

Université de Montréal

Caractérisation du système inductible au cumate pour la production de protéines thérapeutiques en cellules CHO

par Adeline Poulain

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Microbiologie et Immunologie

Avril 2018

© Adeline Poulain, 2018

Résumé

Les protéines thérapeutiques représentent une classe de médicaments pour le traitement de diverses maladies telles que différentes formes de cancer ou les maladies auto-immunes. La grande majorité de ces protéines commercialisées sont produites à partir de lignées cellulaires d'ovaire d'hamster chinois (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) qui permettent notamment de réaliser les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'obtention de protéines biologiquement actives.

Le développement de lignées cellulaires CHO hautement productrices à grande échelle est un processus long (de 6 à 18 mois) et très coûteux. Celui-ci débute par la transfection, suivie par la sélection des cellules ayant intégré aléatoirement dans leur génome le gène codant pour la protéine d'intérêt, donnant lieu à une population hétérogène en termes de production, de qualité du produit et de croissance. Depuis quelques années, l'utilisation de ces populations hétérogènes est devenue une approche très populaire pour la caractérisation biochimique des protéines et les études précliniques nécessitant la production rapide et à moindre coût de quantités suffisantes de matériel. Les autorités de régulation des médicaments exigent néanmoins que les lignées cellulaires soient issues d'une unique cellule progénitrice (ou clone). L'obtention d'une lignée cellulaire hautement productrice nécessite une étape de criblage, afin d'isoler un clone présentant à la fois un avantage de production et de croissance. Or, cette étape est considérée comme l'étape limitante du processus de développement de lignées cellulaires puisque, du fait de la très faible fréquence des clones forts producteurs, il est nécessaire de cribler des milliers de cellules. Jusqu'à date, aucun mécanisme précis n'a permis d'expliquer la faible occurrence des clones forts producteurs dans les populations hétérogènes sélectionnées. Cependant, la combinaison de mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place en réponse au stress dû à la surexpression du gène d'intérêt pourrait être mise en cause.

Au sein de notre laboratoire, nous avons développé une lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA} contenant le système d'expression inductible au cumate. Ce système, contrairement à la majorité des systèmes constitutifs utilisés dans l'industrie, permet de choisir le moment et le niveau d'expression de la protéine d'intérêt. En effet, l'ajout de l'inducteur cumate permet au transactivateur chimérique rcTA de se fixer au promoteur fort CR5 et d'activer la transcription.

Ce projet de recherche se base sur l'hypothèse que l'utilisation d'un système d'expression inductible permettrait de limiter le stress potentiel induit par la surexpression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection, qui pourrait affecter le taux de croissance et la survie des clones lors la dilution limite. La fréquence de clones forts producteurs dans la population sélectionnée serait alors augmentée, améliorant la productivité de la population et facilitant l'étape de criblage.

Dans un premier temps, en combinant les vecteurs d'expression plasmidiques et la lignée CHO^{BRI/rcTA}, nous avons développé et optimisé une plateforme performante pour la production rapide de protéines recombinantes via la génération de populations hétérogènes. Nous avons ainsi obtenu des populations produisant environ 0.9 g/L de la protéine de fusion hCD200Fc et environ 0.35 g/L de l'anticorps rituximab. La stabilité de la production de chacune des populations après un mois en culture et après un cycle de congélation-décongélation a également été démontrée. De plus, l'étude de la qualité du produit final n'a montré aucune différence majeure entre les protéines produites à partir d'un clone stable ou d'une population hétérogène, et ce pour les deux protéines. Enfin, nous avons montré la supériorité du promoteur inductible CR5 par rapport à deux promoteurs constitutifs couramment utilisés dans l'industrie.

Dans un second temps, l'impact de l'expression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection sur la productivité et la répartition clonale de la population hétérogène sélectionnée a été étudié. Pour cela, deux populations hétérogènes issues d'une même transfection et produisant le hCD200Fc ont été générées. Pour l'une des populations hétérogènes, l'expression de la protéine a été activée durant la phase de sélection par l'ajout de cumate. Par la suite, pour chacune des populations hétérogènes, la production en culture en mode cuvée-alimentée a été comparée et la répartition clonale via le criblage de micro-populations a été étudiée. Nous avons ainsi mis en évidence qu'une diminution de l'expression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection mène à une augmentation significative de la productivité de la population hétérogène, due à un enrichissement de cellules présentant une productivité spécifique accrue. Enfin, lors de la sélection, nous avons observé une augmentation de la mortalité cellulaire accompagnée d'une augmentation de l'expression d'un marqueur du stress du réticulum endoplasmique dans la population exprimant de haut niveau de hCD200Fc sous induction du cumate. Ces résultats suggèrent que durant la phase de sélection,

la surexpression de la protéine recombinante entraîne de la part de la cellule l'activation des voies de réponse au stress du réticulum endoplasmique, pouvant alors limiter son amplification ou induire le phénomène d'apoptose.

Ce projet a contribué au développement d'une plateforme performante pour la production rapide de protéines recombinantes via la génération de populations hétérogènes stables. De plus, la caractérisation du système inductible au cumate dans ce contexte a permis de démontrer le réel avantage de l'utilisation d'un système inductible pour réduire le temps et les coûts de développement de lignées cellulaires stables à haut potentiel de production.

Mots-clés : Système d'expression inductible au cumate, cellule CHO, production de protéines recombinantes, expression stable

Abstract

Therapeutic proteins represent a class of therapeutics for the treatment of various diseases such as cancer or autoimmune diseases. Due to their ability to perform post-translational modifications, necessary to obtain biologically active proteins, most of these marketed proteins are produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines.

The development of large-scale highly productive CHO cell lines is a long (6 to 18 months) and very expensive and labor-intensive process. This starts with the transfection followed by the selection of cells having randomly integrated the gene coding for the protein of interest into their genome, resulting in a heterogeneous population (pool) in terms of production, product quality and growth. In recent years, the use of these pools has become a very popular approach for protein biochemical characterization and preclinical studies, requiring the rapid and cost-effective production of sufficient quantities of material. However, drug regulatory authorities require that cell lines be derived from a single progenitor cell (or clone). Obtaining a highly productive cell line requires a screening step to isolate a clone with both high productivity and growth rate. This step is considered as the limiting step of the cell line development process because the very low frequency of high-producer clones requires the screening of thousands of cells. So far, no specific mechanism has explained the low occurrence of high-producer clones in selected pools. However, the combination of molecular and cellular mechanisms in response to stress due to overexpression of the gene of interest could be involved.

In our laboratory, we have developed a CHO^{BRI/rcTA} cell line containing the cumate gene switch inducible expression system. This system, unlike most of constitutive systems used in the industry, allows defining the time and the expression level of the protein of interest. Indeed, by the addition of the cumate inducer, the chimeric rcTA transactivator binds to the strong CR5 promoter and triggers transcription. In this research project, we hypothesised that the use of an inducible expression system could limit the potential stress induced by the overexpression of the recombinant protein during the selection process. The frequency of high-producer clones in the selected population would then be increased, improving the population productivity and facilitating the screening step.

We first developed and optimized an efficient platform for the rapid production of recombinant proteins via the generation of pools, by combining plasmid expression vectors and the CHO^{BRI/rcTA} cell line. We thus obtained populations which produced about 0.9 g/L of the fusion protein hCD200Fc and about 0.35 g/L of the antibody rituximab. For each population, the production stability after a one-month culture and after a freeze-thaw cycle was also demonstrated. Furthermore, for both proteins, the final product quality analysis showed no major differences between proteins produced either from a stable clone or from a stable pool. Finally, we showed the superiority of the CR5 inducible promoter compared to two constitutive promoters commonly used in the industry.

We then studied the impact of recombinant protein expression on the productivity and clonal distribution of the selected pool. For this, two stable pools resulting from the same transfection and producing hCD200Fc were generated. For one of them, protein expression was triggered during the selection process by addition of cumate. Subsequently, for each pool, fed-batch production was compared and clonal distribution via micro-population screening was studied. We have thus demonstrated that a decrease in recombinant protein expression during the selection process leads to a significant increase in pool productivity, due to an enrichment of cells with increased specific productivity. Finally, during selection process, we observed an increase in cell mortality together with an increase in the expression of an endoplasmic reticulum stress marker in the population expressing high levels of hCD200Fc. These results suggest that during the selection process, overexpression of the recombinant protein results in activation of the endoplasmic reticulum stress response pathways by the cell, which could then limit its growth or induce apoptosis.

This project contributed to the development of an efficient platform for the rapid production of recombinant proteins via the generation of stable pools. In addition, the cumate inducible system characterization in this context has demonstrated the real advantage of using an inducible system to reduce the development time and costs of stable cell lines with high production potential.

Keywords: Cumate-inducible expression system, CHO cell, recombinant protein production, stable expression

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 CONTEXTE	1
1.2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	3
1.3 CONTRIBUTIONS DE CHACUN DES AUTEURS AUX ARTICLES	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 LES PROTÉINES RECOMBINANTES DANS LE MARCHÉ PHARMACEUTIQUE	6
2.1.1 <i>Biomédicaments et petites molécules</i>	6
2.1.2 <i>Les anticorps monoclonaux et les protéines de fusion Fc</i>	7
2.1.3 <i>Biosimilaires</i>	10
2.2 EXEMPLES DE SYSTÈMES D'EXPRESSION POUR LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES	11
2.2.1 <i>Les systèmes procaryotes</i>	12
2.2.2 <i>Les systèmes eucaryotes</i>	13
2.2.2.1 Les levures	13
2.2.2.2 Les cellules isolées d'insectes	13
2.2.2.3 Les cellules isolées de mammifères	14
2.3 PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES EN CELLULES CHO	16
2.3.1 <i>Vecteurs d'expression</i>	16
2.3.2 <i>Véhicule de transfection : le PEI</i>	17
2.3.3 <i>Expression transitoire</i>	18
2.3.4 <i>Expression stable</i>	21
2.3.5 <i>Criblage des clones fort producteurs</i>	24
2.3.6 <i>Culture en bioréacteur</i>	29
2.3.7 <i>Purification</i>	32

2.4	MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES LIMITANT LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES	33
2.4.1	<i>Limitations transcriptionnelles</i>	33
2.4.2	<i>Limitations post-transcriptionnelles</i>	34
2.4.2.1	Contrainte cellulaire	34
2.4.2.2	Agrégation.....	35
2.4.2.3	Le stress du réticulum endoplasmique et voie UPR	36
2.5	OPTIMISATION DE LA PLATEFORME D'EXPRESSION EN CELLULES CHO	40
2.5.1	<i>Optimisation des vecteurs d'expression</i>	40
2.5.1.1	Les promoteurs.....	40
2.5.1.2	Les systèmes de sélection.....	48
2.5.1.3	Les S/MAR.....	50
2.5.2	<i>Optimisation des bioprocédés</i>	50
2.5.3	<i>Optimisation des lignées cellulaires par les micro-ARN</i>	52
CHAPITRE 3 DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE LA PLATEFORME DE PRODUCTION RAPIDE VIA LES POPULATIONS HÉTÉROGÈNES STABLES CHO ^{BRI/rcTA}		54
3.1	PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	54
3.2	RAPID PROTEIN PRODUCTION FROM STABLE CHO CELL POOLS USING PLASMID VECTOR AND THE CUMATE GENE-SWITCH	55
3.3	ABSTRACT	55
3.4	INTRODUCTION	56
3.5	MATERIALS AND METHODS.....	58
3.5.1	<i>Generation of the CHO^{BRI/rcTA} cell line and culture condition</i>	58
3.5.2	<i>Cumate</i>	59
3.5.3	<i>Plasmid vectors</i>	59
3.5.4	<i>pDNA transfection</i>	61
3.5.5	<i>Flow cytometry analysis</i>	62
3.5.6	<i>GS-MSX selection of CHO^{BRI/rcTA} cell pools</i>	62
3.5.7	<i>Recombinant protein production</i>	62
3.5.8	<i>Recombinant protein quantification</i>	63
3.5.9	<i>Freezing and thawing process</i>	63
3.5.10	<i>Recombinant protein purification from cell culture supernatants</i>	64
3.5.11	<i>SDS-PAGE</i>	64
3.5.12	<i>Analytical Size Exclusion Chromatography</i>	64
3.6	RESULTS	65
3.6.1	<i>Description of the CHO^{BRI/rcTA} cell line expression system</i>	65

3.6.2	<i>Optimization of stable CHO^{BRI/rcTA} cell pools generation</i>	66
3.6.2.1	pDNA topology	66
3.6.2.2	MSX selection conditions	69
3.6.2.3	Determination of optimal cumate concentration for induction	71
3.6.3	<i>Evaluation of pool expression stability</i>	72
3.6.3.1	Long-term maintenance.....	72
3.6.3.2	Effect of freeze/thaw cycle on CHO pool volumetric productivity	73
3.6.4	<i>Product quality characterization</i>	74
3.6.5	<i>Comparison between inducible and constitutive promoters for pool generation</i>	76
3.7	DISCUSSION	79
3.8	AUTHOR CONTRIBUTIONS	83
3.9	ACKNOWLEDGMENTS	83
CHAPITRE 4 ÉTUDES COMPARATIVES SUPPLÉMENTAIRES DU PROMOTEUR INDUCTIBLE CR5 ET DU PROMOTEUR CONSTITUTIF CMV5		84
4.1	INTRODUCTION	84
4.2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	84
4.2.1	<i>Maintenance des cellules</i>	84
4.2.2	<i>Vecteurs plasmidiques</i>	85
4.2.3	<i>Transfection</i>	86
4.2.3.1	Pour l'étude de la stabilité	86
4.2.3.2	Pour l'étude des μ -pools.....	86
4.2.4	<i>Sélection des pools</i>	87
4.2.5	<i>Production en mode cuvée</i>	87
4.2.6	<i>Quantification de hCD200Fc par pA-HPLC</i>	87
4.2.7	<i>Génération de μ-pools</i>	88
4.3	RÉSULTATS.....	88
4.3.1	<i>Étude de la stabilité du promoteur inductible CR5 et du promoteur constitutif CMV5 après deux mois en culture</i>	88
4.3.2	<i>Comparaison de la fréquence de cellules hautement productrices du pool CR5-hCD200Fc et du pool CMV5-hCD200Fc via la génération de μ-pools</i>	90
4.4	DISCUSSION ET CONCLUSION	93
4.4.1	<i>Étude de la stabilité</i>	93
4.4.2	<i>Étude de la fréquence de cellules hautement productrices via la génération de μ-pools</i>	94
CHAPITRE 5 EFFET DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE RECOMBINANTE DURANT LA GÉNÉRATION DE POPULATIONS HÉTÉROGÈNES STABLES CHO ^{BRI/RC^{TA}}		97

5.1	PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	97
5.2	REGULATION OF RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION DURING CHO POOL SELECTION ENHANCES HIGH-PRODUCING CELL FREQUENCY.....	98
5.3	ABSTRACT	98
5.4	INTRODUCTION	99
5.5	MATERIALS AND METHODS.....	102
5.5.1	<i>CHO^{BRI/rcTA} cell line</i>	102
5.5.2	<i>CHOBRI/rcTA cell line culture condition</i>	102
5.5.3	<i>Cumate</i>	103
5.5.4	<i>Plasmid vectors</i>	103
5.5.5	<i>pDNA transfection</i>	103
5.5.6	<i>MSX selection of CHO^{BRI/rcTA} cell pools</i>	104
5.5.7	<i>hCD200Fc intracytoplasmic labelling</i>	104
5.5.8	<i>Fed-batch culture production</i>	105
5.5.9	<i>Quasi-limiting dilution cloning for the generation of μ-pools</i>	105
5.5.10	<i>Assays for apoptosis and necrosis</i>	106
5.5.11	<i>Measurement of intracellular hCD200Fc and Bip expression by western blotting</i>	106
5.6	RESULTS.....	107
5.6.1	<i>r-protein overexpression negatively affects pool selection profile</i>	107
5.6.2	<i>r-protein overexpression increases annexinV-FITC positive cells and Bip expression during pool selection</i>	110
5.6.3	<i>Reducing r-protein expression during selection increases pool productivity</i>	113
5.6.4	<i>Regulated r-protein expression during selection enhances high producer frequency</i>	115
5.7	DISCUSSION	117
5.8	AUTHOR CONTRIBUTIONS	121
5.9	ACKNOWLEDGEMENTS	121
	DISCUSSION GÉNÉRALE	122
	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	132
	BIBLIOGRAPHIE	I
	ANNEXE 1 CLONAGE MOLÉCULAIRE DES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	I

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : CLASSEMENT PAR REVENU DES DIX MEILLEURS MÉDICAMENTS EN 2016.	7
TABLEAU 2 : ANTICORPS MONOCLONAUX AYANT DES BIOSIMILAIRES EN COURS DE DÉVELOPPEMENT.	11
TABLEAU 3 : COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES D'EXPRESSION DE PROTÉINES PHARMACEUTIQUES RECOMBINANTES.	16
TABLEAU 4 : PRODUCTIONS DE PROTÉINES RECOMBINANTES PAR TRANSFECTION TRANSITOIRE DE CELLULES DE MAMMIFÈRES.....	19
TABLEAU 5 : PRODUCTIONS DE PROTÉINES RECOMBINANTES À PARTIR DE POPULATIONS HÉTÉROGÈNES STABLES.	23
TABLE 6: PLASMIDS USED IN THIS WORK.	61

Liste des figures

FIGURE 1 : PROCESSUS DE RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT (R&D) DANS L'INDUSTRIE BIOPHARMACEUTIQUE.	2
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION D'UNE IMMUNOGLOBULINE G1 ET D'UNE PROTÉINE DE FUSION FC.	8
FIGURE 3 : TYPES D'ANTICORPS MONOCLONAUX ET NOMENCLATURE.	9
FIGURE 4 : CARACTÉRISTIQUES COMMUNES DES PLASMIDES OU VECTEURS D'EXPRESSION.	17
FIGURE 5 : ILLUSTRATION DES STRUCTURES CHIMIQUES LINÉAIRE ET BRANCHÉE DU POLYÉTHYLÈNIMINE.	18
FIGURE 6 : COMPARAISON DES DIFFÉRENTES PLATEFORMES D'EXPRESSION EN CELLULES CHO.	21
FIGURE 7 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROCÉDÉ TYPIQUE DE DÉVELOPPEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE MAMMIFÈRE POUR LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES.	24
FIGURE 8 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU TEST HTRF SPÉCIFIQUE À LA RÉGION FC HUMAINE.	26
FIGURE 9 : STRATÉGIES DE MARQUAGE PAR FLUORESCENCE POUR DIFFÉRENTES TECHNOLOGIES DE CRIBLAGE DE CLONES FORTS PRODUCTEURS.	28
FIGURE 10 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES TROIS MODES DE CULTURE DE CELLULES EN SUSPENSION.	31
FIGURE 11 : DESCRIPTION SCHÉMATIQUE DE LA RÉPONSE AU STRESS LIÉ À L'ACCUMULATION DE PROTÉINES MAL REPLIÉES DANS LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE.	38
FIGURE 12 : COMPARAISON DE LA STRUCTURE DES PROMOTEURS CMV, CMV5 ET CR5.	41
FIGURE 13 : CONFIGURATION TET _{OFF} DU SYSTÈME INDUCTIBLE À LA TÉTRACYCLINE.	43
FIGURE 14 : CONFIGURATION TET _{ON} DU SYSTÈME INDUCTIBLE À LA TÉTRACYCLINE.	43
FIGURE 15 : CONFIGURATION T _{REX} DU SYSTÈME INDUCTIBLE À LA TÉTRACYCLINE.	44
FIGURE 16 : CONFIGURATION « RÉPRESSEUR » DU SYSTÈME INDUCTIBLE AU CUMATE.	46
FIGURE 17 : CONFIGURATION « TRANSACTIVATEUR » DU SYSTÈME INDUCTIBLE AU CUMATE.	47
FIGURE 18 : CONFIGURATION « TRANSACTIVATEUR INVERSÉ » DU SYSTÈME INDUCTIBLE AU CUMATE.	47
FIGURE 19 : THE CUMATE-INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM.	66
FIGURE 20 : IMPACT OF PLASMID DNA TOPOLOGY ON POOL GENERATION.	68
FIGURE 21 : DETERMINATION OF OPTIMAL MSX CONCENTRATION FOR POOL SELECTION.	70
FIGURE 22 : DETERMINATION OF OPTIMAL CUMATE CONCENTRATION FOR RECOMBIANT PROTEIN EXPRESSION. ...	71
FIGURE 23 : THE POOL GENERATION PROCESS IS ROBUST AND POOLS ARE STABLE FOR AT LEAST ONE MONTH.	73
FIGURE 24 : POOL VOLUMETRIC PRODUCTIVITY IS MAINTAINED AFTER A FREEZE/THAW CYCLE.	74
FIGURE 25 : PROTEIN PRODUCT QUALITY CHARACTERIZATION OF CHO ^{BRI/rcTA} POOLS.	75
FIGURE 26 : COMPARISON OF THE CUMATE PROMOTER TO THE CMV5 AND EF1-HTLV PROMOTER FOR POOL GENERATION.	78
FIGURE 27 : COMPARAISON DE LA STABILITE DU <i>POOL</i> CR5-HCD200Fc ET DU <i>POOL</i> CMV5-HCD200Fc APRES DEUX MOIS EN CULTURE.	89
FIGURE 28 : COMPARAISON DES μ - <i>POOLS</i> CR5-HCD200Fc ET DES μ - <i>POOLS</i> CMV5-HCD200Fc.	92
FIGURE 29 : HCD200Fc EXPRESSION NEGATIVELY AFFECTS POOL PRODUCTIVITY.	109

FIGURE 30: HCD200Fc EXPRESSION INCREASES BIP EXPRESSION AND ANNEXIN-V FITC POSITIVE CELLS DURING THE SELECTION PROCESS. 111

FIGURE 31: COMPARISON OF CUM0 AND CUM1 POOLS DURING BIPHASIC FED-BATCH CULTURE PROCESS. 114

FIGURE 32: CUM0 AND CUM1 μ -POOLS: EVALUATION OF μ -POOLS PROLIFERATION DISTRIBUTION. 116

FIGURE 33: CUM0 AND CUM1 μ -POOLS: CUM0 WAS ENRICHED IN HIGH PRODUCING CELLS. 119

Liste des sigles et abréviations

\$US : Dollar américain

AcM/*mAb* : Anticorps monoclonal / *Monoclonal antibody*

ADN/*DNA* : Acide désoxyribonucléique / *Deoxyribonucleic acid*

ADNc/*cDNA* : ADN complémentaire / *Complementary DNA*

ADNp/*pDNA* : ADN plasmidique / *Plasmid DNA*

AEM : Agence européenne des médicaments

ARN/*RNA* : Acide ribonucléique / *Ribonucleic acid*

ARNm/*mRNA* : ARN messenger / *Messenger RNA*

ARNt/*tRNA* : ARN de transfert / *Transfer RNA*

ATF : *Activating transcription factor*, facteur de transcription activateur

BHK : *Baby Hamster Kidney*, fibroblaste de rein de bébé hamster

BiP : *Binding immunoglobulin protein*

C_H : *Heavy constant domain*, domaine constant de la chaîne lourde

CHO : *Chinese hamster ovary*, cellules d'ovaire d'hamster chinois

CHOP : *transcription factor C/EBP homologous protein*, protéine homologue au facteur de transcription C/EBP

C_L : *Light constant domain*, domaine constant de la chaîne légère

CMV5 : *Cytomegalovirus 5*, promoteur constitutif

CNRC/*NRC* : Conseil national de recherches Canada / *National research council*

CpG : Une cytosine et une guanine séparées par un groupement phosphate

CR5 : *Cumate regulated promoter*, promoteur inductible au cumate

CuO : Opérateur cumate

CymR : *Cymene repressor*, répresseur Cymène

Da : Dalton, unité de masse molaire utilisée pour les polymères égale au g/mol

DH5 α : Souche d'*E. coli* compétente

DHFR : Dihydrofolate réductase

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dpt : *Days post-transfection*, jours post-transfection

DTT : Dithiothréitol

EBNA1 : *Epstein-Barr nuclear antigen 1*, antigène nucléaire 1 du virus Epstein Barr

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EF1 α -HTLV : *Elongation Factor-1 alpha-Human T-Cell Leukemia Virus*, promoteur constitutif

EiF2 : *Eukaryotic initiation factor 2*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*, dosage immuno-enzymatique

ERAD : *ER-associated protein degradation*, dégradation des protéines associée au RE

ERSE : *ER stress response elements*, éléments de réponse au stress du RE

Etc. : Et cætera

Fab : *Antigen-binding fragment*, fragment de liaison à l'antigène

FACS : *Fluorescent-activated cell sorting*, tri de cellules activées par fluorescence

Fc : Fragment cristallisable

FcRn : Récepteur Fc néonatal

FDA : *Food and drug administration*, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

Fig. : Figure

FRET : *Fluorescence resonance energy transfer*, transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

GADD34 : *Growth arrest and DNA damage-inducible 34*

GFP : *Green fluorescent protein*, protéine fluorescence verte

GMP : *Good manufacturing practices*, bonnes pratiques de fabrication

GS : Glutamine synthétase

GOI : *Gene of interest*, gène d'intérêt

hCD200Fc : Protéine de fusion Fc, hCD200 couplé au fragment Fc

HEK293 : *Human embryonic kidney*, lignées cellulaires humaines utilisées en biotechnologie pour la production de protéines recombinantes

HeLa : Lignée cellulaire cancéreuse

HMW : *High molecular weight*, haut poids moléculaire

HPLC : *High performance liquid chromatography*, chromatographie liquide à haute performance

hpt : *Hours post-transfection*, heures post-transfection

HT-1080 : *Human Fibrosarcoma-Derived*, lignée cellulaire dérivée de fibrosarcome humain

HTRF : *Homogenous time-resolved FRET*, FRET résolu en temps homogène

IFN : Interférons

IgG : Immunoglobuline G

IRB/BRI : Institut de recherche en biotechnologie/*Biotechnology research institute*

IRE1 : *Inositol-requiring enzyme 1*, enzyme 1 requérant l'inositol

IVCD : *Integral of viable cell density*, intégrale de la densité de cellules viables

LpDNA : *Linear plasmid DNA*, ADN plasmidique linéaire

M : Molaire, unité égale au mol/L

MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, solution tampon (pKa = 7.2)

MPT : Modification post-traductionnelle

MSX : L-méthionine sulfoximine

MTX : Méthotrexate

NR : Non réduit

NSERC : *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*

NS0 : *Mouse myeloma-derived cell line*, lignée cellulaire dérivée d'un myélome de souris

OKT3 : Orthoclone OKT3 (nom commercial), Muromonab-CD3

pA : Protéine A

pb : paire de bases

pcj : picogramme par cellule par jour

PCR : *Polymerase chain reaction*, réaction en chaîne par polymérase

PEI : polyéthylènimine

PERK : *double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*

pH : potentiel hydrogène, unité de mesure

PI : *Propidium iodide*, iodure de propidium

POI : *Protein of interest*, protéine d'intérêt

PR : Polyarthrite rhumatoïde

pTT : vecteur d'expression

R : Réduit

rcTA : *Reverse cumate transactivator*

R&D : Recherche et développement

RE : Réticulum endoplasmique

rpm : *Revolutions per minute*, le tour par minute est une unité mesurant la vitesse de rotation

RTXM : Rituximab (nom commercial : Rituxan)

SCpDNA : *Supercoiled plasmid DNA*, ADN plasmidique super-enroulé

SEC : *Size exclusion chromatography*, chromatographie d'exclusion stérique

Sf9 : *Spodoptera frugiperda* 9, lignée cellulaire d'insecte

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du SDS

S/MARs : *Scaffold/matrix attachment regions*, régions d'attachement à la matrice

SV40 : *Simian virus 40*, promoteur constitutif

TGE : Expression génique transitoire

Tn : *Trichoplusia ni*, lignée cellulaire d'insecte

TSH/HHT : Thérapeutiques en santé humaine / *Human health therapeutics*

UCOE : Éléments ubiquitaires d'ouverture de la chromatine

UPR : *Unfolded protein response*, voie de réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées

UPRE : Éléments de la voie UPR

UTR : *Untranslated Transcribed Region*, région transcrite non traduite

UV : Ultraviolet

V_H : *Heavy variable domain*, domaine variable de la chaîne lourde

V_L : *Light variable domain*, domaine variable de la chaîne légère

VP16 : *Herpes simplex virus protein vmw65*, transactivateur viral

v/v : *volume-to-volume ratio*, rapport volumique

w/w : *weight-to-weight ratio*, rapport massique

w/v : *weight-to-volume ratio*, rapport masse sur volume

XBP1 : X-box binding protein, Protéine de liaison à la X-box 1

À Florian, mes parents, ma sœur et mes frères

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche M. Bernard Massie ainsi que mon co-directeur M. Yves Durocher pour m'avoir permis d'effectuer mon doctorat au sein du CNRC. Merci pour votre encadrement, vos conseils et surtout pour votre temps malgré des emplois du temps très chargés. Je souhaite également remercier Mme. Alaka Mullick pour son suivi et ses conseils.

Je remercie les membres du jury, M. Bruno Gaillet, M. Alain Moreau et M. Rémy Sauvé pour avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que M. Guy Lemay pour avoir accepté de présider mon jury et pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté tout au long de mon doctorat.

Je voudrais chaleureusement remercier chacun des membres de l'équipe HHT pour m'avoir permis de travailler dans un lieu convivial. Je voudrais tout particulièrement remercier certains d'entre eux pour leur soutien et leur gentillesse, ainsi que pour l'aide dans les manips : Sylvie, Roseanne, pour moi vous avez toujours été l'âme du labo. Merci pour votre gentillesse et votre générosité à toutes les deux. Flô, merci d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais jours, merci pour ta gentillesse et ton écoute. Christian, merci d'avoir partagé ton bureau pendant ces cinq dernières années, merci pour tes précieux conseils et ton soutien. Gilles, merci d'avoir partagé tes midis avec nous, et de m'avoir écouté « chialer » les jours où ça n'allait pas. Felix, Julien, François, merci à tous les trois pour votre aide.

Merci aux étudiants et jeunes chercheurs que j'ai pu croiser au cours de mon doctorat et avec qui j'ai partagé mes joies, mes peines, mes ras-le bol, ma vie de thésarde : Elodie, Céline, Laurence, Aziza, Alina, July, Marc-André, Kajan, Jean-Sébastien, Marie-Eve.

Merci à l'équipe de poly pour tous les bons moments partagés avec vous, les barbeucs, les bières, les raclettes etc... vous avez illuminé ce doctorat : Eric, Fred, Ben, Edy, Kahina, Cécile, René, Cyril, Yuan.

Je voudrais remercier Sylvanie, Guillaume, leur petite Pauline et le bébé en construction pour tous les bons moments passés ensemble. Sylvanie, merci de ton soutien dans les derniers moments de la thèse. Nos cafés-boulots m'ont grandement aidé à me motiver.

Caroline, Charles, Christophe, Delphine, Géraldine, Lucie, Mathilde, Michel, Jérôme, Samantha merci les amis d'être toujours là et si bienveillant malgré les années et les kilomètres. Je suis tellement chanceuse de vous avoir dans ma vie.

Je voudrais remercier mes parents, ma sœur, mes frères, mon « bof chéri », et mes deux belles-sœurs, ainsi que mes 4,5 neveux et ma nièce pour leur amour et leur soutien. Merci de me donner la chance d'avoir une famille aussi unie et aimante. Être loin de vous aura été l'une des choses les plus difficiles à vivre durant ce doctorat. Peut-être serait-il temps de retraverser l'Atlantique...

J'ai une tendre pensée pour ma grand-mère et mon grand-père, qui par leur exemple, nous ont appris la générosité et l'ouverture aux autres.

Flo, merci d'avoir déboulé dans ma vie sans crier gare, car depuis elle est incroyablement plus belle et plus drôle.

Parce qu'avec toi les choses sont simples, évidentes...

Je t'aime

Chapitre 1 Introduction

1.1 Contexte

À l'origine, les protéines d'intérêt thérapeutique étaient extraites de sources naturelles telles que le sang, le placenta ou des extraits de tissus humains ou animaux. Les quantités étaient toutefois limitées et les produits potentiellement dangereux pour les patients, en raison des risques de contamination par des virus [1]. À partir du début des années 70, de nombreux progrès dans le domaine du génie génétique ouvrent la voie à la technologie de l'ADN recombinant. C'est ainsi qu'en 1976, le co-fondateur de la compagnie Genentech Herbert Boyer produit avec son équipe de l'insuline recombinante à partir d'une souche atténuée de la bactérie *Escherichia coli* [2]. Cette dernière deviendra en 1982 la première protéine thérapeutique issue de l'ADN recombinant approuvée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*, FDA). Au cours des décennies suivantes, d'autres progrès scientifiques, dont le séquençage à haut débit, ont permis une meilleure compréhension des maladies au niveau moléculaire, menant à l'identification de nombreuses cibles thérapeutiques et au développement de nouveaux médicaments et en particulier des protéines thérapeutiques, pour des maladies qui jusque-là étaient incurables. Aujourd'hui, pas moins de 120 protéines thérapeutiques, dont la quasi-totalité sont des protéines recombinantes, ont été approuvées par la FDA et plus d'une centaine sont en phase préclinique [3, 4].

La recherche et le développement de nouveaux médicaments est un processus long et fastidieux. En effet, le temps moyen écoulé entre l'identification d'une cible et l'approbation du médicament par les organismes de réglementation est généralement de 10 ans (Figure 1) [3]. Afin d'accélérer le processus de développement de nouveaux médicaments, des efforts considérables ont été déployés par l'industrie biopharmaceutique. D'importants investissements ont ainsi été réalisés dans l'optimisation du développement de lignées cellulaires, la mise au point de milieux de culture ou encore dans la mise au point de techniques permettant de contrôler la qualité des produits tout au long du processus de culture cellulaire [3].

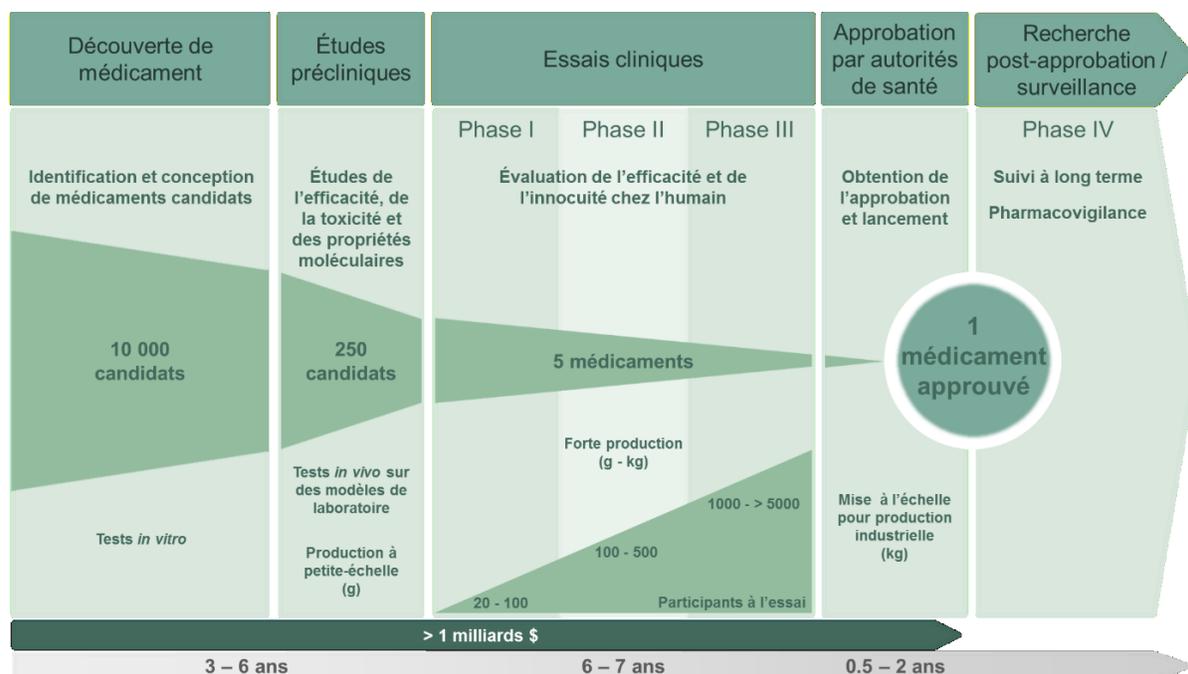


Figure 1 : Processus de recherche et développement (R&D) dans l'industrie biopharmaceutique. (Adaptée de [5])

Le développement des protéines thérapeutiques à un stade précoce débute généralement par la transfection de l'ADN dans des lignées cellulaires de mammifères et notamment des cellules d'ovaire de hamster chinois (*Chinese hamster ovary*, CHO). En effet, ce système d'expression approuvé par la FDA est le plus largement utilisé pour la production commerciale de protéines thérapeutiques [6]. Une fois transfectées, les cellules ayant intégré le transgène dans leur génome sont sélectionnées donnant lieu à une population hétérogène en termes de productivité et de croissance. Une étape de criblage permet ensuite d'isoler les cellules ayant une forte productivité. Puis, après diverses évaluations, les clones présentant d'excellentes performances en termes de productivité, de croissance et de qualité du produit dans le mode de culture souhaité sont sélectionnés. Finalement, une banque cellulaire est constituée afin de soutenir la fabrication selon les critères de bonnes pratiques de fabrication (*good manufacturing practices*, GMP).

Le criblage de clones forts producteurs est un processus laborieux pouvant prendre plusieurs mois. En effet, les clones présentant à la fois un avantage de productivité et de

croissance sont des événements extrêmement rares de l'ordre de 0.003 % [7]. Ainsi, la diminution drastique du temps de développement des populations hétérogènes stables par rapport aux lignées cellulaires productrices suscite, depuis quelques années, l'intérêt des industriels pour l'expression de protéines recombinantes nécessaires aux essais précliniques. Toutefois, ces plateformes de production nécessitent encore des efforts d'optimisation afin de réduire le temps de développement et d'augmenter les titres en protéines recombinantes tout en s'assurant du maintien de la qualité du produit fini.

1.2 Hypothèses et objectifs

Contrairement aux promoteurs constitutifs largement utilisés dans l'industrie, l'utilisation d'un système d'expression inductible permettrait de limiter le stress potentiel induit par la surexpression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection de la population hétérogène. Ceci conduirait à l'augmentation de la fréquence des clones capables d'exprimer une forte concentration de protéines recombinantes. Ainsi, l'augmentation de la productivité des populations hétérogènes via l'enrichissement en clones forts producteurs permettrait de générer rapidement de fortes quantités de protéines recombinantes pour les études précliniques et faciliterait l'étape de criblage, réduisant le temps de développement des lignées cellulaires productrices.

Le premier objectif de cette thèse est de développer une plateforme performante pour la production rapide de protéines recombinantes en populations hétérogènes stables. Pour cela, nous avons combiné la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA} aux vecteurs plasmidiques pTT, contenant le promoteur CR5 inductible au cumate.

Le deuxième objectif est d'étudier l'impact de l'expression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection sur la productivité et la répartition clonale de la population hétérogène sélectionnée.

1.3 Contributions de chacun des auteurs aux articles

Article 1: Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch

Auteurs : Adeline Poulain, Sylvie Perret, Félix Malenfant, Alaka Mullick, Bernard Massie et Yves Durocher

État actuel de l'article : Publié dans *Journal of Biotechnology*

DOI 10.1016/j.jbiotec.2017.06.009

Ma contribution concerne la définition du sujet et ses limites, la conceptualisation et l'exécution des expériences, l'analyse des résultats et leur présentation. J'ai également réalisé la bibliographie sur le sujet, écrit le manuscrit et effectué les corrections demandées par les examinateurs.

Sylvie Perret et Félix Malenfant ont participé au développement de la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA}.

Alaka Mullick a supervisé l'ensemble de l'étude puis relu et corrigé le manuscrit.

Bernard Massie a supervisé l'ensemble de l'étude puis relu et corrigé le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude et également, relu et corrigé le manuscrit avant de procéder à sa soumission.

Article 2: Regulation of recombinant protein expression during CHO pool selection enhances high-producing cell frequency

Auteurs : Adeline Poulain, Alaka Mullick, Bernard Massie et Yves Durocher

État actuel de l'article : Soumis dans *Biotechnology and Bioengineering*

Ma contribution concerne la définition du sujet et ses limites, la conceptualisation et l'exécution des expériences, l'analyse des résultats et leur présentation. J'ai également réalisé la bibliographie sur le sujet, écrit le manuscrit et effectué les corrections demandées par les examinateurs.

Alaka Mullick a supervisé l'ensemble de l'étude puis relu et corrigé le manuscrit.

Bernard Massie a supervisé l'ensemble de l'étude puis relu et corrigé le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude et également, relu et corrigé le manuscrit avant de procéder à sa soumission.

Chapitre 2 Revue de littérature

2.1 Les protéines recombinantes dans le marché pharmaceutique

2.1.1 Biomédicaments et petites molécules

Les médicaments peuvent être divisés en deux classes principales : les petites molécules, générées par synthèse chimique, et les produits biologiques ou biomédicaments dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite. Ces derniers sont pour la plupart des protéines recombinantes et parmi les plus notables, on peut citer les anticorps monoclonaux, les hormones, les facteurs de croissance ou encore certains types de cytokines.

Contrairement aux médicaments chimiques traditionnels qui sont des composés organiques synthétiques de faible poids moléculaire, les biomédicaments sont formés de (glyco) protéines et/ou d'acides nucléiques, formant des complexes pouvant atteindre des poids moléculaires élevés [8]. Ils possèdent également des caractéristiques moléculaires variées avec des structures complexes, nécessitant d'être produits dans des cellules vivantes ou des organismes afin que soient réalisées les nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) souvent indispensables à l'activité de la molécule. La complexité des biomolécules implique certaines difficultés pour leur production. D'une part, le moindre changement dans le processus de fabrication ayant un impact sur la cellule hôte est susceptible de modifier considérablement la nature du produit fini et d'affecter son efficacité thérapeutique et son immunogénicité. D'autre part, les exigences des agences de régulation des médicaments sont plus contraignantes que pour les petites molécules dont la composition chimique et la pureté peuvent être définies avec une plus grande précision par comparaison aux produits biologiques.

Malgré tout, les produits biologiques offrent des perspectives thérapeutiques à fort potentiel pour des besoins médicaux non satisfaits. D'ailleurs, en 2016, sur 22 médicaments approuvés par la FDA, 7 sont des produits biologiques [9]. Cette même année, huit des dix médicaments dont les ventes ont le plus rapporté sont des produits biologiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Classement par revenu des dix meilleurs médicaments en 2016. (Adapté de Morrison and Lähteenmäki, 2017 [10])

Nom	Compagnie	Type	Indications	Ventes mondiales 2016 (Millions \$US)
Humira	AbbVie	AcM	PR, PR juvénile, maladie de Crohn, Psoriasis, colite ulcéreuse, arthrite psoriasique, syndrome de Behçet, spondylarthrite ankylosante	16,078
Harvoni	Gilead Sciences	Petite molécule	Hépatite C	9,081
Rituxan	Roche	AcM	PR, leucémie lymphoïde chronique, lymphome non hodgkinien, vascularite associée aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles, lymphome diffus à grandes cellules B	7,454
Revlimid	Celgene	Petite molécule	Myélome multiple, syndrome myélodysplasique, lymphome du manteau	6,974
Avastin	Roche	AcM	Cancer colorectal, cancer du sein, cancers bronchiques non à petites cellules, Cancer à cellules rénales, cancer de l'ovaire, gliome, cancer du col utérin	6,901
Herceptin	Roche	AcM	Cancer du sein, cancer de l'estomac	6,900
Enbrel	Amgen	Protéine	PR, PR juvénile, psoriasis, spondylarthrite ankylosante, arthrite psoriasique	6,817
Prevnar 13	Pfizer	Vaccin	Vaccin contre les infections invasives à pneumocoque	5,718
Lantus	Sanofi	Peptide	Diabète de type I et type II	5,287
Neulasta	Amgen	Protéine	Neutropénie/leucopénie	4,658

L'expansion considérable du portefeuille de produits biologiques est notamment liée aux progrès de la biotechnologie, à d'importants investissements et à des taux de réussite plus élevés par rapport aux petites molécules [11].

2.1.2 Les anticorps monoclonaux et les protéines de fusion Fc

Les anticorps monoclonaux (AcM) et les protéines de fusion Fc ont été majoritairement développés pour des applications oncologiques et immunologiques (Figure 2). Parmi les plus gros succès de ces dernières années, on peut notamment citer le Rituxan®, principalement utilisé pour le traitement du lymphome non hodgkinien et de la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'Herceptin®, utilisé pour le traitement des cancers du sein et de l'estomac et l'Humira®, également utilisé pour le traitement de la PR, mais aussi de la maladie de Crohn, et du psoriasis (Tableau 1) [12].

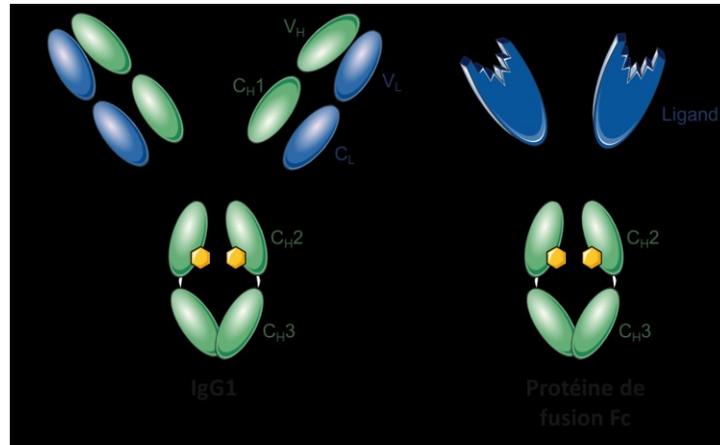


Figure 2 : Représentation d'une immunoglobuline G1 et d'une protéine de fusion Fc.

Le succès des AcM est principalement lié à sa capacité de reconnaître de façon spécifique un antigène puis d'activer les fonctions effectrices du système immunitaire via l'interaction entre le fragment Fc et les récepteurs présents à la surface des cellules immunitaires. De plus, en raison de la flexibilité et de la robustesse de la molécule d'immunoglobuline ainsi que des progrès dans des domaines tels que la biologie moléculaire et l'ingénierie des protéines, la production de nouveaux anticorps contre un nombre quasi illimité d'antigènes cibles est aujourd'hui possible, permettant de maintenir la valeur des anticorps thérapeutiques sur le marché [13-15].

Depuis l'approbation du premier anticorps dérivé d'un hybridome de souris en 1986, un IgG2a murin (Orthoclone OKT3®), les formats des AcM sont passés d'une structure entièrement murine (suffixe -omab) à une forme chimérique (suffixe -ximab) puis, à des anticorps humanisés (suffixe -zumab) contenant des séquences humaines (Figure 3). Cependant, même si l'humanisation a permis de diminuer l'immunogénicité et d'augmenter la demi-vie par rapport aux anticorps murins et chimériques, ce type d'anticorps présente toujours des limitations et le procédé d'humanisation reste laborieux [16]. Ainsi, le développement d'anticorps entièrement humains (suffixe -umab) a permis de diminuer l'immunogénicité des AcM, d'obtenir une demi-vie similaire aux immunoglobulines G (IgG) humaines endogènes et d'augmenter l'efficacité de l'induction des fonctions effectrices. Ces avantages ont permis entre autres une administration du traitement plus pratique pour le patient et une présence plus longue des anticorps dans la circulation [17].

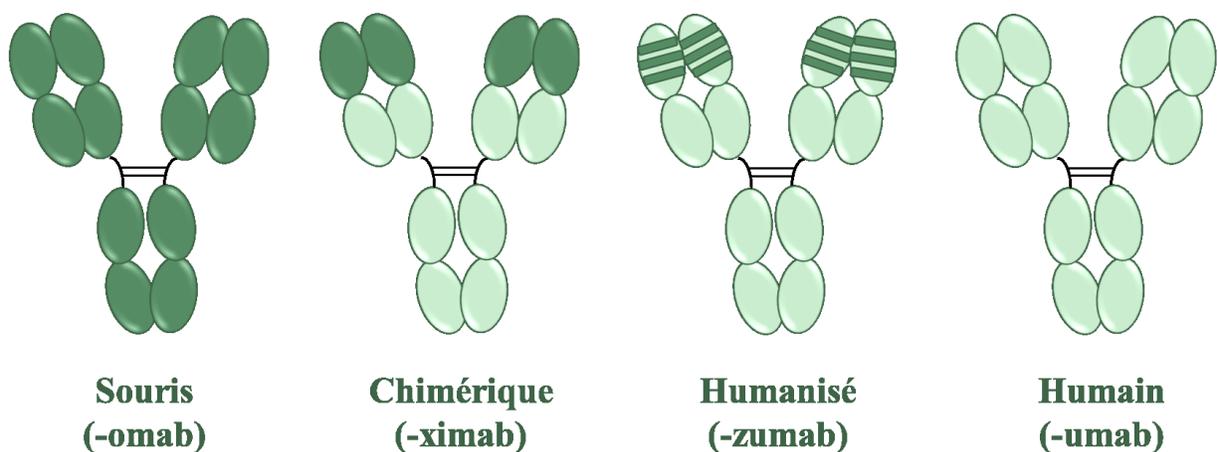


Figure 3 : Types d'anticorps monoclonaux et nomenclature. (Adaptée de Buss et al., 2012 [16])

De nombreux médicaments protéiques et peptidiques biologiquement actifs ont une demi-vie sérique très courte en raison d'une clairance rénale rapide qui limite l'efficacité thérapeutique. Des efforts considérables ont donc été entrepris pour développer des techniques permettant de prolonger la demi-vie de ces protéines thérapeutiques [18]. La technologie de fusion Fc, consistant à lier le domaine Fc des IgG à une protéine thérapeutique, est sans doute l'une des solutions les plus efficaces (Figure 2). En effet, le fragment Fc permet de prolonger la demi-vie *in vivo* de la protéine thérapeutique via le mécanisme de recyclage du récepteur Fc néonatal (FcRn). De plus, outre l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la protéine thérapeutique, cette technologie facilite également le processus de purification par chromatographie d'affinité grâce à la liaison du fragment Fc à la protéine A. Ces divers avantages expliquent ainsi la présence de la technologie de fusion Fc dans sept médicaments approuvés par la FDA, utilisés notamment pour le traitement de maladies chroniques, y compris la polyarthrite rhumatoïde, les troubles plaquettaires et le psoriasis [19].

