



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108431026 B

(45) 授权公告日 2023.02.17

(21) 申请号 201680077178.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2016.11.01

C07K 14/435 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108431026 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2018.08.21

CN 102459603 A, 2012.05.16

(30) 优先权数据

62/249,828 2015.11.02 US

Imai-nishiya h等. Double knockdown of alpha 1,6-fucosyltransferase (FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) in antibody-producing cells: a new strategy for generating fully non-fucosylated therapeutic antibodies with enhanced ADCC.《BMC biotechnol》.2007, 第7卷(第84期), 1-13.

62/338,280 2016.05.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.29

Smith pl等. Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus.《J cell biol》.2002, 第158卷(第4期), 801-815. (续)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/059922 2016.11.01

审查员 朱宁

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/079165 EN 2017.05.11

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 S·米萨吉 J·B·洛

B·R·斯内德克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书1页 说明书55页

专利代理人 陈迎春 黄革生

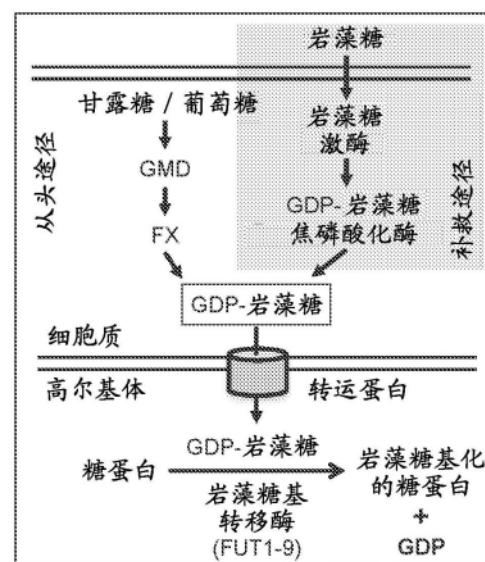
序列表2页 附图16页

(54) 发明名称

制备岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法

(57) 摘要

本申请涉及以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Taupin p.Cell lines expressing mutant FX proteins to generate proteins with reduced rate of fucosylation:  
W02010141478.《expert opin ther pat》.2011, 第21卷(第7期), 1143-1146.

kanda y等. Establishment of a GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: a new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics.《journal of biotechnology》.2007, 第130卷(第3期), 300-310.

1. 一种产生含Fc的蛋白质的方法,其中所述含Fc的蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括:

在培养基中培养经工程化以表达含Fc的蛋白质的CHO宿主细胞,

其中GDP-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶,4-还原酶(FX)的活性在所述宿主细胞中是失活的,其中所述宿主细胞是FX敲除的宿主细胞,和

其中培养基包含0.01mM至1mM的岩藻糖。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中预定比例是50:1至1:50。

3. 一种调节由经工程化以产生含Fc蛋白质的CHO宿主细胞产生的含Fc蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括:

a) 在初始培养基中培养CHO宿主细胞,其中FX活性在CHO宿主细胞中是失活的,其中所述CHO宿主细胞是FX敲除的宿主细胞,并且其中培养基包含0.01mM至1mM的岩藻糖;

b) 测定含Fc蛋白质的岩藻糖基化水平;和

c) 调节培养基中岩藻糖的量,使得以预定的岩藻糖基化水平产生含Fc蛋白质。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中调节岩藻糖的量包括当岩藻糖基化水平低时增加岩藻糖的量,或当岩藻糖基化水平高时减少岩藻糖的量。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述方法包括在不含岩藻糖的培养基中培养CHO宿主细胞,然后在包含岩藻糖的培养基中培养CHO宿主细胞。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中岩藻糖在培养步骤开始时存在于培养基中。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中在培养步骤期间岩藻糖存在于培养基中。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中在低于37°C进行培养步骤。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其还包括从细胞培养物中分离含Fc蛋白质。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中岩藻糖是L-岩藻糖。

11. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。

12. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中岩藻糖是GDP-岩藻糖。

13. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中含Fc的蛋白质包含抗体重链或其片段。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中含Fc的蛋白质是全长抗体。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中全长抗体是单克隆抗体。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中含Fc的蛋白质是含Fc的融合蛋白。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中含Fc的融合蛋白是免疫粘附素。

18. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中与包含没有失活的野生型FX的CHO宿主细胞相比,CHO宿主细胞包含不超过20%的FX活性。

19. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中FX基因通过序列缺失、序列添加或取代失活。

20. 根据权利要求11所述的方法,其中使用成簇的、规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)系统、锌指核酸酶(ZFN)系统、或大范围核酸酶系统使FX基因失活。

## 制备岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年11月2日提交的美国临时专利申请号62/249,828和2016年5月18日提交的美国临时专利申请号62/338,280的优先权,其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 在ASCII文本文件中提交序列表

[0004] 以下在ASCII文本文件中提交的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF) (文件名:146392035340SEQLIST.txt,记录日期:2016年10月27日,大小:2KB)。

### 技术领域

[0005] 本申请涉及以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法。

### 背景技术

[0006] 糖蛋白对免疫系统所有分支(包括先天性和适应性免疫系统)的正常功能是必不可少的。糖蛋白通过补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)参与识别、结合、信号传导和消除威胁(Rudd等人,Science,291,2001,2370-2376;和Jefferis等人,Immunol Rev,163,1998,59-76)。哺乳动物表达的抗体在其重链(HC)的Asn<sup>297</sup>残基上携带单个聚糖。聚糖结构的存在和组成影响抗体的受体结合和效应子功能(Rudd等人,Science,291,2001,2370-2376;和Jefferis等人,Immunol Rev,163,1998,59-76)。例如,IgG的Fc区(Fc $\gamma$ )的聚糖组成的变化差异地影响Fc区与Fc结合受体(Fc $\gamma$ R)的结合亲和力。存在三类Fc $\gamma$ R,即Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII(Jefferis等人,Immunol Rev,163,1998,59-76;Ravetch&Bolland,Annu Rev Immunol,19,2001,275-290)。抗体与Fc $\gamma$ 受体的不同亲和力决定了宿主对特定抗原的免疫应答的命运,并且还负责激活、抑制、抗体功效/半衰期、耐受性和自身免疫应答(Ravetch&Bolland,Annu Rev Immunol,19,2001,275-290)。抗体对不同类型受体的亲和力可以根据其所携带的聚糖的存在和组成而改变,从而突出了寡糖/蛋白质相互作用对抗体生物功能的重要性(Raju等人,Glycobiology,10,2000,477-486;Jefferis等人,Immunol Rev,163,1998,59-76)。

[0007] 治疗性蛋白质领域的进展允许在无血清培养物中表达重组蛋白质(Wurm,Nat Biotechnol,22,2004,1393-1398),并允许开发越来越多的用于治疗疾病的基于蛋白质的疗法,如基于抗体的疗法(Carter,Exp Cell Res,317,2011,1261-1269)。

[0008] 在真核细胞例如哺乳动物宿主细胞中表达蛋白质后,蛋白质进行翻译后修饰,通常包括通常称为“糖基化”的糖残基的酶促添加。

[0009] 多肽的糖基化通常是N-连接或O-连接。N-连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺(Asn)-X-丝氨酸(Ser)和天冬酰胺(Asn)-X-苏氨酸(Thr)(其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是用于将碳水化合物部分酶促连接至天冬酰胺侧链的识别序列。O-连接糖基化是指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、岩藻糖、N-乙酰葡萄糖胺或木糖中的一个连接至羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但是5-羟基脯氨酸或5-羟基

赖氨酸也可参与O-连接糖基化中。

[0010] 由哺乳动物产生的蛋白质的糖基化模式详细描述于The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control, Putnam, F.W., 编辑, 第2版, 第4卷, Academic Press, New York, 1984, 尤其是第271-315页。在本章中, 讨论了天冬酰胺连接的寡糖, 包括其细分的至少三组, 称为复合的、高甘露糖和杂合结构, 以及糖苷连接的寡糖。

[0011] 在N-连接聚糖的情况下, 存在连接寡糖的还原性末端N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)残基的异头碳(C-1)和多肽的天冬酰胺(Asn)残基的氮的酰胺键。在动物细胞中, O-连接聚糖通过N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、半乳糖(Gal)、岩藻糖、N-乙酰葡萄糖胺或木糖与几种羟基氨基酸中的一个之间的糖苷键连接, 最常见的羟基氨基酸是丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr), 而且在某些情况下还有羟脯氨酸或羟赖氨酸。

[0012] O-连接寡糖的生物合成途径由通过一系列特异性糖基转移酶从核苷酸糖逐步转移单糖残基组成。用作单糖供体的核苷酸糖是尿苷二磷酸GalNAc(UDP-GalNAc)、UDP-GlcNAc、UDP-Gal、胍二磷酸岩藻糖(GDP-Fuc)和胞苷单磷酸唾液酸(CMP-SA)。

[0013] 在N-连接寡糖合成中, N-连接寡糖组装的起始不直接发生在蛋白质的Asn残基上, 而是包括预组装脂质连接的前体寡糖, 然后在其从mRNA翻译期间或从mRNA翻译之后很快转移成蛋白质。合成这种前体寡糖(Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)同时借助多种膜结合的糖基转移酶通过焦磷酸桥连接至聚异戊二烯(polyisoprenoid)载体脂质(多萜醇)。脂质连接的前体组装完成后, 另一种膜结合酶将其转移至空间可及的Asn残基上, 该Asn残基作为序列-Asn-X-Ser/Thr-的一部分存在。

[0014] 新合成的糖蛋白的糖基化Asn残基仅瞬时携带一种类型的寡糖Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>。加工这种寡糖结构生成在成熟糖蛋白上存在的非常多样性的结构。

[0015] N-连接寡糖的加工通过许多膜结合酶的连续作用完成, 包括去除三个葡萄糖残基、去除可变数目的甘露糖残基、以及将多种糖残基添加到所得的修剪核心。

[0016] 根据作用模式和效应子功能的必要性, 使用靶蛋白质或聚糖修饰来增强治疗性抗体的临床潜力(Carter, Exp Cell Res, 317, 2011, 1261-1269)。这些修饰中的一种包括表达在其壳二糖核心(N-连接)聚糖上不具有岩藻糖分子(去岩藻糖基化)的重组抗体, 由于其对Fc $\gamma$  RIII(通常表达在外周血单核细胞和天然杀伤细胞中)更强的亲和力导致ADCC增加(Shields等人, J Biol Chem, 277, 2002, 26733-26740)。抗体岩藻糖基化和ADCC水平降低之间的相关性也已经被一些小组研究和记录(Shields等人, J Biol Chem, 277, 2002, 26733-26740; Kanda等人, J Biotechnol, 130, 2007, 300-310; 和Yamane-Ohunuki等人, Biotechnol Bioeng, 87, 2004, 614-622)。

[0017] 聚糖的岩藻糖基化需要通过从头或补救途径合成GDP-岩藻糖。岩藻糖基化过程包括几种酶的连续作用, 导致将岩藻糖分子添加至聚糖还原末端的第一N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)部分(Becker&Lowe, Glycobiology, 13, 2003, 41R-53R)。Lowe和Fukuda实验室发现了负责从甘露糖和/或葡萄糖产生GDP-岩藻糖的从头途径的两种关键酶。具体而言, 实验室发现GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶(GMD)和GDP-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶, 4-还原酶(FX)(Ohyama等人, J Biol Chem, 273, 1998, 14582-14587; Smith等人, J Cell Biol, 158, 2002, 801-815; 和Becker, Genetic and Biochemical Determination of Fucosylated Glycan Expression, 2002, Thesis from The University of Michigan, UMI3121891)。在

没有岩藻糖的情况下, GMD和FX将甘露糖和/或葡萄糖转化为GDP-岩藻糖。然后,GDP-岩藻糖被转运到高尔基复合体中, 其中九个岩藻糖基转移酶(FUT1-9)协同作用, 将聚糖的第一GlcNAc分子岩藻糖基化(Becker&Lowe, Glycobiology, 13, 2003, 41R-53R)。然而, 在岩藻糖存在的情况下, 岩藻糖激酶和GDP-岩藻糖焦磷酸化酶可以将岩藻糖转化为GDP-岩藻糖, 从而绕过由GMD和FX酶从头合成GDP-岩藻糖的需要(Becker&Lowe, Glycobiology, 13, 2003, 41R-53R)。

[0018] 除了FX敲除(KO)外,许多策略已用于增加CHO细胞系表达的去岩藻糖基化抗体种类的百分比以增强ADCC效应子功能,然而,它们的使用通常伴随着特定的挫折。例如,已经显示 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GNTIII)的过表达通过增加二等分GlcNAc(将第三GlcNAc连接至聚糖的第一甘露糖)中间种类的水平来降低岩藻糖基化抗体的水平(Umana等人,Nat Biotechnol, 17, 1999, 176-180; Davies等人,Biotechnol Bioeng, 74, 2001, 288-294)。然而,这些聚糖种类通常不存在于抗体上,将它们保持在一致的、可重现的水平可能具有挑战性,危害产物质量和制造环境的一致性。此外,由于沉默或DNA拷贝数损失,重组GNTIII随着时间表达水平降低,使得难以可重复地表达用于制造目的的可预测水平的去岩藻糖基化抗体。类似地,原核生物GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)的过表达(von Horsten等人,Glycobiology, 20, 2010, 1607-1618)或任何利用过表达以增加去岩藻糖基化抗体种类百分比的方法,可能遭受这样的挫折。使用敲低策略(Imai-Nishiya等人,BMC Biotechnol, 7, 2007, \*1-13)或市售的岩藻糖基化途径的抑制剂是具有挑战性的,因为抑制剂的敲低稳定性或脱靶活性可导致产物异质性。更不用说与制造环境中使用岩藻糖基化的化学抑制剂相关的成本。表达或纯化后用岩藻糖苷酶处理抗体产物(Intra等人, Gene, 392, 2007, 34-46)也是无效的,导致产物质量一致性的缺乏和制造过程的复杂化,这是由于需要另外的步骤去除这些酶。

[0019] 已经提出利用GMD KO宿主表达去岩藻糖基化的抗体(Kanda等人,J Biotechnol, 130, 2007, 300-310),但是这种宿主尚未被广泛利用,并且报道的这种宿主的单位生产力不是很高(Kanda等人,J Biotechnol, 130, 2007, 300-310)。

[0020] 另一方面,FUT8KO宿主已被广泛用于生成可表达适用于生产目的的去岩藻糖基化抗体的克隆(Yamane-Ohnuki等人,Biotechnol Bioeng, 87, 2004, 614-622; 和Malphettes等人,Biotechnol Bioeng, 106, 2010, 774-783)。但是,利用FUT8KO宿主并非没有缺点和挑战。通常,需要体内和体外抗体功能分析以确定去岩藻糖基化抗体相对于野生型(岩藻糖基化)抗体的必要性和功效。由于FUT8KO宿主仅能够表达去岩藻糖基化的抗体,因此需要进行平行细胞系开发(CLD)工作以表达用于比较目的的野生型抗体,使需要的CLD工作增加一倍。此外,需要筛选大量的去岩藻糖基化抗体和野生型抗体表达克隆,以获得具有相当的产物质量属性的克隆,以确保任何观察到的优点仅仅归因于缺乏岩藻糖基化。另外,已经观察到FUT8KO宿主具有生长问题,可能需要更长的悬浮适应时间,增加了CLD时间线,可能引起较低的滴度(Malphettes等人,Biotechnol Bioeng, 106, 2010, 774-783)。

[0021] 因此,本领域需要一种细胞系和培养所述细胞系的方法,其能够以期望的比例产生去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质,以及包含其蛋白质的组合物。

[0022] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和公开的专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

## 发明内容

[0023] 在一些实施方案中,本申请提供了产生蛋白质的方法,其中所述蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括:培养经工程化以在培养基中表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含GDP-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶,4-还原酶(FX)活性或基本上不包含GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶(GMD)活性,并且其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,预定比例为约50:1至约1:50(包括例如约50:5.5、约50:12.5、约50:21.5、约50:33.5、约50:50、约50:75、约50:116.5、约50:200或约50:450)。

[0024] 在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的方法,所述方法包括:培养经工程化以在培养基中表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,并且其中培养基包含足以以一定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源,所述一定比例提供了增强的ADCC功能。在一些实施方案中,通过ADCC测定法来测定ADCC功能。在一些实施方案中,通过FC  $\gamma$  RIII结合测定法来测定ADCC功能。

[0025] 在一些实施方案中,提供了调节由经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括:在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本不包含FX活性或基本不包含GMD活性,并且其中培养基包含岩藻糖源;测定蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定的岩藻糖基化水平产生蛋白质。在一些实施方案中,测定蛋白质的岩藻糖基化水平包括测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,测定蛋白质的岩藻糖基化水平包括测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,调节岩藻糖源的量包括当岩藻糖基化水平低时增加岩藻糖源的量。在一些实施方案中,调节岩藻糖源的量包括当岩藻糖基化水平高时减少岩藻糖源的量。

[0026] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在不含岩藻糖源的培养基中培养宿主细胞,然后在包含岩藻糖源的培养基中培养宿主细胞。在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在培养基中培养宿主细胞,其中岩藻糖源在培养步骤开始时存在于培养基中。在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在培养基中培养宿主细胞,其中岩藻糖源在培养步骤期间添加到培养基中。在一些实施方案中,通过快速浓注(bolus)添加将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,通过连续进料将岩藻糖源添加到培养基中。

[0027] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在培养基中培养宿主细胞,其中在培养步骤期间培养基中岩藻糖源的量是约0.01mM至约1mM。

[0028] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在培养基中培养宿主细胞,其中在低于约37°C进行培养步骤。

[0029] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法包括在培养基中培养宿主细胞,其中培养基还包含葡萄糖源或甘露糖源。

[0030] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,方法还包括从细胞培养物中分离蛋白质。

[0031] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在根

据(或应用于)上述任何实施方案的一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0032] 在一些实施方案中,提供了表征去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法,所述方法包括:比较去岩藻糖基化蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质由经工程化以产生蛋白质的相同宿主细胞产生,并且其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,去岩藻糖基化形式的蛋白质由不含岩藻糖源的第一细胞培养物中的宿主细胞产生。在一些实施方案中,岩藻糖基化形式的蛋白质由包含岩藻糖源的第二细胞培养物中的宿主细胞产生。

[0033] 在一些实施方案中,表征去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法包括比较体外的生物活性。在一些实施方案中,表征去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法包括比较体内的生物活性。在一些实施方案中,通过ADCC测定法来测定ADCC功能。在一些实施方案中,通过FC  $\gamma$  RIII结合测定法来测定ADCC功能。

[0034] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,在聚糖结构水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,PNGase F用于从蛋白质切割聚糖结构。在一些实施方案中,在聚糖结构水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质,其中通过毛细管电泳(CE)测定岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0035] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,在蛋白质水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,在蛋白质水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质,其中通过质谱法(MS)测定岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0036] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,蛋白质是含Fc的蛋白。在一些实施方案中,含Fc的蛋白质包含抗体重链或其片段。在一些实施方案中,含Fc的蛋白质是全长抗体。在一些实施方案中,全长抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,含Fc的蛋白质是含Fc的融合蛋白。在一些实施方案中,含Fc的融合蛋白是免疫粘附素。

[0037] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,宿主细胞是真核细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0038] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,分别与包含没有失活的野生型FX或GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞包含不超过20%的FX或GMD活性。

[0039] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,宿主细胞中的FX或GMD基因失活。在一些实施方案中,FX或GMD基因通过siRNA失活。在一些实施方案中,FX或GMD基因通过shRNA失活。在一些实施方案中,提供了其中FX或GMD基因通过序列缺失失活的方法。在一些实施方案中,提供了其中FX或GMD基因通过序列添加或取代失活的方法。在一些实施方案中,使用成簇的、规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统使FX或GMD基因失活。在一些实施方案中,使用转录激活子样效应核酸酶(TALEN)系统使FX或GMD基因失活。在一些实施方案中,使用锌指核酸酶(ZFN)系统使FX或GMD基因失活。在一些实施方案中,使用大范围核酸酶系统使FX或GMD基因失活。

[0040] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性。

[0041] 在根据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在根

据(或应用于)任何上述实施方案的一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0042] 此外,本文提供了包含由本文所述的任何一种方法产生的蛋白质的组合物。

[0043] 在一些实施方案中,提供了包含具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的组合物,其中所述组合物以提供增强的ADCC功能的比例包含去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0044] 在一些实施方案中,组合物包含岩藻糖基化形式的蛋白质,其在聚糖结构的还原端包含岩藻糖。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。在一些实施方案中,组合物是细胞培养基。在一些实施方案中,组合物是细胞裂解物。在一些实施方案中,组合物是来自蛋白质纯化柱的洗脱液。

[0045] 本文还提供了细胞培养物,其包含:经工程化以表达蛋白质的宿主细胞和培养基,其中所述宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性;所述培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源。

[0046] 本文还提供治疗有需要的个体的疾病的方法,其包括:向个体施用本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,肠胃外施用组合物。在一些实施方案中,静脉内或皮下施用组合物。在一些实施方案中,局部施用组合物。在一些实施方案中,局部施用组合物。

[0047] 根据随后的详细描述和所附权利要求,本发明的这些和其他方面和优点将变得显而易见。应该理解,本文所述的各种实施方案的一个、一些或全部特性可以被组合以形成本发明的其他实施方案。

## 附图说明

[0048] 图1显示了岩藻糖基化途径的概述,包括产生GDP-岩藻糖的从头和补救途径。GDP-酮基-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶,4-还原酶(FX)和GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶(GMD)是从头途径的成员。

[0049] 图2A-2B显示失活FX的工作流程和使用失活的FX基因对细胞进行PCR分析。图2A显示用于失活FX的工作流程。图2B显示池-3、池-9和用于检测缺失的FX等位基因的对照的PCR分析。在分开的反应中使用野生型(WT;内部)和敲除(KO;外部)引物。仅用gRNA转染的CHO-K1细胞(无Cas9)用作对照。

[0050] 图3显示未染色的CHO-K1细胞(未染色)、具有FX失活的LCA-FITC染色的CHO-K1细胞(CHO-K1FXKO-池-3)和LCA-FITC染色的野生型CHO-K1细胞(WT CHO-K1宿主)的FACS分析。

[0051] 图4A-4B显示从池-3获得的单细胞克隆的FX基因和蛋白质分析。图4A显示使用野生型(WT)和敲除(KO)引物对FX基因的PCR分析。图4B显示FX蛋白的Western blot分析。注意,在FX印迹组中,由星号(\*)表示的较低条带是存在于所有样品中的非特异性条带。肌动蛋白印迹用作加载对照。

[0052] 图5A-5F显示从池-3获得的单细胞克隆的FACS分析。各FACS分析显示未染色的CHO-K1细胞(未染色)、在含有岩藻糖的培养基中生长的具有FX失活的LCA-FITC染色的CHO-K1细胞(FXKO+岩藻糖)、在缺乏岩藻糖的培养基中生长的具有FX失活的LCA-FITC染色的CHO-K1细胞(FXKO)、和LCA-FITC染色的野生型CHO-K1细胞(WT CHO-K1)。图5A显示克隆3的FACS分析。图5B显示克隆5的FACS分析。图5C显示克隆6的FACS分析。图5D显示克隆7的FACS分析。图5E显示克隆9的FACS分析。图5F显示克隆11的FACS分析。

[0053] 图6A-6C显示使用FXK0细胞系产生抗体的过程和由所述FXK0细胞系产生的聚糖结构的分析。图6A显示在培养基中存在或不存在岩藻糖时,转染和池选择从FXK0宿主池3-5、3-7和3-11表达抗体-A的示意图。使用CHO-K1宿主作为对照。图6B显示由FXK0克隆3-11表达的抗体-A进行毛细管电泳的代表性电泳图谱。图6C显示在存在或不存在岩藻糖时,通过来自不同池的毛细管电泳检测的聚糖种类。“-F”表示缺乏岩藻糖基化。未显示较低水平的聚糖种类。G0=岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G 1=在一个GlcNAc分支上的一个半乳糖,G-1=缺乏一个分支GlcNAc的壳二糖核心聚糖,G1'=G1的位置异构体,G1-1=缺乏一个分支GlcNAc的壳二糖核心聚糖,其在剩余的分支GlcNAc上具有一个半乳糖,G2=两个半乳糖,在每个分支GlcNAc上各一个,Man5=GlcNAc-GlcNAc-5x(甘露糖),G0-1=缺乏一个分支GlcNAc的壳二糖核心聚糖,G0-1-F=缺乏一个分支GlcNAc的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G0-F=去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G1-F=在一个GlcNAc分支上具有一个半乳糖的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G1'-F=G1-F的位置异构体,G2-F=去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,具有两个半乳糖,在每个分支GlcNAc上各一个。

[0054] 图7A-7F显示在标准CLD方法之后由FXK03-11宿主的24个克隆产生的抗体的分析。图7A显示抗体的滴度(g/L)。图7B显示克隆的单位生产力(pg/细胞·天)。图7C显示克隆的生长。图7D显示由克隆产生的G0-F(去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖)聚糖结构的百分比。图7E显示由克隆产生的G1-F(在一个GlcNAc分支上具有一个半乳糖的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖)聚糖结构的百分比。图7F显示由克隆产生的G0-1-F(缺乏一个分支GlcNAc的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖)聚糖结构的百分比。

[0055] 图8A-8F显示在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的野生型和去岩藻糖基化形式的抗体-A和抗体-B的分析。图8A显示与CHO-K1宿主对照相比,在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的纯化抗体-A的电荷变体的百分比。图8B显示与CHO-K1宿主对照相比,在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的纯化抗体-A的聚集百分比。图8C显示在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的抗体-B的滴度(g/L)。图8D显示在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的抗体-B的主要糖型的百分比。G0=岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G 1=在一个GlcNAc分支上的一个半乳糖,Man5=GlcNAc-GlcNAc-5x(甘露糖),G0-F=去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G1-F=在一个GlcNAc分支上具有一个半乳糖的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖。图8E显示在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的纯化抗体-B的电荷变体的百分比。图8F显示在不存在岩藻糖或者存在1mM岩藻糖时培养的FXK0克隆产生的纯化抗体-B的聚集百分比。

