

7 Chapter Seven: Summary and perspectives

7.1 Summary

The presence and structure of oligosaccharides in glycoproteins are known to influence the major characteristics of therapeutic proteins. The ability to characterize the oligosaccharides during mammalian bioprocessing offers the possibility to control and ensure the quality and consistency of those proteins.

This thesis presents a scheme using high-sensitive analytical techniques for the quantitative measurement of microheterogeneous N-glycan-structures of glycoproteins. The monitoring techniques include PNGaseF-digestion, 2-AB-labelling, Anion Exchange Chromatography (AEX = GlycoSepC-HPLC) and Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC = Aminophase-HPLC) (Figure 64).

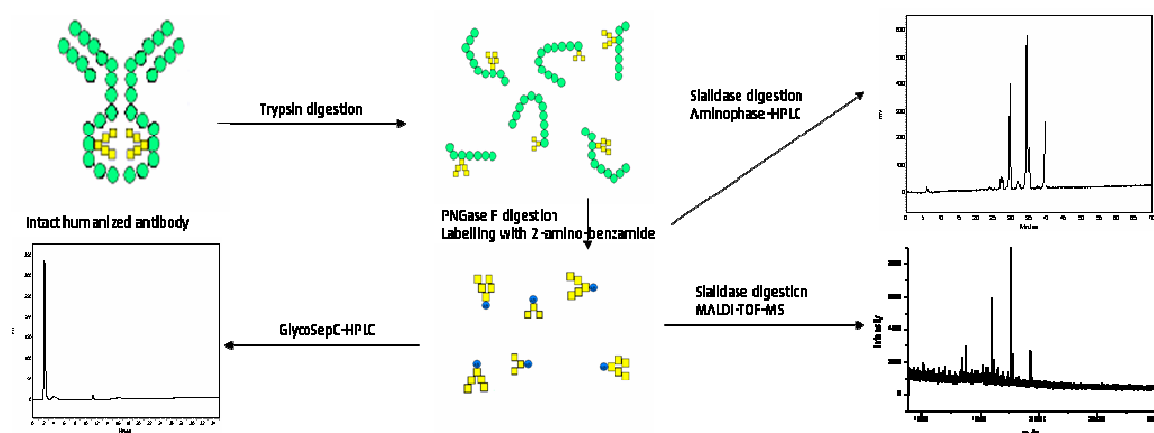


Figure 64: Analytical scheme for N-glycan-analysis of glycoproteins

This methodology combined all aspects mentioned in the thesis objective. By using PNGaseF-digestion, N-glycans were selectively separated from the rest of the protein. 2-AB-labelling led to an unification of the different response factors of the N-glycans. The high resolving HPLC-techniques for the charged and the uncharged oligosaccharides could be used to even detect intra-batch-inconsistencies during continuous production processes.

All methods were standardized in SOPs and characterized by a validation approach. Relative quantification approaches as well as two strategies for absolute quantification have been described. The first strategy included a further analytical method for the absolute quantification of sialic acids using colorimetry and the second used the external standard 2-AB-labelled N-acetyl-glucosamine (Figure 65) for absolute quantification.

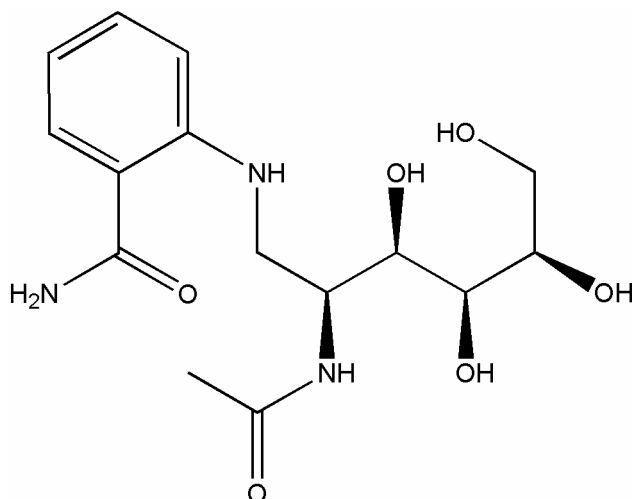


Figure 65: External standard that could be used for absolute quantification of oligosaccharides

The established methods were used to examine the influence of different bioprocessing parameters on the glycosylation of two recombinant model proteins. Only minor differences have been observed. To evaluate these differences critically and to find out if they were eventually based on the variability of the analytical methods, a validation of the methods was performed corresponding to the needs for an early clinical phase drug development. The statistical evaluation of the methods resulted in exact limits for their variability in a certain working range (Figure 66).

