



**HAL**  
open science

# La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques

Rachel Legeron

► **To cite this version:**

Rachel Legeron. La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0420 . tel-01418770

**HAL Id: tel-01418770**

**<https://theses.hal.science/tel-01418770>**

Submitted on 17 Dec 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ : Biologie cellulaire et physiopathologie

Par Rachel LEGERON-LIEUTENANT

**LA SPECTROMETRIE DE MASSE APPLIQUEE A LA  
QUANTIFICATION ABSOLUE DES ANTICORPS  
MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES EN MILIEU  
PLASMATIQUE POUR LA REALISATION D'ETUDES  
PHARMACOCINETIQUES-PHARMACODYNAMIQUES**

Sous la direction de : Pr Dominique BREILH

Soutenue le 16 Décembre 2015

Membres du jury :

Mr FARINOTTI Robert, Professeur, Université Paris-Sud XI  
Mr LAPREVOTE Olivier, Professeur, Université Paris Descartes  
Mr SCHMITTER Jean-Marie, Professeur, Université de Bordeaux  
Mr HONORE Stéphane, Maître de Conférences, Université Aix-Marseille  
Mr DUPUIS Antoine, Maître de Conférences, Université de Poitiers  
Mr XUEREB Fabien, Maître de Conférences, Universités de Bordeaux  
Mme BREILH Dominique, Professeur, Université de Bordeaux

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



# Remerciements

## Je remercie tous les membres du jury

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM U1034 dans l'équipe de Pharmacocinétique-Pharmacie Clinique et sous la direction du Professeur Dominique Breilh

### **Madame le Professeur Dominique BREILH,**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse. Vous avez eu l'idée de cet ambitieux travail mais dont l'aboutissement n'en a été que meilleur. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet en parallèle de mon internat et de m'avoir permis de le finaliser sur des fonctions hospitalo-universitaires au sein de votre service. Ces deux années d'A.H.U m'ont certes donné une charge de travail importante mais l'enrichissement et l'épanouissement professionnel qui en ressortent sont immenses. C'est avec beaucoup de gratitude que je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée et de la formation indispensable à la poursuite d'une carrière hospitalo-universitaire dont j'ai pu bénéficier. J'espère pouvoir encore avoir l'occasion de travailler dans votre équipe. Soyez assurée de ma reconnaissance et de toute ma considération.

### **Monsieur le Professeur Robert FARINOTTI,**

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et je suis honorée de vous pouvoir compter parmi les membres de ce jury.

### **Monsieur le Professeur Olivier LAPREVOTE**

J'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à ce travail en acceptant d'être rapporteur. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury.

### **Monsieur le Professeur Jean-Marie SCHMITTER,**

Je suis honorée et vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury de thèse. Je tenais particulièrement à vous remercier pour les conseils que vous m'avez apportés tout au long de ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de tous mes remerciements.

### **Monsieur le Docteur Stéphane HONORE,**

Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour avoir accepté de siéger à ce jury de thèse. C'est avec plaisir que je vous adresse mes très sincères remerciements.

### **Monsieur le Docteur Antoine DUPUIS,**

Je vous remercie d'avoir accepté avec gentillesse de faire partie de ce jury. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

### **Monsieur le Docteur Fabien XUEREB,**

Tu as énormément contribué à ce travail et à sa valorisation et je tenais à te remercier une énième fois. Ce fut un plaisir de travailler et d'apprendre avec toi, tu as su te rendre disponible et je t'en suis profondément reconnaissante. Ta rigueur, tes conseils avisés, et ton soutien moral m'ont été d'une aide précieuse. Tes qualités professionnelles et humaines sont indéniables et sont indissociables de l'aboutissement de ce travail. Sois assuré de ma profonde reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour moi et de mon amitié la plus sincère.

## **Je tiens à remercier également,**

### **Madame le Professeur Marie-Claude SAUX**

C'est avec beaucoup d'émotions que je tenais à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous m'avez chaleureusement accueillie dans votre service de Pharmacie du Groupe Hospitalier Haut-Lévêque au début de mon internat, vous avez également contribué à la poursuite de mon parcours comme assistante hospitalo-universitaire. Je vous en suis profondément reconnaissante. Votre clairvoyance, votre esprit et vos qualités humaines succitent en moi un profond respect et une immense admiration.

### **Toute l'équipe de la Pharmacie du Groupe Hospitalier Haut-Lévêque**

Un grand merci pour votre accueil, votre amitié et votre bonne humeur toute au long de ces années passées avec vous. Merci pour votre soutien dans les moments difficiles à travers votre présence réconfortante au quotidien.

### **Toute l'équipe de l'INSERM U1034**

Je tiens à vous remercier pour votre accueil chaleureux au cours de mes différentes visites, de votre disponibilité et de vos précieux conseils tout au long de ce projet. Merci pour m'avoir aidé dans les perspectives et la valorisation de ce travail. Soyez assurés de ma reconnaissance et de ma gratitude.

### **L'équipe de la plateforme génomique fonctionnelle de Bordeaux**

Merci pour votre accueil durant mes différentes visites. Vous avez mis à ma disposition tous les moyens scientifiques et techniques nécessaires à la réalisation de ce projet. Stéphane, encore merci pour ton accueil, ta disponibilité et ton engagement. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions toujours avec humour !! Merci également à Jean-William Dupuy et Stéphane Claverol pour vos compétences en protéomique. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

### **L'ensemble du laboratoire de la Pharmacie de Haut-Lévêque**

*Fabien Xuereb, Sarah Djabarouti, Jean-Marc Bernadou, Vincent Marquais et Boubakar Ba*

J'ai beaucoup appris à vos cotés aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Vous avez toujours avec eu une attitude bienveillante à mon égard et je vous en suis très reconnaissante. Vous m'avez permis de garder une attitude positive.

Jean-Marc Bernadou, Vincent Marquais (tonton), merci pour votre bonne humeur, et votre soutien « ha vous savez ! C'est pas facile tous les jours ! ».

Sarah, je tenais à te remercier pour tes conseils et tes remarques toujours pertinentes qui m'ont aidé à avancer.

Fabien, j'espère que les longues séances de lectures n'ont pas été trop soporiphiriques. C'est la dernière thèse...promis !

### **Tous ceux qui m'ont permis de m'évader de temps à autres...et qui m'ont soutenue et encouragée pendant ces années de dur labeur**

Je pense à vous les amis ! Je les ai trouvé les « ions », ça m'a juste pris un peu de temps ...

Je pense à vous les cousins ! Champagne !

Je pense à vous les « frérot de la Rachou » !

### **Mes parents**

Bon ok après celle-ci j'arrête !

Sans votre soutien inconditionnel, votre présence, votre écoute pendant tous les moments difficiles que j'ai passé au cours de ces dernières années je n'aurai clairement pas pu tenir ! L'amour sans concession que vous m'apportez au quotidien me permet d'avancer. A mon tour maintenant de vous combler et de prendre soin de vous !

### **Mes grands-parents**

Ma petite Mamie, comme tu dis le dis si bien « tu es folles, tu travailles trop ». Oui mais je te ressemble ! Tu as toujours su trouver les mots pour m'encourager et ton soutien m'a été précieux au cours des mes études. Maintenant à nous de veiller sur toi !

### **« Tonton Jean-Paul »**

Merci tonton de toujours être présent à nos côtés et pour le soutien que tu nous apportes depuis toujours.

### **Maes beaux parents, ma belle famille**

C'est officiel maintenant !

Bruno, Marie-pascale, Dorothée, Manu, je vous remercie pour toutes les pensées et attentions à mon égard que vous m'avez porté depuis notre rencontre. Votre générosité et votre amour au cours des moments passés ensemble m'ont permis de me ressourcer et de recharger les batteries ! Je vous en suis profondément reconnaissante.

### **Mon Mari**

Et oui je « n'attends » plus (en revanche tu m'attends beaucoup ces derniers temps...). Je pense que de loin c'est toi qui a le plus subit toutes ces intempéries...et je dois reconnaître que l'entrée dans la communauté de l'anneau n'a pas été un long fleuve tranquille. Pour le meilleur et pour le pire ? Ok tu as été le meilleur et moi le pire. Mais le changement c'est pour maintenant non ? ∞∞

## Résumé

**Titre : La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques.**

**Résumé :** La quantification des anticorps monoclonaux (mAbs) dans le plasma est un pré-requis essentiel pour les études PK/PD. Les méthodes de références pour quantifier actuellement les mAbs sont de type ELISA mais les difficultés rencontrées notamment lorsque l'analyse porte sur des mAbs dont la cible pharmacologique est circulante, suggèrent que la spectrométrie de masse serait une alternative intéressante.

Appliquée au bevacizumab, la stratégie développée fait appel à la spectrométrie de masse en tandem utilisée en mode MRM (HPLC-ESI-QqQ) et porte sur l'analyse des peptides spécifiques du bevacizumab obtenus à l'issue d'une protéolyse trypsique. La quantification absolue est réalisée à l'aide d'une droite de calibration obtenue à partir du ratio des aires des peptides du bevacizumab et de l'étalon interne.

Afin de proposer une méthodologie de quantification de référence, nous avons définie les points clés du développement pour la transposition à d'autre mAbs et comparé les deux stratégies d'étalonnage interne les plus employées : l'une utilisant une protéine analogue et l'autre un peptide marqué par des isotopes stables (SIL-peptide).

A travers ce développement la stratégie proposée présente un caractère universel vis-à-vis des anticorps monoclonaux de type IgG dont le traitement des échantillons repose sur une purification par protéine A suivit d'une concentration par ultrafiltration et dont la quantification fait appel à l'approche d'étalonnage interne SIL-peptide. Validée selon les recommandations de la FDA, notre méthode présente les performances analytiques attendues en termes de sensibilité, répétabilité et spécificité pour être appliquée à des études cliniques.

**Mots clés :** Anticorps monoclonaux thérapeutiques, plasma humain, spectrométrie de masse, mode MRM, quantification absolue, étalon interne, protéolyse trypsique

---

## Abstract

**Title: A new assay method for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC-MS/MS in human serum comparing two internal standard calibration approaches.**

**Abstract:** The quantification in plasma of monoclonal antibodies (mAbs) is an essential prerequisite to any PK/PD preclinical and clinical study. To date, reference techniques used to quantify mAbs, rely on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) but the difficulties encountered in particular when the analysis focuses on the mAbs whose pharmacological target is circulating, suggest that mass spectrometry would be an interesting alternative.

Applied to bevacizumab, the quantification developed strategy involves tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-QqQ) used in MRM mode and focuses on the analysis of specific peptides bevacizumab obtained after tryptic proteolysis. Absolute quantification is achieved through calibration curve obtained from peak area ratios of bevacizumab surrogate peptide and internal standard.

To propose a reference quantification methodology, we have identified the key points of development for transposition to other mAbs and compared the two most commonly used internal calibration approaches: one using protein analogue and the other a stable isotope labeled surrogate peptide (SIL-peptide).

Through this development, the proposed strategy has a universal character with respect to IgG monoclonal antibodies subclasses which is based on sample processing purification using protein A followed by concentration by ultra filtration and whose quantification involves the internal calibration approach SIL-peptide. Validated according to FDA guidelines, our method shows the expected analytical performance in terms of sensitivity, specificity and repeatability for application in clinical studies.

**Keywords :** Monoclonal antibodies, human plasma, mass spectrometry, MRM mode, absolute quantification, tryptic proteolysis

---

## Unité de recherche

Adaptation cardio-vasculaire à l'ischémie, INSERM U1034,  
1 avenue de Magellan, Hôpital Haut Lévêque 33604 PESSAC.



# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>18</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>20</b>

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION AUX ANTICORPS MONOCLONAUX ET AU**

### **BEVACIZUMAB**.....**24**

I.	Protéines et anticorps .....	25
A.	Conformation des protéines .....	25
B.	Structure générale des anticorps .....	29
II.	Les anticorps monoclonaux thérapeutiques .....	31
A.	Généralités .....	31
1.	Les immunoglobulines polyvalentes .....	31
2.	Les immunoglobulines polyclonales .....	32
3.	Les anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs) .....	33
B.	Pharmacodynamie des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	36
1.	Neutralisation des éléments circulants .....	36
2.	Modulation de fonctions cellulaires.....	37
3.	Ciblage et dépôt in situ de composés toxiques.....	37
4.	Destruction des cellules cibles .....	37
C.	Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques.....	40
1.	Absorption.....	41
2.	Distribution .....	42
3.	Élimination .....	42
D.	Variabilité pharmacocinétique inter-individuelle des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	47
1.	Origine de la variabilité interindividuelle .....	48
2.	Relation exposition plasmatique-effet des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	50
E.	L'anticorps monoclonal thérapeutique bevacizumab (AVASTIN®).....	52
1.	Le VEGF, promoteur de l'angiogenèse tumorale.....	52
2.	Le bevacizumab : inhibition de l'axe VEGF/VEGF-R .....	53
3.	Données pharmacocinétiques du bevacizumab .....	55
III.	Techniques actuelles de dosage plasmatique des anticorps monoclonaux thérapeutiques .....	56
A.	Les immunodosages pour la bioanalyse des anticorps thérapeutiques.....	57
1.	Généralités.....	57

2.	Techniques d'immunodosage du bevacizumab .....	61
3.	Avantages et limites des immunodosages pour le dosage des anticorps monoclonaux .....	63
B.	La spectrométrie de masse pour la bioanalyse des anticorps thérapeutiques .....	65
1.	Historique .....	65
2.	Apport de la spectrométrie de masse pour le dosage du bevacizumab plasmatique .....	66
IV.	Objectif de l'étude .....	67

## **CHAPITRE 2 : REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES ANTICORPS**

### **MONOCLONAUX FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....**

I.	Techniques de séparation ou d'enrichissement des protéines ou des peptides en vue de leur quantification absolue dans un milieu biologique .....	75
A.	Techniques de séparation des protéines .....	75
1.	Précipitation des protéines .....	76
2.	Déplétion en protéines majoritaires .....	77
3.	Immunocapture de la protéine d'intérêt .....	78
4.	Enrichissement en anticorps sur protéine A et/ou G .....	79
B.	Techniques de séparation des peptides .....	81
1.	Immuno-enrichissement des peptides .....	82
2.	Chromatographie sur phase solide (SPE) .....	84
II.	Quantification des anticorps monoclonaux en spectrométrie de masse .....	85
A.	Quantification de la protéine à partir des peptides .....	85
B.	Protéolyse enzymatique des anticorps monoclonaux .....	86
C.	Critères de choix des peptides retenus pour la quantification .....	90
D.	La quantification absolue des anticorps monoclonaux .....	93
1.	Quantification absolue via un peptide rapporteur marqué .....	93
2.	Quantification absolue à partir d'une droite de calibration .....	94
E.	Choix de l'étalon interne .....	95
2.	Polypeptide marqué : stratégie QconCAT .....	98
3.	Analogue protéique .....	99
4.	mAb entier marqué : stratégie PSAQ .....	100
III.	Les difficultés liées à la quantification absolue de mAbs par spectrométrie de masse	102
IV.	Validation d'une méthode dosage selon les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) .....	104
A.	Evaluation de la spécificité .....	105
B.	Evaluation de la linéarité .....	105
C.	Détermination de la sensibilité .....	106

D.	Evaluation de l'exactitude et de la précision.....	106
E.	Evaluation du rendement de la méthode.....	107

### **CHAPITRE 3 : INSTRUMENTATION.....111**

I.	Description de la spectrométrie de masse .....	112
A.	Les différentes sources d'ionisations .....	114
1.	La désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI) .....	115
2.	L'ionisation par électrospray (ESI).....	117
B.	Les analyseurs couplés à une source ESI .....	122
1.	L'analyseur quadripolaire .....	125
2.	Appareillage triple quadripôle (QqQ) et modes d'analyses MS/MS.....	127
3.	Les pièges à ions .....	131
4.	L' orbitrap XL™ .....	135
5.	Appareillage LTQ-Orbitrap XL™ ETD et mode d'analyse en mode MS/MS ...	136
C.	Fragmentation peptidique et identification des peptides et des protéines.....	138
1.	Principe de la fragmentation par dissociation induite par collision (CID).....	139
2.	Analyse bio-informatique des données pour l'identification des protéines et interprétation des spectres de fragmentation .....	141
II.	Description de la chromatographie liquide .....	144
A.	Principe général de la chromatographie liquide .....	144
B.	Systèmes de chromatographie liquide en phase inverse .....	147

### **CHAPITRE 4 : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION ANALYTIQUE D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE EN MILIEU PLASMATIQUE : LE BEVACIZUMAB .....155**

I.	Identification et sélection des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab .....	160
A.	Détermination in silico des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab générés par protéolyse trypsique .....	161
1.	Matériel et méthode .....	161
2.	Résultats .....	163
B.	Identification expérimentale par LC-MS/MS des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab générés par protéolyse trypsique.....	167
1.	Principe de l'analyse MS/MS.....	167
2.	Préparation des solutions mères (SM) de bevacizumab, de trastuzumab et d'IgGs humaines polyvalentes (Tégéline®).....	167
3.	Protocole standard de protéolyse des solutions pures de bevacizumab, trastuzumab et d'IgGs humaines polyvalentes Tégéline® .....	168
4.	Conditions de l'analyse LC-MS/MS .....	169

5.	Résultats .....	169
C.	Sélection des peptides candidats au développement de la méthode de quantification parmi les peptides spécifiques préalablement identifiés .....	173
1.	Critères de sélections .....	173
2.	Sélection des peptides candidats selon les résultats issus du BLAST .....	174
3.	Sélection des peptides candidats selon l'intensité du signal généré en spectrométrie de masse .....	175
II.	Développement de la méthode de quantification du bevacizumab sur le système HPLC-ESI-QqQ. ....	178
A.	Optimisation des paramètres d'analyse en spectrométrie de masse .....	178
1.	Etablissement des transitions SRM pour l'identification des peptides .....	178
2.	Optimisation des paramètres d'ionisation et de fragmentation des peptides ..	183
3.	Détermination des transitions SRM pour la quantification .....	186
B.	Choix de la méthode d'extraction du bevacizumab et du trastuzumab du plasma humain .....	188
1.	Choix de la fraction d'élution à conserver .....	189
2.	Concentration des échantillons .....	190
3.	Evaluation de l'efficacité de la méthode de traitement des échantillons plasmatiques .....	191
4.	Validation de la spécificité biologique des peptides détectés .....	194
5.	Etude préliminaire de sensibilité et de linéarité de la méthode de dosage .....	197
C.	Optimisation de l'étape de protéolyse .....	200
1.	Détermination de la quantité de trypsine optimale .....	201
2.	Etude préliminaire de la variabilité de la méthode avec le mAbIS .....	203
3.	Intérêt d'une étape de dénaturation par l'urée .....	208
4.	Intérêt de l'utilisation d'une trypsine traitée par TPCK et résistante à l'autolyse	210
5.	Etude de la durée d'incubation trypsique sur la formation des peptides détectés	215
III.	Comparaison des deux approches d'étalonnage interne et validation analytique de la méthode de quantification retenue. ....	217
A.	Stabilité des peptides dans le protéolysat .....	218
B.	Linéarité .....	219
C.	Exactitude et précision .....	221
1.	Répétabilité intra-journalière .....	222
2.	Répétabilité inter-journalière .....	225
D.	Détermination de la limite de quantification .....	227
E.	Rendement des différentes étapes de traitement des échantillons .....	228
F.	Stabilité des échantillons plasmatiques .....	231

G.	Application de notre méthode de quantification.....	232
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>236</b>
I.	Discussion-Conclusion.....	237
A.	Le contexte et les enjeux .....	237
B.	Les ambitions et l'originalité du projet .....	238
C.	La méthode de quantification développée.....	238
1.	Stratégie de la méthode et transposition aux autres anticorps monoclonaux.....	238
2.	Points forts et points faibles de la méthode .....	243
II.	Perspectives .....	245
A.	Perspectives analytiques .....	245
B.	Applications Cliniques.....	246
<b>CHAPITRE 6 : PUBLICATIONS ET INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES.....</b>		<b>248</b>
Annexe 1 : Revendications relatives à la demande de brevet.....		249
Annexe 2 : Article scientifique.....		251
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>273</b>

## Liste des figures

---

Figure n° 1: Structure générique d'un acide aminé.....	25
Figure n° 2: Structure primaire d'une protéine .....	27
Figure n° 3 : Représentation d'une hélice $\alpha$ (a) et d'un feuillet $\beta$ (b).....	28
Figure n° 4 : Repliement des feuillets plissés $\beta$ d'un anticorps. ....	29
Figure n° 5 : Structure générale d'une IgG et de ses différents fragments [8]. ....	30
Figure n° 6 : Degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques d'après Paintaud. G <i>et al</i> modifié [13].....	33
Figure n° 7 : Mécanismes de destruction des cellules cibles après fixation des mAbs à leur cible membranaire. ....	38
Figure n° 8: Différents mécanismes de destruction cellulaire des anticorps monoclonaux anti- CD20 (types I et II).....	39
Figure n° 9 : Modèle bicompartimental des mAbs administrés par voie IV.....	41
Figure n° 10 : Processus de recyclage et migration trans-cellulaire des anticorps monoclonaux via le récepteur FcRn au sein de la cellule endothéliale [60, 61]. ....	44
Figure n° 11 : Incidence de la réponse immunogène selon le type d'anticorps induits [76]. ...	46
Figure n° 12 : Axe VEGF/VEGF-R et angiogenèse.....	53
Figure n° 13 : Stratégie d'inhibition de l'axe VEGF/VEGF-R.....	54
Figure n° 14 : Formats des immunodosages pour la quantification des anticorps thérapeutiques (d'après Kuang <i>et al</i> [117]). ....	59
Figure n° 15 : Principe du dosage par ELISA de la forme libre et partiellement liée du bevacizumab. ....	62
Figure n° 16 : Principe du kit ELISA commercialisé pour le dosage du bevacizumab libre : technique du double antigène.....	62
Figure n° 17 Système de déplétion en protéines plasmatiques dans sa version cartouche pour centrifugation ou « Spin Cartridge® » (à gauche) et dans sa version colonne de chromatographie (à droite) ( <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> ). ....	77
Figure n° 18 : Procédé général de la technique d'enrichissement des mAbs par immunocapture sur billes magnétiques.....	78
Figure n° 19 : Représentation schématique du principe de purification des anticorps par chromatographie d'affinité sur protéine A et /ou G. ....	81
Figure n° 20 : Diagramme d'immuno-enrichissement des peptides de la méthode SISCAPA ( <i>Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies</i> ) ( <a href="http://www.siscapa.com">www.siscapa.com</a> ). .....	82
Figure n° 21 : Système de plaque magnétique et plaque de micro-puits pour l'automatisation de la méthode SISCAPA d'immuno-enrichissement des peptides sur billes magnétiques ( <a href="http://www.siscapa.com">www.siscapa.com</a> ).....	83
Figure n° 22 : Principe de la formation de peptides par protéolyse trypsique d'une protéine.	87

Figure n° 23 : Critères de choix pour la sélection du ou des peptides signature pour la quantification d'une protéine (d'après Van den Broek <i>et al</i> , modifié [143]).	91
Figure n° 24 : Schéma de la stratégie d'étalonnage interne type AQUA™ avec marquage isotopique du peptide d'intérêt ( <a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a> ).	97
Figure n° 25 : Correction de la dégradation physico-chimique du peptide d'intérêt généré au cours de l'étape de protéolyse trypsique (ligne pleine, losanges noirs) via l'utilisation d'un SIL-peptide de séquence identique (ligne discontinue, triangles blancs) [150].	98
Figure n° 26 : Structure de la protéine QconCAT. Les sites de coupure par l'enzyme sont indiqués par des flèches (figure extraite des travaux de thèse de Mathieu Dubois adaptée de Beynon <i>et al</i> [153]).	99
Figure n° 27 : Stratégies analytiques des principales méthodes de dosages des mAbs en milieu plasmatique par spectrométrie de masse [124-138].	103
Figure n° 28 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse conventionnelle appliqué à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).	112
Figure n° 29 : Schéma de principe de l'ionisation MALDI ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> ) (figure modifiée d'après Hoffmann <i>et al</i> [159]).	116
Figure n° 30 : Représentation schématique du principe général d'ionisation par ESI.	118
Figure n° 31 : Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises (figure modifiée d'après Kebarle <i>et al</i> [163]).	119
Figure n° 32 : Principe schématisé des deux modèles pour l'obtention d'ions en phase gazeuse par ESI.	120
Figure n° 33 : Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire [165, 166].	126
Figure n° 34 : Photographie du spectromètre de masse QqQ- API3200™ au laboratoire de pharmacocinétique et pharmacie clinique (INSERM U1034).	127
Figure n° 35 : Représentation schématique du fonctionnement en mode MS/MS d'un analyseur QqQ (MS/MS dans l'espace).	128
Figure n° 36 : Représentation schématique du mode de balayage descendant ou « <i>product ion scan</i> » au sein d'un analyseur à triple quadripôle.	129
Figure n° 37 : Représentation schématique du mode <i>Single Reaction Monitoring (SRM)</i> ...	130
Figure n° 38 : Représentation schématique d'un piège à ions	131
Figure n° 39 : Trajectoire d'un ion dans le champ électrique d'un piège à ion (figure modifiée d'après de Hoffmann [159]).	132
Figure n° 40 : Représentation schématique d'un piège à ions linéaire (tiré des travaux de thèse de SIMON Romain [167]).	133
Figure n° 41 : Représentation schématique du fonctionnement en mode MS/MS de l'analyseur piège ionique (MS/MS dans le temps).	134
Figure n° 42 : Piège ionique linéaire à éjection radiale	135
Figure n° 43 : Représentation schématique de l'orbitrap™ ou du piège électrostatique.	135

Figure n° 44 : Photographie du LTQ Orbitrap XL™ ETD (Thermo-Scientific) ( <a href="http://www.thermoscientific.com">www.thermoscientific.com</a> ).....	136
Figure n° 45 : Schéma de la structure interne du spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL™ ETD (Thermo-Scientific) ( <a href="http://www.thermoscientific.com">www.thermoscientific.com</a> ).....	137
Figure n° 46 : Analyse MS/MS avec le LTQ Orbitrap XL™ .....	137
Figure n° 47 : Principe de la fragmentation selon le procédé de dissociation induite par collision (CID). .....	139
Figure n° 48 : Nomenclature de la fragmentation des peptides par MS/MS selon Biemann [173]. .....	140
Figure n° 49 : Principe de l'établissement des cartes peptidiques ou PFF ( <i>Peptide Fragment Fingerprinting</i> ) d'une protéine en spectrométrie de masse.....	142
Figure n° 50 : Représentation schématique du greffage C <sub>18</sub> en chromatographie liquide en phase inverse. ....	151
Figure n° 51 : Représentation schématique du procédé de « end-capping ». ....	151
Figure n° 52 : Représentation schématique de la technologie Core Shell® ( <a href="http://www.phenomenex.com">www.phenomenex.com</a> ).....	152
Figure n° 53 : Stratégie de dosage du bevacizumab dans le plasma en fonction du type d'étalon interne utilisé. ....	159
Figure n° 54 : Position au sein de la séquence peptidique du bevacizumab des modifications par rapport à la séquence consensus d'une IgG (acides aminés en bleu) ainsi que des CDR (acides aminés sous-lignés). La partie variable de l'anticorps est identifiée en noire et la partie constante en gris.....	163
Figure n° 55 : Position au sein de la séquence du bevacizumab des peptides tryptiques spécifiques du bevacizumab identifiés <i>in silico</i> par comparaison avec la séquence d'IgG consensuelle. Les acides aminés modifiés sont identifiés en bleu, la partie variable de l'anticorps en noire, la partie constante en gris et les CDR sont soulignés.....	165
Figure n° 56 : recouvrement de la séquence de la chaîne légère du bevacizumab par les peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines sur le système nano LC-ESI-LTQ-Orbitrap™.....	172
Figure n° 57 : recouvrement de la séquence de la chaîne lourde du bevacizumab par les peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines sur le système nanoLC-ESI-LTQ-Orbitrap™.....	172
Figure n° 58 : intensité du signal généré en mode MRM par les peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> (a), <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> (b) et <sup>46</sup> VLIYFTSSLHSGVPSR <sup>61</sup> (c) spécifiques du bevacizumab candidats à la quantification après analyse d'un protéolysat de bevacizumab sur le système LC-ESI-QqQ. ....	176
Figure n° 59 : Spectre de fragmentation généré par la fragmentation CID du peptide du bevacizumab doublement chargé <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> ( <i>m/z</i> 523.3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ. ....	180