[0056] 图9A-9E显示在一系列岩藻糖浓度下培养的FXK0克隆产生的抗体-B的分析。图9A显示在一系列岩藻糖浓度(0-1mM)下培养的FXK0克隆-1产生的抗体-B的主要糖型的百分比。图9A显示在一系列岩藻糖浓度(0-1mM)下培养的FXK0克隆-2产生的抗体-B的主要糖型的百分比。G0=岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G1=在一个GlcNAc分支上的一个半乳糖,Man 5=GlcNAc-GlcNAc-5x(甘露糖),G0-F=去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖,G1-F=在一个GlcNAc分支上具有一个半乳糖的去岩藻糖基化的壳二糖核心聚糖。图9C显示在一系列岩藻糖浓度(0-1mM)下培养的FXK0克隆-1和-2产生的抗体-B的滴度(g/L)。图9D显示在一系列岩藻糖浓度(0-1mM)下培养的FXK0克隆-1和-2产生的抗体-B的聚集百分比。图9E显示在一

系列岩藻糖浓度 (0-1mM) 下培养的FXK0克隆-1和-2产生的抗体-B的电荷变体的百分比。

[0057] 图10A-10G显示在一系列岩藻糖浓度下培养的FXK0克隆产生的抗体的分析。图10A显示在具有所示浓度的岩藻糖的生产培养基中培养的FXK0克隆产生的抗体-B (IgG1) 的去岩藻糖基化糖型与岩藻糖基化糖型的比例。图10B显示在10 $\mu$ g/ml的非饱和浓度下纯化的抗体-B抗体的Fc  $\gamma$  RIII结合测定法的结果。图10C显示在具有所示浓度的岩藻糖的生产培养基中培养的FXK0克隆产生的抗体-C (IgG1) 的去岩藻糖基化聚糖种类与岩藻糖基化聚糖种类的比例。图10D显示来自不同岩藻糖饲育培养物纯化的抗体-C抗体的基于NK细胞的ADCC测定法的%ADCC活性结果。图10E显示从具有0和1mM岩藻糖饲育的培养物制备的抗体混合物的去岩藻糖基化聚糖总和的百分比和相对ADCC活性的百分比。图10F显示相对于去岩藻糖基化聚糖种类总和的百分比的%ADCC活性。图10G显示具有不同岩藻糖基化与去岩藻糖基化聚糖比例的抗体-C样品的ADCC剂量反应曲线。

[0058] 发明详述

[0059] 本申请利用如下原理:当在包含不同量的岩藻糖的培养基中培养时,GDP-酮基-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶,4-还原酶敲除 (FXK0) 细胞能够产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体。发现在生产培养基中滴定岩藻糖允许产生具有所需比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化聚糖形式的抗体,而不会改变抗体滴度或产物质量。FXK0宿主细胞的克隆表达具有相对高单位生产力和良好生长概况 (profile) 的靶抗体。

[0060] 因此本申请提供了用于从相同FXK0宿主细胞产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化蛋白的方法。这是有利的,因为其允许产生具有相似产物质量的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白。进而,具有相似产物质量的岩藻糖基化和去岩藻糖基化蛋白的比较允许确定去岩藻糖基化蛋白上缺乏岩藻糖是否确实对观察到的生物功能的变化起作用(例如增强的ADCC功能)。与能够产生野生型或去岩藻糖基化形式的蛋白的FUT8敲除的宿主细胞不同,FXK0宿主避免了进行两个分开的细胞系开发 (CLD) 工作的需要。此外,使用单个宿主细胞产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白避免了为了可能地鉴定具有可比较产物质量的克隆而筛选许多克隆的需要。

[0061] 另外,FXK0克隆可用于表达具有治疗相关比例的岩藻糖基化糖型和去岩藻糖基化糖型的任何抗体或含Fc多肽。已经报道了虽然去岩藻糖基化的抗体通过单核细胞(如NK细胞)增强ADCC介导的细胞死亡,但多形核 (PMN) 细胞优先通过结合具有岩藻糖基化聚糖的抗体而识别并杀死其靶标 (Peipp等人, Blood, 112, 2008, 2390-2399)。因此,使用FXK0宿主细胞以及将正确量的岩藻糖滴定到培养基中可用于产生所需比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体,其原则上应该有效地增强通过单核细胞和PMN细胞的ADCC介导的细胞死亡。此外,调节蛋白岩藻糖基化和无岩藻糖形式的比例的能力允许产生具有最大水平的ADCC功能、同时最小化任何可能的与ADCC相关的毒性的蛋白。

[0062] 因此,本申请一方面提供了以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白的方法,所述方法包括:培养基本上无FX活性或基本上无GMD活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白的量的岩藻糖源。另一方面,本申请提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白的方法,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,并且其中培养基包含足以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白的量的岩

藻糖源。另一方面,本申请提供了调节蛋白质岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性或基本上无GMD活性的宿主细胞,测定蛋白质岩藻糖基化的水平,和调节培养基中岩藻糖的量使得以预定的岩藻糖基化水平产生蛋白质。另一方面,本申请提供了表征去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法,所述方法包括比较去岩藻糖基化的蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中通过经工程化以产生蛋白质的相同宿主细胞产生去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质,并且其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。另一方面,本申请提供了包含通过上述任何方法产生的蛋白质的组合物。另一方面,本申请提供了治疗疾病的方法,所述方法包括施用包含所述蛋白质的药物组合物。另一方面,本申请提供了包含宿主细胞和约0.01mM至约1mM的岩藻糖源的细胞培养物,所述宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性。

[0063] 定义

[0064] 如本文所用,岩藻糖基化形式的蛋白质是指具有岩藻糖部分的聚糖结构。

[0065] 如本文所用,去岩藻糖基化形式的蛋白质是指缺乏岩藻糖部分的聚糖结构。

[0066] 如本文所用,“含Fc的蛋白质”是指包含Fc结构域的蛋白质(例如抗体或含Fc的融合蛋白质)。在一些实施方案中,含Fc的蛋白质包含一个或多个蛋白质亚基。在一些实施方案中,含Fc的蛋白质包含一个或多个多肽。

[0067] 如本文所用,“Fc结构域”是指免疫球蛋白重链的Fc区或其C-末端片段。该术语包括野生型Fc结构域和变体Fc结构域。在一些实施方案中,人IgG重链Fc结构域从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端(氨基酸编号根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述)。在一些实施方案中,该术语包括免疫球蛋白重链的C-末端片段和一个或多个恒定区。在一些实施方案中,对于IgG, Fc结构域可以包含免疫球蛋白结构域CH2和CH3以及CH1和CH2之间的铰链。

[0068] 如本文所用,“含Fc的融合蛋白”是指包含与至少一个其他异源蛋白质单元或多肽融合的Fc结构域的蛋白质。

[0069] 本文使用的术语“重链”是指免疫球蛋白重链。

[0070] 抗体是在Fc区具有糖基化的糖蛋白。因此,例如,IgG免疫球蛋白的Fc区是包含链间二硫键键合的铰链区、在天冬酰胺297(Asn-297)处携带N-连接寡糖的糖基化CH2结构域和非共价配对的CH3结构域的同二聚体。糖基化在Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII、Fc  $\gamma$  RIII和C1q介导的效应机制中起重要作用。因此,本发明的抗体片段必须包含糖基化的Fc区和抗原结合区。

[0071] 本文中的术语“抗体”以最广泛的含义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们包含Fc结构域。

[0072] 术语“全长抗体”在本文中用于指具有与天然抗体结构基本上相似的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0073] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由二硫键键合的两个相同的轻链和两个相同的重链组成。从N-末端到C-末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,从N-末端到C-末端,每条轻链

具有可变区 (VL) , 也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域, 随后是恒定轻链 (CL) 结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列, 可以将抗体的轻链指定为两种类型中的一种, 称为kappa ( $\kappa$ ) 和lambda ( $\lambda$ ) 。

[0074] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要类别的抗体: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 其中的几种可进一步分成亚类 (同种型) , 例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0075] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体, 其中重链和/或轻链的一部分源自特定的来源或物种, 而重链和/或轻链的其余部分源自不同的来源或物种。

[0076] “抗体片段”是指完整抗体以外的分子, 其包含与完整抗体结合的抗原结合的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>; 双体; 线性抗体; 单链抗体分子 (例如scFv) ; 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0077] “人抗体”是具有这样的氨基酸序列的抗体, 其中所述氨基酸序列对应于人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列, 或者所述氨基酸序列源自利用人抗体库或其他编码人抗体的序列的非人来源。人抗体的该定义特别排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0078] “人源化”抗体是指包含来自非人高变区 (HVR) 的氨基酸残基和来自人框架区 (FR) 的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中, 人源化抗体包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部, 其中全部或基本上全部HVR (例如CDR) 对应于非人抗体的那些, 并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体 (例如非人抗体) 的“人源化形式”是指已进行人源化的抗体。

[0079] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群获得的抗体, 即除了可能的变体抗体, 群包含的各抗体是相同的和/或结合相同的表位, 所述变体抗体例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体产生期间引起的突变, 这些变体通常以少量存在。与通常包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂不同, 单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此, 修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群获得的抗体的特征, 并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0080] 如本文所用, 术语“免疫粘附素”指组合异源蛋白质 (“粘附素”) 的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能的分子。在结构上, 免疫粘附素包含具有所需结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列 (例如IgG的C<sub>H</sub>2和/或C<sub>H</sub>3序列) 的融合, 该氨基酸序列不是抗体的抗原识别和结合位点 (即与抗体的恒定区相比是“异源的”) 。示例性的粘附素序列包括连续的氨基酸序列, 其包含结合感兴趣蛋白质的受体或配体的一部分。粘附素序列也可以是结合感兴趣蛋白质的序列, 但不是受体或配体序列 (例如, 肽体 (peptibody) 中的粘附素序列) 。可以通过各种方法选择或鉴定这样的多肽序列, 包括噬菌体展示技术和高通量分选方法。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可以从任何免疫球蛋白获得, 如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA (包括IgA1和IgA2) 、IgE、IgD或IgM。

[0081] 术语“治疗性抗体”是指用于治疗疾病的抗体。治疗性抗体可具有各种作用机制。治疗性抗体可以结合并中和与抗原相关的靶标的正常功能。例如, 阻断癌细胞生存所需的蛋白质的活性的单克隆抗体导致细胞死亡。另一种治疗性单克隆抗体可以结合并激活与抗原相关的靶标的正常功能。例如, 单克隆抗体可以结合细胞上的蛋白质并触发凋亡信号。另

一种单克隆抗体可以结合仅在疾病组织上表达的靶抗原；毒性负载(有效试剂)如化疗剂或放射性试剂与单克隆抗体的缀合可产生用于将毒性负载特异性递送到疾病组织的试剂，从而减少对健康组织的伤害。治疗性抗体的“生物功能片段”显示完整抗体所具有的至少一个(如果不是一些或全部)生物功能，所述功能至少包括与靶抗原的特异性结合。

[0082] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外，优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ受体)，包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体，包括这些受体的等位基因变体和可选地剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”)，其具有相似的氨基酸序列，主要不同在于其胞质结构域。激活受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述M. in **Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997))。FcR的综述在Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); 和de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995) 中。其他FcR，包括将来鉴定的FcR，也涵盖在本文的术语“FcR”中。该术语还包括新生儿受体FcRn，其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) 和Kim等人, *J. Immunol.* 24: 249 (1994))，并介导较慢的分解代谢，从而延长半衰期。

[0083] “效应子功能”是指归因于抗体Fc区的那些生物活性，其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调；和B细胞激活。

[0084] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地，细胞至少表达Fc γ RIII并且执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天热杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞；其中PBMC和NK细胞是优选的。效应细胞可以从其天然来源分离，例如从本文所述的血液或PBMC分离。

[0085] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应，其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞的裂解。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII，而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991) 的第464页的表3中。为了评估感兴趣分子的ADCC活性，可以进行体外ADCC测定法，如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定法。用于此类测定法的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者，或另外地，感性趣分子的ADCC活性可以在体内评估，例如在动物模型中评估，如在Clynes等人, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998) 中公开的动物模型。

[0086] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指分子在补体存在下裂解靶标的能力。补体激活途径由补体系统的第一组分(C1q)结合与同源抗原复合的分子(例如抗体)而启动。为了评估补体激活，可以进行CDC测定法，例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996) 中所述。

[0087] 如本文所用，“宿主细胞”是指能够产生蛋白质或多肽产物的细胞。在一些实施方案中，宿主细胞可以产生含Fc的蛋白质。

[0088] 如本文所用,“基本上无FX活性”或“基本上无GMD活性”是指分别与无活性水平降低的包含野生型FX或GMD的宿主细胞相比,降低至少约80%、85%、90%、95%或100%的FX或GMD的活性水平。在一些实施方案中,活性水平降低约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%或约95%至100%。在一些实施方案中,活性水平降低至少95%。在一些实施方案中,活动水平降低100%。在一些实施方案中,与无酶活性水平降低的包含野生型酶的宿主细胞相比,酶的活性水平不超过20%。在一些实施方案中,与无酶的活性水平降低的包含野生型酶的宿主细胞相比,酶的活性水平不超过15%。在一些实施方案中,与无酶的活性水平降低的包含野生型酶的宿主细胞相比,酶的活性水平不超过10%。在一些实施方案中,与无酶的活性水平降低的包含野生型酶的宿主细胞相比,酶的活性水平不超过5%。

[0089] 短语“破坏基因”和“基因破坏”是指基因的天然、内源DNA序列和/或启动子区的突变,从而与野生型或天然存在的基因序列相比较,降低或阻止该基因在细胞中的表达。

[0090] 术语“敲除”是指与未改变的基因相比,将通常由基因编码的多肽的生物活性降低至少80%的基因的核酸序列改变。例如,改变可以是插入、取代、缺失、移码突变或错义突变。

[0091] 术语“敲低”是指通过遗传修饰(生物体染色体之一的DNA中的变化)或通过用试剂(如具有与mRNA转录本或基因互补的序列的短DNA或RNA寡核苷酸)处理来减少一个或多个基因表达的技术。如果进行DNA的遗传修饰,则结果是“敲低生物体”或“敲低宿主细胞”。

[0092] “分离的”核酸是指已从其天然环境的组分中分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但所述核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0093] 如本文所用的术语“载体”是指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及整合到其已经引入其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导其有效地连接的核酸的表达。这种载体在本文中被称为“表达载体”。

[0094] “分离的”蛋白质是已从其天然环境的组分中分开的蛋白质。在一些实施方案中,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如离子交换或反相HPLC)测定的,将蛋白质纯化至大于95%或99%的纯度。例如,对于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0095] 术语“药物组合物”是指允许其中所含活性成分的生物活性有效的形式的制剂,并且其不含有对于施用该制剂的受试者是不可接受的毒性的其他成分。

[0096] “药学上可接受的载体”是指除了活性成分之外的药物制剂中对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0097] 如本文所用,“治疗”或“治疗”是用于获得有益或所需结果(包括临床结果)的方法。对于本发明的目的,有益或所需临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:减轻由疾病引起的一种或多种症状、减少疾病的程度、稳定疾病(例如预防或延迟疾病的恶化)、预防或延迟疾病的传播(例如转移)、预防或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病的状态、提供疾病的缓解(部分或全部)、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量、延缓疾病的进展、提高生活质量和/或延长生存期。本发明的方法涵盖治疗的这些方面中的任一个或多个。

[0098] 术语“个体”是指哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物或灵长动物。在一些实施方案中,个体是人。

[0099] “治疗有效量”至少是实现特定疾患的可测量改善所需的最小浓度。本文中的治疗有效量可根据以下因素而变化:如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量也是其中抗体的治疗有益效果超过任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”是指在必需的剂量和时间段内有效达到所需预防结果的量。典型地但非必须地,由于预防剂量在疾病之前或疾病的早期阶段用于受试者,所以预防有效量可以小于治疗有效量。

[0100] 应该理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”的方面和实施方案。

[0101] 本文对值或参数提及的“约”包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0102] 如本文和所附权利要求中所用的,除非上下文另外地明确指出,否则单数形式“a”、“或(or)”和“该(the)”包括复数指代物。

[0103] 产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法

[0104] 本申请在一些方面提供了产生蛋白质的方法,其中所述蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,其中所述方法包括在培养基中培养如本文实施方案中所述的基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性的任何宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生蛋白质的方法,其中所述蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括培养具有FX或GMD基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生含Fc的蛋白质的方法,其中所述含Fc的蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生含Fc的蛋白质的方法,其中所述含Fc的蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养具有FX或GMD基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生抗体的方法,其中所述抗体以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养基本上无FX活性或基本上无GMD活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生抗体的方法,其中所述抗体以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养具有FX或GMD基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些

实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0105] 在一些实施方案中,提供了产生蛋白质的方法,其中所述蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括培养基本上无FX活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生蛋白质的方法,其中所述蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括培养具有FX基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生含Fc的蛋白质的方法,其中所述含Fc的蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养基本上不包含FX活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生含Fc的蛋白质的方法,其中所述含Fc的蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养具有FX基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生抗体的方法,其中所述抗体以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养基本上无FX活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生抗体的方法,其中所述抗体以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生,所述方法包括在培养基中培养具有FX基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0106] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约50:1至约1:50、约50:2.5至约1:50、约50:5.5至约1:50、约50:8.5至约1:50、约50:12.5至约1:50、约50:15.5至约1:50、约50:21.5至约1:50、约50:27至约1:50、约50:33.5至约1:50、约50:41至约1:50、约50:50至约1:50、约50:61至约1:50、约50:75至约1:50、约50:93至约1:50、约50:116.5至约1:50、约50:150至约1:50、约50:200至约1:50、约50:283.5至约1:50、约50:450至约1:50、或约50:950至约1:50。

[0107] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约50:1至约2.5:50、约50:1至约5.5:50、约50:1至约8.5:50、约50:1至约12.5:50、约50:1至约15.5:50、约50:1至约21.5:50、约50:1至约27:50、约50:1至约33.5:50、约50:1至约41:50、约50:1至约50:50、约50:1至约61:50、约50:1至约75:50、约50:1至约93:50、约50:1至约116.5:50、约50:1至约150:50、约50:1至约200:50、约50:1至约283.5:50、约50:1至约450:50、或约50:1至约950:50。

[0108] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约50:2.5至约2.5:50、约50:5.5至约5.5:50、约50:8.5至约8.5:50、约50:12.5至约12.5:50、约50:15.5至约15.5:50、约50:15.5至约21.5:50、约50:27至约27:50、约50:33.5至约33.5:50、或约50:41至约41:50。

[0109] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约12.5:50至约2.5:50、约12.5:50至约5.5:50、约12.5:50至约8.5:50、约12.5:50至约12.5:50、或约12.5:50至约15.5:50。

[0110] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约21.5:50至约2.5:50、约21.5:50至约5.5:50、约21.5:50至约8.5:50、约21.5:50至约12.5:50、或约21.5:50至约15.5:50。

[0111] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约33.5:50至约2.5:50、约33.5:50至约5.5:50、约33.5:50至约8.5:50、约33.5:50至约12.5:50、约33.5:50至约15.5:50、约33.5:50至约21.5:50、或约33.5:50至约27:50。

[0112] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约50:50至约2.5:50、约50:50至约5.5:50、约50:50至约8.5:50、约50:50至约12.5:50、约50:50至约15.5:50、约50:50至约21.5:50、约50:50至约27:50、约50:50至约33.5:50、或约50:50至约41:50。

[0113] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约75:50至约2.5:50、约75:50至约5.5:50、约75:50至约8.5:50、约75:50至约12.5:50、约75:50至约15.5:50、约75:50至约21.5:50、约75:50至约27:50、约75:50至约33.5:50、约75:50至约41:50、约75:50至约50:50、或约75:50至约61:50。

[0114] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约116.5:50至约2.5:50、约116.5:50至约5.5:50、约116.5:50至约8.5:50、约116.5:50至约12.5:50、约116.5:50至约15.5:50、约116.5:50至约21.5:50、约116.5:50至约27:50、约116.5:50至约33.5:50、约116.5:50至约41:50、约116.5:50至约50:50、约116.5:50至约61:50、约116.5:50至约75:50、或约116.5:50至约93:50。

[0115] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约200:50至约2.5:50、约200:50至约5.5:50、约200:50至约8.5:50、约200:50至约12.5:50、约200:50至约15.5:50、约200:50至约21.5:50、约200:50至约27:50、约200:50至约33.5:50、约200:50至约41:50、约200:50至约50:50、约200:50至约61:50、约200:50至约75:50、约200:50至约93:50、约200:50至约116.5:50、或约200:50至约150:50。

[0116] 在一些实施方案中,岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例为约50:1、约50:2.5、约50:5.5、约50:8.5、约50:12.5、约50:15.5、约50:21.5、约50:27、约50:33.5、约50:41、约50:50、约50:61、约50:75、约50:93、约50:116.5、约50:150、约50:200、约50:283.5、约50:450、或约50:950。

[0117] 在包含足以以预定比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源的培养基中岩藻糖源的量主要取决于系统组分,如宿主细胞类型、宿主细胞数量、蛋白质产生速率以及岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的预定比例。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM至约1mM。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM至约0.1mM、约0.01mM至约0.09mM、约0.01mM至约0.08mM、约0.01mM至约0.07mM、约0.01mM至约0.06mM、约0.01mM至约0.05mM、约0.01mM至约0.04mM、约0.01mM至约0.03mM、约0.01mM至约0.02mM、约0.02mM至约0.1mM、约0.02mM至约0.09mM、约0.02mM至约0.08mM、约0.02mM至约0.08mM、约0.02mM至约0.07mM、约0.02mM至约0.06mM、约0.02mM至约0.05mM、约0.02mM至约0.04mM、约0.02mM至约0.03mM。

0.02mM至约0.03mM、约0.03mM至约0.1mM、约0.03mM至约0.09mM、约0.03mM至约0.08mM、约0.03mM至约0.07mM、约0.03mM至约0.06mM、约0.03mM至约0.05mM、约0.03mM至约0.04mM、约0.04mM至约0.1mM、约0.04mM至约0.09mM、约0.04mM至约0.08mM、约0.04mM至约0.07mM、约0.04mM至约0.6mM、约0.04mM至约0.05mM、约0.05mM至约0.1mM、约0.05mM至约0.09mM、约0.05mM至约0.08mM、约0.05mM至约0.07mM、约0.06mM至约0.09mM、约0.06mM至约0.08mM、约0.06mM至约0.07mM、约0.07mM至约0.1mM、约0.07mM至约0.09mM、约0.07mM至约0.08mM、约0.08mM至约0.1mM、约0.08mM至约0.9mM、或约0.09mM至约0.1mM。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM、约0.02mM、约0.03mM、约0.04mM、约0.05mM、约0.06mM、约0.07mM、约0.08mM、约0.09mM、约0.1mM、约0.11mM、约0.12mM、约0.13mM、约0.14mM、约0.15mM、约0.16mM、约0.17mM、约0.18mM、约0.19mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、或约1mM。

[0118] 本文还提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的方法,所述方法包括:在培养基中培养经工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中所述宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的方法,所述方法包括培养具有FX或GMD基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性或基本上无GMD活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性或基本上无GMD活性并经工程化以表达含Fc的蛋白质的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括在培养基中培养具有FX或GMD基因破坏并经工程化以表达含Fc的蛋白质的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的抗体的方法,所述方法包括在培养基中培养经工程化以表达抗体的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括在培养基中培养具有FX或GMD基因破坏并经工程化以表达抗体的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX和GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷

酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0119] 在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的方法,所述方法包括培养具有FX基因破坏的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括培养基本上无FX活性并经工程化以在培养基中表达含Fc的蛋白质的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括培养具有FX基因破坏并经工程化以在培养基中表达含Fc的蛋白质的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了产生具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的抗体的方法,所述方法包括培养经工程化以在培养基中表达抗体的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供一种方法,其包括培养具有FX基因破坏并经工程化以在培养基中表达抗体的宿主细胞,其中培养基包含足以以提供增强的ADCC功能的比例产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的量的岩藻糖源。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0120] 在一些实施方案中,蛋白质增强的ADCC功能是与由无降低的FX或GMD活性水平的野生型宿主产生的蛋白质相比。在一些实施方案中,蛋白质增强的ADCC功能是与岩藻糖基化形式的蛋白质相比。在一些实施方案中,蛋白质增强的ADCC功能是与野生型蛋白质相比。在一些实施方案中,与由无降低的FX或GMD活性水平的野生型宿主产生的蛋白质相比,蛋白质的ADCC功能增强约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍或100倍。

[0121] 在一些实施方案中,通过ADCC测定法来测定ADCC功能。ADCC测定法和测定ADCC功能的方法在本领域中是公知的。参见例如Tada等人,PLoS One, 9, 2014, e95787; Cheng等人, J Immunol Methods, 414, 2014, 69-81。例如,可通过将蛋白质(如含Fc的蛋白质)与在其表面上表达Fc受体的效应细胞(如外周血单核细胞(PBMC)或天然杀伤细胞(NK细胞))和靶细胞孵育测定蛋白质的ADCC功能。当与目标疾病细胞结合的蛋白质的Fc区与Fc受体结合后,Fc受体在效应细胞内转导细胞内信号,导致靶细胞的消除。随后通过闪烁计数器或分光光度计通过细胞内标记的释放测量靶细胞裂解。这些方法中包括铬-51释放测定法、铕释放测定法和硫-35释放测定法。例如,可通过例如使用<sup>51</sup>Cr或荧光染料(例如钙荧光素-AM44、羧基

荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)、2',7'-二(2-羧乙基)-5-(和-6)-羧基荧光素)(BCECF)或铕测量来自预标记靶细胞的特异性探针的释放,或通过测量细胞溶质酶如乳酸脱氢酶(LDH)或ATP的释放,来评估靶细胞裂解。用于评估ADCC功能的其他测定法包括例如测量天然存在于靶细胞中的酶的释放的偶联生物发光方法(ACELLA<sup>TM</sup> TOX;Promega)。不需要靶细胞标记步骤,也不使用放射性试剂。

[0122] 在一些实施方案中,通过ADCC测定法测定蛋白质的ADCC功能,其中ADCC测定法包含NK细胞。在一些实施方案中,通过ADCC测定法来测定蛋白质的ADCC功能,其中ADCC测定法包含PBMC。在一些实施方案中,ADCC测定法是体外测定法。在一些实施方案中,ADCC测定法是体内测定法。

[0123] 在一些实施方案中,通过FC  $\gamma$  III结合测定法测定ADCC功能。参见例如Miller等人,J Immunol Methods,385,2012,45-50。替代结合方法可用于评估ADCC功能。通常,这些方法分开地或同时地测量与细胞表面靶抗原结合的互补决定区(CDR)和与Fc  $\gamma$  R结合的Fc。各种流式细胞术和基于平板的形式可以用于CDR和Fc  $\gamma$  R结合测定法。已经用许多平台开发了重组蛋白受体结合和C1q结合测定法,包括表面等离子体共振和酶联免疫吸附测定法。在一些实施方案中,通过基于ELISA的测定法来测定ADCC功能。

[0124] 还提供了调节由经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的蛋白质岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括:在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中培养基包含岩藻糖源;测定蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白质。在一些实施方案中,提供调节由具有FX或GMD基因破坏和经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的蛋白质岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白质。在一些实施方案中,提供了调节由经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不含GMD活性,其中培养基包含岩藻糖源;测定含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供了调节由具有FX或GMD基因破坏并经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供调节由经工程化以产生抗体的宿主细胞产生的抗体的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中培养基包含岩藻糖源;测定抗体的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生抗体。在一些实施方案中,调节由具有FX或GMD基因破坏并经工程化以产生抗体的宿主细胞产生的抗体的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定抗体的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生抗体。在一些实施方案中,宿主细胞基

本上不包含FX活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX和GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0125] 在一些实施方案中,提供了调节由基本上无FX活性并经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白质。在一些实施方案中,提供了调节由具有FX基因破坏并经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白质。在一些实施方案中,提供了调节由经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性,其中培养基包含岩藻糖源;测定含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供了调节由具有FX基因破坏并经工程化以产生蛋白质的宿主细胞产生的含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定含Fc的蛋白质的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供调节由经工程化以产生抗体的宿主细胞产生的抗体的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性,其中培养基包含岩藻糖源;测定抗体的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生抗体。在一些实施方案中,调节由具有FX基因破坏并经工程化以产生抗体的宿主细胞产生的抗体的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括在初始培养基中培养宿主细胞,其中培养基包含岩藻糖源;测定抗体的岩藻糖基化水平;和调节培养基中岩藻糖源的量,使得以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生抗体。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0126] 在一些实施方案中,提供了测定蛋白质的岩藻糖基化水平的方法,所述方法包括测定蛋白质的岩藻糖基化形式。在本申请中描述了测定蛋白质的岩藻糖基化形式的方法。在一些实施方案中,测定蛋白质的岩藻糖基化水平包括测定蛋白质的去岩藻糖基化形式。在本申请中描述了测定蛋白质的去岩藻糖基化形式的方法。在一些实施方案中,测定蛋白质的岩藻糖基化水平包括测定蛋白质的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式。

[0127] 在一些实施方案中,在培养步骤期间测定岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化水平。在一些实施方案中,在培养宿主细胞期间超过一次测定岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化水平。在一些实施方案中,在测定岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化水平之后调节培养基中岩藻糖

源的量。在一些实施方案中,在测定岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化水平之后未调节岩藻糖源的量。在一些实施方案中,在培养宿主细胞期间超过一次调节岩藻糖源的量。

[0128] 在一些实施方案中,提供了调节初始培养基中岩藻糖源的量的方法,所述方法包括当岩藻糖基化水平低时增加岩藻糖源的量。在一些实施方案中,增加初始培养基中岩藻糖源的量包括通过快速浓注向初始培养基中添加岩藻糖源。在一些实施方案中,增加初始培养基中岩藻糖源的量包括通过快速浓注向初始培养基中添加包含岩藻糖源的第二培养基,其中第二培养基中岩藻糖源的量大于初始培养基中岩藻糖的量。在一些实施方案中,增加初始培养基中岩藻糖源的量包括通过连续进料向初始培养基中添加岩藻糖源。在一些实施方案中,增加初始培养基中岩藻糖源的量包括通过连续进料向初始培养基中添加包含岩藻糖源的第二培养基,其中第二培养基中岩藻糖源的量大于初始培养基中岩藻糖的量。

[0129] 在一些实施方案中,提供了调节初始培养基中岩藻糖源的量的方法,所述方法包括当岩藻糖基化水平高时降低初始培养基中岩藻糖源的量。在一些实施方案中,降低初始培养基中岩藻糖源的量包括添加缺乏岩藻糖源的第二培养基。在一些实施方案中,降低初始培养基中岩藻糖源的量包括添加与初始培养基相比包含降低水平的岩藻糖源的第二培养基。

[0130] 本申请在一些方面提供了比较岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性的方法,所述方法包括:比较去岩藻糖基化蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质由经工程化以产生蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质由具有FX或GMD基因破坏并且经工程化以产生蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的含Fc的蛋白质与岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质由经工程化以产生含Fc的蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的含Fc的蛋白质与岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质由具有FX或GMD基因破坏并经工程化以产生含Fc的蛋白质的相同的宿主细胞产生。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化抗体与岩藻糖基化形式的抗体的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的抗体由经工程化以产生抗体的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的抗体与岩藻糖基化形式的抗体的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的抗体由具有FX或GMD基因破坏并且经工程化以产生抗体的相同的宿主细胞产生。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX和GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0131] 在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质由经工程化以产生蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的蛋白质与岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质由具有FX基因破坏并经工程化以产生蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的含Fc的蛋白质与岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质由经工程化以产生含Fc的蛋白质的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的含Fc的蛋白质与岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的含Fc的蛋白质由具有FX基因破坏并经工程化以产生含Fc的蛋白质的相同的宿主细胞产生。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的抗体与岩藻糖基化形式的抗体的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的抗体由工程化以产生抗体的相同的宿主细胞产生,其中宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较去岩藻糖基化的抗体与岩藻糖基化形式的抗体的生物活性,其中去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的抗体由具有FX基因破坏并经工程化以产生抗体的相同的宿主细胞产生。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX和GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0132] 从相同宿主细胞产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质允许产生具有相似产物质量属性的蛋白质形式,以及归因于岩藻糖基化状态的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式蛋白质之间的生物活性差异。

[0133] 在一些实施方案中,去岩藻糖基化形式的蛋白质由不含岩藻糖源的第一细胞培养物中的宿主细胞产生。在一些实施方案中,岩藻糖基化形式的蛋白质由包含岩藻糖源的第二细胞培养物中的宿主细胞产生。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括:a) 通过在不含岩藻糖源的第一细胞培养物中培养宿主细胞来产生去岩藻糖基化形式的蛋白质,b) 分离去岩藻糖基化的蛋白质,c) 通过在包含岩藻糖源的第二细胞培养物中培养宿主细胞产生岩藻糖基化形式的蛋白质,d) 分离岩藻糖基化的蛋白质,和e) 比较岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性。在一些实施方案中,提供了一种方法,其包括比较岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性,其中岩藻糖基化形式的蛋白质在第一细胞培养物中产生,并且其中去岩藻糖基化形式的蛋白质在第二细胞培养物中产生。

[0134] 在一些实施方案中,在包含岩藻糖源的培养基中通过宿主细胞产生去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,培养基中岩藻糖源的量为约0.01mM至约1mM。通常,如果在相同的培养基中通过宿主细胞产生去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质,则需要分开岩藻糖基化和非岩藻糖基化形式的蛋白质。可以使用例如LCA pull-down(拉开)技术实现岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的分开。参见例如Seth等人,Dev Dyn, 239, 2010, 3380-3390; 和Jilani等人,J Histochem Cytochem, 2003, 51, 597-604。

[0135] 可以使用分离的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质比较岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的生物活性。在一些实施方案中,在体外进行生物活性的比较。在一些实施方案中,在体内进行生物活性的比较。在一些实施方案中,生物活性是ADCC功能。在一些实施方案中,通过ADCC测定法来测定ADCC功能。ADCC测定法在本领域中是公知的并且在本申请中描述。在一些实施方案中,通过替代ADCC测定法来测定ADCC功能。替代ADCC测定法在本领域中是公知的并且在本申请中描述。在一些实施方案中,替代ADCC测定法是FC  $\gamma$  RIII结合测定法。在一些实施方案中,通过FC  $\gamma$  RIII结合测定法来测定ADCC功能。FC  $\gamma$  RIII结合测定法在本领域中是公知的并且在本申请中描述。

[0136] 本申请在一些方面提供了鉴定能够产生岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞的方法。

[0137] 适于鉴定能够产生岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞的方法在本领域中是公知的。在一些实施方案中,在细胞水平上确定能够产生岩藻糖基化的蛋白质的宿主细胞的鉴定。在一些实施方案中,在细胞水平上确定能够产生去岩藻糖基化的蛋白质的宿主细胞的鉴定。例如,可以使用基于兵豆凝集素(LCA)的测定法在细胞水平上鉴定能够产生岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。参见例如Okeley等人,PNAS,110,5404-5409。LCA结合具有核心岩藻糖的碳水化合物(如聚糖)。标记的LCA,如荧光素(FITC)缀合的LCA(LCA-FITC)可以用于结合宿主细胞表面上的岩藻糖基化的聚糖。随后使用荧光激活的细胞分选(FACS)可用于鉴定能够产生岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,进行能够产生岩藻糖基化形式的宿主细胞的鉴定。在一些实施方案中,进行能够产生去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞的鉴定。在一些实施方案中,进行能够产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞的鉴定,其中在包含岩藻糖的培养基中培养之后评估宿主细胞,并且分开地,其中在缺乏岩藻糖的培养基中培养之后评估宿主细胞。

[0138] 在一些实施方案中,通过荧光激活的细胞分选(FACS)鉴定能够产生岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,通过荧光激活的细胞分选(FACS)鉴定能够产生去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,通过荧光激活的细胞分选(FACS)鉴定能够产生岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,通过基于LCA的测定法鉴定能够产生岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞用荧光素(FITC)缀合的兵豆凝集素(LCA)染色。在一些实施方案中,通过基于LCA的测定法鉴定能够产生去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞不用荧光素(FITC)缀合的兵豆凝集素(LCA)染色。

[0139] 在一些方面,本申请提供了测定蛋白质的岩藻糖基化和/或去岩藻糖基化形式的方法。

[0140] 在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在聚糖结构水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在聚糖结构水平上测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。如本文所用,“聚糖结构水平”是指使用分离的聚糖结构分析岩藻糖基化或去岩藻糖基化。通常,在聚糖结构水平测定岩藻糖基化或去岩藻糖基化的方法包括从蛋白质切割聚糖结构。从蛋白质切割聚糖结构的方法在本领域中是公知的。参见例如Szabo等人,Anal Chem,82,2010,2588-2593;和Mulloy等人,Essentials of Glycobiology,第2版,

Chapter 47, 2009。在一些实施方案中,通过酶切割切割聚糖结构。在一些实施方案中,酶对N-连接的聚糖结构是特异性的。在一些实施方案中, PNGase F用于从蛋白质切割聚糖结构。

[0141] 然后分析分离的聚糖结构以测定聚糖结构的组成,例如存在或不存在岩藻糖基化。分析聚糖结构的方法在本领域是公知的。参见例如Mulloy等人, *Essentials of Glycobiology*, 第2版, 第47章, 2009。通常, 通过例如毛细管电泳或高压液相色谱法分离聚糖结构混合物。然后使用随后的分析方法来鉴定存在于聚糖结构混合物中的聚糖结构的类型。

[0142] 在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过毛细管电泳(CE)测定聚糖结构的岩藻糖基化形式。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过CE测定聚糖结构的去岩藻糖基化形式。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过质谱法(MS)测定聚糖结构的岩藻糖基化形式。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过MS测定聚糖结构的去岩藻糖基化形式。在一些实施方式中,提供了一种方法,其中通过核磁共振(NMR)测定聚糖结构的岩藻糖基化形式。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过NMR测定聚糖结构的去岩藻糖基化形式。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过闪烁法测定聚糖结构的岩藻糖基化形式,其中岩藻糖是放射性标记的岩藻糖。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过基于标记的测定法测定聚糖结构的去岩藻糖基化形式,其中聚糖结构的游离还原端用标签如荧光标签来标记。

[0143] 在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在蛋白质水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在蛋白质水平上测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。如本文所用,“蛋白质水平”是指使用与聚糖结构结合的蛋白质(例如糖蛋白)分析岩藻糖基化或去岩藻糖基化。用于在蛋白质水平上测定岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法在本领域中是公知的。参见例如Balaguer&Neususs, *Anal Chem*, 78, 2006, 5384-5393。在一些实施方案中,通过质谱法(MS)测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过MS测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过由上至下MS测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中通过由上至下MS测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0144] 在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在聚糖结构水平和蛋白质水平上测定岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了一种方法,其中在聚糖结构水平和蛋白质水平上测定去岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0145] 培养基和培养方法

[0146] 可以在各种培养基中培养用于产生本文实施方案中描述的所需蛋白质的宿主细胞。通常,所述培养基的岩藻糖含量是已知的。市售培养基如Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,Ham等人, *Meth Enz*, 58, 1979, Barnes等人, *Anal Biochem*, 102, 1980, 美国专利号4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或5,122,469; 国际专利申请号W090/03430或W0 87/00195; 美国专利补发号30,985中描述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任何一种可以根据需要补充激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸腺嘧啶)、抗生素(如GENTAMYCIN<sup>TM</sup>药物)、微量元素

素(定义为无机化合物,通常以微摩尔范围内的终浓度存在)、和葡萄糖或等同的能源。在一些实施方案中,培养基还包含葡萄糖源。在一些实施方案中,培养基还包含甘露糖源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包含任何其他必要的补充剂。

[0147] 在一些实施方案中,培养基不含岩藻糖源。在一些实施方案中,培养基包含岩藻糖源。如本文所用,“岩藻糖源”是指包含参与岩藻糖基化途径的岩藻糖的部分。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。在一些实施方案中,培养基包含岩藻糖源,其中培养基中岩藻糖源的量为约0.01mM至约1mM。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM至约1mM。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM至约0.1mM,约0.01mM至约0.09mM,约0.01mM至约0.08mM,约0.01mM至约0.07mM,约0.01mM至约0.06mM,约0.01mM至约0.05mM,约0.01mM至约0.04mM,约0.01mM至约0.03mM,约0.01mM至约0.02mM,约0.02mM至约0.1mM,约0.02mM至约0.09mM,约0.02mM至约0.08mM,约0.02mM至约0.08mM,约0.02mM至约0.07mM,约0.02mM至约0.06mM,约0.02mM至约0.05mM,约0.02mM至约0.04mM,约0.02mM至约0.03mM,约0.03mM至约0.1mM,约0.03mM至约0.09mM,约0.03mM至约0.08mM,约0.03mM至约0.07mM,约0.03mM至约0.06mM,约0.03mM至约0.05mM,约0.03mM至约0.04mM,约0.04mM至约0.1mM,约0.04mM至约0.09mM,约0.04mM至约0.08mM,约0.04mM至约0.07mM,约0.04mM至约0.6mM,约0.04mM至约0.05mM,约0.05mM至约0.1mM,约0.05mM至约0.09mM,约0.05mM至约0.08mM,约0.05mM至约0.07mM,约0.05mM至约0.06mM,约0.06mM至约0.1mM,约0.06mM至约0.09mM,约0.06mM至约0.08mM,约0.06mM至约0.07mM,约0.07mM至约0.09mM,约0.07mM至约0.08mM,约0.08mM至约0.1mM,约0.08mM至约0.9mM,或约0.09mM至约0.1mM。在一些实施方案中,岩藻糖源为约0.01mM,约0.02mM,约0.03mM,约0.04mM,约0.05mM,约0.06mM,约0.07mM,约0.08mM,约0.09mM,约0.1mM,约0.11mM,约0.12mM,约0.13mM,约0.14mM,约0.15mM,约0.16mM,约0.17mM,约0.18mM,约0.19mM,约0.2mM,约0.3mM,约0.4mM,约0.5mM,约0.6mM,约0.7mM,约0.8mM,约0.9mM,或约1mM。

[0148] 在培养基中培养宿主细胞的方法是本领域技术人员熟知的。参见例如Li等人,MAbs,2,2010。在一些实施方案中,培养宿主细胞包括在不含岩藻糖源的培养基中培养宿主细胞,然后在含有岩藻糖源的培养基中培养宿主细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源在培养步骤开始时存在于培养基中。在一些实施方案中,在培养步骤期间将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,岩藻糖源以例如在至少 $2 \times 10^5$ 个细胞/mL的细胞密度时添加。在一些实施方案中,岩藻糖源以例如在50%溶解O<sub>2</sub>的氧气水平时添加。在一些实施方案中,岩藻糖源以例如在6g/L的葡萄糖水平时添加。在一些实施方案中,岩藻糖源在培养步骤开始时存在于培养基中,并且其中在培养步骤期间添加岩藻糖源。在一些实施方案中,在培养步骤期间通过快速浓注将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,在培养步骤期间通过连续进料将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,通过快速浓注将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,通过连续进料将岩藻糖源添加到培养基中。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0149] 培养条件(如温度、pH)可以是之前用于表达所选择宿主细胞的那些条件,并且对于普通技术人员而言是显而易见的。在一些实施方案中,在低于约37℃、36℃、35℃、34℃、

33°C、32°C、31°C或30°C下进行培养步骤。在一些实施方案中,在低于约37°C下进行培养步骤。在一些实施方案中,在低于约34°C下进行培养步骤。在一些实施方案中,在约37°C下进行培养步骤。在一些实施方案中,在约34°C下进行培养步骤。在一些实施方案中,在初始温度下进行培养步骤,然后转移至第二温度。在一些实施方案中,初始温度为约37°C,第二温度为约34°C。在一些实施方案中,初始温度为约34°C,第二温度为约37°C

[0150] 通常,以大规模(如商业规模)进行蛋白质的产生。为了获得适用于商业规模生产的宿主细胞群,本领域普通技术人员将认识到使用逐步扩大宿主细胞群的方法的效用。例如,该方法包括以较小规模生长所需宿主细胞以允许宿主细胞群(如种子驯养物(seed train))增加。为了进一步增加宿主细胞群,方法一般包括使用种子驯养物接种更大的培养罐(如接种罐)。通常,使用一系列递增尺寸的接种罐来扩大宿主细胞群,如接种驯养物(inoculum train)。该方法将为生产培养物(production culture)中的培养提供合适的宿主细胞群。在一些实施方案中,生产培养物是1000L培养罐。

[0151] 在一些实施方案中,提供了制备蛋白质的方法,所述方法包括使用分批进料方法培养宿主细胞。在一些实施方案中,提供了制备蛋白质的方法,所述方法包括使用连续进料方法培养宿主细胞。在一些实施方案中,提供制备含Fc的蛋白质的方法,所述方法包括使用包括分批进料方法和连续进料方法的进料方法培养宿主细胞。

[0152] 在其他方面,本申请提供了细胞培养物,其包含本文实施方案中描述的任何宿主细胞和包含低水平岩藻糖源的培养基。在一些实施方案中,细胞培养物可以进一步包含去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,细胞培养物可以进一步包含特定比例的去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含经工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中宿主细胞是敲除宿主细胞,并且培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含经工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源,其中蛋白质是含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,其中宿主细胞是敲除宿主细胞,并且培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源,其中蛋白质是含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含经工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源,其中蛋白质是抗体。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含工程化以表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,并且其中宿主细胞是敲除宿主细胞,并且培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源,其中蛋白质是抗体。在一些实施方案中,提供了细胞培养物,其包含以预定比例表达岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞基本上不包含FX和GMD活性。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩

藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0153] 在一些实施方案中,细胞培养物在生长环境中维持宿主细胞。在一些实施方案中,细胞培养物在产生蛋白质的环境中维持宿主细胞。在一些实施方案中,以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式产生蛋白质。

[0154] 在一些实施方案中,培养基包含约0.01mM至约1mM的岩藻糖源。在一些实施方案中,培养基包含约0.01mM至约0.1mM的岩藻糖源。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0155] 在一些实施方案中,细胞培养物是种子培养物。在一些实施方案中,细胞培养物是接种培养物。在一些实施方案中,接种物培养物是初级接种物培养物。在一些实施方案中,接种物培养物是次级接种物。在一些实施方案中,细胞培养系统包含生产培养物。

[0156] 在一些实施方案中,细胞培养物保持在特定温度。在一些实施方案中,特定温度为约15°C至约45°C。在一些实施方案中,特定温度为约30°C。在一些实施方案中,特定温度小于约37°C。在一些实施方案中,特定温度小于约35°C。在一些实施方案中,特定温度小于约34°C

[0157] 在一些实施方案中,细胞培养物维持在特定pH。在一些实施方案中,细胞培养物维持在特定的溶解氧浓度。在一些实施方案中,细胞培养物维持在特定营养水平。

[0158] 在一些实施方案中,细胞培养系统包含如本文实施方案中所述的蛋白质。在一些实施方案中,细胞培养物包含如本文实施方案中所述的多种蛋白质。在一些实施方案中,细胞培养物包含含有本文实施方案中所述的蛋白质的组合物。

[0159] 宿主细胞

[0160] 在一些方面,本申请提供了用于表达蛋白质的宿主细胞,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本不包含GMD活性。

[0161] 可以使用的宿主细胞是真核细胞,如酵母或高等真核细胞。高等真核细胞包括昆虫细胞和建立的哺乳动物来源的细胞系。

[0162] 合适的哺乳动物宿主细胞的实例包括猴肾细胞的COS-7系(ATCC CRL 1651)(Gluzman等人,Cell,23,1981)、L细胞、293细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物,如Veggie CHO和在无血清培养基中生长的相关细胞系(Rasmussen等人,Cytotechnology,28,1998)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL10)细胞系、以及源自非洲绿猴肾细胞系CVI(ATCC CCL 70)的CVI/EBNA细胞系(如McMahan等人,EMBO J,10,1991所述)、人胚胎肾细胞(如293、293EBNA或MSR 293)、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化的灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源自原代组织、原代外植体的体外培养的细胞株、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。任选地,例如,哺乳动物细胞系如HepG2/3B、KB、NIH 3T3或S49可用作宿主细胞。

[0163] 在一些实施方案中,宿主细胞是CHO细胞。CHO细胞在本领域中是公知的。参见例如Xu等人,Nat Biotechnol,29,2011。在一些实施方案中,宿主细胞是DP12宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是DUXB-11衍生的DHFR缺陷型DP12宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是CHO-K1宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是DHFR阳性CHO-K1宿主细胞。在一

些实施方案中,宿主细胞是CHOK1M宿主细胞。

[0164] 在一些实施方案中,宿主细胞是小鼠宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是Sp2/0宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是NS0宿主细胞。

[0165] 在一些实施方案中,宿主细胞是杂交瘤。在一些实施方案中,杂交瘤是产生抗体的细胞,其中在用抗原免疫宿主之后从宿主收集产生抗体的细胞。在一些实施方案中,产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合。在一些实施方案中,宿主细胞是小鼠骨髓瘤来源的细胞系。

[0166] 或者,宿主细胞可以是低等真核生物如酵母。合适的酵母包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母菌株(*Kluyveromyces strain*)、念珠菌(*Candida*)或任何能够表达异源多肽的酵母菌株。

[0167] 如本文所用,“基本上无FX活性或基本上无GMD活性”是指分别与包含没有失活的野生型FX或GMD基因的宿主细胞相比宿主细胞包含不超过40%的FX或GMD活性。在一些实施方案中,分别与包含没有失活的野生型FX或GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞包含不超过40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%FX或GMD活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型FX基因的宿主细胞相比,宿主细胞包含不超过20%、15%、10%或5%FX活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型FX基因的宿主细胞相比,宿主细胞不包含FX活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞包含不超过20%、15%、10%或5%GMD活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞不包含GMD活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型FX和GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞包含不超过20%、15%、10%或5%FX和GMD活性。在一些实施方案中,与包含没有失活的野生型FX和GMD基因的宿主细胞相比,宿主细胞不包含FX和GMD活性。

[0168] FX和GMD是属于补救途径的酶,其从L-岩藻糖产生GPD-岩藻糖。参见Becker和Lowe等人,Biochim Biophys Acta,1455,1999,193-204。在细胞溶质中,FX将L-岩藻糖转化成L-岩藻糖-1-磷酸,而GMD将L-岩藻糖-1-磷酸转化成GPD-岩藻糖。然后GPD-岩藻糖被转运到高尔基体腔,在那里作为底物用于使聚糖结构岩藻糖基化。

[0169] 在一些实施方案中,宿主细胞中的FX或GMD基因失活。如本文所用,“失活”是指抑制功能基因的翻译或潜在的将来的翻译(即功能酶的表达)。失活可发生在基因表达的任何阶段或进程,包括但不限于转录、翻译和蛋白质表达,失活可影响任何基因或基因产物,包括但不限于DNA、RNA,如mRNA和多肽。

[0170] 在一些实施方案中,宿主细胞中的FX或GMD基因失活,其中FX或GMD活性基于DNA水平。在一些实施方案中,宿主细胞中的FX或GMD基因失活,其中FX或GMD活性基于RNA水平。在一些实施方案中,宿主细胞中的FX或GMD基因失活,其中FX或GMD活性基于多肽水平。

