



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Boosting mass spectrometry-based analytics for biopharma Gstöttner, C.J.

Citation

Gstöttner, C. J. (2021, November 30). *Boosting mass spectrometry-based analytics for biopharma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3245884>

Version: 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/1887/3245884>

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

Appendices

Nederlandse samenvatting

Antilichamen worden veelvuldig ingezet als medicijn bij de behandeling van verschillende ziektes. Aanvankelijk werden deze therapeutische antilichamen uit bloed van donoren gezuiverd, echter tegenwoordig worden deze veelal recombinant geproduceerd. Het kan hierbij zowel om een conventioneel antilichaam gaan als een antilichaam met geoptimaliseerde functionaliteiten. Evenals endogene antilichamen bevatten recombinant geproduceerde antilichamen verschillende post-translationele modificaties (PTMs), die potentieel de functie kunnen beïnvloeden. Het is van groot belang de effecten van deze PTMs in kaart te brengen teneinde de veiligheid en effectiviteit van de medicijnen te garanderen (**Hoofdstuk 1**). Ondanks dat er verschillende analytische platforms succesvol zijn ontwikkeld voor de karakterisering van monoklonale antilichamen (mAbs), is het belangrijk dat technologie verder wordt ontwikkeld en geoptimaliseerd voor nauwkeurige analyse van nieuwe therapeutische antilichamen. De volgende aspecten zijn hierbij van belang: automatisering, de detectie van onverwachte PTMs en proteovorm-specifieke functionele karakterisering.

In **Hoofdstuk 2** en **3** wordt automatisering van zogenaamde *bottom-up* methoden voor de snelle karakterisering van antilichamen beschreven. Door automatisering kunnen er meer monsters in een kortere tijd geanalyseerd worden. De doorlooptijd voor analyse wordt verkort en het risico op introductie van onbedoelde modificaties wordt kleiner. In **Hoofdstuk 2** wordt de integratie van een *bottom-up* methode met een multidimensionaal vloeistofchromatografie systeem beschreven. De antilichamen worden hierbij gescheiden op basis van lading, gevolgd door een *bottom-up* karakterisering. Deze methode maakt gedetailleerde en geautomatiseerde karakterisering van antilichaamvarianten met een verschil in lading mogelijk zonder dat er fracties geïsoleerd worden. Dit is een voordeel aangezien zulke fracties vaak een mengsel van verschillende varianten bevatten als gevolg van niet-perfecte chromatografische scheiding. Daarnaast kan met deze aanpak *offline* monstervoorbewerking omzeild worden. Hierdoor worden de volgende stappen uitgevoerd zonder dat er handen aan te pas komen: reductie, digestie met trypsine en meting met LC-MS(/MS). In **Hoofdstuk 3** wordt deze nieuwe aanpak met een online digestie met trypsine verder ontwikkeld door middel van optimalisatie van de kolom, *flow rate* en temperatuur. Op deze manier kan de aminozuursequentie (primaire structuur) van de antilichamen met eenzelfde kwaliteit worden vastgesteld als bij de conventionele *offline* procedures. Dit hoofdstuk laat daarnaast zien dat het mogelijk is geformuleerde mAbs en bispecifieke antilichamen (BsAbs) direct en snel te analyseren zonder extra monstervoorbehandeling. Hiermee wordt een alternatief geboden voor eerdergenoemde geautomatiseerde platforms.

Bottom-up onderzoeksstrategieën zijn geschikt om monospecifieke antilichamen in detail te karakteriseren, echter voor het lokaliseren van modificaties op nieuwe antilichaam

producten zijn additionele technieken noodzakelijk. Zo is bijvoorbeeld van een proteolytisch glycopeptide niet vast te stellen bij welke zware keten van het BsAbs deze hoort. Daarom zijn in **Hoofdstuk 4** *middle-up/down* procedures ontwikkeld gebaseerd op *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI)-MS voor de lokalisering van PTMs van BsAbs op het niveau van de ketens en de aminozuren. Het voordeel van deze methodes wordt gedemonstreerd aan de hand van geglyceerde BsAb monsters, waar meerdere glycaties op de ketens zijn gedetecteerd. De exacte plaats van de glycatie kon worden achterhaald wanneer deze zich dichtbij de N- of C-terminus bevond door fragmentatie met *in-source decay* (ISD). In **Hoofdstuk 5** wordt MALDI-ISD toegepast voor de detectie van een labiele modificatie (sulfatering) op een antilichaam. Deze sulfatering kon met ISD toegekend worden aan een tyrosine residu, iets wat niet mogelijk is met andere fragmentatietechnieken. Naast sulfatering wordt in **Hoofdstuk 5** ook een 4-hydroxyproline modificatie beschreven op een nieuw antilichaam product. Tot slot is een *in silico* model ontwikkeld om modificaties al in een vroeg stadium (tijdens het ontwerpproces van mAbs en BsAbs) te kunnen voorspellen. Hierdoor kan de sequentie voorafgaand aan de expressie aangepast worden teneinde te voorkomen dat ongewenste modificaties in het eindproduct aanwezig zijn.