Figure n° 60 : Spectre de fragmentation généré par la fragmentation CID du peptide du bevacizumab doublement chargé <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> ( <i>m/z</i> 642,3) sur spectromètre de masse ESI-QqQ. ....	181
Figure n° 61 : Spectre de fragmentation obtenu par la fragmentation CID du peptide du trastuzumab doublement chargé <sup>31</sup> DTYIHWVR <sup>38</sup> ( <i>m/z</i> 545,3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ. ....	182
Figure n° 62 : Spectre de fragmentation obtenu par la fragmentation CID du SIL-peptide doublement chargé <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76*</sup> ( <i>m/z</i> 527,3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ.....	183
Figure n° 11 : Représentation schématique des différents paramètres variables à optimiser lors d'une analyse MS/MS sur le spectromètre de masse ESI-QqQ (API3200™). ....	184
Figure n° 64 : Corrélation des transitions SRM sélectionnées pour la quantification des peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> (a) et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> (b) du bevacizumab.....	187
Figure n° 65 : Analyse par spectrophotométrie UV (280 nm) des différentes fractions de lavages et d'élution obtenues au cours de la purification sur protéine A d'échantillon plasmatiques. ....	189
Figure n° 66 : Représentation schématique du principe de concentration des échantillons purifiés sur membrane ultra-filtrante type Amicon® 100 KDa.....	191
Figure n° 67 : Chromatogrammes et spectres de masse obtenus à l'issu de l'analyse LC-MS/MS (MRM) sur le système HPLC-ESI-QqQ d'un échantillon plasmatique chargé en bevacizumab à 400 µg/mL et en trastuzumab avant tout étape de traitement.....	193
Figure n° 68 : Chromatogrammes de masse obtenus à l'issu de l'analyse MS/MS (MRM) sur le système HPLC-ESI-QqQ d'un blanc de plasma humain (a), d'un échantillon plasmatique chargé en trastuzumab et SIL-peptide (b), chargé en bevacizumab et SIL-peptide (c) et chargé en bevacizumab et trastuzumab(d). ....	196
Figure n° 69 : Droites de calibrations des peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> obtenues à l'issu de l'analyse MS/MS (MRM) d'échantillons plasmatiques chargés à des concentrations croissantes en bevacizumab allant de 12.5 à 500 µg/mL et protéolysés au 1/20. ....	198
Figure n° 70 : Chromatogrammes de masse obtenus à l'issu de l'analyse MS/MS (MRM) d'un échantillon plasmatique chargé en bevacizumab à 12.5 µg/mL.....	199
Figure n° 71 : ASCs moyennes des peptides spécifiques du bevacizumab (a) et (b) et du peptide spécifique du trastuzumab (c) en fonction du ratio trypsine/substrat. ....	202
Figure n° 72 : Droites de calibrations des peptides du bevacizumab <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> (b, d) et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> (a, c) obtenues à l'issu de l'analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillon plasmatiques chargés à des concentrations croissantes en bevacizumab allant de 12,5 à 500 µg/mL et protéolysés à un ratio tryptique de 1/20.....	205

Figure n° 73 : ASC moyennes des peptides du bevacizumab (a) et du peptide du mAbIS (b) obtenues après analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillons traités par l'urée et non traités par l'urée au cours de l'étape de protéolyse. ....	209
Figure n° 74 : Mesure des ASC moyennes des peptides du bevacizumab (a) et (b) et du peptide du mAbIS (c) en fonction du ratio trypsine « Gold » /substrat. ....	211
Figure n° 75 : Droites de calibrations des peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> (a) et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> (b) obtenues à l'issue de l'analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillon plasmatiques chargés à des concentrations croissantes en bevacizumab et protéolysés à un ratio trypsine « Gold »/ substrat de 1/50. ....	213
Figure n° 76 : Cinétique de la protéolyse du bevacizumab et du trastuzumab mesurée par les peptides spécifiques du bevacizumab <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> et par le peptide spécifique du trastuzumab <sup>31</sup> DTYIHWVR <sup>38</sup> . ....	216
Figure n° 77 : Stabilité des peptides du bevacizumab (a), (b), du SIL-peptide (c) et du peptide du trastuzumab (d) dans le protéolysat au cours de l'analyse MS/MS sur LC-ESI-QqQ. ....	219
Figure n° 78 : Droites de calibrations obtenues pour les deux peptides du bevacizumab avec l'approche d'étalonnage interne mAbIS (a), (b) et l'approche SIL-peptide (c), (d). ....	221
Figure n° 79 : Corrélation entre les deux peptides du bevacizumab dans la gamme de concentration en bevacizumab étudiée (12,5 µg/mL à 500 µg/mL). ....	227
Figure n° 80 : Chromatogramme de masse et exactitude/précision obtenus à l'issue de l'analyse ..... MS/MS (MRM) d'échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à la limite de quantification (LOQ) de 12.5µg/mL (n=6). ....	228
Figure n° 81 : Représentation schématique de la méthodologie du calcul du rendement des différentes étapes du traitement d'un échantillon plasmatique. ....	229
Figure n° 82 : Stabilité du bevacizumab en milieu plasmatique évaluée à travers le ratio ASC <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> / ASC <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>*76</sup> après conservation d'échantillons plasmatiques à +4°C (droites en pointillées) et à -80°C (droites pleines). ....	231
Figure n° 83 : Chromatogrammes de masses obtenus à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) par LC-ESI-QqQ d'échantillons plasmatiques provenant d'un patient traité par bevacizumab et correspondant à une concentration basse (Cres-a) et à une concentration haute (Cmax-b) en bevacizumab. ....	233

## Liste des tableaux

---

Tableau I: Nom, code et structure des 20 acides aminés retrouvés chez l'homme. ....	26
Tableau II : Caractéristiques des isotypes d'immunoglobulines humaines d'après lobo <i>et al</i> [9]. ....	31
Tableau III : Principaux mAbs et dérivés utilisés en thérapeutique (d'après Vidal 2015 [20] et Thériaque 2015 [21]). ....	35
Tableau IV : Revue des différentes méthodes LC-MS/MS développées pour la quantification des anticorps monoclonaux dans le plasma [124-138].....	73
Tableau V : Différents acides aminés marqués pouvant constituer un AQUA™ peptide ou SIL peptide ( <a href="http://www.sigma-aldrich.com">www.sigma-aldrich.com</a> ).....	96
Tableau VI : Performances et applications des deux appareils de spectrométrie de masse utilisés au cours de notre étude. ....	124
Tableau VII : Les différents types de chromatographie liquide.....	146
Tableau VIII : Liste théorique des peptides tryptiques spécifiques du bevacizumab identifiés <i>in silico</i> par comparaison avec la séquence d'IgG humaine consensuelle. ....	164
Tableau IX : Liste théorique des peptides tryptiques spécifiques du trastuzumab identifiés <i>in silico</i> par comparaison avec la séquence d'IgG humaine consensuelle. ....	166
Tableau X : Carte peptidique expérimentale du bevacizumab obtenue à l'issue de l'analyse MS/MS menée sur le système nano-LC-LTQ-Orbitrap.....	170
Tableau XI : Score issue du BLAST obtenu par comparaison avec la banque de donnée UniProtKB_HUMAN pour chacun des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab précédemment retenus. ....	174
Tableau XII : Paramètres de détection en spectrométrie de masse optimisés .....	186
Tableau XIII : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS pour les peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> du bevacizumab. ....	206
Tableau XIV : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir des ASCs du peptide <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> et du peptide <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> . ....	207
Tableau XV : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS obtenus pour les peptides <sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup> et <sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup> avec la trypsine « Gold ».....	214
Tableau XVI : Exactitude et précision intra-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne SIL-peptide.....	222
Tableau XVII : Exactitude et précision intra-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne mAbIS. ....	223
Tableau XVIII : Exactitude et précision inter-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne SIL-peptide.....	225

Tableau XIX : Rendement des différentes étapes du traitement des échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab. ....	230
--	-----

## Liste des abréviations

---

**ACN** : Acétonitrile

**AF** : Acide Folinique

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ASC** : Aire Sous la Courbe

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool (Algorithme de recherche heuristique utilisée en bio-informatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés).

**CCR** : Cancer Colorectal

**CCRM** : Cancer Colorectal Métastatique

**Da** : Dalton

**CE** : Energie de collision (*Collision Energy*)

**CEP** : Potentiel d'entrée dans la cellule de collision (*Cell Entrance Potential*)

**CID** : Fragmentation Induite par Collision (*Collision Induced Dissociation*)

**CQ** : Contrôle Qualité

**CUR** : Pression du gaz rideau (*Curtain Gaz*)

**CV** : Coefficient de Variation (exprimé en pourcentage)

**CXP** : Potentiel de sortie de la cellule de collision (*Cell Exit Potential*)

**DP** : Potentiel de dissociation (*Declustering potential*)

**DTT** : dithiothreitol

**EI** : Etalon Interne ou *Internal Standard (IS)* (composé ajouté en quantité connue et fixe à chaque échantillon pour limiter les biais dans la méthode de dosage)

**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay

**EP** : Potentiel d'entrée dans l'analyseur (*Entrance Potential*)

**ESI**: Ionisation ElectroSpray (*ElectroSpray Ionization*)

**Fab** : C'est un des trois morceaux de la molécule d'immunoglobuline G. Il a la même affinité pour l'antigène que l'anticorps complet. Le fragment Fab est formé de la chaîne légère en entier et d'une partie de la chaîne lourde (partie variable et un domaine de la partie constante). Il est monovalent

**F (ab')<sub>2</sub>** : Il correspond à l'association de deux fragments Fab reliés par une petite partie des parties constantes des chaînes lourdes, la région charnière. Il a la même affinité que l'anticorps pour l'antigène et il est divalent.

**Fc** : C'est un des trois morceaux de la molécule d'immunoglobuline G. Ce fragment Fc comporte la partie constante des deux chaînes lourdes au-delà de la partie charnière. Il ne possède pas de site de fixation des antigènes.

**FCGRT** : gène codant pour le récepteur Fc néonatal (FcRn)

**FcRn** : Récepteur des fragments Fc néonatal situé à la surface des cellules endothéliales. Les immunoglobulines s'y fixent par leur fragment Fc.

**FDA** : Food and Drug Administration

**FIA** : Analyse par injection en flux continu (*Flow injection analysis*)

**GS1** : Pression du gaz séchant au niveau de la source d'ionisation ESI (*Sheath Gas*)

**GS2** : Pression du gaz auxiliaire au niveau de la source d'ionisation ESI

**HACA** : Anticorps produits par l'homme dirigés contre les anticorps thérapeutiques chimériques (Human Anti Chimeric Antibodies)

**HAHA** : Anticorps produits par l'homme dirigé contre les anticorps thérapeutiques humanisés (Human Anti Human Antibodies)

**HAMA** : Anticorps produits par l'homme dirigé contre les anticorps thérapeutiques murins (Human Anti Mouse Antibodies)

**HER-2** : Récepteur cellulaire du facteur de croissance épidermique humain (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*)

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

**IAA** : Iodoacétamide

**IgG** : Immunoglobuline G

**IS** : Etalon Interne ajouté à une quantité connue et fixe à chaque échantillon pour limiter les biais de la méthode de dosage (*Internal Standard*)

**LC** : Chromatographie Liquide (*Liquid Chromatography*)

**LC-ESI-qQq** : système de spectrométrie de masse équipé d'une source d'ionisation électrospray et d'un analyseur triple quadripolaire, et couplé à de la chromatographie liquide haute performance (système sur lequel la méthode de quantification du bevacizumab est développée)

**LC-MS** : Couplage Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

**LOD** : Limite de détection (*Limit of detection*)

**LOQ** : Limite de quantification (*Limit of quantification*)

**LTQ** : Spectromètre de masse à piège ionique linéaire (*Linear Ion-Trap Mass Spectrometer*)

**mAb** : Anticorps monoclonal (*Monoclonal Antibody*)

**mAbIS** : Anticorps monoclonal utilisé comme étalon interne (ici le trastuzumab)

**MALDI** : Spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser à partir d'une matrice ou Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)

**MRM** : Suivi alterné de plusieurs transitions métastables (*Multiple Reaction Monitoring*)

**MS** : Spectrométrie de Masse (*Mass Spectrometry*)

**MS/MS** : Spectrométrie de masse en tandem, combinant deux ou n analyseurs : MS<sub>n</sub> (*Mass Spectrometry-Mass Spectrometry*)

**m/z** : nombre sans dimension mesurant le rapport de la masse d'un ion (en unités atomiques) à son nombre de charges

**NANO-LC** : Chromatographie Liquide haute performance utilisant des débits de phase mobile de l'ordre du nano litre par minute

**NANO-LC-ESI-LTQ-Orbitrap** : système de spectrométrie de masse équipé d'une source d'ionisation électrospray et d'un analyseur hybride composé d'une trappe ionique linéaire et d'une Orbitrap couplée à de la nano-chromatographie liquide (système utilisé pour identifier les peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab) (*nano-Liquid Chromatography-ElectroSpray ionisation-Linear Ion Trap Mass Spectrometer-Orbitrap*)

**PD** : Pharmacodynamie

**PK** : Pharmacocinétique

**PK/PD** : Pharmacocinétique/Pharmacodynamique

**Q** : Quadripôle

**QqQ** : triple quadripôle

**SIL-peptide** : peptide marqué avec des isotopes stables (utilisé comme étalon interne)

**SPE** : Solide Phase Extraction

**TOF** : Temps de Vol (*Time Of Flight*)

**Tr** : Temps absolu de rétention d'un soluté issu d'une colonne de chromatographie

**VEGF-R** : Récepteur au Facteur de Croissance vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor - Receptor*)

**VEGF** : Facteur de Croissance vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

**Nomenclature des acides aminés :**

Ala Alanine (A)

Arg Arginine (R)

Asn Asparagine (N)

Asp Acide Aspartique (D)

Cys Cystéine (C)

Gln Glutamine (Q)

Glu Acide Glutamique (E)

Gly Glycine (G)

His Histidine (H)

Ile Isoleucine (I)

Leu Leucine (L)

Lys Lysine (K)

Met Méthionine (M)

Phe Phénylalanine (F)

Pro Proline (P)

Pyr Acide Pyroglutamique (Z)

Ser Sérine (S)

Thr Thréonine (T)

Trp Tryptophane (W)

Tyr Tyrosine (Y)

Val Valine (V)



## **CHAPITRE 1**

# **INTRODUCTION AUX ANTICORPS MONOCLONAUX ET AU BEVACIZUMAB**

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION AUX ANTICORPS MONOCLONAUX ET AU BEVACIZUMAB

### I. Protéines et anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des macromolécules protéiques caractérisées par un haut poids moléculaire et composées de quatre chaînes polypeptidiques (identiques deux à deux) dont l'enchaînement des acides aminés et leur agencement dans l'espace sont déterminants pour leur fonction.

#### A. Conformation des protéines

Les protéines sont des polymères linéaires constitués d'acides aminés mais ayant une structure spatiale différente les unes des autres. Tous les acides aminés ont la même architecture et sont composés d'un carbone tétraédrique central ( $\alpha$ ). Sur cet atome de carbone sont fixés un groupement amine, un groupement carboxylique, un hydrogène et un groupement appelé chaîne latérale (R) (Figure 1).

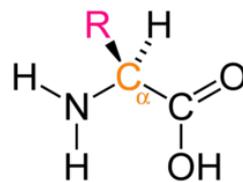


Figure n° 1: Structure générique d'un acide aminé.

Il existe chez l'Homme, 20 acides aminés différents naturels retrouvés dans les chaînes polypeptidiques. Le très grand nombre de combinaisons possibles entraîne une diversité quasi-infinie [1, 2]. Les acides aminés diffèrent les uns des autres par leur chaîne latérale (R). En raison des différences de longueur et de composition chimique, les chaînes latérales engendrent des propriétés très différentes pour chacun des acides aminés. Celles-ci peuvent être de type aliphatique, aromatique, hétérocyclique, ou peuvent présenter des groupements hydroxyles, sulfhydryles, carboxyliques et amides. En fonction des propriétés

physico-chimiques de leur chaîne latérale, les acides aminés peuvent être classés comme hydrophobes, polaires, acides ou basiques (Tableau I).

**Tableau I: Nom, code et structure des 20 acides aminés retrouvés chez l'homme [3].**

Basiques	Lysine	Lys (K)		Acide Aspartique	Asp (D)		Acides
	Arginine	Arg (R)		Acide Glutamique	Glu (E)		
	Histidine	His (H)		Alanine	Ala (A)		Hydrophobes
Polaires	Serine	Ser (S)		Valine	Val (V)		
	Threonine	Thr (T)		Isoleucine	Ile (I)		
	Asparagine	Asn (N)		Leucine	Leu (L)		
	Glutamine	Gln (Q)		Méthionine	Met (M)		
	Cystéine	Cys (C)		Phénylalanine	Phe (F)		
	Glycine	Gly (G)		Tyrosine	Tyr (Y)		
	Proline	Pro (P)		Tryptophane	Trp (W)		

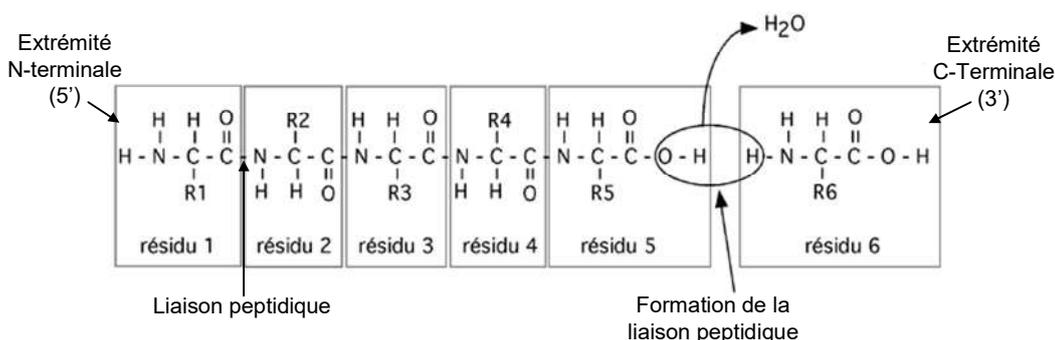
On distingue quatre stades structuraux pour les protéines :

- **La structure primaire**, qui correspond à la séquence proprement dite de la protéine, c'est à dire à l'enchaînement des acides aminés.
- **La structure secondaire**, qui correspond au premier niveau de repliement de l'enchaînement peptidique en hélice ou en feuillets.
- **La structure tertiaire**, correspond au repliement et à l'assemblage en domaine stable dans l'espace des différents éléments de la structure secondaire.
- **La structure quaternaire**, agencement des sous-unités entre elles, quand la protéine est constituée de plusieurs sous-unités indépendantes.

- **La structure primaire**

L'enchaînement des acides aminés constitue la structure primaire de la biomolécule (Figure 2). Chaque acide aminé est lié au suivant par une liaison

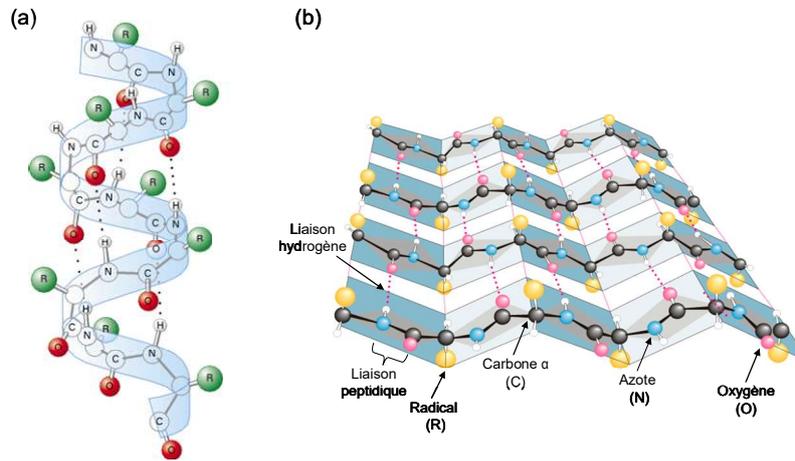
peptidique qui se forme quand le groupement carboxylique d'un premier acide aminé réagit avec le groupement aminé d'un second, avec élimination d'une molécule d'eau. Les acides aminés sont incorporés dans une chaîne qu'on appelle chaîne polypeptidique. Par convention on désigne le premier acide aminé de la chaîne comme étant celui dont le groupement aminé reste libre ; on dit qu'il se trouve en 5' ou encore qu'il constitue l'extrémité N-terminale. On désigne comme étant le dernier résidu de la chaîne celui dont le groupement carboxylique reste libre ; on dit qu'il se trouve en 3' ou encore à l'extrémité C-terminale.



**Figure n° 2: Structure primaire d'une protéine**

- **La structure secondaire**

Les protéines adoptent une orientation spatiale locale bien précise (hélice, feuillet) qui correspond à leur structure secondaire. On distingue deux types de structures secondaires, qui ont été proposées pour la première fois en 1951 par Linus Pauling et Robert Corey [4, 5], l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$  (Figure 3). L'hélice  $\alpha$  se forme lorsque la chaîne polypeptidique s'enroule en hélice et que le groupement CO d'une liaison peptidique se lie avec le groupe NH d'une autre liaison peptidique située quatre résidus plus loin. Le feuillet  $\beta$  est formé quant à lui de deux segments juxtaposés d'une chaîne polypeptidique, avec des liaisons hydrogènes entre ces deux segments.

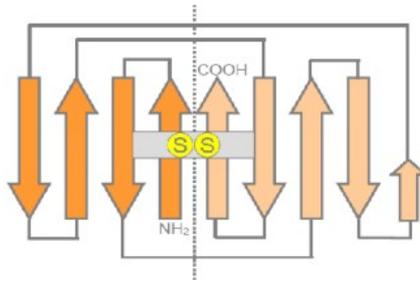


**Figure n° 3 : Représentation d'une hélice  $\alpha$  (a) [6] et d'un feuillet  $\beta$  (b) [7].**

Dans les chaînes polypeptidiques des anticorps, on retrouve à peu près tous les 110 acides aminés une certaine homologie, quel que soit la chaîne ou le fragment examiné (environ 30 % de similitude). Chacune de ces zones d'homologie contient une boucle d'environ 60 acides aminés avec un pont disulfure (liaison covalente entre deux cystéines par oxydation). La structure secondaire des anticorps correspond en fait aux zones d'homologies qui forment des feuillets  $\beta$  anti-parallèles.

- **La structure tertiaire**

La structure tertiaire d'une protéine correspond à l'organisation dans l'espace de ses structures secondaires. La formation de la structure tertiaire est liée au repliement de la chaîne polypeptidique par interactions entre les chaînes latérales des acides aminés se trouvant à divers endroits de la séquence. Pour la plupart des protéines, la structure tertiaire est constituée de domaines. Chaque domaine est un repliement compact d'une combinaison d'hélices  $\alpha$ , de feuillets  $\beta$  et de boucles reliant ces structures secondaires. Les petites protéines ne possèdent qu'un seul domaine alors que les plus grosses en possèdent plusieurs. Le positionnement des acides aminés hydrophobes au cœur de la protéine et des acides aminés hydrophiles en périphérie au contact des molécules d'eau est un paramètre déterminant pour la structure tertiaire de la protéine. Les feuillets  $\beta$  anti-parallèles des anticorps forment des domaines globulaires. Chaque domaine est fait de 2 ensembles de feuillets plissés  $\beta$  antiparallèles. Ces deux ensembles sont reliés par un pont disulfure et constituent une structure sphérique thermodynamiquement stable dont la partie interne est hydrophobe. La figure 4 schématise le repliement des anticorps par l'association de ces deux feuillets  $\beta$  plissés anti-parallèles.



**Figure n° 4 : Repliement des feuillets plissés  $\beta$  d'un anticorps.**

- **La structure quaternaire**

Enfin, la structure quaternaire est issue de l'assemblage de plusieurs domaines globulaires [8]. De la structure quaternaire découle la fonction de la protéine [8, 9]. Les édifices quaternaires sont maintenus par des liaisons non-covalentes, de faible énergie comme par exemple les liaisons hydrogène, les forces de Van Der Waals, les liaisons ioniques et les interactions hydrophobes [9]. Ces entités supramoléculaires ont souvent une haute masse moléculaire allant de 5 000 à plus de 100 000 Da.

## **B. Structure générale des anticorps**

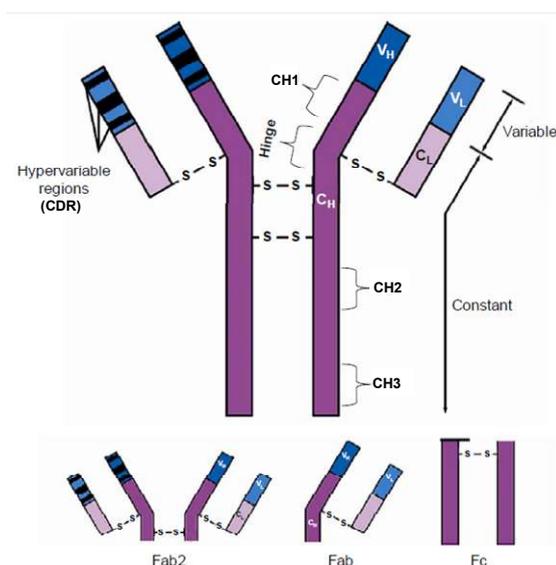
Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des protéines de haut poids moléculaire, symétriques, formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (Heavy Chain ou H) et deux chaînes légères (Light Chain ou L) kappa ou lambda qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule [10]. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Ces chaînes forment une structure en Y schématisée par la figure 5.

Chacune des quatre chaînes est composée d'un domaine variable (VL ou VH) et d'une (CL) ou trois parties constantes (CH1, CH2, CH3) pour les chaînes légères et les chaînes lourdes respectivement (Figure 5). Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées CDR (régions déterminantes de complémentarités, *complementary determining regions*) qui se caractérisent par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à un autre. Les CDR constituent le site d'interaction antigénique.

La protéolyse par la papaine casse la molécule d'immunoglobuline au niveau de la région charnière avant le pont disulfure inter-chaîne. Ainsi, à l'extrémité N-terminale se situent les fragments Fabs constitués de la partie variable et d'une

partie constante de chaque chaîne (VL-CL et VH-CH1). Contenant le site de liaison à l'antigène cible (CDR), ils déterminent la spécificité de l'anticorps.

La protéolyse par la papaine génère aussi un autre fragment à l'extrémité C-terminale : le fragment Fc, fragment cristallisable, exclusivement formé par les deux autres parties de la région constante des chaînes lourdes (CH2 et CH3). Il contient les sites d'interaction avec les cellules effectrices du système immunitaire (monocytes, macrophages, lymphocytes, granulocytes) via les récepteurs cellulaires FcR, avec le complément et avec les molécules impliquées dans la pharmacocinétique des anticorps (récepteur FcRn).



**Figure n° 5 : Structure générale d'une IgG et de ses différents fragments [11].**

Chez l'homme, il y a cinq classes ou isotypes d'immunoglobulines. On retrouve les immunoglobulines gamma (IgG), alpha (IgA), mu (IgM), epsilon (IgE), et delta (IgD). Elles partagent la même structure de base mais diffèrent en ce qui concerne leurs chaînes lourdes appelées respectivement  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  et également par leur forme (monomérique ou polymérique), leur poids moléculaire, leur demi-vie ou encore leur concentration sérique (Tableau II). Les IgGs, les plus nombreuses (70 à 80 % des Ig totales [10]), sont subdivisées en quatre sous-types (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), sur la base des différences structurales dans la chaîne lourde  $\gamma$ . Les IgG1 représentent le sous type le plus abondant (45 à 75 % des IgG totales).

**Tableau II : Caractéristiques des isotypes d'immunoglobulines humaines d'après lobo et al [12].**

	<b>IgA</b>	<b>IgD</b>	<b>IgE</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
<b>Poids moléculaire</b>	160 kDa - 400 Da	175 kDa	190 kDa	150 kDa	950 kDa - 1150 kDa
<b>Forme</b>	Monomère, dimère	Monomère	Monomère	Monomère	Pentamère, Hexamère
<b>Valence</b>	2, 4	2	2	2	10, 12
<b>Concentration sérique (mg/ml)</b>	1,5 – 2,6	0,04	0,0003	9,5 – 12,5	0,7 – 1,7
<b>Demi-vie sérique (jour)</b>	6	3	2.5	23	5

## II. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

### A. Généralités

Les anticorps thérapeutiques ont connu, notamment depuis l'arrivée des anticorps monoclonaux (mAbs pour « monoclonal antibodies ») il y a trois décennies, un essor considérable. Ils ont révolutionné de nombreux domaines de la thérapeutique notamment la cancérologie avec des indications thérapeutiques de plus en plus larges, dans les maladies inflammatoires (plusieurs mAbs pour la plupart dirigés contre le TNF- $\alpha$ ) et en transplantation (anticorps polyclonaux et monoclonaux) indiqués dans la prévention du rejet aigu du greffon.

