



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월25일

(11) 등록번호 10-1441437

(24) 등록일자 2014년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. C1.)

C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7031320

(22) 출원일자(국제) 2010년06월01일

심사청구일자 2012년02월09일

(85) 번역문제출일자 2011년12월28일

(65) 공개번호 10-2012-0029443

(43) 공개일자 2012년03월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/036914

(87) 국제공개번호 WO 2010/141478

국제공개일자 2010년12월09일

(30) 우선권주장

61/183,400 2009년06월02일 미국(US)

61/348,858 2010년05월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

EP01331266 A1

BMC Biotechnology. 2007, vol. 7, no. 1, p.  
84.

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 푸코실화-결핍 세포

**(57) 요약**

위치 79에 세린, 위치 90에 리신, 위치 136에 류신, 위치 211에 아르기닌, 위치 289에 세린 및 이들의 조합을 갖는 FX 단백질을 암호화하는 분리된 핵산이 제공된다. 변형된 FX 단백질을 암호화하는 유전자를 가진 세포가 제공되며, 상기 세포는 제 1 온도에서는 당단백질을 푸코실화하는 감소된 능력을 나타내지만, 제 2 온도에서는 당단백질을 푸코실화하는 능력을 나타낸다. 푸코실화가 감소된 당단백질을 제조하는 방법 및 조성물이 제공된다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

당단백질을 푸코실화할 수 있는 세포로서,

상기 세포는 변형된 GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스-3,5-에피머라제-4-리덕타제(FX) 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하고;

상기 변형된 FX 단백질은 *C. griseus*의 FX 단백질(SEQ ID NO:1)에서 L289S 변형을 포함하는 단백질이고; 및

외부 푸코오스 공급원의 부재시에 37°C의 온도에서 세포가 성장될 경우에 당단백질의 10% 이하가 푸코실화되는 세포.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 변형된 FX 단백질은 N79S, N90K, P136L 및 G211R로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 변형을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 세포는 면역글로불린 CH2 영역과 면역글로불린 CH3 영역을 포함하는 당단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 당단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 8

제 6 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 부재시에 37°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 당단백질의 6% 이하가 푸코실화되는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 부재시에 37°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 당단백질의 2% 이하가 푸코실화되는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 부재시에 34°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 세포가 당단백질의 적어도 70%를 푸코실화하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 11

제 1 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 부재시에 34°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 세포가 당단백질의 적어도 90%를 푸코실화하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 12

제 1 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 존재시에 37°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 세포가 당단백질

의 적어도 70%를 푸코실화하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 13

제 1 항에 있어서, 외부 푸코오스 공급원의 존재시에 37°C의 온도에서 세포가 성장된 경우에 세포가 당단백질의 적어도 90%를 푸코실화하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 14

C. griseus의 FX 단백질(SEQ ID NO:1)에서 L289S 변형을 포함하는 FX 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

### 청구항 15

삭제

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

제 1 항에 있어서, 면역글로불린 유전자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포.

### 청구항 18

감소된 푸코실화를 가진 당단백질을 제조하는 방법으로서,

제 1 항 또는 제 2 항의 세포를 37°C의 온도에서 외부 푸코오스 공급원의 부재하에 배양하는 단계; 및 배양물로부터 당단백질을 분리하는 단계  
를 포함하고,

상기 세포는 면역글로불린 CH2 및 면역글로불린 CH3 영역을 포함하는 당단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 19

삭제

### 청구항 20

제 18 항에 있어서, 당단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 푸코실화(fucosylation) 경로의 변형된 포유류 효소, 및 단백질을 푸코실화하는 능력을 감소시키는 유전자 변형을 포함하는 세포에 관한 것이며, 변형된 포유류 효소를 지닌 세포는 단백질을 푸코실화하는 감소된 능력을 나타낸다. 본 발명은 야생형 셀라인과 비교하여 푸코실화가 감소된 항체를 포함하는 단백질을 발현하는 포유류 셀라인(예를 들어, CHO 계통)을 포함한다. 또한, 본 발명은 단백질 푸코실화의 조건적 제어에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 단백질을 푸코실화할 수 없는 셀라인들이 본 분야에 알려져 있다. 단백질을 푸코실화할 수 없는 많은 기능 상실 돌연변이체가 알려져 있으며, 아마도 특정 렉틴에 대한 내성에 대해 선택된 특정 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 돌연변이체가 가장 주목된다. 이러한 셀라인은 돌연변이원의 존재하에 특정 렉틴, 예를 들어 *Lens culinaris* 렉틴과 결합할 수 없는 무능력에 대해 반복적으로 선택함으로써 분리된다. 단백질, 예를 들어 항체를 푸코실화할 수 없다고 보고된 다른 셀라인들도 알려져 있으며, 예를 들어 미국특허 No. 7,425,466과 미

국특허 No. 7,214,775(  $\alpha$  1,6-푸코실트랜스페라제, 즉 FUT8 돌연변이체)를 참조한다. 단백질을 푸코실화하는 능력이 감소된 셀라인, 특히 녹아웃이 없을 때도 감소된 푸코실화 능력을 갖는 세포, 및 단백질을 조건적으로 푸코실화하는 세포가 본 분야에 여전히 필요하다.

### 발명의 내용

- [0003] 한 양태에서, 79S, 90K, 136L, 211R, 289S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 변형을 포함하는 분리된 변형된 GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스-3,5-에피마라제-4-리덕타제(FX) 단백질이 제공된다. 한 구체예에서, FX 단백질은 289S 변형을 포함한다. 한 구체예에서, FX 단백질은 289S 변형과 79S, 90K, 136L, 211R 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함한다.
- [0004] 한 양태에서, 변형된 FX 단백질 서열을 코딩하는 핵산이 제공된다. 특정 구체예에서, 핵산은 cDNA이다. 한 구체예에서, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 표적화 벡터가 제공된다. 한 구체예에서, 표적화 벡터의 핵산은 인트론을 포함한다. 한 구체예에서, 표적화 벡터의 핵산은 변형된 FX 단백질을 암호화하는 cDNA를 포함한다. 특정 구체예에서, 표적화 벡터는 사람, 비-사람 영장류, 햄스터, 마우스 또는 래트 계놈에 벡터를 표적화하는 표적화 서열을 포함한다.
- [0005] 한 양태에서, FX 단백질을 코딩하는 핵산에 변형을 포함하거나, 또는 변형을 가진 FX 단백질을 발현하는 세포가 제공되며, 상기 세포는 야생형 FX 단백질을 발현하지 않거나 실질적으로 발현하지 않는다. 특정 구체예에서, 세포는 변형이 없는 세포와 비교하여 10% 이하, 5% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하의 야생형 FX 단백질을 나타낸다.
- [0006] 한 구체예에서, 변형된 FX 단백질 또는 핵산을 포함하는 세포는 Fc-함유 당단백질을 발현하며, 상기 세포는 변형이 없는 세포와 비교하여 90% 이하, 95% 이하, 96% 이하, 97% 이하, 98% 이하, 또는 99% 이하의 당단백질을 푸코실화한다.
- [0007] 한 양태에서, FX 단백질을 암호화하는 핵산에 변형을 포함하거나, 또는 변형을 가진 FX 단백질을 발현하는 세포가 제공되며, 상기 세포는 제 1 온도에서는 당단백질을 푸코실화하는 능력을 결여하거나 실질적으로 결여하지만, 제 2 온도에서는 당단백질을 푸코실화하는 능력을 결여하지 않거나 실질적으로 결여하지 않는다.
- [0008] 한 구체예에서, 제 1 온도는 약 37°C이다. 한 구체예에서, 제 2 온도는 약 34°C이다.
- [0009] 한 구체예에서, 제 1 온도에서 당단백질을 푸코실화하는 능력은 변형이 없는 세포가 나타내는 당단백질 푸코실화 능력의 약 1% 내지 약 10%이다. 한 구체예에서, 제 2 온도에서 당단백질을 푸코실화하는 능력은 변형이 없는 세포에 의한 당단백질 푸코실화 능력과 비교하여 약 70%, 80%, 90% 또는 그 이상이다.
- [0010] 특정 구체예에서, FX 단백질 변형은 다음 아미노산 치환으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다: 90K, 289S, 211R, 136L, 79S 및 이들의 조합. 특정 구체예에서, 치환은 289S이다.
- [0011] 한 구체예에서, FX 단백질은 비-사람 영장류(예를 들어, *Macaca mulatta*), 사람, 마우스(예를 들어, *Mus musculus*), 래트(예를 들어, *Rattus norvegicus*), 또는 햄스터(예를 들어, 중국 햄스터 또는 *Cricetulus griseus*)로부터 얻어진다. 특정 구체예에서, FX 단백질은 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 또는 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하고, 본원에 설명된 하나 이상의 변형(예를 들어, 아미노산 치환)을 보유한다.
- [0012] 한 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO:1의 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하고, 다음 위치들 중 하나 이상에 다음 아미노산 중 하나 이상을 더 포함하는 FX 단백질을 코딩한다: 79S, 90K, 136L, 211R 및 289S.
- [0013] 한 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO:2의 FX와 적어도 95% 동일한 FX를 코딩한다. 특정 구체예에서, FX는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 가진다.
- [0014] 한 양태에서, 당단백질을 푸코실화하는 세포의 능력을 감소시키는 변형을 포함하는 세포가 제공되며, 상기 변형은 당단백질을 푸코실화하는 능력을 감소시키는 FX 유전자 서열에 있는 돌연변이나 변경을 포함한다.
- [0015] 한 구체예에서, 세포는 GDP-만노오스 4,6-데히드라타제(GMD), 야생형 GDP- $\beta$ -L-푸코오스 피로포스포릴라제(GFPP), 야생형  $\alpha$ -1,6-푸코실트랜스페라제(FUT8) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 야생형 푸코실화 경로 효소를 발현한다.
- [0016] 한 양태에서, FX 유전자에 변형을 포함하는 단백질을 푸코실화할 수 있는 포유류 세포가 제공되며, 상기 변형

은 돌연변이나 변경이 없는 세포와 비교하여 단백질을 푸코실화하는 세포의 능력을 적어도 90% 감소시킨다.

[0017] 한 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 포유류 세포와 비교하여 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이다.

[0018] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 변형된 세포와 변형을 포함하지 않는 세포의 비교는 동일한 조건에서 또는 본 질적으로 동일한 조건에서 수행된다(예를 들어, 배지, 온도, 세포 밀도 등).

[0019] 한 구체예에서, 세포는 COS 세포, CHO 세포, 293 세포, BHK 세포, HeLa 세포, Vero 세포, 아데노바이러스 유전자, 예를 들어 AD5E1로 트랜스펙션된 포유류 세포, 제한은 아니지만 아데노바이러스 유전자로 트랜스펙션된 불멸화된 사람 망막세포, 예를 들어 PER.C6™ 세포 및 NSO 세포로부터 선택된다. 한 구체예에서, 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다. 특정 구체예에서, CHO 세포는 CHO K1 세포이다.

[0020] 한 구체예에서, 변형은 다음 아미노산 79S, 90K, 136L, 211R, 289S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 치환은 289S를 포함한다. 또 다른 특정 구체예에서, 치환은 289S와 79S, 90K, 136L 및 211R 중 하나 이상을 포함한다.

[0021] 한 구체예에서, 세포는 N79S, N90K, P136L, G211R, L289S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환을 갖는 SEQ ID NO:1의 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 FX 유전자를 포함한다. 한 특정 구체예에서, 아미노산 치환은 L289S와 N79S, N90K, P136L 및 G211R 중 하나 이상을 포함한다.

[0022] 한 구체예에서, 세포는 면역글로불린 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 더 포함한다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 단백질은 사람 단백질 또는 마우스 단백질이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 단백질은 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 한 특정 구체예에서, 면역글로불린 단백질은 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소타입의 것이다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄는 IgG1 이소타입, 예를 들어 사람 IgG1 이소타입이다. 한 구체예에서, 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역은 사람 CDR을 포함하고, 다른 구체예에서는 마우스 CDR, 또 다른 구체예에서는 마우스 또는 비-사람 영장류의 인간화된 CDR을 포함한다.

[0023] 한 구체예에서, 세포는 면역글로불린 중쇄의 CH2 및 CH3 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다. 한 구체예에서, 면역글로불린 중쇄는 이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 것이다.

[0024] 한 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 특정 구체예에서, 항원-결합 단백질은 항체이다. 특정 구체예에서, 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 이소타입의 중쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 IgG1 이소타입의 항체이다.

[0025] 한 구체예에서, 단백질은 항체이고, 세포에 의해 제조된 항체 단백질의 단지 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0.5% 만이 푸코실화된다. 한 구체예에서, 푸코실화된 제조된 항체 단백질의 양은 항체 단백질을 하룻밤 탈글리코실화(deglycosylation)한 다음, HPLC에 의한 다당류 분석에 의해 측정되며, 글리칸 피크 면적을 적분하여 푸코실-함유 다당류가 정량되고, 예를 들어 단백질 푸코실화가 글리칸 피크 면적에 기초하여 계산된다. 특정 구체예에서, 푸코실화된 글리칸은 질량분광법에 의해서 확인된다.

[0026] 한 양태에서, 항원-결합 단백질을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 단백질을 푸코실화하는 세포의 능력을 적어도 90% 감소시키는 변형을 FX 유전자에 포함하는, 단백질을 푸코실화할 수 있는 세포를 제공하는 단계; (b) 항원-결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 세포에 도입하는 단계; (c) 항원-결합 단백질을 생산할 수 있는 핵산 서열을 발현할 수 있는 충분한 조건에서 세포를 유지하는 단계; 및 (d) 세포에 의해 발현된 항원-결합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.

[0027] 한 구체예에서, 항원-결합 단백질은 항체이다. 특정 구체예에서, 항체는 사람 항체, 마우스 항체, 키메라 사람/마우스 항체 및 비-사람 영장류 항체로부터 선택된다.

[0028] 한 구체예에서, 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0029] 한 구체예에서, 단백질을 푸코실화하는 세포 능력의 감소는 FX 유전자에 변형이 없는 세포와 비교하여 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5%이다.

[0030] 한 구체예에서, 변형은 다음 위치들에 있는 다음 아미노산으로 구성되는 군으로부터 선택된다: 79S, 90K, 136L, 211R 및 289S. 한 구체예에서, 변형은 289S와 79S, 90K, 136L 및 211R 중 적어도 하나를 포함한다.

[0031] 한 구체예에서, 푸코실트랜스페라제 유전자는 N79S, N90K, P136L, G211R 및 L289S로 구성되는 군으로부터 선

택된 아미노산 치환을 갖는, SEQ ID NO:1의 서열을 포함하는 단백질을 암호화한다. 한 구체예에서, 변형은 L289S와 N79S, N90K, P136L 및 G211R 중 적어도 하나를 포함한다.

[0032] 한 구체예에서, 항체 또는 그것의 단편은 사람 항체 또는 그것의 단편이다. 특정 구체예에서, 항체는 IgG1 이소타입, 예를 들어 사람 IgG1이다.

[0033] 한 구체예에서, 회수된 항체는 변형이 없는 야생형 세포에서 제조된 동일한 항체와 비교하여 약 5% 이하의 푸코실화를 가지며, 다른 구체예에서는 변형이 없는 야생형 세포에서 제조된 동일한 항체와 비교하여 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0.5% 이하의 푸코실화를 가진다.

[0034] 한 양태에서, GDP-만노오스 4,6-데히드라타제(GMD), 야생형 GDP- $\beta$ -L-푸코오스 피로포스포릴라제(GFPP), 야생형  $\alpha$ -1,6-푸코실트랜스페라제(FUT8) 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 야생형 푸코실화 경로 효소를 발현하는 세포가 제공되며, 상기 세포는 변형된 FX 유전자를 포함하고, FX 유전자에 변형이 없는 세포와 비교하여 당단백질을 푸코실화하는 감소된 능력을 가진다.

[0035] 특정 구체예에서, 당단백질은 Fc를 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 IgG의 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, IgG의 서열은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 서열 또는 이들의 조합이다. 특정 구체예에서, 단백질은 항체이고, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및/또는 IgG4 서열을 갖는 Fc를 포함한다.

[0036] 한 구체예에서, 세포는 CHO 세포, COS 세포, 사람 망막세포(예를 들어, PER.C6<sup>TM</sup>), Vero 또는 HeLa 세포로부터 선택된다.

[0037] 한 양태에서, 변형된 FX 유전자를 포함하는 포유류 세포에서 당단백질을 발현하는 단계를 포함하는 당단백질을 제조하는 방법이 제공된다.

[0038] 한 구체예에서, CHO 세포가 당단백질을 발현할 수 있는 충분한 조건에서 배양 배지에서 당단백질-발현 CHO 세포를 배양하는 단계, 및 CHO 세포 또는 배양 배지로부터 발현된 당단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 당단백질을 제조하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 발현된 당단백질은 약 5% 이하가 푸코실화된다. 한 구체예에서, 약 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0.5% 이하가 푸코실화된다. 특정 구체예에서, 푸코실화 퍼센트는 글리칸에 대한 푸코오스의 몰 퍼센트이다. 특정 구체예에서, 푸코실화 퍼센트는 당단백질에 대한 푸코오스의 몰 퍼센트이다. 특정 구체예에서, 푸코실화되지 않은 단백질 대 푸코실화된 단백질의 몰 비는 약 0.90 내지 0.10, 약 0.91 내지 0.09, 약 0.92 내지 0.08, 약 0.93 내지 0.07, 약 0.94 내지 0.06, 약 0.95 내지 0.05, 약 0.96 내지 0.04, 약 0.97 내지 0.03, 약 0.98 내지 0.02, 또는 약 0.99 내지 0.01이다.