Actuellement, les AcM et les protéines de fusion Fc dominent le marché des produits biologiques et leur importance dans l'activité des industries pharmaceutiques ne cesse de croître. En mai 2016, on dénombrait 62 AcM approuvés par la FDA (États-Unis) et l'agence européenne des médicaments (AEM) dont 14 rien qu'entre 2015 et 2016 [20]. Avec ce taux d'approbation, le plus élevé parmi l'ensemble des produits biologiques, les ventes globales de produits basés

sur les AcM ont eu une croissance de 90 % entre 2008 et 2013 contre seulement 26 % pour les autres produits biologiques [12]. En termes de valeur marchande, les AcM et les protéines de fusion Fc représentaient à elles seules 54 % des 140 milliards de dollars US de ventes mondiales de produits biologiques en 2013 [6]. Enfin, d'ici 2020, il est prévu que les ventes globales atteignent 125 milliards de dollars US uniquement pour les AcM, avec un total de 70 produits disponibles sur le marché [12].

2.1.3 Biosimilaires

De nos jours, les médicaments biologiques sont indispensables et incontournables au sein de l'arsenal thérapeutique pour traiter de nombreuses maladies graves et invalidantes. Pour autant, du fait de leur processus de production plus fastidieux et plus coûteux, ils sont généralement plus chers que les médicaments chimiques, et la gestion de leur utilisation représente un vrai défi pour les systèmes de santé. À titre d'exemple, le coût annuel moyen d'un traitement d'une maladie inflammatoire de l'intestin avec un produit biologique aux États-Unis en 2015 a été estimé à environ 36 000 \$US [21]. De surcroît, l'utilisation de l'anticorps recombinant commercial Humira® pour traiter l'arthrite rhumatoïde peut coûter jusqu'à 1800 \$US par mois, soit 30 fois plus que le traitement chimico-pharmaceutique homologue, Rheumatex® [22].

Ces dernières années, les entreprises biopharmaceutiques se sont lancées dans le développement de biosimilaires en raison de l'expiration actuelle ou à venir des brevets de plusieurs médicaments biologiques majeurs, notamment en oncologie et dans le traitement des pathologies auto-immunes [23]. Les biosimilaires correspondent à des versions génériques de molécules déjà approuvées et possèdent une séquence d'acide aminé identique. L'utilisation de clones et de procédés de production et de purification différents peuvent néanmoins mener à des microvariations pouvant impacter la qualité du produit. C'est notamment le cas des AcM, pour lesquels des variations apparaissent au niveau des N-glycosylations de la région Fc [24]. Afin d'assurer un haut degré de similarité, les agences de régulation exigent donc que les différences avec le produit de référence au niveau de la qualité, de la sûreté, de la pureté et de l'efficacité ne soient pas significatives [25]. Cette complexité des procédés de fabrication due à une telle

régulation n'a cependant pas empêché l'approbation de deux anticorps biosimilaires en 2013 en Europe et en 2016 aux États-Unis [12, 26]. D'ailleurs, le développement actuel de nombreux autres biosimilaires ainsi que les nombreux investissements assurent une place importante des biosimilaires sur le futur marché des biopharmaceutiques (Tableau 2). L'introduction de ces biosimilaires, offrant un prix inférieur aux médicaments de référence (de 30 à 50%) et stimulant la concurrence, permettra alors un accès moins onéreux aux traitements dans le futur.

Tableau 2 : Anticorps monoclonaux ayant des biosimilaires en cours de développement.
(Adapté de Udpa and Million, 2016 [23])

Produit	Molécule	En développement	Fabricants	Ventes 2014 (Milliards \$US)	Initiateur	Expiration brevet ÉU	Expiration brevet UE
Immunologie							
Enbrel	Etanercept	27	Merck/Samsung Bioepis, Coherus, Sandoz	8.5	Amgen/Pfizer	2028	2015
Humira	Adalimumab	24	Amgen, Sandoz	12.5	AbbVie	2016	2018
Remicade	Infliximab	13	Celltrion, Hospira	9.2	Johnson & Johnson/Merck	2018	2015
Oncologie							
Avastin	Bevacizumab	22	Amgen, Oncobiologics	7.0	Genentech/Roche	2019	2022
Herceptin	Trastuzumab	37	Actavis/Amgen/Synthon, Biocad, Biocon/Mylan	6.8	Genentech/Roche	2019	2014
Rituxan	Rituximab	44	Sandoz, Boehringer Ingelheim	8.7	Biogen/Genentech/Roche	2018	2013

2.2 Exemples de systèmes d'expression pour la production de protéines recombinantes

Il existe une grande variété d'hôtes pour la production de protéines recombinantes. Des systèmes microbiens en passant par les animaux et les plantes transgéniques, le choix d'un système par rapport à un autre dépendra principalement de l'application du produit fini et des moyens disponibles. Ci-dessous quelques exemples non exhaustifs des systèmes d'expression les plus couramment utilisés. La comparaison de divers paramètres entre les différents systèmes d'expression a également été synthétisée dans le Tableau 3.

2.2.1 Les systèmes procaryotes

La bactérie *Escherichia coli* est l'un des systèmes bactériens les plus couramment utilisés pour la production de protéines recombinantes [27]. Dans l'histoire de la biotechnologie, cette bactérie tient une place importante puisqu'au début des années 1980, la première protéine recombinante approuvée et mise sur le marché par la compagnie Eli Lilly (l'insuline sous le nom d'*Humuline*) a été produite à partir d'une souche atténuée d'*E. coli* [28]. Ce système d'expression très bien documenté présente de nombreux avantages pour le processus de production tels qu'une croissance rapide dans des milieux simples et peu coûteux (temps de doublement de l'ordre de 20 minutes), des rendements de production élevés pouvant atteindre plusieurs g/L et une facilité de mise à l'échelle en bioréacteur. De plus, le génome de la bactérie étant relativement simple et ayant été entièrement séquencé depuis 1997, il est facile de le modifier afin d'améliorer les caractéristiques de la bactérie et d'augmenter ses performances [29]. Cependant, dans un contexte où la demande en protéines recombinantes complexes n'a fait qu'augmenter, la production de protéines recombinantes dans *E. coli* a montré certaines limites. Tout d'abord, les protéines recombinantes produites dans *E. coli* sont rarement sécrétées. En effet, une fois exprimées, celles-ci résident plus couramment dans le périplasme ou peuvent être dirigées vers des compartiments cellulaires [30]. La surexpression de protéines dans le cytoplasme amène alors à la formation de protéines mal repliées qui s'agrègent entre elles pour former des corps d'inclusion. Les étapes de purification et d'extraction se voient donc complexifier, pouvant ainsi mener à une diminution des rendements et à une augmentation du risque de contamination du produit. Une autre des principales limitations de l'utilisation de ce système est liée à son incapacité à réaliser l'ensemble des MPT présentes chez l'humain et nécessaires à l'activité et à la stabilité de nombreuses protéines.

La bactérie *E. coli* peut néanmoins être utilisée pour la production de protéines recombinantes ne nécessitant pas de modifications post-traductionnelles pour leur bioactivité. Ainsi, certaines enzymes non glycosylées, disponibles dans le commerce, ont été produites dans des bactéries [31, 32]. D'autres biologiques tels que l'IFN- α et l'IFN- β [30] mais aussi des fragments d'anticorps (2 Fab et 1 peptide fusionné à un Fc non glycosylé) ont également pu être produits dans *E. coli*. Dans le cas des Fab, étant naturellement non glycosylés, il est avantageux de les produire dans *E. coli* [15].

2.2.2 Les systèmes eucaryotes

2.2.2.1 Les levures

Les levures offrent les mêmes facilités expérimentales et industrielles que la bactérie, avec notamment une très bonne connaissance de sa génétique, facilitant ainsi le développement de nouvelles souches, une mise à l'échelle aisée et à coûts restreints ainsi que de hauts niveaux de production. À titre d'exemple, des niveaux de gélatine sécrétée de l'ordre de 15 g/L ont été obtenus à partir de la souche *Pichia pastoris* [33]. De plus, étant un eucaryote inférieur, la levure est un système d'expression pouvant réaliser quelques MPT élémentaires requises pour le repliement des protéines telles que la formation de pont disulfures, la carboxylation ou l'acylation. Le plus souvent, selon la souche utilisée, des hyperglycosylations sont observées avec uniquement des structures riches en mannose [34]. D'ailleurs, chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette hypermannosylation des protéines, néfaste chez l'humain car pouvant déclencher une réaction immunitaire, limite son utilisation pour la production de protéines thérapeutiques [35]. Ainsi, de nouvelles souches de *P. pastoris* ont été développées et améliorées afin d'obtenir des N-glycosylations humanisées [32, 36]. Dans ce contexte, Hamilton et son équipe ont démontré que l'érythropoïétine recombinante sialylée produite dans une souche de levure entièrement humanisée induit une réponse érythropoïétique dose-dépendante, compatible avec une forme biologiquement active de la protéine recombinante produite dans les cellules CHO [37]. Enfin, dans une autre étude, Li *et al.* ont montré la faisabilité de produire des AcM humains avec des profils de glycosylation humanisés spécifiques [38].

2.2.2.2 Les cellules isolées d'insectes

Spodoptera frugiperda (sf9) et *Trichoplusia ni* (Tn) sont les lignées de cellules d'insectes les plus utilisées pour la fabrication de protéines recombinantes. La plupart du temps, la production s'effectue en infectant les cellules avec un baculovirus, ayant un tropisme spécifique aux cellules d'insectes et contenant la séquence du transgène à exprimer sous le contrôle d'un promoteur fort [39]. Les cellules d'insectes constituent une alternative intéressante pour la production de protéines recombinantes. Tout d'abord, l'utilisation du baculovirus permet

l'expression de transgène de grande taille. De plus, elles sont cultivables en suspension et permettent des rendements plutôt élevés. Par exemple, des rendements d'environ 500 mg/L de β -galactosidase et de 350 mg/L d'une nucléocapside protéique ont été obtenus dans des cellules Sf9 [40, 41]. La plupart des MPT, incluant les O- et N-glycosylations, sont effectuées par les cellules d'insectes. Cependant, la présence de certaines glycosylations peut potentiellement induire des réactions allergiques (fucose α 1-3, structure riche en mannose) et limite l'utilisation des cellules d'insectes pour la production de protéines thérapeutiques. De plus, étant donné que les structures complexes, nécessitant l'ajout de résidus terminaux d'acide sialique, ne sont pas synthétisés, la pharmacocinétique et l'efficacité clinique de la protéine synthétisée peuvent être affectées [42]. Afin de palier à ce problème, l'une des solutions a été d'insérer les gènes codant pour les glycosyltransférases manquantes dans le baculovirus afin que celles-ci puissent être exprimées durant l'infection [43]. Plusieurs études ont démontré le succès de cette approche pour la production, dans les cellules d'insectes, de glycoprotéines avec des N-glycosylations similaires à celles obtenues en cellules de mammifères [44, 45].

2.2.2.3 Les cellules isolées de mammifères

Les cellules isolées de mammifères sont les plus utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines recombinantes. Entre 2010 et 2014, environ 60 % des produits biologiques approuvés ont été produits dans ces cellules de mammifères [6, 42]. Pourtant, les cellules de mammifères sont caractérisées par une croissance relativement lente avec un temps de doublement d'environ 20 h contre 20 min chez les bactéries, une consommation rapide des nutriments du milieu et une production plus ou moins élevée en métabolites toxiques (lactate, ammonium, etc.) contribuant à altérer la culture et la qualité du produit. De plus, ce sont des systèmes fragiles qui nécessitent des milieux coûteux. Cependant, malgré les difficultés inhérentes à leur culture, les cellules de mammifères sont largement utilisées en raison de leur capacité déterminante à réaliser les MPT de type humain (N- et O-glycosylations, formation de ponts disulfures, etc...), essentielles pour la stabilité et la fonction biologique des protéines thérapeutiques complexes [42, 46]. Des MPT telles que la N-glycosylation peuvent également influencer les propriétés pharmacocinétiques et l'immunogénicité de la protéine. Cet avantage combiné à une culture dans des milieux sans

sérum, pratique pour la mise à l'échelle et facilitant la purification, ainsi qu'à une forte capacité de sécrétion des protéines d'intérêt, en font des outils efficaces pour la production industrielle [42, 46]. De plus, les recherches actuelles dans la culture et la mise à l'échelle de procédés de production de protéines recombinantes chez les cellules animales tendent à améliorer les rendements de production tout en limitant leurs coûts [47]. Parmi les cellules de mammifères les plus utilisées pour la production de protéines recombinantes, on retrouve notamment les CHO (*Chinese Hamster Ovary*), les HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), les HT-1080 (*Human Fibrosarcoma-Derived*), les BHK (*Baby Hamster Kidney*) et les NS0 (*Mouse Myeloma-Derived*). Toutefois, depuis l'utilisation des cellules CHO pour la production de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) en 1986, celles-ci restent le système d'expression prédominant pour la production à grande échelle de protéines thérapeutiques [6].

Plusieurs facteurs permettent d'expliquer le succès de ces cellules isolées en 1957 par Theodore Puck [48]. En effet, mis à part la capacité à réaliser des MPT efficaces et à produire des protéines recombinantes avec des glycoformes à la fois compatibles et bioactifs chez l'homme, les cellules CHO sont bien caractérisées et le génome de plusieurs lignées cellulaires CHO a déjà été entièrement séquencé [49-51]. Ainsi, d'un point de vue réglementaire, l'approbation pour la mise sur le marché par la FDA et l'AEM est facilitée pour les protéines thérapeutiques dérivées de ce système d'expression. Par ailleurs, le rendement des cellules CHO a été multiplié par plus de 20 au cours des deux dernières décennies, augmentation largement attribuable au développement des milieux de culture et des bioprocédés [52]. De plus, la mise en place de système d'amplification génique (CHODG44 avec le système dihydrofolate réductase (DHFR) et CHOK1 avec le système glutamine synthétase (GS)) a permis de surmonter la faible productivité spécifique des cellules CHO [51]. Elles ont également la capacité de croître à des densités élevées en suspension permettant une production à grande échelle en bioréacteur [49]. Finalement, elles représentent un hôte sûr car elles sont peu susceptibles à une infection par un virus humain et elles sont facilement adaptables à des milieux chimiquement définis [50, 53].

Tableau 3 : Comparaison entre les différents systèmes d'expression de protéines pharmaceutiques recombinantes. (Adapté de Dumas and Robert, 2009 [54])

Points de comparaison	Bactéries	Levures	Cellules d'insectes + baculovirus	Cellules animales (CHO)
Niveau de production théorique	+++++	+++++	+++	+
Niveau de production pratique	++(+)	++(+)	+	+
Coût de production	+++++	+++++	++	++
Flexibilité	+++++	+++++	++	+
Conservation	+++++	+++++	+++	+++
Stabilité	+++++	+++++	++++	+++
Modifications post-traductionnelles	+	++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++
Stabilité du produit	+++++	+++++	+++	+++
Purification	+++	+++	+++	++++
Produits sur le marché	++++	+++	+++	+++++

2.3 Production de protéines recombinantes en cellules CHO

2.3.1 Vecteurs d'expression

La majorité des vecteurs utilisés pour l'expression génique dans les cellules de mammifères sont des vecteurs plasmidiques de quelques kilobases, dans lesquels sont insérés l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt et divers éléments qui améliorent la transcription et la traduction (Figure 4) [55]. De façon générale, le plasmide contient une origine de réplication procaryote [56], un promoteur fort situé en amont du gène d'intérêt à transcrire et des séquences *enhancers* qui vont influencer l'activité du promoteur et augmenter l'efficacité de transcription [57]. Dans certains cas, l'inclusion d'au moins un intron entre le promoteur et la séquence codante de l'ADNc facilite le transport des ARNm vers le cytoplasme et augmente donc le niveau d'ARNm disponible pour la traduction [55, 58]. D'autres éléments tels que le signal de polyadénylation, la région 5' UTR contenant la séquence de Kozak ou la région 3' UTR sont

ajoutés afin de stabiliser l'ARNm et d'améliorer la traduction [59, 60]. La modification de la région codante peut également améliorer le niveau d'expression du gène. En effet, le niveau d'expression d'un gène de mammifère sera faible si celui-ci est composé des codons correspondant aux ARN de transfert (ARNt) les moins abondants dans la cellule. Par conséquent, afin d'augmenter la production de protéines recombinantes, les séquences des gènes sont généralement optimisées par l'utilisation des codons correspondant aux ARNt les plus abondants [55]. Dans le cas où le vecteur d'expression est utilisé pour la génération de populations hétérogènes stables ou de lignées cellulaires productrices, un marqueur de sélection est ajouté. Il s'agit d'un gène conférant une résistance à un antibiotique (puromycine, G418, etc.) ou à un inhibiteur enzymatique (méthionine sulfoximine, méthotrexate, etc.).

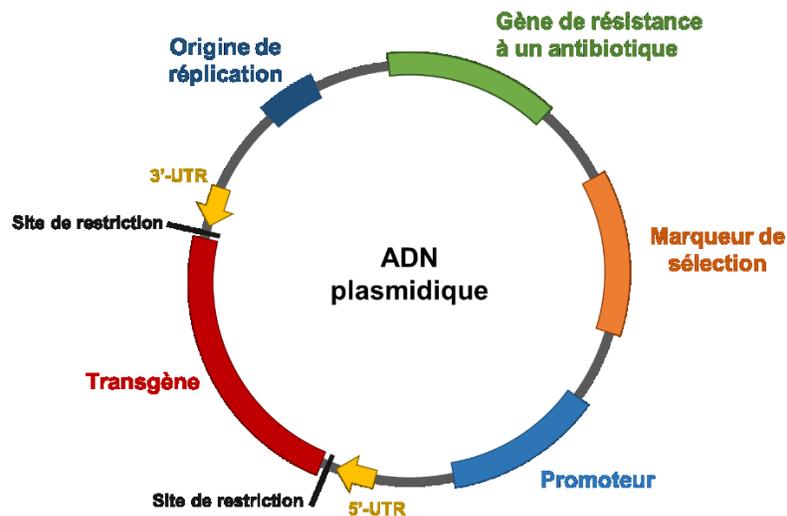


Figure 4 : Caractéristiques communes des plasmides ou vecteurs d'expression. (Adaptée de Monroe, 2014 [61])

2.3.2 Véhicule de transfection : le PEI

Pour assurer le transport du transgène à l'intérieur de la cellule et du noyau, il existe plusieurs agents de transfection dont notamment les vecteurs viraux et non-viraux [47]. L'agent de transfection décrit comme le plus efficace (rapport coût/efficacité le plus élevé) dans les cellules de mammifères est le polyéthylèneimine (PEI), un polymère polycationique ayant

l'avantage d'être peu coûteux, simple d'utilisation et compatible avec des milieux sans sérum (Figure 5) [47, 62]. Le PEI condense et protège l'ADN plasmidique en formant des structures appelées polyplexes. Une fois en contact avec les cellules, ces derniers sont endocytés puis libérés dans le cytoplasme après échappement endosomal [63]. Concernant les mécanismes permettant le transport et l'entrée des polyplexes ou des vecteurs d'expression dans le noyau, ceux-ci restent encore à étudier et demeurent limitant pour l'optimisation de l'expression du transgène [64, 65]. Cependant, afin d'augmenter l'efficacité de la transfection, certains paramètres tels que le milieu de transfection, le ratio ADN:PEI, le temps d'incubation des polyplexes ou encore la température à laquelle est effectuée la production ont été optimisés [66-68]. Enfin, étant donné sa haute efficacité de transfection, le PEI est particulièrement utilisé pour des productions à grande échelle dans les cellules CHO et HEK293 [62, 69].

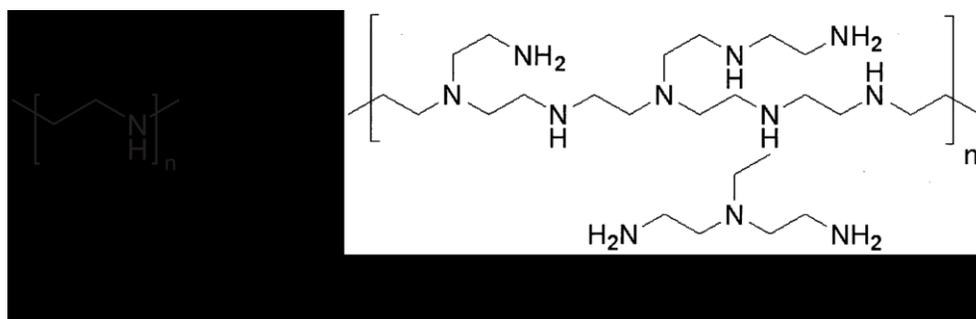


Figure 5 : Illustration des structures chimiques linéaire et branchée du polyéthylènimine.

2.3.3 Expression transitoire

La transfection génique transitoire est la méthode la plus rapide et la moins coûteuse pour la production de protéines recombinantes à partir de cellules de mammifères [55]. Cette méthode est basée sur l'insertion de multiples copies d'ADN plasmidique exprimées dans un court laps de temps. En effet, suite à la transfection, les molécules d'ADN sont dirigées jusqu'au noyau et restent sous forme épisomale (Figure 6). Ainsi, l'expression peut durer jusqu'à 14 jours, jusqu'à ce que l'ADN plasmidique soit dilué au cours des divisions cellulaires. Du clonage de gène jusqu'au produit fini, l'expression génique transitoire permet d'obtenir des titres en protéines recombinantes de l'ordre du milligramme au gramme en 2 à 4 semaines (Tableau 4) [62].

Tableau 4 : Productions de protéines recombinantes par transfection transitoire de cellules de mammifères.

Lignée cellulaire	Plasmide	Promoteur	Méthode	Ratio ADN:PEI (w/w)	Produit	Titre (mg/L)	Mode de production	Volume	Durée de production (jours)	Réf.
CHO-DG44	pEAK8	EF-1 α	PEI	1:2	IgG humain anti-Rhésus D	8	Cuvée	1.2 L	10	[70], 2004
HEK293-EBNA1	pTT	CMV5	PEI	N.S.	SEAP	30	Cuvée	600 mL	6	[71], 2005
CHOK1-SV	pCB72.3	CMV	PEI	20:1 (N:P)	IgG4	13	Cuvée	100 mL	12	[72], 2006
HEK293-EBNA	pCEP4	CMV	PEI	1:2.5	IgG	7	Cuvée-alimentée	100 L	8	[69], 2008
HEK293E	pEAK8	CMV	PEI	1:2	IgG anti-Rhésus D	860	Cuvée	2 L	10	[73], 2008
CHOK1SV	N.S.	CMV	PEI	1:3	AcM	66	Cuvée-alimentée	10 L	14	[74], 2009
CHO-DG44	pXLG ^{CHO} -A3	CMV	PEI	1:4	IgG humain anti-Rhésus D	290	Cuvée	500 mL	9	[75], 2011
HEK293-6E	pTT5	CMV5	PEI	1:3	IgG1	120	Cuvée	5 L	8	[66], 2011
HEK293-6E	pCMV	CMV	PEI	1:2.5	scFv-Fc	450	Cuvée	25 mL	6	[76], 2013
CHO-EBNA GS	VHE / VKE	EF-1 α	PEI	1:7	AcM	1800	Cuvée-alimentée	6 L	20	[77], 2014
CHOK1SV GSKO	N.S.	N.S.	PEI	1:1.5	Anticorps	1000	Cuvée-alimentée	2 L	16	[78], 2015
CHO-3E7	pTT5	CMV5	PEI	1:5	AcM	140	Cuvée	500 mL	8	[68], 2016
HEK293-6E	pTT5	CMV5	PEI	1:3	AcM	791	Cuvée	500 mL	8	[68], 2016

Les cellules HEK293 sont les plus couramment utilisées pour la production de protéines recombinantes en transfection transitoire en raison de leur permissivité à la transfection et de leur haut niveau d'expression. Parmi les différentes lignées cellulaires HEK293 modifiées, la lignée HEK293-EBNA1, exprimant l'antigène nucléaire 1 du virus d'Epstein Barr (EBNA1), est particulièrement populaire [79]. Dans ces cellules, la réplication épisomale des plasmides est initiée par la liaison de l'EBNA1 à l'origine de réplication (oriP) du virus d'Epstein Barr (EBV) situé sur le plasmide et permet des taux de rétention élevés de plasmides (92-98 % par génération de cellules), se traduisant par l'obtention de niveaux élevés de protéines [80]. Ainsi, des titres de 120 mg/L ont été obtenus pour une culture de 5 L, à partir de cellules HEK293-6E exprimant de façon stable une forme tronquée de l'EBNA1 [66]. Toujours à partir de cette même lignée, des titres de l'ordre de 800 mg/L ont été obtenus pour l'anticorps palivizumab dans une culture de 500 mL [68]. Dans les deux cas, un ajout de peptone TN1 à 24 h post-transfection a été réalisé

afin d'augmenter les productions [71]. Enfin, la transfection à de hautes densités cellulaires (4.10^6 cellules/mL) combinée à la co-expression de facteurs de croissance et de régulateurs du cycle cellulaire a permis d'atteindre des titres d'IgG supérieurs à 1 g/L dans des cultures de 2 L [73].

Initialement, les cellules CHO étaient peu utilisées pour l'expression transitoire car les productions étaient relativement faibles par rapport aux HEK293, et ce principalement en raison de faibles efficacités de transfection. Cependant, de nombreuses études ont démontré que les profils de glycosylation des protéines recombinantes présentent des différences selon qu'elles soient exprimées dans les cellules CHO ou les cellules HEK293 [81, 82]. L'utilisation de la même lignée cellulaire des premiers stades de développement jusqu'à la production est donc primordiale et ce, afin de diminuer le risque d'une différence dans les MPT et dans les propriétés biophysiques et fonctionnelles des protéines. Or, puisque la cellule CHO est l'hôte de choix pour la fabrication commerciale de protéines recombinantes, de nombreux développements ont été réalisés afin d'optimiser les protocoles de transfection pour cette plateforme, notamment via l'ingénierie des lignées cellulaires. Un titre de 875 mg/L dans une culture de 200 mL a ainsi pu être obtenu à partir d'une lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable des protéines impliquées dans les voies de sécrétion de la cellule [83]. D'un autre côté, un titre supérieur à 2 g/L dans une culture de 500 mL a été obtenu à partir d'une lignée coexprimant de façon stable l'EBNA1 et le gène codant pour la glutamine synthétase [77].

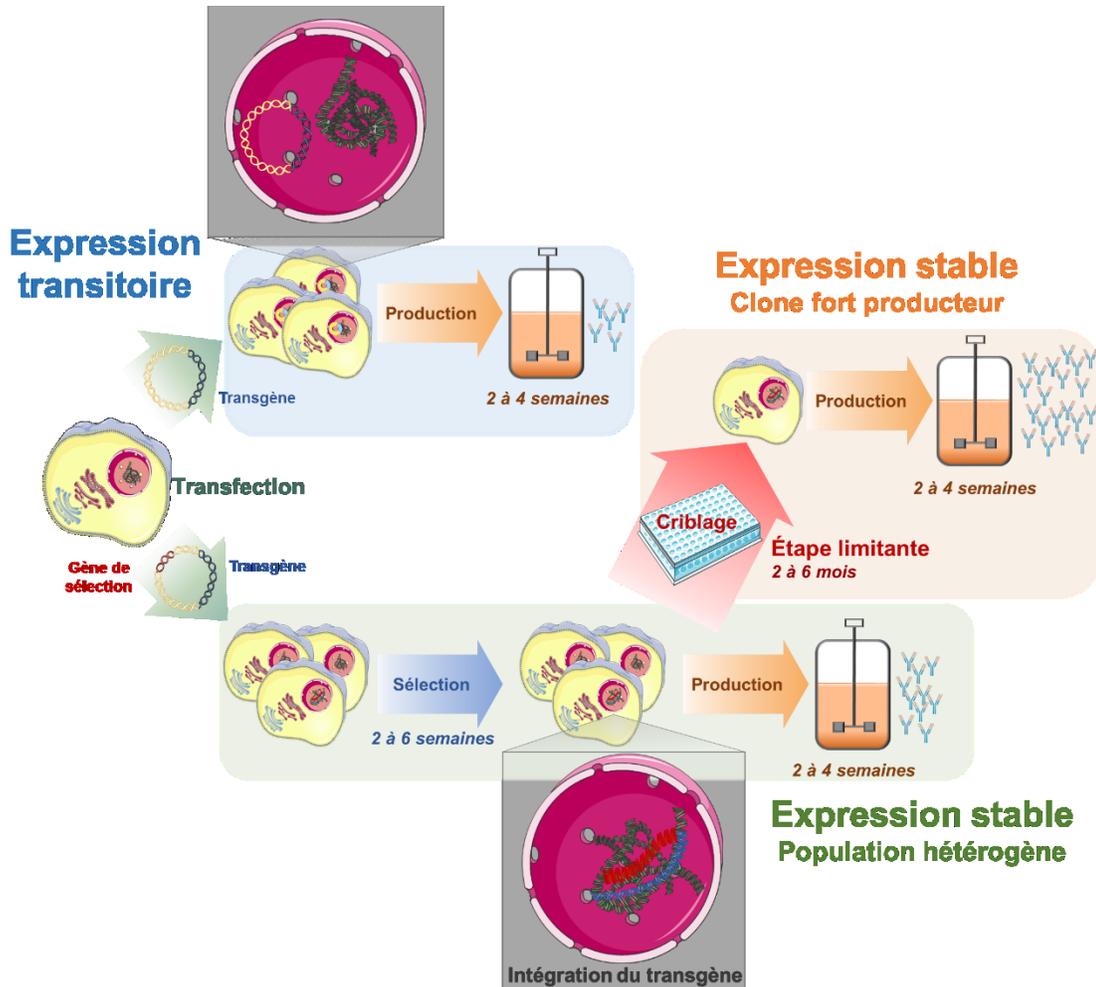


Figure 6 : Comparaison des différentes plateformes d'expression en cellules CHO.

2.3.4 Expression stable

L'expression stable est la méthode la plus couramment utilisée en cellules de mammifères pour la production de protéines recombinantes à grande échelle (Figure 6). Brièvement, une fois dans la cellule, le vecteur plasmidique comportant le gène d'intérêt flanqué d'un marqueur de sélection (gène conférant une résistance à un antibiotique ou à un inhibiteur enzymatique) est linéarisé par des nucléases puis inséré aléatoirement dans le génome de la cellule à l'aide de recombinases [30]. Les systèmes de sélection les plus couramment utilisés dans l'industrie sont basés sur la glutamine synthétase (GS) et la dihydrofolate réductase (DHFR) (voir partie 5 pour une description détaillée) [57]. Un antibiotique ou un inhibiteur

enzymatique est ensuite ajouté dans le milieu de culture afin de sélectionner les cellules ayant intégré dans leur génome le gène codant pour la protéine d'intérêt, menant ainsi à l'obtention d'une population hétérogène en termes de productivité et de croissance cellulaire appelée *pool* stable. Cette hétérogénéité s'explique majoritairement par des différences dans le nombre de copies insérées mais aussi par le lieu d'intégration dans le génome de la cellule qui influence la transcription. Ce phénomène appelé « effet de position » est discuté dans la partie 4.

Depuis quelques années, l'utilisation des *pools* stables en tant qu'alternative à la transfection transitoire est devenue très populaire afin de générer les quantités de produit nécessaires à la recherche ou aux études précliniques. En effet, du fait de l'intégration du transgène, la cellule peut répliquer le gène d'intérêt et l'exprimer sur de nombreuses générations cellulaires, ce qui facilite la mise à l'échelle. Ainsi, des productions en mode cuvée-alimentée de 200 L et 400 L ont été rapportées [84, 85]. De plus, malgré un nombre plus faible de copies du transgène dans la cellule, les titres obtenus sont souvent supérieurs à ceux obtenus en transitoire. Par exemple, via l'utilisation d'éléments transposables, connus pour faciliter l'intégration dans des régions transcriptionnellement active du génome, des titres compris entre 350 et 550 mg/L de protéines de fusion Fc ont été obtenus en culture de 100 mL et des productions d'IgG ont atteint 600 à 800 mg/L dans des volumes de culture compris entre 500 mL et 1 L [86]. En utilisant ce même système, une étude récente a reporté des titres de 4.8 g/L dans un volume de 25 L [87]. Les études publiées sur la production de protéines recombinantes en populations hétérogènes stables ont été résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Productions de protéines recombinantes à partir de populations hétérogènes stables.

Type cellulaire	Vecteur	Expression	Sélection	Promoteur	Intégration transgène	Méthode transfection	Protéine produite	Production (g/L)	Mode de production	Volume	Temps de génération	Temps de production (jour)	Réf.
CHO	pMPIG (donneur) pmPBBase (helper)	Constitutif	Puromycine	CMV	Aléatoire facilitée (PiggyBac transposon)	PEI	1 protéine de fusion Fc 1 AcM	0.6 (fusion Fc) 0.8 (AcM)	Cuvée non optimisée	100 mL (Fc fusion) 1 L (AcM)	12	14	[86], 2015
CHO	pB007 (donneur) sPBo-25 (helper)	Constitutif	GS	CMV	Aléatoire facilitée (PiggyBac transposon)	PEI Électroporation	3 AcM 1 bispécifique	2.3 à 7.6	Cuvée-alimentée optimisée	4 mL	12	14-16	[87], 2016
CHO	pB007 (donneur) sPBo-25 (helper)	Constitutif	GS	CMV	Aléatoire facilitée (PiggyBac transposon)	Électroporation	1 AcM	4.8	Cuvée-alimentée optimisée	25 L	12	14	[88], 2017
CHO	pTT	Inductible	GS	CR5	Aléatoire	PEI	1 protéine de fusion Fc 1 AcM	0.9 (fusion Fc) 0.35 (AcM)	Cuvée-alimentée non optimisée	20 mL	16	14	[89], 2017
CHO	pCON ou PEE	Constitutif	GS ou puromycine	CMV	Aléatoire	Électroporation	AcM	0.4 et 0.35	Cuvée-alimentée	50 mL et 100 L	45	13	[84], 2010
CHO	N.S.	Constitutif	GS	N.S.	Aléatoire	Électroporation	2 AcM	2	Cuvée-alimentée	25 mL	N.S.	14	[3], 2017

Comme mentionné précédemment, les *pools* sont des populations cellulaires hétérogènes en termes de productivité et de croissance. Ainsi, la génération de lignées cellulaires hautement productrices nécessite une étape de criblage et ce, afin d'isoler des clones ayant des productivités élevées (Figure 7).

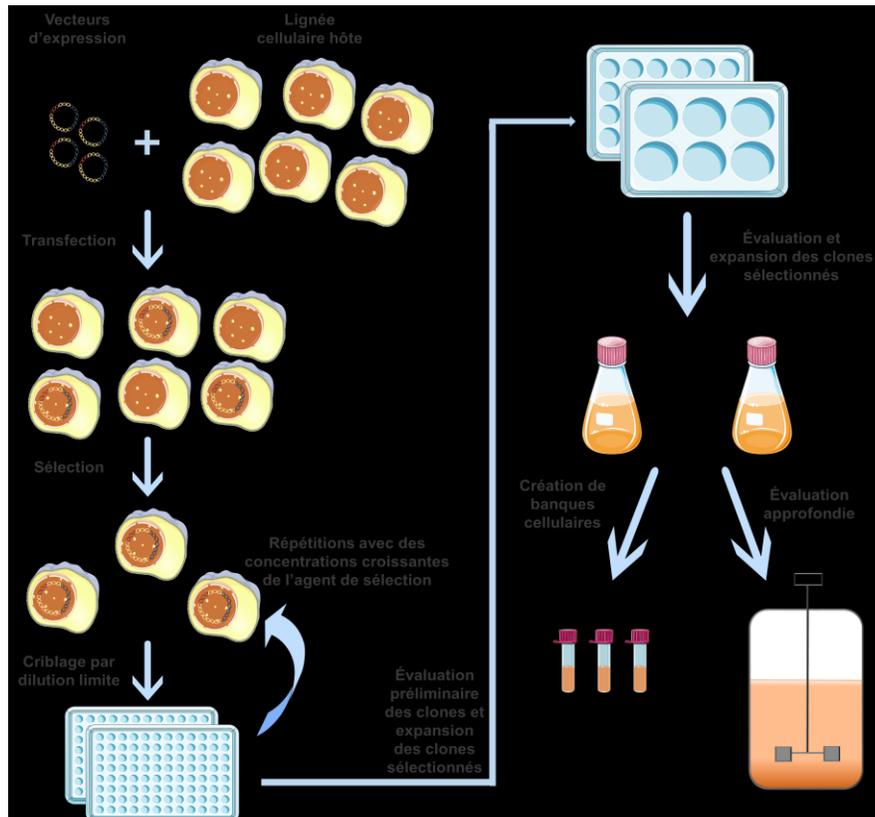


Figure 7 : Représentation schématique du procédé typique de développement d'une lignée cellulaire mammifère pour la production de protéines recombinantes. (Adaptée de Lai et al., 2013 [51])

2.3.5 Criblage des clones fort producteurs

Au cours du développement d'une lignée cellulaire, l'intégration aléatoire du gène d'intérêt dans le génome de la cellule hôte mène à l'obtention de *pools* très hétérogènes. Au sein de cette population hétérogène, les clones ayant une forte productivité sont extrêmement rares étant donné la rareté des régions actives supportant un taux élevé d'expression génique dans le

chromosome [90]. De plus, les clones ayant une forte productivité sont généralement associés à des taux de croissance plus faibles étant donné la réquisition d'une partie importante des ressources pour l'expression de la protéine recombinante. Des sous-populations produisant peu, ou non-productrices, présentant des différences du taux de croissance minimales mais significatives, peuvent alors dépasser la croissance des clones forts producteurs, menant à une diminution de la productivité spécifique du *pool* au cours des passages [91, 92]. Par conséquent, le criblage d'un nombre conséquent de clones est généralement nécessaire afin d'isoler les clones forts producteurs présentant des avantages à la fois en termes de productivité que de croissance.

La dilution limite est de loin la méthode la plus couramment utilisée pour la sélection de clones forts producteurs. Brièvement, cette méthode consiste à diluer séquentiellement la population de cellules hétérogènes stables dans des plaques multi-puits, de façon à ce que chaque puits reçoive une à dix cellules, en fonction du taux de récupération attendu [93]. Cette méthode ne requérant pas d'équipements spécialisés est donc caractérisée par sa simplicité et son faible coût. Toutefois, elle présente plusieurs limitations. Tout d'abord, c'est une méthode laborieuse et bas débit. Ensuite, étant donné que les cellules dans un puits après croissance peuvent provenir à l'origine de plusieurs cellules de la population hétérogène, il est nécessaire de réaliser plusieurs cycles de clonage par dilution limite afin d'assurer la monoclonalité, c'est-à-dire que les cellules proviennent d'un seul et même clone [94]. Enfin, la détermination de la productivité des clones nécessite des étapes supplémentaires de culture et de titrage des protéines par dosage immuno-enzymatique (ELISA) [51]. Au vu de la quantité de travail requise pour la caractérisation complète d'un clone, le processus de criblage par dilution limite peut prendre jusqu'à 8 mois [90].

Des systèmes automatisés et haut-débit ont été développés afin de diminuer la charge de travail et le temps du criblage par dilution limite pour la sélection de clones forts producteurs. Ces systèmes ont également l'avantage de pouvoir être combinés à des méthodes de détection et de quantification des protéines à petite échelle, permettant ainsi d'éviter les diverses étapes additionnelles nécessaires au dosage immuno-enzymatique. L'une de ces méthodes de quantification appelée HTRF (homogenous time-resolved fluorescence) est basée sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Brièvement, un donneur est excité par une source d'énergie telle qu'un laser. Puis, si le donneur est à proximité du fluorophore accepteur,

l'énergie est transférée à ce dernier qui émet de la lumière à une longueur d'onde le caractérisant [95]. Dans le cadre de ce projet, des dosages immuns HTRF compétitifs ont été réalisés à l'aide du kit HTRF Fc (Cisbio) pour la quantification de la protéine de fusion Fc, hCD200Fc (Figure 8). En plus d'être très sensible et robuste, la méthode HTRF requiert de très faibles volumes et peut être miniaturisée pour des formats de plaques 1536 puits [96].

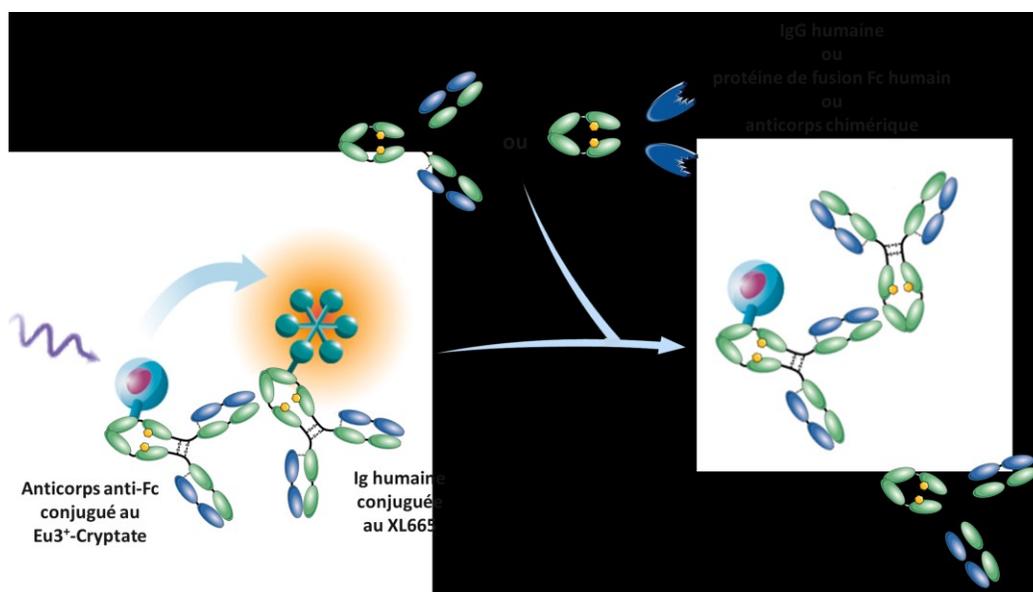


Figure 8 : Principe de fonctionnement du test HTRF spécifique à la région Fc humaine.
(Adaptée de [97] et Degorce et al., 2009 [96])

Au vu de la demande croissante du marché des protéines thérapeutiques et de la nécessité de réduire le temps et les efforts consacrés à la recherche de clones forts producteurs, les industries biopharmaceutiques ont délaissé le criblage manuel par dilution limite pour faire place à des systèmes de criblage automatisés plus complexes [55].

La cytométrie en flux et plus particulièrement le tri de cellules activé par fluorescence (FACS) est l'une des méthodes les plus largement utilisées pour le criblage haut-débit de cellules ayant le phénotype désiré. Cette technique permet de trier les cellules selon leur niveau de fluorescence et ce, à un débit de plusieurs millions de cellules par minute, permettant ainsi d'économiser du temps et des ressources [98, 99]. Néanmoins, l'exactitude de cette méthode repose sur l'association de la fluorescence à la cellule. Ainsi pour les clones ne sécrétant pas la protéine, la co-expression ou la fusion de la protéine d'intérêt avec un marqueur tel que la

protéine fluorescente verte (GFP) permet de déterminer le niveau d'expression de la protéine d'intérêt de chaque clone. Toutefois, dans le cas d'une fusion entre la protéine et le marqueur, ce dernier peut influencer la structure et la fonction de la protéine [100]. De plus, dans un cadre thérapeutique, l'administration d'une protéine recombinante fusionnée à un marqueur fluorescent peut présenter certains risques [101]. Dans le cas de protéines sécrétées, diverses stratégies ont été développées afin de lier celles-ci à la surface de la cellule les ayant sécrété ou de les piéger à proximité. Une première stratégie consiste à encapsuler préalablement la cellule dans une matrice d'agarose biotinylée de 35 μm de diamètre [102-105]. Un anticorps primaire marqué avec un fluorophore est ensuite ajouté à la microgoutte pour se lier à la protéine recombinante sécrétée. Puis, l'ajout d'un anticorps secondaire biotinylé permet la capture de l'anticorps primaire suivi de la liaison du complexe à un pont de streptavidine immobilisé sur la matrice d'agarose biotinylée. La cellule et ses protéines sécrétées immobilisées dans la microgoutte sont ensuite traitées par FACS (Figure 9A). Une autre stratégie utilise une matrice d'affinité réticulée à la surface de la cellule dans un milieu à faible perméabilité à base de gélatine afin de capturer les protéines recombinantes sécrétées [106]. Une fois immobilisées, les protéines recombinantes sont détectées à l'aide d'anticorps marqués avec un fluorophore et traitées par FACS (Figure 9B). Ces méthodes ont ainsi permis de faciliter le criblage par FACS des clones forts producteurs sécrétant la protéine d'intérêt. Cependant, l'immobilisation des protéines recombinantes sécrétées reste techniquement difficile et nécessite beaucoup de temps [93]. Une méthode de capture des protéines sécrétées plus simple appelée capture à froid consiste à lier les protéines recombinantes associées à la surface de la cellule à de basses températures (0 à 4 °C) puis de les lier à des anticorps marqués avec un fluorophore avant traitement par FACS (Figure 9C) [107, 108]. Finalement, une dernière méthode consiste à corréler le niveau d'expression de la protéine recombinante avec celui d'un marqueur de sélection intracellulaire tel que la GFP (Figure 9D) [109, 110].

Des systèmes automatisés basés sur la fluorescence sont également utilisés pour le criblage à haut débit des clones forts producteurs. Ceux-ci permettent de réduire le temps et la quantité de travail tout en augmentant l'efficacité et l'exactitude du processus de criblage [93]. L'une des techniques les plus prometteuses des systèmes automatisés combine la croissance dans un milieu semi-solide, la détection par fluorescence et le criblage par un sélecteur de

cellules automatisé tel que le CellCelector™ [111] ou le ClonePix™ [7]. Brièvement, les clones sont cultivés dans un milieu semi-solide (agar, agarose ou méthylcellulose) afin de limiter la diffusion de la protéine recombinante sécrétée. Puis, les protéines sécrétées sont capturées par des anticorps marqués par un fluorophore, formant ainsi un halo autour de la colonie (Figure 9E). Enfin, le sélecteur transfère les clones d'intérêt dans une plaque multi-puits afin d'approfondir la caractérisation. Caron et son équipe furent parmi les premiers à combiner un marquage fluorescent dans un milieu semi-solide de méthylcellulose et un CellCelector™ pour la détection de protéines recombinantes exprimées dans des cellules CHO et HEK293 [111]. Finalement, contrairement au FACS où la mesure du taux de sécrétion est indirecte (au moment de l'analyse), les systèmes automatisés avec une culture dans un milieu semi-solide ont l'avantage de mesurer un signal de fluorescence correspondant à l'intégrale de la productivité en fonction du temps de développement du clone [93].

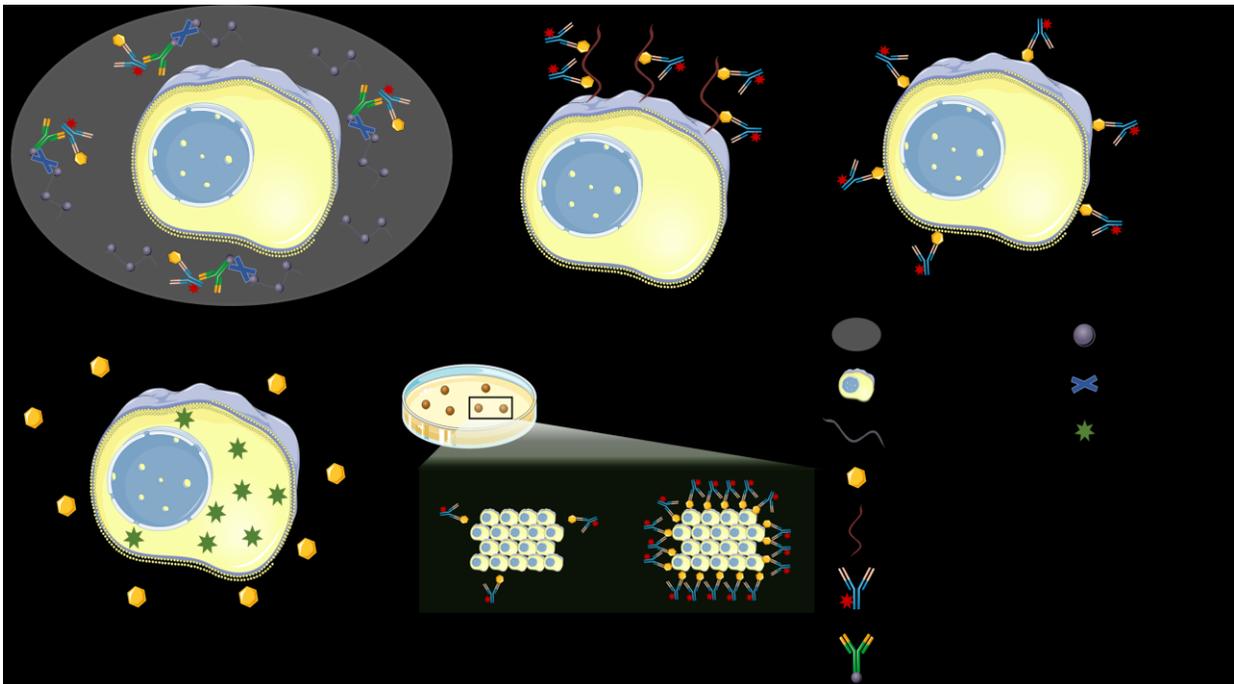


Figure 9 : Stratégies de marquage par fluorescence pour différentes technologies de criblage de clones forts producteurs. (A) Microgoutte de gel, (B) matrice d'affinité, (C) capture par le froid, (D) marqueur de sélection intracellulaire et (E) culture dans un milieu semi-solide avec détection par fluorescence. (Adaptée de Lai et al., 2013 [51] et Priola et al., 2016 [93])

2.3.6 Culture en bioréacteur

Après avoir sélectionnés des clones stables sur la base de leurs hauts niveaux d'expression, seuls les clones présentant les meilleures performances en bioréacteur à petite échelle sont définitivement sélectionnés comme lignées cellulaires de production [50].