[0171] 在本申请中还提供了产生敲除宿主细胞的方法。例如,方法包括但不限于使用CRISPR、TALEN、ZFN和大范围核酸酶系统。在一些实施方案中,宿主细胞包含基因缺失或基因添加或取代。

[0172] 通常,产生基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性的宿主细胞的方法包括使宿主细胞的FX或GMD基因失活。用于使宿主细胞中的FX或GMD基因失活的方法和技术包括但不限于小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA;也称为短发夹RNA)、成簇的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、同源重组、

非同源端连接、大范围核酸酶和酶抑制。参见例如O' Keefe, Mater Methods, 3, 2013; Doench等人, Nat Biotechnol, 32, 2014; Gaj等人, Trends Biotechnol, 31, 2014; 和Silva等人, Curr Gene Ther, 11, 2011。

[0173] 通常,本文使用的CRISPR系统可以包含半胱天冬酶(caspase)蛋白(如Cas9)和包含核苷酸序列的RNA序列(称为介导序列),其与感兴趣序列互补。半胱天冬酶和RNA序列形成识别宿主细胞DNA序列的复合体,并且随后半胱天冬酶的核酸酶活性允许切割DNA链。半胱天冬酶同种型具有单链DNA或双链DNA核酸酶活性。在CRISPR系统中介导RNA序列的设计和使用的介导RNA序列的数目允许去除基因特定的片段和/或添加DNA序列。

[0174] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中所述宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,所述方法包括使用CRISPR系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体包含DNA核酸内切酶基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体包含CAS基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体包含Cas9基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体编码Cas9基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含Cas蛋白质的CRISPR系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含Cas9蛋白质的CRISPR系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体编码能够与Cas9蛋白质相互作用的RNA分子。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体编码包含介导RNA(gRNA)单元的RNA分子,其中gRNA单元包含与FX或GMD基因序列的一部分互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含RNA分子的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述RNA分子包含gRNA单元,其中gRNA单元包含与FX或GMD基因序列的一部分互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体编码包含反式激活crRNA(tracrRNA)单元的RNA分子。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含RNA分子的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述RNA分子包含tracrRNA单元。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含编码载体的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述编码载体编码包含gRNA单元和tracrRNA单元的RNA分子,其中gRNA单元包含与基因序列的一部分互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用包含RNA分子的CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述RNA分子包含gRNA单元和tracrRNA单元,其中gRNA单元包含与FX或GMD基因序列的一部分互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用CRISPR系统失活FX或GMD基因,所述CRISPR系统包含:a)包含gRNA单元的第一RNA分子,其中gRNA单元包含与FX或GMD基因序列的一部分互补的第一核苷酸序列;和b)包含gRNA单元的

第二RNA分子，其中gRNA单元包含与FX或GMD基因序列的一部分互补的第二核苷酸序列。在一些实施方案中，第一核苷酸序列和第二核苷酸序列是不同的。在一些实施方案中，第一核苷酸序列与FX或GMD基因序列的一部分互补，该互补部分位于与第二核苷酸序列互补的FX或GMD基因部分的区域不同的位置。

[0175] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其包括将CRISPR系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其包括使用递送载体递送包含CRISPR系统的载体。在一些实施方案中，递送载体是病毒载体。在一些实施方案中，递送载体是慢病毒。在一些实施方案中，递送载体是腺病毒。在一些实施方案中，载体包含启动子。

[0176] 通常，本文使用的TALEN系统可以包含一种或多种限制性核酸酶和两种或更多种蛋白复合体以允许DNA序列的识别和随后的双链DNA切割。TALEN系统的蛋白复合体包含许多转录激活子样效应物 (TALE) (每个都识别特定的核苷酸) 和限制性核酸酶的结构域。通常，设计TALEN系统使得两个蛋白复合体 (各包含TALE和限制性核酸酶的结构域) 将以以下方式单独结合DNA序列：允许限制性核酸酶的两个结构域 (分别来自各蛋白复合体) 形成活性核酸酶并切割特定的DNA序列。设计TALEN系统中蛋白复合体数和待切割的序列以允许去除基因的特定片段和/或添加DNA序列。

[0177] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞具有降低水平的FX或GMD活性，所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其包括使用包含第一TALEN单元的TALEN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中，第一TALEN单元包含第一TALEN结合单元。在一些实施方案中，第一TALEN结合单元包含至少一种转录激活子样效应物 (TALE) 和第一核酸酶结构域。在一些实施方案中，第一TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第一核酸酶结构域，其中各TALE连接在一起并且其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中，第一TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第一核酸酶结构域，其中各TALE连接在一起并且其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分，其中连接的TALE进一步连接至第一核酸酶结构域。在一些实施方案中，第一TALEN单元还包含第二TALEN结合单元。在一些实施方案中，第二TALEN结合单元包含至少一种转录激活子样效应物 (TALE) 和第二核酸酶结构域。在一些实施方案中，第二TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第二核酸酶结构域，其中各TALE连接在一起并且其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中，第二TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第二核酸酶结构域，其中各TALE连接在一起并且其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分，并且其中连接的TALE进一步连接至第二核酸酶结构域。在一些实施方案中，第一TALEN结合单元和第二TALEN结合单元结合不同的FX或GMD基因的序列。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域和第二核酸酶结构域结合以包含活性限制性核酸内切酶。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域和第二核酸酶结构域结合以包含活性Fok1酶。

[0178] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用还包含第二TALEN单元的TALEN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,第二TALEN单元包含第三TALEN结合单元。在一些实施方案中,第三TALEN结合单元包含至少一种转录激活子样效应物(TALE)和第三核酸酶结构域。在一些实施方案中,第三TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第三核酸酶结构域,其中各TALE连接在一起并且其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中,第三TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第三核酸酶结构域,其中各TALE连接在一起,其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分,并且其中连接的TALE进一步连接至第三核酸酶结构域。在一些实施方案中,第二TALEN单元还包含第四TALEN结合单元。在一些实施方案中,第四TALEN结合单元包含至少一种转录激活子样效应物(TALE)和第四核酸酶结构域。在一些实施方案中,第四TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第四核酸酶结构域,其中各TALE连接在一起,其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中,第四TALEN结合单元包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个TALE和第四核酸酶结构域,其中各TALE连接在一起,其中连接的TALE识别FX或GMD核苷酸序列的一部分,并且其中连接的TALE进一步连接至第四核酸酶结构域。在一些实施方案中,第三TALEN结合单元和第四TALEN结合单元结合不同的FX或GMD基因的序列。在一些实施方案中,第三核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中,第三核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中,第三核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中,第四核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中,第四核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中,第四核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中,第三核酸酶结构域和第四核酸酶结构域结合以包含活性限制性核酸内切酶。在一些实施方案中,第三核酸酶结构域和第四核酸酶结构域结合以包含活性Fok1酶。

[0179] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含第一TALEN单元和第二TALEN单元,其结合不同的FX或GMD基因序列的不重叠的部分。

[0180] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含编码第一TALEN单元的编码载体。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含编码第一TALEN单元的编码载体,其中TALEN系统包含编码第二TALEN单元的编码载体。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含编码第一TALEN单元的编码载体,其中TALEN系统包含编码第一TALEN单元和第二TALEN单元的编码载体。

[0181] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含第一TALEN单元。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系

统包含第二TALEN单元。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用TALEN系统失活FX或GMD基因,其中TALEN系统包含第一TALEN单元和第二个TALEN单元。

[0182] 在一些实施方案中,第一TALEN结合单元包含一组连接的TALE,其中该组TALE识别核苷酸序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因的一部分的序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因启动子的一部分的序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因侧翼序列的一部分的序列。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因启动子的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因侧翼序列的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。

[0183] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将TALEN系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用递送载体递送包含TALEN系统的载体。在一些实施方案中,递送载体是病毒载体。在一些实施方案中,递送载体是慢病毒。在一些实施方案中,递送载体是腺病毒。

[0184] 通常,本文使用的ZFN系统可以包含一种或多种限制性核酸酶和两种或更多种蛋白复合体以允许DNA序列的识别和随后的双链DNA切割。ZFN系统的蛋白复合体包含许多锌指(每个都识别特定的核苷酸密码子)和限制性核酸酶的结构域。通常,设计ZFN系统使得两个蛋白复合体(各包含锌指和限制性核酸酶的结构域)将以以下方式单独结合DNA序列:允许限制性核酸酶的两个结构域(分别来自各蛋白复合体)形成活性核酸酶并切割特定的DNA序列。设计ZFN系统中蛋白复合体数和待切割的序列以允许去除基因的特定片段和/或添加DNA序列。

[0185] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX或基本上无GMD活性,所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含第一ZFN单元的ZFN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,第一ZFN单元包含第一ZFN结合单元。在一些实施方案中,第一ZFN结合单元包含至少一个锌指和第一核酸酶结构域。在一些实施方案中,第一ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第一核酸酶结构域,其中各锌指连接在一起并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中,第一ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第一核酸酶结构域,其中各锌指连接在一起并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分,其中连接的锌指进一步连接至第一核酸酶结构域。在一些实施方案中,第一ZFN单元还包含第二ZFN结合单元。在一些实施方案中,第二ZFN结合单元包含至少一个锌指和第二核酸酶结构域。在一些实施方案中,第二ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第二核酸酶结构域,其中各锌指连接在一起,并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中,第二ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第二核酸酶结构域,其中各锌指连接在一起,并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分,其中连接的锌指进一步连接至第二核酸酶结构域。在一些实施方案中,第一ZFN结合单元和第二ZFN结合单元结合不同的FX或GMD基因的序列。在一些实施方案中,第一核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中,第

一核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第二核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域和第二核酸酶结构域结合以包含活性限制性核酸内切酶。在一些实施方案中，第一核酸酶结构域和第二核酸酶结构域结合以包含活性Fok1酶。

[0186] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其包括使用还包含第二ZFN单元的ZFN系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中，第二ZFN单元包括第三ZFN结合单元。在一些实施方案中，第三ZFN结合单元包含至少一个锌指和第三核酸酶结构域。在一些实施方案中，第三ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第三核酸酶结构域，其中各锌指连接在一起，并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中，第三ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第三核酸酶结构域，其中各锌指连接在一起，并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分，并且其中连接的锌指还连接第三核酸酶结构域。在一些实施方案中，第二ZFN单元还包含第四ZFN结合单元。在一些实施方案中，第四ZFN结合单元包含至少一个锌指和第四核酸酶结构域。在一些实施方案中，第四ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第四核酸酶结构域，其中各锌指连接在一起，并且其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中，第四ZFN结合单元包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个锌指和第四核酸酶结构域，其中各锌指连接在一起，其中连接的锌指识别FX或GMD核苷酸序列的一部分，并且其中连接的锌指还连接第四核酸酶结构域。在一些实施方案中，第三ZFN结合单元和第四ZFN结合单元结合不同的FX或GMD基因的序列。在一些实施方案中，第三核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第三核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第三核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第四核酸酶结构域是核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第四核酸酶结构域是限制性核酸内切酶的结构域。在一些实施方案中，第四核酸酶结构域是Fok1的结构域。在一些实施方案中，第三核酸酶结构域和第四核酸酶结构域结合以包含活性限制性核酸内切酶。在一些实施方案中，第三核酸酶结构域和第四核酸酶结构域结合以包含活性Fok1酶。

[0187] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性，所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因，其中ZFN系统包含第一ZFN单元和第二TALEN单元，其结合FX或GMD基因序列的不同的、不重叠的部分。

[0188] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性，所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因，其中ZFN系统包含编码第一ZFN单元的编码载体。在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性，所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因，其中ZFN系统包含编码第一ZFN单元的编码载体，其中ZFN系统包括编码第二ZFN单元的编码载体。在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性，所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因，其中ZFN系统包含编码第一ZFN单元的编码载体，其中ZFN系统包含编码第一ZFN单元和第二ZFN单元的编码载体。

[0189] 在一些实施方案中，提供了产生宿主细胞的方法，其中宿主细胞基本上无FX活性

或基本上无GMD活性,所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因,其中ZFN系统包含第一ZFN单元。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因,其中ZFN系统包含第二ZFN单元。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用ZFN系统失活FX或GMD基因,其中ZFN系统包含第一ZFN单元和第二ZFN单元。

[0190] 在一些实施方案中,第一ZFN结合单元包含一组连接的锌指,其中该组锌指识别核苷酸序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因的一部分的序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因启动子的一部分的序列。在一些实施方案中,核苷酸序列是包含FX或GMD基因侧翼序列的一部分的序列。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因启动子的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。在一些实施方案中,该序列与FX或GMD基因侧翼序列的一部分至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%同源。

[0191] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将ZFN系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用递送载体递送包含ZFN系统的载体。在一些实施方案中,递送载体是病毒载体。在一些实施方案中,递送载体是慢病毒。在一些实施方案中,递送载体是腺病毒。

[0192] 通常,本文使用的大范围核酸酶系统可以包含一种或多种允许识别DNA序列和随后的双链DNA切割的大范围核酸酶。

[0193] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法包括使用大范围核酸酶系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,大范围核酸酶具有长度约8至约35个核苷酸碱基对的DNA识别序列。在一些实施方案中,大范围核酸酶具有长度约12至约30个核苷酸碱基对的DNA识别序列。在一些实施方案中,DNA识别序列是包含FX或GMD基因的一部分的序列。在一些实施方案中,DNA识别序列是包含FX或GMD基因启动子的一部分的序列。在一些实施方案中,DNA识别序列是包含FX或GMD基因侧翼序列的一部分的序列。

[0194] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将大范围核酸酶系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用递送载体递送包含大范围核酸酶系统的载体。在一些实施方案中,递送载体是病毒载体。在一些实施方案中,递送载体是慢病毒。在一些实施方案中,递送载体是腺病毒。

[0195] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性或基本上无GMD活性,所述方法还包括测定FX或GMD活性的水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中检测FX或GMD基因缺失。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中检测FX或GMD基因添加或取代。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中在失活宿主细胞中的基因之前测定FX或GMD表达水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中在使用CRISPR系统失活宿主细胞中的FX或GMD基因之后测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞

的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中在使用TALEN系统失活宿主细胞中的FX或GMD基因之后测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD活性水平,其中在使用ZFN系统失活宿主细胞中的FX或GMD基因之后测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括测定FX或GMD基因失活水平,其中在使用大范围核酸酶系统失活宿主细胞中的FX或GMD基因之后测定FX或GMD活性水平。

[0196] 在本文公开的一些方法中,在DNA水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,在RNA水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用PCR测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用PCR测定FX或GMD活性水平,其中检测变体序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用qPCR测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用qPCR测定FX或GMD活性水平。

[0197] 在本文公开的一些方法中,可以在蛋白质水平测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用免疫组织化学测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用Western blot测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用流式细胞术测定FX或GMD活性水平。

[0198] 在一些实施方案中,通过比较FX或GMD基因失活后的FX或GMD活性水平与对照值来测定FX或GMD基因失活水平。在一些实施方案中,通过比较FX或GMD基因失活后的FX或GMD活性水平与FX或GMD基因失活前的FX或GMD活性水平来测定FX或GMD基因失活水平。

[0199] 在一些实施方案中,通过小干扰RNA (siRNA) 系统失活FX或GMD基因,其中宿主细胞包含siRNA系统。

[0200] 在一些实施方案中,siRNA系统包含长度约10至200个核苷酸、或长度约10至100个核苷酸、或长度约15至100个核苷酸、或长度约10至60个核苷酸、或长度约15至60个核苷酸、或长度约10至50个核苷酸、或长度约15至50个核苷酸、或长度约10至30个核苷酸、或长度约15至30个核苷酸的siRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA核苷酸序列的长度为约10-25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA核苷酸序列的长度为约15-25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA核苷酸序列的长度为至少约10、至少约15、至少约20或至少约25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA系统包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA系统包含与FX或GMD pro-mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA系统包含双链RNA分子。在一些实施方案中,siRNA系统包含单链RNA分子。在一些实施方案中,宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的siRNA系统。在一些实施方案中,宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的pro-siRNA核苷酸序列,其被加工成活性siRNA分子。在一些实施方案中,宿主细胞包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的siRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,宿主细胞包含编码如本文任何实施方案中所述的siRNA分子的表达载体。在一些实施方案中,宿主细胞包含编码如本文任何实施方案中所述的pro-siRNA分子的表达载体。

[0201] 在一些实施方案中, siRNA系统包含递送载体。在一些实施方案中, 宿主细胞包含递送载体。在一些实施方案中, 递送载体包含pro-siRNA和/或siRNA分子。

[0202] 在一些实施方案中, 通过小发夹RNA (shRNA; 也称为短发夹RNA) 系统失活FX或GMD基因, 其中宿主细胞包含shRNA系统。通过shRNA系统的基因失活在本领域中是公知的。在一些实施方案中, shRNA系统包含长度约10至200个核苷酸、或长度约10至100个核苷酸、或长度约15至100个核苷酸、或长度约10至60个核苷酸、或长度约15至60个核苷酸、或长度约10至50个核苷酸、或长度约15至50个核苷酸、或长度约10至30个核苷酸、或长度约15至30个核苷酸的核苷酸序列。在一些实施方案中, shRNA核苷酸序列的长度为约10-25个核苷酸。在一些实施方案中, shRNA核苷酸序列的长度为约15-25个核苷酸。在一些实施方案中, shRNA核苷酸序列的长度为至少约10、至少约15、至少约20或至少约25个核苷酸。在一些实施方案中, shRNA系统包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中, shRNA系统包含与FX或GMD pro-mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中, shRNA系统包含双链RNA分子。在一些实施方案中, shRNA系统包含单链RNA分子。在一些实施方案中, 宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的shRNA系统。在一些实施方案中, 宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的pre-shRNA核苷酸序列, 其被加工成活性shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中, pro-shRNA分子由DNA组成。在一些实施方案中, pro-shRNA分子是DNA构建体。在一些实施方案中, 宿主细胞包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中, 宿主细胞包含编码如本文任何实施方案中所述的shRNA分子的表达载体。在一些实施方案中, 宿主细胞包含编码如本文任何实施方案中所述的pro-shRNA分子的表达载体。

[0203] 在一些实施方案中, shRNA系统包含递送载体。在一些实施方案中, 宿主包含递送载体。在一些实施方案中, 递送载体包含pro-shRNA和/或shRNA分子。

[0204] 在一些实施方案中, FX或GMD基因被失活, 其中宿主细胞包含基因缺失。如本文所用, “基因缺失”是指从基因或在基因附近除去DNA序列的至少一部分, 如单个核酸。在一些实施方案中, 进行基因缺失的序列包含基因的外显子序列。在一些实施方案中, 进行基因缺失的序列包含基因的启动子序列。在一些实施方案中, 进行基因缺失的序列包含基因的侧翼序列。在一些实施方案中, 从基因去除基因序列的一部分。在一些实施方案中, 从FX或GMD基因或在FX或GMD基因附近去除FX或GMD基因序列的一部分。在一些实施方案中, 从染色体中去除完整的基因序列。在一些实施方案中, 从染色体中去除完整的FX或GMD序列。在一些实施方案中, 宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的基因缺失。在一些实施方案中, 宿主细胞包含FX或GMD基因中的基因缺失。在一些实施方案中, 宿主细胞包含在FX或GMD基因附近的基因缺失。

[0205] 在一些实施方案中, FX或GMD基因被失活, 其中宿主细胞包含基因添加或取代。如本文所用, “基因添加”或“基因取代”是指基因序列的改变, 包括插入或取代一个或多个核苷酸或核苷酸碱基对。在一些实施方案中, 基因的内含子序列被改变。在一些实施方案中, 基因的外显子序列被改变。在一些实施方案中, 基因的启动子序列被改变。在一些实施方案中, 基因的侧翼序列被改变。在一些实施方案中, 将一个核苷酸或核苷酸碱基对添加至基因

序列。在一些实施方案中,将至少一个连续的核苷酸或核苷酸碱基对添加至基因序列。在一些实施方案中,宿主细胞包含如本文任何实施方案中所述的基因添加或取代。在一些实施方案中,宿主细胞包含FX或GMD基因中的基因添加或基因取代。在一些实施方案中,宿主细胞包含FX和GMD基因中的基因添加或基因取代。

[0206] 在一些实施方案中,通过基因缺失使FX或GMD基因失活,其中基因序列中至少一个核苷酸或核苷酸碱基对的缺失导致非功能性基因产物。在一些实施方案中,通过基因缺失使FX或GMD基因失活,其中缺失基因序列的至少一个核苷酸产生不再具有原始基因产物功能或活性的基因产物。在一些实施方案中,通过基因缺失使FX或GMD基因失活,其中缺失基因序列的至少一个核苷酸产生功能失调的基因产物。

[0207] 在一些实施方案中,通过基因添加或取代使FX或GMD基因失活,其中FX或GMD基因序列中至少一个核苷酸或核苷酸碱基对的添加或取代产生非功能性基因产物。在一些实施方案中,通过基因失活使FX或GMD基因失活,其中FX或GMD基因序列中至少一个核苷酸的掺入或取代产生不再具有原始基因产物功能或活性的基因产物。在一些实施方案中,通过基因添加或取代使FX或GMD基因失活,其中在FX或GMD基因序列中至少一个核苷酸的掺入或取代产生功能失调的基因产物。

[0208] 在一些实施方案中,宿主细胞包含非功能性FX或GMD基因产物。在一些实施方案中,宿主细胞包含分别不具有原始FX或GMD基因产物功能或活性的FX或GMD基因产物。在一些实施方案中,宿主细胞包含功能失调的FX或GMD基因产物。

[0209] 在一些实施方案中,宿主细胞包含失活的FX或GMD基因,其中失活的FX或GMD基因分别不表达全长的和功能性的FX或GMD基因产物(例如全长FX或GMD多肽序列)。在一些实施方案中,宿主细胞包含失活的FX或GMD基因,其中失活的FX或GMD基因分别不表达内源FX或GMD基因产物序列。在一些实施方案中,宿主细胞包含失活的FX或GMD基因,其中失活的FX或GMD基因分别表达变体FX或GMD基因产物。在一些实施方案中,宿主细胞包含变体FX或GMD基因产物。

[0210] 在一些实施方案中,宿主细胞包含递送载体。在一些实施方案中,递送载体是病毒载体。在一些实施方案中,递送载体是慢病毒。在一些实施方案中,递送载体是腺病毒。在一些实施方案中,载体包含启动子。

[0211] 在一些实施方案中,宿主细胞是稳定的敲低宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是稳定的FX或GMD敲低细胞系。在一些实施方案中,宿主细胞是瞬时敲低细胞系。在一些实施方案中,宿主细胞是瞬时FX或GMD敲低细胞系。

[0212] 在一些实施方案中,通过小干扰RNA(siRNA)系统失活FX或GMD基因。鉴定适用于FX或GMD基因失活的siRNA序列的方法在本领域中是公知的。例如,开发和鉴定靶向FX或GMD基因的siRNA的一般考虑包括:a) 长度优选为21-23个核苷酸的第一搜索序列(随后根据需要减少序列长度),b) 避免起始密码子和终止密码子的50-100个碱基对内的区域,c) 避免内含子区域,d) 避免四个或更多个碱基的延伸,例如AAAA,e) 避免GC含量小于30%或大于60%的区域,f) 避免重复和低序列复杂性,g) 避免单核苷酸多态性位点,和h) 避免与其他脱靶基因中的序列互补的序列。参见例如Rules of siRNA design for RNA interference, Protocol Online, May 29, 2004; 和Reynolds等人,Nat Biotechnol, 22, 2004。

[0213] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上无FX活性

或基本上无GMD活性,所述方法包括使用siRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用siRNA系统失活FX或GMD基因,所述siRNA系统包含长度约10至200个核苷酸、或长度约10至100个核苷酸、或长度约15至100个核苷酸、或长度约10至60个核苷酸、或长度约15至60个核苷酸、或长度约10至50个核苷酸、或长度约15至50个核苷酸、或长度约10至30个核苷酸、或长度约15至30个核苷酸的siRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含长度约10-25个核苷酸的siRNA核苷酸序列的siRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含长度约15-25个核苷酸的siRNA核苷酸序列的siRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含长度至少约10、至少约15、至少约20或至少约25个核苷酸的siRNA核苷酸序列的siRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用siRNA系统失活FX或GMD基因,所述siRNA系统包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用siRNA系统失活FX或GMD基因,所述siRNA系统包含与FX或GMD pro-mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的siRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含双链RNA分子的siRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含单链RNA分子的siRNA系统失活FX或GMD基因。

[0214] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将siRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将siRNA系统递送至宿主细胞,其中所述siRNA系统包含siRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用电穿孔将siRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用转染技术将siRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用病毒将siRNA系统递送至宿主细胞。

[0215] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,所述方法还包括测定宿主细胞中的FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,测定FX或GMD活性水平包括在将siRNA核苷酸序列递送至宿主细胞之前测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,测定FX或GMD活性水平包括在将siRNA核苷酸序列递送至宿主细胞之后测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,在RNA水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用PCR测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,在蛋白质水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用免疫组织化学测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用Western blot测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用流式细胞术测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过比较siRNA递送后的FX或GMD活性水平与对照值来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过比较siRNA递送后的FX或GMD活性水平与野生型值来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过分别比较siRNA递送后的FX或GMD活性水平与FX或GMD siRNA递送前的FX或GMD活性水平来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,FX或GMD活性水平基于FX或GMD基因的表达水平,如FX或GMD RNA

和/或蛋白质的表达。在一些实施方案中,FX或GMD活性水平基于FX或GMD蛋白质的表达水平。

[0216] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,所述方法包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因,所述shRNA系统包含长度约10至200个核苷酸、或长度约10至100个核苷酸、或长度约15至100个核苷酸、或长度约10至60个核苷酸、或长度约15至60个核苷酸、或长度约10至50个核苷酸、或长度约15至50个核苷酸、或长度约10至30个核苷酸、或长度约15至30个核苷酸的shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因,所述shRNA系统包含长度约10-25个核苷酸的shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因,所述shRNA系统包含长度至少约10、至少约15、至少约20或至少约25个核苷酸的shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因,所述shRNA系统包含与FX或GMD mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,所述方法包括使用shRNA系统失活FX或GMD基因,所述shRNA系统包含与FX或GMD pro-mRNA分子的区域至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或100%互补的shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含双链RNA分子的shRNA系统失活FX或GMD基因。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用包含单链RNA分子的shRNA系统失活FX或GMD基因。

