

VU Research Portal

Methods for the glycosylation analysis of therapeutic antibodies

Reusch, D.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Reusch, D. (2015). *Methods for the glycosylation analysis of therapeutic antibodies*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Immunoglobulinen (Ig), ook wel antilichamen genoemd, vormen een belangrijk onderdeel van de menselijke afweerrespons. Te onderscheiden zijn de vijf verschillende isotypen IgA, IgD, IgE, IgG en IgM, waar IgG weer verder onderverdeeld kan worden in de vier subklassen IgG1, IgG2, IgG3 en IgG4. Ieder van de IgGs is opgebouwd uit twee zware en twee lichte aminozuurketens, gebonden door middel van zwavelbruggen, en heeft de kenmerkende vorm van een Y. De monoklonale antilichamen die heden ten dagen geproduceerd worden door de farmaceutische industrie zijn van groot belang voor de behandeling van ziekten, en behoren globaal gezien tot de meest verkochte medicijnen. Ze worden binnen vele medische gebieden gebruikt, met voorbeelden in de oncologie (niet-kleincellige longkanker, melanoom, neuroblastoom, slokdarm- en maagkanker, darmkanker, borstkanker, etc.), autoimmuunziekten (rheumatoïde arthritis, arthritis psoriatica, de ziekte van Bechterew, psoriasis, de ziekte van Crohn, multiple sclerose, etc.) en infectieziekten (miltvuur). Momenteel zijn er honderden therapeutische antilichamen in ontwikkeling en zijn er meer dan vijftig monoklonale antilichamen goedgekeurd of in beschouwing binnen de Europese Unie en de Verenigde Staten. Als zodanig is de ontwikkeling en commercialisering van therapeutische antilichamen van buitengewoon belang voor de farmaceutische industrie.

IgGs zijn geglycosyleerd op asparagine 297 van het Fc gedeelte, een site die gekenmerkt wordt door de aminozuursequentie Asn-X-Ser/Thr (waarbij X ieder aminozuur kan zijn behalve proline). Op de site zijn drie soorten biantennaire N-glycanen terug te vinden: mannose-rijk, hybride, en complex. Glycosylering kan een groot effect hebben op de activiteit, farmacodynamiek en immunogene werking van biologische geneesmiddelen, en moet ter voorkoming van nadelige effecten met de menselijke variant overeenkomen en consistent geproduceerd worden. Het is derhalve van groot belang dat er toezicht wordt gehouden op de glycosylering van IgG tijdens de ontwikkeling van cellijnen, kloonsselectie, karakterisatie- en validatiestudies, maar ook voor de vergelijkbaarheid en vrijgave van een eindproduct.

Er wordt in de biotechnologische industrie gebruik gemaakt van een groot aantal analytische methoden, veelal gebaseerd op scheidingstechnieken en/of massaspectrometrie. In principe kunnen de meeste methoden voor glycaananalyse worden ondergebracht in drie groepen: 1) analyse van een intact molecuul en deductie van de glycaancompositie, 2) het losmaken van de glycosylering met enzymatische of chemische middelen, gevolgd door analyse van de losse glycanen, en 3) proteolyse van de eiwitsequentie, gevolgd door analyse van de glycopeptiden. Voor procesontwikkeling, ontwikkeling van medium, en kloonsselectie is er in de biotech grote vraag naar glycoanalysemethoden met hoge doorloopsnelheid.

De biologische en klinische rol van IgG Fc N-glycosylering, met name als kwaliteitskenmerk (CQA), wordt behandeld in **Hoofdstuk 2**. Zowel in de literatuur gepubliceerde resultaten als

interne data worden geëvalueerd in relatie tot patientveiligheid, immunogeniteit, bioactiviteit, farmacodynamica en farmacokinetiek.

