
Glykosylierung rekombinant erzeugter Pharmazeutika in Abhängigkeit der Kultivierungsphasen

Dissertation

zur Erlangung des Titels Doktor der Naturwissenschaft

der

Universität Bielefeld

Vorgelegt von

KLAUDIA GRUNWALD

Master of Science

Geboren am 04.03.1985
in Meschede - Deutschland

17.01.2019

Diese Arbeit wurde mit der Betreuung von Dr. Heino Büntemeyer in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Noll angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Heino Büntemeyer
AG Zellkulturtechnik
Technische Fakultät
Universität Bielefeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Müthing
Institut für Hygiene
Medizinische Fakultät Münster
Universität Münster

Tag der Disputation: 18.04.2019

Alles, was man tun muss, ist, die richtige Taste zum richtigen Zeitpunkt zu treffen.

Johann Sebastian Bach

ZUSAMMENFASSUNG

Der steigende Anteil an zugelassenen Biopharmazeutika, die in tierischen Zellen produziert werden, verdeutlicht die Wichtigkeit von posttranslationalen Modifikationen. Eine beständige Produktqualität ist ein Hauptziel in der Produktion von Biopharmazeutika, insbesondere bei Glykoproteinen. Ein bekanntes Beispiel für ein glykosyliertes Biopharmazeutikum ist Erythropoetin. Im Gegensatz zur Biosynthese der Polypeptidkette sind posttranslationale Modifikationen und die Proteinfaltung durch Änderungen während des Produktionsprozesses beeinflussbar. Die Glykosylierung eines rekombinant produzierten Proteins ist wichtig für seine Funktion, die Halbwertszeit und die Stabilität des Proteins *in vivo*. In dieser Arbeit wird die Produktglykosylierung im Verlauf einer *Batch*-Kultivierung näher betrachtet. Während des Produktionsprozesses ist sowohl die produzierende Zelle, als auch das produzierte und sekretierte Produkt mehreren variierenden Parametern ausgesetzt. Zu Beginn einer Kultivierung sind ausreichend Nährstoffe vorhanden, und das sekretierte Protein verbleibt lange im Kulturüberstand. Zum Ende einer Kultivierung hingegen sind viele Nährstoffe verbraucht und mögliche störende Metabolite und Enzyme akkumulieren im Kulturüberstand. Die Verweilzeit des Produktes, welches in dieser Zeit produziert wird, ist jedoch kurz und es ist somit kaum extrazellulären Einflüssen ausgesetzt. Um die Glykosylierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten betrachten zu können, wurde zunächst eine wachstumsspezifische Probenahme etabliert. Dadurch konnte das Produkt, welches zu Anfang der Produktion produziert wurde, mit dem Produkt aus einer späteren Phase und mit dem Produkt vom Ende der Kultivierung verglichen werden, ohne dass in den Proben zu späteren Zeitpunkten Produkt vom Anfang der Kultur vorlag. Hier wurde die Produktglykosylierung von fünf rekombinanten Proteinen (Erythropoetin, ein IgG1-Antikörper, C1-Inhibitor, α -1-Antitrypsin und Antithrombin III) in unterschiedlichen Zelllinien während einer *Batch*-Kultivierung mit Hilfe einer wachstumsspezifischen Probenahme analysiert. Zusätzlich wurde die Stabilität einiger Glykoproteine nach Inkubation unter Kultivierungsbedingungen betrachtet, um eine Einschätzung treffen zu können, wie stark ein bereits sekretiertes Produkt von extrazellulären Prozessen beeinflusst wird.

Die Ergebnisse der wachstumsspezifischen Produktanalytik zeigten, dass zu Beginn einer Kultivierung, wenn die Versorgung der Zellen optimal war, Galaktosylierungsgrad und bei sialylierten Glykanen der Sialylierungsgrad am höchsten waren. Mit der Kultivierungsdauer sanken Sialylierungs- und Galaktosylierungsgrad. Die Antennarität blieb bei den hier untersuchten Proteinen während der Kultivierung konstant. Der Antikörper zeigte zum Ende der Kultivierung weniger *core*-fucosylierte Glykane und mehr *High* Mannose Strukturen. C1-Inhibitor und α -1-Antitrypsin zeigten antennäre Fucosen. Der Anteil an antennären

Fucosen sank bei der Produktion des C1-Inhibitors mit der Kultivierungsdauer. Die Versuche zur Produktstabilität bestätigten, dass die Glykosylierung im Kulturüberstand lediglich von der Aktivität extrazellulärer Glykosidasen, aber nicht von chemischen Prozessen abhängig war. Glykosidasen gelangen durch Zellyse in den Kulturüberstand. Es ist davon auszugehen, dass bei sinkender Viabilität das sekretierte Produkt durch solche Enzyme degradiert wird. Durch den Nachweis einer Sialidase-Aktivität in einigen der Kulturüberständen wurde diese Vermutung bestätigt. Zusätzlich zeigte sich, dass die Aktivitäten von Sialidasen in den Kulturüberständen abhängig von der produzierenden Zelllinie sind.

Als weiteren Grund für Unterschiede in der Glykosylierung konnten intrazelluläre Prozesse identifiziert werden, die durch die variierende Nährstoffversorgung und Akkumulation von Metaboliten hervorgerufen werden. Besonders die Versorgung mit Glukose und die Verstoffwechselung von Glutamin schienen den Glykosylierungsprozess zu beeinflussen. Durch die Untersuchung der fünf Glykoproteine, die in unterschiedlichen Zelllinien produziert wurden, wurde gezeigt, dass die Produktheterogenität sowohl zelllinien- als auch produktabhängig ist. Für die Optimierung von Produktionsprozessen ist ein solches Wissen zusammen mit der Kenntnis über die Anforderungen, die an das zu produzierende Glykoprotein gestellt werden, essentiell.

ABSTRACT

The increasing number of approved biopharmaceuticals produced in mammalian cell lines emphasizes the importance of posttranslational modifications. A consistent product quality is a major goal in the production of biotherapeutics, especially recombinant glycoproteins. In contrast to the biosynthesis of the amino acid chain, posttranslational modifications like glycosylation and protein folding may be influenced by changes within the production process. Glycosylation of recombinant proteins is important for their function, half-life and stability in vivo. In this study, glycosylation during a batch cultivation is evaluated. Cells and secreted protein are exposed to continuous change during a cultivation batch process. In early cultivation the supply situation is excellent and a complete glycosylation can be expected. However, the product's long dwell time may influence product quality. Later in cultivation, substrate supply decreases while metabolites increase, which result in changes in cultivation. As the dwell time of the product produced at later cultivation stages is short, an extracellular degradation has a less significant effect. A time-dependent sampling was established to examine the glycosylation at different cultivation stages. This sampling allows a comparison between product from early cultivation and product resulting from later cultivation stages. In this study, the glycosylation of five recombinant proteins (erythropoietin, an IgG1 antibody, C1-inhibitor, α -1-antitrypsin and antithrombin III) was analysed. The proteins were produced in different cell lines in batch cultivations. Products from three different cultivation periods could be evaluated with the time-dependent sampling. Additional glycoprotein stability was considered after exposure to different cultivation-like scenarios to estimate the influence of extracellular processes.

Results of the time-dependent analysis of the glycosylation showed that in early cultivation stages (excellent supply situation) the degree of galactosylation and sialylation (for sialylated products) was higher than in later cultivation stages. Galactosylation and sialylation decreased during cultivation, antennarity however stayed consistent. The antibody showed less core fucosylation but an increase in high mannose structures in later cultivation stages. Antennary fucoses were found in C1-inhibitor and α -1-antitrypsin. The antennary fucosylation of C1-inhibitor decreased with the cultivation time. Glycosylation was dependent on glycosidase activity in the supernatant, but not on chemical processes. This was confirmed via the stability experiments. It is likely that the secreted product is degraded by glycosidases with a decreasing viability of the cell culture due to cell lysis. With the evidence of sialidase activity this assumption was confirmed. Furthermore, it was shown that sialidase activity is dependent on the producing cell line.

Changes of intracellular processes due to varying substrate supply and accumulating metabolites were found to be a further reason for changes in glycosylation during a batch cultivation. Mainly glucose supply and metabolism of glutamine appeared to influence the glycosylation process.

With the examination of five glycoproteins produced in different cell lines it could be shown that product heterogeneity is cell line dependent as well as product dependent. Such knowledge combined with the awareness of the requirements of the biotherapeutic is essential for optimising a production process.

Inhalt

Zusammenfassung	9
Abstract.....	11
Einleitung.....	8
1. Theoretischer Hintergrund	11
1.1. Produktion von rekombinanten Pharmazeutika.....	11
1.2. Proteinglykosylierung.....	12
1.2.1. Sialinsäuren.....	13
1.2.2. O-Glykosylierung.....	15
1.2.3. N-Glykosylierung	16
1.3. Einflüsse auf die Produktglykosylierung.....	24
1.3.1. Einflüsse der Expressionssysteme auf die Glykosylierung.....	25
1.3.2. Einfluss diverser Kultivierungsbedingungen auf die Glykosylierung.....	28
1.4. Glykosidasen im Kulturüberstand	33
1.5. Analysierte Biopharmazeutika	34
1.5.1. Erythropoetin	35
1.5.2. Monoklonaler Antikörper.....	36
1.5.3. C1-Inhibitor.....	41
1.5.4. α -1-Antitrypsin	42
1.5.5. Antithrombin III	44
Material und Methoden	46
2. Zellkultur.....	46
2.1. Verwendete Zelllinien	46
2.1.1. Parentalzelllinie CHO-K1 und die EPO-produzierende Zelllinie CHO-K1-C4	46
2.1.2. Parentalzelllinie CHO-K1 Derivat und die mAb-produzierende Zelllinie CHO-XL99	47
2.1.3. Parentalzelllinie CAP® und die C1-INH-produzierende Zelllinie CAP®-1D9 und -2B10.....	47
2.1.4. Parentalzelllinie AGE1.hn und die AAT-produzierende Zelllinie AGE1.hn-AAT..	47

2.1.5. Als Parentalzelllinie eingesetzte CHO-K1 und die ATIII-produzierende Zelllinie CHO-ATIII	48
2.2. Stammhaltung und Zellpassage	48
2.3. Kryokonservierung.....	50
2.4. Adaptionen an neue Kultivierungsbedingungen	51
2.4.1. Adaption an Wachstum in Suspension der CHO-ATIII-Zellen	51
2.4.2. Adaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zellen an neue Medien und neue Kultivierungsbedingungen.....	52
2.4.3. Adaption von CHO-K1 an andere Kultivierungsmedien	52
2.5. Tests zur wachstumsspezifischen Probenahme	53
2.5.1. Versuch zur Auswirkung der wachstumsspezifischen Probenahme und die damit verbundene Zentrifugation auf einen EPO-produzierenden Zellpool	53
2.5.2. Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum der CAP®-2B10-Zellen.....	55
2.5.3. Überprüfung der Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme auf eine weitere Produktionszelllinie: AGE1.hn-AAT	56
2.6. Hauptkultivierungen	57
2.7. Tests zur Produktstabilität.....	58
2.7.1. Produktstabilität in Medium, bzw. in konditioniertem Medium	58
2.7.2. Produktstabilität von ATIII in Medium und in Zellkulturen.....	59
2.8. Sialidase-Aktivität in Kulturüberständen.....	59
3. Produktaufarbeitung	61
3.1. Aufreinigung von EPO an Anti-EPO-Antikörpern	61
3.2. Aufreinigung von mAb an Protein A	62
3.3. Aufreinigungssequenz vom C1-INH.....	62
3.3.1. Affinitätschromatographie	62
3.3.2. Ultrafiltration	63
3.3.3. Anionenaustauschchromatographie	63
3.4. Aufreinigung von AAT an dem Lektin ConA.....	64

3.5. Aufreinigung von ATIII an Heparin	65
4. Analytik.....	66
4.1. Kultivierungsbezogene Analytik	66
4.1.1. Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung.....	66
4.1.2. Messung der Glukose- und Laktatkonzentration	66
4.1.3. Aminosäure-Analytik.....	66
4.2. Produktbezogene Analytik	67
4.2.1. Produktquantifizierung und -identifizierung	68
4.2.2. Analysen zur Produktqualität in Bezug auf die N-Glykosylierungen	72
Ergebnisse und Diskussion	82
5. Medienadaption	82
5.1. Adaption der CHO-ATIII-Zelllinie an Wachstum in Suspension.....	82
5.2. Medienadaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zelllinien	84
5.3. Adaption von CHO-K1 an andere Kultivierungsmedien.....	86
6. Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel	89
6.1. Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme und der damit verbundenen Zentrifugation auf einen EPO-produzierenden Zellpool.....	89
6.2. Einfluss der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum der CAP®-2B10-Zellen	92
6.3. Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme auf eine weitere Produktionszelllinie: AGE1.hn-AAT.....	96
6.4. Fazit aus den Vorversuchen	100
7. Hauptversuche	101
7.1. Kultivierungsdaten und Ergebnisse der Aufarbeitungen.....	101
7.1.1. Wachstumsspezifische Probenahme von EPO-produzierenden CHO-Kulturen.....	102
7.1.2. Wachstumsspezifische Probenahme eines mAb	107
7.1.3. Wachstumsspezifische Probenahme des C1-INHs.....	111
7.1.4. Wachstumsspezifische Probenahme des AATs.....	115
7.1.5. Wachstumsspezifische Probenahme des ATIIIIs	120

7.2. Sialidase-Aktivität in Kulturüberständen.....	124
7.3. Zusammenfassung der möglichen Einflüsse auf die Proteinglykosylierung.....	127
7.4. Produktanalytik der glykosylierten Produkte aus unterschiedlichen Wachstumsphasen	128
7.4.1. Produktanalytik des EPOs mittels CZE.....	128
7.4.2. Produktanalytik des mAbs	132
7.4.3. Produktanalytik des C1-INHs.....	147
7.4.4. Produktanalytik des AATs.....	156
7.4.5. Produktanalytik des ATIIIIs	165
7.5. Zusammenfassung der Hauptversuche	172
8. Analytik zur Produktstabilität.....	174
8.1. Inkubation von EPO in Kulturüberstand und die Auswirkungen auf die Sialylierung.....	174
8.2. Produktstabilität des C1-INHs unter Kultivierungsbedingungen	176
8.3. Produktstabilität des ATIIIIs unter Kultivierungsbedingungen.....	177
8.4. Zusammenfassung zur Produktstabilität	179
Ausblick	180
Anhang	i
1. Abbildungsverzeichnis	i
2. Tabellenverzeichnis	vi
3. Abkürzungsverzeichnis	vii
4. Tabellen.....	x
5. Abbildungen	xvii
6. Curriculum Vitae	xxiii
Danksagung.....	xxvi
Erklärung	xxix
Literaturverzeichnis	xxx

EINLEITUNG

Allein in den letzten zehn Jahren wurden in den Vereinigten Staaten und in der Europäischen Union mehr als 100 neue Biopharmazeutika zugelassen. Ihr Marktwert steigert sich stetig. 2013 wurden 140 Milliarden US Dollar mit Biopharmazeutika umgesetzt (Walsh, G.; 2014). 2016 waren es bereits 228 Milliarden Dollar (Moorkens, E., et al.; 2017). Im Zeitraum von 1995-1999 betrug der Anteil an Biopharmazeutika aus Säugetierzellen 47 %, zwischen 2000-2004 bereits 55 % und in den Jahren 2005-2010 58 %. Bis 2014 stieg der Anteil auf 60 % aller Zulassungen von Biopharmazeutika (Walsh, G.; 2014). Ein Grund dafür ist die Fähigkeit der Zellen die Proteine posttranslational zu modifizieren. Besonders die posttranslationale Modifikation durch Glykosylierungen beeinflusst Faltung und Stabilität sowie die biologische Aktivität, die Halbwertszeit im Blutkreislauf und die Immunogenität (Runkel, L., et al.; 1998; Elliott, S., et al.; 2003; Ghaderi, D., et al.; 2012; Jefferis, R.; 2016; Kuriakose, A., et al.; 2016). Bei der Glykosylierung handelt es sich nicht um einen genetisch codierten Bauplan, sondern sie ist von vielen, zum Teil wenig beeinflussbaren Faktoren abhängig (Hossler, P., et al.; 2009; Zhang, P., et al.; 2016). Neben der Auswahl der Produktionszelllinie und dem Zellliniendesign sind auch Faktoren wie die Zusammensetzung des Mediums, die Art der Kultivierung (*Batch*, *Fed-Batch* oder *Perfusion*), Temperatur und pH-Wert für die Glykosylierung von Bedeutung (Ivarsson, M., et al.; 2014; Chen, P.; Harcum, S. W.; 2006; Fan, Y., et al.; 2015; Liu, H., et al.; 2016; Dionne, B., et al.; 2017). Aus diesem Grund ist eine Analytik und Kontrolle der Glykosylierung von rekombinant produzierten Proteinen, die als Biopharmazeutika zugelassen werden sollen, nicht nur nach Etablierung eines Produktionsprozesses, sondern ebenfalls für jede einzelne Produktionscharge von enormer Bedeutung.

In den Jahren 2013 bis 2016 liefen in der Europäischen Union 13 Patente für Biopharmazeutika aus, wodurch der Marktanteil an *Biosimilars* wuchs (Walsh, G.; 2014). Als *Biosimilars* werden Präparate bezeichnet, die dem bereits zugelassenem Produkt ähneln, aber einen anderen Herstellungsprozess aufweisen. Da die Glykosylierung stark von der produzierenden Zelllinie und dem Kultivierungsprozess beeinflusst werden kann, ist die Kontrolle der Glykosylierung der *Biosimilars* essentiell wichtig (Borza, B., et al.; 2018; Grampp, G.; Ramanan, S.; 2015).

Um auf die durch Glykosylierungen entstehende Produktheterogenität gezielt einwirken und diese kontrollieren zu können, ist es unerlässlich die beeinflussenden Faktoren für die jeweilige Produktionszelllinie und für das jeweilige Produkt zu kennen. Daher sollte die Prozessführung nicht nur auf Zellwachstum und Produktivität, sondern auch auf die Glykosylierung hin optimiert werden. Die Ansprüche an die Glykosylierung können von Protein

zu Protein variieren. So ist für monoklonale Antikörper (mAb), die in der Onkologie eingesetzt werden, beispielsweise ein geringer Grad an *core*-Fucosylierungen vorteilhaft (Liu, L.; 2015; Liu, H., et al.; 2016; Jefferis, R.; 2005; Liu, L., et al.; 2011). Bei der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen mittels Erythropoetins (EPO) wird besonderen Wert auf den Sialyierungsgrad der Glykane gelegt, um eine längere Halbwertszeit des Medikaments im Blutkreislauf des Patienten gewährleisten zu können. Daher wurde am Protein eine zusätzliche Glykosylierungsstelle eingefügt, um den Sialyierungsgrad des Proteins zu erhöhen. Das entstandene Produkt Darbepoetin weist eine deutlich längere Halbwertszeit auf als rekombinant produziertes EPO (Egrie, J. C., et al.; 2003). Diese Beispiele zeigen, wie unterschiedlich die Ansprüche an ein Glykoprotein sein können und wie viele Optimierungsmöglichkeiten es gibt.

Nicht nur die Anforderungen an die Glykosylierung des Proteins sind wichtig auf dem Weg zur Optimierung eines Produktionsprozesses, sondern auch das Wissen über die Ursachen der Heterogenität der Glykosylierungen. Welche Unterschiede sind bedingt durch die Zelllinie, das Medium oder den Produktionsprozess? Des Weiteren stellen sich die Fragen, ob bereits unterschiedlich glykosylierte Formen produziert und sekretiert werden, oder, ob die Heterogenität außerhalb der Zelle durch degradierende Prozesse entsteht. Ist die Produktheterogenität auf die eigentliche Produktion innerhalb der Zelle zurückzuführen, so ist ungewiss, ob das Produkt in verschiedene Wachstumsphasen unterschiedlich glykosyliert wird. Das würde bedeuten, dass am Ende eines *Batch*-Prozesses ein Gemisch dieser Produkte vorliegt. Es wäre aber auch möglich, dass das Produkt zu jedem Zeitpunkt gleichermaßen heterogen produziert wird. Bei der Veränderung des Produktes außerhalb der Zelle ist unklar, ob chemische und physikalische Einflüsse zur Degradation beitragen, oder ob die Glykanstrukturen durch enzymatische Prozesse verändert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten Antworten auf diese Fragen gefunden werden. Zunächst musste dazu eine wachstumsspezifische Probenahme entwickelt werden, die es erlaubt das Produkt aus einem bestimmten Zeitraum der Kultivierung zu untersuchen, ohne dass erstens Produkte aus vorherigen Wachstumsphasen die Ergebnisse verfälschen und zweitens Wachstums- und Produktionsbedingungen sich im Vergleich zu einer Kultivierung ohne Probenahmen verändern. Es wurden fünf unterschiedliche Biopharmazeutika (EPO, mAb, C1-Inhibitor, α -1-Antitrypsin und Antithrombin III) in fünf unterschiedlichen Zellen (CHO- und humane Zelllinien) produziert und wachstumsspezifisch analysiert. Ferner wurde der Einfluss von chemischen, physikalischen und enzymatischen Prozessen auf das sekretierte Produkt untersucht. In der Literatur sind viele Studien zu finden, die vom Einfluss verschiedener Parameter auf die Produktglykosylierung berichten. Manche dieser Parameter zeigten bei unterschiedlichen Produkten und verschiedenen Produktionszelllinien konträre Effekte. Um

Einleitung

möglichst umfassende Ergebnisse zu erhalten, wurden sowohl Glykoproteine mit diverser Komplexität in ihrer Glykosylierung ausgewählt, als auch unterschiedliche Produktionszelllinien.

1. Theoretischer Hintergrund

Ziel dieser Arbeit war die Analyse fünf unterschiedlicher Glykoproteine, die in der Pharmazie eingesetzt werden. Dazu sollte der putative Einfluss unterschiedlicher Wachstumsphasen diverser Säugetierzellen auf die Glykosylierung untersucht werden. Hierzu wird im Folgenden der Einsatz von Glykoproteinen als Pharmazeutika beschrieben. Zudem werden unterschiedliche Arten der Glykosylierung als posttranslationale Modifikation dargestellt. Die vorliegende Arbeit legt den Fokus auf die Analyse der N-Glykosylierung der produzierten Glykoproteine. Darüber hinaus werden unterschiedliche Expressionssysteme für Glykoproteine aufgezeigt mit besonderem Blick auf die hier eingesetzten Säugetierzellen. Da neben den Expressionssystemen, auch die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Glykosylierung haben, werden Faktoren der Kultivierung und ihr Einfluss näher betrachtet, ebenso wie die extrazellulären Reaktionen, die im Zellkulturüberstand Einfluss auf die Glykosylierung haben können. Um mögliche Veränderungen in der Glykosylierung der Proteine in Bezug auf ihre pharmakologische Wirkung hin einordnen zu können, werden die einzelnen Proteine, ihre Glykosylierung sowie deren Bedeutung beschrieben.

1.1. Produktion von rekombinanten Pharmazeutika

Der humane gewebspezifische Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, tPA) war 1986 das erste zugelassene therapeutische Protein, welches in Säugetierzellen produziert wurde (Wurm, F. M.; 2004). Der Unterschied zwischen der Produktion von rekombinanten Proteinen in Tierzellen und in Bakterien, wie beispielsweise in *Escherichia coli*, ist die korrekte Faltung der Proteine und die posttranslationalen Modifikationen (PTM), die nicht genetisch codiert sind (Butler, M.; 2005). So konnte bereits 1982 Insulin in *Escherichia coli* produziert werden, da es sich um ein strukturell einfaches Protein handelt, welches posttranslational kaum verändert wird. Bei komplexeren Proteinen, bei denen PTMs sowohl für eine korrekte Faltung als auch für die Bioaktivität essentiell sind, ist jedoch eine Maschinerie notwendig, wie sie in eukaryotischen Zellen zu finden ist (Butler, M.; 2005). Bis 2004 wurden bereits 60-70 % der rekombinanten therapeutischen Proteine in Säugetierzellen produziert (Wurm, F. M.; 2004). Bis 2014 wurden 246 rekombinant produzierte Biopharmazeutika in den USA und der Europäischen Union (EU) zugelassen (Walsh, G.; 2014). In den Jahren 2010 bis 2014 machten den Hauptanteil monoklonale Antikörper (mAbs) aus (17 von 54 zugelassenen Produkten). Neben den mAbs wurden neun Hormone, acht Blut-relevante Proteine, sechs Enzyme, vier Impfstoffe, Fusionsproteine und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktoren sowie ein Interferon und ein Gentherapie basiertes Produkt zugelassen. 59 % der Produkte waren neue Zulassungen,

Einleitung

wohingegen 41 % *Biosimilars* oder Produkte, die bereits anderorts zugelassen wurden, ausmachten (Walsh, G.; 2014).

2016 brachten Biopharmazeutika einen weltweiten Umsatz von 228 Milliarden US Dollar (Moorkens, E., et al.; 2017). Dies zeigt, dass der Markt an Biopharmazeutika weiterwächst. Um sowohl die Produktivität der Zellen als auch die Qualität der Produkte zu optimieren, wurde in den letzten Jahren auf verschiedenen Ebenen geforscht. Nicht nur Studien in den Bereichen der Genexpression, des Metabolismus, des Zellzyklus, sondern auch bessere Kenntnisse über Vektorsysteme, Zellliniendesign, Medienoptimierung, Screening Methoden und Prozessführung führten bereits zu höherer Produktivität von Zelllinien (Butler, M.; 2005; Butler, M.; 2006; Wurm, F. M.; 2004; Lin, H., et al.; 2017) und einer höheren Produktqualität (Shinkawa, T., et al.; 2003; Sha, S., et al.; 2016), wie beispielsweise eine längere Halbwertszeit von modifiziertem EPO im Körper (Egrie, J. C., et al.; 2003). Für die Produktion von Therapeutika ist es wichtig, dass ihre Glykosylierung der Glykosylierung humaner Proteine entspricht, da sie andernfalls immunogen sein könnten (Jefferis, R.; 2016; Raju, T. S.; 2003; Kuriakose, A., et al.; 2016). Die Enzymausstattung der Wirtszellen ist für die PTMs, wie die Glykosylierung, von Bedeutung, da unterschiedliche Organismen unterschiedliche Glykanstrukturen bilden (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994; Chadd, H. E.; Chamow, S. M.; 2001; Butler, M.; 2005; Gomord, V., et al.; 2005; Goh, J. B.; Ng, S. K.; 2018). Einige Expressionssysteme werden in Kapitel 1.3.1 detailliert beschrieben.

1.2. Proteinglykosylierung

Monosaccharide können kovalent an Proteine oder Lipide gebunden sein. Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane werden als Glykokonjugate bezeichnet. Diese Arbeit befasst sich mit den Glykoproteinen. Sind Kohlenhydratseitenketten glykosidisch an Aminosäure (AS)-Reste gebunden, so handelt es sich um Glykoproteine. Diese Glykosylierungen werden hauptsächlich in O- und N-Glykane aufgeteilt. Die meisten O-Glykane sind über N-Acetyl- α -D-Galaktosamin an ein Serin oder Threonin gebunden. N-Glykane sind über N-Acetyl- β -D-Glucosamin an Asparagin gebunden. Die Struktur der N-Glykane wird in drei Typen aufgeteilt: *High Mannose*, *Komplex Typ* und *Hybrid Typ*. Die N-Glykantypen sowie die unterschiedlichen Klassen der O-Glykane sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

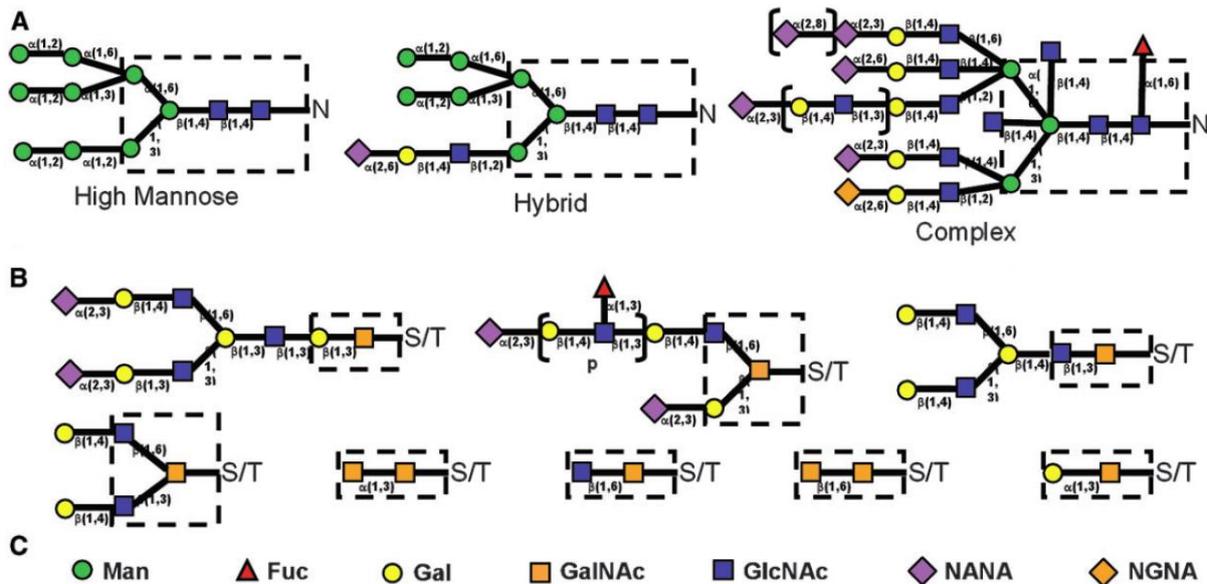


Abbildung 1: Die schematische Darstellung der Zuckerstrukturen von N- und O-Glykanen. (A) Drei N-Glykotypen. (B) Repräsentative Darstellung der 8 Klassen der O-Glykane. (C) Symbolische Darstellung der Monosaccharide, die in O- und N-Glykanen vorkommen (Man: Mannose; Fuc: Fucose; Gal: Galaktose; GalNAc: N-Acetylgalaktosamin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; NANA: N-Acetylneuraminsäure; NGNA: N-Glykolyneuraminsäure) (Hossler, P., et al.; 2009).

Glykane setzen sich aus mehreren Monosacchariden zusammen. Zu diesen Monosacchariden gehören neutrale Zucker wie Mannose (Man), Galaktose (Gal), Fucose (Fuc), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Diese machen, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, den Großteil der Glykane aus (Staudacher, E., et al.; 1999; Becker, D. J.; Lowe, J. B.; 2003). Zudem können terminal geladene Zucker an die Glykane angehängt werden. N-Acetylneuraminsäure (NANA) und N-Glykolyneuraminsäure (NGNA) sind Sialinsäuren, die durch Modifikationen von Neuraminsäure entstehen (Varki, A.; 2009).

1.2.1. Sialinsäuren

Die geladenen Sialinsäuren, insbesondere NANA und NGNA spielen eine gesonderte Rolle in der Proteinglykosylierung und werden im Folgenden detailliert beschrieben. In Abbildung 2 ist die Grundstruktur der Sialinsäuren mit den zugehörigen möglichen Substituenten gezeigt.

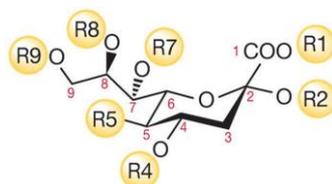


Abbildung 2: Grundstruktur der Sialinsäuren, R1 - R9 zeigen die Bindungsstellen für unterschiedliche Substituenten (Varki, A.; 2009).

Aus den sieben Stellen, an denen jeweils unterschiedliche Substituenten gebunden werden können bzw. von denen aus Bindungen zu anderen Molekülen eingegangen werden können,

Einleitung

resultiert eine große Vielfalt der Sialinsäuren. Es gibt vier „Kern“-Strukturen: NGNA (R5= N-Acetyl, hydroxyliert), NANA (R5= N-Acetyl), Kdn (R5= Hydroxyl Gruppe, 2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galaktononulosonsäure) und Neu (R5= H, Neuraminsäure). Die weiteren möglichen Strukturen bilden sich aus diesen Sialinsäuren durch die Bindung von Acetyl-, Sulfat-, Lactyl-, Methyl- oder Phosphat-Gruppen. Das erste Kohlenstoffatom (C 1) ist unter physiologischem pH deprotoniert, wodurch eine negative Ladung entsteht (Schauer, R.; 2009; Varki, A.; 2009; Ghaderi, D., et al.; 2007).

NANA und Kdn sind die Vorläufer für alle in Säugetieren bekannten Sialinsäuren. Diese werden in Wirbeltieren aus ManNAc-6-P (Vorläufer für NANA) oder Man-6-P (Vorläufer für Kdn) durch Kondensation mit Phosphoenolpyruvat gewonnen. Diesen Vorstufen geht aktiviertes GlcNAc (UDP-GlcNAc) voraus, welches durch ein bifunktionales Enzym, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE) zu UDP und ManNAc-6-P umgewandelt wird (Ghaderi, D., et al.; 2007). Nach der Kondensation der Zucker werden diese durch eine spezifische Phosphorylase dephosphoryliert. Um auf ein Glykan übertragen werden zu können, müssen die Sialinsäuren aktiviert werden. Dies geschieht durch eine CMP-Sia-Synthase, wobei Cytidintriphosphat als Donor dient. Cytidinmonophosphat (CMP) wird unter Abgabe von zwei Phosphatgruppen auf die Sialinsäure übertragen. Diese Reaktion findet im Zellkern statt. Die aktivierte Sialinsäure gelangt über das Cytoplasma in das Golgi-Lumen. Dort kann die Sialinsäure unter Abspaltung des CMP durch eine Sialyl-Transferase (SiaT) auf ein Glykokonjugat übertragen werden (Tipson, R. S.; Horton, D.; 1982; Kondo, H., et al.; 1992; Schauer, R.; 2000; Schauer, R.; 2009; Varki, A.; 2009).

Die Funktionen von Sialinsäuren sind mannigfaltig. Die bei physiologischem pH starke Elektronegativität der geladenen Zucker ist bei der Bindung und dem Transport von Ionen und der Stabilisierung der Proteinkonformation essentiell. Auch die Viskosität von Mucinen wird durch ihre Elektronegativität beeinflusst. Eine weitere Funktion von Sialinsäuren ist der Schutz vor Proteasen und Glykosidasen, als auch vor dem Abbau des Glykokonjugates durch Makrophagen und Hepatozyten, wodurch die Halbwertszeit von Molekülen im Organismus verlängert wird. Neben diesen maskierenden Effekten können Sialinsäuren auch als Liganden von beispielsweise mikrobiellen Lektinen dienen, was in der Aufreinigung von sialylierten Glykoproteinen ausgenutzt wird (Schauer, R.; 2009; Varki, A.; 2009).

Obwohl die zuvor bereits genannten „Kern“-Strukturen in den meisten Säugetieren vorkommen, ist NGNA in menschlichem Gewebe nur in Spuren zu finden. Im Gegensatz zu Primaten wie Schimpansen und Bonobos sowie den meisten anderen Säugetieren hat der Mensch eine Deletion im *cmah* Gen, welches für das Enzym Cytidinmonophospho-N-acetylneuraminsäure-Hydroxylase codiert. Dies führt zum Fehlen eines aktiven Enzyms, was wiederum zum Fehlen von NGNA im menschlichen Gewebe führt

(Irie, A.; Suzuki, A.; 1998). Das Vorkommen von geringen Mengen von NGNA in menschlichen Gewebe wird durch die Aufnahme von rotem Fleisch und Milchprodukten erklärt (Tangvoranuntakul, P., et al.; 2003; Varki, A.; 2009). Wird NGNA dem Menschen in höheren Dosen zugeführt, beispielsweise durch nicht human glykosylierte Biopharmazeutika, werden Antikörper gegen diese Sialinsäure (Hanganutziu-Deicher-Antigen) gebildet, was eine starke Immunantwort bis hin zu einem anaphylaktischen Schock hervorrufen kann. Diese Antikörper wurden ebenfalls bei Krebspatienten, bei Patienten mit einer Herpes-Infektion oder bei Patienten mit der Marek-Krankheit (Viruserkrankung) nachgewiesen (Varki, A.; 2009).

Nicht nur die angehangene Sialinsäure kann abhängig vom Organismus sein, sondern auch die Bindung zwischen Galaktose und Sialinsäure kann je nach Organismus als α -2,3 oder α -2,6 Bindung vorliegen. Dieser Unterschied kann die Wirkungsweise des Proteins beeinflussen (Higai, K., et al.; 2006; Takahata, M., et al.; 2007).

Sialinsäuren sind durch die weit gefächerten Funktionen für pathologische und pharmazeutische Studien von besonderer Bedeutung. Beispielsweise binden viele bakterielle Toxine und auch Viren an sialylierte Glykokonjugate. Über die Bindung an NANA-Gal-Strukturen können Influenza-Viren in die Wirtszelle eindringen (Chandrasekaran, A., et al.; 2008). Unterschiedliche Krankheiten stehen mit einer Veränderung der Sialinsäuren in Verbindung. So scheinen solche Veränderungen bei Krankheiten wie Diabetes, Alzheimer und Arteriosklerose involviert zu sein (Schauer, R.; 2000; Varki, A.; 2009). Gegen Influenza A und B konnten kompetitive Inhibitoren von viralen Sialidasen erfolgreich eingesetzt werden, um die Verbreitung der Viren im Organismus zu hemmen. Rekombinant produzierte Pharmazeutika konnten durch eine Erhöhung des Sialyierungsgrades in Hinblick auf die biologische Aktivität und die Halbwertszeit im Kreislauf verbessert werden (vgl. Kapitel 1.5.1) (Varki, A.; 2009).

1.2.2. O-Glykosylierung

Innerhalb der Glykoproteine gibt es unterschiedliche Arten der Glykosylierung. Wie zuvor bereits beschrieben, sind die beiden bekanntesten Arten die N- und die O-Glykosylierung. O-Glykane sind über eine O-glykosidische Bindung an Serin oder Threonin gebunden und können nicht nur, wie in Abbildung 1 gezeigt, ein GalNAc als primäres Glykan besitzen, sondern auch eine Fucose oder Glukose. Diese O-Glukose-Glykane sind jedoch nur bei wenigen Proteinen wie den Faktoren VII oder IX, dem Protein Z, dem fötalen Antigen 1 und Notch bekannt (Varki, A.; 2009). Eine komplexere O-Glykosylierung ist die O-Mannose-Glykosylierung. Sie macht ein Drittel aller O-Glykosylierungen im Gehirn aus. Kollagen, ein Protein, das den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ausmacht, trägt häufig über eine O-Bindung ein Disaccharid (Glc-Gal) an einem Hydroxylysin oder einem

Einleitung

Hydroxyprolin. Der dadurch resultierende Kohlenhydratanteil dient der Wasserbindung im Bindegewebe (Spiro, R. G.; Spiro M. J.; 1971; Myllyharju, J.; 2004; Peter - Katalinić, J.; 2005). Die O-GalNAc-Glykosylierung wird auch Mucin O-Glykosylierung genannt, da O-Glykane bei Mucinen 80 % des Molekulargewichts ausmachen können (Varki, A.; 2009). Die Klassen der O-GalNAc-Glykane sind in Abbildung 1 gezeigt. Im Gegensatz zu den N-Glykanen werden O-Glykane posttranslational direkt am Protein durch das Anhängen von Monosacchariden gebildet (van den Steen, P., et al.; 1998; Novak, J., et al.; 2000). Die Übertragung eines UDP-GalNAc auf ein Serin oder Threonin geschieht im Golgi-Apparat und initiiert die Glykosylierung. Die nächsten Zucker werden dort einzeln durch *core*-spezifische Enzyme angehängt (Hanisch, F. G.; 2001; Varki, A.; 2009).

Mucine werden in den Atmungsorganen, dem Gastrointestinaltrakt, dem Urogenitaltrakt und den Augen sekretiert. Mucine können durch die negativ geladenen Glykosylierungen Wasser stark binden und bilden so eine schützende Schleimschicht über dem Epithelgewebe (Hanisch, F. G.; 2001; Robbe, C., et al.; 2004; Varki, A.; 2009).

Die O-Glykosylierung schützt nicht nur Zellen, sondern sie beeinflusst auch die Konformation des gebundenen Proteins. Dadurch werden je nach Glykosylierung unterschiedliche Epitope von unterschiedlichen Antikörpern erkannt und gebunden (Hanisch, F. G.; 2001; Varki, A.; 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass O-Glykosylierungen für die Regulation von Enzym-Aktivitäten und der Proprotein-Prozessierung relevant sind. Sie dienen zusätzlich als Signalmolekül, um das synthetisierte Protein zur richtigen Lokalisation innerhalb der Zelle zu führen (Schjoldager, K. T.-B. G.; Clausen, H.; 2012; Robledo, Y., et al.; 2006; van den Steen, P., et al.; 1998). Es wurde gezeigt, dass veränderte O-Glykane Einfluss auf die Invasivität von Tumoren haben (Gill, D. J., et al.; 2013; Radhakrishnan, P., et al.; 2014). Zudem sind O-Glykane essentiell für den von Willebrand Faktor und somit für die Hämostase (Badirou, I., et al.; 2012). O-Glykane sind kritisch für die Unversehrtheit von Gefäßen und während der eukaryotischen Entwicklung (Tran, D. T.; Hagen, K. G. ten; 2013; Herzog, B. H., et al.; 2014).

1.2.3. N-Glykosylierung

Da in dieser Arbeit die Analytik von N-Glykanen im Mittelpunkt steht, fokussiert das folgende Kapitel die Synthese und die Funktion von N-Glykosylierungen.

Bei der N-Glykosylierung handelt es sich um einen enzymatischen Prozess, bei dem ein Glykan über eine glykosidische Bindung an ein Asparagin (Asn) eines Proteins angehängt wird. Für die N-Glykosylierung gibt es bestimmte Erkennungssequenzen: Asparagin (Asn) - beliebige AS (außer Prolin) - Serin (Ser) oder Threonin (Thr) (N-X-S/T). In manchen Fällen tritt anstelle des Serins oder Threonins auch ein reduziertes Cystein (Varki, A.; 2009).

Die putativen N-Glykosylierungsstellen bilden die Grundlage für die Makroheterogenität. Dies bedeutet, dass die Glykosylierungsstellen eines Proteins variabel glykosyliert werden können (Apweiler, R.; 1999). Die Makroheterogenität beschreibt den Glykosylierungsgrad des Proteins. Die Mikroheterogenität hingegen stellt die Variabilität der Struktur des gebundenen Glykans an einer einzigen Glykosylierungsstelle dar. Die Mikroheterogenität zeigt sich nicht nur in unterschiedlichen Organismen, sondern kann auch bei unterschiedlicher Kultivierung einer Zelllinie und in unterschiedlichen Wachstumsphasen nachgewiesen werden (Elbers, I. J., et al.; 2001). Die drei Kernstrukturen der N-Glykane wurden oben bereits vorgestellt (vgl. Abbildung 1). Ausgehend von diesen Strukturen sind durch das Anhängen verschiedener Monosaccharide über variable Verbindungen an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Glykans unzählige unterschiedliche Glykanstrukturen möglich. Eine variierende Anzahl an Wiederholungen (*repeats*) bestimmter Zuckermotive können innerhalb des Glykans eingebaut werden. Ursachen für die variable Glykanstrukturen sind zum einen Organismus abhängige Faktoren wie die Enzymausstattung der jeweiligen Zelle (beispielsweise die Expression von Glykosyltransferasen), die Konkurrenz der Enzyme um ein Substrat und die Verweilzeit der Proteine im Golgi-Apparat. Zum anderen können äußere Faktoren Einfluss auf die Glykosylierung nehmen: Das Vorhandensein der verschiedenen Zuckermoleküle in bestimmten Konzentrationen sowie die Kultivierungsbedingungen (Elbers, I. J., et al.; 2001). Unterschiedliche Einflüsse auf die Glykosylierung werden in Kapitel 1.3 näher betrachtet.

1.2.3.1. Biosynthese

Die Synthese der N-Glykane lässt sich in fünf Schritte aufteilen (Rademacher, T. W., et al.; 1988; Dwek, R. A., et al.; 1993; Varki, A.; 2009).

- 1) *Aufbau eines Oligosaccharids an einem Dolicholphosphat (Dol-P)*
- 2) *Übertragung des unreifen Glykans auf das entstehende Protein*
- 3) *Verkürzung des Glykans (Frühe Prozessierung)*
- 4) *Entstehung des High Mannose, Komplex- oder Hybrid Glykans (späte Prozessierung)*
- 5) *Reifung des Glykans*

- 1) *Aufbau eines Oligosaccharid an einem Dolicholphosphat (Dol-P)*

Dolichol ist ein Polyisoprenol und ist über die Isopreneinheiten in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert. Das Dolichol trägt terminal eine Phosphatgruppe (P). Die Synthese des Dol-P-P-Glykans wird durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase (ALG 7, ALG= *Asparagin-linked glycosylation protein*) eingeleitet, welche ein GlcNAc-P von einem UDP-GlcNAc unter Abspaltung eines

Einleitung

Uridinmonophosphates (UMP) auf das Dol-P überträgt. Anschließend wird ein weiteres UDP-GlcNAc von dem ALG 13 oder 14 (UDP-GlcNAc-Transferase) unter Abspaltung des UDPs an das GlcNAc gehängt (Ruddock, L. W.; Molinari, M.; 2006). Darauf folgt das schrittweise Anhängen von fünf Guanidindiphosphat (GDP)-Man, die unter Abspaltung des GDPs von unterschiedlichen spezifischen Glykosyltransferasen (ALG1, ALG2, ALG11) übertragen werden. Das so gebildete $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ wird durch den Flip-Flop-Mechanismus von der cytosolischen Seite des ER in dessen Lumen überführt. Dieser Mechanismus leitet die weitere Synthese des Glykanvorläufers ein (Schenk, B., et al.; 2001; Lairson, L. L., et al.; 2008). Das Glykan wird von spezifischen Enzymen (ALG3, ALG9, ALG12) mit vier weiteren Mannosen verlängert, die von einem Dol-P-Man stammen. Die Übertragung einer Mannose auf ein Dol-P geschieht durch das Enzym DPM1 (Dol-P Mannosyltransferase 1) auf der cytosolischen Seite der ER Membran. Dazu wird eine GDP-Man unter Abspaltung des GDPs an das Dol-P gebunden. Dieser Komplex muss auf die Innenseite der ER Membran geflippt werden. Über einen ähnlichen Mechanismus werden drei Glukose-Moleküle angehängt. Eine GDP-Glc wird auf der cytosolischen Seite des ER mittels ALG5 an ein Dol-P unter Abspaltung des GDPs gebunden.

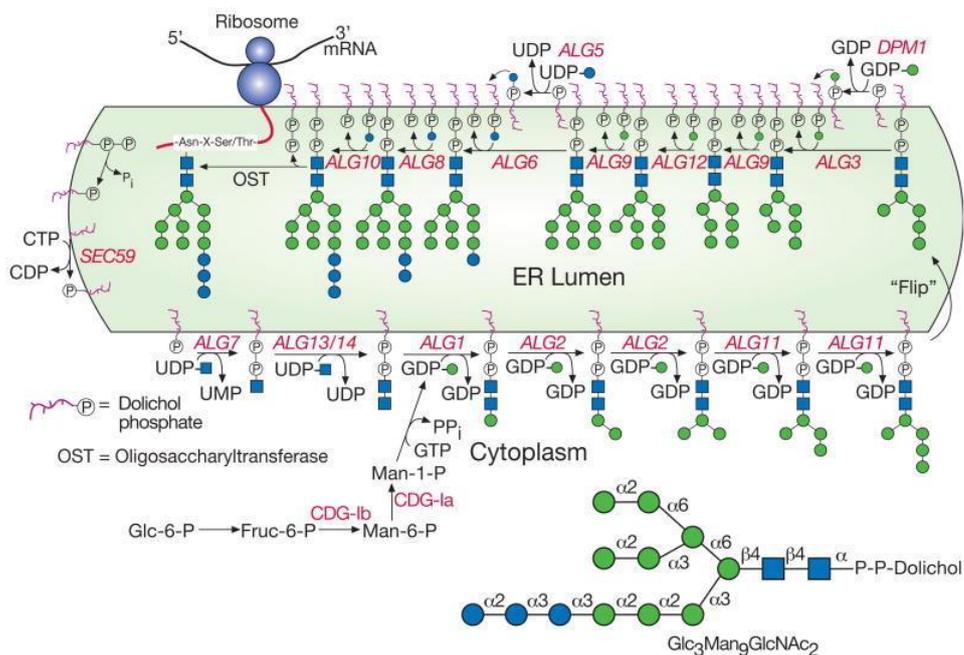


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Synthese des $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ -Vorläufers und der Übertragung des unreifen Glykans auf das Asparagin in der AS-Kette. Auf der cytosolischen Seite des ERs wird zunächst der $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ Precursor synthetisiert und anschließend im ER Lumen der zur Übertragung fertige $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ Precursor. Das 14-Zucker Glykan wird mittels Oligosaccharyltransferase (OST) auf die entstehende AS-Kette übertragen (Mohammed Al-Rubeai; 2002).

Auch das Dol-P-Glc flippt auf die Innenseite der ER Membran. Drei Glukose-Moleküle werden schrittweise durch die Enzyme ALG6, ALG8 und ALG10 auf das Glykan übertragen

(vgl. Abbildung 3) (Schachter, H.; 2000; Varki, A.; 2009). Das unreife Glykan des $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ Vorläufers kann auf die entstehende AS-Kette übertragen werden.

2) *Übertragung des unreifen Glykans auf das entstehende Protein*

Die Übertragung des unreifen N-Glykans auf die entstehende AS-Kette wird durch einen Proteinkomplex, die Oligosaccharyltransferase (OST), katalysiert (Shibatani, T., et al.; 2005; Igura, M., et al.; 2008). Diese Reaktion findet im Lumen des ERs statt. Ein neu synthetisierter Teil einer AS-Kette mit der N-X-S/T Sequenz gelangt über ein Translokon in das Lumen des ERs. Die OST bindet an das membranständige $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ und überträgt das Glykan auf das Asparagin des entstehenden Proteins. Dies geschieht durch die Spaltung der energiereichen GlcNAc-P Bindung unter Abspaltung des Dol-P-P (vgl. Abbildung 3) (Kelleher, D. J.; Gilmore, R.; 2006; Varki, A.; 2009).

3) *Verkürzung des Glykans (Frühe Prozessierung)*

Während der frühen Prozessierung wird das 14-Zucker Glykan verkürzt. Dieses Trimmen findet kotranslational im Lumen des ERs statt. Die ersten Schritte der Prozessierung scheinen in den meisten Eukaryoten konserviert zu sein (Stanley, P., et al.; 2017) und sind von besonderer Bedeutung für die Faltung des Glykoproteins: Die verkürzten Glykane dienen als Checkpoints im ER. Sie können von Lektin-ähnlichen Chaperonen Calnexin/Calretikulin spezifisch erkannt werden. Das Calnexin und Calretikulin (CNX/CRT) System ist für die Qualitätssicherung der Proteinfaltung entscheidend. Nachdem die terminalen Glukosen sequentiell mit Hilfe der α -Glucosidase I und II vom Glykan entfernt wurden, gelangt das Glykoprotein in das CNX/CRT-System. Calnexin ist ein Membran-gebundenes ER Chaperon, während Calretikulin löslich vorliegt. Diese Chaperone binden an das monoglykosidische Glykan. Anschließend wird eine Thiol-Disulfid-Reduktase (Erp57) durch CNX oder CRT komplexiert. Diese bildet oder spaltet Disulfidbrücken des gebundenen Glykoproteins. Die α -Glucosidase II spaltet die letzte Glukose vom Glykan, wodurch sich das Protein von CRT oder CNX löst und von der Glykoprotein-Glycosyltransferase auf korrekte Faltung hin geprüft wird. Durch die Erkennung exponierter hydrophober Bereiche und exzessiven Oberflächendynamiken, was Zeichen für eine unzureichende Faltung sind, wird falsch gefalteten Glykoproteinen über eine Glycosyltransferase eine Glukose angehängt, was zu einer erneuten Bindung an CNX oder CRT führt. Ist das Glykoproteinen korrekt gefaltet, gelangt es über ein Shuttlesystem in den *Cis*-Golgi-Apparat (Parodi, A. J.; 2000; Shental-Bechor, D.; Levy, Y.; 2008; Leymarie, N.; Zaia, J.; 2012; Parodi, A., et al.; 2017). Über einen weiteren Prozess (ERAD= *ER assisted degradation*) können falsch gefaltete Glykoproteine

Einleitung

aus dem ER entfernt und durch das Lysosom abgebaut werden. Teil dieses Systems ist ein α -Mannosidase I-ähnliches Protein EDEM (*ER degradation-enhancing- α -Mannosidase I-like protein*).

Im ER wird bei vielen Glykoproteinen die terminale Mannose der zentralen Antenne des Glykans durch die α -Mannosidase I abgespalten, wodurch ein $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Isomer entsteht. Dementsprechend gelangen sowohl Glykoproteine mit acht, als auch mit neun Mannosen zum *Cis*-Golgi-Apparat (Herscovics, A.; 1999; Varki, A.; 2009). In Abbildung 4 sind diese Mechanismen schematisch dargestellt.

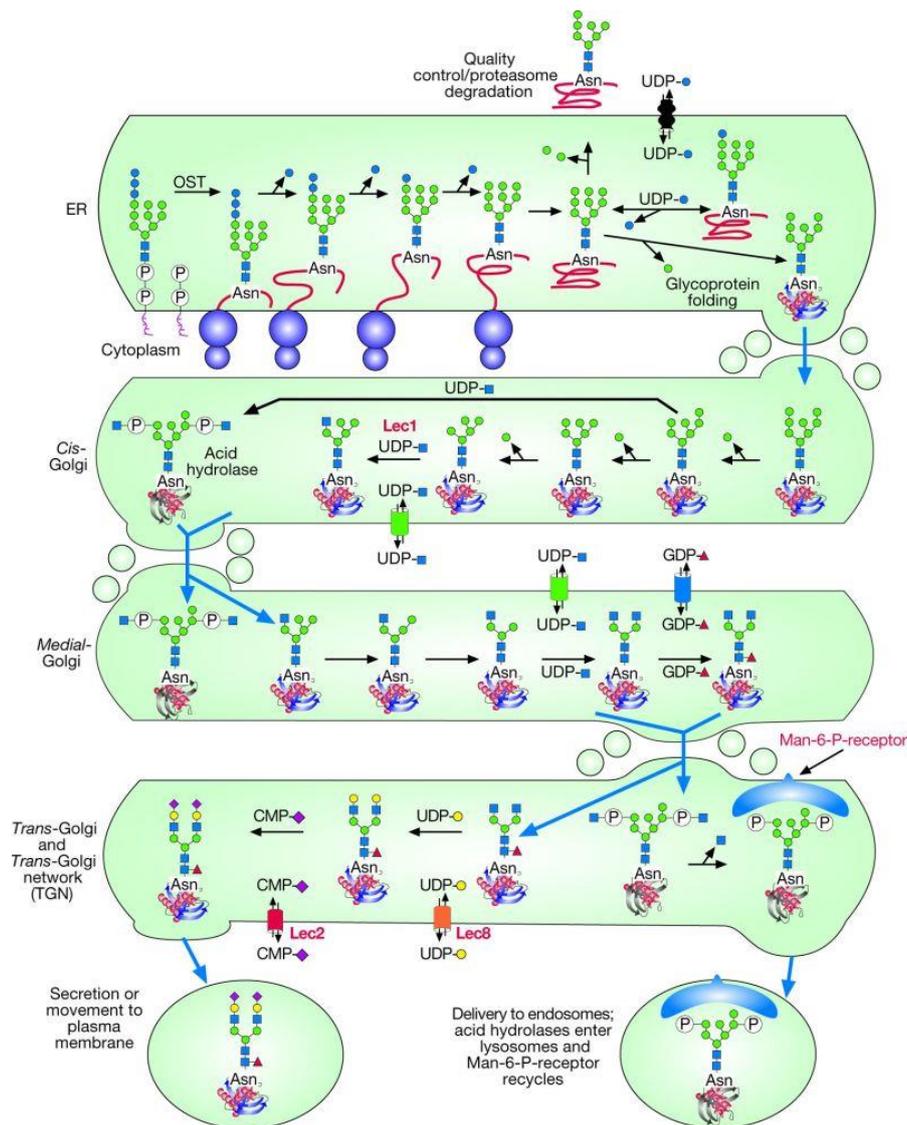


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prozessierung und Reifung von N-Glykanen (Varki, A.; 2009).

Zum Teil gelangen Glykane mit einer Glukose in den *Cis*-Golgi-Apparat. Bei diesen werden mittels einer Endo- α -Mannosidase sowohl die Glukose, als auch eine Mannose abgespalten. Dadurch entsteht ein weiteres $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Isomer, welches sich von dem im ER gebildeten

unterscheidet. In mehrzelligen Organismen spalten die α 1-2 Mannosidasen IA, IB und IC die α 1-2 Mannose Reste vom Glykan ab, wodurch ein $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Glykan entsteht (Herscovics, A.; 1999; Varki, A.; 2009).

4) Entstehung des High Mannose, Komplex- oder Hybrid-Glykans (späte Prozessierung)

Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, findet die spätere Prozessierung im *Medial*-Golgi-Apparat statt. Die Prozessierung wird durch die N-Acetylglucosaminyltransferase GlcNAcT-I initiiert. Dadurch wird ein GlcNAc an die α 1-3Man angehängt. Erst nach diesem Schritt können die Glykane von der α -Mannosidase II getrimmt werden, wodurch ein $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ Glykan entsteht. Sobald die terminalen α 1-3Man und α 1-6Man entfernt wurden, kann die GlcNAcT-II ein weiteres GlcNAc an eine Mannose anhängen. Das Resultat ist der Vorläufer des diantennären komplexen N-Glykans. Wird nach der Bindung des ersten GlcNAc keine Mannose abgespalten, entstehen Hybrid N-Glykane (Herscovics, A.; 1999).

An die komplexen Glykane kann an das C-4 der α 1-3 Man durch die GlcNAcT-IV und an das C-6 der α 1-6 Man durch die GlcNAcT-V je ein GlcNAc angehängt werden, um tri- und tetraantennäre Strukturen zu erhalten. Im Gegensatz zu GlcNAcT-V kann das Enzym GlcNAcT-XI GlcNAc nicht nur an die α 1-6Man binden, sondern auch an die α 1-3Man. Durch eine vierte GlcNAcT (VI) kann am C-4 der α 1-3Man eine weitere Verzweigung des Glykans eingebracht werden, jedoch ist diese bislang nur in Fischen und Vögeln, nicht aber in Säugetieren nachgewiesen worden (Schachter, H.; 2000; Varki, A.; 2009).

5) Reifung des Glykans

Die weitere Addition von Monosacchariden findet wie in Abbildung 4 abgebildet im *Trans*-Golgi-Apparat statt. Hybrid und komplexe Glykane werden durch

1. die Addition von Zuckern an die Kernstruktur,
2. die Elongation der Verzweigungen und
3. das „Capping“ der Elongationen

zu unterschiedlich komplexen Glykanen prozessiert.

1. Addition von Zuckern

An die Kernstruktur werden hauptsächlich die Zucker Fucose und Xylose gebunden. Die Xylosylierung wurde bislang lediglich in Pflanzen und im Darmwurm nachgewiesen. Dieser Vorgang sowie die Fucosylierung können erst nach der Addition des ersten GlcNAc durch die GlcNAcT-I geschehen. Abbildung 5 veranschaulicht die daraus resultierenden Modifikationen.

Einleitung

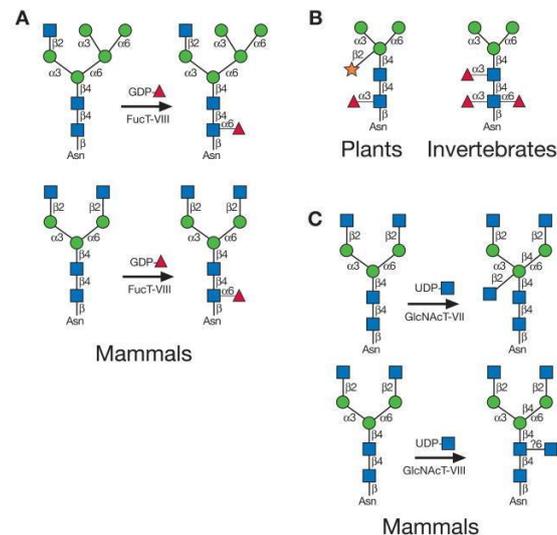


Abbildung 5: Mögliche Modifikationen der Kernstruktur in Säugern, Pflanzen und Invertebraten (Varki, A.; 2009).

Die Fucosylierung ist abhängig vom Organismus. In Säugern wird die Fucose lediglich an das Asparagin gebundenen GlcNAc über eine α 1-6 Bindung addiert. Bei Invertebraten können bis zu vier Fucosen an den beiden GlcNAc der Kernstruktur über α 1-3 und α 1-6 Bindungen addiert werden. Dagegen findet die Fucosylierung in Pflanzen lediglich am Asparagin gebundenen GlcNAc unter einer α 1-3 Bindung statt (Varki, A.; 2009)

2. Die Elongation der Verzweigungen

Für die Elongation der Verzweigungen werden hauptsächlich Galaktosen über eine β 1-4-Bindung an die GlcNAcs addiert. Der Gal β 1-4GlcNAc Komplex wird als Typ-2 N-Acetyllactosamin bezeichnet. Durch mehrere dieser Disaccharide können die Antennen verlängert werden. Solche Wiederholungen von Strukturen werden *tandem repeats* genannt. Neben der β 1-4 Bindung kann Galaktose auch über eine β 1-3 Bindung an das GlcNAc addiert werden, was als Typ-1 N-Acetyllactosamin bezeichnet wird. Außer Galaktose kann auch GalNAc an das GlcNAc addiert werden, dies geschieht über eine β 1-4 Bindung. *Tandem repeats* dieser letzten zwei Strukturen sind weitaus weniger häufig als die des Typ-2 N-Acetyllactosamins (Varki, A.; 2009). Neben der Verlängerung der Antennen kann ein *bisecting* GlcNAc durch die N-Acetylglucosamintransferase III (GnT-III) an die Mannose, die am zweiten GlcNAc der Kernstruktur gebunden ist, angehängen werden (Isaji, T., et al.; 2010). Die Expression der GnT-III ist abhängig von der Zelllinie. In humanen Zellen wird sie exprimiert, in CHO-Zellen jedoch nicht (Narasimhan, S.; 1982; Sburlati, A. R., et al.; 1998; Ihara, H., et al.; 2002b). Wurde ein *bisecting* GlcNAc angehängen, kann die GnT-V kein zusätzliches GlcNAc zur Bildung einer weiteren Antenne anhängen (Isaji, T., et al.; 2010).

3. Das „Capping“

Der letzte Reifungsschritt besteht im sogenannten *Capping*, also in der Addition von abdeckenden terminalen Gruppen, welche meist Sialinsäuren, Fucose, Galaktose, GalNAc und Sulfat sind. Hier entstehen beispielsweise Lewis^x (Le^x) oder auch sialyl Lewis X (sLe^x) Strukturen (vgl. Abbildung 6).



Abbildung 6: Schematische Abbildung von Le^x, bzw. sLe^x. Diese Strukturen können während des *Cappings* entstehen.

Diese Gruppen werden über α -Bindungen an die Antennen addiert. Im Gegensatz zur β -Bindung erleichtert die α -Bindung die Präsentation der terminalen Zucker gegenüber Lektinen und Antikörpern (Schachter, H.; 2000; Varki, A.; 2009).

1.2.3.2. Bedeutung der Glykosylierungen

Die Glykosylierung ist für die korrekte Faltung von Glykoproteinen (Parodi, A., et al.; 2017), sowie für ihre Stabilität notwendig (Shental-Bechor, D.; Levy, Y.; 2008). N-Glykane dienen sowohl intrinsisch als auch extrinsisch zur spezifischen Erkennung von Organismus-eigenen oder -fremden Proteinen (Rudd, P. M.; 2001). Intrinsische Glykan-bindende Proteine vermitteln beispielsweise Zell-Zellkontakte. Viren, Bakterien und Parasiten besitzen extrinsische Glykan-bindende Proteine, um sich an Wirtszellen anzuheften. Diese Proteine sind sehr spezifisch und können zum Teil die Art der Sialinsäure, ihre Modifikationen und ihre Bindung zum vorhergehenden Zucker erkennen (Varki, A.; Gagneux, P.; 2017). Viele dieser Funktionen sind hauptsächlich in den terminalen Sialinsäuren begründet. Deren Funktionen wiederum wurden bereits in Abschnitt 1.2.1 behandelt.

Eine fehlerhafte N-Glykosylierung kann Krankheiten hervorrufen. Bis 2006 gab es 19 bekannte Arten angeborener Erkrankungen, die auf fehlerhafte Glykosylierung (*congenital disorders of glycosylation* CDG) zurückzuführen sind. Diese werden in zwei Klassen – Typ I und Typ II - eingeteilt. Zwölf CDGs des Typs I beruhen auf hypoglykosylierten Proteinen, die durch unzureichende oder unvollständige Synthese des Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol Vorläufers entstehen (Freeze, H. H.; 2006; Marquardt, T.; Denecke, J.; 2003). Die sieben CDGs des Typs II beruhen auf einer fehlerhaften Prozessierung des N-Glykans, welches bereits am Protein gebunden ist. (Vgl. Anhang: Tabelle-A 1)

Da im Rahmen dieser Arbeit die Produktion von rekombinanten Pharmazeutika und deren Glykosylierung im Mittelpunkt steht, liegt das Augenmerk hier auf der Bedeutung der

Einleitung

Glykosylierung von rekombinanten Pharmazeutika. Zunächst wird dazu ein allgemeiner Überblick gegeben. Ferner wird die spezifische Bedeutung der Glykosylierung für die im Zuge dieser Arbeit produzierten Proteine in Kapitel 1.5 näher erläutert. Die Glykosylierung von rekombinant produzierten Therapeutika ist sowohl für die Bioaktivität, die Immunogenität, die Pharmakokinetik und -dynamik, als auch für die Halbwertszeit dieser entscheidend (Varki, A.; 2009; Egrie, J. C., et al.; 2003; Lamanna, W. C., et al.; 2018; Ghannam, A., et al.; 2016; Higel, F., et al.; 2016; Liu, L.; 2015). Einen großen Anteil der biotherapeutischen Proteine machen Glykoproteine aus. Allein der Anteil der Antikörper an allen zugelassenen biologischen Produkten lag 2014 bei 27 % (Walsh, G.; 2014). Neben Antikörpern werden sowohl Zytokine, Glykosyltransferasen, als auch Glykosidasen als Therapeutika eingesetzt. Diese Produkte können in Zellkultursystemen oder in transgenen Tieren produziert werden. Dabei ist die Kontrolle der Glykosylierung der Proteine essentiell. Eine Optimierung der Glykosylierung kann durch das Einbringen von zusätzlichen Glykosylierungsstellen geschehen (Varki, A.; 2009; Egrie, J. C., et al.; 2003). Asialylierte Glykoproteine werden durch den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGRP), welcher in der Leber gefunden wurde, aus dem Blutkreislauf entfernt. Dies erklärt eine längere Halbwertszeit von stark sialylierten Glykoproteinen im Blut (Fukuda, M. N., et al.; 1989; Stockert, R. J.; 1995; Beck, A.; 2011; Schwab, I.; Nimmerjahn, F.; 2014; Bauer, J.; Osborn, H. M. I.; 2015). Mittels Hypoglykosylierung konnte in experimentellem Maßstab bei Interferon- α eine 25- bis 50-fache Verlängerung der Halbwertszeit nachgewiesen werden (Ceaglio, N., et al.; 2008; Beck, A.; 2011). Die Art der Glykanstruktur nimmt ebenso einen Einfluss auf die Pharmakotherapie. Ein glykosyliertes Enzym, Cerezyme, welches zur Behandlung von Morbus Gaucher eingesetzt wird, wird durch exponierte Mannosen an Makrophagen gebunden und erkannt, da es hypermannosyliert ist (Walsh, G.; Jefferis, R.; 2006). Ähnliche Moleküle ohne diese Modifikation werden von Hepatozyten aus dem Blutkreislauf entfernt (Furbish, F.S., et al.; 1978).

Proteine werden in verschiedenen Organismen unterschiedlich glykosyliert. Daher ist die Wahl eines Expressionssystems zur Produktion von Glykoproteinen bereits richtungsweisend. Im folgenden Kapitel werden einige Expressionssysteme näher betrachtet und vorgestellt.

1.3. Einflüsse auf die Produktglykosylierung

Sowohl die Auswahl der Produktionszelllinie als auch Parameter der Kultivierung haben einen Einfluss auf die Glykosylierung. Viele Studien beschäftigen sich mit unterschiedlichen Parametern und Methoden, um die Glykosylierung zum einen in Bezug auf die Immunogenität und zum anderen in Bezug auf die Pharmakokinetik und -dynamik hin zu optimieren. In diesem Kapitel werden einerseits unterschiedliche Expressionssysteme im Hinblick auf die

resultierenden Glykosylierungen vorgestellt, sowie andererseits Parameter im Kultivierungsprozess, die einen Einfluss auf die Produktglykosylierung haben, betrachtet.

1.3.1. Einflüsse der Expressionssysteme auf die Glykosylierung

Biopharmazeutika können in den unterschiedlichsten Organismen produziert werden. In Bakterien beispielsweise können hohe Ausbeuten in der Produktion von Proteinen erreicht werden. Jedoch fehlt den Bakterien die Enzymausstattung (vgl. Abbildung 3 und Abbildung 4), um das Protein zu glykosylieren. Des Weiteren entstehen häufig Proteinaggregate und Proteine müssen nach der Extraktion aus *Inclusion bodies in vitro* neu gefaltet werden. Einige nicht glykosylierte Enzyme werden mit Hilfe von Bakterien produziert (Ghaderi, D., et al.; 2012). Seitdem 2002 die N-Glykosylierungsmaschinerie von *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli* eingebracht wurde (Wacker, M.; 2002) wurden weitere Fortschritte in der Humanisierung der Glykanstrukturen in Bakterien gemacht. Die Produktion von eukaryotischen Glykanen in *Escherichia coli* und anderen bakteriellen Systemen stellt bisweilen eine Herausforderung dar (Jaffé, S. R. P., et al.; 2014; Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). Hefen bieten als Expressionssystem ebenfalls eine hohe Ausbeute und besitzen bereits eine Glykosylierungsmaschinerie. Allerdings bilden Hefen *High* Mannose Strukturen, die in einer geringeren Halbwertszeit des Proteins resultieren. Glykoproteine aus Stämmen, deren Glykosylierung optimiert wurde, zeigen eine ähnliche Pharmakokinetik und Halbwertszeit wie Proteine aus CHO-Zellen (Liu, L., et al.; 2011). Beispiele für zugelassene Therapeutika aus Hefen sind Ocriplasmin (Einsatz in der Augenheilkunde) und Catridecagog (Einsatz bei Faktor XIII-Mangel) (Korte, W.; 2014; Korte, W.; 2014). Pflanzen sowie Insektenzellen werden ebenfalls für die Produktion von glykosylierten Biopharmazeutika eingesetzt, obwohl sie hauptsächlich *High* Mannose und Paucimannose Glykane an das Protein anhängen (vgl. Abbildung 5) (Kost, T. A., et al.; 2005). Des Weiteren können weder Pflanzen noch Insektenzellen sialylierte Glykane produzieren. In den letzten 20 Jahren wurden sowohl transgene Pflanzen als auch Insektenzelllinien in Bezug auf die Glykosylierung optimiert (Cox, K. M., et al.; 2006; Misaki, R., et al.; 2006; Paccalet, T., et al.; 2007; Schähns, M., et al.; 2007; Sourrouille, C., et al.; 2008; Strasser, R., et al.; 2008). Taliglucerase (Einsatz bei Morbus Gaucher) wird in Pflanzen produziert und wurde 2012 von der FDA (*US Food and Drug Administration*) zugelassen (Walsh, G.; 2014). Auch unterschiedliche Impfstoffe (gegen das humane Papillomavirus, für die Immuntherapie von Prostatakrebs und gegen Flöhe) werden erfolgreich in Pflanzen produziert (Cox, K. M., et al.; 2006; Dumont, J., et al.; 2016). Neben transgenen Pflanzen werden zudem transgene Tiere zur Produktion von Pharmazeutika eingesetzt. Bislang sind drei in transgenen Tieren produzierte Pharmazeutika zugelassen: Anti-Thrombin alpha aus transgener Ziegenmilch, C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) aus

Einleitung

transgener Hasenmilch und lysosomale saure Lipase aus transgenen Hühnereiern (Kling, J.; 2009; Walsh, G.; 2014; Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). Ein Vorteil in der Expression in Milch ist der hohe Produkttiter (C1-INH in Ziegenmilch 12 g/L (van Veen, H. A., et al.; 2012)). Auch bei diesen Produkten muss das Glykosylierungsmuster der Proteine überprüft werden, da es sich vom humanen unterscheiden kann.

1) *Produktion in nicht humanen Säugetierzellen*

Der Großteil der biologischen Pharmazeutika wird in Säugetierzellen produziert, unter anderem, weil die Proteinglykosylierung der humanen sehr ähnlich ist. Neben Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO), Maus Myelom-Zellen (NS0 und Sp2/0) und Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK) wurden unter anderem auch menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293), humane Retinalzellen (PERC.6), humanen Amniozyten (CAP) sowie neuronale Vorläuferzellen (AGE1.hn) für die Produktion von rekombinanten Therapeutika eingesetzt und weiterentwickelt (Chadd, H. E.; Chamow, S. M.; 2001; Andersen, D. C.; Krummen, L.; 2002; Jones, D., et al.; 2003; Wurm, F. M.; 2004; Butler, M.; 2006; Durocher, Y., et al.; 2007; Petriccioni, J.; Sheets, R.; 2008; Durocher, Y.; Butler, M.; 2009; Hossler, P., et al.; 2009; Niklas, J., et al.; 2011; Wissing, S., et al.; 2015; Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017; Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). Es gibt viele Vorteile für die Produktion von Pharmazeutika in CHO-Zellen: Hohe Produkttiter, Kultivierung im *Large-Scale*, Suspensionskulturen in serumfreien Medien (Kim, J. Y., et al.; 2012; Lai, T., et al.; 2013), sowie Immunität gegen human pathogene Viren (Xu, X., et al.; 2011) und eine humanähnliche Glykosylierung. Das erklärt, warum in den Jahren 2010 bis 2014 33 % aller zugelassenen Produkte in CHO-Zellen produziert wurden (Walsh, G.; 2014). Die Enzymausstattung der CHO-Zellen unterscheidet sich von der humaner Zelllinien. Es fehlen die Enzyme Gal α 2,6 ST, α 1,3/4Fucosyltransferase und die β -1,4 *N*-acetylglucosaminyltransferase III, die im Menschen exprimiert werden (Hård, K., et al.; 1990; Zhang, A., et al.; 1999; Ihara, H., et al.; 2002a). CHO-Zellen besitzen allerdings einige Enzyme, die im Menschen nicht exprimiert werden (Lee, E. U., et al.; 1989; Chou, H. H., et al.; 1998). Dadurch ist in CHO-Zellen die Synthese von Glykosylierungsmustern möglich, die sich von humanen unterscheiden. Das humane Immunsystem bildet Antikörper gegen diese Strukturen, was entweder die Halbwertszeit des Wirkstoffes verkürzen oder zu einer allergischen Reaktion führen kann (Galili, U., et al.; 1984; Noguchi, A., et al.; 1995; Tangvoranuntakul, P., et al.; 2003; Padler-Karavani, V., et al.; 2008; Macher, B. A.; Galili, U.; 2008; Padler-Karavani, V.; Varki, A.; 2011). BHK-Zellen werden hauptsächlich für die Produktion von Impfstoffen, aber auch zur Produktion von Gerinnungsfaktoren eingesetzt (Durocher, Y.; Butler, M.; 2009; Dumont, J., et al.; 2016). In den Maus-Myelom Zellen NS0 und SP2/0 werden mAbs für die Behandlung von

unterschiedlichen Krebsarten produziert (Dumont, J., et al.; 2016). Ähnlich wie bei der Produktion in CHO-Zellen werden auch in Mauszellen nicht-humane Glykosylierungsmuster produziert (α -Gal und Neu5Gc) (Tangvoranuntakul, P., et al.; 2003; Chung, C. H., et al.; 2008; Macher, B. A.; Galili, U.; 2008; Padler-Karavani, V., et al.; 2008; Ghaderi, D., et al.; 2012).

2) *Produktion in humanen Zelllinien*

In Bezug auf die Immunogenität der Glykoproteine liegt es nahe, Pharmazeutika in humanen Zellen zu exprimieren, damit keine immunogenen Glykosylierungsmuster auftreten (Swiech, K., et al.; 2012). Die meist genutzten humanen Zelllinien sind die HEK293 (humanen embryonalen Nierenzellen, 1970 immortalisiert) (Graham, F. L., et al.; 1977) und die HT-1080, welche aus einem Fibrosarkom stammen (Rasheed, S., et al.; 1974). Bis 2014 stammten lediglich 4 % der zugelassenen Pharmazeutika aus humanen Zellen (Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017; Walsh, G.; 2014). Produkte aus PER.C6 und aus den HKB-11 (eine Hybridoma Zelllinie aus HEK293S und humanen B-Zellen) befanden sich 2017 in präklinischen oder klinischen Phasen (Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). HuH-7-Zellen (aus einem hepatozellulären Karzinom) und die in dieser Arbeit verwendeten CAP®-Zellen werden momentan in präklinischen Studien auf den Einsatz zur Produktion von Pharmazeutika getestet (Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). Ihre Produkte weisen humane Glykosylierungsmuster auf (Schiedner, G., et al.; 2008; Wissing, S., et al.; 2015; Enjolras, N., et al.; 2012; Wölfel, J., et al.; 2011; Lalonde, M.-E.; Durocher, Y.; 2017). Die CAP® Go Zellen können vollständig sialylierte komplexe Glykane synthetisieren, was zu einer Verbesserung der Halbwertszeit führt. Zusätzlich zur Optimierung der N-Glykosylierungen wurde die O-Glykosylierung optimiert (CAP®-Go2), was zu einer ähnlichen Halbwertszeit vom produzierten C1-INH führte wie der von C1-INH, der aus humanem Plasma stammt (Wissing, S., et al.; 2015). Das in humanen AGE1.hn-Zellen produzierte α -1-Antitrypsin (AAT) weist in Bezug auf Antennarität und Sialylierung Ähnlichkeiten zum AAT aus Plasma auf. Im Gegensatz zur Produktion in CHO-Zellen fehlt NGNA. NANA ist α 2-6 an Galaktose gebunden, dies entspricht dem Original. Jedoch zeigten sich Unterschiede in der Fucosylierung, denn sowohl der Anteil an Glykanen mit *core*-Fucosylierung als auch der Anteil an Glykanen mit antennären Fucosen (Le^x -Fucosylierung) waren höher als in dem AAT aus humanem Plasma (Blanchard, V., et al.; 2011). Diese Arten der Fucosylierung konnten in Prion Proteinen, welche hauptsächlich im Gehirn zu finden sind, bei Mäusen und im syrischen Hamster gefunden werden (Rudd, P. M., et al.; 1999; Stimson, E., et al.; 1999). Dies lässt vermuten, dass die Le^x -Fucosylierung typisch für neuronale N-Glykosylierung ist (Blanchard, V., et al.; 2011). Dies zeigt, dass nicht nur der Ursprungsorganismus, sondern auch das Ursprungsgewebe eine Rolle für die Glykosylierung spielt. Trotz der Unterschiede konnte eine dem Prolastin

Einleitung

(AAT aus Plasma aufgereinigt) ähnliche Bioaktivität *in vitro* nachgewiesen werden (Blanchard, V., et al.; 2011).

Bei der Auswahl eines Expressionssystems für ein spezielles Pharmazeutikum ist somit darauf zu achten, dass die gegebene Glykosylierungsmaschinerie möglichst eine Glykosylierung zulässt, die mindestens humanähnlich ist oder die Pharmakokinetik und -dynamik des Glykoproteins sogar verbessert. Welchen Einfluss die Glykosylierung auf diese Parameter hat wird exemplarisch für die hier untersuchten Glykoproteine in Kapitel 1.5 beschrieben.

1.3.2. Einfluss diverser Kultivierungsbedingungen auf die Glykosylierung

Neben der Auswahl des Expressionssystems haben Faktoren wie das Zellkulturmedium, bzw. Supplemente und die Prozessführung einen Einfluss auf die Glykosylierung. Im Folgenden werden einige Parameter zusammengefasst. Abbildung 7 stellt die schematische Einordnung einiger Einflüsse in die Produktglykosylierung dar.

1) *Medien und Supplemente*

Der Einfluss von Glukoselimitierung auf die N-Glykosylierung wurde in vielen Studien untersucht. Der Mangel an Glukose beeinflusst die Synthese von Oligosaccharid-Vorläufern (Chapman, A. E.; Calhoun, J. C.; 1988). 1999 zeigten Nyberg et al., dass unter Glukose-Mangel weniger UDP-GlcNAc verfügbar ist (Nyberg, G. B., et al.; 1999). In den unterschiedlichen Studien wurde dargelegt, dass die Heterogenität der Glykosylierung bei limitierender Glukosekonzentration zunimmt (Jayme, D., et al.; 1997) und der Anteil an nicht glykosyliertem Produkt, sowohl bei CHO-Kultivierungen (Liu, B., et al.; 2014; Hayter, P. M., et al.; 1992), als auch bei humanen Zelllinien (Seo, J. S., et al.; 2014) steigt. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an sialylierten und galaktosylierten N-Glykanen bei geringen Glukosekonzentrationen abnahm (Villacrés, C., et al.; 2015). Der gleiche Effekt wurde für geringe (< 1 mM) Glutamin (Gln) Konzentrationen für Produkte aus BHK nachgewiesen (Cruz, H. J., et al.; 2000). Einen weiteren Effekt bei Glukose- oder Glutamin-Limitierung zeigten Chee Fung Wong und seine Kollegen bei der Produktion von Interferon- γ (IFN- γ). Das Produkt war weniger sialyliert und es wurde ein höherer Anteil an Hybrid und High Mannose Strukturen detektiert (Chee Fung Wong, D., et al.; 2005). Mit zunehmender Asparagin Konzentration sank der Galaktosylierungsgrad. Dieser Effekt ist auf eine veränderte Enzymaktivität durch einen höheren intrazellulären pH-Wert zurückzuführen. (McCracken, N. A., et al.; 2014)

Darüber hinaus wurde mehrfach berichtet, dass die Ammoniumkonzentration in der Zellkultur ebenfalls Einfluss auf die Glykosylierung hat. Glutamin im Medium wird entweder zu Glutamat

und Ammonium verstoffwechselt, oder es degradiert chemisch zu Pyroglutaminsäure und Ammonium. Dadurch akkumuliert Ammonium zum Ende eines Kultivierungsprozesses auf 5-10 mM (Büntemeyer, H., et al.; 1992; Butler, M.; Jenkins, H.; 1989; Hayter, P. M., et al.; 1991; Schneider, M.; 1996). Neben der Inhibierung des Zellwachstums und der Produktivität werden sowohl Galaktosylierung als auch Sialylierung negativ beeinflusst und die Produktheterogenität steigert sich (Andersen, D. C.; Goochee, C. F.; 1995; Borys, M. C., et al.; 1994; Gawlitzek, M., et al.; 1998; Thorens, B.; Vassalli, P.; 1986; Yang, M.; Butler, M.; 2000a; Yang, M.; Butler, M.; 2000b; Yang, M.; Butler, M.; 2002). Gawlitzek et al. zeigten 2000, dass bereits bei einer Ammoniumkonzentration von 4 mM der Anteil an Galaktosen und Sialinsäuren der N-Glykane des TNFR-IgGs im Vergleich zu Kultivierungen bei einer Konzentration von 1 mM Ammonium abnahm. Deutlicher wurde der Effekt bei steigender Ammoniumkonzentration (Gawlitzek, M., et al.; 2000). Bei Ammoniumkonzentrationen von ≥ 10 mM konnte sowohl eine verringerte Genexpression des Gens für GalT als auch eine verringerte Aktivität dieses Gens beobachtet werden, was zu einer Verringerung der Galaktosylierung und aufgrund dessen zu einer geringeren Sialylierung führte (Chen, P.; Harcum, S. W.; 2006). Gawlitzek et al. legten nahe, dass der pH durch das Ammonium im *trans*-Golgi-Apparat steigt und somit die Aktivitäten von SiaT und GalT inhibiert werden (Gawlitzek, M., et al.; 2000). Ryll et al. zeigten, dass intrazelluläre Konzentrationen an Oligosaccharidvorläufern wie UDP-Hexosamin durch Ammonium erhöht werden, wodurch der UTP-Pool verringert wird (Ryll, T., et al.; 1994). Es wird in Betracht gezogen, dass sich dadurch eine erhöhte Antennarität bei erhöhter Ammoniumkonzentration erklären lässt (Gawlitzek, M., et al.; 1998; Grammatikos, S. I., et al.; 1998).

Einige Studien zeigten den fundamentalen Einfluss von Mangan auf die N- und O-Glykosylierung (Kaufman, R. J., et al.; 1994; Gramer, M. J., et al.; 2011; Crowell, C. K., et al.; 2007). Mangan ist ein Kofaktor der β -4-GalT1. 2015 wurden Ergebnisse bestätigt, die vermuten ließen, dass Mangan im Medium zu einem Anstieg der High Mannose Strukturen führt (Surve, T.; Gadgil, M.; 2015; St Amand, M. M., et al.; 2014). Des Weiteren wurde berichtet, dass bei Zugabe von 40 mM Mangan ein höherer Galaktosylierungsgrad und vermutlich als Folge dessen eine höhere Sialylierung erreicht wurde (Crowell, C. K., et al.; 2007). Allerdings verringerte sich die Produktausbeute. Zusammen mit Uridin und Galaktose zeigte Mangan in einer weiteren Studie ebenfalls einen Anstieg der Galaktosylierung (Grainger, R. K.; James, D. C.; 2013).

Die Supplementierung von Vorläufer Oligosacchariden wird ebenfalls häufig in der Literatur beschrieben. Sowohl Gu et al., als auch Bork et al. konnten einen höheren Sialylierungsgrad durch die Zugabe von ManNAc zeigen (Gu, X.; Wang, D. I. C.; 1998; Bork, K., et al.; 2007). Zufütterung von Galaktose mit Uridin, Glucosamin mit Uridin und N-Acetylmannosamin mit

Einleitung

Cytidin zeigte eine Steigerung der Sialylierung von IFN- γ (Wong, N. S. C., et al.; 2010). 2017 testeten Hossler und seine Kollegen unterschiedliche Mono-, Di- und Trisaccharide als Supplemente bei der Produktion eines mAb in CHO-Zellen. Dabei zeigte das Trisaccharid Melezitose den deutlichsten Effekt. Wie bei den anderen eingesetzten Sacchariden wurden weniger G0F Strukturen nachgewiesen und im Fall des Trisaccharids stieg dafür der Anteil der galaktosylierten Strukturen. (Hossler, P., et al.; 2017)

In humanen Zellen wurde hingegen bei der Zugabe von ManNAc keine Steigerung der Sialylierung festgestellt (Baker, K. N., et al.; 2001). Jedoch ist dies womöglich abhängig vom Produkt, da sterische Effekte die Sialylierung hindern können.

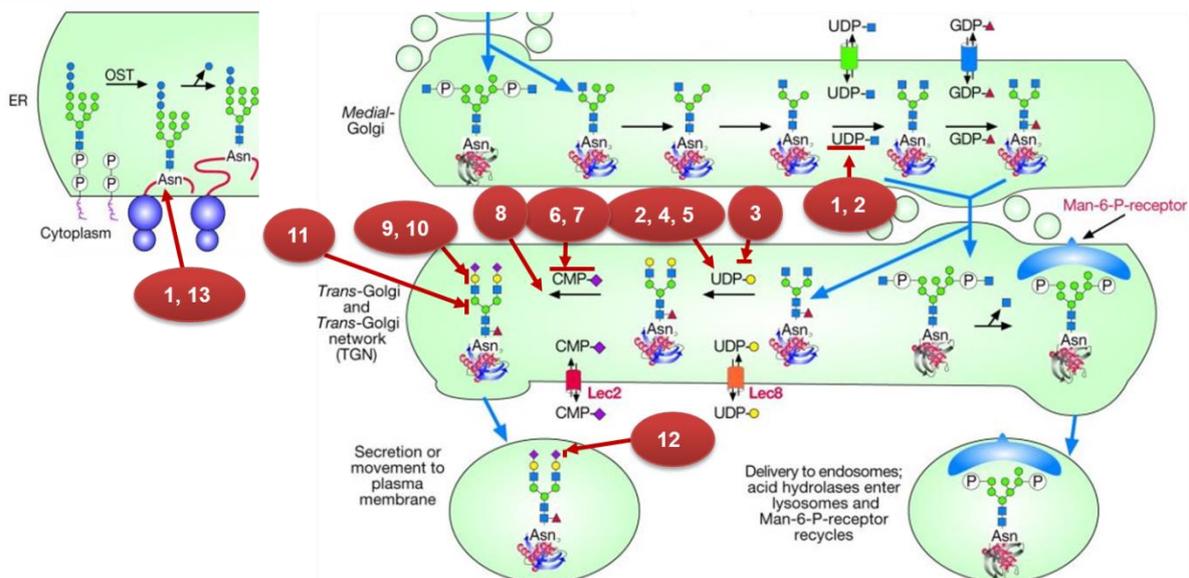


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Produktglykosylierung. Gezeigt sind mögliche kultivierungsbedingte Einflüsse: (1) Geringe Glc/Gln Konzentration; (2) Natriumbutyrat; (3) DOT (*Dissolved oxygen tension*, Sauerstoffpartialdruck); (4) pH-Wert; (5) Mangan; (6) hoher pCO₂ (Auswirkung auf CMP-NGNA); (7) N-Acetylmannosamin (Auswirkung auf CMP-NANA); (8) Ammonium; (9) DMSO; (10) Glycerol; (11) niedrige Temperatur (30-32 °C); (12) geringe viable Zelldichte (VZD) (beeinflusst extrazelluläre Sialidase Aktivität); (13) Scherstress (Varki modifiziert nach Hossler (Varki, A.; 2009; Hossler, P., et al.; 2009)).

Neben Aminosäuren, Zuckern und Cofaktoren können auch Glykosyltransferase Inhibitoren zur Optimierung des Glykosylierungsmusters eingesetzt werden (Brühlmann, D., et al.; 2015). Mannosidase I kann spezifisch durch Zugabe von Kifunensin inhibiert werden (Zhou, Q., et al.; 2008; Elbein, A. D., et al.; 1990; Shi, H. H.; Goudar, C. T.; 2014). Zur Inhibierung von Mannosidase II kann Mannostatin A eingesetzt werden (Aoyagi, T., et al.; 1989; Kuntz, D. A., et al.; 2009). Die Fucosyltransferase kann durch fluorierte Fucose-Analoga (Rillahan, C. D., et al.; 2012), Cibrocyan Blue 3GA und Reactive Red 120 (Kamińska, J., et al.; 1999) inhibiert werden. Ist eine Inhibierung der Sialylierung gewünscht, können fluorierte Sialinsäure-Analoga eingesetzt werden (Rillahan, C. D., et al.; 2012).

Die Zugabe von Natriumbutyrat kann zum einen die Produktivität fördern und zum anderen wurde bei der Produktion des follikelstimulierenden Hormons eine Erhöhung der Sialylierung beobachtet (Chotigeat, W., et al.; 2013). Im Gegensatz dazu wurde bei der Produktion von β -Interferon (β -IFN) in CHO-Zellen bei Zugabe von DMSO oder Natriumbutyrat ein geringerer Sialylierungsgrad gezeigt (Rodriguez, J., et al.; 2005). Auch bei der Produktion von humanem Thrombopoetin (hTPO) wurde zwar eine gesteigerte Produktivität, aber auch eine erhöhte Produktheterogenität und eine Verringerung der Sialylierung bei Zugabe von Natriumbutyrat beobachtet (Sung, Y. H., et al.; 2004).

Tabelle 1: Zusammenfassung der Auswirkungen unterschiedlicher Supplemente auf die Produktglykosylierung; \uparrow steigende Konzentration/ steigender Anteil; \downarrow Limitierung /sinkender Anteil; + Zugabe in Medium

Supplement	Auswirkung	vgl. Abbildung 7
\downarrow Glc	\uparrow Heterogenität; \uparrow Hybrid und High Mannose; \downarrow Sialylierungsgrad; \downarrow Galaktosylierungsgrad; \uparrow Anteil an nicht glykosyliertem Produkt	1
\downarrow Gln	\uparrow Heterogenität; \uparrow Hybrid und High Mannose; \downarrow Sialylierungsgrad; \downarrow Galaktosylierungsgrad; \uparrow Anteil an nicht glykosyliertem Produkt	1
\uparrow Asn	\downarrow Galaktosylierungsgrad	-
\uparrow Ammonium	\uparrow Heterogenität; \downarrow Galaktosylierungsgrad; \downarrow Sialylierungsgrad, \uparrow Antennarität	8
+ Mangan	\uparrow Galaktosylierungsgrad; \uparrow Sialylierungsgrad; \downarrow Produkttiter	5
+ Verschiedene Vorläufer Oligosaccharide	\uparrow Sialylierungsgrad	7
+ Di- und Trisaccharide	\downarrow G0F; unterschiedliche Effekte, je nach Saccharid	-
+ diverse Inhibitoren	Gezielt einsetzbar zur Inhibierung von Mannosidasen; Fucosyltransferasen und der Sialylierung	-
+ Natriumbutyrat	Protein spezifische Änderungen	2

Die oben dargestellten Beispiele zeigen, dass durch die Zusammensetzung des Kulturmediums Einfluss auf die Produktglykosylierung genommen werden kann. Die zuvor vorgestellten Supplemente und die Auswirkung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

2) Kultivierungsparameter

In Abbildung 7 sind neben den Einflüssen von unterschiedlichen Supplementen einige Kultivierungsparameter gezeigt, die die Produktglykosylierung beeinflussen können.

Die Beeinflussung der Glykosylierung durch den pH-Wert (vgl. Abbildung 7 (4)) ist auf veränderte Aktivitäten der Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat durch veränderte

Einleitung

Ammoniumkonzentrationen zurückzuführen (Gawlitzeck, M., et al.; 2000; Chen, P.; Harcum, S. W.; 2006; Pacis, E., et al.; 2011). Ivarsson et al. beobachteten einen Abfall des Galaktosylierungsgrades sowie des Sialylierungsgrades bei höherem pH-Wert (pH 8,0 im Vergleich zu pH 6,8) (Ivarsson, M., et al.; 2014). In welcher Weise sich die Produktglykosylierung durch eine Veränderung des pH-Wertes auswirkt, ist nicht stringent. Ein in einer Hybridoma Zelllinie produzierter IgG3-Antikörper wies bei ansteigendem pH einen Anstieg in der Galaktosylierung auf (Müthing, J., et al.; 2003). Bei der Produktion eines mAb in humanen Zellen wurde bei höherem pH-Wert eine geringere Galaktosylierung beobachtet (Seo, J. S., et al.; 2013). Neben Galaktosylierung können Fucosylierung und Sialylierung durch den pH-Wert beeinflusst werden (Müthing, J., et al.; 2003; Borys, M. C., et al.; 2010; Trummer, E., et al.; 2006). Auch Änderungen in der Osmolarität zeigten keinen eindeutigen Trend in der Beeinflussung der Glykosylierung. Einen erhöhten Anteil an Man5 Strukturen bei erhöhter Osmolarität, wie er von Pacis et al. gezeigt wurde (Pacis, E., et al.; 2011), konnte bei der IgG Produktion in einer murinen Hybridoma Zelllinie nicht beobachtet werden (Ivarsson, M., et al.; 2014). In einer weiteren Studie wurde eine Korrelation zwischen der Osmolarität und der Fucosylierung eines Antikörpers beobachtet (Konno, Y., et al.; 2012).

Der Sauerstoffpartialdruck (DOT: *dissolved oxygen tension*) hat ebenfalls Einfluss auf die Glykosylierung (vgl. Abbildung 7 (3)). Es wurde in mehreren Studien ein Anstieg der Galaktosylierung bei steigendem DOT beobachtet (Kunkel, J. P., et al.; 2000; Kunkel, J. P., et al.; 1998; Ivarsson, M., et al.; 2014). Ein weiterer Parameter, der die Glykosylierung beeinflussen kann, ist die Temperatur (vgl. Abbildung 7 (11)). Wurde EPO in CHO-Zellen bei 33 °C produziert, konnte ein leicht erhöhter Sialylierungsgrad im Vergleich zum Produkt aus der Kultivierung bei 37 °C festgestellt werden (Yoon, S. K., et al.; 2003). Gegensätzliche Ergebnisse wurden in den Jahren 1999 und 2006 beobachtet. Bei einer Kultivierung bei 30 °C zeigte das Produkt eine geringere Sialylierung, als bei einer Kultivierung bei 37 °C (Kaufmann, H., et al.; 1999; Trummer, E., et al.; 2006). In einem Screening von elf Prozessparametern und ihrer Wirkung auf die Produktqualität wurde ein signifikanter Einfluss der Temperatur auf Fucosylierung, Galaktosylierung und Sialylierung gezeigt (Agarabi, C. D., et al.; 2015). Dahingegen konnte bei einer Kombination aus der Zugabe von Natriumbutyrat und der Kultivierung bei 30 °C keine Beeinflussung der Sialylierung beobachtet werden (Chen, F., et al.; 2011).

