



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Multi-level approaches for the proteoform characterization of therapeutic antibodies by mass spectrometry

Grunert, I.F.K.

Citation

Grunert, I. F. K. (2023, May 17). *Multi-level approaches for the proteoform characterization of therapeutic antibodies by mass spectrometry*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3618392>

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/1887/3618392>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Eiwitten zijn macromoleculen die een belangrijke rol spelen in verschillende biologische processen, zoals het metabolisme, celdeling en -herkenning, transport, opslag en immuunrespons. Eiwitten worden ook wel proteïnen genoemd afgeleid van het Griekse woord "proteios" dat primair of belangrijkste betekent en aangeeft dat eiwitten een fundamenteel onderdeel van organismen uitmaken. Antilichamen (of antistoffen) vormen een familie van specifieke eiwitten die gemaakt worden door het afweersysteem teneinde ons te beschermen tegen pathogenen. Deze kennis gebruikte Edward Jenner in 1796 bij de uitvinding van een eerste vaccin (tegen het pokkenvirus). In de daarop volgende eeuwen werd de structuur van antilichamen opgehelderd, evenals de biochemische eigenschappen en binding aan antigenen.

Tegenwoordig maken therapeutische antilichamen verreweg het grootste deel van biotherapeutische geneesmiddelen ("biotherapeutics") uit en zijn daarnaast de snelst groeiende subklasse. De ontwikkeling van deze geneesmiddelen is een continu proces waarbij structuur en functie verder worden verbeterd. De meest recente therapeutische antilichamen zijn complex van aard door aanwezigheid van verschillende modificaties. Elk van deze zogenaamde proteovormen van een antilichaam kan potentieel een andere functie hebben. Het is daarom van groot belang deze proteovormen te karakteriseren om effectieve en veilige biotherapeutica te garanderen (**Hoofdstuk 1**). De verwachting is dat de volgende generatie antilichamen nog complexer van structuur zal zijn, waarmee het belang van ontwikkeling van adequate analytische methoden extra wordt onderstreept.

Multidimensionale vloeistofchromatografie gekoppeld met massaspectrometrie (verder aangeduid met de Engelse afkorting mD-LC-MS) is de meeste moderne en geavanceerde manier van karakteriseren van verschillende proteovormen van een antilichaam. In **Hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van geïmmobiliseerde enzymreactoren waarbij trypsine in een mD-LC-MS systeem geïncubeerd kan worden voor geautomatiseerde "peptide mapping" experimenten. De zogenaamde online digestie is snel, reproduceerbaar en efficiënt, verbruikt minder eiwitmateriaal, en zorgt bovendien voor minder artefacten, onzuiverheden en wachttijden.

Naast analytische methoden kunnen ook andere strategieën ingezet worden voor het identificeren van belangrijke proteovormen. Voorbeelden hiervan zijn specifieke stressmodellen (verhoogde temperatuur, lage en hoge pH, geforceerde oxidatie of glycering) die het optreden van modificaties versnellen en daarmee ingezet worden voor een eenvoudiger identificatieproces van de kritische varianten met betrekking tot stabiliteit van een complex

antilichaam format (bispecifieke IgG1 CrossMab), zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**. De gedetailleerde structuur-functie karakterisering van het geselecteerde antilichaam bij verschillende stresscondities laat een vergelijkbaar stabiliteitsprofiel als in geval van standaard IgG en bewijst daarmee dat met “knob-into-hole IgG1 CrossMab” technologie stabiele therapeutische eiwitten worden verkregen.

Het is belangrijk de degradatie van een therapeutische eiwit in een stress-model te bestuderen. Daarnaast is kennis van de biologische impact van een therapeutisch antilichaam na toediening in de bloedbaan cruciaal. In **Hoofdstuk 4** wordt *in vivo* degradatie van een therapeutisch eiwit bestudeerd en vergeleken met een *in vitro* stress-model bij fysiologische condities. Het was interessant te zien dat in beide modellen vergelijkbaar degradatiegedrag werd waargenomen, terwijl voor geen enkele proteovorm de affiniteit voor de target volledig verdween. De diversiteit aan proteovormen is gekarakteriseerd met behulp van fractioneren met een kationenwisselaar gevolgd door uitgebreide analyses met deeltjes-grootte chromatografie, kationenwisselaar chromatografie, “peptide mapping” met trypsine en “surface plasmon resonance”. Tevens werden modificaties in stabiele regio’s van endogene antilichamen bestudeerd om hun biologische relevantie te evalueren. Daaruit bleek dat de levels van deamidatie en oxidatie hoog waren in het Fc-deel van het antilichaam.

