

DEVELOPMENT, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HUMANIZED ANTI-C2 MONOCLONAL ANTIBODY

ABSTRACT

Humanized monoclonal antibodies (mAbs) are widely used for diagnosis and treatment of cancer due to their reduced immunogenicity and high specificity. In this project, we aimed to develop procedures to produce, with high efficiency in terms continuity of production, lowered cost and increased speed, humanized mAbs against C2-antigen (hum-C2 mAbs), a marker specifically expressed in colorectal and ovarian cancer, from mAb of mouse origin. The resulting hum-C2 mAbs must still retain their original specificity and functionality, but possess reduced immunogenicity. Two methods of humanization were compared to identify potential immunogenic mouse amino acids in the variable regions: a deimmunization method and a logical approach method using IgBLAST software. The respective amino acids were then replaced with their corresponding human residues by overlapping-PCR mutagenesis. The hum-C2 mAbs were expressed in NS0 mammalian cells. To decrease the time to identify and isolate high-producing transfectomas secreting hum-C2 mAbs, ClonePix FL which is a high-throughput, rapid and automated system, was employed to screen large numbers of transfectomas in a short period of time with increased probability of obtaining rare and precious high-producing cells. The high-producing NS0 transfectomas were adapted to serum-free media because the use of serum involves many ethical, safety and scientific complications. An automated liquid chromatography system, Äktaprime Plus, was used to purify hum-C2 mAb instead of the conventional method of antibody purification which is time-consuming, laborious and prone to errors. In terms of functionality, the hum-C2 mAbs produced by both humanization methods were still able to bind

specifically to C2-antigen expressed on the surface of colorectal cancer cells (SW1116) *in vitro*. However, in terms of immunogenicity, only the humanized antibodies developed by deimmunization method had lower immunogenicity in *Macaca fascicularis* compared to chimeric and mouse anti-C2 mAbs. This clearly indicated the superiority of deimmunization method and demonstrated the fact that it could not be substituted by the logical approach method. Unfortunately, the use of overlapping-PCR mutagenesis to humanize mouse residues in the deimmunization method frequently results in undesired mutations which cause the method to be time-consuming and thus is not cost-effective. Thus, we substituted the conventional protocol with a method using synthetic DNA coding for the hum-C2 variable regions which were then transfected into NS0 and CHO mammalian cells using both pFUSE and UCOE expression systems. However we found that pFUSE vectors only worked for NS0 cells and UCOE vectors only for CHO cells. It was also found that the level of expression of hum-C2 mAbs in CHO cells using UCOE vectors was 100 times higher than NS0 cells transfected with pFUSE vectors. In addition, the use of UCOE vectors in CHO cells produced a greater number of high-producing and stable transfectomas. Hence, it was concluded that the best approach to produce hum-C2 mAbs is by using synthetic DNA coding the variable regions cloned into UCOE expression vectors and transfected in CHO cells. The use of ClonePix FL and Äktaprime Plus systems also allows the isolation of high-producing transfectomas and purification of humanized mAbs to be performed efficiently and quickly.