Neben solchen Prozessparametern kann sich auch die Prozessstrategie auf die Glykosylierung auswirken (Hossler, P., et al.; 2009). Bei einem Vergleich zwischen der Kultivierung im *Fed-Batch* und in einer semikontinuierlichen Perfusionskultur konnte ein höher sialyliertes und glykosyliertes Produkt, einer alkalischen Phosphatase, in der Perfusionskultur produziert werden (Lipscomb, M. L., et al.; 2005).

Bei der Betrachtung der oben beschriebenen Studien wird deutlich, dass die Kultivierungsparameter und Prozessstrategien zwar viele Chancen zur Beeinflussung der Produktglykosylierung bieten, jedoch die Art des Einflusses für jedes Protein und jede Zelle einzeln betrachtet werden muss. Um die zum Teil spezifischen Ansprüche an ein Biopharmazeutikum in Bezug auf die Glykosylierung erfüllen zu können (vgl. Kapitel 1.5), gibt es viele Stellschrauben, deren Justierung jedoch ein detailliertes Wissen über das Zusammenspiel zwischen dem Expressionssystem, dem Kultivierungsmedium und dem Kultivierungsprozess voraussetzt. Um ein besseres grundlegendes Verständnis für die Glykosylierung eines Produktes im Prozessverlauf zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit Proteine in unterschiedlichen Wachstumsphasen auf ihre N-Glykosylierung hin untersucht.

1.4. Glykosidasen im Kulturüberstand

Nach der Darstellung von diversen Möglichkeiten die Produktglykosylierung während der Proteinproduktion zu beeinflussen, sollen in diesem Kapitel degenerative Mechanismen erläutert werden, die das Protein nach der Sekretion in den Kulturüberstand beeinflussen. Seit 1990 ist bereits bekannt, dass das Produkt durch Enzyme, die im Kulturüberstand zu finden sind, verändert werden kann. Gramer und Goochee wiesen die Aktivität von Sialidasen, β -Galaktosidasen β -Hexosaminidasen und Fucosidasen in CHO-Zelllysaten nach. Aktivitäten dieser Enzyme wurden auch im zellfreien Kulturüberstand beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Sialidasen aus dem Zelllysate und dem Überstand Sialinsäuren von Fetuin bei einem pH von 7,5 abspalten konnten. Die pH-Optima für die anderen Glykosidasen entsprachen nicht dem pH-Wert, der in einer Kultivierung bevorzugt wird (β -Galaktosidase: 5,5; β -Hexosaminidasen: 4,6; Fucosidasen: 6,5) (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993). 1993 wurden die zuvor beschriebenen Glykosidase-Aktivitäten auch in anderen Zellen (HEK-293, NS0 und Hybridoma Zelllinien) nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass pH-Optima für spezifische Sialidase und Fucosidase Aktivitäten von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich waren. Sialidasen aus CHO-Zelllysaten war bei einem pH von 7,5 und 37 °C mit einer Halbwertszeit von 57 h aktiv (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993). Im Gegensatz dazu zeigten Sialidasen aus HEK-293 und NS0-Zelllysaten nach zwei Stunden bei gleicher Temperatur und gleichem pH keine Aktivität mehr. Sialidasen aus Hybridoma-Zelllysaten zeigten nach zweistündiger Inkubation bei den genannten Bedingungen noch 30 % ihrer vorherigen Aktivität. In den zellfreien Überständen der drei untersuchten Zelllinien konnten ebenfalls Aktivitäten von β -Galaktosidasen, β -Hexosaminidasen und Fucosidasen nachgewiesen werden (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994). Demnach kann der pH-Wert

Einleitung

einer Kultivierung bei geringer Viabilität je nach Zelllinie die Sialidase Aktivität und somit die Produktqualität beeinflussen.

1995 konnte gezeigt werden, dass die Sialidasen im Kulturüberstand aus dem Cytosol der Zellen stammten und durch Beschädigungen der Zellmembran in den Kulturüberstand gelangten. Außerdem wurde in dieser Studie beobachtet, dass die Fucosidase im Kulturüberstand lediglich Fucosen von Oligosacchariden abspalten konnte, jedoch nicht von Glykanen, welche am Protein gebunden waren (Gramer, M. J., et al.; 1995).

In weiteren Studien wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Anzahl toter Zellen in einer Kultur und der Sialidase sowie Galaktosidase Aktivität beschrieben. Der negative Effekt auf den Sialylierungsgrad wurde dabei ebenfalls beobachtet (Lao, M. S., et al.; 1996; Munzert, E., et al.; 1995; Munzert, E., et al.; 1997). Im Jahr 2000 fanden Gawlitzek et al. Hinweise darauf, dass extrazelluläre β -Galaktosidase aktiv sekretiert wird. Extrazelluläre β -Galaktosidase korrelierte in dieser Studie mit der Konzentration an Ammonium (Gawlitzek, M., et al.; 2000). Das Ammonium kann der Grund für die Sekretion der β -Galaktosidase sein, da schwache Basen wie Ammonium den pH-Wert in Lysosomen erhöhen, was zu fehlerhaften Zuordnungen von lysosomalen Enzymen führt (Hasilik, A.; Neufeld, E. F.; 1980b; Hasilik, A.; Neufeld, E. F.; 1980a; Tapper, H.; Sundler, R.; 1990). Jedoch wurde das Produkt durch die extrazelluläre β -Galaktosidase nicht verändert, da das pH-Optimum von 3,5 - 4,0 nicht den Kultivierungsbedingungen entspricht (Gawlitzek, M., et al.; 2000; Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993).

Diese Studien zeigen zum einen, dass die hier untersuchten extrazellulären Glykosidasen β -Galaktosidase, β -Hexosaminidase und Fucosidase für die Produktion von Glykoproteinen in Zellkulturen von untergeordnetem Interesse sind, da sie ein pH-Optimum zeigen, welches von den Kultivierungsbedingungen abweicht. Zum anderen zeigen diese Studien, dass die Sialidase-Aktivitäten diverser Expressionssysteme abhängig vom pH-Wert sind und somit extrazelluläre Sialidasen bei verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Effekte auf die Produktqualität haben können.

1.5. Analytierte Biopharmazeutika

Die Glykosylierung von Proteinen kann unterschiedliche Aufgaben erfüllen (vgl. Kapitel 1.2.3.2). Aus diesem Grund werden hier die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glykoproteine näher betrachtet und die Rolle der Produktglykosylierung wird für jedes einzelne Protein beschrieben.

1.5.1. Erythropoetin

EPO ist ein glykosyliertes, 165 Aminosäuren langes Hormon, welches durch die Bindung an den EPO-Rezeptor die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen der Erythrozyten im Knochenmark stimuliert (D'Andrea, A. D., et al.; 1989). Es besitzt drei N- und eine O-Glykosylierungsstelle (Lai, P. H., et al.; 1986). Die O-Glykosylierungsstelle befindet sich am Serin 126 und die N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginen 24, 38 und 83. Für EPO ist eine Vielzahl unterschiedlicher Glykanstrukturen bekannt. Es sind komplexe und zum Großteil fucosylierte Glykane (Takeuchi, M.; Kobata, A.; 1991). Sie können di- bis tetraantennär sein, *bisecting* GlcNAcs, antennäre Fucosen oder GlcNAc-Gal Wiederholungen tragen. Weiterhin können die Antennen sialyliert sein. Die korrekte Glykosylierung ist notwendig für die Synthese und Sekretion (Dubé, S., et al.; 1988), sowie die *in vivo* Halbwertszeit (Salmonson, T., et al.; 1990), die physikalische Stabilität und die biologische Aktivität (Tsuda, E., et al.; 1990). Der Kohlenhydratanteil macht 40 % des Gewichtes des Hormons aus. EPO wird in den Nieren oder der Leber produziert. Bei Anämien, die durch chronische Nierenerkrankungen oder durch Chemotherapie hervorgerufen werden, wird rekombinant produziertes EPO (rhEPO) zur Unterstützung der Erythropoese eingesetzt. Im Jahre 1988 wurde das erste rhEPO, Epoetin α , in der Europäischen Union (EU) zugelassen. Seitdem wurden einige EPOs mit unterschiedlichen Glykosylierungsprofilen zugelassen (Jelkmann, W.; 2010; Shahrokh, Z., et al.; 2011). Des Weiteren wurde modifiziertes EPO (Darbepoetin, hyperglykosyliert und Micera, PEGyliert) auf den Markt gebracht. Nach Ablauf des ersten Patentes wurden einige *Biosimilars* zugelassen (Mikhail, A.; Farouk, M.; 2013; Bocquet, F., et al.; 2015; Jelkmann, W.; 2015). Die Produktion von EPO in CHO-Zellen führt zu vielen unterschiedlichen Glykanstrukturen (Davis, J. M., et al.; 1987; Erbayraktar, S., et al.; 2003; Jensen, P. H., et al.; 2012). Wie bereits erwähnt, beeinflusst die Glykosylierung die Halbwertszeit *in vivo* und wirkt sich auch auf die biologische Aktivität auf. Durch Asialoglykoprotein-Rezeptoren werden nicht sialylierte Proteine in der Leber abgebaut (Fukuda, M. N., et al.; 1989). Um dem entgegenzuwirken, wurden zwei weitere N-Glykosylierungsstellen in EPO eingebracht. Die Halbwertszeit dieses Darbepoetin stieg um das Dreifache im Gegensatz zum EPO (Macdougall, I. C., et al.; 1999; Egrie, J. C., et al.; 2003).

Wie bereits beschrieben, ist die Glykosylierung sowohl von dem produzierenden Organismus (vgl. Kapitel 1.3.1) als auch von den Kultivierungsbedingungen (vgl. Kapitel 1.3.2) abhängig. Bei drei bzw. fünf N- und einer O-Glykosylierungsstelle liegt eine hohe Heterogenität des Proteins nahe. Shahkroh et al. verglichen EPO, welches in CHO-Zellen produziert wurde mit EPO aus humanen Zellen (Dynepo). Sie zeigten unter anderem, dass im Gegensatz zu dem EPO aus CHO-Zellen das Dynepo antennäre Fucosen aber kein NGNA aufwies. Des

Einleitung

Weiteren wies Dynepo mehr *core*-fucosylierte tetraantennäre Strukturen auf (Shahrokh, Z., et al.; 2011). 2018 verglichen Cowper et al. 12 rekombinant produzierten EPOs in Bezug auf die Sialinsäure-Acetylierung, die Verlängerung der Antennen mit N-Acetylactosamin, die Verteilung der Sialinsäuren und ihre biologische Aktivität. Obwohl die Unterschiede in der biologischen Aktivität gering waren, zeigten sich bei der strukturellen Aufklärung deutliche Unterschiede. Dies unterstreicht die Bedeutung der Analytik in Bezug auf die Glykosylierung besonders bei der Produktion und Zulassung von *Biosimilars* (Cowper, B., et al.; 2018).

1.5.2. Monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAbs) sind die größte Gruppe der Biopharmazeutika und machten 2015 mit 85,4 Milliarden US Dollar mehr als ein Drittel des Umsatzes aller Biopharmazeutika aus (*Monoclonal Antibodies Market Size*. Grand View Research; 2017; *Monoclonal Antibodies Market Size*. Grand View Research; 2017). Ende der 1980er betrug der Anteil der mAbs an zugelassenen Biopharmazeutika noch 10 %, wohingegen er in den Jahren 2010 bis 2014 auf 27 % anstieg (Walsh, G.; 2014). MAbS werden bei Therapien unterschiedlichster Krankheitsbilder eingesetzt. Die Hälfte der therapeutischen mAbs findet in der Onkologie ihren Einsatz. In der Immunologie werden ca. 20 % der mAbs eingesetzt. Des Weiteren werden sie als Antiinfektiva, bei kardiovaskulären und zerebrovaskulären Krankheiten, sowie als Neuropharmazeutika verwendet (Berger, M., et al.; 2002; Reichert, J. M., et al.; 2005; ElBakri, A., et al.; 2010; Nelson, A. L., et al.; 2010; Geng, X., et al.; 2015). In der Onkologie werden mAbs eingesetzt, die selektiv an tumorspezifische Antigene auf der Oberfläche der Krebszellen binden. Tumorzellen werden durch diese Bindung auf unterschiedliche Arten bekämpft. Beispielsweise können toxische Moleküle zur Zielzelle dirigiert werden, wodurch die Proliferation der Zielzelle inhibiert wird. Des Weiteren werden inhibierende Signalwege für das Immunsystem blockiert und die Zielzelle wird mittels antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) vernichtet (Alderson, K. L.; Sondel, P. M.; 2011; Scott, A. M., et al.; 2012; Wang, W.; 2015). In Abbildung 8 ist der mAb Trastuzumab schematisch dargestellt.

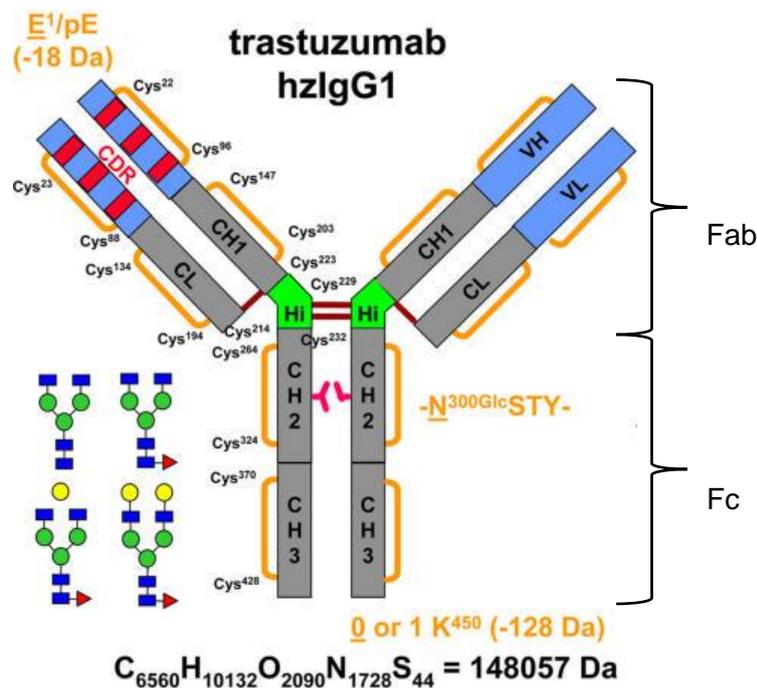


Abbildung 8: Struktur eines IgG1 (Trastuzumab). Gezeigt sind die über Disulfidbrücken verbundenen leichten und schweren Ketten sowie die Glykosylierungsstelle am Asparagin 300 und mögliche Glykanstrukturen (Beck, A., et al.; 2013).

Neben neu zugelassenen mAbs kommen zum einen durch auslaufende Patente immer mehr *Biosimilars* und zum anderen *Biobetters* (optimierte Formen von bereits zugelassenen Biopharmazeutika) auf den Markt. 2013 wurde in Europa die erste Vertriebsgenehmigung für einen *Biosimilar* mAb (Infliximab) an zwei Firmen (Celltrion und Hospira) vergeben. Nach Gemtuzumab Zogamicin (Wyeth, jetzt Pfizer; wurde 2000 zugelassen und 2010 vom Markt zurückgezogen) und Brentuximab Vedotin (Seattle Genetics) wurde 2013 mit Trastuzumab Emtansine (Roche/Genentech) das dritte ADC (*Antibody Drug Conjugate*) zur Behandlung von HER2 positivem fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen (Walsh, G.; 2014).

ADCs werden zur gezielten Behandlung von Tumoren oder malignen Lymphomen eingesetzt. Durch Kopplung eines Zytostatikums über einen Linker an einen tumorspezifischen mAb wird das Zytostatikum gezielt in Tumorzellen eingebracht (Peters, C.; Brown, S.; 2015). Nicht nur in der Entwicklung von *Biosimilars* und ADCs wurden in den letzten Jahren Fortschritte gemacht. Auch konnten therapeutische mAbs in Bezug auf ihre ADCC und der ihr gegenüberstehenden komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) optimiert werden (Beck, A.; 2011; Walsh, G.; 2014; Liu, L.; 2015). Das *Biobetter* Obinutuzumab (Genentech) wurde 2013 zugelassen und war der erste in den USA zugelassene mAb, welcher mittels *Glyco-Engineerings* optimiert wurde. Durch einen geringeren Grad an *core*-Fucosylierung konnte die ADCC erhöht werden (Goede, V., et al.; 2014).

Einleitung

Es ist zu erwarten, dass mAbs und ihre Derivate in näherer Zukunft einen noch höheren Anteil an neuen Biopharmazeutika ausmachen werden. Zu den mAb-Derivaten gehören FC-Fusionsproteine, ADCs, Immunozytokine und Fusionsproteine aus Antikörper und Enzym (Liu, L.; 2015).

Die Glykosylierung des mAbs an der schweren Kette liegt in einer konservierten Region des Antikörpers. An das Asparagin 297 ist ein Oligosaccharid gebunden. Die Glykane der mAbs aus Tierzellen haben in der Regel eine komplexe diantennäre Struktur (Higel, F., et al.; 2016). Wie bei allen Glykoproteinen wirkt sich die Glykosylierung beim Antikörper auf seine physikalischen und chemischen Eigenschaften aus. Von besonderem Interesse ist dabei die Auswirkung auf die Funktionalität. Nicht nur *in vivo* Halbwertszeit und Immunogenität werden von der Struktur der Glykane beeinflusst, sondern auch die ADCC und die CDC (Lingg, N., et al.; 2012; del Val, I. J., et al.; 2010).

Im Folgenden werden sowohl Einflüsse auf die Glykosylierung, als auch der Einfluss unterschiedlicher Glykosylierungen auf die Produktqualität näher betrachtet.

1.5.2.1. Äußere Einflüsse auf die mAb Glykosylierung - einige Beispiele

Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, wird die Glykosylierung von vielen unterschiedlichen Parametern beeinflusst. Um beispielsweise den Anteil an glykosyliertem und nicht glykosyliertem mAb während eines Kultivierungsprozesses online verfolgen zu können, entwickelten Li et al. 2018 eine Raman-spektroskopische Methode, um mAbs bereits im Bioreaktor zu analysieren. Es zeigte sich, dass bei Glutamin Limitierung der Anteil an nicht glykosyliertem Produkt stieg. War Glukose verbraucht, stoppte die Produktion von glykosyliertem mAb. Nicht glykosylierte mAbs wurden weiter produziert (Li, M.-Y., et al.; 2018). Dies zeigt, wie bedeutend der Kultivierungsprozess für die Glykosylierung des mAbs ist. Viele Studien belegen, dass neben Substraten auch Prozessparameter einen Einfluss auf die Glykosylierung haben. Beispielsweise wies die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zu einer Kultivierung von NS0-Zellen, was zu einem verringertem Redoxpotential in der Kultur führt, sowohl eine Verringerung des Galaktosylierungsgrades als auch des Grades an *core*-Fucosylierung auf (Dionne, B., et al.; 2017). Bei Kultivierungen einer murinen Hybridoma Zelllinie HFN7.1 mit *Shifts* des pH-Wertes, der Osmolarität und des gelöst-Sauerstoffpartialdruckes (DOT) zeigten Ivarsson et al. 2014, dass der pH-*Shift* die größte Auswirkung auf die Mikroheterogenität eines IgG1 hatte. Bei geringerem pH-Wert beobachteten sie eine Steigerung der Galaktosylierung und eine Minderung an *core*-Fucosen. Ein *Shift* im DOT zeigte einen geringen Einfluss auf die Galaktosylierung und Sialylierung des Produktes, wohingegen eine Änderung der Osmolarität keine signifikanten Unterschiede der Glykosylierung hervorrief (Ivarsson, M., et al.; 2014).

Auch Aghamohseni et al. zeigten, dass bei der Kultivierung von CHO-Zellen ein geringerer pH zu einer höheren Galaktosylierung der produzierten humanisierten Kamel-mAb führt (Aghamohseni, H., et al.; 2014). Dass auch ein höherer pH-Wert zu einem gesteigerten Galaktosylierungsgrad führen kann, zeigten Müthing et al. (Müthing, J., et al.; 2003). In dieser Studie wurde ein Maus IgG3-Antikörper in der Hybridoma Zelllinie R 24 produziert und untersucht. Ein geringerer pH-Wert zeigte bei der Kultivierung von CHO-Zellen eine Verringerung an Ladungsvarianten des produzierten Antikörpers. Dieses war auf eine Reduktion der Disulfidbrücken, des Galaktosylierungsgrades und der Desaminierung durch den geringeren pH-Wert zurückzuführen (Xie, P., et al.; 2016). Auch der Einfluss der Osmolarität kann nicht verallgemeinert werden. Schmelzer und Miller zeigten 2008 im Gegensatz zu Ivarsson, dass eine gesteigerte Osmolarität zu einer reduzierten Galaktosylierung führt (Schmelzer, A. E.; Miller, W. M.; 2002). Ein höherer Grad an Galaktosylierung führt häufig zu einem höheren Grad an Sialylierung. Durch Zufütterung von Uridin, Manganchlorid und Galaktose konnte die Galaktosylierung und in Folge dessen die Sialylierung gesteigert werden (Gramer, M. J., et al.; 2011). Diese wenigen Beispiele zeigen, dass der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter auf die Glykosylierung nicht verallgemeinert werden kann. Es zeigt auch, dass es sich bei der Glykosylierung um eine komplexe Modifikation handelt, die sich trotz vieler Studien zu ihrer Beeinflussung durch Kultivierungsparameter nicht vollständig und gezielt kontrollieren lässt. Die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass für eine Minimierung der Produktheterogenität die Parameter für jeden Produktionsprozess spezifisch, unter Berücksichtigung von Zellwachstum und Produktivität, optimiert werden müssen. Welchen Einfluss unterschiedliche Formen der Glykosylierung auf die pharmazeutischen Eigenschaften eines mAbs haben und welche Bedeutung somit der Glykosylierung beigemessen werden muss, soll im nächsten Kapitel verdeutlicht werden.

1.5.2.2. Glykosylierung und ihr Einfluss auf die pharmazeutische Wirkung

Ist ein mAb nicht glykosyliert, kommt es zu Konformationsänderungen der Fc-Region (Krapp, S., et al.; 2003; Borrok, M. J., et al.; 2012; Alsenaidy, M. A., et al.; 2013; Alsenaidy, M. A., et al.; 2014). Darum scheint es verwunderlich, dass eine fehlende Glykosylierung keine Auswirkung auf die Pharmakokinetik des mAbs (Dasgupta, S., et al.; 2007) *in vivo* hat (Nose, M.; Wigzell, H.; 1983; Tao, M. H.; Morrison, S. L.; 1989; Kim, J. K., et al.; 1994a; Liu, L., et al.; 2011). Einige Studien zeigten, dass die Affinität zum neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zwischen glykosylierten und aglykosylierten IgGs kaum voneinander abweicht (Liu, L., et al.; 2011; Hobbs, S. M., et al.; 1992; Kim, J. K., et al.; 1994b). Jedoch zeigten Williams et al. 1973, dass die Aktivität mancher mAbs auf ihre Glykosylierung zurückzuführen ist (Williams, R. C.,

Einleitung

et al.; 1973). Mit deglykosylierten Antikörpern wurde dargestellt, dass diese keine ADCC auslösen konnten und nicht an Proteinen des Komplementsystems binden konnten (Koide, N., et al.; 1977). Weitere Studien bestätigten, dass das Komplementsystem von aglykosylierten Antikörpern nicht aktiviert werden konnte (Koide, N., et al.; 1977; Nose, M.; Wigzell, H.; 1983). Nicht nur die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein von Glykanen beeinträchtigt die Pharmakodynamik von mAbs, sondern auch die Struktur der gebundenen Glykane. Bereits 1989 konnte eine Verringerung der ADCC bei mAbs mit *core*-Fucosylierung gezeigt werden (Rothman, R. J., et al.; 1989). Die erhöhte ADCC konnte mit einer verbesserten Bindung des mAbs an den Fcγ RIIIa-Rezeptor durch das Fehlen einer Fucose an der *core*-Struktur begründet werden (Shields, R. L., et al.; 2002). In den folgenden Jahren wurde dieses Phänomen mehrfach bestätigt (Yamane-Ohnuki, N., et al.; 2004; Satoh, M., et al.; 2006; Mori, K., et al.; 2007; Iida, S., et al.; 2009). Das Vorhandensein von *bisecting* GlcNAcs zeigte ebenso wie das Fehlen der *core*-Fucose eine Steigerung der ADCC. (Ikeda, Y.; Taniguchi, N.; 2001). Das gebundene *bisecting* GlcNAc inhibiert die Bindung der Fucose. Shinkawa et al. konnten darlegen, dass nicht das Vorhandensein des *bisecting* GlcNAcs die ADCC erhöht, sondern das Fehlen der Fucose (Shinkawa, T., et al.; 2003). Gegen diese These spricht, dass 2005 Hodoniczky et al. feststellten, dass die ADCC bei Rituximab, dem *bisecting* GlcNAc zugefügt wurde, zehnmal höher ist, als beim ursprünglichen Rituximab (Hodoniczky, J., et al.; 2005). Vermutlich kann sowohl das Fehlen der *core*-Fucose, als auch das Vorhandensein von *bisecting* GlcNAc eine erhöhte ADCC bewirken. Der Grad an Galaktosylierung scheint keine Auswirkungen auf die ADCC zu haben, jedoch auf die CDC. Mit zunehmender Galaktosylierung nimmt auch die CDC zu (Boyd, P. N., et al.; 1995; Raju, T. S.; 2008). *High* Mannose Strukturen führen zu einer erhöhten ADCC (Kanda, Y., et al.; 2006; Kanda, Y., et al.; 2007; Zhou, Q., et al.; 2008; Yu, M., et al.; 2012), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass *High* Mannose Strukturen nicht fucosyliert sind (Zhou, Q., et al.; 2008). Die CDC Aktivität sinkt durch *High* Mannose Strukturen (Kanda, Y., et al.; 2006; Zhou, Q., et al.; 2008; Yu, M., et al.; 2012; Hiatt, A., et al.; 2014).

Die Sialylierung der Glykane des mAbs erhöht die entzündungshemmende Wirkung von Antikörpern. Anhand des intravenösen Gamma Globulins (IVIG) wurde belegt, dass die desialylierte Form des Antikörpers eine geringere entzündungshemmende Wirkung aufweist, als die sialylierte (Samuelsson, A., et al.; 2001; Kaneko, Y., et al.; 2006; Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V.; 2008; Anthony, R. M., et al.; 2011; Sondermann, P., et al.; 2013). Die ADCC hingegen wird durch sialylierte Glykane verringert (Beck, A.; Reichert, J. M.; 2012).

Diese hier dargestellten Erkenntnisse bekräftigen, wie wichtig die Analytik und die Regulierung der Glykosylierung von mAbs ist. Zum einen müssen anaphylaktische

Reaktionen ausgeschlossen werden und zum anderen sollte die Glykosylierung in Bezug auf die Wirksamkeit des mAbs hin optimiert werden.

1.5.3. C1-Inhibitor

Der C1-Inhibitor (C1-INH) ist ein Serinprotease-Inhibitor und gehört zu den Serpinen. Die Aktivierung des C1 Komplexes wird durch den C1-INH kontrolliert und er ist Teil des Kontaktsystems der Immunabwehr. Neben C1s, C1r, Kallikrein und Faktor XII inhibiert er auch Chymotrypsin (Aulak, K. S., et al.; 1993). Wird zu wenig oder defekter C1-INH produziert, so führt dies zu einem hereditären Angioödem (HAE). Dabei handelt es sich um einen autosomal dominant vererbten Gendefekt. Dieser führt zu Hautödemen und Ödemen der inneren Organe. Des Weiteren führt er zu Kontraktionen der glatten Muskulatur. Dafür verantwortlich ist die Akkumulation von Bradykinin, welche durch Fehlen der C1-INH-Aktivität hervorgerufen wird. Das Bradykinin führt zum einen dazu, dass Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Gewebe übertritt und zum anderen, dass die Gefäße erweitert werden, wodurch die Kontraktionen entstehen (Cugno, M., et al.; 1997; Nussberger, J., et al.; 1998; Nzeako, U. C.; 2001; Zuraw, B. L., et al.; 2010).

Neben der Therapie von Schüben bei HAE-Patienten wurde an weiteren Einsatzgebieten für den C1-INH geforscht. So gibt es Hinweise auf eine entzündungshemmende Wirkung des C1-INHs (Caliezi, C., et al.; 2000; Tillou, X., et al.; 2010). Es gibt erste Studien zum Einsatz des C1-INHs bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH). DeZern et al. konnten belegen, dass Erythrozyten von PNH-Patienten durch den Zusatz von C1-INH vor Zelllyse geschützt wurden (DeZern, A. E., et al.; 2014).

Derzeit sind mehrere Produkte kommerziell erhältlich. Einige davon werden aus Blutplasma gewonnen (Berinert, Cinryze, Haergada). Ein rekombinant hergestelltes Produkt, welches aus der Milch von transgenen Hasen extrahiert wird (Ruconest), wurde 2010 für den europäischen Markt zugelassen (van Veen, H. A., et al.; 2012; Farkas, H., et al.; 2014; Cruz, M. P.; 2015).

Der C1-INH ist ein 478 AS langes Protein mit einer C-terminalen Serpin Domäne und einer nicht Serpin, Mucin ähnlichen N-terminalen Domäne (Bock, S. C., et al.; 1986; Wagenaar-Bos, I. G.A.; Hack, C. E.; 2006; Davis, A., et al.; 2010). Er besitzt sechs N-Glykosylierungsstellen und mindestens neun O-Glykosylierungsstellen. Drei der N- und neun O-Glykosylierungsstellen (Ser31, Thr47, Thr48, Ser63, Ser64, Thr67, Thr71, Thr72, Thr76) liegen in der N-terminalen Domäne (Bock, S. C., et al.; 1986; Bock, S. C., et al.; 1986; Stavenhagen, K., et al.; 2018). Bei den N-Glykanen handelt es sich beim humanen C1-INH hauptsächlich um disialylierte komplexe Glykane sowie um geringe Mengen an tri- und tetraantennären Strukturen (Strecker, G., et al.; 1985; Perkins, S. J., et al.; 1990; Stavenhagen, K., et al.; 2018).

Einleitung

Trotz der Vielzahl an Glykosylierungen ist bislang keine detaillierte Funktion bekannt. Weder die Abspaltung von N- und O-Glykanen, noch das Einfügen einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle änderte die Bildung des C1 Komplexes (Reboul, A., et al.; 1987; Zahedi, R., et al.; 1996). Nach Behandlung mit O-Glykanasen verlor der C1-INH die Fähigkeit an Kallikrein zu binden (Ghannam, A., et al.; 2016). Die Desialylierung führt wie bei anderen Plasmaproteinen zu einer verkürzten Halbwertszeit (Minta, J. O.; 1981). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Glykane beispielsweise eine Rolle bei der Stabilität des β -Faltblattes spielen (Bos, I.; 2002). Wird der C1-INH rekombinant produziert, ist jedoch zu beachten, dass nicht humane Glykosylierungen wie auch bei anderen Glykoproteinen zu anaphylaktischen Reaktionen führen können. Daher ist es von enormem Interesse, die Glykanstrukturen von rekombinant produziertem C1-INH auf immunogene Glykane hin zu überprüfen.

1.5.4. α -1-Antitrypsin

AAT ist wie der C1-INH ein Serinprotease-Inhibitor. Es inhibiert irreversibel Trypsin, Chymotrypsin, neutrophile Elastase und den Plasminogen Aktivator. Zusätzlich weist es eine Affinität zu Plasmin und Thrombin auf. AAT handelt es sich um ein Akute-Phase-Protein, dessen Konzentration bei einer Entzündung ansteigt. Es ist ein 394 AS langes sekretiertes Glykoprotein mit drei N-Glykosylierungsstellen (Carrell, R. W., et al.; 1981). Bei humanem AAT ist an der Glykosylierungsstelle Asparagin 107 eine hohe Heterogenität an Glykanen, bis hin zu tetraantennären Strukturen bekannt. Hingegen sind an Asparagin 70 nur geringe Mengen an triantennären Glykanen und an Asparagin 271 ausschließlich diantennäre Strukturen nachweisbar. An den triantennären Glykanen wurden sLe^x Strukturen identifiziert. Es konnten kaum *core*-Fucosylierungen gefunden werden. (Zhang, H., et al.; 2003; Bunkenborg, J., et al.; 2004; Kristiansen, T. Z., et al.; 2004; Liu, T., et al.; 2005; Kolarich, D., et al.; 2006; Lewandrowski, U., et al.; 2006; Chen, R., et al.; 2009; Nilsson, J., et al.; 2009; Halim, A., et al.; 2011). McCarthy et al. zeigten, dass sich die Glykosylierung von AAT im Laufe einer Erkrankung verändert und dies als Biomarker für akute oder chronische Erkrankungen dienen könnte (McCarthy, C., et al.; 2014). Wie bei vielen Glykoproteinen hat die Glykosylierung des AATs einen Einfluss auf die Stabilität, die Flexibilität und das Signaling des Proteins (McCarthy, C., et al.; 2014). Es wurde gezeigt, dass AAT mit vom Wildtyp abweichenden Glykanen schneller im ER proteolytisch abgebaut wird (Hosokawa, N., et al.; 2003; Wu, Y., et al.; 2003). Die Glykosylierung verlängert die Halbwertszeit von AAT und schützt vor Aggregatbildung (Varki, A.; 1993; Shental-Bechor, D.; Levy, Y.; 2009). Es konnte belegt werden, dass rekombinant produziertes AAT eher zur Bildung von Polymeren neigt, als

AAT aus Plasma. Möglicherweise ist dies auf die abweichenden Glykanstrukturen des rekombinant produzierten AATs zurückzuführen (Casolaro, M. A., et al.; 1987).

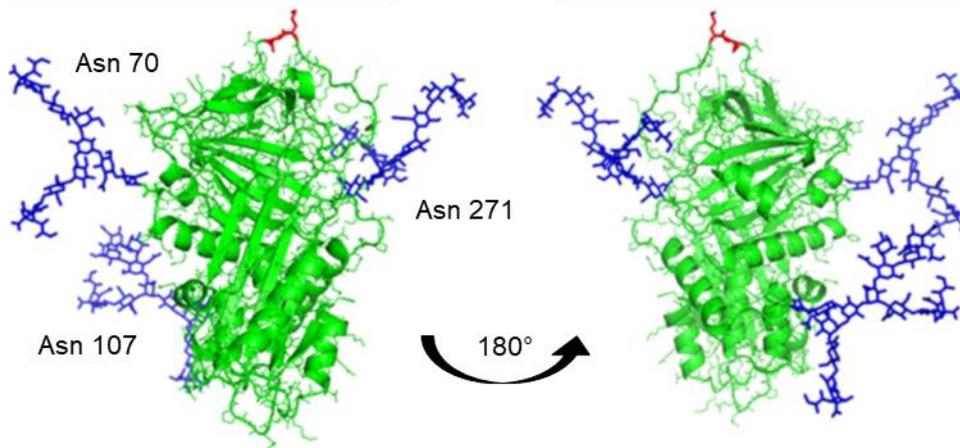


Abbildung 9: Model des glykosylierten AAT (3nr4.pdb). Grün: Peptid, blau: Glykane, rot: aktives Zentrum für die Peptidbindung (McCarthy, C., et al.; 2014).

Liegt ein genetischer Defekt im codierenden Gen *SERPINA1* vor, führt dieser zu einem Mangel an AAT (AATD; *AAT-deficiency*). Durch nicht inhibierte Proteasen kommt es in der Lunge zum Verdau von Gewebe, was zu einem Lungenemphysem führt (Graham, A., et al.; 1990; Holmes, M. D., et al.; 1990; Seyama, K., et al.; 1991). Zur Behandlung der AATD wird bislang humanes AAT aus gepooltem humanem Plasma eingesetzt (Gadek, J. E., et al.; 1981; Nita, I., et al.; 2005; Wewers, M. D.; Crystal, R. G.; 2013; Parr, D.; Lara, B.; 2017). Bis heute wird eine Ersatztherapie mit humanem AAT (60 mg/kg/Woche) empfohlen, um den Grenzwert von 11 μM zu überschreiten (Sandhaus, R. A., et al.; 2016; Chapman, K. R., et al.; 2018). Der Einsatz von rekombinantem AAT könnte die Kosten der Therapie senken und möglicherweise würden die langen Infusionszeiten verringert werden, da in rekombinantem Material keine anderen Plasma Proteine vorhanden sind (Blanchard, V., et al.; 2011). AAT wurde bereits in unterschiedlichen Expressionssystemen produziert. Jedoch hat AAT aus *E.coli* aufgrund von fehlenden Glykosylierungen eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als humanes AAT (Johansen, H., et al.; 1987; Kwon, K. S., et al.; 1995). AAT, welches in *Saccharomyces diastaticus* (Kwon, K. S., et al.; 1995) bzw. in *Asperigillus niger* (Chill, L., et al.; 2009) produziert wird, weist *High Mannose* Strukturen und endständige Galaktofuranosen auf. Darum können diese Produkte nicht als Therapeutikum eingesetzt werden (Chill, L., et al.; 2009). Die hier aufgezeigten Herausforderungen in der Produktion von rekombinantem AAT in Bezug auf die korrekte Glykosylierung zeigen, wie wichtig das Verständnis der Einflüsse auf die Produktglykosylierung ist.

Einleitung

1.5.5. Antithrombin III

Antithrombin III (ATIII) gehört wie der C1-INH und AAT zu den Serinprotease-Inhibitoren und reguliert die Kaskade zur Blutgerinnung. Es inhibiert Thrombin, Matripase-3/TMPRSS7 und die Faktoren IXa, Xa und XIa. Heparin verstärkt die inhibitorische Wirkung (Szabo, R., et al.; 2005).

ATIII ist ein 432 AS langes Protein mit vier N-Glykosylierungsstellen am Asparagin 96, 135, 155 und 192 (Bunkenborg, J., et al.; 2004; Kristiansen, T. Z., et al.; 2004; Liu, T., et al.; 2005; Lewandrowski, U., et al.; 2006; Chen, R., et al.; 2009; Nilsson, J., et al.; 2009). Der größte Anteil der Glykane ist diantennär, disialo und nicht fucosyliert. 30 % der Glykane sind nicht sialyliert (Franzén, L. E., et al.; 1980; Mizuochi, T., et al.; 1980; Edmunds, T., et al.; 1998).

Durch unterschiedliche genetische Defekte im SERPINC1 Gen, welches für ATIII kodiert, wird ein ATIII-Mangel (AT3D, ATIII *deficiency*) ausgelöst (Gruenberg, J. C., et al.; 1975; ZAKAI, N. A., et al.; 2007; Furie, B.; 2009). Bis heute sind 93 unterschiedliche genetische Defekte bekannt, welche alle zu einer Thrombophilie führen (*SERPINC1 - Antithrombin-III precursor - Homo sapiens (Human) - SERPINC1 gene & protein*. UniProt. 17.06.2018). Entweder wird nicht voll funktionsfähiges oder zu wenig ATIII produziert. Ein ATIII-Mangel kann aber auch durch Lebererkrankungen, aufgrund einer Beeinträchtigung der Neusynthese des ATIII oder durch einen Proteinverlust, der wiederum durch erkrankte Nieren oder eine Darmerkrankung hervorgerufen wird, entstehen. Der Mangel an ATIII kann neben der Gabe von anderen Antikoagulantien auch mittels Substitutionstherapie, bei der dem Patienten ATIII intravenös verabreicht wird, therapiert werden (Refaei, M., et al.; 2017; Bauer, K. A., et al.; 2016). Es gibt Präparate, die aus humanem Plasma gewonnen werden. 2006 wurde in Europa (2009 in den USA) das erste rekombinant produzierte Antithrombin III zugelassen (Antithrombin alfa) (*European Medicines Agency - ATryn*. 17.06.2018; *U.S. approves first drug from DNA-altered animals | Reuters*. 17.06.2018; Konkle, B. A., et al.; 2003). Antithrombin alfa wird aus der Milch transgener Ziegen extrahiert (Edmunds, T., et al.; 1998). Unterschiede in der Glykosylierung begründen eine höhere Affinität zu Heparin im Vergleich zu ATIII, welches aus Plasma stammt (Zettlmeissl, G., et al.; 1989; Edmunds, T., et al.; 1998). Edmunds et al. zeigten, dass Antithrombin alfa geringer sialyliert und stärker fucosyliert ist. Ein weiterer Unterschied ist das Vorhandensein von NGNA (Zettlmeissl, G., et al.; 1989; Edmunds, T., et al.; 1998). Ergebnisse unterschiedlicher Studien lassen vermuten, dass besonders die Glykosylierung an Asparagin 155 eine Rolle bei der Affinität zum Heparin spielt (Zettlmeissl, G., et al.; 1989; Garone, L., et al.; 1996; Olson, S. T., et al.; 1997; Edmunds, T., et al.; 1998).

Bereits in den späten 1980ern, bzw. frühen 1990ern wurde ATIII in Säugetierzellen produziert. Zettlmeissl et al. charakterisierten 1989 rekombinantes ATIII aus CHO Zellen (Zettlmeissl, G.,

et al.; 1989). Sie konnten *in vitro* eine ähnliche Affinität zu Heparin und eine ähnliche biologische Aktivität des rekombinanten ATIII_s im Vergleich zum ATIII aus Plasma zeigen. Ebenso konnte eine ähnliche Halbwertszeit in Hasen nachgewiesen werden. Die Glykanzusammensetzung unterscheidet sich jedoch vom Original. Es wurden neben diantennären Strukturen (60 %) tri- und tetraantennäre komplexe Strukturen (20 %) sowie trunke diantennäre Glykane (20 %) gefunden. (Zettlmeissl, G., et al.; 1989)

In Untersuchungen von ATIII_s, welches in BHK-Zellen produziert wurde, konnten drei Isoformen isoliert und analysiert werden. Die Isoform, die mehr als zwei Antennen aufwies, zeigte die geringste Affinität zu Heparin. Eine höhere Affinität wies die Isoform auf, bei der sowohl komplexe, als auch *High Mannose* Strukturen nachgewiesen werden konnten. Die höchste Affinität zeigte die Isoform, die zwar auch komplexe und *High Mannose* Glykane trug, jedoch insgesamt geringer glykosyliert war (Fan, B., et al.; 1993). Yamada et al. zeigten, dass ATIII mit *High Mannose* Strukturen zwar eine höhere Affinität zum Heparin aufwies und damit einhergehend eine stärkere Wirkung als Antikoagulanz besaß, aber deutlich schneller abgebaut wurde (Yamada, T., et al.; 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Besetzung der Glykosylierungsstellen, als auch die Struktur der Glykane einen Einfluss auf die biologische Aktivität und die Halbwertszeit des ATIII_s haben. Besonders die Fucosylierung der komplexen Glykane und das Vorhandensein von *High Mannose* Strukturen scheinen sich darauf auszuwirken. Die Immunogenität von der *High Mannose* Strukturen darf nicht vernachlässigt werden (Dasgupta, S., et al.; 2007). Dies zeigt, dass auch für die Produktion des ATIII_s eine Aufklärung der Glykanstrukturen notwendig ist.

MATERIAL UND METHODEN

2. Zellkultur

Für die Produktion der fünf beschriebenen Glykoproteine wurden fünf unterschiedliche Zelllinien kultiviert. Im Folgenden werden die Details zu den Kultivierungen beschrieben.

2.1. Verwendete Zelllinien

Für die Zellkultivierung ist steriles Arbeiten unabdingbar. Die Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (*Clean Air*, Deutschland) durchgeführt. Puffer, Filter und andere hitzestabile Geräte wurden 45 min bei 120 °C und 2 bar in einem Autoklav (*Getinge*, Schweden) sterilisiert. Glasgeräte wie Messpipetten wurden für 8 h bei 180 °C hitzesterilisiert. Gegenstände und die Arbeitsfläche wurden mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Hitze-instabile Lösungen wie Medien wurden über 0,22 µm Sterilfilter der Firma *Sartorius* (Deutschland) sterilfiltriert.

In dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche Produktions- und die jeweiligen Parentalzelllinien kultiviert. In Tabelle 2 sind alle Zellen, die Kultivierungsart und die jeweiligen Medien mit den zugehörigen Supplementen aufgelistet.

2.1.1. Parentalzelllinie CHO-K1 und die EPO-produzierende Zelllinie CHO-K1-C4

Die Erythropoetin (EPO)-produzierende Zelle CHO-K1-C4 wurde in einer anderen Abschlussarbeit innerhalb dieser Arbeitsgruppe durch Transfektion des pCMVMIE-Epo-Plasmids in die CHO-K1-Zelllinie (ursprünglich: ATCC-Nr.: CCL-61) etabliert. Das Plasmid trägt unter Kontrolle eines optimierten CMV Promotors sowohl eine Neomycin Resistenz, als auch die EPO Sequenz (Mariati, et al.; 2010). Für die ersten Tests der wachstumsspezifischen Probenahme wurde kein einzelner Zellklon verwendet, sondern ein Zellpool, der ebenfalls durch die Transfektion der CHO-K1-Zelllinie mit dem pCMVMIE-EPO-Vektor erzeugt wurde. Als Parentalzelllinie diente CHO-K1, welche an das Medium (CDM 2) angepasst wurde, in der die CHO-K1-C4-Zelllinie kultiviert wurde. 1957 isolierte T.T. Puck CHO-Zellen aus dem chinesischen Hamster. CHO-K1 ist ein Subklon dieser ursprünglichen CHO-Zelle (Kao, F. T., et al.; 1969; Kao, F. T.; Puck, T. T.; 1967; Kao, F. T.; Puck, T. T.; 1968).

2.1.2. Parentalzelllinie CHO-K1 Derivat und die mAb-produzierende Zelllinie CHO-XL99

Bei der dem CHO-K1 Derivat (XL99) handelt es sich um eine Glutamin-Synthetase-defiziente CHO-Zelllinie. Sie und der mAb-produzierende Klon CHO-XL99 wurden von Dr. Jeff Hou (AIBN, *University of Queensland*) zur Verfügung gestellt. Der CHO-XL99 Klon produziert einen IgG1-Antikörper. Dazu wurde der auf dem pCDNA3.1 Vektor (*Invitrogen*) basierende Vektor pNBF-XPress in die XL99 Zelle transfiziert. Neben dem Gen, welches für den IgG1 Antikörper (mAb) kodiert, liegen Gene, die für eine Glutamin-Synthetase (Hamster) und eine N-Acetyltransferase (*Streptomyces*) kodieren, auf diesem Vektor. Neben der Selektion über eine Kultivierung ohne Glutamin, kann zusätzlich über die kotransfizierte Neomycinresistenz auf Klone mit integriertem Gen für den IgG1 selektioniert werden.

2.1.3. Parentalzelllinie CAP® und die C1-INH-produzierende Zelllinie CAP®-1D9 und -2B10

Die CAP® (*Cevec's Amniocyte Production*) Technologie der Firma *Cevec Pharmaceuticals GmbH* (Köln) beruht auf humanen Amniozyten. Diese wurden durch das Einbringen von den adenoviralen Genen E1A und E1B immortalisiert. Die E1A Gene führen zum einen zu einer Progression des Zellzyklus (Brockmann, D.; Esche, H.; 1995; Gallimore, P. H.; Turnell, A. S.; 2001), zum anderen zur Apoptose, welche durch die E1B Gene inhibiert wird. Dies geschieht durch eine Interaktion der Proteine P53 und Bax (Han, J., et al.; 1996; Niklas, J., et al.; 2011; White, E.; 1996). Neben diesen Genen zur Immortalisierung wurde ein Produktivitäts-steigerndes Gen (codiert für das adenovirale pIX Protein) in die Zellen eingebracht (Schiedner, G., et al.; 2008; Fliedl, L., et al.; 2015). Die Glykosylierung von rekombinant produzierten Pharmazeutika aus den CAP®-Zellen ist human und muss dementsprechend nicht wie bei der Produktion in anderen Säugerzellen angepasst werden. In dieser Arbeit wurde sowohl die Parentalzelllinie kultiviert, als auch zwei C1-INH-produzierende Klone (CAP®-1D9, CAP®-2B10).

2.1.4. Parentalzelllinie AGE1.hn und die AAT-produzierende Zelllinie AGE1.hn-AAT

Sowohl die AGE1.hn-Zelllinie, als auch die α -1-Antitrypsin exprimierende AGE1.hn-AAT-Zelllinie wurden von der Firma *ProBioGen* (Berlin) zur Verfügung gestellt. Eine neuronale Vorläuferzelle aus der periventikulären Zone eines humanen Fötus wurde durch Einbringung der adenoviralen Gene E1A und B des humanen Adenovirus des Typs 5

Material und Methoden

immortalisiert (vgl. 2.1.3) (Whyte, P., et al.; 1989). Zusätzlich wurde wie bei den CAP®-Zellen zur Produktivitätssteigerung das pIX-Gen eingebracht. Die Zelllinie ist patentrechtlich (06807777.52406) gesichert.

Ein Vorteil bei der Produktion von rekombinanten Pharmazeutika, die in Zellen humanen Ursprungs produziert werden, ist die native Glykosylierung des Produktes.

2.1.5. Als Parentalzelllinie eingesetzte CHO-K1 und die ATIII-produzierende Zelllinie CHO-ATIII

Durch Kotransfektion zweier Plasmide in DHFR-defizienten CHO-Zellen (CHO DUXB1, ATCC-Nr.: CRL-9010) wurde eine ATIII-exprimierende Zelllinie CHO-ATIII etabliert. Ein Plasmid trägt unter Kontrolle des SV40 Promotors die cDNA für humanes ATIII (Broker, M., et al.; 1987). Das zweite Plasmid trägt die cDNA für die Dihydrofolatreduktase (DHFR), welche zur Selektion der Klone dient (Zettlmeissl, G., et al.; 1987; Zettlmeissl, G., et al.; 1989).

Die eigentliche Parentalzelllinie der CHO-ATIII, CHO/dhFr-, konnte in dieser Arbeit nicht an das Wachstum in Suspension adaptiert werden, darum wurde hier als Parentalzelllinie für den wachstumsspezifischen Medienwechsel mit der CHO-K1-Zelllinie gearbeitet. Die CHO/dhFr-entstanden durch chemische Mutagenese der CHO-K1-Zellen mit Ethylmethansulfonat (Urlaub, G.; Chasin, L. A.; 1980). Im Gegensatz zu den CHO-K1 sind sie heterozygot dhFr negativ. Da bei der Kotransfektion das dhFr Gen in die CHO/dhFr- eingebracht wurde, wurde vermutet, dass sich der Metabolismus der CHO-K1 und der CHO-ATIII kaum unterscheidet, bzw. Abweichungen im Metabolismus sich nicht auf die Zusammensetzung der konditionierten Medien für die Medienwechsel bzw. auf das Wachstum und die Produktion der Produktionszelllinie nach dem Medienwechsel auswirken.

2.2. Stammhaltung und Zellpassage

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank der Firma *Mytron* (Deutschland) bei 37 °C, mit einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer Humidität von 80 % kultiviert. Die adhärent wachsenden CHO-ATIII-Zellen wurden in T-25, beziehungsweise T-75 Flaschen (Nunc®, *Thermo Fisher Scientific*, USA) kultiviert. Die AGE1.hn-AAT-Zellen wurden in Schüttelkolben mit Schikanen bei 125 rpm auf einem Schüttler (50 mm Auslenkung, Shaker ES-X, *Kuhner*, Schweiz) kultiviert und später an Wachstum in Schüttelkolben ohne Schikanen bei 185 rpm adaptiert. Alle Zellen, die in Suspension kultiviert wurden, wurden in Schüttelkolben von 125 mL (Arbeitsvolumen 20-50 mL), 250 mL (Arbeitsvolumen 70-100 mL) oder 500 mL (max. Arbeitsvolumen 200 mL) der Firma *Corning B.V. Life Sciences* (Niederlande) bei 185 rpm kultiviert. Wurden weniger als 20 mL Zellsuspension kultiviert, so wurde in

TPP-Kulturröhrchen der Firma *TPP* (Schweiz) kultiviert. Die Zellsuspension in den Kulturröhrchen wurde in einem auf dem Schüttler befestigten Halter mit einem Neigungswinkel von 30 ° kultiviert. Die unterschiedlichen Zellen wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert. Zusammenfassend sind die Medien und Supplemente in Tabelle 2 aufgelistet.

Die adhärent wachsenden Kulturen, wie auch die in Suspension kultivierten Zellen wurden regelmäßig alle drei bis vier Tage passagiert. In Tabelle 3 sind die einzelnen Startzellichten aufgelistet. Für die Passage der Suspensionszellen wurde die exakte Zelldichte im *Cedex Analyzer* bestimmt (vgl. Kapitel 4.1.1) und das benötigte Volumen der Zellsuspension in einem Schüttelkolben mit frischem Medium (vgl. Tabelle 2) vermischt.

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit den zugehörigen Medien und Supplementen. CDM 1-4 wurden von der Firma Xell, Deutschland zur Verfügung gestellt; das DMEM/F12 von Life Technologies, Deutschland. Glutamin (Gln) und IGF wurden von Applichem (Deutschland) bezogen, FCS von Sigma Aldrich (USA) und das Blastocidin Genitacin (G418) von InvivoGen (USA).

Zelllinie		Medium	Supplemente
CAP®	Suspension	CDM 4	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF (<i>insulin like growth factor</i>)
CAP®-1D9 CAP®-2B10	Suspension	CDM 4	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF; 5 µg/mL ⁻¹ Blastocidin (Vorkultur)
AGE1.hn	Suspension	CDM 4	5 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
AGE1.hn-AAT	Suspension	CDM 4	5 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
CHO-K1	Ausgangskultur und für EPO- Pool	Zellspezifisches, chemisch definiertes, von Tierkomponenten freies Medium 1 (CDM 1)	5 mM Gln
	Suspension		
	Suspension für ATIII	CDM 4	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
	Suspension für C4 (EPO)	CDM 2	6 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
CHO-EPO-Pool	Suspension	CDM 1	5 mM Gln; 600 µg L ⁻¹ G418
CHO-K1-C4	Suspension	CDM 2	6 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF; 200 mg L ⁻¹ G418 (Vorkultur)
CHO-ATIII	adhärent	DMEM/F12	5 % FCS (<i>fetal calf serum</i>), 4 mM Gln
	Suspension	CDM 4	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
XL99	Suspension	CDM 3	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF
mAb- produzierender CHO-XL99- Klon	Suspension	CDM 3	8 mM Gln; 0,1 mg L ⁻¹ IGF; 330 mg L ⁻¹ G418 (Vorkultur)

Die adhärennten Zellen wurden passagiert, sobald sie zu 80-90 % konfluent gewachsen waren. Um die adhärennt wachsenden Zellen passagieren zu können, mussten diese zunächst vom

Material und Methoden

Boden des Kulturgefäßes gelöst werden. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit jeweils 5-10 mL CMF-PBS (*Calcium und Magnesium Free Phosphate Buffered Saline*) ($210 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; 9 g/L NaCl ; $726 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{PO}_4$; pH 7,4) gewaschen. 0,5 mL (T-25 Flasche) bis 1 mL (T-75 Flasche) Trypsin-Lösung (0,25 % Trypsin; 0,02 % EDTA in Puck's Saline A (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*, USA)) wurden gleichmäßig über den Zellrasen verteilt und bei Raumtemperatur leicht geschwenkt.

Tabelle 3: Startzellichten aller in dieser Arbeit kultivierten Zelllinien

Zelllinie		Startzellichte [$\times 10^5$ Zellen mL^{-1}]
CAP®	Suspension	2,5 - 3,5
CAP®-1D9 / 2B10	Suspension	2,5 - 3,5
AGE1.hn	Suspension	3,0 - 4,0
AGE1.hn-AAT	Suspension	3,0 - 4,0
CHO-K1		
in CDM 1	Suspension	2,0 - 3,0
in CDM 4	Suspension	2,0 - 3,0
in CDM 2	Suspension	2,0 - 3,0
CHO-K1-C4	Suspension	2,0 - 3,0
CHO-ATIII	adhärent	$0,5 \times 10^4$ Zellen cm^{-2}
	Suspension	2,0 - 3,0
XL99	Suspension	2,0 - 3,0
mAb-produzierender CHO-XL99-Klon	Suspension	2,0 - 3,0

Nach 5 min bei 37 °C wurde mikroskopisch das Ablösen der Zellen kontrolliert. Die Enzyminkubation wurde durch eine 1:10-Verdünnung mit Kulturmedium (mit FCS) gestoppt. Die Zellsuspension wurde durch wiederholtes Aufsaugen in die Pipette homogenisiert, um Zellaggregate aufzulösen. Die Zelldichte wurde mittels *Cedex Analyzer* (vgl. Kapitel 4.1.1) bestimmt. Das benötigte Volumen an Zellsuspension wurde in einer T-Flasche mit frischem Medium vermischt. Das Medium wurde frisch aufsupplementiert (vgl. Tabelle 2).

2.3. Kryokonservierung

Um konsistente Eigenschaften der Zellen gewährleisten zu können, wurde von allen in dieser Arbeit kultivierten Zellen eine WCB (*Working Cell Bank*) angelegt. Dazu wurden Zellen während der exponentiellen Phase bei 200 \times g für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, *Thermo Fisher Scientific*, USA) und in 4 °C kaltem Medium mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, *Sigma Aldrich*, USA) vorsichtig resuspendiert. Das DMSO dringt in die Zellen ein und verdrängt Wasser, welches zur Kristallbildung führen würde und die Zellen somit zerstören würde. Pro Kryovial wurden 1×10^7 Zellen eingefroren. Die Kryovials mit 1,5 mL Zellsuspension wurden in einen gekühlten *Freezing Container* (*Mr Frosty*, *Nalgene*, Dänemark) überführt und

bei -80 °C gelagert. Nach 24 h wurden die Kryovials in einem Stickstofftank *Chronos Biosafe 350* der Firma *Messer-Griessheim* (Sulzbach) in der Dampfphase flüssigen Stickstoffs bei etwa -196 °C gelagert.

Für das Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Kryovial aus dem Tank entnommen und in der Hand aufgetaut. Um das zelltoxische DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension in 10 mL CMF-PBS aufgenommen und gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 200 xg für 5 min zentrifugiert und in 10-20 mL Medium aufgenommen und entweder in einen Schüttelkolben, ein Kulturröhrchen oder eine T-Flasche überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert (vgl. Kapitel 2.2).

2.4. Adaptionen an neue Kultivierungsbedingungen

Einige der hier verwendeten Zellen lagen entweder in Medien vor, die nicht mehr erhältlich waren, oder wurden bislang adhärent kultiviert. Dies machte eine Adaption an andere Medien beziehungsweise an eine Kultivierung in Suspension notwendig. Des Weiteren war es für die wachstumsspezifische Probenahme essentiell, dass Parentalzelllinie und Produktionszelllinie im gleichen Medium kultiviert wurden. Darum musste die CHO-K1-Zelllinie an das Wachstum in unterschiedlichen Medien adaptiert werden (vgl. Tabelle 2).

Auch andere Kultivierungsbedingungen neben dem Medium sollten bei Parentalzelllinie und Produktionszelllinie gleich sein. Darum wurden für eine vergleichbare Kultivierung der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zellen die AGE1.hn-Zellen an die Kultivierung in Schüttelkolben ohne Schikanen und die AGE1.hn-AAT-Zellen an die Kultivierung bei 185 rpm adaptiert.

2.4.1. Adaption an Wachstum in Suspension der CHO-ATIII-Zellen

Zu Beginn der Arbeit lagen adhärent wachsende ATIII-produzierende CHO-Zellen vor. Diese wurden in DMEM/Ham's F12 mit 5 % FCS adhärent wachsend kultiviert. Zur Adaption an das Wachstum in Suspensionskultur wurde ein Kryovial mit 1×10^7 Zellen mL^{-1} aufgetaut. Die Zellen wurden gewaschen und in DMEM/Ham's F12 mit 5 % FCS und 4 mM Glutamin in einer T-25 Flasche kultiviert. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie trypsinisiert und in eine T-75 Flasche expandiert und in DMEM/Ham's F12 mit 4 mM Glutamin und ohne FCS kultiviert. Bei der nächsten Passage wurden die Zellen nach dem Abstoppen des Trypsinierens zweimal mit PBS gewaschen und in 20 mL des chemisch definierten, von Tierkomponenten freien Mediums CDM 4 (Xell AG, Bielefeld) überführt und in einem 125 mL Schüttelkolben bei 185 rpm kultiviert. Die Startzellendichte betrug 5×10^5 Zellen mL^{-1} . Nach drei Passagen in neuem Medium wurde eine WCB angelegt und eine Kultivierung zur

Material und Methoden

Charakterisierung des Zellwachstums unter den adaptierten Bedingungen durchgeführt. Bei dieser Kultivierung wurde die viable Zelldichte (VZD) täglich mittels Dreifachbestimmung gemessen. Es wurden Proben zur Analytik von Glukose und Laktat, sowie zur Überprüfung der Sekretion des Produktes mittels SDS-PAGE gezogen.

2.4.2. Adaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zellen an neue Medien und neue Kultivierungsbedingungen

Sowohl die Parentalzelllinie AGE1.hn als auch die Produktionszelllinie wurden von der Firma Probiogen zur Verfügung gestellt. Sie wurden bis zu dieser Arbeit in MAX UB 42 kultiviert. Da dieses Medium nicht mehr zur Verfügung stand, wurden die AGE1.hn-AAT-Zellen in 15 mL CDM 4 mit 5 mM Glutamin aufgetaut und in Kultivierungsröhrchen bei 125 rpm mit einer Startzelldichte von $6,35 \times 10^5$ Zellen mL⁻¹ kultiviert. Nach zwei Passagen wurden die Zellen in einen Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 20 mL überführt. Nach weiteren sieben Passagen wurde eine WCB angelegt, aus der alle anschließenden Kultivierungen inokuliert wurden.

Die Parentalzelllinie wurde mit einer Startzelldichte von 12×10^5 Zellen mL⁻¹ in einem Kultivierungsröhrchen in 15 mL CDM 4 mit 5 mM Glutamin bei 185 rpm kultiviert. Nach zwei Passagen wurden die Zellen in einen Schüttelkolben mit Schikanen mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL überführt und bei 185 rpm kultiviert. Eine WCB, aus der alle weiteren Kultivierungen inokuliert wurden, wurde nach weiteren zwei Passagen angelegt. Eine Kultivierung unter den neuen Bedingungen wurde mit den adaptierten Zellen unter täglicher Dreifachbestimmung der viablen Zelldichte und Probenahme für Glukose und Laktat Messungen durchgeführt.

Um möglichst vergleichbare Kultivierungsbedingungen zu schaffen, wurden parallel Kultivierungen der AGE1.hn-Zellen in Schüttelkolben ohne Schikanen bei 185 rpm durchgeführt sowie Kultivierungen der AGE1.hn-AAT-Zellen bei 185 rpm.

2.4.3. Adaption von CHO-K1 an andere Kultivierungsmedien

Die CHO-K1-Zelllinie diente bei zwei unterschiedlichen Produktionszelllinien, die in unterschiedlichen Medien kultiviert wurden, als Parentalzelllinie. Ausgehend von der Zelllinie, die in CDM 1 kultiviert vorlag, wurde diese aufgetaut und zum einen in 20 mL CDM 4 mit einer Startzelldichte von 5×10^5 Zellen mL⁻¹ und zum anderen in 20 mL CDM 2 mit einer Startzelldichte von 5×10^5 Zellen mL⁻¹ bei 185 rpm kultiviert.

Wichtig für die wachstumsspezifische Probenahme war, dass die Parentalzelllinien ein ähnliches Wachstumsverhalten in dem entsprechenden Medium zeigten, wie auch die Produktionszelllinie, damit der Substratverbrauch und die Akkumulation von Metaboliten in

beiden Kultivierungen ähnlich waren und ein Medienwechsel keine Änderung des Wachstums oder der Produktion hervorrief. Um dies zu überprüfen wurden Produktionszelllinie und Parentalzelllinie parallel kultiviert. Die viable Zelldichte wurde täglich als Dreifachbestimmung gemessen. Proben für Glukose und Laktat Messungen wurden ebenfalls täglich gezogen.

2.5. Tests zur wachstumsspezifischen Probenahme

In dieser Arbeit sollten unterschiedliche rekombinante Glykoproteine, produziert in unterschiedlichen Zelllinien, näher betrachtet werden. Die Fragestellung, ob sich die Produktqualität hinsichtlich der Glykosylierung in unterschiedlichen Wachstumsphasen unterscheidet, sollte beantwortet werden. Dazu musste zunächst eine kostengünstige und einfach zu handhabende Methodik entwickelt werden, die es zulässt, dass ein Produkt einer Wachstumsphase unabhängig von den vorherigen Phasen analysiert werden konnte. Es sollten das Produkt, welches während der *lag*-Phase gebildet wird, sowie das Produkt aus der exponentiellen Phase, als auch aus der Absterbe-Phase analysiert werden. Um dieses zu ermöglichen, wurde die Parentalzelllinie analog zur Produktionszelllinie kultiviert. Am Ende einer Wachstumsphase wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Dies bedeutet, dass Überstand der Produktionskultur geerntet wurde und für die Aufarbeitung und Analytik bei -20 °C gelagert wurde. Die zurückbleibenden Zellen wurden im Überstand der Parentalzellen Kultivierung resuspendiert und weiter kultiviert. Unter der Annahme, dass die Parentalzellen Substrate analog zur Produktionskultur metabolisieren, sollte sichergestellt werden, dass die produzierenden Zellen, trotz Medienwechsel, unter analogen Bedingungen bezüglich Substrat- und Metabolitkonzentrationen kultiviert wurden, wie eine Kultur, bei der kein Medienwechsel durchgeführt wird.

Diese Vorgehensweise wurde bezüglich des Wachstumsverhaltens, der Metabolitkonzentrationen von Glukose und Laktat und ggf. der Aminosäurekonzentrationen an drei Produktionszelllinien und ihrer Parentalzelllinien getestet.

2.5.1. Versuch zur Auswirkung der wachstumsspezifischen Probenahme und die damit verbundene Zentrifugation auf einen EPO-produzierenden Zellpool

Ein Test zur wachstumsspezifischen Probenahme wurde von O. Sawitzki während ihrer an diese Arbeit gekoppelten Projektarbeit durchgeführt. Es wurde ein EPO-produzierender Zellpool, der von O. Krämer (Krämer, O.; 2014) generiert wurde, als Produktionszelllinie kultiviert. Die Parentalzelllinie ist CHO-K1. Es stand die Fragestellung im Vordergrund, ob die Zentrifugation der Zellen während der Kultivierung Auswirkungen auf das Wachstum der

Material und Methoden

Zellen hat. Dazu wurden CHO-K1-Zellen und der CHO-EPO-Pool in CDM 2 mit 5 mM Glutamin aufgetaut und über drei Passagen expandiert. Für die Kultivierung wurden je 50 mL einer Zellsuspension der Parentalzelllinie mit einer Startzelldichte von 3×10^5 Zellen mL^{-1} in vier 125 mL Schüttelkolben überführt. Sechs Kulturen à 50 mL des CHO-EPO-Pools wurden mit der gleichen Startzelldichte angeimpft. Die Zellkulturen wurden wie in 2.2 beschrieben, mit täglicher Probenahme für viable Zelldichte und Glukose-/Laktat-Messungen kultiviert. Sechs Tage nach Inokulation wurde der erste Medienwechsel durchgeführt. Zwei der CHO-EPO-Pool-Kulturen wurden auf je zwei Kultivierungsröhrchen mit 15 mL Kultur aufgeteilt. Ebenso wie je 15 mL von zwei Parentalzellkulturen wurden die Zellsuspensionen bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Je ein Zellpellet der gesplitteten Produktionskulturen wurde im gleichen Überstand resuspendiert, das zweite wurde im Überstand der Parentalzellen wiederaufgenommen und weiterkultiviert. Die Volumina von abgenommenen Überstand und Überstand, in dem die Zellen wiederaufgenommen wurden, waren gleich. Der zellfreie Überstand der Produzenten wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Am neunten Tag der Kultivierung wurde der zweite Medienwechsel durchgeführt. Sowohl die Kultivierungsröhrchen, bei denen der erste Medienwechsel vorgenommen wurde, als auch zwei der verbliebenen Produktionskulturen im Schüttelkolben, die wie zuvor beim ersten Medienwechsel gesplittet wurden, wurden bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert.

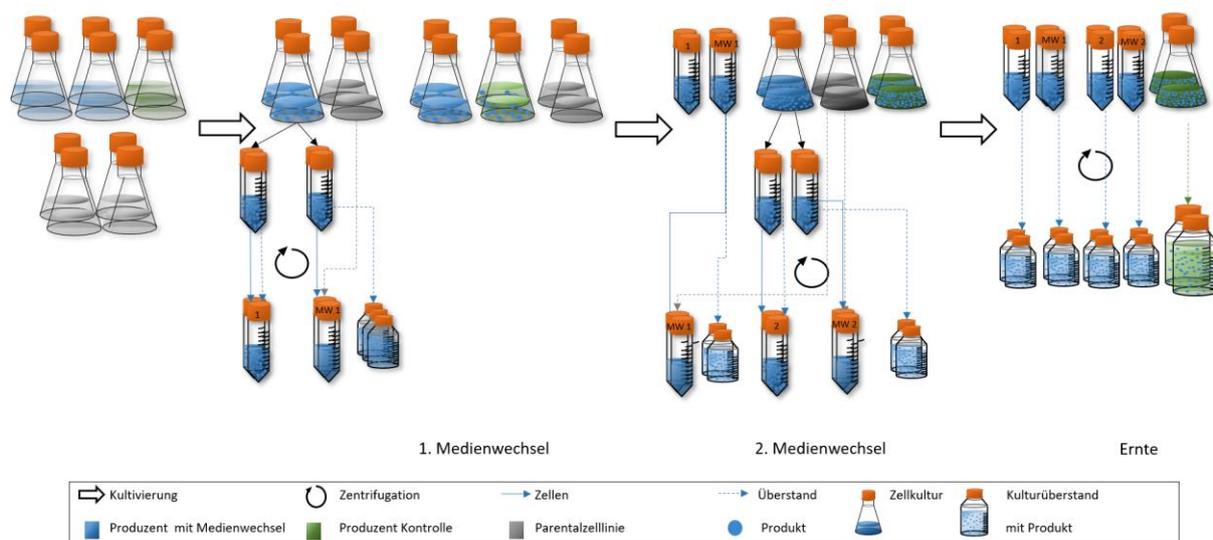


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorversuches zur Auswirkung der Zentrifugation auf die wachstumsspezifische Probenahme.

Es wurden die Überstände, die das Produkt, welches zwischen Tag sechs und Tag neun gebildet wurde, beinhalteten, und je ein Überstand der frisch gesplitteten Kulturen, die folglich Produkt aus dem Zeitraum von Tag null bis Tag neun enthielten, wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Zellpellets der jeweils zweiten Kulturen der gesplitteten Kulturen wurden im gleichen Überstand wiederaufgenommen. Die anderen Zellpellets wurden im gleichen Volumen,

welches zuvor abgenommen wurde, in Kulturüberstand der Parentalzellkulturen aufgenommen. Die Kultivierung wurde abgebrochen, nachdem die Viabilität der Zellen unter 30 % sank. Alle Überstände wurden zur späteren Analytik bei -20 °C gelagert. Der Ablauf der Kultivierung ist in Abbildung 10 gezeigt.

2.5.2. Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum der CAP®-2B10-Zellen

Die Test Kultivierungen wurden von O. Hertel in seiner Bachelor Arbeit im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Nach Auftauen der CAP®-Zellen und der C1-INH-produzierenden CAP®-2B10-Zellen wurden diese über drei Passagen expandiert, sodass jeweils sechs 125 mL Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL und einer Startzellendichte von $3,7 \times 10^5$ Zellen mL⁻¹ inokuliert werden konnten. Die Zellen wurden wie in 2.2 beschrieben kultiviert. Während der Vorkultur wurden die Produktionszelllinien unter Selektionsdruck (5 µg mL⁻¹ Blasticidin) kultiviert. Dieser entfiel bei der Hauptkultivierung. Die viable Zelldichte wurde täglich mittels Dreifachbestimmung ermittelt. Überstandsproben zur Aminosäureanalytik und zur Messung von Glukose und Laktat wurden täglich gezogen und bei -20 °C bis zur Analytik gelagert. Vier Tage nach Inokulation, zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, wurde der erste Medienwechsel durchgeführt. Dafür wurden von drei der Parentalzellkulturen und von drei Produktionszellkulturen je 40 mL bei 200 xg für 5 min zentrifugiert. Die Überstände der Produktionszelllinien wurden bei -20 °C für spätere Analysen gelagert.

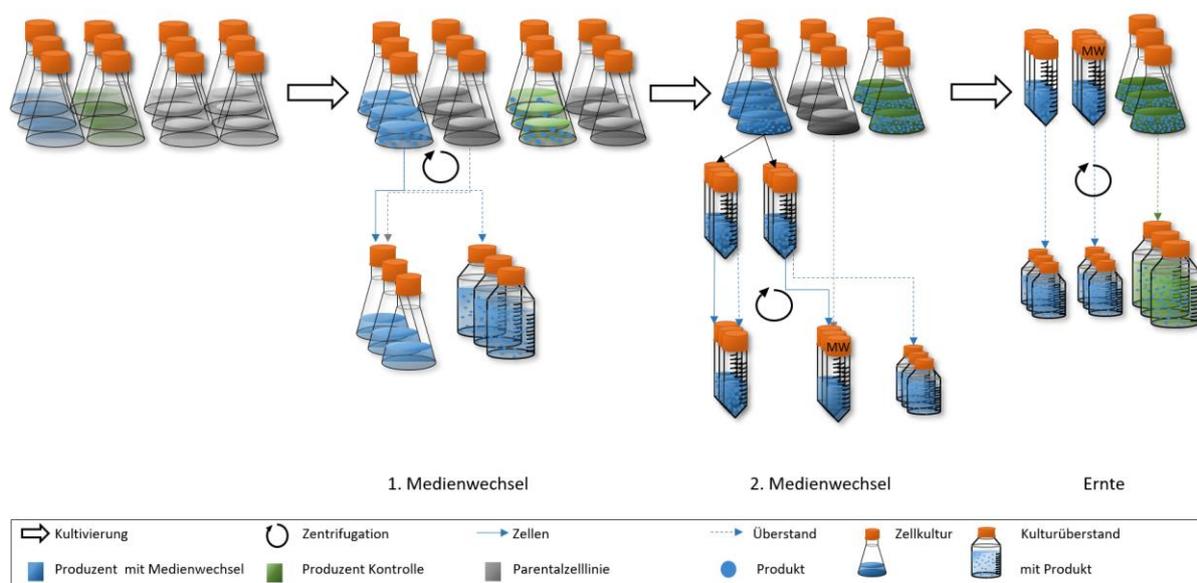


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vorversuches zur wachstumsspezifischen Probenahme.

Material und Methoden

Diese Überstände beinhalten das Produkt, welches in der *lag*-Phase produziert wurde. Die Zellpellets der Produzenten wurden in den sterilfiltrierten Überständen der Parentalzelllinien resuspendiert. Die Probenahme für die Aminosäure, Glukose und Laktat Analytik erfolgte vor dem Medienwechsel, die viable Zelldichte wurde vor und nach dem Medienwechsel ermittelt. Zu Beginn der Absterbe-Phase, acht Tage nach Inokulation, erfolgte der zweite Medienwechsel. Dieser wurde annähernd analog zum ersten Medienwechsel durchgeführt. Um zu überprüfen, ob der zweite Medienwechsel einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat, wurden die drei Produktionskulturen, bei denen bereits ein Medienwechsel durchgeführt wurde, in je zwei 15 mL Kulturen gesplittet. Bei je einer der beiden Kulturen wurde der Medienwechsel durchgeführt. Der Überstand dieser Produktionskulturen, wurde bei - 20 °C für spätere Analysen gelagert. In diesem Überstand lag das Produkt, welches ausschließlich in der exponentiellen Phase produziert wurde, vor. Die jeweils andere Kultur wurde ohne weitere Maßnahmen weiter kultiviert. Die sechs entstandenen Produktionskulturen wurden in Kultivierungsröhrchen kultiviert, bis die Viabilität unter 70 % absank. Aufgrund des geringen Volumens von 15 mL konnten diese Kulturen nicht in Schüttelkolben kultiviert werden. Dieser Umstand sollte bei der Betrachtung der Wachstumsparameter berücksichtigt werden. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die drei Produktionskulturen, bei denen kein Medienwechsel stattfand, geerntet. Alle Überstände wurden für spätere Analysen bei -20 °C gelagert. Der Ablauf der wachstumsspezifischen Probenahme ist in Abbildung 11 gezeigt.

2.5.3. Überprüfung der Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme auf eine weitere Produktionszelllinie: AGE1.hn-AAT

Um bei einer weiteren Zelllinie zu überprüfen, ob ein Medienwechsel während der Kultivierung einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat, wurden je sechs Parentalzellkulturen, AGE1.hn-Zellen, mit einer Startzelldichte von 4×10^5 Zellen mL⁻¹ in CDM 4 in Schüttelkolben mit Schikanen bei 185 rpm kultiviert. Die Produktionszellkultur, AGE1.hn-AAT, wurde analog inokuliert, jedoch in Schüttelkoben ohne Schikanen bei 125 rpm kultiviert. Der Ansatz wurde drei Passagen nach Auftauen der Zellen gestartet. Der erste Medienwechsel fand vier Tage nach Inokulation statt. Je drei Kulturen der Parental- und der Produktionszelllinie wurden bei 200 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand der Produktionszelllinie wurde bei -20 °C gelagert und die Zellen wurden im gleichen Volumen an Zellkulturüberstand der Parentalzelllinie aufgenommen. Der zweite Medienwechsel wurde nach weiteren drei Tagen durchgeführt. Die drei Kulturen, bei denen bereits ein Medienwechsel stattfand, wurden auf je zwei Kultivierungsröhrchen aufgeteilt und genauso wie drei AGE1.hn-Kulturen für 5 min bei

200 µg zentrifugiert. Je ein Zellpellet der AGE1.hn-AAT-Kulturen wurde im gleichen Kulturüberstand wieder aufgenommen. Der Überstand der jeweils anderen AGE1.hn-AAT-Kultur wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in dem entsprechenden Volumen an Kulturüberstand der Parentalzelllinie aufgenommen. Die Kultivierung wurde abgebrochen, nachdem die Viabilität unter 70 % sank. Es wurden täglich Proben zur Bestimmung von Zelldichte und Viabilität, Glukose- und Laktatkonzentration genommen. Zusätzlich wurden Proben für die Aminosäure-Analytik gezogen. Der Ablauf dieses Vorversuches ist in Abbildung 11 gezeigt.

2.6. Hauptkultivierungen

Für die Hauptkultivierungen wurden alle Produktions- und Parentalzelllinien nach dem Auftauen dreimal passagiert. Für die Kultivierung zur wachstumsspezifischen Probenahme wurden je sechs Kulturen der Produktions- und der Parentalzelllinien entsprechend der jeweiligen Animpfdichten inokuliert (vgl. Tabelle 3). Die Volumina aller Kulturen wurden der jeweiligen erwarteten Produktivität und der Ausbeute der Aufreinigung angepasst.

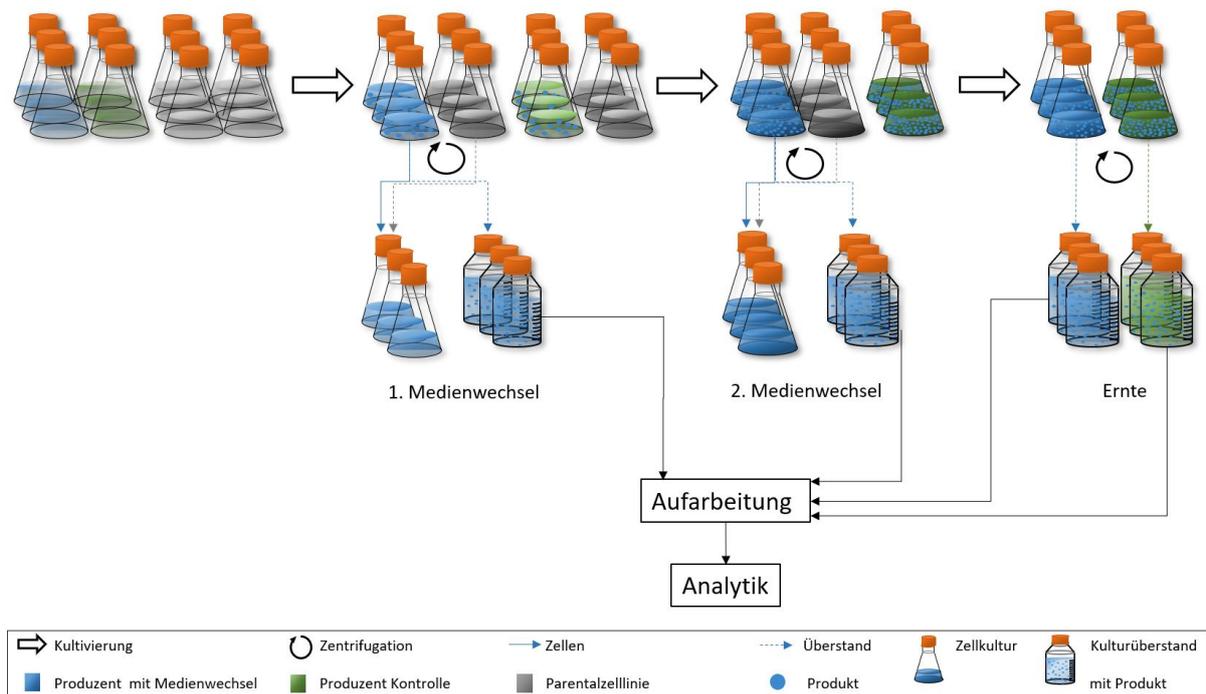


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Kultivierung mit wachstumsspezifischer Probenahme

Die Kultivierungen zur Produktion von C1-INH, AAT, ATIII und EPO wurden in einem Volumen von 200 mL durchgeführt. Für die Produktion des mAb war ein Volumen von 80 mL ausreichend. Der erste Medienwechsel wurde vor Beginn der exponentiellen Phase durchgeführt und der zweite am Ende der exponentiellen Phase. Dazu wurden je drei Kulturen

Material und Methoden

der Parental- und der Produktionszelllinien bei 200 xg für 5 min zentrifugiert, der Überstand der Produktionszelllinie wurde für die Aufarbeitung bei -20 °C gelagert und die Zellen wurden im gleichen Volumen an Zellkulturüberstand der Parentalzelllinie aufgenommen.

Die Kultivierung wurde abgebrochen, nachdem die Viabilität der Zellen mind. unter 70 % sank. Täglich wurden Proben für die Bestimmung der Zelldicht, sowie der Viabilität, Glukose- und Laktat-Messungen, Aminosäure-Analytik und zur Quantifizierung des Produktes im Kulturüberstand gezogen. In Abbildung 12 ist ein Schema zur wachstumsspezifischen Probenahme gezeigt.

2.7. Tests zur Produktstabilität

Neben den Produkten, die während unterschiedlichen Wachstumsphasen produziert wurden, sollten Produkte, die unter Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden, analysiert werden. Dadurch sollten Rückschlüsse darauf möglich sein, ob putative Änderungen der Glykosylierung der Produkte auf Mechanismen innerhalb der Zelle oder auf Reaktionen außerhalb der Zelle zurückzuführen sind.

Dazu wurde das jeweilige Produkt für sieben Tage entweder in dem entsprechenden Medium oder in Kulturüberstand der entsprechenden Zelllinie unter Kultivierungsbedingungen inkubiert.

2.7.1. Produktstabilität in Medium, bzw. in konditioniertem Medium

C1-INH bzw. EPO wurden für sieben Tage entweder in dem entsprechenden Medium oder in Kulturüberstand der entsprechenden Zelllinie unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Für die Inkubation in Kulturüberstand wurde die Parentalzelllinie des EPO-Produzenten (CHO-K1) kultiviert. Die Zellsuspension wurde zum Ende der exponentiellen Phase (Viabilität: 90 %) für 5 min bei 200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Aufgereinigtes und entsalztes EPO wurde hinzugegeben (60 mg/mL EPO in 30 mL). Nach sieben Tagen Inkubation wurden die Ansätze durch einen 0,2 µm Filter filtriert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.1) und entsalzt (vgl. Kapitel 4.2.2.1), in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur Analytik bei -20 °C gelagert.

Parallel wurde aufgereinigter und entsalzter C1-INH (55 mg/mL in 7 mL) in CDM 4 für sieben Tage bei Kultivierungsbedingungen inkubiert. Da das Produkt in diesem Fall in reinem Medium vorlag, waren keine kontaminierenden Proteine vorhanden und eine Aufarbeitung mittels Affinitätschromatographie war nicht nötig. Die Produkte wurden entsalzt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (vgl. Kapitel 4.2.2.1) und bis zur Analytik bei -20 °C gelagert.

EPO wurde mittels CZE analysiert und die abgespaltenen Glykane des C1-INHs wurden permethyliert und mittels MALDI-ToF untersucht.

2.7.2. Produktstabilität von ATIII in Medium und in Zellkulturen

Um ein weiteres Produkt auf die Produktstabilität hin zu untersuchen, wurde aufgereinigtes und entsalztes (vgl. Kapitel 4.2.2.1) ATIII (100 mg/mL) zum einen für vier Tage in Medium (25 mL) inkubiert und zum anderen in zwei Zellkulturen (je 52 mL Kulturen nach Passage) der Parentalzelllinie. Zellkultur I wurde nach Zugabe des Produktes vier Tage kultiviert. Die Viabilität der CHO-K1-Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt 89 %. Zu einer zweiten Zellkultur wurde parallel ATIII hinzugegeben. Diese Kultur wurde jedoch bis zur Absterbe-Phase (sieben Tage) kultiviert. Die Viabilität betrug bei der Ernte 31 %. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und das Produkt wurde sowohl aus den Zellüberständen, als auch aus dem Medium aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.5). Bis zur Analytik der abgespaltenen Glykane mittels IEX-HPLC-FLD (vgl. Kapitel 4.2.2.9) lagerte es bei -20 °C.

2.8. Sialidase-Aktivität in Kulturüberständen

Endständige Sialinsäuren haben eine gesonderte Bedeutung für die Verträglichkeit und Halbwertszeit des Produktes (vgl. 1.2.3.2). Des Weiteren ist bekannt, dass Sialidasen durch Zelllyse im Kulturüberstand vorhanden sein können, und das Produkt in der Qualität vermindern können. Darum sollten die Kulturüberstände auf Sialidase-Aktivität untersucht werden (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994; Gramer, M. J., et al.; 1995; Munzert, E., et al.; 1995).

Bei diesem Sialidase-Assay wurde beim Vorhandensein von Sialidasen 2´-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuraminsäure (MUF-NANA, *Sigma Aldrich*, USA), eine Fluoreszenz gelabelte Sialinsäure, zum fluoreszierenden Cumarinderivat (MUF) und zur Sialinsäure NANA umgesetzt. Mittels Fluoreszenzmessung mit einer Extinktion von 362 nm und einer Emission von 448 nm kann mit Hilfe einer Kalibriergeraden, der unterschiedliche Sialidase Aktivitäten zu Grunde liegen, auf die Sialidase Aktivität im Kulturüberstand geschlossen werden (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993).

Der Assay wurde in einer Fluoreszenz Multititer Platte durchgeführt. Die Proben wurden als Triplikate aufgetragen und für jede Probe wurde das entsprechende Medium für die Nullwertbestimmung eingesetzt. Von jeder Kultivierung wurden Proben, die zum Zeitpunkt der Medienwechsel und zum Zeitpunkt der Ernte gezogen wurden analysiert. Für die Kalibrierreihe wurde eine Sialidase mit Aktivitäten von 0,3125 mU-5 mU eingesetzt.

Material und Methoden

Es wurden 20 µL Phosphatpuffer (1 M Dikaliumhydrogenphosphat (Roth, Deutschland), pH 7,0) zu 200 µL Probe, *Blank* bzw. Standard gegeben. Nach Zugabe von 20 µL Substratlösung (4 mM MUF-NANA) wurden die Proben bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 27 µL 2,6 M Glycinpuffer gestoppt. Die Messungen wurden mit einem *Microplate Reader* (Tecan, Schweiz) durchgeführt. Um die Relevanz der Aktivitäten einschätzen zu können, wurden die Stoffmengen an NANA aus den Produktkonzentrationen im Überstand zu den entsprechenden Zeitpunkten, den Daten der Sialinsäure-Analytik und dem jeweiligen Kulturvolumen berechnet (vgl. Formel (1)). Bei dieser Berechnung konnten die Sialinsäuren, die an andere im Kulturüberstand vorliegenden Glykoproteine nicht berücksichtigt werden.

$$(1) n_{NANA} = \frac{c_{Protein}}{MW_{Protein}} \times V_{Kultur} \times Sialylierung_{Protein}$$

Es ist zu beachten, dass die Quantifizierung der an Glykanen gebundenen Sialinsäuren unspezifisch ist. Die Sialinsäuren stammen sowohl von N- als auch von O-Glykanen.

3. Produktaufarbeitung

Die Aufarbeitung von Produkten aus den Zellkulturüberständen ist essentiell, sowohl im industriellen Maßstab als auch im Labormaßstab. Neben Salzen und anderen niedermolekularen Stoffen sind viele zelleigene Proteine im Kulturüberstand enthalten. Für diese Arbeit war die Aufarbeitung der Produkte von großer Bedeutung, da im Anschluss an die Kultivierung die N-Glykane der Produkte, und möglichst ausschließlich die der Produkte, analysiert werden sollten. Dazu war für alle fünf Produkte eine möglichst einfache und schnelle Aufarbeitung vonnöten, die als Resultat ein möglichst reines Produkt aufweist. Für diesen Zweck eignen sich besonders Affinitätschromatographien. Dabei werden biologische Affinitäten zwischen unterschiedlichen Molekülen ausgenutzt. Zwischen einem an das Gelmaterial gekoppelten Molekül (Ligand) und dem Produkt entsteht eine Bindung. Diese Bindung entsteht je nach Ligand selektiv zu einer Gruppe an Molekülen (gruppenspezifische Affinität) oder zu einer einzelnen Komponente (monospezifische Affinität) (Hage, David S.; 2006; Scopes, R. K.; 1994).

Ein Beispiel für eine gruppenspezifische Affinität sind Wechselwirkungen zwischen Protein A und der FC-Region des IgGs. Mittels Protein A können sowohl IgG1, IgG2, IgG2a und IgG2b, sowie IgG3 unterschiedlicher Organismen gebunden werden. Auch bei der Lektin-Affinitätschromatographie handelt es sich um gruppenspezifische Bindungen, da Moleküle anhand ihrer Glykane und nicht aufgrund einer spezifischen Erkennungsstelle im Protein gebunden werden. Diese Art der Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit sowohl für die Aufarbeitung vom C1-INH mit Jacalin als Lektin als auch für die Aufreinigung von AAT mit ConA als Lektin eingesetzt. Ein drittes Beispiel der gruppenspezifischen Affinität wurde in dieser Arbeit für die Aufreinigung von ATIII verwendet. Heparin bindet neben ATIII auch andere Plasma Proteine wie den Heparincofaktor II. Neben Serinprotease-Inhibitoren werden auch DNA bindende Proteine, Lipoproteine und Gerinnungsenzyme von Heparin gebunden (Farooqui, A. A.; 1980; Posch, Anton; 2008; Kjellen, L.; Lindahl, U.; 1991). Im Gegensatz dazu ist die Antigen-Antikörper Bindung ein Beispiel für monospezifische Affinität. In dieser Arbeit wurde diese spezifische Bindung für die Aufreinigung von EPO ausgenutzt.

Vor der Aufarbeitung wurden alle Kulturüberstände über einen 0,22 µm Filter (*Sartorius*, Deutschland) filtriert, um u.a. Zelldebris abzutrennen

3.1. Aufreinigung von EPO an Anti-EPO-Antikörpern

EPO wurde mittels Affinitätschromatographie an einem Anti-EPO Antikörper aufgereinigt. Eine Säule mit einem Volumen von 1,33 mL wurde gepackt und mit einem Äquilibriumspuffer (20 mM Tris; 20 mM Ammoniumsulfat; 20 % Isopropanol; pH 8) äquilibriert. Der

Material und Methoden

Kulturüberstand wurde mittels 1:2 Verdünnung mit einem Probenpuffer (40 mM Tris; 40 mM Ammoniumsulfat; 40 % Isopropanol; pH 8) auf die Bindebedingungen eingestellt. Nach Beladung der Säule wurde diese mittels Äquilibriumspuffer gewaschen. Zur Elution des EPOs wurde ein saurer Elutionspuffer (0,5 M Glycin; 1 M NaCl; 10 % Isopropanol; pH 2,7) eingesetzt. Um das Protein vor Denaturierung zu schützen wurde das Eluat in ca. 10 % des Volumens des Eluats in 1 M Tris; pH 9 aufgefangen. Das Eluat wurde bei -20 ° C gelagert. Die Säule wurde mittels alternierender Puffer (Regenerationspuffer 1: 0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; pH 8,5; Regenerationspuffer 2: 0,1 M Natriumacetat; 0,2 M NaCl; pH 4,5) regeneriert.

3.2. Aufreinigung von mAb an Protein A

Der Antikörper wurde an Protein A aufgereinigt. Es wurde eine 5 mL HiTrap rProtein A Säule (GE Healthcare, UK) verwendet. Die Säule wurde mit 50 mM Tris, 150 mM NaCl bei einem pH von 8 äquilibriert. Nach Beladen wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gewaschen. Durch eine pH Änderung auf 2,5 mit einem Elutionspuffer (50 mM Na-Phosphat; 50 mM Na-Citrat; 150 mM NaCl) wurde der Antikörper eluiert. Um eine Denaturierung des Antikörpers zu vermeiden wurde die Elution mit einem Auffangpuffer (0,5 M Tris; 150 mM NaCl; pH 8,5) neutralisiert. Das Eluat wurde bis zu den Analysen bei -20 °C gelagert. Die Säule wurde abwechselnd mittels 1 M Essigsäure und Äquilibriumspuffer regeneriert.

3.3. Aufreinigungssequenz vom C1-INH

Die Aufreinigungssequenz für den C1-INH wurde in einer an diese Arbeit gekoppelten Masterarbeit von N. Tichomirow entwickelt. Sie beinhaltet drei Schritte:

1. Affinitätschromatographie zur Isolation des Produktes (*Capture*)
2. Ultrafiltration zur Konzentrierung und Umpufferung
3. Anionenaustauschchromatographie (AEX) zur Steigerung der Reinheit (*Polishing*) der Proben.

Als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie wurde an 6 % vernetzte Agarose immobilisiertes Jacalin (*Thermo Fisher Scientific, USA*) eingesetzt. Eine 7 mL Säule wurde gepackt und mit PBS eingefahren.

3.3.1. Affinitätschromatographie

Jacalin ist ein Lektin, welches aus Samen des Jackfruchtbaums stammt. Es bindet O-Glykane, bei denen das N-Acetyl-D-Galaktosamin keine Verknüpfung an der C₆-Position aufweist (Tachibana, K., et al.; 2006). Der C1-INH weist neben sechs N-Glykosylierungen acht O-Glykosylierungen auf (Liu, T., et al.; 2005; Halim, A., et al.; 2013; Chen, R., et al.; 2009;

Bock, S. C., et al.; 1986). Die Aufarbeitung über die O-Glykosylierungen ist der über N-Glykosylierungen in diesem Fall vorzuziehen, da so ausgeschlossen werden kann, dass nur Proteine mit spezifischen N-Glykosylierungen angereichert werden.

Zur Aufreinigung der zellfreien Kulturüberstände wurde die 7 mL Jacalin Säule (Säulenmaterial: *Geno Technology Inc.; Thermo Fisher Scientific In.*) mit 10 Säulenvolumen (SV) PBS bei einer Fließgeschwindigkeit von 50 cm h⁻¹ äquiliibriert. Die Beladung mit der Probe erfolgt bei gleicher Fließgeschwindigkeit. 5 Intervalle à 0,25 SV mit 50 cm h⁻¹ und 0,25 SV mit 5 cm h⁻¹ mit 0,125 M Melibiose (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*); 10 % Glycerin (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*) in PBS dienten der Elution. Die Säule wurde mit 10 SV PBS bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 cm h⁻¹ reäquiliibriert. Zur Regeneration der Säule wurde folgendes Programm (vgl. Tabelle 4) bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 cm h⁻¹ gefahren:

Tabelle 4: Programm zur Regeneration der Jacalin Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 cm h⁻¹.