Les cellules animales sont particulièrement difficiles à cultiver car elles ont des besoins en éléments nutritifs très complexes et sont sensibles au cisaillement, ce qui complique les conditions d'agitation pouvant assurer un niveau adéquat d'O₂ et de CO₂ dans les cultures à grande échelle [112]. Ainsi, pour permettre une croissance soutenue des cultures et une production efficace de protéines recombinantes, la composition des milieux de culture cellulaire est très importante [30]. Ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la mise au point de milieux sans ingrédients d'origine animale [59]. En effet, durant des années, les milieux de culture étaient complétés avec du sérum de veau fœtal. Cet apport permettait d'améliorer la croissance et le maintien cellulaire puisque le sérum apporte des éléments essentiels que le milieu de base ne contient pas, tels que de nombreux nutriments, des facteurs de croissance, des facteurs d'adhésion, des agents détoxifiants et des cofacteurs. Cependant, son utilisation a été fortement déconseillée par les autorités de régulation en raison de l'introduction éventuelle d'agents à risque tels que le prion. De plus, la composition du sérum est sujette à variation et son utilisation apporte des difficultés lors des étapes de purification [55]. Désormais, les cellules animales sont cultivées dans des milieux chimiquement définis contenant un ensemble de peptides, de facteurs de croissance, de protéines, de lipides, de glucides et de petites molécules [30]. Les milieux définis ont pour avantages d'être moins coûteux et de simplifier les étapes de purification puisqu'il y a moins de contaminants à contrôler et à éliminer. Enfin, l'utilisation d'un environnement défini permet de faciliter l'optimisation des procédés [59].

Les cellules animales sont cultivées à grande échelle dans des bioréacteurs à cuve agitée pouvant atteindre 20 000 L. La culture en bioréacteur permet la mesure et le contrôle de certains paramètres tels que le pH, la concentration d'oxygène dissous et la température. De plus, les cuves sont soigneusement conçues afin d'assurer un mélange et un transfert de masse d'oxygène et de CO₂ adéquats [59]. Les cultures peuvent être adhérentes ou en suspension. La croissance en suspension est néanmoins le mode de culture privilégié dans la production de protéines recombinantes puisqu'elle permet d'atteindre des densités cellulaires beaucoup plus élevées

[30]. Dans ce cas, l'ajout d'un polymère synthétique, tel que le Kolliphor® P188, au milieu de culture est nécessaire afin de protéger les cellules du cisaillement causé par l'agitation et le bullage [59]. Les cultures de cellules en suspension peuvent être réalisées en mode cuvée (*batch*), cuvée-alimentée (*fed-batch*) ou perfusion (Figure 10).

Le mode de culture cuvée consiste en un système fermé dans lequel aucun ajout ni soutirage de métabolites n'est effectué, excepté dans le cadre du contrôle du pH lors d'une culture dans un bioréacteur contrôlé. Sa simplicité de mise en œuvre contraste néanmoins avec de faibles rendements de production. De plus, ce mode de culture ne permet pas d'obtenir de hautes densités cellulaires et mène à un épuisement rapide des nutriments couplé à une forte accumulation des déchets métaboliques pouvant impacter négativement la croissance et la qualité du produit [50]. Cette accumulation de fortes concentrations de déchets métaboliques tels que le lactate et l'ammonium est principalement due à un métabolisme peu efficace du glucose et de la glutamine dans les lignées cellulaires utilisées. Par conséquent, la culture est plus courte et s'arrête lorsque la viabilité cellulaire a atteint une valeur critique. Une fois terminée, l'ensemble du milieu de culture contenant les cellules et les protéines recombinantes est récolté [30].

La limitation nutritionnelle des cultures en mode cuvée a pu être surmontée par le développement du mode de culture cuvée-alimentée [113]. Cette stratégie d'alimentation consiste en l'ajout répété de petit volume de milieux concentrés en nutriments durant la culture, permettant de pallier le problème d'inhibition de la croissance. Ceci permet d'atteindre des concentrations cellulaires plus élevées, d'allonger le temps de culture et donc d'obtenir un meilleur rendement par rapport au procédé en mode cuvée [112]. Ainsi, pour les procédés les plus optimisés, des rendements de production de l'ordre de 5 à 10 g/L d'anticorps ont pu être atteints dans l'industrie [112, 114]. L'amélioration des procédés en mode cuvée-alimentée s'est principalement concentrée sur le développement de milieux de culture et de stratégies de contrôle pour une gestion efficace de l'alimentation. L'approche la plus courante pour le développement de milieu d'alimentation consiste à concentrer le milieu de base. Néanmoins, une optimisation approfondie de la composition des milieux et de la stratégie d'alimentation exige la prise en compte de la consommation des éléments nutritifs, de l'équilibre entre la croissance et la productivité volumétrique et de l'accumulation de déchets métaboliques [112].

Il est également nécessaire de prendre en compte la concentration minimale à maintenir pour les principaux nutriments, le mode d'alimentation (continu ou intermittent) ainsi que les volumes et les moments des ajouts [113]. Tout compte fait, la supériorité du mode cuvée-alimentée par rapport au mode cuvée associée à sa simplicité de mise en œuvre ont fait de ce mode de culture le plus utilisé pour la production à grande échelle de protéines recombinantes.

Afin d'éliminer les déchets toxiques pour les cellules, l'industrie s'intéresse depuis quelques années au développement de procédés perfusés pour la production de protéines recombinantes. Ce système de culture consiste à ajouter continuellement du milieu frais et à soutirer un milieu clarifié (avec les protéines produites) au même débit, tout en réintroduisant les cellules dans le bioréacteur [59]. Ce procédé permet ainsi d'éviter l'accumulation de déchets métaboliques tout en permettant l'obtention de très hautes densités cellulaires (jusqu'à 1×10^7 cellules/mL) et une production plus élevée [115]. Ce mode de culture reste toutefois long et coûteux à mettre en place et suivant le débit et la durée de la culture, les volumes à purifier peuvent être de 10 à 50 fois plus élevés que le volume utile du bioréacteur [59].

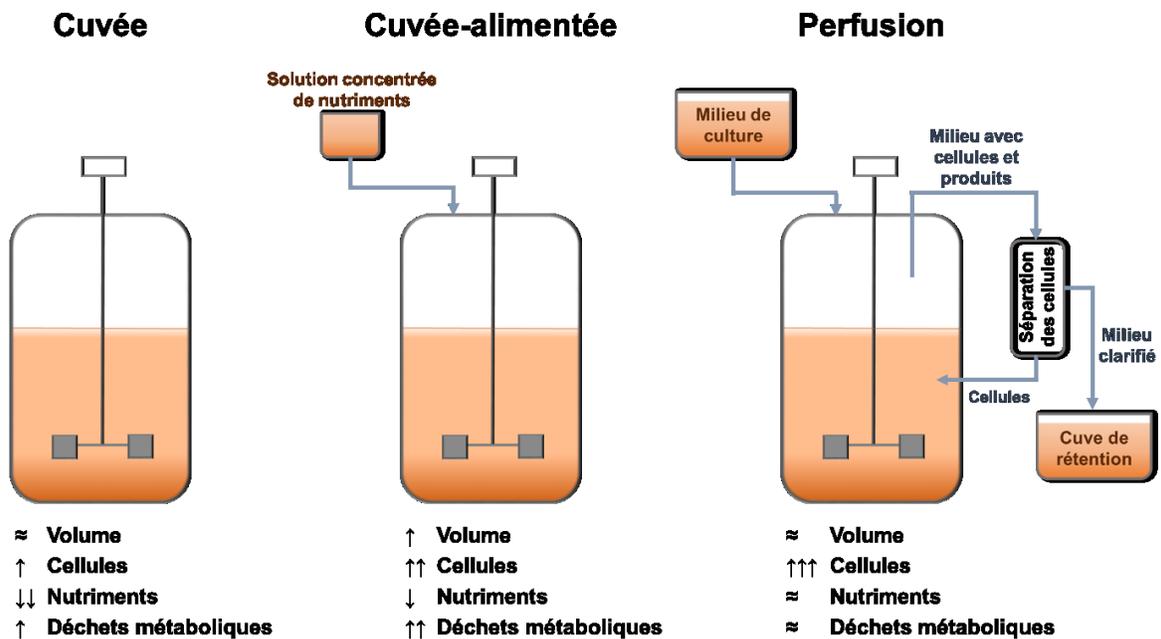


Figure 10 : Représentation schématique des trois modes de culture de cellules en suspension. (Adaptée de Birch and Racher, 2006 [59])

2.3.7 Purification

Les parties précédentes se sont concentrées sur les procédés en amont de la production de protéines recombinantes (*upstream*). Cependant, les procédés en aval de la production (*downstream*), consistant à extraire et purifier les protéines recombinantes produites du milieu de culture, sont également d'une importance cruciale. L'optimisation des méthodes de purification permet d'augmenter de façon non négligeable le rendement et par conséquent influence fortement les coûts de fabrication [116]. Les procédés de purification du produit final doivent permettre d'éliminer toutes les impuretés liées aux cellules, au bioréacteur voire même au procédé de purification. Ces impuretés incluent entre autres la protéine A (protéine structurale de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*), les composants du milieu, l'ADN, les protéines cellulaires, les virus et les endotoxines [116]. Les procédés de purification seront différents selon la protéine produite mais une approche industrielle globale est communément utilisée. Dans le cas des AcM, la plateforme de purification débute par une récolte de la culture cellulaire, consistant en l'élimination des cellules et des débris cellulaires par centrifugation puis filtration frontale. Puis, une étape de chromatographie d'affinité à la protéine A permet la capture spécifique des AcM et ce grâce à l'interaction de haute affinité de la protéine A avec la région Fc des anticorps. Cette seule étape permet d'éliminer des impuretés telles que l'ADN et les protéines cellulaires et d'atteindre une pureté supérieure à 98 %, tout en réduisant fortement le volume. Le pH acide de la solution d'élution est subséquentement utilisé pour une étape d'inactivation virale puis neutralisé par des étapes de polissage. Ces dernières consistent le plus souvent en deux voire trois étapes chromatographiques par échange d'ions, d'interaction hydrophobe ou par exclusion stérique et permettent d'éliminer les impuretés résiduelles afin d'atteindre des niveaux très bas afin d'assurer l'innocuité du produit. Ces impuretés sont principalement des protéines cellulaires, des agrégats de haut poids moléculaire, des espèces de faible poids moléculaire, de l'ADN ou encore de la protéine A résiduelle suite à la chromatographie d'affinité. Finalement, après une étape de filtration virale, un procédé d'ultrafiltration/diafiltration permet le transfert du produit dans son tampon de formulation [116, 117]. Un rendement de 60 % à 80 % d'anticorps est généralement obtenu suite à ces étapes de purification [59].

2.4 Mécanismes moléculaires et cellulaires limitant la production de protéines recombinantes

Dans les cellules eucaryotes, l'expression génique est un processus très complexe impliquant de nombreux processus moléculaires et cellulaires tels que la modification chimique et structurelle de l'ADN, la transcription, le traitement et la modification des transcrits, le transport de l'ARNm dans le cytoplasme, la traduction, les modifications post-traductionnelles et le repliement des protéines. Bien que la transcription soit traditionnellement considérée comme le facteur dominant dans le contrôle de l'expression des protéines, toutes les étapes énumérées ci-dessus peuvent être modifiées en réponse à la surexpression du transgène et influencer la production de la protéine recombinante [118].

2.4.1 Limitations transcriptionnelles

Le site d'intégration de l'ADN plasmidique dans le génome de la cellule mammifère a un impact important sur le niveau de transcrit du transgène et, par conséquent, influence la production de la protéine recombinante. Cet « effet de position » est en grande partie dû aux effets épigénétiques [55, 119]. L'expression du transgène est dépendante de la structure du site chromosomique où se trouvent les séquences d'ADN régulatrices, telles que les promoteurs ou les *enhancers* [120]. En effet, lorsque la structure de la chromatine est ouverte (euchromatine), elle est facilement accessible aux facteurs de transcription, tandis que cet accès sera limité avec la structure condensée (hétérochromatine) [121, 122]. Cependant, l'intégration dans un site d'euchromatine permettant une haute activité transcriptionnelle ne garantit pas une expression stable à long terme du gène recombinant. En effet, dans de nombreux cas, l'expression est rapidement inactivée, probablement sous l'influence de l'hétérochromatine voisine qui rend le gène recombinant inaccessible à la machinerie transcriptionnelle [118]. De plus, des processus épigénétiques tels que la désacétylation ou la méthylation des histones ainsi que la méthylation des régions promotrices peuvent entraîner une perte d'expression à plus ou moins long terme [123, 124]. Pour faire face à ce problème, l'utilisation d'éléments génétiques tels que les éléments ubiquitaires d'ouverture de la chromatine (*ubiquitous chromatin opening elements*,

UCOE) ou les régions d'attachement à la matrice (*scaffold/matrix attachment regions*, S/MAR) peuvent être utilisés. Les éléments S/MAR sont discutés dans la partie 5.

2.4.2 Limitations post-transcriptionnelles

2.4.2.1 Contrainte cellulaire

La voie de sécrétion des protéines dans les cellules de mammifères est complexe. Celle-ci implique tout d'abord la translocation du polypeptide en cours de traduction du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE), où sont effectuées certaines MPT, suivi finalement par la sécrétion de la protéine mature. À chacune de ces étapes, il existe des points de contrôle pouvant affecter la productivité de la cellule. Ainsi, malgré les optimisations effectuées pour augmenter l'activité transcriptionnelle, l'expression de la protéine recombinante reste parfois limitée. En effet, pour de faibles niveaux d'ARNm, il existe une corrélation entre productivité spécifique des cellules et niveaux d'ARNm. Cependant, lorsque l'expression d'ARNm est élevée, cette corrélation peut être affectée et un plateau est observé au niveau des productivités spécifiques, démontrant une limitation dans les mécanismes post-transcriptionnels. Ce type de limitation a déjà été reportée pour l'expression transitoire d'une protéine de fusion Fc et d'érythropoïétine en cellules CHO [125, 126]. Des limitations post-transcriptionnelles ont également été observées dans l'expression stable d'AcM dans les cellules CHO [127]. Par conséquent, la productivité est faible pour de nombreuses protéines recombinantes. De plus, les contraintes imposées à la cellule sont spécifiques à chaque protéine, ce qui rend les niveaux de production imprévisibles. À titre d'exemple, des niveaux d'expression variables peuvent être observés pour la production d'AcM d'une même sous-classe en raison de différences au niveau traductionnel et post-traductionnel [128]. D'une façon générale, la quantité d'ARNm recombinant disponible semble souvent être le phénomène limitant dans les cellules exprimant la protéine de façon stable, tandis qu'en transitoire, les mécanismes traductionnels et post-traductionnels sont généralement mis en cause, notamment dans le cas de protéines difficiles à exprimer [129, 130].

2.4.2.2 Agrégation

L'agrégation des protéines reste une difficulté majeure dans le développement et la fabrication de protéines thérapeutiques. Ce terme regroupe les espèces protéiques ayant un poids moléculaire plus élevé (oligomères) par rapport au monomère protéique natif [131, 132]. Les agrégats peuvent provoquer des effets indésirables tels qu'une immunogénicité, une activité biologique réduite ou nulle, ainsi que des problèmes de production, de formulation et de stockage [133].

Lors d'un stress dans le RE, lié par exemple à une surexpression de protéines, une privation de glucose, une hypoxie ou encore une infection virale, les protéines peuvent se replier incorrectement et former des agrégats via des interactions hydrophobes ou des réactions de réticulation [134-136]. D'ailleurs, des études suggèrent que les précurseurs dans l'agrégation des protéines sont des intermédiaires protéiques du processus de repliement puisque ceux-ci possèdent une plus grande flexibilité et exposent des résidus hydrophobes à l'extérieur de la protéine, se distinguant ainsi de leurs homologues nativement repliés dont les résidus hydrophobes sont incorporés au centre de la protéine. L'agrégation est plus difficile dans le cas de chaînes polypeptidiques complètement repliées [137]. Concernant les réactions de réticulation, la plus courante est la formation de ponts disulfures intermoléculaires. En effet, dans de nombreux cas, l'inefficacité de la machinerie de repliement et d'assemblage des protéines nouvellement synthétisées et s'accumulant dans la RE entraînent la formation d'agrégats présentant des ponts disulfures inter- et intramoléculaires anormaux [138-140]. D'autres voies de réticulation, telles la formation de dityrosine et la réticulation médiée par le formaldéhyde, ont également été décrites [133].

Afin de se protéger du mauvais repliement et de l'agrégation des protéines, pouvant dans certains cas mener à l'apoptose, les cellules de mammifères disposent de plusieurs mécanismes dont notamment la voie de réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées (*unfolded protein response*, UPR) et la voie de dégradation du RE (*ER-associated degradation*, ERAD) [141]. Pendant l'UPR, les résidus hydrophobes sont reconnus par BiP (*binding immunoglobulin protein*), une chaperonne qui stabilise et retient les protéines mal repliées au sein du RE et aide à leur repliement. Elle permet également la prévention de l'agrégation en protégeant les surfaces hydrophobes de la formation de liaisons inter- ou intramoléculaires

indésirables [135]. La capacité de ces chaperonnes peut toutefois être dépassée, selon les lignées cellulaires et les protéines produites, entraînant ainsi une diminution de l'efficacité du repliement des protéines. Si malgré les multiples contrôles de qualité et cycles de repliement, les protéines restent toujours mal repliées, celles-ci sont dégradées via l'ERAD.

Comme expliqué précédemment, dans un contexte de production de protéines thérapeutiques, les agrégats peuvent être éliminés au cours du traitement *downstream*. Cependant, diverses approches ont été développées afin de contrôler efficacement les agrégats protéiques [136, 142, 143]. Ainsi, dans une étude, des anticorps ayant des niveaux élevés de thiols libres et donc susceptibles de s'agréger ont été cultivés avec de faibles quantités de sulfate de cuivre (agent oxydant) dans le milieu de culture, permettant ainsi une réduction par 10 du nombre de thiols libres et une amélioration de la formation des ponts disulfures [144].

2.4.2.3 Le stress du réticulum endoplasmique et voie UPR

Dans des conditions physiologiques normales, les protéines mal repliées sont recyclées ou éliminées afin d'éviter une accumulation dans le RE. Cependant, dans certains cas, la demande de repliement des protéines est supérieure à la capacité de contrôle de qualité et de l'ERAD. Dans ces situations, les niveaux potentiellement toxiques de protéines agrégées, dépliées et mal repliées accumulées entraînent un stress pour le RE. Dans ce contexte, la cellule déclenche plusieurs voies de signalisation, collectivement appelées UPR, afin d'éliminer les protéines agrégées et de rétablir l'homéostasie normale de la traduction, de la dégradation et de la sécrétion des protéines [145]. L'activation de l'UPR vise ainsi à (i) restaurer la fonction normale de la cellule en mettant fin à la traduction des protéines et en dégradant les transcrits d'ARNm non traduits, (ii) dégrader les protéines mal repliées via le processus d'ERAD et (iii) augmenter la capacité de repliement en augmentant la taille du RE et en activant les voies de signalisation conduisant à l'augmentation de la production de protéines chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines. Si l'ensemble de ces stratégies permettent d'éliminer l'accumulation d'agrégats, la réponse au stress prend alors fin et la traduction reprend. Cependant, dans le cas où les protéines mal repliées ne sont pas éliminées, l'UPR peut mener à la mort cellulaire par apoptose. Dans les cellules de mammifères, la voie UPR est médiée par trois principaux effecteurs dont les voies de signalisation forment trois branches distinctes avec

toutefois un certain degré de connexion. Selon les circonstances, chacune des voies peut mener à la fois à l'activation de mécanismes de survie et pro-apoptotiques. Les trois effecteurs de la voie UPR sont la protéine kinase activée par l'ARN double brin (PKR)-comme la protéine kinase du réticulum endoplasmique (*double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK), le facteur de transcription activateur 6 (*activating transcription factor 6*, ATF6) et l'enzyme 1 requérant l'inositol (*inositol-requiring enzyme 1*, IRE1). Dans des conditions physiologiques normales, PERK, IRE1 et ATF6 sont sous une forme inactive, liés à BiP. En présence de protéines mal repliées avec des résidus hydrophobes exposés à l'extérieur, BiP se détache des trois effecteurs de l'UPR et se lie aux agrégats, déclenchant ainsi l'activation des voies de signalisation [146]. Finalement, lorsque la réponse au stress n'est plus nécessaire, BiP se réassocie à PERK, IRE1 et ATF6, inactivant alors l'UPR (Figure 11) [141, 145, 147].

La voie PERK est la première voie à se mettre en place au cours du temps. Celle-ci va permettre d'inhiber momentanément la traduction afin de limiter l'accumulation de protéines dépliées/mal repliées dans le RE. Elle permet également la transduction de signaux de survie et pro-apoptotiques. La dissociation de BiP de l'extrémité N-terminale de PERK déclenche la dimérisation et l'autophosphorylation du domaine des protéines kinases. La protéine PERK une fois activée va phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 (*eukaryotic initiation factor 2*, eIF2 α), empêchant ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la traduction ce qui va entraîner une atténuation globale de l'initiation de la traduction et régule négativement la transcription des gènes [148], réduisant ainsi l'afflux de protéines dans la RE et réduisant la charge de repliement. Simultanément, l'eIF2 α phosphorylé (eIF2 α -P) induit la traduction du facteur de transcription activateur 4 (*activating transcription factor 4*, ATF4). L'élévation du niveau d'ATF4 stimule l'expression de fonctions de survie telles que l'importation d'acides aminés et la réponse anti-oxydative du RE [149]. L'ATF4 stimule également l'expression de facteurs pro-apoptotiques via la protéine homologue au facteur de transcription C/EBP, la protéine CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*, CHOP). Cette dernière est responsable à la fois de l'induction d'une boucle de rétroaction négative via une augmentation de l'expression de la GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*) conduisant à la déphosphorylation de l'eIF2 α -P [150] ainsi que des voies apoptotiques des cellules via la répression de l'expression de Bcl-2 (lymphome à cellules B 2) [151].

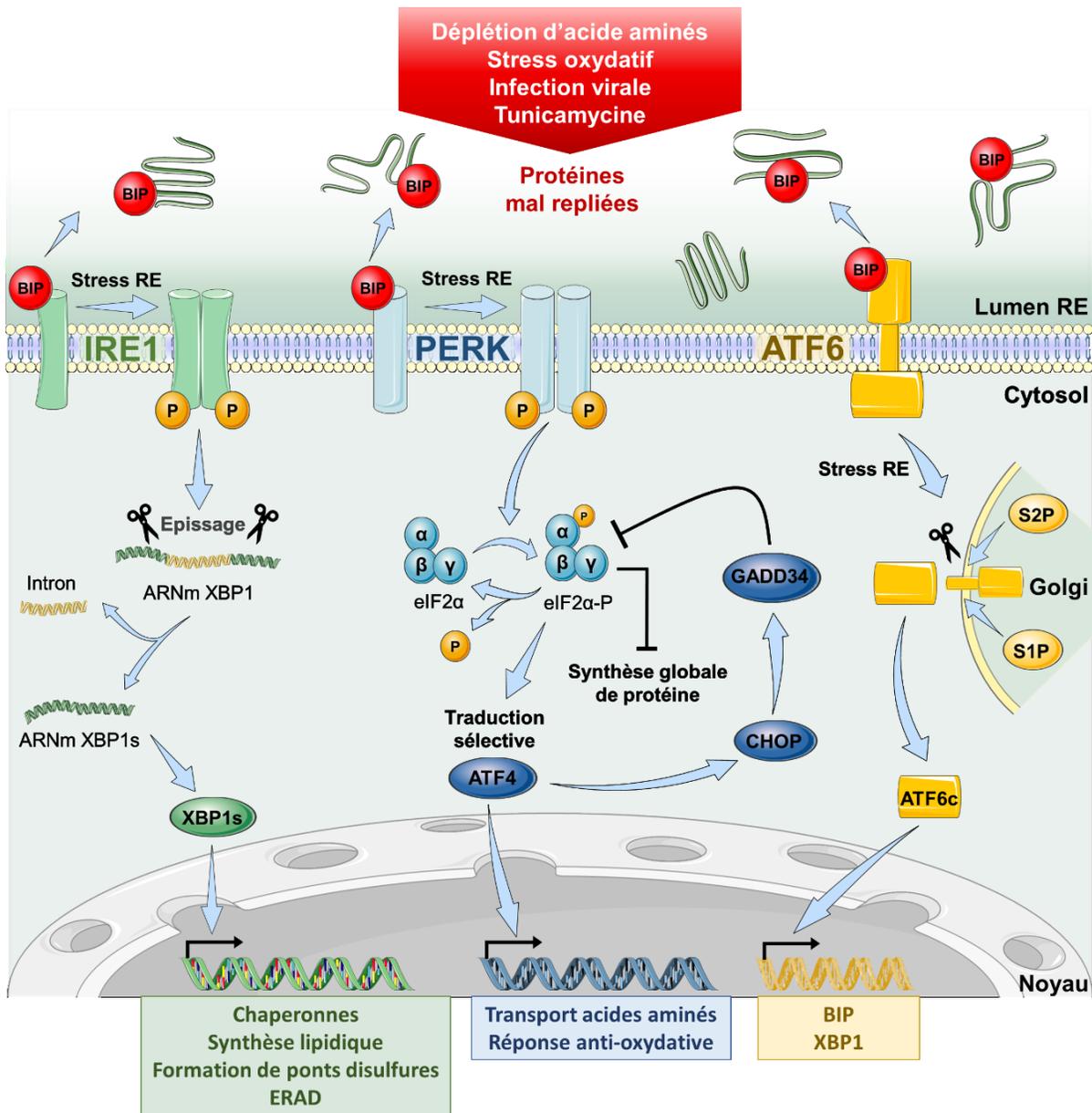


Figure 11 : Description schématique de la réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. (Adaptée de Cláudio et al., 2013 [152] et Hetz et al., 2013 [153])

Lors de l'élimination de BiP, l'IRE1 s'homodimérise et subit une autophosphorylation du domaine kinase. Puis, l'activité d'endoribonucléase de l'IRE1 permet le retrait d'un intron de 26 paires de bases des transcrits de la protéine de liaison à la X-box 1 (*X-box Binding Protein 1*, XBP1), générant ainsi le XBP1s, un puissant facteur de transcription [154]. Une fois dans le

noyau, XBP1s se lie aux éléments de réponse au stress du RE (*ER stress response elements*, ERSE) et aux éléments de l'UPR (*unfolded protein response elements*, UPR) de gènes liés à l'ERAD et codant pour une variété de chaperonnes.

La dernière voie de l'UPR débute par la translocation de l'ATF6 vers l'appareil de Golgi. Puis, contrairement aux voies PERK et IRE1, l'activation de l'ATF6 n'implique pas de phosphorylation mais un clivage par la protéase à sérine site-1 (S1) et la métalloprotéase site-2 (S2). L'ATF6 clivé (ATF6c) conduit à une augmentation de l'activité des chaperonnes du RE et de CHOP [155, 156]. De plus, l'ATF6c peut se lier aux ERSE de XBP1 afin d'augmenter sa transcription qui, comme expliqué précédemment, induit également l'expression de chaperonnes et d'enzymes de biosynthèse lipidique [154].

Compte tenu du rôle essentiel des composants de la voie de signalisation de l'UPR, leur régulation a été étudiée par surexpression dans les cellules CHO [157]. Parmi les protéines des voies de signalisation, XBP1, et notamment la forme épissée XBP1s, est la protéine la plus largement explorée. Une étude a ainsi démontré que contrairement à la surexpression de la forme non épissée (XBP1u), la surexpression transitoire et stable de XBP1s permet d'augmenter la productivité des cellules et ce, pour diverses protéines thérapeutiques [158]. L'application de cette stratégie de surexpression de XBP1s à une culture en mode cuvée-alimentée a également permis d'augmenter la productivité et le titre d'un anticorps [159]. Dans cette étude, la similarité des propriétés physico-chimiques par rapport à des anticorps obtenus avec des cellules non modifiées a également été démontrée. Néanmoins, cette stratégie ne semble efficace que lorsque les cellules CHO ont leur système de sécrétion saturé [126]. Une autre stratégie consiste à lever l'atténuation de la synthèse globale de protéines via la régulation de l'ATF4, l'un des régulateurs clés de la voie UPR. En effet, comme expliqué précédemment, celui-ci a la capacité d'inverser le signal d'atténuation de la traduction, dû à la phosphorylation de l'eIF2 α , par induction de la protéine GADD34. Ainsi, des cellules CHO exprimant les protéines ATF4 et GADD34 ont montré une productivité accrue de l'antithrombine III [160, 161]. Par contre, dans le cas de la surexpression de XBP1, la production de l'antithrombine III n'a pas été améliorée.

2.5 Optimisation de la plateforme d'expression en cellules CHO

2.5.1 Optimisation des vecteurs d'expression

2.5.1.1 Les promoteurs

- *Promoteurs constitutifs*

Afin de maximiser la quantité d'ARNm exprimés à partir du gène d'intérêt, l'utilisation de promoteurs forts est essentielle dans le développement de lignées cellulaires productrices. Les promoteurs constitutifs les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes dans les cellules de mammifères sont des promoteurs dérivés du cytomégalo virus humain (*human CMV*), du virus simien 40 (SV40) ainsi que le promoteur *elongation factor 1 alpha* (EF1- α) [162]. La plupart des vecteurs artificiels utilisés sont des promoteurs viraux, qui sont en général plus fort que les promoteurs cellulaires.

Dans le but d'augmenter leur activité transcriptionnelle dans les différents systèmes d'expression utilisés, ces promoteurs ont été modifiés par génie génétique. C'est le cas notamment du promoteur CMV5, une configuration optimisée du promoteur CMV. Dans cette configuration, un fragment d'environ 500 pb du promoteur CMV, comprenant la boîte TATA, a été fusionné avec la séquence de tête tripartite de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad-*tpl*) et son intron (Figure 12). Le *tpl* permet notamment d'augmenter l'efficacité de la traduction, tandis que la séquence intronique permet un meilleur recrutement de facteurs impliqués dans la transcription et dans la maturation du transcrit [163]. La configuration optimisée CMV5 permet de multiplier par six la force du promoteur CMV dans les HEK293, et par dix dans les cellules HeLa [164].

Un autre exemple de promoteur optimisé est le promoteur EF-1 α -HTLV (*elongation factor-1 apha-human T-cell leukemia virus*). Cette nouvelle version regroupe le promoteur EF-1 α couplé à la région R et une partie de la séquence U5 (R-U5') du virus T-lymphotropique humain (*human T-lymphotropic virus*, HTLV). Le R-U5' a été couplé au promoteur EF-1 α pour améliorer la stabilité de l'ADN et de l'ARN [165].

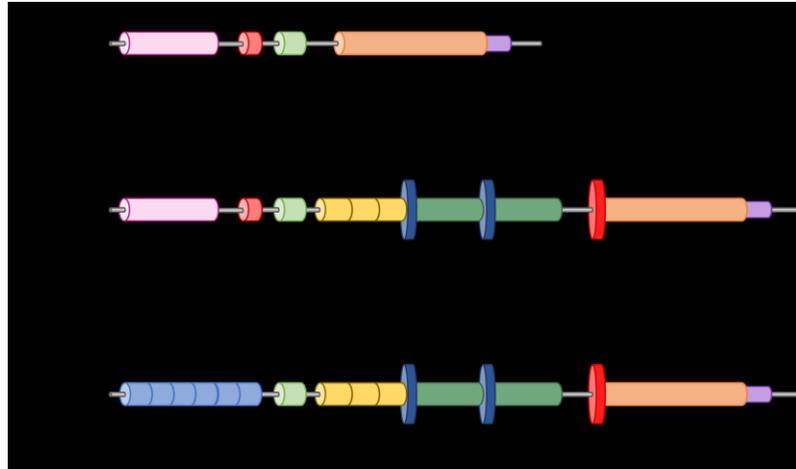


Figure 12 : Comparaison de la structure des promoteurs CMV, CMV5 et CR5. SD : site donneur de l'intron ; SA : site accepteur de l'intron ; tpl : séquence de tête tripartite ; enh : *enhancer* ; pA : signal de polyadénylation ; CAT : éléments de régulation de la transcription. (Adaptée de Mullick et al., 2006 [166] et Massie et al., 1998 [167])

Le promoteur EF-1 α , contrairement à d'autres promoteurs d'origine virale, a l'avantage d'avoir une forte activité dans diverses lignées cellulaires de mammifères [162]. De plus, contrairement au promoteur CMV, il donne une expression persistante du transgène *in vivo* [168]. En effet, le promoteur CMV est connu pour être susceptible à la méthylation, en particulier sur les îlots CpG, ce qui entraîne une répression de la transcription et réduit la production de la protéine d'intérêt [169]. Ce phénomène pourrait expliquer la grande variabilité de la force de ce promoteur observée dans différentes lignées cellulaires de mammifères [162].

- *Promoteurs inductibles*

Contrairement aux promoteurs constitutifs, actifs en tout temps, les promoteurs inductibles sont activés uniquement en présence d'un inducteur. Il existe divers systèmes inductibles en fonction de la nature de l'inducteur, tels que le système inductible à la chaleur dans le cas d'un choc thermique, le système inductible aux métaux lourds ou le système inductible aux corticoïdes. Cependant, en raison de leurs effets péritrophiques et de leurs hauts niveaux d'expression basale, des promoteurs inductibles plus efficaces ont été mis au point. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer le promoteur inductible à la tétracycline (tet), à la streptogramine et plus récemment le promoteur inductible au cumate [166, 170].

Pour qu'un système inductible soit efficace, il doit posséder certaines caractéristiques telles que la possibilité d'être finement régulé et hautement inductible. En effet, l'utilisation d'un inducteur spécifique non-toxique et bon marché doit permettre une expression élevée lors de l'induction. Cependant, il est important qu'en l'absence de l'inducteur, le niveau basal d'expression, s'il a lieu, soit faible afin de permettre un ratio *ON/OFF* élevé. De plus, l'inducteur doit être simple à utiliser et permettre de réguler le système d'expression selon un mode dose-réponse [171]. Enfin, il est important que le système inductible soit constitué d'éléments d'origine hétérologue à la cellule hôte, afin de ne pas interférer avec les voies de régulation génique de cette dernière [170].

- *Systèmes inductibles à la tétracycline*

Les systèmes d'expression inductibles à la tétracycline (tet) les plus utilisés dans les cellules de mammifères sont appelés Tet_{ON} et Tet_{OFF}.

Le système Tet_{OFF}, développé par les professeurs Hermann Bujard et Manfred Gossen, est construit à partir des éléments de l'opéron de résistance à la tétracycline, présent chez la bactérie *E. coli* (Figure 13) [172]. Ce dernier se base sur l'utilisation d'un transactivateur chimérique (tTA), formé par la fusion de la protéine TetR (répresseur de la tétracycline) avec le transactivateur du virus de l'*herpès simplex* (VP16). Le tTA, capable de se lier à l'ADN sur une séquence tetO spécifique, est capable d'activer un promoteur composé de sept séquences tetO (tetO₇) suivi du promoteur minimal (boîte TATA) du CMV. En l'absence de tétracycline (ou de l'un de ses analogues tels que la doxycycline), le tTa se lie à l'ADN et active l'expression du gène d'intérêt. À l'inverse, en cas d'ajout de la tétracycline dans le milieu, cette dernière se lie au tTA, entraînant l'inactivation du promoteur [172].

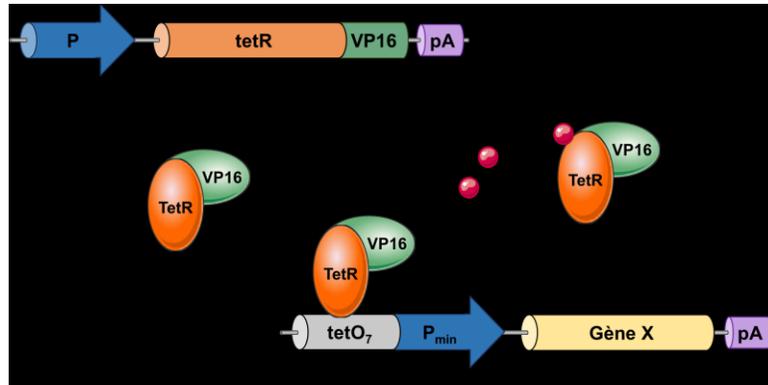


Figure 13 : Configuration TET_{OFF} du système inductible à la tétracycline. (Adaptée de Fussenegger, 2001 [170])

Le système Tet_{ON} est une configuration inverse du système Tet_{OFF}. En effet, dans ce cas, les caractéristiques allostériques du tTA ont été modifiées afin de former le tTA inverse (rtTA) (Figure 14). Ainsi, en présence de tétracycline (ou de l'un de ses analogues), le rtTA se lie à l'ADN et active l'expression du gène d'intérêt. En l'absence de tétracycline, le rtTA se dissocie du promoteur et l'expression du gène d'intérêt est réprimée [170].

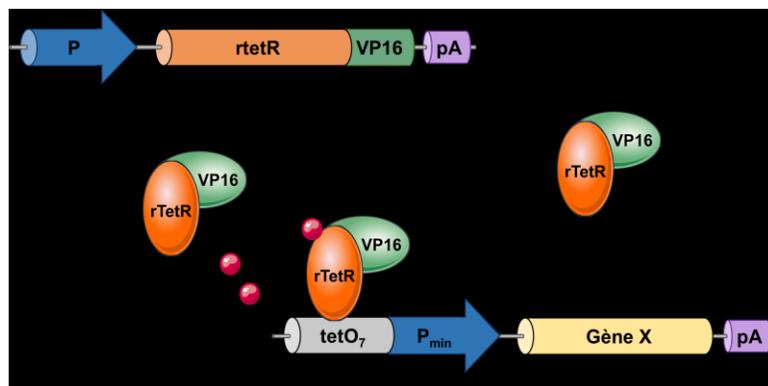


Figure 14 : Configuration TET_{ON} du système inductible à la tétracycline. (Adaptée de Fussenegger, 2001 [170])

D'autres configurations différentes de la configuration Tet_{ON}, mais dans lesquelles l'ajout de tétracycline active l'expression de la protéine recombinante, ont été développées. Parmi celles-ci, la configuration T_{REX}, dans laquelle un dimère tetO₂ a été placé entre le promoteur CMV et le transgène à exprimer (Figure 15). Ainsi, en l'absence de tétracycline, le

TetR se lie de façon spécifique au dimère, menant à l'inhibition de la transcription du transgène. À l'inverse, en présence de tétracycline, le TetR se dissocie du dimère et la transcription peut avoir lieu. Dans une étude, Jones *et al.* ont démontré que comparativement à un système constitutif, l'utilisation du système T_{REX} dans les cellules HEK293 permettait la sélection de clones produisant de faibles niveaux de transferrine, une protéine difficile à exprimer qui s'accompagne d'une surexpression de la protéine de stress BiP et d'un ralentissement de la croissance cellulaire [173].

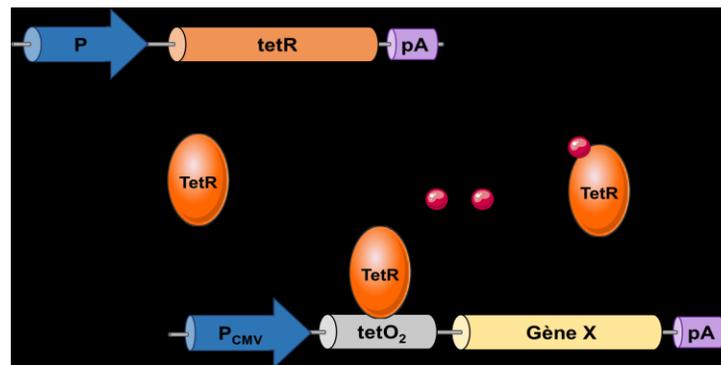


Figure 15: Configuration T_{REX} du système inductible à la tétracycline. (Adaptée de Jones et al., 2005 [173])

Plus récemment, une équipe de la compagnie Genentech a démontré que l'utilisation d'une configuration similaire au T_{REX}, mais dans laquelle une seule séquence tetO a été placée en amont du promoteur CMV, permettait l'expression élevée dans les cellules CHO d'une version optimisée de la désoxyribonucléase I humaine (*hDNase I*), connue pour être toxique et instable. Ils ont ainsi pu atteindre des titres en *hDNase I* de l'ordre de 0.6 g/L [174]. Dans une seconde étude, ils ont démontré l'intérêt de ce système inductible pour pallier aux problèmes d'instabilité liée à la protéine recombinante elle-même mais aussi après décongélation des lignées productrices. Dans cet article, les clones contenant le système tétracycline ont permis l'expression de 1.7 à 2 g/L d'anticorps [175].

D'autres travaux, visant à améliorer le système inductible à la tétracycline ont été effectués. Ainsi, Massie *et al.* ont développé un promoteur inductible à la tet (TR5), qui comprend sept séquences opératrices (TetO₇) auxquelles le transactivateur tTA (*tetracycline transactivator*) peut se lier [167].

- *Système inductible au cumate*

Le système inductible au cumate, développé par Mullick *et al.*, est dérivé des opérons *cym* et *cmt* présents chez la bactérie *Pseudomonas putida F1*. L'opéron *cym* est responsable de la conversion du p-cymène (ou p-isopropyltoluène, une molécule trouvée dans les huiles volatiles de plusieurs espèces de plantes) en p-cumate. L'opéron *cmt*, quant à lui, contient les gènes impliqués dans la conversion du p-cumate (p-isopropylbenzoate) en isobutyrate, pyruvate et acétyl-coenzyme A [176]. La régulation de l'expression de ces gènes se fait via la fixation du répresseur CymR (*Cymene Repressor*) sur des séquences opératrices appelées CuO (*Cumate Operator*), en présence de cumate ou de cymène, les molécules effectrices. Le domaine de liaison du CymR à l'ADN se situe dans sa partie N-terminale et consiste en un domaine hélice-coude-hélice [166].

Ces propriétés ont été utilisées afin de contrôler l'expression des protéines recombinantes dans les cellules de mammifères, notamment via le développement du promoteur CR5, inductible au cumate. En effet, ce dernier contient les mêmes éléments que le promoteur CMV5 à partir de la boîte TATA, ainsi que six répétitions des séquences opératrices CuO placées en amont du promoteur minimal hCMV (boîte TATA) et du gène à transcrire (Figure 12). Plusieurs configurations du système inductible au cumate ont été développées.

- **La configuration « répresseur »** : dans cette configuration, la séquence CuO est placée en aval du promoteur constitutif CMV5 (Figure 16). En l'absence de cumate, la liaison du CymR à la séquence opératrice CuO empêche la transcription du gène d'intérêt. La répression est levée par l'ajout de cumate dans le milieu. En effet, celui-ci se lie par allostérie au CymR, entraînant un changement de conformation du répresseur et permettant la transcription du gène [166].

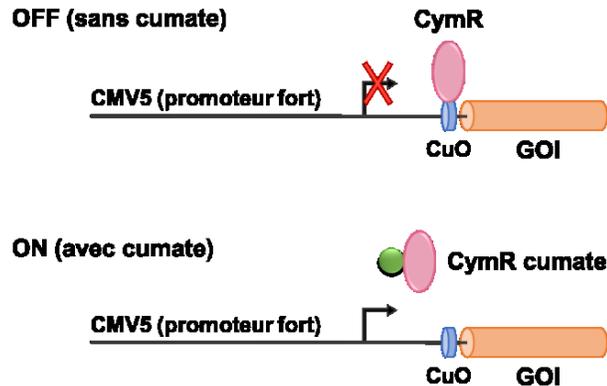


Figure 16 : Configuration « répresseur » du système inductible au cumate. (Adaptée de Mullick et al., 2006 [166])

- La configuration « transactivateur » :** dans cette configuration, utilisant le promoteur CR5, l'activation de la transcription se fait en l'absence de cumate, via la liaison du transactivateur (*cumate transactivator*, cTA) sur la région correspondant aux six répétitions des séquences opératrices CuO, placées en amont du promoteur minimal hCMV (Figure 17). Le cTA est une molécule chimérique formée par la fusion du CymR et du domaine activateur de la protéine activatrice VP16 du virus *Herpes simplex*. Un peptide de cinq glycines forme le lien entre le CymR et le VP16. L'ajout de cumate dans le milieu empêche la fixation du cTA au promoteur CR5 et par conséquent la transcription [166]. Cette configuration a été utilisée pour le développement de la lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable le cTA (CHO-cTA). Dans cette lignée, Gaillet *et al.* ont montré que le promoteur CR5 est supérieur au promoteur constitutif CMV5, avec une expression de la GFP six fois plus élevée [177]. Dans une seconde étude, des productions de SEAP de l'ordre de 65 mg/L ont été obtenues dans les CHO-cTA [178].

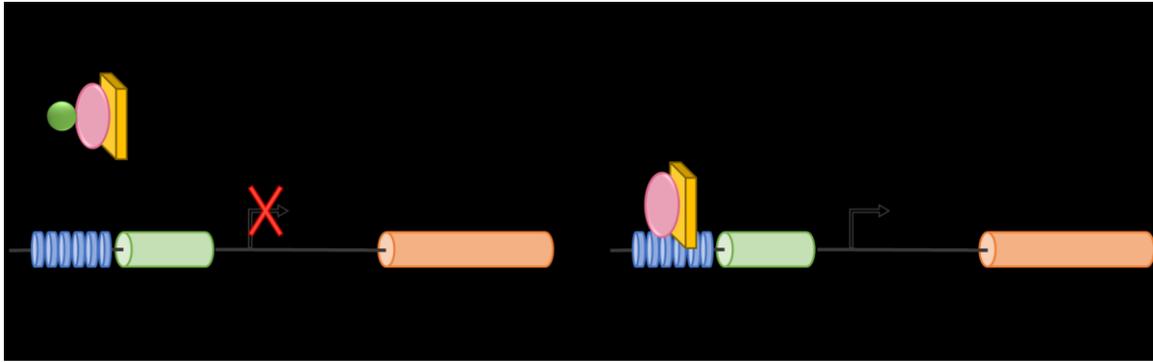


Figure 17 : Configuration « transactivateur » du système inductible au cumate. (Adaptée de Mullick et al., 2006 [166])

- Configuration « transactivateur inversé »** : contrairement à la configuration précédente, la configuration « transactivateur inversé » a été développée afin de permettre l'induction par ajout du cumate dans le milieu, facilitant ainsi la mise à l'échelle (Figure 18). Pour cela, une configuration inverse du cTA (*reverse cumate transactivator*, rcTA), ayant la capacité de se lier aux séquences CuO en présence de cumate, a été développée via une mutagenèse aléatoire au niveau du domaine de liaison du CymR à l'ADN. Dans les cellules CHO, les niveaux d'expression obtenus à partir de cette configuration sont similaires à ceux obtenus à partir du cTA. Cependant, le ratio *ON/OFF* est très faible (2 à 3 fois), en raison d'une expression basale élevée sans ajout du cumate [166].

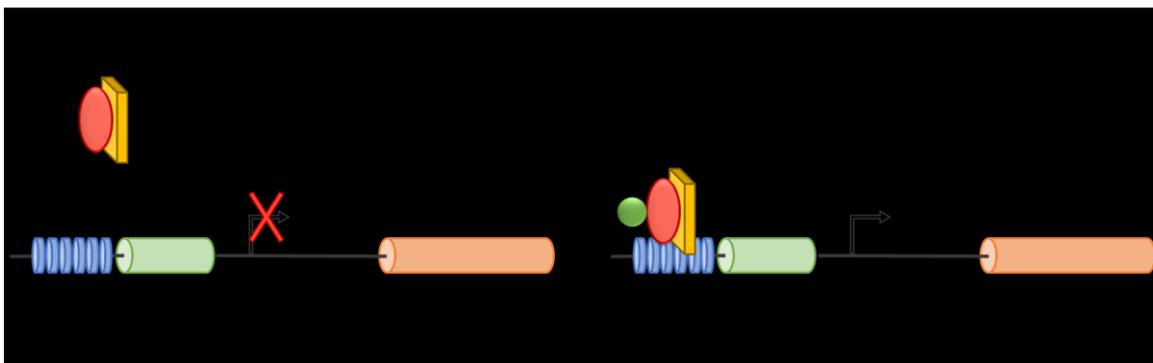


Figure 18 : Configuration « transactivateur inversé » du système inductible au cumate. (Adaptée de Mullick et al., 2006 [166])

- **Configuration « inverse double régulée »** : cette configuration a été développée afin de limiter le niveau élevé d'expression basale et d'augmenter ainsi le ratio *ON/OFF* (Figure 19). Comme pour la configuration précédente, le rcTA se lie au promoteur CR5. Cependant, la différence repose sur la régulation de l'expression du rcTA via le promoteur CMV5-CuO. Ainsi, en l'absence de cumate, le CymR réprime l'expression du rcTA, menant à la diminution du niveau basal de transcription. Dans le cas où le cumate est ajouté, celui-ci empêche la fixation du CymR à la séquence CuO, permettant alors l'expression du rcTA puis l'activation de l'expression du gène d'intérêt via la fixation du rcTA sur le promoteur CR5. La configuration « inverse double régulée » a été utilisée pour le développement des lignées CHO-Cum2 et CHO^{BRI/rcTA}, toutes deux exprimant de façon stable le répresseur CymR sous le contrôle du promoteur CMV5 et le rcTA sous le contrôle du promoteur CMV5-CuO. La génération de populations hétérogènes stables à partir de la lignée CHO-Cum2 a permis d'atteindre des titres de 235 mg/L d'hCD200Fc, 160 mg/L d'anticorps chimérique B43 et 206 mg/L d'EPO, avec des ratios *ON/OFF* de 6, 16 et 74 respectivement [178].