Les anticorps thérapeutiques peuvent être classés en trois grandes classes : les immunoglobulines polyvalentes, les immunoglobulines polyclonales et les mAbs [13]. D'une manière générale les anticorps thérapeutiques sont des IgGs et leur structure est semblable à celle des IgGs endogènes précédemment décrites.

#### 1. Les immunoglobulines polyvalentes

Les immunoglobulines polyvalentes humaines à usage intraveineux (IgIV) sont dérivées d'un « pool » de plasma de plusieurs milliers de donneurs sains ce qui permet d'apporter des anticorps dirigés contre un très large panel d'antigènes. Les IgIV sont obtenues à partir d'un « pool » de plasma qui est fractionné, purifié puis concentré. Il s'agit d'IgG à plus de 95 % dont la distribution en sous-classes est comparable à celle du sérum normal. La plupart des préparations ne contiennent que de faibles taux d'IgA et d'IgM. Les préparations d'IgIV sont en effet soumises à une étape d'adsorption pour éliminer les IgA, dont il ne reste que des traces, afin de

limiter le risque de pseudo-allergie aux IgA (production d'anticorps anti-IgA). La demi-vie des anticorps injectés est identique à celle des IgG endogènes, c'est-à-dire environ trois semaines. En France elles sont représentées par 6 spécialités pharmaceutiques dont Tégéline<sup>®</sup>, Privigen<sup>®</sup> et Clairyg<sup>®</sup> pour les trois les plus utilisées.

Les indications thérapeutiques des IgIV sont doubles : substitution ou immunomodulation. Les IgIV peuvent être utilisées comme un traitement de substitution dans les déficits immunitaires avec hypogammaglobulinémie ou atteinte de l'immunité humorale. Ces déficits peuvent être primaires (déficits congénitaux, infections bactériennes répétées) ou secondaire (leucémie lymphoïde chronique, myélome, infections à cytomégalovirus après greffe de moelle osseuse, VIH). Les IgIV peuvent également être utilisées pour une toute autre application en rapport avec leurs effets immunorégulateurs d'efficacité clinique prouvée dans des pathologies variées comme certains syndromes auto-immuns (le purpura thrombopénique, la myasthénie, la vascularite de Kawasaki, la polyradiculonévrite de Guillain-Barré) ou pour réduire le risque et la sévérité de la maladie greffon contre l'hôte chez les receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

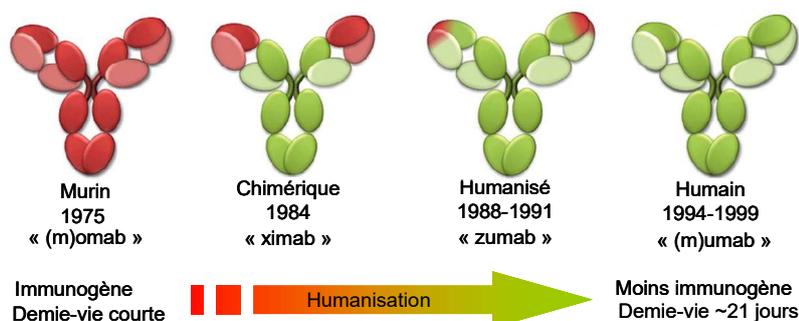
## **2. Les immunoglobulines polyclonales**

Elles peuvent être d'origine humaine ou animale. Les immunoglobulines polyclonales humaines sont obtenues en immunisant des volontaires sains. Il en existe plusieurs sur le marché, les principales étant les immunoglobulines anti-rhésus D (RhD) (Rophylac<sup>®</sup>) indiquées dans la prophylaxie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-RhD chez les femmes RhD-, et les immunoglobulines antitétaniques (Gammatétanos<sup>®</sup>) indiquées dans la prophylaxie du tétanos en cas de plaies souillées chez des populations particulières.

Les immunoglobulines polyclonales animales sont obtenues en immunisant des animaux (lapins, souris, chevaux..) contre des déterminants antigéniques humains. Elles sont principalement représentées par les sérums anti-lymphocytaires (SAL) utilisés en transplantation. Ces SAL sont obtenus par immunisation de lapin (Thymoglobuline<sup>®</sup>) ou de chevaux (Atgam<sup>®</sup>) contre des thymocytes humains.

### 3. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs)

Les mAbs proviennent d'une même lignée cellulaire, et, pour une préparation donnée sont tous identiques et reconnaissent le même épitope sur l'antigène. Cette révolution a eu lieu grâce à la mise au point en 1975 de la technique des hybridomes par Georges Kohler et César Milstein, qui permet de produire *in vitro* des anticorps murins de spécificité unique en quantité quasi illimitée [14]. Cette technique est basée sur la fusion d'un lymphocyte B murin normal produisant un seul anticorps et d'une cellule dite myélomateuse murine immortelle ne sécrétant pas d'anticorps. Cette fusion produit un hybridome immortel producteur d'un anticorps monoclonal, plus particulièrement d'une IgG unique dirigée contre un épitope unique. Les premiers mAbs à visées thérapeutiques étaient intégralement murins et sont entrés en phase d'études cliniques dans les années 1980. Cependant, ces premiers essais ont rapidement montré trois inconvénients qui ont limité leur utilisation en thérapeutique [15]: premièrement de faibles capacités de recrutement des fonctions effectrices du système immunitaire humain par la portion Fc murine, deuxièmement l'induction d'une réponse immunitaire de l'organisme-hôte se manifestant par la production par les patients d'anticorps humains anti-souris (HAMA pour *human anti-mouse antibodies*), et troisièmement une faible persistance dans l'organisme liée à la production d'HAMA. L'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapie humaine a ainsi nécessité la réduction de l'immunogénicité des anticorps. Les progrès en biotechnologie ont permis de réduire la fraction de séquence d'origine murine responsable de réactions immunitaires et de développer des anticorps monoclonaux dérivant à la fois d'ADN humain et murins (chimériques ou humanisés), ou encore des anticorps monoclonaux entièrement humains. La figure 6 reprend la chronologie de ces événements.



**Figure n° 6 : Degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques d'après Paintaud. G et al modifié [16].**

Dans le cas d'anticorps chimériques issus à la fois d'ADN murin et humain, des techniques d'ingénierie génétique sont utilisées pour remplacer le fragment Fc de souris par un fragment de séquence humaine dans le but d'optimiser l'efficacité, la pharmacocinétique (demi-vie d'élimination plus longue) de la molécule ou diminuer son immunogénicité [17, 18]. Un degré supplémentaire de similitude avec les anticorps humains a été obtenu avec les anticorps humanisés. L'anticorps humanisé se distingue de l'anticorps chimérique par ses fragments Fab où seules restent murines les régions hypervariables impliquées dans la reconnaissance des antigènes (CDR) [19]. En dehors de leur appartenance à la même classe d'immunoglobuline (essentiellement IgG) et de la présence d'une portion Fc humaine, les anticorps monoclonaux partiellement ou totalement humains varient dans leur degré d'humanisation (ce qui affecte les séquences peptidiques de leurs chaînes lourdes et légères). Théoriquement le risque d'immunisation contre les anticorps décroît avec leur degré d'humanisation, c'est-à-dire : murins > chimériques > humanisés > totalement humains. Le premier anticorps monoclonal approuvé pour une utilisation thérapeutique est OKT-3 (muromomab, Orthoclone®), en 1986 dans la prévention du rejet de greffon en transplantation rénale humaine. Par ailleurs, différents dérivés d'anticorps mais gardant la capacité de se lier à un antigène ont également été développés : dépourvus de la région Fc, fusionnés à une autre protéine ou conjugués à une autre molécule ou à un radio-isotope. La forme la plus courante des anticorps fragmentés dépourvus de fragment Fc est le fragment Fab. La petite taille de ces différents fragments d'anticorps est intéressante si l'on souhaite une élimination rapide par l'organisme ou une meilleure pénétration au sein des tumeurs solides [20, 21]. Les anticorps fusionnés (ou protéines de fusion) sont constitués du domaine de liaison extracellulaire d'un récepteur donné pour une protéine cible fusionné avec le fragment Fc d'un anticorps (le plus souvent une IgG humaine). Cette construction permet de créer des leurres solubles de la protéine cible en maintenant une élimination lente par l'organisme et une faible immunogénicité grâce à la présence du fragment Fc humain.

Actuellement, une quarantaine d'anticorps monoclonaux et dérivés sont utilisés en thérapeutique en France dans des indications variées telles que l'oncologie et l'immunologie, pour les deux plus importantes, mais aussi l'infectiologie, l'ophtalmologie et les pathologies cardiovasculaires. Le nombre de ces d'anticorps monoclonaux va d'ailleurs continuer à augmenter dans les années à venir puisque plus de 300 étaient en développement en 2013 d'après les données de la

PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America) [22]. Le tableau III présente une classification des principaux mAbs et dérivés utilisés en thérapeutique.

**Tableau III : Principaux mAbs et dérivés utilisés en thérapeutique (d'après Vidal 2015 [23] et Thériaque 2015 [24]).**

	DCI	Spécialité	Construction	Cible	Domaine thérapeutique
Chimériques	Basiliximab	SIMULECT®	IgG <sub>1</sub>	chaîne α du récepteur à IL-2	Immunologie
	Brentuximab Vedotine	ADCTERIS®	IgG <sub>1</sub> ( liée de façon covalente à un agent anti-microtubule)	CD30	Oncologie
	Catumaxomab	REMOVAB®	IgG <sub>2</sub> (rat/souris)	EpCAM et CD3	Oncologie
	Cetuximab	ERBITUX®	IgG <sub>1</sub>	EGFR	Oncologie
	Infliximab	REMICADE®	IgG <sub>1</sub>	TNF-α	Immunologie
	Rituximab	MABTHERA®	IgG <sub>1</sub>	CD20	Oncologie
Humanisés	Bevacizumab	AVASTIN®	IgG <sub>1</sub>	VEGF	Oncologie
	Eculizumab	SOLIRIS®	IgG <sub>2</sub>	Protéine C5 du complément	Immunologie
	Epratuzumab	Epratuzumab (ATU)	IgG <sub>1</sub>	CD 22	Oncologie
	Gemtuzumab ozogamicin	MYLOTARG® (ATU)	IgG <sub>4</sub> ( conjugué à un antibiotique antitumoral cytotoxique, la calichéamicine)	CD33	Oncologie
	Natalizumab	TYSABRI®	IgG <sub>1</sub>	α4-intégrine	Immunologie
	Obinutuzumab	GAZYVARO	IgG <sub>1</sub>	CD20	Oncologie
	Omalizumab	XOLAIR®	IgG <sub>1</sub>	IgE	Immunologie
	Palivizumab	SYNAGIS®	IgG <sub>1</sub>	protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS)	Infectiologie
	Pembrolizumab	Pembrolizumab (ATU)	IgG <sub>4</sub>	PD1	Oncologie
	Pertuzumab	PERJETA®	IgG <sub>1</sub>	HER2	Oncologie
	Tocilizumab	ROACTEMRA®	IgG <sub>1</sub>	R-IL6	Immunologie
	Trastuzumab	HERCEPTIN®	IgG <sub>1</sub>	HER2	Oncologie
	Trastuzumab emtansine	KADCYLA®	IgG <sub>1</sub> ( liée de façon covalente à un agent anti-microtubule)	HER2	Oncologie
	Vedolizumab	ENTYVIO®	IgG <sub>1</sub>	l'intégrine α <sub>4</sub> β <sub>7</sub>	Immunologie
Humains	Adalimumab	HUMIRA®	IgG1	Anti TNF-α	Immunologie
	Belimumab	BENLYSTA®	IgG <sub>1</sub>	protéine BLYS	Immunologie
	Canakinumab	ILARIS®	IgG <sub>1</sub>	IL-1β	Immunologie
	Denosumab	XGEVA®	IgG <sub>2</sub>	RANKL	Maladies osseuses
	Golimumab	SIMPONI®	IgG <sub>1</sub>	TNF-α	Immunologie
	Ibritumomab tiuxetan	ZEVALIN®	IgG <sub>1</sub> (conjugué au chélateur MX-DTPA et marqué au <sup>90</sup> Y)	CD20	Oncologie
	Ipilimumab	YERVOY®	IgG <sub>1</sub>	CTLA4	Oncologie
	Nivolumab	OPDIVO®	IgG4	PD1	Oncologie
	Ofatumumab	ARZERRA®	IgG <sub>1</sub>	CD20	Oncologie
	Panitumumab	VECTIBX®	IgG <sub>2</sub>	EGFR	Oncologie
	Ramucirumab	CYRAMZA®	IgG <sub>1</sub>	VEGFR-2	Oncologie
	Ustekinumab	STELARA®	IgG <sub>1</sub>	IL-12/23	Immunologie
Protéine de fusion	Abatacept	ORENCIA®	Fragment Fc modifié d' IgG <sub>1</sub> -domaine extracellulaire du CTLA4	CD80 et CD86 des CPA ( leurre soluble)	Immunologie
	Aflibercept	ZALTRAP® EYLEA®	Fragment Fc d' IgG <sub>1</sub> -domaine extracellulaire du VEGF 1 et 2	VEGF-A, VEGF-B et PIGF ( leurre soluble)	Oncologie/ Ophthalmologie
	Belatacept	NULOJIX®	Fragment Fc d' IgG <sub>1</sub> (charnière, CH2-CH3)-domaine extracellulaire du CTLA4	CD80 et CD86 des CPA ( leurre soluble)	Immunologie
	Etanercept	ENBREL®	Fragment Fc d' IgG <sub>1</sub> (charnière, CH2-CH3)-domaine extracellulaire du TNF-R2	TNF-α ( leurre soluble)	Immunologie
Fragments	Abciximab	REOPRO®	Fab chimérique	récepteur de la glycoprotéine (GP) IIb/IIIa plaquettaire	Cardiologie
	Certolizumab Pegol	CIMZIA®	Fab humanisé-PEG	TNF-α	Immunologie
	Ranibizumab	LUCENTIS®	Fab humanisé	VEGF-A	Ophthalmologie

## **B. Pharmacodynamie des anticorps monoclonaux thérapeutiques**

Le mode d'action des mAbs et de leurs dérivés passe par différents mécanismes dont les effets peuvent s'additionner et dont il est généralement difficile d'en apprécier la part relative. Cependant le principe général de la thérapeutique par anticorps est de cibler un antigène déterminé dans l'organisme afin d'éliminer des agents pathogènes ou de modifier, moduler ou inhiber un mécanisme physiopathologique. Certains mAbs auront des cibles antigéniques solubles, c'est-à-dire circulantes dans le sang. C'est par exemple le cas de bevacizumab qui a pour cible antigénique le VEGF soluble (ligand du récepteur transmembranaire VEGF-R). D'autres mAbs auront des cibles antigéniques exprimées à la surface de cellules (par exemple le récepteur HER-2 pour le trastuzumab ou HER-1 également appelé EGFR pour le cetuximab).

De façon schématique de cette interaction antigène-anticorps découlera quatre mécanismes d'actions [13] : la neutralisation des éléments circulants (anti-TNF $\alpha$ , bevacizumab par exemple), la modulation de fonctions cellulaires (cas du basiliximab), le dépôt *in situ* de composés toxiques (cas des anticorps conjugués à un cytotoxique tels que le gemtuzumab ozogamicin, le brentuximab vedotine ou le trastuzumab emtansine) et la destruction des cellules cibles (cas du trastuzumab ou du rituximab).

### **1. Neutralisation des éléments circulants**

La fonction neutralisante d'un anticorps consiste à piéger un élément circulant afin de l'empêcher d'atteindre sa cible. Cette neutralisation concerne des cibles antigéniques solubles, comme une toxine, des cytokines, le ligand spécifique d'un récepteur membranaire, ou un antigène exprimé à la surface d'une bactérie ou d'un virus.

Citons l'exemple du bevacizumab qui en se liant au VEGF soluble, empêche sa fixation sur son récepteur (VEGF-R) et bloque ainsi les effets antigéniques et pro-tumoraux que cette liaison active [25]. Citons encore celui de l'omalizumab qui se fixe sur les IgE et empêche leur fixation aux récepteurs Fc $\epsilon$ RI présents sur les basophiles et les mastocytes, réduisant ainsi la quantité d'IgE circulantes pouvant déclencher la chaîne de réactions allergiques [26]. Dans le cas des mAbs ciblant le TNF $\alpha$ , comme l'infliximab, ces derniers se fixent à la fois au TNF $\alpha$  soluble et au

TNF $\alpha$  transmembranaire pour empêcher leur fixation à leur récepteur transmembranaire [27].

## **2. Modulation de fonctions cellulaires**

Un mAb peut agir en tant qu'antagoniste compétitif en se liant à un récepteur membranaire impliqué dans une voie biologique déterminée et empêcher le ligand naturel de s'y fixer bloquant ainsi la transduction du signal intracellulaire. Ainsi le basiliximab et le daclizumab, des immunosuppresseurs, se fixent sur la sous-unité  $\alpha$  (CD25) du récepteur à IL2, empêchant l'IL2 de s'y fixer, et inhibant ainsi la réponse proliférative des lymphocytes T. Le complexe anticorps-antigène formé peut également être internalisé diminuant ainsi la disponibilité du récepteur à la surface de la cellule. C'est le cas du cetuximab qui lorsqu'il est lié à sa cible cellulaire (l'EGFR), le complexe cetuximab-EGFR formé empêche la fixation du facteur de croissance épidermique et son internalisation diminue la densité d'EGFR à la surface cellulaire [28].

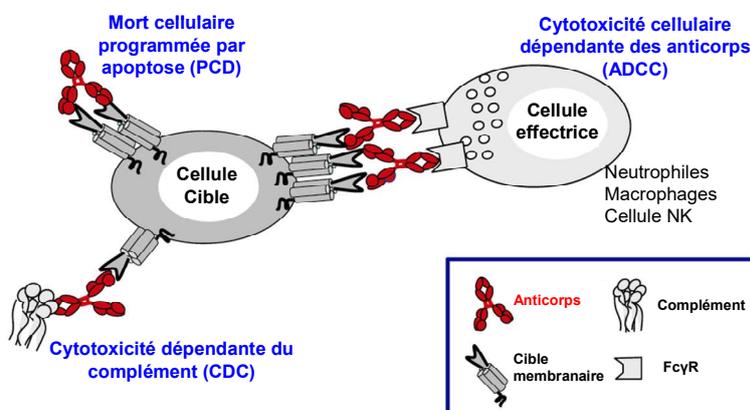
## **3. Ciblage et dépôt in situ de composés toxiques**

Certains mAbs sont couplés à des composés cytotoxiques (radio-isotopes, agents cytotoxiques), qui sont délivrés au niveau des cellules cibles. Ainsi l'ibritumomab tiuxetan est dirigé contre le CD20 et permet de délivrer des radio-isotopes au niveau des cellules B malignes [29]. Comme nous l'avons vu plus haut, l'internalisation peut être exploitée pour délivrer la substance à l'intérieur de la cellule. C'est le cas du gemtuzumab-ozogamicin qui en se fixant par sa partie anticorps au CD33 exprimé par les cellules hématopoïétiques anormales et immatures entraîne la formation d'un complexe qui est ensuite internalisé. Après internalisation, le dérivé de calichéamicine est libéré à l'intérieur des lysosomes de la cellule et se lie à l'ADN ce qui entraîne la rupture du double brin d'ADN et la mort de la cellule [30].

## **4. Destruction des cellules cibles**

Dans le cas des antigènes membranaires, la liaison du mAb à sa cible, en plus de la modulation des fonctions cellulaires décrite plus haut, peut également provoquer la destruction des cellules cibles par différents mécanismes : la mort

cellulaire programmée par apoptose (PCD) ou une lyse par le système immunitaire dépendants de la fraction Fc de l'anticorps représentée par deux grandes voies : la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). La figure 7 est une représentation schématique des différents mécanismes de destruction cellulaire.



**Figure n° 7 : Mécanismes de destruction des cellules cibles après fixation des mAbs à leur cible membranaire [31].**

- ***Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC)***

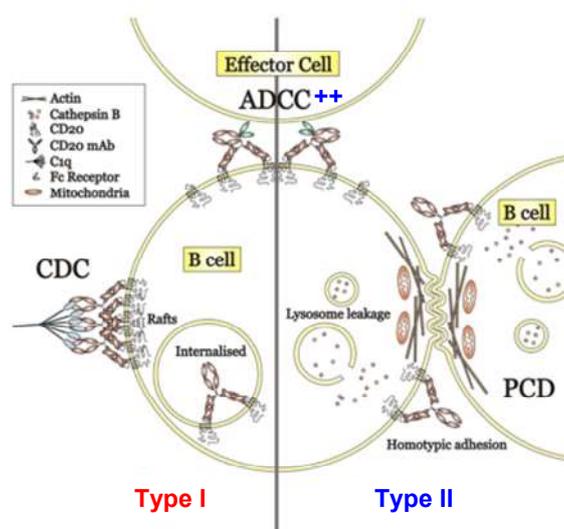
La portion Fc des mAbs fixés sur leur cible se lie aux récepteurs du fragment Fc (FcγR) présents sur les cellules effectrices (polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules NK) chacun spécifique d'une lignée cellulaire. Ainsi les neutrophiles expriment à leur surface le FcγRI, le FcγRIIa FcγRIIC et le FcγRIIIb. Les cellules NK expriment seulement le FcγRIIIa [13, 32]. Il existe un polymorphisme génétique de ces récepteurs qui peut être responsable d'une variabilité de leur affinité pour le fragment Fc des mAbs, avec pour conséquence une variabilité d'efficacité des anticorps thérapeutiques [33-36]. Cependant toutes les études menées n'ont pas mis en évidence de corrélation significative entre la réponse clinique aux mAbs et le polymorphisme génétique portant sur les gènes codant pour les FcγR [37-40].

- ***Cytotoxicité dépendante du complément (CDC).***

La portion Fc des mAbs fixés à leur cible se lie au C1q (protéine du complément) via une partie du domaine CH2 et entraîne l'activation du complément. Ceci conduit soit la phagocytose des cellules cibles par les macrophages, soit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire aboutissant à la destruction de la

cellule cible. Ce même complément peut aussi permettre le recrutement de cellules effectrices. Ce dernier processus est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDCC).

Il est possible qu'un couple antigène-mAb produise plusieurs mécanismes simultanément. La part de chacun des mécanismes est variable selon l'anticorps utilisé. Ainsi, le développement des nouveaux mAbs anti-CD20 opéré pour répondre à la volonté d'augmenter l'efficacité du rituximab et de diminuer ses effets indésirables (le rituximab est le premier anti-CD20 à avoir été développé), ont permis de mettre en évidence que la structure de l'anticorps pouvait modifier la part relative de chacun des mécanismes de lyse cellulaire impliqués dans le mécanisme d'action de l'anticorps. Le degré de glycosylation de la fraction Fc, les substitutions au niveau de la région charnière ou la conformation spatiale de la région contenant l'épitope seraient autant de facteurs impliqués dans la capacité d'un mAb à engager préférentiellement un des mécanismes de destruction cellulaire précédemment décrit [41, 42]. Ainsi la réduction de la fucosylation de la région Fc de l'obinutuzumab (mAb humanisé anti-CD20 de troisième génération) a permis d'optimiser la liaison Fc-FcγRIIIa et d'améliorer la puissance de l'ADCC par rapport au chef de file le rituximab [31]. Cet anticorps a de plus une région charnière conçue pour fournir une meilleure réticulation du CD-20 qui semble améliorer considérablement l'apoptose. De ces développements a émané une classification des mAbs anti-CD20 en fonction du ou des processus de lyse cellulaire qu'ils engagent (type I et type II) [41, 43]. La figure 8 schématise cette classification.



**Figure n° 8: Différents mécanismes de destruction cellulaire des anticorps monoclonaux anti-CD20 (types I et II) (d'après Beers et al/ modifié [43]).**

Les mAbs anti-CD20 de type I sont capables d'engager une destruction cellulaire par ADCC et CDC mais ne suscitent pas (ou peu) de mort cellulaire programmée (PCD), alors que les mAbs anti-CD20 de type II peuvent médier une mort cellulaire programmée lysosomiale (PCD) et engager une ADCC (plus importante que les mAbs de type I) mais n'orientent pas (ou peu) vers une mort par CDC.

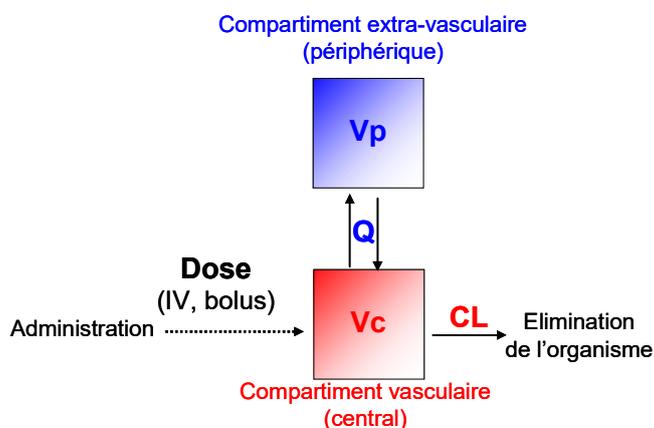
### **C. Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques**

La pharmacocinétique (PK) a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme de son administration jusqu'à son élimination. Elle comprend généralement 4 étapes désignées sous le nom d'ADME : absorption (A), distribution (D), métabolisation (M) et excrétion (E) du médicament et de ces métabolites. Les deux dernières étapes (métabolisation et excrétion) peuvent être regroupées dans le processus d'élimination quantifié par la clairance (CL), un des paramètres pharmacocinétiques (PK) des médicaments.

Depuis les années 2000 la PK des mAbs a été étudiée par plusieurs équipes [11-13, 44-62]. Etant donné que les mAbs sont des molécules hydrophiles et de haut poids moléculaire, il n'est pas étonnant de constater que leur profil PK soit différent de celui des médicaments chimiques « classiques ». Cependant, comme les médicaments de nature chimique, les anticorps suivent les principales phases du devenir d'un médicament dans l'organisme à savoir l'absorption, la distribution et l'élimination. La PK des mAbs administrés par voie IV est généralement décrite selon un modèle bi-compartimental [11, 12, 45, 46, 54, 63].

L'approche compartimentale assimile l'organisme à un réseau de compartiments. Ce sont des volumes fictifs, sans réalité physiologique, dans lesquels la concentration du médicament est instantanément homogène. Ce modèle bi-compartimental correspond au cas où le médicament n'est plus distribué de façon homogène dans tout l'organisme et où il est possible de différencier deux groupes de fluides biologiques ou de tissus dans lesquels la distribution du médicament est homogène. Les échanges entre ces compartiments peuvent le plus souvent être décrits par des constantes de transfert d'ordre 1 comme c'est le cas pour les mAbs. Le compartiment « central » correspond le plus souvent au milieu sanguin, alors que le compartiment périphérique correspond le plus souvent aux tissus et organes dans lesquels la concentration du médicament n'est pas immédiatement en équilibre avec

celle du compartiment central. L'élimination peut le plus souvent être décrite comme se faisant à partir du compartiment central. Le modèle bi-compartimental peut se schématiser selon la figure 9 ci-dessous.



**Figure n° 9 : Modèle bicompartimental des mAbs administrés par voie IV.**

Le modèle est décrit à l'aide des volumes de distribution des compartiments central et périphérique, respectivement  $V_c$  et  $V_p$ , et des clairances d'élimination  $CL$  et de distribution  $Q$ . La clairance est la constante de proportionnalité qui relie la vitesse de transfert du principe actif à sa concentration dans un compartiment à un instant donné (une clairance est mesurée en unité de débit par un temps, mL/min ou mL/heure par exemple). Il peut s'agir d'une clairance d'élimination si l'on fait référence à la vitesse de transfert vers l'extérieur de l'organisme ou d'une clairance de distribution si l'on fait référence à la vitesse de transfert entre le compartiment sanguin et des compartiments extravasculaires.

## 1. Absorption

En raison de leur haut poids moléculaire, leur relativement faible perméabilité membranaire et leur instabilité dans les conditions du tractus gastro-intestinal, l'administration parentérale est la voie d'administration la plus utilisée pour les mAbs et leurs dérivés. La majorité des mAbs sont administrés par voie intraveineuse (IV), intramusculaire (IM) ou sous-cutanée (SC). Les mécanismes d'absorption après administration par les voies SC et IM ne sont pas encore complètement élucidés mais il a été suggéré que l'absorption systémique des mAbs résulterait de la diffusion de l'IgG à travers les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques par convection [46].

Etant donné que le flux lymphatique chez l'homme est relativement lent, le processus de distribution des mAbs après injection SC ou IM peut durer plusieurs jours. Ainsi, la concentration plasmatique maximale est atteinte entre 1 et 8 jours après l'administration avec une grande variabilité inter-individuelle.