Massaspectrometrie is geschikt voor structurele karakterisering van eiwitglycosylering en site-specifieke structurele karakterisering van glycopeptiden. In **Hoofdstuk 3** wordt de ontwikkeling beschreven van een snelle, volautomatische methode voor de massaspectrometrische analyse van glycopeptiden, met als resultaat een robuust systeem voor monsters opgewerkt in 96-well indeling. IgGs worden direct ingevangen vanuit de fermentatievloeistof met geïmmobiliseerd proteïne A, gevolgd door tryptische digestie, purificatie van de glycopeptiden met hydrofiele interactie-vloeistofchromatografie (HILIC), robotische injectie in een electrospray massaspectrometer (ESI-MS), en analyse van de positieve ionen. Het gaat hier om een gerobotiseerde variant van een recentelijk gepubliceerde methode, en naast het gebruik van ESI-MS in plaats van MALDI-MS zijn er verscheidene stappen geoptimaliseerd. Bij analyse bleken de relatieve hoeveelheden van de glycovormen goed overeen te komen met alternatieve methoden, en de procedure is toegepast voor het meten van de staat van glycosylering gedurende een fermentatieproces. Tevens bleek het mogelijk om de fermentatietijd af te leiden die nodig is voor een wenselijke glycosylering, en om te onderzoeken hoe de glycosylering beïnvloed wordt door veranderingen in het fermentatieproces. Er werd bevonden dat de concentratie acetonitril en trifluorazijnzuur van cruciaal belang is tijdens de HILIC opzuivering. De gehele procedure bleek accuraat, precies en reproduceerbaar, en kan gebruikt worden voor het selecteren van klonen, de ontwikkeling van media, grootschalige glycaananalyse, procesontwikkeling en proceskarakterisering.

In **Hoofdstuk 4** van dit proefschrift wordt de ontwikkeling van nog een snelle, automatische methode beschreven, ditmaal voor de analyse van de losse glycanen afkomstig van IgG. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een DNA Analyzer voor multiplex capillaire-gel elektroforese (CGE) met detectie door lasergeïnduceerde fluorescentie (LIF). Na purificatie met proteïne A en PNGase F digestie worden de glycanen in 96-well indeling gelabeld met 8-aminopyreen-1,3,6-trisulfonzuur (APTS), gevolgd door simultane analyse van maximaal 48 monsters. De kwantitatieve analyse van de data wordt vervolgens uitgevoerd met binnenshuis ontwikkelde software. Aangezien de DNA Analyzer niet direct aan een massaspectrometer gekoppeld kan worden, wordt de piekannotatie uitgevoerd met HILIC-UPLC-MS/MS van de APTS-gelabelde glycanen, gecombineerd met fractionering en CGE-LIF analyse van de MS-gekaracteriseerde fracties. Normalisering kan plaatsvinden met behulp van DNA fracties, aangezien de gekarakteriseerde pieken direct aan basepaareenheden gekoppeld kunnen worden binnen de software. Het resultaat is een eenduidige piekverklaring voor iedere run. Het CGE-LIF DNA Analyzer systeem bleek met APTS-gelabelde glycanen een scheidingscapaciteit te hebben die vergelijkbaar is met HILIC-UPLC na 2-aminobenzamide (2-AB) labeling.

Met de beschreven experimenten werd gevonden dat de CGE-LIF methode een uitstekende scheidingscapaciteit heeft, samen met een zeer goede herhaalbaarheid, een intermediaire precisie en een hoge robuustheid. De methode is tevens met succes toegepast voor het meten van de staat van glycosylering gedurende een fermentatierun. Zoals verwacht voor de fermentatie van therapeutische antilichamen in CHO cellen, bleek de relatieve hoeveelheid G0F te stijgen met fermentatieduur en G1F overeenkomstig af te nemen.