2.5.1.2 Les systèmes de sélection

Les deux systèmes de sélection les plus couramment utilisés dans la cellule CHO sont les systèmes dihydrofolate réductase (DHFR) et glutamine synthétase (GS) [57].

Le système d'expression DHFR, est basé sur le gène *dhfr* codant pour l'enzyme DHFR. Cette dernière catalyse la conversion du dihydrofolate (forme active du folate) en tétrahydrofolate, un intermédiaire impliqué dans la voie de synthèse *de novo* de la purine et de la thymidine. Le méthotrexate (MTX) est un analogue du folate, qui inhibe l'enzyme DHFR en se liant à celle-ci. La sélection est effectuée en cultivant les cellules dans un milieu dépourvue d'hypoxanthine et de thymidine et contenant du MTX [118]. Ainsi, les cellules sélectionnées sont celles ayant intégré dans leur génome le plasmide contenant le gène *dhfr* et le gène codant pour la protéine d'intérêt. L'utilisation de concentrations croissantes de MTX permet un processus d'amplification génique menant à une augmentation de l'expression du transgène. En effet, pour survivre, les cellules transfectées contenant le gène *dhfr* augmentent leur capacité de synthèse de la DHFR en amplifiant le gène *dhfr*. Or, l'unité d'amplification étant beaucoup plus

grande (de 100 à 3000 kilobases (kb)) que la taille du gène *dhfr*, le gène d'intérêt, localisé sur le même vecteur d'expression, est également amplifié [179]. Cette amplification du nombre de copies du gène d'intérêt permet d'obtenir une expression transgénique élevée [180]. Cependant, dans certains cas, l'augmentation de la productivité des cellules n'est pas linéaire avec la concentration de MTX [181]. De plus, la sélection via ce système est longue et fastidieuse, et une perte de productivité a été observée pour des clones cultivés en l'absence de MTX, due à une perte de copies du transgène [182].

La GS est une enzyme essentielle catalysant la biosynthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammoniaque dans les cellules de mammifères. La méthionine sulfoximine (MSX) est un inhibiteur de la GS, utilisé pour sélectionner les cellules ayant incorporé une ou plusieurs copies du vecteur d'expression contenant le gène codant pour la GS ainsi que le gène d'intérêt. Dans les cellules CHO exprimant de la GS endogène, la sélection est effectuée en cultivant les cellules dans un milieu dépourvu de glutamine et contenant du MSX. Ainsi, les cellules sélectionnées sont celles ayant ajusté leur métabolisme afin d'avoir un équilibre entre la quantité de MSX dans le milieu et la quantité de GS surexprimée. Initialement, la sélection basée sur le système GS/MSX se déroulait en deux tours de sélection, le premier utilisant des concentrations de MSX comprises entre 25 et 50 μM et le second permettant une amplification génique avec des concentrations comprises entre 100 et 1000 μM . Cependant, des études ont démontré qu'un seul tour de sélection avec des concentrations comprises entre 25 et 50 μM suffisait à sélectionner des cellules hautement productrices malgré un nombre de copies plus faible [183]. Ainsi, la sélection avec le système GS est plus rapide qu'avec le système DHFR [184]. Récemment, la compagnie Lonza a généré et commercialisé la lignée cellulaire CHOK1SV GS-KO™, dans laquelle le gène codant pour la GS endogène a été éliminé afin d'augmenter la stringence de la sélection. L'utilisation de cette lignée cellulaire a permis d'augmenter de six fois la fréquence de clones ayant des productivités supérieures à 2 g/L, comparée à la lignée cellulaire CHOK1 originale sélectionnée dans les mêmes conditions [185]. Par la suite, la même équipe a démontré qu'une diminution de 44 à 61 % de l'expression de la GS présente sur le vecteur d'expression, via l'utilisation d'une forme tronquée du promoteur SV40, permettait la sélection de clones produisant 3.5 g/L de la protéine d'intérêt, par rapport à des clones contenant la forme non tronquée de SV40 ne produisant qu'un maximum de 1.5 g/L

[186]. La délétion du gène codant pour la GS dans la lignée cellulaire CHOK1 permettrait également de sélectionner des clones avec des niveaux élevés de production sans ajout de MSX, permettant ainsi d'éviter des étapes supplémentaires de purification afin d'éliminer toute trace de MSX dans le produit fini [62, 186].

2.5.1.3 Les S/MAR

Afin de maintenir le transgène dans une configuration active, la chromatine peut être remodelée par des éléments génétiques. Généralement, deux composantes de la transcription sont utilisées pour augmenter l'expression des gènes : les facteurs agissant en *trans* (facteurs de transcription) et les éléments agissant en *cis*. Jusqu'à présent, un certain nombre d'éléments agissant en *cis* ont été appliqués aux cellules CHO pour améliorer l'expression et la stabilité de la production de protéines. Les éléments agissant en *cis* les plus utilisés dans la culture de cellules CHO sont les régions d'attachement à la matrice (S/MAR). Les MAR sont des séquences d'ADN génomique servant de points de fixation à l'intérieur de l'ADN qui facilitent l'ancrage de la structure de la chromatine à la matrice nucléaire pendant l'interphase [187]. Ainsi, les MAR maintiennent la structure de la chromatine transcriptionnellement active grâce à la création de boucles de chromatine. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des MAR tels que le MAR de la β -globine humaine, le MAR du lysozyme de poulet et le SAR de l'IFN- β comme éléments actifs *cis* favorise l'expression des gènes et augmente la présence de clones forts producteurs [188-192].

2.5.2 Optimisation des bioprocédés

Au cours des trois dernières décennies, les améliorations apportées aux lignées cellulaires, au contrôle des procédés de culture et aux formulations de milieux ont permis une multiplication par 100 des titres de protéines produites [55]. En effet, à la fin des années 1980, une culture en mode cuvée standard durait environ 7 jours et permettait d'atteindre des concentrations cellulaires d'environ 2×10^6 cellules/mL et des titres de protéines de l'ordre de 50-100 mg/L [193]. De nos jours, les cultures en mode cuvée-alimentée durent en moyenne 3

semaines et peuvent atteindre des concentrations cellulaires maximales excédant souvent 25×10^6 cellules/mL et des titres de 10-13 g/L [194].

Le titre final de la protéine recombinante dépend de deux paramètres de culture, à savoir, (i) la productivité spécifique de la cellule et (ii) l'intégrale de la densité de cellules vivantes (*integral viable cell density, IVCD*). De ce fait, l'augmentation de la production des cellules CHO doit se concentrer sur ces deux paramètres. Cependant, la plupart des stratégies développées ont créé un environnement qui maximise la croissance cellulaire à défaut de maximiser la productivité spécifique, conduisant alors à la génération d'une importante biomasse de cellules produisant des niveaux modérés de protéine [195].

Bien que de nombreux moyens aient été mis en place pour augmenter la productivité spécifique, ceux-ci s'accompagnent souvent d'une forte réduction de la croissance cellulaire. Cette corrélation apparemment inverse entre la productivité spécifique et la croissance cellulaire a constitué la base d'une stratégie de contrôle de la prolifération visant à améliorer l'expression des protéines recombinantes [196]. La culture cellulaire "biphasique" est l'une des méthodes permettant de contourner l'inconvénient d'une densité cellulaire plus faible. Dans ce mode de culture, la croissance cellulaire n'est pas limitée durant une première phase, permettant ainsi l'accumulation d'une densité cellulaire viable, puis durant une seconde phase, le cycle cellulaire est arrêté pour permettre une période prolongée de productivité élevée. Cette stratégie est basée sur l'idée qu'une cellule sépare nécessairement les ressources nécessaires à la production de la protéine recombinante, des ressources nécessaires à la génération de biomasse cellulaire [141].

La diminution de la température de culture est un des moyens de contrôle de la prolifération permettant le ralentissement ou l'arrêt de la division cellulaire sans induire la mort cellulaire. En effet, l'hypothermie est très utilisée afin d'augmenter la productivité spécifique des cellules. De plus, ce moyen est particulièrement avantageux puisqu'il prolonge efficacement la longévité de la culture. Le mécanisme par lequel la production de protéines recombinantes est augmentée à basse température demeure incertain. En effet, bien que l'hypothèse la plus courante soit que l'augmentation de la production de protéines recombinantes à basse température soit due à l'accumulation des cellules en phase G1 [170, 197, 198], d'autres études ont montré que cette amélioration serait principalement due à des niveaux élevés d'ARNm plus

stables mais aussi que la cellule en état d'hypothermie peut présenter une productivité associée à la croissance [199-201].

Du point de vue des bioprocédés de production, les promoteurs inductibles présentent de nombreux avantages pour la production de protéines recombinantes à grande échelle. En effet, ces systèmes offrent la possibilité de découpler la phase de croissance et de production en maintenant le niveau d'expression de la protéine d'intérêt à un niveau basal durant l'accumulation de la biomasse cellulaire. L'induction de la protéine recombinante peut alors se faire à de hautes concentrations cellulaires. Cette caractéristique est très utile pour la production de protéines toxiques pour la cellule dont l'expression nécessite d'être activée en fin de culture [202].

2.5.3 Optimisation des lignées cellulaires par les micro-ARN

Outre l'optimisation des vecteurs d'expression, des bioprocédés et des milieux de culture, de nombreux progrès dans les technologies d'ingénierie des cellules ont permis l'amélioration des lignées cellulaires productrices CHO. Ces améliorations concernent principalement la croissance, la résistance à l'apoptose, le métabolisme, la productivité ou la capacité d'exprimer des r-protéines avec des profils de glycosylation adaptés. Différentes approches peuvent être envisagées, permettant la surexpression de gènes bénéfiques, ou à l'inverse l'invalidation de produits génétiques désavantageux pour la production de protéines hétérologues par *knock-out* génomique ou par *knock-down* [203].

Concernant cette dernière approche, les microARN (miARN), découverts dans les années 90, sont devenus des outils d'ingénierie cellulaire de pointe, présentant un grand potentiel dans le développement de lignées cellulaires CHO optimisées. Les miARN sont de petits ARN endogènes non codants qui modulent l'expression génique post-transcriptionnelle dans les cellules eucaryotes, et qui sont très bien conservés d'une espèce à l'autre [204]. Un seul miARN peut moduler jusqu'à des centaines d'ARNm différents et on estime que la plupart des ARNm sont des cibles pour les miARN [205]. Ils ont également pour avantage de ne pas ajouter une charge traductionnelle supplémentaire pour les cellules productrices, tout en étant capable d'orchestrer des réseaux de gènes complexes de manière coordonnée. Ainsi, des

multitudes de voies régulées par les miARN dans les CHO peuvent être exploitées, telles que la machinerie de production de protéines, la voie sécrétoire, le cycle cellulaire, le métabolisme ou la mort cellulaire représentée par l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie. Récemment, Jadhav *et al.*, ont montré une augmentation de la productivité d'environ trois fois pour la protéine de fusion EPO-Fc dans une lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable miR-17 [206]. Dans une autre étude récente, Fischer *et al.* ont étudié l'avantage d'utiliser les miARN pour le développement de lignées cellulaires produisant des protéines difficiles à exprimer. En effet, les résultats présentés montrent que l'expression stable de miR-557 dans une lignée cellulaire CHO entraîne une augmentation de la fréquence de clones fort-producteurs comparée à une lignée cellulaire contrôle et cela pour la production de deux anticorps difficiles à exprimer, facilitant ainsi l'étape de criblage. De plus, les titres obtenus à partir de la lignée cellulaire miR-557 sont significativement supérieurs en culture en mode cuvée-alimentée. Malgré le succès de ces outils pour améliorer les lignées cellulaires, les protéines codées à partir des gènes cibles de ces miARN sont souvent largement inconnus et ne sont généralement identifiés que plus tard, voire pas du tout [207]. Par conséquent, depuis peu, de nouvelles approches visent à identifier les miARN responsables de la régulation d'une protéine donnée. Ainsi, en utilisant la technique miR-CATCH, Griffith *et al.* ont réussi pour la première fois à identifier des miARN (miR-124-3p et miR-19b-3p) régulant la protéine cible XIAP, connue pour réduire l'apoptose dans la cellule CHO [207].

Chapitre 3 Développement et optimisation de la plateforme de production rapide via les populations hétérogènes stables CHO^{BRI/rcTA}

3.1 Présentation de l'article

Ce chapitre reprend l'article de recherche intitulé « *Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch* » et publié le 10 août 2017 dans le *Journal of Biotechnology*, volume 255, pages 16-27, DOI 10.1016/j.jbiotec.2017.06.009

Au cours de ce travail, la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA} a été combinée au vecteur plasmidique pTT comportant le vecteur inductible CR5, afin de développer une plateforme performante pour la production de protéines recombinantes en *pools* stables. Diverses optimisations ont été réalisées notamment au niveau de la topologie de l'ADN transfecté, de la concentration en agent de sélection MSX ainsi que dans la concentration de l'inducteur cumate. Ceci a permis de générer en moins de 4 semaines à partir de la transfection, des *pools* capables de produire 0.35 g/L de rituximab et 0.9 g/L de protéine de fusion hCD200Fc. La stabilité des *pools* après un mois en culture ainsi qu'après un cycle de congélation/décongélation a également été évaluée. Puis, la qualité de la protéine rituximab et de la protéine hCD200Fc produits à partir des *pools* a été comparée à la qualité des protéines exprimées à partir d'un clone stable. Enfin, la force du promoteur inductible CR5 a été comparée avec deux autres promoteurs constitutifs couramment utilisés dans l'industrie, le CMV5 et le EF1 α -HTLV.

3.2 Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch

Adeline Poulain^{a,b}, Sylvie Perret^a, Félix Malenfant^a, Alaka Mullick^a, Bernard Massie^{a,b} and Yves Durocher^{a,c}*

^a National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, QC H4P 2R2, Canada.

^b Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

^c Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

3.3 Abstract

To rapidly produce large amounts of recombinant proteins, the generation of stable Chinese hamster ovary (CHO) cell pools represents a useful alternative to large-scale transient gene expression (TGE). We have developed a cell line (CHO^{BRI/rcTA}) allowing the inducible expression of recombinant proteins, based on the cumate gene switch. After the identification of optimal plasmid DNA topology (supercoiled vs linearized plasmid) for PEIproTM mediated transfection and of optimal conditions for methionine sulfoximine (MSX) selection, we were able to generate CHO^{BRI/rcTA} pools producing high levels of recombinant proteins. Volumetric productivities of up to 900 mg/L were reproducibly achieved for a Fc fusion protein and up to 350 mg/L for an antibody after 14 days post-induction in non-optimized fed-batch cultures. In addition, we show that CHO pool volumetric productivities are not affected by a freeze-thaw cycle or following maintenance in culture for over one month in the presence of MSX. Finally, we demonstrate that volumetric protein production with the CR5 cumate-inducible promoter is three- to four-fold higher than with the CMV or hybrid EF1 α -HTLV constitutive promoters. These results suggest that the cumate-inducible CHO^{BRI/rcTA} stable pool platform is a powerful and robust system for the rapid production of gram amounts of recombinant proteins.

Keywords: CHO; Polyethylenimine; Methionine sulfoximine; Cell pools; Recombinant proteins; Inducible expression system

3.4 Introduction

Since the past decade, over half of the biopharmaceuticals approved by the Food and Drug Administration (FDA) have been produced in mammalian-based expression systems, with a majority in Chinese hamster ovary (CHO) cells [6]. The ability to carry out efficient post-translational modifications, documented safety and their ease to scale-up in bioreactors all contribute to CHO cell popularity for manufacturing biologics [42, 50]. However, despite many advantages, the development of an efficient stable cell line, producing high level of recombinant protein, is a labour-intensive process that typically requires from 4 to 6 months. To reduce the resources and time for early drug development phase, transient gene expression (TGE) is commonly used to rapidly produce moderate amounts of material [47, 208-210]. Using human embryonic kidney (HEK) 293 cells, the preferred host for TGE due to their high transfection efficiency, some studies have reported antibody production levels between 600 mg/L to 1 g/L [68, 73]. However, proteins produced in HEK293 cells are known to exhibit different glycosylation patterns than if produced in CHO cells, potentially resulting in changes in biophysical or functional properties [82, 211]. Thus, preliminary studies performed with material generated in HEK293 cells that potentially differ from CHO-produced material that is typically used in later development phases could adversely affect the outcomes of the project. Although historically TGE yields in CHO cells have been relatively low [70, 210], recent improvements in cell engineering, culture medium and feeds have enabled the expression of recombinant protein at levels of up to 2 g/L [77]. Nonetheless, issues with large scale TGE in CHO cells remain such as the high plasmid DNA requirement that restricts the volume of cell culture to a few liters, titers that are typically much lower than with stable cell lines, and variable process robustness. Stably transfected pool, a method consisting of the rapid selection of a heterogeneous CHO cell population stably expressing integrated transgene, represents a practical and cost-effective complement to TGE, especially when recombinant proteins are needed in large amounts. Indeed, large-scale production from stable pools can be easily achieved following cell culture expansion, thus restricting the amount of DNA plasmid needed for the

initial transfection. Previous studies have reported the successful scale up of pools expressing monoclonal antibody (mAb) to a 200 L bioreactor [84], and the achievement of volumetric yields up to 800 mg/L for two therapeutic proteins at the 1L-scale [86]. More recently, Rajendra et al., 2016 [87] reported the use of piggyBac transposon-based gene delivery for the generation of stable CHO pools able to produce over 7 g/L of antibody in less than 5 weeks under optimized conditions, although pool's stability over time was not examined in this study. Given that transgene integration in the host cell genome is a random phenomenon, and because transcriptional variation can occur as a result of integration site context, stable pools are usually composed of a very heterogeneous CHO clones population in terms of growth rates and protein expression levels [212, 213]. However, high productivity clones can be isolated from the pools and used for later stable cell lines development. Thus, host cell line, expression vector and culture medium typically can remain the same throughout the early and late drug development phases, allowing the production of material with more consistent quality attributes from preclinical to clinical studies.

High level of recombinant protein production requires a well optimized expression system. Among the key elements composing this system, such as the host cell line, selection marker stringency, culture medium and feeds, the use of a strong promoter to drive expression of the cDNA is important. Although, constitutive promoters are predominant in the biopharmaceutical industry, some studies reported the use of inducible promoters for the expression of several proteins in CHO cells [175, 178, 212]. The cumate gene switch system [166], derived from the cymene operon of *Pseudomonas putida*, is one example of an inducible system used for the production of recombinant proteins [177, 178]. A CHO cell line containing the cumate gene switch elements (CHO^{Cum2}) was transduced with lentiviral vectors for the generation of stable pools able to produce volumetric yields of up to 200 mg/L of protein in less than two months, starting from the cDNA. Even if this method is efficient, lentiviral vectors are cumbersome to manipulate (biosafety level 2) and the process is lengthy as it requires recombinant virus generation, expansion, titration and storage. The aim of this study was to evaluate the combination of a new CHO cell line, harbouring components of the reverse cumate transactivator inducible system, the CHO^{BRI/rcTA} cell line, with transfection of plasmid vectors containing the cumate gene switch promoter (CR5) for the generation of stable CHO pools. In

less than 30 days from the day of transfection, we were able to generate CHO^{BRI/rcTA} pools producing up to 900 mg/L of hCD200Fc, a fusion protein consisting of the human CD200 extracellular domain linked to a human Fc, and up to 350 mg/L for Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody, in non-optimized fed-batch process. Moreover, we have shown that freeze-thaw and maintenance of the pools in culture for more than one month had no effect on their volumetric productivities. Finally, the superiority of the CR5 promoter in CHO^{BRI/rcTA} stable pools was demonstrated by comparing it with both CMV5 and the hybrid EF1 α -HTLV constitutive promoters. Thus, the generation of stable CHO^{BRI/rcTA} pools is a rapid and efficient process to rapidly produce large amounts of recombinant proteins.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Generation of the CHO^{BRI/rcTA} cell line and culture condition

The CHO^{BRI} cell line is derived from CHO DUXB11 [214] and was adapted to suspension culture in serum-free medium. The CHO^{BRI/rcTA} cell line used in this study stably expresses the cymene repressor (CymR) and the cumate reverse transactivator (rcTA) [166]. Briefly, the CHO^{BRI} cell line was transfected with pTT54-rcTA plasmid containing the chimeric rcTA transactivator. Following transfection, cells were plated at 500-2000 cells/well in 96-well plates and selected with puromycin (10 μ g/mL). The puromycin-resistant colonies were expanded, duplicated and tested for cumate inducible GFP expression by infection with adenoviral vector AdCR5-GFP in the presence or absence of cumate, as described previously [166]. The best clone showing highest GFP expression following cumate induction was selected and transfected with the pTT82-CymR plasmid containing the cymene repressor CymR. Following selection with G418 (600 μ g/mL) (Wisent Inc. St-Bruno, Québec, Canada) the pool was plated at 1750 cells/mL in a CloneMatrix semi-solid medium (Molecular Devices, Menlo Park, CA) containing CD CHO AGT medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), 4 mM L-glutamine (Hyclone Laboratories Logan, Utah, USA), 1X CloneXL reagent (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) as described previously [111]. A total of 80 colonies were picked after 7 or 8 days of growth using the CellCelectorTM device (Aviso, Jena,

Germany). These colonies were allowed to grow for a few days, duplicated and then tested again using the adenoviral vector AdCR5-GFP in the presence or absence of cumate to monitor the cumate-inducible expression. One of the resulting subclones was chosen because it had the highest levels of GFP expression in the presence of cumate and the lowest level of basal expression in the absence of cumate. The resulting cell line was thus named CHO^{BRI/rcTA}. Following transduction with a lentiviral vector encoding GFP under the CR5 promoter, absolute cumate-induced expression level of GFP was similar in both CHO^{Cum2} [178] and CHO^{BRI/rcTA} cell lines (data not shown).

Cells were grown in PowerCHO2 chemically defined medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 4 mM L-glutamine. The cells were passaged three times per week at a cell density of 0.1×10^6 to 0.2×10^6 cells/mL in 125 mL or 250 mL Erlenmeyer flasks (Corning, NY, USA), with 25 or 50 mL culture medium, respectively, and were grown at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm). Cell number and viability were measured with the Cedex Innovatis' automated cell counter Cedex Analyzer (Roche, Laval, Qc) using the trypan blue exclusion method.

3.5.2 Cumate

Cumate was purchased from Ark Pharm Inc. (Arlington Heights, IL, USA) and dissolved at 2 mg/ml in 95 % (v/v) ethanol. The cumate solution was aliquoted in sterile screwcap Eppendorf tubes and stored at -20 °C for up to 6 months.

3.5.3 Plasmid vectors

All the plasmid vectors used in this study (Table 6) were derived from the pTT vector [79] in which a short sequence from the scaffold attachment region 3 (SAR3) of the human interferon $\alpha 2$ gene and the human glutamine synthetase (GS) gene driven by the SV40 promoter were inserted. The hCD200Fc [178] is a fusion protein consisting of the human CD200 extracellular domain linked to a human Fc. The gene-optimized (CHO codon-biased) anti-CD20 Rituximab light chain (LC) and heavy chain (HC) sequences were from Genent®. The GFP gene used in this study was from QBiogene (Carlsbad, CA, USA). The cumate inducible CR5

promoter was developed by Mullick et al., 2006 [166], the CMV5 promoter is an optimized human cytomegalovirus (CMV) promoter developed by Massie et al., 1998 [164] and the EF1 α -HTLV promoter is a composite promoter comprising the Elongation Factor-1 alpha (EF-1 α) core promoter [215] and the R segment and part of the U5 sequence (R-U5') of the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Type 1 Long Terminal Repeat [165] and was obtained from Invivogen (San Diego, CA, USA). For Rituximab expression, LC and HC, carried on the same plasmid, were both independently expressed by the same CR5 promoter. All plasmids were amplified in *Escherichia coli* (DH5 α) and purified using an in-house low-endotoxin chromatographic method (unpublished). To generate linearized topology purified plasmids, these were cut by enzymatic digestion using the *PvuI-HF* enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Then, DNA was purified using the QIAquick PCR Extraction Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada). DNA was further precipitated by the addition of 0.1 volumes of 3 M sodium acetate pH 5.2 and 0.7 volumes of isopropanol and incubated for 15 min at room temperature. Samples were then centrifuged 20 min at 13000 rpm and DNA pellets washed with 70 % (v/v) ethanol and centrifuged again for 10 min. Finally, DNA pellets were dissolved in endotoxin free TE buffer and quantified by measuring absorbance at 260 and 280 nm.

Table 6: Plasmids used in this work.

Promoter	Plasmid name	Recombinant protein	Selection
CR5	pTT75-hCD200Fc	hCD200Fc	
	pTT96-RTXM	Rituximab (CR5:RTX-HC-CR5:RTX-LC)	
	pTT75-GFP	GFP	
CMV5	pTT71-hCD200Fc	hCD200Fc	Glutamine synthetase
	pTT117-RTXM	Rituximab (CMV5:RTX-HC-CMV5:RTX-LC)	
	pTT71-GFP	GFP	
EF1 α -HTLV	pTT115-hCD200Fc	hCD200Fc	
	pTT108-RTXM	Rituximab (EF1 α -HTLV:RTX-HC-EF1 α -HTLV:RTX-LC)	
	pTT115-GFP	GFP	
CMV5	pTT82-CymR	CymR	Neomycin
CMV5-Cuo	pTT54-rcTA	rcTA	Puromycin

3.5.4 pDNA transfection

Cells were transfected using linear polyethylenimine (PEIproTM) from Polyplus-Transfection (Illkirch, France). On the day of transfection, cells with viability greater than 98 % were centrifuged and resuspended at a density of 2×10^6 cells/mL in CD DG44 medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), supplemented with 4 mM L-glutamine and 0,1 % Kolliphor® P 188. The cell suspension was distributed in 6-well plates (1.8 mL/well). The DNA:PEIproTM complexes were prepared at a ratio of 1:5 (w:w), with a total of 2 μ g DNA per well to transfect in 100 μ L of complete culture medium. Equal volume of diluted PEIproTM (10 μ g per well to transfect) was added to the diluted DNA and the mixture was vortexed 4 s and incubated for 3 min at room temperature. Polyplexes were then added to the cells (200 μ L per well) and the plates were returned to the incubator at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm). For the transient GFP expression under the control of the CR5 promoter, expression was induced by adding 2 μ g/mL of cumate in the transfection media just before polypex addition.

3.5.5 Flow cytometry analysis

GFP expression was analysed 48 to 72 hours post-transfection (hpt) by flow cytometry using a BD LSRII cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Four hundred microliters aliquots of transfected cell culture were taken out from the 6-well plates and filtered through a 50 μm mesh Nitex tissue (Sefar Group, Heiden, CH). To determine the cell viability, 4 μL of a 1 mg/ mL propidium iodide (PI) solution in water (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) was added to each tube containing 400 μL of transfected cells. Each sample was measured with a minimum of 10 000 recorded events.

3.5.6 GS-MSX selection of CHO^{BRI/rcTA} cell pools

CHO^{BRI/rcTA} cell pools were generated by transfecting cells with the expression vectors as described above. The day after transfection, the cells were centrifuged for 5 min at 250 rpm and seeded at density of 0.5×10^6 cells/mL in selection medium (PowerCHO2 medium supplemented with 50 μM of methionine sulfoximine). Selection medium was replaced every 2-3 days during 14 to 18 days with inoculation at 0.5×10^6 cells/mL. Cell number and viability were measured with the Cedex Innovatis' automated cell counter Cedex Analyzer as described above. When cell viability reached greater than 95 %, pools were inoculated at 0.2×10^6 cells/mL in 125 or 250 mL Erlenmeyer flasks. A similar protocol was followed when generating CHO^{BRI/rcTA} cell pools with 0, 25, 75 and 100 μM of MSX.

3.5.7 Recombinant protein production

For the batch cultures, CHO^{BRI/rcTA} cell pools were inoculated in 125 mL Erlenmeyer flask at 0.3×10^6 cells/mL in 20 mL of BalanCD Growth A chemically defined medium (Irvine Scientific, Irvine, CA, USA) supplemented with 50 μM of MSX and incubated at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm). At day three post-inoculation, when cell density reached 3.5 to 4.5×10^6 cells/mL, expression of the recombinant protein was induced by adding 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cumate, followed by a temperature shift to 32 °C. Samples were collected at day 7-8 post-induction and recombinant protein titers were determined by pA-HPLC.

For the fed-batch cultures, CHO^{BRI/rcTA} cell pools were inoculated as described above. At day three post-inoculation, when cell density reached 3.5 to 4.5 x 10⁶ cells/mL, expression of the recombinant protein was induced by adding 2 µg/mL of cumate. MSX concentration was adjusted to 125 µM, and F12.7 feed (Irvine Scientific) was added followed by a temperature shift to 32 °C. Every 2-3 days, cultures were fed with 5 % (v:v) F12.7 and samples were collected for recombinant protein (pA-HPLC) and glucose concentration determination (VITROS 350, Orthoclinical Diagnostics, USA). Glucose was added to maintain a minimal concentration of 17 mM.

3.5.8 Recombinant protein quantification

Rituximab and hCD200Fc titers were determined by protein A high performance liquid chromatography (WATERS Corporation, Milford, MA) using a 2.1 mmD x 30 mmH, 104 µL, POROS® A20 column (Invitrogen, Grand Island, NY). Before their injection on the column at a flow rate of 2 mL/min, samples were filtered by centrifugation at 8000–11,000 xg for 3 min through a NANOSEP MF GHP 0.45 µm filter (PALL Life Sciences). Elution was performed using 0.15 M NaCl, pH 2.0, and UV detection was done at 280 nm. Quantification was done by integrating the surface under the elution peak and comparing against an IgG standard curve.

3.5.9 Freezing and thawing process

Cells in the exponential growth phase were centrifuged during 5 min at 250 rpm and suspended in PowerCHO2 medium containing 10 % DMSO. One milliliter aliquot was dispensed into cryovials and then placed in a –80 °C freezer. After 3 days, cryovials were transferred in liquid nitrogen. For thawing, cryovials were retrieved from the liquid nitrogen and immediately placed in a 37 °C water bath. When the cells were thawed, they were directly inoculated in 20 mL of PowerCHO2 medium supplemented with 50 µM of MSX in a 125 mL Erlenmeyer flask and incubated at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm).

3.5.10 Recombinant protein purification from cell culture supernatants

Cell cultures were centrifuged for 10 min at 3700 xg. The supernatants were collected, filtered using 0.22 µm filters (Millipore) and loaded on a 2 mL MabSelect SuRe column (GE Healthcare, Mississauga, ON) equilibrated in PBS. The column was washed with PBS and recombinant proteins were eluted with 100 mM citrate buffer pH 3.6. The fractions containing purified proteins were pooled and the buffer was exchanged against PBS on Econo-Pac® 10DG columns (Bio-Rad, Mississauga, ON). Purified proteins were sterilized by passing through 0.22 µm filters, aliquoted, quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI) and stored at -80 °C.

3.5.11 SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed with the purified proteins under reducing (50 mM DTT) and non-reducing conditions using NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gel (Life Technologies) with MOPS running buffer. At the end of the electrophoresis run, the gel was stained with Coomassie blue 0.02 %.

3.5.12 Analytical Size Exclusion Chromatography

To analyze the content of aggregates in purified proteins, analytical size-exclusion chromatography (SEC) analyses were performed with a Superdex 200 GL 5/150 column (GE Healthcare Life Sciences). The mobile phase consisted of PBS (pH 7.4), and the flow rate was 0.25 mL/min. Detection was performed with a UV detector set at 280 nm.

3.6 Results

3.6.1 Description of the CHO^{BRI/rcTA} cell line expression system

The CHO^{BRI/rcTA} cell line contains an inducible expression system developed from the reverse activator configuration of the cumate-gene switch [166] (Figure 19). This cell line stably expresses both the cymene repressor (CymR), able to bind to the specific CuO operator sequence in the absence of cumate, and the cumate reverse transactivator (rcTA). Upon transient or stable transfection, the expression of the gene of interest present in the plasmid vector is activated by the binding of the rcTA on the CR5 inducible promoter in the presence of cumate, a small non-toxic inducer. More precisely, into the CHO^{BRI/rcTA} cell line, expression of the rcTA is controlled by the CMV5-CuO promoter, where the binding operator site CuO is placed downstream of the CMV transcription initiation site. The binding of the CymR (constitutively expressed) to the CuO site prevents rcTA expression. Upon cumate binding, a conformational change in the CymR structure occurs making it no longer able to bind the CuO sequence, thus allowing rcTA expression. The rcTA is composed of the VP16 activation domain fused to the reverse CymR (able to bind to the CuO sequence in presence of cumate). In the presence of cumate, rcTA binds the CR5 promoter which is composed of six repeats of the CuO operon sequence, placed upstream of the TATA box of the cytomegalovirus (CMV) promoter, and induces expression of the cDNA placed downstream of the CR5 promoter.

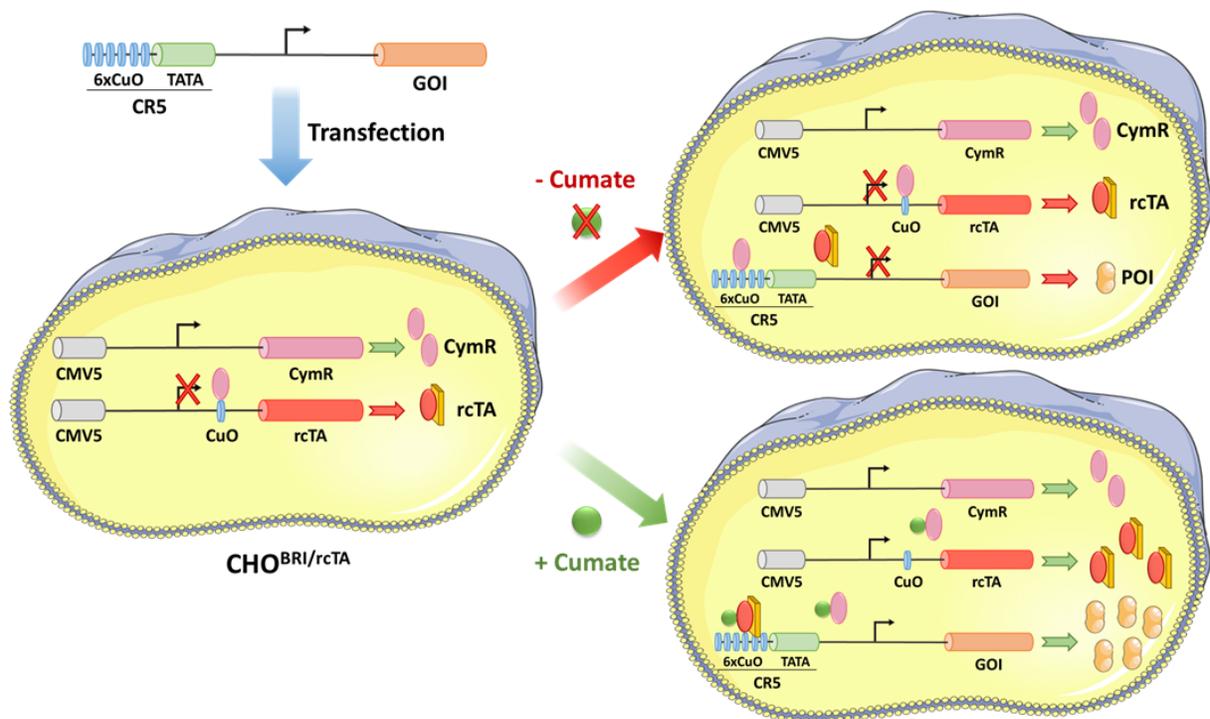


Figure 19: The cumate-inducible expression system. The $CHO^{BRI/rcTA}$ cell line stably expresses the *rcTA* transactivator and the *CymR* repressor. For recombinant protein production, plasmid vector encoding the gene of interest (*GOI*) controlled by the *CR5* promoter is transfected into the cell. Addition of cumate (green dot) causes a change in the conformation of the *CymR* that relieves it from the *CuO* operator, allowing for *rcTA* transactivator expression. Binding of cumate to the transactivator enables its binding to the *CuO* operators present in the *CR5* promoter, turning-on the expression of the cDNA encoding the protein of interest (*POI*).

3.6.2 Optimization of stable $CHO^{BRI/rcTA}$ cell pools generation

3.6.2.1 pDNA topology

It was previously reported that the use of linear plasmid DNA (LpDNA) obtained by cutting plasmid at specific restriction site increases the number of stable clones, in comparison with cells transfected with supercoiled plasmid DNA (SCpDNA) [216]. To determine the optimal plasmid DNA topology for the generation of stable $CHO^{BRI/rcTA}$ pools, linearized or supercoiled pTT75-hCD200Fc and pTT96-RTXM plasmid vectors were used to transfect

CHO^{BRI/rcTA} cells. Linearization was achieved by digestion with the single-cutter *PvuI* enzyme that cuts in the ampicillin gene. Linearization was confirmed by agarose gel electrophoresis (data not shown). For both plasmids, three independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with SCpDNA or LpDNA, and cell pools were selected with 50 μ M of MSX for 20 days. Then, at the end of a 12-days fed-batch culture, volumetric productivity of each CHO^{BRI/rcTA} cell pool was determined by protein A HPLC. For both recombinant proteins, the volumetric productivity of the pools generated with SCpDNA was around 2-fold higher than for the pools generated with LpDNA (Figure 20A and B). Indeed, the maximum titers obtained with SCpDNA were respectively 870 mg/L for hCD200Fc and 295 mg/L for Rituximab, whereas maximum titers obtained with LpDNA reached 490 mg/L for hCD200Fc and 190 mg/L for Rituximab. To determine the effect of pDNA topology on transfection efficiency, expression of the green fluorescent protein (GFP) reporter gene was monitored. Three independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with PEI-DNA polyplex containing linearized or supercoiled pTT75-GFP plasmid. Transient GFP expression was induced by the addition of 2 μ g/mL of cumate in the transfection media and transfection efficiency was determined 48 hpt by flow cytometry. Both the percentage of GFP-positive cells and the mean fluorescence intensity were higher with SCpDNA transfection (Figure 20C). Indeed, 96.5 % of cells transfected with SCpDNA expressed GFP compared to only 79.3 % with LpDNA. Finally, the mean GFP-fluorescence at 48 hpt was three times higher with transfection performed with SCpDNA compared to LpDNA. Further transfections were therefore all performed with SCpDNA.

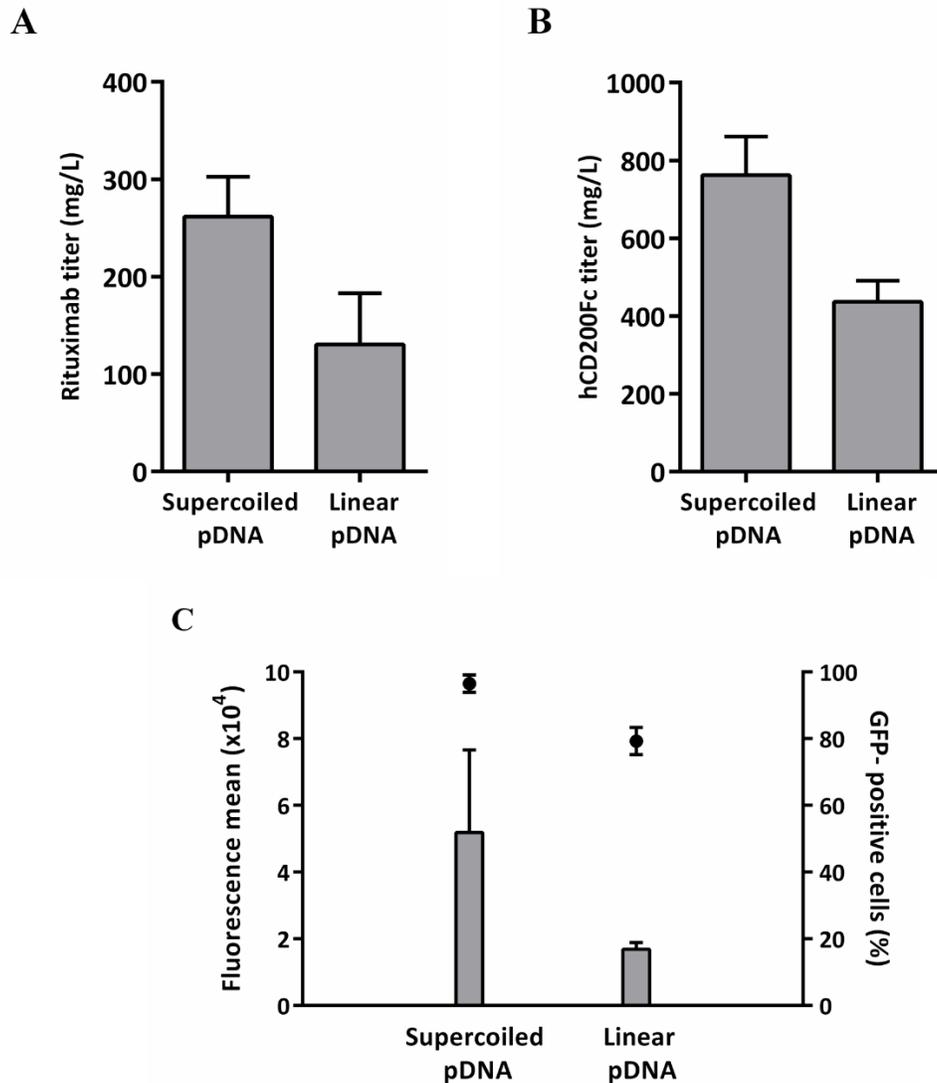


Figure 20: Impact of plasmid DNA topology on pool generation. *CHO^{BRI/rcTA}* cell line was transfected (three independent transfections) with supercoiled or linearized pTT96-RTXM (A) or pTT75-hCD200Fc (B) plasmids. Pool selection was performed with 50 μ M MSX during 14 days. Rituximab and hCD200Fc titers were quantified at the end of a 12-days fed-batch process. (C) The *CHO^{BRI/rcTA}* cell line was transfected with supercoiled or linearized pTT75-GFP plasmid and GFP expression was induced with 2 μ g/mL of cumate. Transfection efficiency was analysed 48 hours post-transfection by flow cytometry. Bars represent mean GFP fluorescence intensity and circles represent the percentage of GFP-positive cells. Data are mean values of three independent biological replicates with standard deviation.

3.6.2.2 MSX selection conditions

The glutamine synthetase (GS)/MSX selection system is often used for the development of stable cell lines expressing biopharmaceuticals. Recent studies have reported the influence of MSX concentrations on the volumetric productivity of CHO cell pools [87, 186]. To determine the optimal selection condition for the rapid generation of high expressing CHO^{BRI/rcTA} pools, various MSX concentrations were tested. Two independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with the pTT96-RTXM plasmid. The day following transfection, cells were split and pool selection was carried out under increasing concentrations of MSX. Cells were passaged every 2-3 days until viability was greater than 90 % (Figure 21A). A good correlation between the concentration of MSX and the CHO^{BRI/rcTA} pools recovery time has been observed. Indeed, for pools selected without MSX, where the selection pressure is only provided by the lack of L-glutamine in the selection media, viability decreased to 75 %, and the recovery process (viability > 90 %) was completed in less than 8 days. In comparison, CHO^{BRI/rcTA} pools selected with 25 μ M and 50 μ M of MSX required between 14-18 days recovering, and the viability dropped to 55 % and 37 % with 25 μ M and 50 μ M, respectively. Under higher selection pressure, viability recovery to > 90 % was more difficult as it required around 22 days with 75 μ M of MSX, while the cells did not survive with 100 μ M of MSX. Once CHO^{BRI/rcTA} pools recovered, the volumetric productivity was determined at the end of an 8-days batch culture process (Figure 21B). Surprisingly, CHO^{BRI/rcTA} pools selected in the absence of MSX could produce more than 120 mg/L of Rituximab. Similar titers, between 210 mg/L and 220 mg/L were obtained for CHO^{BRI/rcTA} pools selected with 25 μ M and 50 μ M of MSX. However, under more stringent conditions (75 μ M of MSX), volumetric productivity decreased to 190 mg/L. The reduced cell growth observed with increasing MSX concentrations may explain the lower productivity (Figure 21C) even though specific productivity of pools selected with 50 μ M and 75 μ M of MSX (around 7.3 pg/cell/day) are slightly higher than the pool selected with 25 μ M MSX (around 6 pg/cell/day) (Figure 21D).

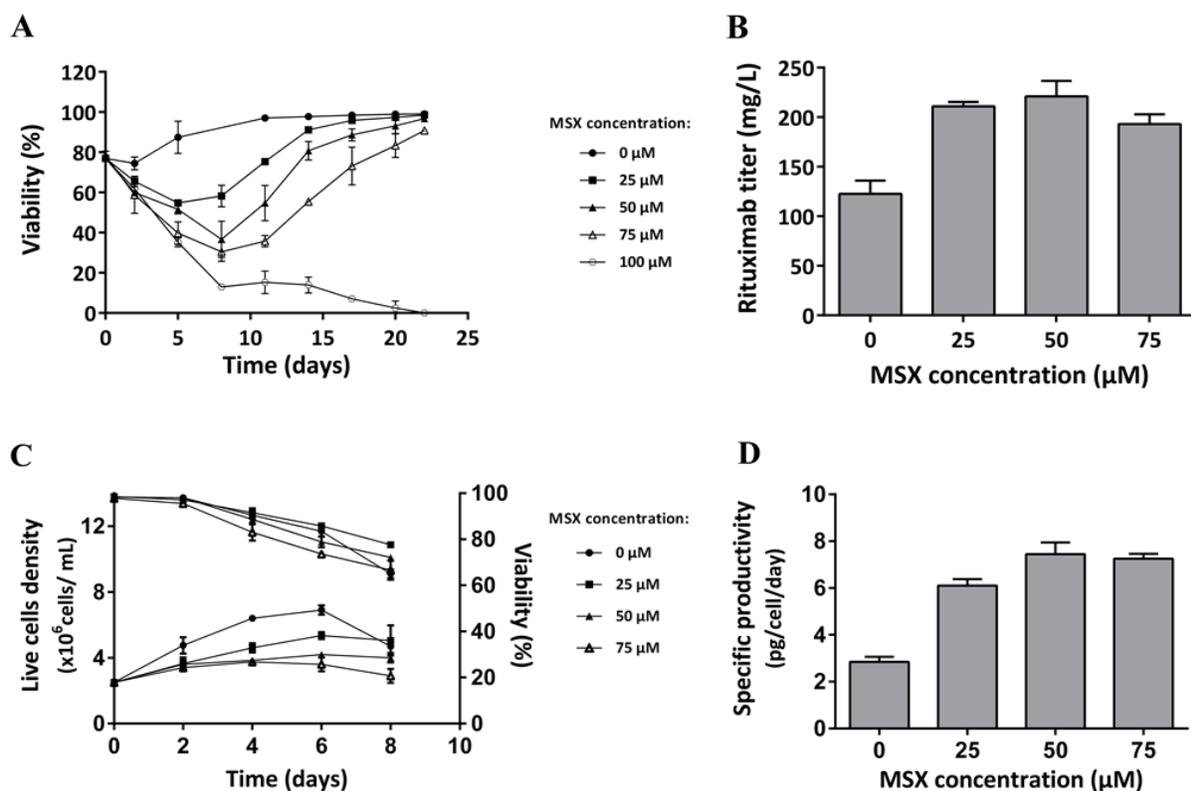


Figure 21: Determination of optimal MSX concentration for pool selection. *Two independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cell line with the pTT96-RTXM plasmid were performed. The day after transfection, cultures were split and cells subjected to a range of MSX concentrations (0 μM; 25 μM; 50 μM; 75 μM and 100 μM). (A) Viability was measured every 2 to 3 days with the Cedex analyzer, based on the trypan blue exclusion method. The cells selected with 100 μM of MSX did not survive. (B) When the pools recovered from the selection process (viability > 95 %), their volumetric productivities were evaluated at the end of an 8-days batch process at which time antibody titers were determined by pA-HPLC. (C) Viability and viable cell density were measured every 2 to 3 days with the Cedex analyzer. (D) Specific productivity of Rituximab was calculated for each conditions from the titer and the integral of viable cell density (IVCD) at day 8. Data are mean values of two biological replicates with standard deviation.*

3.6.2.3 Determination of optimal cumate concentration for induction

To determine the optimal induction conditions for recombinant protein expression from CHO^{BRI/rcTA} pools, increasing cumate concentrations were tested. Two of the previous CHO^{BRI/rcTA} pools expressing hCD200Fc were seeded at 0.3×10^6 cells/mL. Three days later, when the cell density reached 2.5 to 3.5×10^6 cells/mL, hCD200Fc expression was induced with increasing cumate concentrations (up to $10 \mu\text{g/mL}$). The volumetric productivities were measured at the end of a 7-days batch culture process and hCD200Fc titer was quantified by pA-HPLC (Figure 22). At day 7, the viability was around 95 % for each culture condition, suggesting a lack of cumate toxicity even at high concentration (data not shown). In the absence of cumate, a titer of 50 mg/L was measured indicating some leakiness of the system. Beyond $1 \mu\text{g/mL}$ of cumate, no further increase in the titer level was observed and a plateau was reached. Cumate concentration of $2 \mu\text{g/mL}$ was found to be optimal for ensuring the highest level of recombinant protein expression, with hCD200Fc titer of 310 mg/L. Thus, and consistent with previous study [178], an on/off ratio of 6 was found in the presence of $2 \mu\text{g/mL}$ of cumate.