## **2. Distribution**

Le devenir d'un anticorps monoclonal dans l'organisme dépend de sa distribution et de son élimination. Globalement, à l'image des anticorps endogènes, les anticorps monoclonaux diffusent mal et de manière hétérogène dans les tumeurs en raison de leur poids moléculaire élevé et de leur hydrophilie. Cependant, ils pénètrent dans les cellules soit par convection, par endocytose en phase fluide notamment dans les cellules endothéliales, ou par endocytose médiée par un récepteur via le récepteur FcγR exprimé à la membrane des cellules immunologiques [12, 64, 65]. Le transport par convection est conditionné par le gradient de pression hydrostatique entre le compartiment sanguin et le compartiment tissulaire et la taille des pores tissulaires [46, 66, 67]. La distribution par convection dépend de la physiologie tumorale et des caractéristiques de l'anticorps. Les paramètres liés à la vascularisation de la tumeur (perméabilité, débit sanguin), la différence de pression observée entre le capillaire tumoral et le liquide interstitiel semblent ainsi déterminer la distribution tumorale des IgGs par convection [68, 69]. La phase de distribution apparaît déterminante pour les anticorps à visée tissulaire afin qu'ils puissent atteindre leur cible antigénique. Ainsi, un autre facteur limitant la diffusion tumorale de ces anticorps apparaît être l'affinité pour l'antigène membranaire cible et l'intensité de l'expression antigénique [70, 71]. Enfin, la masse moléculaire peut également constituer un facteur limitant. Les fragments Fab (50 KDa) présentent une diffusion plus rapide et plus homogène que l'anticorps entier (150 KDa) [72]. Néanmoins, l'utilisation des fragments Fab peut être limitée par leur demi-vie d'élimination courte (inférieure à 12 heures) et par l'absence du fragment Fc impliqué dans l'activité cytotoxique.

## **3. Elimination**

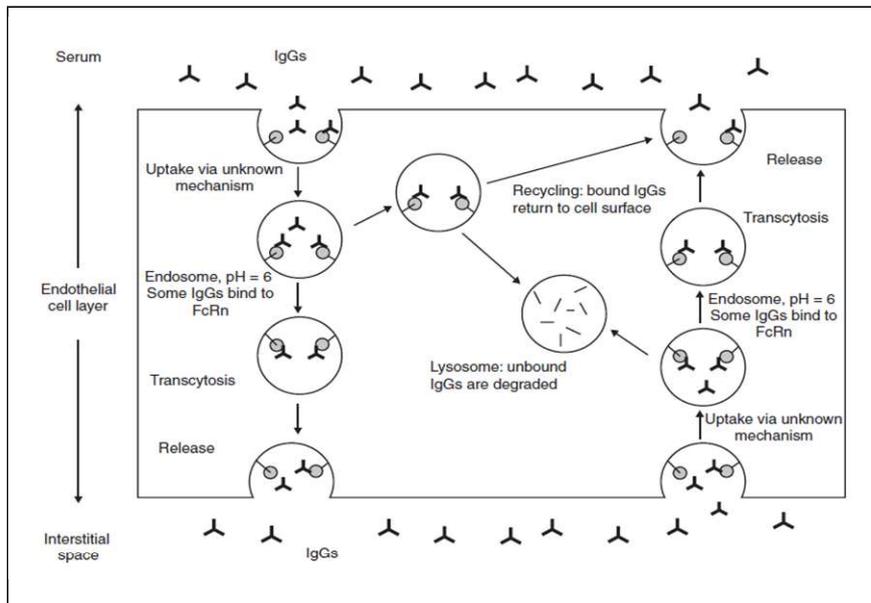
La biotransformation hépatique et l'excrétion biliaire et rénale sont les principaux mécanismes par lesquels les médicaments de petite taille sont éliminés de l'organisme. Le catabolisme hépatique et la filtration rénale peuvent également

être une voie d'élimination importante pour les protéines thérapeutiques de faible poids moléculaire. Les fragments Fab (< 60 kDa) sont filtrés et éliminés efficacement dans le rein, le taux d'élimination étant à peu près égal au taux de filtration glomérulaire. Mais il paraît évident que les mAbs du fait de leur poids moléculaire élevé (150 kDa) ne suivent pas ces voies habituelles d'élimination des médicaments. Les différentes voies d'élimination des mAbs ne sont pas très bien élucidées et plusieurs mécanismes sont actuellement envisagés. L'élimination des mAbs implique trois différentes voies : l'élimination intracellulaire non spécifique, l'élimination spécifique médiée par la liaison à la cible antigénique et l'élimination par production d'anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique [13, 45]. La clairance totale d'un mAb donné est par conséquent la somme de tous ces mécanismes.

- ***Élimination intracellulaire non spécifique***

Par analogie avec les IgG endogènes, les mAbs subirait un catabolisme lysosomal au sein des cellules dans lesquels ils sont internalisés de façon non spécifique (indépendamment du fragment Fab). Ces processus d'internalisation incluent l'internalisation par pinocytose en phase fluide et l'internalisation via la liaison du fragment Fc au récepteur FcγR présent à la surface des cellules du système immunitaire [12, 45, 73]. Étant donné leur rôle dans la réponse immunitaire innée, les récepteurs FcγR peuvent être impliqués dans la clairance des complexes immuns mAb-antigène solubles ou des cellules du système immunitaire opsonisées par le mAb fixé à sa cible antigénique de surface. Toutefois, l'importance du catabolisme médié par le récepteur FcγR dans l'élimination des mAbs n'est pas encore connue.

Cependant l'élimination non spécifique des anticorps monoclonaux (dépendant du fragment Fc) peut être régulée par l'intervention d'un autre récepteur qui est saturable, le FcRn situé à la surface des cellules endothéliales, des cellules intestinales, des cellules glomérulaires rénales, des monocytes et des macrophages [74, 75]. Identifié il y a plus de 30 ans, ce récepteur protège les IgG du catabolisme endogène. D'après le modèle proposé par Gheti et Ward [74], l'interaction FcRn-IgG serait dépendante du pH : les IgGs après leur endocytose, sont captées par le FcRn à pH acide (6,0) et relarguées à pH neutre (7,3) (figure 10). L'anticorps internalisé dans ces vésicules intracellulaires est ainsi protégé de la dégradation lysosomiale et peut être relargué à la surface cellulaire pour être à nouveau disponible. Les IgGs endocytées mais non fixées au FcRn sont dégradées dans les lysosomes.



**Figure n° 10 : Processus de recyclage et migration trans-cellulaire des anticorps monoclonaux via le récepteur FcRn au sein de la cellule endothéliale [63, 64].**

Le FcRn aurait une affinité particulière pour le fragment Fc des IgGs d'origine humaine et l'affinité pour les IgG1, IgG2 et IgG4 serait supérieure à celle des IgG3 [63]. Toutefois, parmi les anticorps humanisés commercialisés aucun n'est de type IgG3 [23, 24]. Le FcRn possède en outre une faible affinité pour les IgGs d'origine murine [63]. Ce système de recyclage exposé dans la figure 10, retarde donc la dégradation et prolonge la demi-vie d'élimination plasmatique des anticorps monoclonaux humanisés [63].

Ainsi, l'absence de fragment Fc dans les fragments Fab est responsable de leur demi-vie d'élimination plus courte (environ 12 heures) car ils échappent à ce phénomène de recyclage. Les mAbs murins dont le fragment Fc n'est pas d'origine humaine ont également une demi-vie d'élimination plus courte du fait de la moindre affinité pour le récepteur FcRn par rapport aux mAbs présentant dans leur structure un fragment Fc humain.

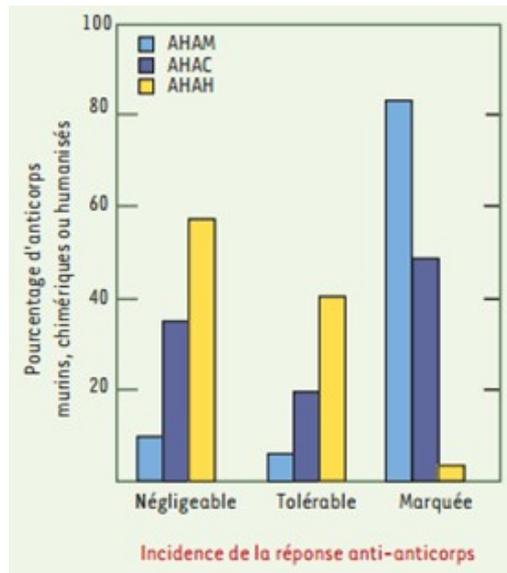
Par ailleurs, des études menées sur des lignées cellulaires polarisées ont démontré que le transport des IgGs était bi-directionnel : le FcRn peut transporter les IgGs du pôle apical vers le pôle basolatéral ainsi que du pôle basolatérale vers le pôle apical des cellules, suggérant un rôle du FcRn dans la transcytose des mAbs et donc une contribution à leur pénétration tissulaire [45]. Cependant sa part relative dans le processus de distribution des mAbs n'est pas connue.

- ***Élimination spécifique médiée par la liaison à l'antigène***

L'interaction entre le mAb et sa cible antigénique peut contribuer au processus d'élimination des mAbs. Ce mécanisme intervient après internalisation du complexe mAb-antigène cellulaire entraînant la dégradation lysosomiale du complexe. Le nombre de site antigénique à la surface cellulaire est limité, de ce fait ce phénomène est saturable et dose dépendant. Il en résulte une clairance non linéaire par ce mécanisme d'élimination. La part relative de l'élimination médiée par la liaison antigénique dans la clairance totale des mAbs dépend de nombreux facteurs dont la concentration et la distribution du récepteur, l'affinité du mAb pour sa cible, et le taux de récepteurs internalisés et recyclés [45].

- ***Élimination par production d'anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique***

La troisième voie d'élimination envisagée correspond à la neutralisation de l'anticorps monoclonal par des anticorps produits par l'organisme et dirigés contre les anticorps thérapeutiques car reconnus comme étranger à l'organisme. Les anticorps induits sont nommés HAMA (human anti-mouse antibodies), HACA (human anti-chimeric antibodies) et HAHA (human anti-human antibodies). Leur développement peut accélérer l'élimination des anticorps de l'organisme [76, 77]. Ceci a été démontré pour l'infliximab (anticorps chimérique) dans le traitement de la maladie de Crohn où le développement d'HACA a des répercussions sur la pharmacocinétique de l'anticorps et entraîne une diminution des concentrations plasmatiques résiduelles [76, 78]. Plusieurs études ont été menées afin d'évaluer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux en fonction de leur degré d'humanisation et l'impact de l'immunogénicité sur la PK des mAbs [79].



**Figure n° 11 : Incidence de la réponse immunogène selon le type d'anticorps induits [79].**

L'analyse bibliographique menée par Hwang et Foote qui est partiellement rapportée dans la figure 11, a comparé l'immunogénicité des anticorps murins, chimériques et humanisés [79]. Une réponse est qualifiée de négligeable lorsqu'elle se produit chez moins de 2 % des patients, tolérable lorsqu'elle se produit chez 2 à 15 % des patients et marquée lorsqu'elle se produit chez plus de 15 % d'entre eux. Sur la question « est ce que les anticorps humanisés sont moins immunogènes que les chimériques ? », ces résultats apportent deux éléments de réponse : la chimérisation a largement contribué à réduire l'immunogénicité des anticorps mais la faible immunogénicité des anticorps humanisés ne peut être affirmée. En effet, bien que les réponses « marquées » soient nettement plus faibles pour ces derniers, les réponses « négligeables » et « tolérables » sont comparables aux résultats recensés avec les chimériques. Enfin, si le degré d'humanisation des anticorps thérapeutiques a permis de diminuer la survenue d'anticorps induits, il a toutefois été rapporté que les anticorps totalement humains peuvent rester immunogènes. En effet, dans une étude menée chez des patients traités par adalimumab (anti-TNF $\alpha$  humain) dans le cadre d'une arthrite rhumatoïde, la formation d'anticorps anti-adalimumab a été rapportée chez 17 % des patients traités. La présence d'HAHA anti-adalimumab était associée à une diminution des concentrations sériques en adalimumab [77]. Ces résultats ont été confirmés pas d'autres études menées sur l'adalimumab et aussi sur un autre anti-TNF $\alpha$  humain le golimumab [80, 81]. Ces études mettent en évidence les limites des techniques actuelles de productions des mAbs à réduire l'immunogénicité des biothérapies.

Cependant les études menées sur le panitumumab (anticorps humain dirigé contre l'EGFR) ont démontré un taux très bas d'HAHA de l'ordre de 3 à 4 % n'ayant pas d'impact significatif sur la pharmacocinétique de cet anticorps [28, 82, 83]. Les raisons pour lesquelles certains anticorps thérapeutiques humains développent des anti-anticorps et pas d'autres ne sont pas clairement élucidées mais il semblerait qu'elle soit liée à une immunogénicité résiduelle dans la région hypervariable (CDR) de l'anticorps [28]. Concernant le bevacizumab aucune réponse immunogène n'a été quantifiée à ce jour essentiellement par défaut de recherche d'anticorps induits dans les cohortes étudiées. Des études sur de plus larges cohortes avec le recours à des techniques de dosages des anticorps induits fiables et robustes permettraient de mieux définir le taux attendu de ces anticorps pour chaque mAb.

#### **D. Variabilité pharmacocinétique inter-individuelle des anticorps monoclonaux thérapeutiques**

Une variabilité PK interindividuelle existe pour les anticorps monoclonaux, au même titre que pour les médicaments classiques [45, 63]. La variabilité interindividuelle relative à la PK des anticorps thérapeutiques a été rapportée très tôt notamment lors des premières études sur le rituximab (anti-CD20 chimérique) [52] et l'approche de population s'est progressivement imposée pour permettre de prendre en compte cette variabilité et d'en étudier les sources. Par la suite cette variabilité PK a été confirmée par plusieurs études menées sur des mAbs utilisés dans l'arthrite rhumatoïde. Celles-ci ont rapporté des coefficients de variations (CV %) interindividuels portant sur différents paramètres pharmacocinétiques et compris entre 12 et 97 % pour le volume central de distribution ( $V_c$ ) et entre 17 et 44 % pour la clairance d'élimination (CL) [84]. Il est à noter que la PK n'a pas été étudiée avec le même niveau de détail pour tous les anticorps. Celle du rituximab et des anti-TNF $\alpha$  a été assez bien étudiée [52, 85], alors que celle du bevacizumab reste partiellement connue. Certaines études suggèrent que pour les anticorps à visée plasmatique les mécanismes d'élimination des mAbs seraient principalement responsables de cette variabilité PK [86], tandis que pour les anticorps à cibles cellulaires viendraient s'ajouter les mécanismes de distribution dans le compartiment tissulaire.

## 1. Origine de la variabilité interindividuelle

Avec la généralisation des analyses pharmacocinétiques de population, les sources de variabilité pharmacocinétique interindividuelle commencent à être identifiées et leur influence mériterait d'être mieux intégrée dans l'adaptation posologique individuelle. Les sources identifiées peuvent être des paramètres démographiques, biochimiques, relatifs à la masse tumorale ou à l'apparition d'anticorps neutralisants [33, 63].

- ***Facteurs démographiques***

L'étude de l'influence des facteurs démographiques (âge, sexe, poids, surface corporelle...) et des paramètres biochimiques (marqueurs de l'inflammation, albuminémie, phosphatases alcalines...) fait partie intégrante de l'analyse pharmacocinétique de population. L'influence du poids, de la surface corporelle et du sexe sur les volumes de distribution et sur les clairances sont très souvent retrouvés [84]. Généralement les volumes de distribution et/ou la clairance des mAbs augmentent avec le poids ou la surface corporelle et s'avèrent être plus élevés chez l'homme que chez la femme. Par exemple quand le poids augmente de 50 à 90 kg, le volume de distribution central (compartiment sanguin) est doublé pour l'infliximab [87] et le golimumab [61]. Quant à la clairance dans le cas de l'adalimumab [88] et du rituximab [52] elle est environ 40 % plus élevée chez l'homme que chez la femme. L'influence du poids et de la surface corporelle justifie actuellement l'ajustement des doses des mAbs sur le poids. Cependant, aucune adaptation des doses sur le sexe n'est à l'heure actuelle recommandée. Par ailleurs des études de modélisation PK ont intégrés le poids comme co-variable d'intérêt dans leur modèle et ont ainsi mis en évidence que le poids n'était pas un facteur majeur de la variabilité PK pour certains mAbs. En se basant sur ces études plusieurs mAbs sont actuellement développés avec une administration par voie sous-cutanée à une dose fixe. L'intérêt de cette voie d'administration et de la dose fixe est la facilité de la préparation (seringues pré-remplies) et de l'administration de ces thérapies (soins ambulatoires à domicile du patient). Cependant il reste encore des incertitudes sur les schémas thérapeutiques proposés notamment pour les poids extrêmes et sur la fréquence d'administration. Ainsi l'administration des mAbs à dose fixe ou à dose normalisée au poids (ou à la surface corporelle) suscite encore des débats.

- **Facteurs biochimiques**

Plusieurs études ont rapporté que le taux sérique d'albumine influencerait la PK des mAbs. Ceci a notamment été rapporté pour l'infliximab, le bevacizumab et le cetuximab [51, 62, 89].

Dans le cas de l'infliximab, une relation inversement proportionnelle a été observée entre le taux d'albumine sérique et la clairance de l'infliximab [51, 62, 89]. Les auteurs expliqueraient cette relation par le fait que les IgGs et l'albumine partagent le même mécanisme de protection contre le catabolisme lysosomal via le récepteur FcRn bien qu'ils ne partageraient pas le même site de liaison. C'est pourquoi un faible taux d'albumine pourrait refléter une diminution de l'activité du récepteur FcRn et par conséquent une diminution de la quantité d'infliximab recyclé favorisant la clairance de l'anticorps. Cependant, l'interprétation du taux d'albumine en tant qu'indicateur de l'expression du FcRn est limitée par la variabilité pathologique du taux d'albumine d'un patient à l'autre.

Cette relation a également été rapportée chez des patients traités par le bevacizumab où les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la clairance du bevacizumab inversement proportionnelle au taux d'albumine. Leur explication serait qu'un faible taux d'albumine, qui signe d'un syndrome inflammatoire, reflèterait le degré de sévérité de la maladie et serait corrélé à la charge tumorale ce qui pourrait augmenter la clairance du médicament par élimination du complexe antigène-anticorps soluble [51].

- **Immunsation**

Comme évoqué précédemment, les mAbs peuvent induire chez l'hôte une réaction immunitaire de l'hôte dirigée contre ces derniers. Il en résulte la production d'anticorps anti-mAbs (anticorps induits) pouvant impacter la PK des mAbs et essentiellement le processus d'élimination [77, 80, 81, 90]. Dans le cadre des études menées sur les anti-TNF $\alpha$ , la présence d'anticorps induits est associée à une diminution des concentrations sériques d'infliximab [91] ou d'adalimumab [77]. L'élimination des mAbs par les anticorps induits s'ajouterait alors à l'élimination « physiologique » et leur présence et également leur taux pourrait être un facteur à prendre en compte dans la variabilité PK interindividuelle observée pour les mAbs.

- ***Masse antigénique***

L'influence du nombre de cibles antigéniques sur la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques a été rapportée chez des patients traités par rituximab (anti-CD20) où les concentrations sériques en rituximab étaient inversement corrélées avec la numération en lymphocytes B [92, 93]. Cette notion a également été rapportée pour le trastuzumab (anticorps humanisé anti-HER2) pour lequel des études pharmacocinétiques de population ont intégré la quantité initiale de cibles antigéniques (HER2) en tant que co-variable du volume de distribution et de la clairance [94]. Ceci s'expliquerait par le processus d'élimination spécifique médié par la liaison du mAb à sa cible antigénique décrite précédemment.

- ***Polymorphisme du gène codant pour le récepteur FcRn (FCGRT)***

En raison des fonctions du FcRn dans le recyclage et la transcytose des IgGs précédemment décrites, le polymorphisme génétique du FCGRT (gène codant pour le récepteur Fc néonatal ou FcRn) qui a été rapporté au cours de plusieurs études pourrait être une source potentielle de la variabilité interindividuelle de la PK des mAbs [95]. Cependant, il reste encore à démontrer que les polymorphismes de FcRn peuvent affecter la pharmacocinétique des mAbs et les études sont assez controversés sur ce sujet [95]. Les biais évoqués sont essentiellement liés à la petite taille des cohortes étudiées et à l'hétérogénéité des mutations screenées.

## **2. Relation exposition plasmatique-effet des anticorps monoclonaux thérapeutiques**

L'importante variabilité de la réponse thérapeutique et de la survenue d'effets indésirables pour une même dose de mAb administrée est un problème clinique préoccupant. L'explication de la variabilité de la réponse clinique aux mAbs reste à l'heure actuelle mal connue. Plusieurs pistes sont étudiées et les résultats des études PK menées sur les différents mAbs suggèrent que le niveau de variabilité PK interindividuelle est suffisamment significatif pour impacter l'effet clinique du traitement [96]. Dans ce contexte, une corrélation entre les concentrations plasmatiques et la réponse clinique a été mise en évidence pour certains anticorps monoclonaux. Les travaux conduits sur l'infliximab ont mis en évidence une corrélation entre les concentrations plasmatiques et la réponse au traitement dans la maladie de Crohn [97] ou la polyarthrite rhumatoïde [62]. Dans une étude japonaise,

les concentrations sériques en rituximab étaient significativement plus élevées chez les répondeurs que chez les non répondeurs [55]. D'autres études ont également montré que l'exposition plasmatique du rituximab était corrélée à la survie sans progression (PFS) [92]. Enfin, deux travaux conduits sur le cetuximab en monothérapie ont rapporté une corrélation entre les concentrations plasmatiques et la réponse anti-tumorale [89, 98].

Ces premiers résultats évaluant la relation entre l'exposition plasmatique des mAbs et l'effet clinique laissent suggérer qu'un effet maximal des mAbs pourrait être obtenu en saturant les cibles antigéniques disponibles. Il serait alors intéressant d'établir des schémas posologiques en fonction des profils de patients visant à maintenir des concentrations induisant un effet maximal tout en minimisant les doses et rythmes d'administrations (et donc les effets indésirables potentiels). Compte tenu des variabilités interindividuelles, ces schémas posologiques devraient être adaptés à chaque profil de patients. C'est ce qu'on appelle le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) ou *therapeutic drug monitoring* (TDM) qui se consiste à individualiser la dose d'un médicament par le maintien de sa concentration dans un milieu biologique (le plus souvent le plasma) dans un intervalle thérapeutique pré-établi.

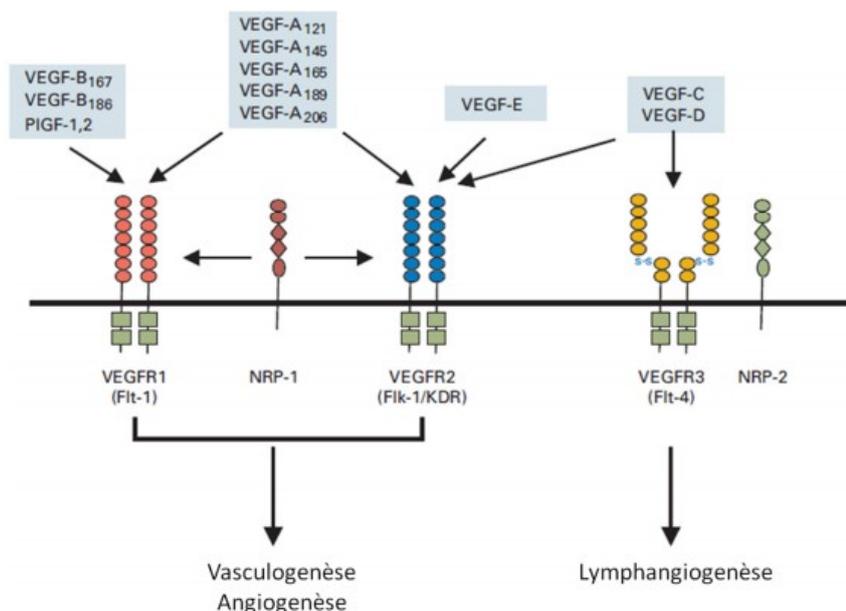
Cependant en dépit de certains résultats encourageants le TDM des mAbs nécessite des études PK supplémentaires d'un niveau de preuves scientifiques plus élevé. A cet effet, des études devraient être réalisées dans le cadre d'essais randomisés contrôlés : études interventionnelles (STP avec adaptation posologique versus attitude standard). De telles études permettraient d'une part de confirmer avec un niveau de preuve suffisant la relation exposition-effet rapportée pour certains mAbs (études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques, PK/PD) et d'autre part de définir avec quel(s) paramètre(s) PK l'effet clinique est corrélé (concentrations plasmatiques résiduelles, exposition globale estimée par l'aire sous la courbe des concentrations entre deux administrations, clairance du médicament...). De plus, pour déterminer ces posologies idéales pour chaque patient il serait nécessaire de déterminer les seuils du ou des paramètres PK suivis en deçà duquel l'effet risque de ne pas être maximal et au-delà duquel on risque d'augmenter la toxicité (fenêtre thérapeutique).

## **E. L'anticorps monoclonal thérapeutique bevacizumab (AVASTIN®)**

Parmi les anticorps thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à un anticorps humanisé, le bevacizumab, commercialisé sous le nom d'Avastin®, qui cible le facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF) soluble. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 caractérisé par un poids moléculaire d'environ 149 000 Da soit 1 320 acides aminés [25]. Il est constitué d'une partie constante d'origine humaine (93 %) et d'une partie variable d'origine murine (7 %) qui correspond au site de liaison à sa cible le VEGF [99].

### **1. Le VEGF, promoteur de l'angiogenèse tumorale**

Le VEGF est un régulateur clé de l'angiogenèse en situation physiologique et pathologique. Il intervient très précocement dans le développement tumoral et représente le plus puissant et le plus spécifique des différents facteurs angiogéniques identifiés à ce jour [100, 101]. Il s'agit d'une glycoprotéine qui comprend plusieurs isoformes (VEGF-A, -B, -C et -D) dont le majeur représentant est le VEGF-A. Les différents membres de la famille du VEGF agissent via 3 récepteurs spécifiques VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Ce sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase [102-104]. L'activation du récepteur à activité tyrosine kinase après fixation du VEGF au VEGFR est alors responsable de plusieurs effets biologiques indispensables au processus d'angiogenèse tels que la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales à l'origine d'une néo-vascularisation tumorale. Les VEGFRs sont exprimés sur les cellules endothéliales principalement mais également sur d'autres cellules : monocytes, macrophages et cellules souches hématopoïétiques [103]. Ces derniers présentent un spectre d'expression cellulaire différent en fonction du type de récepteur concerné. Les deux principales isoformes impliquées dans le phénomène d'angiogenèse et essentiellement retrouvées au niveau des cellules endothéliales sont les isoformes VEGFR-1 et VEGFR-2 alors que le VEGFR-3 lui est plutôt impliqué dans les processus de lymphangiogenèse [102, 103]. Par ailleurs, son action sur l'induction de protéinases conduit à un remodelage de la matrice extracellulaire, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un maintien des vaisseaux néoformés. L'ensemble de ces caractéristiques est résumé dans la figure 12.



**Figure n° 12 : Axe VEGF/VEGF-R et angiogenèse [102].**

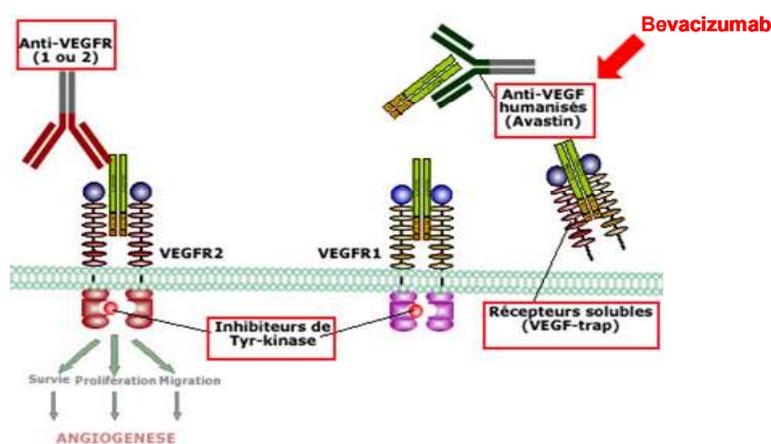
Cette voie de signalisation est souvent suractivée dans de nombreux cancers. En effet, une tumeur maligne, ou cancer, comme tout tissu sain, nécessite de l'oxygène et des nutriments pour sa croissance. Dans ce contexte l'angiogenèse tumorale correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur facilitant non seulement la croissance de la tumeur, mais aussi la dissémination de cellules cancéreuses vers d'autres organes distants à l'origine des métastases [105]. L'étape clé du phénomène d'angiogenèse tumoral est le « switch angiogénique », qui correspond à un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques au profit des facteurs pro-angiogéniques entraînant une modification du profil d'expression du VEGF tendant vers l'augmentation de sa transcription [102, 106]. Ce déséquilibre en faveur d'une activité angiogénique accrue survient tôt dans la progression tumoral et il est même fréquemment présent dans les stades précancéreux [107]. Une surexpression de VEGF est également associée à une progression tumorale [108, 109]. Dans les cancers colorectaux une expression élevée du VEGF a d'ailleurs été corrélée à l'invasion cellulaire, la densité vasculaire, le développement de métastases et le pronostic [110, 111].

