



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월14일  
(11) 등록번호 10-2793554  
(24) 등록일자 2025년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/00 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/00 (2013.01)  
C12N 15/85 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009379
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월01일  
심사청구일자 2021년11월01일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월03일
- (65) 공개번호 10-2018-0068967
- (43) 공개일자 2018년06월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/059922
- (87) 국제공개번호 WO 2017/079165  
국제공개일자 2017년05월11일
- (30) 우선권주장  
62/249,828 2015년11월02일 미국(US)  
62/338,280 2016년05월18일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020120029443 A

- (73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
미사기, 샤람  
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
로우, 존 비.  
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
스넬데코어, 브래들리 알.  
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
- (74) 대리인  
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 54 항

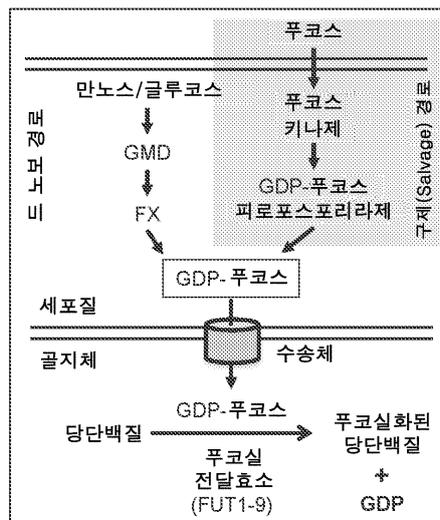
심사관 : 조원담

(54) 발명의 명칭 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 소정의 비율로 단백질의 푸코실화 형태 및 탈푸코실화 형태를 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12N 9/0006* (2013.01)

*C12N 9/88* (2013.01)

*C12P 21/005* (2013.01)

*C12Y 101/01271* (2013.01)

*C12Y 402/01047* (2013.01)

*C07K 2317/41* (2013.01)

*C07K 2317/52* (2013.01)

*C07K 2317/732* (2013.01)

*C12N 2510/02* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

소정 비율의 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태로 생성되는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이며,

- a) 배양 배지에서 상기 Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계이며,
  - 상기 숙주 세포는 GDP-케토-6-데옥시만노스-3,5-에피머라제,4-환원효소 (FX) 활성을 포함하지 않고,
  - 상기 숙주 세포는 모든 대립형질에서 FX 녹아웃을 갖는 FX 녹아웃 숙주 세포이고,

상기 배양 배지는, 상기 소정 비율의 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 Fc-함유 단백질을 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는 것인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 소정의 비율이 50:1 내지 1:50인 방법.

**청구항 3**

NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이며, 배양 배지에서 상기 Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계이며,

상기 숙주 세포는 FX 활성을 갖지 않고,

상기 숙주 세포는 모든 대립형질에서 FX 녹아웃을 갖는 FX 녹아웃 숙주 세포이고,

상기 배양 배지는 상기 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는 것인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 4**

청구항 3에 있어서, 상기 ADCC 작용이 ADCC 검정에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 5**

청구항 3에 있어서, 상기 ADCC 작용이 FC $\gamma$ RIII 결합 검정에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 6**

Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의해 생산되는 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이며,

- a) 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계이며,
  - 상기 숙주 세포는 FX 활성을 갖지 않고,
  - 상기 숙주 세포는 모든 대립형질에서 FX 녹아웃을 갖는 FX 녹아웃 숙주 세포이고,
  - 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는 것인 단계,
- b) 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계, 및
- c) 상기 Fc-함유 단백질이 소정의 수준의 푸코실화로 생산되도록 배양 배지에서 상기 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계

를 포함하는 방법.

**청구항 7**

청구항 6에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계가 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태를 측정하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 8**

청구항 6에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계가 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 형태를 측정하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 9**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하기 전에,

푸코스 공급원이 없는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계

를 포함하는 방법.

**청구항 10**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 배양 단계의 개시시점에서 배양 배지 내에 존재하는 것인 방법.

**청구항 11**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 배양 단계 동안 배양 배지에 첨가되는 것인 방법.

**청구항 12**

청구항 9에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 볼러스 첨가(bolus addition)를 통하여 배양 배지에 첨가되는 것인 방법.

**청구항 13**

청구항 9에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 연속식 공급(continuous feeding)을 통하여 배양 배지에 첨가되는 것인 방법.

**청구항 14**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 단계 동안 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양이 0.01 mM 내지 1 mM인 방법.

**청구항 15**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 단계가 37° C 미만에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 16**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 배지가 글루코스 공급원 또는 만노스 공급원을 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 배양물로부터 상기 Fc-함유 단백질을 분리시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 18**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 푸코스인 방법.

**청구항 19**

청구항 18에 있어서, 상기 푸코스가 L-푸코스인 방법.

**청구항 20**

청구항 18에 있어서, 상기 푸코스가 L-푸코스-1-포스페이트인 방법.

**청구항 21**

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 GDP-푸코스인 방법.

**청구항 22**

탈푸코실화 형태의 Fc-함유 단백질을 특성화하는 방법이며,

탈푸코실화된 Fc-함유 단백질의 생물학적 활성을 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태와 비교하는 단계이며,

상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 형태 및 푸코실화 형태가 상기 Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의해 생산되고,

상기 숙주 세포가 FX 활성을 갖지 않고,

상기 숙주 세포는 모든 대립형질에서 FX 녹아웃을 갖는 FX 녹아웃 숙주 세포인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 형태가, 푸코스 공급원이 없는 제1 세포 배양물 내에서 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 것인 방법.

**청구항 24**

청구항 22에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태가, 푸코스 공급원을 포함하는 제2 세포 배양물 내에서 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 것인 방법.

**청구항 25**

청구항 22에 있어서, 상기 생물학적 활성을 비교하는 단계가 시험관내에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 26**

청구항 25에 있어서,

상기 생물학적 활성이 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC) 작용이고,

상기 ADCC 작용이 ADCC 검정에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 27**

청구항 25에 있어서,

상기 생물학적 활성이 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC) 작용이고,

상기 ADCC 작용이 FC $\gamma$ R111 결합 검정에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 28**

청구항 22에 있어서, 상기 생물학적 활성을 비교하는 단계가 생체내에서 완료되는 것인 방법.

**청구항 29**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태가 글리칸 구조물 수준에서 측정되는 것인 방법.

**청구항 30**

청구항 29에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질로부터 글리칸 구조물을 절단하기 위해 PNGase F가 사용되는 것인 방법.

**청구항 31**

청구항 29에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태가 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE)에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 32**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태가 단백질 수준에서 측정되는 것인 방법.

**청구항 33**

청구항 32에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 형태가 질량 분광분석 (MS)에 의해 측정되는 것인 방법.

**청구항 34**

청구항 1 내지 8 및 청구항 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질이 항체 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 방법.

**청구항 35**

청구항 34에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질이 전장 항체인 방법.

**청구항 36**

청구항 35에 있어서, 상기 전장 항체가 단클론성 항체인 방법.

**청구항 37**

청구항 34에 있어서, 상기 Fc-함유 단백질이 Fc-함유 융합 단백질인 방법.

**청구항 38**

청구항 37에 있어서, 상기 Fc-함유 융합 단백질이 면역접합체인 방법.

**청구항 39**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵 세포인 방법.

**청구항 40**

청구항 39에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

**청구항 41**

청구항 40에 있어서, 상기 포유동물 세포가 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

**청구항 42**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가, 야생형 FX 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여 20% 이하의 FX 활성을 포함하는 것인 방법.

**청구항 43**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FX 유전자가 서열 결실에 의하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 44**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FX 유전자가 서열 부가 또는 치환에 의하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 45**

청구항 43에 있어서, 상기 FX 유전자가, 일정간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복부 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR) 시스템을 사용하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 46**

청구항 43에 있어서, 상기 FX 유전자가 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN) 시스템을 사용하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 47**

청구항 43에 있어서, 상기 FX 유전자가 아연-핑거 뉴클레아제 (ZFN) 시스템을 사용하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 48**

청구항 43에 있어서, 상기 FX 유전자가 메가뉴클레아제 시스템을 사용하여 비활성화되는 것인 방법.

**청구항 49**

청구항 23 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 푸코스인 방법.

**청구항 50**

청구항 49에 있어서, 상기 푸코스가 L-푸코스인 방법.

**청구항 51**

청구항 49에 있어서, 상기 푸코스가 L-푸코스-1-포스페이트인 방법.

**청구항 52**

청구항 23 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 푸코스 공급원이 GDP-푸코스인 방법.

**청구항 53**

청구항 1 내지 8 및 22 내지 28 중 어느 한 항의 방법 중 임의의 것에 의해 생산된 Fc-함유 단백질을 포함하는 조성물.

**청구항 54**

- a) FX 활성을 갖지 않는, Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포이며, 모든 대립형질에서 FX 녹아웃을 갖는 FX 녹아웃 숙주 세포, 및
- b) 0.01 mM 내지 1 mM의 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지를 포함하는 세포 배양물.

**청구항 55**

삭제

- 청구항 56
- 삭제
- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제

청구항 72

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2015년 11월 2일 월요일 출원된 미국 가출원 번호 62/249,828 및 2016년 5월 18일 수요일 출원된 미국 가출원 번호 62/338,280의 우선권을 주장하고, 이들 각 개시내용은 본원에서 그 전체가 참고로 편입된다.

[0003] **ASCII 텍스트 파일에 대한 서열목록 제출**

[0004] ASCII 텍스트 파일 상에서의 하기 제출된 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392035340SEQLIST.txt, 기록된 날짜: 2016년 10월 27일 목요일, 크기: 2 KB).

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 소정의 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0007] 당단백질은 선천성 및 후천성 면역계를 포함하는 모든 영역의 면역계의 적당한 기능에 필수적이다. 당단백질은 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)을 통한 인식, 결합, 신호전달 및 위협의 제거에 관여한다 (Rudd *et al.*, *Science*, 291, **2001**, 2370-2376; 및 Jefferis *et al.*, *Immunol Rev*, 163, **1998**, 59-76). 포유동물 발현된 항체는 이들의 중쇄 (HC)의 Asn<sup>297</sup> 잔기 상에 단일 글리칸을 함유한다. 글리칸 구조의 존재 및 조성은 항체의 수용체 결합 및 효과기 기능에 영향을 미친다 (Rudd *et al.*, *Science*, 291, **2001**, 2370-2376; 및 Jefferis *et al.*, *Immunol Rev*, 163, **1998**, 59-76). 예를 들어, IgG의 Fc 영역 (Fc $\gamma$ )의 글리칸 조성에서의 변화는 Fc 영역 및 Fc 결합 수용체 (Fc $\gamma$ R)의 결합 친화성에 차등적으로 영향을 준다. 3개 부류의 Fc $\gamma$ R, 즉, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, 및 Fc $\gamma$ RIII (문헌참조: Jefferis *et al.*, *Immunol Rev*, 163, **1998**, 59-76; Ravetch & Bolland, *Annu Rev Immunol*, 19, **2001**, 275-290)이 있다. 항체 및 Fc $\gamma$  수용체의 차등적 친화성은 특정 항원에 대한 숙주의 면역 반응의 운명을 지시하고 추가로 활성화, 억제, 항체 효능/반감기, 관용성 및 자가면역 반응에 관여할 수 있다 (Ravetch & Bolland, *Annu Rev Immunol*, 19, **2001**, 275-290). 상이한 유형의 수용체에 대한 항체의 친화성은 이것이 함유하는 글리칸의 존재 및 조성에 의존하여 변화할 수 있고 따라서 항체의 생물학적 기능에 대한 올리고당/단백질 상호작용의 중요성을 반영한다 (Raju *et al.*, *Glycobiology*, 10, **2000**, 477-486; Jefferis *et al.*, *Immunol Rev*, 163, **1998**, 59-76).

[0008] 치료학적 단백질 분야에서의 진전은 무혈청 배양물에서 재조합 단백질의 발현 (Wurm, *Nat Biotechnol*, 22, **2004**, 1393-1398) 및 항체-기반 치료제와 같은 증가하는 다수의 단백질-기반 치료제의 개발 (Carter, *Exp Cell Res*, 317, **2011**, 1261-1269)을 가능하게 한다.

[0009] 진핵세포, 예를 들어, 포유동물 숙주 세포에서 단백질의 발현 후, 단백질은 흔히 일반적으로 "글리코실화"로서 언급되는 당 잔기의 효소적 부가를 포함하는 해독 후 변형을 진행한다.

[0010] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. "N-연결됨"은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착하는 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴 (Asn) -X-세린 (Ser), 및 아스파라긴 (Asn) -X-트레오닌 (Thr) (여기에서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록실리신이 또한 O-연결된 글리코실화에 연루될 수 있지만, O-연결된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 당류 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 푸코스, N-아세틸글루코사민, 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭한다.

[0011] 포유동물에 의해 제조되는 단백질에 대한 글리코실화 패턴은 하기의 문헌에 상세히 기재되어 있다: *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Putnam, F.W., ed., 2nd edition, Vol. 4, Academic Press, New York, 1984, 특히 pp. 271-315. 상기 챕터에서, 아스파라긴-연결된 올리고당이 논의되고 글리코실화로 연결된 올리고당 뿐만 아니라 복합 고품량의 만노스 및 하이브리드 구조로서 언급되는 적어도 3개 그룹으로

세분됨을 포함한다.

- [0012] N-연결된 글리칸의 경우에, 올리고당의 환원-말단 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 잔기의 아노머 탄소 (C-1) 및 폴리펩티드의 아스파라긴 (Asn) 잔기의 질소를 연결하는 아마이드 결합이 있다. 동물 세포에서, O-연결된 글리칸은 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc), 갈락토스 (Gal), 푸코스, N-아세틸글루코사민, 또는 크실로스 및 여러 하이드록시아미노산 중 하나, 대부분 통상적으로 세린 (Ser) 또는 트레오닌 (Thr), 및 일부 경우에 하이드록시프롤린 또는 하이드록시라이신 간의 글리코시드 결합을 통해 부착된다.
- [0013] O-연결된 올리고당의 생합성 경로는 일련의 특이적 글리코실전달효소에 의한 뉴클레오티드 당으로부터 단일 당 잔기의 단계적 전달로 이루어진다. 단당류 공여체로서 기능하는 뉴클레오티드 당은 우리딘-디포스포-GalNAc (UDP-GalNAc), UDP-GlcNAc, UDP-Gal, 구아니딘-디포스포-푸코스 (GDP-Fuc), 및 시티딘-모노포스포-시알산 (CMP-SA)이다.
- [0014] N-연결된 올리고당 합성에서, N-연결된 올리고당 어셈블리의 개시는 단백질의 Asn 잔기 상에서 직접적으로 일어나지 않고 지질-연결된 전구체 올리고당의 프리어셈블리에 이어서 mRNA로부터의 해독 동안에 또는 이의 해독 바로 직후 단백질에 전달됨을 포함한다. 전구체 올리고당 (Glc<sub>3</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)은 다수의 막-결합된 글리코실전달효소의 도움으로 피로포스페이트 가교를 통해 폴리이소프레노이드 담체 지질인 돌리콜에 부착되면서 합성된다. 지질-연결된 전구체의 어셈블리가 완결된 후, 또 다른 막-결합된 효소는 이를 서열 -Asn-X-Ser/Thr-의 일부로서 존재하는 입체적으로 접근가능한 Asn 잔기로 전달한다.
- [0015] 새롭게 합성된 당단백질의 글리코실화된 Asn 잔기는 일시적으로 단지 한 유형의 올리고당, Glc<sub>3</sub>Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 로 전달된다. 올리고당 구조물의 프로세싱은 성숙한 당단백질 상에서 발견되는 매우 다양한 구조물을 생성한다.
- [0016] N-연결된 올리고당의 프로세싱은 다수의 막-결합된 효소의 연속 작용에 의해 성취되고 3개 글루코스 잔기의 제거, 다양한 수의 만노스 잔기의 제거 및 다양한 당 잔기의 수득한 정리된 코어로의 부가를 포함한다.
- [0017] 작용 방식 및 효과기 기능의 필요성에 따라, 표적화된 단백질 또는 글리칸 변형은 치료학적 항체의 임상 잠재력을 증진시키기 위해 사용된다 (Carter, *Exp Cell Res*, 317, **2011**, 1261-1269). 이들 변형 중 하나는 이들의 키토비오스 코어 (N-연결된) 글리칸 상에 푸코스 분자를 갖지 않는 (탈푸코실화된) 재조합 항체의 발현을 포함하고, 이는 일반적으로 말초 혈액 단핵구 및 자연 살해 세포 상에서 발현되는 FcγRIII에 대해 보다 강한 친화성으로 인해 ADCC를 증가시킨다 (Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 277, **2002**, 26733-26740). 항체 푸코실화 및 ADCC 수준에서의 감소 간의 상호관계는 또한 여러 그룹에 의해 연구되고 보고되었다 (Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 277, **2002**, 26733-26740; Kanda *et al.*, *J Biotechnol*, 130, **2007**, 300-310; 및 Yamane-Ohunuki *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 87, **2004**, 614-622).
- [0018] 글리칸의 푸코실화는 드-노보 또는 구제 (salvage) 경로를 통한 GDP-푸코스의 합성을 필요로 한다. 상기 푸코실화 공정은 푸코스 분자를 글리칸의 환원 말단의 제1 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 모이어티로 추가시키는 여러 효소의 연속 기능을 포함한다 (Becker & Lowe, *Glycobiology*, 13, **2003**, 41R-53R). 로웨 및 후쿠다 연구소는 만노스 및/또는 글루코스로부터 GDP-푸코스의 생성에 관여하는 드 노보 경로의 2개의 주요 효소를 발견하였다. 구체적으로, 상기 연구소는 GDP-D-만노스-4,6-테하이드라타제 (GMD) 및 GDP-케토-6-테옥시만노스-3,5-에피머라제, 4-환원효소 (FX)를 발견하였다 (Ohyama *et al.*, *J Biol Chem*, 273, **1998**, 14582-14587; Smith *et al.*, *J Cell Biol*, 158, **2002**, 801-815; 및 Becker, *Genetic and Biochemical Determination of Fucosylated Glycan Expression*, **2002**, Thesis from The University of Michigan, UMI3121891). 푸코스의 부재에서, GMD 및 FX는 만노스 및/또는 글루코스를 GDP-푸코스로 전환시킨다. 이어서, GDP-푸코스는 골지체로 수송되고, 여기서, 9개의 푸코실-전달효소 (FUT1-9)는 협력하여 글리칸의 제1 GlcNAc 분자를 푸코실화하는 작용을 한다 (Becker & Lowe, *Glycobiology*, 13, **2003**, 41R-53R). 그러나, 푸코스의 존재하에, 푸코스-키나제 및 GDP-푸코스 피로포스리라제는 푸코스를 GDP-푸코스로 전환시킬 수 있고, GMD 및 FX 효소에 의한 GDP-푸코스의 드 노보 합성을 위한 필요성을 우회한다 (Becker & Lowe, *Glycobiology*, 13, **2003**, 41R-53R).
- [0019] FX 녹아웃 (KO) 이외의 다른 많은 전략을 사용하여 ADCC 효과기 기능을 증진시키기 위해 CHO 세포주에 의해 발현되는 % 탈푸코실화된 항체 중을 증가시켰지만, 이들의 사용은 특정 차질을 수반한다. 예를 들어, β(1,4)-N-아세틸글루코사민일전달효소 III (GNTIII)의 과발현은 증가하는 수준의 양분된 GlcNAc (제3 GlcNAc의 글리칸의 첫번째 만노스로의 부착) 중간체 중을 통해 푸코실화된 항체의 수준을 감소시키는 것으로 나타났다 (Umana *et al.*, *Nat Biotechnol*, 17, **1999**, 176-180; Davies *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 74, **2001**, 288-294). 그러나, 이들 글리칸 중은 통상적으로 항체 상에 존재하지 않고 이들을 일정하고 재생가능한 수준으로 유지하는 것

은 도전적 과제일 수 있고 제조 세팅에서 제품의 품질 및 일관성을 위험에 처하게 할 수 있다. 추가로, 사일런싱 또는 DNA 사본수 감소로 인한 시간 경과에 따른 재조합 GNTIII의 발현 수준에서의 감소는 제조 목적을 위해 탈푸코실화된 항체의 재생가능한 수준을 재생가능하게 발현하기 어렵게 한다. 또한, 원핵세포 GDP-6-데옥시-D-리코-4-헥실로스 환원효소 (RMD) 효소 (von Horsten *et al.*, *Glycobiology*, 20, 2010, 1607-1618)의 과발현, 또는 % 탈푸코실화된 항체 중을 증가시키기 위해 과발현을 사용하는 임의의 방법은 상기 차질을 받을 수 있다. 녹다운 전략 (Imai-Nishiya *et al.*, *BMC Biotechnol*, 7, 2007, \*1-13), 또는 푸코실화 경로의 시판되는 억제제를 사용하는 것은 생성물 이질성을 유도할 수 있는, 억제제의 안정성 또는 오프-표적 활성을 녹다운시키기 때문에 도전적 과제이다. 제조 세팅에서 푸코실화의 화학적 억제제를 사용하는 것과 관련된 비용을 언급할 필요도 없다. 발현 또는 정제 후 항체 생성물의 푸코시다제 (Intra *et al.*, *Gene*, 392, 2007, 34-46)로의 처리는 또한 비효율적이어서 생성물 품질의 일관성 부재 및 이들 효소의 제거를 위해 요구되는 추가의 단계(들)로 인한 복잡한 제조 공정을 유도한다.

[0020] 탈푸코실화된 항체의 발현을 위한 GMD KO 숙주의 사용이 제한되었지만 (Kanda *et al.*, *J Biotechnol*, 130, 2007, 300-310), 상기 숙주는 광범위하게 사용되지 않았고 상기 숙주의 보고된 특이적 생산성은 매우 높지 않다 (Kanda *et al.*, *J Biotechnol*, 130, 2007, 300-310).

[0021] 한편, FUT8 KO 숙주는 제조 목적을 위해 적합한 탈푸코실화된 항체를 발현할 수 있는 클론을 생성하기 위해 광범위하게 사용되었다 (Yamane-Ohunuki *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 87, 2004, 614-622; 및 Malphettes *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 106, 2010, 774-783). 그럼에도 불구하고, FUT8 KO 숙주를 사용하는 것은 이의 단점 및 난제가 없는 것은 아니다. 일반적으로, 생체내 및 시험관내 항체 기능의 분석은 탈푸코실화된 것 대 야생형 (푸코실화된) 항체의 필요성 및 효능을 측정하기 위해 요구된다. FUT8 KO 숙주는 단지 탈푸코실화된 항체를 발현할 수 있기 때문에, 병행된 세포주 개발 (CLD) 노력이 비교 목적을 위해 야생형 항체를 발현하기 위해 착수될 필요가 있고 이는 요구되는 CLD 노력을 배가시킨다. 추가로, 다수의 탈푸코실화되고 야생형 항체 발현 클론은 임의의 관찰된 이점이 단지 푸코실화 부재로 인한 것임을 보장하기 위해 상응하는 생성물 품질 성질을 갖는 클론을 수득하기 위해 스크리닝할 필요가 있다. 추가로, FUT8 KO 숙주는 성장 문제를 갖는 것으로 관찰되었고 보다 긴 현탁 적응 시간을 요구할 수 있어 CLD 타임라인을 증가시켜 이는 보다 낮은 역가에 대한 관련성을 갖는다 (Malphettes *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 106, 2010, 774-783).

[0022] 따라서, 당업계에서는 목적하는 비율로 탈푸코실화 및 푸코실화 형태의 단백질을 생산할 수 있는 세포주, 및 상기 세포주를 배양하는 방법, 및 이의 단백질을 포함하는 조성물에 대한 필요성이 존재한다.

[0023] 본원에서 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 공개된 특허 출원의 개시는 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다.

**발명의 내용**

[0024] 본 출원은, 일부 구현예에서, 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 단백질은 소정의 비율로의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 배양 배지 내 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 GDP-케토-6-데옥시만노스-3,5-에피머라제,4-환원효소 (FX) 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GDP-D-만노스-4,6-데하이드라타제 (GMD) 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계. 일부 구현예에서, 소정의 비율은 약 50:1 내지 약 1:50이다 (예를 들어, 약 50:5.5, 약 50:12.5, 약 50:21.5, 약 50:33.5, 약 50:50, 약 50:75, 약 50:116.5, 약 50:200, 또는 약 50:450을 포함한다).

[0025] 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 배양 배지 내 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 FC $\gamma$ RIII 결합 검정에 의하여 측정된다.

[0026] 일부 구현예에서, 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 단백질의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원

을 포함하는, 상기 배양 단계; 단백질의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 단백질이 푸코실화의 소정의 수준에서 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 것은 푸코실화 형태의 단백질을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 것은 탈푸코실화 형태의 단백질을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원의 양을 조정하는 것은 푸코실화 수준이 낮은 경우 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원의 양을 조정하는 것은 푸코실화 수준이 높은 경우 푸코스 공급원의 양을 감소시키는 것을 포함한다.

- [0027] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하기 전에 푸코스 공급원이 없는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 푸코스 공급원은 상기 배양 단계의 개시시점에서 상기 배양 배지에 존재한다. 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 푸코스 공급원은 상기 배양 단계 동안 상기 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 볼러스 첨가를 통하여 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 연속 공급을 통하여 배양 배지에 첨가된다.
- [0028] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 배양 단계 동안 상기 배양 배지 내 상기 푸코스 공급원의 양은 약 0.01 mM 내지 약 1 mM이다.
- [0029] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 배양 단계는 약 37°C 미만으로 수행된다.
- [0030] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 배양 배지는 글루코스 공급원 또는 만노스 공급원을 추가로 포함한다.
- [0031] 상기 임의의 구현예에 따른 일부 구현예에서 (또는 여기에 적용되는 바와 같이), 상기 방법은 추가로 세포 배양 물로부터 단백질을 분리시키는 단계를 포함한다.
- [0032] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.
- [0033] 일부 구현예에서, 탈푸코실화 형태의 단백질을 특성화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기를 포함한다: 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 형태는 푸코스 공급원이 없는 제1 세포 배양물 내 숙주 세포에 의하여 생산된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 푸코스 공급원을 포함하는 제2 세포 배양물 내 숙주 세포에 의하여 생산된다.
- [0034] 일부 구현예에서, 탈푸코실화 형태의 단백질을 특성화하는 방법은 시험관내 생물학적 활성을 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 탈푸코실화 형태의 단백질을 특성화하는 방법은 생체내 생물학적 활성을 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 FCγRIII 결합 검정에 의하여 측정된다.
- [0035] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 글리칸 구조물 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, PNGase F는 단백질로부터 글리칸 구조물을 절단하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 글리칸 구조물 수준에서 측정되며, 상기 단백질의 푸코실화 형태는 모세관 전기영동 (CE)에 의하여 측정된다.
- [0036] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 단백질 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 단백질 수준에서 측정되며, 상기 단백질의 푸코실화 형태는 질량 분광분석 (MS)에 의하여 측정된다.
- [0037] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 단백질은 Fc-함유 단백

질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 항체 중쇄 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 전장 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 단클론성 항체이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 Fc-함유 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질은 면역접합체이다.

- [0038] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 숙주 세포는 진핵세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 포유동물 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.
- [0039] 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 또는 GMD 유전자 각각을 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, 20% 이하의 FX 또는 GMD 활성을 포함한다.
- [0040] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자는 비활성화된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 siRNA에 의해 비활성화된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 shRNA에 의해 비활성화된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자가 서열 결실에 의하여 비활성화된 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자가 서열 첨가 또는 치환에 의하여 비활성화된 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 일정간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복부 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats; CRISPR) 시스템을 사용하여 비활성화시킨다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (transcription activator-like effector nuclease: TALEN)를 사용하여 비활성화시킨다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 아연-핑거 뉴클레아제 (zinc-finger nuclease; ZFN) 시스템을 사용하여 비활성화시킨다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 메가뉴클레아제 (meganuclease) 시스템을 사용하여 비활성화시킨다.
- [0041] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다.
- [0042] 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따르는 (또는 그에 적용된 바와 같은) 일부 구현예 있어서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.
- [0043] 또한, 본원에는 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 제조된 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0044] 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의해 매개되는 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 포함하는 조성물이 제공되고, 여기서, 상기 조성물은 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태를 포함한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 조성물은 글리칸 구조물의 환원 말단에서 푸코스를 포함하는 푸코실화 형태의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 세포 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 조성물은 세포 용해물이다. 일부 구현예에서, 조성물은 단백질 정제 칼럼으로부터의 용리액이다.
- [0046] 또한 하기를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공된다: 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM 에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지.
- [0047] 또한, 본원에는 다음을 포함하는 이를 필요로 하는 개체에서 질환을 치료하는 방법이 제공된다: 본원에 기재된 약제학적 조성물을 개체에게 투여함을 포함하는 단계. 일부 구현예에서, 조성물은 비경구 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 정맥내 또는 피하 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 국소적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 국소로 투여된다.
- [0048] 본 발명의 이들 및 다른 양상 및 이점은 이의 후속적 상세한 설명 및 첨부된 청구항로부터 자명해질 것이다. 본원에 기재된 다양한 구현예의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합될 수 있어 본 발명의 다른 구현예를 형성할 수 있음을 이해해야 한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0049] **도 1**은 GDP-푸코스를 생성하기 위한 드 노보 및 구제 경로를 포함하는 푸코실화 경로의 개요를 도시한다. GDP-케토-6-데옥시만노스-3,5-에피머라제, 4-환원효소 (FX) 및 GDP-D-만노스-4,6-데하이드라타제 (GMD)은 드 노보 경

로의 구성원이다.

