

Université de Montréal

**Production d'IgG sialylées en CHO et impact sur leurs
fonctions effectrices**

par

Céline Raymond

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en biochimie

Octobre 2015

© Céline Raymond, 2015

Résumé

La sialylation des N-glycanes du fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) est une modification peu fréquente des IgG humaines. Pourtant, elle est l'objet de beaucoup d'attention depuis que deux articles fondateurs ont été publiés, qui montrent l'un que la sialylation des IgG diminue leur capacité à déclencher la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC), et l'autre que les IgG sialylées en α 2,6 seraient la fraction efficace des IgG intraveineuses (IgIV) anti-inflammatoires.

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques, qui sont le plus souvent des IgG recombinantes produites en culture de cellules de mammifère, connaissent depuis la fin des années 90 un succès et une croissance phénoménaux sur le marché pharmaceutique. La maîtrise de la N-glycosylation du Fc des IgG est une clé de l'efficacité des anticorps monoclonaux.

Si les IgG sialylées sont des molécules peu fréquentes *in vivo*, elles sont très rares en culture cellulaire. Dans cette étude, nous avons développé une méthode de production d'IgG avec une sialylation de type humain en cellules CHO. Nous avons travaillé principalement sur la mise au point d'une stratégie de production d'IgG sialylées par co-expression transitoire d'une IgG1 avec la β 1,4-galactosyltransférase I (β 4GTI) et la β -galactoside- α 2,6-sialyltransférase I (ST6GalI). Nous avons montré que cette méthode permettait d'enrichir l'IgG1 en glycane fucosylé di-galactosylé mono- α 2,6-sialylé G2FS(6)1, qui est le glycane sialylé présent sur les IgG humaines.

Nous avons ensuite adapté cette méthode à la production d'IgG présentant des profils de glycosylation riches en acides sialiques, riches en galactose terminal, et/ou appauvris en fucosylation. L'analyse des profils de glycosylation obtenus par la co-expression de diverses combinaisons enzymatiques avec l'IgG1 native ou une version mutante de l'IgG1 (F243A), a permis de discuter des influences respectives de la sous-galactosylation des IgG1 en CHO et des contraintes structurales du Fc dans la limitation de la sialylation des IgG en CHO.

Nous avons ensuite utilisé les IgG1 produites avec différents profils de glycosylation afin d'évaluer l'impact de la sialylation α 2,6 sur l'interaction de l'IgG avec le récepteur

Fc γ RIIIa, principal récepteur impliqué dans la réponse ADCC. Nous avons montré que la sialylation α 2,6 augmentait la stabilité du complexe formé par l'IgG avec le Fc γ RIIIa, mais que ce bénéfice n'était pas directement traduit par une augmentation de l'efficacité ADCC de l'anticorps.

Enfin, nous avons débuté le développement d'une plateforme d'expression stable d'IgG sialylées compatible avec une production à l'échelle industrielle. Nous avons obtenu une lignée capable de produire des IgG enrichies en G2FS(6)1 à hauteur de 400 mg/L.

Cette étude a contribué à une meilleure compréhension de l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG, et a permis d'augmenter la maîtrise des techniques de modulation du profil de glycosylation des IgG en culture cellulaire.

Mots-clés : anticorps monoclonal, IgG, F243A, N-glycosylation, sialylation, CHO, transfection, expression transitoire, β 4GTI, ST6GalII, culture cellulaire, fonction effectrice, ADCC, IgIV

Abstract

Only a fraction of the N-glycans present on the Fc fragment of the human IgGs is sialylated. However, a new interest for sialylation has risen since two major articles were published, one showing that sialylation reduces the capacity of the antibody to trigger antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), whereas the other showed that the IgGs carrying α 2,6-sialic acids on their Fc N-glycans were responsible for the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulins (IVIg) injected at high doses.

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are in majority recombinant IgGs produced in mammalian cell culture. Since the end of the nineties, mAbs have become a major class of pharmaceutical products, and their success is still growing. The control of Fc N-glycosylation is a key parameter for the improvement of the therapeutic efficacy of mAbs.

Sialylated IgGs are found only as traces in the classic CHO cell culture processes. In this study, we developed a method for the production of IgGs with a human-like sialylation in CHO cells. We focused on a production strategy relying on the transient co-expression of an IgG1 with the β 1,4-galactosyltransferase I (β 4GTI) and the β -galactoside- α 2,6-sialyltransferase I (ST6GalI). We showed that this method allowed the enrichment of the IgG1 glycoprofile in the fucosylated di-galactosylated mono- α 2,6-sialylated glycane G2FS(6)1, which is the main sialylated glycan found in human IgGs.

We then adapted this method to the production of highly galactosylated or highly sialylated IgGs with and without core-fucosylation. The analysis of the glycosylation profiles obtained using the various enzyme combinations co-expressed with the native IgG1 or the mutant IgG1 F243A allowed us to discuss the influence of the under-galactosylation found in IgGs produced in CHO cells versus the Fc structural constraints on the limitation of IgG sialylation in CHO cells.

We used the IgG1 glycovariants produced with our method to assess the impact of Fc α 2,6-sialylation on the interaction of the IgG with the receptor Fc γ RIIIa, which is the main receptor mediating the ADCC response. We showed that the presence of α 2,6-sialylation in

the Fc increased the stability of the IgG-FcγRIIIa complex. This benefit however did not translate into an improved ADCC capacity.

Finally, we initiated the development of a stable expression platform for the production of sialylated IgGs at yields relevant for the industry. We obtained a cell line capable of producing IgGs enriched in G2FS(6)1 at 400 mg/L. This may eventually represent a novel approach to manufacture a recombinant IVIG surrogate.

With this work, we contributed to a better understanding of the impact of sialylation on the effector functions of IgGs. We also improved our understanding of the techniques allowing for the modification and control of the glycosylation profile of IgGs in cell culture.

Keywords: monoclonal antibody, IgG, F243A, N-glycosylation, sialylation, CHO, transfection, transient expression, β4GTI, ST6GalI, cell culture, effector function, ADCC, IVIG

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | iii |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | x |
| Liste des figures..... | xi |
| Liste des sigles..... | xiv |
| Liste des abréviations..... | xv |
| Remerciements..... | xvii |
| I. Introduction..... | 1 |
| Contexte historique..... | 2 |
| Sialylation et pharmacocinétique des protéines recombinantes thérapeutiques..... | 2 |
| Les récepteurs des IgG et la glycosylation du Fc..... | 4 |
| Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) anti-inflammatoires..... | 5 |
| Des groupes de recherche émergent en 2000..... | 5 |
| Objectifs de la thèse..... | 7 |
| Organisation de la thèse..... | 7 |
| II. Revue de littérature..... | 10 |
| La N-glycosylation..... | 10 |
| Glycoprotéines..... | 10 |
| Synthèse du N-glycane..... | 10 |
| Caractéristiques des N-glycanes humains..... | 13 |
| Site de N-glycosylation..... | 14 |
| Macrohétérogénéité et microhétérogénéité..... | 15 |
| Glycosyltransférases du Golgi..... | 16 |
| Différences de N-glycosylation entre les espèces..... | 18 |
| La sialylation..... | 20 |

| | |
|---|----|
| Augmentation de la sialylation des glycoprotéines en culture de cellules de mammifères.. | 25 |
| Stratégies de contrôle de la sialylation..... | 25 |
| Procédé de production : impact des paramètres de culture sur la sialylation | 26 |
| Procédé de production : impact du milieu de culture sur la sialylation..... | 30 |
| Ingénierie cellulaire : surexpression du transporteur et de la synthétase de CMP-sia..... | 33 |
| Ingénierie cellulaire : surexpression des glycosyltransférases..... | 34 |
| Ingénierie cellulaire : expression d'ARN inhibiteurs | 39 |
| Ingénierie cellulaire : autre | 40 |
| Conclusion sur les stratégies de contrôle en culture cellulaire | 40 |
| Modification de la glycosylation <i>in vitro</i> | 41 |
| Addition d'un glycane entier | 41 |
| Elongation d'un glycane préexistant..... | 43 |
| Conclusion sur les modifications <i>in vitro</i> | 45 |
| La glycosylation des IgG | 45 |
| Structure et fonctions générales des IgG | 45 |
| Fonctions effectrices des IgG et récepteurs associés | 50 |
| Anticorps monoclonaux | 53 |
| Impact de la N-glycosylation du Fc sur la structure de l'IgG..... | 59 |
| Impact de la N-glycosylation sur les fonctions effectrices de l'IgG dépendant du Fc | 62 |
| Un autre type d'IgG thérapeutiques : les IgIV | 69 |
| Conclusion de l'étude bibliographique | 76 |
| III. Sialylation d'un anticorps mutant et impact de la lignée cellulaire d'expression sur le glycoprofil..... | 78 |
| Introduction..... | 78 |
| Méthodologie | 82 |
| Choix de l'anticorps modèle | 82 |
| Production des anticorps | 83 |
| Analyse de la glycosylation | 86 |
| Contribution de chacun des auteurs | 89 |
| Production of highly sialylated monoclonal antibodies..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| Abstract | 90 |
| Introduction..... | 91 |
| Materials and method..... | 96 |
| Results..... | 101 |
| Discussion | 114 |
| Discussion | 116 |
| Conclusion | 119 |
| IV. Sialylation d'une IgG1 native | 120 |
| Introduction..... | 120 |
| Méthodologie | 121 |
| Production des anticorps | 121 |
| Analyse de la glycosylation | 122 |
| Contribution de chacun des auteurs | 124 |
| Production of α 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells..... | 125 |
| Abstract | 125 |
| Introduction..... | 126 |
| Results..... | 130 |
| Discussion | 145 |
| Materials and Methods..... | 149 |
| Acknowledgments..... | 154 |
| Expériences complémentaires..... | 154 |
| Confirmation de la prédominance du type α 2,6 dans le Fc des IgG humaines..... | 154 |
| Application de la méthode à d'autres sous-classes d'IgG | 157 |
| Discussion | 160 |
| Conclusion | 162 |
| V. Impact du glycoprofil sur l'efficacité du Trastuzumab..... | 163 |
| Introduction..... | 163 |
| Méthodologie | 164 |
| Production des anticorps | 164 |
| Analyse par SPR | 164 |

| | |
|--|-----|
| Présentation du test ADCC de substitution..... | 165 |
| Contribution de chacun des auteurs | 165 |
| Impact of terminal galactosylation and α 2,6-sialylation on IgG1 binding to Fc γ RIIIa | 166 |
| Abstract | 167 |
| Introduction..... | 167 |
| Materials and Methods..... | 169 |
| Results..... | 174 |
| Discussion | 189 |
| Expériences complémentaires..... | 193 |
| Analyse de ST6-32 et ST6-37..... | 193 |
| Essai ADCC complémentaire | 195 |
| Discussion | 200 |
| Conclusion | 201 |
| VI. Développement d'une plateforme d'expression stable | 202 |
| Introduction..... | 202 |
| Méthodologie | 203 |
| Déroulement général du développement d'une lignée stable | 203 |
| Système de sélection GS/MSX | 205 |
| Système inductible au cumate..... | 205 |
| Lignée cellulaire..... | 206 |
| Résultats..... | 209 |
| Avantage de l'inductibilité de ST6 | 209 |
| Pools..... | 212 |
| Clones | 219 |
| Discussion | 228 |
| Conclusion | 231 |
| VII. Conclusion | 232 |
| Avantages d'un système transitoire pour la production d'IgG sialylées | 233 |
| Compétition/coopération des glycosyltransférases endogènes et transfectées | 236 |
| Mutant..... | 236 |

| | |
|---|-------|
| Conclusion sur le système transitoire | 237 |
| Production stable d'IgG sialylées | 237 |
| Exploitation des IgG produites pour l'élaboration de techniques analytiques | 239 |
| Exploitation des IgG produites pour l'évaluation de l'impact de la glycosylation sur l'ADCC | 240 |
| Limites du projet | 241 |
| Perspectives..... | 242 |
| Impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG..... | 242 |
| Applications industrielles..... | 243 |
| Sialylation et balance pro/anti-inflammatoire..... | 243 |
| Bibliographie..... | i |
| Annexe 1 : Caractéristiques des anticorps modèles..... | i |
| Annexe 2 : Article sur la transfection directe des cellules 293-6E | ii |
| A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications..... | ii |
| Abstract..... | iii |
| 1. Introduction..... | iv |
| 2. Materials and methods | vi |
| 3. Results..... | ix |
| 3.1. Optimization of transfection parameters for the direct method..... | ix |
| 3.2. Comparison of direct and indirect transfection methods | x |
| 3.2.1. Comparison in ThinCert™ plates and 125 mL shake flasks | x |
| 3.2.2. Comparison in a WAVE bioreactor | xi |
| 3.3. High-throughput transfection and impact of culture mode | xi |
| 4. Discussion..... | xiv |
| Acknowledgements..... | xvi |
| Figures..... | xvii |
| Tables..... | xxiii |
| Annexe 3 : Articles en tant que deuxième auteur ou co-auteur | xxv |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps monoclonaux du marché en date du 25 Août 2015 (d'après la base de données IMGT ¹)..... | 54 |
| Table 2: Impact of the presence of extra-core monosaccharides on IgG ADCC and CDC effector functions (as of 2012 knowledge) | 94 |
| Table 3: Optimal DNA and PEI ratios determined for the expression of TZM and TZM F246A mutant (TZMm) in 293-6E and CHO cells using the direct transfection protocol..... | 104 |
| Tableau 4 : Principales caractéristiques de la méthode de production d'IgG sialylées | 122 |
| Table 5: Fc glycan composition of the wild-type TZM and F243A mutant expressed alone or co-expressed with GT, ST6 or both | 137 |
| Table 6: Incidence of terminal GlcNAc, galactose and sialic acid residues in the composition of the antennae of the complex glycans..... | 138 |
| Table 7: Fc glycan composition of the wild-type TZM co-expressed with GT and ST6, and the F243A mutant (TZMm) co-expressed with ST6 alone or GT and ST6..... | 144 |
| Tableau 8: 4 anticorps soumis à la co-expression de GThu ou GThu et ST6GalI..... | 158 |
| Tableau 9: Paramètres de purification des anticorps | 158 |
| Table 10: Relative abundance of the glycans detected in the HILIC chromatograms..... | 182 |
| Table 11: KD values | 187 |
| Tableau 12 : Paramètres de transfection initiale des pools | 213 |
| Tableau 13 : Abondances relatives des N-glycanes des Fc | 227 |
| Tableau 14 : Caractéristiques des séquences des anticorps modèles utilisés dans cette thèse | i |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : N-glycosylation chez l'humain | 12 |
| Figure 2 : Types de N-glycanes chez l'humain | 13 |
| Figure 3 : Particularités des N-glycanes selon le système d'expression..... | 20 |
| Figure 4 : Acides NeuAc et NeuGc | 21 |
| Figure 5 : Synthèse du donneur d'acide sialique CMP-sia | 25 |
| Figure 6 : Représentation schématique des IgG | 47 |
| Figure 7 : N-glycanes du Fc des IgG | 49 |
| Figure 8 : Fonctions effectrices des IgG | 52 |
| Figure 9 : Dérivés de mAbs | 58 |
| Figure 10 : Contacts du N-glycane avec les acides aminés du Fc | 61 |
| Figure 11 : Mécanisme d'action des IgIV proposé par le groupe de Ravetch et les points de controverse..... | 74 |
| Figure 12 : Principe de la transfection au PEI | 80 |
| Figure 13 : Etapes principales de la production d'IgG | 85 |
| Figure 14 : IgG1 glycan bi-antennary complex structure | 93 |
| Figure 15 : Optimization of LC:HC and ST6Gal ratio | 102 |
| Figure 16 : Determination of the optimal transfection parameter..... | 103 |
| Figure 17 : Production kinetics of TZMm in 293 and CHO cells | 105 |
| Figure 18 : Sialylation kinetics of TZMm in 293 and CHO cells..... | 106 |
| Figure 19 : Impact of ST6GalI expression and F246A mutation on TZM sialylation | 108 |
| Figure 20 : Glycan analysis by MALDI-MS in negative mode..... | 110 |
| Figure 21 : Glycan analysis by MALDI-MS in positive mode..... | 111 |
| Figure 22 : Intact antibody analysis of mAbs by LC-ESI-MS..... | 113 |
| Figure 23 : Représentation des données de variants de charge recueillies avec le LabChip® GX..... | 123 |
| Figure 24 : Complex biantennary N-linked glycan structures found in the Fc domain of IgGs | 127 |
| Figure 25 : Lectin-blot analyses of TZM from culture supernatants | 131 |

| | |
|---|-----|
| Figure 26 : Capillary IEF (cIEF) electropherograms of TzM constructs..... | 133 |
| Figure 27 : Fc/2 molecular weight profiles obtained by LC-ESI-MS analysis..... | 136 |
| Figure 28 : Effect of α 2,3SA-specific sialidase S treatment on TzM samples | 141 |
| Figure 29 : Proportion of α 2,3- and α 2,6-sialic acids in TzMGTST6, TzMmST6 and TzMmGTST6..... | 143 |
| Figure 30 : Lectine-blots pour l'analyse du type de liaison des Sia du Fc des IgG humaines | 156 |
| Figure 31 : SNA- et ECL-blots pour l'analyse de quatre anticorps exprimés seuls, avec la GThu ou avec GThu et ST6Gall..... | 159 |
| Figure 32 : <i>In vitro</i> sialylation by ST6-32 and ST6-37..... | 175 |
| Figure 33 : Lectin-blot analysis of the eight glycovariants..... | 176 |
| Figure 34 : cIEF profiles of the eight glycovariants | 178 |
| Figure 35 : HILIC profiles of the eight glycovariants | 179 |
| Figure 36 : Relative abundance of glycan families..... | 180 |
| Figure 37 : Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the binding of the eight TzM glycovariants with Fc γ RIIIa _{F158} | 184 |
| Figure 38 : Zoom on the early dissociation phase | 186 |
| Figure 39 : ADCC response induced by the glycovariants..... | 189 |
| Figure 40 : Analyse en SDS-PAGE de ST6-32 et ST6-37 | 194 |
| Figure 41 : Profils cIEF de TzM-9j et TzM-4j | 196 |
| Figure 42 : Profils d'association et de dissociation de TzM-4j, TzM GT, TzM GTST6 et TzMmGTST6 avec Fc γ RIIIa _{F158} | 197 |
| Figure 43 : Réponse ADCC induite par l'interaction de glycovariants de TzM et du mutant TzMmGTST6..... | 198 |
| Figure 44 : Etapes de développement d'un clone stable..... | 204 |
| Figure 45 : Impact de l'inductibilité de ST6 sur la phase de sélection des pools..... | 210 |
| Figure 46 : Sialylation α 2,6 à la surface des cellules induites | 211 |
| Figure 47 : Phase de sélection des pools FcGTST6..... | 214 |
| Figure 48 : Rendement de production du Fc six jours après induction | 215 |
| Figure 49 : Sialylation α 2,6 des Fc issus des pools | 216 |
| Figure 50 : Densité de cellules viables et viabilité du Pool 12 comparativement à la lignée parentale..... | 218 |

| | |
|--|-----|
| Figure 51 : Sélection des clones en SNA-dotblot | 220 |
| Figure 52 : Titre de Fc et intensité de signal SNA pour les 16 colonies induites..... | 221 |
| Figure 53 : Croissance cellulaire et viabilité des 3 meilleures colonies en production fed-batch | 222 |
| Figure 54 : Titre de Fc obtenu en fed-batch..... | 223 |
| Figure 55 : Sialylation α 2,6 des Fc produits en fed-batch | 224 |
| Figure 56 : Profil de N-glycosylation du Fc produit par 12-D5 à 6 jpi | 225 |
| Figure 57 : Evolution de l'abondance des principaux glycanes complexes au cours du temps | 226 |

Liste des sigles

ADN : acide désoxyribonucléique

CHO : « Chinese hamster ovary » ; cellule d'ovaire de hamster chinois

CNRC : Conseil National de Recherche du Canada

cIEF : « capillary isoelectric focusing » ; focalisation isoélectrique capillaire

ECL : *Erythrina Cristagalli* lectin

ESI-MS : spectrométrie de masse à ionisation par électrospray

GT : galactosyltransférase

GS : glutamine synthétase

HEK : « human embryonic kidney » ; cellule de rein embryonnaire humaine

HILIC : « hydrophilic interaction liquid chromatography » ; chromatographie par interaction hydrophile

hpt : heure post-transfection

jpi : jour post-induction

jpt : jour post-transfection

MALII : *Maackia Amurensis* lectin II

MALDI-MS : spectrométrie de masse à désorption-ionisation laser assistée par matrice

MSX : méthionine sulfoximine

PEI : polyéthylèneimine

SA : acide sialique

SNA : *Sambucus Nigra* agglutinin

ST : sialyltransférase

Liste des abréviations

bGlcNAc : N-acétylglucosamine bisectante

Fc : fragment cristallisable

Fuc : fucose

Gal : galactose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GTcho : β 1,4-galactosyltransférase I des cellules CHO

GThu : β 1,4-galactosyltransférase I humaine

i : inductible

IgG : immunoglobuline G

IgIV : immunoglobulines intraveineuses

mAbs : anticorps monoclonaux

Man : mannose

NeuAc : acide N-acétylneuraminique

NeuGc : acide N-glycolylneuraminique

Sia : acide sialique

ST3cho : α 2,3-sialyltransférases III/IV des cellules CHO

ST6GalI : α 2,6-sialyltransférase I humaine

TZM : Trastuzumab (Herceptine)

Syn : Synagis

« On ne dit pas non aux gens, on leur demande ce qu'ils veulent faire, et comment on peut les aider. » Philippe Raymond

A mon père.

Remerciements

Je commence par remercier mon directeur, Yves Durocher, qui a su me guider tout au long de mon projet, à sa manière discrète mais présente, et qui s'est démené pour me réserver un peu de son temps même après que son agenda est devenu plus rempli que celui de tous les ministres du Canada réunis.

Je remercie les membres du jury, madame Pascale Legault, monsieur Bruce Mazer et monsieur Pierre Thibault, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que monsieur Alain Moreau pour avoir accepté de présider mon jury et pour les conseils qu'il m'a prodigués également en tant que président de mon comité de thèse. Je remercie également monsieur Grégory DeCrescenzo pour sa participation à mon comité de thèse, ses critiques et ses encouragements.

J'aimerais aussi adresser mes plus chaleureux remerciements à chacun de mes collègues du CNRC, les anciens, c'est-à-dire les personnes qui étaient là quand je suis arrivée en 2010, et les nouveaux, qui arrivent par vagues depuis 2013. Grâce aux anciens, je me suis sentie très vite en confiance dans mon nouveau laboratoire, ma nouvelle ville, mon nouveau pays. Ils m'ont accompagnée dans les premiers pas de mon doctorat avec une grande gentillesse. Quant aux nouveaux, ils ont apporté beaucoup de bonne humeur supplémentaire. A eux tous, mes collègues ont su créer un laboratoire où j'étais heureuse de venir chaque jour, même lorsque rien de ce que j'y faisais en pratique ne fonctionnait. J'aimerais remercier plus particulièrement cinq d'entre eux, pour qui j'ai une grande amitié et énormément d'estime : Yves Durocher encore, Denis L'abbé, Christian Gervais, Eric Grazzini, et Roseanne Tom. Ils ont en commun de m'avoir beaucoup appris, de m'avoir soutenue, et de m'avoir beaucoup fait rire.

J'ai une pensée particulière également pour tous les étudiants et jeunes chercheurs que j'ai croisés au lab, avec qui j'ai pu partager mes craintes, mes espoirs, mes absences totales de motivation, mes moments d'exaltation scientifique, bref, mon histoire d'étudiante au doctorat : Emma Petiot, Igor Slivac, Georg Hinterkörner, Laurence Delafosse, Cécile Toussaint, Alina Venereo-Sanchez, Christine Thompson, July Dorion-Thibaudeau, Aziza Manceur, Charles

Fortier, Samantha Noël, Adeline Poulain, Florian Cambay, Marc-André Robert et Sylvain Armando. Certains d'entre eux sont devenus des amis très précieux.

J'aimerais aussi remercier sincèrement ces autres personnes qui sont devenues mes amies, rencontrées au NRC ou ailleurs, qui ont rendu si riches ces cinq années passées à Montréal, et qui ont rendu si difficile mon départ : Anna Legoudivèze et François Desmons (avec leur petite Zélie), Julien Verneau, Luis Ortega, Jacques Levesque, les amoureux-ses de la sociologie : Mélanie, Emilie, Marie, Fabien, Nicolas et Anthony, et la bande du 6550.

J'ai maintenant retraversé l'Atlantique et je voudrais remercier les personnes, famille, belle-famille, anciens amis, nouveaux amis et nouveaux collègues, qui m'ont apporté leur soutien au cours des dernières semaines de l'écriture de cette thèse : Cécile Bernaudeau, Marion et Hugo, Sylvie et Alain Arbogast, Patricia Laroche, Jérôme Lapeyre, la bawen, et l'équipe de Martillac.

J'aimerais enfin évoquer mes proches, en commençant par celui qui n'est plus là.

Mon père m'a beaucoup donné : l'amour, la confiance, une grande bienveillance, un exemple magnifique du sens du devoir et de la justice. Ces parts de lui-même qu'il m'a offertes sans y penser constituent des repères inébranlables qui me permettent de tracer le chemin de ma vie, même maintenant qu'il n'est plus là. J'avance, et je sens encore sa bienveillance sur moi, comme une seconde peau infiniment légère et protectrice.

J'ai également la chance d'être soutenue par ma mère et mon frère, que j'aime et que j'admire. Ils sont le noyau de mon monde et je les remercie du fond du cœur pour leur soutien indéfectible.

Enfin, parce qu'il partage chaque jour de ma vie, parce qu'il a su m'apprendre à vivre à deux (*work in progress*), pour sa patience et sa douceur, j'adresse mes plus tendres remerciements à Adrien, qui m'ouvre sans cesse de nouveaux horizons, qui ne s'en aperçoit pas, et qui s'étonne quand je le lui dis.

Et puis Marcel!

I. Introduction

Les anticorps monoclonaux (mAbs) dominent aujourd'hui le marché des protéines thérapeutiques et leur importance dans l'activité des industries pharmaceutiques continue de croître. En août 2015, à peine plus de quinze ans après la mise sur le marché des premiers grands succès des mAbs (Rituxan[®], Herceptin[®], Remicade[®], Enbrel[®]), 52 mAbs sont approuvés par les instances du médicament, la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en Europe.¹ Des dizaines d'autres sont en phase clinique, et on attend jusqu'à vingt nouveaux mAbs et dérivés de mAbs sur le marché d'ici à 2020.²

La grande majorité des mAbs sont développés pour des indications oncologiques et immunologiques, comme l'illustrent certains des mAbs avec les plus grandes réussites commerciales : le Rituxan[®] est utilisé – entre autres – pour le traitement du lymphome non Hodgkinien et de la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'Herceptin[®] pour le traitement des cancers du sein et gastrique, et le Remicade[®] pour le traitement de la PR, de la maladie de Crohn, et du psoriasis. L'efficacité des mAbs thérapeutiques repose non seulement sur leur grande spécificité pour leurs cibles, mais aussi sur leur capacité à engager le système immunitaire de l'organisme, via l'interaction de leur fragment cristallisable (Fc) avec les récepteurs des cellules du système immunitaire.

Les mAbs sur le marché sont exclusivement des immunoglobulines de type G (IgG); parmi les mAbs en développement, on compte seulement quelques IgA et IgM en phase clinique II et III, mais la grande majorité reste de type G.¹ Le segment Fc des IgG comporte deux chaînes de sucres, les N-glycanes, nécessaires à la reconnaissance des Fc par leurs récepteurs, et capables de moduler l'interaction Fc/récepteur et la réponse cellulaire qui en découle. Ce sont ces N-glycanes, et en particulier le monosaccharide terminal des chaînes, l'acide sialique, qui constituent le cœur du travail présenté ici. Les moyens de produire des Fc arborant des N-glycanes sialylés, leur affinité pour les récepteurs du système immunitaire comparativement à des Fc portant d'autres types de N-glycanes, ainsi que les méthodes

d'analyse permettant leur caractérisation, sont autant d'aspects que nous examinerons au cours de cette étude.

Contexte historique

La recherche fondamentale et la recherche appliquée sont intimement liées dans l'histoire de la recherche sur la N-glycosylation des IgG. C'est en 2006-2007 que naît plus particulièrement l'intérêt pour les IgG sialylées, quand trois grands domaines de recherche académique et industrielle vont se rencontrer : la pharmacocinétique et le contrôle de la qualité des protéines thérapeutiques industrielles, l'étude de l'interaction entre les IgG et les récepteurs de Fc, les FcγR, et enfin la recherche sur les mécanismes d'action des IgG intraveineuses (IgIV) utilisées comme anti-inflammatoires.

Après leur découverte dans les années trente, l'importance potentielle des acides sialiques dans les systèmes biologiques se révèle au cours des années 40 et 50 à mesure que l'on constate leur présence à la surface de certains virus et bactéries, des cellules de plante et animales, et des cellules mammifères en particulier³, ainsi que l'existence de sialidases, ou neuraminidases (les acides sialiques sont aussi appelés acides neuraminiques), à la surface de nombreux pathogènes comme le virus de la grippe ou la bactérie du choléra.⁴ L'exposition des acides sialiques à la surface des cellules suppose leur implication dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, les interactions cellule-cellule, les interactions cellule-pathogène, etc. Ces premières découvertes attisent la recherche et dès les années 60, beaucoup de connaissances sont accumulées sur la structure, la biosynthèse, le rôle des acides sialiques, et parallèlement sur les sialyltransférases et les sialidases.

Sialylation et pharmacocinétique des protéines recombinantes thérapeutiques

Dans les années 1970, Ashwell et Morell découvrent le récepteur hépatique des asialoglycoprotéines⁵, c'est-à-dire un récepteur qui reconnaît les glycanes de protéines qui ne portent pas d'acide sialique terminal, ce qui conduit à leur élimination. Cette découverte fait entrer la question de la sialylation dans la recherche appliquée et industrielle. En effet, à la même période se développent les technologies de manipulation de l'ADN et de production de

protéines recombinantes. La première protéine recombinante de l'industrie pharmaceutique, l'insuline, est mise sur le marché en 1982. D'autres protéines recombinantes suivent bientôt, et comme pour tout médicament, la question de leur devenir après administration est centrale. Plus le temps de résidence dans le sang est long, plus la protéine thérapeutique a le temps d'agir, et plus la dose nécessaire pour traiter le patient est faible. Ce temps de résidence en circulation est caractérisé par la « demi-vie » des protéines, terme qui désigne le temps à l'issue duquel la moitié de la protéine d'intérêt a disparu de la circulation sanguine. La sialylation apparaît comme un moyen de prévenir l'élimination trop rapide de ces protéines, c'est-à-dire d'augmenter leur demi-vie, en les protégeant des récepteurs de Ashwell et Morell. Les équipes de recherche appliquée observent et mesurent les niveaux de sialylation et de sialidases au cours des productions en culture cellulaire, elles commencent à étudier l'impact des types et des conditions de culture sur ces niveaux.⁶

Pendant ce temps, c'est-à-dire au cours des années 80 et 90, la recherche fondamentale continue et des progrès sont fait sur la caractérisation des glycosyltransférases en général et des sialyltransférases en particulier.⁷ Harduin-Lepers publie même en 1995 une revue de littérature intitulée « 1994, the year of sialyltransferases ». ⁸ A la fin des années 90, ces travaux sont mis à profit pour augmenter la sialylation des protéines recombinantes, toujours avec le souci d'améliorer leur demi-vie, et des études impliquant l'expression de sialyltransférases recombinantes dans les systèmes d'expression industriels, les cellules d'ovaire de hamster (CHO) en tête, commencent à paraître. De manière secondaire, la sialylation commence aussi à être perçue comme un moyen d'uniformiser la qualité des protéines produites. En effet, la glycosylation d'une protéine est très hétérogène : on peut trouver, pour un site de glycosylation donné, des dizaines de N-glycanes plus ou moins longs. Cette variété est reproductible, puisque dans des conditions données, un ensemble de protéines présentera un profil de glycosylation plutôt constant. Néanmoins, de petites variations de l'environnement de la cellule peuvent entraîner des modifications de la glycosylation, qui est donc difficile à maîtriser. L'acide sialique étant le dernier maillon de la chaîne de sucre, parvenir à sialyler tous les N-glycanes signifie améliorer l'homogénéité du glycoprofil de la protéine cible.⁹

Les récepteurs des IgG et la glycosylation du Fc

Alors que la part des protéines recombinantes, et particulièrement les anticorps monoclonaux, augmente sur le marché des thérapeutiques, et que les connaissances sur la glycosylation s'accumulent, deux groupes commencent à s'intéresser de près aux IgG et à la glycosylation du Fc. Il s'agit du groupe de Dwek à l'Université d'Oxford au Royaume-Uni, et du groupe de Lund et Jefferis à l'école médicale de l'Université de Birmingham, également au Royaume-Uni. Le premier groupe est à l'origine de la découverte en 1985 du lien entre la PR (polyarthrite rhumatoïde) et les IgG agalactosylées (IgG-G0), c'est-à-dire dont les N-glycanes du Fc ne possèdent ni acide sialique, ni galactose.¹⁰ Cette observation va les conduire à s'intéresser de plus près à la structure du Fc au niveau des sites de glycosylation, dans le but de mieux comprendre la relation entre IgG-G0 et PR. Le deuxième groupe travaille sur la N-glycosylation des IgG et son impact sur l'interaction entre le Fc et les FcγR.¹¹⁻¹⁴ La structure des N-glycanes des IgG, des sucres complexes di-antennaires, est connue depuis 1971¹⁵, et le premier cristal d'IgG avec ses glycanes a été obtenu en 1981.¹⁶ S'appuyant sur ces premiers éléments, les deux groupes vont être à l'origine de concepts très importants concernant la structure du Fc et de ses N-glycanes, parmi lesquels on peut citer :

- le concept de conformation ouverte/conformation fermée du Fc, la présence des glycanes étant nécessaire pour maintenir le Fc en conformation ouverte, cette dernière permettant la reconnaissance des IgG par leurs récepteurs^{11,13,17-21}
- l'idée que les N-glycanes sont enserrés par le Fc, et que cette structure quaternaire du Fc ainsi que les interactions multiples des N-glycanes avec sa surface peptidique, expliquent que les N-glycanes du Fc soient limités en nombre de branches et en longueur comparativement aux glycanes d'autres glycoprotéines^{22,23}
- l'idée selon laquelle la présence ou l'absence d'un seul des résidus de monosaccharide qui composent les N-glycanes du Fc peut avoir des répercussions sur sa conformation, et donc sur les fonctions effectrices de l'IgG^{13,22,24}.

Ces travaux sur les IgG coïncident avec l'arrivée sur le marché d'une nouvelle grande classe de protéines thérapeutiques : les mAbs, c'est-à-dire des IgG produites soit par des hybridomes, soit, le plus souvent, grâce à la technologie des protéines recombinantes. A la fin

des années 90, les grands succès commerciaux que sont, encore aujourd'hui, le Rituxan[®] (1997), l'Herceptin[®] (1998), l'Enbrel[®] (1998) et le Remicade[®] (1999), dont nous avons parlé plus haut, signent la prise de pouvoir des mAbs sur le marché des biothérapeutiques. Les recherches fondamentales sur les IgG, leur glycosylation, leurs mécanismes d'action, deviennent indissociables des recherches appliquées visant l'amélioration des mAbs. Une meilleure connaissance de ce qui influe sur les fonctions effectrices des IgG devient synonyme de potentielle augmentation d'efficacité thérapeutique des mAbs, ce qui représente des gains pour les patients évidemment, mais aussi des gains commerciaux énormes pour les industries pharmaceutiques. Les premières études de l'impact de chacun des monosaccharides des N-glycanes sur les fonctions effectrices des IgG sont publiées au tournant des années 2000.²⁵⁻²⁷ Elles ne concernent pas encore les acides sialiques, les IgG sialylées étant peu abondantes chez l'humain, et les systèmes de production des mAbs, les CHO en particulier, produisant des mAbs avec un niveau de sialylation du Fc presque nul.

Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) anti-inflammatoires

Enfin, un troisième champ de recherche se développe à partir des années 80. Des observations cliniques ont montré que les IgIV pouvaient être utilisées avec succès pour soulager des maladies inflammatoires, telles que le purpura thrombopénique auto-immun (PTI) (effet bénéfique observé dès 1981²⁸), la PR²⁹, ou l'asthme.³⁰ Les IgIV sont des IgG collectées auprès de milliers de donneurs et purifiées. Les IgG étant pro-inflammatoires, l'utilisation d'IgIV comme anti-inflammatoires est contre-intuitive, ouvrant la question de leur(s) mécanisme(s) d'action.³¹ Ces recherches rejoignent naturellement les travaux sur les mécanismes d'action classiques des IgG, et donc sur leur interaction avec les FcγR.

Des groupes de recherche émergent en 2000

Au début des années 2000, deux groupes de recherche émergent dont les travaux participent à relier ensemble les domaines que nous venons de décrire. Ravetch *et al.* travaillent sur l'idée que les maladies auto-immunes pourraient découler d'un déséquilibre entre FcγR activateurs et inhibiteurs³², et tentent d'expliquer le mécanisme d'action des IgIV d'après ce concept.³³ Par ailleurs, Raju *et al.* examinent les différences de galactosylation et de

sialylation selon les espèces animales³⁴, et souhaitent attirer l'attention de l'industrie pharmaceutique sur l'impact des lignées cellulaires choisies pour produire les protéines recombinantes et les mAbs en particulier.

En 2006, chacune de ces deux équipes produit des travaux mettant en lumière l'importance de la sialylation du Fc des IgG. Ravetch *et al.* découvrent que la présence d'acides sialiques de type $\alpha 2,6$ (nous reviendrons sur les types d'acides sialiques plus loin) dans le Fc des IgG confère aux IgIV leurs propriétés anti-inflammatoires.³⁵ Quasi simultanément, et bien que ses travaux ne soient publiés qu'en 2007, le groupe de Raju découvre que la présence d'acides sialiques (de type non spécifié) dans les N-glycanes des IgG abolit l'une de leurs principales fonctions effectrices, la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (« antibody-dependent cellular cytotoxicity », ADCC).³⁶

Ces deux évènements provoquent une nouvelle vague de recherches dédiées à l'étude de la sialylation des IgG dans une grande variété de domaines, tels que l'impact structurel de la présence d'un acide sialique sur les conformations des N-glycanes ou du Fc, les méthodes de production d'IgG sialylées, que ce soit en culture par des techniques d'ingénierie cellulaire ou *in vitro* par des procédés enzymatiques et chimiques, la mise au point de techniques de pointe pour la caractérisation spécifique des acides sialiques, l'examen de l'effet de la sialylation sur les fonctions effectrices des mAbs, *in vitro* via des tests moléculaires et cellulaires, ou *in vivo* dans des modèles de souris. La prise de conscience de la complexité de la sialylation, et de la nécessité de tenir compte de différences qui semblent ténues telles que le type d'acide sialique rencontré selon le système d'expression, le nombre d'acides sialiques par glycanes, le type $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$, se fait petit à petit au sein de la communauté scientifique.

Le présent travail a ainsi l'ambition de participer à cette prise de conscience par la rigueur des observations réalisées. Ce projet se trouve à la croisée de deux des thèmes de recherche évoqués au paragraphe précédent : la production d'IgG sialylées par des techniques d'ingénierie cellulaire, et l'étude de l'impact de la sialylation du Fc sur les fonctions effectrices de l'anticorps *in vitro*. La discussion des résultats obtenus se nourrit des travaux sur la structure du Fc glycosylé. Enfin, une place importante est accordée au développement de méthodes de caractérisation des acides sialiques.

Objectifs de la thèse

Le premier objectif du travail réalisé et présenté ici est le développement d'une plateforme de production d'IgG avec une sialylation de type humain en cellules CHO. La méthode développée doit permettre de créer et optimiser les capacités de production d'IgG sialylées par ingénierie génétique des cellules CHO.

Le deuxième objectif de la thèse est d'étendre la stratégie de production d'IgG sialylées à la production d'IgG avec d'autres profils de glycosylation afin d'évaluer l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices de l'IgG *in vitro*, en particulier l'ADCC.

Organisation de la thèse

La revue de littérature débute avec l'exposition des connaissances générales sur la N-glycosylation, en insistant plus particulièrement sur la sialylation. Les travaux sur l'augmentation de la sialylation des N-glycanes des protéines recombinantes sont ensuite présentés, en deux grandes parties qui correspondent aux deux familles de stratégies d'obtention de glycoprotéines sialylées : la modification au cours de la culture cellulaire, et la modification sur protéine purifiée. Enfin, nous détaillons le cas particulier de la glycosylation des IgG. L'état des connaissances sur l'impact de la glycosylation du Fc sur la structure et les fonctions des IgG est présenté, avec un effort pour montrer les enjeux de la maîtrise de la glycosylation pour l'élaboration des anticorps thérapeutiques.

Nos travaux sont ensuite présentés en quatre chapitres.

Dans le premier chapitre, nous démontrons la faisabilité de l'augmentation de la sialylation $\alpha 2,6$ d'une IgG mutante par surexpression transitoire de la ST6GalI humaine en CHO, et confirmons la difficulté de sialyler les IgG natives. Les lignées CHO3E7 et HEK293-6E sont comparées et nous montrons les avantages de travailler avec la lignée CHO, qui est choisie pour la poursuite des travaux. Nous présentons différentes méthodes de caractérisation avec leurs avantages et leurs limites. Nous montrons que les techniques de lectine-blot et de focalisation isoélectrique permettent d'obtenir rapidement les informations essentielles sur le niveau et le type de sialylation, puis nous mettons en évidence les difficultés propres à l'analyse de la sialylation en spectrométrie de masse.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons une méthode qui permet cette fois de sialyler efficacement les IgG natives, par co-surexpression transitoire de ST6GalII et de β 4GTI. De plus, nous montrons que cette stratégie permet d'obtenir un profil de glycosylation enrichi en glycanes sialylés de type humain, c'est à dire le glycanes di-antennaire di-galactosylé et mono- α 2,6-sialylé G2FS(6)1. Ensuite, la comparaison des profils de glycosylation obtenus pour l'IgG native et l'IgG mutante, avec la ST6GalII seule, la β 4GTI seule, ou la combinaison des deux permet de discuter le rôle que joue la structure protéique du Fc dans la limitation de la sialylation des IgG. Par ailleurs, nous montrons que dans le domaine de la caractérisation détaillée des profils de glycosylation, l'analyse du glycopeptide $C_{H2}-C_{H3}$ (Fc/2) en spectrométrie de masse et l'analyse du glycanes libre en chromatographie par interaction hydrophile (HILIC), deux méthodes d'analyse orthogonales, montrent une excellente corrélation dans leurs résultats. L'utilisation de ces deux méthodes en parallèle a permis d'améliorer l'identification des pics des chromatogrammes HILIC, et de renforcer la confiance dans l'exactitude de l'évaluation des abondances de glycanes par ces méthodes, cette dernière étant particulièrement problématique avec les protocoles de spectrométrie de masse testés précédemment.

Dans le troisième chapitre, nous reprenons la stratégie de production d'IgG par expression transitoire de combinaisons d'enzymes afin d'obtenir rapidement des IgG hautement galactosylées ou hautement sialylées, riches ou pauvres en fucose. Ces anticorps nous permettent d'évaluer l'impact du fucose, du galactose, et de l'acide sialique α 2,6 sur l'interaction de l'IgG avec le récepteur Fc γ RIIIa. Cette interaction est testée au niveau moléculaire par la technique de résonance des plasmons de surface et au niveau cellulaire avec un test d'ADCC utilisant des cellules exprimant fortement un ou l'autre variant du Fc γ RIIIa. Nous montrons que contrairement aux idées communément répandues dans la communauté scientifique, mais en accord avec les travaux les plus récents, la sialylation ne réduit pas l'interaction du Fc avec le Fc γ RIIIa. Nous montrons que la présence d'un acide sialique α 2,6 permet d'augmenter la stabilité du complexe formé avec le Fc γ RIIIa, à l'instar du galactose, et que son effet s'ajoute d'ailleurs à l'effet de ce dernier.

Enfin, dans un quatrième chapitre, la méthode de production est remaniée afin d'atteindre des rendements de production d'IgG sialylées qui soient compatibles avec le

principe d'une production à grande échelle de mAbs anti-inflammatoires visant à pallier la demande d'IgIV. Une lignée stable comportant la combinaison GTST6 est ainsi développée, qui exprime également un fragment Fc d'IgG1. Nous montrons que les paramètres de transfection définis pour une production en transitoire ne peuvent pas être transférés tels quels pour une production stable. Le maintien d'un niveau élevé de sialylation pour un fort rendement de production d'IgG nécessite l'optimisation des constructions plasmidiques et des paramètres de transfection initiaux.

II. Revue de littérature

La N-glycosylation

Glycoprotéines

La N-glycosylation est la troisième plus fréquente modification post-traductionnelle après la phosphorylation et l'acétylation.³⁷ Une glycoprotéine, ou protéine glycosylée, est une protéine à laquelle sont attachées de manière covalente une ou plusieurs chaînes de sucre appelées glycanes. Les glycanes désignent des oligosaccharides linéaires ou branchés qui peuvent exister seuls ou liés de façon covalente à d'autres macromolécules, assemblages que l'on appelle glycoconjugués. Les macromolécules peuvent être des lipides (glycolipides) ou des protéines (protéoglycanes et glycoprotéines). On réserve le nom de protéoglycanes à une association de glycanes de type glycosaminoglycane avec un corps protéique. Le terme glycane est parfois utilisé pour désigner les polysaccharides, mais nous le réserverons ici aux oligosaccharides, c'est-à-dire aux chaînes sucrées qui ne sont pas des polymères. Les glycoprotéines peuvent comporter deux types de glycanes : les O-glycanes et les N-glycanes. O- et N- font référence au type de liaison qui lie le glycane à la protéine. Les O-glycanes sont attachés à l'atome d'oxygène (O-) du groupe hydroxyle d'un résidu de sérine (Ser) ou de thréonine (Thr), tandis que les N-glycanes sont attachés à l'atome d'azote (N-) du groupe amide d'un résidu d'asparagine (Asn) de la protéine. Chacun de ces types de glycanes possède des caractéristiques structurales propres au-delà du site d'attachement : composition, longueur et ramification sont différentes.

Synthèse du N-glycane

La N-glycosylation est un processus qui commence dans le réticulum endoplasmique (RE) et se poursuit tout au long de l'appareil de Golgi.⁷ La synthèse des N-glycanes chez l'humain est présentée sur la Figure 1. Un précurseur de N-glycane est d'abord synthétisé dans le cytoplasme, sur un lipide de type dolichol enchâssé dans la membrane du RE. Ce précurseur

est constitué de cinq mannoses (Man) et deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), et lié au dolichol par une liaison pyrophosphate (PP). Lorsque le Man5GlcNAc2-PP-dolichol est prêt, il bascule dans le lumen du RE, où il reçoit quatre mannoses supplémentaires et trois glucoses (Glc). L'oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2 est alors transféré en bloc sur une asparagine de la protéine naissante, puis les trois glucoses et un mannose sont clivés. Les N-glycanes sont donc à ce stade tous des oligosaccharides Man8GlcNAc2. Le transfert du glycanes sur l'asparagine intervient souvent pendant la traduction de la protéine dans le RE, c'est pourquoi on dit de la N-glycosylation qu'elle est co-traductionnelle plutôt que post-traductionnelle.

Les étapes suivantes ont lieu dans le Golgi. L'oligosaccharide est clivé jusqu'à l'obtention du pentasaccharide Man3GlcNAc2, qui constitue le noyau commun à tous les N-glycanes. Il est ensuite allongé par l'addition successive de GlcNAc, galactose (Gal) et acide sialique (Sia) sur les mannoses, ainsi que par l'addition d'un fucose (Fuc) sur le GlcNAc de cœur, c'est-à-dire le GlcNAc lié à l'asparagine.³⁸

Chaque étape de synthèse du N-glycane est réalisée par une enzyme spécifique. Les étapes de clivage et d'élongation sont réalisées grâce à l'action de glycosidases et de glycosyltransférases. La séquence du N-glycane ainsi que les types de liaison entre les monosaccharides sont définis par ces enzymes. Les caractéristiques des glycosyltransférases du Golgi et leur impact sur la composition du N-glycane sont détaillées dans la partie « Glycosyltransférases du Golgi ».

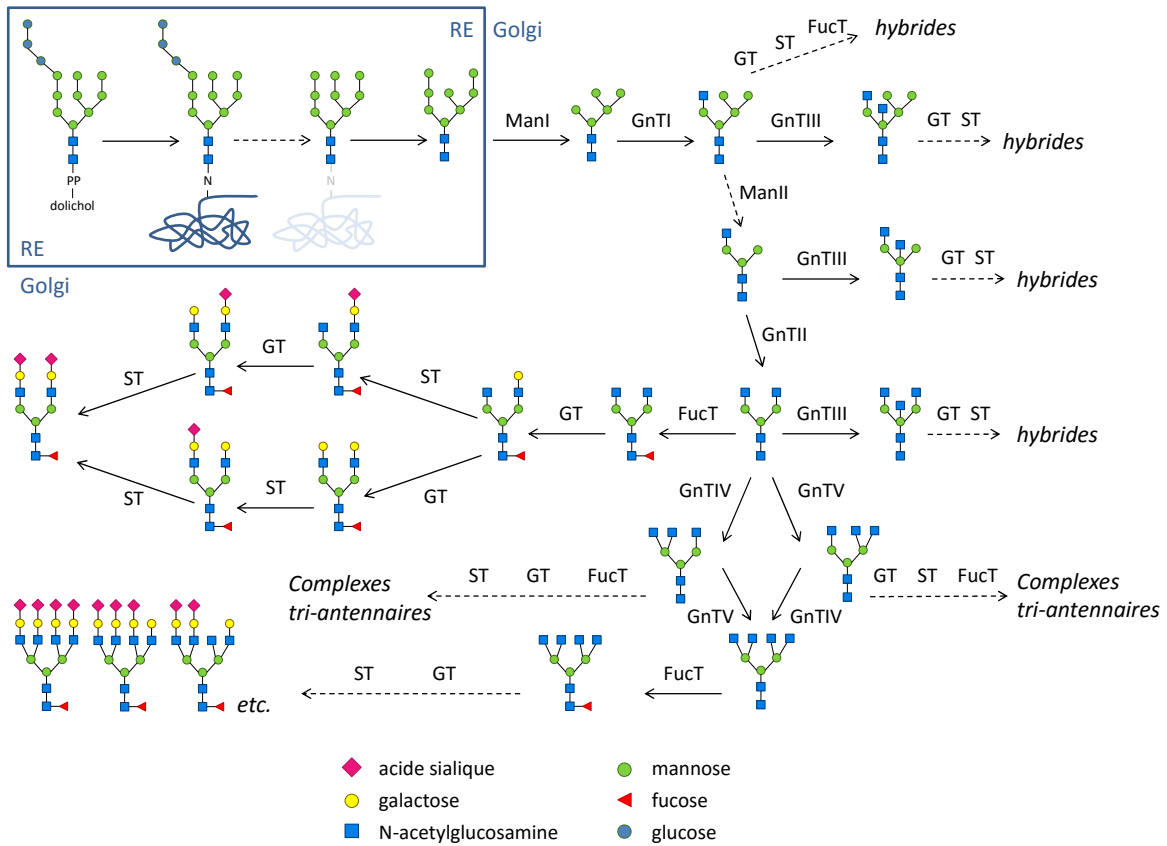


Figure 1 : N-glycosylation chez l'humain

Etapes de formation du N-glycane dans le Golgi. Dès la première étape, le glycane se trouve attaché à une asparagine de la protéine. Pour plus de clarté, la protéine n'est plus représentée à partir de la première étape. A la sortie du réticulum endoplasmique (ER), le glycane est successivement coupé puis allongé au fur et à mesure du parcours dans l'appareil de Golgi, pour former en bout de chaîne des glycanes hybrides ou complexes di-, tri- ou tétra-antennaires. Toutes les étapes ne se produisent pas nécessairement, ce qui conduit à des glycanes présentant des branches variablement sialylées et galactosylés, bisectés ou non, fucosylés ou non. Dans les IgG, on trouvera majoritairement des glycanes complexes di-antennaires fucosylés, α - ou mono-galactosylés. Les flèches pleines représentent une étape enzymatique. Les flèches en pointillé représentent plusieurs étapes enzymatiques. Les acides sialiques sont majoritairement des acides N-acétylneuraminiques, plus rarement des acides N-glycolylneuraminiques.

ManI et II: mannosidase I et II ; GnTI, II, III, IV, V : N-acétylglucosaminyltransférase I, II,

III, IV, V ; FucT : α 1,6-fucosyltransférase VIII ; GT : β 1,4-galactosyltransférase I ; ST : Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransférase III (ST3GalIII), α 2,3-sialyltransférase IV (ST3GalIV) ou Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-sialyltransférase I (ST6GalI).

Figure réalisée d'après Umaña et al. 1999, Hossler et al. 2009, Kim et al. 2009.

Caractéristiques des N-glycanes humains

Selon le degré de maturation de l'oligosaccharide, on définit trois classes de N-glycanes : les haut-mannose (HM), les complexes, et les hybrides.³⁹ Un exemple de chaque classe est représenté sur la Figure 2. Les branches des glycanes haut-mannose sont constituées de mannose uniquement. Les N-glycanes complexes ne contiennent pas de mannose à l'exception des trois mannoses du noyau. Les hybrides ont une ou des branches de mannose sur le Man α 1,6 du noyau, et une ou des branches complexes sur le Man α 1,3.

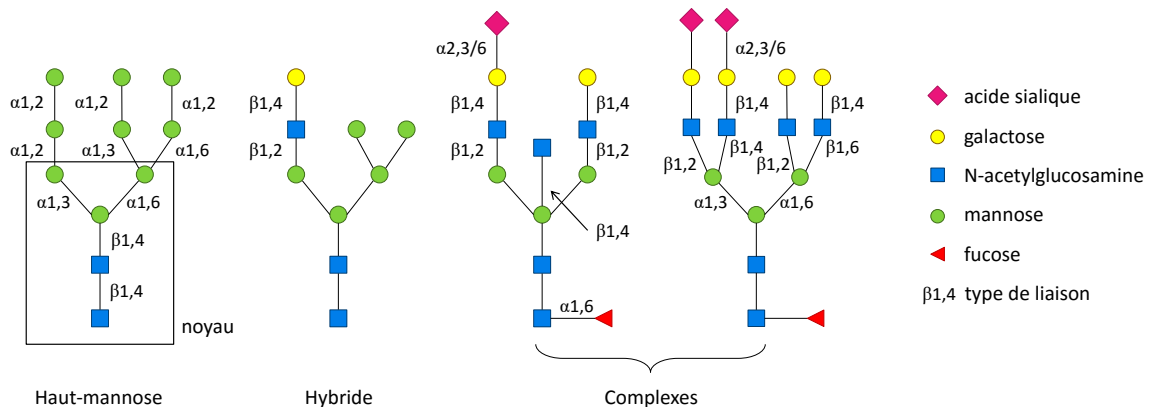


Figure 2 : Types de N-glycanes chez l'humain

Les N-glycanes sont classés en trois types, haut-mannose, hybride et complexe. Le noyau commun à tous les N-glycanes est composé de deux résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et trois mannoses (Man). Le glycanes minimal du type complexe est constitué du noyau comportant un GlcNAc en β 1,2 sur chacun des Man α 1,3 et α 1,6, mais peut présenter plus de deux branches diversement galactosylées et sialylées. La séquence d'élongation et les types de liaison entre les monosaccharides sont conservés, et découlent des spécificités des glycosidases et glycosyltransférases du Golgi.

Les N-glycanes complexes humains sont di-, tri- ou tetra-branchés (Figure 2). Les branches sont composées, dans l'ordre, de résidus de GlcNAc, Gal et enfin Sia. « Acide sialique » est un nom générique qui recouvre une famille de près de 50 molécules. L'acide sialique présent chez l'homme est l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc). Les N-glycanes peuvent aussi comporter un GlcNAc bisectant (bGlcNAc) sur le mannose central, ainsi qu'un résidu de fucose sur le GlcNAc de cœur. Toutes les étapes de clivage et d'élongation du Golgi n'ont pas forcément lieu. Ainsi, la longueur et la composition des branches peuvent varier, mais la séquence de monosaccharides, ainsi que les liaisons glycosidiques qui les relient sont toujours les mêmes.

Une liaison glycosidique est le résultat de la condensation de deux groupes hydroxyles portés par des atomes de carbones de deux monosaccharides avec élimination d'une molécule d'eau. Les atomes de carbone concernés peuvent varier, donnant lieu à différents types de liaison : (1,3), (1,6), (2,6) etc. La liaison osidique du dernier monosaccharide ajouté à la chaîne peut se trouver sous le plan formé par le cycle du monosaccharide, donnant lieu à une liaison α , ou bien au-dessus du plan de ce monosaccharide, donnant lieu à une liaison β .

Les mannoses du pentasaccharide de base initiant les branches sont désignés par le type de liaison qui les relie au mannose de cœur : on parle du Man α 1,3 et du Man α 1,6. De même, dans le cas d'un glycanes complexe à deux branches, on parlera de la branche α 1,3 et de la branche α 1,6 pour désigner les antennes portées par Man α 1,3 et Man α 1,6 respectivement, et par extension, on parlera du Gal α 1,3 par exemple, pour désigner le résidu de galactose présent dans la branche α 1,3.

Site de N-glycosylation

La N-glycosylation se produit sur des résidus d'asparagine appartenant à un site consensus Asn-X-Ser/Thr⁴⁰, où X peut être tout acide aminé à l'exception de la proline.⁴¹ Des N-glycanes ont également été observés parfois sur des sites Asn-X-Cys⁴²⁻⁴⁴, et même exceptionnellement sur un site TVSWNSGAL.⁴⁵ Ainsi, la présence de sérine ou thréonine en troisième position est le cas dominant, mais n'est pas nécessaire pour qu'une asparagine reçoive une chaîne de sucre.⁴⁶

Tous les sites potentiels ne sont pas nécessairement occupés. Le taux d'occupation dépend tout d'abord de la séquence du site de N-glycosylation : les sites NXT sont plus souvent glycosylés que les sites NXS, et l'acide aminé en position X joue également un rôle.⁴⁷ Les acides aminés qui entourent immédiatement le site influencent également le taux d'occupation^{41,48}, de même que la présence d'acides aminés aromatiques, pas nécessairement tout proches du site de glycosylation, mais qui en revanche se retrouvent dans l'environnement du N-glycane après le repliement de la protéine.⁴⁹ Ce dernier élément semble indiquer d'ailleurs que la N-glycosylation pourrait être un facteur de stabilisation des zones hydrophobes de la protéine.⁴⁹ Enfin, l'occupation d'un site dépend également de l'environnement cellulaire au moment de l'expression de la protéine.⁶

Macrohétérogénéité et microhétérogénéité

Si l'obtention du glycane Man₈GlcNAc₂ est nécessaire pour que la glycoprotéine soit transférée du RE au Golgi, la totalité des étapes du Golgi ne se produit pas toujours. La glycoprotéine peut donc quitter le Golgi avec des N-glycanes plus ou moins ramifiés, plus ou moins longs. Deux sites de glycosylation d'une même protéine peuvent porter des glycanes différents. C'est la macrohétérogénéité de la glycosylation. De plus, un site de glycosylation donné peut présenter une variété de N-glycanes. C'est ce qu'on appelle la microhétérogénéité de la glycosylation. La glycoprotéine se présente donc sous différentes glycoformes : un même corps protéique avec une glycosylation variable. Il est intéressant de noter que les macro- et microhétérogénéités d'une protéine sont reproductibles^{50,51} : dans des conditions biologiques données, le nombre et les proportions relatives des glycoformes sont remarquablement constantes. La macrohétérogénéité semble découler de l'exposition du N-glycane après repliement de la protéine. Des N-glycanes bien exposés à la surface de la protéine, avec une conformation peu contrainte par des interactions avec le corps protéique, sont plus susceptibles d'entrer en contact avec et d'être des substrats pour les glycosyltransférases du Golgi, et seraient donc plus ramifiés et plus longs que des N-glycanes moins accessibles.^{38,50} Ce qui régit la microhétérogénéité de la N-glycosylation est complexe et mal compris. Plusieurs facteurs ont été identifiés : le niveau d'expression et la compétition des enzymes impliquées dans la N-glycosylation, la disponibilité des donneurs de monosaccharides, ou encore le temps de résidence de la protéine dans le Golgi jouent un rôle.⁷

Glycosyltransférases du Golgi

Nomenclature

Les glycosyltransférases sont désignées par leur substrat, le monosaccharide qu'elles transfèrent et le type de liaison créé entre les deux résidus. Par exemple, la β -galactoside α 2,6-sialyltransférase opère le transfert d'un acide sialique sur un résidu de galactose avec une liaison α 2,6, 2 désignant le carbone impliqué de l'acide sialique et 6 celui du galactose. La galactose est lui-même lié en β avec le monosaccharide qui le précède.

Caractéristiques générales communes

Toutes les glycosyltransférases du Golgi sont des protéines membranaires de type II⁵², c'est-à-dire qu'elles possèdent un domaine cytoplasmique court en N-terminal, un domaine transmembranaire, et un domaine lumenal en C-terminal. Le domaine lumenal présente un pied plus ou moins long surmonté d'un large domaine qui contient le site catalytique.

Localisation

La localisation des glycosyltransférases dans le Golgi correspond assez bien au moment où elles interviennent dans l'élongation du glycanes.⁵³ Ainsi, les β 1,2-N-acétylglucosaminyltransférases 1 et 2 (GnTI et GnTII), responsables de l'addition des GlcNAc aux résidus de mannose du noyau, se situent principalement dans les compartiments de la région médiane du Golgi, tandis que la β 1,4-galactosyltransférase (GT), les α 2,3-sialyltransférases (ST3) et l' α 2,6-sialyltransférase (ST6GalI), responsables de l'addition des monosaccharides terminaux du N-glycane, Gal et Sia, co-localisent principalement dans le trans-Golgi.⁵³ Les enzymes ne sont pas strictement localisées dans certains compartiments ; elles sont plutôt distribuées dans le Golgi selon des gradients.⁵³ La localisation des glycosyltransférases serait régie par des caractéristiques de la région transmembranaire, du domaine cytoplasmique, et du pied du domaine lumenal, dans des modalités qui ne sont pas encore parfaitement comprises.⁵² Le pied des glycosyltransférases est sensible à des protéases, ce qui conduit à la sécrétion de formes solubles des glycosyltransférases, notamment de la GalT1 et de la ST6GalI.⁵⁴

Oligomérisation des glycosyltransférases

Les glycosyltransférases peuvent former des complexes homogènes ou hétérogènes.⁵⁵ Une étude a révélé la formation d'homodimères des enzymes GnTI, GnTII, GalT1, ST6GalI et ST3GalIII.⁵⁵ Ces enzymes étaient également capables de former des hétérodimères pour former des complexes pertinents du point de vue de la séquence d'élongation du N-glycane : GnTI/GnTII, GalT1/ST6GalI, GalT1/ST3GalIII ; en revanche, ST3GalIII et ST6GalI ne formaient pas de complexe.⁵⁵ Les complexes étaient plus actifs que chacune des glycosyltransférases qui les composaient, suggérant une coopération des enzymes d'un complexe. L'oligomérisation semble le résultat d'interactions entre les domaines catalytiques pour une majorité des enzymes (GnTI, GnTII, GalT1, ST3GalIII), tandis que l'oligomérisation de la ST6GalI et de son complexe avec GalT1 passerait plutôt par le domaine transmembranaire.^{54,55}

Spécificités et sélectivités des enzymes du Golgi

L'organisation des enzymes le long du Golgi dans l'ordre approximatif dans lequel elles interviennent sur le glycane ne suffit pas à expliquer la séquence conservée des monosaccharides qui le composent, puisque de nombreuses enzymes co-localisent. La séquence est gouvernée par les spécificités et sélectivités de substrat des enzymes.⁵³ Ainsi, les enzymes ayant les mêmes substrats peuvent entrer en compétition. Les enzymes ne sont pas sélectives du seul monosaccharide accepteur, mais plutôt de portions du glycane. Par exemple, la fucosyltransférase VIII (FucT), qui ajoute un résidu de fucose sur le GlcNAc de cœur en α 1,6, reconnaît les glycanes diversement branchés, à condition qu'ils soient dépourvus de galactose.⁵⁶ Elle entre en compétition avec la GnTIII, qui a une spécificité similaire. En revanche, l'addition d'un résidu de GlcNAc bisectant par la GnTIII inhibe par la suite l'action de la FucT. Plusieurs réactions de ce type ferment ainsi certaines voies d'élongation potentielles. C'est ce que Schachter a qualifié de principe « go-no go ».⁷ Symétriquement, le principe « no go-go » décrit le fait qu'un glycane n'est pas un substrat pour une enzyme donnée tant qu'un monosaccharide en particulier n'y a pas été ajouté. Ce cas de figure est illustré par exemple par l'action de la mannosidase II (ManII), qui éliminera les résidus de

mannose de la branche α 1,6 à condition que le Man α 1,3 soit substitué par un résidu de GlcNAc en position β 1,2, c'est-à-dire à condition que la GnTI ait déjà agi.

L'élongation des glycanes est aussi régie par les sélectivités des enzymes. Par exemple, la ST6GalII est spécifique des disaccharides Gal β 1,4GlcNAc, mais sélective de Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3.⁵⁷⁻⁵⁹ L'acide sialique α 2,6 sera donc préférentiellement ajouté sur la branche α 1,3 plutôt que sur la branche α 1,6 du glycanes. A l'inverse, la GT est sélective de la branche α 1,6.^{60,61} On voit ainsi que l'addition de l'acide sialique α 2,6 se fera plus fréquemment sur un glycanes di-galactosylé, puisque les glycanes mono-galactosylés présentent le galactose majoritairement sur la branche la moins bien reconnue par ST6GalII. Enfin, la totalité des spécificités et sélectivités des enzymes du Golgi n'est pas encore élucidée. Par exemple, dans le cas des glycanes mono-galactosylés et monosialylés G1FS(6)1, on ne sait pas si l'acide sialique empêche l'addition d'un deuxième résidu de galactose.

Impact sur la microhétérogénéité

La spécificité des glycosyltransférases pour un nombre restreint de substrats, leur sélectivité, la compétition des enzymes pour un même substrat, ainsi que la formation d'hétéro et d'homodimères enzymatiques sont tous des facteurs qui participent au contrôle de la séquence des N-glycanes. Alors qu'une infinité de combinaisons seraient en théorie possible, les glycosyltransférases présentes dans la cellule déterminent un répertoire limité de N-glycanes.

Différences de N-glycosylation entre les espèces

La N-glycosylation est observée chez tous les organismes eucaryotes. Cependant, le degré de complexité des N-glycanes formés augmente avec le degré de complexité de l'organisme (Figure 3). Par exemple, les levures ne sont capables que de la synthèse de N-glycanes haut-mannose. On note cependant que contrairement aux humains où les haut-mannoses sont limités aux structures comportant de 5 à 9 mannoses (Man5 à Man9), les haut-mannoses des levures sont généralement très ramifiés et très longs^{62,63}, grâce à la présence de mannosyltransférases qui n'existent pas chez l'homme. Les plantes ont la particularité d'incorporer à leurs glycanes complexes des résidus de xylose.⁶⁴ Autre différence, chez les

plantes le fucose est ajouté en position $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$, mais jamais $\alpha 1,6$ contrairement à ce que l'on observe chez les insectes ou les mammifères.⁶⁴ Les mammifères sont tous capables de produire des N-glycanes complexes, relativement similaires d'une espèce à l'autre. Néanmoins, ils ne possèdent pas tous exactement le même ensemble de glycosyltransférases dans le Golgi. En conséquence, de petites différences existent. Par exemple, comparons les N-glycanes complexes de l'homme, de la souris et des cellules de hamster CHO. Premièrement, on trouve chez la souris des branches terminées par deux galactoses (Gal-Gal) en plus de la séquence terminale habituelle Sia-Gal. Le disaccharide de galactose terminal est appelé antigène α -Gal et est très immunogène pour l'humain.⁶⁵ Ensuite, les acides sialiques de la souris peuvent être des acides N-acétylneuraminiques (NeuAc) comme chez l'humain, ou bien N-glycolylneuraminiques (NeuGc). Les NeuGc peuvent représenter jusqu'à 50% des acides sialiques d'une glycoprotéine de souris, tandis qu'ils sont présents en très faibles quantités dans les glycoprotéines des CHO.⁶⁶ Comme l'antigène α -Gal, mais dans une moindre mesure, le NeuGc pourrait être immunogène chez certains individus. En effet, si l'homme a perdu la capacité de synthétiser *de novo* du NeuGc, on en trouve quand même des traces issues du recyclage de NeuGc introduit par l'alimentation.⁶⁷ Les cellules CHO ne sont capables d'introduire dans les N-glycanes qu'un type d'acides sialiques, les acides sialiques $\alpha 2,3$, tandis que les souris et l'homme peuvent y incorporer les types $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$. Enfin, les N-glycanes humains peuvent présenter des résidus de N-acetylglucosamine bisectants, qui n'existent pas chez la souris et les CHO.

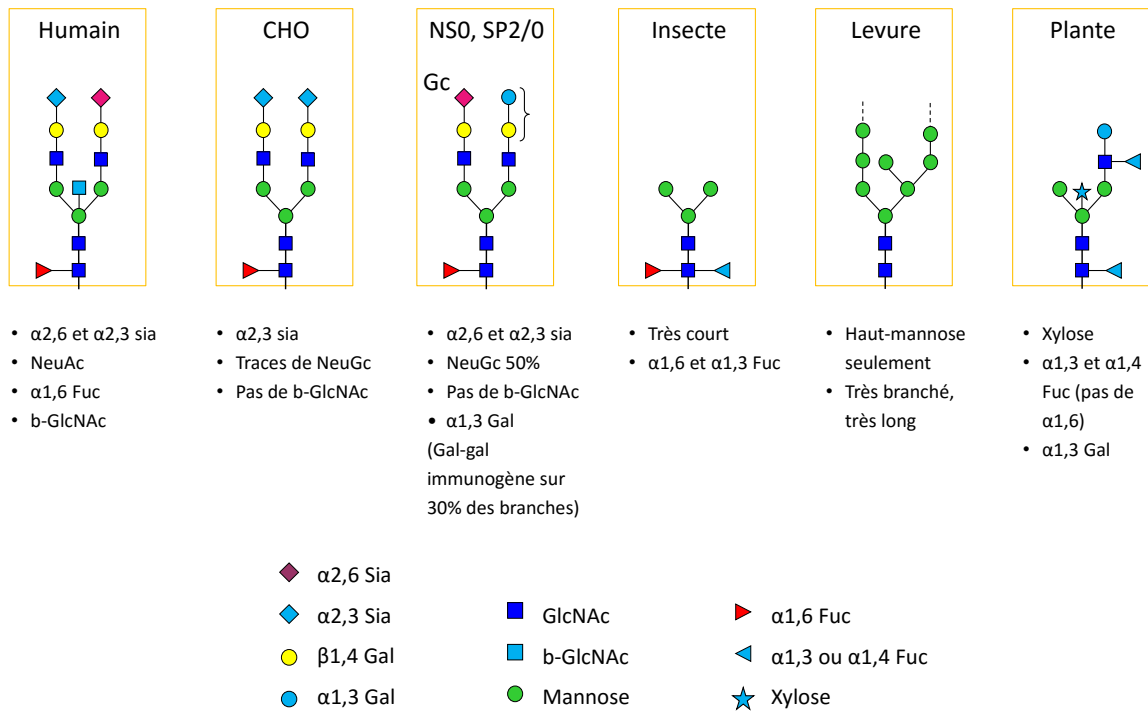


Figure 3 : Particularités des N-glycanes selon le système d'expression

Différents organismes possèdent différentes machineries de N-glycosylation, c'est-à-dire un ensemble de glycosyltransférases et glycosidases particulier, ainsi que des capacités de synthèse de monosaccharides variables, qui conduisent à des N-glycanes différents.

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; b-GlcNAc : N-acétylglucosamine bisectant ; NeuAc : acide N-acétylneuraminique ; NeuGc : acide N-glycolylneuraminique ; Sia : acide sialique

La sialylation

Les acides sialiques

Les acides sialiques forment une famille de près de 50 monosaccharides, dont le motif commun est un monosaccharide à neuf carbones, le premier, C1, faisant partie d'un groupe carboxyle situé sur le premier carbone du cycle, numéroté C2, et avec une chaîne de trois carbones, C7, C8 et C9, attachés au 5e et dernier carbone du cycle, numéroté C6 (Figure 4).⁶⁸ Les substitutions des carbones C4, C5, C7, C8 et C9 sont variables (N-acétylation, O-acétylation, O-méthylation, etc.) et sont la source de la grande diversité des acides sialiques.

Les deux plus fréquents sont l'acide N-acétylneuraminique, et l'acide N-glycolylneuraminique, qui diffèrent par le groupe porté par l'atome d'azote attaché au C5 (Figure 4). Les acides sialiques portent une charge nette négative à pH physiologique, ce qui fait d'eux les seuls monosaccharides chargés des N-glycanes.⁵²

On les trouve en position terminale des N-glycanes complexes, attachés au résidu de galactose par des liaisons α 2,3 ou α 2,6, ou bien à un autre acide sialique par une liaison α 2,8. Le type de liaison et le substrat dépendent de la sialyltransférase impliquée dans le transfert de l'acide sialique sur le glycane.

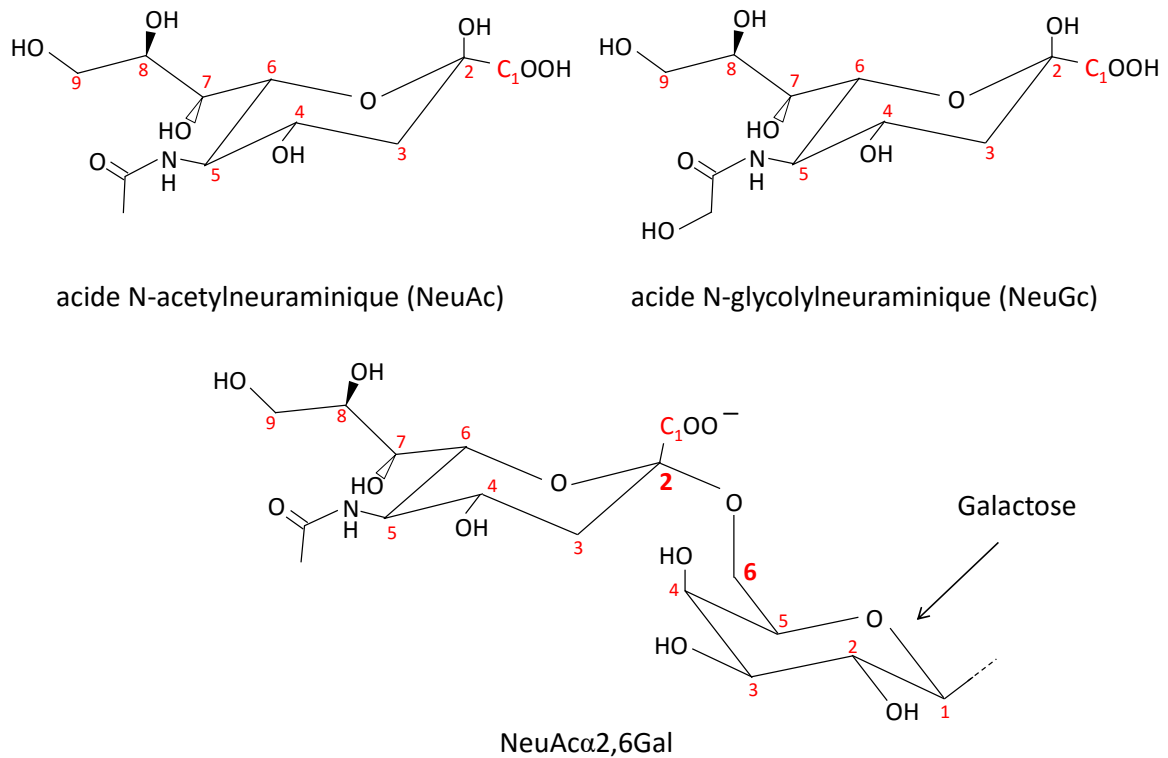


Figure 4 : Acides NeuAc et NeuGc

Les acides sialiques sont une famille de plus de cinquante molécules dont l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) et l'acide N-glycolylneuraminique (NeuAc) sont les principaux représentants. La grande diversité des acides sialiques tient à la substitution des carbones 5, 7, 8 et 9. L'humain n'est capable de synthétiser que le NeuAc, mais on trouve des traces de NeuGc dans ses glycanes provenant du recyclage du NeuGc apporté par son alimentation. Le NeuGc est immunogène pour certains individus. Les acides sialiques forment des liaisons α 2,3

ou $\alpha 2,6$ avec les résidus de galactose (Gal) des N-glycanes. Le disaccharide terminal NeuAca2,6Gal β est représenté ici. A pH physiologique, l'acide sialique porte une charge négative au carbone C₁. Ses substitutions en C₅ et C₆ en font un monosaccharide particulièrement volumineux.

Importance de la sialylation

La position terminale des acides sialiques dans les chaînes de sucre des glycoconjugués leur confère une place bien exposée à la surface des cellules et des protéines sécrétées qui se traduit par de nombreuses implications dans une grande variété de mécanismes cellulaires. Les rôles des acides sialiques peuvent être classés en deux types^{69,70}. Premièrement, ils peuvent agir comme masque du pénultième monosaccharide de la chaîne, les résidus de galactose et N-acétylgalactosamine (GalNAc). Les résidus de Gal et GalNAc sont des ligands pour une variété de récepteurs, dont les récepteurs hépatiques des asialoglycoprotéines (R-ASGP) et les galectines. Ensuite, les acides sialiques sont des ligands eux-mêmes pour les sélectines, les lectines de type immunoglobuline liant les acides sialiques (Siglecs), pour les IgG qui se développent par exemple contre le NeuGc, ou encore pour des récepteurs de pathogènes, comme la neuraminidase du virus de la grippe. Inversement, d'autres pathogènes exposent des acides sialiques à leur surface, soit pour échapper au contrôle immunitaire, soit pour utiliser nos récepteurs d'acides sialiques comme portes d'entrée dans les cellules.^{3,71,72}

Les acides sialiques sont donc impliqués dans les interactions cellule-cellule (Siglecs), le trafic cellulaire (sélectines), la signalisation, les interactions cellules-pathogène, et le devenir des glycoprotéines.^{69,70,73} Ils sont impliqués en particulier dans des processus de l'immunité, et des anomalies de la sialylation sont très largement associées aux cancers.⁷²⁻⁷⁴ Plus précisément, les cellules cancéreuses présentent souvent une activité accrue de certaines sialyltransférases, ce qui se traduit par une forte augmentation de la présence d'acides sialiques à la surface des cellules, et également dans les glycoprotéines sécrétées. Cette surabondance d'acides sialiques a été reliée à l'invasivité et aux capacités métastatiques des tumeurs.^{74,75} Les mécanismes en cause incluent par exemple une signalisation aberrante de récepteurs tels que les intégrines ou les récepteurs de facteurs de croissance, impliqués dans l'angiogenèse et la croissance cellulaire.⁷⁶ Ils incluent aussi l'inhibition des mécanismes de

défense immunitaire, notamment par l'interaction de ligands sialylés avec des lectines (souvent des Siglecs) des cellules effectrices.⁷⁷

Récemment, et c'est le domaine qui nous intéresse ici, ils ont également été évoqués comme des modulateurs de la fonction des IgG, diminuant les capacités à déclencher la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC), et leur conférant des propriétés anti-inflammatoires. Ces derniers points seront explicités dans la section « La glycosylation des IgG ».

Les sialyltransférases de la N-glycosylation

La famille des sialyltransférases humaines compte vingt membres, classés et nommés en fonction du monosaccharide auquel l'acide sialique sera transféré (Gal, GalNAc, Sia) et du type de liaison créé entre les deux (α 2,3, α 2,6 ou α 2,8) : ST6GalI, par exemple, transfère des acides sialiques en α 2,6 sur des résidus de galactose (Figure 4).⁷⁴ Les N-glycanes, avec leurs branches constituées de la séquence Gal β 1-4GlcNAc, peuvent être modifiés par trois sialyltransférases principalement : ST3GalIII et IV, et ST6GalI. Il existe une ST6GalIII qui a des propriétés similaires à ST6GalI mais elle est très faiblement exprimée et son activité est faible ou nulle pour les glycoprotéines.⁷⁴ Les sialyltransférases ST8 sont capables d'ajouter des acides sialiques en α 2,8 à des acides sialiques de type α 2,3, α 2,6 et α 2,8, mais on les trouve quasi exclusivement dans le cerveau. Ainsi, nous nous concentrerons sur ST3GalIII et IV, et ST6GalI.

ST3GalIII intervient sur les O-glycanes et N-glycanes des glycoprotéines. Ses substrats sont les disaccharides Gal β 1,3GlcNAc ou Gal β 1,4GlcNAc. La ST3GalIV intervient sur les glycoprotéines et les glycolipides. Ses substrats sont Gal β 1,3GalNAc ou Gal β 1,4GlcNAc. Dans beaucoup de travaux sur la N-glycosylation des protéines en culture cellulaire, leurs actions ne sont que très rarement distinguées, puisque leur substrat est identique, et unique (Gal β 1,4GlcNAc), et le résultat le même (Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc). On les désigne habituellement sous la même appellation de « ST3 ».

ST6GalI est l' α 2,6-sialyltransférase majeure qui intervient sur les N-glycanes. C'est pourquoi dans le cadre de l'étude de la N-glycosylation, on la désigne souvent simplement par « ST6 ». Son substrat est également Gal β 1,4GlcNAc. Elle entre donc en compétition avec les

ST3 pour son élongation. Il a été montré que la ST6GalI a une préférence marquée pour la branche α 1,3 du glycane, à laquelle elle ajoute un acide sialique huit fois plus vite par rapport à la branche α 1,6.^{57,78} Cette préférence est indépendante de la protéine à laquelle est attachée le N-glycane, puisque la même sélectivité a été observée pour un glycane seul, pour un glycane du segment Fc d'une IgG, ou encore pour un glycane de la protéine β -trace (β -TP).^{57,78} Les raisons de cette sélectivité ne sont pas claires. Un cristal de ST6GalI accommodant le N-glycane d'une seconde ST6GalI n'a révélé aucune raison de nature chimique ou stérique permettant de l'expliquer.⁵⁹ Si le squelette protéique n'influence pas la sélectivité de la ST6GalI, il influence la vitesse de conversion du substrat.⁷⁹ Cela s'explique par le fait que l'action de la ST6GalI se produit tard dans la maturation de la protéine, à un moment où les structures tertiaire et quaternaire de la protéine sont en place. La ST6GalI co-localisant avec la galactosyltransférase et les ST3, on peut supposer que la structure protéique peut également être un frein à l'activité de ces dernières, dans les cas où le site de glycosylation se retrouve enfoui dans la protéine à l'issue de son repliement, comme c'est le cas des sites N297 du Fc des immunoglobulines.

Les étapes de la sialylation

L'addition d'un acide sialique sur la chaîne de sucre en élongation requiert trois éléments : la glycoprotéine, le donneur d'acide sialique, sous forme de sucre nucléotidique CMP-sia, et la sialyltransférase. Nous avons déjà évoqué les étapes par lesquelles passe la glycoprotéine avant d'être sialylée ainsi que les sialyltransférases. Reprenons ici la voie de synthèse du donneur d'acide sialique CMP-sia (ou CMP-NeuAc) (Figure 5).^{3,39} La synthèse de l'acide sialique commence dans le cytoplasme à partir du sucre nucléotidique uridine diphosphate GlcNAc (UDP-GlcNAc). L'UDP-GlcNAc est converti en N-acétylmannosamine (ManNAc) puis en ManNAc-6-phosphate (ManNAc-6-P) par l'enzyme bifonctionnelle UDP-N-acétylglucosamine 2-épipimérase/ManNAc kinase. Le ManNAc-6-P est ensuite converti en acide N-acétylneuraminique-9-phosphate (NeuAc-9-P) par la NeuAc-9-P synthase, qui devient du NeuAc par l'action de la NeuAc-9-phosphatase. Le NeuAc entre alors dans le noyau de la cellule, où il est attaché à une cytidine monophosphate par la CMP-NeuAc synthase, pour devenir le CMP-NeuAc, la molécule donneur de NeuAc pour les sialyltransférases. Le CMP-NeuAc quitte le noyau et entre dans le Golgi via le transporteur de CMP-NeuAc. Une fois

dans le Golgi, il devient disponible pour addition sur les glycoconjugués. Dans le cytoplasme, le CMP-NeuAc est converti dans certains organismes en CMP-NeuGc par l'hydroxylase de CMP-NeuAc. C'est cette capacité de conversion de CMP-NeuAc en CMP-NeuGc qui a été perdue chez l'homme, à cause de la perte de 92 paires de bases dans le gène de l'hydroxylase.

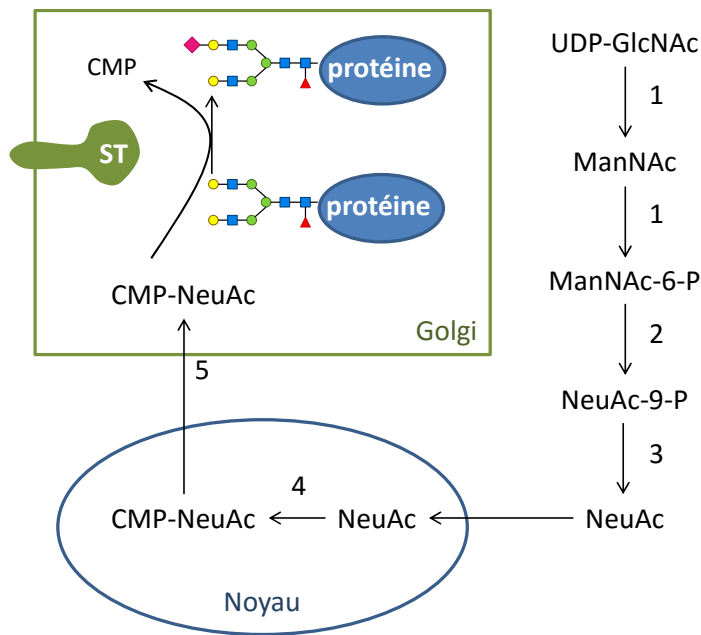


Figure 5 : Synthèse du donneur d'acide sialique CMP-sia

Le CMP-sia est synthétisé par une succession d'étapes catalysées par des enzymes (numérotées 1 à 5) dans le cytoplasme puis dans le noyau, à partir de l'UDP-GlcNAc, avant de rejoindre l'appareil de Golgi où il sert de donneur d'acide sialique aux sialyltransférases (ST) pour l'élongation des glycanes. (1) UDP-N-acétylglucosamine 2-épipimérase/ManNAc kinase, (2) NeuAc-9-P synthase, (3) NeuAc-9-phosphatase, (4) CMP-NeuAc synthase, (5) transporteur de CMP-NeuAc. Figure adaptée de Bork et al. 2009.

Augmentation de la sialylation des glycoprotéines en culture de cellules de mammifères

Stratégies de contrôle de la sialylation

Les raisons de vouloir maximiser la sialylation des glycoprotéines sont multiples, depuis l'allongement de la demi-vie des glycoprotéines thérapeutiques, à l'uniformisation des

glycoformes pour améliorer la robustesse des procédés, en passant par la synthèse de profils de sialylation définis pour l'étude de leur impact sur les fonctions des protéines.

Les conditions de culture classiques comprennent le type de procédé (fed-batch, perfusion), les paramètres du procédé (température, pH, etc.), le milieu de culture et ses suppléments. L'influence de nombre de ces conditions sur le niveau de sialylation de la glycoprotéine a été examinée, et a parfois fait l'objet de recherches plus approfondies pour déterminer quelle étape de la sialylation exactement était influencée par un paramètre donné. De ces observations peuvent être tirées après coup des stratégies d'augmentation – ou de diminution – de la sialylation.

