



Doctoral Thesis

## **Bioprocess Engineering Framework to Control Protein N-linked Glycosylation**

**Author(s):**

Villiger, Thomas K.

**Publication Date:**

2015

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010556353> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22727

# Bioprocess Engineering Framework to Control Protein N-linked Glycosylation

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Thomas K. Villiger**

MSc Chemical and Bioengineering, ETH Zurich

born on 06.01.1987

citizen of Sins AG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Massimo Morbidelli (ETH Zurich), examiner

Prof. Dr. Markus Aebi (ETH Zurich), co-examiner

Prof. Dr. Miroslav Soos (ICT Prague), co-examiner

Dr. Matthieu Stettler (Merck-Serono), co-examiner

2015

# Abstract

Mammalian cells represent the predominant expression system for the manufacture of monoclonal antibodies (mAbs) and many other biopharmaceuticals due to their ability to properly fold and post-translationally modify the desired proteins. In particular, N-linked glycosylation plays a crucial role for the efficacy of therapeutic proteins and is therefore considered as one of the major quality attributes. However, bioprocess conditions, media components and scale-up issues can significantly influence the quality of a protein. The aim of this thesis is to provide an experimental and modeling framework for the development of mammalian cell bioprocesses with the objective to keep protein N-linked glycosylation patterns under control.

First, an experimental method to determine maximum effective stress in multiphase flow was developed in order to detect possible detrimental effects in biotechnological equipment. Although shear stress is not considered a major issue during scale-up of mammalian cell processes anymore, a cost and time-effective method is required to evaluate the maximum operating range.

The determination of maximum hydrodynamic stress combined with other experimental measurements including mixing time and oxygen mass transfer rate were used to validate a computational fluid dynamic model of bioreactors at various scales. This experimental and modeling approach builds the basis for a more rational way to scale-up mammalian cell culture processes, ensuring coherent performance and product quality.

Having defined scale-up criteria that provide identical or at least similar cellular environments across different bioreactor scales, the development of processes with defined protein glycan patterns can be carried out using high-throughput micro-bioreactors. In order to gain a deeper understanding on the mode of action of different feed supplementations, a high-throughput analytical method based on matrix assisted laser desorption/adsorption time-of-flight mass spectrometry was applied to quantify the intracellular content of glycosylation precursors as a function of added sugars, trace elements and amino acids.

This experimental technique was further applied to investigate the time course of a mAb N-linked glycosylation during a fed-batch culture. By varying the amount as well as the timing of additional feed supplements, the evolution of the antibody glycan pattern could be modulated and even kept constant during the entire process.

Consequently, a dynamic and mechanistic mathematical model was developed for the description and optimization of culture conditions that yield in desired N-glycan patterns. The predictive capability was demonstrated for changing and constant N-linked glycosylation profiles during a mammalian cell fed-batch process.

Finally, flux analysis was applied to different networks of N-linked glycosylation to reduce the complexity of a mechanistic model. The applicability of this modeling approach was demonstrated in two case studies: in the first case study, glycosylation flux analysis was used to quantify the site-specific enzymatic turnover rates of a protein with five N-glycosylation sites. In the second case study, dynamic glycosylation flux analysis was applied to describe the changes of mAb glycosylation during a mammalian cell fed-batch culture.

# Zusammenfassung

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern und anderen Biopharmazeutika werden vorwiegend tierische Säugerzellen verwendet, da sie Proteine korrekt falten und diese mit posttranslationalen Modifikationen ausstatten können. Insbesondere die N-Glykosylierung stellt ein entscheidender Faktor für die Wirkungskraft von therapeutischen Proteinen dar und wird deshalb als ein kritisches Qualitätsmerkmal angesehen. Allerdings können Bioprozessbedingungen, Mediumskomponenten und veränderte Gegebenheiten während der Massstabsvergrößerung die Proteinqualität signifikant beeinflussen. Das Ziel dieser Arbeit ist eine experimentelle sowie mathematische Vorgehensweise zu bieten, welche für die Entwicklung von biotechnologischen Säugerzellenprozessen angewandt werden kann, mit dem Bestreben eine kontrollierte Proteinglykosylierung zu erreichen.

Zu Beginn wurde eine experimentelle Methode für die Messung der maximal effektiven Scherkräfte in mehrphasigen Strömungen entwickelt, um mögliche schädliche Auswirkungen auf die zu kultivierenden Zellen durch biotechnologische Apparaturen festzustellen. Obwohl Scherkräfte während der Massstabsvergrößerung nicht mehr als problematisch angesehen werden, ist ein kosten- und zeiteffektives Verfahren erforderlich, um den Betriebsbereich eindeutig definieren zu können.

Zusammen mit der experimentellen Bestimmung der maximalen Scherkräfte, den Mischzeiten der Bioreaktoren und des Sauerstoffmassentransferkoeffizienten wurde ein Modell der numerischen Strömungsmechanik von Bioreaktoren mit unterschiedlicher Grösse validiert. Dieser Ansatz der experimentellen und mathematischen Beschreibung von Bioreaktoren bildet die Basis für eine rationale Massstabsvergrößerung von Zellkulturprozessen unter der Berücksichtigung einer gleichbleibenden Prozessausbeute mit definierten Proteinmerkmalen.

In Anbetracht einer definierten Massstabsvergrößerung, welche eine identische oder zumindest ähnliche Zellumgebung in unterschiedlich grossen Bioreaktoren bietet, kann

folglich die Entwicklung von Prozessen mit definierten Glykanmustern in Mikrobioreaktoren mit hohem Durchsatz erfolgen. Für ein besseres mechanistisches Verständnis der Wirkungsweise von verschiedenen Mediumszusätzen wurde eine analytische Hochdurchsatz-Methode basierend auf Matrixunterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator angewendet, um den intrazellulären Gehalt von Glykosylierungsausgangstoffen als Funktion der zugegebenen Zucker, Spurenelementen und Aminosäuren zu bestimmen.

Dieser experimentelle Vorgang wurde ebenfalls für die Untersuchung der zeitlichen Veränderung von N-Glykanmustern eines monoklonalen Antikörpers im Verlauf eines Fed-batch Prozesses angewandt. Durch Änderung der Menge und der zeitlichen Abfolge der Zugabe von Zusatzkomponenten konnte die N-Glykosylierung angepasst und sogar während des gesamten Prozesses konstant gehalten werden.

Ferner wurde ein dynamisches und mechanistisches mathematisches Modell für die Optimierung von Zellkulturkonditionen entwickelt, welche eine gewünschte Glykosylierungsprofil während dem Verlauf der Zellkultur ergeben. Die Vorhersagefähigkeit des Modelles wurde für zeitlich wechselnde als auch für konstante N-Glykosylierungsmuster gezeigt.

Schiesslich wurde eine mathematische Beschreibung der N-Glykosylierung mittels Flussanalyse entwickelt, um die Komplexität des mechanistischen Modelles zu reduzieren. Die Anwendbarkeit dieses Modellansatzes wurde in zwei Fallstudien erprobt. In der ersten Fallstudie wurde die Glykosylierungsflussanalyse auf ein Protein mit fünf N-Glykosylierungsstellen angewandt um die ortsspezifischen Aktivitäten von verschiedenen Enzymen zu vergleichen. In der zweiten Fallstudie wurde eine dynamische Flussanalyse für die Beschreibung der Glykosylierung eines monoklonalen Antikörpers während eines Fed-batch Prozesses angewandt.