Laufmittel	SV
PBS	5
0,8 M D (+)-Galaktose (<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>) in PBS	5
PBS	5
1 M NaCl (<i>Fisher Scientific International Inc., Hampton, USA</i>) in PBS	5
PBS	5
20 % Ethanol in PBS	5
PBS	20

3.3.2. Ultrafiltration

Die Eluate aus der Affinitätschromatographie mussten für die AEX umgepuffert werden, um die Leitfähigkeit des AEX-Bindepuffers zu erreichen. Dazu wurden *Vivaspin® Turbo 15* Ultrafiltrationseinheiten, MWCO 10 kDa (*Sartorius, USA*), eingesetzt. 15 mL Eluat wurden 10 min bei 4000 xg (Universalzentrifuge *Sigma Aldrich, USA*) zentrifugiert und an der Membran konzentriert. In einem zweiten Schritt wurde das Retentat durch Lösen in 15 mL AEX Bindepuffer (20 mM L-Histidin (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*); pH 5,5) und einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4000 xg umgepuffert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Retentat wurde in 7 mL AEX-Bindepuffer aufgenommen und für die anschließende AEX eingesetzt.

3.3.3. Anionenaustauschchromatographie

Für die AEX wurde eine *HiScreen™ Capto™ Q*-Säule (*GE Healthcare Life Sciences, UK*), SV 4,7 mL verwendet. Es handelt sich um einen starken Anionentauscher. In Tabelle 5 ist die Prozessführung gezeigt.

Material und Methoden

Tabelle 5: Prozessführung der AEX als *Polishing* Schritt der Aufreinigung des C1-INHs.

	Laufmittel	Fließgeschwindigkeit [cm h ⁻¹]	Volumen
Äquilibration	20 mM L-Histidin, pH 5,5	200	5 SV
Beladen	Probe	200	10 mL
Waschen	20 mM L-Histidin, pH 5,5	200	5 SV
Elution	20 mM L-Histidin 0 → 1 M NaCl pH 5,5	130	20 SV

Die Elution des gebundenen Proteins geschah durch eine lineare Steigerung des Salzgehaltes von 0 bis auf 1 M NaCl innerhalb von 20 SV. Zur Reinigung und Regeneration der AEX-Säule wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 200 cm h⁻¹ folgendes Programm gefahren:

Tabelle 6: Programm zur Reinigung und Regeneration der HiScreen™ Capto™ Q-Säule.

Laufmittel	SV
2 M NaCl	2
1 M NaOH (<i>Fisher Scientific International Inc.</i> Hampton)	4
2 M NaCl	2
dH ₂ O	2
20 mM L-Histidin, pH 5,5	10

3.4. Aufreinigung von AAT an dem Lektin ConA

AAT wurde, wie auch der C1-INH, mittels Lektin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufarbeitung an Jacalin kann jedoch nicht verwendet werden, da für humanes AAT nur N-Glykosylierungen bekannt sind (Halim, A., et al.; 2012; Kolarich, D., et al.; 2006; Kristiansen, T. Z., et al.; 2004). AAT wurde an Concanavalin A (ConA) aufgereinigt. Es handelt sich um ein Lektin, welches α -D-Mannose und α -D-Glukose, sowie sterisch ähnliche Reste, die Hydroxyl-Gruppen am C3-, C4- oder C5-Atom besitzen, bindet. Daher ist es möglich, Proteine mit N-Glykosylierungen mit diesem Lektin zu binden (Jha, S., et al.; 2016). Zur Bindung von Kohlenhydraten sind Mangan und Calcium nötig (Grimaldi, J. J.; Sykes, B. D.; 1975).

Daher wurde die 6 mL ConA Sepharose 4B (*GE Healthcare*, UK) Säule mit einem Mangan- und Calcium- haltigen Puffer (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 1 mM MnCl₂ (Roth, Deutschland); 1 mM CaCl₂ (Roth, Deutschland); pH 7,4) äquilibriert. Der Kulturüberstand wurde 1:10 mit dem Äquilibrationpuffer verdünnt auf die Säule aufgetragen. Die gebundenen Glykoproteine wurden durch Zugabe von Methyl- α -D-Glucopyranosid (*Sigma Aldrich*, USA), welches eine höhere Affinität zum ConA besitzt als die Glykane, verdrängt. Der Elutionspuffer (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 3300 mM Methyl- α -D-Glucopyranosid; pH 7,4) enthielt weder Mangan, noch Calcium, damit die Glykoproteine besser eluierten. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert. Die

Säule wurde mit Puffern mit alternierenden pH-Werten (Puffer A: 25 mM Natriumacetat (VWR, Deutschland); 500 mM NaCl; pH 4,5; Puffer B: 25 mM Tris; 500 mM NaCl; pH 8,5) regeneriert.

3.5. Aufreinigung von ATIII an Heparin

ATIII wurde mittels Affinitätschromatographie mit Heparin als Ligand aus den Kulturüberständen aufgereinigt (Damus, P. S.; Wallace, G. A.; 1974, Miller-Andersson, M., et al.; 1974). Der Kulturüberstand wurde auf den pH-Wert und die Leitfähigkeit des Äquilibrierungspuffers (50 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, Sigma Aldrich, USA); 550 mM NaCl; pH 5,8) eingestellt. Die Säule wurde vor dem Beladen äquilibriert. Nach dem Beladen wurde mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Heparin wirkt nicht nur als Ligand für die Affinitätschromatographie, sondern auch als starker Kationentauscher. Daher wurde mittels Stufengradient mit einem Elutionspuffer mit einer hohen Salzkonzentration (50 mM Tris; 2,5 M NaCl; pH 7,3) eluiert. Das Eluat wurde bis zur Produktanalytik bei -20 °C gelagert.

4. Analytik

4.1. Kultivierungsbezogene Analytik

4.1.1. Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung

Die automatisierte Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung wurde mittels CEDEX (*cell density examination system*) der Firma Roche-Innovatis (Deutschland) durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf einer Ausschlussfärbung der Zellen mit Trypanblau. Der Azofarbstoff dringt durch beschädigte Zellmembran in tote Zellen und färbt diese dunkelblau (Tennant, J. R.; 1964). Eine CCD-Kamera nimmt mehrere Bilder einer Durchflusszelle, durch die die gefärbte Zellsuspension geleitet wird, auf. Diese werden mit Hilfe der zugehörigen Software, welche lebende von toten Zellen unterscheidet, ausgewertet.

4.1.2. Messung der Glukose- und Laktatkonzentration

Glukose- und Laktatkonzentrationen der Überstandsproben wurden mittels Glukose-/Laktatanalysator (YSI 2700 S, Fa. Yellow Springs Instruments, USA) ermittelt. Grundlage beider Konzentrationsbestimmungen ist ein enzymbasiertes Messprinzip. Glukose wird unter Sauerstoffverbrauch durch membrangekoppelte Glukoseoxidase zu Glucono- δ -lacton umgesetzt. Dabei freiwerdendes Wasserstoffperoxid passiert die Celluloseacetat-Membran und wird an einer Platin-Anode oxidiert. Der entstehende Stromfluss wird in Bezug auf ein Silber/Silberchlorid-System gemessen. Bei der Umsetzung von Laktat durch eine Laktatoxidase entsteht ebenfalls Wasserstoffperoxid, welches analog zur Glukose-Konzentrationsmessung detektiert wird.

Der gemessene Stromfluss ist proportional zur Analytkonzentration. Die Messung einer Referenzlösung ermöglicht die Berechnung der Glukose- bzw. der Laktatkonzentration der Proben.

4.1.3. Aminosäure-Analytik

Die Aminosäure-Analytik wurde mittels RP (*Reversed Phase*) HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine RP C18 Säule (Kromasil®, AkzoNobel, Schweden). Ein binäres Puffersystem, welches durch einen Gradienten von polar zu unpolar eine Elution der Aminosäuren zu unterschiedlichen Retentionszeiten erlaubt, diente als mobile Phase (Büntemeyer, H.; 1988). Für die Analytik wurden 50 μ L zellfreier Überstand mit 50 μ L 10 %iger Perchlorsäure vermischt. Durch Zentrifugation wurden gefällte Proteine vom Kulturüberstand abgetrennt. 50 μ L des Überstandes wurden zu 100 μ L 0,6 M

Kalium-Boratpuffer, pH 10,4, gegeben und gut durchmischt, sodass ein weißer Niederschlag auftrat. Durch Zentrifugation wurde der Niederschlag, das Borat, abgetrennt und 20 µL der Probe wurden für die Analytik gemessen. Zur Detektion der Aminosäuren wurde eine Vorsäulenderivatisierung durchgeführt. Dazu wurden in einem Autosampler (Kontron, Spanien) automatisch 70 µL eines OPA (ortho-Phthaldialdehyd)-Reagenz (25 mg ortho-Phthaldialdehyd gelöst in 0,5 mL Methanol mit 50 µL 3-Mercaptopropionsäure und 4,5 mL 0,6 M Boratpuffer (pH 10,4)) zur Probe gegeben. Dadurch entstanden Isoindolderivate, welche durch eine Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nm bei einer Emission von 450 nm detektiert werden konnten. Über *Peakflächen* konnte mit Hilfe eines zuvor gemessenen Standards mit bekannten Konzentrationen der Aminosäuren auf die Konzentration geschlossen werden. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurde bei der Probenvorbereitung ein interner Standard (L-Norvalin) zu jeder Probe hinzugegeben.

4.2. Produktbezogene Analytik

Neben der Produktquantifizierung und der Produktidentifizierung wurden die Produkte des Weiteren auf ihre Produktqualität analysiert. Das Kriterium der Produktqualität ist in dieser Arbeit die Proteinglykosylierung, insbesondere die N-Glykosylierung. Um die Produktqualität der Produkte aus unterschiedlichen Wachstumsphasen vergleichen zu können, wurden unterschiedlichste Analysen durchgeführt.

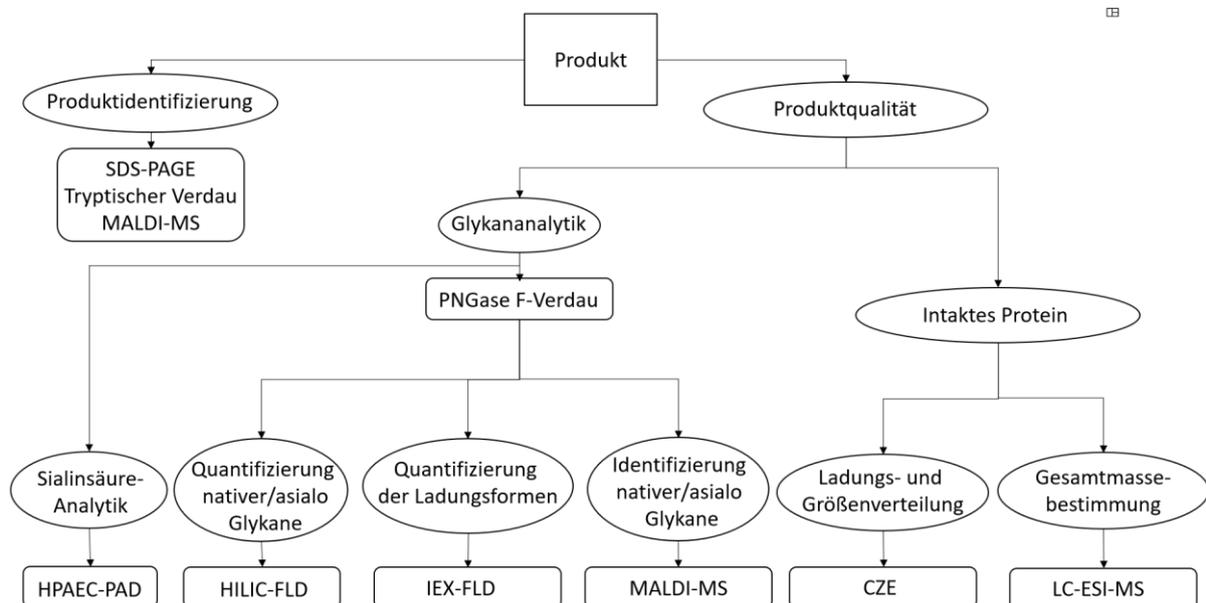


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Analytik zur Produktqualität.

In Abbildung 13 ist eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit angewandten Methoden gezeigt.

Material und Methoden

4.2.1. Produktquantifizierung und -identifizierung

Zur Produktquantifizierung der unterschiedlichen Proteine wurden diverse Methoden eingesetzt. Für den Antikörper wurde eine Protein A Affinitätschromatographie über eine HPLC und anschließender UV-Messung durchgeführt. Ebenfalls mittels HPLC, aber über eine RP-Chromatographie wurden EPO, ATIII und AAT quantifiziert. Um den C1-INH in Überständen und Aufarbeitungsfractionen zu bestimmen wurde ein ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Diese Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

4.2.1.1. Antikörperbestimmung mittels Protein A-Affinitätschromatographie

Der zellfreie Kulturüberstand wurde durch einen 0,45 µm Zentrifugal-Filter für 1 min bei 16.000 xg zentrifugiert (Heraeus fresco, Fa. Thermo Fisher Scientific, USA). Die Eluate aus der Aufarbeitung benötigten keine weitere Vorbereitung. Die Probe wurde an einer Protein-A-Säule (POROS A, *Life Technologies*, Deutschland) aufgetrennt, mittels pH-Änderung eluiert und bei einer Wellenlänge von 214 nm wurde die Absorption gemessen. Über eine Standardkalibrierreihe konnte mit Hilfe der *Peakflächen* der Antikörpertiter berechnet werden.

4.2.1.2. Produktbestimmung mittels RP-HPLC

Die Produkte AAT, ATIII und EPO wurden mittels RP-HPLC über eine C4-Säule (Nucleosil 300-5 C4, *Machery-Nagel*, Deutschland) und UV-Messung quantifiziert. Als mobile Phase diente ein binäres Puffersystem (Laufmittel A: 0,1 % TFA (Trifluoressigsäure, *Fluka*, USA) in dH₂O; Laufmittel B: 0,095 % TFA in 80 % AcN (Acetonitril, *HPLC-Grade*, *VWR*, Deutschland)). Bei einer Wellenlänge von 214 nm wurde die Absorption gemessen. Über die *Peakflächen* und eine Kalibrierreihe des jeweiligen Proteins konnte die Produktkonzentration ermittelt werden.

4.2.1.3. ELISA zur Quantifizierung des C1-INHs

Zur Quantifizierung des C1-INHs diente ein *Sandwich* ELISA. Eine 96-Well Mikrotiter Platte (*Nunc MaxiSorb plate*, *VWR*, Deutschland) wurde zunächst mit einem Fang-Antikörper (*Mouse monoclonal C1-INH capturing antibody* (Fisher Scientific, USA)) beschichtet. Dieser wurde 1:666 in einem Beschichtungspuffer (0,1 M Natriumcarbonat; 0,1 M Natriumhydrogencarbonat; pH 9,5 (*Roth*, Deutschland)) verdünnt. 100 µL dieser Lösung wurden in jede Vertiefung der Mikrotiter Platte gegeben. Zur Beschichtung wurde die Platte 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Beschichtungspuffer wurde abgenommen und jede Vertiefung

wurde mit Hilfe eines *Plate washers* (*ELP40 Microplate Strip Washer, BioTek Instruments, USA*) viermal mit je 200 μL TBS-T (*Tris buffered Saline-Tween: 20 mM Tris (Roth, Deutschland); 1,37 M NaCl; pH 7,4; 0,1 % Tween-20 (Sigma Aldrich, USA)*) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die gebundenen Antikörper mit Milchpulver geblockt. Dazu wurden 200 μL TBS-TM (TBS-T + 5 % Milchpulver (*Roth, Deutschland*)) zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige Proteine des Milchpulvers zu entfernen, wurde erneut jede Vertiefung mit Hilfe des *Plate washers* zweimal mit je 200 μL TBS-T gespült. 100 μL der Verdünnungen einer Standardreihe (*human C1-INH, prepared from serum, EMD Millipore Corporation, USA*) und je drei Verdünnungen einer Probe wurden als Triplikate auf die Platte aufgetragen. Für die Bindung zwischen Antigen (C1-INH) und Antikörper wurde die Platte 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T wurden je 100 μL Detektionspuffer (Detektionsantikörper (*Rabbit polyclonal HRP labeled C1 detection antibody, Thermo Fisher Scientific, USA*) 1:2000 in TBS-TM verdünnt) in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Detektion wurden nach viermaligem Waschen mit TBS-T je 100 μL Substratlösung (Seramum blau, *Seramum Diagnostica, Deutschland*) hinzugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Umsetzung des Substrates (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) durch die an den Detektionsantikörper gekoppelte Peroxidase (*Horseradish peroxidase (HRP)*) durch Zugabe von 2 N Schwefelsäure (*VWR, Deutschland*) gestoppt. Die Absorption wurde im Mikroplatten-Spektrometer (*PowerWave HAT Reader, BioTek Instruments, USA*) bei 450 nm gemessen. Die Produktkonzentration wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden, die durch die Standardreihe berechnet wurde, ermittelt.

4.2.1.4. Proteinbestimmung mittels BCA

Für die Sialinsäure-Quantifizierung ist es wichtig, die exakt gleiche Menge an Protein einzusetzen. Darum wurde von die Proteinkonzentration der entsalzten Eluate mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA) ermittelt. Im alkalischen Milieu reduzieren die Peptidbindungen der Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ (Biuret-Reaktion). Die Bicinchoninsäure und die einwertigen Kupferionen bilden einen Komplex, welcher eine violette Farbe aufweist, die bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann. Die Absorption ist proportional zur Proteinkonzentration.

Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA). Die Standard Reihe deckte einen Bereich von 20-500 mg/L ab. Die Proben wurden entsprechend verdünnt und als Triplikate vermessen. Der BC-Assay (*BCA protein quantification kit, Uptima, USA*) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Je 25 μL Probe, bzw. Standard wurden mit 200 μL BCA Reagenz in einer Multititerplatte vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 562 nm

Material und Methoden

wurde im *PowerWave HT Reader* (BioTek, USA) die Absorption gemessen. Mit Hilfe der Standards wurde eine Kalibrierreihe erstellt, mit deren Funktion die Konzentrationen der Proben berechnet wurden.

4.2.1.5. SDS-PAGE

Für die wachstumsspezifische Probenahme wurden zu zwei Zeitpunkten der Kultivierung Medienwechsel durchgeführt. Um zu überprüfen, ob direkt nach dem Medienwechsel kein Produkt in der Kultur vorhanden ist, wurden von allen Kultivierungen Überstandsproben mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Der Aufreinigungserfolg der Chromatographien wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE überprüft. Es handelt sich um ein einfaches Verfahren, um Proteine der Größe nach aufzutrennen (Laemmli, U. K.; 1970).

Die Proben wurden in 12,5 %igen SDS Gelen (vgl. Tabelle 7) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

Tabelle 7: Zusammensetzung aller Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Sammelgel	13 % Rotiphorese® Gel 30	Roth, Deutschland
	0,125 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), pH 6,8	Roth, Deutschland
	0,1 % SDS	GE Healthcare, UK
	0,05 % APS (Ammoniumpersulfat)	GE Healthcare, UK
	0,1% TEMED (Tetramethyldiamin)	GE Healthcare, UK
Trenngel	41,5 % Rotiphorese® Gel 30	Roth, Deutschland
	0,375 M Tris, pH 8,8	Roth, Deutschland
	0,05 % APS	GE Healthcare, UK
	0,1 % SDS	GE Healthcare, UK
	0,05 % TEMED	GE Healthcare, UK
4x Laemmli-Puffer	8 % SDS	GE Healthcare, UK
	250 mM Tris, pH 6,8	GE Healthcare, UK
	40 % Glycerol	GE Healthcare, UK
	0,04 % Bromphenolblau	Roth, Deutschland
10x DTT-Lösung	500 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)	Fluka, Schweiz
SDS-Elektrophorese Puffer	0,1 % SDS	GE Healthcare, UK
	192 mM Glycin	Roth, Deutschland
	25 mM Tris	GE Healthcare, UK

Es wurden pro Probe 9,75 µL mit 3,75 µL 4 x Laemmli Puffer und 1,5 µL 10 x DTT-Lösung für 10 min bei 70 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 3 µL des Protein-Größen-Standards (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas, USA) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im Mini-PROTEON® System (*Bio-Rad*, UK) mit

SDS-Elektrophorese-Puffer (vgl. Tabelle 7) für 45 min bei 200 V (*PowerPac HC High-Current Power Supply, Bio-Rad, UK*).

4.2.1.6. Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Mit der Coomassie-Brillant-Blau Färbung (Wilson, 1979) können Proteine, welche in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt sind, angefärbt werden. Sie eignet sich für Proteinmengen über 1 µg Protein/Probe. Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, welcher Polypeptide und Proteine mit vielen basischen Aminosäuren (z.B. Lysin, Arginin, Histidin) verstärkt anfärbt. Er benötigt ein saures Milieu, um die aromatischen und basischen Aminosäurereste der Proteine zu binden, weshalb in der Färbelösung Essigsäure enthalten ist.

Die Gele wurden mit dH₂O gewaschen, um störendes SDS zu entfernen. Um die Proteine im Gel zu fixieren, wurden die Gele in Fixierlösung (25 % Propanol-2 (*VWR, Deutschland*); 10 % Essigsäure (*VWR, Deutschland*)) für 30 min inkubiert. Die Proteinbanden wurden mit Färbelösung (0,1 % Coomassie Brillant Blau-R-250 (*Serva, Deutschland*); 50 % Methanol; 10 % Essigsäure) über Nacht bei RT gefärbt. Das Gel wurde so lange mit Entfärber (5 % Propanol-2; 7 % Essigsäure) entfärbt, bis der Hintergrund farblos war.

Zur Identifikation des Produktes wurden die Banden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels Massenspektrometrie analysiert.

4.2.1.7. Proteinidentifizierung mittels tryptischen Verdau und MALDI-MS

Um zu überprüfen, ob das Produkt in den Kulturüberständen vorhanden ist, wurden nach der Coomassie-Brillant-Blau Färbung (vgl.4.2.1.6) des Gels die Banden, die auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts zu erkennen waren, ausgeschnitten. In Tabelle 8 sind die zu erwartenden Molekulargewichte der Produkte und die jeweilige UniProt ID angegeben.

Tabelle 8: Auflistung der Produkte mit ihrem theoretischen Molekulargewicht und der zugehörigen UniProt ID.

Produkt	Molekulargewicht [Da]	UniProt ID
mAb	150.000	Nicht bekannt
EPO	21.307 (ohne Glykane) Ca. 34.000 (mit Glykanen)	P01588
C1-INH	55.154	P05155
AAT	46.737	P01009
ATIII	52.602	P01008

Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und in 1,5 mL Reaktionsgefäße (*Eppendorf, Deutschland*) überführt. Der gebundene Farbstoff wurde zunächst über dreimaliges Waschen, bzw. bis das Gelstück farblos war, mit 350 µL

Material und Methoden

30 % Acetonitril (AcN) in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (*Roth*, Deutschland) entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit abgenommen. Das Gelstück wurde in einer Vakuumzentrifuge (*Eppendorf*, Deutschland) getrocknet. Trypsin (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega*, USA) wurde mit einer Endkonzentration von $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ in 3 mM Tris, pH 8,8 hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden 12 μL 3 mM Tris, pH 8,8 hinzugegeben. Der Verdau fand bei RT über Nacht statt. Durch Zugabe von 24 μL H_2O (LC-MS grade, *VWR*, Deutschland) und eine 20-minütige Inkubation wurde der Verdau gestoppt. Zur Extraktion der Peptide wurden 20 μL 30 % AcN, 0,1 % TFA hinzugegeben und für 20 min bei RT und 400 rpm auf dem Schüttler (*Ditabis HLC*, Deutschland) inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vollständig in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde mit 50 % AcN; 0,1 % TFA wiederholt. Das vereinte Peptidextrakt wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zur Analyse der Peptide mittels MALDI TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight*) wurden diese in 3 μL 50 % AcN; 0,1 % TFA resuspendiert. 0,5 μL der Probe wurden zusammen mit 0,5 μL HCCA-Lösung (90 % AcN; 0,1 % TFA; 1 mM Ammoniumdihydrogenphosphat (*Roth*, Deutschland); 0,045 % einer gesättigten HCCA (*Bruker Daltonik*, Deutschland) Lösung) auf ein *Anchor Chip Target* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) gespottet. Die Proben wurden mit einem *Ultraflexextreme* der Firma *Bruker Daltonik* mit der Software *FlexControl* analysiert. Es wurde im Reflektor positiv (RP)-Modus gemessen. Die aufgenommenen Spektren wurden mittels *FlexAnalysis* prozessiert. Fragmentiert wurden alle Parentalitionen, deren Peptidsignale ein $m/z > 500$ und ein S/N (*signal to noise*) > 10 aufwiesen. Die Suchen wurden mit *Proteinscape 3.0* über einen *Mascot* Server durchgeführt. Als Datenbank wurde *SwissProt 08/2017* gewählt. Es wurden zwei ausgelassene Schnittstellen zugelassen, sowie eine Peptid Toleranz von 50 ppm (*parts per million*) und eine MS/MS Toleranz von 0,5 Da.

4.2.2. Analysen zur Produktqualität in Bezug auf die N-Glykosylierungen

Um die N-Glykosylierungen der Produkte zu untersuchen, gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. In dieser Arbeit wurden in erster Linie die abgespaltenen Glykane betrachtet. Über eine Gesamtmassebestimmung mittels LC-ESI-MS wurde versucht, ohne langwierige Probenvorbereitung Informationen über die Produktqualität des mAb zu erlangen. Für die Einschätzung der Qualität des EPOs zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde eine Kapillarzonenoelektrophorese (CZE, *capillary zone electrophoresis*) durchgeführt.

4.2.2.1. *Probenvorbereitung*

Die aufgereinigten Proteine lagen in den unterschiedlichen Elutionspuffern bzw. Auffangpuffern der Aufarbeitung vor. Diese sind nicht optimal für die unterschiedlichen Analytik-Methoden geeignet. Darum wurden die Eluate zunächst über 10 kDa Zentrifugen Membrankonzentratoren (VWR, Deutschland) entsalzt und umgepuffert.

Dazu wurden 400 µL dH₂O auf die Membran gegeben. Der Zentrifugen-Membrankonzentrator wurde bei 16.000 ×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Biofuge Fresco, Haereus, Deutschland). Der Durchlauf wurde verworfen. Maximal 400 µL des Eluates wurden auf den Filter gegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert, bis ein restliches Volumen von ca. 20 µL auf der Membran verblieb. Der Durchlauf wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die gewünschte Menge an Protein aufgetragen wurde. Das auf der Membran befindliche Protein wurde einmal mit 400 µL dH₂O durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und anschließende Zentrifugation gewaschen. Es folgte entweder ein Umpuffern in einen Inkubationspuffer durch zweimaliges Waschen des Proteins in selbigem, oder zweimaliges Waschen in dH₂O. Je nach Bedarf wurde das Protein in dH₂O oder dem entsprechenden Inkubationspuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Entweder konnte das Protein direkt weiter behandelt werden, oder es wurde mittels Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

4.2.2.2. *HPAEC-PAD-Sialinsäure Bestimmung*

Zur Bestimmung des Sialinsäure Gehaltes der Proteine wurde eine milde saure Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde die Proteinkonzentration aufgereinigter, entsalzter und umgepufferter Proben (vgl. Kapitel 4.2.2.1) mittels BCA (vgl. Kapitel 4.2.1.4) bestimmt. Nach Möglichkeit wurden je zwei Aliquots à 50 µg derselben Probe in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. War nicht genügend Material vorhanden, wurden einmal 50 µg getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 50 µL 200 µM 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galakto-nonon-säure (Kdn), welches als interner Standard diente, gelöst. Es wurden 50 µL 0,2 M TFA hinzugefügt und die Probe bei 82 °C für 1 h hydrolysiert. Das Protein wurde mittels 10 kDa Filter abgetrennt (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Der Durchlauf wurde lyophilisiert und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Standardreihe wurde mit N-Acetylneuraminsäure (NANA), Kdn und N-Glykolyneuraminsäure (NGNA) in einem Bereich von 10 µM-50 µM aufgenommen. Die Proben wurden in 100 µL dH₂O aufgenommen und mittels Hoch-Leistungs-Anionenaustausch-Chromatographie (*High Performance Anion Exchange Chromatography* (HPAEC)) getrennt. Als feste Phase wurde ein starker Anionenaustauscher (CarboPac™ PA20, Thermo Scientific, USA) eingesetzt, welcher auf 35 °C temperiert wurde.

Material und Methoden

Als mobile Phase diente ein Gradient aus drei Laufmitteln (Laufmittel A: 200 mM Natriumhydroxid (NaOH); Laufmittel B: 100 mM NaOH, 1000 mM Natriumacetat (NaOAc); Laufmittel C: dH₂O). Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 0,5 mL min⁻¹.

Die negativ geladenen Sialinsäuren eluieren zu unterschiedlichen Zeiten, wodurch sie einzeln detektiert werden können. Zur Detektion diente eine gepulste amperometrische Detektion (*pulsed amperometric detection* (PAD)). Durch diese Detektionsmethode ist keine Derivatisierung der Zucker zur Quantifizierung nötig. An einer Goldelektrode oxidiert der Zucker, wodurch eine elektrische Spannung gemessen werden kann, welche proportional zur Zuckerkonzentration ist (Manzi, A. E., et al.; 1990; Behan, J. L.; Smith, K. D.; 2011; Rohrer, J. S., et al.; 2013).

Die gemessenen Sialinsäurekonzentrationen wurden auf die Molmenge des eingesetzten Proteins bezogen, um ein molares Verhältnis von Sialinsäure zu Protein zu erhalten.

4.2.2.3. Intaktmassen-Analytik

Mit Hilfe der Bestimmung der Gesamtmasse eines Proteins können Unterschiede in der Produktqualität ohne langwierige Probenvorbereitung analysiert werden. Sind sowohl die Masse des Produktes ohne Glykosylierungen als auch die möglichen Strukturen der N-Glykane bekannt, können bei unterschiedlichen Gesamtmassen Rückschlüsse auf die Veränderungen der Glykosylierung gezogen werden.

Der mAb wurde mittels LC-ESI-MS analysiert. Die aufgereinigten und entsalzten Proben wurden in 0,1 % Ameisensäure (*Sigma Aldrich*, USA) gelöst. Die Proben wurden von der *Biofidus AG* (Deutschland) mit einem LaChrom HPLC System (*VWR*, Deutschland) über eine C4-Säule (*EC 150/4 Nucleodur 300-5 C4ec evtl Mab paC Säule MAbPac RP*, 2.1x100mm, 4 µm) aufgetrennt. Die Laufmittel waren 0,1 % FA in dH₂O und 0,1 % FA in AcN. Die Massenanalytik wurde mit einem *micrOTOF II* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) durchgeführt. Die aufgenommenen Spektren wurden mit der Software *DataAnalysis* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) aufsummiert, dekonvolutiert und geglättet. Bei der Annotation wurden N- und C-terminale Trunkierungen, sowie bekannte säugerspezifische N-Glykosylierungen berücksichtigt. Nach Identifikation der gebundenen Glykane wurden diesen Qualitätsattribute zugeschrieben (Antennarität, Galaktosylierungsgrad, Fucosylierungsgrad, Sialylierungsgrad, Anteil an *High Mannose*). Die Berechnung ist in Kapitel 4.2.2.11 beschrieben.

4.2.2.4. Kapillaronenelektrophorese

Bei der Kapillaronenelektrophorese (CZE) handelt es sich um eine Art der Kapillarelektrophorese mit der in diesem Fall Proteine aufgrund ihrer Mobilität, also ihrer

Größe und Ladung aufgetrennt werden. Es ist eine trägerfreie Elektrophorese. Die Analyten werden innerhalb einer Kapillare in einer meist wässrigen Elektrolytlösung, die zum einen den Stromfluss sicherstellt und zum anderen sowohl die Feldstärke als auch den pH-Wert konstant hält, voneinander getrennt. Durch das Anlegen von Spannung an den Enden der Kapillare wandern die Probenmoleküle abhängig von ihrer Größe und Ladung durch die Kapillare und werden so nach ihrer Mobilität aufgetrennt. Bei einem pH von 5,5 liegen die sialylierten Glykoproteine negativ geladen vor und werden abhängig von ihrer Anzahl an negativ geladenen Sialinsäuren aufgetrennt (Sanz-Nebot, V., et al.; 2003). Sie wandern gegen den elektroosmotischen Fluss (EOF) und werden anodenseitig mittels UV-Detektor gemessen. Jeder detektierte *Peak* steht für viele unterschiedliche Glykoformen des Glykoproteins, die ein ähnliches Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, also eine ähnliche Mobilität aufweisen. (Sanz-Nebot, V., et al.; 2003; Morzunova, T. G.; 2006; European Pharmacopoeia; 2002)

Da Fremdionen aus der Probe dazu führen, dass die Leitfähigkeit in der Probenzone höher ist als, die in der Elektrolytlösung, sollte die zu analysierende Probe möglichst salzfrei vorliegen. Andernfalls würde das Injektionsprofil verbreitert. Darum wurden die Proben vor der CZE mittels Membrankonzentratoren entsalzt (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Das entsalzte Protein wurde in dH₂O aufgenommen, sodass eine Konzentration zwischen 1 mg/mL und 4 mg/mL vorlag.

Die Probe wird durch Unterdruck in die Kapillare gesogen und dort im Elektrolytssystem (10 mM Natriumchlorid; 10 mM Tricine, 10 mM Natriumacetat; 7M Urea; 2,5 mM Putrescin, pH 5,5 bei 30 °C) bei konstanter Spannung von 28 kV aufgetrennt.

Für die Auswertung wurden die detektierten *Peaks* integriert. Zur relativen Quantifizierung der unterschiedlichen aufgetrennten Formen wurden die *Peakintensitäten* auf die Summe der zu analysierenden *Peaks* normalisiert.

4.2.2.5. PNGaseF Verdau

Zur besseren Charakterisierung der N-Glykane wurden diese vom Proteinrückrat entfernt und analysiert. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Methoden zur Identifizierung und relativen Quantifizierung der Zuckerstrukturen angewandt. Zur Identifizierung diente eine massenspektrometrische Messung der Glykane mittels MALDI-TOF, welche zur Stabilisierung der Sialinsäuren zuvor permethyliert wurden. Mittels hydrophober Interaktion Chromatographie (HILIC *hydrophobe interaction liquid chromatography*), bzw. Ionenauschromatographie (IEX *ion exchange chromatography*) und anschließender Fluoreszenzdetektion (FLD) konnten mit 2-Aminobenzamid (2-AB, Acros Organics, USA) gelabelte Glykane relativ quantifiziert werden.

Zur Entfernung der Glykane vom Protein wurde ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Die Endoglykosidase Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) spaltet die glykosidische Bindung

Material und Methoden

zwischen N-Acetylglucosamin und Asparagin. Sie eignet sich somit für die spezifische Abspaltung von N-Glykanen.

Je Protein wurden 400 µg Protein, wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, entsalzt, konzentriert und in den entsprechenden Inkubationspuffer (AAT, C1-INH: 10 mM Ammoniumformiat; IgG, ATIII: 10 mM Natriumphosphatpuffer) umgepuffert. Das Retentat wurde in 45 µL des entsprechenden Puffers aufgenommen. Zur Denaturierung des Proteins wurden 2,5 µL einer 2 %igen SDS Lösung mit 1 M β-Mercaptoethanol (*Serva*, Deutschland) hinzugegeben und für 20 min bei 100 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 2,5 µL NP40 (*Fluka*, Schweiz) hinzugegeben. Für den enzymatischen Verdau wurden 4 U PNGaseF (*Roche*, Schweiz) hinzugefügt. Der Verdau der Glykane erfolgte für 18 h bei 37 °C.

Um nach dem Verdau sowohl das Enzym, als auch das Protein von den Glykanen zu trennen, wurde der Verdau über einen 10 kDa Zentrifugen Membrankonzentratoren filtriert. Die Membran wurde mit 400 µL dH₂O gespült. Der Membrankonzentrator wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gestellt. Der Filter wurde mit 20 µL dH₂O benetzt und die Probe wurde aufgetragen. Der Zentrifugen-Membrankonzentrator wurde bei 16.000 xg zentrifugiert, bis keine Flüssigkeit auf dem Filter zurückblieb. Der Filter wurde zweimal mit je 100 µL dH₂O gespült. Der Durchlauf beinhaltete die Glykane und wurde im Weiteren mittels Graphit-Festphasenextraktion aufgereinigt.

4.2.2.6. Graphit-Festphasenextraktion

Glykane können mittels Graphit-Festphasenextraktion aufgereinigt werden (Yang, S.; Zhang, H.; 2012).

Die Graphit Extraktionssäulen (*HyperSep Hypercarb, 100 % porous graphitic carbon, 30-40 µm, 25 mg, Thermo Scientific, USA*) wurden auf einen Vakuumblock gesteckt. Mittels angeschlossener Wasserstrahlpumpe wurde ein Unterdruck von -20 kPa eingestellt. Die Säulen wurden dreimal mit je 1 mL Konditionierungslösung (80 % AcN; 0,1 % TFA) konditioniert und dreimal mit je 1 mL dH₂O gewaschen. Der Unterdruck wurde für den Probenauftrag auf -10 kPa verringert. Der Durchlauf der Filtration wurde auf die Säule gegeben und mittels Unterdrucks durch das Graphitmaterial gesogen. Die Säulen wurden dreimal mit je 1 mL dH₂O gewaschen. Für die Elution wurden unter die Röhren neue 2 mL Reaktionsgefäße gestellt. Mit je 1 mL Elutionspuffer (25 % AcN; 0,1 % TFA) wurden die Glykane von der Graphitphase eluiert. Nach Durchmischen der Probe wurden 0,5 mL (entspricht hier Glykanen von 200 µg Protein) in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Diese Probe wurde für ein Labeling mit 2-AB in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert. Ebenfalls 0,5 mL der Probe wurden für eine Permethylierung der Glykane in ein Glas-Zentrifugenröhrchen überführt, getrocknet und bei -20 °C gelagert.

4.2.2.7. Labeln der Glykane mit 2-Aminobenzamid

Zur Quantifizierung von Glykanen können diese mittels Derivatisierung am reduzierenden Ende mit einer fluoreszierenden Gruppe versehen werden und nach Auftrennung mittels LC von einem Fluoreszenzdetektor sowohl sensitiv als auch quantitativ gemessen werden. Bei der Derivatisierung mit 2-Aminobenzamid (2-AB) handelt es sich um eine reduktive Aminierung des reduzierenden Endes des Zuckers (Bigge, J. C., et al.; 1995; Kozak, R. P., et al.; 2015, Pabst, M., et al.; 2009).

Die getrockneten Glykane wurden in je 5 μL Labeling-Reagenz (0,25 M 2-AB; 1 M Dimethylaminboran (Sigma Aldrich, Deutschland)) in 30 % Essigsäure in Dimethylsulfoxid (DMSO (Sigma Aldrich, Deutschland)) aufgenommen und bei 65 °C im Dunkeln für 3 h inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Aufreinigung der gelabelten Glykane wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Es wurden Einwegsäulchen der Firma *GE Healthcare* eingesetzt (*MiniTrap G10*). Diese wurden geschüttelt, damit sich anschließend ein möglichst Luftblasen-freies Gelbett absetzen konnte. Das Gelmaterial wurde fünfmal mit je 2,1 mL dH_2O äquilibriert. Die Proben wurden in 100 μL dH_2O aufgenommen und auf das Gelbett aufgetragen. War die Probe vollständig in das Gelbett eingedrungen, wurden 900 μL dH_2O auf das Gelmaterial gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen. Mit 1,5 mL dH_2O wurden die gelabelten Glykane eluiert. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur HPLC-FLD Analytik bei -20 °C gelagert.

4.2.2.8. HILIC-FLD

Hydrophobe Interaktions Flüssigkeits Chromatographie (HILIC) ist eine Chromatographie, mit der sich polare Moleküle auftrennen lassen. Die Auftrennung mittels HILIC und anschließende Detektion von derivatisierten Glykanen zur strukturellen Aufklärung und zur Erstellung eines Glykanprofils ist weit verbreitet (Wuhrer, M., et al.; 2009; Ruhaak, L. R., et al.; 2010; Melmer, M., et al.; 2010).

Als stationäre Phase diente in dieser Arbeit eine *XBridge® Glycan BEH Amide* Säule (130 Å; 3,5 μm ; 2,1 mm \times 150 mm; *Waters*, USA). Ein binäres Laufmittelgemisch mit Laufmittel A (50 mM Ammoniumformiat, pH 4,45) und Laufmittel B (AcN) wurde als mobile Phase eingesetzt. Es wurde ein Fluss von 0,7 mL min^{-1} eingestellt. Der Gradient ist in Tabelle 9 gezeigt. Die Säule wurde auf 60 °C temperiert. Die gelabelten Glykane wurden in 100 μL Laufmittelgemisch zu Anfangsbedingungen (A/B: 77,5 %/22,5 %) gelöst. 5 μL der Probe wurden injiziert und mit einem Fluss von 0,7 mL min^{-1} auf die Säule geladen. Die Detektion der 2-AB gelabelten Glykane geschah durch einen Fluoreszenz-Detektor (*Varian Prostar FLD*

Material und Methoden

363, *Varian*, jetzt *Agilent*, USA) bei einer Extinktion von 320 nm und einer Emission von 420 nm.

Tabelle 9: Gradient der HILIC zur Separation 2-AB-gelabelter Glykane

Zeit [min]	Anteil Laufmittel A [%]	Anteil Laufmittel B [%]
0,0	22,5	77,5
70,0	48,0	53,0
73,0	80,0	20,0
78,0	80,0	20,0
81,0	22,5	77,5
82,0	22,5	77,5

Die entstandenen Chromatogramme wurden in der Software *Galaxy* (*Agilent*, USA) ausgewertet. Zur Identifikation der *Peaks* wurde eine Dextran Leiter (*Waters*, USA) analog zu den Proben mittels HILIC-FLD analysiert. Aus Retentionszeit und Anzahl an Glukose Einheiten (GU) wurde eine Kalibrierreihe berechnet, über die die GU für die zu identifizierenden *Peaks* der Glykane berechnet werden konnten. Diese GUs dienen zur Identifizierung der Glykane anhand der *EurocarbDB* Datenbank (<http://relax.org.au/eurocarb/>). Zur besseren Identifikation der *Peaks* wurden sowohl asialo, als auch native Glykane mittels HILIC-FLD analysiert und mit den MS-Daten aus den MALDI-MS Messungen der permethylierten Glykane und der asialo Glykane verglichen. Nach Identifikation der Glykane wurden diesen Qualitätsattribute zugeschrieben (Antennarität, Galaktosylierungsgrad, *core*-Fucosylierung, Sialylierungsgrad, Anteil an *High* Mannose, Anteil an antennärer Fucosylierung). Die Berechnung ist in Kapitel 4.2.2.11 beschrieben.

4.2.2.9. IEX-HPLC-FLD

Neben der Trennung der Glykane aufgrund ihrer Polarität können sialylierte Glykane auch nach der Anzahl ihrer Ladungen aufgetrennt werden. Dies geschieht über einen Ionenaustauscher (Ion-Exchange (IEX)). Da die Glykane aufgrund der terminalen Sialinsäuren negativ geladen sind, wurde ein Anionenaustauscher eingesetzt. Die Detektion geschah wie bei der HILIC-FLD über eine fluoreszenz-Detektion der 2AB-gelabelten Glykane. Als Anionenaustauscher wurde eine ProPac® SAX-10 Säule (2 × 250 mm; *Thermo Scientific*; USA) verwendet. Mit dieser Säule ließen sich Moleküle trennen, die sich lediglich in einer Ladung unterscheiden. Die Trennung erfolgte in einem Gradienten aus zwei Laufmitteln (A: 20 % Acetonitril in dH₂O; B: 20 % Acetonitril in 0,25 M Ammoniumformiat, pH 4,5) und einem Fluss von 0,2 mL/min. Der Gradient ist in Tabelle 10 gezeigt

Tabelle 10: Gradient der IEX-HPLC zur Separation 2AB-gelabelter Glykane

Zeit [min]	Anteil Laufmittel A [%]	Anteil Laufmittel B [%]
0,0	100	0
5,0	100	0
30,0	70	30
40,0	0	100
50,0	0	100
50,1	100	0
85,0	100	0

Die separierten Glykane wurden bei einer Extinktion von 260 nm und einer Emission von 430 nm detektiert. Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit der Software *Galaxy* (Agilent, USA) durchgeführt. Die aufgetrennten *Peaks* wurden integriert und die Flächen wurden relativ quantifiziert.

4.2.2.10. Permethylierung von Glykanen

Die negativ geladenen endständigen Sialinsäuren der Glykane sind bei der Ionisierung des Moleküls im MALDI nicht stabil. Um diese am Glykan zu stabilisieren, kann eine Permethylierung des Glykans durchgeführt werden. Die Sialinsäuren werden in die korrespondierenden Methylester umgewandelt, welche im Gegensatz zu den Sialinsäuren neutral sind. Dadurch werden sialylierte Glykane für die MALDI-MS Analytik stabilisiert. (Yu, S.-Y., et al.; 2006; Wheeler, S. F.; Harvey, D. J.; 2000)

Für die Permethylierung und anschließende Analytik mittels MALDI-TOF wurden jeweils Glykane von 200 µg Protein eingesetzt. Die zuvor vom Protein entfernten Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5) lagen getrocknet in Glas-Zentrifugenröhrchen vor.

Die Glykane wurden zur Reduktion in 200 µL einer Natriumborhydrid (NaBH₄)-Lösung (5 mg mL⁻¹ NaBH₄; 0,3 % (v/v) Methanol; 30 mM NaOH) aufgenommen und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µL Essigsäure wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die trockenen Proben wurden in 1 mL 0,1 % Salzsäure (HCl (Roth, Deutschland)) in Methanol aufgenommen und getrocknet. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Für die Permethylierung wurde eine Dimethylsulfoxid (DMSO)-NaOH Lösung angesetzt. 50 % NaOH wurde 1:3 mit Methanol gemischt. Um Wasser aus der Lösung zu verdrängen, wurde das 20fache Volumen des Gemisches an DMSO hinzugefügt. Die Suspension wurde mit einem Vortexmischer (*Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Schweiz*) durchmischt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. In einer Megafuge (*Haereus, Deutschland*) wurde die Suspension 3 min bei 1000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat wurde

Material und Methoden

erneut in dem zuvor genannten Volumen an DMSO aufgenommen, mit einem Vortexmischer durchmischt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Wie zuvor wurde die Suspension zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde weitere dreimal mit einem Drittel des vorherigen Volumens an DMSO wiederholt. Das Präzipitat wurde in dem zuvor genannten Volumen DMSO aufgenommen und kurz vor der Verwendung gut durchmischt.

Die trockenen reduzierten Glykane wurden in 200 μ L DMSO aufgenommen, mit einem Vortexmischer durchmischt und nach zweiminütiger Ultraschallbehandlung für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ L der DMSO-NaOH Suspension wurde die Probe mit einem Vortexmischer durchmischt und für wenige Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei RT. Um Salze zu entfernen, wurde eine Flüssigphasen Extraktion mit Wasser und Chloroform (VWR, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden zur Suspension 3 mL dH₂O und 3 mL Chloroform hinzugegeben. Die Suspension wurde mittels Vortexmischer durchmischt. Nach Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase verworfen. Die untere Phase wurde dreimal mit dH₂O auf gleiche Weise gewaschen. Die untere organische Phase enthielt die permethylierten Glykane, wurde auf zwei Braunglasvials aufgeteilt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C bis zur Massenanalytik gelagert.

Für die MALDI-TOF Analytik wurden die getrockneten permethylierten Glykane in 10 μ L dH₂O aufgenommen. Je 0,5 μ L der Probe und 0,5 μ L Matrix (0,32 % (w/v) 2-((3'-Methyl-4'-Hydroxyphenyl)azo)Benzoessäure (MHB) (*Sigma Aldrich*, USA); 6,4 % (w/v) 2,5-Dihydroxybenzoessäure (DHB) (*Bruker Daltonik*, Deutschland); 5 mM NaCl; 50 % Ethanol) wurden zusammen auf ein Edelstahl-Target (*Bruker Daltonik*, Deutschland) gespottet. Nach Trocknen der Proben wurden diese in 1 μ L dH₂O aufgenommen und rekristallisiert. Alle Proben wurden zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Analytik als technische Duplikate gespottet.

Die Proben wurden im *Ultraflex extreme* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) im positiven Reflektormodus manuell analysiert. Als Kalibrant diente ein Gemisch aus vier Zuckern (*Dextran Laboratories*). Die entstandenen Spektren wurden mit der Software *flexAnalysis* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) und *Glycoworkbench* (Ceroni, A., et al.; 2008) ausgewertet. Zur relativen Quantifizierung wurden die Intensitäten der identifizierten *Peaks* zu Grunde gelegt. Die Auswertung erfolgte Analog zu der in Kapitel 4.2.2.11 beschriebenen Berechnung der Qualitätsattribute.

4.2.2.11. Berechnung der Qualitätsattribute

Den identifizierten Glykanen wurden Qualitätsattribute (Antennarität, Galaktosylierungsgrad, Fucosylierungsgrad der *core*-Struktur, antennäre Fucosylierung, Sialylierungsgrad, Anteil an

High Mannose, Anteil an Hybrid Strukturen und Anteil an trunkierten Glykanen) zugeteilt. Den unterschiedlichen Glykanstrukturen wurden für jedes dieser Attribute Werte zugeordnet. Für Antennarität, Galaktosylierungsgrad, Sialylierungsgrad, sowie den Grad der antennären Fucosylierung wurde der Wert entsprechend der Anzahl an Antennen, antennären Galaktosen, Sialinsäuren, bzw. Fucosen gewählt. Für die Anteile an *High Mannose*-, Hybrid- und trunkierten Strukturen sowie dem Grad an *core*-Fucosylierung wurde einem Glykan bei Vorhandensein des Attributes der Wert 1 zugeordnet. So wurden einem Glykan mit der Struktur A2G1F folgende Werte zugewiesen: Antennarität: 2; Galaktosylierungsgrad: 1 und *core*-Fucosylierungsgrad: 1.

$$(2) x_Q = \left(\sum_{k=m}^n I_k \times W_k \right) \times \frac{1}{\sum_{k=m}^n I_k}$$

mit x_Q = normalisierte Kenngröße des jeweiligen Qualitätsattributes
 I_k = Intensität des zum jeweiligen Qualitätsattribut zugeordneten *Peaks*
 W_k = zugeordneter Wert des jeweils identifizierten Glykans

Für die relative Quantifizierung der genannten Qualitätsattribute wurde jeweils das Summenprodukt der für das jeweilige Qualitätsattribut relevanten Intensitäten und der zugeordneten Werte auf die Summe der Intensitäten aller identifizierten *Peaks* (*core*-Fucosylierung, *High Mannose*, Anteil an Vorstufen, Anteil an Hybrid Strukturen, Anteil an trunkierten Glykanen), bzw. aller identifizierten komplexen Glykane (Antennarität, Galaktosylierungsgrad, der *core*-Struktur, antennäre Fucosylierung, Sialylierungsgrad) normalisiert (vgl. Formel (2)).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kultivierungen durchgeführt. Einige Zelllinien mussten an neue Kultivierungsbedingungen adaptiert werden. Die Ergebnisse dieser Kultivierungen werden im ersten Teil dieses Kapitels gezeigt. Nach erfolgreicher Adaption wurden Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durchgeführt, welche im zweiten Teil dieses Kapitels besprochen werden. Im dritten Teil werden die Ergebnisse der Hauptkultivierungen gezeigt, in denen eine wachstumsspezifische Probenahme zur anschließenden Produktanalytik durchgeführt wurde. Im vierten Teil werden Ergebnisse der Produktanalytik zur Heterogenität in der Glykosylierung besprochen.

Um den möglichen Einfluss der Verweilzeit der Produkte in Medium bzw. in Kulturüberständen einschätzen zu können, wurden einige der Produkte sowohl in Medium als auch in Kulturüberständen und in Kulturen der Parentalzelllinie bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse zur Produktqualität werden im fünften Teil dieses Kapitels behandelt.

5. Medienadaption

Vier Zelllinien mussten für diese Arbeit an neue Kultivierungsbedingungen adaptiert werden. Die CHO-ATIII-Zelllinie wurde bislang adhärent in Tierkomponenten-haltigem Medium kultiviert. Das Medium, in dem die AGE1.hn und die AGE1.hn-AAT-Zelllinien vorlagen war nicht mehr erhältlich. Zudem sollten Parental- und Produktionszelllinie für die wachstumsspezifische Probenahme möglichst gleich kultiviert werden. Die Zelllinien wurden bislang bei unterschiedlichen Umdrehungszahlen und in Kolben mit (AGE1.hn) bzw. ohne Schikanen (AGE1.hn-AAT) kultiviert. Zusätzlich war es für die wachstumsspezifische Probenahme vonnöten, dass die zugehörige Parentalzelllinie im gleichen Medium kultiviert wurde wie auch die Produktionszelllinie. Für die Kultivierung von CHO-K1-C4 und CHO-ATIII diente CHO-K1 als Parentalzelllinie, die in CDM 1 vorlag. Diese musste an zwei unterschiedliche Medien (CDM 4 (CHO-ATIII) und CDM 2 (CHO-K1-C4)) adaptiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Adaptionen der unterschiedlichen Zellen an neue Kultivierungsbedingungen dargestellt. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen werden im Anhang in Abbildung-A 1 gezeigt.

5.1. Adaption der CHO-ATIII-Zelllinie an Wachstum in Suspension

Die CHO-ATIII-Zellen lagen zu Beginn dieser Arbeit als adhärent wachsende Kultur in DMEM/Ham's F12 mit 5 % FCS vor. Für die folgenden Versuche war eine Adaption zum einen an ein chemisch definiertes, von Tierkomponenten freies Medium und zum anderen an das

Wachstum als Suspensionskultur notwendig. In Abbildung 14 ist sowohl die viable Zelldichte als auch die Viabilität der CHO-ATIII-Zellen in den unterschiedlichen chemisch definierten, tierkomponentenfreien Medien CDM 1, CDM 4 und TC HYB (Xell AG, Bielefeld) dargestellt.

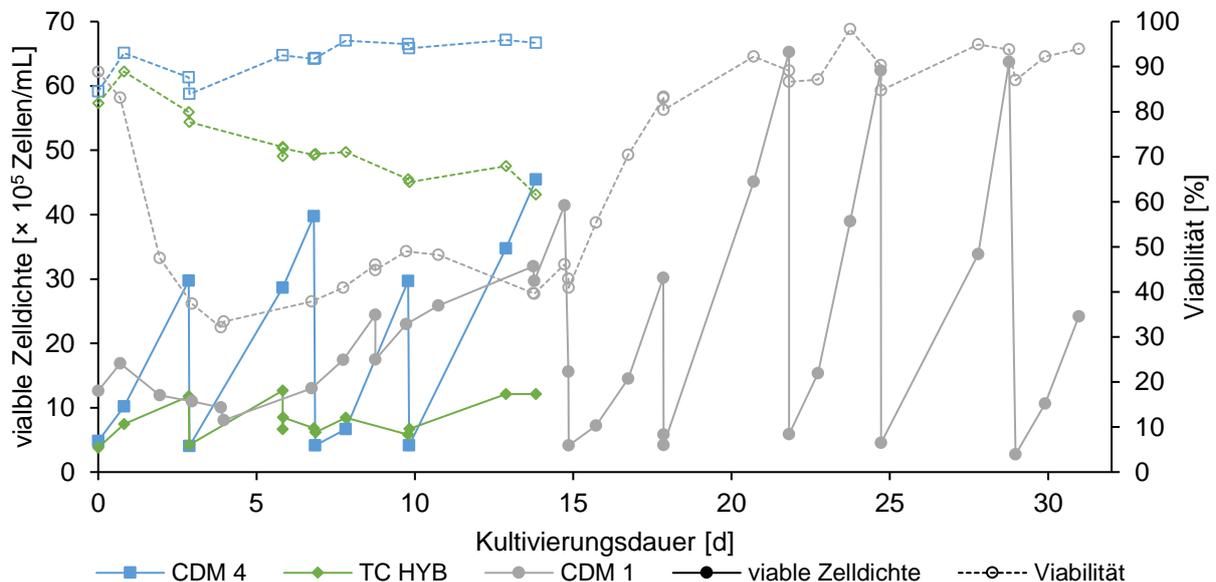


Abbildung 14: Viable Zelldichte und Viabilität während der Medienadaption der CHO-ATIII-Zellen in drei unterschiedlichen Medien: CDM 1, CDM 4 und TC HYB.

Die Zellen wurden zunächst adhärenz in DMEM/Ham's F12 mit 5 % FCS und 4 mM Glutamin in einer T-75 Flasche bis zu 80-90 %iger Konfluenz kultiviert. Nach Trypsinieren (vgl. Kapitel 2.2) der Zellen wurden diese gewaschen und in unterschiedlichen Medien (CDM 4, TC HYB und CDM 1) aufgenommen. Die Kultivierung in CDM 4 und TC HYB starteten mit ca. $4\text{-}5 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Kultivierung in CDM 1 startete bei $12,6 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Viabilitäten lagen nach Inokulieren zwischen 82 % und 89 %. Die Viabilität der Zellen in CDM 1 und TC HYB sank deutlich ab (CDM 1: von 89 % auf 32 % innerhalb von 4 Tagen; TC HYB: von 82 % auf 62 % innerhalb von 14 Tagen). Die Zellen in TC HYB zeigten innerhalb von zwei Wochen kein Wachstum über $1,5 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} , daher wurde diese Adaption abgebrochen. Die Zellen in CDM 1 zeigten nach 18 Tagen Adaption ein Wachstum von 4×10^5 Zellen mL^{-1} auf 65×10^5 Zellen mL^{-1} innerhalb von vier Tagen. Jedoch schwankte die Viabilität auch nach weiteren Passagen. Da im Hauptversuch ein Medienwechsel zwischen Parentalzelllinie und Produktionszelllinie stattfinden sollte, war eine schwankende Viabilität der Produktionszelllinie von Nachteil, da lysierte Zellen die Zusammensetzung des konditionierten Mediums beeinflussen. Die Kultivierung der CHO-ATIII-Zelllinie in CDM 4 zeigte nach zehn Tagen Adaption an das Medium eine Verzehnfachung der viablen Zelldichte innerhalb von vier Tagen und eine annähernd stabile Viabilität von 95 %. Darum wurde eine Wachstumskurve der Zellen in CDM 4 aufgenommen (vgl. Abbildung 15 (A)). Die maximale viable Zelldichte wurde

Ergebnisse und Diskussion

nach sechs Tagen erreicht und betrug $57,1 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} bei einer Viabilität von 93 %. Die Viabilität stieg vom Start der Kultivierung von 93,0 % auf 95,6 % am fünften Tag. In den nächsten acht Tagen sank sie auf 57,7 %. Die viable Zelldichte betrug am Ende der Kultivierung $33,2 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} .

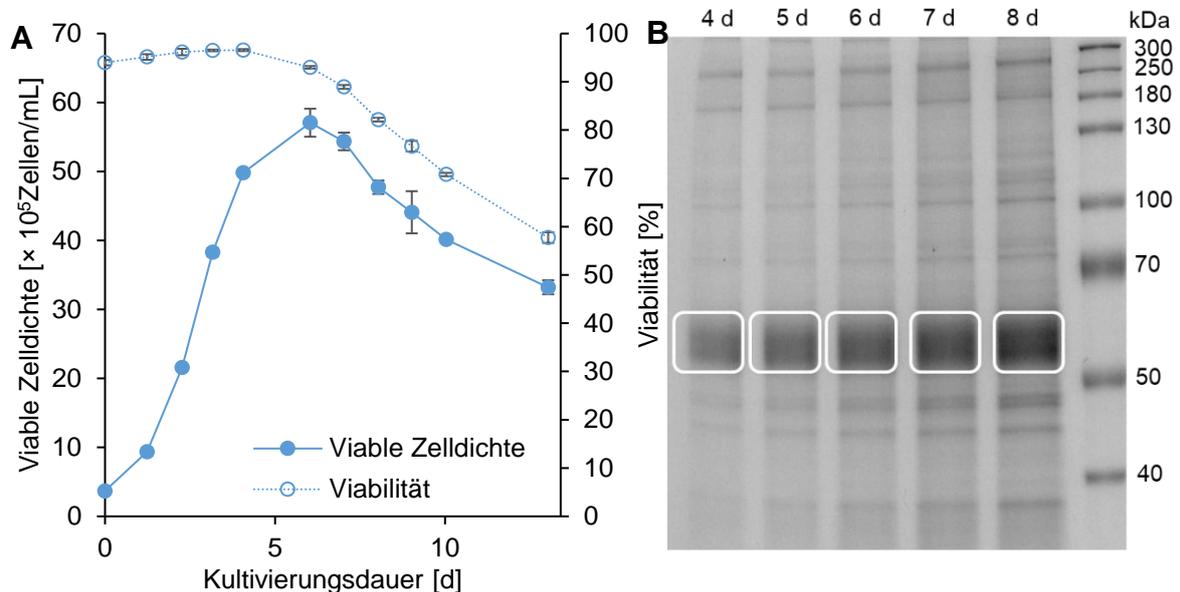


Abbildung 15: (A) Viable Zelldichte und Viabilität der CHO-ATIII-Zelllinie in CDM 4 über einen Zeitraum von 13 Tagen. (B) SDS-PAGE der Überstände der CHO-ATIII-Kultivierung von den Tagen vier bis acht. Protein-Größenstandard: *Page Ruler High Range* (*Thermo Fisher Scientific, USA*).

Es wurden Proben vom Überstand während der Kultivierung genommen, um das Produkt nachzuweisen. In Abbildung 15 (B) ist das 12,5 % SDS-Gel zu sehen, auf dem Überstände der CHO-ATIII-Kultivierung aufgetrennt wurden. Zwischen 50 und 70 kDa ist in allen fünf Spuren eine mit dem Verlauf der Kultivierung breiter werdende Bande zu erkennen. Zur Identifikation dieser Bande wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt. Mittels MALDI-TOF-MS/MS konnte humanes Antithrombin III identifiziert werden. Die CHO-ATIII-Zelllinie wurde erfolgreich an das Wachstum in chemisch definiertem und von Tierkomponenten freiem Medium in Suspension adaptiert. Es wurde eine WCB von der adaptierten Zelle für alle nachfolgenden Kultivierungen angelegt.

5.2. Medienadaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zelllinien

Die Zelllinien AGE1.hn und AGE1.hn-AAT wurden zunächst an das Wachstum in CDM 4 adaptiert. Die Ergebnisse der Medienadaption sind in Abbildung 16 gezeigt.

Nach dem Auftauen der Zellen in CDM 4 wurde die Produktionszelllinie AGE1.hn-AAT bei 125 rpm über elf Passagen kultiviert bis die Viabilität stabil bei ca. 95 % lag. Vier Tage nach Verdünnen der Zellen auf 4×10^5 Zellen mL^{-1} erreichten die Zellen eine viable Zelldichte von

24×10^5 Zellen mL^{-1} (vgl. Abbildung 16). Nach weiteren drei Passagen wurde die WCB für alle weiteren Kultivierungen angelegt.

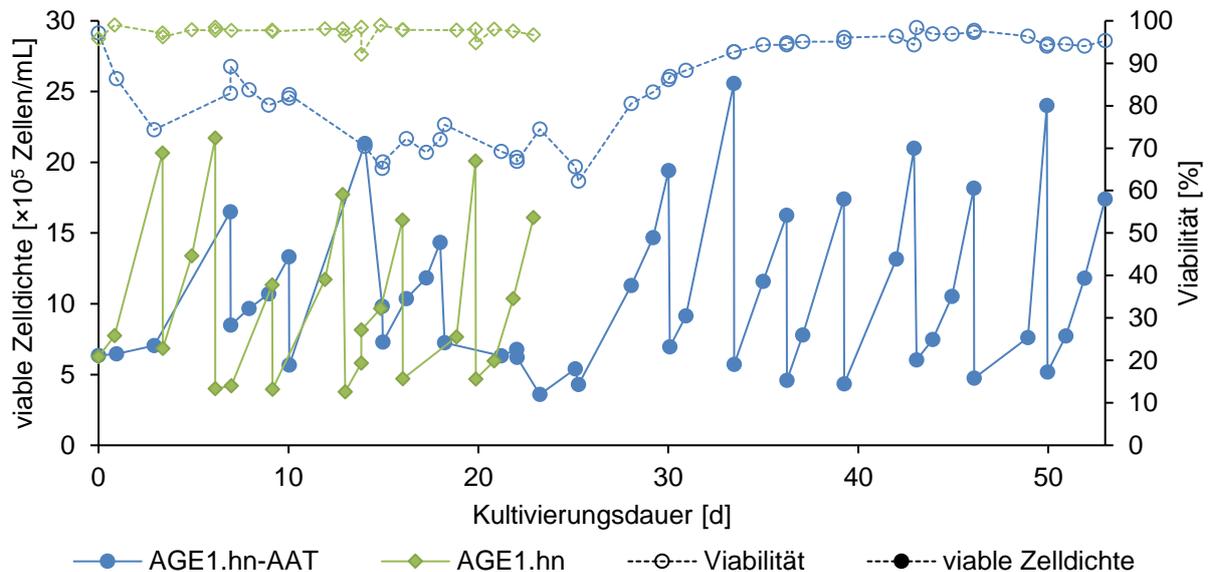


Abbildung 16: Viable Zelldichte und Viabilität während der Medienadaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zelllinie in CDM 4. Beide Zelllinien wurden zunächst in Kultivierungsröhrchen kultiviert. Nach zwei Passagen wurde die AGE1.hn-Zelllinie in Kolben mit Schikane bei 185 rpm kultiviert und AGE1.hn-AAT-Zelllinie in Kolben ohne Schikane bei 125 rpm.

Die Parentalzelllinie AGE1.hn wurde bei 185 rpm in Kolben mit Schikanen kultiviert. Die Viabilität war nach der ersten Passage annähernd stabil bei ca. 98 %. Die Parentalzelllinie wuchs innerhalb von vier Tagen von ca. 4×10^5 Zellen mL^{-1} auf ca. 18×10^5 Zellen mL^{-1} . Nach sieben Passagen wurde eine WCB für alle nachfolgenden Kultivierungen angelegt.

Für die wachstumsspezifische Probenahme waren möglichst analoge Kultivierungsbedingungen wichtig. Daher wurden die Parentalzelllinie und die Produktionszelllinie testweise unter gleichen Bedingungen in Kolben ohne Schikanen und bei 185 rpm kultiviert. Abbildung 17 (A) zeigt die viable Zelldichte und die Viabilität über einen Kultivierungszeitraum von sechs Tagen. Das Wachstum beider Zelllinien verläuft über die Dauer von sechs Tagen parallel. Beide Kulturen wurden mit $3,6 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} inokuliert und erreichten nach sechs Tagen eine viable Zelldichte von $49,8 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Viabilität der Parentalzelllinie lag mit durchschnittlich 89 % unter der Viabilität des Produzenten (im Durchschnitt 94 %). Ein paralleles Wachstum über sechs Tage war ausreichend für den Medienwechsel bei der wachstumsspezifischen Probenahme, da spätestens am sechsten Tag der zweite Medienwechsel stattfand. Um zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen das Produkt gebildet wurde, wurde am sechsten Tag der Kultivierung eine Überstandsprobe sowohl von der Produktions- als auch von der Parentalzelllinie mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 (B) gezeigt. Die Bande auf der Höhe von ca. 55 kDa wurde ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS/MS als

Ergebnisse und Diskussion

α -1-Antitrypsin identifiziert. In der Spur der Überstandsprobe der Parentalzelllinie ist diese Bande nicht vorhanden.

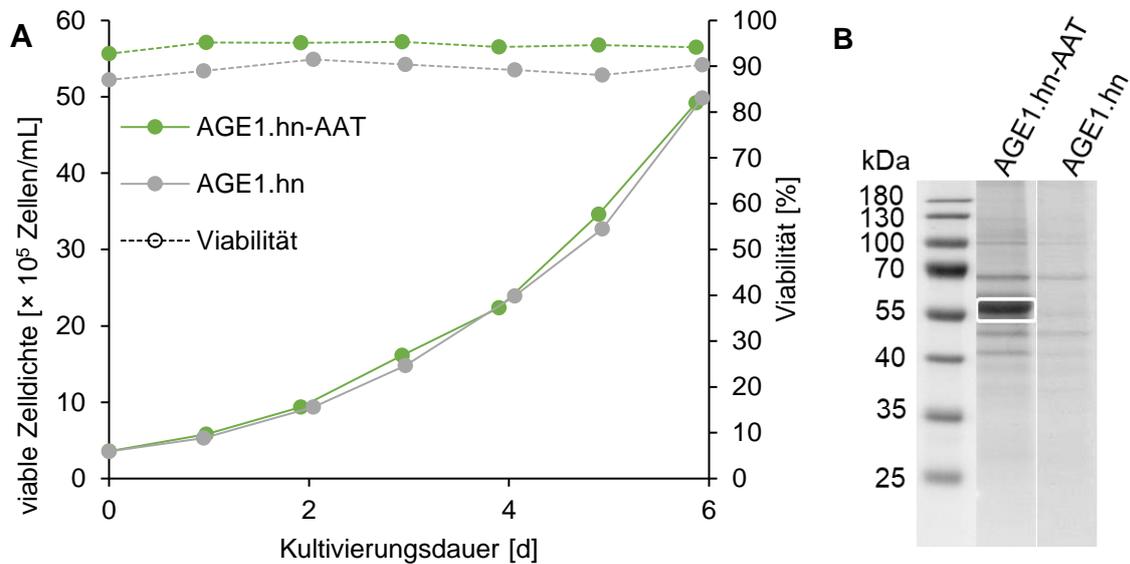


Abbildung 17: (A) Vergleich der Kultivierungen von AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Zellen bei gleichen Kultivierungsbedingungen: 185 rpm Kolben ohne Schikanen. (B) SDS-PAGE der Überstände der AGE1.hn-AAT- und AGE1.hn-Kultivierungen von Tag sechs. Protein-Größenstandard: Page Ruler Prestained Protein Ladder (*Fermentas*, Litauen).

Die AGE1.hn-Zelllinie und die AGE1.hn-AAT-Zelllinie wurden erfolgreich an das Wachstum in CDM 4 adaptiert. Des Weiteren zeigten sie in diesem Medium bei gleichen Kultivierungsbedingungen lediglich geringfügige Unterschiede, die für die wachstumsspezifische Probenahme zunächst vernachlässigbar waren.

5.3. Adaption von CHO-K1 an andere Kultivierungsmedien

Die CHO-K1 Zelllinie lag in CDM 1 vor. Sie diente hier für drei unterschiedliche Produktionszelllinien als Parentalzelllinie und musste dafür an zwei neue Medien adaptiert werden. Dazu wurden CHO-K1-Zellen, die in CDM 1 eingefroren waren in CDM 2 (für die CHO-K1-C4-Zelllinie) und in CDM 4 (für die CHO-ATIII-Zelllinie) mit einer viablen Zelldichte von 5×10^5 Zellen mL^{-1} aufgetaut und wie beschrieben (vgl. Kapitel 2.2) kultiviert. Um zu überprüfen, ob das Wachstumsverhalten der Parentalzelllinie in den unterschiedlichen Medien dem der jeweiligen Produktionszelllinie entsprach, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Diese sind in Abbildung 18 gezeigt. Abbildung 18 (A) zeigt die Kultivierung der Produktionszelllinie CHO-ATIII und der Parentalzelllinie CHO-K1. Beide Zelllinien wurden in CDM 4 kultiviert. Die Viabilität beider Zelllinien lag konstant bei 96-97 %. Das Wachstumsverhalten unterschied sich, trotz gleicher Animpfdichte von 2×10^5 Zellen mL^{-1} ,

deutlich. Die CHO-K1-Zelllinie erreichte nach fünf Tagen Wachstum eine viable Zelldichte von 33×10^5 Zellen mL^{-1} und die Produktionszelllinie das 1,7-fache (55×10^5 Zellen mL^{-1}).

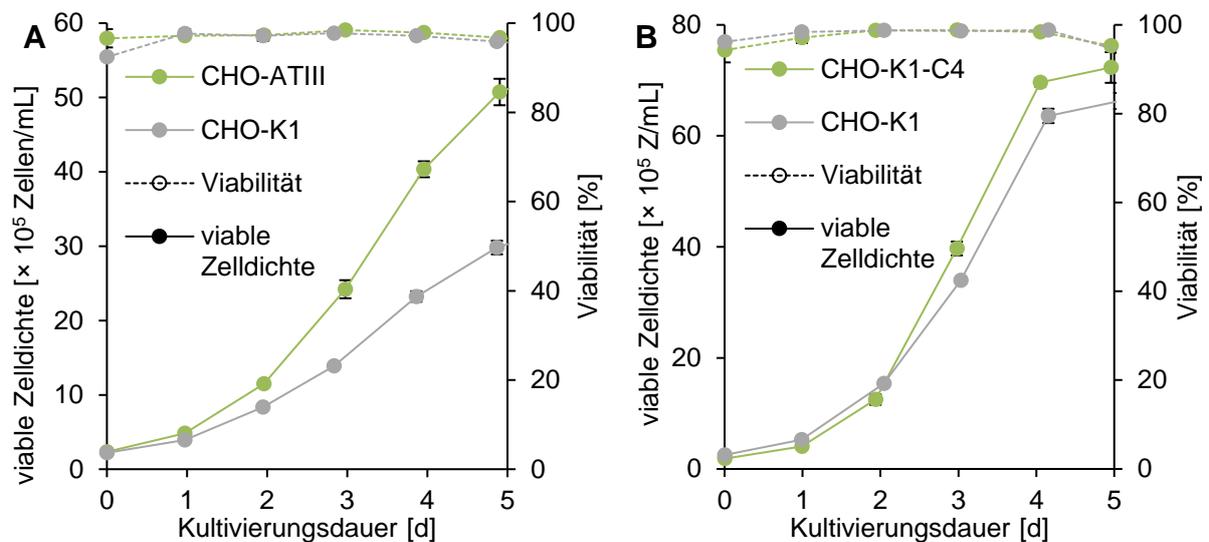


Abbildung 18: Viable Zelldichten und Viabilitäten von Parentalzelllinien und Produktionszelllinien über fünf Tage Kultivierungsdauer im Vergleich. (A) CHO-K1 in CDM 4 parallel kultiviert zu CHO-ATIII; (B) CHO-K1 in CDM 2 parallel kultiviert mit CHO-K1-C4 als Produktionszelllinie.

Das Wachstum von CHO-K1 und der Produktionszelllinie CHO-K1-C4 verlief bis zu Tag zwei parallel (Wachstum von 2×10^5 Zellen mL^{-1} auf 12×10^5 Zellen mL^{-1} (CHO-K1-C4), bzw. 15×10^5 Zellen mL^{-1}). Bis Tag fünf wuchsen die Parentalzellen bis auf 66×10^5 Zellen mL^{-1} und die Produktionszelllinie zeigte eine viable Zelldichte von 72×10^5 Zellen mL^{-1} . Die Viabilität bei beiden Kultivierungen betrug im Durchschnitt 97 % und blieb bis zum vierten Tag annähernd konstant (vgl. Abbildung 18 (B)).

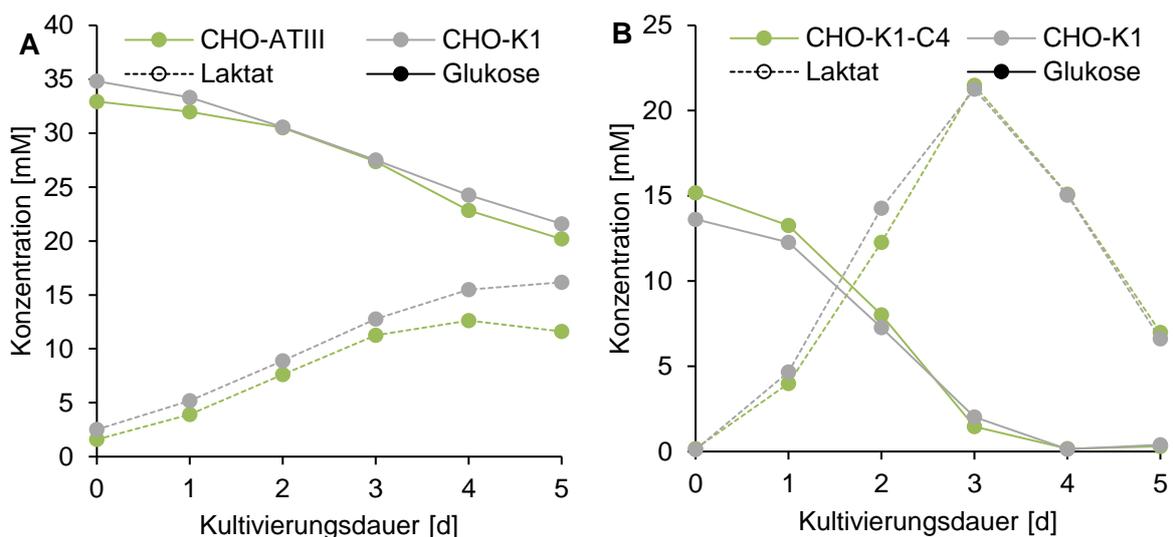


Abbildung 19: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierungen von (A) CHO-K1 und CHO-ATIII in CDM 4 (B) CHO-K1 und CHO-K1-C4 in CDM 2.

Durch unterschiedliches Wachstum werden die Substrate im Medium unterschiedlich schnell verbraucht und Metabolite werden unterschiedlich schnell gebildet. Daher ist davon

Ergebnisse und Diskussion

auszugehen, dass sich die Überstände von Produktions- und Parentalzelllinie in ihrer Zusammensetzung unterschieden. Um einen ersten Hinweis auf die Auswirkungen zu bekommen, wurden die Glukose und Laktatkonzentrationen ermittelt (vgl. Kapitel 4.1.2). Diese zeigten bei der Kultivierung von ATIII-produzierenden Zellen geringe und bei den EPO-produzierenden Zellen keine Unterschiede. Demnach hatte das ungleiche Wachstum nur geringe oder keine Auswirkungen auf diese Substrate.

Um einschätzen zu können, wann sich Wachstumsunterschiede zum einen auf die Zusammensetzung der Kulturüberstände und zum anderen auf das Wachstumsverhalten bei einem Medienwechsel während der Kultivierung auswirken, wurden unterschiedliche Vorversuche durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

6. Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

Ziel dieser Arbeit war es, rekombinant produzierte Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Kultivierung untereinander zu vergleichen. Dazu wurde eine wachstumsspezifische Probenahme entwickelt, bei der die jeweilige Parentalzelllinie parallel zu der Produktionszelllinie kultiviert wurde. Zu bestimmten Zeitpunkten fand ein Medienwechsel statt. Der Kulturüberstand der Produzenten wurde abgenommen und das enthaltene Produkt sollte später analysiert werden. Die Zellen wurden im Überstand der Parentalzelllinie aufgenommen und weiter kultiviert. In den Vorversuchen zur Probenahme sollte geprüft werden, ob sowohl dieser Medienwechsel, als auch die mechanischen Belastungen, die dabei eine Rolle spielen, einen Einfluss auf das Wachstum der Produktionszellen haben.

Dazu wurden Kultivierungen mit drei unterschiedlichen Zelllinien, einem CHO-Zellpool und zwei humanen Zelllinien, durchgeführt. Es wurden sowohl das Wachstumsverhalten, als auch die Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung betrachtet. Die Aminosäurekonzentrationen wurden bei zwei der Kultivierungen verfolgt, um neben möglichen Unterschieden im Wachstum und Substratverbrauch mögliche Unterschiede zwischen dem Aminosäureverbrauch bzw. der Bildung von Aminosäuren von Parental- und Produktionszelllinie aufzuzeigen. Da sowohl Glukose- als auch Glutaminmangel zu einer veränderten Glykosylierung führen können (Liu, B., et al.; 2014; Seo, J. S., et al.; 2014; Seo, J. S., et al.; 2014; Chee Fung Wong, D., et al.; 2005), ist die Betrachtung der Substrate und ihrer Metabolite auch in Hinsicht auf die Produktglykosylierung im Verlauf der Kultivierung wichtig.

6.1. Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme und der damit verbundenen Zentrifugation auf einen EPO-produzierenden Zellpool

Im Fokus dieses Versuches stand die Fragestellung, ob die mechanische Belastung der Zellabtrennung einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat. Es wurde ein EPO-produzierender Zellpool, der von O. Krämer ausgehend von der CHO-K1 Zelllinie (Krämer, O.; 2014) generiert wurde, als Produktionszelllinie verwendet. Für die Kultivierung wurden vier Kulturen à 50 mL der Parentalzelllinie und sechs Kulturen des CHO-EPO-Pools mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen mL⁻¹ in CDM 2 angeimpft und wie unter 2.5.1 beschrieben kultiviert. Neben den Medienwechseln zu zwei Zeitpunkten (vgl. Kapitel 2.5.1) wurde je ein Teil der Produktionskulturen lediglich zentrifugiert und das Zellpellet wurde im

Ergebnisse und Diskussion

selben Kulturüberstand wiederaufgenommen, um einen möglichen Einfluss der Zentrifugation auf das Wachstum der Zellen zu überprüfen. Der Ablauf der Kultivierung ist in Abbildung 10 dargestellt. In Abbildung 20 wird das Wachstum im Kultivierungsverlauf des CHO-EPO-Zellpools und der CHO-K1-Zellen gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Parentalzelllinie und Produktionszelllinie ein unterschiedliches Wachstumsverhalten aufwiesen. Während die Parentalzelllinie (grau) am Tag des ersten Medienwechsels (Tag 6) 59 bzw. 69×10^5 Zellen mL^{-1} erreichte, so betrug die viable Zelldichte der Produktionszelllinie mit $120 - 142 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} mehr als die zweifache Zelldichte. Die maximale viable Zelldichte der Parentalzellen betrug 83×10^5 Zellen mL^{-1} , die maximale viable Zelldichte der Produktionszellen betrug hingegen 162×10^5 Zellen mL^{-1} . Diese Unterschiede im Wachstum legen Unterschiede im Substratverbrauch nahe, was zur Folge haben könnte, dass die Zusammensetzung des konditionierten Mediums für den Medienwechsel anders ist, als die Zusammensetzung des Mediums der Kontrollkultur. Dies würde zu unterschiedlichen Bedingungen für die Produktion des EPOs führen und wäre für die gegebene Fragestellung von Nachteil.

Wird jedoch das Wachstum der Kontrollkultur (grün) mit dem Wachstum der Kulturen mit Medienwechsel (blau und hellblau) verglichen, sind unter Berücksichtigung der Messtoleranz der Zellzählung (10 %) keine Unterschiede erkennbar. Die maximale viable Zelldichte der Kontrollkultur betrug 148×10^5 Zellen mL^{-1} , die der Kultur mit zwei Medienwechseln 162×10^5 Zellen mL^{-1} und die mit einem Medienwechsel an Tag neun 144×10^5 Zellen mL^{-1} . Die Viabilität sank bei allen Kulturen ab Tag sieben und lag bei allen Produktionszelllinien an Tag neun unter 80 %. Bei der Kultur mit Zentrifugation und Resuspension im gleichen Kulturüberstand zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels (orange) zeigte sich an Tag sechs (Medienwechsel), dass durch die Zentrifugation die Zelldichte von 142×10^5 Zellen mL^{-1} auf 157×10^5 Zellen mL^{-1} stieg. Dies kann auf einen Volumenverlust des Überstandes zurückgeführt werden. Ab diesem Zeitpunkt stieg die viable Zelldichte der Kultur nicht mehr. Die Viabilität fiel von 96 % an Tag sieben auf 89 % an Tag acht. Im Vergleich dazu erreichte die Kontrollkultur (grün) an Tag sieben das Maximum der viablen Zelldichte von 148×10^5 Zellen mL^{-1} . Die Viabilität sank erst an Tag neun unter 90 %. Die Produktionskultur bei der zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels eine Zentrifugation durchgeführt wurde (gelb), zeigte ein Absinken in der viablen Zelldichte nach der Zentrifugation. Die Viabilität der Zellen lag zu diesem Zeitpunkt bei 79 %. Der Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels lag in der Absterbe-Phase und bereits einen Tag später lag die Viabilität aller Kulturen unter 50 %. Dies ist zum einen nachteilhaft für Rückschlüsse auf mögliche Einflüsse des Medienwechsels auf das Wachstum und zum anderen wird innerhalb von einem Tag bei geringer Viabilität vermutlich nicht genügend Produkt gebildet, um dieses zu analysieren. Demnach sollte bei

Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

späteren Kultivierungen darauf geachtet werden, dass erstens das Zellpellet bei einem Medienwechsel in exakt dem gleichen Volumen an konditioniertem Medium aufgenommen wird, wie zuvor abgenommen wurde und zweitens der zweite Medienwechsel zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt werden sollte.

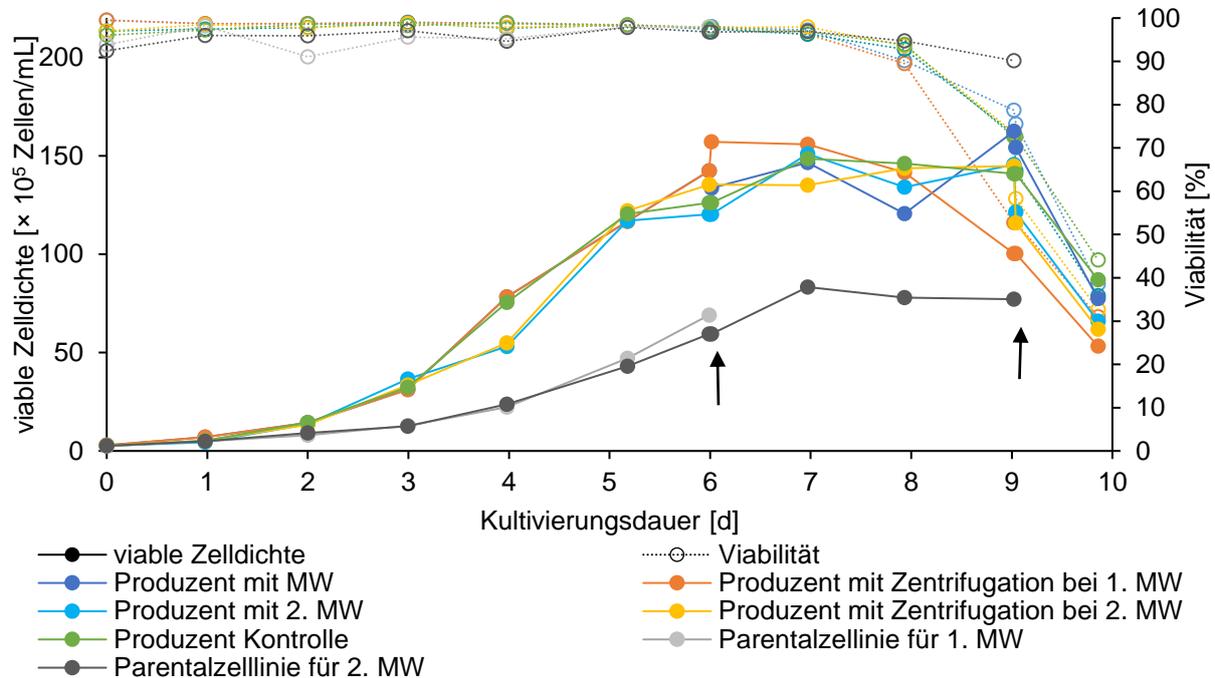


Abbildung 20: Kultivierung des EPO-Pools und der CHO-K1-Parentalzelllinie zur Überprüfung des Einflusses der Zentrifugation und der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zehn Tage bei je zwei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

In Abbildung 21 sind Glukose- und Laktatkonzentrationen im Kultivierungsverlauf aller Kulturen gezeigt. Der bereits vermutete Unterschied im Substratverbrauch durch unterschiedliche Zelldichten sieht sich hier bestätigt. Die Glukosekonzentration der Parentalzelllinie lag an Tag sechs bei 17 mM, und bei den Produktionszelllinien bei 8 mM. Die Laktatkonzentration der Parentalzellen stieg bis an Tag fünf bis auf 17 mM und begann ab Tag sechs zu sinken, bis sie an Tag neun bei annähernd 0 mM lag. Bei der Produktionszelllinie stieg die Laktatkonzentration bis Tag vier auf 21 mM und sank ab Tag fünf. An Tag acht lag die Konzentration bei annähernd 0 mM. Die Glukosekonzentration der Produktionszelllinie mit Medienwechsel war an Tag fünf bei 15 mM und nach dem Medienwechsel an Tag sechs bei 17 mM. Dieser Anstieg ist auf den Medienwechsel zurückzuführen. Die Glukosekonzentration in Kulturen der Produktionszelllinie betrug am vierten Tag 21 mM, wohingegen die Parentalkulturen eine Konzentration von 29 mM aufwies. Ab Tag vier sank die Laktatkonzentration in den Produktionskulturen. In den Kulturen der Parentalzelllinie lag die Glukosekonzentration an Tag fünf bei 21 mM. Ab diesem Zeitpunkt sank die Laktatkonzentration auch in den Kulturen der Parentalzelllinie.

Ergebnisse und Diskussion

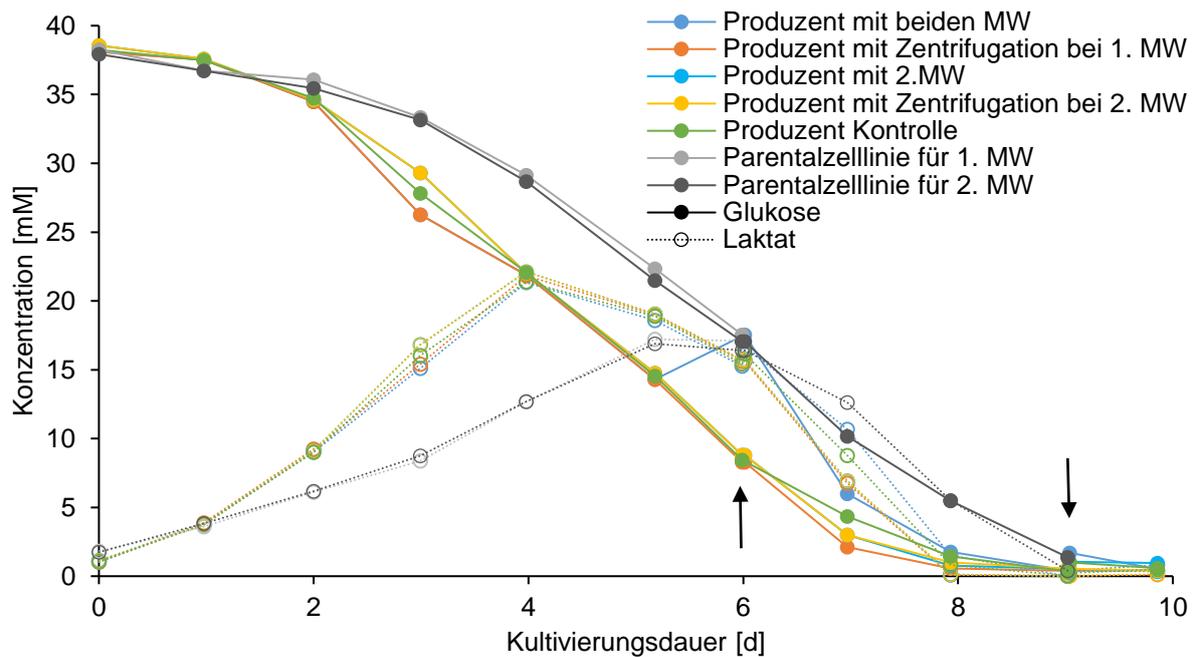


Abbildung 21: Glukose- und Laktatkonzentration in den Kultivierungen zur wachstumsspezifischen Probenahme mit einem EPO-produzierenden Zellpool und der Parentalzelllinie CHO-K1. Die Kultivierungen wurden als biologische Duplikate durchgeführt. Hier werden die Mittelwerte der jeweiligen Kultivierungen gezeigt.

Die hier aufgetretenen Unterschiede in der Verfügbarkeit von Nährstoffen schienen jedoch nur einen geringen Unterschied im Wachstum der Zellen mit Medienwechsel zu bewirken. Da jedoch bekannt ist, dass limitierende Glukosekonzentrationen einen Einfluss auf die Produktqualität haben (Chapman, A. E.; Calhoun, J. C.; 1988; Nyberg, G. B., et al.; 1999; Jayme, D., et al.; 1997; Liu, B., et al.; 2014; Seo, J. S., et al.; 2014), muss bei einem Medienwechsel gewährleistet sein, dass die Glukosekonzentrationen bei Kontrollkultur und Kultur mit Medienwechsel zur gleichen Zeit in die Limitierung gehen. Die Zentrifugation der Zellen scheint weder Auswirkungen auf den Glukoseverbrauch noch Einfluss auf das Wachstum zu haben, wenn der Medienwechsel mit exakten Volumina durchgeführt wird.

6.2. Einfluss der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum der CAP®-2B10-Zellen

Um zu überprüfen, ob sich der Medienwechsel auf das Wachstum der CAP®-2B10-Zellen (produzieren C1-INH) auswirkt, wurden parallel CAP®-2B10-Zellen und CAP®-Zellen in biologischen Triplikaten kultiviert. Neben den drei CAP®-2B10-Kulturen, bei denen zu zwei Zeitpunkten ein Medienwechsel stattfinden sollte, dienten weitere drei CAP®-2B10-Kulturen als Kontrollkulturen ohne Medienwechsel. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase und zu Beginn der Absterbe Phase wurden die Medienwechsel durchgeführt (vgl. Kapitel 2.5.2, Abbildung 11). Beim zweiten Medienwechsel wurden die CAP®-2B10-Kulturen aufgeteilt,

Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

sodass jeweils ein Teil der Kultur in Kulturüberstand der Parentalzelllinie aufgenommen wurde und der andere Teil weiter kultiviert wurde. In Abbildung 22 sind die viable Zelldichte und die Viabilität aller Kulturen gezeigt. Viable Zelldichte und Viabilität jeder Kultur wurden täglich dreifach bestimmt. Die erhaltenen Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen sind hier gezeigt. Alle sechs Kulturen wurden mit einer Zelldichte von $3-4 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} angeimpft. Am vierten Tag der Kultivierung wurde der erste Medienwechsel durchgeführt, am achten der zweite. In den ersten drei Tagen zeigten alle Kulturen ein annähernd analoges Wachstum. Ab dem vierten Tag erreichten die Parentalzelllinien und eine der Kontrollkulturen geringere Zelldichten als die Produktionszelllinien. Während diese von Tag sieben auf acht eine spezifische Wachstumsrate zwischen $0,06 \text{ d}^{-1}$ und $0,10 \text{ d}^{-1}$ aufwiesen, so lag diese bei den Parentalzelllinien maximal bei $0,04 \text{ d}^{-1}$. Ab dem achten Tag sank die viable Zelldichte aller CAP®-2B10-Kulturen. Bis Tag neun zeigten die Produktionszelllinien ein ähnliches Wachstum, unabhängig vom Medienwechsel.

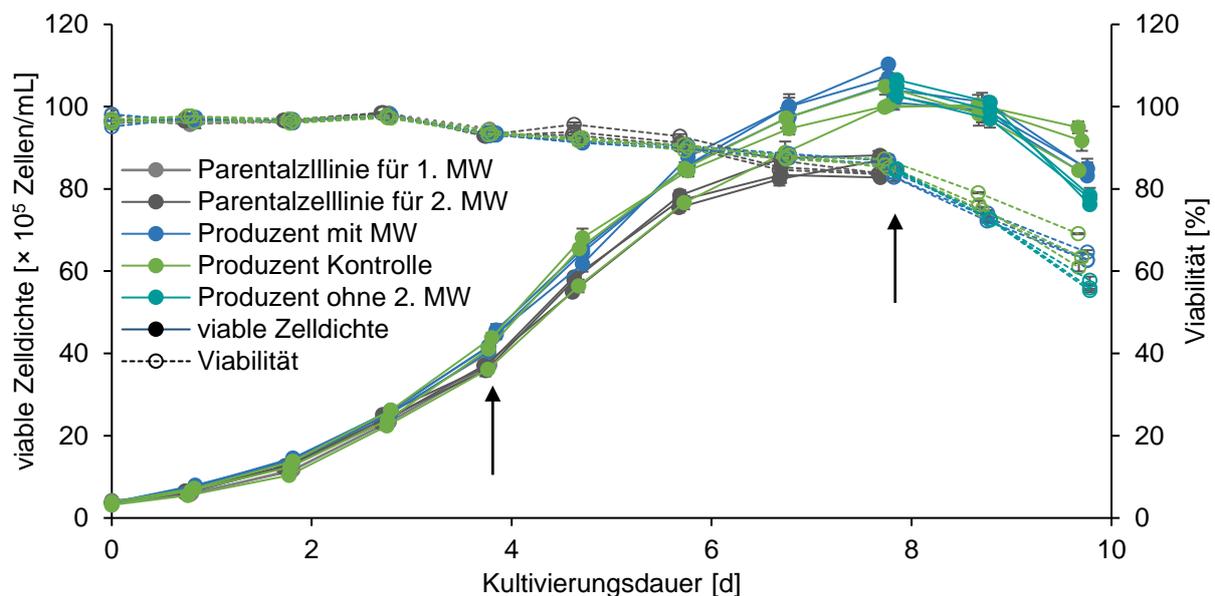


Abbildung 22: Kultivierung der CAP®- und der CAP®-2B10-Zelllinie zur Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zehn Tage bei je drei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

Lediglich an Tag zehn zeigten zwei Kontrollkulturen ohne Medienwechsel eine höhere viable Zelldichte ($92-95 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}) als die Kulturen mit einem Medienwechsel ($76-78 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}) und als die Kulturen mit zwei Medienwechseln ($83-85 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}). Die Viabilität aller Kulturen verlief bis zu Tag vier annähernd analog (ca. $93-97\%$). Die Viabilität der Produktionszelllinien sank von Tag vier bis Tag acht kontinuierlich von 93% auf 86% . Die Viabilität der Parentalzelllinien stieg von Tag vier auf Tag fünf von 93% auf 96% und sank in den nächsten drei Tagen auf 84% . Die Unterschiede in der Viabilität zwischen CAP®- und CAP®-2B10-Zellen waren geringfügig. Zwischen den

Ergebnisse und Diskussion

CAP®-2B10-Zellen mit und ohne den ersten Medienwechsel, sowie mit und ohne den zweiten Medienwechsel gab es keine deutlichen Unterschiede. Bei Betrachtung des Wachstums scheint der Medienwechsel keinen Einfluss auf selbiges zu haben. Diesbezüglich kann der Medienwechsel zur wachstumsspezifischen Produktanalytik eingesetzt werden.