Par ailleurs, d'autres recherches ont consisté à cibler spécifiquement l'une des étapes de la sialylation, par suppléments de promoteurs ou d'inhibiteurs de la voie de sialylation ou bien par ingénierie cellulaire. En effet, chacune des étapes de la voie de la sialylation étant potentiellement limitante, toutes peuvent faire l'objet de manipulations qui pourraient améliorer le niveau final de la sialylation (Figure 5).

Enfin, des techniques de modification de la sialylation après l'étape de culture cellulaire, par mise en présence de la glycoprotéine purifiée, d'un donneur de sucre et d'un catalyseur enzymatique ou chimique de la réaction, ont également été mises au point.

Procédé de production : impact des paramètres de culture sur la sialylation

Mode de culture : batch, fed-batch, perfusion

La culture en fed-batch est de loin le mode de production de glycoprotéines le plus utilisé aujourd'hui.^{9,80} En culture fed-batch, comme en batch simple, les cellules croissent et produisent la protéine cible, qui est récoltée en fin de culture, dès les premiers signes de mort cellulaire. Le fed-batch consiste à allonger la durée de vie des cellules, et donc le temps de culture et de production, en apportant des suppléments de nutriments tout au long de la culture, le plus communément toutes les 24h à 48h. Comme en batch, les déchets cellulaires, comme le lactate et l'ammoniaque, s'accumulent dans le milieu. Les conditions de cultures des systèmes batch et fed-batch évoluent donc au cours du temps, et la qualité de la glycoprotéine produite (agrégats, variants de charge, et surtout glycoprofil) peut varier au

cours de la culture. De nombreuses équipes de recherche ont ainsi observé que la galactosylation et *a fortiori* la sialylation des glycoprotéines diminuent au cours de la culture et chutent avec la baisse de viabilité.⁸¹⁻⁸⁵ En particulier, Rodriguez *et al.* ont montré que les glycanes di-sialylés de l'interféron gamma (IFN γ) produit en CHO en batch diminuaient au cours du temps au profit des glycanes di-sialylés.⁸²

En perfusion, du milieu frais est injecté en semi-continu dans le réacteur, tandis que le milieu « usé », contenant la protéine cible mais aussi les déchets cellulaires, est récolté périodiquement tandis que les cellules sont retenues dans le réacteur. La culture en perfusion permet d'amener les cellules à un état stable, et donc d'obtenir potentiellement une qualité de protéine constante. Une étude de Lipscomb *et al.* a montré que le niveau de sialylation était plus élevé en perfusion par rapport au fed-batch.⁸⁶ Les auteurs proposent que la dégradation des conditions de culture en batch et fed-batch ne serait pas la seule cause de l'écart de sialylation observé, mais que le taux de croissance cellulaire plus lent observé en perfusion pourrait permettre un meilleur taux d'occupation des sites de glycosylation ainsi qu'une élongation complète plus fréquente. Ce type de procédé, en plus d'être coûteux, a longtemps posé des difficultés technologiques rendant sa mise en œuvre laborieuse, tandis que le fed-batch est moins cher et plus simple.⁹ Cependant, nombre de difficultés techniques ont été résolues ou du moins allégées ces dernières années, et on assiste à un regain d'intérêt pour cette technologie, l'avantage d'un glycoprofil constant étant maintenant un argument récurrent en faveur de cette technologie.

Cette hypothèse qu'une sécrétion rapide de la protéine irait de pair avec une moindre glycosylation a été reprise par de nombreuses équipes, donnant lieu récemment à la définition d'un paramètre de « capacité de glycosylation », qui désigne la quantité maximale de glycoprotéines totales que les cellules peuvent produire dans un système donné sans générer de glycanes tronqués.^{81,87}

Température

L'hypothermie légère, c'est-à-dire une température de culture comprise entre 30°C et 33°C, permet d'augmenter les rendements de production par les cellules CHO^{88,89}, mais il semblerait que cela se fasse au détriment des niveaux de sialylation. Ainsi Trummer *et al.* ont

montré que le niveau de sialylation d'une protéine de fusion EPO-Fc était diminué de 40% lorsque la température était abaissée de 37°C à 30°C, et de 20% en passant de 37°C à 33°C.⁸³ Borys *et al.* ont observé qu'une hypothermie amenée tôt dans la culture (avant la fin de la phase exponentielle) donne la sialylation la plus basse, comparativement à une diminution plus tardive.⁸⁵ Dans une étude récente, Sou *et al.* ont suggéré que la cause principale de cette diminution de la sialylation à basse température était une moindre expression des glycosyltransférases plutôt qu'une pénurie de substrats, rejoignant ici la notion de capacité de glycosylation.⁸⁷ Pourtant, une baisse de sialylation en culture en hypothermie n'est pas systématique. Bollati-Fogolin *et al.* ont rapporté que des molécules de GM-CSF produites en CHO à 37°C ou 33°C présentaient un niveau semblable de sialylation.⁹⁰ Yoon *et al.* ont observé que la sialylation de l'EPO produite en CHO à 30°C ou 33°C était meilleure que l'EPO produite à 37°C.⁸¹ Plus particulièrement, le maximum atteint était plus élevé à 30°C et 33°C (un acide sialique de plus par molécule d'EPO (mol sia/mol EPO)), et les niveaux de sialylation chutaient de 12 à 7 mol sia/mol EPO à 37°C au cours de la phase de mort (très rapide), tandis qu'ils se maintenaient autour de 11.5 mol sia/mol EPO à 33°C. La productivité spécifique d'EPO était pourtant significativement augmentée dans les cultures à basse température. Les auteurs reprennent l'hypothèse commune selon laquelle le retard de mort cellulaire à basse température limite la libération dans le milieu de protéases et sialidases, ce qui diminuerait la dégradation de la sialylation.⁹¹ Ils avancent aussi que l'activité de ces sialidases pourrait être diminuée à basse température, mais cette hypothèse a été réfutée plus tard par Clark *et al.*⁹²

Quoi qu'il en soit, on retient que l'hypothermie engendre un ensemble de modifications (modulation de l'expression et de l'activité enzymatiques, mort cellulaire retardée, augmentation de la productivité spécifique, chute du pH plus faible en fin de culture, augmentation du taux d'occupation des sites de N-glycosylation), toutes susceptibles d'affecter le niveau final de sialylation.^{81,87,89,93} Les facteurs promoteurs et inhibiteurs de la sialylation pourraient se combiner différemment d'un système à un autre, ce qui expliquerait les différents résultats observés selon les groupes de recherche, et qui souligne la complexité des mécanismes de contrôle de la glycosylation en culture.

pH

Une étude réalisée par Muthing *et al.* sur le cas d'un mAb produit par un hybridome a montré que les proportions relatives des formes agalactosylées, mono-galactosylées et digalactosylées variaient avec le pH, et que la sialylation obtenue à 7.2 était plus élevée qu'à pH 6.9 ou 7.4.⁹⁴ Yoon *et al.* ont montré que la sialylation de l'EPO était plus élevée lorsque le pH de la culture était inférieur à 7.2.⁹⁵ Trummer *et al.* ont ajouté que la sialylation de EPO-Fc cultivée à basse température pouvait remonter au niveau obtenu à 37°C à condition d'abaisser le pH de la culture de 7.1 à 6.9.⁹⁶ Enfin, Gawlitzek *et al.* 2009 ont examiné une gamme de pH beaucoup plus étroite pour la production d'une enzyme en CHO, et ont rapporté que la sialylation diminue linéairement de 4.1 à 3.4 mol sia / mol enzyme quand on passe de 7.0 à 7.16 unités de pH.⁹³ Le taux d'occupation de l'unique site de N-glycosylation de la protéine diminuait de 49% à 39% sur la même gamme de pH, ce qui pourrait indiquer que ce n'est pas l'élongation du glycane qui était affectée, mais l'addition du glycane à la protéine, en amont.

DO

L'étude de la glycosylation d'une IgG1 produite par un hybridome murin a montré que la galactosylation augmentait avec le taux d'oxygène dissous (DO), les glycanes digalactosylés représentant 9%, 25% puis à 30% des glycanes à 10%, 50% et 100% de DO respectivement.⁹⁷ Cette hausse de la galactosylation s'est accompagnée d'une augmentation – très légère – de la sialylation. Trummer *et al.* ont rapporté que des variations de DO de 10% à 90% n'avaient aucun effet significatif sur la sialylation de EPO-Fc, mais ont noté une baisse de la sialylation à une DO de 100%.⁸³ Les mécanismes selon lesquels la DO affecte la glycosylation ne sont pas bien compris.³⁸ Butler *et al.* ont proposé que dans le cas de l'anticorps, la DO pourrait influencer le moment auquel se forment ses ponts disulfures (HC-HC et HC-LC), ce qui créerait une gêne stérique empêchant la galactosylation des glycanes du Fc.³⁸

Ammoniaque

L'ammoniaque est un déchet métabolique toxique des cellules qui s'accumule au cours de la culture. Il est issu principalement du métabolisme de la glutamine et de l'asparagine, ainsi que de la dégradation chimique de la glutamine du milieu. L'ammoniaque inhibe la

croissance et la productivité cellulaires. Il affecte aussi les profils de glycosylation et cause en particulier une diminution du niveau de sialylation.^{85,98-100} Une des hypothèses principales est que l'ammoniaque affecte la glycosylation via l'augmentation du pH qu'il entraînerait dans le Golgi. Cette augmentation du pH entraînerait une diminution de l'activité de diverses glycosyltransférases du Golgi, dont la β -1,4-galactosyltransférase, et les sialyltransférases.^{100,101} Une autre étude a suggéré que c'est l'expression de ces glycosyltransférases qui est affectée principalement plutôt que leur activité.¹⁰⁰ Des études ont rapporté également que le niveau de sialidases et β -galactosidases augmente avec la concentration en ammoniaque, mais il semblerait que l'ammoniaque affecte bien la synthèse du glycane plutôt que sa dégradation.^{99,101}

Procédé de production : impact du milieu de culture sur la sialylation

Glucose et glutamine

Le glucose et la glutamine sont les deux sources principales d'énergie pour les cellules dans le milieu de culture. Globalement, diminuer les concentrations de glucose et de glutamine conduit à une glycosylation incomplète : baisse de la galactosylation, de la sialylation, et du taux d'occupation des sites.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Une étude précise que des niveaux bas en glucose et glutamine peuvent améliorer la productivité, éviter l'accumulation de lactate et d'ammoniaque, mais que le glucose devrait être maintenu au-dessus de 0.7 mM et la glutamine au-dessus de 0.1 mM pour conserver une élongation complète du glycane.¹⁰² Villacres *et al.* signalent que dans leur cas, la baisse de sialylation serait simplement une conséquence de la baisse de la galactosylation, mais qu'elle pourrait être due également à une augmentation de la concentration en cytidine phosphate CMP, qui inhibe la réaction de sialylation.¹⁰⁴

Précurseurs du sucre nucléotidique CMP-sia

N-acétylmannosamine (ManNAc) et cytidine triphosphate sont nécessaires à la biosynthèse de CMP-Sia, et donc *in fine* à la sialylation. Si la concentration en CMP-sia est efficacement augmentée grâce à une supplémentation en ManNAc, la sialylation n'augmente pas en conséquence.^{6,66} Coupler la supplémentation en ManNAc avec une supplémentation en

cytidine triphosphate ne permet pas non plus d'augmenter la sialylation.¹⁰⁵ De plus, Villacres *et al.* ont rapporté que dans les cultures privées de glucose où la sialylation était diminuée, la concentration de CMP-sia, elle, n'était pas affectée.¹⁰⁴

Précurseurs du sucre nucléotidique UDP-GlcNAc

La glucosamine et l'ammoniaque sont deux précurseurs du sucre nucléotidique UDP-GlcNAc, nécessaire à l'addition de N-acétylglucosamine, qui précède le galactose et l'acide sialique. Des similarités existent entre les effets de la glucosamine et de l'ammoniaque : tous deux inhibent la croissance cellulaire, tous deux interviennent dans la synthèse de l'UDP-GlcNAc, un apport de glucosamine ou de NH₄⁺ permet d'augmenter la quantité d'UDP-GlcNAc disponible, et modifie le profil de glycosylation, avec notamment une diminution de la sialylation. Néanmoins, les variations de la sialylation demeurent mineures.^{66,106}

Galactose

Comme la glucosamine et la N-acétylmannosamine, le galactose est un précurseur de sucres nucléotidiques nécessaires à l'élongation du glycane, ici l'UDP-gal. Comme les autres précurseurs de sucres nucléotidiques, l'apport en galactose permet d'augmenter la quantité d'UDP-gal intracellulaire, mais reste sans effet sur la sialylation.¹⁰⁷ Plus précisément, dans l'étude de Clark *et al.*¹⁰⁷, non seulement cette stratégie n'a engendré aucune amélioration du niveau de la sialylation, mais de plus, les auteurs ont montré que le galactose pourrait augmenter l'expression et l'activité des sialidases intracellulaires, ce qui pourrait potentiellement nuire à la sialylation.

Manganèse

Le manganèse est un co-facteur de la β -galactosyltransférase. La supplémentation en Mn²⁺ conduit à un enrichissement en glycanes complexes di-antennaire riches en galactose, accompagné d'une augmentation de sialylation.¹⁰⁸

Butyrate de sodium

Le butyrate de sodium (NaBu) est utilisé couramment pour diminuer le taux de croissance, inhiber les histones deacétylases (la deacétylation des histones réprime la

transcription) et augmenter la productivité spécifique des cellules. Selon les résultats les plus récents, NaBu ajouté tôt au milieu de culture et à moins de 1 mM augmente la sialylation, mais aussi la macro-hétérogénéité (taux d'occupation des sites) et la micro-hétérogénéité (branchage) de la glycosylation.^{82,85,93}

DANA

Le niveau de sialylation diminuant graduellement au cours du temps, l'hypothèse principale était que la mort cellulaire entraînait la libération de sialidases dans le milieu qui dégradait la sialylation de la glycoprotéine après sa sécrétion.^{84,91,107} Les travaux récents suggèrent que la diminution de la sialylation au cours du temps soit causée par des mécanismes intracellulaires plutôt qu'extracellulaires^{101,107}, mais les sialidases libérées dans le milieu pourraient être néanmoins la cause de la perte de sialylation lorsque la viabilité est descendue au moins au-dessous de 80%.^{107,109} Les sialidases présentes dans le milieu ont fait l'objet d'une stratégie d'inhibition par un analogue d'acide sialique, l'acide 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acétylneuraminic acid (DANA). Par exemple, le DANA a en effet permis de limiter la perte de sialylation de l'IFN γ et de la GP120 produits en CHO lorsque la viabilité cellulaire avait chuté^{91,109}, mais n'a pas été efficace pour préserver la sialylation de l'EPO. Néanmoins, le DANA est un produit très cher, et son utilisation à grande échelle pour les productions industrielles n'est pas envisageable.⁸⁴ Notons que le DANA n'est pas le seul inhibiteur de sialyltransférase existant, des équipes travaillent à la synthèse et à l'évaluation d'autres analogues d'acide sialique, de CMP-sia, de glycane accepteur et des intermédiaires de la réaction de sialylation.¹¹⁰

Autre

La liste de suppléments établie ici n'est pas exhaustive ; elle reprend les éléments les plus étudiés et/ou les plus efficaces uniquement. D'autres molécules, courantes ou rares, ont été évaluées : glycérol, DMSO⁸², cocktails d'acides aminés¹⁰⁸, dexaméthasone¹¹¹, glutamate¹¹², sucrose et tagatose¹¹³, etc.

Ingénierie cellulaire : surexpression du transporteur et de la synthétase de CMP-sia

L'ingénierie cellulaire pour l'augmentation de la sialylation reprend les trois étapes principales révélées par les travaux sur les conditions de culture : l'approvisionnement en précurseur CMP-sia, l'augmentation de l'efficacité des étapes d'élongation par les glycosyltransférases, et l'inhibition de la dégradation de la sialylation par les sialidases.

Les essais visant l'augmentation du CMP-sia disponible sont les plus récents. Dans une étude publiée en 2006, Wong *et al.* ont cloné le gène codant pour le transporteur de CMP-sia (CMP-SAT) du hamster dans une lignée CHO exprimant l'IFN γ .¹¹⁴ Les clones obtenus exprimaient deux à trois fois plus de CMP-SAT que la lignée parentale. Cela s'est traduit par une augmentation de 4 à 16% de la sialylation de l'interféron, ce qui correspond au maximum à seulement 0,5 acide sialique supplémentaire par molécule d'IFN γ .

Une autre étude rapporte le clonage d'une sialyltransférase humaine de type α 2,3 (ST3hu) seule ou en combinaison avec la synthétase humaine de CMP-sia (CMP-SAS), dans une lignée CHO exprimant l'EPO.¹¹⁵ La surexpression de CMP-SAS a en effet permis d'augmenter la concentration intracellulaire de CMP-sia, mais sans amélioration de la sialylation de l'EPO par comparaison avec la lignée surexprimant uniquement ST3hu, rappelant les résultats obtenus avec les stratégies de supplémentation en précurseurs de CMP-sia, où la quantité de CMP-sia intracellulaire n'était pas corrélée avec le niveau de sialylation. Supposant une limitation au niveau du transport dans le Golgi du CMP-sia supplémentaire synthétisé, les auteurs ont développé des lignées exprimant la CMP-SAT du hamster en plus de ST3hu et CMP-SAS. La sialylation de l'EPO était en effet plus élevée dans les lignées surexprimant ST3hu, CMP-SAS et CMP-SAT que dans les lignées surexprimant ST3hu et CMP-SAS. Cependant, l'augmentation de la sialylation restait modérée : l'expression de ST3hu seule permettait de réduire la proportion de glycanes mono- et di-sialylés au profit des tri-sialylés (+5% de tri-sialylés) par rapport à la lignée contrôle, tandis que l'expression de ST3hu, CMP-SAS et CMP-SAT conduisait à une diminution plus prononcée des mono- et di-sialylés au profit des tri- et tétra-sialylés (+6 à 7% et +7 à 9% respectivement).

Ingénierie cellulaire : surexpression des glycosyltransférases

De nombreux travaux ont exploré les effets de sialyltransférases de diverses origines sur la sialylation d'une variété de glycoprotéines, très souvent en CHO et toujours en expression stable. Ce qui est intéressant avec le clonage de gènes de la glycosylation dans la cellule hôte, c'est que celui-ci permet non seulement d'augmenter les capacités préexistantes de la cellule, mais aussi d'y introduire de nouvelles compétences. Les lignées de hamster possédant uniquement des α 2,3-sialyltransférases (ST3GalIII/IV), le clonage d'une α 2,6-sialyltransférase introduit la capacité d'incorporer des acides sialiques liés en α 2,6 aux résidus de galactose, et leur confère ainsi une capacité de glycosylation humanisée. La surexpression des α 2,3-sialyltransférases ne manque néanmoins pas d'intérêt. Si l'objectif est d'amener la sialylation à son maximum, afin d'uniformiser les profils de glycosylation, étendre la demi-vie de la protéine recombinante, ou bien encore découpler le profil de glycosylation des variations de conditions de culture – ce qui renforce la robustesse du procédé de production¹¹⁶, alors fonctionner avec des acides sialiques de type α 2,3 est indiqué et présente l'avantage de ne pas ajouter de niveau de complexité supplémentaire à l'analyse de la glycosylation de la protéine.

Surexpression de ST3

Parmi les études explorant les effets de la surexpression de ST3, on trouve les travaux sur la combinaison de ST3hu, CMP-SAS et CMP-SAT résumés au paragraphe précédent.¹¹⁵ On trouve également des recherches rapportées par Weikert *et al.*, très intéressantes pour nous puisqu'elles empruntent la même démarche que la nôtre, soit l'étude des modifications induites par la surexpression d'une β -1,4-galactosyltransférase humaine (GThu) et d'une sialyltransférase humaine, en l'occurrence ST3GalIII, seules, ou en combinaison.¹¹⁶ Après la transfection, les cellules CHO ont été soumises à une pression de sélection permettant de ne maintenir en culture que les cellules exprimant les transgènes. Ceci a conduit à un ensemble de cellules appelé « pool stable ». D'une part, le pool stable a en commun avec les cellules clonales la stabilité de l'expression des transgènes. D'autre part, il a en commun avec les cellules modifiées de façon transitoire l'hétérogénéité des niveaux d'expression des transgènes d'une cellule à une autre. Ainsi, comme en transitoire, l'étude de pools stables permet de produire une analyse qui concerne potentiellement l'ensemble des CHO, plutôt que restreinte

au cas particulier d'un clone isolé. Dans le cas présent, la stratégie de Weikert *et al.* est donc commune à la nôtre sur deux niveaux : l'expression combinée d'une GT et d'une ST, et le travail sur un ensemble non clonal de CHO. Les essais ont été réalisés dans deux lignées, l'une exprimant une protéine de fusion composée du domaine de liaison du récepteur du facteur de nécrose tumorale fusionné au domaine Fc d'une IgG1 (TNFR-IgG), et l'autre exprimant un variant de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), le TNK-tPA. Cette dernière présente des glycanes di-, tri- et tétra-antennaires presque totalement galactosylés, et déjà richement sialylés. Au total, dans les glycanes sialylés, les auteurs ont trouvé 77% d'antennes terminées par un acide sialique, et l'expression de ST3GalIII a fait grimper cette proportion à plus de 90%. TNFR-IgG est plus riche que TNK-tPA en glycanes sous-galactosylés, justifiant la surexpression de GThu en plus de ST3GalIII. La surexpression de GThu a principalement permis de convertir les glycanes di-antennaires agalactosylés en glycanes di-galactosylés, mais a eu des effets mineurs sur le niveau de sialylation. En présence des deux enzymes, la proportion de branches galactosylées a également augmenté, permettant d'atteindre, comme pour TNK-tPA, plus de 90% de branches sialylées au sein des glycanes sialylés. Cette précision est nécessaire car une large part de glycanes neutres demeure, c'est-à-dire que la proportion de branches sialylées pour l'ensemble des glycanes du TNFR-IgG n'atteint pas 90%, et ne peut d'ailleurs pas être évaluée. La comparaison des quantités relatives de glycanes neutres et sialylés ne peut être réalisée en raison de la méthode d'analyse utilisée, à savoir la spectrométrie de masse à source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI). Le MALDI permet de mesurer les quantités relatives de glycanes neutres en mode positif, et les quantités relatives de glycanes sialylés en mode négatif, mais ne permet pas d'évaluer les neutres et les sialylés ensemble. Nous reviendrons sur l'analyse MALDI puis sur une interprétation plus poussée des résultats de Weikert *et al.* à la lumière de nos propres résultats dans le chapitre « Sialylation d'une IgG1 native ».

Surexpression de ST6

Une des premières études de surexpression d'une sialyltransférase ST6 a été réalisée par Monaco *et al.* en 1996 dans une lignée CHO exprimant l'IFN γ .¹¹⁷ La sialyltransférase de rat (ST6rat) a été incorporée de façon stable dans la lignée avec l'objectif d'humaniser la sialylation de la CHO. La conséquence de l'expression de ST6rat dans la CHO a été

l'obtention de glycanes sialylés présentant un mélange d'acides sialiques de type $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ plutôt qu'une augmentation nette de la sialylation. Les auteurs ajoutent qu'ils n'ont pas observé de différence entre les caractéristiques de croissance de la lignée parentale et de celle surexprimant la ST6rat. Enfin, dans une étude complémentaire, ils ont montré que l'IFN γ avec sialylation mixte avait une efficacité comparable et une demi-vie plus longue que l'IFN γ $\alpha 2,3$.¹¹⁸ Ces quatre caractéristiques, distribution $\alpha 2,3/\alpha 2,6$, augmentation nette de la sialylation, impact sur les caractéristiques de croissance de la cellule hôte et impact de la présence d'acides sialiques $\alpha 2,6$ sur la bioactivité de la protéine, constituent les points principaux de discussion dans l'étude de l'intégration de ST6 dans une lignée exprimant des ST3 seulement.

Au sujet de l'impact de la sialylation $\alpha 2,6$ sur l'activité d'une protéine, il apparaît qu'une sialylation mixte $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ n'est pas nécessairement bénéfique, et l'avantage doit être démontré pour chaque protéine individuellement. Par exemple, si la sialylation est essentielle pour assurer l'activité et une longue demi-vie à l'EPO, une étude a montré que l'EPO était plus active avec une sialylation entièrement $\alpha 2,3$ plutôt qu'avec une sialylation mixte obtenue par production dans une lignée CHO exprimant la ST6GalI humaine.¹¹⁹ Une autre étude, publiée par Jassal *et al.* en 2001¹⁹, présente des résultats très intéressants sur l'impact du type de sialylation d'un anticorps mutant de type IgG3 sur son activité. L'IgG3 avec la phénylalanine 243 (située dans le Fc et en contact avec le glycane) substituée par une alanine (IgG3-F243A), produite en CHO, avait une sialylation beaucoup plus élevée que l'anticorps non-mutant : 53% de glycanes sialylés (mono- et di-sialylés) dans le mutant contre 3% (mono-sialylés) dans le non-mutant. Dans trois tests cellulaires destinés à évaluer l'efficacité de l'anticorps dans l'activation de mécanismes reposant sur Fc γ RI ou Fc γ RII, et de la voie du complément, le mutant se révélait moins efficace que le non-mutant. Par production dans une lignée CHO exprimant ST6rat, la proportion de glycanes sialylés de l'IgG3-F243A augmentait légèrement pour atteindre 60% des glycanes, avec notamment une progression des di-sialylés de 25% à 35%. Le type $\alpha 2,6$ représentait un peu moins de la moitié des acides sialiques (ratio 0.9:1 $\alpha 2,6:\alpha 2,3$). Ce mutant avec une sialylation mixte avait une efficacité meilleure que celle du mutant à sialylation $\alpha 2,3$. Mieux, l'efficacité du mutant à sialylation mixte remontait même au niveau de celle de l'anticorps non-mutant original. Cette étude soulève ainsi des questions

sur l'effet de l'expression de ST6 en CHO sur la glycosylation du Fc, sur l'effet de la structure du Fc sur la sialylation, et sur l'impact de la sialylation du Fc sur les fonctions effectrices des anticorps, sur lesquelles nous reviendrons tout au long de ce projet.

La distribution des acides sialiques $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ est le résultat de la compétition entre la ST3 endogène et la ST6 introduite pour les N-glycanes galactosylés.⁷⁸ Il apparaît que l'issue de la compétition entre les deux enzymes peut dépendre de nombreux facteurs, parmi lesquels les caractéristiques de la ST3 endogène (niveau d'expression, activité), l'efficacité de l'introduction de la ST6 (nombre de copies du gène intégrées, niveau d'expression, activité), ou encore la structure de la glycoprotéine cible et l'exposition de ses glycanes. Ainsi, bien que les publications citées jusqu'à présent rapportent l'obtention d'une sialylation mixte $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ plutôt qu'une augmentation nette de la sialylation, ce résultat n'est pas général et des cas différents ont été rapportés. Par exemple, un groupe a étudié l'expression de β -TP dans une lignée de cellules de rein de bébé hamster (baby hamster kidney cells, BHK) surexprimant la ST6GalI humaine.⁷⁸ La β -TP était déjà hautement sialylée dans la BHK parentale : son glycoprofil était composé de 70% de N-glycanes di-antennaires di-sialylés, 25% de di-antennaires mono-sialylés et 5% de non sialylés. L'introduction de ST6GalI a permis d'augmenter la part de glycanes di-sialylés, mais les acides sialiques $\alpha 2,3$ sont restés majoritaires. De plus, 60% des glycanes di-sialylés portaient un acide sialique $\alpha 2,3$ et un acide sialique $\alpha 2,6$, ce qui montre que la mixité de la sialylation a lieu au niveau des branches des glycanes : on trouve des glycanes sialylés $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$, et non $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$. Par contre, dans le cas d'une autre protéine présentant des glycanes sialylés tri- et tétra-antennaires, exprimée dans la même lignée BHK-ST6GalI, la sialylation $\alpha 2,6$ était devenue majoritaire, dans un ratio 1:2 $\alpha 2,3:\alpha 2,6$.⁷⁸

Dans une autre étude parue en 2010, un groupe a exprimé de façon transitoire l'EPO avec des groupes de gènes de la glycosylation, incluant les sialyltransférases spécifiques des N-glycanes ST6GalI, ST3GalIII, ST3GalIV et ST3GalVI, dans six lignées courantes pour l'expression de protéines recombinantes : CHO-K1 (hamster), BHK-21 (hamster), HEK293 (humain), Cos-7 (singe), 3T3 (souris) et NS0 (souris).¹²⁰ Leurs résultats ont montré premièrement que les capacités de sialylation endogène des lignées variaient beaucoup, CHO et BHK ayant une forte capacité de sialylation, et NS0 une faible capacité de sialylation. De

plus, ils ont montré que dans les deux lignées de hamster, la sialylation nette de l'EPO n'était pas augmentée, mais des acides sialiques de type $\alpha 2,6$ étaient bien introduits, semblablement aux observations de Monaco *et al.* Dans les quatre autres lignées, l'étude montrait que seules les sialyltransférases étaient responsables de l'augmentation de la sialylation, et non les gènes des enzymes en amont dans la voie de la N-glycosylation. Dans les HEK293 et les Cos-7, ST6GalI, ST3GalIII et IV avaient un impact positif sur le niveau de sialylation, tandis que seules ST3GalIII et IV étaient efficaces dans les lignées de souris. Dans aucune des lignées ST3GalVI n'a induit d'augmentation de la sialylation. Ainsi, la possibilité d'augmenter la sialylation par l'expression de sialyltransférases dépendait des capacités de sialylation initiales de chaque lignée.

Onitsuka *et al.* ont décrit les résultats de la ré-introduction de la propre ST6 de hamster (ST6cho) dans des CHO exprimant un anticorps monoclonal de type IgG1.¹²¹ Dans la lignée parentale, l'IgG1 était asialylée, tandis que dans la lignée modifiée avec la ST6cho, les glycanes sialylés représentaient 70% des glycanes, étaient majoritairement di-sialylés, et 100% sialylés $\alpha 2,6$. Par ailleurs, les auteurs signalaient que non seulement l'obtention d'un clone positif pour la sialyltransférase ST6 avait été difficile, mais aussi que sa croissance était plus lente, la densité cellulaire maximale plus faible, et le rendement de production de l'anticorps plus faible également que pour la lignée parentale. Cette excellente efficacité de sialylation $\alpha 2,6$ d'une IgG, molécule notoirement difficile à sialyler comme nous le détaillerons plus tard, est expliquée par les auteurs par une différence dans la structure de ST6cho en comparaison de ses homologues humaine et murines (souris et rat). Si cela ouvre des perspectives intéressantes, cette hypothèse ne peut suffire à expliquer la haute sialylation observée. En effet, l'IgG produite dans la lignée parentale était pauvrement galactosylée. La forte sialylation dans la lignée modifiée était nécessairement soutenue par une forte galactosylation en amont, qui n'est pas discutée dans le papier mais pourrait être un effet de variabilité clonale. En sélectionnant leur clone exprimant la ST6cho, et les auteurs signalent qu'ils n'en ont obtenu qu'un seul, ils ont très probablement sélectionné un variant à forte galactosylation. Une telle variation clonale n'est pas improbable : Grabenhorst *et al.* ont rapporté avoir déjà isolé un variant de BHK aberrant, où la glycosylation complexe n'avait pas lieu.⁷⁸ Par ailleurs, les glycanes afucosylés sont rares sur les IgG humaines et les protéines produites en CHO

(<10%).¹²² On note pourtant que le clone isolé par Onitsuka *et al.* présentait environ 24% de G2S2, ce qui souligne de nouveau le caractère tout à fait singulier de la machinerie de glycosylation de leur clone. Des résultats semblables à ceux d'Onitsuka *et al.* ont été publiés par Lin *et al.*, qui ont développé une lignée de CHO exprimant la ST6cho (CHO-ST6cho) : la densité maximale de CHO-ST6cho était plus faible que celle de la lignée parentale (4 à 5 x 10⁶ cellules/mL contre 8 à 9 x 10⁶ cellules/mL), et un anticorps produit dans cette lignée possédait un meilleur niveau de galactosylation que lorsqu'il était produit dans la lignée parentale, ce qui permettait à la sialylation d'avoir lieu.¹²³ L'enrichissement en sialylation α 2,6 consistait en l'obtention de 9% environ du glycan di-antennaire mono-galactosylé et mono-sialylé (G1FS1), et 6% du di-galactosylé mono-sialylé (G2FS1). Ces résultats sont loin au-dessous des résultats d'Onitsuka *et al.*, et affaiblissent l'hypothèse selon laquelle la ST6cho a des capacités de sialylation beaucoup plus élevées que ses homologues humaine et murines. La présence de sialylation α 2,6 dans l'anticorps a été confirmée, mais le niveau de sialylation α 2,3 n'a pas été évalué. Finalement, les auteurs ont rapporté n'avoir pas trouvé de corrélation linéaire entre le niveau d'ARNm de la ST6cho et le niveau de sialylation α 2,6 à la surface des cellules, ce qui pourrait suggérer selon eux l'existence d'un seuil régulant l'expression ou l'activité de la ST6cho.

Ces travaux récents montrent que le développement d'une lignée CHO permettant la sialylation α 2,6 est toujours d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique et demeure un défi technique, vingt ans après les premiers travaux du genre.

Ingénierie cellulaire : expression d'ARN inhibiteurs

Pour empêcher la dégradation de la sialylation par les sialidases, les techniques d'ingénierie cellulaire consistent à bloquer la synthèse des sialidases, par l'emploi de divers formats d'ARN inhibiteurs.

Ferrari *et al.* ont décrit le développement d'un clone stable de CHO exprimant un ARN anti-sens de la sialidase.⁸⁴ L'activité de la sialidase a été de 60% par rapport à la CHO parentale, et la sialylation d'une protéine modèle a progressé de 3 à 4 mol sia/mol protéine. Une autre approche, l'interférence ARN, consiste à exprimer des petits ARN interférents (ARNsi) et des ARN en épingle à cheveu (ARNhp) pour bloquer et dégrader les ARNm de la

sialidase. Ngantung *et al.* ont obtenu une réduction de 60% également de l'activité de la sialidase par rapport à la CHO parentale, ainsi qu'un maintien de la sialylation de l'IFN γ pendant la phase de mort cellulaire.¹²⁴ Selon les auteurs, ces résultats sont comparables avec les effets de l'utilisation de DANA.

Plus récemment, deux nouvelles sialidases ont été identifiées dans les CHO.¹²⁵ La sialidase visée dans les travaux de Ferrari *et al.* et Ngantung *et al.* serait la Neuraminidase 2 (Neu2cho), nommée en fonction de sa localisation et par homologie avec les neuraminidases 2 connues chez l'homme, la souris et le rat, localisées dans le cytosol. Trois autres neuraminidases sont connues chez ces espèces : Neu1 et Neu4 sont localisées dans les lysosomes, et Neu3 se trouve à la membrane. Les deux sialidases nouvellement identifiées dans la CHO sont de type 1 et 3 (Neu1cho et Neu3cho), Neu3cho étant la plus active des trois neuraminidases de CHO.¹²⁵ L'extinction de Neu3cho par interférence ARN a résulté en une diminution de 98% de son activité. Alors que l'extinction de Neu2 se traduisait par l'augmentation du niveau de sialylation de la protéine cible comparativement à la lignée parentale pendant la phase de mort cellulaire uniquement, l'extinction de Neu3 a permis d'augmenter la sialylation dès la phase stationnaire. Notons que dans leur modèle, la sialylation augmente au cours du temps de culture. Néanmoins, l'extinction de Neu3 a eu pour résultat l'augmentation du niveau de sialylation de l'IFN γ : progression de 1 à 1.5 mol sia/mol IFN γ lors de la phase stationnaire, et progression de 4 à 5 mol sia/mol IFN γ pendant la phase de mort cellulaire.

Ingénierie cellulaire : autre

Dans une étude parue en 2011, Wang *et al.* ont étudié l'effet du gène anti-apoptotique 30Kc19 du papillon *Bombyx mori* sur le niveau de sialylation de l'EPO en CHO.¹²⁶ Il a été démontré que ce gène anti-apoptotique conduisait à une meilleure productivité des CHO, et améliorerait la sialylation de l'EPO en augmentant l'activité de la sialyltransférase.

Conclusion sur les stratégies de contrôle en culture cellulaire

Le contrôle de la sialylation pendant l'étape de culture cellulaire du procédé de production de protéine est une tâche complexe car la sialylation est sensible aux variations des

paramètres de culture, à la composition du milieu et dépend des caractéristiques génétiques de la cellule hôte. Lorsque l'objectif est d'augmenter le niveau de sialylation de la protéine cible, toutes les stratégies ne se valent pas. Que ce soit par modification du milieu ou ingénierie cellulaire, augmenter la disponibilité en CMP-sia donne des résultats médiocres. La stratégie la plus efficace est d'augmenter l'expression des glycosyltransférases. Néanmoins, la manipulation génétique des lignées productrices n'est pas toujours possible, et les progrès réalisés en matière de composition du milieu et gestion des paramètres de culture pourraient permettre bientôt d'obtenir des résultats équivalents à l'ingénierie cellulaire.¹²⁷ Dans ce domaine, les travaux de modélisation des voies de la glycosylation et des paramètres qui les influencent seront une aide précieuse, et pourraient permettre de quitter la méthode de modification-observation paramètre par paramètre pour se diriger vers l'étude de facteurs multiples simultanément.¹²⁸⁻¹³⁰ Malgré ces progrès, la seule manière pour introduire une sialylation de type humain dans la lignée la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique, la CHO, reste l'introduction, stable ou transitoire, du gène de la ST6GalII dans la cellule.

Modification de la glycosylation *in vitro*

Addition d'un glycane entier

Plusieurs stratégies ont été développées qui permettent l'addition d'un glycane défini entier sur un site de glycosylation d'un peptide ou d'une protéine. Ces méthodes sont dites chimioenzymatiques car les donneurs de glycane sont le plus souvent synthétisés par voie chimique classique, tandis que le transfert du glycane à la protéine se fait par des enzymes. Les techniques les plus répandues, glycosylation par formation de pont disulfure et transglycosylation via des endoglycosidases et des glycanes-oxazoline, sont présentées ici.

Une méthode décrit la glycosylation *in vitro* d'une IgG où l'asparagine 297 (selon la numérotation EU), site de glycosylation de la chaîne lourde très conservé des IgG, est remplacée par une cystéine. Des glycanes portant un groupement thiol (-SH) en C1 du premier GlcNAc du cœur étaient synthétisés (thioaldoses), puis liés à la C297 par formation d'un pont disulfure.²⁰

Une autre méthode consiste à synthétiser des glycanes liés à une oxazoline d'une part, et d'autre part à produire des protéines portant le premier GlcNAc de cœur uniquement sur le site de N-glycosylation (protéine-GlcNAc), puis à transférer le glycanes de l'oxazoline à la protéine-GlcNAc grâce à une endoglycosidase. La protéine-GlcNAc peut être aisément obtenue par digestion de la protéine glycosylée de façon hétérogène avec certaines endoglycosidases comme l'endoglycosidase F. Des techniques de synthèse chimique peuvent également être employées comme celle décrite au paragraphe suivant. Pour le transfert du glycanes de l'oxazoline à la protéine, ce qu'on appelle la transglycosylation, des mutants de l'endoglycosidase M ont été synthétisés, qui ont permis d'obtenir des protéines avec des N-glycanes courts, composés des cinq monosaccharides du cœur avec ou sans GlcNAc bisectant.¹³¹ Le transfert de glycanes plus longs n'était pas possible avec ces endoglycosidases.

Le groupe de Bertozzi a décrit une autre technique reprenant la substitution N297C et la transglycosylation via des glycanes-oxazolines.¹³² Le Fc était d'abord muté pour présenter une séquence reconnue par l'enzyme génératrice de formylglycine (« formylglycine generating enzyme », FGE), comportant la cystéine en position 297. La FGE convertissait ensuite la cystéine en formylglycine. L'aldéhyde de la formylglycine devenait le point d'ancrage pour le glycanes : un aminooxy-GlcNAc était synthétisé puis conjugué à l'aldéhyde en milieu acide. Enfin, un mutant de l'endoglycosidase S réalisait le transfert de glycanes complexes de l'oxazoline au GlcNAc. Le transfert de glycanes di-sialylés était réalisé cette fois avec succès, avec un rendement de 51%.

Une variante de ces méthodes consistait à introduire tout d'abord un résidu de glucose et non de N-acétylglucosamine sur un site de glycosylation d'un peptide synthétique (peptide-Glc).¹³³ Les donneurs oxazoline et des nouveaux mutants de l'endoglycosidase M permettaient de réaliser la transglycosylation du peptide-Glc, cette fois aussi avec succès pour le transfert de glycanes galactosylés et sialylés. Dans cette étude, le rendement de chacune de ces réactions était évalué à plus de 80%, et variait selon la séquence du site de glycosylation et le type de glycanes à transférer.

Enfin, une étude parue en 2015 décrit le transfert réussi d'une variété de glycanes complexes pertinents, dont le di-sialylé (α 2,6) non fucosylé, grâce à une combinaison de la technique de transglycosylation à partir de glycanes-oxazolines et d'un mutant de

l'englycosidase S, avec la technique d'élongation enzymatique décrite au paragraphe suivant. Ces variants ont permis de montrer l'impact de la di-sialylation α 2,6 sur les fonctions effectrices de l'anticorps. Cette étude sera détaillée au paragraphe dédié à l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG.

Enfin, toutes ces techniques permettent, en plus d'introduire des glycanes définis sur les sites de glycosylation de la protéine, l'intégration de tags, conjugués, et autres attributs permettant d'élargir le spectre d'application des protéines recombinantes.

Elongation d'un glycanne préexistant

Comme nous l'avons vu, le problème majeur en culture est plutôt une élongation incomplète du N-glycane complexe qu'un déficit du taux d'occupation des sites de N-glycosylation. Une stratégie est donc de compléter l'élongation du glycanne *in vitro*, en mettant en présence la protéine glycosylée avec les glycosyltransférases terminales et les sucres activés correspondant.¹³⁴ Une étude a décrit l'élaboration de TNFR-IgG sialylée grâce à l'utilisation simultanée de la β 1,4-galactosyltransférase bovine (GTbov), l' α 2,3-sialyltransférase de rat (ST3rat), UDP-gal et CMP-sia dans un tampon contenant du $MnCl_2$.¹³⁴ La sialylation s'opérait au cours de deux cycles de 24h avec une nouvelle addition d'enzymes et de donneurs de sucres à l'issue du premier cycle. La sialylation était ainsi augmentée de 20%. Une étude du même groupe publiée quelques années plus tard a montré l'obtention d'un glycoprofil composé à presque 85% du glycanne complètement sialylé G2FS2 pour une IgG re-galactosylée selon une méthode similaire.¹³⁵ Des glycoprofiles homogènes composés de glycanes agalactosylés G0F, ou di-galactosylés G2F avaient aussi été obtenus par digestion *in vitro* avec une sialidase et une galactosidase.

Une méthode similaire a été utilisée par une autre équipe pour incorporer des acides sialiques α 2,6 à des IgG1.¹³⁶ La préparation des IgG sialylées consistait en une première étape de galactosylation de 48h, suivie d'une étape de sialylation de 48 ou 72h. La présence d'acides sialiques α 2,6 a été confirmée par SNA-blot, c'est-à-dire une variante d'immunobuvardage (western-blot) où l'anticorps primaire est remplacé par une lectine, ici une lectine de la plante *Sambucus nigra* (*Sambucus nigra* agglutinine, SNA) spécifique des acides sialiques α 2,6. Les

auteurs ne donnaient pas de détail sur le glycoprofil obtenu ni sur la provenance de la ST6 utilisée.

Au sujet de l'addition d'acide sialique α 2,6, les travaux de Barb *et al.* parus entre 2009 et 2012 sont les plus riches.^{57,79,137} Dans l'une de leurs études, ils ont décrit le processus d'addition de l'acide sialique *in vitro* avec une forme tronquée de ST6rat (dépourvue de son segment transmembranaire et cytoplasmique N-terminal), et ils montraient que le premier acide sialique d'un glycane galactosylé di-antennaire était ajouté onze fois plus vite que le second (huit fois plus vite pour la ST6GalI humaine).¹³⁷ Grâce à l'addition rapide du premier sia et lente du second, des conditions de réactions différentes ont permis d'enrichir le glycoprofil d'une IgG soit avec G2FS1, soit avec G2FS2 : une concentration « basse » d'enzyme permettait de convertir G2F en G2FS1, tout en gardant la formation de G2FS2 suffisamment lente pour que ce glycane reste minoritaire ; une concentration dix fois plus élevée de cette ST6rat courte permettait de rendre transitoire la formation de G2FS1, et d'accumuler G2FS2. L'obtention d'un glycoprofil enrichi en G2FS2 à plus de 75% nécessitait quatre cycles de 24h avec l'élimination du CMP libre et l'addition de CMP-sia après chaque cycle, le CMP libre inhibant la ST6. Il convient de préciser que les travaux de Barb *et al.* portaient initialement sur la caractérisation de la ST6GalI humaine, particulièrement dans le cas de la sialylation du Fc des IgG. Le développement d'une méthode de sialylation *in vitro* était donc un résultat naturel mais secondaire de ces recherches. L'ensemble de ces travaux a révélé des données fondamentales sur la conformation du Fc et de ses N-glycanes sialylés, raison pour laquelle nous reviendrons à plusieurs reprises sur les travaux de cette équipe tout au long de ce projet.

Les travaux récents de Washburn *et al.*¹³⁸, complètent l'étude de Barb *et al.* en montrant que la sialylation *in vitro* avec la ST6GalI humaine peut permettre l'obtention très rapide et transitoire de G2FS1, suivie de l'accumulation de G2FS2. Leur étude précise que la sialyltransférase peut alors jouer un rôle de sialidase et convertir le G2FS2 en G2FS1 de nouveau, en éliminant l'acide sialique de la branche α 1,3, c'est-à-dire le premier qui avait été ajouté selon la sélectivité de branche de ST6GalI. Le G2FS1 de fin (G2FS(3)1) est donc l'isomère du G2FS1 initial (G2FS(6)1). Les auteurs ajoutent que l'addition régulière de CMP-sia permet de limiter ce phénomène.

Très récemment, les industriels ont commencé à investir ce domaine, et on trouve désormais les premières galactosyltransférases et sialyltransférases optimisées de façon à réduire le temps de réaction à quelques heures au lieu des cycles de plusieurs jours décrits jusqu'à présent, commercialisées par Roche.

Conclusion sur les modifications *in vitro*

Les modifications *in vitro* présentent l'avantage de simplifier l'environnement dans lequel a lieu la réaction de sialylation, puisqu'il est réduit à un tampon donné, avec les réactifs dans des concentrations connues. Ces techniques sont très efficaces et permettent d'obtenir des glycoformes homogènes. En revanche, elles multiplient les étapes de traitement en aval de la culture cellulaire et ne sont pas adaptées à des productions à grande échelle. En outre, le coût prohibitif des enzymes et substrats est pour le moment incompatible avec la mise à l'échelle. Elles sont donc pour le moment réservées à la préparation de petites quantités qui sont très utiles pour conduire des tests sur l'impact d'un sucre sur les fonctions biologiques d'une glycoprotéine et sa structure.

La glycosylation des IgG

Structure et fonctions générales des IgG

Structure générale des IgG

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont des glycoprotéines clés du système immunitaire adaptatif produites par les plasmocytes pour lier des antigènes, les neutraliser, et recruter les cellules effectrices du système. Elles sont constituées de quatre chaînes, deux chaînes lourdes (HC pour « heavy chains ») et deux chaînes légères (LC pour « light chains »). Cinq classes d'immunoglobulines sont définies, IgA, IgG, IgD, IgE et IgM, qui correspondent à cinq types de chaîne lourdes, α , γ , δ , ϵ et μ . Les chaînes légères peuvent être de deux isoformes, κ et λ . Les chaînes α , γ et δ sont constituées d'un domaine variable en N-terminal (V_H), et de trois domaines constants (C_{H1} , C_{H2} et C_{H3}), tandis que les chaînes ϵ et μ possèdent quatre domaines constants (C_{H1} à C_{H4}). La portion de chaîne lourde V_H - C_{H1} est associée par un pont disulfure à une LC pour former les fragments liant l'antigène, appelés Fab pour

« fragment antigen-binding ». La LC est elle-même composée d'une région variable (V_L) et d'une région constante (C_L). Le domaine N-terminal formé par V_H et V_L est appelé fragment variable (F_v), c'est là que se trouve le site de reconnaissance spécifique de l'antigène. Les domaines constants C_{H2} à C_{H3} (ou C_{H4} dans le cas des chaînes μ et ϵ) des deux chaînes lourdes forment un dimère appelé Fc pour « fragment cristallisable ». Le Fc est maintenu par des ponts disulfures entre les chaînes lourdes et des interactions non covalentes entre les domaines constants en C-terminal. Dans les IgA, IgG et IgD, les Fab et le Fc sont reliés par une région flexible appelée région charnière, où se trouvent les ponts disulfures inter-HC en nombre variable. La structure finale de l'immunoglobuline a la forme d'un Y.

Les immunoglobulines majoritaires en circulation sont les IgG et sont divisées en quatre sous-classes, les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, qui représentent approximativement 60%, 25%, 10% et 5% des IgG respectivement.¹³⁹ Les quatre sous-classes partagent plus de 90% de leurs séquences, et sont distinguées par la structure de leur région charnière, ainsi que par quelques variations de leurs domaines constants, principalement dans la zone N-terminale des domaines C_{H2} (Figure 6).^{140,141} L'IgG est une molécule flexible d'abord grâce à cette région charnière, qui permet beaucoup de souplesse entre les Fab et le Fc. De plus, le Fc est lui-même assez souple et dynamique au niveau des C_{H2} , tandis que les domaines C_{H3} , qui forment une interface de contacts non-covalents en C-terminal, sont plus rigides.¹⁴²

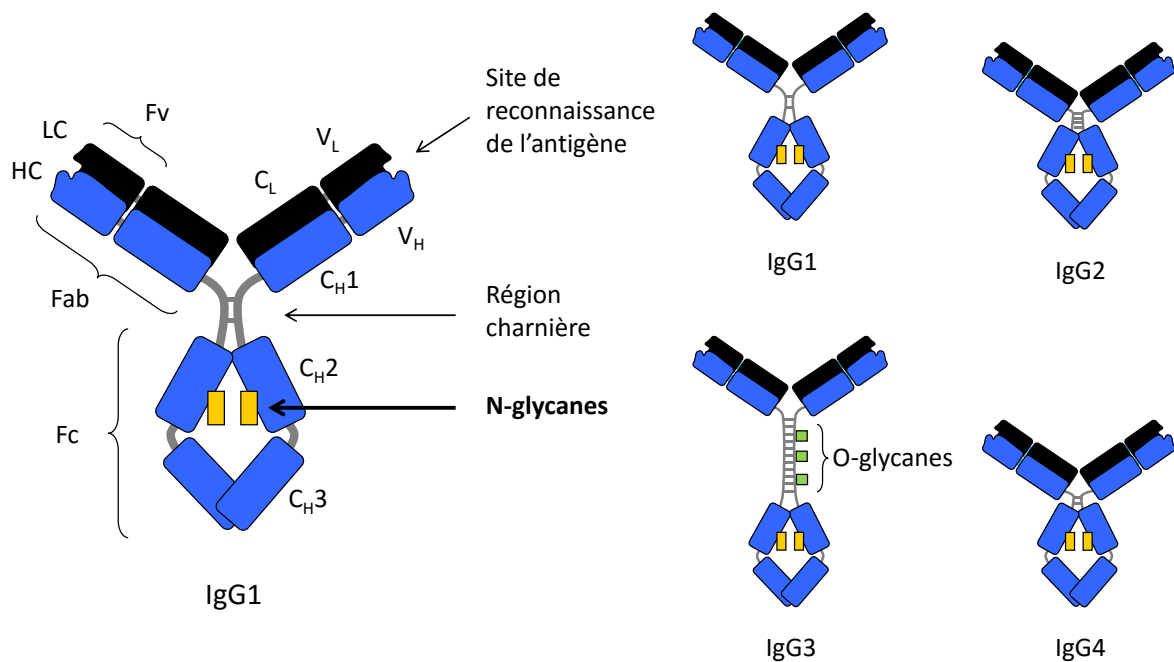


Figure 6 : Représentation schématique des IgG

Les IgG sont constituées de deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC), organisées en deux domaines Fab et un domaine Fc. La partie variable des Fab est spécifique de l'antigène de l'IgG. Le segment Fc assure les fonctions effectrices de l'IgG suivantes : cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC), cytotoxicité dépendant du complément (CDC) et mécanismes anti-inflammatoires, déclenchés par la liaison du Fc avec les récepteurs de Fc ($Fc\gamma R$), la molécule C1q du complément, et une lectine (incertaine pour le moment), respectivement. C'est également dans le Fc que se situe le site de liaison du récepteur néo-natal FcRn, qui intervient dans le recyclage des IgG.

HC : chaîne lourde (bleu) ; LC : chaîne légère (noir) ; C_{HX} : domaine constant X de la chaîne lourde ; C_L : domaine constant de la chaîne légère ; V_H : domaine variable de la chaîne lourde ; V_L : domaine variable de la chaîne légère ; Tirets gris : ponts disulfures ; Rectangles jaunes : N-glycane ; Carrés verts : O-glycane.

N-glycosylation du Fc

Toutes les IgG possèdent deux sites de N-glycosylation très conservés dans le Fc, sur l'asparagine 297 du domaine C_{H2} de chacune des deux chaînes lourdes. Les N-glycane du Fc

sont des glycanes complexes di-antennaires souvent fucosylés, faiblement galactosylés et très faiblement sialylés (Figure 7). Plus de trente glycanes différents ont été identifiés sur le site N297.^{10,51} Pour les IgG1 humaines, le glycanes majoritaire est le mono-galactosylé fucosylé G1F (environ 40%), suivi du di-galactosylé fucosylé G2F (environ 25%), puis le fucosylé agalactosylé G0F (environ 20%) et enfin le G2F sialylé G2FS1 (<15%).^{51,122,139} On trouve ensuite quelques glycanes bisectés, de faibles quantités de glycanes non fucosylés, et enfin des traces de glycanes disialylés G2FS2 (<4%). La sialylation est principalement de type α 2,6, mais la présence de traces d'acides sialiques α 2,3 est probable.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Le glycoprofil type varie modérément d'une sous-classe à l'autre ; on notera simplement que les IgG2, 3 et 4 sont nettement moins galactosylées que les IgG1, c'est-à-dire qu'elles présentent une plus grande proportion de glycanes G0F.¹²² Par ailleurs, les deux N-glycanes du Fc peuvent être identiques ou différents.¹⁴⁶ La définition des paires de N-glycanes ne semble pas aléatoire, mais les mécanismes qui la régissent demeurent obscurs.

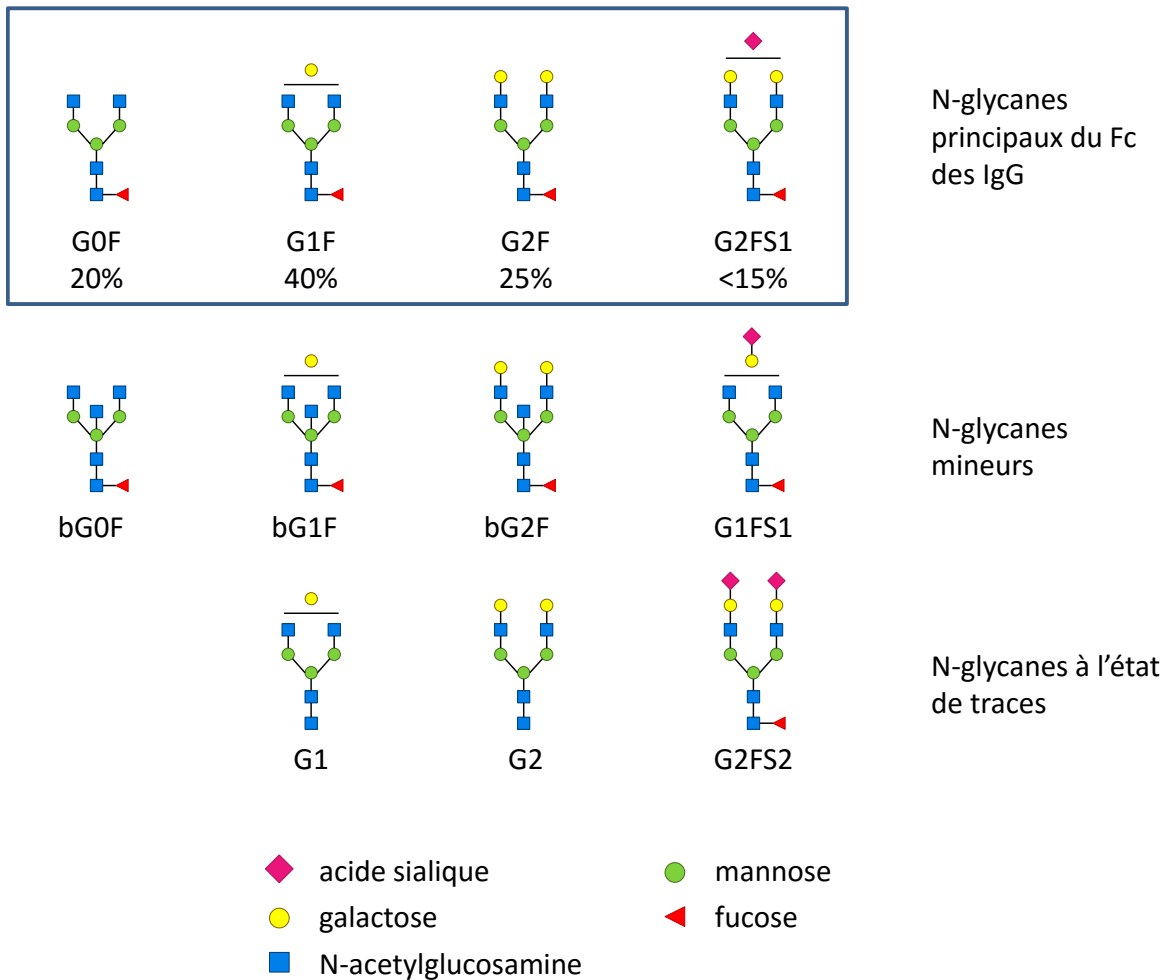


Figure 7 : N-glycanes du Fc des IgG

Plus de 30 glycanes différents ont été observés au site N297 du Fc des IgG en circulation.¹⁰ Parmi ces 30 glycanes, seuls quatre suffisent à décrire le profil commun de glycosylation des IgG. Il s'agit de G0F, G1F, G2F et G2FS1, qui sont représentés dans le cadre en première ligne. Les N-glycanes bisectés peuvent représenter quelques pourcents du profil (ligne 2), tout comme les glycanes non fucosylés (<10% au total) (ligne 3). Les quantités de glycanes sialylés G1FS1 et G2FS2 varient selon les sources, et peuvent représenter de 5% à <1%.^{51,122}

N-glycosylation du Fab

La proportion des IgG en circulation dont le Fab est N-glycosylé est évaluée entre 10% et 30% selon les sources.^{139,141} Les sites de N-glycosylation semblent apparaître plutôt dans les parties variables de la chaîne légère, de la chaîne lourde, ou des deux, au gré des mutations

somatiques.^{139,147,148} Les profils de glycosylation du Fc et du Fab sont distincts.²³ Contrairement aux glycanes du Fc, les glycanes du Fab sont généralement complètement galactosylés, et riches en acides sialiques. Les glycanes di-sialylés sont communs.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Le Fab contient également plus de GlcNAc bisectant que le Fc, mais moins de fucose (environ 70%).^{22,141,152} Des études ont aussi montré qu'un déséquilibre de la glycosylation pouvait s'opérer spécifiquement sur le Fab. Par exemple, des anticorps produits par des lymphomes folliculaires ayant une glycosylation du Fc normale portaient en revanche des haut-mannose seulement dans le Fab.¹⁴⁸

O-glycosylation

La O-glycosylation est plutôt une caractéristique des IgA et IgD.¹⁵³ Les IgG en sont globalement dépourvues, à l'exception des IgG3 qui seraient partiellement O-glycosylées au niveau de leur région charnière particulièrement longue.¹⁵⁴ Des O-glycanes ont été également détectés, dans notre laboratoire et d'autres, dans la région charnière de fragments Fc d'IgG1 recombinants, c'est-à-dire dépourvus de Fab.¹⁵⁵ Ceci suggère que des sites de O-glycosylation potentiels sont présents dans la région charnière des IgG1 comme dans les IgG3, mais qu'ils sont inaccessibles après le repliement complet des immunoglobulines, probablement masqués par les Fab.

Fonctions effectrices des IgG et récepteurs associés

Les mécanismes de défense de l'organisme reposant sur la reconnaissance de l'antigène par une IgG spécifique sont multiples. Après la formation du complexe immun antigène-IgG, l'anticorps recrute d'autres éléments du système immunitaire par l'intermédiaire de son Fc : le complément ou les cellules immunitaires effectrices. Les fonctions effectrices cellulaires pour l'élimination des cibles comprennent la phagocytose des complexes immuns et la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC), tandis que le recrutement du complément induit la cytotoxicité dépendant du complément (CDC) (Figure 8). Le recrutement du complément se produit par l'interaction entre le Fc et la molécule C1q. Le recrutement des cellules effectrices se produit par l'interaction du Fc avec une famille de récepteurs appelés les Fcγ récepteurs (FcγR). Les sites d'adhésion du C1q et des FcγR se recouvrent partiellement, et se situent dans le haut du Fc, près de la jonction des C_H2 et de la

région charnière.^{12,51,156,157} Les sous-classes d'IgG ont des profils d'affinités pour les récepteurs différents, ce qui se traduit par des profils distincts de fonctions effectrices.^{140,158} Globalement, les IgG1 et surtout les IgG3 génèrent des réponses plus fortes que les IgG2 et IgG4. L'intensité des réponses est assez bien reliée à l'affinité des Fc pour ses ligands.^{26,141,159,160} Cette caractéristique générale (IgG3>IgG1>>IgG2, IgG4) s'explique en partie par les particularités des domaines C_H2 de chaque sous-classe, et en partie par le fait que les Fab peuvent masquer les sites de liaison du C1q et des FcγR surtout lorsque la charnière de l'IgG est courte et rigide, ce qui est le cas des IgG2 et 4.^{141,161,162} A l'inverse, la longue charnière souple des IgG3 assure une bonne disponibilité du Fc pour la liaison avec le C1q et les FcγR.

Les FcγR comprennent trois classes de récepteurs, les récepteurs de haute affinité FcγRI, et deux familles de récepteurs de faible affinité, les FcγRII (a, b, c) et les FcγRIII (a et b). Le FcγRI a une affinité caractérisée par un KD compris entre 10⁻⁷ et 10⁻⁸ M (sauf pour les IgG2 qu'il ne reconnaît pas). Les FcγRIIa, IIIa et IIIb ont plutôt des KD de l'ordre de 10⁻⁵ à 10⁻⁷ M, selon les isotopes. Enfin, les FcγRIIb et c ont les affinités les plus faibles, avec un KD de 10⁻⁴ à 10⁻⁵ M.¹⁶³ Les FcγRI sont des récepteurs activateurs, de même que FcγRIIa, IIc, et IIIa. FcγRIIb est inhibiteur. Enfin, la fonction de FcγRIIIb demeure incertaine. La plupart des cellules immunitaires expriment plusieurs de ces récepteurs. La réponse cellulaire découlant de la liaison à l'IgG résulte donc de l'intégration de plusieurs signaux simultanés.³² Néanmoins, certains récepteurs sont très fortement impliqués dans certaines réponses cellulaires en particulier. C'est le cas du FcγRIIIa, qui est presque le seul FcγR exprimé par les cellules tueuses NK. Seule une faible proportion des NK exprime en plus le FcγRIIc.¹⁶³ Cette singularité des NK fait de l'interaction Fc-FcγRIIIa un facteur très spécifique de la réponse ADCC. Par ailleurs, les monocytes macrophages, acteurs majeurs de la phagocytose, sont les cellules qui expriment le plus le FcγRI. Elles expriment aussi FcγRIIa, RIIB et RIIIA. La forte expression de FcγRI par ces cellules relativement à d'autres types cellulaires conduit à associer couramment le FcγRI à la phagocytose dépendant de l'anticorps.

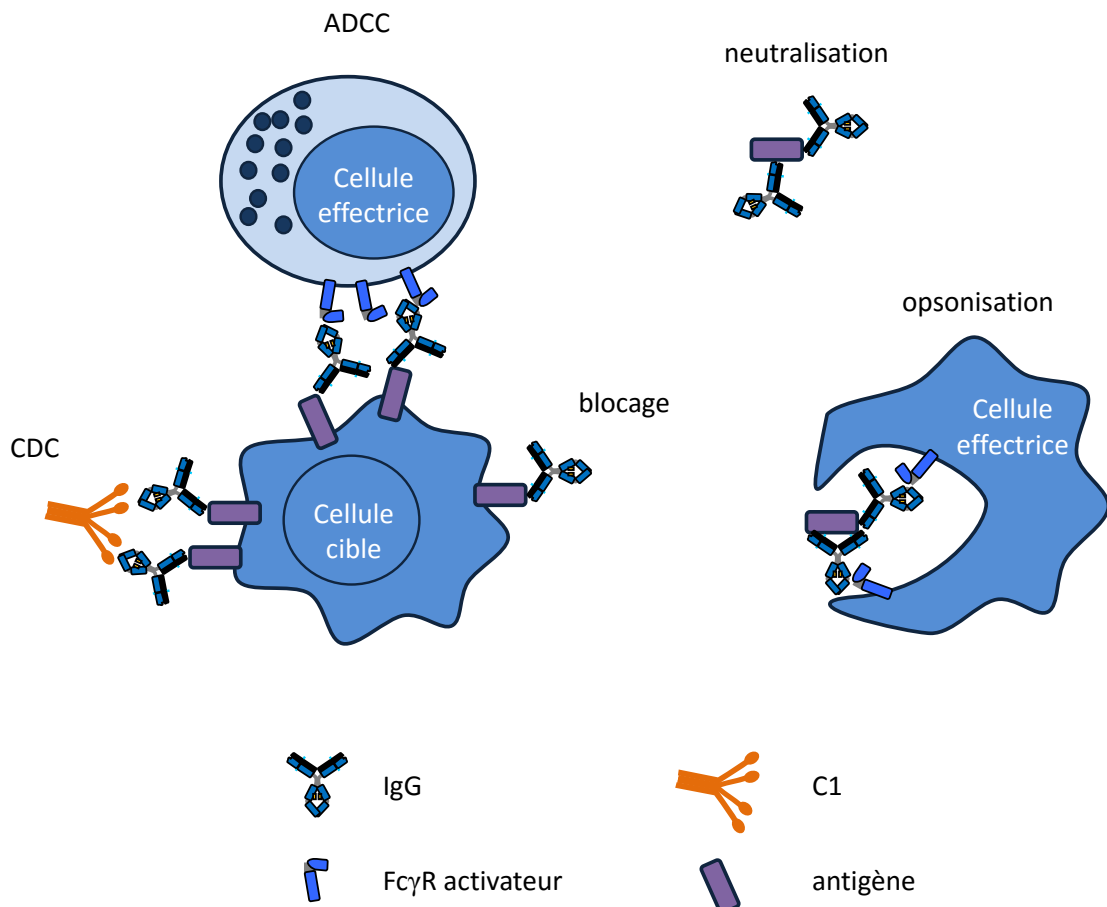


Figure 8 : Fonctions effectrices des IgG

Les fonctions effectrices des IgG peuvent être dépendantes ou indépendantes du segment Fc. Les fonctions effectrices dépendantes du Fc sont la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC pour « antibody-dependent cellular cytotoxicity»), la cytotoxicité dépendant du complément (CDC pour « complement-dependent cytotoxicity») et la phagocytose dépendant de l'opsonisation par les IgG. Ces fonctions reposent sur l'interaction du Fc avec des molécules du système immunitaire. Pour l'ADCC et la phagocytose, ce sont les récepteurs de Fc (FcγR) exprimés à la surface des cellules immunitaires. Par exemple, l'ADCC est principalement déclenchée par l'interaction du Fc avec le FcγRIIIa exprimé à la surface des cellules NK. Quant à la CDC, elle est déclenchée par l'interaction du Fc avec la molécule C1q entrant dans la composition de l'élément C1 du complément. Les autres fonctions effectrices des IgG reposent sur la liaison du Fab avec la cible, ce qui conduit à la neutralisation ou au blocage de cette cible.

Anticorps monoclonaux

Modes d'action et isotypes des anticorps monoclonaux

Les recherches des dernières années sur l'impact de la glycosylation des IgG sur leurs fonctions effectrices sont indissociables du développement des anticorps monoclonaux (mAbs) thérapeutiques. Les mAbs thérapeutiques sont jusqu'à présent toujours des IgG, et exploitent aussi bien les capacités de liaison d'un antigène spécifique que la capacité à déclencher des réponses cellulaires, en particulier pour les mAbs développés contre le cancer – les plus nombreux, pour lesquels la destruction de la cellule cancéreuse est primordiale (Tableau 1). Les modes d'actions des mAbs sont classés en catégories qui reprennent les fonctions effectrices naturelles des IgG.

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps monoclonaux du marché en date du 25 Août 2015 (d'après la base de données IMGT¹)

| Type | | Sous-classe | | Système d'expression | | Domaine thérapeutique | |
|---|----|-------------|----|----------------------|----|--|----|
| humain | 21 | IgG1 | 42 | CHO | 11 | oncologie | 25 |
| humanisé | 17 | IgG2 | 6 | NS0 | 5 | immunologie | 21 |
| chimérique souris/humain | 7 | IgG4 | 3 | Sp2/0 | 5 | hématologie | 9 |
| souris | 6 | IgG2/IgG4 | 1 | E.coli | 2 | ophtalmologie infectiologie | 8 |
| chimérique souris/rat | 1 | | | hybridome | 2 | maladies respiratoires rhumatologie | |
| constructions Fc-fusion parmi les mAbs du marché | 8 | | | non communiqué | 27 | maladies cardiovasculaires | |

Classe I. L'antigène est exprimé à la surface d'une cellule. L'anticorps se lie à la cellule par l'intermédiaire de l'antigène et déclenche l'apoptose de la cellule par la CDC ou l'ADCC. Ce mode d'action est évidemment le mode typique des mAbs thérapeutiques utilisés en oncologie, qui visent la destruction des cellules tumorales. Deux grands exemples de mAbs thérapeutiques entrant dans cette catégorie sont le Trastuzumab (Herceptin, de Genentech/Roche), et le Rituximab (Rituxan, de Genentech/Roche également).

Classe II. Ici, l'antigène est également exprimé à la surface de la cellule, mais l'action de l'anticorps consiste à bloquer la fonction de l'antigène, sans induire nécessairement la destruction de la cellule. Les anticorps avec ce mode d'action sont plutôt utilisés en immunologie. Par exemple, l'Infliximab (Remicade, Janssen-Johnson&Johnson) et l'Adalimumab (Humira, Abbvie) sont deux anticorps qui ciblent le TNF α membranaire, diminuant l'intensité des réactions inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, ou encore la maladie de Crohn.

Classe III. Les mAbs entrant dans cette catégorie ont pour cible un antigène soluble, qu'ils vont neutraliser. C'est le cas par exemple de l'Omalizumab (Xolair, Genentech) qui est utilisé pour soulager l'asthme allergique en bloquant les IgE en circulation. C'est aussi le cas du Palivizumab (Synagis, MedImmune), dont la cible est le virus respiratoire syncytial.

Un mAb peut combiner différents modes d'actions. Les mAbs de classe I génèrent idéalement des effets cytotoxiques puissants, ADCC en tête.¹⁶⁴ Cela est moins crucial pour les mAbs de classe II, qui peuvent induire la mort de la cellule de façon intermédiaire à faible, selon les applications. Pour les anticorps de la classe III en revanche, les activités cytotoxiques ne sont pas souhaitables. Les anticorps monoclonaux sont le plus souvent des IgG1 (Tableau 1). Le développement de la classe III favorise l'apparition d'IgG2 ou 4. Les IgG3, qui ont les plus fortes affinités pour les récepteurs des cellules effectrices, n'ont pas encore été utilisées comme modèle d'anticorps thérapeutique (selon les mAbs sur le marché en date du 25 août 2015). Cette absence des IgG3 s'explique en partie par une plus courte demi-vie que les autres isotypes (une semaine au lieu de trois), et un polymorphisme allotypique important, synonyme d'immunogénicité potentielle pour certains groupes de population.^{165,166} Cependant la compréhension progressive de ce qui, dans la structure des IgG3, est responsable d'une part des excellentes affinités de l'Ig pour les récepteurs, et d'autre part de sa courte demi-vie et

potentielle immunogénicité, pourrait bientôt amener des IgG3 optimisées parmi les mAbs thérapeutiques.

MAbs chimériques, humanisés, protéines de fusion : le vocabulaire des mAbs

Le champ d'étude et du développement des anticorps monoclonaux a mené à l'élaboration de tout un vocabulaire spécifique, intimement lié aux progrès de l'ingénierie des protéines.

Immunogénicité des mAbs.

Afin de diminuer l'immunogénicité des mAbs qui sont issus de la souris, les mAbs chimériques puis humanisés ont été développés (Tableau 1). Les mAbs chimériques ont un fragment variable V_H - V_L de souris, fusionné par génie génétique à la portion constante d'une IgG humaine (exemple : l'Infliximab). Dans les anticorps humanisés, la charpente du V_H et du V_L humains est conservée, et seules les boucles hypervariables (CDR pour « complementarity determining region ») qui sont les régions responsables de la spécificité de l'anticorps pour son antigène, sont issues de la souris (exemple : le Trastuzumab). Enfin, beaucoup d'anticorps monoclonaux sont aujourd'hui complètement humains (exemple : Adalimumab). Malgré des progrès, les améliorations successives de la technologie des immunoglobulines recombinantes n'a pas permis d'éliminer complètement l'immunogénicité des mAbs. En effet, certains patients développent des anticorps humains anti-chimériques (HACA, human anti-chimeric antibodies), et même des anticorps humains anti-humains (HAHA, human anti-human antibodies). Par exemple, l'Adalimumab, complètement humain, induit des réponses anti-Adalimumab chez plus de 10% des patients.¹⁶⁷

Variantes des immunoglobulines.

En plus des traditionnels Fc et Fab, d'autres termes ont été définis pour désigner des fragments d'immunoglobulines. Le fragment Fc est parfois utilisé fusionné à une protéine active (un récepteur par exemple) afin d'augmenter la demi-vie de ladite protéine, ou bien pour bénéficier des fonctions effectrices dépendant du Fc. Les fragments sont parfois aussi utilisés seuls comme agent thérapeutique, comme par exemple les scFv (single chain Fv), développés pour des mAbs de classe III dont les fonctions activées par le Fc ne sont pas

souhaitées. Une autre façon de modifier les IgG, pour augmenter leur spécificité pour un phénotype pathogène, et de les rendre bispécifiques, avec deux Fv reconnaissant chacun un antigène différent. Cela se produit naturellement pour les IgG4, chez qui des particularités du domaine CH3 et de la région charnière autorisent un échange des couples HC-LC dans environnement réducteur.¹⁶⁸ Une autre enfin consiste à utiliser l'anticorps comme véhicule de transport pour un principe actif (anticorps conjugué ou ADC pour « antibody drug conjugate »). Toutes ces technologies peuvent se combiner (protéines de fusion bispécifiques par exemple). Les variations sur le thème de l'anticorps sont sans limite. Les plus couramment employées sont listées ci-dessous et illustrées Figure 9 :

Fab : $V_L-C_L + V_H-C_{H1}$ reliés par un pont disulfure.

Fab' : Fab où le C_{H1} est prolongé d'une partie de la région charnière.

F(ab')₂ : Le Fc est coupé entre les ponts disulfures de la région charnière, résultant en un dimère de Fab, ou plus exactement un dimère de Fab'.

Fabc : IgG sans les C_{H3} .

Fd : V_H-C_{H1} .

Fv : $V_L + V_H$.

scFv : $V_L + V_H$ reliés par un peptide introduit par génie génétique.

Anticorps bispécifique : les Fv de l'anticorps ont deux spécificités distinctes.

Diabody : deux Fv avec deux spécificités distinctes, reliés ensemble par génie génétique.

Protéine de fusion : Les Fab sont remplacés par un ligand de la cible, fusionnés à un Fc d'IgG1. Par exemple, l'Etanercept (Enbrel, Pfizer/Amgen), est un récepteur du $TNF\alpha$ fusionné à un Fc.

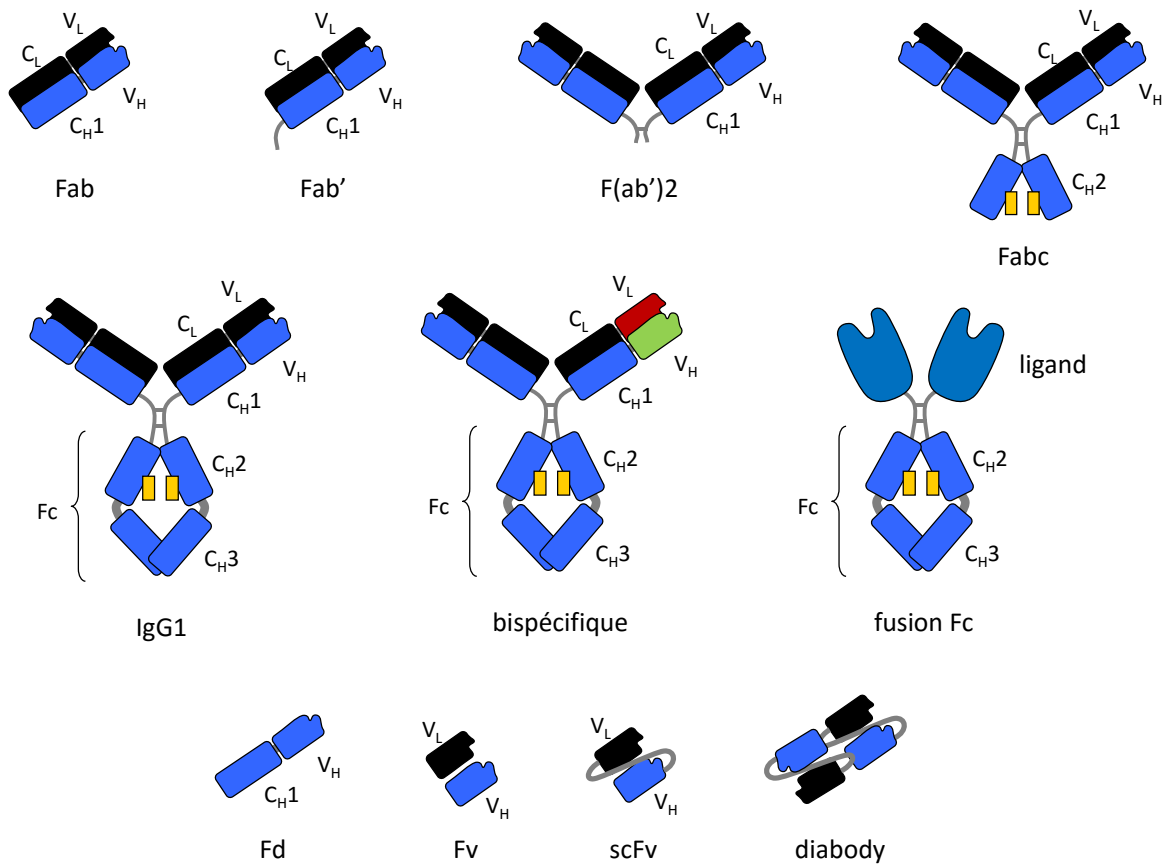


Figure 9 : Dérivés de mAbs

La technologie des protéines recombinantes permet de créer toutes sortes de dérivés de mAbs destinés à exploiter selon les cas la grande spécificité des IgG pour leurs antigènes, ou la capacité du Fc des IgG à déclencher des réponses cellulaires cytotoxiques.

Conclusion : la glycosylation du Fc, intérêt fondamental et appliqué

Bien que les indications thérapeutiques des mAbs se diversifient, la majorité des mAbs sur le marché sont de la classe I, c'est-à-dire que leur efficacité repose sur les fonctions de l'IgG dépendant du Fc. Or, comme nous allons le montrer, l'interaction du Fc avec ses récepteurs est largement influencée par les N-glycanes du Fc. Ainsi la glycosylation des mAbs n'est pas seulement un attribut qualitatif qu'il faut caractériser pour documenter par exemple la reproductibilité du procédé ou la stabilité de la molécule, mais un élément déterminant de

l'efficacité du mAb thérapeutique de classe I. Ainsi, toutes les recherches fondamentales sur la glycosylation des IgG nourrissent le développement des mAbs, et inversement.

Impact de la N-glycosylation du Fc sur la structure de l'IgG

Glycanes et corps protéique : contraintes réciproques

Les N-glycanes des IgG se situent sur l'asparagine 297 des C_{H2} du Fc, qui forment une cavité que les N-glycanes occupent.¹⁶ La séquence autour des N297 est très bien conservée entre les différents isotopes d'IgG. Chaque N-glycane forme de nombreuses interactions non covalentes avec la surface de la protéine, en particulier via leur bras α 1,6. Peu de contacts existent entre les deux glycanes du Fc, et chaque glycane n'interagit qu'avec la chaîne lourde à laquelle il est attaché.^{16,21,23} La cavité formée par les C_{H2} du Fc et les interactions du glycane avec la surface de la protéine expliquent la restriction des N-glycanes du Fc en termes de branchage et d'élongation.²³ En effet, les N-glycanes du Fc sont strictement di-antennaires, et caractérisés par de faibles voire très faibles niveaux de galactosylation et sialylation. Si cette position « enfouie » des sites de N-glycosylation du Fc est caractéristique, elle n'est pas rare pour autant, puisque le N-glycane est ajouté à la protéine avant que le repliement de celle-ci n'ait lieu.⁴⁹ Par ailleurs, les contacts N-glycanes-protéine stabilisent le Fc.²⁴

Si la structure protéique du Fc influence le N-glycane, le N-glycane influence lui aussi la structure protéique du Fc en retour. En effet, la présence des glycanes maintient un écart entre les C_{H2} qui se referment en l'absence de N-glycane ou lorsque celui-ci est tronqué.^{18,21,142} Cet écart entre les C_{H2} (conformation « ouverte ») serait d'ailleurs nécessaire à la bioactivité du Fc.¹⁸ Plusieurs études ont montré que l'abrogation de la N-glycosylation du Fc induit la perte d'activité de l'IgG et/ou la perte d'affinité pour ses récepteurs, bien qu'aucun contact direct entre le récepteur et les N-glycanes n'ait été détecté (sauf pour le Fc γ RIIIa).^{11,17,19,20,169,170} Cette perte d'activité serait donc plutôt liée à l'impact de l'absence de N-glycanes sur la conformation du Fc. Les travaux les plus récents montrent que la paire de C_{H2} n'a pas une conformation unique, la position « ouverte » en présence d'un N-glycane normal, mais qu'elle est dynamique et adopte une multitude de conformation plus ou moins ouvertes.^{142,155} L'élongation terminale du N-glycane (galactose et acide sialique) renforcerait

la flexibilité du CH₂, c'est-à-dire que l'amplitude entre la conformation la plus fermée et la conformation la plus ouverte augmenterait avec la longueur du glycane.^{142,155}

Plusieurs monosaccharides du N-glycane exercent des contacts non covalents avec la surface du Fc, qui sont des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogène, ou encore des liaisons CH/ π (Figure 10). Le premier résidu du glycane, c'est-à-dire le GlcNAc de cœur, crée une liaison hydrogène avec l'Asp265,¹⁵² et un contact par effet hydrophobe avec la Val264. De la même façon, le deuxième GlcNAc crée une liaison hydrogène avec l'Arg301 et une liaison CH/ π avec la Phe241. Le GlcNAc du bras α 1,6 crée lui aussi une liaison CH/ π avec la Phe243. Enfin, le résidu de galactose est le monosaccharide qui crée le plus de contacts avec la surface du Fc.^{16,23,152} Il est lié à la Lys246 et la Thr260 par plusieurs liaisons hydrogènes.²³ Lorsqu'un acide sialique est présent sur ce bras α 1,6 (ce qui est très rare), il ne crée pas de contact supplémentaire avec la surface du Fc ; il serait plutôt projeté loin de la surface et en contact avec le solvant environnant la protéine.^{155,171}

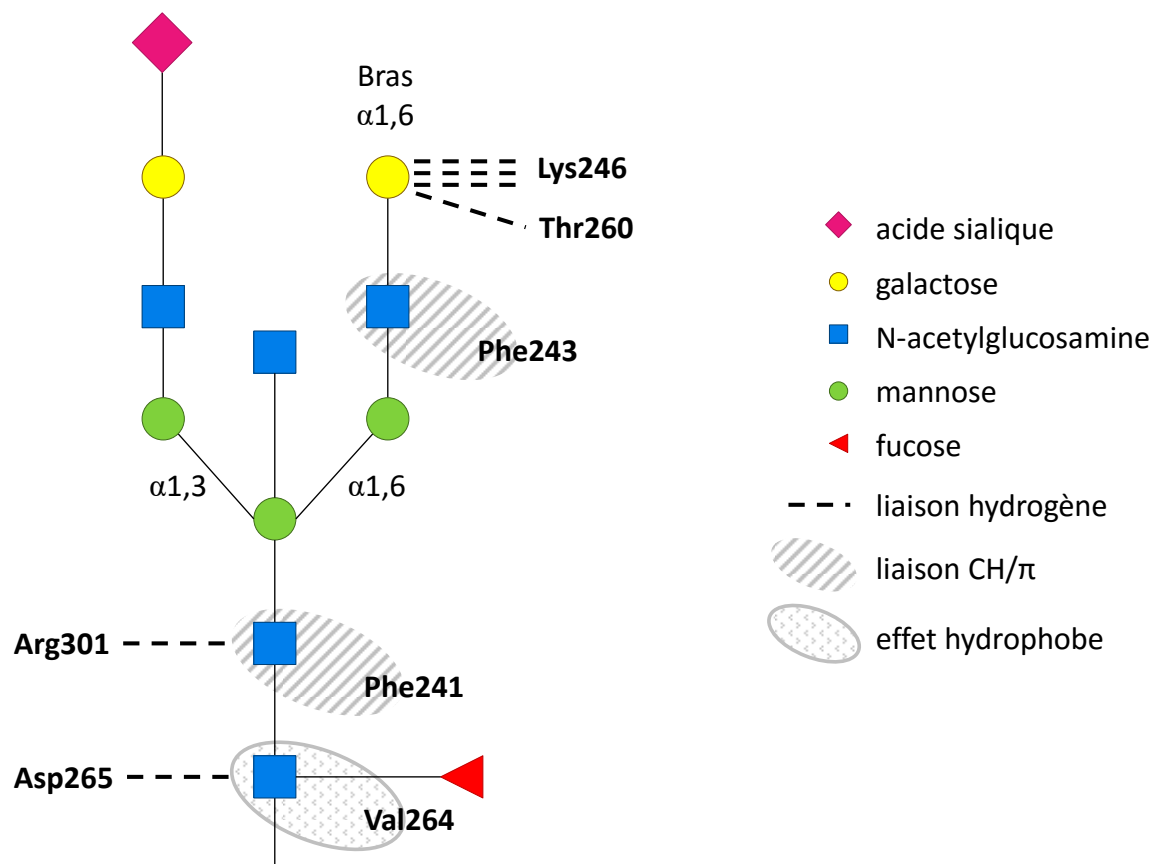


Figure 10 : Contacts du N-glycane avec les acides aminés du Fc

Le N-glycane crée de nombreuses liaisons non covalentes avec la chaîne lourde qui le porte, très peu avec l'autre glycane et aucun avec la deuxième chaîne lourde. Ces liaisons sont de type Van der Waals, liaison hydrogène, et CH/ π , et existent entre le monosaccharide du cœur et de la branche α 1,6 du glycane. Le N-glycane est dynamique, et alterne entre une conformation où il crée les contacts illustrés ici, et une conformation où il est projeté loin de la surface de la protéine.¹³⁷ Figure adaptée de Raymond et al. 2012.

