

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗАМИНА И ИОНОВ МЕДИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРОФИЛЯ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В КЛЕТКАХ СНО

© 2023 г. Е. А. Гузов¹ *, М. А. Цирулева¹, А. В. Исеркапов¹, А. П. Тюкова²,
В. Н. Казин², В. М. Кольшкин¹, В. Г. Игнатъев¹

¹Акционерное общество «Р-Фарм», Ярославль, 150061 Россия

²Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, 150003 Россия

*e-mail: guzov@rpharm.ru

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 03.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Изучено влияние глюкозамина гидрохлорида и сульфата меди на профиль гликозилирования экспрессирующихся в клетках СНО К1 рекомбинантных моноклональных антител подклассов IgG1 и IgG2. Исследование проведено на трех клеточных линиях, продуцирующих рекомбинантные моноклональные антитела, специфичные к разным биомолекулам. Установлено, что внесение глюкозамина в среду культивирования клеток СНО К1 влияло на формирование профиля гликозилирования N-связанных гликанов моноклональных антител. В присутствии глюкозамина увеличивалось относительное содержание фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы. Внешение CuSO_4 также приводило к увеличению относительного содержания фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы за счет снижения относительного содержания галактозилированных углеводных цепей, при этом относительное содержание высокоманнозных цепей не изменялось. Изучено влияние на профиль гликозилирования моноклональных антител снижения температуры культивирования клеток СНО в присутствии глюкозамина. Показано, что использовании температурного режима 37/33°C при культивировании клеток СНО в присутствии глюкозамина приводит к изменению гликанового профиля рекомбинантных моноклональных антител.

Ключевые слова: моноклональные антитела, N-гликозилирование, глюкозамин, ионы меди, температура, СНО К1

DOI: 10.56304/S0234275823020035

Гликозилирование представляет собой наиболее распространенную и сложную посттрансляционную модификацию белков, которая определяет их третичную и четвертичную структуру, функциональную активность, а также характеристики, связанные с терапевтическим применением. Олигосахаридный паттерн белка – важнейший показатель системы контроля качества на различных стадиях производства биологических препаратов, в том числе моноклональных антител

(моноАТ) [1, 2]. Посттрансляционный паттерн гликозилирования определяет и физико-химические свойства белка: агрегацию, растворимость и стабильность [3, 4]. При нарушении процесса гликозилирования генерируются неправильно свернутые белки – с повышенной склонностью к агрегации и деградации [5, 6]. От природы, типа и размера углеводных цепей, прикрепленных к остатку Asn (N-гликаны) белка, зависит его стабильность и функциональная активность [7–9].

Присоединение олигосахаридов к гликопротеину представляет собой сложный метаболический процесс, характеризующийся переносом единого блока полисахаридных цепей вместе с поэтапным добавлением и удалением отдельных моносахаридов. Число этапов процесса гликозилирования зависит от субстратной специфичности ферментов, а также от локализации различных ферментов и их субстратов в компартаментах клетки, что необходимо для протекания реакций

Сокращения: GlcN (D-glucosamine) – глюкозамин; G_0 – нефукозилированная гликоформа без концевых остатков галактозы; G_0F – фукозилированная гликоформа без концевых остатков галактозы; Man_5 – высокоманнозная гликоформа, содержащая 5 остатков маннозы; G_1F – фукозилированная гликоформа с одним остатком галактозы; $G_1'F$ – изомер G_1F по расположению галактозы; G_2F – фукозилированная гликоформа с двумя остатками галактозы; другие формы – гликоформы, отличные от вышеуказанных; моноАТ – моноклональные антитела.

