

UNIwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Lekarski

Julita Balcerek

Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych do ekspresji białek rekombinowanych dla zastosowań biofarmaceutycznych



PROMOTOR PRACY DOKTORSKIEJ:
Dr hab. prof. nadzw. Tadeusz Pietrucha
(Zakład Biotechnologii Medycznej)

Projekt realizowany w firmie
Mabion S.A.

ŁÓDŹ 2021

1. ABSTRACT

Stable gene integration and rapid selection of clones with high transgene expression are extremely important in the development of biopharmaceutical systems for the production of the protein of interest. According to the regulatory guidelines, production clones should be stable for many generations, that is, consistently produce the desired product, the quantity and quality of which are not adversely modified. This project presents a solution to significantly shorten the development process of therapeutic proteins. To achieve long-term stable expression exemplified by a *Fab* transgene using recombinase-mediated cassette exchange (RMCE), the *lox* sequence configurations with each other was modified. Among other things, by reversing the orientation of the spacer sequence, the integrated gene was not lost after several dozen cycles of cell division. This feature also prevents the reversible integration of the transgene. It has also been shown that the location of the mutations in the *lox* arm (*lox71_2272_s3'-5'* and *lox66T_2272_s3'-5'*, in the donor and acceptor vector) affects the efficiency/specificity of the recombinase reaction and the stability of recombinant protein production. As a result of the developed recombination reaction, a quadruple mutant (DSMDAM, *double spacer mutant double arm mutant*) is formed. The Cre recombinase excision pathway for products flanked with the DSMDAM mutant is blocked. The insertion event is not reversible.

The developed technology to derive stable cell lines was based on the use of the properties of the Cre-*lox* system, which is compatible with the CHO host. The basis of the recombination strategy used in the presented solution was the selection of appropriate mutation configurations of the *lox* sequence, shape (including sequence and structure) of vector constructs (acceptor, donor, control with a reporter gene, for expression of *cre/TAT-cre*) and the conditions of the recombination reaction, affecting both the efficiency and effectiveness of the exchange as well as the long-term stability of the recombinant. The derivation of the acceptor stable cell line (CHO_pMlml_2_GFP) and verification of the possibility of acting as a platform for efficient generation of target cell lines, stably producing the expected product, was successful. A universal line of reusable cells for the site-specific integration of transgenes has been obtained. Together with a reliable recombination process, the entire platform can be freely used for the processes of commercial development of therapeutic proteins, including monoclonal antibodies. Thanks to the proposed solution, it is possible to: efficiently and comparable with the RMCE processes presented in the literature, integrate genes in a specific place in a specific order in one transfection step; stable integration of therapeutic protein transgenes into a target site in the genome of CHO cells (stable transgene expression and protein

production for up to 60 days in culture); a significant reduction of the costly stages of therapeutic protein development due to the possibility of using a universal cell line to the stage of establishing a stable therapeutic protein producer line as well as a substitute for transient transfection for preliminary tests, verifying the potential of the obtained molecule and the suitability of the CHO host for its production.

Stable cell lines are the key production tools used to express recombinant biotherapeutic protein transgenes. Cell lines proliferate and consistently produce the desired product over a specified period of time, with specified yields and without adversely affecting the quality of specific product characteristics. The development of a highly stable production cell line is demanding and depends primarily on careful selection of clones in the early stages of the cell line development. Instability of antibody expression in CHO is a common problem in industrial processes. Therefore, it is important to properly control mAb production. The analytical platform presented here is designed to comprehensively and accurately verify the stability of IgG1-producing cell lines during drug development and its various stages. The platform consists of analytical tools to verify protein attributes and cell line parameters, such as: galactosylation, afucosylation (G0 glycoform content), oxidation, host cell proteins [HCP], host cell DNA [HC DNA], charge heterogeneity, aggregates, gene copy number [GCN], cell density and viability. All of the above were pre-classified as analytical goals for the platform based on literature data. However, in the conducted studies, only ten pre-qualified attributes and parameters showed variability indicating their sensitivity to changes in the stability of the cell line and the produced antibody. The design of the analytical platform was developed to guide the proper control of stable expression of the transgene. The following parameters of the cell line were considered critical and necessary for monitoring in the context of stability analysis: the number of gene copies and productivity. The antibody attributes that have been identified as critical for analysis under this aspect are galactosylation, afucosylation (expressed as G0 content), protein charge dependent isoforms, and aggregation.