Des N-glycanes dynamiques plutôt que figés

Les cristaux de Fc montrant les N-glycanes pris entre les domaines C_H2 avec les nombreux contacts glycane-protéine ont installé longtemps une vision du N-glycane comme un élément figé, le bras α 1,6 plaqué contre la paroi du Fc dès l'addition du résidu de galactose, et la branche α 1,3 flottant non loin.^{23,152} Or, les travaux récents du groupe de Barb et collègues en particulier suggèrent que le glycane est dynamique et alterne entre la conformation liée à la

protéine et une conformation libre, dans laquelle les deux branches du glycanes sont dégagées de la surface protéique, et accessibles aux glycosyltransférases.⁷⁹ La conformation liée serait la plus favorable, en accord avec les travaux précédents montrant que les contacts glycanes-protéine stabilisent le Fc²⁴, et également avec l'étude montrant que la sialylation d'un glycan libre est plus rapide que la sialylation du glycan du Fc.^{57,79} Par contre, des travaux de la même équipe suggèrent que l'addition du premier acide sialique au glycan favoriserait la conformation libre par rapport à la conformation liée.¹³⁷

Conclusion sur la structure du Fc glycosylé

En conclusion, les IgG sont des molécules encore plus flexibles que ce que l'on a longtemps pensé. Non seulement la région charnière permet aux Fab et au Fc de bouger très librement les uns par rapport aux autres, mais de plus, le Fc est intrinsèquement flexible, puisque les domaines C_{H2} s'écartent et se rapprochent, d'autant plus que les N-glycanes sont longs. Et enfin, les N-glycanes eux-mêmes sont dynamiques, alternant entre un état lié aux C_{H2}, et un état libre. L'élucidation de la structure du Fc et de ses N-glycanes est beaucoup convoquée pour comprendre les effets de la N-glycosylation du Fc sur l'affinité des IgG pour ses récepteurs.

Impact de la N-glycosylation sur les fonctions effectrices de l'IgG dépendant du Fc

Fucose

Le fucose de cœur est le résidu du N-glycane qui a l'impact le plus grand et le mieux compris sur les fonctions effectrices de l'IgG. Le fucose diminue fortement l'affinité de l'IgG pour le récepteur FcγRIIIa, et la réponse ADCC qui en découle.^{26,27,164} Rappelons ici que l'affinité Fc-FcγRIIIa, l'ADCC et l'efficacité de l'anticorps *in vivo* sont plutôt bien reliées, bien que la corrélation ne soit pas parfaite.^{26,158,172} Pour en revenir à l'impact du fucose, puisque la grande majorité des IgG (naturelles et recombinantes) sont fucosylées^{141,152}, il est plus juste de le formuler ainsi : l'absence de fucose augmente fortement l'affinité du Fc pour le FcγRIIIa et la réponse ADCC. Des augmentations de la constante d'affinité (KD) de cinq à 30 fois ont été décrites selon les conditions.^{164,173}

La raison de l'impact négatif du Fc sur l'interaction Fc-FcγRIIIa a été élucidée en 2011 par deux études présentant des cristaux du complexe Fc-FcγRIIIa avec et sans fucose.^{174,175} Le FcγRIIIa est une glycoprotéine qui possède deux N-glycanes, le premier en N162 et l'autre en N45. Le N-glycane le plus important du récepteur pour l'affinité est celui qui est attaché à l'Asn162. Le N-glycane en N45 pourrait créer une gêne stérique pour le complexe Fc-récepteur, mais son effet n'est pas majeur.¹⁷⁴ En revanche, le sucre en N162 est directement impliqué dans le contact Fc-récepteur.¹⁶⁴ C'est même lui qui crée le plus de contacts avec l'IgG.^{174,175} L'interaction Fc-FcγRIIIa est caractérisée par des contacts protéine-protéine, protéine(Récepteur)-glycane(Fc), glycane(Récepteur)-protéine(Fc) et enfin glycane-glycane. Quand l'anticorps est fucosylé, le fucose crée une gêne stérique qui repousse le glycane N162 loin du Fc. En conséquence, les contacts entre le glycane N162 et le Fc (protéine et glycane) sont distendus ou perdus. Quand l'anticorps est non-fucosylé, les contacts sont possibles et l'affinité augmente.

Le FcγRIIIa est le seul récepteur de Fc qui possède un N-glycane au site de liaison avec l'IgG.¹⁶⁴ L'interaction très spécifique du glycane N162 du FcγRIIIa avec le glycane du Fc, ainsi que l'absence de modification de la conformation du Fc avec ou sans fucose¹⁷⁶, expliquent que la présence du fucose n'ait un effet que sur l'affinité de l'IgG avec le FcγRIIIa et non avec les autres récepteurs, ou le complément.²⁶

GlcNAc bisectant

Le GlcNAc bisectant (bGlcNAc) est le premier monosaccharide du glycane du Fc dont l'effet sur l'ADCC a été rapporté. En 1995, Lively *et al.* ont décrit la production d'un mAb thérapeutique dans trois lignées cellulaires différentes, CHO, NS0 et Y0, de hamster, souris et rat respectivement.¹⁷⁷ Des trois lignées, celle de rat était la seule exprimant des glycanes bisectés, et les mAbs issus de cette lignée avaient une meilleure ADCC que les autres. Se fondant sur ces travaux, Umaña *et al.* ont développé une lignée de CHO exprimant la GnTIII, la glycosyltransférase responsable de l'addition du bGlcNAc.²⁵ Le mAb produit dans cette lignée, riche en bGlcNAc, avait bien une ADCC augmentée en comparaison des mAbs produits dans les CHO parentales. En 2001, Davies *et al.* ont démontré que l'ADCC augmentée des mAbs enrichis en bGlcNAc impliquait une meilleure liaison au FcγRIIIa.¹⁷⁸

Néanmoins, Umaña et d'autres se sont aperçu dans les années suivantes que le niveau de fucosylation était inversement corrélé au niveau de bGlcNAc, à cause d'une compétition entre la GnTIII et l' α 1,6-fucosyltransférase (FucT).¹⁷⁹ Ainsi, les anticorps riches en bGlcNAc auraient une ADCC améliorée parce qu'ils seraient moins fucosylés.^{27,164}

Des études employant des mAbs reglycosylés *in vitro*, donc dans un contexte où la GnTIII et la FucT n'étaient pas en compétition, suggèrent que le bGlcNAc aurait tout de même un effet positif sur l'interaction Fc-Fc γ RIIIa, indépendamment du fucose.^{131,180} En effet, ces équipes ont construit des IgG arborant des glycanes di-antennaires complexes ou tronqués non fucosylés, avec ou sans bGlcNAc. Dans la première étude, la réponse ADCC induite par les mAbs arborant un bGlcNAc était un peu meilleure que celle des mAbs sans bGlcNAc (+5% de lyse cellulaire).¹⁸⁰ Dans la deuxième étude, l'analyse en SPR de l'interaction de ces mAbs avec le Fc γ RIIIa indiquait un KD trois fois plus élevé des mAbs avec glycanes bisectés comparativement aux glycanes non bisectés. Cette amélioration demeure moins forte que celle permise par l'afucosylation. Enfin, le bGlcNAc ne semble pas voir d'effet sur la CDC.¹⁸⁰ Une dernière étude, utilisant également des techniques de glycosylation *in vitro*, n'a pas observé d'effet du bGlcNAc sur l'ADCC.¹⁷⁰

Galactose

Le niveau de galactosylation des IgG varie avec l'âge ou encore pendant la grossesse^{181,182} : la galactosylation des IgG augmente pendant l'enfance, se stabilise entre 10 ans et 40 ans, puis diminue de nouveau au cours de la vieillesse. Le niveau de glycanes mono-galactosylés G1F est relativement constant, mais ce sont les niveaux de G0F et G2F qui oscillent. Chez la femme enceinte, la galactosylation augmente au cours de la grossesse, puis diminue après l'accouchement. Ces niveaux de galactosylation ont été fortement associés aux maladies inflammatoires. Ainsi, l'hypogalactosylation des IgG est une caractéristique des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR).¹⁰ Chez les femmes enceintes atteintes de PR, le niveau de galactosylation augmente comme pour les femmes enceintes saines au cours de la grossesse, ce qui donne lieu à une rémission de la maladie, qui s'aggrave de nouveau lorsque la galactosylation chute après l'accouchement.¹⁸² Le niveau de G0F des IgG en circulation est ainsi directement corrélé à l'apparition et à l'intensité de certaines maladies

inflammatoires.^{183,184} L'hypogalactosylation des IgG a aussi été observée chez les malades atteints d'arthrite psoriasique et d'arthrite juvénile chronique.^{10,185}

Ces données suggèrent que les IgG agalactosylées sont plus inflammatoires que les IgG galactosylées, c'est-à-dire qu'elles devraient a priori induire des réponses ADCC et CDC plus fortes. Pourtant, les essais cellulaires ou *in vivo* d'activité d'IgG ayant divers profils de glycosylation n'ont pas montré d'impact majeur de la présence du galactose sur les fonctions des anticorps.

Il a été montré que l'absence de galactosylation permettait à la lectine MBL (mannose-binding lectin) de lier l'IgG et d'induire l'activation du complément, possiblement en exposant le cœur mannosylé du glycane, lui-même mieux exposé en l'absence des interactions du Gal α 1,6 avec la surface du Fc.¹⁸⁶ Cette interaction des IgG agalactosylées avec la MBL, démontrée *in vitro*, ne semble pas trouver écho *in vivo*. Nimmerjahn *et al.* ont montré que les IgG agalactosylées (appelées IgG-G0) avaient en effet une meilleure affinité pour MBL, mais que l'activité des IgG, G0 ou normales, était préservée dans des souris négatives pour la MBL. Cela montre que l'implication de ces IgG dans la voie du complément induite par la lectine MBL ne jouait pas de rôle dans leur activité *in vivo*.¹⁸⁷ En ce qui concerne la voie du complément classique, un groupe a montré un résultat intéressant sur l'impact du galactose sur la CDC : les IgG-G0, mais également les IgG-G2 initiaient une réponse CDC plus faible que des IgG avec une galactosylation moyenne, c'est-à-dire constituée d'un mélange de glycanes G0F et G1F (ce résultat est intéressant parce qu'il attire l'attention sur le fait que la glycosylation doit être évaluée en détail afin de pouvoir conclure).¹⁸⁰ Nimmerjahn *et al.* montraient aussi dans leur étude que les IgG-G0 avaient une affinité plus faible pour C1q que les IgG contrôle (donc à galactosylation moyenne). Néanmoins, comme pour la MBL, ces effets visibles au niveau moléculaire ne se traduisaient pas en impact *in vivo*, puisque les IgG étaient aussi actives dans des souris modèles que dans des souris négatives pour la molécule C3 du complément, c'est-à-dire incapables d'activer la voie classique du complément. En revanche, les IgG n'avaient plus d'impact dans des souris déficientes pour l'expression des Fc γ R, montrant que leur activité reposait sur leur interaction avec ces récepteurs. Pour finir, le niveau de galactosylation n'avait pas d'impact sur l'activité des IgG, malgré de légères différences d'affinité observées au niveau moléculaire, en SPR. En particulier, l'effet

bénéfique, quoique modeste, de la présence de galactose sur l'affinité des IgG1 pour le FcγRIIIa a été plusieurs fois relevé, mais pas encore, à notre connaissance, traduit en bénéfices *in vivo*.^{170,176,188,189}

Acide sialique

“Small but possibly significant differences in the affinities of sialylated and non-sialylated IgG Fc for FcγR have been reported.” Roy Jefferis, Nature Reviews Drug Discovery, 2009

La sialylation est largement employée dans le domaine de la production de protéines recombinantes pour augmenter leur demi-vie. Cependant, des études suggèrent que cela ne s'appliquerait pas aux IgG.^{35,190,191} Par exemple, un groupe a étudié les propriétés pharmacocinétiques d'IgG produites dans une lignée CHO contrôle et dans une lignée modifiée pour sécréter une sialidase.¹⁹⁰ Les IgG de la lignée modifiée présentaient environ 15% de glycanes G2FS1, ainsi qu'une petite quantité de G2FS2 (<5%), tandis que dans la lignée contrôle, aucun glycanes sialylé n'était détecté. Les IgG issues des deux lignées avaient les mêmes propriétés pharmacocinétiques. Une autre étude suggère que le profil de glycosylation du Fc (haut-mannose ou complexe) ou du Fab (complexe sialylé ou non sialylé) des IgG n'a pas d'influence sur leur demi-vie.¹⁹¹ Ces résultats sont cohérents avec la théorie selon laquelle la demi-vie des IgG est principalement contrôlée par leur interaction avec le récepteur de Fc néonatal (FcRn), et non avec les récepteurs plus classiques de mannose ou galactose (R-ASGP, galectines).¹⁹² Plusieurs travaux ont indiqué que l'interaction de l'IgG avec le FcRn n'était pas modifiée par des variations de son profil de glycosylation.^{26,193,194}

Dans une étude publiée en 2007, Scallon *et al.* ont montré que la sialylation du Fc des IgG engendrait une diminution de l'activité ADCC des anticorps.³⁶ L'étude de Scallon *et al.* se fondait sur l'examen de paires de glycovariants avec différents degrés de sialylation pour trois IgG1 produites dans une lignée de souris soumise à différentes conditions de culture (non précisées). Des glycovariants supplémentaires ont été préparés par resialylation *in vitro* et/ou fractionnement par affinité pour la lectine WGA (« wheat germ agglutinin »). Pour les trois IgG1 testées, l'ADCC était diminuée lorsque le degré de sialylation était plus élevé. Cette étude était la première à pointer la sialylation comme un facteur influençant l'ADCC des IgG. Leur étude a aussi montré que pour certaines de leurs IgG, la perte d'ADCC pouvait

s'expliquer par une perte de la capacité de l'anticorps à lier son antigène. Leur hypothèse était que la présence d'acide sialique réduisait la flexibilité de l'IgG, la contraignant à lier un seul antigène au lieu de deux (un par Fab). Les récents travaux sur la structure des IgG galactosylées et sialylées cités plus haut semblent infirmer cette hypothèse, et la question reste ouverte. Par ailleurs, les auteurs notaient que les IgG1 provenant de lignées de souris, les acides sialiques présents devaient être du type NeuGc, et que l'effet sur l'ADCC de NeuAc était susceptible d'être différent. Par contre, les auteurs ne discutaient pas l'impact du type de liaison des acides sialiques, qui n'était pas spécifié pour chacun des glycovariants. La resialylation *in vitro* des IgG avait été réalisée avec une ST3 en présence de CMP-NeuAc. Ainsi, la perte d'ADCC en présence d'acides sialiques NeuAc α 2,3 a été démontrée. En revanche, la conclusion pour les acides sialiques NeuAc α 2,6 est incertaine. Les lignées de souris sont capables d'incorporer des acides sialiques en α 2,3 et en α 2,6, les derniers étant potentiellement les plus fréquents.^{63,120} La lectine WGA, utilisée pour isoler une fraction plus sialylée des IgG, permet de lier les types α 2,3 et α 2,6. Ainsi, l'étude de Scallon *et al.* n'a pas démontré formellement l'impact de la sialylation de type humain sur les fonctions effectrices des IgG, à savoir les NeuAc α 2,6.

Des résultats indiquant l'impact négatif des NeuAc α 2,6 et α 2,3 sur l'ADCC ont été publiés dans les études de Kaneko *et al.* et Anthony *et al.* (groupe de Ravetch).^{35,143} Dans la première étude, des IgG1 produites dans la lignée humaine 293T ont été fractionnées par affinité pour la lectine SNA, spécifique des acides sialiques α 2,6 et liant les anticorps possédant au minimum deux acides sialiques dans le Fc.¹⁵¹ La fraction enrichie en Sia α 2,6 (probablement G2FS1/G2FS1 compte-tenu de la prédominance du glycane sialylé G2FS1 par rapport à G2FS2 en circulation) démontrait une affinité cinq fois plus faible que l'échantillon non fractionné pour le Fc γ RIIIa dans un essai de SPR. Dans la seconde, des IgG2b dirigées contre les plaquettes ont été sialylées en α 2,3 ou α 2,6 par resialylation *in vitro* avec une ST3 ou une ST6. Ces IgG2b ont été ensuite injectées dans des souris pour évaluer leur ADCC *in vivo* par comptage des plaquettes après 4 et 24h. Les IgG2b resialylées ont induit moins de destruction de plaquettes que l'IgG2b non modifiée. Cependant, ces résultats ne sont pas soutenus par les données récentes, ni par nos propres résultats.

En effet, dans une étude parue en 2013, Yu *et al.* montraient qu'un anticorps hypersialylé (environ deux tiers de G2FS(6)1 et un tiers de G2FS(6,6)2), obtenu par resialylation *in vitro*, avait la même affinité que l'anticorps contrôle pour le FcγRIIIa dans un essai de SPR. Ensuite, dans une étude publiée en juillet 2015 par Lin *et al.*, deux anticorps commerciaux, le Rituximab et le Trastuzumab, ont été modifiés par les techniques combinées de transglycosylation et de resialylation *in vitro* présentées plus haut, afin de générer un panel de glycoformes homogènes, dont une IgG1 arborant le glycane afucosylé α2,6-sialylé G2S(6,6)2, et une autre le glycane afucosylé α2,3-sialylé G2S(3,3)2.¹⁷⁰ Ces anticorps ont été comparés aux versions commerciales dans des tests de liaison au FcγRIIIa (entre autres) par ELISA, et également dans des tests ADCC. Les essais ont démontré que le glycane G2S(6,6)2 permettait une interaction équivalente au G2, et plus forte que le G0 entre l'IgG et le FcγRIIIa (ainsi que les FcγRIIa et b), ainsi qu'une meilleure ADCC. L'effet de l'acide sialique par rapport à l'effet de l'afucosylation a été évalué par comparaison avec plusieurs glycanes afucosylés, qui se sont avérés globalement moins puissants, dès lors que le Gal α1,6 était absent. Les deux anticorps testés ne réagissaient pas exactement de la même manière. Si l'impact positif des Sia α2,6 a été confirmé dans les deux, il était plus intense pour le Rituximab. Le Trastuzumab arborant du G2S(3,3)2 avait la même efficacité que le Trastuzumab commercial, tandis que le Rituximab G2S(3,3)2 était meilleur que le Rituximab commercial, quoiqu'inférieur au Rituximab G2S(6,6)2. Par ailleurs, un résultat secondaire de cette étude était que le glycane hybride (pas de GlcNAc sur le Manα1,3) galactosylé sur la branche α1,6 avait une meilleure affinité pour le FcγRIIIa que le complexe galactosylé sur l'autre branche G(3)1. Toutes ces données indiquent que la galactosylation de la branche α1,6 joue un rôle dans l'interaction avec FcγRIIIa. Avant de finir, il est intéressant de noter que le Trastuzumab G(3)1S(6)1, pourtant dépourvu du Gal α1,6 et ayant une affinité pour le FcγRIIIa plus faible que le Trastuzumab G2, a une efficacité ADCC équivalente à ce dernier ; ce n'est pas le cas du Trastuzumab G(3)1, ce qui montre que l'acide sialique de la branche α1,3 a un impact positif indépendant du galactose sur l'ADCC du Trastuzumab. En dernier lieu, la sialylation α2,6 n'avait pas d'impact sur la CDC, tandis que la sialylation α2,3 avait un effet légèrement négatif.

Enfin, un corpus d'études publiées par le groupe de Ravetch a montré que la sialylation $\alpha 2,6$, mais non $\alpha 2,3$, du Fc des IgG leur conférait des propriétés anti-inflammatoires. Ce résultat a été montré en utilisant des IgG humaines enrichies en $\alpha 2,6$ par chromatographie d'affinité sur la lectine SNA, ou des fragments Fc recombinants sialylés *in vitro*^{35,143}, dans des modèles de souris pour les maladies inflammatoires (deux modèles pour l'arthrite, un modèle de purpura thrombopénique auto-immun (PTI), et un modèle d'épidermolyse bulleuse acquise.¹³⁸ Un autre groupe a obtenu des résultats positifs dans un modèle murin d'inflammation des voies respiratoires¹⁹⁵, tandis que divers autres groupes n'ont pas observé d'impact de la sialylation, parfois dans les mêmes modèles que le groupe Ravetch, qui pointe l'usage de doses inappropriées pour expliquer ces différences.^{138,196-200} Le mécanisme proposé pour l'activité anti-inflammatoire des IgG-sia sera présenté au paragraphe suivant, consacré aux immunoglobulines intraveineuses (IgIV), des IgG humaines utilisées comme anti-inflammatoires pour lesquelles beaucoup d'autres mécanismes ont été proposés. Notons simplement ici que la théorie du groupe Ravetch est que la sialylation fait perdre leur affinité aux IgG pour les Fc γ R, le Fc γ RIIIa en particulier³⁵, mais qu'elle leur confère une affinité pour de nouveaux ligands, déclenchant une réponse anti-inflammatoire. La sialylation agirait donc comme un interrupteur permettant de faire basculer les IgG de pro- à anti-inflammatoires. On voit que les résultats de Lin *et al.* et Yu *et al.* contredisent l'idée que la sialylation abolisse l'interaction Fc-Fc γ R, mais ils décrivent des glycanes afucosylés, tandis que Ravetch *et al.* considèrent plutôt des glycanes fucosylés. Malgré tout, le modèle qui se dessine aujourd'hui est que les anticorps $\alpha 2,6$ -sialylés seraient les acteurs de mécanismes pro- et anti-inflammatoires à la fois. D'autres points du mécanisme proposé par Ravetch *et al.* ont suscité la controverse, comme nous allons le montrer au prochain paragraphe.

Un autre type d'IgG thérapeutiques : les IgIV

Présentation des IgIV

Les IgIV (en anglais IVIG pour « intravenous immunoglobulins ») sont des Ig humaines collectées auprès de 3000 à 60000 donneurs par lot, purifiées et utilisées comme anti-inflammatoires pour le soulagement d'un nombre croissant de maladies auto-immunes et

inflammatoires.^{138,201} Les IgIV sont constituées à 95% d'IgG, les 5% restants étant des IgA et/ou des IgM.³¹ Les IgG présentes dans les IgIV sont essentiellement des IgG1.¹⁵¹

A l'origine, les IgIV étaient utilisées pour pallier le manque d'immunoglobulines chez des patients avec des déficits immunitaires primaires (défauts de formation du système immunitaire). Par la suite, autour des années 80, elles ont été utilisées pour la première fois pour le traitement de patients atteints d'une maladie auto-immune, le PTI, chez qui les traitements classiques ne fonctionnaient pas. Depuis le succès de cet essai, les IgIV ont été utilisées pour le traitement d'un grand nombre de maladies auto-immunes, mais également dans des cas cancer et de fausses couches répétées (auto-immunes ou non).³¹ Leur efficacité a été prouvée pour de nombreuses indications, parmi lesquelles le PTI, la maladie de Kawasaki, ou encore le syndrome de Guillain-Barré. Les IgIV sont aussi utilisées dans plus d'une centaine d'autres indications pour lesquelles l'efficacité n'a pas été formellement établie.^{201,202} Enfin, elles sont inefficaces ou contre-indiquées pour certaines indications, comme la PR.

Les IgIV sont administrées lors d'injections de plusieurs heures à très hautes doses, de 0.4 g/kg à 2 g/kg.^{31,202} Les injections sont répétées plusieurs fois par mois pendant une année.²⁰¹ Un gramme d'IgIV coûte entre 50 et 80 CAD, ce qui conduit à des coûts totaux pour le traitement complet compris entre 30 000 et plus de 150 000 CAD pour les patients adultes, selon les doses employées et le poids des patients (hors coûts de personnel et d'infrastructure). Ce coût est beaucoup plus élevé que celui de traitements classiques.^{201,203}

Outre le coût, les très fortes doses d'utilisation des IgIV conduisent à l'inconfort des patients, la survenue d'effets secondaires le plus souvent sans gravité (douleurs musculaires, nausées), mais parfois plus sévères (thromboses, problèmes rénaux).^{31,202}

Enfin, l'accroissement mondial de leur utilisation fait craindre la survenue de pénuries d'IgIV à répétition.^{201,204}

Le mécanisme d'action, ou plutôt les mécanismes d'action des IgIV demeurent insuffisamment compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'isoler les fractions actives des IgIV ou s'il y a lieu de produire des produits de remplacement recombinants. Des préparations avec des actions plus ciblées et mieux définies permettraient

de rationaliser l'utilisation des IgIV, d'augmenter l'efficacité des traitements, de réduire les doses administrées, donc les coûts et enfin l'inconfort du patient.

Les mécanismes d'action indépendants de la sialylation

Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés pour expliquer les propriétés anti-inflammatoires des IgIV à haute dose. Ces mécanismes ne s'excluent pas les uns les autres et leurs effets seraient plutôt synergiques.^{31,205}

Une partie des mécanismes proposés reposent sur la saturation de voies inflammatoires par l'abondance des Ig injectées, empêchant ainsi l'action des anticorps pathogènes. Ici, la nécessité d'utiliser de fortes doses d'IgIV pour observer un effet inflammatoire est expliquée par le besoin de saturation des voies par abondance d'Ig. Les deux exemples suivants illustrent cette idée.

Saturation des FcγR.

Il a été proposé que la forte concentration des IgIV injectée bloquait les FcγR, empêchant les auto-anticorps de déclencher la phagocytose dépendant des macrophages ou l'ADCC contre des cellules du soi. Ce mécanisme a été exploré pour le PTI en particulier, dans lequel les plaquettes sont détruites après opsonisation par des auto-anticorps. Cette hypothèse a été renforcée par les résultats positifs d'un essai de traitement du PTI chez des enfants par administration de fragments Fc d'IgG préparés à partir d'IgIV.^{31,205,206}

Saturation des FcRn.

Une autre hypothèse est que les fortes quantités d'IgIV administrées entraînent la saturation des récepteurs FcRn, ce qui aurait pour conséquence d'empêcher le recyclage des auto-anticorps pathogènes, et donc d'accélérer leur élimination. En faveur de cette hypothèse, une étude a montré que l'administration d'anticorps recombinants modifiés de façon à lier le FcRn avec une haute affinité a diminué l'intensité de l'arthrite dans un modèle murin.²⁰⁷

D'autres mécanismes reposent sur les capacités de neutralisation d'antigènes par certaines IgG contenues dans les IgIV. Contrairement aux deux exemples mentionnés ci-dessus, où les mécanismes reposent sur le segment Fc des IgG, les exemples suivants reposent

sur leurs segments Fab. Les chances de présence des IgG actives seraient augmentées par le très grand nombre de donneurs dans les préparations d'IgIV, et les fortes doses utilisées. Ici, la nécessité d'utiliser les fortes concentrations d'IgIV s'explique donc par la très faible concentration de la part active des IgIV.

Neutralisation d'antigènes bactériens.

La cause de la maladie de Kawasaki est inconnue mais une infection bactérienne est suspectée. L'efficacité des IgIVs pour le traitement de la maladie de Kawasaki reposerait sur la présence d'IgG neutralisant ces pathogènes, ou encore sur la présence d'IgG neutralisant les cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes T activés par la reconnaissance des antigènes du pathogène.²⁰⁵

Neutralisation des auto-anticorps par des anti-idiotypes.

L'idiotype définit la conformation caractéristique des immunoglobulines permettant la reconnaissance spécifique de l'antigène. Les auto-anticorps seraient éliminés après opsonisation par des anti-idiotypes contenus dans les IgIV. De plus, la liaison de ces anti-idiotypes avec l'idiotype présenté par les récepteurs de l'antigène à la surface des cellules B causerait la régulation négative des cellules B productrices des auto-anticorps.^{204,205} Ce mécanisme semble effectif dans le traitement du syndrome de Guillain-barré par exemple.

A l'instar de l'exemple des anti-idiotypes, les IgIV pourraient ainsi réguler positivement ou négativement l'expression de récepteurs ou cytokines par les cellules immunitaires, inhibant l'activité de cellules comme les lymphocytes B ou les macrophages²⁰⁸, et l'activation de cellules telles que les lymphocytes T.²⁰⁹ Le détail de ces mécanismes et d'autres a été résumé et commenté ailleurs.^{205,210,211} Le mécanisme d'action des IgIV proposé par le groupe de Ravetch suppose la régulation positive de l'expression de récepteurs inhibiteurs par la liaison de la fraction $\alpha 2,6$ -sialylée dans le Fc des IgIV avec des lectines exprimées à la surface des cellules dendritiques.

Controverse autour d'un mécanisme dépendant de la sialylation $\alpha 2,6$

Le modèle d'action des IgIV par l'intermédiaire de la fraction présentant des acides sialiques $\alpha 2,6$ dans le Fc proposé par le groupe de Ravetch s'est bâti au fil de travaux décrits

dans cinq publications parues entre 2001 et 2008. Ce modèle est illustré sur la Figure 11. Il propose que les IgIV interagissent avec la lectine DC-SIGN (« dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin ») à la surface des cellules dendritiques ou macrophages via leur segment Fc α 2,6-sialylé.^{35,143,212} L'interaction des Fc sialylés avec DC-SIGN a été déduite de la démonstration de l'interaction des Fc sialylés avec une lectine proche chez la souris, SIGNR1. Des essais *in vitro* ont confirmé l'interaction des Fc sialylés avec DC-SIGN.²¹² De plus, il a été montré que des glycanes sialylés semblables à ceux du Fc ne liaient pas DC-SIGN, et que la structure protéique du Fc était nécessaire pour que l'interaction avec DC-SIGN ait lieu. La liaison de DC-SIGN activerait ensuite la sécrétion de cytokines par la cellule dendritique, en particulier l'IL-33, qui à son tour activerait les basophiles.²¹³ Les basophiles activés émettraient ensuite l'IL-4, qui activerait enfin la régulation positive de Fc γ RIIb à la surface des macrophages.^{33,143}

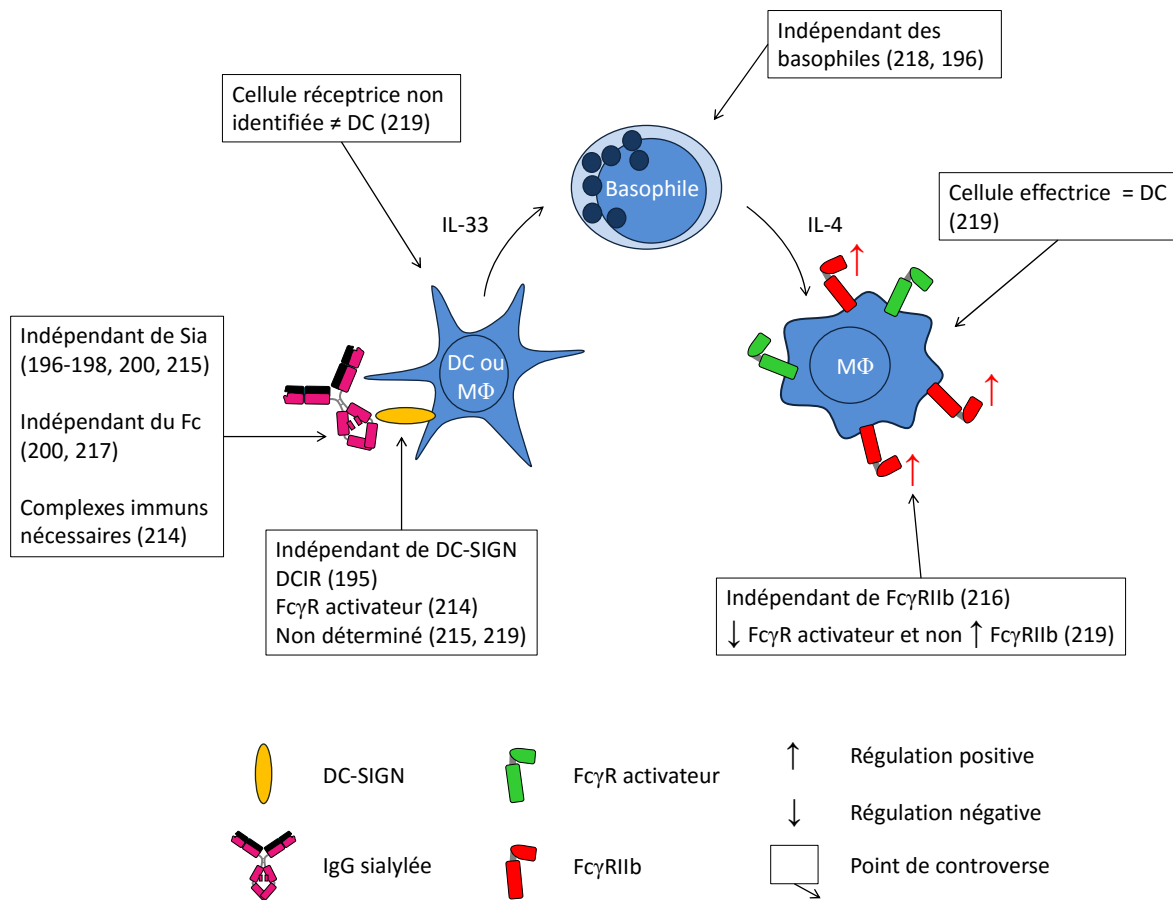


Figure 11 : Mécanisme d'action des IgIV proposé par le groupe de Ravetch et les points de controverse

La première étape du mécanisme proposé par le groupe de Ravetch est l'interaction du Fc sialylé des IgG avec la lectine DC-SIGN exprimée à la surface des cellules dendritiques ou des macrophages. Cette interaction entraînerait la sécrétion d'IL-33, qui activerait les basophiles. Ces derniers sécrèteraient alors l'IL-4, qui favoriserait l'expression du récepteur inhibiteur de Fc, le FcγRIIb, par les macrophages. L'augmentation de la proportion de FcγRIIb comparativement aux récepteurs FcγR activateurs se traduirait par la diminution de la réponse inflammatoire des macrophages lors de leur propre interaction avec les IgG. Chacune des étapes de ce mécanisme est sujet à controverse.

DC : cellule dendritique ; MΦ : macrophage ; Sia : acide sialique ; (XXX) : référence de la publication décrivant les résultats alternatifs

Un modèle proposé par Siragam *et al.* en 2006 pour le fonctionnement des IgIV (indépendamment de la sialylation) présente plusieurs points communs avec le modèle du groupe Ravetch. Siragam *et al.* ont montré que les IgIV interagissaient avec des Fc γ R activateurs, en particulier Fc γ RIIIa, exprimés à la surface des cellules dendritiques (DC) dans un modèle murin de PTI.²¹⁴ Il y a donc divergence sur les récepteurs impliqués, mais le rôle des cellules dendritiques comme cellules réceptrices des IgIV est appuyé. Siragam *et al.* reconnaissent également l'implication du Fc γ RIIb et des macrophages en aval de l'interaction IgIV-DC. Dans ce modèle, les IgIV seraient efficaces à condition de former de petits complexes immuns solubles (sICs), et à condition que la formation des sICs ne soient pas induits par la maladie. Cette théorie expliquerait pourquoi, chez la souris comme chez l'humain, les IgIV sont efficaces pour certaines maladies inflammatoires uniquement. Par exemple, on trouve des sICs chez les malades atteints de PR, mais non de PTI, et le traitement par IgIV est effectivement inopérant pour la PR, mais efficace pour la PTI. La condition de formation de sICs est une divergence par rapport au modèle du groupe Ravetch, qui défend que le segment Fc seul peut induire les propriétés inflammatoires des IgIV.

D'autres équipes ont montré des résultats contredisant plusieurs points du mécanisme proposé par le groupe Ravetch. Ainsi, l'amélioration de l'inflammation dans des modèles murins d'arthrite ou de thrombocytopenie serait (i) indépendante de la sialylation des IgIV^{196-198,200,215}, (ii) de la lectine DC-SIGN²¹⁵, (iii) du Fc γ RIIb²¹⁶, du fragment Fc^{200,217}, (iv) des basophiles.^{196,218} Ces deux dernières études réfutant l'implication des basophiles ont été réalisées l'une dans un modèle murin d'inflammation articulaire utilisée par le groupe de Ravetch, à savoir les souris K/BxN¹⁹⁶, et l'autre *in vivo* chez des malades atteints de PR.²¹⁸

Un troisième mécanisme a été proposé par Massoud *et al.*, qui soutient le rôle des Fc α 2,6 sialylés et des cellules dendritiques dans un modèle murin d'inflammation des voies respiratoires.¹⁹⁵ Dans ce modèle, les IgIV sialylées sont reconnues puis internalisées par la lectine inhibitrice DCIR (« dendritic cell immunoreceptor ») exprimée par les cellules dendritiques, ce qui déclenche leur régulation positive, et induit la multiplication des cellules T régulatrices. Comme dans les essais du groupe Ravetch, les effets anti-inflammatoires ont été obtenus avec des doses dix fois plus faibles d'IgIV sialylées comparativement aux IgIV contrôles.

Tous ces travaux montrent d'une part que l'efficacité des IgIV repose probablement sur des mécanismes différents selon les types d'inflammation, et d'autre part, en ce qui concerne les thrombocytopénies immunes et l'arthrite, et leurs versions modèles dans les souris, ils montrent que le mécanisme réel n'a probablement pas encore été élucidé. De plus, la transposition des résultats établis dans des modèles murins à ce qui se passe chez l'homme devrait être faite avec plus de prudence. Sur ce sujet, une revue publiée en avril 2015 par Tjon *et al.* reprend dans le détail les points conflictuels des modèles de souris ainsi que les écarts avec l'humain.²¹⁹ Par ailleurs, la lutte pour l'élucidation du mécanisme d'action des IgIV prend la tournure d'une guerre de clans épique, qui ravira certainement les amateurs de sociologie et politique de la science.

Conclusion de l'étude bibliographique

La N-glycosylation du Fc des IgG est un élément crucial pour leur efficacité. La présence des N-glycanes est absolument nécessaire à l'activation des fonctions effectrices des IgG, l'ADCC et la CDC. De plus, la composition des N-glycanes permet de moduler ces fonctions effectrices. L'exemple le mieux compris est celui du fucose. Les N-glycanes des IgG humaines présentent communément un résidu de fucose attaché au premier résidu de l'oligosaccharide. L'absence de ce résidu de fucose permet d'augmenter fortement l'affinité de l'IgG pour le récepteur FcγRIIIa et l'ADCC. L'impact des résidus terminaux des branches, le galactose et l'acide sialique, est moins évident. Leur influence sur l'affinité de l'IgG pour le FcγRIIIa et l'ADCC fait débat. De plus, le galactose et l'acide sialique semblent associés à des désordres pathologiques de l'inflammation. L'acide sialique en particulier est l'objet d'intenses débats depuis une dizaine d'années, quant à son implication dans le ou les mécanismes d'action des IgIV. La sialylation est une modification complexe, car elle recouvre en réalité deux types d'acides sialiques, le NeuAc et le NeuGc, et deux types de liaison, α 2,3 ou α 2,6. De plus, les N-glycanes des Fc étant di-antennaires, chaque Fc sialylé peut comporter de 1 à 4 acides sialiques. Les IgG humaines sont pauvrement sialylées. La structure particulière du Fc, qui forme une cavité autour des sites de glycosylation, semble empêcher une sialylation efficaces des glycanes du Fc. En l'état actuel de nos connaissances sur la sialylation, il est essentiel de bien caractériser le profil de sialylation des IgG avec lesquelles

nous travaillons, car de petites variations de la sialylation sont susceptibles de modifier l'activité des IgG.

Les procédés de reglycosylation *in vitro* par les voies chimio-enzymatiques se sont avérés des outils très précieux pour l'investigation des effets de glycoformes bien définies sur les fonctions effectrices des IgG. En revanche, ces procédés sont difficilement adaptables à grande échelle, ce qui limite leur application au développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques présentant un profil de glycosylation optimisé. Dans ce dernier domaine, la compréhension et la maîtrise de l'impact de la composition du milieu de culture sur le profil de glycosylation des protéines produites en culture cellulaire a fait beaucoup de progrès. La stratégie adaptable à grande échelle ayant le plus d'impact sur la modification du glycoprofil des protéines recombinantes demeure l'ingénierie cellulaire. Pour l'augmentation de la sialylation, l'expression des sialyltransférases est la stratégie de choix. De plus, c'est le seul moyen d'introduire dans la lignée CHO, la plus utilisée par l'industrie pour la production de mAbs, les acides sialiques α 2,6 que l'on trouve chez l'homme.

III. Sialylation d'un anticorps mutant et impact de la lignée cellulaire d'expression sur le glycoprofil

Introduction

L'impact de la sialylation du Fc sur les fonctions effectrices d'un anticorps demeure incertain. Les deux principaux effets communément retenus sont une réduction de la capacité d'une IgG sialylée à déclencher la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)^{36,143}, et le gain de propriétés anti-inflammatoires.³⁵ Les données récentes tendent à montrer un effet positif plutôt que négatif de la sialylation sur l'ADCC.^{160,170} Ces résultats contradictoires pourraient venir de la variété des IgG sialylées testées : mono-sialylées, di-sialylées, $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$, NeuGc ou NeuAc. Le type de glycane sialylé responsable de l'effet anti-inflammatoire des IgG a lui été mieux caractérisé : la sialylation $\alpha 2,6$ est la seule capable d'induire des effets anti-inflammatoires. De plus, la forme complexe di-antennaire di-sialylée en $\alpha 2,6$ G2FS(6,6)2 a montré une bonne efficacité dans quatre modèles murins de l'inflammation.¹³⁸ Pour l'instant, peu d'informations existent sur la forme complexe di-antennaire mono-sialylée (G2FS1). Un obstacle à la génération de données comparables, et donc d'hypothèses robustes, entre les différentes équipes de recherche est la difficulté d'obtenir et de bien caractériser des IgG sialylées. La reglycosylation *in vitro* par des techniques chimioenzymatiques est une stratégie très efficace pour l'obtention de glycoformes homogènes ; des progrès récents sur la compréhension de l'influence de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG ont été réalisés grâce à cet outil.^{138,170} Néanmoins, c'est une technique fastidieuse qui n'est pas appropriée à la production d'IgG sialylées à grande échelle.

Avantager un profil de glycosylation donné d'une protéine au cours de sa production permet de réduire le nombre et la complexité des étapes en aval visant à isoler ce glycoprofil, comme par exemple l'enrichissement par chromatographie d'affinité ou la reglycosylation chimioenzymatique. Dans cette optique, nous souhaitons obtenir des anticorps avec un Fc enrichi en acides sialiques $\alpha 2,6$ à l'issue d'un procédé simple, constitué des seules étapes de

transfection, production, et purification de l'anticorps. La transfection est une technique permettant d'introduire un gène d'intérêt dans une cellule par complexation d'un plasmide contenant le gène avec un agent de transfection, ici le polymère cationique linéaire polyéthylèneimine (PEI) (Figure 12). La transfection transitoire est un moyen simple et rapide d'obtenir plusieurs dizaines de milligrammes par litre d'une protéine donnée à partir de cultures à petite échelle (2 mL – 1 L) ou grande échelle (plusieurs litres ou dizaines de litres).

Par ailleurs, l'expression de sialyltransférases dans la cellule hôte est la stratégie la plus efficace pour augmenter la sialylation des glycoprotéines au cours de la culture cellulaire. C'est aussi la seule manière d'introduire la sialylation α 2,6 dans les CHO, qui en sont dépourvues. Dans ce chapitre, nous proposons de développer une méthode simple et rapide de production par co-expression transitoire d'une IgG avec l' α 2,6-sialyltransférase humaine ST6GalI.

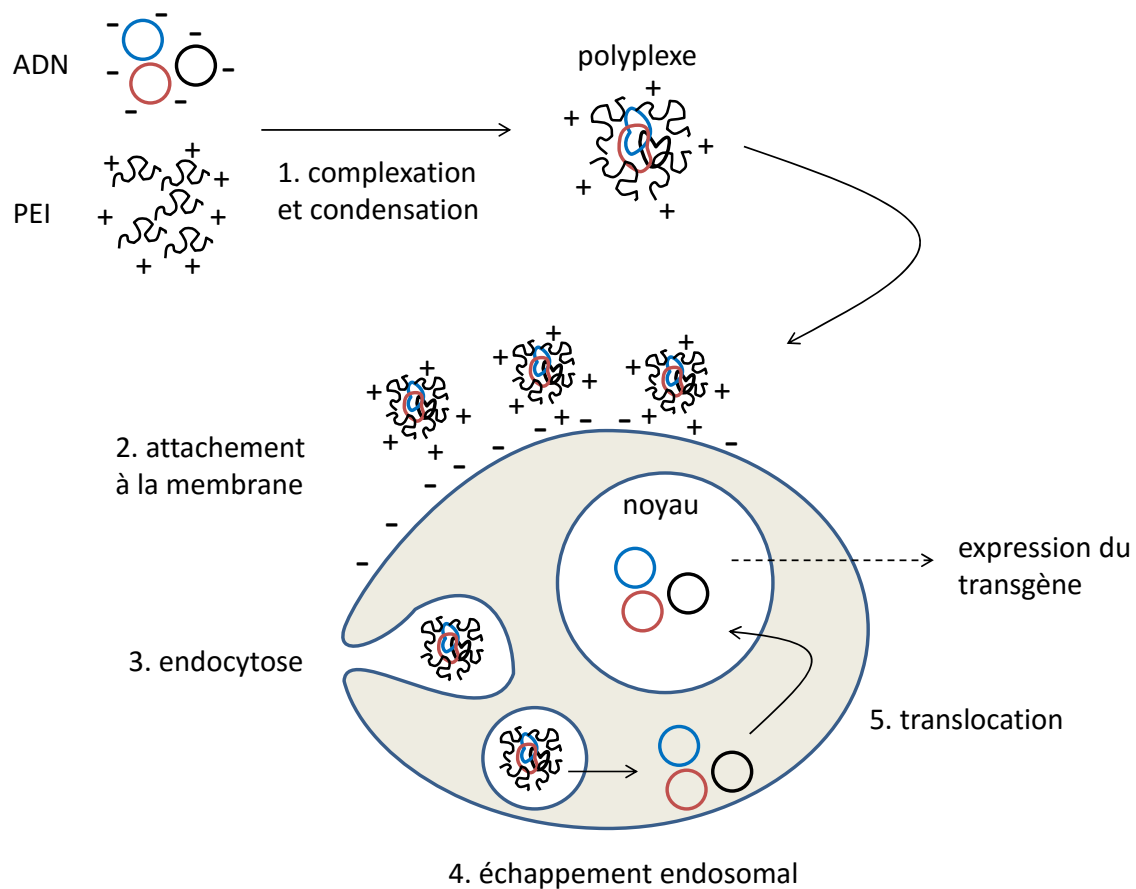


Figure 12 : Principe de la transfection au PEI

La transfection commence par la complexation de l'ADN plasmidique, chargé négativement, avec le PEI, chargé positivement. Le complexe final, appelé polyplexe, a une charge nette positive qui interagit avec la membrane chargée négativement de la cellule. Certains des polyplexes attachés à la membrane sont introduits à l'intérieur de la cellule par endocytose, puis l'ADN quitte l'endosome pour rejoindre le noyau selon des mécanismes qui ne sont pas encore complètement élucidés. Une fois dans le noyau, le gène porté par le plasmide (le transgène) peut être transcrit et traduit, ce qui conduit à l'expression de la protéine d'intérêt.

Le premier champ d'interrogations qui émerge alors concerne la faisabilité de cette approche. Il faut s'assurer que la co-transfection transitoire des plasmides codant pour une IgG et pour ST6GalII permet d'augmenter la sialylation du Fc de l'IgG. La possibilité de sialyler

des protéines grâce à l'introduction d'ADN codant pour une sialyltransférase, de type ST3 comme ST6, a été démontrée dans une variété de systèmes CHO stables et transitoires. Cependant, rappelons que la position des sites de glycosylation du Fc d'une IgG, à l'intérieur d'une cavité formée par les deux domaines C_H2 des chaînes lourdes, restreint l'accès des glycosyltransférases aux glycanes, limitant ainsi leur élongation.^{23,79} La sialylation du Fc serait donc plus difficile à obtenir que la sialylation d'un N-glycane exposé à la surface d'une protéine telle que l'EPO ou le TNFR. Nous reviendrons plus loin sur la question de la prépondérance de la gène structurelle face au défaut de galactose dans la faible sialylation des anticorps. Pour le moment, soulignons simplement que le succès de la sialylation du Fc d'une IgG native est jusqu'ici un cas exceptionnel (voir paragraphe « Ingénierie cellulaire : surexpression des glycosyltransférases »).

Le deuxième champ d'interrogations est relatif à la lignée cellulaire qui doit être choisie comme plate-forme d'expression. Nous avons vu que l'organisme d'expression a un impact direct sur le profil de glycosylation d'une protéine donnée (voir le paragraphe « Différences de N-glycosylation entre les espèces »). Choisir des lignées mammifères garantit déjà un bon degré de similarité des N-glycanes de l'IgG produite avec les IgG humaines que l'on souhaite imiter. La majorité des lignées mammifères utilisées pour l'expression de protéines recombinantes sont issues de trois espèces : l'humain, le hamster, et la souris. Les lignées de souris ont l'inconvénient de générer des attributs immunogènes. Elles ne sont donc pas un bon choix pour la production de protéines à visée thérapeutique. En revanche, les lignées humaines et de hamster sont de bons choix.

La lignée 293-6E est dérivée de cellules humaines et a été développée spécialement pour la transfection transitoire. Les cellules CHO étant préférées pour la production de la plupart des anticorps monoclonaux thérapeutiques de l'industrie pharmaceutique, elles devraient être évaluées également. Si les CHO n'étaient pas traditionnellement de bonnes candidates pour la transfection transitoire, des progrès ont été réalisés ces dernières années permettant d'améliorer leurs performances. Ainsi, la lignée CHO3E7 a été développée par notre laboratoire et permet l'obtention de bons rendements en transitoire (de quelques milligrammes à plusieurs dizaines de milligrammes par litre selon la protéine cible).

Finalement, l'objectif de cette partie est double. D'une part, il s'agit de valider le concept d'augmentation du niveau de sialylation de type α 2,6 du domaine Fc d'un anticorps par co-expression transitoire d'une IgG avec ST6GalI dans les lignées 293-6E et CHO3E7. D'autre part, on souhaite évaluer les deux lignées afin de choisir la meilleure plateforme d'expression d'anticorps sialylés pour la suite du projet. Enfin, la collaboration avec des spécialistes de spectrométrie de masse doit permettre de développer conjointement des méthodes d'analyses adaptées à l'évaluation de la sialylation.

Méthodologie

Choix de l'anticorps modèle

L'IgG1 modèle choisie est l'Herceptine®, également appelée Trastuzumab (abrégié ici en TZM), qui est une IgG1 humanisée commercialisée depuis les années 90 par l'entreprise Roche, et utilisée dans le traitement du cancer du sein HER2+. Cet anticorps monoclonal a été choisi comme modèle car i) les immunoglobulines G de type 1 constituent la majorité des IgG dans la circulation sanguine ainsi que la majorité des anticorps monoclonaux thérapeutiques développés (Tableau 1), ii) le Trastuzumab a des caractéristiques physico-chimiques et biologiques bien décrites, ce qui permet de profiter d'un corpus de publications de référence solide et enfin iii) le TZM ne possède que les sites de glycosylation du Fc. Les détails sur la construction utilisée (séquence, allotype, données sur la région charnière, le signal peptide) sont donnés en Annexe 1.

En utilisant seulement une IgG1 type comme protéine cible, nous risquons de nous heurter à l'impossibilité structurelle de sialyler son Fc. Afin d'explorer cette question de la contrainte structurelle, et de prouver plus sûrement la capacité de notre dispositif à générer une forte sialylation, nous avons intégré une IgG1 mutante dans notre étude. Le mutant comporte un seul acide aminé de différence avec la séquence contrôle : il s'agit de la substitution du résidu de phénylalanine de la position 243 (selon la numérotation EU) par un résidu d'alanine. Les effets de cette substitution ont été décrits la première fois dans une IgG3 par Lund *et al.* Les F243 se trouvent en surface de la protéine, dans la cavité du Fc qui abrite les deux N-glycanes. Elles interagissent via des liaisons CH/ π avec les résidus de N-acetylglucosamine de

la branche $\alpha 1,6$ des glycanes (GlcNAc $\alpha 1,6$). Après la substitution de F243 par une alanine (F243A), l'IgG3 produite en CHO présentait un niveau de sialylation beaucoup plus élevé. Une étude publiée un peu plus tard par le même groupe détaillait le profil de glycosylation de ce mutant ainsi que ses fonctions effectrices. L'IgG3-F243A présentait 59% de branches sialylées contre <3% dans l'IgG3 contrôle. L'hypothèse dominante à ce moment pour expliquer l'augmentation de sialylation induite par la mutation était que la rupture des liaisons CH/ π entre F243 et le GlcNAc $\alpha 1,6$ détachait le glycanes de la surface de la protéine. Ainsi libéré, le glycanes devenait plus accessible pour les sialyltransférases. Dans le chapitre que nous avons publié et que nous présentons dans cette partie, c'est avec cette hypothèse que nous discutons. Néanmoins, les travaux publiés depuis par Barb *et al.* permettent de reformuler les choses un peu différemment : l'absence des liaisons CH/ π entre la surface du Fc et le GlcNAc $\alpha 1,6$ pourrait déplacer l'équilibre des conformations liée et libre du glycanes vers la conformation libre, augmentant, et ceci ne change pas, l'accessibilité du glycanes pour les sialyltransférases.

Le segment Fc est très conservé d'un sous-type d'IgG à l'autre : on retrouve cette phénylalanine dans les IgG1. Nous avons fait l'hypothèse que dans notre IgG1 modèle, cette substitution F243A aurait les mêmes conséquences que dans l'IgG3 décrite par le groupe de Lund, c'est-à-dire qu'elle permettrait la sialylation du Fc en CHO. Nous pourrions alors vérifier la fonctionnalité de la sialyltransférase que nous aurons transfectée. A noter qu'en pratique, cette « F243 » était pour nous l'acide aminé numéro 246 de la chaîne lourde. Nous utiliserons donc plus loin la notation F246, mais il s'agit bien du même acide aminé conservé du Fc.

Production des anticorps

Les conditions exactes de réalisation des expériences sont détaillées dans la publication insérée dans ce chapitre. Nous aborderons ici plutôt les éléments directeurs de notre méthode de travail.

La lignée embryonnaire humaine de rein (HEK) 293-6E et la lignée d'ovaire de hamster chinois CHO3E7 expriment toutes les deux une version tronquée de l'antigène nucléaire 1 du virus d'Epstein-Barr (EBNA1). L'expression d'EBNA1 permet de maintenir et

répliquer dans les cellules transfectées des plasmides contenant l'origine de réplication virale du virus d'Epstein-Barr, ce qui augmente et prolonge l'expression de la protéine encodée par un tel plasmide.²²⁰ Les vecteurs pTT contiennent cette origine de réplication virale, ainsi qu'un promoteur fort dans les cellules mammifères, le promoteur du cytomégalovirus (CMV).²²⁰ Tous les gènes des protéines exprimées dans cette étude sont insérés dans des vecteurs pTT, afin d'optimiser leur expression dans les lignées 293-6E et CHO3E7.

L'agent de transfection utilisé tout au long de notre étude est le PEI. Le PEI est peu toxique, pas trop cher, et efficace pour la transfection des 293-6E et des CHO3E7. La méthode de transfection traditionnelle au PEI consiste à préparer une solution de complexes ADN-PEI, les polyplexes, puis à les incorporer à la culture cellulaire.²²⁰ La transfection directe, par opposition à la méthode traditionnelle indirecte, consiste en l'incorporation de l'ADN puis du PEI à la culture cellulaire sans complexation préalable (Figure 13). Elle permet d'atteindre les mêmes rendements que la transfection indirecte dans les cellules 293-6E à condition d'augmenter la concentration de PEI utilisée. Elle offre plus de souplesse dans le déroulement de la transfection, en éliminant le facteur de temps d'incubation des polyplexes. Ceci est un avantage pour passer de petite à grande échelle de production. Le développement de cette technique pour la lignée 293-6E avec les vecteurs plasmidiques pTT développés et utilisés dans notre laboratoire, a fait l'objet d'une publication qui est présentée en Annexe 2.

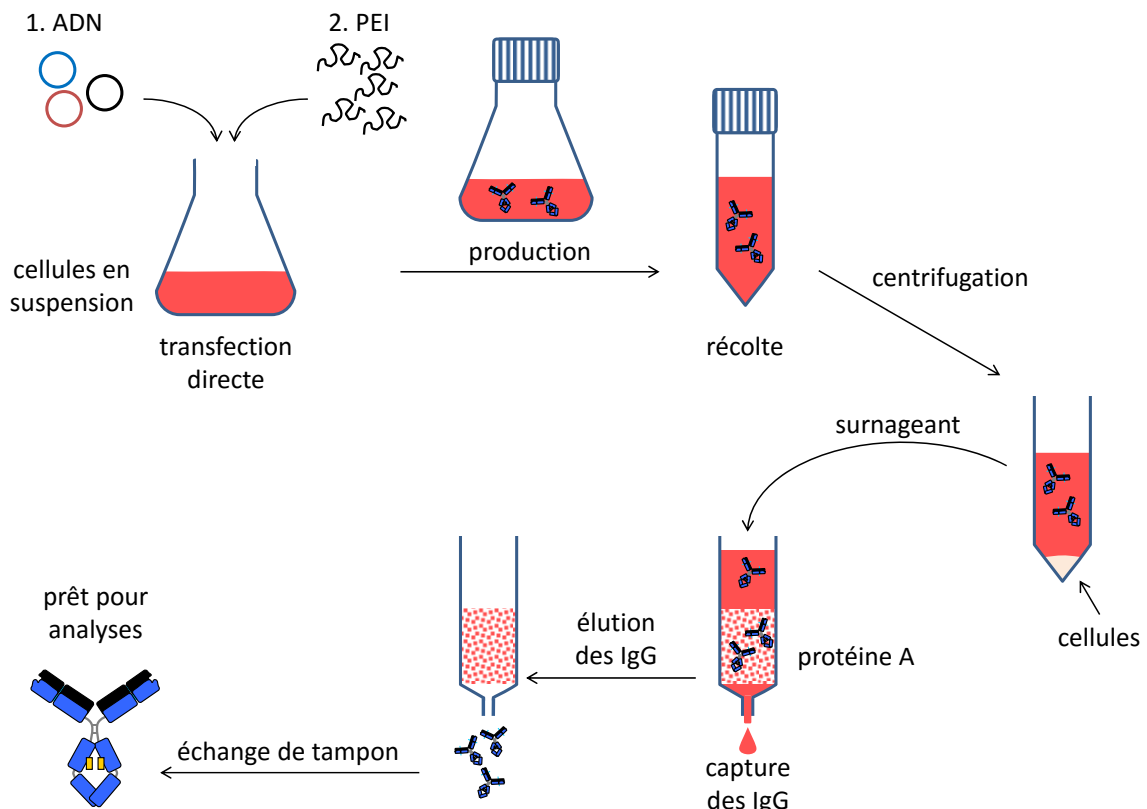


Figure 13 : Etapes principales de la production d'IgG

Les IgG sialylées sont obtenues par co-transfection directe des cellules avec les plasmides codant la chaîne légère et la chaîne lourde de l'IgG, ainsi que le plasmide codant la ST6GalII. La transfection directe consiste en l'ajout des plasmides suivi de l'ajout du PEI aux cellules. Les cellules, HEK 293-6E ou CHO3E7, sont cultivées en suspension, dans des flasques agitées et ventilées placées à 37°C. Après la transfection, les cellules expriment l'anticorps qui est sécrété dans le milieu. A l'issue de la phase de production, les cellules sont séparées du milieu par centrifugation, et le surnageant est chargé sur une colonne de protéine A. La protéine A lie l'anticorps spécifiquement, puis celui-ci est élué par ajout d'une solution acide. La solution acide est échangée contre de l'eau sur des colonnes de dessalage ou bien par filtrations successives sur des membranes poreuses. L'anticorps purifié, en solution dans l'eau, est alors prêt pour l'ensemble des analyses.

Les gènes codant pour la chaîne lourde et la chaîne légère de notre anticorps modèle, le TZM, comportent des peptides-signal qui permettent la sécrétion du TZM dans le milieu de culture. A l'issue de la phase de production, les cellules sont séparées du milieu de culture contenant les protéines sécrétées (surnageant) par centrifugation. Le TZM est ensuite extrait du surnageant par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A. La protéine A (pA) est un composant de la paroi de la bactérie *Staphylococcus aureus* qui se lie avec la chaîne lourde des IgG1, 2, et 4. L'interaction IgG-pA n'est pas sensible à la glycosylation du Fc ; les IgG aglycosylées sont aussi reconnues par la pA.¹⁸⁸

Analyse de la glycosylation

L'analyse des IgG et de leur glycosylation est séparée en deux types. Le premier type d'analyse regroupe les techniques qui permettent d'évaluer rapidement le succès de l'expression de l'IgG et des glycosyltransférases, le niveau de glycosylation général, ou la présence d'un résidu de monosaccharide en particulier. On compte dans cette catégorie la séparation des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE avec coloration des protéines au bleu de Coomassie, ou transfert sur membrane pour marquage spécifique avec des anticorps (western-blots) ou des lectines (lectine-blots), et la focalisation isoélectrique (IEF).

L'analyse des surnageants de culture par électrophorèse avec coloration au bleu de Coomassie permet de vérifier la présence de l'IgG, son repliement quaternaire (appariement des chaînes lourdes et légères), de visualiser son niveau d'expression. L'examen du poids apparent des IgG, relativement à un marqueur de poids moléculaire ou entre elles, permet de distinguer l'IgG contrôle de l'IgG mutante. L'analyse de l'IgG purifiée permet d'évaluer la présence de contaminants résiduels après purification. Ces informations permettent de comparer des conditions de transfection et d'identifier celle permettant le meilleur rendement, et le repliement quaternaire optimal. L'analyse en western-blot avec le marquage spécifique de la chaîne lourde peut servir à appuyer les résultats obtenus avec le gel de Coomassie.

Les lectine-blots sont une variante des western-blots où l'anticorps primaire de marquage est remplacé par une lectine, spécifique d'un type d'oligosaccharide. Des lectines adaptées à l'utilisation en blot sont disponibles dans le commerce. Celles que nous avons utilisées étaient biotinylées, et la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP pour

horseradish peroxydase en anglais) était utilisée comme marquage secondaire. La HRP était ensuite révélée par des protocoles classiques de chimioluminescence. Des lectines spécifiques du fucose, du galactose terminal, et des acides sialiques $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ ont ainsi été utilisées pour évaluer rapidement la présence de ces résidus dans les IgG. Les lectine-blots présentent l'avantage de pouvoir être réalisés sur des surnageants de culture, avant l'étape de purification de l'IgG, et de nécessiter de très petites quantités de matériel (<50 μ L de surnageant, <500 ng d'IgG). La possibilité de marquer spécifiquement les acides sialiques $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ est très intéressante. Les lectin-blots sont ainsi idéaux pour évaluer facilement le niveau de sialylation générée par la ST6GalII transfectée, et son évolution au cours de la culture.

L'évaluation du niveau de sialylation totale ($\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$) a été réalisée par IEF. L'IEF permet de séparer sur gel les IgG en fonction de leur point isoélectrique (pI). La réalisation des IEF demande plus de préparation que les lectin-blots car les IgG doivent être purifiées et dans l'eau. Les IgG comportant des acides sialiques ont des pI plus acides que les IgG non sialylées. Les variations des niveaux de galactosylation, de fucosylation ou de tout autre monosaccharide ne modifient pas le profil de charge des protéines, puisque ces sucres sont neutres. L'IEF permet ainsi de comparer facilement le niveau de sialylation des échantillons en tirant parti de la singularité des acides sialiques qu'est leur charge négative. Les résultats d'IEF associés aux résultats de lectine-blots avec les lectines spécifiques pour les $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ Sia permettent l'évaluation simple et rapide de l'état de la sialylation d'une protéine.

Le deuxième type d'analyse regroupe les méthodes de description détaillée des glycoprofiles, c'est-à-dire leur composition en glycanes. Les techniques qui permettent ce niveau de détail sont la chromatographie et la spectrométrie de masse. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux approches de l'analyse de la glycosylation par spectrométrie de masse, en utilisant deux sources d'ionisation douce adaptées à l'ionisation des grosses molécules, comme les protéines et les oligosaccharides : la source de type désorption-ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption ionisation), et la ionisation par électrospray (ESI).

La première approche consiste à séparer les N-glycanes de la protéine par digestion avec la PNGase F. Les glycanes libérés ont ensuite été dérivatisés par réaction avec la phénylhydrazine afin d'améliorer leur détection puis soumis à l'analyse par spectrométrie de

masse à temps de vol en tandem TOF/TOF, avec une source MALDI.²²¹ Les ionisations peuvent être réalisées en mode positif, qui génère des ions positifs et facilite la détection des glycanes neutres, ou en mode négatif, qui facilite la détection des glycanes chargés négativement, c'est-à-dire sialylés. L'inconvénient majeur de cette méthode est que les glycanes neutres et sialylés ne peuvent pas être analysés ensemble. Afin de lever cet obstacle, certains échantillons ont été perméthylés avant ionisation ($\text{COOH} \rightarrow \text{C}(\text{OCH}_3)\text{OH}$) pour éliminer la charge négative de l'acide sialique.

La seconde approche de l'analyse par spectrométrie de masse consiste à analyser l'anticorps complet avec ses deux N-glycanes. Une telle analyse implique de pouvoir détecter des molécules ionisées très lourdes, avec peu de différences de masse ou de charge entre elles, ce qui nécessite une technique avec une très bonne résolution. Cette analyse a pu être réalisée par chromatographie couplée à un spectromètre de masse avec un analyseur Quadripôle-TOF (Q-TOF), avec une source ESI. L'ionisation des très grosses molécules que sont les IgG produit des ions multichargés, ce qui minimise l'influence de la charge de l'acide sialique sur l'ion et diminue l'effet de l'ionisation en mode positif ou négatif. Cette technique présente l'avantage de générer des données sur l'appariement des glycanes du Fc.

Une troisième approche commune est l'analyse de glycopeptides, qui sont obtenus par digestion de l'IgG avec la trypsine. Cette stratégie est particulièrement adaptée pour l'analyse des glycoprotéines qui possèdent plusieurs sites de glycosylation, puisque chaque glycopeptide contient l'information sur le glycanes et sur son site de glycosylation. On peut ainsi déterminer le profil de glycosylation de chacun des sites. Dans notre cas, la digestion avec la trypsine a conduit à la formation de deux glycopeptides pour le seul site N297 : le peptide court EEKYNSTYR, et le peptide long TKPREEKYNSTYR. Les profils de glycosylation des deux peptides étaient différents : le peptide court était beaucoup moins riche en acides sialiques que le peptide long. Ceci suggère que la sialylation affecte l'activité de la trypsine. L'existence de ces deux peptides avec des profils de glycosylation différents gêne l'analyse de la glycosylation du site N297. Cette technique a donc été abandonnée.

Contribution de chacun des auteurs

Céline Raymond – J'ai défini le sujet et les limites de l'étude ; réalisé la bibliographie sur le sujet ; déterminé et réalisé les expériences pour le développement de la méthode de production ; réalisé les gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie, lectine-blots, IEF, digestions avec sialidases et analysé les résultats ; défini les paramètres de la méthode de production (transfection, jour de récolte, température etc.) après l'analyse des résultats et en accord avec mon directeur ; coordonné conjointement avec mon directeur la collaboration avec les équipes de spectrométrie de masse ; analysé les résultats obtenus par les équipes de spectrométrie de masse ; écrit le manuscrit.

Anna Robotham a participé au développement du protocole d'analyse de masse intacte par spectrométrie de masse ESI-MS dans le laboratoire de John Kelly. Elle a réalisé l'analyse des échantillons en masse intacte et attribué les glycanes à chacun des pics détectés. Elle a réalisé un rapport d'analyse.

John Kelly a supervisé le développement du protocole d'analyse de masse intacte par spectrométrie de masse ESI-MS et l'analyse de nos échantillons.

Erika Lattova a participé au développement du protocole d'analyse des glycanes libérés par digestion avec la PNGaseF par spectrométrie de masse par dérivatisation avec phénylhydrazine ou perméthylation dans le laboratoire d'Hélène Perreault. Elle a réalisé les analyses en mode positif et négatif et a participé à l'attribution des glycanes aux pics détectés, conjointement avec Hélène Perreault.

Hélène Perreault a supervisé le développement du protocole d'analyse des glycanes libres par spectrométrie de masse MALDI-MS et l'analyse de nos échantillons.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude, validé le sujet, ses limites, les résultats et leur analyse. Il a relu et corrigé le manuscrit, avant d'envoyer la version finale aux équipes de spectrométrie de masse pour validation.

Production of highly sialylated monoclonal antibodies

Chapitre publié dans Glycosylation, Chapitre 17, édité par S. Petrescu, publié par Intech, DOI 10.5772/51301

Céline Raymond^{1,2}, Anna Robotham³, John Kelly³, Erika Lattova^{2,4}, Hélène Perreault^{2,4}, and Yves Durocher^{1,2,3}

¹Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Canada; ²MabNet NSERC Network for the manufacturing of single-type glycoform monoclonal antibody; ³Human Health Therapeutic Portfolio of the National Research Council Canada, Montreal and Ottawa, Canada and ⁴Chemistry Department, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

Abstract

Fc glycosylation plays a key role in the effector functions of monoclonal antibodies. The type of glycan present on Asparagine 297 of each heavy chain influences the affinity of the antibody for Fc γ -receptors and subsequent effector functions such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. Sialylation is known to inhibit the interaction between monoclonal antibodies (mAbs) and canonical Fc γ -receptors. However it may be responsible for the anti-inflammatory properties of intravenous immunoglobulins (IVIg) when administered at high doses to patients. Sialylation is the final step of the glycan elongation process that occurs in the Golgi apparatus. The particular structure of the Fc domain of IgG1 mAbs forms a pocket in which the two glycans are embedded restraining their processing to a bi-antennary complex structure with marginal level of sialylation. In typical recombinant mAbs derived from CHO cell cultures, only 1 to 2% of them possess Fc with sialylated glycan. In order to better understand the role of Fc sialylation, especially the α 2,6-sialylated glycoforms involved in anti-inflammatory activity, methods for large-scale production of highly sialylated mAbs are needed. In this chapter, we compared the sialylation profiles of the IgG1 herceptin and a F246A Fc-mutant transiently expressed with the human sialyltransferase ST6GalII in CHO and 293 cell lines. The two cell lines provided very similar profiles of Mab glycans. Isoelectric focusing demonstrated that the co-expression

of ST6GalII with the wild-type herceptin led to only marginal sialylation enhancement. The F246A Fc mutation was necessary to significantly increase sialylation levels. These observations were confirmed by glycan analysis by MALDI-MS. For the mutant Mab co-expressed with ST6GalII, the presence of monosialylated glycans was greatly enhanced and fully processed glycans were detected. Intact mass spectrometry analysis of the F246A antibody showed a clear shift from neutral towards sialylated glycoforms. A significant amount of fully sialylated mAbs was also detected. While the F246A mutation alone was sufficient to remarkably enhance sialylation level of mAbs, the co-expression of ST6GalII in CHO cells remains necessary to introduce the α 2,6 linkage which is thought to confer the anti-inflammatory properties of mAbs in humans.

Introduction

The first monoclonal antibody (Mab), developed against kidney transplant rejection, was accepted by the FDA in 1986.²²² Today, mAbs are leading the biotherapeutics market as 28 have been approved in Europe and the USA, and hundreds are in clinical trials.²²³⁻²²⁵ Most of them are of IgG1 subtype, developed for cancer and immune diseases treatments. mAbs clinical efficacy not only relies on specific target binding provided by their variable region, but also on their ability to trigger defense mechanisms such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC). These effector functions are mediated by the interaction between the antibody Fc fragment and the Fc γ -receptors expressed on immune cells' surface or the molecules of the complement for ADCC and CDC respectively. In the last decade, these interactions were found to highly depend on the presence and structure of the N-glycan linked to the Fc fragment.^{13,152}

Fc fragment possesses two conserved N-glycosylation sites, on the asparagine 297 in the CH2 domain of each heavy chain. mAbs produced in mammalian cells possess a wide variety of glycoforms, as the attached glycans are modified to different extents with core-fucosylation, bisecting N-acetylglucosamine addition, galactosylation and sialylation. The glycan composition is crucial, as the presence or absence of a single monosaccharide residue can remarkably affect the affinity of the Mab for the Fc γ -receptors. Among the variety of monosaccharides present on the Fc glycans, terminal sialic acids are particularly interesting, as

their role in Mab functions is both positive and negative. Sialylation of the Fc glycan dramatically decreases Mab affinity for the canonical Fc receptors, thereby inhibiting ADCC. However, recent studies on the anti-inflammatory properties of intravenous immunoglobulins (IVIg) suggest that this biological activity could be conferred by the presence of α 2,6-sialic acid residues on the Fc glycans. Although this hypothesis is still controversial, the study raised a new interest for α 2,6-sialylated IgGs. While glycosylation of therapeutic mAbs significantly impact their biological activity, the production of mAbs with a specific homogenous glycoform profile is in general beyond the reach of manufacturing bioprocesses. In this chapter, we describe and compare two large-scale transient expression platforms using CHO and HEK293 cells for the production of highly sialylated monoclonal antibodies.

IgG N-glycans and their interactions with the Fc

Glycosylation is a complex process that involves several glycosyltransferases and glycosidases. Most glycosylation sites are located on glycoproteins' surface, whereas IgGs' N-glycans are embedded within the Fc fragment. This particular location restricts the access of glycosyltransferases to their substrates, thereby reducing glycan complexity. Subsequently, while tri- and tetra-antennary glycans can be found on many glycoproteins such as EPO or IgG Fab fragments, Fc N-glycans are of complex biantennary type that consists of a heptasaccharide core structure comprising four N-acetylgalactosamines (GlcNAc) and three mannoses (Figure 14).²²⁶ The α 1,3 and α 1,6 arms can be further elongated with galactose and sialic acid. Fucose and bisecting-GlcNAc can be found on the core GlcNAc and on the central mannose respectively. This glycan is rarely fully processed; the predominant glycoform found on antibodies produced in CHO and 293 cell cultures is the fucosylated core-structure.

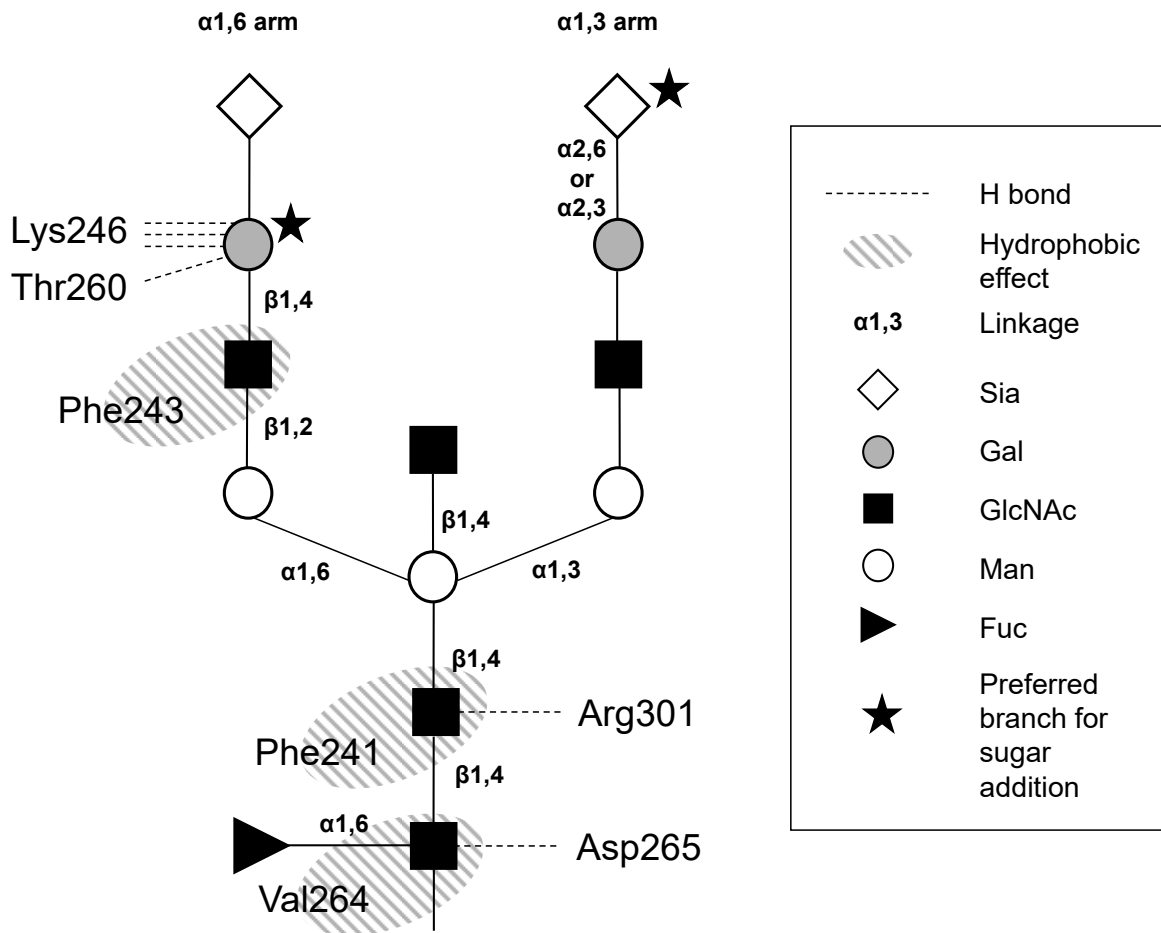


Figure 14 : IgG1 glycan bi-antennary complex structure

Glycan interactions with C_{H2} amino acids. Sia: sialic acid; Gal: galactose; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Man: mannose; Fuc: fucose.

The C_{H2} amino acid sequence around Asn297 is very well conserved amongst IgG subtypes. Several amino acids have been shown to interact with the glycan located on the same heavy chain (HC), whereas no interaction is likely to happen with the other heavy chain. Amino acid-glycan interactions determine the glycan position within the Fc pocket and its availability for glycosyltransferases. The galactose (Gal) on the $\alpha 1,6$ arm is the main residue retaining the glycan on the protein surface^{16,23,152} by generating H-bonds with Lys246 and Thr260.¹⁵² In IgG1 and IgG4 subtypes, galactosylation occurs preferentially on the $\alpha 1,6$ branch.^{23,227} The inner saccharides have less interaction with the protein. The first and second GlcNAc residues

generate H-bonds with Asp265 and Arg301 respectively.¹⁵² They also form a CH/ π interaction with the non-polar moieties of Val264 and Phe241.¹⁵² Similarly, the GlcNAc residue on the α 1,6 branch also forms a CH/ π interaction with Phe243.²¹ In contrast to galactosylation, sialylation preferentially occurs on the α 1,3 arm. It has been suggested that the galactose on the α 1,6 arm may limit further elongation by maintaining the branch close to the C_{H2} protein surface.²³ However, even if steric hindrance may play a role, branch α 2,6-sialylation specificity was shown to be a consequence of ST6GalI α 1,3 arm preference⁵⁷, a phenomenon that is protein independent. The presence or absence of sugar residue on the Fc glycan thus affects the conformation of the Fc, thereby affecting the Fc-mediated effector functions. These effects are summarized in Table 2.

Table 2: Impact of the presence of extra-core monosaccharides on IgG ADCC and CDC effector functions (as of 2012 knowledge)

| | Mab-FcγR | Mab-C1q | Impacted effector | Reference |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|
| | Affinity | Affinity | function | |
| b-GlcNAc | + | | ADCC | Umaña 1999 |
| Fucose | - | | ADCC | Shinkawa 2003 |
| Galactose | | + | CDC | Hodoniczky 2005 |
| Sialic acid | - | | ADCC | Scallon 2007 |

Sialic acids in Fc N-glycans

The half-life of a number of glycoproteins can be enhanced by sialylation, as sialic acid acts as a cap that hides the penultimate galactose residue recognized by the hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGPR, or Ashwell-Morell receptor).²²⁸ Sialic acid can be linked to the galactose either with α 2,3 or α 2,6 linkage. Recent studies showed that α 2,3 sialylation provides a better protection to the protein than α 2,6 sialylation, as ASGPR recognizes Sia α 2,6Gal and Sia α 2,6GalNAc moieties in addition to the well-known Gal and GalNAc residues.^{229,230} However, Fc-glycans have no apparent impact on IgG half-life.¹⁹¹ The benefits of IgG sialylation on *in vivo* properties of IgGs are still to be understood. Recent studies suggest that sialylation provides anti-inflammatory properties to IgGs. It was observed that

intravenous immunoglobulins (IVIg) injected at very high doses have a therapeutic effect in several auto-immune and inflammatory diseases such as immune thrombocytopenic purpura (ITP) and rheumatoid arthritis (RA). Kaneko *et al.* demonstrated that IgGs bearing sialylated Fc-glycans have anti-inflammatory properties in a RA murine model.³⁵ The inhibitory Fcγ-receptor FcγRIIb as well as Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) receptor were shown to be involved,^{33,212,214,231} but the exact mechanism has not been elucidated. In parallel, Van de Geijn *et al.* reported that the increased levels of IgG1 galactosylation and sialylation during pregnancy may be responsible for the improved condition of RA-affected pregnant women.¹⁸²

IVIg are IgGs pooled and purified from sera of 3000 to 60000 donors. The sialylated fraction represents around 10% of the total IgGs present in the pool. To be therapeutically effective, IVIg used as an anti-inflammatory drug require repeated injections of very high doses (1-2 g/kg). As IVIg are successfully used in an increasing number of applications, a lack of donors is expected in the coming future.^{207,232} To increase the therapeutic efficacy of anti-inflammatory IgGs and avoid IVIg shortage, one strategy may reside in the production of recombinant sialylated IgGs.²⁰⁴

Production of sialylated recombinant antibody

The Chinese Hamster Ovary cell line is the most widely accepted production cell line in the industry for therapeutics manufacturing, including monoclonal antibodies. CHO cells have proven to be a safe expression system and provide high production yields. IgG and Fc fragment produced in CHO cells exhibit a very low level of sialylation (<2%). However, it was shown that a single mutation in the C_H2 domain, the replacement of Phe243 by an alanine, enhances the sialylation level of an IgG3.¹⁹ CHO glycosylation machinery is very similar to that found in human cells but with two major differences: they lack a functional N-acetylglucosaminyltransferase-III (GnTIII) for the addition of bisecting-GlcNAc and, more importantly, they lack the alpha-2,6-sialyltransferase-I activity (ST6GalI or SIAT1) responsible for the addition of sialic acids on galactose residues with α2,6 linkage. The expression of a recombinant ST6GalI is therefore necessary to achieve the production of α2,6 sialylated IgGs in CHO cells.

Large-scale transfection strategies allow for the rapid expression of recombinant glycoproteins. The human embryonic kidney 293 cell line (HEK293) is easily transfectable with a variety of gene transfer reagents, and is probably the most utilized cell line for large-scale transient gene expression.^{233,234} More recently, approaches using CHO cells have also been developed that provide tens to hundreds of milligrams of protein per litre.²³⁵ In order to generate high titers of antibodies with enhanced α 2,6-sialylation, we optimized the conditions for the transient co-expression of human ST6GalI together with IgG light and heavy chains in CHO and HEK293 cells. Our model antibody, Herceptin (or Trastuzumab, herein abbreviated TZM), is a humanized mouse IgG1 used in the treatment of Her2-positive breast cancers. TZM has no glycosylation site on the Fab fragment but only the N297 sites on each CH2 domains of the Fc. We compared sialylation of the wild-type antibody to the F246A mutant (TZMm), which is equivalent to the IgG3 F243A mutant described previously.¹⁹

Materials and method

Mammalian cell culture

The human embryonic kidney 293-6E cell line stably expressing truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1) and the Chinese hamster ovary cell line also expressing a truncated EBNA1 protein (clone 3E7, or CHO-3E7) were grown in suspension culture in serum-free F17 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 0.1% Pluronic-F68, 25 μ g/mL geneticin G418 (for 293-6E cells only) and 4 mM glutamine.²³⁶ Cultures were maintained between 0.1 and 2.0 $\times 10^6$ cells/mL in 125 mL ventilated Erlenmeyer flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

Plasmids

The light (LC), heavy (HC), and F246A mutated heavy (HCF246A) chains were cloned between the EcoRI and BamHI sites of the pTT5 vector.^{237,238} The human ST6GalI gene was cloned between the HindIII and BamHI sites of the pYD7 vector.²³⁹ Green fluorescent protein (GFP) cloned into the pTT vector was used as a reporter gene to evaluate transfection efficiency.²²⁰ Plasmids were amplified in *Escherichia coli* (DH5 α) grown overnight in CircleGrow medium (MP Biomedical, Solon, OH) supplemented with 100 μ g/mL

ampicillin and purified using MAXIprep or QIAprep spin Miniprep columns (Qiagen, Mississauga, ON).

Transfection

Linear 25 kDa polyethylenimine (LPEI), and linear deacylated polyethylenimine (PEI max) were obtained from Polysciences (Warrington, PA). Stock solutions (1 mg/mL and 3 mg/mL for LPEI and PEI max respectively) were prepared in ultrapure water, sterilized by filtration (0.2 μ m), aliquoted and stored at 4°C. Cells were diluted 2 days before transfection in fresh medium at 0.5 and 0.2 x 10⁶ cells/mL for 293-6E and CHO 3E7 cells respectively. Cells were transfected at densities between 1.5 and 2 x 10⁶ cells/mL. DNA and PEI were separately diluted in complete serum-free F17 medium in sterile tubes. Transfection reagents volume was 10% of the final culture volume. The final DNA concentration was 1 μ g per mL of 293-6E culture, and 1.5 μ g per mL of 3E7 culture. PEI was used at the final concentration of 3 μ g per mL in 293-6E culture and 7 μ g per mL in 3E7 culture. Plasmid DNA mix was directly added to the cells and the suspension was allowed to incubate under agitation for 5 min at 37°C before the addition of PEI according to the direct transfection protocol.²⁴⁰ Cells were fed 24 hours post-transfection (hpt) with TN1 peptone to a final concentration of 0.5% (w/w) to enhance productivity.²³³ Transfection efficiency was assessed 48 hpt by determining the percentage of GFP positive cells and GFP fluorescence intensity by flow cytometry with BD LSRII cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON). Only viable single cells were taken in account. Cell density and viability were determined using the Cedex Innovatis automated cell counter Cedex Analyzer (Roche, Laval, QC) based on the trypan blue exclusion method.

Purification of mAbs from cell culture supernatants

Cell cultures were centrifuged 20 min at 3000g. The supernatant was collected and loaded on a 4 mL MabSelect SuRe column (GE Healthcare, Mississauga, ON) equilibrated in PBS. The column was washed with PBS and mAbs were eluted with 100mM citrate buffer pH 3.0. The fractions containing mAbs were pooled and the citrate buffer was exchanged against water on Econo-Pac® 10DG columns (Bio-Rad, Mississauga, ON). Purified mAbs were sterilized by passing through 0.2 μ m filters, aliquoted, and stored at -80°C.

Quantification of mAbs

Concentration of TZM and TZMm in culture supernatants were determined by protein-A HPLC using a 800 μ L POROS® 20 micron Protein A ID Cartridge (Applied BioSystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's recommendations. The antibody present in the culture medium was also visualized following reducing and no-reducing SDS-PAGE stained by Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad, Mississauga, ON). Purified Mab were quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (ThermoScientific).

Lectin-Blot for α 2,6-sialylation evaluation

α 2,6 sialylation was assessed by lectin-blotting on denatured and reduced antibody to separate HC from LC. After protein transfer, nitrocellulose membrane was incubated 3 hours with biotinylated Sambucus Nigra (SNA) lectin (Vector Laboratories, Burlingame, CA), then incubated with Streptavidin-Peroxidase Polymer (Sigma, Saint Louis, MO) for one hour. Signal was revealed with BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

Isoelectric focusing (IEF)

Purified mAbs were analysed on PhastGel™ 3-10 runned with the PhastSystem™ (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, QC) according to the manufacturer's recommendations. Gels were fixed in trichloroacetic acid (TCA) 5% in water (w/w) and stained with Coomassie blue 0.02%.

Enzymatic removal of sialic acids

α 2,3 linked sialic acids were enzymatically removed from the purified antibody by *Streptococcus pneumoniae* Glyko Sialidase S (PROzyme, Hayward, CA) after one hour incubation at 37°C. Total sialylation (α 2,6 and α 2,3 sialic acids) was removed after incubation overnight at 37°C with *Arthrobacter ureafaciens* Neuraminidase (MP Biomedicals, Solon, OH).