**도 2a-2b**는 FX를 비활성화시키기 위한 작업흐름도 및 비활성화된 FX 유전자를 갖는 세포의PCR 분석을 도시한다. **도 2a**는 FX를 비활성화시키기 위한 작업흐름도를 도시한다. **도 2b**는 결실된 FX 대립형질의 검출을 위한 풀-3, 풀-9, 및 대조군의 PCR 분석을 도시한다. 야생형 (WT; 내부) 및 녹아웃 (KO; 외부) 프라이머는 별도의 반응에 사용되었다. 단지 gRNA (Cas9 부재)로 형질감염된 CHO-K1 세포는 대조군으로서 사용하였다.

**도 3**은 염색되지 않은 CHO-K1 세포 (염색되지 않은), FX 불화성화를 갖는 LCA-FITC 염색된 CHO-K1 세포(CHO-K1 FXKO-풀-3), 및 LCA-FITC 염색된 야생형 CHO-K1 세포 (WT CHO-K1 숙주)의 FACS 분석을 도시한다.

**도 4a-4b**는 풀-3으로부터 수득된 단일 세포 클론의 FX 유전자 및 단백질 분석을 도시한다. **도 4a**는 야생형 (WT) 및 녹아웃 (KO) 프라이머를 사용한 FX 유전자의 PCR 분석을 도시한다. **도 4b**는 FX 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. FX 블롯 패널에서, 별표 (\*)로 표시된 보다 낮은 대역은 모든 샘플에 존재하는 비-특이적 대역임을 주지한다. 액틴 블롯은 로딩 대조군으로서 사용한다.

**도 5a-5f**는 풀-3으로부터 수득된 단일 세포 클론의 FACS 분석을 도시한다. 각 FACS 분석은 하기를 도시한다: 비지속형 CHO-K1 세포 (비지속형), 푸코스 (FXKO + 푸코스)를 포함하는 배지 내 성장한 FX 비활성화를 갖는 LCA-FITC 염색된 CHO-K1 세포, 푸코스 (FXKO) 없는 배지 내 성장한 FX 비활성화를 갖는 LCA-FITC 염색된 CHO-K1 세포, 및 LCA-FITC 염색된 야생형 CHO-K1 세포 (WT CHO-K1). **도 5a**는 클론 3 의 FACS 분석을 도시한다. **도 5b**는 클론 5 의 FACS 분석을 도시한다. **도 5c**는 클론 6 의 FACS 분석을 도시한다. **도 5d**는 클론 7 의 FACS 분석을 도시한다. **도 5e**는 클론 9 의 FACS 분석을 도시한다. **도 5f**는 클론 11 의 FACS 분석을 도시한다.

**도 6a-6c**는 FXKO 세포주를 사용한 항체를 제조하는 방법 및 상기 FXKO 세포주에 의해 생성된 글리칸 구조물의 분석을 도시한다. **도 6a**는 배지에 푸코스의 존재 또는 부재하에 FXKO 숙주 3-5, 3-7, 및 3-11의 풀 (pool)로부터 항체-A를 발현하기 위한 형질감염 및 풀 선택의 도식을 도시한다. CHO-K1 숙주는 대조군으로서 사용하였다.

**도 6b**는 모세관 전기영동에 적용된, FXKO 클론 3-11에 의해 발현된 항체-A의 대표적인 전기영동도 프로파일을 도시한다. **도 6c**는 푸코스의 존재 또는 부재하에 상이한 풀로부터 모세관 전기영동에 의해 검출된 글리칸 종을 도시한다. 푸코실화의 부재는 "-F"로 나타낸다. 보다 낮은 수준의 글리칸 종은 나타내지 않는다. G0 = 푸코실화 키토비오스 코어 글리칸, G1 = GlcNac 분지 중 하나 상의 1개 갈락토스, G-1 = 일 분지된 GlcNac가 결합된 키토비오스 코어 글리칸, G1' = G1의 위치 이성질체, G1-1 = 잔여 분지된 GlcNac 상에서 1개 갈락토스를 갖는, 일 분지된 GlcNac가 결합된 키토비오스 코어 글리칸, G2 = 2개 갈락토스, 분지된 GlcNac 상에 각 1개, Man5 = GlcNac-GlcNac-5x(만노스), G0-1 = 일 분지된 GlcNac가 결합된 키토비오스 코어 글리칸, G0-1-F = 일 분지된 GlcNac가 결합된 탈푸코실화 키토비오스 코어 글리칸, G0-F = 탈푸코실화 키토비오스 코어 글리칸, G1-F = GlcNac 분지 중 하나 상에 1개 갈락토스를 갖는, 탈푸코실화 키토비오스 코어 글리칸, G1'-F = G1-F의 위치 이성질체, G2-F = 2개 갈락토스를, 분지된 GlcNac 상에 각 1개씩 갖는, 탈푸코실화 키토비오스 코어 글리칸.

**도 7a-7f**는 표준 CLD 공정 후 FXKO3-11 숙주의 24개 클론에 의해 생성된 항체의 분석을 도시한다. **도 7a**는 항체의 역가 (g/L)를 도시한다. **도 7b**는 클론의 비생산성 (pg/세포-일)을 도시한다. **도 7c**는 클론의 성장을 도시한다. **도 7d**는 클론에 의해 생성된 G0-F (탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸)인 글리칸 구조물의 %를 도시한다. **도 7e**는 클론에 의해 생성된 G1-F (GlcNac 분지 중 하나 상에 1개 갈락토스를 갖는, 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸)인 글리칸 구조물의 백분율을 도시한다. **도 7f**는 클론에 의해 생성된 G0-1-F (일 분지형 GlcNac이 결합된 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸)인 글리칸 구조물의 백분율을 도시한다.

**도 8a-8f**는 푸코스의 부재하에서, 또는 1mM 푸코스의 존재 하에서 배양된 FXKO 클론에 의하여 생산된 항체-A 및 항체-B의 야생형 및 탈푸코실화 형태의 분석을 도시한다. **도 8a**는, CHO-K1 숙주 대조군과 비교하여, 푸코스의 부재 하에서, 또는 1mM 푸코스의 존재 하에서 배양된 FXKO 클론에 의하여 생산된 정제된 항체-A의 전하 변이체의 백분율을 도시한다. **도 8b**는, CHO-K1 숙주 대조군과 비교하여, 푸코스의 부재 하에서, 또는 1mM 푸코스의 존재 하에서 배양된 FXKO 클론에 의하여 생산된 정제된 항체-A의 응집물의 백분율을 도시한다. **도 8c**는 푸코스의 부재 또는 1 mM 푸코스의 존재하에 배양된 FXKO 클론에 의해 생성된 항체-B의 역가 (g/L)를 도시한다. **도 8d**는 푸코스의 부재 또는 1 mM 푸코스의 존재하에 배양된 FXKO 클론에 의해 생성된 항체-B의 주요 글리코형의 백분율을 도시한다. G0 = 푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸, G1 = GlcNac 측쇄의 하나 상에 1개의 갈락토스, Man5 = GlcNac-GlcNac-5x(만노스), G0-F = 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸, G1-F = GlcNac 측쇄 중 하나 상에 1개의 갈락토스를 갖는 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸. **도 8e**는 푸코스의 부재 또는 1 mM 푸코스의 존재 하에 배양된 FXKO 클론에 의해 생성된 정제된 항체-B의 전하 변이체의 백분율을 도시한다. **도 8f**는 푸코스의 부재 또는 1 mM 푸코스의 존재하에 배양된 FXKO 클론에 의해 생성된 정제된 항체-B의 응집물의 백분율을

도시한다.

**도 9a-9e**는 푸코스 농도의 범위에서 배양된 FFXO 클론에 의해 생성된 항체-B의 분석을 도시한다. **도 9a**는 푸코스 농도의 범위 (0-1 mM)에서 배양된 FFXO 클론-1에 의해 생성된 항체-B의 주요 글리코형의 %를 도시한다. **도 9a**는 푸코스 농도의 범위 (0-1 mM)에서 배양된 FFXO 클론-2에 의해 생성된 항체-B의 주요 글리코형의 %를 도시한다. G0 = 푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸, G1 = GlcNAc 측쇄의 하나 상에 1개의 갈락토스, Man5 = GlcNAc-GlcNAc-5x(만노스), G0-F = 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸, G1-F = GlcNAc 측쇄 중 하나 상에 1개의 갈락토스를 갖는 탈푸코실화된 키토비오스 코어 글리칸. **도 9c**는 푸코스 농도 (0-1mM)의 범위에서 배양된 FFXO 클론-1 및 -2에 의하여 생산된 항체-B의 역가(g/L)를 도시한다. **도 9d**는 푸코스 농도 (0-1mM)의 범위에서 배양된 FFXO 클론-1 및 -2에 의하여 생산된 항체-B의 응집물의 백분율을 도시한다. **도 9e**는 푸코스 농도 (0-1mM)의 범위에서 배양된 FFXO 클론-1 및 -2에 의하여 생산된 항체-B의 전하 변이체의 백분율을 도시한다.

**도 10a-10g**는 푸코스 농도의 범위에서 배양된 FFXO 클론에 의해 생성된 항체의 분석을 도시한다. **도 10a**는 지정된 농도의 푸코스를 갖는 생산 배지에서 배양된 FFXO 클론에 의해 생성된 항체-B (IgG 1)의 탈푸코실화된 글리코형 대 푸코실화된 글리코형의 비율을 도시한다. **도 10b**는 10 µg/ml의 비-포화 농도에서 정제된 항체-B 항체의 FcγRIII 결합 검정으로부터의 결과를 도시한다. **도 10c**는 지정된 농도의 푸코스를 갖는 생산 배지에서 배양된 FFXO 클론에 의해 생성된 항체-C (IgG 1)의 탈푸코실화된 글리칸 중 대 푸코실화된 글리칸 종의 비율을 도시한다. **도 10d**는 상이한 푸코스-공급 배양으로부터 정제된 항체-C 항체의 NK-세포 기반 ADCC 검정으로부터의 %ADCC 활성 결과를 도시한다. **도 10e**는 탈푸코실화된 글리칸의 % 합계 및 0 및 1 mM 푸코스 공급물을 갖는 배양물로부터 제조된 항체 혼합물의 상대적 ADCC 활성을 도시한다. **도 10f**는 탈푸코실화된 글리칸 종의 % 합계에 대해 상대적인 %ADCC 활성을 도시한다. **도 10g**는 상이한 비율의 푸코실화된 글리칸과 탈푸코실화된 글리칸을 갖는 항체-C 샘플에 대한 ADCC 용량 반응 곡선을 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0050] 본원은 GDP-케토-6-테옥시만노스-3,5-에피머라제, 4-환원효소 녹아웃 (FXKO) 세포가 다양한 양의 푸코스를 포함하는 배양 배지에서 배양되는 경우 항체의 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태 둘 다를 생성할 수 있다는 원리를 활용한다. 생성 배지에서 푸코스의 적정은 항체 역가 또는 생성물 품질에 대한 임의의 변화 없이, 푸코실화된 글리칸 형태와 탈푸코실화된 글리칸 형태의 목적하는 비율을 갖는 항체의 생성을 가능하게 하는 것으로 밝혀졌다. FFXO 숙주 세포의 클론은 상대적으로 높은 비생산성 및 양호한 성장 프로파일로 표적 항체를 발현시켰다.
- [0051] 본원은 따라서 동일한 FFXO 숙주 세포로부터 푸코실화된 단백질과 탈푸코실화된 단백질을 제조하기 위한 방법을 제공한다. 이는, 이것이 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 생산을 유사한 제품 품질로 허용한다는 점에서 이점을 갖는다. 이어서, 푸코실화된 단백질 및 탈푸코실화된 단백질과 유사한 생성물 품질의 비교는 탈푸코실화된 단백질 상에 푸코스의 존재 또는 부재가 실제로 생물학적 기능 (예를 들어, 증진된 ADCC 작용)에서 관찰된 변화에 관여하는지의 예측을 가능하게 한다. FUT8이 단백질의 야생형 또는 탈푸코실화 형태를 생성할 수 있는 숙주 세포를 녹아웃시키는 것과 대조적으로, FFXO 숙주는 2개의 별도의 세포주 개발 (CLD) 노력을 착수할 필요성을 제거한다. 추가로, 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태 둘 다의 단백질을 제조하기 위한 단일 숙주 세포의 사용은 비교가능한 생성물 품질을 갖는 클론을 능히 동정하는 많은 콜로니를 스크리닝할 필요성을 방지한다.
- [0052] 추가로, FFXO 클론은 푸코실화된 글리코형과 탈푸코실화된 글리코형의 치료학적 관련 비율을 갖는 임의의 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 탈푸코실화된 항체가 단핵 세포 (예를 들어, NK 세포)를 통해 ADCC-매개된 세포사를 증진시키지만 다형핵 (PMN) 세포는 푸코실화된 글리칸을 항체로의 결합을 통해 이들의 표적을 우선적으로 인식하고 사멸시키는 것으로 보고되었다 (Peipp *et al.*, *Blood*, 112, 2008, 2390-2399). 따라서, FFXO 숙주 세포의 사용 및 올바른 양의 푸코스를 배양 배지로의 적정이 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 항체의 목적하는 비율을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 이는 원칙적으로 단핵 및 PMN 세포 둘 다에 의해 ADCC-매개된 세포사를 증진시키는데 효율적이어야만 한다. 추가로, 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질의 비율을 조정하는 능력은 임의의 가능한 ADCC-연결된 독성을 최소화하면서 최대 수준의 ADCC 작용을 갖는 단백질의 생성을 가능하게 한다.
- [0053] 따라서, 본 출원은, 일 양태에서, 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 상기 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 본 출원은, 또 다른 양태에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이

없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 본 출원은, 또 다른 양태에서, 단백질 푸코실화의 수준을 조정하는 방법을 제공하며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계, 단백질의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계, 및 단백질이 푸코실화의 소정의 수준에서 생산되도록 배양 배지에서 푸코스의 양을 조정하는 단계를 포함한다. 본 출원은, 또 다른 양태에서, 탈푸코실화 형태의 단백질을 특성화하는 방법을 제공하며, 이는 하기를 포함한다: 단백질의 푸코실화 (fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 본원은 또 다른 양상에서 상기된 임의의 방법에 의해 제조된 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 본원은 또 다른 양상에서 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하는, 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 출원은, 또 다른 양태에서, 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 그리고 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 갖는 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다.

- [0054] **정의**
- [0055] 본원에 사용된 바와 같은 푸코실화 형태의 단백질은 푸코스 모이어티를 갖는 글리칸 구조물을 지칭한다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같은 탈푸코실화 형태의 단백질은 푸코스 모이어티가 없는 글리칸 구조물을 언급한다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같은 "Fc-함유 단백질"은 Fc 도메인을 포함하는 단백질(예를 들어, 항체 또는 Fc-함유 융합 단백질)을 언급한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 하나 이상의 단백질 하부단위를 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 하나 이상의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같은 "Fc 도메인"은 면역글로불린 중쇄 또는 이의 C-말단 단편의 Fc 영역을 언급한다. 용어는 야생형 Fc 도메인 및 변이체 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 도메인은 Cys226으로부터, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실-말단까지 연장한다 (아미노산 번호는 하기에 기재된 바와 같이 EU 지수로도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다): Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). 일부 구현예에서, 용어는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 단편 및 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG의 경우, Fc 도메인은 면역글로불린 도메인 CH2 및 CH3과, CH1 및 CH2 사이의 힌지를 포함할 수 있다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같은 "Fc-함유 융합 단백질"은 적어도 하나의 다른 이종성 단백질 단위체 또는 폴리펩티드에 융합된 Fc 도메인을 포함하는 단백질을 언급한다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "중쇄"는 면역글로불린 중쇄를 언급한다.
- [0061] 항체는 Fc 영역에 글리코실화를 갖는 당단백질이다. 따라서, 예를 들어, IgG 면역글로불린의 Fc 영역은 쇠간 디설파이드-결합된 힌지 영역, 아스파라긴 297 (Asn-297)에서 글리코실화된 CH2 도메인 함유 N-연결된 올리고당, 및 비-공유 쌍의 CH3 도메인을 포함하는 동중이량체이다. 글리코실화는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, 및 C1q에 의하여 매개된 효과기 기전에서 중요한 역할을 수행한다. 따라서, 본 발명의 항체 단편은 글리코실화된 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함해야 한다.
- [0062] 본 명세서에서 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 단클론성 항체, 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예: 이중특이적 항체), 및 그들이 Fc 도메인을 포함하는 한 항체 단편을 포함하는, 다양한 항체 구조를 포함한다.
- [0063] 용어 "전장 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타내기 위해 본원에서 사용된다.
- [0064] "천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 천연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들면, 천연 IgG 항체는 디설파이드 결합된 두 개의 동일한 경쇄 및 두 개의 동일한 중쇄로 이루어진, 약 150,000 달톤의 이질사량체성 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역(VH)에 이어 세 개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역(VL)에 이어 불변(CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는, 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ )라고 불리는 두 가지 타입 중의 하나에 할당될 수 있다.

- [0065] 항체의 “부류”는 이의 중쇄가 소유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5개 주요 부류의 항체가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있으며, 이들 중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들면 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, 및 IgA<sub>2</sub> 로 추가 구분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 및  $\mu$ 로 불린다.
- [0066] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 공급원 또는 종들로부터 유도되며, 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 공급원 또는 종들로부터 유도된 항체를 지칭한다.
- [0067] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원과 결합하는 무손상 항체의 일부분을 포함하는 무손상 항체가 아닌 분자를 가리킨다. 항체 단편들의 예시들은 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab' -SH, F(ab')<sub>2</sub>; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예컨대, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다가특이적 항체를 포함한다.
- [0068] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 기타의 인간 항체-암호화 서열을 사용하는 비-인간 공급원으로부터 유도되는 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특이적으로 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다.
- [0069] “인간화된” 항체는 비-인간 초가변 영역 (HVRs)으로부터 아미노산 잔기 및 인간 프레임워크 영역 (FRs)으로부터 아미노산 잔기를 포함한 키메라 항체를 지칭한다. 특정 구현예에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함할 것이고, 여기서 HVR (예를 들면, CDR)의 실질적으로 모두는 비인간 항체의 것에 일치하고, 그리고 FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 항체의 것에 일치한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들면, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화처리되는 항체를 지칭한다.
- [0070] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는, 예를 들면, 천연 발생 돌연변이를 함유하거나 또는 단클론성 항체 제조의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체 (상기 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프)에 대하여 지향된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체와 대조로, 단클론성 항체 제조의 각각의 단클론성 항체는 항원에서 단일 결정인자에 대하여 지향된다. 따라서, 형용사 "단클론"은 항체가 실질적으로 균일한 항체 집단에서 수득된 것이라는 속성을 명시하고, 어떤 특정한 방법에 의한 상기 항체의 생산을 요구하는 것으로 간주되지 않는다.
- [0071] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체(immunoadhesin)"는 이형 단백질 ("접합체")의 결합 특이성을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합하는 분자를 가리킨다. 구조적으로, 면역접합체는 목적 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열의 융합을 포함하고, 이의 아미노산은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 (즉, 항체의 불변 영역과 비교하여 "이종성"임) 및 면역글로불린 불변 도메인 서열 (예를 들어, IgG의 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 서열) 이외의 것이다. 예시적인 접합체 서열은 관심 단백질에 결합하는 수용체 또는 리간드의 부분을 포함하는 인접 아미노산 서열을 포함한다. 접합체 서열은 또한 관심 단백질에 결합하는 서열일 수 있으나, 수용체 또는 리간드 서열 (예를 들어, 펩티다 내 접합체 서열)이 아니다. 그러한 폴리펩티드 서열은 파지 디스플레이 기술 및 높은 처리율 분류 방법을 포함한 다양한 방법에 의하여 선택 및 식별될 수 있다. 면역접합체의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하위유형, IgA (IgA1 및 IgA2 포함), IgE, IgD, 또는 IgM으로부터 수득할 수 있다.
- [0072] 용어 "치료학적 항체"는 질환의 치료에 사용되는 항체를 언급한다. 치료학적 항체는 다양한 작용 기작을 가질 수 있다. 치료학적 항체는 항원과 결합하여 항원과 관련된 표적의 정상적 기능을 중화시킬 수 있다. 예를 들어, 암 세포의 생존을 위해 요구되는 단백질의 활성을 차단하는 단클론성 항체는 세포사를 유발한다. 또 다른 치료적 단클론성 항체는 항원에 결합하고 항원과 관련된 표적의 정상적 기능을 활성화시킬 수 있다. 예를 들어, 단클론성 항체는 세포 상의 단백질에 결합하고 세포사멸 신호를 유발할 수 있다. 또 다른 단클론성 항체는 환부 조직 상에서만 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있고; 화학치료학적 또는 방사능활성 제제와 같은 독성 페이로드(유효 제제)의 단클론성 항체로의 콘주게이션은 환부 조직으로의 독성 페이로드의 특이적 전달을 위한 체제를 생성시킬 수 있어 건강한 조직에 대한 해로움을 감소시킬 수 있다. 치료학적 항체의 "생물학적 기능성 단편"은 일부 또는 전부가 아니더라도 무손상 항체에 부여되는 적어도 하나의 생물학적 기능을 나타내고, 상기 기능은 적어도 표적 항원으로서의 특이적 결합을 포함한다.
- [0073] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은

천연 서열 인간 FcR이다. 게다가, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)를 결합하는 것이고 그리고, 대립유전자 변이체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이스된 형태를 포함하여, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체를 포함한다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이는 이의 세포질 도메인 내에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 저해 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITIM)를 함유한다(참고 검토: M. in **Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs은 하기에 검토된다: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 및 de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). 향후 확인될 것들을 포함하는 다른 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 포괄된다. 상기 용어에는 또한 신생아 수용체, FcRn이 포함되며, 이는 모계 IgG의 태아로의 전달에 관여하며 (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 및 Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), 그리고 보다 낮은 이화작용을 매개하여, 이로써 보다 긴 반감기를 갖도록 한다.

[0074] "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 나타내며, 이것은 항체 이소형에 따라 가변한다. 항체 효과기 기능의 예는 하기를 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절 (예를 들면, B 세포 수용체); 및 B 세포 활성화.

[0075] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcRs을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII을 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예에는 말초 혈액 단핵구(PBMC), 자연 살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구가 포함되며; PBMCs 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 이들의 천연 공급원, 예를 들면 본원에 기재된 바와 같이 혈액 또는 PBMC로부터 분리될 수 있다.

[0076] "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR) (예를 들면 자연 살해 (NK) 세포, 중성구, 및 대식세포)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포에서 결합된 항체를 인식하고 그리고 차후에 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 언급한다. ADCC, NK 세포 매개용 1차 세포는 Fc $\gamma$ RIII 만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 및 Fc $\gamma$ RIII을 발현한다. 조혈 세포상의 FcR 발현은 다음 문헌의 464 페이지 상의 표 3에 요약되어 있다: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). 해당 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된, *시험관내* ADCC 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 *생체내*, 예를 들면 [Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.

[0077] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 동족 항원으로 복합된 분자 (예를 들면 항체)에 대한 보체 시스템 (C1q)의 제1 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들면 하기에 기술된 CDC 검정이 수행될 수 있다: Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0078] 본원에 사용된 바와 같은 "숙주 세포"는 단백질 또는 폴리펩티드 생성물을 생성할 수 있는 세포를 언급한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 Fc-함유 단백질을 생산할 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같이, "실질적으로 FX 활성이 없는" 또는 "실질적으로 GMD 활성이 없는" 은, 활성 수준의 감소 없이, 각각 야생형 FX 또는 GMD를 포함하는 숙주 세포와 비교하여, FX 또는 GMD 각각의 활성 수준의 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼의 감소를 지칭한다. 일부 구현예에서, 활성 수준은 약 80% 내지 100%, 약 85% 내지 100%, 약 90% 내지 100%, 또는 약 95% 내지 100% 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 활성 수준은 적어도 95% 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 활성 수준은 100%까지 감소한다. 일부 구현예에서, 효소의 활성 수준은 효소의 활성 수준이 감소되지 않은 야생형 효소를 포함하는 숙주 세포와 비교하여 20% 이하이다. 일부 구현예에서, 효소의 활성 수준은 효소의 활성 수준이 감소되지 않은 야생형 효소를 포함하는 숙주 세포와 비교하여 15% 이하이다. 일부 구현예에서, 효소의 활성 수준은 효소의 활성 수준이 감소되지 않은 야생형 효소를 포함하는 숙주 세포와 비교하여 10% 이하이다. 일부 구현예에서, 효소의 활성 수준은 효소의 활성 수준이 감소되지 않은 야생형 효소를 포함하는 숙주 세포와 비교하여 5% 이하이다.

[0080] 어구 "유전자의 붕괴" 및 "유전자 붕괴"는 유전자의 야생형 또는 천연적으로 존재하는 서열과 비교하여 세포에

서 상기 유전자의 발현을 감소시키거나 차단하기 위해 유전자의 천연의 내인성 DNA 서열 및/또는 프로모터 영역의 돌연변이를 언급한다.

- [0081] 용어 "녹아웃"은 변형되지 않는 유전자와 비교하여 이로부터 정상적으로 암호화된 폴리펩티드의 생물학적 활성을 적어도 80 %까지 감소시키는 유전자의 핵산 서열에서의 변경을 언급한다. 상기 변경은 예를 들어, 삽입, 치환, 결실, 프레임전환 돌연변이 또는 미스센스 돌연변이일 수 있다.
- [0082] 용어 "녹다운"은 유전학적 변형 (유기체의 염색체 중 하나의 DNA에서의 변화)을 통해 또는 mRNA 전사체 또는 유전자에 상보적인 서열을 갖는 짧은 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드와 같은 시약을 사용한 처리에 의해 하나 이상의 유전자의 발현이 감소되는 기술을 언급한다. DNA의 유전학적 변형이 수행되는 경우, 상기 결과는 "녹다운 유기체" 또는 "녹다운 숙주 세포"이다.
- [0083] "단리된" 핵산은 자연 환경 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 말한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 원래 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체외에 또는 이의 자연 염색체 위치와는 다른 염색체 위치에 존재한다.
- [0084] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결되는 또 다른 핵산을 전파시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 벡터 뿐만 아니라 이것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 삽입되는 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결되는 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.
- [0085] "단리된" 단백질은 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 구현예에서, 단백질은 하기 기술에 의하여 적어도 95% 또는 99% 초과로 정제된다: 예를 들어, 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC). 예를 들어, 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 하기를 참고한다: 예컨대, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).
- [0086] 용어 "약제학적 조성물"은 그안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하기 위한 형태인, 그리고 제제가 투여되는 대상체에 허용불가능하게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0087] "약제학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에 무독성인, 활성 성분 이외의, 약제학적 제제 중의 성분을 나타낸다. 약제학적으로 허용가능한 담체에는 비제한적으로, 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제가 포함된다.
- [0088] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "치료(treatment)" 또는 "치료하는(treating)"은 임상적 결과를 포함한 유익하거나 바람직한 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 본 발명을 위하여, 유용하거나 바람직한 임상적 결과는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 다음중 하나 이상을 포함한다: 질환으로부터 생성된 하나 이상의 증상 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화 (예: 질환 악화의 방지 또는 지연), 질환 확산 (예: 전이)의 방지 또는 지연, 질환 재발의 방지 또는 지연, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선, 질환의 회복(부분적 또는 완전) 제공, 질환을 치료하는데 필요한 하나 이상의 다른 약제의 용량 감소, 질환 진행의 지연, 삶의 질 증가, 및/또는 연장된 수명. 본 발명의 방법은 이들 치료 측면중 어느 하나 이상을 고려한다.
- [0089] 용어 "개체"는 포유동물을 언급하고 인간, 소, 말, 고양이, 개, 설치류 또는 영장류를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 개체는 인간이다.
- [0090] "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)"은 적어도 특별한 장애의 측정 가능한 개선을 수행하는데 필요한 최소 농도이다. 본 명세서에서 치료학적 유효량은 질환 상태, 나이, 성별 및 환자 체중과, 개체에서 원하는 반응을 나타내는 항체의 능력과 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 항체의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적 유익 효과를 능가하는 것이다. "예방적 유효량"은 원하는 예방 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 그러한 투여량에서, 유효한 양을 나타낸다. 통상적으로, 만드시는 아니지만, 예방학적 용량이 질환의 초기 단계 전에 또는 초기 단계에 대상에 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적을 수 있다.
- [0091] 본 명세서에 기술된 본 발명의 측면 및 구현예는 측면 및 구현예로 "이루어짐(consisting)" 및/또는 "필수적으로 이루어짐"을 포함하는 것으로 이해한다.
- [0092] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 지칭은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 변이를 포함한다 (그리고 기재한다). 예를 들면, "약 X"를 언급하는 기술은 "X"의 기재를 포함한다.
- [0093] 본 명세서에서 그리고 첨부되는 청구범위에서, 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포

함한다.