Neben dem Wachstum wurden Glukose- und Laktatkonzentrationen sowie Aminosäurekonzentrationen während der Kultivierung bestimmt. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen sind in Abbildung 23 gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen. Die Glukosekonzentration verlief bei den Kultivierungen des Produzenten mit und ohne Medienwechsel analog. Sie sank vom ersten Tag von 33 bzw. 34 mM innerhalb von sieben Tagen auf ca. 0 mM. Bei einer Glukosekonzentration von 2 mM wurde gebildetes Laktat verstoffwechselt (vgl. Tag sechs bis sieben). Die Parentalzellen zeigten erst einen Tag später dieses Verhalten, da die Glukosekonzentration an Tag sechs 5 mM betrug.

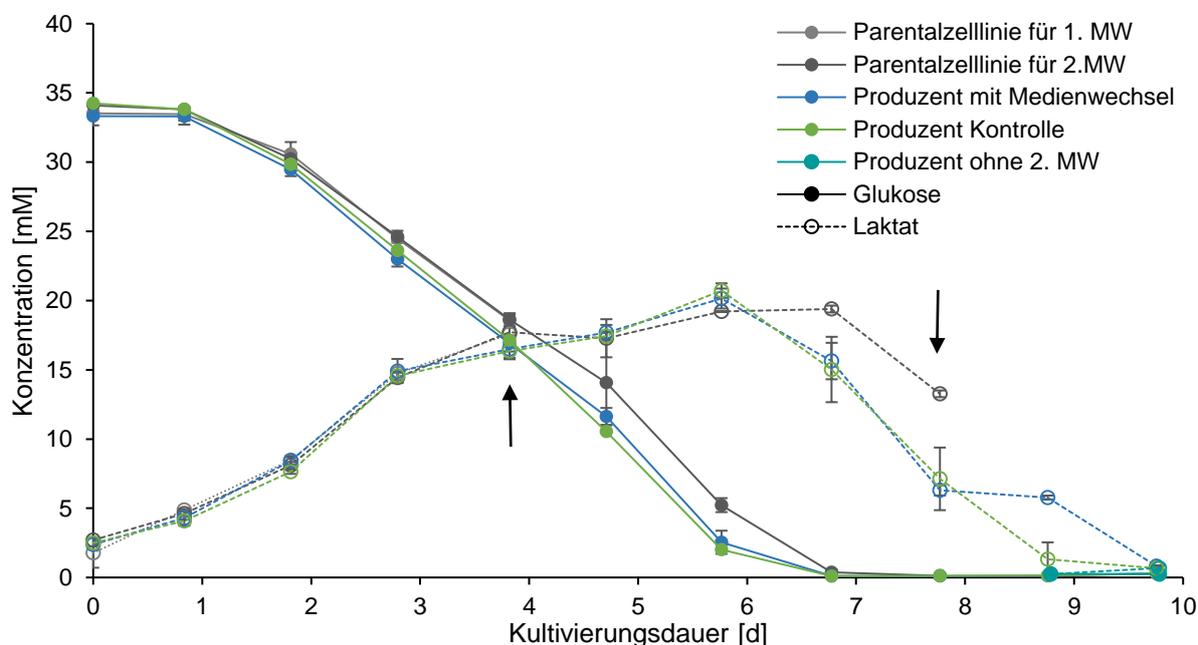


Abbildung 23: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierung der C1-INH produzierenden CAP®-Zellen und der Parentalzelllinien.

Dementsprechend war im Kulturüberstand, der für den zweiten Medienwechsel genutzt wurde, eine höhere Laktatkonzentration (13 mM) als im Überstand der Produktionszellen (6 mM). Dieser Konzentrationsunterschied resultierte in einer annähernd gleichbleibenden Laktatkonzentration in den Produktionskulturen mit zwei Medienwechseln (blau) von Tag acht auf Tag neun (6 mM), während die Laktatkonzentration in den Kontrollkulturen und in den Kulturen mit nur einem Medienwechsel (türkis) auf 1 mM bzw. 0 mM sank. Die höhere Laktatkonzentration am vorletzten Tag der Kultivierung schien jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum zu haben.

Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

In Abbildung 24 sind die Konzentrationen aller gemessenen Aminosäuren in den unterschiedlichen Kultivierungen über die Zeit gezeigt. Mit Pfeilen sind die Zeitpunkte des Medienwechsels markiert. Es sollte gezeigt werden, dass der Medienwechsel innerhalb der Kultivierung keinen Einfluss auf wichtige Bestandteile des Mediums wie Aminosäuren hat. Es wurden die Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Serin, Histidin, Arginin, Alanin, Tyrosin, Lysin, Methionin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan, Phenylalanin, Glycin und Threonin mittels HPLC (vgl. Kapitel 4.1.3) in den Kulturüberständen analysiert. Es wird nicht näher auf einzelne Aminosäuren eingegangen. Wichtig ist hier ein Überblick über die Verläufe der Aminosäurekonzentrationen in den Kulturen mit und ohne Medienwechsel.

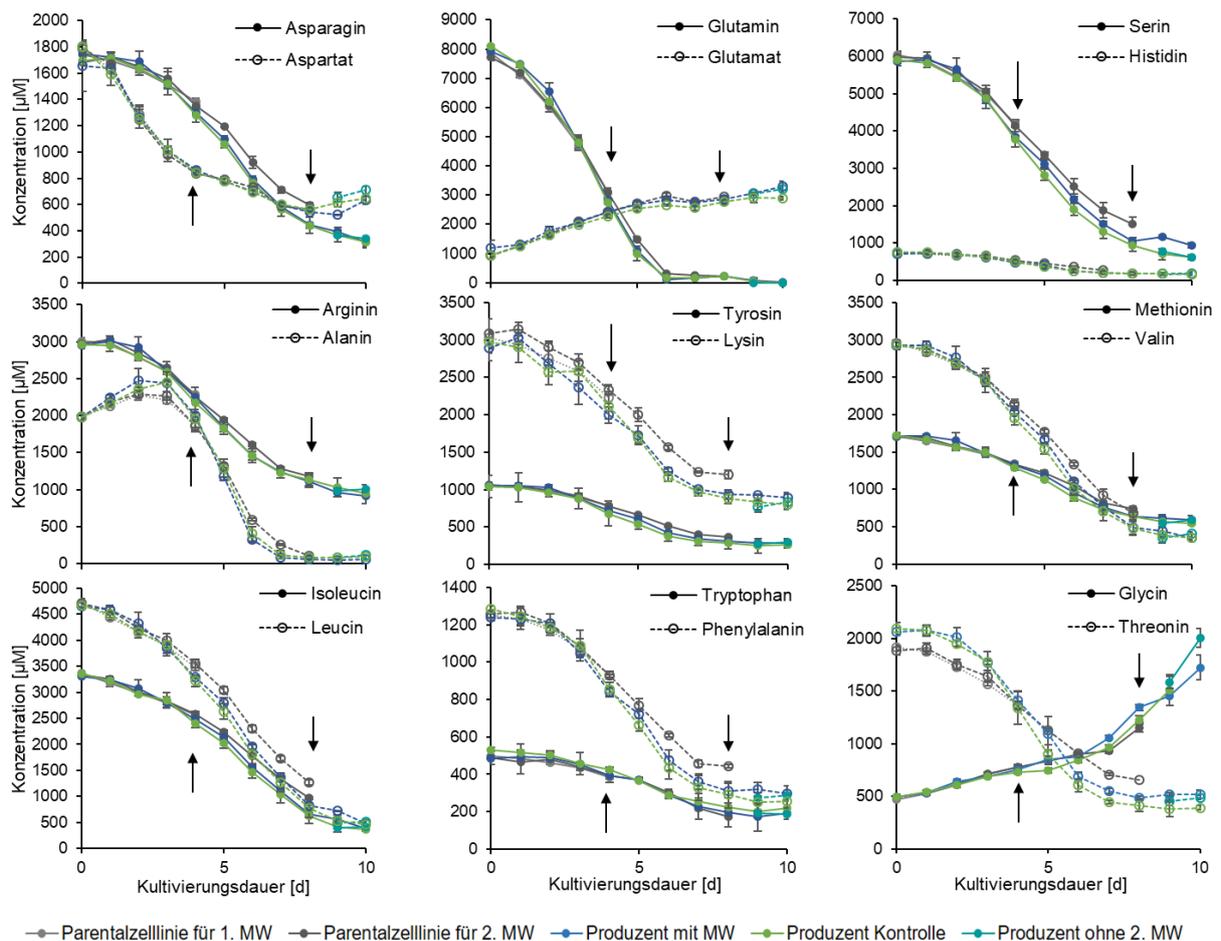


Abbildung 24: Gemessene Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der Kultivierungen der CAP®-Zellen und CAP®-2B10-Zellen mit und ohne Medienwechsel. Die Standardabweichungen resultieren aus den biologischen Triplikaten. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 22: hellgrau: Parentalzelllinie für 1. MW, dunkelgrau: Parentalzelllinie für den 2. MW, blau: Produzent mit MW, grün: Produzent Kontrolle, türkis: Produzent ohne 2. MW.

Zu erkennen ist, dass es keine nennenswerten Unterschiede in den Verläufen mit und ohne Medienwechsel gab. Demnach konnte ausgeschlossen werden, dass sich der Medienwechsel auf die Aminosäurekonzentration und auf das Zellwachstum auswirkt. Die Konzentrationen

Ergebnisse und Diskussion

der Aminosäuren sind nicht nur für das Wachstumsverhalten von Interesse, sondern auch für die Produktglykosylierung.

Die hier gesammelten Daten lassen nicht darauf schließen, dass der Medienwechsel die Glykosylierung im Vergleich zur Kontrollkultivierung verändert. Die beiden Aminosäuren Glutamin und Asparagin sind bekannt dafür, dass sie die Produktglykosylierung beeinflussen können (Chee Fung Wong, D., et al.; 2005; McCracken, N. A., et al.; 2014). Sie verlaufen in den Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel analog.

Es wurde vermutet, dass sich bei analogen Glukose- und Laktatkonzentrationsverläufen, sowie bei analogen Verläufen der Aminosäurekonzentrationen, Konzentrationen anderer Metabolite und Substrate im Verlauf der Kultivierung ähnlich verhalten. Somit sollten die äußeren Umstände für die Produktion des C1-INHs bei Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel annähernd gleich sein. Unter dieser Annahme können Produkte aus unterschiedlichen Wachstumsphasen mit Hilfe von Medienwechseln mit konditioniertem Medium durchgeführt werden. Um zu überprüfen, ob dies für die hier kultivierten CAP® und CAP®-2B10-Zellen ein Einzelfall ist, wurden die AAT produzierende Zelllinie AGE1.hn-AAT und die zugehörige Parentalzelllinie AGE1.hn mit Medienwechseln kultiviert.

6.3. Auswirkungen der wachstumsspezifischen Probenahme auf eine weitere Produktionszelllinie: AGE1.hn-AAT

Ein dritter Vorversuch wurde durchgeführt, um für eine weitere Zelllinie (AGE1.hn-AAT) zu testen, ob der Medienwechsel während der Kultivierung Auswirkungen auf das Wachstum hat. Um biologische Triplikate zu erhalten, wurden sechs Produktionskulturen (AGE1.hn-AAT) und sechs Parentalzellkulturen (AGE1.hn) mit einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen mL^{-1} angeimpft. Die Kulturen wurden parallel kultiviert. Ein Medienwechsel wurde an Tag vier bzw. Tag sieben durchgeführt. Das Wachstum der Zellen ist in Abbildung 25 gezeigt. Beim zweiten Medienwechsel wurden die drei Kulturen, bei denen an Tag vier bereits der Medienwechsel stattfand, auf je zwei Kultivierungsröhrchen aufgeteilt. Bei je einer der Kulturen wurde der Medienwechsel wie bereits beschrieben durchgeführt. Die zweite Kultur wurde analog zur ersten Kultur zentrifugiert, jedoch im gleichen Überstand wiederaufgenommen, um erneut Auswirkungen der Zentrifugation auf das Wachstum zu überprüfen (vgl. Kapitel 2.5.3). Zu erkennen ist, dass die Parentalzellen, die für den Medienwechsel an Tag vier zentrifugiert wurden (hellgrau), an Tag vier mit 28×10^5 Zellen mL^{-1} eine ähnliche Zelldichte erreichten wie die Produktionszelllinie mit $23\text{-}27 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Parentalzellkulturen für den zweiten Medienwechsel (dunkelgrau) erreichten an Tag sieben eine Zelldichte von $47\text{-}51 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Kontrollkulturen (grün) der AGE1.hn-AAT Zellen zeigten an Tag

Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

sieben eine Zelldichte von $54\text{-}57 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} und die drei Kulturen mit Medienwechsel (blau) zeigten eine viable Zelldichte von $57\text{-}63 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Viabilität aller Kulturen war bis zu Tag sechs annähernd konstant bei 97-99 %. Die Viabilität der Parentalzellkultur für den zweiten Medienwechsel blieb konstant. Die Viabilität der Produktionszellen sank an Tag sieben auf 93-98 %. Die viable Zelldichte der Kontrollkulturen und der gesplitteten Produktionskultur, bei der kein Medienwechsel stattfand (türkis), sank von Tag acht auf Tag neun von 65×10^5 Zellen mL^{-1} auf 59×10^5 Zellen mL^{-1} , bzw. von $62\text{-}65 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} auf $56\text{-}59 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Kulturen, bei denen ein zweiter Medienwechsel stattfand, blieben in der viablen Zelldichte von Tag acht auf Tag neun annähernd konstant. Ab Tag zehn lagen die Viabilitäten aller Kulturen unter 70 %. An Tag 12, bei einer Viabilität von unter 45 %, wurden die Kultivierungen abgebrochen. Die drei Kulturen mit zwei Medienwechseln erreichten die höchste maximale Zelldichte von $64\text{-}68 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} an Tag acht. Die Kulturen mit nur einem Medienwechsel erreichten eine maximale Zelldichte von $62\text{-}65 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} und die Kontrollkulturen von 55×10^5 Zellen mL^{-1} ebenfalls an Tag acht. Die Kultivierungen der unterschiedlich behandelten Kulturen zeigten einen ähnlichen Verlauf, wobei jedoch die Kulturen mit Medienwechsel eine höhere Zelldichte erreichten.

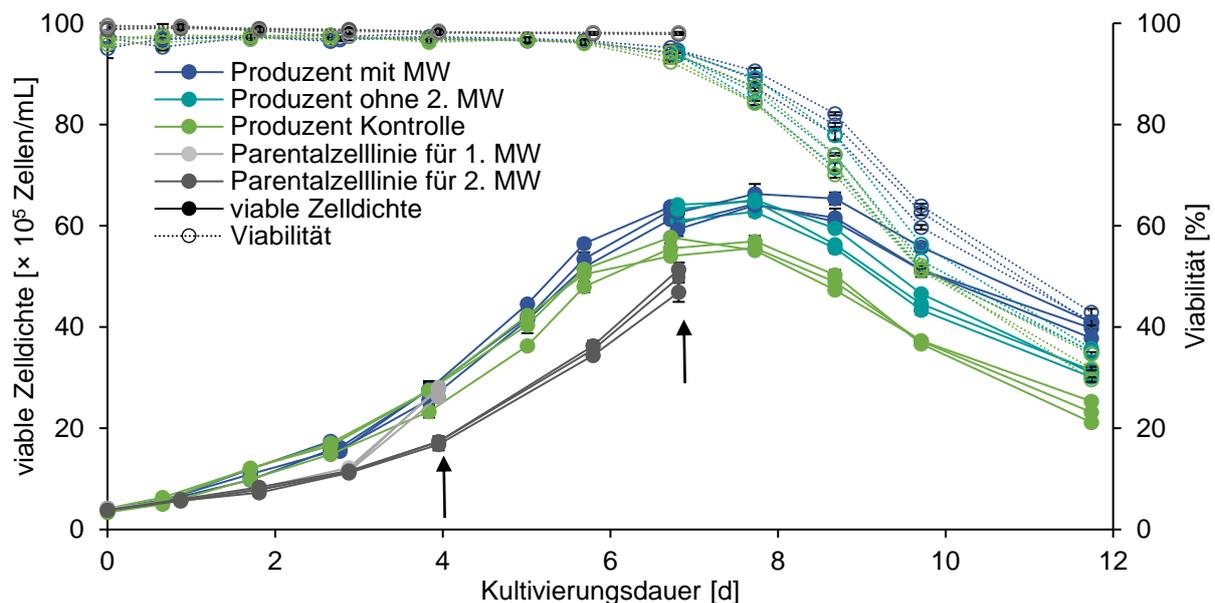


Abbildung 25: Kultivierung der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zelllinie zur Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zwölf Tage bei je drei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen werden hier gezeigt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

Um mögliche Unterschiede im Substratverbrauch der unterschiedlichen Kulturen verfolgen zu können, wurden die Glukose- und Laktatkonzentrationen in den Kulturen gemessen. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der biologischen Triplikate gezeigt. Zum Zeitpunkt des

Ergebnisse und Diskussion

ersten Medienwechsels war die Glukosekonzentration der Parentalzellkultur annähernd gleich der der Produktionszellkulturen (26 mM, bzw. 25 mM). Bis zum zweiten Medienwechsel gab es lediglich geringfügige Unterschiede in sowohl Glukose- als auch Laktatkonzentration.

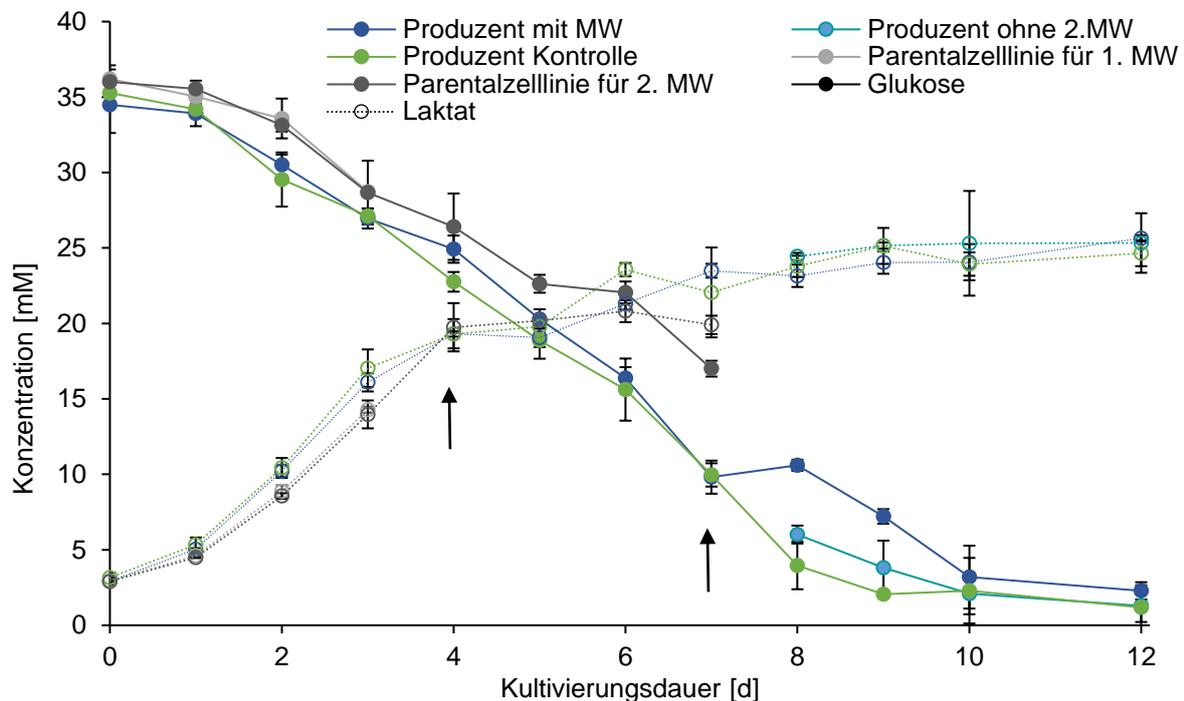


Abbildung 26: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierung der AAT produzierenden AGE1.hn-AAT-Zellen und der Parentalzelllinien. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

An Tag sieben lag die Glukosekonzentration bei den AGE1.hn-AAT-Kulturen bei 10 mM und die Laktatkonzentration bei 22-23 mM. Die Glukosekonzentration der Parentalzellkulturen lag an Tag sieben bei 17 mM und die Laktatkonzentration bei 20 mM. Dieser Unterschied zwischen den AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Kulturen erklärt die höhere Glukosekonzentration der Produktionskulturen einen Tag nach dem zweiten Medienwechsel (11 mM) im Vergleich zu den Kulturen ohne Medienwechsel (4 mM Kontrollkultur und 6 mM nur zentrifugierte Kultur). Zwei Tage nach dem Medienwechsel glichen sich die Glukosekonzentrationen aneinander an und lagen bei 2-3 mM. Die Laktatkonzentrationen der unterschiedlichen Produktionskulturen waren bereits an Tag acht innerhalb der Standardabweichung gleich (24-25 mM). Neben der Glukose- und Laktatkonzentration wurden auch die Aminosäurekonzentrationen der unterschiedlichen Kultivierungen gemessen. Die Ergebnisse aus den biologischen Triplikaten sind in Abbildung 27 gezeigt. Die Aminosäurekonzentrationen werden nicht im Einzelnen besprochen. Die Verläufe sollen eine Einschätzung über die möglichen Auswirkungen der Medienwechsel auf die Aminosäurekonzentrationen während der Kultivierungen liefern. Lediglich bei den Alanin- und Glycinkonzentrationen zeigen sich Unterschiede zwischen Kontrollkulturen und Produktionskulturen mit Medienwechsel, die auf den zweiten

Versuche zur wachstumsspezifischen Probenahme durch Medienwechsel

Medienwechsel zurückzuführen sind. Zu einem möglichen Einfluss von Alanin oder Glycin auf die Glykosylierung konnten keine Studien gefunden werden. Demnach kann die Abweichung dieser beiden Aminosäurekonzentrationen vernachlässigt werden. Diese Kultivierungen zeigen, dass Unterschiede im Wachstum der Parentalzellen und der Produktionszellen sich konsequenterweise auf die Substrat- und Metabolitkonzentrationen in den Kulturüberständen auswirken. Bei einem Medienwechsel hat dies zur Folge, dass im konditionierten Medium mehr oder weniger Substrat bzw. Metabolit zur Verfügung stehen, als bei einer Kultivierung ohne Medienwechsel.

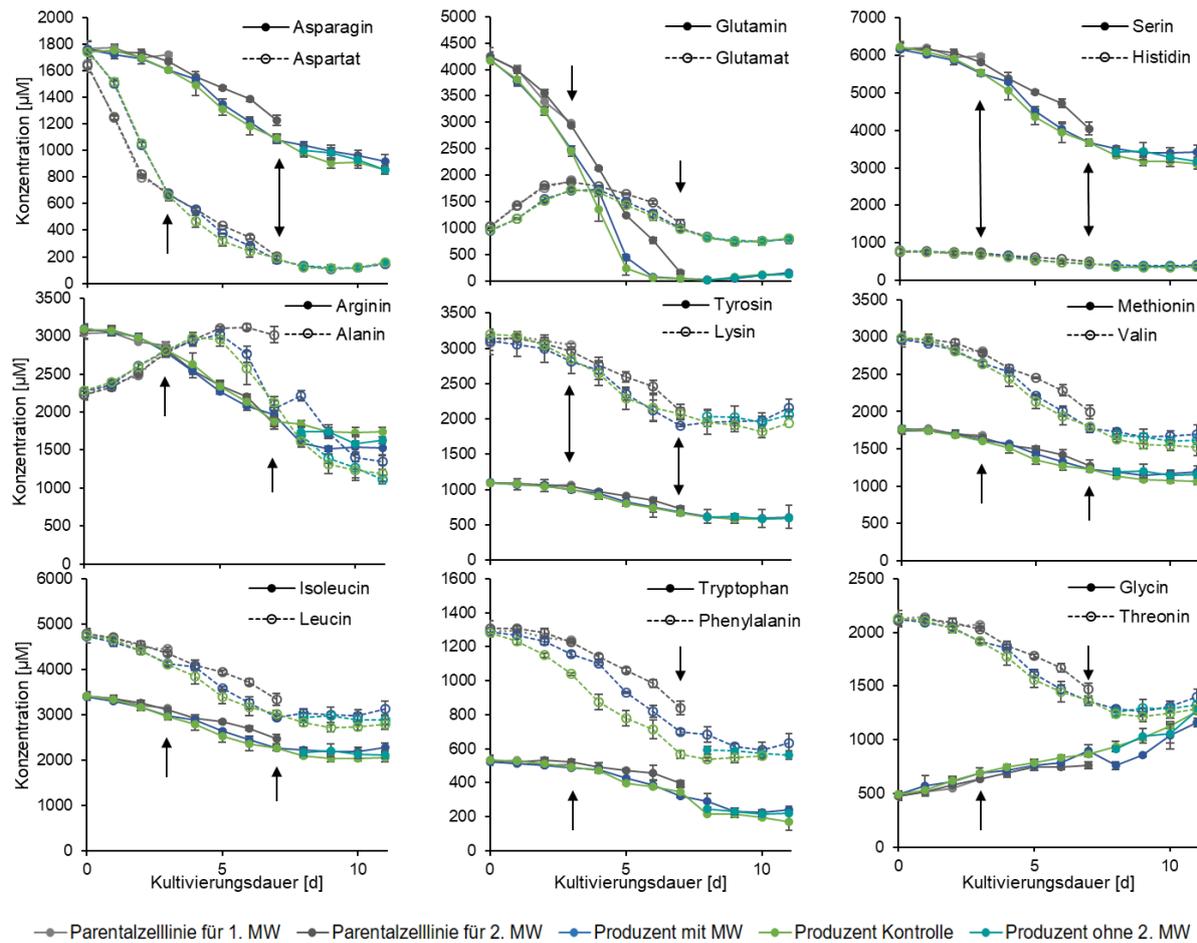


Abbildung 27: Gemessene Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der Kultivierungen der AGE1.hn-Zellen und AGE1.hn-AAT-Zellen mit und ohne Medienwechsel. Die Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 26: hellgrau: Parentalzelllinie für 1. MW, dunkelgrau: Parentalzelllinie für den 2. MW, blau: Produzent mit MW, grün: Produzent Kontrolle, türkis: Produzent ohne 2. MW.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch die hier gezeigten geringfügigen Unterschiede Auswirkungen auf die Produktqualität haben können, wurden die Kultivierungsbedingungen der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zellen angeglichen (vgl. Kapitel 2.4.2 und Kapitel 5.2). In diesem Versuch zum Medienwechsel wurden die

Ergebnisse und Diskussion

Produktions- und Parentalzelllinien bei unterschiedlicher Umdrehung des Schüttlers und in unterschiedlichen Kolben (mit bzw. ohne Schikane) kultiviert. Für den Hauptversuch wurden beide Zelllinien unter gleichen Bedingungen (185 rpm in Kolben ohne Schikane) kultiviert, um ein möglichst gleiches Wachstum von Parental- und Produktionszelllinie zu erhalten. Dadurch sollte ein konditioniertes Medium entstehen, welches in der Zusammensetzung dem Überstand der Produktionszellen glich.

6.4. Fazit aus den Vorversuchen

Diese drei Vorversuche zeigen, dass eine wachstumsspezifische Probenahme während einer Kultivierung durch einen Medienwechsel mit konditioniertem Medium erfolgreich durchgeführt werden kann, ohne Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und somit vermutlich ohne Auswirkungen auf die Produktqualität zu haben. Es wurden eine CHO-Zelllinie und zwei humane Zelllinien dafür getestet. Dies sollte zeigen, dass die wachstumsspezifische Probenahme für Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs eingesetzt werden kann. Es wurde zudem aufgezeigt, dass ein Medienwechsel ohne Auswirkungen auf das Wachstum nur unter bestimmten Bedingungen funktionieren kann:

1. Parental- und Produktionszelllinie sollten ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigen.
2. Die viable Zelldichte vor und nach dem Medienwechsel muss gleichbleiben.

Die erste Bedingung kann unter Umständen nur näherungsweise eingehalten werden, da Unterschiede im Wachstumsverhalten auf die Zelllinienentwicklung der Produktionszelllinie zurückgeführt werden können. Da das Ziel der Zelllinienentwicklung neben der Produktqualität auch die Produktquantität ist, werden Zellen auf hohe viable Zelldichten bzw. auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und die Produktivität selektiert. Je mehr Zellen ein Protein produzieren, desto höher ist der volumetrische Produkttiter. Es wurde beispielsweise die Expression von Genen aus den Bereichen der Zellproliferation oder der Apoptose verändert, um ein verbessertes Zell-Zeit-Integral zu erlangen (Fussenegger, M., et al.; 1997; Wong, D. C. F., et al.; 2006; Figueroa, B., et al.; 2007). Darum ist es nicht verwunderlich, dass sich das Wachstum von Parental- und Produktionszelllinie unterscheidet. Können diese Unterschiede nicht durch angepasste Kultivierungsbedingungen ausgeglichen werden, so müssen Unterschiede in der Zusammensetzung der Kulturüberstände bei der Analytik berücksichtigt werden und ihr möglicher Einfluss auf die Produktqualität erörtert werden. Um die zweite Bedingung zu erfüllen, müssen die abzentrifugierten Zellen in exakt dem Volumen an konditioniertem Medium aufgenommen werden, welches zuvor abgenommen wurde. Zusätzlich muss ein Verlust an Zellen bei der Zellabscheidung vermieden werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von fünf Kultivierungen (drei Kultivierungen mit CHO-Zellen zur Produktion von EPO, mAb und ATIII, eine mit CAP®-Zellen zur Produktion vom C1-INH und eine mit AGE1.hn Zellen, die AAT produzieren) mit wachstumsspezifischen Probenahmen dargestellt.

7. Hauptversuche

Es wurden Kultivierungen mit fünf unterschiedlichen Produktionszelllinien und den zugehörigen Parentalzelllinien für die wachstumsspezifische Probenahme durchgeführt (vgl. Kapitel 2.6 und Abbildung 12). Die jeweiligen Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen und den Kontrollkultivierungen wurden aufgereinigt (vgl. Kapitel 3). Im Anschluss wurden die Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen auf ihre N-Glykosylierungen hin analysiert und verglichen. In Tabelle 11 sind die kultivierten Zellen und das jeweilige Produkt aufgelistet.

Tabelle 11: Zusammenfassung der für die wachstumsspezifische Produktanalytik kultivierten Zelllinien und die zugehörigen Produkte.

Produktionszelllinie	Verwendete Parentalzelllinie	Produkt
CHO-C4	CHO-K1	EPO
CAP®-1D9	CAP®	C1-INH
AGE1.hn-AAT	AGE1.hn	AAT
CHO-ATIII	CHO-K1	ATIII
mAb-produzierender CHO-XL99-Klon	XL99	mAb

In den folgenden Kapiteln werden die Kultivierungsergebnisse, sowie die Ergebnisse der Aufarbeitung dargestellt. Des Weiteren wird die Aktivität von Sialidasen im Kulturüberstand während der Kultivierung thematisiert. Abschließend werden die Ergebnisse der Produktanalytik für die unterschiedlichen Produkte erörtert.

7.1. Kultivierungsdaten und Ergebnisse der Aufarbeitungen

Neben dem Wachstumsverhalten werden Ergebnisse der Glukose- und Laktatkonzentrationen sowie die Konzentrationen der gemessenen Aminosäuren gezeigt. Diese Daten sollten bei einer wachstumsspezifischen Probenahme erhoben werden, um zu überprüfen, ob und wie stark sich die Kultivierungsbedingungen der Kulturen mit und ohne Medienwechsel unterscheiden. Des Weiteren soll anhand dieser Ergebnisse eine Einschätzung getroffen werden, ob mögliche Unterschiede Einfluss auf die

Ergebnisse und Diskussion

Produktglykosylierung haben können. Diese Bewertung der Kultivierungsergebnisse wird in der Diskussion der Ergebnisse der Produktanalytik berücksichtigt.

7.1.1. Wachstumsspezifische Probenahme von EPO-produzierenden CHO-Kulturen

Für die Analytik von rekombinant produziertem EPO wurde, anders als in den Vorversuchen, ein isolierter Zellklon CHO-C4 verwendet. Als Parentalzelle diente CHO-K1. Es wurde untersucht, ob sich das produzierte EPO in den unterschiedlichen Wachstumsphasen unterscheidet. Dazu wurde während der Kultivierung die etablierte wachstumsspezifische Probenahme durchgeführt, das Produkt aus den so gewonnenen Kulturüberständen aufgearbeitet und mittels CZE analysiert (vgl. Kapitel 7.4.1).

7.1.1.1. Kultivierung zur Produktion von EPO

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden je sechs Schüttelkolben mit der Produktions- und sechs Schüttelkoben mit der Parentalzelllinie mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen mL^{-1} in je 200 mL Medium angeimpft. Täglich wurden Proben für die viable Zelldichte, Viabilität, Glukose- und Laktatkonzentration, Aminosäurekonzentration und Produktkonzentration gezogen. Die Medienwechsel fanden an Tag drei und an Tag sechs statt. Die Kultivierung wurde nach acht Tagen beendet, als die Viabilität unter 40 % lag.

In Abbildung 28 sind die viable Zelldichte und die Viabilität der 12 Zellkulturen über die gesamte Kultivierungsdauer gezeigt. Alle Kulturen für den ersten Medienwechsel erreichte an Tag drei eine Lebendzellendichte von $32\text{-}39 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels, an Tag sechs, lagen die viablen Zelldichten zwischen 48 und 57×10^5 Zellen mL^{-1} . Die maximale Zelldichte der Produzenten mit Medienwechsel lag mit 65×10^5 Zellen mL^{-1} unter der der Kontrollkultur (72×10^5 Zellen mL^{-1}). Die Viabilität aller Kulturen war bis Tag vier annähernd konstant bei 98-99 %. Innerhalb der nächsten vier Tage sank sie bei allen Kulturen auf unter 40 %. Der Verlauf der viablen Zelldichten und der Viabilität der Kulturen mit und ohne Medienwechsel waren vergleichbar. Bei Betrachtung der Glukose- und Laktatkonzentrationen fallen keine Unterschiede zwischen den Produktionskulturen mit und ohne Medienwechsel auf (vgl. Abbildung 29). Bis Tag drei sank die Glukosekonzentration bei allen Kulturen von anfänglichen 15 mM auf 1 mM. Die Laktatkonzentration stieg von 0 mM auf 22 mM. Ab Tag drei sank die Laktatkonzentration, da ein metabolischer *Shift* eintrat, nachdem die Glukose fast vollständig aufgebraucht war. Bis zum zweiten Medienwechsel an Tag sechs sank die Laktatkonzentration auf 3 mM und blieb bis Tag acht annähernd konstant.

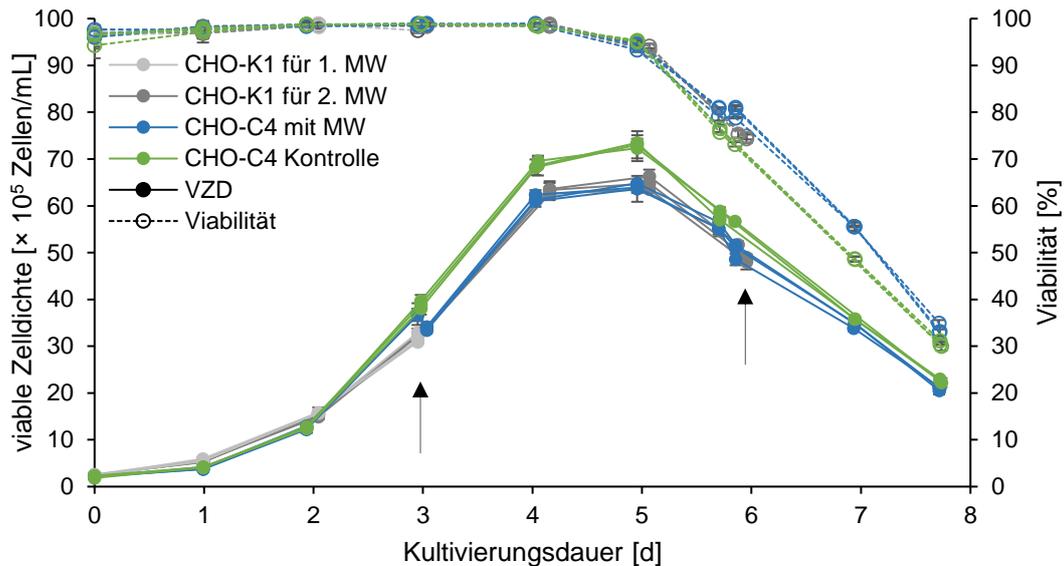


Abbildung 28: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CHO-K1 und CHO-C4-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es wurden die Mittelwerte der drei Messungen berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Triplikate an. Die Zeitpunkte der Medienwechsel sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Es ist zwar bekannt, dass eine Limitierung in der Glukosekonzentration zu einer veränderten Produktglykosylierung führen kann (Jayme, D., et al.; 1997; Liu, B., et al.; 2014), jedoch verlaufen die Glukosekonzentrationen in Kontrollkultur und Kultur mit wachstumsspezifischer Probenahme analog. Somit ist die Vergleichbarkeit der Produkte hinsichtlich einer veränderten Glykosylierung durch die Glukosekonzentration vermutlich nicht beeinträchtigt.

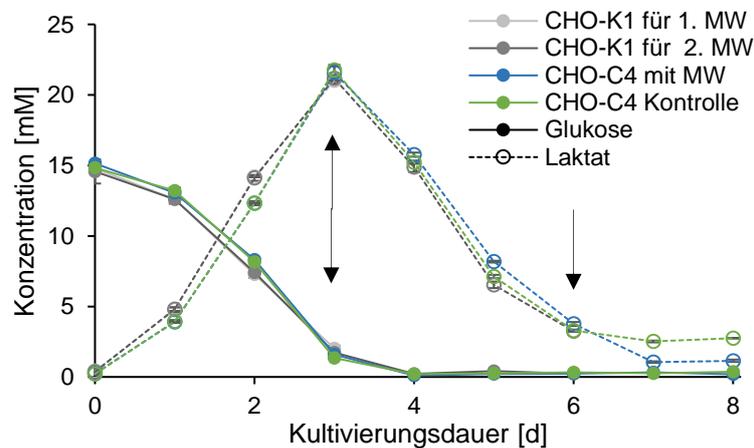


Abbildung 29: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CHO-K1- und der CHO-C4-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Medienwechsel.

Es gab keine Unterschiede zwischen den Konzentrationsverläufen der Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Serin, Histidin, Glycin, Threonin, Tyrosin, Lysin, Methionin, Valin, Tryptophan, Phenylalanin sowie Isoleucin und Leucin der Produktionskulturen mit und ohne Medienwechsel (vgl. Abbildung 30). Lediglich die Verläufe von Glutamat, Aspartat und Alanin

Ergebnisse und Diskussion

unterschieden sich. Dies ist auf die Konzentrationen dieser Aminosäuren in den Parentalzellkulturen zurückzuführen. Die Aspartatkonzentration stieg bei den Parentalzellkulturen in den ersten drei Tagen von 789 μM auf 1082 μM , während die Konzentration in den Produktionskulturen von 751 μM auf 341 μM sank, was für einen veränderten Stoffwechsel der Produktionszellen im Vergleich zu den Parentalzellen sprach. Dementsprechend war die Aspartatkonzentration in den Produktionskulturen am Tag nach dem Medienwechsel höher, als in den Kontrollkulturen.

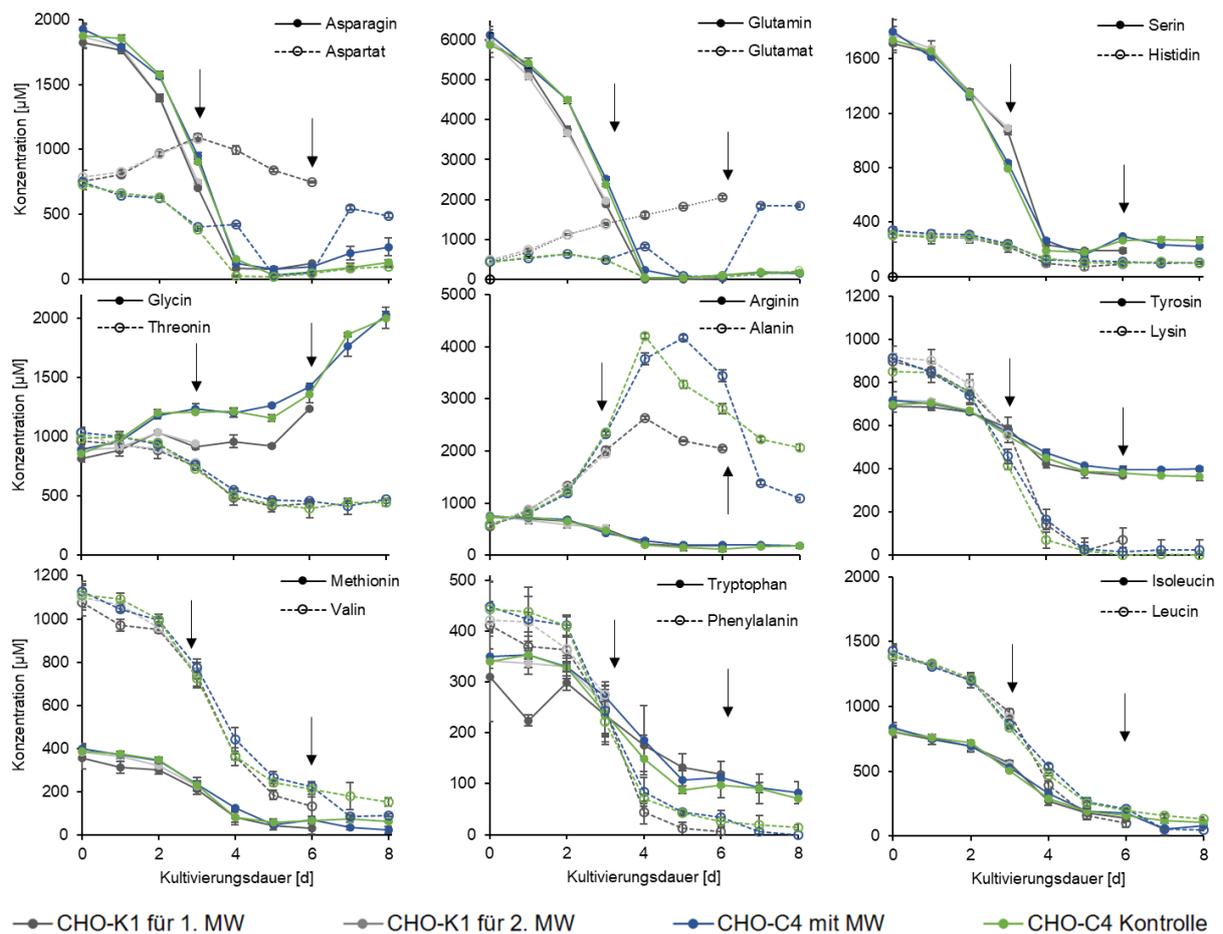


Abbildung 30: Konzentrationen der gemessenen Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der CHO-K1- und der CHO-C4-Zellen mit Medienwechsel an Tag drei und sechs (durch Pfeile gekennzeichnet). Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 29: hellgrau: CHO-K1 für 1. MW, dunkelgrau: CHO-K1 für den 2. MW, blau: CHO-C4 mit MW, grün: CHO-C4 Kontrolle.

Dies war sowohl nach dem ersten als auch nach dem zweiten Medienwechsel der Fall. Eine Bedeutung von Aspartat für die Produktglykosylierung ist bislang nicht bekannt. Darum wird der Unterschied der Aspartatkonzentration zwischen Kontrollkultivierung und Kultivierung mit wachstumsspezifischer Probenahme bei der späteren Diskussion einer möglichen veränderten Produktglykosylierung vernachlässigt. Ähnlich verhielt es sich mit Glutamat. Während die Glutamatkonzentration in den Parentalzellkulturen bis Tag drei, bzw. Tag sechs

von 423 μM auf 1368 μM , bzw. 2062 μM anstieg, stieg die Konzentration der Produktionskulturen bis Tag zwei lediglich auf 638 μM und sank bis Tag drei auf 482 μM . Am Tag nach dem Medienwechsel erreichten die Kontrollkulturen eine Konzentration von annähernd 0 μM , wobei die Konzentration in den Kulturen mit Medienwechsel durch diesen stieg. Nach dem zweiten Medienwechsel stieg die Glutamatkonzentration erneut von ca. 100 μM auf 1833 μM . Glutamat spielt zwar beim Abbau von Aminosäuren eine Rolle und kann über α -Ketoglutarat in den TCA eingespeist werden, aber eine direkte Beeinflussung der Produktglykosylierung konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Darum ist auch dieser Unterschied für den Vergleich der Produktglykosylierung in den unterschiedlichen Wachstumsphasen wahrscheinlich vernachlässigbar.

7.1.1.2. EPO-Quantifizierung und Ergebnisse der Aufarbeitung

In Abbildung 31 (A) sind die Produktkonzentrationen (EPO-Bestimmung, vgl. Kapitel 4.2.1.2) im Verlauf der Kultivierung gezeigt. Nach dem ersten Medienwechsel an Tag drei betrug die Produktkonzentration in den Kontrollkulturen ca. das Doppelte (22 mg/L) der Kulturen mit Medienwechsel (11 mg/L). Für die folgenden Tage bis zum zweiten Medienwechsel konnte innerhalb der Standardabweichungen kein Anstieg der EPO-Konzentration verzeichnet werden. Zum Erntezeitpunkt lag die Produktkonzentration der Kontrollkulturen bei 55 mg/L und die der Kulturen mit Medienwechsel bei 23 mg/L. Die absolute Produktmenge ist in Abbildung 31 (B) gezeigt. Zwischen der aufsummierten Produktmenge aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen und der Produktmenge der Kontrollkultur gab es keine Unterschiede. Die EPO-Konzentration war während der gesamten Kultivierung gering. Dies wurde bei der SDS-PAGE deutlich (vgl. Anhang: Abbildung-A 2). Es konnte keine Produktbande identifiziert werden. Jedoch finden sich in der Literatur ähnliche Produkttiter. So wurde in *Batch*-Kultivierungen von transient transfizierten HEK293-Zellen ein maximaler Produkttiter von 18 mg/ mL drei Tage nach der Transfektion erreicht (Sun, X., et al.; 2006). Da es sich in der genannten Studie um humane Zellen handelt, sind die Ergebnisse nicht gut vergleichbar. Jedoch wurden auch in CHO-Zellen ähnliche oder geringere Konzentrationen erreicht. So berichteten Ku et al. 2007 in transient transfizierten CHO-K1-Zellen zwei Tage nach Transfektion von 0,24-0,50 mg/L und bei stabil transfizierten Zellen zwei Tage nach Medienwechsel von 0,005 mg/L (Ku, S. C. Y., et al.; 2008).

Ergebnisse und Diskussion

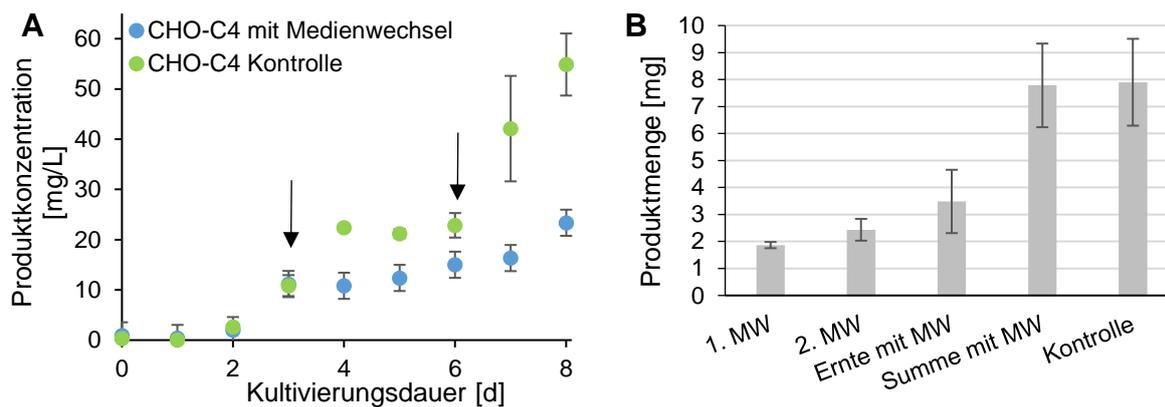


Abbildung 31: (A) EPO-Konzentration im Kultivierungsverlauf. Die Zeitpunkte des Medienwechsels sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Absolute Proteinmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der absoluten Produktmengen der CHO-C4-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In dieser Arbeit wurde mit EPO-produzierenden CHO-K1 Zellen nach zwei Tagen Kultivierung eine Produktkonzentration von 2,7 mg/L erreicht. Dies ist das 540fache der stabil transfizierten und das 5,4fache der transient transfizierten Zellen. Krämer zeigte 2014 mit stabil transfizierten CHO-K1-Zellen eine EPO-Konzentration von 15 mg/L nach drei Tagen Kultivierung (Krämer, O.; 2014), die etwas über der hier gezeigten Konzentration von 11 mg/L an Tag drei der Kultivierung lag. Die absoluten EPO-Mengen in den Überständen, sowie die EPO-Mengen in den Eluaten der Aufarbeitung, die wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt wurde, sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: EPO-Mengen vor und nach Aufarbeitung der unterschiedlichen Überstände

Aus Überstand von	m_{EPO} [μ g] im Überstand	m_{EPO} [μ g] nach Aufarbeitung
Kontrollkultur 1	6600	79
Kontrollkultur 2	9700	122
Kontrollkultur 3	7400	74
Kultur 1, Tag 0-3	2000	82
Kultur 2, Tag 0-3	1800	155
Kultur 3, Tag 0-3	1800	174
Kultur 1, Tag 4-6	2800	167
Kultur 2, Tag 4-6	2500	160
Kultur 3, Tag 4-6	2000	174
Kultur 1, Tag 6-8	3750	-
Kultur 2, Tag 6-8	4500	80
Kultur 3, Tag 6-8	2200	46

Die Aufarbeitung vom Überstand der Kultur 1, Tag 6-8 ist fehlgeschlagen. Im Eluat der Aufarbeitung konnte kein EPO nachgewiesen werden. Dies kann mit einem schnellen Verlust der Kapazität der Affinitätssäule begründet werden. Aufgrund der geringen Produktmenge

wurde das EPO aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen mittels CZE analysiert (vgl. Kapitel 7.4.1).

7.1.2. Wachstumsspezifische Probenahme eines mAb

Die zuvor etablierte wachstumsspezifische Probenahme wurde mit den mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen durchgeführt, um die Glykosylierung des Produktes, ein IgG Antikörper, in unterschiedlichen Phasen der Kultivierung untersuchen zu können. Der mAb besitzt an jeder schweren Kette eine Glykosylierungsstelle, wodurch die Heterogenität der Glykosylierungen begrenzt sind. Im Folgenden werden die für die Kultivierung relevanten Daten besprochen. Im Kapitel 7.4 folgen die Ergebnisse der Produkt-bezogenen Analytik.

7.1.2.1. Kultivierung zur mAb-Produktion

Sowohl die Parentalzelllinie XL99 als auch die mAb-produzierende Zelllinie CHO-XL99 wurden mit einer viablen Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} in 80 mL Kultivierungsmedium inokuliert. Die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben mit biologischen Triplikaten. Der erste Medienwechsel wurde an Tag drei durchgeführt und der zweite an Tag sechs. Das Wachstum der Kulturen ist in Abbildung 32 dargestellt. Bis Tag drei wuchsen alle Kulturen ähnlich und die viable Zelldichte stieg von $2,5 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} auf 42×10^5 Zellen mL^{-1} (Kulturen mit Medienwechsel), 48×10^5 Zellen mL^{-1} (Kontrollkultur), bzw. 52×10^5 Zellen mL^{-1} (Parentalzelllinie). Bis Tag sechs wuchsen die Kulturen mit Medienwechsel auf $106-116 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Die Kontrollkulturen erreichten etwas höhere Zelldichten von $122-134 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} und die Parentalzellkulturen zeigten eine höhere viable Zelldichte von $180-193 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} . Das Wachstum der Kulturen mit Medienwechsel verlangsamte sich bereits zwischen Tag fünf und sechs ($\mu=0,077 \text{ d}^{-1}$). Die Kontrollkulturen wiesen im gleichen Zeitraum eine spezifische Wachstumsrate von durchschnittlich $2,25 \text{ d}^{-1}$ auf. Einen Tag nach dem Medienwechsel zeigte sich dieser Unterschied deutlicher. Die viable Zelldichte der Kulturen mit Medienwechsel sank an Tag sieben auf 92×10^5 Zellen mL^{-1} , während die der Kontrollkulturen auf $155-161 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} stieg. Die Viabilität der Kulturen mit Medienwechsel sank von Tag sechs auf Tag sieben von 96 % auf 77-82 %. Bei den Kultivierungen ohne Medienwechsel sank die Viabilität im gleichen Zeitraum lediglich von 96 % auf 92 %. Bei Betrachtung der Glukose- und Laktatkonzentrationen ist zu sehen, dass die Glukosekonzentration der Parentalzellkulturen an Tag fünf annähernd 0 mM betrug. Somit war die Hauptkohlenstoffquelle zwar früher aufgebraucht, als die der Produktionskulturen (vgl. Abbildung 33), jedoch lag die Glukosekonzentration bei sowohl den Kulturen mit als auch ohne Medienwechsel bei 0 mM. Auch die Laktatkonzentration ging bei den

Ergebnisse und Diskussion

Parentalzellkulturen bereits an Tag sechs gegen 0 mM und die der Produktionskulturen erst an Tag sieben. Dies ist durch das schnellere Wachstum der Parentalzellkulturen bis Tag sechs zu erklären.

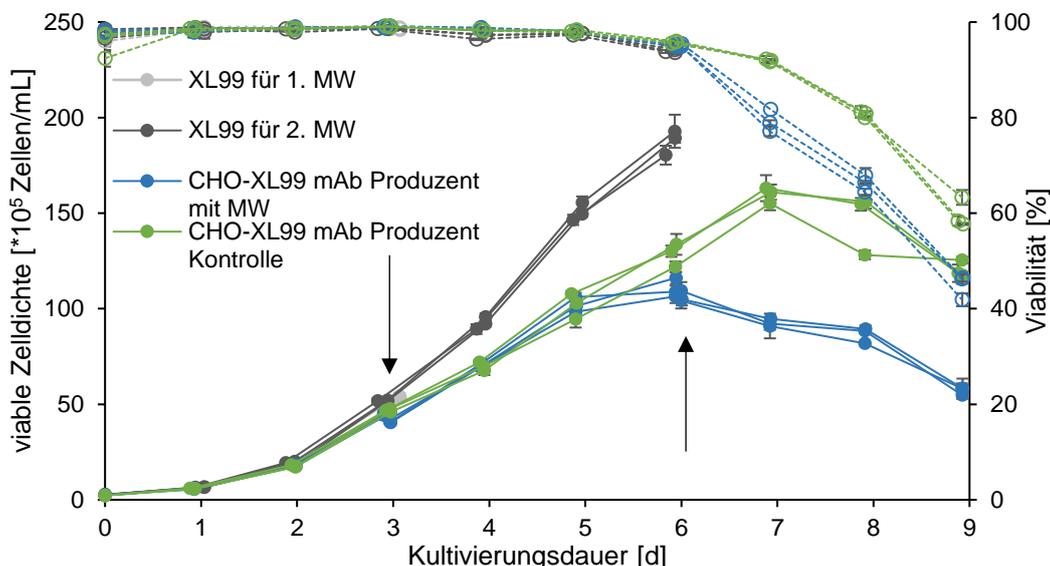


Abbildung 32: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der XL99 und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

Eine Glukoselimitierung kann sich auf die Produktglykosylierung auswirken (vgl. Kapitel 1.3.2). So wurde beispielsweise 2014 gezeigt, dass der Anteil an glykosyliertem mAb bei Glukoselimitierung in einer CHO-Zellkultur abnahm (Liu, B., et al.; 2014). Des Weiteren könnte die Heterogenität der Glykosylierung zunehmen, wie Jayme et al. berichteten (Jayme, D., et al.; 1997).

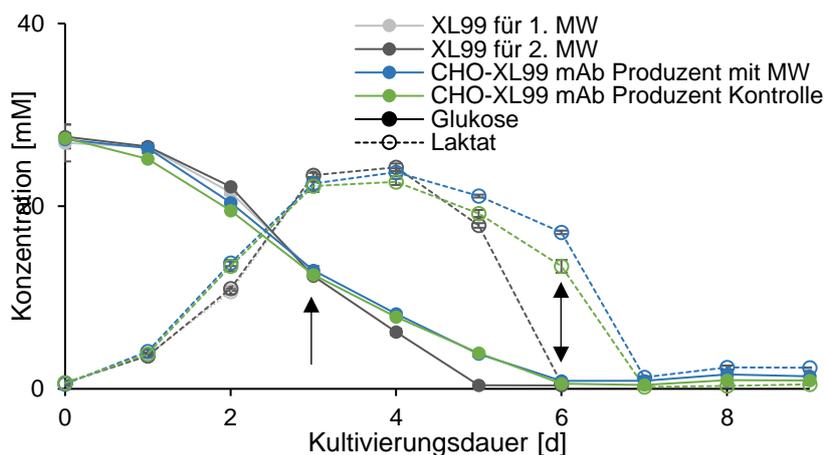


Abbildung 33: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der XL99- und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus den Konzentrationen der biologischen Triplikate gebildet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Hier war an Tag drei (1. MW) keine Limitierung der Glukose zu erkennen (12,5 mM). Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels trat eine Limitierung sowohl in den Kontrollkulturen als

auch in den Kulturen mit Medienwechsel ein. Demnach liefert die Glukosekonzentration keinen Grund für abweichende Produktglykosylierungen in den Kulturen mit bzw. ohne Medienwechsel.

Werden die Aminosäurekonzentrationen der Produktionskulturen mit und ohne Medienwechsel verglichen, so fallen nur bei wenigen Aminosäuren deutliche Unterschiede auf. Die Glycinkonzentration sank von Tag sechs auf Tag sieben in der Kontrollkultur von 3363 μM auf 3126 μM , während die Glycinkonzentration der Kulturen mit Medienwechsel von 3779 μM auf 4298 μM anstieg. Zum Ende der Kultivierung näherten sich die Konzentrationen auf 5021 μM (Kontrollkulturen) und 4813 μM (Kulturen mit Medienwechsel) an.

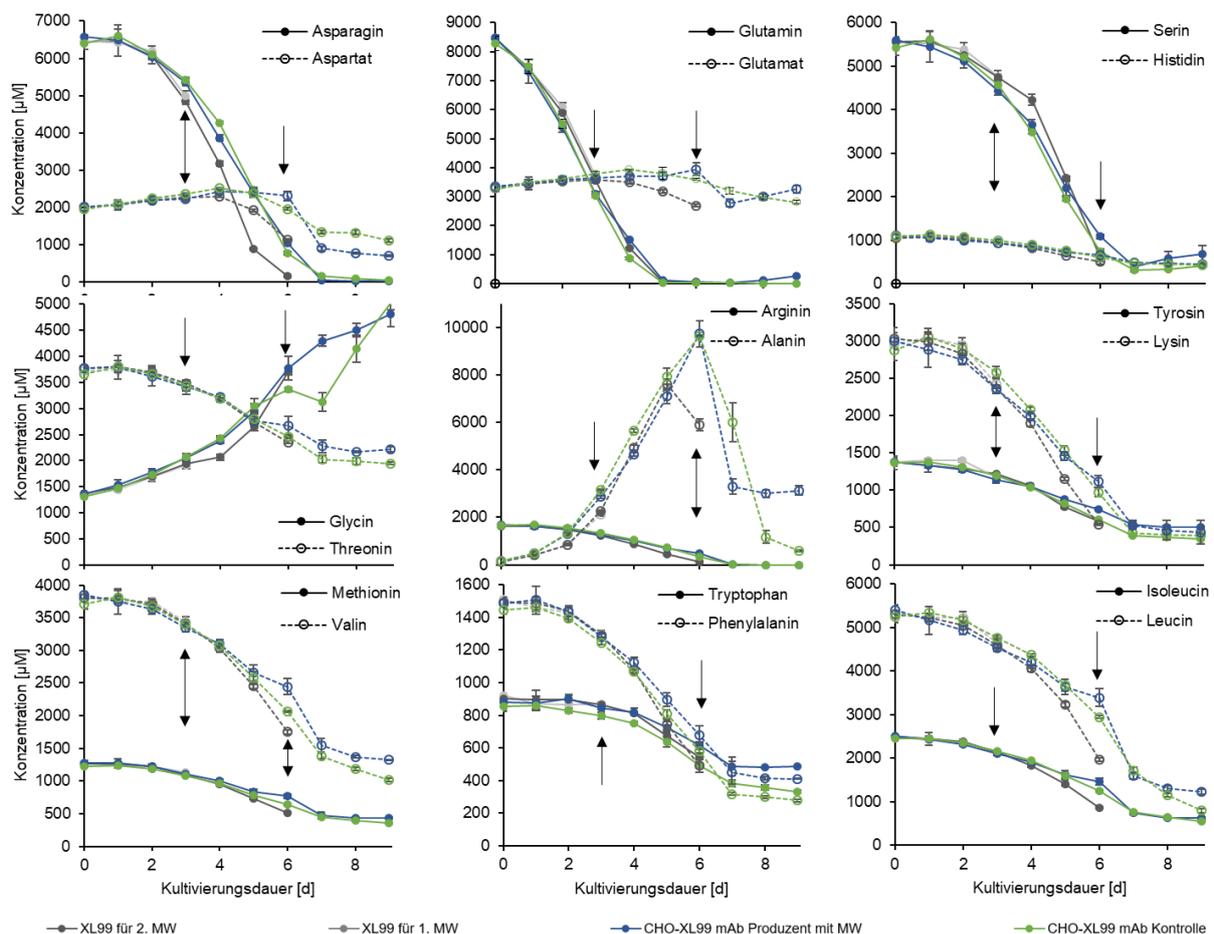


Abbildung 34: Aminosäurekonzentrationen im Kultivierungsverlauf der XL99-Zellen und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Standardabweichungen sind mit den Fehlerbalken gezeigt. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 33: hellgrau: XL99 für 1. MW, dunkelgrau: XL99 für den 2. MW, blau: CHO-XL99 mAb Produzent mit MW, grün: CHO-XL99 mAb Produzent Kontrolle.

Die Alaninkonzentration sank in den Kulturen mit Medienwechsel nach dem Medienwechsel stärker (9736 μM Tag sechs; 3285 μM Tag sieben) als in der Kontrollkultur (9635 μM Tag sechs; 6015 μM Tag sieben). Dies lässt sich mit der geringeren Alaninkonzentration in den Parentalzellkulturen zum Zeitpunkt des Medienwechsels begründen (5905 μM). Im weiteren

Ergebnisse und Diskussion

Kultivierungsverlauf sank die Alaninkonzentration der Kontrollkultur auf 572 μM , während die Konzentration in den Kulturen mit Medienwechsel bis Tag neun annähernd konstant blieb (3126 μM). Der Grund dafür liegt vermutlich in der geringeren viablen Zelldichte der Kulturen mit Medienwechsel (vgl. Abbildung 34). Dafür, dass nicht die Alaninkonzentration (3285 μM) die Abnahme der Viabilität bedingt, spricht die weitaus geringere Alaninkonzentration in den Kontrollkultivierungen an Tag acht (572 μM). Die Konzentrationsunterschiede der Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Aspartat ab Tag sieben lassen sich durch die geringeren Konzentrationen dieser Aminosäuren in den Parentalzellkulturen begründen. Nach dem Medienwechsel wurden die mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen in Medium kultiviert, welches bereits geringere Konzentrationen aufwies, als das, in dem die Kontrollkulturen wuchsen. Weder diesen Aminosäuren noch Alanin wird eine Bedeutung für die Produktglykosylierung zugeschrieben. Daher sind die Konzentrationsunterschiede in Bezug auf den Vergleich der Glykosylierung des mAb aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen, bzw. der Kontrollkultivierung vernachlässigbar.

Des Weiteren zeigen die Aminosäurekonzentrationen in den Kulturen mit Medienwechsel keine Limitierungen, die an Tag fünf oder sechs eintreten und sich von denen der Kontrollkulturen unterscheiden. Somit kann der Abfall der Viabilität der Kulturen mit Medienwechsel weder mit der Glukose- noch mit den Aminosäurekonzentrationen begründet werden. Möglicherweise litt die Kultur unter dem mechanischen Stress während der Zentrifugation oder anderen Faktoren des Medienwechsels, obwohl dies in keinem der Vorversuche der Fall war. Die unterschiedlichen Verläufe der Viabilität müssen bei Betrachtung der Produktanalytik berücksichtigt werden.

7.1.2.2. mAb-Quantifizierung und Ergebnisse der Aufarbeitung

Die mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen erreichten eine maximale Produktkonzentration von 487 mg/L in der Kontrollkultur (vgl. Abbildung 35 (A)). Die maximale Produktkonzentration in den Kulturen mit Medienwechsel wurde an Tag sechs mit 216 mg/L erreicht. In Abbildung 35 (B) sind die absoluten Proteinmengen gezeigt. Es fällt auf, dass die Summe der Produktmengen aus den Überständen der Kulturen mit Medienwechsel deutlich geringer war (20 mg) als die Produktmenge der Kontrolle (33 mg). Dies lässt sich durch das abweichende Wachstum der mAb-produzierenden CHO-XL99-Kulturen nach dem zweiten Medienwechsel begründen (vgl. Abbildung 32).

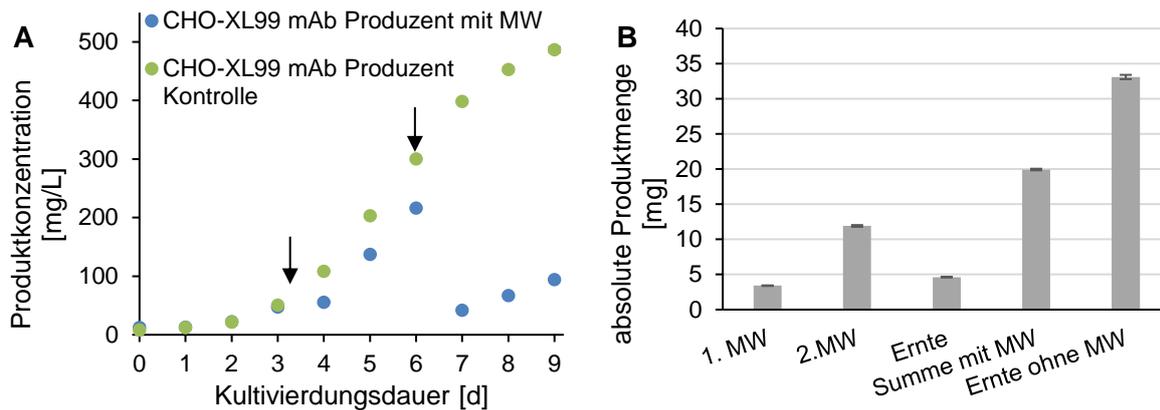


Abbildung 35: (A) Produktkonzentrationen in den mAb-produzierenden CHO-XL99-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteilmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der mAb-produzierenden CHO-XL99-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Die Ausbeuten der Aufreinigung des produzierten Antikörpers sind im Anhang gezeigt (vgl. Anhang: Tabelle-A 2). Es konnte eine durchschnittliche Ausbeute von 51 % erreicht werden. Demnach stand ausreichend Material zur Verfügung, um folgende Analysen durchzuführen:

- Sialinsäure Bestimmung mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 4.2.2.2)
- Intaktmasse-Analytik mittels ESI-ToF-MS (vgl. Kapitel 4.2.2.3)
- Auftrennung und relative Quantifizierung der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.8)
- Identifizierung und relative Quantifizierung der Glykane durch MALDI-ToF-MS Analytik der permethylierten Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.6; 4.2.2.10)

Die Ergebnisse werden im Kapitel 7.4.2 gezeigt.

7.1.3. Wachstumsspezifische Probenahme des C1-INHs

Im Gegensatz zu einem mAb ist die Glykosylierung des C1-INHs bei Weitem komplexer. Neben sechs N-Glykosylierungsstellen besitzt der Serinprotease-Inhibitor mind. acht O-Glykosylierungsstellen. In dieser Arbeit werden die N-Glykosylierungen und der Sialinsäuregehalt des in unterschiedlichen Wachstumsphasen produzierten Proteins analysiert. Als Expressionssystem diente eine Zelllinie humanen Ursprungs. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Kultivierung mit wachstumsspezifischer Probenahme erläutert. Es folgt eine kurze Zusammenfassung der Aufarbeitung. Die Analytik der Produktglykosylierung wird in Kapitel 7.4.3 besprochen.

Ergebnisse und Diskussion

7.1.3.1. Kultivierung zur Produktion des C1-INHs

Die C1-INH produzierenden CAP®-1D9-Zellen und deren Parentalzellen wurden mit einer viablen Zelldichte von $1,7 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} in jeweils 200 mL Kulturmedium angeimpft. Die Kultivierung verlief wie in Kapitel 2.6 beschrieben. An den Tagen fünf und neun wurden die Medienwechsel durchgeführt. Die viable Zelldichte und die Viabilität sind in Abbildung 36 gezeigt.

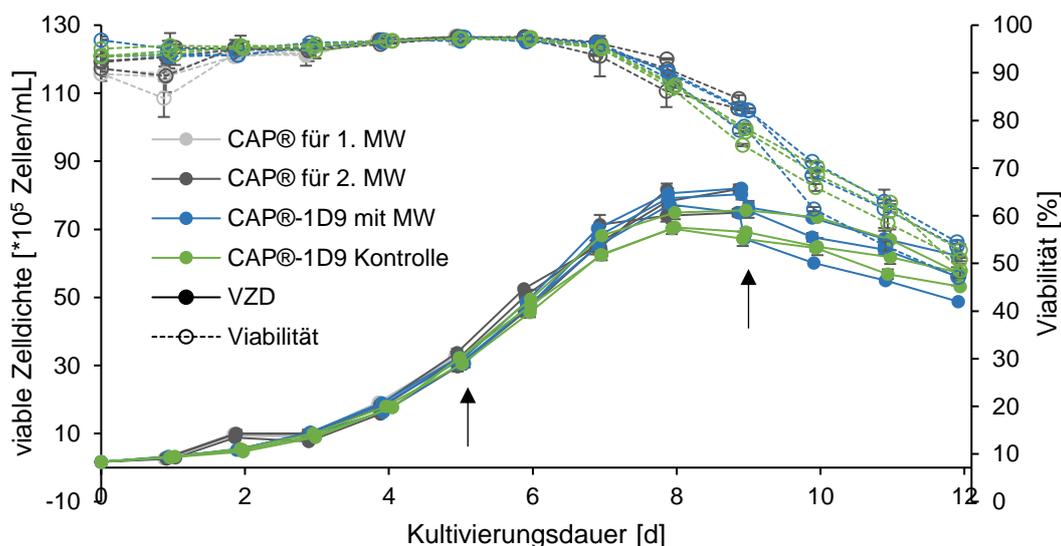


Abbildung 36: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CAP®- und CAP®-1D9-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

Bis Tag sechs wuchsen alle Kulturen im Mittel sehr ähnlich. Bis zu diesem Tag lag die Viabilität bei 95-97 %. Ab Tag sieben sank die Viabilität in allen Kulturen. Ab diesem Zeitpunkt verlief das Wachstum der biologischen Triplikate annähernd analog. Das analoge Wachstum spiegelt sich in den Glukose- und Laktatkonzentrationen unter Berücksichtigung der Standardabweichung wider. Glukose war an Tag neun vollständig verbraucht. Bis zu diesem Zeitpunkt stieg die Laktatkonzentration auf 16 mM und sank in den folgenden Tagen auf eine Konzentration von 3 mM (vgl. Abbildung 37). Aufgrund des annähernd gleichen Wachstumsverhaltens waren auch bei den Aminosäurekonzentrationen keine Unterschiede zwischen den Kontrollkulturen und den Produktionskulturen mit Medienwechsel zu erkennen (vgl. Abbildung 38). Bis Tag zehn war die Glukose in allen Kulturen verbraucht. Die Laktatkonzentration stieg bis Tag neun auf 16 mM und fiel bis zum Ende der Kultivierung in allen Kulturen auf 4 mM. Wegen der gleichen Kultivierungsverläufe, die sich in den Glukose-, Laktatkonzentrationen sowie in den Aminosäurekonzentrationen widerspiegeln, kann bei der Produktanalytik davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in der Glykosylierung unabhängig von der Probenahme sind.

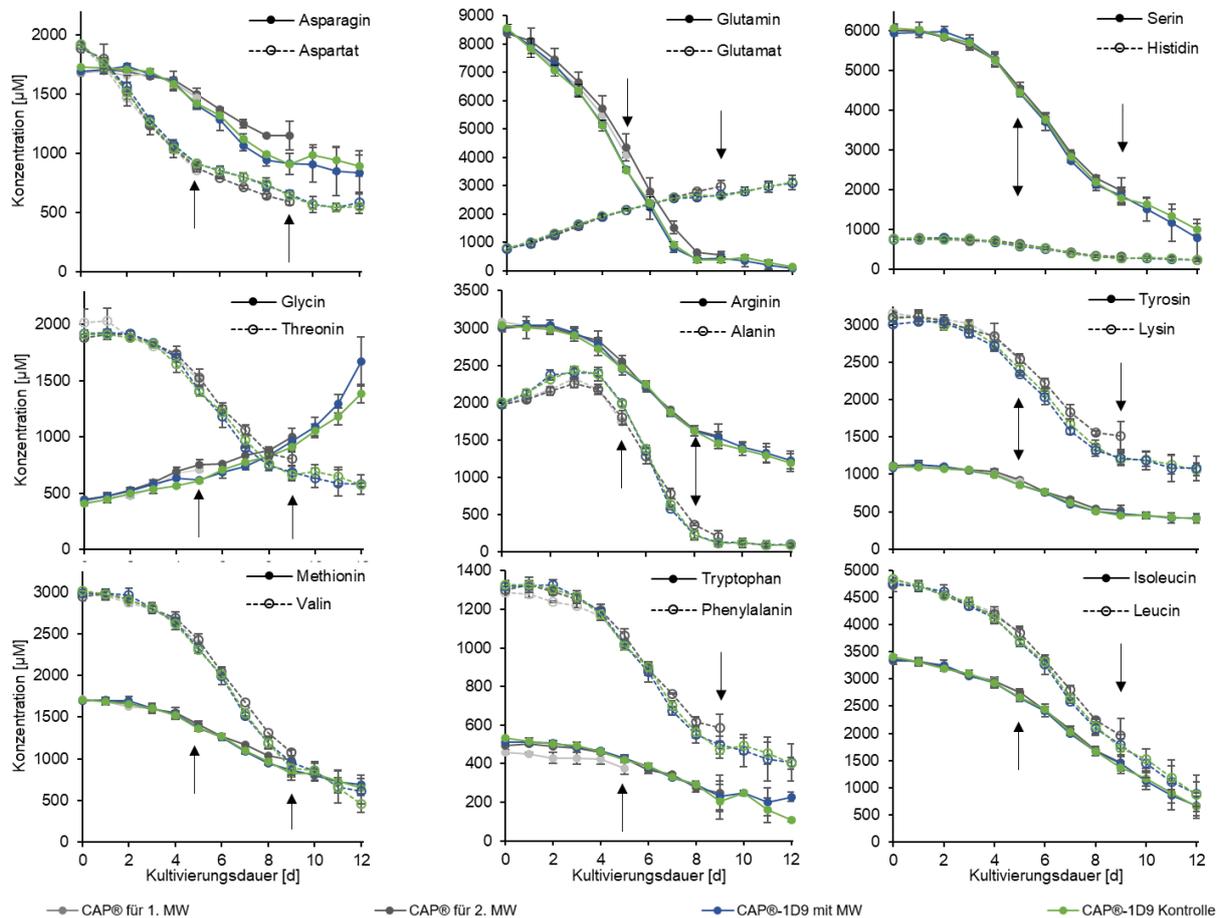
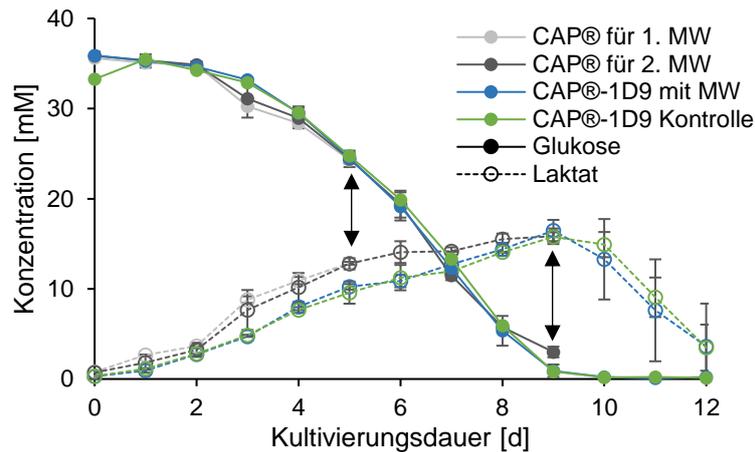


Abbildung 38: Aminosäurekonzentrationen im Verlauf der CAP®- und CAP®-1D9-Kultivierungen. Es wurden die Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 37: hellgrau: CAP® für 1. MW, dunkelgrau: CAP® für den 2. MW, blau: CAP® 1D9 mit MW, grün: CAP® 1D9 Kontrolle.

Ergebnisse und Diskussion

7.1.3.2. C1-INH-Quantifizierung und Ergebnisse der Aufarbeitung

Die C1-INH-Konzentrationen aus den Überständen und Eluaten der Aufreinigung wurden mittels ELISA (vgl. Kapitel 4.2.1.3) bestimmt. Die Produktkonzentrationen im Kultivierungsverlauf werden in Abbildung 39 (A) dargestellt. Die maximale Konzentration in den Kontrollkulturen betrug $71 \text{ mg/L} \pm 12 \text{ mg/L}$. Die maximale C1-INH-Konzentration in den Kulturen mit Medienwechsel betrug $32 \text{ mg/L} \pm 7 \text{ mg/L}$. In Abbildung 39 (B) sind die absoluten Proteinmengen in den Überständen gezeigt. Werden die Produktmengen der einzelnen Wachstumsphasen addiert, so wurde von den Kulturen eine C1-INH-Menge von $12,5 \text{ mg} \pm 0,3 \text{ mg}$ erreicht. Dies entspricht nahezu der Menge, die durch die Kontrollkulturen erreicht wurde ($11,8 \text{ mg} \pm 0,3 \text{ mg}$).

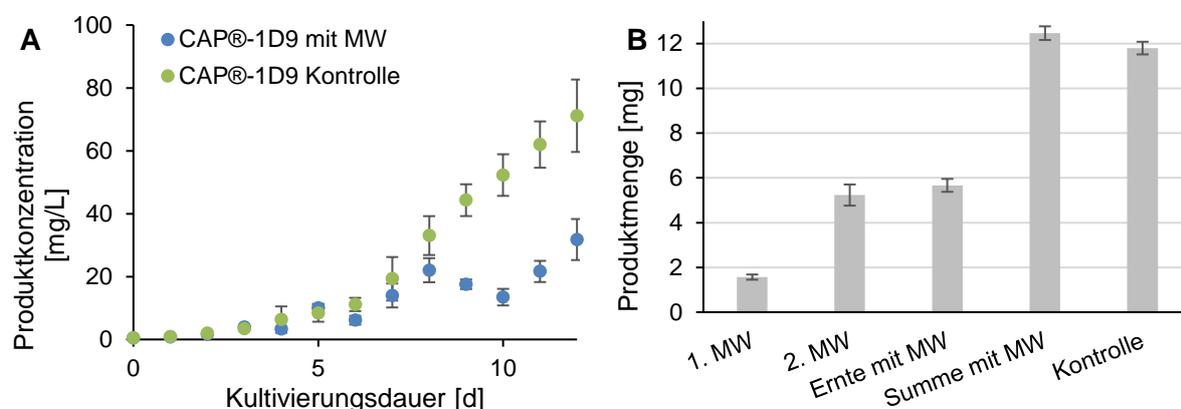


Abbildung 39: (A) Produktkonzentration und (B) Produktmenge während des Kultivierungsprozesses. (A) Produktkonzentrationen in den CAP®-1D9-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteinmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der CAP®-1D9-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Die Aufarbeitung wurde in der Masterarbeit von N. Tichomirow entwickelt und durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3). In Tabelle 13 sind die Produktausbeuten gezeigt. Diese schwanken zwischen 31 % und 55 %. Bei der Aufreinigungssequenz handelt es sich um einen dreistufigen Prozess (Affinitätschromatographie, Ultrafiltration, Anionenaustauschchromatographie). Die Ultrafiltration ist schlecht reproduzierbar und könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ausbeuten sein. Die Aufreinigungen der Überstände der dritten Kultur an den Tagen null bis drei sowie an den Tagen sieben bis neun sind fehlgeschlagen, daher wurden bei den Analysen der Produkte aus diesen Wachstumsphasen zwei biologische Replikate berücksichtigt.

Tabelle 13: C1-INH-Menge in den aufgearbeiteten Überständen, sowie in den zugehörigen Eluat.

	m_{Produkt} [mg] Überstand	m_{Produkt} [mg/L] Eluat
Kultur 1, Tag 0-3	1,7	0,7
Kultur 2, Tag 0-3	1,5	0,8
Kultur 3, Tag 0-3	1,5	-
Kultur 1, Tag 4-6	5,6	2,0
Kultur 2, Tag 4-6	5,4	1,7
Kultur 3, Tag 4-6	4,7	2,0
Kultur 1, Tag 7-9	5,5	2,7
Kultur 2, Tag 7-9	5,5	3,0
Kultur 3, Tag 7-9	6,0	-
Kontrollkultur 1	12,4	4,6
Kontrollkultur 2	12,0	4,5
Kontrollkultur 3	11,6	4,0

Aus den restlichen Wachstumsphasen war genügend Produkt vorhanden, sodass drei unterschiedliche Analysen durchgeführt werden konnten:

- Sialinsäure Bestimmung mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 4.2.2.2)
- Auftrennung und relative Quantifizierung der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.8)
- Identifizierung und relative Quantifizierung der Glykane durch MALDI-ToF-MS Analytik der permethylierten Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.6; 4.2.2.10)

Die Ergebnisse dieser Analysen werden Kapitel 7.4.3 vorgestellt.

7.1.4. Wachstumsspezifische Probenahme des AATs

Um ein weiteres Glykoprotein aus unterschiedlichen Wachstumsphasen analysieren zu können, wurde eine zweite humane Zelllinie wie in Kapitel 2.6 beschrieben kultiviert. Diese produziert das Glykoprotein AAT. Wie unter Kapitel 3.4 beschrieben wurde das Produkt aus drei Wachstumsphasen und aus Kontrollkultivierungen ohne Medienwechsel aufgereinigt und auf die Glykosylierung hin analysiert. Nach Besprechung und Zusammenfassung der Kultivierungsdaten sowie der Daten der Aufarbeitung, werden die Ergebnisse der diversen Analysen zur Produktqualität in Kapitel 7.4.4 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

7.1.4.1. Kultivierung zur Produktion des AATs

Die AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Zellkulturen wurden mit einer Zelldichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} in 200 mL Kultivierungsmedium als biologische Triplikate angeimpft. Die Kultivierung wurde wie in Kapitel 2.6 beschrieben durchgeführt. An Tag vier und sechs fand die wachstumsspezifische Probenahme statt.

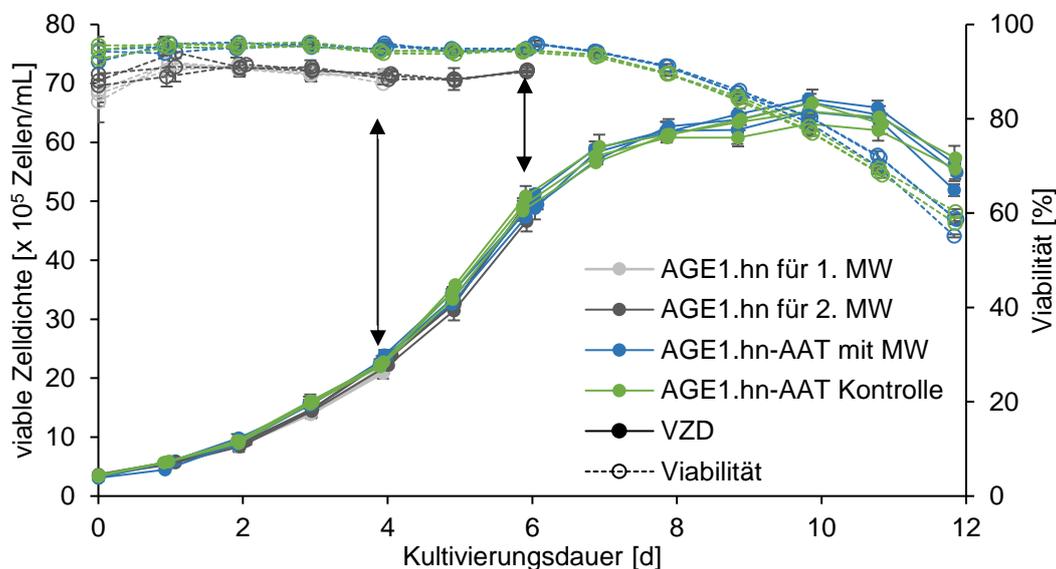


Abbildung 40: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

In Abbildung 40 sind die Kultivierungsverläufe der AAT-produzierenden AGE1.hn-AAT-Zellen und die ihrer Parentalzelllinie gezeigt. Die Parentalkulturen zeigten eine geringere Viabilität (88-90 %) als die Produktionskulturen (94-96 %). Das Wachstumsverhalten aller Kulturen ist während des gesamten Kultivierungsverlaufes annähernd gleich. Die maximale viable Zelldichte lag am Tag zehn zwischen 63 und 67×10^5 Zellen mL^{-1} . Die Viabilität sank bei allen Kulturen am Tag acht unter 90 %. Da die Parentalzellkulturen ähnliche Verläufe der Glukose- und Laktatkonzentrationen zeigten wie die Produktionskulturen, zeigten sich auch in den Konzentrationen der Kulturen mit Medienwechsel keine Abweichungen von denen der Kontrollkulturen (vgl. Abbildung 41). Ähnlich verhielt es sich mit den Aminosäurekonzentrationen im Verlauf der Kultivierung, die in Abbildung 42 gezeigt sind. Die Kulturen mit Medienwechsel wichen lediglich ab Tag sieben (einen Tag nach dem zweiten Medienwechsel) in der Glutamat-Konzentration von der Kontrollkultivierung ab. Dies lässt sich durch den schnelleren Verbrauch des Glutamats durch die Parentalzellen erklären. Die Glutamat-Konzentration lag am Tag des zweiten Medienwechsels bei den Parentalzellen bei $718 \mu\text{M} \pm 17,4 \mu\text{M}$ und bei den Kontrollkulturen bei $1265,9 \mu\text{M} \pm 40,6 \mu\text{M}$.

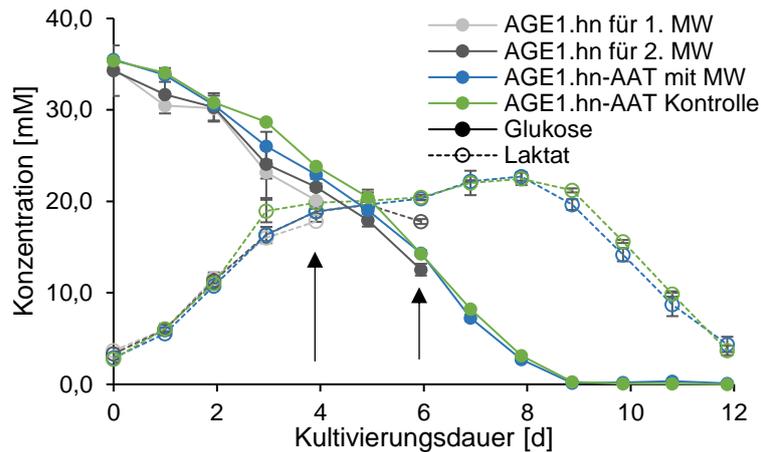


Abbildung 41: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten gebildet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

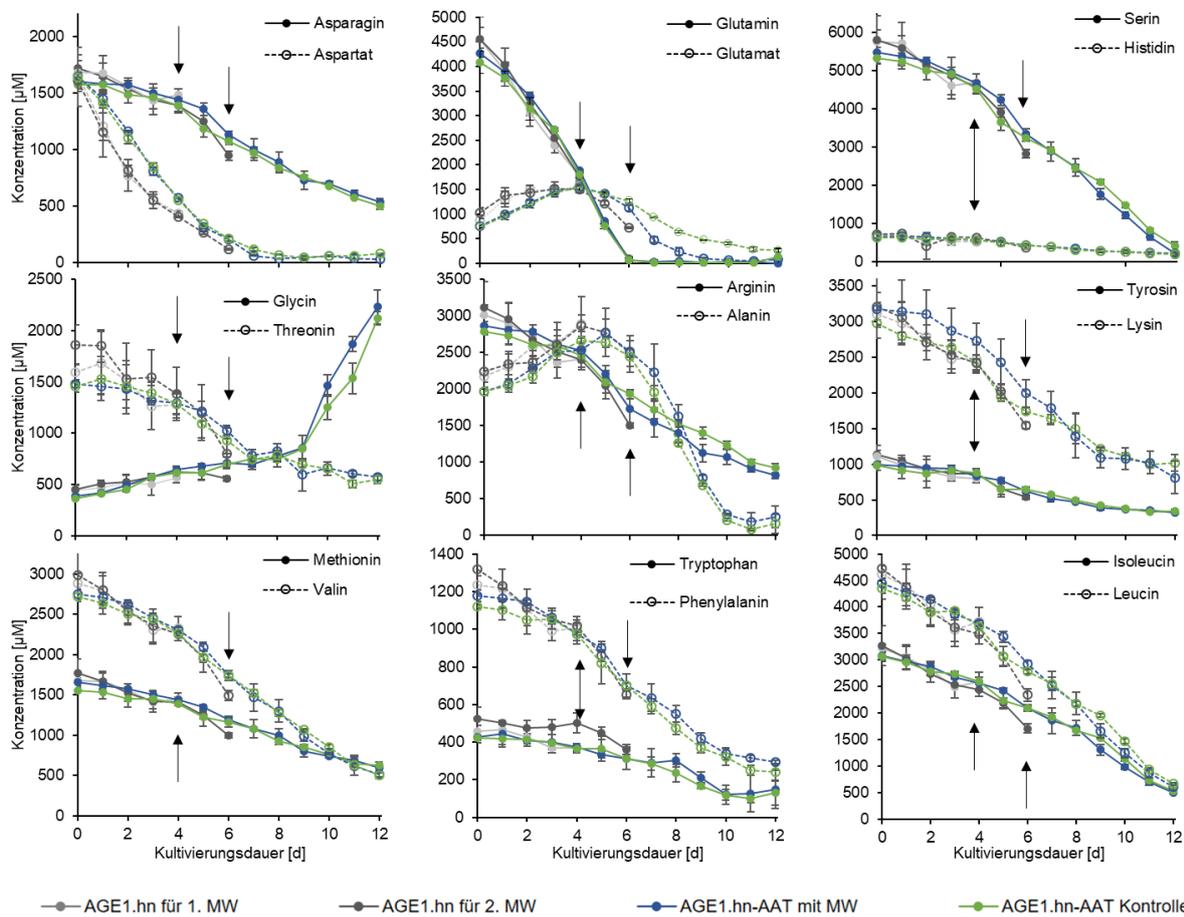


Abbildung 42: Aminosäurekonzentration der AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Kulturen im Kultivierungsverlauf. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 41: hellgrau: AGE1.hn für 1. MW, dunkelgrau: AGE1.hn für den 2. MW, blau AGE1.hn-AAT mit MW, grün: AGE1.hn-AAT Kontrolle.

Es konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden, dass Glutamat einen Einfluss auf die Glykosylierung hat. Demnach wird der Konzentrationsunterschied zwischen den

Ergebnisse und Diskussion

Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel ab Tag acht für die Diskussion der Ergebnisse der Glykananalytik vernachlässigt.

7.1.4.2. AAT-Quantifizierung und Ergebnisse der Aufarbeitung

Die Produktkonzentrationen von Überständen und Eluaten wurden, wie in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben, mittels RP-HPLC durchgeführt. Aufgrund von störenden Substanzen in den Überständen wurden lediglich die Produktmengen in den Überständen quantifiziert, die später aufgereinigt wurden.

Um die Produktzunahme des AATs während der Kultivierungen zu veranschaulichen, wurden die Proteine in den Überstandsproben mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 4.2.1.5) aufgetrennt und mittels kolloidalen Coomassie-Färbung (vgl. Kapitel 4.2.1.6) gefärbt (vgl. Abbildung 43).

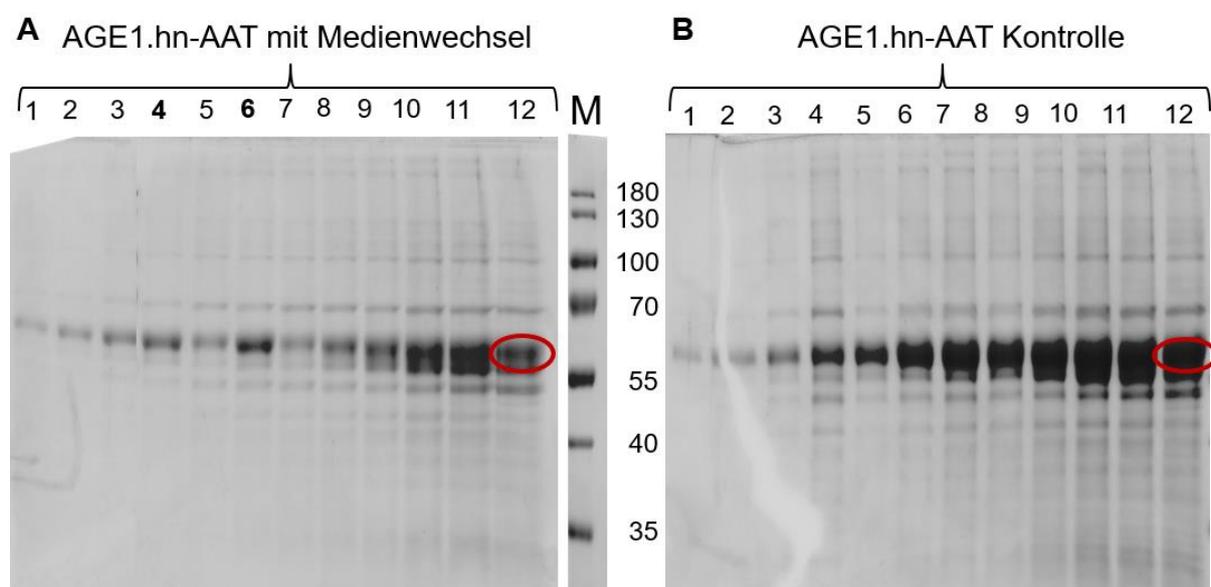


Abbildung 43: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach kolloidaler Coomassie Färbung. (A) Aufgetragen wurden Kulturüberstände (KÜ) aus den Kultivierungen mit wachstumsspezifischer Probenahme der Produktionszelllinie AGE1.hn-AAT. An den Tagen vier und sechs fand ein Medienwechsel statt. (B) KÜ im Verlauf der Kontrollkultivierung. M: Protein Größensstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA) Rot markiert sind die Banden des produzierten AAT (auf Höhe zwischen 55 kDa und 70 kDa).