In **Hoofdstuk 5** en **Hoofdstuk 6** wordt een alomvattende vergelijking gemaakt tussen methoden die geschikt zijn voor het analyseren van therapeutische IgG Fc glycosylering. **Hoofdstuk 5** vergelijkt specifiek de methoden die gebaseerd zijn op scheiding, terwijl **Hoofdstuk 6** zich bezighoudt met methoden gebaseerd op massaspectrometrie. Voor iedere methode is referentiemateriaal, namelijk een therapeutisch antilichaam, zesmaal geanalyseerd op twee verschillende dagen, en vergeleken in onder andere precisie, accuraatheid en doorloopsnelheid. Aan de analyse van gesialyleerde glycanen is speciale aandacht geschonken, alhoewel deze slechts in lage hoeveelheid aanwezig zijn. In beide studies wordt als referentiemethode gebruik gemaakt van hydrofiele-interactie vloeistofchromatografie van 2-AB gelabelde glycanen.

De zeven op scheiding gebaseerde methoden lieten een uitstekende performance zien wat betreft precisie, accuraatheid en scheiding, en zijn buitengewoon geschikt voor de analyse van de Fc-glycosylering van IgG1. De relatieve kwantificatie van de individuele glycanen bleek vergelijkbaar. In principe kunnen al de onderzochte methoden ingezet worden als analysemethode voor vrijgave, en validatie hiervan zou geen probleem moeten vormen. In onze handen bleek de referentiemethode (2-AB HILIC) optimaal als vrijgavemethode, en de methode met de beste doorlooptijd bleek DSA-FACE (APTS), dankzij de mogelijkheid om 96 monsters in parallel te analyseren. Indien een volledige karakterisering van de glycosylering noodzakelijk is, heeft het voordeel om twee methoden in parallel te gebruiken.

Voor de massaspectrometriemethoden bestaat het risico van in-source fragmentatie, wat de analyse in gevaar kan brengen. Hierdoor kan er niet altijd onderscheid gemaakt worden tussen glycanen van het monster zelf, en glycanen die ontstaan zijn door in-source fragmentatie. Desalniettemin kunnen met alle methoden, behalve de ESI-MS Heavy Chain, de meest voorkomende glycanen worden gedetecteerd en gekwantificeerd met hoge accuraatheid en precisie. Tevens bleken de resultaten van de massaspectrometriemethoden zeer over een te komen met de scheidingsmethoden (diegenen zonder massaspectrometriedetectie), zowel in robuustheid en accurate detectie, als voor de kwantificatie van laag-aanwezige glycovormen.

In **Hoofdstuk 7** is geschreven over de *in vitro* glycoengineering van IgG1 en het effect daarvan op de Fc receptor bindingsactiviteit en Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC). De invloed van IgG1 Fc galactosylering en sialylering op de effector functies is onderzocht door middel van monsters geproduceerd met *in vitro* glycoengineering. Een scala aan

analytische assays is uitgeprobeerd, inclusief Surface Plasmon Resonance (SPR), de recent ontwikkelde Fc γ R affiniteitschromatografie, en een geoptimaliseerde ADCC assay op cel-basis. Geen effect werd gevonden, positief of negatief, van sialylering van IgG1 Fc glycanen op Fc γ RI, Fc γ RIIA en ADCC activiteit, hoewel een kleine verbetering in Fc γ RIIa binding aantoonbaar was. Tevens kon een positief effect worden aangetoond van de IgG1 galactosylering op de binding met Fc γ RIIa en Fc γ RIIIa, en de ADCC activiteit.

Het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 8**) is een algehele discussie, en plaatst de individuele hoofdstukken in context. De sterke kanten, tekortkomingen, toepassingsgebieden en perspectieven voor de glycoanalytische methoden worden uitgemeten. Tevens wordt er gediscussieerd over de uitdagingen en nieuwe ontwikkelingen binnen de glycoanalytische methoden voor biologische geneesmiddelen, en wordt er gesproken over het gebruik van *in vitro* glycoengineering voor onderzoek naar de relatie tussen structuur en functie.