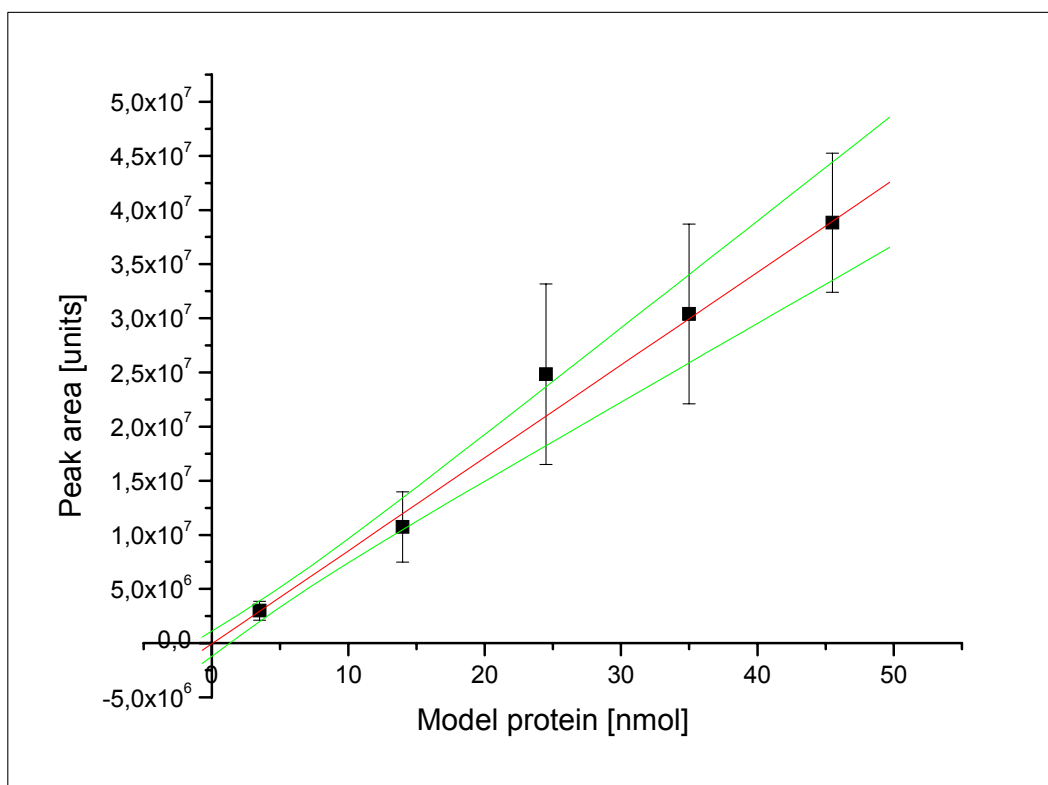


Figure 66: Example of validation of the analytical method GlycoSepC-analysis by determining the core-parameter linearity³⁷

Differences in processes could now be divided into significant and non-significant (incidental) changes. The results of clone comparisons, harvested products at different cultivation times within continuous production processes and production systems working with different cell densities showed slight, but sometimes significant changes in the glycosylation pattern of the model proteins.

The glycosylation differences could be separated in three categories by their intensity. The major influence on glycosylation was observed between different clones. This phenomenon could be used for clone selection procedures that could not be decided by evaluation of the classical

³⁷ *Weighted linear regression curve (red), standard deviations (error bars) and 95% confidence interval (green)*

parameters productivity and activity. New glycosylation criteria such as sialylation rate have been found to gather useful information (Figure 67).