Zu erkennen ist die Akkumulation der Produktbande (zwischen 55 kDa und 70 kDa) während der Kultivierungsdauer. An den Tagen fünf und sieben ist die Produktbande weniger stark als am jeweiligen Tag zuvor (vgl. Abbildung 43 (A)). Dies ist auf den Medienwechsel an den Tagen vier und sechs zurückzuführen. Die Angaben zum Molekulargewicht von AAT aus humanem Plasma reichen von 47 kDa bis 58 kDa. Dies lässt sich zum einen mit unterschiedlichen Genvarianten, aber auch durch unterschiedliche Glykosylierungen erklären (Brown, W. T.; 1982; Crawford, I. P.; 1973; Roll, D., et al.; 1978; Jeppsson, J. O., et al.; 1978; Yoshida, A., et al.; 1977; Berninger, R. W.; Talamo, R. C.; 1979). Das Molekulargewicht des

hier rekombinant produzierten AATs liegt im erwarteten Bereich zwischen 55 und 60 kDa. Das Laufverhalten des AATs stimmt mit der SDS-PAGE in Kapitel 2.4.2 (vgl. Abbildung 17) überein. Aus dem dort gezeigten Gel wurde die Bande tryptisch verdaut und mittels massenspektrometrischer Messung als AAT identifiziert.

Aus den Überständen der Medienwechsel und der Ernte der Kulturen wurde AAT mittels Lektin-Affinitätschromatographie an ConA aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.4). Zur Überprüfung der Reinheit der Eluate wurden die einzelnen Fraktionen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt. Im Anhang ist eine Abbildung eines Gels gezeigt, bei denen die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung des Kulturüberstandes der Kontrollkultur 1 aufgetragen sind (vgl. Anhang: Abbildung-A 5).

In Tabelle 14 sind die ermittelten Produktkonzentrationen und -mengen sowohl in den Überständen, als auch in den dazugehörigen Eluaten der Aufarbeitung gezeigt.

Tabelle 14: Produktmengen in den aufgearbeiteten Überständen und in den zugehörigen Eluaten.

	m_{Produkt} [mg] Überstand	m_{Produkt} [mg/L] Eluat
Kultur 1, Tag 0-4	3,3	0,9
Kultur 1, Tag 5-6	4,9	0,8
Kultur 1, Tag 7-12	17,0	2,4
Kultur 2, Tag 0-4	3,9	0,7
Kultur 2, Tag 5-6	4,5	0,6
Kultur 2, Tag 7-12	14,3	4,5
Kultur 3, Tag 0-4	4,0	0,1
Kultur 3, Tag 5-6	5,1	0,4
Kultur 3, Tag 7-12	21,3	2,6
Kontrollkultur 1	49,8	5,0
Kontrollkultur 2	38,7	3,4
Kontrollkultur 3	35,8	4,0

Bis auf das Eluat der Kultur 3 vom ersten Medienwechsel enthalten alle Eluate ausreichend AAT, um folgende Analysen durchzuführen:

- Sialinsäure-Bestimmung mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 4.2.2.2)
- Auftrennung und relative Quantifizierung der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.8)
- Identifizierung und relative Quantifizierung der Glykane durch MALDI-ToF-MS Analytik der permethylierten Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.6; 4.2.2.10)

Die Ergebnisse dieser Analysen werden Kapitel 7.4.4 vorgestellt.

Ergebnisse und Diskussion

7.1.5. Wachstumsspezifische Probenahme des ATIIIs

Als fünftes Glykoprotein wurde ATIII in CHO-Zellen produziert. Es wurde sowohl das Produkt aus den einzelnen Wachstumsphasen, als auch aus den vergleichenden Kontrollkultivierungen analysiert. Im Folgenden werden die Kultivierungsdaten vorgestellt.

7.1.5.1. Kultivierung zur Produktion des ATIIIs

Die Kultivierungen zur wachstumsspezifischen Produktanalytik ATIII wurden wie in Kapitel 2.6 beschrieben durchgeführt. Die CHO-ATIII-Kulturen mit Medienwechsel wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die CHO-ATIII-Kontrollkulturen in biologischen Duplikaten. Als Parentalzelle fungierte die Zelllinie CHO-K1. Die Kulturen wurden mit einer Startzelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen mL^{-1} in je 200 mL angeimpft. Die Medienwechsel fanden an den Tagen drei und sechs statt. Obwohl die CHO-K1-Zellkulturen bis Tag sechs eine weitaus geringere viable Zell-dichte erreichten ($33-36 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}), als die Produzenten ($55-61 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}), zeigten die CHO-ATIII-Kulturen mit Medienwechsel im Wachstum nur geringe Unterschiede zu den Kontrollkulturen (vgl. Abbildung 44).

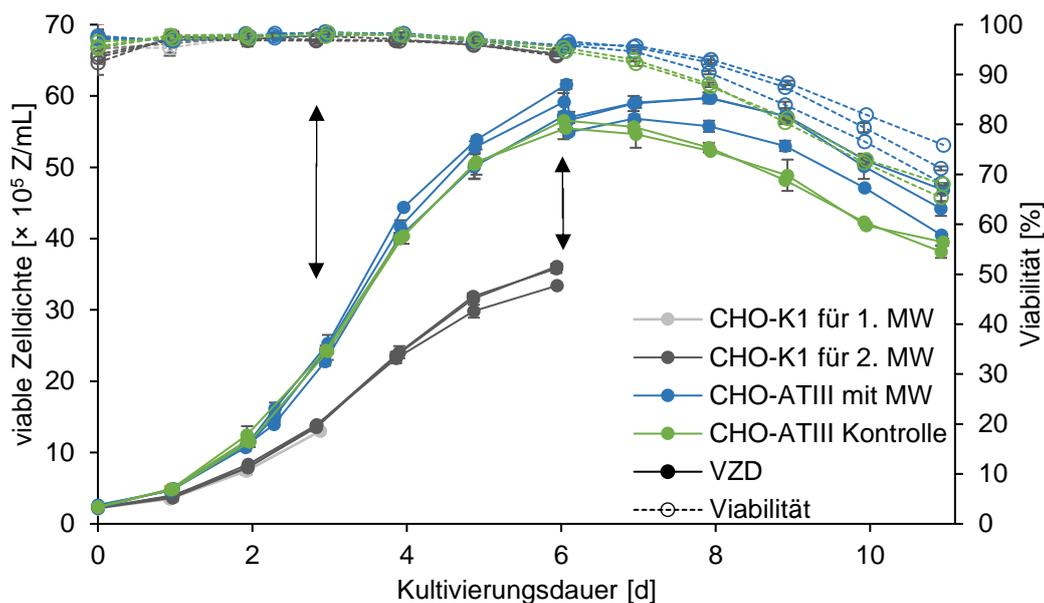


Abbildung 44: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CHO-K1- und CHO-DXB-ATIII-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.

Die Kontrollkulturen erreichten an Tag sechs eine maximale viable Zelldichte von 56×10^5 Zellen mL^{-1} . Die maximale Zelldichte der Produktionskulturen mit Medienwechsel wurde an Tag acht erreicht ($56-60 \times 10^5$ Zellen mL^{-1}). Die Viabilität der Kontrollkulturen lag an Tag neun bereits bei 80-81 %, wohingegen die Viabilität der CHO-ATIII-Kulturen bei 84-87 % lag. An Tag neun zeigte sich ein Unterschied in der Laktatkonzentration zwischen den

Produktionszellkulturen und den Parentalzellkulturen (vgl. Abbildung 45). Die Laktatkonzentration der Produktionskulturen lag bei 10 mM, die der CHO-K1-Kulturen betrug 17 mM. Dies hatte zur Folge, dass am Tag nach dem Medienwechsel die Laktatkonzentration in den Produktionskulturen mit 13 mM höher lag als die der Kontrollkultur (8 mM). Erst am Tag zehn lagen die Konzentrationen aller Produktionskulturen bei 4 mM.

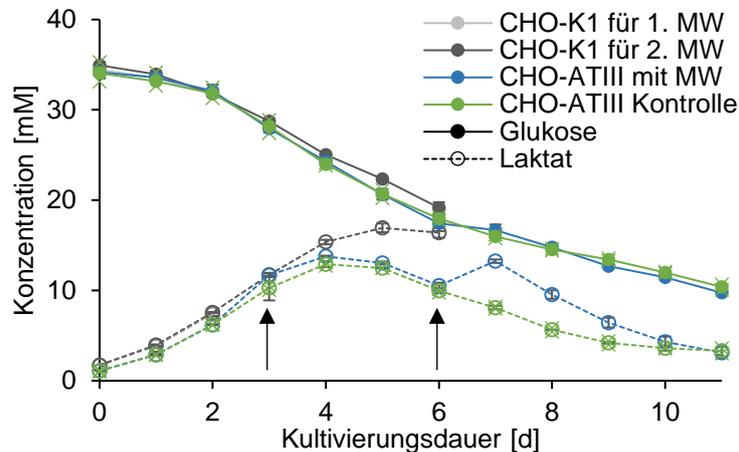


Abbildung 45: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CHO-K1- und der CHO-ATIII-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden die Mittelwerte aus biologischen Triplikaten berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Für die Kontrollkulturen werden hier die Werte (x) der beiden Duplikate, sowie der Mittelwert gezeigt.

An Tag sechs stand den Kulturen mit Medienwechsel mehr Laktat zur Verfügung, was zur Verschiebung der Wachstumskurve führte. Ein direkter Einfluss von Laktat auf die Glykosylierung ist jedoch nicht bekannt.

In Abbildung 46 sind die Verläufe der Aminosäurekonzentrationen der Kultivierungen gezeigt. Die meisten Konzentrationsverläufe verliefen innerhalb der Standardabweichungen analog. Lediglich zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels gab es bei Asparagin, Serin und Alanin Konzentrationsunterschiede zwischen den Parentalzellkulturen und den Produktionskulturen (Parentalzellkulturen: Asparagin 395 μM ; Serin: 4012 μM ; Alanin: 8173 μM ; Produktionskulturen: Asparagin: 98 μM ; Serin: 3166 μM ; Alanin: 6829 μM – 7215 μM). Diese lassen sich durch die geringere Zelldichte der Parentalzellkulturen erklären. Es wurde weniger Asparagin und Serin verstoffwechselt. Das führte dazu, dass nach dem Medienwechsel diese Konzentrationen in den Produktionskulturen mit Medienwechsel höher waren (mit Medienwechsel: Asparagin: 209 μM ; Serin: 3760 μM ; ohne Medienwechsel: Asparagin: 94 μM ; Serin: 3290 μM). Ab Tag zehn glichen sich die Konzentrationen wieder an. Für einen Einfluss von Alanin und Serin auf die Glykosylierung gibt es keine Hinweise.

Für Asparagin ist ähnlich wie für Glutamin ein Einfluss auf die Galaktosylierung bekannt, der sich vermutlich auf das bei der Verstoffwechslung entstehende Ammonium zurückführen lässt. Bei erhöhter Asparaginkonzentration wurden in unterschiedlichen Zellen geringere Galaktosylierungsgrade bei den Glykanen festgestellt (McCracken, N. A., et al.; 2014). Jedoch

Ergebnisse und Diskussion

wurden in dieser Studie einem Basalmedium mindestens 2 mM Asparagin hinzugegeben bzw. 2 mM Ammoniumchlorid. In beiden Fällen wurden ähnliche Ergebnisse beschrieben (Verringerung der G1F und G2F Anteile bei Erhöhung des G0F Anteils). In dieser Kultivierung liegen die Asparaginkonzentrationen mit 0,2 mM und 0,09 mM weit unter 2 mM. Ein Einfluss dieser Asparaginkonzentrationen auf die Glykosylierung ist daher unwahrscheinlich.

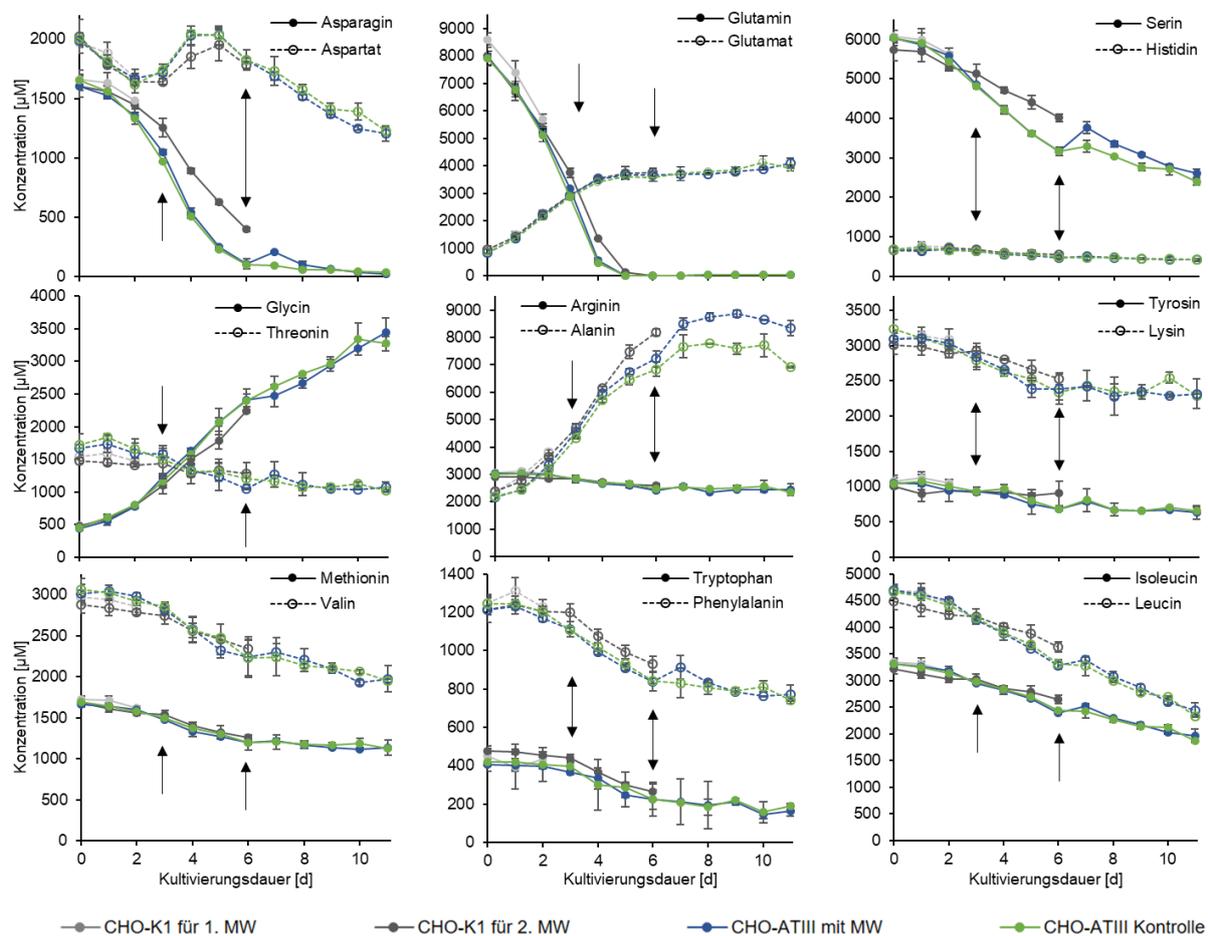


Abbildung 46: Aminosäurekonzentrationen der CHO-K1- und CHO-ATIII-Kulturen im Kultivierungsverlauf. Es wurden Mittelwerte aus biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 45: hellgrau: CHO-K1 für 1. MW, dunkelgrau: CHO-K1 für den 2. MW, blau CHO-ATIII mit MW, grün: CHO-ATIII Kontrolle.

Die Ergebnisse der Produktanalytik können ohne Einschränkungen seitens der Aminosäuren bzw. Glukose- und Laktatkonzentrationen durch Unterschiede in den Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel verglichen werden. Der geringe Unterschied in der Viabilität und den viablen Zelldichten ab dem zweiten Medienwechsel sollte jedoch berücksichtigt werden.

7.1.5.2. ATIII-Quantifizierung und Ergebnisse der Aufarbeitung

Während der Kultivierung der CHO-ATIII-Zellen wurden täglich Proben gezogen, um die Produktkonzentration im Überstand zu ermitteln. Dies geschah mittels RP-HPLC

(vgl. Kapitel 4.2.1.2). Die Überstände wurden mittels Affinitätschromatographie an Heparin aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.5). Auch die Produktkonzentrationen wurden bestimmt. In Abbildung 47 (A) sind die Ergebnisse der Kulturüberstände gezeigt. Die Produktkonzentration stieg erst ab Tag acht bei den Kontrollkulturen und ab Tag neun bei den Kulturen mit Medienwechsel deutlich an. Bis zu diesen Zeitpunkten lagen die Produktkonzentrationen unter dem Detektionslimit der Methode.

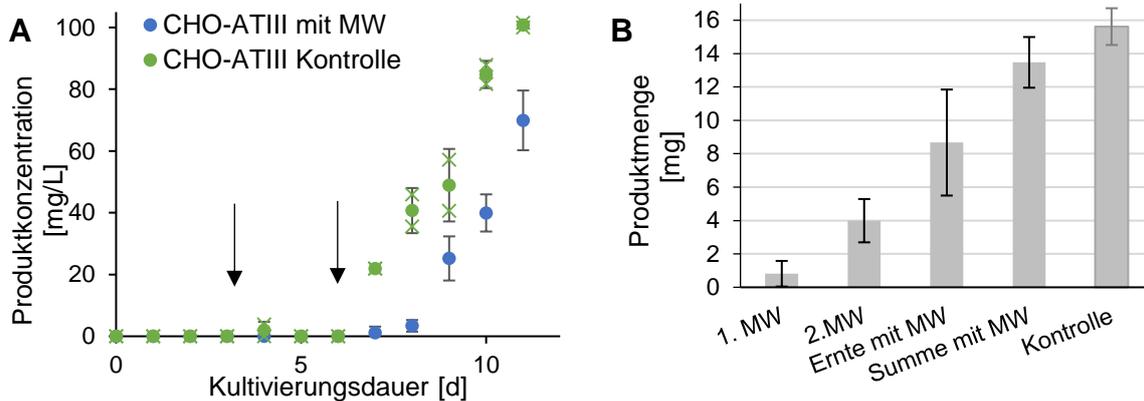


Abbildung 47: (A) Produktkonzentrationen während der Kultivierung der CHO-ATIII-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteinmengen der analysierten Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der CHO-ATIII-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Für die Kontrollkulturen wird die Differenz der beiden Duplikate als Fehlerbalken gezeigt.

In Abbildung 47 (B) sind die absoluten Proteinmengen in den Überständen zum Zeitpunkt der Medienwechsel, bzw. zum Erntezeitpunkt gezeigt.

Tabelle 15: Produktmengen in den aufgearbeiteten Überständen und in den zugehörigen Eluaten.

	m_{Produkt} [mg] Überstand	m_{Produkt} [mg] Eluat
Kultur 1, Tag 0-3	1,5	0,5
Kultur 1, Tag 4-6	3,5	4,6
Kultur 1, Tag 7-11	7,9	3,8
Kultur 2, Tag 0-3	0,9	0,7
Kultur 2, Tag 4-6	5,5	4,2
Kultur 2, Tag 7-11	5,9	3,0
Kultur 3, Tag 0-3	0,0	1,3
Kultur 3, Tag 4-6	3,0	4,3
Kultur 3, Tag 7-11	12,2	0,4
Kontrollkultur 1	16,2	5,4
Kontrollkultur 2	15,1	5,4

Die Summe der Produktmengen der Kulturen mit Medienwechsel entsprachen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der Produktmenge der Kontrollkultivierungen. Die Produktmengen der Eluate sind in Tabelle 15 gezeigt. Die Ausbeuten der ATIII

Ergebnisse und Diskussion

Aufreinigung an Heparin variieren stark. Hierfür gibt es zwei mögliche Ursachen: 1. Das Detektionslimit der Produktanalytik und 2. eine nicht vollständige Regeneration der Säule nach einer Aufreinigungssequenz. Für diese Arbeit waren die Produktausbeuten jedoch ausreichend, um folgende Analysen, durchzuführen:

- Sialinsäure Bestimmung mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 4.2.2.2)
- Auftrennung und relative Quantifizierung der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD (vgl. Kapitel 4.2.2.5 - 4.2.2.8)
- Identifizierung und relative Quantifizierung der Glykane durch MALDI-ToF-MS Analytik der permethylierten Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5; 4.2.2.6; 4.2.2.10)

Die Ergebnisse dieser Analysen werden in Kapitel 7.4.5 vorgestellt.

7.2. Sialidase-Aktivität in Kulturüberständen

Enzyme, die im Kulturmedium im Laufe der Kultivierung akkumulieren, können das sekretierte Produkt durch ihre Aktivität verändern (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994; Munzert, E., et al.; 1995; Gramer, M. J., et al.; 1995; Lao, M. S., et al.; 1996; Munzert, E., et al.; 1997; Gawlitzek, M., et al.; 2000). Dies beeinträchtigt die Qualität des Produktes.

Die Sialylierung eines Produktes ist, wie bereits erwähnt (vgl. 1.2.1), von besonderer Bedeutung, da sie die Halbwertszeit eines Proteins *in vivo* beeinflusst. Um die Aktivität von Sialidasen im Kulturüberstand zu überprüfen, wurden Überstandsproben zum Zeitpunkt der Medienwechsel und zum Erntezeitpunkt von den Kulturen mit und ohne Medienwechsel wie unter Kapitel 2.8 beschrieben analysiert. In Abbildung 48 (A) ist zu erkennen, dass erstens die maximale Sialidase-Aktivität nicht höher als 0,5 mU war (bei Ernte mit Medienwechsel der Kultivierung zur C1-INH-Produktion) und zweitens die Standardabweichungen zum Teil größer waren, als die gemessene Aktivität. Dies ist darin begründet, dass die Enzym-Aktivitäten zum Großteil nicht detektierbar waren. Auf Grund der hohen Standardabweichungen sind diese Daten als Hinweise zu betrachten, die in weiterführenden Arbeiten bestätigt werden sollte. Trotzdem sollen diese gewonnen Hinweise hier diskutiert werden.

Zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels sind keine signifikanten Aktivitäten zu erkennen, was auf die hohe Viabilität aller Kulturen zu diesem Zeitpunkt (CHO-C4: 99 %; mAb-produzierender CHO-XL99-Klon: 99 %; CAP®-1D9: 97 %; AGE1.hn-AAT: 94 %; CHO-ATIII: 98 %, vgl. Kapitel 7.1.) zurückzuführen ist. Sialidasen werden nicht sekretiert, sondern gelangen durch Zellyse in das Kulturmedium (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer,

M. J., et al.; 1995). Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels konnten in den Proben der Kultivierung zur ATIII- und mAb-Produktion Sialidase-Aktivitäten von $0,3 \pm 0,0$ mU (ATIII), bzw. $0,3 \pm 0,2$ mU (mAb) detektiert werden. Das bedeutet, dass 0,3 nmol Sialinsäure in einer Minute von einem Glykan abgespalten werden konnten. Für die Produktion des mAb war dies unbedeutend, da kein sialyliertes Produkt identifiziert werden konnte (vgl. Kapitel 7.4.2.1 - 7.4.2.4). Bei ATIII konnten hingegen sialylierte Strukturen nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 7.4.5.1 - 7.4.5.3). In Abbildung 48 (B) sind die Stoffmengen an am Produkt gebundenem NANA im Kulturüberstand der Kultivierungen zur ATIII, AAT und C1-INH Produktion gezeigt (vgl. Forme (1)). Die Konzentrationen an NGNA waren vernachlässigbar (vgl. Kapitel 7.4.3.1; 7.4.4.1; 7.4.5.1). Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels betrug die Stoffmenge an ATIII gebundenem NANA im Kulturüberstand $0,6 \mu\text{mol}$ (vgl. Abbildung 48 (B)). Eine Aktivität von 0,3 mU entspricht einem Substratumsatz von $1,5 \mu\text{mol}$ in der Zeit zwischen erstem und zweiten Medienwechsel (bei gleichbleibender Aktivität). Hier könnte die Aktivität der Sialidasen sich bereits negativ auf die Produktqualität ausgewirkt haben. Die Sialidase-Aktivität blieb in der CHO-ATIII-Kultivierung konstant. Sie betrug sowohl bei der Ernte mit als auch bei der Ernte ohne Medienwechsel 0,3 mU. Der Zeitraum zwischen zweitem Medienwechsel und Ernte betrug fünf Tage. In dieser Zeit konnten rechnerisch $2,4 \mu\text{mol}$ Sialinsäuren abgespalten werden. Die Stoffmenge an NANA bei Ernte mit Medienwechsel betrug $1,2 \mu\text{mol}$. Hier war ein negativer Einfluss auf den Sialylierungsgrad demnach ebenso wahrscheinlich wie bei der Kultivierung ohne Medienwechsel.

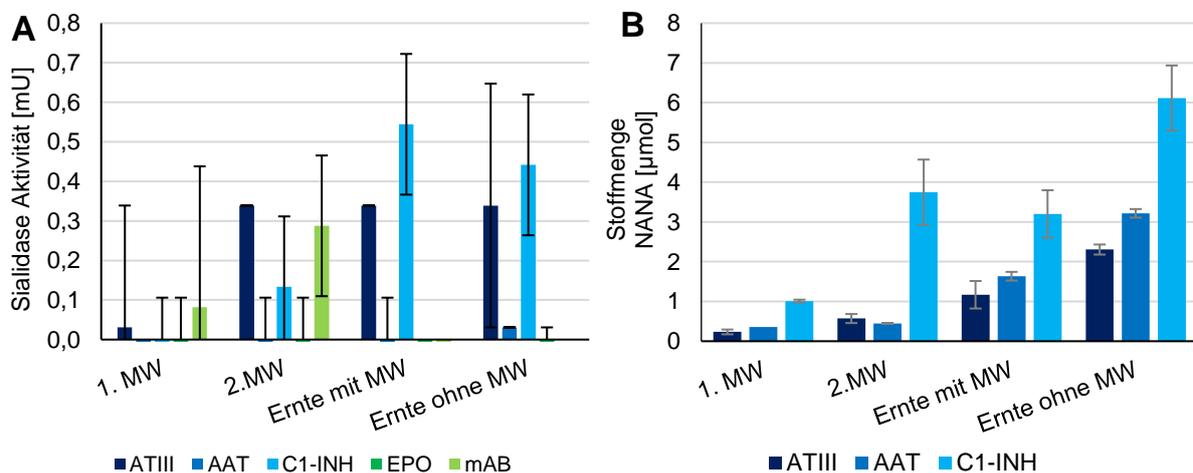


Abbildung 48: (A) Daten der Analytik zur Sialidase-Aktivität im Kulturüberstand der Hauptkultivierungen mit und ohne Medienwechsel. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate an. (B) Die Stoffmenge an am Produkt gebundenem NANA im Kulturüberstand, berechnet aus den Produktkonzentrationen, dem Sialylierungsgrad des jeweiligen Proteins (Sialinsäure-Analytik) und dem Kulturvolumen.

Es konnte in diesem Fall keine Abhängigkeit der Sialidase-Aktivität von der Viabilität der Kulturen gezeigt werden. 1993 konnten Gramer et al. eine Korrelation zwischen der Rate an

Ergebnisse und Diskussion

Zelllyse (basierend auf der Aktivität von extrazellulärer Laktatdehydrogenase) und der extrazellulären Sialidase-Aktivität zeigen (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993).

Die Viabilität der CHO-ATIII-Zellen betrug zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels 95 % und zum Zeitpunkt der Ernte 65-76 %. Eine Steigerung der Sialidase-Aktivität wäre demnach zum Ende der Kultivierung zu erwarten gewesen und kann aufgrund der hohen Standardabweichung nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

In den Kulturüberständen der AGE1.hn-AAT-Kulturen konnte lediglich im Überstand der Ernte ohne Medienwechsel eine Sialidase-Aktivität von 0,03 mU nachgewiesen werden. Ausgehend davon, dass diese Aktivität frühestens nach dem zweiten Medienwechsel eintrat, konnten in diesem Zeitraum rechnerisch 0,3 μ mol Sialinsäuren abgespalten werden. Bei 3,2 μ mol an AAT gebundenem NANA im Kulturüberstand entspricht das 9 % des vorhandenen Substrates zum Ernte-Zeitpunkt. Dies ist bedeutend weniger als bei der ATIII-Produktion. Die Viabilität der AGE1.hn-AAT-Zellen lag zum Ende der Kultivierung bei 55-60 %.

Die höchste Sialidase-Aktivität wurde in den Überständen der CAP®-1D9-Kulturen gemessen. Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels lag sie bei 0,1 mU \pm 0,2 mU, zum Zeitpunkt der Ernte mit bzw. ohne Medienwechsel war die Aktivität innerhalb der Fehler gleich (mit MW: 0,5 mU \pm 0,2 ohne Medienwechsel 0,4 mU \pm 0,2 mU). Die Viabilität der CAP®-1D9-Zellen sank vom Zeitpunkt des ersten Medienwechsels bis zum zweiten Medienwechsel von 97 % auf 83 %. Dies könnte die Sialidase-Aktivität am sechsten Tag (2. MW) erklären. Bis zum Ende der Kultivierung sank die Viabilität weiter auf 48-52 %, was die höheren Aktivitäten erklären kann, da von den lysierten Zellen Sialidasen in den Kulturüberstand freigegeben wurden. Die Aktivität von Sialidasen war in den CAP®-1D9 Kulturen am höchsten und war vermutlich für den geringeren Sialyierungsgrad der Proteine aus der Ernte mit Medienwechseln im Vergleich zu dem der Proteine aus dem zweiten Medienwechsel verantwortlich.

Es ist zu beachten, dass die hier berechneten Stoffmengen an abgespaltenen Sialinsäuren aufgrund der gemessenen Sialidase-Aktivität theoretisch berechnet wurden. Die Sialidase-Aktivität wurde in allen Überständen unter gleichen Bedingungen (pH 7,0; 37 °C) ermittelt. Diese entsprachen nicht den Bedingungen zum Ende einer Kultivierung (geringerer pH) und ggf. waren dies nicht für alle Sialidasen die optimalen Bedingungen. Gramer und Goochee zeigten 1994, dass Sialidasen aus unterschiedlichen Zellen unterschiedliche pH-Optima besitzen (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994). Das verwendete Substrat (MUF-NANA) war frei zugänglich. Die Glykane an Proteinen können durch Faltung des sekretierten Proteins nicht frei zugänglich für die Enzyme sein. In Kulturüberständen sind neben dem Produkt eine Vielzahl an *Host Cell* Proteinen vorhanden (vgl. Abbildung 15 (B), Abbildung 17 (B) und Abbildung 43), die z.T. glykosyliert vorliegen und demnach als Substrat für die Sialidasen dienen. In den Berechnungen für die Sialinsäuren im Überstand (vgl.

Abbildung 48 (B)) wurden lediglich Sialinsäuren berücksichtigt, die am eigentlichen Produkt gebunden waren. Aus diesen Gründen konnte keine direkte Relation zwischen den theoretisch berechneten abgespaltenen Sialinsäuren und den im Überstand vorhandenen Sialinsäuren, die am Produkt gebunden waren, hergestellt werden. Die hier gezeigten Daten sollen veranschaulichen, dass 1. die Enzymaktivität im Kulturüberstand neben der eigentlichen Proteinproduktion innerhalb der Zelle die Produktqualität und Produktheterogenität beeinflussen kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass 2. die Enzymaktivität von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein kann, was Gramer und Kollegen 1994 anhand der Zelllinien NS0 und HEK293 sowie einer Hybridoma Zelllinie zeigen konnten (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994) ; und es gab Hinweise dafür, dass 3. die Sialidase-Aktivität für manche Kultivierungsprozesse von Bedeutung zu sein scheint (in diesem Fall vermutlich bei der C1-INH-Produktion) und bei anderen von geringerer Bedeutung (AAT-Produktion), oder keiner Bedeutung (mAb-Produktion). Neben den hier untersuchten Sialidasen sind Aktivitäten von β -Galaktosidase, β -Hexosaminidase und Fucosidase bekannt (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994; Gawlitzek, M., et al.; 2000), die ebenfalls die Produktheterogenität negativ beeinflussen können.

Sowohl bei der Wahl von Zelllinien als auch bei der Zelllinien-Entwicklung für die Expression von sialylierten Glykoproteinen sollte die Aktivität von Glykosidasen im Kulturüberstand unter Produktionsbedingungen berücksichtigt werden. Da die Glykosidasen aus lysierten Zellen stammen, wird mit den immer höheren Zelldichten, die durch Optimierung von Medien und Prozessparametern erreicht werden, auch der Anteil an lysierten Zellen höher. Somit gelangen bei einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen mL^{-1} und einer Viabilität von 95 % Glykosidasen aus 5×10^3 Zellen mL^{-1} in den Kulturüberstand (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993), bei einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen mL^{-1} (erreicht im *Fed Batch* und beschrieben durch Lin et al. 2017), wären es Glykosidasen aus 5×10^6 Zellen mL^{-1} .

Die hier gezeigten Daten geben Hinweise darauf, dass die Produktqualität und die Produktheterogenität sowohl abhängig von der produzierenden Zelle als auch abhängig vom exprimierten Produkt ist. Um dem nachzugehen, wird im folgenden Kapitel die Produktqualität in Hinsicht auf die Glykosylierung der fünf in dieser Arbeit produzierten Proteine untersucht.

7.3. Zusammenfassung der möglichen Einflüsse auf die Proteinglykosylierung

In den Kapiteln 7.1 und 7.2 wurden Daten der Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel gezeigt. Es wurde diskutiert, welche der analysierten Parameter einen Einfluss auf die Produktglykosylierungen haben könnten. Unterschiede unter den Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel, die die Glykosylierung abhängig von der wachstumsspezifischen Probenahme beeinflussen könnten, sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Zusammenfassung der detektierten Unterschiede zwischen den Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel.

Produkt	Unterschied zwischen Kultivierung mit und ohne Medienwechsel	Auswirkungen auf Proteinglykosylierung
EPO	Aspartat, Glutamat, Alanin	keine
mAb	Viable Zelldichte, Viabilität Alanin, Glutamat, Glycin	möglich keine
C1-INH	-	-
AAT	Glutamat	keine
ATIII	Viable Zelldichte, Viabilität Laktat Serin, Aspartat	möglich keine keine

Bei den Produkten EPO, C1-INH und AAT waren keine unterschiedlichen Proteinglykosylierungen aufgrund der wachstumsspezifischen Probenahme zu erwarten. Bei den Glykoproteinen mAb und ATIII müssen bei der Ergebnisdiskussion die unterschiedlichen Zelldichten und Viabilitäten ab dem zweiten Medienwechsel berücksichtigt werden.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Viabilität und der Sialidase Aktivität zu den unterschiedlichen Probenahme-Zeitpunkten

Produkt Zeitpunkt	Viabilität [%]				Sialidase Aktivität [mU]			
	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte - MW	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte - MW
EPO	99	73-81	31-33	30-31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
mAb	99	96	42-46	58-63	0,08	0,29	n.d.	n.d.
C1-INH	98	74-85	49-53	49-53	n.d.	0,13	0,54	0,44
AAT	94	95	55-60	55-60	n.d.	n.d.	n.d.	0,03
ATIII	98	95	65-68	68-76	0,03	0,34	0,34	0,34

Zusätzlich sind die Daten, die einen direkten Einfluss auf die Produktglykosylierung haben können in Tabelle 17 zusammengefasst. Es handelt sich um die Viabilität der Kultur und die im Kulturüberstand gemessene Sialidase Aktivität.

7.4. Produktanalytik der glykosylierten Produkte aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

7.4.1. Produktanalytik des EPOs mittels CZE

Aufgrund der geringen Produktmenge wurde das produzierte EPO mittels CZE analysiert (vgl. Kapitel 4.2.2.4). Für diese Methodik ist lediglich eine geringe Probenmenge erforderlich. Sie gibt durch die Auftrennung unterschiedlicher Ladungsformen eine gute Übersicht der

Produktqualität. Sie dient in der Industrie als Freigebeanalytik für EPO und ist in der europäischen Pharmakopöe (EuPh) beschrieben. Die Proben werden nach ihrer Mobilität (Größe und Ladung) aufgetrennt. (European Pharmacopoeia; 2002).

Tabelle 18: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die die Glykosylierung des EPOs beeinflussen können.

Kultivierungsparameter	1. MW Tag 0-3	2. MW Tag 4-6	Ernte + MW Tag 7-8	Ernte - MW Tag 0-8
Viabilität	99 %	73-81 %	31-33 %	30-31 %
Glukosekonzentration	1,3 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,4 mM
Glutaminkonzentration	2,4 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,2 mM

Für die CZE wurden die aufgereinigten Proben entsalzt und konzentriert. Es wurde eine Probe vom ersten Medienwechsel, drei vom zweiten Medienwechsel und zwei von der Kontrollkultivierung erfolgreich analysiert. In allen CZE-Elektropherogrammen wurden sieben bis neun *Peaks* detektiert. Eine hohe *Peak* Nummer bedeutet eine hohe negative Ladung des Glykoproteins, was auf einen hohen Grad an Sialylierung zurückzuführen ist. In Abbildung 49 ist ein Elektropherogramm einer CZE-Messung von EPO aus dem ersten Medienwechsel gezeigt. Es konnten neun Isoformen detektiert werden.

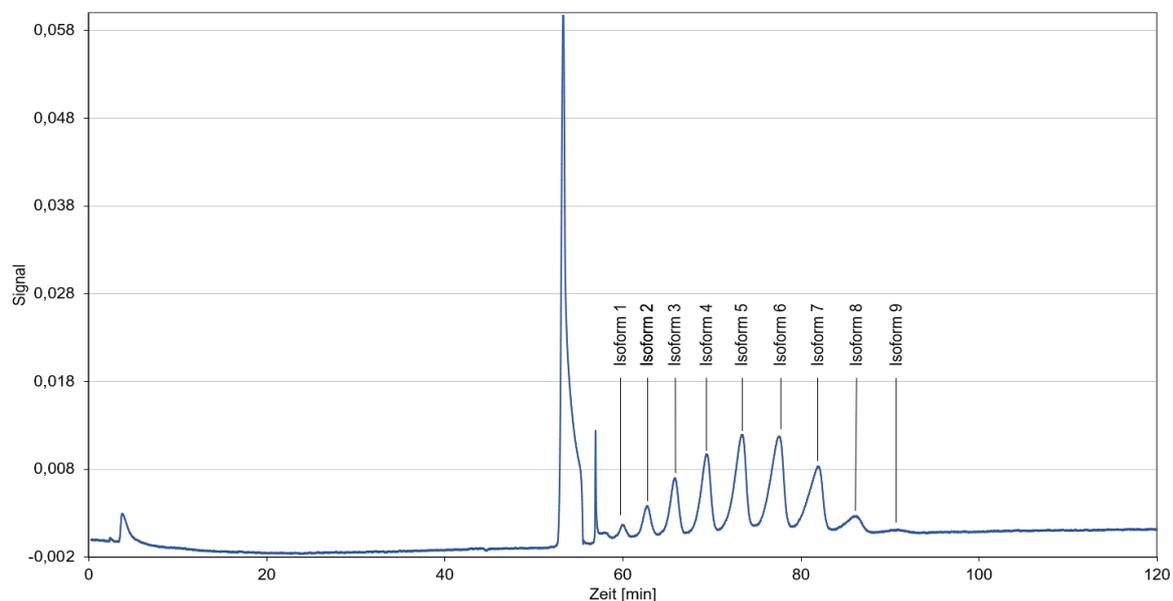


Abbildung 49: Elektropherogramm von EPO, welches aus Überstand nach dem ersten Medienwechsel aufgearbeitet wurde. Es sind neun *Peaks* zu erkennen. Für die Berechnungen wurden die *Peaks* der Isoformen 1-7 verwendet, da nicht in allen Proben die Isoformen 8 und 9 identifiziert werden konnten. Bei ca. 55 min ist der Injektions*peak* zu erkennen.

Für die Auswertung wurden die Intensitäten der sieben *Peaks* (*Peak* 1-7), die in allen Elektropherogrammen detektiert wurden, auf die Summe der Intensitäten dieser sieben *Peaks*

Ergebnisse und Diskussion

normalisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 gezeigt. Während sowohl das in den ersten drei Tagen produzierte EPO, wie auch das in den nächsten drei Tagen produzierte EPO die höchsten Intensitäten in den *Peaks* drei (1. MW: 15,7 %; 2. MW: 20,3 % \pm 2,4 %) und vier (1. MW: 19,8 %; 2. MW: 19,9 % \pm 4,5 %) aufwiesen, zeigte das EPO, welches über den gesamten Kultivierungszeitraum produziert wurde, im ersten *Peak* die höchste Intensität (21,7 % \pm 0,9). Die Intensitäten der *Peaks* dieser Probe waren bei den *Peaks* zwei bis vier annähernd konstant bei ca. 17–18 %. Mit zunehmender *Peak*-Nummer nahmen die Intensitäten bis zu *Peak*-Nummer sieben ab. Dies lässt darauf schließen, dass das EPO, welches über den gesamten Kultivierungsverlauf produziert wurde, weniger Ladungen und somit weniger Sialinsäuren aufwies als das, welches zu Anfang der Kultivierung mit Medienwechsel produziert wurde. Die EPO Proben aus den beiden Medienwechseln unterschieden sich innerhalb der Fehler kaum. Beide zeigten bis zum dritten *Peak* steigende Intensitäten, welche ab dem vierten *Peak* bis zum siebten wieder sanken.

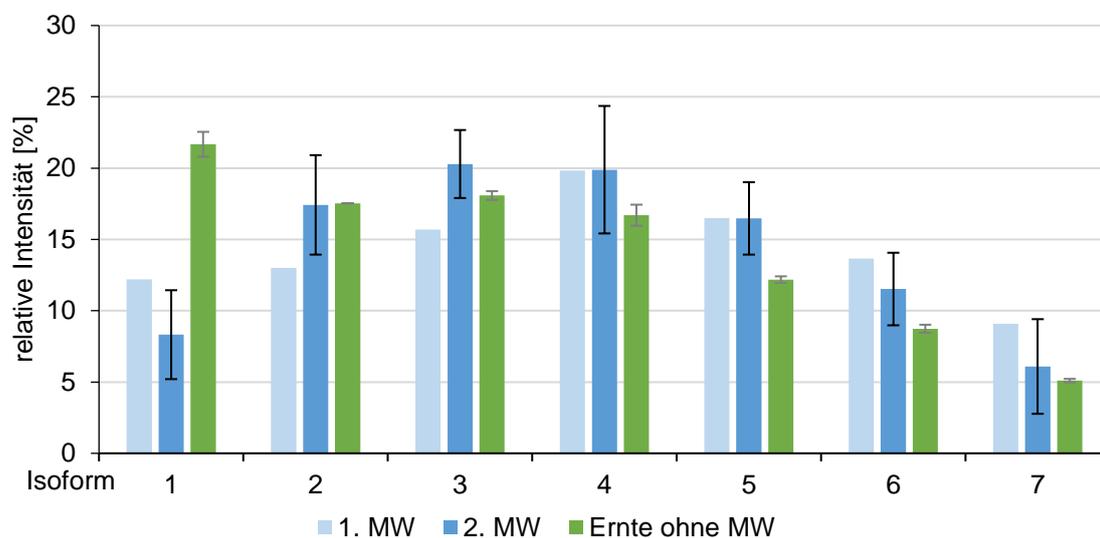


Abbildung 50: Relative Intensitäten der detektierten Isoformen. Verglichen wird EPO, welches an den ersten drei Kultivierungstagen produziert wurde, mit EPO, das zwischen Tag vier und Tag sechs produziert wurde, und mit EPO, dass über den gesamten Kultivierungszeitraum produziert wurde. Schwarze Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der biologischen Triplikate an. Graue Fehlerbalken zeigen die Differenz zwischen biologischen Duplikaten an.

Die EuPh hat Grenzen für den prozentualen Anteil der acht Isoformen, die für die CZE von EPO bekannt sind, etabliert. Sie sind in Tabelle 19 aufgelistet. Alle hier untersuchten EPO-Proben wiesen die ersten sieben Isoformen auf.

Lediglich das EPO, welches zu Beginn der Kultivierung produziert wurde, entspricht den Anforderungen der EuPh. Das EPO, welches von Tag drei bis Tag sechs (2. MW) produziert wurde, weist einen zu hohen Anteil der Isoform 2 auf. EPO, welches über den gesamten Kultivierungsverlauf produziert wurde, wies zu hohe Anteile der Isoformen 1 und 2 und zu geringe Anteile der Isoformen 5 und 6 auf (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Erlaubter Bereich der prozentualen *Peakfläche* der acht Isoformen des EPOs etabliert durch die EuPh (European Pharmacopoeia; 2002) und die Einordnung des hier produzierten EPOs.

Isoform	1	2	3	4	5	6	7	8
Erlaubter Bereich der relativen Peakfläche [%]	0-15	0-15	5-20	10-35	15-40	13-35	0-20	0-15
1. MW	√	√	√	√	√	√	√	√
2. MW	√	x	√	√	√	√	√	√
Ernte ohne MW	x	x	√	√	x	x	√	√

Diese Daten weisen auf einen höheren Sialyierungsgrad des Produktes zu Beginn einer Kultivierung hin. Dies kann zum einen durch Sialidasen im Kulturüberstand zum Ende einer Kultivierung begründet sein (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1993; Gramer, M. J., et al.; 1995). Zum anderen könnten weniger antennäre Galaktosen eine geringere Antennarität zum Ende einer Kultivierung eine geringere Sialylierung bedingen. Galaktosyierungsgrad wie auch Antennarität können durch Substratmangel oder Akkumulation von Ammonium beeinflusst werden. Es wurde ein Sialidase-Aktivitätstest durchgeführt, bei dem jedoch im Überstand der EPO-produzierenden Kulturen keine Sialidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 7.2; Abbildung 48). Mögliche Ursachen für eine geringere Antennarität, eine geringere Galaktosylierung, bzw. eine geringere Sialylierung zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels, sind die geringe Menge an Glukose und Glutamin zwischen Tag drei und Tag sechs (Glukose 0-1 mM; Glutamin Tag drei: 2,4 mM; ab Tag vier: 0-0,3 mM, vgl. Tabelle 18) (Chapman, A. E.; Calhoun, J. C.; 1988; Nyberg, G. B., et al.; 1999; Seo, J. S., et al.; 2014; Chee Fung Wong, D., et al.; 2005; Liu, B., et al.; 2014; Hayter, P. M., et al.; 1992; Cruz, H. J., et al.; 2000), sowie eine Akkumulation von Ammonium durch die Verstoffwechselung und die chemische Degradation von Glutamin (McCracken, N. A., et al.; 2014; Andersen, D. C.; Goochee, C. F.; 1995; Borys, M. C., et al.; 1994; Borys, M. C., et al.; 1994; Gawlitzek, M., et al.; 2000; Gawlitzek, M., et al.; 1998; Thorens, B.; Vassalli, P.; 1986; Yang, M.; Butler, M.; 2000a; Yang, M.; Butler, M.; 2000b; Yang, M.; Butler, M.; 2002). Dies lässt vermuten, dass die Zellen während der späten exponentiellen Phase und der stationären Phase aufgrund der Zusammensetzung des Kulturüberstandes ein weniger sialyliertes Produkt produzierten und sekretierten. Die Frage, ob die Glykosylierung des sekretierten Produktes im Überstand durch die Verweilzeit verändert wurde, konnte mit diesem Versuch nicht beantwortet werden. Zur Produktstabilität wurden zusätzliche Versuche durchgeführt (vgl. Kapitel 8.1).

Der Grad der Sialylierung hat einen direkten Einfluss auf die Halbwertszeit des EPOs im Blutkreislauf, da Rezeptoren in der Leber asialo Glykoproteine binden und abbauen (Fukuda, M. N., et al.; 1989). So konnte die Halbwertszeit von EPO durch zwei zusätzliche N-Glykosylierungsstellen um das Dreifache verlängert werden (Macdougall, I. C., et al.; 1999;

Ergebnisse und Diskussion

Egrie, J. C., et al.; 2003). Das hier produzierte EPO hätte vermutlich keine lange Halbwertszeit im Blutkreislauf, da besonders zum Ende der Kultivierung gering sialyliertes Produkt gefunden wurde. Demnach müssten die Kultivierungsbedingungen so angepasst werden, dass die Viabilität über 90 % bleibt, bzw. das Produkt vor Abfall der Viabilität aus dem Kulturüberstandes aufgereinigt wird. Wichtiger wäre in diesem Falle vermutlich eine bessere Versorgung der Zellen durch eine Kohlenstoffquelle. Ein *Feed* mit angepassten Glukose- und Glutaminkonzentrationen wäre vielversprechend.

7.4.2. Produktanalytik des mAbs

Ein mAb wurde hinsichtlich seiner Produktglykosylierung in unterschiedlichen Wachstumsphasen (nach drei Tagen (1.MW), nach weiteren drei Tagen (2. MW), nach zusätzlichen drei Tagen (Ernte mit MW), nach neuntägiger Kultivierung (Ernte ohne MW)) analysiert. Die Ergebnisse der vier unterschiedlichen Analysen (Sialinsäure-Analytik, Intaktmassen-Analytik; HILIC-FLD und MALDI-MS) werden im Folgenden erläutert. Im Anschluss folgt eine zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse.

Tabelle 20: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die die Glykosylierung des mAbs beeinflussen können.

Kultivierungsparameter	3. MW	4. MW	Ernte + MW	Ernte - MW
	Tag 0-3	Tag 4-6	Tag 7-9	Tag 0-9
Viabilität	99 %	96 %	42-46 %	58-61 %
Glukosekonzentration	17 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Glutaminkonzentration	3,0 mM	0,0 mM	0,3 mM	0,0 mM

In Tabelle 20 sind einige Ergebnisse der Kultivierung zusammengefasst, die für die Produktglykosylierung von Bedeutung sein können.

7.4.2.1. Sialinsäure-Analytik des mAb

Für die Quantifizierung der Sialinsäuren wurden je zweimal 50 µg mAb eingesetzt, was 336 pmol entspricht. Nach einer milden sauren Hydrolyse (vgl. Kapitel 4.2.2.2) wurde das Protein von den abgespaltenen Sialinsäuren durch Filtration abgetrennt. Die Sialinsäuren wurden mittels HPAEC-PAD quantifiziert. Es wurde eine Kalibrierreihe in einem Bereich von 10 µM-50 µM zur Quantifizierung von NANA und NGNA genutzt. Sowohl Standards als auch Proben wurde ein interner Standard (Kdn) zur besseren Reproduzierbarkeit hinzugegeben. Es konnte weder NGNA noch NANA in den Proben nachgewiesen werden. In Abbildung 51

sind der Standard mit 10 μM NANA/ NGNA und die hydrolysierte Probe der dritten Kultivierung mit Medienwechsel zum Erntezeitpunkt gezeigt.

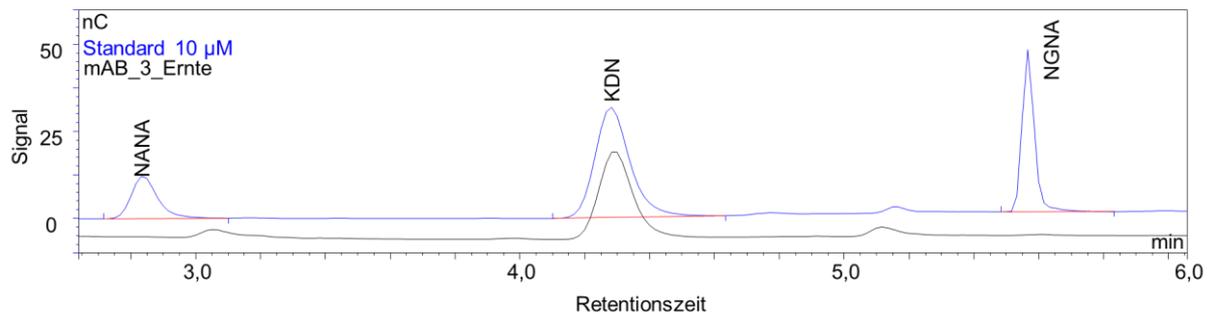


Abbildung 51: Chromatogramme des Sialinsäure Standards mit 10 μM NANA und NGNA (blau) und von einer hydrolysierten mAb Probe (schwarz), jeweils mit KDN als internem Standard.

Es ist deutlich zu erkennen, dass lediglich bei einer Retentionszeit von 4,25 min der interne Standard detektiert werden konnte. Die abgespaltenen Sialinsäuren wurden in 200 μL dH_2O aufgenommen. Besäße jedes mol mAb ein mol NANA, so würde eine Konzentration von 1,7 μM erwartet, welche nicht im linearen Bereich der Kalibrierreihe liegt, jedoch nicht unter der Detektionsgrenze. Demzufolge konnte mittels Sialinsäure-Analytik keine Sialylierung des mAbs nachgewiesen werden.

7.4.2.2. Intaktmassen-Analytik des mAbs

Die Intaktmassen-Analytik gibt ohne aufwendige Probenvorbereitung viele Informationen zu Modifikationen eines Proteins. Die Proben wurden mittels LC aufgetrennt und mittels microTOF II analysiert. Die unterschiedlich modifizierten Proteine können über die unterschiedlichen Massen identifiziert werden (vgl. Kapitel 4.2.2.3). In Abbildung 52 (A) ist ein $\text{UV}_{280\text{ nm}}$ Chromatogramm eines intakten mAbs gezeigt. In einem Zeitraum von 12,4-14,6 min ist ein *Peak* zu erkennen. Für die Auswertung wurden die aufgenommenen Massenspektren für einen m/z -Bereich von 2500-4000 aufsummiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 52 (B) zu sehen. Die Dekonvolution wurde für einen Massenbereich von 140.000 bis 160.000 kDa mit einem Algorithmus basierend auf dem Prinzip der maximalen Entropie berechnet. Anschließend wurde das Spektrum über zwei Zyklen mittels Savitzky Golay Filter geglättet. Diese Berechnungen wurden mit der Software *DataAnalysis* (*Bruker Daltonik*, Deutschland) durchgeführt. Das resultierende Spektrum ist in Abbildung 52 (C) gezeigt. Zu erkennen sind mehrere *Peaks*, denen sowohl die Masse, als auch die Glykosylierung der beiden schweren Ketten des Antikörpers zugeordnet sind. Der *Peak* mit einer Masse von 148.652 kDa erreicht die höchste Intensität. Der nicht glykosylierte Antikörper besitzt eine Masse von 145.565 kDa. Die Massendifferenz beträgt 3090 kDa. Diese entspricht der Summe der Glykanstrukturen FA2G1 (1624,6 kDa) und FA2 (1462,5 kDa).

Ergebnisse und Diskussion

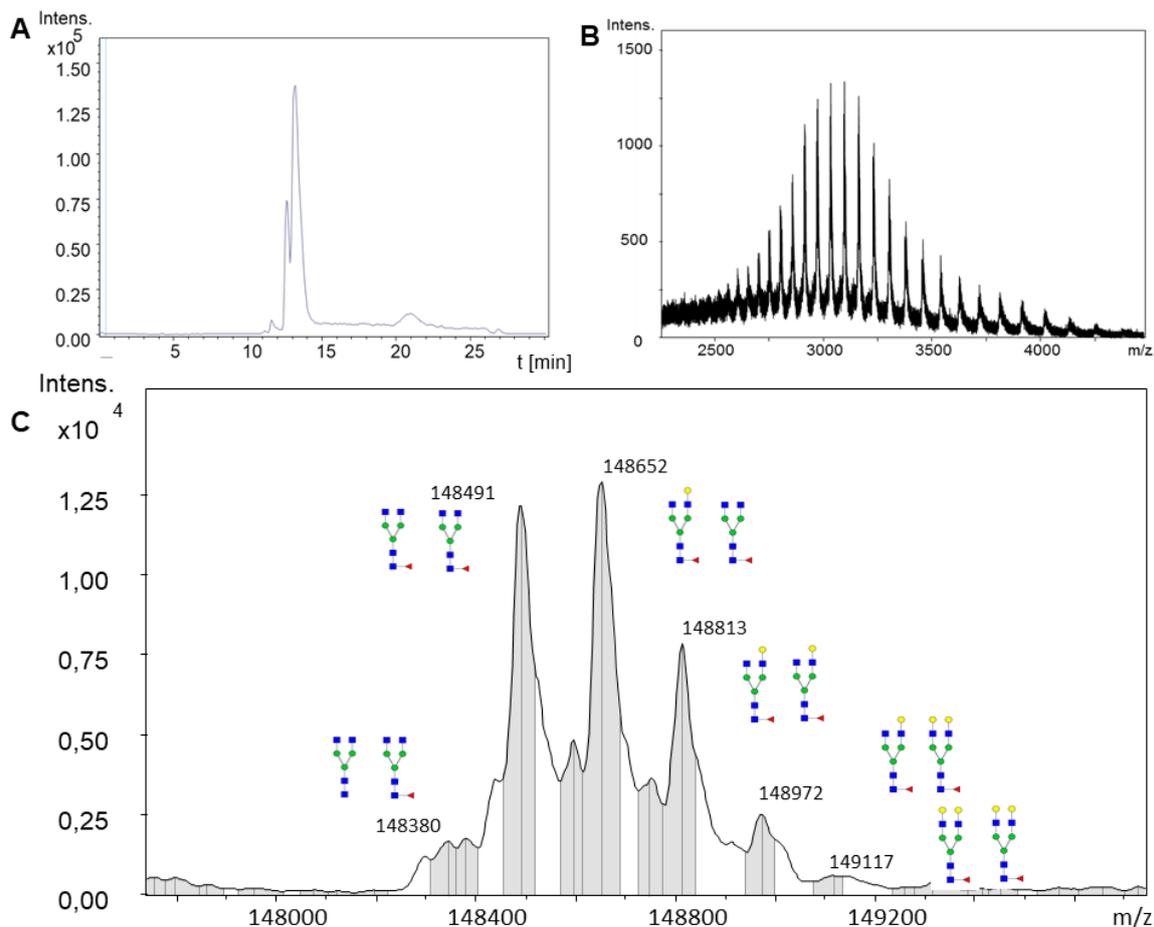


Abbildung 52: Intaktmassen-Analytik des mAbs mittels LC-ESI-ToF. (A) Chromatogramm des aufgereinigten mAb. (B) MS-Spektrum aufgenommen von 12-15 min der chromatographischen Trennung. (C) Dekonvolviertes Spektrum (12-15 min) im m/z-Bereich von 147800-14970.

Zu erkennen ist, dass der intakte Antikörper hauptsächlich mit fucosylierten diantennären nicht sialylierten Glykanen an beiden schweren Ketten besetzt ist. Die Hauptform ist FA2G1/FA2, gefolgt von der FA2/FA2 glykosylierten Form.

Es konnten vom ersten sowie vom zweiten Medienwechsel jeweils aus allen drei biologischen Replikaten Proben analysiert werden, aus der Ernte mit Medienwechsel lediglich aus zwei biologischen Replikaten und aus der Ernte ohne Medienwechsel aus einer Probe. Nach Prozessierung der Daten wie oben beschrieben, wurden die *Peakintensitäten* zur relativen Quantifizierung der einzelnen mAb-Formen genutzt. Die Intensität eines identifizierten *Peaks* wurde auf die Gesamtintensität der identifizierten *Peaks* normalisiert. In Abbildung 53 sind beispielhaft die relativen Mengen der mAb mit den Glykosylierungen FA2/FA2 und FA2G1/FA2G1, bzw. der Isoform FA2G2/FA2 gezeigt. Zu erkennen ist, dass bei Betrachtung dieser zwei mAb-Formen die Galaktosylierung mit der Kultivierungszeit abnahm. Zu Beginn der Kultivierung waren 21 % zweifach galaktosyliert und 17 % der mAb lagen ohne Galaktosen vor.

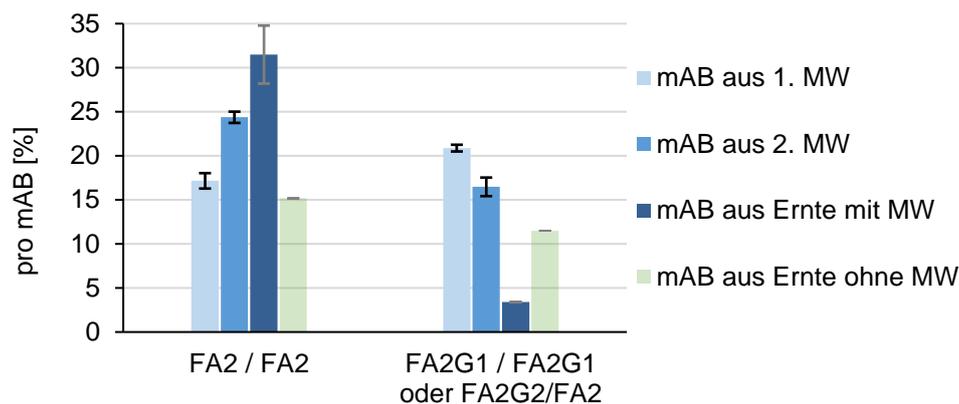


Abbildung 53: Ergebnisse der Intaktmassen-Analytik des mAb. Gezeigt sind die relativen Mengen mAb mit den Glykosylierungen FA2/FA2 und FA2G1/FA2G1 oder der Isoform FA2G2/FA2 aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den biologischen Triplikaten an. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der biologischen Duplikate.

Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels, also zum Ende der exponentiellen Phase, stieg dieser Anteil auf 24 %, während der Anteil der galaktosylierten Form auf 16 % reduziert war. Zum Ende der Kultivierung wurde dieser Unterschied deutlicher. Der Anteil der FA2/FA2 Form stieg auf 31 %. In dieser Kultivierungsphase waren die galaktosylierten Formen lediglich mit 3 % vertreten. Wurden die mAb-Formen über die gesamte Kultivierungsdauer betrachtet, so lagen 15 % der mAb nicht galaktosyliert vor. 12 % wiesen zwei Galaktosen pro Protein auf. Neben den hier dargestellten mAb-Formen wurden viele weitere identifiziert. Um eine Betrachtung aller identifizierten mAb-Formen zu erleichtern, wurden diese ähnlich wie unter Kapitel 4.2.2.8 (Formel (2)) beschrieben, nach Qualitätsattributen wie dem Galaktosylierungsgrad eingeteilt und bewertet. Mit Hilfe der Intaktmassen-Analytik konnten die Glykanstrukturen anhand der Massendifferenzen identifiziert und quantifiziert werden. Zusätzlich konnte der Anteil an nicht besetzten Glykosylierungsstellen ermittelt werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 54 (A) gezeigt. Über den Kultivierungsverlauf änderte sich der Glykosylierungsgrad nicht. In allen Proben waren 97 % aller Glykosylierungsstellen besetzt. Im Gegensatz zur Besetzung der Glykosylierungsstellen änderten sich Galaktosylierungsgrad, *core*-Fucosylierungsgrad und der Anteil an *High* Mannose Strukturen im Kultivierungsverlauf (vgl. Abbildung 54 (B)). Der Galaktosylierungsgrad betrug zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels $0,68 (\pm 0,03)$ und blieb innerhalb der Standardabweichung bis zum zweiten Medienwechsel gleich ($0,64 \pm 0,10$). Bei Ernte der Kulturen, als ihre Viabilität unter 50 % lag (vgl. Kapitel 7.1.2.1 und Tabelle 20), fiel der Galaktosylierungsgrad auf $0,16 (\pm 0,07)$. Der Galaktosylierungsgrad in der Kontrollkultur ohne Medienwechsel betrug $0,57$. Auch die

Ergebnisse und Diskussion

core-Fucosylierung war beim ersten und zweiten Medienwechsel innerhalb der Standardabweichungen konstant (1. MW: $0,82 \pm 0,02$; 2. MW: $0,84 \pm 0,04$).

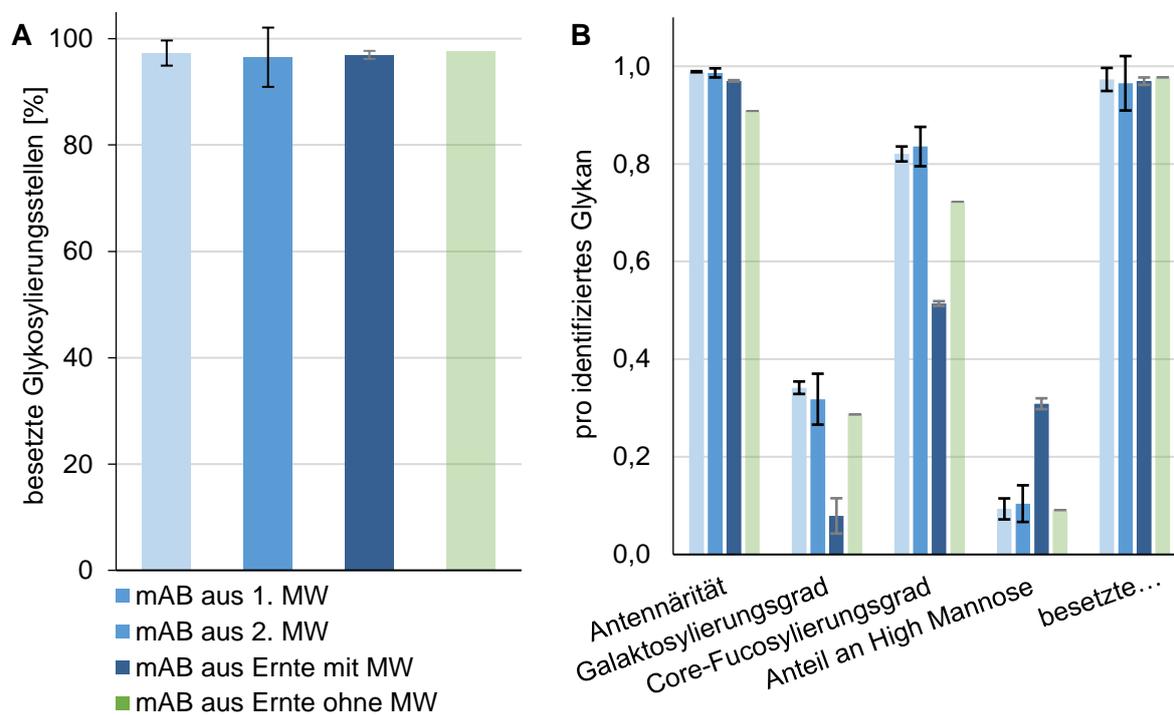


Abbildung 54: Ergebnisse der Intaktmassen-Analytik des mAb aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den biologischen Triplikaten an. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der biologischen Duplikate. Aus der Kultivierung ohne Medienwechsel konnte nur ein biologisches Replikat untersucht werden. In (A) ist der Anteil an besetzten Glykosylierungsstellen für alle Wachstumsphasen gezeigt. In (B) sind die Ergebnisse der Bewertung der Qualitätsattribute der identifizierten Glykosylierten Proteine gezeigt.

Das bedeutet, dass über 80 % aller Glykane fucosyliert waren. Zum Ende der Kultivierung sank der Wert um 39 % auf $0,51 (\pm 0,00)$. Wurde das Produkt über die gesamte Kultivierungsdauer analysiert, so zeigte sich eine core-Fucosylierung von 72 %. Der Anteil an High Mannose Strukturen lag in allen Proben unter 40 %. Sowohl nach drei, als auch nach sechs Tagen, waren $9 \% \pm 2 \%$, bzw. $10 \% \pm 4\%$ der identifizierten Glykane High Mannose Strukturen. Deren Anteil stieg bis zum 9. Tag der Kultivierung auf $31 \% \pm 1 \%$. In der Kontrollkultur lag der Anteil bei 9 %. Die Antennarität unterschied sich zwischen den Proben aus dem ersten und zweiten Medienwechsel nicht (1. MW: $1,98 \pm 0,00$; $1,97 \pm 0,02$). Am neunten Tag der Kultivierung sank der Wert auf $1,94 \pm 0,00$. In der Kultivierung ohne Medienwechsel lag die Antennarität der Glykane bei 1,84.

Für die Auswertung der Intaktmasse-Daten waren Informationen über vorkommende Glykane unerlässlich. Dafür wurden die Glykane mittels PNGaseF-Verdau vom Protein separiert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 4.2.2.5 und 4.2.2.6). Die Glykane wurden mit verschiedenen Methoden analysiert. Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Glykosylierungen dient eine HILIC von Fluoreszenz-gelabelten Glykanen. Die aufgetrennten Glykane wurden zum einen

mittels *Glucose Units* (GU) und zum anderen massenspektrometrisch identifiziert. Die Glykane wurden dazu mit Schutzgruppen versehen (Permethylierung) und mittels MALDI-ToF analysiert. Die Glykosylierungen wurden mit drei unterschiedlichen Verfahren analysiert. Durch den Einsatz dieser drei Methoden konnten Informationen zusammengeführt werden, um die unterschiedlichen Strukturen identifizieren und quantifizieren zu können.

7.4.2.3. HILIC von 2-AB gelabelten Glykanen des mAb

Zur Derivatisierung mit 2-AB wurden Glykane von 200 µg Protein abgespalten (vgl. Kapitel 4.2.2.5) und aufgereinigt (vgl. Kapitel 4.2.2.6). Nach dem Labeling der Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.7) wurden diese mittels Gelfiltration gereinigt, getrocknet und in 100 µL eines Laufmittelgemisches gelöst. 5 µL der Probe wurden injiziert und über eine *XBridge® Glycan BEH Amide* Säule in einem binären Laufmittelgemisch aufgetrennt. Die Fluoreszenz-gelabelten Glykane konnten mittels FL-Detektor detektiert werden (vgl. Kapitel 4.2.2.8). Zur Identifizierung der *Peaks* wurde unter gleichen Bedingungen eine Dextran Leiter aufgetrennt und detektiert. Aus der Anzahl der Glukosen und der zugehörigen Retentionszeit wurde eine Kalibrierreihe der GU (Glukose Einheiten) berechnet. Anhand dieser Kalibrierreihe konnten für die unterschiedlichen Glykanpeaks GUs berechnet werden. Mit Hilfe dieser Daten konnten Glykanstrukturen zu den *Peaks* zugeordnet werden. Als Datenbank diente die *EuroCarb DB* (http://relax.org.au.se/eurocarb/search_glycobase.action; Stand 31.08.2017). In Abbildung 55 ist ein Beispiel-Chromatogramm der 2-AB gelabelten Glykane eines mAb zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels gezeigt.

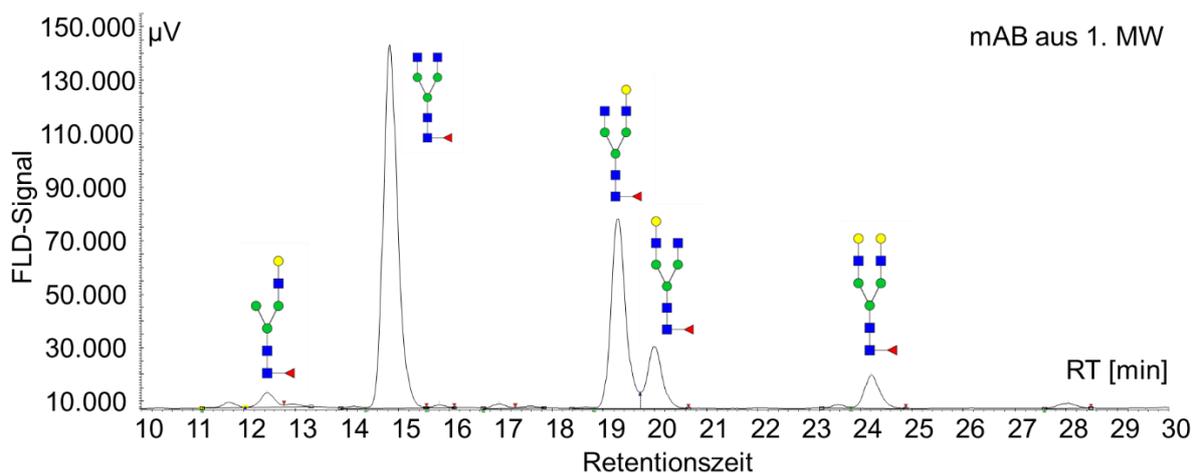


Abbildung 55: Chromatogramm von 2-AB gelabelten Glykanen eines mAb aus dem ersten Medienwechsel. Es sind die mittels GU und MS-Daten identifizierten Glykane gezeigt.

Den identifizierten Glykanstrukturen wurden folgende Qualitätsattribute zugeteilt: Antennarität, Galaktosylierungsgrad, *core*-Fucosylierungsgrad, antennäre Fucosylierung, Sialylierungsgrad

Ergebnisse und Diskussion

und den Anteil an *High* Mannose Strukturen. Die Berechnung ist in Kapitel 4.2.2.8 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 gezeigt. Es wurden keine Hybrid-Strukturen identifiziert. Der Anteil an trunkierten Strukturen war gering (0,03 und 0,08 pro identifiziertem Glykan) und wird hier nicht gezeigt. Es wurden zum Großteil diantennäre Glykane identifiziert. Dies entspricht den Daten aus der Intaktmassen-Analytik. Der Galaktosylierungsgrad lag nach der HILIC-FLD geringfügig höher (um 0,11 bis 0,15 pro identifiziertem Glykan), als mittels Intaktmassen-Analytik ermittelt, jedoch ist der Verlauf bei beiden Analysen ähnlich. Nach drei Tagen betrug der Galaktosylierungsgrad 0,57, zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels 0,48 und bei der Ernte mit Medienwechsel 0,16. Das Produkt aus den Kontrollkulturen wies eine Galaktosylierung von 46 % auf. Der mittels HILIC-FLD ermittelte *core*-Fucosylierungsgrad lag nach drei und sechs Tagen Kultivierungsdauer bei 0,98. Zum Ende der Kultivierung sank der Anteil an fucosylierten Glykanen auf 64 %. Dieser Verlauf entspricht dem, der mittels Intaktmassen-Analytik ermittelt wurde.

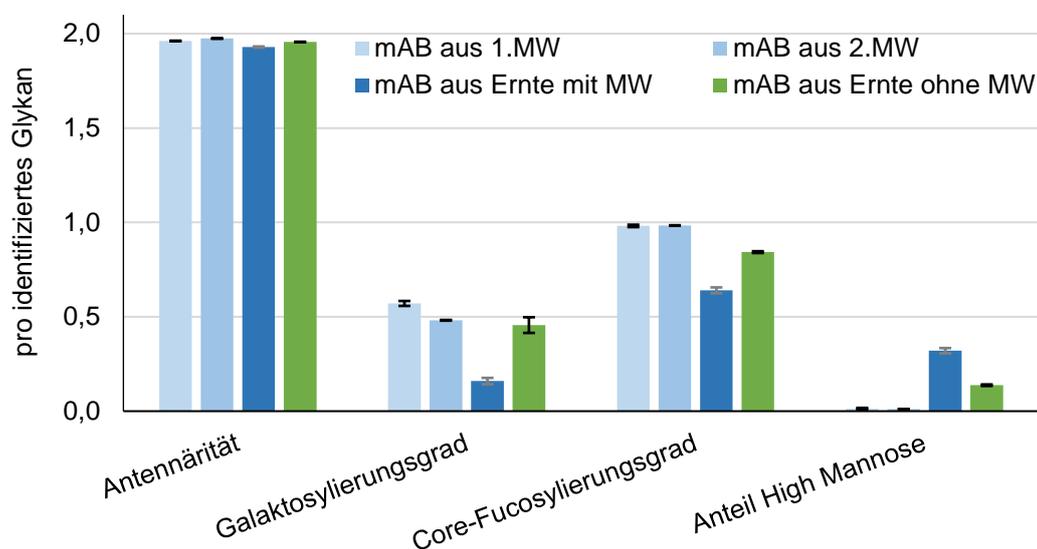


Abbildung 56: Ergebnisse der HILIC-FLD. Der Analytik der mAb aus dem ersten und zweiten Medienwechsel, sowie aus der Ernte ohne Medienwechsel lagen Proben aus drei biologischen Triplikaten zu Grunde, hier wird die Standardabweichung mit den Fehlerbalken (schwarz) angezeigt. Für die Analytik der mAb aus der Ernte mit Medienwechsel lagen zwei Proben zugrunde. Die Fehlerbalken (grau) zeigen jeweils die Differenz der Ergebnisse der beiden Proben an. Es wurden keine sialylierten Strukturen oder Strukturen mit antennären Fucosen identifiziert.

84 % aller identifizierten Glykane des Produktes der Kontrollkultur wiesen eine *core*-Fucosylierung auf. Ähnlich wie die Ergebnisse der Intaktmassen-Analytik zeigten die Ergebnisse der HILIC-FLD, dass zu Beginn der Kultivierung (bis Tag sechs) kaum *High* Mannose Strukturen detektiert werden konnten (1. MW und 2. MW: 1 %). Am Ende der Kultivierung, als die Viabilität der Zellen sank, stieg ihr Anteil auf 32 %. In der Kontrollkultur lag der Anteil an *High* Mannose Strukturen bei 14 %.

7.4.2.4. Identifizierung und relative Quantifizierung von permethylierten Glykanen des mAb

Um die mittels HILIC-FLD aufgetrennten und detektierten Glykanstrukturen sicher identifizieren zu können, wurde die Annotation mittels GU mit den Daten aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie überprüft. Die vom Protein abgespaltenen Glykane (vgl. Kapitel 4.2.2.5 und 4.2.2.6) wurden vor der Messung mittels MALDI-ToF permethyliert, sodass mögliche terminale Sialinsäuren bei der Ionisierung nicht abgespalten wurden. In den erhaltenen Spektren wurden Glykane annotiert. Dazu wurde eine Datenbank erstellt, die 174 Glykanstrukturen (*High Mannose*, Hybrid- und komplexe Strukturen) beinhaltet (vgl. Anhang: Tabelle-A 3). Es handelt sich um Strukturen, die für Säugetiere bekannt sind. Zur Berechnung der m/z der unterschiedlichen Strukturen wurden in der Software *GlycoWorkBench* (Ceroni, A., et al.; 2008) folgende Parameter eingestellt: Derivatisierung: *Permethyliert*; Ende: *reduziertes Ende*; Na^+ -Addukte.

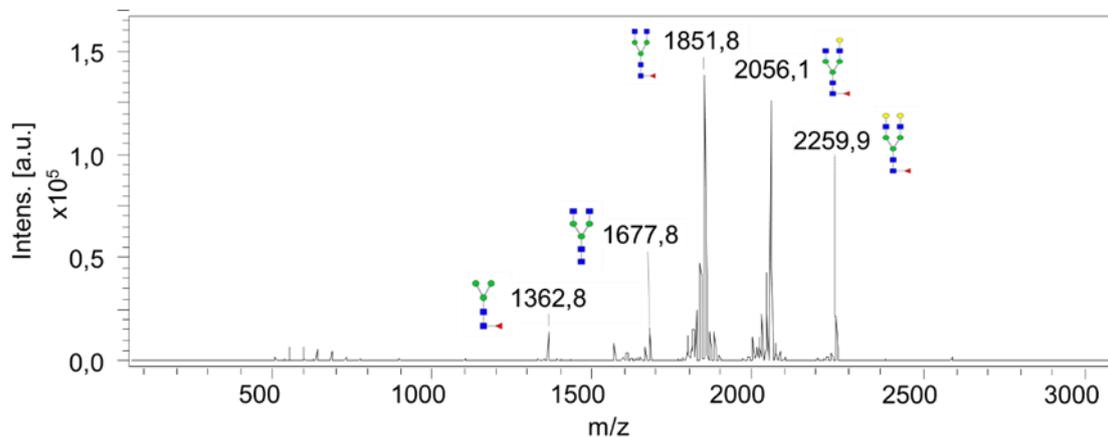


Abbildung 57: Massenspektrum der Glykane eines mAbs aus dem ersten Medienwechsel. Neben dem m/z ist jeweils die identifizierte Glykanstruktur gezeigt.

In Abbildung 57 ist ein Massenspektrum permethylierter Glykane gezeigt. Die Glykane stammen von einem mAb, das aus dem ersten Medienwechsel stammt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Struktur FA2 am intensivsten detektiert wurde, gefolgt von FA2G1 und FA2G2. Alle Spektren wurden nach den m/z der Glykanstrukturen durchsucht. Den identifizierten Glykanen wurden analog zu der Auswertung der Intaktmassen-Analytik und der HILIC-FLD Qualitätsattribute zugeordnet (vgl. Kapitel 4.2.2.8; Formel (2)). In Abbildung 58 sind die Ergebnisse der Auswertung gezeigt. Die Ergebnisse stimmen weitestgehend mit denen der Intaktmassen-Analytik (vgl. Kapitel 7.4.2.2) und der HILIC-FLD (vgl. Kapitel 7.4.2.3) überein. Die Antennarität lag zu allen Zeitpunkten bei 2,0. Der Galaktosylierungsgrad sank zum Ende der Kultivierung von $0,57 \pm 0,03$ (1. MW), bzw. $0,46 \pm 0,04$ (2. MW), auf $0,14 \pm 0,08$.

Ergebnisse und Diskussion

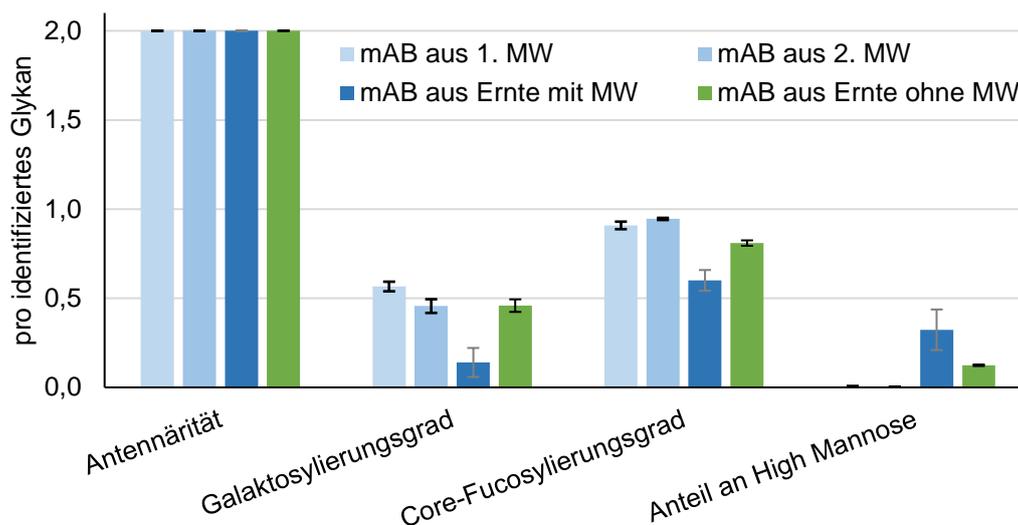


Abbildung 58: Ergebnisse der MALDI-ToF Messungen der permethylierten Glykane. Der Analytik der mAb aus dem ersten und zweiten Medienwechsel sowie aus der Ernte ohne Medienwechsel lagen Proben aus drei biologischen Triplikaten zu Grunde, hier wird die Standardabweichung mit den Fehlerbalken (schwarz) angezeigt. Für die Analytik der mAb aus der Ernte mit Medienwechsel lagen zwei Proben zugrunde. Die Fehlerbalken (grau) zeigen jeweils die Differenz der Ergebnisse der beiden Proben an. Es wurden weder sialylierte Glykane noch Glykane mit antennären Fucosen identifiziert.

Ohne Medienwechsel lag er bei $0,46 \pm 0,04$. Ebenso war der *core*-Fucosylierungsgrad am Ende der Kultivierung mit Medienwechsel mit $0,60 \pm 0,06$ am Geringsten, während zum Zeitpunkt des ersten und des zweiten Medienwechsels über 90 % der Glykane fucosyliert waren. Der Fucosylierungsgrad des mAb aus den Kontrollkultivierungen lag bei $0,81 \pm 0,02$. Die Daten der MALDI-Messungen zeigten, wie auch die Daten der Intaktmasse-Analytik und der Analytik der gelabelten Glykane, einen deutlichen Anstieg von *High Mannose* Strukturen zum Ende der Kultivierungen mit Medienwechsel (von 0,01 (1. MW), bzw. 0,00 (2. MW) auf 0,32). Der Anteil an *High Mannose* Strukturen in den Kontrollkultivierungen betrug 12 %.

7.4.2.5. Zusammenfassung der Analytik des mAb

Die Daten der unterschiedlichen Produktanalysen werden in diesem Kapitel zusammen mit den Kultivierungsdaten diskutiert. Neben der Diskussion der Produktanalytik werden die analytischen Methoden beurteilt und die Produktglykosylierung wird hinsichtlich pharmazeutischer Gesichtspunkte bewertet.

1) Einschätzung der Analytik

Zunächst sollen die Analytik-Strategien, mit denen intakte Glykane untersucht wurden, verglichen werden.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (IM = Intaktmassen-Analytik des intakten Proteins; 2-AB = HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI = MALDI-ToF Analyse permethylierter Glykane)

Qualitätsattribut	Analytik	1. MW Tag 0-3	2. MW Tag 4-6	Ernte + MW Tag 7-9	Ernte -MW Tag 0-9
Antennarität	IM	1,98 ± 0,00	1,97 ± 0,02	1,94 ± 0,00	1,82
	2-AB	1,96 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,93 ± 0,00	1,96 ± 0,00
	MALDI	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
Galaktosylierung	IM	0,68 ± 0,03	0,64 ± 0,10	0,16 ± 0,07	0,57
	2-AB	0,57 ± 0,01	0,48 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,46 ± 0,04
	MALDI	0,57 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,14 ± 0,08	0,46 ± 0,04
core-Fucosylierung	IM	0,82 ± 0,02	0,84 ± 0,04	0,51 ± 0,00	0,72
	2-AB	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,00	0,64 ± 0,02	0,84 ± 0,00
	MALDI	0,91 ± 0,02	0,95 ± 0,01	0,60 ± 0,06	0,81 ± 0,02
High Mannose	IM	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,09
	2-AB	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,14 ± 0,00
	MALDI	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,11	0,12 ± 0,00

Für die Analytik kamen folgende Methoden zum Einsatz: Intaktmassen-Analytik, HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane und MALDI-ToF Analytik permethylierter Glykane. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden sind in Tabelle 21 und Abbildung 59 vergleichend dargestellt.

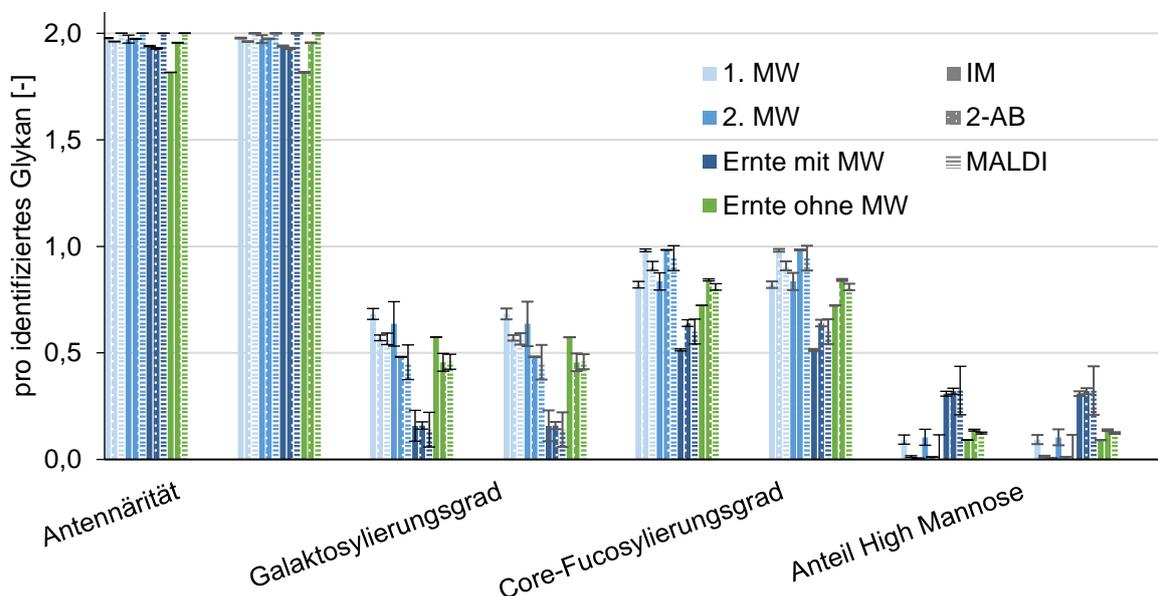


Abbildung 59: Vergleichende Darstellung der drei Analysen zur N-Glykosylierung des mAb nach wachstumsspezifischer Probenahme (IM = Intaktmassen-Analytik; 2-AB = HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI = MALDI-ToF Analytik permethylierter Glykane).

Es wird deutlich, dass die Abweichungen unter den Analytik-Strategien gering sind. Dies zeigt zum einen, dass weder PNGase F Verdau noch die anschließende Aufreinigung der Glykane selektiv waren und die Glykan-Analytik somit nicht einschränken. Trotz geringer Unterschiede

Ergebnisse und Diskussion

der absoluten Werte zeigen alle drei Analysen für die unterschiedlichen Qualitätsattribute gleiche Trends, was ebenso gegen eine Selektivität der Probenvorbereitung (PNGase F Verdau, Glykan Aufreinigung, Labeling und Permethylierung) sowie der eigentlichen Analysen (microTOF, HILIC-FLD und MALDI-ToF) spricht (vgl. Abbildung 59). Des Weiteren konnten mit keiner der Analytik Methoden Sialinsäuren nachgewiesen werden.

2) Ursachen für die Unterschiede in der Glykosylierung

Mittels Intaktmassen-Analytik wurde zusätzlich zu den Qualitätsattributen, die die Mikroheterogenität beschreiben, die Besetzung der Glykosylierungsstellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung analysiert. Zu allen Zeitpunkten lagen 97 % der Glykosylierungsstellen glykosyliert vor. In der Literatur wird mehrfach beschrieben, dass sich sowohl eine Glukose-, als auch eine Glutaminlimitierung auf die Glykosylierung des Produktes negativ auswirkt. Es wurde sowohl bei CHO-Zellen, als auch bei humanen Zellen beobachtet, dass der Anteil an nicht glykosyliertem Produkt bei Glukosemangel zunimmt (Liu, B., et al.; 2014; Hayter, P. M., et al.; 1992; Seo, J. S., et al.; 2014). Für einen Glutaminmangel konnte der gleiche Effekt bei BHK-Zellen gezeigt werden (Cruz, H. J., et al.; 2000). Im Zeitraum zwischen Tag sieben und Tag neun (Ernte mit MW) waren sowohl Glukose, als auch Glutamin limitierend. In diesem Zeitraum blieb der Anteil an glykosyliertem Produkt konstant. Liu et al. berichteten hingegen von einer Zunahme von nicht glykosyliertem mAb bereits nach 24 h ohne Glukose, bzw. bei Glukosekonzentrationen von 12,5 mM. Ein vollständig glykosylierter mAb wurde bei einer Glukosekonzentration von 25 mM produziert. Der mAb wurde in stabil transfizierten CHO.DUXB-Zellen produziert (Liu, B., et al.; 2014). Für die hier kultivierten Zellen, in dem hier verwendeten, chemisch definierten Medium konnte dieser Effekt auch nach drei Tagen unter sowohl Glukose-, als auch Glutaminlimitierung nicht bestätigt werden. Auswirkungen wie die Erhöhung des Anteils an *High* Mannose Strukturen und Verringerung des Grades an Galaktosylierung bei Glukose- und Glutaminmangel fanden sich in diesen Ergebnissen jedoch bestätigt (vgl. Tabelle 21 und Abbildung 59). Mit den vier durchgeführten Analysen konnten übereinstimmend folgende Beobachtungen gemacht werden:

- 1) Die Glykane des mAb waren nicht sialyliert.
- 2) Die Hauptformen der identifizierten Glykane waren G0F, G1F und mit geringerem Anteil G2F.
- 3) Die Antennarität blieb annähernd konstant. Es lagen zu jedem Zeitpunkt fast ausschließlich diantennäre Strukturen vor.

- 4) Der Galaktosylierungsgrad nahm im Verlauf der Kultivierung ab. Zu Beginn lagen durchschnittlich ca. 50 % der Glykane galaktosyliert vor, während zum Ende der Kultivierung im Durchschnitt ca. 15 % galaktosyliert waren.
- 5) Der Anteil der *core*-fucosylierten Glykane nahm im Verlauf der Kultivierung ab. Zum Zeitpunkt der ersten beiden Medienwechsel trugen 82-98 % der Glykane eine *core*-Fucose. Die Glykane aus der Ernte mit Medienwechsel zeigten zu 51-64 % *core*-Fucosen.
- 6) Der Anteil an *High* Mannose Strukturen war am Ende der Kultivierung am höchsten. Während der ersten sechs Tage lag der Anteil an *High* Mannose Strukturen bei 1-10 %. Zum Ende der Kultivierung (Tag 7-9) stieg der Anteil auf 31-32 %.

In keiner der drei Analysen der intakten Glykane konnten Sialinsäuren nachgewiesen werden. Die Quantifizierung abgespaltener Sialinsäuren (vgl. 7.4.2.1) bestätigte die Abwesenheit von sowohl NANA und NGNA. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da weder humane Antikörper noch die meisten in CHO, NS0, SP2/0 oder PERC.6 produzierten Antikörper sialyliert sind, obwohl andere Glykoproteine, die in den gleichen Systemen produziert wurden, Sialylierungen aufweisen (Beck, A.; Reichert, J. M.; 2012). Die Zellen, die mAbs mit sialylierten Glykanen produzieren, sind genetisch optimiert. Solchen Antikörpern konnte eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben werden (Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V.; 2008). Die ADCC wird jedoch verringert (Beck, A.; Reichert, J. M.; 2012). Je nach Einsatzgebiet sind nicht sialylierte Glykane bei mAbs also erwünscht oder unerwünscht.

Die identifizierten diantennären Glykanformen sind bekannt für die mAb-Glykosylierung und sind essentiell für die Bindung und Aktivierung von Fcγ-Rezeptoren (Jefferis, R.; 2012; Beck, A.; Reichert, J. M.; 2012). Die Galaktosylierung der Antennen war am Ende der Kultivierung (Tag sieben bis neun) deutlich geringer (15 %) als im Zeitraum von Tag null bis Tag sechs (50 %). Ein solcher Effekt wird wie auch die Zunahme der *High* Mannose Strukturen in der Literatur in Zusammenhang mit geringen Glukose- und Glutaminkonzentrationen gebracht (vgl. Kapitel 1.3.2) (Hayter, P. M., et al.; 1992; Chapman, A. E.; Calhoun, J. C.; 1988; Liu, B., et al.; 2014; Jayme, D., et al.; 1997; Seo, J. S., et al.; 2014; Chee Fung Wong, D., et al.; 2005; Cruz, M. P.; 2015; Villacrés, C., et al.; 2015). Da sowohl die Glukose, als auch die Glutaminkonzentration im Zeitraum vom siebten bis zum neunten Tag der Kultivierung annähernd 0 mM betrug, kann mit den hier gezeigten Ergebnissen sowohl die Abnahme der Galaktosylierung, als auch die Zunahme an *High* Mannose Strukturen bestätigt werden. Die Zunahme von *High* Mannose Strukturen bedingt eine Verringerung des Anteils an *core*-Fucosylierungen, da *High* Mannose Strukturen nicht fucosyliert vorliegen (Zhou, Q., et al.; 2008). Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Ammoniumkonzentration im

Ergebnisse und Diskussion

genannten Zeitraum erhöht war, was ebenfalls eine Verringerung der Galaktosylierung zur Folge haben kann (vgl. Kapitel 1.3.2) (McCracken, N. A., et al.; 2014; Gawlitzek, M., et al.; 1998; Gawlitzek, M., et al.; 2000; Yang, M.; Butler, M.; 2000a; Yang, M.; Butler, M.; 2002). Die Ammoniumkonzentration wurde in diesen Kultivierungen nicht ermittelt. Es ist davon auszugehen, dass sie zum Ende der Kultivierung zwischen 5 und 10 mM lag (Büntemeyer, H., et al.; 1992), da das Ammonium hauptsächlich durch die Verstoffwechslung des Glutamins bzw. durch den chemischen Abbau des Glutamins entsteht. Dies ist jedoch hypothetisch, da der Stoffwechsel sowohl Zelllinien, als auch Klon abhängig ist. Glutamin wurde in diesen Kultivierungen in einer Konzentration von 8 mM supplementiert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Veränderung der Glykosylierung sowohl durch Nährstoffmangel als auch durch Akkumulation von Metaboliten im Kulturüberstand verursacht wird. Vermutlich wird zum Ende der Kultivierung bereits anders glykosyliertes Produkt sekretiert als am Anfang. Es wird vermutet, dass die Kultivierungsbedingungen den Produktionsprozess der Zelle beeinflussen, was unabhängig von der Wachstumsphase, in der sich die Zellen befinden, wäre. Die Antennarität blieb über den Kultivierungszeitraum annähernd konstant.