[0094] **단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하는 방법**

[0095] 본 출원은, 일부 양태에서, 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 본원의 구현예에서 기술된, 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는 임의의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 상기 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 이는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 Fc-함유 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 Fc-함유 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포가 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않거나, 또는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0096] 일부 구현예에서, 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 상기 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 상기 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 이는 FX 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 Fc-함유 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 실질적으로 FX 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 Fc-함유 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 FX 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 실질적으로 FX 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되며, 상기 방법은 배양 배지에서 FX 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 소정의 비율로 상기 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다.

일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

- [0097] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은, 약 50:1 내지 약 1:50, 약 50:2.5 내지 약 1:50, 약 50:5.5 내지 약 1:50, 약 50:8.5 내지 약 1:50, 약 50:12.5 내지 약 1:50, 약 50:15.5 내지 약 1:50, 약 50:21.5 내지 약 1:50, 약 50:27 내지 약 1:50, 약 50:33.5 내지 약 1:50, 약 50:41 내지 약 1:50, 약 50:50 내지 약 1:50, 약 50:61 내지 약 1:50, 약 50:75 내지 약 1:50, 약 50:93 내지 약 1:50, 약 50:116.5 내지 약 1:50, 약 50:150 내지 약 1:50, 약 50:200 내지 약 1:50, 약 50:283.5 내지 약 1:50, 약 50:450 내지 약 1:50, 또는 약 50:950 내지 약 1:50이다.
- [0098] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은, 약 50:1 내지 약 2.5:50, 약 50:1 내지 약 5.5:50, 약 50:1 내지 약 8.5:50, 약 50:1 내지 약 12.5:50, 약 50:1 내지 약 15.5:50, 약 50:1 내지 약 21.5:50, 약 50:1 내지 약 27:50, 약 50:1 내지 약 33.5:50, 약 50:1 내지 약 41:50, 약 50:1 내지 약 50:50, 약 50:1 내지 약 61:50, 약 50:1 내지 약 75:50, 약 50:1 내지 약 93:50, 약 50:1 내지 약 116.5:50, 약 50:1 내지 약 150:50, 약 50:1 내지 약 200:50, 약 50:1 내지 약 283.5:50, 약 50:1 내지 약 450:50, 또는 약 50:1 내지 약 950:50이다.
- [0099] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 50:2.5 내지 약 2.5:50, 약 50:5.5 내지 약 5.5:50, 약 50:8.5 내지 약 8.5:50, 약 50:12.5 내지 약 12.5:50, 약 50:15.5 내지 약 15.5:50, 약 50:21.5 내지 약 21.5:50, 약 50:27 내지 약 27:50, 약 50:33.5 내지 약 33.5:50, 또는 약 50:41 내지 약 41:50이다.
- [0100] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 12.5:50 내지 약 2.5:50, 약 12.5:50 내지 약 5.5:50, 약 12.5:50 내지 약 8.5:50, 약 12.5:50 내지 약 12.5:50, 또는 약 12.5:50 내지 약 15.5:50이다.
- [0101] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 21.5:50 내지 약 2.5:50, 약 21.5:50 내지 약 5.5:50, 약 21.5:50 내지 약 8.5:50, 약 21.5:50 내지 약 12.5:50, 또는 약 21.5:50 내지 약 15.5:50이다.
- [0102] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 33.5:50 내지 약 2.5:50, 약 33.5:50 내지 약 5.5:50, 약 33.5:50 내지 약 8.5:50, 약 33.5:50 내지 약 12.5:50, 약 33.5:50 내지 약 15.5:50, 약 33.5:50 내지 약 21.5:50, 또는 약 33.5:50 내지 약 27:50이다.
- [0103] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 50:50 내지 약 2.5:50, 약 50:50 내지 약 5.5:50, 약 50:50 내지 약 8.5:50, 약 50:50 내지 약 12.5:50, 약 50:50 내지 약 15.5:50, 약 50:50 내지 약 21.5:50, 약 50:50 내지 약 27:50, 약 50:50 내지 약 33.5:50, 또는 약 50:50 내지 약 41:50이다.
- [0104] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 75:50 내지 약 2.5:50, 약 75:50 내지 약 5.5:50, 약 75:50 내지 약 8.5:50, 약 75:50 내지 약 12.5:50, 약 75:50 내지 약 15.5:50, 약 75:50 내지 약 21.5:50, 약 75:50 내지 약 27:50, 약 75:50 내지 약 33.5:50, 약 75:50 내지 약 41:50, 약 75:50 내지 약 50:50, 또는 약 75:50 내지 약 61:50이다.
- [0105] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 116.5:50 내지 약 2.5:50, 약 116.5:50 내지 약 5.5:50, 약 116.5:50 내지 약 8.5:50, 약 116.5:50 내지 약 12.5:50, 약 116.5:50 내지 약 15.5:50, 약 116.5:50 내지 약 21.5:50, 약 116.5:50 내지 약 27:50, 약 116.5:50 내지 약 33.5:50, 약 116.5:50 내지 약 41:50, 약 116.5:50 내지 약 50:50, 약 116.5:50 내지 약 61:50, 약 116.5:50 내지 약 75:50, 또는 약 116.5:50 내지 약 93:50이다.
- [0106] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 200:50 내지 약 2.5:50, 약 200:50 내지 약 5.5:50, 약 200:50 내지 약 8.5:50, 약 200:50 내지 약 12.5:50, 약 200:50 내지 약 15.5:50, 약 200:50 내지 약 21.5:50, 약 200:50 내지 약 27:50, 약 200:50 내지 약 33.5:50, 약 200:50 내지 약 41:50, 약 200:50 내지 약 50:50, 약 200:50 내지 약 61:50, 약 200:50 내지 약 75:50, 약 200:50 내지 약 93:50, 약 200:50 내지 약 116.5:50, 또는 약 200:50 내지 약 150:50이다.
- [0107] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태 대 탈푸코실화 형태의 소정의 비율은 약 50:1, 약 50:2.5, 약 50:5.5, 약 50:8.5, 약 50:12.5, 약 50:15.5, 약 50:21.5, 약 50:27, 약 50:33.5, 약 50:41, 약 50:50, 약

50:61, 약 50:75, 약 50:93, 약 50:116.5, 약 50:150, 약 50:200, 약 50:283.5, 약 50:450, 또는 약 50:950이다.

[0108] 소정의 비율로 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질을 생성하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양은 대부분 숙주 세포의 유형, 숙주 세포의 수, 단백질 생성율 및 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질의 소정의 비율과 같은 시스템의 요소에 의존한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM 내지 약 1 mM이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.03 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.02 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.03 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.6 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.08 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.08 mM 내지 약 0.9 mM, 또는 약 0.09 mM 내지 약 0.1 mM이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM, 약 0.02 mM, 약 0.03 mM, 약 0.04 mM, 약 0.05 mM, 약 0.06 mM, 약 0.07 mM, 약 0.08 mM, 약 0.09 mM, 약 0.1 mM, 약 0.11 mM, 약 0.12 mM, 약 0.13 mM, 약 0.14 mM, 약 0.15 mM, 약 0.16 mM, 약 0.17 mM, 약 0.18 mM, 약 0.19 mM, 약 0.2 mM, 약 0.3 mM, 약 0.4 mM, 약 0.5 mM, 약 0.6 mM, 약 0.7 mM, 약 0.8 mM, 약 0.9 mM, 또는 약 1 mM이다.

[0109] NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법이 또한 본원에 제공되며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 배양 배지 내 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 배양 배지 내 Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 항체를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 배양 배지 내 항체를 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 배양 배지 내 항체를 발현하도록 가공된, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 Fc-함유 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예

에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0110] 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 유전자 교란을 갖는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 실질적으로 FX 활성이 없고, 배양 배지 내 Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 Fc-함유 단백질을 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 유전자 교란을 갖고, 배양 배지 내 Fc-함유 단백질을 발현하도록 가공된, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 Fc-함유 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된, 증진된 ADCC 작용을 갖는 항체를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 배양 배지 내 항체를 발현하도록 가공된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없으며, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 이는 FX 유전자 교란을 갖고, 배양 배지 내 항체를 발현하도록 가공된, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 배양 배지는 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 Fc-함유 항체의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산하기에 충분한 양으로 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0111] 일부 구현예에서, 단백질의 증진된 ADCC 작용은, FX 또는 GMD 활성의 감소된 수준 없이 야생형 숙주로부터 생산된 단백질과 비교된다. 일부 구현예에서, 단백질의 증진된 ADCC 작용은 단백질의 푸코실화 형태와 비교된다. 일부 구현예에서, 단백질의 증진된 ADCC 작용은 야생형 단백질과 비교된다. 일부 구현예에서, 단백질의 ADCC 작용은, FX 또는 GMD 활성의 감소된 수준 없이 야생형 숙주로부터 생산된 단백질과 비교하여, 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 75배, 또는 100배 증진된다.

[0112] 일부 구현예에서, ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정된다. ADCC 작용을 측정하는 ADCC 검정 및 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. **참고: 예컨대, Tada et al., PLoS One, 9, 2014, e95787; Cheng et al., J Immunol Methods, 414, 2014, 69-81.** 예를 들어, 단백질의 ADCC 작용은 Fc-함유 단백질과 같은 단백질을 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 또는 자연 살해 세포 (NK 세포) 및 표적 세포와 같은, 이의 표면 상에 Fc 수용체를 발현하는 효과기 세포로 항온처리함에 의해 결정될 수 있다. Fc 수용체와 함께 표적 질환 세포에 결합된 단백질의 Fc 영역의 관여 후, Fc 수용체는 표적 세포를 제거하는 효과기 세포 내에서 세포내 신호를 전달한다. 표적 세포 용해는 후속적으로 섬광 계수기 또는 분광측정기에 의한 세포내 표지의 방출에 의해 측정된다. 이들 중에서 방법은 크로뎀-51 방출 검정, 유로뎀 방출 검정 및 황-35 방출 검정을 포함한다. 예를 들어, 표적 세포 용해는 예를 들어, <sup>51</sup>Cr 또는 형광 염료, 예를 들어, 칼세인-AM44, 카복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE), 2',7'-비스-(2-카복시에틸)-5-(및-6)-카복시플루오레세인 (BCECF) 또는 유로뎀을 사용하여 예비-표지된 표적 세포로부터 특정 프로브의 방출을 측정함에 의해 또는 락테이트 데하이드로게나제 (LDH) 또는 ATP와 같은 세포질 효소의 방출을 측정함에 의해 평가될 수 있다. ADCC 작용을 평가하기 위한 다른 검정은 예를 들어, 표적 세포 (ACELLA™ TOX; Promega)에서 천연적으로 존재하는 효소의 방출을 측정하는 커플링된 생발광 방법을 포함한다. 어떠한 표

적 세포 표지 단계도 요구되지 않고 어떠한 방사능 활성 제제도 사용되지 않는다.

- [0113] 일부 구현예에서, 단백질의 ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정되며, 여기서 상기 ADCC 검정은 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정되며, 여기서 상기 ADCC 검정은 PBMC를 포함한다. 일부 구현예에서, ADCC 검정은 시험관내 검정이다. 일부 구현예에서, ADCC 검정은 생체내 검정이다.
- [0114] 일부 구현예에서, ADCC 작용은 FC $\gamma$  III 결합 검정에 의하여 측정된다. 참고: 예컨대, Miller *et al.*, *J Immunol Methods*, 385, 2012, 45-50. 대용물 결합 방법은 ADCC 작용의 평가를 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법은 세포 표면 표적 항원으로 상보성 결정 영역 (CDR) 결합, 및 별도로 또는 동시에 Fc $\gamma$ R로의 Fc 결합을 측정한다. 다양한 유동 세포측정 및 플레이트 기반 포맷은 CDR 및 Fc $\gamma$ R 결합 검정을 위해 사용될 수 있다. 재조합 단백질 수용체 결합 및 C1q 결합 검정은 표면 플라즈몬 공명 및 효소 결합된 면역흡착 검정을 포함하는, 다수의 플랫폼과 함께 개발되었다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 ELISA-기반 검정을 통하여 측정된다.
- [0115] 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 단백질의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 단백질의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 Fc-함유 단백질의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; Fc-함유 단백질의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 Fc-함유 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 Fc-함유 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 항체를 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 항체의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 항체의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 항체가 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 항체를 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 항체의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 항체의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 항체가 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.
- [0116] 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, 실질적으로 FX 활성이 없고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질

을 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 Fc-함유 단백질의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; Fc-함유 단백질의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 Fc-함유 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 숙주세포에 의하여 생산된 Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; Fc-함유 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 Fc-함유 단백질이 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 항체를 생산하도록 가공된 숙주 세포에 의하여 생산된 항체의 푸코실화의 수준을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없고, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 항체의 푸코실화의 수준을 측정하는 단계; 및 항체가 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 항체를 생산하도록 가공된, 숙주 세포에 의하여 생산된 항체의 푸코실화 수준을 조정하는 방법이 제공된다: 초기 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하는, 상기 배양 단계; 항체의 푸코실화 수준을 측정하는 단계; 및 항체가 소정의 비율로 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 생산되도록 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 조정하는 단계. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0117] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 방법이 제공되며, 이는 단백질의 푸코실화 형태를 측정하는 단계를 포함한다. 푸코실화 형태의 단백질을 측정하는 방법은 본원에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 것은 탈푸코실화 형태의 단백질을 측정하는 것을 포함한다. 단백질의 탈푸코실화 형태를 측정하는 방법은 본원에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 수준을 측정하는 것은 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 측정하는 것을 포함한다.

[0118] 일부 구현예에서, 푸코실화 및/또는 탈푸코실화의 수준은 배양 단계 동안에 측정된다. 일부 구현예에서, 푸코실화 및/또는 탈푸코실화의 수준은 숙주 세포의 배양 동안 1 초과의 횟수로 측정된다. 일부 구현예에서, 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양은, 푸코실화 및/또는 탈푸코실화의 수준을 측정한 후 조정된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원의 양은, 푸코실화 및/또는 탈푸코실화의 수준을 측정한 후 조정되지 않는다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원의 양은 숙주 세포의 배양 동안 1 초과의 횟수로 조정된다.

[0119] 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 푸코스 수준이 낮은 경우 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 것은, 볼러스 첨가를 통하여 상기 초기 배양 배지에 푸코스 공급원을 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 것은, 볼러스 첨가를 통하여 상기 초기 배양 배지에 푸코스 공급원을 포함하는 제2 배양 배지를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서 상기 제2 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양은 상기 초기 배양 배지 내 푸코스의 양보다 크다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 것은, 연속식 공급을 통하여 상기 초기 배양 배지에 푸코스 공급원을 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 증가시키는 것은, 연속식 공급을 통하여 상기 초기 배양 배지에 푸코스 공급원을 포함하는 제2 배양 배지를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서 상기 제2 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양은 상기 초기 배양 배지 내 푸코스의 양보다 크다.

[0120] 일부 구현예에서, 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 조정하는 방법이 제공되며, 이는 푸코실화 수준이 높은 경우 초기 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양을 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 감소시키는 것은 푸코스 공급원이 없는 제2 배양 배지를 첨가함을 포함한다. 일부 구현예에서, 초기 배양 배지에서 푸코스 공급원의 양을 감소시키는 것은, 초기 배양 배지와 비교하여, 푸코스 공급원의 감소된 수준을 포함하는 제2 배양 배지를 첨가하는 것을 포함한다.

[0121] 본 출원은, 일부 양태에서, 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 생물학적 활성을 비교하는 방법을 제공하며, 이는 하기를 포함한다: 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: Fc-함유 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 Fc-함유 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: Fc-함유 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 Fc-함유 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 항체의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 항체의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 항체의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 항체를 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 항체의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 항체의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 항체의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 또는 GMD 유전자 교란을 갖고, 그리고 항체를 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0122] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 단백질을 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 단백질을 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: Fc-함유 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 Fc-함유 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: Fc-함유 단백질의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 Fc-함유 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 Fc-함유 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 Fc-함유 단백질을 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 항체의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 항체의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 항체의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 항체를 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되며, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 항체의 푸코실화(fucosylated) 형태와 탈푸코실화 항체의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 항체의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 FX 유전자 교란을 갖고, 그리고 항체를 생산하도록 가공된, 상동한 숙주 세포에 의하여 생산되는, 상기 비교 단계. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0123] 동일한 숙주 세포로부터의 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질의 제조는 유사한 생성물 품질 성질 및 푸코실화 상태에 기인하는 단백질의 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태 간의 생물학적 활성의 차이를 갖는 단백질

형태를 생성시킨다.

- [0124] 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 형태는 푸코스 공급원이 없는 제1 세포 배양물 내 숙주 세포에 의하여 생산된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 푸코스 공급원을 포함하는 제2 세포 배양물 내 숙주 세포에 의하여 생산된다. 일부 구현예에서, a) 푸코스 공급원이 없는 제1 세포 배양물에서 숙주 세포를 배양하는 단계, b) 탈푸코실화된 단백질을 단리시키는 단계, c) 푸코스 공급원을 포함하는 제2 세포 배양에서 숙주 세포를 배양함에 의해 푸코실화 형태의 단백질을 제조하는 단계, d) 푸코실화된 단백질을 단리시키는 단계, e) 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질의 생물학적 활성을 비교하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 방법이 제공된다: 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 생물학적 활성을 비교하는 단계로서, 상기 단백질의 푸코실화 형태는 제1 세포 배양물 내 생산되고, 그리고 상기 단백질의 탈푸코실화 형태는 제2 세포 배양물 내 생산되는, 상기 비교 단계.
- [0125] 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태는 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지 내 숙주 세포에 의하여 생산된다. 일부 구현예에서, 배양 배지 내 푸코스 공급원의 양은, 약 0.01 mM 내지 약 1 mM이다. 일반적으로, 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태가 상동한 배양 배지 내에서 숙주 세포에 의하여 생산될 경우, 단백질의 푸코실화(fucosylated) 및 탈푸코실화 형태를 분리할 필요가 있다. 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 분리, 예를 들어, LCA 풀-다운(pull-down) 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 참고: 예컨대, Seth *et al.*, *Dev Dyn*, 239, 2010, 3380-3390; 및 Jilani *et al.*, *J Histochem Cytochem*, 2003, 51, 597-604.
- [0126] 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태의 생물학적 활성은 단백질의 단리된 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 사용하여 비교될 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 활성의 비교는 시험관내 수행된다. 일부 구현예에서, 생물학적 활성의 비교는 생체내 수행된다. 일부 구현예에서, 생물학적 활성은 ADCC 작용이다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 ADCC 검정에 의하여 측정된다. ADCC 검정은 당업계에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 대용물 ADCC 검정에 의하여 측정된다. 대용물 ADCC 검정은 당업계에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 대용물 ADCC 검정은 FC $\gamma$ R111 결합 검정이다. 일부 구현예에서, ADCC 작용은 FC $\gamma$ R111 결합 검정에 의하여 측정된다. FC $\gamma$ R111 결합 검정은 당업계에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다.
- [0127] 본원은 일부 양상에서 푸코실화되고/되거나 탈푸코실화 형태의 단백질을 생성할 수 있는 숙주 세포를 동정하는 방법을 제공한다.
- [0128] 단백질의 푸코실화 및/또는 탈푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포를 식별하기에 적합한 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 푸코실화 단백질을 생산할 수 있는 숙주 세포의 식별은 세포 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, 탈푸코실화 단백질을 생산할 수 있는 숙주 세포의 식별은 세포 수준에서 측정된다. 예를 들어, 렌즈 쿨리나리스 응집소 (LCA)-기반 검정을 사용하여 세포 수준에서 푸코실화되고/되거나 탈푸코실화 형태의 단백질을 생성할 수 있는 숙주 세포를 동정할 수 있다. 참고: 예컨대, Okeley *et al.*, *PNAS*, 110, 5404-5409. LCA는 코어 푸코스를 갖는 글리칸과 같은 탄수화물에 결합한다. 플루오레세인 (FITC) 콘주게이트된 LCA (LCA-FITC)와 같은 표지된 LCA를 사용하여 숙주 세포 표면 상에 푸코실화된 글리칸에 결합할 수 있다. 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)의 후속적 사용을 사용하여 푸코실화되고/되거나 탈푸코실화 형태의 단백질을 생성할 수 있는 숙주 세포를 동정할 수 있다. 일부 구현예에서, 푸코실화 형태를 생성할 수 있는 숙주 세포의 동정이 수행된다. 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 형태를 생성할 수 있는 숙주 세포의 식별이 수행된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포의 식별이 수행되며, 여기서 상기 숙주 세포는 푸코스를 포함하는 배양 배지 내에서 배양 후 평가되며, 그리고 별개로, 상기 숙주 세포는 푸코스가 결여된 배양 배지 내에서 배양 후 평가된다.
- [0129] 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의하여 식별된다. 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의하여 식별된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의하여 식별된다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포는 LCA-기반 검정에 의하여 식별된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 플루오레세인 (FITC) 콘주게이트된 렌즈 쿨리나리스 응집소 (LCA)로 염색된다. 일부 구현예에서, 단백질의 탈푸코실화 형태를 생산할 수 있는 숙주 세포는 LCA-기반 검정에 의하여 식별된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 플루오레세인 (FITC) 콘주게이트된 렌즈 쿨리나리스 응집소 (LCA)로 염색되지 않는다.
- [0130] 본원은 일부 양상에서 푸코실화되고/되거나 탈푸코실화 형태의 단백질을 측정하는 방법을 제공한다.

[0131] 일부 구현예에서, 푸코실화 형태의 단백질이 글리칸 구조물 수준에서 측정되는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 탈푸코실화 형태의 단백질이 글리칸 구조물 수준에서 측정되는 방법이 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 "글리칸 구조물 수준"은 단리된 글리칸 구조물을 사용하는 푸코실화 또는 탈푸코실화의 분석을 언급한다. 일반적으로, 글리칸 구조물 수준에서 푸코실화 또는 탈푸코실화를 측정하는 방법은 단백질로부터 글리칸 구조물을 절단함을 포함한다. 단백질로부터 글리칸 구조물을 절단하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. *참고: 예컨대, Szabo et al., Anal Chem, 82, 2010, 2588-2593; 및 Mulloy et al., Essentials of Glycobiology, 2nd Edition, Chapter 47, 2009.* 일부 구현예에서, 글리칸 구조물은 효소적 절단을 통해 절단된다. 일부 구현예에서, 상기 효소는 N-연결된 글리칸 구조물에 대해 특이적이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 단백질로부터 글리칸 구조물을 절단하기 위해 사용된다.

[0132] 단리된 글리칸 구조물은 이어서 글리칸 구조물의 조성, 예를 들어, 푸코실화의 존재 또는 부재를 측정하기 위해 분석한다. 글리칸 구조물을 분석하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. *참고: 예컨대, Mulloy et al., Essentials of Glycobiology, 2nd Edition, Chapter 47, 2009.* 일반적으로, 글리칸 구조물 혼합물은 예를 들어, 모세관 전기영동 또는 고압 액체 크로마토그래피에 의해 분리될 것이다. 이어서 후속적 분석학적 방법을 사용하여 글리칸 구조물의 혼합물에 존재하는 글리칸 구조물의 유형을 동정한다.

[0133] 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 푸코실화 형태는 모세관 전기영동 (CE)에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 탈푸코실화 형태는 CE에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 푸코실화 형태는 질량 분광분석 (MS)에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 탈푸코실화 형태는 MS에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 푸코실화 형태는 핵 자기 공명 (NMR)에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 탈푸코실화 형태는 NMR에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 푸코실화 형태는 섬광(scintillation)에 의하여 측정되며, 상기 푸코스는 방사성표지된 푸코스이다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 글리칸 구조물의 탈푸코실화 형태는 표지-기반 검정에 의하여 측정되며, 글리칸 구조물의 자유 환원 단부(free reducing end)는 태그, 예컨대 형광 태그로 표시된다.

[0134] 일부 구현예에서, 푸코실화 형태의 단백질이 단백질 수준에서 측정되는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 탈 푸코실화 형태의 단백질이 단백질 수준에서 측정되는 방법이 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 "단백질 수준"은 글리칸의 구조물에 결합된 단백질 (예를 들어, 당단백질)을 사용하여 푸코실화 또는 탈푸코실화의 분석을 언급한다. 단백질 수준에서 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 측정하기 위한 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다. *참고: 예컨대, Balaguer & Neuss, Anal Chem, 78, 2006, 5384-5393.* 일부 구현예에서, 푸코실화 형태의 단백질은 질량 분광측정 (MS)에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 단백질의 탈 푸코실화 형태는 MS에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 단백질의 푸코실화 형태는 탑-다운(top-down) MS에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, 방법이 제공되며, 여기서 단백질의 탈푸코실화 형태는 탑-다운(top-down) MS에 의하여 측정된다.

[0135] 일부 구현예에서, 푸코실화 형태의 단백질이 글리칸 구조물 및 단백질 수준에서 측정되는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 탈푸코실화 형태의 단백질이 글리칸 구조물 및 단백질 수준에서 측정되는 방법이 제공된다.

[0136] **배양 배지 및 배양 방법**

[0137] 본원에서의 구현예에 기재된 목적하는 단백질을 제조하기 위해 사용된 숙주 세포는 다양한 배양 배지에서 배양 될 수 있다. 일반적으로, 상기 배지의 푸코스 함량은 공지된다. 상업적으로 가용한 배지, 예를 들면, Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 및 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지 ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 문헌[Ham et al., Meth Enz, 58, 1979, Barnes et al., Anal Biochem, 102, 1980], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; 국제 특허출원 번호 WO 90/03430 또는 WO 87/00195; 또는 미국 특허 재등록 제30,985호에 기술된 배지중 어느 하나가 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이러한 배지 중 임의의 것은 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 나트륨, 칼로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCIN<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 상응하는 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스 공급원을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 만노스 공급원을 추가로 포함한다. 임의의 다른 필요한 보

층제가 당해 분야의 숙련자에게 공지된 적절한 농도로 또한 포함될 수 있다.

[0138] 일부 구현예에서, 배양 배지는 푸코스 공급원이 없다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "푸코스 공급원"은 푸코실화 경로에 관여하는 푸코스를 포함하는 모이어티를 언급한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함하고, 여기서 배양 배지 내 상기 푸코스 공급원의 양은 약 0.01 mM 내지 약 1 mM이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM 내지 약 1 mM이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.03 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.02 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.03 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.03 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.6 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.05 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.05 mM 내지 약 0.06 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.07 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.09 mM, 약 0.07 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.08 mM 내지 약 0.1 mM, 약 0.08 mM 내지 약 0.9 mM, 또는 약 0.09 mM 내지 약 0.1 mM이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 약 0.01 mM, 약 0.02 mM, 약 0.03 mM, 약 0.04 mM, 약 0.05 mM, 약 0.06 mM, 약 0.07 mM, 약 0.08 mM, 약 0.09 mM, 약 0.1 mM, 약 0.11 mM, 약 0.12 mM, 약 0.13 mM, 약 0.14 mM, 약 0.15 mM, 약 0.16 mM, 약 0.17 mM, 약 0.18 mM, 약 0.19 mM, 약 0.2 mM, 약 0.3 mM, 약 0.4 mM, 약 0.5 mM, 약 0.6 mM, 약 0.7 mM, 약 0.8 mM, 약 0.9 mM, 또는 약 1 mM이다.