в определенном порядке. Конечные формы гликопротеинов зависят от природы терминального сахара и сиалирования. В свою очередь, уровень антеннарности и сиалирования зависят от условий культивирования клеток и экспрессии ферментов [10, 11]. На гликозилирование можно воздействовать как путем изменения условий культивирования, так и введением специальных добавок к среде [12]. Уровень растворенного кислорода (DO) в культуре имеет большое значение для клеточного метаболизма, так как напрямую влияет на рост клеток и обмен веществ. Однако концентрация DO влияет на физиологию клеток только выше или ниже определенных критических пределов. Колебание DO в этих пределах в процессе культивирования увеличивает сиалирование и галактозилирование моноАТ [13, 14]. В работах М. Gramer с соавт. [15] и Е. Edwards с соавт. [16] показано, что важным показателем, влияющим на гликозилирование моноАТ, является продолжительность культивирования. С увеличением продолжительности культивирования повышается относительное содержание нефукозилированных углеводных цепей без концевых остатков галактозы (G_0) и высокоманнозных цепей.

Н. Kildegaard и др. [17] обнаружили, что внесение в культуральную жидкость предшественников гликозилирования может быть эффективным способом модуляции N-гликанов. Так, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) ингибировал присоединение галактозы к углеводным цепям молекулы моноАТ, что приводило к увеличению относительного содержания гликоформы G_0 и фукозилированных цепей без концевых остатков галактозы (G_0F). В присутствии галактозы в питательной среде повышалась внутриклеточная концентрация уридиндифосфатгалактозы (UDP-Gal) и экспрессия ферментов галактозилирования. В результате увеличивалась доля гликанов с терминальными остатками галактозы и снижалось относительное содержание негалактозилированных гликоформ: G_0 и G_0F . В присутствии 10 мМ маннозы незначительно увеличивалось содержание высокоманнозных цепей в молекуле IgG.

Ионы двухвалентных металлов, включая железо, медь, цинк и селен, служат кофакторами многих ферментов и необходимы для роста и метаболизма клеток. Они участвуют в процессах посттрансляционной модификации белков, окисления, дезамидирования, агрегации и фрагментации. Добавление биодоступного источника железа в культуральную среду улучшало физиологические свойства клеток, а также качество экспрессируемого рекомбинантного белка [18].

Ионы Mn^{2+} служат кофактором олигосахарилтрансферазы и играют важную роль в гликозилировании моноАТ [19]. В присутствии ионов Mn^{2+} регистрировали значимое снижение негалактози-

лированных гликоформ и высокоманнозных цепей, а также повышенное содержание гликоформ с одной и двумя остатками галактозы (G_1 и G_2 соответственно) [20]. Так, в присутствии $MnCl_2$, уридина и галактозы в клетках повышалась степень галактозилирования углеводных цепей белков. Такой же эффект наблюдали и при добавлении глутамата (но не глутамина) в среду культивирования [21].

Паттерну гликозилирования уделяют особое внимание при разработке биологически активных препаратов, так как он во многом определяет их терапевтическую активность, в том числе и моноАТ. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (XIV издание), включение показателя “Гликановый профиль” в нормативную документацию на субстанции и лекарственные препараты моноклональных антител (ОФС.1.7.1.0014.18 “Моноклональные антитела для медицинского применения”) обязательно для выполнения.

Цель представленной работы заключалась в исследовании влияния глюкозамина и ионов меди на паттерн гликозилирования иммуноглобулинов подклассов $G1$ и $G2$ в трех линиях (I, II и III) клеток яичника китайского хомячка (СНО К1). В работе использованы созданные компанией “Р-Фарм” три линии генно-модифицированных клеток СНО К1, экспрессирующие следующие моноАТ: панитумумаб (линия I), окрелизумаб (линия II) и бевацезумаб (линия III) (приведены международные непатентованные названия антител).¹

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Питательные среды и добавки

Используемые питательные среды: BalanCD-HEK293 (Irvine Scientific, США), CDM4HEK293 (Cytiva, Австрия).

Питательные добавки: BalanCDHEK293 Feed (Irvine Scientific), BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific) – 5% от объема добавляли на 4, 6, 7, 8, 11, 13 сутки культивирования.

В экспериментах использовали свежеприготовленный раствор глюкозамина гидрохлорида (GlcN; Spectrum, США) и раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (PanReac AppliChem, Германия).

