 세번째 GlcNAc 아암(GlcNAc 이등분)의 부착을 통해 발생할 수 있다.

[0066]

본 개시내용은 (예를 들어, NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 갖는) 분지형 글리칸의 두 아암 상에서 시알릴화되는

특정 수준의 분지형 글리칸을 갖는 Fc 영역을 갖는 면역글로불린(예를 들어, 인간 IgG)의 제조 방법을 부분적으로 포함한다. 수준은 개별 Fc 영역 상에서 측정될 수 있거나(예를 들어, Fc 영역의 분지형 글리칸의  $\alpha 1,3$  아암,  $\alpha 1,6$  아암, 또는 이 둘 모두 상에서 시알릴화되는 분지형 글리칸의 개수), 폴리펩티드의 제조에서 전체 조성에 대해 측정될 수 있다(예를 들어, 폴리펩티드의 제조에서 Fc 영역에서 분지형 글리칸의  $\alpha 1,3$  아암,  $\alpha 1,6$  아암, 또는 이 둘 모두 상에서 시알릴화되는 분지형 글리칸의 개수 또는 백분율).

[0067] 하이퍼시알릴화된 IgG를 제조하는 데 사용될 수 있는 천연 유래 폴리펩티드는 예를 들어, 인간 혈청(1,000명 초과)의 공여자로부터 풀링된 특정 인간 혈청) 중 IgG, 정맥 면역글로불린(IVIg) 및 IVIg 유래 폴리펩티드(예를 들어, IVIg로부터 정제된 폴리펩티드(예를 들어, 시알릴화된 IgG가 풍부함)) 또는 변형된 IVIg(예를 들어, 효소적으로 시알릴화된 IVIg IgG)를 포함한다.

[0068] N-연결된 올리고당류 사슬은 소포체의 내강의 단백질에 첨가된다. 구체적으로, 초기 올리고당류(전형적으로, 14-당)는 Asn-X-Ser/Thr의 표적 컨센서스 서열 내에 함유된 아스파라긴 잔기의 측쇄 상의 아미노기에 첨가되고, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. 이러한 초기 올리고당류의 구조는 대부분의 진핵생물에 공통적이고, 3개의 글루코오스, 9개의 만노오스, 및 2개의 N-아세틸글루코사민 잔기를 함유한다. 이러한 초기 올리고당류 사슬은 소포체의 특정 글리코시다아제 효소에 의해 불필요한 부분을 절단하여, 2개의 N-아세틸글루코사민과 3개의 만노오스 잔기로 구성된 짧은, 분지형 코어 올리고당류를 유도할 수 있다. 분지 중 하나는 도 1에 나타난 바와 같이 당업계에서 " $\alpha 1,3$  아암"으로 지칭되고, 두번째 분지는 " $\alpha 1,6$  아암"으로 지칭된다.

[0069] N-글리칸은 "고 만노오스 유형", "혼성 유형", 및 "복합 유형"으로 지칭된 3개의 개별 그룹으로 하위분류될 수 있고, 이때 공통적인 5당류 코어(Man ( $\alpha 1,6$ )-(Man ( $\alpha 1,3$ ))-Man ( $\beta 1,4$ )-GlcNAc ( $\beta 1,4$ )-GlcNAc ( $\beta 1,N$ )-Asn)가 모든 3개의 그룹에서 발생한다.

[0070] 보다 공통적인 Fc 글리칸이 IVIg에 존재하고, 도 2에 나타나 있다.

[0071] 부가적으로 또는 대안적으로, N-아세틸글루코사민의 하나 이상의 단당류 단위는 "복합 글리칸"을 형성하기 위해 코어 만노오스 서브단위에 첨가될 수 있다. 갈락토오스는 N-아세틸글루코사민 서브단위에 첨가될 수 있고, 시알산 서브단위는 갈락토오스 서브단위에 첨가될 수 있어, 임의의 시알산, 갈락토오스 또는 N-아세틸글루코사민 잔기로 말단화되는 사슬을 유도한다. 부가적으로, 푸코오스 잔기는 코어 올리고당류의 N-아세틸글루코사민 잔기에 첨가될 수 있다. 각각의 이들 첨가는 특정 글리코실 트랜스퍼라아제에 의해 촉매화된다.

[0072] "혼성 글리칸"은 고-만노오스 및 복합 글리칸 둘 모두의 특징을 포함한다. 예를 들어, 혼성 글리칸의 하나의 분지는 주로 또는 독점적으로 만노오스 잔기를 포함할 수 있지만, 다른 분지는 N-아세틸글루코사민, 시알산, 갈락토오스, 및/또는 푸코오스 당을 포함할 수 있다.

[0073] 시알산은 헤테로시클릭 고리 구조를 갖는 9-탄소 단당류의 부류이다. 이들은 고리에 부착된 카르복실산기를 통한 음전하를 가질 뿐 아니라 N-아세틸 및 N-글리콜릴기를 포함한 다른 화학적 데코레이션을 갖는다. 포유동물 발현 시스템에서 생성된 폴리펩티드에서 확인된 시알산 잔기의 2가지 주요 유형은 N-아세틸-뉴라민산(NeuAc) 및 N-글리콜릴뉴라민산(NeuGc)이다. 이들은 통상적으로 N-연결된 글리칸 및 O-연결된 글리칸의 비-환원 말단에서 갈락토오스(Gal) 잔기에 부착된 말단 구조로서 발생한다. 이들 시알산기에 대한 글리코시드 연결 배치는  $\alpha 2,3$  또는  $\alpha 2,6$ 일 수 있다.

[0074] Fc 영역은 보존된, N-연결된 글리코실화 부위에서 글리코실화된다. 예를 들어, IgG 항체의 각각의 중쇄는 CH2 도메인의 Asn297에서 단일 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는다. IgA 항체는 CH2 및 CH3 도메인 내에 N-연결된 글리코실화 부위를 갖고, IgE 항체는 CH3 도메인 내에 N-연결된 글리코실화 부위를 갖고, IgM 항체는 CH1, CH2, CH3, 및 CH4 도메인 내에 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는다.

[0075] 각각의 항체 이소타입은 불변 영역에서 별도의 다양한 N-연결된 탄수화물 구조를 갖는다. 예를 들어, IgG는 Fc 영역의 각각의 Fc 폴리펩티드의 CH2 도메인의 Asn297에서 단일 N-연결된 바이안테너리(biantennary) 탄수화물을 갖고, 이는 또한 C1q 및 Fc $\gamma$ R에 대한 결합 부위를 함유한다. 인간 IgG의 경우, 코어 올리고당류는 일반적으로 GlcNAc2Man3GlcNAc로 이루어지고, 이때 외부 잔기의 개수는 상이하다. 개별 IgG 중 변이는 하나 또는 두 개의 말단 GlcNAc에서의 갈락토오스 및/또는 갈락토오스-시알산의 부착을 통해 또는 세번째 GlcNAc 아암(GlcNAc 이등분)의 부착을 통해 발생할 수 있다.

[0076] 면역글로불린, 예를 들어 IgG 항체는 갈락토실화 단계 이후 시알릴화 단계를 수행함으로써 시알릴화될 수 있다. 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 1(B4GalT)은 유리된 5'-디포스포오스갈락토오스([[(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-디옥

소피리미딘-1-일)-3,4-디히드록시옥솔란-2-일]메톡시-히드록시포스포릴][(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-트리히드록시-6-(히드록시메틸)옥산-2-일] 히드로겐 포스페이트; UDP-Gal)로부터의 갈락토오스를 GlcNAc에 β-1,4 연결로서 이동시키는 II형 골지막-결합 당단백질이다. 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 1(ST6)은 시티딘 5'-모노포스포-N-아세틸뉴라민산 ((2R,4S,5R,6R)-5-아세트아미도-2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-아미노-2-옥소피리미딘-1-일)-3,4-디히드록시옥솔란-2-일]메톡시-히드록시포스포릴]옥시-4-히드록시-6-(1,2,3-트리히드록시프로필)옥산-2-카르복실산; CMP-NANA 또는 CMP-시알산)으로부터의 시알산을 Gal에 α-2,6 연결로서 이동시키는 II형 골지막-결합 당단백질이다. 도식으로서, 반응 진행은 도 3에 나타나 있다.

[0077] 폴리펩티드의 글리칸은 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 글리칸 조성물의 시알릴화(예를 들어, α1,3 분지 및/또는 α1,6 분지 상에서 시알릴화되는 분지형 글리칸의 수준)는 국제공개 WO 2014/179601호에 기재된 방법을 사용하여 특징화될 수 있다.

[0078] 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 hsIgG 조성물의 일부 실시형태에서, Fc 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다. 또한, 일부 실시형태에서, Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다. 종합적으로, 일부 실시형태에서, 분지형 글리칸의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.

[0079] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 hsIgG 조성물은, Fc 도메인 상의 분지형 글리칸의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%를 포함하고, 이는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.

[0080] **효소**

[0081] 효소 활성

[0082] 본원에 기재된 바와 같이, 1 U의 B4GalT B4GalT는 분당 UDP-Gal로부터의 Gal에서 GlcNAc로의 이동에 의한 1 nmol의 Gal-GlcNAc(LacNAc로도 지칭됨)의 형성과 동일하다. 효소

[0083] 본원에 기재된 바와 같이, 1 U의 ST6Gal1은 분당 CMP-NANA로부터의 NeuAc에서 Gal-GlcNAc(LacNAc)로의 이동에 의한 1 nmol의 NeuAc-Gal-GlcNAc(Sa-LacNAc로도 지칭됨)의 형성과 동일하다.

[0084] 갈락토실화 효소

[0085] 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT), 예를 들어 인간 B4GalT, 예를 들어 인간 B4GalT1뿐만 아니라 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(B4GalT), 예를 들어 인간 B4GalT, 예를 들어 인간 B4GalT1의 효소적 활성 부분을 포함하는 동원체(ortholog), 돌연변이체, 및 이의 변이체뿐만 아니라 이를 포함하는 융합 단백질 및 폴리펩티드와 동원체, 돌연변이체, 및 이의 변이체는 본원에 기재된 방법에서 사용하기에 적합하다. 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 1(B4GalT)은 우리딘 5'-디포스포옥소갈락토오스(UDP-Gal)로부터의 갈락토오스를 GlcNAc에 β-1,4 연결로서 이동시키는 II형 골지막-결합 당단백질이다. B4GalT1은 공여자 기질 UDP-갈락토오스에 대해 특이적인 특이성을 갖는 것으로 나타난 II형 막-결합 당단백질을 각각 인코딩하는 7가지의 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제(베타4GalT) 유전자 중 하나이고; 모든 갈락토오스는 베타1,4 연결로 유사한 수용체 당: GlcNAc, Glc, 및 Xyl에 이동한다. B4GalT1은 당단백질 탄수화물 사슬의 비환원 말단 또는 단당류인 N-아세틸글루코사민 잔기에 갈락토오스를 첨가한다. B4GalT1은 GGTB2로도 지칭된다. B4GALT1(NCBI 유전자 ID 2683)의 4개의 이소폼을 인코딩하는 4개의 대안의 전사체가 표 1에 기재되어 있다.

[0086] [표 1]

인간 B4GALT1 이소폼

전사체	길이(nt)	단백질	서열 번호	길이(aa)	이소폼
NM_001497.4	4176	NP_001488.2	서열 번호 5	398	1
NM_001378495.1	3999	NP_001365424.1	서열 번호 6	385	2
NM_001378496.1	4053	NP_001365425.1	서열 번호 7	357	3
NM_001378497.1	1520	NP_001365426.1	서열 번호 8	225	4

[0087]

[0088] [표 2]

B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5)의 토폴로지

특징	AA	설명	길이	서열	서열 번호
토폴로지 도메인	1 내지 24	세포질	9	MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACR	서열 번호 9
트랜스막	25 내지 44	나선형: II 형 막 단백질에 대한 신호-앵커(Signal-anchor)	17	LLVAVCALHLGVTLVYYLAG	서열 번호 10
토폴로지 도메인	45 내지 398	내강	380	RDL SRLPQLVGVSTPLQGGNSAA AIGQSSGELRTGGARPPPLGASSQ PRPGGDSSPVVDSGPGASNLTSPV VPHTTALSLPACPEESPLLVGMLIE FNMPVDLELVAKQNPVVKMGGRY APRDCVSPHKVAIIPFRNRQEHLK YWLYYLHPVLQRQQLDYGIYVINQ AGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYD YTCFVSDVDLIPMNDHNA YRCFS QPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGG VSALSKQQLTINGFPNNYWGWWG EDDDIFNRLVFRGMSISRPNVAVGR CRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHT KETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPL YTQITVDIGTPS	서열 번호 11

[0089]

[0090] [표 3]

B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5)의 결합 부위

위치(들)	설명	참조문헌(들)
250	금속 결합; 망간	
310	결합 부위; UDP-알파-D-갈락토오스	문헌["Structural snapshots of beta-1,4-galactosyltransferase-I along the kinetic pathway." Ramakrishnan B., Ramasamy V., Qasba P.K. J. Mol. Biol. 357:1619-1633(2006)]
343	금속 결합; 망간; tele 질소를 통합	
355	결합 부위; N-아세틸-D-글루코사민	문헌["Oligosaccharide preferences of beta1,4-galactosyltransferase-I: crystal structures of Met340His mutant of human beta1,4-galactosyltransferase-I with a pentasaccharide and trisaccharides of the N-glycan moiety." Ramasamy V., Ramakrishnan B., Boeggeman E., Ratner D.M., Seeberger P.H., Qasba P.K. J. Mol. Biol. 353:53-67(2005)] 문헌["Deoxygenated disaccharide analogs as specific inhibitors of beta1-4-galactosyltransferase 1 and selectin-mediated tumor metastasis." Brown J.R., Yang F., Sinha A., Ramakrishnan B., Tor Y., Qasba P.K., Esko J.D. J. Biol. Chem. 284:4952-4959(2009)]

[0091]

[0092] [표 4]

B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5)의 번역후 아미노산 변형

주요 특징	위치(들)	설명	참조문헌(들)
글리코실화	113	N-연결된(GlcNAc...) 아스파라긴	
디설파이드 결합	130 ↔ 172		문헌["Oligosaccharide preferences of beta1,4-galactosyltransferase-I: crystal structures of Met340His mutant of human beta1,4-galactosyltransferase-I with a pentasaccharide and trisaccharides of the N-glycan moiety." Ramasamy V., Ramakrishnan B., Boeggeman E., Ratner D.M., Seeberger P.H., Qasba P.K. J. Mol. Biol. 353:53-67(2005)] 문헌["Structural snapshots of beta-1,4-galactosyltransferase-I along the kinetic pathway." Ramakrishnan B., Ramasamy V., Qasba P.K. J. Mol. Biol. 357:1619-1633(2006)]
디설파이드 결합	243 ↔ 262		

[0093]

[0094] B4GalT1의 가용성 형태는 단백질을 가공에 의해 막 형태로부터 유래된다. 절단 부위는 B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5)의 위치 77 내지 78이다.

[0095] 일부 실시형태에서, B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5)의 아미노산 113, 130, 172, 243, 250, 262, 310, 343, 또는 355에 상응하는 B4GalT1의 하나 이상의 아미노산은 (서열 번호 5)와 비교하여 보존된다.

[0096] 일부 실시형태에서, 효소는 예를 들어 B4GalT1의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 B4GALT1 이소폼 1(서열 번호 5), 또는 서열 번호 5의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 B4GALT1 이소폼 2(서열 번호 6), 또는 서열 번호 6의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 B4GALT1 이소폼 3(서열 번호 7), 또는 서열 번호 7의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 B4GALT1 이소폼 4(서열 번호 8), 또는 서열 번호 8의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다.

[0097] 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 세포질 도메인, 예를 들어 서열 번호 9를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 트랜스막 도메인, 예를 들어 서열 번호 10을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 세포질 도메인, 예를 들어 서열 번호 9 또는 트랜스막 도메인, 예를 들어 서열 번호 10을 포함하지 않는다.

[0098] 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 내강 도메인, 예를 들어 서열 번호 11, 또는 이의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0099] 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 서열 번호 5, 또는 이의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 아미노산 109 내지 398을 포함한다. 일부 실시형태에서, B4GalT1의 효소적 활성 부분은 서열 번호 5, 또는 서열 번호 5의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체로 이루어진다.

[0100] B4GalT1의 적합한 기능적 부분은 서열 번호 12와 적어도 80%(85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%)인 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다.

[0101] 또한 본원에 기재된 방법에서 사용하기에 적합한 것은 서열 번호 13과 적어도 80%(85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%) 동일한 아미노산을 포함하거나 이로 이루어지는 아미노산 서열이다.

[0102] 시알릴화 효소

[0103] ST6, 예를 들어 ST6Gal1, 예를 들어 인간 ST6Gal1뿐만 아니라 ST6Gal1, 예를 들어 인간 ST6Gal1의 효소적 활성 부분을 포함하는 동원체, 돌연변이체, 및 이의 변이체뿐만 아니라 이를 포함하는 융합 단백질 및 폴리펩티드와 동원체, 돌연변이체, 및 이의 변이체는 본원에 기재된 방법에서 사용하기에 적합하다. 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라아제 1(ST6)은 시티딘 5'-모노포스포-N-아세틸뉴라민산(CMP-NANA)으로부터의 시알산에서 Gal에 α-2,6 연결로서 이동시키는 II형 골지막-결합 당단백질이다. ST6Gal1은 ST6N 또는 SIAT1로도 지칭된다. ST6GAL1(NCBI 유전자 ID 6480)의 2개의 이소폼을 인코딩하는 4개의 대안의 전사체가 표 1에 기재되어 있다.

[0104] [표 1]

인간 ST6GAL1 이소폼

전사체	길이(nt)	단백질	서열 번호	길이(aa)	이소폼
NM_173216.2	4604	NP_775323.1	서열 번호 14	406	a
NM_173217.2	3947	NP_775324.1	서열 번호 15	175	b
NM_003032.3	4303	NP_003023.1	서열 번호 14	406	a
NM_001353916.2	4177	NP_001340845.1	서열 번호 14	406	a

[0105]

[0106] [표 2]

ST6Gal1 이소폼 a(서열 번호 14)의 토폴로지

특징	AA	설명	길이	서열	서열 번호
토폴로지 도메인	1 내지 9	세포질	9	MIHTNLKKK	서열 번호 16
트랜스막	10 내지 26	나선형; II 형 막 단백질에 대한 신호-앵커	17	FSCCVLVFLLFAVICVW	서열 번호 17
토폴로지 도메인	27 내지 406	내강	380	KEKKKGSYYDSFKLQTKFQVLKSLGKLA MGSDSQSVSSSTQDPHRGRQTLGSLRGL AKAKPEASFQVWNKSSSKNLIPRLQKIW KNYLSMNKYKVSYKGGPGIKFSAEALRC HLRDHVNVMVEVTDFPNTSEWEGYLPK ESIRTKAGPWGRCAVSSAGSLKSSQLGR EIDDHDAVLRFNAGAPTANFQQDVGTKTTI RLMNSQLVTTTEKRFKDSLYNEGILIVWDP SVYHSDIPKWYQNPDYNFNNYKTYRKLH PNQPFYILKPMPWELWDILQEISPEEIQPN PPSSGMLGHMMTLCDQVDIYEFLPSKRKT DVCYYYQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNL VKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTHC	서열 번호 18

[0107]

[0108] [표 3]

ST6Gal1 이소폼 a(서열 번호 14)의 결합 부위

위치(들)	설명	참조문헌(들)
189	기질: 아미드 질소를 통합	문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
212	기질	
233	기질	
353	기질: 카르보닐 산소를 통합	
354	기질	
365	기질	
369	기질	
370	기질	문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
376	기질	

[0109]

[0110] [표 4]

ST6Gal1 이소폼 a(서열 번호 14)의 번역후 아미노산 변형

주요 특징	위치(들)	설명	참조문헌(들)
디설파이드 결합	142 ↔ 406		문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
글리코실화	149	N-연결된(GlcNAc...) 아스파라긴	문헌["Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry." Chen R., Jiang X., Sun D., Han G., Wang F., Ye M., Wang L., Zou H. J. Proteome Res. 8:651-661(2009); 및 문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
글리코실화	161	N-연결된(GlcNAc...) 아스파라긴	문헌["Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry." Chen R., Jiang X., Sun D., Han G., Wang F., Ye M., Wang L., Zou H. J. Proteome Res. 8:651-661(2009);
디설파이드 결합	184 ↔ 335		문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
디설파이드 결합	353 ↔ 364		문헌["The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans." Kuhn B., Benz J., Greif M., Engel A.M., Sobek H., Rudolph M.G. Acta Crystallogr. D 69:1826-1838(2013)]
변형된 잔기	369	포스포티로신	문헌["Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions." Mayya V., Lundgren D.H., Hwang S.-I., Rezaul K., Wu L., Eng J.K., Rodionov V., Han D.K. Sci. Signal. 2: RA46-RA46(2009)]

[0111]

[0112] ST6Gal1의 가용성 형태는 단백질을 가공에 의해 막 형태로부터 유래된다.

[0113] 일부 실시형태에서, ST6Gal1 이소폼 a(서열 번호 14)의 아미노산 142, 149, 161, 184, 189, 212, 233, 335, 353, 354, 364, 365, 369, 370, 376, 또는 406에 상응하는 ST6Gal1의 하나 이상의 아미노산은 서열 번호 14와 비교하여 보존된다.

[0114] 또한, 본원에서 제공된 것은 예를 들어 ST6Gal1의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 ST6Gal1 이소폼 a(서열 번호 14), 또는 서열 번호 14의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다. 일부 실시형태에서, 효소는 ST6Gal1 이소폼 b(서열 번호 15), 또는 서열 번호 15의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 효소적 활성 부분이다.

[0115] 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 세포질 도메인, 예를 들어 서열 번호 16을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 트랜스막 도메인, 예를 들어 서열 번호 17을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 세포질 도메인, 예를 들어 서열 번호 16 또는 트랜스막 도메인, 예를 들어 서열 번호 17을 포함하지 않는다.

[0116] 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 내강 도메인, 예를 들어 서열 번호 18, 또는 이의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0117] 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 서열 번호 14의 아미노산 87 내지 406(서열 번호 19), 또는 이의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, ST6Gal1의 효소적 활성 부분은 서열 번호 19, 또는 서열 번호 19의 동원체, 돌연변이체, 또는 변이체로 이루어진다.

- [0118] ST6Gal1의 적합한 기능적 부분은 **서열 번호 19**와 적어도 80%(85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0119] 일부 실시형태에서, ST6Gal1은 **서열 번호 19**, 아미노산 4 내지 320으로부터의 **서열 번호 19**의 부분, 또는 아미노산 5 내지 320으로부터의 **서열 번호 19**의 부분을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0120] 또한 본원에 기재된 방법에서 사용하기에 적합한 것은 **서열 번호 20**과 적어도 80%(85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 아미노산 서열이다.
- [0121] **항체**
- [0122] 본원에 기재된 방법은 항체의 갈락토실화 및 시알릴화를 포함한다. 적합한 항체는 예를 들어 IgG 항체를 포함한다. 항체, 예를 들어 IgG 항체는 풀링될 수 있다. 예를 들어, 풀링된 IgG 항체는 IVIg를 포함한다.
- [0123] 일부 실시형태에서, IgG 항체는 적어도 1000명의 공여자로부터 단리된 IgG 항체를 포함한다.
- [0124] 일부 실시형태에서, IgG 항체의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% w/w는 IgG1 항체이다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 공여자 대상체의 적어도 90%는 바이러스에 노출되었다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 IgG 항체의 혼합물을 제공하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG 항체의 혼합물을 제공하는 것은 (a) 적어도 1000명의 인간 대상체로부터 풀링된 혈장을 제공하는 단계; 및 (b) 풀링된 혈장으로부터 IgG 항체의 혼합물을 단리하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG 항체의 혼합물은 정맥 면역글로불린으로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, IgG 항체의 혼합물은 정맥 면역글로불린이다. 일부 실시형태에서, 풀링된 혈장으로부터 IgG 항체의 혼합물을 단리하는 단계는 에탄올 침전 또는 카프릴산(옥탄산으로도 지칭됨) 침전을 포함한다. 일부 실시형태에서, 풀링된 혈장으로부터 IgG 항체의 혼합물을 단리하는 단계는 이온 교환 컬럼에 IgG 항체를 결합하는 단계 및 이온 교환 컬럼으로부터 IgG 항체를 용출하는 단계를 포함한다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg가 용액의 일부로서 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg의 농도는 약 100 mg/mL 내지 약 200 mg/mL이다. 일부 실시형태에서, 항체(들)의 농도는 150 mg/mL 또는 약 150 mg/mL이다.
- [0128] 일부 실시형태에서, 용액은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg, 및 완충액으로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충액은 BIS-TRIS, MOPS, MES, PIPES, BES, MOPSO, TEA, POPSO, EPPS, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0129] 일부 실시형태에서, 용액은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg, 및 BIS-TRIS 완충액으로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액은 50 mM BIS-TRIS 완충액에 항체(들)로 이루어지거나 이를 포함한다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 용액은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg, 및 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.4의 BIS-TRIS 완충액, 예를 들어 50 mM BIS-TRIS 완충액으로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg, 및 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.3, 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.2, 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.1, 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.0, 약 pH 6.8 내지 약 pH 6.9, 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.4, 약 pH 7.3 내지 약 pH 7.2, 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.1, 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.0, 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.4, 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.3, 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.2, 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.1, 약 pH 7.1 내지 약 pH 7.4, 약 pH 7.1 내지 약 pH 7.3, 약 pH 7.1 내지 약 pH 7.2, 약 pH 7.2 내지 약 pH 7.4, 또는 약 pH 7.3 내지 약 pH 7.4의 BIS-TRIS 완충액, 예를 들어 50 mM BIS-TRIS 완충액으로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg, 및 약 pH 7.3의 BIS-TRIS 완충액, 예를 들어 50 mM BIS-TRIS 완충액으로 이루어지거나 이를 포함한다.
- [0131] **효소적 갈락토실화 및 시알릴화**
- [0132] 본원에 기재된 방법은 갈락토실화 단계를 포함할 수 있다. 예시적인 갈락토실화 반응은 **도 3**에 도시되어 있다. 따라서, 본원에 제공된 것은 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들); 갈락토실화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 갈락토실화 효소, 예를 들어 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체; UDP-gal 또는 이의 염;

완충액, 예를 들어 본원에 기재된 완충액, 예를 들어 BIS-TRIS 완충액; 및 선택적으로  $MnCl_2$ 를 포함하는 조성물(갈락토실화 혼합물)을 제공하고, 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체의 갈락토실화에 효과적인 조건 하에서 조성물을 인큐베이팅하여 갈락토실화된 항체(들)를 생성함으로써, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들)를 갈락토실화하는 방법이다.

[0133] 본원에 기재된 방법은 시알릴화 단계를 포함할 수 있다. 예시적인 시알릴화 반응은 도 3에 도시되어 있다. 따라서, 본원에 제공된 것은 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 갈락토실화된 항체(들), 시알릴화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 시알릴화 효소, 예를 들어 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체; CMP-NANA 또는 이의 염; 완충액, 예를 들어 본원에 기재된 완충액, 예를 들어 BIS-TRIS 완충액; 및 선택적으로  $MnCl_2$ 를 포함하는 조성물(시알릴화 반응 혼합물)을 제공하고, 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체(들)의 시알릴화에 효과적인 조건 하에서 조성물을 인큐베이팅함으로써, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들)를 시알릴화, 예를 들어 하이퍼-시알릴화하는 방법이다.

[0134] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 단계와 시알릴화 단계는 동일한 반응 혼합물에서 순차적으로 수행되며, 즉 갈락토실화 반응 혼합물은 시알릴화 효소 및 CMP-NANA 또는 이의 염을 첨가할 때 시알릴화 반응 혼합물이 된다. 일부 실시형태에서, 상기 갈락토실화 반응 혼합물은 시알릴화 단계 이전에 여과, 분획화, 또는 정제되지 않는다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 단계와 시알릴화 단계는 개별적으로 수행되며, 예를 들어 사전 갈락토실화된 항체(들)가 제공되지만, 이들은 시알릴화 단계 이전에 가공(예를 들어, 여과, 분획화 또는 정제)되었고/되었거나 저장되었을 수 있다.

[0135] 따라서, 본원에 기재된 방법은 또한 순차적 갈락토실화 및 시알릴화 단계를 포함할 수 있다. 예시적인 갈락토실화 및 시알릴화 반응은 도 3에 도시되어 있다. 따라서, 본원에 제공된 것은 a) 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체(들), 갈락토실화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 갈락토실화 효소, 예를 들어 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체; UDP-gal 또는 이의 염; 완충액, 예를 들어 본원에 기재된 완충액, 예를 들어 BIS-TRIS 완충액; 및 선택적으로  $MnCl_2$ 를 포함하는 조성물(갈락토실화 반응 혼합물)을 제공하는 단계; 및 b) 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체(들)를 갈락토실화하기에 효과적인 조건 하에서 조성물을 인큐베이팅하는 단계; c) 시알릴화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 시알릴화 효소, 예를 들어 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체 및 CMP-NANA 또는 이의 염을 갈락토실화 반응 혼합물에 첨가하여, 시알릴화 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및 d) 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 갈락토실화된 항체(들)를 시알릴화하기에 효과적인 조건 하에서 조성물을 인큐베이팅하는 단계에 의해, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들)를 갈락토실화 및 시알릴화, 예를 들어 하이퍼-시알릴화하는 방법이다.

[0136] 또한 본원에 제공된 것은 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체(들), 갈락토실화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 갈락토실화 효소, 예를 들어 B4GalT 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체; UDP-gal 또는 이의 염; 및 완충액, 예를 들어 본원에 기재된 완충액, 예를 들어 BIS-TRIS 완충액; 시알릴화 효소, 예를 들어 본원에 기재된 시알릴화 효소, 예를 들어 ST6Gal1 또는 이의 효소적 활성 부분 또는 변이체; CMP-NANA 또는 이의 염; 및 선택적으로  $MnCl_2$ 를 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 갈락토실화 반응 혼합물에 첨가하여, 시알릴화 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및 d) 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 항체(들)를 갈락토실화 및 시알릴화하기에 효과적인 조건 하에서 조성물을 인큐베이팅하는 단계에 의해, 항체(들), 예를 들어 본원에 기재된 항체(들)를 갈락토실화 및 시알릴화, 예를 들어 하이퍼-시알릴화하는 방법이다.

[0137] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 반응 혼합물(들)의 하나 이상의 성분(들)은 인큐베이션 도중 보충된다. 즉, 반응 혼합물은 반응의 개시점에서 소정량의 성분을 포함할 수 있고(이는 반응 과정 중 변경될 수 있음), 반응 중 추가량의 성분(들)으로 또한 보충될 수 있다.

[0138] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 약 50 내지 약 200 mg/mL의 항체(들), 예를 들어, 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 폴링된 IgG, 예를 들어, IVIg를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 약 50 내지 약 200, 약 50 내지 약 150, 약 50 내지 약 100, 약 100 내지 약 200, 약 100 내지 약 200, 약 100 내지 약 150, 또는 약 150 내지 약 200 mg/mL의 항체(들), 예를 들어, 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 폴링된 IgG, 예를 들어, IVIg를 포함한다.

[0139] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 50 mg/mL 이상, 75 mg/mL 이상, 100 mg/mL 이상, 125 mg/mL 이상, 150 mg/mL 이상, 또는 200 mg/mL 이상의 항체(들), 예를 들어, 본원에 기재된 항체(들), 예를 들어 IgG, 예를 들어 폴링된 IgG, 예를 들어, IVIg를 포함한다.

- [0140] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 6.0 내지 약 15.0 U의 갈락토실화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 7.0 내지 약 9.0 U의 갈락토실화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 7.2 내지 약 8.8 U의 갈락토실화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 7.5 또는 약 7.5 U의 갈락토실화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 8.0 또는 약 8.0 U의 갈락토실화 효소를 포함한다.
- [0141] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 6.0 내지 약 15.0 U의 갈락토실화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 7.0 내지 약 9.0 U의 갈락토실화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 7.2 내지 약 8.8 U의 갈락토실화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 7.5 또는 약 7.5 U의 갈락토실화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 8.0 또는 약 8.0 U의 갈락토실화 효소로 보충된다.
- [0142] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.030 내지 약 0.050 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 혼합물은 항체 그램당 약 0.038 내지 약 0.046 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.038 또는 약 0.038 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.042 또는 약 0.042 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염을 포함한다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.030 내지 약 0.050 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염으로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 혼합물은 항체 그램당 약 0.038 내지 약 0.046 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염으로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.038 또는 약 0.038 mmol의 UDP-gal 또는 이의 염으로 보충된다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.042 또는 약 0.042 mmol의 UDP-gal로 보충된다.
- [0144] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 14.0 내지 약 20.0 U의 시알릴화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 17.1 내지 약 18.9 U의 시알릴화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 15.8 또는 약 15.8 U의 시알릴화 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 18.0 또는 약 18.0 U의 시알릴화 효소를 포함한다.
- [0145] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 14.0 내지 약 20.0 U의 시알릴화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 17.1 내지 약 18.9 U의 시알릴화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 15.8 또는 약 15.8 U의 시알릴화 효소로 보충된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 18.0 또는 약 18.0 U의 시알릴화 효소로 보충된다.
- [0146] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.1 내지 약 0.3 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.1425 내지 약 0.1575 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.220 또는 약 0.220 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 0.150 mmol 또는 약 0.150 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염을 포함한다.
- [0147] 일부 실시형태에서, 약 0.01 내지 약 0.3 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염은 반응 개시점에서 항체 그램당 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된다. 일부 실시형태에서, 약 0.01425 내지 약 0.1575 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염은 반응 개시점에서 항체 그램당 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된다.
- [0148] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.01 내지 약 0.3 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염으로 보충된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 항체 그램당 약 0.01425 내지 약 0.1575 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염으로 보충된다.
- [0149] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA의 총량은 항체 그램당 약 0.1 내지 약 0.3 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염이다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA의 총량은 항체 그램당 약 0.1425 내지 약 0.1575 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염이다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA의 총량은 항체 그램당 0.220 또는 약 0.220 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염이다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물에 첨가된 CMP-NANA의 총량은 항체 그램당 0.150 mmol 또는 약 0.150 mmol의 CMP-NANA 또는 이의 염이다.

- [0150] 일부 실시형태에서, 시알릴화 반응 혼합물은 CMP-NANA로 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 또는 10회 보충된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화 혼합물은 CMP-NANA로 7회 미만 보충된다.
- [0151] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 1 내지 약 20 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 4.5 내지 약 5.5 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 7.5 또는 약 7.5 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 5.0 또는 약 5.0 mM의  $MnCl_2$ 를 포함한다.
- [0152] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 BIS-TRIS 완충액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 500 mM의 BIS-TRIS를 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 400, 약 10 내지 약 300, 약 10 내지 약 300, 약 10 내지 약 200, 약 10 내지 약 100, 약 10 내지 약 50, 약 50 내지 약 500, 약 50 내지 약 400, 약 50 내지 약 300, 약 50 내지 약 200, 약 50 내지 약 100, 약 100 내지 약 500, 약 100 내지 약 400, 약 100 내지 약 300, 약 100 내지 약 200, 약 200 내지 약 500, 약 200 내지 약 400, 약 200 내지 약 300, 약 300 내지 약 500, 약 300 내지 약 400, 또는 약 400 내지 약 500 mM의 BIS-TRIS 완충액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100, 약 10 내지 약 90, 약 10 내지 약 80, 약 10 내지 약 70, 약 10 내지 약 60, 약 10 내지 약 50, 약 10 내지 약 40, 약 10 내지 약 30, 약 10 내지 약 20, 약 20 내지 약 100, 약 20 내지 약 90, 약 20 내지 약 80, 약 20 내지 약 70, 약 20 내지 약 60, 약 20 내지 약 50, 약 20 내지 약 40, 약 20 내지 약 30, 약 30 내지 약 100, 약 30 내지 약 90, 약 30 내지 약 80, 약 30 내지 약 70, 약 30 내지 약 60, 약 30 내지 약 50, 약 30 내지 약 40, 약 40 내지 약 100, 약 40 내지 약 90, 약 40 내지 약 80, 약 40 내지 약 70, 약 40 내지 약 60, 약 40 내지 약 50, 약 50 내지 약 100, 약 50 내지 약 90, 약 50 내지 약 80, 약 50 내지 약 70, 약 50 내지 약 60, 약 60 내지 약 100, 약 60 내지 약 90, 약 60 내지 약 80, 약 60 내지 약 70, 약 70 내지 약 100, 약 70 내지 약 90, 약 70 내지 약 80, 약 80 내지 약 100, 약 80 내지 약 90, 또는 약 90 내지 약 100 mM의 BIS-TRIS 완충액을 포함한다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)은 각각 독립적으로 50 mM 이하, 100 mM 이하, 150 mM 이하, 30 mM의 소듐 클로라이드를 포함하거나 아예 포함하지 않는다.
- [0154] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)의 완충액, 예를 들어 갈락토실화 및/또는 시알릴화 반응 혼합물(들)의 BIS-TRIS 완충액은 각각 독립적으로 50 mM 이하, 100 mM 이하, 150 mM 이하, 30 mM의 소듐 클로라이드를 포함하거나 아예 포함하지 않는다.
- [0155] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 단계는 각각 독립적으로 약 20°C 내지 약 50°C에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화는 약 20°C 내지 약 45°C, 약 20°C 내지 약 40°C, 약 20°C 내지 약 35°C, 약 20°C 내지 약 30°C, 약 20°C 내지 약 25°C, 약 25°C 내지 약 50°C, 약 25°C 내지 약 45°C, 약 25°C 내지 약 40°C, 약 25°C 내지 약 35°C, 약 25°C 내지 약 30°C, 약 30°C 내지 약 50°C, 약 30°C 내지 약 45°C, 약 30°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 35°C, 약 35°C 내지 약 50°C, 약 35°C 내지 약 45°C, 약 35°C 내지 약 40°C, 약 40°C 내지 약 50°C, 약 40°C 내지 약 45°C, 또는 약 45°C 내지 약 50°C에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화는 37°C 또는 약 37°C에서 수행된다.
- [0156] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 및/또는 시알릴화 단계는 각각 독립적으로 약 pH 5.8 내지 약 pH 7.2에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 시알릴화는 pH 5.8 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.2, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.1, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 6.0, 또는 약 pH 5.8 내지 약 pH 5.9, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.2, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.0, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH

6.0 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.2, 또는 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.1, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.2, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.1, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.2, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.2 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.3 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.4 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.5 내지 약 pH 6.6, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.6 내지 약 pH 6.7, 또는 약 pH 6.7 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.7 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.7 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.7 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.7 내지 약 pH 6.8, 또는 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 6.8 내지 약 pH 6.9, 또는 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 6.9 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.2, 또는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.1, 또는 약 pH 7.1 내지 약 pH 7.2에서 수행된다.

- [0157] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 반응 혼합물의 pH는 예를 들어 개시 pH 또는 약 개시 pH로 돌아가도록 예를 들어, 바람직한 범위 내에 속하도록 갈락토실화 및/또는 시알릴화 도중 조정된다.
- [0158] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 단계는 60시간 이하, 예를 들어 50시간 이하, 40시간 이하, 또는 바람직하게는 20시간 이하 또는 20시간 이하 동안 수행된다.
- [0159] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 단계는 적어도 8, 12, 18, 24, 30, 또는 40시간, 그러나 60시간 이하 동안 수행된다.
- [0160] 일부 실시형태에서, 갈락토실화 단계는 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 또는 60시간 동안 또는 약 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 또는 60시간 동안 수행된다.
- [0161] 일부 실시형태에서, 시알릴화 단계는 70시간 이하, 예를 들어 60시간 이하, 50시간 이하, 또는 바람직하게는 40시간 이하 동안 수행된다.
- [0162] 일부 실시형태에서, 시알릴화 단계는 적어도 8, 12, 18, 24, 30, 40, 또는 50시간, 그러나 70시간 이하 동안 수행된다.
- [0163] 일부 실시형태에서, 시알릴화 단계는 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 또는 70시간 또는 약 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 또는 70시간 동안 수행된다.
- [0164] 일부 실시형태에서, 예를 들어 동일한 반응 혼합물에서 순차적으로 갈락토실화 및 시알릴화를 위한 총 인큐베이션 시간은 130시간 이하, 예를 들어, 120시간 이하, 110시간 이하, 100시간 이하, 90시간 이하, 80시간 이하, 바람직하게는 70시간 이하 또는 60시간 이하이다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 예를 들어 동일한 반응 혼합물에서 순차적으로 갈락토실화 및 시알릴화를 위한 총 인큐베이션 시간은 적어도 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 120시간이지만, 그러나 130시간 이하이다.
- [0166] 일부 실시형태에서, 예를 들어 동일한 반응 혼합물에서 순차적으로 갈락토실화 및 시알릴화의 총 인큐베이션 시간은 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 130시간이거나 약 8, 12, 18, 24, 30, 40, 50,

60, 70, 80, 90, 100, 또는 130시간이다.

- [0167] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG 상의 분지형 글리칸의 적어도 또는 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85% 또는 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0169] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85% 또는 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0170] 일부 실시형태에서, hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 80% 또는 적어도 80%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0171] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70% 또는 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0172] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 85% 또는 적어도 85%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0173] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70% 또는 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0174] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG 상의 분지형 Fc 글리칸의 약 90% 또는 적어도 90%는 α1,3 분지 및 α1,6 분지 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0175] 일부 실시형태에서, 항체(들), 예를 들어 hsIgG의 Fab 도메인 상의 분지형 글리칸의 약 60%, 65%, 70% 또는 적어도 60%, 65%, 70%는 NeuAc-α 2,6-Gal 말단 연결을 통해 연결되는 α1,3 아암 및 α1,6 아암 둘 모두 상에서 시알산을 갖는다.
- [0176] 예시적인 갈락토실화 및 시알릴화 반응은 하기 표에 도시되어 있다.

단계	성분	초기 농도	반응 혼합물에 첨가된 총량	인큐베이션 시간
갈락토실화	약 pH 7.3 으로 조정된 50 mM BIS-TRIS 중 풀링된 IgG, 예를 들어 IVIg	125 mg/mL	21 g	≤60 시간, 예를 들어 ≤50 시간, ≤40 시간, ≤30 시간 또는 ≤20 시간; 바람직하게는 24 또는 약 24 시간
	BIS-TRIS	50 mM	2.4 mL	
	MnCl <sub>2</sub>	5.0 ± 0.5 mM	0.735 mL	
	B4GalT 효소	8.0 ± 0.8 U/g IVIg	0.390 mL	
	UDP-gal	0.042 ± 0.004 mmol/g IVIg	0.880 mL	
시알릴화	ST6 효소	18.0 ± 0.9 U/g IVIg	4.13 mL	≤70 시간, 예를 들어 ≤60 시간, ≤50 시간, 또는 ≤40 시간; 바람직하게는 32 시간 또는 약 32 시간
	BIS-TRIS	50 mM	5.7 mL	
	CMP-NANA	0.150 ± 0.0075 mmol/g IVIg	1.58 mL	

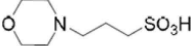
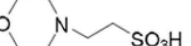
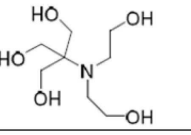
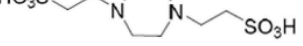
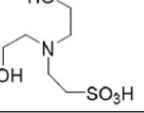
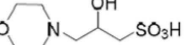
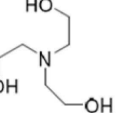
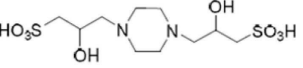
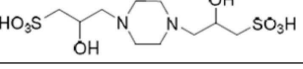
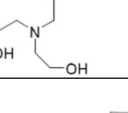
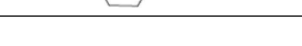
- [0177]
- [0178] **실시예**
- [0179] 본 발명은 하기 실시예에서 추가 설명되며, 이는 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- [0180] **실시예 1: 하이퍼시알릴화된 IgG 제조**
- [0181] 전체 분지형 글리칸의 60% 초과가 디시알릴화되어 있는 IgG는 하기와 같이 제조될 수 있다.
- [0182] 간략하게, IgG 항체의 혼합물은 β1,4 갈락토실트랜스퍼라아제 1 (B4GalT) 및 α2,6-시알릴트랜스퍼라아제 (ST6Gal1) 효소를 사용하는 순차적 효소 반응에 노출된다. B4GalT는 ST6Gal1의 첨가 전 반응으로부터 제거될

필요가 없고, 생성물의 부분 또는 완전 정제는 효소 반응 간에 필요하지 않다.

- [0183] 갈락토실트랜스퍼라아제 효소는 선택적으로 기존의 아스파라긴-연결된 글리칸에 갈락토오스 잔기를 첨가한다. 생성된 갈락토실화된 글리칸은 시알산 트랜스퍼라아제 효소에 대한 기질로서 작용하고, 이는 선택적으로 부착된 아스파라긴-연결된 글리칸 구조를 캡핑하기 위해 시알산 잔기를 첨가한다. 따라서, 전체 시알릴화 반응은 2개의 당 뉴클레오티드(우리딘 5'-디포스포갈락토오스(UDP-gal) 및 시티딘-5'-모노포스포-N-아세틸뉴라민산(CMP-NANA))을 사용했다. 후자는 모노시알릴화된 생성물에 비해 디시알릴화된 생성물을 증가시키기 위해 주기적으로 보충된다. 반응은 공동 인자 망간 클로라이드를 포함한다.
- [0184] IVIg로 개시되는 이와 같은 반응에 대한 IgG-Fc 글리칸 프로파일 및 반응 생성물의 대표적 예는 도 4에 나타나 있다. 도 4에서, 좌측 패널은 IgG를 hsIgG로 변형시키기 위한 효소적 시알릴화 반응의 개략도이고; 우측 패널은 개시 IVIg 및 hsIgG에 대한 IgG Fc 글리칸 프로파일이다. 본 연구에서, 상이한 IgG 서브클래스에 대한 글리칸 프로파일은 글리코캡티드 질량 분광법 분석을 통해 유도된다. 상이한 IgG 서브클래스에 대한 글리코캡티드를 정량화하기 위해 사용된 펩티드 서열은 IgG1 = EEQYNSTYR(서열 번호 1), IgG2/3 EEQFNSTFR(서열 번호 2), IgG3/4 EEQYNSTFR(서열 번호 3) 및 EEQFNSTYR(서열 번호 4)이었다.
- [0185] IgG 서브클래스에 따른 글리칸 데이터가 나타나 있다. IgG3 및 IgG4 서브클래스로부터의 글리칸은 개별적으로 정량화될 수 없다. 도시된 바와 같이, IVIg에 대해 모든 비시알릴화된(nonsialylated) 글리칸의 합은 80% 초과이고, 모든 시알릴화된 글리칸의 합은 20% 미만이다. 반응 생성물에 대해, 모든 비시알릴화된 글리칸의 합은 20% 미만이고, 모든 시알릴화된 글리칸의 합은 80% 초과이다. 글리코프로파일에 열거된 상이한 글리칸에 대한 명명법은 N 연결된 글리칸에 대한 옥스포드 표기법을 사용한다.
- [0186] **실시예 2: 시알릴화 반응의 개선**
- [0187] Fc 도메인 분지형 글리칸의 디시알릴화를 비롯한 IgG 항체의 디시알릴화를 추가로 개선하기 위한 노력으로 광범위한 반응 조건의 분석을 수행하였다. 기질로서 CMP-NANA를 사용하여 ST6Gal1에 의해 구동된 시알릴화 반응은 전체 디시알릴화 수준, 특정한 수준의 디시알릴화에 도달하는 시간, 특정한 전체 수준의 디시알릴화에 도달하는 데 요구된 효소 및 기질의 양으로 평가된지 여부에 관계 없이, 반응의 개선을 어렵게 한다는 특징을 갖는다. 예를 들어: (a) CMP-NANA는 완전히 안정하지 않고, 심지어 임의의 효소 부재 하에서도 자발적으로 가수분해될 것이고; (b) ST6Gal1은 분지형 글리칸 상의 Gal에 생산적 첨가 없이 CMP-NANA의 가수분해를 촉매화하는 것으로 여겨지고; (c) 효소적 첨가 또는 CMP-NANA 가수분해를 통해 발생된 부산물인 시티딘 모노포스페이트(CMP)는 ST6Gal1의 경쟁적 억제체로서 작용할 수 있고; (d) CMP는 새로 형성된 글리칸으로부터 NeuAc를 제거하기 위한 역 효소 반응을 촉매화하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 시간에 걸쳐, 부산물의 수준은 증가할 것이고, 이는 목적하는 시알릴화 반응을 늦추거나 심지어 역전시킬 수 있다.
- [0188] Fc 도메인 분지형 글리칸 상에서 디시알릴화 수준이 높은 IgG 항체 또는 IVIg 또는 풀링된 면역글로불린을 유도하는 반응 조건이 존재한다. 예를 들어, pH 7.4에서 37°C에서 비교적 높은 IgG 항체 농도(예를 들어, 고농도의 IVIg 농도(125 mg/mL 이상))의 MOPS 완충액 중 ST6Gal1을 이용한 시알릴화는, 시알릴화 반응이 충분히 긴 시간 동안 수행되고, CMP-NANA가 시알릴화 반응의 과정에 걸쳐 보충되는 경우, 높은 수준의 분지형 글리칸, 예를 들어 Fc 도메인 상의 분지형 글리칸의 디시알릴화를 제공할 수 있다. 여전히, 기질의 사용 또는 농도를 감소시키고, 반응 시간을 줄이거나, hsIgG 생성의 다른 개선을 제공하는 대안들을 확인하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0189] CMP로부터 포스페이트를 제거하고, 이를 비-억제성 시티딘으로 전환하기 위한 알칼린 포스파타아제의 첨가는 시알릴화 반응의 성질을 기반으로 유망한 것으로 간주되었다. 그러나, 이러한 변형은 연구된 조건 하에서 약간의 이점만을 제공했다. MOPS 완충액의 pH는 연구된 조건 하에서 의미있는 이점을 제공하기 위해 변하지 않았다. 또한, 다양한 금속 이온의 첨가가 조사되었지만 연구된 조건 하에서 의미 있는 이점을 제공하는 것으로 보이지는 않았다. 그러나, 이들 변화를 조사하는 과정에서, 심지어 공동 완충액으로서의 TRIS 완충액의 첨가는 일부 이점을 제공하는 것으로 확인됐다고 관찰되었다. 또한, 일부 조건 하에서, 감소된 CMP-NANA 농도가 이로울 수 있다고 관찰되었다.
- [0190] TRIS와 일부 구조적 유사성을 갖고, 다양한 pKa의 다양한 완충액이 MOPS에 대한 첨가 또는 이에 대한 대안으로서 연구되었다. 시험된 완충액은 하기 표 5에 나타난 것이다. Fc 함유 단백질 상의 ST6Gal1 및 CMP-NANA를 이용하여 시알릴화를 수행하였다.

[0191] [표 5]

시험된 완충액

완충액 및 pH	완충액 명칭	구조
50 mM MOPS, pH 7.0	3-(N-모르폴리노)프로판설포산	
50 mM MES, pH 6.5	2-(N-모르폴리노)에탄설포산	
50 mM BIS-TRIS pH 6.9	비스(2-히드록시에틸)아미노-트리스(히드록시메틸)메탄	
50 mM PIPES, pH 7.0	1,4-피페라진디에탄설포산	
50 mM BES, pH 7.0	N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄설포산	
50 mM MOPSO, pH 7.1	3-모르폴리노-2-히드록시프로판설포산	
50 mM TEA, pH 7.5	트리에탄올아민	
50 mM POPSO, pH 7.6	피페라진-N,N'-비스(2-히드록시프로판설포산)	
50 mM POPSO, pH 8.0	피페라진-N,N'-비스(20히드록시프로판설포산)	
50 mM TEA, pH 8.0	트리에탄올아민	
50 mM EPPS, pH 8.0	4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진프로판설포산	

[0192]

[0193] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 완충액의 성질은 A2F의 수준에 영향을 미쳤다(71 내지 85%).

[0194] 1,6-A1F의 형성은 도 6에 나타난 바와 같이 시험된 조건 하에서 완충액에 걸쳐 더 적은 범위로 변동된다.

[0195] IVIg의 시알릴화는 BIS-TRIS pH 6.9, TEA pH 7.5, TEA pH 8.0, 및 TRIS pH 8.0에서 조사되었다. 또한, 갈락토실화 및 시알릴화 모두에 대해 동일한 완충액을 사용하는 것이 바람직할 수 있기 때문에, 예를 들어 원 포트 반응을 제공하기 위해, 갈락토실화에 대한 다양한 완충액의 영향을 또한 조사하였다. 시알릴화에 이로운 것으로 나타난 특정한 완충액은 갈락토실화에 유해한 것으로 관찰되었다.

[0196] BIS-TRIS를 추가 연구를 위해 선택했다. 상기 기재된 일부 연구가, 일부 조건 하에서, 감소된 CMP-NANA가 이룰 수 있음을 나타내는 것으로 보였기 때문에, 효소 및 당 뉴클레오티드 초과량 및 투여 요법에 대한 광범위한 조사가 IVIg를 기질로서 사용하여 착수되었다. 이들 연구의 일부로서, 갈락토실화에 대한 BIS-TRIS 완충액의 영향을 조사하였다.

[0197] BIS-TRIS pH 6.9에서 IVIg의 갈락토실화에서, MOPS pH 7.4를 사용하는 경우보다 50% 미만의 B4GalT 효소가 사용될 수 있다는 것이 확인됐다. 동일한 양의 UDP-Gal이 사용된 경우, 갈락토실화는 15시간 이하 이내에 완료됐다. 후속 시알릴화 반응 BIS-TRIS pH 6.9의 경우, CMP-NANA의 총량을 50%로 감소시킬 수 있고, 극적으로 반응 시간을 감소시킬 수 있다(72+시간부터 32 내지 33시간)는 것을 확인했다. 하기 표 6 및 표 7은 BIS-TRIS 완충액에서 관찰된 개선의 예를 제공한다.

[0198] [표 6]

MOPS 와 BIS-TRIS 를 비교하는 IVIg 의 갈락토실화

규모	완충액	mU B4GalT/mg IVIg	Nmol UDP-Gal/mg IVIg	갈락토실화 시간(h)	G2F(%)
100 mg	50 mM MOPS pH 7.4	15	38	64	98
2 mg	50 mM BIS-TRIS pH 6.9	7.8	39	24	99

[0199]

[0200] [표 7]

MOPS 와 BIS-TRIS 를 비교하는 IVIg 의 시알릴화

규모	완충액	mU ST6/mg IVIg	총 nmol CMP-NANA/ mg IVIg	CMP-NANA 첨가 수	시간(h)	A2F(%)
15.5 g	50 mM MOPS pH 7.4	14.9	470	7	88	91
4.3 mg	50 mM BIS-TRIS pH 6.9	14.2	221	2	32	95
2.0 g	50 mM BIS-TRIS pH 6.9	15.0	220	2	33	90

[0201]

[0202] 전체적으로, MOPS pH 7.4를 BIS-TRIS pH 6.9로 변경함으로써, 더 적은 효소 및/또는 더 적은 당 뉴클레오티드를 사용하면서, 상당히 적은 시간 내에 높은 수준의 시알릴화를 달성하는 것이 가능하다는 것을 확인했다. 따라서, 50 mM의 BIS-TRIS pH 6.9에서 적합한 반응 조건은 IgG 항체(예를 들어, 폴링된 IgG 항체, 폴링된 면역 글로불린 또는 IVIg)의 갈락토실화가 하기와 같은 것을 포함한다: 7.4 mM의 MnCl<sub>2</sub>; 38 μmol의 UDP-Gal/g IgG 항체; 및 7.5 단위의 B4GalT/g IgG 항체의 37°C에서 16 내지 24시간의 인큐베이션 이후 7.4 mM의 MnCl<sub>2</sub>에서의 시알릴화; 220 μmol의 CMP-NANA/g IgG 항체(2회 첨가됨: 반응 초반에 절반 및 9 내지 10시간 후 절반); 및 15 단위의 ST6Gal1/g IgG 항체의 37°C에서 30 내지 33시간 인큐베이션. 반응은 ST6Gal1 및 CMP-NANA를 갈락토실화 반응에 첨가함으로써 수행될 수 있다. 대안적으로, 모든 반응물은 처음에 조합될 수 있고, CMP-NANA가 보충될 수 있다.

[0203] **실시예 3: 고농도 IVIg 또는 IgG 항체에서 hsIgG의 생성에 대한 효소적 갈락토실화 및 시알릴화**

[0204] 50 mM MOPS 완충액 pH 7.4 중 UDP-Gal 및 CMP-NANA를 사용하여 2개의 순차적 효소 반응 단계로 시알릴화를 달성한다. 갈락토실화는 5 내지 8 mM의 MnCl<sub>2</sub>를 갖는 50 mM의 MOPS 완충액 pH 7.4 중 8 내지 15 단위의 B4GalT/g IVIg 및 0.038 내지 0.042 mmol의 UDP-Gal/g IVIg와 IVIg(약 135 mg/ml)의 반응에 의해 발생한다. 반응은 46 내지 50시간 동안 37°C에서 진행된다. 다음으로, 15.8 내지 18 단위의 ST6Gal/g IVIg 및 CMP-NANA를 반응에 첨가하고, 50 mM의 MOPS 완충액 pH 7.4를 이용하여 IVIg의 농도를 약 120 mg/ml로 조정한다. CMP-NANA를 시알릴화 반응 초기에 첨가하고, 37°C에서 총 70 내지 74시간의 반응 시간에 걸쳐 8 내지 12시간의 간격으로 5회 더 첨가된다. 첨가된 CMP-NANA의 양은 400 μmol의 CMP-NANA/g IVIg이다. 따라서, 각각의 첨가는 첨가된 총량의 6분의 1이다.

[0205] 이후, 반응을 주변 온도로 냉각시키고, 5X 소듐 포스페이트 완충액(PBS) 1:1 v/v로 희석한다.

[0206] 총 글리칸을 시알릴화를 위해 평가했다. 97% 초과와 글리칸을 시알릴화하고, 90% 초과와 글리칸을 디시알릴화했다.

[0207] **실시예 4: 반응 조건**

[0208] hsIgG의 생성에서의 갈락토실화 반응은 상대적으로 간단하다. 그러나, 시알릴화 반응은 여러 어려운 점이 있다. 먼저, CMP-NANA는 안정하지 않고, 심지어 임의의 효소 부재 하에서도 자발적으로 가수분해될 것이다. 부가적으로, ST6 효소는 또한 글리칸 수용체에 생산적 첨가 없이 CMP-NANA의 가수분해를 촉매화하는 것으로 여겨진다. 시터딘 모노포스페이트(CMP)는 효소적 첨가 또는 CMP-NANA 가수분해를 통해 발생된 부산물이다. CMP는 ST6의 경쟁적 억제제로서 작용한다. 또한, CMP는 새로 형성된 글리칸으로부터 NeuAc를 제거하기 위한 효

소 반응을 촉매화하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 시간에 따라, CMP-NANA의 농도는 감소하는 반면, 부산물이 축적됨에 따라, 시알릴화 반응은 느려지고 역전된다. 그러나, 이러한 역반응은 완충액으로서 MOPS에 비해 완충액으로서 BIS-TRIS를 이용할 때 훨씬 덜 바람직하다.

[0209] M254는 MOPS pH 7.4 완충액 중 IVIg 약물의 Fc 및 Fab 글리칸의 효소적 시알릴화에 의해 현재 제조되고, 이들의 모든 단계는 37°C에서 이고, 매우 높은 IVIg 농도(약 150 mg/mL)를 사용하고, 여기서 높은 단백질 농도는 반응 동역학을 개선한다. 갈락토실화 단계는 48시간의 기간에 걸친 인큐베이션을 사용한다. 상기 논의된 시알릴화 문제를 보상하기 위해, 72시간의 기간에 걸쳐 ST6의 단일 첨가 이후 CMP-NANA를 하루에 2회 첨가한다(총 6회). 이를 방법 2.0으로 칭한다.

[0210] 명목상 방법 3.0.0으로 지칭됐던 pH 6.90의 BIS-TRIS 완충액에서 수행된 대체 방법으로 전환하는 것이 바람직하다. 방법 3.0.0은 더 적은 B4GalT 효소, 더 적은 CMP-NANA 효소를 쓰고, 두 단계 모두에 대해 전체 반응 시간이 56시간 대 120시간으로 더 짧다. 따라서, 방법 3.0.0은 물질 비용 및 생산 비용을 더 낮춘다.

[0211] 방법 3.0.0을 사용하는 BIS-TRIS 완충액 중 IVIg의 시알릴화는 랩 규모(2 g 이하) 및 각각 상이한 두 설비 각자에서의 50 g 및 250 g의 보다 큰 규모에서 수행됐다. BIS-TRIS 완충액(방법 3.0.0)을 사용하는 보다 큰 규모에서 수득된 디시알릴화 규모는 랩 규모에서 관찰된 것보다 낮고, 또한 동일한 설비에서의 MOPS 완충액(방법 2.0)에서 수행된 반응보다도 낮지만, 여전히 80% 이상 디시알릴화의 사양을 충족했다(표 8). 따라서, 어떤 반응 조건이 이 차이에 가장 큰 영향을 미치는지 시도하고, 이해하기 위해 연구가 수행됐다. 갈락토실화 단계가 이상적인 것으로 보였지만, UDP-Gal 및 B4GalT 둘 모두의 양을 10% 만큼 증가시켜 최상의 결과를 보장하는 대비책을 제공하는 것이 권장된다.

[0212] 부가적으로, 초기에 사용된 BIS-TRIS 조건에 비해, 30% 미만의 CMP-NANA 및 10% 초과인 ST6은 보다 높은 시알릴화를 유도할 수 있었으며, 물질 비용의 전체적인 증가를 최소화했다는 것이 나타났다.

[0213] [표 8]

CMO 에서 M254 에 대해 TP-01167 로 측정된 디시알릴화

IVIg	완충액	설비	규모(g)	디시알릴화(%)
Privigen	MOPS	1	50	92.7
Privigen	BIS-TRIS	1	250, 수행 1	87.9
Privigen	BIS-TRIS	1	250, 수행 2	86.6
ADMA	MOPS	2	50	94.7
ADMA	BIS-TRIS	2	50	86.2
Privigen	MOPS	2	1500	92.7 <sup>1</sup>

[0214] <sup>1</sup>5 회의 GMP 수행의 평균

[0215] IVIg 용액

[0216] IVIg 용액을, BIS-TRIS 완충액으로 교환된 Privigen IVIg 약물(drug product) 완충액을 사용하여 제조했다. IVIg의 한 배치를, BIS-TRIS pH 6.9 완충액으로 평형화된 G25 탈염 컬럼을 사용하여, 완충액을 교환한 후, 10 kDa Vivaspin Turbo 15 장치를 사용하여 IVIg 유량 분획을 농축시켰다. 3개의 Privigen IVIg의 5 g 배치를 탄젠트 여과 흐름(TFF)에 의해 pH 6.67, 6.93, 및 7.11에서 50 mM의 BIS-TRIS로 완충액을 교환했다. IVIg의 한 배치를 탄젠트 여과 흐름(TFF)에 의해 50 mM의 BIS-TRIS pH 6.9로 완충액을 교환한 후, 10 kDa Vivaspin Turbo 15 장치를 사용하여 농축시켰다.

[0217] 사용된 IVIg 로트, 완충액 교환 방법, 완충액 교환 pH, 및 농축 후 측정된 최종 pH는 표 9에 나타나 있다.

[0218] [표 9]

사용된 IVIg 용액

IVIg 로트	완충액 교환 방법	교환 완충액 pH	농축 후 측정된 pH	농도(mg/mL)
1	G25/Vivaspin 농축	6.90	7.28	123
2	TFF	6.67	7.02	120
3	TFF	6.93	7.26	129
4	TFF	7.11	7.49	126
5	TFF	6.90	6.99 및 6.86 <sup>a</sup>	135
6	TFF 이후 Vivaspin 농축	6.90	6.88	123

[0219]

[0220] 만약, 완충액 교환 및 농축 후, IVIg 용액의 pH가 바람직한 범위, 예를 들어 7.2 내지 7.4, 바람직하게는 약 7.3을 벗어나는 경우, 이는 조정되어야 한다.

[0221] 일반적 반응 설명

[0222] 일반적으로, 갈락토실화는 아침에 가장 먼저 시작됐다. 시약(IVIg, UDP-Gal, B4GalT 효소, 및  $MnCl_2$ )을 부드럽게 혼합한 후, 반응을 교반하거나 진탕하지 않으면서 37°C에서 인큐베이션했다. 반응은 평균 여과되지 않았다. 인큐베이션을 여러 번 지속했다. 2개의 5 uL 분취액을 여러 번 제거한 후 분석될 때까지 동결시켰다. 실험의 결말에서, 벌크 반응 물질을 4°C에 두었다.

[0223] ST6 효소 및 절반의 필요한 CMP-NANA를 첨가하여 시알릴화 단계를 개시하였다(일반적으로 갈락토실화 24시간 후). 일부 경우에, 갈락토실화된 물질을 먼저 작은 부피로 나누어 시알릴화 반응을 여러 번 수행했다. 9시간에서, 두번째 절반의 CMP-NANA를 첨가했다. 인큐베이션을 여러 번 지속했다. 2개의 5 uL 분취액을 여러 번 제거한 후 분석될 때까지 동결시켰다. 실험의 결말에서, 벌크 반응 물질을 4°C에 두었다.

[0224] 글리코실화 정도

[0225] 글리코실화 정도를 Fc 글리코펩티드 상에서 LCMS로 정량화했다. 표 10은 Fc 글리코펩티드 상에서 LCMS로 정량화된 글리칸을 보여준다. 완전히 갈락토실화된 것은 시알릴화되었는지 여부와 관계 없이 2개의 갈락토오스 잔기를 갖는 모든 글리칸을 포함했다. A2F, A2F+이등분 GlcNAc, 및 A2의 합으로서 디시알릴화를 정의했다.

[0226] [표 10]

Fc 글리코펩티드 상에서 LCMS로 정량화된 글리칸.

정량화된 글리칸	완전히 갈락토실화된 것에 포함됨	디시알릴화된 것에 포함됨
G0F	-	-
G1F	-	-
G2F	G2F	-
1,3-A1F	1,3-A1F	-
1,6-A1F	1,6-A1F	-
A2F	A2F	A2F
G1F+NeuAc	-	-
G0F+이등분 GlcNAc	-	-
G1F+이등분 GlcNAc	-	-
G2F+이등분 GlcNAc	G2F+이등분 GlcNAc	-
A1F+이등분 GlcNAc	A1F+이등분 GlcNAc	-
A2F+이등분 GlcNAc	A2F+이등분 GlcNAc	A2F+이등분 GlcNAc
G0	-	-
G1	-	-
G2	-	-
1,3-A1	G2	-
1,6-A1	1,3-A1	-
A2	A2	A2
G1+NeuAc	-	-

[0227]

[0228]  $MnCl_2$  농축

[0229] 이 작업을 시작하기 전에 IVIg 시알릴화 실험을 수행했고, 여기서  $MnCl_2$ 의 양은 광범위하게 변경되었다(도 3).<sup>10</sup> 이는 다량의  $MnCl_2$ 가 유해한 것을 명백히 나타냈고, 심지어 방법 3.0.0.에서 사용된 약 7.5 mM에서 상이한 효과를 가질 수 있음을 또한 암시했다.

[0230] 도 7a는 증가하는  $MnCl_2$ 에 따른 G1F+NeuAc 및 G1+NeuAc의 증가량을 보여준다. 이러한 증은 불완전 갈락토실화로부터 유래된다. 도 7b는 증가하는  $MnCl_2$ 에 따른 G0F, G1F, 및 G2F 증가량을 보여준다. 이는 더 불량한 갈락토실화에 더불어, 또한 시알릴화도 영향을 받고, 즉 비-시알릴화된 종의 양이 또한 보다 높은  $MnCl_2$ 에서 더 높았다는 것을 보여준다. 도 8은 디시알릴화 수준을 보여주는 이들 결과를 반복한다.

[0231] 이들 결과는 2.5 mM 내지 10 mM의  $MnCl_2$  농도의 하한 값을 살펴보기 위한 추가 실험을 유도했다.<sup>11</sup> 이러한 반응 세트는 G25 탈염 및 Vivaspin 농축기를 사용하여 완충액 교환된 IVIg를 사용했다.

[0232] 갈락토실화(B4GalT 및 UDP-Gal 사용, 표 11)를 수행했고, 20, 24, 28 및 44시간 후 글리코펩티드 분석을 위해 샘플을 제거했다. 44시간 샘플을 이후 추가 48시간 동안 CMP-NANA 및 ST6으로 처리하고, 28, 32, 36 및 48시간

에서의 분석을 위한 샘플을 취하였으며, 이는 실험 시리즈 A로 지칭될 것이다. 별도로, 일련의 샘플을 24시간 동안 갈락토실화한 후, 일정 분취액을 취하여 추가 48시간 동안 시알릴화하고, 이는 실험 시리즈 B로 지칭될 것이다. LCMS 글리코펩티드 데이터를 Qual 브라우저를 사용하여 분석했다.

[0233] [표 11]

MnCl<sub>2</sub> 농축 조사 JS1169에서 사용된 시약

시약	로트
MnCl <sub>2</sub>	SLBR8810V
IVIg pH 6.90	4323400386 (JS1164B)
B4GalT	30716921
UDP-Gal	MOPS 중 조합된 로트 11840262, 11840277, 11840264
CMP-NANA	37304121
ST6	36071123

[0234]

[0235] **도 9**는 모든 조건에 대해 20 내지 44시간에서 IgG1의 갈락토실화의 증가를 보여준다(MnCl<sub>2</sub> 농축으로 그룹핑됨). 유사한 결과가 다른 IgG 서브클래스에 대해 확인됐다.

[0236] **도 10**은 시간으로 그룹핑된 동일한 데이터를 보여준다. 여기서, 어떠한 시점에, 갈락토실화 범위가 2.5 mM MnCl<sub>2</sub>에서 5.0 mM로 증가한 후 7.5 mM 그리고 그 다음 10 mM로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 5.0 mM MnCl<sub>2</sub>를 이용한 갈락토실화가 방법 3.0.0에서 사용된 7.5 mM MnCl<sub>2</sub>보다 양호함을 명백히 입증한다.

[0237] **염 농도**

[0238] pH 6.9 완충액 중 IVIg를, 37°C 인큐베이션하면서 MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에서 각각 UDP-Gal/B4GalT 및 CMP-NANA/ST6을 사용하여 갈락토실화 및 시알릴화 반응을 거쳤다. BIS-TRIS 완충액 중 다양한 농도의 염화나트륨을 첨가하여, 0, 50, 100, 150, 및 300 mM 염화나트륨의 최종 반응 농도를 수득했다. 갈락토실화 및 시알릴화 반응 후반에 글리코펩티드 LCMS에 의해 글리칸 분석을 위해 샘플을 제거했다.

[0239] **도 11, 도 12, 도 13, 도 14, 도 15 및 도 16**에 나타난 바와 같이, 갈락토실화 및 시알릴화 반응에 염화나트륨을 첨가하는 것은 염 농도 의존적 방식으로 반응 정도에 부정적 영향을 주었다. 모든 IgG 서브클래스에 대해 효과가 관찰됐고, 시알릴화 단계에서 가장 두드러졌다. 50 mM 염화나트륨의 존재는 IgG 서브클래스에 따라 4 내지 9%로 시알릴화 정도를 감소시킬 수 있었다.

[0240] **UDP-Gal 안정성**

[0241] UDP-Gal은 효소 촉매 전달 생성물(UDP)과 상이한 분해 생성물(UMP 및 아마도 1,2-포스포갈락토오스 1)을 제공하기에 MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에서 불안정한 것으로 확인되었다. 메커니즘은 **도 17**에 나타난 반응식을 따르는 것으로 여겨진다.

[0242] UDP-Gal, UDP, 및 UMP의 양을 0.1 M 포타슘 포스페이트, 4 mM 테트라부틸암모늄 바이실레이트, pH 6.0 이동상 및 254 nm에서 UV 검출을 사용하여 Supelcosil LC-18-T 컬럼 상에서 이온 페어링 HPLC로 평가했다. 우리딘을 갖는 성분만이 UV에 의해 검출되었고, 우리딘에 결합하지 않은 당은 검출될 수 없었다. 생성물을 알려진 표준과 비교했다.

[0243] BIS-TRIS pH 6.9 완충액 중 UDP-Gal을 8시간 동안 0, 5, 10 또는 20 mM MnCl<sub>2</sub>의 존재 하에서 37°C에서 가열한 후 이온 페어링 HPLC로 평가했다. B4GalT는 이 실험에 포함되지 않았다. UDP-Gal 손실 양은 MnCl<sub>2</sub> 의존적이었고, 증가하는 MnCl<sub>2</sub> 농도에 따라 증가했다. 관찰된 유일한 다른 생성물은 UMP였다. 매우 적은 UMP가 MnCl<sub>2</sub>의 부재 하에서 관찰되었다.

[0244] **도 18 및 도 19**에서 나타난 바와 같이, 이러한 UDP-Gal의 비특이적 분해가 IVIg의 갈락토실화에서 검출될 수 있다. 3개의 상이한 pH(6.7, 6.9, 및 7.1)에서 BIS-TRIS 완충액 중 UDP-Gal, B4GalT 및 5 mM MnCl<sub>2</sub>를 사용하여 24시간 IVIg를 갈락토실화했다. 보다 고분자량 IgG 단백질을 500 MWCO 스피닝 장치를 사용하여 저분자량 당 뉴클레오타이드로부터 분리하고, 뉴클레오타이드 함유 분획을 이온 페어링 HPLC 상에 주입했다. UMP(피크 1) 및 UDP(피크 3) 둘 모두의 형성이 관찰되었으며, 이는 비-특이적 분해로부터의 UMP 및 효소 촉매 전달로부터의 UDP에서

IgG의 글리칸으로 이동이었다. UMP의 형성은 pH가 6.7에서 6.9 내지 7.1로 변경됨에 따라 증가했다. UDP의 형성은 여기서 시험된 pH 범위에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

[0245] **실시예 5: 하이퍼시알릴화된 IgG 제조**

[0246] 다른 예에서, hsIgG를 BIS-TRIS pH 7.3을 사용하여 제조한다. 따라서, 50 mM BIS-TRIS pH 7.3에서 적합한 반응 조건은 IgG 항체(예를 들어, 풀링된 IgG 항체, 풀링된 면역글로불린 또는 IVIg)의 갈락토실화가 하기와 같은 것을 포함한다: 5.0 mM MnCl<sub>2</sub>; 42 μmol의 UDP-Gal/g IgG 항체; 및 8.0 단위의 B4GalT/g IgG 항체의 37°C에서 16 내지 24시간의 인큐베이션 이후 5.0 mM MnCl<sub>2</sub>에서의 시알릴화; 110 μmol의 CMP-NANA/g IgG 항체(2회 첨가됨: 반응 초반에 절반 및 9 내지 10시간 후 절반); 및 18 단위의 ST6Gal1/g IgG 항체의 37°C에서 30 내지 33시간 인큐베이션. 반응은 ST6Gal1 및 CMP-NANA를 갈락토실화 반응에 첨가함으로써 수행될 수 있다.

[0247] 21 g 규모로 수행된 이러한 방법은 글리코캡티드 LCMS에 의한 99% 완전 IgG1 갈락토실화, 글리코캡티드 LCMS에 의한 96% 디시알릴화된 IgG1, 및 N-글리칸 방출에 의한 94% 디시알릴화를 달성했다(InstantPC kit, Agilent로의 AdvanceBio Gly-X N-glycan prep). 이는 IVIg에 존재하는 약 15 내지 25% Fab 글리코실화뿐만 아니라 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 Fc 글리칸의 정량적 함을 허용하는 N-글리칸의 완전 방출을 제공한다.