[0039] 한 구체예에서, 당단백질은 위치 297(EU 넘버링)에 다음의 글리칸 부분을 갖는 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역을 포함한다: N-연결을 통해서 당단백질에 결합된 GlcNAc(1); GlcNAc(1)-GlcNAc(2)-만노오스(1), 여기서 만노오스(1)는 제 1 및 제 2 부분을 지니며, 제 1 부분은 만노오스(2)-ManGlcNAc(3)로 필수적으로 구성되고; 제 2 부분은 만노오스(3)-GlcNAc(4)로 필수적으로 구성된다. 한 구체예에서, 탄수화물 부분이 GlcNAc(4)에 결합된 Gal(1)으로 필수적으로 더 구성된다. 다른 구체예에서, 탄수화물 부분이 GlcNAc(4)에 결합된 Gal(1) 및 GlcNAc(3)에 결합된 Gal(2)로 필수적으로 더 구성된다.

[0040] 한 구체예에서, 푸코실화된 당단백질은 이 문단의 직전 문단에서 설명된 푸코실화되지 않은 글리칸 부분과 동일한 글리칸 부분을 포함하며, 또한 GlcNAc(1)에 푸코오스 부분을 더 보유한다.

[0041] 한 양태에서, 유전자 변형된 세포가 제공되며, 변형은 FX 유전자에 대한 것이고, 변형은 아미노산 79S, 90K, 136L, 211R, 289S 중 적어도 하나를 갖는 FX 단백질을 암호화하는 FX mRNA를 생산하는 세포를 가져오며, 이 세포는 FX 유전자 변형이 없는 세포와 비교하여 당단백질을 푸코실화하는 감소된 능력을 나타낸다. 한 구체예에서, mRNA는 위치 289에 세린을 포함하는 FX 단백질을 암호화한다. 또 다른 구체예에서, mRNA는 79S, 90K, 136L, 211R 중 적어도 하나를 더 포함하는 FX 단백질을 암호화한다.

[0042] 한 양태에서, 유전자 변형된 세포가 제공되며, 변형은 FX 유전자에 대한 것이고, 변형은 변형된 FX 유전자가 위치 79에 세린, 위치 90에 리신, 위치 136에 류신, 위치 211에 아르기닌, 및 위치 289에 세린 중 적어도 하나를 갖는 FX 단백질을 코딩하도록 FX 유전자의 코돈을 변경한다. 한 구체예에서, FX 단백질은 위치 289에 세린과 위치 90에 리신, 위치 136에 류신 및/또는 위치 211에 아르기닌 중 적어도 하나를 포함한다.

[0043] 한 구체예에서, 세포는 Fc-함유 단백질을 발현한다. 한 구체예에서, Fc-함유 단백질은 항체이다.

[0044] 한 구체예에서, 세포는 Fc-함유 단백질은 글리코실화하지만, 글리코실화된 Fc-함유 단백질은 실질적으로 푸코

실화하지 않는다. 특정 구체예에서, 푸코실화는 FX 유전자 변형이 없는 세포와 비교하여 글리코실화된 Fc-함유 단백질의 푸코실화의 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0.5% 이하이다.

[0045] 한 구체예에서, 글리코실화는 바이안테나리 트리만노실 기를 포함한다. 한 구체예에서, 푸코오스 대 바이안테나리 트리만노실 기의 몰 비는 약 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 1:200 이하이다. 한 구체예에서, 푸코실화된 Fc-함유 단백질에서 푸코오스 대 바이안테나리 트리만노실 기의 몰 비는 약 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 1:200 이하이다.

[0046] 한 구체예에서, Fc-함유 단백질은 항체이고, 글리코실화는 Fc의 위치 297에 글리칸 부분을 포함한다. 한 구체예에서, 푸코오스 대 글리칸 부분의 몰 비는 1:20, 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 200 이하이다. 한 구체예에서, 글리칸 부분은 2개의 직렬 GlcNAc 잔기와 그에 이어진 바이안테나리 트리만노실 부분을 포함하며, 트리만노실 부분의 2개의 말단 만노실 부분의 각각이 GlcNAc 잔기를 1개씩 보유한다. 한 구체예에서, 글리칸에서 푸코오스 대 GlcNAc의 몰 비는 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400 또는 1:800 이하이다.

[0047] 한 양태에서, 당단백질을 이소적으로 발현하는 변형된 포유류 세포가 제공되며, 상기 변형은 변형된 FX 핵산 서열을 포함하고, 상기 세포는 푸코오스 회수 경로 및 신생 푸코오스 합성 경로를 포함하며, 기능적 FUT8 단백질과 기능적 GMD 단백질을 발현하고, 신생 푸코오스 합성 경로는 약 37°C에서는 FX 핵산 서열의 변형으로 인해 당단백질을 실질적으로 푸코실화할 수 없지만, 약 34°C에서는 당단백질을 실질적으로 푸코실화할 수 있다.

[0048] 본원에 설명된 각 양태 및 구체예들은 단독으로 이용되거나, 또는 분명히 다른 언급이 있거나 또는 이러한 조합이 문맥상 허용되지 않는 경우를 제외하면 다른 양태나 구체예와 조합하여 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 FX 단백질 서열의 MacVector™ 정렬을 도시한 것으로서, (위에서부터 아래로) 원숭이(*Macacca mulatta*), SEQ ID NO:3; 사람, SEQ ID NO:4; 마우스(*Mus musculus*), SEQ ID NO:5; 래트(*Rattus norvegicus*), SEQ ID NO:6; CHO(*Cricetulus griseus*), SEQ ID NO:1; L289S 및 N90K 변형을 가진 CHO(셀라인 8088로 지정됨), SEQ ID NO:2이다.

도 2는 LCA로 염색하기 전후의 3033, 6066, 7077 및 8088 세포의 유세포분석 히스토그램을 도시한다.

도 3은 염색되지 않은 4044-1 세포의 유세포분석 히스토그램, 및 LCA로 염색된 4044-1, 6069, 2020 및 2121 세포의 히스토그램을 도시한다.

도 4는 염색되지 않은 5055 세포의 유세포분석 히스토그램, 및 LCA로 염색된 5055, 8088 및 1010 세포의 히스토그램을 도시한다.

도 5는 LCA로 염색하기 전후의 37°C 및 34°C에서 배양된 4044-1 및 6066-1 세포의 유세포분석 히스토그램을 도시한다.

도 6은 5mM L-푸코오스를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 배양된 3033, 7077, 8088 및 1010 세포의 유세포분석 히스토그램, 및 L-푸코오스를 첨가하지 않은 배지에서 배양된 5055 세포의 히스토그램을 도시한다. 모든 세포는 LCA로 염색되었다.

도 7은 pR4009, pR4010 및 pR4011로 안정하게 트랜스펙션된 8088 세포, 및 5055 세포의 유세포분석 히스토그램을 도시한다.

도 8은 외부 푸코오스 공급원의 부재하에 37°C에서 성장된 8088 세포에서 Ab 3.1에 대한 HPLC에 의한 글리칸 분리를 도시한다(1.47% 푸코실화).

도 9는 도 8의 글리칸에 대한 질량분광분석 결과를 도시한다. 글리칸의 구조가 각 피크의 우측에 표시된다. GlcNAc 잔기는 사각형, 만노오스 잔기는 원형, 갈락토오스 잔기는 다이아몬드형으로 표시된다.

도 10은 10mM 푸코오스의 존재하에 37°C에서 성장된 8088 세포에서 Ab 3.1에 대한 HPLC에 의한 글리칸 분리를 도시한다(95.22% 푸코실화).

도 11은 도 10의 글리칸에 대한 질량분광분석 결과를 도시한다. 글리칸의 구조가 각 피크의 우측에 표시된다. GlcNAc 잔기는 사각형, 만노오스 잔기는 원형, 갈락토오스 잔기는 다이아몬드형, 푸코오스 잔기는

삼각형으로 표시된다.

도 12는 외부 푸코오스 공급원의 부재하에 37°C에서 성장된 8088 세포에서 Ab 3.2에 대한 HPLC에 의한 글리칸 분리를 도시한다(5.73% 푸코실화).

도 13은 도 12의 글리칸에 대한 질량분광분석 결과를 도시한다. 글리칸의 구조가 각 피크의 우측에 표시된다. GlcNAc 잔기는 사각형, 만노오스 잔기는 원형, 갈락토오스 잔기는 다이아몬드형으로 표시된다.

도 14는 10mM 푸코오스의 존재하에 37°C에서 성장된 8088 세포에서 Ab 3.2에 대한 HPLC에 의한 글리칸 분리를 도시한다(95.63% 푸코실화).

도 15는 도 14의 글리칸에 대한 질량분광분석 결과를 도시한다. 글리칸의 구조가 각 피크의 우측에 표시된다. GlcNAc 잔기는 사각형, 만노오스 잔기는 원형, 갈락토오스 잔기는 다이아몬드형, 푸코오스 잔기는 삼각형으로 표시된다.

도 16은 야생형 및 저 푸코실화 셀라인에 대한 질량분광분석 연구의 결과를 요약한다. GlcNAc 잔기는 사각형, 만노오스 잔기는 원형, 갈락토오스 잔기는 다이아몬드형, 푸코오스 잔기는 삼각형으로 표시된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050]

본 발명은 설명된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건은 변할 수 있다. 본원에 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 취지로서 사용되며, 본 발명을 제한하려는 의도는 없고, 본 발명은 첨부된 청구항들에 포함된다.

[0051]

달리 정의되지 않는다면, 사용된 모든 용어와 구절들은 분명히 다르게 지시되거나, 또는 해당 용어 또는 구절이 사용된 문맥상 분명히 다른 의미가 나타나지 않는다면, 해당 용어 및 구절이 본 분야에서 쓰이고 있는 의미를 포함한다. 설명된 것들과 유사한 또는 동등한 어떤 방법 및 재료들도 본 발명을 실시하거나 시험하는데 사용될 수 있으며, 이제 특정 방법 및 재료가 설명될 것이다. 언급된 모든 간행물은 본원에 참고자료로 포함된다.

[0052]

단수형(예를 들어, "한" 또는 "그")은 문맥상 명백히 복수를 배제하지 않는다면 복수형을 포함한다.

[0053]

용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합으로 서로 연결된 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역(CH)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다. VH와 VL 영역은 상보성 결정 영역이라고 하는 초가변성 영역들로 더 구분될 수 있으며, 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 더 보존성인 영역들이 산재되어 있다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함하며, 이들은 아미노 말단에서부터 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다(중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로 약기될 수 있고, 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로 약기될 수 있다). 용어 "고 친화성" 항체는 그것의 표적 애피토프에 대해서 약  $10^{-9}$  이하의 KD를 갖는 항체를 말한다(예를 들어, 약  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  M). 한 구체예에서, KD는 표면 플라스몬 공명에 의해서, 예를 들어 BiACORE™에 의해서 측정되고, 다른 구체예에서는 KD가 ELISA에 의해서 측정된다.

[0054]

용어 "결합 단백질"은 결합 파트너를 특이적으로 인식할 수 있는 어떤 단백질을 포함한다. 특이적 인식에는 일반적으로 결합 단백질이 수 마이크로몰 이하의 해리 상수(KD)로 그것의 결합 파트너와 결합하는 것이 필요하며, 대부분의 예에서 바람직한 결합 단백질은 그것의 결합 파트너와 나노몰 범위에서 결합하는데, 예를 들어 다양한 구체예에서 수백 나노몰 미만 정도로 결합한다. 본원에 설명된 대부분의 결합 단백질은 또한 Fc-함유 단백질인데, 즉 이들은 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능적 부분을 포함하는 Fc와 융합된 결합 부분을 포함한다. 전형적인 결합 단백질은 항체, 다중-특이적 항체(예를 들어, 이중-특이적 항체), 면역부착소, 트랩(예를 들어, IL-1 트랩과 같은 사이토카인 트랩, VEGF 트랩 등)이다. 항체가 아닌 전형적인 결합 단백질은 결합 부분(예를 들어, 수용체 또는 그것의 단편, 리간드 또는 그것의 단편, 정규 면역글로불린 가변 도메인 상의 변형 등)과 CH2 및 CH3 면역글로불린 도메인(또는 Fc 이펙터 기능을 보유하는 그것의 단편)을 주로 포함하는 면역글로불린 부분을 보유한다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법은 Fc 수용체와 결합하고 및/또는 보체(예를 들어, 기능적 CH2 및 CH3 영역)를 활성화함으로써 ADCC 및/또는 CDC를 매개할 수 있는 면역글로불린 영역을 보유하는 결합 단백질(예를 들어, 면역부착소 및 트랩을 포함하는)을 제조하는데 사

용될 수 있다.

[0055] 다중-특이적 항체는 1개의 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프들에 특이적일 수 있거나, 또는 둘 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원-결합 도메인들을 함유할 수 있다. 2개의 면역글로불린 팔을 포함하는 이중-특이적인 다중-특이적 결합 단백질이 제조될 수 있으며, 예를 들어 이 경우 면역글로불린의 제 1 팔은 제 1 에피토프에 특이적이고, 면역글로불린의 제 2 팔은 제 2 에피토프에 특이적이다. 다른 다중-특이적 결합 단백질은 제 2 팔이 단백질 또는 비-단백질 결합 파트너인 표적과 특이적으로 결합하는 결합 부분(리간드 또는 수용체 또는 이들의 결합 단편)을 보유하는 것들을 포함한다.

[0056] 용어 "이중-특이적 항체"는 둘 이상의 에피토프와 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중-특이적 항체는 일반적으로 2개의 동일하지 않은 중쇄를 포함하며, 각 중쇄가 상이한 에피토프와 특이적으로 결합하는데, 이 상이한 에피토프들은 두 상이한 분자에 있거나(예를 들어, 두 상이한 항원 상의 상이한 에피토프) 또는 동일한 분자에 있을 수 있다(예를 들어, 동일한 항원 상의 상이한 에피토프). 이중-특이적 항체가 2개의 상이한 에피토프(제 1 에피토프 및 제 2 에피토프)와 선택적으로 결합하는 경우, 제 1 에피토프에 대한 제 1 중쇄의 친화성은 일반적으로 제 2 에피토프에 대한 제 1 중쇄의 친화성보다 적어도 1배 내지 2배 또는 3배 또는 4배 또는 그 이상의 배수만큼 낮을 것이고, 그 반대도 역시 마찬가지일 것이다. 이중-특이적 항체에 의해 특이적으로 결합되는 에피토프는 동일한 또는 상이한 표적 상에 있을 수 있다(예를 들어, 동일한 또는 상이한 단백질 상에). 이중-특이적 항체는, 예를 들어 동일한 항원의 상이한 에피토프들을 인식하는 중쇄들을 조합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열이 동일한 또는 상이한 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열과 융합될 수 있으며, 이러한 서열은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중-특이적 항체는 2개의 중쇄를 가지고, 각 중쇄는 3개의 중쇄 CDR과, 그에 이어진 (N-말단에서 C-말단으로) CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인과, 면역글로불린 경쇄를 가지며, 면역글로불린 경쇄는 각 중쇄와 회합될 수는 있지만 에피토프-결합 특이성은 부여하지 않거나, 또는 각 중쇄와 회합되어 중쇄 에피토프-결합 영역에 의해 결합된 에피토프 중 하나 이상과 결합할 수 있거나, 또는 각 중쇄와 회합되어 중쇄의 하나 또는 둘 다를 하나 또는 둘 다의 에피토프와 결합하도록 할 수 있다.

[0057] 이중-특이적 결합 단백질 형식의 한 예는 제 1 면역글로불린(Ig) CH3 도메인과 제 2 Ig CH3 도메인을 이용하며, 여기서 제 1 및 제 2 Ig CH3 도메인은 적어도 1개 아미노산이 서로 상이하고, 적어도 1개 아미노산 차이가 아미노산 차이가 없는 이중-특이적 항체와 비교하여 단백질 A에 대한 해당 이중-특이적 항체의 결합을 감소시킨다. 한 구체예에서, 제 1 Ig CH3 도메인은 단백질 A와 결합하고, 제 2 Ig CH3 도메인은 435R 변형(EU 넘버링; IMGT 엑손 넘버링에 따르면 95R)과 같은 단백질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이를 함유한다. 제 2 CH3는 436F 변형(EU 넘버링; IMGT 넘버링에 따르면 96F)을 더 포함할 수 있다. 제 2 CH3에서 발견될 수 있는 추가의 변형들은 356E, 358M, 384S, 392N, 397M 및 422I를 포함한다(EU 넘버링; IMGT 넘버링에 따르면 16E, 18M, 44S, 52N, 57M 및 82I). 이 형식에서, 제 1 Ig CH3 도메인은 제 1 결합 부분(예를 들어, 제 1 에피토프와 특이적으로 결합하는 제 1 Ig 가변 도메인)과 융합되고, 제 2 Ig CH3 도메인은 제 2 결합 부분(예를 들어, 제 2 에피토프와 특이적으로 결합하는 제 2 Ig 가변 도메인, 제 1 에피토프와 제 2 에피토프는 상이하다)과 융합된다.

[0058] 용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현하는데 적합한 어떤 세포를 포함한다. 세포는 진핵세포(단세포 또는 다세포), 효모 세포(예를 들어, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* 등), 식물 세포, 곤충 세포(예를 들어, SF-9, SF-21, 바콜로바이러스-감염된 곤충 세포, *Thchoplusia ni* 등), 비-사람 동물 세포, 사람 세포, 또는 예를 들어 하이브리도마 또는 쿼드로마와 같은 세포 융합체를 포함한다. 푸코실화 경로를 자연적으로 포함하지 않는 세포는 그것을 함유하도록 유전자 변형될 수 있으며(예를 들어, 미국 특허출원 공개 No. 2010/0028951 A1 참조), 세포는 본원에 설명된 대로 변형된 FX 유전자를 이용하도록 변형될 수 있다.

[0059] 어떤 구체예에서, 세포는 사람, 원숭이, 에이프(ape), 햄스터, 래트 또는 마우스 세포이다. 어떤 구체예에서, 세포는 진핵세포이며, CHO(예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 시리아 햄스터, 래트 흑색종, 마우스 흑색종(예를 들어, SP2/0, NSO), 망막세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK 293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431(표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 사람 흑색종 세포, 종양 세포, 사람 럼프종 세포(예를 들어, Namalwa 세포) 및 전술한 세포로부터 유래된 셀라인으로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자를 포함하

는데, 예를 들어 세포는 바이러스 유전자를 발현하는 망막세포이다(예를 들어, PER.C6™ 세포).