¹ Эти моноАТ получены в клеточных линиях СНО К1 с использованием рекомбинантной ДНК-технологии. Панитумумаб – моноАТ подкласса IgG2 против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Окрелизумаб – гуманизованное моноАТ против CD20. Бевацезумаб – рекомбинантное гиперхимерное (гуманизованное) моноАТ подкласса IgG1 против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

Таблица 1. Условные обозначения и особенности структуры исследованных углеводных цепей
Table 1. Symbols and features of the structure of carbohydrate chains studied

Гликан	Структура
G ₀	Нефукозилированная гликоформа без концевых остатков галактозы
G ₀ F	Фукозилированная гликоформа без концевых остатков галактозы
Man ₅	Высокоманнозная гликоформа, содержащая 5 остатков маннозы
G ₁ F	Фукозилированная гликоформа с одним остатком галактозы
G ₁ 'F	Изомер G ₁ F по расположению галактозы
G ₂ F	Фукозилированная гликоформа с двумя остатками галактозы
Другие формы	Все гликоформы, отличные от вышеуказанных

Культивирование клеток

Линии клеток CHO K1, экспрессирующие моноАТ, культивировали в течение 14–16 сут; отбор проб проводили ежедневно для подсчета клеток и определения содержания глюкозы, лактата, растворенных O₂ и CO₂, pH и осмоляльности среды.

Размораживание клеточной культуры проводили в течение 3–5 мин на водяной бане, предварительно нагретой до 37°C. Криопротектор удаляли центрифугированием клеточной суспензии при 200 g и 20 ± 2°C: надосадочную жидкость отсасывали, а в клетки вносили свежую питательную среду.

Для получения необходимого количества клеток для исследований проводили еще два посева клеточной культуры в колбы объемом 500 и 1000 см³. Клетки пересеивали при достижении плотности (2.5–4.0) × 10⁶ клеток/мл. Экспериментальное культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 1000 см³ с рабочим объемом культуральной жидкости 300 см³. Каждую пробу анализировали в двух повторах. Посевная клеточная плотность составила 0.5 × 10⁶ клеток/мл; максимальная клеточная плотность – (12–14) × 10⁶ клеток/мл; скорость вращения шейкера – 120 об./мин, температура культивирования – 37.0 ± 0.5°C, концентрация CO₂ – 5–6%, pH – в интервале 6.9–7.3.

Анализ гликанового профиля

Анализ гликанового профиля проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Культуральную жидкость получали центрифугированием клеточной суспензии при 3000 g в течение 40 мин при 4°C. Антитела выделяли хроматографией на колонках HiTrap Mab-Select (Cytiva) согласно рекомендациям производителя. Дегликозилирование моноАТ проводили с использованием набора PNGase F (Biolabs, США) по протоколу производителя. Для очистки гликанов использовали подготовленные картриджи

LudgerClean EB10 (Ludger Ltd., Великобритания) и методики, указанные производителем. Для окрашивания гликанов использовали маркирующий набор LudgerTagTM 2 AB Glycan Labeling Kit (Ludger Ltd.), окончательное выделение и очистку гликанов проводили на картриджах LudgerClean S Glycan Cleanup к (Ludger Ltd.) согласно методике производителя². Проанализированные типы гликановых цепей представлены в табл. 1.

Содержание пиков целевых гликанов (X) рассчитывали в процентах от общей площади по формуле (1):

$$X = S_i / (\sum S) \times 100, \quad (1)$$

где S_i – площадь пика G₀, G₀F, Man₅, G₁F (сумма пиков G₁F и G₁'F) или G₂F на хроматограмме испытуемого раствора; ∑S – сумма площадей всех пиков.

Содержание других форм гликанов (Y) рассчитывали в процентах от общей площади по формуле (2):

$$Y = (100 - \sum S_i) \times 100. \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследовали влияние глюкозамина в концентрации 10 и 20 мМ на формирование гликопрофиля молекул IgG2, экспрессирующихся в клеточной линии I CHO K1. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Как видно из результатов, представленных в табл. 2, глюкозамин влияет на профиль гликозилирования моноАТ. Зафиксировано увеличение гликанов G₀F на 52–53% при снижении Man₅, G₁F, G₁'F, G₂F и других форм. Следует отметить, что увеличение концентрации глюкозамина с 10 до 20 мМ не изменяло профиль гликозилирования. Полученные результаты можно объяснить тем, что глюкозамин ингибирует формирование

² Это методика для анализа паттерна N-связанных углеводных цепей, которые находятся на Fc-фрагменте моноАТ.