	Productivity [%]	Activity [%]	Sialylation (A2) [%]
Clone 2	100	75	54
Clone 4	75	100	59
Clone 5	100	75	47

Figure 67: Final clone selection criteria

Cultivation time was observed to have the second intensive significant influence on glycosylation. It was shown that dominant complex structures decreased and precursor-structures evolved during long-time cultivation. Therefore, it was possible to create a new stop time criterium for continuous production processes by defining a limit for the crucial structure High Mannose (Figure 68).

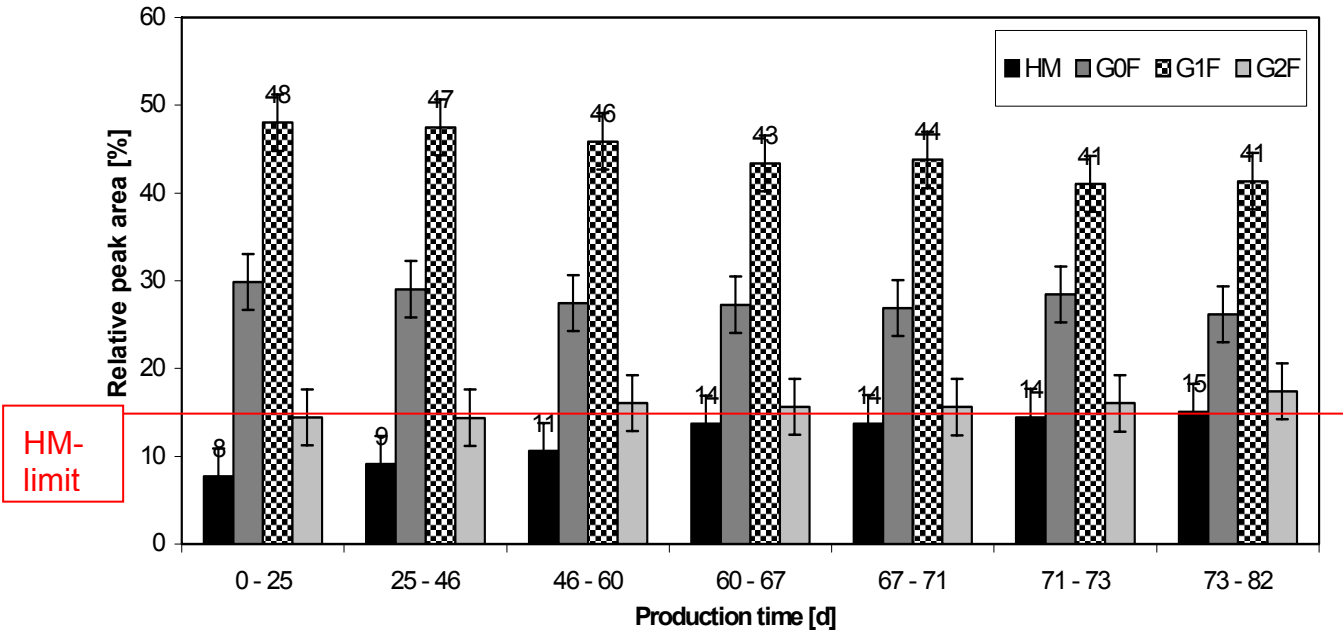


Figure 68: Stop time criteria in continuous production process

Comparison of production systems with different cell densities was also possible with the established techniques, but the density of the cells showed the least intensive effects on glycosylation. This led to the conclusion that an transfer of production processes from low cell density systems to high cell density systems (e.g. HFBR-systems) should be possible without disadvantageous effects on product quality (Figure 69).