## **2. Le bevacizumab : inhibition de l'axe VEGF/VEGF-R**

Connaissant son rôle central dans l'angiogenèse tumorale, l'axe VEGF/VEGF-R est une cible clé en oncologie en association avec une chimiothérapie cytotoxique.

Les approches pharmacologiques présentes sur le marché pour inhiber la voie du VEGF et exposées sur la figure 13 sont :

- **le blocage du VEGF circulant** par un anticorps monoclonal humanisé (bevacizumab, Avastin®) ou par un leurre soluble du récepteur au VEGF (aflibercept, Zaltrap®)
- **l'inhibition de la fonction tyrosine kinase** des récepteurs du VEGF par des petites molécules : inhibiteurs de tyrosines kinases (sunitinib, Sutent®), (sorafenib, Nexavar®).



**Figure n° 13 : Stratégie d'inhibition de l'axe VEGF/VEGF-R.**

Le bevacizumab en se liant au VEGF inhibe la liaison de ce dernier à ses récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2, situés à la surface des cellules endothéliales neutralisant ainsi son activité biologique [109]. En bloquant la fixation du VEGF aux VEGF-Rs il permet une involution des néo-vaisseaux tumoraux, d'où une réduction de la perfusion tumorale et de la croissance tumorale. Ce mécanisme a notamment été mis en évidence lors de l'administration du bevacizumab dans des modèles de transplantation de cancers humains chez les souris nudes qui ont montré une réduction de la croissance des micro-vaisseaux et une inhibition de la progression des métastases [112-114].

Le bevacizumab est indiqué dans divers cancers en association à une chimiothérapie cytotoxique. Le bevacizumab a obtenu sa première AMM (autorisation de mise sur le marché) en 2005 pour le traitement en première ligne du cancer colorectal métastatique (CCRm). Cette AMM a par la suite été élargie à la deuxième ligne du traitement du CCRm en 2008, au cancer du sein métastatique, au cancer bronchique non à petite cellules métastatique ou non opérable, au cancer du rein métastatique ou avancé et au cancer épithélial des ovaires récidivant [23, 25].

### **3. Données pharmacocinétiques du bevacizumab**

- ***Données générales***

A l'heure actuelle la PK du bevacizumab a essentiellement été étudiée sur des populations issues d'essais de phase I, II et III. Dans toutes les études cliniques, le bevacizumab était administré par perfusion IV. La PK du bevacizumab était linéaire aux doses allant de 1 à 10 mg/kg intégrant donc les posologies utilisées en thérapeutique pour le CCRm (5 et 7,5 mg/kg) [48]. Les concentrations plasmatiques obtenues à l'issue des différentes études PK étaient comprises entre 71,1 µg/mL et 412 µg/mL pour la concentration maximale (C<sub>max</sub>), et entre 13,5 µg/mL et 172 µg/mL pour la concentration résiduelle (concentration obtenue juste avant l'administration suivante) [48]. Les études PK de populations suggèrent un modèle bi-compartimental avec une cinétique d'élimination d'ordre 1 pour décrire les variations des concentrations plasmatiques du bevacizumab en fonction du temps [50, 51, 53]. Les paramètres PK estimés à partir de ces modèles oscillent pour la clairance (CL) de 0,17 à 0,260 L, pour la clairance de distribution (Q) de 0,36 à 0,636 L, et pour les volumes de distribution de 3,26 à 2,39 L et de 2,63 à 2,49 L respectivement pour le volume de distribution central (V<sub>c</sub>) et le volume de distribution extravasculaire (V<sub>p</sub>) [50, 51, 53]. La faible clairance (CL) peut s'expliquer par le phénomène de recyclage précédemment décrit que subit le bevacizumab (au même titre que les autres mAbs) par fixation du fragment Fc au FcRn. Il en résulte une demi-vie d'élimination plasmatique rapportée de 20 jours ce qui coïncide avec la demi-vie d'élimination des IgGs endogènes humaines, qui est comprise entre 18 et 23 jours [51]. La faible clairance de distribution (Q) et le faible volume de distribution suggèrent une distribution extravasculaire limitée qui peut s'expliquer par le haut poids moléculaire des mAbs et par la présence dans la circulation sanguine de la cible antigénique du bevacizumab, le VEGF.

- ***Variabilité pharmacocinétique interindividuelle***

Les études PK précédemment menées ont rapporté une variabilité interindividuelle portant sur la clairance et le volume de distribution de l'ordre de 30 % impliquant quelques co-variables d'intérêt telles que le poids, le sexe et le taux d'albumine [50, 51, 53, 58, 115]. Dans l'étude de Lu *et al*, les patients dont l'albuminémie était basse ( $\leq 29$  g/L) et les phosphatases alcalines élevées ( $\geq 484$  U/L), deux indicateurs de sévérité de la maladie, la clairance était environ 20 % plus élevée que chez les patients ayant des valeurs biologiques médianes [51]. D'une

manière générale comme cela a été décrit à l'issu des études PK menées sur d'autres mAbs, le volume de distribution et la clairance (CL) du bevacizumab augmente avec le poids ou la surface corporelle et s'avèrent être plus élevés chez l'homme que chez la femme. L'impact de cette variabilité pharmacocinétique interindividuelle sur la réponse clinique du bevacizumab (efficacité et/ou toxicité) n'est pas encore connu. Au vu des résultats des premières études PK/PD menées sur d'autre mAbs évaluant la relation entre l'exposition plasmatique au médicament (à travers les paramètres PK) et l'effet du médicament il serait intéressant de l'étudier pour le bevacizumab. D'autant plus que le bevacizumab peut être responsable d'effets indésirables graves tels que l'apparition d'hypertension artérielle (HTA) de grade III et IV, la survenue d'événements hémorragiques sévères (grade III-V) ou d'événements thromboemboliques. L'incidence des cas d'HTA de grade III/IV rapportée par les différentes études varie de 4 à 19,4 % [116-119] et celle des événements hémorragiques sévères (grade III-V) se situe entre 0,4 et 5 % [116-119]. L'incidence des événements thromboemboliques oscille de 1 à 8,9 % en fonction du type d'évènement (veineux ou artériel) et des études [116-119].

### **III. Techniques actuelles de dosage plasmatique des anticorps monoclonaux thérapeutiques**

L'identification et la quantification des mAbs est un prérequis essentiel à toute étude PK et PK/PD. Ces études interviennent lors du développement préclinique et clinique (phase I, II et III) du médicament ainsi que tout au long de son utilisation en post-AMM notamment lorsque l'on cherche à déterminer l'intérêt et les conditions de réalisation du STP d'un médicament en situation réelle (population différentes des populations étudiées à l'issu des essais cliniques de phase I, II ou III). Les études PK/PD permettraient de mieux définir la relation effet-concentration d'un médicament et sont cruciales pour l'optimisation et l'individualisation des traitements. Les études PK permettraient par ailleurs de mieux définir les différents mécanismes impliqués dans les processus de distribution et d'élimination des mAbs.

Cependant la quantification des mAbs est compliquée par leur nature protéique et également par leur ressemblance avec les protéines endogènes et par les faibles concentrations auxquelles ils peuvent être attendus dans le milieu plasmatique, qui est de plus un milieu de composition protéique complexe compliquant l'analyse. Ainsi, la mise au point de techniques analytiques sensibles et

spécifiques de ces médicaments permettant leur quantification dans des matrices biologiques a fait l'objet de plusieurs travaux dans ce domaine actuellement. Par ailleurs les mAbs ayant une cible antigénique circulante (tels que le bevacizumab ou les anti-TNF $\alpha$ ) peuvent exister sous trois formes différentes au niveau plasmatique : libre, liée, et partiellement liée à leur cible (le VEGF dans le cas du bevacizumab). Le choix et la connaissance de la forme mesurée est donc cruciale pour l'interprétation des concentrations plasmatiques mesurées et des données pharmacocinétiques qui en sont issues [120]. Il est donc important d'avoir une connaissance approfondie des méthodes bioanalytiques utilisées pour le dosage des mAbs et plus particulièrement dans notre cas du bevacizumab.

## **A. Les immunodosages pour la bioanalyse des anticorps thérapeutiques**

### **1. Généralités**

A ce jour, les techniques de référence pour identifier et quantifier les mAbs et plus particulièrement le bevacizumab font appel à des méthodes d'immunodosages (type ELISA *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) [48, 50, 51, 53, 58, 115, 121].

Les techniques immunologiques sont basées sur la formation de complexes antigène-anticorps. La mise en œuvre d'un immunodosage nécessite trois intervenants qui sont un antigène, un anticorps et un traceur. Dans notre cas l'anticorps est la molécule à doser (mAb) et l'antigène la molécule de capture du mAb. Le traceur est une entité chimique (atome, molécule, ion...) liée à une molécule d'antigène ou d'anticorps et délivrant un signal quantitativement mesurable. Il existe plusieurs méthodes de marquage, dont les plus utilisées sont le marquage radioactif, le marquage enzymatique et le marquage luminescent. Pour les marqueurs radioactifs, on utilise surtout de l'iode 125 qui, en se désintégrant, fournit un rayonnement  $\gamma$ , et du tritium, qui fournit un rayonnement  $\beta$ . Parmi les différentes méthodes d'immunodosage, les techniques faisant appel aux traceurs radiomarqués restent globalement très compétitives par leur sensibilité et leur facilité de mise en œuvre. Les traceurs enzymatiques utilisent une enzyme comme marqueur. Au cours de ces enzymo-immunodosages, après la réaction immunologique, une réaction enzymatique avec un substrat approprié donne naissance à une espèce chimique quantifiable par photométrie, par absorption, ou par émission. Le marquage d'un anticorps ou d'un antigène consiste à lier de façon covalente la molécule à marquer

avec l'enzyme. Parmi les enzymes les plus utilisées, on compte la peroxydase de raifort (HRP pour *horse-radish peroxidase*), la phosphatase alcaline, la glucose oxydase et l'acétylcholinesterase. L'addition d'un substrat de l'enzyme, à la dernière étape du dosage, permet la formation d'un composé soluble et coloré, dont l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre. Les marqueurs luminescents offrent une alternative aux méthodes colorimétriques. Ces traceurs permettent de réaliser des dosages au moins aussi sensibles que ceux utilisant des techniques radiométriques tout en présentant l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de marqueurs radioactifs. Le marquage enzymatique ou luminescent sont les techniques analytiques fréquemment utilisées pour quantifier les peptides et les protéines dans les liquides biologiques, puisqu'elles présentent une haute sensibilité, une assez bonne spécificité et sont faciles à utiliser [120].

On distingue deux grands types d'immunodosages utilisant un marqueur, selon que le réactif (dans notre cas la molécule de capture du mAb) est limitant ou en excès par rapport à la molécule à doser (le mAb) :

- **Dosages avec réactif limitant** : méthodes par compétition ou méthodes indirectes
- **Dosages avec un excès de réactif** : méthodes immunométriques ou méthodes directes

Un certain nombre de formats d'immunodosages employés pour la quantification des anticorps thérapeutiques sont brièvement présentés sur la figure 14.

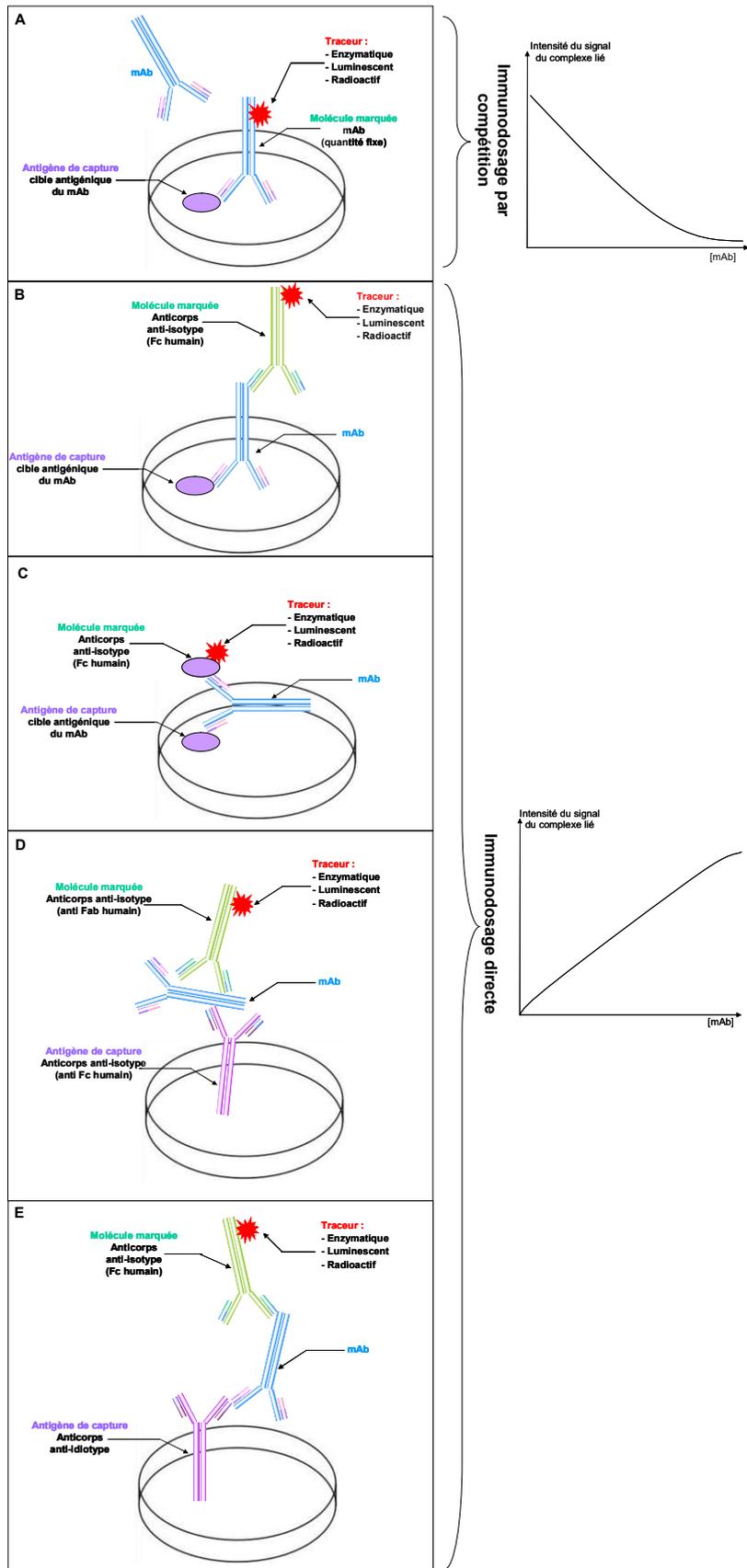


Figure n° 14 : Formats des immunodosages pour la quantification des anticorps thérapeutiques (d'après Kuang *et al* modifiée [120]).

- **Dosages avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes** (Figure 14-A)

Lorsque l'on met en présence un anticorps (mAb), son antigène (Ag) et ce même anticorps marqué (mAb\*), il peut se créer deux types de complexes selon que l'antigène se fixe à l'anticorps ou à l'anticorps marqué : mAb-Ag et mAb\*-Ag. Le principe de ce dosage réside donc dans la compétition entre les deux formes d'anticorps (mAb et mAb\*). Pour rendre cette technique quantitative, la concentration en antigène et en mAb marqué est maintenue fixe, et l'augmentation de la concentration en mAb à doser entraîne une diminution du complexe mAb\*-Ag. Si l'on dispose d'une méthode permettant de séparer, sans modifier l'équilibre de la réaction, les composés libres des complexes mAb-Ag et mAb\*-Ag, on peut déterminer, grâce au signal délivré par le marqueur, la concentration de l'anticorps dans sa forme libre et/ou dans sa forme complexée à l'antigène. Suivant la nature du dosage, on peut être amené à ne pouvoir conserver que l'une des deux fractions (anticorps libre ou anticorps lié). En établissant une courbe d'étalonnage avec des concentrations connues de mAb, on détermine la concentration en mAb pour une solution inconnue par comparaison au signal mesuré. Dans ce type d'immunodosage, le signal généré est inversement proportionnel à la concentration en mAb dans l'échantillon à doser.

- **Dosages avec un excès de réactif : méthodes immunométriques ou méthodes directes** (Figure 14- B, C, D et E)

La totalité de la molécule à doser (mAb) se lie à l'antigène de capture préalablement fixé sur un support. Il est ensuite révélé par une molécule marquée qui reconnaît le mAb. La quantité de l'antigène de capture doit être telle que le nombre de sites de liaison soit supérieur au nombre de molécules d'anticorps présentes dans les solutions étalons ou inconnues. L'anticorps va ainsi se fixer sur les sites spécifiques. La molécule marquée est ajoutée, soit simultanément, soit après une première incubation et un lavage, et se fixe sur le mAb, préalablement fixé à l'antigène de capture. Le mAb se trouve ainsi pris en sandwich entre l'antigène de capture et la molécule marquée. Un simple lavage permet de séparer les complexes « antigène-mAb-molécule marquée » des molécules marquées libres en excès. On peut employer, comme antigène de capture soit la cible antigénique de l'anticorps (figure 14-B et C) soit un autre anticorps reconnaissant une partie variable ou constante du mAb à doser (figure 14-D et E). Pour la molécule marquée on peut employer soit un anticorps reconnaissant un site de l'anticorps à doser différent de

celui de l'antigène de capture (figure 14-B, D et E) soit la cible antigénique de l'anticorps à doser (figure 14-C). De même que pour les dosages par compétition, les molécules marquées peuvent l'être par l'intermédiaire d'un traceur radioactif ou par une enzyme. Lorsque le traceur est une enzyme on parle dans le cas des dosages avec réactif en excès de technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Dans les différents cas on mesure le signal généré par la fraction liée (complexe « antigène de capture-mAb-molécule marquée ») qui est un signal croissant en fonction de la quantité de mAb à doser.

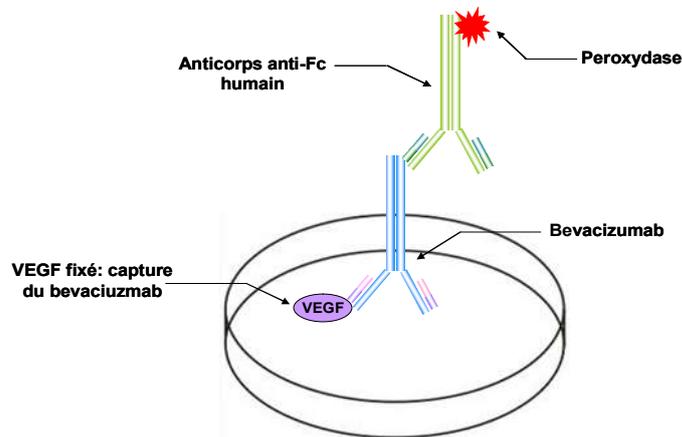
A l'exception du format exposé sur la figure 14-D, toutes les constructions d'immunodosages directes présentées sur la figure 14 dosent la fraction physiologique libre ou partiellement liée du mAb. A l'inverse, en théorie, le format de dosage de la figure 14-D peut généralement détecter la fraction totale des mAbs (libre, liée partiellement liée à sa cible). Cependant, ce format de dosage ne convient pas à la quantification des mAbs dans les matrices biologiques humaines à cause des interférences avec les IgGs endogènes que la molécule de capture peut engendrer par la reconnaissance d'une partie constante du mAb.

## **2. Techniques d'immunodosage du bevacizumab**

La technique d'immunodosage utilisée pour déterminer les concentrations plasmatiques en bevacizumab au cours des études PK précédentes est de type ELISA. Dans toutes ces études le format de l'immunodosage dose la fraction libre voir partiellement liée au VEGF du bevacizumab [48, 50, 51, 53, 58, 115]. D'autres kits commercialisés se basent sur un format différent de celui utilisé dans les publications en reposant sur la technique du double antigène. Il en résulte le dosage exclusivement de la fraction libre du bevacizumab.

- ***Dosage de la forme libre et partiellement liée [48, 50, 51, 53, 58, 115]***

Cette technique ELISA dont le principe est illustré sur la figure 15 a été utilisée lors des différentes études pharmacocinétiques du bevacizumab. Cependant aucun kit de dosage reprenant ce procédé n'est commercialisé à ce jour si ce n'est par la société Genentech qui est à l'origine du bevacizumab. Par conséquent l'accessibilité à un tel kit de dosage est souvent restreinte à des études de recherche clinique portant sur le bevacizumab nécessitant l'approbation de cette société.



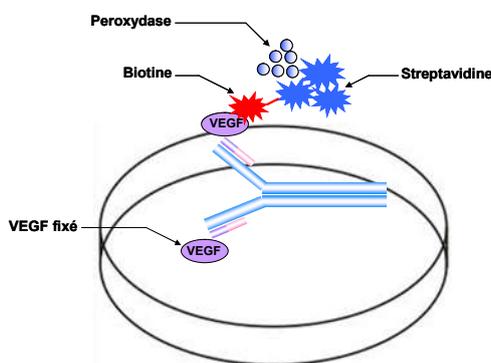
**Figure n° 15 : Principe du dosage par ELISA de la forme libre et partiellement liée du bevacizumab.**

Le sérum dans lequel se trouvent les différentes fractions de bevacizumab est incubé sur une plaque recouverte de VEGF (correspondant à l'antigène de capture) puis lavé. Après lavage les molécules de bevacizumab fixées sont révélées par un anticorps secondaire dirigé contre les fragments Fc du bevacizumab couplé à une enzyme : une peroxydase (anticorps anti-fragment Fc d'IgG humaine). Enfin, une réaction chromogénique dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en bevacizumab permet de quantifier le médicament.

Etant donné que seulement un site libre suffit à la capture du bevacizumab par le VEGF du kit, cet essai en principe permet de détecter à la fois la fraction non liée et partiellement liée au VEGF du bevacizumab présent dans l'échantillon. Cette méthode présente une limite de quantification à 78 ng/mL [48, 50, 51, 53, 58, 115].

- **Dosage de la forme libre exclusivement**

Un autre format d'immunodosage type ELISA dont le principe est présenté sur la figure 16, est commercialisé et produit par la société Matriks Biotech (Shikari® ELISA kits [121]).



**Figure n° 16 : Principe du kit ELISA commercialisé pour le dosage du bevacizumab libre : technique du double antigène.**

La quantification s'appuie sur le principe du double antigène. L'échantillon plasmatique dans lequel se trouvent les différentes fractions de bevacizumab est incubé sur une plaque recouverte de VEGF puis lavé. Le bevacizumab fixé sur la plaque par liaison au VEGF par un site de reconnaissance (antigène de capture) et restant après lavage est quantifié grâce à l'ajout de VEGF conjugué à la biotine (liaison par l'autre site de reconnaissance du VEGF resté libre sur la molécule de bevacizumab préalablement fixée). La réaction colorimétrique est produite par ajout de streptavidine couplée à une peroxydase qui se lie à la biotine conjuguée au VEGF. Etant donné que le bevacizumab présente dans sa structure deux sites de reconnaissance du VEGF ce type d'essai permet en principe de détecter seulement la fraction libre, les deux sites de fixation au VEGF du bevacizumab étant nécessaires pour la capture d'une part et la détection d'autre part. La limite de quantification de cette méthode a été évaluée à 30 ng/mL [121].

### **3. Avantages et limites des immunodosages pour le dosage des anticorps monoclonaux**

Les immunodosages sont actuellement les méthodes de choix pour la bioanalyse étant donné leur facilité de mise en œuvre, le faible coût d'analyse et le haut débit d'analyse qu'elles permettent. En effet, ces méthodes utilisent couramment des plaques de titration permettant l'analyse simultanée de 96 ou 384 échantillons sur le même support. Les volumes d'échantillons sont également faibles puisque 50 µL d'échantillon suffisent pour effectuer l'analyse (l'échantillon est même très souvent dilué). La sensibilité obtenue au regard du volume d'échantillon consommé est également un atout majeur : ceci s'explique par la capacité d'amplification des enzymes fixées sur les traceurs enzymatiques, par conversion chimique de leur substrat en produits colorés.

Cependant, la présence d'une molécule possédant un paratope semblable au paratope de l'anticorps à analyser peut entraîner une réaction avec l'antigène de capture, et ceci quel que soit le format de dosage. Les interférences avec les molécules endogènes peuvent également se manifester par la présence de molécule possédant un autre site de reconnaissance pour la cible antigénique de capture du mAb. Ces interférences aboutissent à une sous-estimation de la concentration de l'analyte ou à une surestimation si la molécule marquée reconnaît également la molécule interférente fixée.

Une autre source d'erreur apparaît lors de liaisons non spécifiques entre les réactifs, par l'intermédiaire de substances pontant les réactifs [122] ou simplement par adsorption, aboutissant à une surestimation de l'analyte. La quantification des protéines thérapeutiques, qui ont pour certaines un caractère immunogène donc susceptibles d'engendrer une réponse immunitaire chez les patients traités, présente une difficulté supplémentaire pour la bioanalyse. Les anticorps endogènes peuvent se lier au mAb et inhiber la formation des complexes « antigènes de capture-mAb à doser ». Il s'ensuit une sous-estimation de la concentration en mAb. Malgré une très forte sensibilité et une facilité de mise en œuvre, les immunodosages ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambiguïté le composé qui est analysé, et la spécificité des anticorps utilisés ne permet pas toujours d'éliminer les réactions croisées avec des molécules interférentes. Il est alors nécessaire de se tourner vers des techniques alternatives permettant d'identifier et de quantifier les molécules analysées sans ambiguïté.

Par ailleurs, en raison du caractère réversible de l'interaction anticorps-antigènes, de nombreux facteurs tels que le temps d'incubation, la température et les dilutions successives pourraient avoir une incidence sur l'équilibre antigène-anticorps établi *in vivo* et par conséquent modifier les fractions liées et non liées des mAbs [120, 123]. Les conditions de prélèvement, de stockage et d'analyse des échantillons biologiques pourraient influencer grandement les concentrations mesurées par les immunodosages ne dosant que la forme libre ou partiellement liée. Par conséquent, la quantification *ex vivo* des différentes formes du bevacizumab (libre, liée, partiellement liée) dosées par les techniques ELISA précédemment exposées peut différer des valeurs réelles *in vivo*. Ce phénomène peut conduire à une surestimation de la fraction libre ou partiellement liée, et introduire une variabilité supplémentaire dans les mesures, tout ceci pouvant aboutir à des interprétations pharmacocinétiques erronées. Une méthode bioanalytique qui ne perturbe pas l'équilibre de liaison serait idéale pour mesurer les fractions libres ou liées des mAbs dans des échantillons biologiques [120]. Dans la mesure où il est difficile de contrôler la dynamique d'équilibre entre les différentes formes des mAbs dans un échantillon qui contient un mélange de ces formes, il peut être envisageable d'avoir recours à la stratégie alternative de mesurer la fraction totale [123]. Cette approche permettrait de s'affranchir de la variabilité liée à la technique de dosage dans les mesures et rendrait l'analyse pharmacocinétique plus fiable.

Enfin, les immunodosages pour la quantification des mAbs sont conçus pour un mAb spécifique ne permettant pas des analyses en multiplex et les réactifs de

capture et de révélation spécifique nécessaires à leur développement ne sont souvent pas disponibles dès la mise sur le marché du médicament.

## **B. La spectrométrie de masse pour la bioanalyse des anticorps thérapeutiques**

La technique de référence à l'heure actuelle pour quantifier les protéines thérapeutiques fait appel aux techniques d'immunodosages en raison de la sensibilité et du haut débit associé à ces techniques. Dans l'optique de trouver des alternatives à l'immunoanalyse qui peut parfois présenter des problèmes de spécificité, l'attention s'est tournée vers la spectrométrie de masse (MS), devenue un outil incontournable pour l'identification et la quantification des protéines. Cette technique présente en effet des avantages pour la bioanalyse, en raison de la spécificité que confère la détection par la masse des analytes et de leurs fragments (spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS). L'autre avantage de la spectrométrie de masse est sa capacité à analyser un grand nombre de composés en parallèle (multiplexage). L'utilisation généralisée de standards internes permettent d'améliorer la robustesse des dosages. Elle fait également preuve d'une certaine flexibilité puisqu'elle est utilisée aussi bien pour analyser un composé que ses métabolites.