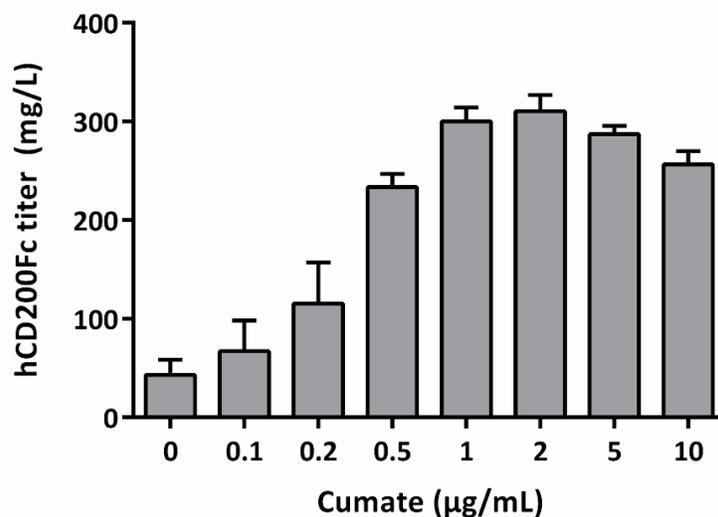


Figure 22: Determination of optimal cumate concentration for recombinant protein expression. Two independent CHO^{BRI/rcTA} pools expressing hCD200Fc were induced with a range of cumate concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 and $10 \mu\text{g/mL}$). Volumetric productivity was determined by pA-HPLC at the end of a 7 days batch culture process. Data are mean values of two independent biological replicates with standard deviation.

3.6.3 Evaluation of pool expression stability

3.6.3.1 Long-term maintenance

One potential limitation of the use of CHO pools for large-scale protein production is the progressive loss of volumetric productivity over time. Stability of the CHO^{BRI/rcTA} cell pools producing hCD200Fc or Rituximab was thus tested following maintenance in culture for one month in the presence of MSX. Three independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with the pTT75-hCD200Fc or pTT96-RTXMHCLC plasmid and the pools were selected with 50 μ M of MSX during 16 days. Then, each pool was subjected to a fed-batch culture process where cells were seeded at 0.3×10^6 cells/mL and recombinant protein expression was induced with 2 μ g/ml of cumate. Viability and cell density profiles were determined until day 16 where cell viability was around 60 % (Figure 23A and B). For all three pools expressing either Rituximab or hCD200Fc, similar cell growth and viability were observed, with a maximal cell density between 1.7×10^7 and 2.7×10^7 cells/mL (Figure 23A and B). Note that errors in the cell counts due to cells aggregation could explain the differences in the maximum cell densities observed. Volumetric productivity of the fed-batch cultures was determined by pA-HPLC at day 14. The titers obtained were between 247 to 350 mg/L for Rituximab and 740 to 900 mg/L for hCD200Fc and (Figure 23C and D). To evaluate pool stability over time, each pool was maintained for 1 month under 50 μ M MSX selection (cells were passaged three times per week at a cell density of 0.1×10^6 to 0.2×10^6 cells/mL in 125 mL or 250 mL Erlenmeyer flasks) and the same 14-days fed-batch culture process was performed. For both hCD200Fc and the Rituximab pools, volumetric productivity remained stable over time (Figure 23C and D). These results demonstrate the stability and the robustness of the recombinant protein production process using CHO^{BRI/rcTA} cell pools.

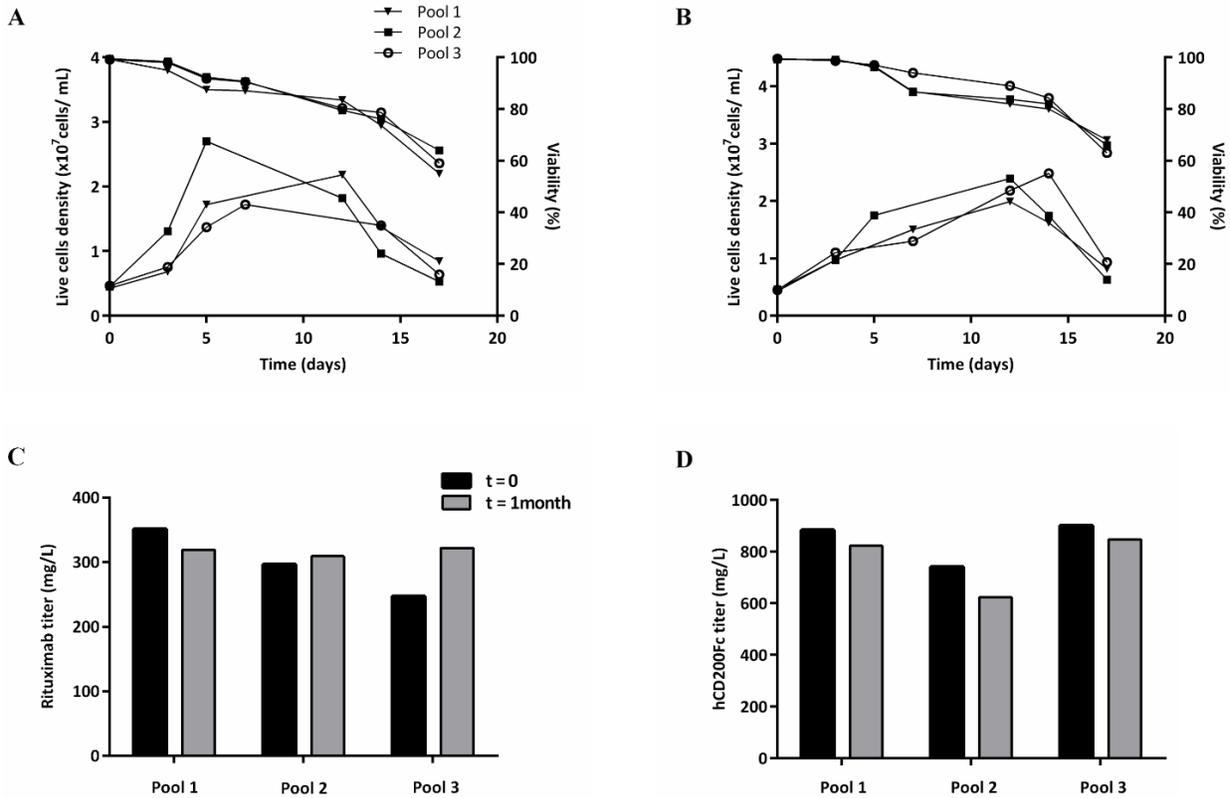


Figure 23: The pool generation process is robust and pools are stable for at least one month. Three independent transfections of $CHO^{BRI/rcTA}$ cells were performed with $pTT75$ - $hCD200Fc$ and $pTT96$ - $RTXM$ plasmids. Pools were selected for 16 days with $50 \mu M$ of MSX . A 20 mL fed-batch culture was initiated for each condition. Viability and viable cell density were measured with the Cedex analyzer for pools expressing Rituximab (A) or $hCD200Fc$ (B). Each pool was maintained in culture during one month with $50 \mu M$ of MSX . Cells were then used to initiate a 20 mL 14-days fed-batch culture. Volumetric productivities for freshly selected pools ($t = 0$) and pools maintained for 1 month in culture ($t = 1$ month) were determined by pA -HPLC for Rituximab (C) and $hCD200Fc$ (D). Data are mean values of three independent biological replicates with standard deviation.

3.6.3.2 Effect of freeze/thaw cycle on CHO pool volumetric productivity

The ability to maintain pool volumetric productivity following a freeze-thaw cycle is a desirable feature. Indeed, long-term cryogenic storage of CHO pools would avoid making a new pool each time a need for the same recombinant protein occurs. However, in some cases a freeze-

thaw cycle seems to expedite clonal instability [175]. With the aim to evaluate the effect of cryopreservation and thawing on the CHO^{BRI/rcTA} cell pools productivity, we have compared the performance of pools producing hCD200Fc or Rituximab before and after nitrogen freeze-thaw cycle. The volumetric productivity was determined by protein A HPLC at the end of a 14-days fed-batch culture process. For both recombinant proteins expressed, no volumetric productivity difference was observed between the unfrozen and the post-thaw CHO^{BRI/rcTA} cell pools as Rituximab titers were still at 250 mg/L (Figure 24A) whereas hCD200Fc titers remained at 780 mg/L after thawing (Figure 24B).

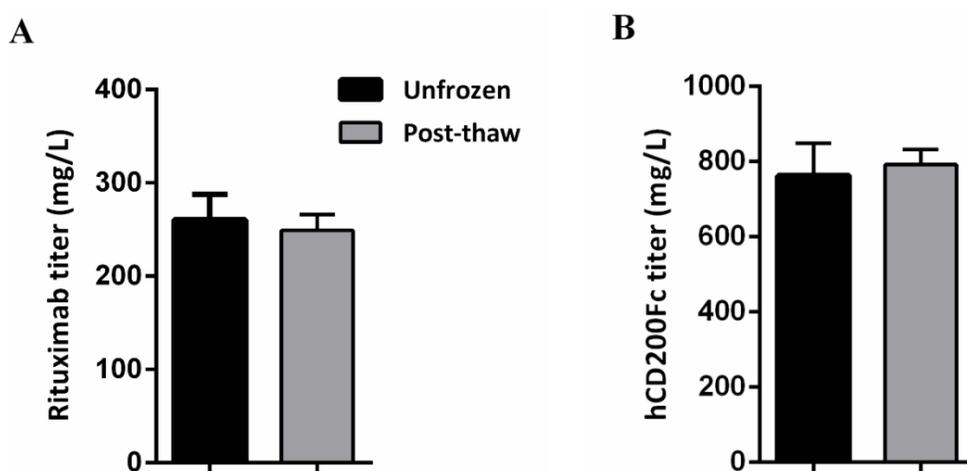


Figure 24: Pool volumetric productivity is maintained after a freeze/thaw cycle. CHO^{BRI/rcTA} pools were cryopreserved in liquid nitrogen and then thawed. After a few days in culture, a 14-days fed-batch culture was performed to compare volumetric productivity of pools expressing Rituximab (A) and hCD200Fc (B) before and after cryopreservation. Recombinant protein titers at the end of the 14-days fed-batch culture were determined by pA-HPLC. Data are mean values of three biological replicates with standard deviation.

3.6.4 Product quality characterization

In addition to productivity and stability, the quality of products derived from CHO pools is also an important aspect to monitor. Protein purity, integrity and aggregation levels in purified product were thus evaluated through a combination of SDS-PAGE and size-exclusion chromatography (SEC) (Figure 25).

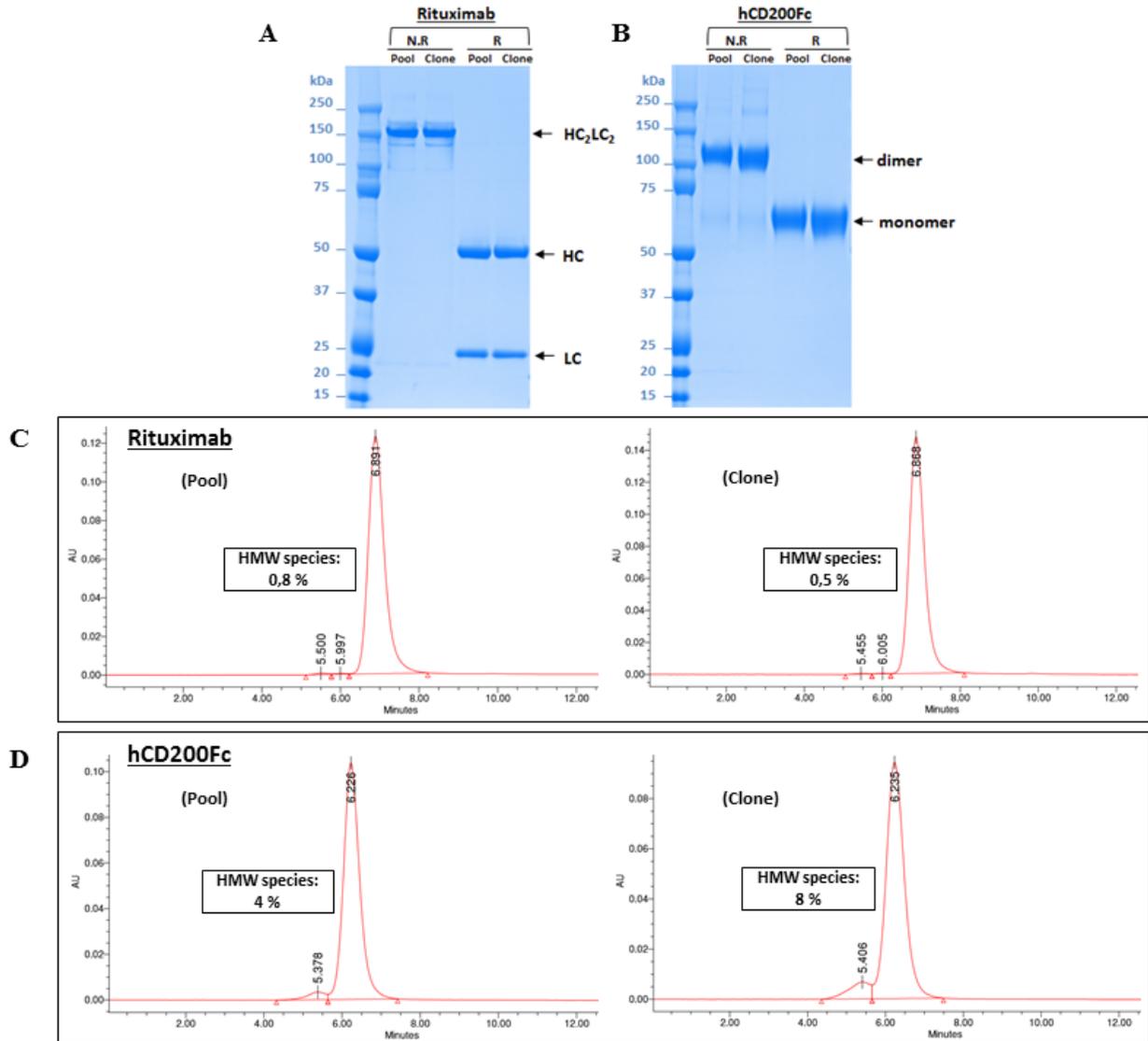


Figure 25: Protein product quality characterization of CHO^{BRI/rcTA} pools. Protein quality from CHO^{BRI/rcTA} cell pools was analyzed and compared to the same protein produced from stable CHO^{BRI/rcTA} clones (previously isolated from pools by limiting dilution). Both Rituximab and hCD200Fc were purified from eight days fed-batch cultures by a single step protein-A affinity purification. SDS-PAGE analysis under reducing or non-reducing condition of 3 μ g of Rituximab (A) and hCD200Fc (B) from pool or clone was performed. (C and D) The presence of high molecular weight (HMW) material in purified protein samples were determined by analytical size-exclusion chromatography on a Superdex 200 HR 5/150 column.

SDS-PAGE analysis of both hCD200Fc and Rituximab purified by a single step pA affinity purification from CHO^{BRI/rcTA} pool fed-batch culture was performed and compared to the same product expressed from a similar fed-batch process using a stable high-producing CHO clone (Figure 25A et B). Purified Rituximab protein from pool or clone revealed a very similar migration profile and purity under both non-reducing and reducing conditions (Figure 25A). Similarly, purified hCD200Fc, obtained from stable CHO pool or clone also showed similar migration profiles under non-reduced or reduced conditions (Figure 25B), except maybe for a slightly higher high molecular weight (HMW) species observed under non-reduced conditions for the clone-derived material. Purified hCD200Fc protein also migrated at a higher apparent molecular weight (~60 and ~120 kDa under reduced and non-reduced conditions) for both pool and clone since the predicted size for this molecule is 47 kDa for the monomer and around 94 kDa for the dimer form. Because hCD200Fc has 6 potential N-glycosylation sites, glycosylation could explain this difference. SEC analysis of purified Rituximab (Figure 25C) showed that only a very small amount of HMW species (< 1 %) was observed in both the pool- or clone-derived material. However, and consistent with SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions, SEC analysis of purified hCD200Fc material showed that pool-derived material (Figure 25D, left panel) contained lower amount of high molecular weight aggregates (~ 4 %) compared to clone-derived material (~ 8 %, right panel). These results suggest that the quality of product derived from CHO^{BRI/rcTA} pool compares favorably to that derived from stable CHO^{BRI/rcTA} clone. Using a LC-MS method developed in-house, we were also able to demonstrate that following a single-step pA affinity chromatography, cumate is efficiently removed as it cannot be detected in the purified material (data not shown).

3.6.5 Comparison between inducible and constitutive promoters for pool generation

Finally, the cumate-inducible CR5 promoter was compared with two strong commonly used constitutive promoters, the CMV5 and the composite EF1 α -HTLV, for stable CHO pool generation. We first evaluated the strength of each promoter in CHO^{BRI/rcTA} cells by transient expression of GFP. Three independent transfections were performed with the pTT75-GFP, pTT71-GFP (CMV5 promoter) and pTT115-GFP (EF1 α -HTLV promoter) plasmid vectors.

Gene expression under the control of the CR5 promoter was induced by the addition of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cumate. Transfection efficiency was determined 48 hpt by flow cytometry (Figure 26A). The percentage of GFP-positive cells was very high for each promoter, being of 96 % with CR5, 91 % with CMV5 and 85 % for EF1 α -HTLV. A clear difference was however observed for the mean GFP-fluorescence intensity. Indeed, GFP expression was around 3-fold higher with the cumate-inducible CR5 promoter than with both constitutive promoters. These observations are consistent with previous data where adenoviruses [177] or lentiviruses [178] were used to compare the strength of the CR5 and the CMV5 promoters for GFP expression in CHO cells. With the aim to confirm this result for stable CHO pools, two independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with plasmids driving the expression of hCD200Fc or Rituximab through the CR5 (pTT75), CMV5 (pTT71) or EF1 α -HTLV (pTT115) promoters and the pools were generated following selection with 50 μM of MSX during 16 days. No difference was observed in the culture viability during the selection process using the three plasmids (data not shown). Following pool selection, recombinant proteins titers were followed over a 14-days fed-batch culture process. Expression was induced with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cumate for the pTT75 (CR5) pools. Samples were collected every 2-3 days and product titers were quantified by protein-A HPLC. For both recombinant proteins, titers were higher with the CR5 promoter throughout the fed-batch process. The average titer for CR5-hCD200Fc pools at day 14 (810 mg/L) was more than 3-fold higher compared to the EF1 α -HTLV-hCD200Fc pools (260 mg/L) and more than 4-fold higher compared to the CMV5-hCD200Fc pools (190 mg/L) (Figure 26C). For Rituximab production, the difference between the three promoters was less significant, the titer with CR5 (330 mg/L) being around 3-fold higher than with CMV5 (110 mg/L), but only 1.5-fold higher than with EF1 α -HTLV (220 mg/L) (Figure 26B). Specific productivity determined from the volumetric titers and IVCD every 2-3 days for both Rituximab (Figure 26D) and hCD200Fc (Figure 26E) clearly demonstrate that the CR5 promoter is two to three-fold stronger than the constitutive CMV5 and EF1 α -HTLV promoters throughout the 14-days fed-batch cultures.

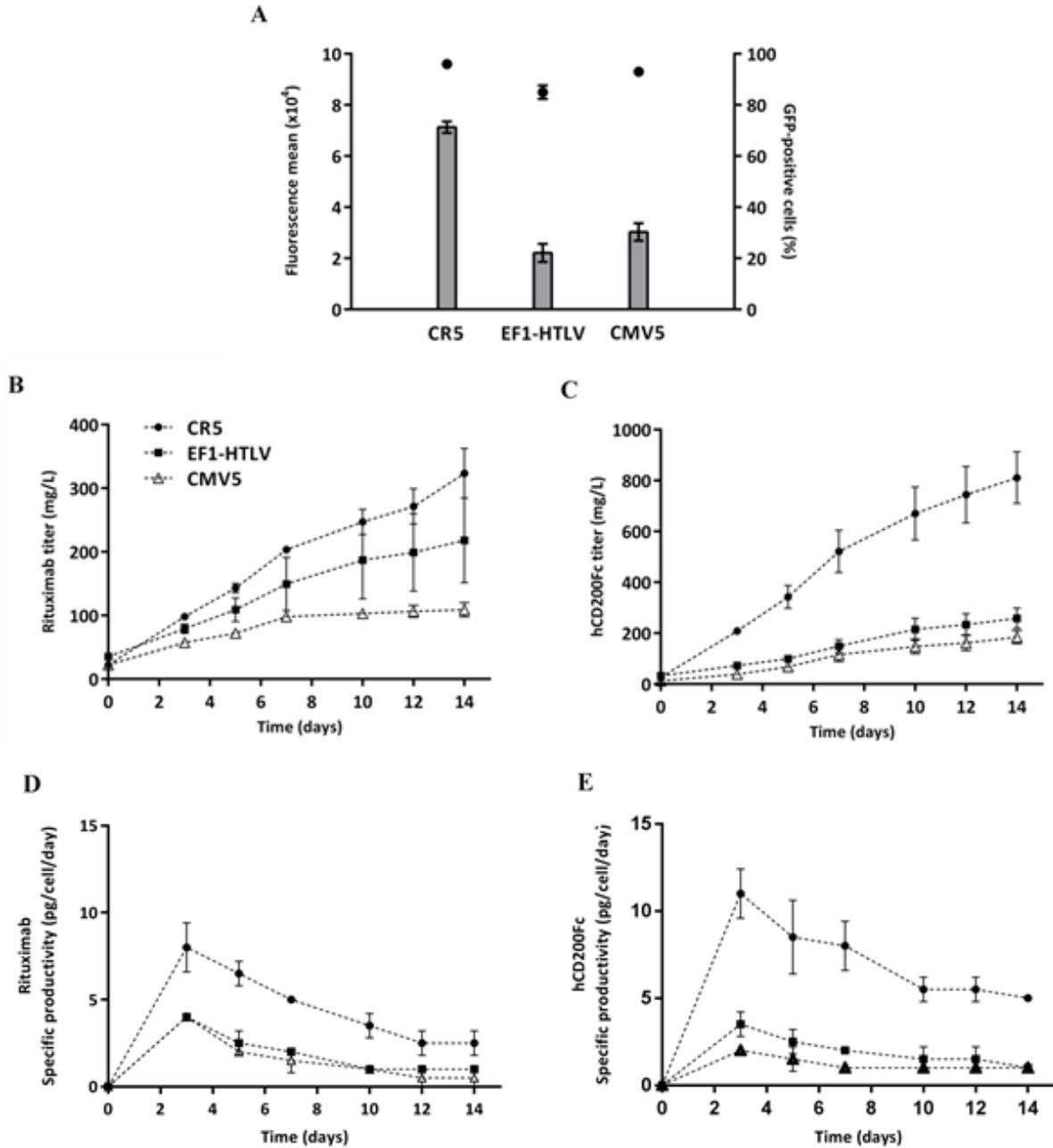


Figure 26: Comparison of the cumate promoter to the CMV5 and EF1-HTLV promoter for pool generation. (A) $CHO^{BRI/rcTA}$ cells were transfected (three independent transfections) with $pTT75$ -GFP (CR5), $pTT71$ -GFP (CMV5) and $pTT115$ -GFP (EF1 α -HTLV) plasmids. Transient expression of the GFP under the control of the CR5 promoter was induced with 2 μ g/mL of cumate. Transfection efficiencies were analysed 48 hpt by flow cytometry. Bars represent mean GFP fluorescence intensity and circles represent the percentage of GFP-

positive cells. For stable pools production, two independent transfections of CHO^{BRI/rcTA} cells were performed with plasmids expressing Rituximab (B) or hCD200Fc (C), under the control of CR5, CMV5 or EF1-HTLV promoters. Following selection with 50 μM MSX, 20 mL fed-batch cultures were initiated. Samples were collected every 2-3 days during the 14-days fed-batch cultures and volumetric productivity of each pool was determined by pA-HPLC. Specific productivities were determined from titers and corresponding IVCD for both Rituximab (D) and hCD200Fc (E). Data are mean values of three (A) or two (B, C, D and E) biological replicates with standard deviation.

3.7 Discussion

During the early stages of biologics development, robust and reliable methods are required to rapidly produce moderate amounts of material. Transient gene expression in CHO and HEK293 cells is commonly used for this purpose [47, 51, 210, 217], but the significant quantities of plasmid DNA that are required at large scale may represent a challenge. For the last few years, some studies have assessed the potential of using stable CHO pools, a method consisting of the rapid selection of a heterogeneous CHO cell population stably expressing integrated transgenes, as an alternative to TGE [84, 86, 87, 212]. Indeed, many potential advantages have to be considered with stable pools, such as the small amount of pDNA required for the initial transfection, the ease of expansion of the transfected and selected cell culture for large scale production, the cryogenic storage of a frozen cell bank allowing multiple productions over time from the same cell population, and the isolation of stable clones from the CHO cell pool. In this study, we have evaluated the CHO^{BRI/rcTA} cell line combined with plasmid transfection for the generation of stable pools. Using two model proteins and the GS/MSX selection system, we were able to generate, in less than 30 days from the transfection, stable CHO pools producing titers up to 900 mg/L of hCD200Fc and up to 350 mg/L of Rituximab, in non-optimized fed-batch cultures. We first determined the influence of pDNA topology on CHO^{BRI/rcTA} pools productivity. We showed that volumetric productivity of pools generated from PEIproTM-mediated transfection with supercoiled plasmid was around 2-fold higher than those generated with linearized plasmid. The observed lower transfection efficiency with linear pDNA could in part explain this difference. These results are consistent with a previous study

where transfection efficiency was higher with polyplex containing supercoiled pDNA vs linear pDNA [218]. The use of supercoiled pDNA is advantageous for stable pool transfection because no additional plasmid manipulation is required for linearization, and it eliminates concerns regarding the use of restriction enzymes produced from processes using animal-derived components. However, another study [216] has demonstrated that linearization of plasmid at a specific restriction site seems to increase the number of stable transfected cells. It is assumed that plasmid linearization at a single restriction site before transfection, usually in the bacterial resistance gene or bacterial replication origin, ensures optimal plasmid integration into the host genome. To determine if DNA topology can affect the frequency of clones with superior productivity, a statistical comparison of clones issued from CHO^{BRI/rcTA} stable pools generated with linear or supercoiled pDNA should be performed.

With the recent development of the GS knockout CHOK1SV cell line and because this selection system does not require tedious gene amplification steps, GS/MSX selection system is becoming a dominant selection tool in the industry. Here we have determined the optimal MSX concentration to generate CHO^{BRI/rcTA} pools. Stringent conditions between 25 to 50 μM of MSX were the most efficient to rapidly select (14-18 days) pools expressing the highest recombinant protein titers. These MSX concentrations are similar to those reported by the industry for CHO cells [87, 185, 186]. Interestingly, our results suggest that selection stringency can be increased by raising MSX concentration, since CHO cell pools selected with 50 and 75 μM of MSX resulted in higher specific productivities. This could be the result of a selection of cells where the plasmid DNA has integrated into more transcriptional active regions of the CHO genome. However, beyond 50 μM , the negative effects of MSX on cell growth and viability impairs volumetric productivity of the resulting pools, while the pools did not survive selection with 100 μM of MSX.

With the use of an inducible expression system, optimization of the inducer concentration is essential to reach maximum expression level. The highest recombinant protein production with the cumate-responsive CHO^{BRI/rcTA} cells was observed with 1-2 $\mu\text{g/mL}$ of cumate. Level of recombinant protein could thus be modulated by varying cumate concentration between 0 and 2 $\mu\text{g/mL}$, with a plateau observed beyond 1 $\mu\text{g/mL}$, probably due to saturation of the expression system. Adjustment in cumate concentration can be useful to modulate expression

of cytotoxic or cytostatic proteins. Indeed, the use of an inducible system has been recently shown to allow the isolation of stable clones for the production of monoclonal antibodies that appear to induce cytotoxicity when constitutively overexpressed [175].

We then evaluated the stability of the CHO^{BRI/rcTA} cell pools over time and after cryopreservation. It is advantageous to generate pools able to maintain productivity and quality over time and after a freeze-thaw cycle to ensure material availability and consistency over the duration of the lead candidate selection/development project. In previous studies, conflicting results have been reported on CHO pools stability. In one study, Balasubramanian et al., 2015 [86] have shown that CHO pool titers can be maintained over three months, whereas Ye et al., 2010 [84] have observed decreased antibody expression 28 days after transfection. Differences in the expression system or in the type of recombinant proteins expressed could explain these observations. Here we have demonstrated that volumetric productivity of CHO^{BRI/rcTA} cell pools expressing hCD200Fc and Rituximab were stable for over one month in culture under 50 μ M MSX selection. Because cells expansion and production at large scale take significant time, a minimum of 3 months stability is typically needed for industrial cell lines [219]. In the context of protein production from CHO pools, we may consider that one month is enough to allow for the production process to be completed at a reasonable scale. Moreover, we have shown that storage in liquid nitrogen had no effect on pools productivity, allowing the generation of cell banks that will ensure their long-term availability. It is noteworthy that we generated other pools using the same protocol that were stable for up to two months in culture (data not shown). Protein aggregation, which is a major problem in biologics development, can induce adverse effects such as immunogenic responses, reduced or compromised biological activity and can cause formulation and storage problems [220, 221]. In this study, we have analyzed product quality from CHO^{BRI/rcTA} cell pools and high producing CHO^{BRI/rcTA} clones by mean of SDS-PAGE and SEC analyses. No relevant difference was observed between pool- and clone-produced Rituximab and hCD200Fc, except for a somewhat greater level of species in hCD200Fc purified from the stable clone. Since only a limited number of hCD200Fc clones were screened, is reasonable to conceive that with a greater clone screening effort, a candidate showing much less HMW species could have been identified. Nonetheless, this data suggest that pool-derived material quality attributes compares favorably to that derived from clones.

Finally, we have compared the cumate inducible expression system with two strong constitutive promoters commonly used in the industry, namely CMV5 and EF1 α -HTLV. The promoter CMV5, developed by Massie et al., 1998 [164] is an optimized version of the CMV promoter, while EF1 α -HTLV promoter is a composite promoter comprised of the Elongation Factor-1 α (EF-1 α) core promoter [215] and the R segment and part of the U5 sequence (R-U5') of the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Type 1 Long Terminal Repeat [165]. For transient transfection, the CR5 promoter was shown to be more efficient than the CMV5 promoter, consistent with a previous report [177], and also more efficient than the EF1 α -HTLV hybrid promoter. These results were confirmed in stable CHO pools with the production of two recombinant proteins, the volumetric productivity of CHO^{BRI/rcTA} cell pools generated with the CR5 promoter being more than 4-fold higher than those generated with the constitutive promoters for hCD200Fc protein and more than 3-fold for Rituximab. Variable transcriptional efficiency of the promoters in CHO cells could explain this difference. Indeed, the CR5 promoter is regulated by the chimeric transactivator rcTA, composed of the cumate binding domain in the reverse configuration fused to the potent viral transactivator VP16, whereas CMV5 and EF1 α -HTLV are regulated by endogenous transcription factor. Besides the transcriptional strength of the promoter, the ability to regulate the expression of the recombinant protein during cell line development by using an inducible promoter could be advantageous. For example, clonal instability may arise from expression of the protein itself. In a previous study, Misaghi et al., 2014 [175] have shown, using a tetracycline-responsive promoter, that maintaining the clones in a non-induced state prevents clonal instability over time and also after cryopreservation. Moreover, Li et al., 2013 [212] observed a reduction in the number of clones when the expression of the recombinant protein was induced during the selection process compared to non-induced conditions. We have also observed that pools generated using the constitutive CMV5 promoter showed a significant reduction in protein production after two months in culture (data not shown). This further supports the use of an inducible system for stable pools generation and ultimately stable clones. Future studies will be required to determine if regulating protein expression during CHO^{BRI/rcTA} pools generation affects productivity or stability of the polyclonal population.

In conclusion, we have demonstrated the usefulness of the inducible CR5/CHO^{BRI/rcTA} system to rapidly generate stable pools capable of producing high levels of recombinant proteins. Moreover, pools cryopreservation and maintenance in culture for more than one month had no effect on their volumetric productivity. Finally, CHO^{BRI/rcTA} pools generated with the inducible CR5 promoter were 3 to 4-fold more productive than pools generated using the CMV or EF1 α -HTLV constitutive promoters.

3.8 Author contributions

Experiments were designed by BM, AM, YD and AP. Experiments were performed by AP. FM and SP contributed to the development of the CHO^{BRI/rcTA} cell line used in this study. AP wrote the manuscript, BM, AM and YD revised the manuscript.

3.9 Acknowledgments

The authors would like to thank Louis Bisson for performing protein A-HPLC analyses, Roger Maurice for performing SEC-HPLC analysis, Mélanie Leclerc, Julien Leroy and Richard Gingras for their help for the development of the CHO^{BRI/rcTA} cell line. This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Some figures were produced using Servier Medical Art. This is NRC publication #HHT_53330.

Chapitre 4 Études comparatives supplémentaires du promoteur inductible CR5 et du promoteur constitutif CMV5

4.1 Introduction

Dans ce chapitre nous avons regroupé deux études comparatives supplémentaires à celles effectuées dans le chapitre précédent entre le promoteur inductible CR5 et le promoteur constitutif CMV5. Ces deux promoteurs sont assez proches dans leur structure dans le sens où le CR5 contient les mêmes éléments que le promoteur CMV5 à partir de la boîte TATA, ainsi que six répétitions des séquences opératrices CuO placées en amont du promoteur minimal hCMV (boîte TATA) et du gène à transcrire. Cependant, l'activation du promoteur CR5 nécessite la fixation du transactivateur chimérique rcTA sur la séquence (CuO)₆ pour son activation, tandis que le promoteur CMV5 est régulé par des éléments transcriptionnels endogènes à la cellule. Dans le précédent chapitre, nous avons démontré la supériorité du promoteur CR5 par rapport au promoteur CMV5 pour la production en *pools* stables du rituximab et de la protéine hCD200Fc [89]. Dans cette étude, nous avons testé en parallèle la stabilité de ces deux promoteurs pour l'expression de la protéine hCD200Fc en *pools* après deux mois en culture en présence de 50 μ M de MSX. Enfin, afin de comparer la proportion de cellules hautement productrices dans chacun des *pools*, une étude de la distribution de la population a été effectuée via la génération de μ -*pools*.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Maintenance des cellules

Pour la maintenance de la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA}, les cellules sont cultivées en suspension dans des flacons Erlenmeyer de 125 mL (Corning) dans le milieu défini sans sérum PowerCHO2-CD (Lonza) supplémenté de 4 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich). Dans le cas

des *pools* CR5-hCD200Fc et des *pools* CMV5-hCD200Fc, les cellules sont cultivées dans le milieu défini sans sérum PowerCHO2-CD (Lonza) supplémenté de 25 μM ou 50 μM de MSX. Les flacons sont agités à 120 rpm dans un incubateur maintenu à 37 °C et 5 % de CO₂. Une dilution des cellules est effectuée tous les deux à trois jours afin de maintenir une densité cellulaire comprise entre 0.2 et 3.0×10^6 cellules/mL (phase exponentielle de croissance). La numération cellulaire et la viabilité sont déterminées à l'aide du compteur automatisé Cedex AS20 (Roche, Laval, Qc) selon la méthode d'exclusion du bleu trypan. Brièvement, les cellules vivantes, ayant une membrane intacte, excluent le bleu trypan qui est une macromolécule anionique. Le bleu trypan est donc capable de pénétrer dans les cellules mortes qui apparaissent colorées en bleu. Le temps de doublement de la lignée cellulaires CHO^{BRI/rcTA} est estimé à environ 16 heures.

4.2.2 Vecteurs plasmidiques

Les plasmides utilisés pour cette étude sont les plasmides pTT75-hCD200Fc et le pTT71-hCD200Fc. Ces derniers dérivent des vecteurs pTT développés et décrits par l'équipe d'Yves Durocher [79]. Dans ces vecteurs, une courte séquence de la région SAR de l'interféron humain α ainsi que le gène de la glutamine synthétase humaine (GS), tous deux contrôlés par le promoteur SV40, ont été insérés. La protéine hCD200Fc est une protéine chimérique construite à partir du domaine extracellulaire de la protéine humaine CD200 lié à la région Fc d'une immunoglobuline [178]. Le plasmide pTT75-hCD200Fc contient le promoteur inductible CR5 tandis que le plasmide pTT71-hCD200Fc contient le promoteur constitutif CMV5. Le plasmide pTT71-hCD200Fc a été généré en remplaçant le promoteur CR5 du plasmide pTT75-hCD200Fc par le promoteur CMV5. Le clonage a été effectué par une double digestion enzymatique. Le détail du protocole général pour la construction de plasmides est décrit dans l'annexe 1.

4.2.3 Transfection

4.2.3.1 Pour l'étude de la stabilité

Les cellules ont été transfectées avec du PEIpro™ (25 kDa linéaire, Polyplus-transfection®). Le jour de la transfection, les cellules, dont la viabilité était supérieure à 98 %, ont été centrifugées et remises en suspension à une densité de 2×10^6 cellules/mL dans le milieu de transfection CD DG44 (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) supplémenté avec 4 mM de glutamine et 0.1 % de Kolliphor® P 188. Les cellules ont ensuite étéensemencées dans des plaques 6 puits (1.8 mL/puits). Les complexes ADN:PEIpro™ ont été préparés suivant un ratio de 1:5. Ainsi, pour chaque puit, 2 µg d'ADN et 10 µg de PEIpro™ ont été dilués séparément dans 100 µL de milieu de transfection. Par la suite, le PEIpro™ dilué a été ajouté à l'ADN dilué et le mélange a été vortexé 4 secondes et incubé pendant 3 min à température ambiante. Les polyplexes formés ont ensuite été ajoutés aux cellules (200 µL par puits) et les plaques ont été placées dans l'incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂ sous agitation constante (120 rpm).

4.2.3.2 Pour l'étude des *µ-pools*

Les cellules ont été transfectées avec du PEIpro™ (25 kDa linéaire, Polyplus-transfection®). Le jour de la transfection, les cellules, dont la viabilité était supérieure à 98 %, ont été centrifugées et remises en suspension à une densité de 2×10^6 cellules/mL dans le milieu de transfection CD DG44 (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada) supplémenté avec 4 mM de glutamine et 0.1 % de Kolliphor® P 188. Les cellules ont ensuite étéensemencées dans des flacons Erlenmeyer de 125 mL (18 mL/flacon). Les complexes ADN:PEIpro™ ont été préparés suivant un ratio de 1:5. Ainsi, pour chaque flacon, 20 µg d'ADN et 100 µg de PEIpro™ ont été dilués séparément dans 1 mL de milieu de transfection. Par la suite, le PEIpro™ dilué a été ajouté à l'ADN dilué et le mélange a été vortexé 4 secondes et incubé pendant 3 min à température ambiante. Les polyplexes formés ont ensuite été ajoutés aux cellules (2 mL par flacon) et les flacons ont été placés dans l'incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂ sous agitation constante (120 rpm).

4.2.4 Sélection des *pools*

Un jour post-transfection, les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 250 rpm etensemencées à une densité de 0.5×10^6 cellules/mL dans un milieu de sélection (milieu PowerCHO2 supplémenté avec 50 μ M de MSX). Le milieu de sélection a été remplacé tous les 2 à 3 jours pendant 14 à 18 jours avec une inoculation à 0.5×10^6 cellules/mL. Le nombre et la viabilité des cellules ont été mesurés à l'aide du compteur automatisé Cedex AS20 (Roche, Laval, Qc) selon la méthode d'exclusion du bleu trypan. Une fois la viabilité cellulaire supérieure à 95 %, les *pools* ont été inoculés à 0.2×10^6 cellules/mL dans des flacons Erlenmeyer de 125 ou 250 mL.

4.2.5 Production en mode cuvée

Pour les cultures en cuvée, les *pools* ont étéensemencés dans un flacon Erlenmeyer de 125 mL à 0.3×10^6 cellules/mL dans 20 mL de milieu chimiquement défini BalanCD Growth A (Irvine Scientific, Irvine, CA, USA) supplémenté avec 50 μ M de MSX et incubé à 37 °C et 5 % de CO₂ sous agitation constante (120 rpm). Trois jours plus tard, lorsque la densité cellulaire a atteint 3.5 à 4.5×10^6 cellules/mL, l'expression de la protéine recombinante a été induite par l'ajout de 2 μ g/mL de cumate, suivi d'un changement de température à 32 °C. Des échantillons ont été prélevés 10 jours après l'induction et les titres de hCD200Fc ont été déterminés par pA-HPLC.

4.2.6 Quantification de hCD200Fc par pA-HPLC

Les titres de hCD200Fc ont été déterminés par chromatographie liquide à haute performance de la protéine A (pA-HPLC) (WATERS Corporation, Milford, MA) en utilisant une colonne POROS® A20 (Invitrogen, Grand Island, NY) de 2.1 mm de diamètre x 30 mm de hauteur, 104 μ L, POROS® A20. Avant leur injection sur la colonne à un débit de 2 mL/min, les échantillons ont été filtrés par centrifugation à 8000-11,000 xg pendant 3 min à travers un filtre NANOSEP MF GHP 0.45 μ m (PALL Life Sciences). L'élution a été effectuée à l'aide de NaCl 0.15 M, pH 2.0, et la détection UV a été effectuée à 280 nm. La quantification a été réalisée en intégrant la surface sous le pic d'élution et en la comparant à une courbe standard d'IgG.

4.2.7 Génération de μ -pools

Les cellules ont été ensemencées manuellement dans des plaques 384 puits à fond transparent (Corning #3712) à une concentration de 5 cellules/puits dans 60 μ L de milieu de croissance BalanCD A et incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 10 jours jusqu'à atteindre environ 30 à 50 % de confluence dans la plupart des puits. Par la suite, 15 μ L de milieu BalanCD Growth A ont été ajoutés dans les puits. Dans le cas du *pool* CR5-hCD200Fc, le milieu a été additionné de 2 μ g/mL de cumate, pour obtenir une concentration finale de cumate de 0.5 μ g/mL. Les plaques ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 5 jours. Le 5^e jour après l'induction, le pourcentage de confluence a été déterminé, 30 μ L de surnageant a été prélevé dans chaque puits, et le titre hCD200Fc a été déterminé par Fluorescence HTRF (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) à l'aide du kit d'IgG humaines (Cisbio, France), selon les recommandations du fabricant. Pour déterminer le pourcentage de confluence dans chaque puits, les plaques ont été imagées à l'aide du système d'analyse à haut champ ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices, CA, USA). Ensuite, le pourcentage de confluence a été calculé en divisant la surface totale du puits par la surface occupée par les cellules.

4.3 Résultats

4.3.1 Étude de la stabilité du promoteur inductible CR5 et du promoteur constitutif CMV5 après deux mois en culture

Les cellules CHO^{BRI/rcTA} ont été transfectées avec le plasmide pTT75-hcD200Fc ou le plasmide pTT71-hcD200Fc. Le MSX a été ajouté 24 heures après la transfection à une concentration de 50 μ M. Une fois la sélection terminée, la productivité de chacun des *pools* a été comparée par culture en mode cuvée-alimentée. Un titre en hCD200Fc proche de 400 mg/L a été obtenu pour le *pool* exprimant hCD200Fc sous le contrôle du promoteur CR5. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans l'étude précédente, ou des titres en hCD200Fc de l'ordre de 310 mg/L ont été obtenus en culture en mode cuvée. La différence observée pourrait s'expliquer par une différence des paramètres hydrodynamiques de la culture, puisque pour cette étude le volume de culture était de 20 mL tandis qu'il était de 15 mL pour l'étude précédente.

Pour le *pool* généré avec le promoteur constitutif CMV5, une production trois fois plus faible, de l'ordre de 135 mg/L, a été quantifiée. Par la suite, les cellules ont été cultivées pendant deux mois en présence de MSX, puis la productivité des *pools* a de nouveau été comparée dans les mêmes conditions de culture en mode cuvée. Alors que la productivité du *pool* CR5-hCD200Fc a été maintenue, une nette diminution a été observée pour le *pool* CMV5-hCD200Fc. En effet, les titres sont passés de 135 mg/L à 40 mg/L, soit une diminution proche de 3 fois (Figure 27A). Une diminution de 5.5 fois de la productivité spécifique du *pool* CMV5-hCD200Fc a permis d'expliquer cette différence dans le titre en hCD200Fc. Une légère diminution dans la productivité spécifique du *pool* CR5-hCD200Fc a également été observée après deux mois (Figure 27C). Cependant, une augmentation de l'intégrale de la densité des cellules vivantes mesurée au jour 10, après deux mois en culture semble avoir compensée la perte de productivité spécifique, maintenant alors le titre en hCD200Fc. Pour le *pool* CMV5-hCD200Fc, une augmentation de l'intégrale de la densité des cellules vivantes plus marquée que pour le *pool* CR5-hCD200Fc a également été observée (Figure 27B).

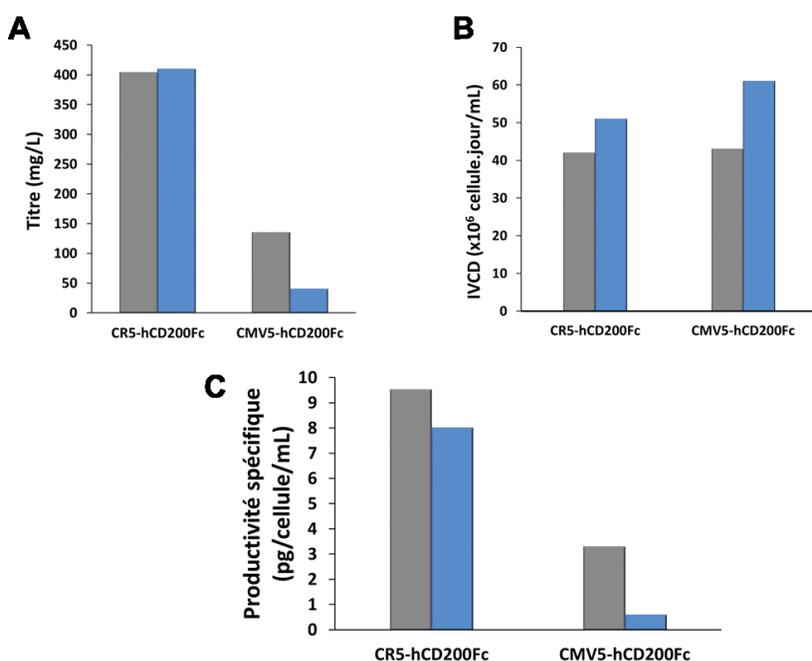


Figure 27 : Comparaison de la stabilité du *pool* CR5-hCD200Fc et du *pool* CMV5-hCD200Fc après deux mois en culture. Lorsque les *pools* ont été sélectionnés (viabilité > 95 %), leur productivité volumétrique a été évaluée à la fin de 10 jours d'une culture cellulaire en

mode cuvée. Par la suite ils ont été maintenus en culture durant 2 mois en présence de 50 μ M de MSX. Les titres de hCD200Fc ont été déterminés par pA-HPLC (A). La densité de cellules vivantes a été mesurée avec l'analyseur Cedex et l'intégrale de la densité de cellules vivantes a été calculée. (B) La productivité spécifique a été calculée pour chaque condition à partir du titre et de l'intégrale de la densité de cellules vivantes (C).

4.3.2 Comparaison de la fréquence de cellules hautement productrices du *pool* CR5-hCD200Fc et du *pool* CMV5-hCD200Fc via la génération de μ -pools

Afin d'examiner la distribution des cellules à haut rendement dans le *pool* CR5-hCD200Fc et le *pool* CMV5-hCD200Fc, des μ -pools ont été générés. Ainsi, pour chaque *pool* sélectionné (viabilité ≥ 95 %), les cellules ont étéensemencées dans trois plaques 384 puits, à la concentration de 5 cellules/puit. Dans le cas du *pool* CR5-hCD200Fc, une culture biphasique a été effectuée. Pour cela, les cellules ont été cultivées pendant 10 jours en l'absence de cumate, jusqu'à atteindre environ 30 à 50 % de la confluence dans la plupart des puits (phase de croissance). Ensuite, le cumate a été ajouté dans chaque puits et les titres de hCD200Fc ont été quantifiés cinq jours plus tard à l'aide d'un test HTRF. Les plaques ont également été imagées sur le microscope ImageXpress afin de déterminer la confluence pour chaque μ -pools (phase de production). Dans le cas du *pool* CMV5-hCD200Fc, les cellules ont été cultivées en parallèle des μ -pools CR5-hCD200Fc durant 15 jours et la quantification des titres en hCD200Fc ainsi que l'imagerie ont été effectués le même jour que pour les μ -pool CR5-hCD200Fc. Une efficacité de croissance des μ -pools proche de 100 % a été obtenue pour les deux conditions.