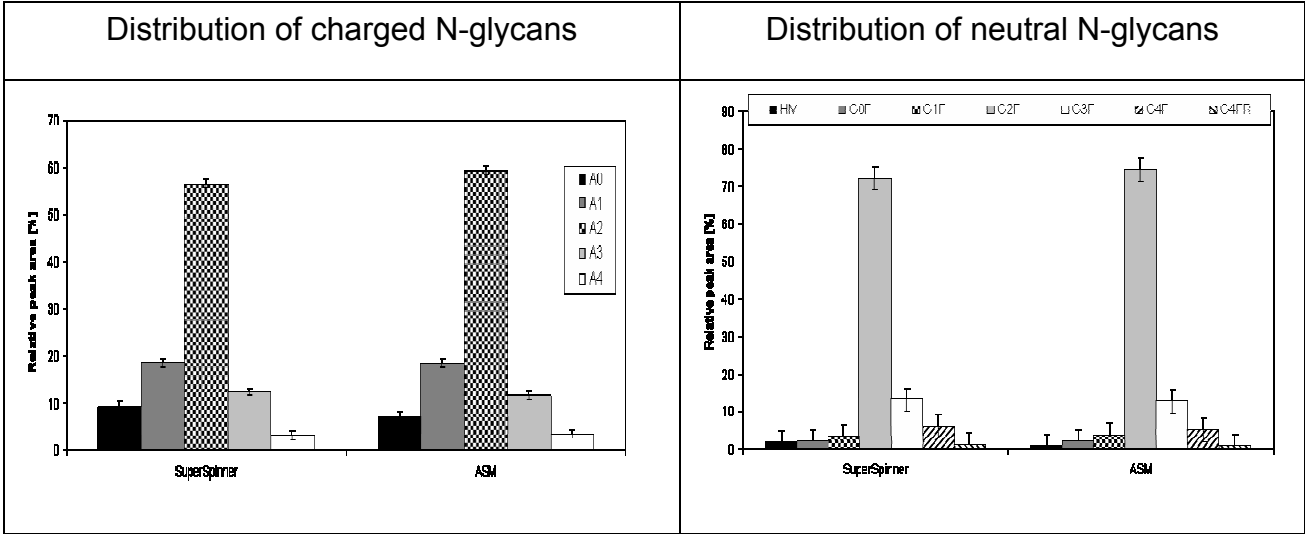


Figure 69: Glycosylation analysis of two samples of a model protein produced with two different cell densities³⁸

³⁸ SuperSpinner = low cell density, ASM = high cell density

7.2 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass die Anwesenheit und Struktur von Oligosacchariden in Glycoproteinen wesentliche Eigenschaften von therapeutischen Proteinen maßgeblich beeinflusst. Die analytische Charakterisierung dieser Oligosaccharide während des Produktionsprozesses ist daher von großer Bedeutung und ermöglicht die Herstellung von Proteinen gleichbleibender Qualität und übereinstimmender Struktur.

Diese Doktorarbeit beschreibt ein hoch sensitives analytisches Verfahren, welches die quantitative Messung der Microheterogenität von N-Glykanstrukturen in Glycoproteinen ermöglicht. Die verwendeten Techniken umfassten PNGaseF-Verdau, 2-Aminobenzamidmarkierung (2-AB), Anionenaustauschchromatographie (AEX = GlycoSepC-HPLC) und hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC = Aminophasen-HPLC) (Bild 64).