### **1. Historique**

Déjà largement utilisées pour la quantification de petites molécules, les techniques faisant appel à la spectrométrie de masse sont également utilisées pour l'analyse biologique de peptides et de protéines. En effet, la quantification par spectrométrie de masse a d'abord concerné les petites molécules analysées le plus souvent avec des méthodes couplant la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en mode *Single Ion Monitoring* (SIM). Les perfectionnements des instruments ont conduit à des améliorations spectaculaires en termes de sensibilité et de résolution, et de plus, le couplage aisé avec des techniques chromatographiques a permis d'améliorer les limites de détection, permettant des applications comme l'analyse de composés pharmaceutiques lors de contrôles de qualité ou encore la quantification de produits actifs pour des études PK. Ces diverses applications, tant qualitatives que quantitatives, sont liées à ses principales caractéristiques : la sensibilité et la spécificité. Les avancées

technologiques telles que le développement en 1988 de la source d'ionisation par électrospray (ESI) par le Pr. John Fenn qui a obtenu le prix Nobel de chimie en 2002 et le développement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) permettent aujourd'hui l'étude de macromolécules dans des milieux biologiques complexes. Les techniques de spectrométrie de masse de type LC-MS/MS peuvent permettre d'abaisser les limites de détection et surtout d'améliorer la sélectivité de la méthode de dosage grâce à l'information supplémentaire donnée par les ions fragments et à l'analyse en mode *Multiple Reaction Monitoring* ou *MRM* (ce point particulier sera détaillé dans le chapitre 3). Avec l'avènement de la protéomique, les méthodes d'analyse quantitative existantes ont ainsi été adaptées aux caractéristiques particulières des peptides et des protéines. La protéomique est définie comme la comparaison quantitative de protéomes similaires sous différents *stimuli* permettant une meilleure compréhension des processus biologiques complexes. Un des principaux objectifs de la recherche en protéomique est ainsi d'effectuer une identification et une quantification systématiques des protéines exprimées dans les systèmes biologiques. Les approches standard faisant appel à des techniques de séparation des protéines à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle, des puces à protéines ou de la chromatographie en phase liquide (LC) bi ou multidimensionnelle, pouvant être couplée à la spectrométrie de masse en tandem [124]. Avec le développement croissant en thérapeutique des médicaments de nature protéique telle que les mAbs le besoin de leur quantification dans les matrices biologiques est grandissant que ce soit dans le cadre des différentes études préalables à la mise sur le marché d'un médicament (toxicité, pharmacocinétique, pharmacodynamie...), dans le cadre des études PK et PK/PD postérieures à la mise sur le marché et des dosages pharmacologiques de routine (STP). Ces différentes applications nécessitent de disposer de méthodes fiables de quantification de ces médicaments.

## **2. Apport de la spectrométrie de masse pour le dosage du bevacizumab plasmatique**

L'apport de la spectrométrie de masse pour l'identification et le dosage du bevacizumab dans les milieux biologiques est triple.

Par rapport aux techniques de type immunologique utilisées pour le dosage du bevacizumab au cours des précédentes études de pharmacocinétique, la spectrométrie de masse permet d'avoir accès au dosage de la forme totale. Cette

approche offre l'avantage de fournir des résultats indépendants de la modification *ex vivo* de l'équilibre entre les différentes formes établies *in vivo*. Elle est une alternative intéressante aux techniques ELISA d'autant plus que la pharmacocinétique de la forme totale du bevacizumab n'a jamais été étudiée.

Par ailleurs, la spécificité de la technique choisie est une considération importante pour des études de PK, de toxicocinétique et des études PK/PD des mAbs. Cet argument fait de la LC-MS/MS une technique de choix pour la quantification en milieu biologique des médicaments issus de biotechnologies pour la plupart semblables à des agents biologiques présents dans l'organisme (versions recombinantes) et présents à de faibles concentrations. Ces objectifs peuvent être atteints avec des techniques de spectrométrie de masse en tandem permettant de travailler en mode *MRM*.

Enfin, un spectromètre de masse constitue une plateforme analytique de grande polyvalence qui permet de réaliser très facilement des analyses d'un grand nombre de composés en parallèle (multiplexage) laissant envisager l'analyse simultanée de plusieurs anticorps monoclonaux par cette technique.

#### **IV. Objectif de l'étude**

Comme pour plusieurs autres anticorps thérapeutiques le bevacizumab est sujet à une variation interindividuelle en terme de réponse thérapeutique et de survenue des effets indésirables graves (tels que l'hypertension artérielle de grade III/IV, évènements thromboemboliques ou hémorragiques) pour une même dose de bevacizumab [116-119, 125, 126]. Les mécanismes de cette variabilité ne sont pas totalement compris et plusieurs pistes sont à l'heure actuelle étudiées, notamment la variabilité pharmacocinétique qui lui a été rapportée et qui caractérise les mAbs [50, 51, 53, 58, 115]. Certaines études ont d'ailleurs mis en évidence une relation exposition plasmatique-effet clinique (PK/PD) pour quelques mAb. Cette relation a essentiellement été étudiée pour les anti-TNF $\alpha$  et le cetuximab. Il serait donc intéressant d'approfondir ces études et de les étendre à d'autres anticorps thérapeutiques tels que le bevacizumab afin de pouvoir déterminer l'intérêt et les conditions de mise en œuvre d'un suivi thérapeutique des concentrations plasmatiques de ce médicament. De telles études doivent être complétées par des analyses pharmacocinétiques de population pour définir les co-variables d'intérêt pouvant expliquer la variabilité interindividuelle s'exprimant sur les paramètres

pharmacocinétiques et en estimer leur part relative dans la variabilité de réponse au médicament.

Pour mener à bien ces études il est crucial de pouvoir doser avec fiabilité les mAbs dans les matrices biologiques souhaitées. A ce jour, les techniques de référence pour identifier et quantifier les mAbs au cours des études précédentes ont fait appel à des techniques ELISA. Les kits commercialisés et utilisés au cours des études de pharmacocinétique préalablement menées sur le bevacizumab dosent la forme libre et partiellement liée du bevacizumab. Etant donné les biais analytiques décrits plus haut que cette approche peut engendrer, notamment lorsqu'il s'agit de doser un mAb ayant une cible antigénique circulante dans le plasma (comme c'est le cas pour le bevacizumab), la stratégie alternative de dosage de la forme totale nous paraît intéressante, d'autant plus que la pharmacocinétique de cette fraction plasmatique n'a pas encore été étudiée.

A cet effet, au regard des différentes méthodes de quantification des mAbs précédemment développées qui ont mis en évidence les capacités analytiques de la spectrométrie de masse pour le dosage de la fraction totale de ces médicaments, nous avons choisi de développer une méthode de dosage du bevacizumab plasmatique par LC-MS/MS. Le fait que nous souhaitons appliquer cette méthode de dosage à des études cliniques nous impose qu'elle soit validée selon les recommandations de la *Food and Drug Administration* (FDA) [127] conférant ainsi à notre approche une plus grande fiabilité de quantification.

A travers cette opportunité de développer un dosage par spectrométrie de masse d'un anticorps thérapeutique spécifique, nous souhaitons que cette approche analytique ait une valeur de modèle pour l'ensemble des anticorps thérapeutiques actuellement sur le marché ou en développement pour la réalisation de futures études cliniques. Pour cela quatre points essentiels développés par la suite nécessitent ainsi une attention particulière : la taille de ces macromolécules constitue tout d'abord un handicap pour leur quantification nécessitant le recours à une protéolyse enzymatique dont les conditions doivent être optimisées, le choix des peptides spécifiques de la molécule d'intérêt déterminant pour la spécificité de la méthode, le choix d'un bon étalon interne (ou standard interne) déterminant pour la répétabilité de la méthode, et enfin la sensibilité, qui constitue le problème majeur de la spectrométrie de masse pour ce type d'application, qui peut être améliorée par un

traitement d'échantillon efficace et qui conditionnera également la fraction plasmatique dosée du mAb.

Plusieurs conditions de protéolyse et deux types de standards internes ont été évalués au cours de ce développement apportant des informations complémentaires nécessaires aux futures méthodes de quantification des mAbs par spectrométrie de masse.

Dans le deuxième chapitre nous présenterons une revue des méthodes de quantification des mAbs par spectrométrie de masse précédemment développées.

Dans un troisième chapitre, nous présenterons les différentes techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse auxquelles nous avons eu recours pour notre étude.

La méthode de dosage souhaitée transposable à l'ensemble des mAbs que nous avons mise au point sur le bevacizumab sera exposée dans le quatrième chapitre.

Une dernière partie, présentée sous la forme d'une discussion, sera consacrée à la synthèse des succès et des difficultés rencontrées au cours du développement de notre méthode de dosage et des enseignements qui en ont été tirés.

Au sein de ce paragraphe, nous ferons le point sur l'aboutissement des objectifs fixés, notamment en matière de performances analytiques de la méthode (sensibilité de détection, répétabilité, exactitude et spécificité) mais aussi en termes de capacité de transposition de notre stratégie analytique à d'autres mAbs. Dans cette partie, seront recensées et d'évaluées les performances de chacune des étapes de dosage et notamment des deux approches d'étalonnage interne testées, et seront évaluées aussi leurs limites et leurs lacunes et certains choix méthodologiques seront remis en question.

Enfin, dans une partie consacrée d'une part aux perspectives analytiques, nous proposerons d'autres pistes destinées à améliorer certaines étapes clés ou critiques de la méthode. D'autre part nous aborderons les perspectives d'applications cliniques de notre méthode de quantification qui ont été entreprises au cours de ces travaux et les difficultés rencontrées pour leur mise en œuvre.



## **CHAPITRE 2**

# **REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

## **CHAPITRE 2**

# **REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE**

La spectrométrie de masse occupe une place privilégiée parmi les techniques d'analyse en protéomique en raison de sa grande reproductibilité, de la large gamme de masses analysables, de l'exactitude et de la précision des mesures [128]. Par la suite de nombreuses méthodes de spectrométrie de type LC-MS/MS ont été ainsi développées pour l'identification et la quantification des protéines thérapeutiques telles que les anticorps monoclonaux dans des matrices biologiques complexes comme le plasma. A l'heure actuelle aucune méthode de dosage par spectrométrie de masse du bevacizumab plasmatique n'a été publiée. Les principales méthodes de dosage plasmatique des anticorps monoclonaux par LC-MS/MS décrites dans la littérature sont résumées dans le tableau IV. Ces différentes méthodes présentent plusieurs points communs.

Tout d'abord, toutes les méthodes se basent sur l'analyse non pas de la protéine entière mais des peptides spécifiques de la protéine d'intérêt (obtenus après protéolyse trypsique de l'échantillon). Cela s'explique par le fait que l'analyse en spectrométrie de masse des protéines entières de haut poids moléculaire telles que les mAbs (environ 150 KDa), n'est ni assez sensible ni assez spécifique pour pouvoir les quantifier dans le plasma. Dans ce contexte, en spectrométrie de masse, la majorité des protéines ne sont pas quantifiées à partir de la protéine intacte mais à partir de peptides de masse moléculaire beaucoup plus faible obtenue par clivage de la protéine au travers d'une protéolyse enzymatique. De la même façon qu'une protéine, un peptide est un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides mais un peptide est constitué de moins de cinquante acides aminés alors qu'un anticorps en compte plus de mille. Les peptides issus de la protéolyse enzymatique de la protéine d'intérêt présentent ainsi une faible distribution d'états de charge ce qui simplifie grandement l'analyse en spectrométrie de masse et augmente la sensibilité du dosage.

**Tableau IV : Revue des différentes méthodes LC-MS/MS développées pour la quantification des anticorps monoclonaux dans le plasma [128-142].**

Auteurs	Année	Molécule dosée	Séparation chromatographique	Détection en spectrométrie de masse		Simplification de l'échantillon	Fraction dosée	Nature de l'étalon interne	Limite de quantification
				Source d'ionisation	Analyseur				
Yang et al [128]	2007	"mAbX"	HPLC conventionnelle	ESI	Triple quadripôle	<b>2D-SPE</b> (après protéolyse trypsique)	Forme totale	Analogue	0,5 µg/mL
Dubois et al [130]	2008	Cetuximab	HPLC conventionnelle	ESI	Triple quadripôle	<b>Immuncapture</b> (Cible antigénique; billes magnétiques)	Forme libre et partiellement liée	Analogue	0,02 µg/mL
Heudi et al [133]	2008	mAb non spécifié	HPLC conventionnelle	ESI	Triple quadripôle	<b>SPE-MCX</b> (après protéolyse trypsique)	Forme totale	SIL peptide	5 µg/mL
Hagman et al [132]	2008	mAb huamisé	HPLC conventionnelle	ESI	QTRAP	<b>Déplétion albumine</b>	Forme totale	SIL peptide	2 µg/mL
Ji et al [134]	2009	mAb non spécifié	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	Triple quadripôle	<b>Aucun</b>	Forme totale	SIL peptide	1 µg/mL
Lesur et al [136]	2010	mAb non spécifié	Chromatographie capillaire	ESI	QTRAP	<b>Aucun</b>	Forme totale	PSAQ	>5 µg/mL
Liu et al [139]	2011	mAb non spécifié	Chromatographie capillaire	ESI	TOF	<b>Enrichissement protéine A</b> (Chromatographie d'affinité)	Forme totale	PSAQ	1 µg/mL
Duan et al [129]	2012	cT84.66 chimérique	Nano chromatographie	ESI	Triple quadripôle	<b>Precipitation</b> (protéolyse du culot)	Forme totale	SIL peptide	0,012 µg/mL
Fernandez et al [131]	2012	Anti-Mad Cam	Chromatographie capillaire	Captive spray ionisation	Triple quadripôle	<b>Enrichissement protéine G</b> (Billes magnétiques)	Forme totale	SIL peptide	0,781 µg/mL
						<b>Immuncapture</b> (cible antigénique; billes magnétiques)	Forme libre et partiellement liée		0,0703 µg/mL
Li et al [137]	2012	mAb non spécifié	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	Triple quadripôle	<b>Immuncapture</b> (Anti-Fc du clone; billes magnétiques)	Forme totale	PSAQ	0,1 µg/mL
Jiang et al [135]	2013	Deux mAbs : A et B	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	Triple quadripôle	<b>Precipitation</b> (protéolyse du culot)	Forme totale	SIL peptide	5 µg/mL mAb-A 25 µg/mL mAb-B
Li et al [138]	2013	4 mAbs	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	Triple quadripôle	<b>Immuncapture</b> (Anti Fc du clone; billes magnétiques)	Forme totale	PSAQ	0,1 à 0,5 µg/mL
Zhang et al [140]	2014	Infliximab	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	Triple quadripôle	<b>Enrichissement protéine A/G</b> (Billes magnétiques)	Forme totale	PSAQ	0,1 µg/mL
Xu et al [142]	2014	Deux mAbs : A et B	HPLC conventionnelle	ESI	Triple quadripôle	<b>Immuncapture</b> (anti-idiotypic; billes magnétiques)	Forme libre et partiellement liée	PSAQ	0,1 µg/mL
Lebert et al [141]	2015	mAb humanisé	UPLC (diamètre particule <2µm)	ESI	QTRAP	<b>Déplétion albumine</b>	Forme totale	SIL peptide	5 µg/mL

**Abbreviations :** SPE Extraction sur phase solide; SPE-MCX Extraction sur phase solide par échange de cations; HPLC Chromatographie liquide à haute performance; UPLC Chromatographie liquide à très haute performance; ESI Electrospray ionisation; TOF Time of flight; QTRAP: triple quadripôle/trappe ionique linéaire; SIL-peptide : Stable Isotope Labeled peptide (peptide spécifique de la protéine d'intérêt)

Pour l'analyse d'un échantillon complexe tel que le plasma, le couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide permet en une seule analyse de détecter plus d'espèces grâce à la séparation par la chromatographie. Toutes les méthodes développées pour quantifier les mAbs en milieux plasmatiques ont d'ailleurs eu recours au couplage LC-MS/MS qu'il soit de type nano-LC ou HPLC (chromatographie liquide de haute performance) couplé avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ), Q-TRAP ou Q-TOF équipés d'une source d'ionisation ESI.

En effet, bien que les technologies d'ionisation type MALDI utilisées en mode MS ou MS/MS permettent d'effectuer des mesures de masses exactes elles sont plus adaptées à l'identification qu'à la quantification de protéines. Les techniques MALDI sont limitées en sensibilité pour des échantillons peptidiques complexes étant donné l'impossibilité de couplage à des techniques séparatives telles que la chromatographie liquide. Il en résulte que la totalité de l'acquisition d'un échantillon se retrouve sur un seul spectre chargé d'espèces [143].

Une technique de LC-MS/MS est donc indispensable pour quantifier des protéines dans un mélange hautement complexe [144] , en utilisant la sensibilité et la spécificité du mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Les différents instruments LC-MS/MS ainsi que les différents modes de fonctionnement des analyseurs simples et complexes qui leurs sont associés seront détaillés dans le chapitre 3.

La simplification ou l'enrichissement de l'échantillon protéique plasmatique à analyser est indispensable pour réduire la complexité des mélanges de peptides avant l'analyse par spectrométrie de masse. Les différences entre les méthodes précédemment développées pour la quantification des mAbs résident essentiellement dans la stratégie de traitement de l'échantillon. Il est important de noter que du procédé de simplification ou d'enrichissement employé dépendra la fraction de médicament dosée (liée, libre ou totale). Les techniques de simplification des échantillons plasmatiques par immunocapture se basant sur le site de reconnaissance antigénique de la protéine permettent en principe de doser la fraction libre voir partiellement liée. A l'inverse, les techniques de simplification des échantillons avant protéolyse faisant appel à l'immunocapture et à l'immunoaffinité basée sur la reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps mais aussi à la purification par déplétion en protéines plasmatiques majoritaires et à la précipitation des protéines permettent d'avoir accès au dosage de la forme totale de l'anticorps. Les principes de ces différentes techniques seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

La quantification absolue des mAbs est réalisée à l'aide d'une droite de calibration en se basant sur le ratio des aires du ou des pic(s) chromatographique(s) du ou des peptide(s) correspondant(s) au mAb sur l'aire du pic chromatographique du peptide correspondant à l'étalon interne. L'utilisation d'un étalon interne permettra d'améliorer la répétabilité et la fiabilité de la méthode de quantification. Sa nature peut différer d'une méthode à une autre et les différentes stratégies d'étalonnage interne seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

Enfin ces techniques présentent des limites de quantification entre 0,01 à 5 µg/mL (une seule technique à 25 µg/ml [135]) ce qui est tout à fait acceptable si on se réfère aux concentrations plasmatiques attendues en thérapeutique aux doses de bevacizumab utilisées en oncologie et estimées par les techniques ELISA à l'issu des précédentes études de pharmacocinétique à savoir entre 13,5 µg/mL et 172 µg/mL pour la concentration résiduelle [48, 50, 51, 53, 58, 115].

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les méthodes employées pour simplifier et enrichir les échantillons en vue de quantifier les mAbs dans des fluides biologiques. Dans un second temps nous passerons en revue les différentes stratégies de quantification absolue actuellement utilisées et utilisant la spectrométrie de masse. Dans un troisième temps, nous aborderons le choix du standard interne. Enfin, nous discuterons au regard de la bibliographie les difficultés rencontrées au cours du développement des différentes techniques de spectrométrie de masse décrites dans la littérature pour quantifier un mAb dans le plasma humain. Nous en profiterons pour présenter les différents paramètres évalués au cours de la validation analytique d'une méthode de dosage selon les recommandations de la FDA [127].

## **I. Techniques de séparation ou d'enrichissement des protéines ou des peptides en vue de leur quantification absolue dans un milieu biologique**

Le plasma humain est un milieu protéique complexe comportant 237 protéines connues qui peuvent potentiellement donner après protéolyse trypsique 10 203 peptides [145]. Cependant, le problème est fortement compliqué par la gamme de concentrations de ces protéines. En effet, moins d'une dizaine de protéines constituent à elles seules 97 % des protéines plasmatiques. Une étape de séparation des protéines de l'échantillon plasmatique en vue de l'enrichir en protéine à quantifier semble incontournable. Cette étape peut intervenir soit sur l'échantillon plasmatique brut avant protéolyse [129-132, 135, 137-142] soit suivant l'étape de protéolyse sur l'échantillon peptidique [128, 133]. Les méthodes de dosages précédemment développées pour la quantification des anticorps monoclonaux au niveau plasmatique ont utilisé différentes techniques pour simplifier l'échantillon à doser en vue d'améliorer la sensibilité et la répétabilité de la méthode.

### **A. Techniques de séparation des protéines**

Au regard des précédents travaux menés par Havlis et Shevechenko la quantification absolue d'une protéine séparée par une méthode électrophorétique sur gel est possible mais sa précision et son efficacité sont limitées [144]. En effet le rendement de chacun des peptides obtenus pris individuellement et provenant de la

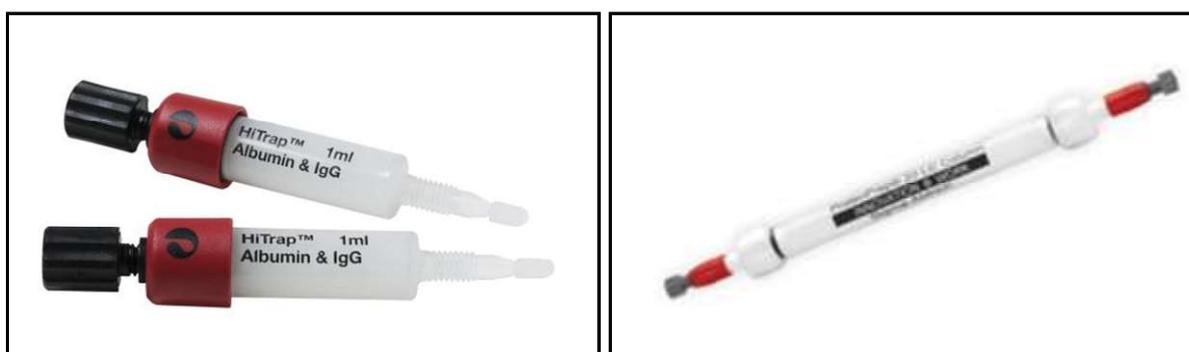
même protéine varie fortement avec ce procédé de traitement de l'échantillon. Cette perte de peptides après protéolyse dans le gel proviendrait d'une part de la protéolyse, moins efficace dans un gel qu'en milieu liquide, et d'autre part d'une perte de peptides lors de leur extraction de la matrice polyacrylamide avant l'analyse [144]. Cependant, d'autres auteurs ont montré que pour certaines protéines telles que la myoglobine [146], la quantification absolue précise après séparation électrophorétique et protéolyse sur gel est possible. Dans le cadre de la quantification des mAbs d'autres techniques de séparation ou d'enrichissement des protéines (détaillées ci-dessous) ont été employées et aucune équipe n'a eu recours à ce procédé de purification par électrophorèse sur gel. Par conséquent nous ne le détaillerons pas ici.

## 1. Précipitation des protéines

Une première stratégie d'enrichissement en vue de la quantification d'une protéine dans le plasma humain consiste en la précipitation des protéines plasmatiques par un solvant organique (acétone pour Duan *et al* [129]). Dans ce cas la protéolyse porte sur le culot protéique (comprenant à la fois les immunoglobulines endogènes et le mAb à quantifier). Ce prétraitement est simple, rapide et peu coûteux, mais par manque de spécificité envers le mAb d'intérêt, elle ne permet pas toujours d'obtenir des échantillons suffisamment enrichis en composé d'intérêt ce qui peut limiter la sensibilité et la répétabilité de la méthode. Ce procédé génère des échantillons complexes pouvant rendre plus difficile l'analyse en spectrométrie de masse. La méthode développée par Jiang *et al* [135] présente une limite de quantification de l'ordre de 5 à 25 µg/mL alors qu'ils utilisent un couplage LC-MS/MS de type UPLC-triple quadripôle (API 5500). En effet, des limites de quantification plus faibles ont été obtenues avec ce type d'appareillage (chromatographie UPLC d'ultra haute performance à la place de l'HPLC couplée à un spectromètre de masse de dernière génération) par le recours à des techniques de purification plus spécifique. C'est le cas de l'équipe de Li *et al* [137] qui atteint une sensibilité de l'ordre de 0,1 à 0,5 µg/mL avec le même couplage mais en ayant recours à une autre technique d'enrichissement plus spécifique telle que l'immunocapture. Tous ces critères nous ont amené à ne pas retenir cette technique bien qu'elle permette de conserver la fraction totale du mAb.

## 2. Déplétion en protéines majoritaires

Pour l'analyse d'une protéine dans le plasma humain, une autre approche consiste à enrichir l'échantillon en protéine d'intérêt en supprimant une partie des protéines plasmatiques les plus abondantes au moyen d'une étape d'immunocapture [132, 140, 141]. Il existe pour cela des kits de déplétion pour enlever uniquement l'albumine, ou l'albumine et les immunoglobulines G, ou les six protéines les plus abondantes (albumine, immunoglobuline G, immunoglobuline A, transferrine, anti-trypsine et haptoglobine), ou les sept plus abondantes (les six précédentes et les fibrinogènes), ou les douze (les sept précédentes et  $\alpha$ 2- macroglobuline, IgM, apolipoprotéine A1, A3  $\alpha$ 1- Acid Glycoprotein), voire les vingt plus abondantes (les 12 précédentes et le complément C3, l'apolipoprotéine B, la ceruloplasmine, les compléments C4 et C1q, les IgD, la préalbumine, et le plasminogène). D'une manière générale les protéines majoritaires du plasma subissent une déplétion en étant retenues sur la phase stationnaire sur laquelle sont greffés des anticorps dirigés contre les différentes protéines. L'éluât, contenant les protéines plasmatiques minoritaires, est dessalé et concentré par exemple avec une membrane de porosité de 5 kDa. Ces systèmes existent sous différentes formes : des cartouches pour centrifugation ou « Spin Cartridge® » réutilisables (figure 17, gauche) et des colonnes de chromatographie (figure 17, droite). En fonction du nombre et du type de protéines éliminées par le kit, ces supports d'affinité permettent de supprimer du plasma 70 à 98 % des protéines majoritaires.



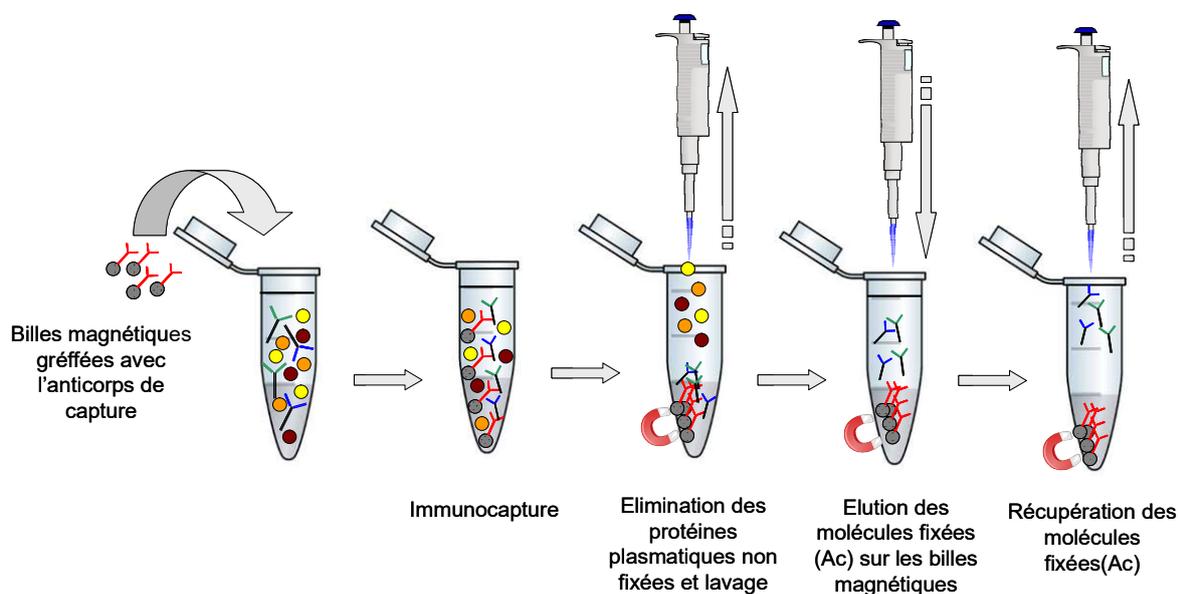
**Figure n° 17** Système de déplétion en protéines plasmatiques dans sa version cartouche pour centrifugation ou « Spin Cartridge® » (à gauche) et dans sa version colonne de chromatographie (à droite) ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Cependant, dans le cadre du dosage des anticorps monoclonaux cette technique ne nous permet pas toujours de nous affranchir de la majorité des protéines tout en conservant les IgGs avant la protéolyse. En effet, les IgGs sont

parties des protéines plasmatiques majoritaires et sont concernées par la majorité des kits de déplétion commercialisés à l'exception du kit de déplétion de l'albumine. Etant donné l'existence d'autres techniques de purification plus spécifiques fournissant un échantillon moins complexe que le kit ne supprimant que l'albumine nous n'avons pas retenu ce procédé de purification des échantillons.