Um einschätzen zu können, ob die gefundenen Unterschiede in den Glykosylierungen zellbezogen sind, oder durch chemische bzw. enzymatische Prozesse außerhalb der Zelle verursacht werden, wurden die Ergebnisse der einzelnen Probenahmen unter Berücksichtigung der Produktquantität bei jeder Probenahme aufsummiert und mit den Ergebnissen der Kontrollkultivierung verglichen. Die Berechnung ist in Formel (3) gezeigt.

$$(3) \overline{x_{mit\ MW}} = \frac{P_{1.MW}}{\sum P} \times x_{K(1.MW)} + \frac{P_{2.MW}}{\sum P} \times x_{K(2.MW)} + \frac{P_{Ernte\ mit\ MW}}{\sum P} \times x_{K(Ernte)}$$

mit $\overline{x_{mit\ MW}}$ = Durchschnitt des normalisierte Kenngröße des jeweiligen Qualitätsattributs über die drei Probenahmen

$P_{1.MW}$ = Produktmenge nach erstem Medienwechsel

$\sum P$ = Summe der Produktmengen aus erstem, zweitem Medienwechsel und Ernte mit Medienwechsel

$x_{K(1.MW)}$ = normalisierte Kenngröße der jeweiligen Klasse (erster Medienwechsel)

Der zugehörige Fehler wurde mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung berechnet (vgl. Formel (4)).

$$(4) u_{\overline{x_{mit MW}}} = \sqrt{\left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial \Sigma P} \times \Delta \Sigma P\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial x_{K(1.MW)}} \times \Delta x_{K(1.MW)}\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial x_{K(2.MW)}} \times \Delta x_{K(2.MW)}\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial x_{K(Ernte)}} \times \Delta x_{K(Ernte)}\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial P_{1.MW}} \times \Delta P_{1.MW}\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial P_{2.MW}} \times \Delta P_{2.MW}\right)^2 + \left(\frac{\partial \overline{x_{mit MW}}}{\partial P_{Ernte}} \times \Delta P_{Ernte}\right)^2}$$

Würden die summierten Ergebnisse der Qualitätsattribute der Kultivierung mit Medienwechsel, denen der Ergebnisse ohne Medienwechsel entsprechen, so würde dies einen Hinweis dafür liefern, dass der Grund für die unterschiedliche Glykosylierung auf die Produktion durch die Zellen zurückzuführen ist. Das Produkt, welches am Ende der Kultivierung ohne Medienwechsel geerntet wurde, setzt sich in diesem Fall aus den Produkten der einzelnen Wachstumsphasen zusammen. Demnach hätte die Verweildauer des Produktes in der Kultur keinen Einfluss auf die Glykosylierung. Unterschiede in den Ergebnissen hingegen würden auf eine Beeinflussung der Glykosylierung durch unterschiedliche Verweilzeiten in der Kultur hinweisen.

In Abbildung 60 sind die mittels Formel (3) berechneten Werte im Vergleich zum Produkt der Kontrollkultivierung gezeigt. Es wurden sowohl für die Analytik mittels HILIC-FLD (Abbildung 60 (A)), als auch für die massenspektrometrische Analytik (Abbildung 60 (B)) die Antennarität, der Galaktosylierungsgrad, der *core*-Fucosylierungsgrad sowie der Anteil an *High* Mannose Strukturen berechnet. Antennarität und Galaktosylierungsgrad zeigten innerhalb der Fehler keine Unterschiede zwischen den Produkten, die aus der Kultivierung mit Medienwechsel stammen, zu den Produkten, die über die gesamte Kultivierungsdauer im Kulturüberstand bei 37 °C verweilten. Bei der *core*-Fucosylierung und dem Anteil an *High* Mannose Strukturen sind geringe Unterschiede zu erkennen. Die *core*-Fucosylierung der Summe der Produkte aus den Kultivierungen mit Medienwechsel ist geringfügig höher (HILIC-FLD: 90 % ± 1 %; MALDI-ToF: 86 % ± 1 %), als die der Kontrollkultivierung (HILIC-FLD: 84 % ± 0 %; MALDI-ToF: 81 % ± 2 %). Der mAb aus den Kontrollkultivierungen zeigte einen höheren Anteil an *High* Mannose Strukturen (HILIC-FLD: 14 % ± 0 %; MALDI-ToF: 12 % ± 0 %), als die Summe der Produkte aus den Kultivierungen mit Medienwechsel (HILIC-FLD: 8 % ± 1 %; MALDI-ToF: 8 % ± 1 %). Wie bereits erwähnt sind *High* Mannose Strukturen nicht fucosyliert, was die Abnahme der *core*-Fucosylierungen bei Zunahme von *High* Mannose Strukturen erklärt. Es ist unwahrscheinlich, dass im Kulturüberstand durch chemische oder enzymatische Prozesse *High* Mannose Strukturen aus komplexen Glykanen entstehen. Bei Betrachtung dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass die Viabilität in den Kulturen mit Medienwechsel schneller abfiel, als in den Kontrollkultivierungen (vgl. 7.1.2.1; mit Medienwechsel: ab Tag sechs von 96 % auf 77 % (Tag acht) bzw. 46 % (Tag neun); ohne

Ergebnisse und Diskussion

Medienwechsel: ab Tag sechs von 96 % auf 92 % (Tag acht) bzw. 58 % (Tag neun); vgl. Tabelle 16; Tabelle 20).

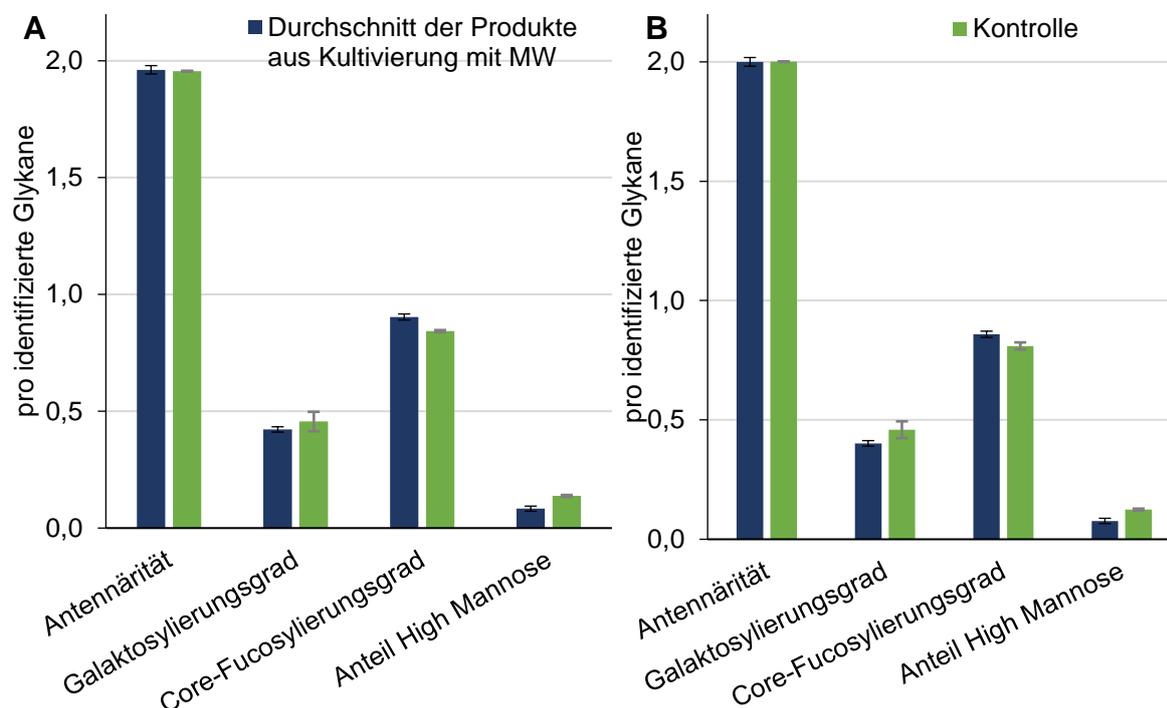


Abbildung 60: Vergleich der Glykosylierungen der Summe des mAbs aus den wachstumsspezifischen Probenahmen und dem mAb aus der Kontrollkultivierung. (A) Analytik der 2-AB gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD. (B) Massenspektrometrische Analytik der permethylierten Glykane des mAbs.

Deswegen konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Unterschiede in der Fucosylierung bzw. im Anteil der *High Mannose* Strukturen durch unterschiedliche Viabilitäten zwischen Kontrollkulturen und Kulturen mit Medienwechsel begründet waren, oder ob dies durch eine längere Verweilzeit des Produktes im Kulturüberstand erklärt werden könnten.

3) Bedeutung der identifizierten Glykane für die pharmazeutische Wirkung

2013 machten die mAbs, die zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden 44 % der mAbs aus, die den größten Umsatz machten (neun mAbs: Humira, Enbrel, Remica, Rituxan/MabThera, Avastin, Herceptin, Lucentis, Erbitux und Eylea: 58 Milliarden US \$) (Walsh, G.; 2014). Diese mAbs sollen eine möglichst starke ADCC hervorrufen, um Tumorzellen zu bekämpfen. Der hier produzierte Antikörper würde zwar kaum immunologische Reaktionen hervorrufen, da kein NGNA an den Glykanen zu finden war und der *High Mannose* Anteil sehr gering war, jedoch könnte die Wirkung des Antikörpers optimiert werden, indem die *core*-Fucosylierung erniedrigt würde. Dass *core*-fucosylierte Glykane die ADCC verringern, ist lange bekannt und Ansatzpunkt zur Optimierung von mAbs (vgl. Kapitel 1.5.2.2) (Rothman, R. J., et al.; 1989; Shields, R. L., et al.; 2002; Yamane-Ohnuki,

N., et al.; 2004; Satoh, M., et al.; 2006; Mori, K., et al.; 2007). Zum Ende der Kultivierung sank der Anteil der *core*-fucosylierten Antikörper, jedoch lediglich, da mehr *High* Mannose Strukturen gebildet wurden. MAbs mit *High* Mannose Strukturen werden schneller im Blutkreislauf abgebaut (Goetze, A. M., et al.; 2011; Kanda, Y., et al.; 2007; Kanda, Y., et al.; 2006). Demnach verbessert sich die Produktqualität zum Ende der Kultivierung hinsichtlich der Pharmakokinetik und -dynamik nicht.

Um ein Therapeutikum, welches eine hohe ADCC auslöst, zu produzieren, reicht es im Falle der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen vermutlich nicht aus, den Kultivierungsprozess zu optimieren, da zu jedem Zeitpunkt mindestens 80 % der mAb fucosyliert vorlagen. Der pH-Wert während der Kultivierung könnte angepasst werden, da bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass dadurch der Fucosylierungsgrad beeinflusst werden kann (Müthing, J., et al.; 2003; Trummer, E., et al.; 2006; Borys, M. C., et al.; 2010). Ebenso kann die Osmolarität des Mediums Auswirkungen auf die *core*-Fucosylierung haben, wie Konno et al. 2012 zeigten (Konno, Y., et al.; 2012). Diese Parameter zeigen aber, wie auch der Einfluss der Temperatur auf die Fucosylierung (Agarabi, C. D., et al.; 2015), keinen eindeutigen Trend (vgl. Kapitel 1.3.2). Daher ist eine Optimierung der Fucosylierung durch Kultivierungsparameter diffizil. Einfacher ist der Einsatz von fluorierten Fucose-Analoga (Rillahan, C. D., et al.; 2012; Kamińska, J., et al.; 1999), jedoch wäre für eine Produktion im industriellen Maßstab die Optimierung der Produktionszelle durch molekularbiologische Methoden vorzuziehen.

7.4.3. Produktanalytik des C1-INHs

Um mögliche Unterschiede in der Qualität des C1-INHs aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen (die ersten fünf Tage: 1. MW; die nächsten vier Tage: 2. MW; weitere drei Tage: Ernte mit MW und die 12-tägige Kontrollkultivierung: Ernte ohne MW) zu identifizieren, wurden drei Analysen zur Glykosylierung des Produktes durchgeführt. Die Sialinsäuren wurden mittels milder Hydrolyse vom Produkt abgespalten und quantifiziert (vgl. Kapitel 4.2.2.2). Des Weiteren wurden die N-Glykane spezifisch mittels PNGase F Verdau vom Protein abgespalten (vgl. Kapitel 4.2.2.5 und 4.2.2.6). Ein Teil der Glykane wurde Fluoreszenz-gelabelt, mittels HILIC-FLD aufgetrennt und detektiert (vgl. Kapitel 4.2.2.7 und 4.2.2.8). Der andere Teil wurde permethyliert, um die Glykane über ihre Masse zu identifizieren und relativ zu quantifizieren (vgl. Kapitel 4.2.2.10). Hier werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert. In Tabelle 22 sind einige für die folgende Diskussion relevante Kultivierungsparameter zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 22: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Produktglykosylierung auswirken können.

Kultivierungsparameter	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte - MW
	Tag 0-5	Tag 6-9	Tag 10-12	Tag 0-12
Viabilität	98 %	74-85 %	49-53 %	49-53 %
Glukosekonzentration	25 mM	1 mM	0 mM	0 mM
Glutaminkonzentration	3,5 mM	0,4 mM	0,1 mM	0,0 mM

7.4.3.1. Sialinsäure-Bestimmung des C1-INHs

Für die Sialinsäure-Bestimmung wurden je 50 µg des aufgereinigten C1-INH eingesetzt. Das entspricht einer Stoffmenge von 907 pmol. Die abgespaltenen Sialinsäuren wurden mittels HPAEC-PAD aufgetrennt. In Abbildung 61 ist beispielhaft ein Chromatogramm einer Probe und des Standards (100 µM) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass NANA bei einer Retentionszeit von 2,8 min detektiert wurde. In der Probe sind NANA und der interne Standard zu erkennen. Es war lediglich für die Probe des zweiten Medienwechsels ausreichend Material aus den drei biologischen Replikaten vorhanden. Es konnte in keiner Probe NGNA detektiert werden. Die ermittelten NANA-Konzentrationen wurden auf die Proteinmenge bezogen (vgl. Abbildung 62 (A)) und auf eine Glykosylierungsstelle (Summe aus sechs N- und neun O-Glykosylierungsstellen) (vgl. Abbildung 62 (B)). Der Sialinsäuregehalt lag zwischen 28 mol und 40 mol NANA pro mol Protein, bzw. zwischen 1,8 und 2,6 NANA pro Glykosylierungsstelle (N- und O-Glykane).

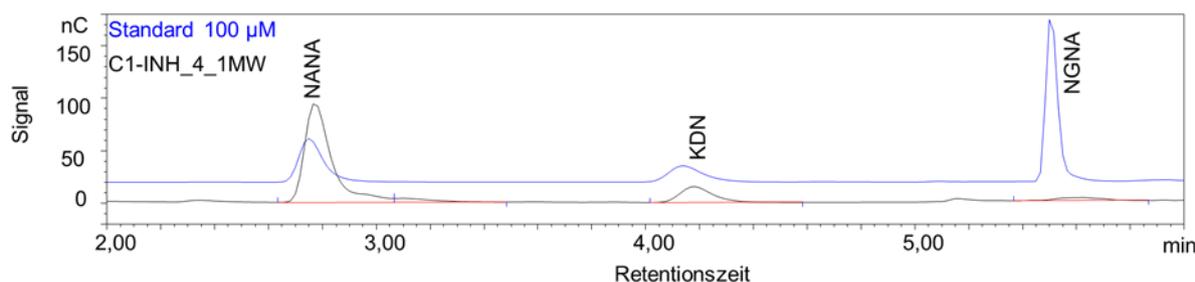


Abbildung 61: Chromatogramme des Sialinsäure Standards mit 100 µM NANA und NGNA (blau) und von einer hydrolysierten C1-INH Probe (schwarz), jeweils mit dem internen Standard Kdn.

Aufgrund der hohen Standardabweichung der Probe vom zweiten Medienwechsel ist kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten zu erkennen. Jedoch sank der Sialyierungsgrad zum Ende der Kultivierung. Zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels waren im Schnitt $2,5 \pm 0,1$ N-Acetylneuraminsäuren an einem Glykan. Zum

Ende der Kultivierung waren es $2,0 \pm 0,3$. Bei der Kontrollkultivierung lag die Sialylierung pro Glykosylierungsstelle bei $1,8 \pm 0,2$.

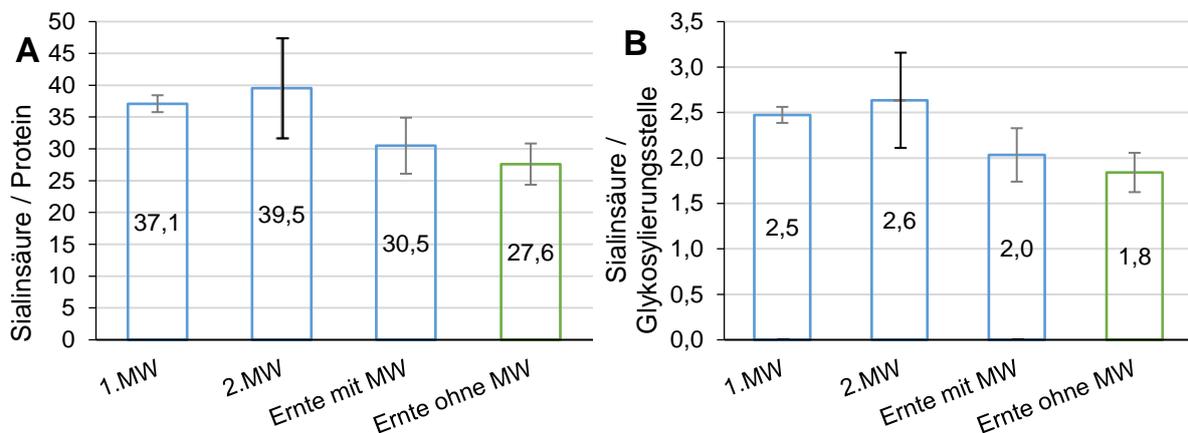


Abbildung 62: NANA bezogen auf (A) ein mol Protein, bzw. (B) auf alle Glykosylierungsstellen eines Mols C1-INH. Für den zweiten Medienwechsel konnte die Standardabweichung berechnet werden, da es drei biologische Replikate gab (schwarze Fehlerbalken). Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate.

Beim C1-INH ist zu beachten, dass neben den sechs N-Glykosylierungsstellen weitere neun O-Glykosylierungsstellen vorhanden sind. Diese sind bei der Berechnung der Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle zu berücksichtigen, da die Abspaltung der Sialinsäuren unspezifisch war und sowohl Sialinsäuren von N-, als auch von O-Glykanen abgespalten wurden. Hier wurde ein Durchschnittswert für alle 15 Glykosylierungsstellen berechnet.

Zur genaueren Betrachtung der N-Glykane wurden diese mittels PNGaseF vom Protein abgespalten und zum einen mit 2-AB gelabelt (vgl. Kapitel 4.2.2.7) und mittels HILIC-FLD aufgetrennt und detektiert (vgl. Kapitel 4.2.2.8). Zum anderen wurden sie mit Schutzgruppen versehen (Permethylierung (vgl. Kapitel 4.2.2.10)) und mittels Massenspektrometrie wurde ihre Masse ermittelt, über die sie identifiziert werden konnten. Zusätzlich war eine relative Quantifizierung durch die *Peakintensitäten* möglich.

7.4.3.2. HILIC-FLD von 2-AB gelabelten Glykanen des C1-INHs

Die 2-AB gelabelten Glykane wurden über einen 82-minütigen Gradienten (vgl. Kapitel 4.2.2.8, Tabelle 9) aufgetrennt. In Abbildung 63 sind Chromatogramme der unterschiedlichen Proben gezeigt. Zu erkennen ist, dass die *Peaks* nicht basisliniengetreunt werden konnten. Neben einigen Haupt*peaks* sind viele kleine *Peaks* zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussion

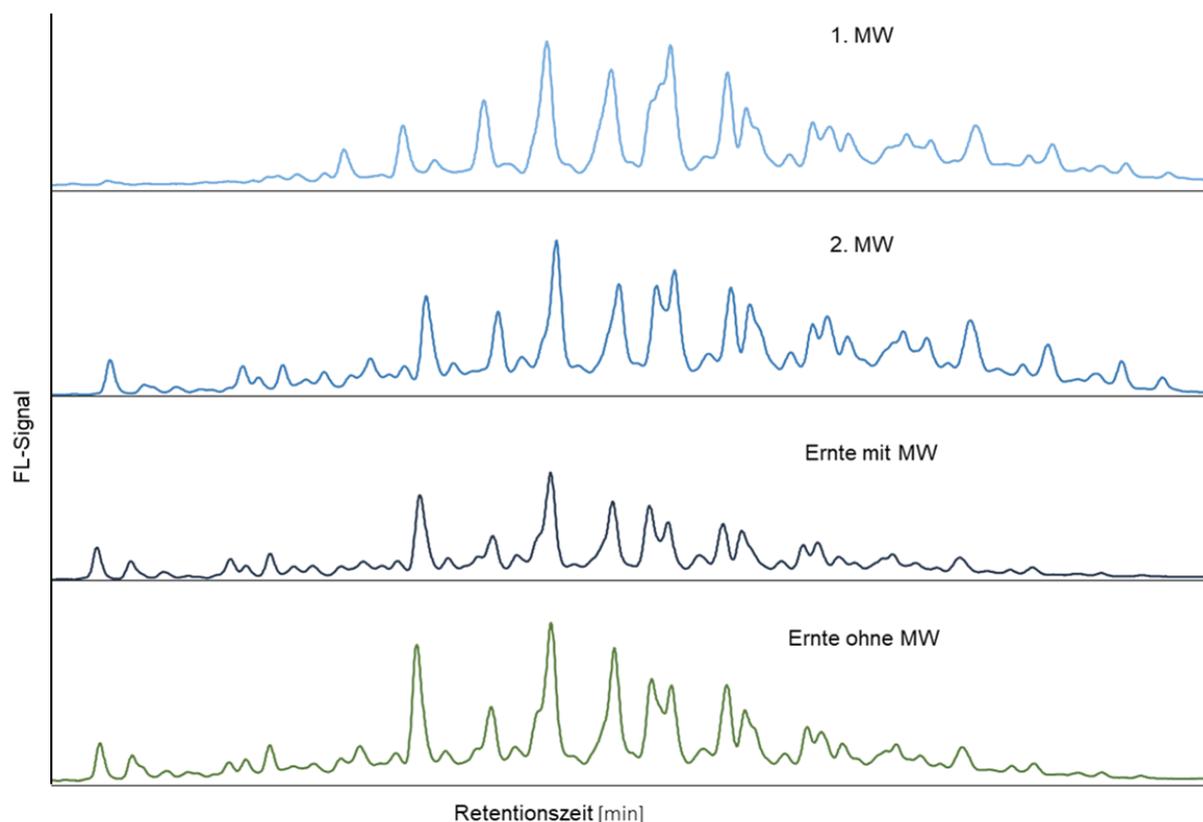


Abbildung 63: Chromatogramme der 2-AB gelabelten Glykane des C1-INHs der unterschiedlichen Wachstumsphasen.

Trotz Identifizierung von Glykanen mittels MALDI-ToF-MS und der Berechnung von GUs konnte keine eindeutige Annotation durchgeführt werden. Im Vergleich mit dem Chromatogramm in Abbildung 63 der Glykane eines mAb zeigen diese Chromatogramme eine hohe Komplexität und Heterogenität der N-Glykosylierung des C1-INHs. Die Chromatogramme der unterschiedlichen Proben unterschieden sich, was eine variierende Glykosylierung in den diversen Wachstumsphasen vermuten ließ. Die gemessenen biologischen Replikate zeigten jeweils ein analoges Laufverhalten (vgl. Anhang: Abbildung-A 6). In Kapitel 7.4.2.5 wurde gezeigt, dass sich die Ergebnisse der Analytik der Glykane mittels HILIC-FLD und MALDI-ToF kaum unterschieden und die Methoden keine Selektivitäten aufwiesen. Daher wurden zur näheren Betrachtung der Glykosylierung die Ergebnisse der Massenbestimmung der permethylierten Glykane genutzt.

7.4.3.3. Identifizierung und relative Quantifizierung der permethylierten Glykane des C1-INHs

Die abgespaltenen Glykane konnten über ihre Masse identifiziert werden. Um die Sialinsäuren vor einer Abspaltung in der MALDI-Quelle zu schützen, wurden die Glykane permethyliert (vgl. Kapitel 4.2.2.10). Die durch die Chromatogramme vermutete Komplexität und

Heterogenität der Glykosylierung des C1-INHs wurde in den Spektren bestätigt (vgl. Abbildung 64).

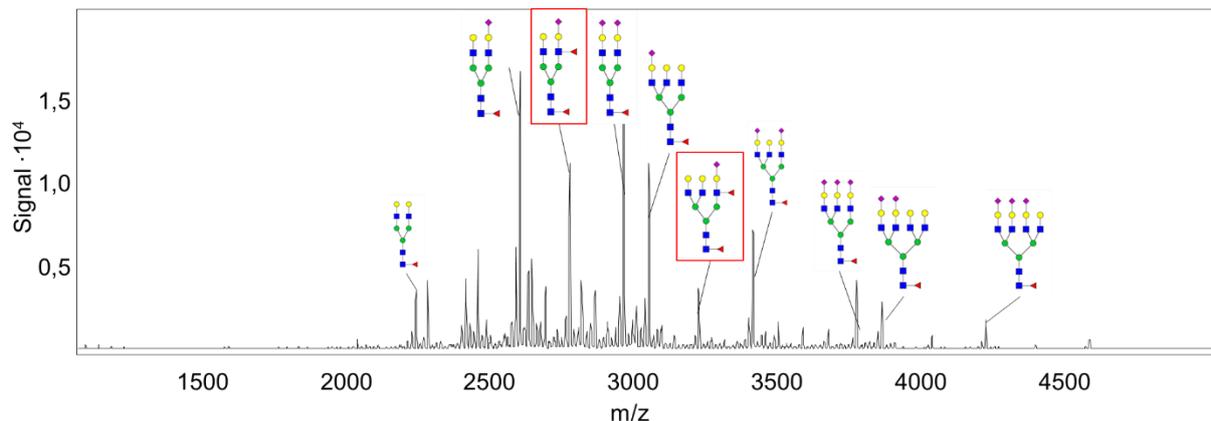


Abbildung 64: MS-Spektrum permethylierter Glykane des C1-INHs am fünften Tag der Kultivierung. Einige der identifizierten Glykanstrukturen sind gezeigt. Rot umrandet: Sialyl-Lewis^X.

Es wurden diantennäre, triantennäre und tetraantennäre Glykane identifiziert. Neben einer *core*-Fucosylierung wurden Strukturen mit antennären Fucosen gefunden. Das bedeutet, dass Lewis^x, bzw. Sialyl-Lewis^x Strukturen vorlagen (vgl. Abbildung 6). Die Glykane lagen asialo bis hin zu tetrasialo vor. Alle Spektren wurden gegen die Glykandatenbank (vgl. Anhang: Tabelle-A 3) durchsucht. Die Intensitäten der annotierten *Peaks* dienen zur relativen Quantifizierung. Wie unter Kapitel 4.2.2.8 beschrieben wurden den identifizierten Glykanen Qualitätsattribute zugeordnet. In Abbildung 65 sind die Ergebnisse gezeigt. Vom ersten Medienwechsel und von der Ernte mit Medienwechsel wurden je zwei biologische Replikate analysiert. Von den restlichen Zeitpunkten konnte die Analytik mit biologischen Triplikaten durchgeführt werden. Der Anteil an *High* Mannose Strukturen betrug während aller Wachstumsphasen weniger als 1 % und ist hier nicht gezeigt. Die Antennarität der Glykane des C1-INHs lag nach fünf Tagen der Kultivierung bei $2,65 \pm 0,06$, nach weiteren vier Tagen sank sie auf $2,61 \pm 0,03$. Zum Erntezeitpunkt betrug die Antennarität der Proben mit Medienwechsel $2,56 \pm 0,04$, ohne Medienwechsel $2,50 \pm 0,07$. Innerhalb der Fehler blieb die Antennarität annähernd gleich. Der Galaktosylierungsgrad verringerte sich im Laufe der Kultivierung. Zu Beginn der Kultivierung betrug dieser $2,05 \pm 0,05$. Zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels, sowie zum Zeitpunkt der Ernte (mit und ohne Medienwechsel) lag der Galaktosylierungsgrad bei 1,8. 96-97 % der Glykane wiesen zu jedem Zeitpunkt eine *core*-Fucosylierung auf. Die antennäre Fucosylierung betrug nach dem ersten Medienwechsel $0,35 \pm 0,02$ und sank im weiteren Kultivierungsverlauf auf $0,26 \pm 0,04$ am neunten Tag der Kultivierung. Am Ende der Kultivierung betrug sie $0,14 \pm 0,00$. Der Wert der antennären Fucosylierung betrug beim C1-INH aus den Kontrollkultivierungen $0,20 \pm 0,05$. Mittels massenspektrometrischer Analytik kann nicht zwischen *core*-Fucose und antennärer Fucose

Ergebnisse und Diskussion

unterschieden werden. Dies wäre über die HILIC-FLD möglich. Diese Daten lagen für den C1-INH nicht vor. Da der C1-INH ebenso wie das AAT in humanen Zellen produziert wurden, wurde angenommen, dass sich *core*-Fucosylierung und antennäre Fucosylierung im Verlauf der Kultivierung ähnlich verhalten. Für das AAT konnten die Glykane mittels HILIC-FLD identifiziert und quantifiziert werden. Mit Sicherheit kann jedoch lediglich die Anzahl an Fucosen bestimmt werden.

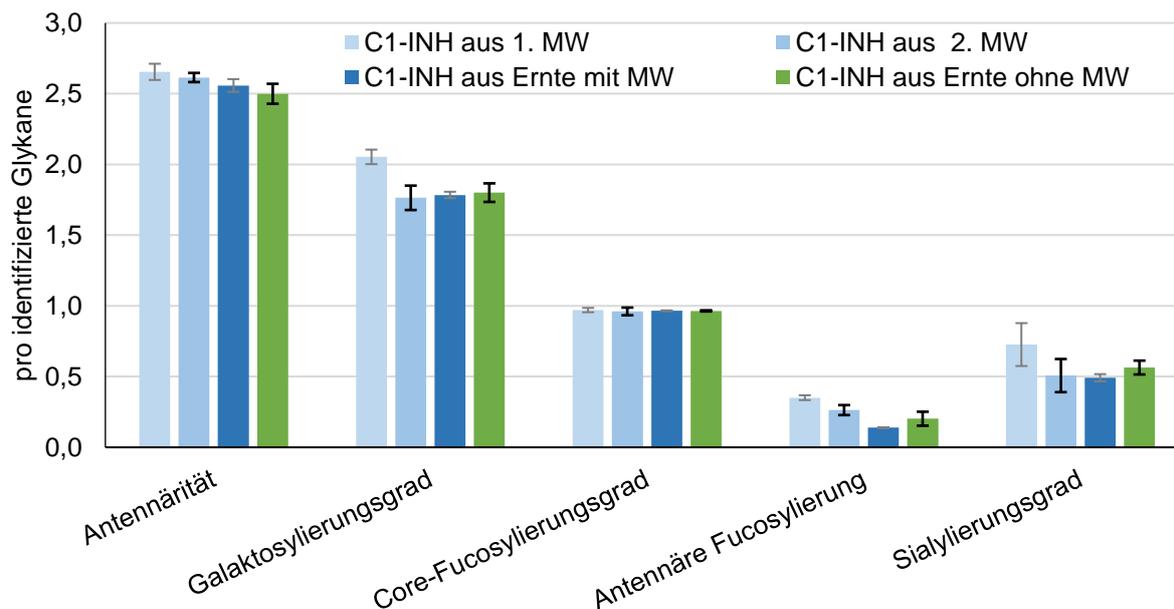


Abbildung 65: MALDI-ToF Ergebnisse der permethylierten Glykane des C1-INHs. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der Doppelbestimmung an, da nur zwei biologische Replikate zur Verfügung standen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der biologischen Triplikate.

Der Sialylierungsgrad war zu Beginn der Kultivierung mit $0,73 \pm 0,15$ am Höchsten. Nach dem zweiten Medienwechsel lag der Sialylierungsgrad bei $0,51 \pm 0,12$ und bei Ernte mit Medienwechsel bei $0,49 \pm 0,03$. Der Sialylierungsgrad des C1-INHs aus den Kontrollkultivierungen ohne Medienwechsel betrug $0,56 \pm 0,05$. Es fällt auf, dass nach dem ersten Medienwechsel sowohl Galaktosylierung, als auch antennäre Fucosylierung und Sialylierung sanken. Die Viabilität der Kulturen lag zu diesem Zeitpunkt bei 97 %, zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels bei 83 %. Es liegt nahe, dass Enzyme, die durch Zellyse bei sinkender Viabilität freigesetzt werden, die Glykane nach Sekretion im Kulturüberstand modifizieren (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994). Der Einfluss von Sialidasen, die durch Zellyse zum Ende der Kultivierung im Kulturüberstand akkumulieren wird gesondert in Kapitel 7.2 näher betrachtet. Im folgenden Kapitel wird die Produktglykosylierung zusammenfassend diskutiert.

7.4.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik des C1-INHs

Der in dieser Arbeit produzierte C1-INH wies eine hohe Heterogenität in der Glykosylierung auf. Es konnten diantennäre bis tetraantennäre fucosylierte Strukturen identifiziert werden, welche sialyliert sein konnten und zum Teil eine Lewis^x Struktur aufwiesen. Die Daten der Sialinsäure-Analytik und der Analytik der permethylierten Glykane zeigten folgende Ergebnisse:

- 1) Es konnten di- bis tetraantennäre fucosylierte komplexe Glykane, die bis zu vier NANA und zum Teil antennäre Fucosen tragen, identifiziert werden (vgl. Anhang: Abbildung-A 7).
- 2) Die Sialylierung sank nach dem ersten Medienwechsel und blieb im folgenden Kultivierungsverlauf annähernd konstant.
- 3) Die Antennarität bleibt innerhalb der Fehler konstant bei 2,5.
- 4) Der Galaktosylierungsgrad fällt nach den Tagen null bis fünf von 2,1 auf 1,8 ab und bleibt im restlichen Kultivierungsverlauf konstant.
- 5) Der Grad an core-Fucosylierung bleibt konstant bei 1,0.
- 6) Die antennäre Fucosylierung sinkt im Verlauf der Kultivierung von 0,4 auf 0,1.

Im Folgenden werden sowohl die Analysetechniken, als auch mögliche Ursachen für unterschiedliche Glykosylierungen diskutiert. Die Bedeutung der identifizierten Glykanstrukturen werden zusammenfassend mit den Ergebnissen des AATs diskutiert, da es für diese zwei Plasmaproteine ähnliche Anforderungen als Biopharmazeutikum gibt.

1) *Einschätzung der Analytik*

Eine Beurteilung der Analytik Methoden ist im Falle der C1-INH Analytik kritisch, da die beiden auswertbaren Analysen nicht vergleichbar sind. Die Sialinsäure-Analytik ist nicht spezifisch für N-Glykane, wohingegen durch einen spezifischen PNGase F Verdau permethylierte N-Glykane analysiert wurden, die O-Glykane aber nicht betrachtet wurden. Die Daten der Sialinsäure-Analytik zeigten zum Ende der Kultivierung (Tag neun bis Tag 12) die geringste Sialylierung. Die Analytik der N-Glykane zeigte eine Abnahme der Sialylierung nach dem ersten Medienwechsel. Die Sialylierung der N-Glykane blieb im weiteren Kultivierungsverlauf annähernd konstant. Eine Intaktmassen-Analytik konnte aufgrund der Produktheterogenität nicht durchgeführt werden. Daher konnten in diesem Fall keine orthogonalen Methoden zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführt werden.

Ergebnisse und Diskussion

2) Ursachen für die Unterschiede in der Glykosylierung

Eine Ursache für die Abnahme der Sialylierung im Kultivierungsverlauf kann die Sialidase-Aktivität im Überstand sein. Die Aktivität der Sialidasen betrug zum Ende der Kultivierung, als die Viabilität der Zellen bereits unter 80 % lag, 0,5 mU (mit Medienwechsel), bzw. 0,4 mU (ohne Medienwechsel). Eine Degradation von sekretiertem Produkt durch cytosolische Enzyme, die durch Zellyse in den Kulturüberstand gelangen, ist mehrfach für unterschiedliche Zelllinien der Literatur beschrieben (vgl. Kapitel 1.4) (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994; Gramer, M. J., et al.; 1995; Lao, M. S., et al.; 1996; Munzert, E., et al.; 1997; Munzert, E., et al.; 1995). Ein weiterer Grund für die Abnahme des Sialylierungsgrades könnte die Zusammensetzung des Mediums bzw. des Kulturüberstandes sein. Dies konnte in diesem Versuch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Vermutlich resultiert die verringerte Sialylierung sowohl aus einer Degradation nach der Sekretion und aus einer veränderten Prozessierung, die durch den Glukose- und Glutaminmangel (Tag neun Glukose: < 1 mM; Glutamin: < 0,4 mM; vgl. Abbildung 37, Abbildung 38, Tabelle 20) sowie durch Akkumulation von Ammonium (durch die Metabolisierung von Glutamin und der chemischen Degradation (Yang, M.; Butler, M.; 2000a)) hervorgerufen wurde. Diese Effekte finden sich für die Produktion von Glykoproteinen in unterschiedlichsten Zelllinien bestätigt (vgl. Kapitel 1.3.2, Abbildung 7 und Tabelle 1) (Yang, M.; Butler, M.; 2002; Chapman, A. E.; Calhoun, J. C.; 1988; Fan, Y., et al.; 2015; Hayter, P. M., et al.; 1992; Hayter, P. M., et al.; 1992; Hayter, P. M., et al.; 1992; Liu, B., et al.; 2014; Villacrés, C., et al.; 2015).

Die Antennarität scheint sich im Kultivierungsverlauf innerhalb der Fehler nicht zu verändern. Der Verlust von Galaktosylierungen zum Ende der Kultivierung (Tag neun bis 12) kann in der Verstoffwechslung von Glutamin begründet sein (vgl. Tabelle 22), da dadurch die Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand steigt. Durch akkumuliertes Ammonium steigt der pH-Wert im *trans*-Golgi-Apparat, wodurch die SiaT und GalT weniger aktiv sind, was wiederum zu einer geringeren Galaktosylierung führt (Gawlitzeck, M., et al.; 2000)(Gawlitzeck, M., et al.; 2000). Des Weiteren wird die Genexpression der GalT durch eine erhöhte Ammoniumkonzentration verringert (Chen, P.; Harcum, S. W.; 2006) (vgl. Kapitel 1.3.2, Abbildung 7 und Tabelle 1).

Die antennäre Fucosylierung sank im Laufe der Kultivierung. Da die Temperatur während der Kultivierung konstant war, könnte eine Ansäuerung des Kulturüberstandes zu einem Verlust von Fucosen geführt haben. Müthing und seine Mitarbeiter zeigten 2003, dass bei der Kultivierung von Hybridoma Zellen (R24) unter unterschiedlichen Pufferbedingungen das Produkt, ein monoklonaler IgG 3 Mausantikörper, bei unterschiedlichem pH unterschiedlich fucosylierte Glykane trug. Das diantennäre, galaktosylierte Glykan ohne Fucose machte bei

einem pH-Wert von 7,4 8 % aller detektierten Glykane aus. Bei einem pH-Wert von 7,2 fiel der Anteil auf 5 % und bei einem pH von 6,9 auf 4 % (Müthing, J., et al.; 2003).

Die Fucosylierung der *core*-Struktur und die antennäre Fucosylierung wird durch unterschiedliche Fucosyltransferasen bewerkstelligt. Die *core*-Fucose wird durch FUT8 an das GlcNAc angehängen. Antennäre Fucosen können durch FUT4 und FUT7 angehängen werden. FUT7 hat eine Selektivität auf sialylierte Antennen und fucosyliert somit lediglich ein antennäres GlcNAc, wenn die darauf folgende Galaktose eine Sialinsäure trägt (Wang, H., et al.; 2013; Ma, B., et al.; 2006). Da hier der Sialyierungsgrad des C1-INHs im Kultivierungsverlauf sinkt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die antennären Fucosen in den CAP®-1D9-Zellen durch die FUT7 angehängen werden. Dadurch ließe sich die Abnahme der Fucosylierung der Antennen im Kultivierungsverlauf erklären. Ob der Verlust der Sialinsäuren, oder die Änderung des pH-Wertes in der Kultur zum Verlust der antennären Fucosylierung führte, kann anhand der hier erhobenen Daten nicht bestimmt werden.

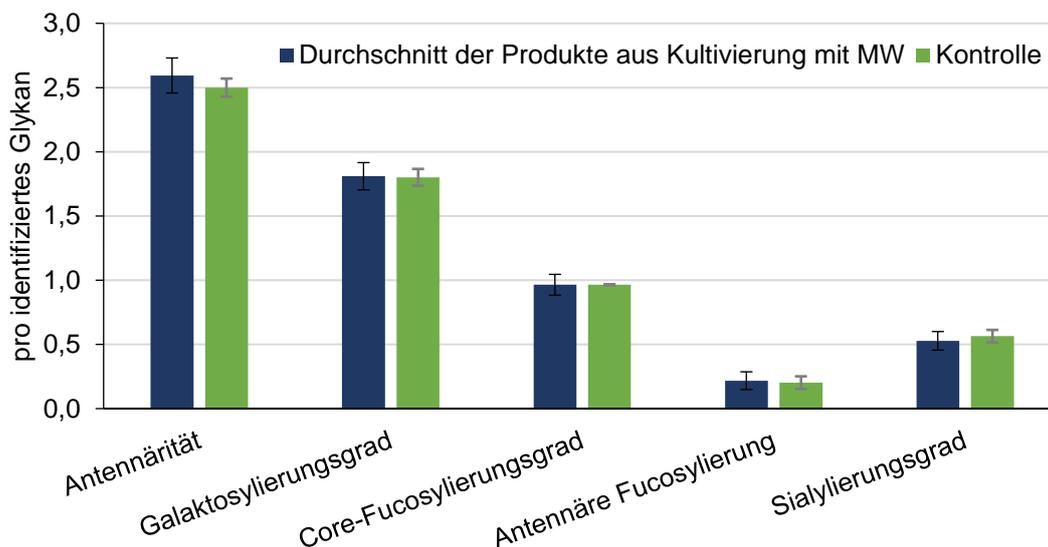


Abbildung 66: Vergleich der Produkte aus der Kultivierung mit und ohne Medienwechsel. Es wurde für die Kultivierung mit Medienwechsel der Durchschnitt der einzelnen Kenngrößen berechnet (Formel (3)). Mittels gauss'scher Fehlerverfolgung (Formel (4)) wurde der Fehler berechnet.

Neben den genannten Ursachen für unterschiedliche Glykosylierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, könnte die Verweildauer des Produktes im Kulturüberstand ebenfalls Einwirkungen auf diese zeigen. Um dieses zu überprüfen, wurde der Durchschnitt der Qualitätsattribute für die Kultivierung mit Medienwechsel unter Berücksichtigung der Produktquantität zu den einzelnen Probenahme-Zeitpunkten berechnet (vgl. Formel (3)) und mit den Werten der Kontrollkultivierung verglichen. Sind die Ergebnisse gleich, so ist dies ein Indiz dafür, dass das Produkt, welches zum Ende der Kultivierung in der Kontrollkultivierung vorhanden ist, sich aus den Produkten der einzelnen Probenahme-Zeitpunkte zusammensetzt. Ein solches Ergebnis würde dafürsprechen, dass Größen wie die Verweilzeit des Produktes

Ergebnisse und Diskussion

im Kulturüberstand keinen Einfluss auf die Glykosylierung haben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 66 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Fehler des Durchschnitts der Produkte aus der Kultivierung mit Medienwechsel vergleichbar mit dem Fehler der Produkte aus der Kontrollkultivierung ist. Innerhalb dieser Fehler sind Antennarität, Galaktosylierungsgrad, *core*-Fucosylierungsgrad, antennäre Fucosylierung und der Sialyierungsgrad der Produkte der Kontrollkultivierung gleich dem Durchschnitt der Produkte aus der Kultivierung mit Medienwechsel.

Dies deutet darauf hin, dass sich das Produkt, welches zu Beginn der Kultivierung gebildet wurde, nicht durch die Verweilzeit im Kulturüberstand bis zum Ende der Kultivierung ändert, sondern dass sich das Produkt am Ende der Kultivierung aus den Produkten der unterschiedlichen Wachstumsphasen zusammensetzt.

7.4.4. Produktanalytik des AATs

Aus den Kultivierungen zur Produktion von AAT mit und ohne Medienwechsel wurde das Produkt nach vier Tagen Kultivierung (1. MW), aus dem Zeitraum der Tage fünf und sechs (2. MW), sowie der Tage sieben bis 12 (Ernte + MW) und aus der Kontrollkultivierung für die Glykananalytik mittels Sialinsäure-Analytik, der HILIC-FLD gelabelten Glykane und der massenspektrometrischen Identifizierung und Quantifizierung mittels MALDI-Analytik eingesetzt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Analysen vorgestellt und zusammenfassend diskutiert. Dabei werden die Methoden beurteilt und die Ursachen für Unterschiede in der Produktglykosylierung im Kultivierungsverlauf diskutiert. Die Qualität in Hinblick auf die pharmazeutische Wirkung des AATs wird zusammen mit der des hier produzierten C1-INH eingeschätzt. In Tabelle 23 sind Ergebnisse der Kultivierung zusammengefasst, die einen Einfluss auf die Produktglykosylierung haben könnten.

Tabelle 23: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Glykosylierung des AAT auswirken können.

Kultivierungsparameter	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte - MW
	Tag 0-4	Tag 5-6	Tag 7-12	Tag 0-12
Viabilität	94 %	95 %	55-60 %	55-60 %
Glukosekonzentration	23 mM	14 mM	0 mM	0 mM
Glutaminkonzentration	1,8 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,0 mM

7.4.4.1. Sialinsäure-Bestimmung des AATs

Für die Sialinsäure-Analytik von AAT wurden 50 µg Protein eingesetzt, was einer Stoffmenge von 1070 pmol entspricht. Die durch milde Hydrolyse erhaltenen Sialinsäuren wurden mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 4.2.2.2) aufgetrennt und detektiert. Für AAT resultierend aus dem ersten Medienwechsel konnte lediglich eine Probe analysiert werden. Für AAT aus dem zweiten Medienwechsel und zum Zeitpunkt der Ernte war aus zwei biologischen Replikaten der Kultivierung genügend Material für diese Analytik vorhanden. Hier wird der Fehler durch die Differenz der Einzelwerte angegeben. Lediglich von allen drei Kontrollkulturen war genügend Material für eine Dreifachbestimmung vorhanden. In Abbildung 67 (A) sind die molaren Verhältnisse der NANA- und NGNA-Mengen in Bezug auf das Protein gezeigt. In Abbildung 67 (B) werden die Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle gezeigt. Es ist zu erkennen, dass keine N-Glykolyneuraminsäure vorhanden war. Im Gegensatz dazu konnten $2,7 \pm 0,07$ mol N-Acetylneuraminsäure pro mol Protein bis 4,1 mol pro mol Protein nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass die Sialylierung des Proteins zu Beginn der Kultivierung höher lag und im Kultivierungsverlauf abnahm.

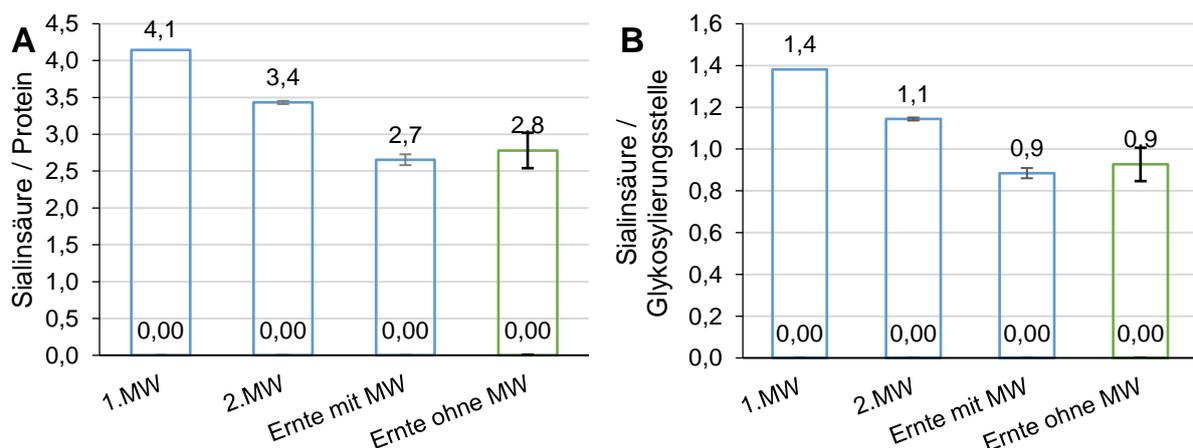


Abbildung 67: Sialinsäure Bestimmung für AAT. Die bestimmte Sialinsäurekonzentration (NANA, bzw. NGNA) bezogen auf das Protein (A), bzw. auf eine Glykosylierungsstelle (B). Für den Zeitpunkt des 1. MW konnte nur eine Probe analysiert werden. Für den 2. MW und die Ernte mit MW wurden zwei biologische Replikate analysiert. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate an. Für die Ernte ohne Medienwechsel wurden drei biologische Replikate analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die Kontrollkulturen wiesen $2,8 \pm 0,2$ mol NANA pro mol Protein auf, was dem Sialylierungsgrad des AATs zum Ende der Kultivierungen mit Medienwechsel entspricht. Umgerechnet auf eine Glykosylierungsstelle bedeuten diese Ergebnisse, dass zu Beginn jedes Glykan mit 1,4 NANA besetzt war, zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels mit $1,1 \pm 0,0$ und zum Ende der Kultivierung mit $0,9 \pm 0,0$. Die Kontrollprobe zeigte eine Sialylierung von $0,9 \pm 0,1$ NANA pro Glykosylierungsstelle.

Ergebnisse und Diskussion

Zu Anfang der Kultivierung bis zum Beginn der stationären Phase (1. MW und 2. MW) war jede Glykosylierungsstelle im Durchschnitt mindestens einfach sialyliert. Im letzten Abschnitt der Kultivierung sank der Sialyierungsgrad auf weniger als eine Sialinsäure pro Glykosylierungsstelle. In der Kontrollkultivierung fand sich ebenso Produkt, dass weniger als eine N-Acetylneuraminsäure pro Glykosylierungsstelle zeigte.

7.4.4.2. HILIC-FLD von Glykanen des AATs

Neben der Abspaltung von Sialinsäuren wurden die vollständigen Glykane mittels PNGaseF Verdau vom Protein abgespalten und analysiert. Zur relativen Quantifizierung wurden die Glykane mit einem fluoreszierenden Molekül versehen (vgl. Kapitel 4.2.2.8) und über eine HILIC-FLD aufgetrennt und detektiert. In Abbildung 68 sind die Ergebnisse für die Qualitätsattribute Antennarität, Galaktosylierungsgrad, core-Fucosylierung, antennäre Fucosylierung und Sialyierungsgrad gezeigt. Für alle Wachstumsphasen wurden hauptsächlich diantennäre Glykane identifiziert.

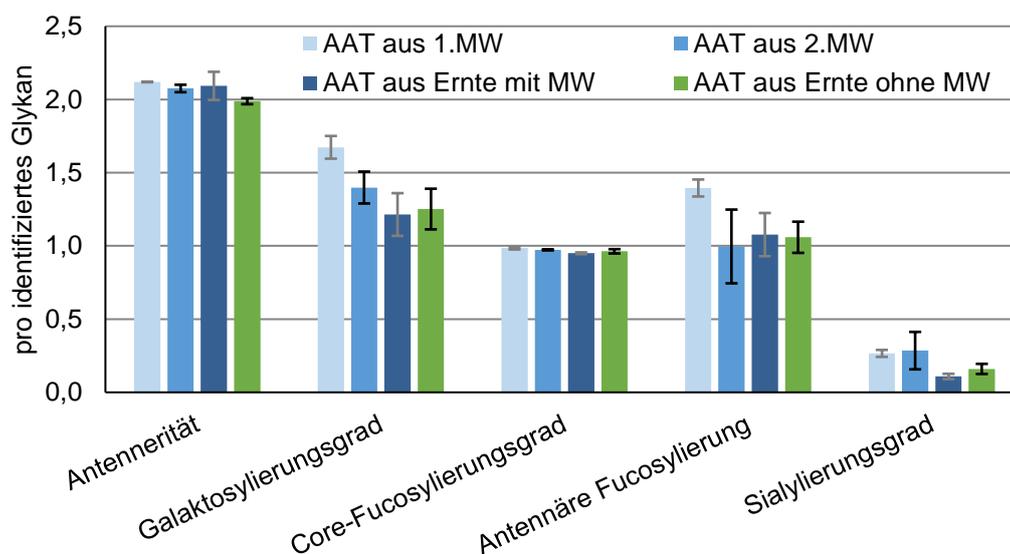


Abbildung 68: Ergebnisse der HILIC-FLD. Der Analytik des AATs aus dem 1. MW sowie aus der Ernte mit Medienwechsel lagen Proben aus zwei biologischen Replikaten zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Doppelbestimmung). Für die Analytik des AATs aus dem 2. MW und der Ernte ohne Medienwechsel lagen biologische Triplikate zugrunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung).

Während der ersten vier Tage der Kultivierung wiesen 85 % dieser zwei Antennen eine Galaktosylierung auf ($1,7 \pm 0,1$ pro identifiziertes Glykan). Der Galaktosylierungsgrad sank innerhalb der nächsten zwei Tage auf 70 % ($1,4 \pm 0,1$ pro identifiziertes Glykan). Bis zum Ende der Kultivierung fiel er auf 60 % ($1,2 \pm 0,2$ pro identifiziertes Glykan). Verblieb das Produkt über den gesamten Kultivierungszeitraum in der Kultur, betrug der Galaktosylierungsgrad jeder Antenne 62,5 % ($1,3 \pm 0,1$ pro identifiziertes Glykan). Die core-Fucosylierung blieb während aller Wachstumsphasen und der Kontrollkultivierung

annähernd konstant bei 95 % - 99 %. Die antennäre Fucosylierung hingegen lag zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels bei $1,4 \pm 0,1$. Das bedeutet, dass 70 % der Antennen eine Fucosylierung aufwiesen. Zum Zeitpunkt des 2. Medienwechsels lag der Anteil an antennärer Fucosylierungen bei $1,0 \pm 0,3$. Bis zum Ende der Kultivierung änderte sich dies innerhalb der Fehler nicht (Ernte mit MW: $1,1 \pm 0,1$). Das Produkt aus der Kultivierung ohne Medienwechsel zeigte eine Fucosylierung von 50 % der Antennen ($1,1 \pm 0,1$ pro identifiziertes Glykan). Der Sialylierungsgrad der identifizierten Glykane änderte sich zwischen den Produkten aus dem ersten und zweiten Medienwechsel nicht (1. MW: $0,27 \pm 0,02$; 2. MW: $0,29 \pm 0,13$). Nach zwölf tägiger Kultivierung wies das AAT aus der Kultivierung mit zwei Medienwechseln einen Sialylierungsgrad von $0,11 \pm 0,02$ auf, und das Produkt aus der Kontrollkultivierung zeigte einen Sialylierungsgrad von $0,16 \pm 0,03$. Sowohl Galaktosylierungsgrad, als auch antennäre Fucosylierung und Sialylierungsgrad nahmen im Kultivierungsverlauf ab. Besonders die Proben aus der letzten Wachstumsphase zeigten weniger Galaktosylierungen und Sialylierungen. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Viabilität 55-60 %, während sie zum Zeitpunkt des ersten und des zweiten Medienwechsels bei ca. 95 % lag.

Beim Vergleich der Daten der Sialinsäure-Analytik und der Daten der Analyse der abgespaltenen Glykane mittels HILIC-FLD fällt auf, dass die Anzahl an Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle nach Quantifizierung der mittels Hydrolyse abgespaltenen Sialinsäuren weit höher lag, als der Sialylierungsgrad der mittels HILIC-FLD identifizierten abgespaltenen Glykane. Der Trend, dass die Glykane mit zunehmender Kultivierungsdauer weniger sialyliert sind, findet sich jedoch wieder.

7.4.4.3. Identifizierung und relative Quantifizierung der permethylierten Glykane des AATs

Zur Identifizierung und relativen Quantifizierung wurden die abgespaltenen Glykane mit Schutzgruppen versehen und mittels MALDI-ToF analysiert (vgl. Kapitel 4.2.2.10). Die Antennarität der identifizierten Glykane war innerhalb der Fehler zu allen Probenahmezeitpunkten gleich und lag mit 2,1–2,2 über dem Wert der mittels HILIC-FLD identifizierten Glykane. Unterschiede zwischen diesen Methoden lassen sich durch eine weitaus höhere Anzahl an identifizierten Glykanen mittels massenspektrometrischer Analytik erklären. Der Galaktosylierungsgrad der Glykane des AATs lag beim Produkt aus den ersten vier Kultivierungstagen bei $1,8 \pm 0,3$ und bei dem Produkt aus den Tagen vier und fünf bei $1,3 \pm 0,3$. Aufgrund der Fehler schien kein Unterschied vorzuliegen. Ein Vergleich dieser Daten mit den Daten der HILIC-FLD (vgl. Kapitel 7.4.4.2: 1.MW $1,7 \pm 0,1$; 2. MW: $1,4 \pm 0,1$) legt jedoch ein Verlust von Galaktosylierungen nach dem ersten Medienwechsel nahe. Zum Ende der

Ergebnisse und Diskussion

Kultivierung lag der Galaktosylierungsgrad sowohl bei der Kontrollkultivierung als auch bei der Kultivierung mit Medienwechsel bei $1,2 \pm 0,1$. Dieser Verlauf findet sich in den zuvor besprochenen Daten der HILIC-FLD wieder. Die identifizierten Glykane sind zu 91–93 % *core*-fucosyliert. Dies ändert sich im Kultivierungsverlauf nicht. Die antennäre Fucosylierung ändert sich über den Kultivierungsverlauf und im Vergleich der Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel innerhalb der Fehler nicht. Der Sialylierungsgrad der mittels MALDI-ToF analysierten Glykane, liegt wie schon bei der Analytik mittels HILIC-FLD deutlich unter dem mittels Sialinsäure-Analytik bestimmten Sialylierungsgrad (vgl. Kapitel 7.4.4.1: 1. MW: 1,4 NANA/Glykosylierungsstelle, 2. MW: 1,1 NANA/Glykosylierungsstelle; Ernte mit MW und Ernte ohne MW: 0,9 NANA/Glykosylierungsstelle). Der Trend ist jedoch ähnlich. AAT, welches in den ersten vier Tagen der Kultivierung produziert wurde, wies mit $0,25 \pm 0,04$ den höchsten Sialylierungsgrad in Bezug auf alle identifizierten Glykane auf. Im weiteren Kultivierungsverlauf sank er auf $0,14 \pm 0,05$ und lag am Ende der Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel bei $0,04 \pm 0,04$ (mit MW), bzw. $0,05 \pm 0,06$ (Kontrollkultur).

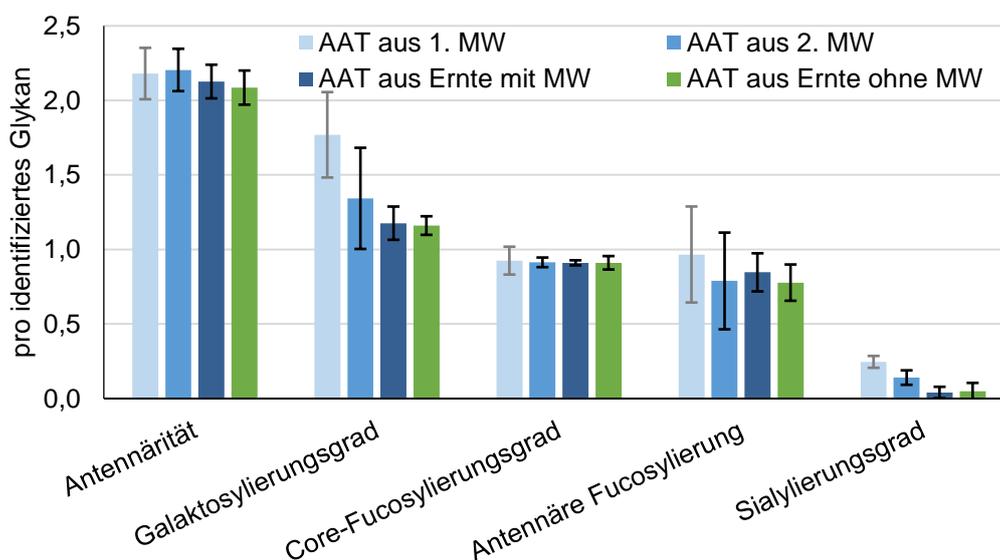


Abbildung 69: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analytik der permethylierten Glykane des AATs bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des AATs aus dem ersten Medienwechsel lagen Proben aus zwei biologischen Replikaten zugrunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Doppelbestimmung). Für die Analytik des AATs der restlichen Zeitpunkte und der Ernte ohne Medienwechsel lagen biologische Triplikate zugrunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung).

Die deutlichsten Unterschiede zeigten der Galaktosylierungs- und Sialylierungsgrad. Beide waren zu Beginn der Kultivierung am höchsten und sanken im folgenden Verlauf. Das über die gesamte Kultivierungszeit akkumulierte Produkt wies jeweils eine ähnliche Galaktosylierung bzw. Sialylierung auf, wie das zum Erntezeitpunkt der Kultivierungen mit Medienwechseln. Antennarität, *core*-Fucosylierung und antennäre Fucosylierung änderten sich hingegen innerhalb des Fehlerbereiches nicht.

7.4.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik des AATs

Die N-Glykane des während der Kultivierung mit wachstumsspezifischer Probenahme produzierten AAT wurden mittels drei unterschiedlicher Analysen untersucht. Diese Analysen lieferten folgende Ergebnisse:

- 1) Es konnten di- bis tetraantennäre fucosylierte komplexe Glykane, die bis zu zwei NANA und zum Teil antennäre Fucosen tragen, identifiziert werden (vgl. Anhang: Abbildung-A 8).
- 2) Im Durchschnitt lagen hauptsächlich diantennäre, einfach galaktosylierte Glykane mit jeweils einer *core*- und einer antennären Fucosylierung vor.
- 3) Nach den Ergebnissen der Sialinsäure-Analytik waren die Glykane einfach sialyliert. Die Ergebnisse der Analytik der intakten Glykane lassen eine weitaus geringere Sialylierung vermuten.
- 4) Im Verlauf der Kultivierung änderten sich die Antennarität und der Anteil an antennärer Fucosylierung nicht (MALDI-ToF), bzw. kaum (HILIC-FLD).
- 5) Galaktosylierungsgrad und Sialylierungsgrad fielen im Lauf der Kultivierung mit Medienwechsel.
- 6) In den Kontrollkultivierungen entsprachen Galaktosylierungsgrad, Sialylierungsgrad und Anteil an antennärer Fucosylierung jeweils den Ergebnissen vom Ende der Kultivierungen mit Medienwechsel.
- 7) Der Grad an *core*-Fucosylierung blieb konstant bei eins.

In einer Studie von 2011 wurden für AAT, welches in AGE1.hn-AAT Zellen produziert wurde, zwei Hauptformen detektiert: Monosialo, diantennär, mit *core*- und antennärer Fucose, sowie disialo, diantennär und *core*-fucosyliert (Blanchard, V., et al.; 2011). In dieser Arbeit wurden ebenso fucosylierte diantennäre Glykane identifiziert. Ebenso konnten Glykane mit antennärer Fucosylierung nachgewiesen werden. Wie auch in der Studie von 2011 konnten hier di- bis tetraantennäre Glykane identifiziert werden (vgl. Anhang: Abbildung-A 8). AAT, welches aus Plasma aufgereinigt wurde zeigt ähnliche N-Glykanstrukturen, jedoch ist der Anteil an Glykanen mit antennärer Fucosylierung geringer als bei AAT, welches in AGE1.hn-Zellen produziert wurde (Kolarich, D., et al.; 2006).

1) Vergleichbarkeit der Analytik

Die intakten N-Glykane wurden vom Protein abgespalten und mittels HILIC-FLD und MALDI-ToF Analytik untersucht. Die Ergebnisse für alle Qualitätsattribute deckten sich innerhalb der berechneten Fehler. Eine deutliche Abweichung ist zwischen den Ergebnissen

Ergebnisse und Diskussion

der Sialinsäure-Analytik und der Analyse der intakten Glykane zu erkennen, wenngleich der Trend, dass die Sialylierung mit der Zeit abnimmt in allen drei Analysen zu erkennen ist. Der Unterschied zwischen der Analytik der abgespaltenen Sialinsäuren (chemischer Prozess) und der Analytik der intakten Glykane (enzymatischer Prozess) könnte auf die Art der Abspaltung zurückzuführen sein. Die Sialinsäuren werden mittels saurer Hydrolyse vom nativen Protein abgespalten. Die intakten N-Glykane werden nach der Denaturierung des Proteins enzymatisch abgespalten, vom Protein abgetrennt und aufgereinigt. Hier sind viele einzelne Schritte nötig, um das intakte Glykan analysieren zu können. So wäre es beispielsweise durch eine unvollständige Denaturierung des Proteins möglich, dass es für die PNGase F zu sterischen Hinderungen kommt und zum Beispiel eins der drei Glykane nicht vom AAT abgespalten werden kann.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (2-AB= HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI= MALDI-ToF Messung permethylierter Glykane)

Qualitätsattribut	Analytik	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte -MW
Antennarität	2-AB	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0
	MALDI	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Galaktosylierung	2-AB	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1
	MALDI	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
core-Fucosylierung	2-AB	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	MALDI	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1
Antennäre Fucosylierung	2-AB	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	MALDI	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Sialylierung	Sia-A	1,4	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1
	2-AB	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
	MALDI	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1

Es ist bekannt, dass eine Selektivität der PNGase F nicht auf die Glykanstruktur zurückzuführen ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei RNase B eine sterische Hinderung vorliegt, bei RNase BS (RNase B nach Verdau mit Subtilisin) und RNase B^{cm} (carboxymethylierte RNase B) aber nicht (Blanchard, V., et al.; 2008). Für AAT aus humanem Plasma ist bekannt, dass die Glykane an Asn 107 bis zu tetraantennär sein können, wohingegen an Asn 70 nur wenige triantennäre Glykane vorhanden sind und an Asn 271 lediglich diantennäre Strukturen vorliegen. (Zhang, H., et al.; 2003; Bunkenborg, J., et al.; 2004; Kristiansen, T. Z., et al.; 2004; Liu, T., et al.; 2005; Kolarich, D., et al.; 2006; Lewandrowski, U., et al.; 2006; Nilsson, J., et al.; 2009; Halim, A., et al.; 2011). Wenn nun die N-Glykosylierungsstelle bei Asn 107 nicht gut zugänglich wäre, könnte dies erklären, warum die Ergebnisse der intakten Daten geringere Sialylierungen zeigen, als die der chemisch

abgespaltenen Sialinsäuren. Da sich zum einen in allen drei Analysen der gleiche Verlauf zeigt und zum anderen davon ausgegangen werden kann, dass sich die Einflüsse der Kultivierung (Substratmangel, Viabilität) gleichermaßen auf die Glykane an allen Glykosylierungsstellen auswirken, können die Ergebnisse aller Analysen für die folgenden Diskussionen mit einbezogen werden.

2) Ursachen für die Unterschiede in der Glykosylierung

Während Antennarität, *core*- und antennäre Fucosylierung zu allen drei Zeitpunkten und in der Kontrollkultivierung keine Unterschiede zeigten, verringerte sich sowohl der Galaktosylierungsgrad, als auch der Sialylierungsgrad bereits zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels. Eine Sialidase Aktivität konnte nur in den Kontrollkultivierungen nachgewiesen werden. Diese lag bei 0,03 mU. Wie in Kapitel 7.2 beschrieben, würde eine solche geringe Aktivität nur einen geringen Anteil an Sialinsäuren vom Produkt abspalten. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Zusammensetzung des Kulturüberstandes zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels und zum Ende der Kultivierung die Glykosylierung beeinträchtigte. Der Galaktosylierungs- und Sialylierungsgrad verringerten sich vom ersten Medienwechsel zum zweiten Medienwechsel von 1,7-1,8 auf 1,3-1,4 (Gal), bzw. 1,4 auf 1,1 (NANA) pro identifizierter Glykosylierungsstelle, bis zum Ende der Kultivierung auf 1,2 (Gal), bzw. auf 0,9 (NANA). Aufgrund der sinkenden Glutaminsäurekonzentration (vgl. Kapitel 7.1.4.1; Tabelle 23) ist davon auszugehen, dass Ammonium akkumuliert (Butler, M.; Jenkins, H.; 1989; Büntemeyer, H., et al.; 1992; Hayter, P. M., et al.; 1991) und ,dass dadurch der pH-Wert im *trans*-Golgi-Apparat steigt. Dies kann sich auf die Enzymaktivität der Galaktosyltransferase (GalT) und der Sialyltransferase (SiaT) auswirken (Gawlitsek, M., et al.; 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Genexpression des Gens für die GalT und die SiaT bei Ammoniumkonzentrationen von ≥ 10 mM sinkt (Chen, P.; Harcum, S. W.; 2006). Aus einer verringerten Galaktosylierung folgt meist eine geringere Sialylierung. Dies ist hier für das AAT zu erkennen. Der Sialylierungsgrad sank im Kultivierungsverlauf zum einen durch die verringerte Genaktivität durch die gestiegene Ammoniumkonzentration und zum anderen durch die geringere Galaktosylierung. Begünstigt wurde dies vermutlich durch die sinkende Glukosekonzentration (vgl. Abbildung 26; Tabelle 23) (Liu, B., et al.; 2013).

Wie schon für die Glykosylierung des mAbs und des C1-INHs, wurde der Durchschnitt der Qualitätsattribute der Glykananalytik (sowohl MALDI-MS, als auch HILIC-FLD) für die Kultivierung mit Medienwechsel berechnet (vgl. Anhang: Abbildung-A 10). Die resultierenden Fehler lassen jedoch keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen über mögliche Ursachen für Unterschiede in der Glykosylierung zu.

Ergebnisse und Diskussion

3) Bedeutung der identifizierten Glykane der hier produzierten Proteine C1-INH und AAT für ihre pharmazeutische Wirkung

Die Bedeutung der Glykane vom C1-INH und AAT für die pharmazeutische Wirksamkeit werden hier zusammen diskutiert, da die Ansprüche an die Glykosylierung der beiden Plasmaproteine gleich sind. Für keins der beiden Proteine ist bekannt, dass eine Änderung der N-Glykosylierung die Wirkungsweise verändert (vgl. Kapitel 1.5.3 und 1.5.4) (Reboul, A., et al.; 1987; Zahedi, R., et al.; 1996). Daher stehen hier die Halbwertszeit und die Immunogenität im Mittelpunkt. Asialylierte Glykane werden im Blutkreislauf durch den ASGRP abgebaut. Dadurch erklärt sich die längere Halbwertszeit sialylierter Proteine (Fukuda, M. N., et al.; 1989; Stockert, R. J.; 1995; Beck, A.; 2011; Schwab, I.; Nimmerjahn, F.; 2014; Bauer, J.; Osborn, H. M. I.; 2015)(Fukuda, M. N., et al.; 1989; Stockert, R. J.; 1995; Beck, A.; 2011; Schwab, I.; Nimmerjahn, F.; 2014; Bauer, J.; Osborn, H. M. I.; 2015). Dies wurde für den C1-INH bestätigt. Desialylierter C1-INH wurde nach Injektion in Hasen schneller abgebaut als sialylierter (Minta, J. O.; 1981). Für AAT konnte gezeigt werden, dass AAT mit *High* Mannose Strukturen im ER proteolytisch abgebaut wird (Wu, Y., et al.; 2003; Hosokawa, N., et al.; 2003). Sowohl der in dieser Arbeit produzierte C1-INH als auch das AAT zeigten bis zu zwei Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle, was die Halbwertszeit besonders für den C1-INH, da dieser sechs N-Glykosylierungsstellen besitzt und somit 12 Sialinsäuren trägt (nur durch die N-Glykane), im Gegensatz zu asialo Proteinen erhöhen kann. Beide hier produzierten Proteine weisen eine humane Glykosylierung auf. Es konnte kein immunogenes NGNA nachgewiesen werden. Dies war nicht weiter verwunderlich, da der C1-INH und das AAT in humanen Zellen produziert wurden. Ein Unterschied zu den Proteinen, die aus Plasma aufgereinigt wurden, ist der höhere Grad an antennärer Fucosylierung (Anteil der Glykane mit antennärer Fucosylierung: C1-INH: 0,1-0,4; AAT: 0,8-1,4) und die daraus resultierenden Le^x, bzw. sLe^x Strukturen. Es wird vermutet, dass die Le^x-Fucosylierung typisch für neuronale Zelltypen, wie den AGE1.hn-Zellen, ist (Blanchard, V., et al.; 2011). *In vitro* konnte für AAT, welches in AGE1.hn-Zellen produziert wurde, eine ähnliche Bioaktivität wie AAT aus Blutplasma nachgewiesen werden (Blanchard, V., et al.; 2011). Der in der Studie von 2011 höhere Anteil an *core*-fucosylierten Glykanen im Vergleich zu den Glykanen des AATs aus humanem Plasma konnte hier bestätigt werden. Da der C1-INH wie auch das AAT Serinproteasen sind, kann vermutet werden, dass weder *core*-Fucosylierung noch antennäre Fucosylierung die Bioaktivität verringern.

Die Produktqualität wurde im Falle des AATs wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit von Glukose und Glutamin beeinflusst, sowie durch eine steigende Ammoniumkonzentration. Dementsprechend wäre für ein gleichbleibend galaktosyliertes und sialyliertes Produkt eine

Zufütterung von Glukose und Glutamin hilfreich, wobei die Ammoniumkonzentration geringgehalten werden sollte. Für die Produktion des C1-INHs liegen Hinweise vor, dass eine Viabilität von unter 90% zu extrazellulärer Degradation des Produktes führen könnte.

7.4.5. Produktanalytik des ATIIIs

Das ATIII aus den Kultivierungen zur wachstumsspezifischen Probenahme wurde hinsichtlich seiner Glykosylierung mittels Sialinsäurebestimmung, HILIC-FLD von intakten gelabelten Glykanen und MALDI-ToF-Analytik zur Identifizierung permethylierter Glykane analysiert. Es werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Analysen besprochen. Im Anschluss werden diese zusammenfassend sowohl in Hinblick auf die Analysetechniken als auch auf mögliche Ursachen für auftretende Unterschiede in der Produktglykosylierung diskutiert. Des Weiteren wird eine Einschätzung zur Bedeutung der identifizierten Glykanstrukturen gegeben. In Tabelle 25 sind einige Ergebnisse der Kultivierung zusammengefasst, die die Glykosylierung beeinflussen könnten.

Tabelle 25: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Produktglykosylierung auswirken können.

Kultivierungsparameter	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte - MW
	Tag 0-3	Tag 4-6	Tag 7-11	Tag 0-11
Viabilität	98 %	95 %	65-68 %	68-76 %
Glukosekonzentration	27 mM	17 mM	10 mM	11 mM
Glutaminkonzentration	3,2 mM	0,0 mM	0,0 mM	0,0 mM

7.4.5.1. Sialinsäure Bestimmung des ATIIIs

Für die Sialinsäure Bestimmungen wurden exakte Proteinmengen (zwischen 20 und 50 µg) eingesetzt und hydrolysiert. Die abgespaltenen Sialinsäuren wurden mittels HPAEC-PAD aufgetrennt und detektiert (vgl. Kapitel 4.2.2.2). Vom ersten Medienwechsel sowie von der Ernte mit Medienwechseln und von den Kontrollkulturen konnten zwei biologische Replikate analysiert werden. Vom zweiten Medienwechsel wurden drei biologische Replikate analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

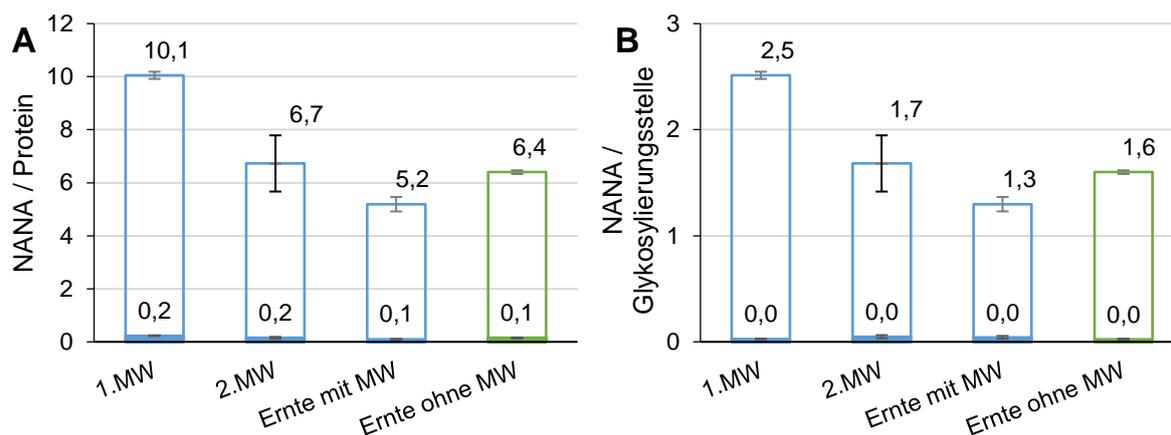


Abbildung 70: Sialinsäure Bestimmung für ATIII. Die bestimmten Sialinsäurekonzentrationen (NANA, bzw. NGNA) bezogen auf das Protein (A), bzw. auf eine Glykosylierungsstelle (B). Für den Zeitpunkt des 1. MW, die Ernte mit MW und die Ernte ohne Medienwechsel wurden zwei biologische Replikate analysiert. Die grauen Fehlerbalken zeigen Differenz der Replikate. Für den 2. MW wurden drei biologische Replikate analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

In Abbildung 70 (A) wurden die erhaltenen Sialinsäurekonzentration auf die Proteinmenge bezogen und in (B) auf die Glykosylierungsstellen. Es konnte kaum NGNA in den Proben detektiert werden (0,1-0,2 mol pro mol ATIII). Zu Beginn der Kultivierung waren durchschnittlich $2,5 \pm 0,0$ NANA pro Glykosylierungsstelle am ATIII. Die Sialylierung sank bis zum zweiten Medienwechsel auf $1,7 \pm 0,3$ NANA pro Glykosylierungsstelle und bis zum Ende der Kultivierung war eine Glykosylierungsstelle mit $1,3 \pm 0,1$ NANA besetzt. In den Kultivierungen ohne Medienwechsel trug jede Glykosylierungsstelle $1,6 \pm 0,0$ NANA. Es konnte eine deutliche Verringerung des Sialylierungsgrades des ATIIIs beobachtet werden.

7.4.5.2. HILIC-FLD von Glykanen des ATIIIs

Neben den Sialinsäuren wurden auch die N-Glykane mittels enzymatischem Verdau vom ATIII abgespalten (vgl. Kapitel 4.2.2.5). Die Glykane wurden mit fluoreszierendem 2-AB gelabelt (vgl. Kapitel 4.2.2.7) und mittels HILIC-FLD aufgetrennt und detektiert (vgl. Kapitel 4.2.2.8). Die Retentionszeiten der Glykane wurden mit Hilfe einer Dextran Leiter auf GUs umgerechnet und mit Hilfe der *EurocarbDB* Datenbank und den massenspektrometrischen Ergebnissen (vgl. Kapitel 7.4.5.3) identifiziert. Den Glykanen wurden Qualitätsattribute zugeteilt. Die Ergebnisse der Berechnung nach Formal (2) sind in Abbildung 71 gezeigt. Zu erkennen ist, dass zu allen Zeitpunkten diantennäre Glykane, die an beiden Antennen eine Galaktose tragen, vorhanden sind. Antennarität und Galaktosylierungsgrad lagen im Kultivierungsverlauf bei 2,1 Antennen pro identifiziertem Glykan und 2,0-2,1 Galaktosen pro identifiziertem Glykan. Das Produkt der Kontrollkultivierung zeigte eine gleiche Antennarität und gleichen Galaktosylierungsgrad. Die Fehler innerhalb der biologischen Replikate lagen bei unter 3%. Die *core*-Fucosylierung war innerhalb der Fehler bei allen Produkten konstant bei 0,7-0,8

core-Fucosen pro identifiziertem Glykan. Antennäre Fucosen konnten mittels HILIC-FLD nicht identifiziert werden. Der Grad an Sialylierung nahm mit der Kultivierungsdauer geringfügig ab. Beim ATIII aus den ersten drei Tagen der Kultivierung waren 74 % der Antennen sialyliert (Sialylierungsgrad $1,47 \pm 0,02$). Das Produkt, das an den Tagen vier bis sechs produziert wurde, zeigte eine Sialylierung von 70 % der Antennen ($1,40 \pm 0,11$) und das ATIII, welches zum Ende der Kultivierung produziert wurde (Tag 7-11), wies eine Sialylierung von 65 % der Antennen auf ($1,30 \pm 0,05$). Akkumulierte das ATIII über den gesamten Kultivierungszeitraum, waren 72 % der Antennen sialyliert (Sialylierungsgrad $1,43 \pm 0,08$).

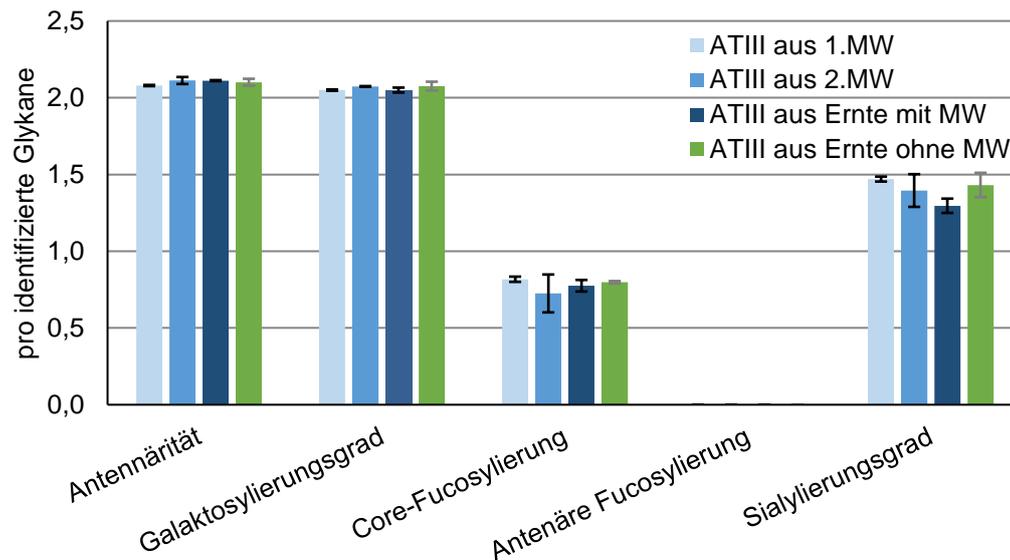


Abbildung 71: Ergebnisse der HILIC-FLD bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des ATIIIs aus der Kultivierung mit Medienwechsel lagen zu den drei Probenahme-Zeitpunkten je Proben aus biologischen Triplikaten zu Grunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung). Für die Analytik des ATIIIs der Kultivierung ohne Medienwechsel lagen zwei biologische Replikate zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Duplikate).

Ähnlich wie bei den Ergebnissen des AATs wichen auch hier die Werte der Sialylierungen pro identifiziertem Glykan (mittels HILIC-FLD) von den Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle (mittels Sialinsäure-Analytik) ab. Bis auf bei der Probe vom Ende der Kultivierung waren die Werte der Sialinsäuren pro Glykosylierungsstelle höher, als die der mittels HILIC-FLD identifizierten Glykane. Der Trend war jedoch gleich.

Die Glykanstruktur des ATIIIs schien sich, ausgehend von diesen Daten, während der Kultivierung nur geringfügig zu verändern (vgl. Anhang: Abbildung-A 11).

7.4.5.3. Identifizierung und relative Quantifizierung der permethylierten Glykane des ATIIIs

Die Identifizierung der Glykane mittels GU-Datenbank ist sehr komplex, da die Retentionszeit nicht nur von Ladung und Größe des Glykans abhängig ist, sondern auch von der Bindung

Ergebnisse und Diskussion

der Zucker untereinander. Um die Glykane zu identifizieren wurden sie permethyliert, sodass auch die geladenen Zucker während der MALDI-ToF-Analytik stabil ionisiert werden konnten. Es wurde das ATIII aus biologischen Triplikaten des ersten und zweiten Medienwechsels und der Ernte mit Medienwechsel massenspektrometrisch analysiert. Das ATIII aus den Kontrollkulturen wurde in biologischen Duplikaten analysiert. Die in den Spektren über ihre Masse identifizierten Glykane wurden wie bereits erwähnt Qualitätsattributen zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 72 gezeigt. Die Antennarität der Glykane lag bei allen Proben zwischen 2,1 und 2,2 Antennen pro identifiziertem Glykan. Das Produkt welches am Ende der Kultivierung (Tag 7-11) produziert wurde, zeigte mit 2,1 Antennen pro identifiziertem Glykan die niedrigste Antennarität. Nahezu alle Antennen der identifizierten Glykane lagen zu allen Zeitpunkten galaktosyliert vor (Galaktosylierungsgrad: 2,0-2,1). Ähnlich wie bei der Antennarität war auch der Galaktosylierungsgrad des Produktes vom Ende der Kultivierung am geringsten (2,0). 81 %-88 % der identifizierten Glykane wiesen eine *core*-Fucosylierung auf (1. MW: 88 %; 2. MW: 87 %; Ernte mit MW: 81 %; Kontrolle: 87 %).

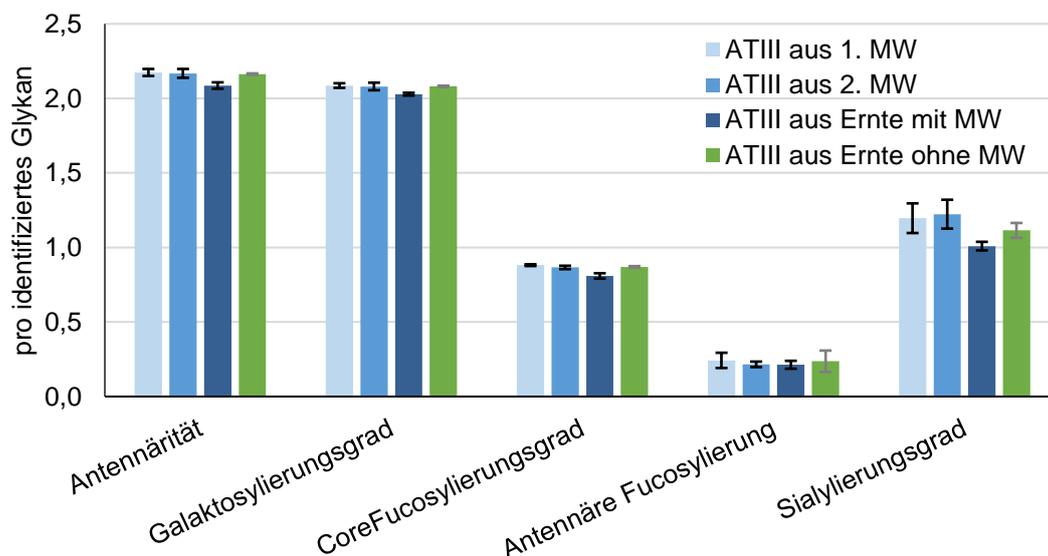


Abbildung 72: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analytik der permethylierten Glykane des ATIII bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des ATIII aus der Kultivierung mit Medienwechsel lagen zu den drei Probenahme-Zeitpunkten je Proben aus biologischen Triplikaten zu Grunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung). Für die Analytik des ATIII der Kultivierung ohne Medienwechsel lagen zwei biologische Replikate zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Duplikate).

Antennäre Fucosen wiesen 21-24 % der Glykane auf. Der Sialylierungsgrad zeigte den deutlichsten Unterschied zwischen Beginn und Ende der Kultivierung. Sowohl das Produkt, welches an den ersten drei Tagen produziert wurde, als auch das, welches in den folgenden drei Tagen produziert wurde, zeigte einen Sialylierungsgrad von $1,2 \pm 0,1$. Dieser sank über die letzten sechs Tage der Kultivierung auf 1,0. Der Sialylierungsgrad des ATIII aus der Kontrollkultivierung lag mit $1,1 \pm 0,1$ zwischen dem Sialylierungsgrad des Produktes der

frühen Kultivierungsphase und der zweiten Hälfte der Kultivierung. Dieser Trend findet sich in den Daten der mit 2-AB gelabelten Glykane wieder (vgl. Kapitel 7.4.5.2). Ab dem Tag des zweiten Medienwechsels begann die Viabilität aller Kulturen zu sinken (vgl. Kapitel 7.1.5.1; Abbildung 44).

7.4.5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik des ATIII

ATIII, welches aus den wachstumsspezifischen Probenahmen stammt, wurde hinsichtlich der Glykane analysiert. Die Glykosylierung des ATIII zeigte während der Kultivierung nur geringfügige Änderungen. Dies zeigen sowohl die Daten der Analytik der 2-AB gelabelten Glykane, als auch die Daten der massenspektrometrischen Untersuchung.

Die geringen Abweichungen der Glykanstrukturen innerhalb der biologischen Triplikate lässt eine geringe Heterogenität des Produktes vermuten. Zusammenfassend können folgende Aussagen über die N-Glykane, des in dieser Arbeit produzierten ATIII gemacht werden:

- 1) Es konnten di- und triantennäre zum Teil fucosylierte komplexe Glykane, die bis zu drei NANA tragen, identifiziert werden (vgl. Anhang: Abbildung-A 9).
- 2) Im Durchschnitt lagen hauptsächlich diantennäre, zweifach galaktosylierte Glykane mit jeweils ein bis zwei NANA vor, von denen 80-90 % fucosyliert waren.
- 3) Nach den Ergebnissen der Sialinsäure-Analytik waren die Glykane zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels mehr als zweifach sialyliert. Der Sialyierungsgrad fällt mit der Kultivierungsdauer. Die Ergebnisse der Analytik der intakten Glykane lassen eine geringere Sialylierung vermuten, zeigen jedoch einen ähnlichen Trend.
- 4) Im Verlauf der Kultivierung, sowie in den Kontrollkultivierungen blieben Antennarität, Galaktosylierungsgrad sowie *core*- und antennäre Fucosylierung innerhalb der Fehler annähernd konstant.

1989 analysierten Zettlmeissl et al. ATIII, welches wie hier in CHO-Zellen produziert wurde. Es wurden hauptsächlich diantennäre Strukturen gefunden, aber auch di- und tetraantennäre sowie trunkierte Glykane (Zettlmeissl, G., et al.; 1989). In dieser Arbeit konnten kaum trunkierte und keine tetraantennären Glykane identifiziert werden. Jedoch machen diantennäre Glykane bei dem in dieser Arbeit produziertem ATIII den Hauptteil aus.

1) Vergleichbarkeit der Analytik

Zunächst sollen die drei unterschiedlichen Analyse Methoden miteinander verglichen werden. In Tabelle 26 sind die Werte der aus den unterschiedlichen Analysen berechneten Qualitätsattribute zusammengefasst. Wurden die intakten Glykane mittels HILC-FLD bzw.

Ergebnisse und Diskussion

MALDI-ToF analysiert, waren die Ergebnisse der Antennarität sowie der Galaktosylierung nahezu identisch. Die *core*-Fucosylierung lag bei den Ergebnissen der MALDI-ToF Analytik geringfügig höher. Auffällig ist, dass mittels HILIC-FLD keine antennären Fucosylierungen detektiert werden konnten. Die massenspektrometrische Analytik zeigte bei 20 % der identifizierten Glykane eine antennäre Fucosylierung.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (Sia-A= Sialinsäure-Analytik; 2-AB= HILIC-FLD 2-Ab gelabelter Glykane; MALDI= MALDI-ToF Messung permethylierter Glykane)

Qualitätsattribut	Analytik	1. MW	2. MW	Ernte + MW	Ernte -MW
Antennarität	2-AB	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0
	MALDI	2,2 ± 0,0	2,2 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,2 ± 0,0
Galaktosylierung	2-AB	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0
	MALDI	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,00 ± 0,0	2,1 ± 0,0
core-Fucosylierung	2-AB	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0
	MALDI	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0
Antennäre Fucosylierung	2-AB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MALDI	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
Sialyierungsgrad	Sia-A	2,5 ± 0,0	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,0
	2-AB	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	MALDI	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1

Die Unterschiede in den Ergebnissen können durch eine höhere Sensitivität der massenspektrometrischen Analysen begründet werden. Mittels HILIC-FLD konnten nicht alle identifizierten *Peaks* Glykanen zugeordnet werden. Des Weiteren wurden nicht alle *Peaks* basisliniengetrennt, was die Integration erschwert (vgl. Anhang: Abbildung-A 9). Werden die Ergebnisse der Sialinsäure-Analytik mit denen der Analysen der intakten Glykane verglichen, so zeigt sich, dass der Sialyierungsgrad zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels bei der Messung der abgespaltenen Sialinsäuren deutlich höher ist, als bei der Messung der intakten Glykane (2,5 pro Glykosylierungsstelle, bzw. 1,2-1,5 pro identifiziertem Glykan). Für die restlichen Zeitpunkte zeigen sich bei allen drei analytischen Methoden ähnliche Werte. Die Verläufe, die die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zeigen, ähneln sich. Daher sind alle drei Methoden zur Beantwortung der in dieser Arbeit behandelten Fragestellung geeignet.

2) Ursachen für die Unterschiede in der Glykosylierung

Die Sialylierung ist im Falle des ATIII das einzige Qualitätsattribut, welches sich im Verlauf der Kultivierung verändert. Besonders deutlich wurde dies bei den Ergebnissen der Sialinsäure-Analytik (vgl. 7.4.5.1). In Kapitel 7.2 wurde bereits der Einfluss der Sialidasen im Kulturüberstand besprochen. Bereits zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels wurde eine

Sialidase Aktivität von 0,34 mU detektiert. Die Sialidasen degradierten demnach das sekretierte Produkt. Zusätzlich war die Glutaminkonzentration bereits an Tag 6 (2. MW) bei 0 mM, was, wie bereits beschrieben, zu einer verringerten Sialylierung führen kann (vgl. Kapitel 1.3.2) (Chee Fung Wong, D., et al.; 2005).

Die Unterschiede in der viablen Zelldichte und Viabilität zwischen den Kulturen mit und ohne Medienwechsel zum Ende der Kultivierung (vgl. Tabelle 16; Abbildung 44) scheinen sich nicht auf die Glykosylierung auszuwirken. Die Aktivität der Sialidasen, welche durch Zellyse in den Kulturüberstand gelangten, betrug am Ende der Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel 0,34 mU. Die Unterschiede in der Sialylierung zwischen den Produkten aus der Ernte mit, bzw. ohne Medienwechsel lassen sich dadurch erklären, dass es sich beim Produkt aus den Kontrollkulturen um die Summe der Produkte aus den Kultivierungen mit Medienwechsel handelt.

Obwohl beim ATIII nur geringe Unterschiede in der Glykosylierung der Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen auftraten, wurden aus den nach Qualitätsattributen klassifizierten Ergebnissen der massenspektrometrischen sowie der chromatographischen Analytik Durchschnittswerte für das Produkt aus der Kultivierung mit Medienwechsel berechnet (vgl. Anhang: Abbildung-A 11). Die aus Produktquantifizierung und Produktanalytik resultierenden Fehler ließen keine Aussage über mögliche Ursachen der Unterschiede zu.

Um die Degradation durch extrazelluläre Prozesse weiter zu untersuchen, wurde ATIII in Medium, und in Kulturen von Parentalzellen, die unterschiedliche Viabilitäten aufwiesen, inkubiert (vgl. Kapitel 2.7.2). So sollte besser unterschieden werden können, ob der Verlust an Sialylierung eher durch extrazelluläre Prozesse bedingt wird, oder durch intrazelluläre Prozesse, die durch Substratmangel oder Akkumulation von Metaboliten hervorgerufen werden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 8.3 gezeigt.

3) Bedeutung der identifizierten Glykane für die pharmazeutische Wirkung

Das in dieser Arbeit produzierte ATIII zeigte im Durchschnitt hauptsächlich diantennäre, zweifach galaktosylierte Glykane mit jeweils ein bis zwei NANA. Die Glykane waren zu 80-90 % fucosyliert. Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass geringer sialyliertes und stärker fucosyliertes ATIII eine höhere Affinität zu Heparin hat (Edmunds, T., et al.; 1998). Dies lässt vermuten, dass das hier produzierte ATIII eine hohe Affinität zu Heparin aufweisen würde. 1993 wurden drei Isoformen von ATIII, welche in BHK-Zellen produziert wurden, untersucht. Das ATIII mit Glykanen, die mehr als zwei Antennen aufwiesen, zeigte die geringste Affinität zu Heparin im Gegensatz zu ATIII, welches sowohl komplexe Glykane als auch *High Mannose* Strukturen zeigte (Fan, B., et al.; 1993). Jedoch beobachteten Yamada et al., dass die Affinität des ATIII zu Heparin durch das Vorhandensein von *High Mannose* Glykanen erhöht werden

Ergebnisse und Diskussion

kann. Die Proteine mit *High* Mannose Glykanen werden schneller abgebaut, als ATIII mit komplexen und sialylierten Glykanen (Yamada, T., et al.; 2016). Demnach ist das in dieser Arbeit in CHO-Zellen produzierte ATIII vermutlich ein Produkt, welches sowohl eine hohe Halbwertszeit, als auch eine hohe Affinität zu Heparin aufweisen würde. Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass das ATIII aus drei biologischen Replikaten homogen zu sein scheint und im Verlauf der Kultivierung, abgesehen von der Sialylierung, stabil war. Außerdem konnten kaum immunogenen Strukturen identifiziert werden. Demnach wird vermutlich unter den folgenden zwei Bedingungen hochwertiges und stabiles ATIII produziert:

- Die Viabilität der Zellen sollte über 95 % bleiben, damit möglichst keine Sialidasen im Kulturüberstand vorhanden sind.
- Glutamin und Glukose sollten zugefüttert werden. Es ist zu überprüfen, welchen Einfluss die Ammoniumkonzentration auf die Glykosylierung hat. Dementsprechend müsste darauf geachtet werden, dass die Ammoniumkonzentration niedrig gehalten wird.