[0139] 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. *참고: 예컨대, Li et al., Mabs, 2, 2010.* 일부 구현예에서, 숙주 세포를 배양하는 것은 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하기 전에 푸코스 공급원이 없는 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 배양 단계의 개시시점에서 배양 배지 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 배양 단계 동안 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은, 예를 들어, 적어도  $2 \times 10^5$  세포/mL의 세포 밀도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 예를 들어, 50% 용존 O<sub>2</sub> 의 산소 수준으로 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 예를 들어, 6 g/L 의 글루코스 수준으로 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 배양 단계의 개시 시점에서 배양 배지 내 존재하고, 그리고 푸코스 공급원은 배양 단계 동안 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 배양 단계 동안 볼러스 첨가를 통하여 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 배양 단계 동안 연속식 공급을 통하여 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 볼러스 첨가를 통하여 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 연속 공급을 통하여 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0140] 배양 조건, 예를 들면, 온도, pH 등은 발현을 위해 선별된 숙주 세포에서 기존에 이용된 것들일 수 있고, 그리고 당업자에게 명백할 것이다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 약 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C, 또는 30°C 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 약 37°C 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 약 34°C 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 약 37°C 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 약 34°C 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 초기 온도에서 수행되고, 그리고 이후 제2 온도로 이동한다. 일부 구현예에서, 초기 온도는 약 37°C이고, 그리고 제2 온도는 약 34°C이다. 일부 구현예에서, 초기 온도는 약 34°C이고, 그리고 제2 온도는 약 37°C이다.

[0141] 일반적으로, 단백질의 생성은 대규모 (예를 들어, 상업적 스케일)로 수행된다. 상업적 규모의 제조에 적합한 숙주 세포 집단을 성취하기 위하여, 당해 분야의 통상의 숙련가는 숙주 세포 집단을 확장시키기 위한 단계적 접근법을 사용하는 유용성을 인식할 것이다. 예를 들어, 상기 공정은 숙주 세포 집단 (예: 시드 트레인)을 증가시킬 수 있도록 원하는 숙주 세포를 보다 작은 규모로 성장시킴을 포함한다. 숙주 세포 집단을 추가로 증가시키기 위

하여, 방법은 일반적으로 보다 큰 배양 탱크 (예: 접종물 탱크)를 접종시키기 위해 시드 트레이의 사용을 포함했다. 종종, 크기를 증가시킨 일련의 접종물 탱크가 숙주 세포 집단 (예: 접종물 트레이)을 확장시키는데 사용된다. 이 공정은 제조 배양시 배양을 위해 적합한 숙주 세포 집단을 제공할 것이다. 일부 구현예에서, 제조 배양은 1000 L 배양 탱크이다.

[0142] 일부 구현예에서, 단백질을 제조하는 방법이 제공되며, 이는 배치 공급 방법을 사용하여 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질을 제조하는 방법이 제공되며, 이는 연속식 공급 방법을 사용하여 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 배치 공급법 및 연속 공급법을 포함하는 공급법을 사용한 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, Fc-함유 단백질의 제조 방법이 제공된다.

[0143] 본원은 다른 양상에서 본원의 구현예에 기재된 임의의 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물 및 낮은 수준의 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 고유 비율로의 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공된다: 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지. 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공된다: 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 그리고 상기 숙주 세포는 녹아웃 숙주 세포인, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지. 일부 구현예에서, 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없는, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 단백질은 Fc-함유 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 그리고 상기 숙주 세포는 녹아웃 숙주 세포인, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 단백질은 항체이다. 일부 구현예에서, 단백질을 발현하도록 가공된 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나 실질적으로 GMD 활성이 없고, 그리고 상기 숙주 세포는 녹아웃 숙주 세포인, 상기 숙주 세포; 및 약 0.01mM 내지 약 1 mM에서 푸코스 공급원을 포함하는 배양 배지를 포함하는 세포 배양물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 단백질은 항체이다. 일부 구현예에서, 소정의 비율로 단백질의 코실화 및 탈푸코실화 형태를 발현시키는 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물이 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 실질적으로 FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0144] 일부 구현예에서, 상기 세포 배양물은 성장을 위한 환경에서 숙주 세포를 유지한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 단백질의 제조를 위한 환경에서 숙주 세포를 유지한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 소정의 비율로 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태로 생성된다.

[0145] 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 0.01 mM 내지 약 1 mM에서의 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 0.01 mM 내지 약 0.1 mM에서의 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.

[0146] 일부 구현예에서, 세포 배양물은 시드 배양물(seed culture)이다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 접종 배양물(seed culture)이다. 일부 구현예에서, 접종 배양물은 주요 접종 배양물이다. 일부 구현예에서, 접종물 배양은 2차 접종물이다. 일부 구현예에서, 세포 배양 시스템은 생산 배양물을 포함한다.

[0147] 일부 구현예에서, 세포 배양물은 명시된 온도에서 유지된다. 일부 구현예에서, 명시된 온도는 약 15°C 내지 약 45°C이다. 일부 구현예에서, 명시된 온도는 약 30°C 이다. 일부 구현예에서, 명시된 온도는 약 37°C 미만이다. 일부 구현예에서, 명시된 온도는 약 35°C 미만이다. 일부 구현예에서, 명시된 온도는 약 34°C 미만이다.

- [0148] 일부 구현예에서, 세포 배양물은 명시된 pH에서 유지된다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 명시된 용존 산소 농도에서 유지된다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 명시된 영양분 수준에서 유지된다.
- [0149] 일부 구현예에서, 숙주 배양 시스템은 본원의 구현예에 기재된 바와 같은 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 본원의 구현예에 기재된 바와 같은 다수의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 본원의 구현예에 기재된 바와 같은 단백질을 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0150] **숙주 세포**
- [0151] 본 출원은, 일부 양태에서, 단백질의 발현을 위한 숙주 세포를 제공하며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없다.
- [0152] 사용될 수 있는 숙주 세포중에 진핵 세포, 예를 들어, 효모 또는 고등 진핵세포가 있다. 고등 진핵 세포는 곤충 세포 및 포유 동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다.
- [0153] 적절한 포유동물 숙주 세포의 예는 원숭이 신장 세포의 COS-7 계통 (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, *Cell*, 23, 1981), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포 (ATCC CCL 163), 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 그들의 유도체, 예를 들어, 혈청-부재 배지에서 성장하는 베지(Veggie) CHO 및 관련 세포주 (Rasmussen *et al.*, *Cytotechnology*, 28, 1998), HeLa 세포, BHK (ATCC CRL10) 세포주, 및 문헌[McMahan *et al.*, *EMBO J*, 10, 1991]에 기술된 바와 같은 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CVI로부터 유래된 CVI/EBNA 세포주 (ATCC CCL 70), 인간 배아 신장 세포 (예: 293, 293 EBNA, 또는 MSR 293), 인간 상피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 형질전환된 영장류 세포주, 정상적인 이배체 세포, 1차 조직의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포 균주, 1차 이식편, HL-60, U937, HaK, 또는 주카트 세포를 포함한다. 임의로, 예를 들어, 포유동물 세포주, 예를 들어, HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49는 숙주 세포로서 사용될 수 있다.
- [0154] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. CHO 세포는 당해 기술에 공지되어 있다. **참고:** *예컨대*, Xu *et al.*, *Nat Biotechnol*, 29, 2011. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DP12 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DUXB-11 유래된 DHFR-결핍 DP12 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHO-K1 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 DHFR-양성 CHO-K1 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 CHOK1M 숙주 세포이다.
- [0155] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 마우스 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 Sp2/0 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 NSO 숙주 세포이다.
- [0156] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 하이브리도마이다. 일부 구현예에서, 하이브리도마는 항체-생성 세포이며, 이때 항체-생성 세포는 숙주를 항원으로 면역화시킨 다음 숙주로부터 수집한다. 일부 구현예에서, 항체-생성 세포는 골수종 세포와 융합된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 마우스 골수종-유래 세포주이다.
- [0157] 대안적으로, 숙주 세포는 효모와 같은 하등 진핵세포일 수 있다. 적절한 효모는 사카로미세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 슈코사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베르미세스 균주 (*Kluyveromyces strains*), 칸디다(*Candida*), 또는 이중 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 임의의 효모 균주를 포함한다.
- [0158] 본원에 사용된 바와 같은, "실질적으로 부재인 FX 활성 또는 실질적으로 부재인 GMD 활성"은 각각 비활성화 없이 야생형 FX 또는 GMD 유전자를 포함하는 숙주 세포와 비교하여 40 % 이하의 FX 또는 GMD 활성을 포함하는 숙주 세포를 언급한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 또는 GMD 유전자 각각을 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 이하의 FX 또는 GMD 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 이하의 FX 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, FX 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 GMD 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 이하의 GMD 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 GMD 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, GMD 활성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 및 GMD 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 이하의 FX 및 GMD 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는, 야생형 FX 및 GMD 유전자를 비활성화 없이 포함하는 숙주 세포와 비교하여, FX 및 GMD 활성을 포함하지 않는다.

- [0159] FX 및 GMD는 구체 경로에 속하는 효소이고 L-푸코스로부터 GPD-푸코스를 생성한다. 참고: Becker and Lowe, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1455, **1999**, 193-204. 세포질에서, FX는 L-푸코스를 L-푸코스-1-포스페이트로 전환시키고 GMD는 L-푸코스-1-포스페이트를 GPD-푸코스로 전환시킨다. GPD-푸코스는 이어서 글리칸 구조물을 푸코실화하기 위해 사용되는 기질로서 작용하는 골지체 강으로 수송된다.
- [0160] 일부 구현예에서, 숙주 세포의 FX 또는 GMD 유전자는 비활성화된다. 본원에 사용된 바와 같은 "비활성화된"은 기능성 유전자 (즉어, 기능성 효소의 발현)의 해독 또는 잠재적 향후 해독을 억제함을 언급한다. 비활성화는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 전사, 번역 및 단백질 발현을 포함한, 유전자 발현의 임의 단계 또는 공정에서 일어날 수 있고, 비활성화는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, DNA, RNA(예: mRNA) 및 폴리펩티드를 포함한, 임의 유전자 또는 유전자 생성물에 영향을 줄 수 있다.
- [0161] 일부 구현예에서, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자는 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 활성은 DNA 수준을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자는 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 활성은 RNA 수준을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자는 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 활성은 폴리펩티드 수준을 기반으로 한다.
- [0162] 본원에서 또한 녹아웃 숙주 세포를 제조하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 방법은 CRISPR, TALEN, ZFN, 및 메가 뉴클레아제 시스템의 용도를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 유전자 결실 또는 유전자 부가 또는 치환을 포함한다.
- [0163] 일반적으로, 실질적으로 부재의 FX 활성 또는 실질적으로 부재의 GMD 활성을 포함하는 숙주 세포를 제조하는 방법은 숙주 세포의 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시킴을 포함한다. 숙주 세포에서 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키기 위한 방법 및 기술은 소형 간섭 RNA (siRNA), 소형 헤어핀 RNA (shRNA; 또한 짧은 헤어핀 RNA로서 언급되는), 클러스터되고, 규칙적으로 서로 떨어져 있는 짧은 회문 반복부(CRISPR), 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN), 아연-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 상동성 재조합, 비-상동성 말단-연결, 메가뉴클레아제 및 효소 억제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 (O' Keefe, *Mater Methods*, 3, 2013; Doench *et al.*, *Nat Biotechnol*, 32, 2014; Gaj *et al.*, *Trends Biotechnol*, 31, 2014; 및 Silva *et al.*, *Curr Gene Ther*, 11, 2011)을 참조한다.
- [0164] 일반적으로, 본원에 사용된 CRISPR 시스템은 카스파제 단백질, 예를 들어 Cas9, 및 목적하는 서열에 상보적인 가이드 서열로 언급되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA 서열을 포함할 수 있다. 카스파제 및 RNA 서열은 숙주 세포의 DNA 서열을 동정하는 복합체를 형성하고, 후속적으로 카스파제의 뉴클레아제 활성은 DNA 가닥의 절단을 가능하게 한다. 카스파제 이소형은 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA 뉴클레아제 활성을 갖는다. CRISPR 시스템에 사용된 가이드 RNA 서열의 설계 및 가이드 RNA 서열의 수는 유전자의 특정 연신부 제거 및/또는 DNA 서열의 부가를 허용한다.
- [0165] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 CRISPR 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, DNA 엔도뉴클레아제 유전자를 포함하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, CAS 유전자를 포함하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, CAS9 유전자를 포함하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, CAS9 유전자를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, Cas 단백질을 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질을 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질과 상호작용할 수 있는 RNA 분자를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 가이드 RNA(gRNA) 단위체를 포함하는 RNA 분자를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 이때 gRNA 단위체는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보적인 뉴클레오

티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 가이드 gRNA 단위체를 포함하는 RNA 분자를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 이때 gRNA 단위체는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA) 단위체를 포함하는 RNA 분자를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, tracrRNA 단위체를 포함하는 RNA 분자를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 gRNA 단위체 및 tracrRNA 단위체를 포함하는 RNA 분자를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 gRNA 단위체는 유전자 서열의 일부에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 가이드 gRNA 단위체 및 tracrRNA 단위체를 포함하는 RNA 분자를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 이때 gRNA 단위체는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는: a) gRNA 단위체를 포함하는 제1 RNA 분자 (여기서, gRNA 단위체는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보성인 제1 뉴클레오티드 서열을 포함한다); 및 b) gRNA 단위체를 포함하는 제2 RNA 분자 (여기서, gRNA 단위체는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보성인 제2 뉴클레오티드 서열을 포함한다)를 포함하는 CRISPR 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자의 비활성화를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오티드 서열 및 제2 뉴클레오티드 서열은 상이하다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레오티드 서열은 제2 뉴클레오티드 서열에 상보성인 FX 또는 GMD 유전자 일부 영역보다 상이한 위치에 존재하는 FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부에 상보성이다.

[0166] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 CRISPR 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터를 사용하여 CRISPR 시스템을 포함하는 벡터의 전달하는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 아데노바이러스이다. 일부 구현예에서, 벡터는 프로모터를 포함한다.

[0167] 일반적으로, 본원에 사용되는 TALEN 시스템은 DNA 서열의 인식 및 후속적 이중 가닥 DNA 절단을 가능하게 하는 하나 이상의 제한 뉴클레아제 및 2개 이상의 단백질 복합체를 포함할 수 있다. TALEN 시스템의 단백질 복합체는 다수의 전사 활성인자-유사 효과기 (TALE)를 포함하고 이의 각각은 특이적 뉴클레오티드 및 제한 뉴클레아제의 도메인을 인식한다. 일반적으로, TALEN 시스템은 각각 TALE 및 제한 뉴클레아제의 도메인을 포함하는 2개의 단백질 복합체가 개별적으로 제한 뉴클레아제의 2개의 도메인 (각각의 단백질 복합체로부터 하나)이 활성 뉴클레아제를 형성하고 특정 DNA 서열을 절단할 수 있는 방식으로 DNA 서열에 결합한다. TALEN 시스템으로 절단되는 단백질 착화합물 및 서열 수의 설계는 유전자의 특정 연신부의 제거 및/또는 DNA 서열의 부가를 허용한다.

[0168] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 감소된 수준의 FX 또는 GMD 활성을 갖고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 단위체를 포함하는 TALEN 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 단위체는 제1 TALEN 결합 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 결합 단위체는 적어도 1개의 전사 활성인자-유사 효과기 (TALE) 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 TALE는 제1 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 단위체는 제2 TALEN 결합 단위체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 TALEN 결합 단위체는 적어도 1개의 전사 활성인자-유사 효과기 (TALE) 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제2 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 제2 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 TALEN 결합 단위체 및 제2 TALEN 결합 단위체는 FX 또는 GMD 유전자의 상이한 서열에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이

다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인 및 제2 뉴클레아제 도메인은 활성 제한 엔도뉴클레아제를 포함하도록 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인 및 제2 뉴클레아제 도메인은 활성 Fok1 효소를 포함하도록 결합된다.

[0169] 일부 구현예에서, 제2 TALEN 단위체를 추가로 포함하는 TALEN 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 제2 TALEN 단위체는 제3 TALEN 결합 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 TALEN 결합 단위체는 적어도 1개의 전사 활성인자-유사 효과기 (TALE) 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제3 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 TALE는 제3 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제2 TALEN 단위체는 제4 TALEN 결합 단위체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 TALEN 결합 단위체는 적어도 1개의 전사 활성인자-유사 효과기 (TALE) 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제4 TALEN 결합 단위체는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 TALE 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 TALE는 함께 결합되며, 결합된 TALE는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 TALE는 제4 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제3 TALEN 결합 단위체 및 제4 TALEN 결합 단위체는 FX 또는 GMD 유전자의 상이한 서열에 결합한다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인 및 제4 뉴클레아제 도메인은 연합되어 활성 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인 및 제4 뉴클레아제 도메인은 활성 Fok1 효소를 포함하도록 결합된다.

[0170] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 TALEN 시스템은 FX 또는 GMD 유전자 서열의 상이한, 비-중첩 부분에 결합하는 제1 TALEN 단위체 및 제2 TALEN 단위체를 포함한다.

[0171] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하고, 상기 TALEN 시스템은 제2 TALEN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하고, 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체 및 제2 TALEN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다.

[0172] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 TALEN

시스템은 제2 TALEN 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 TALEN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 TALEN 시스템은 제1 TALEN 단위체 및 제2 TALEN 단위체를 포함한다.

[0173] 일부 구현예에서, 제1 TALEN 결합 단위체는 결합된 TALE 그룹을 포함하며, 이때 TALE 그룹은 뉴클레오티드 서열을 인식한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자 프로모터의 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자를 측정하는 서열 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자 프로모터의 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자를 측정하는 서열 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다.

[0174] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 TALEN 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터를 사용하여 TALEN 시스템을 포함하는 벡터의 전달하는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 아데노바이러스이다.

[0175] 일반적으로, 본원에 사용되는 ZFN 시스템은 DNA 서열의 인식 및 후속적 이중-가닥 DNA 절단을 가능하게 하는 하나 이상의 제한 뉴클레아제 및 2개 이상의 단백질 복합체를 포함할 수 있다. ZFN 시스템의 단백질 복합체는 다수의 아연 핑거를 포함하고 이의 각각은 특이적 뉴클레오티드 코돈 및 제한 뉴클레아제의 도메인을 인식한다. 일반적으로, ZFN 시스템은 제한 뉴클레아제의 두 도메인 (각각의 단백질 착화합물로부터의 것)이 활성 뉴클레아제를 형성하고 특정 DNA 서열을 절단할 수 있도록 하는 방식으로, 각각 아연-핑거 및 제한 뉴클레아제 도메인을 포함하는, 2개의 단백질 착화합물이 DNA 서열에 개별적으로 결합하도록 설계된다. ZFN 시스템으로 절단되는 단백질 착화합물 및 서열 수의 설계는 유전자의 특정 스트레치의 제거 및/또는 DNA 서열의 부가를 허용한다.

[0176] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 단위체를 포함하는 ZFN 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 단위체는 제1 ZFN 결합 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 결합 단위체는 적어도 1개의 아연-핑거 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제1 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 아연-핑거는 제1 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 단위체는 제2 ZFN 결합 단위체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 ZFN 결합 단위체는 적어도 1개의 아연-핑거 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제2 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제2 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 아연-핑거는 제2 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 ZFN 결합 단위체 및 제2 ZFN 결합 단위체는 FX 또는 GMD 유전자의 상이한 서열에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제2 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인 및 제2 뉴클레아제 도메인은 활성 제한 엔도뉴클레아제를 포함하도록 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 뉴클레아제 도메인 및 제2 뉴클레아제 도메인은 활성 Fok1 효소를 포함하도록 결합된다.

[0177] 일부 구현예에서, 제2 ZFN 단위체를 추가로 포함하는 ZFN 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 제2 ZFN 단위체는 제3 ZFN 결합 단

위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 ZFN 결합 단위체는 적어도 1개의 아연-핑거 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제3 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제3 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 아연-핑거는 제3 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제2 ZFN 단위체는 제4 ZFN 결합 단위체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 ZFN 결합 단위체는 적어도 1개의 아연-핑거 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식한다. 일부 구현예에서, 제4 ZFN 결합 단위체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아연-핑거 및 제4 뉴클레아제 도메인을 포함하고, 이때 아연-핑거는 함께 결합되며, 결합된 아연-핑거는 FX 또는 GMD 뉴클레오티드 서열의 일부를 인식하고, 결합된 아연-핑거는 제4 뉴클레아제 도메인에 추가로 결합된다. 일부 구현예에서, 제3 ZFN 결합 단위체 및 제4 ZFN 결합 단위체는 FX 또는 GMD 유전자의 상이한 서열에 결합한다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 제한 엔도뉴클레아제의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제4 뉴클레아제 도메인은 Fok1의 도메인이다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인 및 제4 뉴클레아제 도메인은 연합되어 활성 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 뉴클레아제 도메인 및 제4 뉴클레아제 도메인은 활성 Fok1 효소를 포함하도록 결합된다.

[0178] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없으며, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 ZFN 시스템은 FX 또는 GMD 유전자 서열의 상이한, 비-중첩 부분에 결합하는 제1 ZFN 단위체 및 제2 TALEN 단위체를 포함한다.

[0179] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하고, 상기 ZFN 시스템은 제2 ZFN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하되, 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함하고, 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체 및 제2 ZFN 단위체를 암호화하는 암호화 벡터를 포함한다.

[0180] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ZFN 시스템은 제2 ZFN 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 ZFN 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ZFN 시스템은 제1 ZFN 단위체 및 제2 ZFN 단위체를 포함한다.

[0181] 일부 구현예에서, 제1 ZFN 결합 단위체는 결합된 아연-핑거 그룹을 포함하며, 이때 아연-핑거 그룹은 뉴클레오티드 서열을 인식한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자 프로모터의 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 FX 또는 GMD 유전자를 측정하는 서열 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자 프로모터의 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적

어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다. 일부 구현예에서, 서열은 FX 또는 GMD 유전자를 측정하는 서열 부분과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상동성이다.

[0182] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 ZFN 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터를 사용하여 ZFN 시스템을 포함하는 벡터의 전달하는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 아데노바이러스이다.

[0183] 일반적으로, 본원에 사용되는 메가뉴클레아제 시스템은 DNA 서열의 인식 및 후속적 이중-가닥 DNA 절단을 가능하게 하는 하나 이상의 메가뉴클레아제를 포함할 수 있다.

[0184] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 메가뉴클레아제 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 메가뉴클레아제는 길이가 약 8 내지 약 35 개 뉴클레오티드 염기쌍인 DNA 인식 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 메가뉴클레아제는 길이가 약 12 내지 약 30 개 뉴클레오티드 염기쌍인 DNA 인식 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, DNA 인식 서열은 FX 또는 GMD 유전자 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, DNA 인식 서열은 FX 또는 GMD 유전자 프로모터의 부분을 포함하는 서열이다. 일부 구현예에서, DNA 인식 서열은 FX 또는 GMD 유전자를 측정하는 서열 부분을 포함하는 서열이다.

[0185] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 메가뉴클레아제 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터를 사용하여 메가뉴클레아제 시스템을 포함하는 벡터의 전달하는 단계를 포함하는 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 아데노바이러스이다.

[0186] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 유전자 결실이 검출된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 유전자 부가 또는 치환이 검출된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 발현의 수준은 숙주 세포 내 유전자의 비활성화 이전에 측정된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 활성의 수준은, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키기 위하여 CRISPR 시스템을 사용한 후 측정된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 활성의 수준은, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키기 위하여 TALEN 시스템을 사용한 후 측정된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 활성의 수준은, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키기 위하여 ZFN 시스템을 사용한 후 측정된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 이는 FX 또는 GMD 유전자 비활성화의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 FX 또는 GMD 활성의 수준은, 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키기 위하여 메가뉴클레아제 시스템을 사용한 후 측정된다.

[0187] 본원에 개시된 일부 방법에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 상기 DNA 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 RNA 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, PCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, PCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 여기서 변이체 서열이 검출된다. 일부 구현예에서, qPCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, qPCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다.

[0188] 본원에 개시된 일부 방법에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 상기 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역조직화학을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 웨스턴 블롯을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 유동 세포측정을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다.

- [0189] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자 비활성화의 수준은 FX 또는 GMD 유전자 비활성화 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 대조군 값과 비교함에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자 비활성화의 수준은, FX 또는 GMD 유전자 비활성화 이전의 FX 또는 GMD 활성의 수준과 FX 또는 GMD 유전자 비활성화 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 비교함에 의하여 측정된다.
- [0190] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 소 간섭 RNA (siRNA) 시스템에 의해 비활성화되며, 여기서 숙주 세포는 siRNA 시스템을 포함할 것이다.
- [0191] 일부 구현예에서, siRNA 시스템은 길이가 약 10 내지 200개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 30개 뉴클레오티드, 또는 약 15 내지 30개 뉴클레오티드인 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 대략 10 내지 25 개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, siRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 대략 15 내지 25 개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, siRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 적어도 약 10, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 또는 적어도 약 25개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, siRNA 시스템은 FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA 시스템은 FX 또는 GMD pro-mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, siRNA 시스템은 이중 가닥 RNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 siRNA 시스템은 단일 가닥의 RNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 siRNA 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 활성 siRNA 분자로 처리되는 pro-siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 siRNA 분자를 암호화하는 발현 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 pro-siRNA 분자를 암호화하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0192] 일부 구현예에서, siRNA 시스템은 전달 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 전달 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 pro-siRNA 및/또는 siRNA 분자를 포함한다.
- [0193] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 작은 헤어핀 RNA (shRNA; 짧은 헤어핀 RNA로서 또한 언급됨) 시스템에 의해 비활성화되며, 여기서 숙주 세포는 shRNA 시스템을 포함할 것이다. shRNA 시스템에 의한 유전자 비활성화는 당업계에서 널리 공지되어 있다. 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 길이가 약 10 내지 200개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 30개 뉴클레오티드, 또는 약 15 내지 30개 뉴클레오티드인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, shRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 대략 10 내지 25개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, shRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 대략 15 내지 25개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, shRNA 뉴클레오티드 서열은 길이가 적어도 약 10개, 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 또는 적어도 약 25개 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 FX 또는 GMD pro-mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 이중 가닥 RNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 단일 가닥 RNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 shRNA 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 활성 shRNA 뉴클레오티드 서열로 처리되는 pre-shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, pro-shRNA 분자는 DNA로 구성된다. 일부 구현예에서, pro-shRNA 분자는 DNA 작제물이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 100% 상보성인 shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 shRNA 분자를 암호화하는 발현 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 pro-shRNA 분자를 암호화하는 발현 벡터를 포함한다.

