

Towards a specific therapy for myasthenia gravis : a quest for armor against autoantibody attack

Citation for published version (APA):

Stassen, M. H. W. (2003). *Towards a specific therapy for myasthenia gravis : a quest for armor against autoantibody attack*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20031204ms>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20031204ms](https://doi.org/10.26481/dis.20031204ms)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summery and general discussion

Chapter 1 reviews the role of autoantibodies in myasthenia gravis (MG). The majority of MG patients have autoantibodies against the muscular nicotinic acetylcholine receptor (AChR). Although anti-AChR antibodies are the main MG antibodies, patients can be seronegative for them or specificities for other muscle autoantigens can coincide. Besides electromyography (EMG) and single-fiber EMG (SFEMG), analysis of the autoantibodies of patient sera can diagnose MG and can also lead to the early detection of thymoma. The immunopathogenesis of seropositive MG has been studied in detail. Anti-AChR antibodies lower the number of functional AChRs at the motor endplate by: crosslinking of AChRs, which increases their internalization and degradation (antigenic modulation); complement activation, which causes focal lysis of the postsynaptic membrane; and functional inhibition of the AChR's ion-channel function. AChR loss leads to an impaired neuromuscular signal transmission, explaining the muscle weakness of the MG patients. The etiology of MG is not clear. However, the thymus plays an important role in MG, since hyperplastic thymic medullas or thymoma are found in many patients. Experimental autoimmune MG (EAMG) is an animal model that closely resembles MG. It can be induced by immunization with AChR or transfer of MG sera. EAMG is used to study MG and EAMG antibodies, the role of complement and macrophages, the resistance to the induction of the disease, and the treatment of EAMG.

Chapter 2 describes a new EAMG mouse model that generates human anti-AChR antibodies. Mice transgenic for human μ , $\gamma 1$, and κ germ line genes (HuMAb-Mice) were immunized with AChR from *Torpedo californica* (tAChR). Serum titers of anti-tAChR antibodies were in the nanomolar range, and anti-rodent AChR antibodies were in picomolar range. Some HuMAb-Mice had signs of muscle weakness, clearly indicating their susceptibility to EAMG. Human antibody-mouse AChR complexes were found at the neuromuscular junction, while AChR loss was up to 65%. Spleen and lymph nodes were used for producing hybridomas. Of the anti-tAChR monoclonal antibody (mAb)-producing hybridomas, 2% had cross-reactivity with rodent AChR and none with human AChR. Immunization with a fusion protein, Trx-H α 1-210, displaying the human main immunogenic region did not result in EAMG or the generation of human anti-human AChR mAbs.

In Chapter 3, a large-scale production method of the potential therapeutic F_{ab}637 was assessed. F_{ab}637 protects the AChR from antigenic modulation *in vitro*. To test the *in vivo* effects of F_{ab}637, which only crossreacts with primate AChR, large quantities of purified F_{ab} are needed for a monkey EAMG model. But, the current bacterial expression system is inefficient for this purpose. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has

been successfully used by others to produce antibodies and antibody fragments. *P. pastoris* was transfected with plasmids encoding for the λ light chain (λ 637) and the heavy chain of F_{ab} 637 (F_d 637). Stable transfected cells produced about 100 mg λ 637 per liter, which was secreted as a homodimer. However, co- or supertransfection of F_d 637 plasmid did not result in the production of F_{ab} or F_d 637. Although F_d 637 was not produced in *P. pastoris*, its mRNA was transcribed. A plasmid encoding for a single-chain variable fragment (scF_v) variant of F_{ab} 637 did not express scF_v in *P. pastoris*.

In Chapter 4, a scF_v variant of F_{ab} 637, scF_v637, was constructed and characterized. Bacterially produced scF_v637 was able to bind to human and monkey AChR, like its parental F_{ab} 637. Furthermore, scF_v637 was capable of inhibiting the binding of its intact IgG1 isotype variant (IgG1-637) and anti-AChR mAb35 binding to human AChR up to 33 and 73%, respectively, and of MG patient sera up to 46%.

Chapter 5 describes a fully human γ 1 immunoglobulin that was reconstructed from F_{ab} 637, IgG1-637. The coding sequences of λ 637 and F_d 637 were cloned in one expression plasmid. The F_d 637 was genetically fused to the human γ 1 F_c , resulting in a complete IgG1 heavy-chain coding sequence. Monoclonal transfected chinese hamster ovary (CHO) cells produced up to 55 mg purified IgG1-637 per liter. IgG1-637 bound human and monkey AChR, indicating a maintained specificity after the reconstruction. The pathogenicity of the reconstructed MG autoantibody was tested in a monkey EAMG model. Three daily injections of 1.7 to 5 mg IgG1-637 per kg body weight resulted in clinical signs of EAMG in rhesus monkeys.