[0217] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将shRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括将shRNA系统递送至宿主细胞,其中shRNA系统包含shRNA核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用电穿孔将shRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用转染技术将shRNA系统递送至宿主细胞。在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其包括使用病毒将shRNA系统递送至宿主细胞。

[0218] 在一些实施方案中,提供了产生宿主细胞的方法,其中宿主细胞基本上不包含FX活性或基本上不包含GMD活性,所述方法还包括测定宿主细胞中的FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,测定FX或GMD活性水平包括在将shRNA核苷酸序列递送至宿主细胞之前测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,测定FX或GMD活性水平包括在将shRNA核苷酸序列递送至宿主细胞之后测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,在RNA水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用PCR测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,在蛋白质水平上测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用免疫组织化学测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用Western blot测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,提供了测定FX或GMD活性水平的方法,其包括使用流式细胞术测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过比较shRNA递送后的FX或GMD活性水

平与对照值来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过比较shRNA递送后的FX或GMD活性水平与野生型值来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,通过分别比较shRNA递送后的FX或GMD活性水平与FX或GMD shRNA递送前的FX或GMD表达水平来测定FX或GMD活性水平。在一些实施方案中,FX或GMD活性水平基于FX或GMD基因的表达水平,如FX或GMD RNA和/或蛋白质的表达。在一些实施方案中,FX或GMD活性水平基于FX或GMD蛋白质的表达水平。

[0219] 在一些实施方案中,宿主细胞还包含FX或GMD以外的失活基因。

[0220] 通常,用包含编码所需蛋白质的DNA的重组表达载体转化宿主细胞。另外,本申请的宿主细胞可以是空白宿主细胞。如本文所用,“空白宿主”是指不含编码蛋白质的表达载体的细胞。在一些实施方案中,空白宿主细胞是CHO细胞。在一些实施方案中,空白宿主细胞是小鼠细胞。

[0221] 本申请还提供了包含编码本文所述蛋白质的核酸的宿主细胞。本发明提供的核酸分子包括单链和双链形式的DNA和RNA以及相应的互补序列。DNA包括例如cDNA、基因组DNA、化学合成的DNA、通过PCR扩增的DNA及其组合。本发明的核酸分子包括全长基因或cDNA分子以及其片段的组合。本文提供的核酸优选来自人源。

[0222] 在某些实施方案中,核酸基本上不含污染的内源物质。核酸分子优选源自至少一次以能够通过标准生物化学方法(如在Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY(1989)中列出的那些)鉴定、操作和回收其组成核苷酸序列的基本上纯的形式和量或浓度分离的DNA或RNA。这样的序列优选以通常不被存在于真核基因中的内部非翻译序列或内含子间断的开放阅读框的形式提供和/或构建。非翻译DNA的序列可以存在于开放阅读框的5'或3',其中该非翻译DNA的序列不干扰编码区的操作或表达。

[0223] 在一些实施方案中,宿主细胞能够表达蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞能够表达含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞包含蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞包含含Fc的蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞能够分泌蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞能够分泌含Fc的蛋白质。

[0224] 在一些实施方案中,宿主细胞能够以与在FX或GMD基因失活之前宿主细胞输出量相似的输出量表达蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞能够以与在FX或GMD基因失活之前宿主细胞输出量相同的输出量表达蛋白质。在一些实施方案中,宿主细胞能够以FX或GMD基因失活之前宿主细胞输出量的约70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的输出量表达蛋白质。

[0225] 在一些实施方案中,宿主细胞还包含基因修饰。为了产生蛋白质的目的通过基因修饰优化宿主细胞是本领域公知的,其包括考虑例如用于整合方法的载体选择特性以及产生蛋白质的操作所需的任何其他细胞特性。在一些实施方案中,基因修饰是靶向基因修饰。在一些实施方案中,基因修饰是敲除基因修饰。在一些实施方案中,基因修饰是敲入基因修饰。

[0226] 还提供评估宿主细胞是否适合表达蛋白质的方法,其包括测定FX或GMD活性,其中降低的FX或GMD活性水平表示适合。

[0227] 细胞经工程化以产生蛋白质

[0228] 本申请在一些方面提供了经工程化以产生如本文实施方案中所述的蛋白质的宿主细胞。本申请在其他方面提供了如本文实施方案中所述的制备宿主细胞的方法。

[0229] 在一些实施方案中,宿主细胞经工程化以产生蛋白质。

[0230] 在一些实施方案中,提供了用于制备经工程化以产生蛋白质的宿主细胞的方法,其包括:a)用包含编码蛋白质的核酸的表达载体转化宿主细胞。

[0231] 使用表达载体转化宿主细胞的方法在本领域中是公知的。参见例如, Kim等人, Anal Bioanal Chem, 397, 2010。用于转染宿主细胞的方法包括但不限于转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂质转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或其他已知技术。选择的方法部分取决于待使用的宿主细胞的类型。这些方法和其他合适的方法是本领域技术人员所熟知的。

[0232] 还提供了包含至少一种本文所述的蛋白质的质粒、表达载体、转录或表达盒形式的表达系统和构建体。在某些实施方案中,本文提供的质粒、表达载体、转录或表达盒包含编码至少一种蛋白质的多核苷酸。

[0233] 在一些实施方案中,宿主细胞中使用的表达载体将含有用于维持质粒以及用于克隆和表达外源核苷酸序列的序列。在某些实施方案中此类序列(统称为“侧翼序列”)通常包含一个或多个以下核苷酸序列:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完整内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、用于插入编码待表达蛋白质的核酸的多连接区和可选择的标记元件。下面讨论这些序列中的每一个。

[0234] 侧翼序列可以是同源的(即来自与宿主细胞相同的物种和/或菌株)、异源的(即来自不同于宿主细胞物种或菌株的物种)、杂合的(即来自超过一个来源的侧翼序列的组合)、合成的或天然的。因此,侧翼序列的来源可以是任何真核生物、任何脊椎动物或无脊椎动物或任何植物,只要侧翼序列在宿主细胞机制中起作用并且可以被宿主细胞机制激活。

[0235] 在本发明载体中有用的侧翼序列可以通过本领域公知的几种方法中的任何一种获得。典型地,本文有用的侧翼序列先前已通过作图(mapping)和/或通过限制性内切酶消化鉴定,并因此可使用适当的限制性核酸内切酶从适当的组织来源分离。在一些情况下,侧翼序列的全部核苷酸序列可能是已知的。本文,可以使用本文所述的用于核酸合成或克隆的方法来合成侧翼序列。

[0236] 无论侧翼序列的全部还是仅有部分是已知的,可以使用聚合酶链式反应(PCR)和/或通过用合适的探针(如寡核苷酸和/或来自相同或另一物种的侧翼序列片段)筛选基因组文库来获得侧翼序列。在侧翼序列未知的情况下,可以从可能含有例如编码序列或甚至另一个或多个基因的较大DNA片段中分离含有侧翼序列的DNA片段。可以通过限制性核酸内切酶消化,以产生正确的DNA片段,然后使用琼脂糖凝胶纯化、**Qiagen®**柱色谱法(Chatsworth, CA)或本领域技术人员已知的其他方法完成分离。对于本领域的普通技术人员而言,选择合适的酶实现该目的是显而易见的。

[0237] 复制起点通常是商业购买的表达载体的一部分,并且该起点有助于在宿主细胞中扩增载体。如果选择的载体不含复制位点的起点,可以基于已知序列化学合成,并连接到载体中。例如,各种病毒起点(例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)或乳头瘤病毒如HPV或BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通

常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(例如,通常使用SV40起点,仅因为其也含有病毒早期启动子)。

[0238] 转录终止序列通常位于多肽编码区的3'端并用于终止转录。虽然该序列容易从文库中克隆或者甚至作为载体的一部分商业购买,但其也可以使用用于核酸合成的方法如本文所述的方法容易地合成。

[0239] 可选择的标记基因编码在选择培养基中生长的宿主细胞存活和生长所必需的蛋白质。典型的选择标记基因编码蛋白质,其(a)赋予对抗生素或其他毒素的抗性;(b)补充细胞的营养缺陷;或(c)提供复合或限定的培养基所不能提供的重要营养物。具体的可选择标记是卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因。有利地,新霉素抗性基因也可用于在真核宿主细胞中的选择。

[0240] 其他可选择的基因可用于扩增待表达的基因。扩增是在连续几代重组细胞的染色体中以串联方式重复产生对于生长或细胞存活重要的蛋白质所需的基因的过程。适用于哺乳动物细胞的可选择标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子胸苷激酶基因。将哺乳动物细胞转化体置于选择压力下,其中只有转化体由于存在于载体中的可选择基因而独特地适应生存。通过在递增培养基中的选择试剂浓度的条件下培养转化的细胞而施加选择压力,从而导致可选择基因和编码另一基因(如抗体轻或重链)的DNA扩增。结果,从扩增的DNA合成增加量的多肽。

[0241] 起始mRNA的翻译通常需要核糖体结合位点,所述核糖体结合位点的特征在于例如Kozak序列。元件通常位于启动子的3'和待表达多肽的编码序列的5'。在某些实施方案中,一个或多个编码区有效地连接至内部核糖体结合位点(IRES),从而允许从单个RNA转录本翻译两个开放阅读框。

[0242] 本发明的表达和克隆载体通常含有被宿主生物体识别并有效地连接至编码多肽的分子的启动子。启动子是位于结构基因起始密码子上游(即5')的非转录序列(通常在约100至1000bp内),其控制结构基因的转录。启动子通常分组为两个类别之一:诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子响应培养条件中的一些变化(如存在或不存在营养物或温度变化)启动在其控制下的DNA增加的转录水平。另一方面,组成型启动子一致地转录其有效地连接的基因,即对基因表达很少或没有控制。许多可被各种潜在宿主细胞识别的启动子是公知的。通过限制性酶消化从源DNA去除启动子并将所需的启动子序列插入载体中,将合适的启动子有效地连接至编码例如重链或轻链的DNA。

[0243] 与酵母宿主使用的合适启动子在本领域中也是公知的。酵母增强子有利地与酵母启动子使用。与哺乳动物宿主细胞使用的启动子是公知的,包括但不限于从病毒(如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒、最优先猿猴病毒40(SV40))的基因组获得的那些启动子。其他合适的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子和肌动蛋白启动子。

[0244] 其他可能感兴趣的启动子包括但不限于:SV40早期启动子(Benoist和Chambon,1981,Nature 290:304-310);CMV启动子(Thomsen等人,1984,Proc.Natl.Acad.U.S.A.81:659-663);包含在Rous肉瘤病毒的3'长末端重复中的启动子(Yamamoto等人,1980,Cell 22:787-797);疱疹胸苷激酶启动子(Wagner等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1444-1445);来自金属硫蛋白基因的启动子和调控序列Prinster等人,1982,Nature 296:

39-42;或tac启动子(DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25)。还感兴趣的是下列动物转录控制区,其显示组织特异性并已用于转基因动物:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人,1984,Cell 38:639-646;Omitz等人,1986,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409;MacDonald,1987,Hepatology 7:425-515);在胰腺β细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan,1985,Nature 315:115-122);在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人,1984,Cell 38:647-658;Adames等人,1985,Nature 318:533-538;Alexander等人,1987,Mol.Cell.Biol.7:1436-1444);在睾丸、乳腺、淋巴样和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder等人,1986,Cell 45:485-495);在肝中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等人,1987,Genes and Devel.1:268-276);在肝中有活性的α胎甲球蛋白基因控制区(Krumlauf等人,1985,Mol.Cell.Biol.5:1639-1648;Hammer等人,1987,Science 253:53-58);在肝中有活性的α1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人,1987,Genes and Devel.1:161-171);在骨髓细胞中有活性的β-珠蛋白基因控制区(Mogram等人,1985,Nature 315:338-340;Kollias等人,1986,Cell 46:89-94);在脑的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead等人,1987,Cell 48:703-712);在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani,1985,Nature 314:283-286);和在下丘脑中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等人,1986,Science 234:1372-1378)。

[0245] 可以将增强子序列插入载体中以通过高等真核生物增加编码本发明轻链或重链的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常长度约10-300bp,作用于启动子以增加转录。增强子是相对定向和位置独立的,已经在转录单元的5'和3'位置都发现增强子。可以哺乳动物基因(例如,珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、α胎甲球蛋白和胰岛素)获得的几种增强子序列是已知的。然而,通常使用来自病毒的增强子。本领域已知的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤增强子和腺病毒增强子是用于激活真核生物启动子的示例性增强元件。尽管增强子可以在载体中位于编码序列的5'或3',但其通常位于启动子5'的位点。编码适当的天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)的序列可以并入表达载体中以促进抗体的细胞外分泌。信号肽或前导序列的选择取决于产生抗体的宿主细胞的类型,并且异源信号序列可置换天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中有功能的信号肽的实例包括以下:美国专利号4,965,195中描述的白细胞介素-7(IL-7)的信号序列;Cosman等人,1984,Nature 312:768中描述的白细胞介素-2受体的信号序列;EP专利号0367566中描述的白细胞介素-4受体信号肽;美国专利号4,968,607中描述的I型白细胞介素-1受体信号肽;EP专利号0 460 846中描述的II型白细胞介素-1受体信号肽。

[0246] 当载体整合到宿主细胞基因组中时,载体可以含有一种或多种促进表达的元件。实例包括EASE元件(Aldrich等人2003Biotechnol Prog.19:1433-38)和基质结合区(MAR)。MAR介导染色质的结构组织并且可以使整合的载体免受“位置”效应。因此,当载体用于产生稳定的转染体时,MAR特别有用。许多天然和合成的含MAR的核酸在本领域中是已知的,例如,美国专利号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。

[0247] 本发明提供的表达载体可以从起始载体(如市售载体)构建。这种载体可能含有或可能不含有所需的侧翼序列。当一个或多个本文所述的侧翼序列不存在于载体中时,

可以单独获得这些侧翼序列并连接到载体中。用于获得每个侧翼序列的方法是本领域技术人员熟知的。

[0248] 在构建载体并将编码蛋白质序列的核酸分子插入载体的适当位点之后,可以将完成的载体插入合适的宿主细胞中用于扩增和/或多肽表达。

[0249] 用于制备包含编码蛋白质(如含Fc的蛋白质)的核酸的载体的方法在本领域中是公知的。参见例如美国专利号7,923,221。

[0250] 包含蛋白质和所需编码和控制序列的合适载体的构建采用标准连接技术。以形成要求质粒的所需形式切割、剪裁并重新连接分离的质粒或DNA片段。所采用的方法不依赖于DNA来源或预期的宿主。

[0251] 在一些实施方案中,提供了制备蛋白质的方法,其进一步包括确定导入宿主细胞中的多核苷酸的最佳比例。在一些实施方案中,质谱法用于测定蛋白质产率,并调节比率以使蛋白质产率最大化。在一些实施方案中,使用双抗原ELISA来测定蛋白质(如含Fc的蛋白质)产率,并调节比率以使蛋白质产率最大化。

[0252] 纯化

[0253] 在一些方面,本文所述的方法还包括分离通过本文所述方法产生的蛋白质的方法。

[0254] 获得蛋白质的方法在本领域中是公知的。参见例如Huse等人,J Biochem Bioph Meth,51,2002。蛋白质可以在细胞内产生或直接分泌到培养基中。如果蛋白质在细胞内产生,作为第一步,通过例如离心或超滤除去微粒碎片(宿主细胞或裂解片段)。如果蛋白质分泌到培养基中,则通常首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellecon超滤单元)浓缩来自这种表达系统的上清液。在一些实施方案中,在任何前述步骤中可包括蛋白酶抑制剂以抑制蛋白水解,并可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0255] 可以使用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法来纯化由细胞制备的组合物,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。对于含Fc的蛋白质,蛋白A作为亲和配体的适合性取决于存在于含Fc的蛋白质中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可以用于纯化基于含有1、2或4重链的人免疫球蛋白的含Fc的蛋白质(参见,例如,Lindmark等人,J Immunol Meth,62,1983)。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人3(参见例如Guss等人,EMBO,5,1986)。亲和配体所连接的基质通常是琼脂糖,但其他基质是可用的。机械稳定的基质(如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯)比用琼脂糖可以实现更快的流速和更短的处理时间。根据待回收的蛋白质可以使用用于蛋白质纯化的其他技术,如在离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上的色谱法、在肝素SEPHAROSE<sup>TM</sup>上的色谱,在阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的色谱法、聚焦色谱法、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0256] 在一些实施方案中,提供了一种纯化蛋白质的方法,其包括使用过滤器。在一些实施方案中,过滤器是渗滤系统。在一些实施方案中,过滤器是超滤系统。在一些实施方案中,过滤器是病毒过滤系统。在一些实施方案中,纯化蛋白质包括使用一系列过滤步骤。在一些实施方案中,一系列过滤步骤选自以下中的至少一种:渗滤、超滤和病毒过滤。

[0257] 在一些实施方案中,提供了纯化蛋白质的方法,其包括使用一系列蛋白质纯化技术,所述蛋白质纯化技术选自过滤、蛋白A纯化、阳离子交换纯化、强阳离子交换纯化、阴离

子交换纯化、反相纯化和多模式纯化。

[0258] 组合物

[0259] 本申请在一些方面提供了一种包含聚糖结构的蛋白质，其中该蛋白质以预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质通过本文公开的任何方法产生。

[0260] 在一些实施方案中，蛋白质是含Fc的蛋白质。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含Fc结构域。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含一个或多个Fc结构域。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含两个Fc结构域。

[0261] 在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含重链或其片段。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含至少一条重链。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含一条或多条重链。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质包含两条重链。

[0262] 在一些实施方案中，含Fc的蛋白质是全长抗体。在一些实施方案中，全长抗体是人抗体。在一些实施方案中，全长抗体是人源化抗体。在一些实施方案中，全长抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，全长抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中，全长抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中，全长抗体是多特异性抗体。

[0263] 在一些实施方案中，含Fc的蛋白质是含Fc的融合蛋白。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白包含一个或多个Fc结构域。

[0264] 在一些实施方案中，含有Fc的融合蛋白的Fc结构域延长含Fc的融合蛋白的血浆半衰期。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白的Fc结构域延长含Fc的融合蛋白的生物活性。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白的Fc结构域降低含Fc的融合蛋白的肾清除率。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白的Fc结构域增加含Fc的融合蛋白的溶解度。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白的Fc结构域增加含Fc的融合蛋白的稳定性。

[0265] 含Fc的融合蛋白在本领域中是公知的。参见例如Czajkowsky等人EMBO Mol Med, 4, 2012, 1015-1028。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白是免疫粘附素。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白是细胞因子-Fc融合蛋白。

[0266] 在一些实施方案中，蛋白质是多聚体蛋白质。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质是多聚体蛋白质。在一些实施方案中，含Fc的融合蛋白是多聚体蛋白质。

[0267] 在一些实施方案中，蛋白质缀合至试剂。在一些实施方案中，蛋白质缀合至至少约2、3、4、5、6、7、8、9或10个分子的试剂。在一些实施方案中，蛋白质缀合至约2-10、约4-10、约6-10或约8-10个分子的试剂。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质缀合至试剂，其中试剂缀合至含Fc的蛋白质的Fc结构域。在一些实施方案中，试剂是治疗剂。在一些实施方案中，治疗剂是小分子治疗剂。在一些实施方案中，治疗剂是化疗剂。在一些实施方案中，试剂是检测剂。在一些实施方案中，检测剂是放射性标记。在一些实施方案中，检测剂是荧光标记。在一些实施方案中，检测剂是免疫标记。在一些实施方案中，蛋白质是伴随诊断剂。在一些实施方案中，含Fc的蛋白质是伴随诊断剂。

[0268] 在一些实施方案中，蛋白质包含翻译后修饰。在一些实施方案中，翻译后修饰是非酶促产生的。在一些实施方案中，翻译后修饰是酶促产生的。在一些实施方案中，翻译后修饰选自二硫化物配对、脱酰胺化、氧化和N-末端谷氨酰胺环化。

[0269] 在一些实施方案中，蛋白质(如含Fc的蛋白质)可以与任何蛋白质结合或相互作用，所述任何蛋白质包括但不限于HER受体家族成员，如HER1(EGFR)、HER2、HER3和HER4；CD

蛋白质如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD21、CD22和CD34；细胞粘附分子如LFA-1、Mol、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和包含 $\alpha$ 或 $\beta$ 或其亚基的av/p3整联蛋白(例如抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体)；巨噬细胞受体如CRIg；肿瘤坏死因子如TRAIL/Apo-2；生长因子如血管内皮生长因子(VEGF)；IgE；血型抗原；f1k2/f1t3受体；肥胖(0B)受体；和蛋白C。其他示例性蛋白质包括生长激素(GH)，包括人生长激素(hGH)和牛生长激素(bGH)；生长激素释放因子；甲状旁腺激素；促甲状腺激素；脂蛋白； $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶；胰岛素A链；胰岛素B链；胰岛素原；促卵泡激素；降钙素；黄体生成素；胰高血糖素；凝血因子如因子VIIIC、组织因子和von Willebrands因子；抗凝血因子如蛋白C；心房利钠因子；肺表面活性剂；纤溶酶原激活剂，如尿激酶或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)；棉纱(bombazine)；凝血酶；肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和 $\beta$ ；脑啡肽酶；RANTES(调节激活正常的T细胞表达和分泌)；人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- $\alpha$ )；血清白蛋白如人血清白蛋白(HSA)；mullerian-抑制物质；松弛素A链；松弛素B链；松弛素原；小鼠促性腺激素相关肽；DNA酶；抑制素；激活素；激素或生长因子受体；整联蛋白；蛋白A或D；类风湿因子；神经营养因子如骨衍生的神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神经生长因子如NGF- $\beta$ ；血小板衍生生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子如aFGF和bFGF；表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ，包括TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4或TGF- $\beta$ 5；胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II)；des(1-3)-IGF-1(脑IGF-1)；胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)；促红细胞生成素(EPO)；血小板生成素(TPO)；骨诱导因子；免疫毒素；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ ；集落刺激因子(CSF)，如M-CSF、GM-CSF和G-CSF；白细胞介素(IL)，例如IL-1至IL-10；超氧化物歧化酶；T细胞受体；表面膜蛋白；衰变加速因子(DAF)；病毒抗原，如例如AIDS包膜的一部分；转运蛋白；归巢受体；地址素；调节蛋白；免疫粘附素；抗体；以及任何以上列出的多肽的生物活性片段或变体。根据本发明可以使用许多其他抗体和/或其他蛋白质，并且上述列表不意味着限制。

[0270] 在一些方面，本申请提供了包含通过本文所述的任何方法制备的蛋白质的组合物。另一方面，本申请提供了包含具有增强的NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质的组合物，其中所述组合物以提供增强的ADCC功能的比例包含去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0271] 在一些实施方案中，岩藻糖基化形式的蛋白质在聚糖结构的还原端包含岩藻糖。在一些实施方案中，岩藻糖基化形式的蛋白质在聚糖结构的还原端包含岩藻糖，其中岩藻糖共价连接至聚糖结构的还原端的第一N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)部分。在一些实施方案中，聚糖结构在聚糖结构的还原端包含岩藻糖部分。在一些实施方案中，岩藻糖部分是与聚糖结构共价结合的单个岩藻糖分子。在一些实施方案中，聚糖结构包含L-岩藻糖。在一些实施方案中，蛋白质包含两个或更多个聚糖结构。

[0272] 在一些实施方案中，组合物是药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物为用于储存的形式。在一些实施方案中，药物组合物为用于产物运输的形式。在一些实施方案中，药物组合物是冷冻的。在一些实施方案中，药物组合物是冻干的。在一些实施方案中，药物组合物是重构的。在一些实施方案中，药物组合物是施用组合物。在一些实施方案中，药物组合物为用于施用给需要其的个体的形式。

[0273] 在一些实施方案中，药物组合物是无菌药物组合物。无菌药物制剂是根据本领域

技术人员已知的药物级灭菌标准(例如,美国药典第797,1072和1211章;加利福尼亚商业和职业法规4127.7;16加利福尼亚法规的规则1751,联邦规则的21法规或美国之外的这些法规的对应物)合成或生产的。

[0274] 在一些实施方案中,药物组合物是稳定的制剂。如本文所用,“稳定”制剂是其中的蛋白质在储存时基本上保持物理和化学稳定性和完整性的制剂。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术可用于本领域中并且在例如Jones,Adv Drug Delivery Rev,10,1993中进行了综述。可以在选定的温度下针对选定的时期评估稳定性。例如,储存期间的聚集程度可以用作蛋白质稳定性的指标。因此,“稳定的”制剂可以是其中小于约10%、优选小于约5%的蛋白质在制剂中作为聚集物存在。

[0275] 在一些实施方案中,药物组合物是重构制剂。如本文所用,“重构”制剂是通过将冻干的蛋白质制剂溶解在稀释剂中使得蛋白质分散在整体中而制备的制剂。该重构制剂适合施用(例如静脉内或皮下施用)给有需要的个体。

[0276] 在一些实施方案中,药物组合物是等渗的制剂。如本文所用,“等渗”制剂是具有与人血液基本上相同的渗透压的制剂。等渗的制剂通常具有约250至350m0sm的渗透压。术语“低渗”描述具有低于人血液的渗透压的制剂。相应地,术语“高渗”用于描述具有高于人血液的渗透压的制剂。