- [0194] 일부 구현예에서, shRNA 시스템은 전달 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 전달 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 pro-shRNA 및/또는 shRNA 분자를 포함한다.
- [0195] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 비활성화되며, 여기서 숙주 세포는 유전자 결실을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "유전자 결실"은 유전자로부터 또는 이에 인접된 단일 핵산과 같은 DNA 서열의 적어도 일부의 제거를 언급한다. 일부 구현예에서, 유전자 결실에 적용되는 서열은 유전자의 엑손 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 결실된 서열은 유전자의 프로모터 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 결실된 서열은 유전자의 측접(flanking) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 서열의 일부는 유전자로부터 제거된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자 서열의 일부는 FX 또는 GMD 유전자로부터 또는 이에 근접해서 제거된다. 일부 구현예에서, 완성된 유전자 서열이 염색체로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 완전한 FX 또는 GMD 서열은 염색체로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 유전자 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자에서의 유전자 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자에 근접한 유전자 결실을 포함한다.
- [0196] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 비활성화되며, 여기서 숙주 세포는 유전자 부가 또는 치환을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "유전자 첨가" 또는 "유전자 치환"은 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기쌍의 삽입 또는 치환을 포함하는, 유전자 서열의 변경을 언급한다. 일부 구현예에서, 유전자의 인트론 서열은 변경된다. 일부 구현예에서, 유전자의 엑손 서열이 변경된다. 일부 구현예에서, 상기 유전자의 프로모터 서열은 변경된다. 일부 구현예에서, 유전자의 측접 서열이 변경된다. 일부 구현예에서, 1개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기쌍이 유전자 서열에 추가된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 연속 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기쌍은 유전자 서열에 첨가된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서의 구현예 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 유전자 부가 또는 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자에서의 유전자 부가 또는 유전자 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자에서의 유전자 부가 및 유전자 치환을 포함한다.
- [0197] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 결실에 의해 비활성화되며, 이때 유전자 서열에서 적어도 1개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기쌍의 결실로 비-관능성 유전자 생성물이 생성된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 결실에 의해 비활성화되며, 이때 유전자 서열에 대한 적어도 1개 뉴클레오티드의 결실로 더 이상 고유 유전자 생성물 관능 또는 활성을 갖지 않는 유전자 생성물이 생성된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 결실에 의해 비활성화되며, 이때 유전자 서열에 대한 적어도 1개 뉴클레오티드의 결실로 이관능성 유전자 생성물이 생성된다.
- [0198] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 부가 또는 치환에 의해 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 유전자 서열로 적어도 1개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 염기쌍의 부가 또는 치환으로 비-관능성 유전자 생성물이 생성된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 비활성화에 의해 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 유전자 서열에 대한 적어도 1개 뉴클레오티드의 혼입 또는 치환으로 더 이상 고유 유전자 생성물 관능 또는 활성을 갖지 않는 유전자 생성물이 생성된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 유전자 부가 또는 치환에 의해 비활성화되며, 이때 FX 또는 GMD 유전자 서열로 적어도 1개 뉴클레오티드의 혼입 또는 치환으로 이관능성 유전자 생성물이 생성된다.
- [0199] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 비-관능성 FX 또는 GMD 유전자 생성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 고유 FX 또는 GMD 유전자 생성물 작용 또는 활성을 각각 갖지 않는 FX 또는 GMD 유전자 생성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 기능이상성 FX 또는 GMD 유전자 생성물을 포함한다.
- [0200] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자를 포함하며, 이때 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자는 전장 및 관능성, FX 또는 GMD 유전자 생성물 (예: 전장 FX 또는 GMD 폴리펩티드 서열)을 각각 발현하지 않을 것이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자를 포함하며, 여기서 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자는 내인성 FX 또는 GMD 유전자 생성물 서열을 각각 발현하지 않을 것이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자를 포함하며, 여기서 상기 비활성화된 FX 또는 GMD 유전자는 변이체 FX 또는 GMD 유전자 생성물을 각각 발현할 것이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 변이체 FX 또는 GMD 유전자 생성물을 포함한다.
- [0201] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 전달 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 구현예에서, 전달 벡터는 아데노바이러스이다. 일부 구현예에

서, 벡터는 프로모터를 포함한다.

- [0202] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 무변성 녹다운 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 무변성 FX 또는 GMD 녹다운 세포주이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 일시적 녹다운 세포주이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 일시적 FX 또는 GMD 녹다운 세포주이다.
- [0203] 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 유전자는 소간섭 RNA (siRNA) 시스템에 의해 비활성화된다. FX 또는 GMD 유전자 비활성화에 적합한 siRNA 서열을 동정하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, FX 또는 GMD 유전자를 표적화하기 위한 siRNA를 개발하고 동정하기 위한 일반 고려사항은: a) 바람직하게 길이가 21 내지 23 개 뉴클레오티드(이어서 필요한 만큼 서열 길이의 감소)인 제1 검색 서열, b) 개시 코돈 및 말단 코돈의 50 내지 100개 염기쌍내 회피 영역, c) 회피 인트론 영역, d) 4개 이상의 염기, 예를 들어, AAAA의 회피 스트레치, e) 30 % 미만 또는 60 % 초과인 GC 함량을 갖는 회피 영역, f) 회피 반복부 및 낮은 서열 복잡체, g) 회피 단일 뉴클레오티드 다형태 부위, 및 h) 다른 오프-표적 유전자에서의 서열에 상보적인 회피 서열을 포함한다. *참고*: 예컨대, Rules of siRNA design for RNA interference, Protocol Online, May 29, 2004; 및 Reynolds et al., Nat Biotechnol, 22, 2004.
- [0204] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 siRNA 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 길이가 약 10 내지 200개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 30개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 30개 뉴클레오티드인 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 대략 10-25개 뉴클레오티드인 siRNA 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 대략 15-25개 뉴클레오티드인 siRNA 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 적어도 약 10, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 또는 적어도 약 25개 뉴클레오티드인 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD pro-mRNA 분자 영역에 적어도 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상보성인 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 RNA 분자를 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 RNA 분자를 포함하는 siRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다.
- [0205] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 siRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 siRNA 시스템을 숙주 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 여기서 siRNA 시스템은 siRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기천공을 사용하여 숙주 세포에 siRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 형질감염 기술을 사용하여 숙주 세포에 siRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 바이러스를 사용하여 숙주 세포에 siRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다.
- [0206] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성을 측정하는 것은, siRNA 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포에 전달하기 전에 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성을 측정하는 것은, siRNA 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포에 전달한 후에 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 RNA 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, PCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부

구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 단백질 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, 면역조직화학을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 웨스턴 블롯을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 유동 세포측정을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은 siRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 대조군 값과 비교함에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은 siRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 야생형 값과 비교함에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은, siRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 FX 또는 GMD siRNA의 전달 이전 FX 또는 GMD 활성의 수준과 각각 비교함에 의하여 측정된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 FX 또는 GMD 유전자의 발현 수준, 예컨대 FX 또는 GMD RNA 및/또는 단백질의 발현을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 FX 또는 GMD 단백질의 발현을 기반으로 한다.

[0207] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 shRNA 시스템을 사용하여 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 길이가 약 10 내지 200개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 100개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 60개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 50개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 10 내지 30개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 15 내지 30개 뉴클레오티드인 shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 대략 10-25개 뉴클레오티드인 shRNA 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 대략 15-25개 뉴클레오티드인 shRNA 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 길이가 적어도 약 10, 적어도 약 15, 적어도 약 20, 또는 적어도 약 25개 뉴클레오티드인 shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD mRNA 분자 영역에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD pro-mRNA 분자 영역에 적어도 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 100% 상보성인 shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이 중 가닥 RNA 분자를 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 RNA 분자를 포함하는 shRNA 시스템을 사용한 FX 또는 GMD 유전자를 비활성화시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 제조 방법이 제공된다.

[0208] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 shRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포의 제조 방법이 제공되며, 이는 shRNA 시스템을 숙주 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 여기서 shRNA 시스템은 shRNA 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기천공을 사용하여 숙주 세포에 shRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 형질감염 기술을 사용하여 숙주 세포에 shRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 바이러스를 사용하여 숙주 세포에 shRNA 시스템을 전달하는 단계를 포함하는, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0209] 일부 구현예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 숙주 세포는 실질적으로 FX 활성이 없거나, 또는 실질적으로 GMD 활성이 없고, 이는 숙주 세포 내 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성을 측정하는 것은, shRNA 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포에 전달하기 전에 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성을 측정하는 것은, shRNA 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포에 전달한 후에 FX 또는 GMD 활성의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 RNA 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, PCR을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 단백질 수준에서 측정된다. 일부 구현예에서, 면역조직화학을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 웨스턴 블롯을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을

계측하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 유동 세포측정을 사용한 FX 또는 GMD 활성 수준을 계측하는 단계를 포함하는, FX 또는 GMD 활성 수준을 계측하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은 shRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 대조군 값과 비교함에 의하여 계측된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은 shRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 야생형 값과 비교함에 의하여 계측된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성의 수준은, shRNA의 전달 후 FX 또는 GMD 활성의 수준을 FX 또는 GMD shRNA의 전달 이전 FX 또는 GMD 발현의 수준과 각각 비교함에 의하여 계측된다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 FX 또는 GMD 유전자의 발현 수준, 예컨대 FX 또는 GMD RNA 및/또는 단백질의 발현을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, FX 또는 GMD 활성 수준은 FX 또는 GMD 단백질의 발현을 기반으로 한다.

- [0210] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 이외의 다른 비활성화된 유전자를 추가로 포함한다.
- [0211] 일반적으로, 숙주 세포는 원하는 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터에 의해 형질감염시킨다. 게다가, 본 출원의 숙주 세포는 블랭크 숙주 세포일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "블랭크 숙주"는 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 함유하지 않는 세포를 언급한다. 일부 구현예에서, 블랭크 숙주 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 블랭크 숙주 세포는 마우스 세포이다.
- [0212] 또한 본원에 기재된 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 본 발명에 의해 제공되는 핵산 분자는 모두 단일-가닥 및 이중-가닥 형태뿐만 아니라, 상응하는 상보성 서열인 DNA 및 RNA를 포함한다. DNA는 예를 들어, cDNA, 게놈 DNA, 화학적으로 합성된 DNA, PCR에 의해 증폭된 DNA 및 이의 조합물을 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 전장 유전자 또는 cDNA 분자 및 이의 단편의 배합물을 포함한다. 본 명세서에 제공된 핵산은 우선적으로 인간 공급원으로부터 유래된다.
- [0213] 특정 구현예에서, 핵산은 실질적으로 내인성 물질의 오염으로부터 간섭받지 않는다. 핵산 분자는 바람직하게는 표준 생화학적 방법(예컨대 하기에서 개괄된 방법들)에 의해 그의 성분 뉴클레오티드 서열의 동정, 가공 및 회수를 가능하게 하는 양 또는 농도로, 실질적으로 순수한 형태로 1 회 이상 단리된 DNA 또는 RNA로부터 유도된 것이다: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989). 상기 서열은 바람직하게는 통상 진핵생물 유전자에 존재하는 내부 비-번역된 서열, 또는 인트론에 의해 간섭받지 않는 개방 판독 프레임(open reading frame)의 형태로 제공되고/되거나 작제된다. 번역되지 않은 DNA 서열은 개방 판독 프레임으로부터 5' 또는 3'에 존재할 수 있으며, 이때 이들은 암호화 영역의 가공 또는 발현을 간섭하지 않는다.
- [0214] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단백질을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 Fc-함유 단백질을 발현시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 Fc-함유 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단백질을 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 Fc-함유 단백질을 분비할 수 있다.
- [0215] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자 비활성화 전에 유사한 숙주 세포의 생산 속도로 단백질을 발현시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자 비활성화 전에 상동한 숙주 세포의 생산 속도로 단백질을 발현시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 FX 또는 GMD 유전자 비활성화 전에 숙주 세포의 생산 속도의 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%로 단백질을 발현시킬 수 있다.
- [0216] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 추가로 유전자 변형을 포함한다. 유전자 변형을 통한 단백질의 제조 목적을 위한 숙주 세포의 최적화는 당업계에서 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 통합 방법을 위한 벡터 선택 성질 및 단백질의 제조를 위해 가공할 필요가 있는 임의의 다른 세포 성질에 속하는 고려사항을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 표적화된 유전자 변형이다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 녹아웃 유전자 변형이다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 녹-인(knock-in) 유전자 변형이다.
- [0217] 또한, FX 또는 GMD 활성을 계측하는 단계를 포함하는 단백질 발현의 적합성에 대해 숙주 세포를 평가하는 방법이 제공되고, 여기서, FX 또는 GMD 활성의 감소된 수준이 적합성을 지적하는 것이다.
- [0218] **세포는 단백질을 생산하기 위해 가공된다.**
- [0219] 본원은 일부 측면에서 본원의 구현예에 기재된 바와 같은 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포를 제공한다. 본원은 일부 측면에서 본원의 구현예에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0220] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단백질을 생산하도록 가공된다.
- [0221] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 단백질을 생산하도록 가공된 숙주 세포를 제조하기 위한 방법이 제공된다:

a) 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 변형시키는 단계.

- [0222] 발현 벡터를 사용하여 숙주 세포를 변형시키기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 참고: 예를 들어, Kim *et al.*, *Anal Bioanal Chem*, 397, 2010. 숙주 세포를 형질감염시키기 위한 방법은 형질감염, 감염, 인산칼슘 공-침전, 전기천공, 미세주사, 지질감염, DEAE-텍스트란 매개된 형질감염, 또는 다른 공지된 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 선택된 방법은 부분적으로 사용되는 숙주세포의 유형의 기능일 것이다. 이들 방법 및 다른 적합한 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.
- [0223] 본원에 기재된 적어도 하나의 단백질을 포함하는, 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 발현 시스템 및 작제물이 또한 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트는 적어도 하나의 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0224] 일부 구현예에서, 숙주 세포에 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 특정 구현예에서, 집약적으로 "측접 서열"로 언급되는 상기 서열은 통상 1개 이상의 하기 뉴클레오티드 서열을 포함할 것이다: 프로모터, 1개 이상의 인핸서(enhancer) 서열, 복제 기점, 전사 종결 서열, 공여체 및 수용체 스플라이스 부위를 함유하는 완결 인트론 서열, 폴리펩티드 분비를 위한 리더 서열을 암호화하는 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 단백질을 암호화하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역, 및 선택 가능한 마커 요소. 이들 서열은 각각 하기에서 논의된다.
- [0225] 측접 서열은 동종성 (즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주로부터), 이종성 (즉, 숙주 세포 종 또는 균주와 다른 종으로부터), 하이브리드 (즉, 1개 이상의 공급원으로부터의 측접 서열의 조합), 합성 또는 고유 상태일 수 있다. 또한, 측접 서열의 공급원은 진핵세포 유기체, 임의의 척추동물 또는 무척추동물 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있되, 단 측접 서열은 숙주 세포 기작에서 작용하고, 이에 의해 활성화될 수 있다.
- [0226] 본 발명의 벡터에서 유용한 측접 서열은 당업계에 공지된 몇 가지 방법 중 임의의 방법에 의해 수득될 수 있다. 전형적으로, 본원에 유용한 측접 서열은 맵핑에 의해 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 종래에 확인된 것일 수 있고, 이에 따라 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직 공급원으로부터 단리될 수 있다. 일부 경우에서, 측접 서열의 전체 뉴클레오티드 서열이 공지될 수 있다. 본원에서, 측접 서열은 핵산 합성 또는 클로닝을 위한 본원에 기재된 방법을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0227] 측접 서열중 모두 또는 단지 일부만이 알려져있든지 간에, 그것은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용하고/하거나, 동일하거나 다른 종으로부터 올리고뉴클레오티드 및/또는 측접 서열과 같은 적절한 프로브에 의해 게놈 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득할 수 있다. 측접 서열이 알려지지 않은 경우, 측접 서열을 함유하는 DNA의 단편은 예를 들어, 암호화 서열 또는 심지어 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 더 큰 DNA 조각으로부터 단리될 수 있다. 단리는 적절한 DNA 단편을 생성하기 위해 제한 엔도뉴클레아제 소화, 이후 아가로스 겔 정제, Qiagen® 칼럼 크로마토그래피 (Chatsworth, CA), 또는 당업자에게 공지된 다른 방법을 사용하는 단리에 의해 달성될 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위한 적절한 효소의 선별은 본 기술분야의 당업자에게 용이하게 자명할 것이다.
- [0228] 복제 기원은 통상 상업적으로 구입되는 부분 발현 벡터이고, 기원은 숙주 세포에서 벡터의 증폭을 돕는다. 선택된 벡터가 복제 부위의 기점을 함유하지 않으면, 공지된 서열에 기초하여 화학적으로 합성할 수 있고, 벡터에 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 다양한 바이러스 기원 (예: SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 또는 유두종 바이러스 (예: HPV 또는 BPV))이 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는데 유용하다. 일반적으로, 복제 성분의 개시점은 포유동물 발현 벡터에 대해 필요로 되지 않는다 (예를 들면, SV40 개시점은 대개 단독으로 사용되고, 이는 또한 바이러스 초기 프로모터를 함유하기 때문이다).
- [0229] 전사 종료 서열은 전사를 종료시키는 역할을 하며, 폴리펩티드 암호화 영역의 단부 3'에 전형적으로 위치한다. 서열이 라이브러리로부터 용이하게 클로닝되거나 심지어 벡터의 일부로서 상업적으로 구입되지만, 그것은 또한 본 명세서에 기술된 것들과 같은 핵산 합성을 위한 방법을 사용하여 용이하게 합성할 수 있다.
- [0230] 선택 가능한 마커 유전자는 선택 배양 배지에서 성장시킨 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 암호화한다. 통상적인 선택 마커 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소에 대한 내성을 부여하거나; (b) 세포의 영양요 구성 결핍을 보완하거나; 또는 (c) 착화합물 또는 한정 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다. 특정 선택 가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유용하게는, 네오마이신 내성 유전자가 또한 진핵 숙주 세포에서 선택을 위해 사용될 수 있다.

- [0231] 다른 선택 가능 유전자가 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 생존에 중요한 단백질 제조에 필요한 유전자가 재조합 세포의 연속적 세대의 염색체 내에서 동시에 되풀이되는 과정이다. 포유동물 세포에 대한 적합한 선별 마커의 예는 디하이드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 및 프로모터 없는 티미딘 키나제 유전자를 포함한다. 포유동물 세포 변형체는 선택 압력 하에 배치되고, 여기서 단지 변형체가 벡터 내에 존재하는 선별 유전자로 인해 생존되도록 특이적으로 적용된다. 선택 압력은 배지중 선택 제제의 농도가 연속적으로 증가되는 조건하에 형질전환된 세포를 배양하고, 이에 의해 다른 유전자 (예: 항체 경쇄 또는 중쇄)를 암호화하는 DNA 및 선택 가능한 유전자 모두의 증폭을 유도함으로써 부과된다. 결과적으로, 증가된 폴리펩티드 양이 증폭된 DNA로부터 합성된다.
- [0232] 리보솜-결합 부위는 대개 mRNA의 번역 개시에 필요하고, 예를 들어, Kozak 서열에 의해 특성화된다. 상기 요소는 전형적으로 프로모터의 3'에 그리고 발현되는 폴리펩티드의 암호화 서열의 5'에 위치한다. 특정 구현예들에 있어서, 하나 이상의 암호화 영역은 내부 리보솜 결합 부위 (IRES)에 작동가능하도록 연계될 수 있고, 이로 인하여 단일 RNA 전사체로부터 2개의 개방 판독 프레임의 해독이 가능하다.
- [0233] 본 발명의 발현 및 클로닝 벡터는 통상 숙주 유기체에 의해 인식되고 폴리펩티드를 암호화하는 분자에 작동가능하게 결합된 프로모터를 함유할 것이다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 조절하는 구조 유전자의 개시 코돈 (일반적으로 약 100 내지 1000 bp 이내)에 대해 상류 (즉, 5')에 위치한 비전사 서열이다. 프로모터는 통상적으로 유도성(inducible) 프로모터 및 구성(constitutive) 프로모터의 2 가지 분류중 하나로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건, 예컨대 영양소의 존재 또는 부재 하의 일부 변화 또는 온도의 변화에 대한 반응시의 이의 조절 하에서 DNA로부터의 증가된 수준의 전사를 개시한다. 한편, 구성 프로모터는 유전자 발현의 제어 없이 또는 거의 없이, 이에 작동가능하게 연계된 유전자를 균일하게 전사한다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 알려져 있다. 적절한 프로모터는 제한 효소 분해에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고, 원하는 프로모터 서열을 벡터에 삽입시킴으로써, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 DNA에 작동가능하게 결합시킨다.
- [0234] 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터가 또한 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 유리하게는 효모 인핸서가 효모 프로모터와 함께 사용된다. 포유동물 숙주 세포와 함께 사용하기에 적합한 프로모터는 익히 공지되어 있고, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예: 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 심미안 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터 수득된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 적합한 포유동물 프로모터는 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들면, 열-충격 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.
- [0235] 관심있을 수 있는 추가의 프로모터는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 다음을 포함한다: SV40 초기 프로모터 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); CMV 프로모터 (Thomsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터 (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터 (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); 메탈로티오닌 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열 (Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); 또는 tac 프로모터 (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). 조직 특이성을 나타내고 형질전환 동물에 이용되어 온, 하기 동물 전사 조절 영역이 또한 관심 대상이다: 돼장 선방 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역 (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Omitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 돼장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역 (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122); 림프성 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역 (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); 고환, 유방, 림프 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유방 종양 바이러스 조절 영역 (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1 :268-276); 간에서 활성인 알파-페타-단백질 유전자 조절 영역 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); 간에서 활성인 알파 1-항트립신 유전자 조절 영역 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171); 골수성 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 조절 영역 (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); 뇌의 희소돌기아교세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역 (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역 (Sani, 1985, Nature 314:283-286); 및 시상하부에서 활성인 생식선자극 방출 호르몬 유전자 조절 영역 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378).

- [0236] 인헨서 서열은 고등 진핵세포에 의한 본 발명의 경쇄 또는 중쇄를 암호화하는 DNA의 전사를 증가시키기 위해 벡터에 삽입될 수 있다. 인헨서는 일반적으로 전사를 증가시키기 위해 프로모터에 대해 작용하는 길이가 약 10-300 bp인 DNA의 시스-작용 요소이다. 인헨서는 비교적 배향 및 위치에 무관하며, 전사 단위체에 대해 위치 5' 및 3'에서 모두 발견되었다. 포유동물 유전자로부터 이용가능한 몇몇 인헨서 서열이 알려져 있다 (예: 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파페토-단백질 및 인슐린). 전형적으로, 그러나, 바이러스로부터의 인헨서가 사용된다. 당해 기술 분야에 공지된 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서는 진핵세포 프로모터의 활성화를 위한 예시적인 향상 요소이다. 인헨서는 암호화 서열에 대해 5' 또는 3'로 벡터에 위치할 수 있지만, 통상적으로 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다. 적절한 원상태 또는 이중성 신호 서열 (리더 서열 또는 신호 펩티드)을 암호화하는 서열은 항체의 세포외 분비를 촉진하기 위해 발현 벡터로 혼입될 수 있다. 신호 펩티드 또는 리더의 선택은 항체가 생성되는 숙주세포의 유형에 좌우되고, 이중성 신호 서열은 원상태 신호 서열을 대체할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 작용하는 신호 펩티드의 예는 다음을 포함한다: 미국 특허 제4,965,195호에 기술된 인터류킨-7 (IL-7)에 대한 신호 서열; 문헌(Cosman et al., 1984, Nature 312:768)에 기술된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; 유럽 특허 제0367 566호에 기술된 인터류킨-4 수용체 신호 펩티드; 미국 특허 제4,968,607호에 기술된 타입 I 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드; 유럽 특허 제0 460 846호에 기술된 타입 II 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드.
- [0237] 상기 벡터는 이 벡터가 숙주 세포 계통에 통합될 때 발현을 촉진시키는 하나 이상의 요소를 포함할 수 있다. 예시는 하기를 포함한다: EASE 요소 (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19: 1433-38) 및 기질 부착 영역 (MAR). MAR은 염색질의 구조적 조직을 매개하며, "위치" 효과로부터 통합된 벡터를 분리할 수 있다. 따라서, MAR은 특히 벡터가 무변성 형질감염체를 생성하기 위해 사용되는 경우에 유용하다. 다수의 천연 및 합성 MAR-함유 핵산은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062).
- [0238] 본 발명에 의해 제공되는 발현 벡터는 출발 벡터 (예: 시판용 벡터)로부터 작제될 수 있다. 이러한 벡터는 모든 목적하는 측점 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 본원에 기재된 하나 이상의 측점 서열이 벡터에 이미 존재하지 않는 경우, 그들은 개별적으로 수득되고 벡터 내로 결합될 수 있다. 측점 서열 각각을 수득하기 위해 사용되는 방법은 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0239] 벡터가 작제되어 단백질 서열을 암호화하는 핵산 분자를 벡터의 적절한 부위로 삽입시킨 후, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현에 적합한 숙주 세포로 삽입시킬 수 있다.
- [0240] 단백질, 예컨대 Fc-함유 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 제조하는 방법은 본 분야에 잘 공지되어 있다. **참고:** 예컨대, 미국 특허 번호 7,923,221.
- [0241] 단백질 및 원하는 암호화 및 조절 서열을 포함하는 적절한 벡터의 작제는 표준 결합 기술을 사용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편은 절단되고, 재단되고, 요구되는 플라스미드를 형성하기 위해 목적하는 형태로 재연결된다. 사용되는 방법은 DNA 공급원 또는 의도된 숙주에 의존하지 않는다.
- [0242] 일부 구현예에서, 단백질을 제조하는 방법이 제공되며, 이는 숙주 세포 내로의 도입을 위하여 폴리뉴클레오티드의 최적 비율을 계측하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 질량 분광측정을 사용하여 단백질 수율을 계측하고 상기 비율을 조정하여 단백질 수율을 최대화한다. 일부 구현예에서, 이중 항원 ELISA가 단백질 수율, 예컨대 Fc-함유 단백질 수율을 측정하는데 사용되며, 그 비는 단백질 수율을 최대화하도록 조절된다.
- [0243] **정제**
- [0244] 본원에 기재된 방법은 일부 양상에서 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 단백질을 단리하기 위한 방법을 추가로 포함한다.
- [0245] 단백질의 수득 방법이 당해 분야에 잘 공지되어 있다. **참고:** 예컨대, Huse et al., *J Biochem Bioph Meth*, 51, 2002. 단백질은 세포내로 생성되거나 또는 배지에 직접적으로 분비될 수 있다. 단백질이 세포내 제조된다면, 제 1 단계로서, 미립자 과편, 숙주 세포 또는 용해된 단편이, 예를 들어, 원심분리 또는 환외여과에 의해 제거된다. 단백질이 배지로 분비된다면, 상기 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 먼저 시판용 단백질 농도 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 환외여과 단위체를 사용하여 농축시킨다. 일부 구현예에서, 프로테아제 억제제가 가단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계중 어느 하나에 포함될 수 있고, 항생제는 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

- [0246] 세포로부터 제조된 조성물은, 예를 들어, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제시킬 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. Fc-함유 단백질의 경우, 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 Fc-함유 단백질에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 좌우된다. 단백질 A는 1, 2 또는 4개의 중쇄를 함유하는 인간 면역글로불린을 기반으로 하는 Fc-함유 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있다 (참고: 예컨대, Lindmark *et al.*, *J Immunol Meth*, 62, 1983). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 3에 대해 추천된다 (참고: 예컨대, Guss *et al.*, *EMBO*, 5, 1986). 친화성 리간드가 부착되는 기질은 종종 아가로오이지만, 다른 기질이 이용가능하다. 기계적으로 무변성인 기질, 예를 들면, 제어된 구멍 유리 또는 폴리(스티렌-디비닐)벤젠은 아가로오스로 달성될 수 있는 것보다 더욱 빠른 유속 및 더욱 짧은 처리 시간을 허용한다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어, 이온-교환 칼럼상의 분별화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카상 크로마토그래피, 헤파린상 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지상 SEPHAROSE™ 크로마토그래피 (예: 폴리아스파르트산 칼럼), 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수될 단백질에 따라 이용가능하다.
- [0247] 일부 구현예에서, 필터를 사용함을 포함하는, 단백질을 정제하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 필터는 정용여과 시스템이다. 일부 구현예에서, 필터는 한외여과 시스템이다. 일부 구현예에서, 필터는 바이러스 여과 시스템이다. 일부 구현예에서, 단백질을 정제하는 것은 일련의 여과 단계를 사용함을 포함한다. 일부 구현예에서, 일련의 여과 단계는 정용여과, 한외여과 및 바이러스 여과 중 적어도 하나로부터 선택된다.
- [0248] 일부 구현예에서, 단백질의 정제 방법이 제공되며, 이는 여과, 단백질 A 정제, 양이온 교환 정제, 강양이온 교환 정제, 음이온 교환 정제, 역상 정제 및 멀티모드 정제로부터 선택된 일련의 단백질 정제 기술의 사용을 포함한다.
- [0249] **조성물**
- [0250] 본 출원은, 일부 양태에서, 글리칸 구조물을 포함하는 단백질을 제공하며, 여기서 상기 단백질은 본원에 개시된 방법 중 임의의 것에 의하여 생산된, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태로 소정의 비율로 존재한다.
- [0251] 일부 구현예에서, 단백질은 Fc-함유 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 하나 이상의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 2개의 Fc 도메인을 포함한다.
- [0252] 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 중쇄 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 적어도 하나의 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 하나 이상의 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 2개의 중쇄를 포함한다.
- [0253] 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 전장 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 인간 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 단클론성 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 키메라 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 전장 항체는 다중특이적 항체이다.
- [0254] 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 Fc-함유 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질은 하나 이상의 Fc 도메인을 포함한다.
- [0255] 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질의 Fc 도메인은 Fc-함유 융합 단백질의 혈장 반감기를 연장시킨다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질의 Fc 도메인은 Fc-함유 융합 단백질의 생물학적 활성을 연장시킨다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질의 Fc 도메인은 Fc-함유 융합 단백질의 신장 청소율을 감소시킨다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질의 Fc 도메인은 Fc-함유 융합 단백질의 용해도를 증가시킨다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질의 Fc 도메인은 Fc-함유 융합 단백질의 안정성을 증가시킨다.
- [0256] Fc-함유 융합 단백질은 당업계에 널리 공지되어 있다. 참고: 예컨대, Czajkowsky *et al.*, *EMBO Mol Med*, 4, 2012, 1015-1028. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질은 면역접합체이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질은 사이토카인-Fc 융합 단백질이다.
- [0257] 일부 구현예에서, 단백질은 다량체성 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 다합체(multimeric) 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 융합 단백질은 다합체(multimeric) 단백질이다.
- [0258] 일부 구현예에서, 단백질은 제제에 콘주게이트된다. 일부 구현예에서, 단백질은 한 제제의 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 분자에 콘주게이트된다. 일부 구현예에서, 단백질은 한 제제의 약 2-10, 약 4-10, 약

6-10 또는 약 8-10개 분자에 콘주게이트된다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 한 제제에 콘주게이트되며, 이때 제제는 Fc-함유 단백질의 Fc 도메인에 콘주게이트된다. 일부 구현예에서, 제제는 치료학적 제제이다. 일부 구현예에서, 치료학적 제제는 소분자 치료학적 제제이다. 일부 구현예에서, 치료학적 제제는 화학요법 제제이다. 일부 구현예에서, 제제는 검출제이다. 일부 구현예에서, 검출제는 방사성표지이다. 일부 구현예에서, 검출 제제는 형광성 표지이다. 일부 구현예에서, 검출제는 면역표지이다. 일부 구현예에서, 단백질은 동반진단 (companion diagnostic)이다. 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질은 동반진단(companion diagnostic)이다.