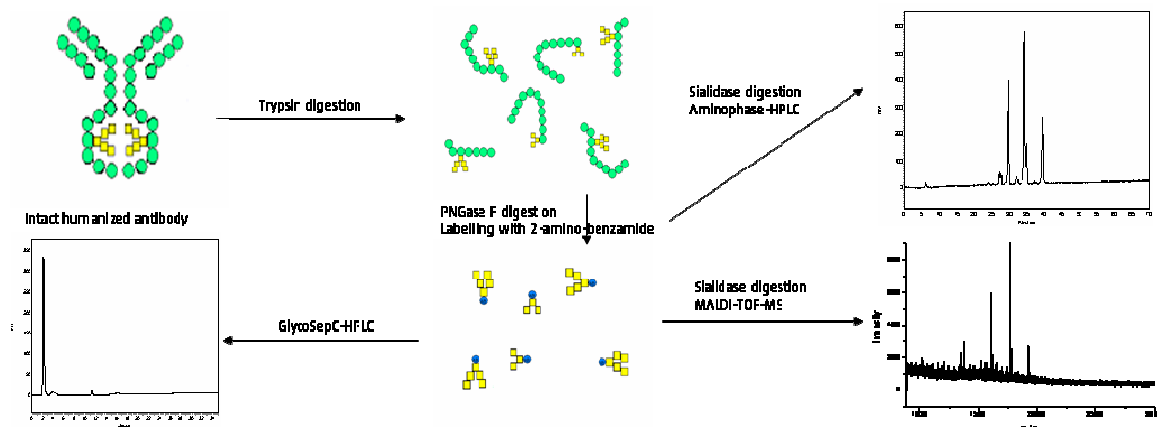


Bild 64: Analytisches Schema der N-Glykananalyse von Glykoproteinen

Diese Methode kombinierte alle Aspekte, die in der Zielstellung der Dissertation definiert wurden. Mit Hilfe des PNGaseF-Verdau wurden die N-Glykane selektiv vom Rest des Proteins abgetrennt. Durch die Markierung mit 2-AB konnte eine Vereinheitlichung der unterschiedlichen Response-Faktoren der N-Glykane erreicht werden. Mittels hochauflösender HPLC-Methoden für geladene und ungeladene Oligosaccharide konnten während

eines kontinuierlichen Produktionsprozesses sogar Uneinheitlichkeiten innerhalb einer Charge ermittelt werden. Alle Methoden wurden in Standardarbeitsanweisungen (SOPs) standardisiert und über eine Validierung charakterisiert. Es wurde ein Verfahren zur Relativquantifizierung sowie zwei Strategien für die Absolutquantifizierung beschrieben. Die erste Strategie beinhaltete eine zusätzliche kolorimetrische Methode zur Bestimmung des absoluten Sialinsäuregehaltes einer Proteinprobe. Bei der zweiten Methode diente 2-AB-markiertes N-Acetylglucosamin (Bild 65) als externer Standard zur Absolutquantifizierung.

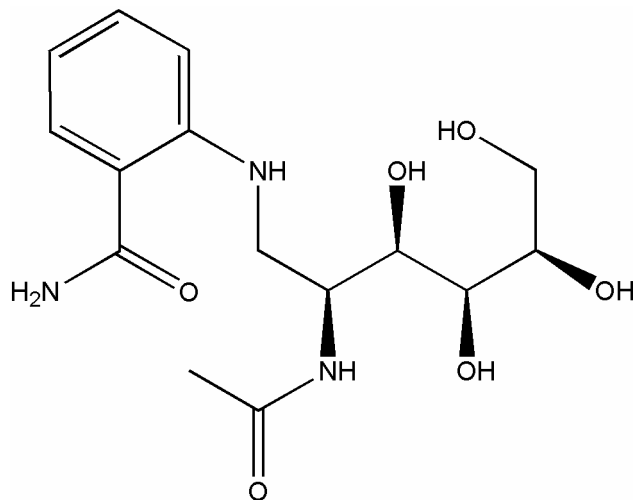


Bild 65: Externer Standard zur Absolutquantifizierung von Oligosacchariden

Mit den entwickelten Methoden wurde der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Glykosylierung von zwei rekombinanten Modellproteinen untersucht. Es wurden nur geringe Effekte beobachtet. Um die Unterschiede kritisch beurteilen zu können und herauszufinden, ob diese eventuell auf der Variabilität der analytischen Methoden beruhen, wurden diese validiert. Die Validierung entsprach den Anforderungen für eine frühe klinische Phase in der Arzneistoffentwicklung. Die statistische Auswertung der Methoden ergab exakte Streuungsbreiten innerhalb eines bestimmten Arbeitsbereiches (Bild 66).