In Chapter 6, it is shown that overexpression of rapsyn prevents the induction of EAMG. In age-related resistance to EAMG, the postsynaptic membrane of old rats is resistant to antigenic modulation. The AChR-clustering and -anchoring protein rapsyn is upregulated in old Brown Norway (BN) rats. In order to test if rapsyn overexpression could transfer the resistance to susceptible rats, muscles were *in vivo* transfected with a rapsyn expression plasmid. Transfected muscle fibers showed, in contrast to non-transfected fibers, extra-synaptic clusters of rapsyn. The rapsyn overexpression increased the AChR level of the muscles by 42%. Two weeks after transfection, EAMG was passively transferred. Rapsyn overexpressing muscles of EAMG rats had no AChR loss, in contrast to control muscles of the same animals. Moreover, repetitive nerve stimulation of rapsyn-overexpressing muscles showed no decrement of the compound muscle action potential, in contrast to control muscles of the same EAMG rats. Electron microscopic examination of the motor endplates of EAMG rats showed a normal morphology of the postsynaptic folds in rapsyn-overexpressing muscles, while the folds were damaged in control muscles.

A specific therapy for MG would reduce the side effects of non-specific treatments. The hypothetical immunotherapy with a human anti-AChR antibody-derived protein could help treating patients with an acute MG phase [1]. MG patients can be treated by plasmapheresis during a

myasthenic crisis, thereby removing the autoantibodies from the circulation [2]. To prolong the remission effect of plasmapheresis, the MG patient's AChRs could be shielded against newly produced autoantibodies by a therapeutic antibody. A recombinant antibody with F_{ab}637's binding characteristic [3] and IgG4's bispecific and none-complement-activating characteristics [4] would combine the advantages of F_{ab} and IgG. The resulting IgG-like molecule could block the AChR for a long period (expected serum half-life of 21 days), compared to scF_v637 and F_{ab}637. IgG1-637 and its mutants IgG1-637ΔC1q, which does not activate complement, and IgG1-637/CDR3ΔPLKP, which is non-specific, could form the basis for the construction of a therapeutic antibody.

Gene therapy, on the other hand, is a potential long-lasting therapy for MG. Although overexpression of rapsyn prevents the induction of EAMG, the effect on ongoing EAMG has to be investigated. After an immune attack, the postsynaptic membrane is focally destroyed by the membrane attack complex. In contrast to the maintenance, formation of new AChR clusters could be impaired by a high overexpression of rapsyn. Considering the impact of slight changes in rapsyn expression in old BN rats [5] and in a subset of congenital myasthenic syndrome (CMS) patients [6,7] versus the rapsyn overexpression in cultured cells [8-10], a more moderate rapsyn expression induced by gene therapy is better for the formation of AChR clusters. An inducible, tissue-specific promoter instead of the currently used constitutive CMV promoter is an option to optimize the level of expression. The stability of long-term (over)expression of rapsyn in muscles has to be determined. The level of expression of luciferase is reported to be stable from day 3 to at least day 270 after electroporation [11]. Also, the long-term effects of rapsyn (over)expression have to be assessed, e.g. a possible anti-rapsyn response. If rapsyn gene therapy has a therapeutic effect, selected muscles could be *in vivo* electroporated, like the eyelid muscles.

The expression level of rapsyn plays an important role in the susceptibility to myasthenia. Down-regulation causes CMS, while up-regulation provides protection against MG. Slighter changes in the endogenous level of rapsyn could correlate with the severity of MG. Therefore, it might be interesting to determine the level of rapsyn in different subsets of MG patients.

References

- [1] Toyka, K.V., B. Lowenadler, K. Heininger, U.A. Besinger, K.L. Birnberger, A. Fateh-Moghadam, E. Heilbronn, "Passively transferred myasthenia gravis: protection of mouse endplates by Fab fragments from human myasthenic IgG", *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 43 (1980) pp. 836-840.
- [2] Pinching, A.J., D.K. Peters, "Remission of myasthenia gravis following plasma-exchange", *Lancet* 2 (1976) pp. 1373-1376.
- [3] Graus, Y.F., M.H. de Baets, P.W. Parren, S. Berrih-Aknin, J. Wokke, P.J. van Breda Vriesman, D.R. Burton, "Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis

- patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies", *Journal of Immunology* 158 (1997) pp. 1919-1929.
- [4] Aalberse, R.C., J. Schuurman, "IgG4 breaking the rules", *Immunology* 105 (2002) pp. 9-19.
- [5] Hoedemaekers, A., J.L. Bessereau, Y. Graus, T. Guyon, J.P. Changeux, S. Berrih-Aknin, P. van Breda Vriesman, M.H. De Baets, "Role of the target organ in determining susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis", *Journal of Neuroimmunology* 89 (1998) pp. 131-141.
- [6] Ohno, K., A.G. Engel, X.M. Shen, D. Selcen, J. Brengman, C.M. Harper, A. Tsujino, M. Milone, "Rapsyn Mutations in Humans Cause Endplate Acetylcholine-Receptor Deficiency and Myasthenic Syndrome", *American Journal of Human Genetics* 70 (2002) pp. 4.
- [7] Ohno, K., M. Sadeh, I. Blatt, J.M. Brengman, A.G. Engel, "E-box mutations in the RAPSN promoter region in eight cases with congenital myasthenic syndrome", *Human Molecular Genetics* 12 (2003) pp. 739-748.
- [8] Han, H., P.G. Noakes, W.D. Phillips, "Overexpression of rapsyn inhibits agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells", *Journal of Neurocytology* 28 (1999) pp. 763-775.
- [9] Yoshihara, C.M., Z.W. Hall, "Increased expression of the 43-kD protein disrupts acetylcholine receptor clustering in myotubes", *Journal of Cell Biology* 122 (1993) pp. 169-179.
- [10] Han, H., S.H. Yang, W.D. Phillips, "Overexpression of rapsyn modifies the intracellular trafficking of acetylcholine receptors", *Journal of Neuroscience Research* 60 (2000) pp. 155-163.
- [11] Mir, L.M., M.F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J.M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, D. Scherman, "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) pp. 4262-4267.

Samenvatting

Het menselijk lichaam wordt beschermd door het immuunsysteem tegen virussen, bacteriën en parasieten, maar ook tegen kwaadaardige tumoren die gezond weefsel binnendringen. Voor een adequate immuunrespons moet het immuunsysteem de binnendringers herkennen, met andere woorden het moet een onderscheid maken tussen (gezond) eigen en vreemd. Antilichamen en T-celreceptoren (TCR'en) zijn de eiwitten die de identificatie van lichaamsvreemde antigenen verzorgen en na herkenning een, respectievelijk, humorale of een cellulaire immuunrespons te weeg brengen. Falen van het immuunsysteem in het tolerant zijn voor eigen kan leiden tot de ongewenste situatie waarin TCR'en en antilichamen binden aan eigen onderdelen, wat resulteert in een auto-immuunziekte.

Myasthenia gravis (MG) is een prototypische auto-immuunziekte, omdat de antilichaam-gemedieerde pathogenese is beperkt tot één doelwit, namelijk de postsynaptische membraan van de neuromusculaire junctie (NMJ). De musculaire acetylcholinereceptor (AChR) is het belangrijkste autoantigen dat zich bevindt in de postsynaptische membraan. Autoantilichamen gericht tegen de AChR verlagen het aantal functionele AChR'en, wat resulteert in een vermoeibare zwakte van skeletspieren.

In hoofdstuk 1 wordt de rol van autoantilichamen in MG gereviewd. Het merendeel van de MG-patiënten heeft autoantilichamen tegen de AChR. Ondanks dat anti-AChR-antilichamen de belangrijkste MG-antilichamen zijn, kunnen MG-patiënten seronegatief voor deze antilichamen zijn of kunnen ze daarnaast ook antilichamen hebben die gericht zijn tegen andere spierantigenen. Voor de diagnose van MG kan naast elektromyografie (EMG) en *single-fiber* EMG (SFEMG) ook de analyse van autoantilichamen in patiëntensera worden gebruikt, dat tevens kan leiden tot de vroege diagnose van een thymoma. De immunopathogenese van seropositieve MG is gedetailleerd onderzocht. Anti-AChR-antilichamen verlagen de functionele concentratie aan AChR'en ter hoogte van de motoreindplaat door: het aaneenschakelen van AChR'en, wat resulteert in een verhoogde internalisatie en afbraak (antigene modulatie); complementactivering, wat resulteert in de focale lyse van de postsynaptische membraan; en functionele hindering van de functie van ionkanaal van de AChR. Het verlies aan AChR'en leidt tot een verslechterde neuromusculaire transmissie, wat de spierzwakte van MG-patiënten verklaart. De etiologie van MG is niet duidelijk. De thymus speelt echter een belangrijke rol in MG, gezien het feit dat thymoma en hyperplastische thymusmedulla's worden gevonden in veel MG-patiënten. Experimentele auto-immuun-MG (EAMG) is een proefdiermodel dat nauw overeenkomt met MG bij de mens. Het kan worden geïnduceerd door immunisering met AChR of transfusie met MG-sera. EAMG wordt gebruikt

ter bestudering van MG- en EAMG-antilichamen, de rol van complement en macrofagen, de resistentie tegen de inducering van de ziekte en de behandeling van MG.