[0060] 용어 "Fc-함유 단백질"은 항체, 이중-특이적 항체, 면역부착소, 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능적 부분을 포함하는 다른 결합 단백질을 포함한다. "기능적 부분"은 Fc 수용체(예를 들어, FcγR 또는 FcRN)와 결합할 수 있고, 및/또는 보체의 활성화에 참여할 수 있는 CH2 및 CH3 영역을 말한다. CH2 및 CH3 영역이 어떤 Fc 수용체와 결합할 수 없게 하고, 또한 보체를 활성화할 수 없게 하는 결실, 치환 및/또는 삽입이나 다른 변형들을 함유하는 경우, CH2 및 CH3 영역은 기능적이지 않다.

[0061] Fc-함유 단백질은 면역글로불린 도메인에 변형을 포함할 수 있으며, 결합 단백질의 하나 이상의 이펙터 기능에 영향을 미치는 변형을 포함한다(예를 들어, FcγR 결합, FcRN 결합 및 반감기, 및/또는 CDC 활성에 영향을 미치는 변형). 이러한 변형은, 제한은 아니지만, EU 넘버링에 따라 면역글로불린 불변 영역 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 및 439의 변형 및 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 제한은 아니지만, 결합 단백질은 증진된 혈청 반감기를 나타낼 수 있고, 위치 252, 254 및 256에 변형을 가지거나, 또는 위치 428 및/또는 433 및/또는 434에 변형을 가지거나, 또는 위치 250 및/또는 428에 변형을 가지거나, 또는 위치 307 또는 308 및 434에 변형을 가질 수 있다.

[0062] 용어 "FX"는 GDP-4-케토-6-데옥시만노오스-3,5-에피머라제-4-리덕타제 활성을 나타내는 단백질을 말하거나, 또는 GDP-4-케토-6-데옥시만노오스-3,5-에피머라제-4-리덕타제 활성을 가진 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 말한다. 본원에 설명된 대부분의 예들은 야생형 *C. griseus* FX 또는 본 발명에 따라 변형된 *C. griseus* FX를 말한다. 그러나, "FX"는 CHO 세포에만 제한되는 것은 아니다. 도 1에 도시된 대로, *Macaca Mulatta*, 사람, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* FX 서열들의 정렬은 매우 높은 보존도를 나타냈는데, 즉 다양한 유기체로부터 얻어진 FX 서열들은 아주 매우 유사하다. 이런 높은 동일성에 기초하여, 종들 간에 존재하는 사소한 서열 차이는 FX 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않을 것으로 예상될 수 있다. CHO FX 서열(SEQ ID NO:1)과 원숭이(SEQ ID NO:3), 사람(SEQ ID NO:4), 마우스(SEQ ID NO:5) 및 래트(SEQ ID NO:6)의 서열들의 차이는 5H, 8M, 21K, 37D, 51T, 55R, 59E, 62R, 93M, 106A, 107C, 138N, 161Y<sub>1</sub> 167S, 177Y, 201S, 202S, 202D, 212N, 225Q, 235S, 266H, 266N, 266S, 273T, 274S, 280F, 287S, 291T, 291S, 297C<sub>1</sub> 310D, 314E를 포함한다. 321-아미노산 야생형 CHO FX(SEQ ID NO:1)의 경우, 원숭이, 사람, 마우스 및 래트 FX 서열들 중 어떤 하나가 31개의 상이한 치환으로부터 선택함으로써 재현될 수 있거나, 또는 야생형 CHO FX 서열의 31/321 x 100 = 9.6%가 된다. 따라서, 본 발명의 변형된 FX는 야생형 CHO FX(예를 들어, SEQ ID NO:1) 또는 야생형 CHO FX와 적어도 90.4%의 동일성을 갖고, 또한 N79S, N90K, G211R 및 L289S로 구성되는 군으로부터 선택된 치환을 보유하는 FX를 포함한다. SEQ ID NO:1로부터 약간 벗어난 경우, 본 발명의 변형된 FX는 SEQ ID NO:1과 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하고, N79S, N90K, P136L, G211R 및 L289S로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 보유하는데, 예를 들어 L289S 변형을 보유한다. 당업자는 위치 79, 90, 136, 211 및 289 중 적어도 하나를 포함하는 작은 삽입 중 하나 이상 또는 작은 결실 중 하나 이상이 본 발명의 구체예와 관련된 이점을 또한 제공할 가능성이 높다는 것을 예상할 수 있다(예를 들어, 변형된 유전자를 보유한 세포는 당단백질의 감소된 푸코실화를 나타낼 수 있다).

[0063] 특정 구체예에서, FX는 289S인 제 1 치환 및 하나 이상의 제 2 치환을 포함한다.

[0064] 용어 "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화"는 정상 또는 야생형 세포와 비교하여 당단백질을 푸코실화하는 변형된 세포의 저하된 또는 감소된 능력을 말한다. 당단백질은 내인성 당단백질일 수 있다. 더 전형적으로, 핵산 변형은 이종성 당단백질을 발현하는데 사용되는 세포, 예를 들어 이소적으로 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이중-특이적 항체 또는 면역부착소 또는 다른 Fc-함유 당단백질)을 발현하는 세포에서 만들어진다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 변형된 CHO 또는 PERC.6™ 셀라인은 또한 사람 항체, 예를 들어 사람 IgG1 항체를 발현한다.

[0065] 일반적으로, 당단백질에 관해서 "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화"라는 언급은 푸코오스 잔기가 더 적게 부착된 단일 당단백질 분자를 말하는 것은 아니다. 오히려, 이런 언급은 세포로부터 제조된 당단백질 제제를 말하며, 당단백질 제제는 개별 당단백질 분자의 집단을 포함하고, 집단의 구성원들은 상이한 당단백질 특징을 가진다. 제한이 아닌 예시의 목적에서, 본 발명에 따라서 변형된 CHO 세포에서 발현된 IgG1 항체의 경우, "

저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화"는 Fc의 위치 297에서 글리칸의 N-연결된 GlcNAc 잔기 상에 푸코오스 잔기를 가진 개별 당단백질의 수가 더 적다는 것을 말한다. 이러한 "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화"는 여러 방식으로 특정될 수 있지만(본원의 다른 곳 참조), 이런 언급은 각 경우별로 본 발명에 따른 변형이 없는 셀라인에서 제조된 동일한 당단백질 집단과 비교하여 집단 중에 푸코오스 잔기를 갖는 당단백질의 수가 비교적 적다(또는 감소된다)는 것을 말한다.

[0066] 예를 들면, 본 발명에 따라서 제조된 당단백질이 야생형 세포에서 제조된 동일한 당단백질과 비교하여 1% 푸코실화된 경우, Fc-함유 단백질의 분자들의 단지 1%만이 상응하는 야생형 세포에서 관찰된 푸코실화 양과 비교하여 본 발명의 세포에서 푸코실화된다는 것이다(임의로 100%를 정했을 때, 동일한 조건에서 야생형 세포에서 Fc-함유 단백질의 분자들이 전부 푸코실화되는지 그렇지 않은지의 여부).

[0067] 본 발명에 따른 "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화" 세포에서, 당단백질의 푸코실화는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 감소된다. 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%이다. 다른 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 또는 98.9%이다. 다른 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 또는 97.9%이다. 다른 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 또는 96.9%이다. 다른 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 95.1%, 95.2%, 95.3%, 95.4%, 95.5%, 95.6%, 95.7%, 95.8%, 또는 95.9%이다. 다른 특정 구체예에서, 상기 감소는 변형을 함유하지 않는 세포와 비교하여 약 94.1%, 94.2%, 94.3%, 94.4%, 94.5%, 94.6%, 94.7%, 94.8%, 또는 94.9%이다.

[0068] 본 발명에 따른 세포에서 제조된 당단백질 제제는 변형을 함유하지 않는 세포에서 제조된 동일한 당단백질의 푸코실화 양의 단지 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 약 0.5%, 약 0.4%, 약 0.3%, 약 0.2%, 또는 약 0.1% 만 푸코실화된다.

[0069] "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화" 세포로부터의 당단백질 제제를 특정하는 다른 방식은 세포에 의해 제조된 당단백질 제제 중의 푸코실화된 당단백질 대 푸코실화되지 않은 당단백질의 비에 의한 것이다. 예를 들어, 변형된 세포에 의해서 제조된 당단백질 제제에서 푸코실화된 당단백질: 푸코실화되지 않은 당단백질의 비는 약 1:10 내지 1:15, 1:15 내지 1:20, 1:20 내지 1:40, 1:40 내지 1:60, 1:60 내지 1:80, 1:80 내지 1:100, 또는 1:100 내지 1:150이다.

[0070] "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화" 세포로부터의 당단백질 제제를 특정하기 위한 또 다른 방식은 푸코실화되지 않은 당단백질의 상대 중량 퍼센트에 의한 것이다(총 당단백질, 즉 푸코실화된 당단백질 및 푸코실화되지 않은 당단백질과 비교하여). 예를 들어, 변형된 세포에 의해서 제조된 당단백질 제제는 변형이 없는 세포로부터의 동일한 당단백질 제제와 비교하여 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99.5%의 푸코실화되지 않은 당단백질 퍼센트를 가진다.

[0071] "저 푸코실화" 또는 "감소된 푸코실화" 세포로부터의 당단백질 제제를 특정하기 위한 다른 방식은 푸코오스 대 글리칸의 상대적 양 또는 당단백질 제제의 푸코오스 대 글리칸 성분의 상대적 양이다. 예를 들어, Fc-함유 단백질(예를 들어, 항체)의 경우, 글리코실화는 위치 297에 글리칸을 포함하고, 글리칸은 바이안테너리 트리만노실 부분을 포함한다. 한 구체예에서, 푸코오스 대 글리칸 부분의 몰 비는 약 1:20, 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 1:200 이하이다. 한 구체예에서, 푸코오스 대 바이안테너리 트리만노실 부분의 몰 비는 약 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 1:200 이하이다. 한 구체예에서, 푸코실화된 Fc-함유 단백질에서 푸코오스 대 바이안테너리 트리만노실 부분의 몰 비는 약 1:20, 1:25, 1:33, 1:50, 1:100 또는 1:200 이하이다. 한 구체예에서, 글리칸 부분은 2개의 직렬 GlcNAc 잔기와 그에 이어진 바이안테너리 트리만노실 부분을 포함하며, 트리만노실 부분의 2개의 안테너리 말단 만노실 부분이 각각 1개의 GlcNAc 잔기를 보유한다. 한 구체예에서, 글리칸에서 푸코오스 대 GlcNAc의 몰 비는 1:80, 1:100, 1:133, 1:150, 1:200, 1:400 또는 1:800 이하이다.

[0072] 한 구체예에서, 푸코실화된 제조된 항체 단백질의 양은 PNGase F에 의해 항체 단백질을 하룻밤 탈글리코실화한 다음, HPLC를 통해 다당류를 분석함으로써 측정되며, 글리칸 피크 면적을 적분함으로써 푸코실-함유 다당류가 정량되는데, 예를 들어 단백질 푸코실화는 글리칸 피크 면적에 기초하여 계산된다. 글리칸의 확인(및 조성)은 어떤 적합한 방법(예를 들어, 질량분광법)에 의해서 결정(및/또는 정량)될 수 있다.

[0073] 용어 "야생형"은 본 발명에 따라 변형되지 않은 세포 또는 활성을 말하는 것을 포함하며, 예를 들어 변형된 FX 핵산 서열 또는 변형된 FX 단백질을 함유하지 않는 세포를 포함한다. "야생형" FX 활성은 천연 또는 비-변형된 FX 유전자 또는 단백질에 의해 나타나는 활성(예를 들어, 효소 활성)의 어떤 파라미터를 말하는 것을 포함한다. FX 단백질의 "야생형" 활성과 변형된 FX 단백질의 활성을 비교하는 경우, "야생형" FX 단백질과 변형된 FX 단백질은 실질적으로 동일한 공급원(예를 들어, 동일한 세포 타입, 동일한 유기체)로부터 실질적으로 동일한 방식으로 분리되고, 실질적으로 동일한 조건에서 비교된다. 야생형 세포와 변형된 세포 사이에서 "야생형" FX 활성과 변형된 FX 활성을 비교하는 경우, FX 활성은 동일한 또는 실질적으로 동일한 당단백질을 가진 실질적으로 동일한 또는 실질적으로 유사한 조건에서 측정되는 것이 바람직하다.

[0074] 개관

[0075] 변형된 FX 핵산 및 단백질 서열이 제공되며, 변형은 변형이 없는 세포가 지원할 수 있는 수준으로 외부 푸코오스 공급원의 부재시에 단백질 푸코실화를 지원할 수 없는 세포를 만든다. 세포는 당단백질 푸코실화의 기질인 GDP-L-푸코오스의 신생 경로에 있어서 효소 활성의 파괴로 인하여 한 온도에서는 당단백질을 푸코실화할 수 있는 실질적으로 감소된 능력을 나타낸다(푸코오스 공급원의 부재시에). 다른 (더 높은) 온도에서는 세포 능력의 감소가 최소화되거나 실질적이지 않다.

[0076] 효소인 GDP-4-케토-데옥시-만노오스-3,5-에피머라제-4-리덕타제(FX)는 GDP-L-푸코오스 합성의 신생 경로에 참여하여, GDP-4-케토-6-데옥시만노오스로부터 GDP-L-푸코오스를 형성한다. 결과의 GDP-L-푸코오스는 세포에 의해 사용되어 푸코실화된 항체를 포함하는 푸코실화된 단백질이 제조될 수 있다. GDP-L-푸코오스 합성효소가 신생 경로에 참여하기 때문에, 충분한 FX 활성이 없는 세포에서 푸코실화의 감소는 회수 경로에 의해 구제될 수 있다. 회수 경로에는 푸코오스가 필요한데, 이것이 회수 경로를 통해 작용하여 단백질 푸코실화의 기질인 GDP-L-푸코오스를 형성한다.

[0077] FX에 있는 특정 변형은 푸코오스 공급원의 부재시에 단백질 푸코실화를 지속할 수 없는 변형된 FX 유전자를 가진 세포의 무능력을 초래하며, 이로써 변형된 효소를 보유하며, 예를 들어 재조합 항체를 발현하는 세포는 야생형 FX 유전자를 보유한 야생형 세포와 비교하여 항체를 푸코실화하는 능력에 있어서 실질적인 감소를 나타낸다.

[0078] 본원에 설명된 FX 유전자 변형으로 인하여 단백질 푸코실화의 충분한 비율이나 수준을 유지할 수 없는 무능력은 실질적으로 온도 의존성이다. 특히, 변형된 FX 유전자를 보유한 세포는 약 37°C에서 당단백질 푸코실화를 지속할 수 없는 실질적인 무능력을 나타내며(예를 들어, 사람 IgG1 이소타입 항체의 7% 푸코실화), 이것은 약 34°C에서 실질적으로 완화된다(예를 들어, 동일한 항체의 70% 푸코실화; 표 3 참조). 반면에, 야생형 FX 유전자만을 가진 세포는 34°C와 비교하여 37°C에서 당단백질 푸코실화를 지속하는 능력에 큰 차이를 보이지 않는다.

[0079] GDP-푸코오스로 가는 신생 경로 및 회수 경로

[0080] GDP-푸코오스는 당단백질 푸코실화 경로의 중심적인 대사산물이다. 이것은 당단백질 푸코실화의 푸코오스 공여자이다. Fc를 포함하는 당단백질을 푸코실화할 수 있는 공지된 관심의 푸코실트랜스페라제는 모두 GDP-푸코오스를 사용한다. 따라서, 효과적인 당단백질 푸코실화를 위해서는 GDP 푸코오스의 충분한 풀(pool)이 당단백질 생산과 조화될 수 있는 충분한 수준으로 생성되어 유지되어야 한다.

[0081] GDP-푸코오스로 가는 2가지 주요 경로가 있는데, 신생 합성 경로와 회수 경로가 그것이다. 많은 포유류 세포에서 GDP-푸코오스는 신생 푸코실화 경로에 대해서 외부에서 공급된 탄소원(예를 들어, 글루코오스)으로부터 제조될 수 있다. 신생 푸코실화 경로에서는, 글루코오스가 수송인자를 통해 세포로 들어가서 D-만노오스-1-포스페이트로 전환된다. 다음에, D-만노오스-1-포스페이트가 D-만노오스-1-포스페이트 구아닐일트랜스페라제에 대해서 GDP-만노오스로 전환된다. GDP-만노오스는 GDP 만노오스 4,6-데히드라타제(GMD)에 대해서 GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스로 전환된다. GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스는 GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스-3,5-에피머라제-4-리덕타제(FX)에 대해서 GDP-푸코오스로 전환된다. GDP-푸코오스는 GMD의 효력 있는 피드백 억제제이다. GDP-푸코오스는 GDP 푸코오스 수송인자를 통해서 Golgi 장치로 들어간다. 일단 Golgi에 들어가면, GDP-푸코오스는  $\alpha$  1,6-푸코실트랜스페라제의 기질이 되어 당단백질을 푸코실화한다.

[0082] 많은 포유류 세포에는 외부에서 공급된 푸코오스로부터 GDP-푸코오스를 생성하는 회수 경로가 또한 존재한다. 회수 경로에서는 푸코오스가 세포로 수송되어 인산화됨으로써 푸코오스-1-포스페이트가 형성되고, 이것이 GDP-푸코오스로 전환될 수 있다. GDP-푸코오스는 Golgi로 수송되어  $\alpha$  1,6-푸코실트랜스페라제의 기질로서 이

용될 수 있다. 세포로의 푸코오스 수송은 아마도 촉진된 확산과 리소좀 수송에 의한 것이라고 보여지며, 회수 경로는 포유류 세포에서 보편적으로 나타난다(예를 들어, Becker and Lowe (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, Glycobiology 13(7):41R-53R 참조).

