



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Oxidation, aggregation and immunogenicity of therapeutic proteins

Torosantucci, R.

Citation

Torosantucci, R. (2013, September 17). *Oxidation, aggregation and immunogenicity of therapeutic proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21762>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/21762>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21762> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Torosantucci, Riccardo

Title: Oxidation, aggregation and immunogenicity of therapeutic proteins

Issue Date: 2013-09-17

Appendix 1

Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

Samenvatting

Recombinante humane therapeutische eiwitten hebben unieke structurele en biologische eigenschappen waardoor ze bruikbaar zijn voor de behandeling van verschillende aandoeningen. Een nadeel van deze klasse geneesmiddelen is dat ze immunogeen zijn, wat wil zeggen dat sommige patiënten anti-geneesmiddel antilichamen (ADAs) tijdens de behandeling ontwikkelen. Van de vele factoren die betrokken zijn bij eiwit-immunogeniciteit is aggregatie van eiwitten een belangrijke risicofactor.

Aggregaten die door oxidatieve stress worden gevormd zijn bijzonder immunogeen gebleken. Het doel van dit proefschrift was om de mechanismen achter eiwitaggregatie ten gevolge van gekatalyseerde oxidatie te onderzoeken (MCO), en daarnaast om de relatie tussen oxidatie, aggregatie en immunogeniciteit van therapeutische eiwitten te bestuderen.

Hoofdstuk 2 beschrijft een literatuuronderzoek van de structurele en biologische gevolgen van oxidatie waargenomen in therapeutische eiwitten en peptiden, met name gericht op antilichamen, calcitonine, granulocyt koloniestimulerende factor, groeihormoon, interferon alfa en bèta, insuline, oxytocine en bijschildklierhormoon.

Hoofdstuk 3 vergelijkt het aggregatiegedrag van gepegyleerde en niet-gepegyleerde insuline onder stresscondities. Recombinant humaan insuline werd aan lysine B29 geconjugerd met 5-kDa PEG en onderworpen aan verhitting bij 75 °C, metaal gekatalyseerde oxidatie en glutaaraldehyde cross-linking. Onder elke stressconditie toonden insuline en gepegyleerd insuline vergelijkbare degradatieprofielen. Alle gestreste monsters bleken aggregaten te bevatten in de ordegrootte tussen 50 en 500 nm. Ook microneeltjes werden in diverse gestreste monsters gevonden. Afhankelijk van de toegepaste stress werden voornamelijk covalente aggregaten samengesteld uit eiwitmoleculen met verschillende mate van modificatie in de secundaire en tertiaire structuur gemeten. Pegylatie bleek echter de gevoeligheid van insuline voor aggregatie niet te beïnvloeden.

Therapeutische eiwitten zoals recombinant humaan interferon alfa, recombinant humaan interferon bèta en monoklonale antilichamen vormen

zeer immunogene aggregaten geïnduceerd onder invloed van koper gekatalyseerde oxidatie. In **Hoofdstuk 4** wordt het chemische mechanisme beschreven van insulineaggregatie door MCO, geïnduceerd door middel van Cu^{2+} /ascorbinezuur. Geoxideerde insuline bleek DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanine) en DOCH (of propionzuur) te bevatten, afkomstig van Phe en Tyr residuen. DOCH, dat een elektronenacceptor is voor 1,4 - of 1,6-type toevoeging (d.w.z. Michael-additie), bleek verantwoordelijk te zijn voor nieuwe cross-links die resulteerden in covalente aggregatie van insuline tijdens MCO. Specifiek werden 1,4 - of 1,6-type additie producten gedetecteerd tussen DOCH op posities B16, B26, A14 en A19, en de vrije aminogroepen van de N-terminale aminozuren Phe B1 en Gly A1 en de zijketens van Lys B29, His B5 en His B10. Fragmenten afkomstig van gehydrolyseerde peptidebindingen werden ook gemeten.