Таблица 2. Влияние глюкозамина на профиль гликозилирования молекул IgG2
Table 2. Effect of glucosamine on IgG2 glycosylation profile

[GlcN], mM	[Гликан]*, %						
	G ₀	G ₀ F	Man ₅	G ₁ F	G ₁ 'F	G ₂ F	другие формы
0	5.67 ± 0.35	43.52 ± 0.32	9.68 ± 0.54	9.77 ± 0.28	12.80 ± 0.54	3.49 ± 0.23	15.09 ± 0.32
10	4.67 ± 0.27	66.43 ± 0.45	2.89 ± 0.62	6.52 ± 0.36	10.25 ± 0.43	1.70 ± 0.16	7.55 ± 0.46
20	3.96 ± 0.35	65.92 ± 0.87	3.85 ± 0.51	6.72 ± 0.43	9.48 ± 0.34	1.66 ± 0.28	8.44 ± 0.38

Примечание: *Относительное содержание каждого гликана рассчитывали по формуле (1) (здесь и далее).
Note: *The relative content of each glycan was calculated by formula (1).

Таблица 3. Влияние глюкозамина на профиль гликозилирования молекул IgG1
Table 3. Effect of glucosamine on IgG1 glycosylation profile

[GlcN], mM	[Гликан], %						
	G ₀	G ₀ F	Man ₅	G ₁ F	G ₁ 'F	G ₂ F	другие формы
0	6.63 ± 0.47	45.84 ± 0.43	4.70 ± 0.32	23.69 ± 0.30	8.25 ± 0.43	4.76 ± 0.37	6.24 ± 0.54
10	4.35 ± 0.36	47.41 ± 0.38	5.57 ± 0.37	14.87 ± 0.28	5.14 ± 0.27	2.72 ± 0.23	19.94 ± 0.43
20	4.03 ± 0.48	53.55 ± 0.45	6.14 ± 0.23	13.43 ± 0.44	4.64 ± 0.38	2.04 ± 0.18	16.19 ± 0.51
30	3.83 ± 0.35	52.01 ± 0.27	6.86 ± 0.36	13.57 ± 0.53	4.64 ± 0.28	2.05 ± 0.34	17.06 ± 0.62
40	3.73 ± 0.24	50.41 ± 0.32	7.27 ± 0.43	14.54 ± 0.35	4.87 ± 0.36	2.22 ± 0.43	16.96 ± 0.72

галактозилированных форм олигосахаридов за счет конкурентного ингибирования переносчика UDP-Gal. Кроме того, глюкозамин препятствует образованию UDP-Gal за счет конкуренции за УТР при образовании UDP-GlcNAc. Оба механизма приводят к ограниченной доступности активированной галактозы в аппарате Гольджи [22, 23].

Результаты исследования по влиянию глюкозамина на профиль гликозилирования молекул подкласса IgG1, экспрессируемых в клетках СНО К1 линии II, представлены в табл. 3.

По результатам, представленным в табл. 3, видно, что добавление глюкозамина в среду клеточной линии II повышает содержание гликоформ G₀F, Man₅ и других. Наибольшее увеличение гликоформ G₀F, на 17%, произошло при добавлении 20 мМ глюкозамина, при этом относительное

содержание гликоформ G₁F, G₁'F и G₂F уменьшилось на 43%. Содержание высокоманнозных гликанов увеличивалось, фактически, пропорционально концентрации добавленного глюкозамина.

Выявленное различное действие глюкозамина на формирование гликанов в клеточных линиях I и II можно объясняется тем, что процесс трансформации изменил метаболизм клеток. Репродукция рекомбинантного белка повлияла на активность ферментов, участвующих в гликозилировании моноАТ.

Результаты исследования по влиянию сульфата меди в концентрации от 0.1 до 0.5 мМ в сочетании с 20 мМ глюкозамином на гликановый профиль синтезируемых в клеточной линии III молекул IgG1 представлены в табл. 4.