[0277] 在一些实施方案中,药物组合物处于特定的pH。在一些实施方案中,药物组合物的pH为约5-7、约5-6或约5-5.5。在一些实施方案中,药物组合物的pH为约5.3。在一些实施方案中,药物组合物的pH为约5.4。在一些实施方案中,药物组合物是pH调节的。

[0278] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”是指除活性成分之外的药物组合物中的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。药学上可接受的载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六烃季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚醇、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。本文中示例性的药学上可接受的载体进一步包括中间药物分散剂如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX®**,Baxter International, Inc.)。在一些实施方案中,药学上可接受的载体选自乙酸钠、蔗糖、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20)、琥珀酸钠、组氨酸HCl和氯化钠。

[0279] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的酸。如本文所用,“药学上可接受的酸”包括在其配制的浓度和方式下无毒的无机酸和有机酸。例如,合适的无机酸包括盐酸、高氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸、磷酸、亚磷酸、对氨基苯磷酸、磷酸、碳酸等。合适的有机酸包括直链和支链烷基、芳香族、环状、脂环族、芳基脂肪族、杂环、饱和、不饱和、单、二和三羧酸,包括例如甲酸、乙酸、2-羟基乙酸、三氟乙酸、苯乙酸、三甲基乙酸、乙酸叔

丁酯、邻氨基苯甲酸、丙酸、2-羟基丙酸、2-氧代丙酸、丙二酸、环戊烷丙酸、环戊烷丙酸、3-苯基丙酸、丁酸、丁二酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰)苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、抗坏血酸、肉桂酸、月桂基硫酸、硬脂酸、粘康酸、扁桃酸、琥珀酸、帕莫酸、反丁烯二酸、苹果酸、马来酸、羟基马来酸、丙二酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、乙醇酸(glycolic)、葡萄糖酸(glyconic)、葡萄糖酸(gluconic)、丙酮酸、乙醛酸、草酸、甲磺酸(mesylic)、琥珀酸、水杨酸、邻苯二甲酸、棕榈酸(palmoic)、棕榈酸(palmeic)、硫氰酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷二磺酸、2-羟基乙烷磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、萘-2-磺酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2,2,2]-辛-2-烯-1-羧酸、葡萄糖酸、4,4'-亚甲基双-3-(羟基-2-烯-1-羧酸)、羟基萘酸(hydroxynapthoic)。

[0280] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的碱。如本文所用,“药学上可接受的碱”包括无机和有机碱,其在配制的浓度和方式下是无毒的。例如,合适的碱包括由无机碱形成金属(例如锂、钠、钾、镁、钙、铵、铁、锌、铜、锰、铝、N-甲基葡萄糖胺、吗啉、哌啶)形成那些碱,以及有机无毒碱,包括伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂,例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙氨基乙醇、三甲胺、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等等。特别优选的有机无毒碱为异丙胺、二乙胺、乙醇胺、氨基丁三醇、二环己胺、胆碱和咖啡因

[0281] 可用于本发明的另外的药学上可接受的酸和碱包括衍生自氨基酸(例如组氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和天冬酰胺)的那些。

[0282] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的缓冲剂或盐,例如衍生自上述酸和碱的酸和碱加成盐的那些。具体的缓冲液和/或盐包括组氨酸、琥珀酸盐和乙酸盐。

[0283] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的糖。如本文所用,“药学上可接受的糖”是当与蛋白质组合时显著防止或降低蛋白质在储存时的化学和/或物理不稳定性的分子。当打算将制剂冻干然后重构时,“药学上可接受的糖”也可称为“冻干保护剂”。示例性的糖及其相应的糖醇包括:氨基酸如谷氨酸一钠或组氨酸;甲胺如甜菜碱;感胶离子盐如硫酸镁;多元醇如三元或更高分子量的糖醇,例如,甘油(glycerin)、葡萄糖、赤藓糖醇、甘油(glycerol)、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露糖醇;丙二醇;聚乙二醇;

**PLURONICS®**;以及它们的组合。另外的示例性冻干保护剂包括甘油和明胶,以及糖mellibiose、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水苏糖。还原糖的实例包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和乳果糖。非还原糖的实例包括选自糖醇和其它直链多元醇的多羟基化合物的非还原糖苷。优选的糖醇是单糖苷,特别是通过还原二糖(如乳糖、麦芽糖、乳果糖和麦芽酮糖)而获得的那些化合物。糖苷侧基可以是糖苷或半乳糖苷。糖醇的其他例子是葡萄糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇和异麦芽酮糖。优选的药学上可接受的糖是非还原糖海藻糖或蔗糖。药学上可接受的糖以“保护量”添加到制剂中(例如冻干前),“保护量”意味着蛋白质在储存期间(例如在重构和储存之后)基本上保持其物理和化学稳定性和完整性。

[0284] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学上可接受的防腐剂。如本文所用,“药学上可接受的防腐剂”是可以添加到本文制剂中以降低细菌活性的化合物。潜在的防腐剂的实例包括但不限于十八烷基二甲基苄基氯化铵、六烃季铵氯化物、苯扎氯铵(其中烷基为

长链化合物的烷基苄基二甲基氯化铵的混合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳香醇如酚醇、丁醇和苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0285] 在一些实施方案中,包含多种蛋白质的组合物是细胞培养基。在一些实施方案中,细胞培养基是营养培养基。营养培养基含有宿主细胞生长所需的所有元素。在一些实施方案中,细胞培养基是基本培养基。基本培养基含有可能用于宿主细胞生长的基本营养物,例如,通常不存在氨基酸。在一些实施方案中,细胞培养基是选择培养基。选择培养基包含抑制选择生物体生长的试剂。

[0286] 在一些实施方案中,细胞培养基还包含用于细胞支持和/或生长的细胞培养基营养物。在一些实施方案中,细胞培养基营养物选自例如:蛋白质;肽;氨基酸;碳水化合物;金属和矿物质,例如钙、镁、铁;微量金属,例如磷酸盐和硫酸盐;缓冲液;pH指示剂,例如酚红、溴甲酚紫;和抗微生物剂。

[0287] 在一些实施方案中,细胞培养基还包含宿主细胞。在一些实施方案中,培养基基本上没有宿主细胞。

[0288] 在一些实施方案中,细胞培养基包含岩藻糖源。在一些实施方案中,岩藻糖源是岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖。在一些实施方案中,岩藻糖是L-岩藻糖-1-磷酸。在一些实施方案中,岩藻糖源是GDP-岩藻糖。

[0289] 在一些实施方案中,组合物是细胞裂解物。在一些实施方案中,细胞裂解物包含多种蛋白质和宿主细胞组分。在一些实施方案中,细胞裂解物是离心的细胞裂解物。在一些实施方案中,细胞裂解物包含细胞裂解物的沉淀部分(*precipitated portion*)和细胞裂解物的上清部分。在一些实施方案中,细胞裂解物包含细胞裂解物的沉淀部分(*pelleted portion*)和细胞裂解物的上清液部分。

[0290] 在一些实施方案中,组合物是来自蛋白质纯化柱的洗脱液。如本文所用,“洗脱液”是指通过蛋白质纯化柱的任何液体。在一些实施方案中,洗脱液包含从流经液体中分离的液体。在一些实施方案中,洗脱液包含从洗涤液体中分离的液体。在一些实施方案中,洗脱液包含从一种或多种洗涤液体中分离的液体。在一些实施方案中,洗脱液包含从洗脱液体中分离的液体。

[0291] 在一些实施方案中,组合物是蛋白质文库,其中多种蛋白质中的至少两种蛋白质是不同的。在一些实施方案中,文库包含至少两种结合不同抗原的蛋白质。在一些实施方案中,文库包含至少两种结合不同表位的蛋白质。在一些实施方案中,不同的蛋白质包含在不同的容器中。在一些实施方案中,本发明提供包含至少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或超过10000000种不同蛋白质的文库。

[0292] 本申请提供了本文实施方案中描述的任何组合物的大规模批次(例如,商业批次或生产规模的批次)。例如,在一些实施方案中,批次包含预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质。在一些实施方案中,批次包含具有增强的由NK细胞和PMN细胞两者介导的ADCC功能的蛋白质。在一些实施方案中,批次包含预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体。在一些实施方案中,批次包含具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的抗体。

[0293] 在一些实施方案中,批次包含至少约5g、10g、50g、100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1,000g、1,500g、2,000g、2,500g、3,000g、3,500g、4,000g、4,500g或5,000g蛋白质,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。在一些实施方案中,批次包含至少约5-5,000g、50-4,000g或约100-1,000g蛋白质,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。

[0294] 在一些实施方案中,批次为用于药物储存的形式。在一些实施方案中,批次为用于产物运输的形式。在一些实施方案中,批次为用于向有需要的个体施用的形式。在一些实施方案中,批次为冻干的。在一些实施方案中,批次不与试剂缀合。在一些实施方案中,批次与试剂缀合。在一些实施方案中,批次进一步包含制剂组分。

[0295] 在一些实施方案中,批次是细胞培养基。在一些实施方案中,批次是细胞裂解物。

[0296] 在一些实施方案中,批次或其一部分在容器中。在一些实施方案中,批次或其部分在小瓶中。在一些实施方案中,批次或其部分在多个小瓶中。在一些实施方案中,批次或其部分在注射器中。

[0297] 在一些实施方案中,批次或其一部分在多个小瓶中,其中每个小瓶包含蛋白质,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。在一些实施方案中,批次或其一部分在多个小瓶中,其中至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的小瓶包含预定比例的岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0298] 在一些实施方案中,将批次等分成单位剂量。如本文所用,“单位剂量”是旨在作为单一单位剂量施用的蛋白质的量。在一些实施方案中,单一单位剂量为约1至约500mg的蛋白质。在一些实施方案中,单位剂量包装在容器中。在一些实施方案中,单位剂量包装在小瓶中。

[0299] 在一些实施方案中,商业批次的大小不超过临床批次大小的约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。如本文所用,“商业批次”是指为了商业生产和/或分销的目的而完成的一个或多个生产运行过程中产生的蛋白质的量。如本文所用,“临床批次”是指为了临床测试目的而完成的一个或多个生产运行期间产生的蛋白质的量。在一些实施方案中,商业批次的大小不超过临床批次大小的10倍。

[0300] 在一些实施方案中,容器包含如本文所述的商业批次的等分试样,其中商业批次包含含蛋白质的组合物,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。在一些实施方案中,小瓶包含如本文所述的商业批次的等分试样,其中商业批次包含含蛋白质的组合物,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。在一些实施方案中,注射器包含如本文所述的商业批次的等分试样,其中商业批次包含含蛋白质的组合物,其中岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质为预定比例。

[0301] 治疗方法

[0302] 在一些方面,本申请提供了在有需要的个体中治疗疾病的方法,其包括向个体施用本文实施方案中所述的药物组合物。

[0303] 在一些实施方案中,向有需要的个体施用有效量的药物组合物,其中药物组合物包含预定比例的去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0304] 在一些实施方案中,向有需要的个体施用有效量的药物组合物,其中药物组合物包含具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质。在一些实施方案中,向有需

要的个体施用有效量的药物组合物,其中药物组合物包含具有增强的由NK细胞和PMN细胞介导的ADCC功能的蛋白质,其中药物组合物包含提供增强的ADCC功能的比例的去岩藻糖基化和岩藻糖基化形式的蛋白质。

[0305] 本文所述的药物组合物可以通过各种途径施用,如胃肠外施用,包括静脉内、动脉内、腹膜内、肺内、口服、吸入、囊内、肌内、气管内、皮下、眼内、鞘内或透皮。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以肠胃外施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以静脉内施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以皮下施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以局部施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以局部施用。

[0306] 可以通过本文的方法治疗的疾病是可以用蛋白质治疗的任何疾病。在一些实施方案中,疾病是癌症。在一些实施方案中,疾病是自身免疫性疾病。在一些实施方案中,疾病是感染。

[0307] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物与另一种施用形式或治疗组合使用。

[0308] 本领域技术人员将认识到,在本发明的范围和精神内可能有若干实施方案。现在将参考以下非限制性实施例更详细地描述本发明。以下实施例进一步说明本发明,但是,当然不应该以任何方式解释为限制其范围。

## 实施例

[0309] 实施例1:

[0310] 开发每种都能够表达抗体的FX敲除CHO细胞系,所述抗体具有可通过岩藻糖滴定调节的岩藻糖基化:去岩藻糖基化的比例

[0311] 为了评估去岩藻糖基化形式的抗体的生物功能的变化,有必要产生野生型(岩藻糖基化)和去岩藻糖基化形式的抗体。事先,FUT8敲除宿主(FUT8-KO)已用于开发能够以相对合理的滴度表达去岩藻糖基化形式的抗体的CHO细胞系(Malphettes等人,Biotechnol Bioeng,106,2010,774-783)。然而,已经观察到FUT8-KO细胞系具有较慢的克隆生长和适应率。此外,为了也产生野生型形式的抗体(即,岩藻糖基化形式),需要另外的和分开的细胞系开发(CLD)。为了实现这一点,有必要生产和筛选大量的克隆,这是一项艰巨且繁琐的任务,以获得产生具有相匹配的产物质量的野生型和去岩藻糖基化形式的抗体的克隆。更具挑战性的是获得野生型和FUT8-KO克隆,其产生具有足够类似的产物质量属性的抗体,以确保任何观察到的野生型和去岩藻糖基化形式的抗体的差异可严格归因于去岩藻糖基化。

[0312] 能够产生野生型和去岩藻糖基化形式的抗体的单细胞系将允许以相同的产物质量属性生产抗体。在本文,假设通过失活从头途径和控制岩藻糖的水平,可能产生能够产生野生型岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的抗体的细胞系。之前已经报道了GMD敲除CHO宿主细胞系的产生和表征,但是实现的单位生产力(Qp)低,约16pg/细胞·d(Kanda等人,J Biotechnol,130,2007,300-310)。在本文,我们探索通过CRISPR/Cas9系统敲除我们CHO-K1宿主系中的FX基因,并评估这些宿主中抗体的生长、表达和岩藻糖基化状态。

[0313] 结果:

[0314] 使用CRISPR/Cas9系统靶向FX基因座

[0315] 为了靶向FX基因座,对CHO-K1FX基因的5'和3'编码区进行测序。使用该序列,设计

与序列互补的介导-RNA (gRNA) 构建体用于与CRISPR/Cas系统使用 (Le Cong等人, *Science*, 339, 2013, 819-823; Mali等人, *Nat Methods*, 10, 2013, 957-963)。gRNA序列被设计在FX基因的5'和3'区的侧翼,并与等摩尔比例的Cas9表达载体一起共转染以删除整个6Kb FX基因。在pLKO.5载体 (Cat#SHC-201, Sigma) 的人U6启动子的控制下克隆并表达单个gRNA。转染后72小时,在含有200μg/ml LCA的培养基中选择转染细胞的池(以选择具有岩藻糖基化表面糖蛋白的细胞)。QIAGEN血液和组织提取试剂盒 (Cat#69506) 和Roche HiFi Taq聚合酶 (Cat#11732650001) 分别用于DNA提取和PCR分析。设计相对于gRNA的外部和内部PCR引物以分别区分具有完全FX缺失的等位基因与具有野生型或小缺失的等位基因(图2A)。将CHO-K1细胞用gRNA和Cas9表达载体转染,并在兵豆凝集素 (LCA) 存在下选择为池。使用荧光素 (FITC) 缀合的LCA (LCA-FITC) 试剂通过流式分选仪确认细胞表面上岩藻糖基化糖蛋白的减少。

[0316] 通过PCR分析证实FX基因缺失(图2B)。使用gRNA内部的引物来检测野生型等位基因或具有小缺失的等位基因,而使用外部引物来检测FX基因完全缺失的等位基因。

[0317] FX缺失的池是通过有限稀释克隆并通过针对FX基因缺失的PCR、荧光激活的细胞分选 (FACS) 和Western blot筛选的单细胞。FXK0池-3的流式细胞仪分析、用LCA-FITC染色证实了在细胞表面岩藻糖基化的糖蛋白水平的不存在/减少(图3)。

[0318] 分离单细胞克隆并确认FX基因敲除

[0319] 为了获得FX基因在所有等位基因中被敲除的单克隆,来自池-3的细胞是通过有限稀释克隆并通过针对FX基因中的缺失的PCR筛选的单细胞(图4A)。在所筛选的克隆中,5个克隆具有至少一个缺失和一个野生型等位基因,一个克隆(克隆-11)在其所有等位基因中显示完全FX缺失(图4A)。注意,虽然通过K0引物组检测到的PCR产物的存在表明FX基因缺失,但通过野生型引物组扩增的PCR带的存在并不一定意味着FX基因能够表达功能蛋白(图2A和图4A)。针对野生型引物设计的筛选方法不能区分点突变和小缺失,该点突变和小缺失可能导致无功能或截短的FX蛋白质的表达,或甚至统括缺乏FX蛋白质表达。为了确认缺少的FX蛋白质表达,通过免疫印迹测定法分析前6个克隆并证实了所有克隆缺少FX蛋白质表达(图4B)。这表明FX基因通过完全等位基因缺失或缺失和移码的组合被敲除。还使用LCA-FITC染色和流式细胞术确认了取决于培养基中岩藻糖的存在或不存在,这些克隆分别能够表达去岩藻糖基化或岩藻糖基化的糖蛋白(图5A-5F)。

[0320] 评估表达野生型或去岩藻糖基化的抗体的FXK0克隆

[0321] 基于生长和生存力特征选择FXK0宿主3-5、3-7和3-11用于进一步评估,特别是确保它们能够表达去岩藻糖基化的抗体。为此,用表达抗体-A的构建体转染这些FXK0宿主并选择池3周(图6A)。使用亲本CHO-K1宿主作为对照,使用HTRF测定法确认所有池的抗体表达(数据未显示)。然后在存在或不存在岩藻糖的情况下使用这些池建立14天补料分批生产培养物。然后使用蛋白-A柱从培养基纯化来自每种培养物的表达的抗体-A分子,并且在PNGase F处理后通过毛细管电泳分析它们的各种聚糖种类(图6B)。在不存在岩藻糖的情况下,代表G0-F聚糖种类(去岩藻糖基化)的主峰出现在所有FXK0宿主中,而在岩藻糖存在下, G0种类在电泳图中形成主峰(图6B)。对每种FXK0宿主的所有抗体聚糖种类的超过98%的分析显示在岩藻糖不存在时其仅表达去岩藻糖基化的抗体,而岩藻糖存在时,少于2%的抗体是去岩藻糖基化的(图6C)。因此,虽然不存在岩藻糖时缺乏岩藻糖基化,然而当存在岩藻糖

时,在所有FXK0克隆中抗体岩藻糖基化的过程完全恢复(图6C)。由于FX基因在FXK03-11宿主的所有等位基因中完全缺失(图4A),我们选择该宿主作进一步研究。

[0322] 在CLD方法中评估FXD0宿主

[0323] 为了评估CLD期间FXK03-11宿主的性能,用表达抗体-B和作为选择标记的谷氨酰胺合成酶(GS)的载体转染该宿主,并进行完整的CLD。在产生测定法中评估前24个克隆,显示滴度为3.5-5.5g/L(图7A)。与之前报道的具有最高Qp为16pg/细胞-天的GMD敲除系(Kanda等人,J Biotechnol,130,2007,300-310)不同,FXK03-11克隆具有Qp的范围为25-130pg/细胞-天,其中大部分克隆具有的Qp为40-70pg/细胞-天(图7B)。表达抗体B的FXK03-11克隆表现出广泛的生长(4-18百万细胞/ml)和第14天生存力(40-95%),并且正如预期的那样,具有较高Qp的克隆与具有较低Qp的克隆相比生长较慢(图7C)(附加数据未示出)。此外,所有FXK03-11克隆都完全表达去岩藻糖基化的抗体-B分子,其中大部分糖型按丰度顺序分别为G0-F(图7D)、G1-F(图7E)和G0-1-F(图7F)。在相同的CLD方案后,还在FUT8-K0 DP12宿主中独立地评估了抗体-B的表达,其中表达去岩藻糖基化抗体-B的前面的克隆与FXK03-11前面的克隆相比滴度低30-40%(数据未示出)。这些发现表明FXK0宿主可以以相当于或高于FUT8-K0宿主的滴度表达给定的抗体分子,并具有表达野生型或去岩藻糖基化形式的抗体的潜力。

[0324] FXK0宿主表达具有相似产物质量的WT或去岩藻糖基化形式的抗体

[0325] 为了评估表达抗体的FXK0克隆是否可以表达具有相当的产物质量的相同抗体的野生型和去岩藻糖基化形式,将表达抗体-A的FXK0克隆(图6A-6C)用于有或没有1mM岩藻糖的培养基中的生产测定法中。在存在或不存在岩藻糖的培养基中,每个克隆的抗体-A的电荷变体百分比和聚集水平相似(图8A-8B)。在存在或不存在1mM岩藻糖的情况下,对表达抗体-B的两个FXK0克隆进行类似的生产测定法(图7A-7F),与岩藻糖水平无关两个克隆具有相当的滴度(图8C)。在不存在岩藻糖的情况下,抗体-B的所有聚糖种类都是去岩藻糖基化的,但是通过向生产培养基中添加岩藻糖,两个克隆均表达具有正常和预期分布的WT聚糖种类的抗体-B(图8D)。

[0326] 尽管在存在或不存在岩藻糖的情况下两个克隆之间的电荷变体种类百分比是相当的(图8E),但我们注意到当添加岩藻糖到生产培养基时主峰(main peak)百分比略高(4%),而酸性峰百分比略低(4%)(图8E)。注意,对于抗体-A生产池没有观察到这种行为(图8A)。在存在或不存在岩藻糖的情况下,表达抗体-B的克隆的聚集水平百分比保持相当(图8F)。

[0327] 因为FXK0宿主提供了表达具有几乎相同的产物质量的野生型和去岩藻糖基化的抗体的选择,所以其适合于评估去岩藻糖基化在体外和体内增强抗体的ADCC的作用。这种特性确保了效应子功能或毒性研究的结果可以直接与野生型和去岩藻糖基化抗体种类的水平相关联,而与不同克隆表达这些抗体时无意中出现的产物质量差异无关。

[0328] FXK0宿主可用于表达具有所需比例的WT与去岩藻糖基化糖型的抗体

[0329] 在完全去岩藻糖基化的抗体种类由于毒性是不必要或不合需要的情况下,测定发挥ADCC的全部作用同时使毒性最小化所需的去岩藻糖基化的抗体水平可能是有益的。为了评估FXK0克隆是否能够表达具有所需水平的去岩藻糖基化糖型的抗体,选择两种抗体-B表达克隆以建立培养基中具有增加岩藻糖水平(0-1mM)的生产培养物。为了微调对应于培养

物中一定百分比的去岩藻糖基化抗体种类的岩藻糖进料水平,该实验进行几次。图6A-6B显示向生产培养基和进料中添加一定浓度的岩藻糖可用于实现所需比例的野生型与去岩藻糖基化的抗体水平。这些实验使用快速浓注进料方法。然而,可以想象,连续平衡方法也可以用于产生所需的野生型与去岩藻糖基化的抗体比例。

[0330] 由于通过PNGase F处理然后进行毛细管电泳测定各种聚糖种类的水平,所以不可能通过该方法测定具有零个、一个或两个去岩藻糖基化聚糖的抗体分子的分数(fraction)。无论如何,与生产培养基中的岩藻糖浓度无关,抗体滴度(图6C)、聚集水平(图6D)和电荷变体百分比(图6E)都是相当的。总言之,这些发现表明FXK0宿主允许表达具有所需比例的野生型与去岩藻糖基化糖型的抗体,适合于计量所需的ADCC水平,同时避免毒性。此外,可以通过向生产培养基和进料中滴定岩藻糖来实现具有相当的产物质量的所需比例的野生型与去岩藻糖基化抗体,以评估使ADCC最大化同时使毒性最小化所需的去岩藻糖基化水平。

[0331] 方法:

[0332] 载体构建体和试剂

[0333] 通过将巨细胞病毒(CMV)启动子控制下的重链和轻链基因克隆到抗体表达载体中实现组成型抗体表达,所述抗体表达载体还指导用于选择的谷氨酰胺合成酶(GS)的表达。最终表达载体的组装和使用该载体的选择之前已经描述了。参见Hu等人, *Biotechnol Progr*, 29, 2013, 980-985。小鼠抗 $\beta$ -肌动蛋白(Sigma, 目录号A2228, 1:30000)和抗FX的兔多克隆抗体(GeneTex, 目录号101663, 1:2000)用于免疫印迹。在裂解缓冲液中使用蛋白酶抑制剂混合物(Roche, 目录号11-836-153-001)。兵豆凝集素(LCA)(目录号L-1040)和FITC缀合的LCA(LCA-FITC)(目录号FL-1041)试剂购自Vector Laboratories。岩藻糖购自Sigma(目录号F2252)。以下引物用于扩增WT或FXK0基因片段:

[0334] 正向WT FX引物:GTCACCCAAAGCTCTCCTTG (SEQ ID NO.1) ;

[0335] 反向WT FX引物:AAAAGTCCTGCTCTGCTTGC (SEQ ID NO.2) ;

[0336] 正向FXK0引物:CTAGGCTTCCCTAGGCCATT (SEQ ID NO.3) ;和

[0337] 反向FXK0引物:GCTATGCCTTGAGTCTTGG (SEQ ID NO.4) 。

[0338] 免疫印迹

[0339] 对于免疫印迹分析,细胞在NP40裂解缓冲液(10mM Tris, pH8.0、0.5%NP40、150mM NaCl和5mM MgCl<sub>2</sub>, 含有蛋白酶抑制剂混合物)中以3-5千万个细胞/ml在冰上裂解20分钟。然后将裂解物在4°C以13,000rpm离心10分钟,并将上清液转移到新管中,并通过BCA测定法(Thermo Scientific)测定蛋白质浓度。将150 $\mu$ l各裂解物与50 $\mu$ l 4X还原加载缓冲液混合并煮沸5分钟。将等蛋白质浓度的每个样品加载到SDS-PAGE凝胶(4-20%Tris-甘氨酸)上并转移到膜上用于免疫印迹。