### 3. Immunocapture de la protéine d'intérêt

Une autre approche consiste à effectuer une immunocapture spécifique de la protéine d'intérêt avant l'analyse par spectrométrie de masse [130, 131, 137, 138, 142]. Cette technique se base sur la capture de la molécule à doser par un anticorps de reconnaissance greffé sur un support. La reconnaissance peut se faire soit sur le site antigénique du mAb (anti-idiotype) [130, 131, 142] soit sur une région du fragment Fc du mAb [137, 138]. L'anticorps de capture est souvent greffé sur des billes magnétiques mises à incuber avec l'échantillon à analyser. Le procédé général de cette technique est illustré sur la figure 18.



**Figure n° 18 : Procédé général de la technique d'enrichissement des mAbs par immunocapture sur billes magnétiques.**

Après incubation des billes magnétiques avec l'échantillon plasmatique, les anticorps de capture greffés sur les billes magnétiques se lient à leur cible (un mAb spécifique, une classe ou sous classe d'immunoglobuline). Les complexes ainsi formés avec les billes magnétiques sont ensuite isolés des molécules non fixées sous l'effet d'un aimant qui attire les billes magnétiques vers la paroi du tube où il est

appliqué. Les molécules non fixées peuvent être éliminées par aspiration du surnageant. Après une étape de lavage, l'ajout d'un tampon d'éluion décroche les molécules fixées à l'anticorps de capture. Toujours sous l'effet d'un aimant les billes greffées ainsi libérées de leur cible sont isolées de l'éluât contenant la molécule d'intérêt. L'éluât peut ainsi être récupéré par aspiration en vue de l'étape de protéolyse et de l'analyse en LC-MS/MS en mode *MRM*.

Dans le cas où l'anticorps de capture reconnaît le site antigénique du mAb, cela revient aux techniques de capture employées par les techniques ELISA. Par exemple, Dubois *et al* [130] ont isolé un anticorps monoclonal (cetuximab) du plasma humain par une technique d'immunocapture basée sur l'affinité de cet anticorps avec la région extracellulaire du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (EGFR). Des billes magnétiques micrométriques greffées avec des récepteurs solubles au facteur de croissance épidermique humain permettent l'extraction de l'anticorps monoclonal en vue de sa quantification par une technique de spectrométrie de masse permettant de travailler en *MRM*. Une telle approche présente donc les limites déjà évoquées des techniques immunoenzymatiques à savoir un développement long car elle requiert la fabrication d'un anticorps de reconnaissance spécifique et d'un système de capture. D'autre part, une telle méthode ne permet pas de doser la fraction totale du mAb dans l'échantillon et n'est pas transposable au dosage d'un autre mAb sans développement. Tous ces critères nous ont amené à ne pas retenir la technique d'immunocapture basée sur la reconnaissance du site antigénique.

Dans le cas où l'anticorps de capture reconnaît une région du fragment Fc de l'anticorps la fraction totale du mAb (libre et liée) est récupérée. Cette approche présente l'avantage d'être transposable à un plus grand nombre d'anticorps présentant dans leur structure la région du fragment Fc reconnue. Par exemple Li *et al* [137, 138] ont employé une technique d'immunocapture basée sur la reconnaissance d'une région spécifique du fragment Fc humain des mAbs et pas du fragment Fc des immunoglobulines endogènes. Ce principe de reconnaissance leur a permis de doser 8 mAbs différents présentant dans leur structure cette région du fragment Fc par spectrométrie de masse en mode *MRM*.

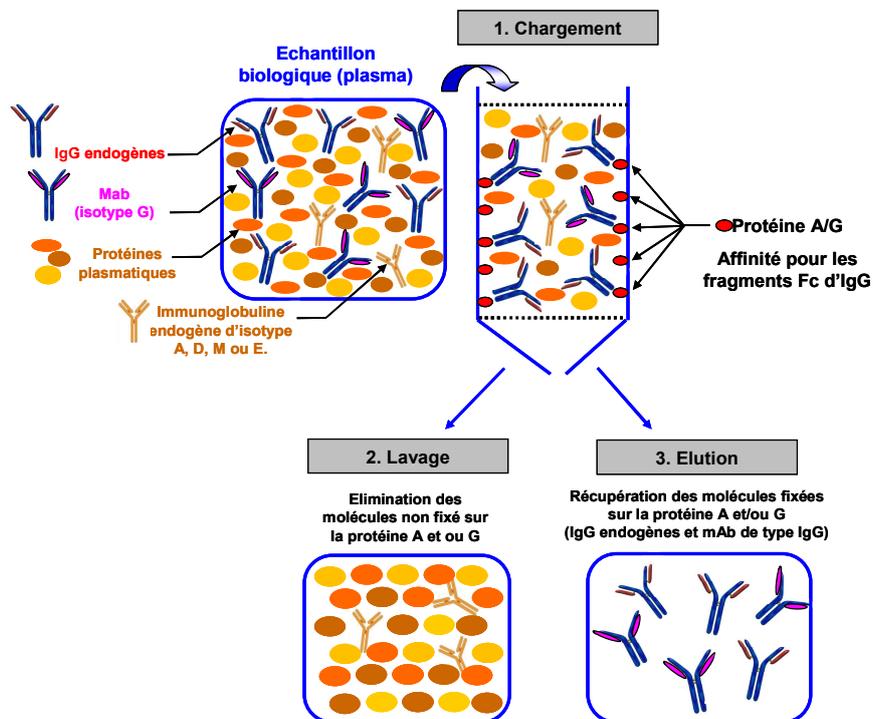
#### **4. Enrichissement en anticorps sur protéine A et/ou G**

Cette technique repose sur l'interaction réversible entre une protéine et un ligand spécifique immobilisé de façon covalente sur un support. Dans le cas de la

quantification des mAbs les ligands correspondent aux protéines A [139, 140] ou G [131, 140]. Ces protéines sont des protéines natives et recombinantes d'origine microbienne (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* respectivement) qui se lient aux immunoglobulines de mammifères. La protéine A et la protéine G se lient avec une haute affinité et une haute spécificité à la région Fc d'immunoglobulines de diverses espèces de mammifères, et notamment les IgGs humaines. Cette technique, qui permet de recueillir seulement la fraction des IgGs, est d'ailleurs très utilisée pour purifier les anticorps à partir de mélanges biologiques (liquide d'ascite, d'un sérum ou d'un surnageant de culture). L'utilisation des protéines A ou G est dictée par l'isotype de l'anticorps à purifier et l'espèce à laquelle le fragment Fc appartient. Globalement peu de différences d'affinité envers les IgGs humaines existe entre les deux protéines si ce n'est pour les IgG3 pour lesquelles la protéine G présente une affinité beaucoup plus importante que la protéine A. Dans tous les cas la capture du mAb d'intérêt se basant sur la reconnaissance du fragment Fc et non sur le site de fixation à l'antigène, cette technique permet de récupérer la fraction totale des mAbs pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Ces protéines sont typiquement fixées sur un support solide comme des billes magnétiques ou une résine d'agarose. Pour les deux supports il existe des kits de purification prêts à l'emploi avec greffage de protéine A, de protéine G ou des deux protéines A et G [140]. Lorsque le support est une bille magnétique le procédé de purification suit les mêmes étapes que l'immunocapture précédemment décrite et illustrée sur la figure 18.

Lorsque le support est une résine d'agarose on parlera de chromatographie d'affinité. Les résines d'agarose greffées peuvent se présenter sous forme de cartouches individuelles prêtes à l'emploi pour centrifugation et sont en général réutilisables une dizaine de fois. Les résines d'affinité sur lesquelles sont greffées les protéines A (ou/et G) sont d'abord mises dans des conditions qui favorisent la liaison spécifique des protéines A (ou/et G) avec le fragment Fc des IgGs. Après conditionnement, l'échantillon plasmatique contenant le mAb d'intérêt est chargé sur la résine. Les anticorps présentant dans leur structure un fragment Fc d'IgG (mAb d'intérêt et IgG endogènes) vont donc se lier aux protéines A (et/ou G) présentes sur la résine. Après élimination des molécules non liées, la fraction contenant les molécules liées (IgGs et mAb d'intérêt) est éluée à l'aide d'un solvant acide qui permet de rompre la liaison « protéines A (et/ou G)-Fc d'IgGs ». La figure 19 reprend schématiquement les différentes étapes de ce procédé.



**Figure n° 19 : Représentation schématique du principe de purification des anticorps par chromatographie d'affinité sur protéine A et /ou G.**

En se liant à la fraction Fc de l'anticorps, la chromatographie d'affinité par protéine A et/ou G présente l'avantage de doser la fraction totale du mAb mais aussi d'être facilement transposable à l'ensemble des mAb de type IgG présentant dans leur structure un fragment Fc humain. Ce procédé a d'ailleurs été employé par plusieurs équipes pour quantifier des mAbs différents. De plus, les niveaux de sensibilité atteints avec ce procédé de purification sont suffisamment bas pour quantifier la majorité des mAb au niveau plasmatique après administration aux doses thérapeutiques. Enfin au regard des kits commercialisés prêts à l'emploi, ce procédé est facile à mettre en œuvre et ne demande pas de développement spécifique pour chaque mAb à doser tant pour les systèmes magnétiques que pour les systèmes chromatographiques.

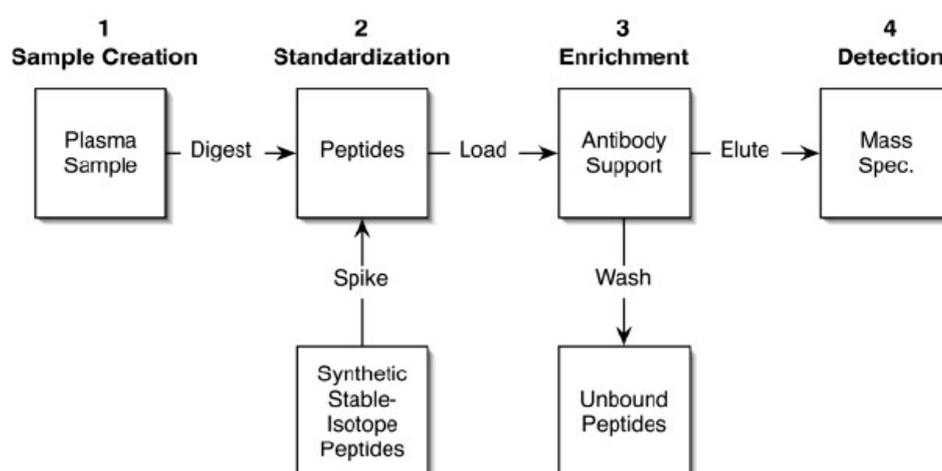
## **B. Techniques de séparation des peptides**

Les techniques de séparation des protéines dans un échantillon plasmatique peuvent être suivies d'une étape de protéolyse et d'une séparation des peptides obtenus. L'échantillon plasmatique peut aussi être directement soumis à protéolyse, puis les peptides sont séparés avant d'être analysés [128]. Une première technique d'enrichissement d'un peptide dans un mélange complexe est l'utilisation d'anticorps

spécifiques dirigés contre le ou les peptides à analyser suivi d'une élution rapide dans le spectromètre de masse.

## 1. Immuno-enrichissement des peptides

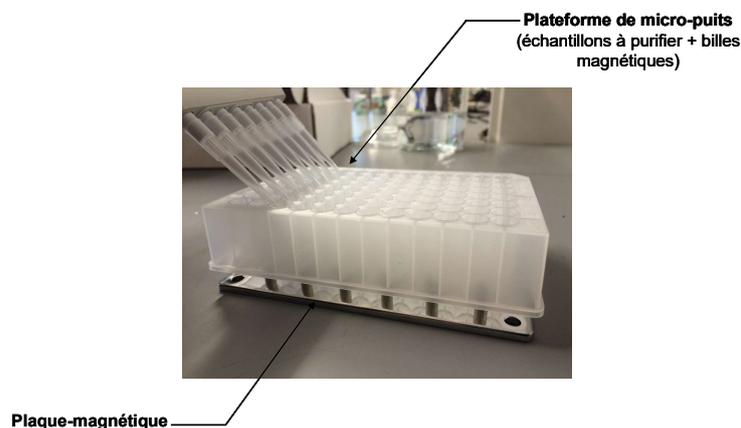
L'immuno-enrichissement des peptides après la protéolyse a été décrites par le groupe Anderson en 2004 sous le nom de SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) [145]. Cette technique a été employée dans le but d'atteindre des limites de quantification comparables à celles obtenues après enrichissement des protéines décrites précédemment (techniques d'immunocapture et de chromatographie d'affinité sur protéine A/ou G). Dans cette étude préliminaire d'Anderson *et al*/ menée sur quatre peptides, l'enrichissement de chaque peptide est d'environ un facteur 100. Cette solution est maintenant commercialisée et les anticorps employés sont recyclables. La figure 20 montre le principe général de cette technique qui combine quatre étapes : **(1)** la protéolyse de l'échantillon protéique en peptides, **(2)** l'ajout des peptides marqués par un isotope stable et servant d'étalon interne, **(3)** l'enrichissement en peptides à quantifier par immuno-capture qui sont généralement en faible abondance par rapport à l'ensemble des peptides générés par la protéolyse des protéines plasmatiques, **(4)** la quantification par spectrométrie de masse.



**Figure n° 20 : Diagramme d'immuno-enrichissement des peptides de la méthode SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) ([www.siscapa.com](http://www.siscapa.com)).**

Des optimisations ont été apportés à ce système afin d'augmenter le débit d'analyse grâce à l'automatisation de la procédure d'enrichissement. Cette

automatisation a commencé par l'immobilisation des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les peptides d'intérêt (peptides de la protéine à quantifier et peptides étalons interne marqués) sur des billes magnétiques. La phase de capture et d'éluion des peptides d'intérêt est possible grâce à des plaques magnétiques attirant les billes. Le système de plaque de 96 micro-puits couplée à une plaque magnétique s'adaptant sur un automate est illustré sur la figure 21.



**Figure n° 21 : Système de plaque magnétique et plaque de micro-puits pour l'automatisation de la méthode SISCAPA d'immuno-enrichissement des peptides sur billes magnétiques ([www.siscapa.com](http://www.siscapa.com)).**

L'étape d'immuno-enrichissement est ensuite suivie d'une chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse MS/MS pour la quantification. Anderson *et al* ont comparé les résultats obtenus avec et sans immuno-enrichissement et ont montré des gains de sensibilité pouvant atteindre un facteur presque de 10 000. Ces travaux confirment le rôle déterminant de la technique de purification des échantillons avant une analyse en spectrométrie de masse pour améliorer la sensibilité. Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence le fort potentiel de la spectrométrie de masse pour devenir une alternative crédible aux dosages immuno-enzymatiques en terme de limite de détection. Cependant, cette technique intéressante par son rendement, présente les inconvénients déjà mentionnés des techniques de type immunodosage et n'a pas encore été employée pour la quantification des mAbs. En effet, bien que cette technique permette de doser la fraction plasmatique totale des mAbs, son manque d'universalité au regard de l'ensemble de cette classe pharmacologique et la nécessité de développer un anticorps de capture spécifique nous a amené à ne pas retenir ce procédé pour notre développement.

## 2. Chromatographie sur phase solide (SPE)

Des techniques de chromatographie en phase solide unidimensionnelle (chromatographie échangeuse de cations Oasis MCX® ou chromatographie en phase inverse C18 RP) ou bidimensionnelle (chromatographie en phase inverse C18 RP et chromatographie échangeuse de cations) sont couramment utilisées pour l'enrichissement de peptides. Dans le cadre des mAbs, Yang *et al* et Heudi *et al* ont eu recours à ces procédés, le premier associant une chromatographie en phase inverse (RP-SPE) suivie d'une chromatographie échangeuse de cations (chromatographie bidimensionnelle) [128] et le second une simple chromatographie par échange de cations (unidimensionnelle) [133].

L'une des approches les plus utilisées est le fractionnement par échange de cations (SCX) après protéolyse enzymatique. En fonction de sa composition en acides aminés, chaque peptide va posséder un point isoélectrique différent. Ainsi, en utilisant un support chargé négativement quel que soit le pH (par exemple un support sur lequel est greffé un acide sulfonique), et en déposant l'échantillon en milieu acide, la majorité des peptides seront retenus sur le support puisqu'ils seront chargés positivement. Ensuite, en augmentant progressivement le pH et/ou la force ionique, les peptides les plus acides vont être élués. Les peptides les plus basiques seront quant à eux élués en dernier. Si de nombreuses fractions sont réalisées, la matrice peut être fortement simplifiée. Cette approche nécessite donc une première optimisation permettant de définir dans quelle fraction va se trouver le peptide d'intérêt afin d'analyser seulement cette fraction. Le fractionnement de l'échantillon peptidique par échange d'ions est donc une méthode moins onéreuse que l'immuno-enrichissement puisqu'elle ne nécessite pas d'anticorps.

Le principal inconvénient du fractionnement par SPE réside dans le nombre assez important de fractions à analyser. Ceci n'est bien sûr un problème que lorsque plusieurs analytes élués dans différentes fractions doivent être quantifiés mais qui peut s'avérer être nécessaires lorsque plusieurs peptides sont utilisés pour quantifier et identifier une protéine afin d'améliorer la spécificité de la méthode. Enfin, même si de nombreuses fractions sont réalisées, il reste très certainement des peptides issus de protéines majoritaires dans la fraction à analyser. Ces peptides peuvent causer suffisamment de suppression de signal en source d'ionisation pour limiter la sensibilité de la méthode. Cependant, associée à des techniques de séparation des protéines, une technique de séparation des peptides après clivage des protéines peut permettre un gain en spécificité et en sensibilité d'une méthode de dosage.

## II. Quantification des anticorps monoclonaux en spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est devenue un outil puissant pour la quantification des protéines dans un mélange et tend à se développer pour la quantification des mAbs grâce à sa haute sensibilité, sa haute spécificité et la capacité de multiplexage qu'elle laisse envisager. En spectrométrie de masse, la molécule est analysée sous une forme ionisée et pour la quantifier, le détecteur enregistre l'intensité du signal associé à cette espèce (rapport  $m/z$ ) en fonction du temps. On obtient alors un chromatogramme dont l'abscisse est le temps et l'ordonnée est l'intensité de l'ion considéré. Différents modes d'analyses peuvent être utilisés, mais dans le cas de l'analyse des protéines le mode privilégié est le mode *MRM* que nous détaillerons dans le chapitre 3. Comme précisé au début de ce chapitre, la stratégie de quantification à partir des peptides issus de la protéolyse de l'anticorps n'est plus à confirmer et à déjà largement fait ses preuves dans le cadre de la quantification des mAbs dans des matrices biologiques complexes. La quantification des protéines (et donc des mAbs) ne se fait pas à partir du signal généré par la molécule intacte ionisée mais à partir du signal généré par les peptides spécifiques issus de la protéolyse enzymatique de la protéine d'intérêt. La sensibilité des techniques développées pour quantifier les mAbs dans les matrices biologiques est de l'ordre de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  à 25  $\mu\text{g/mL}$  et les fragments obtenus en MS/MS à partir des peptides spécifiques permettent d'identifier sans ambiguïté une protéine.

### A. Quantification de la protéine à partir des peptides

La gamme limitée en masse des spectromètres basse résolution ne permet pas d'analyser des protéines intactes de haute masse moléculaire.

Par ailleurs, plus la protéine va être importante en taille, plus elle sera protonée lors du processus de formation des ions par ESI, et cette protéine ne présentera pas qu'un seul état de charge, mais une distribution d'états de charge : chaque molécule ne portera pas le même nombre de protons à l'issue du processus de désorption-ionisation. Il en résulte une perte de sensibilité puisque les composés sont répartis sous différentes espèces moléculaires protonées (plusieurs dizaines), alors que les peptides suffisamment courts ne présentent en comparaison que 2 ou 3 états de charge en fonction de leur séquence. Ainsi dans le cas d'une source

d'ionisation type ESI, l'ionisation de macromolécules crée une enveloppe très complexe d'ions multichargés qui nécessite l'utilisation d'algorithmes de déconvolution menant au spectre dérivé et à la masse moléculaire de la protéine. Dans ce contexte une protéolyse est systématiquement réalisée avant l'analyse des mAbs en LC-MS/MS [130-142]. Ces peptides présentent un spectre de masse simplifié par rapport à la protéine intacte, car leur faible masse moléculaire provoque peu d'états de charge lors du processus d'ionisation par électrospray (ESI).

Bien qu'une autre technique d'ionisation, la technique de désorption-ionisation par MALDI, génère nettement moins d'états de charges, y compris pour les protéines de haute masse moléculaires, l'ESI est généralement la technique de référence pour la quantification des protéines en raison des facilités de couplage avec la chromatographie en phase liquide [130-142]. Toutes les méthodes développées pour la quantification des mAbs ont d'ailleurs eu recours à ce mode d'ionisation.

## **B. Protéolyse enzymatique des anticorps monoclonaux**

Afin de générer des peptides, la protéine doit être protéolysée (ou « digérée ») par une enzyme. La protéolyse enzymatique consiste à fragmenter de manière localisée une protéine au moyen d'une protéase. Les enzymes, comme toutes les protéines, sont très sensibles à la température, au pH et à la force ionique, ainsi les conditions de protéolyse doivent être adaptées selon les enzymes utilisées. Concernant la température, comme pour la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions catalysées par des enzymes augmente en général avec la température. Cependant, l'élévation de la température au-dessus de 50 à 60°C peut modifier la structure des protéines. Pour les enzymes, le maintien de leur structure est nécessaire à la fixation du substrat. Aussi, une élévation trop importante de la température peut conduire à la perte de l'activité enzymatique. Il existe donc une température optimale correspondant à la température physiologique, 37°C.

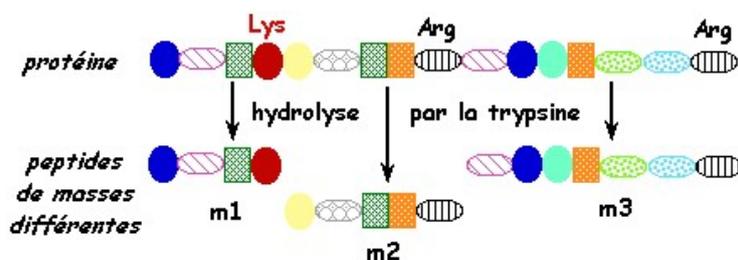
Cependant, comme décrit dans le chapitre 1.1.A, les protéines et donc les mAbs possèdent des structures secondaires et tertiaires qui vont limiter l'accès de l'enzyme aux sites d'hydrolyse. Ces structures sont permises par des liaisons hydrogènes et par des ponts disulfures. Différents traitements sont généralement effectués pour rompre ces structures secondaires et tertiaires et diminuer la gêne stérique. D'une manière générale, la protéolyse enzymatique des mAbs se déroule en trois étapes.

La première étape consiste à réduire les ponts disulfures par chauffage de la molécule en présence d'agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) ou la tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine (TCEP). Pour améliorer l'accessibilité de l'enzyme à ces sites de clivages certains ont recours à une dénaturation en présence d'agents chaotropes (tels que l'urée ou l'hydrochlorure de guanidine), de détergents (comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) ou le déoxycholate de sodium) ou de solvants organiques. L'utilisation de SDS est très courante lors de l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide mais est évitée si l'échantillon doit être analysé par spectrométrie de masse sans être au préalable purifié sur un gel. En effet, les détergents non volatils comme le SDS ne sont pas compatibles avec la spectrométrie de masse. La dénaturation par solvant organique peut être problématique puisque les protéines peuvent précipiter en présence de ces solvants. La dénaturation par des agents chaotropes, notamment par l'urée est donc la plus largement utilisée en l'absence d'électrophorèse sur gel. Cependant l'ajout d'urée à de fortes concentrations lors de l'étape de dénaturation nécessite par la suite de diluer l'échantillon avant l'ajout de l'enzyme de clivage afin d'éviter qu'elle aussi soit dénaturée. Cette étape de dilution peut conduire à une diminution de la sensibilité de la méthode lorsque la protéolyse n'est pas suivie d'une étape de concentration.

La seconde étape consiste à bloquer les cystéines libres afin d'éviter leur oxydation et la reformation des ponts disulfures en ajoutant un agent alkylant tel que l'iodoacétamide (IAA).

La troisième étape correspond à l'ajout de l'enzyme de protéolyse qui va cliver la séquence d'acides aminés en divers endroits et générer des peptides.

L'enzyme la plus couramment utilisée est la trypsine issue du pancréas de porc [130-138, 140-142]. C'est une enzyme extrêmement spécifique hydrolysant la liaison peptidique côté C-terminal après les lysines (K) et les arginines (R) sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline, comme l'illustre la figure 22.



**Figure n° 22 : Principe de la formation de peptides par protéolyse trypsique d'une protéine.**

La trypsine est active dans des milieux légèrement basiques (pH 8) en présence de sels (tampons salins). La chymotrypsine, synthétisée en même temps que la trypsine au niveau du pancréas, peut induire des coupures supplémentaires lors de la protéolyse trypsique, ce qui complique l'interprétation des spectres de masse. Pour pallier ce problème, il existe une trypsine traitée avec un inhibiteur irréversible de la chymotrypsine, le tosyl-L-phenylalanine chlorométhylcétone (TPCK). Le TPCK inhibe l'activité de la chymotrypsine sans modifier l'activité de la trypsine. La majorité des méthodes de quantification des mAbs ont d'ailleurs été développées avec ce type de trypsine. Cependant Hagman *et al* et Lesur *et al* ont utilisé une trypsine non traité par TPCK et ont tout de même pu quantifier des mAbs au niveau plasmatique avec suffisamment de précision (coefficient de variation intra-journalier portant sur les concentrations mesurées inférieur à 15 %). Théoriquement, plus il y a d'enzymes, meilleure est l'efficacité de la protéolyse. Cependant, une concentration trop importante d'enzyme peut conduire à une autodigestion également appelée autolyse de celle-ci et donc à une efficacité de protéolyse limitée. De manière générale, les ratios enzyme/substrat (E/S), c'est-à-dire enzyme/protéine utilisés varient de 1/20 à 1/100 par rapport à la quantité totale de protéines présente dans l'échantillon au moment de l'étape de protéolyse [147]. Ces ratios permettent une protéolyse des composés d'intérêt suffisante pour générer des peptides détectables en spectrométrie de masse tout en limitant l'autolyse de l'enzyme. Les échantillons sont en général incubés pendant une durée allant de 2 à 16 heures (souvent une nuit entière) selon la complexité de l'échantillon et la faculté de la protéine d'intérêt être clivée par l'enzyme de protéolyse [130-135, 138, 140-142]. L'inconvénient majeur de la protéolyse en solution reste la durée d'incubation qui peut être très longue et limiter considérablement les délais de quantification des protéines. Pour réduire la durée de cette étape, certaines équipes ont eu recours à plusieurs techniques comme par exemple l'augmentation de la température d'incubation de l'enzyme [137] et la protéolyse sous agitation [136]. D'autres procédés ont été utilisés afin de réduire la durée de cette étape tels que la protéolyse assistée par micro-ondes [136] ou par ultra-sons. En augmentant la température à 55°C au lieu de 37°C, Li *et al* ont réduit le temps d'incubation trypsique, le faisant passer de 4 h à 30 min avec une efficacité de protéolyse comparable [137]. En revanche l'utilisation de la protéolyse assistée par micro-ondes afin d'en réduire la durée n'a pas été contributive dans cette étude. Lesur *et al* ont également étudié l'effet de la température, de l'assistance par micro-onde et du temps sur la quantité de peptide générée. Ces travaux ont mis en évidence, différents profils de formation

des peptides vis-à-vis de la protéolyse. Ils distinguent trois catégories : la première correspond aux peptides pour lesquels la quantité générée atteint son maximum en 30 min indépendamment de la température et de l'assistance par micro-onde pour décroître rapidement au cours du temps. La seconde catégorie correspond aux peptides pour lesquels l'augmentation de la température accélère leur formation, avec atteinte du maximum de concentration en 60 min à 60°C contre toute une nuit à 37°C. Enfin la troisième catégorie correspond aux peptides pour lesquels la température, l'assistance par micro-onde et le temps n'ont aucun impact sur leur formation avec un plateau de concentration atteint en 20 minutes indépendamment des conditions d'incubation [136]. Les travaux de Jiang *et al* confirment également le caractère peptide dépendant vis-à-vis des conditions optimales de protéolyse [135]. Au cours du développement de leur méthode ils ont pu observer que pour un des deux peptides quantifiés ni la température, ni le temps d'incubation n'avait d'impact sur la quantité de peptide générée. A l'inverse pour le second peptide quantifié l'élévation de la température à 50°C doublait la quantité de peptide générée comparé à 37°C. En revanche l'augmentation de la température de la protéolyse à 60°C diminuait considérablement la quantité de ce peptide. Ces expériences ont été conduites sous protéolyse assistée par agitation. En combinant l'élévation de la température et l'agitation, Jiang *et al* ont réduit le temps de protéolyse à 30 min.