7.5. Zusammenfassung der Hauptversuche

In den Hauptversuchen zur Produktglykosylierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Kultivierung wurden fünf unterschiedliche Glykoproteine in fünf verschiedenen Zelllinien erfolgreich produziert und anschließend für die Glykananalytik aufgearbeitet. Die wachstumsspezifische Probenahme stellte eine solide Methode dar, um ein Produkt aus einem definierten Kultivierungsabschnitt zu untersuchen. Die Unterschiede, die zum Teil durch nicht parallel verlaufende Wachstumskurven von Parental- und Produktionszelllinien auftraten (vgl. Tabelle 16), waren gering und wirkten sich lediglich auf die Viabilitäten der Kultivierungen von den mAb-produzierenden CHO-XL99- und den CHO-ATIII-Zellen zum Erntezeitpunkt aus. Die Viabilitäten der Kontrollkultivierungen und der Kulturen mit Medienwechsel unterschieden sich. Daher konnte für die Produktion des mAbs nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Fucosylierung und im Anteil an *High* Mannose Strukturen beim Vergleich zwischen den Produkten aus den Kultivierungen mit bzw. ohne Medienwechsel (vgl. Abbildung 60) durch die variierenden Viabilitäten der Kulturen hervorgerufen wurden. Bei der Produktion des ATIIIs gab es keine Hinweise für einen Einfluss der unterschiedlichen Viabilitäten auf die Glykosylierung.

Für die Produktanalytik des EPOs wurde die Produktqualität aufgrund unterschiedlicher Ladungsformen des Proteins analysiert. Für die restlichen Produkte wurde die vom Protein abgespaltenen Glykane identifiziert und quantifiziert. Den Glykanen, die mittels unterschiedlicher Analysen (Intaktmassen-Analytik, HILIC-FLD, MALDI-ToF) identifiziert und

quantifiziert wurden, wurden folgende Qualitätsattribute zugeteilt: Antennarität, *core*-Fucosylierungsgrad, Galaktosylierungsgrad, Grad der antennären Fucosylierung, Sialylierungsgrad und Anteil an *High Mannosen*. Die Antennarität zeigte sich in allen hier durchgeführten Kultivierungen konstant. Die *core*-Fucosylierung des mAbs sank mit der Kultivierungsdauer. Bei den anderen Glykoproteinen blieb sie konstant. Die Galaktosylierung änderte sich in drei von vier untersuchten Proteinen. Lediglich beim ATIII zeigte sich ein gleichbleibender Galaktosylierungsgrad. Ein Verlust an Sialinsäuren konnte bei allen sialylierten Glykanen (bei allen Produkten außer dem mAb) verzeichnet werden. Der C1-INH zeigte während der Kultivierung einen Verlust an antennären Fucosen.

Der im Verlauf der Kultivierung abnehmende Sialylierungsgrad ist vermutlich auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. Der erste Mechanismus beruht auf extrazellulären Prozessen. Es konnten Sialidase-Aktivitäten in den Kulturüberständen nachgewiesen werden. Von einer möglichen extrazellulären Beeinflussung der Sialylierung kann für die Produktion des C1-INHs und des ATIII ausgegangen werden, da in diesen Kulturüberständen die höchsten Sialidase-Aktivitäten gemessen wurden. Bei der Produktion des AATs und des EPOs schien die Sialidase-Aktivität von geringerer Bedeutung gewesen zu sein (vgl. Kapitel 7.2, Abbildung 48). Durch den Sialidase-Aktivitätstest wurde zudem gezeigt, dass die unterschiedlichen Zelllinien auch bei geringer Viabilität unterschiedliche Sialidase-Aktivitäten aufwiesen. Dies kann durch unterschiedliche pH-Optima der diversen Sialidasen begründet werden. Unterschiedliche pH-Optima von Sialidasen aus unterschiedlichen Zelllinien wurden bereits 1994 von Gramer und Goochee beschrieben (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994). Der zweite verantwortliche Mechanismus beruht auf intrazellulären Prozessen während der Produktglykosylierung. Durch Glukose- und Glutaminlimitierung als auch der möglichen Steigerung der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand kann der Sialylierungsgrad negativ beeinflusst werden (Yang, M.; Butler, M.; 2000a; Liu, B., et al.; 2014; Cruz, H. J., et al.; 2000). Diese Parameter beeinflussten bei der Produktion des mAbs, des C1-INHs und des AATs vermutlich nicht nur die Sialylierung, sondern auch den Galaktosylierungsgrad. Als Folge einer Glukoselimitierung wurde ein steigender Anteil an nicht glykosyliertem Produkt beschrieben (Jayme, D., et al.; 1997; Seo, J. S., et al.; 2014). Dies konnte für den hier produzierten mAb nicht bestätigt werden. Der Anteil an glykosyliertem Produkt blieb auch nach der Verstoffwechslung der Glukose und des Glutamins bei 97-98 %.

Während der Produktion des C1-INHs fiel auf, dass die antennäre Fucosylierung im Kultivierungsverlauf mit dem Sialylierungsgrad abnahm. Dies könnte ein Hinweis auf die Fucosyltransferase sein, welche für die antennäre Fucosylierung bei der Produktion des C1-INHs in den CAP®-1D9-Zellen verantwortlich ist. Die FUT7 hängt Fucosen lediglich an

Ergebnisse und Diskussion

sialylierte Antennen an (Ma, B., et al.; 2006; Wang, H., et al.; 2013). Da während der Kultivierung der Sialylierungsgrad abnahm, könnte dies der Grund für eine ebenfalls abnehmende Fucosylierung der Antennen sein.

Mit Hilfe der wachstumsspezifischen Probenahme konnten Produkte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung untereinander verglichen werden und zusätzlich mit dem Produkt, welches von Anfang bis Ende einer Kultivierung in der Kultur akkumulierte. Dadurch war es möglich, einen detaillierten Blick auf die Glykosylierung des Produktes bei unterschiedlichen Bedingungen innerhalb einer Kultivierung zu werfen. Durch diese Art der Probenahme war es möglich, auszuschließen, dass es sich um ein Produkt aus mehreren Wachstumsphasen handelte. Zudem war die Verweilzeit des Produktes im Kulturüberstand kurz und somit wurde ein möglicher extrazellulärer Einfluss auf das Produkt minimiert. Beim Vergleich der Summe der Produkte aus den Kultivierungen mit Medienwechsel mit den Produkten aus den Kontrollkulturen ließen sich erste Hinweise finden, dass die Verweilzeit des Produktes im Medium bzw. im Kulturüberstand nur unter bestimmten Bedingungen (geringe Viabilität) eine Auswirkung auf die Glykosylierung hat. Um dies zu überprüfen wurden diverse Versuche zur Produktstabilität durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt und diskutiert.

8. Analytik zur Produktstabilität

Um die Ursachen der unterschiedlichen Glykosylierungen im Kultivierungsverlauf gezielter untersuchen zu können, wurde aufgereinigtes Produkt sowohl in Medium und Kulturüberstand, als auch in Parentalzellkulturen mit unterschiedlicher Viabilität inkubiert.

8.1. Inkubation von EPO in Kulturüberstand und die Auswirkungen auf die Sialylierung

Für die Untersuchung der Produktstabilität in Kulturüberstand wurde EPO vor und nach einer sieben tägigen Inkubation in Kulturüberstand bei 37 °C mittels CZE analysiert. Dieses EPO wurde nicht von CHO-C4 Zellen produziert, da aus den Kultivierungen nicht ausreichend Produkt vorhanden war. In Abbildung 73 sind die relativen Intensitäten der sieben detektierten *Peaks* gezeigt. Das EPO nach Inkubation in Kulturüberstand zeigte geringere Mengen an hoch sialylierten Glykanen (je höher die *Peak* Nummer, desto mehr Sialinsäuren, vgl. Kapitel 4.2.2.4) (*Peak* 6: Ausgangsprobe: 9,8 % ± 0,1 %; nach Inkubation: 8,3 % ± 0,5 %; *Peak* 7: Ausgangsprobe: 3,1 % ± 0,1 %; nach Inkubation: 1,8 % ± 0,4 %).

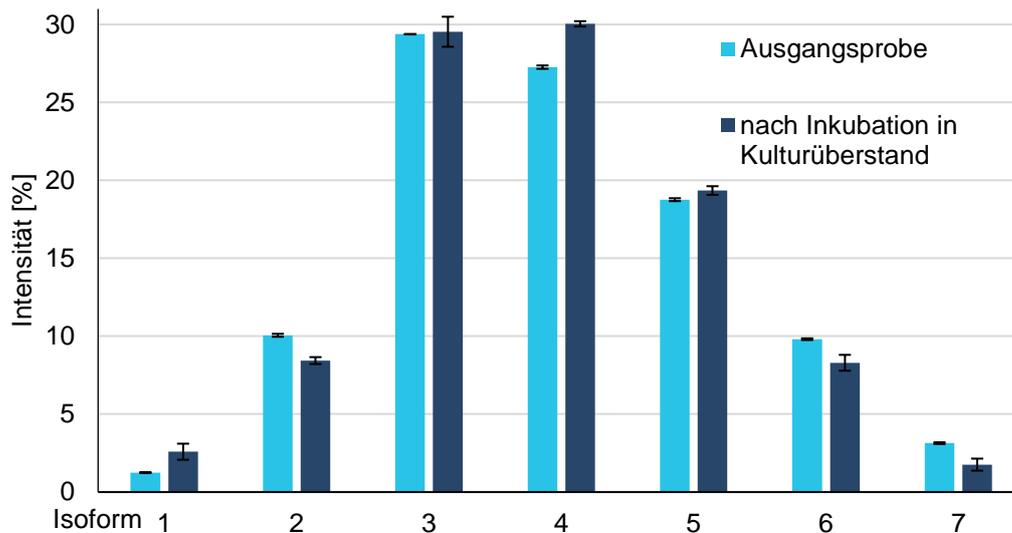


Abbildung 73: Relative Intensitäten der detektierten *Peaks*. Verglichen wird EPO vor und nach der Inkubation in Kulturüberstand bei 37 °C. Die Fehlerbalken zeigen die Differenz zwischen Duplikaten.

Die Intensitäten der *Peaks* 3 und 4 blieben nach der Inkubation innerhalb der Fehler gleich (*Peak* 3: Ausgangsprobe: 29,4 % ± 0,0 %; nach Inkubation: 29,5 % ± 1,0 %; *Peak* 5: Ausgangsprobe: 18,8 % ± 0,1 %; nach Inkubation: 19,2 % ± 0,3 %). Die Intensitäten der *Peaks* 1 und 4 stiegen nach der Inkubation im Kulturüberstand und die Intensität des *Peaks* 2 sank. Die Unterschiede zwischen dem Ausgangsprodukt und dem EPO nach Inkubation im Kulturüberstand waren gering und folgten keinem eindeutigen Trend.

Tabelle 27: Bewertung der EPO Proben nach der prozentualen *Peak*flächenverteilung (EuPh).

Isoform	1	2	3	4	5	6	7	8
Erlaubter Bereich der relativen <i>Peak</i>fläche [%]	0-15	0-15	5-20	10-35	15-40	13-35	0-20	0-15
Ausgangsprobe	√	√	×	√	√	×	√	√
Nach Inkubation in Kulturüberstand	√	√	×	√	√	×	√	√

Der Kulturüberstand stammte von einer Kultivierung, die nach Eintritt in die stationäre Phase beendet wurde. Dementsprechend lag die Viabilität über 90 % (Daten nicht gezeigt) und es ist davon auszugehen, dass wenig Proteine, wie Sialidasen aus lysierten Zellen im Kulturüberstand waren. Demnach ist eine enzymatische Degradation des Proteins durch Glykosidasen unwahrscheinlich. Dies wird durch die Daten zur Sialidase-Aktivität in den Kulturüberständen aus der wachstumsspezifischen Probenahme des EPOs untermauert (vgl. Kapitel 7.2 und Tabelle 17). Mittels CZE können unterschiedliche Ladungsformen eines Proteins aufgetrennt werden. Eine Desialylierung ist im Falle der Glykosylierungen die einzige Möglichkeit, dass das EPO im Vergleich zu vor der Inkubation andere Ladungsformen

Ergebnisse und Diskussion

aufweist. Da eine enzymatische Desialylierung ausgeschlossen wurde, käme eine chemische Abspaltung der Sialinsäuren in Frage. Dazu müsste jedoch ein saurer pH vorliegen und die Temperatur müsste höher als 37 °C sein (vgl. Kapitel 4.2.2.2) (Mulloy, B.; 2009). Somit lässt sich erklären, warum es kaum Unterschiede zwischen dem EPO vor und nach der Inkubation im Kulturüberstand zeigen.

8.2. Produktstabilität des C1-INHs unter Kultivierungsbedingungen

Um den Einfluss von Medienbestandteilen und physikalischen Einflüssen wie der Temperatur auf die Produktstabilität zu untersuchen wurden die Glykane des C1-INHs vor und nach einer sieben-tägigen Inkubation in Kulturmedium bei 37 °C vom Produkt abgespalten, permethyliert und mittels MALDI-ToF analysiert (vgl. Kapitel 4.2.2.10). Die Auswertung der Spektren erfolgte analog zu den vorherigen Auswertungen (vgl. Kapitel 4.2.2.8). Innerhalb der Fehler sind keine Unterschiede in den hier gezeigten Qualitätsattributen der Glykosylierung zu sehen (vgl. Abbildung 74).

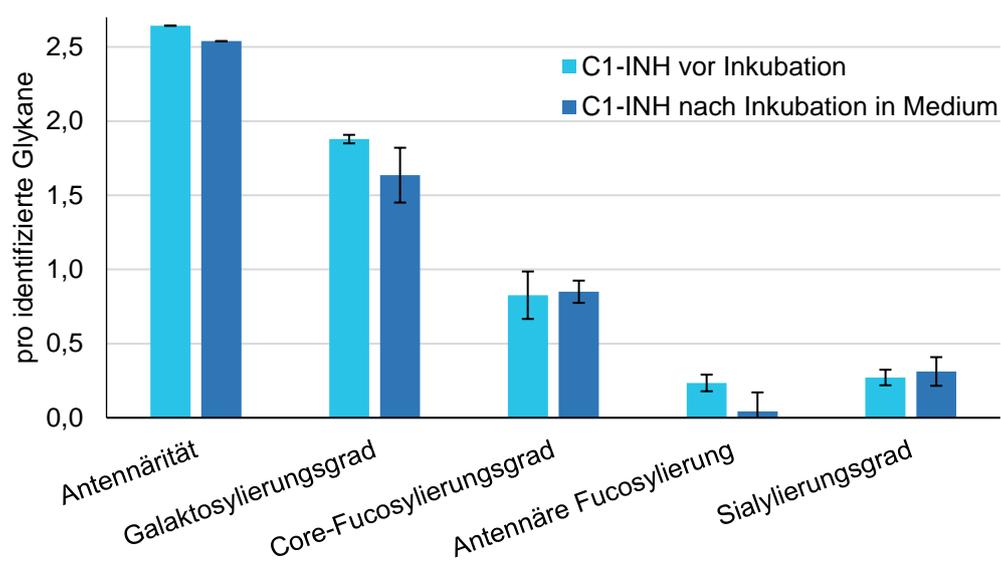


Abbildung 74: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Glykane des C1-INHs vor und nach der Inkubation in Kulturmedium bei 37 °C. Die Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate an.

Die Ergebnisse des C1-INHs bestätigen die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung des EPO. Im Kulturmedium waren keine Enzyme enthalten und pH und Temperatur waren physiologisch. Dementsprechend gab es keine Gründe für eine Abspaltung der Sialinsäuren. Um das Verhältnis von Monosacchariden zu untersuchen, werden Glykane einer harschen Hydrolyse unter saurem pH bei 100 °C für mehrere Stunden unterzogen (Mulloy, B.; 2009). Dies verdeutlicht, dass eine Degradation unter physiologischen Bedingungen nicht sehr wahrscheinlich ist. Dies wird durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt. Einen Hinweis darauf gab bereits der Vergleich der gemittelten Ergebnisse aus den Kulturen mit

Medienwechsel im Vergleich zu den Kulturen ohne Medienwechsel (vgl. Abbildung 66). Es konnte kein Hinweis auf eine Veränderung der Glykosylierung durch die Verweilzeit des C1-INHs in der Kultur gefunden werden.

8.3. Produktstabilität des ATIII unter Kultivierungsbedingungen

Ein weiteres Produkt, ATIII, wurde sowohl durch Inkubation in Kulturmedium, als auch durch Inkubation in zwei unterschiedlichen Zellkulturen auf die Produktqualität hin untersucht. Bei den zwei Zellkulturen handelte es sich um CHO-K1. Die Inkubation in Medium und in Zellkultur I dauerte vier Tage, wobei die Viabilität der Zellen 89 % betrug. In Zellkultur II wurden das ATIII sieben Tage inkubiert. Die Viabilität sank in dieser Zeit auf 31 % (Daten nicht gezeigt). Die abgespaltenen Glykane wurden 2-AB gelabelt (vgl. Kapitel 4.2.2.7) und über einen Anionentauscher aufgrund ihrer negativen Ladungen aufgetrennt (vgl. Kapitel 4.2.2.9). In Abbildung 75 ist ein Chromatogramm der IEX des ATIII vor der Inkubation gezeigt. Ungeladene Glykane eluierten nach 2,5 min. Die geladenen Glykane wurden nach ihrer Anzahl an negativen Ladungen, also nach Anzahl ihrer Sialinsäuren aufgetrennt. Beim ATIII liegt ein Großteil der Glykane einfach und zweifach sialyliert vor.

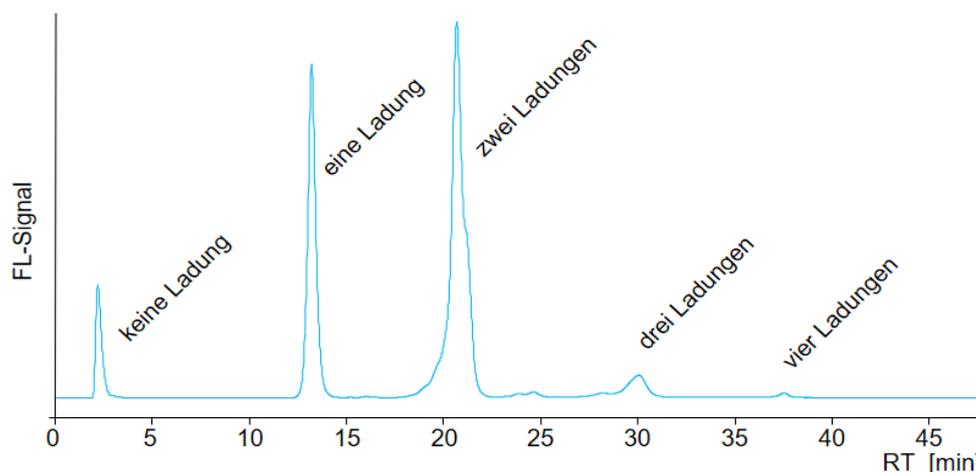


Abbildung 75: IEX-HPLC-Chromatogramm des ATIII vor Inkubation. Die Glykane wurden aufgrund ihrer Ladungen aufgetrennt.

Aber auch asialo Glykane, sowie geringe Mengen von tri- und tetrasialo Glykanen konnten nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Daten aus der wachstumsspezifischen Probenahme überein (vgl. Kapitel 7.4.5.2 und 7.4.5.3). Die Peakflächen wurden integriert und relativ quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 76 gezeigt. Die Unterschiede zwischen der Ausgangsprobe und dem ATIII nach Inkubation in Medium sind gering. Werden jedoch die Glykane der Ausgangsprobe mit denen aus den Inkubationen in Zellkulturen I und II verglichen so wird deutlich, dass der Anteil der Glykane mit keiner, bzw. einer Ladung steigt, wohingegen der Anteil der Glykane mit zwei Ladungen abnimmt. Der Anteil an dreifach geladenen

Ergebnisse und Diskussion

Glykanen ändert sich marginal (vor Inkubation 4,5 %; nach Inkubation: Zellkultur I: 3,0 %; Zellkultur II: 3,5 %) und der Anteil von vierfach geladenen Glykanen bleibt gleich bei 0,4 %. Die Unterschiede zwischen den Glykanen vor Inkubation und nach der sieben-tägigen Inkubation in Zellkultur II sind besonders deutlich. So steigt der Anteil der ungeladenen Glykane von 9,6 % auf 18,3 %. Der Anteil der einfach geladenen Glykane steigt von 28,3 % auf 36,7 %. Diese Anstiege lassen sich durch die Abnahme der zweifach geladenen Glykane von 57,2 % auf 41,0 % erklären. Nach der sieben-tägigen Inkubation lag die Viabilität bei lediglich 31 %. Das bedeutet, dass nicht sekretierte Enzyme durch Zellyse im Überstand vorhanden waren. Dies war vermutlich auch bei Zellkultur I der Fall, jedoch lag die Viabilität mit 89 % weit höher. Dementsprechend gelangten durch Zellyse weniger Enzyme in das Kulturmedium, als es bei Zellkultur II der Fall war.

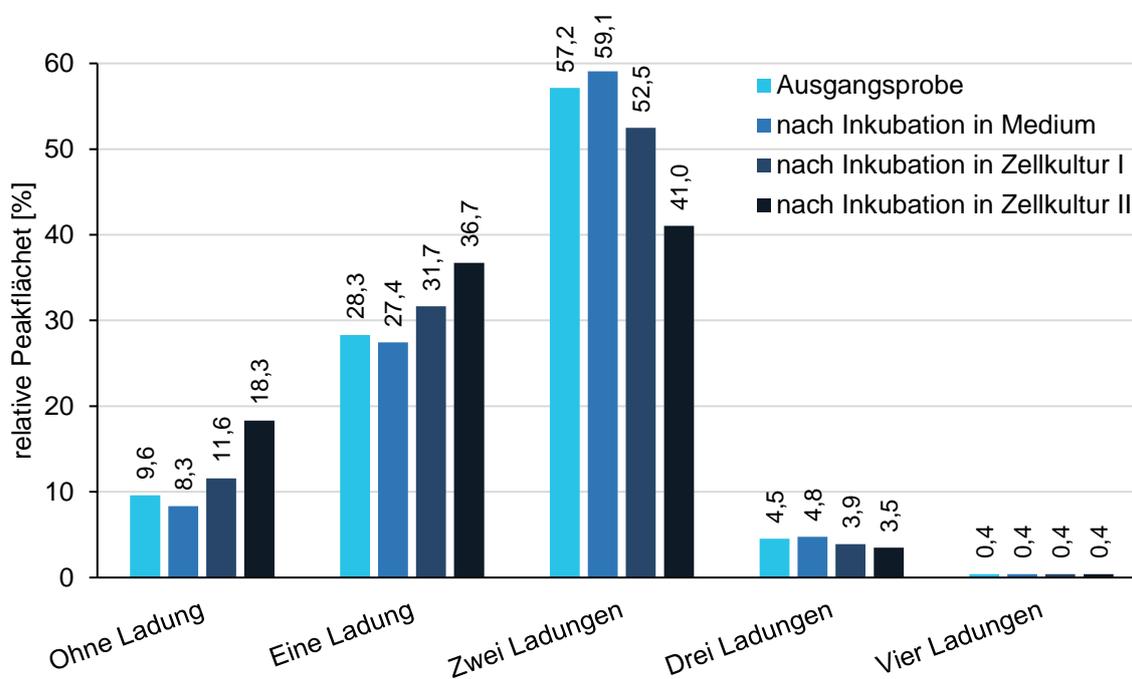


Abbildung 76: Ergebnisse der IEX-HPLC-FLD der 2-AB gelabelten Glykane des ATIIIs. Gezeigt sind die relativen Quantitäten der detektierten *Peaks* die jeweils 0-4 negativen Ladungen am Molekül entsprechen.

Im Sialidase-Assay konnte in den Überständen der Kultivierung der CHO-ATIII-Zellen bereits zum Zeitpunkt des zweiten Medienwechsels eine Sialidase-Aktivität von 0,3 mU detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt lag die Viabilität bei 95 % (vgl. Tabelle 17). Es ist davon auszugehen, dass diese Aktivität mit abnehmender Viabilität steigt, da Sialidasen durch Zellyse in den Kulturüberstand gelangen. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass der Verlust an Sialinsäuren durch extrazelluläre Sialinsäuren hervorgerufen wird. Zwar ist es wahrscheinlich, dass sich die Glykosylierung durch die Produktionszellen durch Substratlimitierung und Akkumulation von Ammonium ändert, jedoch wird deutlich, wie stark

sekretiertes Produkt in einem Kulturüberstand mit lysierten Zellen degradiert. Durch die beiden vorausgegangenen Versuche mit EPO und dem C1-INH ist eine chemische Degradation auszuschließen.

8.4. Zusammenfassung zur Produktstabilität

Mit Hilfe der Stabilitätsversuche sollte die Produktstabilität unter verschiedenen physiologischen Parametern getestet werden. Unterschiedliche Produkte (EPO, C1-INH und ATIII) wurden im Kulturüberstand der Parentalzelllinie, in Medium und in Parentalzellkulturen für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Weder nach Inkubation im Medium noch nach Inkubation im Kulturüberstand, bei dem die Zellen eine Viabilität von über 90 % zeigten, wurden Unterschiede zwischen dem Produkt vor und nach der Inkubation detektiert. Dies spricht dafür, dass keine chemischen Prozesse stattfinden, die sich auf die Glykane des Produktes auswirken. Somit ist die Verweilzeit in einer Zellkultur mit hoher Viabilität für die Produktqualität vernachlässigbar. Erst sinkende Viabilität und die damit einhergehende Akkumulation von Enzymen durch lysierte Zellen trägt zur Degradation der Glykane bei. Dies wurde durch den Stabilitätstest mit ATIII deutlich gezeigt. ATIII wurde sowohl in Medium, als auch in Parentalzellkulturen inkubiert. Während das Ausgangsprodukt und das Produkt nach Inkubation in Medium eine annähernd gleiche Ladungsverteilung aufwiesen, zeigten die Produkte, die in den Zellkulturen inkubiert wurden, mit abnehmender Viabilität der Kulturen eine Abnahme der höher geladenen Formen bei Zunahme der nicht bzw. einfach geladenen Strukturen.

Somit haben sich Vermutungen aus den Versuchen zur wachstumsspezifischen Probenahme, nämlich dass sich die Verweilzeit des Produktes im Kulturüberstand nicht auf die Produktglykosylierung auswirkt, bestätigt. Erst durch Glykosidasen, die durch die sinkende Viabilität der Kulturen in den Kulturüberstand freigesetzt werden, kann die Produktglykosylierung beeinträchtigt werden. Je nach pH-Optimum der Enzyme, welches von der produzierenden Zelllinie abhängt, sind die Glykosidasen unter Kultivierungsbedingungen aktiv und können die Glykanstrukturen beeinträchtigen (vgl. Kapitel 7.2.; (Gramer, M. J.; Goochee, C. F.; 1994). Um eine Kultivierung auf die Anforderungen, die an das zu produzierende Glykoprotein gestellt werden, zu optimieren, sollten demnach auch die Aktivitäten von Glykosidasen im Kulturüberstand bekannt sein und das Ende der Kultivierung abhängig von einer zuvor für die Glykosidase-Aktivität kritischen Viabilität gewählt werden.

AUSBLICK

Auf die am Anfang dieser Arbeit stehenden Fragen nach dem Ursprung von Produktheterogenitäten am Ende einer Kultivierung konnten mittels wachstumsspezifischer Probenahme und diverser Versuche zur Produktstabilität mehrere Antworten gefunden werden. Aufgrund der hier gesammelten Daten sind die Hauptparameter, die auf die Glykosylierung des Produktes im Kultivierungsverlauf einwirken, zum einen extrazelluläre enzymatische Prozesse, die durch lysierte Zellen ausgelöst werden, und zum anderen intrazelluläre Prozesse während der Glykosylierung, die von Substrat- und Metabolitkonzentrationen beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche Glykoproteine, die in unterschiedlichen Zellen produziert wurden, analysiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Produktheterogenität vom Produkt selber oder von der produzierenden Zelle abhängig sein kann. So zeigte ATIII, produziert in CHO-Zellen, kaum eine Veränderung während der *Batch*-Kultivierung, wohingegen beispielsweise die Glykosylierung des mAbs, ebenfalls in CHO-Zellen produziert, wesentliche Unterschiede im Kultivierungsverlauf zeigte. In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, wie unterschiedlich sich Produktglykosylierungen innerhalb eines Prozesses verändern können. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit solcher grundlegenden Versuche zum einen für das Verständnis der Glykosylierung im Kultivierungsprozess, und zum anderen für die Entwicklung von Produktionszellen und -prozessen. Durch die hier verhältnismäßig unkomplizierte Versuchsdurchführung der wachstumsspezifischen Probenahme konnten mögliche Engpässe und auftretende Probleme für die Produktglykosylierung innerhalb des *Batch*-Prozesses identifiziert werden. Durch das Wissen über die Ursachen der Produktheterogenität kann diese durch eine angepasste Prozessführung verringert werden.

Sowohl für die Zelllinien- als auch für die Prozessentwicklung können Ergebnisse aus einer wachstumsspezifischen Probenanalytik von großem Interesse sein, denn in der Optimierung des Mediums oder des *Feeds* kann berücksichtigt werden, welche Substrate wichtig für eine gewünschte Glykosylierung sind und welche Metabolite stören könnten. Die zusätzliche Messung der Ammoniumkonzentration sollte dabei berücksichtigt werden. Ein weiterer Vorteil in der Prozessoptimierung kann das Wissen über die Glykosidase-Aktivitäten im Überstand sein. Sind auch bei hohen Viabilitäten hohe Aktivitäten messbar, wäre ein optimierter Perfusionsprozess für ein möglichst hoch sialyliertes Produkt eventuell wirtschaftlicher als eine komplexe Aufarbeitung, die dieses Produkt aus einem heterogenen Pool, welcher durch längere Verweilzeit im Kulturüberstand entsteht, anreichert. Bei der Optimierung solcher Prozesse müssen die Ansprüche an das Produkt berücksichtigt werden. Soll ein mAb für die Krebstherapie eingesetzt werden, so ist die Sialylierung vernachlässigbar. In diesem Fall

spielt die Fucosylierung eine große Rolle, da nicht fucosylierte Glykane an einem mAb eine Erhöhung der ADCC zur Folge haben. Ist jedoch eine entzündungshemmende Wirkung das Ziel, ist die Sialylierung des mAbs von Relevanz. Die Kombination aus den variierenden Ansprüchen an die unterschiedlichen Pharmazeutika und der von Zellen und Produkt abhängigen Glykosylierung macht eine individuelle Prozessentwicklung für die Produktion von Biopharmazeutika unabdingbar.

In dieser Arbeit wurden nicht-gesteuerte *Batch*-Kultivierungen durchgeführt. Ein nächster Schritt, um die Ursachen der Unterschiede in der Produktglykosylierung weiter einzugrenzen, sind gesteuerte *Batch*- und *Fed-Batch*-Prozesse mit wachstumsspezifischer Probenahme. So kann der pH-Wert des Kulturüberstandes konstant gehalten werden und Glukose- und Glutaminlimitierungen sowie erhöhte Ammoniumkonzentrationen vermieden werden. Daraus ließen sich Schlüsse darüber ziehen, welche Parameter bei welchen Zellen, bzw. bei welchem Produkt, den größten Einfluss auf die Produktglykosylierung haben. Des Weiteren wäre die Prüfung von Glykosidase-Aktivitäten im Überstand bei dem pH-Wert der Kultivierung sinnvoll. Hier konnten für die diversen Zellen bei unterschiedlichen Viabilitäten Sialidase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Darum ist die Kenntnis darüber, ab welcher Viabilität einer Kultur Glykosidasen im Kulturüberstand die Produktqualität im Kultivierungsprozess beeinflussen können für den Produktionsprozess von enormer Bedeutung. Bei all diesen Stellschrauben für die Optimierung der Produktglykosylierung darf jedoch die Produktivität und das Zellwachstum nicht vernachlässigt werden. Mit dieser Arbeit wurden weitere Erkenntnisse über die Produktglykosylierung gewonnen, die helfen können die Glykosylierung gezielt zu beeinflussen. Es ist ein Schritt weiter in Richtung einer gezielt gesteuerten und konstanten Produktglykosylierung, denn wie Johann Sebastian Bach einst sagte: „Alles, was man tun muss, ist, die richtige Taste zum richtigen Zeitpunkt zu treffen.“ (Johann Sebastian Bach).

ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die schematische Darstellung der Zuckerstrukturen von N- und O-Glykanen. (A) Drei N-Glykantypen. (B) Repräsentative Darstellung der 8 Klassen der O-Glykane. (C) Symbolische Darstellung der Monosaccharide, die in O- und N-Glykanen vorkommen (Man: Mannose; Fuc: Fucose; Gal: Galaktose; GalNAc: N-Acetylgalaktosamin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; NANA: N-Acetylneuraminsäure; NGNA: N-Glykolyneuraminsäure) (Hossler, P., et al.; 2009).	13
Abbildung 2: Grundstruktur der Sialinsäuren, R1 - R9 zeigen die Bindungsstellen für unterschiedliche Substituenten (Varki, A.; 2009).	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Synthese des Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol-Vorläufers und der Übertragung des unreifen Glykans auf das Asparagin in der AS-Kette. Auf der cytosolischen Seite des ERs wird zunächst der Man ₅ GlcNAc ₂ -P-P-Dol Precursor synthetisiert und anschließend im ER Lumen der zur Übertragung fertige Glc ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ -P-P-Dol Precursor. Das 14-Zucker Glykan wird mittels Oligosaccharyltransferase (OST) auf die entstehende AS-Kette übertragen (Mohammed Al-Rubeai; 2002).	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prozessierung und Reifung von N-Glykanen (Varki, A.; 2009).	20
Abbildung 5: Mögliche Modifikationen der Kernstruktur in Säugern, Pflanzen und Invertebraten (Varki, A.; 2009).	22
Abbildung 6: Schematische Abbildung von Le ^x , bzw. SLe ^x . Diese Strukturen können während des <i>Cappings</i> entstehen.	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Produktglykosylierung. Gezeigt sind mögliche kultivierungsbedingte Einflüsse: (1) Geringe Glc/Gln Konzentration; (2) Natriumbutyrat; (3) DOT (<i>Dissolved oxygen tension</i> , Sauerstoffpartialdruck); (4) pH-Wert; (5) Mangan; (6) hoher pCO ₂ (Auswirkung auf CMP-NGNA); (7) N-Acetylmannosamin (Auswirkung auf CMP-NANA); (8) Ammonium; (9) DMSO; (10) Glycerol; (11) niedrige Temperatur (30-32 °C); (12) geringe viable Zelldichte (VZD) (beeinflusst extrazelluläre Sialidase Aktivität); (13) Scherstress (Varki modifiziert nach Hossler (Varki, A.; 2009; Hossler, P., et al.; 2009)).	30
Abbildung 8: Struktur eines IgG1 (Trastuzumab). Gezeigt sind die über Disulfidbrücken verbundenen leichten und schweren Ketten sowie die Glykosylierungsstelle am Asparagin 300 und mögliche Glykanstrukturen (Beck, A., et al.; 2013).	37
Abbildung 9: Model des glykosylierten AAT (3nr4.pdb). Grün: Peptid, blau: Glykane, rot: aktives Zentrum für die Peptidbindung (McCarthy, C., et al.; 2014).	43
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorversuches zur Auswirkung der Zentrifugation auf die wachstumsspezifische Probenahme.	54
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vorversuches zur wachstumsspezifischen Probenahme.	55
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Kultivierung mit wachstumsspezifischer Probenahme .	57
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Analytik zur Produktqualität.	67
Abbildung 14: Viable Zelldichte und Viabilität während der Medienadaption der CHO-ATIII-Zellen in drei unterschiedlichen Medien: CDM 1, CDM 4 und TC HYB.	83
Abbildung 15: (A) Viable Zelldichte und Viabilität der CHO-ATIII-Zelllinie in CDM 4 über einen Zeitraum von 13 Tagen. (B) SDS-PAGE der Überstände der CHO-ATIII-Kultivierung von den Tagen vier bis acht. Protein-Größenstandard: <i>Page Ruler High Range</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i> , USA).	84
Abbildung 16: Viable Zelldichte und Viabilität während der Medienadaption der AGE1.hn und AGE1.hn-AAT-Zelllinie in CDM 4. Beide Zelllinien wurden zunächst in Kultivierungsröhrchen kultiviert. Nach zwei Passagen wurde die AGE1.hn-Zelllinie in Kolben mit Schikane bei 185 rpm kultiviert und AGE1.hn-AAT-Zelllinie in Kolben ohne Schikane bei 125 rpm.	85
Abbildung 17: (A) Vergleich der Kultivierungen von AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Zellen bei gleichen Kultivierungsbedingungen: 185 rpm Kolben ohne Schikanen. (B) SDS-PAGE der Überstände der AGE1.hn-AAT- und AGE1.hn-Kultivierungen von Tag sechs. Protein-Größenstandard: <i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i> (<i>Fermentas</i> , Litauen).	86

Anhang

Abbildung 18: Viable Zelldichten und Viabilitäten von Parentalzelllinien und Produktionszelllinien über fünf Tage Kultivierungsdauer im Vergleich. (A) CHO-K1 in CDM 4 parallel kultiviert zu CHO-ATIII; (B) CHO-K1 in CDM 2 parallel kultiviert mit CHO-K1-C4 als Produktionszelllinie.	87
Abbildung 19: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierungen von (A) CHO-K1 und CHO-ATIII in CDM 4 (B) CHO-K1 und CHO-K1-C4 in CDM 2.	87
Abbildung 20: Kultivierung des EPO-Pools und der CHO-K1-Parentalzelllinie zur Überprüfung des Einflusses der Zentrifugation und der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zehn Tage bei je zwei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	91
Abbildung 21: Glukose- und Laktatkonzentration in den Kultivierungen zur wachstumsspezifischen Probenahme mit einem EPO-produzierenden Zellpool und der Parentalzelllinie CHO-K1. Die Kultivierungen wurden als biologische Duplikate durchgeführt. Hier werden die Mittelwerte der jeweiligen Kultivierungen gezeigt.	92
Abbildung 22: Kultivierung der CAP®- und der CAP®-2B10-Zelllinie zur Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zehn Tage bei je drei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	93
Abbildung 23: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierung der C1-INH produzierenden CAP®-Zellen und der Parentalzelllinien.	94
Abbildung 24: Gemessene Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der Kultivierungen der CAP®-Zellen und CAP®-2B10-Zellen mit und ohne Medienwechsel. Die Standardabweichungen resultieren aus den biologischen Triplikaten. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 22: hellgrau: Parentalzelllinie für 1. MW, dunkelgrau: Parentalzelllinie für den 2. MW, blau: Produzent mit MW, grün: Produzent Kontrolle, türkis: Produzent ohne 2. MW.	95
Abbildung 25: Kultivierung der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zelllinie zur Überprüfung des Einflusses der wachstumsspezifischen Probenahme auf das Wachstum. Viable Zelldichte und Viabilität wurden über zwölf Tage bei je drei parallelen Kultivierungen in Dreifachmessungen bestimmt. Die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen werden hier gezeigt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	97
Abbildung 26: Glukose- und Laktatkonzentrationen während der Kultivierung der AAT produzierenden AGE1.hn-AAT-Zellen und der Parentalzelllinien. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	98
Abbildung 27: Gemessene Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der Kultivierungen der AGE1.hn-Zellen und AGE1.hn-AAT-Zellen mit und ohne Medienwechsel. Die Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten. Die schwarzen Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 26: hellgrau: Parentalzelllinie für 1. MW, dunkelgrau: Parentalzelllinie für den 2. MW, blau: Produzent mit MW, grün: Produzent Kontrolle, türkis: Produzent ohne 2. MW.	99
Abbildung 28: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CHO-K1 und CHO-C4-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es wurden die Mittelwerte der drei Messungen berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Triplikate an. Die Zeitpunkte der Medienwechsel sind durch Pfeile gekennzeichnet.	103
Abbildung 29: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CHO-K1- und der CHO-C4-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Medienwechsel.	103
Abbildung 30: Konzentrationen der gemessenen Aminosäuren im Kultivierungsverlauf der CHO-K1- und der CHO-C4-Zellen mit Medienwechsel an Tag drei und sechs (durch Pfeile gekennzeichnet). Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 29: hellgrau: CHO-K1 für 1. MW, dunkelgrau: CHO-K1 für den 2. MW, blau: CHO-C4 mit MW, grün: CHO-C4 Kontrolle.	104
Abbildung 31: (A) EPO-Konzentration im Kultivierungsverlauf. Die Zeitpunkte des Medienwechsels sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Absolute Proteinmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der absoluten Produktmengen der CHO-C4-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. ...	106

Abbildung 32: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der XL99 und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	108
Abbildung 33: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der XL99- und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus den Konzentrationen der biologischen Triplikate gebildet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.	108
Abbildung 34: Aminosäurekonzentrationen im Kultivierungsverlauf der XL99-Zellen und der mAb-produzierenden CHO-XL99-Zellen. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Standardabweichungen sind mit den Fehlerbalken gezeigt. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 33: hellgrau: XL99 für 1. MW, dunkelgrau: XL99 für den 2. MW, blau: CHO-XL99 mAb Produzent mit MW, grün: CHO-XL99 mAb Produzent Kontrolle.	109
Abbildung 35: (A) Produktkonzentrationen in den mAb-produzierenden CHO-XL99-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteinmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der mAb-produzierenden CHO-XL99-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.	111
Abbildung 36: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CAP®- und CAP®-1D9-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	112
Abbildung 37: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CAP®- und der CAP®-1D9-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden die Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.	113
Abbildung 38: Aminosäurekonzentrationen im Verlauf der CAP®- und CAP®-1D9-Kultivierungen. Es wurden die Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 37: hellgrau: CAP® für 1. MW, dunkelgrau: CAP® für den 2. MW, blau: CAP® 1D9 mit MW, grün: CAP® 1D9 Kontrolle.	113
Abbildung 39: (A) Produktkonzentration und (B) Produktmenge während des Kultivierungsprozesses. (A) Produktkonzentrationen in den CAP®-1D9-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteinmengen der zu analysierenden Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der CAP®-1D9-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.	114
Abbildung 40: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	116
Abbildung 41: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der AGE1.hn- und der AGE1.hn-AAT-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten gebildet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.	117
Abbildung 42: Aminosäurekonzentration der AGE1.hn- und AGE1.hn-AAT-Kulturen im Kultivierungsverlauf. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 41: hellgrau: AGE1.hn für 1. MW, dunkelgrau: AGE1.hn für den 2. MW, blau AGE1.hn-AAT mit MW, grün: AGE1.hn-AAT Kontrolle.	117
Abbildung 43: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach kolloidal Coomassie Färbung. (A) Aufgetragen wurden Kulturüberstände (KÜ) aus den Kultivierungen mit wachstumsspezifischer Probenahme der Produktionszelllinie AGE1.hn-AAT. An den Tagen vier und sechs fand ein Medienwechsel statt. (B) KÜ im Verlauf der Kontrollkultivierung. M: Protein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA) Rot markiert sind die Banden des produzierten AAT (auf Höhe zwischen 55 kDa und 70 kDa).	118
Abbildung 44: Viable Zelldichte (VZD) und Viabilität der CHO-K1- und CHO-DXB-ATIII-Zellen im Kultivierungsverlauf. Es sind die Werte der biologischen Triplikate gezeigt. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Medienwechsel an.	120
Abbildung 45: Glukose- und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CHO-K1- und der CHO-ATIII-Zellen im Verlauf der Kultivierung. Es wurden die Mittelwerte aus biologischen Triplikaten berechnet und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Für die Kontrollkulturen werden hier die Werte (x) der beiden Duplikate, sowie der Mittelwert gezeigt.	121

Anhang

- Abbildung 46: Aminosäurekonzentrationen der CHO-K1- und CHO-ATIII-Kulturen im Kultivierungsverlauf. Es wurden Mittelwerte aus biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 45: hellgrau: CHO-K1 für 1. MW, dunkelgrau: CHO-K1 für den 2. MW, blau CHO-ATIII mit MW, grün: CHO-ATIII Kontrolle. 122
- Abbildung 47: (A) Produktkonzentrationen während der Kultivierung der CHO-ATIII-Kulturen mit und ohne Medienwechsel. (B) Absolute Proteinmengen der analysierten Produkte aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Zusätzlich wurde die Summe der Produktmengen der CHO-ATIII-Kulturen mit Medienwechsel berechnet. Es wurden Mittelwerte aus den biologischen Triplikaten berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Für die Kontrollkulturen wird die Differenz der beiden Duplikate als Fehlerbalken gezeigt. 123
- Abbildung 48: (A) Daten der Analytik zur Sialidase-Aktivität im Kulturüberstand der Hauptkultivierungen mit und ohne Medienwechsel. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der technischen Replikate an. (B) Die Stoffmenge an am Produkt gebundenem NANA im Kulturüberstand, berechnet aus den Produktkonzentrationen, dem Sialylierungsgrad des jeweiligen Proteins (Sialinsäure-Analytik) und dem Kulturvolumen. 125
- Abbildung 49: Elektropherogramm von EPO, welches aus Überstand nach dem ersten Medienwechsel aufgearbeitet wurde. Es sind neun *Peaks* zu erkennen. Für die Berechnungen wurden die *Peaks* der Isoformen 1-7 verwendet, da nicht in allen Proben die Isoformen 8 und 9 identifiziert werden konnten. Bei ca. 55 min ist der Injektions*peak* zu erkennen. 129
- Abbildung 50: Relative Intensitäten der detektierten Isoformen. Verglichen wird EPO, welches an den ersten drei Kultivierungstagen produziert wurde, mit EPO, das zwischen Tag vier und Tag sechs produziert wurde, und mit EPO, das über den gesamten Kultivierungszeitraum produziert wurde. Schwarze Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der biologischen Triplikate an. Graue Fehlerbalken zeigen die Differenz zwischen biologischen Duplikaten an. 130
- Abbildung 51: Chromatogramme des Sialinsäure Standards mit 10 μ M NANA und NGNA (blau) und von einer hydrolysierten mAb Probe (schwarz), jeweils mit KDN als internem Standard. 133
- Abbildung 52: Intaktmassen-Analytik des mAbs mittels LC-ESI-ToF. (A) Chromatogramm des aufgereinigten mAb. (B) MS-Spektrum aufgenommen von 12-15 min der chromatographischen Trennung. (C) Dekonvuliertes Spektrum (12-15 min) im m/z-Bereich von 147800-14970. 134
- Abbildung 53: Ergebnisse der Intaktmassen-Analytik des mAb. Gezeigt sind die relativen Mengen mAb mit den Glykosylierungen FA2/FA2 und FA2G1/FA2G1 oder der Isoform FA2G2/FA2 aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den biologischen Triplikaten an. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der biologischen Duplikate. 135
- Abbildung 54: Ergebnisse der Intaktmassen-Analytik des mAb aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den biologischen Triplikaten an. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der biologischen Duplikate. Aus der Kultivierung ohne Medienwechsel konnte nur ein biologisches Replikat untersucht werden. In (A) ist der Anteil an besetzten Glykosylierungsstellen für alle Wachstumsphasen gezeigt. In (B) sind die Ergebnisse der Bewertung der Qualitätsattribute der identifizierten Glykosylierten Proteine gezeigt. 136
- Abbildung 55: Chromatogramm von 2-AB gelabelten Glykanen eines mAb aus dem ersten Medienwechsel. Es sind die mittels GU und MS-Daten identifizierten Glykane gezeigt. 137
- Abbildung 56: Ergebnisse der HILIC-FLD. Der Analytik der mAb aus dem ersten und zweiten Medienwechsel, sowie aus der Ernte ohne Medienwechsel lagen Proben aus drei biologischen Triplikaten zu Grunde, hier wird die Standardabweichung mit den Fehlerbalken (schwarz) angezeigt. Für die Analytik der mAb aus der Ernte mit Medienwechsel lagen zwei Proben zugrunde. Die Fehlerbalken (grau) zeigen jeweils die Differenz der Ergebnisse der beiden Proben an. Es wurden keine sialylierten Strukturen oder Strukturen mit antennären Fucosen identifiziert. 138
- Abbildung 57: Massenspektrum der Glykane eines mAbs aus dem ersten Medienwechsel. Neben dem m/z ist jeweils die identifizierte Glykanstruktur gezeigt. 139
- Abbildung 58: Ergebnisse der MALDI-ToF Messungen der permethylierten Glykane. Der Analytik der mAb aus dem ersten und zweiten Medienwechsel sowie aus der Ernte ohne Medienwechsel lagen Proben aus drei biologischen Triplikaten zu Grunde, hier wird die Standardabweichung mit den Fehlerbalken (schwarz) angezeigt. Für die Analytik der mAb aus der Ernte mit Medienwechsel lagen zwei Proben zugrunde. Die Fehlerbalken (grau) zeigen jeweils die Differenz der Ergebnisse der beiden Proben an. Es wurden weder sialylierte Glykane noch Glykane mit antennären Fucosen identifiziert. 140

Abbildung 59: Vergleichende Darstellung der drei Analysen zur N-Glykosylierung des mAb nach wachstumsspezifischer Probenahme (IM = Intaktmassen-Analytik; 2-AB = HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI = MALDI-ToF Analytik permethylierter Glykane).	141
Abbildung 60: Vergleich der Glykosylierungen der Summe des mAbs aus den wachstumsspezifischen Probenahmen und dem mAb aus der Kontrollkultivierung. (A) Analytik der 2-AB gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD. (B) Massenspektrometrische Analytik der permethylierten Glykane des mAbs.	146
Abbildung 61: Chromatogramme des Sialinsäure Standards mit 100 µM NANA und NGNA (blau) und von einer hydrolysierten C1-INH Probe (schwarz), jeweils mit dem internen Standard Kdn.	148
Abbildung 62: NANA bezogen auf (A) ein mol Protein, bzw. (B) auf alle Glykosylierungsstellen eines Mols C1-INH. Für den zweiten Medienwechsel konnte die Standardabweichung berechnet werden, da es drei biologische Replikate gab (schwarze Fehlerbalken). Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate.	149
Abbildung 63: Chromatogramme der 2-AB gelabelten Glykane des C1-INHs der unterschiedlichen Wachstumsphasen.	150
Abbildung 64: MS-Spektrum permethylierter Glykane des C1-INHs am fünften Tag der Kultivierung. Einige der identifizierten Glykanstrukturen sind gezeigt. Rot umrandet: Sialyl-Lewis ^x	151
Abbildung 65: MALDI-ToF Ergebnisse der permethylierten Glykane des C1-INHs. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenz der Doppelbestimmung an, da nur zwei biologische Replikate zur Verfügung standen. Die schwarzen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der biologischen Triplikate.	152
Abbildung 66: Vergleich der Produkte aus der Kultivierung mit und ohne Medienwechsel. Es wurde für die Kultivierung mit Medienwechsel der Durchschnitt der einzelnen Kenngrößen berechnet (Formel (3)). Mittels gauss'scher Fehlerverfolgung (Formel (4)) wurde der Fehler berechnet. .	155
Abbildung 67: Sialinsäure Bestimmung für AAT. Die bestimmte Sialinsäurekonzentration (NANA, bzw. NGNA) bezogen auf das Protein (A), bzw. auf eine Glykosylierungsstelle (B). Für den Zeitpunkt des 1. MW konnte nur eine Probe analysiert werden. Für den 2. MW und die Ernte mit MW wurden zwei biologische Replikate analysiert. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate an. Für die Ernte ohne Medienwechsel wurden drei biologische Replikate analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.	157
Abbildung 68: Ergebnisse der HILIC-FLD. Der Analytik des AATs aus dem 1. MW sowie aus der Ernte mit Medienwechsel lagen Proben aus zwei biologischen Replikaten zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Doppelbestimmung). Für die Analytik des AATs aus dem 2. MW und der Ernte ohne Medienwechsel lagen biologische Triplikate zugrunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung).	158
Abbildung 69: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analytik der permethylierten Glykane des AATs bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des AATs aus dem ersten Medienwechsel lagen Proben aus zwei biologischen Replikaten zugrunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Doppelbestimmung). Für die Analytik des AATs der restlichen Zeitpunkte und der Ernte ohne Medienwechsel lagen biologische Triplikate zugrunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung).	160
Abbildung 70: Sialinsäure Bestimmung für ATIII. Die bestimmten Sialinsäurekonzentrationen (NANA, bzw. NGNA) bezogen auf das Protein (A), bzw. auf eine Glykosylierungsstelle (B). Für den Zeitpunkt des 1. MW, die Ernte mit MW und die Ernte ohne Medienwechsel wurden zwei biologische Replikate analysiert. Die grauen Fehlerbalken zeigen Differenz der Replikate. Für den 2. MW wurden drei biologische Replikate analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.	166
Abbildung 71: Ergebnisse der HILIC-FLD bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des ATIIIs aus der Kultivierung mit Medienwechsel lagen zu den drei Probenahme-Zeitpunkten je Proben aus biologischen Triplikaten zu Grunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung). Für die Analytik des ATIIIs der Kultivierung ohne Medienwechsel lagen zwei biologische Replikate zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Duplikate).	167
Abbildung 72: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analytik der permethylierten Glykane des ATIIIs bezogen auf alle mittels dieser Methode identifizierten Glykane. Der Analytik des ATIIIs aus der Kultivierung mit Medienwechsel lagen zu den drei Probenahme-Zeitpunkten je Proben aus biologischen Triplikaten zu Grunde (schwarze Fehlerbalken: Standardabweichung). Für die Analytik des ATIIIs der Kultivierung ohne Medienwechsel lagen zwei biologische Replikate zu Grunde (graue Fehlerbalken: Differenz der Duplikate).	168

Anhang

Abbildung 73: Relative Intensitäten der detektierten <i>Peaks</i> . Verglichen wird EPO vor und nach der Inkubation in Kulturüberstand bei 37 °C. Die Fehlerbalken zeigen die Differenz zwischen Duplikaten.	175
Abbildung 74: Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Glykane des C1-INHs vor und nach der Inkubation in Kulturmedium bei 37 °C. Die Fehlerbalken zeigen die Differenzen der Duplikate an.	176
Abbildung 75: IEX-HPLC-Chromatogramm des ATIIIIs vor Inkubation. Die Glykane wurden aufgrund ihrer Ladungen aufgetrennt.	177
Abbildung 76: Ergebnisse der IEX-HPLC-FLD der 2-AB gelabelten Glykane des ATIIIIs. Gezeigt sind die relativen Quantitäten der detektierten <i>Peaks</i> die jeweils 0-4 negativen Ladungen am Molekül entsprechen.	178

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Auswirkungen unterschiedlicher Supplemente auf die Produktglykosylierung; ↑ steigende Konzentration/ steigender Anteil; ↓ Limitierung /sinkender Anteil; + Zugabe in Medium	31
Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit den zugehörigen Medien und Supplementen. CDM 1-4 wurden von der Firma Xell, Deutschland zur Verfügung gestellt; das DMEM/F12 von Life Technologies, Deutschland. Glutamin (Gln) und IGF wurden von Applichem (Deutschland) bezogen, FCS von Sigma Aldrich (USA) und das Blastocidin Genitacin (G418) von InvivoGen (USA).	49
Tabelle 3: Startzellichten aller in dieser Arbeit kultivierten Zelllinien	50
Tabelle 4: Programm zur Regeneration der Jacalin Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 cm h ⁻¹	63
Tabelle 5: Prozessführung der AEX als <i>Polishing</i> Schritt der Aufreinigung des C1-INHs.	64
Tabelle 6: Programm zur Reinigung und Regeneration der HiScreen™ Capto™ Q-Säule.	64
Tabelle 7: Zusammensetzung aller Lösungen für die SDS-PAGE	70
Tabelle 8: Auflistung der Produkte mit ihrem theoretischen Molekulargewicht und der zugehörigen UniProt ID.	71
Tabelle 9: Gradient der HILIC zur Separation 2-AB-gelabelter Glykane	78
Tabelle 10: Gradient der IEX-HPLC zur Separation 2AB-gelabelter Glykane	79
Tabelle 11: Zusammenfassung der für die wachstumsspezifische Produktanalytik kultivierten Zelllinien und die zugehörigen Produkte.	101
Tabelle 12: EPO-Mengen vor und nach Aufarbeitung der unterschiedlichen Überstände	106
Tabelle 13: C1-INH-Menge in den aufgearbeiteten Überständen, sowie in den zugehörigen Eluaten.	115
Tabelle 14: Produktmengen in den aufgearbeiteten Überständen und in den zugehörigen Eluaten.	119
Tabelle 15: Produktmengen in den aufgearbeiteten Überständen und in den zugehörigen Eluaten.	123
Tabelle 16: Zusammenfassung der detektierten Unterschiede zwischen den Kultivierungen mit und ohne Medienwechsel.	128
Tabelle 17: Zusammenfassung der Viabilität und der Sialidase Aktivität zu den unterschiedlichen Probenahme-Zeitpunkten.	128
Tabelle 18: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die die Glykosylierung des EPOs beeinflussen können.	129
Tabelle 19: Erlaubter Bereich der prozentualen <i>Peak</i> fläche der acht Isoformen des EPOs etabliert durch die EuPh (European Pharmacopoeia; 2002) und die Einordnung des hier produzierten EPOs.	131
Tabelle 20: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die die Glykosylierung des mAbs beeinflussen können.	132
Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (IM = Intaktmassen-Analytik des intakten Proteins; 2-AB = HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI = MALDI-ToF Analyse permethylierter Glykane)	141
Tabelle 22: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Produktglykosylierung auswirken können.	148

Tabelle 23: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Glykosylierung des AAT auswirken können.	156
Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (2-AB= HILIC-FLD 2-AB gelabelter Glykane; MALDI= MALDI-ToF Messung permethylierter Glykane).....	162
Tabelle 25: Zusammenfassung einiger Kultivierungsparameter, die sich auf die Produktglykosylierung auswirken können.	165
Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktanalytik aus drei unterschiedlichen Analysen (Sia-A= Sialinsäure-Analytik; 2-AB= HILIC-FLD 2-Ab gelabelter Glykane; MALDI= MALDI-ToF Messung permethylierter Glykane)	170
Tabelle 27: Bewertung der EPO Proben nach der prozentualen <i>Peakflächenverteilung</i> (EuPh).....	175

3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
x	-fach
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
2-AB	2-Aminobenzamid
AAT	α-1-Antitrypsin
AATD	<i>α-1-Antitrypsin deficiency</i>
Acn	Acetonitril
AEX	Anionenaustauschchromatographie
ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i> (Antikörper Konjugat)
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
ATIII	Antithrombin III
BCA	Bicichinonsäure Assay
β-IFN	β-Interferon
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C1-INH	C1 Inhibitor
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	<i>Cevec's Amniocyte Production</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> (komplementabhängigen Zytotoxizität)
CDM	Chemisch definiertes Medium, hier insbesondere: Zellspezifisches, chemisch definiertes, von Tierkomponenten freies Medium
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CEDEX	<i>cell density examination system</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMF-PBS	<i>Calcium and Magnesium Free Phosphate Buffered Saline</i>
ConA	Concanvalin A
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i>
Da	Dalton
dH ₂ O	Milli®-Q-Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase

Anhang

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOT	<i>Dissolved oxygen tension</i> ; Sauerstoffpartialdruck
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	Erythropoetin
EuPh	europäischen Pharmakopöe
FA	Ameisensäure
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FLD	Fluoreszenz Detektion
Fuc	Fucose
g	Gramm
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gln	Glutamin
GU	<i>Glucose unit</i> (Glucose Einheit)
h	Stunde
HAE	Hereditäres Angioödem
Hex	Hexose
HILIC	<i>hydrophobe interaction liquid Chromatography</i>
HPAEC	<i>High performance anion exchange chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IGF	<i>insulin like growth factor</i> []
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
KDN	<i>2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid</i>
L	Liter
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
Le^x	Lewis ^x
M	Molar (mol /L)
m	Milli
m	Meter
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
Man	Mannose
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MnCl₂	Mangan(II)-chlorid
MUF-NANA	2´-(4-Methylumbelliferyl)-α-D-N-Acetylneuraminsäure
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> (Molekulargewichts Ausschlussgrenze)
n	Nano
N	Konzentrationsangabe, ein Grammäquivalent, die ein Mol an Protonen oder Elektronen abgeben, bzw. aufnehmen kann in einem Liter Lösung
NaBH₄	Natriumborhydrid
GnT-III	N Acetylglucosamintransferase III
NaCl	Natriumchlorid
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid

Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NGNA	N-Glycolylneuraminsäure
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
Pa	Pascal (Druckeinheit)
PAD	<i>Pulsed amperometric detection</i>
PNGase F	<i>Peptid-N-Glycosidase F</i>
ppm	<i>Parts per million</i> (Teile pro Million)
PTM	Posttranslationale Modifikationen
RP	<i>Reversed Phase</i>
RP	Reflektor positive (im Zusammenhang mit MALDI-ToF Analytik)
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatographie</i> (Umkehrphasen flüssigkeitschromatographie)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfoxid-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sLe^x	Sialyl Lewis ^x
SV	Säulenvolumen
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
hTPO	Humanes Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> (Einheiten); Enzymeinheit: $60 \times 10^6 \text{ U} = 1 \text{ mol s}^{-1}$
VCD	<i>Viable cell density</i> (viable Zelldichte)
WCB	<i>Working Cell Bank</i>

Verwendete Glykan-Nomenklatur:

Abkürzung	Bedeutung
F	Fucose
A	Antenne
G	Galaktose
S	Sialinsäure, hier NANA
Zahl	Anzahl an Zuckern/Antennen, die vor der Zahl genannt werden

4. Tabellen

Um die Bedeutung der N-Glykosylierung zu verdeutlichen, werden hier Krankheiten aufgelistet, die auf Gendefekte in der Glykosylierung zurückzuführen sind.

Tabelle-A 1: Krankheiten, die auf genetische Defekte in der N-Glykansynthese zurückzuführen sind (Freeze, H. H.; 2006).

Krankheit	Gen	Enzym	Hauptsymptom
CDG-Ia	<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase II	Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Esotropie, Lipodystrophie, Cerebellar Hypoplasie, Apoplexie ähnliche Vorfälle, Krämpfe
CDG-Ib	<i>MPI</i>	Phosphomannose-isomerase	Hepatische Fibrose, Protein-verlierende Enteropathie, Koagulopathie, Hypoglycaemie
CDG-Ic	<i>ALG6</i>	Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Glucosyltransferase	Moderate Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Esotropie, Epilepsie
CDG-Id	<i>ALG3</i>	Man ₅ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Mannosyltransferase	Schwere psychomotorische Entwicklungsstörung, Optikusatrophie, erworbene Mikrozephalie, Iris Coloboma, Hypsarrhythmie
CDG-Ie	<i>DPM1</i>	Dol-P-Man-synthase I GDP-Man: Dol-P-Mannosyltransferase	Ernste Entwicklungsverzögerungen, Epilepsie, Hypotonie, milder Dysmorphismus, Koagulopathie
CDG-If	<i>MPDU1</i>	<i>Man-P-Dol utilization 1/Lec35</i>	Kleinwuchs, Ichthyose, psychomotorische Entwicklungsstörung, Retinitis pigmentosa
CDG-Ig	<i>ALG12</i>	Dol-P-Man:Man ₇ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Mannosyltransferase	Hypotonie, fazialer Dysmorphismus, psychomotorische Entwicklungsstörung, erworbene Mikrozephalie, häufige Infektionen
CDG-Ih	<i>ALG8</i>	Glucosyltransferase II Dol-P-Glc: Glc ₁ -Man ₉ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Glucosyltransferase	Hepatomegalie, Protein-verlierende Enteropathie, Hypoalbuminaemie, Oedeme, Ascites
CDG-Ii	<i>ALG2</i>	Mannosyltransferase II GDP-Man: Man ₁ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Mannosyltransferase	Gesund bei der Geburt; Entwicklungsverzögerung, Hypomyelination, hartnäckige Krämpfe, Iris Coloboma, Hepatomegalie, Koagulopathie
CDG-Ij	<i>DPAGT1</i>	UDP-GlcNAc: Dol-P-GlcNAc-P Transferase	Ernste Entwicklungsverzögerungen, Hypotonie, Krämpfe, Mikrozephalie, Exotropie
CDG-Ik	<i>ALG1</i>	Mannosyltransferase I GDP-Man: GlcNAc ₂ -P-P-Dol Mannosyltransferase	Ernste psychomotorische Entwicklungsverzögerungen, Hypotonie, erworbene Mikrozephalie, hartnäckige Krämpfe, Fieber, Koagulopathie, Nephrotisches Syndrom, früher Tod
CDG-II	<i>ALG9</i>	Man ₆ - and Man ₈ -GlcNAc ₂ -P-P-Dol Mannosyltransferase	Ernste Mikrozephalie, Hypotonie, Krämpfe Hepatomegalie

Krankheit	Gen	Enzym	Hauptsymptom
CDG-IIa	<i>MGA</i> <i>T2</i>	GlcNAc Transferase 2	Entwicklungsverzögerung, Dysmorphismus, Stereotypie, Krämpfe
CDG-IIb	<i>GLS1</i>	Glucosidase I	Dysmorphismus, Hypotonie, Krämpfe Hepatomegalie, hepatische Fibrose; Tod mit 2,5 Monaten
CDG-IIc	<i>SLC3</i> <i>5C1/F</i> <i>UCT1</i>	GDP-Fucose Transporter	Rezidive Infektionen, Neutrophilie, Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie, Hypotonie
CDG-IIId	<i>B4GA</i> <i>LT1</i>	β 1,4 Galactosyltransferase	Hypotonie (myopathisch), spontane Haemorrhagie, Dandy-Walker Fehlbildung
CDG-IIe	<i>COG7</i>	<i>Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7</i>	Tödlich im Säuglingsalter; Dysmorphismus, Hypotonie, hartnäckige Krämpfe, Hepatomegalie, progressive Gelbsucht, rezidive Infektionen, Herzfehler
CDG-IIIf	<i>SLC3</i> <i>5A1</i>	CMP-Sialinsäure Transporter	Thrombocytopaenie, keine neurologischen Symptome
CDG-II/COG1	<i>COG1</i>	<i>Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1</i>	Hypotonie, Wachstumshemmung, progressive Mikrozephalie, Hepatosplenomegalie, milde Entwicklungsstörung

Der mAb wurde mittels Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigt. In Tabelle-A 2 sind die Produktmengen in Kulturüberstand sowie im Eluat aufgelistet, ebenso wie die berechneten Ausbeuten.

Tabelle-A 2: Produktmenge in aufgearbeiteten Überständen und den zugehörigen Eluaten der Aufreinigung, sowie die Produktausbeute der Aufreinigung des mAbs.

Überstand	Produktmenge [mg]		Ausbeute [%]
	im Überstand	im Eluat	
Kultur 1, Tag 0-3	3,4	1,6	47
Kultur 2, Tag 0-3	3,5	1,7	48
Kultur 3, Tag 0-3	3,4	1,4	41
Kultur 1, Tag 4-6	11,9	11,8	99
Kultur 2, Tag 4-6	11,8	7,9	67
Kultur 3, Tag 4-6	12,0	6,1	51
Kultur 1, Tag 7-9	4,7	0,8	17
Kultur 2, Tag 7-9	4,6	2,6	57
Kultur 3, Tag 7-9	4,6	-	0
Kontrollkultur 1	33,4	14,9	45
Kontrollkultur 2	33,0	10,6	32
Kontrollkultur 3	32,8	17,0	52
	mittlere Ausbeute		51

Anhang

Für die Auswertung der MS-Spektren wurde eine Liste erstellt, die das Glykan mit zugehöriger berechneter m/z zeigt. Dem Glykan wurden Kenngrößen für die Qualitätsattribute (Antennarität, Galaktosylierungsgrad, core-Fucosylierung, antennärer Fucosylierung, Sialylierungsgrad, Anteil an *High* mAnnose Strukturen, Anteil an Hybrid Strukturen und Anteil an Vorläufern) zugewiesen. Diese sind ebenfalls in Tabelle-A 3 aufgelistet.

Tabelle-A 3: Glykanstrukturen mit ihrem m/z Verhältnis nach Permethylierung. Es sind die Werte die jeweiligen Werte der entsprechenden Qualitätsattribute angegeben.

Struktur	m/z (PerMe; Red; Na ⁺)	Antennarität	Galaktosylierungsgrad	Core-Fucosylierungsgrad	Antennärer Fucosylierungsgrad	Sialylierungsgrad	Anteil <i>High</i> Mannose	Anteil Hybrid	Anteil Vorstufen
FGlcNac2Man2	1157,60	0	0	1	0	0	0	0	1
GlcNac2Man3	1187,61	0	0	0	0	0	0	0	1
FGlcNac2Man3	1361,70	0	0	1	0	0	0	0	1
Man4	1391,71	0	0	0	0	0	1	0	0
A1	1432,74	0	0	0	0	0	0	0	1
Man4F	1565,80	0	0	1	0	0	1	0	0
Man5	1595,81	0	0	0	0	0	1	0	0
FA1	1606,83	0	0	1	0	0	0	0	1
A2	1677,87	2	0	0	0	0	0	0	0
Man5F	1769,90	0	0	1	0	0	1	0	0
Man6	1799,91	0	0	0	0	0	1	0	0
FA2	1851,96	2	0	1	0	0	0	0	0
A2G1	1881,97	2	1	0	0	0	0	0	0
A3	1922,93	3	0	0	0	0	0	0	0
Man6F	1974,00	0	0	1	0	0	1	0	0
Man7	2004,01	0	0	0	0	0	1	0	0
FA2G1	2056,06	2	1	1	0	0	0	0	0
A2G2	2086,07	2	2	0	0	0	0	0	0
FA3	2097,02	3	0	1	0	0	0	0	0
A2G1+GlcNac1	2127,09	3	1	0	0	0	0	0	0
Man7F	2178,10	0	0	1	0	0	1	0	0
FA2F2	2200,13	2	0	1	2	0	0	0	0
Man8	2208,11	0	0	0	0	0	1	0	0
FA2G1F1	2230,15	2	1	1	1	0	0	0	0
A2G1S1	2243,14	2	1	0	0	1	0	0	0
Man7GlcNac1	2249,14	2	0	0	0	0	0	1	0
FA2G2	2260,16	2	2	1	0	0	0	0	0
FA2BF	2271,11	3	0	1	1	0	0	0	0
FA3G1	2301,18	3	1	1	0	0	0	0	0

Struktur	m/z (PerMe; Red; Na ⁺)	Antennärität	Galaktosylierungsgrad	Core-Fucosylierungsgrad	Antennärer Fucosylierungsgrad	Sialylierungsgrad	Anteil <i>High</i> Mannose	Anteil Hybrid	Anteil Vorstufen
A2G2+GlcNAc1	2331,19	3	2	0	0	0	0	0	0
A4G1	2372,22	4	1	0	0	0	0	0	0
Man8F	2382,20	0	0	1	0	0	1	0	0
FA2G1F2	2404,23	2	1	1	2	0	0	0	0
Man9	2412,21	0	0	0	0	0	1	0	0
FA2G1S1	2417,23	2	1	1	0	1	0	0	0
Man7GlcNAc1F	2423,23	0	0	1	0	0	0	1	0
FA2G2F1	2434,24	2	2	1	1	0	0	0	0
FA2B1F2	2445,20	3	0	1	2	0	0	0	0
A2G2S1	2447,24	2	2	0	0	1	0	0	0
Man7GlcNAc1G1	2453,24	2	1	0	0	0	0	1	0
FA3G2F1	2475,27	3	1	1	1	0	0	0	0
FA2G1BF	2475,27	3	1	1	1	0	0	0	0
FA3G2	2505,28	3	2	1	0	0	0	0	0
A3G3	2535,29	3	3	0	0	0	0	0	0
FA4G1	2546,31	4	1	1	0	0	0	0	0
A4G2	2576,32	4	2	0	0	0	0	0	0
Man9F	2586,30	0	0	1	0	0	1	0	0
FA2G2F2	2608,33	2	2	1	2	0	0	0	0
FA2G2S1	2621,33	2	2	1	0	1	0	0	0
Man7GlcNAcG1F	2627,33	0	1	1	0	0	0	1	0
FA2G1BF2	2649,36	3	1	1	2	0	0	0	0
FA3G2F2	2679,37	3	2	1	1	0	0	0	0
A3G2S1	2692,37	3	2	0	0	1	0	0	0
FA3G3	2709,38	3	3	1	0	0	0	0	0
FA4G1F1	2720,40	4	1	1	1	0	0	0	0
FA4G2	2750,41	4	2	1	0	0	0	0	0
A4G3	2780,42	4	3	0	0	0	0	0	0
FA2G2F1S1	2795,42	2	2	1	1	1	0	0	0
Man7GlcNacG1F2	2801,42	0	1	1	1	0	0	1	0
A2G2S2	2808,41	2	2	0	0	2	0	0	0
Man7GlcNAcG1S1	2814,13	2	1	0	0	1	0	1	0
FA3G2F2	2853,46	3	2	1	2	0	0	0	0
FA3G2S1	2866,46	3	2	1	0	1	0	0	0
FA3G3F1	2883,47	3	3	1	1	0	0	0	0
A3G3S	2896,47	3	3	0	0	1	0	0	0
FA4G2F1	2924,50	4	2	1	1	0	0	0	0
FA4G3	2954,51	4	3	1	0	0	0	0	0

Anhang

Struktur	m/z (PerMe; Red; Na ⁺)	Antennärität	Galaktosylierungsgrad	Core-Fucosylierungsgrad	Antennärer Fucosylierungsgrad	Sialylierungsgrad	Anteil <i>High</i> Mannose	Anteil Hybrid	Anteil Vorstufen
FA2G2F2S1	2969,51	2	2	1	2	1	0	0	0
FA2G2S2	2982,50	2	2	1	0	2	0	0	0
A4G4	2984,52	4	4	0	0	0	0	0	0
Man7GlcNacG1S1F	2988,22	0	1	1	0	1	0	1	0
FA2G2BF1S1	3040,54	3	2	1	1	1	0	0	0
A3G2S2	3053,54	3	2	0	0	2	0	0	0
FA3G3F2	3057,56	3	3	1	2	0	0	0	0
FA3G3S1	3070,56	3	3	1	0	1	0	0	0
FA4G2F2	3098,59	4	2	1	2	0	0	0	0
FA4G3F	3128,60	4	3	1	1	0	0	0	0
A3G3S1	3141,59	4	3	0	0	1	0	0	0
FA2G2F1S2	3156,59	2	2	1	1	2	0	0	0
FA4G4	3158,61	4	4	1	0	0	0	0	0
Man7GlcNacG1SF2	3162,31	0	1	1	1	1	0	1	0
FA2G2BF2S1	3214,63	3	2	1	2	1	0	0	0
FA3G2S2	3227,63	3	2	1	0	2	0	0	0
A4G4B	3229,65	4	4	0	0	0	0	0	0
FA3G3F3	3231,65	3	3	1	3	0	0	0	0
FA3G3F1S1	3244,64	3	3	1	1	1	0	0	0
A3G3S2	3257,64	3	3	0	0	2	0	0	0
FA4G3F2	3302,69	4	3	1	2	0	0	0	0
FA4G3S1	3315,68	4	3	1	0	1	0	0	0
FA2G2F2S2	3330,68	2	2	1	2	2	0	0	0
FA2G4F	3332,70	4	4	1	1	0	0	0	0
A4G4S1	3345,69	4	4	0	0	1	0	0	0
FA2G2BF1S2	3401,72	3	2	1	1	2	0	0	0
FA4G4B	3403,73	4	4	1	0	0	0	0	0
FA3G3F2S1	3418,73	3	3	1	2	1	0	0	0
FA3G3S2	3431,73	3	3	1	0	2	0	0	0
FA4G3F3	3476,78	4	3	1	3	0	0	0	0
FA3G3BF1S1	3489,77	4	3	1	1	1	0	0	0
A3G3S2	3502,77	4	3	0	0	2	0	0	0
FA4G4F2	3506,79	4	4	1	2	0	0	0	0
FA4G4S1	3519,78	4	4	1	0	1	0	0	0
FA2G2BF2S2	3575,81	3	2	1	2	2	0	0	0
FA4G3F1	3577,82	4	4	1	1	0	0	0	0
A4G4BS1	3590,82	4	4	0	0	1	0	0	0
FA3G3F3S1	3592,82	3	3	1	3	1	0	0	0
FA3G3F1S2	3605,82	3	3	1	1	2	0	0	0

Struktur	m/z (PerMe; Red; Na ⁺)	Antennarität	Galaktosylierungsgrad	Core-Fucosylierungsgrad	Antennärer Fucosylierungsgrad	Sialylierungsgrad	Anteil <i>High</i> Mannose	Anteil Hybrid	Anteil Vorstufen
A3G3S3	3618,81	3	3	0	0	3	0	0	0
FA3G3BF2S1	3663,86	4	3	1	2	1	0	0	0
FA4G3S2	3676,86	4	3	1	0	2	0	0	0
FA4G3F3	3680,88	4	4	1	3	0	0	0	0
FA2G4FS1	3693,87	4	4	1	1	1	0	0	0
A4G4S2	3706,87	4	4	0	0	2	0	0	0
FA4G4BF2	3751,91	4	4	1	2	0	0	0	0
FA4G4BS1	3764,91	4	4	1	0	1	0	0	0
FA3G3F2S2	3779,91	3	3	1	2	2	0	0	0
FA3G3S3	3792,90	3	3	1	0	3	0	0	0
FA4G3BF3S1	3837,95	4	3	1	3	1	0	0	0
FA3G3BF1S2	3850,94	4	3	1	1	2	0	0	0
FA4G4F4	3854,96	4	4	1	4	0	0	0	0
A3G3S3	3863,94	4	3	0	0	3	0	0	0
FA4G4F2S1	3867,96	4	4	1	2	1	0	0	0
FA4G4S2	3880,96	4	4	1	0	2	0	0	0
FA4G4BF3	3926,00	4	4	1	3	0	0	0	0
FA4G3F1S1	3939,00	4	4	1	1	1	0	0	0
A4G4BS2	3951,99	4	4	0	0	2	0	0	0
FA3G3F3S2	3954,00	3	3	1	3	2	0	0	0
FA3G3F1S3	3966,99	3	3	1	1	3	0	0	0
FA3G3BF2S2	4025,03	4	3	1	2	2	0	0	0
FA4G3S3	4038,03	4	3	1	0	3	0	0	0
FA4G4F3S1	4042,05	4	4	1	3	1	0	0	0
FA2G4FS2	4055,04	4	4	1	1	2	0	0	0
A4G4S3	4068,04	4	4	0	0	3	0	0	0
FA4G4BF4	4100,09	4	4	1	4	0	0	0	0
FA4G4BF2S1	4113,09	4	4	1	2	1	0	0	0
FA4G4BS2	4126,08	4	4	1	0	2	0	0	0
FA3G3F2S3	4141,08	3	3	1	2	3	0	0	0
FA4G3BF3S2	4199,12	4	3	1	3	2	0	0	0
FA3G3BF1S3	4212,12	4	3	1	1	3	0	0	0
FA4G4F4S1	4216,14	4	4	1	4	1	0	0	0
FA4G4F2S2	4229,13	4	4	1	2	2	0	0	0
FA4G4S3	4242,13	4	4	1	0	3	0	0	0
FA4G4BF3S1	4287,18	4	4	1	3	1	0	0	0
FA4G3F1S2	4300,17	4	4	1	1	2	0	0	0
A4G4BS3	4313,17	4	4	0	0	3	0	0	0

Anhang

Struktur	m/z (PerMe; Red; Na ⁺)	Antennarität	Galaktosylierungsgrad	Core-Fucosylierungsgrad	Antennärer Fucosylierungsgrad	Sialylierungsgrad	Anteil <i>High</i> Mannose	Anteil Hybrid	Anteil Vorstufen
FA3G3F3S3	4315,17	3	3	1	3	3	0	0	0
FA3G3BF2S3	4386,21	4	3	1	2	3	0	0	0
FA4G4F3S2	4403,22	4	4	1	3	2	0	0	0
FA2G4FS3	4416,22	4	4	1	1	3	0	0	0
A4G4S4	4429,21	4	4	0	0	4	0	0	0
FA4G4BF4S1	4461,26	4	4	1	4	1	0	0	0
FA4G4BF2S2	4474,26	4	4	1	2	2	0	0	0
FA4G4BS3	4487,26	4	4	1	0	3	0	0	0
FA4G3BF3S3	4560,30	4	3	1	3	3	0	0	0
FA4G4F4S2	4577,31	4	4	1	4	2	0	0	0
FA4G4F2S3	4590,31	4	4	1	2	3	0	0	0
FA4G4S4	4603,30	4	4	1	0	4	0	0	0
FA4G4BF3S2	4648,35	4	4	1	3	2	0	0	0
FA4G3F1S3	4661,34	4	4	1	1	3	0	0	0
A4G4BS4	4674,34	4	4	0	0	4	0	0	0
FA4G4F3S3	4764,40	4	4	1	3	3	0	0	0
FA2G4FS4	4777,39	4	4	1	1	4	0	0	0
FA4G4BF4S2	4822,44	4	4	1	4	2	0	0	0
FA4G4BF2S3	4835,43	4	4	1	2	3	0	0	0
FA4G4BS4	4848,43	4	4	1	0	4	0	0	0
FA4G4F4S3	4938,49	4	4	1	4	3	0	0	0
FA4G4F2S4	4951,48	4	4	1	2	4	0	0	0
FA4G4BF3S3	5009,52	4	4	1	3	3	0	0	0
FA4G3F1S4	5022,52	4	4	1	1	4	0	0	0
FA4G4F3S4	5125,57	4	4	1	3	4	0	0	0
FA4G4BF4S3	5183,61	4	4	1	4	3	0	0	0
FA4G4BF2S4	5196,61	4	3	1	2	4	0	0	0
FA4G4F4S4	5299,66	4	4	1	4	4	0	0	0
FA4G4BF3S4	5370,70	4	4	1	3	4	0	0	0
FA4G4BF4S4	5544,79	4	4	1	4	4	0	0	0

5. Abbildungen

Nachdem die CHO- ATIII-Zellen an das Wachstum in CDM 4 adaptiert wurden, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Dabei wurden Glukose- und Laktatkonzentration gemessen (vgl. Abbildung-A 1).

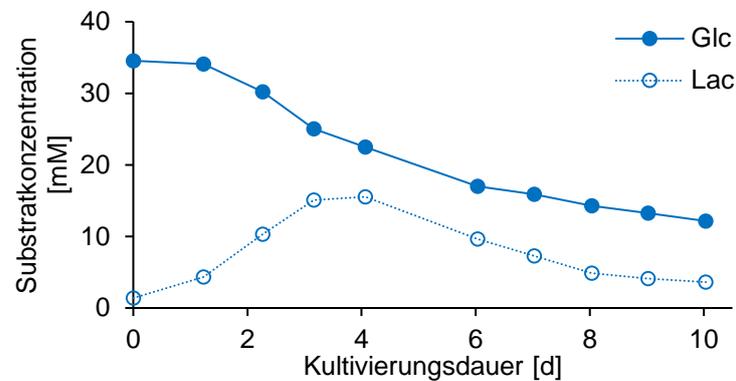


Abbildung-A 1: Glukose und Laktatkonzentration während der Kultivierung der CHO-ATIII-Zelllinie in CDM 4.

Überstände der Kultivierung zur wachstumsspezifischen Produktanalytik des EPOs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das EPO konnte mittels SDS-PAGE nicht detektiert werden (vgl. Abbildung-A 2).

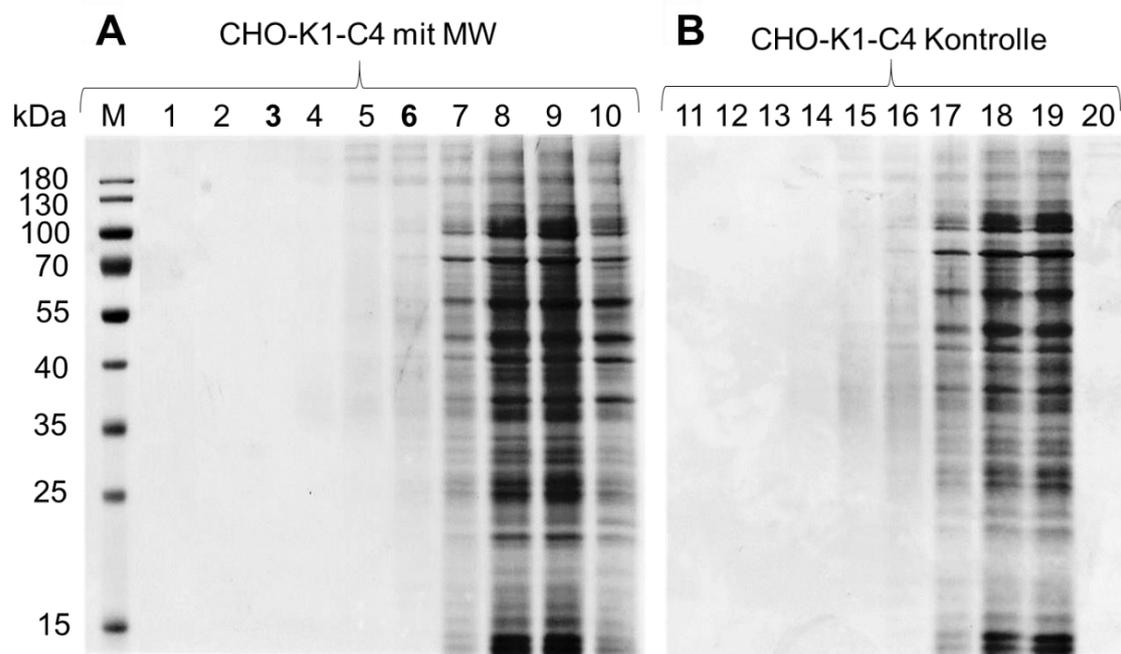


Abbildung-A 2: SDS-PAGE nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden Kulturüberstände (KÜ) aus den Kultivierungen zur wachstumsspezifischen Probenahme der Produktionszelllinie CHO-K1-C4. Es sind jeweils die Kultivierungstage über der zugehörigen Spur angegeben. A) KÜ im Verlauf der Kultivierung, bei der an zwei Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 6) ein Medienwechsel stattfand. B) KÜ im Verlauf der Kontroll-Kultivierung. M: Protein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA).

Anhang

Überstände der Kultivierung zur wachstumsspezifischen Produktanalytik des mAbs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der denaturierte mAb konnte mittels SDS-PAGE detektiert werden. In den Kulturüberständen nach dem Medienwechsel (Tag 4 und 7) sind jeweils zwei schwächere Banden auf Höhe der schweren Kette (ca. 55 kDa) und der leichten Kette (ca. 25 kDa) des mAbs zu erkennen (vgl. Abbildung-A 3).

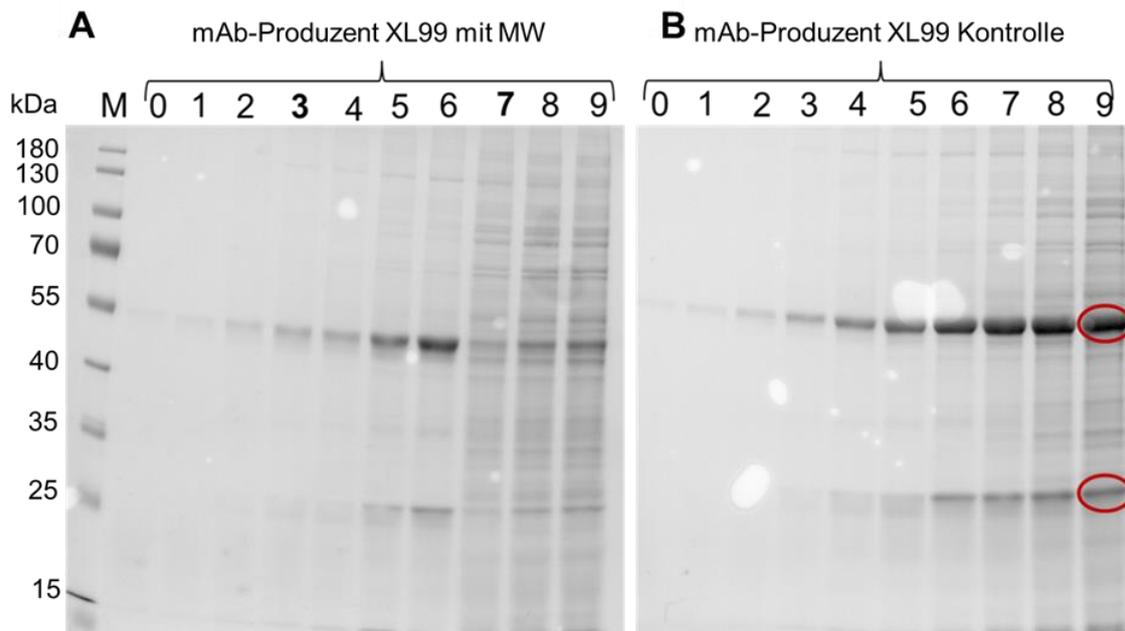


Abbildung-A 3: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden Kulturüberstände (KÜ) aus der den Kultivierungen mit wachstumsspezifischer Probenahme der mAb produzierenden Zelle CHO-XL99. Es sind jeweils die Kultivierungstage über der zugehörigen Spur angegeben. A) KÜ im Verlauf der Kultivierung, bei der an zwei Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 6) ein Medienwechsel stattfand. B) KÜ im Verlauf der Kontroll-Kultivierung. M: Protein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA). Rot markiert sind die Banden der schweren Kette (auf Höhe von ca. 55 kDa) und der leichten Kette (auf Höhe von ca. 20 kDa) des produzierten Antikörpers.

Überstände der Kultivierung zur wachstumsspezifischen Produktanalytik des C1-INHs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der C1-INH konnte mittels SDS-PAGE detektiert werden. In den Kulturüberständen nach dem Medienwechsel (Tag 6 und 10) ist jeweils eine schwächere Bande auf Höhe des C1-INHs (100-130 kDa) zu erkennen (vgl. Abbildung-A 4).

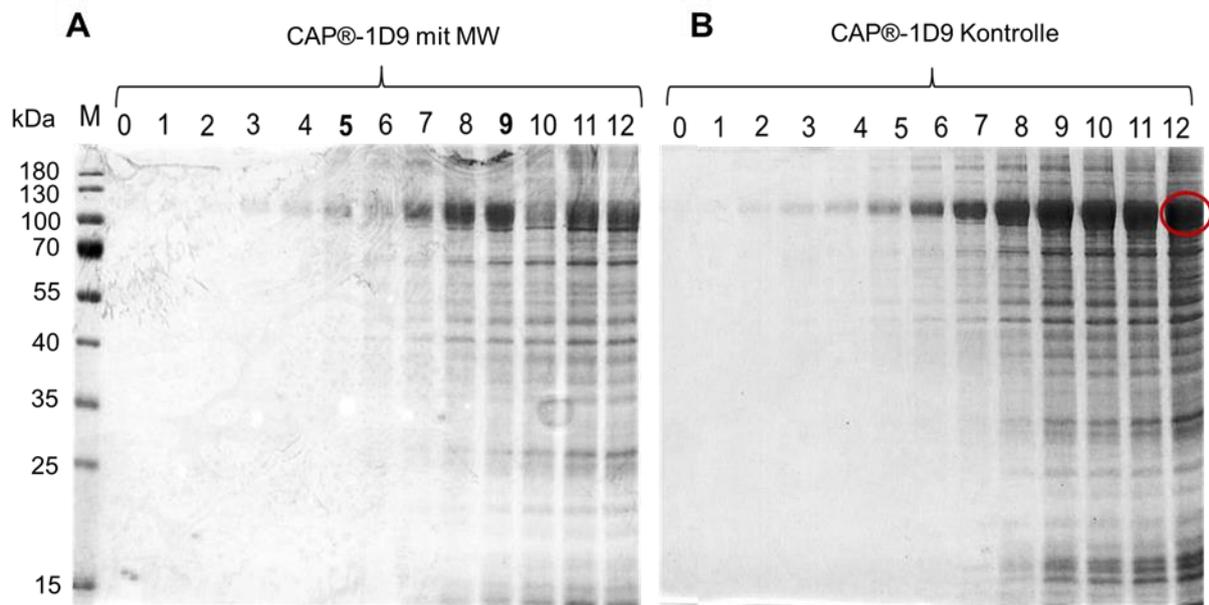


Abbildung-A 4: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden Kulturüberstände (KÜ) aus den Kultivierungen mit wachstumsspezifischer Probenahme der Produktionszelllinie CAP@-1D9. Es sind jeweils die Kultivierungstage über der zugehörigen Spur angegeben. A) KÜ im Verlauf der Kultivierung, bei der an zwei Zeitpunkten (Tag 5 und Tag 9) ein Medienwechsel stattfand. B) KÜ im Verlauf der Kontroll-Kultivierung. M: Protein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA). Rot markiert ist die Banden des produzierten C1-INH (ca. 110 kDa).

Der Aufreinigungserfolg des AAT an ConA wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Es wurden der eingesetzte Kulturüberstand, die Waschfraktion, der Durchlauf, sowie das Eluat aufgetragen. Im Eluat war zwischen 55 kDa und 70 kDa eine distinkte Bande zu erkennen (vgl. Abbildung-A 5). Es handelt sich um AAT.

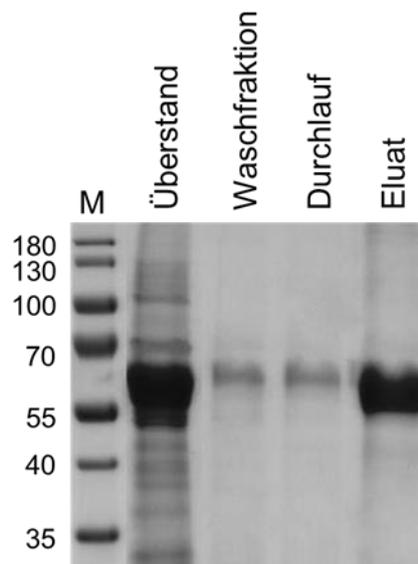


Abbildung-A 5: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach kolloidalen Coomassie Färbung. Proben der AAT-Aufarbeitung (Kontrollkultur 1) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden je 20 μ L des Überstandes, des Durchlaufes, der Waschfraktion und des Eluates aufgetragen. Als Proteingrößenstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, USA) aufgetragen

Anhang

Die Glykane des C1-INHs wurden fluoreszierend gelabelt und mittels HILIC-FL detektiert. Die Chromatogramme konnten aufgrund ihrer Komplexität nicht ausgewertet werden. Es sollte jedoch gezeigt werden, dass Chromatogramme der biologischen Triplikate ähnlich verliefen und dass unter den Proben aus unterschiedlichen Kultivierungsabschnitten Unterschiede vorlagen (vgl. Abbildung-A 6).

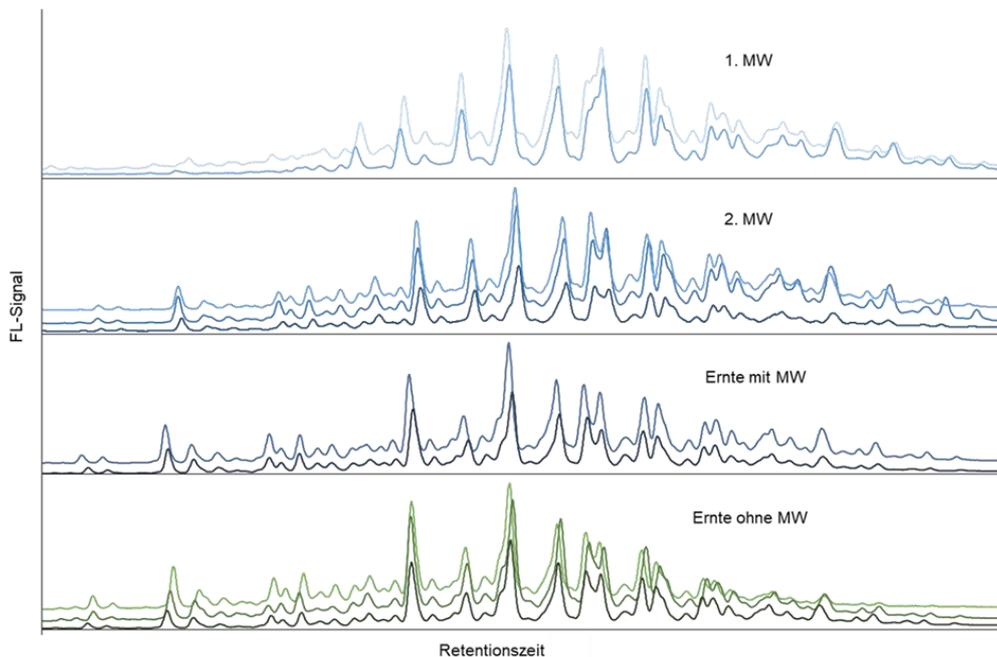


Abbildung-A 6: Chromatographische Trennung der 2-AB gelabelten Glykane des C1-INHs. Gezeigt sind die biologischen Replikate der unterschiedlichen Wachstumsphasen

Die permethylierten Glykane wurden massenspektrometrisch analysiert. In der Arbeit werden die berechneten Kenngrößen der Qualitätsattribute gezeigt. In Abbildung-A 7 und Abbildung-A 8 sind die Spektren des C1-INHs bzw. des AATs gezeigt, um die identifizierten Glykane zu veranschaulichen.