[0340] LCA-FITC染色细胞的FACS分析

[0341] 将200,000个细胞旋转并用0.5ml PBS洗涤一次并重悬于0.3ml含有1%BSA的PBS中。用2 $\mu$ g/ml终浓度的LCA-FITC在冰上染色细胞30分钟。然后将细胞转移至FACS管并使用FACSCalibur分析流式细胞仪(Becton Dickinson)分析。使用FlowJo软件分析所有样品。

[0342] 细胞培养和稳定转染

[0343] 在不含血清的专有Genentech培养基中在37°C和5%CO<sub>2</sub>下培养CHO-K1宿主细胞。遵循标准转染方案,使用Amaxa核转染试剂盒-V(Lonza, 目录号VCA-1003)稳定转染CHO-K1

细胞。将转染的细胞铺板在384孔板中并用甲硫氨酸砜亚胺 (MSX) 选择。3-4周后,在MSX存在下将1000个生长的克隆挑入96孔板中。4-5天后,使用Homogenous Time-Resolved FRET (HTRF) 测定法测定挑取克隆的抗体表达。前面的克隆是使用有限稀释克隆到384孔板中随后进行成像的单细胞克隆。3-4周后,将约700个生长的克隆挑入96孔板并进行HTRF测定法(第4-6天)。通过HTRF测定前200个和随后的前100个表达抗体克隆。克隆和成像证实的前48个单细胞克隆适应于悬浮生长并在之前所述的生产测定法 (Misaghi等人, Biotechnol Progr, 30, 2014, 1432-1440) 中进行评估。简言之,将细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml接种于生产培养基中,其具有指定量的岩藻糖。培养物在第3天、第7天和第10天接受专有进料培养基和岩藻糖(以指定浓度)。在第0、3、7、10和14天,使用Vi-Cell XR仪器 (Beckman Coulter) 测量培养物中的活细胞计数 (VCC) 和细胞生存力%。在第7、10和14天测定生产培养物中的抗体滴度(蛋白A纯化)。在第7天和第14天使用Bioprofile 400分析仪 (Nova Biomedical) 测量葡萄糖和乳酸盐。通过毛细管等电聚焦 (cIEF) 测量电荷变体,并且通过PNGaseF消化随后通过毛细管电泳鉴定聚糖亚型。通过对蛋白-A纯化的抗体进行凝胶过滤(尺寸)柱来测定聚集的水平。

[0344] 实施例2:

[0345] FXX0宿主中抗体岩藻糖基化的调节可以调节Fc  $\gamma$  RIII结合和ADCC水平

[0346] 方法:

[0347] ADCC测定法

[0348] 使用工程化的NK细胞系 (Roche) 提供效应细胞,并使用DELFIA BATDA (Perkin Elmer) 标记的WIL2-S细胞作为靶细胞。在测定培养基(含10%热失活-FBS、2mM L-谷氨酰胺和20mM HEPES, pH7.2的RPMI 1640)中制备标记的WIL2-S靶细胞 ( $2 \times 10^4$ ) 和NK细胞 ( $1.0 \times 10^5$ ) 的混合物并添加到圆底96孔组织培养板的每个孔中。将目标稀释的抗体 (100至0.06ng/ml) 添加平板中,并将平板孵育3小时。使用微量培养板读数仪 **SPECTRAMAX®** 190 (Molecular Devices) 通过345nm处的激发和在615nm处的发射定量、使用时间分辨荧光以相对荧光单位 (RFU) 测量细胞裂解。仅含有标记靶细胞的孔的吸光度用作背景的对照(背景),而含有DELFIA BATDA裂解缓冲液和标记靶细胞的孔提供最大可用信号(最大释放)。从仅含有靶细胞的孔中测量自发释放 (SR),而从含有靶细胞和效应细胞而不含抗体的孔中测量SR+NK。根据下式测定特定毒性百分比 (%ST) :

[0349] 
$$\% ST = \{ [( \text{特定释放} - \text{背景} ) - ( \text{自发释放} - \text{背景} ) ] \times 100 \} / [ ( \text{最大释放} - \text{背景} ) - ( \text{自发释放} - \text{背景} ) ]$$

[0350] 使用4-参数拟合通过绘制一式三份的平均%ST相对于抗体样品浓度 (ng/ml) 产生剂量反应曲线。使用来自SOFTmaxPROTM的平行线分析曲线拟合软件 (PLA) 进行数据分析。参见Shatz等人, mAbs, 5, 2013, 872-81。

[0351] Fc  $\gamma$  RIII结合测定法

[0352] Biacore T200仪器 (GE healthcare) 用于SPR分析。将抗His抗体 (R&D Systems) 稀释至50 $\mu$ g/ml并通过以10 $\mu$ L/分钟注射7分钟固定在Biacore Sensor CM5芯片 (GE healthcare) 上,使用胺偶联试剂盒 (GE healthcare)。在每个循环中,在样品注射之前捕获Fc  $\gamma$  RIIIa-6xHis标签蛋白 (Genentech)。将Fc  $\gamma$  RIIIa-6xHis标签蛋白在含有0.1% BSA和0.05% Tween20的PBS中稀释至0.5mg/ml,并以10 $\mu$ L/分钟捕获2分钟。将在含有0.05%

Tween20的PBS中以10 $\mu$ g/mL抗体浓度制备的样品以50 $\mu$ L/分钟注射5分钟用于Fc  $\gamma$  RIIIa结合。通过使相同的运行缓冲液通过腔室5分钟实现解离相。所有实验均在25℃下进行。一式三份注射每个样品和缓冲液空白流过两个表面(参考流动室和测试流动室)。以1Hz的速率收集数据。读数是在样品注射结束前五秒、结合相期间的最大结合反应。参考流动室与测试流动室联合运行,以消除非特异性结合的影响。另外,在实验流动室上包括注射空白运行缓冲液。从实验流动室上样品注射的绝对反应中减去来自参考流动室和空白缓冲液注射的信号(双减法)。使用Biacore T200评估软件和JMP软件分析数据。

[0353] 结果:

[0354] 为了评估具有不同比例的去岩藻糖基化与岩藻糖基化糖型的抗体的功能,使用表达抗体-B的FXK0克隆来建立具有不同水平的岩藻糖进料的生产测定法(图10A)。在产生过程中增加浓度的岩藻糖进料导致岩藻糖基化抗体种类水平的逐渐增加,而去岩藻糖基化抗体种类水平相应降低。然后从这些培养物中纯化抗体-B并进行体外Fc  $\gamma$  RIII结合测定法作为NK细胞结合的替代(图10B)。如图所示,岩藻糖基化抗体种类水平的降低对应于Fc  $\gamma$  RIII结合的降低(图10B)。尽管在岩藻糖浓度为0.025mM时,仅约40-50%的聚糖去岩藻糖基化,但约80%的Fc  $\gamma$  RIII结合能力保持完整。用表达抗体-C(IgG1)的构建体转染FXK0宿主细胞,已经开发了针对其的功能性ADCC测定法。在选择池之后,进行池产生测定法,其中进料指定浓度的岩藻糖以获得具有不同比例的去岩藻糖基化与岩藻糖基化抗体种类的抗体-C培养物(图10C)。将来自这些培养物的纯化抗体-C用于ADCC测定法中,观察到%ADCC活性与去岩藻糖基化聚糖种类水平之间的线性相关性(图10D)。主要岩藻糖基化(1mM岩藻糖)和完全去岩藻糖基化(0mM岩藻糖)抗体-C样品的混合可触发基于去岩藻糖基化聚糖种类和岩藻糖滴定图(图10D)水平的可预测的ADCC反应(图10E)。这表明岩藻糖进料方法确实是产生具有相似产物质量和所需的岩藻糖基化与去岩藻糖基化聚糖种类分布的抗体的可行方法,用于以可预测的方式触发ADCC。值得注意的是,岩藻糖进料方法消除了生成完全去岩藻糖基化和主要岩藻糖基化抗体所需的两个分开的制造活动的需要。

[0355] ADCC剂量反应分析显示与其主要岩藻糖基化对应物相比,完全去岩藻糖基化的抗体-C分子在低20倍浓度下可达到50%的最大ADCC活性(图10G)。注意,仅60%的抗体分子携带去岩藻糖基化聚糖种类可保持几乎80%的ADCC活性(图10D、10E和10F)。另外,对于其中少于40%的聚糖是去岩藻糖基化时的0.02mM岩藻糖进料,可以在与完全去岩藻糖基化(0mM岩藻糖)样品的相同抗体-C浓度下实现相对可比的%ADCC活性(图10G)。因此,该发现表明,为了达到接近最大水平的ADCC活性,没有必要具有100%完全去岩藻糖基化的抗体。

## 序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120>制备岩藻糖基化和去岩藻糖基化形式的蛋白质的方法

<130> 146392035340

<140> 尚未指定

<141> 同时附上

<150> US 62/249, 828

<151> 2015-11-02

<150> US 62/338, 280

<151> 2016-05-18

<160> 4

<170> FastSEQ 针对 Windows 版本 4.0

[0001]

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 1

gtcacccaaa gctctccttg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 2

aaaagtccctg ctctgcttgc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 3

ctaggcttcc ctaggccatt

20

[0002]

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 4

gctatccct tgagtcttgg

20

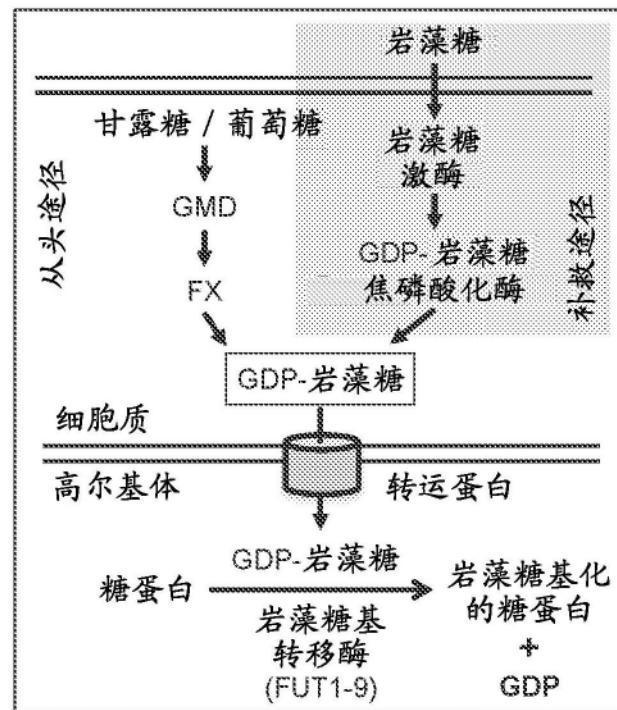


图1

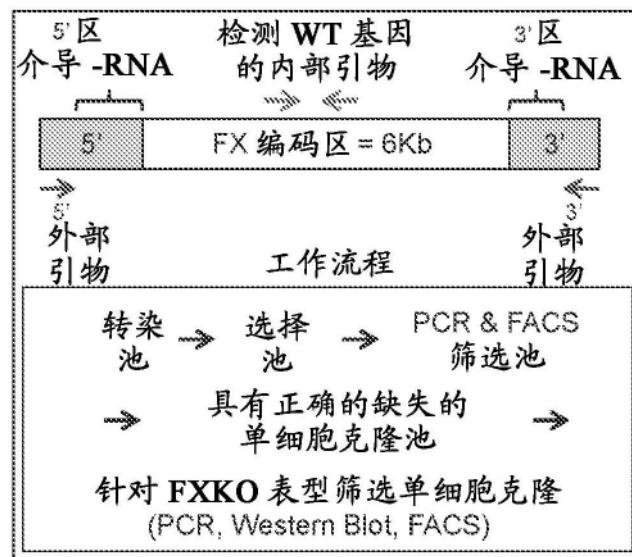


图2A

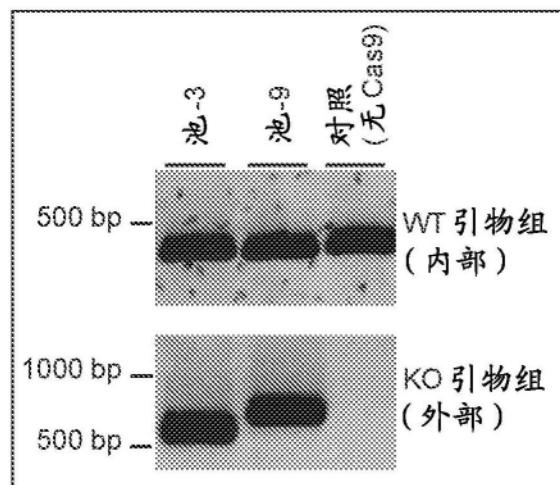


图2B

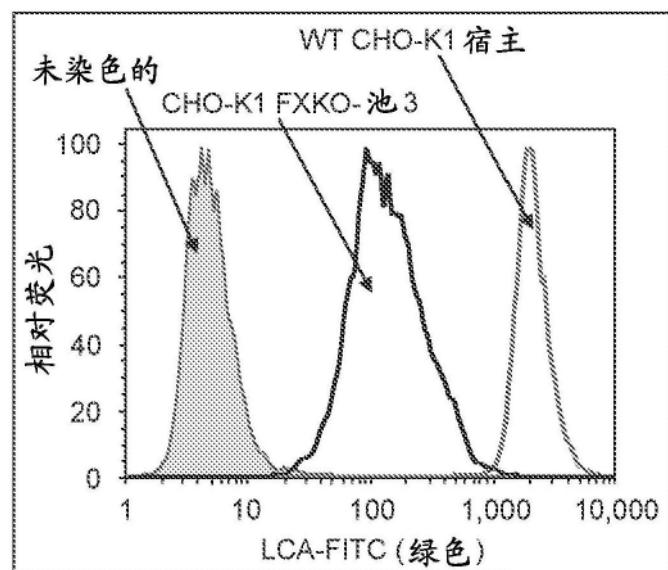


图3

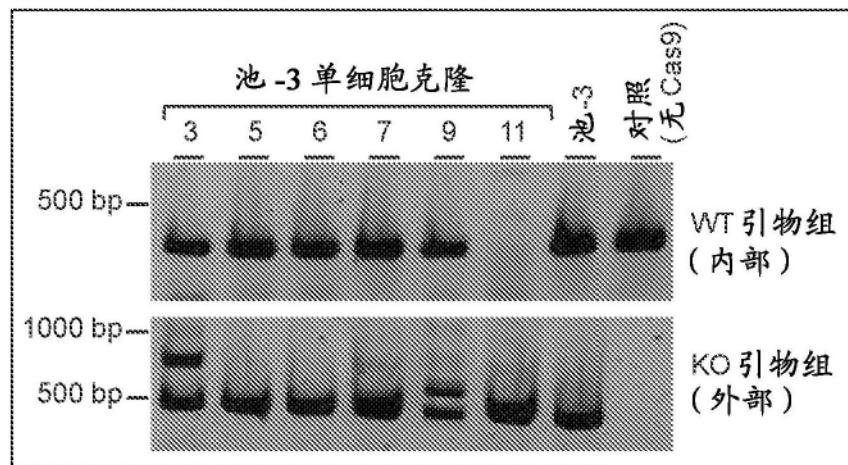


图4A

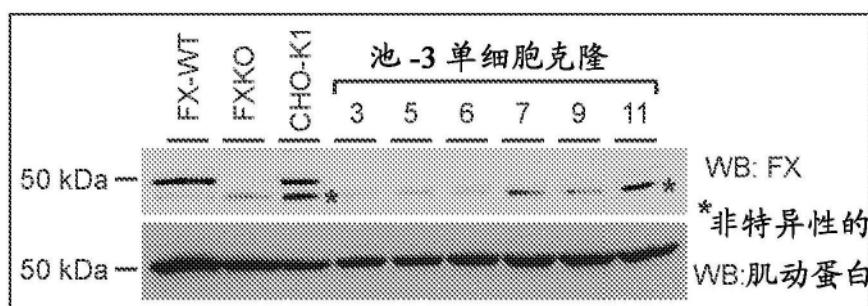


图4B

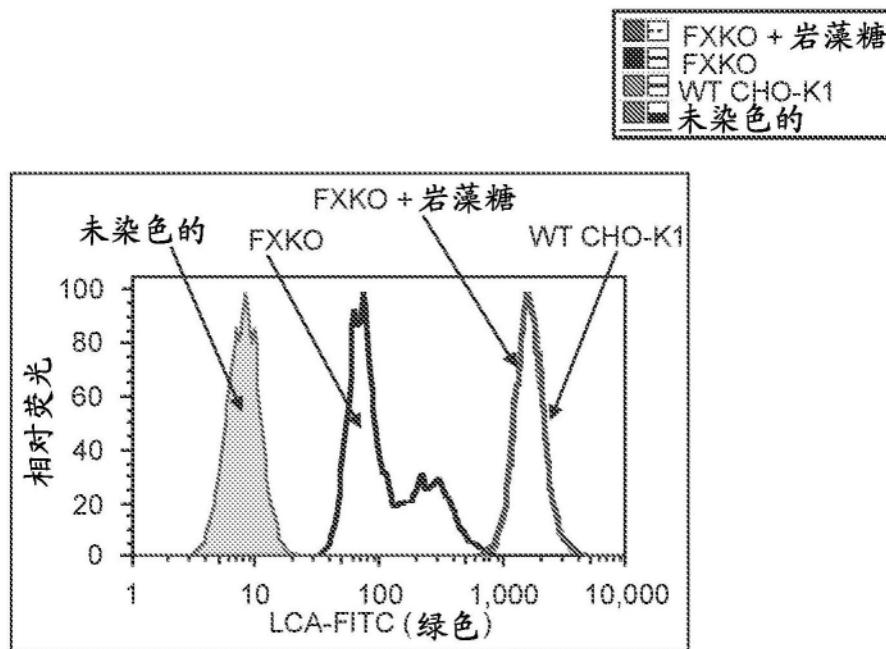


图5A

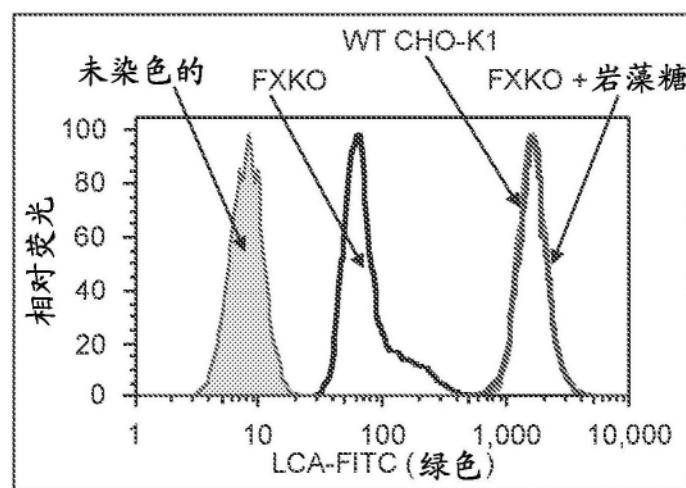


图5B

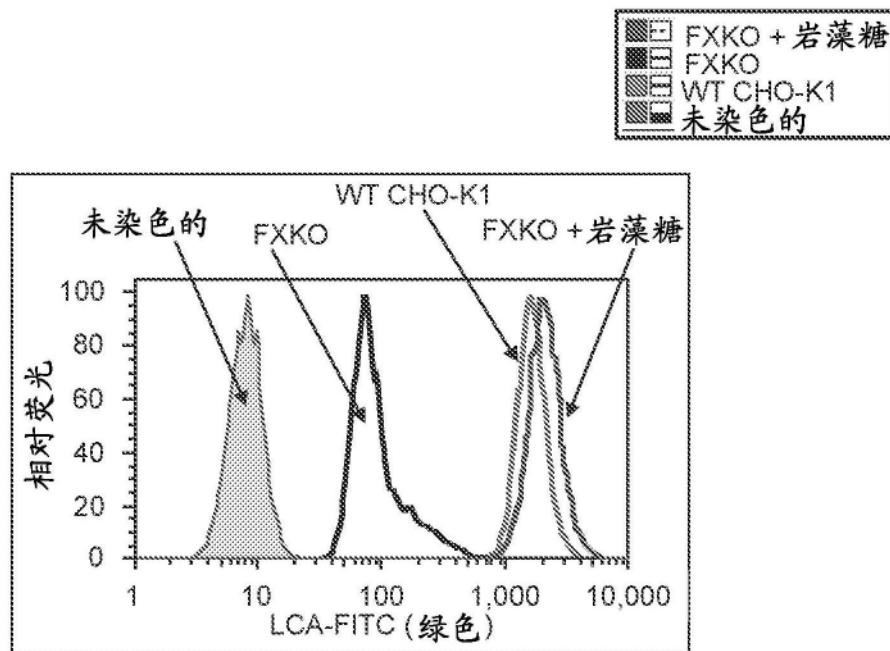


图5C

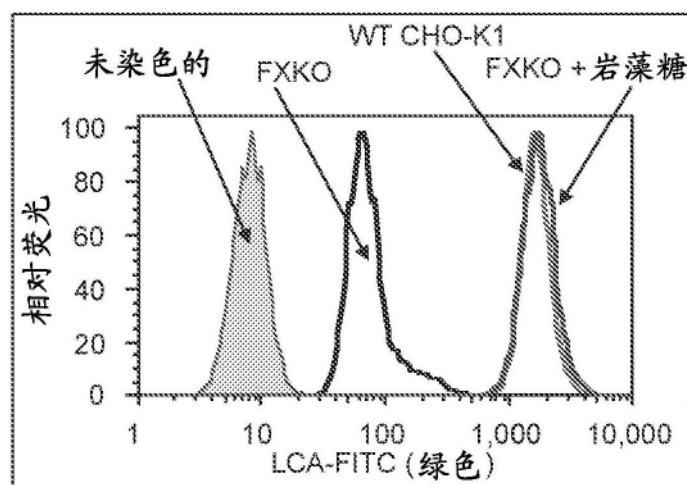


图5D

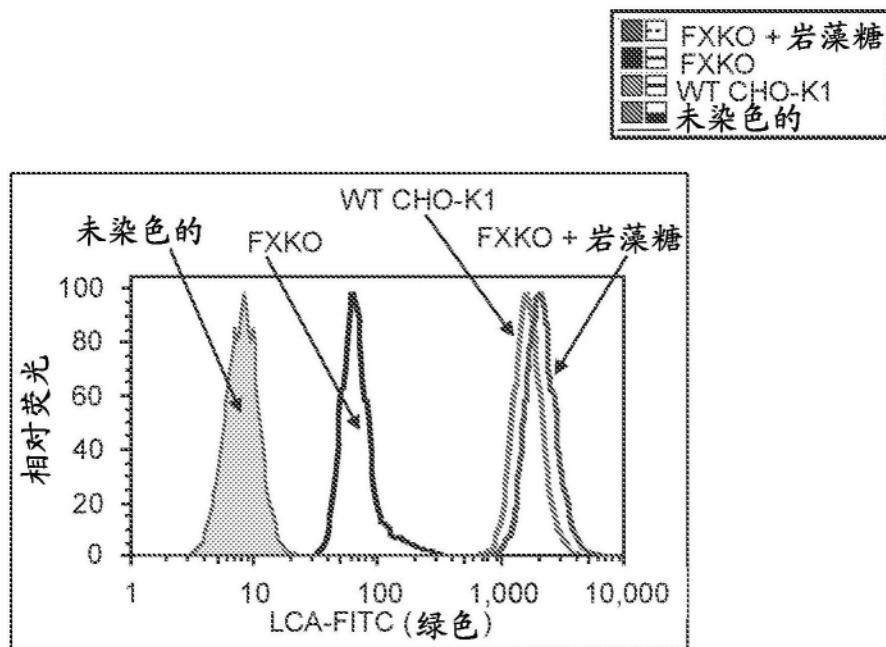


图5E

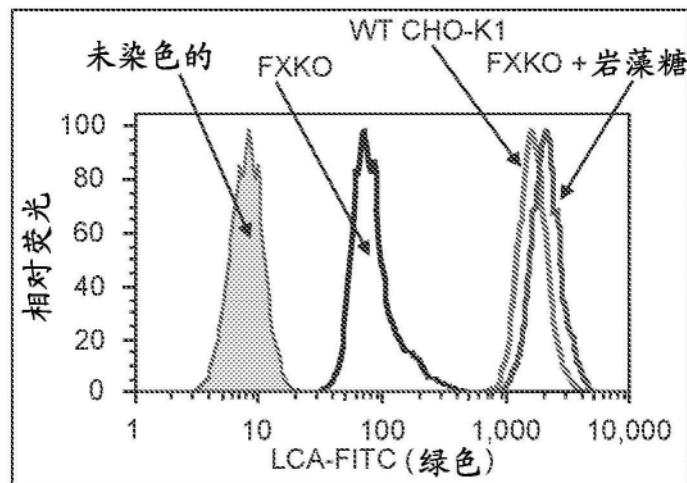


图5F



图6A

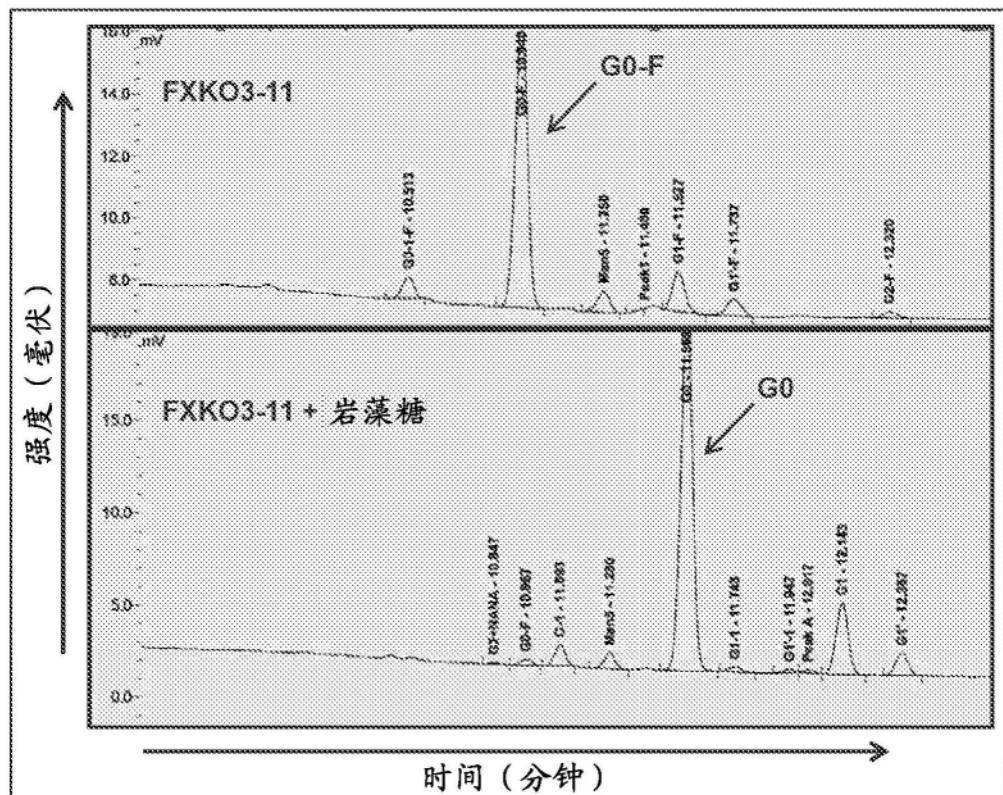


图6B

| 聚糖种类           | 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 + 岩藻糖  | 5.2 | 64.8 | 14.8 | 4.8 | 2.3 | 3.2  | n/a    | 1.8  | n/a  | n/a   | n/a  |
| FXKO3-7 + 岩藻糖  | 3.7 | 63.2 | 18.2 | 5.6 | 2.9 | 2.3  | n/a    | 1.4  | n/a  | n/a   | n/a  |
| FXKO3-11 + 岩藻糖 | 4.1 | 69.0 | 13.8 | 4.3 | 2.3 | 3.1  | n/a    | 1.2  | n/a  | n/a   | n/a  |