Таблица 4. Влияние ионов меди и глюкозамина на профиль гликозилирования молекул IgG1
Table 4. Effects of copper ions and glucosamine on IgG1 glycosylation profile

[GlcN], mM	[CuSO ₄], mM	[Гликан], %						
		G ₀	G ₀ F	Man ₅	G ₁ F	G ₁ 'F	G ₂ F	другие формы
0	0	4.00 ± 0.36	60.20 ± 0.61	1.60 ± 0.15	19.6 ± 0.57	7.40 ± 0.52	3.10 ± 0.34	4.10 ± 0.34
0	0.5	4.54 ± 0.46	71.87 ± 0.45	1.79 ± 0.21	10.5 ± 0.46	4.35 ± 0.52	1.08 ± 0.16	5.87 ± 0.48
20	0	3.68 ± 0.28	65.54 ± 0.65	4.30 ± 0.32	7.49 ± 0.37	2.86 ± 0.32	0.73 ± 0.086	15.4 ± 0.39
20	0.1	3.06 ± 0.25	66.88 ± 0.57	4.33 ± 0.41	7.88 ± 0.54	2.92 ± 0.28	0.75 ± 0.17	14.18 ± 0.67
20	0.5	3.61 ± 0.36	68.07 ± 0.46	4.20 ± 0.40	7.86 ± 0.37	2.88 ± 0.25	0.76 ± 0.045	12.62 ± 0.57

Таблица 5. Влияние снижения температуры культивирования клеток линии II на профиль гликозилирования молекул IgG1**Table 5.** Effect of decreasing culture temperature on IgG1 glycosylation profile

Температурный режим, °C	[Гликан], %						
	G ₀	G ₀ F	Man ₅	G ₁ F	G ₁ 'F	G ₂ F	другие формы
37/33	4.35 ± 0.85	47.41 ± 0.87	5.57 ± 0.46	14.87 ± 0.58	5.14 ± 0.65	2.72 ± 0.36	19.94 ± 0.68
37/35	4.70 ± 0.67	54.61 ± 0.62	4.15 ± 0.65	14.52 ± 0.78	5.23 ± 0.35	2.42 ± 0.42	14.40 ± 0.86
37/37	4.63 ± 0.67	54.61 ± 0.35	4.20 ± 0.55	13.74 ± 0.86	5.01 ± 0.28	2.24 ± 0.29	15.59 ± 0.83

Установлено, что в присутствии 0.5 мМ CuSO₄ в среде культивирования клеточной линии III содержание гликоформы G₀F увеличивалось на 19% относительно контрольной культуры, а гликоформ G₁F, G₁'F и G₂F снижалось на 87, 70 и 187% соответственно. Относительное содержание фракции гликоформы Man₅ не изменилось. Представленные результаты частично согласуются с данными S. Loebrich и соавт. [24], полученными на разных моноАТ, где показано, что в присутствии 1.0 мМ Cu²⁺ в культуральной среде снижалось содержание гликоформ Man₅ на 6.8% при одновременном увеличении гликоформ G₀, G₀F и G₁F на 0.7, 5.5 и 0.5% соответственно.

Полученные результаты могут быть объяснены следующим образом. Ионы двухвалентных металлов участвуют в активации гликозилтрансфераз, которые катализируют перенос углеводных фрагментов с активированного донора (нуклеотидного сахара) к молекуле-акцептору [25]. Можно предположить, что возникает конкуренция Cu²⁺ и Mn²⁺ за сайт активации фермента. Например, при достижении определенной концентрации Cu²⁺ блокирует связывание Mn²⁺, что приводит к изменению активности соответствующих гликозилтрансфераз и, как следствие, к перераспределению относительного содержания гликанов.

Следует отметить, что, в отличие от глюкозамина, при применении CuSO₄ для корректировки гликанового профиля моноАТ не происходит значимого повышения содержания гликоформ Man₅ и других.