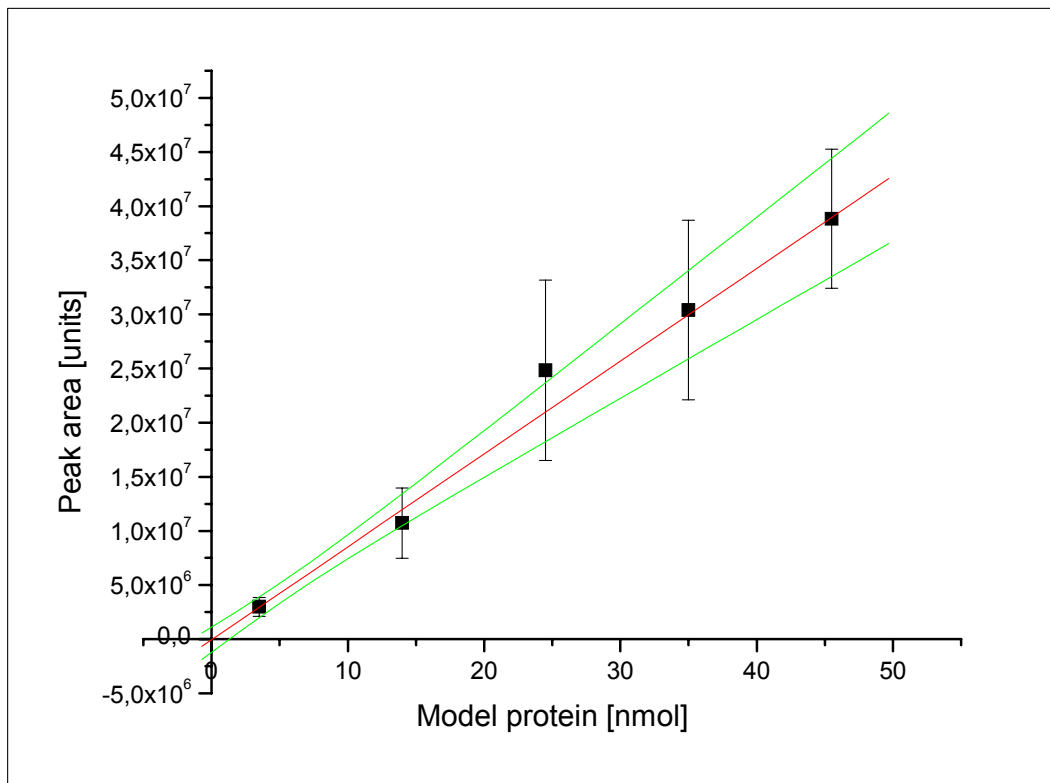


Bild 66: Beispiel der Validierung einer GlycoSepC-Analyse durch Ermittlung der Linearität als Kernparameter³⁹

Prozessunterschiede konnten nun in signifikante und nicht-signifikante (zufällige) Änderungen unterteilt werden. Es wurden Produkte verschiedener Klone, als auch Produkte, die nach unterschiedlichen Zeiten in einem kontinuierlichen Prozess geerntet wurden, untersucht. Zusätzlich wurden Produkte aus Systemen mit unterschiedlichen Zelldichten miteinander verglichen. Dabei wurden zwar nur geringfügige, aber zum Teil signifikante Änderungen der Glykosylierungsmuster der Modellproteine beobachtet. Die Unterschiede in der Glykosylierung konnten aufgrund ihrer Intensität in drei Kategorien unterteilt werden. Der größte Einfluss auf die Glykosylierung ergab sich durch den Einsatz verschiedener Klone. Dieses Phänomen konnte für die Auswahl eines Produktionsklones genutzt werden, da die klassischen Parameter Produktivität und Aktivität zur Entscheidungsfindung nicht ausreichend waren. Es wurde ein Glykosylierungskriterium definiert, in

³⁹ *Grade der gewichteten linearen Regression (rot), Standardabweichung (Fehlerbalken) und 95%-Konfidenzintervall (grün)*

diesem Fall der Grad der Sialylierung, welches die Auswahl des bestmöglichen Klones für einen Produktionsprozess ermöglichten (Bild 67).