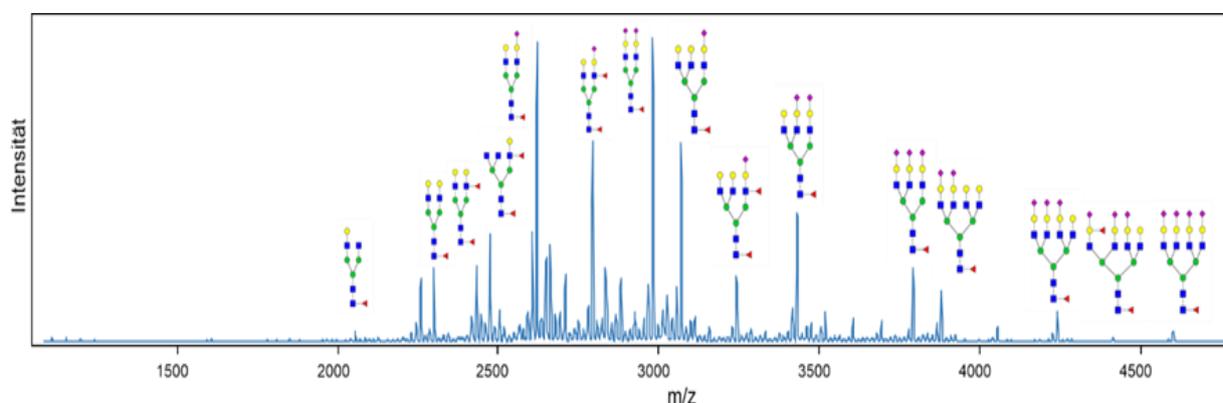


Abbildung-A 7: Spektrum der permethylierten Glykane des C1-INHs, welcher aus dem ersten Medienwechsel stammt. Gezeigt sind die annotierten Glykane

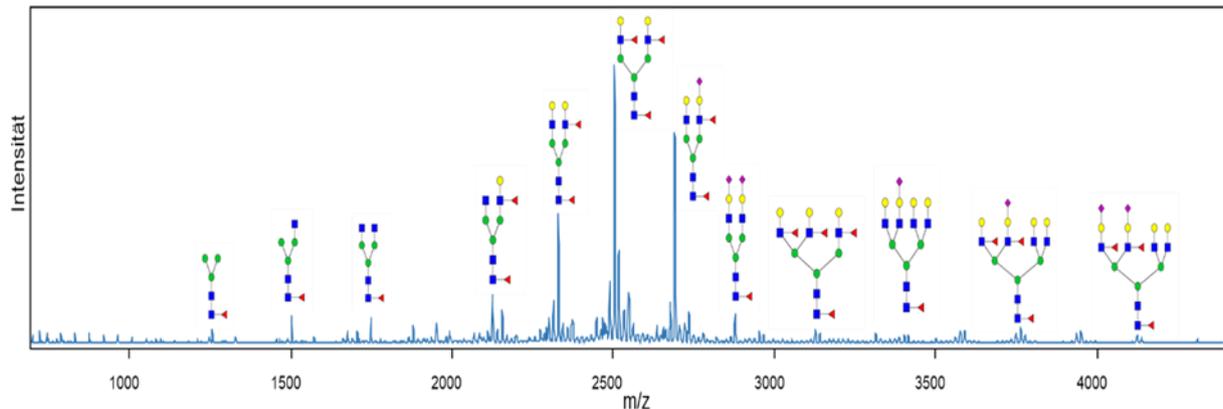


Abbildung-A 8: Spektrum der permethylierten Glykane von AAT, welches aus dem ersten Medienwechsel stammt. Gezeigt sind die annotierten Glykane

Um die identifizierten Glykane des ATIII zu zeigen, sind diese im Chromatogramm der Fluoreszenz-gelabelten Glykane gezeigt. Des Weiteren sind Chromatogramme der Proben aus den unterschiedlichen Kultivierungsabschnitten gezeigt. Die Abbildung-A 9 verdeutlicht, dass sich die Glykosylierung des ATIIIs während der Kultivierung kaum verändert.

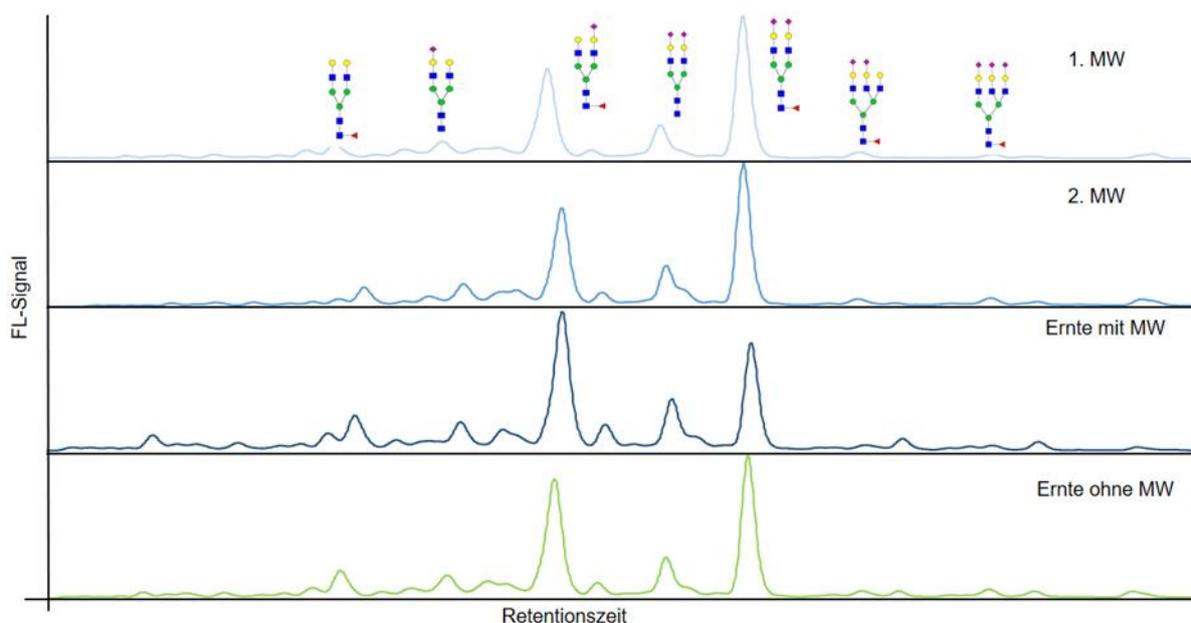


Abbildung-A 9: Chromatogramme der HILIC-FLD des ATIIIs aus erstem und zweitem Medienwechsel, sowie aus dem dritten Kultivierungsabschnitt und aus der Kontrollkultivierung.

Um erste Hinweise auf die Ursachen der Unterschiede der Glykosylierung im Kultivierungsverlauf zu erhalten, wurden Durchschnittswerte der Qualitätsattribute der Kultivierung mit Medienwechsel mit den Ergebnissen der Kontrollkultivierung verglichen. In Abbildung-A 10 sind die berechneten Werte der chromatografischen (A) sowie massenspektrometrischen (B) Analysen des AATs gezeigt. In Abbildung-A 11 werden die Ergebnisse des ATIIIs gezeigt.

Anhang

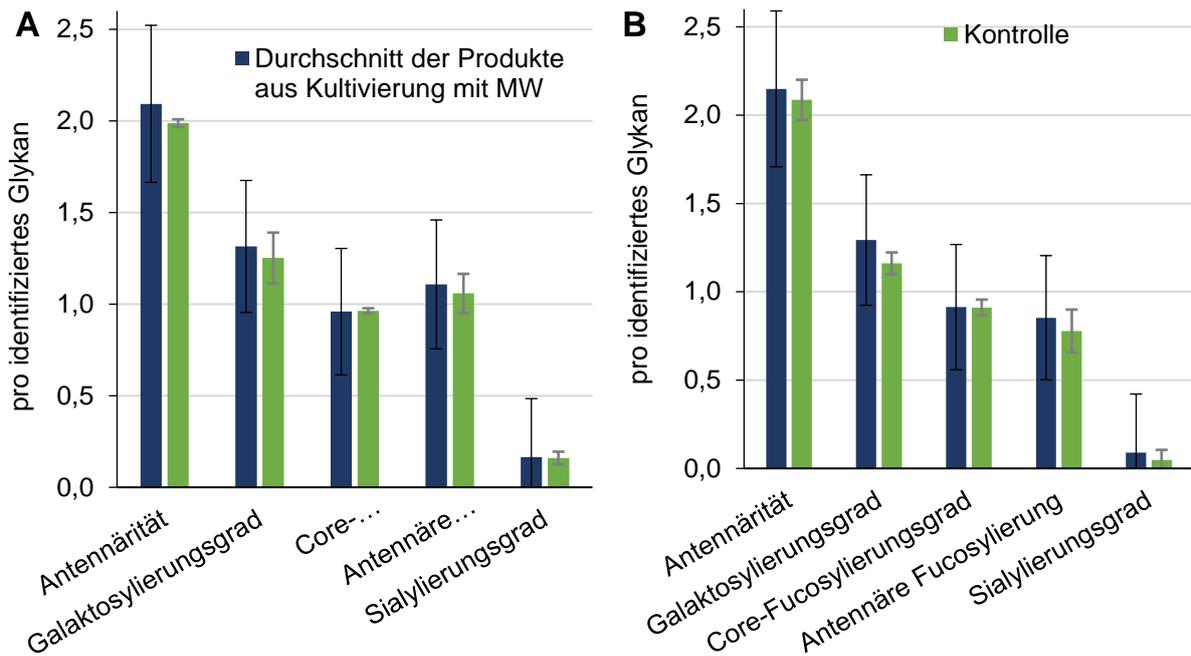


Abbildung-A 10: Vergleich der Glykosylierungen der Summe des AATs aus den wachstumsspezifischen Probenahmen und dem AAT aus der Kontrollkultivierung. (A) Analytik der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD. (B) Massenspektrometrische Analytik der permethylierten Glykane des AATs.

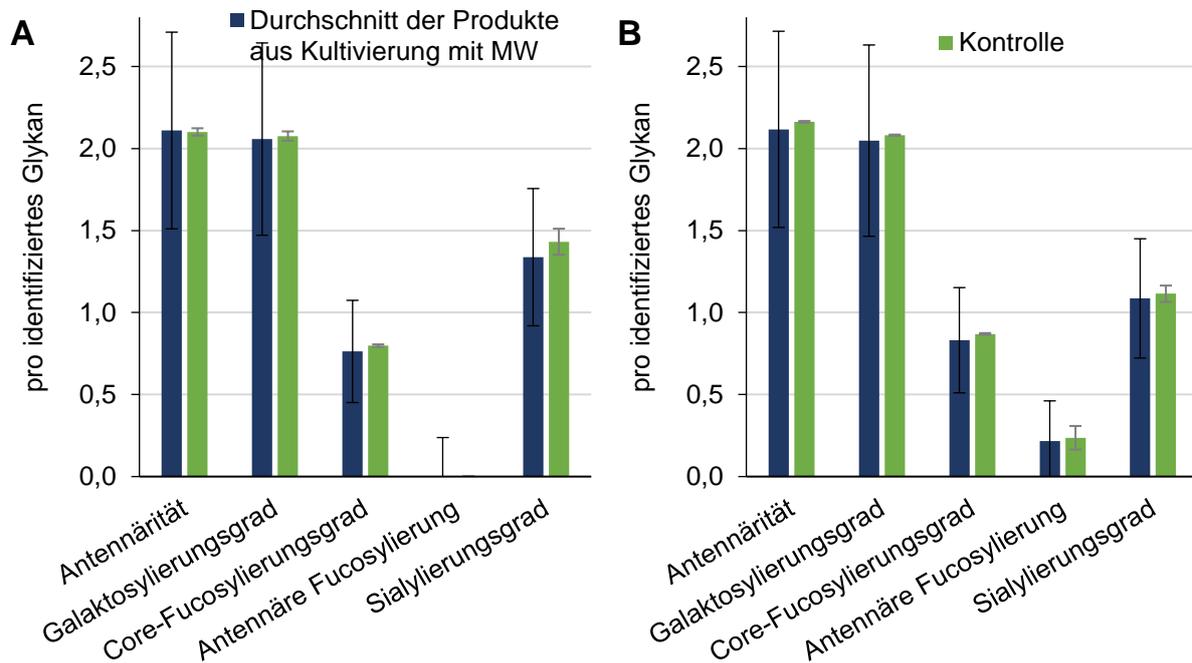


Abbildung-A 11: Vergleich der Glykosylierungen der Summe des ATIII aus den wachstumsspezifischen Probenahmen und dem ATIII aus der Kontrollkultivierung. (A) Analytik der 2-AB-gelabelten Glykane mittels HILIC-FLD. (B) Massenspektrometrische Analytik der permethylierten Glykane des ATIII.

Anhang

Oliver Hertel (Bachelorarbeit): *„Methodenetablierung zur Bestimmung der Wachstumsphasen spezifischen Produktqualität in C1-Inhibitor produzierenden CAP-Zellen“*

Oxana Sawitzki (Projektarbeit): *„Entwicklung einer Strategie zur wachstumsphasenspezifischen Produktanalytik“*

Nikita Tichomirow (Projektarbeit): *„Aufreinigung des C1-Inhibitors“*

Nikita Tichomirow (Masterarbeit): *„Kultivierung einer CAP-Zelllinie zur Produktion von C1-Inhibitor und anschließende Aufreinigung des Proteins“*

Jens Esken (Projektarbeit): *„Aufreinigung und Isolierung von N-Glykopeptiden“*

Jens Esken (Masterarbeit): *„Methodenetablierung zur LC-MS basierten Analyse der Mikroheterogenität von N-Glykopeptiden“*

AUSBILDUNG

Ausbildung zur biologisch technischen Assistentin 09/2005 – 06/2007
Berufskolleg Olsberg, Höhere Berufsschule für biologisch-technische Assistenten, Olsberg

BERUFLICHER WERDEGANG

BTA 11/2008 – 12/2011
Algea Biotechnology & Bioenergy (Prof. Dr. Olaf Kruse, Universität Bielefeld)

Laboratory Head of Protein & Spent Media Analysis 09/2016 - dato
Biofidus AG, Bielefeld

VERÖFFENTLICHUNGEN

BRANDENBUSCH, C., Glonke, S., Collins, J., Hoffrogge, R., Grunwald, K., Bühler, B., Schmid, A., Sadowski, G., *Process Boundaries of Irreversible scCO₂-assisted Phase Separation in Biphasic Whole Cell Biocatalysis*, 2015, *Biotechnol Bioengineering* 112-11, 2316-2323

GRUNWALD, K.; Noll.T; Büntemeyer, H., *Method development and Application of Growth Phase specific recombinant Protein Glycosylation Analysis*, 2015, *BMC Proceedings* 9, P37

GRUNWALD, K.; Noll.T; Büntemeyer, H., *Time-dependent product heterogeneity in mammalian cell fermentation processes*, 2018, *BMC Proceedings* 12, P-068

Danksagung

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Zellkulturtechnik an der Universität Bielefeld in einem ZIM-Förderprojekt mit der Firma Cevec durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich daher bei Prof. Dr. Thomas Noll für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Vielen Dank für das Vertrauen und die Gesprächsbereitschaft.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Heino Büntemeyer, dem Projektleiter für dieses Projekt, für das Vertrauen, die Geduld und die Unterstützung nicht nur bei inhaltlichen Fragen, sondern auch bei Fragen, was Geräte und Methoden angeht bedanken. Danke für unzählige Ratschläge und die gute Zusammenarbeit.

Auch bei Dr. Raimund Hoffrogge möchte ich mich herzlich bedanken. Durch die Projekt- und Masterarbeit bei ihm bin ich überhaupt erst zum Thema der Proteinglykosylierung gekommen. Danke nicht nur für diese Zeit, sondern auch für viele Diskussionen und Ratschläge und den ein oder anderen Kaffee und Flurplausch.

Bei Prof. Doktor Johannes Müthing möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich bedanken.

An Frau Dr. Silke Wissing geht mein Dank für eine gute Zusammenarbeit innerhalb des Projektes und für das Gegenlesen dieser Arbeit und die daraus resultierenden Anregungen. Danke auch an Cevec für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Projektes.

An Jana ein riesiges Dankeschön für die Einarbeitung in die faszinierende Welt der Glykananalytik und für die Unterstützung bei den Messungen. Bei Angela, Angelika und Heike möchte ich mich herzlich nicht nur für die Unterstützung bei Kultivierungen, verschiedenen Analysen und Aufarbeitungen bedanken, sondern auch für die Einarbeitung in HPLC-Analysen und Proteinaufarbeitungen. Danke auch für die moralische und fachliche Hilfe, wenn die Anlagen mal wieder nicht so wollten wie ich. Bei Nadine und Larissa bedanke ich mich herzlich für immer fertig vorbereitete Puffer, Hilfe und Ideen bei unterschiedlichsten Fragestellungen zur Proteom-Analytik und den ein oder anderen Plausch über die Handballsaison oder Backtipps. Danke an Lothar, dessen Karma die meisten Geräte bei seinem bloßen Betreten repariert hat. Danke für den Löt-Kurs und frei gebohrte Kapillaren. Bei Ulrike möchte ich mich herzlich für die Hilfe bei allem Organisatorischen und für das Korrekturlesen englischer Texte bedanken. Für immer sauberes und autoklaviertes Material

bedanke ich mich bei Kerstin. Ich möchte mich bei euch allen für die letzten sieben Jahre im Labor auf F0 und E0 bedanken. Es war immer schön mit euch.

Bei Benny und Timmy möchte ich mich für die Einführung in die Welt des MALDI-ToFs bedanken und bei Benny besonders für die Unterstützung in den letzten zwei Jahren. Danke für die Unzähligen Diskussionen über Daten, Methoden und vieles mehr, sowie für Messungen am MicroToF.

Bei Anica möchte ich mich besonders herzlich bedanken, für unzählige Antworten auf kultivierungstechnischen Fragen, aber viel mehr noch für die Freundschaft, die sich im Laufe der letzten Jahre entwickelt hat. Danke für die unzähligen Gespräche unter der Sterilbank, beim Kaffee oder beim Wein. Ich denke mit WD 40 und Panzertape wird noch was aus uns.

Bei meinen Bürokollegen Olli, Bean und Anna bedanke ich mich für eine schöne Zeit und eine gute Arbeitsatmosphäre, auch wenn wir die Erdmännchen und die Cocktail Bar nie bekommen haben...

Bei Oxana, Oliver und Nikita möchte ich mich dafür bedanken, dass ihr mich mit euren Projekt-, Bachelor- bzw. Masterarbeiten in meiner Dissertation unterstützt habt.

Bei der ganzen AG für Zellkulturtechnik, BiBiTec und Xell möchte ich mich bedanken für die gute Zusammenarbeit in den letzten sieben Jahren. Danke für Kaffeepausen, Kuchen und die Gesprächsbereitschaft. Der Xell AG gilt darüber hinaus ein großes Dankeschön für die bereitgestellten Medien.

Danke an Frauke, Benny, Anja, Lena, Anica und Marit für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

An meine Eltern geht ein riesiges Dankeschön. Ihr habt mir nicht nur das Studium ermöglicht, ihr habt mich immer unterstützt und habt auch heute immer ein offenes Ohr für mich. Danke für die Unterstützung in stressigen Zeiten, beim Hausumbau, im Haushalt und für die Verpflegung bei euch, wenn ich zum Schreiben zu euch geflüchtet bin. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir geholfen habt zu dem Menschen zu werden, der ich heute bin.

Zum Schluss gilt mein Dank Toto. Du hast immer an mich geglaubt, mir den Rücken freigehalten, mich motiviert und mich ausgehalten. Danke, dass du da bist! Du bist der

Danksagung

wichtigste Mensch in meinem Leben und ich freue mich wahnsinnig auf die Zukunft mit dir,
besonders auf die freien Wochenenden!

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der technischen Fakultät der Universität Bielefeld bekannt ist. Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet. Dies gilt auch für die beigefügten Zeichnungen oder bildlichen Darstellungen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Vermittlungstätigkeiten oder für Arbeiten im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation erhalten. Diese Arbeit wurde bisher für keine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Bielefeld, 17.01.2019

Kludia Grunwald

LITERATURVERZEICHNIS

AGARABI, C. D.; Schiel, J. E.; Lute, S. C.; Chavez, B. K.; Boyne, M. T.; Brorson, K. A.; Khan, M.; Read, E. K. *Bioreactor process parameter screening utilizing a Plackett-Burman design for a model monoclonal antibody*; 2015. Journal of pharmaceutical sciences. 6. 1919–1928.

AGHAMOHSENI, H.; Ohadi, K.; Spearman, M.; Krahn, N.; Moo-Young, M.; Scharer, J. M.; Butler, M.; Budman, H. M. *Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody*; 2014. Journal of biotechnology. 98–109.

ALDERSON, K. L.; Sondel, P. M. *Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*; 2011. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 8. 1–7.

ALSENAIDY, M. A.; Kim, J. H.; Majumdar, R.; Weis, D. D.; Joshi, S. B.; Tolbert, T. J.; Middaugh, C. R.; Volkin, D. B. *High-throughput biophysical analysis and data visualization of conformational stability of an IgG1 monoclonal antibody after deglycosylation*; 2013. Journal of pharmaceutical sciences. 11. 3942–3956.

ALSENAIDY, M. A.; Okbazghi, S. Z.; Kim, J. H.; Joshi, S. B.; Middaugh, C. R.; Tolbert, T. J.; Volkin, D. B. *Physical stability comparisons of IgG1-Fc variants: effects of N-glycosylation site occupancy and Asp/Gln residues at site Asn 297*; 2014. Journal of pharmaceutical sciences. 6. 1613–1627.

ANDERSEN, D. C.; Goochee, C. F. *The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells*; 1995. Biotechnology and bioengineering. 1. 96–105.

ANDERSEN, D. C.; Krummen, L. *Recombinant protein expression for therapeutic applications*; 2002. Current opinion in biotechnology. 2. 117–123.

ANTHONY, R. M.; Kobayashi, T.; Wermeling, F.; Ravetch, J. V. *Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway*; 2011. Nature. 7354. 110–113.

AOYAGI, T.; Yamamoto, T.; Kojiri, K.; Morishima, H.; Nagai, M.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. *Mannostatins A and B: new inhibitors of alpha-D-mannosidase, produced by Streptovercillium verticillus var. quintum ME3-AG3: taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities*; 1989. The Journal of antibiotics. 6. 883–889.

- APWEILER, R.** *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*; 1999. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1. 4–8.
- AULAK, K. S.; Davis, A. E.; Donaldson, V. H.; Harrison, R. A.** *Chymotrypsin inhibitory activity of normal C1-inhibitor and a P1 Arg to His mutant: Evidence for the presence of overlapping reactive centers*; 1993. *Protein Science*. 5. 727–732.
- BADIROU, I.; Kurdi, M.; Legendre, P.; Rayes, J.; Bryckaert, M.; Casari, C.; Lenting, P. J.; Christophe, O. D.; Denis, C. V.** *In vivo analysis of the role of O-glycosylations of von Willebrand factor*; 2012. *PLoS one*. 5. e37508.
- BAKER, K. N.; Rendall, M. H.; Hills, A. E.; Hoare, M.; Freedman, R. B.; James, D. C.** *Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells*; 2001. *Biotechnology and bioengineering*. 3. 188–202.
- BAUER, J.; Osborn, H. M. I.** *Sialic acids in biological and therapeutic processes: opportunities and challenges*; 2015. *Future medicinal chemistry*. 16. 2285–2299.
- BAUER, K. A.; Nguyen-Cao, T. M.; Spears, J. B.** *Issues in the Diagnosis and Management of Hereditary Antithrombin Deficiency*; 2016. *Annals of Pharmacotherapy*. 9. 758–767.
- BECK, A.** *Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies*; 2011. *mAbs*. 2. 107–110.
- BECK, A.; Reichert, J. M.** *Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering*; 2012. *mAbs*. 4. 419–425.
- BECK, A.; Wagner-Rousset, E.; Ayoub, D.; van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianfèrani, S.** *Characterization of therapeutic antibodies and related products*; 2013. *Analytical chemistry*. 2. 715–736.
- BECKER, D. J.; Lowe, J. B.** *Fucose: biosynthesis and biological function in mammals*; 2003. *Glycobiology*. 7. 41R-53R.
- BERGER, M.; Shankar, V.; Vafai, A.** *Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies*; 2002. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1. 14–30.
- BERNINGER, R. W.; Talamo, R. C.** *Preparation of concanavalin A free purified alpha-1-antitrypsin*; 1979. *Analytical Biochemistry*. 1. 180–188.

Literaturverzeichnis

- BLANCHARD, V.;** Frank, M.; Leeflang, B. R.; Boelens, R.; Kamerling, J. P. *The structural basis of the difference in sensitivity for PNGase F in the de-N-glycosylation of the native bovine pancreatic ribonucleases B and BS*; 2008. *Biochemistry*. 11. 3435–3446.
- BLANCHARD, V.;** Liu, X.; Eigel, S.; Kaup, M.; Rieck, S.; Janciauskiene, S.; Sandig, V.; Marx, U.; Walden, P.; Tauber, R.; Berger, M. *N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line*; 2011. *Biotechnology and Bioengineering*. 9. 2118–2128.
- BOCK, S. C.;** Skriver, K.; Nielsen, E.; Thogersen, H. C.; Wiman, B.; Donaldson, V. H.; Eddy, R. L.; Marrinan, J.; Radziejewska, E.; Huber, R. *Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization*; 1986. *Biochemistry*. 15. 4292–4301.
- BOCQUET, F.;** Paubel, P.; Fusier, I.; Cordonnier, A.-L.; Sinègre, M.; Le Pen, C. *Biosimilar Versus Patented Erythropoietins: Learning from 5 Years of European and Japanese Experience*; 2015. *Applied Health Economics and Health Policy*. 1. 47–59.
- BORK, K.;** Reutter, W.; Weidemann, W.; Horstkorte, R. *Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells*; 2007. *FEBS Letters*. 22. 4195–4198.
- BORROK, M. J.;** Jung, S. T.; Kang, T. H.; Monzingo, A. F.; Georgiou, G. *Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc*; 2012. *ACS chemical biology*. 9. 1596–1602.
- BORYS, M. C.;** Dalal, N. G.; Abu-Absi, N. R.; Khattak, S. F.; Jing, Y.; Xing, Z.; Li, Z. J. *Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells*; 2010. *Biotechnology and bioengineering*. 6. 1048–1057.
- BORYS, M. C.;** Linzer, D. I.; Papoutsakis, E. T. *Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner*; 1994. *Biotechnology and bioengineering*. 6. 505–514.
- BORZA, B.;** Szigeti, M.; Szekrenyes, A.; Hajba, L.; Guttman, A. *Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: Quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept*; 2018. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 182–185.
- Bos, I.** *Structural and Functional Aspects of C1-Inhibitor*; 2002. *Immunobiology*. 4-5. 518–533.
-

- BOYD**, P. N.; Lines, A. C.; Patel, A. K. *The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H*; 1995. *Molecular Immunology*. 17-18. 1311–1318.
- BROWN**, W. T. *Alpha 1-antitrypsin: apparent molecular weight heterogeneity shown by two-dimensional electrophoresis*; 1982. *American Journal of Human Genetics*. 2. 195–208.
- BRÜHLMANN**, D.; Jordan, M.; Hemberger, J.; Sauer, M.; Stettler, M.; Broly, H. *Tailoring recombinant protein quality by rational media design*; 2015. *Biotechnology progress*. 3. 615–629.
- BUNKENBORG**, J.; Pilch, B. J.; Podtelejnikov, A. V.; Wiśniewski, J. R. *Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry*; 2004. *Proteomics*. 2. 454–465.
- BÜNTEMEYER**, H.; Wallerius, C.; Lehmann, J. *Optimal medium use for continuous high density perfusion processes*; 1992. *Cytotechnology*. 1-3. 59–67.
- BUTLER**, M. *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*; 2005. *Applied microbiology and biotechnology*. 3. 283–291.
- BUTLER**, M. *Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems*; 2006. *Cytotechnology*. 1-3. 57–76.
- BUTLER**, M.; Jenkins, H. *Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture*; 1989. *Journal of biotechnology*. 2. 97–110.
- CALIEZI**, C.; Wuillemain, W. A.; Zeerleder, S.; Redondo, M.; Eisele, B.; Hack, C. E. *C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema*; 2000. *Pharmacological reviews*. 1. 91–112.
- CARRELL**, R. W.; Jeppsson, J. O.; Vaughan, L.; Brennan, S. O.; Owen, M. C.; Boswell, D. R. *Human alpha 1-antitrypsin: carbohydrate attachment and sequence homology*; 1981. *FEBS Letters*. 2. 301–303.
- CASOLARO**, M. A.; Fells, G.; Wewers, M.; Pierce, J. E.; Ogushi, F.; Hubbard, R.; Sellers, S.; Forstrom, J.; Lyons, D.; Kawasaki, G. *Augmentation of lung antineutrophil elastase capacity with recombinant human alpha-1-antitrypsin*; 1987. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 5. 2015–2023.

Literaturverzeichnis

- CEAGLIO, N.;** Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Oggero, M. *Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering*; 2008. *Biochimie*. 3. 437–449.
- CERONI, A.;** Maass, K.; Geyer, H.; Geyer, R.; Dell, A.; Haslam, S. M. *GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans*; 2008. *Journal of proteome research*. 4. 1650–1659.
- CHADD, H. E.;** Chamow, S. M. *Therapeutic antibody expression technology*; 2001. *Current opinion in biotechnology*. 2. 188–194.
- CHANDRASEKARAN, A.;** Srinivasan, A.; Raman, R.; Viswanathan, K.; Raguram, S.; Tumpey, T. M.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. *Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin*; 2008. *Nature biotechnology*. 1. 107–113.
- CHAPMAN, A. E.;** Calhoun, J. C. *Effects of glucose starvation and puromycin treatment on lipid-linked oligosaccharide precursors and biosynthetic enzymes in Chinese hamster ovary cells in vivo and in vitro*; 1988. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1. 320–333.
- CHAPMAN, K. R.;** Chorostowska-Wynimko, J.; Koczulla, A. R.; Ferrarotti, I.; McElvaney, N. G. *Alpha 1 antitrypsin to treat lung disease in alpha 1 antitrypsin deficiency: recent developments and clinical implications*; 2018. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 419–432.
- CHEE FURNG WONG, D.;** Tin Kam Wong, K.; Tang Goh, L.; Kiat Heng, C.; Gek Sim Yap, M. *Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures*; 2005. *Biotechnology and Bioengineering*. 2. 164–177.
- CHEN, F.;** Kou, T.; Fan, L.; Zhou, Y.; Ye, Z.; Zhao, L.; Tan, W.-S. *The combined effect of sodium butyrate and low culture temperature on the production, sialylation, and biological activity of an antibody produced in CHO cells*; 2011. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 6. 1157–1165.
- CHEN, P.;** Harcum, S. W. *Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells*; 2006. *Metabolic engineering*. 2. 123–132.
- CHEN, R.;** Jiang, X.; Sun, D.; Han, G.; Wang, F.; Ye, M.; Wang, L.; Zou, H. *Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry*; 2009. *Journal of proteome research*. 2. 651–661.
-

- CHILL**, L.; Trinh, L.; Azadi, P.; Ishihara, M.; Sonon, R.; Karnaukhova, E.; Ophir, Y.; Golding, B.; Shiloach, J. *Production, purification, and characterization of human α 1 proteinase inhibitor from *Aspergillus niger**; 2009. *Biotechnology and Bioengineering*. 3. 828–844.
- CHOTIGEAT**, W.; Watanapokasin, Y.; Mahler, S.; Gray, P. P. 2013. *Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells*. in: Buckland, Barry C.; Aunins, John G.; Bibila, Theodora A.; Hu, Wei-Shou; Robinson, David K.; Zhou, Weichang. 217–221.
- CHOU**, H. H.; Takematsu, H.; Diaz, S.; Iber, J.; Nickerson, E.; Wright, K. L.; Muchmore, E. A.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.; Varki, A. *A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence*; 1998. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 20. 11751–11756.
- CHUNG**, C. H.; Mirakhur, B.; Chan, E.; Le, Q.-T.; Berlin, J.; Morse, M.; Murphy, B. A.; Satinover, S. M.; Hosen, J.; Mauro, D.; Slebos, R. J.; Zhou, Q.; Gold, D.; Hatley, T.; Hicklin, D. J.; Platts-Mills, T. A.E. *Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- α -1,3-Galactose*; 2008. *New England Journal of Medicine*. 11. 1109–1117.
- COWPER**, B.; Li, X.; Yu, L.; Zhou, Y.; Fan, W. H.; Rao, C. M. *Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan*; 2018. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 214–220.
- COX**, K. M.; Sterling, J. D.; Regan, J. T.; Gasdaska, J. R.; Frantz, K. K.; Peele, C. G.; Black, A.; Passmore, D.; Moldovan-Loomis, C.; Srinivasan, M.; Cuison, S.; Cardarelli, P. M.; Dickey, L. F. *Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor**; 2006. *Nature Biotechnology*. 12. 1591–1597.
- CRAWFORD**, I. P. *Purification and properties of normal human alpha 1-antitrypsin*; 1973. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1. 215–222.
- CROWELL**, C. K.; Grampp, G. E.; Rogers, G. N.; Miller, J.; Scheinman, R. I. *Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system*; 2007. *Biotechnology and Bioengineering*. 3. 538–549.
- CRUZ**, H. J.; Peixoto, C. M.; Nimtz, M.; Alves, P. M.; Dias, E. M.; Moreira, J. L.; Carrondo, M. J. *Metabolic shifts do not influence the glycosylation patterns of a recombinant fusion protein expressed in BHK cells*; 2000. *Biotechnology and Bioengineering*. 2. 129–139.

Literaturverzeichnis

- CRUZ, M. P.** *Conestat Alfa (Ruconest): First Recombinant C1 Esterase Inhibitor for the Treatment Of Acute Attacks in Patients With Hereditary Angioedema*; 2015. Pharmacy and Therapeutics. 2. 109–114.
- CUGNO, M.**; Cicardi, M.; Bottasso, B.; Coppola, R.; Paonessa, R.; Mannucci, P. M.; Agostoni, A. *Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies*; 1997. Blood. 9. 3213–3218.
- D'ANDREA, A. D.**; Lodish, H. F.; Wong, G. G. *Expression cloning of the murine erythropoietin receptor*; 1989. Cell. 2. 277–285.
- DASGUPTA, S.**; Navarrete, A.-M.; Bayry, J.; Delignat, S.; Wootla, B.; André, S.; Christophe, O.; Nascimbeni, M.; Jacquemin, M.; Martinez-Pomares, L.; Geijtenbeek, T. B. H.; Moris, A.; Saint-Remy, J.-M.; Kazatchkine, M. D.; Kaveri, S. V.; Lacroix-Desmazes, S. *A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes*; 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 21. 8965–8970.
- DAVIS, A.**; Lu, F.; Mejia, P. *C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor*; 2010. Thrombosis and Haemostasis. 11. 886–893.
- DAVIS, J. M.**; Arakawa, T.; Strickland, T. W.; Yphantis, D. A. *Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells*; 1987. Biochemistry. 9. 2633–2638.
- DEL VAL, I. J.**; Kontoravdi, C.; Nagy, J. M. *Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns*; 2010. Biotechnology progress. 6. 1505–1527.
- DEZERN, A. E.**; Uknis, M.; Yuan, X.; Mukhina, G. L.; Varela, J.; Saye, J.; Pu, J.; Brodsky, R. A. *Complement blockade with a C1 esterase inhibitor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*; 2014. Experimental hematology. 10. 857-861.e1.
- DIONNE, B.**; Mishra, N.; Butler, M. *A low redox potential affects monoclonal antibody assembly and glycosylation in cell culture*; 2017. Journal of biotechnology. 71–80.
- DUBÉ, S.**; Fisher, J. W.; Powell, J. S. *Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function.*; 1988. Journal of Biological Chemistry. 263. 17516–17521.
-

- DUMONT, J.;** Ewart, D.; Mei, B.; Estes, S.; Kshirsagar, R. *Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives*; 2016. *Critical Reviews in Biotechnology*. 6. 1110–1122.
- DUROCHER, Y.;** Butler, M. *Expression systems for therapeutic glycoprotein production*; 2009. *Current opinion in biotechnology*. 6. 700–707.
- DUROCHER, Y.;** Pham, P. L.; St-Laurent, G.; Jacob, D.; Cass, B.; Chahal, P.; Lau, C. J.; Nalbantoglu, J.; Kamen, A. *Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells*; 2007. *Journal of virological methods*. 1-2. 32–40.
- DWEK, R. A.;** Edge, C. J.; Harvey, D. J.; Wormald, M. R.; Parekh, R. B. *Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides*; 1993. *Annual review of biochemistry*. 65–100.
- EDMUNDS, T.;** van Patten, S. M.; Pollock, J.; Hanson, E.; Bernasconi, R.; Higgins, E.; Manavalan, P.; Ziomek, C.; Meade, H.; McPherson, J. M.; Cole, E. S. *Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin*; 1998. *Blood*. 12. 4561–4571.
- EGRIE, J. C.;** Dwyer, E.; Browne, J. K.; Hitz, A.; Lykos, M. A. *Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin*; 2003. *Experimental hematology*. 4. 290–299.
- ELBAKRI, A.;** Nelson, P. N.; Abu Odeh, R. O. *The state of antibody therapy*; 2010. *Human Immunology*. 12. 1243–1250.
- ELBEIN, A. D.;** Tropea, J. E.; Mitchell, M.; Kaushal, G. P. *Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I*; 1990. *The Journal of biological chemistry*. 26. 15599–15605.
- ELBERS, I. J.;** Stoop, G. M.; Bakker, H.; Stevens, L. H.; Bardor, M.; Molthoff, J. W.; Jordi, W. J.; Bosch, D.; Lommen, A. *Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves*; 2001. *Plant physiology*. 3. 1314–1322.
- ELLIOTT, S.;** Lorenzini, T.; Asher, S.; Aoki, K.; Brankow, D.; Buck, L.; Busse, L.; Chang, D.; Fuller, J.; Grant, J.; Hernday, N.; Hokum, M.; Hu, S.; Knudten, A.; Levin, N.; Komorowski, R.; Martin, F.; Navarro, R.; Osslund, T.; Rogers, G.; Rogers, N.; Trail, G.; Egrie, J.

Literaturverzeichnis

Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering; 2003. Nature biotechnology. 4. 414–421.

ENJOLRAS, N.; Dargaud, Y.; Pérot, E.; Guillaume, F.; Becchi, M.; Négrier, C. *Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications*; 2012. Thrombosis Research. 5. e266-e273.

ERBAYRAKTAR, S.; Grasso, G.; Sfacteria, A.; Xie, Q.-w.; Coleman, T.; Kreilgaard, M.; Torup, L.; Sager, T.; Erbayraktar, Z.; Gokmen, N.; Yilmaz, O.; Ghezzi, P.; Villa, P.; Fratelli, M.; Casagrande, S.; Leist, M.; Helboe, L.; Gerwein, J.; Christensen, S.; Geist, M. A.; Pedersen, L. O.; Cerami-Hand, C.; Wuerth, J.-P.; Cerami, A.; Brines, M. *Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo*; 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 11. 6741–6746.

European Medicines Agency - A Tryn verfügbar auf

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000587/human_med_000658.jsp. 17.06.2018.

European Pharmacopoeia; 2002.

FAN, B.; Crews, B. C.; Turko, I. V.; Choay, J.; Zettlmeissl, G.; Gettins, P. *Heterogeneity of recombinant human antithrombin III expressed in baby hamster kidney cells. Effect of glycosylation differences on heparin binding and structure*; 1993. The Journal of biological chemistry. 23. 17588–17596.

FAN, Y.; Jimenez Del Val, I.; Müller, C.; Wagtberg Sen, J.; Rasmussen, S. K.; Kontoravdi, C.; Weilguny, D.; Andersen, M. R. *Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation*; 2015. Biotechnology and bioengineering. 3. 521–535.

FARKAS, H.; Csuka, D.; Veszeli, N.; Zotter, Z.; Szabó, E.; Varga, L. *Home treatment of attacks with conestat alfa in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency*; 2014. Allergy and Asthma Proceedings. 3. 255–259.

FIGUEROA, B.; Ailor, E.; Osborne, D.; Hardwick, J. M.; Reff, M.; Betenbaugh, M. J. *Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells*; 2007. Biotechnology and bioengineering. 4. 877–892.

- FRANZÉN, L. E.;** Svensson, S.; Larm, O. *Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III*; 1980. The Journal of biological chemistry. 11. 5090–5093.
- FREEZE, H. H.** *Genetic defects in the human glycome*; 2006. Nature reviews. Genetics. 7. 537–551.
- FUKUDA, M. N.;** Sasaki, H.; Lopez, L.; Fukuda, M. *Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates*; 1989. Blood. 1. 84–89.
- FURBISH, F.S.;** Steer, C. J.; Barranger, J. A.; Jones, E.A.; Brady, R. O. *The uptake of native and desialylated glucocerebrosidase by rat hepatocytes and Kupffer cells*; 1978. Biochemical and Biophysical Research Communications. 3. 1047–1053.
- FURIE, B.** *Pathogenesis of thrombosis*; 2009. Hematology. 1. 255–258.
- FUSSENEGGER, M.;** Mazur, X.; Bailey, J. E. *A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells*; 1997. Biotechnology and Bioengineering. 6. 927–939.
- GADEK, J. E.;** Klein, H. G.; Holland, P. V.; Crystal, R. G. *Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects*; 1981. The Journal of clinical investigation. 5. 1158–1165.
- GALILI, U.;** Rachmiletz, E. A.; Peleg, A.; Flechner, I. *A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity*; 1984. Journal of Experimental Medicine. 5. 1519–1531.
- GARONE, L.;** Edmunds, T.; Hanson, E.; Bernasconi, R.; Huntington, J. A.; Meagher, J. L.; Fan, B.; Gettins, P. G. *Antithrombin-heparin affinity reduced by fucosylation of carbohydrate at asparagine 155*; 1996. Biochemistry. 27. 8881–8889.
- GAWLITZEK, M.;** Ryll, T.; Lofgren, J.; Sliwkowski, M. B. *Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms*; 2000. Biotechnology and Bioengineering. 6. 637–646.
- GAWLITZEK, M.;** Valley, U.; Wagner, R. *Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells*; 1998. Biotechnology and bioengineering. 5. 518–528.

Literaturverzeichnis

GENG, X.; Kong, X.; Hu, H.; Chen, J.; Yang, F.; Liang, H.; Chen, X.; Hu, Y. *Research and development of therapeutic mAbs: An analysis based on pipeline projects*; 2015. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 12. 2769–2776.

GHADERI, D.; Strauss, H. M.; Reinke, S.; Cirak, S.; Reutter, W.; Lucka, L.; Hinderlich, S. *Evidence for dynamic interplay of different oligomeric states of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase by biophysical methods*; 2007. Journal of Molecular Biology. 3. 746–758.

GHADERI, D.; Zhang, M.; Hurtado-Ziola, N.; Varki, A. *Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation*; 2012. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 1. 147–176.

GHANNAM, A.; Sellier, P.; Fain, O.; Martin, L.; Ponard, D.; Drouet, C. *C1 Inhibitor as a glycoprotein: The influence of polysaccharides on its function and autoantibody target*; 2016. Molecular Immunology. 161–165.

GILL, D. J.; Tham, K. M.; Chia, J.; Wang, S. C.; Steentoft, C.; Clausen, H.; Bard-Chapeau, E. A.; Bard, F. A. *Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness*; 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 34. E3152-61.

GOEDE, V.; Fischer, K.; Busch, R.; Engelke, A.; Eichhorst, B.; Wendtner, C. M.; Chagorova, T.; La Serna, J. de; Dilhuydy, M.-S.; Illmer, T.; Opat, S.; Owen, C. J.; Samoylova, O.; Kreuzer, K.-A.; Stilgenbauer, S.; Döhner, H.; Langerak, A. W.; Ritgen, M.; Kneba, M.; Asikanius, E.; Humphrey, K.; Wenger, M.; Hallek, M. *Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions*; 2014. The New England journal of medicine. 12. 1101–1110.

GOETZE, A. M.; Liu, Y. D.; Zhang, Z.; Shah, B.; Lee, E.; Bondarenko, P. V.; Flynn, G. C. *High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans*; 2011. Glycobiology. 7. 949–959.

GOH, J. B.; Ng, S. K. *Impact of host cell line choice on glycan profile*; 2018. Critical Reviews in Biotechnology. 6. 851–867.

GOMORD, V.; Chamberlain, P.; Jefferis, R.; Faye, L. *Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities*; 2005. Trends in biotechnology. 11. 559–565.

GRAHAM, A.; Kalsheker, N. A.; Bamforth, F. J.; Newton, C. R.; Markham, A. F. *Molecular characterisation of two alpha-1-antitrypsin deficiency variants: proteinase inhibitor (Pi) Null(Newport) (Gly115----Ser) and (Pi) Z Wrexham (Ser-19----Leu)*; 1990. Human genetics. 5. 537–540.

GRAHAM, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*; 1977. Journal of General Virology. 1. 59–74.

GRAINGER, R. K.; James, D. C. *CHO cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation*; 2013. Biotechnology and Bioengineering. 11. 2970–2983.

GRAMER, M. J.; Eckblad, J. J.; Donahue, R.; Brown, J.; Shultz, C.; Vickerman, K.; Priem, P.; van den Bremer, E. T. J.; Gerritsen, J.; van Berkel, P. H. C. *Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose*; 2011. Biotechnology and bioengineering. 7. 1591–1602.

GRAMER, M. J.; Goochee, C. F. *Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant*; 1993. Biotechnology progress. 4. 366–373.

GRAMER, M. J.; Goochee, C. F. *Glycosidase activities of the 293 and NS0 cell lines, and of an antibody-producing hybridoma cell line*; 1994. Biotechnology and bioengineering. 5. 423–428.

GRAMER, M. J.; Goochee, C. F.; Chock, V. Y.; Brousseau, D. T.; Sliwkowski, M. B. *Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase*; 1995. Bio/technology (Nature Publishing Company). 7. 692–698.

GRAMMATIKOS, S. I.; Valley, U.; Nimitz, M.; Conradt, H. S.; Wagner, R. *Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity: a mechanism of ammonium action on protein glycosylation*; 1998. Biotechnology progress. 3. 410–419.

GRAMPP, G.; Ramanan, S. *The Diversity of Biosimilar Design and Development: Implications for Policies and Stakeholders*; 2015. Biodrugs. 365–372.

Monoclonal Antibodies Market Size verfügbar auf <http://grandviweresearch.com/industry-analysis/monoclonal-antibodies-market>; 2017. Grand View Research.

Literaturverzeichnis

GRUENBERG, J. C.; Smallridge, R. C.; Rosenberg, R. D. *Inherited antithrombin-III deficiency causing mesenteric venous infarction: a new clinical entity*; 1975. *Annals of Surgery*. 6. 791–794.

GU, X.; Wang, D. I. C. *Improvement of interferon- γ sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine*; 1998. *Biotechnology and Bioengineering*. 6. 642–648.

HALIM, A.; Brinkmalm, G.; Rüttschi, U.; Westman-Brinkmalm, A.; Portelius, E.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Larson, G.; Nilsson, J. *Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid β -peptides in human cerebrospinal fluid*; 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 29. 11848–11853.

HANISCH, F. G. *O-glycosylation of the mucin type*; 2001. *Biological chemistry*. 2. 143–149.

HÅRD, K.; Mekking, A.; Damm, J. B.; Kamerling, J. P.; Boer, W. de; Wijnands, R. A.; Vliegthart, J. F. *Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells*; 1990. *European journal of biochemistry*. 1. 263–271.

HASILIK, A.; Neufeld, E. F. *Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues*; 1980a. *The Journal of biological chemistry*. 10. 4946–4950.

HASILIK, A.; Neufeld, E. F. *Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight*; 1980b. *The Journal of biological chemistry*. 10. 4937–4945.

HAYTER, P. M.; Curling, E. M.; Baines, A. J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P. G.; Bull, A. T. *Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture*; 1991. *Applied microbiology and biotechnology*. 5. 559–564.

HAYTER, P. M.; Curling, E. M.; Baines, A. J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P. G.; Tong, J. M.; Bull, A. T. *Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma*; 1992. *Biotechnology and Bioengineering*. 3. 327–335.

HERSCOVICS, A. *Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis*; 1999. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1. 96–107.

HERZOG, B. H.; Fu, J.; Xia, L. *Mucin-type O-glycosylation is critical for vascular integrity*; 2014. *Glycobiology*. 12. 1237–1241.

HIATT, A.; Bohorova, N.; Bohorov, O.; Goodman, C.; Kim, D.; Pauly, M. H.; Velasco, J.; Whaley, K. J.; Piedra, P. A.; Gilbert, B. E.; Zeitlin, L. *Glycan variants of a respiratory syncytial virus antibody with enhanced effector function and in vivo efficacy*; 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 16. 5992–5997.

HIGAI, K.; Ishihara, S.; Matsumoto, K. *NFkappaB-p65 dependent transcriptional regulation of glycosyltransferases in human colon adenocarcinoma HT-29 by stimulation with tumor necrosis factor alpha*; 2006. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 12. 2372–2377.

HIGEL, F.; Seidl, A.; Sörgel, F.; Friess, W. *N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins*; 2016. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 94–100.

HOBBS, S. M.; Jackson, L. E.; Hoadley, J. *Interaction of aglycosyl immunoglobulins with the IgG Fc transport receptor from neonatal rat gut: Comparison of deglycosylation by tunicamycin treatment and genetic engineering*; 1992. *Molecular Immunology*. 7-8. 949–956.

HODONICZKY, J.; Zheng, Y. Z.; James, D. C. *Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro*; 2005. *Biotechnology progress*. 6. 1644–1652.

HOLMES, M. D.; Brantly, M. L.; Fells, G. A.; Crystal, R. G. *α 1-Antitrypsin Wbethesda: Molecular basis of an unusual α 1-antitrypsin deficiency variant*; 1990. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 3. 1013–1020.

HOSOKAWA, N.; Tremblay, L. O.; You, Z.; Herscovics, A.; Wada, I.; Nagata, K. *Enhancement of Endoplasmic Reticulum (ER) Degradation of Misfolded Null Hong Kong α 1 -Antitrypsin by Human ER Mannosidase I*; 2003. *Journal of Biological Chemistry*. 28. 26287–26294.

HOSSLER, P.; Khattak, S. F.; Li, Z. J. *Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture*; 2009. *Glycobiology*. 9. 936–949.

Literaturverzeichnis

HOSSLER, P.; Racicot, C.; Chumsae, C.; McDermott, S.; Cochran, K. *Cell culture media supplementation of infrequently used sugars for the targeted shifting of protein glycosylation profiles*; 2017. *Biotechnology progress*. 2. 511–522.

IGURA, M.; Maita, N.; Kamishikiryo, J.; Yamada, M.; Obita, T.; Maenaka, K.; Kohda, D. *Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase*; 2008. *The EMBO journal*. 1. 234–243.

IHARA, H.; Ikeda, Y.; Koyota, S.; Endo, T.; Honke, K.; Taniguchi, N. *A catalytically inactive beta 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) behaves as a dominant negative GnT-III inhibitor*; 2002a. *European journal of biochemistry*. 1. 193–201.

IHARA, H.; Ikeda, Y.; Koyota, S.; Endo, T.; Honke, K.; Taniguchi, N. *A catalytically inactive β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) behaves as a dominant negative GnT-III inhibitor*; 2002b. *European journal of biochemistry*. 1. 193–201.

IIDA, S.; Kuni-Kamochi, R.; Mori, K.; Misaka, H.; Inoue, M.; Okazaki, A.; Shitara, K.; Satoh, M. *Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood*; 2009. *BMC cancer*. 58.

IKEDA, Y.; Taniguchi, N. *Enzymatic Properties and Biological Functions of .BETA.1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III*; 2001. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 70. 167–176.

IRIE, A.; Suzuki, A. *CMP-N-Acetylneuraminic acid hydroxylase is exclusively inactive in humans*; 1998. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2. 330–333.

ISAJI, T.; Kariya, Y.; Xu, Q.; Fukuda, T.; Taniguchi, N.; Gu, J. 2010. *Functional Roles of the Bisecting GlcNAc in Integrin-Mediated Cell Adhesion*. in: Fukuda, Minoru. 445–459.

IVARSSON, M.; Villiger, T. K.; Morbidelli, M.; Soos, M. *Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation*; 2014. *Journal of biotechnology*. 88–96.

JAFFÉ, S. R. P.; Strutton, B.; Levarski, Z.; Pandhal, J.; Wright, P. C. *Escherichia coli as a glycoprotein production host: recent developments and challenges*; 2014. *Current opinion in biotechnology*. 205–210.

JAYME, D.; Watanabe, T.; Shimada, T. *Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective*; 1997. *Cytotechnology*. 1-3. 95–101.

- JEFFERIS, R.** *Glycosylation of recombinant antibody therapeutics*; 2005. *Biotechnology progress*. 1. 11–16.
- JEFFERIS, R.** *Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics*; 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2. 159–166.
- JEFFERIS, R.** *Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics*; 2016. *Journal of immunology research*. 5358272.
- JELKMANN, W.** *Biosimilar epoetins and other “follow-on” biologics: Update on the European experiences*; 2010. *American Journal of Hematology*. 10. 771–780.
- JELKMANN, W.** *The ESA scenario gets complex: from biosimilar epoetins to activin traps*; 2015. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 4. 553–559.
- JENSEN, P. H.; Karlsson, N. G.; Kolarich, D.; Packer, N. H.** *Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins*; 2012. *Nature Protocols*. 7. 1299–1310.
- JEPPSSON, J. O.; Laurell, C. B.; Fagerhol, M.** *Properties of isolated human alpha1-antitrypsins of Pi types M, S and Z*; 1978. *European journal of biochemistry*. 1. 143–153.
- JOHANSEN, H.; Sutiphong, J.; Sathe, G.; Jacobs, P.; Cravador, A.; Bollen, A.; Rosenberg, M.; Shatzman, A.** *High-level production of fully active human alpha 1-antitrypsin in Escherichia coli*; 1987. *Molecular biology & medicine*. 5. 291–305.
- JONES, D.; Kroos, N.; Anema, R.; van Montfort, B.; Vooy, A.; van der Kraats, S.; van der Helm, E.; Smits, S.; Schouten, J.; Brouwer, K.; Lagerwerf, F.; van Berkel, P.; Opstelten, D.-J.; Logtenberg, T.; Bout, A.** *High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6*; 2003. *Biotechnology progress*. 1. 163–168.
- KAMIŃSKA, J.; Dziecioł, J.; Kościelak, J.** *Triazine dyes as inhibitors and affinity ligands of glycosyltransferases*; 1999. *Glycoconjugate journal*. 11. 719–723.
- KANDA, Y.; Yamada, T.; Mori, K.; Okazaki, A.; Inoue, M.; Kitajima-Miyama, K.; Kuni-Kamochi, R.; Nakano, R.; Yano, K.; Kakita, S.; Shitara, K.; Satoh, M.** *Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types*; 2007. *Glycobiology*. 1. 104–118.

Literaturverzeichnis

- KANDA, Y.;** Yamane-Ohnuki, N.; Sakai, N.; Yamano, K.; Nakano, R.; Inoue, M.; Misaka, H.; Iida, S.; Wakitani, M.; Konno, Y.; Yano, K.; Shitara, K.; Hosoi, S.; Satoh, M. *Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC*; 2006. *Biotechnology and Bioengineering*. 4. 680–688.
- KANEKO, Y.;** Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V. *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation*; 2006. *Science (New York, N.Y.)*. 5787. 670–673.
- KAUFMAN, R. J.;** Swaroop, M.; Murtha-Riel, P. *Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells*; 1994. *Biochemistry*. 33. 9813–9819.
- KAUFMANN, H.;** Mazur, X.; Fussenegger, M.; Bailey, J. E. *Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells*; 1999. *Biotechnology and Bioengineering*. 5. 573–582.
- KELLEHER, D. J.;** Gilmore, R. *An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase*; 2006. *Glycobiology*. 4. 47R-62R.
- KIM, J. K.;** Tsen, M. F.; Ghetie, V.; Ward, E. S. *Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis*; 1994a. *European journal of immunology*. 3. 542–548.
- KIM, J. K.;** Tsen, M. F.; Ghetie, V.; Ward, E. S. *Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor*; 1994b. *European journal of immunology*. 10. 2429–2434.
- KIM, J. Y.;** Kim, Y.-G.; Lee, G. M. *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*; 2012. *Applied microbiology and biotechnology*. 3. 917–930.
- KLING, J.** *First US approval for a transgenic animal drug*; 2009. *Nature Biotechnology*. 4. 302–303.
- KOIDE, N.;** Nose, M.; Muramatsu, T. *Recognition of IgG by Fc receptor and complement: effects of glycosidase digestion*; 1977. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 4. 838–844.
-

KOLARICH, D.; Weber, A.; Turecek, P. L.; Schwarz, H.-P.; Altmann, F. *Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms*; 2006. *Proteomics*. 11. 3369–3380.

KONDO, H.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. *beta.-Sialyl phosphite and phosphoramidite: synthesis and application to the chemoenzymic synthesis of CMP-sialic acid and sialyl oligosaccharides*; 1992. *Journal of the American Chemical Society*. 22. 8748–8750.

KONKLE, B. A.; Bauer, K. A.; Weinstein, R.; Greist, A.; Holmes, H. E.; Bonfiglio, J. *Use of recombinant human antithrombin in patients with congenital antithrombin deficiency undergoing surgical procedures*; 2003. *Transfusion*. 3. 390–394.

KONNO, Y.; Kobayashi, Y.; Takahashi, K.; Takahashi, E.; Sakae, S.; Wakitani, M.; Yamano, K.; Suzawa, T.; Yano, K.; Ohta, T.; Koike, M.; Wakamatsu, K.; Hosoi, S. *Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity*; 2012. *Cytotechnology*. 3. 249–265.

KORTE, W. *Catridecacog: a breakthrough in the treatment of congenital factor XIII A-subunit deficiency?*; 2014. *Journal of Blood Medicine*. 107.

KOST, T. A.; Condreay, J. P.; Jarvis, D. L. *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells*; 2005. *Nature Biotechnology*. 5. 567–575.

KRÄMER, O. *RNAi-vermittelter knockdown zur Identifikation von Zielgenen für die Verbesserung von Produktionszelllinien*.

KRAPP, S.; Mimura, Y.; Jefferis, R.; Huber, R.; Sondermann, P. *Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity*; 2003. *Journal of Molecular Biology*. 5. 979–989.

KRISTIANSEN, T. Z.; Bunkenborg, J.; Gronborg, M.; Molina, H.; Thuluvath, P. J.; Argani, P.; Goggins, M. G.; Maitra, A.; Pandey, A. *A proteomic analysis of human bile*; 2004. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 7. 715–728.

KU, S. C. Y.; Ng, D. T. W.; Yap, M. G. S.; Chao, S.-H. *Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells*; 2008. *Biotechnology and bioengineering*. 1. 155–164.

Literaturverzeichnis

- KUNKEL, J. P.;** Jan, D. C.; Butler, M.; Jamieson, J. C. *Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors*; 2000. *Biotechnology progress*. 3. 462–470.
- KUNKEL, J. P.;** Jan, D. C.H.; Jamieson, J. C.; Butler, M. *Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody*; 1998. *Journal of biotechnology*. 1. 55–71.
- KUNTZ, D. A.;** Zhong, W.; Guo, J.; Rose, D. R.; Boons, G.-J. *The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase II by mannosatin A*; 2009. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2. 268–277.
- KURIAKOSE, A.;** Chirmule, N.; Nair, P. *Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications*; 2016. *Journal of immunology research*. 1298473.
- KWON, K. S.;** Song, M.; Yu, M. H. *Purification and characterization of alpha 1-antitrypsin secreted by recombinant yeast Saccharomyces diastaticus*; 1995. *Journal of biotechnology*. 3. 191–195.
- LAI, P. H.;** Everett, R.; Wang, F. F.; Arakawa, T.; Goldwasser, E. *Structural characterization of human erythropoietin*; 1986. *The Journal of biological chemistry*. 7. 3116–3121.
- LAI, T.;** Yang, Y.; Ng, S. *Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production*; 2013. *Pharmaceuticals*. 5. 579–603.
- LAIRSON, L. L.;** Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*; 2008. *Annual review of biochemistry*. 521–555.
- LALONDE, M.-E.;** Durocher, Y. *Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells*; 2017. *Journal of biotechnology*. 128–140.
- LAMANNA, W. C.;** Holzmann, J.; Cohen, H. P.; Guo, X.; Schweigler, M.; Stangler, T.; Seidl, A.; Schiestl, M. *Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals*; 2018. *Expert opinion on biological therapy*. 4. 369–379.
- LAO, M. S.;** Toth, D.; Danell, G.; Schalla, C. *Degradative activities in a recombinant chinese hamster ovary cell culture*; 1996. *Cytotechnology*. 1-3. 43–52.
-

- LEE, E. U.;** Roth, J.; Paulson, J. C. *Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase*; 1989. *The Journal of biological chemistry*. 23. 13848–13855.
- LEWANDROWSKI, U.;** Moebius, J.; Walter, U.; Sickmann, A. *Elucidation of N-Glycosylation Sites on Human Platelet Proteins*; 2006. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2. 226–233.
- LEYMARIE, N.;** Zaia, J. *Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptide structural analysis*; 2012. *Analytical chemistry*. 7. 3040–3048.
- LI, M.-Y.;** Ebel, B.; Paris, C.; Chauchard, F.; Guedon, E.; Marc, A. *Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures*; 2018. *Biotechnology progress*. 2. 486–493.
- LIN, H.;** Leighty, R. W.; Godfrey, S.; Wang, S. B. *Principles and approach to developing mammalian cell culture media for high cell density perfusion process leveraging established fed-batch media*; 2017. *Biotechnology progress*. 4. 891–901.
- LINGG, N.;** Zhang, P.; Song, Z.; Bardor, M. *The sweet tooth of biopharmaceuticals: importance of recombinant protein glycosylation analysis*; 2012. *Biotechnology journal*. 12. 1462–1472.
- LIPSCOMB, M. L.;** Palomares, L. A.; Hernández, V.; Ramírez, O. T.; Kompala, D. S. *Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells*; 2005. *Biotechnology progress*. 1. 40–49.
- LIU, B.;** Spearman, M.; Doering, J.; Lattová, E.; Perreault, H.; Butler, M. *The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody*; 2014. *Journal of biotechnology*. 17–27.
- LIU, B.;** Villacres-Barragan, C.; Lattova, E.; Spearman, M.; Butler, M. *Differential affects of low glucose on the macroheterogeneity and microheterogeneity of glycosylation in CHO-EG2 camelid monoclonal antibodies*; 2013. *BMC Proceedings*. Suppl 6. P112.
- LIU, H.;** Nowak, C.; Shao, M.; Ponniah, G.; Neill, A. *Impact of cell culture on recombinant monoclonal antibody product heterogeneity*; 2016. *Biotechnology progress*. 5. 1103–1112.

Literaturverzeichnis

- LIU, L.** *Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins*; 2015. Journal of pharmaceutical sciences. 6. 1866–1884.
- LIU, L.**; Stadheim, A.; Hamuro, L.; Pittman, T.; Wang, W.; Zha, D.; Hochman, J.; Prueksaritanont, T. *Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized Pichia pastoris with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials*; 2011. Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization. 4. 205–210.
- LIU, T.**; Qian, W.-J.; Gritsenko, M. A.; Camp, D. G. 2.; Monroe, M. E.; Moore, R. J.; Smith, R. D. *Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry*; 2005. Journal of proteome research. 6. 2070–2080.
- MA, B.**; Simala-Grant, J. L.; Taylor, D. E. *Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes*; 2006. Glycobiology. 12. 158R-184R.
- MACDOUGALL, I. C.**; Gray, S. J.; Elston, O.; Breen, C.; Jenkins, B.; Browne, J.; Egrie, J. *Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients*; 1999. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 11. 2392–2395.
- MACHER, B. A.**; Galili, U. *The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance*; 2008. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2. 75–88.
- MARQUARDT, T.**; Denecke, J. *Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies*; 2003. European journal of pediatrics. 6. 359–379.
- MCCARTHY, C.**; Saldoval, R.; Wormald, M. R.; Rudd, P. M.; McElvaney, N. G.; Reeves, E. P. *The Role and Importance of Glycosylation of Acute Phase Proteins with Focus on Alpha-1 Antitrypsin in Acute and Chronic Inflammatory Conditions*; 2014. Journal of proteome research. 7. 3131–3143.
- MCCRACKEN, N. A.**; Kowle, R.; Ouyang, A. *Control of galactosylated glycoforms distribution in cell culture system*; 2014. Biotechnology progress. 3. 547–553.
- MIKHAIL, A.**; Farouk, M. *Epoetin Biosimilars in Europe: Five Years On*; 2013. Advances in Therapy. 1. 28–40.
-

MINTA, J. O. *The role of sialic acid in the functional activity and the hepatic clearance of C1-INH*; 1981. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1. 245–249.

MISAKI, R.; Fujiyama, K.; Seki, T. *Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell*; 2006. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 4. 1184–1189.

MIZUOCHI, T.; Fujii, J.; Kurachi, K.; Kobata, A. *Structural studies of the carbohydrate moiety of human antithrombin III*; 1980. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1. 458–465.

Mohammed Al-Rubeai. *Glycosylation*; 2002.

MOORKENS, E.; Meuwissen, N.; Huys, I.; Declerck, P.; Vulto, A. G.; Simoons, S. *The Market of Biopharmaceutical Medicines: A Snapshot of a Diverse Industrial Landscape*; 2017. *Frontiers in Pharmacology*.

MORI, K.; Iida, S.; Yamane-Ohnuki, N.; Kanda, Y.; Kuni-Kamochi, R.; Nakano, R.; Imai-Nishiya, H.; Okazaki, A.; Shinkawa, T.; Natsume, A.; Niwa, R.; Shitara, K.; Satoh, M. *Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies*; 2007. *Cytotechnology*. 2-3. 109–114.

MORZUNOVA, T. G. *Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review)*; 2006. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 3. 158–170.

MULLOY, B.; Hart G.W.; Stanley P. 2009. *Structural Analysis of Glycans*. in: Varki, Ajit.

MUNZERT, E.; Heidemann, R.; Büntemeyer, H.; Lehmann, J.; Müthing, J. *Production of recombinant human antithrombin III on 20-L bioreactor scale: Correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein*; 1997. *Biotechnology and Bioengineering*. 4. 441–448.

MUNZERT, E.; Müthing, J.; Büntemeyer, H.; Lehmann, J. 1995. *Sialidase Activity in Culture Fluid of Chinese Hamster Ovary Cells During Batch Culture and Its Effect on Recombinant Glycoprotein Integrity*. in: Beuvery, E. C.; Griffiths, J. B.; Zeijlemaker, W. P. 421–425.

MÜTHING, J.; Kemminer, S. E.; Conradt, H. S.; Sagi, D.; Nimtz, M.; Kärst, U.; Peter-Katalinić, J. *Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24*; 2003. *Biotechnology and Bioengineering*. 3. 321–334.

Literaturverzeichnis

- MYLLYHARJU, J.** *Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms*; 2004. Trends in Genetics. 1. 33–43.
- NARASIMHAN, S.** *Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc:glycopeptide beta 4-N-acetylglucosaminyltransferase III, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in beta 1-4 linkage to the beta-linked mannose of the trimannosyl core of N-glycosyl oligosaccharides*; 1982. The Journal of biological chemistry. 17. 10235–10242.
- NELSON, A. L.**; Dhimolea, E.; Reichert, J. M. *Development trends for human monoclonal antibody therapeutics*; 2010. Nature reviews. Drug discovery. 10. 767–774.
- NIKLAS, J.**; Schrader, E.; Sandig, V.; Noll, T.; Heinzle, E. *Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis*; 2011. Bioprocess and biosystems engineering. 5. 533–545.
- NILSSON, J.**; Rüttschi, U.; Halim, A.; Hesse, C.; Carlsohn, E.; Brinkmalm, G.; Larson, G. *Enrichment of glycopeptides for glycan structure and attachment site identification*; 2009. Nature methods. 11. 809–811.
- NIMMERJAHN, F.**; Ravetch, J. V. *Anti-Inflammatory Actions of Intravenous Immunoglobulin*; 2008. Annual review of immunology. 1. 513–533.
- NITA, I.**; Hollander, C.; Westin, U.; Janciauskiene, S.-M. *Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human alpha1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release*; 2005. Respiratory research. 12.
- NOGUCHI, A.**; Mukuria, C. J.; Suzuki, E.; Naiki, M. *Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells*; 1995. Journal of biochemistry. 1. 59–62.
- NOSE, M.**; Wigzell, H. *Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies*; 1983. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 21. 6632–6636.
- NOVAK, J.**; Tomana, M.; Kilian, M.; Coward, L.; Kulhavy, R.; Barnes, S.; Mestecky, J. *Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1*; 2000. Molecular Immunology. 17. 1047–1056.
-

NUSSBERGER, J.; Cugno, M.; Amstutz, C.; Cicardi, M.; Pellacani, A.; Agostoni, A. *Plasma bradykinin in angio-oedema*; 1998. The Lancet. 9117. 1693–1697.

NYBERG, G. B.; Balcarcel, R. R.; Follstad, B. D.; Stephanopoulos, G.; Wang, D. I. *Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells*; 1999. Biotechnology and Bioengineering. 3. 336–347.

NZEAKO, U. C. *Hereditary Angioedema*; 2001. Archives of internal medicine. 20. 2417.

OLSON, S. T.; Frances-Chmura, A. M.; Swanson, R.; Björk, I.; Zettlmeissl, G. *Effect of Individual Carbohydrate Chains of Recombinant Antithrombin on Heparin Affinity and on the Generation of Glycoforms Differing in Heparin Affinity*; 1997. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2. 212–221.

PACCALET, T.; Bardor, M.; Rihouey, C.; Delmas, F.; Chevalier, C.; D'Aoust, M.-A.; Faye, L.; Vézina, L.; Gomord, V.; Lerouge, P. *Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes*; 2007. Plant Biotechnology Journal. 1. 16–25.

PACIS, E.; Yu, M.; Autsen, J.; Bayer, R.; Li, F. *Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation--what affects high mannose 5 glycoform*; 2011. Biotechnology and bioengineering. 10. 2348–2358.

PADLER-KARAVANI, V.; Varki, A. *Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk*; 2011. Xenotransplantation. 1. 1–5.

PADLER-KARAVANI, V.; Yu, H.; Cao, H.; Chokhawala, H.; Karp, F.; Varki, N.; Chen, X.; Varki, A. *Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease*; 2008. Glycobiology. 10. 818–830.

Parodi, A., et al. *Glycans in Glycoprotein Quality Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.

PARODI, A. J. *Protein Glucosylation and Its Role in Protein Folding*; 2000. Annual review of biochemistry. 1. 69–93.

PARR, D.; Lara, B. *Clinical utility of alpha-1 proteinase inhibitor in the management of adult patients with severe alpha-1 antitrypsin deficiency: a review of the current literature*; 2017. Drug Design, Development and Therapy. 2149–2162.

Literaturverzeichnis

- PERKINS, S. J.;** Smith, K. F.; Amatayakul, S.; Ashford, D.; Rademacher, T. W.; Dwek, R. A.; Lachmann, P. J.; Harrison, R. A. *Two-domain structure of the native and reactive centre cleaved forms of C inhibitor of human complement by neutron scattering*; 1990. *Journal of Molecular Biology*. 3. 751–763.
- PETER - KATALINIĆ, J.** 2005. *Methods in Enzymology: O - Glycosylation of Proteins*. in: Burlingame, A. L. 139–171.
- PETERS, C.;** Brown, S. *Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics*; 2015. *Bioscience reports*. 4.
- PETRICCIANI, J.;** Sheets, R. *An overview of animal cell substrates for biological products*; 2008. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 6. 359–362.
- RADEMACHER, T. W.;** Parekh, R. B.; Dwek, R. A. *Glycobiology*; 1988. *Annual review of biochemistry*. 785–838.
- RADHAKRISHNAN, P.;** Dabelsteen, S.; Madsen, F. B.; Francavilla, C.; Kopp, K. L.; Steentoft, C.; Vakhrushev, S. Y.; Olsen, J. V.; Hansen, L.; Bennett, E. P.; Woetmann, A.; Yin, G.; Chen, L.; Song, H.; Bak, M.; Hlady, R. A.; Peters, S. L.; Opavsky, R.; Thode, C.; Qvortrup, K.; Schjoldager, K. T.-B. G.; Clausen, H.; Hollingsworth, M. A.; Wandall, H. H. *Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features*; 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 39. E4066-75.
- RAJU, T. S.** *Glycosylation variations with expression systems and their impact on biological activity of therapeutic immunoglobulins*; 2003. *BioProcess Int*. 44–53.
- RAJU, T. S.** *Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs*; 2008. *Current opinion in immunology*. 4. 471–478.
- RASHEED, S.;** Nelson-Rees, W. A.; Toth, E. M.; Arnstein, P.; Gardner, M. B. *Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)*; 1974. *Cancer*. 4. 1027–1033.
- REBOUL, A.;** Prandini, M. H.; Colomb, M. G. *Proteolysis and deglycosylation of human C1 inhibitor. Effect on functional properties*; 1987. *Biochemical Journal*. 1. 117–121.
- REFAEI, M.;** Xing, L.; Lim, W.; Crowther, M.; Boonyawat, K. *Management of Venous Thromboembolism in Patients with Hereditary Antithrombin Deficiency and Pregnancy: Case*
-

Report and Review of the Literature; 2017. *Case Reports in Hematology*. 6, article no. 600. 1–11.

REICHERT, J. M.; Rosensweig, C. J.; Faden, L. B.; Dewitz, M. C. *Monoclonal antibody successes in the clinic*; 2005. *Nature biotechnology*. 9. 1073–1078.

RILLAHAN, C. D.; Antonopoulos, A.; Lefort, C. T.; Sonon, R.; Azadi, P.; Ley, K.; Dell, A.; Haslam, S. M.; Paulson, J. C. *Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome*; 2012. *Nature chemical biology*. 7. 661–668.

ROBBE, C.; Capon, C.; Coddeville, B.; Michalski, J.-C. *Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract*; 2004. *The Biochemical journal*. Pt 2. 307–316.

ROBLEDO, Y.; Marigómez, I.; Angulo, E.; Cajaraville, M. P. *Glycosylation and sorting pathways of lysosomal enzymes in mussel digestive cells*; 2006. *Cell and tissue research*. 2. 319–333.

RODRIGUEZ, J.; Spearman, M.; Huzel, N.; Butler, M. *Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions*; 2005. *Biotechnology progress*. 1. 22–30.

ROLL, D.; Aguanno, J. J.; Coffee, C. F.; Glew, R. H.; Iammarino, R. M. *Comparison of the carbohydrate and amino acid composition of normal and S-variant alpha-1-antitrypsin*; 1978. *Biochimica et biophysica acta*. 1. 171–178.

ROTHMAN, R. J.; Perussia, B.; Herlyn, D.; Warren, L. *Antibody-dependent cytotoxicity mediated by natural killer cells is enhanced by castanospermine-induced alterations of IgG glycosylation*; 1989. *Molecular Immunology*. 12. 1113–1123.

RUDD, P. M. *Glycosylation and the Immune System*; 2001. *Science*. 5512. 2370–2376.

RUDD, P. M.; Endo, T.; Colominas, C.; Groth, D.; Wheeler, S. F.; Harvey, D. J.; Wormald, M. R.; Serban, H.; Prusiner, S. B.; Kobata, A.; Dwek, R. A. *Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms*; 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 23. 13044–13049.

RUDDOCK, L. W.; Molinari, M. *N-glycan processing in ER quality control*; 2006. *Journal of cell science*. Pt 21. 4373–4380.

Literaturverzeichnis

- RUNKEL, L.;** Meier, W.; Pepinsky, R. B.; Karpusas, M.; Whitty, A.; Kimball, K.; Brickelmaier, M.; Muldowney, C.; Jones, W.; Goelz, S. E. *Structural and Functional Differences Between Glycosylated and Non-glycosylated Forms of Human Interferon- β (IFN- β)*; 1998. *Pharmaceutical Research*. 4. 641–649.
- RYLL, T.;** Valley, U.; Wagner, R. *Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells*; 1994. *Biotechnology and bioengineering*. 2. 184–193.
- SALMONSON, T.;** Danielson, B. G.; Wikström, B. *The pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration to healthy subjects*; 1990. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 6. 709–713.
- SAMUELSSON, A.;** Towers, T. L.; Ravetch, J. V. *Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor*; 2001. *Science (New York, N.Y.)*. 5503. 484–486.
- SANDHAUS, R. A.;** Turino, G.; Brantly, M. L.; Campos, M.; Cross, C. E.; Goodman, K.; Hogarth, D. K.; Knight, S. L.; Stocks, J. M.; Stoller, J. K.; Strange, C.; Teckman, J. *The Diagnosis and Management of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in the Adult*; 2016. *Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation*. 3. 668–682.
- SANZ-NEBOT, V.;** Benavente, F.; Vallverdú, A.; Guzman, N. A.; Barbosa, J. *Separation of Recombinant Human Erythropoietin Glycoforms by Capillary Electrophoresis Using Volatile Electrolytes. Assessment of Mass Spectrometry for the Characterization of Erythropoietin Glycoforms*; 2003. *Analytical Chemistry*. 19. 5220–5229.
- SATOH, M.;** Iida, S.; Shitara, K. *Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies*; 2006. *Expert opinion on biological therapy*. 11. 1161–1173.
- SBURLATI, A. R.;** Umaña, P.; Prati, E. G.; Bailey, J. E. *Synthesis of bisected glycoforms of recombinant IFN-beta by overexpression of beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III in Chinese hamster ovary cells*; 1998. *Biotechnology progress*. 2. 189–192.
- SCHACHTER, H.** *The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches*; 2000. *Glycoconjugate journal*. 7-9. 465–483.
- SCHÄHS, M.;** Strasser, R.; Stadlmann, J.; Kunert, R.; Rademacher, T.; Steinkellner, H. *Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern*; 2007. *Plant Biotechnology Journal*. 5. 657–663.
-

- SCHAUER, R.** *Achievements and Challenges of Sialic Acid Research*; 2000. Glycoconjugate journal. 7/9. 485–499.
- SCHAUER, R.** *Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions*; 2009. Current opinion in structural biology. 5. 507–514.
- SCHENK, B.;** Fernandez, F.; Waechter, C. J. *The ins(ide) and outs(ide) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum*; 2001. Glycobiology. 5. 61R-70R.
- SCHIEDNER, G.;** Hertel, S.; Bialek, C.; Kewes, H.; Waschutzka, G.; Volpers, C. *Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection*; 2008. BMC biotechnology. 13.
- SCHJOLDAGER, K. T.-B. G.;** Clausen, H. *Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family*; 2012. Biochimica et biophysica acta. 12. 2079–2094.
- SCHMELZER, A. E.;** Miller, W. M. *Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content*; 2002. Biotechnology progress. 2. 346–353.
- SCHNEIDER, M.** *The importance of ammonia in mammalian cell culture*; 1996. Journal of biotechnology. 3. 161–185.
- SCHWAB, I.;** Nimmerjahn, F. *Role of sialylation in the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulin - F(ab')₂ versus Fc sialylation*; 2014. Clinical & Experimental Immunology. 97–99.
- SCOTT, A. M.;** Wolchok, J. D.; Old, L. J. *Antibody therapy of cancer*; 2012. Nature Reviews Cancer. 4. 278–287.
- SEO, J. S.;** Kim, Y. J.; Cho, J. M.; Baek, E.; Lee, G. M. *Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 °C and 37.0 °C*; 2013. Applied microbiology and biotechnology. 12. 5283–5291.
- SEO, J. S.;** Min, B. S.; Kim, Y. J.; Cho, J. M.; Baek, E.; Cho, M. S.; Lee, G. M. *Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture*; 2014. Applied microbiology and biotechnology. 8. 3509–3515.

Literaturverzeichnis

- SEYAMA, K.;** Nukiwa, T.; Takabe, K.; Takahashi, H.; Miyake, K.; Kira, S. *Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone*; 1991. The Journal of biological chemistry. 19. 12627–12632.
- SHA, S.;** Agarabi, C.; Brorson, K.; Lee, D.-Y.; Yoon, S. *N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies*; 2016. Trends in biotechnology. 10. 835–846.
- SHAHROKH, Z.;** Royle, L.; Saldova, R.; Bones, J.; Abrahams, J. L.; Artemenko, N. V.; Flatman, S.; Davies, M.; Baycroft, A.; Sehgal, S.; Heartlein, M. W.; Harvey, D. J.; Rudd, P. M. *Erythropoietin Produced in a Human Cell Line (Dynepo) Has Significant Differences in Glycosylation Compared with Erythropoietins Produced in CHO Cell Lines*; 2011. Molecular Pharmaceutics. 1. 286–296.
- SHENTAL-BECHOR, D.;** Levy, Y. *Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization*; 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 24. 8256–8261.
- SHENTAL-BECHOR, D.;** Levy, Y. *Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code*; 2009. Current opinion in structural biology. 5. 524–533.
- SHI, H. H.;** Goudar, C. T. *Recent advances in the understanding of biological implications and modulation methodologies of monoclonal antibody N-linked high mannose glycans*; 2014. Biotechnology and Bioengineering. 10. 1907–1919.
- SHIBATANI, T.;** David, L. L.; McCormack, A. L.; Frueh, K.; Skach, W. R. *Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits*; 2005. Biochemistry. 16. 5982–5992.
- SHIELDS, R. L.;** Lai, J.; Keck, R.; O'Connell, L. Y.; Hong, K.; Meng, Y. G.; Weikert, S. H. A.; Presta, L. G. *Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity*; 2002. The Journal of biological chemistry. 30. 26733–26740.
- SHINKAWA, T.;** Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M.; Hanai, N.; Shitara, K. *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity*; 2003. The Journal of biological chemistry. 5. 3466–3473.
-

- SONDERMANN, P.;** Pincetic, A.; Maamary, J.; Lammens, K.; Ravetch, J. V. *General mechanism for modulating immunoglobulin effector function*; 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 24. 9868–9872.
- SOURROUILLE, C.;** Marquet-Blouin, E.; D'Aoust, M.-A.; Kiefer-Meyer, M.-C.; Seveno, M.; Pagny-Salehabadi, S.; Bardor, M.; Durambur, G.; Lerouge, P.; Vezina, L.; Gomord, V. *Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa*; 2008. Plant Biotechnology Journal. 7. 702–721.
- SPIRO, R. G.;** Spiro M. J. *Studies on the Biosynthesis of the Hydroxylysine-linked Disaccharide Unit of Basement Membranes and Collagens*; 1971. The Journal of biological chemistry. 246. 4899–4909.
- ST AMAND, M. M.;** Radhakrishnan, D.; Robinson, A. S.; Ogunnaike, B. A. *Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy*; 2014. Biotechnology and Bioengineering. 10. 1957–1970.
- Stanley, P., et al. *N-Glycans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.
- STAUDACHER, E.;** Altmann, F.; Wilson, I. B.; März, L. *Fucose in N-glycans: from plant to man*; 1999. Biochimica et biophysica acta. 1. 216–236.
- STAVENHAGEN, K.;** Kayili, H. M.; Holst, S.; Koeleman, C. A. M.; Engel, R.; Wouters, D.; Zeerleder, S.; Salih, B.; Wuhler, M. *N- and O -glycosylation Analysis of Human C1-inhibitor Reveals Extensive Mucin-type O -Glycosylation*; 2018. Molecular & cellular proteomics : MCP. 6. 1225–1238.
- STIMSON, E.;** Hope, J.; Chong, A.; Burlingame, A. L. *Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions*; 1999. Biochemistry. 15. 4885–4895.
- STOCKERT, R. J.** *The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression*; 1995. Physiological reviews. 3. 591–609.
- STRASSER, R.;** Stadlmann, J.; Schähs, M.; Stiegler, G.; Quendler, H.; Mach, L.; Glössl, J.; Weterings, K.; Pabst, M.; Steinkellner, H. *Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure*; 2008. Plant Biotechnology Journal. 4. 392–402.

Literaturverzeichnis

STRECKER, G.; Ollier-Hartmann, M. P.; van Halbeek, H.; Vliegenthart, J. F.; Montreuil, J.; Hartmann, L. *Structure primaire des chaînes glycaniques de l'inhibiteur de C 1 estérase normal (C 1-INH) après l'analyse en RMN à 400 MHz*; 1985. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie. 11. 571–576.

SUN, X.; Goh, P. E.; Wong, K. T. K.; Mori, T.; Yap, M. G. S. *Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension*; 2006. Biotechnology letters. 11. 843–848.

SUNG, Y. H.; Song, Y. J.; Lim, S. W.; Chung, J. Y.; Lee, G. M. *Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells*; 2004. Journal of biotechnology. 3. 323–335.

SURVE, T.; Gadgil, M. *Manganese increases high mannose glycoform on monoclonal antibody expressed in CHO when glucose is absent or limiting: Implications for use of alternate sugars*; 2015. Biotechnology progress. 2. 460–467.

SWIECH, K.; Picanço-Castro, V.; Covas, D. T. *Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production*; 2012. Protein Expression and Purification. 1. 147–153.

SZABO, R.; Netzel-Arnett, S.; Hobson, J. P.; Antalis, T. M.; Bugge, T. H. *Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity*; 2005. The Biochemical journal. Pt 1. 231–242.

TAKAHATA, M.; Iwasaki, N.; Nakagawa, H.; Abe, Y.; Watanabe, T.; Ito, M.; Majima, T.; Minami, A. *Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis*; 2007. Bone. 1. 77–86.

TAKEUCHI, M.; Kobata, A. *Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins*; 1991. Glycobiology. 4. 337–346.

TANGVORANUNTAKUL, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A.; Muchmore, E. *Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid*; 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. 21. 12045–12050.

TAO, M. H.; Morrison, S. L. *Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region*; 1989. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). 8. 2595–2601.

TAPPER, H.; Sundler, R. *Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion*; 1990. *Biochemical Journal*. 2. 407–414.

THORENS, B.; Vassalli, P. *Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion*; 1986. *Nature*. 6070. 618–620.

TILLOU, X.; Poirier, N.; Le Bas-Bernardet, S.; Hervouet, J.; Minault, D.; Renaudin, K.; Vistoli, F.; Karam, G.; Daha, M.; Soullilou, J. P.; Blancho, G. *Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons*; 2010. *Kidney International*. 2. 152–159.

TIPSON, R. S.; Horton, D. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 40; 1982.

TRAN, D. T.; Hagen, K. G. ten. *Mucin-type O-glycosylation during development*; 2013. *The Journal of biological chemistry*. 10. 6921–6929.

TRUMMER, E.; Fauland, K.; Seidinger, S.; Schriebl, K.; Lattenmayer, C.; Kunert, R.; Vorauer-Uhl, K.; Weik, R.; Borth, N.; Katinger, H.; Müller, D. *Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors*; 2006. *Biotechnology and bioengineering*. 6. 1033–1044.

TSUDA, E.; Kawanishi, G.; Ueda, M.; Masuda, S.; Sasaki, R. *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin*; 1990. *European journal of biochemistry*. 2. 405–411.

U.S. approves first drug from DNA-altered animals | Reuters verfügbar auf <https://www.reuters.com/article/us-gtc-atryn/u-s-approves-first-drug-from-dna-altered-animals-idUSTRE5154OE20090206>. 17.06.2018.

SERPINC1 - Antithrombin-III precursor - Homo sapiens (Human) - SERPINC1 gene & protein verfügbar auf https://www.uniprot.org/uniprot/P01008#pathology_and_biotech. UniProt. 17.06.2018.

VAN DEN STEEN, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. *Concepts and principles of O-linked glycosylation*; 1998. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 3. 151–208.

VAN VEEN, H. A.; Koiter, J.; Vogelezang, C. J.M.; van Wessel, N.; van Dam, T.; Velterop, I.; van Houdt, K.; Kupers, L.; Horbach, D.; Salaheddine, M.; Nuijens, J. H.; Mannesse, M. L.M.

Literaturverzeichnis

Characterization of recombinant human C1 inhibitor secreted in milk of transgenic rabbits; 2012. Journal of biotechnology. 2-3. 319–326.

VARKI, A. *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*; 1993. Glycobiology. 2. 97–130.

Varki, A. *Essentials of glycobiology*; 2009. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Varki, A.; Gagneux, P. *Biological Functions of Glycans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.

VILLACRÉS, C.; Tayi, V. S.; Lattová, E.; Perreault, H.; Butler, M. *Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture*; 2015. Biotechnology journal. 7. 1051–1066.

WACKER, M. *N-Linked Glycosylation in Campylobacter jejuni and Its Functional Transfer into E. coli*; 2002. Science. 5599. 1790–1793.

WAGENAAR-BOS, I. G.A.; Hack, C. E. *Structure and Function of C1-Inhibitor*; 2006. Immunology and Allergy Clinics of North America. 4. 615–632.

WALSH, G. *Biopharmaceutical benchmarks 2014*; 2014. Nature biotechnology. 10. 992–1000.

WALSH, G.; Jefferis, R. *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*; 2006. Nature Biotechnology. 10. 1241–1252.

WANG, H.; Morales-Levy, M.; Rose, J.; Mackey, L. C.; Bodary, P.; Eitzman, D.; Homeister, J. *W. $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferases FUT4 and FUT7 control murine susceptibility to thrombosis*; 2013. The American journal of pathology. 6. 2082–2093.

WANG, W. *NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy*; 2015. Frontiers in Immunology.

WEWERS, M. D.; Crystal, R. G. *Alpha-1 Antitrypsin Augmentation Therapy*; 2013. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. sup1. 64–67.

WHEELER, S. F.; Harvey, D. J. *Negative Ion Mass Spectrometry of Sialylated Carbohydrates*; 2000. Analytical Chemistry. 20. 5027–5039.

WILLIAMS, R. C.; Osterland, C. K.; Margherita, S.; Tokuda, S.; Messner, R. P. *Studies of biologic and serologic activities of rabbit-IgG antibody depleted of carbohydrate residues*; 1973. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 6. 1690–1698.

WISSING, S.; Wölfel, J.; Kewes, H.; Niehus, C.; Bialek, C.; Hertel, S.; Faust, N. *Expression of glycoproteins with excellent glycosylation profile and serum half-life in CAP-Go cells*; 2015. *BMC Proceedings*. Suppl 9. P12.

WÖLFEL, J.; Essers, R.; Bialek, C.; Hertel, S.; Scholz-Neumann, N.; Schiedner, G. *CAP-T cell expression system: a novel rapid and versatile human cell expression system for fast and high yield transient protein expression*; 2011. *BMC Proceedings*. P133.

WONG, D. C. F.; Wong, K. T. K.; Nissom, P. M.; Heng, C. K.; Yap, M. G. S. *Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures*; 2006. *Biotechnology and bioengineering*. 3. 350–361.

WONG, N. S. C.; Wati, L.; Nissom, P. M.; Feng, H. T.; Lee, M. M.; Yap, M. G. S. *An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding*; 2010. *Biotechnology and bioengineering*. 2. 321–336.

WU, Y.; Swulius, M. T.; Moremen, K. W.; Sifers, R. N. *Elucidation of the molecular logic by which misfolded α 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation*; 2003. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 14. 8229–8234.

WURM, F. M. *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*; 2004. *Nature Biotechnology*. 11. 1393–1398.

XIE, P.; Niu, H.; Chen, X.; Zhang, X.; Miao, S.; Deng, X.; Liu, X.; Tan, W.-S.; Zhou, Y.; Fan, L. *Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures*; 2016. *Applied microbiology and biotechnology*. 24. 10343–10353.

XU, X.; Nagarajan, H.; Lewis, N. E.; Pan, S.; Cai, Z.; Liu, X.; Chen, W.; Xie, M.; Wang, W.; Hammond, S.; Andersen, M. R.; Neff, N.; Passarelli, B.; Koh, W.; Fan, H. C.; Wang, J.; Gui, Y.; Lee, K. H.; Betenbaugh, M. J.; Quake, S. R.; Famili, I.; Palsson, B. O.; Wang, J. *The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line*; 2011. *Nature Biotechnology*. 8. 735–741.

Literaturverzeichnis

- YAMADA, T.;** Kanda, Y.; Takayama, M.; Hashimoto, A.; Sugihara, T.; Satoh-Kubota, A.; Suzuki-Takanami, E.; Yano, K.; Iida, S.; Satoh, M. *Comparison of biological activities of human antithrombins with high-mannose or complex-type nonfucosylated N-linked oligosaccharides*; 2016. *Glycobiology*. 5. 482–492.
- YAMANE-OHNUKI, N.;** Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakano, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Shitara, K.; Satoh, M. *Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity*; 2004. *Biotechnology and bioengineering*. 5. 614–622.
- YANG, M.;** Butler, M. *Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation*; 2000a. *Biotechnology and bioengineering*. 4. 370–380.
- YANG, M.;** Butler, M. *Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level*; 2000b. *Cytotechnology*. 1-2. 83–99.
- YANG, M.;** Butler, M. *Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms*; 2002. *Biotechnology progress*. 1. 129–138.
- YOON, S. K.;** Song, J. Y.; Lee, G. M. *Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells*; 2003. *Biotechnology and bioengineering*. 3. 289–298.
- YOSHIDA, A.;** Ewing, C.; Wessels, M.; Lieberman, J.; Gaidulis, L. *Molecular abnormality of PI S variant of human alpha1-antitrypsin*; 1977. *American Journal of Human Genetics*. 3. 233–239.
- YU, M.;** Brown, D.; Reed, C.; Chung, S.; Lutman, J.; Stefanich, E.; Wong, A.; Stephan, J.-P.; Bayer, R. *Production, characterization, and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans*; 2012. *mAbs*. 4. 475–487.
- YU, S.-Y.;** Wu, S.-W.; Khoo, K.-H. *Distinctive characteristics of MALDI-Q/TOF and TOF/TOF tandem mass spectrometry for sequencing of permethylated complex type N-glycans*; 2006. *Glycoconjugate journal*. 5-6. 355–369.
- ZAHEDI, R.;** Aulak, K. S.; Eldering, E.; Davis, A. E. *Characterization of C1 inhibitor-Ta. A dysfunctional C1INH with deletion of lysine 251*; 1996. *The Journal of biological chemistry*. 39. 24307–24312.
-

ZAKAI, N. A.; KATZ, R.; JENNY, N. S.; PSATY, B. M.; REINER, A. P.; SCHWARTZ, S. M.; CUSHMAN, M. *Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study*; 2007. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 6. 1128–1135.

ZETTLMEISSL, G.; Conradt, H. S.; Nimtz, M.; Karges, H. E. *Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in Chinese hamster ovary cells*; 1989. *The Journal of biological chemistry*. 35. 21153–21159.

ZETTLMEISSL, G.; Ragg, H.; Karges, H. E. *Expression of biologically active human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells*; 1987. *Nature biotechnology*. 5. 720–725.

ZHANG, A.; Potvin, B.; Zaiman, A.; Chen, W.; Kumar, R.; Phillips, L.; Stanley, P. *The gain-of-function Chinese hamster ovary mutant LEC11B expresses one of two Chinese hamster FUT6 genes due to the loss of a negative regulatory factor*; 1999. *The Journal of biological chemistry*. 15. 10439–10450.

ZHANG, H.; Li, X.-J.; Martin, D. B.; Aebersold, R. *Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry*; 2003. *Nature biotechnology*. 6. 660–666.

ZHANG, P.; Woen, S.; Wang, T.; Liau, B.; Zhao, S.; Chen, C.; Yang, Y.; Song, Z.; Wormald, M. R.; Yu, C.; Rudd, P. M. *Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs*; 2016. *Drug discovery today*. 5. 740–765.

ZHOU, Q.; Shankara, S.; Roy, A.; Qiu, H.; Estes, S.; McVie-Wylie, A.; Culm-Merdek, K.; Park, A.; Pan, C.; Edmunds, T. *Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function*; 2008. *Biotechnology and bioengineering*. 3. 652–665.

ZURAW, B. L.; Busse, P. J.; White, M.; Jacobs, J.; Lumry, W.; Baker, J.; Craig, T.; Grant, J. A.; Hurewitz, D.; Bielory, L.; Cartwright, W. E.; Koleilat, M.; Ryan, W.; Schaefer, O.; Manning, M.; Patel, P.; Bernstein, J. A.; Friedman, R. A.; Wilkinson, R.; Tanner, D.; Kohler, G.; Gunther, G.; Levy, R.; McClellan, J.; Redhead, J.; Guss, D.; Heyman, E.; Blumenstein, B. A.; Kalfus, I.; Frank, M. M. *Nanofiltered C1 Inhibitor Concentrate for Treatment of Hereditary Angioedema*; 2010. *New England Journal of Medicine*. 6. 513–522.