À la fin des 15 jours de culture, il apparaît clairement que la prolifération des μ -pools CMV5-hCD200Fc a été beaucoup plus faible que celle des μ -pools CR5-hCD200Fc (Figure 28A). En effet, la distribution gaussienne du pourcentage de confluence mesuré à la fin des quinze jours de culture révèle que la majorité des μ -pools CR5-hCD200Fc ont un pourcentage de confluence supérieure à 70 %. Pour les μ -pools CMV5-hCD200Fc la distribution est plus hétérogène avec une majorité des μ -pools ayant un pourcentage de confluence compris entre 40 % et 80 % (Figure 28B).

Les titres en hCD200Fc des μ -pools CR5-hCD200Fc sont nettement supérieurs à ceux des μ -pools CMV5-hCD200Fc. En effet, le titre maximum obtenu à partir d'un μ -pool CR5-hCD200Fc est de 184 mg/L comparé à 114 mg/L pour un μ -pool CMV5-hCD200Fc (Figure 28C). De plus, la distribution gaussienne des titres en hCD200Fc montre une population plus homogène pour les μ -pools CMV5-hCD200Fc, dont la quasi-totalité des μ -pools ont des titres inférieurs à 20 mg/L. Concernant les μ -pools CR5-hCD200Fc, la population est plus hétérogène en termes de production, avec une majorité des μ -pools produisant des titres compris entre 20 et 40 mg/L (Figure 28D).

Pour chaque μ -pool, une productivité spécifique relative a été déterminée en normalisant le titre hCD200Fc avec le pourcentage de confluence mesuré à la fin des 15 jours de culture. Les μ -pools CR5-hCD200Fc présentent des productivités spécifiques relatives plus fortes que les μ -pools CMV5-hCD200Fc (Figure 28E). De plus, le pool CR5-hCD200Fc est enrichi en cellules capables d'exprimer de hauts niveaux de protéines, puisque plus de 50 % des μ -pools ont une productivité spécifique relative supérieure à 25, alors que ceux-ci ne représentent que 4 % pour le pool CMV5-hCD200Fc. De plus, plus de la moitié des μ -pools CMV5-hCD200Fc ont une productivité spécifique relative inférieure à 2.5 (Figure 28F).

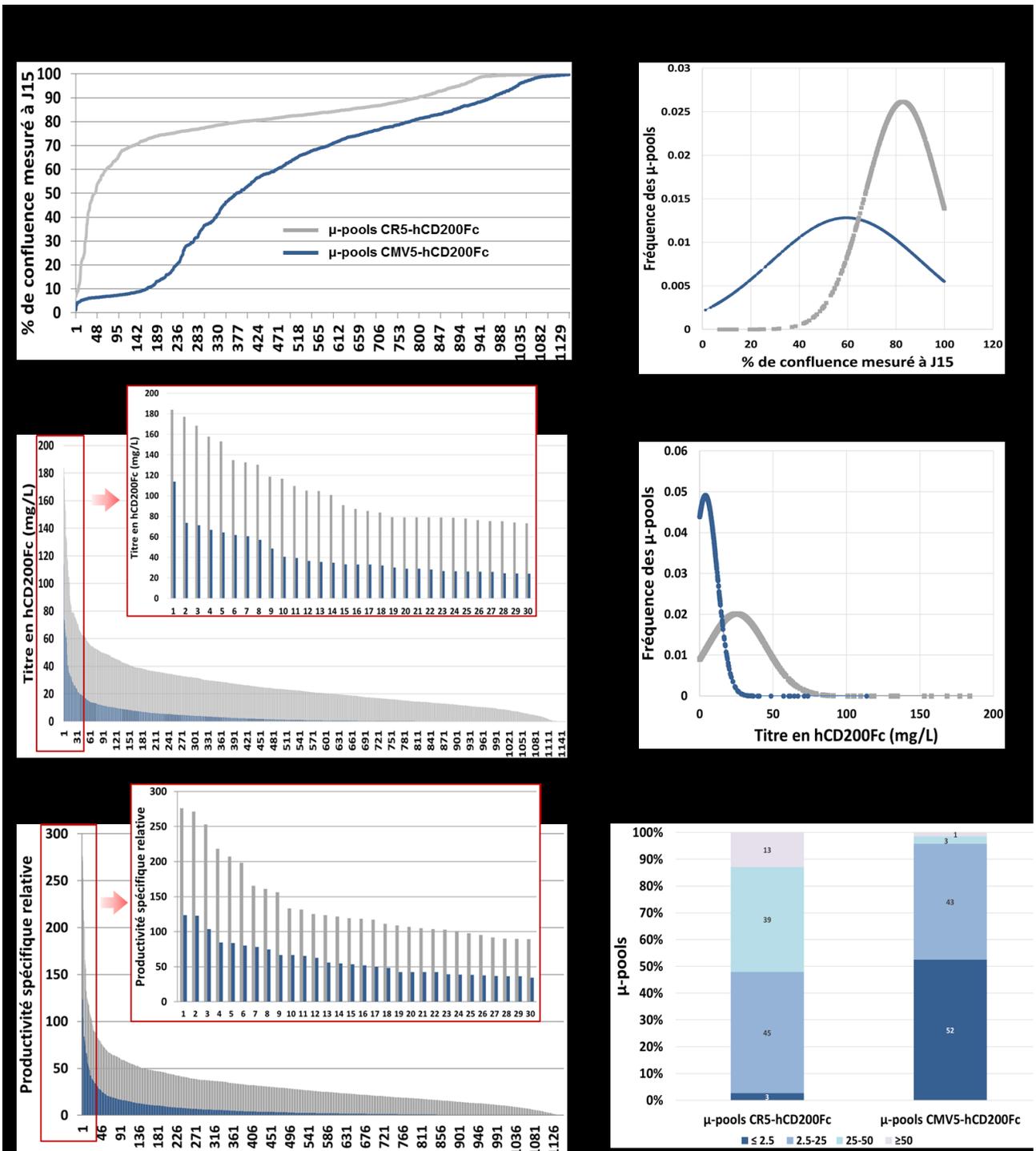


Figure 28 : Comparaison des μ-pools CR5-hCD200Fc et des μ-pools CMV5-hCD200Fc.
 Les pools CR5-hCD200Fc et CMV5-hCD200Fc ont étéensemencés à 5 cellules/puits dans trois plaques de 384 puits. Après 10 jours, les μ-pools CR5-hD200Fc ont été induits avec 0.5 μg/ml de cumate. Cinq jours après l'induction, le pourcentage de confluence a été calculé et le titre

en hCD200Fc a été quantifié dans chaque puits à l'aide d'un test HTRF. Le pourcentage de confluence pour chacun des μ -pools a été comparé (A) et a été représenté avec une distribution gaussienne (B). Un rendement de dilution limite proche de 100 % a été obtenu pour les deux pools puisqu'une croissance cellulaire a été observée dans environ 1150 puits. L'expression du hCD200Fc pour chaque μ -pool a été comparée (C) et la fréquence a été représentée par une distribution gaussienne (D). Une productivité spécifique relative a été calculée avec le pourcentage de confluence. Les μ -pools ont été comparés et classés en fonction de leur productivité relative (E et F).

4.4 Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté des études complémentaires réalisées au cours de ce doctorat afin de comparer le promoteur inductible CR5 et le promoteur constitutif CMV5.

4.4.1 Étude de la stabilité

Dans un premier temps, la stabilité des promoteurs a été comparée pour la production de la protéine hCD200Fc à partir de *pools* maintenus en culture pendant deux mois en présence de 50 μ M de MSX. Nous avons pu constater que le *pool* CR5-hCD200Fc ne présentait pas de diminution du titre en hCD200Fc même après deux mois. Bien qu'une légère diminution dans la productivité spécifique ait été observée, celle-ci a probablement été compensée par l'augmentation de l'intégrale de la densité de cellules vivantes, permettant ainsi d'atteindre un titre proche de 400 mg/L. Concernant le *pool* CMV5-hCD200Fc, une nette diminution de la productivité volumétrique a été observée, qui s'explique par une diminution de la productivité spécifique de 5.5 fois. De plus, même si une augmentation de l'intégrale de la densité de cellules vivantes a été observée après deux mois en culture, par rapport au *pool* CMV5-hCD200Fc à $t = 0$, celle-ci n'a pas permis de compenser la perte de productivité spécifique. En effet, un titre proche de 40 mg/L a été obtenu après deux mois en culture, soit trois fois plus faible que la production de 135 mg/L de hCD200Fc obtenue à $t = 0$.

L'ensemble de ces résultats laissent à penser qu'au fur et à mesure des passages cellulaires, une population de cellules produisant de hauts niveaux de protéines a été perdue

dans le *pool* CMV5-hCD200Fc, et de façon plus restreinte pour le *pool* CR5-hCD200Fc, probablement en raison du silence génique. Contrairement au promoteur CR5, le promoteur CMV5 est un promoteur sensible aux phénomènes épigénétiques pouvant diminuer l'efficacité de transcription. En effet, il contient plusieurs sites CpG sujets à la méthylation situés en amont de la boîte TATA. Parmi eux, le site C-179G, dont la méthylation est la plus fréquente, a un impact majeur sur la stabilité du promoteur hCMV au cours du temps [222]. Le promoteur CR5 ne contient pas ces séquences puisqu'elles ont été remplacées par les séquences (CuO)₆ à partir de la boîte TATA qui ne sont pas sensibles à la méthylation. Cependant, afin de confirmer cette hypothèse, des études supplémentaires devront être réalisées, par exemple via l'utilisation d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN afin d'observer si après deux mois en culture, les cellules traitées retrouvent leur productivité spécifique initiale dans le *pool* CMV5-hCD200Fc et le *pool* CR5-hCD200Fc.

4.4.2 Étude de la fréquence de cellules hautement productrices via la génération de μ -pools

L'étude de la distribution des cellules hautement productrices dans chacun des *pools* CR5-hCD200FC et CMV5-hCD200Fc a été réalisée.

L'efficacité de la dilution limite des cellules consistant à ensemercer les cellules de manière à obtenir une densité théorique d'une cellule/puit est d'environ 45 % dans notre laboratoire (résultats non publiés). Ainsi, afin d'augmenter cette efficacité, les μ -*pools* ont été générés à partir des *pools*, en ensemençant 5 cellules/puit. Ceci a permis une efficacité de près de 100 % pour chaque *pool*, puisqu'une croissance cellulaire a été observée dans la quasi-totalité des 1152 puits ensemençés.

Les productions volumétriques de la protéine hCD200Fc sont meilleures dans les μ -*pools* contenant le promoteur CR5, puisqu'un maximum de 184 mg/L a été obtenu, par apport à un titre maximum de 114 mg/L pour les μ -*pools* CMV5-hCD200Fc. De plus, la majorité des μ -*pools* CMV5-hCD200Fc ont des titres en hCD200Fc inférieurs à 20 mg/L alors qu'une grande majorité de μ -*pools* CR5-hCD200Fc ont des titres compris entre 20 et 40 mg/L. Les résultats des productivités spécifiques, obtenues après normalisation avec le pourcentage de confluence

mesuré au bout des 15 jours de culture, ont démontré un net enrichissement du *pool* CR5-hCD200Fc en cellules hautement productrices par rapport au *pool* CMV5-hCD200Fc. En effet, plus de la moitié des μ -*pools* CR5 ont une productivité spécifique supérieure à 25 alors qu'ils ne sont que 4 % parmi les μ -*pools* CMV5. Cet enrichissement en cellules hautement productrices pourrait être un avantage dans le développement de *pools* et de lignées cellulaires productrices. En effet, en raison de la très faible proportion de cellules hautement productrices dans la population cellulaire hétérogène sélectionnée, la sélection de clones forts producteurs est souvent considérée comme l'étape limitante. Des méthodes de criblage haut-débit coûteuse, permettant l'analyse de milliers de clones, doivent alors être développées. Ainsi, ces résultats, même s'ils comparent des μ -*pools* et non des clones issus d'une cellule unique, montrent que par rapport au promoteur constitutif CMV5, l'utilisation du système inductible au cumate pourrait faciliter l'étape de criblage et réduire les coûts et le temps de développement d'une lignée cellulaire.

La comparaison des pourcentages de confluence mesurés à la fin des 15 jours de production a démontré une nette différence dans la prolifération des μ -*pools* CR5 et des μ -*pools* CMV5. Or, pour la génération des μ -*pools* CR5, l'expression de hCD200Fc n'a pas été induite durant les 10 premiers jours dans le but de réduire le potentiel stress, dû à l'expression de la protéine recombinante, qui pourrait affecter la prolifération cellulaire. Puis, l'induction de l'expression de la protéine recombinante a permis une phase de production de 5 jours. Dans le cas des μ -*pools* exprimant hCD200Fc sous le contrôle du promoteur CMV5, la phase de production a duré 15 jours. Ainsi, l'expression constitutive de hCD200Fc semble avoir fortement impacté la croissance cellulaire. Encore une fois, l'utilisation d'un système inductible permettant une culture cellulaire biphasique semble plus avantageux puisque celui-ci permet une accumulation de biomasse cellulaire importante avant l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt.

L'ensemble de ces résultats ont démontré l'avantage de l'utilisation du promoteur inductible au cumate CR5 pour le développement de *pools*. En effet, dans cette étude la force du promoteur a été confirmé puisque des productivités en hCD200Fc trois fois supérieures ont été obtenues dans le *pool* CR5-hCD200Fc par rapport au *pool* CMV5-hCD200Fc. De plus, il semblerait que le CR5 soit également peu sensible aux phénomènes épigénétiques contrairement

au promoteur CMV5, permettant ainsi un maintien de la productivité des *pools* après deux mois en culture. Enfin, l'étude de la distribution de μ -*pools* a démontré un net enrichissement en cellules hautement productrices dans le *pool* CR5-hCD200Fc, pouvant faciliter l'étape de criblage et optimiser le développement de lignées cellulaires. L'étude des μ -*pools* suggère également que l'expression constitutive de hCD200Fc pourrait impacter de façon négative la prolifération cellulaire. Ainsi, au-delà de la force du promoteur CR5, l'inductibilité du système pourrait être un avantage dans la sélection du *pool*, car il permettrait de limiter le stress induit par l'expression de la protéine d'intérêt. Ceci permettrait alors d'augmenter la fréquence de cellules hautement productrices dans le *pool* sélectionné et de faciliter l'étape de criblage. Afin de valider cette hypothèse des études supplémentaires doivent être réalisées.

Chapitre 5 Effet de la régulation de l'expression de la protéine recombinante durant la génération de populations hétérogènes stables CHO^{BRI/rcTA}

5.1 Présentation de l'article

Ce chapitre reprend l'article de recherche intitulé « *Regulation of recombinant protein expression during CHO pool selection enhances high-producing cell frequency* » qui sera soumis le 7 mai 2017 dans le journal *Biotechnology and Bioengineering*

Dans cet article, l'effet de la diminution de l'expression de la protéine hCD200Fc, durant l'étape de sélection, sur la productivité du *pool* et la fréquence de cellules hautement productrices a été étudiée dans les cellules CHO^{BRI/rcTA}. Pour cela, deux populations issues de la même transfection avec le plasmide pTT75-hCD200Fc ont été sélectionnées en parallèle. Pour l'une des populations, de hauts niveaux d'expression de hCD200Fc ont été activés par l'ajout de 1 µg/mL de cumate. Pour l'autre population sélectionnée sans cumate, un niveau basal de hCD200Fc a toutefois été observé. L'effet de l'expression de hCD200Fc sur le profil de sélection de chacune des populations a été étudié par comparaison de la viabilité cellulaire, du nombre de cellules vivantes et du taux de croissance spécifique. L'expression de la protéine de stress BiP et les niveaux d'expression de hCD200Fc intracellulaires ont été quantifiés par western blot. La caractérisation du mécanisme de mort cellulaire impliquée a été permise par un double marquage des cellules via l'Annexine V et l'iodure de propidium. Par la suite, la productivité des *pools* sélectionnés a été comparée en culture en mode cuvée-alimentée. La fréquence de cellules hautement productrices a finalement été évaluée via la génération de µ-*pools*.

5.2 Regulation of recombinant protein expression during CHO pool selection enhances high-producing cell frequency

Adeline Poulain^{a,b}, Alaka Mullick^a, Bernard Massie^{a,b} and Yves Durocher^{a,c}*

^a National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, QC H4P 2R2, Canada.

^b Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

^c Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, QC, Canada.

5.3 Abstract

Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most widely used mammalian host for industrial-scale production of monoclonal antibodies (mAbs) and other protein biologics. Isolation of high-producing cell lines from heterogeneous population is a major bottleneck in the process of manufacturing a novel biologic and requires an extensive screening of multiple hundreds of clones. This is in part due to the low integration frequency of the expression cassette into transcriptionally active regions of the host genome for high level protein production. Moreover, the metabolic burden resulting from sustained high-level expression of the recombinant protein (r-protein) may represent another challenge for the generation of high-producers. Cells expressing high-levels of the r-protein also experience a variety of stress conditions, particularly endoplasmic reticulum (ER)-associated stress, and are likely to fail surviving the stringent pool selection process. Nevertheless, CHO cell line development processes have not traditionally received much optimization in this area because the vast majority use constitutive expression systems to produce biologics. We have previously reported the development of a cell line (CHO^{BRI/rcTA}) containing an efficient inducible expression system, based on the cumate gene switch. Using our cumate-gene switch, we generated inducible CHO^{BRI/rcTA} pools within two weeks from transfection with volumetric productivity of up to 1.1 g/L achieved for an Fc fusion protein after 17 days post-induction in a platform fed-batch culture

process. Herein, we show that the ability to regulate r-protein expression during pool generation confers an advantage for selecting high-producer cells. Our results indicate that reducing expression level (“off-state”) during pool selection process dramatically enhances high-producers frequency compared to a pool in which expression was induced to high level (“on-state”, mimicking a constitutive expression system). Moreover, following induction, overexpression of the r-protein during the pool selection process negatively affects pool recovery and ostensibly amplifies ER-stress and cell death phenomena compared to pool selection in the “off-state”. Our data strongly suggests that the cumate gene-switch is a valuable platform for stable clone generation and therefore we advocate for wider application of inducible systems for scalable production of biologics in CHO cells, including difficult-to-express r-proteins.

Keywords: CHO cells; recombinant protein production; stable expression; high producing cell; cumate gene-switch; ER stress

5.4 Introduction

Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most widely used mammalian host for industrial-scale production of monoclonal antibodies (mAbs) and other biologic proteins [42]. Many reasons, such as their ability to carry out human-like post-translational modifications [53], their resistance to human viruses infection [223], or their ease of growth in chemically defined serum-free medium in large scale cultures [50] explain this popularity. However, despite many advantages, the development of a robust stable cell line, producing high level of recombinant protein, is a labour-intensive process that typically requires from 6 to 9 months depending on the cell line, expression system and selection method. As a rule, the generation of producing cell line starts with the transfection of host cells with a plasmid vector containing both the gene of interest and a selection marker and is followed by the selection of cells having randomly integrated the plasmid vector into their genome. Selection leads to a pool of cells with random chromosomal integration sites, copy numbers and high heterogeneity in terms of protein expression level and cell growth [51]. This heterogeneity is in part attributed to the site of integration of the transgene and in part due to the intrinsic heterogeneity existing in the parental

cell line [224]. Because the generation of a cell line with the desired phenotype in both growth, productivity and stability is a rare event, isolation of a high producing clone from a heterogeneous population represents a major bottleneck since it requires the screening of hundreds to thousands of individual clones. The very low frequency of high producing clones could be attributed to a combination of cellular responses triggered by the stress due to the transfection process itself, the overexpression of the gene of interest, and the selection process that often use cytotoxic drugs. It is also likely that high producing clones tend to be overgrown by the faster-growing low or non-producer ones, due to metabolic burden associated with high level r-protein production [91, 92]. In addition, the presence of high level of r-protein in the endoplasmic reticulum (ER) can activate signalling cascades known as the unfolded protein response (UPR), endoplasmic reticulum overload response (EOR) and ER-associated-protein-degradation (ERAD) to restore ER homeostasis [125, 225-227]. As a first phase, activation of UPR promotes cellular survival by reducing unfolded protein load through several pro-survival mechanisms, such as attenuation of protein synthesis, specific expression of key components of the protein folding machinery or through cell cycle arrest in G1 phase. When ER stress is prolonged, and homeostasis is not restored, the UPR can trigger apoptosis [226, 228, 229]. Thus, some cells constitutively expressing high level of r-protein and consequently with a high level of ER stress will likely not grow or survive during pool selection process. This phenomenon could also be exacerbated by the presence of the selection drug, which may also sensitise cells to apoptosis or necrosis. Hence, in a previous study, Hu et al., 2013 [230] have speculated that during stable clone selection for the expression of “difficult to express” antibodies, high expressing cells not able to cope with ER stress would die. To circumvent this, inducible gene expression systems, allowing the regulation of transgene expression during the cell line development process could be an interesting approach. Accordingly, the use of a tetracycline responsive promoter to produce difficult-to-express mAbs in stable CHO cell lines was shown to prevent clonal instability, probably arising from intracellular accumulation of misfolded antibodies over time and after cryopreservation [175]. Using the same inducible expression system, they have successfully developed and scaled in bioreactors stable clones producing moderate level of an engineered version of the human DNase I (hDNase I), known to be toxic when overexpressed in CHO cells [174]. Although these studies clearly point to the advantages of using an inducible system with “toxic” targets, overexpression of well-behaved r-proteins is

not necessarily problematic, and therefore we wanted to examine whether the use of an inducible system for r-protein production could be more broadly advantageous, both for pool generation and subsequent clone isolation.

We previously developed a cell line for the inducible expression of recombinant proteins (r-proteins), based on the cumate gene switch. Using viral vectors, we have shown that the cumate-regulated promoter is not only inducible but also more efficient to produce various r-proteins than the constitutive human CMV-promoter in CHO cells [177]. Furthermore, we have recently shown that the cumate-inducible expression system, that combines the CHO^{BRI/rcTA} cell line and plasmids containing the cumate-responsive CR5 promoter, was also more efficient than using constitutive promoters and allowed for the rapid generation of stable CHO pools (< 3 weeks) producing high levels of r-proteins (400-900 mg/L) [89]. Moreover, we showed that CHO pool volumetric productivities were not affected by freeze-thaw cycle or following maintenance in culture for over one month in the presence of the selection drug methionine sulfoximine (MSX). Our results were consistent with the hypothesis that reducing transgene expression during the selection process may limit the stress induced by r-protein overexpression and leads to a recovered pool enriched in high producer clones, even with “non-problematic” r-proteins. Indeed, r-proteins used in our study appeared to be ‘non-toxic’ as we were able to readily select high-producing stable CHO clones with a standard constitutive promoter, albeit at lower expression level compared the CR5 promoter (unpublished data). In the current study, we examined if the ability to control r-protein expression during pool selection could be advantageous not only for generating stable CHO^{BRI/rcTA} pools but also for the isolation of producing cell lines. Using the Fc-fusion protein hCD200Fc as a case study, we have demonstrated that reduced levels (“off-mode”) of r-protein expression during MSX selection leads to the generation of stable CHO^{BRI/rcTA} pools with a 2-fold increased productivity in a biphasic fed batch culture process compared to pools in which high level (“on-mode”) expression was induced by cumate addition. Sub-population distribution study, performed by the generation of μ -pools by limiting dilution, revealed a significant increase in high specific productivity cells in the pool selected in the absence of cumate. Moreover, we observed that maintaining high level of hCD200Fc expression upregulated endoplasmic reticulum (ER)-resident glucose regulated proteins GRP78/Bip concomitant with a significant decrease in viable

cell number and proliferation during the early phase of the selection process, compared to non-induced pool. Our data strongly suggests that during selection, some cells constitutively expressing high level of r-protein and with a high level of ER stress will not survive or will be overgrown by cells able to cope with the stress. Thus, the use of an inducible system allowing the regulation of r-protein production could represent an advantage in the development of high producing stable clones by increasing the frequency of high-producers, thus facilitating clone screening and reducing time and costs.

5.5 Materials and Methods

5.5.1 CHO^{BRI/rcTA} cell line

CHO^{BRI/rcTA} cell line has been described in detail in our previous article [89]. Briefly, this cell line contains an inducible expression system based on the reverse activator configuration of the cumate-gene switch [166]. CHO^{BRI/rcTA} cells stably express both the cymene repressor (CymR), able to bind to the CuO operator sequence in the absence of cumate, and the cumate reverse transactivator (rcTA) composed of the VP16 activation domain fused to the reverse CymR, able to bind to the CuO sequence when the CymR is released from CuO in the presence of cumate. Upon transient or stable transfection of a plasmid vector encoding a gene of interest driven by the CR5 inducible promoter (which contains five CuO operator sequences), expression is activated by the addition of cumate (p-isopropylbenzoate), a small non-toxic inducer.

5.5.2 CHO^{BRI/rcTA} cell line culture condition

Cells were grown in PowerCHO2 chemically defined medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 4 mM L-glutamine. The cells were passaged three times per week at cell density of 0.1×10^6 to 0.2×10^6 cells/mL in 125 mL or 250 mL Erlenmeyer flasks (Corning, NY, USA), with 25 or 50 mL culture medium, respectively, and were grown at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm). Cell number and viability were measured with

the Cedex Innovatis' automated cell counter Cedex Analyzer (Roche, Laval, Qc) using the trypan blue exclusion method.

5.5.3 Cumate

Cumate was purchased from Ark Pharm Inc (Arlington Heights, IL, USA) and dissolved at 2 mg/mL in 95 % (v/v) ethanol. The cumate solution was aliquoted in sterile screwcap Eppendorf tubes and stored at -4 °C for up to 6 months.

5.5.4 Plasmid vectors

All the plasmid vectors used in this study were derived from the pTTTM vector backbone [79] in which the CMV5 promoter was replaced with CR5 promoter and a short sequence from the scaffold attachment region 3 (SAR3) of the human interferon α 2 gene and the human glutamine synthase (GS) gene driven by the SV40 promoter were inserted. The hCD200Fc [177, 178] is a fusion protein consisting of the human CD200 extracellular domain linked to a human IgG1 Fc domain. The cumate inducible CR5 promoter was developed by Mullick et al., 2006 [166], and the CMV5 promoter is an optimized human cytomegalovirus (CMV) promoter developed by Massie et al., 1998 [164]. The *hCD200Fc* gene was removed from the pTT75-hCD200Fc plasmid by digestion to generate the pTT75 empty vector. All plasmids were amplified in *Escherichia coli* (DH5 α) and purified using an in-house low-endotoxin chromatographic method (unpublished).

5.5.5 pDNA transfection

Cells were transfected using linear polyethylenimine (PEIproTM) from Polyplus-Transfection (Illkirch, France). On the day of transfection, cells with viability greater than 98 % were centrifuged and resuspended at a density of 2×10^6 cells/mL in CD DG44 medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), supplemented with 4 mM glutamine and 0.1 % Kolliphor® P 188. The cell suspension was distributed in 125 mL Erlenmeyer flasks (18 mL/flask). The DNA: PEIproTM complexes were prepared at a ratio of 1:5 (w:w), with a total of 20 μ g DNA in 1 mL of complete culture medium. Equal volume of diluted PEIproTM (100 μ g)

was added to the diluted DNA and the mixture was vortexed 4 s and incubated for 3 min at room temperature. Polyplexes were then added to the cells (2 mL per flask) and the flasks were returned to the incubator at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm).

5.5.6 MSX selection of CHO^{BRI/rcTA} cell pools

CHO^{BRI/rcTA} cell pools were generated by transfecting cells with the expression vectors as described above. The day after transfection, the cells were centrifuged for 5 min at 250 rpm and seeded at density of 0.5 x 10⁶ cells/mL in selection medium (PowerCHO2 medium supplemented with 25 µM of methionine sulfoximine) without (Cum0 pool) or with 1 µg/mL of cumate (Cum1 pool). Selection medium (supplemented or not with 1 µg/mL of cumate) was replaced every 2-3 days during 14 to 18 days while maintaining cell density at 0.5 x 10⁶ /mL. Cell number and viability were measured with the Cedex Innovatis' automated cell counter Cedex Analyzer as described above. When cell viability reached greater than 95%, pools were inoculated at 0.2 x 10⁶ cells/mL in 125 or 250 mL Erlenmeyer flasks.

5.5.7 hCD200Fc intracytoplasmic labelling

During CHO^{BRI/rcTA} cell pool selection, 1 x 10⁶ cells were collected every 2 to 3 days, washed in PBS, fixed with 1 mL ice-cold 70 % ethanol and stored at -20 °C prior to staining. The thawed cell pellets were washed twice with PBS, resuspended in 1 mL of PBS containing CloneDetect anti-Human IgG (Fc) specific antibody conjugated to fluorescein (FITC) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and incubated in the dark, under continuous agitation, for 1 hour at room temperature. Cell pellets were washed, resuspended in 500 µL of PBS and filtered through a 50 µm mesh Nitex tissue (Sefar Group, Heiden, CH). Flow cytometric analysis was done with a BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Each sample was measured with a minimum of 10 000 recorded events.

5.5.8 Fed-batch culture production

For the fed-batch cultures, CHO^{BRI/rcTA} cell pools were inoculated in 125 mL Erlenmeyer flask at 0.3×10^6 cells/mL in 20 mL of BalanCD Growth A chemically defined medium (Irvine Scientific, Irvine, CA, USA) supplemented with 25 μ M of MSX and incubated at 37 °C and 5 % CO₂ under constant agitation (120 rpm). At day 3 post-inoculation, when cell density reached 2.5 to 3.5×10^6 cells/mL, expression of the recombinant protein was induced by adding 2 μ g/mL of cumate. MSX concentration was adjusted to 125 μ M, and F12.7 feed (Irvine Scientific) was added followed by a temperature shift to 32 °C. Every 2-3 days, cultures were fed with 5% (v:v) F12.7 and samples were collected for recombinant protein (pA-HPLC) and glucose (VITROS 350, Orthoclinical Diagnostics, USA) concentration determination. Glucose was added to maintain a minimal concentration of 17 mM. hCD200Fc titers were determined by protein A high performance liquid chromatography (WATERS Corporation, Milford, MA) using a 2.1 mmD x 30 mmH, 104 μ L, POROS® A20 column (Invitrogen, Grand Island, NY). Before their injection on the column at a flow rate of 2 mL/min, samples were filtered by centrifugation at 8000–11,000 x g for 3 min through a NANOSEP MF GHP 0.45 μ m filter (PALL Life Sciences). Elution was performed using 0.15 M NaCl, pH 2.0, and UV detection was done at 280 nm. Quantification was done by integrating the surface under the elution peak and comparing against an IgG standard curve.

5.5.9 Quasi-limiting dilution cloning for the generation of μ -pools

Cells were plated in 384-clear bottom plates (Corning #3712) at a concentration of 5 cells/well in 60 μ L of BalanCD Growth A medium and incubated at 37 °C and 5 % CO₂ for 10 days until around 30 to 50 % of confluence was obtained in most wells. Then, 15 μ L of BalanCD Growth A medium supplemented with 2 μ g/mL of cumate was added in each well to obtain a final cumate concentration of 0.5 μ g/ml. Plates were incubated at 37 °C and 5 % CO₂ for 5 days. On day 5 post-induction, % of confluence was determined, 30 μ L of supernatant was collected in each well, and hCD200Fc titer was determined by Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) using the human IgG kit (Cisbio, France), according to manufacturer's recommendations. To determine the % of confluence in each well, plates were imaged using the

ImageXpress Micro XLS widefield high-content analysis system (Molecular Devices, CA, USA). Then, the % of confluence was calculated by dividing the total well surface area by the surface area occupied by the cells. Specific growth rate during production phase was calculated using the following formula, where C_{J5} corresponded to the % of confluency at day 5 post-induction and C_{Jind} the % of confluency at the day of induction.

$$\mu \text{ (day}^{-1}\text{)} = \text{Ln} (C_{J5} - C_{Jind})/\Delta t$$

5.5.10 Assays for apoptosis and necrosis

Apoptosis and necrosis were determined by the Annexin V-propidium iodide assay and flow cytometry according to the manufacturer's instructions (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma). Briefly, the harvested cells were washed twice with DPBS and resuspended in binding buffer at concentration of 1×10^6 cells/mL and incubated for 10 min at 37°C with Annexin V-FITC. Propidium iodide (PI) (1 $\mu\text{g/mL}$) was added immediately before flow cytometric analysis. Cells (50 000) were recorded in each analysis. Live cells being the population with no staining by either PI or Annexin V-FITC conjugate. Early apoptotic cells were stained with the Annexin V-FITC conjugate alone and late-apoptotic or necrotic cells will be stained by both the Propidium Iodide and Annexin V-FITC conjugate. Flow cytometric data were used to determine the percentage of cells undergoing apoptosis and necrosis.

5.5.11 Measurement of intracellular hCD200Fc and Bip expression by western blotting

For intracellular protein extraction, 1×10^6 cells were harvested, washed twice with cold PBS and lysed in 100 μL of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS), supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) and phosphatase inhibitor cocktail (PhosphoStop, Roche) and incubated on ice for 10 min. Lysates were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm and clarified extracts harvested and stored at -80°C. SDS-PAGE was performed with the protein extracts under reducing (50 mM DTT) conditions using Criterion™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel (Biorad) with MES running buffer. Proteins were transferred to a 0.2 μm nitrocellulose membrane for 7

min using Trans-Blot® Turbo™ RTA Kit (Bio-Rad, cat# 170-4271) and Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, cat# 170-4150). Before immunodetection, the membranes were stained with 0.2 % w/v Ponceau S. Membranes were then blocked with 5 % (w/v) BSA in TBS-T and then probed with anti-BiP primary antibody (1:4,000; Cell Signaling) or HRP-conjugated anti-human IgG Fc fragment (1: 5,000 ; Sigma). Pictures were recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad).

5.6 Results

5.6.1 r-protein overexpression negatively affects pool selection profile

The pTT75-hCD200Fc plasmid carrying *hCD200Fc* gene under the control of the CR5 inducible promoter, was inserted into the CHO^{BRI/rcTA} cell line by transfection. The day following transfection, 25 µM MSX selection was applied and the cells were split into two distinct populations, one left without cumate addition and the other one where hCD200Fc expression was activated by addition of 1 µg/mL of cumate. The two pools were selected in parallel and are referred as “Cum0 pool” (selected without cumate) and “Cum1 pool” (selected with 1µg/ml of cumate). Pool viability was determined every two days by trypan blue exclusion method and hCD200Fc expression was monitored on different days during the selection process by intracytoplasmic labelling of hCD200Fc with an anti-human IgG (Fc) specific antibody conjugated to fluorescein (FITC). Permeabilized-labelled cells were analyzed by flow cytometry and the fluorescence index ([FITC-fluorescence mean] x [percent of FITC positive cells]) of each pool was determined. As expected, addition of 1 µg/mL of cumate induced hCD200Fc expression (Figure 29A). A basal level of hCD200Fc expression was observed for the Cum0 pool as a result of the leakiness of the cumate expression system as previously described [89, 178]. Interestingly, cell culture parameter profiles were not the same for both pools during selection. Indeed, Cum1 pool experienced a more pronounced drop in cell viability that reach 56 % at day 6, significantly lower than the Cum0 pool where viability did not fall below 70 % on the same day. However, from day 11, both pools recovered and showed the same viability profile (Figure 29A). During the first nine days of selection, the cell growth rate was minimal,

and cells were resuspended in fresh medium at 0.5×10^6 cells/mL every two days. By calculating the number of living cells in each pool for this time period, significantly fewer Cum1 cells (around two-fold less) survived the MSX selection process as compared to Cum0 cells (Figure 29E). To rule out the possibility of a toxic effect of cumate itself or of the rcTA transactivator (which expression is induced by cumate addition), a pool transfected with the empty pTT75 plasmid was also selected with or without 1 μ g/mL of cumate (Figure 29B). No difference was observed between the two pools, and interestingly, viability did not fall below 80 % during MSX selection of both pools.

The cell growth rate observed during the first days of selection was lower (or even negative at day 4 and day 6) for the Cum1 pool expressing hCD200Fc compared to the Cum0 pool (Figure 29C). Clearly, cumate had no effect on the pool transfected with empty pTT75 plasmid since both growth rates and viable cell densities were the same for both Cum0 and Cum1 pools (Figure 29D and F). These observations suggest that hCD200Fc overexpression per se negatively impacts viability and cell proliferation in the early days of pool selection.

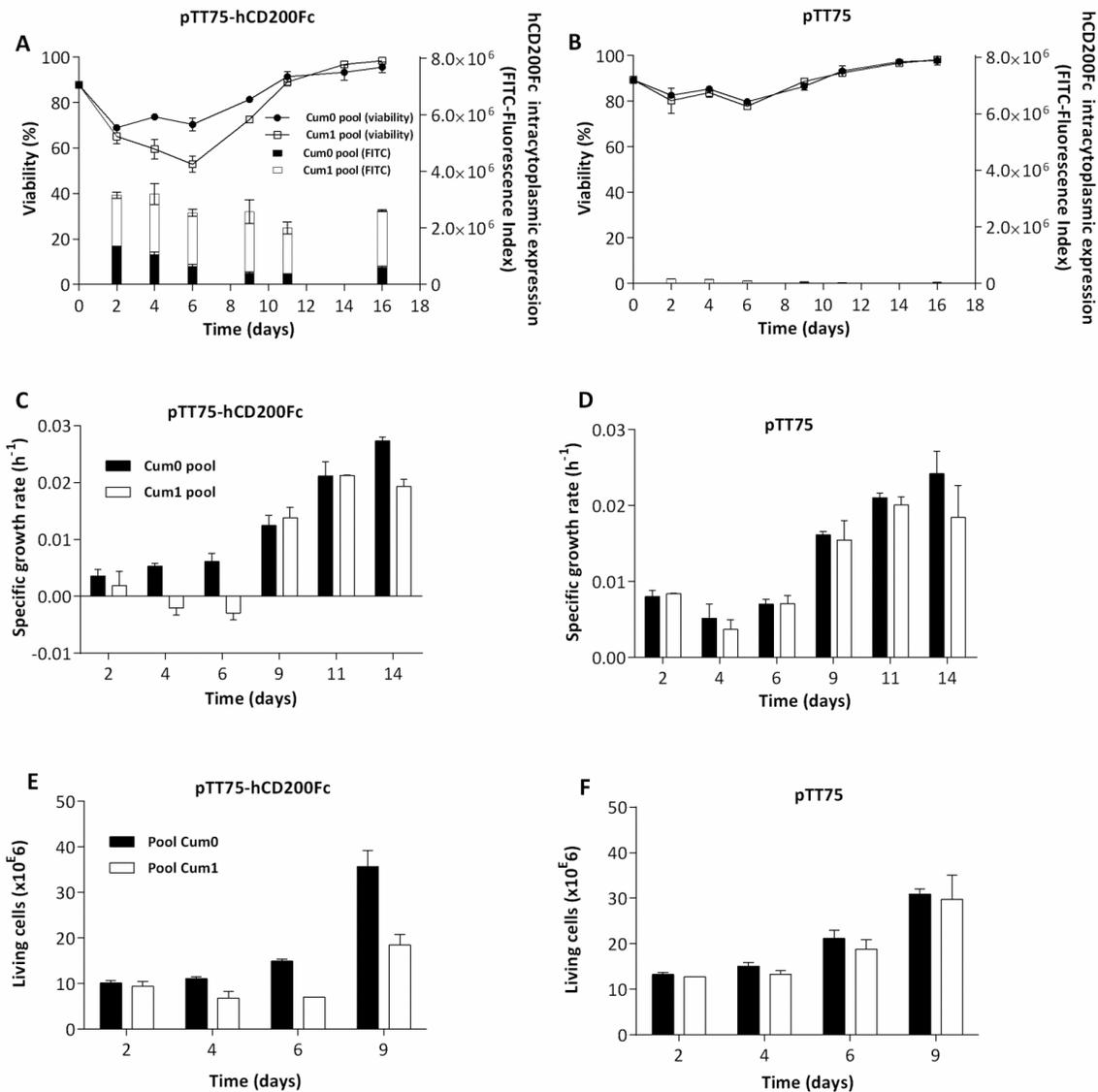


Figure 29: hCD200Fc expression negatively affects pool productivity. *CHO^{BRI/rcTA}* cell line were transfected (two independent transfections) with pTT75-hCD200Fc or pTT75 vector and 24 hpt, cells were split and selected with 25 μ M of MSX in absence (Cum0 pool) or in presence of 1 μ g/mL of cumate (Cum1 pool). Cell viability was measured and hCD200Fc expression was monitored at different time during the selection by intracytoplasmic labelling of hCD200Fc with an anti-Human IgG (Fc) specific antibody conjugated to fluorescein (FITC). Cells were analyzed by flow cytometry and the fluorescence index ($[FITC\text{-fluorescence mean}] \times [\text{percentage of FITC positive cells}]$) was determined (A and B). Specific growth rate (C and D) and number of living cells (E and F) were calculated at different time point for each pools. Data shown are the mean value, standard deviation of two biological replicates.

5.6.2 r-protein overexpression increases annexinV-FITC positive cells and Bip expression during pool selection

Cells amenable to high-level expression of the r-protein may experience a variety of stress conditions, particularly endoplasmic reticulum (ER)-associated stress [125]. The Endoplasmic Reticulum (ER)-resident Glucose Regulated Protein 78 (GRP78/Bip), which binds to and retains misfolded proteins within the ER lumen and helps in their refolding, is known to be a marker for the onset of ER stress [127, 225]. To study the ER stress in Cum0 and Cum1 pools during the selection process, the relationship between recombinant protein expression and Bip upregulation was examined. To discriminate stress caused by r-protein overexpression from stress due to selection process, Bip upregulation was examined in cells transfected with empty pTT75 plasmid. Intracellular hCD200Fc and Bip expression were monitored all along the selection by western blotting where pTT75-hCD200Fc and pTT75 lysates were study in the same conditions (loaded in the same electrophoresis gel and transferred on the same nitrocellulose membrane) (Figure 30A). As expected, the addition of cumate in the cells transfected with pTT75-hCD200Fc induced intracellular hCD200Fc overexpression (Figure 30B). It is noteworthy that the hCD200Fc protein was not detectable by Ponceau staining (not shown), suggesting that its intracellular steady-state level is fairly low. As previously observed, a basal level of hCD200Fc was also observed without cumate addition. Bip expression increased during the early phase of the MSX selection process for both pools transfected with pTT75 or pTT75-hCD200Fc, probably due to the stress induced by the glutamine depletion (Figure 30C). However, an upregulation of Bip independent of MSX selection was observed for the cells expressing hCD200Fc under cumate induction. Although it appeared that putative ER stress caused by low level of r-protein expression in un-induced cells was difficult to discriminate from the one caused by selection, our observations suggest that during the selection process, ER stress was upregulated for cells expressing hCD200Fc and higher r-protein expression was associated with greater ER stress.

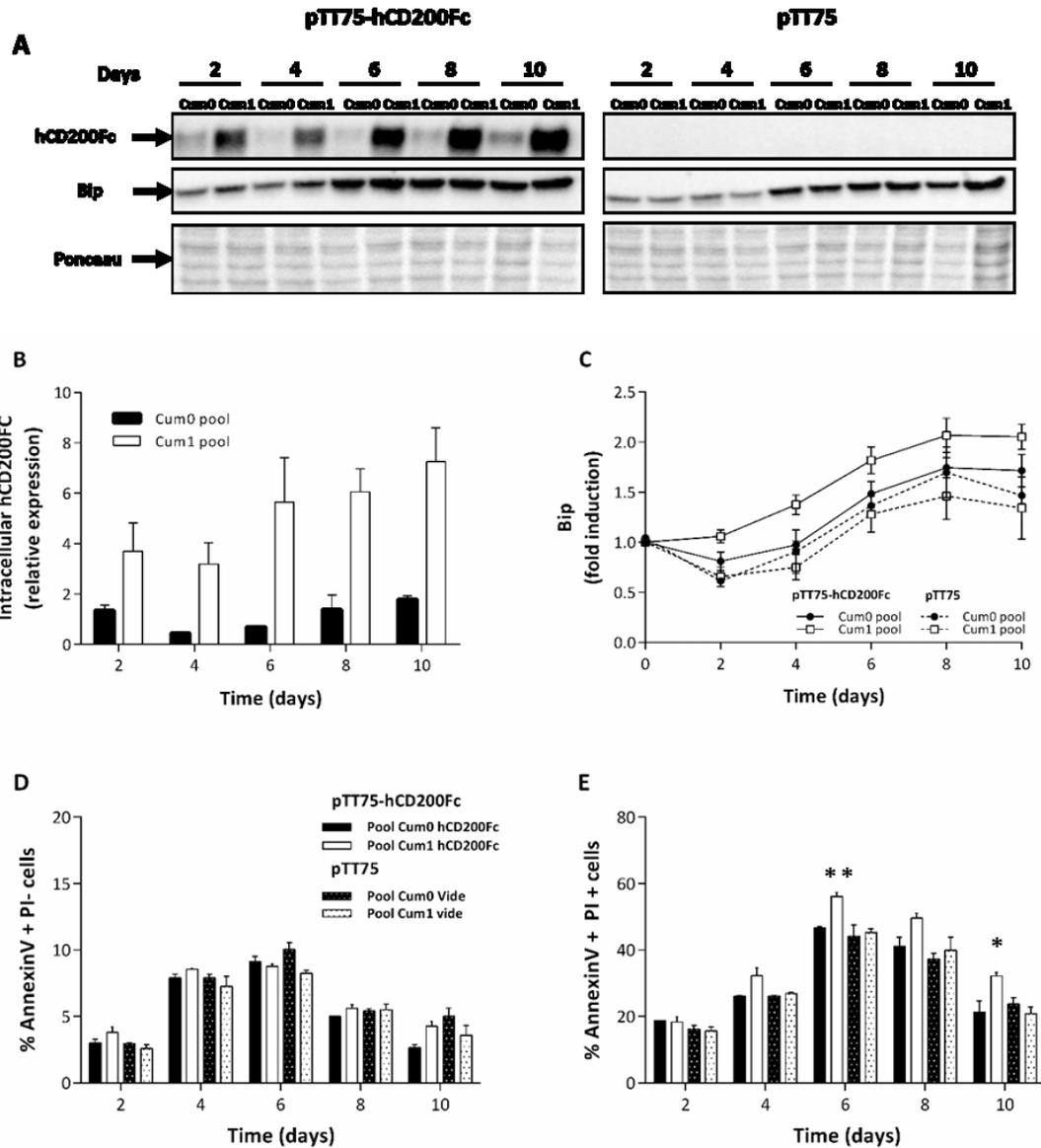


Figure 30: hCD200Fc expression increases Bip expression and annexin-V FITC positive cells during the selection process. *CHO^{BRI/rcTA}* cell line were transfected (two independent transfections) with *pTT75-hCD200Fc* or *pTT75* vector and 24 hpt, cells were split and selected with 25 μ M of MSX in absence (*Cum0* pool) or in presence of 1 μ g/mL of cumate (*Cum1* pool). Cells were harvested every two days during the first ten days of the selection. Bip (78 kDa) and hCD200Fc (94 kDa) intracytoplasmic expression were quantified by western-blot analysis from the same nitrocellulose membrane(A). Quantification of hCD200Fc level was expressed as a fold induction after normalization with red-ponceau (B). Quantification of Bip levels was expressed as fold induction after normalization with red-ponceau and with Bip quantification

at day 0 (presentating J0 of MSX selection) (C). Cells were labelled with the AnnexinV binding and PI uptake assay. The % of (AnnexinV + PI -) cells representing the % of early apoptotic cells and the % of (Annexin + PI+) cells representing the % of necrotic and apoptotic cells was calculated for each pool. Data shown are the mean value, standard deviation of two biological replicates. Significance was determined to be a value of $P < 0.05$.

To further characterize the type of cell death initially measured by trypan blue exclusion method, annexinV binding and PI uptake assay was used to measure apoptosis and necrosis in each pool during the selection process. The percentage of early apoptotic (annexinV positive/PI negative) cells was represented in Figure 30D, while the percentage of late apoptotic/necrotic cells (annexinV positive/PI positive) was represented in Figure 30E. No difference was observed between pools for cells in early apoptosis (Figure 30D). Though, for cells transfected with pTT75-hCD200Fc and overexpressing hCD200Fc (Cum1 pool), the percentage of late apoptotic/necrotic cells was significantly higher compared to cells expressing basal level of hCD200Fc (Cum0 pool) or expressing no protein (pTT75 pools) (Figure 30E). These results suggest that during the GS/MSX selection process, overexpression of hCD200Fc increases the percentage of dead cells. Though, because de difference observed was only for annexinV positive/PI positive cells, we couldn't determine if the cells death was due to apoptosis. Further studies should be carried out to confirm the mechanism involved in the death of high producing cells. Nonetheless, all these results suggest that during the MSX selection process, high level of r-protein expression further exacerbates induced ER stress that could ultimately lead to cell death.

5.6.3 Reducing r-protein expression during selection increases pool productivity

To evaluate if reducing r-protein expression during selection affects pool performance, pools that recovered from MSX selection under induced and un-induced conditions were compared using a fed-batch culture process. For both pools, a fed-batch culture process without cumate induction was also performed (un-induced pool). Viability and viable cell density were determined until day 17 where cell viability dropped to ~60 % (Figure 31A). No difference was observed for viability of both Cum0 and Cum1 pools in the induced or un-induced state. However, hCD200Fc overexpression negatively affected viable cell density for Cum0 pools, in comparison to the un-induced pools. Indeed, the maximal viable cell density for the non-induced state was around 1.6×10^7 cells/mL compared to 1×10^7 cells/mL for the induced state, resulting in a marked difference for the integral viable cell density calculated at the end of the fed batch culture (Figure 31B and C). As for the Cum1 pool, only a slightly more pronounced drop in viable cell density was observed from day 12 in the presence of cumate and a minimal difference was observed, between induced and un-induced pool, for the integral viable cell density (Figure 31B and C). Moreover, during the exponential phase, specific growth rates were the same for the induced or un-induced Cum1 pool, while a significant decrease was observed for the Cum0 pool in the induced state (Figure 31D). Interestingly, the specific growth rate calculated for Cum0 pool in the induced state was similar to Cum1 pool in the un-induced or induced state. To compare pools volumetric productivities, samples were collected every 2-3 days and hCD200Fc titers quantified by protein-A HPLC (Figure 31E). Interestingly, the average titer for Cum0 pools at day 17 (1.1 g/L) was around 2-fold higher compared to the Cum1 pools (0.6 g/L). The induced/un-induced ratio for both Cum0 and Cum1 pool was around 12. Specific productivity was determined from the volumetric titers and IVCD every 2-3 days (Figure 31F). This parameter clearly demonstrated a significant difference between the pools, since specific productivity of induced Cum0 pool (peak at 14 pg/cell/day) was around two-fold higher compared to induced Cum1 pool (peak at 7 pg/cell/day) during the whole duration of the fed-batch culture. Because induced Cum0 and Cum1 pools had similar viable cell density profiles, the difference observed in the final fed-batch titers could be explained by an enrichment of Cum0 pool with cells with higher specific productivity.