Mass spectrometry

Peptide-N-glycosidase F (PNGaseF) was purchased from Roche (Mannheim, Germany). Phenylhydrazine (PHN), phenylhydrazine hydrochloride (PHN.HCl), iodomethane (MeI), dimethylsulfoxide (DMSO), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and 2-aza-2-thiothymine (ATT) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Carbon and STRATA-X-C cartridges were purchased from Phenomenex (Torrance, CA). Solid sodium hydroxide (NaOH) and HPLC-grade solvents (acetonitrile (ACN), chloroform, methanol) were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). HPLC-grade water was obtained with a Milli-Q® plus TOC water purification system (Millipore, Bedford, MA).

Release of N-linked oligosaccharides from samples and MALDI-MS analysis

To the sample solution (100 µL; 50 µg glycoprotein) 2 µL of PNGaseF were added and incubated at 37°C for 5-18 h. One µL of digested mixture was loaded onto a spot with freshly prepared matrix solution (0.8 µL; 5 mg of ATT and 2.5 mg of PHN.HCl dissolved in 350 µL 50% ACN in water) predeposited on the surface of a MALDI target. When the mixture was partially dried, 0.4 µL of PHN-labelling solution (phenylhydrazine:deionized water:ACN/1:4:1) was added to the spot with sample-matrix and left to air-dry. The samples were analysed by MALDI-TOF/TOF-MS (UltrafleXtreme™, Bruker) in both positive and negative ion modes. For the structural analysis individual parent ions were manually selected. MS/MS spectra of oligosaccharides were interpreted manually. The structures of N-glycans were derived on the basis of fragmentation patterns which were produced under MS/MS conditions for single precursor ions. For a discrimination of isomeric structures, general rules described in previous study have been applied.²⁴¹

To verify glycan profiles obtained by PHN-target derivatization immediately after PNGase F treatment, all digested samples were also purified on STRATA-XC cartridges combined with carbon cartridges. After washing carbon cartridge with 4x1000µL of deionized water, glycans were eluted with 40% ACN (1000 µL). After total evaporation the glycans were labelled with PHN as described above or permethylated according to the procedure described by Ciucanu and Kerek.²⁴¹ Briefly, dried fractions containing oligosaccharides were dissolved in DMSO (40 µL), to which NaOH (2 mg) and methyl iodide (8 µL) were added.

The mixture was vortexed vigorously (30 min) at room temperature. Then, the reaction was ceased by adding ice-cold water (500 μ L) followed by chloroform (200 μ L). After mixing and centrifugation, the upper aqueous layer was discarded and the chloroform portion was again washed with distilled water (4 x 500 μ L each). Chloroform was evaporated and the sample was reconstituted in 70% aqueous methanol (5 μ L). One μ L of permethylated sample solution was spotted into DHB matrix and analyzed by MS.

Intact Mass analysis of mAbs

The antibody isolates were analyzed by Trap-LC-MS using an Agilent 1100 series HPLC system coupled to a Q-TOF2 hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Waters) equipped with an electrospray interface. Approximately 3 μ g of antibody was injected onto a Protein MicroTrap (Michrom BioResources/Dionex). The trap was washed with deionized water (~500 μ L) to remove buffers prior to being switched on-line with the LC-MS system. The antibody was eluted using a linear gradient from 1% to 85% solvent B in 27min (solvent A: 0.1% formic acid, solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile, flow rate: 0.45 mL/min). The mobile phase was split before the trap to 50 μ L/min. The electrospray voltage was 4200V and cone voltage was 80V. The Q-TOF2 mass spectrometer was calibrated for high mass range using cesium iodide. Mass spectra were acquired every 2 seconds during the analyses over the full mass range (m/z 50-4000). The mass spectra acquired across the protein peak were combined and smoothed (smooth window: \pm 3, number of smooths: 8, smoothing method: Savitsky-Golay) and deconvoluted using the MassLynx MaxEnt 1 software from Waters: spectral window: m/z 2500-3200, molecular weight range: 140,000-160,000 Da, resolution: 1.00 Da/channel, damage model: simulated isotope pattern spectrometer blur width of 0.500 Da, minimum intensity ratios: 60% left, 60% right, number of iterations: 15). Peaks in the molecular weight profile were integrated using the MassLynx software.

Results

Transfection conditions optimization

DNA ratios parameters

Transfection efficacy relies on a variety of parameters that are, amongst others, cell line- protein- and plasmid-dependent. We expressed our model Mab together with the human α 2,6-sialyltransferase (ST6GalII) by performing co-transfection of the Mab heavy chain (HC), light chain (LC) and ST6GalII expressing plasmids. The optimal proportions of each plasmid were determined to ensure 1) the proper assembly of the Mab, 2) high sialylation levels and 3) high Mab yields. The LC:HC and (LC:HC):ST6GalII ratios were then assessed in CHO and 293 cells in suspension in 6-well plates, after 5 days at 37°C. The supernatants were collected and analyzed by protein-A HPLC (Figure 15A) and by SDS-PAGE followed by Coomassie staining (Figure 15B) to evaluate the expression yield and proper assembly of antibodies. Sialylation was assessed by SNA-blotting (Figure 15C). For TZMm, a slight excess of LC plasmid (LC:HC of 6:4) provided a better expression yield in both cell lines. For wild-type TZM, this ratio was of 5:5 in 293 and 6:4 in CHO cells. A ratio 6:4 was chosen for the expression of TZM and TZMm in both cell lines. As for sialylation, 20% of ST6GalII plasmid was found to allow maximum signal in SNA blots without significantly affecting TZMm expression yields in both cell lines. It is worth noticing that the sialylation of the wild-type antibody remained very low for all ST6GalII plasmid ratios, suggesting the inability of the enzyme to sialylate TZM. Mab yields were increased in 293 cells with the incorporation of 30% of non-coding DNA (salmon sperm DNA) in the final DNA mix, while this was unnecessary in CHO cells (data not shown).

Transfection protocol

The usual polyethylenimine (PEI) mediated transfection protocol involves the formation of DNA-PEI complexes (polyplexes) prior to their addition to the cells. Another approach, the direct transfection, consists in the successive addition of DNA and PEI to the cell suspension, and was validated with 293 cells to facilitate large-scale transfection handling.^{240,242} This strategy was adapted here for CHO cells. 1.5 μ g of DNA and 7 μ g of PEI

per mL of culture allowed the expression of amounts of IgGs equal to the classic indirect protocol (Figure 16). Transfection parameters for CHO and 293 cells are summarized in Table 3.

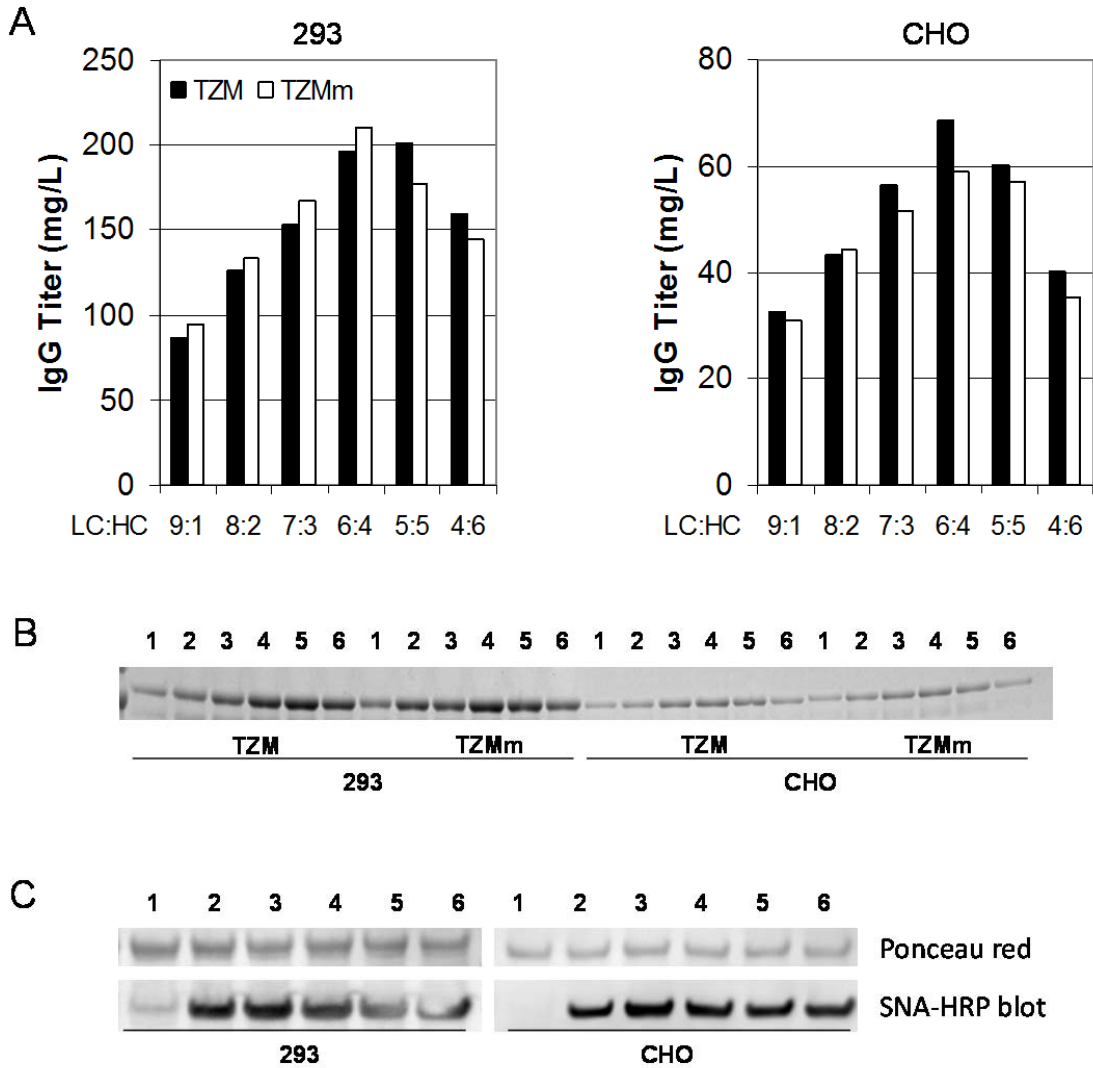


Figure 15 : Optimization of LC:HC and ST6Gal ratio

Panel A – mAbs were quantified by protein-A HPLC in 293 and CHO supernatants 5 days post-transfection. Different LC:HC and LC:HC F246A DNA ratios were tested for proper expression of TZM and TZMm respectively. Panel B – The supernatants were loaded on SDS-PAGE (non-reducing) and stained with Coomassie blue. LC:HC ratios are: Lane 1: 9:1; Lane 2: 8:2; Lane 3: 7:3; Lane 4: 6:4; Lane 5: 5:5; Lane 6: 4:6. Panel C – Determination of the

optimal ST6GalI ratio. Supernatants from cells transfected with TZMm HC and LC and various ST6GalI ratios were harvested 5 days post-transfection, separated by SDS-PAGE (reducing conditions) and transferred on nitrocellulose membrane for the determination of the sialylation level by blotting with SNA-HRP. Nitrocellulose membrane was stained with Ponceau red for protein load control, and then incubated with SNA-HRP. Proportion of ST6GalI plasmid in transfection mixture was: Lane 1: 0%; Lane 2: 10%; Lane 3: 20%; Lane 4: 30%; Lane 5: 40%; Lane 6: 50%.

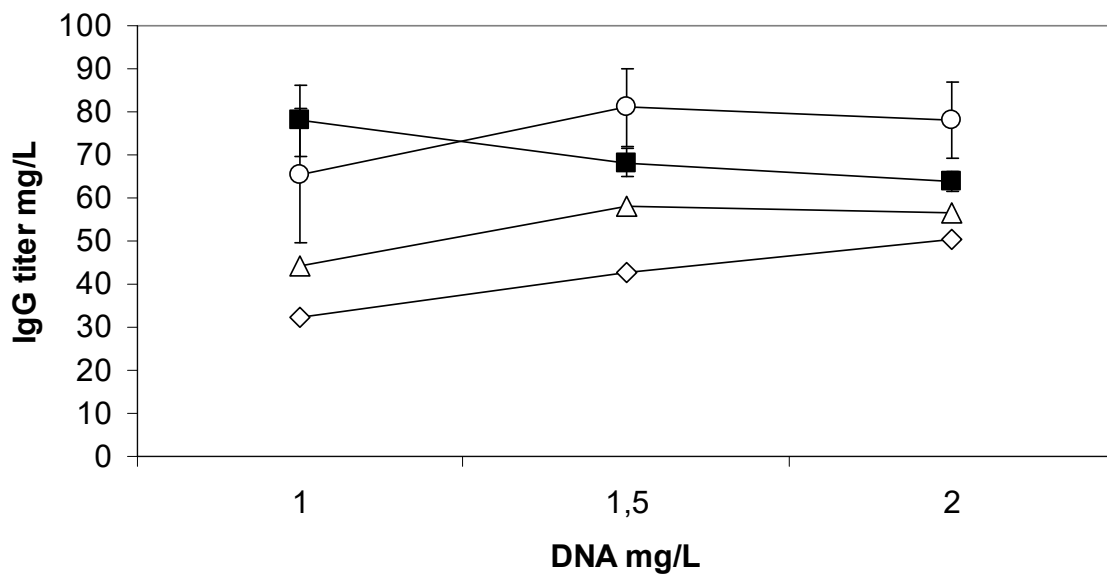


Figure 16 : Determination of the optimal transfection parameter

Final concentrations of DNA and PEI per mL of culture for direct transfection of CHO cells were determined for TZM. Closed squares represent the TZM titers obtained using the traditional indirect protocol, i.E. with DNA-PEI complexation prior to the addition to the cell culture (PEI 5 µg/mL). Open symbols represent the results for 3 different PEI concentrations with direct protocol: open circle: 7 µg/mL; open triangle: 6 µg/mL; open diamond: 5 µg/mL. Results represent the average of three independent experiments ±SD

Table 3: Optimal DNA and PEI ratios determined for the expression of TZM and TZM F246A mutant (TZMm) in 293-6E and CHO cells using the direct transfection protocol.

| | 293 | CHO |
|------------------------------------|------------|-----------------|
| LC:HC | 6:4 | 6:4 |
| (LC:HC):ST6GalII | (80):20 | (80):20 |
| ((LC:HC):ST6GalII):ssDNA | (70):30 | (100):0 |
| DNA:PEI for Direct protocol | 1:3 (LPEI) | 1.5:7 (PEI max) |

Mab expression and sialylation kinetics

Sialylation is likely to be limited after a certain time in batch culture due to a combination of adverse factors such as, but not limited to, ammonia accumulation,^{101,106} ST6GalII plasmid loss upon successive cell division and sialidases release in medium.⁸⁴ As Mab titer increases over time in the culture medium, the harvest time point selected must provide an acceptable compromise between high Mab yield and high sialylation. In this study, we gave priority to sialylation over Mab expression yield.

Sialylation kinetics was studied on the mutant antibody as sialylation of TZM was barely detectable. TZMm co-expression with ST6GalII was carried out for 7 days in 293 and CHO cells, until viability dropped to approximately 60% (Figure 17A). A fraction of each culture was harvested daily from day 3 to day 7 and purified by protein-A affinity chromatography. Sialylation level of the purified TZMm fractions were assessed by SNA-blotting and IEF analyses.

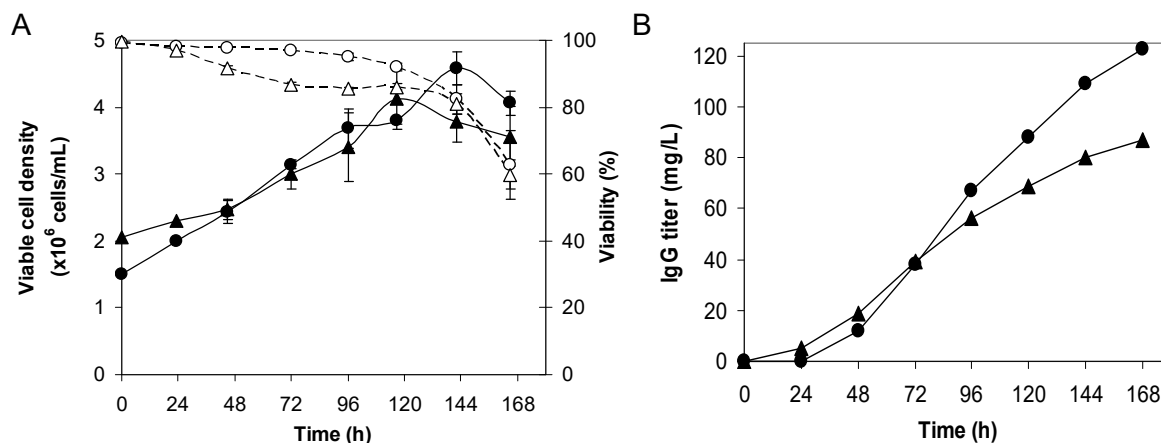


Figure 17 : Production kinetics of TZMm in 293 and CHO cells

Panel A – Cell growth and viability for TZMm co-expression with ST6Gall. Cells were transfected at $t=0h$ and fed at 24h post-transfection with TN1 peptone (0.5% w/v final). Open and closed circles: viability and viable cell density in 293 cell cultures. Open and closed triangles: viability and viable cell density in CHO cell cultures. Panel B – TZMm yield over time as determined by protein-A HPLC quantification of each fraction. Closed circles: titers in 293 cells; closed triangles: titers in CHO cells.

In 293 cells, SNA-blot showed a maximum $\alpha 2,6$ -sialylation on day 3, which then decreased over time (Figure 18A). In CHO cells, no significant loss of intensity was observed, suggesting that $\alpha 2,6$ -sialylation of the heavy chain was more stable over time. These patterns were supported by IEF analyses. Due to the negative charge of sialic acid, mono, di, tri and tetra-sialylated mAbs are expected to have lower pI than asialylated glycoforms. Even though these variations in pI are small, they could be easily distinguished on IEF gels. The upper band intensity showed a higher amount of asialylated glycoforms in 293 than in CHO as seen on the blot (Figure 18B). The decline in the sialylation level was less obvious by IEF vs SNA-blot analysis for the 293 cells, which could be explained by a change in the $\alpha 2,3$ / $\alpha 2,6$ sialylation ratio over time. For CHO cells, the IEF profiles mirrored the SNA-blot results as there was no significant band intensity variation among the samples from day 3 to day 7. TZM and TZMm treated overnight with $\alpha 2,3-6$ neuraminidase (*Arthrobacter ureafaciens*) at 37°C exhibited the same pattern than aglycosylated TZM mutant N297A (Figure 18C), confirming that the lower bands correspond to sialylated states of the mAbs.

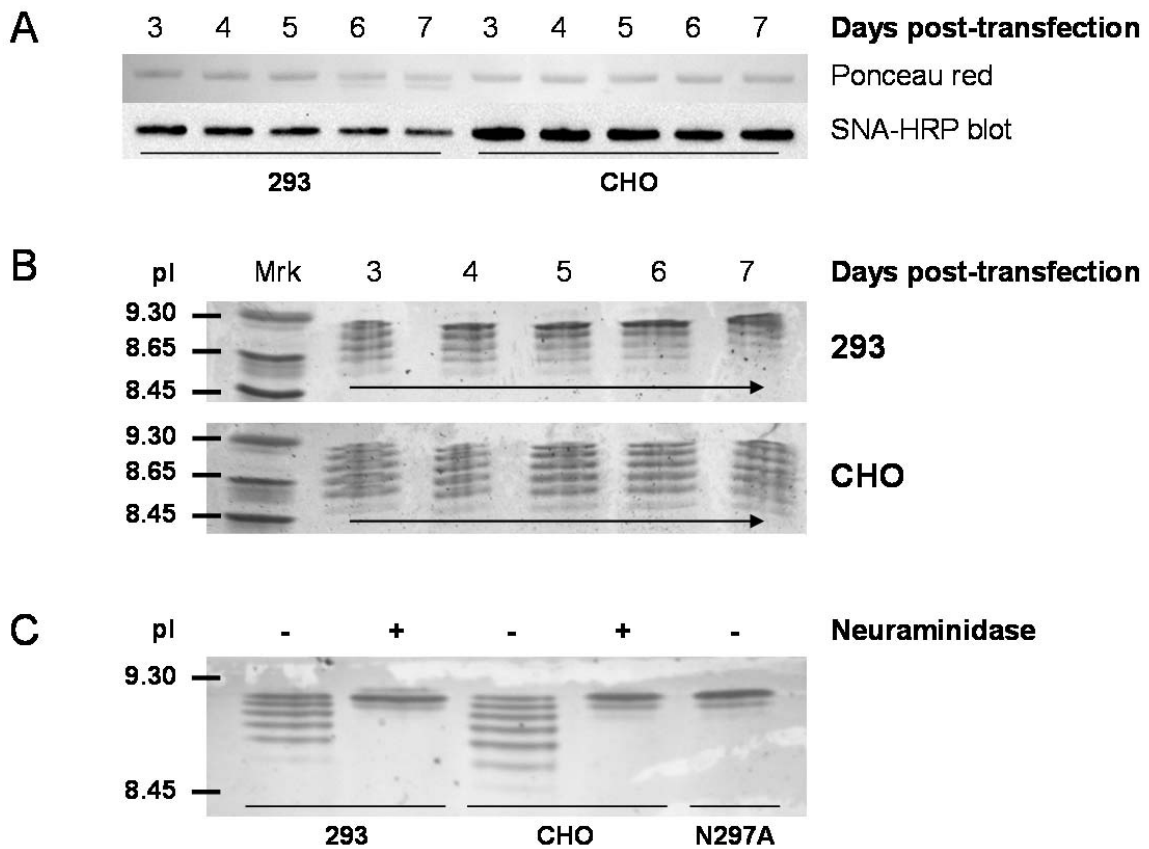


Figure 18 : Sialylation kinetics of TZMm in 293 and CHO cells

*Panel A – TZMm was co-expressed with ST6GalII, harvested from day 3 to day 7 and purified by protein-A chromatography. 300 ng were resolved by SDS-PAGE (reducing conditions), transferred to nitrocellulose membrane and probed with SNA-HRP. Only the heavy chain is shown. The membrane was stained with Ponceau red to monitor protein loads. Panel B – IEF profiles of purified TZMm co-expressed with ST6GalII and harvested between day 3 and 7 post-transfection. Mrk: IEF calibration markers. Panel C – IEF profiles of purified TZMm from 293 and CHO cells digested or not with *A. ureafaciens* neuraminidase and of aglycosylated TZM (N297Q mutant produced in 293 cells).*

Impact of ST6GalII expression and F246A mutation on sialylation patterns

Lectin-blot and IEF analysis of the sialylation patterns

To evaluate the impact of ST6GalII expression on overall sialylation levels of TZM and TZMm, purified mAbs were submitted to SNA blotting and IEF analyses (Figure 19). While SNA blot (panel A) shows a significant increase in α 2,6-sialylation levels of TZMm, no increase in sialylation of the wild-type antibody could be observed in 293 cells while only a faint band could be seen in CHO cells. In 293 cells, only a marginal signal with SNA lectin could be seen when TZMm was expressed alone, suggesting that endogenous levels of ST6GalII activity are low in this cell line. The main consequence of ST6GalII co-expression was the significant preference for α 2,6-sialylation over α 2,3-sialylation of TZMm in CHO cells. While all of the acidic TZMm species observed when the Mab was expressed alone disappeared after treatment with Sialidase S (an α 2,3-specific neuraminidase), these acidic species became resistant to Sialidase S when ST6GalII was co-expressed. This suggests that sialylation of TZMm in the presence of ST6GalII was mostly due to the preferential addition of α 2,6- over α 2,3-sialic acid residues.

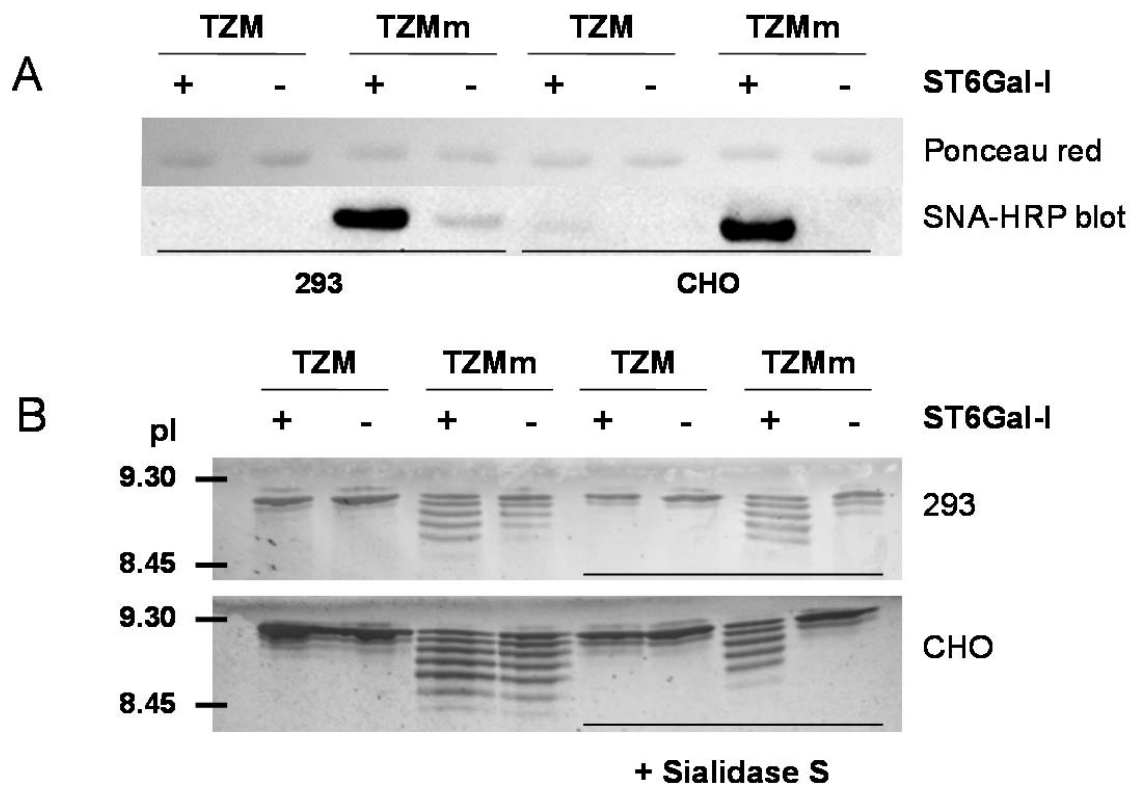


Figure 19 : Impact of ST6GalI expression and F246A mutation on TZM sialylation

Transfected CHO and 293 cultures (with or without ST6GalI) were harvested on day 3 and day 4, respectively and mAbs were purified by protein A chromatography. Panel A – mAbs (300 ng per lane) were resolved by SDS-PAGE (reducing conditions) and submitted to SNA-blotting (only the heavy chains are shown). Panel B – IEF analyses of mAbs from 293 and CHO cells treated or not with Sialidase S (α 2,3-neuraminidase).

Glycans analysis by MALDI-MS spectrometry

After PNGase F digestion of the purified mAbs, oligosaccharides detection was firstly achieved by MALDI-MS directly after non-reductive derivatization with phenylhydrazine (PHN) on the target without using any purification procedure. Despite a presence of side products and salts coming from original buffer, which have generally tendency to suppress signal peaks corresponding to glycans, all samples provided good evidence for the presence of N-glycans. These N-glycans were known to be located on the Fc as Asparagine 297 is the only glycosylation site in our model antibody. The profile differences between the samples in CHO

and 293 were consistent with what was observed by SNA-blot and IEF. The dominant oligosaccharides derived from all Mab samples were observed in positive mode in PHN-derivatized samples at m/z 1575, 1737 and were consistent with bi-antennary core-fucosylated structures with zero and one galactose. Glycan having both antennae occupied with galactoses (m/z 1899) was observed with higher intensity only in TZMm samples without ST6GalI.

The spectra recorded in the negative mode from TZM samples co-expressed with ST6GalI and derivatized with PHN, provided evidence for the presence of small amount of monosialylated glycans structures - NeuAcGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc (Figure 20A & E). Sialylated glycans were clearly detected at higher levels in TZMm samples. TZMm samples co-expressed with ST6GalI in both cell lines (Figure 20C & G) indicated higher sialylation degree than that obtained under control conditions (Figure 20D & H).

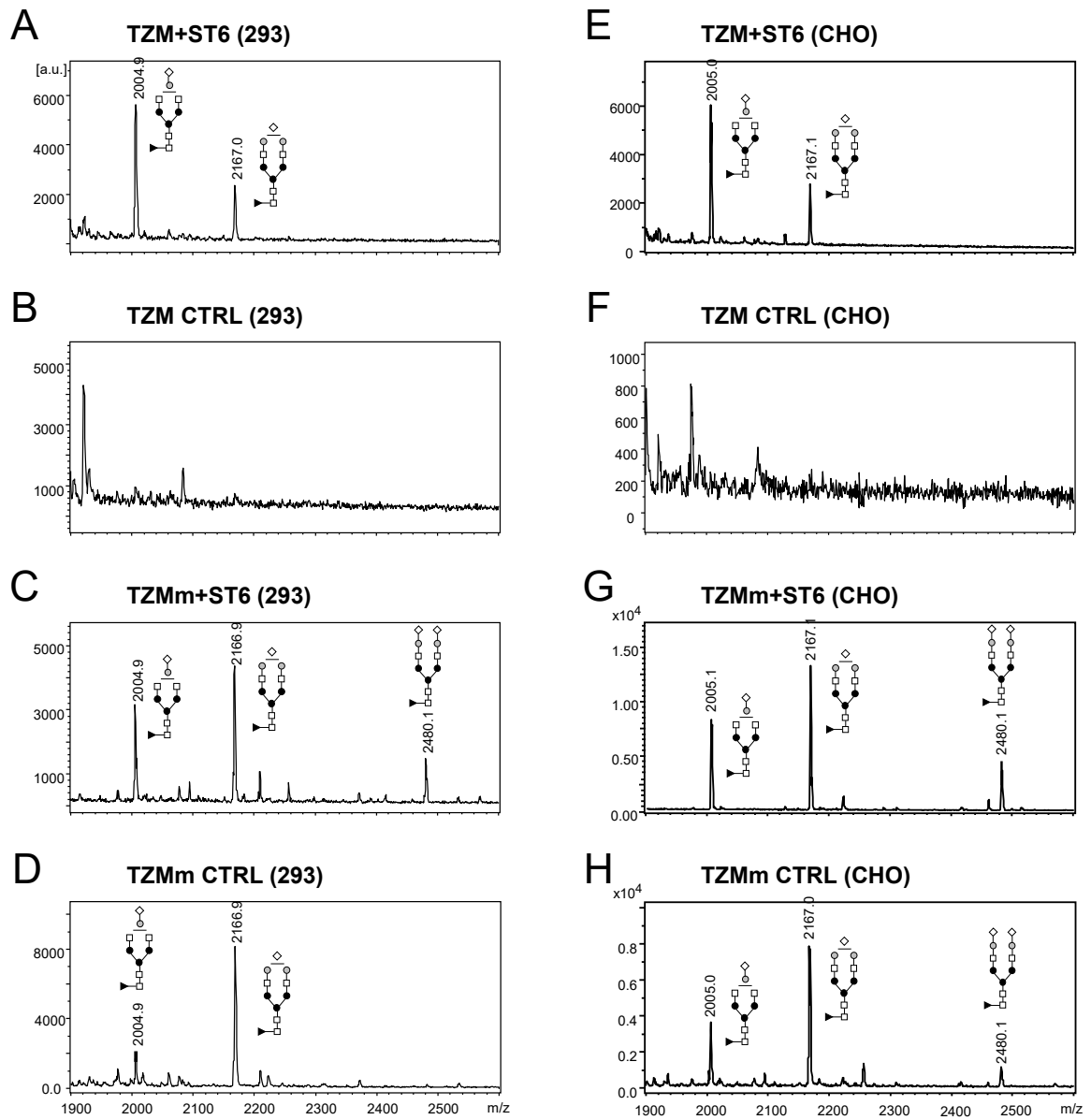


Figure 20 : Glycan analysis by MALDI-MS in negative mode

Negative MALDI-MS spectra of N-glycans obtained after PNGase F digestion and on-target derivatization with PHN (+90 Da) of mAbs from 293 cells (panels A to D) and CHO cells (panels E to H). Monosialylated glycans (m/z at 2005 and 2167) are detected as [M-H]⁻ ions.

The high level of sialylated glycans was even better observed in the fractions obtained after purification prior to derivatization, as shown in Figure 21 which represents MS spectra recorded from TZMm samples produced in 293 cells. Interestingly, this analysis revealed traces of tri-antennary glycans in TZMm that cannot naturally occur in wild-type IgG1, supporting the vision of an open Fc conformation presenting reduced space constraint to the glycosyltransferases.

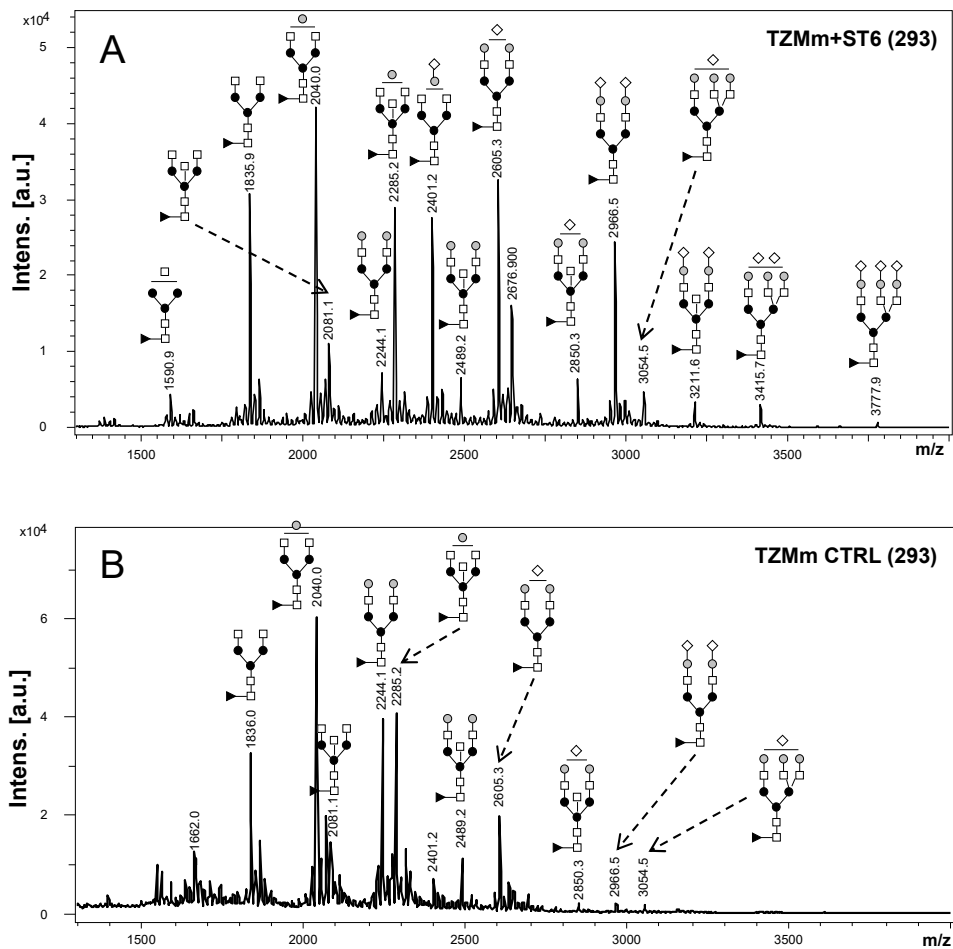


Figure 21 : Glycan analysis by MALDI-MS in positive mode

Positive MALDI-MS spectra of N-glycans recorded after glycans purification and permethylation from PNGase F digested TZMm produced in 293 cells. All glycans are as $[M+Na]^+$.

Intact mass analysis of antibodies by LC-ESI-MS using a Q-TOF2 spectrometer

The intact mass analysis approach allowed us to see the outcome of the pairing of the glycans on the overall glycosylation of the antibodies, and to distinguish with a high resolution between galactosylated and sialylated mAbs glycoforms. The prevalence of agalactosylated and monogalactosylated glycoforms in TZM[±]-ST6 samples in both cell lines was consistent with the glycan analysis by MALDI-MS (Figure 22A). No trace of sialylated antibodies was detected. The close resemblance of the profiles of TZM produced in presence or absence of ST6GalI confirmed the poor sialylation efficacy of the wild-type antibody. In contrast, the association of the Fc F246A mutation with the expression of ST6GalI in CHO cells resulted in a massive conversion of the neutral mAbs into a variety of mono-, di-, tri- and tetra-sialylated antibodies, where the tetrasialylated version was predominant (Figure 22B). The combination of the two approaches in 293 cells, as well as the Fc mutation alone in both cell lines provided intermediary results (not shown).

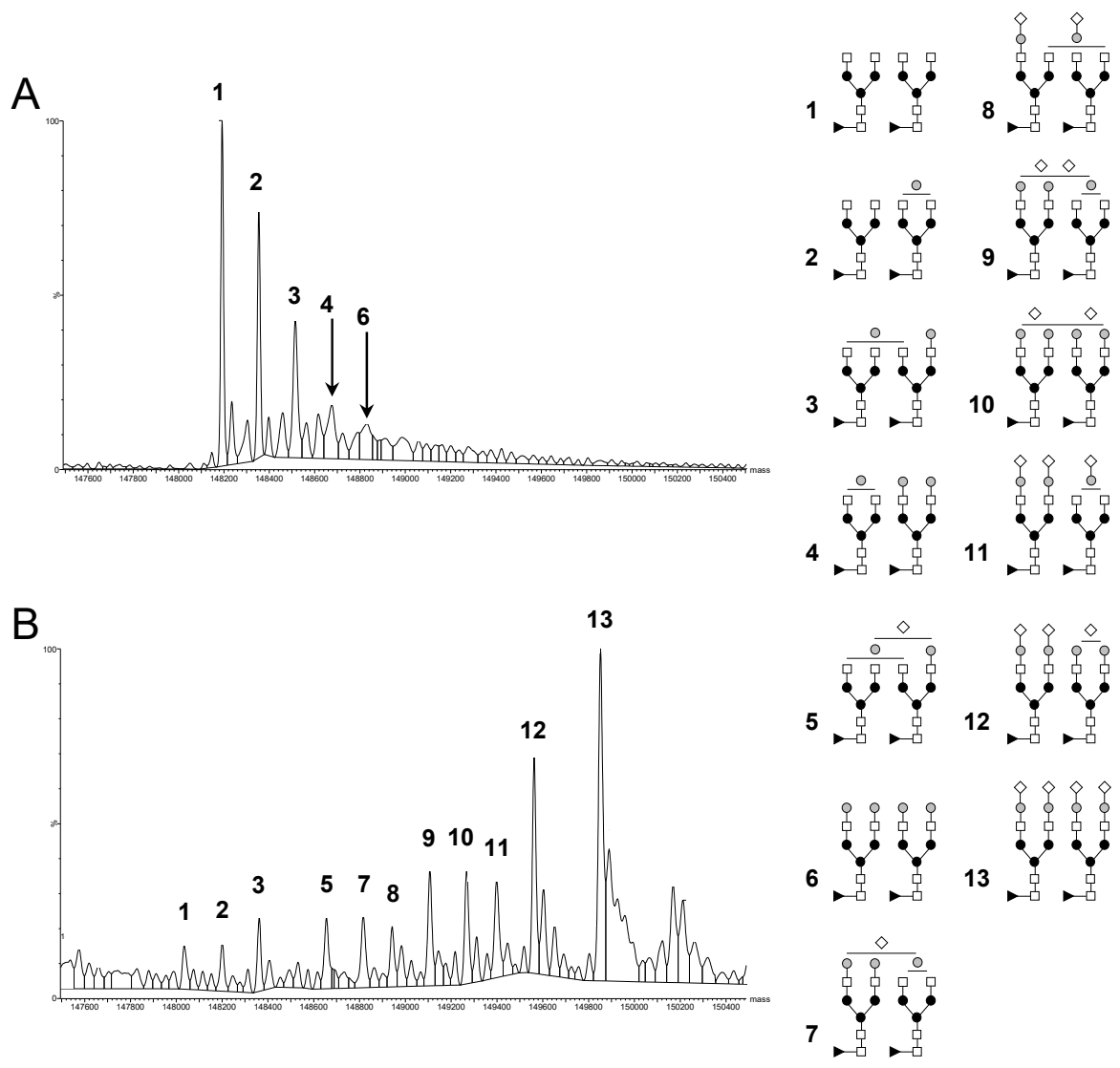


Figure 22 : Intact antibody analysis of mAbs by LC-ESI-MS

Purified mAbs produced in CHO cells were analyzed by LC-ESI-MS on a Q-TOF2 spectrometer as described in Materials and Methods. Panel A: TZM+ST6. Panel B: TZMm+ST6.

Discussion

IVIg are successfully used for the treatment of an increasing number of autoimmune and inflammatory disorders. Their effect results from several distinct mechanisms working together in a complex fashion that is not yet understood. Anti-inflammatory mechanisms of IVIg may involve distinct pathways via FcRn and Fc γ RIIb receptors. Kaneko *et al.* highlighted the implication of the Fc α 2,6-sialylated fraction of IVIg in a murine model of rheumatoid arthritis.³⁵ The production of sialylated IgGs with potentially enhanced specificity and efficacy may provide a safe alternative to IVIg and could also compensate for possible IVIg shortage. The ability to generate highly sialylated IgGs could also help in better understanding their mechanism of action.

Several approaches are used to enhance the sialylation level of recombinant proteins produced in mammalian cell cultures, such as cell line engineering, bioprocess control, post-production enrichment (such as lectin-affinity purification) and *in vitro* glycan remodelling.¹³⁴ In the field of mammalian cell engineering, a variety of approaches were developed. Antisense RNA and short interfering RNA were used in CHO cell lines to knock-down genes encoding for sialidases, leading to a significant increase in total amount of sialic acid in recombinant proteins.^{84,124} Smaller but still significant improvement was achieved by the overexpression of CMP-sialic acid transporter, either alone¹¹⁴ or in combination with CMP-sialic acid substrate.¹¹⁵ Among the variety of approaches, the expression of the ST6GalII gene remains the only way to introduce α 2,6-linked sialic acids on proteins in CHO cells.

The results obtained in this study were very similar to those of Jassal *et al.* on a monoclonal antibody of IgG3 subtype.¹⁹ The replacement of phenylalanine 246, equivalent to F243 in IgG3, by an alanine residue was necessary to reach significant sialylation levels, and the impact of this mutation was much stronger than that of human ST6GalII over-expression in both 293 and CHO cell lines. This confirms that IgG1 Fc structure strongly limits glycan accessibility to the sialyltransferases. The intact mass analysis profile of the mutant co-expressed with ST6GalII in CHO was dominated by the fully sialylated Mab, followed by tri-, di- and monosialylated forms.

Replacing the phenylalanine with an alanine residue decreases the hydrophobic environment that maintains the glycan buried in the Fc. Multiple mutations strategies are a powerful mean to promote glycosylation enhancement and Fc affinity for Fc γ Rs. Computational modelling allows the design of antibodies with amino acids mutations that are not even exposed on the surface of the glycan pocket. However, the accumulation of mutations in a therapeutic Mab can have unpredictable side effects.²⁴³ In the first place, mutation may compromise the affinity of the Mab for potential receptors involved in anti-inflammatory mechanism. Also, non-natural Mab glycan structures (like sialylated tri-antennary glycans) may reduce their biological activity or even render them immunogenic. In a recent study, the CHO ST6GalI gene, present but not expressed, was cloned and stably expressed in these cells.¹²¹ As a result, 70% of the glycans of a stably expressed IgG1 and released by PNGase F were sialylated. This striking result was thought to be conferred by a higher propensity of the CHO ST6GalI gene product for Fc glycan compared to its human or rat homologues, possibly due to some mutations in the substrate binding region. The use of this particular CHO ST6GalI gene may provide an interesting alternative strategy independent of IgG mutation to enhance sialylation of mAbs.

The production of highly sialylated IgGs in large quantities will probably be achieved by the simultaneous use of cell line engineering, Fc engineering, bioprocess control and downstream processing. Alternatively, optimizing *in vitro* glycan remodelling using ST6GalI and CMP-sialic acid may represent another cost-effective way to produce industrial amounts of sialylated IgGs.⁵⁷ In the perspective of safe and reliable alternative to IVIg for anti-inflammatory applications, the production of sialylated recombinant Fc could be an attractive approach. However, developing these molecules as therapeutics awaits a better understanding of their mode of action.

Discussion

Les objectifs de cette partie étaient i) de valider le concept d'augmentation de la sialylation α 2,6 du Fc d'une IgG1 par co-expression transitoire de ST6GalI en 293-6E et CHO3E7, et ii) de choisir la meilleure lignée pour l'expression des IgG sialylées.

L'étude a permis de démontrer que notre construction plasmidique permettait bien d'exprimer une ST6GalI fonctionnelle, puisque le marquage avec la lectine SNA spécifique des α 2,6 sia révèle leur présence dans l'IgG1 mutante F246A co-exprimée avec la ST6GalI dans les deux lignées. L'IEF et le SNA-blot montrent que la sialylation endogène du mutant dans les 293-6E est faible. Dans cette lignée, l'expression de ST6GalI a permis d'augmenter le niveau de sialylation globale du mutant, comme le montrent l'IEF et la spectrométrie de masse. Dans les CHO3E7 en revanche, le niveau de sialylation globale du mutant est similaire avec ou sans ST6GalI, et dans tous les cas plus élevé que dans le 293-6E. Ces résultats sont en adéquation avec les travaux antérieurs.^{117,120}

Les analyses de spectrométrie de masse révèlent que, si le niveau global de sialylation ne varie pas dans CHO3E7, la distribution des glycanes sialylés, elle, est influencée par l'expression de la ST6GalI : on trouve ainsi moins de G2FS1 mais plus de G2FS2 en proportion. Dans les 293-6E, l'augmentation de la sialylation du mutant se traduit par l'augmentation relative des glycanes G1FS1 et G2FS2 par rapport à G2FS1.

Une analyse supplémentaire de spectrométrie de masse du mutant exprimé en 293-6E avec et sans ST6GalI montrant l'ensemble des glycanes (neutres et sialylés), révèle la grande complexité du profil de glycosylation de l'IgG. La présence de glycanes bisectés dans cette lignée ajoute un niveau de complexité qui ne nous apporte rien pour l'étude de la sialylation. De même, le niveau de sialylation α 2,6 endogène des 293-6E est trop faible pour être avantageux, mais suffisant pour compliquer l'évaluation de notre méthode. De plus, la sialylation diminue au cours du temps dans les 293-6E, ce qui est moins évident dans les CHO3E7. Enfin, les CHO permettent un niveau de sialylation du mutant plus élevé que les 293-6E.

Ainsi, malgré des rendements et viabilités légèrement meilleurs en 293-6E, les résultats de sialylation obtenus pour l'IgG F246A nous encouragent à choisir la plateforme CHO plutôt que 293-6E pour la production d'IgG sialylées.

La méthode de production d'IgG sialylées par co-transfection transitoire que nous avons développée dans ce chapitre a permis d'augmenter significativement la sialylation α 2,6 du mutant F246A. En revanche, la sialylation de l'IgG1 native est restée quasi nulle en présence de ST6GalI. Une trace très faible d' α 2,6 sia est décelée sur le SNA-blot de l'IgG1 + ST6GalI en CHO, tandis qu'aucun signal n'est visible dans les 293-6E. Seule l'analyse des glycanes par spectrométrie de masse permet de révéler leur présence, sous la forme des glycanes G1FS1 et G2FS1, dans les deux lignées. L'expression de ST6GalI est donc insuffisante pour permettre une sialylation significative de l'IgG1 native.

L'analyse de l'anticorps natif intact produit en présence de ST6GalI en CHO ne permet pas de détecter la sialylation, ce qui renforce l'idée que les acides sialiques révélés en SNA-blot et spectrométrie des glycanes libres sont à des niveaux très bas. Cette analyse met en évidence la très faible galactosylation de l'IgG1 native, puisque les deux espèces principalement détectées sont l'anticorps complètement agalactosylé (G0F/G0F) et l'anticorps mono-galactosylé (G0F/G1F). Cette observation est en accord avec les profils de glycosylation d'IgG en CHO obtenus par d'autres. Le fait que nous travaillions en transitoire et non sur un clone ayant intégré la ST6GalI permet d'élargir la portée de nos résultats, et renforce l'hypothèse selon laquelle l'équipe d'Onitsuka *et al.* avait isolé un variant clonal avec une galactosylation particulièrement élevée ayant permis à la sialylation de se produire.¹²¹

Ainsi, nos travaux montrent que la mutation F246A est très efficace pour augmenter la sialylation du Fc comme attendu d'après les travaux de Jassal *et al.*¹⁹ Cette mutation, et l'amélioration de l'accessibilité des glycanes qu'elle engendre, permet une meilleure galactosylation du Fc. La riche sialylation du mutant pourrait donc être une conséquence de cette augmentation de galactosylation plutôt que de l'amélioration de l'accessibilité du glycanes. Le travail présenté au chapitre suivant sur les IgG1 native et mutante avec une galactosylation augmentée apportera des éléments de réponse à cette question.

Les différents protocoles d'analyse par spectrométrie de masse utilisés ont apporté des informations différentes et complémentaires sur le profil de glycosylation des anticorps. Ainsi, l'analyse des glycanes libres en MALDI-MS en mode négatif a permis de détailler la nature des glycanes sialylés présents dans les anticorps. Cette méthode est la plus sensible, et a permis de montrer la présence de glycanes sialylés dans les IgG natives co-exprimées avec ST6GalII dans les deux lignées cellulaires, présence non détectée ou incertaine avec l'IEF, le SNA-blot et l'analyse de masse intacte. L'analyse de masse intacte apporte des informations uniques sur l'appariement des glycanes au sein du Fc.

Pourtant, il est important de noter que la corrélation entre les deux techniques de spectrométrie est médiocre. L'exemple qui illustre le mieux cette difficile corrélation est le cas du mutant co-exprimé avec la ST6GalII dans CHO. En effet, l'analyse de glycanes libres indique que le glycanes sialylé majoritaire est le G2FS1. Ce résultat est en contradiction avec les résultats de l'analyse de masse intacte qui montre que la paire de glycanes majoritaire est G2FS2/G2FS2, suivie de la paire G2FS2/G2FS1. D'après ces résultats, nous pouvons déduire que le glycanes majoritaire devrait être le G2FS2.

Des travaux complémentaires de l'équipe de John Kelly ont montré que l'intensité du signal correspondant aux glycanes sialylés était influencée par la taille des molécules analysées. Pour un même anticorps, en l'occurrence notre IgG1 F246A co-exprimée avec ST6GalII dans CHO, Kelly *et al.* ont observé que la quantité relative des glycanes sialylés était plus élevée lors de l'analyse de masse intacte que lors de l'analyse des glycanes libres. En d'autres termes, la charge négative de l'acide sialique induit un biais lors de la détection, qui conduit à une évaluation de la quantité relative de glycanes sialylés erronée ; ce biais reste mal défini et il est difficile de dire laquelle des deux méthodes permet l'évaluation des quantités relatives de glycanes la plus juste. Nous verrons dans le prochain chapitre un protocole de spectrométrie de masse utilisant le glycopeptide Fc/2 (C_H2-C_H3), qui fournit des signaux d'intensité intermédiaire ayant une bonne corrélation avec d'autres techniques, ce qui permettra de réaliser une quantification relative des glycanes avec une plus grande confiance.

Conclusion

Cette première étude nous a permis de valider le principe de l'augmentation de la sialylation par co-transfection transitoire de la protéine d'intérêt avec la ST6GalII humaine. Cette méthode permet l'obtention de l'IgG1 F246A α 2,6 sialylée en moins de deux semaines (expansion cellulaire, transfection, production, purification). Nous avons déterminé que les CHO étaient le meilleur système d'expression pour les anticorps sialylés car elles permettent un meilleur compromis rendement/sialylation et facilitent l'évaluation de notre méthode.

De plus, nos essais ont mis en relief la nécessité d'augmenter le niveau de galactosylation des IgG1 natives afin de permettre leur sialylation. Ils ont aussi permis de soulever la question des rôles respectifs de l'agalactosylation et de la conformation du Fc dans la faible sialylation des IgG1. Dans la suite de nos travaux, nous nous attacherons donc à augmenter le niveau de galactosylation de l'IgG1 native afin de permettre sa sialylation, et à interroger les rôles de la conformation du Fc et de cette sous-galactosylation dans la sialylation limitée des IgG.

IV. Sialylation d'une IgG1 native

Introduction

Nous avons vu au chapitre précédent l'échec de la sialylation $\alpha 2,6$ d'une IgG1 native par la seule expression de ST6GalII en CHO. Le premier objectif de l'étude présentée dans ce chapitre demeure donc l'obtention d'IgG1 riches en Sia $\alpha 2,6$. Après avoir validé le principe de la co-expression transitoire de ST6GalII en CHO pour l'expression d'une IgG1 mutante $\alpha 2,6$ -sialylée, et avoir mis en évidence le manque de galactosylation comme un obstacle à la sialylation de l'IgG1 native, nous avons entrepris d'ajouter un plasmide codant pour la $\beta 1,4$ -galactosyltransférase I humaine (GThu) lors de la transfection, avec l'hypothèse que la co-expression transitoire de l'IgG1 avec GThu et ST6GalII ensemble conduirait à l'obtention d'IgG1 $\alpha 2,6$ -sialylées.

Comme pour la première phase du projet, nous devons tout d'abord vérifier que l'expression transitoire de GThu permet d'augmenter la galactosylation de l'IgG1 native en CHO, puis que l'expression combinée de GThu et ST6GalII permet d'en augmenter la sialylation $\alpha 2,6$.

Ensuite, il s'agira de répondre à des interrogations sur les caractéristiques des glycanes sialylés produits par notre système. La première interrogation concerne le type de glycanes sialylés qui sera obtenu. Dans une revue publiée en 2007, Arnold *et al.* ont indiqué que l'on trouve parmi les IgG en circulation 11% de G2FS1 et 4% de G2FS2. Dans un article paru également en 2007, Wuhrer *et al.* trouvent pour les IgG1 de deux personnes saines 12 à 20% de G2FS1, 2% de G1FS1, et pas de G2FS2.^{51,122} Les IgG1 sialylées humaines arborent le glycanes G2FS(6)1 en majorité.^{143,144} Peu de données existent sur ce glycanes, pourtant le plus pertinent du point de vue physiologique.

G2FS2, dans sa forme di- $\alpha 2,6$ -sialylée G2FS(6,6)2, conférerait les propriétés anti-inflammatoires aux IgG.^{138,143,170} Ces deux glycanes sont susceptibles d'être obtenus dans notre système, mais supposent que la galactosylation soit totale.

Le glycane G1FS1, avec une galactosylation partielle, est a priori indésirable bien que presque aucune donnée n'existe sur son impact sur les fonctions des IgG ; nous l'avons observé précédemment dans l'IgG1 F243A et à l'état de trace dans l'IgG1 native, lors de leur co-expression avec ST6GalI seule.

La deuxième interrogation concerne le type de liaison de l'acide sialique qui sera obtenu. En effet, dans l'hypothèse où l'expression de GThu conduirait à une forte augmentation de galactose disponible pour les ST, nous nous trouverons dans un système où ST3cho et ST6GalI seront en compétition pour le substrat galactosylé.⁷⁸ Dès lors, la question des proportions de Sia α 2,3 et α 2,6 dans les IgG1 produites va se poser.

L'analyse et la comparaison des glycoprofiles obtenus par co-expression des deux enzymes séparément ou ensemble avec l'IgG1 fourniront des indications sur les sélectivités (glycane préféré comme substrat) et régiosélectivités (branche du glycane préférée) des glycosyltransférases. Ces données seront intéressantes pour évaluer les raisons de la limitation de la sialylation en termes de disponibilité de substrats. De plus, l'analyse croisée des glycoprofiles obtenus dans les mêmes conditions pour l'IgG1 et l'IgG1 F243A apportera des informations sur la limitation de l'élongation des glycanes en termes de conformation du Fc. Le deuxième objectif de cette partie est de proposer à partir de cette analyse une réflexion sur les rôles respectifs de la conformation du Fc et de la limitation en galactose dans la faible sialylation des IgG en CHO. Cette réflexion ouvrira des questions sur les jeux de coopération/compétition des glycosyltransférases endogènes et exogènes.

Méthodologie

Production des anticorps

La production des anticorps a été réalisée dans les CHO 3E7 selon la méthode établie au chapitre précédent. Ses principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principales caractéristiques de la méthode de production d'IgG sialylées

| | |
|--|---|
| Système d'expression | cellules CHO3E7 |
| Transfection | directe ; agent de transfection : PEI _{max} (déacétylé, linéaire 25 kDa) |
| co-transfection | HC, LC, G _{Thu} , ST6GalI, GFP |
| proportions des plasmides dans le mix de transfection en poids | HC:LC 4:6, (HC:LC):GT 98:2, ((HC:LC):GT):ST6GalI 8:2, tout:GFP 95:5 |
| concentrations ADN et PEI | ADN 1,5 µg/mL de culture ; PEI 7 µg/mL de culture |
| Production | transitoire, batch ; 37°C avec passage à 32°C un jour post-transfection (jpt) ; récolte 4 jpt |

Les quantités relatives de plasmides codant pour la HC, la LC, et la ST6GalI établies au chapitre précédent sont utilisées ici. En complément, nous déterminerons dans ce chapitre la quantité optimale de plasmide codant pour G_{Thu} à incorporer dans le mélange d'ADN de transfection.

Analyse de la glycosylation

De nouvelles stratégies de caractérisation ont été déployées. Les lectines-blots ont été conservés, mais des améliorations ont été apportées sur les autres méthodes d'analyse : IEF, et spectrométrie de masse. Enfin, une nouvelle méthode a été introduite : l'analyse des glycanes libres par chromatographie d'affinité (HILIC).

IEF

Nous sommes passés de l'IEF sur gel à l'IEF capillaire (cIEF), qui possède une meilleure résolution. Le cIEF a été réalisé sur un appareil LabChip® GX qui propose une fonction d'électrophorèse capillaire avec élution par gradient de pH développée spécifiquement pour l'analyse des anticorps. Le résultat de l'analyse est un

électrophérogramme qu'il est possible de présenter au format « gel », c'est-à-dire que la hauteur de chaque pic détecté est convertie en densité de noir sur un fond blanc, ce qui ressemble au rendu d'un IEF classique réalisé sur gel. Une illustration de ce principe est présentée sur la Figure 23. Nous avons choisi ce mode de présentation des données car il permet une comparaison visuelle très aisée des profils de charge obtenus pour chacun des échantillons.

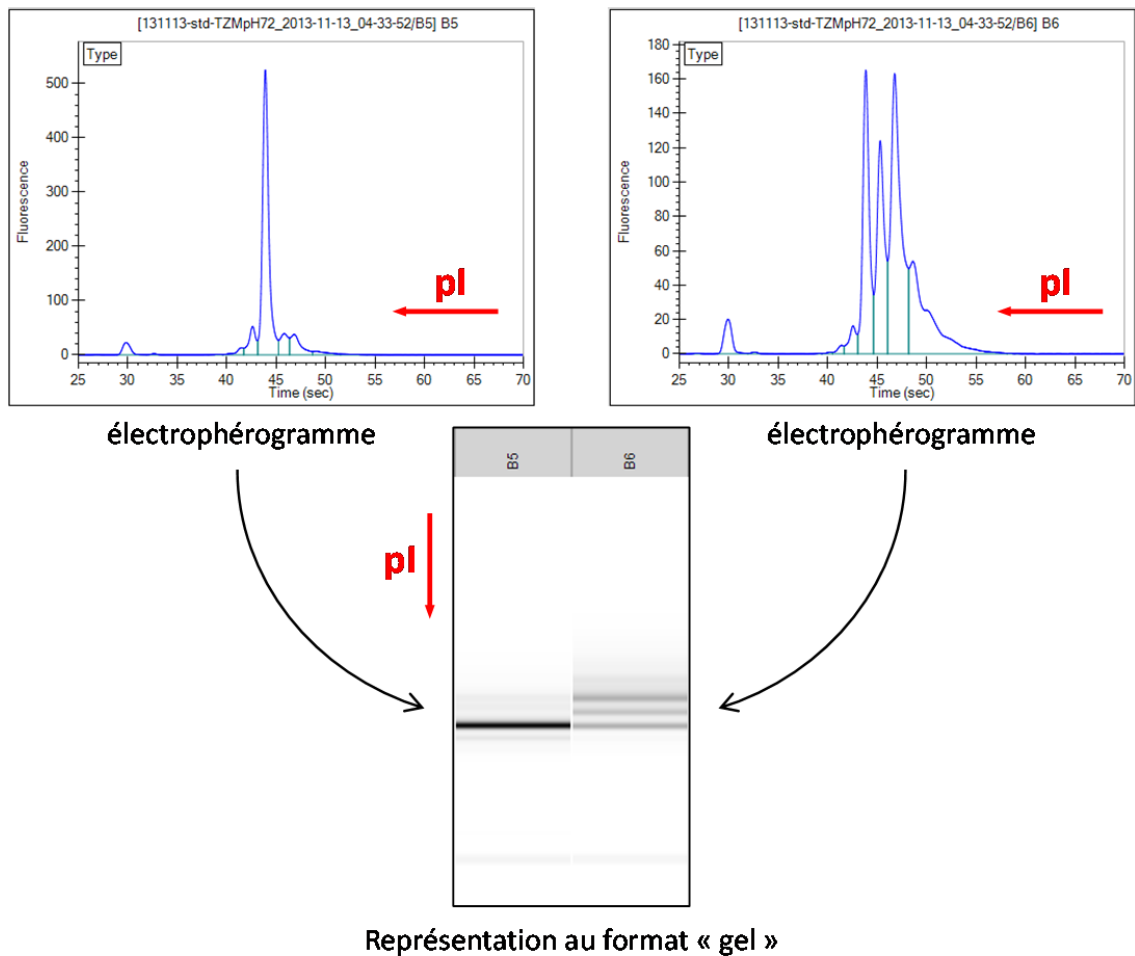


Figure 23 : Représentation des données de variants de charge recueillies avec le LabChip® GX

Les électrophérogrammes sont convertis au « format gel » afin de faciliter la comparaison des échantillons. La comparaison aisée était un atout des IEF classiques réalisés sur gel tels que nous les avons faits au chapitre précédent.

Spectrométrie de masse

Un nouveau protocole de spectrométrie de masse a été introduit : l'analyse ESI-MS du glycopeptide Fc/2 obtenu par digestion de l'IgG avec l'enzyme IdeS. Nous avons fait appel à l'équipe de Michael Butler de l'Université du Manitoba pour intégrer une analyse des glycanes libres par HILIC. La mise en parallèle des résultats de la méthode d'analyse de Fc/2 par ESI-MS et de glycanes libres par HILIC a permis de progresser dans l'interprétation des deux méthodes et d'augmenter la confiance dans la précision de l'évaluation de la glycosylation de nos IgG.

Contribution de chacun des auteurs

Céline Raymond – De nouveau, j'ai défini le sujet et les limites de l'étude ; réalisé la bibliographie sur le sujet ; déterminé et réalisé les expériences pour le développement de la méthode de production ; réalisé les gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie, lectine-blots, IEF capillaire (cIEF), digestions avec sialidases et analysé les résultats ; défini les paramètres de la méthode de production ; coordonné conjointement avec mon directeur la collaboration avec les équipes de spectrométrie de masse et de HILIC ; analysé les résultats obtenus par les équipes de spectrométrie de masse ; déterminé l'attribution des pics des chromatogrammes de HILIC aux glycanes sialylés conjointement avec Maureen Spearman ; réalisé les modèles de glycosylation dans les CHO après analyse des résultats ; écrit le manuscrit.

Anna Robotham a participé au développement du protocole d'analyse de du glycopeptide Fc/2 par spectrométrie de masse ESI-MS dans le laboratoire de John Kelly. Elle a réalisé l'analyse des échantillons et attribué les glycanes à chacun des pics détectés. Elle a réalisé un rapport d'analyse.

Maureen Spearman a participé au développement de la méthode d'analyse des glycanes libérés par digestion avec la PNGase F par HILIC dans le laboratoire de Michael Butler.

Michael Butler a supervisé l'analyse des échantillons par HILIC.

John Kelly a initié et supervisé le développement du protocole d'analyse de Fc/2 par spectrométrie de masse ESI-MS et l'analyse de nos échantillons.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude, validé le sujet, ses limites, les résultats et leur analyse. Il a relu et corrigé le manuscrit, avant d'envoyer la version finale aux équipes de spectrométrie de masse et HILIC pour validation.

Production of α 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells

Article publié dans mAbs, Volume 7, Issue 3, DOI 10.1080/19420862.2015.1029215

Céline Raymond^{1,2}, Anna Robotham³, Maureen Spearman⁴, Michael Butler⁴, John Kelly¹ and Yves Durocher^{1,2}

¹Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council of Canada; Montreal, Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine; University of Montreal; Montreal, Canada

³Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council of Canada; Ottawa, Canada

⁴Department of Microbiology; University of Manitoba; Winnipeg, Canada

Keywords: N-glycosylation, sialylation, IgG1, CHO cells, transfection, SIAT1, B4GALT1

Abstract

The presence of α 2,6-sialic acids on the Fc N-glycan provides anti-inflammatory properties to the IgGs through a mechanism that remains unclear. Fc-sialylated IgGs are rare in humans as well as in industrial host cell lines such as Chinese hamster ovary (CHO) cells. Facilitated access to well-characterized α 2,6-sialylated IgGs would help elucidate the mechanism of this intriguing IgG's effector function. This study presents a method for the efficient Fc glycan α 2,6-sialylation of a wild-type and a F243A IgG1 mutant by transient co-expression with the human α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6) and β 1,4-galactosyltransferase 1

(GT) in CHO cells. Overexpression of ST6 alone only had a moderate effect on the glycoprofiles, whereas GT alone greatly enhanced Fc-galactosylation, but not sialylation. Overexpression of both GT and ST6 was necessary to obtain a glycoprofile dominated by α 2,6-sialylated glycans in both antibodies. The wild-type was composed of the G2FS(6)1 glycan (38%) with remaining unsialylated glycans, while the mutant glycoprofile was essentially composed of G2FS(6)1 (25%), G2FS(3,6)2 (16%) and G2FS(6,6)2 (37%). The α 2,6-linked sialic acids represented over 85% of all sialic acids in both antibodies. We discuss how the limited sialylation level in the wild-type IgG1 expressed alone or with GT results from the glycan interaction with Fc's amino acid residues or from intrinsic galactosyl- and sialyl-transferases substrate specificities.

Introduction

The efficacy of many therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) relies on their Fc-dependent effector functions.^{163,244,245} For example, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC) are triggered when the Fc domain interacts with the Fc γ receptors (Fc γ R) present at the surface of immune cells or the complement molecule C1q, respectively. The Fc domain of immunoglobulin (Ig) G possesses two N-glycans, one on each heavy chain (HC) at Asparagine 297, which are necessary for its binding to Fc γ Rs^{51,176,246} or C1q.^{247,248}

N-glycosylation is a very common co-translational modification initiated in the endoplasmic reticulum (ER) and completed in the Golgi apparatus. While the antibody progresses in the secretory pathway, the monosaccharide chains are sequentially trimmed and elongated by glycosyltransferases distributed along the ER and Golgi compartments. Glycan modifications happening in the Golgi typically occur when the protein quaternary structure is established. While N-glycans are normally exposed at the surface of the proteins, the Fc N-glycans lie within a pocket formed by the two C_H2 domains of the antibody where they interact with internal amino acid residues through hydrogen and CH- π bonds.^{21,23,249} As a consequence of this embedment, the Fc N-glycans are mostly limited to di-antennary complex type with partial galactosylation and low sialylation. The most common glycan on circulating human IgGs is a fucosylated complex structure with one galactose (G1F), followed by

fucosylated complex glycans with 0 and 2 galactoses (G0F and G2F) (Figure 24). In addition, 10-20% of IgGs are sialylated (mostly G2FS1).^{122,149,250}

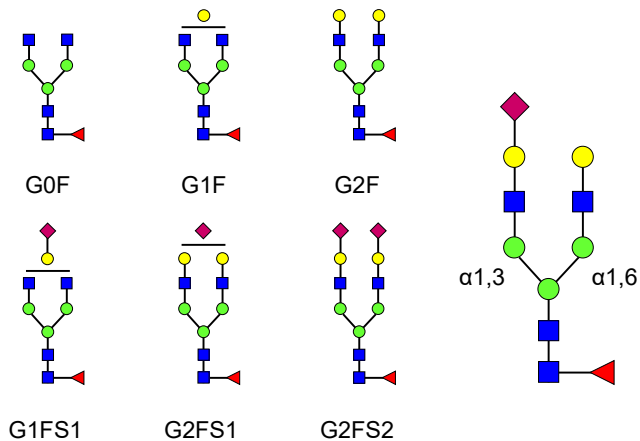


Figure 24 : Complex biantennary N-linked glycan structures found in the Fc domain of IgGs

All complex glycans are composed of four N-acetylglucosamine residues (GlcNAc, blue squares), and three mannose residues (green circles). G0, G1, G2 indicate 0, 1 or 2 galactose residues (yellow circles). F indicates the presence of a core-fucose residue (red triangle). S1 and S2 indicate mono- and di-sialylated glycans (sialic acids are represented as purple diamonds). The sialic acid linkage type is indicated when required in parentheses: G1FS(3)1 and G1FS(6)1 designate G1FS1 carrying either a α 2,3- or a α 2,6-linked sialic acid, respectively. Similarly, G2FS1 may be G2FS(3)1 or G2FS(6)1. G2FS(3,3)2, G2FS(3,6)2 and G2FS(6,6)2 designate G2FS2 carrying two α 2,3SA, one α 2,3SA and one α 2,6SA, or two α 2,6SA, respectively. α 1,3 and α 1,6 designate the linkage types of the core mannose residues, and by extension refer to the branches initiated by these residues: the α 1,3-arm and the α 1,6-arm, respectively.

The Fc glycan structure of an IgG impacts its effector functions. For example, core-fucosylation has been shown to decrease Fc binding to Fc γ R1IIa,^{174,176,179} which significantly reduces ADCC.^{26,27} In addition, the presence of terminal galactose has been shown to induce conformational changes in the Fc domain,²¹ increasing Fc binding to C1q which promotes CDC.^{180,187} However, the effect of galactosylation on Fc γ R1IIa binding or ADCC is unclear.^{176,180,187} The impact of the presence of terminal sialic acid residues is also

uncertain.^{35,36,160,195,196,198,200,212,217} Indeed, the discrepancies in the methods used for evaluating biological activity, the variability in the type and level of sialylation, as well as the lack of a systematic in-depth glycan characterization, all contribute to the ambiguity of its role in IgG functions. In humans, sialic acids can be attached to the Fc-glycans either on the C3- or the C6-hydroxyl group of the terminal galactose, through the action of α 2,3-sialyltransferases (ST3) or the α 2,6-sialyltransferase-1 (ST6).²⁵¹ Although Fc-sialylation in circulating human IgGs is generally believed to be mainly – if not only – of α 2,6 type,^{19,51,143-145,252} the impact of Fc sialylation on IgG's ADCC was only tested using antibodies bearing exclusively α 2,3-linked sialic acids (α 2,3SA).³⁶ Contradictory results were also reported on sialylated Fcs' ability to bind Fc γ RIIIa, but using dissimilar IgG preparations and affinity measurement protocols.^{35,160} In other studies assessing the anti-inflammatory properties of α 2,6-sialylated IgGs,^{35,195,198,217} blood-derived or recombinant antibodies were enriched by affinity chromatography using *Sambucus Nigra agglutinin*-resins that were shown to catch mainly IgGs bearing Fab-sialylated glycans to the detriment of Fc-sialylated species.^{144,198,253} While the specific involvement of Fc's α 2,6-sialylation in anti-inflammatory activity was shown by Anthony *et al.* in their model,¹⁴³ which receptor the sialylated Fcs are targeting remains controversial.^{195,200,212} A method for the rapid production of IgGs with physiological and well-characterized α 2,6-sialylated Fc would thus greatly help to better characterize their mechanism of action.

Approaches developed to enhance sialylation of IgG's Fc-glycans fall into three major categories: 1) *in vitro* enzymatic glycan remodeling of purified antibodies, 2) engineering of Fc amino-acid sequence, or 3) cell engineering through the over-expression of glycosyltransferases. The *in vitro* enzymatic addition of galactose and sialic acid residues on purified mAbs was shown to be effective, but requires several 24 hour-cycles of reaction, substantial amounts of costly recombinant enzymes and substrates, and an additional purification step.^{57,134,143} Single amino acid mutations in the Fc, such as the replacement of the phenylalanine 243 by an alanine that disrupts the glycan-CH2 domain interaction,^{14,19} were shown to allow enhanced galactosylation and sialylation, reinforcing the hypothesis that glycan embedment and interaction with the Fc structure may limit its access to some glycosyltransferases. However, amino acid substitutions lying far away from the glycan were

also shown to affect glycosylation and receptor binding.^{243,254} The very high number of potent mutations and the possibility that the mutations themselves rather than the resulting altered glycan structure may affect antibody function render the understanding of Fc glycan structure/function a complex task.¹⁶⁰

Most cell engineering efforts directed toward altering glycosylation have focused on the manipulation of Chinese hamster ovary (CHO) cell lines because they are widely used for the manufacturing of therapeutic mAbs.²⁵⁵ Their glycosylation machinery is very similar to that of humans, but they lack a functional ST6, limiting their sialylation capability to the addition of α 2,3SA residues.²⁵⁶ Moreover, IgGs produced in CHO cells appear to be severely hypogalactosylated.¹⁴ The stable expression of human ST3 and β 1,4-galactosyltransferase 1 (GT) together with a tumor necrosis factor receptor-IgG1 (TNFR-IgG1) fusion protein, allowed increased sialylation,¹¹⁶ but the highly-branched and highly-sialylated TNFR N-glycans did not allow clear assessment of Fc sialylation. In another study, the untranslated ST6 gene present in the CHO genome was cloned and reinserted, providing a functional ST6, which led to a good enhancement of IgG's sialylation, but the growth and viability of the CHO cells expressing ST6 were significantly affected.¹²¹ Finally, it was shown that the co-expression of a rat ST6 with a mutant F243A IgG3 did not increase the overall Fc sialylation level, but rather resulted in a α 2,6: α 2,3 sialic acid ratio of 0.9:1.¹⁹ Interestingly, this work also showed that the α 2,3-sialylated F243A mutant had no affinity for Fc γ RI, Fc γ RII, and C1q, while the same mutant containing 50% of α 2,6SA residues showed affinity for these receptors similar to that of the wild-type IgG3, highlighting the importance of properly determining the type of sialic acid linkage.

In this study, we developed a method for the fast production of α 2,6-sialylated IgG1 by transient co-expression of human GT, ST6 and IgG1 in CHO cells. The mAbs used as models were the humanized Trastuzumab (TzM) IgG1 antibody possessing a human Fc, and its F243A mutated version. The effect of co-expressing GT, ST6, or both on Fc glycans was analyzed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS). The nature of the sialic acid linkage was assessed by sequential sialidase digestions followed by capillary zone electrophoresis isoelectric focusing (cIEF), and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). We showed that significant levels of

physiologically relevant monosialylated glycan, as those found on circulating human IgGs, were found on TzM Fc following the co-expression of GT and ST6. Comparison of the wild-type and F243A mutant glycoprofiles suggests that glycan interaction with F243 hampers the action of CHO and human GT as well as ST6. Also, our data indicate that the overexpression of human GT and ST6 in CHO cells significantly favors α 2,6-sialylation over α 2,3-sialylation.

Results

Production of sialylated antibodies

TzM was expressed by co-transfection of two plasmids, one coding for the HC and the other coding for the light chain (LC). A HC:LC ratio of 2:3 (w:w) was used to ensure optimal expression of the mAb in CHO-3E7 cells as determined in a previous work.²⁵⁷ The human membrane-associated beta-1,4-galactosyltransferase 1 (GT) and beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6) were co-expressed with the mAbs to enhance galactosylation or α 2,6-sialylation of the Fc. The quantity of GT-encoding plasmid necessary to achieve maximal galactosylation of the Fc was first assessed. Between 0.5% to 10% (w:w) of GT plasmid was incorporated into the DNA mix, for a final DNA concentration of 1 μ g per mL of culture to be transfected. The extent of Fc glycan galactosylation was determined by lectin-blot using the *Erythrina cristagalli* lectin (ECL) that specifically detects terminal galactoses. The blot showed that 2% of GT encoding plasmid was sufficient to allow maximal galactosylation of the HC (Figure 25A). The assay was repeated with a 98:2 (w:w) TzM:GT plasmid ratio and various amounts of the ST6 encoding plasmid. The *Sambucus nigra* lectin (SNA) was used to evaluate α 2,6-sialylation. As previously reported, 20% of ST6 plasmid in the transfection mix was optimal for HC sialylation (Figure 25B).²⁵⁷ The DNA mix composition selected was thus 2% of GT plasmid and 20% of ST6 plasmid (Figure 25A-B). Next, we assessed the optimal harvest time that produced the highest α 2,6-sialylation level of the Fc. HC α 2,6-sialylation was monitored by SNA-blot from two days post-transfection (dpt) until day 9 post-transfection where cell viability dropped to ~40%. The cultures were shifted from 37 °C to 32 °C at 1 dpt to delay cell death and increase production yields.⁸⁹ The harvest time was set at 4 dpt to get an optimal Fc sialylation while allowing for acceptable TzM yields of ~15-20 mg/L after protein-A purification (Figure 25C).

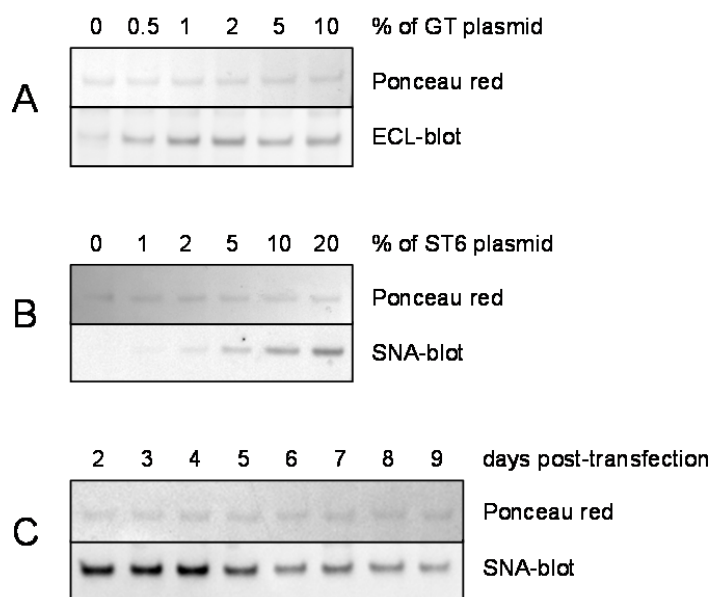


Figure 25 : Lectin-blot analyses of TZM from culture supernatants

Various amounts of glycosyltransferases and harvest time were tested for optimal galactosylation and sialylation of the Fc. The lectin-blots show the mAbs' heavy chain (reducing gels). Ponceau red staining was used to control the protein load. Panel A: Co-expression of TZM and GT. The DNA mix was composed of 0% to 10% in weight of GT encoding plasmid, the rest being a 6:4 mixture of plasmids coding for TZM light and heavy chains. ECL was used to detect terminal galactosylation. Panel B: Co-expression of TZM, GT and ST6. The DNA mix was composed of 2% of GT plasmid with 0% to 20% of ST6 coding plasmid, the rest being a 6:4 mixture of plasmids coding for TZM light and heavy chains. SNA was used to detect terminal α 2,6-sialylation. Panel C: HC α 2,6-sialylation level from day 2 to day 9 post-transfection.

Antibody characterization by lectin-blot and cIEF

These optimal conditions were scaled up to 500 mL cultures to produce milligrams of TZM expressed alone or co-expressed with GT, ST6 or both (designated GT, ST6 or GTST6, respectively). The TZM containing the F243A substitution (TZMm) was also produced under the same conditions. All antibodies were obtained at yields of ~15-20 mg/L. Following protein-A purification, the sialylation levels were first evaluated by cIEF and lectin-blotting.

Figure 26A shows that TZM IEF profile was defined by a main charge variant flanked by very low amounts of two basic variants and two acidic variants. A non-glycosylated version of TZM, the N297Q mutant, exhibited the same profile, showing that the basic and acidic variants were not due to Fc glycan. In contrast, TZMm exhibited high levels of acidic variants. Its desialylation by an α 2,3SA-specific sialidase (sialidase S) resulted in the complete loss of these acidic variants, confirming that appearance of these acidic variants on cIEF is the consequence of sialylation. Interestingly, TZMGT and TZMST6 showed the same cIEF profile as TZM, whereas TZMGTST6 and the four TZMm samples (+/- GT and/or ST6) had patterns differing in number, pI and intensity of acidic variants (Figure 26B panel 1). SNA-blotting confirmed the presence of α 2,6SA in TZMGTST6, TZMmST6 and TZMmGTST6, but no signal was detected in TZMST6, supporting IEF results (Figure 26B panel 2). *Maackia amurensis* lectin II (MALII)-blotting was then used to detect endogenous CHO α 2,3-sialylation, which was only detectable in the four TZMm samples. The strongest signal was obtained when TZMm was expressed alone (Figure 26B panel 3), declined when GT or ST6 were co-expressed, and became almost undetectable in the presence of both GT and ST6. Finally, the presence of terminal galactose residues was assessed using the *Erythrina cristagalli* lectin (Figure 26B panel 4). No or only barely detectable ECL signal was detected when TZM or TZMm were expressed alone or co-expressed with ST6. However, a strong signal appeared when both mAbs were co-expressed with GT, indicating efficient galactosylation. The ECL signal was significantly reduced when TZM was co-expressed with GT and ST6 while it completely disappeared in the case of TZMmGTST6, indicating efficient sialylation by ST6.

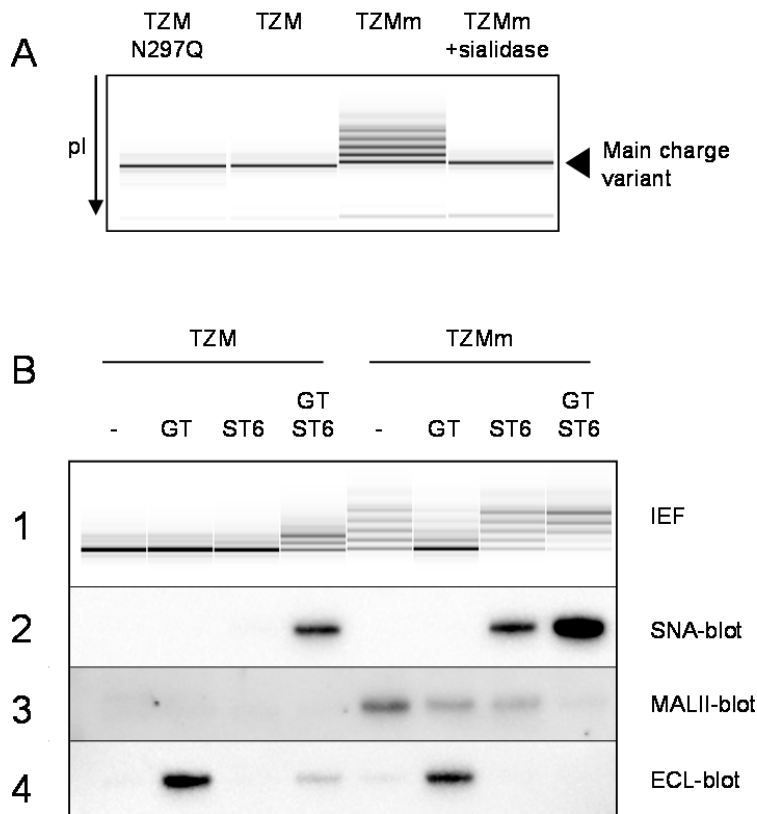


Figure 26 : Capillary IEF (cIEF) electropherograms of TZM constructs

Panel A: The cIEF profile of TZM is composed of a main charge variant and traces of acidic and basic variants. These traces are not the result of glycosylation since the non-glycosylated mutant TZM N297Q has an identical profile. In contrast, the acidic variants of TZMm are the result of sialylation. Panel B1: cIEF profiles of purified TZM and TZMm expressed alone or in the presence of GT, ST6, or both. Panel B2-4: Lectin-blots showing the α 2,6-sialylation, α 2,3-sialylation and terminal galactosylation levels of TZM heavy chain as revealed by SNA, MALII and ECL, respectively.

Glycan analyses by mass spectrometry

To confirm these observations and describe further the effect of the F243A mutation and co-expression of glycosyltransferases on TZM glycoprofiles, the antibodies were submitted to LC-ESI-MS analysis. They were first digested by the immunoglobulin-degrading enzyme from *Streptococcus pyogenes* (IdeS), which cleaves the antibody into a F(ab')₂ fragment and two Fc/2 (C_H2-C_H3) glycosylated polypeptides. The molecular weight profiles obtained for the Fc/2 glycopeptides by LC-ESI-MS are shown in Figure 27 and their relative intensities are presented in Table 5. For each mAb, the relative peak intensities were used to calculate the relative number of branches terminated by a given monosaccharide residue among the complex glycans (Table 6). Non-glycosylated Fc/2 peptides were not detected in any of the eight conditions, confirming the full occupancy of the N297 glycosylation site in all antibodies.

TZM showed the classical glycoprofile of CHO-produced IgG1, i.e., a large majority of fucosylated non-galactosylated glycans (G0F, 54.4 ± 1.9%), followed by monogalactosylated glycans (G1F, 31.4 ± 2.1%) and small amounts of fully galactosylated glycans (G2F, 5.1 ± 0.1%) (Figure 27A, Table 7). As suggested by the cIEF and lectin-blot results, ST6 expression had negligible effect on TZM glycan (Figure 27B); only small amounts of the mono-sialylated species G1FS1 and G2FS1 (5.8 ± 0.7% and 2.7 ± 0.7%, respectively) were obtained (Table 7). To estimate the sialylation efficiency independently of the composition of the glycan pool, we expressed the sialylation level in relative number of antennae carrying a sialic acid among the complex glycan branches, i.e., excluding high-mannose and hybrid glycan branches (see the Materials and Methods Section for the formula employed). We found that only 4.8 ± 0.1% of the complex antennae were terminated by a sialic acid in TZMST6 (Table 6). However, expression of GT dramatically modified TZM glycoprofile as seen on the m/z profile (Figure 27C); G2F became the predominant glycan (44.8 ± 2.1%), and the percentage of complex antennae terminated by a galactose increased from 22.7 ± 0.4% in TZM to 66.4 ± 1.2% in TZMGT (Table 6). Although it could not be seen by cIEF and lectin-blot analyses, the presence of terminal sialic acid was detected at low level (4.6 ± 0.6% of glycans), despite the abundance of terminal galactose residues available for the CHO endogenous ST3 enzyme. Upon co-expression of both GT and ST6, the amount of G2F

significantly decreased compared to TZMGT ($20.9 \pm 2.9\%$ vs $44.8 \pm 2.1\%$) while G2FS1 increased to $32.0 \pm 1.0\%$, becoming the major glycan found in TZMGTST6 sample (Figure 27D, Table 7). However, only a little amount of G2FS2 was detected ($6.6 \pm 0.8\%$). In contrast with the TZM produced in the other three conditions, where less than 5% of the complex glycan branches were sialylated, up to $25.4 \pm 0.2\%$ of the complex glycan branches were terminated by a sialic acid in TZMGTST6 (Table 6). These results confirmed that both GT and ST6 were necessary to raise sialylation of the wild-type TZM to high levels as previously suggested by the cIEF analysis.