**PENJANAAN, PENGHASILAN DAN PENCIRIAN
ANTIBODI MONOKLONAL HUMANISASI ANTI-C2**

ABSTRAK

Antibodi monoklonal (mAb) humanisasi digunakan secara meluas untuk diagnosis dan rawatan kanser kerana mempunyai keimmunogenan yang rendah dan spesifisiti yang tinggi. Dalam projek ini, kami berhasrat untuk menjana prosedur bagi menghasilkan, dengan kecekapan yang tinggi dari segi kesinambungan pengeluaran, pengurangan kos dan masa, mAbs humanisasi terhadap antigen C2 (hum-C2 mAbs), iaitu penanda khusus dalam kanser kolorektal dan ovari, dari mAb yang berasal dari tikus. Justeru, hum-C2 mAbs perlu mengekalkan spesifisiti dan fungsi asalnya, tetapi mempunyai keimmunogenan yang lebih rendah. Dua kaedah humanisasi telah dibandingkan untuk mengenal pasti asid-asid amino tikus yang berpotensi immunogen di rantau variasi antibodi: kaedah deimmunisasi dan kaedah pendekatan logik menggunakan perisian IgBLAST. Asid-asid amino yang telah dikenalpasti kemudiannya digantikan dengan asid-asid amino homolog manusia melalui mutagenesis-PCR bertindih. Hum-C2 mAbs diekspreskan dalam sel mamalia NS0. Untuk mengurangkan masa bagi mengenal pasti dan memencilkan transfektoma produksi tinggi yang menghasilkan hum-C2 mAbs, ClonePix FL, iaitu sistem pemprosesan tinggi, pantas dan automatik, digunakan untuk menganalisa transfektoma dalam kuantiti yang banyak dalam tempoh masa yang singkat dengan kebarangkalian yang lebih tinggi untuk mendapatkan sel-sel produksi tinggi yang amat sedikit dan berharga. Transfektoma produksi tinggi NS0 kemudiannya, diadaptasikan kepada media bebas-serum kerana penggunaan serum melibatkan banyak komplikasi etika, keselamatan dan saintifik. Satu sistem kromatografi cecair automatik, Äktaprime Plus, telah digunakan untuk menuliskan hum-C2 mAbs berbanding kaedah konvensional penulenan antibodi yang mengambil masa, susah dan cenderung kepada

kesilapan. Dari segi fungsi, mAbs hum-C2 yang dihasilkan melalui kedua-dua kaedah humanisasi masih mampu untuk mengikat khusus antigen-C2 yang diekspreskan di permukaan sel-sel kanser kolorektal (SW1116) *in vitro*. Walau bagaimanapun, dalam segi keimmunogen, hanya antibodi yang dihumanisasi melalui kaedah deimmunisasi sahaja mempunyai keimmunogenan yang lebih rendah dalam *Macaca fascicularis* jika dibandingkan dengan mAbs 'chimeric' dan tikus anti-C2. Ini jelas menunjukkan keberkesanan kaedah deimmunisasi dan juga hakikatnya bahawa ia tidak boleh digantikan dengan kaedah pendekatan logik. Malangnya, penggunaan mutagenesis-PCR bertindih untuk menghumanisasi asid-asid amino tikus dalam kaedah deimmunisasi kerap menyebabkan mutasi yang tidak diingini yang menyebabkan kaedah ini memakan masa dan dengan itu menjadi tidak kos efektif. Oleh itu, kita telah menggantikan protokol konvensional dengan kaedah yang menggunakan DNA sintetik yang mengkodkan kawasan variasi hum-C2 mAb yang kemudiannya ditransfeksi ke dalam sel mamalia NS0 dan CHO dengan menggunakan kedua-dua vektor pengekspresan pFUSE dan UCOE. Bagaimanapun, kami mendapati bahawa vektor pengekspresan pFUSE hanya berfungsi untuk sel NS0 manakala vektor pengekspresan UCOE hanya untuk sel CHO. Tahap pengekspresan hum-C2 mAbs dalam sel CHO dengan menggunakan vektor UCOE adalah 100 kali lebih tinggi berbanding sel NS0 dengan menggunakan vektor pFUSE. Di samping itu, penggunaan vektor UCOE dalam sel-sel CHO menghasilkan lebih banyak transfektoma produksi tinggi dan stabil. Maka, secara kesimpulannya pendekatan terbaik untuk menghasilkan hum-C2 mAb adalah dengan menggunakan DNA sintetik yang mengkodkan rantau variasi antibodi yang kemudiannya diklonkan ke dalam vektor pengekspresan UCOE dan seterusnya ditransfeksi ke dalam sel CHO. Penggunaan sistem ClonePix FL dan Äktaprime Plus juga membolehkan proses pemencilan transfektoma produksi tinggi dan penulenan mAbs humanisasi dapat dilaksanakan dengan cekap dan cepat.