In **Hoofdstuk 5** wordt de prestatie en betrouwbaarheid van een geautomatiseerd mD-LC-MS-systeem getoetst met betrekking tot het karakteriseren van “charge variants” ten behoeve van een vergelijking tussen drie verschillende laboratoria. Elk van deze laboratoria heeft een eigen manier van selecteren van varianten en daaropvolgende online analyses. De verkregen data wordt daarna vergeleken met een conventionele strategie, waarbij de varianten handmatig zijn gefractioneerd. Hierbij werd gevonden dat verschillende post-translationele modificaties in gelijke mate voorkomen op verschillende varianten. Met dit mD-LC-MS-systeem konden de eiwitsequenties met grote zekerheid worden geconfirmeerd, wat impliceert dat deze benadering zeer geschikt is voor geautomatiseerde karakterisering van antilichamen.

In **Hoofdstuk 6** wordt een geavanceerde mD-LC-MS set-up beschreven die het mogelijk maakt een heterogeen profiel van varianten op moleculair niveau te karakteriseren volgens zogenaamde middle-up en bottom-up procedures. Op deze manier kunnen proteovormen op aminozuurniveau volledig worden gekarakteriseerd en worden vergelijkbare resultaten verkregen als bij de conventionele handmatige procedure. Daarnaast zijn er enkele aanpassingen gedaan in met betrekking tot acetonitrilconcentratie en kolom materiaal, waardoor een betrouwbare toekenning van proteovormen mogelijk werd, zelfs in chromatografische profielen van complexe antilichaam formats. Tenslotte werd een

stabiliteitsstudie op een product uitgevoerd en konden met de mD-LC-MS set-up kritische degradaties worden geïdentificeerd.

Naast het bestuderen van verschillende proteovormen bestaat de mogelijkheid om de functie van een antilichaam in een bepaalde richting te moduleren. Exo-enzymen kunnen specifieke glycosyleringspatronen gericht veranderen tijdens de industriële productie van therapeutische eiwitten. Twee verschillende glycosyltransferases, namelijk β 1,4-galactosyltransferase en α 2,6-sialyltransferase verantwoordelijk voor respectievelijk galactosylering en sialylering, werden tijdens het productieproces van antilichamen ingezet (**Hoofdstuk 7**). Verschillende protocollen met betrekking tot affiniteitskolommen en type materiaal tijdens en na productie (celcultuur of bulk) werden ingezet en er werd gekeken naar toepasbaarheid voor IgG1- en IgG4-subklassen en hergebruik van enzymen. Een geoptimaliseerde mixed-mode strategie werd opgesteld, waarbij galactosylering op de kolom plaatsvindt en sialylering in oplossing. Dit resulteerde in een homogeen glycosyleringsprofiel (100% biantennaire galactosylering en 61% biantennaire sialylering) en geconcludeerd werd dat deze strategie ingezet kan worden tijdens zogenaamde downstream processing van antilichaamproductie.

In **Hoofdstuk 8** wordt ingegaan op de uitdagingen en vooruitzichten die er zijn met betrekking tot op massaspectrometrie-gebaseerde technologieën. Het belang van het combineren van complementaire analytische methoden voor het correct identificeren van proteovormen wordt onderstreept. De rol en de vooruitzichten voor mD-LC-MS in farmaceutisch onderzoek en ontwikkeling worden besproken met een focus op methodologische en technologische uitdagingen. Tenslotte wordt het potentieel van geautomatiseerde en geïntegreerde data-evaluatie besproken in de context van de grote toename in hoeveelheden data gegenereerd door geavanceerde analytische technologieën.