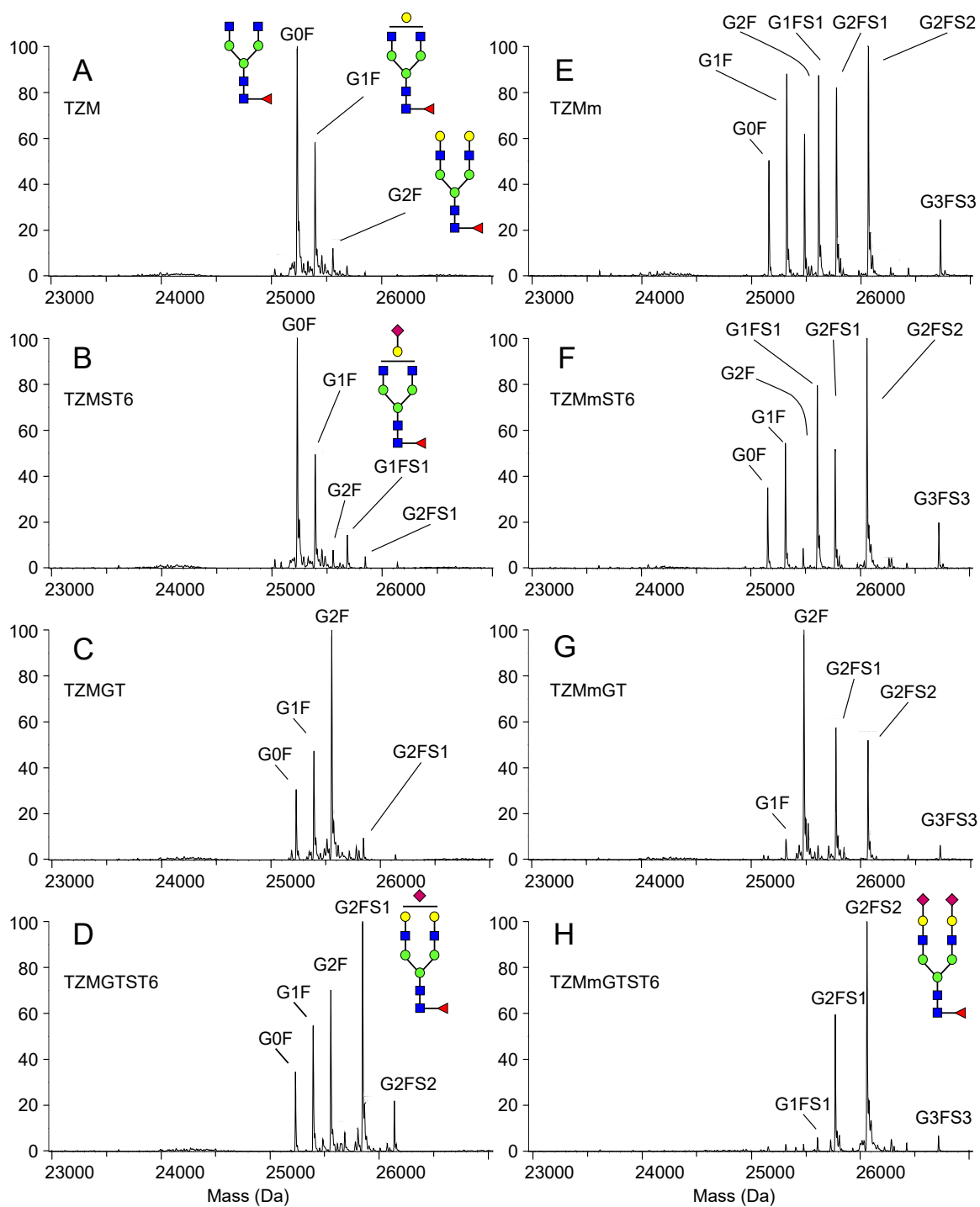


Figure 27 : Fc/2 molecular weight profiles obtained by LC-ESI-MS analysis

The analysis was performed on two independent batches. Secondary peaks were detected at +16 Da for all glycopeptides and were considered to be caused by oxidation.

Table 5: Fc glycan composition of the wild-type TZM and F243A mutant expressed alone or co-expressed with GT, ST6 or both

| | TZM | TZMGT | TZMST6 | TZMGTST6 | TZMm | TZMmGT | TZMmST6 | TZMmGTST6 |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| G0F (%) | 54.4 ± 1.9 | 15.0 ± 1.4 | 49.6 ± 4.6 | 12.3 ± 1.4 | 8.3 ± 2.3 | 0.0 | 9.9 ± 0.2 | 0.6 ± 0.8 |
| G1F (%) | 31.4 ± 2.1 | 23.5 ± 4.2 | 26.3 ± 1.5 | 19.5 ± 1.4 | 19.4 ± 0.4 | 3.5 ± 0.3 | 14.9 ± 2.9 | 1.4 ± 0.3 |
| G2F (%) | 5.1 ± 0.1 | 44.8 ± 2.1 | 3.5 ± 0.1 | 20.9 ± 2.9 | 11.4 ± 1.1 | 41.0 ± 0.5 | 2.3 ± 0.1 | 2.9 ± 0.4 |
| G3F (%) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.2 ± 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| G1FS1 (%) | 0.9 ± 1.3 | 0.6 ± 0.8 | 5.8 ± 0.7 | 2.4 ± 0.3 | 14.3 ± 4.3 | 2.2 ± 0.4 | 19.8 ± 3.3 | 2.8 ± 0.6 |
| G2FS1 (%) | 0.0 | 3.5 ± 1.2 | 2.7 ± 0.7 | 32.0 ± 1.0 | 16.7 ± 0.6 | 19.9 ± 5.6 | 13.4 ± 1.3 | 29.1 ± 4.0 |
| G2FS2 (%) | 0.0 | 0.5 ± 0.7 | 0.0 | 6.6 ± 0.8 | 19.6 ± 0.2 | 17.0 ± 6.3 | 28.6 ± 1.2 | 50.4 ± 4.4 |
| G3FS3 (%) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.3 ± 0.8 | 1.3 ± 1.8 | 5.0 ± 0.7 | 2.6 ± 1.4 |
| Other tri-antennae (%) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 ± 0.1 | 2.6 ± 1.0 |
| High-mannose (%) | 5.3 ± 1.7 | 6.8 ± 4.2 | 4.8 ± 1.3 | 4.7 ± 2.7 | 0.6 ± 0.8 | 4.4 ± 2.7 | 0.0 | 2.0 ± 2.9 |
| Truncated core (%) | 2.9 ± 1.0 | 5.3 ± 4.7 | 6.9 ± 3.6 | 1.6 ± 2.2 | 5.4 ± 7.6 | 8.6 ± 12.2 | 5.0 ± 7.1 | 5.7 ± 8.0 |

The values are averages of relative peak heights in the molecular weight profiles obtained by LC-ESI-MS of Fc/2 glycopeptides of two independent batches. The category “other tri-antennae” contains glycans having a third complex branch being partially sialylated or galactosylated (e.g. G3FS2). High-mannose glycans comprise M5, M6, M7, M8 and M9. The category “truncated core” contains the hybrid glycans $Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3/6(Man\alpha 1-6/3)Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4(Fuca 1-6)GlcNAc$ (abbreviated here as G1F–GlcNAc), $GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3/6(Man\alpha 1-6/3)Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4(Fuca 1-6)GlcNAc$ (G0F–GlcNAc), and $GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3/6Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4(Fuca 1-6)GlcNAc$, as well as the $Fuca 1-6GlcNAc$ fragment (GlcNAcF), which was found in one of the two batches only, but represented 2 to 6% in the wild-type mAb, and up to 10-15% in the mutant.

Table 6: Incidence of terminal GlcNAc, galactose and sialic acid residues in the composition of the antennae of the complex glycans

| | TZM | TZMGT | TZMST6 | TZMGTST6 | TZMm | TZMmGT | TZMmST6 | TZMmGTST6 |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Arms terminated by a GlcNAc (%) | 76.8 ± 0.3 | 30.7 ± 0.4 | 74.7 ± 2.2 | 24.9 ± 1.9 | 26.1 ± 2.4 | 3.2 ± 0.2 | 28.0 ± 1.3 | 2.7 ± 1.0 |
| Arms terminated by a Gal (%) | 22.7 ± 0.4 | 66.4 ± 1.2 | 20.5 ± 2.1 | 49.7 ± 1.7 | 30.7 ± 1.7 | 63.7 ± 7.5 | 17.3 ± 0.2 | 21.1 ± 1.0 |
| Arms terminated by a SA (%) | 0.5 ± 0.7 | 2.9 ± 0.8 | 4.8 ± 0.1 | 25.4 ± 0.2 | 43.2 ± 0.7 | 33.1 ± 7.7 | 54.7 ± 1.5 | 76.2 ± 0.1 |
| Arms carrying a Gal (%) | 23.2 ± 0.3 | 69.3 ± 0.4 | 25.3 ± 2.2 | 75.1 ± 1.9 | 73.9 ± 2.4 | 96.8 ± 0.2 | 72.0 ± 1.3 | 97.3 ± 1.0 |
| Gal capped by a SA (%) | 2.2 ± 3.2 | 4.2 ± 1.2 | 19.1 ± 1.1 | 33.9 ± 0.6 | 58.5 ± 1.0 | 34.2 ± 7.9 | 76.0 ± 0.7 | 78.4 ± 0.8 |

The complex glycans refer to the glycans presented in Table 5, except for the high-mannose and truncated-core categories) (rows 1, 2 and 3, respectively). A complex antenna is defined here by the sequence GlcNAc β 1-2Man α 1-3/6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. The incidence of Gal residues (either terminal of SA-capped), as well as the proportion of Gal residues capped with a SA were also calculated (rows 4 and 5, respectively). These results are based on the LC-ESI-MS analys.

Impact of the F243A mutation

The F243A mutation resulted in a sharp increase in the glycan heterogeneity compared to the wild-type TZM (Figure 27E). This was a direct consequence of the appearance of the sialylated glycans G1FS1, G2FS1 and G2FS2, representing ~14%, 17% and 20%, respectively, of the glycan species. This increased sialylation was enabled by a high level of galactosylation compared to the wild-type antibody; the proportion of complex glycan arms carrying a galactose residue, either terminal or capped with a SA, increased from $23.2 \pm 0.3\%$ in TZM up to $73.9 \pm 2.4\%$ in TZMm (Table 6). Similarly to TZMST6, the co-expression of the F243A mutant with ST6 resulted in a moderate 11.5% increase in the relative number of complex arms terminated by a SA (Figure 27F, Table 6), while its co-expression with human GT resulted in >95% of the complex glycan branches carrying a galactose (Table 6). Interestingly, and as observed with TZMGT, G2F was the dominant species ($41.0 \pm 0.5\%$) in TZMmGT (Figure 27G). However, this increased galactosylation did not lead to a higher sialylation; the sialylation level was even lower in TZMmGT than in TZMm (40% and 55% of sialylated glycans, respectively). Finally, the TZMmGTST6 glycans were mostly sialylated (Figure 27H and Table 5); G2FS2 and G2FS1 were the predominant glycans ($50.4 \pm 4.4\%$ and $29.1 \pm 4.0\%$, respectively), meaning that over 75% of the complex glycan branches were terminated by a sialic acid (Table 6). Moreover, 78% of the galactoses were sialylated compared to only 34% in TZMGTST6 (Table 6), suggesting that the F243A mutation greatly improves ST6-mediated sialylation.

Determination of sialic acid linkage type

Considering the extremely low level of α 2,3-sialylation in TZMGT, we hypothesized that the sialic acids in TZMGTST6 glycans were mostly – if not only – of the α 2,6 type, whereas in the mutants TZMmST6 and TZMmGTST6, the sialylated glycans could contain a mixture of α 2,3- and α 2,6-linked SA. The SA linkage types in the glycans were assessed by cIEF and HILIC analysis after digestion with the α 2,3SA-specific sialidase S from *Streptococcus pneumoniae* or the non-specific sialidase A from *Arthrobacter ureafaciens*.

TZMGTST6

Specific α 2,3SA digestion with Sialidase S had no effect on the cIEF profile of TZMGTST6 (Figure 28A), in agreement with the absence of signal on the MALII-blot (see Figure 26B panel 3). This was also confirmed by HILIC analysis of sialidase S treatment of PNGaseF released Fc-glycans (Figure 28B). The G0F, G1F, G2F and G2FS1 glycans were detected in increasing amounts, in accordance with LC-ESI-MS analyses. The correlation between the glycans relative abundance as detected by MS and HILIC analyses of TZMGTST6 was very good (Pearson correlation coefficient $P = 0.95$). G2FS1 mainly appeared (~95%) as an α 2,6-sialylated isomer G2FS(6)1 ($37.6 \pm 4.0\%$) eluting at a retention time (RT) of 41.2 min (Table 7). It is noteworthy that G2FS(6)1 eluted on some occasions at a higher RT corresponding to the G2FS(3,3)2 glycan, but each time the peak was not sensitive to sialidase S digestion (data not shown). The peak at RT = 42.4 min was attributed to the disialylated glycan G2FS(3,6)2 ($4.1 \pm 1.1\%$), although a small peak remaining after sialidase S treatment suggested the presence of a co-eluting compound (Figure 28B, C & D). G2FS(6,6)2 was also detected at a low level. It was found that 88% of the sialic acids in TZMGTST6 glycans were of α 2,6 type (Table 7 and Figure 29).

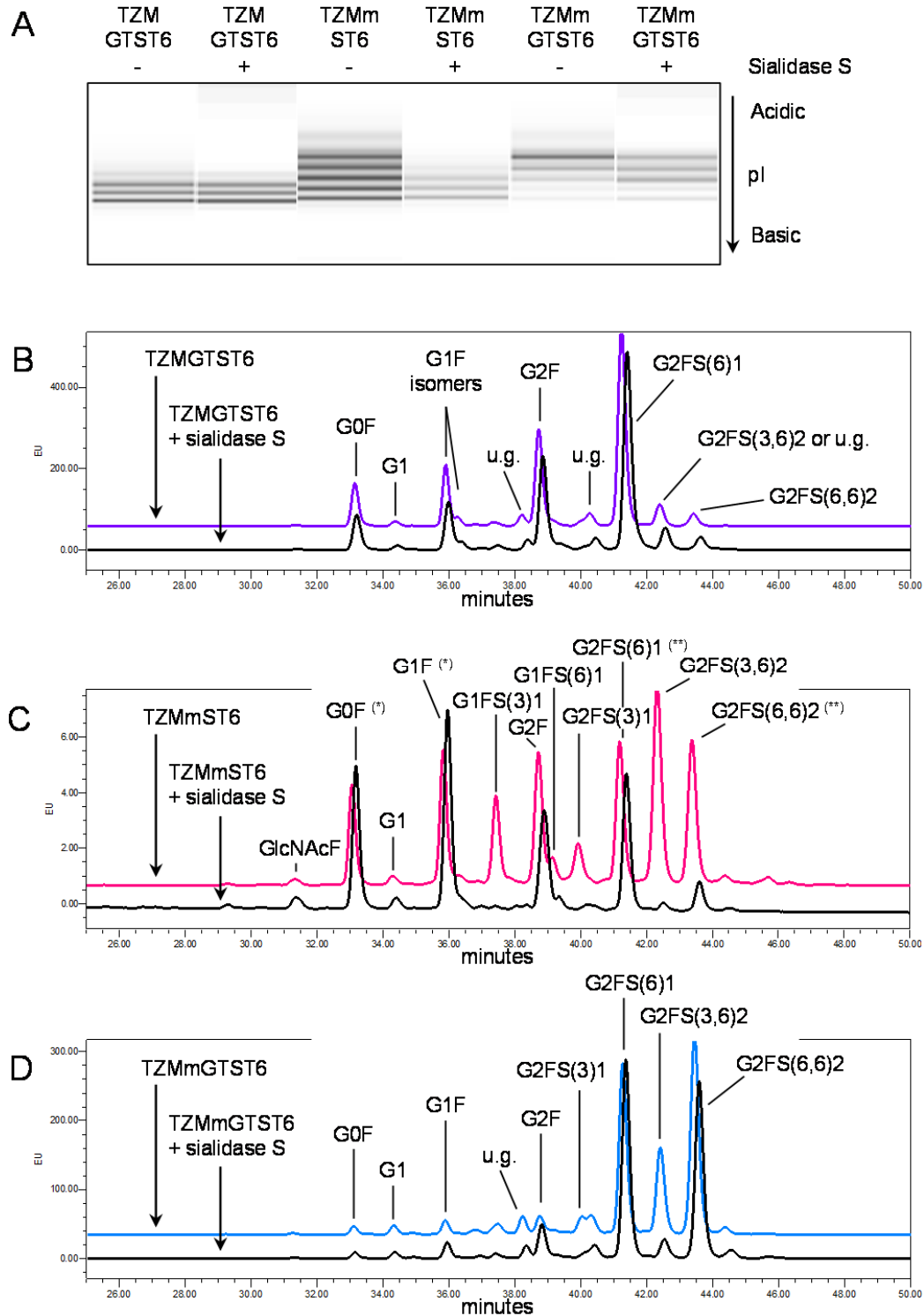


Figure 28 : Effect of α 2,3SA-specific sialidase S treatment on TZM samples

Panel A: cIEF profiles TZM and TZMm; panels B-D: HILIC profiles of TZMGTST6, TZMmST6 and TZMmGTST6. HILIC was performed on PNGaseF-released glycans from two independent batches (u.g. stands for unidentified glycan). Non-specific digestion was suspected in TZMmST6 (Panel C). Unexpected high absorbance is indicated by (), and unexpected low absorbance by (**). GlcNAcF refers to the Fuca1-6GlcNAc fragment.*

TZMmST6

The α 2,3SA-specific desialylation of TZMmST6 resulted in a drastic decrease in the abundance of the most acidic bands of the cIEF profile (Figure 28A), demonstrating the presence of α 2,3SA, as supported by MALII-blotting (Fig. 3B, panel 3). However, the HILIC profile obtained for TZMmST6 did not fully agreed with the LC-ESI-MS data (Pearson correlation coefficient $P = 0.77$) (compare Figure 28C with Figure 27F). There were two main discrepancies with the LC-ESI-MS profile; first, the glycan G2F (RT = 38.7 min) appeared more abundant in HILIC than in MS (HILIC: 12%; MS: 2%), and second, the G1FS1 glycans (two isomers at RT = 37.4 and 39.1 min) were less abundant in HILIC than in MS (HILIC: 10%; MS: 17%) (Figure 28C and Figure 27F, Table 5 and Table 7). Nevertheless, the presence of the α 2,3-sialylated glycans G1FS(3)1, G2FS(3)1 and G2FS(3,6)2, eluting at 37.4 min, 39.9 min and 42.3 min, respectively, was confirmed by sialidase S digestion (Figure 28C). The α 2,6-sialylated isomers G1FS(6)1 (RT = 39.1 min), G2FS(6)1 (RT = 41.2 min) and G2FS(6,6)2 (RT = 43.4 min), were also detected, although the peaks appeared altered by the sialidase S treatment (the increased peak intensities of G0F and G1F suggests some non-specific digestion). It was found that G1FS(3)1 was the predominant G1FS1 isoform while G2FS(6)1 was the predominant G2FS1 isoform (Table 7). The G2FS2 glycans were a mixture of G2FS(3,6)2 ($18.8 \pm 0.9\%$) and G2FS(6,6)2 ($11.7 \pm 3.5\%$) isoforms. Interestingly the G2FS(3,3)2 isoform was not detected (Table 7), suggesting that ST6 is faster than ST3 to sialylate G2FS(3)1. Overall, the predominant SA linkage in TZMmST6 was of the α 2,6 type (63%), although its predominance over the α 2,3-linkage type was less pronounced than in TZMGTST6 (Table 7 or Figure 29).

TZMmGTST6

The sialidase S treatment resulted in a decreased intensity of the most acidic bands on the cIEF profile (Figure 28A), suggesting the presence of α 2,3SA in TZMmGTST6 as predicted by the MALII-blot (Figure 26B, panel 3). The relative abundance of TZMmGTST6 glycans as determined by HILIC were in very good agreement with those of the corresponding Fc/2 glycopeptides detected by LC-ESI-MS (Pearson correlation coefficient $P=0.99$). The chromatogram showed that G2FS(6,6)2 was the major glycan (Figure 28D), ($37 \pm 5.8\%$), followed by G2FS(6)1 ($24.6 \pm 3.5\%$) (Table 7). The G2FS2 isoform G2FS(3,6)2 was the third glycan in abundance ($15.8 \pm 2.0\%$) (Figure 28D, Table 6), whereas G2FS(3,3)2 was again not found. The predominance of α 2,6SA was similar to that found in TZMGTST6 as they represented 85% of all sialic acids present in the G1FS1, G2FS1 and G2FS2 glycans (Table 7 or Figure 29).

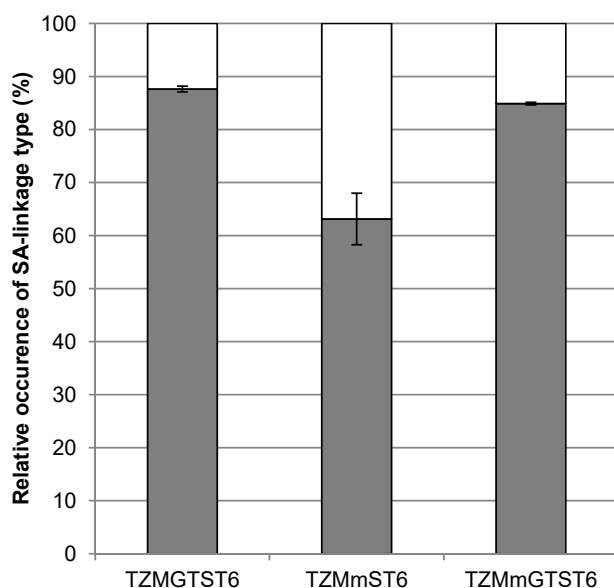


Figure 29 : Proportion of α 2,3- and α 2,6-sialic acids in TZMGTST6, TZMmST6 and TZMmGTST6

The relative abundance of the sialylated biantennary complex glycans (G1FS1, G2FS1 and G2FS2) obtained by HILIC was used to calculate the proportion of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids found in TZMGTST6, TZMmST6 and TZMmGTST6. White: % α 2,3SA. Grey: % α 2,6SA.

Table 7: Fc glycan composition of the wild-type TZM co-expressed with GT and ST6, and the F243A mutant (TZMm) co-expressed with ST6 alone or GT and ST6.

| | Retention time (min) | GU value | TZMGTST6 (%) | TZMmST6 (%) | TZMmGTST6 (%) |
|--------------------------|----------------------|---------------|--------------|-------------|---------------|
| GlcNAcF | 31.3 | 5.40 | 0.4 ± 0.1 | 0.6 ± 0.1 | 0.1 ± 0.2 |
| G0F | 33.2 | 5.84 | 9.5 ± 1.6 | 8.6 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 |
| G1 | 34.4 | 6.15 | 1.1 ± 0.1 | 1.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.6 |
| G1F isomer a | 36.0 | 6.60 | 13.3 ± 3.8 | 12.0 ± 1.6 | 2.1 ± 0.3 |
| G1F isomer b | 36.3 | 6.70 | 2.0 ± 0.6 | 1.2 ± 0.0 | 0.0 |
| G2F | 38.9 | 7.48 | 20.5 ± 1.9 | 11.2 ± 0.7 | 2.8 ± 0.5 |
| G1FS(3)1 | 37.4 | 7.04 | 1.0 ± 0.2 | 9.4 ± 2.6 | 1.9 ± 0.7 |
| G1FS(6)1 | 39.3 | 7.60 | 1.4 ± 0.2 | 2.6 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 |
| G2FS(3)1 | 40.2 | 7.94 | 1.8 ± 0.9 | 5.3 ± 0.6 | 2.8 ± 0.1 |
| G2FS(6)1 | 41.3 | 8.38 | 37.6 ± 4.0 | 12.9 ± 0.4 | 24.6 ± 3.5 |
| G2FS(3,3)2 | 41.4 | 8.42 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| G2FS(3,6)2 | 42.6 | 8.80 | 4.1 ± 1.1 | 18.8 ± 0.9 | 15.8 ± 2.0 |
| G2FS(6,6)2 | 43.6 | 9.20 | 3.0 ± 0.3 | 11.7 ± 3.5 | 37.0 ± 5.8 |
| Presumed tri-antennae | ≥ 44.4 | ≥ 9.60 | 0.2 ± 0.2 | 3.1 ± 0.1 | 2.9 ± 1.0 |
| Unidentified glycans >2% | 38.4 and 40.4 | 7.30 and 8.04 | 3.1 ± 2.8 | 0.0 | 4.4 ± 2.7 |
| total % α2,6SA:α2,3SA | | | 88:12 | 63:37 | 85:15 |

The values are averages of the peak areas obtained in the HILIC chromatograms of PNGaseF-released glycans from two independent batches. Although significant amounts of

G3FS3 were detected by LC-ESI-MS, no peak could be attributed with certitude to this glycan in HILIC chromatograms, because of their numerous potential isoforms. The peaks with a GU value ≥ 9.60 , affected by sialidases, were thus grouped in the category “presumed triantennae”, and the incidence of $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6SA$ was calculated on the glycans G1FS1, G2FS1 and G2FS2 only.

Discussion

The precise impact of Fc-sialylation on CDC and ADCC, and the mechanism by which it has been proposed to confer anti-inflammatory properties to antibodies, have not been fully elucidated. The variety of sialylated glycans (linkage type, branch occupancy) and the low abundance of Fc-sialylated glycans in circulating antibodies or in CHO-produced recombinant mAbs have made difficult the generation of consistent data on their functions. In this study, we present a method for the fast production of highly sialylated mAbs in CHO cells with a well-characterized glycoprofile to enable better assessment of the biological function of Fc-sialylation. Milligram amounts of highly galactosylated IgG1 or G2FS(6)1 enriched IgG1 could be obtained within two weeks.

Our data indicated that the co-transfection of both GT and ST6 was required to obtain a wild-type IgG1 with a glycoprofile dominated by monosialylated G2FS1 glycans, as found in circulating human antibodies. Indeed, the expression of ST6 alone resulted in very poor sialylation improvement. Although terminal galactose residues were available in the G1F glycans, they were not efficiently used as substrates by ST6. This could be explained by the selectivity of the human ST6 for the $\alpha 1,3$ -branch of the glycan, while the galactose residue present on the main G1F isomer was found on the opposite arm.⁵⁷ More surprising, while TZM co-expression with GT was expected to improve terminal sialylation by providing galactose residues for the endogenous ST3, G2F was the major glycan, while only traces of G2FS1 could be detected. Thus, the concomitant expression of ST6 with GT was necessary not only to introduce $\alpha 2,6$ -linked SA in the CHO cell, but also to allow the sialylation of the additional galactoses provided by GT. By co-expressing GT and ST6, we obtained >40% of sialylated glycans in the wild-type TZM, with >75% of them being G2FS(6)1. About 25% of the complex branches were terminated by a sialic acid, and 88% of the sialic acids were of the

α 2,6 type. Onitsuka *et al.* reported the development of a stable CHO cell line overexpressing the CHO ST6 (called ST6M).¹²¹ They showed high sialylation level of the Fc portion of a human IgG1-based diabody, with ~44% of disialylated diantennary glycans (G2S2, G2FS2), and ~26% of G2FS1. Strikingly, while diabody Fc galactosylation in the parental cell line was relatively low (15% of digalactosylated G2F glycan), this level was highly enhanced in the ST6M cell line (~76% of digalactosylated glycans overall; 6% as G2F and 70% as sialylated digalactosylated species). However, the mechanism leading to this highly enhanced galactosylation level in ST6M cell line was not discussed by the authors. Yet, similarly to *in vitro* mAb sialylation, the ST6M cell line generated a mAb with mostly disialylated glycans, which may not be physiologically relevant since G2FS1 is the main sialylated Fc glycan found in circulating human IgGs. In a paper published in 1999, Weikert *et al.* reported that the co-expression of human GT and ST3 with a TNFR-IgG1 Fc fusion protein resulted in >90% of the glycan branches terminated by a sialic acid.¹¹⁶ However, the glycans considered in this estimation were the sialylated glycans only, i.e., the neutral glycans (G0F, G1F and G2F) were not taken into account. Moreover, no distinction was made between the glycans attached to the TNFR and the IgG Fc glycans. Thus, while the sialylation efficiency they obtained cannot be compared to our results despite the similarity of the methods, it is interesting to note that the co-expression of TNFR-Fc with GT resulted in an accumulation of G2F without sialylation improvement, as we observed for TZMGT and TZMmGT. Clark and coworkers also reported no sialylation improvement upon enhancement of the galactose content of an Fc-fusion protein following galactose feeding of a CHO cell culture.¹⁰⁷ They observed a concomitant increase of the intracellular sialidase content, and suggested that galactose up-regulated the production of sialidases in CHO cells, thus reducing sialylation. While the presence of intracellular sialidase activity participating in the generation of G2F glycan cannot be excluded, our data suggest other causes.

The IgG1 bearing the F243A substitution was produced to enlighten some of the restrictions encountered for the sialylation of the wild-type mAb. The phenylalanine 243 has been shown to be in contact with the GlcNAc residue of the α 1,6-arm of the glycan.²¹ The F243A substitution was shown to enhance galactosylation and sialylation levels of the Fc, presumably by allowing the glycan to span out of the cavity formed by the two C γ 2 domains

of the IgG, thus increasing the glycan exposure to the galactosyl- and sialyltransferases.^{14,19,23} More recently, Barb *et al.* proposed that the glycans were dynamic and alternating between two states, a state where the glycan is maintained within the cavity by the interactions of the α 1,6-arm with the protein surface, and the other where both arms of the glycans are exposed outside of the Fc cavity and become accessible to glycosyltransferases.^{79,137} Thus, the reduced glycan-protein interaction caused by the F243A substitution may perturb the equilibrium between the two states in favor of the second.⁷⁹ As expected, TZMm expressed alone was highly galactosylated and sialylated, yet the expression of ST6 somewhat increased the sialylation level. However, the expression of GT resulted in increased galactosylation, but the sialylation level was lower than in TZMm and TZMmST6. In both TZMGT and TZMmGT, G2F was the major glycan observed. Thus, while our results support the conclusion that the F243-glycan interaction in the wild-type Fc impairs galactosylation and ST6-mediated sialylation of the glycans, it could not explain the lack of endogenous ST3-mediated sialylation of the galactosylated wild-type antibodies. The co-expression of GT and ST6 in the F243A mutant resulted in >80% of sialylated glycans, and 76% of the complex branches terminated by a sialic acid. 85% of the sialic acids were α 2,6-linked in TZMmGTST6, which is close to the 88% found in TZMGTST6. In contrast, only 63% of the sialic acids were of the α 2,6-linkage type in TZMmST6, which is higher than the 47% observed by Jassal *et al.* using a F243A IgG3 co-expressed with the rat ST6.¹⁹ Thus, our data suggest that the co-expression of both GT and ST6 in CHO cells favors α 2,6 over α 2,3 sialylation since the galactose residues provided by the overexpression of human GT are preferentially used by ST6 rather than ST3.

The close examination of the glycan isomers detected in our samples gives insights on the characteristics of transferases. First, the action of the endogenous GT and overexpressed human GT could not be distinguished. However, the galactose residue in G1F was present on the α 1,6-arm of the glycan in all cases (endogenous CHO or human GT), suggesting they both have the same selectivity for this arm, a result in agreement with the reported selectivity found for the human GT.⁶⁰ Second, only one G2FS(6)1 isomer was detected. Given the branch selectivity of the human ST6^{57,137}, the sialic acid was considered to be on the galactose residue

lying on the α 1,3 arm. As for G1FS(6)1, only one isomer was detected, but we could not determine if the galactose and SA residues were on the α 1,3- or α 1,6-arm of the glycan.

The very low incidence of G1FS(6)1 could be explained by the opposed branch selectivity of GT and ST6: the α 1,6-arm galactose being more abundant, but less favored by ST6, while the ST6's preferred α 1,3-arm galactose residue being rare due to GT's selectivity. Interestingly, we found that G2FS2 is composed of G2FS(3,6)2 and G2FS(6,6)2 since G2FS(3,3)2 was never detected when ST6 was expressed. Thus, ST6 appears faster than ST3 to sialylate G2FS(3)1, which suggests that G2FS(3)1 carries the α 2,3 sialic acid on the α 1,6 arm, leaving the free galactose residue on ST6's favorite α 1,3 branch. This in turn indicates that CHO ST3 has the opposite arm selectivity to ST6, which had been suggested for the rat liver ST3 and ST6.⁵⁸ The hypothesis of ST3 selectivity for the α 1,6-arm is supported by the relatively high amounts of G1FS(3)1 found in TZMm and TZMmST6.

Finally, it is reasonable to think that the α 1,6-arm glycan's interaction with F243 residue hampers ST3 action as it also hampers CHO GT, human GT and ST6 by limiting glycan accessibility, *a fortiori* if ST3 is indeed selective for this α 1,6-arm. The increased ST3-mediated sialylation of the mutant F243A Fc compared to the wild-type could be the simple consequence of the increase of galactose level due to the mutation, rather than the consequence of increased accessibility to the galactose. However, overexpression of the human GT did not enhance ST3-mediated sialylation as it rather reduced it with a concomitant accumulation of G2F glycan. Moreover, the G1FS(3)1 observed in TZMm and TZMmST6 dropped to trace levels when GT was expressed. This indicates that G2F may not be a very good substrate *per se* for the CHO endogenous ST3, which could actually strongly prefer the G1F glycan.

The successive reaction steps of the ST3 enzyme would thus be G1F→G1FS1→G2FS1 (through GT)→G2FS2, whereas the human ST6Gal1 would rather take the classic path G1F→G2F→G2FS1→G2FS2. Then, the rapid G1F to G2F conversion upon GT over-expression would consume ST3's preferred substrate. The studies on sialyltransferases' enzymatic activity usually consider G2F or Gal β 1-4GlcNAc as substrates, and data comparing G1F isomers to G2F as acceptor substrates are missing.¹⁰³ Similarly, to our knowledge, G1FS1 has not been studied as acceptor substrate for the

galactosyltransferases.^{60,61,258,259} Thus, there is no data in the literature indicating that the presence of a sialic acid on one branch would be an obstacle for galactosylation of the other branch. A second hypothesis is that the absence of G2F α 2,3-sialylation in TZMGT and TZMmGT could reflect the inability of ST3 to cooperate with the human GT, whereas human ST6 and human GT may form highly active complexes, as proposed by Hassinen and coworkers.⁵⁵

In conclusion, we developed a method for the fast production of antibodies enriched in the glycan G2FS(6)1, which is the predominant sialylated glycan found in circulating human IgGs. This approach provides sufficient amounts of homogeneous material for structure-function and small animal studies. This work also provides valuable information to help delineate the contributions of the Fc structure, versus the inherent substrate particularities of the glycosyltransferases that limit mAbs' sialylation in glyco-engineered CHO cells. Further understanding of these glycosylation processes would allow the design of cell lines producing mAbs with glycans tailored for therapeutic applications.

Materials and Methods

Cell line

CHO cells expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (CHO-3E7) were grown in suspension in serum-free FreeStyleTM F17 medium (Invitrogen, cat# A13835-01) supplemented with 0.1% Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich, cat# K4894) and 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, cat# G8540). Cultures were maintained between 0.1 and 2.0 x 10⁶ cells/mL in 125 mL Erlenmeyer ventilated flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ (standard conditions). Cell density and viability were determined using the Cedex Innovatis automated cell counter Cedex Analyzer (Roche) based on the trypan blue exclusion method.

Plasmids

TZM is a humanized mouse IgG1 directed against the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2 or Erb2). The wild-type and F243A mutant versions consist of a HC of the G1m17 allotype and a kappa LC of Km3 allotype. The non-glycosylated TZM mutant

(N297Q) consists of the LC, coupled to a TZM HC variant of G1m17,1 allotype, with a truncated IgG3 hinge¹⁶² and the N297Q substitution. The LC used has no N-glycosylation site, and HC and HCF243A contain only the N297 glycosylation site. The human GT and ST6 were expressed as the complete membrane-bound proteins. HC, HCF243A, HCN297Q, LC, ST6 and GT were each cloned in pTT5 vectors essentially as described previously.^{237,238} The pTT vector encoding the green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter gene and has been described elsewhere.²²⁰

mAbs production

Linear deacylated polyethylenimine Max (PEI_{max}) was obtained from Polysciences, (cat# 24765).²⁶⁰ Stock solutions (3 mg/mL) were prepared in ultrapure water, sterilized by filtration (0.2 μm), aliquoted and stored at 4°C. Cells were diluted 1 day before transfection in fresh medium at 0.7 x 10⁶ cells/mL. They were transfected with viability greater than 99% at densities between 1.5 and 2.0 x 10⁶ cells/mL. DNA and PEI_{max} mixes were separately prepared in complete F17 medium. DNA (1.5 μg/mL in the final culture volume) was added first to the suspension, which was incubated 5 min at 37 °C before the addition of PEI (7 μg/mL final). 24 hours post-transfection (hpt), cells were fed with peptone TN1 (0.5% w/v final), and the culture temperature was shifted to 32 °C. Transfection efficiency was assessed 24 hpt by determining the percentage of GFP positive cells by flow cytometry with a BD LSRII cytometer (BD Biosciences). Only viable single cells were taken into account.

Purification of mAbs from cell culture supernatants

Cell cultures were centrifuged 20 min at 3000g 4 days post-transfection (dpt) at a viability > 60%. The supernatant was collected and loaded on a 4 mL MabSelectTM SuReTM column (GE Healthcare, cat# 17-5438-02) equilibrated in PBS. The column was washed with PBS and mAbs were eluted with 100 mM citrate buffer pH 3.0. The fractions containing mAbs were pooled and the citrate buffer was exchanged against water on Econo-Pac® 10DG columns (Bio-Rad, cat# 732-2010). Purified mAbs were sterilized by passing through 0.2 μm filters, aliquoted, and stored at -80 °C.

Quantification of mAbs

mAbs titers in culture supernatants were determined by protein-A HPLC using a 800 μ L POROS® 20 micron Protein A ID Cartridge (Applied Biosystems, cat# 2-1001-00) according to the manufacturer's recommendations. Purified mAbs were quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Sialidase digestions

α 2,3-linked sialic acids were removed from the purified antibody (50-100 μ g, 1-2 mg/mL), by the *Streptococcus pneumoniae* Glyko® Sialidase S™ (Prozyme, cat# GK80020) at 0.2 U/mL after two hours of incubation at 37 °C in 250 mM phosphate buffer pH 6.0. All sialic acids (α 2,3 and α 2,6) were removed by incubation for 18 h at 37 °C with the *Arthrobacter ureafaciens* Neuraminidase (MP Biomedicals, cat# 153846) at 0.05 U/mL in 250 mM phosphate buffer pH 5.0.

*Lectin-blot*s

Biotinylated *Erythrina Cristagalli* agglutinin (ECL), *Sambucus Nigra* agglutinin (SNA) and *Maackia Amurensis* lectin II (MALII) (Vector Laboratories, cat# B-1145, B-1305 and B-1265, respectively) were used to evaluate terminal β 1,4-galactosylation, α 2,6-sialylation and α 2,3-sialylation, respectively. The supernatants containing antibodies, as well as purified antibodies were treated with DTT (10 min at 70 °C) to reduce disulfide bonds in order to visualize the mAb HCs separately from the LCs. 180 ng of mAbs were loaded for ECL and MALII-blot, while 120 ng were loaded for SNA-blot. After protein transfer, nitrocellulose membrane was incubated 2 hours with the lectin (3 μ g/mL ECL, 1 μ g/mL SNA or 10 μ g/mL MALII), then one hour with 1:1000 Streptavidin-HRP (Sigma-Aldrich, cat# S2438). The membrane was thoroughly washed with PBS-Tween 0.05% before each incubation step. Ponceau red staining was used to control the amount of protein loaded. Signal was revealed with BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Applied Science, cat# 11500708001) and the images recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Biorad).

cIEF

Charge profiles of the antibodies were obtained with the HT Protein Charge Variant kit on a LabChip® GX (Caliper Life Sciences). Purified mAbs at 1-2 mg/mL in water were prepared according to the manufacturer's recommendations. The conditions selected were 90 seconds assay length with the buffer pH 7.2. Desialylated mAbs were desalted on Illustra Microspin columns (GE Healthcare, cat# 27-5330-01) before analysis.

Glycoprofile analysis by LC-MS

Fc/2 (C_{H2}-C_{H3}) glycopeptides were obtained by digestion of the antibodies (20 µg, 2 mg/mL) with 20 U of "FabRICATOR" IdeS (Genovis) in 0.15 M NaCl, 0.05 M sodium phosphate, pH 6.6, at 37 °C for 30 minutes. The resulting digests were analyzed by LC-MS using an Agilent HP1100 Capillary LC system (Agilent Technologies) coupled to a LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a high flow electrospray ionization source. 1 µg of digested antibody was loaded on a Poros R2 column (2.1 x 30 mm) (Applied Biosystems) heated to 80 °C. Mobile phases were 0.1% formic acid in water (A) and 75% acetonitrile, 25% tetrahydrofuran (B) preheated to ~ 80 °C. A linear gradient of 10%-75% B over 12 minutes (1 mL/min) was used to resolve the Fc/2 and Fab antibody fragments. The HPLC eluent was split to 100 µL/min just before the electrospray source of the LTQ-Orbitrap XL and MS spectra was acquired from m/z 400 to 2000 at a resolution of 15,000. LC-MS spectra were viewed in Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific). Molecular weight profiles were generated with the MassLynx® MaxEnt1 deconvolution software (Waters). Databridge (Waters) was used to convert the protein LC-MS spectra into a format that was compatible with MaxEnt1.

The glycan abundance was calculated on the basis of signal heights observed in the molecular weight profiles. The percentage of a given glycan was obtained as the signal height of the Fc/2 glycopeptide carrying this glycan divided by the total signal heights of the glycans identified in the profile. The glycans identified and taken into account in the total signal heights are presented in Table 5. In Table 6, the percentage of complex antennae terminated by a given monosaccharide residue or containing a given monosaccharide residue represents the actual number of residues present on complex antennae divided by the total available

positions for this residue in the complex glycans (for example, G0F contains 0 galactoses, but 2 available positions for galactose). Only the strictly complex glycans were taken into account, i.e., the hybrids G0F–GlcNAc and G1F–GlcNAc (see legend of Table 6 for definitions) containing only one outer arm-GlcNAc residue, were not considered. For example, the percentage of complex antennae terminated by a galactose was calculated as follows:

$$\% \text{ Gal-terminated complex antennae} = 100 \times (1 \times \%G1F + 2 \times \%G2F + 1 \times \%G2FS1 + 3 \times \%G3F) / (2 \times \%G0F + 2 \times \%G1F + 2 \times \%G2F + 2 \times \%G1FS1 + 2 \times \%G2FS1 + 2 \times \%G2FS2 + 3 \times \%G3F + 3 \times \%G3FS3)$$

Glycan analysis by HILIC

Glycan were released from the antibody using PNGase F (Promega, cat# V4831) at 37°C for 24 hours. The enzyme and the antibody were removed using prewashed 10K molecular weight cut-off filters, and the glycans were evaporated to dryness under vacuum. They were then labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) (Sigma-Aldrich, cat# PP0520).²⁶¹ Glycans were analyzed by HILIC with fluorescent detection using a Waters X-Bridge 3.5 μm amide column (4.6 x 250 mm) with the column heated to 30°C and a flow rate of 0.86 mL/min. Glycans were eluted using 50 mM ammonium formate, pH 4.4 (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B) starting with an initial ratio of 20:80, followed by a gradient to 50:50 over 48 minutes. Peaks were calibrated with a 2-AB labeled glucose ladder and glycan standards²⁶² (Prozyme, cat# GKSB-503) and compared to GU values in Glycobase.NIBRT.ie. Structural assignment was also based on exoglycosidase analysis.²⁶³ Broad specificity Glyko® sialidase ATM (Prozyme, cat# GK80040) and Sialidase STM (Prozyme, cat# GK80020) were used for sialic acid digests according to the manufacturer's instructions.

The glycan abundance was calculated on the basis of peak areas observed in the chromatograms. The percentage of a given glycan was obtained as the peak area of the PNGaseF-released glycan divided by the sum of the areas of all the peaks detected in the chromatogram. The incidence of terminal α2,3 and α2,6SA residues was calculated among the sialylated di-antennae complex glycans only, i.e., G1FS(3)1, G1FS(6)1, G2FS(3)1, G2FS(6)1, G2FS(3,3)2, G2FS(3,6)2 and G2FS(6,6)2. For example, the percentage of sialylated complex antennae terminated by a α2,3SA was calculated using the following term:

$$\% \alpha 2,3\text{SA-terminated sialylated complex antennae} = 100 \times (1 \times \%G1\text{FS}(3)1 + 1 \times \%G2\text{FS}(3)1 + 2 \times \%G2\text{FS}(3,3)2 + 1 \times \%G2\text{FS}(3,6)2) / (1 \times \%G1\text{FS}(3)1 + 1 \times \%G1\text{FS}(6)1 + 1 \times \%G2\text{FS}(3)1 + 1 \times \%G2\text{FS}(6)1 + 2 \times \%G2\text{FS}(3,3)2 + 2 \times \%G2\text{FS}(3,6)2 + 2 \times \%G2\text{FS}(6,6)2)$$

Acknowledgments

This work is supported in part by the NSERC Strategic Network for the Production of Single-Type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet). This is NRC publication #53284.

Expériences complémentaires

Confirmation de la prédominance du type $\alpha 2,6$ dans le Fc des IgG humaines

Il est communément admis que les acides sialiques sont de type $\alpha 2,6$ dans le Fc des IgG humaines. Quelques articles présentent une démonstration formelle de la présence de ce type de liaison, et de l'absence du type $\alpha 2,3$. Dalziel *et al.* ont montré la présence des Sia $\alpha 2,6$ par marquage de sérum polyclonal humain avec la lectine SNA, et la faible quantité de Sia $\alpha 2,3$ par la mesure de la quantité de NeuAc libéré par la digestion de ces IgG avec une sialidase $\alpha 2,3$ -spécifique. Ils concluent que les $\alpha 2,6$ Sia prédominent dans les N-glycanes des IgG du sérum (Fc et Fab confondus). Ils mentionnent dans leur discussion que ce résultat est cohérent avec l'observation que le niveau d'expression de la ST6GalII dans les lymphocytes B est plus élevé que celui des ST3.^{144,264}

Avec une démarche similaire, Anthony *et al.* montrent dans une analyse par lectine-blotting d'un échantillon d'IgIV la présence de Sia $\alpha 2,6$ par marquage avec la lectine SNA et l'absence de Sia $\alpha 2,3$ par marquage avec la lectine MALI.¹⁴³

Afin de confirmer ces observations dans notre laboratoire, un test semblable a été réalisé. Pour nous assurer de détecter les N-glycane du Fc, un échantillon commercial d'IgG humaines a été digéré avec l'enzyme IdeS afin de générer le glycopeptide Fc/2, puis ce dernier a été analysé en lectine-blot avec la lectine SNA et la lectine MALII.

Matériel et méthode

Préparation des fragments Fc

Les IgG ont été achetés chez Sigma-Aldrich (cat#I2611) et l'enzyme IdeS provient de Genovis (Fabricator, cat#A0-FR1-020). 500 µg d'IgG ont été digérés avec 10 uL (500 U) d'IdeS à 50 U/µL dans du PBS, 30 minutes à 37°C conformément aux recommandations de Genovis. Le Fc a ensuite été isolé des Fab sur colonne de protéine A (5000 µL de résine MabSelect SuRe de GE Healthcare, cat# 17-5438-02), et élué avec du tampon citrate 100 mM à pH 3,6. Le tampon a été échangé contre de l'eau par concentrations/dilutions successives sur filtres Amicon Ultra (Millipore cat#UFC501024) avec une membrane de seuil 10 kDa. Notons que la préparation finale ne contient pas de chaîne lourde ou de Fc/2 d'IgG3 car la protéine A ne lie pas cette sous-classe d'IgG. La concentration de Fc/2 obtenue a été évaluée au Nanodrop en attribuant au mélange de Fc/2 le coefficient d'absorbance 1,4 par défaut.

Lectine-blots

Les lectines SNA et MALII biotinylées proviennent de Vector Laboratories (cat#B-1305 et cat# B-1265 respectivement). Une gamme de 200 ng, 400 ng et 600 ng de Fc/2 a été déposée sur gel SDS-PAGE pour le SNA-blot et 400 ng, 800 ng et 1200 ng pour le MALII-blot, qui est moins sensible. Un fragment Fc de TZM riche en Sia α 2,6 produit au laboratoire par le clone 12-9 qui sera décrit dans le dernier chapitre a été utilisé comme contrôle pour le marquage avec SNA (100 ng et 200 ng déposés). Le TZMm produit en CHO3E7, riche en Sia α 2,3, a été utilisé comme contrôle pour le marquage avec MALII (300 ng et 600 ng déposés). Un anticorps anti-Fc couplé à la HRP (Sigma-Aldrich, cat#A0170) a été utilisé pour vérifier que les bandes correspondent à un Fc ou une chaîne lourde (Fc/2, 100 ng, TZMm, 150 ng, TZMFC, 100 ng). Les échantillons ont été dénaturés avec du DTT avant d'être chargés sur le gel. Les lectine-blots avec les lectines SNA et MALII ont été réalisés tels que décrit au paragraphe « Lectin-blots » de l'article « Production of α 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells ».

Résultats et discussion

La Figure 30 montre les photographies de la membrane. On voit sur le Ponceau et la membrane marquée avec l'anti-Fc que le Fc/2 issu de l'échantillon commercial migre en une bande étroite à un peu plus de 25 kDa, tandis que le monomère de Fc de TZM sialylé α 2,6 est plus lourd, et que le TZMm migre en deux bandes correspondant à la chaîne lourde près de 50 kDa et la chaîne légère près de 25 kDa. L'anti-Fc révèle également une bande correspondant à la chaîne lourde dans le Fc/2, qui doit provenir d'IgG non digérées avec l'IdeS. En effet, il ne peut s'agir de dimère de Fc/2 non dissocié, puisque l'IdeS coupe le Fc en-dessous des ponts disulfures qui relient les chaînes lourdes.

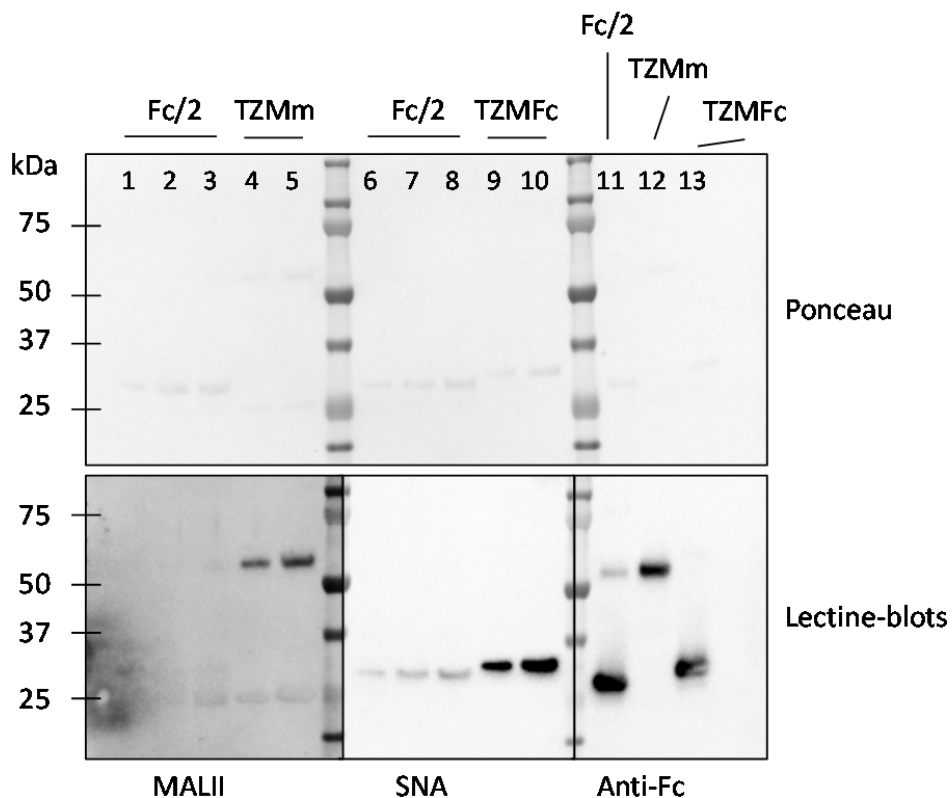


Figure 30 : Lectine-blots pour l'analyse du type de liaison des Sia du Fc des IgG humaines

Le panneau supérieur montre la coloration de la membrane au Ponceau, qui se lie à toutes les protéines. Le panneau inférieur montre un montage de trois photographies de la membrane coupée en trois, chacune des parties ayant été incubée avec un réactif différent. La lectine MALII révèle les Sia α 2,3, la SNA les Sia α 2,6 et l'anti-Fc montre les fragments Fc et les

chaînes lourdes. Pistes 1, 2 et 3 : gamme de Fc/2 400, 800 et 1200 ng ; Pistes 4 et 5 : gamme de TZMm 300 et 600 ng ; Pistes 6, 7 et 8 : gamme de Fc/2 200, 400 et 600 ng ; Pistes 9 et 10 : TZMFc gamme 100 et 200 ng ; Piste 11 : Fc/2 100 ng ; Piste 12 : TZMm 150 ng ; Piste 13 : TZMFc 100 ng. Marqueur de poids moléculaire : Precision Plus Protein Dual Color (Biorad cat#1610374).

Le SNA-blot confirme la présence de Sia α 2,6 dans le Fc des IgG. Sur le MALII-blot, on devine un signal extrêmement faible au niveau du Fc, ce qui pourrait signer la présence de très faibles quantités de Sia α 2,3 dans le Fc des IgG humaines. La faiblesse du signal nous empêche de conclure. On observe en revanche un signal plus fort (quoique faible dans l'absolu) dans la piste du Fc/2 commercial à la même hauteur que la chaîne légère du TZMm, elle-même faiblement réactive au MALII. Ce signal au niveau de la chaîne légère avec la lectine MALII dans les TZM et TZMm est récurrent mais demeure incompris puisqu'aucune glycosylation n'a été détectée sur la chaîne légère que nous utilisons. Dans le Fc/2, il pourrait révéler la présence de Sia α 2,3 dans les chaînes légères d'une fraction des IgG du sérum, puisqu'il est fort relativement à la très faible quantité de LC potentiellement présente sur la membrane (non détectée avec la coloration au Ponceau). Un test conçu pour l'analyse de la LC de l'échantillon commercial serait nécessaire pour conclure.

Conclusion

Le résultat de ce test est cohérent avec l'hypothèse que les acides sialiques de type α 2,6 prédominent dans les N-glycanes du Fc des IgG humaines en circulation.

Application de la méthode à d'autres sous-classes d'IgG

Afin d'apporter des arguments en faveur de l'applicabilité de notre méthode de sialylation aux IgG en général, et pas seulement à notre IgG1 modèle, quatre anticorps ont été produits en parallèle dans les conditions de contrôle (co-expression de HC et LC), les conditions de sur-galactosylation (co-expression de HC, LC et GT), et les conditions de sialylation α 2,6 (HC, LC, GT et ST6GalI).

Matériel et méthode

Anticorps testés

Tableau 8: 4 anticorps soumis à la co-expression de GThu ou GThu et ST6GalI

| Sous-classe | Nom | Abréviation |
|-------------|-------------|-------------|
| IgG1 | Trastuzumab | TZM |
| IgG4 | B72.3 | B72.3 |
| IgG1 | Synagis | Syn |
| IgG3 | B43 | B43 |

Production

Les paramètres de l'expression (proportions des plasmides codant HC, LC, GT et ST6, temps de culture, température) optimisés pour notre anticorps modèle ont été appliqués aux quatre autres anticorps. Les douze productions ont été réalisées en parallèle à partir d'un lot de cellules CHO3E7 unique. Les protocoles de purification ont été adaptés à chaque anticorps.

Tableau 9: Paramètres de purification des anticorps

| Anticorps | Résine pour la purification par affinité | Tampon d'élution |
|--------------------|--|-----------------------|
| Trastuzumab | protéine A | citrate 100 mM pH 3,0 |
| B72.3 | protéine A | citrate 100 mM pH 3,6 |
| Synagis | protéine A | citrate 100 mM pH 3,6 |
| B43 | protéine G | citrate 100 mM pH 3,0 |

Analyse par lectine-blot

Les lectine-blot avec les lectines SNA et ECL ont été réalisés tels que décrits précédemment.

Résultats et discussion

Quatre anticorps, une IgG1 (notre modèle, le TZM), une IgG4 (le B72.3), une seconde IgG1 (le Synagis) et une IgG3 (le B43) ont été exprimés seuls, avec GThu (« GT ») ou avec la combinaison GThu/ST6Gall (« GTST6 »). La glycosylation des douze anticorps obtenus a été analysée par lectine-blot (Figure 31).

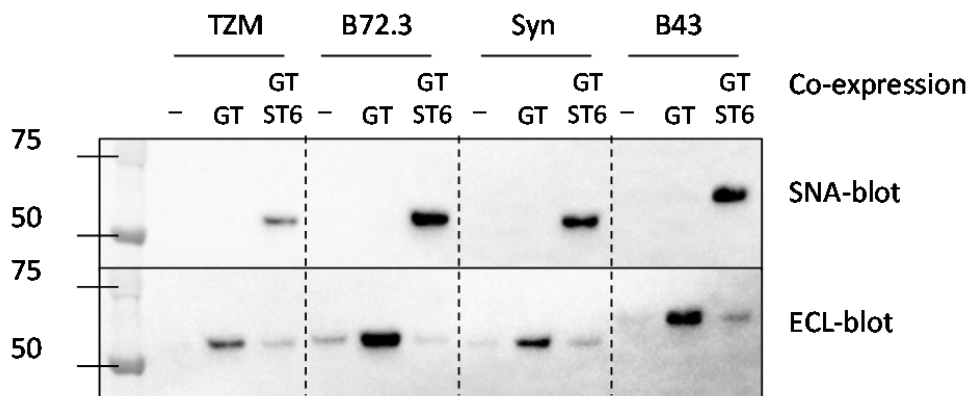


Figure 31 : SNA- et ECL-blots pour l'analyse de quatre anticorps exprimés seuls, avec la GThu ou avec GThu et ST6Gall

120 ng de mAb ont été déposés en SNA-blot et 150 ng en ECL-blot. Le SNA-blot révèle la présence des acides sialiques α 2,6 et le ECL-blot la présence de galactose terminal. Seules les chaînes lourdes sont montrées. TZM : IgG1 ; B72.3 : IgG4 ; Syn : IgG1 et B43 : IgG3.

La figure montre les chaînes lourdes uniquement ; on observe que la chaîne lourde de l'IgG3 est plus lourde que les autres, conformément à ce qu'on attend en raison de sa longue région charnière. Tous les anticorps ont globalement le même profil en lectine-blot que le TZM. En effet, les quatre anticorps exprimés seuls ont une galactosylation terminale faible ou nulle, qui augmente lorsque l'anticorps est co-exprimé avec GThu (ECL-blot). La sialylation α 2,6 apparaît lorsque l'anticorps est co-exprimé avec GThu et ST6Gall (SNA-blot), mais elle demeure partielle puisque du galactose terminal est détecté en ECL-blot. Enfin, on constate que les signaux ECL et SNA des anticorps de test sont plus forts que les signaux obtenus pour le modèle. Les efficacités de galactosylation et de sialylation seraient donc plus élevées pour ces anticorps que pour le TZM. Ceci suggère que la sous-classe mais aussi l'allotype, la région charnière ou le Fab, qui sont trois caractéristiques qui diffèrent ou peuvent différer entre deux

mAbs de la même sous-classe, peuvent influencer l'accessibilité des glycanes du Fc. Wuhrer *et al.* ont montré que chez un individu sain donné (appelé « Contrôle 1 »), les IgG1 étaient plus galactosylées et sialylées que les autres sous-classes. Cependant, cet individu présentait justement un niveau de galactosylation élevé par rapport à un autre de la même étude (« Contrôle 2 »).¹²² L'analyse de glycosylation de chaque sous-classe n'a été réalisée que sur le Contrôle 1. Nous ne savons pas si son cas était particulier ou représentatif d'une population plus large.

Conclusion

L'efficacité de la méthode varie légèrement en fonction de chaque anticorps et plus largement de sa sous-classe, mais demeure applicable avec succès à une variété d'IgG.

Discussion

Dans cette partie, nous avons présenté une méthode de production rapide d'IgG sialylées grâce à la co-expression transitoire de la β -galactosyltransférase humaine (GThu) et de l' α 2,6-sialyltransférase I humaine (ST6GalI) en CHO. Nous avons également proposé une plateforme analytique comptant quatre méthodes orthogonales, qui permettent d'obtenir rapidement une évaluation de la glycosylation de l'IgG (lectine-blots et cIEF), puis une évaluation de la composition du glycoprofil avec une bonne confiance grâce à l'utilisation croisée de l'analyse du glycopeptide Fc/2 par ESI-MS et des glycanes libres par HILIC.

Nous avons montré que les résidus de galactose fournis par la GThu étaient efficacement sialylés par la ST6GalI, mais très pauvrement utilisés par les ST3cho. Par la comparaison des glycoprofiles de l'IgG native et de l'IgG F243A, nous avons confirmé que l'interactions glycane-F243 était effectivement un obstacle ralentissant la galactosylation et la sialylation des glycanes par GThu, ST6GalI et ST3cho conformément aux conclusions d'autres équipes de recherche.^{23,137} Néanmoins, nous avons également montré que l'interaction glycane-F243 et la faible galactosylation du Fc de l'IgG native ne suffisaient pas à expliquer sa faible sialylation α 2,3. L'analyse approfondie des résultats d'ESI-MS et de HILIC nous ont permis de formuler les deux hypothèses suivantes pour expliquer l'absence de sialylation α 2,3 en présence de G2F abondant : i) ST3cho ne coopère pas ou mal avec la GThu

transfectée qui fournit l'essentiel des substrats galactosylés et ii) la surexpression de GThu accélère la conversion de G1F en G2F, ce qui serait défavorable à la ST3cho s'il s'avère que son substrat préféré est le G1F. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les régiosélectivités de ST6GalI et ST3cho sont opposées, en accord avec une hypothèse formulée en 1982 par Weinstein *et al.*⁵⁸

Ainsi, nous avons montré que la co-expression de GThu et ST6GalI permettait de favoriser le type de liaison α 2,6. L'IgG1 a été enrichie en G2FS(6)1, tandis que l'IgG1 F243A a été enrichie en G2FS(6)1 et G2FS(6,6)2.

La méthode possède deux limites principales. La première est que la galactosylation et la sialylation demeurent partielles. Le maximum de galactosylation a été atteint avec une proportion de plasmide codant pour la GThu compris entre 2 et 5% du mix de transfection. Ainsi, augmenter la proportion de plasmide codant pour la GThu n'est pas une solution pour compléter la galactosylation. De plus, l'augmentation de la galactosylation par l'expression de GThu n'a pas permis de diminuer la quantité de plasmide codant pour la ST6GalI utilisée au moment de la transfection. Or, ce plasmide occupe déjà 20% en poids du mix de transfection. Augmenter encore la proportion de plasmides codant pour la GThu et la ST6GalI signifie réduire la quantité de plasmides codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps, ce qui pourrait conduire à une perte de rendement, qui est relativement faible. Ainsi, il faudrait soit augmenter l'efficacité des plasmides, soit envisager un système stable. Pour augmenter l'efficacité des constructions plasmidiques, on pourrait par exemple envisager des plasmides bicistroniques (deux gènes sous le contrôle d'un promoteur) ou bien dicistroniques (deux gènes sous le contrôle de deux promoteurs). Le développement d'un système stable avec une sélection des cellules à forte sialylation pourrait potentiellement nous permettre d'éliminer les cellules présentant une faible galactosylation.

La deuxième grande limite de notre système est le rendement de production des anticorps. Cette méthode, avec un rendement de routine d'environ 15 mg/L, a permis de produire suffisamment de matériel pour commencer l'évaluation de l'efficacité des différents glycovariants. Or, dans l'optique d'une production à grande échelle d'IgG sialylées, le rendement de départ (avant optimisation du procédé de production, milieu, suppléments, température etc.) devrait être vingt fois plus élevé (300 mg/L). Passer en système stable, c'est-

à-dire avec une expression stable de G_{Th} et ST6GalI, pourrait permettre de consacrer la totalité du mix de transfection à l'anticorps cible, et ainsi potentiellement augmenter son rendement. Alternativement, les cellules pourraient déjà contenir l'anticorps et les glycosyltransférases. Bien que cette technique ne garantisse pas l'obtention d'une galactosylation et d'une sialylation totale, ni même élevée,^{121,123} le développement d'un système stable est l'approche de choix pour l'obtention de rendements élevés.

Conclusion

La méthode que nous avons développée permet d'obtenir des IgG enrichies en G2FS(6)1, le glycané sialylé majoritaire chez l'humain. Dans le prochain chapitre, nous présenterons une étude de l'interaction du Trastuzumab avec le récepteur FcγRIIIa en fonction de son glycoprofil. Puis, dans le dernier chapitre, nous présenterons le développement d'une plateforme d'expression stable avec pour objectif l'augmentation des rendements de production.

V. Impact du glycoprofil sur l'efficacité du Trastuzumab

Introduction

Une des fonctions effectrices majeures des IgG est la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC). Cette fonction consiste à recruter les cellules immunitaires effectrices après liaison d'un antigène présent à la surface d'une cellule cible (cellule malade, cellule cancéreuse), afin de déclencher l'émission par la cellule effectrice de toxines qui vont détruire la cible. Le recrutement et l'activation des cellules effectrices se font par l'intermédiaire de l'interaction du segment Fc des IgG avec les récepteurs de Fc, en particulier le FcγRIIIa des cellules tueuses. Cette fonction est particulièrement importante pour les mAbs thérapeutiques développés pour la destruction des cellules cancéreuses.

La sialylation est classiquement considérée comme induisant une diminution de l'affinité des IgG pour le FcγRIIIa, et une baisse de leur efficacité ADCC. Or, des travaux récents suggèrent que la sialylation $\alpha 2,6$ n'aurait pas l'effet délétère attendu : Yu *et al.* ont observé que la sialylation $\alpha 2,6$ n'avait pas d'impact sur l'affinité de leur anticorps pour le FcγRIIIa_{V158}, tandis que Lin *et al.* ont montré que les glycanes di- $\alpha 2,6$ -sialylés non fucosylés permettaient une meilleure efficacité ADCC que le profil de glycosylation classique des IgG.^{160,170}

L'impact de la fucosylation sur l'affinité des IgG pour le FcγRIIIa est en revanche très bien caractérisé : le fucose induit une gêne stérique qui empêche l'interaction optimale du glycanes N162 du FcγRIIIa avec l'un des deux glycanes du Fc de l'IgG. Or, cette interaction glycanes-glycanes, très spécifique de l'interaction IgG-FcγRIIIa, a un rôle majeur dans la force de l'affinité des deux molécules.

Dans cette étude, nous avons repris notre méthode de production et l'avons adaptée pour produire des variants faiblement fucosylés, en plus des variants très galactosylés et très sialylés en $\alpha 2,6$. Nous avons ensuite testé les propriétés de liaison de ces glycovariants avec le FcγRIIIa_{F158} en SPR. Peu d'articles proposent une analyse moléculaire de l'interaction du Fc

avec le récepteur (par SPR ou ELISA) couplée à une analyse cellulaire ou *in vivo* de l'ADCC avec le même lot d'anticorps. Il est souvent supposé qu'un anticorps avec une meilleure affinité pour le FcγRIIIa aura une meilleure efficacité en ADCC. Or, des travaux suggèrent que la corrélation n'est pas systématique.^{160,170,178} Nous avons donc complété notre étude par l'analyse de la réponse ADCC induite par les différents glycovariants dans un test cellulaire, dans lequel les cellules effectrices exprimaient soit le FcγRIIIa_{F158}, soit le FcγRIIIa_{V158}.

Nos résultats suggèrent que l'élongation du glycane du Fc permet la formation d'un complexe plus stable de l'IgG avec le FcγRIIIa_{F158}, les IgG α2,6-sialylées formant un complexe plus stable que les IgG galactosylées, formant elles-mêmes un complexe plus stable que les IgG agalactosylées. Ce gain de stabilité semble correspondre à une augmentation de l'intensité de la réponse ADCC lorsque le glycane du Fc n'est pas fucosylé. Cet effet positif sur l'ADCC n'a pu être mis en évidence avec la même confiance pour les IgG fucosylées.

Méthodologie

Production des anticorps

Pour la production des anticorps galactosylés et sialylés, nous avons appliqué la méthode développée au cours des travaux précédents. Nous l'avons adaptée afin de produire également des anticorps faiblement fucosylés. Pour cela, nous avons co-exprimé avec l'anticorps, et/ou GT, et/ou ST6GalI, la GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD). Cette enzyme bactérienne empêche la biosynthèse du GDP-fucose, privant ainsi la fucosyltransférase de donneur de fucose. Le plasmide a été exprimé à hauteur de 5% du mélange d'ADN plasmidique lors de la transfection.

Analyse par SPR

L'essai de SPR a été réalisé conjointement avec July Dorion-Thibaudeau selon la méthode qu'elle a développée et décrite dans une publication parue en 2015.²⁶⁵ Brièvement, le domaine soluble du FcγRIIIa_{F158} a été exprimé dans les cellules HEK293-6E couplé à une biotine, puis attaché à la surface sensible grâce à la présence de streptavidine. Cela permet que

le FcγRIIIa soit orienté sur la surface de manière à être disponible pour interagir avec les anticorps.

Présentation du test ADCC de substitution

Le test ADCC choisi est un test ADCC de substitution dans lequel les cellules effectrices ont été développées pour exprimer soit le récepteur de basse affinité FcγRIIIa_{F158}, soit le variant polymorphique de haute affinité FcγRIIIa_{V158}. De plus, l'initiation de la réponse ADCC par la liaison de l'anticorps avec le récepteur est traduite par un signal bioluminescent proportionnel à l'intensité de la réponse ADCC. Ce test présente l'avantage de connaître et de comparer les réponses d'un variant de FcγRIIIa donné, tandis que l'utilisation de cellules effectrices naturelles peut conduire à des résultats non reproductibles selon que le donneur exprimera l'un ou l'autre, ou les deux variants polymorphiques du FcγRIIIa. En revanche, il ne permet pas de rassembler des données mimant au plus près le mécanisme naturel de cytotoxicité dépendant de l'anticorps.

Contribution de chacun des auteurs

Céline Raymond – Comme précédemment, j'ai défini le sujet et les limites de l'étude ; réalisé la bibliographie sur le sujet ; déterminé et réalisé les expériences pour le développement de la méthode de production des anticorps avec les différents profils de glycosylation, ainsi que de la production de ST6GalI soluble ; réalisé les gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie, lectine-blots, IEF capillaire (cIEF), digestions avec sialidases et glycosidases, analysé les résultats ; réalisé les expériences de sialylation *in vitro* ; coordonné conjointement avec mon directeur la collaboration avec les équipes de spectrométrie de masse et de HILIC ; analysé les résultats obtenus par les équipes de spectrométrie de masse ; déterminé l'attribution des pics des chromatogrammes de HILIC aux glycanes sialylés conjointement avec Denis Brochu ; participé à la réalisation des expériences de SPR sous la tutelle de July Dorion-Thibaudeau ; écrit le manuscrit.

July Dorion-Thibaudeau a développé la méthode de SPR. Elle m'a formée et encadrée lorsque j'ai préparé les échantillons puis lancé l'analyse. Elle a elle-même préparé certains

échantillons, puis traité les données recueillies à l'issue des essais. Elle m'a aidée à interpréter les données.

Denis Brochu a participé au développement de la méthode d'analyse des glycanes libérés par digestion avec la PNGase F par HILIC dans le laboratoire de Michel Gilbert.

Michel Gilbert a supervisé l'analyse des échantillons par HILIC.

Catherine Collins a réalisé les tests cellulaires d'ADCC.

Anne Lenferink a supervisé la réalisation des tests ADCC et validé l'interprétation des résultats.

Gregory De Crescenzo a supervisé le développement de la méthode de SPR.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude, validé le sujet, ses limites, les résultats et leur analyse. Il a relu et corrigé le manuscrit, et le transmettra aux co-auteurs pour recueillir leurs commentaires avant publication.

Impact of terminal galactosylation and α 2,6-sialylation on IgG1 binding to Fc γ RIIIa

Article en préparation

Céline Raymond^{1,2}, July Dorion-Thibaudeau³, Denis Brochu⁴, Michel Gilbert⁴, Catherine Collins¹, Anne Lenferink¹, Gregory De Crescenzo³ and Yves Durocher^{1,2}

¹Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council of Canada; Montreal, Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine; University of Montreal; Montreal, Canada

³Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal; Montreal, Canada

⁴Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council of Canada; Ottawa, Canada

Keywords: N-glycosylation, sialylation, fucosylation, IgG, CHO cells, SPR, ADCC, Fc γ RIIIa

Abstract

Fc N-glycosylation impacts IgG's effector functions. In particular, the absence of core-fucosylation is known to increase the affinity of IgGs for the Fc gamma receptor IIIa (FcγRIIIa), which results in an improvement of antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). The impact of sialylation is less clear. In this study, we produced eight glycovariants of Trastuzumab (TZM, IgG1 type) in CHO cells through transient co-expression of TZM with various combinations of human α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6GalII), human β 1,4-galactosyltransferase 1 (b4GT1) and GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD). Highly α 2,6-sialylated IgGs and highly galactosylated IgGs, with high or low levels of core-fucosylation, were obtained and characterized by lectin-blotting, capillary isoelectric focusing (cIEF) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC). The glycovariants interactions with FcγRIIIa were analyzed by surface plasmon resonance (SPR) and in an ADCC assay. For both highly and poorly fucosylated IgGs, galactosylation and sialylation resulted in a decreased dissociation rate of the antibody from FcγRIIIa. In low-fucose IgGs, this translated into an improvement of ADCC. Thus, α 2,6-sialylation did not impair ADCC of highly fucosylated IgGs and even improved ADCC in low-fucose IgGs.

Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are a major class of biotherapeutics being developed for an increasing number of pathologies. mAbs are mostly recombinant immunoglobulin G1 (IgG1) produced in Chinese hamster ovary cells (CHO). The efficacy of many of these therapeutic antibodies relies on their ability to trigger cellular effector functions after binding to their target antigen.²⁶⁶ The cellular effector functions, such as the complement-dependent cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), are dependent on the interaction of the IgG's Fc domain with receptors on the immune cells.

In particular, ADCC is mediated by the interaction of the IgG Fc (fragment crystallizable) domain with the activating Fc gamma receptor IIIa (FcγRIIIa) at the surface of natural killer (NK) cells. The FcγRIIIa has two polymorphic variants, with the amino acid at position 158 being a valine or a phenylalanine. The variant V158 allows for a higher affinity between the receptor and the IgG than the variant F158. The high affinity V158 variant

expression results from the genotype V/V158, present in 10-15% of the population, while the low affinity variant F158 is found in >85% of the population (genotypes V/F158 or F/F158). The genotype V/V158 has been associated *in vivo* and *in vitro* to a better ADCC response to anti-CD20 antibodies, while the Fc γ RIIIa_{F158} has been linked to auto-immune diseases.^{158,164}

IgG1s possess two N-glycans in the C_H2 domain of the Fc, on the asparagine 297 of each heavy chain. The Fc N-glycans have been shown to be necessary for binding to Fc γ RIIIa receptors in several reports.^{188,189} Moreover, the affinity of IgGs for these receptors is sensitive to the presence of fucose in the N297 glycan, which drastically decreases the affinity for the receptor,^{26,27} resulting in a decreased capacity to elicit ADCC.²⁶ Most of the IgGs in circulation are fucosylated (>70%), and the proportion is higher in the most common cell hosts used for recombinant protein expression. For example, the level of fucosylation often reaches 90-95% in CHO cells.^{51,152} Thus, afucosylated antibodies are usually obtained through process and cell engineering: kifunensine supplementation,²⁶⁷ GDP-fucose synthesis defective cells (CHO Lec13),²⁶ fucosyltransferase VIII (FucTVIII) gene KO,²⁶⁸ FucTVIII inhibitors,²⁶⁹ and co-expression of enzymes deflecting the fucosylation pathway (GnTIII, GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD)).^{25,270} Fc N-glycans are also variably galactosylated and sialylated. In CHO cells, they are typically undergalactosylated and only traces of sialic acids are detected.¹⁴⁰ The respective impacts of terminal galactose or sialic acid on Fc γ R binding are still debated.^{27,35,160,176}

Fc γ RIIIa is itself a glycoprotein, and carries two N-glycans in its extracellular domain, one at N45 and the other one at N162.¹⁷⁴ The N162 glycan has been shown to be directly involved in the interaction between IgG1s and Fc γ RIIIa of both variants.^{174,175} This interaction is thus particularly complex, as it depends on protein-protein, protein-glycan and glycan-glycan contacts.^{174,175}

In this study, we generated eight IgG1 glycoforms to evaluate the impact of high and low levels of core-fucose, terminal galactose and terminal α 2,6 sialylation in the Fc N-glycans on its affinity for the Fc γ RIIIa receptor. The antibodies were transiently co-expressed in CHO cells with various combinations of the human galactosyltransferase β GalT1 (GT), the human sialyltransferase ST6Gal1 (ST6) and the bacterial enzyme RMD. The antibodies' glycoprofiles were characterized by lectin-blotting, capillary isoelectric focusing (cIEF) and hydrophilic

interaction chromatography (HILIC). The binding characteristics of the glycoforms to the FcγRIIIa receptor were analyzed by surface plasmon resonance (SPR) and also by using a surrogate ADCC assays. We show that terminal sialic acids and galactoses have a small yet significant impact on the dissociation rates of the antibodies containing high or low core-fucose. The beneficial impact of the galactose was echoed in the ADCC assay for the antibodies devoid of core-fucose. Moreover, no reduction of ADCC response was observed upon terminal α2,6 sialylation.

Materials and Methods

Cells

CHO cells expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (CHO-3E7) were grown in suspension in serum-free FreeStyle™ F17 medium (Invitrogen, cat# A13835–01) supplemented with 0.1% Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich, cat# K4894) and 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, cat# G8540). Cultures were maintained between 0.1 and 2.0 x 10⁶ cells/mL in 125 mL Erlenmeyer ventilated flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ (standard conditions). Cell density and viability were determined using the Cedex Innovatis automated cell counter Cedex Analyzer (Roche) based on the trypan blue exclusion method.

Production of eight TZM glycoforms

TZM is a humanized mouse IgG1 directed against the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2 or Erb2) consisting of a HC of the G1m17 allotype and a kappa LC of Km3 allotype. The productions were carried out essentially as described in our previous study.²⁷¹ The light and heavy chains of TZM were each cloned into pTT5 vectors,^{237,238} as well as the human glycosyltransferases β1,4-galactosyltransferase 1 (GT), β-galactoside α-2,6-sialyltransferase 1 (ST6Gal1, herein abbreviated ST6), and the bacterial enzyme GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD). The pTT vector encoding a green fluorescent protein (GFP) was used to monitor transfection efficiency as described elsewhere.²²⁰ When GT, ST6 or RMD were required, the DNA transfection mixes contained 5%, 20% and 5% in weight of GT plasmid, ST6 plasmid and RMD plasmid respectively. GFP plasmid was also

incorporated as 5% in weight for all transfections. The remaining of the DNA mix was a mixture of LC and HC plasmid in the ratio 6:4 LC:HC. Linear deacylated polyethylenimine pro (PEIpro) was obtained from Polyplus transfection, (cat# 115-100) as sterile stock solutions in water at 1 mg/mL and stored at 4°C. Cells were diluted two days before transfection in fresh medium at 0.3×10^6 cells/mL. They were transfected with viability greater than 99% at densities between 1.5 and 2.0×10^6 cells/mL. DNA and PEIpro solutions were separately prepared in complete F17 medium for a final concentration of 1 mg/mL and 2.5 mg/mL respectively in the final culture volume. They were mixed and incubated for 5 min at room temperature before addition to the cells. 24 hours post-transfection (hpt), cells were fed with peptone TN1 (0.5% w/v final), and the culture temperature was shifted to 32°C unless indicated otherwise. Transfection efficiency was assessed 24 hpt by determining the percentage of GFP positive cells by flow cytometry with a BD LSRII cytometer (BD Biosciences). Only viable single cells were taken into account. Cell cultures were centrifuged 20 min at 3000 g 4 days post-transfection (dpt) at a viability superior to 80%. The cell culture for the production of TZM alone was harvested 9 dpt. The clarified supernatant was collected and loaded on a 4 mL MabSelect™ SuRe™ column (GE Healthcare, cat# 17-5438-02) equilibrated in PBS. The column was washed with PBS and mAbs were eluted with 100 mM citrate buffer pH 3.0. The fractions containing mAbs were pooled and the citrate buffer was exchanged against water on Econo-Pac 10DG columns (Bio-Rad, cat# 732-2010). The final yields ranged from 19 and 32 mg/L. Purified mAbs were filtered through 0.2 µm membranes, aliquoted, and stored at 80°C.

Production of soluble ST6

A truncated human ST6Gal1 lacking the N-terminal cytoplasmic tail and the transmembrane domain was inserted into a pTT5 vector. The truncated ST6 sequence was flanked by a signal peptide from the vascular endothelial growth factor A for secretion and a 10-histidine tag inserted at the C-terminus to facilitate its purification. CHO cells expressing a full transmembrane ST6Gal1 were transfected with the soluble ST6 as described above for antibody expression. The cells were either cultivated at 37°C for five days or shifted to 32°C at 1 dpt, yielding ST6 called ST6-37 or ST6-32 respectively. The supernatants were collected at 5 dpt and loaded onto 4-mL Co²⁺-charged IMAC columns for his-tag capture as described

before.²³⁶ The columns were washed with sodium phosphate 50 mM, 300 mM NaCl, pH 7.0 and the ST6 were eluted with the washing buffer containing imidazole 300 mM, pH 7.0. The buffer was exchanged against PBS on Econo-Pac 10DG columns. The post-purification yields were 18.5 mg/L and 9.5 mg/L for ST6-32 and ST6-37 respectively.

In vitro sialylation (IVS)

The method was adapted from the protocol published by Barb *et al.*¹³⁷ The CMP-sia was obtained from Nacalai (cat# 10432-24). A ratio of 1:16 enzyme:antibody in weight was used. The antibody at 1 mg/mL was sialylated with ST6 in presence of CMP-sia at 1 mM in 25 mM MOPS buffer, KCl 100 mM at pH7.2, at 37°C. After 24 hours, the reaction mixture was concentrated 10-fold on Amicon Ultra-0.5 mL (Millipore) with a 3 kDa cut-off (cat# UFC500324) to eliminate the free CMP. The volume was readjusted to its initial value and a fresh aliquot of CMP-sia was added to a final concentration of 1mM. This 24-hour cycle was repeated three times. At the end of the fourth day, the reaction mixture was loaded on a 250 μ L MabSelectTM SuReTM column and the antibody was purified as described above.

Coomassie-stained gels and lectin-blots

The proteins were loaded on NuPAGE Novex 4-12% gels from Life sciences (cat# NP0323BOX) ran in MES buffer (Novex) at 200 V for 35 minutes. For the Coomassie staining, 2 μ g of protein were loaded. The gel was stained in a solution of Coomassie blue for one hour and destained overnight in a solution of acetic acid 7.5% (v:v) and ethanol 20% (v:v). For lectin-blots, biotinylated lectins *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Erythrina cristagalli* lectin (ECL), *Maackia amurensis* lectin II (MALII) and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) were purchased from Vector Laboratories (cat# SNA: B-1305, ECL: B-1145, MALII: B-1265, LCA: B-1045). Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Strep-HRP) was purchased from Sigma-Aldrich (cat# S2438). 120 ng of purified mAbs were loaded on the gels for SNA-blots and 180 ng for the other lectin-blots. After migration, the proteins were transferred on a nitrocellulose membrane using the Turbo protocol of the Trans-Blot TurboTM Transfer system and the RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit (BioRad, cat# 1704270) according to the manufacturer's recommendations. The lectin SNA was used at 2 μ g/mL, ECL at 3 μ g/mL, MALII and LCA at 10 μ g/mL. The membrane was incubated with the lectins for

two hours at room temperature and then incubated with Strep-HRP (1:1000) for one hour. The membrane was thoroughly washed with PBS-Tween 0.05% before each incubation step. Ponceau red staining of the nitrocellulose membrane was used to control the amount of protein transferred. Signal was revealed with BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Applied Science, cat# 11500708001) and the images recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Biorad).

cIEF

Charge profiles of the antibodies were obtained with the HT Protein Charge Variant kit on a LabChip GX (Caliper Life Sciences). Purified mAbs at 1–2 mg/mL in water were prepared for analysis according to the manufacturer's recommendations. The conditions selected were 90 seconds assay length with the buffer pH 7.2.

HILIC

Glycans were released from the antibody using PNGase F (Promega, cat# V4831) at 37°C for 24 hours. The enzyme and the antibody were removed using prewashed 10kDa molecular weight cut-off filters, and the glycans were evaporated to dryness under vacuum. They were then labeled with 2-aminobenzamide (2-AB) (Sigma-Aldrich, cat# PP0520).²⁶¹ Glycans were analyzed by HILIC with fluorescent detection using a Waters X-Bridge 3.5 mm amide column (4.6 x 250 mm) with the column heated to 30°C and a flow rate of 0.86 mL/min. Glycans were eluted using 50 mM ammonium formate, pH 4.4 (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B) starting with an initial ratio of 20:80, followed by a gradient to 50:50 over 48 minutes. Peaks were calibrated with a 2-AB labeled glucose ladder and glycan standards (Prozyme, cat# GKSB-503) and compared to GU values in the database Glycobase.NIBRT (https://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action). Structural assignment was also based on exoglycosidase analysis.²⁶³ Broad specificity Neuraminidase (MP biomedical cat# 153846) and Sialidase S (Prozyme, cat# GK80020) were used for sialic acid digests according to the manufacturer's instructions.

The glycans abundance was calculated on the basis of the peak areas observed in the chromatograms. The percentage of a given glycan was obtained as the peak area of the

PNGaseF released glycan divided by the sum of the areas of all the peaks detected in the chromatogram.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis

Antibodies were further purified by size-exclusion chromatography to remove aggregates prior to SPR analysis. SPR analyses were carried out as described by Dorion-Thibaudeau *et al.*²⁶⁵ All SPR experiments were performed using a Biacore T100 instrument (GE Healthcare) at a flow rate of 50 μ L/min at 25°C using HBS-P 1x, pH 7.4 (GE Healthcare) as running buffer. Kinetic analysis was performed with the Biacore T100 Evaluation software. The Biotin CAPture kit (GE Healthcare) was used to stably capture biotinylated Fc γ RIIIa (F158 variant) at the surface of the biosensor, according to the manufacturer's recommendations. Mab solutions were injected in duplicate over captured Fc γ RIIIa at 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500 and 1000 nM and control surfaces for 2 minutes at 50 μ L/min. The receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer for 5 min. Surface regeneration was performed by injecting the regeneration solution included with the kit (6 M guanidine-HCl, 0.25 M NaOH).

Bioluminescent surrogate ADCC assay

The analysis of the mAb glycovariants binding to Fc γ RIIIa was also evaluated using a surrogate ADCC assay where the effector cells were engineered Jurkat T-cells expressing either the low-affinity (F158) (Promega cat# G930A) or the high-affinity (V158) Fc γ RIIIa variants (Promega cat# G701A). In this assay, the effector cells are also engineered to generate a bioluminescent signal upon engagement of the ADCC pathway by the IgG-Fc γ RIIIa interaction. Effector cells were propagated in RPMI 1640 (Hyclone cat#SH30096.01) supplemented with 10% FBS (Hyclone cat#SH30071.03), 100 μ g/mL hygromycin (Invitrogen, cat#10687-010), 250 μ g/mL G418 sulfate (Invitrogen cat#10131-035), 1 mM sodium pyruvate (Gibco cat#11360-070) and 0.1 mM MEM non-essential amino acids (Gibco cat#11140-050). BT-474 cells which express high levels of HER2 were used as target cells for our antibodies (Herceptin glycovariants). The day prior to the assay, target cells were seeded at 8000 cells per well in the inner 60 wells of 96-well opaque white plates (Corning cat#3917). The plates were incubated at 37°C in a humidified incubator, 5% CO₂, overnight. The assay was carried out

according to the manufacturer's instructions. Briefly, TzM glycovariants diluted in ADCC buffer (RPMI + 4% low IgG serum (Promega cat#G7110)) and effector cells were applied to the target cells. After six hours of incubation, Bioglo luciferase substrate (Promega cat#G7941) was added to the wells and luciferase activity was quantified by luminescence readout. The antibody Synagis was used as a non-specific antibody negative control.

