



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Medizinische Fakultät Mannheim  
Dissertations-Kurzfassung**

**Glyco-engineered HEK 293-F cell lines to produce therapeutic glycoproteins with human *N*-glycosylation and improved pharmacokinetics**

Autor: Rico Uhler  
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Für die Produktion von therapeutischen Proteinen mit humanen posttranslationalen Modifikationen stellen humane Zelllinien ein vorteilhaftes System dar. HEK 293-F Zellen sind ein effizientes Expressionssystem, das schon von regulatorischen Behörden zur Produktion von therapeutischen Proteinen zugelassen wurde. Allerdings sind *N*-Glykane von Proteinen, die in HEK 293 Zellen produziert werden, besetzt mit *N*-Acetylgalactosamin und tragen wenige Sialinsäuren, was zum schnellen Abbau der Proteine durch Glykanrezeptoren—wie dem Asialoglykoproteinrezeptor und dem Mannose Rezeptor—in Patienten führt. Dadurch ist die Produktion von therapeutischen Proteinen in HEK 293 Zellen auf solche beschränkt, die diese Glykanstrukturen nicht tragen.

Um Proteine ohne *N*-Acetylgalactosamin produzieren zu können, wurden HEK 293-F Zellen, in denen die Enzyme B4GALNT3 und B4GALNT4 genetisch deaktiviert wurden, hergestellt. Um die Sialylierung zu erhöhen, wurden anschließend die Sialyltransferasen ST6GAL1 und ST3GAL6 durch eine Geninsertion überexprimiert. In den entstandenen Zelllinien wurde das Modellprotein Faktor VII-Albumin exprimiert und es wurden die phänotypischen Veränderungen analysiert, welche durch die angewandte Glyko-Optimierung induziert wurden.

HEK 293-F Zellen ohne funktionelles B4GALNT3 und B4GALNT4 stellten Faktor VII-Albumin ohne *N*-Acetylgalaktosamin und sulfatiertem *N*-Acetylgalaktosamin, mit reduzierter Antennenfukosylierung und mit erhöhter Antennarität, bisecting *N*-Acetylglukosamin und Sialylierung her. Die Überexpression von ST6GAL1 oder ST3GAL6 führte zu einer weiteren Erhöhung der Sialylierung und Reduzierung der Antennenfukosylierung. Dagegen hatte die Zugabe von *N*-Acetylmannosamin und Cytidin, Vorläufer des Sialinsäuremetabolismus, zum Kulturmedium keinen Effekt auf die Sialylierung. Faktor VII-Albumin, das in der Zelllinie ohne B4GALNT3- und B4GALNT4-Aktivität aber mit ST6GAL1-Überexpression hergestellt wurde, zeigte eine ähnlich hohe Sialylierung wie Faktor VII aus humanem Plasma und eine höhere als FVII aus CHO oder BHK Zellen. Glyko-optimierte Faktor VII-Albumin-Varianten zeigten eine reduzierte Bindung an den Asialoglykoproteinrezeptor und den Mannose Rezeptor *in vitro* und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo*.

Um festzustellen ob die detektierten Änderungen der *N*-Glykosylierung spezifisch für Faktor VII-Albumin sind, oder ob die Ergebnisse auch auf andere Protein übertragbar sind, wurde ein Faktor VIII Molekül ohne B-Domäne und ein Faktor IX Molekül in Wildtyp HEK 293-F Zellen hergestellt, sowie in HEK 293-F Zellen ohne funktionelles B4GALNT3 und B4GALNT4 und in HEK 293-F Zellen ohne funktionelles B4GALNT3 und B4GALNT4 aber mit überexprimiertem ST6GAL1. Obwohl sich die *N*-Glykosylierung der drei Proteine grundlegend unterscheidet, waren die Veränderungen durch die angewendete Glyko-Optimierung in allen drei vergleichbar.

Die neuen, glyko-optimierten Zelllinien sind daher für die Herstellung von vollständig humanen Proteinen mit vorteilhafter *N*-Glykosylierung und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften geeignet.