[0248] **서열**

[0249] **서열 번호 1(IgG1)**

[0250] EEQYNSTYR

[0251] **서열 번호 2(IgG2/3)**

[0252] EEQFNSTFR

[0253] **서열 번호 3(IgG3/4)**

[0254] EEQYNSTFR

[0255] **서열 번호 4(IgG3/4)**

[0256] EEQFNSTYR

[0257] **서열 번호 5(NP\_001488.2 B4GALT1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=2683] [이소폼=1])**

[0258] MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAQNPNVKGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIVYINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHSVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWWGEGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIHRSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

[0259] **서열 번호 6(NP\_001365424.1 B4GALT1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=2683] [이소폼=2])**

[0260] MPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAQNPNVKGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIVYINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHSVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLTINGFPNNYWGWWGEGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIHRSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

[0261] **서열 번호 7(NP\_001365425.1 B4GALT1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=2683] [이소폼=3])**

[0262] MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAQNPNVKGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIVYINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHSVAMDKFGFRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIHRSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

[0263] **서열 번호 8(NP\_001365426.1 B4GALT1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=2683] [이소폼=4])**

[0264] MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAQNPNVKGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQLDYGIVYINQYKIRLLW

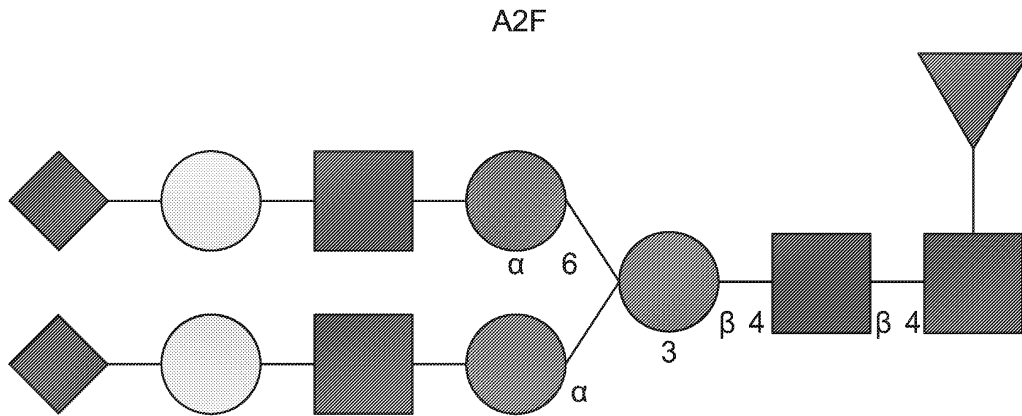
- [0265] 서열 번호 9
- [0266] MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACR
- [0267] 서열 번호 10
- [0268] LLVAVCALHLGVTLVYYLAG
- [0269] 서열 번호 11
- [0270] RDL SRLPQL VGVSTPLQGGNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPLGASSQPRPGGSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLL VGPM L IEFNMPVDLELVAKQNPVNMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEAL KDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSKQQFLTINGFPNNYWG WGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMI RHRSDKKNEPNPQRFDR I AHTKETM L SDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
- [0271] 서열 번호 12(B4Ga1T)
- [0272] GPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLL VGPM L IEFNMPVDLELVAKQNPVNMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEAL KDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSKQQFLTINGFPNNYWG WGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMI RHRSDKKNEPNPQRFDR I AHTKETM L SDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
- [0273] 서열 번호 13(B4Ga1T)
- [0274] gsspl1dmGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLL VGPM L IEFNMPVDLELVAKQNPVNMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEAL KDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSKQQFLTINGFPNNYWG WGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMI RHRSDKKNEPNPQRFDR I AHTKETM L SDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPSpr dhhhhh hh
- [0275] 서열 번호 14(NP\_001340845.1 (NP\_003023.1, NP\_775323.1) ST6GAL1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=6480] [이소폼=a])
- [0276] MIHTNLKKKFSCCVLVFLFAVICVWKEKKKGSYYDSFKLQTKEFQVLKSLGKGLAMGSDSQSVSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAKPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNYLSMNKYKVS YKGGPGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFPNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVVSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQQDVGTKTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSL YNEGILIVWDPSVYHSDIPK WYQNP DYNFN NYKYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEIQPNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDVCY YQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDDEDIYLLGKATLPGFRTIHC
- [0277] 서열 번호 15(NP\_775324.1 ST6GAL1 [유기체=호모 사피엔스] [GeneID=6480] [이소폼=b])
- [0278] MNSQLVTTEKRFLKDSL YNEGILIVWDPSVYHSDIPK WYQNP DYNFN NYKYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEIQPNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDVCY YQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDDEDIYLLGKATLPGFRTIHC
- [0279] 서열 번호 16
- [0280] MIHTNLKKK
- [0281] 서열 번호 17
- [0282] FSCCVLVFLFAVICVW
- [0283] 서열 번호 18
- [0284] KEKKKGSYYDSFKLQTKEFQVLKSLGKGLAMGSDSQSVSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAKPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNYLSMNKYKVS YKGGPGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFPNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVVSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQQDVGTKTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSL YNEGILIVWDPSVYHSDIPK WYQNP DYNFN NYKYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEIQPNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDVCY YQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDDEDIYLLGKATLPGFRTIHC
- [0285] 서열 번호 19(ST6Ga11)
- [0286] AKPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQKIWKNYLSMNKYKVS YKGGPGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFPNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVVSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFN GAPTANFQQDVGTKTIRLMNSQLVTTEKRFLKDSL YNEGILIVWDPSVYHSDIPK WYQNP DYNFN NYKYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEEIQPNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDVCY YQKFFDSACTMGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDDEDIYLLGKATLPGFRTIHC

[0287] 서열 번호 20(ST6Gal1)

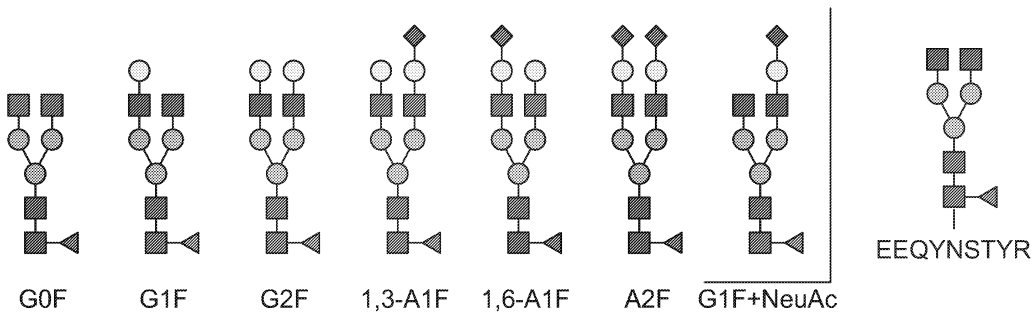
[0288] gssplldmlehhhhhhhhmAKPEASFQVWNKDSSSKNLIPRLQKIWKNYLSMNKYKVSYKGPGGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFNTSEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFGAPTANFQQDVGTKTTIRLMNSQLVTTEKRFKDSLYNEGILIVWDPSVYHSDIPKWWYQNPDYNNFYKYRKLHPNQPFYILKPKMPWELWDILQEISPEEQPNPSSGMLGIIMMFLCDQVDIYEFPLPSKRKTDVCYYYQKFFDSACTMGAYHPLL  
YEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC

도면

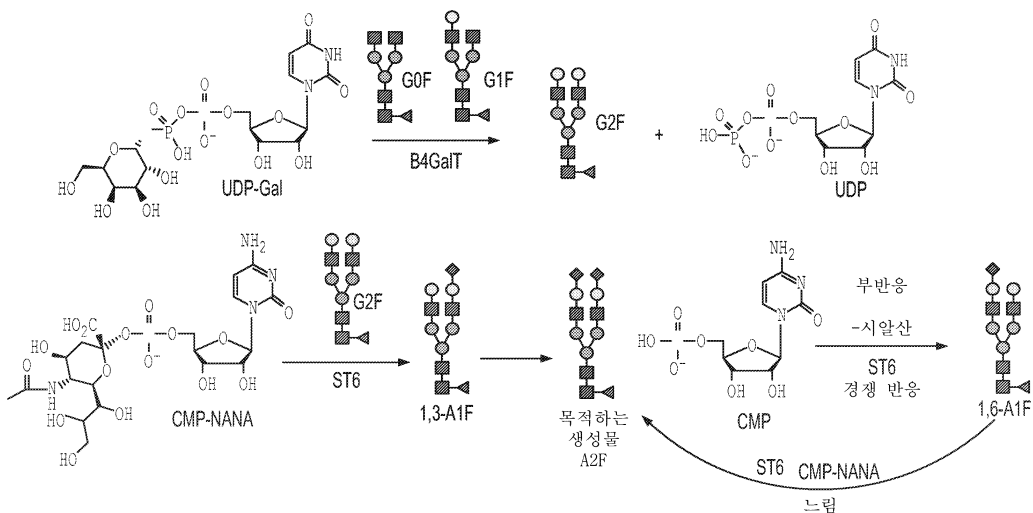
도면1



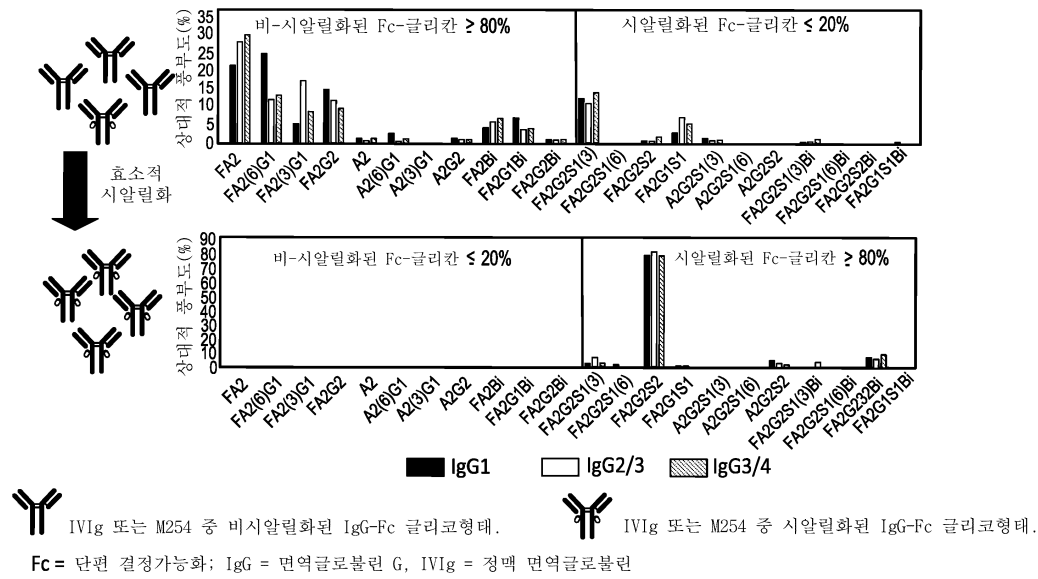
도면2



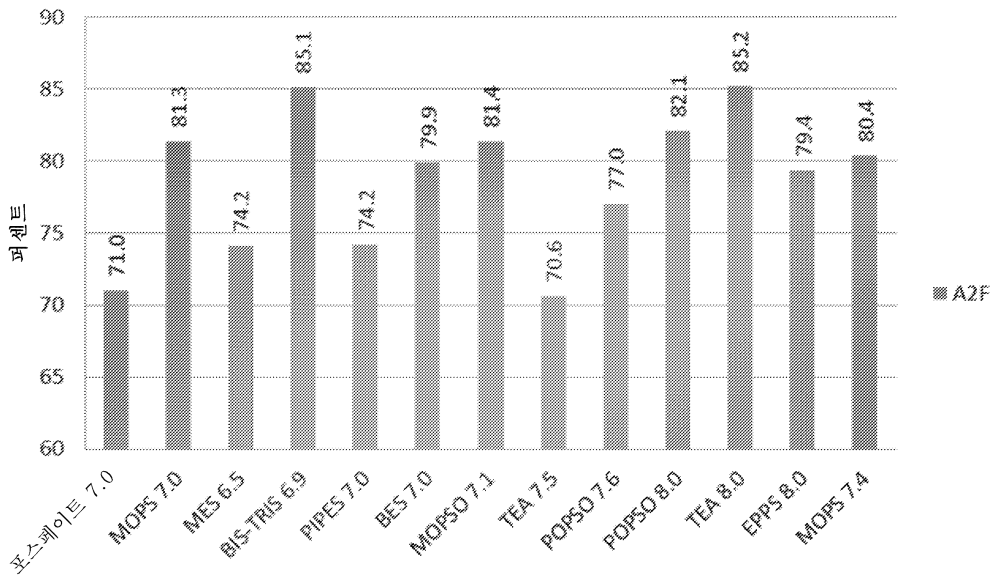
도면3



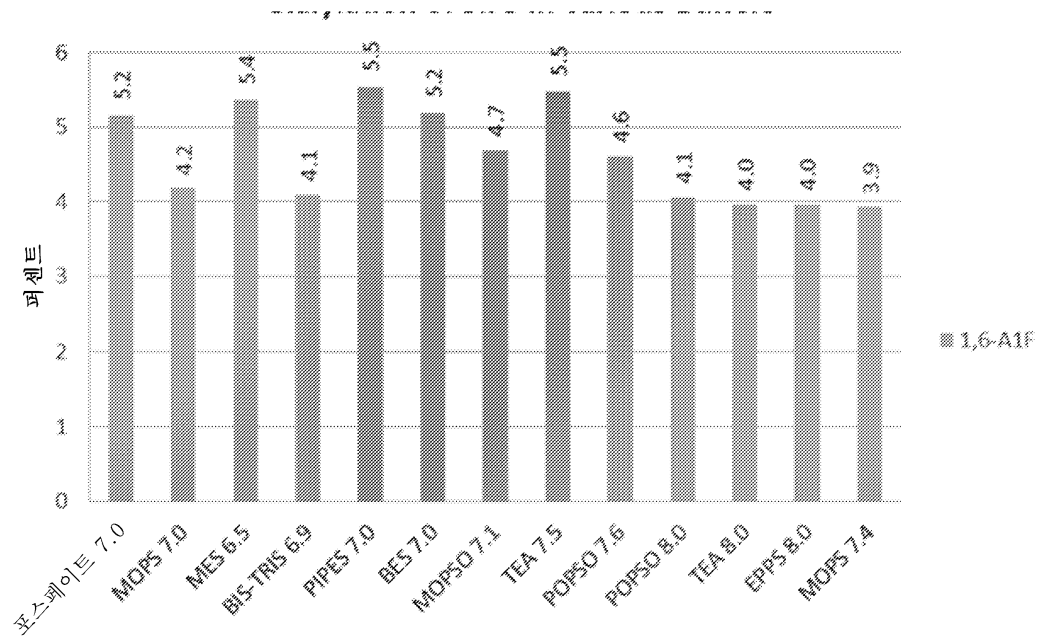
도면4



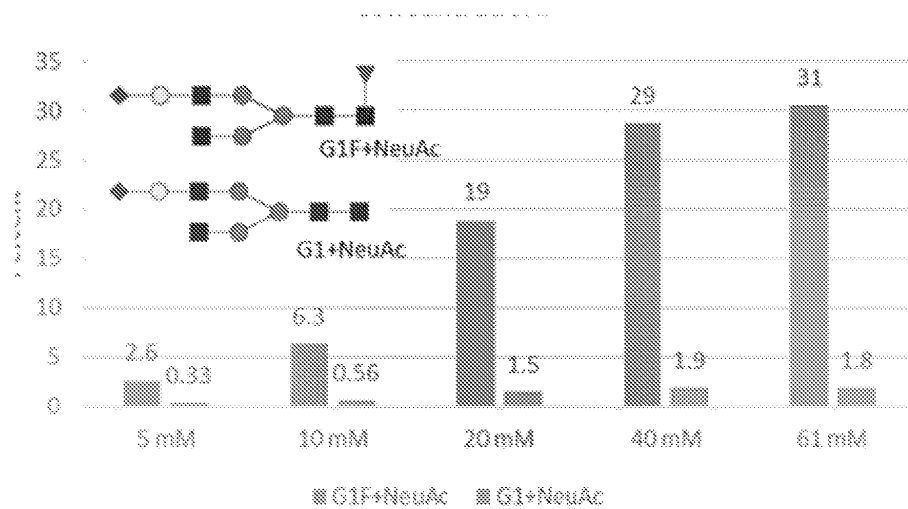
도면5



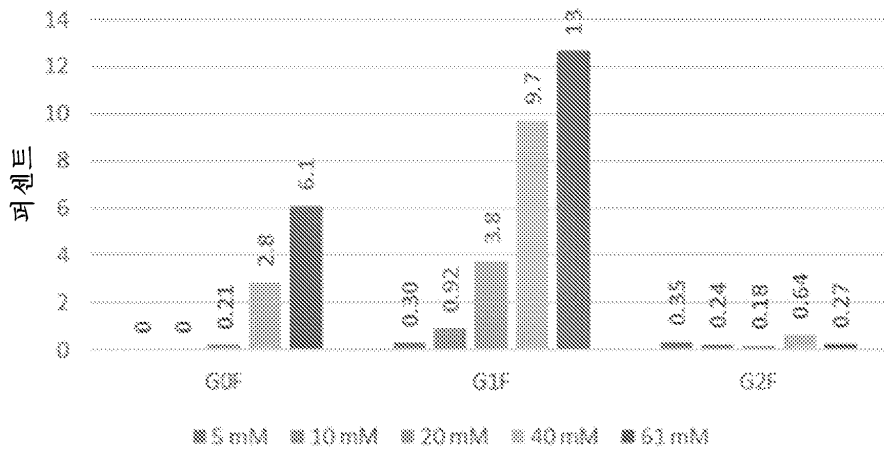
도면6



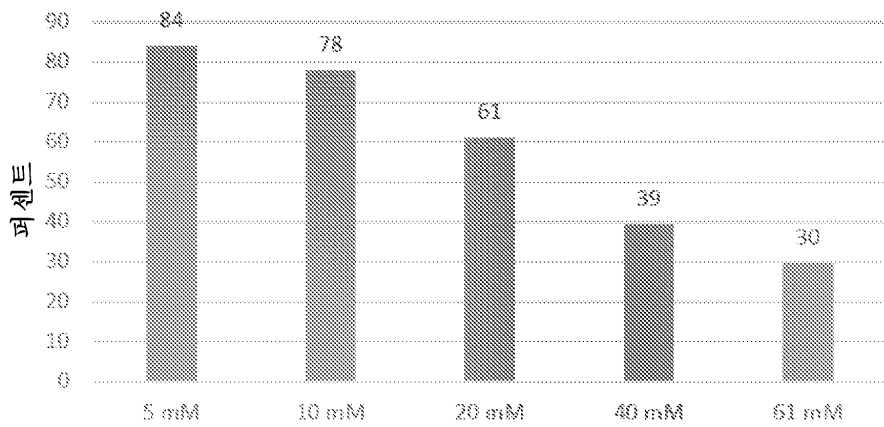
도면7a



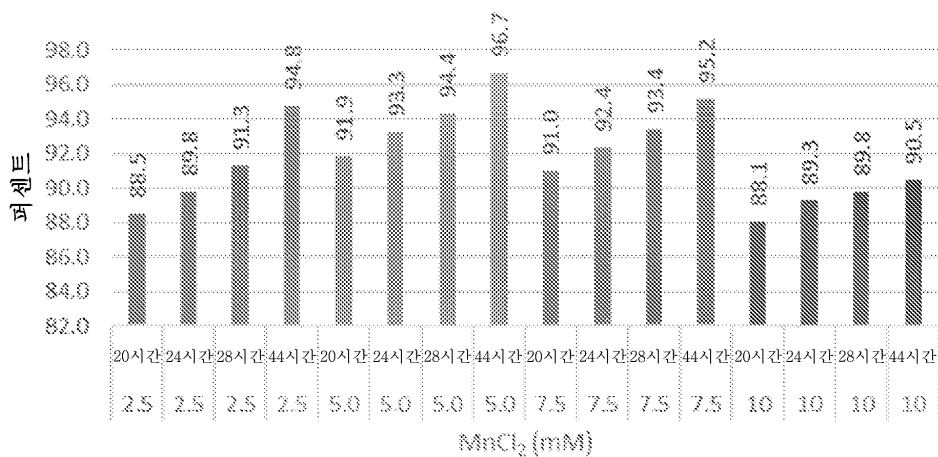
도면7b



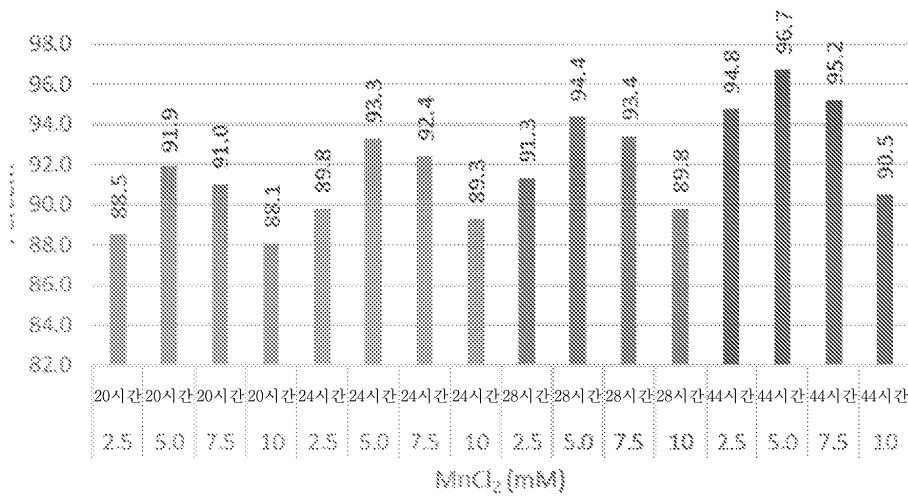
도면8



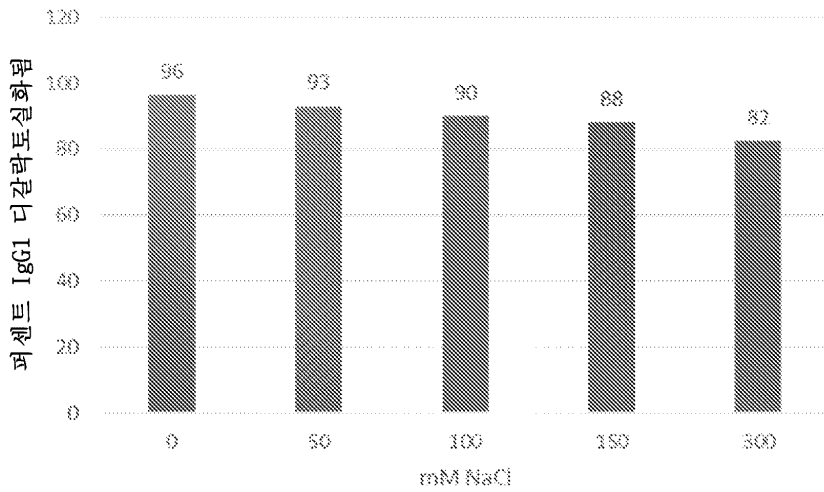
도면9



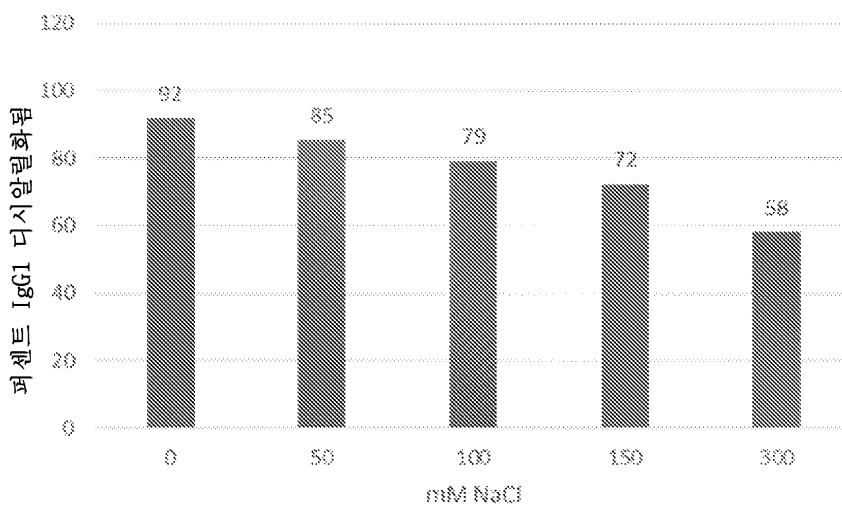
도면10



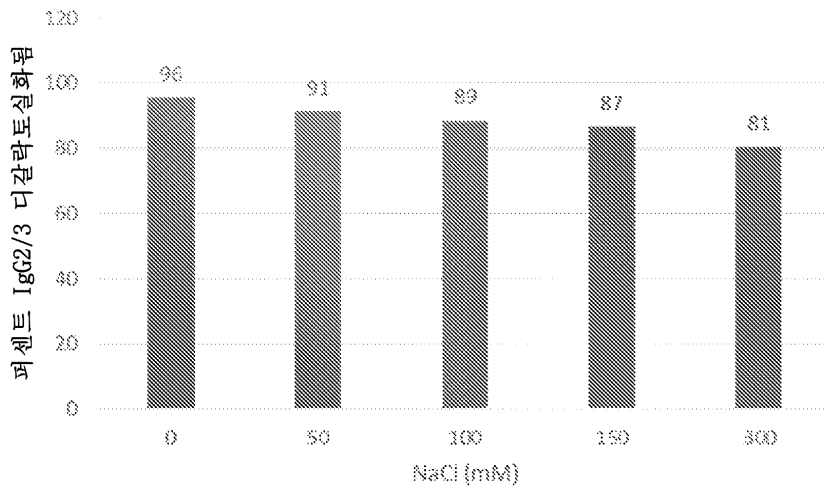
도면11



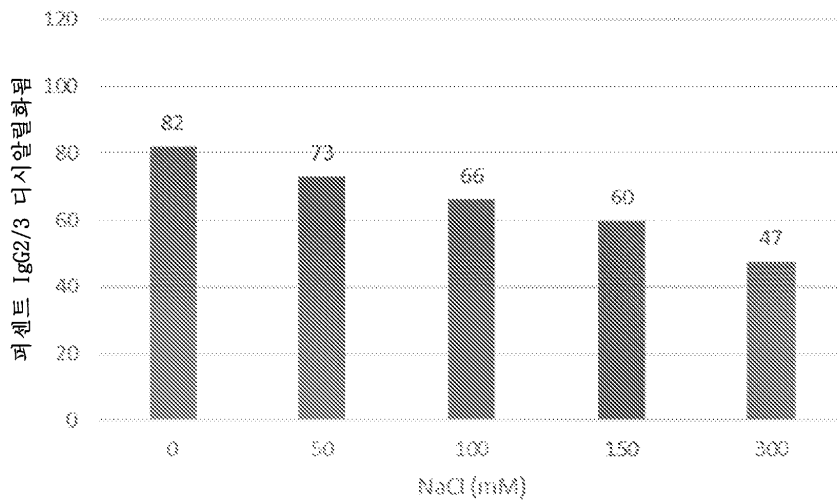
도면12



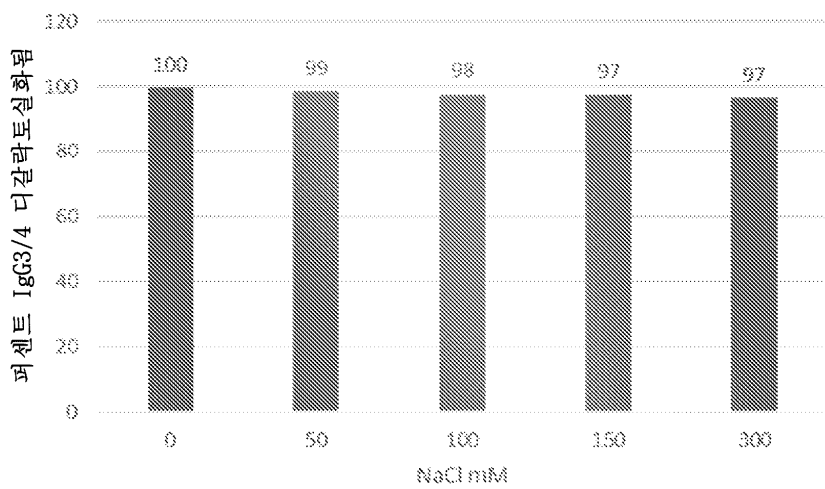
도면13



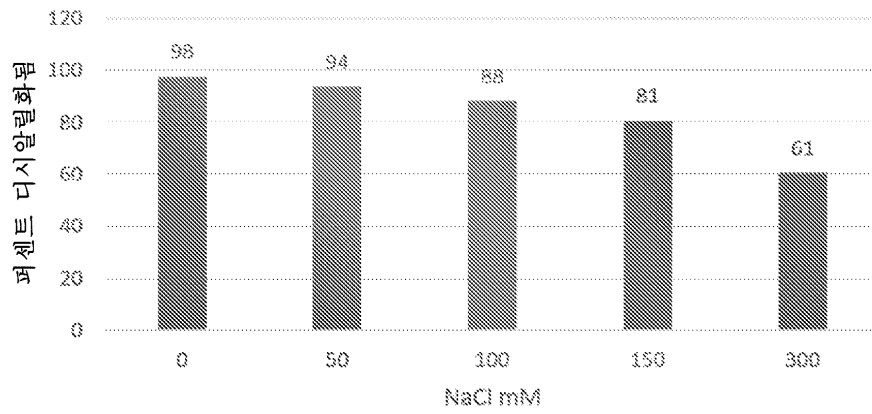
도면14



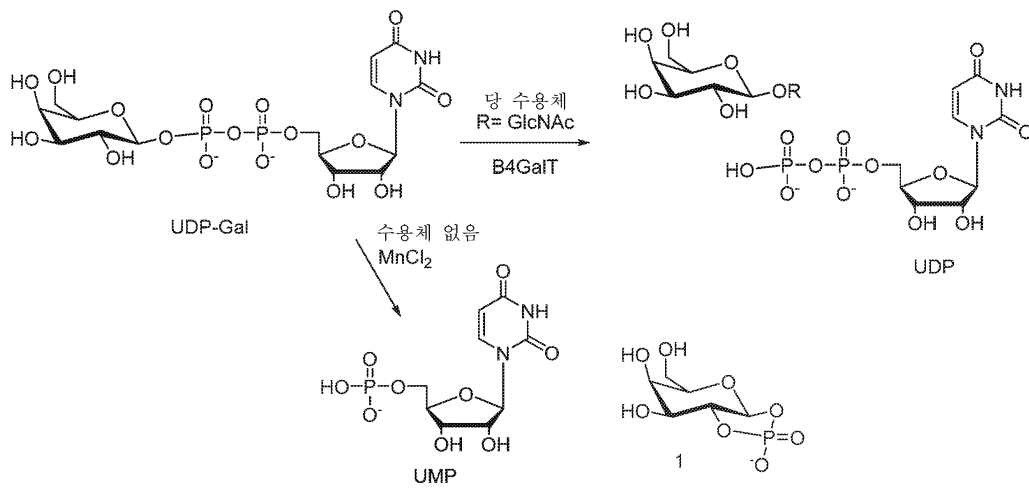
도면15



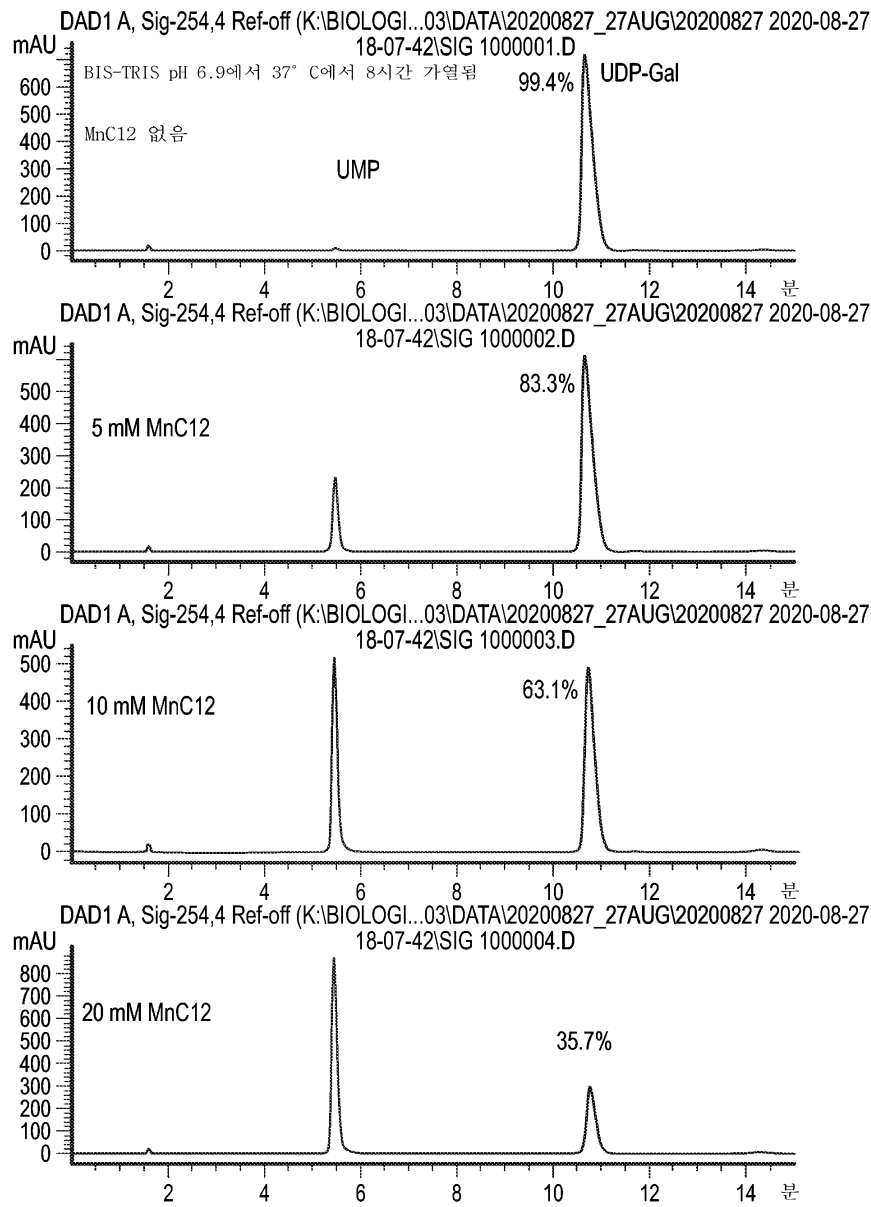
도면16



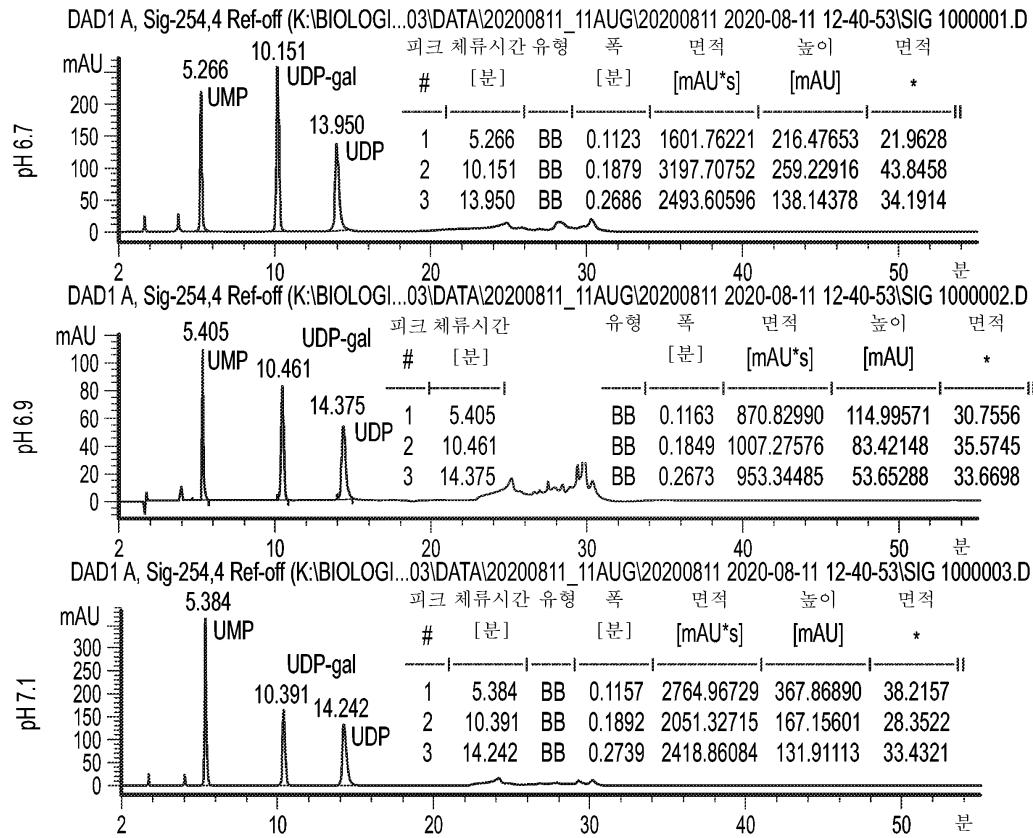
도면17



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Momenta Pharmaceuticals, Inc.

<120> HYPER-SIALYLATED IMMUNOGLOBULIN

<130> 14131-0229W01

<140> PCT/US2021/033150

<141> 2021-05-19

<150> 63/026,826

<151> 2020-05-19

<150> 63/108,741

<151> 2020-11-02

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

1                    5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg

1                    5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg

1                    5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

1                    5

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly

1                    5                    10                    15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu

20                    25                    30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
 35 40 45  
 Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
 65 70 75 80  
  
 Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
 85 90 95  
 Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
 100 105 110  
 Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
 115 120 125  
 Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
 130 135 140  
  
 Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn  
 145 150 155 160  
 Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
 165 170 175  
 Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
 180 185 190  
 Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp  
 195 200 205  
  
 Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg  
 210 215 220  
 Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp  
 225 230 235 240  
 Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp  
 245 250 255  
 His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala  
 260 265 270  
  
 Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly



Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu  
 100 105 110  
 Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met  
 115 120 125  
 Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln  
 130 135 140  
 Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val  
 145 150 155 160  
 Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu  
 165 170 175  
 His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln  
 180 185 190  
 Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys  
 210 215 220  
 Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro  
 225 230 235 240  
 Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile  
 245 250 255  
 Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn  
 275 280 285  
 Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile  
 290 295 300  
 Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala  
 305 310 315 320  
 Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn  
 325 330 335  
 Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr



Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
 165 170 175

Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
 180 185 190

Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp  
 195 200 205

Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg  
 210 215 220

Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp  
 225 230 235 240

Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp  
 245 250 255

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala  
 260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser  
 275 280 285

Arg Pro Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg  
 290 295 300

Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His  
 305 310 315 320

Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln  
 325 330 335

Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp  
 340 345 350

Ile Gly Thr Pro Ser  
 355

<210> 8

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
                   20                    25                    30  
 His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
                   35                    40                    45  
 Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
                   50                    55                    60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
                   85                    90                    95  
 Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
                   100                    105                    110  
 Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
                   115                    120                    125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
                   130                    135                    140  
 Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
                   165                    170                    175  
 Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
                   180                    185                    190

Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp  
                   195                    200                    205  
 Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Tyr Glu Lys Ile Arg Arg Leu Leu  
                   210                    215                    220  
 Trp  
 225  
 <210> 9  
 <211> 24

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg

20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr Leu Ala Gly  
 20

<210> 11  
 <211> 354  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 Arg Asp Leu Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Gly Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu  
 20                    25                    30

Leu Arg Thr Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser  
 35                    40                    45  
 Gln Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro  
 50                    55                    60  
 Gly Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro



Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr

340 345 350

Pro Ser

<210> 12

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> B4GalT

<400> 12

Gly Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro

20 25 30

Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys

35 40 45

Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys

50 55 60

Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln

65 70 75 80

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg

85 90 95

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr

100 105 110

Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu

115 120 125

Lys Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile

130 135 140

Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His

145 150 155 160

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln

165 170 175

Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile

180 185 190

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp

195 200 205

Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn

210 215 220

Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys

225 230 235 240

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu

245 250 255

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp

260 265 270

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr

275 280 285

Pro Ser

290

<210> 13

<211> 308

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> B4GalT

<400> 13

Gly Ser Ser Pro Leu Leu Asp Met Gly Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser

1 5 10 15

Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu

20 25 30

Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro

35 40 45

Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly

50 55 60



305

<210> 14

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val Leu Val

1                    5                    10                    15

Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val Trp Lys Glu Lys Lys Lys Gly

                  20                    25                    30

Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Lys Leu Gln Thr Lys Glu Phe Gln Val Leu

                  35                    40                    45

Lys Ser Leu Gly Lys Leu Ala Met Gly Ser Asp Ser Gln Ser Val Ser