Results

Production of 7 different mAb glycoforms in CHO cells

The glycoprofile of TzM expressed in CHO cells is essentially composed of fucosylated di-antennary agalactosylated glycan G0F, and some mono-galactosylated glycans G1F. To obtain TzM glycovariants, the light and heavy chains (LC and HC) were co-expressed in CHO cells with various combinations of enzymes affecting the glycosylation pathway. The culture conditions were essentially as described previously²⁷¹: CHO-3E7 cells were transfected with cocktails of plasmids separately encoding TzM LC, HC, the human β 1,4-galactosyltransferase 1 (GT), the human α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6), and the oxidoreductase GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose reductase (RMD). RMD converts the precursor of GDP-fucose into GDP-rhamnose, which inhibits the addition of core-fucose on the glycans.²⁷⁰ TzM was thus either expressed alone (TzM) or co-expressed with GT (TzM GT), RMD (TzM RMD), GT and RMD (TzM GTRMD), GT and ST6 (TzM GTST6), and GT, ST6 and RMD (TzM GTST6RMD). A second batch of TzM GTST6RMD was obtained by harvesting the cells five days post-transfection; TzM GTST6RMD from the 4 dpt-batch and the 5 dpt-batch are denoted TzM GTST6RMD A and TzM GTST6RMD B respectively. The antibodies were then purified on protein A-columns.

Production of an additional glycovariant by *in vitro* enzymatic sialylation

The last glycovariant was obtained by enzymatic sialylation of TzM GTST6 *in vitro*, in presence of the activated sugar CMP-sia and a soluble human ST6.

Production of the soluble ST6

A truncated his-tagged ST6 version devoid of cytoplasmic and transmembrane domain was co-expressed with the full length ST6 in CHO cells cultured five days at 37°C (ST6-37) or with a temperature switch to 32°C at one dpt (ST6-32). Both enzymes were subsequently purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The efficacy of ST6-32 and ST6-37 for *in vitro* sialylation was assessed using TZM GT as a substrate. The sialylation reaction was conducted during three days and a fraction was collected every day for lectin-blot analysis. The level of sialylation was evaluated using the α 2,6SA-specific lectin SNA, and the terminal galactosylation was evaluated using the lectin ECL. With both ST6-32 and ST6-37, the α 2,6-sialylation gradually increased over time while the terminal galactosylation decreased (Figure 32). The sialylation increase was faster and the residual terminal galactosylation lower when using ST6-37.

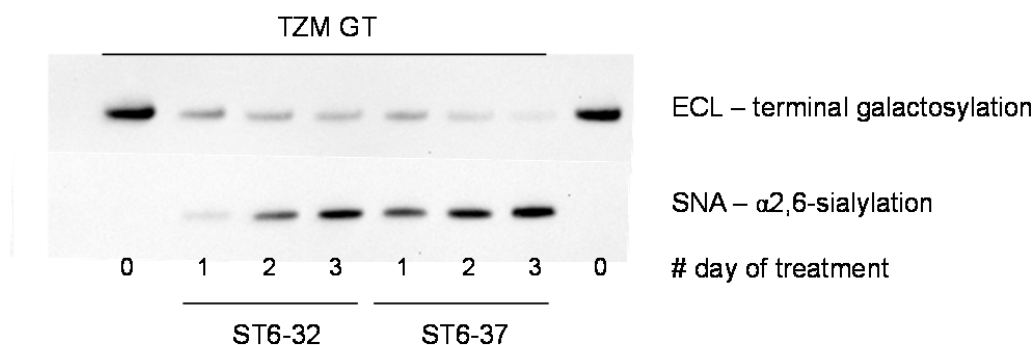


Figure 32 : *In vitro* sialylation by ST6-32 and ST6-37

ST6-32 and ST6-37 were used to sialylate the galactose-rich antibody TZM GT in presence of CMP-Sia. The sialylation of TZM GT was faster and the consumption of terminal galactose more complete with ST6-37.

In vitro sialylation of TZM GTST6

ST6-37 was chosen to proceed with the sialylation of TZM GTST6 *in vitro* in an attempt to obtain di-sialylated glycans. The reaction was carried out for four days at 37°C. The reaction mixture was filtered every 24 hours to eliminate the free CMP resulting from the transfer of SA from CMP-sia to the protein, and novel CMP-sia was added. After four days, the antibody (TZM GTST6 IVS) was purified on a protein-A column.

The SNA signal was obtained only for the antibodies co-expressed with ST6 as expected (Figure 33A). The signal was weaker for antibodies co-expressed with RMD. The co-expression of GT resulted in increased galactosylation as shown by the strong ECL signals of TZM GT and TZM GTRMD as compared to TZM (Figure 33B). The ECL signals were lower than that of TZM GT and GTRMD for all the antibodies co-expressed with ST6, suggesting that some but not all the galactose residues provided by GT were capped by a sialic acid. The MALII-blot shows a high background because the contrast of the picture of the membrane was increased to reveal the bands that were otherwise very faint (Figure 33C). The TZM GTST6 control contains only 2.5% of the mono- α 2,3-sialylated glycan G2FS(3)1. All the antibodies thus contain very low amounts of α 2,3 sialic acids. Considering the very weak signals and high background, the differences in MALII signal intensity between the mAbs were considered not significant. Finally, the LCA-blot shows clearly an extinction of LCA signal for the mAbs co-expressed with the enzyme RMD, showing that the inhibition of the core-fucosylation was effective (Figure 33D).

Capillary isoelectric focusing (cIEF)

The charge variant profiles of the antibodies were analyzed by cIEF. TZM was composed of a main variant flanked by one major basic variant and two major acidic variants (Figure 34). Three minor variants were also detected: one was the most basic variant, and two were the most acidic variants. They were numbered #1 to #8 from basic to acidic, the main variant being thus variant #3. The antibodies produced without ST6 (TZM GT, TZM RMD, and TZM GTRMD, designated as the “neutral mAbs”) had similar profiles, close to that of TZM with lower amounts of variants #1, #2, #4 and #5. The charge variant profile of the antibodies co-expressed with ST6 was very different. The variant #3 dropped to 24-34%, while the acidic variants were more abundant, especially variants #4, #5 (each representing 24-32%) and #6 (7-10%). The strong acidic variants being attributed to the presence of sialic acids,²⁵⁷ the cIEF profiles were consistent with the results of the lectin-blot.

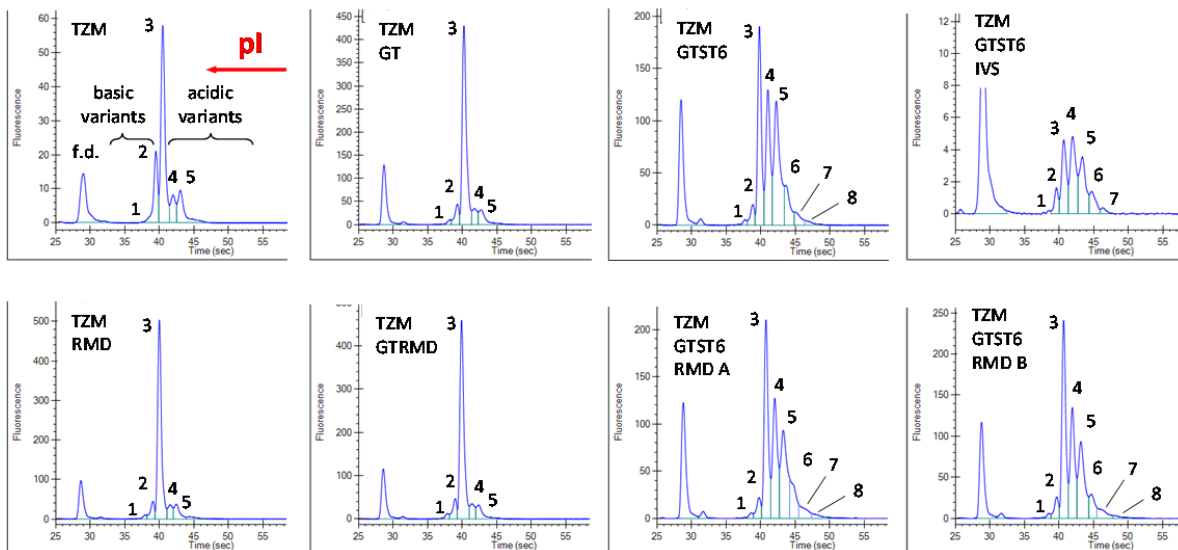


Figure 34 : cIEF profiles of the eight glycovariants

A maximum of 8 charge variants by antibody was detected. The peak #3 represented the main variant, #1 and #2 the basic variants, and #4, #6, #7 and #8 were the acidic variants. Variations in galactose and fucose contents did not impact the charge profile, whereas the acidic variants abundance increased in presence of sialic acids as expected. f.d.: free dye.

HILIC

The characterization of the mAb glycovariants was completed by an analysis of the PNGaseF-released glycans by HILIC (Figure 35). Glycans were attributed to the peaks detected by comparison of the peaks glucose units (GU) values to databases and confirmed by exoglycosidase digestion.²⁷¹ Sixteen different glycans were identified across the 8 mAbs; all were of the complex di-antennary type. The abundance of each species was calculated according to the area under the peak. Each antibody was analyzed in duplicate, and the standard deviation of the abundance was 0.1% in average. The results of the quantification are presented in Table 10; the unidentified glycans (u.g) represented a maximum of 6% of the peak areas.

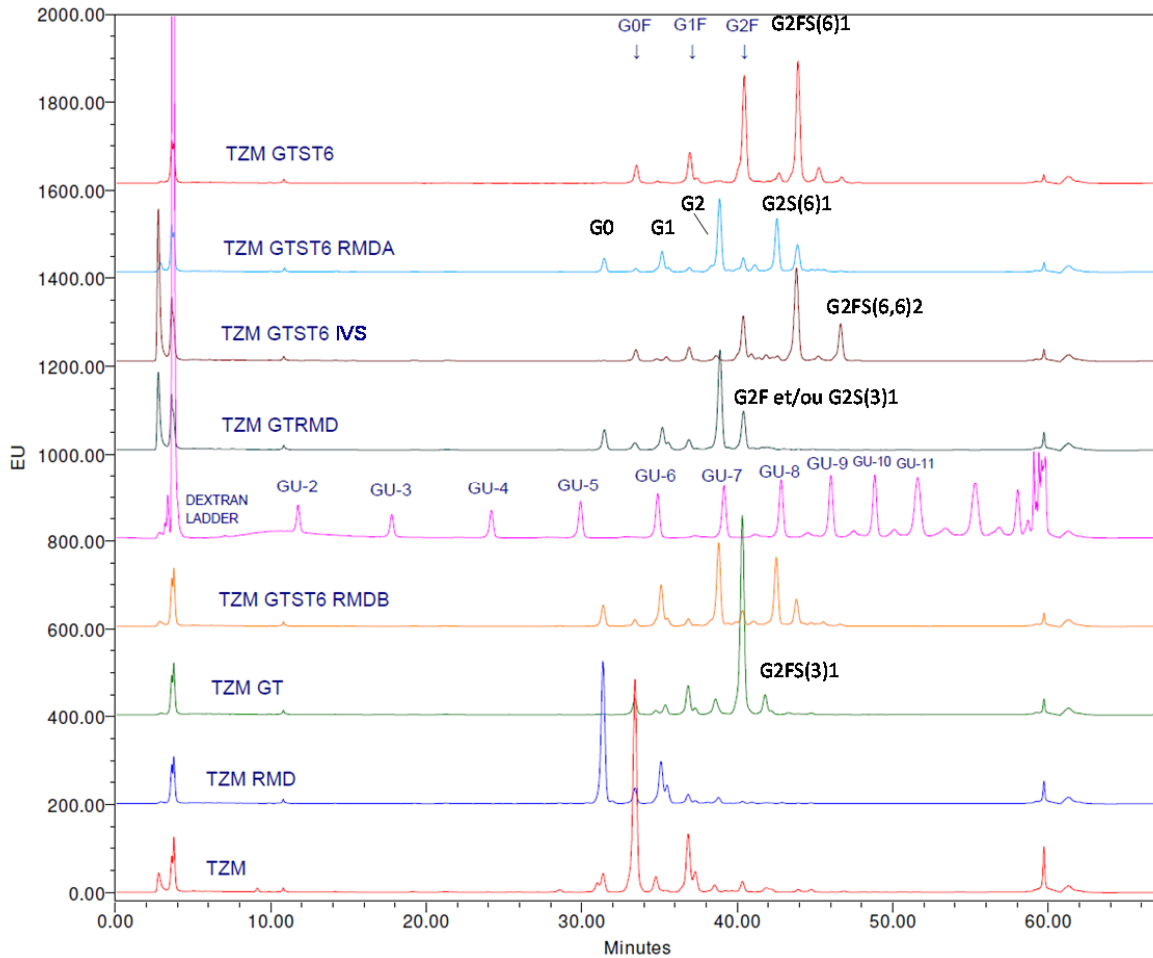


Figure 35 : HILIC profiles of the eight glycovariants

The HILIC analysis was performed on PNGaseF-released glycans. The fucose reduction obtained by RMD co-expression translates into a shift of the profile towards lower GU values, whereas the sialylated glycans are detected at higher GU values than the neutral glycans.

TZM exhibited the typical profile expected from an IgG1 expressed in CHO cells (Figure 35). The glycoprofile comprised G0F mainly (58%), followed by the two G1F isomers (16% and 5%) and very low amounts of G2F (3%). Some afucosylated glycans G0 and G1 were detected (5% and 4% respectively), as well as very low amounts of α 2,3-sialylated species (3%).

In TZM GT, the co-expression of GT resulted in an increased level of the fully galactosylated glycan G2F (66%). This increased abundance of galactosylated glycans however resulted in a relatively small increase in the levels of sialylated glycans (12%).

The co-expression of TZM with RMD (TZM RMD) resulted in a significant drop of fucosylation (from >85% to 10% of the glycans). The drop in fucosylation was less pronounced when GT and RMD were both expressed (Figure 36): 28%, 24% and 19% of the glycans remained fucosylated in TZM GTRMD, TZM GTST6RMD A and TZM GTST6RMD B respectively. In particular, while fucosylated di-galactosylated glycans (G2F, G2FS1, G2FS2) were reduced to traces in TZM RMD (<1%), they represented as much as 20%, 18% and 14% in TZM GTRMD, TZM GTST6RMD A and TZM GTST6RMD B respectively. Also, less than 1% of sialylated glycans was detected in TZM GTRMD as compared to 12% in TZM GT (Figure 36).

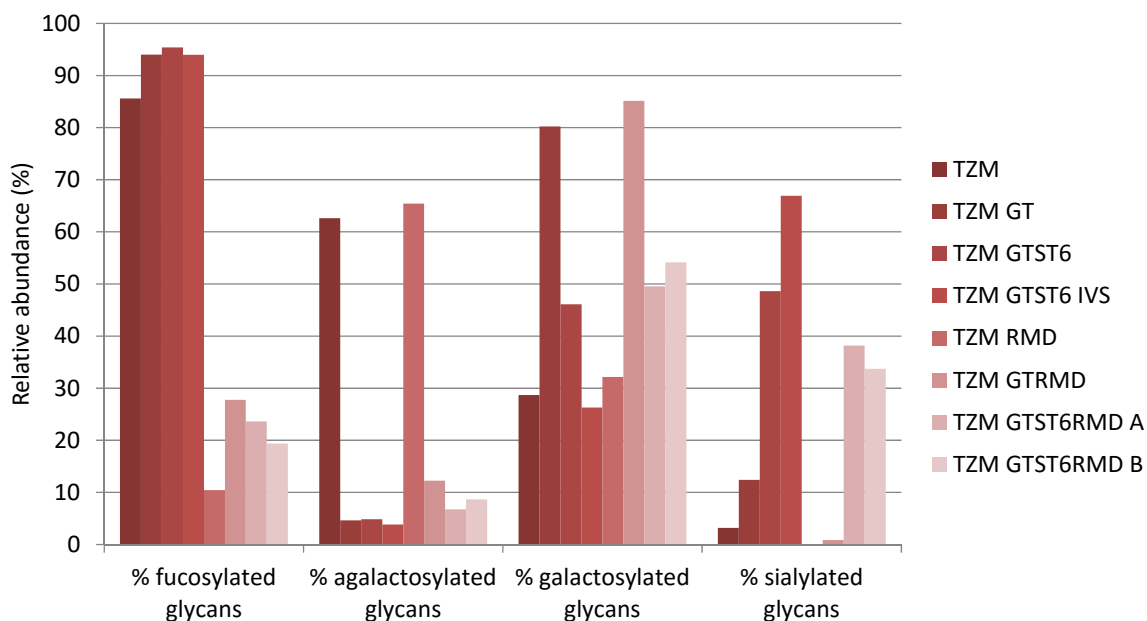


Figure 36 : Relative abundance of glycan families

The relative abundance of each glycan species was calculated as the area under the peak attributed to the glycan divided by the sum of the areas of all the peaks detected in the chromatogram. The results were then compiled, and shown by glycan families (fucosylated, agalactosylated, galactosylated and sialylated glycans) for each antibody.

ST6 co-expression allowed for the production of highly α 2,6-sialylated glycans in all cases (Figure 35 and Table 10); α 2,6-sialic acid represented at least 90% of all sialic acids. TzM GTST6 presented 49% of sialylated glycans, while TzM GTST6RMD A and B presented 38% and 34% of sialylated glycans respectively. The most abundant sialylated glycan was the mono- α 2,6-sialylated G2FS(6)1 in TzM GTST6 (38% of the glycans), and its afucosylated counterpart G2S(6)1 in TzMGTST6RMD A and B (23% in both). However, G2FS(6)1 levels were also quite high in TzM GTST6RMD A and B (12% and 9% respectively). Interestingly, we found that in TzM GTST6RMD A and B, 68-70% of the fucosylated di-galactosylated species were sialylated, whereas this was the case for only 42-43% of the non fucosylated di-galactosylated glycans (Table 10). Overall, TzM GTST6RMD A and B were only slightly different, with TzM GTST6RMD B being a little less sialylated than the sample A (Figure 36).

Finally, the *in vitro* sialylation of TzM GTST6 IVS resulted in a decrease of the proportion of glycans with terminal galactosylation accompanied by an increase in sialylation, for a final content of 67% of sialylated glycans (Figure 35&Figure 36). The level of G2FS(6,6)2 was increased to 15%, but G2FS(6)1 remained the most abundant species (41%) (Table 10).

Table 10: Relative abundance of the glycans detected in the HILIC chromatograms

| GU | Glycan | TZM | TZM GT | TZM RMD | TZM GT RMD | TZM GTST6 | TZM GTST6 SIV | TZM GTST6R MD A | TZM GTST6R MD B |
|------|-------------------|-----|--------|---------|------------|-----------|---------------|-----------------|-----------------|
| 5.91 | G0F | 58 | 5 | 6 | 3 | 5 | 4 | 1 | 2 |
| 6.66 | G1Fa (pr. G(6)1F) | 6 | 9 | 2 | 5 | 9 | 6 | 2 | 2 |
| 6.72 | G1Fb (pr. G(3)1F) | 5 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 7.50 | G2F | 3 | 66 | 1 | 19 | 35 | 19 | 5 | 5 |
| 5.48 | G0 | 5 | 0 | 59 | 9 | 0 | 0 | 6 | 7 |
| 6.27 | G1a | 4 | 3 | 19 | 11 | 0 | 0 | 10 | 15 |
| 6.35 | G1b | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| 7.12 | G2 | 0 | 0 | 2 | 48 | 1 | 0 | 32 | 30 |
| 7.06 | G1FS(3)1 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 7.63 | G1FS(6)1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 7.92 | G2FS(3)1 | 1 | 6 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 8.45 | G2FS(6)1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 | 41 | 12 | 9 |
| 8.45 | G2FS(3,3)2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9.32 | G2FS(6,6)2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 15 | 0 | 0 |
| 8.85 | G2FS(3,6)2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 1 | 0 |
| 8.10 | G2S(6)1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 23 | 23 |
| 7.70 | u.g (GU 7.70) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| | u.g other | 5 | 3 | 2 | 1 | 0 | 2 | 3 | 2 |

The relative glycan abundance was calculated as the area under the peak attributed to the glycan divided by the sum of the areas of all the peaks detected in the chromatogram. pr.: presumably, u.g.: undetermined glycan

Evaluation of the binding kinetics to the low-affinity FcγRIIIa variant by SPR

The impact of the glycosylation pattern of TZM on its binding to the receptor FcγRIIIa was evaluated by SPR in an assay where the receptor ectodomain was biotinylated and captured in an oriented manner on streptavidin-biosensor surfaces.²⁶⁵ The receptor used in this assay was the low-affinity F158 variant of FcγRIIIa (FcγRIIIa_{F158}).

Qualitative analysis

The eight antibodies were injected at 300 nM on the surface, in duplicata. The sensorgrams were normalized and then overlaid to compare the mAbs' association and dissociation profiles (Figure 37). As expected, the antibodies associated and dissociated quickly from the receptor, but the differences in the glycosylation profiles induced clear variations in the association and dissociation kinetics of the complexes (Figure 37). First of all, the association and dissociation curves of TZM GTST6RMD A & B were perfectly superimposed, thus both antibodies are now referred to as TZM GTST6RMD. Similarly, no significant differences were noticed between TZM GTST6 and TZM GTST6 IVS, they are thus referred to as TZM GTST6.

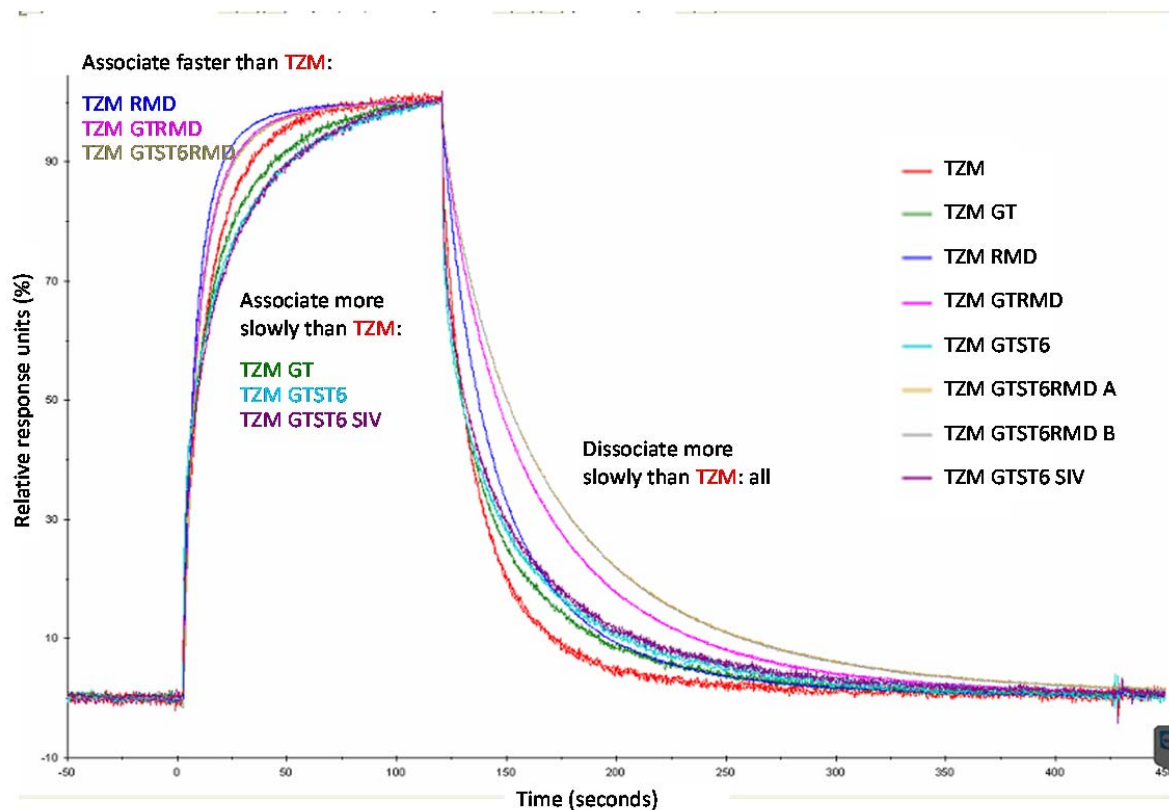


Figure 37 : Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the binding of the eight TzM glycovariants with FcγRIIIa_{F158}

The antibodies were injected over a surface coated with soluble FcγRIIIa_{F158} in an oriented manner such that a maximum of receptors are available for antibody binding. The responses were normalized and the curves overlaid to allow the comparison of the antibodies' association (0 to 120s) and dissociation (120 to 500s) kinetics.

Concerning the association rates with the receptor, two groups could be made according to their properties as compared to reference TzM: the low-fucosylated variants TzM RMD, TzM GTRMD and TzM GTST6RMD showed faster association than TzM, while the fucosylated, highly-galactosylated and -sialylated variants associated more slowly than TzM. The association curves of TzM GTRMD and TzM GTST6RMD were perfectly superimposed. The highest association rate was obtained for TzM RMD. In the slow-association group, TzM GTST6 associated more slowly than TzM GT. Thus, galactosylation affected the association rates of both highly-fucosylated and low-fucose mAbs, whereas

sialylation had an impact on the association rate of highly fucosylated antibodies, but not of low-fucose antibodies.

The influence of the glycosylation pattern on the dissociation kinetics was more complex. The dissociation stage could be divided into two phases. The first phase was very short (3 seconds) and corresponded to a fast dissociation. In the second phase, the dissociation speed was diminished until the complexes were completely dissociated. These two phases could be identified for all glycovariants although it was more visually evident for TZM GT and TZM GTST6 (Figure 38). Two distinct kinetic behaviors were observed depending on the fucose content of the mAbs. In the early dissociation phase, the highly fucosylated glycoforms were characterized by a very fast dissociation, followed by a sudden slow-down before entering the second phase. The dissociation speed increased with the glycan elongation. Among the low-fucose glycoforms, the initial acceleration of the dissociation occurred but the maximal dissociation speed remained low as compared to high-fucose glycoforms. The dissociation speed was globally low across both phases. Low-fucose galactosylated and sialylated glycoforms dissociated more slowly than TZM RMD. In contrast to the association phase, the dissociation curves of the three low-fucose mAbs were distinct: TZM GTST6RMD dissociated less rapidly than TZM GTRMD which itself dissociated less rapidly than TZM RMD. The highly fucosylated glycoforms showed the same ranking in the dissociation rates in the late phase: TZM GTST6 was slower than TZM GT which was slower than TZM. Thus, the elongation of the glycan impacted the dissociation kinetics of TZM and Fc γ RIIIa_{F158} in the low-fucose and high-fucose groups similarly.

The receptor-mAb complexes involving TZM were the first to be completely dissociated, followed by TZM RMD, TZM GT and TZM GTST6, and later by TZM GTRMD and TZM GTST6RMD.

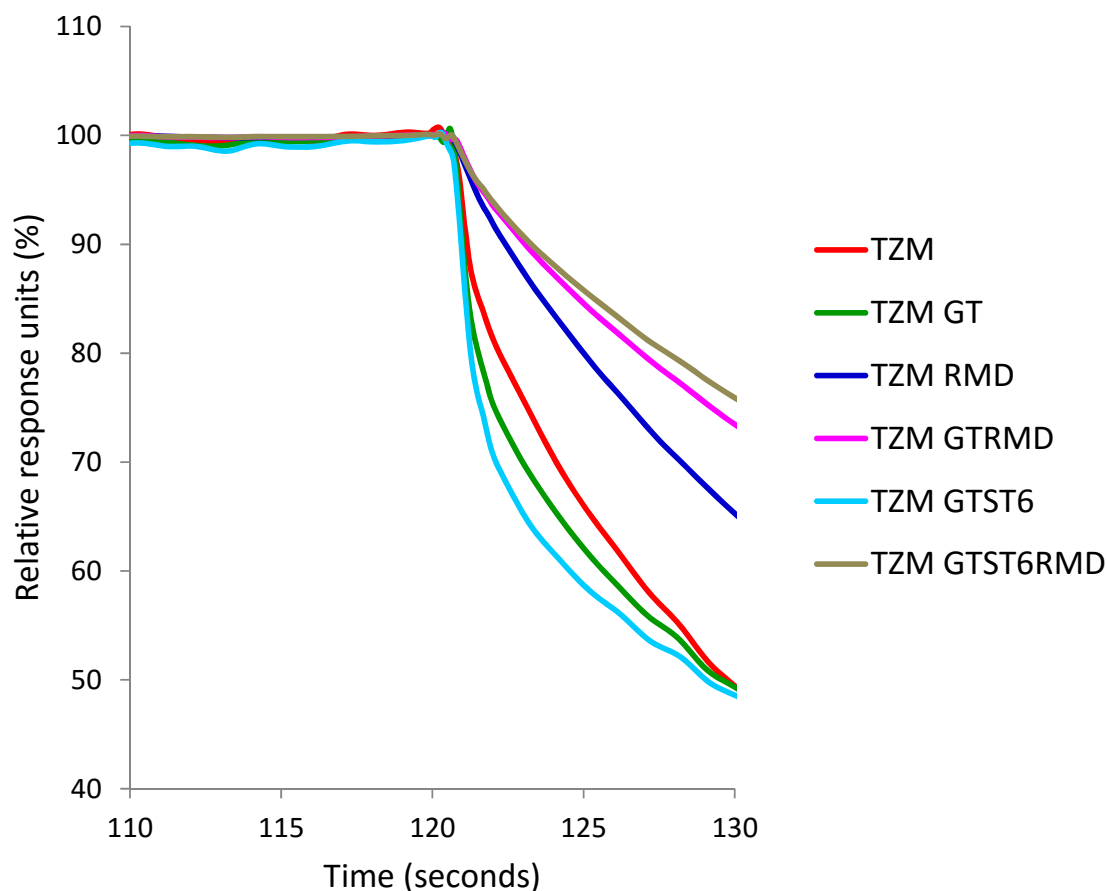


Figure 38 : Zoom on the early dissociation phase

The SPR data were loaded into the Excel software to allow for a personalized representation of the sensorgrams. The curves appear wavier than the original ones shown in Figure 37 because only a fraction of the available points were used to draw the graph.

Determination of the dissociation constant (KD)

Each antibody was injected at concentrations ranging from 1 to 1000 nM to determine the KD values by steady-state affinity with a one-to-one binding model. Although the one-to-one binding model did not fit well the complex dissociation profiles obtained, the KD was calculated to compare the mAbs with one another and also to compare our results to the literature. The KD values obtained are presented in Table 11. In agreement with the literature, TZM KD was in the μM range. The KD of the highly fucosylated glycoforms TZM, TZM GT and TZM GTST6 were not significantly different. In contrast, the absence of core-fucose

resulted in a 10-fold increase of the K_D (0.1 μM range). In the low-fucose group (RMD), the variations induced by the elongation of the glycan were very subtle yet significant: the K_D values ranged from 0.143 μM to 0.075 μM , decreasing along with the length of the glycans, i.e. $K_{D\text{TZM RMD}} > K_{D\text{TZM GTRMD}} > K_{D\text{TZM GTST6RMD}}$.

Table 11: K_D values

| Mab | K_D (μM) |
|---------------------|--|
| TZM | 1.208 \pm 0.082 |
| TZM GT | 1.072 \pm 0.082 |
| TZM GTST6 | 1.037 \pm 0.150 |
| TZM RMD | 0.143 \pm 0.014 |
| TZM GTRMD | 0.104 \pm 0.013 |
| TZM GTST6RMD | 0.075 \pm 0.006 |

The K_D values were obtained by steady-state affinity with a one-to-one binding model to the data. The K_D values provided here should be used to compare antibodies with one another but not as absolute values as the one-to-one binding model was not optimally fitting the data.

ADCC

The impact of the glycosylation pattern of the mAbs on their interaction with $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ was also evaluated in a surrogate ADCC assay, where the effector cells were engineered Jurkat cells expressing either the low-affinity F158 variant or the high-affinity variant V158. Briefly, the mAbs were first incubated with the target cells, in this case BT-474 cells expressing HER2. Then, the engineered effector cells expressing one of the two $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ variants were added. The effector cells are also genetically engineered to produce a luminescent signal when the antibody-receptor binding triggers the ADCC activation pathway. Commercial Herceptin and Synagis mAbs were included in the assays as positive and negative control respectively. The results are presented on Figure 39.

Low-affinity receptor ADCC assay

The absence of the core-fucose had a major effect on the ADCC triggering, as the low-fucose glycoforms response was increased 6-fold relatively to the high-fucose glycoforms. No

difference could be distinguished between the high-fucose glycoforms responses, including the commercial Herceptin reference. In the low-fucose mAbs, the strongest response was obtained for the glycoforms carrying terminal galactose or sialic acid, with no difference in between these, whereas the signal obtained with the low-galactosylated TZM RMD was significantly weaker. The relative responses of high-fucosylated and low-fucosylated mAbs were consistent with the KD and the observations made in the dissociation phase of the SPR assay, as well as the more subtle differences between TZM RMD and TZM GTRMD.

High-affinity receptor ADCC assay

The core-fucose had again the strongest impact on the TZM response with the high-affinity receptor. However, the difference in the responses of the high-fucose and low-fucose mAbs was not as strong as with the low-affinity FcγRIIIa. The high-fucose mAbs induced a better response with the V158 variant, while the low-fucose mAbs showed a decreased response, resulting in a 2-fold increase only of the signal between the high-fucose and low-fucose glycoforms. Inside each group, the impact of the elongation of the glycan seemed not significant. Besides, the commercial Herceptin elicited a stronger response than highly-fucosylated antibodies produced in house.

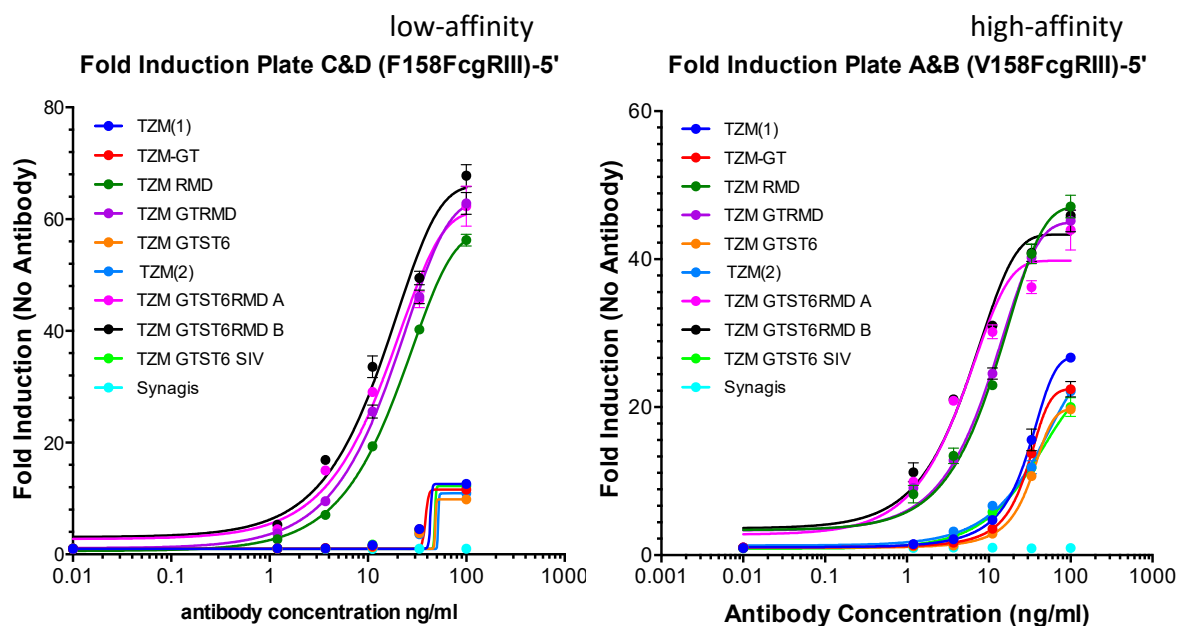


Figure 39 : ADCC response induced by the glycovariants

The antibodies were put in contact with target cells expressing HER2 and effector cells expressing the low-affinity (F158) or the high-affinity (V158) FcγRIIIa. The response was measured as a bioluminescent signal produced by the effector cells upon antibody binding, and expressed as a multiple of the basal bioluminescent signal produced by the effector cells in absence of antibodies. The results are the average and standard deviations of duplicates. TzM(1): commercial Herceptin; TzM(2): TzM produced in house.

Discussion

Seven IgG1 glycoforms were generated by transient co-expression of galactosyltransferase and/or α2,6-sialyltransferase, and/or oxidoreductase RMD, which resulted in an increase in galactosylated glycans, sialylated glycans and afucosylated glycans respectively. The overexpression of GT resulted in all cases in >80% of galactosylated glycans in the antibody while GT and ST6 overexpression resulted in 49% of sialylated glycans in the IgG1. The increase in sialylation was less efficient in the afucosylated glycans, i.e. only 34-38% of sialylated glycans were obtained when GT, ST6 and RMD were co-expressed. Most of the sialylated glycans obtained were mono-α2,6-sialylated di-galactosylated species. The IgG1 co-expressed with RMD exhibited only 10% of residual fucose. The fucosylation

inhibition was less efficient when RMD was used in combination with GT and ST6: the fucosylation level was comprised between 19% and 28% in the antibodies co-expressed in presence of GT and RMD or GT, RMD and ST6. The co-expression of three enzymes may have led to decreased levels of each enzyme in the cells as compared to the levels obtained when one or two enzymes only were expressed, explaining the less efficient fucosylation inhibition and sialylation in the samples TZM GTST6RMD.

Two TZM GTST6RMD variants were obtained by harvesting the antibody co-expressed with the three enzymes after four or five days in culture. The differences in the glycoprofiles were small, with variations of 4-5% in the levels of fucose, galactose and sialic acid. An eighth variant was obtained by *in vitro* sialylation of the IgG expressed in presence of GT and ST6, which resulted in the enrichment of the antibody in di- α 2,6-sialylated glycans G2FS(6,6)2; but still G2FS(6)1 remained the major glycan.

The binding characteristics of the eight antibodies with the Fc γ RIIIa were then analyzed by SPR and a surrogate ADCC assay where the effector cells were engineered to express one of the two Fc γ RIIIa variant. The SPR assay was ran with the low-affinity variant Fc γ RIIIa_{F158}, whereas the ADCC assay was performed with both variants.

Our results first showed that the binding of the IgG1 to Fc γ RIIIa was not sensitive to differences under 5% in the proportion of glycans with core-fucosylation, galactosylation and sialylation as the two IgG1 with such subtle glycosylation variations could not be distinguished in any of the assays. As expected, the variation in core-fucosylation showed the most radical impact on Fc γ RIIIa binding, the low-fucose level allowing for the formation of more stable complexes and higher ADCC triggering capabilities, as previously reported several times.^{26,27}

More precisely, the absence of core-fucose was necessary and sufficient to increase the association rate of TZM with the receptor; the association rate gradually increased as the extent of fucosylation decreased. Besides, the presence of terminal galactose or sialic acid residues induced a slower association rate in both fucosylated and low-fucosylated antibodies.

During the dissociation, all glycovariants formed more stable complexes with Fc γ RIIIa_{F158} than the reference TZM. The dissociation kinetics were biphasic which was

consistent with observations reported by Hayes *et al.*,²⁷² i.e. there was a short initial phase of high speed dissociation followed by a slower dissociation phase. The absence of core-fucosylation was found to decrease the intensity of the initial dissociation.

The presence of galactose was found to be beneficial to the binding of the IgG to the Fc γ RIIIa_{F158} independently of the core-fucose, as galactose-rich antibodies had lowest complex dissociation rates than their low-galactose counterparts in both high-fucose and low-fucose glycoforms groups. The benefits of core-fucose and galactose were thus additive, which is in accordance with the observations of Houde *et al.*¹⁷⁶

Our results suggest that terminal sialylation had a beneficial effect similar to that of galactose on the stability of the complexes as revealed by SPR, since α 2,6-sialylation contributed to reduced dissociation rates independently of the fucose. This result contrasts with the study by Kaneko *et al.* who found that α 2,6-sialylation reduced the affinity of the Fc for the Fc γ RIIIa, but were close to that of Yu *et al.* who found no major difference in the binding of sialylated IgGs to the receptor (V158) both in ELISA and SPR.^{35,160} Kaneko *et al.* used an SPR assay where the immunoglobulins were immobilized on the surface whereas Yu *et al.* used a setup similar to ours, with the receptors being immobilized. Different setups may induce differences in the interaction of the proteins, but totally opposite results are unlikely. The sources of the sialylated antibodies were also different, obtained from cell engineering or *in vitro* sialylation in our case and the work by Yu *et al.*, while Kaneko *et al.* proceeded to lectin-based fractionation of natural antibodies. Our sialylated mAbs and the ones used by Yu *et al.* have in common high levels of mono- α 2,6-sialylated glycans with moderate amounts of di-sialylated glycans. A detailed analysis of the glycoprofile of the antibodies used by Kaneko *et al.* is missing, preventing us from looking for a particularity that could explain the differences observed, such as for example higher levels of di-sialylated glycans, or higher levels of α 2,3-sialic acids. Both modifications are susceptible to impact the conformation of the Fc N-glycan that could result in alterations in the affinity for the Fc γ RIIIa.^{36,137,142,155} Additional data would be needed to test these hypotheses or suggest others, and the reason for the discrepancies in the SPR results remains an open question.

The similarity of the profiles of the trios low-gal/high-gal/high-sia with and without fucose show that the influence of core-fucosylation and elongation of the glycans on the

dissociation kinetics occurs through distinct mechanisms, which is consistent with the very specific role of core-fucose in the interaction IgG1-Fc γ RIIIa,^{174,175} as well as with the impact of galactose and/or sialic acid on the Fc conformation.^{142,155}

The beneficial impact of galactose was echoed in the ADCC assay, but it was not the case for sialic acid. The receptors used in the SPR and ADCC assays being expressed in different cell types, they may present different glycosylation profiles. Given the major role played by the receptor N-glycans in the interaction with the IgG1, this could result in imperfect correlations between SPR and ADCC assays. Besides, in a study by Scallon *et al.* showing that α 2,3-sialylation reduces ADCC, the authors observed that the strength of the response did not linearly correlate with the level of sialylation.³⁶ This suggests the contribution of several mechanisms to the ADCC response, like antigen-binding alterations or binding to lectins expressed at the surface of effector cells.^{36,160}

After the study by Scallon *et al.*, sialylation has commonly been considered to have a negative impact on ADCC. However, no loss of ADCC response upon terminal α 2,6-sialylation was found in our case, at least in the low-fucosylated antibodies. It is possible that α 2,3- but not α 2,6-sialylation reduces IgG's ADCC. The sialic acid linkage type alone is known to induce crucial effector function changes in IgGs, since α 2,6- but not α 2,3-sialylated IgGs demonstrated anti-inflammatory properties in several animal models,^{35,138,195} or the affinity of a mutant IgG3 for Fc γ RI and II was restored to the levels of the wild-type upon α 2,6- but not α 2,3-sialylation.¹⁹ Again, it is also possible that sialylated IgGs bind to lectins on the effector cells in natural cells-ADCC assays that modulate the response. Here, the surrogate ADCC assay that we used relies on engineered effector cells, which may lack natural sialic acids ligands modulating the ADCC response.

In the assay involving the high-affinity Fc γ RIIIa_{V158} variant, the benefits of core-fucosylation were reduced, as the response of the high-fucose glycoforms was improved whereas the response of the low-fucose glycoforms was reduced. However, the high-affinity variant ADCC assay did not show significant impact of the glycans elongation on the efficacy of the IgG1. Again, no loss of ADCC upon sialylation was observed. This is consistent with the study by Yu *et al.* where they demonstrated that α 2,6-sialylation had no impact on the affinity of the antibody for the Fc γ RIIIa_{V158} as mentioned above.¹⁶⁰

Finally, galactose and sialic acids were shown to have a modest yet significant impact on the binding kinetics of the IgG1 with the low-affinity FcγRIIIa_{F158}, which is in good agreement with other studies.^{176,188} The α_{2,6}-sialylation of the antibodies did not impair FcγRIIIa binding neither in SPR nor in the ADCC assays. These observations further underlie the complexity of an interaction involving protein-protein, protein-glycan and glycan-glycan contacts as found in the system IgG1-FcγRIIIa, and highlight the need for careful glycosylation characterization to further understand the subtleties of IgG affinity for its receptors.

Expériences complémentaires

Analyse de ST6-32 et ST6-37

Dans cette étude, nous avons produit deux sialyltransférases solubles destinées à la sialylation α_{2,6} *in vitro* des anticorps, ST6-32 et ST6-37. Nous présentons ici une analyse plus complète de ces deux sialyltransférases.

Matériel et méthode

ST6-32 et ST6-37 ont été digérées avec la PNGaseF et la O-glycosidase du kit de déglycosylation enzymatique de protéine de Sigma-Aldrich (cat# EDEGLY) en suivant les instructions du fournisseur.

Résultats et discussion

Ces deux versions solubles de la ST6GalII ont été obtenues par expression d'un même vecteur dans la même lignée cellulaire (CHO exprimant ST6GalII), mais à deux températures de culture différentes : 32°C et 37°C pour ST6-32 et ST6-37 respectivement. Une queue de dix histidines a été insérée en C-terminus de ces enzymes pour faciliter leur purification.

L'analyse en SDS-PAGE des deux enzymes a révélé qu'elles étaient composées de plusieurs fractions de poids moléculaires différents, répartis en deux groupes, le premier allant de 35kDa à 40 kDa environ, et le deuxième juste au-dessous de 50 kDa. Ce dernier groupe était très présent dans ST6-32, mais à peine visible dans ST6-37 (Figure 40, pistes 1 et 2). Les deux groupes répondaient au marquage avec un anticorps anti-His, montrant que chaque bande

correspondait à un fragment plus ou moins lourd contenant le C-terminus, l'extrémité où se situe le site actif de la ST6GalI.

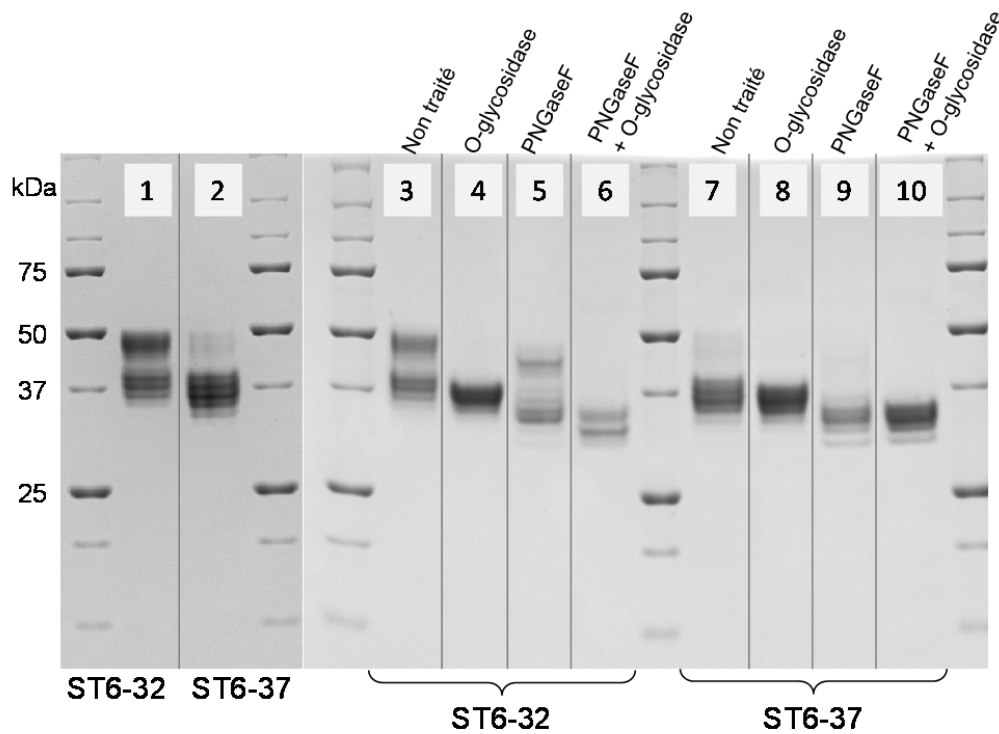


Figure 40 : Analyse en SDS-PAGE de ST6-32 et ST6-37

ST6-32 et ST6-37 présentent des profils de poids moléculaires différents. On distingue deux groupes de bandes, très prononcés chez ST6-32 tandis qu'un groupe domine largement le profil de ST6-37. L'analyse de la glycosylation des deux enzymes révèle que le groupe le plus lourd est constitué de variants fortement O-glycosylés, et que cette O-glycosylation est favorisée par la culture à 32°C de ST6.

Les O-glycanes et N-glycanes potentiels ont été digérés par une O-glycosidase et la PNGaseF respectivement. Le groupe le plus lourd a disparu après traitement avec la O-glycosidase (Figure 40, pistes 4 et 8), et le poids moléculaire apparent de toutes les bandes a été réduit après le traitement par la PNGaseF (Figure 40, pistes 5 et 9). Cela montre que des O-glycanes et des N-glycanes sont présents sur l'enzyme, ST6-32 étant fortement O-glycosylée par rapport à ST6-37.

Après complète déglycosylation (O-glycosidase + PNGaseF), le profil des ST6 est demeuré composé d'au moins trois bandes (Figure 40, pistes 6 et 10). Plusieurs sites de clivage dans le pied lumenal de la ST6GalII ont été rapportés dans la littérature.²⁷³⁻²⁷⁵ Ces bandes pourraient donc correspondre à des fragments de ST6 variablement tronqués en N-terminus.

Conclusion

La ST6-37 choisie pour l'expérience de sialylation *in vitro* est un mélange de fragments de ST6GalII solubles plus ou moins tronqués en N-terminus, N-glycosylés, et faiblement O-glycosylés.

Essai ADCC complémentaire

Le TzM utilisé dans l'étude ci-dessus a été récolté à l'issue d'une culture cellulaire de neuf jours (TzM-9j) tandis que ses glycovariants ont été produits en quatre jours, avec l'hypothèse que nous pourrions récolter une plus grande quantité de TzM sans risquer d'altérer son profil de glycosylation puisqu'il ne contient pas de glycanes sialylés, connus pour diminuer au cours de la culture. Or, nous avons observé que son profil cIEF était un peu différent du profil du TzM récolté à quatre jours (TzM-4j) que nous avons utilisé pour l'article présenté au chapitre « Sialylation d'une IgG1 native ». Les profils de TzM-4j et TzM-9j sont présentés sur la Figure 41. On remarque que le TzM-9j contient en effet plus de variants de charge noté #2, #4 et #5 que le TzM-4j. De plus, le profil de TzM-4j est très similaire aux profils de TzM GT, TzM RMD, et TzM GTRMD.

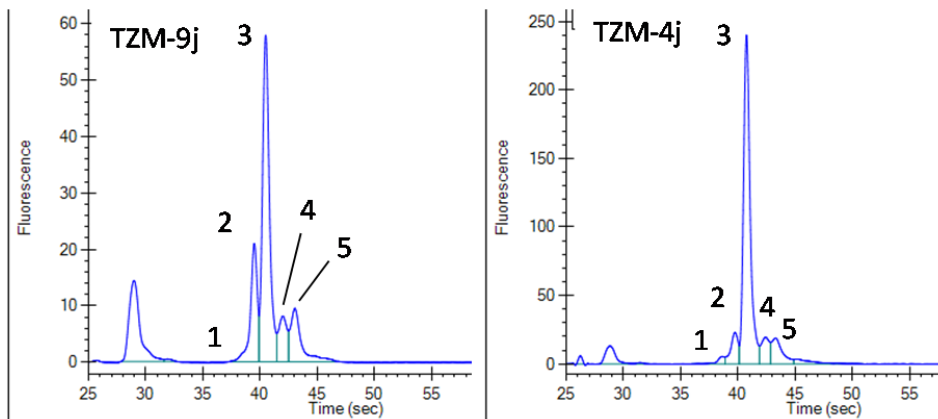


Figure 41 : Profils cIEF de TzM-9j et TzM-4j

Le TzM-9j contient plus de variants acides et basiques mineurs que le TzM-4j, dont le profil est très semblable à celui des autres TzM non sialylés produits en quatre jours (TzM GT, TzM RMD et TzM GTRMD).

Ensuite, nous avons observé que la réponse induite par TzM-9j était plus faible que celle induite par le TzM commercial dans l'essai d'ADCC.

Ces deux constats pourraient conduire à l'hypothèse que l'effet positif du galactose et de l'acide sialique sur l'interaction TzM-FcγRIIIa ne seraient dû qu'à une comparaison avec un TzM de référence de faible qualité. Pour contrer cette hypothèse, nous avons repris les essais de SPR et d'ADCC avec le TzM-4j, et démontré que l'effet positif du galactose et de l'acide sialique était réel.

Par ailleurs, nous avons placé dans ces deux essais supplémentaires le mutant α2,6-sialylé TzMmGTST6 afin de le comparer aux non-mutants.

Matériel et méthode

Le TzM-4j et le TzMmGTST6 sont les anticorps décrits dans le chapitre « Sialylation d'une IgG1 native ». L'essai de SPR et l'essai ADCC ont été réalisés tel que décrit dans la section Materials and Methods de ce chapitre.

Résultats et discussion

SPR

L'interaction du Fc γ RIIIa de faible affinité (F158) avec TZM-4j, TZM GT, TZM GTST6 et TZMmGTST6 a été analysée par SPR. Les courbes de réponse obtenues ont été normalisées puis superposées afin de comparer les cinétiques d'association et de dissociation des quatre anticorps (Figure 42). On voit que comme TZM-9j, TZM-4j s'associe et se dissocie du récepteur plus vite que TZM GT, qui se dissocie lui-même plus vite que TZM GTST6. L'élongation des branches permet donc de former des complexes TZM-Fc γ RIIIa_{F158} plus stables. En revanche, le mutant sialylé TZMmGTST6 s'associe et se dissocie plus vite que les non mutants. Il forme donc des complexes moins stables que les non-mutants avec le récepteur.

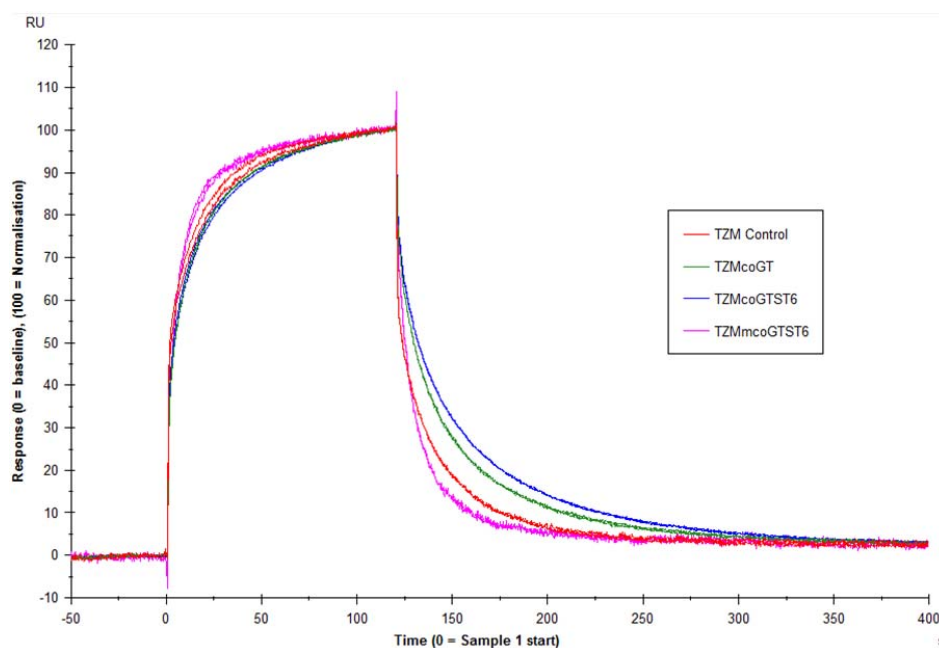


Figure 42 : Profils d'association et de dissociation de TZM-4j, TZM GT, TZM GTST6 et TZMmGTST6 avec Fc γ RIIIa_{F158}

Les essais ont été réalisés en duplicata. Les courbes de réponse des duplicata se superposent si bien qu'on ne distingue les deux courbes que pour le TZMmGTST6. TZM Control : TZM-4j; RU : unité de réponse

ADCC

Dans cet essai ADCC, l'interaction de TZM-4j, TZM GT, TZM GTST6 et TZMmGTST6 avec Fc γ RIIIa_{F158} et Fc γ RIIIa_{V158} a été étudiée. Les résultats sont présentés sur la Figure 43.

On constate que l'interaction des deux récepteurs avec le TZM-4j induit une réponse très inférieure aux anticorps TZM GT et TZM GTST6 produits également en quatre jours. Ainsi, le TZM-4j serait en réalité moins efficace que le TZM-9j. Ceci pourrait s'expliquer en partie par la présence relativement prononcée de forme afucosylées dans le TZM-9j (>14%), ou bien par la présence plus prononcée également des variants acides et basiques dans le TZM-9j. Quoiqu'il en soit, cet essai confirme l'impact positif de l'élongation des glycanes fucosylés du Fc avec des résidus de galactose ou d'acide sialique en position terminale sur l'interaction de l'anticorps avec les deux variants du Fc γ RIIIa.

Enfin, le TZMmGTST6 ne démontre aucune capacité à déclencher l'ADCC via le Fc γ RIIIa_{F158} (Figure 43, cadre gauche), ce qui est cohérent avec le résultat de SPR. Il permet néanmoins d'activer le récepteur à haute affinité Fc γ RIIIa_{V158}, avec une intensité légèrement inférieure au TZM (Figure 43, cadre droit).

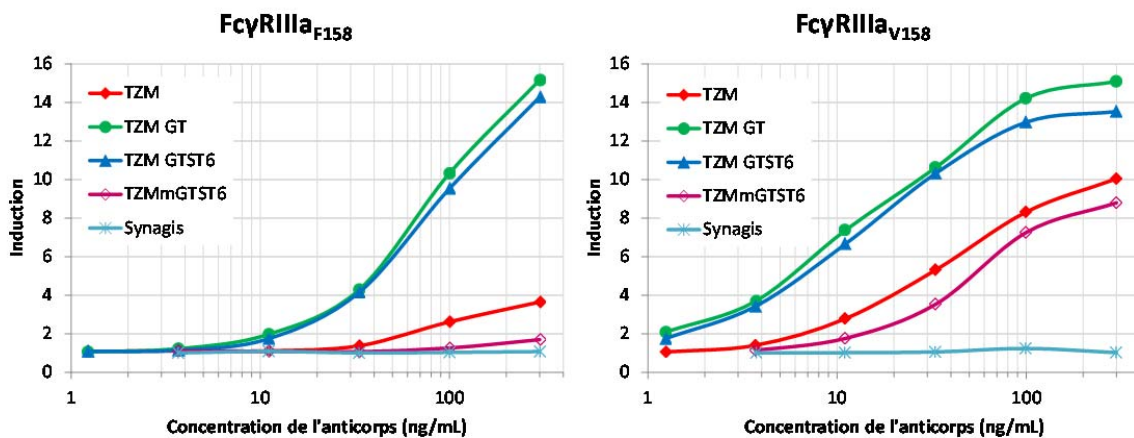


Figure 43 : Réponse ADCC induite par l'interaction de glycovariants de TZM et du mutant TZMmGTST6

Tous les anticorps ont été produits en 4 jours. On voit que la réponse induite par le TZM avec les deux récepteurs Fc γ RIIIa (basse affinité F158 et haute affinité V158) est inférieure à la

réponse induite par les glycoformes galactosylées et sialylées. Le mutant sialylé induit une réponse plus faible que le TzM avec le variant V158, mais pas de réponse avec le variant F158.

Ce mutant possède une alanine à la place de la phénylalanine en position 243. La F243 est connue pour stabiliser la branche α 1,6 du glycanes par une interaction de type CH- π avec le GlcNac de cette branche.²⁷⁶ La mutation F243A, comme F241A ou V264E, permet la sialylation du glycanes du Fc en le rendant plus accessible pour les GT et ST. Une étude a montré que la déstabilisation de l'interaction « surface du Fc/glycanes » induite par F241A et V264E était à l'origine de la perte d'affinité de ces mutants pour le Fc γ RIIIa_{V158}, et non la présence d'acide sialique causée par ces mutations.¹⁶⁰ Or, F241 et V264 interagissent avec les deux GlcNac de cœur du glycanes (Figure 10), qui sont aussi ceux qui interagissent avec le glycanes en N162 du Fc γ RIIIa.^{174,175} On comprend donc que la déstabilisation de cette zone par les mutations F241A et V264E affectent l'affinité de l'anticorps pour le récepteur indépendamment de l'élongation des branches du glycanes du Fc. Ces travaux n'étaient pas concluants concernant la mutation F243A. En effet, pour montrer que c'était la déstabilisation de l'interaction acide aminé-glycanes et non la sialylation qui causait la perte d'affinité des mutants, les auteurs ont comparé des couples IgG1 native/mutante avec une glycosylation homogène de type haut-mannose : les glycoformes Man5/Man5. Ils ont ensuite montré que les mutants F241A et V264E Man5/Man5 avaient une affinité réduite pour le récepteur par rapport aux IgG1 natives Man5/Man5. Cependant, le glycanes Man5 n'était pas un glycanes approprié pour tester l'impact de la F243, puisque qu'il ne possède pas le GlcNac α 1,6 qui interagit avec F243. Ainsi, la comparaison de l'IgG1 et de l'IgG1F243A Man5/Man5 nous apprend seulement que la F243 n'intervient pas directement dans l'interaction avec le récepteur, puisque ces deux anticorps avaient une affinité identique pour le récepteur V158, supérieure à l'IgG1 avec une glycosylation classique, celle-ci ayant elle-même une affinité supérieure au mutant avec une glycosylation classique (IgG1_{Man5/Man5} = IgG1F243A_{Man5/Man5} > IgG1_{classique} (G0F, G1F majoritaires) > IgG1 F243A_{classique} (G2F, G2FS1 majoritaires)). Ainsi, il se pourrait que la déstabilisation de l'interface Fc/glycanes induite par la mutation F243A et/ou l'augmentation de sialylation induite par cette déstabilisation, diminuent l'affinité du mutant pour le Fc γ RIIIa_{V158}.

Ces résultats et nos observations suggèrent un effet opposé de la sialylation selon que l'anticorps est muté F243A, ou non. Dans l'IgG1 native, on sait que le bras α 1,6 est maintenu contre la paroi du Fc par l'interaction F243-GlcNAc α 1,6, puis que cette stabilisation augmente en présence d'un résidu de galactose α 1,6 (formation de G1F), qui crée des liaisons hydrogène avec des acides aminés de la surface du Fc.^{23,276} On peut supposer que l'addition d'un galactose et d'un acide sialique sur la branche α 1,3 voisine (formation de G2F, GFS(6)1), voire d'un deuxième acide sialique sur la branche α 1,6 (G2FS(6,6)2), créent des interactions productives avec le récepteur, ou favorisent une conformation favorable au récepteur, ou enfin au minimum, ne gênent pas l'interaction avec le récepteur. La contribution productive de la branche complexe α 1,3 dans l'affinité de l'anticorps pour le Fc γ RIIIa a déjà été suggérée par les travaux de Kanda *et al* et de Lin *et al*.^{170,193} Par contre, la levée de la contrainte spatiale sur la branche α 1,6 découlant de la mutation F243A pourrait l'amener à gêner de manière stérique l'interaction optimale des GlcNAc de cœur du glycane du Fc avec le glycane en N162 du récepteur. L'allongement des branches du glycane avec du galactose et des acides sialiques pourrait accentuer cette gêne stérique.

Conclusion

La galactosylation permet bien de ralentir la dissociation du TzM avec le Fc γ RIII_{F158}, et d'augmenter la réponse du TzM pour les deux variants du récepteur Fc γ RIIIa. La sialylation permet elle aussi de ralentir la dissociation du TzM avec le Fc γ RIII_{F158}, mais cet effet ne se traduit pas ensuite par une augmentation de réponse ADCC.

Enfin, le mutant s'associe et se dissocie plus vite du récepteur F158 que le TzM. Il déclenche une réponse quasi nulle aux concentrations testées avec le Fc γ RIII_{F158}, et une réponse proche du TzM avec le Fc γ RIII_{V158}.

Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié 9 glycovariants de TzM présentant divers degrés de galactosylation, sialylation et fucosylation, ainsi qu'un mutant TzM F243A sialylé. Lin *et al*. ont suggéré récemment que les IgG1 afucosylées et sialylées G2S(6,6)2 seraient à la fois anti-inflammatoires et pro-inflammatoires.¹⁷⁰ Nous voyons effectivement que les IgG

sialylées, afucosylées et fucosylées, créent des complexes plus stables avec Fc γ RIIIa_{F158} que les IgG très galactosylées, qui forment elles-mêmes des complexes plus stables que les IgG faiblement galactosylées. Cependant, ce bénéfice n'est pas directement traduit par une augmentation graduelle de la réponse ADCC : nos résultats montrent que les IgG sialylées et très galactosylées ont des réponses ADCC équivalentes.

La réponse ADCC est évaluée par un essai où les cellules effectrices ne sont pas issues du sang, mais sont des cellules développées pour surexprimer un seul variant du Fc γ RIIIa, ainsi que pour produire un signal luminescent lorsque la voie de l'ADCC est activée par ce récepteur. Avec un tel ciblage de la réponse Fc γ RIIIa, nous nous attendions à une corrélation plus exacte entre les résultats SPR et ADCC pour le récepteur F158. Les divergences observées suggèrent que l'organisation et la concentration des récepteurs, Fc γ RIIIa ou autres récepteurs exprimés par les cellules effectrices, modulent l'intensité de la réponse cellulaire. La formation de complexes immuns à la surface des cellules cibles pourrait également jouer un rôle.

L'étude du mutant suggère que la sialylation α 2,6 augmente l'ADCC à condition que le bras α 1,6 soit ordonné le long de la surface du Fc, et disponible pour l'interaction avec le glycanes en N162 du récepteur. La compréhension de l'impact de la mutation F243A bénéficierait de tests complémentaires comprenant les glycovariants de TZMm (TZMm, TZMmGT, TZMmGTST6).

Conclusion

La sialylation α 2,6 ralentit la dissociation du complexe IgG1-Fc γ RIIIa et permet une meilleure activation de l'ADCC. Les résultats de notre étude rejoignent les conclusions des récents travaux de recherche sur l'impact de la sialylation, qui contredisent l'idée que celle-ci diminue la capacité des IgG à déclencher l'ADCC comme cela avait été montré dans trois études parues entre 2007 et 2010. Une évaluation de l'ADCC *in vivo* dans une variété de modèles pourrait apporter des éléments expliquant l'écart entre les résultats les plus récents et les travaux fondateurs.

VI. Développement d'une plateforme d'expression stable

Introduction

La méthode de production présentée jusqu'ici nous a permis de produire en CHO des anticorps avec des profils de glycosylation enrichis en galactose, enrichis en glycanes sialylés de type humain (glycane G2FS(6)1 majoritaire), et faiblement fucosylés. Ces différents anticorps ont été obtenus en qualité et quantité très satisfaisantes, permettant de réaliser la caractérisation complète des profils de glycosylation ainsi que des tests pour l'évaluation de l'efficacité ADCC des glycovariants. Les anticorps sialylés se sont révélés, selon les cas, aussi efficaces ou plus efficaces que les anticorps au profil classique produits en CHO, c'est-à-dire pauvrement galactosylés et sialylés.

Les IgG α 2,6-sialylées seraient également capables d'induire des mécanismes anti-inflammatoires, et seraient susceptibles d'être utilisées comme traitement de remplacement des IgIV.

Dans ce contexte, la mise au point de méthodes de production d'IgG sialylées permettant de comprendre et de confirmer l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG, telles que celle que nous avons développée, est très importante. Ensuite, accumuler dès aujourd'hui les connaissances nécessaires à la mise en place d'une méthode applicable à grande échelle pour le cas où l'efficacité anti-inflammatoire des IgG sialylées chez l'humain serait confirmée permettrait d'accélérer le déploiement de cette alternative aux IgIV.

Les méthodes disponibles les plus efficaces pour la fabrication d'IgG sialylées sont les techniques de traitement chimio-enzymatiques post-purification, qui sont difficiles et coûteuses à mettre en place à grande échelle. La méthode de choix serait le développement d'une lignée cellulaire permettant l'expression d'IgG sialylées, avec de forts rendements. Des équipes ont déjà développé des lignées dans ce but, mais les résultats ont été insuffisants

(sialylation trop basse), ou bien satisfaisants mais mal compris, et de ce fait difficilement reproductibles.^{121,123}

Nous proposons de développer une lignée pour la production d'IgG sialylées avec un rendement compatible avec une production industrielle, en utilisant un système d'expression stable et inductible développé par une équipe du CNRC.²⁷⁷ De plus, comme les dernières données nuancent le rôle d'interrupteur pro/anti-inflammatoire de l'acide sialique, et que le fragment Fc α 2,6-sialylé serait suffisant pour diminuer l'inflammation, nous avons décidé de développer un Fc sialylé plutôt qu'une IgG complète¹⁴³, afin d'empêcher l'activation des fonctions effectrices classiques des IgG et de cibler ainsi son fonctionnement anti-inflammatoire.

Méthodologie

Déroulement général du développement d'une lignée stable

Le déroulement général du développement d'une lignée stable est illustré sur la Figure 44. Le développement d'une lignée stable commence par la transfection d'une lignée cellulaire parentale avec un plasmide contenant le transgène et un gène de résistance à une pression de sélection donnée. La pression de sélection est ensuite appliquée à la culture afin d'éliminer les cellules incapables de résister, c'est-à-dire les cellules qui i) n'auraient pas intégré le plasmide contenant le transgène et le gène de résistance, ii) l'auraient intégré de manière transitoire puis perdu après quelques jours, iii) auraient intégré le plasmide dans leur génome de manière stable mais à un emplacement délétère pour la cellule ou encore iv) auraient altéré l'intégrité du gène de résistance au moment de l'intégration au génome. Le couple gène de résistance/pression de sélection est classiquement un couple gène de résistance à un antibiotique/antibiotique, mais d'autres stratégies existent, telles que l'utilisation du couple gène de la glutamine synthétase/inhibiteur de glutamine synthétase (système GS/MSX) que nous évoquerons au paragraphe suivant.

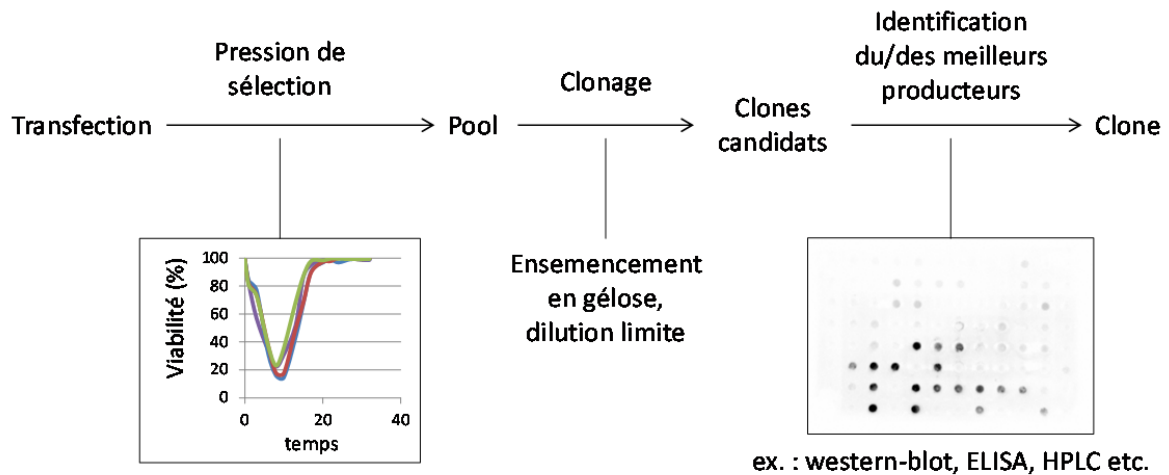


Figure 44 : Etapes de développement d'un clone stable

Au cours de la phase de sélection, la viabilité de la culture cellulaire commence par chuter. Les cellules sont centrifugées tous les deux ou trois jours afin de remplacer le milieu par du milieu frais (toujours additionné de l'agent de sélection) et de les concentrer pour maintenir une densité cellulaire confortable pour les cellules. A un certain point, seules demeurent les cellules résistantes, qui se multiplient : la densité cellulaire et la viabilité remontent jusqu'à l'obtention d'un « pool » cellulaire. Cette phase peut prendre de 2 à 3 semaines.

Le pool cellulaire est constitué de cellules dont le taux d'expression du transgène est variable, puisque celui-ci dépend de facteurs comme le nombre de copies du gène qui ont été intégrées dans le génome ou la position de ces copies dans le génome.

L'étape de clonage consiste à séparer les cellules du pool afin d'isoler les cellules ayant à la fois une forte expression du transgène et de bonnes capacités de croissance cellulaire. En effet, la cellule distribuant son énergie entre l'expression des protéines et la croissance, les plus forts producteurs sont parfois inexploitable en culture cellulaire car ils ne poussent pas. L'isolement des clones passe par l'extrême dilution du pool. Les cellules ainsi diluées sont soit ensemencées dans des puits en milieu liquide (technique de la dilution limite en plaque de 96 ou de 384 puits), soit en milieu semi-solide. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C jusqu'à ce que des colonies se forment. Une grande partie des cellules ne parvient pas à former de colonie à partir d'une seule cellule. Cette étape peut prendre de 2 à 4 semaines.

Lorsque les colonies émergent, la caractérisation de leur capacité d'expression du transgène commence. Les méthodes de caractérisation sont variées et dépendent de la protéine cible. Des cycles d'amplification des colonies et de caractérisation se succèdent afin de resserrer le choix sur les meilleurs candidats. Lorsque les colonies ont atteint une taille suffisante, les meilleurs clones sont sélectionnés et caractérisés de manière plus approfondie. On achève la sélection à ce moment par l'étude de comportement des candidats en production (croissance, rendement), et leur stabilité (évolution du rendement après 2 semaines, 1 mois, 2 mois de maintenance, et après décongélation).

Remarque sur les co-transfections

Lors de la co-transfection de plusieurs plasmides dans le système, on s'attend à ce que si l'un des plasmides contient la résistance à l'agent de sélection, alors la cellule aura de fortes chances d'exprimer tous les transgènes, y compris ceux codés par des plasmides qui ne contiennent pas le gène de résistance.

Système de sélection GS/MSX

La glutamine synthétase (GS) est l'enzyme responsable de la synthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammoniaque, seule voie de synthèse de glutamine dans les cellules mammifères. Les cellules utilisent normalement la glutamine présente dans le milieu de culture. Cependant, dans un milieu sans glutamine, la survie des CHO repose sur la synthèse de glutamine par la GS. La méthionine sulfoximine (MSX) est un inhibiteur de la GS endogène. Dans un milieu sans glutamine et en présence de MSX, les cellules CHO ne survivent pas. En insérant une copie du gène de la GS dans le plasmide codant le transgène, on apporte à la cellule les moyens de survivre dans un milieu sans glutamine et contenant du MSX.

Système inductible au cumate

Le système inductible au cumate a été développé au CNRC par le groupe de Bernard Massie.²⁷⁷ Il repose sur l'utilisation d'un opérateur cumate (CuO) et d'un répresseur de cet opérateur (CymR) issus de la bactérie *Pseudomonas putida F1*. Ces deux éléments ont été exploités comme suit. D'une part, la séquence ADN du CuO a été fusionnée à la séquence

minimale du promoteur du cytomégalo-virus humain (CMV), qui est un promoteur fort dans un grand nombre de cellules animales. Le promoteur obtenu est appelé CR5. D'autre part, le répresseur CymR a été fusionné au trans-activateur du virus de l'herpès simplex, le VP16. Le trans-activateur chimérique obtenu, le cTA, était capable de se lier au CuO en l'absence de cumate uniquement. La séquence du CymR a été retravaillée par mutagenèse dirigée afin de se lier au CuO en présence de cumate. Cette séquence de CymR inversée a été fusionnée avec le VP16, ce qui a donné le trans-activateur chimérique inversé rcTA. Ainsi, en présence de cumate (mode ON), l'expression du transgène est activée par la liaison du rcTA+cumate au promoteur CR5. En l'absence de cumate (mode OFF), le rcTA ne lie pas le CR5, qui est inactif. Cette inactivation n'est pas totale, et une expression basale du transgène se produit en OFF.

Lignée cellulaire

La lignée CHO^{BRI}-55E1 est une lignée compatible avec le système inductible au cumate et le système de sélection GS/MSX. Un dérivé du plasmide pTT (pTTBRI) a été développé au CNRC pour favoriser l'expression stable des protéines recombinantes dans la CHO^{BRI}-55E1. Les caractéristiques de la lignée et des plasmides sont confidentiels.

La séquence du fragment Fc a été prélevée par digestion avec des enzymes de restriction dans le plasmide pTT codant la chaîne lourde de notre IgG1 modèle, le TZM. La séquence a ensuite été clonée dans le pTTBRI. La séquence de la région charnière tronquée obtenue est précisée dans l'Annexe 1. Cette région charnière possède des cystéines qui forment des ponts disulfures entre deux monomères de fragment Fc. Le Fc obtenu a donc la structure dimérique du Fc de l'IgG1 complète, avec les deux sites de glycosylation N297 dans chaque domaine C_H2.

Obtention de pools cellulaires

Les cellules ont été maintenues dans le milieu PowerCHO-2 CD (PwC2) (Lonza, cat# 12-771Q) supplémenté en glutamine 4 mM entre 0,3 et 2 x 10⁶ c/mL. Deux à 4 heures avant la transfection, les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 250 g à température ambiante et resuspendues dans du milieu CD-DG44 (Thermo Fisher Scientific, cat# 12610-010) sans glutamine. Les cellules ont été transfectées entre 1,5 et 2,5 x 10⁶ c/mL à une viabilité >95%

avec du PEI selon la méthode indirecte (ADN 1 µg/mL final, PEI 3 µg/mL final, incubation des polyplexes 5 minutes à température ambiante). Le lendemain, le milieu a été échangé de nouveau pour du PwC2, sans glutamine. Le MSX a été ajouté à la concentration de 50 µM. Tous les deux à trois jours, les cellules ont été comptées, centrifugées puis resuspendues dans du PwC2+MSX neuf afin de maintenir les cellules à une densité de cellules viables minimale de $0,3 \times 10^6$ c/mL. Le contenant était changé en conséquence : démarrage en flasque ventilée de 125 mL (15 à 25 mL de volume de culture), puis passage en plaques de 6 puits profonds (5 à 9 mL de volume de culture), 6 puits classiques (2 à 3 mL de culture), 12 puits (800 µL à 1,5 mL de culture), et 24 puits si nécessaire (400-500 µL de culture), puis changement de contenant dans l'ordre inverse à mesure que la densité cellulaire progressait. Depuis la transfection jusqu'à la remontée de la viabilité cellulaire à >70%, la totalité des cellules a été conservée. Lorsque la viabilité a dépassé 70%, les cellules ont été passées de façon classique (rejet des cellules excédentaires) à $0,4 \times 10^6$ c/mL jusqu'à ce que la viabilité remonte à >90%. Une partie des cellules a alors été congelée à 8×10^6 c/mL (ampoules de 1 mL) dans un mélange de PwC2 neuf et de diméthylsulfoxyde (DMSO, 7,5% en volume). L'autre partie a été placée en production (voir paragraphe Production batch).

Le meilleur pool a été sélectionné en fonction de l'intensité du signal de SNA-blot réalisé sur les surnageants de production contenant le Fc à 6 jours post-induction. Les SNA-blots ont été réalisés tel que décrit aux chapitres précédents.

Sélection d'un clone

Les cellules du pool choisi ont été décongelées dans le milieu BalanCD CHO Growth A (BCD) (Irvine Scientific, cat# 91128) sans glutamine et avec MSX. Elles ont été entretenues deux semaines avant d'être diluées dans le BCD sans MSX et sans cumate à 1, 3 ou 10 cellules par puits, chaque puits contenant 100 µL final en plaque 96 puits. Les plaques ont été placées dans un incubateur humidifié à 37°C sans agitation pendant 3 à 4 semaines. Lorsque les colonies cellulaires formaient une couche couvrant environ les deux tiers du fond du puits, les colonies ont été resuspendues et amplifiées lentement en passant progressivement des plaques 96 puits aux plaques 24, 12, puis 6 puits, et enfin en flasques Erlenmeyer ventilées agitées de 125 mL.

La sélection des meilleurs clones a été réalisée en fonction de la sialylation α 2,6 détectée dans le surnageant de culture en SNA-dotblot jusqu'à l'obtention de 21 candidats, puis la sélection s'est poursuivie en fonction de la sialylation du surnageant et du rendement de production de Fc mesuré en HPLC protéine A.

Pour réaliser le SNA-dotblot, 40 μ L du surnageant de chaque colonie ont été déposés sur une membrane comprimée dans un appareil à dot-blot relié à une pompe à vide. La membrane a ensuite été rincée avec du PBS-tween, bloquée avec une solution de caséine, puis incubée avec la lectine SNA biotinylée puis la Streptavidine-HRP et enfin révélée selon le même protocole que les SNA-blot décrits dans les chapitres précédents.

Numération cellulaire

Les cellules ont été traitées avec de l'Accumax (Innovative cell technologies, cat# AM-105) dans les proportions 1:1 en volume, 30 minutes sous agitation à 32°C afin de réduire l'agrégation des cellules avant le comptage au Cedex.

Production batch

Les cellules ont étéensemencées à $0,4 \times 10^6$ cellules/mL dans le milieu PwC2 dans des flasques ventilées de 2 L pré-rincées au PBS, agitées à 120 rpm dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂. Après 3 jours de croissance, lorsque la culture avait atteint environ 3×10^6 cellules/mL, le cumate a été ajouté à 2 μ g/mL (concentration non toxique pour les cellules) et la température descendue à 32°C. Le Fc a été purifié sur colonne de protéine A tel que décrit aux paragraphes précédents pour le TZM complet, à l'exception du pH d'élution qui était de 3,6 au lieu de 3,0 pour le TZM complet.

Production fed-batch

Les cellules ont étéensemencées à $0,4 \times 10^6$ cellules/mL dans le milieu BCD dans des flasques ventilées de 1 L pré-rinsées au PBS agitées à 120 rpm dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂. Après 3 jours de croissance, lorsque la culture avait atteint environ 3×10^6 cellules/mL, le cumate a été ajouté à 2 μ g/mL et la température descendue à 32°C. Les cultures ont été supplémentées avec une solution nutritive aux jours 4, 5, 6, 7, 10 et 12 après l'induction selon un protocole établi au laboratoire. A 4, 6, 8 et 11 jours post-induction, un

échantillon de culture a été prélevé et le surnageant récolté après centrifugation 20 minutes à 4000 rpm. Le Fc a été purifié comme décrit au paragraphe précédent.

Spectrométrie de masse

L'analyse de la glycosylation du peptide Fc/2 par LC-ESI-MS a été réalisée comme cela a été décrit au chapitre « Sialylation d'une IgG1 native ».

Résultats

Avantage de l'inductibilité de ST6

Phase de sélection

Pour commencer, nous avons testé l'impact de l'inductibilité de ST6GalI sur la phase de sélection de pools stables. Des cellules CHO^{BRI}-55E1 ont été transfectées soit avec le plasmide codant pour la ST6GalI sous contrôle du promoteur inductible (ST6i), soit avec un mélange 1:1 du plasmide codant ST6i et du plasmide utilisé lors des expressions transitoires, codant pour une ST6GalI dont l'expression était constitutive (ST6c). Les cellules ont ensuite été soumises à la pression de sélection. Les transfections ont été réalisées en duplicat.

La Figure 45 montre l'évolution de la viabilité de la culture au cours de la phase de sélection. On observe que la viabilité des cellules est descendue jusqu'à 60-65% pour les cellules ST6i, et 50-55% pour les cellules ST6i-ST6c. Après le huitième jour de sélection, la viabilité est remontée. A la fin des deux premières semaines de sélection, on constate que les cellules ST6i-ST6c ont subi une deuxième baisse de viabilité, moins forte que la première. Cette deuxième vague peut correspondre à la mort des cellules qui n'avaient pas intégré les copies du gène de résistance à la pression de sélection de façon stable. Comme le gène de résistance se trouve sur le plasmide de ST6i, une hypothèse est que ce sont des cellules ayant perdu ST6i qui sont mortes. Ainsi, les plasmides de ST6i et ST6c ont potentiellement été en compétition pour leur intégration stable dans le génome, ce qui a conduit à cette deuxième vague de mort cellulaire dans les pools ST6i-ST6c. Alternativement, ce sont les cellules qui exprimaient trop de ST6 à cause de l'intégration et de l'expression immédiate de ST6c qui sont mortes.

L'expérience a été renouvelée en présence de Fc inductible : les cellules ont été transfectées soit avec un mélange 1:1 de plasmides codant pour le Fc inductible (Fci) et la ST6i, soit un mélange 1:1 Fci-ST6c. Lors de la phase de sélection, la viabilité est descendue jusqu'à 50-55%, sauf pour l'une des deux cultures Fci-ST6i, qui n'est descendue qu'à 80%. Cette fois, il n'y a pas eu de deuxième baisse de viabilité, ce qui affaiblit l'hypothèse d'une compétition pour l'intégration des plasmides, et apporte plus de poids à l'hypothèse d'une mort cellulaire due à un excès de sialylation dans les systèmes ST6i-ST6c.

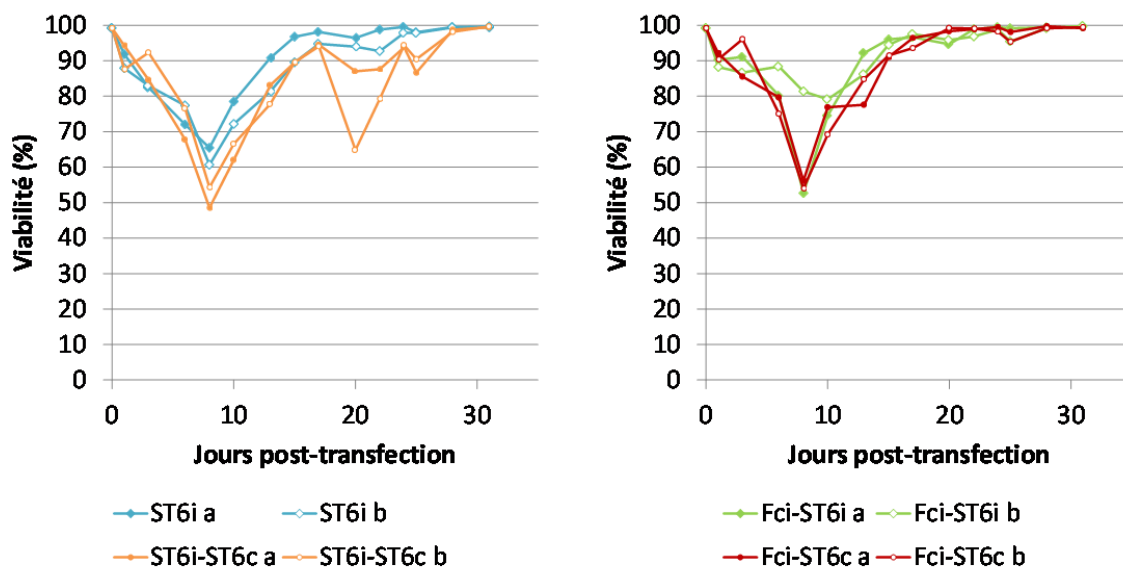


Figure 45 : Impact de l'inductibilité de ST6 sur la phase de sélection des pools

Les cellules *CHO^{BRI}-55E1* ont été transfectées avec le plasmide de ST6 inductible (ST6i), un mélange 1:1 de plasmides de ST6i et ST6 non inductible (constitutive, ST6c), un mélange 1:1 de Fc inductible (Fci) et ST6i, ou enfin un mélange 1:1 de Fci et ST6c. Les transfections ont été réalisées en duplicata (a et b). Tous les deux ou trois jours, la viabilité était mesurée, et les cellules concentrées ou diluées tel que la densité de cellules viables soit égale à $0,4 \times 10^6$ cellules/mL.

Niveau de sialylation

L'efficacité de la sialylation dans ces pools a été évaluée par marquage des acides sialiques $\alpha 2,6$ de la surface des cellules 48h post-induction avec une SNA couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (SNA-FITC), puis analyse par cytométrie en flux (Figure 46).

L'analyse révèle que les pools ST6i et ST6i-ST6c avaient des niveaux de sialylation α 2,6 comparables : environ 80 à 90% des cellules étaient positives, pour un niveau moyen de fluorescence proche de 600. Par contre, dans les systèmes exprimant le Fc inducible, l'utilisation de ST6 inducible a donné de meilleurs résultats, puisqu'on voit que dans les pools Fci-ST6i, 75 à 80% des cellules étaient positives pour une fluorescence moyenne de 600 environ, tandis que dans les pools Fci-ST6c, seulement 45% des cellules étaient positives, pour une fluorescence de 440. Dans ce cas, la pression de sélection se trouvant uniquement sur le plasmide codant pour le Fc, il est possible que les pools Fci-ST6c aient contenu des cellules exprimant le Fc seulement et pas de ST6.

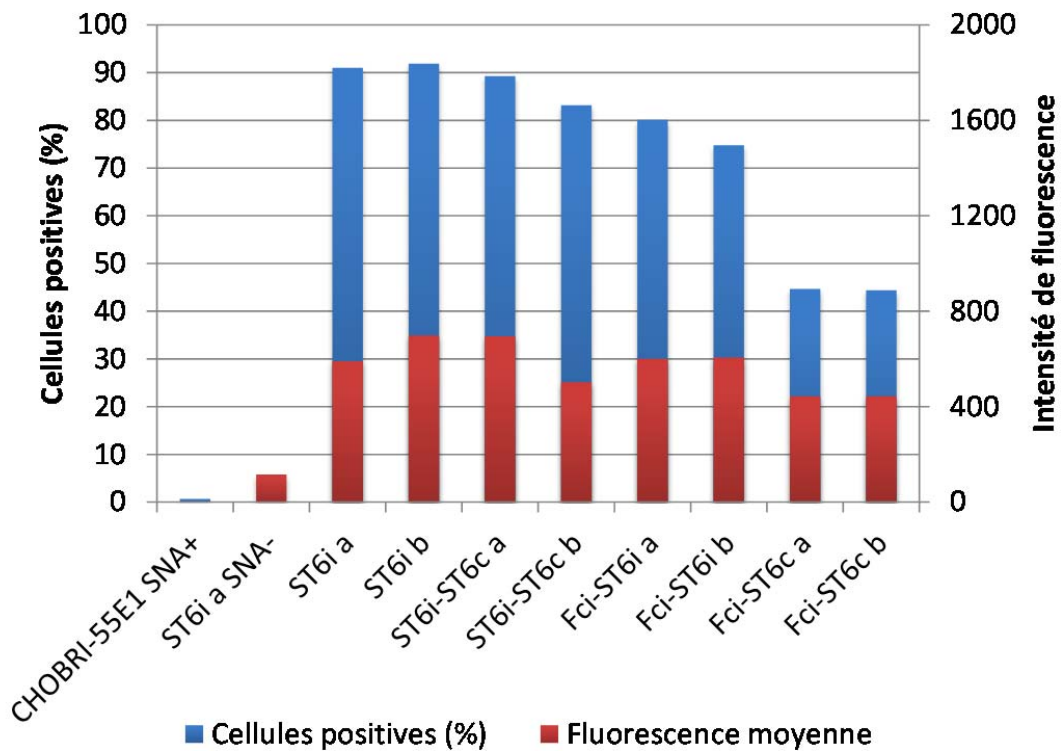


Figure 46 : Sialylation α 2,6 à la surface des cellules induites

Les cellules ont été induites puis marquées 48h post-induction avec de la lectine SNA couplée à la FITC, puis ont été analysées par cytométrie en flux. Les CHO^{BRI}-55E1 marquées à la SNA-FITC (SNA+) et les cellules du pool ST6i non marquées ont été utilisées comme contrôles négatifs.

En conclusion, ce qui ressort de ces expériences est moins un avantage à avoir une ST6 inductible, qu'un avantage à avoir une pression de sélection qui s'exerce sur tous les plasmides transfectés. La co-expression de Fc et ST6 tous les deux inductibles a été retenue pour la suite.

Pools

Les cellules ont tout d'abord été transfectées avec un premier mélange de transfection qui mimait les conditions développées pour l'expression transitoire. Ce mélange contenait le plasmide codant pour le Fci mais les plasmides de ST6 et GT développés pour le transitoire (ST6c et GTc), dans les proportions optimales pour l'expression transitoire (20% et 5% respectivement). Le pool obtenu a été appelé 10, le 1 désignant la lignée cellulaire 55E1, et le 0, la condition 0. Le plasmide de GT non inductible a été gardé dans la suite de l'étude également car les essais en transitoire ont montré qu'une faible quantité de plasmide GT était nécessaire pour obtenir de bons rendements de galactosylation (2-5% du mix de transfection). L'hypothèse est ici que même en l'absence de pression de sélection sur la GT, suffisamment de copies du gène seraient intégrées pour avoir une galactosylation satisfaisante.

Les cellules ont aussi été transfectées avec deux mélanges de plasmides codant Fci, ST6i, et GTc. Dans la condition 1, le mix de transfection était composé de 50% de plasmide ST6i, 15% de plasmide GTc, et 35% de plasmide Fci. Le pool obtenu a été nommé 11, selon la nomenclature précisée ci-dessus. Dans la condition 2, le mix de transfection était composé de 50% de plasmide ST6i, 25% de plasmide GTc, et 25% de plasmide Fci. Le pool obtenu a été nommé 12. Les paramètres d'obtention des trois pools 10, 11 et 12 sont récapitulés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Paramètres de transfection initiale des pools

| Pool | Fc | | GT | | ST6Gall | |
|------|----|------|----|------|---------|------|
| 10 | i | 75 % | c | 5 % | c | 20 % |
| 11 | i | 35 % | c | 15 % | i | 50 % |
| 12 | i | 25 % | c | 25 % | i | 50 % |

Les CHO^{BRI}-55E1 ont été co-transfectées avec trois plasmides, codant pour le fragment Fc, la GT, et la ST6Gall. Les plasmides intégrant un promoteur inductible sont indiqués par un « i », les autres par un « c ». Notons que les plasmides « i » contiennent également le gène de résistance à la pression de sélection, en l'occurrence le gène de la glutamine synthétase GS

Sélection

Les cellules ayant intégré les transgènes ont été sélectionnées en présence de MSX. La viabilité des cultures a chuté en-dessous de 20% de viabilité, puis est remontée à 100% après 24-25 jours de sélection (Figure 47). Cette chute de viabilité sévère a pu être attribuée à la présence du plasmide de GTc par des tests complémentaires (non montrés).

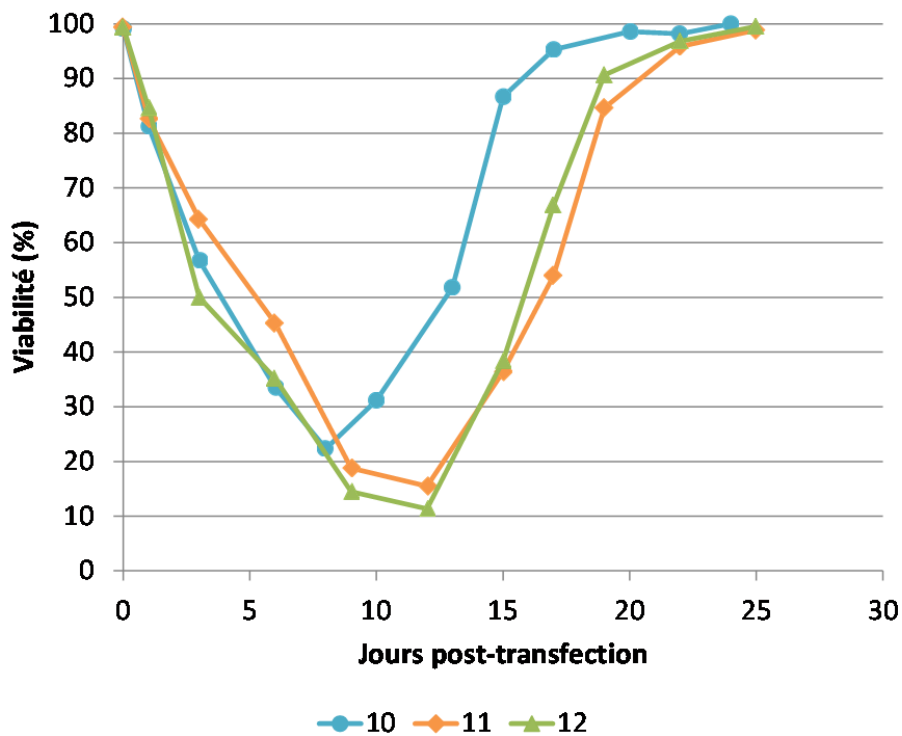


Figure 47 : Phase de sélection des pools FcGTST6

La transfection a été réalisée au jour 0 puis les cellules ont été mises en présence de MSX à 50 μ M. Tous les deux ou trois jours, les cellules étaient concentrées ou diluées dans du milieu neuf contenant le MSX afin de maintenir leur densité cellulaire à $0,4 \times 10^6$ cellules/mL. Le pool 10 a été transfecté avec 75% de Fci, 20% de plasmide ST6c et 5% de plasmide GTc ; pool 11 : 35% de Fci, 50% de ST6i et 15% de GTc ; pool 12 : 25% de Fci, 50% de ST6i et 25% de GTc. Plus la proportion de plasmide codant pour la GTc était importante et plus la chute de viabilité était prononcée.

Production de Fc en batch

Le rendement de production du Fc par les cellules induites au cumate (ON) et non induites (OFF) a été évalué, puis le niveau de sialylation du Fc a été testé en SNA-blot afin de sélectionner le meilleur pool.

Rendement de Fc ON/OFF

Six jours après l'induction, le Fc sécrété dans le surnageant des cultures ON et OFF des pools 10, 11 et 12 a été dosé par HPLC de protéine A (Figure 48). Il apparaît nettement que le rendement le meilleur est atteint par le pool 10, pour lequel le gène de résistance à la sélection était porté par le plasmide Fci uniquement. Ce rendement est très largement supérieur à ce qui avait pu être obtenu en transitoire. Néanmoins, cette amélioration n'est pas observée dans les pools où le gène de sélection était porté par le plasmide codant le Fci et la ST6i. Ces résultats suggèrent qu'une partie des cellules des pools 11 et 12 ont été sélectionnés par intégration de la ST6i seulement. Alternativement, on peut supposer que les gènes de Fci et ST6i ont été tous les deux intégrés, mais que l'expression de ST6i nuit à l'expression de Fci.

Par ailleurs, on remarque que le système inductible au cumate fuit, puisque 20 à 45 mg/L de Fc est mesuré dans le surnageant des cultures non induites. Ce niveau d'expression basal sans induction est connu, mais il était ici particulièrement élevé. Le gain de productivité en mode ON pour les pools 11 et 12 était très faible.

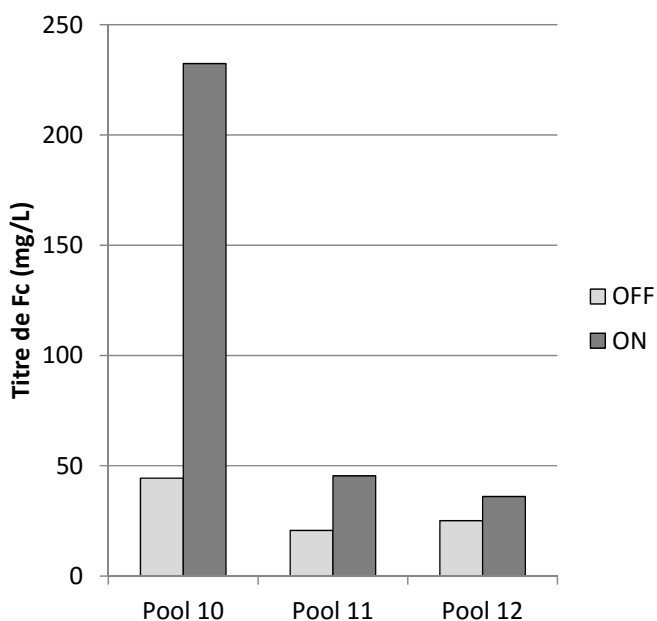


Figure 48 : Rendement de production du Fc six jours après induction

Le Fc présent dans le surnageant de culture des pools 10, 11 et 12 induits (ON) ou non induits (OFF) a été dosé par HPLC protéine A six jours après l'induction.

Sialylation du Fc

Le niveau de sialylation de ces fragments de Fc a ensuite été analysé par SNA-blot, et comparé au fragment Fc produit en présence de GT et ST6 selon la méthode décrite au chapitre « Sialylation d'une IgG1 native » (Figure 49). On remarque que le Fc sialylé en transitoire a le signal SNA le plus fort. Le pool 10, qui avait le rendement de Fc le plus prometteur, ne génère presque pas de Fc α 2,6-sialylé. Le pool 11 a lui aussi généré des Fc avec une très faible sialylation α 2,6. Ainsi, seul le pool 12, qui avait été transfecté avec 25% de plasmide Fci, 50% de plasmide ST6i et 25% de plasmide GTc, a produit du Fc avec une niveau de sialylation α 2,6 acceptable.

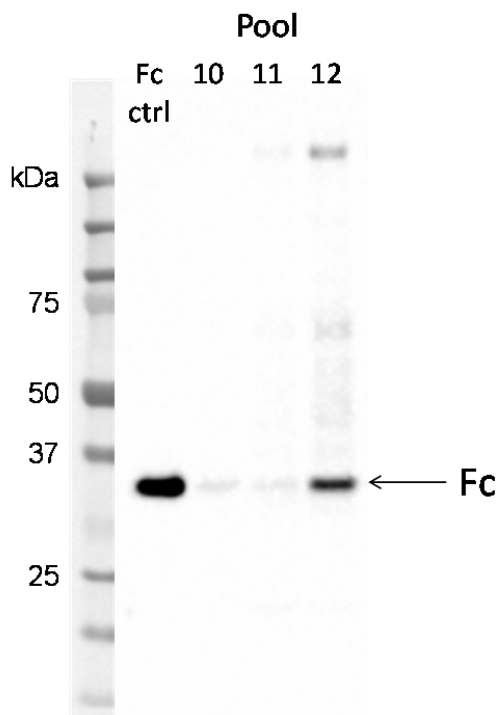


Figure 49 : Sialylation α 2,6 des Fc issus des pools

Du surnageant de culture des Pools 10, 11 et 12 a été prélevé six jours après induction et marqué avec la lectine SNA pour révéler les acides sialiques α 2,6 (en conditions réductrices). Le niveau de sialylation du Fc produit par les pools a été comparé avec le niveau de sialylation d'un Fc produit en transitoire en présence de GT et ST6GalI et purifié (Fc ctrl). La concentration des Fc a été mesurée en HPLC protéine A afin de déposer 120 ng de Fc pour chaque échantillon.

Croissance par rapport à la lignée parentale

Les caractéristiques de croissance du Pool 12 a ensuite été comparée à la lignée parentale CHOBRI-55E1 afin de voir si l'expression des transgènes, et en particulier de la ST6Gall, affecte la croissance des cellules. Deux cultures ont été ensemencées en parallèle, les 55E1 et le Pool12. Après trois jours de croissance, le Pool 12 a été divisé en deux : une moitié a reçu du cumate et l'autre non.

Les cellules ont formé très vite de gros agrégats viables qui ont rendu le dénombrement difficile. Les résultats de croissance cellulaire sont présentés comme une moyenne mobile sur quatre points afin de dégager la tendance de l'évolution de la densité de cellules viables au cours du temps (Figure 50, cadre supérieur). On n'observe pas de différence majeure de la densité cellulaire au cours du temps de culture en batch entre la lignée parentale 55E1, le pool 12 induit (Pool 12 ON), et le pool 12 non induit (Pool 12 OFF). La densité de cellules viables maximale pourrait être un plus basse pour le Pool 12 ON que pour le Pool 12 OFF et la lignée parentale. La viabilité des cellules a chuté plus tôt dans la lignée parentale que dans le pool ON ou OFF (Figure 50, cadre inférieur). Ainsi, la croissance des cellules du pool 12 n'apparaît pas affectée par la production de Fc, GT et ST6Gall.

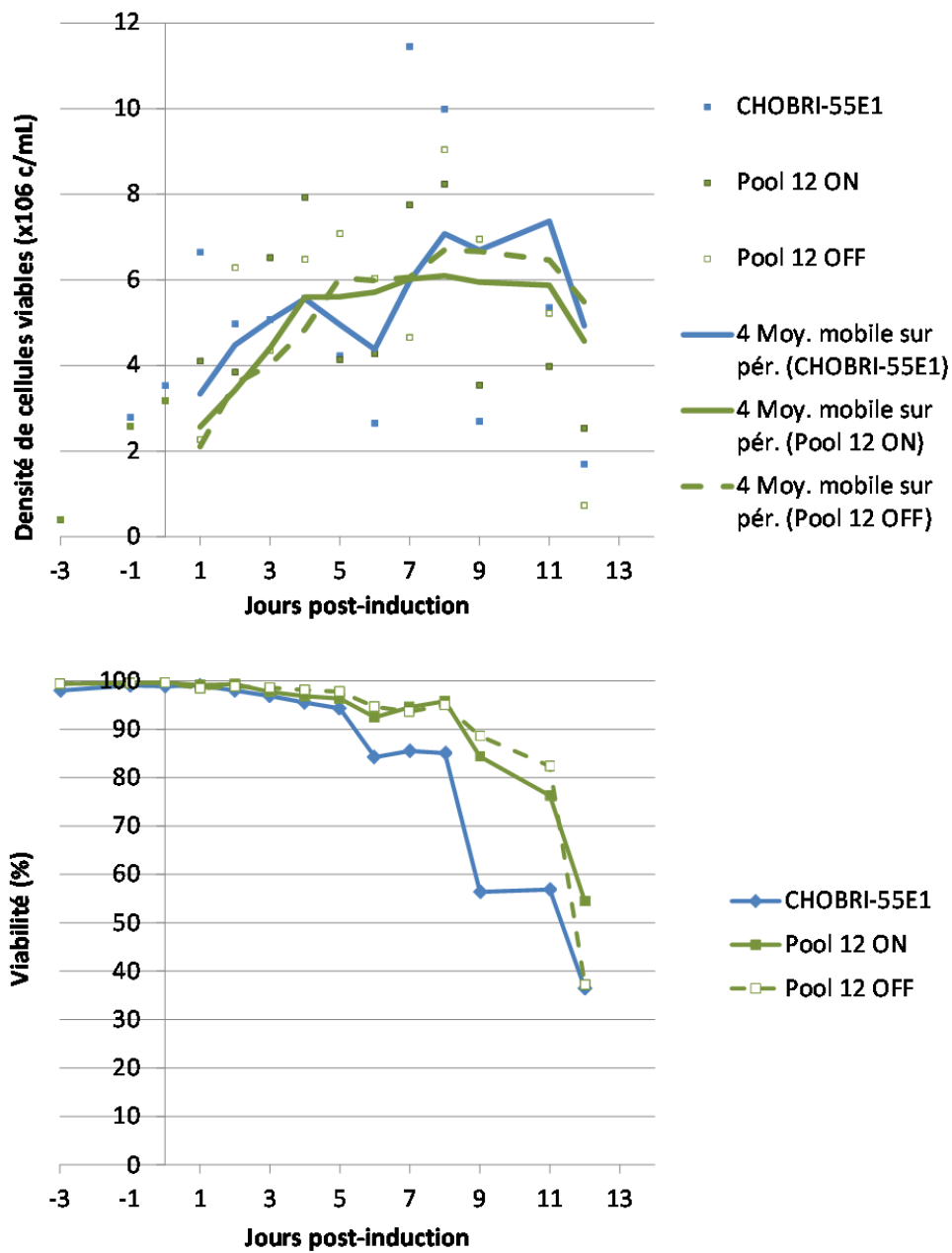


Figure 50 : Densité de cellules viables et viabilité du Pool 12 comparativement à la lignée parentale

Le nuage de points sur le graphique de suivi de la densité cellulaire s'explique par la présence de gros agrégats de cellules viables dans la culture. Pour donner l'allure de la croissance cellulaire, c'est la moyenne mobile calculée sur quatre points qui a été représentée (« 4 Moy. mobile sur pér. »).

Conclusion sur la création de pools

Les performances des pools qui ont été créés ne satisfont pas aux exigences de rendement de production de Fc et de haut niveau de sialylation $\alpha 2,6$. On a vu que les pools avec le plus fort rendement de production de Fc étaient aussi ceux pour lesquels la sialylation $\alpha 2,6$ était la plus basse, et inversement. Le pool 12, transfecté avec les plasmides Fci, ST6i et GTc dans les proportions Fci:ST6i:GTc 1 :2 :1, est le seul pool qui présente un niveau de sialylation du Fc acceptable. Afin d'atteindre les objectifs fixés en termes de rendement et de sialylation, les cellules du pool 12 vont être triées afin d'isoler les meilleures cellules.

Clones

Dilution limite puis sélection par SNA-blot/protéine A

Les cellules du Pool 12 ont étéensemencées en plaques de 96 puits à des concentrations de 1 cellule par puits (2 plaques), 3 cellules par puits (2 plaques) et 10 cellules par puits (2 plaques), sans MSX et sans cumate. Après un mois, dans certains puits les cellules se sont multipliées et ont formé un tapis cellulaire qui couvre de 50% à 75% de la surface du puits. Seulement 24 colonies sur deux plaques de 96 puits ont émergé à partir des cellulesensemencées à 1 cellule par puits. Les puitsensemencés à 3 et 10 cellules par puits sont plus nombreux à être repartis (>80% et >95% des puitsensemencés à 3 et 10 cellules par puits respectivement). Du surnageant a été prélevé et analysé en dot-blot avec un marquage à la lectine SNA pour révéler la présence d'acides sialiques $\alpha 2,6$ sur les protéines totales sécrétées par les cellules. Les 48 colonies avec le signal SNA le plus fort ont été repiquées en plaque de 24 puits afin d'amplifier la quantité de cellules. Après trois semaines d'amplification en plaques de 24 puits, le surnageant a de nouveau été prélevé et analysé en dot-blot pour évaluer le niveau de sialylation $\alpha 2,6$. Sur ces 48 colonies, les 21 possédant le signal le plus fort ont continué d'être amplifiées en plaque de 24 puits. Parmi ces 21 colonies, aucune ne provenaient de puits contenant une cellule à l'origine. Ces colonies ne sont donc pas des populations monoclonales, mais plutôt des « mini-pools ». La Figure 51 montre la membrane de SNA-dotblot de l'étape de passage de 48 colonies à 21.

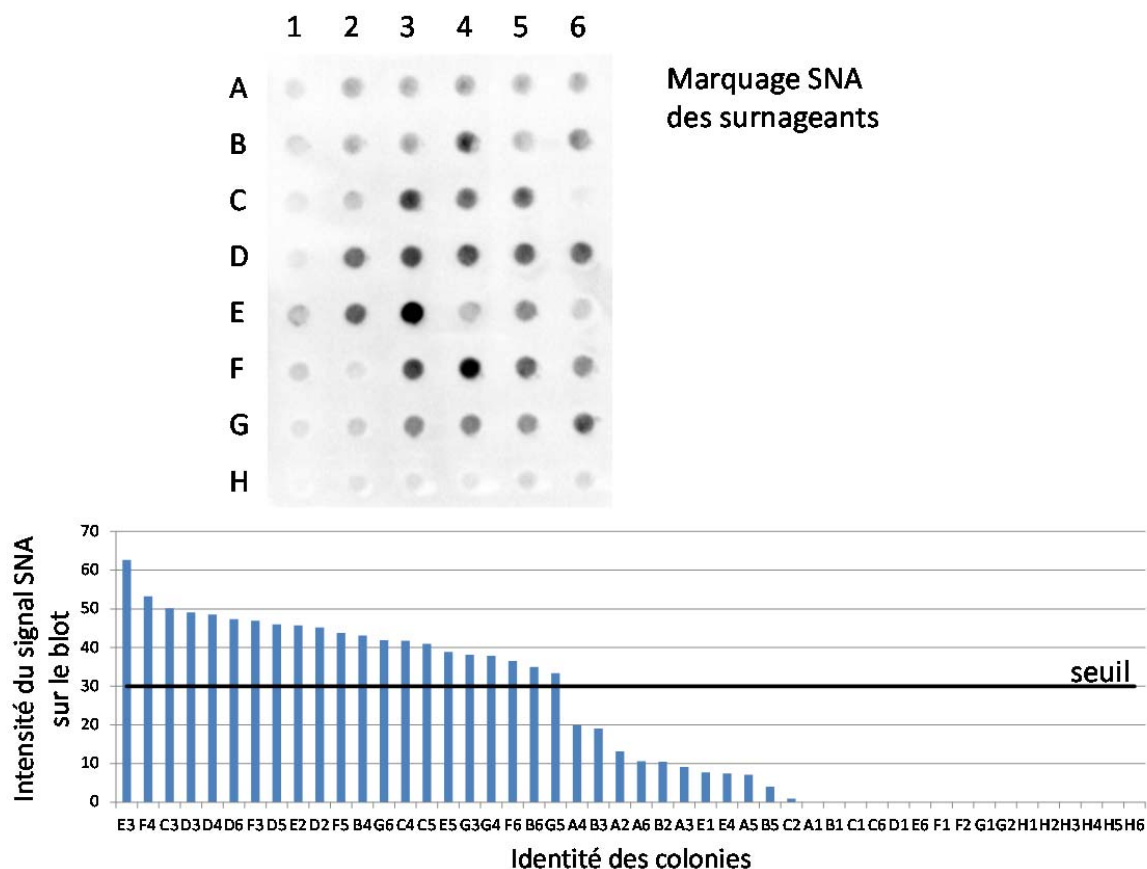


Figure 51 : Sélection des clones en SNA-dotblot

40 μ L de surnageant de chaque colonie ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose, qui a été marquée avec la lectine SNA afin de détecter la présence d'acides sialiques α 2,6 sur les protéines sécrétées par les cellules. Les colonies ont ensuite été classées en fonction de l'intensité du signal de dot-blot. Le seuil d'intensité de 30 a été choisi en fonction de l'allure de l'histogramme obtenu, qui révèle trois groupes distincts de colonies : fortes (intensité > 30), faibles (intensité < 30), et nulles (signaux trop proches du bruit de fond).

Pendant les quatre semaines suivantes, les 21 colonies sélectionnées ont été replacées en présence de MSX et amplifiées lentement jusqu'à pouvoir cultiver 2 à 3 mL en plaques de 6 puits. Cinq colonies n'ont pas poussé ou ont vu leur viabilité chuter au cours de cette période, laissant 16 colonies. Ces colonies ont été induites par addition de cumate ; après 5 jours, la sialylation α 2,6 des protéines du surnageant ainsi que le titre de Fc sécrété ont été évalués en SNA-dotblot et en HPLC protéine A respectivement. Le titre de Fc a été représenté

en fonction de l'intensité du signal de SNA-dotblot afin de déterminer graphiquement les trois meilleures colonies. Ce graphe est présenté sur la Figure 52.

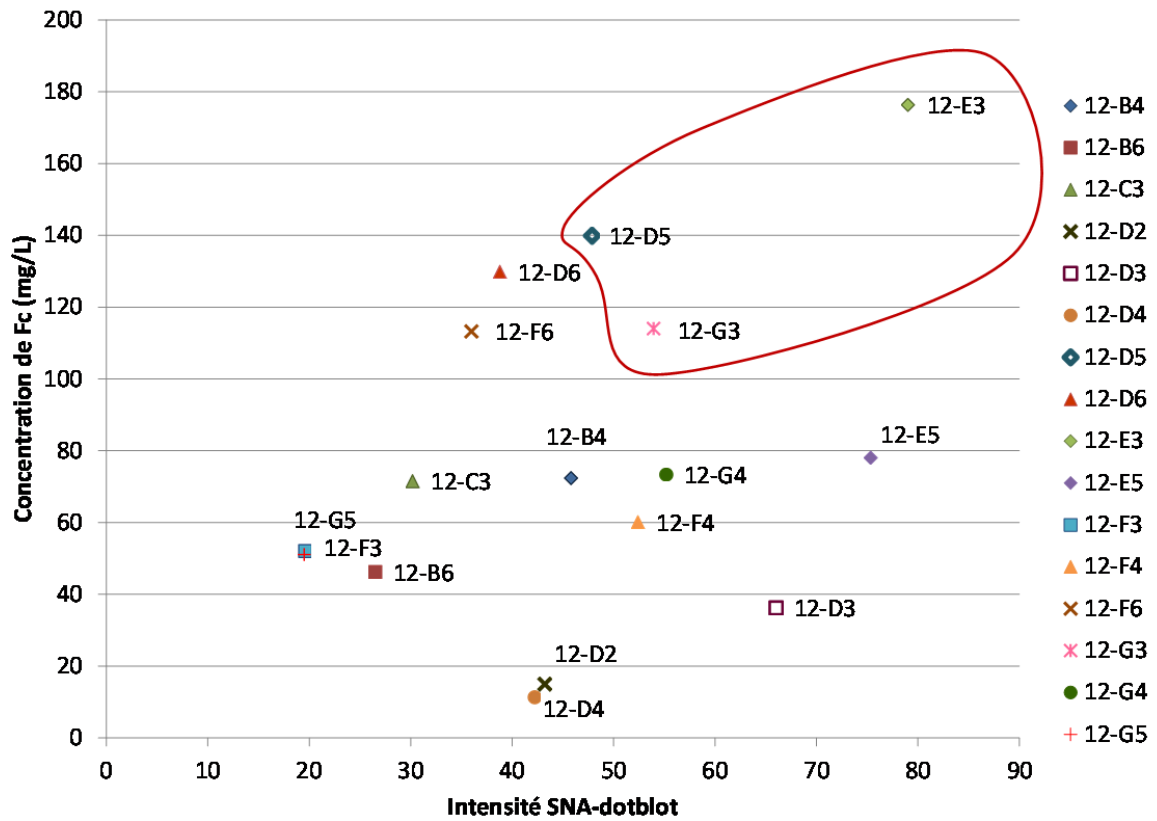


Figure 52 : Titre de Fc et intensité de signal SNA pour les 16 colonies induites

Cinq cents microlitres de culture (environ 0,5 million de cellules) ont été placées en plaques de 24 puits. Les plaques ont été placées sous agitation à 37°C, puis la production a été induite le lendemain par addition de cumate. Le titre de Fc et le niveau de sialylation $\alpha 2,6$ dans le surnageant ont été déterminés 5 jours post-induction. Pour chaque colonie, le titre a été placé en fonction de l'intensité du signal SNA sur le dot-blot. Les meilleures colonies se retrouvent dans le quart haut droit du graphique. Les trois colonies choisies pour la suite ont été encerclées en rouge.

On remarque que les titres de Fc obtenus en plaques de 24 puits agitées après 5 jours sous induction sont très supérieurs à ce qui avait été obtenu pour le Pool 12 initial après 6

jours sous induction (Figure 48), puisqu'ils atteignent facilement 50 mg/L – le meilleur (12-E3) approche les 180 mg/L – tandis que le titre du Pool n'avait pas dépassé 40 mg/L.

Les trois meilleures colonies ont été sélectionnées pour une étude du rendement de Fc et du niveau de sialylation obtenus en condition de production fed-batch.

Production en fed-batch : croissance cellulaire et rendement de Fc

Les lignées sélectionnées ont été cultivées pendant 8 à 15 jours après induction, à 32°C, et régulièrement supplémentées avec une solution nutritive et du glucose. Les cellules formaient beaucoup moins d'agrégats que le Pool 12 originel, possiblement grâce au changement de milieu de culture effectué pour la dilution limite et gardé jusqu'à la production en fed-batch. L'alimentation régulière a permis d'atteindre des densités viables cellulaires comprises entre 10 et 15 x 10⁶ cellules/mL au lieu de 6-7 x 10⁶ cellules/mL en production non alimentée. De plus, la viabilité des cellules a commencé à chuter à partir du 12^e jour post-induction (jpi), contre 5 jpi en production non alimentée.

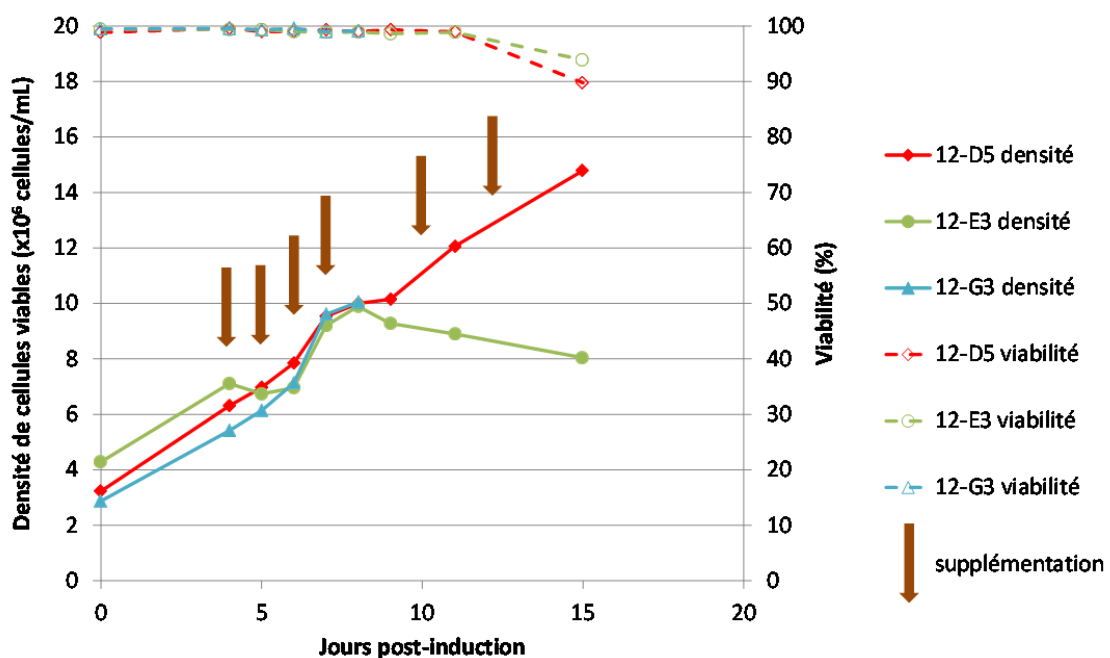


Figure 53 : Croissance cellulaire et viabilité des 3 meilleures colonies en production fed-batch

Les trois lignées 12-D5, 12-E3 et 12-G3 ont étéensemencées à 0,4 x 10⁶ cellules/mL en flasques Erlenmeyer de 1L placées sous agitation à 37°C. Après trois jours, lorsque la densité

de cellules viables a atteint 3×10^6 cellules/mL, le cumate à $2 \mu\text{g/mL}$ a été ajouté afin d'augmenter l'expression du Fc et de la ST6Gall, puis la culture a été placée à 32°C . La culture a été supplémentée en nutriments et glucose 4 jours post-induction (jpi), 5 jpi, 6 jpi, 7 jpi, 10 jpi et 12 jpi.

Des échantillons de culture ont été prélevés à 4, 6, 8, 11 et 15 jpi (4, 6 et 8 jpi seulement pour la culture 12-G3 qui a dû être arrêtée à 8 jpi en raison d'une contamination). Le titre de Fc a été mesuré en HPLC protéine A. On observe que le rendement de production de Fc était plus élevé qu'en transitoire et plus élevé que les titres obtenus pour le Pool 12 originel dès le quatrième jour post-induction (Figure 54). A 15 jpi, la lignée 12-D5 a produit environ 950 mg/L, et la lignée 12-E3 plus de 1,3 g/L. La lignée 12-G3 présentait des titres inférieurs aux deux autres. Le classement des trois lignées en termes de productivité était le même que ce qui avait été observé en 24 puits au moment de la sélection des trois meilleures colonies (Figure 52).

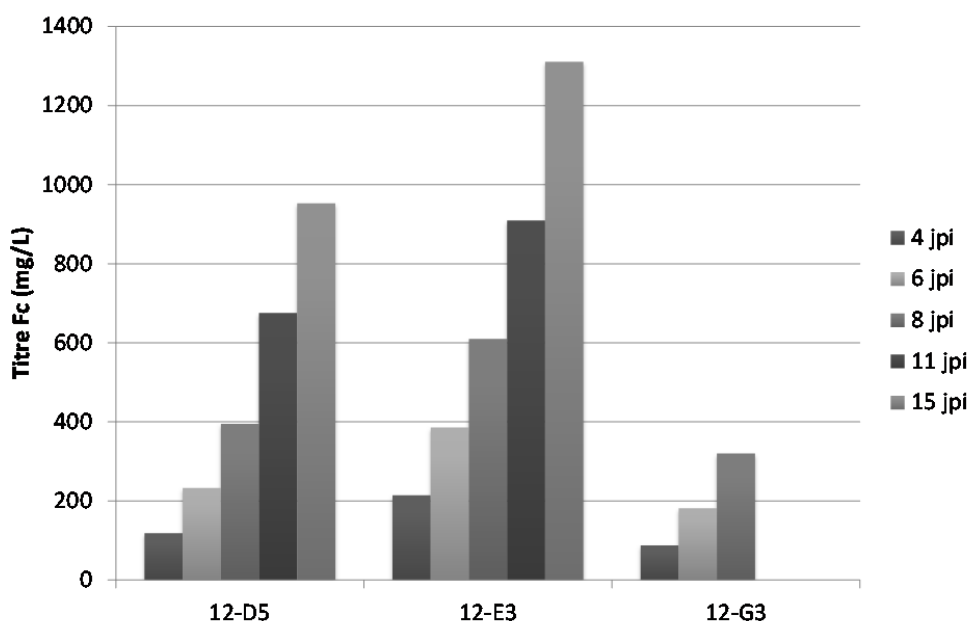


Figure 54 : Titre de Fc obtenu en fed-batch

Du surnageant de culture des lignées 12-D5, 12-E3 et 12-G3 cultivées en fed-batch a été prélevé à 4, 6, 8, 11 et 15 jpi puis la concentration du Fc dans les surnageants a été déterminée en HPLC protéine A.

Production en fed-batch : analyse de la glycosylation

Comparaison des trois lignées en SNA-blot

Le surnageant de culture prélevée à 4, 6, 8 et 11 jpi a été analysé en SNA-blot (Figure 55). Celui-ci a révélé que la sialylation la plus forte a été obtenue pour le Fc produit par la lignée 12-D5. On voit que la sialylation du Fc a diminué au cours du temps de culture. La lignée 12-E3, la plus forte productrice de Fc, présentait une sialylation du Fc faible. Cette lignée était celle qui avait obtenu la plus forte sialylation des protéines du surnageant lors de l'essai en plaque de 24 puits. Il est possible que la lignée 12-E3 ait atteint dès le début de la production les limites de sa capacité de sialylation, puisqu'elle est la lignée avec la plus forte productivité spécifique de Fc. Enfin, la lignée 12-G3 présentait un niveau de sialylation intermédiaire. On ne remarque pas de diminution de la sialylation au cours du temps pour cette lignée.

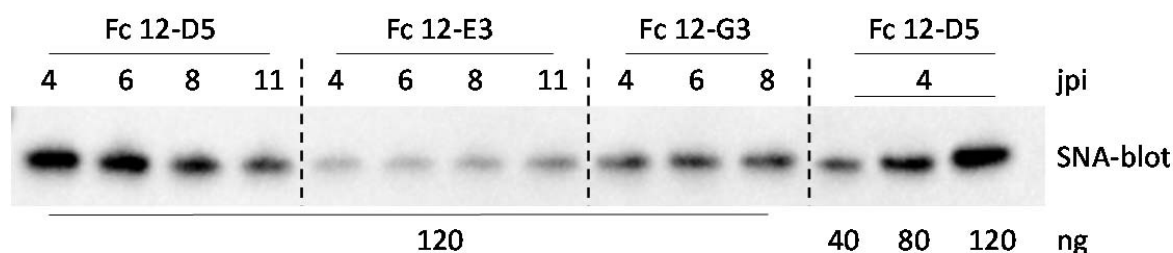


Figure 55 : Sialylation α 2,6 des Fc produits en fed-batch

La sialylation α 2,6 des fragments Fc a été révélée par marquage avec la lectine SNA. Le volume de surnageant correspondant à 120 ng de Fc a été déposé pour chaque échantillon (conditions réductrices). Le Fc produit par la lignée 12-D5 à 4 jours post-induction a été utilisé pour vérifier la linéarité de la réponse SNA. On voit bien la force du signal augmenter proportionnellement à la quantité de Fc sialylé déposée. jpi : jour post-induction.

Analyse approfondie de la glycosylation du Fc 12-D5 à 4, 6 et 8 jpi

La glycosylation du Fc produit par la lignée 12-D5 à 4, 6 et 8 jpi a été caractérisée plus en profondeur en spectrométrie de masse, par analyse du glycopeptide Fc/2 selon la méthode décrite dans le chapitre « Sialylation d'une IgG1 native ». Le Fc produit à 6 jpi par le pool 12 original en production non alimentée a également été analysé. Le spectre du Fc 12-D5 à 6 jpi est présenté Figure 56; les abondances relatives des glycanes des Fc du Pool 12 et de la lignée 12-D5 sont présentées dans le Tableau 13.

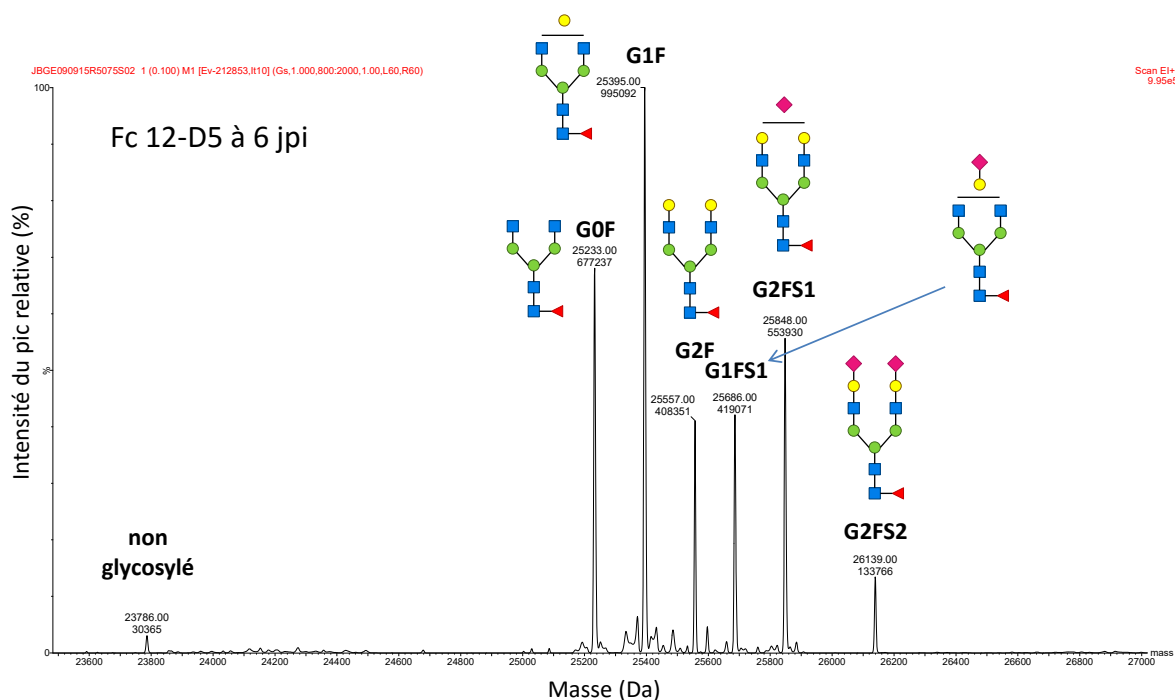


Figure 56 : Profil de N-glycosylation du Fc produit par 12-D5 à 6 jpi

Les Fc produits ont été digérés par l'enzyme IdeS qui génère deux glycopeptides Fc/2 (C_{H2} - C_{H3}). Ces glycopeptides ont ensuite été analysés en LC-ESI-MS. Le spectre de masse obtenu pour le Fc produit par la lignée 12-D5 à 6 jpi est présenté ci-dessus.

Le glycan majoritaire du profil était le G1F pour les trois échantillons, il représentait environ 30% des glycanes du Fc. L'analyse de l'évolution de la N-glycosylation du Fc a révélé une tendance à la diminution de la sialylation peu prononcée. A 4 jpi, G0F et G2FS1 représentaient chacun environ 17% des glycanes du Fc. Au cours du temps, la proportion de G0F a augmenté (+4%) tandis que celle de G2FS1 a diminué (-1%), faisant de G0F la

deuxième espèce majoritaire des profils. Globalement, le Fc a plutôt subi une diminution de la galactosylation plutôt que de la sialylation (Figure 57).

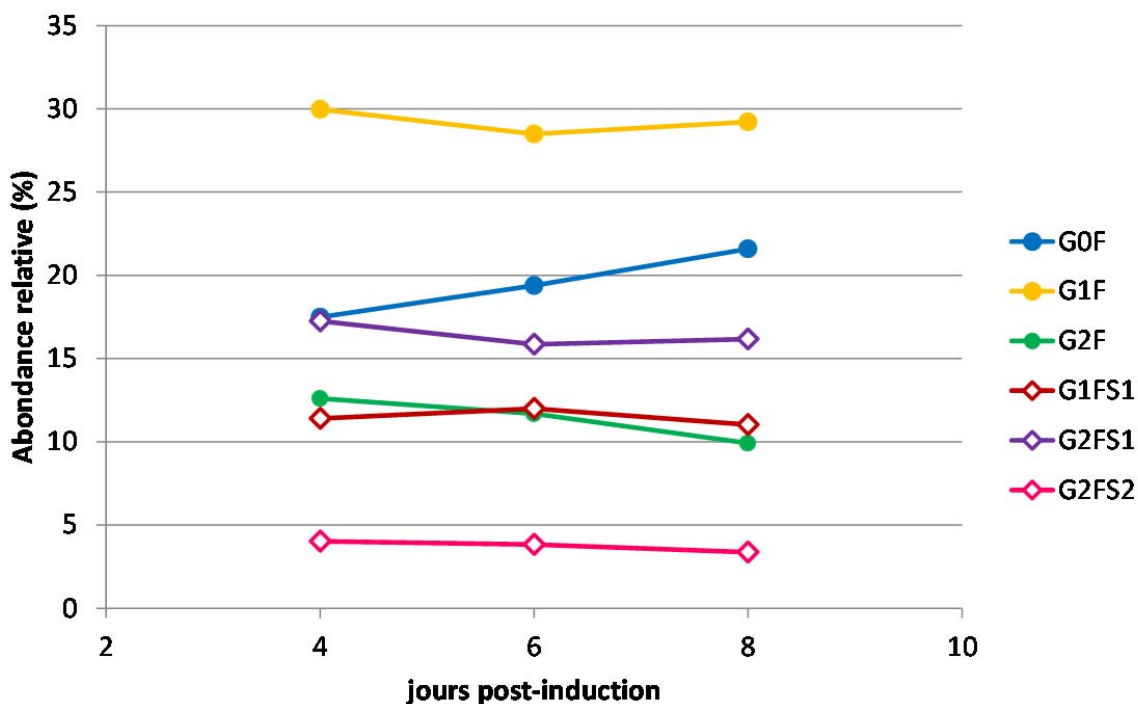


Figure 57 : Evolution de l'abondance des principaux glycanes complexes au cours du temps

Les abondances relatives des principaux glycanes complexes du profil ont été représentées graphiquement pour faire ressortir l'évolution du glycoprofil au cours de la culture. Les données complètes des abondances relatives sont disponibles dans le Tableau 13.

On constate que le profil de N-glycosylation du Fc produit par la lignée 12-D5 est très similaire à celui produit par le Pool 12 dont elle est issue (Tableau 13). Les deux principales différences (>2% d'écart) résident dans les proportions de G2F et de G1FS1 (-3,9% et + 5,0% dans le Fc 12-D5 par rapport au Fc du pool 12 à 6 jpi).

Tableau 13 : Abondances relatives des N-glycanes des Fc

| Glycoforme de Fc/2 | Abondance relative (%) | | | |
|--|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Pool 12 6 jpi | 12-D5 4 jpi | 12-D5 6 jpi | 12-D5 8 jpi |
| Non glycosylé | 0.0 | 0.7 | 0.9 | 0.9 |
| G0F | 18.7 | 17.5 | 19.4 | 21.6 |
| G1F | 27.9 | 30.0 | 28.5 | 29.2 |
| G2 | 1.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| G2F | 15.6 | 12.6 | 11.7 | 9.9 |
| G1FS1 | 7.0 | 11.4 | 12.0 | 11.0 |
| G2FS1 | 16.9 | 17.3 | 15.9 | 16.2 |
| G2FS2 | 4.8 | 4.0 | 3.8 | 3.4 |
| Tri-antennaires (agal. et monagal.) | 3.3 | 2.6 | 2.6 | 3.0 |
| Haut-mannose (M5, M7, M8) | 2.1 | 1.9 | 2.3 | 1.8 |
| Complexe tronqué (G1F-GlcNAc) | 1.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Glycanes traces (<1%) | 1.2 | 2.1 | 3.0 | 3.0 |

Les abondances relatives ont été calculées comme le rapport de la hauteur du pic d'un glycane donné sur la somme des hauteurs des pics détectés.

Remarque sur la O-glycosylation

Des traces d'O-glycosylation (<1%) ont été détectées dans la région charnière du Fc. La glycosylation de la région charnière a pu se produire en raison de son exposition accrue dans le fragment Fc comparativement à l'IgG complète. Ce phénomène a déjà été rapporté par Ahmed *et al.*¹⁵⁵

Discussion

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à développer un système d'expression de Fc avec une sialylation de type humain avec des rendements compatibles avec une exploitation industrielle. Pour cela, nous avons choisi de quitter le système transitoire dont la principale limite est justement le rendement, et de passer en système stable. La plateforme stable choisie a été le système inductible au cumate développé par une équipe du CNRC. L'inductibilité d'un transgène cible a pour avantage de pouvoir développer des lignées cellulaires exprimant des protéines toxiques ou ralentissant leur croissance, comme ce serait le cas de la ST6GalI.^{25,121,123}

Tout d'abord, nous avons obtenu un pool avec une sialylation élevée, le Pool 12, par transfection des cellules avec les plasmides codant le Fc et la ST6GalI sous contrôle du promoteur inductible à hauteur de 25% et 50% du mix de transfection, ainsi que le plasmide codant pour la GThu non inductible à hauteur de 25% du mix. Des proportions plus faibles des plasmides codant ST6GalI et GT ont mené à des niveaux de sialylation insatisfaisants.

La comparaison du Pool 12 ON et OFF avec la lignée parentale en production n'a pas révélé d'impact de l'expression de GT et de ST6GalI sur la croissance des cellules. La viabilité du Pool 12 s'est même révélée meilleure que celle de la lignée parentale. Ainsi, l'impact négatif de l'expression de glycosyltransférases à ce stade n'a pas pu être vérifié.

Le Pool 12 avait des rendements proches de ceux obtenus en transitoire, pour un niveau de sialylation moins élevé. Ce système d'expression n'était donc pas satisfaisant en soi, et le pool a été sous-cloné afin d'isoler les cellules les plus fortes productrices de Fc et de sialylation α 2,6.

Lors de l'isolement de colonies, nous avons constaté que les cellules repartaient particulièrement difficilement après la dilution limite comparativement à d'autres clonages réalisés au laboratoire, ce qui est en accord avec les observations d'Onitsuka *et al.*¹²¹ Un ensemencement en milieu semi-solide a également été tenté, mais les cellules n'ont pas poussé dans ce milieu. L'ensemencement de mini-pools (3-10 cellules/puits) plutôt que de cellules uniques a permis de contourner cette difficulté.

Cette opération a été un succès, puisqu'une lignée capable de produire plus de 100 mg/L de Fc dès le quatrième jour de production, et jusqu'à près de 1 g/L au 15^e jour avec une viabilité excellente a été obtenue. Dans notre procédé, la baisse graduelle classique de sialylation au cours du temps rapportée par d'autres équipes de recherche a été observée.^{81,84} Cette diminution de la sialylation s'est produite alors que la viabilité n'avait pas diminué. Elle a été faible entre le 4^e et le 8^e jour de production, et semble s'être accentuée après le 8^e jour, qui correspond également à un regain de croissance cellulaire. Une perte de l'expression des glycosyltransférases pourrait expliquer cette soudaine poussée cellulaire associée à une baisse de la sialylation, ce qui suggère une instabilité du système, où une nécessité d'alimenter la culture en cumate ou agent de sélection supplémentaire.

Ainsi, il a été possible de produire près de 400 mg/L de Fc contenant 16% du glycane sialylé de type humain G2FS1 au bout de 8 jours de production, ce qui représente une amélioration de la sialylation significative par rapport aux travaux de Lin *et al.* qui avaient obtenu 6% de G2FS1 seulement, et une forte amélioration en termes de rendement par rapport aux travaux de Onitsuka *et al.* qui avaient obtenu 15 mg/L après six jours de production.^{121,123}

Nous avons pu observer un fort taux de G1FS1 dans le Fc produit par la lignée 12-D5. Ce résultat rappelle ceux obtenus par Lin *et al.*, dont le glycane sialylé majoritaire était le G1FS1 (10%).¹²³ Lin *et al.* n'avaient pas essayé d'augmenter la galactosylation des CHO, et avaient compté sur la variabilité clonale pour isoler une cellule ayant une capacité de galactosylation suffisante pour soutenir l'activité de la ST6GalII introduite. Or, cette stratégie n'avait pas très bien fonctionné, puisqu'elle avait abouti à la formation du glycane G1FS1 principalement, qui est symptomatique du manque de galactosylation. Le taux relativement élevé de ce glycane dans le glycoprofil du Fc produit par notre lignée 12-D5 révèle ici aussi le manque de substrat galactosylé nécessaire au fonctionnement optimal de la ST6GalII introduite.

Ainsi, la sélection clonale a permis avant tout d'augmenter le rendement de Fc en conservant un bon niveau de sialylation, le niveau obtenu dans le pool originel. Ceci souligne l'importance de l'optimisation des paramètres de la co-transfection initiale, et confirme qu'une forte sialylation peut être obtenue en même temps qu'un fort rendement de Fc.

Globalement, l'impact positif de l'inductibilité de la ST6GalI sur le développement de la lignée cellulaire n'a pas pu être mis en évidence. En revanche, tout au long de l'étude, le plasmide utilisé pour l'expression de la GT s'est révélé problématique : la chute drastique de viabilité lors de la phase de sélection du pool a pu lui être attribuée, et dans la lignée 12-D5 en particulier, la galactosylation s'est révélée insuffisante, et diminuait au cours de la culture cellulaire. Ces résultats donnent un écho à l'observation réalisée lors des études en transitoire, où le rendement du TZM co-exprimé avec GT était systématiquement plus bas que le rendement d'expression des autres IgG1. Ainsi, il serait intéressant de reprendre ce travail avec un nouveau plasmide pour l'expression de GT. Ce plasmide GT devrait au minimum contenir le gène de résistance GS pour être plus fermement maintenu dans les cellules. De plus, il se pourrait que l'expression de GT soit plus problématique pour les cellules que l'expression de la ST6GalI. Ainsi, placer cette enzyme sous contrôle du promoteur inductible pourrait peut-être permettre de i) faciliter la sélection des pools, ii) permettre à des lignées monoclonales d'émerger, et iii) d'améliorer les performances du procédé de culture de la lignée (densité cellulaire, stabilité). Néanmoins, il serait intéressant de travailler en parallèle sur une lignée présentant la combinaison GT constitutive-ST6GalI inductible. En effet, le développement d'une lignée versatile, capable de produire un anticorps très galactosylé en mode OFF et très sialylé en mode ON pourrait être avantageux. Des essais préliminaires ont été développés en ce sens mais n'ont pour le moment pas abouti.

Enfin, des traces d'O-glycosylation ont été relevées, sur moins de 1% des régions charnières du Fc, une observation qui est soutenue par les travaux de Ahmed *et al.*, qui avaient eux aussi observé des O-glycanes dans la région charnière de fragments Fc produits dans les cellules 293-6E.¹⁵⁵ Bien que ces quantités aient été très faibles, ce résultat doit être pris en considération pour le développement futur potentiel de Fc thérapeutiques, car on ne connaît pas l'impact de l'O-glycosylation sur les fonctions effectrices du Fc.

Conclusion

Ces travaux sont très prometteurs puisqu'ils ont permis de développer une lignée exprimant conjointement un fragment Fc d'IgG1, GThu et ST6GalII, avec un excellent rendement de production de Fc et un niveau de sialylation intéressant. Nous avons également dégagé des pistes d'amélioration, qui passerait notamment par l'optimisation du plasmide utilisé pour exprimer la GT.

VII. Conclusion

La sialylation est une modification post-traductionnelle très fréquente parmi les protéines du corps humain, mais plutôt rare sur les IgG. Les IgG possèdent deux sites de N-glycosylation très conservés dans leur domaine Fc, qui portent majoritairement des glycanes complexes fucosylés agalactosylés, monogalactosylés et di-galactosylés. 10 à 15% des glycanes du Fc sont sialylés, et se présentent sous la forme mono- α 2,6-sialylée G2FS1.

Les glycanes du Fc sont essentiels à l'efficacité des IgG, qui interagissent avec les récepteurs du système immunitaire via des régions proches des sites de glycosylation. La présence d'un glycanes et sa composition influencent la conformation du Fc, et déterminent l'efficacité de la réponse immunitaire découlant de l'interaction de l'IgG avec ses récepteurs.

Une fonction effectrice majeure des IgG est la cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps, l'ADCC, qui est activée lorsque les IgG ayant reconnu un antigène à la surface d'une cellule malade se lient au récepteur Fc γ RIIIa exprimé principalement par les cellules tueuses naturelles, et résulte en la destruction de la cellule malade. Cette fonction est au cœur du principe du traitement de certains cancers par l'administration d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Les IgG peuvent également être anti-inflammatoires, une propriété exploitée pour le traitement d'affections inflammatoires de plus en plus nombreuses par injection d'IgG récoltées auprès de donneurs à très forte concentration en intraveineuse (IgIV). Les mécanismes d'action des IgIV demeurent très mal compris.

En 2006-2008, des travaux ont montré d'une part que la sialylation du segment Fc diminuait la capacité des IgG à déclencher l'ADCC, et d'autre part que les IgG α 2,6-sialylées pouvaient à faible dose reproduire l'effet anti-inflammatoire des IgIV. La publication de ces travaux a donné un nouvel élan à la recherche sur la sialylation des IgG. Les conclusions de ces travaux sont régulièrement remises en cause à mesure que progressent la maîtrise des techniques de production, de caractérisation, les connaissances et le regard critique de la communauté scientifique sur la sialylation des IgG.

C'est à cet effort d'approfondissement des connaissances que j'ai souhaité participer avec le travail présenté dans cette thèse. La sialylation est une modification complexe, puisqu'elle peut prendre des formes variées (nombre d'acides sialiques, type d'acide sialique, type de liaison), qui varient d'un organisme à un autre, d'une lignée cellulaire à une autre, et en fonction de l'environnement de la cellule.

L'objectif de ce travail était de développer une plateforme de production d'IgG sialylées permettant de générer du matériel pertinent et en quantité suffisante pour évaluer l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices de l'IgG. La mise au point de cette plateforme devait permettre de développer la maîtrise des procédés de production d'IgG sialylées en culture cellulaire, particulièrement en CHO.

Avantages d'un système transitoire pour la production d'IgG sialylées

La stratégie la plus utilisée pour la fabrication d'IgG sialylée est la resialylation chimio-enzymatique sur IgG purifiée. La maîtrise de cette technique a progressé ces dernières années, et elle permet aujourd'hui de synthétiser des glycoformes homogènes à façon. L'homogénéité de la glycosylation de l'IgG obtenue est le grand atout de cette stratégie, et en fait un outil précieux pour l'étude de l'impact d'un glycane donné sur l'efficacité des IgG. Son désavantage est qu'elle est par nature un traitement post-production de l'IgG, qui nécessite beaucoup d'étapes et qui n'est pas adaptée à la production de grandes quantités d'IgG sialylées.

Nous nous sommes inspirés des techniques d'ingénierie cellulaire développées pour l'augmentation de la sialylation des glycoprotéines en culture, qui s'inscrivaient dans le contexte de la maximisation de la sialylation des protéines thérapeutiques dans le but d'augmenter leur demi-vie.

Nous avons fait le choix de développer une plateforme de production en CHO par expression transitoire de l'IgG avec des glycosyltransférases, puisque la transfection transitoire est une technique versatile et peu coûteuse de génération de protéines recombinantes.

Or, les IgG sont des protéines particulièrement difficiles à glycosyler. Tout d'abord, les IgG sont globalement des protéines sous-galactosylées et sous-sialylées en raison de la conformation très particulière du Fc. Le Fc forme une cavité à l'intérieur de laquelle se trouvent les sites de N-glycosylation. Au moment de l'élongation des N-glycanes, la structure quaternaire du Fc, c'est-à-dire cette cavité, est déjà formée. Celle-ci réduit l'accès des glycosyltransférases aux N-glycanes naissants. De plus, les monosaccharides du N-glycane forment des interactions faibles avec la surface peptidique du Fc, qui maintiennent le N-glycane proche de la paroi du Fc. Cette conformation « intérieure » est en équilibre avec une conformation « extérieure », où les N-glycanes sont libérés de ces interactions faibles et exposés à l'extérieur de la cavité du Fc.¹³⁷ Cette conformation serait la moins fréquente, et les N-glycanes du Fc des IgG humaines demeurent restreints à deux branches quand on peut en trouver jusqu'à quatre sur d'autres protéines, et avec un niveau de galactosylation et sialylation singulièrement bas.

Par ailleurs, les systèmes d'expression développés pour la production de protéines recombinantes ont de faibles capacités de galactosylation et de sialylation des IgG. Les cellules HEK, NS0, Cos7, BHK ou CHO, qui possèdent toutes une machinerie de glycosylation en général et de sialylation en particulier fonctionnelle, produisent des IgG sous-galactosylées et peu ou pas sialylées (<2% de glycanes sialylés).¹²⁰

Par ailleurs, les cellules CHO ont la capacité de générer des acides sialiques de type α 2,3 seulement, tandis que les IgG humaines présentent principalement des acides sialiques α 2,6.

Ainsi, nous avons commencé par montrer que la co-expression de l'IgG avec la ST6GalI humaine en CHO n'était pas suffisante pour sialyler significativement le Fc d'une IgG1. Nous avons montré que la limitation de cette sialylation pouvait être levée grâce à la co-expression supplémentaire de la β 4GT1 humaine (GT), et que la limitation de la sialylation de l'IgG en CHO était due à une limitation de la galactosylation avant d'être due à la faible accessibilité du glycane aux sialyltransférases. Ainsi, nous avons obtenu des IgG comportant un tiers de glycanes sialylés de type humain, le G2FS(6)1.

Le système n'était cependant pas assez fort pour contrer complètement la restriction structurelle de la sialylation, puisque relativement peu de glycanes di-sialylés G2FS2 étaient générés. Nous pensons que cette limitation est un avantage dans la mesure où elle existe également chez l'humain, où les G2FS2 dans le Fc sont très rares. Notre système permet donc de mimer des conditions de sialylation réellement proches des conditions de glycosylation des IgG humaines naturelles.

Cette méthode transitoire a pu être étendue à la production d'IgG avec un glycoprofil enrichi en glycanes galactosylés (principalement G2F) par la co-expression de l'IgG avec la GT, ainsi qu'à la production de glycanes afucosylés par la co-expression d'une troisième enzyme, la RMD, qui pouvait être utilisée en combinaison avec la GT et la ST6GalII pour générer des IgG galactosylées afucosylées ou sialylées afucosylées.

Ainsi, nous avons mis en évidence plusieurs avantages de la méthode de production de glycoformes d'IgG par expression transitoire. Premièrement, la méthode est rapide, puisqu'elle permet l'obtention d'IgG avec des glycoprofils variés en quatre semaines, depuis la décongélation des cellules jusqu'à la purification des IgG. Deuxièmement, le système est versatile, car nous avons pu obtenir des IgG α 2,6-sialylées, ou galactosylées, et/ou afucosylées. Ce principe de co-expression pourrait être appliqué à d'autres enzymes de la glycosylation, comme par exemple la GnTIII ou les ST3GalIII/IV, afin d'étendre la gamme de glycoformes générées, avec par exemple des glycanes bisectés, bisectés galactosylés, bisectés afucosylés, bisectés sialylés α 2,3 ou α 2,6, etc. Ensuite, nous avons montré que la méthode de production par expression transitoire est reproductible. En fixant les pratiques d'entretien des cellules (milieu, densité) et les paramètres de culture (méthode de transfection, température, jour de récolte), le glycoprofil de l'IgG produite était remarquablement constant, même avec plusieurs mois ou années d'écart entre deux productions.

Enfin, la versatilité du système transitoire, c'est-à-dire la possibilité de tester l'impact de plusieurs combinaisons d'enzymes sur le profil d'une IgG, a ouvert des perspectives inattendues : nous avons, en effet, montré que le système d'expression transitoire pouvait être un outil utilisé pour comprendre les jeux de coopération/compétition des glycosyltransférases, ou encore l'effet des interactions glycane-surface peptidique du Fc grâce à la comparaison des profils de l'IgG native avec le mutant F243A.

Compétition/coopération des glycosyltransférases endogènes et transfectées

Notre travail en transitoire a permis de montrer que les α 2,3-sialyltransférases des CHO n'entraient que faiblement en compétition avec la ST6GalI introduite lorsque la GT était elle aussi exprimée. Nous avons formé deux hypothèses pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, il est possible que la GT et la ST6GalI (toutes deux humaines) s'associent en complexes, ce qui expliquerait que les résidus de galactose soit immédiatement exploités par la ST6GalI, et non disponibles pour les ST3cho. Deuxièmement, il se pourrait que les ST3cho soient en compétition avec la GT pour le glycan G1F, et non en compétition avec la ST6GalI pour le glycan G2F. La conversion rapide du G1F en G2F par l'action de la GT pourrait nuire à l'efficacité des ST3cho.

Mutant

Nous avons comparé le glycoprofil de l'IgG1 native avec l'IgG1-F243A, dans laquelle le remplacement de la phénylalanine 243 par une alanine permet d'augmenter l'élongation de glycanes en supprimant les interactions de type CH/ π qui s'exercent entre la chaîne latérale de la phénylalanine et le résidu de GlcNAc de la branche α 1,6 du glycan. Nous pensons que la suppression de cette interaction déplace l'équilibre des conformations intérieures et extérieures vers la conformation extérieure, augmentant l'exposition des glycanes aux glycosyltransférases. La comparaison des glycoprofiles de l'IgG native et de l'IgG mutée nous a permis de discerner à quel moment la conformation de l'IgG entrainait en jeu, et à quel moment la sialylation était strictement limitée par une absence de substrat disponible. La répétition de tels essais avec d'autres mutants, dans lesquels les acides aminés en contact avec le glycan (la valine 264 ou la phénylalanine 241 par exemple) seraient remplacés par des acides aminés inertes, permettrait de continuer à explorer l'impact de la conformation du Fc sur sa glycosylation. Cette stratégie a été adoptée en partie par Yu *et al.*, qui ont présenté un travail où différents mutants ont été exprimés transitoirement dans des cellules HEK 293T. Bien que le remaniement de la glycosylation ait ensuite été chimio-enzymatique, leur étude confirme le potentiel des techniques transitoires pour l'élucidation des mécanismes et des limitations de la glycosylation du Fc des IgG.¹⁶⁰

Conclusion sur le système transitoire

L'expression transitoire permet de combiner plusieurs paramètres influençant la glycosylation du Fc et d'exprimer une variété de glycoformes, dont l'analyse permet de tirer des informations sur les processus de glycosylation. De plus, la méthode permet de générer du matériel en quantité suffisante (plusieurs dizaines de milligrammes) pour évaluer les fonctions effectrices des différentes glycoformes *in vitro*. Nous avons ainsi pu explorer l'impact de la glycosylation sur l'interaction de l'IgG avec le récepteur FcγRIIIa.

Néanmoins, notre méthode serait difficilement exploitable pour la production d'IgG sialylées à visée thérapeutique. En effet, le rendement s'est révélé trop bas pour que la méthode soit rentable à l'échelle industrielle, notamment en raison de la nécessité de stopper le processus de production à 4 jours post-transfection afin de préserver la qualité de la glycosylation. C'est pourquoi nous avons développé une plateforme d'expression de type stable.

Production stable d'IgG sialylées

Nous avons développé un système de production de fragment Fc sialylé, où l'expression de Fc et de ST6GalII étaient sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate. Nous espérons avec ce système nous prémunir contre les difficultés de croissance de cellules exprimant la ST6GalII rapportées par d'autres.^{121,123} Ces nouveaux plasmides contenaient également le gène de résistance à l'agent de sélection (système GS/MSX). En revanche, nous avons conservé le plasmide codant pour la GT utilisé dans le système transitoire, et avons fait l'hypothèse que comme peu de copies de la GT semblaient nécessaires pour augmenter efficacement la galactosylation du Fc dans les CHO, la croissance des cellules ne serait pas affectée par l'intégration et l'expression du gène de la GT.

Nous avons réussi à isoler un mini-pool avec un rendement de production du Fc de 100 mg/L dès le quatrième jour de production, et presque 1 g/L après deux semaines de production. La sialylation du Fc produit par cette lignée diminuait au cours du temps, mais cette diminution demeurait modérée entre le 4^e et le 8^e jour de production, ce qui a permis de produire près de 400 mg/L de Fc enrichi en glycane sialylé G2FS1 (16% du glycoprofil). Un

tel rendement de production du Fc combiné à ce bon niveau de sialylation constitue une amélioration significative par rapport aux travaux du même type ^{121,123}, et démontre l'utilité d'introduire la GT dans la cellule plutôt que de compter sur la variabilité clonale pour obtenir un niveau de galactosylation suffisant pour soutenir l'augmentation de sialylation.

Toutefois, le niveau de sialylation obtenu avec ce système s'est avéré plus faible que celui obtenu en transitoire, confirmant les difficultés mentionnées par d'autres d'isoler des CHO stables ayant de très fortes capacités de galactosylation et de sialylation. Pourtant, nous n'avons pas observé d'effet de l'expression de la ST6GalII et de la GT sur le profil de croissance des CHO transformées comparativement à la lignée parentale, mais des problèmes de croissance liés à la surexpression de glycosyltransférases ne sont pas systématiques.¹¹⁷ Nous pensons que la sialylation pourrait être améliorée par l'optimisation de plusieurs points de la méthode.

En effet, plusieurs signes suggèrent que le plasmide d'expression de la GT pourrait être une source de difficultés pour la cellule, plutôt que l'expression de l'enzyme en elle-même. Si c'est le cas, le clonage de la GT dans un autre plasmide pourrait améliorer le système. Si l'expression de GT est le problème, alors la placer sous le contrôle d'un promoteur inductible comme le Fc et la ST6GalII pourrait là aussi améliorer le système.

Par ailleurs, pour cet essai nous avonsensemencé six plaques de 96 puits pour trouver les meilleurs clones, soit 576 colonies potentielles. Or, il est de plus en plus souvent admis que l'isolement de clones exceptionnellement forts doit passer par l'évaluation de 1000 à 5000 colonies. L'augmentation du nombre de colonies à évaluer peut être facilitée par l'utilisation de plaques de 384 puits au lieu de 96. Le développement de techniques de microscopie et de repiquage robotisé pourrait permettre la prise en charge de plusieurs plaques de 384 puits, qui devient autrement difficile à réaliser par un seul opérateur.

Des variations de la stratégie de transfection initiale pourraient également être essayées. Ici, nous avons transfecté le Fc conjointement avec les deux glycosyltransférases. Une sélection en deux étapes pourrait être envisagée : la sélection d'un fort producteur de Fc d'abord, puis l'intégration à ce clone des glycosyltransférases, ou bien la mise au point d'une lignée avec une forte sialylation d'abord, suivie de l'introduction de l'IgG. Cette deuxième

stratégie présenterait l'avantage de se doter d'une plateforme d'expression exploitable pour la production de différentes protéines cibles.

Enfin, l'inductibilité pourrait être utilisée pour passer d'un patron de glycosylation à un autre dans un système d'expression unique : on pourrait imaginer par exemple un système capable de produire des IgG afucosylées en OFF, ayant a priori un fort potentiel ADCC, et la même IgG fucosylée α 2,6-sialylée, ayant plutôt un potentiel anti-inflammatoire. Pour qu'un tel outil soit efficace, il faudrait maîtriser mieux le ratio d'expression ON/OFF du système inductible, qui était un point faible du système que nous avons développé dans notre étude. Ainsi, on pourrait à terme allier la versatilité du système inductible avec les excellents rendements du système stable.

Exploitation des IgG produites pour l'élaboration de techniques analytiques

La variété des profils de glycosylation des IgG générées a permis de faciliter le développement de méthodes d'analyses robustes et d'une expertise de l'analyse de la glycosylation, particulièrement de la sialylation, au laboratoire et chez nos partenaires du CNRC d'Ottawa et de l'Université du Manitoba.

Tout d'abord, nous avons montré qu'une évaluation rapide de la glycosylation d'une protéine pouvait être réalisée grâce au marquage avec des lectines spécifiques de certains types d'oligosaccharides. L'utilisation de la combinaison SNA/ECL pour le marquage des acides sialiques α 2,6 et des résidus de galactose terminal respectivement, était un bon moyen pour suivre le niveau de sialylation au cours du temps ou pour comparer rapidement des lots d'IgG sialylées. L'analyse par focalisation isoélectrique sur gel ou bien capillaire offrait aussi un aperçu du niveau de sialylation grâce à la mise en évidence des variants de charge acides de l'IgG avec une très bonne résolution.

Ensuite, le travail de collaboration avec les équipes de John Kelly et d'Hélène Perreault a permis de montrer que l'analyse du glycopeptide Fc/2 était le format comportant le moins de biais pour l'évaluation de l'abondance des glycanes sialylés à partir de la hauteur des pics du spectre de masse, comparativement à l'analyse de glycopeptides tryptiques et à l'analyse de

l'IgG intacte. En effet, l'analyse de glycopeptides obtenus par digestion de l'IgG avec la trypsine avait l'inconvénient majeur de résulter en deux glycopeptides différents pour la région du site N297, le peptide court EEQYNSTYR, et le peptide long TKPREEQYNSTYR. Le profil de glycosylation des deux peptides s'était révélé différent, ajoutant à la complexité de l'analyse du glycoprofil. De plus, l'abondance des glycanes sialylés issue de l'analyse des glycopeptides tryptiques était étonnamment faible considérant les résultats de SNA-blot, cIEF ou HILIC. A l'autre extrémité, l'analyse de l'IgG complète donnait une évaluation de la sialylation singulièrement élevée. La possibilité de croiser les résultats des méthodes de spectrométrie de masse avec les lectine-blots, le cIEF, et la HILIC a permis d'identifier les biais des protocoles d'analyse par spectrométrie de masse. Finalement, nous avons montré que les analyses de Fc/2 en LC-ESI-MS et des glycanes libres en HILIC avaient une excellente corrélation, ce qui permet maintenant d'exploiter les données de ces techniques avec beaucoup plus de confiance.

L'analyse de masse intacte demeure extrêmement intéressante puisqu'elle seule propose un aperçu de l'appariement des glycanes du Fc. Si la technique ne peut pas être pour l'instant utilisée pour quantifier les glycanes, elle est utile pour comparer les profils de deux IgG avec un niveau d'information supplémentaire par rapport à l'analyse de glycopeptides. La comparaison d'IgG entre elles a beaucoup d'importance dans le domaine industriel, où la variabilité des lots produits est suivie attentivement, ou encore dans le développement en pleine expansion des biosimilaires, pour lesquels la similarité avec la protéine thérapeutique qu'ils copient doit être prouvée avec le plus de détail possible, notamment au niveau du profil de glycosylation.

Exploitation des IgG produites pour l'évaluation de l'impact de la glycosylation sur l'ADCC

Nous avons testé l'impact du profil de glycosylation de notre IgG1, l'Herceptine, sur son interaction avec le récepteur FcγRIIIa qui initie la réponse ADCC. Nos résultats ont montré que la présence du glycan G2FS1 sialylé en α 2,6 n'avait pas d'impact négatif sur la capacité de l'IgG à déclencher la réponse ADCC via le récepteur FcγRIIIa.

Nos résultats sont cohérents avec les travaux récents, qui contredisent l'idée selon laquelle la sialylation déstabiliserait l'interaction de l'IgG avec le récepteur FcγRIIIa.^{136,170} Au contraire, nous avons montré que la dissociation de l'IgG et du récepteur était ralentie en présence des glycanes sialylés. Le bénéfice de la sialylation sur la stabilité du complexe IgG-FcγRIIIa n'était pas directement traduit en une augmentation de la réponse ADCC de la cellule effectrice. Pourtant, nous avons utilisé un test ADCC où les cellules effectrices étaient des cellules Jurkat modifiées pour exprimer l'un ou l'autre variant polymorphique de FcγRIIIa, et des essais du fournisseur suggèrent que la réponse ADCC obtenue dépend uniquement du récepteur FcγRIIIa. Il est possible que cette affirmation ne tienne pas pour l'analyse des faibles variations de la réponse ADCC que provoquent les résidus de galactose et d'acide sialique. Il se pourrait donc que même dans ce test aux cellules effectrices contrôlées, il existe une interaction des IgG sialylées avec des éléments de la surface des cellules, qui module la réponse ADCC.

Les raisons expliquant les différences entre les résultats de l'impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG obtenus il y a dix ans et ceux obtenus dans les travaux d'aujourd'hui nous échappent. La multiplication des types de test ADCC (cellulaires, *in vivo*) et des essais anti-inflammatoires, les travaux de caractérisation structurale des IgG sialylées, des IgG sialylées en complexe avec les différents récepteurs, ou encore les travaux sur l'élaboration de glycoformes homogènes très variées dans l'esprit de l'étude réalisée par l'équipe de Lin cette année¹⁷⁰, doivent se poursuivre pour comprendre ces résultats.

Limites du projet

L'hétérogénéité des glycoprofiles des IgG générées par nos méthodes de production est une limite majeure de ce projet. L'approfondissement des connaissances sur l'impact de la glycosylation sur les fonctions effectrices des IgG appelle l'utilisation de glycoformes homogènes. Pour l'instant, des IgG homogènes sont obtenues par des techniques de glycosylation chimio-enzymatiques pratiquées sur des IgG purifiées. La méthode de production de glycoformes ciblées en culture cellulaire présente un gain de temps et de coût relativement à ces manipulations post-purification. Dans ce travail, nous ne nous sommes pas penchés sur l'optimisation du procédé de production (température, pH, DO, optimisation du

milieu). Des progrès ont été réalisés ces dernières années qui, combinés à l'ingénierie cellulaire, pourraient certainement conduire à un enrichissement plus prononcé d'une glycoforme donnée au cours de la culture.

De plus, nos méthodes pourraient être avantageusement complétées par la mise au point de procédés de séparation des glycoformes. Par exemple, la chromatographie d'échange d'ions est prometteuse pour la séparation des glycoformes sialylées. La chromatographie d'affinité préparative pourrait également être mise en place pour la séparation des glycoformes galactosylées ou sialylées grâce à l'utilisation des lectines SNA et ECL.

La mise au point d'une plateforme de production complète, comprenant l'ingénierie cellulaire, l'optimisation des paramètres du procédé, l'optimisation du milieu de culture et des stratégies de supplémentation, et enfin la purification, sera nécessaire pour approcher l'homogénéité des glycoformes d'IgG en culture cellulaire.

Perspectives

Beaucoup de travail est encore nécessaire pour parfaire la méthode de production d'IgG sialylées en culture cellulaire. Nous avons obtenu de bons résultats en transitoire et en stable, avec l'enrichissement d'une IgG1 ou d'un fragment Fc en glycanes G2FS(6)1, le glycanes sialylé le plus pertinent d'un point de vue physiologique.

Impact de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG

Les efforts doivent se poursuivre pour développer la production d'IgG enrichies en glycanes di- α 2,6-sialylés, puisque les glycanes G2FS(6,6)2 semblent détenir des propriétés anti-inflammatoires¹³⁸, tandis que les glycanes G2S(6,6)2 seraient avantageux pour l'induction de l'ADCC.¹⁷⁰ Les efforts doivent également se poursuivre pour la production d'IgG α 2,3-sialylées, qui seront nécessaires pour confirmer l'impact du type de liaison de l'acide sialique sur les différentes fonctions effectrices des IgG.

Malgré ces limites, nous avons pu apporter notre contribution à l'étude de l'impact de la sialylation sur l'ADCC. Des travaux ont aussi été entrepris afin de tester l'impact de la

sialylation sur les propriétés anti-inflammatoires des IgG, qui vont nécessiter plus de développement.

Applications industrielles

Les techniques et les connaissances que nous avons développées peuvent être déjà appliquées au développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques présentant un profil de glycosylation mieux optimisé en fonction de leur fonction effectrice principale. Elles peuvent également être exploitées pour le développement des biosimilaires. En effet, l'enjeu de la maîtrise de la glycosylation des IgG au cours du procédé de culture a pris de l'ampleur depuis le développement de cette nouvelle classe de protéines thérapeutiques. Les biosimilaires sont le plus souvent des anticorps monoclonaux qui copient un mAb déjà sur le marché. Les fabricants de biosimilaires sont tenus de proposer des molécules ayant le même profil de glycosylation que la molécule originale. Le but n'est donc pas de viser une glycoforme particulière en raison de son impact sur l'efficacité du mAb, mais de s'approcher le plus possible du profil de glycosylation du mAb original. Dans ce contexte industriel, l'étude et la compréhension des mécanismes de glycosylation à l'œuvre dans les lignées développées par ingénierie génétique plutôt que dans un système biologique naturel trouve toute sa place.

Sialylation et balance pro/anti-inflammatoire

De nombreux éléments issus de divers thèmes de recherche tendent à désigner l'acide sialique (précédé ou non du résidu de galactose) comme un marqueur anti-inflammatoire. Par exemple, la présence d'IgG agalactosylées en abondance chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde, associée à l'augmentation temporaire des IgG galactosylées et sialylées chez les personnes en rémission^{10,278} est une observation qui s'accorde très bien avec l'hypothèse du pouvoir anti-inflammatoire des IgG sialylées formulée par le groupe de Ravetch.^{35,143} On peut citer aussi la sialylation aberrante très élevée qui est communément observée à la surface des cellules cancéreuses, et qui participe à l'évasion immunitaire des cellules tumorales.⁷⁷

Aussi, la vision de l'acide sialique comme un élément permettant de faire basculer l'IgG d'une activité classique inflammatoire à une activité nouvelle anti-inflammatoire

s'insérait très bien dans cette image globale du rôle de l'acide sialique dans des mécanismes d'atténuation de la réponse immunitaire.

L'absence d'impact de la sialylation sur l'activité ADCC des IgG1 que nous avons montrée, résultat soutenu par des travaux de plusieurs équipes utilisant des techniques variées pour la fabrication d'IgG sialylées et l'évaluation de leur efficacité, s'intègre mal pour le moment dans cette fresque des rôles de l'acide sialique dans l'organisme.

Les travaux de recherche doivent donc continuer afin de mettre à jour les détails des mécanismes d'action des IgG et l'impact des nuances de la glycosylation du Fc sur ces mécanismes afin de dessiner une nouvelle image plus juste de l'influence de la sialylation sur les fonctions effectrices des IgG.

Bibliographie

- 1 Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®. *Nucleic Acids Res.* **37**, D1006-D1012, doi:10.1093/nar/gkn838 (2009).
- 2 Ecker, D. M., Jones, S. D. & Levine, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* **7**, 9-14, doi:10.4161/19420862.2015.989042 (2015).
- 3 Schauer, R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal* **17**, 485-499 (2000).
- 4 Gottschalk, A. & Lind, P. E. Product of interaction between influenza virus enzyme and ovomucin. *Nature* **164**, 232-233, doi:10.1038/164232a0 (1949).
- 5 Ashwell, G. & Morell, A. G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **41**, 99-128 (1974).
- 6 Hossler, P., Khattak, S. F. & Li, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* **19**, 936-949, doi:10.1093/glycob/cwp079 (2009).
- 7 Schachter, H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* **64**, 163-181 (1986).
- 8 Harduin-Lepers, A., Recchi, M. A. & Delannoy, P. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* **5**, 741-758 (1995).
- 9 Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 283-291, doi:10.1007/s00253-005-1980-8 (2005).
- 10 Parekh, R. *et al.* Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**, 452-457 (1985).
- 11 Walker, M. R., Lund, J., Thompson, K. M. & Jefferis, R. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem. J.* **259**, 347-353 (1989).
- 12 Lund, J. *et al.* Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J. Immunol.* **147**, 2657-2662 (1991).
- 13 Lund, J. *et al.* Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fcγ receptors. *FASEB J.* **9**, 115-119 (1995).
- 14 Lund, J., Takahashi, N., Pound, J. D., Goodall, M. & Jefferis, R. Multiple Interactions of IgG with its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition by Complement and Human Fcγ Receptor I and Influence the Synthesis of its Oligosaccharide Chains. *J. Immunol.* **157**, 4963-4969 (1996).
- 15 Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. & Kornfeld, S. The Structure of the Glycopeptide of Human γG Myeloma Proteins. *J. Biol. Chem.* **246**, 3259-3268 (1971).

- 16 Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-2370 (1981).
- 17 Pound, J. D., Lund, J. & Jefferis, R. Aglycosylated chimaeric human IgG3 can trigger the human phagocyte respiratory burst. *Mol. Immunol.* **30**, 469–478 (1993).
- 18 Mimura, Y. *et al.* Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J. Biol. Chem.* **276**, 45539-45547, doi:10.1074/jbc.M107478200 (2001).
- 19 Jassal, R. *et al.* Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat alpha2,6-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 243-249, doi:10.1006/bbrc.2001.5382 (2001).
- 20 Watt, G. M. *et al.* Site-Specific Glycosylation of an Aglycosylated Human IgG1-Fc Antibody Protein Generates Neoglycoproteins with Enhanced Function. *Enzyme* **10**, 807-814, doi:10.1016/j (2003).
- 21 Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. & Sondermann, P. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J. Mol. Biol.* **325**, 979-989, doi:10.1016/S0022-2836(02)01250-0 (2003).
- 22 Dwek, R. a., Lellouch, a. C. & Wormald, M. R. Glycobiology: 'the function of sugar in the IgG molecule'. *J. Anat.* **187** (Pt 2, 279-292 (1995).
- 23 Wormald, M. R. *et al.* Variations in oligosaccharide-protein interactions in immunoglobulin G determine the site-specific glycosylation profiles and modulate the dynamic motion of the Fc oligosaccharides. *Biochemistry* **36**, 1370-1380, doi:10.1021/bi9621472 (1997).
- 24 Mimura, Y. *et al.* 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.* **37**, 697-706 (2001).
- 25 Umaña, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. & Bailey, J. E. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* **17** (1999).
- 26 Shields, R. L. *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**, 26733-26740, doi:10.1074/jbc.M202069200 (2002).
- 27 Shinkawa, T. *et al.* The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 3466-3473, doi:10.1074/jbc.M210665200 (2003).
- 28 Imbach, P. *et al.* High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *The Lancet* **317**, 1228-1231, doi:10.1016/S0140-6736(81)92400-4 (1981).
- 29 Tumiati, B., Casoli, P., Veneziani, M. & Rinaldi, G. High-dose immunoglobulin therapy as an immunomodulatory treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 10-12, doi:10.1002/art.1780351004 (1992).
- 30 Mazer, B. D. & Gelfand, E. W. An open-label study of high-dose intravenous immunoglobulin in severe childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 976-983, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90420-S](http://dx.doi.org/10.1016/0091-6749(91)90420-S) (1991).
- 31 Sapir, T., Blank, M. & Shoenfeld, Y. Immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins as a treatment for autoimmune diseases, cancer, and recurrent

- pregnancy loss. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1051**, 743-778, doi:10.1196/annals.1361.118 (2005).
- 32 Ravetch, J. V. Immune Inhibitory Receptors. *Science* **290**, 84-89, doi:10.1126/science.290.5489.84 (2000).
- 33 Samuelsson, A., Towers, T. L. & Ravetch, J. V. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* **291**, 484-486, doi:10.1126/science.291.5503.484 (2001).
- 34 Raju, T. S., Briggs, J. B., Borge, S. M. & Jones, A. J. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* **10**, 477-486 (2000).
- 35 Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**, 670-673, doi:10.1126/science.1129594 (2006).
- 36 Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N. & Raju, T. S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* **44**, 1524-1534, doi:10.1016/j.molimm.2006.09.005 (2007).
- 37 Houry, G. A., Baliban, R. C. & Floudas, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific reports* **1**, doi:10.1038/srep00090 (2011).
- 38 Butler, M. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology* **50**, 57-76, doi:10.1007/s10616-005-4537-x (2006).
- 39 Bork, K., Horstkorte, R. & Weidemann, W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. *J. Pharm. Sci.* **98**, 3499-3508, doi:10.1002/jps.21684 (2009).
- 40 Hart, G. W., Brew, K., Grant, G. A., Bradshaw, R. A. & Lennarz, W. J. Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with natural and synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **254**, 9747-9753 (1979).
- 41 Bause, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* **209**, 331-336 (1983).
- 42 Stenflo, J. & Fernlund, P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J. Biol. Chem.* **257**, 12180-12190 (1982).
- 43 Grinnell, B. W., Walls, J. D. & Gerlitz, B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* **266**, 9778-9785 (1991).
- 44 Chi, Y. H. *et al.* N-glycosylation at non-canonical Asn-X-Cys sequence of an insect recombinant cathepsin B-like counter-defense protein. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **156**, 40-47, doi:10.1016/j.cbpb.2010.01.017 (2010).
- 45 Valliere-Douglas, J. F. *et al.* Asparagine-linked oligosaccharides present on a non-consensus amino acid sequence in the CH1 domain of human antibodies. *J. Biol. Chem.* **284**, 32493-32506, doi:10.1074/jbc.M109.014803 (2009).