2. STRESZCZENIE

Stabilna integracja genów i szybka selekcja klonów o wysokiej ekspresji transgenów są niezwykle ważne przy opracowywaniu systemów biofarmaceutycznych do produkcji białka, będącego przedmiotem zainteresowania. Zgodnie z wytycznymi regulacyjnymi, klony produkcyjne powinny być stabilne przez wiele pokoleń, to znaczy w sposób niezmienny wytwarzać pożądany produkt, którego ilość i jakość nie ulega niekorzystnym modyfikacjom. W niniejszym projekcie przedstawiono rozwiązanie do istotnego skrócenia procesu rozwoju białek terapeutycznych. Aby osiągnąć długoterminową stabilną ekspresję, na przykładzie transgenów *Fab*, wykorzystując wymianę kaset za pośrednictwem rekombinazy (RMCE), zmodyfikowano wzajemne konfiguracje sekwencji *lox*. Między innymi poprzez odwrócenie orientacji sekwencji rdzenia nie doszło do utraty zintegrowanego transgenów po kilkudziesięciu cyklach podziału komórki. Ta funkcja zapobiega również odwracalnej integracji transgenów. Wykazano dodatkowo, że lokalizacja mutacji w ramieniu *lox* (*lox71_2272_s3'-5'* oraz *lox66T_2272_s3'-5'*, w wektorze donorowym i akceptorowym) wpływa na wydajność/specyficzność reakcji rekombinazy i stabilność wytwarzania rekombinowanego białka. W wyniku opracowanej reakcji rekombinacji powstaje poczwórny mutant (DSMDAM, *double spacer mutant double arm mutant*). Szlak wycinania dla rekombinazy Cre dla produktów oflankowanych mutantem DSMDAM jest zablokowany. Zdarzenie wstawienia nie jest odwracalne.

Opracowana technologia do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych opiera się na wykorzystaniu właściwości systemu Cre-*lox*, wykazującego kompatybilność z gospodarzem CHO. Podstawą strategii rekombinacji, wykorzystanej w prezentowanym rozwiązaniu, był dobór odpowiednich konfiguracji mutacji sekwencji *lox*, kształt (w tym sekwencja i struktura) konstruktyw wektorów (akceptorowego, donorowego, kontrolnego z genem reporterowym, do ekspresji *cre/TAT-cre*) oraz warunki reakcji rekombinacji, wpływające zarówno na wydajność i skuteczność wymiany, jak również długoterminowo na stabilność rekombinanta. Wyprowadzenie akceptorowej stabilnej linii komórkowej (CHO_pMIm1_2_GFP) i weryfikacja możliwości pełnienia funkcji platformy do wydajnego generowania docelowych linii komórkowych, stabilnie wytwarzających oczekiwany produkt, zakończyła się sukcesem. Uzyskano uniwersalną linię komórek wielokrotnego użytku do miejscowo specyficznej integracji transgenów, która w parze z niezawodnie działającym procesem rekombinacji, umożliwia swobodne wykorzystywanie całej platformy do procesów komercyjnego rozwoju białek terapeutycznych, w tym przeciwciał monoklonalnych. Dzięki zaproponowanemu rozwiązaniu możliwa jest: wydajna i porównywalna z prezentowanymi w literaturze procesami RMCE, integracja genów w określonym miejscu, w określonej kolejności w jednym kroku transfekcji;

stabilna integracja transgenów białek terapeutycznych do miejsca docelowego w genomie komórek CHO (stabilna ekspresja transgenu i produkcja białka do 60 dni w hodowli); istotna redukcja kosztownych etapów rozwoju białek terapeutycznych za sprawą możliwości wykorzystania uniwersalnej linii komórkowej do etapu wyprowadzenia stabilnej linii producenta białka terapeutycznego, jak również jako substytut transfekcji przejściowej do testów wstępnych, weryfikujących potencjał uzyskiwanej cząsteczki oraz przydatność gospodarza CHO do jej produkcji.

Stabilne linie komórkowe są kluczowymi narzędziami produkcyjnymi, używanymi do ekspresji transgenów rekombinowanych białek bioterapeutycznych. Linie komórkowe namnażają się i konsekwentnie wytwarzają pożądany produkt przez określony czas, z określoną wydajnością i bez negatywnego wpływu na jakość określonych cech produktu. Opracowanie wysoce stabilnej produkcyjnej linii komórkowej jest wymagające i zależy przede wszystkim od starannej selekcji klonów we wczesnych stadiach rozwoju linii komórkowej. Niestabilność ekspresji przeciwciał w CHO jest częstym problemem w procesach przemysłowych. Dlatego ważne jest, aby odpowiednio kontrolować produkcję mAb. Przedstawiona platforma analityczna jest przeznaczona do kompleksowej i dokładnej weryfikacji stabilności linii komórkowych, produkujących IgG1 w okresie rozwoju leku, na jego różnych etapach. Platforma składa się z narzędzi analitycznych do weryfikacji atrybutów białek i parametrów linii komórkowych, takich jak: galaktozylacja, afukozylacja (zawartość glikoform G0), utlenianie, białka komórki gospodarza [HCP], DNA komórki gospodarza [HC DNA], heterogeniczność ładunku, agregaty, liczba kopii genu [GCN], gęstość komórek i ich żywotność. Wszystkie powyższe zostały wstępnie zaklasyfikowane jako cele analityczne dla platformy na podstawie danych literaturowych. Natomiast w przeprowadzonych badaniach tylko dziesięć wstępnie zakwalifikowanych atrybutów i parametrów wykazało zmienność, wskazującą na ich wrażliwość na zmiany stabilności linii komórkowej i wytwarzanego przeciwciała. Opracowano kształt platformy analitycznej, wyznaczającej kierunek do właściwej kontroli stabilnej ekspresji transgenów. Za krytyczne i niezbędne do monitorowania parametry linii komórkowej, w kontekście analizy stabilności, uznano: liczbę kopii genu oraz produktywność. Cechy przeciwciała, które zostały wyodrębnione jako krytyczne do analizy w ramach niniejszego aspektu to: galaktozylacja, afukozylacja (wyrażona zawartością G0), izoformy zależne od ładunku białka oraz agregacja.