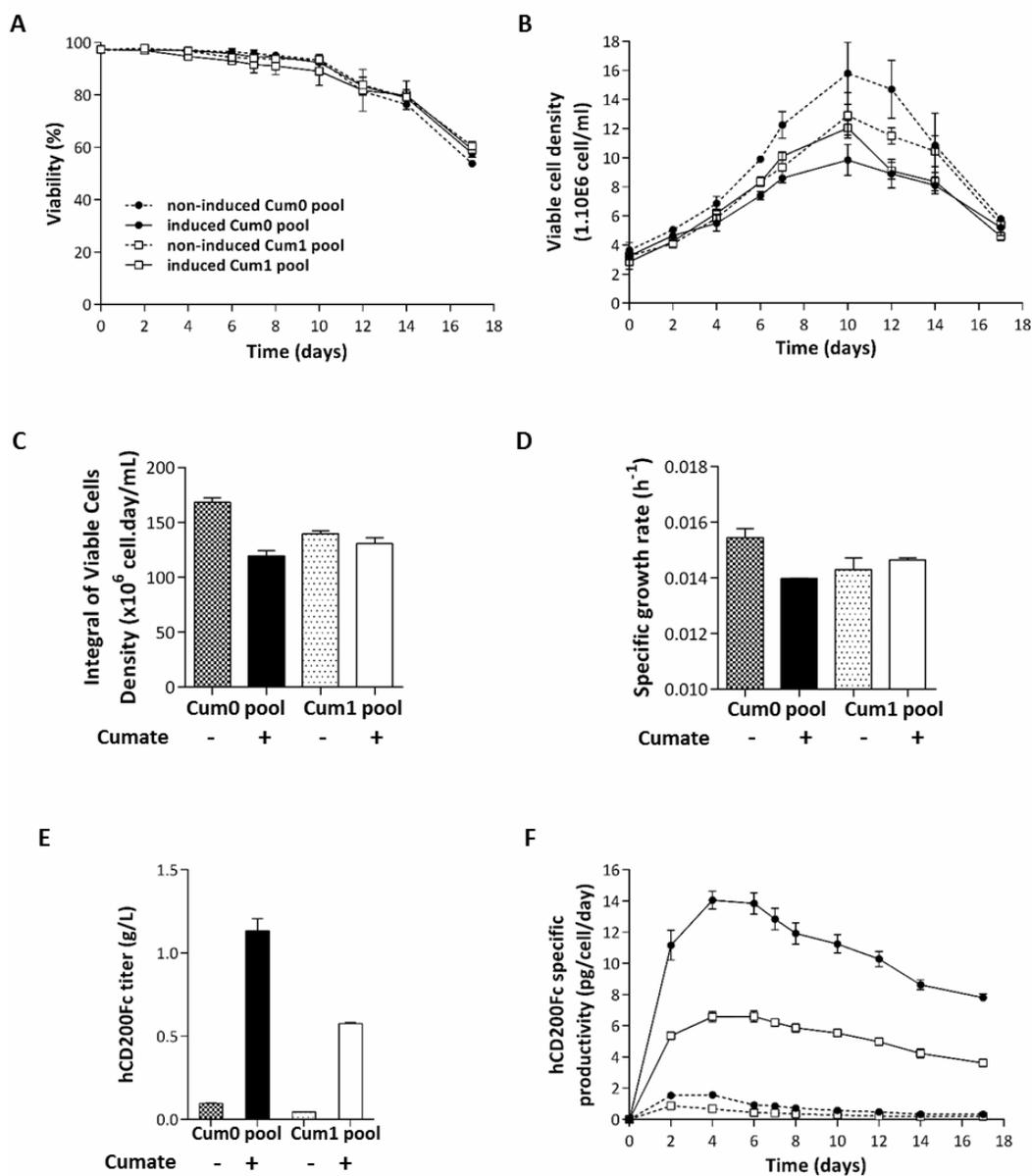


Figure 31: Comparison of Cum0 and cum1 pools during biphasic fed-batch culture process. Viability (A) and viable cell density (B) were monitored all along the fed-batch culture process for both induced or un-induced Cum0 and Cum1 pools. The integral of viable cell density (IVCD) was calculated at day 17 (C). Specific growth rate was calculated during the exponential phase between day 2 and day 7 (D). Volumetric productivity was evaluated at the end of the 17 days fed-batch process (E) and specific productivities were determined from titers and corresponding IVCD (F). hCD200Fc titers were quantified by pA HPLC. Data shown are the mean value, standard deviation of two biological replicates.

5.6.4 Regulated r-protein expression during selection enhances high producer frequency

To examine the distribution of high producer cells in the respective pools, we wanted to analyse clonal distribution following limiting dilution in 384-well plate. Given the low efficiency of single cell cloning and the need to analyse many cells for statistical significance, wells were seeded at 5 cells/well in order to obtain a large number of oligo-clonal populations referred as micro-pools (μ -pools). Cells were seeded in 384-well plates at 5 cells/well and grown for 10 days in absence of cumate, until around 30 to 50 % of confluence was obtained in most wells (growth phase). Then, cumate was added in each well and hCD200Fc titers were quantified five days later using a HTRF-assay. Plates were also imaged on the ImageXpress microscope to normalize for confluence for each μ -pools (production phase) (Figure 32A). A μ -pool growth efficiency close to 100 % was obtained for both Cum0 and Cum1 pools since cell growth was observed in 1150 wells out of the 1152 seeded wells. Gaussian distribution histograms showed a large heterogeneity regarding the % of confluency at the induction time, but this heterogeneity was similar for both Cum0 and Cum1 μ -pools (Figure 32B). The frequency of low confluency wells (≤ 40 %) was slightly higher for Cum1 μ -pools compared to Cum0 μ -pools. This could be an indication that un-induced Cum1 pool has a lower specific growth rate compare to un-induced Cum0 pool as observed previously (Figure 31D). At the end of the production phase, the % of confluency distribution was similar for both pools, suggesting that proliferation during production phase was the same (Figure 32C). The hCD200Fc titers of μ -pools derived from Cum0 pool were higher than those derived from Cum1 pool and, interestingly, μ -pools producing more than 100 mg/L were non-existent in the Cum1 pool, while 14 were found in Cum0 pool (Figure 33A and B). For each μ -pool, a relative specific productivity was determined by normalizing hCD200Fc titer with the % of confluency measured at the end of the production phase. Cum0 μ -pools had higher specific productivity compared to Cum1 μ -pools. In addition, Cum0 pool was clearly enriched in high producing μ -pools since more than 50% of them had a relative specific productivity greater than 25 whereas these represented only 16% in Cum1 pool (Figure 33B). Interestingly, μ -pools with very low productivity were almost non-existent in the Cum0 pool. In summary, we observed that Cum0 pool was enriched with cells having a higher specific productivity.

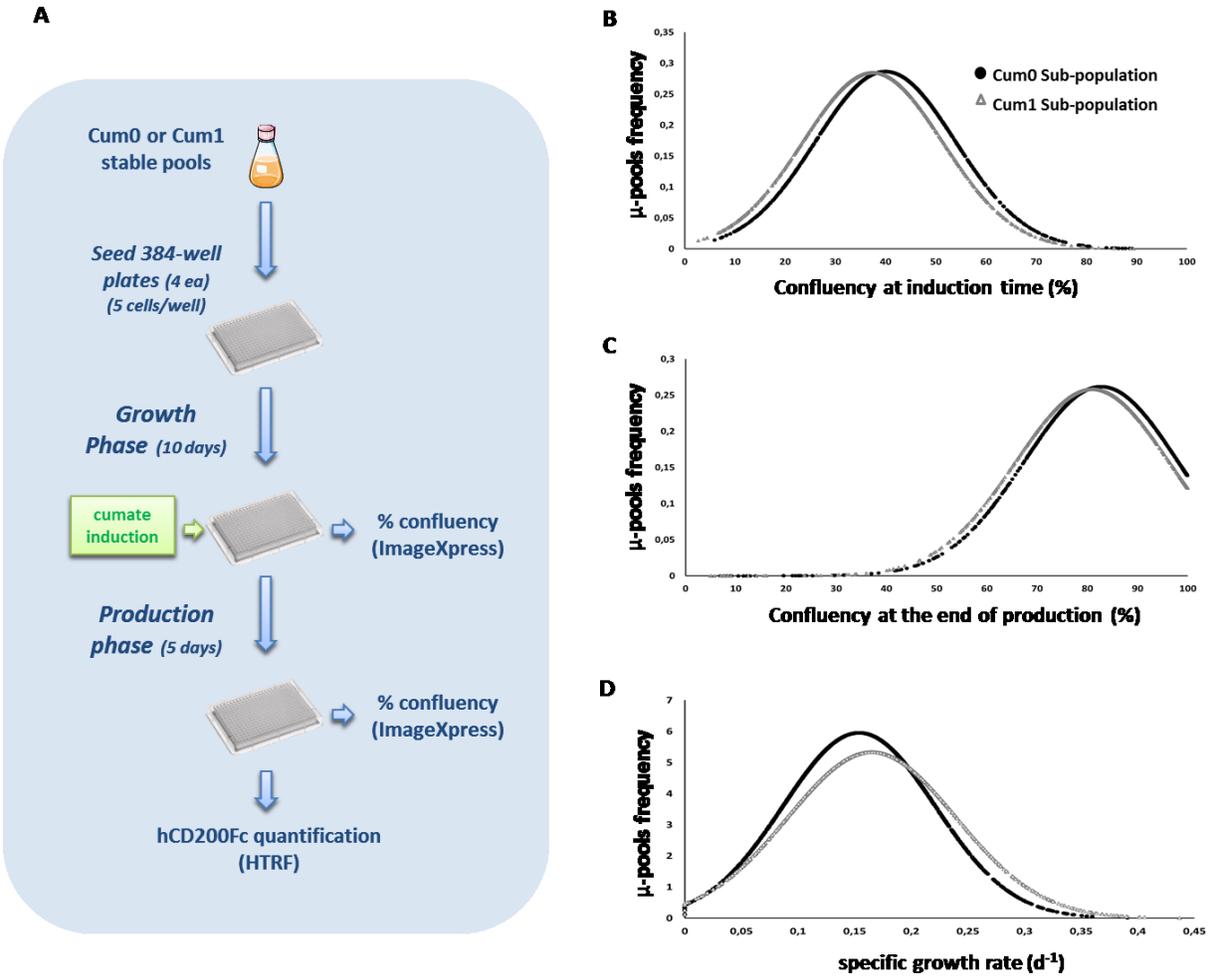


Figure 32: Cum0 and Cum1 μ -pools: evaluation of μ -pools proliferation distribution. *Cum0 and Cum1 pools were seeded at 5 cells/well in a 384 well plate. Growth and production phase were decoupled in a biphasic culture (A). The % of confluency was calculated at the induction time and at the end of the production phase. A gaussian distribution of the % of confluency at the induction time and at the end of the production phase in each well for both Cum0 and Cum1 μ -pools was represented (B and C). A specific growth rate for the production phase was calculated with the % of confluency for Cum0 μ -pools and Cum1 μ -pools and were represented with gaussian distribution (D). A limiting dilution efficiency close to 100 % was obtained for both pools since a cell growth was observed in around 1150 wells.*

5.7 Discussion

In industrial CHO cell line development, the main objective is to select a clone able to express high protein product level whilst maintaining rapid cellular biomass accumulation and being stable over time. Despite significant efforts from the biopharmaceutical industry to develop new technology platforms to shorten the time of biologics development, isolation of cell lines, meeting manufacturing process criteria is still a major bottleneck, requiring the screening of several hundreds of individual cells from a heterogeneous population of transfectants. The low occurrence of high producing clones is the result of a combination of various cellular processes in response to the stress and constraints caused by the integration and overexpression of the gene of interest. Some of these effects can be protein-specific [231]. For instance, it is not surprising that high level expression of cytotoxic/cytostatic r-proteins is not well-tolerated by host cells. In these cases, it has been demonstrated that regulating the expression of the gene of interest is essential. Hence, the Cumate switch has been used successfully to stably express proteins such as the VSVg and interferon beta, two proteins whose constitutive expression causes a dramatic decrease in cell viability (our unpublished results). Other inducible systems have similarly been used to produce “difficult to express” proteins [174, 175]. However, it is not clear what advantage an inducible system may have for the expression of a protein that is not cytotoxic/cytostatic effects, or simply put, “easy-to-express. In this study we have explored the effect of regulating expression of the easy-to-express hCD200Fc r-protein during the selection process on the frequency of high-producing cells recovery. Using our CHO^{BRI/rcTA} cell line, harbouring cumate gene switch components, we have selected in parallel two pools from the same transfection. One pool was induced at high level by cumate addition (Cum1 pool), while the second pool was left un-induced (Cum0 pool), leaving only a basal hCD200Fc expression level due to the system leakiness. After the end of the selection recovery phase, pool productivity was compared in fed-batch culture carried out under the same conditions. We found that repressing hCD200Fc expression during selection dramatically increased pool productivity since Cum0 pool titer at the end of the fed-batch process was 1.1 g/L while Cum1 pool titer was only of 0.6 g/L. The difference in volumetric productivity between the pools was mostly due to a difference in specific productivity since the latter was on average two-fold higher for induced Cum0 pool compared to induced Cum1 pool all along the

fed-batch culture. While cumate induction of the Cum0 pool significantly decreased cell proliferation, it had no impact on Cum1 pool specific growth rate. Moreover, for both pools, overexpression of hCD200Fc (induced state) was associated with a lower integral of viable cell density. No difference was however observed on pool viability. Thus, it seemed that although hCD200Fc was not toxic to the cell as it did not affect viability, its high-level expression seemed to impose a metabolic constraint on the cell as it was associated with a reduced cell proliferation. This was mostly true for Cum0 pool, i.e. Cum1 seemed to adapt to hCD200Fc expression, probably because this last was mainly composed of cells expressing protein at lower levels, that had less impact on cellular metabolism. These results suggested that Cum0 pool was enriched in cells with higher specific productivity under cumate induction compared to Cum1 pool. The frequency of high-producing cells was then evaluated for both pools. Due the low cloning efficiency of our CHO cells by limiting dilution (<45 %, unpublished data), and to reduce heterogeneity in cell recovery and growth after single cell plating, μ -pools were generated by seeding 5 cells/well in 384-wells plate. This allowed us to obtain more than 1150 μ -pools for both pools on a total of 1152 seeded wells (representing a “cloning” efficiency of ~100 %). Biphasic culture was performed by decoupling the growth and the production phase after cumate induction. In biphasic culture cellular density at induction time can affect specific productivity and specific growth rate [202]. By evaluating the % of confluency in each well at the induction time, we found a large heterogeneity, but distribution was the same for Cum1 μ -pools and Cum0 μ -pools ensuring that there was no bias in our study. We observed that the proportion of Cum0 μ -pools producing high hC200Fc titers was greater compare to Cum1 μ -pools. Our results also demonstrate that Cum0 pool is enriched in cells with higher specific productivity: more than 13% of μ -pools had a relative specific productivity greater than 50 (and 50% greater than 25) compared to only 3% (and 16% greater than 25) in Cum1 pool. Moreover, μ -pools with volumetric titers above 100 mg/L were inexistent in Cum1 population, while 14 were present in Cum0. Importantly, the decreased specific growth rate observed in induced Cum0 pool during fed-batch culture indicates an inverse relationship between specific productivity and growth rate. Thus, it is clear that during the selection process, many cells with high specific productivity were lost or severely overgrown in the Cum1 pool.

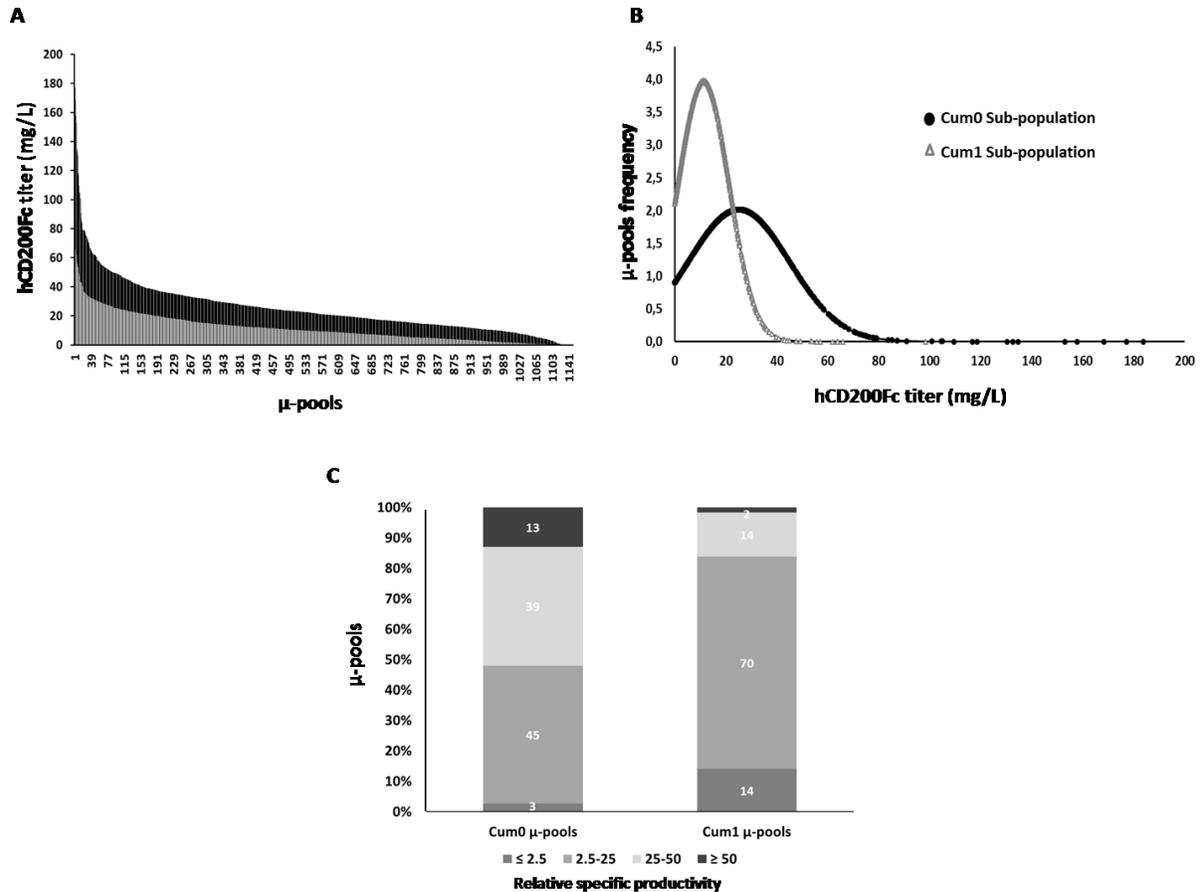


Figure 33: Cum0 and Cum1 μ-pools: Cum0 was enriched in high producing cells. *hCD200Fc titer was quantified in each well using a HTRF assay and a relative specific productivity was calculated with the % of confluence at the end of the production phase. hCD200Fc expression of each Cum0 and Cum1 μ-pools was compared (A) and the frequency was represented by a gaussian distribution (B). μ-pool from each pool were classified based on the relative specific productivity (C). A limiting dilution efficiency close to 100 % was obtained for both pools since a cell growth was observed in around 1150 wells.*

It is noteworthy that, by comparison with a cellular population transfected with an empty pTT75 plasmid, we observed that hCD200Fc expression negatively affects the selection profile. Indeed, in the early days of pool selection during which the vector copy number is expected to be high before stable integration into the host genome, activation of high r-protein expression level led to a decrease in cellular proliferation and viability. Higher hCD200Fc production level correlated with lower viability of pools under selection with a two-fold decrease in the total

viable cell population in Cum1 pool compared to Cum0 pool. In some studies, a correlation has been observed between increased level of r-proteins and ER-stress marker levels during transient expression [125, 225]. In response to ER-stress, UPR pathway can be activated and lead to the activation of several sensors that will act to restore cellular homeostasis through mechanisms, such as attenuation of protein synthesis, specific expression of key components of the protein folding machinery or through cell cycle arrest in G1 [125, 225-227]. When ER stress is prolonged, and homeostasis is not restored, the UPR can trigger apoptosis [226, 228, 229]. Thus, we have studied the correlation between intracytoplasmic hCD200Fc expression and the endoplasmic reticulum (ER)-resident glucose regulated proteins GRP78/Bip, known to be an ER-stress marker [127, 225], during the early days of the selection process. To discriminate stress caused by r-protein overexpression from stress due to selection process, Bip expression was examined in cells transfected with empty pTT75 plasmid. An increased in Bip expression level was observed during the early days of the selection, for both pTT75-hCD200Fc and empty pTT75 plasmids transfected cells suggesting that glutamine depletion and selection due to MSX addition could activated ER-stress. In support of this point, in a previous study, Shanware and collaborators [232] observed that glutamine-deprived cells exhibited increased phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2a (eIF2a) an hallmark of ER stress. However, to confirm this, additional studies should be carried out. With the aim to characterize the mechanism leading to cell death we analysed cells by flow cytometry following annexinV-FITC and propidium iodide labelling. This assay is based on the binding of annexin-V to phosphatidyl-serine (PS), which is characteristically translocated to the outer plasma membrane of the cell in the early phase of apoptosis, and uptake of the dye PI upon loss of membrane integrity. Our results confirmed that a higher portion of cells overexpressing high level of hCD200Fc died during the selection process compared to un-induced cells. However, because the difference was observed only for cells labelling annexin-V positive/ PI positive, corresponding to cells in late apoptosis or necrosis, we couldn't conclude about the mechanism involved in cell death.

Nevertheless, all of these results suggested that for some cells expressing high level of r-protein, ER-stress pathway was activated and could lead to the cell death during selection process. These observations were consistent with a previous study, where the use of CHOK1

cells, harbouring a larger ER size, for cell line generation resulted in a greater survival of high expressing clones compare to those generated in DUXB11 cells [230]. The authors hypothesised that the larger ER in CHOK1 cells may allow a better folding and secretion capability and would be advantageous for the survival of high expressing clones during the selection process. Consequently, they proposed that cells not able to cope with ER stress would die during selection process. In another study, Jones et al. have shown that the production of transferrin, a difficult to express protein, was accompanied by an overexpression of the stress protein Bip and a decrease in HEK cell growth. Moreover, they demonstrated the advantage of using T-REx inducible technology for the isolation of clones that produce transferrin at high levels, compared to a constitutive expression system [173]. Overall, our data strongly suggests that during a pool selection process, some cells constitutively expressing high level of r-protein will experience some levels of ER stress. In some cases, cells will not survive the combined drug selection and ER stress while many will be overgrown by cells expressing lower levels of r-protein. Thus, the use of an inducible system allowing the regulation of r-protein production during selection could be advantageous in the development of high producing stable clones by increasing the frequency of high-producers, thus facilitating clone screening and reducing time and costs.

5.8 Author contributions

Experiments were designed by BM, AM, YD and AP. Experiments were performed by AP. AP wrote the manuscript, BM, AM and YD revised the manuscript.

5.9 Acknowledgements

The authors would like to thank Louis Bisson for performing protein A-HPLC analyses. This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). This is NRC publication #

Discussion générale

Développement et optimisation de la plateforme de production rapide via les populations hétérogènes stables CHO^{BRI/rcTA}

Face à la demande croissante de protéines recombinantes utilisées à des fins thérapeutiques, des méthodes de production permettant la génération rapide de quantités suffisantes de produits afin d'amorcer les études précliniques doivent être développées.

La transfection transitoire en cellules HEK293 est la méthode traditionnellement utilisée pour générer rapidement des quantités modérées de protéines recombinantes. En effet, des concentrations de protéines allant de centaines de milligramme au gramme par litre peuvent être générées en 2 à 4 semaines [62]. Cependant, de nombreux efforts ont été réalisés ces dernières années par les industriels afin d'augmenter l'expression transitoire des cellules CHO, jusqu'ici connu pour ses faibles rendements. En effet, la CHO est l'hôte de référence pour la production à grande échelle et des différences au niveau des profils de glycosylation des protéines produites pouvant impacter la stabilité et la bioactivité du produit ont été observées selon le système d'expression utilisé (HEK293 vs CHO) [82]. Ainsi, il est préférable d'utiliser la même lignée cellulaire durant toutes les phases du développement. Les optimisations, notamment des lignées cellulaires, des vecteurs d'expression ainsi que des processus de culture, ont alors permis d'atteindre des titres de l'ordre de 2 g/L. Malgré tout, l'une des principales limitations de l'expression transitoire réside dans les quantités importantes de plasmide et d'agent de transfection nécessaires, rendant le processus onéreux et limitant grandement la mise à l'échelle.

Afin de pallier les limitations de l'expression transitoire, l'utilisation de *pools* stables générés à partir des cellules CHO suscite, depuis quelques années, l'intérêt des industriels pour l'expression de protéines recombinantes nécessaires aux essais précliniques. En effet, cette méthode permet d'obtenir des rendements plus élevés comparés à l'expression transitoire, tout en diminuant drastiquement le temps de développement par rapport aux lignées cellulaires productrices. De plus, le transgène étant intégré de façon stable dans le génome de la cellule, la

mise à l'échelle est facilitée. Enfin, le criblage de clones pour le développement de lignées cellulaires en vue d'une production industrielle peut-être effectué à partir du *pool*.

Dans ce contexte, nous avons combiné la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA}, contenant les éléments de la configuration inverse double régulée du système inductible au cumate et les vecteurs plasmidiques pTT, dans lesquels ont été insérés le promoteur CR5, afin de développer une plateforme de *pools* stables performante. Pour cela, nous avons concentré nos efforts sur la mise au point des conditions de transfection, de sélection et d'induction permettant de raccourcir le temps de développement des *pools* tout en générant des titres élevés de protéines recombinantes. Les anticorps monoclonaux ainsi que les protéines de fusion Fc étant les protéines recombinantes dominant le marché des produits biologiques, l'anticorps rituximab et la protéine de fusion hCD200Fc ont été utilisés dans cette étude.

Que ce soit pour l'expression transitoire ou stable, l'efficacité de transfection, et par conséquent l'expression de la protéine recombinante, peut-être affectée par la topologie de l'ADN [216]. Dans notre étude, des rendements de production deux fois supérieurs ont été observés pour les *pools* transfectés avec de l'ADN plasmidique sous la forme super enroulée et ce, pour les deux protéines recombinantes testées. Dans le cas du plasmide linéarisé, l'étude de l'efficacité de transfection via l'utilisation d'un gène rapporteur codant pour la GFP a montré une diminution dans le pourcentage de cellules positives à la GFP mais surtout et de façon plus marquée, dans l'intensité de la fluorescence mesurée. Cette diminution pourrait être liée au fait que l'ADN plasmidique sous sa forme linéaire est plus susceptible à la dégradation par les nucléases de la cellule, limitant alors la quantité disponible pour l'intégration [218]. Finalement, pour le développement de *pools* stables, l'utilisation d'ADN plasmidique sous la forme super enroulée est un avantage puisqu'une étape supplémentaire de linéarisation du plasmide, pouvant entraîner des diminutions dans les rendements de plasmides et retarder l'étape de transfection, est évitée.

Depuis quelques années déjà, le système de sélection GS/MSX est devenue très populaire pour la sélection de *pools* et de lignées cellulaires stables. En effet, contrairement au système DHFR, qui requiert une étape supplémentaire d'amplification génique pour obtenir des rendements de production élevés, le système GS/MSX permet de forte production en une seule étape, diminuant grandement le temps de sélection [183]. Dans notre étude, les productions les

plus élevées ont été obtenues pour des *pools* sélectionnés avec des concentrations de MSX comprises entre 25 et 50 μM . Toutefois, la productivité spécifique du *pool* peut être augmenté avec des concentrations de MSX supérieures à 50 μM . Cette augmentation pourrait s'expliquer par une sélection plus efficace des cellules ayant intégré le transgène dans des régions du génome transcriptionnellement plus actives. Cependant, même si cette approche pourrait éventuellement être intéressante pour le criblage de clones forts producteurs, l'utilisation de fortes concentrations de MSX pourrait s'avérer être contre-productif dans le cas de la sélection de *pools*. En effet, une sélection avec des concentrations élevées de MSX prolonge le temps de sélection et peut mener à la mort de la totalité des cellules dans le cas de concentrations trop élevées.

Pour qu'un système inductible soit efficace, il doit posséder plusieurs caractéristiques telles que la possibilité d'être finement régulé et hautement inductible, être simple d'utilisation et être sensible à un inducteur non toxique et peu coûteux [171]. Concernant l'étude des conditions d'induction, des concentrations de cumate comprises entre 1 $\mu\text{g/mL}$ et 2 $\mu\text{g/mL}$ se sont révélées être optimales afin d'obtenir des niveaux de production élevés. Au-delà de ces concentrations, la production diminue, probablement due à une diminution de la productivité spécifique du *pool* puisqu'aucun effet négatif n'a été observé sur la densité cellulaire et la viabilité des cellules (données non publiées). Des études plus poussées sont toutefois nécessaires afin de déterminer la cause de cette limitation. Il est à noter que cette tâche pourrait s'avérer laborieuse face à la complexité du système inductible, lequel présente deux niveaux de régulation (régulation de la production du rcTA et du transgène par le CymR). Le système inductible au cumate permet de finement réguler l'expression de la protéine recombinante dans les cellules $\text{CHO}^{\text{BRI/rcTA}}$, avec des concentrations de cumate aussi faibles que 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, un niveau d'expression basal de l'ordre de 50 mg/L a été observé pour la production de la protéine hCD200Fc, avec un ratio *ON/OFF* égal à six pour l'induction à 1 et 2 $\mu\text{g/mL}$ de cumate. Ce niveau basal est dû à une activité transcriptionnelle intrinsèque de la boîte TATA située en aval de la séquence (CuO)₆ en l'absence de cumate et peut s'avérer limitant, notamment pour la production de protéines toxiques. Dans une étude précédente, utilisant la même configuration du système cumate à partir d'une lignée cellulaire CHO différente (cellules CHO-Cum2), des ratios *ON/OFF* de six ont également été observés pour la production de

hCD200Fc dans des cellules infectées avec des lentivirus [178]. Toutefois, l'induction a été réalisée avec 0.5 µg/mL de cumate et la lignée cellulaire ainsi que les conditions de culture (densité cellulaire, changement de température) étaient différentes. Finalement, le système inductible au cumate sous sa configuration inverse double régulée est un outil très intéressant pour la production de protéines recombinantes et notamment pour la mise à l'échelle. En effet, le cumate est une molécule non-toxique et peu coûteuse. De plus, l'induction des cellules se fait très simplement, par ajout de l'inducteur dans le milieu de culture. Enfin, il peut être facilement éliminé et ne constitue pas un risque de contamination puisque des études réalisées par spectrométrie de masse LC/MS, selon un protocole développé en interne, n'ont pas détecté de cumate dans le matériel purifié après une seule étape de protéine-A.

L'ensemble de ces optimisations a permis la génération, en moins de 4 semaines à partir de la transfection, de *pools* produisant des titres proches de 0.9 g/L pour la protéine hCD200Fc et 0.35 g/L pour l'anticorps rituximab après 14 jours de culture dans un mode cuvée-alimentée non optimisé. Bien que de nombreux points soient encore à optimiser, les productivités obtenues à partir de la combinaison de la lignée CHO^{BRI/rcTA} et des vecteurs plasmidiques sont généralement du même ordre que celles retrouvées dans la littérature. En effet, une étude précédente a montré la sélection de *pools* produisant de 320 à 500 mg/L d'un anticorps monoclonal dans des cultures de 30 à 50 mL en mode cuvée-alimentée de 14 jours [84]. Dans une autre étude, utilisant des éléments transposables connus pour faciliter l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives du génome, des titres compris entre 350 et 550 mg/L de protéine fusion Fc dans une culture de 100 mL en mode cuvée de 14 jours ont été atteints. Plus récemment, toujours via des éléments transposables, Rajendra *et al.* ont généré des *pools* produisant jusqu'à 7.6 g/L dans une culture de 16 jours en mode cuvée-alimentée [87]. Cependant, ces titres ont été obtenus dans des cultures de 4 mL. Cette augmentation, comparée aux résultats décrits dans l'étude publiée par Balasubramanian *et al.*, serait due à l'utilisation d'une transposase hyperactive et à l'utilisation de procédés de culture en mode cuvée-alimentée optimisés. Par la suite, la même équipe a rapporté des titres de 4.8 g/L pour la production d'IgG à partir de *pools* cultivés à une échelle de 25 L en mode cuvée-alimentée. Néanmoins, ces études n'ont pas démontré la stabilité de la productivité des *pools* à long terme.

En effet, la perte de productivité au cours du temps est l'une des limitations dans le développement de *pools* pour la production de protéines recombinantes. D'une façon générale, ce phénomène est attribué à une diminution des ARNm dans la cellule, due à une perte de copies ou à des facteurs épigénétiques tels que la méthylation des promoteurs ou la désacétylation des histones. Dans le cadre de notre étude, nous avons montré que les productions étaient maintenues après un mois en culture en présence de 50 μ M de MSX et ce, pour les deux protéines testées. Dans une étude non publiée (chapitre 4), nous avons également démontré la stabilité du *pool* exprimant la protéine hCD200Fc sous le contrôle du promoteur CR5 après deux mois en culture. En effet, l'augmentation de la prolifération cellulaire a permis de compenser la légère diminution de productivité spécifique et d'obtenir le même titre en hCD200Fc qu'à $t = 0$. À l'inverse, un *pool* exprimant la protéine sous le contrôle du promoteur constitutif CMV5 a montré une diminution par 3 du titre en protéine hCD200Fc, et par 5.5 de la productivité spécifique et ce, malgré la présence sur le vecteur pTT des éléments S/MAR, permettant le maintien d'une structure de chromatine transcriptionnellement active. Néanmoins, le promoteur CR5, contrairement au promoteur CMV5 est un promoteur stable et faiblement sensible aux phénomènes épigénétiques. En effet, il ne contient pas les séquences susceptibles au phénomène de méthylation situées en amont de la boîte TATA et conduisant à une diminution de l'expression du gène d'intérêt [222].

La cryopréservation des *pools* est une méthode clé pour le développement de lignées cellulaires productrices. En effet, celle-ci permet de s'assurer de la disponibilité des matières premières et de l'uniformité du processus pendant toute la durée du développement de produits biologiques. Au cours de notre étude, nous avons montré que les cycles de congélation/décongélation n'avaient aucun impact sur la production de hCD200Fc. Dans une étude récente, publiée par une équipe de la compagnie Genentech, le problème d'instabilité exacerbé après décongélation des lignées productrices a été surmonté grâce à l'utilisation de lignées cellulaires CHO comportant le système inductible à la tétracycline [175]. Ces résultats démontrent ainsi l'avantage de l'utilisation d'un système d'expression inductible dans le développement de banques de cellules ayant une perte de productivité ou exprimant des protéines toxiques.

L'agrégation des protéines est un problème majeur dans le développement des produits biologiques. Celle-ci peut induire des effets indésirables tels que des réponses immunogènes, une activité biologique réduite ou compromise mais également causer des problèmes de formulation [133]. Pour notre étude, la qualité du rituximab et du hCD200Fc a été évaluée via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ainsi que par la chromatographie par exclusion stérique (*Size Exclusion Chromotography*, SEC). Les résultats obtenus ont ainsi démontré que les protéines exprimées à partir du *pool* sont similaires en termes d'agrégation et de poids moléculaire par rapport à celles exprimées à partir de clones stables. Cependant, l'utilisation de ces deux techniques de séparation, permettant une étude basée sur la taille du produit, ne permettent pas l'étude des profils de N-glycosylation. Pourtant, la N-glycosylation est un attribut de qualité critique des anticorps monoclonaux et comme expliqué précédemment, des variabilités ont été observées selon le système d'expression. Ainsi, une caractérisation des profils de N-glycosylation, en utilisant des techniques telles que la chromatographie d'interaction hydrophile (*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC-UPLC) ou la spectrophotométrie de masse, pourrait permettre d'estimer la correspondance entre les profils de N-glycosylation des protéines produites dans les *pools* par rapport à celles produites dans les clones. Dans une récente étude, Fan *et al.*, ont montré des profils de glycosylation similaires pour deux AcM produits à partir de *pools* stables ou de lignées cellulaires isolées à partir de ces *pools* [3].

Dans les conditions d'induction optimisées, nous avons démontré que le promoteur CR5 est un promoteur bien supérieur aux promoteurs constitutifs CMV5 et EF1 α -HTLV pour la production de rituximab et de hCD200Fc en *pools* stables. En effet, il permet des niveaux de production 2 à 4 fois plus élevés selon la protéine produite et le promoteur constitutif utilisé. Cette différence pourrait être expliquée par la variabilité de l'efficacité transcriptionnelle des promoteurs dans les cellules CHO. En effet, le promoteur CR5 est régulé par le transactivateur chimérique rcTA, qui se fixe de façon spécifique et avec une forte affinité à la séquence (CuO)₆, tandis que CMV5 et EF1 α -HTLV sont régulés par des facteurs de transcription endogènes. Ces résultats sont confirmés par une étude précédente, dans laquelle la supériorité du promoteur CR5, par rapport au promoteur CMV5, a été démontrée dans la lignée CHO-cTA (exprimant le transactivateur cTA qui se lie aux séquences CuO en l'absence de cumate) pour l'expression du

gène rapporteur codant pour la GFP [177]. Enfin, l'étude des sous-populations, via la génération de μ -*pools*, a montré que le système inductible au cumate permettait d'enrichir le *pool* exprimant la protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur CR5 en cellules avec des niveaux d'expression protéique plus élevés, par rapport au *pool* exprimant la protéine sous le contrôle du promoteur constitutif CMV5 (chapitre 4).

Face à ces résultats, nous avons voulu déterminer si au-delà de la force du promoteur CR5, l'inductibilité du système, permettant la régulation de la protéine recombinante en tout temps, pouvait être avantageux dans le développement de *pools* et de clones stables.

Effet de la régulation de l'expression de la protéine recombinante durant la phase de sélection sur la productivité et la sous population des *pools* CHO^{BRI/rcTA}

Au cours du développement de lignées cellulaires, l'intégration aléatoire du transgène dans le génome de la cellule conduit à la sélection d'une population de cellules très hétérogènes en termes de productivité et de croissance. Parmi cette population, la proportion de clones présentant de fortes productivités est extrêmement faible (de l'ordre de 0.003 %) [7], nécessitant ainsi le développement de méthodes de criblage haut-débit très coûteuses.

Aucun mécanisme précis ne permet d'expliquer cette très faible occurrence. Toutefois, celle-ci pourrait être la conséquence d'une combinaison de mécanismes cellulaires déclenchés en réponse au stress dû à la transfection, à la surexpression du gène d'intérêt ainsi qu'au processus de sélection, utilisant la plupart du temps des agents cytotoxiques. De plus, les cellules ayant une forte productivité sont généralement associées à des taux de croissance plus faibles, probablement dus à une surcharge métabolique liée à la surexpression de la protéine recombinante [85]. Enfin, la capacité de sécrétion des cellules de mammifères est limitée. Ainsi, lors d'une activité transcriptionnelle importante, les mécanismes traductionnels et post-traductionnels sont souvent limitants notamment au cours de l'expression transitoire, menant à l'activation de voies de stress telles que la voie de stress du réticulum endoplasmique (RE) [130]. Cette dernière permet notamment l'activation de la voie UPR qui favorise la survie cellulaire via la réduction de la charge de protéines mal repliées et ce, grâce à plusieurs mécanismes de

survie tels que l'atténuation de la synthèse protéique globale, l'expression de protéines chaperonnes et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Cependant, lorsque le stress est prolongé et que l'homéostasie n'est pas restaurée, l'UPR peut déclencher l'apoptose [226, 228, 229]. Ainsi, certaines cellules, exprimant de façon constitutive de hauts niveaux de protéines recombinantes et par conséquent avec un niveau élevé de stress du RE, ne proliféreront pas ou ne survivront pas durant le processus de sélection du *pool*.

Dans cette seconde partie de notre projet de recherche, nous avons donc voulu déterminer si la réduction de l'expression de la protéine recombinante, durant la phase de sélection du *pool*, limitait le stress dû à de hauts niveaux d'expression. Ceci permettrait alors d'augmenter le taux de cellules hautement productrices dans le *pool* sélectionné. Pour cela, nous avons étudié l'impact de la régulation, durant la phase de sélection, de l'expression d'une protéine recombinante non toxique, sur la productivité du *pool* sélectionné et sur la répartition de la population clonale. Notre choix de protéine d'intérêt s'est porté sur la protéine hCD200Fc car elle permet, comme nous l'avons vu précédemment, des productions de l'ordre de 0.9 g/L et ne présente aucune toxicité pour la cellule. Ainsi, nous avons sélectionné parallèlement deux populations issues de la même transfection et ce, afin de limiter toutes variations dues à la transfection. Pour l'une des populations, la protéine hCD200Fc a été activée par ajout de 1 µg/mL de cumate (*pool* Cum1) tandis que l'autre population a été sélectionnée sans induction (*pool* Cum0), même si un niveau basal d'expression a pu être observé.

Une fois la sélection achevée, la productivité des *pools* a été comparée au cours d'une culture cellulaire en mode cuvée-alimentée. Étonnamment, nous avons constaté une nette diminution de la production volumétrique du *pool* Cum1, dont le titre avoisinait 0.6 g/L, par rapport au *pool* Cum0 produisant jusqu'à 1.1 g/L de la protéine hCD200Fc. Des productivités spécifiques deux fois plus faibles pour le *pool* Cum1 tout au long de la culture en mode cuvée-alimentée ont permis d'expliquer ces différences. De plus, l'expression de hauts niveaux de hCD200Fc, bien que non toxique au vu des profils de viabilité, semble affecter la prolifération cellulaire du *pool* Cum0, contrairement au *pool* cum1, dont le niveau plus faible d'expression semble limiter la contrainte. Ainsi, ces résultats tendent à prouver que les cellules exprimant de hauts niveaux de hCD200Fc sont associées à des proliférations plus faibles. Par la suite, l'étude de la distribution des μ -*pools* générés à partir des *pools* Cum1 et Cum0 a mis en évidence un

enrichissement du *pool* Cum0 en cellules exprimant de hauts niveaux de protéines. En effet, la proportion de μ -*pools* présentant de fortes productivités spécifiques était de 50 % pour le *pool* cum0 alors qu'elle ne représentait que 16 % de la population du *pool* Cum1. De plus, aucune population de μ -*pools* exprimant des titres de hCD200Fc supérieurs à 100 mg/L n'a été observée dans le *pool* cum1.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que durant la phase de sélection, une partie de la population de forts producteurs a été perdue dans le *pool* Cum1. Comme l'indique les résultats en mode cuvée-alimentée, il semble évident qu'au cours du processus de sélection, de nombreuses cellules ayant une productivité spécifique élevée ont été perdues ou surpassées par une population cellulaire faiblement productrice.

L'étude du profil de sélection pour chacun des *pools* a montré une diminution de la viabilité et de la prolifération cellulaire lorsque des niveaux élevés de hCD200Fc sont exprimés. En effet, durant les premiers jours suivants la transfection, l'induction de l'expression de hCD200Fc dans le *pool* Cum1 a mené à une diminution par deux du nombre de cellules vivantes par rapport au *pool* Cum0. Ces résultats suggèrent que durant les premiers jours de la sélection, alors que l'intégration du transgène dans la cellule n'a pas encore été complétée et que le vecteur se trouve en grande quantité sous forme épisomale, l'expression de niveaux élevés de protéines entraîne une diminution de la prolifération et augmente la mort cellulaire. Des études précédentes ont démontré que des niveaux élevés d'expression transitoire du transgène mènent à l'activation du stress du RE [125, 225]. Or, comme mentionné précédemment, une activation prolongée du stress du RE peut mener à l'apoptose.

Par la suite, la corrélation entre les hauts niveaux d'expression intracellulaire de hCD200FC et de la protéine Bip/GRP78, connue pour être un marqueur du stress du RE, a été démontrée [127, 225]. Ces résultats suggèrent que durant la sélection, l'expression constitutive de haut niveau de protéines mène à l'activation du stress du RE. Dans une étude précédente, Jones et al., 2005 [173] ont montré que l'utilisation du système inductible à la tétracycline permettait de sélectionner des clones produisant des niveaux de transferrine plus élevés que les clones exprimant la protéine de façon constitutive. Ils ont également démontré que l'expression de la transferrine menait à la surexpression de BiP et à une diminution de la prolifération cellulaire. Ils ont ainsi suggéré que l'utilisation d'un système inductible permettait d'éviter le

stress lié à l'expression de la transferrine et conduisait à la sélection de meilleurs clones. Il est à noter que, dans ce cas, l'induction du stress du RE ne semble pas liée à une surexpression de la protéine mais à une difficulté d'expression. De plus, la doxycycline (ou tétracycline) peut avoir un effet cytostatique sur les cellules. Ainsi, un contrôle permettant d'évaluer cet effet aurait dû être effectué dans l'étude.

Afin de caractériser le mécanisme de mort cellulaire observé durant la sélection, un double marquage à l'Annexine-V/iodure de propidium a été réalisé. Ce test a permis de confirmer que l'expression de haut niveau hCD200Fc accentue la mort cellulaire. Cependant, étant donné que les différences observées se situaient uniquement dans les cellules marquées annexine-V positives/IP positives, correspondant à des cellules en apoptose tardive ou en nécrose, le mécanisme impliqué dans la mort cellulaire n'a pas pu être confirmé.

Néanmoins, l'ensemble des résultats observés suggèrent que pour certaines cellules exprimant de hauts niveaux de protéines, la voie de stress du RE est activée et pourrait mener à la mort des cellules durant la phase de sélection. Des études supplémentaires sont donc nécessaires, notamment afin de déterminer si l'expression de niveaux protéiques élevés mène à l'apoptose via l'activation de la voie UPR.

Conclusion et recommandations

Le premier objectif de cette thèse a été de développer une plateforme efficace pour l'expression rapide de hauts niveaux de protéines recombinantes, en combinant la lignée cellulaire CHO^{BRI/rcTA} et les vecteurs plasmidiques pTT contenant le promoteur inductible CR5.

Via l'optimisation des conditions de transfection, de sélection et d'induction, nous avons développé une plateforme de génération de *pools* permettant de produire en moins de 4 semaines à partir de la transfection, des titres d'anticorps rituximab de l'ordre de 0.35 g/L et des titres de protéines de fusion Fc de l'ordre de 1.1 g/L. Nous avons confirmé la force du promoteur inductible CR5 par rapport aux promoteurs CMV5 et EF1 α -HTLV, deux systèmes constitutifs utilisés dans l'industrie. De plus, nous avons démontré le maintien de la productivité des *pools* exprimant la protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur CR5, après deux mois en culture.

Cependant, l'ensemble de ces études ont été menées dans des volumes n'excédant pas 30 mL de milieu de culture en mode cuvée-alimentée. Or, dans le but de générer une quantité de produit suffisante à des études précliniques, la mise à l'échelle est indispensable. Ainsi, afin de valider la preuve de concept, la productivité des *pools* pourrait être testée au cours de productions en mode cuvée-alimentée dans des volumes de plusieurs litres. Des optimisations dans les stratégies d'alimentation pourraient également être effectuées afin d'augmenter les titres en protéines recombinantes.

Pour que les protéines recombinantes issues des *pools* cellulaires puissent être utilisés aux premiers stades de développement des médicaments, il est important que les produits issus de ces *pools* soient similaires à ceux produits à partir des lignées cellulaires. Nous avons comparé les niveaux d'agrégation des protéines exprimées à partir de *pools* et de lignées cellulaires et nous avons démontré une similarité des résultats. Cependant, il est nécessaire de comparer les attributs de qualité tels que les profils de N-glycosylation, ainsi que les modifications post-traductionnelles autres que la glycosylation, dans les protéines produites à partir de *pools* et de lignées cellulaires.

Le deuxième objectif a été d'étudier l'impact de l'expression de la protéine recombinante durant l'étape de sélection sur la productivité et la répartition clonale de la population hétérogène sélectionnée.

Dans les cellules CHO^{BRI/rcTA}, l'expression de hauts niveaux de la protéine hCD200Fc, bien que non toxique, semble être une contrainte, entraînant une diminution de la prolifération cellulaire.

Nous avons montré que maintenir le niveau d'expression de hCD200Fc à un niveau basal permettait la sélection de *pools* enrichis en cellules hautement productrices, comparé aux *pools* dont l'expression a été maintenue à de hauts niveaux tout au long de la sélection.

Durant les premiers jours de la sélection, la production de hauts niveaux de hCD200Fc a mené à une surexpression de la protéine Bip/GRP78 ainsi qu'à une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'au cours du processus de sélection du *pool*, certaines cellules exprimant un niveau élevé de protéines recombinantes seront soumises à l'activation des voies de stress du RE. Dans certains cas, les cellules ne survivront pas à la combinaison du stress du RE et à l'utilisation d'agents de sélection, tandis que d'autres, présentant une prolifération ralentie seront surpassées par une population de cellules ayant des productivités plus faibles.