                  50                    55                    60

Ser Ser Ser Thr Gln Asp Pro His Arg Gly Arg Gln Thr Leu Gly Ser

65                    70                    75                    80

Leu Arg Gly Leu Ala Lys Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp

                  85                    90                    95

Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile

                  100                    105                    110

Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly

                  115                    120                    125

Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu

                  130                    135                    140

Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe

145                    150                    155                    160

Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr

                  165                    170                    175

Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser

                  180                    185                    190

Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val



<400> 15

Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val Trp Asp Pro Ser Val Tyr His  
 20 25 30

Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn  
 35 40 45

Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile  
 50 55 60

Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile  
 65 70 75 80

Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly  
 85 90 95

Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe  
 100 105 110

Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe  
 115 120 125

Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu  
 130 135 140

Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr  
 145 150 155 160

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly Phe Arg Thr Ile His Cys  
 165 170 175

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ile His Thr Asn Leu Lys Lys Lys

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Phe Ser Cys Cys Val Leu Val Phe Leu Leu Phe Ala Val Ile Cys Val

1                    5                    10                    15

Trp

<210> 18

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Glu Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Lys Leu Gln Thr

1                    5                    10                    15

Lys Glu Phe Gln Val Leu Lys Ser Leu Gly Lys Leu Ala Met Gly Ser

20                    25                    30

Asp Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Pro His Arg Gly

35                    40                    45

Arg Gln Thr Leu Gly Ser Leu Arg Gly Leu Ala Lys Ala Lys Pro Glu

50                    55                    60

Ala Ser Phe Gln Val Trp Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile

65                    70                    75                    80

Pro Arg Leu Gln Lys Ile Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr

85                    90                    95

Lys Val Ser Tyr Lys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu

100                    105                    110

Ala Leu Arg Cys His Leu Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu

115                    120                    125

Val Thr Asp Phe Pro Phe Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro

130                    135                    140

Lys Glu Ser Ile Arg Thr Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val

145                    150                    155                    160

Val Ser Ser Ala Gly Ser Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile  
 165 170 175

Asp Asp His Asp Ala Val Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn  
 180 185 190

Phe Gln Gln Asp Val Gly Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser  
 195 200 205

Gln Leu Val Thr Thr Glu Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn  
 210 215 220

Glu Gly Ile Leu Ile Val Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile  
 225 230 235 240

Pro Lys Trp Tyr Gln Asn Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys  
 245 250 255

Thr Tyr Arg Lys Leu His Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro  
 260 265 270

Gln Met Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu  
 275 280 285

Glu Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile  
 290 295 300

Met Met Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser  
 305 310 315 320

Lys Arg Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser  
 325 330 335

Ala Cys Thr Met Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu  
 340 345 350

Val Lys His Leu Asn Gln Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly  
 355 360 365

Lys Ala Thr Leu Pro Gly Phe Arg Thr Ile His Cys  
 370 375 380

<210> 19  
 <211> 320  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> ST6Gal1

<400> 19

Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp Asn Lys Asp Ser Ser Ser

1                    5                    10                    15  
Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile Trp Lys Asn Tyr Leu Ser

                  20                    25                    30  
Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Lys

                  35                    40                    45  
Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu Arg Asp His Val Asn Val

                  50                    55                    60  
Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe Asn Thr Ser Glu Trp Glu

65                    70                    75                    80  
Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr Lys Ala Gly Pro Trp Gly

                  85                    90                    95  
Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser Leu Lys Ser Ser Gln Leu

                  100                    105                    110  
Gly Arg Glu Ile Asp Asp His Asp Ala Val Leu Arg Phe Asn Gly Ala

                  115                    120                    125  
Pro Thr Ala Asn Phe Gln Gln Asp Val Gly Thr Lys Thr Thr Ile Arg

                  130                    135                    140  
Leu Met Asn Ser Gln Leu Val Thr Thr Glu Lys Arg Phe Leu Lys Asp

145                    150                    155                    160  
Ser Leu Tyr Asn Glu Gly Ile Leu Ile Val Trp Asp Pro Ser Val Tyr

                  165                    170                    175  
His Ser Asp Ile Pro Lys Trp Tyr Gln Asn Pro Asp Tyr Asn Phe Phe

                  180                    185                    190  
Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Arg Lys Leu His Pro Asn Gln Pro Phe Tyr

                  195                    200                    205  
Ile Leu Lys Pro Gln Met Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Leu Gln Glu

                  210                    215                    220  
Ile Ser Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly Met Leu

225                    230                    235                    240  
 Gly Ile Ile Ile Met Met Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu  
                           245                    250                    255  
 Phe Leu Pro Ser Lys Arg Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys  
  
                           260                    265                    270  
 Phe Phe Asp Ser Ala Cys Thr Met Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr  
                           275                    280                    285  
 Glu Lys Asn Leu Val Lys His Leu Asn Gln Gly Thr Asp Glu Asp Ile  
                           290                    295                    300  
 Tyr Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Pro Gly Phe Arg Thr Ile His Cys  
 305                    310                    315                    320  
 <210> 20  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220><223> ST6Gal1  
 <400> 20  
 Gly Ser Ser Pro Leu Leu Asp Met Leu Glu His His His His His His  
 1                    5                    10                    15  
 His His Met Ala Lys Pro Glu Ala Ser Phe Gln Val Trp Asn Lys Asp  
                           20                    25                    30  
 Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg Leu Gln Lys Ile Trp Lys Asn  
                           35                    40                    45  
 Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Lys Gly Pro Gly Pro  
                           50                    55                    60  
  
 Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu Arg Cys His Leu Arg Asp His  
 65                    70                    75                    80  
 Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr Asp Phe Pro Phe Asn Thr Ser  
                           85                    90                    95  
 Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Ile Arg Thr Lys Ala Gly  
                           100                    105                    110  
 Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser Ser Ala Gly Ser Leu Lys Ser