Заключительным этапом наших исследований было изучение влияния снижения температуры культивирования на профиль гликозилирования моноАТ подкласса IgG1 в присутствии глюкозамина. При снижении температуры культивирования уменьшается скорость роста биомассы, что приводит к увеличению времени культивирования клеток: с 6–8 до 10–15 сут, – при этом повышается жизнеспособность клеток. В результате суммарная продуктивность на единицу объема среды становится выше. Температурный эффект зависит от разницы между температурами оптимума и шока, а также от возраста клеточной куль-

туры и фазы ее роста на момент снижения температуры. Применение подобных стратегии оказывает влияние не только на титр целевого продукта, но и на другие биохимические процессы клетки, в том числе на гликозилирование моноАТ.

В табл. 5 представлены результаты исследования по влиянию снижения температуры культивирования с 37°C до 35 и 33°C на профиль гликозилирования IgG1 в присутствии 10 мМ глюкозамина в среде культивирования.

При применении двухфазного температурного режима культивирования (37/35°C) и однофазного (37/37°C) профиль гликозилирования практически не изменялся. По-видимому, это связано с температурным оптимумом работы гликозилтрансфераз, который находится в пределах 35–37°C. В случае снижения температуры до 33°C для гликоформы G₀F зарегистрировано снижение относительного содержания на 15%, а для Man₅ – повышение на 34% в сравнении с режимами 37/35°C и 37/37°C.

В результате проведенных исследований показано, что добавление глюкозамина гидрохлорида в среду культивирования приводило к увеличению относительного содержания фракции G₀F в клеточных линиях I и II, в то время как содержание фракции Man₅ и других форм снижалось в клеточной линии I, а в клеточной линии II возрастало по сравнению с контрольными группами клеток. Внесение CuSO₄ в конечной концентрации 0.5 мМ приводило к увеличению относительного содержания гликоформ G₀F по отношению к контрольной культуре за счет снижения углеводных цепей G₁F, G₁'F, G₂F. Действие сульфата меди не выражено в присутствии глюкозамина. Изучено влияние на профиль гликозилирования снижения температуры культивирования в сочетании с глюкозамином. Двухфазный температурный режим 37/33°C в присутствии глюкозамина приводил к снижению относительного содержания гликоформ G₀F на 15%. Полученные нами результаты в целом согласуются с литературными источниками, но при использовании разных клеточных линий и разных условий проведения эксперимента результаты могут отличаться.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено компанией АО «Р-Фарм» в рамках внутренних проектов за счет собственного финансирования.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh G., Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotech.*, 2006, 24, 1241–1252. <https://doi.org/10.1002/9783527626601.ch1>
2. Bolton G.R., Ackerman M.E., Boesch A.W. Separation of nonfucosylated antibodies with immobilized FcγRIII receptors. *Biotechnol. Prog.*, 2013, 29(3), 825–828. <https://doi.org/10.1002/btpr.1717>
3. Wyss D.F., Wagner G. The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1996, 7(4), 409–416. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(96\)80116-9](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(96)80116-9)
4. Sinclair A.M., Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.*, 2005, 94, 1626–1635. <https://doi.org/10.1002/jps.20319>
5. Wang C., Eufemi M., Turano C., Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, 1996, 35(23), 7299–7307. <https://doi.org/10.1021/bi9517704>
6. Helenius A., Aebi M. Intracellular functions of N-glycans. *Science*, 2001, 291, 2364–2369. <https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2364>
7. Zheng K., Bantog C., Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *MAbs*, 2011, 3(6), 568–576. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.6.17922>
8. Mimura Y., Church S., Ghirlando R., Ashton P.R., Dong S., Goodall M., Lund J., Jefferis R. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.*, 2000, 37(12), 697–706. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(00\)00105-x](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(00)00105-x)
9. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
10. Butler M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *CytoTechnology*, 2006, 50, 57–76. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-4537-x>
11. Krambeck F.J., Betenbaugh M.J. A mathematical model of N-linked glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92, 711–728. <https://doi.org/10.1002/bit.20645>
12. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 30, 1158–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
13. Serrato J.A., Palomares L.A., Meneses-Acosta A., Ram'irez O.T. Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 88(2), 176–188. <https://doi.org/10.1002/bit.20232>
14. Jain E., Kumar A. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnol. Adv.*, 2008, 26, 46–72. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.004>
15. Gramer M.J., Eckblad J.J., Donahue R., Brown J., Shultz C., Vickerman K., Priem P., van den Bremer E.T., Gerritsen J., van Berkel P.H. Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108, 1591–1602. <https://doi.org/10.1002/bit.23075>
16. Edwards E., Livanos M., Krueger A., Dell A., Haslam S.M., Smales C.M., Bracewell D.G. Strategies to control therapeutic antibody glycosylation during bioprocessing: synthesis and separation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2022, 119(6), 1337–1690. <https://doi.org/10.1002/bit.28066>
17. Kildegaard H.F., Fan Y., Sen J.W., Larsen B., Andersen M.R. Glycoprofiling effects of media additives on IgG produced by CHO cells in fed-batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 2016, 113(2), 359–366. <https://doi.org/10.1002/bit.25715>
18. Clincke M.F., Guedon E., Yen F.T., Ogier V., Goergen J.L. Effect of iron sources on the glycosylation macroheterogeneity of human recombinant IFN-γ produced by CHO cells during batch processes. *BMC Proc.*, 2011 Nov 22; 5 Suppl 8:P114. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P114>
19. Hendrickson T.L., Imperiali B. Metal ion dependence of oligosaccharyltransferase: implications for catalysis. *Biochemistry*, 1995, 34, 9444–9450. <https://doi.org/10.1021/bi00029a020>
20. 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. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 96(3), 538–549. <https://doi.org/10.1002/bit.21141>
21. 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. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108(7), 1591–1602. <https://doi.org/10.1002/bit.23075>
22. Gu X., Wang D.I. Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 58(6), 642–648.
23. Ryll T., Valley U., Wagner R. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44(2), 184–193. <https://doi.org/10.1002/bit.260440207>
24. Loebrich S., Clark E., Ladd K., Takahashi S., Brousseau A., Kitchener S., Ryll T. Comprehensive manipulation of glycosylation profiles across development scales. *MAbs*, 2019, 11(2), 335–349. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1527665>
25. Mikolajczyk K., Kaczmarek R., Czerwinski M. How glycosylation affects glycosylation: the role of N-glycans in glycosyltransferase activity. *Glycobiology*, 2020, 30(12), 941–969. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa041>