[0259] 일부 구현예에서, 단백질은 번역-후 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 번역후 개질은 비-효소적으로 일어난다. 일부 구현예에서, 번역후 개질은 효소적으로 일어난다. 일부 구현예에서, 해독 후 변형은 디설파이드 쌍형성, 탈아미드화, 산화 및 N-말단 글루타민 환화로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0260] 일부 구현예에서, Fc-함유 단백질과 같은 단백질은 HER 수용체 계열의 구성원, 예를 들어, HER1 (EGFR), HER2, HER3 및 HER4; CD 단백질, 예를 들어, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD22, 및 CD34; 세포 접착 분자, 예를 들어 LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM 및  $\alpha$  또는  $\beta$  또는 하부단위를 포함하는 av/p3 인테그린 (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 마크로과아지 수용체, 예를 들어 CRIG, 종양 괴사 인자, 예를 들어 TRAIL/Apo-2, 성장 인자, 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); IgE; 혈액 그룹 항원; flk2/flt3 수용체; 비만 (OB) 수용체; 및 단백질 C를 제한없이 포함하는 임의의 단백질에 결합하거나 이와 상호작용할 수 있다. 다른 예시적 단백질은 인간 성장 호르몬 (hGH) 및 소 성장 호르몬 (bGH)을 포함하는 성장 호르몬(GH); 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질;  $\alpha$ -1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예를 들어, 인자 VIIIC, 조직 인자, 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예를 들어, 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화 인자, 예를 들어, 우로키나제 또는 조직 유형 플라스미노겐 활성화인자 (t-PA); 봄바진; 트롬빈; 종양 괴사 인자- $\alpha$  및  $-\beta$ ; 엔케팔리나제; RANTES (정상적으로 T-세포 발현되고 분비되는 활성화에 대해 조절된); 인간 마크로과아지 염종 단백질 (MIP-1- $\alpha$ ); 혈청 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민 (HSA); 물레리안-역제 물질; 리랙신 A-쇄; 리랙신 B-쇄; 프로리랙신; 마우스 고나도트로핀-연합된 펩티드; DNase; 인히빈; 액트빈; 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양인자, 예를 들어, 골-유래된 신경영양인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예를 들어, NGF- $\beta$ ; 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF); 섬유아세포 성장 인자, 예를 들어, aFGF 및 bFGF; 상피 성장 인자 (EGF); TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3, TGF- $\beta$  4, 또는 TGF- $\beta$  5를 포함하는 TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ 와 같은 형질전환 성장 인자 (TGF); 인슐린형 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I); 인슐린형 성장 인자 결합 단백질 (IGFBP); 에리트르포이에틴 (EPO); 트롬보 포이에틴 (TPO); 골유도 인자; 면역독소; 골 형태형성 단백질 (BMP); 인터페론, 예를 들어, 인터페론- $\alpha$ ,  $-\beta$ , 및  $-\gamma$ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어, IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 부패 가속화 인자 (DAF); 바이러스 항원, 예를 들어, AIDS 외피 부분; 수송 단백질; 귀소 수용체 (homing receptor); 아드레신; 조절 단백질; 면역접합체 (immunoadhesin); 항체; 및 상기 열거된 임의의 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0261] 많은 다른 항체 및/또는 다른 단백질은 본 발명에 따라 사용될 수 있고 상기 목록은 제한하는 것으로 의미되지 않는다.

[0262] 본원은 일부 양상에서 상기된 임의의 방법에 의해 제조된 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 본원은 또 다른 양상에서 NK 세포 및 PMN 세포에 의해 매개되는 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 조성물은 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 탈푸코실화 형태와 푸코실화 형태의 단백질을 포함한다.

[0263] 일부 구현예에서, 푸코실화 형태의 단백질은 글리칸 구조물의 환원 말단에서 푸코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 푸코실화 형태는 글리칸 구조물의 환원 단부에서 푸코스를 포함하며, 여기서 상기 푸코스는 상기 글리칸 구조물의 환원 단부의 제1 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 모이어티에 공유 부착된다. 일부 구현예에서, 글리칸 구조물은 글리칸 구조물의 환원 말단에서 푸코스 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 모이어티는 글리칸 구조물에 공유 결합되는 단일 푸코스 분자이다. 일부 구현예에서, 글리칸 구조물은 L-푸코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 2개 이상의 글리칸 구조물을 포함한다.

[0264] 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 저장을 위한 형태로 존재한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 제품 수송을 위한 형태로 존재한다. 일부 구현예에서, 약제학적

조성물은 동결시킨다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 동결건조된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 재구성된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 투여 조성물이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 형태로 존재한다.

- [0265] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 멸균 약제학적 조성물이다. 멸균 약제학적 제제는 당업자에게 공지된 약제학적 등급 멸균화 표준 (예를 들어, 미국 약전(United States Pharmacopeia) 챕터 797, 1072, 및 1211; California Business & Professions Code 4127.7; 16 California Code of Regulations 1751, 21 Code of Federal Regulations 21, 또는 ex-U.S. 상기 규제에 대한 대응물)에 따라 혼합되거나 제조된다.
- [0266] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 무변성 제형이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "무변성" 제형은 그 안의 단백질이 저장시 필수적으로 물리적 및 화학적 안정성과 완전성을 유지하는 것이다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석적 기술은 당업계에서 가용하고 예를 들어, 문헌 [Jones, *Adv Drug Delivery Rev*, 10, 1993]에서 검토된다. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된 온도에서 평가할 수 있다. 예를 들어, 저장 도중 응집 정도가 단백질 안정성의 척도로서 사용될 수 있다. 따라서, "무변성" 제형은, 약 10% 미만 및 바람직하게는 약 5% 미만의 단백질이 상기 제형 내 응집물로서 존재할 수 있는 것이다.
- [0267] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 재구성된 제형이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "재구성된 (reconstituted)" 제형은 단백질이 철저히 분산되도록 동결건조된 단백질 제형을 희석제에 용해시킴으로써 제조된 것이다. 재구성된 제형은 이를 필요로 하는 개체로의 투여 (예를 들어, 정맥내 또는 피하 투여)를 위해 적합하다.
- [0268] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 등장성 제형이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "등장성(isotonic)" 제형은 필수적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 갖는 것이다. 등장성 제제는 일반적으로, 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 용어 "저삼투압"은 인간 혈액의 것 미만의 삼투압을 갖는 제형을 기술한다. 상응하게, 용어 "고삼투압"은 인간 혈액의 것 초과 삼투압을 갖는 제형을 기술하기 위하여 사용된다.
- [0269] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 특정화된 pH에서 존재한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5-7, 약 5-6, 또는 약 5-5.5의 pH에 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5.3의 pH로 존재한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5.4의 pH로 존재한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 pH 조절된다.
- [0270] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분 이외의 다른 약제학적 조성물 중 성분을 언급한다. 약제학적으로 허용가능한 담체에는 비제한적으로, 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제가 포함된다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 이용된 복용량 및 농도에서 수형체에 일반적으로 비독성이고, 비제한적으로 하기를 포함한다: 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 당당류, 이당류, 및 글루코오스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제 예컨대 EDTA; 당류 예컨대 슈크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들면 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본원에서 예시적 약제학적으로 허용가능한 담체는 간질 약물 분산제, 예를 들어, 가용성 중성-활성 하이알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어, 인간 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질, 예를 들어, rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체는 나트륨 아세테이트, 슈크로스, 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20), 나트륨 숙시네이트, 히스티딘 HCl, 및 염화나트륨으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0271] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 산을 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 산"은 그들이 제형화된 농도 및 방식에서 비독성인 무기 및 유기산을 포함한다. 예를 들어, 적합한 무기 산은 하기를 포함한다: 염산, 과염산, 브롬화수소산, 아이오딘화수소산, 질산, 황산, 설폰산, 설피산, 설파닐산, 인산, 탄산 등. 적합한 유기 산은 하기를 포함하는 직쇄 및 분지형-쇄 알킬, 방향족, 환형, 지환족, 아릴지방족, 헤테로환, 포화, 불포화, 단일, 디- 및 트리-카르복실산을 포함한다: 예를 들어, 포름산, 아세트산, 2-하이드록시아세트산, 트리플루오로아세트산, 페닐아세트산, 트리메틸아세트산, t-부틸 아세트산, 안트라닐산, 프로판산, 2-하이드록시프로피온산, 2-옥소프로피온산, 프로판디온산, 사이클로

펜탄프로피온산, 사이클로펜탄 프로피온산, 3-페닐프로피온산, 부탄산, 부탄디오산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 2-아세톡시벤조산, 아스코브산, 신남산, 라우릴 황산, 스테아르산, 무콘산, 만델산, 석신산, 엠본산, 푸마르산, 말산, 말레산, 하이드록시말레산, 말론산, 락트산, 시트르산, 타르타르산, 글리콜산, 글리콘산, 글루콘산, 피루브산, 글리옥살산, 옥살산, 메실산, 석신산, 살리실산, 프탈산, 팔모산, 팔메산, 티오시안산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄디설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, p-톨루엔설폰산, 캄포르설폰산, 4-메틸바이사이클로[2,2,2]-옥트-2-에네-1-카복실산, 글루코헵톤산, 4,4'-메틸렌비스-3-(하이드록시-2-에네-1-카복실산), 하이드록시나프토산.

[0272] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 염기를 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 염기"는 그들이 제형화된 농도 및 방식에서 비독성인 무기 및 유기 염기를 포함한다. 예를 들어, 적절한 염기는 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄, N-메틸글루카민, 모르폴린, 피페리딘과 같은 금속을 형성하는 무기 염기 및 1차, 2차 및 3차 아민, 치환된 아민, 사이클릭아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-디에틸아미노에탄올, 트리메타민, 디사이클로헥실아민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 푸린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘 및 폴리아민 수지 등을 포함하는 유기 비독성 염기로부터 형성되는 것들을 포함한다. 특히 바람직한 유기 비독성 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메타민, 디사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0273] 본 발명과 함께 사용가능한 추가의 약제학적으로 허용가능한 산 및 염기는 하기로부터 유도된 것들을 포함한다: 아미노산, 예를 들어, 히스티딘, 글리신, 페닐알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 및 아스파라긴.

[0274] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 완충제 또는 염, 예를 들어, 상기 지적된 산 및 염기의 산 및 염기 부가염으로부터 유래된 것들을 추가로 포함한다. 특정 완충제 및/또는 염은 히스티딘, 숙시네이트 및 아세테이트를 포함한다.

[0275] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 당을 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 당"은 단백질과 혼합된 경우, 저장시 단백질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 상당히 방지하거나 감소시키는 분자이다. 제형이 냉동건조되고, 이후 재구성될 것으로 의도되는 경우, "약제학적으로 허용가능한 당"은 또한 "동결건조보호제"로서 공지될 수 있다. 예시적인 당 및 그들의 상응하는 당 알콜은 다음을 포함한다: 아미노산(예: 일나트륨 글루타메이트 또는 히스티딘); 메틸아민(예: 베타인); 유방성(lyotropic) 염(예: 황산마그네슘); 폴리올(예: 3가 또는 더 큰 분자량의 당 알콜, 예를 들어, 글리세린, 텍스트란, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨); 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; PLURONICS®; 및 이들의 조합. 추가의 예시적 동결보호제는 글리세린 및 젤라틴, 및 당, 펠리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트리오스 및 스타키오스를 포함한다. 환원 당의 예시는 하기를 포함한다: 글루코오스, 말토스, 락토스, 말투로스, 이소-말투로스, 및 락투로스. 비-환원 당의 예시는, 당 알코올 및 기타 직쇄 폴리알코올로부터 선택된 폴리하이드록시 화합물의 비-환원 글리코시드를 포함한다. 바람직한 당 알코올은 모노글리코시드, 특히 이당류 예컨대 락토스, 말토스, 락투로스, 및 말투로스의 환원에 의하여 수득된 화합물이다. 글리코시드 측면 기는 글루코시드류, 또는 갈락토시드류일 수 있다. 당 알코올의 추가 예시는 글루시톨, 말티톨, 락티톨 및 이소-말투로스이다. 바람직한 약제학적으로-허용가능한 당은 비-환원 당 트레할로오스 또는 수크로오스이다. 약제학적으로 허용가능한 당은, "보호량" (예컨대 사전-동결건조)으로 상기 제형에 첨가되며, 이는 단백질이 저장 동안 (예컨대 재구성 및 저장 후) 이의 물리적 및 화학적 안정성 및 온전성을 유지한다는 것을 의미한다.

[0276] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 보존제"는 세균 활성을 감소시키기 위하여 본 원의 제형에 부가될 수 있는 화합물이다. 잠재적인 보존제의 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬 그룹이 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물) 및 벤즈에토늄 클로라이드를 포함한다. 다른 유형의 보존제는 방향족 알코올, 예를 들면, 페놀, 부틸 및 벤질 알코올, 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤, 카데콜, 레소르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올, 그리고 m-크레졸을 포함한다.

[0277] 일부 구현예에서, 복수의 단백질을 포함하는 조성물은 세포 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 영양 배지이다. 영양 배지는 숙주 세포 성장을 위해 필요한 모든 요소를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 배양

배지는 최소 배지이다. 최소 배지는 예를 들어, 일반적으로 아미노산의 존재 없이 숙주 세포 성장을 위해 가능한 최소 영양물을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 선택 배지이다. 선택적 배지는 선택 유기체의 성장을 억제하는 제제를 포함한다.

- [0278] 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 세포 지지 및/또는 성장을 위한 세포 배양 배지 영양소를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지 영양물은 예를 들어 하기로부터 선택된다: 단백질; 펩티드; 아미노산; 탄수화물; 금속 및 무기물, 예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 철; 미량의 금속, 예를 들어, 포스페이트 및 셀레이트; 완충제; pH 지시기, 예를 들어, 페놀 레드, 브로모-크레졸 퍼플; 및 항미생물제.
- [0279] 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 숙주 세포를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 실질적으로 숙주 세포가 없다.
- [0280] 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 푸코스 공급원을 포함한다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스이다. 일부 구현예에서, 푸코스는 L-푸코스-1-포스페이트이다. 일부 구현예에서, 푸코스 공급원은 GDP-푸코스이다.
- [0281] 일부 구현예에서, 조성물은 세포 용해물이다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 다수의 단백질 및 숙주 세포 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 원심분리된 세포 용해물이다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 세포 용해물의 침전 부분 및 세포 용해물의 상층 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 세포 용해물의 펠릿화 부분 및 세포 용해물의 상층 부분을 포함한다.
- [0282] 일부 구현예에서, 조성물은 단백질 정제 칼럼으로부터의 용리액이다. 본원에 사용된 바와 같은 "용리액"은 단백질 정제 칼럼을 통과하는 임의의 유체를 언급한다. 일부 구현예에서, 용리액은 통류 유체로부터 단리된 유체를 포함한다. 일부 구현예에서, 용리액은 세척 유체로부터 단리된 유체를 포함한다. 일부 구현예에서, 용리액은 하나 이상의 세척 유체로부터 단리된 유체를 포함한다. 일부 구현예에서, 용리액은 용출 유체로부터 단리된 유체를 포함한다.
- [0283] 일부 구현예에서, 상기 조성물은 단백질 라이브러리이고, 여기서, 다수의 단백질 중 적어도 2개는 상이하다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 상이한 항원에 결합하는 적어도 2개의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 상이한 에피토프에 결합하는 적어도 2개의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상이한 단백질은 상이한 용기에 함유된다. 일부 구현예에서, 본 발명은 적어도 2, 3, 4, 5, 10, 30, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 250000, 500000, 750000, 1000000, 2500000, 5000000, 7500000, 10000000, 또는 10000000개 초과 상이한 단백질을 포함하는 라이브러리를 제공한다.
- [0284] 본원은 본원의 구현예에 기재된 임의의 조성물의 대규모 배치 (예를 들어, 상업적 배치 또는 제조 규모에서 배치)를 제공한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배치는 소정의 비율로 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 배치는 둘 다 NK 세포 및 PMN 세포에 의해 매개되는 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 배치는 소정의 비율로 푸코실화 형태와 탈푸코실화 형태의 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 배치는 둘 다 NK 세포 및 PMN 세포에 의해 매개되는 증진된 ADCC 작용을 갖는 항체를 포함한다.
- [0285] 일부 구현예에서, 배치는 적어도 약 5 g, 10 g, 50 g, 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1,000 g, 1,500 g, 2,000 g, 2,500 g, 3,000 g, 3,500 g, 4,000 g, 4,500 g, 또는 5,000 g의 단백질을 포함하며, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다. 일부 구현예에서, 배치는 적어도 약 5-5,000 g, 50-4,000 g, 또는 약 100-1,000 g의 단백질을 포함하며, 여기서 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다.
- [0286] 일부 구현예에서, 배치는 약물 저장을 위한 형태로 존재한다. 일부 구현예에서, 배치는 제품 수송을 위한 형태로 존재한다. 일부 구현예에서, 배치는 이를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 형태로 존재한다. 일부 구현예에서, 배치는 동결건조시킨다. 일부 구현예에서, 배치는 제제에 콘주게이트되지 않는다. 일부 구현예에서, 배치는 제제에 콘주게이트된다. 일부 구현예에서, 배치는 제제 성분을 추가로 포함한다.
- [0287] 일부 구현예에서, 배치는 세포 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 배치는 세포 용해물이다.
- [0288] 일부 구현예에서, 배치 또는 이의 일부는 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, 배치 또는 이의 일부는 바이알에 존재한다. 일부 구현예에서, 배치 또는 이의 일부는 다수의 바이알에 존재한다. 일부 구현예에서, 배치 또는 이의 일부는 시린지에 존재한다.

- [0289] 일부 구현예에서, 배치 또는 이의 부분은 복수의 바이알 내에 존재하며, 여기서 각 바이알은 단백질을 포함하며, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다. 일부 구현예에서, 상기 배치 또는 이의 부분은 복수의 바이알 내에 존재하며, 여기서 상기 바이알 중 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 소정의 비율로 존재하는 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태를 포함한다.
- [0290] 일부 구현예에서, 배치는 단위 용량으로 분취된다. 본원에 사용된 바와 같은 "단위 용량"은 단일 단위 용량으로서 투여하기 위해 의도된 단백질의 양이다. 일부 구현예에서, 단일 단위 용량은 약 1 내지 약 500 mg의 단백질이다. 일부 구현예에서, 단위 투여량은 용기에 포장된다. 일부 구현예에서, 단위 투여량은 바이알에 포장된다.
- [0291] 일부 구현예에서, 상업적 배치의 크기는 임상적 배치 크기의 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 이하이다. 본원에 사용된 바와 같은 "상업적 배치"는 상업적 생산 및/또는 분배의 목적을 위해 완료된 하나 이상의 생산 수행 동안에 생성된 단백질의 양을 언급한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "임상용 배치(clinical batch)"는 임상적 시험을 위해 완성된 하나 이상의 제조 수행 도중 생성된 단백질의 양을 의미한다. 일부 구현예에서, 상업용 배치의 크기는 임상용 배치 크기의 10배 이하이다.
- [0292] 일부 구현예에서, 용기는 본원에 기술된 상업적 배치의 분취량을 포함하며, 여기서 상기 상업적 배치는 단백질을 포함하는 조성물을 포함하며, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다. 일부 구현예에서, 바이알은 본원에 기술된 상업적 배치의 분취량을 포함하며, 여기서 상기 상업적 배치는 단백질을 포함하는 조성물을 포함하며, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다. 일부 구현예에서, 주사기는 본원에 기술된 상업적 배치의 분취량을 포함하며, 여기서 상기 상업적 배치는 단백질을 포함하는 조성물을 포함하며, 상기 단백질의 푸코실화 및 탈푸코실화 형태는 소정의 비율로 존재한다.
- [0293] **치료 방법**
- [0294] 본 출원은, 일부 양태에서, 본 명세서의 구현예에 기술된 약제학적 조성물을 개체에 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체에서 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0295] 일부 구현예에서, 유효량의 약제학적 조성물이 이를 필요로 하는 개체에 투여되며, 여기서 상기 약제학적 조성물은 소정의 비율로 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태를 포함한다.
- [0296] 일부 구현예에서, 유효량의 약제학적 조성물이 이를 필요로 하는 개체에 투여되며, 여기서 상기 약제학적 조성물은 NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의하여 매개된 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 유효량의 약제학적 조성물이 이를 필요로 하는 개체에 투여되며, 상기 약제학적 조성물은 NK 세포 및 PMN 세포 둘 모두에 의해 매개되는 증진된 ADCC 작용을 갖는 단백질을 포함하며, 상기 약제학적 조성물은 증진된 ADCC 작용을 제공하는 비율로 단백질의 탈푸코실화 및 푸코실화 형태를 포함한다.
- [0297] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 다양한 경로를 통해, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 복강내, 폐내, 경구, 흡입, 소포내, 근육내, 기관내, 피하, 안내, 척추강내 또는 피내로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 정맥내 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 피하 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 국소적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 국소로 투여될 수 있다.
- [0298] 본원의 방법에 의해 치료될 수 있는 질환은 단백질로 치료될 수 있는 임의의 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 질환은 자가면역 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 감염이다.
- [0299] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 또 다른 투여 방식 또는 치료와 조합하여 사용된다.
- [0300] 당업자는 여러 구현예가 본 발명의 범위 및 취지내 가능함을 인식한다. 본 발명은 이제 하기 비-제한적 실시예를 참조로 보다 상세히 기술될 것이다. 아래 예는 본 발명을 추가로 설명하지만, 이는 물론 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0301] **실시예**
- [0302] **실시예 1:**
- [0303] **푸코스 적정에 의해 조정될 수 있는 푸코실화:탈푸코실화 비율로 항체를 각각 발현할 수 있는 FX 녹아웃 CHO 세**

**포주의 개발**

- [0304] 탈푸코실화 형태의 항체의 생물학적 기능에서 변화를 평가하기 위해, 야생형 (푸코실화된) 및 탈푸코실화 형태 둘 다의 항체를 생산할 필요가 있다. 이전에, FUT8 녹아웃 숙주 (FUT8-KO)는 상대적으로 합리적일 수 있는 역할을 갖는 탈푸코실화 형태의 항체를 발현할 수 있는 CHO 세포주를 개발하기 위해 사용되었다 (Malphettes *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 106, **2010**, 774-783). 그러나, FUT8-KO 세포주는 클론의 보다 느린 성장 및 적응율을 갖는 것으로 관찰되었다. 추가로, 또한 야생형 형태 (즉, 탈푸코실화 형태) 중 항체를 생산하는 것은 추가 및 별도의 세포주 개발 (CLD)을 요구한다. 이를 성취하기 위해, 힘들고 진부한 작업인 다수의 클론을 생산하고 스크리닝할 필요가 있고, 생성물 품질을 일치시키는 것과 함께 야생형 및 탈푸코실화 형태의 항체를 생산하는 클론을 수득할 필요가 있다. 보다 더 도전적 과제는 야생형 및 탈푸코실화 형태의 항체를 사용한 임의의 관찰된 차이가 엄격하게 탈푸코실화에 기인할 수 있음을 보장하기 위해 유사하게 충분한 생성물 품질 성질을 갖는 항체를 생산하는 야생형 및 FUT8-KO 클론을 수득하는 것이다.
- [0305] 야생형 및 탈푸코실화 형태의 항체를 생산할 수 있는 단일 세포주는 동일한 생성물 품질 성질을 갖는 항체의 생산을 가능하게 한다. 여기서, 드 노보 경로를 비활성화하고 푸코스의 수준을 조절함에 의해 야생형 푸코실화되고 탈푸코실화 형태의 항체를 생산할 수 있는 세포주를 생산할 수 있는 것으로 추정되었다. GMD 녹아웃 CHO 숙주 세포주의 생성 및 특성화는 이전에 보고되었지만, 성취된 비생산성 (Qp)은 약 16 pg/세포-d로 낮다 (Kanda *et al.*, *J Biotechnol*, 130, **2007**, 300-310). 여기서, 본원 발명자는 CRISPR/Cas9 시스템을 통한 우리의 CHO-K1 숙주 세포주에서 FX 유전자를 녹아웃 시키고 상기 숙주(들)에서 성장, 발현 및 항체의 푸코실화 상태를 평가한다.
- [0306] 결과 :
- [0307] *CRISPR/Cas9 시스템을 사용한 FX 유전자좌의 표적화*
- [0308] FX 유전자좌를 표적화하기 위해, CHO-K1 FX 유전자의 5' 및 3' 암호화 영역을 서열분석하였다. 서열을 사용하여, 서열에 상보적인 가이드-RNA (gRNA) 작제물은 CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하기 위해 설계하였다 (Le Cong *et al.*, *Science*, 339, **2013**, 819-823; Mali *et al.*, *Nat Methods*, 10, **2013**, 957-963). FX 유전자의 5' 및 3' 영역을 축적하는 gRNA 서열을 설계하고 전체 6kb FX 유전자를 결실시키기 위해 등몰 비율로 Cas9 발현 벡터와 함께 동시 형질감염시켰다. 개별 gRNA를 클로닝하고 pLK0.5 벡터 (Cat# SHC-201, Sigma)의 인간 U6 프로모터의 조절하에 발현시켰다. 형질감염 72시간 후, 형질감염된 세포의 풀은 200 µg/ml LCA를 함유하는 배지 (푸코실화된 표면 당단백질을 갖는 세포를 선택하기 위해)에서 선택되었다. QIAGEN 혈액 및 조직 추출 키트 (Cat# 69506) 및 Roche HiFi Taq 폴리머라제 (Cat# 11732650001)는 각각 DNA 추출 및 PCR 분석을 위해 사용하였다. gRNA에 상대적인 외부 및 내부 PCR 프라이머는 각각 야생형 또는 소형-결실을 갖는 것들에 비해 완전한 FX 결실을 갖는 대립형질을 구분하도록 설계하였다 (도 2a). CHO-K1 세포는 gRNA 및 Cas9 발현 벡터로 형질감염시키고 렌즈 콜리나리스 응집소 (LCA)의 존재에서 풀로서 선택되었다. 플루오레세인 (FITC) 콘주게이트된 LCA (LCA-FITC) 시약을 사용하여 유동 분류기에 의해 세포 표면에 푸코실화된 당단백질의 감소를 확인하였다.
- [0309] FX 유전자 결실은 PCR 분석을 통해 확인하였다 (도 2b). gRNA에 대한 내부 프라이머를 사용하여 야생형 대립형질 또는 소형 결실을 갖는 대립형질을 검출하고 외부 프라이머를 사용하여 FX 유전자의 완전한 결실을 갖는 대립형질을 검출하였다.
- [0310] FX 결실을 갖는 풀은 제한된 희석을 통해 클로닝되고 PCR, 형광성-활성화된 세포 분류 (FACS), 및 FX 유전자의 결실을 위한 웨스턴 블롯에 의해 스크리닝된 단일 세포였다. LCA-FITC로 염색된 FXKO 풀-3의 유동 세포측정 분석은 세포 표면에서 푸코실화된 당단백질의 부재/수준의 감소를 확인시켜 주었다 (도 3).
- [0311] *단일 세포 클론의 단리 및 FX 유전자 녹아웃의 확인*
- [0312] FX 유전자가 모든 대립형질에서 녹아웃된 단일 클론을 수득하기 위해, 풀-3으로부터의 세포는 제한된 희석에 의해 클로닝되고 FX 유전자에서 결실에 대한 PCR에 의해 스크리닝된 단일 세포였다 (도 4a). 스크리닝된 클론 중에서, 5개의 클론은 적어도 1개가 결실되도록 가공하고 하나의 야생형 대립형질 및 하나의 클론 (클론-11)은 이의 모든 대립형질에서 완전한 FX 결실을 나타내었다 (도 4a). KO 프라이머 세트에 의해 검출된 PCR 생성물(들)의 존재가 FX 유전자 결실을 지지하고, 야생형 프라이머 세트에 의해 증폭된 PCR 대역의 존재는 필연적으로 FX 유전자가 기능성 단백질을 발현할 수 있음을 반드시 의미하지 않음을 주지한다 (도 2a 및 도 4a). 야생형 프라이머를 위해 설계된 스크리닝 방법은 비기능성 또는 절단된 FX 단백질의 발현 또는 심지어 모두 함께 FX 단백질 발현에서의 결핍을 유도할 수 있는 점 돌연변이 및 소형 결실에 대해 구별하지 못한다. FX 단백질 발현의 결핍

을 확인하기 위해, 상부 6개의 클론은 면역블롯팅 검정에 의해 분석하였고 클론 모두가 FX 단백질 발현이 결핍되었음을 확인하였다 (도 4b). 이것은 FX 유전자가 완전한 대립형질 결실, 또는 결실 및 프레임 전환의 조합을 통해 녹아웃됨을 시사한다. LCA-FITC 염색 및 유동 세포측정을 또한 사용하여 배지 중에 푸코스의 부재 또는 존재에 따라, 이들 클론이 각각 탈푸코실화되거나 푸코실화된 당단백질을 발현할 수 있음을 확인하였다 (도 5a-5f).