Hoofdstuk 5 beschrijft het onderzoek naar de anti-oxiderende eigenschappen van verschillende hulpstoffen tijdens Cu^{2+} /ascorbaat gekatalyseerde oxidatie van humaan insuline. Van de onderzochte hulpstoffen bleek 100 μM triethyleentetramine (TETA) de enige stof die vrijwel volledig door oxidatie-geïnduceerde insulineaggregatie, -fragmentatie en structurele veranderingen van insuline verminderde. TETA voorkwam ook aggregatie en fragmentatie van een monokonaal IgG1 onder identieke oxidatieve omstandigheden, wat de algemene toepasbaarheid van TETA aangeeft als anti-oxidant voor kopergevoelige eiwitten. Concluderend is TETA een veelbelovende kandidaat als hulpstof in formuleringen van oxidatie-gevoelige eiwitten.

Oxidatie via Cu^{2+} /ascorbaat van recombinant humaan interferon bèta-1a ($\text{IFN}\beta$) leidt tot zeer immunogene aggregaten. In **Hoofdstuk 6** wordt een studie gepresenteerd naar de identificatie van de oxidatieplaatsen en covalente cross-links in $\text{IFN}\beta$, blootgesteld aan MCO. Oxidatieproducten van Met, His, Phe, Trp en Tyr restgroepen werden geïdentificeerd in de primaire structuur van het eiwit. Vergelijkbaar met insuline (**Hoofdstuk 4**) werden covalente crosslinks via 1,4 - of 1,6-type addities tussen primaire amines en DOCH gevonden, terwijl er geen bewijs was voor de vorming van een disulfide brug, Schiff base, of dityrosine. De geïdentificeerde chemische cross-links,

veroorzaakt door oxidatie, zijn hoogstwaarschijnlijk verantwoordelijk voor de vorming van immunogene covalente aggregaten van IFN β .

In **Hoofdstuk 7** is het immunologische mechanisme bestudeerd dat verantwoordelijk is voor de immunogeniciteit van geaggregeerd recombinant humaan interferon alfa-2a (IFN α -2a) en de invloed van geaggregeerd IFN β op IFN α 's immunogeniciteit. Transgene muizen die immunotolerant zijn voor IFN α werden behandeld met natief (in oorspronkelijke staat verkerend) of geaggregeerd IFN α . Na een uitwasperiode werden de muizen opnieuw blootgesteld aan natief of geaggregeerd IFN α om de betrokkenheid van CD4⁺ T-cellen in de immunogeniciteit te testen. Voorts werden de muizen behandeld met een formulering die geaggregeerd IFN β en oorspronkelijk IFN α bevatte om te testen of IFN β werkt als een adjuvans voor IFN α . Na een uitwasperiode en een hernieuwde blootstelling met geaggregeerd of natief IFN α werd een schijnbaar gebrek aan immunologisch geheugen waargenomen. Wanneer we de CD4⁺ T-cell functie blokkeerden in immunotolerante muizen werden geen ADAs geïnduceerd door geaggregeerd rhIFN α . Tenslotte ontwikkelden immunotolerante muizen, behandeld met een mengsel van geaggregeerd IFN β en natief IFN α , geen antilichaamreactie tegen IFN α . Deze resultaten komen overeen met eerdere resultaten verkregen met IFN β .

Hoofdstuk 8 rapporteert de validatie van een adjuvans-vrij muismodel, dat is bedoeld als hulpmiddel om de immunogeniciteit van insulineformuleringen te evalueren. Toediening van humaan insuline (20 μ g/dosis, 12 doseringen over een periode van 4 weken) resulteerde in een immuunrespons in niet-transgene dieren, daar waar de transgene muizen immuuntolerant bleken te zijn. Deze tolerantie in transgene muizen kon worden omzeild indien ze werden behandeld met insuline dat covalent is gebonden aan polystyrene nanodeeltjes met een diameter van 50 nm. Dit transgene muismodel voor humane insuline werd toegepast om de immunogeniciteit van insulineformuleringen te vergelijken en kan van nut zijn voor verder onderzoek naar het mechanisme achter de immunogeniciteit van therapeutische eiwitten, met insuline als model eiwit.