Effect of Glucosamine and Copper Ions on the Glycosylation Pattern of Monoclonal Antibodies Expressed in CHO cells

E. A. Guzov^{a, #}, M. A. Tsiruleva^a, A. V. Iserkapov^a, A. P. Tyukova^b,
V. N. Kazin^b, V. M. Kolyshkin^a, and V. G. Ignatiev^a

^a*R-Pharm Joint-Stock Company, Yaroslavl, 150061 Russia*

^b*Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia*

[#]*e-mail: guzov@rphrm.ru*

Abstract—The effect of glucosamine hydrochloride and copper sulfate on the glycosylation profile of recombinant monoclonal antibodies of the IgG1 and IgG2 subclasses expressed in CHO K1 cells has been studied. Three cell lines producing recombinant monoclonal antibodies specific to different biomolecules were analyzed. It was found that the introduction of glucosamine during cultivation of CHO K1 cells influenced the formation of the glycosylation profile of N-linked glycans of monoclonal antibodies. In the presence of glucosamine, the relative content of fucosylated glycoforms without terminal galactose residues increased. The addition of CuSO₄ also led to an increase in the relative content of fucosylated glycoforms without terminal galactose residues due to a decrease in the relative content of galactosylated glycoforms, while the relative content of high-mannose forms did not change. The effect of lowering the cultivation temperature of CHO cells in the presence of glucosamine on the glycosylation profile of monoclonal antibodies was studied. It was shown that the temperature regime of 37/33°C when cultivating CHO cells in the presence of glucosamine led to a change in the glycan profile of recombinant monoclonal antibodies.

Keywords: monoclonal antibodies, N-glycosylation, glucosamine, copper ions, temperature, CHO K1