[0313] 야생형 또는 탈푸코실화된 항체를 발현하는 FXKO 클론의 평가

[0314] FXKO 숙주 3-5, 3-7, 및 3-11은 구체적으로 이들이 탈푸코실화된 항체를 발현할 수 있음을 보장하기 위해 추가의 평가를 위한 성장 및 생존능 프로파일을 기준으로 선택되었다. 이를 위해, 이들 FXKO 숙주는 항체-A를 발현하는 작제물 및 3주 동안 선택된 풀을 사용하여 형질감염시켰다 (도 6a). 친계 CHO-K1 숙주는 대조군으로서 사용하였고 모든 풀에 대한 항체 발현은 HTRF 검정을 사용하여 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음). 이어서 이들 풀을 사용하여 푸코스의 존재 또는 부재에서 14일 유가식 생산 배양을 설정하였다. 각각의 배양으로부터 발현된 항체-A 분자는 이어서 단백질-A 칼럼을 사용한 배양 배지로부터 정제하였고 이들의 다양한 글리칸 종은 PNGase F 처리 후 모세관 전기영동에 의해 분석하였다 (도 6b). G0-F 글리칸 종 (탈푸코실화된)을 나타내는 주요 피크는 푸코스의 부재하에 모든 FXKO 숙주에 존재하고 푸코스의 존재에서 G0 종은 전기영동도 차트에서 주요 피크를 형성하였다 (도 6b). 각각 FXKO 숙주의 98 % 초과인 모든 항체 글리칸 종의 분석은 이들 모두가 푸코스의 부재하에 탈푸코실화된 항체만을 발현함을 보여주었고 푸코스가 존재하는 경우, 2 % 미만의 항체는 탈푸코실화됨을 보여주었다 (도 6c). 따라서, 푸코스의 부재하에 푸코실화에 대해 결핍이지만, 항체 푸코실화의 공정은 푸코스가 존재하는 경우 FXKO 클론 모두에서 완전하게 회복되었다 (도 6c). FX 유전자는 FXK03-11 숙주의 모든 대립형질에서 완전히 결실하므로 (도 4a), 추가의 연구를 위하여 이러한 숙주를 선택하였다.

[0315] CLD 공정에서 FXKO 숙주 평가

[0316] CLD 동안에 FXK03-11 숙주의 수행능을 평가하기 위해, 상기 숙주는 항체-B 및 선택 마커로서 글루타민 신타제 (GS)를 발현하는 벡터로 형질감염시키고 완전한 CLD를 수행하였다. 상위 24개 클론은 생산 검정에서 평가하였고 3.5-5.5 g/L의 역가를 갖는 것으로 나타났다 (도 7a). 16 pg/세포-일의 최대 Qp를 가진 이전에 보고된 GMD 녹아웃 세포주와 같지 않게 (문헌참조: Kanda et al., J Biotechnol, 130, 2007, 300-310), FXK03-11 클론은 25-130 pg/세포-일 범위의 Qp를 가졌고, 대다수의 클론은 40-70 pg/세포-일의 Qp를 갖는다 (도 7b). 항체-B 발현 FXK03-11 클론은 광범위한 성장 (400만-1800만 세포/ml) 및 14일 생존능 (40-95 %)을 나타내었고, 예상된 바와 같이 보다 높은 Qp를 갖는 클론은 보다 낮은 Qp를 갖는 것과 비교하여 보다 느리게 성장하였다 (도 7c)(추가의 데이터는 나타내지 않음). 추가로, 모든 FXK03-11 클론은 완전하게 탈푸코실화된 항체-B 분자를 발현하였고, 각각의 존재비의 순서로 G0-F로서 다수의 글리코형을 갖는다 (도 7d), G1-F (도 7e), 및 G0-1-F (도 7f). 항체-B의 발현은 또한 독립적으로 동일한 CLD 프로토콜 후 FUT8-KO DP12 숙주에서 평가하였고, 상위 클론은 상위 FXK03-11 클론의 것과 비교하여 30 내지 40 %의 보다 낮은 역가에서 탈푸코실화된 항체-B를 발현한다 (데이터는 나타내지 않음). 이들 발견은 FXKO 숙주가 FUT8-KO 숙주의 것과 비교하여 상응하거나 보다 높은 역가에서 소정의 항체 분자를 발현할 수 있음을 지적하고 야생형 또는 탈푸코실화된 버전 둘 다의 항체를 발현하는 잠재력을 갖는다.

[0317] FXKO 숙주는 유사한 생성물 품질을 갖는 WT 또는 탈푸코실화된 버전 둘 다의 항체를 발현한다.

[0318] 항체-발현 FXKO 클론이 상응하는 생성물 품질을 갖는 야생형 및 탈푸코실화된 버전 둘 다의 동일한 항체를 발현할 수 있는지를 평가하기 위해, 항체-A를 발현하는 FXKO 클론 (도 6a-6c)은 배지에서 1 mM 푸코스의 존재 또는 부재하의 생산 검정에 사용되었다. 항체-A의 % 하전 변이체 및 응집 수준은 배지에서 푸코스의 존재 또는 부재하에 각각의 클론에 대해 유사하였다 (도 8a-8b). 유사한 생산 검정은 1 mM 푸코스의 존재 또는 부재하에 항체-B를 발현하는 2개의 FXKO 클론에 대해 수행하였고 (도 7a-7f), 2개의 클론은 푸코스 수준과는 상관 없이 상응하는 역가를 가졌다 (도 8c). 푸코스의 부재하에, 항체-B의 모든 글리칸 종은 그러나 2개의 클론이 WT 글리칸 종의 정상 및 예상된 분포를 갖는 항체-B를 발현하는 생산 배지의 푸코스 첨가에 의해 탈푸코실화되었다 (도 8d).

[0319] % 하전 변이체 종은 푸코스의 존재 또는 부재하에 2개의 클론 간에 상응할 수 있지만 (도 8e), 본원 발명자는 푸코스가 생산 배지로 첨가되는 경우 % 주요 피크가 약간 보다 높고 (4 %) % 산성 피크는 약간 보다 낮음 (4 %)을 주지하였다 (도 8e). 이것은 항체-A 생산 풀에 대한 상기 거동이 관찰되지 않았음을 주지한다 (도 8a). % 응집물 수준은 푸코스의 존재 또는 부재하에 항체-B 발현 클론에 대해 상응하게 유지되었다 (도 8f).

- [0320] FXKO 숙주는 거의 동일한 생성물 품질과 함께 야생형 및 탈푸코실화된 항체 둘 다를 발현하는 옵션을 제공하기 때문에, 시험관내 및 생체내 항체의 ADCC를 증진시키는데 있어서 탈푸코실화의 역할을 평가하는데 적합하다. 상기 특성은 효과기 기능 또는 독성 연구의 결과가 직접적으로 야생형 및 탈푸코실화된 항체 중의 수준과 연계되고 상이한 클론이 이들 항체를 발현하는 경우 우연히 존재하는 생성물 품질 차이와는 연계될 수 없도록 보장한다.
- [0321] FXKO 숙주는 WT 대 탈푸코실화된 글리코형의 목적하는 비율을 갖는 항체를 발현하기 위해 사용될 수 있다.
- [0322] 완전히 탈푸코실화된 항체 중을 갖는 것이 독성으로 인해 불필요하거나 바람직하지 않을 수 있는 경우에, 독성을 최소화하면서 ADCC의 완전한 효과를 발휘하기 위해 필요한 탈푸코실화된 항체의 수준을 계측하는 것이 이룰 수 있다. FXKO 클론이 탈푸코실화된 글리코형의 목적하는 수준(들)을 갖는 항체를 발현할 수 있는지를 평가하기 위해, 2개의 항체-B 발현 클론은 배지에서 증가하는 수준의 푸코스 (0-1 mM)를 갖는 생산 배양을 확립하기 위해 선택되었다. 본 실험은 배양 중 탈푸코실화된 항체 중의 특정 %에 상응하는 푸코스 공급물의 수준을 미세 조정하기 위해 여러번 수행하였다. 도 6a-6b는 특정 농도의 푸코스의 생산 배지 및 공급물로의 첨가가 야생형 대 탈푸코실화된 항체 수준의 목적하는 비율을 성취하기 위해 사용될 수 있음을 도시한다. 볼러스 공급주입 방법은 이들 실험을 위해 사용되었다. 그러나, 연속 평형 방법이 또한 목적하는 야생형 대 탈푸코실화된 항체 비율을 생성하기 위해 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0323] 다양한 글리칸 종의 수준은 PNGase F 처리에 이어서 모세관 전기영동에 의해 결정되기 때문에, 상기 방법에 의해 0, 1 또는 2개의 탈푸코실화된 글리칸을 갖는 항체 분자의 분획을 결정할 수 없다. 항체 역가와 상관없이 (도 6c), 응집 수준 (도 6d), 및 하전 변이체 % (도 6e)는 생산 배지에서 푸코스 농도와 상관 없이 상응하였다. 전체적으로, 이들 발견은 FXKO 숙주가 독성을 회피하면서 목적하는 ADCC 수준을 계측하기 위해 적합한 야생형 대 탈푸코실화된 글리코형의 목적하는 비율을 갖는 항체를 발현시킴을 도시한다. 추가로, 상응하는 생성물 품질을 갖는 야생형 대 탈푸코실화된 항체의 목적하는 비율은 독성을 최소화하면서 ADCC를 최대화하기 위해 요구되는 탈푸코실화의 수준을 평가하기 위해 푸코스를 생산 배지 및 공급물로 적정함에 의해 성취될 수 있다.
- [0324] 방법:
- [0325] 백터 작제물 및 시약
- [0326] 항상성 항체 발현은 또한 선택을 위해 글루타민 신타제 (GS)의 발현을 지시하는 항체 발현 백터에서 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터의 조절하에 중쇄 및 경쇄 유전자를 클로닝함에 의해 성취되었다. 최종 발현 백터의 어셈블리 및 상기 백터를 사용한 선택은 이전에 기재되었다. 참고: Hu *et al.*, *Biotechnol Progr*, 29, 2013, 980-985. 마우스 항  $\beta$ -액틴 (Sigma, Cat. No. A2228, at 1:30000), 및 FX에 대한 토끼 다클론성 항체 (GeneTex, Cat. No. 101663, at 1:2000)이 면역블롯팅을 위하여 사용되었다. 프로테아제 억제제 콕테일 (Roche, Cat. No. 11-836-153-001)이 용해 완충액에서 사용되었다. 렌즈 쿨리나리스 응집소 (LCA) (Cat. No. L-1040) 및 FITC 콘주게이트된 LCA (LCA-FITC) (Cat. No. FL-1041) 시약이 Vector Laboratories로부터 구매되었다. 푸코스가 하기로부터 구매되었다: Sigma (Cat. No. F2252). 하기의 프라이머는 WT 또는 FXKO 유전자 분절을 증폭시키기 위해 사용하였다:
- [0327] 정방향 WT FX 프라이머: GTCACCCAAAGCTCTCCTTG (서열 번호: 1);
- [0328] 역방향 WT FX 프라이머: AAAAGTCTGCTCTGCTTGC (서열 번호: 2);
- [0329] 정방향 FXKO 프라이머: CTAGGCTTCCCTAGGCCATT (서열 번호: 3); 및
- [0330] 역방향 FXKO 프라이머: GCTATGCCCTTGAGTCTTGG (서열 번호: 4).
- [0331] 면역블롯팅
- [0332] 면역블롯 분석을 위해, 세포는 병상에서 20분 동안 NP40 용해 완충액 (프로테아제 억제제 콕테일과 함께 10 mM Tris, pH 8.0, 0.5 % NP40, 150 mM NaCl, 및 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 중에서 3000만 내지 5000만 세포/ml로 용해시켰다. 이어서, 상기 용해물은 4°C에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고 상등액은 새로운 튜브로 이동시키고 단백질 농도는 BCA 검정에 의해 계측하였다 (Thermo Scientific). 150  $\mu$ l의 각각의 용해물은 50  $\mu$ l의 4X 환원 로딩 완충액과 혼합하고 5분 동안 비등시켰다. 각각의 샘플에 대해 균등한 단백질 농도를 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 (4-20 % Tris-글라이신) 면역블롯팅을 위해 막으로 이동시켰다.
- [0333] LCA-FITC 염색된 세포의 FACS 분석

- [0334] 200,000 세포를 회전 하강시키고 0.5 ml PBS로 1회 세척하고 1 % BSA를 갖는 0.3ml의 PBS 중에 재현탁시켰다. 세포를 병상에서 30분 동안 2 µg/ml의 최종 농도로 LCA-FITC로 염색시켰다. 세포는 이어서 FACS 튜브로 이동시키고 FACSCalibur 분석적 유동 세포측정기를 사용하여 분석하였다 (Becton Dickinson). FlowJo 소프트웨어를 사용하여 모든 샘플을 분석하였다.
- [0335] *세포 배양 및 무변성 형질감염*
- [0336] CHO-K1 숙주 세포는 무혈청 독점 Genentech 배지에서 37 °C 및 5 % CO<sub>2</sub> 에서 배양하였다. Amaxa 뉴클레오펙터 키트-V (Lonza, Cat. No. VCA-1003)를 사용하여 표준 형질감염 프로토콜 후 CHO-K1 세포를 안정하게 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 384-웰 플레이트에 분주하였고 메티오닌 선택소민 (MSX)으로 선택하였다. 3-4주 후에, 1000개의 성장하는 콜로니를 MSX의 존재하에 96-웰 플레이트에 픽킹하였다. 4-5일 후, 픽킹된 콜로니는 균일한 시간-분리된 FRET (HTRF) 검정을 사용한 항체 발현을 위해 검정하였다. 상위 클론은 제한 희석을 사용하여 384-웰 플레이트에 클로닝되고 이어서 이미지화될 단일 세포였다. 3 내지 4주 후 약 700개 성장하는 클론을 96웰 플레이트에 픽킹하고 HTRF 검정에 적용하였다 (4일 내지 6일). 상위 200개 및 후속적 상위 100개 항체-발현 클론은 HTRF를 통해 검정하였다. 클로닝되고 이미지 확인된 상위 48개 단일 세포는 클론이 현탁 성장에 적응하고 이전에 기재된 바와 같이 생산 검정에 평가하였다 (Misaghi *et al.*, *Biotechnol Progr*, 30, **2014**, 1432-1440). 간략하게, 세포는 푸코스의 지정된 양과 함께 생산 배지에서  $1 \times 10^6$  세포/ml로 씨딩하였다. 배양물은 독점 공급 배지 및 푸코스 (지정된 농도에서)를 3, 7, 및 10일째에 주입받았다. 배양 중 생존가능한 세포 계수 (VCC) 및 % 생존능은 Vi-세포 XR 장비 (Beckman Coulter)를 사용하여 0, 3, 7, 10, 및 14일째에 측정하였다. 항체 역가는 생산 배양 (단백질-A 정제)의 7, 10, 및 14일째에 측정하였다. 글루코스 및 락테이트는 Bioprofile 400 분석기 (Nova Biomedical)를 사용하여 7일 및 14일째에 측정하였다. 하전 변이체는 모세관 등-전점 포커싱 (cIEF)을 통해 측정하고 글리칸 서브-타입은 PNGaseF 분해에 이어서 모세관 전기영동에 의해 동정하였다. 응집물의 수준은 단백질-A 정제된 항체를 걸 여과 (크기 배열) 칼럼에 적용함에 의해 측정하였다.
- [0337] **실시예 2:**
- [0338] **FXKO 숙주에서 항체 푸코실화의 조절은 FcγRIII 결합 및 ADCC 수준을 조절할 수 있다.**
- [0339] *방법:*
- [0340] *ADCC 검정*
- [0341] 가공된 NK 세포주 (Roche)를 사용하여 효과기 세포를 제공하고 DELFIA BATDA (Perkin Elmer) 표지된 WIL2-S 세포는 표적 세포로서 사용하였다. 표지된 WIL2-S 표적 세포 ( $2 \times 10^4$ )와 NK 세포 ( $1.0 \times 10^5$ )의 혼합물은 검정 배지 (10 % 열 비활성화된-FBS를 사용한 RPMI 1640, 2 mM L-글루타민, 및 20 mM HEPES, pH 7.2)에서 제조하고 환저 96-웰 조직 배양 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 표적화된 항체 희석액 (100 내지 0.06 ng/mL)을 플레이트에 첨가하고 상기 플레이트는 3시간 동안 항온처리하였다. 세포 용해는 미세플레이트 판독기 SPECTRAMAX® 190 (Molecular Devices)를 사용하여 345 nm에서 여기 및 615 nm에서 방출 정량에 의해 상대적 형광성 단위체 (RFU)로 시간-분리된 형광성을 사용하여 측정하였다. 단지 표지된 표적 세포를 함유하는 웰의 흡광도는 배경 (Background)에 대한 대조군으로서 사용하였고, 반면 DELFIA BATDA 용해 완충액을 사용한 표지된 표적 세포를 함유하는 웰은 최대 가용한 신호를 제공하였다 (Maximum Release). 자발적 방출 (SR)은 단지 표적 세포를 함유하는 웰로부터 측정하고 반면 SR + NK는 항체 없이 표적 및 효과기 세포 둘 다를 함유하는 웰로부터 측정하였다. % 비독성 (% ST)은 하기식에 따라 측정하였다:
- [0342]  $\% ST = \{[(\text{특이적 방출} - \text{배경}) - (\text{자발적 방출} - \text{배경})] \times 100\} / [(\text{최대 방출} - \text{배경}) -$
- [0343]  $(\text{자발적 방출} - \text{배경})]$
- [0344] 용량 반응 곡선은 4-파라미터 피트를 사용하여 ng/mL의 항체 샘플 농도에 대해 3회로부터 평균 % ST를 플롯팅함에 의해 작성하였다. 데이터 분석은 SOFTmaxPROTM으로부터 병행 세포주 분석 곡선 피팅 소프트웨어 (PLA)를 사용하여 수행하였다. 참고: Shatz *et al.*, *mAbs*, 5, 2013, 872-81.
- [0345] *FcγRIII 결합 검정*
- [0346] Biacore T200 장비 (GE healthcare)는 SPR 분석을 위해 사용하였다. 항-His 항체 (R&D Systems)는 50 µg/mL로 희석시키고 아민-커플링 키트 (GE healthcare)를 사용하여 10 µl/분으로 7분 동안 주사함에 의해 Biacore 센서 CM5 칩 (GE healthcare) 상에 고정화시켰다. 각각의 사이클에서, FcγRIIIa-6xHis 태그 단백질 (Genentech)은

샘플 주사 전 포획하였다. Fc $\gamma$ RIIIa-6xHis 태그 단백질은 0.1 % BSA 및 0.05 % Tween 20을 갖는 PBS 중에서 0.5 mg/mL로 희석하고 10  $\mu$ l/분에서 2분 동안 포획하였다. 0.05 % Tween 20을 갖는 PBS 중에서 10  $\mu$ g/ml 항체 농도에서 제조된 샘플은 Fc $\gamma$ RIIIa 결합을 위해 50  $\mu$ l/분으로 5분 동안 주사하였다. 해리 단계는 5분 동안 챔버를 통해 동일한 전개 완충액을 통과시킴에 의해 성취되었다. 모든 실험은 25 °C에서 수행하였다. 각각의 샘플 및 완충액 블랭크의 3회 주사분을 2개의 표면 (참조 유동 세포 및 시험 유동 세포) 상에 유동시켰다. 데이터는 1 Hz의 속도로 수집하였다. 판독은 샘플 주사 종료 5초 전에 연합 상 동안에 최대 결합 반응이었다. 참조 유동 세포는 시험 유동 세포와 연계된 상태로 전개하여 비-특이적 결합의 효과를 무효화시켰다. 추가로, 블랭크 전개 완충액의 주사는 실험 유동 세포 상에 포함시켰다. 참조 유동 세포 및 블랭크 완충액 주사로부터의 신호는 실험적 유동 세포에 대한 샘플 주사의 절대 반응으로부터 공제하였다 (이중 공제 방법). 데이터는 Biacore T200 평가 소프트웨어 및 JMP 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

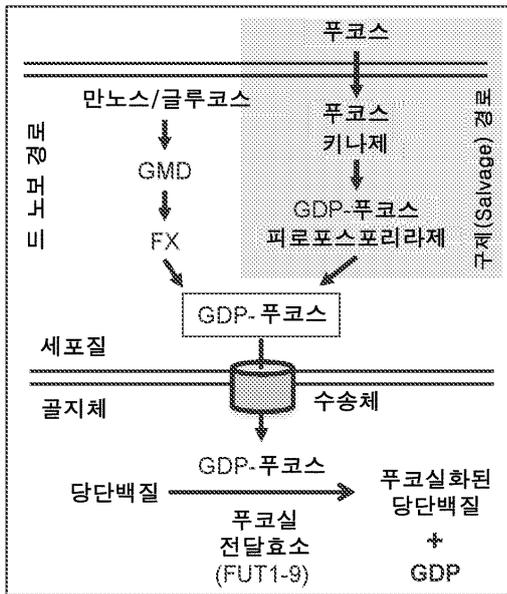
[0347] 결과 :

[0348] 탈푸코실화된 글리코형 대 푸코실화된 글리코형의 상이한 비율을 갖는 항체의 기능을 평가하기 위해, 항체-B 발현 FXKO 클론을 사용하여 상이한 수준의 푸코스 공급물을 사용한 생산 검정을 설정하였다 (도 10a). 생산 동안에 푸코스 공급물의 증가하는 농도는 푸코실화된 항체 종의 수준에서 점진적 증가를 유도하였고 탈푸코실화된 항체 종의 수준은 상응하게 감소하였다. 항체-B는 이어서 이들 배양물로부터 정제하고 NK 세포 결합을 위한 대용물로서 시험관내 Fc $\gamma$ RIII 결합 검정에 적용하였다 (도 10b). 예시된 바와 같이, 푸코실화된 항체 종의 수준의 감소는 Fc $\gamma$ RIII 결합의 감소에 상응한다 (도 10b). 0.025 mM의 푸코스의 농도에서 단지 약 40-50 %의 글리칸이 탈푸코실화되지만, 대략적으로 80 %의 Fc $\gamma$ RIII 결합 경쟁은 무손상 상태로 남아있다. FXKO 숙주 세포는 항체-C (IgG1)를 발현하는 작체물로 형질감염시키고, 이에 대한 기능성 ADCC 검정이 개발되었다. 풀 선택 후, 풀 생산 검정은 푸코스 공급물의 지정된 농도로 수행하여 탈푸코실화된 항체 종 대 푸코실화된 항체 종의 비율이 다양한 항체-C 배양물을 수득하였다 (도 10c). 이들 배양물로부터 정제된 항체-C가 ADCC 검정에 사용되었고 %ADCC 활성과 탈푸코실화된 글리칸 종의 수준 간의 선형 관계가 관찰되었다 (도 10d). 주로 푸코실화된 (1 mM 푸코스) 항체-C 샘플과 완전히 탈푸코실화된 (0 mM 푸코스) 항체-C 샘플의 혼합은 탈푸코실화된 글리칸 종의 수준과 푸코스 적정 차트를 기준으로 (도 10d) 예측가능한 ADCC 반응 (도 10e)을 유발할 수 있다. 이것은 푸코스-공급 방법이 실제로 ADCC를 예측가능한 방식으로 유발하기 위한 푸코실화된 글리칸 종 대 탈푸코실화된 글리칸 종의 유사한 생성물 품질 및 목적하는 분포를 갖는 항체를 생산하기 위해 실행가능한 방법임을 시사한다. 푸코스-공급 방법이 완전히 탈푸코실화된 항체와 주로 푸코실화된 항체 둘 다를 생성하기 위해 요구되는 2개의 별도의 제조 캠페인에 대한 필요성을 제거함을 언급하는 것은 주목할만하다.

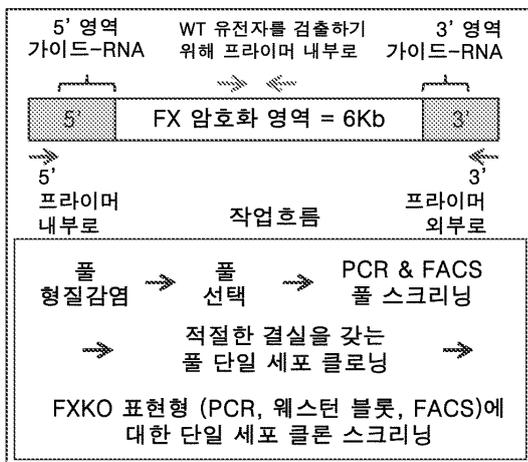
[0349] ADCC 용량-반응 분석은 완전히 탈푸코실화된 항체-C 분자가 이들의 주로 푸코실화된 대응물과 비교하여 20배 낮은 농도에서 최대 ADCC 활성의 50 %를 성취할 수 있음을 보여주었다 (도 10g). ADCC 활성의 거의 80 %가 유지될 수 있고 항체 분자의 60 %만이 탈푸코실화된 글리칸 종을 갖는다는 것을 주목해야 한다 (도 10d, 10e, 및 10f). 추가로, 글리칸의 40 % 미만이 탈푸코실화된 0.02 mM 푸코스 공급물과 함께, 상대적으로 상응하는 % ADCC 활성이 완전히 탈푸코실화된 (0 mM 푸코스) 샘플의 것과 동일한 항체-C 농도로 성취될 수 있다 (도 10g). 따라서, 상기 발견은 거의 최대 수준의 ADCC 활성을 성취하기 위해 100 %의 완전히 탈푸코실화된 항체를 가질 필요성이 없음을 시사한다.