[0083] 따라서, 푸코오스 공급원이 부재하면, 세포는 신생 합성 경로에 의해서 생성된 푸코오스를 사용하여 당단백질을 푸코실화한다. 푸코오스가 존재하면, 세포는 세포로 수송된 푸코오스를 사용하여 당단백질을 푸코실화한다. 따라서, 신생 합성 경로가 차단되거나 손상된다면 푸코오스 공급원이 존재할 때만 당단백질 푸코실화가 여전히 일어날 수 있다.

[0084] 본원에 설명된 조성물 및 방법은 FX 혼산 서열에 변형을 갖는 유전자 변형된 세포를 제공함으로써 당단백질을 푸코실화하는 경로에 조건적 차단을 제공하는 셀라인을 가능하게 한다. 새로운 경로와 회수 경로를 모두 함유하는 세포의 경우, 세포는 증진된 다능성(versatility)을 제공한다. 이러한 세포에서 외부 푸코오스 공급원이 부재하면 당단백질의 푸코실화가 한 온도에서는 실질적으로 감소하고, 제 2 온도에서는 실질적으로 감소하지 않을 수 있다. 대안으로서, 당단백질 푸코실화의 본질적인 야생형 비율 또는 수준이 세포가 유지되는 온도에 관계없이 외부 푸코오스 공급원을 제공함으로써 전환될 수 있다.

#### FX 변형

[0085] [0086] 변형된 FX 단백질 서열을 암호화하는 분리된 혼산이 제공된다. 분리된 혼산은 79S, 90K, 136L, 211R, 289S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 혼산 변형을 포함하는 FX 단백질을 암호화한다. 한 구체예에서, 분리된 혼산은 위치 289에 세린을 포함하는 FX 단백질을 암호화하고, 다른 구체예에서는 79S, 90K, 136L 및/또는 211R 중 적어도 하나를 포함하는 FX 단백질을 암호화한다.

[0087] 변형된 FX 단백질을 암호화하는 혼산은 어떤 적합한 형태로 사용된다. 혼산 형태의 적합성은 그것의 용도에 따라 좌우된다. 예를 들어, 적합한 형태는 cDNA를 포함하며, 이것은 세포에서의 염색체와 발현을 위한 발현 벡터에 사용될 수 있거나, 또는 세포의 게놈에 통합될 수 있다(특정 위치에, 또는 무작위로). 또한, 적합한 형태는 본원에 설명된 치환(들)을 암호화하도록 변형된 게놈 서열을 포함한다. 또한, 적합한 형태는, 예를 들어 게놈에서 특정 위치에 혼산을 표적화하기 위한 표적화 서열(예를 들어, 하나 이상의 표적화 팔)을 포함하며, 예를 들어 이로써 천연 FX 유전자의 대립형질 중 하나 또는 둘 다를 치환할 수 있다. 적합한 형태는 세포에서 특정 위치, 예를 들어 FX 유전자좌에 혼산을 표적화하는 표적화 벡터를 포함하며, 이로써 내인성 FX 혼산 서열이 본 발명에 따른 FX 혼산 서열로 치환될 수 있다. 내인성 FX 서열의 변형은 세포의 대립형질 중 한쪽 또는 양쪽에서 이루어질 수 있다.

#### 저 푸코실화 또는 감소된 푸코실화를 가진 셀라인

[0088] [0089] 저 푸코실화 셀라인을 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 조성물은 천연 또는 야생형 FX 활성을 결여한 또는 실질적으로 결여한 세포에 존재할 때 당단백질, 예를 들어 Fc-함유 당단백질, 예를 들어 항체를 푸코실화하는 감소된 능력을 세포에 부여하는 혼산 및 단백질을 포함한다. 다양한 구체예에서, 이러한 세포는 제 1 온도(예를 들어, 약 37°C)에서는 당단백질을 푸코실화하는 실질적으로 감소된 능력을 나타내지만, 제 2 온도(예를 들어, 약 34°C)에서는 당단백질을 푸코실화하는 능력을 보유하는 세포를 포함한다. 따라서, 푸코실화를 억제하는 제 1 온도에서 성장될 수 있는 세포가 제공되며, 성장 조건은 푸코실화를 허용하는 제 1 온도로 변화될 수 있다.

[0090] 저 푸코실화 셀라인은 본원에 설명된 조성물 및 방법과 함께 어떤 적합한 세포를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 제한은 아니지만, 생물제약의 제조에 통상적으로 이용되는 어떤 셀라인이 사용될 수 있다. 이러한 셀라인을 저 푸코실화 셀라인으로서 유용하게 하는 특정 방법 및 조성물이 본원에 설명되며, 다른 것들도 이 설명에 비추어 당업자에게 자명하거나 쉽게 명확해진다. 사람 세포(예를 들어, HeLa, PERC.6™ 등), CHO 세포, 마우스 세포 등이 유용한 셀라인을 생성하도록 본원에 설명된 대로 유전자 변형될 수 있는데, 이것은 CHO FX 활성이 기능적으로 반수체인 것으로 나타난 관찰로 인한 것이다. 한편, FX 유전자좌에서 기능적 배수체를 나타내는 다른 세포들의 경우, 하나의 FX 대립형질은 본원에 설명된 변형된 FX 혼산 서열로 치환하고, 제 2 (야생형) 대립형질은 녹아웃을 만들거나, 또는 두 FX 대립형질을 모두 본원에 설명된 변형된 FX 혼산 서열로 치환함으로써 조작될 수 있다.

[0091] 결과의 세포는 FX 활성이 완전히 또는 실질적으로 저 푸코실화로서 특정되는 것들을 포함한다. 즉, 세포에서 야생형 FX 단백질 또는 야생형 FX 유전자가 완전히 결여될 필요는 없고, 세포는 - 적절한 조건 또는 조건 세

트(예를 들어, 선택된 온도)에서 - 전체적으로 정상 FX 활성을 가진 상응하는 세포가 동일한 당단백질을 푸코실화할 수 있는 수준 근처로는 어느 정도로도 당단백질(예를 들어, Fc-함유 당단백질)을 푸코실화할 수 없거나 실질적으로 할 수 없어야 한다.

[0092] 본 발명에 따른 세포와 변형을 함유하지 않는 세포의 비교가 동일한 또는 본질적으로 동일한 조건(예를 들어, 배지, 온도, 세포 밀도 등)에서 수행된다. 예를 들어, 다양한 구체예에서, 세포는 야생형 세포가 나타내는 푸코실화 능력의 10% 이하 내지는 1% 이하로 푸코실화 능력을 나타낼 것이다. 이 비교는, 예를 들어 본원에 설명된 변형(들)을 가진 세포를 제조하고, 이 세포에 의해서 발현된(예를 들어, 세포의 발현 구성물로부터 항체의 발현) 당단백질의 푸코실화 수준을 야생형 세포에 의해서 발현된 동일한 당단백질의 푸코실화 수준과 비교함으로써 행해질 수 있다. 비교를 위해, 세포들은 동일한 온도와 동일한 조건에서 성장된다. 당단백질의 푸코실화 수준은 당단백질 제제에 존재하는 푸코오스의 양을 정량하기 위한 본 분야에 공지된 어떤 적합한 분석법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0093] 당단백질이 어느 정도 푸코실화되는지 결정하는데 있어서는 푸코오스의 양이 총 당단백질의 양 또는 단백질로부터 획득된 글리칸의 양과 비교된다.

#### 푸코실화-결핍 셀라인

[0095] 당단백질을 전혀 푸코실화할 수 없는 많은 포유류 셀라인이 분리되었다. 푸코실화-결핍 셀라인의 개발은 푸코실화를 결여한 항체를 제조해야 할 필요성에 의하여 대부분 추진되었다. 푸코실화를 결여한 항체는 Fc 수용체에 대한 결합이 변경됨으로 인해서 푸코실화된 항체보다 훨씬 더 양호한 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 매개할 수 있다. 따라서, ADCC를 더 잘 매개하는 항체가 매우 바람직하며, 특히 종양 세포를 표적화하는 가변 영역을 포함하는 항체가 바람직하다. 따라서, 당단백질을 푸코실화할 수 없는 세포는 치료 용도의 항체의 개발 및 제조에서 광범하게 사용된다.

[0096] 당단백질을 푸코실화할 수 있는 능력이 없는 세포를 만드는 2가지 푸코실화 경로 녹아웃이 개발되었다. a 1,6-푸코실트랜스페라제(FUT8)의 녹아웃은 GDP-푸코오스를 당단백질로 수송할 수 있는 능력을 없애는 결과를 가져온다. GDP 만노오스 4,6-데히드라타제(GMD)의 녹아웃은 신생 경로에서 GDP-만노오스로부터 GDP-4-케토-6-데옥시-만노오스를 제조할 수 있는 능력을 없애는 결과를 가져온다.

[0097] GDP-푸코오스 형성 과정의 하류에서의 푸코실화 녹아웃, 예를 들어 a 1,6-푸코실트랜스페라제 녹아웃은 외부 푸코오스 공급원의 존재시에 당단백질을 푸코실화하는 회수 경로에 의존할 수 없다. 이것은 신생 경로와 회수 경로가 만나는 대사산물인 GDP-푸코오스의 형성의 끝 부분에서 차단이 이루어지기 때문이다. 따라서, 푸코오스와 함께 이러한 녹아웃을 가진 세포를 공급해도 당단백질 푸코실화는 회복되지 않을 것이다. 따라서, a 1,6-푸코실트랜스페라제 녹아웃은 당단백질을 푸코실화하는 세포의 능력을 선택적으로 조작할 수 있는 단순한 경로를 제공하지 않는다.

[0098] GDP-푸코오스 형성 과정의 상류에서의 푸코실화 녹아웃, 예를 들어 GMD 녹아웃은 이론적으로는 당단백질을 푸코실화하는 회수 경로에 의존할 수 있다. 이것은 GDP-푸코오스의 형성 전에 차단이 일어나기 때문이다. 푸코오스와 함께 이러한 세포를 공급하면 이론적으로는 당단백질 푸코실화가 회복될 것이다. 그러나, 녹아웃을 함유하는 셀라인은 다능성을 결여한다.

[0099] 본 발명자들은 GDP-푸코오스의 형성 전에 신생 푸코실화 경로를 선택적 파괴하는 것이 푸코오스의 공급원을 제공함으로써 회복되거나, 또는 푸코실화를 허용하는 조건에서 세포를 유지함으로써 회복되는 결함을 가진 셀라인을 생성한다는 것을 발견했다. 본 발명자들은 GDP-푸코오스 상류의 신생 경로에 결함을 갖도록 세포를 변형했으며, 이로써 제 1 조건에서는 세포가 푸코오스의 부재하에 성장될 수 있고, 당단백질을 푸코실화하는 실질적으로 감소된 능력을 나타내지만, 제 2 조건에서는 세포는 외부 푸코오스 공급원의 부재시에도 당단백질을 효과적으로 푸코실화할 수 있다. 이러한 특히 다능성인 셀라인은 외부 푸코오스 공급원(또는 적합한 푸코오스 전구물질)의 활용성을 제어하고 및/또는 푸코실화-허용 조건 또는 푸코실화-결핍 조건에서 세포를 성장시킴으로써 셀라인에서 푸코실화가 켜지거나 꺼지는 옵션을 제시한다.

[0100] 본 발명자들은 돌연변이된 FX 혼합 서열을 생성함으로써 GDP-푸코오스 합성의 신생 경로를 선택적으로 파괴했다. FX 단백질은 2-관능성 에피미라제-리덕타제로서, 만노오스의 C3 히드록실기와 C5 메틸기를 에피미화하여 GDP-4-케토-6-데옥시갈락토오스를 형성한다. 다음에, 2-관능성 효소의 NADPH-의존성 리덕타제 활성이 케토부분을 환원하여 GDP-푸코오스가 형성된다. FX 유전자는 고도로 보존되는데, 이것은 FX 단백질들의 높은 동일성 및 유사성에 반영된다. 예를 들어, Becker and Lowe (2003) Fucose: biosynthesis and biological

function in mammals, Glycobiology, 13(7):41R-53R 참조. 따라서, CHO 세포에서 FX 돌연변이와 관련되어 제시된 데이터는 광범위한 세포들의 상응하는 FX 변형에도 이용될 수 있다.

[0101] 선택적 FX 파괴는 증진된 다능성을 제공하며, 이로써 의사는 배양물을 제 1 온도에 유지함으로써 푸코실화를 배제하거나 억제할 수 있고, 배양물을 제 2 온도에 유지함으로써 푸코실화를 허용할 수 있다. 다양한 구체예에서, 이것은 변형된 FX 유전자로서 예시되며, 변형은 (CHO FX 단백질에서) L289S, N79S, N90K, P136L, G211R 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 변형을 포함한다. 다양한 구체예에서, FX 변형은 L289S, L289S/N90K, L289S/G211R, L289S/P136L, L289S/N79S 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 변형으로 필수적으로 구성된다.

[0102] 당업자에게 공지된 대로, 배수체인 특정 세포는 특정 유전자좌에서 두 대립형질 중 단지 하나의 활성을 반영하는 표현형을 나타내는데, 예를 들어 CHO 세포는 이들 유전자좌와 관련해서 표현형의 측면에서 기능적으로 반수체(또는 저배수체)인 것으로 나타난다. 이러한 세포에서는 단일 대립형질에서도 본원에 설명된 변형에 의해서 변형된 대립형질의 활성을 본질적으로 반영하는 표현형이 생길 수 있고, 심지어 표현형이 우성 표현형이 아닌 경우에도 그러하다. 예를 들어, CHO 세포에서 단일 대립형질에 만들어진 본원에 설명된 변형은 아마도 야생형 FX 대립형질의 비발현(또는 저발현)으로 인하여 본질적으로 본원에 설명된 FX 표현형을 가져올 가능성이 있다.

[0103] 다양한 구체예에서, FX는 CHO 세포 유래가 아닌 FX이며, 변형은 상기 열거된 CHO 변형에 대한 비-CHO FX의 상응하는 변형으로 구성되는 군으로부터 선택된 변형을 포함한다. 상응하는 변형은, 예를 들어 디폴트 파라미터를 사용하는 ClustalW와 같은 다목적 다중 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 CHO FX 단백질 서열을 다른 관심의 FX 서열과 정렬시킴으로써 확인될 수 있다(예를 들어, 사람(Accession No. AAC50786) 및 C. griseus(Accession No. AAM91926) FX에 대해서, MacVector™ v. 10.0.2, 페어와이즈 사용: 서행 정렬에서 Gonnet 행렬, 오픈 캡 패널티 = 10.0, 익스텐드 캡 패널티 = 0.1; 다중: Gonnet 시리즈, 오픈 캡 패널티 = 10.0, 익스텐드 캡 패널티 = 0.2, 딜레이 디버전트 = 30%, 캡 분리 거리 = 4, 최종 캡 분리, 잔기-특이적 패널티 및 친수성 패널티(친수성 잔기 GPSNDQEKR)는 없음).

[0104] 실제 문제로서, 페어와이즈 정렬 디폴트 파라미터를 사용하는 MacVector™에서 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:1 및 3-6에 대해 해당 서열을 정렬함으로써 해당 서열에서 CHO N79, N90, P136, G211 및 L289 위치와 동등한 위치에 변형이 만들어지는 상응하는 위치가 확인될 것이다.

#### 당단백질

[0106] 조성물 및 방법을 사용하여 세포의 푸코실화 능력을 변형하여 관심의 당단백질의 저 푸코실화를 달성할 수 있다. 본 명세서의 대부분은 항체에서의 감소된 푸코실화의 이점들을 말하고 있지만, 본 발명의 이익은 항체에만 제한되지는 않는다. Fc를 보유한 어떤 결합 단백질도 - 많은, 많은 타입의 이러한 결합 단백질이 있다 - 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0107] 본 발명에서 제조될 수 있는 전형적인 당단백질은 항체(예를 들어, 사람, 마우스 또는 인간화된 항체)로서, 이것은 글리코실화되고, 야생형 세포에서 정상 조건이라면 푸코실화된다. 예들은 제한은 아니지만 IgG1, IgG2 및 IgG4 서브타입의 사람 항체들을 포함한다. 이러한 항체들의 단백당형(glycoform)은 위치 297에 글리칸 부분을 가진 것들을 포함한다. 위치 297에서 전형적인 단백당형은 N-연결된 GlcNAc와 그에 이어진 GlcNAc와 그에 이어진 바이안테나리 트리만노실 부분과 그에 이어진 (바이안테나리 트리만노실 부분의 2개의 만노실 부분에 각각) 하나 이상의 GlcNAc 잔기와 선택적으로 그에 이어진 바이안테나리 트리만노실 부분의 안테나에 부착된 GlcNAc 잔기들 중 하나 이상에 있는 갈락토오스 잔기를 포함한다. 글리칸의 푸코실화는 보통은 N-연결된 처음의 GlcNAc 잔기에서 일어나며, 이 경우 (보통은) 단일 푸코오스 잔기가 푸코실트랜스페라제를 통해 297-글리콜화된 항체에 연결된다. 다양한 구체예에서, 항체의 푸코실화의 몰 비 또는 퍼센트 또는 범위는 항체의 양(또는 몰) 및/또는 글리칸 또는 글리칸 치환의 양(또는 몰)과 관련하여 푸코오스 잔기에 대해 측정된다(예를 들어, 야생형 세포 또는 본 발명에 따른 변형된 FX 혼합 서열을 포함하는 세포로부터 얻어진 항체 제제에서, 푸코오스:항체의 상대 몰량, 또는 297-연결된 글리칸의 푸코오스:GlcNAc 또는 푸코오스:만노오스 또는 푸코오스:트리만노실 부분 또는 푸코오스:갈락토오스).

