

Abstract

The growing demand for therapeutic proteins for the treatment of various diseases, necessitates the continuous development of high-producing and stably expressing cell lines, such as Glycotope's proprietary human GEX[®] cell line, for the production of high-quality proteins. This is a time-consuming and labor-intensive process. The product quality of a therapeutic protein is strongly affected by its glycosylation, e.g. the presence of terminal *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc) and lack of sialylation reduce the half-life by increased affinity to the asialoglycoprotein receptor. To improve the half-life of Glycotope's FVII, two transferases were knocked-out (K.O.) with the CRISPR/Cas9n system singly as well as simultaneously. The transfection of verified K.O.-clones with FVII revealed a complete absence of GalNAc only in the double-K.O. clone. The additional overexpression of a sialyltransferase increased the percentage of fully sialylated glycans to a degree comparable to the plasma-derived FVII. Moreover, the generated clone showed an improved growth behavior and a higher productivity compared to the original FVII-production clone during cultivation in ambr perfusion.

Furthermore, the knockout procedure was applied for the glutamine synthetase (GS), the only enzyme which synthesizes glutamine from glutamate *de novo*. In parallel to the DHFR/MTX system, the generated GS-K.O. clone was employed for the expression of the model antibody CetuGEX[®] with GS as selection marker, which has been described to reduce the timeline for clone development. However, this prediction could not be verified in this work. Nevertheless, a volumetric titer comparable to Glycotope's approved DHFR-derived CM-production clone was obtained for GS-derived clones. The cultivation in absence of glutamine led to an improved energy metabolism with reduced accumulation of growth-inhibiting metabolites, which is favorable for a production process.

To generate a high-producing and stably expressing master cell line, which can be employed for the expression of various proteins, several eGFP master cassette constructs were integrated at the *hbg1* locus in a targeted manner using CRISPR/Cas9. Resulting clones were analyzed in detail for eGFP expression and correct cassette integration. Clones were obtained, which express eGFP stably at a high level without any selection marker. After Cre-mediated exchange of eGFP for ST6 or mCherry, clones with long-term mCherry/ST6 expression were identified. Comparing targeted integration strategies at *hbg1* locus in presence versus absence of resistance marker proved a higher stability for generated clones when excluding selection. Additionally, master cell lines were generated by random integration. After Cre-mediated exchange of eGFP for mCherry or ST6 an inverse correlation between eGFP and ST6/mCherry expression was shown, indicating that protein expression not only depends on the integration locus. However, after the Cre-mediated recombination the yield of clones expressing mCherry or ST6 turned out to be very low due to an unexpected interaction of *lox66* and *lox5171* leading to the exclusion of the master cassette and consequently, to the inhibition of the recombination process.

This work demonstrates that cell line engineering techniques allow the improvement of production clones and host cell lines in a short timeline to optimize product quality, productivity, cell stability as well as the process of clone development.

Zusammenfassung

Die wachsende Nachfrage an therapeutischen Proteinen zur Behandlung diverser Erkrankungen erfordert die ständige Weiterentwicklung von hoch-produzierenden und stabil-exprimierenden Zelllinien, wie Glycotopes firmeneigener humaner GEX[®] Zelllinie, zur Produktion hochqualitativer Proteine. Dies ist ein zeit- und arbeitsintensiver Prozess. Die Produktqualität eines Therapeutikums wird stark durch seine Glykosylierung beeinflusst, so wird z.B. die Halbwertszeit aufgrund einer erhöhten Bindungsaffinität zum Asialoglycoproteinrezeptor durch terminales *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und fehlende Sialylierung reduziert. Um die Halbwertszeit von Glycotopes FVII zu erhöhen wurden zwei Transferasen mittels CRISPR/Cas9 einzeln sowie in Kombination ausgeknockt (K.O.). Nach Transfektion der verifizierten K.O.-Klone mit FVII wurden nur in der Doppelmutante keine GalNAc-Strukturen identifiziert. Die zusätzliche Überexpression einer Sialyltransferase erhöhte den Anteil an vollständig sialylierten Glykanen, vergleichbar zum Plasma-FVII. Zuletzt konnte für den generierten Klon eine Verbesserung im Wachstumsverhalten sowie in der Produktivität verglichen zum ursprünglichen FVII-Produktionsklon während der Kultivierung im Perfusions-ambr erzielt werden.

Diese Strategie wurde auch für den Knockout der Glutamin Synthetase (GS) eingesetzt, dem einzigen Enzym, dass Glutamin aus Glutamat *de novo* synthetisieren kann. Parallel zum DHFR/MTX System, wurde ein generierter GS-K.O.-Klon mit dem Modelprotein CetuGEX[®] und GS als Selektionsmarker transfiziert und die CM-Expression gemessen. Das GS Selektionssystem ist dafür bekannt, die Zeit der Klonentwicklung zu reduzieren, was jedoch in dieser Arbeit nicht verifiziert werden konnte. Für Klone des GS-Systems konnte aber ein volumetrischer Titer erreicht werden, der Glycotopes zugelassenem CM-Produktionsklon mit DHFR-System entspricht. Die Kultivierung ohne Glutamin verbesserte den Energiemetabolismus und reduzierte die Akkumulation wachstumshemmender Metabolite, was für einen Produktionsprozess wünschenswert ist.

Zur Generierung einer hoch-produzierenden und stabil-exprimierenden Masterzelllinie, die für die Expression verschiedener Proteine eingesetzt werden kann, wurden verschiedene eGFP Kassettenkonstrukte gezielt mittels CRISPR/Cas9 in den *hbg1* Locus integriert. Resultierende Klone wurden detailliert auf ihre eGFP Expression sowie die korrekte Integration analysiert. Klone, die ohne Selektionsmarker generiert wurden, exprimierten eGFP stabil auf einem hohen Level. Nach Cre-vermitteltem Austausch von eGFP gegen ST6 oder mCherry wurden Klone mit langzeitiger ST6/mCherry Expression identifiziert. Im Vergleich führte die gerichtete Integration in den *hbg1* Locus ohne Einsatz eines Resistenzgens zu einer höheren Stabilität als mit Selektionsmarker. Zusätzlich wurden mittels ungerichteter Integration Masterzelllinien entwickelt, die ebenfalls für den Cre-vermittelten Austausch von eGFP gegen ST6 oder mCherry eingesetzt wurden. Der Ansatz verdeutlichte eine inverse Korrelation zwischen eGFP und ST6/mCherry Expression, was darauf hindeutet, dass die Proteinexpression nicht ausschließlich durch den Integrationsloкус definiert wird. Nach erfolgter Rekombination wurden nur wenige Klone mit ST6/mCherry Expression identifiziert. Die Ursache hierfür liegt in einer unerwarteten Interaktion von *lox66* mit *lox5171*, die zur Exklusion der Masterkassette führte und somit den Rekombinase-vermittelten Austausch verhinderte.