도면

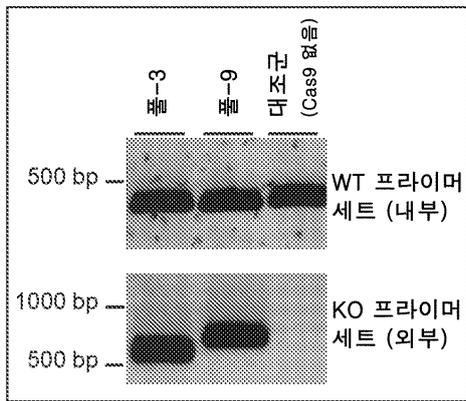
도면1



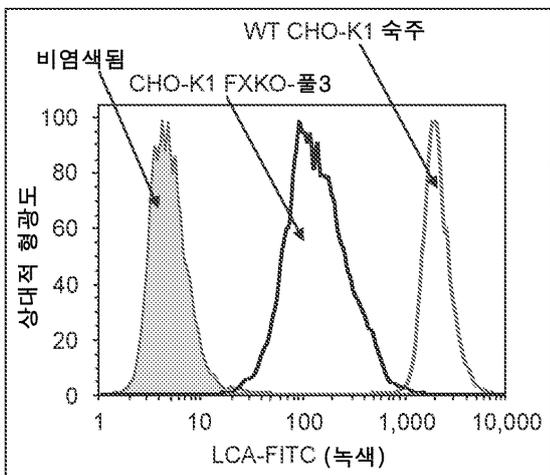
도면2a



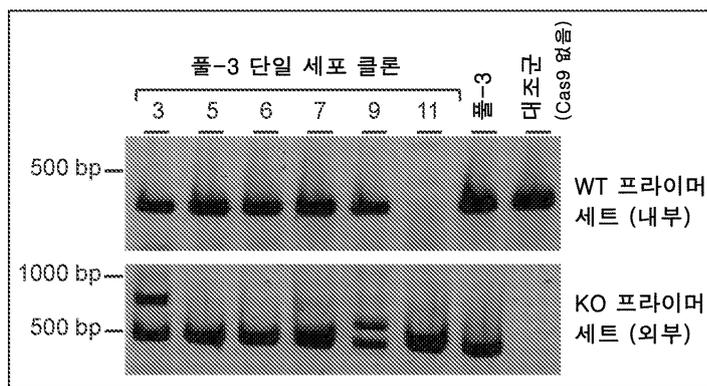
도면2b



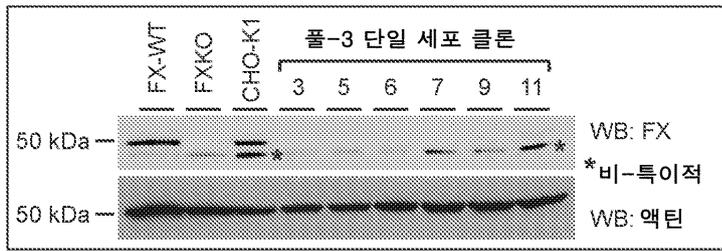
도면3



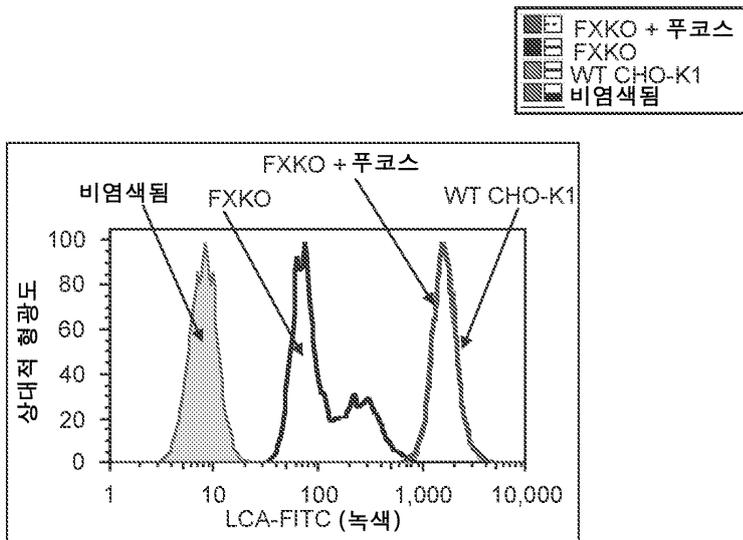
도면4a



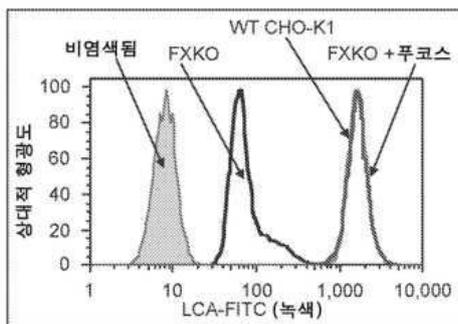
도면4b



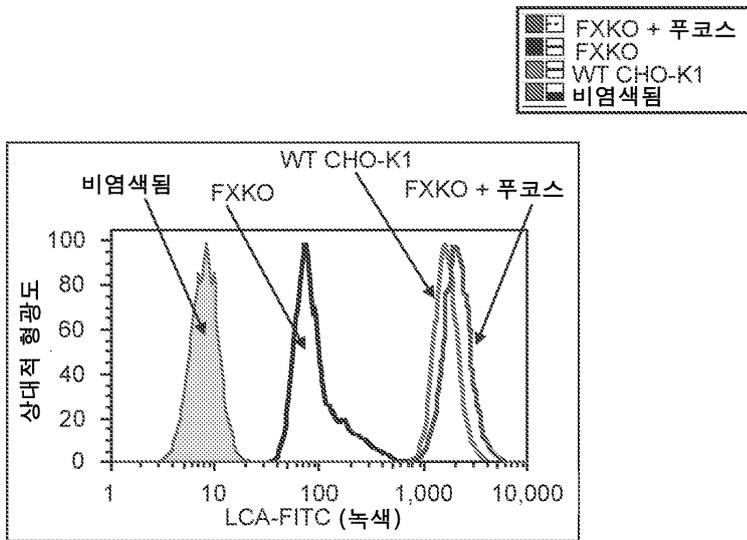
도면5a



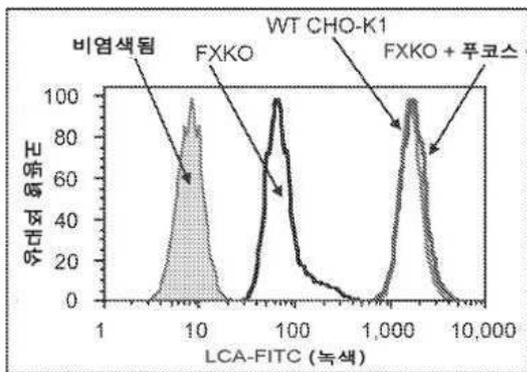
도면5b



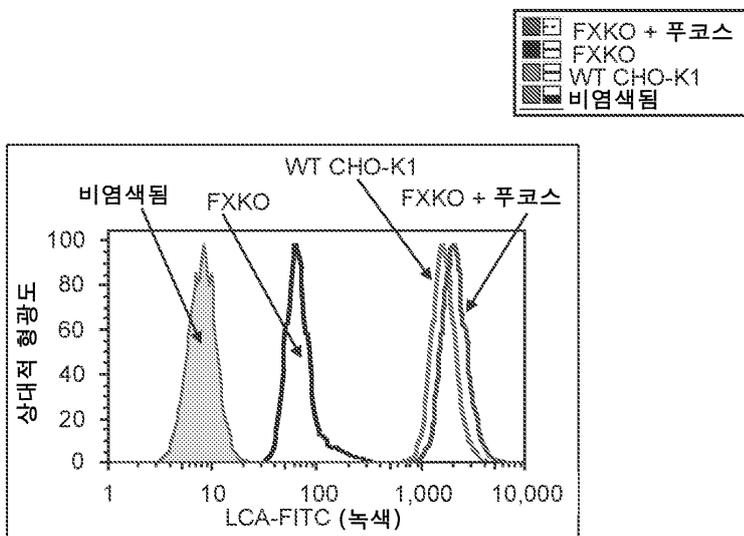
도면5c



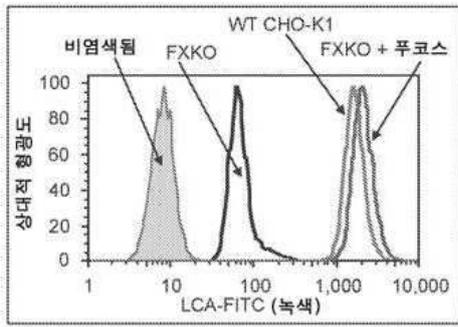
도면5d



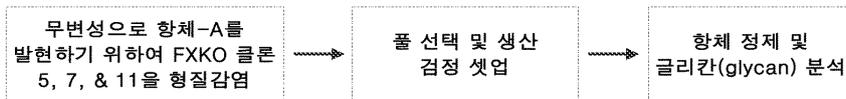
도면5e



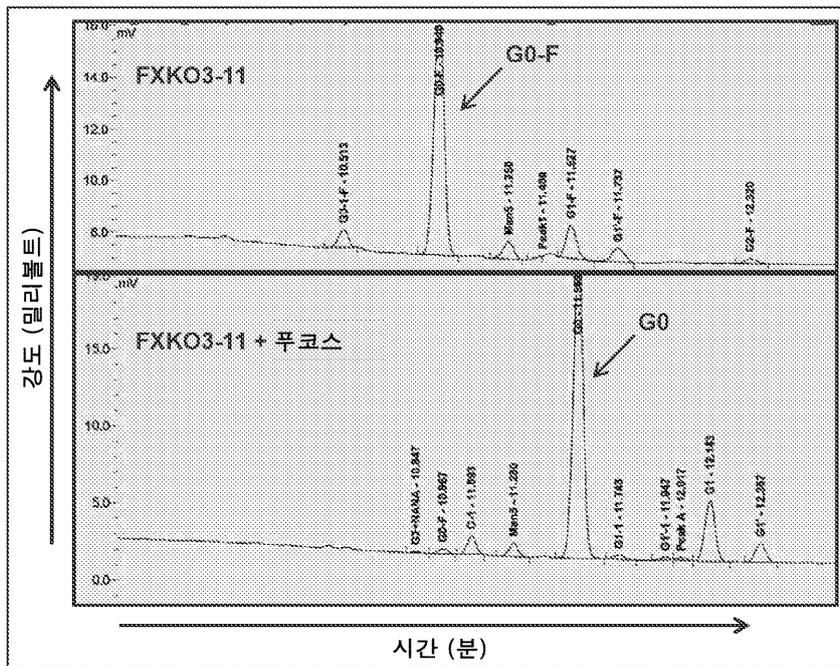
도면5f



도면6a



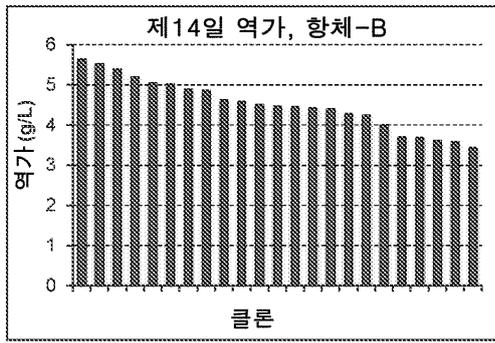
도면6b



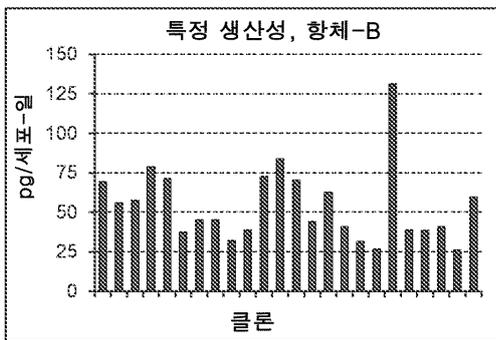
도면6c

글리칸 유형	G-1	G0	G1	G1'	G2	Man5	G0-1-F	G0-F	G1-F	G1'-F	G2-F
FXKO3-5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	5.1	6.2	70.2	11.0	5.1	1.9
FXKO3-7	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	4.7	5.0	68.2	13.3	6.1	2.3
FXKO3-11	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	5.2	5.4	73.1	9.6	4.9	1.6
CHO-K1	9.5	64.6	11.8	4.0	1.5	3.7	n/a	1.4	n/a	n/a	n/a
FXKO3-5 + 푸코스	5.2	64.8	14.8	4.8	2.3	3.2	n/a	1.8	n/a	n/a	n/a
FXKO3-7 + 푸코스	3.7	63.2	18.2	5.6	2.9	2.3	n/a	1.4	n/a	n/a	n/a
FXKO3-11 + 푸코스	4.1	69.0	13.8	4.3	2.3	3.1	n/a	1.2	n/a	n/a	n/a

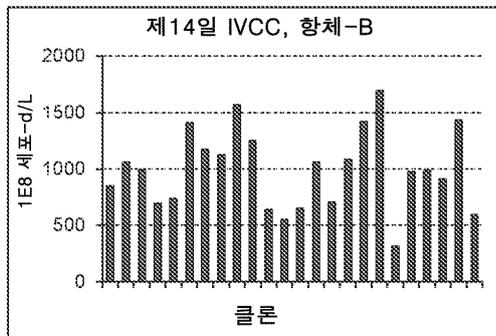
도면7a



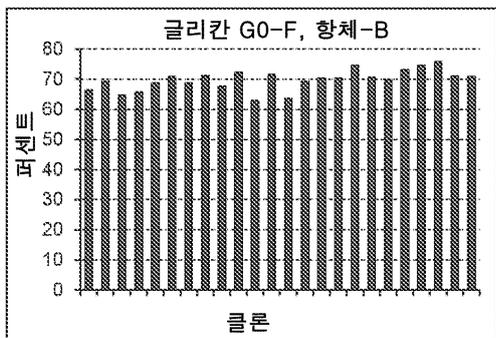
도면7b



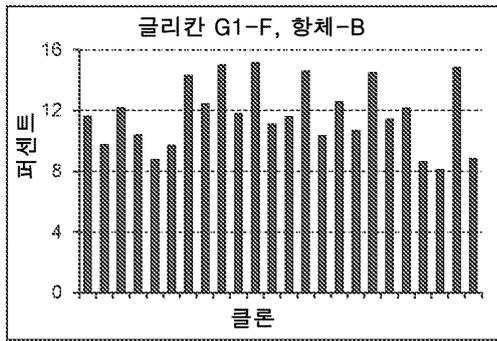
도면7c



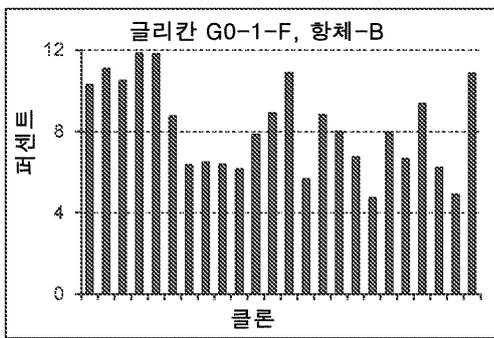
도면7d



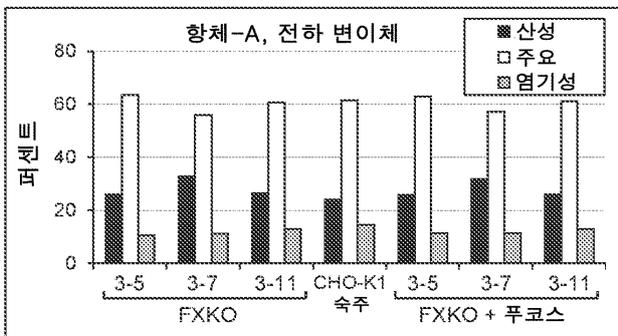
도면7e



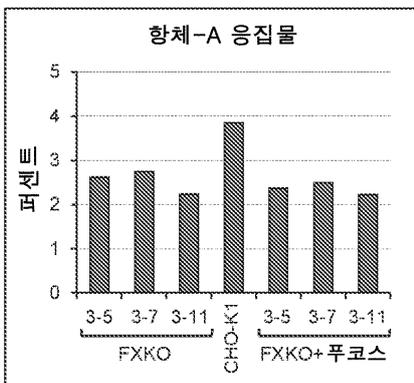
도면7f



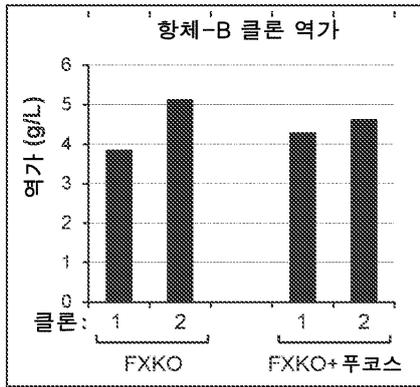
도면8a



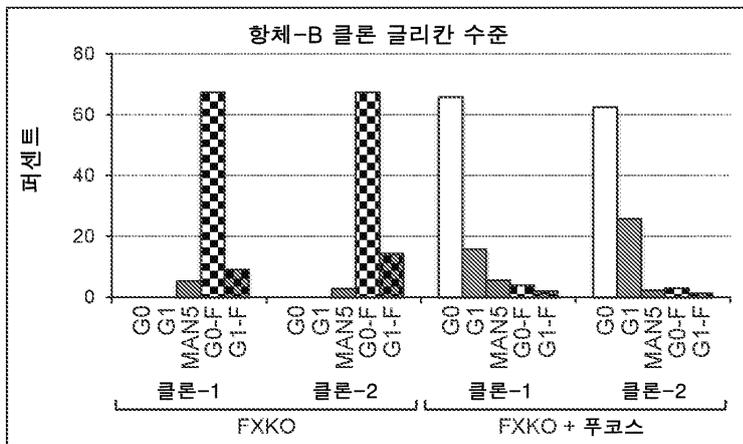
도면8b



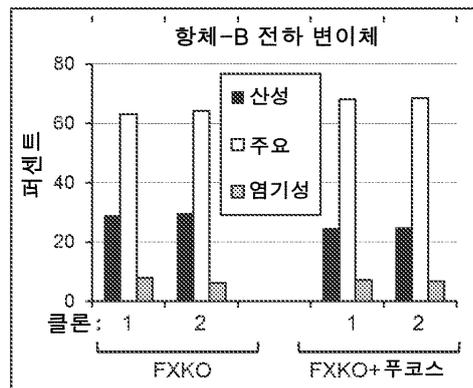
도면8c



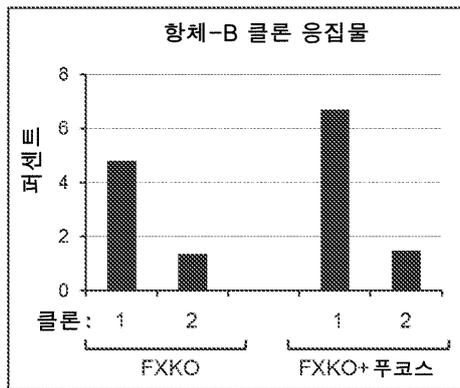
도면8d



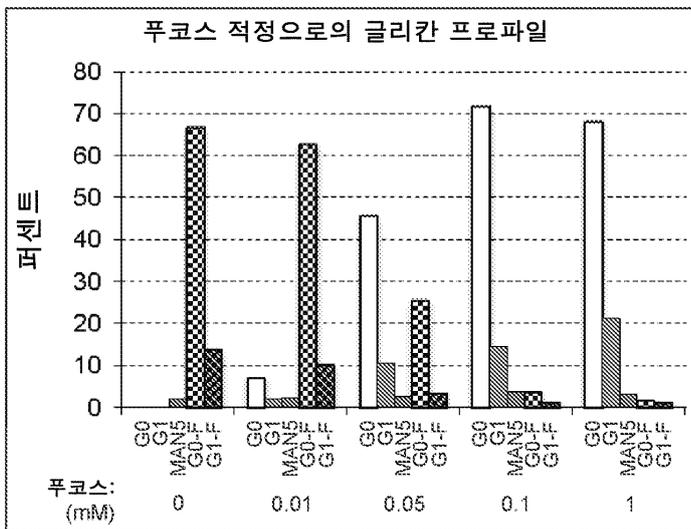
도면8e



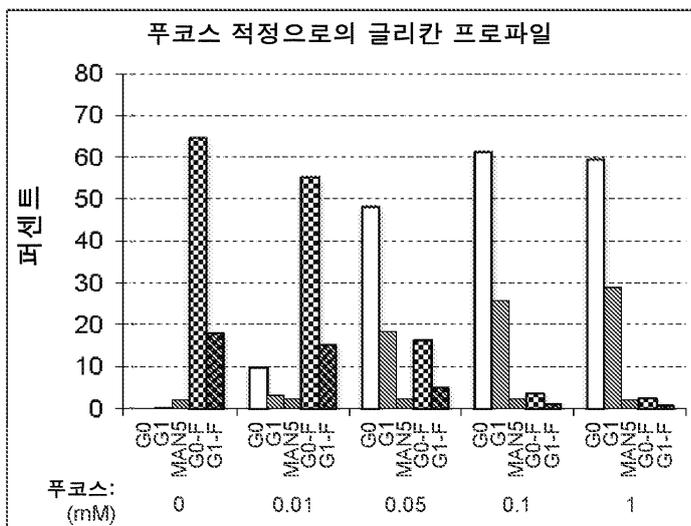
도면8f



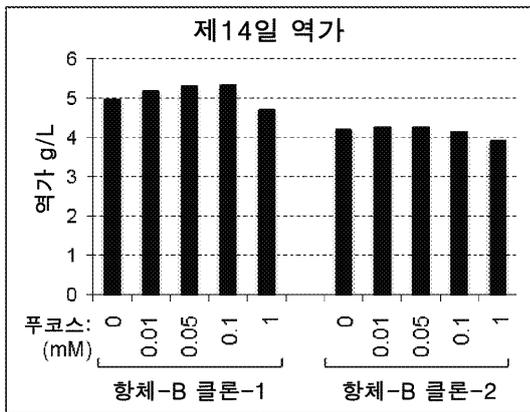
도면9a



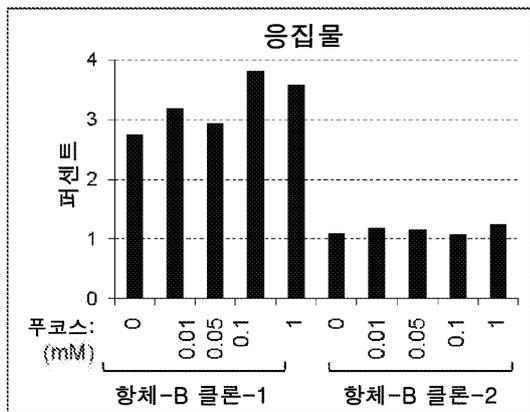
도면9b



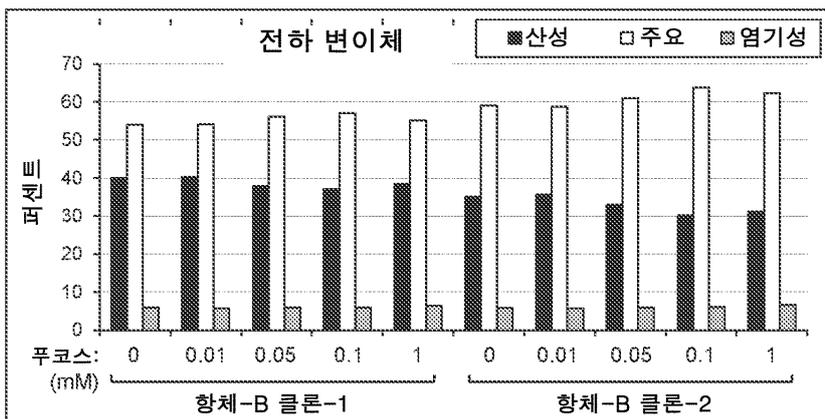
도면9c



도면9d



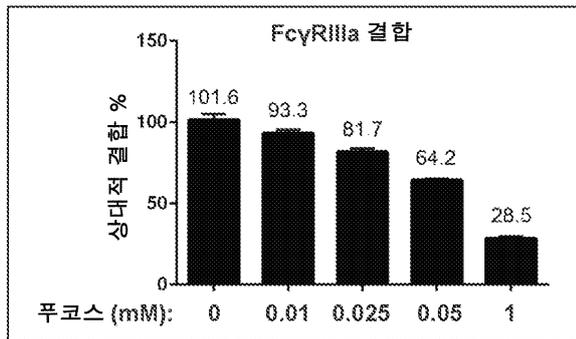
도면9e



도면10a

푸코스 농도 (mM)	G0-F	G1-F	G2-F	Man5	G0	G1	G2
0	67.3	14.3	1	2.8	0	0	0
0.01	54.5	11.6	0.8	2.9	13.4	4	0.4
0.025	32	7.1	0.5	2.9	34.4	11	1.3
0.05	16.5	5.2	0.4	2.2	48.4	18.3	2.3
1	3	1.3	0	2.4	62.5	25.8	2.5

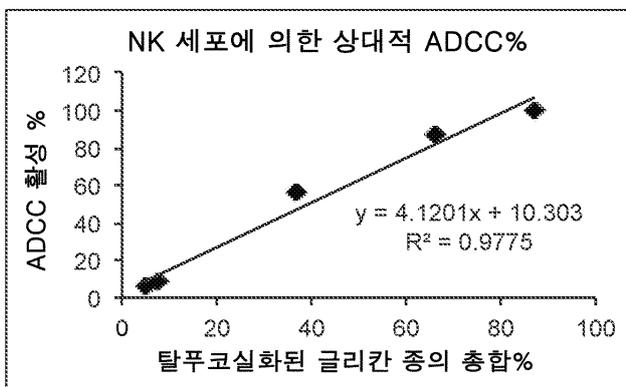
도면10b



도면10c

푸코스 (mM)	G0-F	G1-F	G2-F	Man5	G0	G1	G2
0	73.6	9.5	0.9	2.9	0.2	0.5	0
0.01	54.9	7.6	0.8	3	17.8	3	0.5
0.02	29.4	4.7	0.4	2.3	46.7	7.4	1
0.03	9.6	2.1	0.2	3.3	67.5	10.5	1.4
0.05	3.2	0.9	0.1	3.2	74.4	12.5	1.6
1	2.1	0.7	0	2.1	76.5	14.4	1.9

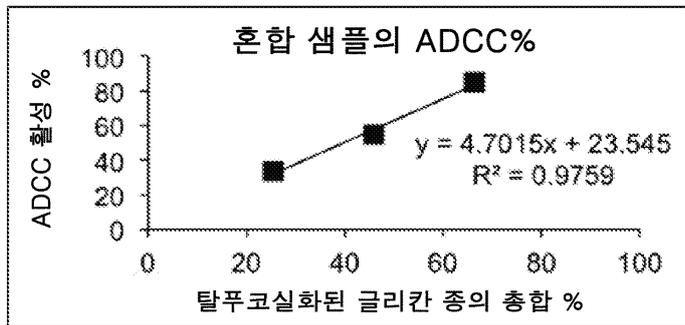
도면10d



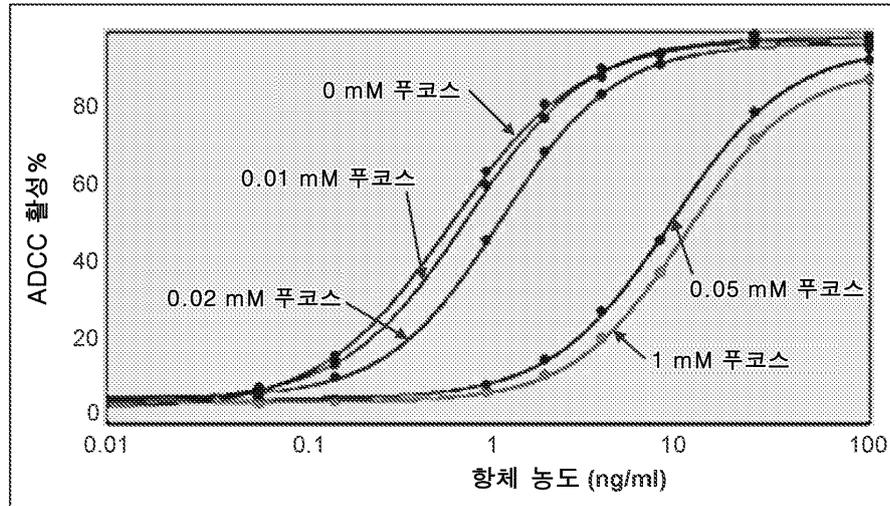
도면10e

푸코스 (nM)	탈푸코실화된 글리칸의 총합 %	상대적 ADCC 활성 %
1:3 혼합 (0&1 mM)	25.4	34
1:1 혼합 (0&1 mM)	45.9	54
3:1 혼합 (0&1 mM)	66.4	85

도면10f



도면10g



서열 목록

- <110> Genentech, Inc.
- <120> METHODS OF MAKING FUCOSYLATED AND AFUCOSYLATED FORMS OF A PROTEIN
- <130> 146392035340
- <150> US 62/249,828
- <151> 2015-11-02
- <150> US 62/338,280
- <151> 2016-05-18

<160> 4  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 1  
 gtcacccaaa gctctccttg 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 2  
 aaaagtctg ctctgcttgc 20  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 3  
 ctaggcttcc ctaggcatt 20  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 4  
 gctatgcct tgagtcttgg 20