	Productivity [%]	Activity [%]	Sialylation (A2) [%]
Clone 2	100	75	54
Clone 4	75	100	59
Clone 5	100	75	47

Bild 67: Kriterien zur Klonselktion

Den zweitgrößten Einfluss auf die Glykosylierung hatte die Zeitdauer der Kultivierung. Es wurde gezeigt, dass sich dominante komplexe Strukturen während einer Langzeitkultivierung verringerten, wohingegen Vorläuferstrukturen häufiger auftraten. Daher war es möglich ein neues Kriterium für das Beenden eines kontinuierlichen Produktionsprozesses festzulegen, indem ein Grenzwert für die kritische N-Glykanstruktur "High Mannose" festgelegt wurde (Bild 68).

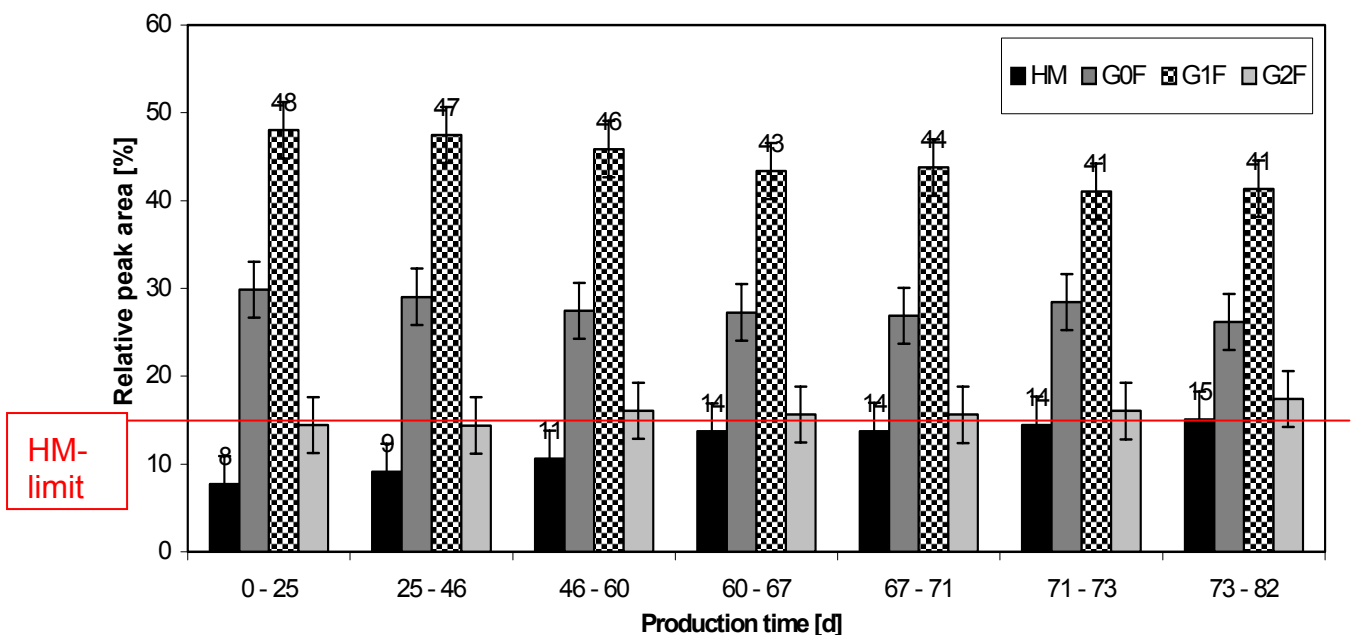


Bild 68: Kriterium für das Beenden eines kontinuierlichen Herstellprozesses

Mit den entwickelten Verfahren war es auch möglich, Produktionssysteme mit unterschiedlichen Zelldichten zu vergleichen. Allerdings zeigte die Zelldichte den geringsten Einfluss auf die Glykosylierung. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass der Wechsel eines Produktionsprozesses von niedrigen zu hohe Zelldichten hin (z.B. von Rührkessel- zu Hohlfaserbioreaktorsystemen), ohne nachteiligen Einfluss auf die Qualität des Produktes möglich ist (Bild 69).