图6C

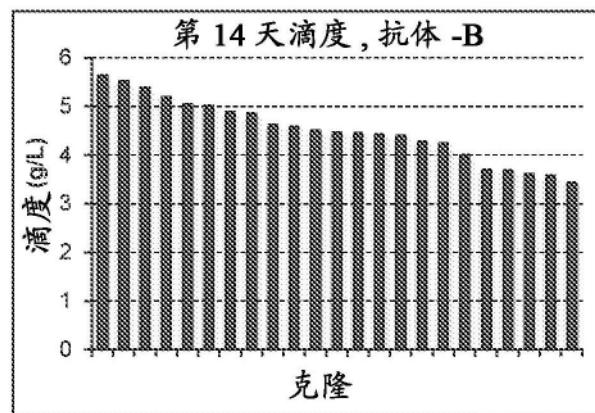


图7A

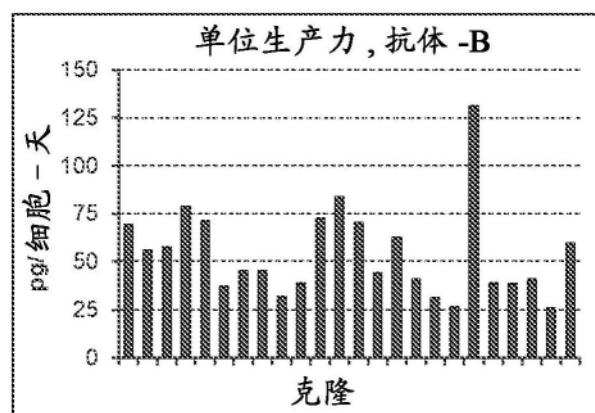


图7B

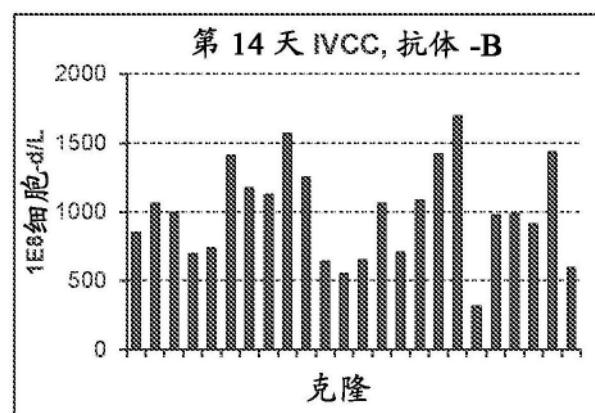


图7C

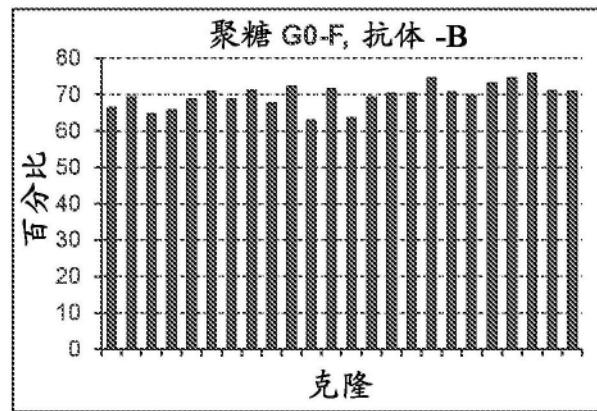


图7D

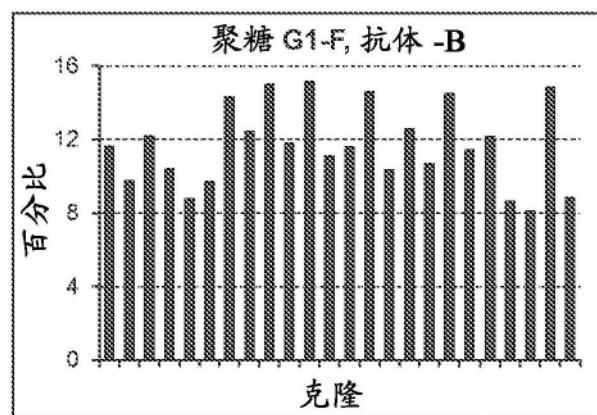


图7E

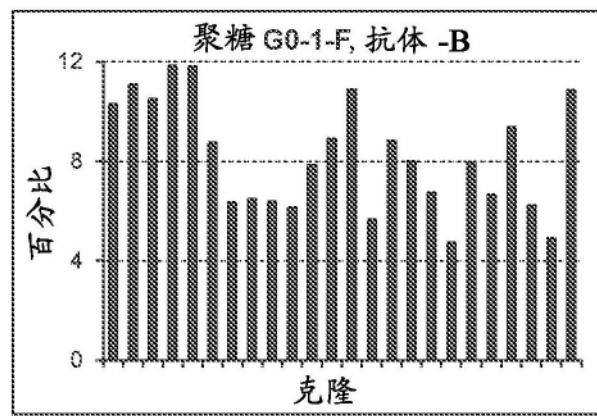


图7F

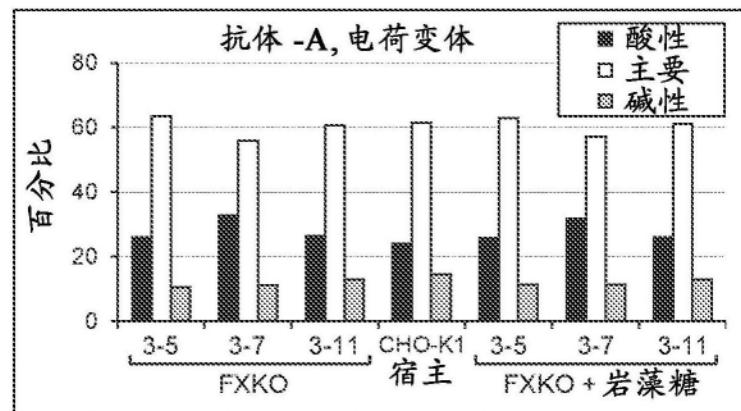


图8A

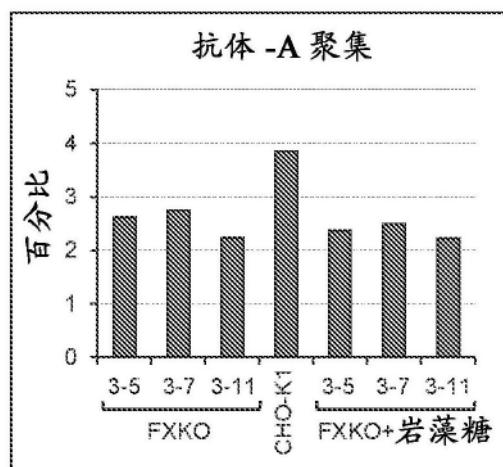


图8B

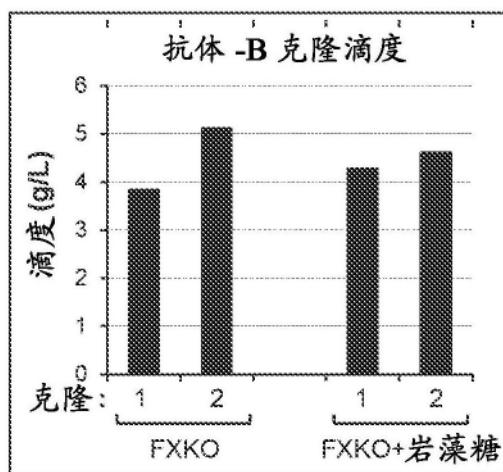


图8C

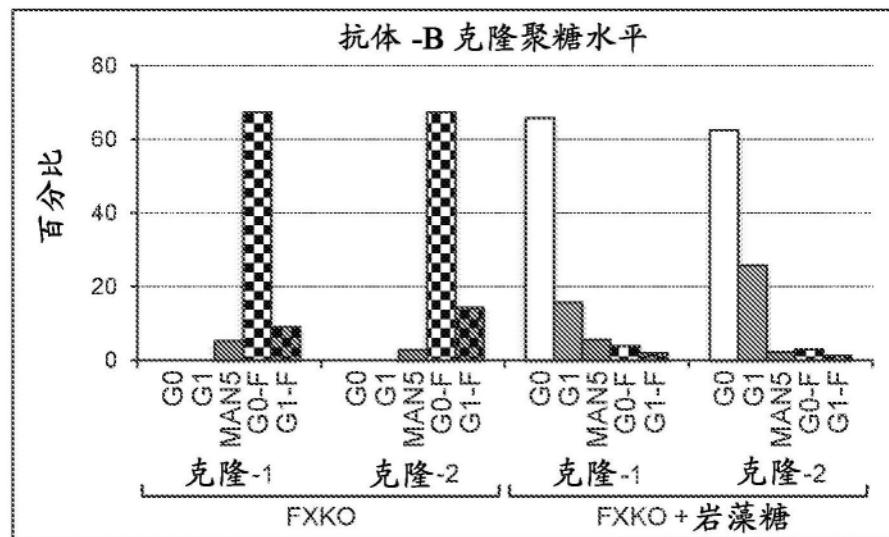


图8D

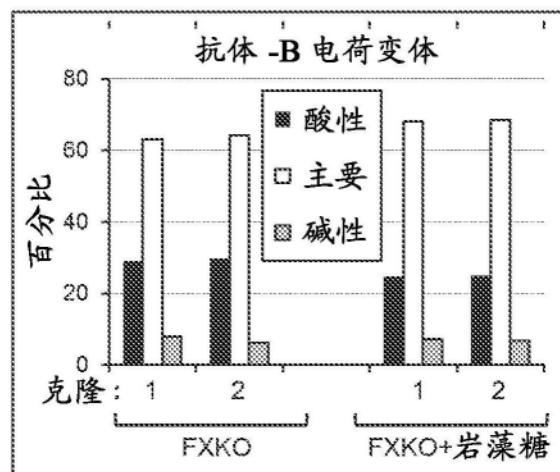


图8E

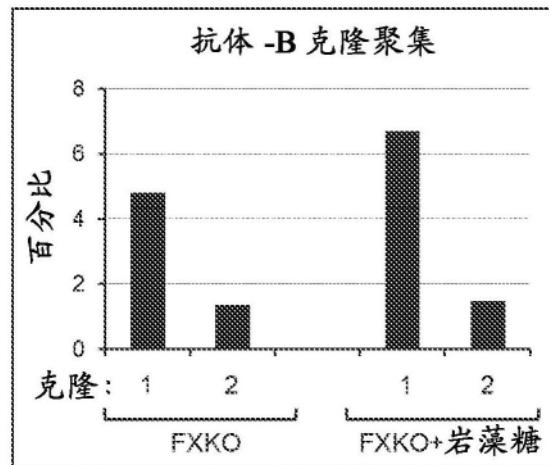


图8F

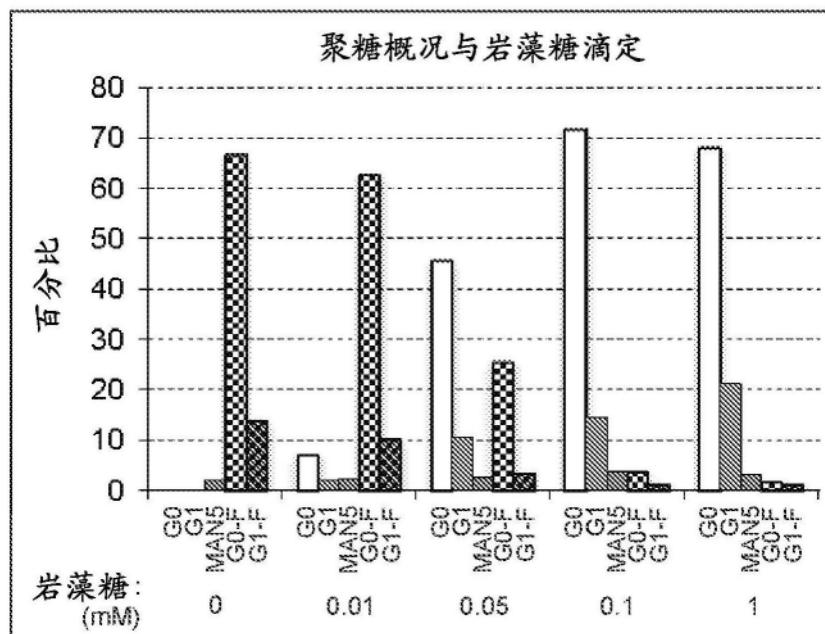


图9A

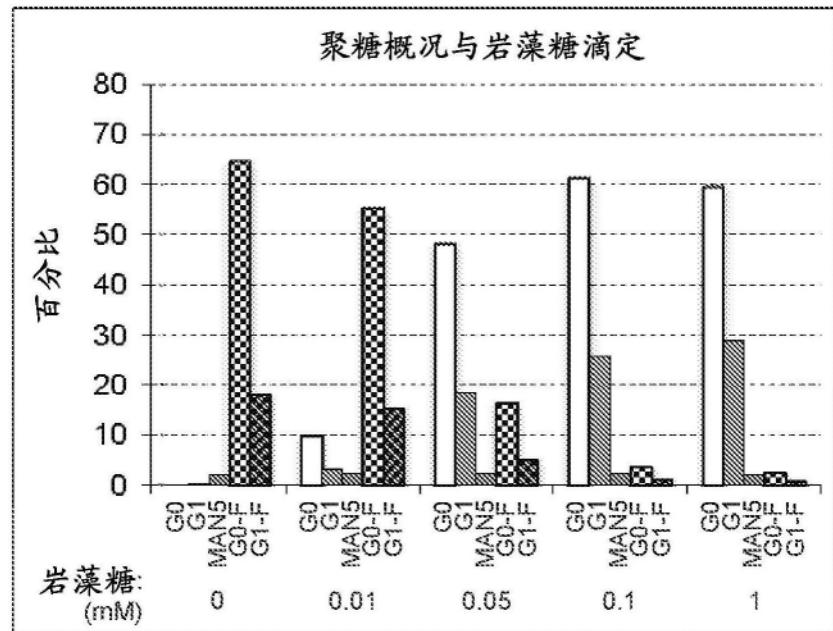


图9B

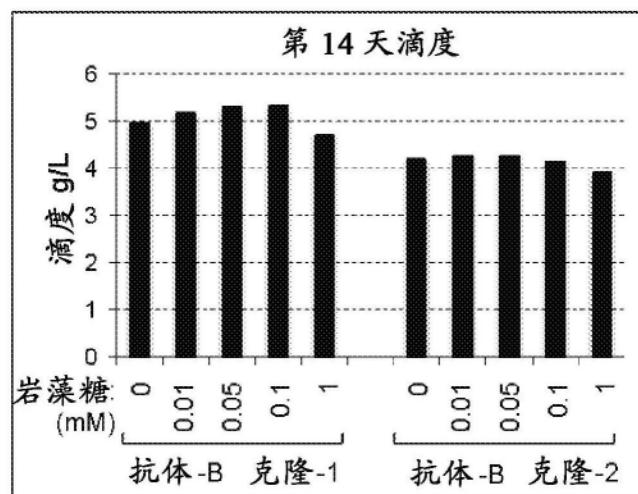


图9C

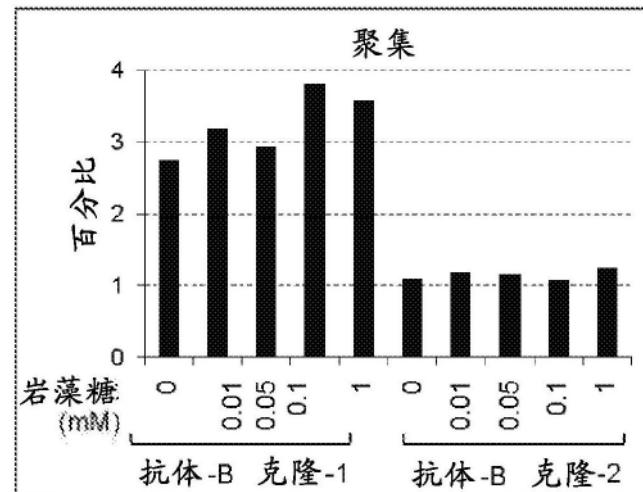


图9D

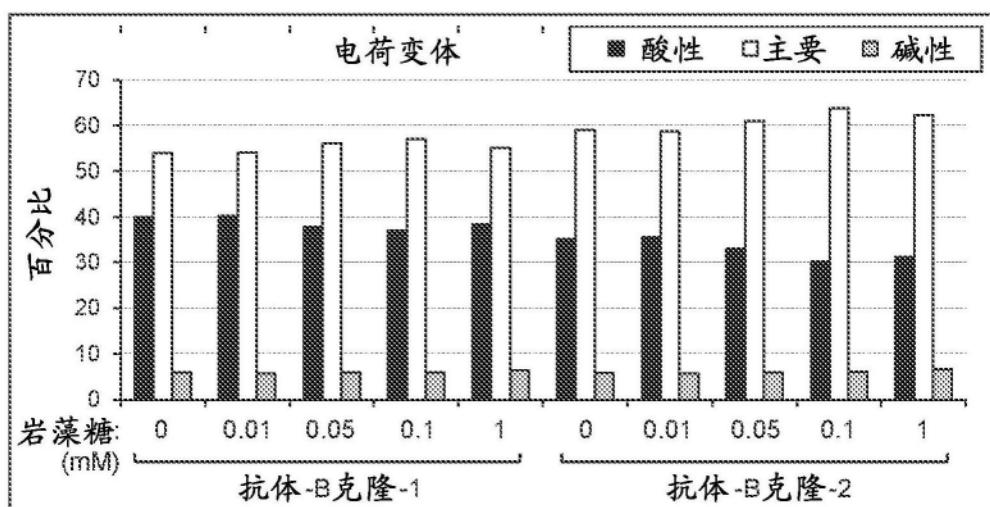


图9E

| 岩藻糖浓度 (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 |

图10A

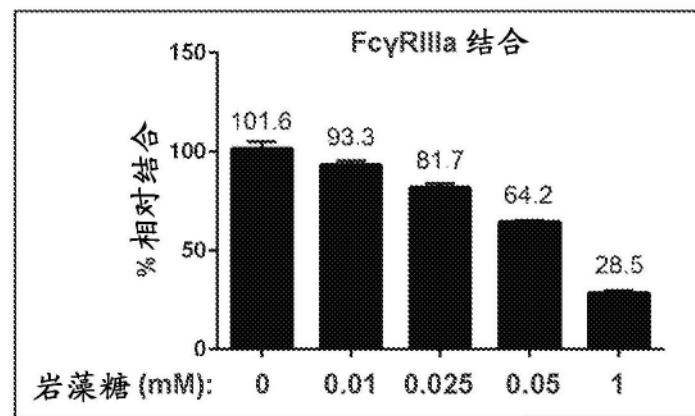


图10B

| 岩藻糖 (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 |

图10C

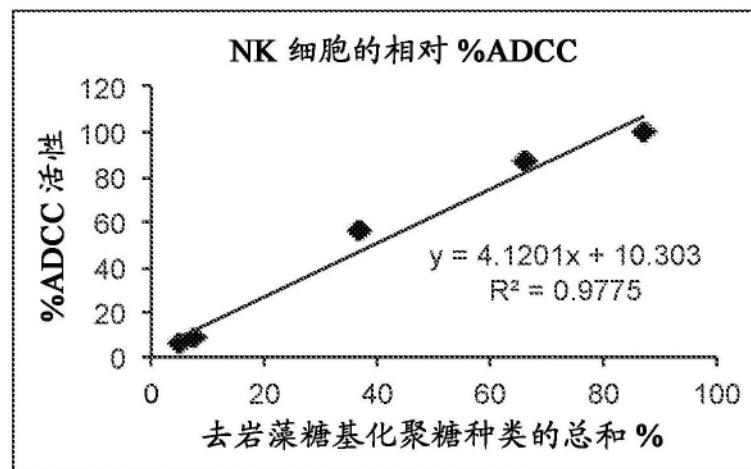


图10D

| 岩藻糖 (mM)         | 去岩藻糖基化聚糖的总和 % | % 相对 ADCC 活性 |
|------------------|---------------|--------------|
| 1:3 mix (0&1 mM) | 25.4          | 34           |
| 1:1 mix (0&1 mM) | 45.9          | 54           |
| 3:1 mix (0&1 mM) | 66.4          | 85           |

图10E

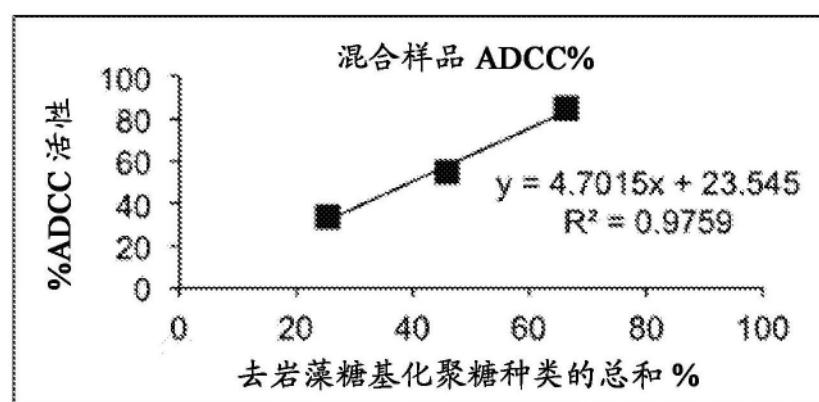


图10F

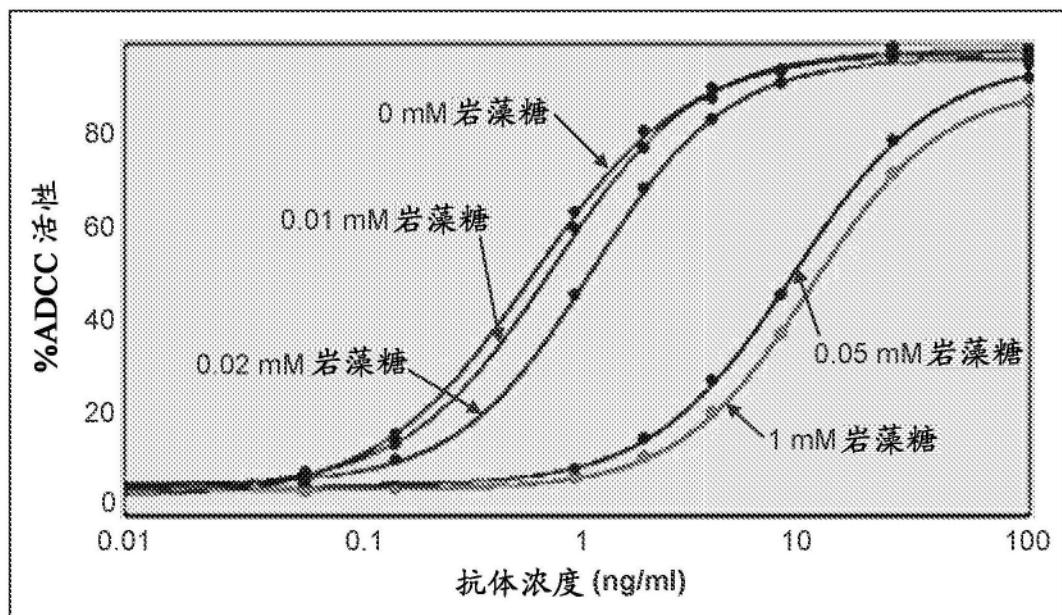


图10G