Perspectieven

Het wetenschappelijk werk dat in dit proefschrift is gepresenteerd heeft als doel een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van veiligere, minder immunogene biofarmaca, door het beschrijven van de mechanismen achter MCO-geïnduceerde aggregatie van therapeutische eiwitten en de relatie met immunogeniciteit. Verder onderzoek is echter nodig om de degradatie van therapeutische eiwitten beter te verhinderen en een beter inzicht te krijgen in de factoren die bijdragen aan hun immunogeniciteit.

Dit gedeelte biedt een aantal perspectieven voor toekomstig onderzoek, gericht op strategieën om eiwitafbraak te verhinderen en analytische methoden ontwikkelen voor eiwitkarakterisering.

Strategieën om eiwitaggregatie te verhinderen

In de laatste twee decennia is de farmaceutische industrie zich meer bewust geworden van de risico's van afbraakproducten in eiwitformuleringen, voornamelijk aggregaten, wat de zoektocht naar oplossingen voor het voorkomen en verminderen van aggregatie rechtvaardigt. Doorgaans kunnen twee strategieën ingezet worden om eiwitdegradatie te voorkomen. De eerste strategie richt zich op het verbeteren van de eiwitstabiliteit door het eiwitmolecuul te modificeren, door genetische of chemische modificatie (bijvoorbeeld door bio-conjugatie zoals pegylatie). De tweede optie is het formuleren van een eiwitmolecuul. Een voorbeeld van de eerste strategie is de productie van een humaan interleukin-1 eiwit waar Asn36 gemuteerd is tot Ser36. De driedimensionale structuur van dit genetisch gemanipuleerde eiwit bleek identiek te zijn aan die van het oorspronkelijke eiwit, zoals aangetoond met circulair dichroïsme en proton NMR. De eiwitmutant was resistent tegen base-gekatalyseerde en hitte-geïnduceerde deamidatie.

Chemische modificatie, zoals conjugatie van eiwitten met polymeren (bijvoorbeeld PEG), kan in sommige gevallen een oplossing zijn, zoals dat bijvoorbeeld is aangetoond door de relatief hogere stabiliteit van gepegyleerde IFN eiwitten ten opzichte van hun ongemodificeerde varianten. Pegylatie is ingezet om de halfwaardetijd te verhogen om resistentie tegen enzymatische degradatie te vergroten en om de vorming van fibrillaire aggregaten tegen te gaan. Maar zoals is aangetoond in hoofdstuk 3 werd de

degradatie van insuline in een vloeibare formulering niet verhinderd door pegylatie. In onze studies hebben wij echter een 5-kDa PEG gebruikt, waardoor wij niet kunnen uitsluiten dat andere vormen van pegylatie de stabiliteit ten goede kunnen komen. Hulpstoffen worden veelal ingezet om eiwitten te beschermen tegen aggregatie en oxidatie. In hoofdstuk 5 zijn verschillende anti-oxiderende moleculen getest op hun potentieel beschermende effect tegen MCO-geïnduceerde aggregatie en fragmentatie van insuline en een monoclonaal antilichaam. Eén van de geteste moleculen, triethyleentetra-amine (TETA), bleek het meest veelbelovend te zijn om MCO te verhinderen. Het is op dit moment echter niet bekend of TETA oxidatie kan verhinderen van aminozuurresiduen die niet betrokken zijn bij aggregatie, zoals methionine en tryptofaan, welke niet aanwezig zijn in insuline.