Hoofdstuk 6 beschrijft een alternatieve methode gebaseerd op capillaire elektroforese (CE)-MS om BsAbs te bestuderen op het *middle-up* en intacte niveau. Hiervoor worden twee zuster BsAbs gebruikt die binden aan hetzelfde deel van een antigeen maar verschillend geproduceerd zijn. In dit hoofdstuk wordt de toepassing van een nieuwe hinge-regio endoprotease (*SpeB*) onderzocht voor antilichamen met een aangepaste hinge regio (vergeleken met IgG1) als alternatief voor het veelgebruikte *IdeS* enzym. Met de ontwikkelde CE-MS methode voor de bestudering van de intacte structuur van een BsAbs is het mogelijk om naast het antilichaam ook nevenproducten te karakteriseren, zoals ontbrekende BsAbs-ketens, vrije lichte ketens met verschillende PTMs of BsAbs die één N-glycosylering missen. Minimale monstervoorbehandeling is van groot belang teneinde verlies van de quaternaire structuur te voorkomen tijdens het onderzoek naar macroheterogeniteit. Deze CE-MS methode is verder toegepast om de correcte samenstelling van BsAbs te controleren. **Hoofdstuk 7** demonstreert de toepasbaarheid van CE-MS op het niveau van intacte antilichamen om de uitwisselingsefficiëntie te monitoren tijdens bispecifieke antilichaamproductie met behulp van een gecontroleerde Fab-armuitwisseling. De methode is geschikt voor antilichamen met en zonder Fab-glycosylering. Daarnaast maakt deze methode het mogelijk om afbraakproducten die optreden tijdens langdurige opslag te monitoren.

De aanwezigheid van PTMs op antilichamen kan vragen oproepen over hun impact op de functionaliteit. Vaak worden deze functies gemeten met behulp van bindingstechnieken, zoals ELISA of SPR. Echter, deze technieken leveren slechts een gemiddelde waarde van de functie van een compleet mAb monster. Om functie van proteovormen vast te kunnen stellen aan de hand van deze technieken moeten er fracties opgevangen worden of

specifieke varianten geproduceerd worden, wat in beide gevallen veel tijd kost. **Hoofdstuk 8** behandelt deze problematiek en draagt mobiliteitsverschuivingsaffiniteit CE-MS aan als alternatieve techniek om antilichaaminteracties op een proteovorm-specifieke manier te bestuderen zonder additionele prefractionering. Met de ontwikkelde methodiek wordt de interactie bestudeerd tussen verschillende antilichaam-proteovormen en de FcRn-receptor, welke verantwoordelijk is voor de halfwaardetijd van antilichamen. De informatie over de affiniteit wordt verkregen door de verschuiving in mobiliteit na toevoeging van de receptor. De koppeling met MS brengt de benodigde structurele informatie. Verder laat dit hoofdstuk zien dat door het gebruik van verschillende hoeveelheden FcRn-receptor in de achtergrondelektrolyt, K_d -waarden voor elke proteovorm tegelijkertijd kunnen worden bepaald.

Het laatste deel van dit proefschrift (**Hoofdstuk 9**) richt zich op de karakterisering van het recombinant geproduceerde SARS-CoV-2 receptorbindend domein (RBD). Om een totaalbeeld van het RBD te krijgen ondanks de immense complexiteit en beperkte voorkennis, is het noodzakelijk om *multilevel* benadering toe te passen, namelijk O-glycaan analyse, *bottom-up* N-glycopeptide analyse, MALDI *top-down* fragmentatie en intacte CE-MS metingen. Daarnaast worden een endo- en exoglycosidase enzym ingezet teneinde de complexiteit van RBD te reduceren. Op deze manier kunnen alle glycovormen en PTMs toegerekend worden. Twee RBD-monsters geproduceerd in verschillende celtypen (CHO en HEK293) worden gekarakteriseerd en heterogeniteit wordt in kaart gebracht. Verder wordt in dit hoofdstuk voor het eerst aangetoond waar de O-glycosylering in het RBD is gelokaliseerd. Hiervoor is een combinatie van intacte en *top-down* MS analyses nodig. Na structurele karakterisering worden bindingsassays met antilichamen van SARS-CoV-2-patiënten en de ACE2 receptor uitgevoerd om de binding (en mogelijke verschillen) tussen de twee RBD-monsters te onderzoeken.

Het laatste hoofdstuk (**Hoofdstuk 10**) bevat een algemene discussie van de onderwerpen die zijn besproken in dit proefschrift. Dit hoofdstuk beschrijft de noodzaak voor geautomatiseerde platforms voor monsteranalyse in de farmaceutische industrie en hoe deze verder verbeterd kunnen worden. Verder wordt de relevantie van intacte en *middle-up/down* native MS bediscussieerd. Hierbij wordt specifiek aandacht gegeven aan de in **Hoofdstuk 9** geconstateerde discrepanties tussen de *bottom-up* en intacte MS-data. Daarnaast wordt er een sectie gewijd aan de functionele karakterisering van PTMs op mAbs. Hierin wordt het gebruik en verdere ontwikkeling van nieuwe technieken besproken. Ook wordt er een perspectief geboden op de invoering van deze technieken in de kliniek om de veranderingen van antilichaam-proteovormen in ziektes te kunnen detecteren. Tenslotte zijn er afsluitende gedachten met betrekking tot de (af en toe) gelimiteerde relatie tussen de industrie en academie en worden er mogelijke strategieën genoemd om deze relaties te versterken.