In hoofdstuk 2 wordt een nieuw EAMG-model beschreven dat humane anti-AChR-antilichamen opwekt in muizen. Muizen die transgeen zijn voor de humane μ -, γ 1- en κ -kiemlijngenen (HuMAB-Muizen) werden geïmmuniseerd met AChR van de *Torpedo californica* (tAChR). Serumtiters van anti-tAChR-antilichamen bevonden zich in het nanomolaire bereik en anti-ratten-AChR-antilichamen bevonden zich in het picomolaire bereik. Sommige HuMAB-Muizen hadden klinische symptomen, wat hun vatbaarheid voor EAMG aantoonde. Complexen van humane antilichamen en muizen-AChR'en werden gevonden ter hoogte van de NMJ, terwijl het verlies aan AChR tot 65% bedroeg. Milt en lymfknoopen werden gebruikt om hybridoma's te maken. Van de anti-tAChR monoclonale antilichamen (mAb's) vertoonde 2% kruisreactiviteit met ratten-AChR en geen met humaan AChR. Immunisering met een fusie-eiwit, Trx-H α 1-210, dat het humane *main immunogenic region* (MIR) bevat, resulteerde niet in EAMG of in het opwekken van humaan anti-humaan AChR mAb's. Deze experimenten tonen aan dat de HuMAB-Muis een geschikt model is voor het opwekken en bestuderen van humane anti-AChR-antilichamen *in vivo*.

In hoofdstuk 3 werd een mogelijke grootschalige productiemethode voor het potentieel therapeutische F_{ab}637 onderzocht. F_{ab}637 beschermt de AChR tegen antigene modulatie *in vitro*. Om F_{ab}637, die enkel met primaat-AChR kruisreageert, *in vivo* te testen zijn grote hoeveelheden aan gezuiverd F_{ab} nodig voor een apen-EAMG-model. Echter, het huidige bacterieel expressiesysteem is niet toereikend voor dit doel. The methylotrofische gist *Pichia pastoris* werd succesvol gebruikt door anderen voor de productie van antilichamen en antilichaamfragmenten. *P. pastoris* werd getransfecteerd met plasmiden die coderen voor de λ lichte keten (λ 637) en de zware keten van F_{ab}637 (F_d637). Stabiël getransfecteerde gistcellen produceerden circa 100 mg/l λ 637, dat werd uitgescheiden als homodimeer. Echter, co- of supertransfectie van het F_d637-plasmide resulteerde niet in de productie van F_{ab}- of F_d637. Alhoewel F_d637 niet werd geproduceerd door *P. pastoris*, werd het mRNA wel afgeschreven. Een plasmide dat codeerde voor een *single-chain variable fragment* (scF_v)-variant van F_{ab}637 produceerde geen scF_v in *P. pastoris*. Deze gegevens tonen aan dat het expressieprobleem van F_d637 mogelijk afhangt van de sequentie van het variabele domein van de zware keten.

In hoofdstuk 4 werd de scF_v-variant van F_{ab}637, scF_v637, geconstrueerd en gekarakteriseerd. Bacterieel geproduceerde scF_v637 was in staat om humaan en apen-AChR te binden, net als het oorspronkelijke F_{ab}637. Bovendien inhibeerde scF_v637 de binding van zijn intacte IgG1 isotype-variant (IgG1-637), anti-AChR mAb35 en MG-patiëntensera aan de humane AChR met, respectievelijk, maximaal 33, 73 en 46%. ScF_v637 is hiermee een alternatieve kandidaat voor immunotherapie van MG.