#### 저 푸코실화 CHO 셀라인

[0109] 저 푸코실화 CHO 셀라인이 혈청이 없는 생물반응기 배지의 혼탁액에서 성장하도록 적응된 CHO K1 세포로부터 구성되었다. CHO 셀라인(셀라인 6066이라고 칭함)은 CHO FX 유전자에 L289S 치환을 함유했다. 실시예에서

설명된 대로, 이 셀라인과 FX 변형이 없는 상응하는 CHO 셀라인(셀라인 4044라고 칭함)에서 인터류킨 수용체에 특이적으로 결합하는 사람 IgG1 항체인 재조합 항체(항체 1)와 면역세포의 세포 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 사람 IgG1인 재조합 항체(항체 2)가 제조되었다. 세포는 쉐이커에서 3일 동안 또는 생물반응기에서 12일 동안 성장되었다(각각 37°C에서).

[0110] FX 유전자 변형을 보유했고 항체 1을 발현한 세포는 항체 1의 단지 약 6.14% 또는 6.86%(제12일) 또는 약 7% 또는 8%(제3일)만 푸코실화했지만, FX 유전자 변형이 부재할 때는 세포는 약 89.3%(제3일) 또는 약 85.8%(제12일)를 푸코실화했다(표 1).

[0111] FX 유전자 변형을 보유했고 항체 2를 발현한 세포는 항체 2를 단지 약 3.6%만 푸코실화했지만, FX 유전자 변형이 부재할 때는 세포는 약 95%(제3일) 또는 약 76.8%(제12일)를 푸코실화했다(표 1).

[0112] 다른 저 푸코실화 CHO 셀라인이 CHO FX 유전자의 L289S 및 N90X 변형을 함유한 CHO K1 세포로부터 제조되었다(셀라인 8088이라고 칭함). 이들 세포에서 발현된 항체 1은 단지 약 0.96%의 푸코실화(제3일) 또는 0.71%의 푸코실화(제12일) 만을 나타냈다(표 2).

[0113] 또 다른 저 푸코실화 CHO 셀라인을 P136L 치환을 함유한 CHO K1 세포(6066-1 세포로부터, 이것은 L289S FX 유전자 변형을 가진다)로부터 제조했다(셀라인 2121라고 칭함). 이들 세포는 항체 1을 발현했는데, 이것은 제3일 차에 단지 0.82%만이 푸코실화되었다(표 2).

[0114] 2개의 추가적인 저 푸코실화 CHO 셀라인을 N79S 치환을 함유한 CHO K1 세포(6066-1 세포로부터, 이것은 L289S FX 유전자 변형을 가진다)로부터 제조했다(셀라인 2020 및 6069라고 칭함). 이들 셀라인은 항체 1을 발현했는데, 이것은 제3일 차에 단지 0.94%만이 푸코실화되었고(2020), 제3일 차에 단지 0.86%만이 푸코실화되었다(6069)(표 2).

[0115] 항체 1에서 푸코실화의 온도 의존성이 셀라인 4044-1(FX 유전자 변형 없음) 및 셀라인 6066-1(L289S FX 유전자 변형)을 사용하여 시험되었다. 셀라인 6066-1은 37°C에서는 단지 7%의 푸코실화를 나타냈지만, 34°C에서는 약 70%의 푸코실화를 나타냈다. 셀라인 4044-1은 37°C와 34°C 모두에서 대략 동일한 푸코실화(95-96%)를 나타냈다.

[0116] 2개의 추가적인 저 푸코실화 셀라인이 동일한 성장인자 수용체 Ab 3.1 및 Ab 3.2에 대해 2개의 상이한 항체를 발현한 셀라인 8088(L289S 및 N90K)으로부터 제조되었다. 푸코오스의 존재(회수 경로) 및 부재(신생 경로)하에 37°C에서 3일 동안 성장시킨 후, 글리칸 조성과 글리칸의 푸코오스 함량이 결정되었다. 푸코오스 부재시에 셀라인은 단지 약 1.87% 또는 5.73%의 푸코실화를 생성했고, 외부 푸코오스 공급원이 존재할 때는 푸코실화가 적어도 95.22% 또는 95.63%까지 회복되었다.

#### 실시예

##### 실시예 1: CHO 셀라인

[0119] CHO K1 세포로부터 직접 또는 간접적으로 분리된 다양한 CHO 셀라인들이 본원에서 설명된다.

[0120] RGC10 세포. 본원에 참고자료로 포함되는 미국특허 No. 7,435,553에 RGC10 세포에 대해 설명된 대로 CHO K1 세포로부터 CHO 셀라인 3033을 생성했다. 간단히 말해서, CHO K1 세포를 벡터 pTE158와 pcDNA6/TR(Invitrogen)로 안정하게 트랜스펙션했다. 트랜스펙션된 세포를 hFc γ R1의 독시시클린-유도성 발현에 대해 스크리닝했고, 3033 셀라인을 생성할 수 있는 1개의 클론을 선택했다. 혈청이 없는 3번 배지의 혼탁 배양액에서 성장할 수 있도록 3033 세포를 적응시켰다.

[0121] 5055 세포. 5055 세포는 혈청이 없는 생물반응기 배지인 2번 배지의 혼탁액에서 성장할 수 있도록 적응된 CHO K1 세포이다.

[0122] 4044 세포. 4044 세포는 본원에 참고자료로 포함되는 2008년 6월 4일 제출된 국제특허출원 공개 No. WO 2008/151219 A1 및 2008년 6월 4일 제출된 미국특허출원 공개 No. 2009/0124005 A1에 설명된 RGC16 세포로부터 유도되었으며, 이것은 증진된 발현 및 안정성(EESYR) 유전자좌에 loxed 카세트를 함유한다. 4044에 있는 EESYR 유전자좌는 5'에서 3' 방향으로 코딩 가닥 상에 loxP 부위, SV40 후기 프로모터, 퓨로마이신-내성 유전자, CMV 프로모터, IRES, eCFP 유전자, lox2272 부위, CMV 프로모터, DsRed 유전자 및 lox511 부위를 가진다. 4044 세포는 안정하게 트랜스펙션된 pcDNA6/TR 벡터를 더 함유한다.

[0123] 다른 세포들. 7077 셀라인은 외인성 재조합 핵산을 사용하지 않고 3033 세포로부터 유도되었다. 6066, 8088

및 1010 셀라인은 외인성 재조합 핵산을 사용하지 않고 4044 세포로부터 유도되었다.

[0124] 실시예 2

[0125] CHO 세포에서 재조합 항체의 생산

[0126] 벡터. 본원에 설명된 벡터들은 나타낸 특징들을 가지며, 특징들의 상대적인 배치는 코딩 가닥에 대해서 5'에서 3' 방향으로 나열되어 제시된다.

[0127] pR4000: 사람 UbC 프로모터, Ab 2의 중쇄 암호화 유전자, SV40 후기 프로모터, 및 히그로마이신 내성 유전자.

[0128] pR4001: 사람 UbC 프로모터, Ab 2의 경쇄 암호화 유전자, SV40 후기 프로모터, 및 퓨로마이신 내성 유전자.

[0129] pR4002: LoxP 부위, 사람 CMV 프로모터, Ab 2의 중쇄 암호화 유전자, SV40 후기 프로모터, 및 Lox2272 부위.

[0130] pR4003: Lox2272 부위, 히그로마이신 내성 유전자, IRES, EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, Ab2의 경쇄 암호화 유전자, 및 Lox511 부위.

[0131] pR4004: SV40 후기 프로모터 및 Cre 재조합효소 암호화 유전자(본원에 참고자료로 포함되는 WO 2008/151219 A1 참조).

[0132] pR4005: LoxP 부위, 사람 CMV 프로모터, 항체 1(Ab 1)의 경쇄 암호화 유전자, SV40 후기 프로모터, 및 Lox2272 부위.

[0133] pR4006: Lox2272 부위, 히그로마이신 내성 유전자, IRES, EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, Ab 1의 중쇄 암호화 유전자, 및 Lox511 부위.

[0134] pR4007: LoxP 부위, 사람 CMV 프로모터, Ab 1의 경쇄 암호화 유전자, SV40 후기 프로모터, 히그로마이신 내성 단백질의 N 말단 암호화 유전자, 및 Lox2272 부위.

[0135] pR4008: Lox2272 부위, 히그로마이신 내성 단백질의 C 말단 암호화 유전자, IRES, EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, Ab 1의 중쇄 암호화 유전자, 및 Lox511 부위.

[0136] pR4009: LoxP 부위, SV40 후기 프로모터, 히그로마이신 내성 유전자, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, 및 Lox511 부위.

[0137] pR4010: LoxP 부위, SV40 후기 프로모터, 히그로마이신 내성 유전자, IRES, EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, 야생형 FX 유전자, 및 Lox511 부위.

[0138] pR4010: LoxP 부위, SV40 후기 프로모터, 히그로마이신 내성 유전자, IRES, EGFP 유전자, 사람 CMV 프로모터, 및 돌연변이 L289S 및 N90K를 갖는 돌연변이된 FX 유전자.

[0139] CHO 세포에서 푸코실화의 능력이 세포 표면 LCA 염색 및 CHO 세포로부터 생산된 재조합 항체의 분석에 의해 연구되었다. 한 연구에서는, 본원에 참고자료로 포함되는 미국특허 No. 7,435,553에 설명된 방법에 따라 7077 세포를 사람 B 세포 수용체에 대한 사람 IgG1 항체인 항체 2(Ab 2)의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용했다. 간단히 말해서,  $1x 10^7$  7077 세포를 Lipofectamine<sup>TM</sup>(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 플라스미드 pR4000(중쇄, 히그로마이신 내성)과 pR4001(경쇄, 퓨로마이신 내성)로 트랜스펙션했다. 트랜스펙션된 배양물을 10% 태아 소 혈청을 함유하는 F12 배지 중에서 각각 2주 동안  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  히그로마이신 및  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  퓨로마이신을 사용하여 선택했다. 선택에서 생존한 세포를 함께 모아서 혈청이 없는 생물반응기 배지인 2번 배지의 혼탁액에서 성장할 수 있도록 적응시켰다. 배양 배지에 독시시클린을 첨가하여 3일간 hFc $\gamma$ R1의 발현을 유도했다. 유도된 배양물을 18시간 동안  $1\text{mg}/\text{mL}$  토끼 IgG와 함께 인큐베이션한 후, 염소 다클론성 FITC-콘쥬게이트된 항-사람 Fc 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)의 F(ab')2 단편으로 염색했다. 세포를 1시간 동안 염색한 다음, PBS로 2번 세척하고, MoFlo<sup>TM</sup> 세포 정렬기(Fort Collins, CO)에서 유세포분석으로 분석했다. 총 세포 집단의 상위 5%에 들어가는 평균 FITC 형광 강도를 가진 세포들이 풀에서 정렬되었고, 7077-1 세포라고 명명되었다. 7077-1 세포를 2번 배지에서 10일간 확장시켰다. 재조합 Ab 2를 생산하기 위해서, 7077-1 세포를  $37^\circ\text{C}$ 에서 쉐이커 플라스크 안에 2번 배지 mL당  $4x 10^5$  세포로 파종했다. 3일 후에 조건화된 배지를 수거해서 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 Ab 2 단백질을 정제했다.

[0140] 4044 및 6066 CHO 세포를 Ab 2 및 사이토카인 수용체에 대한 사람 IgG1 항체인 Ab 1의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용했다. 간단히 말해서, Ab 2를 생성하기 위해서,  $2x 10^6$  4044 세포 및  $2x 10^6$  6066 세포(각각 EESYR

유전자좌에 loxed 카세트를 가진다)를 각각 pR4002(loxed 카세트의 중쇄), pR4003(loxed 카세트의 경쇄 및 히그로마이신 내성) 및 pR4004(Cre 암호화)로 트랜스펙션했다. Ab 1을 발현하기 위해서,  $2 \times 10^6$  4044 세포 및  $2 \times 10^6$  6066 세포를 각각 pR4005(loxed 카세트의 경쇄), pR4006(loxed 카세트의 중쇄 및 히그로마이신 내성) 및 pR4004(Cre 암호화)로 트랜스펙션했다. 트랜스펙션된 4044와 6066 세포를 10% FCS를 함유하는 F12 배지 중에서 10일간  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  히그로마이신을 사용하여 선택했다. 생존한 세포를 7일간 혈청이 없는 1번 배지의 혼탁액에서 성장할 수 있도록 적응시켰다. EESYR 유전자좌에서 Cre-매개 카세트 교환을 거친 세포는 EGFP를 발현했지만, DsRed나 ECFP는 발현하지 않았다. EGFP에 대해서는 양성이지만 DsRed 및 ECFP에 대해서는 음성인 세포를 MoFlo™ 정렬기에서 세포 정렬하여 수집했다. Ab 2 및 Ab 1 유전자로 트랜스펙션된 4044-유도된 세포를 각각 4044-2 및 4044-1 세포라고 칭했다. Ab 2 및 Ab 1 유전자로 트랜스펙션된 6066-유도된 세포는 각각 6066-2 및 6066-1 세포라고 칭했다. 4044-2, 6066-2, 4044-1 및 6066-1 세포를 7일간 2번 배지에서 배양하여 확장시켰다. 재조합 항체를 생산하기 위해서, 4개의 셀라인을  $37^\circ\text{C}$ 에서 쉐이커 플라스크 안에 2번 배지  $\text{mL}$ 당  $4 \times 10^5$  세포로 파종했다. 3일 후에 조건화된 배지를 수거해서 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 재조합 항체를 정제했다.

[0141] 또한, 8088 및 1010 CHO 세포를 Ab. 1의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용했다. 간단히 말해서, Ab 1을 발현하기 위해서,  $2 \times 10^6$  8088 세포 및  $2 \times 10^6$  1010 세포를 각각 pR4007(loxed 카세트의 경쇄 및 히그로마이신 내성 유전자의 제 1 부분), pR4008(loxed 카세트의 중쇄 및 히그로마이신 내성 유전자의 제 2 부분) 및 pR4004(Cre 암호화)로 트랜스펙션했다.  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  히그로마이신을 사용한 선택에서 생존한 트랜스펙션된 세포들을 혈청이 없는 1번 배지의 혼탁액에서 성장할 수 있도록 적응시켰다. 트랜스펙션된 8088 및 1010으로부터 EGFP를 발현하지만 DsRed나 ECFP는 발현하지 않는 세포를 MoFlo™에서 세포 정렬함으로써 분리하여 8088-1 및 1010-1라고 칭했다. Ab 1 단백질을 생성하기 위해서, 8088-1 및 1010-1 세포를 쉐이커 플라스크 안에  $4 \times 10^5$  세포/ $\text{mL}$ 로 파종했다. 3일 후에 배양 배지를 수집하고, 단백질 A 크로마토그래피에 의해서 Ab 1을 정제했다.

#### 실시예 3

#### 항체 푸코실화 분석

[0144] 먼저 정제된 사람 IgG1 항체 단백질을, 단백질/효소 비가  $1\mu\text{g}/0.1\text{mU}$ 인  $50\text{mM}$  트리스 pH 8.0 중에서 변성된 조건(0.5% SDS,  $2\text{mM}$  TCEP, 및 1% NP-40으로 차단)에서 PNGase F를 사용하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 탈글리코실화했다. 다음에, 방출된 글리칸을 1시간 동안  $80^\circ\text{C}$ 에서 안트라닐산을 사용하여 형광 유도체화했다. 샘플들을 Waters Oasis™ HLB 카트리지를 사용해서 예비 세정하여 과량의 안트라닐산 시약을 제거했다. 다음에, 이동상 A로서 ddH<sub>2</sub>O 중의 0.5% TFA를 사용하고, 이동상 B로서 90% 아세토니트릴/10% ddH<sub>2</sub>O 중의 0.045% TFA를 사용하여 역상 HPLC에 의해서 올리고당 혼합물을 분석했다. 40분에 걸쳐서 B를 30-40%의 구배로 적용하여, Thermo Hypercarb™(Thermo Fisher, Waltham, MA) 칼럼(치수  $100 \times 2.1$ , 입자 크기  $3\mu\text{m}$ )에서 글리칸을 분해했다. 여기 과장이  $230\text{nm}$ 이고, 방출 과장이  $425\text{nm}$ 인 형광 검출기를 사용하여 신호를 검출했다. 질량분광기를 통해서 HPLC-분리된 글리칸 피크를 더 분석한 결과, 이들은 푸코실화되지 않은 바이안테너리 글리칸과 푸코실화된 바이안테너리 글루칸의 두 가지 주 그룹으로 분리된 것으로 드러났다. 각 그룹(푸코실화 대비-푸코실화) 내에서 글리칸은 디갈락토실(G2), 모노갈락토실(G1) 또는 무갈락토실(G0) 형태로 더 분리되었다. 상이한 글리칸 형태에 상응하는 피크 면적을 적분하여 단클론성 항체 상의 각 개별 글리칸 집단을 정량할 수 있다.

#### 실시예 4

#### FX, GMD, GDP-푸코오스 수송인자 및 FUT8 유전자의 주요 전사체의 서열화

[0147] FX, GMD, GDP-푸코오스 수송인자 및 FUT8 유전자에 의해서 암호화된 단백질들은 신생 푸코실화 경로의 구성성 분들이다. CHO 셀라인들인 5055, 4044-1, 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010 및 8088 세포에서의 FX 유전자의 주요 전사체들의 서열, 및 4044-1, 6066-1, 1010 및 8088 세포에서의 GMD 유전자의 주요 전사체의 서열을 결정했다. 또한, FUT8 및 GDP-푸코오스 수송인자로부터 발현된 주요 전사체들의 서열을 4044-1 및 6066-1 세포에서 결정했다.