Afin de caractériser les mécanismes impliqués dans la mort des cellules présentant des niveaux d'expression élevés, des études supplémentaires doivent être réalisées. Par exemple, l'étude de la protéine CHOP, impliquée dans les mécanismes d'apoptose liés à la voie UPR, serait une piste à envisager.

Nous avons étudié la sous-population de chacun des *pools* par la génération de μ -*pools*. Bien que cette technique soit plus rapide et permette des efficacités de sous-clonage bien supérieures à celles obtenues par dilution limite avec une densité théorique d'une cellule par puit, elle peut entraîner un biais étant donné que les populations comparées sont hétérogènes en termes de productivité et de croissance. Ainsi, il serait préférable de générer des clones issus d'une cellule unique, afin de comparer la sous-population dans chacun des *pools*.

Nous avons montré ici que la répression de l'expression de la protéine recombinante est un avantage. Or, le système inductible au cumate présente des niveaux d'expression basal non négligeables. Ainsi, il serait judicieux de mettre en place une stratégie afin de les diminuer.

Enfin, l'étude présentée ici a été menée pour une seule protéine recombinante. Ainsi, afin de valider l'hypothèse selon laquelle la régulation de l'expression de la protéine

recombinante durant la phase de sélection permet un enrichissement des *pools*, de nouvelles études devront être effectuées avec d'autres protéines recombinantes et plus particulièrement des protéines difficiles à exprimer.

En conclusion, l'utilisation du système inductible au cumate présente de nombreux avantages pour le développement de *pools* et de lignées cellulaires productrices. Bien que la majorité des promoteurs utilisés dans l'industrie soit des promoteurs constitutifs, l'utilisation de systèmes inductibles pourrait être bénéfique car ces derniers permettraient d'optimiser l'étape de criblage diminuant ainsi le temps et les coûts de développement d'une lignée cellulaire.

Bibliographie

- [1] J. Dumas and B. Robert, "Bioproduction de protéines thérapeutiques-Revue et perspectives," *médecine/sciences*, vol. 25, pp. 18-26, 2009.
- [2] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, and A. D. Riggs, "Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 76, pp. 106-110, 1979.
- [3] L. Fan, G. Rizzi, K. Bierilo, J. Tian, J. C. Yee, R. Russell, and T. K. Das, "Comparative study of therapeutic antibody candidates derived from mini-pool and clonal cell lines," *Biotechnology progress*, vol. 33, pp. 1456-1462, 2017.
- [4] J. A. DiMasi, H. G. Grabowski, and R. W. Hansen, "Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs," *Journal of health economics*, vol. 47, pp. 20-33, 2016.
- [5] S. L. Cancer. (2013). *Le parcours du médicament*. Available: <http://www.synergielyoncancer.fr/les-enjeux/le-parcours-du-medicament>
- [6] G. Walsh, "Biopharmaceutical benchmarks 2014," *Nature biotechnology*, vol. 32, pp. 992-1000, 2014.
- [7] S. Dharshanan, H. Chong, C. S. Hung, Z. Zamrod, and N. Kamal, "Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 14, pp. 8-8, 2011.
- [8] P. Declerck, "Biologicals and biosimilars: a review of the science and its implications," *GaBI-Generics and Biosimilars Initiative Journal*, vol. 1, pp. 13-16, 2012.
- [9] A. Mullard, "2016 FDA drug approvals," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 16, pp. 73-76, Feb 2 2017.
- [10] C. Morrison and R. Lähteenmäki, "Public biotech in 2016—the numbers," *Nature biotechnology*, vol. 35, p. 623, 2017.
- [11] K. Smietana, M. Siatkowski, and M. Møller, "Trends in clinical success rates," ed: Nature Publishing Group, 2016.
- [12] D. M. Ecker, S. D. Jones, and H. L. Levine, "The therapeutic monoclonal antibody market," in *MAbs*, 2015, pp. 9-14.
- [13] T. Igawa, H. Tsunoda, T. Kuramochi, Z. Sampei, S. Ishii, and K. Hattori, "Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies," in *MAbs*, 2011, pp. 243-252.
- [14] H. Tachibana, X.-J. Cheng, K. Watanabe, M. Takekoshi, F. Maeda, S. Aotsuka, Y. Kaneda, T. Takeuchi, and S. Ihara, "Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*," *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, vol. 6, pp. 383-387, 1999.

- [15] J. G. Elvin, R. G. Couston, and C. F. van der Walle, "Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing," *International journal of pharmaceutics*, vol. 440, pp. 83-98, 2013.
- [16] N. A. Buss, S. J. Henderson, M. McFarlane, J. M. Shenton, and L. de Haan, "Monoclonal antibody therapeutics: history and future," *Current opinion in pharmacology*, vol. 12, pp. 615-622, 2012.
- [17] G. J. Weiner, "Building better monoclonal antibody-based therapeutics," *Nature Reviews Cancer*, vol. 15, p. 361, 2015.
- [18] R. E. Kontermann, "Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics," *Current opinion in biotechnology*, vol. 22, pp. 868-876, 2011.
- [19] T. Rath, K. Baker, J. A. Dumont, R. T. Peters, H. Jiang, S.-W. Qiao, W. I. Lencer, G. F. Pierce, and R. S. Blumberg, "Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 35, pp. 235-254, 2015.
- [20] K. R. Rodgers and R. C. Chou, "Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions," *Biotechnology advances*, vol. 34, pp. 1149-1158, 2016.
- [21] H. Yu, D. MacIsaac, J. Wong, Z. Sellers, A. Wren, R. Bensen, C. Kin, and K. Park, "Market share and costs of biologic therapies for inflammatory bowel disease in the USA," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 47, pp. 364-370, 2018.
- [22] E. Dorey, "How the biologic landscape is evolving.," *Clinical Pharmacist.*, vol. 6, 2014.
- [23] N. Udpa and R. P. Million, "Monoclonal antibody biosimilars," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 15, p. 13, 2016.
- [24] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, and N. Corvaia, "Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies," *Nature reviews immunology*, vol. 10, p. 345, 2010.
- [25] A.-S. Ahmad, E. Olech, J. E. McClellan, and C. F. Kirchhoff, "Development of biosimilars," in *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2016, pp. S11-S18.
- [26] N. Simmons-Stern, C. Danosi, A. Haber, J. Greenaway, and J. G. Scaife, "The State of US Biosimilars Market Access," 2018.
- [27] T. W. Overton, "Recombinant protein production in bacterial hosts," *Drug discovery today*, vol. 19, pp. 590-601, 2014.
- [28] L. M. Keefer, M.-A. Piron, and P. De Meyts, "Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, pp. 1391-1395, 1981.
- [29] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, and G. F. Mayhew, "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12," *science*, vol. 277, pp. 1453-1462, 1997.
- [30] A. Berlec and B. Štrukelj, "Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells," *Journal of industrial*

microbiology & biotechnology, vol. 40, pp. 257-274, 2013.

- [31] K. Graumann and A. Premstaller, "Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems," *Biotechnology journal*, vol. 1, pp. 164-186, 2006.
- [32] D. Ghaderi, M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, and A. Varki, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 28, pp. 147-176, 2012.
- [33] M. W. Werten, T. J. van den Bosch, R. D. Wind, H. Mooibroek, and F. A. de Wolf, "High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*," *Yeast*, vol. 15, pp. 1087-1096, 1999.
- [34] R. Montesino, R. Garcia, O. Quintero, and J. A. Cremata, "Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Protein Expression and Purification*, vol. 14, pp. 197-207, 1998.
- [35] E. Çelik and P. Çalık, "Production of recombinant proteins by yeast cells," *Biotechnology advances*, vol. 30, pp. 1108-1118, 2012.
- [36] S. R. Hamilton and T. U. Gerngross, "Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast," *Current opinion in biotechnology*, vol. 18, pp. 387-392, 2007.
- [37] S. R. Hamilton, R. C. Davidson, N. Sethuraman, J. H. Nett, Y. Jiang, S. Rios, P. Bobrowicz, T. A. Stadheim, H. Li, and B.-K. Choi, "Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins," *Science*, vol. 313, pp. 1441-1443, 2006.
- [38] H. Li, N. Sethuraman, T. A. Stadheim, D. Zha, B. Prinz, N. Ballew, P. Bobrowicz, B.-K. Choi, W. J. Cook, and M. Cukan, "Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*," *Nature biotechnology*, vol. 24, p. 210, 2006.
- [39] J. P. Condreay and T. A. Kost, "Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: baculovirus," *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 38, pp. 137-149, 2003.
- [40] A. W. Caron, J. Archambault, and B. Massie, "High-level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus–insect cell expression system," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 36, pp. 1133-1140, 1990.
- [41] T. Wickham, T. Davis, R. Granados, M. Shuler, and H. Wood, "Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system," *Biotechnology progress*, vol. 8, pp. 391-396, 1992.
- [42] Y. Durocher and M. Butler, "Expression systems for therapeutic glycoprotein production," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, pp. 700-7, Dec 2009.
- [43] R. L. Harrison and D. L. Jarvis, "Protein N-glycosylation in the baculovirus–insect cell expression system and engineering of insect cells to produce “mammalianized” recombinant glycoproteins," *Advances in virus research*, vol. 68, pp. 159-191, 2006.
- [44] E. Ailor, N. Takahashi, Y. Tsukamoto, K. Masuda, B. A. Rahman, D. L. Jarvis, Y. C. Lee, and M. J. Betenbaugh, "N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase," *Glycobiology*, vol. 10, pp. 837-847, 2000.

- [45] E.-Y. Yun, T.-W. Goo, S.-W. Kim, K.-H. Choi, J.-S. Hwang, S.-W. Kang, and O.-Y. Kwon, "Galatosylation and sialylation of mammalian glycoproteins produced by baculovirus-mediated gene expression in insect cells," *Biotechnology letters*, vol. 27, pp. 1035-1039, 2005.
- [46] J. Zhu, "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production," *Biotechnology advances*, vol. 30, pp. 1158-1170, 2012.
- [47] P. L. Pham, A. Kamen, and Y. Durocher, "Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein," *Molecular biotechnology*, vol. 34, pp. 225-237, 2006.
- [48] T. T. Puck, "The genetics of somatic mammalian cells," *Advances in Biol. and Med. Phys.*, vol. 5, 1957.
- [49] D. L. Hacker, S. Chenuet, and F. M. Wurm, "Chinese hamster ovary cells, recombinant protein production," *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 2010.
- [50] J. Y. Kim, Y. G. Kim, and G. M. Lee, "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 93, pp. 917-30, Feb 2012.
- [51] T. Lai, Y. Yang, and S. K. Ng, "Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 6, pp. 579-603, 2013.
- [52] D. L. Hacker, M. De Jesus, and F. M. Wurm, "25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here?," *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 1023-7, Nov-Dec 2009.
- [53] M. Butler and M. Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering," *Current opinion in biotechnology*, vol. 30, pp. 107-112, 2014.
- [54] J. Dumas and B. Robert, "Bioproduction of pharmaceutical proteins: review and perspectives," *Medecine sciences: M/S*, vol. 25, pp. 18-26, 2009.
- [55] F. M. Wurm, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," *Nature biotechnology*, vol. 22, pp. 1393-1398, 2004.
- [56] Ö. Özdemir, "The construction of a mammalian transfection vector for expression of cytosine-5 specific DNA methyltransferase gene M. Msp1 in cultured cells," *Turkish Journal of Biology*, vol. 22, pp. 161-170, 1998.
- [57] A. R. Costa, M. E. Rodrigues, M. Henriques, J. Azeredo, and R. Oliveira, "Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 74, pp. 127-138, 2010.
- [58] M. T. Huang and C. M. Gorman, "Intervening sequences increase efficiency of RNA 3'processing and accumulation of cytoplasmic RNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 18, pp. 937-947, 1990.
- [59] J. R. Birch and A. J. Racher, "Antibody production," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, pp. 671-685, 2006.

- [60] S. C. Makrides, "Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells," *Protein expression and purification*, vol. 17, pp. 183-202, 1999.
- [61] M. R. Monroe. (2014, 16 April 2018). *Plasmids 101: What is a plasmid? (Addgene ed.)*. Available: <http://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>
- [62] S. Gutiérrez-Granados, L. Cervera, A. A. Kamen, and F. Gòdia, "Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics," *Critical reviews in biotechnology*, pp. 1-23, 2018.
- [63] S. Paris, A. Burlacu, and Y. Durocher, "Opposing roles of syndecan-1 and syndecan-2 in polyethyleneimine-mediated gene delivery," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, pp. 7697-7704, 2008.
- [64] E. Carpentier, S. Paris, A. A. Kamen, and Y. Durocher, "Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells," *Journal of biotechnology*, vol. 128, pp. 268-280, 2007.
- [65] Y. Rajendra, D. Kiseljak, L. Baldi, F. M. Wurm, and D. L. Hacker, "Transcriptional and post-transcriptional limitations of high-yielding, PEI-mediated transient transfection with CHO and HEK-293E cells," *Biotechnology progress*, vol. 31, pp. 541-549, 2015.
- [66] C. Raymond, R. Tom, S. Perret, P. Moussouami, D. L'Abbé, G. St-Laurent, and Y. Durocher, "A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications," *Methods*, vol. 55, pp. 44-51, 2011.
- [67] W. M. Abbott, B. Middleton, F. Kartberg, J. Claesson, R. Roth, and D. Fisher, "Optimisation of a simple method to transiently transfect a CHO cell line in high-throughput and at large scale," *Protein expression and purification*, vol. 116, pp. 113-119, 2015.
- [68] L. Delafosse, P. Xu, and Y. Durocher, "Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells," *Journal of biotechnology*, vol. 227, pp. 103-111, Apr 13 2016.
- [69] O. Tuveesson, C. Uhe, A. Rozkov, and E. Lüllau, "Development of a generic transient transfection process at 100 L scale," *Cytotechnology*, vol. 56, pp. 123-136, 2008.
- [70] M. Derouazi, P. Girard, F. Van Tilborgh, K. Iglesias, N. Muller, M. Bertschinger, and F. M. Wurm, "Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 87, pp. 537-545, 2004.
- [71] P. Pham, S. Perret, B. Cass, E. Carpentier, G. St-Laurent, L. Bisson, A. Kamen, and Y. Durocher, "Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 90, pp. 332-344, 2005.
- [72] D. J. Galbraith, A. S. Tait, A. J. Racher, J. R. Birch, and D. C. James, "Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells," *Biotechnology progress*, vol. 22, pp. 753-762, 2006.
- [73] G. Backliwal, M. Hildinger, S. Chenuet, S. Wulhfard, M. De Jesus, and F. M. Wurm,

- "Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions," *Nucleic acids research*, vol. 36, pp. e96-e96, 2008.
- [74] J. Ye, V. Kober, M. Tellers, Z. Naji, P. Salmon, and J. F. Markusen, "High-level protein expression in scalable CHO transient transfection," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 103, pp. 542-551, 2009.
- [75] Y. Rajendra, D. Kiseljak, L. Baldi, D. L. Hacker, and F. M. Wurm, "A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells," *Journal of biotechnology*, vol. 153, pp. 22-26, 2011.
- [76] V. Jäger, K. Büssow, A. Wagner, S. Weber, M. Hust, A. Frenzel, and T. Schirrmann, "High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells," *BMC biotechnology*, vol. 13, p. 52, 2013.
- [77] O. Daramola, J. Stevenson, G. Dean, D. Hatton, G. Pettman, W. Holmes, and R. Field, "A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression," *Biotechnol Prog*, vol. 30, pp. 132-41, Jan-Feb 2014.
- [78] Y. Rajendra, M. D. Hougland, R. Alam, T. A. Morehead, and G. C. Barnard, "A high cell density transient transfection system for therapeutic protein expression based on a CHO GS-knockout cell line: Process development and product quality assessment," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 112, pp. 977-986, 2015.
- [79] Y. Durocher, S. Perret, and A. Kamen, "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells," *Nucleic acids research*, vol. 30, pp. e9-e9, 2002.
- [80] K. Van Craenenbroeck, P. Vanhoenacker, and G. Haegeman, "Episomal vectors for gene expression in mammalian cells," *The FEBS Journal*, vol. 267, pp. 5665-5678, 2000.
- [81] Z. Shahrokh, L. Royle, R. Saldova, J. Bones, J. L. Abrahams, N. V. Artemenko, S. Flatman, M. Davies, A. Baycroft, and S. Sehgal, "Erythropoietin produced in a human cell line (Dynepo) has significant differences in glycosylation compared with erythropoietins produced in CHO cell lines," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 8, pp. 286-296, 2010.
- [82] A. Croset, L. Delafosse, J.-P. Gaudry, C. Arod, L. Glez, C. Losberger, D. Begue, A. Krstanovic, F. Robert, and F. Vilbois, "Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells," *Journal of biotechnology*, vol. 161, pp. 336-348, 2012.
- [83] K. Cain, S. Peters, H. Hailu, B. Sweeney, P. Stephens, J. Heads, K. Sarkar, A. Ventom, C. Page, and A. Dickson, "A CHO cell line engineered to express XBP1 and ERO1-L α has increased levels of transient protein expression," *Biotechnology progress*, vol. 29, pp. 697-706, 2013.
- [84] J. Ye, K. Alvin, H. Latif, A. Hsu, V. Parikh, T. Whitmer, M. Tellers, M. C. de la Cruz Edmonds, J. Ly, P. Salmon *et al.*, "Rapid protein production using CHO stable transfection pools," *Biotechnol Prog*, vol. 26, pp. 1431-7, Sep-Oct 2010.

- [85] P. M. O’Callaghan and A. J. Racher, "Building a cell culture process with stable foundations: Searching for certainty in an uncertain world," in *Animal Cell Culture*, ed: Springer, 2015, pp. 373-406.
- [86] S. Balasubramanian, M. Matasci, Z. Kadlecova, L. Baldi, D. L. Hacker, and F. M. Wurm, "Rapid recombinant protein production from piggyBac transposon-mediated stable CHO cell pools," *Journal of biotechnology*, vol. 200, pp. 61-9, Apr 20 2015.
- [87] Y. Rajendra, R. B. Peery, and G. C. Barnard, "Generation of stable CHO pools yielding antibody titers of up to 7.6 g/L using the piggyBac transposon system," *Biotechnology progress*, 2016.
- [88] Y. Rajendra, S. Balasubramanian, R. B. Peery, J. R. Swartling, N. A. McCracken, D. L. Norris, C. C. Frye, and G. C. Barnard, "Bioreactor scale up and protein product quality characterization of piggyBac transposon derived CHO pools," *Biotechnology progress*, vol. 33, pp. 534-540, 2017.
- [89] A. Poulain, S. Perret, F. Malenfant, A. Mullick, B. Massie, and Y. Durocher, "Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch," *Journal of biotechnology*, vol. 255, pp. 16-27, 2017.
- [90] S. M. Browne and M. Al-Rubeai, "Selection methods for high-producing mammalian cell lines," *Trends Biotechnol*, vol. 25, pp. 425-32, Sep 2007.
- [91] S. J. Kromenaker and F. Srenc, "Stability of producer hybridoma cell lines after cell sorting: a case study," *Biotechnology progress*, vol. 10, pp. 299-307, 1994.
- [92] G. M. Lee, A. Varma, and B. O. Palsson, "Application of population balance model to the loss of hybridoma antibody productivity," *Biotechnology progress*, vol. 7, pp. 72-75, 1991.
- [93] J. J. Priola, N. Calzadilla, M. Baumann, N. Borth, C. G. Tate, and M. J. Betenbaugh, "High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production," *Biotechnology Journal*, 2016.
- [94] P. A. Underwood and P. A. Bean, "Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas," *Journal of immunological methods*, vol. 107, pp. 119-128, 1988.
- [95] M. J. Wildey, A. Haunso, M. Tudor, M. Webb, and J. H. Connick, "High-throughput screening," in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. vol. 50, ed: Elsevier, 2017, pp. 149-195.
- [96] F. Degorce, A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik, and B. Xie, "HTRF: a technology tailored for drug discovery—a review of theoretical aspects and recent applications," *Current chemical genomics*, vol. 3, p. 22, 2009.
- [97] Cisbio. *Principle of the HTRF human and mouse Fc assays*. Available: <https://www.cisbio.com/other/drug-discovery/human-mouse-rabbit-fc-kit>
- [98] G. Yang and S. G. Withers, "Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution," *ChemBioChem*, vol. 10, pp. 2704-2715, 2009.
- [99] N. Kumar and N. Borth, "Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories," *Methods*, vol.

56, pp. 366-374, 2012.

- [100] C. T. DeMaria, V. Cairns, C. Schwarz, J. Zhang, M. Guerin, E. Zuena, S. Estes, and K. P. Karey, "Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen," *Biotechnology progress*, vol. 23, pp. 465-472, 2007.
- [101] V. V. Wong, N. S. Wong, H.-K. Tan, D. I. Wang, and M. G. Yap, "Enhancing production of recombinant proteins from mammalian cells," 2003.
- [102] O. Atochina, R. Mylvaganam, Y. Akselband, and P. McGrath, "Comparison of results using the gel microdrop cytokine secretion assay with ELISPOT and intracellular cytokine staining assay," *Cytokine*, vol. 27, pp. 120-128, 2004.
- [103] F. Gray, J. S. Kenney, and J. F. Dunne, "Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells," *Journal of immunological methods*, vol. 182, pp. 155-163, 1995.
- [104] K. T. Powell and J. C. Weaver, "Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population," *Nature Biotechnology*, vol. 8, p. 333, 1990.
- [105] L. Hammill, J. Welles, and G. R. Carson, "The gel microdrop secretion assay: Identification of a low productivity subpopulation arising during the production of human antibody in CHO cells," *Cytotechnology*, vol. 34, pp. 27-37, 2000.
- [106] P. Holmes and M. Al-Rubeai, "Improved cell line development by a high throughput affinity capture surface display technique to select for high secretors," *Journal of immunological methods*, vol. 230, pp. 141-147, 1999.
- [107] S. Brezinsky, G. Chiang, A. Szilvasi, S. Mohan, R. Shapiro, A. MacLean, W. Sisk, and G. Thill, "A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity," *Journal of immunological methods*, vol. 277, pp. 141-155, 2003.
- [108] J. Pichler, F. Hesse, M. Wieser, R. Kunert, S. S. Galosy, J. E. Mott, and N. Borth, "A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay," *Journal of biotechnology*, vol. 141, pp. 80-83, 2009.
- [109] Y. G. Meng, J. Liang, W. L. Wong, and V. Chisholm, "Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells," *Gene*, vol. 242, pp. 201-207, 2000.
- [110] T. Yoshikawa, F. Nakanishi, Y. Ogura, D. Oi, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto, and K. I. Suga, "Flow cytometry: An improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 74, pp. 435-442, 2001.
- [111] A. W. Caron, C. Nicolas, B. Gaillet, I. Ba, M. Pinard, A. Garnier, B. Massie, and R. Gilbert, "Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins," *BMC biotechnology*, vol. 9, p. 42, 2009.
- [112] F. Li, N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, and A. Amanullah, "Cell culture processes for monoclonal antibody production," in *MAbs*, 2010, pp. 466-479.

- [113] K. F. Wlaschin and W.-S. Hu, "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding," in *Cell Culture Engineering*, ed: Springer, 2006, pp. 43-74.
- [114] N. Vijayasankaran, J. Li, R. Shawley, A. Chen, M. Shiratori, M. Gawlitzek, F. Li, R. Kiss, and A. Amanullah, "Animal cell culture media," *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 2010.
- [115] D. J. Karst, F. Steinebach, M. Soos, and M. Morbidelli, "Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 114, pp. 298-307, 2017.
- [116] A. A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, and D. Low, "Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches," *Journal of Chromatography B*, vol. 848, pp. 28-39, 2007.
- [117] A. A. Shukla and J. Thömmes, "Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins," *Trends in biotechnology*, vol. 28, pp. 253-261, 2010.
- [118] J. Chusainow, Y. S. Yang, J. H. Yeo, P. C. Toh, P. Asvadi, N. S. Wong, and M. G. Yap, "A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer?," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 102, pp. 1182-96, Mar 1 2009.
- [119] C. Wilson, H. J. Bellen, and W. J. Gehring, "Position effects on eukaryotic gene expression," *Annual review of cell biology*, vol. 6, pp. 679-714, 1990.
- [120] A. P. Wolffe and M. A. Matzke, "Epigenetics: regulation through repression," *science*, vol. 286, pp. 481-486, 1999.
- [121] E. J. Richards and S. C. Elgin, "Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects," *Cell*, vol. 108, pp. 489-500, 2002.
- [122] V. Mutskov and G. Felsenfeld, "Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9," *The EMBO journal*, vol. 23, pp. 138-149, 2004.
- [123] M. J. Pikaart, F. Recillas-Targa, and G. Felsenfeld, "Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators," *Genes & development*, vol. 12, pp. 2852-2862, 1998.
- [124] Y. Yang, J. Chusainow, and M. G. Yap, "DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines," *Journal of biotechnology*, vol. 147, pp. 180-185, 2010.
- [125] Y. B. Johari, S. D. Estes, C. S. Alves, M. S. Sinacore, and D. C. James, "Integrated cell and process engineering for improved transient production of a "difficult-to-express" fusion protein by CHO cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 112, pp. 2527-2542, 2015.
- [126] S. C. Ku, D. T. Ng, M. G. Yap, and S. H. Chao, "Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 99, pp. 155-164, 2008.
- [127] V. Le Fourn, P.-A. Girod, M. Buceta, A. Regamey, and N. Mermod, "CHO cell

- engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion," *Metabolic engineering*, vol. 21, pp. 91-102, 2014.
- [128] L. P. Pybus, G. Dean, N. R. West, A. Smith, O. Daramola, R. Field, S. J. Wilkinson, and D. C. James, "Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 111, pp. 372-385, 2014.
- [129] P. M. O'Callaghan, J. McLeod, L. P. Pybus, C. S. Lovelady, S. J. Wilkinson, A. J. Racher, A. Porter, and D. C. James, "Cell line-specific control of recombinant monoclonal antibody production by CHO cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 106, pp. 938-951, 2010.
- [130] M. Mason, B. Sweeney, K. Cain, P. Stephens, and S. T. Sharfstein, "Identifying bottlenecks in transient and stable production of recombinant monoclonal-antibody sequence variants in Chinese hamster ovary cells," *Biotechnology progress*, vol. 28, pp. 846-855, 2012.
- [131] H.-C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, and S. Kiese, "Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 98, pp. 2909-2934, 2009.
- [132] J. S. Philo, "Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?," *The AAPS journal*, vol. 8, pp. E564-E571, 2006.
- [133] W. Wang, S. Nema, and D. Teagarden, "Protein aggregation—Pathways and influencing factors," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 390, pp. 89-99, 2010.
- [134] Y. A. Ioannou, D. F. Bishop, and R. J. Desnick, "Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion," *The Journal of cell biology*, vol. 119, pp. 1137-1150, 1992.
- [135] R. R. Kopito, "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation," *Trends in cell biology*, vol. 10, pp. 524-530, 2000.
- [136] J. Tyedmers, A. Mogk, and B. Bukau, "Cellular strategies for controlling protein aggregation," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 11, p. 777, 2010.
- [137] W. Wang, "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 289, pp. 1-30, 2005.
- [138] N. Gomez, J. Subramanian, J. Ouyang, M. D. Nguyen, M. Hutchinson, V. K. Sharma, A. A. Lin, and I. H. Yuk, "Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in CHO cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 109, pp. 125-136, 2012.
- [139] T. Marquardt and A. Helenius, "Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum," *The Journal of Cell Biology*, vol. 117, pp. 505-513, 1992.
- [140] M. Schröder, R. Schäfer, and P. Friedl, "Induction of protein aggregation in an early secretory compartment by elevation of expression level," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 78, pp. 131-140, 2002.
- [141] D. M. Dinnis and D. C. James, "Engineering mammalian cell factories for improved

- recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature?," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 91, pp. 180-9, Jul 20 2005.
- [142] R. V. Cordoba-Rodriguez, "Aggregates in MAbs and recombinant therapeutic proteins: a regulatory perspective," *BioPharm International*, vol. 21, 2008.
- [143] M. E. Cromwell, E. Hilario, and F. Jacobson, "Protein aggregation and bioprocessing," *The AAPS journal*, vol. 8, pp. E572-E579, 2006.
- [144] W. B. Chaderjian, E. T. Chin, R. J. Harris, and T. M. Etcheverry, "Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed," *Biotechnology progress*, vol. 21, pp. 550-553, 2005.
- [145] A. Chakrabarti, A. W. Chen, and J. D. Varner, "A review of the mammalian unfolded protein response," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 108, pp. 2777-2793, 2011.
- [146] S. Kebache, E. Cardin, D. T. Nguyễn, E. Chevet, and L. Larose, "Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation," *Journal of biological chemistry*, vol. 279, pp. 9662-9671, 2004.
- [147] M. Schroder and R. J. Kaufman, "The mammalian unfolded protein response," *Annu Rev Biochem*, vol. 74, pp. 739-89, 2005.
- [148] J. B. DuRose, D. Scheuner, R. J. Kaufman, L. I. Rothblum, and M. Niwa, "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress," *Molecular and cellular biology*, vol. 29, pp. 4295-4307, 2009.
- [149] H. P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, and R. Paules, "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress," *Molecular cell*, vol. 11, pp. 619-633, 2003.
- [150] I. Novoa, H. Zeng, H. P. Harding, and D. Ron, "Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α ," *The Journal of cell biology*, vol. 153, pp. 1011-1022, 2001.
- [151] K. D. McCullough, J. L. Martindale, L.-O. Klotz, T.-Y. Aw, and N. J. Holbrook, "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state," *Molecular and cellular biology*, vol. 21, pp. 1249-1259, 2001.
- [152] N. Cláudio, A. Dalet, E. Gatti, and P. Pierre, "Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways," *The EMBO journal*, vol. 32, pp. 1214-1224, 2013.
- [153] C. Hetz, E. Chevet, and H. P. Harding, "Targeting the unfolded protein response in disease," *Nature reviews Drug discovery*, vol. 12, p. 703, 2013.
- [154] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori, "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor," *Cell*, vol. 107, pp. 881-891, 2001.
- [155] K. Kokame, H. Kato, and T. Miyata, "Identification of ERSE-II, a new cis-acting element

- responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 9199-9205, 2001.
- [156] H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori, "ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response," *Molecular and cellular biology*, vol. 20, pp. 6755-6767, 2000.
- [157] G. Gulis, K. C. R. Simi, R. R. de Toledo, A. Q. Maranhao, and M. M. Brigido, "Optimization of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein," *BMC biotechnology*, vol. 14, p. 26, 2014.
- [158] M. Tigges and M. Fussenegger, "Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells," *Metabolic engineering*, vol. 8, pp. 264-272, 2006.
- [159] E. Becker, L. Florin, K. Pfizenmaier, and H. Kaufmann, "An XBP-1 dependent bottleneck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes," *Journal of biotechnology*, vol. 135, pp. 217-223, 2008.
- [160] T. Ohya, T. Hayashi, E. Kiyama, H. Nishii, H. Miki, K. Kobayashi, K. Honda, T. Omasa, and H. Ohtake, "Improved production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 100, pp. 317-324, 2008.
- [161] T. Omasa, T. Takami, T. Ohya, E. Kiyama, T. Hayashi, H. Nishii, H. Miki, K. Kobayashi, K. Honda, and H. Ohtake, "Overexpression of GADD34 enhances production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 106, pp. 568-573, 2008.
- [162] J. Y. Qin, L. Zhang, K. L. Clift, I. Hular, A. P. Xiang, B.-Z. Ren, and B. T. Lahn, "Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter," *PloS one*, vol. 5, p. e10611, 2010.
- [163] A. Mullick and B. Massie, "Transcription, translation, and the control of gene expression in mammalian cells," *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 2010.
- [164] B. Massie, D. D. Mosser, M. Koutroumanis, I. Vitté-Mony, L. Lamoureux, F. Couture, L. Paquet, C. Guilbault, J. Dionne, and D. Chahla, "New adenovirus vectors for protein production and gene transfer," in *Cell Culture Engineering VI*, ed: Springer, 1998, pp. 53-64.
- [165] Y. Takebe, M. Seiki, J.-I. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida, and N. Arai, "SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 8, pp. 466-472, 1988.
- [166] A. Mullick, Y. Xu, R. Warren, M. Koutroumanis, C. Guilbault, S. Broussau, F. Malenfant, L. Bourget, L. Lamoureux, R. Lo *et al.*, "The cumate gene-switch: a system

- for regulated expression in mammalian cells," *BMC Biotechnol*, vol. 6, p. 43, 2006.
- [167] B. Massie, F. Couture, L. Lamoureux, D. D. Mosser, C. Guilbault, P. Jolicoeur, F. Bélanger, and Y. Langelier, "Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette," *Journal of virology*, vol. 72, pp. 2289-2296, 1998.
- [168] M. C. Milone, J. D. Fish, C. Carpenito, R. G. Carroll, G. K. Binder, D. Teachey, M. Samanta, M. Lakhali, B. Gloss, and G. Danet-Desnoyers, "Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo," *Molecular Therapy*, vol. 17, pp. 1453-1464, 2009.
- [169] A. R. Brooks, R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu, and G. M. Rubanyi, "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle," *The journal of gene medicine*, vol. 6, pp. 395-404, 2004.
- [170] M. Fussenegger, "The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies," *Biotechnology Progress*, vol. 17, pp. 1-51, 2001.
- [171] L. Horbal, V. Fedorenko, and A. Luzhetskyy, "Novel and tightly regulated resorcinol and cumate-inducible expression systems for *Streptomyces* and other actinobacteria," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98, pp. 8641-55, Oct 2014.
- [172] M. Gossen and H. Bujard, "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, pp. 5547-5551, 1992.
- [173] J. Jones, T. Nivitchanyong, C. Giblin, V. Ciccarone, D. Judd, S. Gorfien, S. S. Krag, and M. J. Betenbaugh, "Optimization of tetracycline-responsive recombinant protein production and effect on cell growth and ER stress in mammalian cells," *Biotechnology and bioengineering* vol. 91, pp. 722-32, Sep 20 2005.
- [174] C. Lam, L. Santell, B. Wilson, M. Yim, S. Louie, D. Tang, D. Shaw, P. Chan, R. A. Lazarus, and B. Snedecor, "Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt-and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells," *Biotechnology progress*, vol. 33, pp. 523-533, 2017.
- [175] S. Misaghi, J. Chang, and B. Snedecor, "It's time to regulate: coping with product-induced nongenetic clonal instability in CHO cell lines via regulated protein expression," *Biotechnol Prog*, vol. 30, pp. 1432-40, Nov-Dec 2014.
- [176] R. W. Eaton, "p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate," *Journal of bacteriology*, vol. 179, pp. 3171-3180, 1997.
- [177] B. Gaillet, R. Gilbert, R. Amziani, C. Guilbault, C. Gadoury, A. W. Caron, A. Mullick, A. Garnier, and B. Massie, "High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch," *Biotechnol Prog*, vol. 23, pp. 200-9, Jan-Feb 2007.

- [178] B. Gaillet, R. Gilbert, S. Broussau, A. Pilotte, F. Malenfant, A. Mullick, A. Garnier, and B. Massie, "High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch," *Biotechnol Bioeng*, vol. 106, pp. 203-15, Jun 1 2010.
- [179] R. Kaufman, P. Sharp, and S. Latt, "Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences," *Molecular and cellular biology*, vol. 3, pp. 699-711, 1983.
- [180] Z. Jiang, Y. Huang, and S. T. Sharfstein, "Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression," *Biotechnology progress*, vol. 22, pp. 313-318, 2006.
- [181] N. S. Kim, T. H. Byun, and G. M. Lee, "Key determinants in the occurrence of clonal variation in humanized antibody expression of CHO cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification," *Biotechnology progress*, vol. 17, pp. 69-75, 2001.
- [182] N. S. Kim, S. J. Kim, and G. M. Lee, "Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: Stability in the absence of selective pressure," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 60, pp. 679-688, 1998.
- [183] S. M. Noh, S. Shin, and G. M. Lee, "Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies," *Scientific reports*, vol. 8, p. 5361, 2018.
- [184] R. E. Kingston, R. J. Kaufman, C. Bebbington, and M. Rolfe, "Amplification using CHO cell expression vectors," *Current protocols in molecular biology*, pp. 16.23. 1-16.23. 13, 2002.
- [185] L. Fan, I. Kadura, L. E. Krebs, C. C. Hatfield, M. M. Shaw, and C. C. Frye, "Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells," *Biotechnol Bioeng*, vol. 109, pp. 1007-15, Apr 2012.
- [186] L. Fan, I. Kadura, L. E. Krebs, J. L. Larson, D. M. Bowden, and C. C. Frye, "Development of a highly-efficient CHO cell line generation system with engineered SV40E promoter," *J Biotechnol*, vol. 168, pp. 652-8, Dec 2013.
- [187] J. Mirkovitch, M.-E. Mirault, and U. K. Laemmli, "Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold," *Cell*, vol. 39, pp. 223-232, 1984.
- [188] P. A. Girod, M. Zahn-Zabal, and N. Mermoud, "Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 91, pp. 1-11, 2005.
- [189] P.-A. Girod, D.-Q. Nguyen, D. Calabrese, S. Puttini, M. Grandjean, D. Martinet, A. Regamey, D. Saugy, J. S. Beckmann, and P. Bucher, "Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells," *Nature methods*, vol. 4, p. 747, 2007.
- [190] J. D. Kim, Y. Yoon, H. Y. Hwang, J. S. Park, S. Yu, J. Lee, K. Baek, and J. Yoon,

- "Efficient selection of stable Chinese hamster ovary (CHO) cell lines for expression of recombinant proteins by using human interferon β SAR element," *Biotechnology progress*, vol. 21, pp. 933-937, 2005.
- [191] J.-M. Kim, J.-S. Kim, D.-H. Park, H. S. Kang, J. Yoon, K. Baek, and Y. Yoon, "Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions," *Journal of biotechnology*, vol. 107, pp. 95-105, 2004.
- [192] M. Zahn-Zabal, M. Kobr, P.-A. Girod, M. Imhof, P. Chatellard, M. de Jesus, F. Wurm, and N. Mermod, "Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions," *Journal of biotechnology*, vol. 87, pp. 29-42, 2001.
- [193] M. De Jesus and F. M. Wurm, "Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 78, pp. 184-188, 2011.
- [194] Y. M. Huang, W. Hu, E. Rustandi, K. Chang, H. Yusuf-Makagiansar, and T. Ryll, "Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment," *Biotechnology progress*, vol. 26, pp. 1400-1410, 2010.
- [195] K. Sunley and M. Butler, "Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest," *Biotechnology advances*, vol. 28, pp. 385-394, 2010.
- [196] M. Fussenegger, S. Schlatter, D. Dätwyler, X. Mazur, and J. E. Bailey, "Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells," *Nature biotechnology*, vol. 16, p. 468, 1998.
- [197] S. Wulhfard, S. Tissot, S. Bouchet, J. Cevey, M. De Jesus, D. L. Hacker, and F. M. Wurm, "Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells," *Biotechnology progress*, vol. 24, pp. 458-465, 2008.
- [198] H. Kaufmann, X. Mazur, M. Fussenegger, and J. E. Bailey, "Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 63, pp. 573-582, 1999.
- [199] S. Becerra, J. Berrios, N. Osses, and C. Altamirano, "Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 60, pp. 1-8, 2012.
- [200] T.-C. Kou, L. Fan, Y. Zhou, Z.-Y. Ye, X.-P. Liu, L. Zhao, and W.-S. Tan, "Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 111, pp. 365-369, 2011.
- [201] S. R. Fox, H. K. Tan, M. C. Tan, S. Wong, M. G. Yap, and D. I. Wang, "A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon- γ by Chinese-hamster ovary cells," *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 41, pp. 255-264, 2005.
- [202] Z. Sheikholeslami, M. Jolicoeur, and O. Henry, "The impact of the timing of induction

- on the metabolism and productivity of CHO cells in culture," *Biochemical engineering journal*, vol. 79, pp. 162-171, 2013.
- [203] S. Fischer, R. Handrick, and K. Otte, "The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives," *Biotechnology advances*, vol. 33, pp. 1878-1896, 2015.
- [204] E. Berezikov, "Evolution of microRNA diversity and regulation in animals," *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, p. 846, 2011.
- [205] A. M. Gurtan and P. A. Sharp, "The role of miRNAs in regulating gene expression networks," *Journal of molecular biology*, vol. 425, pp. 3582-3600, 2013.
- [206] V. Jadhav, M. Hackl, G. Klanert, J. A. H. Bort, R. Kunert, J. Grillari, and N. Borth, "Stable overexpression of miR-17 enhances recombinant protein production of CHO cells," *Journal of biotechnology*, vol. 175, pp. 38-44, 2014.
- [207] A. Griffith, P. S. Kelly, S. Vencken, N. T. Lao, C. M. Greene, M. Clynes, and N. Barron, "miR-CATCH identifies biologically active miRNA regulators of the pro-survival gene XIAP, in Chinese hamster ovary cells," *Biotechnology journal*, vol. 13, p. 1700299, 2018.
- [208] L. Baldi, D. L. Hacker, C. Meerschman, and F. M. Wurm, "Large-scale transfection of mammalian cells," *Protein Expression in Mammalian Cells: Methods and Protocols*, pp. 13-26, 2012.
- [209] P. Chahal, Y. Durocher, and A. Kamen, "Cell transfection," in *Comprehensive Biotechnology* vol. 1, ed: Elsevier Science & Technology, 2011, pp. 395-401.
- [210] S. Geisse, "Reflections on more than 10 years of TGE approaches," *Protein expression and purification*, vol. 64, pp. 99-107, 2009.
- [211] J.-P. Gaudry, C. Arod, C. Sauvage, S. Busso, P. Dupraz, R. Pankiewicz, and B. Antonsson, "Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation," *Protein expression and purification*, vol. 58, pp. 94-102, 2008.
- [212] Z. Li, I. P. Michael, D. Zhou, A. Nagy, and J. M. Rini, "Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, pp. 5004-9, Mar 26 2013.
- [213] H. Würtele, K. Little, and P. Chartrand, "Illegitimate DNA integration in mammalian cells," *Gene therapy*, vol. 10, pp. 1791-1799, 2003.
- [214] G. Urlaub and L. A. Chasin, "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 77, pp. 4216-4220, 1980.
- [215] D. W. Kim, T. Uetsuki, Y. Kaziro, N. Yamaguchi, and S. Sugano, "Use of the human elongation factor 1 α promoter as a versatile and efficient expression system," *Gene*, vol. 91, pp. 217-223, 1990.
- [216] G. Stuchbury and G. Münch, "Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA," *Cytotechnology*, vol. 62,

pp. 189-194, 2010.

- [217] L. Baldi, D. L. Hacker, M. Adam, and F. M. Wurm, "Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives," *Biotechnol Lett*, vol. 29, pp. 677-84, May 2007.
- [218] A. Dhanoya, B. M. Chain, and E. Keshavarz-Moore, "The impact of DNA topology on polyplex uptake and transfection efficiency in mammalian cells," *Journal of biotechnology*, vol. 155, pp. 377-386, 2011.
- [219] F. Wurm, "CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes," *Processes*, vol. 1, pp. 296-311, 2013.
- [220] J. Carpenter, B. Cherney, A. Lubinecki, S. Ma, E. Marszal, A. Mire-Sluis, T. Nikolai, J. Novak, J. Ragheb, and J. Simak, "Meeting report on protein particles and immunogenicity of therapeutic proteins: filling in the gaps in risk evaluation and mitigation," *Biologicals*, vol. 38, pp. 602-611, 2010.
- [221] S. Hermeling, D. J. Crommelin, H. Schellekens, and W. Jiskoot, "Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins," *Pharmaceutical research*, vol. 21, pp. 897-903, 2004.
- [222] B. Moritz, P. B. Becker, and U. Göpfert, "CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells," *Scientific reports*, vol. 5, p. 16952, 2015.
- [223] A. Berting, M. R. Farcet, and T. R. Kreil, "Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 106, pp. 598-607, 2010.
- [224] W. Pilbrough, T. P. Munro, and P. Gray, "Intraclonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells," *PloS one*, vol. 4, p. e8432, 2009.
- [225] S. C. Ku, P. C. Toh, Y. Y. Lee, J. Chusainow, M. G. Yap, and S. H. Chao, "Regulation of XBP-1 signaling during transient and stable recombinant protein production in CHO cells," *Biotechnology progress*, vol. 26, pp. 517-526, 2010.
- [226] Y. Zhou, R. Raju, C. Alves, and A. Gilbert, "Debottlenecking protein secretion and reducing protein aggregation in the cellular host," *Current opinion in biotechnology*, vol. 53, pp. 151-157, 2018.
- [227] R. E. Cudna and A. J. Dickson, "Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 81, pp. 56-65, 2003.
- [228] K. A. Moore and J. Hollien, "The unfolded protein response in secretory cell function," *Annual review of genetics*, vol. 46, pp. 165-183, 2012.
- [229] R. Jäger, M. J. Bertrand, A. M. Gorman, P. Vandenabeele, and A. Samali, "The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress," *Biology of the Cell*, vol. 104, pp. 259-270, 2012.
- [230] Z. Hu, D. Guo, S. S. Yip, D. Zhan, S. Misaghi, J. C. Joly, B. R. Snedecor, and A. Y. Shen, "Chinese hamster ovary K1 host cell enables stable cell line development for antibody molecules which are difficult to express in DUXB11-derived dihydrofolate reductase

deficient host cell," *Biotechnology progress*, vol. 29, pp. 980-985, 2013.

- [231] W. Sommeregger, P. Mayrhofer, W. Steinfeldner, D. Reinhart, M. Henry, M. Clynes, P. Meleady, and R. Kunert, "Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 113, pp. 1902-1912, 2016.
- [232] N. P. Shanware, K. Bray, C. H. Eng, F. Wang, M. Follettie, J. Myers, V. R. Fantin, and R. T. Abraham, "Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion," *Nature communications*, vol. 5, p. 4900, 2014.

Annexe 1 Clonage moléculaire des constructions plasmidiques

Digestion enzymatique des plasmides

1 µg de plasmide est digéré dans un volume final de 10 µL contenant 1 µL de chacune des enzymes de restriction (New England Biolabs, Inc.), 1 µL du tampon *NEBuffer* recommandé (New England Biolabs, Inc.). Les mélanges de digestion sont ensuite incubés à 37 °C de 2 à 12 h selon l'efficacité et la compatibilité des enzymes de restrictions utilisées. La séparation adéquate des produits de la digestion est effectuée grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant du SYBR® Safe (Invitrogen) dans un tampon Tris / Acétate / EDTA (tampon TAE) à 80 V pendant 30 minutes. La taille (en paire de bases) de chaque fragment est déterminée grâce au marqueur de poids moléculaire *2-Log DNA Ladder* (New England Biolabs, Inc.). Enfin, les fragments d'intérêts sont découpés à l'aide d'un scalpel et purifiés avec le kit « QIAquick Gel Extraction » (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

Ligation

La ligation des inserts et du vecteur est réalisée dans un volume final de 10 µL contenant un ratio insert/vecteur égal à 3/1, 0.5 µL de l'enzyme T4 DNA ligase (200 unités) et 1 µL de tampon (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM de dithiothréitol ou DTT). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 2 h.

Transformation bactérienne

Suite à la ligation, plusieurs recombinaisons d'ADN sont possibles d'où la nécessité de sélectionner un clone bactérien ayant intégré le plasmide d'intérêt. Pour ce faire, 10 µL de la solution de ligation sont ajoutés à 50 µL de bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α, puis incubé 30 minutes sur la glace. Un choc thermique est ensuite effectué à 42 °C pendant 1 minute, suivi d'une incubation de 2 minutes sur la glace permettant de compléter la transformation bactérienne. Le volume de bactéries transformées estensemencé sur une gélose agar (Difco) - Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Une incubation à 37 °C toute une nuit permet la formation de colonies bactériennes visibles à l'œil nu. Chaque colonie

correspond à un clone bactérien. On parle ici de clone car tous les individus de la colonie sont génétiquement identiques.

Criblage des clones

De manière générale, un nombre de 8 colonies isolées sont amplifiées dans 1 mL de milieu Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma). Les cultures sont incubées 6 h à 37 °C sous agitation continue (250 rpm). Le matériel génétique présents dans chaque clone est purifié à l'aide du kit « QIAquick Miniprep » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. Les enzymes de restriction permettant de distinguer la présence de l'insert correctement intégré dans le vecteur sont sélectionnées et les produits de cette digestion sont visualisés sur gel d'agarose (1 %). Enfin, le clone bactérien ayant intégré le plasmide d'intérêt est sélectionné.

Amplification des plasmides

Les plasmides sont amplifiés suite à la transformation de 25 ng de plasmide d'intérêt dans 50 µL de bactéries compétentes *E. coli* DH5α. Un volume de 10 µL du clone sélectionné est ajouté à 100 mL de milieu Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma) et 5 µL d'anti-mousse. La culture bactérienne est ensuite incubée à 37 °C sous agitation constante (250 rpm) toute la nuit. Les plasmides sont purifiés suivant un protocole (sous licence) développé dans notre laboratoire. La dernière étape de la purification consiste à dissoudre le matériel génétique dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Notons que de manière systématique, un aliquot de 500 µL de culture bactérienne est mélangé à 500 µL de glycérol (50 %) et conservé à -80 °C dans le but de créer notre banque de clones bactériens.

Quantification et pureté des plasmides

La concentration des plasmides purifiés est déterminée par la mesure de l'absorbance 260 nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La pureté de chaque construction plasmidique est vérifiée par le rapport 260/280 et observée par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %).