AGGREGATION & STABILITY ANALYSIS OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES: ROLE OF IMAGE PROCESSING, STRESS CONDITIONS, IN-VITRO MODELS & NOVEL STABILIZERS

SHRAVAN SREENIVASAN

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI
AUGUST 2024

AGGREGATION & STABILITY ANALYSIS OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES: ROLE OF IMAGE PROCESSING, STRESS CONDITIONS, IN-VITRO MODELS & NOVEL STABILIZERS

by

SHRAVAN SREENIVASAN

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

Submitted

In fulfilment of the requirements of the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

AUGUST 2024

Certificate

This is to certify that the thesis entitled **"Aggregation & Stability Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Role of Image Processing, Stress Conditions, In-Vitro Models & Novel Stabilizers"** submitted by Mr. **Shravan Sreenivasan** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of **Doctor of Philosophy**, is a record of the original bonafide research work carried out by him. He has worked under my supervision and has fulfilled the requirements, which to my knowledge, has reached the requisite standard for the submission of this thesis. The results contained in this thesis have not been submitted in part or full to any University or Institute for the award of any degree or diploma.

Prof. Anurag S. Rathore
Department of Chemical Engineering
Indian Institute of Technology Delhi

Acknowledgements

Here I stand, at the end of a journey, which was really long and arduous, but at the same time very much enriching and transformative. My doctoral expedition would be incomplete without the encouragement, guidance, and support of numerous incredible individuals, both within and outside IIT Delhi. As I write this part of my thesis, I am filled with gratitude for everyone who has been a part of my doctoral journey. Hence, I would like to thank all of you and dedicate these words as a token of appreciation for your support that led to relentless pursuit of knowledge.

First and foremost, I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Prof. Anurag S. Rathore, whose unwavering support, insightful feedback, and constant encouragement have been the guiding light of my research. Your expertise, patience, support, perspectives, ideas, determination, and mentorship have been the most valuable in this journey and has helped me in shaping both my scientific acumen and my character. In the realm of scientific collaboration, I would also like to express my gratitude to Prof. Wim Jiskoot, University of Leiden, Netherlands for providing me with insightful feedback, especially on data analysis and manuscript drafting which enabled me to dive deeper into my area of research. Though I worked only for a very short time span of a little more than a year with you, those times were really insightful and helped in paving a direction in my PhD. I would also like to express my gratitude to Prof. Kedar Khare, Department of Physics, IIT Delhi for his dedicated mentoring to develop the fluorescence microscope image analysis algorithm for analyzing protein aggregates.

I would like to thank the SRC members, Prof. Anupam Shukla, Prof. James Gomes, and Prof. Manojkumar Ramteke for their valuable suggestions and insights that helped to improve the quality of research. I am also grateful to Department of Chemical Engineering, IIT Delhi for proving me a suitable environment for conducting the research and knowledge on various chemical engineering subjects, which were new to me during my initial stages of PhD. I am indebted to CSIR, New Delhi for providing the funding as part of direct CSIR-SRF fellowship. The financial support was really helpful and enabled me to focus entirely on my research goals.

I would like to express my gratitude to Dr. Srishti Joshi, co-ordinator of analytical section of our lab. I am highly thankful to you for the insightful discussions, mentorship, and belief in my

abilities, especially during the tough times. I am also thankful to Dr. Rozaleen Dash, co-ordinator of bioassay section of our lab. I would like to thank Dr. Shyampada Mandal for working with me in formulating the image analysis algorithm. I would also like to express my gratitude to Deepak Sonawat, an undergraduate student at IIT Delhi for collaborating with me for various projects and providing in-depth contributions. Deepak, I am yet to see a student of your age with better coding skills. I would now like to express my heartfelt thanks to all the lab mates who have contributed in some way or other for the progress of research. In this regard, I would especially like to thank Vineela Peruri, Sanjeet Patil, Deepika Sarin, Kratika Upadhyay, Preeti Saroha, Snehal Desai, Dr. Wajihul Hassan, Dr. Sunil Kumar, and Dr. Sharad Narnaware for helping me whenever there was a requirement.

I would like to express my gratitude to the support staffs of my lab, Surinder Ji, Mohit Ji, Nitin Ji, Ranjeet Ji, and Naresh Ji. Your efforts for the smooth functioning of lab will always be remembered. I would also like to state that, though indirectly, you guys have contributed a lot to the outcomes of this research.

I am grateful to my friends and family for their support and encouragement throughout this journey. I would like to dedicate a special thanks to my partner Dr. Pooja Madhavan, whose love, support, and understanding helped me to navigate the ups and downs of this journey. Your belief in me kept me going even in the face of challenges. I would also like to thank my parents. Your belief in education, and unconditional love have been very important for me.

Finally, I thank God, the Almighty, who has provided me countless blessings, knowledge, and opportunities. I would like to end this section of thesis by acknowledging again the privilege that I had at IIT Delhi for undertaking this research. I hope that my work contributes meaningfully to the field of therapeutic proteins.

Shravan Sreenivasan

ABSTRACT

Therapeutic proteins, such as monoclonal antibodies (mAbs) are used for the treatment of various diseases. Aggregation of mAb is a major stability issue and occurs during various stages of the product life cycle such as cell culture, downstream processing, formulation, transportation, storage, handling, and administration.

Microscopy based techniques are used for the analysis of aggregates. First objective was to develop a novel image processing algorithm to characterize micron sized aggregates of mAb using brightfield images. Initial steps of image analysis algorithm involved conversion of images to grayscale followed by pixel-based and size-based thresholding. Further steps involved morphological operations and calculation of size distribution. Size distribution output obtained from brightfield image processing was validated using images of liquid chromatography resins. Aggregate size distribution of mAb was also compared with various experimental techniques. Overall, it was concluded that analysis of IgG aggregates using image processing strategy could serve as a rapid orthogonal methodology to the existing approaches.

Combined occurrence of air/liquid interfacial stress and agitation is known to be highly detrimental to the stability of mAbs and hence requires deeper investigation. Second objective consisted of aggregation analysis of therapeutic mAb induced by rapid air/liquid interfacial agitation stress through air bubbling using an in-house set-up. Samples containing mAb subjected to stress were characterized using a wide array of analytical techniques. Stressed samples showed increasing turbidity with time, with mAb1 showing a protein loss of more than 50% after 240 minutes. Aggregate rich samples exhibited altered secondary structure and higher hydrophobicity with 40% reduction in activity. It was also found that the extent of aggregation was affected by protein concentration, sample volume, presence of surfactants, temperature, air flow rate, and presence of silicone oil. In conclusion, exposure to air/liquid interfacial stress through bubbling into liquid mAb samples effectively generated sub-visible and visible aggregates, making air bubbling an attractive approach for interfacial stress testing of mAbs.

Once the sample containing mAb is administered in the human body, the stability of mAb in physiological fluids might vary with time, and hence, different in-vitro models are used for stability assessment. Phosphate-buffered saline (PBS) is a buffer, also used to mimic conditions

of physiology. Samples containing mAb encounters different matrix components of blood once they are administered. However, PBS is devoid of various molecules found in in-vitro models such as serum and HSF. Third objective was to compare the aggregate profile of mAb in PBS with in-vitro models such as serum and HSF. In this study, aggregation of mAb in PBS and models derived from body fluids seeded with mAb samples subjected to various stresses were compared. It was found that aggregation of mAb was different in PBS compared to HSF. It was also found that PBS and serum containing mAb subjected to stirring and interfacial agitation resulted in aggregates of >2 μm size, and average size and percentage number of particles having >10 μm size was higher in serum compared to PBS at all analysis time point. Overall, it was found that aggregation of mAb in PBS was different models derived from human body fluids.

Therapeutic mAbs, upon exposure to chemicals such as ferrous ions (Fe^{2+}) or hydrogen peroxide (H_2O_2), are known to result in the degradation. H_2O_2 and Fe^{2+} reacts by Fenton reaction to form hydroxyl radical (•OH), that are known to rapidly degrade proteins. Before intravenous administration, the mAb product is often diluted in normal saline. Increased levels of Fe^{2+} and H_2O_2 could be found in the human body during various diseases as well. Fourth objective was to investigate the stability of therapeutic mAb in the combined presence of Fe^{2+} and H_2O_2 in saline and in in-vitro models. Saline samples containing mAb having the combined presence of both Fe^{2+} and H_2O_2 exhibited more than 20% HMW, whereas samples having only Fe^{2+}, H_2O_2, or neither resulted in less than 2.5% HMW, respectively. Aggregate-rich samples also exhibited altered protein structure and hydrophobicity. Aggregation increased upon increasing the time, temperature, and concentration of Fe^{2+} and H_2O_2. It was also found that in the presence of both Fe^{2+} and H_2O_2, in-vitro models such as artificially prepared extracellular saline, HSF, and serum resulted in enhanced aggregation of mAb. In conclusion, presence of both Fe^{2+} and H_2O_2 in samples containing mAb resulted in multifold mAb degradation in saline and in-vitro models.

Samples containing mAb are typically stored at 2-8°C. However, the product may get subjected to higher temperatures during various stages, and it might perturb the native structure of the mAb, eventually leading to product degradation. Taurine is a naturally occurring sulfur-containing amino acid, known to offer stability to proteins. The fifth objective was to evaluate the potential of taurine as a stabilizer to reduce mAb degradation. Forced degradation of mAb1 containing samples by thermal stress for 30 minutes resulted in HMW by more than 65% in

sample without taurine compared to sample with taurine. Samples containing mAb1 without taurine also resulted in higher changes in protein structure and hydrophobicity compared to samples with taurine. Stabilizing effect of taurine was retained at different mAb and taurine concentrations, time, temperatures, buffers, and presence of polysorbate 80 (PS80). Additionally, mAb in the presence of taurine showed enhanced stability upon subjecting to light stress, combination of light and H_2O_2, and combination of Fe^{2+} and H_2O_2. In conclusion, presence of taurine in the samples containing mAb enhanced its stability, thereby indicating its possible use as a stabilizer.

सार

चिकित्सीय प्रोटीन, जैसे मोनोक्लोनल एंटीबॉडी का उपयोग विभिन्न रोगों के उपचार के लिए किया जाता है। mAb का एकत्रीकरण एक प्रमुख स्थिरता मुद्दा है और यह उत्पाद जीवन चक्र के विभिन्न चरणों जैसे सेल संस्कृति, डाउनस्ट्रीम प्रसंस्करण, फॉर्मूलेशन, परिवहन, भंडारण, हैंडलिंग और प्रशासन के दौरान होता है।

समुच्चय के विश्लेषण के लिए माइक्रोस्कोपी आधारित तकनीकों का उपयोग किया जाता है। 1 माइक्रोन से अधिक आकार वाले mAb के समुच्चय का आकार वितरण विश्लेषण अत्यधिक महत्वपूर्ण है। 1 माइक्रोन से अधिक आकार के समुच्चय की ब्राइटफील्ड छवियां आसानी से प्राप्त की जा सकती हैं। समुच्चय की पारभासी प्रकृति, पृष्ठभूमि और समुच्चय के बीच कम अंतर, नमूने का यादृच्छिक अनियमित आकार, और पृष्ठभूमि से असंगत भटकती रोशनी सूक्ष्म छवियों से समुच्चय के आकार निर्धारण विश्लेषण को एक कठिन कार्य बना सकती है। पहला उद्देश्य ब्राइटफील्ड छवियों का उपयोग करके mAb के माइक्रोन आकार के समुच्चय को चिह्नित करने के लिए एक उपन्यास छवि प्रसंस्करण एल्गोरिदम विकसित करना था। छवि विश्लेषण एल्गोरिदम के शुरुआती चरणों में छवियों को ग्रेस्केल में परिवर्तित करना और उसके बाद पिक्सेल-आधारित और आकार-आधारित थ्रेशोल्डिंग शामिल थी। आगे के चरणों में रूपात्मक संचालन और आकार वितरण की गणना शामिल थी। ब्राइटफील्ड छवि प्रसंस्करण से प्राप्त आकार वितरण आउटपुट को तरल क्रोमैटोग्राफी रेजिन की छवियों का उपयोग करके मान्य किया गया था। विभिन्न प्रायोगिक तकनीकों के साथ mAb के समग्र आकार वितरण की तुलना भी की गई। कुल मिलाकर, यह निष्कर्ष निकाला गया कि छवि प्रसंस्करण रणनीति का उपयोग करके आईजीजी समुच्चय का विश्लेषण मौजूदा दृष्टिकोणों के लिए एक तीव्र ऑर्थोगोनल पद्धति के रूप में काम कर सकता है।

विभिन्न इंटरफेस पर mAbs का एक्सपोजर विभिन्न ठोस/तरल, तरल/तरल और वायु/तरल सतहों के रूप में होता है। वायु/तरल इंटरफेसियल तनाव और उत्तेजना की संयुक्त घटना को mAb की स्थिरता के लिए अत्यधिक हानिकारक माना जाता है और इसके लिए गहन जांच की आवश्यकता होती है। दूसरे उद्देश्य में इन-हाउस सेट-अप का उपयोग करके वायु बुलबुले के माध्यम से तेजी से वायु/तरल इंटरफेसियल आंदोलन तनाव से प्रेरित फॉस्फेट बफर्ड सलाइन (पीबीएस) में चिकित्सीय मोनोक्लोनल एंटीबॉडी का एकत्रीकरण विश्लेषण शामिल था। तनाव के अधीन mAb वाले नमूनों को विश्लेषणात्मक तकनीकों की एक विस्तृत श्रृंखला का उपयोग करके चित्रित किया गया था। प्रोटीन सांद्रता, नमूना मात्रा, तापमान, बुदबुदाहट दर और सहायक पदार्थों की उपस्थिति जैसे विभिन्न कारकों के प्रभाव का भी मूल्यांकन किया गया था। तनावग्रस्त नमूनों में समय के साथ मैलापन बढ़ता हुआ दिखा, जिसमें mAb1 में 240 मिनट के बाद 50% से अधिक प्रोटीन की हानि देखी गई। समग्र समृद्ध नमूनों ने गतिविधि में 40% की कमी के साथ परिवर्तित माध्यमिक संरचना और उच्च हाइड्रोफोबिसिटी का प्रदर्शन किया। यह भी पाया गया कि एकत्रीकरण की सीमा प्रोटीन सांद्रता, नमूना मात्रा, सर्फेक्टेंट की उपस्थिति, तापमान, वायु प्रवाह दर और सिलिकॉन तेल की उपस्थिति से प्रभावित थी। निष्कर्ष में, तरल mAb नमूनों में

बुलबुले के माध्यम से हवा/तरल इंटरफेशियल तनाव के संपर्क में आने से प्रभावी ढंग से उप-दृश्यमान और दृश्यमान समुच्चय उत्पन्न होते हैं, जिससे एयर बबलिंग mAb के इंटरफेशियल तनाव परीक्षण के लिए एक आकर्षक दृष्टिकोण बन जाता है।

एक बार जब mAb युक्त नमूना मानव शरीर में डाला जाता है, तो शारीरिक तरल पदार्थों में mAb की स्थिरता समय के साथ भिन्न हो सकती है, और इसलिए, स्थिरता मूल्यांकन के लिए विभिन्न इन-विट्रो मॉडल का उपयोग किया जाता है। फॉस्फेट-बफ़र्ड सेलाइन (पीबीएस) एक बफर है, जिसका उपयोग शरीर विज्ञान की स्थितियों की नकल करने के लिए भी किया जाता है। mAb युक्त नमूनों को एक बार प्रशासित किए जाने पर रक्त के विभिन्न मैट्रिक्स घटकों का सामना करना पड़ता है। हालाँकि, पीबीएस सीरम और एचएसएफ जैसे इन-विट्रो मॉडल में पाए जाने वाले विभिन्न अणुओं से रहित है। तीसरा उद्देश्य पीबीएस में mAb के समग्र प्रोफाइल की तुलना सीरम और एचएसएफ जैसे इन-विट्रो मॉडल से करना था। इस अध्ययन में, पीबीएस में mAb के एकत्रीकरण और विभिन्न तनावों के अधीन mAb नमूनों के साथ शरीर के तरल पदार्थ से प्राप्त मॉडल की तुलना की गई। यह भी पाया गया कि पीबीएस और सीरम युक्त mAb को सरगर्मी और इंटरफेशियल उत्तेजना के अधीन किया गया, जिसके परिणामस्वरूप> 2 माइक्रोन आकार के समुच्चय थे, और औसत आकार और >10 माइक्रोन आकार वाले कणों की प्रतिशत संख्या सभी विश्लेषण समय बिंदु पर पीबीएस की तुलना में सीरम में अधिक थी। . कुल मिलाकर, यह पाया गया कि पीबीएस में mAb का एकत्रीकरण मानव शरीर के तरल पदार्थों से प्राप्त विभिन्न मॉडल थे।

चिकित्सीय प्रोटीन, जैसे कि mAbs, फेरस आयनों (Fe^{2+}) या हाइड्रोजन पेरोक्साइड (H_2O_2) जैसे रसायनों के संपर्क में आने पर क्षरण का कारण बनते हैं। H_2O_2 और Fe^{2+} फेंटन प्रतिक्रिया द्वारा प्रतिक्रिया करके हाइड्रॉक्सिल रेडिकल (•OH) बनाते हैं, जो प्रोटीन को तेजी से नष्ट करने के लिए जाने जाते हैं। अंतःशिरा प्रशासन से पहले, mAb उत्पाद को अक्सर सामान्य खारा में पतला किया जाता है। विभिन्न रोगों के दौरान मानव शरीर में Fe^{2+} और H_2O_2 का बढ़ा हुआ स्तर पाया जा सकता है। चौथा उद्देश्य खारा और इन-विट्रो मॉडल में Fe^{2+} और H_2O_2 की संयुक्त उपस्थिति में चिकित्सीय mAb की स्थिरता की जांच करना था। Fe^{2+} और H_2O_2 दोनों की संयुक्त उपस्थिति वाले mAb वाले खारे नमूनों में 20% से अधिक HMW प्रदर्शित हुआ, जबकि केवल Fe^{2+}, H_2O_2 या न होने वाले नमूनों में क्रमशः 2.5% से कम HMW प्रदर्शित हुआ। समग्र-समृद्ध नमूनों में परिवर्तित प्रोटीन संरचना और हाइड्रोफोबिसिटी भी प्रदर्शित हुई। Fe^{2+} और H_2O_2 का समय, तापमान और सांद्रता बढ़ने पर एकत्रीकरण में वृद्धि हुई। यह भी पाया गया कि Fe^{2+} और H_2O_2 दोनों की उपस्थिति में, इन-विट्रो मॉडल जैसे कृत्रिम रूप से तैयार बाह्यकोशिकीय खारा, HSF और सीरम के परिणामस्वरूप mAb का एकत्रीकरण बढ़ा। निष्कर्ष में, mAb युक्त नमूनों में Fe^{2+} और H_2O_2 दोनों की उपस्थिति के परिणामस्वरूप हाइड्रॉक्सिल रेडिकल्स के गठन की तुलना में कई गुना mAb क्षरण हुआ।

mAb वाले नमूनों को आम तौर पर 2-8°C पर संग्रहित किया जाता है। हालाँकि, उत्पाद विभिन्न चरणों के दौरान उच्च तापमान के अधीन हो सकता है, और यह mAb की मूल संरचना को बिगाड़ सकता है, जिससे अंततः उत्पाद खराब हो सकता है। टॉरिन एक प्राकृतिक रूप से पाया जाने वाला सल्फर युक्त अमीनो एसिड है, जो प्रोटीन को स्थिरता प्रदान करने के लिए जाना जाता है। पाँचवाँ उद्देश्य mAb के क्षरण को कम करने के लिए एक सहायक पदार्थ के रूप में टॉरिन की क्षमता का मूल्यांकन करना था। इस कार्य में, तकनीकों और परखों की एक श्रृंखला का उपयोग करके mAb की स्थिरता की निगरानी की गई थी। 30 मिनट के लिए थर्मल तनाव द्वारा mAb1 युक्त नमूनों के जबरन क्षरण के परिणामस्वरूप टॉरिन वाले नमूने की तुलना में टॉरिन रहित नमूने में एचएमडब्ल्यू 65% से अधिक हो गया। टॉरिन के बिना mAb1 वाले नमूनों में टॉरिन वाले नमूनों की तुलना में परिवर्तित प्रोटीन संरचना, उच्च हाइड्रोफोबिसिटी और कम पिघलने का तापमान होता है। टॉरिन का स्थिरीकरण प्रभाव विभिन्न mAb और टॉरिन सांद्रता, समय, तापमान, बफ़र्स और पॉलीसोर्बेट 80 (PS80) की उपस्थिति पर बरकरार रखा गया था। इसके अतिरिक्त, टॉरिन की उपस्थिति में mAb ने हल्के तनाव, प्रकाश और H_2O_2 के संयोजन, और Fe^{2+} और H_2O_2 के संयोजन के साथ तनाव के अधीन होने पर बढ़ी हुई स्थिरता दिखाई। निष्कर्ष में, mAb युक्त नमूनों में टॉरिन की उपस्थिति ने इसकी स्थिरता को बढ़ाया, जिससे एक स्थिर एजेंट के रूप में इसके संभावित उपयोग का संकेत मिलता है।

Table of Contents

List of Figures

List of Tables

List of Abbreviations

ADCC, Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity

AF4, Asymmetrical flow field-flow fractionation

AFM, Atomic force microscope

AI, Aggregation index

ANS, 1-anilino-8 naphthalenesulfonate

ATR-FTIR, Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared

AUC Analytical ultracentrifugation

AUTC, Area under the curve

BSA, Bovine serum albumin

CD, Circular dichroism

CDC, Complement dependent cytotoxicity

CDR, Complementarity determining regions

CLSM, Confocal Laser Scanning Microscope

CQA, Critical quality attributes

DLS, Dynamic light scattering

DSC, Differential scanning calorimetry

FBSF, Fetal bovine serum filtrate

FITC, Fluorescein isothiocyanate

HCP, Host cell proteins

HCD, Host cell DNA

HMW, High molecular weight species

HPLC, High performance liquid chromatography

HSA, Human serum albumin

HSF, Human serum filtrate

ICH, International Conference of Harmonization

IgG, Immunoglobulins

kDa, kilo Dalton

IL, Ionic liquid

LDH, Lactate dehydrogenase

LMW, Low molecular weight species

LO, Light obscuration

mAb, Monoclonal antibodies

MFI, Micro flow imaging

MS2000; Mastersizer 2000

MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(-4-sulphonyl)-2H-tetrazolium salt

NTA, Nanoparticle tracking analysis

OD, Optical density

PBMC, Peripheral blood mononuclear cells

PBS, Phosphate buffered saline

Ph. Eur., European Pharmacopeia

PMS, Phenazine methosulfate

PS, Polysorbate

QSFF, Q Sepharose Fast Flow

RBC, Red blood cell

RI, Refractive index

ROS, Reactive oxygen species

SEC, Size exclusion chromatography

SPR, Surface plasmon resonance

U, Unstressed sample

USP, United States Pharmacopeia

λ_{max}, Maximum emission intensity wavelength