[0148] 간단히 말해서, Micro-Fast Track 2.0 키트™(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여  $5 \times 10^6$  CHO 세포로부터 총 RNA를 분리했다. Superscript III First-Strand Synthesis System™(Invitrogen)과 프라이머로서 Oligo-dT를 사용하여 총 RNA로부터 4개의 푸코실화 유전자의 cDNA를 합성했다. 프라이머 5'-ctacaatctt ggtgcccaaga gc-3' SEQ ID NO:7와 5'-tccagttcag tttctgtgc g-3' SEQ ID NO:8를 사용하여 GMD cDNA를 PCR 증폭했다. 프

라이머 5'-ttccctgaca agaccaccta tcc-3' SEQ ID NO:9와 5'-tagttgtcggtgaaccaggc ac-3' SEQ ID NO: 10을 사용하여 FX cDNA를 PCR 증폭했다. 프라이머 5'-gatgaggaca gcaggaacaa gc-3' SEQ ID NO:11과 5'-agcacttcttcaccccttt ggg-3' SEQ ID NO:12를 사용하여 GDP-푸코오스 수송인자 cDNA를 PCR 증폭했다. 프라이머 5'-agccaagggt aagtaaggag gacg-3' SEQ ID NO:13과 5'-ttgttagacag cctccatcct cg-3' SEQ ID NO:14를 사용하여 FUT8 cDNA를 PCR 증폭했다. PCR 반응에 사용된 DNA 중합효소는 Platinum Taq<sup>TM</sup>(Invitrogen)과 cloned Pfu(Stratagene, La Jolla, CA)의 20:1 혼합물이었다. 젤 전기영동 후 PCR 산물을 정제하고, 제조자의 지시에 따라 pCR2.1 TOPO<sup>TM</sup> 벡터(Invitrogen)에서 클로닝했다. 클로닝된 DNA 산물로 전기-컴페턴트 DH10B 세포를 형질전환시켰다. 각 형질전환으로부터 최소 3개의 박테리아 콜로니를 선별하여 LB 및 100 $\mu$ g/mL 암페실린을 함유하는 3개의 액체 배양액에 접종했다. QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>TM</sup>(Qiagen)를 사용하여 이들 배양물에서 플라스미드 DNA를 정제했다. 벡터에 위치된 M13 프라이머와 각각의 5' 및 3' PCR 프라이머를 사용하여 클로닝된 PCR 산물들의 서열을 결정했다. 이들 서열을 *C. griseus*로부터의 FX(수탁번호 AF525365), GMD(수탁번호 AF525364), GDP-푸코오스 수송인자(수탁번호 AB222037) 및 FUT8(수탁번호 BD359138) mRNA의 Genbank 서열과 비교했다.

[0149] Genbank 기준 서열(AF525365)로부터 코돈 변화를 가져오는 컨센서스 FX 전사체 서열의 돌연변이가 7077-1, 6066-1, 2121, 2020, 6069, 1010 및 8088 세포에서 확인되었다(표 1 및 2). 4044-1, 6066-1, 1010 및 8088 세포로부터의 GMD 전사체의 서열은 GenBank에 보고된 GMD 서열(수탁번호 AF525364)과 일치했다. 4044-1 및 6066-1 세포에서 GDP-푸코오스 수송인자와 FUT8 전사체의 서열도 역시 GenBank에 보고된 이들 각각의 서열(수탁번호 AB222037 및 BD359138)과 일치했다.

[0150] 실시예 5

[0151] FX 유전자에 단일 L289S 돌연변이를 가진 CHO 셀라인에서의 푸코실화

[0152] 먼저 세포를 렉틴 *Lens culinaris* 아글루티닌(LCA)로 염색하여 3033, 4044, 6066, 및 7077 세포에서의 상대적 푸코실화 능력을 연구했다. 간단히 말해서, 2x 10<sup>6</sup> 4044 세포 및 6066 세포를 각각 5 $\mu$ g/mL로 바이오틴-LCA(Vector Laboratories, Burlingame, CA)와 함께 1시간 동안 인큐베이션했다. PBS로 2번 세척한 후, 세포를 피코에리트린-콘쥬게이트된 스트렙토아비딘(Jackson ImmunoResearch)과 함께 30분간 인큐베이션했다. 다음에, 세포를 PBS로 1번 세척하고, 유세포분석기에서 분석했다. 3033 세포 및 7077 세포를 1시간 동안 FITC-LCA로 염색하고, 2번 세척한 다음, 유세포분석기에서 분석했다(도 2). 3033, 4044, 6066 및 7077 세포는 모두 LCA로 염색되었다. 6066 및 7077 세포에서 LCA의 염색 강도는 3033 및 4044 세포에서의 LCA의 염색 강도 보다 상당히 약했는데(도 2), 이것은 3033 및 4044 세포에서보다 6066 및 7077 세포에서 단백질 푸코실화가 적었음을 나타낸다. 6066 세포 및 7077 세포가 푸코오스 함량이 적은 hIgG1 항체의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있었는지를 시험하기 위해, 4044 및 6066 세포를 Ab 2 및 Ab 1의 발현 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션했고, 7077 세포를 Ab 2의 발현 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션했다(실시예 2 참조). 3일간 쉐이커 플라스크에서 배양하고, 12일간 급송 배치식 생물반응기 배양하여 트랜스펙션된 세포로부터 재조합 Ab 2 및 Ab 1을 생산했다. Ab 2와 Ab 1을 조건화된 배지로부터 정제하고, 이들의 푸코실화 수준을 HPLC에 의해 결정했다(표 1). 표 1에 나타낸 대로, 7077-1, 6066-1 및 6066-2는 37°C에서 쉐이커와 생물반응기에서 3.6% 내지 8%의 푸코실화 수준을 나타내는 재조합 항체를 생산했다.

## 표 1

| 표 1       |           |              |        |              |                |
|-----------|-----------|--------------|--------|--------------|----------------|
| 숙주 셀라인 명칭 | 생성 셀라인 명칭 | 컨센서스 FX 돌연변이 | 수용체 항체 | 쉐이커 푸코실화 (%) | 생물반응기 푸코실화 (%) |
| 4044      | 4044-1    | 없음           | Ab 1   | 89.3         | 85.8           |
| 7077      | 7077-1    | L289S        | Ab 2   | 4.0          |                |
| 4044      | 4044-2    | 없음           | Ab 2   | 95           | 76.8           |
| 6066      | 6066-1    | L289S        | Ab 1   | 7; 8         | 6.14; 6.86     |
| 6066      | 6066-2    | L289S        | Ab 2   | 3.6          |                |

[0153]

[0154] 실시예 6

[0155] FX 유전자에 2개의 아미노산 변화를 가진 CHO 셀라인에서의 푸코실화

8088 및 1010은 외인성 재조합 핵산을 사용하지 않고 6066 세포로부터 분리된 2개의 셀라인이다. 6069, 2020 및 2121은 외인성 재조합 핵산을 사용하지 않고 6066-1 세포로부터 분리된 3개의 셀라인이다. FX 유전자의 주요 전사체들의 서열을 RT-PCR에 의해 결정했다(표 2). 이들 5개의 셀라인은 6066 및 7077 세포와 동일한 L289S 돌연변이를 갖는 것으로 판명되었다. 5개 셀라인 모두에서 FX 전사체들은 또한 L289S 변화에 더하여 1개의 아미노산을 변화시키는 돌연변이를 지닌다. 이들 돌연변이가 표 2에 요약된다. 8088, 1010, 6069, 2020 및 2121 세포는 LCA와의 감소된 결합을 나타냈으며(도 4), 이것은 이들 세포에서 단백질 푸코실화가 감소된 것을 나타낸다.

[0157] 8088 및 1010 세포에서 푸코실화 능력을 시험하기 위해, 안정한 트랜스펙션에 의하여 이들 두 숙주 세포로부터 Ab 1을 생산했다. 트랜스펙션된 배양물을 2주 동안 400 $\mu$ g/mL를 사용하여 선택했다. 히그로마이신에 내성이었던 세포를 1번 배지의 혼탁 배양액에서 성장할 수 있도록 적응시켰다. 재조합 Ab 1은 쉐이커 플라이스에서 3일 배양했을 때와 급송 배치식 생물반응기에서 12일 배양했을 때 모두 생산되었다. 조건화된 배지로부터 Ab 1을 정제하고, Ab 1의 푸코실화 수준을 HPLC에 의해 결정했다(표 2). 표 2에 나타낸 대로, 트랜스펙션된 8088 및 1010 세포는 34°C에서 쉐이커와 생물반응기에서 0.53% 내지 0.96%의 푸코실화 수준을 나타내는 재조합 Ab 1 항체를 생산했다.

[0158] 또한, 6069, 2020, 2121 세포에서 푸코실화 능력을 쉐이커 플라스크 배양에서 생산된 Ab 1 단백질의 정제 후에 시험했다. 표 2는 이들 3개 셀라인이 0.82% 내지 0.94% 범위의 푸코실화 수준을 나타내는 Ab 1을 생성했음을 보여준다.

## 표 2

| 표 2         |           |              |         |              |                |
|-------------|-----------|--------------|---------|--------------|----------------|
| 숙주 셀라인 명칭   | 생성 셀라인 명칭 | FX 돌연변이      | 수용체 단백질 | 쉐이커 푸코실화 (%) | 생물반응기 푸코실화 (%) |
| 8088 (8088) | 8088-1    | L289S, N90K  | Ab 1    | 0.96         | 0.71           |
| 1010        | 1010-1    | L289S, G211R | Ab 1    | 0.94         | 0.53           |
|             | 2121      | L289S, P136L | Ab 1    | 0.82         |                |
|             | 2020      | L289S, N79S  | Ab 1    | 0.94         |                |
|             | 6069      | L289S, N79S  | Ab 1    | 0.87         |                |

[0159]

실시예 76066-1에서 푸코실화 능력은 온도-의존적이다

[0160] 6066-1 세포에서 단백질 푸코실화에 대한 배양 온도의 효과를 LCA 염색 및 이들 세포로부터 생산된 Ab 1 단백질의 푸코실화 분석에 의해서 시험했다. 도 5는 37°C 및 34°C 모두에서 성장된 4044-1 및 6066-1 세포의 LCA 염색을 나타낸다. 34°C 및 37°C에서 성장된 4044-1 세포는 LCA에 의해서 유사하게 염색되었다. 34°C에서 성장된 6066-1 세포는 37°C에서 성장된 6066-1 세포보다 상당히 더 높은 수준으로 LCA와 결합했다. 표 3은 34°C 및 37°C에서 쉐이커 플라스크 배양일 때 4044-1 및 6066-1 세포로부터 생산된 Ab 1 단백질의 푸코실화 수준을 나타낸다. 4044-1 세포는 34°C 및 37°C에서 성장되었을 때 각각 96% 및 95%의 푸코실화를 나타내는 Ab 1을 생산했다. 반면에, 6066-1 세포는 34°C 및 37°C에서 각각 약 70% 및 7%의 푸코실화를 나타내는 Ab 1을 생산했다. 이 결과는 6066-1 세포에서 푸코실화 수준이 온도 의존성을 나타낸다.

## 표 3

| 표 3          |                 |               |                        |
|--------------|-----------------|---------------|------------------------|
| 생성 셀라인<br>명칭 | 컨센서스 FX<br>돌연변이 | 배양 온도<br>(°C) | Ab 1에서의<br>푸코실화<br>(%) |
| 4044-1       | 없음              | 37            | 95                     |
| 4044-1       | 없음              | 34            | 96                     |
| 6066-1       | L289S           | 37            | 7                      |
| 6066-1       | L289S           | 34            | 70                     |

[0163]

[0164]

실시예 8

[0165]

L-푸코오스로 보충된 배지에서 배양된 CHO세포의 푸코실화

[0166]

포유류 세포에서 GDP-푸코오스는 신생 합성 경로와 회수 경로에 의해 생산될 수 있다(Becker and Lowe (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals, Glycobiology, 13(7):41R-53R). L-푸코오스가 없는 배양 배지에서 성장된 세포에서는 GDP-푸코오스가 GDP-만노오스로부터의 GMD 및 FX 단백질에 의해서 생산된다. L-푸코오스가 첨가된 배지에서는 GDP-푸코오스가 L-푸코오스 키나제와 GDP-L-푸코오스 피로포스포릴라제에 의해서 L-푸코오스로부터 생성될 수 있다. 어느 경로로든 생산된 GDP-푸코오스는 GDP-푸코오스 수송 인자를 통해서 Golgi 장치로 수송된다. Golgi에서는 푸코실트랜스페라제 단백질 FUT8이 GDP-푸코오스를 사용하여 당단백질을 푸코실화된 단백질로 전환한다. 5mM L-푸코오스가 첨가된 배양 배지와 첨가되지 않은 배양 배지에서 성장된 6066-2, 8088 및 1010 세포의 푸코실화 능력을 시험했다. 6066-2 세포는 Ab 2 항체를 발현했고, FX 유전자 전사체에 L289S 돌연변이를 보유했다(실시예 2 및 표 1). 정제된 Ab 2의 HPLC 분석에서는 쉐이커 플라스크 안의 L-푸코오스가 첨가되지 않은 2번 배지에서 성장된 6066-2 세포가 Ab 2를 생산했고, 이때 푸코실화는 1.9%였다. 반면에, 쉐이커 플라스크 안의 5mM L-푸코오스로 보충된 2번 배지에서 성장된 6066-2 세포는 93.5%의 푸코실화를 나타낸 Ab 2를 생산했다. 이 결과는 GDP-푸코오스 합성의 회수 경로, GDP-푸코오스 수송인자 및 FUT8 단백질이 6066-2 세포에서 기능적이었음을 나타낸다.

[0167]

5mM L-푸코오스를 첨가한 2번 배지 및 첨가하지 않은 2번 배지에서 성장된 3033, 5055, 7077, 8088 및 8088 세포의 상대적 푸코실화 능력을 LCA 염색에 의해서 시험했다(도 6). 3033 및 5055 세포는 L-푸코오스 보충과 무관하게 LCA에 유사한 수준으로 결합되었다. 7077, 8088 및 8088 세포는 L-푸코오스가 없는 배지보다 5mM L-푸코오스를 첨가한 배지에서 성장되었을 때 LCA에 상당히 더 많이 결합되었다. 이 결과는 7077, 8088 및 8088 세포가 기능적 GDP-푸코오스 수송인자 및 기능적 FUT8 단백질을 가졌음을 나타낸다.

[0168]

실시예 9

[0169]

FX 유전자로 트랜스펙션된 8088에서의 푸코실화

[0170]

8088 세포에서 보이는 감소된 푸코실화 수준이 돌연변이체 FX 유전자(L289S 및 N90K 돌연변이를 가진)로 인한 것이었음을 확인하기 위해, 야생형 FX 유전자와 돌연변이체 FX 유전자를 안정한 트랜스펙션에 의해서 8088 세포에서 발현시킨 후, 트랜스펙션된 세포의 푸코실화 능력을 LCA로 세포를 염색하여 시험했다. 대조군으로서, 8088 세포를 별도로 벡터 pR4009(히그로마이신 내성 유전자와 EGFP 유전자를 가진 loxed 카세트)로 트랜스펙션했다. 벡터 pR4010 및 pR4011은 각각 야생형 FX 유전자 및 pR4009에서 CMV 프로모터와 Lox511 부위 사이에 위치된 L289S N90K FX 유전자를 함유한다. pR4004와 pR4009, pR4010 또는 pR4011 중 하나로 트랜스펙션된 8088 세포를 14일 동안 400 $\mu$ g/mL 히그로마이신을 사용하여 선택했다. EESYR에서 Cre-매개된 카세트 교환을 거친 세포는 EGFP를 발현했지만, EYFP는 발현하지 않았다. EGFP에 양성이지만 EYFP에는 음성인 세포를 세포 정렬하여 분리했다. 34°C에서 조직 배양물에서 확장한 후, 정렬된 세포를 바이오틴-LCA와 PE-스트렙토마이신으로 순차적으로 염색했다. 벡터 pR4009 및 pR4011로 트랜스펙션된 8088 세포는 동일한 LCA 염색 수준을 나타냈다. 반면에, pR4010으로 트랜스펙션된 8088 세포는 5055 세포와 비슷한 LCA 염색 수준을 나타냈다(도 7). 요약하면, 야생형 FX 단백질은 LCA 염색에 의해서 분석된 바로는 8088 세포에서 푸코실화 수준을 회복할 수 있었지만, L289K 돌연변이체 FX 단백질은 그렇지 않았다. 이 결과는 8088 세포에서 낮은 푸코실화 수준이

이들 세포에서 FX 단백질에 존재하는 L289S N90K 돌연변이로 인한 것이었음을 나타낸다.

[0171] 실시예 10

[0172] 글리칸의 HPLC 및 질량분광 분석: Ab 3.1 및 3.2

[0173] FX 단백질 치환 L289S 및 N90K를 코딩하는 FX 유전자 변형을 가진 CHO 셀라인인 셀라인 8088을 동일한 성장인자 수용체와 특이적으로 결합하는 상이한 가변 영역을 가진 2개의 사람 항체(항체 3.1 및 항체 3.2)의 중쇄(사람 IgG1) 및 경쇄(사람 kappa)를 암호화하는 플라스미드로 각각 트랜스펙션했다. 각 항체를 발현하는 세포를 10mM 푸코오스의 존재하에 또는 부재하에 2번 배지에서 37°C에서 3일 동안 성장시켰고, 각 조건 세트에서 항체로부터 얻어진 글리칸을 분리하여 질량분광기에 의해 확인했다.

[0174] 푸코오스의 부재하에 A3.1을 발현한 8088 세포는 HPLC에서 3개의 주요 글리칸 피크를 생성했으며(도 8), 이들은 말단 갈락토실화에 차이가 있는 매스 스펙트럼 상의 3개의 상이한 푸코실화되지 않은 글리칸으로 나타나며(도 9), 푸코실화는 약 1.47%이다. 10mM 푸코오스의 존재하에 A3.1을 발현한 8088 세포는 HPLC에서 3개의 주요 글리칸 피크를 생성했으며(도 10), 이들은 매스 스펙트럼 상에 3개의 상이한 푸코실화된 글리칸과 1개의 푸코실화되지 않은 글리칸으로 나타나며(도 11), 푸코실화는 약 95.22%이다.

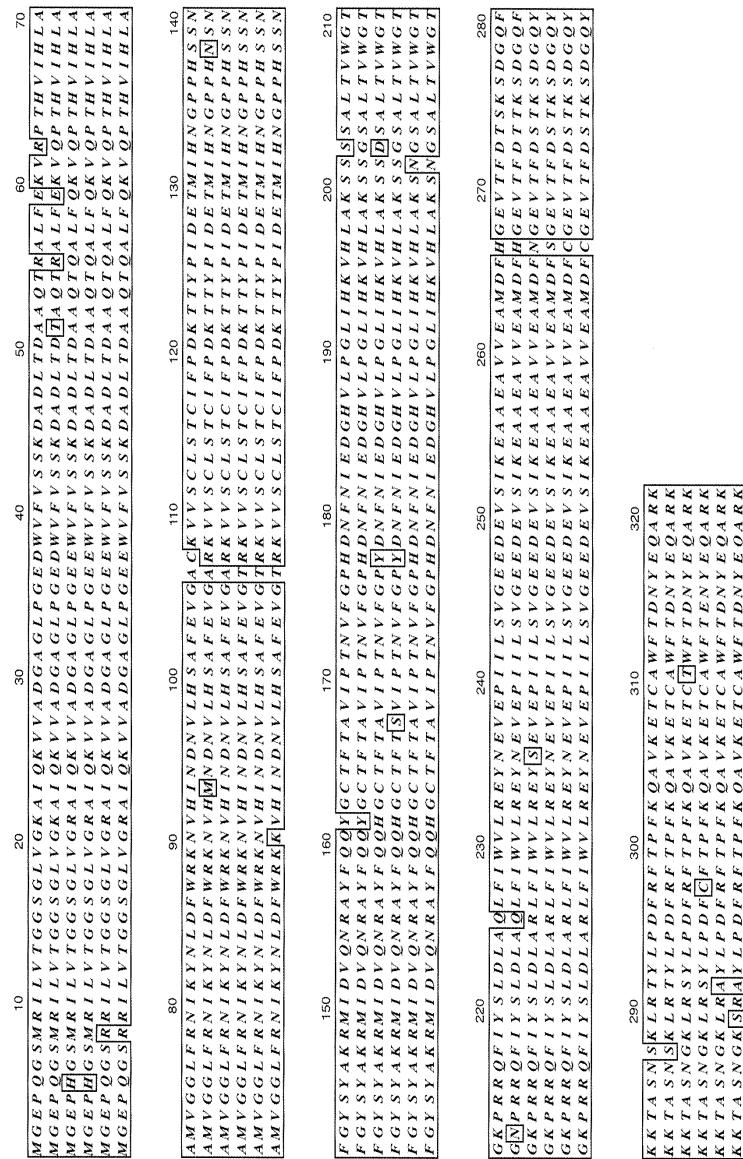
[0175] 푸코오스의 부재하에 A3.2를 발현한 8088 세포는 HPLC에서 3개의 주요 글리칸 피크를 생성했으며(도 12), 이들은 말단 갈락토실화에 차이가 있는 매스 스펙트럼 상의 3개의 상이한 푸코실화되지 않은 글리칸으로 나타나며(도 13), 푸코실화는 약 5.73%이다. 10mM 푸코오스의 존재하에 A3.2를 발현한 8088 세포는 HPLC에서 3개의 주요 글리칸 피크를 생성했으며(도 14), 이들은 매스 스펙트럼 상에 3개의 상이한 푸코실화된 글리칸과 푸코실화되지 않은 소량의 4번째 글리칸으로 나타나며(도 15), 푸코실화는 약 95.63%이다.

[0176] 항체 3.1 또는 항체 3.2를 발현하는 푸코오스-공급된 8088 세포와 푸코오스 공급되지 않은 8088 세포에 대한 글리칸 분석의 결과가 글리칸 타입에 따라 분류되어 도 16에 요약된다. 특정 조건에서의 항체의 퍼센트를 나타내는 칼럼은 합계가 100이다. Ab 3.1의 경우, 10mM 푸코오스의 부재시 총 푸코실화는 1.87%였다. Ab 3.2의 경우, 10mM 푸코오스의 부재시 총 푸코실화는 5.73%였다(도 16의 표에서 마지막 3줄에서 상응하는 칼럼을 합계한다). 10mM 푸코오스가 존재할 경우, Ab 3.1에서 총 푸코실화는 95.22%였다. 10mM 푸코오스가 존재할 경우, Ab 3.2에서 총 푸코실화는 95.63%였다(도 16의 표에서 마지막 3줄에서 상응하는 칼럼을 합계한다). 이들 데이터에 의해서 저 푸코실화 셀라인은 푸코오스의 부재시에는 약 1.87% 또는 5.73% 이하로 푸코실화하지만, 푸코오스가 존재하면 적어도 약 95.22% 또는 95.63%의 푸코실화까지 푸코실화가 회복될 수 있다는 것이 확립된다.

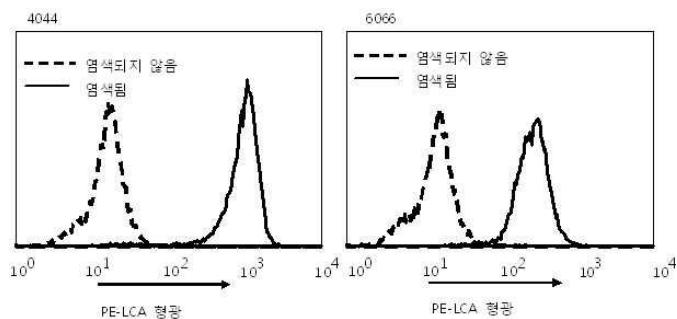
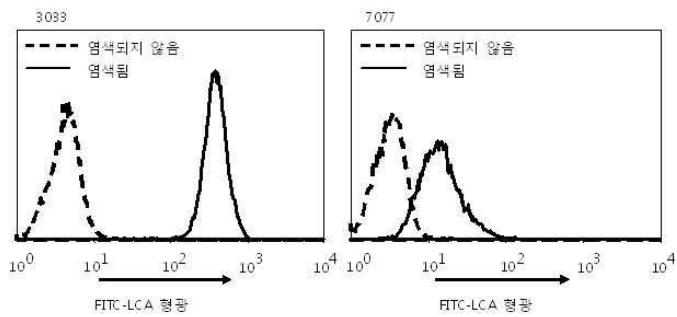
[0177] 글리칸 분석을 위해, 두 항체(항체 3.1 및 항체 3.2) 샘플을 각각 100 $\mu$ g 알리퀴트씩 50mM 트리스(pH 8.0), 2.0mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), 0.5% SDS를 함유하는 변성 버퍼 45 $\mu$ l에 다시 혼탁했다. 7분간 80°C에서 가열하여 단백질을 변성시켰다. PNGase F 10mU 및 1% NP40과 함께 37°C에서 하룻밤 인큐베이션한 후 항체 상의 N-연결된 글리칸들이 방출되었다. 방출된 글리칸에 유도체화 용액(4%(w/v) 아세트산 나트륨과 2%(w/v) 봉산을 함유하는 메탄올 중의 30mg/mL 안트라닐산(AA) 및 20mg/mL 나트륨 시아노보로히드라이드)을 200 $\mu$ l를 첨가하고, 1시간 동안 80°C에서 인큐베이션하여 형광 표지화했다. AA 유도체화된 글리칸은 고체상 추출 카트리지(Oasis<sup>TM</sup> HLB 카트리지, Waters Corp.)를 사용하여 과량의 시약으로부터 더 분리한 다음, 5% 아세토니트릴 200 $\mu$ l로 용출시켰다. 글리칸의 HPLC 분리에는 Thermo Hypercarb<sup>TM</sup> 칼럼(3  $\mu$ m, 100 x 2.1mm)을 0.15mL/분의 유속으로 사용했다. 이동상 A는 H2O 중의 0.05% TFA였고, 이동상 B는 90% 아세토니트릴과 10% H2O 중의 0.045% TFA였다. 형광 유도체화된 다당류의 10 $\mu$ l 알리퀴트를 H2O 중의 0.1% TFA 90 $\mu$ l와 혼합하여 25% 이동상 B로 미리 평형화된 칼럼에 주사했다. 샘플 주사 후, 구배를 5분에 걸쳐서 30% B까지 증가시키고, 이어서 39분에 걸쳐서 43% B까지 더 증가시켜서 다당류를 분리했다. 여기 파장이 230nm이고, 방출 파장이 450nm인 형광 검출기를 사용하여 AA-표지된 글리칸을 검출했다. AA-표지된 글리칸의 질량분광 분석을 Shimadzu Axima<sup>TM</sup> MALDI-TOF 시스템을 사용하여 수행했다. 유도체화된 글리칸 100 $\mu$ l를 가속 진공 상태에서 건조한 다음, 0.1% TFA 10 $\mu$ l에 다시 혼탁했다. 농축된 글리칸을 Nut ip Hypercarb<sup>TM</sup>을 사용하여 더 탈염하고, 65% 아세토니트릴 중의 0.1% TFA 30 $\mu$ l로 용출시킨 후, 가속 진공 상태에서 건조시켰다. 동결건조된 글리칸을 70% 아세토니트릴 중의 10mg/mL DHB(2,5-디히드록시벤조산) 2 $\mu$ l에 다시 용해한 다음, MALDI 플레이트 위에 스팟팅했다. 선형 네거티브 모드에서 스펙트럼을 수집했고, 추출 후는 1500mu이며, 레이저 파워는 최대 파워(6mW)의 60-90%로 설정했고, 337nm의 파장에서 작동되었다.

## 도면

## 도면1

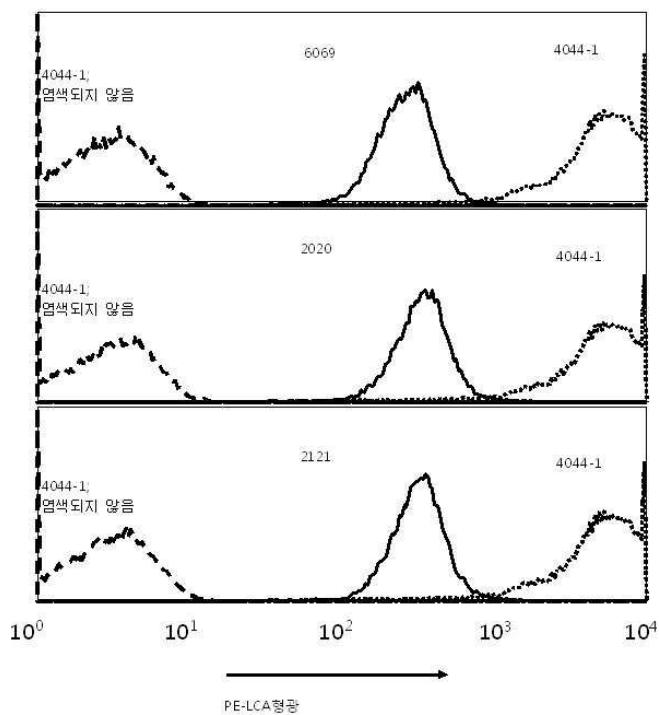


## 도면2

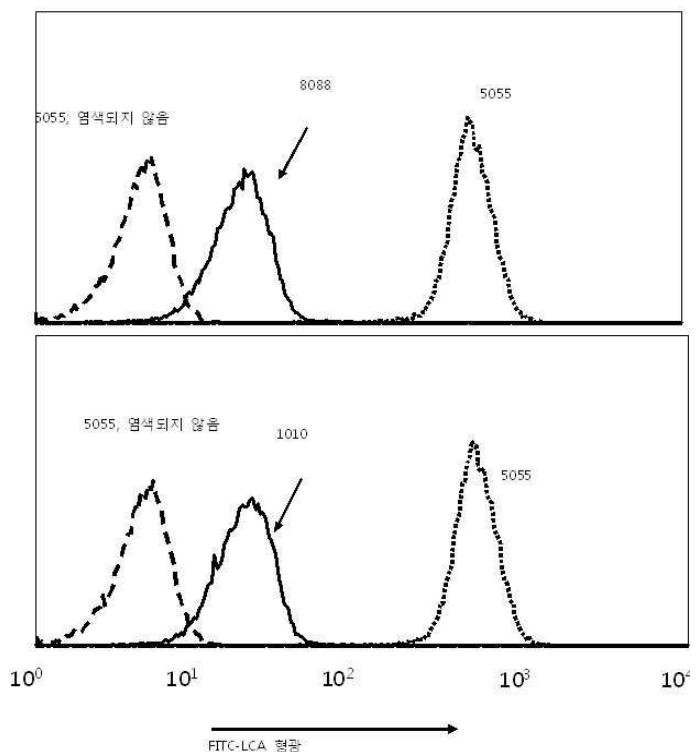


## 도면3

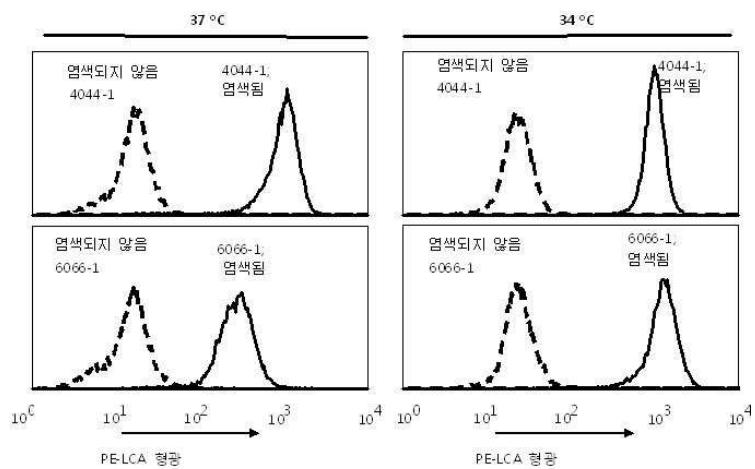
설명 1:



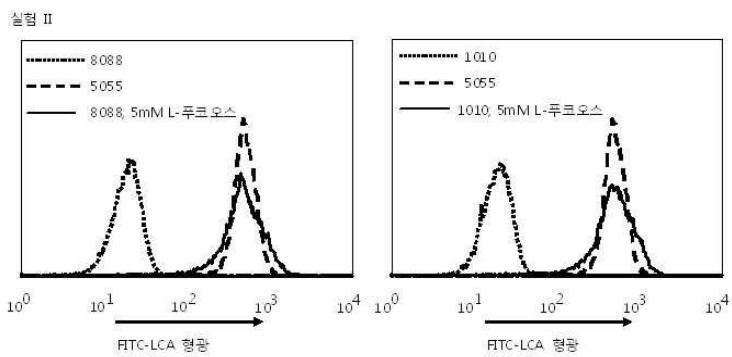
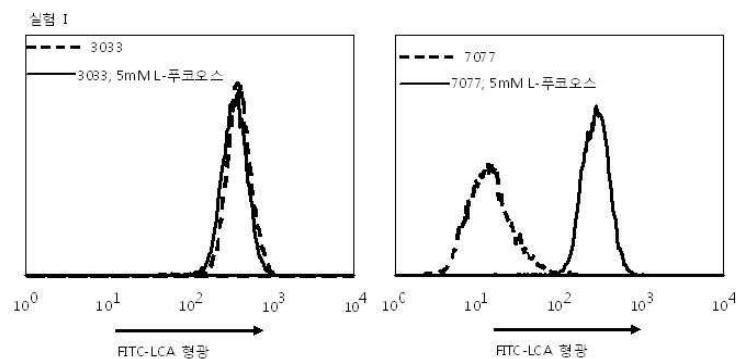
## 도면4