Toekomstige studies zouden het beschermende effect van TETA moeten verifiëren tegen oxidatie van zulke aminozuurresiduen met hulp van tandem-massaspectrometrie. Oppervlakte-actieve hulpstoffen zoals polysorbaat 80 worden veel ingezet in eiwitformuleringen en zijn tevens nuttig om eiwit aggregatie te verhinderen. Eén van de grote nadelen van polysorbaten is dat zij alkyl ketens bezitten die kunnen auto-oxideren, waardoor eiwit beschadigende peroxides ontstaan. Aangezien peroxidevorming sterker is in een aërobe omgeving en verder versterkt wordt door licht, zou een eerste strategie om de hoeveelheid van deze reactieve moleculen in polysorbaten terug te dringen zijn om elk contact met lucht/zuurstof tijdens opslag te vermijden. Vervolgens kan de toevoeging van anti-oxiderende hulpstoffen behulpzaam zijn om de vorming van radicalen te verminderen of te minimaliseren. In dit geval zouden chelatoren zoals TETA niet gebruikt moeten worden, omdat deze anti-oxidantia niet in staat zijn om radicalen weg te vangen. Daarentegen kunnen moleculen zoals methionine, vitamine E of glutathion overwogen worden.

Concluderend, om degradatie te verhinderen is een sterk inzicht nodig in de achterliggende mechanismen. In hoofdstuk 4 bijvoorbeeld, door het gebruik van hoog gevoelige tandem-massaspectrometrische analyse en selectieve fluorogene labels, toonden wij aan dat insulineaggregatie in ons oxidatieve systeem plaatsvond door oxidatieproducten van tyrosine die kunnen reageren met aminogroepen in het insulinemolecuul. Gebaseerd op deze bevindingen stelden wij twee strategieën voor om aggregatie te verhinderen of te

reduceren (hoofdstuk 4). De mechanismen die betrokken zijn bij verscheidene andere degradatieprocessen zouden op gelijke manier geanalyseerd moeten worden om elke andere manier van eiwitdegradatie tegen te gaan.

Analytische hulpmiddelen voor eiwitkarakterisatie

Wanneer een eiwit degradeert, vormt zich over het algemeen een heterogene mix van degradatieproducten met verschillende fysisch-chemische eigenschappen, zoals aggregaten met verschillen in grootte, vorm, eiwitconformatie en chemische modificaties, alsmede qua structuur gemodificeerde monomeren en fragmenten. Elk van deze soorten kan mogelijk bijdragen aan ongewilde nevenreacties.

Voor een adequate karakterisatie van elk van deze soorten degradatieproducten moet men de beschikking hebben over betrouwbare, robuuste analysemethoden. De meeste van de routineuze analytische technieken voor de karakterisatie van aggregaten bij kwaliteitscontrole, richten zich op een deeltjesgrootte van $>1 \mu\text{m}$ en $<100 \text{ nm}$, welke duidelijk een groot gat laten in het subvisuele deeltjesgroottebereik. Technieken zoals nanoparticle tracking analyse (NTA, welke gebruikt is in verscheidene studies gepresenteerd in dit proefschrift) en flow imaging microscopie maken het mogelijk om deeltjesaggregatie te visualiseren en kwantificeren, en geven informatie over de deeltjesgrootte. Deze methoden worden in toenemende mate gebruikt als karakterisatiehulpmiddelen om het eerder genoemde gat in het deeltjesgroottebereik te dichten.

Daarnaast kan een nauwkeurig beeld worden gevormd van chemische modificaties van eiwitgeneesmiddelen met hoog gevoelige MS/MS-analyse. Sommige gedetecteerde chemische modificaties zoals Trp-oxidatie kunnen echter artefacten zijn die ontstaan tijdens de monstervoorbereiding. Selectieve chemische derivatisering voorafgaand aan de MS-analyse kan overwogen worden om misinterpretatie van de resultaten te voorkomen. Bijvoorbeeld, een vergelijkbare fluorogene derivatisatie zoals in hoofdstuk 4 wordt getoond kan op geoxideerde Trp-residuen toegepast worden.