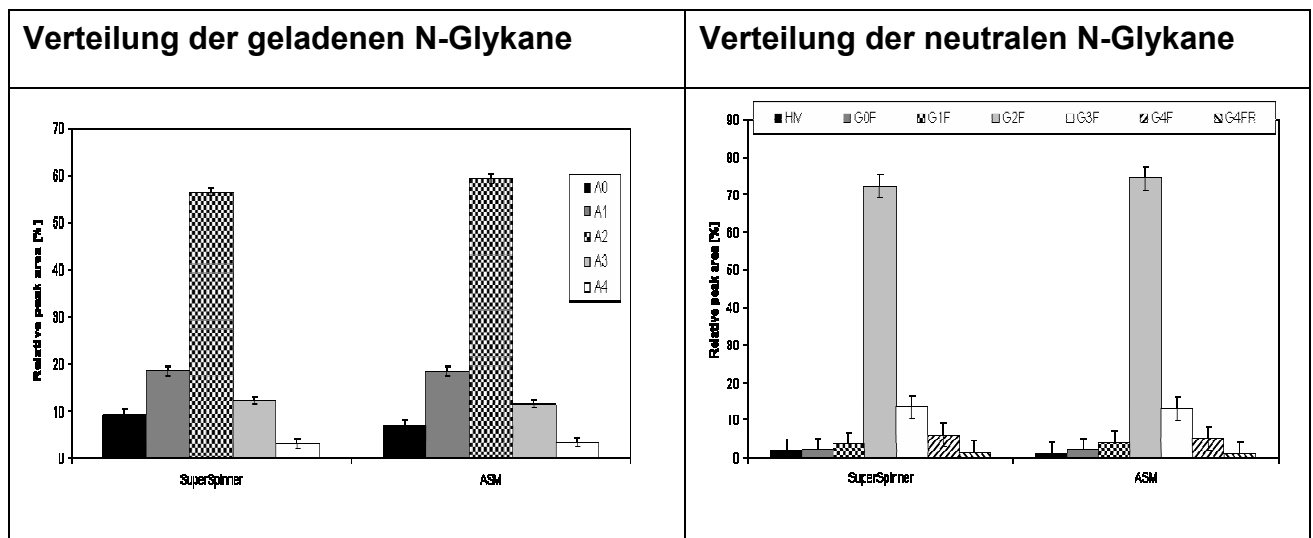


Bild 69: Analyse der Glykosylierung zweier Proben eines Modellproteins produziert mit zwei verschiedenen Zelldichten⁴⁰

⁴⁰ SuperSpinner = niedrige Zelldichte, ASM = hohe Zelldichte

7.3 Recommendation for future works

The results of this thesis have suggested several topics for further investigations. Regarding the observed effects on glycosylation by the examined production parameters, an additional step in the manufacture of glycoproteins would be the directed control of their glycosylation patterns. Based on that, following studies should be used for the concerted optimization of specific glycan structures on glycoproteins. From the pharmaceutical point of view, one goal would be product homogeneity, to get only one glycan structure for the whole product. This would not only facilitate the product characterisation and the derivation of structure-activity relationships for the glycoprotein, but would also simplify the manufacture of biogenerical (biosimilar) drugs and these could lead to significant cost-savings in the current strained public health sector.

But before simplification-engineering of glycan structures should start, it should be studied whether the loss of heterogeneity would have also disadvantageous effects in biological activity of the glycoproteins.

After the standardization of the analytical methodologies in this work, another important aspect for the future would be the simplification and rationalization of the methods to accelerate the whole analytical procedure. Therefore, the analytical methods have to be understood more detailed and unnecessary procedures have to be omitted.

Regarding the establishment of new analytical techniques, important goals would lie in the analysis of unpurified glycoprotein in cell culture supernatant. Most developments in this area are made with miniaturized bio-chips (glycan chips) today which are based on lectin affinity [131, 132]. If this technique will become widely accepted, remains to be seen.