10<sup>1</sup> 실험 II

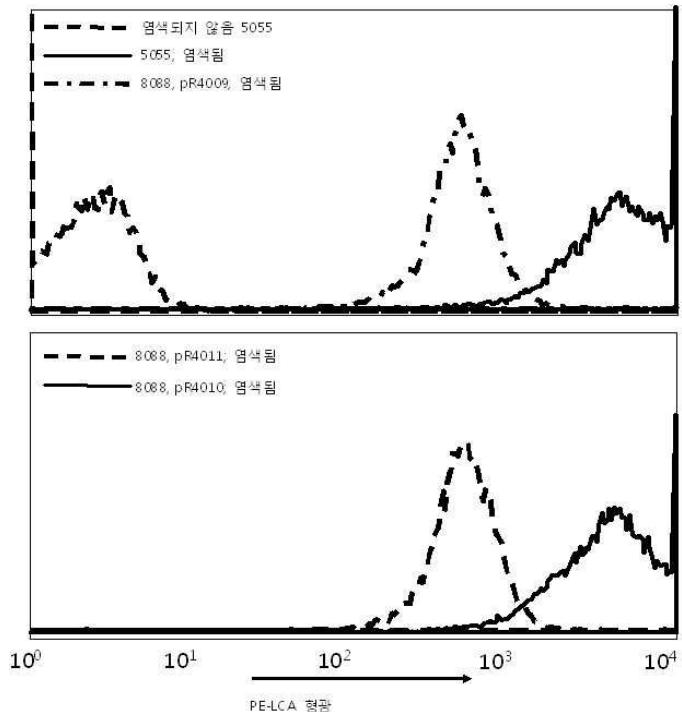
## 도면5



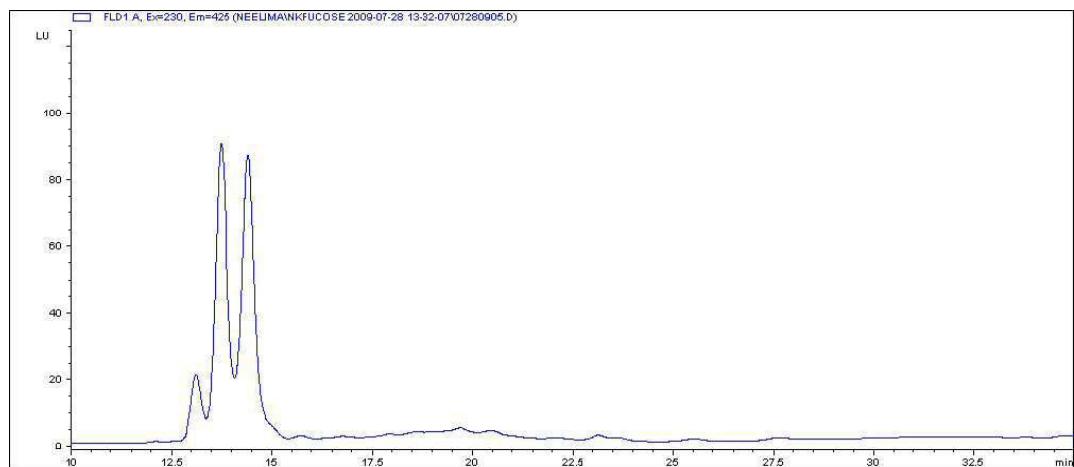
## 도면6



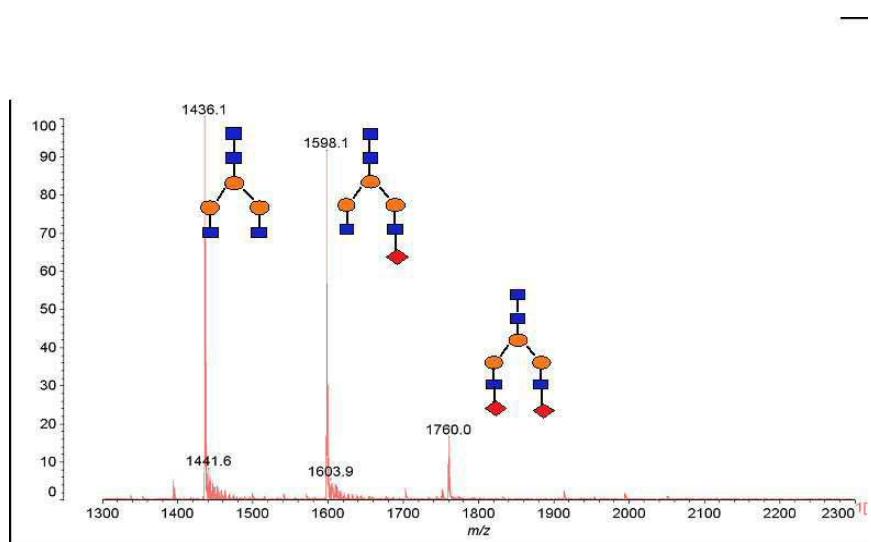
## 도면7



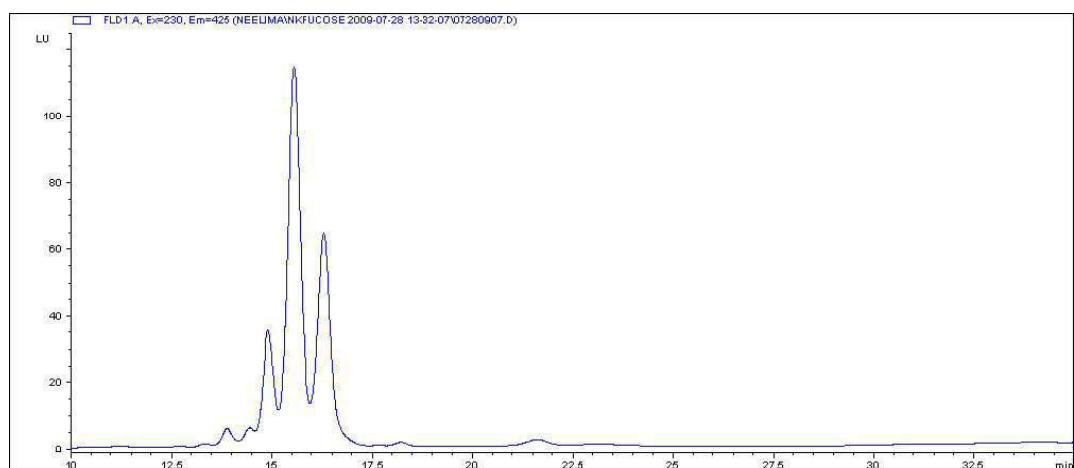
## 도면8



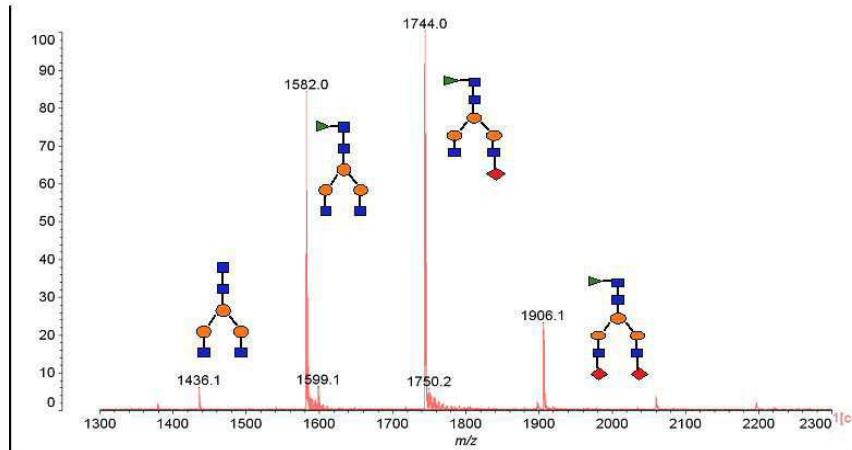
## 도면9



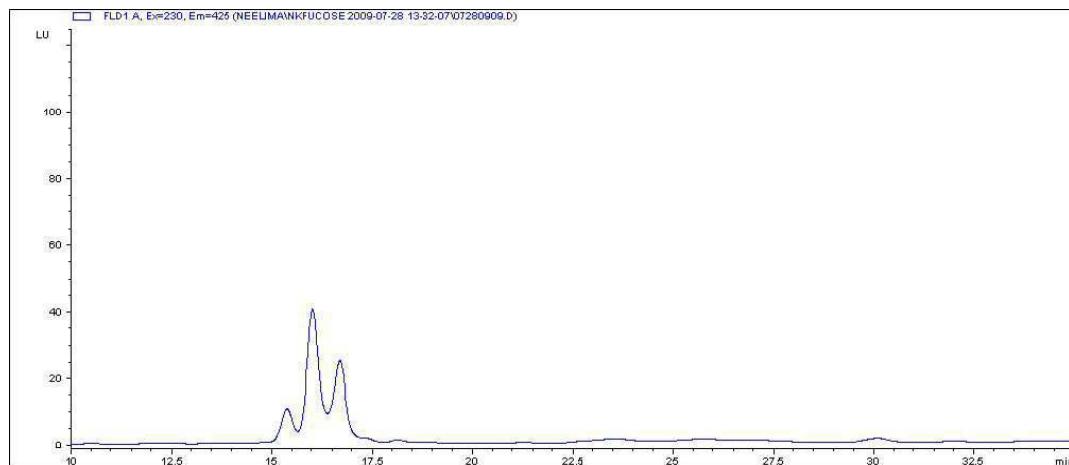
## 도면10



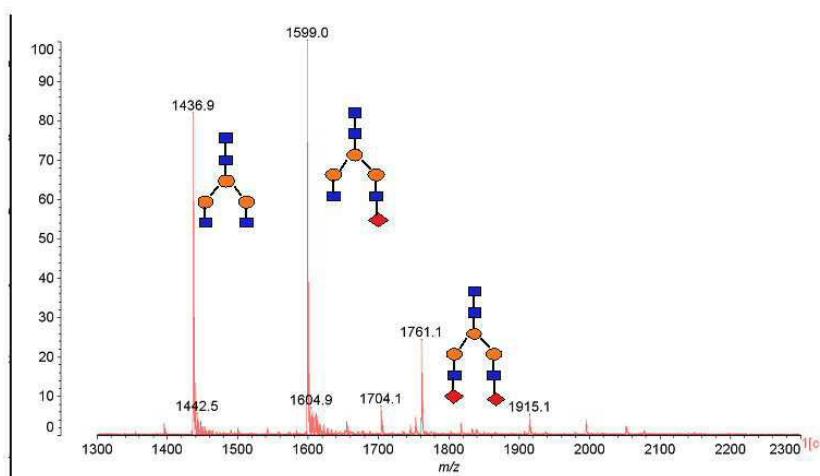
## 도면11



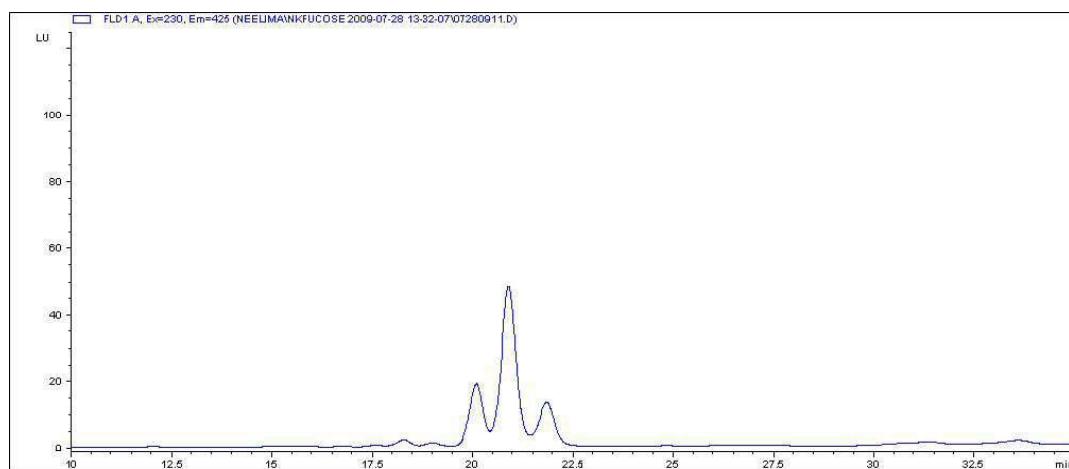
## 도면12



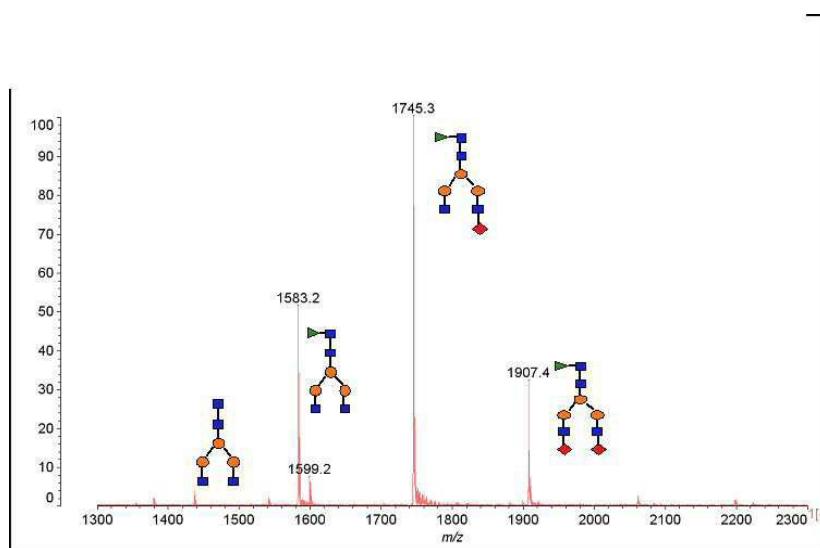
## 도면13



## 도면14



## 도면15



## 도면16

| 글리칸 형태 | 형체 %     |            |          |            | 글리칸 식 | 글리칸 구조   |  |  |
|--------|----------|------------|----------|------------|-------|--|--|--|
|        | Ab 3.1   |            | Ab 3.2   |            |       |  |  |  |
|        | 푸코오스 미첨가 | 10 mM 푸코오스 | 푸코오스 미첨가 | 10 mM 푸코오스 |       |  |  |  |
| 화성구조부  | G0       | 45.73      | 2.12     | 32.12      | 1.48  | $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$                         |  |  |
|        | G1       | 43.93      | 2.26     | 49.53      | 2.29  | $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2(\text{Gal})_1$           |  |  |
|        | G2       | 8.88       | 0.40     | 12.69      | 0.61  | $(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2(\text{Gal})_2$           |  |  |
| 화성구조부  | G0       | 0.43       | 30.2     | 1.45       | 17.48 | $\text{Fuc}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$               |  |  |
|        | G1       | 0.54       | 51.24    | 2.01       | 57.74 | $\text{Fuc}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2(\text{Gal})_1$ |  |  |
|        | G2       | 0.50       | 13.78    | 2.27       | 20.41 | $\text{Fuc}(\text{GlcNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2(\text{Gal})_2$ |  |  |

## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

&lt;120&gt; Fucosylation-Deficient Cells

&lt;130&gt; 0851-WO

&lt;140&gt; To be assigned

&lt;141&gt; Filed herewith

&lt;150&gt; 61/183,400

&lt;151&gt; 2009-06-02

&lt;150&gt; 61/348,858

&lt;151&gt; 2010-05-27

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 1

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly

20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu

35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr

50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile

65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn

85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys

100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu  
 115 120 125  
 Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser  
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln  
 145 150 155 160  
 His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro  
 165 170 175  
 His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile  
 180 185 190  
 His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp  
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala  
 210 215 220  
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala  
 245 250 255  
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275 280 285  
 Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290 295 300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Lys

<210> 2  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic

&lt;400&gt; 2

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Lys Val His Ile Asn Asp Asn |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala  
 245 250 255  
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260 265 270  
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275 280 285  
 Ser Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290 295 300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Lys

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;

&lt;213&gt; Macacca mulatta

&lt;400&gt; 3

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Val Gly Lys Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Leu Pro Gly Glu Asp Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu  
 35 40 45  
 Thr Asp Ala Ala Gln Thr Arg Ala Leu Phe Glu Lys Val Arg Pro Thr  
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn  
 85 90 95  
 Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Cys Lys Val Val Ser Cys

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 100   | 105 | 110 |
| Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
|   |     |     |
| Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
| Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| Tyr Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
|   |     |     |
| His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Ser Ala Leu Thr Val Trp     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Gln Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
|   |     |     |
| Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe His Gly Glu Val Thr Phe Asp |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Thr Ser Lys Ser Asp Gly Gln Phe Lys Lys Thr Ala Ser Asn Ser Lys |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asn Tyr Glu Gln Ala Arg     |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
|   |     |     |
| Lys   |     |     |
| <210> 4   |     |     |
| <211> 321   |     |     |

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Lys Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly

20 25 30

Leu Pro Gly Glu Asp Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu

35 40 45

Thr Asp Thr Ala Gln Thr Arg Ala Leu Phe Glu Lys Val Gln Pro Thr

50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile

65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Met Asn Asp Asn

85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Arg Lys Val Val Ser Cys

100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu

115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Asn Ser Asn Phe Gly Tyr Ser

130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln

145 150 155 160

Tyr Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro

165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile

180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp

195 200 205

Gly Thr Gly Asn Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala

210 215 220

Gln Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile

225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala

245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe His Gly Glu Val Thr Phe Asp

260 265 270

Thr Thr Lys Ser Asp Gly Gln Phe Lys Lys Thr Ala Ser Asn Ser Lys

275 280 285

Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala

290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asn Tyr Glu Gln Ala Arg

305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Glu Pro His Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly

20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu

35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr

50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile

65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn

85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Ala Arg Lys Val Val Ser Cys

100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu

115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser

130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln

145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro

165 170 175

Tyr Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile

180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ala Leu Thr Val Trp

195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala

210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Ser Glu Val Glu Pro Ile

225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala

245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Asn Gly Glu Val Thr Phe Asp

260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys

275 280 285

Leu Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala

290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Thr Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg

305 310 315 320

Lys

<210> 6

<211> 321

<212> PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 6

Met Gly Glu Pro His Gly Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly

20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu

35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr

50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile

65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn

85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys

100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Tyr Pro Ile Asp Glu

115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser

130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln

145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro

165 170 175

Tyr Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile

180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Ser Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp

195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala

210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Ser Gly Glu Val Thr Phe Asp |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Leu Arg Ser Tyr Leu Pro Asp Phe Cys Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Glu Asn Tyr Glu Gln Ala Arg |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Lys   |     |     |     |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <210> 7                   |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220>                     |    |
| <223> synthetic           |    |
| <400> 7                   |    |
| ctacaatctt ggtgccaga gc   | 22 |
| <210> 8                   |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> Artificial Sequence |    |
| <220>                     |    |
| <223> synthetic           |    |
| <400> 8                   |    |
| tccagttcag ttctgtgc g     | 21 |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <210> 9                   |  |
| <211> 23                  |  |
| <212> DNA                 |  |
| <213> Artificial Sequence |  |
| <220>                     |  |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <223> synthetic            |    |
| <400> 9                    |    |
| ttccctgaca agaccaccta tcc  | 23 |
| <210> 10                   |    |
| <211> 22                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> Artificial Sequence  |    |
| <220>                      |    |
| <223> synthetic            |    |
| <400> 10                   |    |
| tagtgtcggtgaaccaggc ac     | 22 |
| <210> 11                   |    |
| <211> 22                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> Artificial Sequence  |    |
| <220>                      |    |
| <223> synthetic            |    |
| <400> 11                   |    |
| gatgaggaca gcaggaacaa gc   | 22 |
| <210                       |    |
| > 12                       |    |
| <211> 23                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> Artificial Sequence  |    |
| <220>                      |    |
| <223> synthetic            |    |
| <400> 12                   |    |
| agcacttttc tcacccttt tgg   | 23 |
| <210> 13                   |    |
| <211> 24                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> Artificial Sequence  |    |
| <220>                      |    |
| <223> synthetic            |    |
| <400> 13                   |    |
| agccaagggt aagtaaggag gacg | 24 |

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 14

ttgttagacag cctccatcct cg 22