Hoofdstuk 5 beschrijft een volledig humaan γ 1 immunoglobuline dat werd gereconstrueerd uit een F_{ab}637, IgG1-637. De coderende sequenties

van λ_{637} en F_{637} werden gecloneerd in één expressieplasmide. De F_{637} werd genetisch gefuseerd met de humane $\gamma 1 F_c$, wat resulteerde in een coderende sequentie voor een complete IgG1-zware keten. Monoklonale, getransfecteerde *chinese hamster ovary* (CHO)-cellen produceerden 55 mg gezuiverd IgG1-637 per liter. IgG1-637 bond aan humaan en apen-AChR, wat de gehandhaafde specificiteit aantoont na reconstructie. De pathogeniteit van het gereconstrueerde MG-autoantilichaam werd getest in een apen-EAMG-model. Drie dagelijkse doses van 1,7 tot 5 mg IgG-637 per kg lichaamsgewicht resulteerde in klinische EAMG symptomen in de rhesus apen. IgG1-637 kan worden gebruikt voor de enzymatische productie van het potentieel therapeutische $F_{ob,637}$ of kan dienen als basis voor een therapeutisch IgG-achtig molecuul, dat een hogere serum halfwaardetijd heeft dan een F_{ob} .

In hoofdstuk 6 wordt aangetoond dat overexpressie van rapsyne de inductie van EAMG voorkomt. Bij de leeftijdsafhankelijke resistentie tegen EAMG is de postsynaptische membraan van oudere ratten resistent tegen antigene modulatie. Rapsyne, dat AChR'en klustert en verankert, is upgereguleerd in oude Brown Norway (BN)-ratten. Om te testen of rapsyne-overexpressie de resistentie kan overdragen op gevoelige ratten, werden de spieren *in vivo* geëlektroporeerd met een rapsyne-expressieplasmide. Getransfecteerde spiervezels hadden rapsyneclusters buiten de synaps, in tegenstelling tot niet-getransfecteerde vezels. De rapsyneoverexpressie verhoogde het AChR-niveau in de spieren met 42%. Twee weken na transfectie werd EAMG passief geïnduceerd. Spieren die rapsyne tot overexpressie brachten hadden geen verlies aan AChR, in tegenstelling tot controle spieren van dezelfde dieren. Bovendien lieten repetitieve zenuwstimulaties geen decrement zien van de actiepotentialen van behandelde spieren, terwijl controle spieren van dezelfde EAMG-ratten dit wel vertoonden. Elektronenmicroscopisch onderzoek van de motoreindplaten van EAMG-ratten toonde aan dat de morfologie van de postsynaptische vouwen normaal was in spieren die rapsyne tot overexpressie brengen, maar de vouwen waren beschadigd in controle spieren. Deze resultaten wijzen op een belangrijke rol voor rapsyne in de vatbaarheid voor EAMG.

Een specifieke therapie voor MG zou de bijwerkingen van aspecifieke behandelingen kunnen reduceren. De hypothetische immunotherapie met een eiwit dat is afgeleid van een humaan anti-AChR-antilichaam zou MG-patiënten kunnen helpen die in een myasthene crisis verkeren. MG-patiënten worden behandeld met plasmaferesis gedurende een myasthene crisis, zodat de circulerende autoantilichamen worden verwijderd. Om het remissie-effect van de plasmaferesis te verlengen, zouden therapeutische antilichamen de AChR kunnen afschermen tegen nieuw gevormde autoantilichamen. Een recombinant antilichaam met de bindingskarakteristieken van $F_{ob,637}$ en de bispecifieke en niet-complementactiverende karakteristiek van IgG4 zou de voordelen combineren van F_{ob} en IgG. Het resulterende IgG-achtige molecuul zou de AChR voor langere tijd kunnen afschermen dan scF₆₃₇ of $F_{ob,637}$. IgG1-637

en zijn mutanten IgG1-637 Δ C1q, die geen complement activeert, en IgG1-637/CDR3 Δ PLKP, die specifiek is, kunnen de basis vormen voor de constructie van een therapeutisch antilichaam.

Gentherapie is daartegen een potentiële therapie met een langdurige werking. Alhoewel de overexpressie van rapsyne de inductie van EAMG voorkomt, moet het effect hiervan op reeds geïnduceerde EAMG nog worden onderzocht. Daarnaast moeten de effecten van langdurige overexpressie van rapsyne worden bepaald, zoals een mogelijke anti-rapsynerespons. Indien wordt aangetoond dat gentherapie met rapsyne-DNA niet alleen preventief maar ook therapeutisch is, zou een selecte groep spieren, bijvoorbeeld de ooglidspieren, kunnen worden behandeld met *in vivo* elektroporatie.

Het expressieniveau van rapsyne speelt een belangrijke rol in de vatbaarheid voor myasthenie. Het verlagen van het niveau veroorzaakt een congenitaal myastheen syndroom, terwijl het verhogen een bescherming geeft tegen MG. Kleinere veranderingen in het endogeen rapsyeneniveau zouden kunnen correleren met de ernst van MG. Het zou daarom interessant zijn het rapsyeneniveau te vergelijken tussen patiëntengroepen die verschillen in de mate van MG.