- 46 Schwarz, F. & Aeby, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 576-582, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.005> (2011).
- 47 Malaby, H. L. & Kobertz, W. R. The middle X residue influences cotranslational N-glycosylation consensus site skipping. *Biochemistry* **53**, 4884-4893, doi:10.1021/bi500681p (2014).
- 48 Bano-Polo, M., Baldin, F., Tamborero, S., Marti-Renom, M. A. & Mingarro, I. N-glycosylation efficiency is determined by the distance to the C-terminus and the amino acid preceding an Asn-Ser-Thr sequon. *Protein Sci.* **20**, 179-186, doi:10.1002/pro.551 (2011).
- 49 Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. & Wormald, M. R. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* **14**, 103-114, doi:10.1093/glycob/cwh008 (2004).
- 50 Cumming, D. A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* **1**, 115-130 (1991).
- 51 Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21-50, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702 (2007).
- 52 Audry, M. *et al.* Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology* **21**, 716-726, doi:10.1093/glycob/cwq189 (2011).
- 53 Nilsson, T., Au, C. E. & Bergeron, J. J. M. Sorting out glycosylation enzymes in the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **583**, 3764-3769, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.064 (2009).
- 54 El-Battari, A. *et al.* Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology* **13**, 941-953, doi:10.1093/glycob/cwg117 (2003).
- 55 Hassinen, A. *et al.* Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 38329-38340, doi:10.1074/jbc.M111.277681 (2011).
- 56 Kim, P.-J., Lee, D.-Y. & Jeong, H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS one* **4**, e7317, doi:10.1371/journal.pone.0007317 (2009).
- 57 Barb, A. W., Brady, E. K. & Prestegard, J. H. Branch-specific sialylation of IgG-Fc glycans by ST6Gal-I. *Biochemistry* **48**, 9705-9707, doi:10.1021/bi901430h (2009).
- 58 Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. & Paulson, J. C. Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. *J. Biol. Chem.* **257**, 13845-13853 (1982).
- 59 Kuhn, B. *et al.* The structure of human α -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **69**, 1826-1838, doi:10.1107/S0907444913015412 (2013).
- 60 Ramasamy, V. *et al.* Oligosaccharide preferences of beta1,4-galactosyltransferase-I: crystal structures of Met340His mutant of human beta1,4-galactosyltransferase-I with a pentasaccharide and trisaccharides of the N-glycan moiety. *J. Mol. Biol.* **353**, 53-67, doi:10.1016/j.jmb.2005.07.050 (2005).

- 61 Ramakrishnan, B., Balaji, P. V. & Qasba, P. K. Crystal structure of beta1,4-galactosyltransferase complex with UDP-Gal reveals an oligosaccharide acceptor binding site. *J. Mol. Biol.* **318**, 491-502, doi:10.1016/S0022-2836(02)00020-7 (2002).
- 62 Marth, J. D. & Grewal, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nature reviews. Immunology* **8**, 874-887, doi:10.1038/nri2417 (2008).
- 63 Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N. & Varki, A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **28**, 147-175 (2012).
- 64 Maeda, M. & Kimura, Y. Structural features of free N-glycans occurring in plants and functional features of de-N-glycosylation enzymes, ENGase, and PNGase: the presence of unusual plant complex type N-glycans. *Frontiers in plant science* **5**, 429, doi:10.3389/fpls.2014.00429 (2014).
- 65 Jenkins, N., Parekh, R. B. & James, D. C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotech* **14**, 975-981 (1996).
- 66 Baker, K. N. *et al.* Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 188-202 (2001).
- 67 Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S. & Varki, A. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* **28**, 863-867, doi:10.1038/nbt.1651 (2010).
- 68 Schauer, R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* **107**, 49-64, doi:10.1016/j.zool.2003.10.002 (2004).
- 69 Schauer, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 507-514, doi:10.1016/j.sbi.2009.06.003 (2009).
- 70 Varki, N. M. & Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **87**, 851-857, doi:10.1038/labinvest.3700656 (2007).
- 71 Chang, Y. C. & Nizet, V. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology* **24**, 818-825, doi:10.1093/glycob/cwu067 (2014).
- 72 Varki, A. & Gagneux, P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253**, 16-36, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x (2012).
- 73 Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer advance online publication*, doi:10.1038/nrc3982 (2015).
- 74 Harduin-Lepers, A. *et al.* Sialyltransferases functions in cancers. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* **4**, 499-515 (2012).
- 75 Monti, E., Preti, A., Venerando, B. & Borsani, G. Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem. Res.* **27**, 649-663 (2002).
- 76 Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M. & Chiricolo, M. Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 2752-2764, doi:10.1016/j.bbagen.2014.06.006 (2014).
- 77 Büll, C., den Brok, M. H. & Adema, G. J. Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim. Biophys. Acta* **1846**, 238-246, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.005> (2014).
- 78 Grabenhorst, E., Schlenke, P., Pohl, S., Nimitz, M. & Conradt, H. S. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate journal* **16**, 81-97 (1999).

- 79 Barb, A. W. & Prestegard, J. H. NMR analysis demonstrates immunoglobulin G N-glycans are accessible and dynamic. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 147-153, doi:10.1038/nchembio.511 (2011).
- 80 Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. Y., Kiss, R. & Amanullah, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* **2**, 466-479 (2010).
- 81 Yoon, S. K., Song, J. Y. & Lee, G. M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 289-298, doi:10.1002/bit.10566 (2003).
- 82 Rodriguez, J., Spearman, M., Huzel, N. & Butler, M. Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol. Prog.* **21**, 22-30, doi:10.1021/bp049807b (2005).
- 83 Trummer, E. *et al.* Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 1033-1044, doi:10.1002/bit.21013 (2006).
- 84 Ferrari, J., Gunson, J., Lofgren, J., Krummen, L. & Warner, T. G. Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant DNase in batch culture with increased sialic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 589-595 (1998).
- 85 Borys, M. C. *et al.* Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 1048-1057, doi:10.1002/bit.22644 (2010).
- 86 Lipscomb, M. L., Palomares, L. A., Hernandez, V., Ramirez, O. & Kompala, D. S. Effect of Production Method and Gene Amplification on the Glycosylation Pattern of a Secreted Reporter Protein in CHO Cells. *Biotechnol. Prog.* **21**, 40-49 (2005).
- 87 Sou, S. N. *et al.* How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1165-1176, doi:10.1002/bit.25524 (2015).
- 88 Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M. & Bailey, J. E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 573-582 (1999).
- 89 Kumar, N., Gammell, P. & Clynes, M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture: a summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology* **53**, 33-46, doi:10.1007/s10616-007-9047-6 (2007).
- 90 Bollati-Fogolin, M. *et al.* Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnol. Prog.* **21**, 17-21, doi:10.1021/bp049825t (2005).
- 91 Gramer, M. J., Goochee, C. F., Chock, V. Y., Brousseau, D. T. & Sliwkowski, M. B. Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **13**, 692-698 (1995).
- 92 Clark, K. J., Chaplin, F. W. & Harcum, S. W. Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1888-1892, doi:10.1021/bp049951x (2004).
- 93 Gawlitzek, M., Estacio, M., Furch, T. & Kiss, R. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins

- expressed in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1164-1175, doi:10.1002/bit.22348 (2009).
- 94 Muthing, J. *et al.* Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 321-334, doi:10.1002/bit.10673 (2003).
- 95 Yoon, S. K., Choi, S. L., Song, J. Y. & Lee, G. M. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 345-356, doi:10.1002/bit.20353 (2005).
- 96 Trummer, E. *et al.* Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation-A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 1045-1052, doi:10.1002/bit.20958 (2006).
- 97 Kunkel, J. P., Jan, D. C., Jamieson, J. C. & Butler, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J. Biotechnol.* **62**, 55-71 (1998).
- 98 Andersen, D. C. & Goochee, C. F. The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 546-549 (1994).
- 99 Yang, M. & Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 370-380 (2000).
- 100 Chen, P. & Harcum, S. W. Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab. Eng.* **8**, 123-132, doi:10.1016/j.ymben.2005.10.002 (2006).
- 101 Gawlitzek, M., Ryll, T., Lofgren, J. & Sliwkowski, M. B. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 637-646 (2000).
- 102 Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C. & Gek Sim Yap, M. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 164-177, doi:10.1002/bit.20317 (2005).
- 103 Hossler, P., Goh, L. T., Lee, M. M. & Hu, W. S. GlycoVis: visualizing glycan distribution in the protein N-glycosylation pathway in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 946-960, doi:10.1002/bit.21062 (2006).
- 104 Villacres, C., Tayi, V. S., Lattova, E., Perreault, H. & Butler, M. Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology journal* **10**, 1051-1066, doi:10.1002/biot.201400662 (2015).
- 105 Wong, N. S. C. *et al.* An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 321-336, doi:10.1002/bit.22812 (2010).
- 106 Yang, M. & Butler, M. Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnol. Prog.* **18**, 129-138, doi:10.1021/bp0101334 (2002).
- 107 Clark, K. J.-R., Griffiths, J., Bailey, K. M. & Harcum, S. W. Gene-expression profiles for five key glycosylation genes for galactose-fed CHO cells expressing recombinant IL-4/13 cytokine trap. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 568-577, doi:10.1002/bit.20439 (2005).

- 108 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.* **96**, 538-549, doi:10.1002/bit (2007).
- 109 Gu, X., Xie, L., Harmon, B. J. & Wang, D. I. Influence of Primatone RL supplementation on sialylation of recombinant human interferon-gamma produced by Chinese hamster ovary cell culture using serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 353-360, doi:10.1002/(sici)1097-0290(19971120)56:4<353::aid-bit1>3.0.co;2-n (1997).
- 110 Kumar, R. *et al.* Sialyltransferase inhibitors: consideration of molecular shape and charge/hydrophobic interactions. *Carbohydrate research* **378**, 45-55, doi:10.1016/j.carres.2012.12.017 (2013).
- 111 Jing, Y., Qian, Y. & Li, Z. J. Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion protein in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 488-496, doi:10.1002/bit.22827 (2010).
- 112 Hong, J. K., Cho, S. M. & Yoon, S. K. Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 869-876, doi:10.1007/s00253-010-2790-1 (2010).
- 113 Hossler, P. *et al.* Cell culture media supplementation of uncommonly used sugars sucrose and tagatose for the targeted shifting of protein glycosylation profiles of recombinant protein therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **30**, 1419-1431, doi:10.1002/btpr.1968 (2014).
- 114 Wong, N. S. C., Yap, M. G. S. & Wang, D. I. C. Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-Sialic acid transporter over expression in Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnology*, doi:10.1002/bit (2006).
- 115 Jeong, Y. T., Choi, O., Son, Y. D., Park, S. Y. & Kim, J. H. Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in genetically engineered Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **52**, 283-291, doi:10.1042/BA20080044 (2009).
- 116 Weikert, S. *et al.* Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1116-1121, doi:10.1038/15104 (1999).
- 117 Monaco, L. *et al.* Genetic engineering of alpha2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon-gamma. *Cytotechnology* **22**, 197-203, doi:10.1007/bf00353939 (1996).
- 118 Bragonzi, a. *et al.* A new Chinese hamster ovary cell line expressing alpha2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 273-282 (2000).
- 119 Zhang, X., Lok, S. H. & Kon, O. L. Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 441-452 (1998).
- 120 Zhang, P. *et al.* A functional analysis of N-glycosylation-related genes on sialylation of recombinant erythropoietin in six commonly used mammalian cell lines. *Metab. Eng.* **12**, 526-536, doi:10.1016/j.ymben.2010.08.004 (2010).

- 121 Onitsuka, M. *et al.* Enhancement of sialylation on humanized IgG-like bispecific antibody by overexpression of α 2,6-sialyltransferase derived from Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 69-80, doi:10.1007/s00253-011-3814-1 (2012).
- 122 Wuhrer, M. *et al.* Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics* **7**, 4070-4081, doi:10.1002/pmic.200700289 (2007).
- 123 Lin, N. *et al.* Chinese hamster ovary (CHO) host cell engineering to increase sialylation of recombinant therapeutic proteins by modulating sialyltransferase expression. *Biotechnol. Prog.*, doi:10.1002/btpr.2038 (2015).
- 124 Ngantung, F. A., Miller, P. G., Brushett, F. R., Tang, G. L. & Wang, D. I. RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 106-119, doi:10.1002/bit.20997 (2006).
- 125 Zhang, M., Koskie, K., Ross, J. S., Kayser, K. J. & Caple, M. V. Enhancing glycoprotein sialylation by targeted gene silencing in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **105**, 1094-1105, doi:10.1002/bit.22633 (2010).
- 126 Wang, Z., Park, J. H., Park, H. H., Tan, W. & Park, T. H. Enhancement of recombinant human EPO production and sialylation in chinese hamster ovary cells through *Bombyx mori* 30Kc19 gene expression. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1634-1642, doi:10.1002/bit.23091 (2011).
- 127 Bruhlmann, D. *et al.* Tailoring recombinant protein quality by rational media design. *Biotechnol. Prog.* **31**, 615-629, doi:10.1002/btpr.2089 (2015).
- 128 Hossler, P., Mulukutla, B. C. & Hu, W. S. Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells. *PLoS One* **2**, e713, doi:10.1371/journal.pone.0000713 (2007).
- 129 Jimenez del Val, I., Nagy, J. M. & Kontoravdi, C. A dynamic mathematical model for monoclonal antibody N-linked glycosylation and nucleotide sugar donor transport within a maturing Golgi apparatus. *Biotechnol. Prog.* **27**, 1730-1743, doi:10.1002/btpr.688 (2011).
- 130 Spahn, P. N. & Lewis, N. E. Systems glycobiology for glycoengineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 218-224, doi:10.1016/j.copbio.2014.08.004 (2014).
- 131 Zou, G. *et al.* Chemoenzymatic Synthesis and Fc γ Receptor Binding of Homogeneous Glycoforms of Antibody Fc Domain. Presence of a bisecting Sugar Moiety Enhances the Affinity of Fc to Fc γ RIIIa Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18975-18991, doi:10.1021/ja208390n.Chemoenzymatic (2012).
- 132 Smith, E. L. *et al.* Chemoenzymatic Fc Glycosylation via Engineered Aldehyde Tags. *Bioconj. Chem.* **25**, 788-795, doi:10.1021/bc500061s (2014).
- 133 Lomino, J. V. *et al.* A two-step enzymatic glycosylation of polypeptides with complex N-glycans. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2262-2270, doi:10.1016/j.bmc.2013.02.007 (2013).
- 134 Raju, T. S., Briggs, J. B., Chamow, S. M., Winkler, M. E. & Jones, A. J. Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochemistry* **40**, 8868-8876 (2001).
- 135 Raju, T. S. & Scallon, B. Fc glycans terminated with N-acetylglucosamine residues increase antibody resistance to papain. *Biotechnol. Prog.* **23**, 964-971, doi:10.1021/bp070118k (2007).

- 136 Sondermann, P., Pincetic, A., Maamary, J., Lammens, K. & Ravetch, J. V. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 9868-9872, doi:10.1073/pnas.1307864110 (2013).
- 137 Barb, A. W. *et al.* NMR characterization of immunoglobulin G Fc glycan motion on enzymatic sialylation. *Biochemistry* **51**, 4618-4626, doi:10.1021/bi300319q (2012).
- 138 Washburn, N. *et al.* Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, doi:10.1073/pnas.1422481112 (2015).
- 139 Jefferis, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 226-234 (2009).
- 140 Jefferis, R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 356-362, doi:10.1016/j.tips.2009.04.007 (2009).
- 141 Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* **5**, 520, doi:10.3389/fimmu.2014.00520 (2014).
- 142 Frank, M., Walker, R. C., Lanzilotta, W. N., Prestegard, J. H. & Barb, A. W. Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J. Mol. Biol.* **426**, 1799-1811, doi:10.1016/j.jmb.2014.01.011 (2014).
- 143 Anthony, R. M. *et al.* A recombinant IgG Fc that recapitulates the anti-inflammatory activity of IVIG. *Science* **320**, 373-376 (2008).
- 144 Dalziel, M., McFarlane, I. & Axford, J. S. Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconjugate journal* **16**, 801-807 (1999).
- 145 Zhao, J., Simeone, D. M., Heidt, D., Anderson, M. A. & Lubman, D. M. Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: application to pancreatic cancer serum. *Journal of proteome research* **5**, 1792-1802 (2006).
- 146 Masuda, K. *et al.* Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G. *FEBS Lett.* **473**, 349-357 (2000).
- 147 Dunn-Walters, D., Boursier, L. & Spencer, J. Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol. Immunol.* **37**, 107-113 (2000).
- 148 McCann, K. J. *et al.* Remarkable selective glycosylation of the immunoglobulin variable region in follicular lymphoma. *Mol. Immunol.* **45**, 1567-1572, doi:10.1016/j.molimm.2007.10.009 (2008).
- 149 Holland, M. *et al.* Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 669-677, doi:10.1016/j.bbagen.2005.11.021 (2006).
- 150 Mimura, Y., Ashton, P. R., Takahashi, N., Harvey, D. J. & Jefferis, R. Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* **326**, 116-126, doi:10.1016/j.jim.2007.07.014 (2007).
- 151 Stadlmann, J. *et al.* A close look at human IgG sialylation and subclass distribution after lectin fractionation. *Proteomics* **9**, 4143-4153, doi:10.1002/pmic.200800931 (2009).

- 152 Raju, T. S. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 471-478, doi:10.1016/j.coi.2008.06.007 (2008).
- 153 Alavi, a. & Axford, J. S. Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford, England)* **47**, 760-770, doi:10.1093/rheumatology/ken081 (2008).
- 154 Plomp, R. *et al.* Hinge-Region O-Glycosylation of Human Immunoglobulin G3 (IgG3). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **14**, 1373-1384, doi:10.1074/mcp.M114.047381 (2015).
- 155 Ahmed, A. A. *et al.* Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J. Mol. Biol.* **426**, 3166-3179, doi:10.1016/j.jmb.2014.07.006 (2014).
- 156 Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* **406**, 267-273, doi:10.1038/35018508 (2000).
- 157 Jefferis, R. & Lund, J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcgammaR: current models. *Immunol. Lett.* **82**, 57-65 (2002).
- 158 Bruhns, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716-3725, doi:10.1182/blood-2008-09-179754 (2009).
- 159 Shields, R. L. *et al.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* **276**, 6591-6604, doi:10.1074/jbc.M009483200 (2001).
- 160 Yu, X. *et al.* Engineering hydrophobic protein-carbohydrate interactions to fine-tune monoclonal antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9723-9732, doi:10.1021/ja4014375 (2013).
- 161 Brekke, O. H., Michaelsen, T. E. & Sandlie, I. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol. Today* **16**, 85-90, doi:10.1016/0167-5699(95)80094-8 (1995).
- 162 Redpath, S., Michaelsen, T. E., Sandlie, I. & Clark, M. R. The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fcgamma receptors. *Hum. Immunol.* **59**, 720-727 (1998).
- 163 Albanesi, M. & Daëron, M. The interactions of therapeutic antibodies with Fc receptors. *Immunol. Lett.* **143**, 20-27, doi:10.1016/j.imlet.2012.02.005 (2012).
- 164 Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P. & Umaña, P. The carbohydrate at FcgammaRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.* **281**, 5032-5036, doi:10.1074/jbc.M510171200 (2006).
- 165 Correia, I. R. Stability of IgG isotypes in serum. *mAbs* **2**, 221-232 (2010).
- 166 Jefferis, R. & Lefranc, M.-p. Human immunoglobulin allotypes. *mAbs* **1**, 1-7 (2009).
- 167 Jefferis, R. Antibody therapeutics : isotype and glycoform selection. *Expert Opinion on Biological Therapy* **7**, 1401-1414 (2007).
- 168 van der Neut Kolfshoten, M. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. *Science* **317**, 1554-1557, doi:10.1126/science.1144603 (2007).

- 169 Lund, J. *et al.* A protein structural change in aglycosylated IgG3 correlates with loss of
huFc gamma R1 and huFc gamma R111 binding and/or activation. *Mol. Immunol.* **27**,
1145-1153 (1990).
- 170 Lin, C. W. *et al.* A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement
of effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10611-10616,
doi:10.1073/pnas.1513456112 (2015).
- 171 Crispin, M., Yu, X. & Bowden, T. a. Crystal structure of sialylated IgG Fc:
Implications for the mechanism of intravenous immunoglobulin therapy. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA **110**, E3544-3546, doi:10.1073/pnas.1310657110 (2013).
- 172 Peipp, M. *et al.* Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by
NK and PMN effector cells. *Blood* **112**, 2390-2399, doi:10.1182/blood-2008-03-
144600 (2008).
- 173 Lu, Y. *et al.* Identification of IgG(1) variants with increased affinity to FcγRIIIa and
unaltered affinity to FcγRI and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-
based binding assays. *J. Immunol. Methods* **365**, 132-141,
doi:10.1016/j.jim.2010.12.014 (2011).
- 174 Mizushima, T. *et al.* Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on
defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells* **16**, 1071-1080, doi:10.1111/j.1365-
2443.2011.01552.x (2011).
- 175 Ferrara, C. *et al.* Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high
affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl*
Acad Sci U S A **108**, 12669-12674, doi:10.1073/pnas.1108455108 (2011).
- 176 Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S. A. & Engen, J. R. Post-translational modifications
differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Molecular & cellular*
proteomics : MCP **9**, 1716-1728, doi:10.1074/mcp.M900540-MCP200 (2010).
- 177 Lifely, M. R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M. J. & Phillips, J. Glycosylation and
biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under
different culture conditions. *Glycobiology* **5**, 813-822 (1995).
- 178 Davies, J. *et al.* Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production
cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in
ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 288-294
(2001).
- 179 Ferrara, C. *et al.* Modulation of therapeutic antibody effector functions by
glycosylation engineering : influence of Golgi enzyme localization domain and co-
expression of heterologous b1 , 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi a-
mannosidase II. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **93**, 851-861, doi:10.1002/bit (2006).
- 180 Hodoniczky, J., Zheng, Y. Z. & James, D. C. Control of recombinant monoclonal
antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol. Prog.* **21**,
1644-1652, doi:10.1021/bp050228w (2005).
- 181 Parekh, R., Roitt, I., Isenberg, D., Dwek, R. & Rademacher, T. Age-related
galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *J. Exp. Med.*
167, 1731-1736 (1988).
- 182 van de Geijn, F. E. *et al.* Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are
associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the
postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthrit. Res. Ther.* **11**,
R193, doi:10.1186/ar2892 (2009).

- 183 Rademacher, T. W., Williams, P. & Dwek, R. a. Agalactosyl glycoforms of IgG
autoantibodies are pathogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6123-6127 (1994).
- 184 Scherer, H. U. *et al.* Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated
from human serum and synovial fluid. *Arthritis and rheumatism* **62**, 1620-1629,
doi:10.1002/art.27414 (2010).
- 185 Axford, J. S. Glycosylation and rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta* **1455**, 219-
229 (1999).
- 186 Malhotra, R. *et al.* Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis
can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* **1**, 237-243
(1995).
- 187 Nimmerjahn, F., Anthony, R. M. & Ravetch, J. V. Agalactosylated IgG antibodies
depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**,
8433-8437, doi:10.1073/pnas.0702936104 (2007).
- 188 Yamaguchi, Y. *et al.* Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region
of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. *Biochim Biophys
Acta* **1760**, 693-700, doi:10.1016/j.bbagen.2005.10.002 (2006).
- 189 Dorion-Thibaudeau, J. *et al.* Towards the development of a surface plasmon resonance
assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the
extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods* **408**, 24-34,
doi:10.1016/j.jim.2014.04.010 (2014).
- 190 Naso, M. F., Tam, S. H., Scallon, B. J. & Raju, T. S. Engineering host cell lines to
reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *mAbs* **2**, 519-527,
doi:10.4161/mabs.2.5.13078 (2010).
- 191 Millward, T. *et al.* Effect of constant and variable domain glycosylation on
pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice. *Biologicals : journal of the
International Association of Biological Standardization* **36**, 41-47,
doi:10.1016/j.biologicals.2007.05.003 (2008).
- 192 Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev.
Immunol.* **7**, 715-725, doi:10.1038/nri2155 (2007).
- 193 Kanda, Y. *et al.* Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic
IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose,
hybrid, and complex types. *Glycobiology* **17**, 104-118, doi:10.1093/glycob/cwl057
(2007).
- 194 Khawli, L. A. *et al.* Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro
binding properties and pharmacokinetics in rats. *mAbs* **2**, 613-624,
doi:10.4161/mabs.2.6.13333 (2010).
- 195 Massoud, A. H. *et al.* Dendritic cell immunoreceptor: a novel receptor for intravenous
immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*
133, 853-863 e855, doi:10.1016/j.jaci.2013.09.029 (2014).
- 196 Campbell, I. K. *et al.* Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is
dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *J. Immunol.*
192, 5031-5038, doi:10.4049/jimmunol.1301611 (2014).
- 197 Leontyev, D. *et al.* Sialylation-independent mechanism involved in the amelioration of
murine immune thrombocytopenia using intravenous gammaglobulin. *Transfusion* **52**,
1799-1805, doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03517.x (2012).

- 198 Guhr, T. *et al.* Enrichment of sialylated IgG by lectin fractionation does not enhance the efficacy of immunoglobulin G in a murine model of immune thrombocytopenia. *PloS one* **6**, e21246, doi:10.1371/journal.pone.0021246 (2011).
- 199 Ogata, S. *et al.* Treatment Response in Kawasaki Disease Is Associated with Sialylation Levels of Endogenous but Not Therapeutic Intravenous Immunoglobulin G. *PLoS ONE* **8**, e81448, doi:10.1371/journal.pone.0081448 (2013).
- 200 Yu, X., Vasiljevic, S., Mitchell, D. a., Crispin, M. & Scanlan, C. N. Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *J. Mol. Biol.* **425**, 1253-1258, doi:10.1016/j.jmb.2013.02.006 (2013).
- 201 Anderson, D. *et al.* Guidelines on the use of intravenous immune globulin for hematologic conditions. *Transfusion medicine reviews* **21**, S9-56, doi:10.1016/j.tmr.2007.01.001 (2007).
- 202 Pyne, D., Ehrenstein, M. & Morris, V. The therapeutic uses of intravenous immunoglobulins in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford, England)* **41**, 367-374 (2002).
- 203 Blackhouse, G. *et al.* Cost-utility of Intravenous Immunoglobulin (IVIg) compared with corticosteroids for the treatment of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP) in Canada. *Cost Effectiveness and Resource Allocation : C/E* **8**, 14-14, doi:10.1186/1478-7547-8-14 (2010).
- 204 Siberil, S. *et al.* Intravenous immunoglobulins in autoimmune and inflammatory diseases: a mechanistic perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1110**, 497-506, doi:10.1196/annals.1423.052 (2007).
- 205 Ballou, M. The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 315-323; quiz 324-315, doi:10.1016/j.jaci.2010.10.030 (2011).
- 206 Ravetch, J. V. Reply to Bayry *et al.* : The anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (2009).
- 207 Patel, D. a. *et al.* Neonatal Fc receptor blockade by Fc engineering ameliorates arthritis in a murine model. *J. Immunol.* **187**, 1015-1022, doi:10.4049/jimmunol.1003780 (2011).
- 208 Paquin Proulx, D., Aubin, E., Lemieux, R. & Bazin, R. Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). *Clin. Immunol.* **135**, 422-429, doi:10.1016/j.clim.2010.01.001 (2010).
- 209 Padet, L. & Bazin, R. IVIg prevents the in vitro activation of T cells by neutralizing the T cell activators. *Immunol. Lett.* **150**, 54-60, doi:10.1016/j.imlet.2012.12.011 (2013).
- 210 Cousens, L. P. *et al.* Tregitope update: Mechanism of action parallels IVIg. *Autoimmun. Rev.*, 1-8, doi:10.1016/j.autrev.2012.08.017 (2012).
- 211 Aloulou, M. *et al.* IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcγRIII controlling inflammatory responses. *Blood* **119**, 3084-3096, doi:10.1182/blood-2011-08-376046 (2012).
- 212 Anthony, R. M., Wermeling, F., Karlsson, M. C. I. & Ravetch, J. V. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19571-19578, doi:10.1073/pnas.0810163105 (2008).

- 213 Anthony, R. M., Kobayashi, T., Wermeling, F. & Ravetch, J. V. Intravenous
gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway. *Nature* **475**,
110-113, doi:10.1038/nature10134 (2011).
- 214 Siragam, V. *et al.* Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc
gamma receptors on dendritic cells. *Nat. Med.* **12**, 688-692 (2006).
- 215 Bayry, J., Bansal, K., Kazatchkine, M. D. & Kaveri, S. V. DC-SIGN and alpha2,6-
sialylated IgG Fc interaction is dispensable for the anti-inflammatory activity of IVIg
on human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, E24; author reply E25,
doi:10.1073/pnas.0900016106 (2009).
- 216 Leontyev, D., Katsman, Y., Ma, X.-Z. & Branch, D. The Inhibitory Fc gamma
Receptor is Unnecessary for IVIG Efficacy. *Nature Precedings* (2010).
- 217 Käsermann, F. *et al.* Analysis and functional consequences of increased Fab-sialylation
of intravenous immunoglobulin (IVIg) after lectin fractionation. *PloS one* **7**, e37243,
doi:10.1371/journal.pone.0037243 (2012).
- 218 Sharma, M. *et al.* Intravenous immunoglobulin-induced IL-33 is insufficient to
mediate basophil expansion in autoimmune patients. *Scientific reports* **4**, 5672,
doi:10.1038/srep05672 (2014).
- 219 Tjon, A. S., van Gent, R., Geijtenbeek, T. B. & Kwekkeboom, J. Differences in anti-
inflammatory actions of intravenous immunoglobulin between mice and men: more
than meets the eye. *Frontiers in Immunology* **6**, doi:10.3389/fimmu.2015.00197
(2015).
- 220 Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant
protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1
cells. *Nucleic Acids Res.* **30**, E9 (2002).
- 221 Lattova, E. & Perreault, H. Labelling saccharides with phenylhydrazine for
electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry.
*Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life
sciences* **793**, 167-179 (2003).
- 222 Kozlowski, S. & Swann, P. Current and future issues in the manufacturing and
development of monoclonal antibodies. *Adv. Drug Del. Rev.* **58**, 707-722,
doi:10.1016/j.addr.2006.05.002 (2006).
- 223 Munro, T. P., Mahler, S. M., Huang, E. P., Chin, D. Y. & Gray, P. P. Bridging the gap:
facilities and technologies for development of early stage therapeutic mAb candidates.
mAbs **3**, 440-452, doi:10.4161/mabs.3.5.16968 (2011).
- 224 Carter, P. J. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein
engineering perspective. *Exp. Cell Res.* **317**, 1261-1269,
doi:10.1016/j.yexcr.2011.02.013 (2011).
- 225 Reichert, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium. *mAbs* **4**, 413-415 (2012).
- 226 Mizuochi, T., Taniguchi, T., Shimizu, A. & Kobata, A. Structural and numerical
variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G. *J. Immunol.* **129**, 2016-
2020 (1982).
- 227 Jefferis, R. *et al.* A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of
human IgG subclass proteins. *Biochemistry* **268**, 529-537 (1990).
- 228 Morell, G., Gregoriadis, G. & Scheinberg, I. H. The role of sialic acid in determining
glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* **246**, 1461-1467 (1971).

- 229 Park, E. I., Mi, Y., Unverzagt, C., Gabius, H.-J. & Baenziger, J. U. The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17125-17129, doi:10.1073/pnas.0508537102 (2005).
- 230 Unverzagt, C. *et al.* Structure-activity profiles of complex biantennary glycans with core fucosylation and with/without additional alpha 2,3/alpha 2,6 sialylation: synthesis of neoglycoproteins and their properties in lectin assays, cell binding, and organ uptake. *J. Med. Chem.* **45**, 478-491 (2002).
- 231 Crow, A. R., Brinc, D. & Lazarus, A. H. New insight into the mechanism of action of IVIg: the role of dendritic cells. *Journal of thrombosis and haemostasis* **7 Suppl 1**, 245-248, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03420.x (2009).
- 232 Ishii, N., Hashimoto, T., Zillikens, D. & Ludwig, R. J. High-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in autoimmune skin blistering diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **38**, 186-195, doi:10.1007/s12016-009-8153-y (2010).
- 233 Pham, P. L. *et al.* Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 332-344, doi:10.1002/bit.20428 (2005).
- 234 Geisse, S. & Fux, C. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. *Methods Enzymol.* **463**, 223-238, doi:10.1016/s0076-6879(09)63015-9 (2009).
- 235 Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L. & Wurm, F. M. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *J. Biotechnol.* **153**, 22-26, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.001 (2011).
- 236 Tom, R., Bisson, L. & Durocher, Y. Culture of HEK293-EBNA1 cells for production of recombinant proteins. *Cold Spring Harbor Protocols* **3**, pdb.prot4976, doi:10.1101/pdb.prot4976 (2008).
- 237 Shi, C. *et al.* Purification and characterization of a recombinant G-protein-coupled receptor, *Saccharomyces cerevisiae* Ste2p, transiently expressed in HEK293 EBNA1 cells. *Biochemistry* **44**, 15705-15714, doi:10.1021/bi051292p (2005).
- 238 Zhang, J. *et al.* Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression Purif.* **65**, 77-82, doi:10.1016/j.pep.2008.10.011 (2009).
- 239 Loignon, M. *et al.* Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **8**, 65-65, doi:10.1186/1472-6750-8-65 (2008).
- 240 Raymond, C. *et al.* A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. *Methods* **55**, 44-51, doi:10.1016/j.ymeth.2011.04.002 (2011).
- 241 Lattova, E. & Perreault, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry and post-source decay fragmentation study of phenylhydrazones of N-linked oligosaccharides from ovalbumin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, doi:10.1016/j.jsms.2004.01.012 (2004).
- 242 Schlaeger, E. J. & Christensen, K. Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture. *Cytotechnology* **30**, 71-83, doi:10.1023/A:1008000327766 (1999).

- 243 Kaneko, E. & Niwa, R. Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering. *BioDrugs* **25**, 1-11, doi:10.2165/11537830-000000000-00000 (2011).
- 244 Chan, A. C. & Carter, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 301-316, doi:10.1038/nri2761 (2010).
- 245 Scott, A. M., Allison, J. P. & Wolchok, J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer immunity* **12**, 14 (2012).
- 246 Patel, D. *et al.* IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab. *Hum. Antibodies* **19**, 89-99, doi:10.3233/hab-2010-0232 (2010).
- 247 Leatherbarrow, R. J. *et al.* Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG2a: binding and activation of complement component C1 and interaction with human monocyte Fc receptor. *Molecular immunology* **22**, 407-415 (1985).
- 248 Tao, M. H. & Morrison, S. L. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol* **143**, 2595-2601 (1989).
- 249 Voynov, V. *et al.* Dynamic fluctuations of protein-carbohydrate interactions promote protein aggregation. *PloS one* **4**, e8425, doi:10.1371/journal.pone.0008425 (2009).
- 250 Anumula, K. R. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J. Immunol. Methods* **382**, 167-176, doi:10.1016/j.jim.2012.05.022 (2012).
- 251 Harduin-Lepers, A. *et al.* The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727-737 (2001).
- 252 Oaks, M., Taylor, S. & Shaffer, J. Autoantibodies targeting tumor-associated antigens in metastatic cancer: Sialylated IgGs as candidate anti-inflammatory antibodies. *Oncoimmunology* **2**, e24841, doi:10.4161/onci.24841 (2013).
- 253 Stadlmann, J., Pabst, M. & Altmann, F. Analytical and functional aspects of antibody sialylation. *J. Clin. Immunol.* **30**, S15-S19, doi:10.1007/s10875-010-9409-2 (2010).
- 254 Rose, R. J. *et al.* Mutation of Y407 in the CH3 domain dramatically alters glycosylation and structure of human IgG. *mAbs* **5**, 219-228 (2013).
- 255 Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Developmental and comparative immunology* **29**, 185-203, doi:10.1016/j.dci.2004.07.003 (2005).
- 256 Lee, E. U., Roth, J. & Paulson, J. C. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* **264**, 13848-13855 (1989).
- 257 Raymond, C. *et al.* in *Glycosylation* (ed Stefana Petrescu) Ch. 17, 397-418 (Intech, 2012).
- 258 Blanken, W. M., van Vliet, A. & van den Eijnden, D. H. Branch specificity of bovine colostrum and calf thymus UDP-Gal: N-acetylglucosaminide beta-1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **259**, 15131-15135 (1984).
- 259 Paquet, M. R., Narasimhan, S., Schachter, H. & Moscarello, M. A. Branch specificity of purified rat liver Golgi UDP-galactose: N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase. Preferential transfer of galactose on the GlcNAc beta-1,2-Man alpha-1,3-branch of a complex biantennary Asn-linked oligosaccharide. *J. Biol. Chem.* **259**, 4716-4721 (1984).

- 260 Use of PEI for transfection may be covered by existing intellectual property rights, i.
U. P., 013,240, European Patent 0,770,140, and foreign equivalents for which further
information may be obtained by contacting polyplus-transfection.
- 261 Bigge, J. C. *et al.* Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-
amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.* **230**, 229-238,
doi:10.1006/abio.1995.1468 (1995).
- 262 Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., Prime, S. B. & Dwek, R. A. A rapid high-
resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan
mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* **240**, 210-226,
doi:10.1006/abio.1996.0351 (1996).
- 263 Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A. & Rudd, P. M. Detailed structural analysis of
N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC
combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol* **347**, 125-143,
doi:10.1385/1-59745-167-3:125 (2006).
- 264 Kitagawa, H. & Paulson, J. C. Differential expression of five sialyltransferase genes in
human tissues. *J. Biol. Chem.* **269**, 17872-17878 (1994).
- 265 Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G. & Durocher,
Y. Biotinylation of the Fc γ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection:
application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *Journal of*
Molecular Recognition, n/a-n/a, doi:10.1002/jmr.2495 (2015).
- 266 Jiang, X. R. *et al.* Advances in the assessment and control of the effector functions of
therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 101-111, doi:10.1038/nrd3365
(2011).
- 267 van Berkel, P. H. *et al.* Rapid production of recombinant human IgG With improved
ADCC effector function in a transient expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **105**,
350-357, doi:10.1002/bit.22535 (2010).
- 268 Yamane-Ohnuki, N. *et al.* Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary
cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with
enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 614-622,
doi:10.1002/bit.20151 (2004).
- 269 Rillahan, C. D. *et al.* Global Metabolic Inhibitors of Sialyl- and Fucosyltransferases.
Nat. Chem. Biol. **8**, 661-668, doi:10.1038/nchembio.999 (2012).
- 270 von Horsten, H. H. *et al.* Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of
heterologous GDP-6-deoxy-d-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology* **20**, 1607-1618,
doi:10.1093/glycob/cwq109 (2010).
- 271 Raymond, C. *et al.* Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *mAbs* **7**, 571-
583, doi:10.1080/19420862.2015.1029215 (2015).
- 272 Hayes, J. M. *et al.* Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG
glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *Journal of proteome*
research **13**, 5471-5485, doi:10.1021/pr500414q (2014).
- 273 Kitazume, S. *et al.* Molecular insights into beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase
secretion in vivo. *Glycobiology* **19**, 479-487, doi:10.1093/glycob/cwp003 (2009).
- 274 Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H. & Paulson, J. C. Primary structure of
beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme
to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *J. Biol. Chem.* **262**,
17735-17743 (1987).

- 275 Chen, C. & Colley, K. J. Minimal structural and glycosylation requirements for ST6Gal I activity and trafficking. *Glycobiology* **10**, 531-583 (2000).
- 276 Bowden, T. a. *et al.* Chemical and Structural Analysis of an Antibody Folding Intermediate Trapped during Glycan Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17554-17563, doi:10.1021/ja306068g (2012).
- 277 Mullick, A. *et al.* The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* **6**, 43, doi:10.1186/1472-6750-6-43 (2006).
- 278 van de Geijn, F. E. *et al.* Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* **11**, R193, doi:10.1186/ar2892 (2009).

Annexe 1 : Caractéristiques des anticorps modèles

Tableau 14 : Caractéristiques des séquences des anticorps modèles utilisés dans cette thèse

| | Chaîne lourde | Chaîne lourde mutante F243A | Chaîne légère | Fragment Fc |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Isotype | gamma 1 | gamma 1 | kappa | gamma 1 |
| Signal peptide | MGWSCIILFLVATA TGVHS | MGWSCIILFLVATA TGVHS | MAVMAPRTLVLVLLSG ALALTQTWA | MPLLLLLLPLW AGAWA |
| Région charnière | EPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGP | EPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGP | – | DKTHTCPPCPA PELLGGP |
| Lysine C-terminale | non | non | – | non |
| Allotype | G1m17 | G1m17 | Km3 | nG1m1 |

Annexe 2 : Article sur la transfection directe des cellules 293-6E

A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications

Article paru dans le journal Methods, doi 10.1016/j.ymeth.2011.04.002

Céline Raymond^{1,3}, Roseanne Tom², Sylvie Perret², Pascal Moussouami¹, Denis L'Abbé², Gilles St-Laurent² and Yves Durocher^{1,2,3,§}

¹Département de Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

²Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, QC, Canada

³NSERC Strategic Network for the large scale production of single-type glycoform monoclonal antibodies (MabNet)

[§]Corresponding author: Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, QC, Canada H4P 2R2. Phone: 1-514-496-6192; FAX: 1-514-496-6785

Abstract

Transient gene expression in mammalian cells is a valuable alternative to stable cell lines for the rapid production of large amounts of recombinant proteins. While the establishment of stable cell lines takes 2 to 6 months, milligram amounts of protein can be obtained within a week following transfection. The polycation polyethylenimine (PEI) is one of the most utilized reagents for small- to large-scale transfections as it is simple to use and, when combined with optimized expression vectors and cell lines, provides high transfection efficiency and titers. As with most transfection reagents, PEI-mediated transfection involves the formation of nanoparticles (polyplexes) which are obtained by its mixing with plasmid DNA. A short incubation period that allows polyplexes to reach their optimal size is performed prior to their addition to the culture. As the quality of polyplexes directly impacts transfection efficiency and productivity, their formation complicates scalability and automation of the process, especially when performed in large-scale bioreactors or small-scale high-throughput formats. To avoid variations in transfection efficiency and productivity that arise from polyplexes formation step, we have optimized the conditions for their creation directly in the culture by the consecutive addition of DNA and PEI. This simplified approach is directly transferable from suspension cultures grown in 6-well plates to shaker flasks and 5-L WAVE bioreactors. As it minimizes the number of steps and does not require an incubation period for polyplex formation, it is also suitable for automation using static cultures in 96-well plates. This “direct” transfection method thus provides a robust platform for high-throughput expression and large-scale production of recombinant proteins.

Keywords: Transfection, suspension culture, polyethylenimine, serum-free, HEK293, EBNA1

1. Introduction

The rising of protein-protein interaction studies as well as the constantly increasing demand of proteins in drug discovery programs have brought the need for high-throughput protein expression and automation to the foreground. The need for recombinant proteins with post-translational modifications has fostered the development of mammalian cell-based expression systems rather than prokaryotes and lower eukaryotes. Transient gene expression in mammalian cells is widely used for the fast production of recombinant proteins, mainly for pre-clinical *in vitro* and *in vivo* applications. Over the last ten years, major improvements of the technique leading to better yields have made transient gene expression a competitive alternative to the establishment of stable cell lines as it shortens the time required to obtain the target protein in sufficient amount from several months to a few weeks only. The capacity to quickly express recombinant proteins in mammalian cells by transfection is thus of great benefit not only for large-scale applications but also for high-throughput expression for functional screening and crystallization purposes.

The human embryonic kidney 293 cell line (HEK293) and its derivatives, such as the HEK293-EBNA1 that stably expresses the Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 (293E) or the simian virus 40 Large-T antigen (293T), are the most commonly used cell lines for transient gene expression. Indeed, HEK293 cells allow proper folding and relevant post-translational modifications of the proteins. They are also easy to grow in serum-free suspension culture and highly transfectable with most gene transfer agents. Polyethylenimine (PEI) is a widely used transfection agent for small to large-scale protein expression as it is highly efficient and cost-effective. PEI is a cationic polymer which binds to and condensates DNA into small cationic nanoparticles, thus facilitating DNA cell uptake, most likely via their interaction with cell-surface heparan sulfate proteoglycans. Linear and branched 25 kDa PEIs are the most widely used polymers, the linear PEI being more efficient and probably less toxic for the transfection of HEK293 cells grown in suspension cultures. The current transfection procedure consists in the formation of PEI-DNA complexes (polyplexes) prior to their addition to the cell culture (indirect method). Typically, PEI and DNA are mixed together and then incubated at room temperature for 10 to 15 minutes to allow complexation before their addition to the cells. This

incubation time allows polyplexes to grow up to the most suitable size for a maximum transfection efficiency, which significantly decreases when incubation time exceeds ~30 minutes. The preparation procedure (order of addition of DNA and PEI, DNA concentration, addition and mixing speed) also influences the size and polydispersity of the polyplexes. However, polyplexes formation becomes difficult to control when working with large-scale productions, as issues such as mixing parameters and time required to transfer the polyplexes into the bioreactor become significant. This DNA-PEI mixing step and the following incubation time are also complicating automation when using high-throughput robotic systems.

An alternative technique to the indirect method is the consecutive addition of DNA then PEI directly to the cell culture, allowing the formation of polyplexes *in situ* (direct method).²⁴² The present study aims to evaluate the direct transfection method as an alternative technique for high-throughput, medium- and large-scale protein production purposes. It has been optimized with 293-6E cells (a HEK293 cell line expressing a truncated version of EBNA1) cultured in 96-well plates, 6-well and 6-deep well agitated plates, 125-mL shaker flasks and 5L WAVE bioreactor, transfected with plasmids encoding green fluorescent protein (GFP), human secreted alkaline phosphatase (SEAP) or a chimeric IgG1/4 monoclonal antibody using linear or branched 25 kDa PEI. The direct transfection process is performed in serum-free medium with cells grown in suspension (except for the 96-well plate format) and does not require a medium exchange at any time. We show here that our optimized direct method provides yields comparable to the indirect method, greatly simplifies process scale-up and is amenable to automation, thus providing a robust and simple platform for protein expression at any scales.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

The human embryonic kidney 293 cell line stably expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (293-6E) was grown in suspension in a serum-free F17 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 0.1% Pluronic-F68, 25 µg/mL geneticin G418 and 4 mM glutamine. Cultures were maintained between 0.1 and 2.0 x 10⁶ cells/mL in 125 or 250 mL Erlenmeyer flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ (standard conditions).

2.2. Plasmids

Secreted human placental alkaline phosphatase (SEAP) and green fluorescent protein (GFP) were used as reporter genes in this study. The pTTo3c/SEAP and pTTo/GFP vectors were essentially as previously described. The chimeric monoclonal antibody against the colorectal carcinoma TAG72 antigen consists of the variable heavy and light-chain domains of the murine monoclonal IgG1 antibody B72.3 coupled to human gamma 4 and kappa constant regions. The heavy and light chains (HC and LC) were each cloned between the EcoRI and BamHI sites of the pTT5 vector. Plasmids were amplified in *Escherichia coli* (DH5α) grown overnight in CircleGrow medium (MP Biomedicals, Solon, OH) supplemented with 50 µg/mL ampicillin and purified using MAXIprep or QIAprep spin Miniprep columns (Qiagen, Mississauga, ON).

2.3. Cell counts

Cell density and viability were determined using either a hemacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA) after erythrosine B staining, or the Cedex Innovatis' automated cell counter Cedex Analyzer (Roche, Laval, Qc) based on the trypan blue exclusion method.

2.4. Transfection

Linear 25 kDa polyethylenimine (LPEI) was obtained from Polysciences (Warrington, PA), and branched 25 kDa PEI (BPEI) from Aldrich (Milwaukee, WI). Stock solutions (1 mg/mL) were prepared in ultrapure water, sterilized by filtration (0.2 µm), aliquoted and stored at -20°C. Cells were diluted two days before transfection in fresh medium at 0.4-0.45 x

10^6 cells/mL. Cells were transfected with viability greater than 98% at densities between 1.5 and 2.0×10^6 cells/mL, except for the 96-well plates for which cell density was reduced to 0.2×10^6 cells/mL the day of transfection, as cells were grown in static instead of suspension culture. DNA and PEI were separately diluted in complete serum-free F17 medium in sterile tubes. Transfection reagents volume was generally 10% of the final culture volume. The final DNA concentration was 1 μ g per mL of culture, unless indicated otherwise. **Direct method:** the DNA:PEI ratio was 1:3 (w:w). Plasmid DNA was directly added to the cells and the suspension was allowed to incubate under agitation for 5 minutes at 37°C before the addition of PEI. **Indirect method:** DNA:PEI ratio was 1:2.5 (w:w). PEI was added dropwise to DNA. The mixture was vortexed for 4 sec and incubated 15 minutes at room temperature. Polyplexes were then added to the cells.

In all cases, cells were fed 24 hours post-transfection with TN1 peptone to a final concentration of 0.5% (w/v) to enhance productivity. Details specific to each scale and experiment are described in Table 1.

2.4.1. Transfection in 5L WAVE Bioreactor

Scalability to 5L bioreactors was assessed with the chimeric B72.3 antibody. The culture medium (3.5L) was transferred and acclimatized for one hour at 37°C in a 10L WAVE Cellbag™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) inflated at 0.1 bar and aerated at 100 ccm with 95% air + 5% CO₂. The rocking speed and angle were 18 rpm and 8° to minimize foaming. Cells grown in shaker flasks were transferred in the WAVE bag (final volume of 4.8L) to obtain an initial density of 0.40-0.45 $\times 10^6$ cells/mL. The rocking speed and angle were then set at 25 rpm, 8° for the growth phase. Two days later, cells were co-transfected with the LC and HC plasmids at a 6:4 ratio (w:w). Plasmids were added to the culture at a final concentration of 0.75 μ g/mL with a DNA:LPEI (w:w) ratio of 1:3 (direct method) or 1:2.5 (indirect method). Direct transfection was achieved by adding 100 mL of DNA followed 5 minutes later by 100 mL of LPEI. The transfer line was rinsed with 50 mL of medium after each addition. For indirect transfection, 200 mL of polyplexes were prepared and incubated for 15 minutes before being added to the cells, followed by a rinse of the transfer line with 50 mL of medium. Twenty-four hours post-transfection, the cultures were fed with TN1 (0.5% w/v final). Then

the rocking speed was increased to 28 rpm and the angle to 9.5°. Culture samples were collected every day for 7 days post-transfection.

2.5. Products analyses

2.5.1. GFP

GFP was analyzed 48 hours post-transfection (hpt) by flow cytometry using a BD LSRII cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON). 200 µL were taken out of the cultures in 6-well plates, 500 µL in cultures of 5 mL and more. Only viable cells were analyzed for the expression of GFP. Remaining cultures were kept for subsequent SEAP analysis.

2.5.2. SEAP

Unless otherwise indicated, SEAP was assessed at day 5 post-transfection (dpt). SEAP transfected cells were centrifuged and the supernatant was diluted in water (typically 1/1000). For the 96-well plate scale, the culture medium was sampled without centrifugation step and diluted in water (1/1000). Fifty µL of diluted supernatant was transferred to a 96-well plate and mixed with an equal volume of SEAP assay solution containing 20 mM paranitrophenyl phosphate (pNPP), 1 mM MgCl₂, and 1 M diethanolamine. Absorbance was read at 405 nm at 1 min intervals for 5 min.

2.5.3. Chimeric B72.3 antibody

Concentration of the chimeric B72.3 antibody from direct and indirect methods in WAVE bioreactor were determined by protein-A HPLC using a 800 µL POROS® 20 micron Protein A ID Cartridge (Applied BioSystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's recommendations. The antibody present in the culture medium was also visualized following reducing and non-reducing SDS-PAGE stained by Coomassie.

3. Results

3.1. Optimization of transfection parameters for the direct method

We first determined the optimal parameters for the direct transfection of 293-6E cells grown in agitated 6-well plates in serum-free F17 medium. The pTT vector expressing the human secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) was used as it allows rapid and quantitative measurement of the product in the culture medium five days post-transfection using a simple and robust colorimetric assay. The optimal DNA concentration and DNA:PEI ratio were first determined. Various concentrations of plasmid DNA were added to the culture followed by a 5 minute incubation under agitation to allow for a uniform mixing. Then various concentrations of PEI were added to the culture and the plates returned to the incubator for five days. Each set of experiment was independently repeated three times. SEAP activity in the culture medium was then measured using pNPP as a substrate and expressed as relative value (in %). Figure 1 (panels A and B) shows that the optimal plasmid DNA concentration lies between 0.5 and 1 μg per mL of culture with 2.5-3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPEI, a slightly higher SEAP productivity being obtained at DNA and LPEI concentrations of 1 and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Maximal absolute SEAP titers were of 62, 67 and 75 mg/L for DNA:LPEI concentrations of 0.5:2.5, 0.75:2.5 and 1:3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (averages of 3 independent experiments). For the branched 25 kDa PEI (BPEI), maximum SEAP productivity was observed with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DNA with 2.5-3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BPEI. Maximal absolute SEAP titer was of 65 mg/L at a 1.5:3 ratio. As previously observed using the indirect method, LPEI was more efficient than BPEI at transfecting HEK293 cells and increasing the concentrations of plasmid and PEI (Fig. 1B) did not increase productivities. A DNA:LPEI ratio of 1:3 with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of plasmid DNA was thus chosen for the subsequent experiments.

Since in the direct method plasmid DNA is directly added to the culture, a minimum incubation time may be needed to allow its adequate mixing prior to addition of PEI in order to obtain optimal transfection efficiency. In addition, the presence of nucleases released by the cells may reduce productivity by degrading the plasmid DNA. Thus the impact of incubation time with plasmid DNA prior to LPEI addition was evaluated. As shown in Figure 2A, an incubation time of 5 to 15 minutes with the DNA prior to PEI addition yielded a maximum of

65-70% of GFP-expressing cells, as measured by flow cytometry two days post-transfection. Similarly, the same incubation time allowed to reach maximal SEAP expression as measured five days post-transfection (Fig. 2B). Longer incubation time yielded only slightly lower titers, suggesting that plasmid DNA is not significantly degraded by cell-derived nucleases that may accumulate in the conditioned medium.

3.2. Comparison of direct and indirect transfection methods

3.2.1. Comparison in ThinCert™ plates and 125 mL shake flasks

The direct transfection approach was then compared to the commonly used indirect method (i.e. formation of polyplexes prior to their addition to the culture) using the optimal parameters determined for both methods. For the direct transfection, DNA and PEI concentration used were 1 and 3 µg/mL with a DNA pre-incubation of 5 minutes prior to PEI addition. For the indirect transfection, previously determined optimal parameters (not shown) were 1 µg/mL of DNA, and 2.5 µg/mL of PEI (DNA:PEI ratio of 1:2.5). Transfections conditions were directly scaled up from 2 mL cultures in 6-well plates to 6 mL cultures in ThinCert™ 6-deep well plates and 25 mL cultures in 125 mL shaker flasks. SEAP expression was measured 5 days post-transfection for ThinCert™ plates (Figure 3A) or followed daily over 8 days post-transfection for the shaker flasks (Figure 3B). With both the direct and indirect methods, SEAP accumulation in the culture medium was very similar. For the ThinCert™ plates, slightly higher SEAP activity was obtained (70 mg/L vs 61 mg/L) when DNA and PEI solution volumes represented 16% vs 10% (1 mL vs 0.6 mL) of the final culture volume, respectively, and both conditions yielded higher titers compared to the direct method (58 mg/L). Surprisingly, transfection efficiencies (% GFP-positive cells) were higher in the indirect (53%) vs direct method (39-43%). For the shaker flask experiments, a steady SEAP increase was observed for up to day 4 post-transfection and then reached a plateau at day 5. Maximum titers found at day 5 post-transfection were of 75 and 88 mg/L for the direct and indirect transfection, respectively.

3.2.2. Comparison in a WAVE bioreactor

To demonstrate scalability of the process, a comparison of the direct and indirect methods was also done at the 5L-scale using a WAVE bioreactor with the chimeric B72.3 monoclonal antibody. Expression of the monoclonal antibody was achieved by co-transfection of two plasmids, one encoding the light chain (LC) and the other one the heavy chain (HC). The optimal LC:HC ratio for achieving highest Mab expression was assessed in 6-well plates and found to be 3:2 using 0.75 µg/mL DNA and 2.25 µg/mL PEI (DNA:PEI ratio of 1:3, not shown). This optimal LC:HC ratio is slightly different to the 2:3 ratio previously found for the same antibody transiently expressed in CHO cells. These optimal conditions were used to transfect two 5L cell cultures in 10L Cellbag™ using the direct and indirect methods (see Materials & Methods for culture and transfection procedure). The cultures were sampled daily for up to 7 days post-transfection and antibody titers measured by protein-A HPLC using an in-house purified and quantified chimeric B72.3 standard (Figure 4A). Supernatants from 5 days post-transfection were also analyzed by reducing and non-reducing Coomassie-stained SDS-PAGE (Figure 4B). Maximum antibody titers were reached on day 6 and corresponded to 116 and 103 mg/L for the cultures transfected with the direct and the indirect methods, respectively. This shows that the direct method is a viable and simple alternative to the traditional polyplexes transfection approach for large-scale transfections.

3.3. High-throughput transfection and impact of culture mode

3.3.1. Miniprep plasmid DNA production

We studied here the feasibility and reproducibility of the direct transfection process in 96-well plates. We paid special attention to make the protocol easily amenable to automation. The first parameter that we addressed was suitability and reproducibility of miniprep plasmid DNA for efficient transfection of HEK293 cells. One critical aspect was to show that plasmid yield is constant not only between minipreps done in parallel, but also between minipreps done at different times. To that purpose, twenty-four *E. coli* colonies transformed with the pTT/SEAP plasmid were picked to inoculate 2 mL of culture medium per well in a 24-deep well plate. The cultures were then grown overnight at 37°C. The following day, twenty-four pTT/SEAP plasmid minipreps were performed using a commercial kit (Qiagen). A second set

of 24 minipreps was performed again as a completely independent experiment, for a total of 48 minipreps. The plasmid DNA was eluted from the columns using 200 μ L of TE buffer and quantified by absorbance at 260 and 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer. The first minipreps series yielded an average of 26.6 ± 1.0 μ g while the second series gave 28.1 ± 1.6 μ g (Table 2). This suggests that the minipreps columns were all saturated as their expected capacity are 20 μ g of DNA according to the manufacturer. The plasmid quality was very good as indicated by the average $A_{260/280}$ ratio of 1.89. This suggests that plasmid DNA concentration determination prior to transfection is not necessary as long as column saturation is reached, thus greatly simplifying automation of the process.

3.3.2. *Transfection in 96-well plates with miniprep DNA*

The transfection conditions in 96-well plates were optimized in a final culture volume of 200 μ L. The optimal DNA:LPEI ratio and concentration was found to be 1:3 and 200 ng of plasmid per well, respectively (data not shown). The impact of cell number per well on volumetric yield was also tested. Volumetric SEAP yield increased steadily from 2×10^4 to 4×10^4 cells/well (e.g. 1×10^5 to 2×10^5 cells/mL) and then slightly declined at 5×10^4 cells/well (Figure 5A). Subsequently, 72 wells of a 96-well plate were transfected with 24 pTT-SEAP plasmid minipreps in triplicates using the direct method (Figure 5B). The average SEAP titer measured 5 days post-transfection was 17.2 ± 2.7 mg/L. This SEAP productivity observed in Figure 5A & 5B was about four-times lower than that obtained with transfection in agitated 6-well plates. To verify that this lower yield was not due to contaminants present in the minipreps DNA, we compared productivity of suspension cells in 6-well plates using miniprep and maxiprep plasmid DNA (Figure 5C). The average SEAP productivity / transfection efficiency obtained with minipreps DNA was of 112.1 ± 2.3 mg/L / 78.9 ± 0.6 % vs 123.3 ± 11.7 mg/L / 82.0 ± 4.6 % for maxipreps. This demonstrates that the use of miniprep DNA provides volumetric yields and transfection efficiencies only slightly lower to those obtained with maxiprep DNA.

3.3.3. *Transfection of adherent vs suspension cultures*

The impact of the culture mode (adherent vs suspension) on SEAP productivity was evaluated using the direct transfection method (Figure 6). Cells transfected in non-agitated 6-

well plates secreted 25.4 ± 4.4 mg/L of SEAP while agitated cultures produced 117.1 ± 16.5 mg/L (average of two independent experiments done in triplicates). This clearly shows that suspension-growing cells allow to reach titers that are 4-5 times higher compared to adherent cells. This difference likely results from the higher optimal cell density at time of transfection of suspension vs adherent cells ($1.5\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL vs 0.36×10^6 cells/mL, respectively). The lower SEAP yield measured in the 96-well plate format (17.2 mg/L, panel B) compared to the non-agitated 6-well plate (25.4 mg/L, panel D) may also be explained by the lower optimal cell density found for the former culture format.

4. Discussion

With the continual increase in demand for high-throughput and high-level protein expression, robust and simple processes providing predictable protein yields are needed. The robustness, versatility and relative simplicity of PEI-mediated transient expression systems concomitant with the use of performing cell lines and episomal expression vectors have made protein expression in mammalian cells a valuable alternative to bacterial systems. For a given cell line, the efficiency of PEI-mediated transfection depends on many parameters such as the culture medium in which the transfection occurs, the mode of cell culture (i.e. adherent vs suspension), the cell density at time of transfection, the DNA concentration in the culture medium and the DNA:PEI ratio. The formation of polyplexes by mixing together plasmid DNA and a polycation is a dynamic process involving particle formation, growth and aggregation. As the size and polydispersity of polyplexes are important parameters for efficient gene transfer, it is a significant source of variation in transfection efficiencies, especially when up-scaling or down-scaling culture volumes. The preparation of polyplexes, which consists of mixing DNA with a cationic polymer such as PEI, is typically done via pipetting and as such, is restricted to relatively small volumes. When performing large-scale (multi-liters) transfections, mixing of DNA with PEI is often done by manual swirling in glass bottles, a process that is difficult to control and which imposes a limitation on the volume that can be handled. In addition, high-throughput PEI-mediated transfection in 96-well plates is challenging as it involves very small volumes that are not easily amenable to efficient and reproducible mixing. To overcome these challenges we have optimized parameters for the direct transfection approach, which consists of the addition of plasmid DNA and PEI directly to the culture. We have shown that this approach provides recombinant protein titers similar to the usual indirect method based on the addition of pre-made polyplexes to the culture. As the direct transfection method implies less pipetting and mixing steps, it is also well suitable for automation in 96-well plates. Even though transfection of adherent cells provides four- to five-fold less product compared to transfection of suspension cells, a likely result of the 4- to 5-fold lower optimal transfection density of adherent vs suspension cultures, transfection in 96-well plate allows the high throughput parallel evaluation of multiple variants for expression screening.

We have shown here that the direct transfection method can be applied to 6-well or 6-deep well plates, 125 mL shaker flasks and to large-scale multi-liter transfection in bioreactors using exactly the same conditions. As ThinCert™ 6 deep-well plates can be stacked easily and can accommodate up to 8 mL of culture/well, we found them convenient for producing significant quantities of proteins in a high-throughput manner. The method can even be adapted to 24 deep-well plates since transfection of 293-EBNA1 cells grown in these plates was shown to be efficient. Moreover, we have shown that plasmid DNA prepared using silica-based commercial miniprep kits is fully compatible with PEI-mediated transfection, giving expression levels comparable to those obtained with anion-exchange purified plasmids. The quantity of plasmid DNA generated with miniprep kits (~25 µg) is sufficient to transfect up to 25 mL of cell culture, which is enough for small-scale affinity purification and crystallization trials. For that purpose, the addition of the glycosyltransferase inhibitor kifunensine can be used to generate glycoproteins with high mannose-type glycosylation that are more susceptible to endoglycosidases treatment and to crystallization.

Still today, many high-throughput transient expression platforms use adherent 293 cells. We have shown here that optimal transfection conditions differ significantly between adherent and suspension cultures, and that suspension cultures provide significantly higher volumetric yields vs adherent ones. Also, cell density measurement at time of transfection, a critical parameter for optimal gene transfer and expression, can only be qualitatively estimated when growing adherent cultures. As for scaling-up production with adherent cells, it requires costly culture flasks such as cell factories (e.g. CellStack™ system) which involve extensive manipulations and complicate cell harvesting for intracellular or membrane-associated products. A single ~6000 cm² cell factory (10 layers of ~600 cm²) that typically uses 2L of culture medium provides up to 1x10⁹ cells at time of transfection, compared to up to 4x10⁹ cells with suspension cultures. As 2L of suspension cells can be easily grown in two 3L Erlenmeyer shaker flasks, the cost for the culture vessel is reduced by a factor of ~4. Combined with the significantly increased volumetric productivity obtained with suspension cells, these factors strongly illustrate the benefits of suspension over static cultures for recombinant protein production by transfection.

In conclusion, the direct transfection of 293 cells in serum-free suspension cultures offers a simple, robust and scalable process for small-scale high-throughput and large-scale protein expression with volumetric yields comparable to the commonly used indirect method. As the process can use miniprep- or maxiprep-quality DNA without impacting transfection efficiency or productivity and does not require a medium exchange at any time, it greatly facilitates automation as well as large-scale operations.

Acknowledgements

C.R. is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) MabNet Strategic Network.

Figures

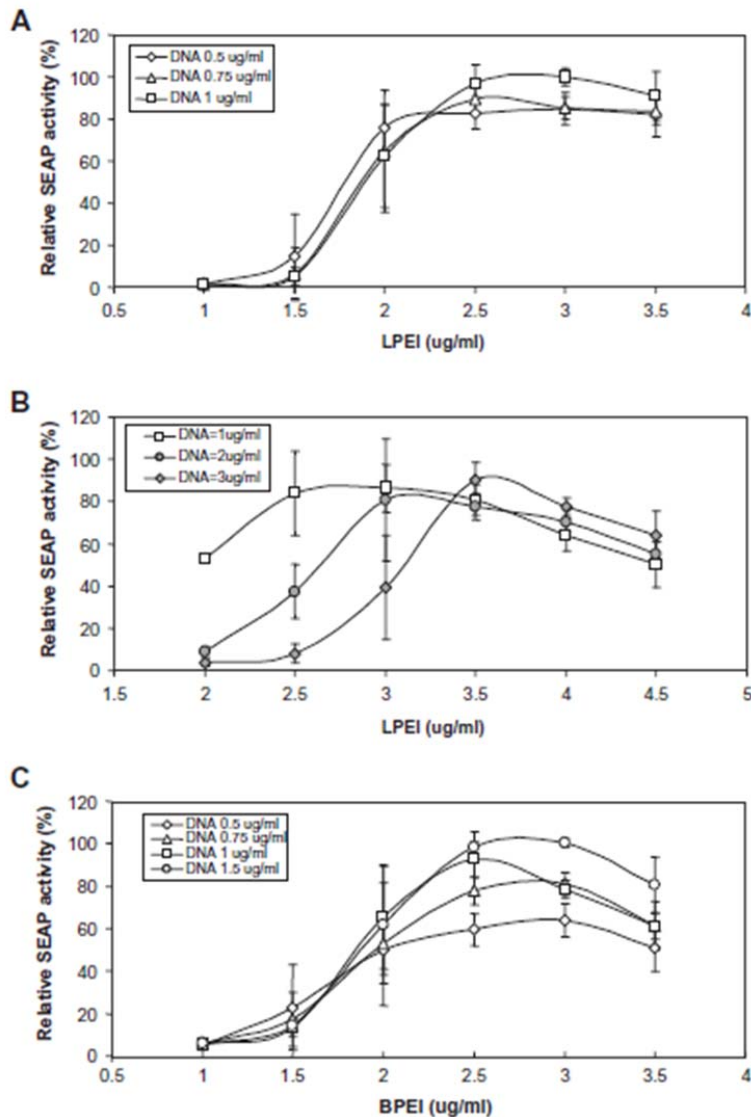


Figure 1. Effect of DNA and PEI concentrations on SEAP production following direct transfection. Cells were grown in agitated 6-well plates at 1.5×10^6 cells/mL in 1.8 mL of complete culture medium. Plasmid DNA and PEI solutions were each diluted in 100 μ L of culture medium at various concentrations. Following DNA addition, the plates were returned to agitation in the incubator for 5 minutes, then PEI was added to the cultures. Tryptone N1 was added 24 hpt at 0.5% (w:v) and SEAP measured in the culture medium five days post-

transfection (dpt) as indicated in the Materials and Methods section. Error bars are standard deviation from three independent experiments.

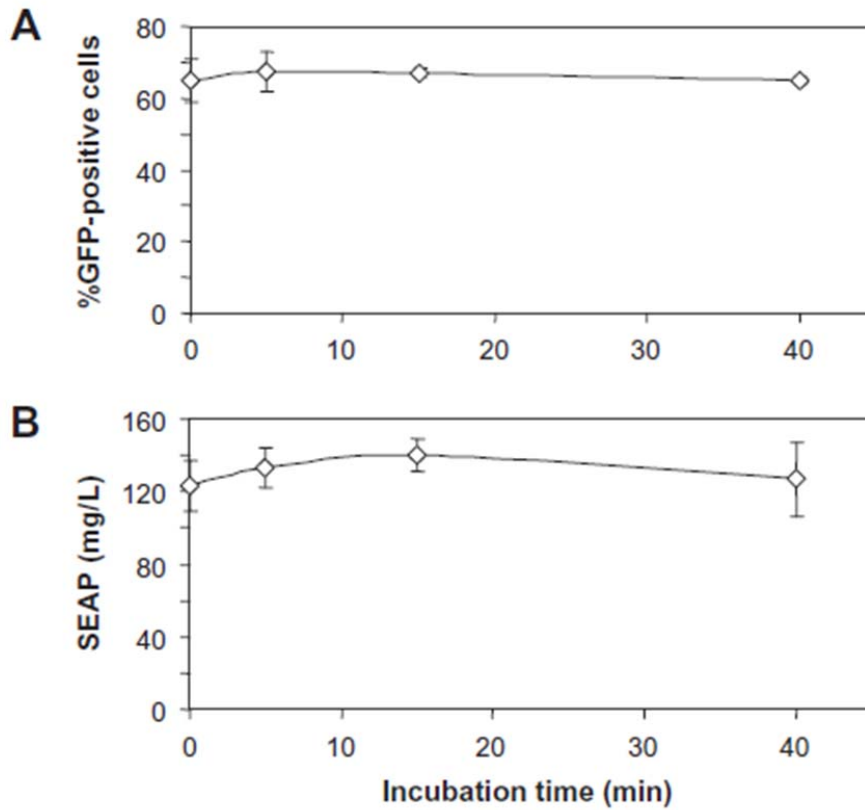


Figure 2. Impact of cells incubation time with DNA before LPEI addition on transfection efficiency. Cells (1.5×10^6 /mL) were plated in 6-well plates (1.8 mL per well). DNA and PEI solutions were prepared to get a DNA:PEI ratio of 1:3 in the culture. 100 μ L of plasmid DNA solution was added to the wells then 100 μ L of LPEI solution was added at various time points after DNA addition. Plates were returned to agitation in the incubator after each transfection, at 120 rpm under standard conditions. GFP was measured by flow cytometry 48 hpt (panel A) while SEAP activity was determined 5 dpt (panel B). Each point represents the average SEAP values from transfections done in triplicate \pm SD.

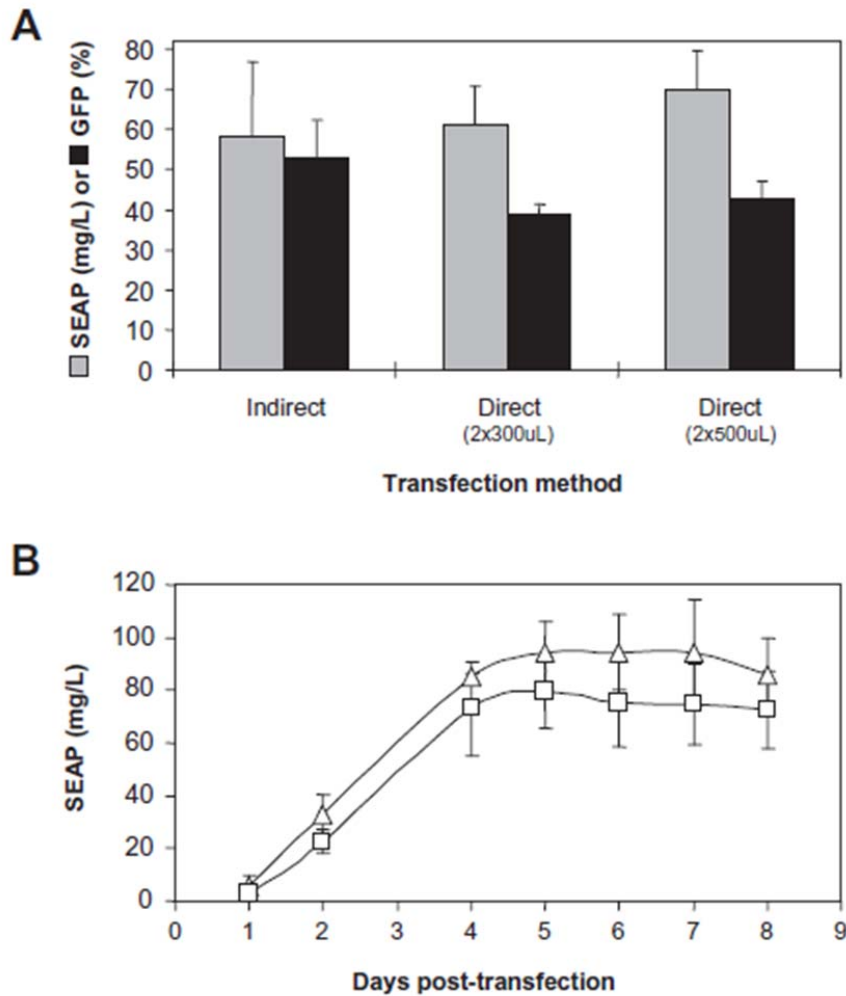


Figure 3. Comparison of SEAP production in 6-deep well ThinCert™ plates or 125-mL shaker flasks using the direct or indirect methods. A) Cells in 6-deep well ThinCert™ (Greiner Bio-One) plates were transfected as follows: *direct method* – 5.4 or 5.0 mL of cultures at densities of $1.5\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL were added to each well. Then 300 or 500 μL of plasmid DNA (95% SEAP plasmid and 5% GFP plasmid) were added to the wells containing 5.4 or 5.0 mL of culture, respectively. After 5 minutes of incubation at 37°C , 300 or 500 μL of LPEI solution were added, for a final volume of 6 mL/well in all cases. GFP (black bars) was monitored by flow cytometry 48 hpt while SEAP activity (gray bars) was measured 5 dpt; *indirect method* - 5.4 mL of cultures at densities of $1.5\text{-}2.0 \times 10^6$ cells/mL were added to each well. 600 μL of polyplexes were then added for a final volume of 6 mL/well. B) 125 mL Erlenmeyer shaker flasks containing 22.5 mL of culture at densities between $1.5\text{-}2.0 \times 10^6$

cells/mL were transfected using 25 μ g of plasmid DNA (95% SEAP plasmid and 5% GFP plasmid) in 1.25 mL of medium followed 5 minutes later by the addition of 75 μ g of LPEI in 1.25 mL of medium (direct method; open squares) or 2.5 mL of polyplexes made of 25 μ g of DNA and 62.5 μ g of LPEI (indirect method; open triangles). GFP was monitored by flow cytometry 48 hpt while SEAP activity was measured daily until 8 dpt. Data are mean values of 3 independent experiments \pm standard deviations.

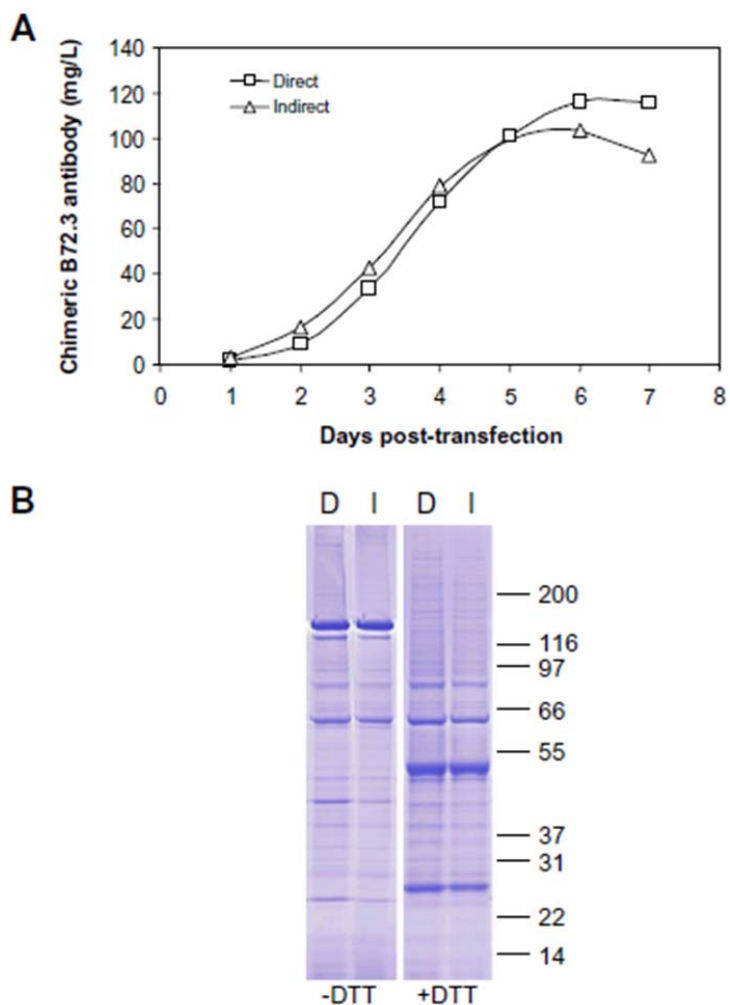


Figure 4. Chimeric B72.3 monoclonal antibody productions in 5L WAVE bioreactors. following direct or indirect transfections. 4.8L of culture in a 10L Cellbag™ were transfected with the direct or indirect method as described in Materials and Methods section. The cultures were sampled daily for up to 8 days post-transfection. A) Antibody titers were determined by protein-A HPLC against a purified chimeric B72.3 standard. B) 20 μ L of

culture medium sampled at day 5 was analyzed by SDS-PAGE under reducing or non-reducing condition. D: direct transfection; I: indirect transfection.

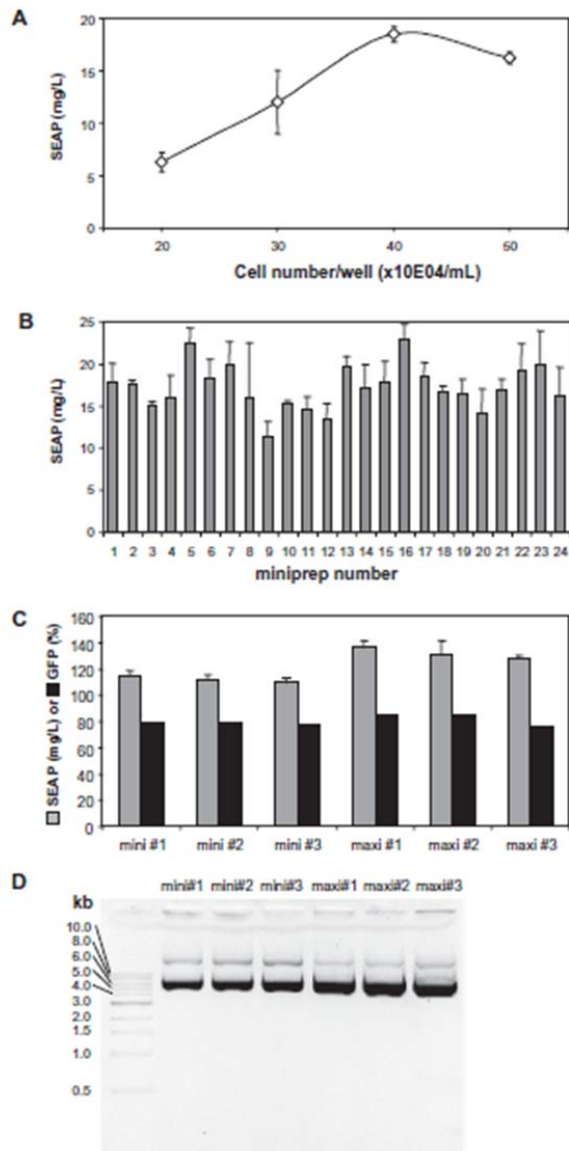


Figure 5. Transfection in 96-well plates. A) the optimal cell number per well was first evaluated. Twenty μL of plasmid DNA were first added to the wells. Then, 100 μL of cells at various densities were plated and mixed with DNA by one up & down pipetting. After 5 minutes at room temperature, 80 μL of LPEI was added to each well. The large volume of PEI solution was increased to 40% of the final culture volume (200 $\mu\text{L}/\text{well}$) to enhance mixing of DNA and PEI with the cells. After transfection, cells were returned to the incubator under standard conditions, without agitation. B) SEAP titers from 72 transfections performed in 96-

well plates using twenty four pTT/SEAP plasmid minipreps. Twenty μL of plasmid DNA were first added to the wells, then 100 μL of cells at 0.4×10^6 cells/mL were added followed by 80 μL of LPEI as described above. C) SEAP titers 5 dpt (gray bars) and % GFP-positive cells 2 dpt (black bars) obtained from transfection suspension cultures in 6-well plates using three independent minipreps (mini) or maxipreps (maxi) DNA.

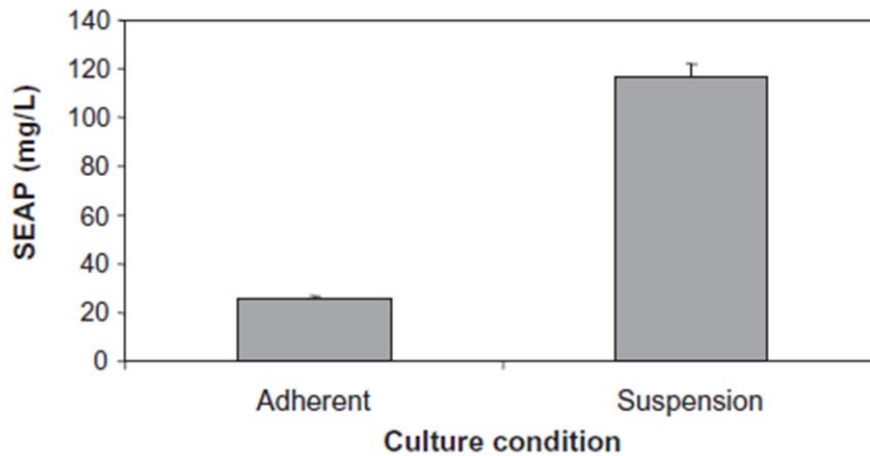


Figure 6. Transfection of adherent vs suspension cultures. Productivity of adherent vs suspension cells was compared in 6-well plates. Cells (1.8 mL) were respectively plated at 4×10^5 or $1.5\text{-}2 \times 10^6$ cells/mL for the adherent or suspension cultures. Plasmid DNA (2 μg) in 100 μL of culture medium was then added, followed by the addition of 100 μL of LPEI (6 μg). SEAP activity was measure 5 dpt. Data are average of 2 independent experiments done in triplicates \pm standard deviation.

Tables

Table 1. Direct transfection parameters from 96-well plates to 5L WAVE batches

| | 96-well plate | 6-well plate | 6 deep-well ThinCert™ plate | 125 mL shake flask | 5 L WAVE |
|--------------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Working volume | 200 µL | 2 mL | 6 mL | 25 mL | ~5 L |
| Seeding cell concentration | 0.2x10 ⁶ cell/mL | 1.5-2x10 ⁶ cell/mL | | | |
| Cell suspension initial volume | 100 µL | 1.8 mL | 5.0-5.4 mL | 22.5 mL | 4.8 L |
| Final DNA concentration | 1 µg/mL | | | | 0.75 µg/mL |
| DNA:LPEI ratio w:w | 1:3 | | | | |
| DNA solution volume | 20 µL | 100 µL | 500-300 µL | 1.25 mL | 100 mL |
| PEI solution volume | 80 µL | 100 µL | 500-300 µL | 1.25 mL | 100 mL |
| Agitation speed | No (adherent) | 120 rpm | 140 rpm | 120 rpm | 25 rpm, 8°; 28 rpm, 9,5° 24 hpt |
| Incubation conditions | 37°C, 5% CO ₂ humidified atmosphere | | | | |

Table 2. Yield and purity of miniprep plasmid DNA

| Plasmid miniprep | 1 st series (average±SD) | 2 nd series (average±SD) | Average of 48 minipreps (±SD) |
|------------------------------------|--|--|----------------------------------|
| Concentration (µg/mL) | 133.2±5.0 | 140.5±8.4 | 136.8±7.8 |
| Yield (µg) | 26.6±1.0 | 28.1±1.6 | 27.4±1.6 |
| A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | 1.93±0.01 | 1.86±0.02 | 1.89±0.04 |

Annexe 3 : Articles en tant que deuxième auteur ou co-auteur

Dorion-Thibaudeau J., Raymond C., Latta E., Perreault H., Durocher Y., De Crescenzo G., Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods* **408**, 24-34, doi:10.1016/j.jim.2014.04.010 (2014).

Dorion-Thibaudeau J., St-Laurent G., Raymond C., De Crescenzo G., Durocher Y., Biotinylation of the Fc γ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *Journal of Molecular Recognition*, n/a-n/a, doi:10.1002/jmr.2495 (2015).

Bodnar E., Raymond C., Lopez P.G., Villacrés C., Butler M., Schoenhofen I.C., Durocher Y., Perreault H., Mass spectrometric analysis of products of metabolic glycan engineering with azido-modification of sialic acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, doi:10.1007/s00216-015-9010-x (2015).

Gomes de Oliveira A.G., Roy R., Raymond C., Bodnar E., Tayi V.S., Butler M., Durocher Y., Perreault H., A systematic study of glycopeptide esterification for the semi-quantitative determination of sialylation in antibodies. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **29**, 1817-1826, doi:10.1002/rcm.7287 (2015).