Par ailleurs, la quantité d'enzyme est un autre facteur prépondérant dans l'efficacité de la protéolyse. En effet une quantité d'enzyme plus élevée peut aboutir à des temps de protéolyse plus courts mais risque d'augmenter la concentration en peptides issus de l'autolyse de l'enzyme de protéolyse. Ceci peut avoir pour conséquence une perte de sensibilité du dosage à cause d'une augmentation des phénomènes de suppression d'ions liés à la présence de peptides issus de l'autolyse de l'enzyme de protéolyse. Ce problème peut cependant être évité par l'utilisation de trypsine méthylée qui empêche son autolyse. Cependant, compte-tenu de son prix élevé la trypsine non modifiée reste également utilisée.

En marge de l'utilisation de la trypsine il est intéressant d'ajouter que certaines équipes ont eu recours à une autre approche consistant en une étape de pré-protéolyse par une autre enzyme : la Lysine C endopeptidase. Il s'agit d'une sérine protéase qui clive les protéines en C-terminal au niveau des lysines. Contrairement à la trypsine, cette enzyme clive également les lysines suivies d'une proline la rendant intéressante en complément à la protéolyse trypsique pour diminuer le nombre de clivages manqués par la trypsine. Lebert *et al* [141] ont eu recours à cette stratégie en réalisant une pré-protéolyse par la lysine-C suivit d'une protéolyse trypsique pour

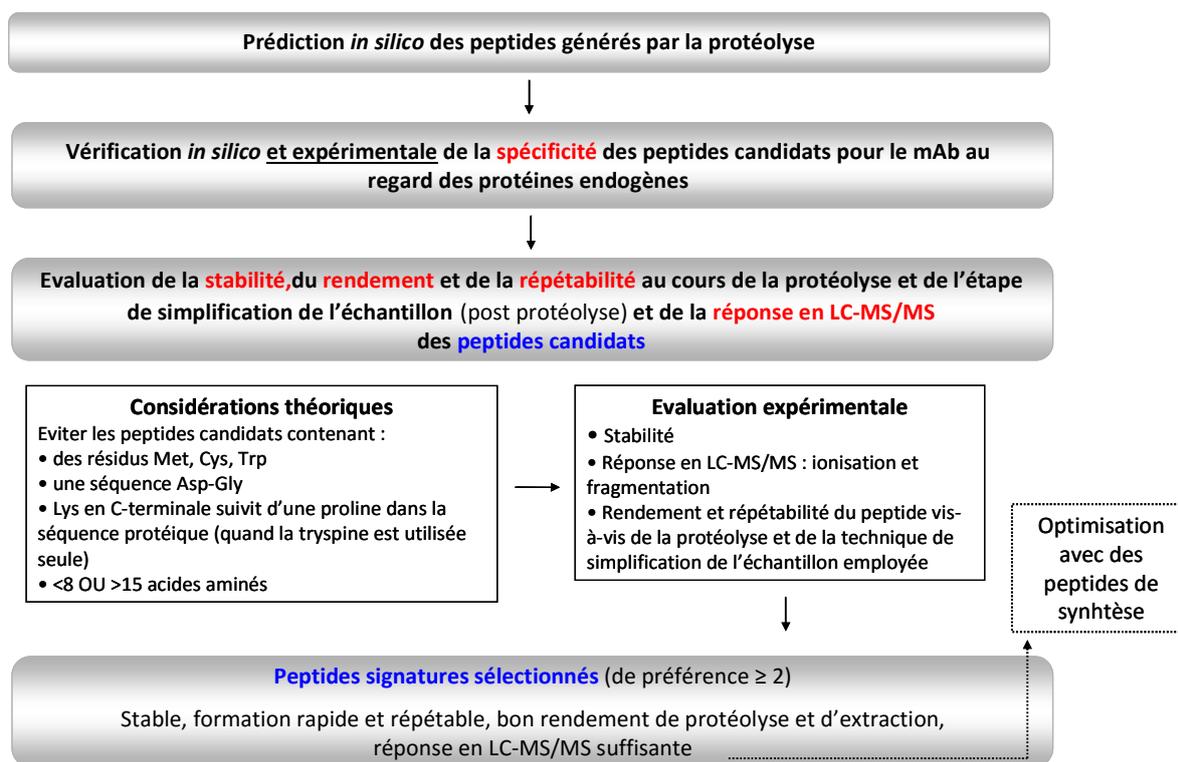
quantifier trois variant idiotypiques d'un anticorps (IgG4, IgG1 et IgG2). Cependant cette stratégie rajoute une étape dans le traitement des échantillons introduisant des biais supplémentaires et une variabilité potentielle dans les résultats. Par ailleurs le recours à deux enzymes de protéolyse allonge le temps de traitement des échantillons. Cette approche peut être intéressante dans le cas où la protéolyse trypsique ne permet pas à elle seule de cliver tous les peptides d'intérêts car présentant dans leur séquence une lysine suivi d'une proline au niveau de la séquence protéique.

### **C. Critères de choix des peptides retenus pour la quantification**

La sélection du ou des peptides signatures du mAb à quantifier est une étape cruciale dans le développement d'une telle méthode de dosage pour garantir de la spécificité, de l'exactitude, de la précision et de la sensibilité de la méthode. Tout d'abord, puisque la quantification par spectrométrie de masse d'une protéine est basée sur la quantification d'un ou de plusieurs peptides obtenus après protéolyse enzymatique, il est indispensable de s'assurer que le ou les peptides étudiés (peptides signatures ou *surrogate peptides*) soient le reflet réel de l'analyte à quantifier (dans notre cas un mAb). En effet, il peut exister des homologies de séquence entre différentes protéines. Ainsi, après protéolyse enzymatique, deux peptides de séquence identiques peuvent être générés à partir de deux protéines différentes. Le dosage de ce peptide donnera donc la concentration de la protéine cible plus celle de la seconde protéine. En plus du caractère unique et spécifique des peptides signatures vis-à-vis du mAb, d'autres critères de sélection sont à considérés notamment :

- l'absence de clivages manqués par la trypsine dans la séquence,
- la longueur de la séquence d'acides aminés,
- la composition en acide aminés du peptide,
- le rendement et la répétabilité du peptide vis-à-vis de l'étape de protéolyse et de l'étape éventuelle d'enrichissement peptidique post-protéolyse de l'échantillon,
- la stabilité du peptide pendant toute la procédure analytique,
- la rétention en chromatographie liquide,
- la capacité à s'ioniser et à se fragmenter par spectrométrie de masse en tandem (de celle-ci dépendra la sensibilité de la méthode).

Toutes les étapes liées à la sélection du ou des peptides signatures sont résumées dans la figure 23 et décrites plus en détail ci-dessous.



**Figure n° 23 : Critères de choix pour la sélection du ou des peptides signature pour la quantification d'une protéine (d'après Van den Broek et al, modifié [147]).**

Pour garantir du caractère unique et spécifique des peptides signature de la protéine dont ils sont issus, il faut d'abord vérifier que les peptides sélectionnés proviennent uniquement de la protéine d'intérêt. A cet effet plusieurs outils de bio-informatique permettent de prédire *in silico* les peptides générés après une protéolyse enzymatique d'une protéine dont la séquence est saisie (ProteinProspector requête *MS-digest* [148] ou ExpASY requête *PeptideMass* [149]). Après comparaison de la liste de peptides tryptiques générées *in silico* avec celle générée avec une molécule homologue (les IgG humaines dans le cas des mAbs), le caractère spécifique des peptides retrouvés uniquement dans la liste du mAb à quantifier peut être confirmé via un alignement de séquence contre une base de données regroupant les peptides retrouvés chez différentes espèces et notamment chez l'homme. Cet alignement de séquences est réalisé par l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search Tool) disponible en ligne [150]. Il est par conséquent préférable de choisir des peptides situés dans les régions déterminant la complémentarité de l'antigène (régions hypervariables de l'anticorps HVR ou CDR). L'absence d'interférence avec les protéines endogènes devra également être vérifiée

expérimentalement pour s'assurer de la spécificité des peptides candidats retenus. Ces derniers dont la spécificité vis-à-vis des protéines endogènes a été prouvée expérimentalement seront par la suite sélectionnés en fonction d'autres critères complémentaires.

Dans la mesure du possible les peptides signatures devront être sélectionnés selon leur composition en acide aminés. Pour prévenir l'oxydation durant le traitement de l'échantillon il est généralement recommandé d'éliminer les peptides contenant des résidus tryptophane (Tryp ou W), méthionine (Met ou M) ou cystéines (Cys ou C) [147]. De plus pour éviter la présence de clivages manqués par la trypsine (quand cette dernière n'est pas utilisée en association avec l'endopeptidase Lysine-C) les peptides présentant une lysine (Lys ou K) en C-terminale suivis d'une proline au niveau du site de clivage sont à éviter. Les peptides composés de 8 à 15 acides aminés sont théoriquement à privilégier pour réduire le nombre d'états de charge, obtenir une rétention chromatographique et une fragmentation dans la cellule de collision suffisante [147]. En dépit de ces recommandations théoriques l'établissement des peptides signatures les mieux appropriés reste difficile à prédire. L'effet de la suppression d'ion par des composées de la matrice co-élués est incertain tout comme l'effet de la longueur de la séquence en acide aminés sur la capacité d'ionisation et de fragmentation. Par conséquent certaines méthodes ont été développées avec des peptides comportant plus de 15 acides aminés [132-134, 137, 138, 141, 142]. Dans tous les cas la sélection des peptides signatures parmi les peptides spécifiques candidats requiert une analyse expérimentale pour évaluer le comportement de ces derniers vis-à-vis de la protéolyse, de l'étape de simplification de l'échantillon (si elle a lieu après la protéolyse) et de la réponse en LC-MS/MS.

La sélection de plusieurs peptides signatures est à privilégier pour augmenter la spécificité de la méthode [147, 151]. Cependant dans le cas des mAbs, étant donné leur forte homologie avec les protéines endogènes, il n'est pas toujours facile d'obtenir plusieurs peptides signatures avec à la fois une réponse en masse suffisante pour atteindre les concentrations attendues en thérapeutiques, un bon rendement et une bonne répétabilité vis-à-vis des étapes de protéolyse et de simplification de l'échantillon. La validation analytique de la méthode permet de sélectionner les peptides signatures sur ces critères via des essais de répétabilité intra et inter-journaliers et la détermination de la limite de quantification. Cependant au cours du développement il est recommandé d'évaluer le comportement de plusieurs peptides spécifiques vis-à-vis des différentes étapes du traitement de l'échantillon et de la réponse en spectrométrie de masse afin de maximiser le

nombre de peptides signature pouvant être monitorés pour la quantification. Les peptides non sélectionnés pour la quantification à l'issu de ces tests pourront toutefois être monitorés pour confirmer l'identité de la protéine et la quantification dans la mesure où il a été prouvé que le signal de ces derniers est proportionnel à la concentration en protéine d'intérêt dont ils sont issus [147].

## **D. La quantification absolue des anticorps monoclonaux**

A l'issu de la protéolyse enzymatique, le mélange peptidique est séparé par chromatographie en phase liquide puis analysé par un spectromètre de masse. La quantification absolue détermine la quantité exacte d'une protéine analysée, exprimée soit en moles soit en masse par cellule ou par volume de solution purifiée.

Actuellement, deux méthodes de quantification absolue des protéines sont envisageables. La première s'adresse davantage aux protéines endogènes (type biomarqueurs) qui possède un taux fixe. Il s'agit de la méthode de quantification via un peptide rapporteur marqué qui sera alors la plus adaptée (surtout si aucune matrice vierge de protéine n'est disponible). La deuxième s'adresse aux protéines thérapeutiques lors d'études de PK ou PK/PD pour lesquelles une large gamme de concentration est nécessaire. Dans ce cas la quantification se fera alors à l'aide d'une droite de calibration obtenue avec des échantillons de concentration connue de la protéine d'intérêt ou analyte en prenant garde à se restreindre à des concentrations comprises dans le domaine de linéarité du spectromètre de masse.

### **1. Quantification absolue via un peptide rapporteur marqué**

La première application de la protéolyse pour la quantification absolue d'une protéine par spectrométrie de masse date de 1996 et a été développée par Barr *et al* en prenant comme protéine modèle l'Apolipoprotéine A-I [152]. L'idée fondamentale consistait à utiliser un peptide généré par protéolyse de la protéine intacte, et d'utiliser la concentration de ce peptide comme représentation de la concentration de la protéine entière, en supposant que la protéolyse soit complète et donc qu'un ratio molaire 1:1 soit obtenu entre la protéine entière et le peptide formé. Dans cette méthode, un composé différent de l'analyte est ajouté en quantité connue dans l'échantillon à partir duquel l'analyte est quantifié. Cet étalon doit avoir des caractéristiques physico-chimiques (masse, hydrophobicité, pKa...) très proches de

l'analyte recherché afin de corriger un maximum de sources de variations. Dans cette approche l'étalon utilisé est un peptide marqué par un isotope stable dont la séquence est identique à celle du peptide signature généré par protéolyse de la protéine à quantifier. L'incorporation d'isotopes stables s'accompagne d'une augmentation de la masse de l'étalon par rapport à celle de l'analyte permettant de les discriminer en spectrométrie de masse.

Puisque l'étalon est ajouté en quantité connue dans l'échantillon, un simple produit en croix permet de remonter à la concentration de l'analyte (à condition de se trouver dans le domaine de linéarité de la réponse) : c'est le principe de la dilution isotopique (IDMS lorsqu'elle est appliquée à la spectrométrie de masse pour *isotope dilution mass spectrometry*).

## **2. Quantification absolue à partir d'une droite de calibration**

Cette stratégie de quantification est très fréquemment utilisée pour les dosages des médicaments dans les matrices biologiques. Elle consiste en la réalisation d'une gamme de concentration connue du composé d'intérêt ou analyte dans la matrice étudiée afin de réaliser une droite d'étalonnage du signal mesuré en fonction de la concentration en analyte. L'échantillon inconnu est ensuite analysé et sa concentration est déduite de l'équation de la droite. Cependant, les sources de variabilité sont nombreuses lors de l'analyse en LC-MS/MS des médicaments en milieux biologiques complexes et particulièrement lors de l'analyse des protéines qui nécessite en plus de la simplification et d'enrichissement des échantillons une étape de protéolyse enzymatique.

Afin de rendre robustes certains processus sujets à une variabilité comme les étapes de purification de la protéine, la protéolyse enzymatique, le processus d'ionisation en spectrométrie de masse, ou la dissociation dans la cellule de collision pour générer les fragments de peptides détectés en mode *MRM*, un étalon interne est introduit dans l'échantillon le plus tôt possible dans le procédé du dosage. Son rôle ici est de s'affranchir des fluctuations d'une analyse à l'autre par la quantification en parallèle de l'analyte et du standard interne qui doivent avoir autant que possible des propriétés physico-chimiques très proches. Pour ce faire l'étalon interne est ajouté le plus tôt possible en quantité connue et fixe dans tous les échantillons. La quantification est alors réalisée à partir du ratio de l'aire du ou des pic(s) chromatographique(s) du ou des peptide(s) de l'analyte sur l'aire du ou des pic(s) chromatographique(s) du ou des peptide(s) correspondant à l'étalon interne. La

droite de calibration est ainsi construite en rapportant le ratio « signal de l'analyte/ signal de l'étalon interne » en fonction de la concentration théorique en analyte correspondant à chacun des points de la gamme. Cette stratégie de quantification est possible par la capacité de la spectrométrie de masse à analyser plusieurs composés simultanément en les discriminant par leur rapport masse sur charge.

## E. Choix de l'étalon interne

Que ce soit pour l'approche IDMS ou pour l'approche utilisant une droite de calibration, le choix de l'étalon interne est déterminant pour la qualité du dosage. Dans le premier cas il détermine directement le niveau de concentration, et dans le second, il permet de corriger les biais liés aux différentes étapes de la méthode de dosage. Ceci impose à l'étalon interne d'être ajouté en quantité connue et fixe à chaque échantillon à doser le plus précocément possible dans le procédé de dosage afin que ce dernier puisse subir le maximum d'étapes. Ainsi les variabilités analytiques d'une analyse à l'autre pourront être corrigées lorsque l'analyse est réalisée sur le ratio des aires de l'analyte et de l'étalon interne. A cet effet l'étalon interne doit présenter les propriétés suivantes :

- ne pas se trouver dans l'échantillon biologique avant son ajout,
- présenter un delta en masse suffisant pour pouvoir le discriminer de l'analyte lors de l'analyse en spectrométrie de masse en mode *MRM*
- être physico-chimiquement le plus proche possible de l'analyte pour se comporter de la même façon que lui vis-à-vis des différentes étapes de la méthode dosage.

Pour la quantification de protéines en spectrométrie de masse via un peptide rapporteur, trois approches ont été développées consistant en l'utilisation d'un marquage isotopique du peptide ou de l'analyte. Pour la quantification des protéines thérapeutiques à l'aide d'une droite de calibration, en plus de ces approches de marquage isotopiques du peptide d'intérêt [129, 131-135], le recours à des d'analogues [128, 130] ou à un marquage isotopique du mAb a également été utilisé [136-139].

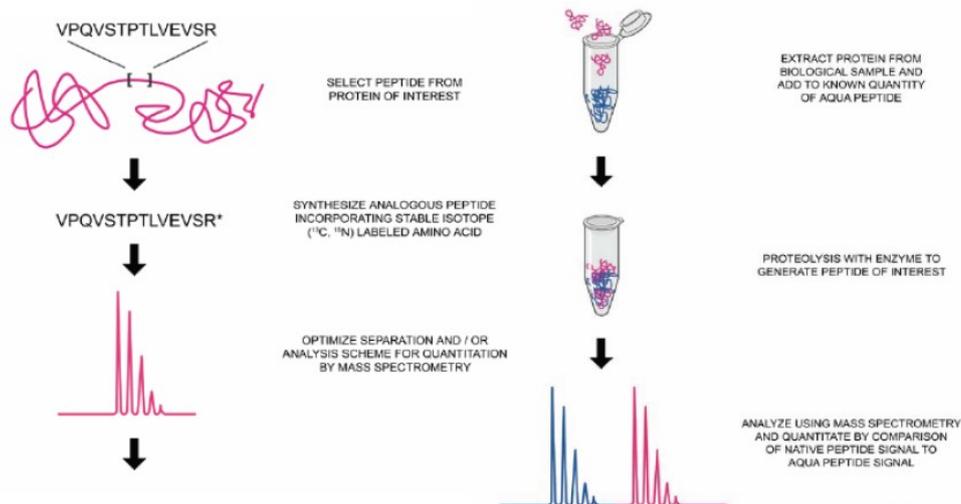
## **1. Peptide d'intérêt marqué par des isotopes stables : stratégie AQUA™ ou SIL-peptide**

L'approche d'étalonnage interne utilisant le peptide d'intérêt marqué par des isotopes stables (SIL-peptide pour *Stable Isotope Labeled Peptide*) également appelé méthode AQUA™ (pour *absolute quantification*) a été introduite en 2003 par Gygi *et al* [146] et commercialisée par Sigma-Aldrich. L'AQUA™ peptide ou SILpeptide est un peptide synthétique ayant la même séquence que le peptide d'intérêt mais qui est synthétisé avec des acides aminés marqués par un ou plusieurs isotopes lourds stables ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ), créant une incrémentation de masse de 6 à 10 Da. Le peptide lourd a ainsi rigoureusement les mêmes propriétés physico-chimiques que le peptide d'intérêt à l'exception d'une masse plus élevée. Les différents acides aminés et la nature de leurs marquages possibles sont présentés dans le tableau V.

**Tableau V : Différents acides aminés marqués pouvant constituer un AQUA™ peptide ou SIL peptide ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).**

Acides aminés marqués par des isotopes stables ( $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ )	Différence de masse entre le peptide natif et l'AQUA peptide
L-Arginine- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$	10 Daltons
L-Isoleucine- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$	7 Daltons
L-Leucine- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$	7 Daltons
L-Lysine- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_2$	8 Daltons
L-Phénylalanine- $^{13}\text{C}_9, ^{15}\text{N}$	10 Daltons
L-Proline- $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$	6 Daltons
L-Valine- $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$	6 Daltons

De tels peptides sont facilement produits par synthèse chimique et plusieurs laboratoires proposent ce service de synthèse de peptide marqués à façon facilitant la mise en œuvre de cette méthode. Cette approche permet l'étude quantitative des protéines dans des échantillons biologiques complexes. Elle est applicable à la quantification absolue par IDMS et à la quantification absolue au moyen d'une droite de calibration basée sur le ratio des aires de l'analyte et de l'étalon interne. La stratégie dans son ensemble est présentée sur la figure 24.



**Figure n° 24 : Schéma de la stratégie d'étalonnage interne type AQUA™ avec marquage isotopique du peptide d'intérêt (<http://www.sigmaldrich.com>).**

Un des phénomènes largement décrit qui peut être responsable de variabilité dans la quantification des protéines, particulièrement avec une source d'ionisation type ESI, est le phénomène de suppression d'ionisation en source décrit pour la première fois par Kebarle et Tang en 1993 [153]. Ce phénomène est principalement causé par le nombre important de composés présents dans la matrice qui peuvent être co-élués avec le peptide d'intérêt [154]. Sa part peut varier grandement d'une matrice à une autre et dépend en grande partie de la structure chimique de l'analyte. Par ailleurs ce phénomène est difficile à contrôler et peut également varier au cours des différentes analyses conduites sur une même journée en raison de plusieurs paramètres comme la température et la pression au sein de la source. Dans ce contexte, pour corriger ce biais il est nécessaire que le peptide de l'étalon interne ait une structure semblable au peptide spécifique de quantification de l'analyte et qu'il présente les mêmes caractéristiques de rétention chromatographique. Ainsi en plus de pouvoir corriger les biais de quantification liés au phénomène de suppression d'ions le recours au peptide spécifique du mAb marqué par des isotopes stables en tant qu'étalon interne permet également de prendre en compte la dégradation physico-chimique du peptide signature au cours de la protéolyse si ce dernier est ajouté juste avant cette étape [155]. Comme le montre la figure 25, tirée des travaux d'Arsene *et al*, le SIL-peptide aurait le même comportement que le peptide signature non marqué vis-à-vis des différentes étapes de la protéolyse qui sont susceptibles d'entraîner une éventuelle modification dans la séquence d'acide aminés (réactifs alkylant, chaleur, agitation par micro-onde...).

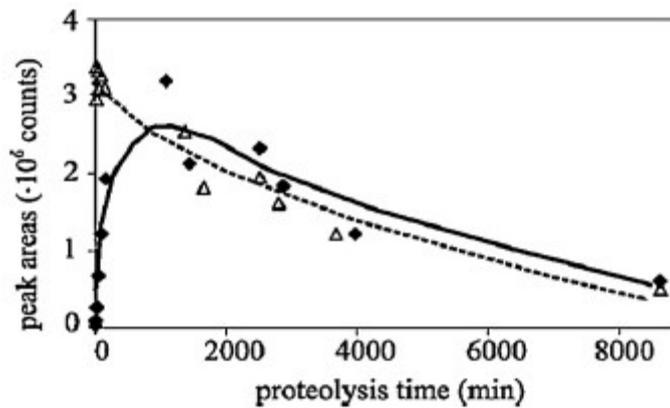


Fig. 5. Time profile of the abundance of the unstable peptide YSFLQNPQTSLCF-SESIPTPSNR (filled diamonds, solid line) during trypsin digestion of purified recombinant growth hormone and of the SIL-peptide internal standard containing a  $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}$ -leucine in position 11 (triangles, dashed line) added prior to digestion.

**Figure n° 25 : Correction de la dégradation physico-chimique du peptide d'intérêt généré au cours de l'étape de protéolyse trypsique (ligne pleine, losanges noirs) via l'utilisation d'un SIL-peptide de séquence identique (ligne discontinue, triangles blancs) [154].**

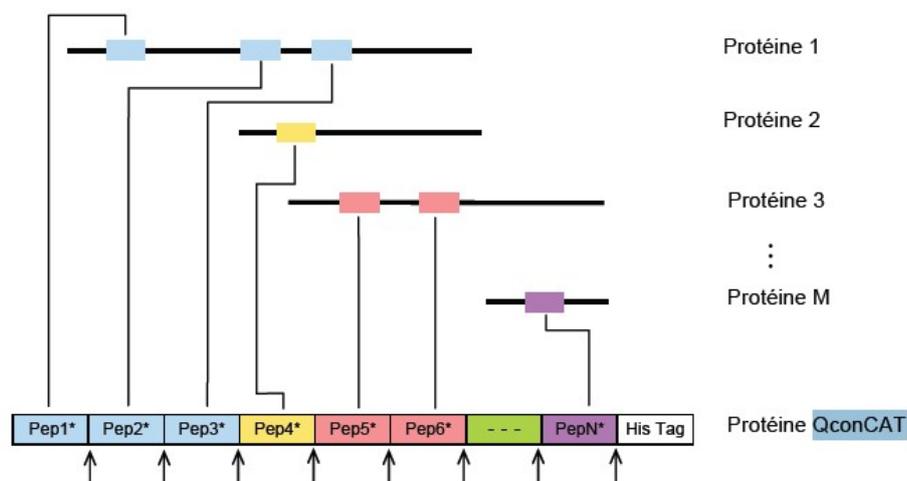
Plusieurs équipes ont d'ailleurs eu recours à cette approche pour quantifier des mAbs et ont obtenu des résultats en termes de répétabilité tout à fait satisfaisant (CV < 15 % portant sur les concentrations mesurées à l'issus des essais de répétabilité intra-journaliers) [129, 131-134]. Cette stratégie reste la plus utilisée pour faire de la quantification absolue en spectrométrie de masse.

Le recours au SIL-peptide comme étalon interne présente cependant quelques limitations : cette stratégie ne permet pas de contrôler le rendement de l'étape de protéolyse enzymatique et des étapes de traitement de l'échantillon réalisées en amont sur la protéine intacte. A cet effet d'autres approches ont été développées.

## **2. Polypeptide marqué : stratégie QconCAT**

Avec l'apparition des étalons internes appelés QconCAT, une étape supplémentaire vers le haut débit a été franchie. Cette stratégie a été initialement décrite par Beynon *et al* en 2005 [156]. Cette méthode consiste à concaténer différents peptides marqués par des isotopes stables (SIL-peptide ou AQUA™) et à produire un polypeptide artificiel (QconCAT) sous la forme d'une protéine recombinante lourde [156]. Après protéolyse enzymatique, les peptides marqués sont générés et utilisés pour la quantification. Cette technique permet de rassembler en une protéine tous les peptides marqués nécessaires à la quantification de

plusieurs protéines, avec la possibilité d'insérer plusieurs peptides spécifiques d'une même protéine (Figure 26).



**Figure n° 26 : Structure de la protéine QconCAT. Les sites de coupure par l'enzyme sont indiqués par des flèches (figure extraite des travaux de thèse de Mathieu Dubois adaptée de Beynon et al [3]).**

Cependant l'étalon QconCAT ne permet pas forcément de corriger le rendement de protéolyse bien qu'il soit présent dès le début de la préparation de l'échantillon. En effet, même s'il doit être hydrolysé par la trypsine pour libérer les peptides marqués, le rendement de clivage dépend de la conformation de la protéine. Cette conformation dépend de la séquence entière de la protéine. L'étalon QconCAT et les protéines ciblées ne peuvent donc pas avoir la même conformation. Ainsi le rendement de protéolyse ne peut être corrigé avec certitude par cette approche. Par exemple il a été démontré que certains peptides de l'étalon QconCAT pouvaient se protéolyser plus rapidement que les mêmes peptides issus de la protéine cible [157].

L'idéal pour pouvoir corriger toutes les étapes d'une méthode de quantification d'une protéine thérapeutique par spectrométrie de masse dans un milieu biologique (procédé de purification et protéolyse incluse) serait d'avoir comme étalon une protéine analogue voir identique à la protéine d'intérêt. C'est le principe des deux approches suivantes.

### **3. Analogue protéique**

D'autres approches utilisent des protéines entières comme étalon interne. L'intérêt de ces approches est de prendre en compte toutes les étapes du traitement de l'échantillon et notamment les étapes de simplification de l'échantillon qui ont lieu

avant la protéolyse et la protéolyse proprement dite. Ces étapes présentent rarement des rendements de 100 %. Ces étalons internes analogues protéiques doivent être le plus proche possible de la protéine à quantifier (dans notre cas un mAb) afin de se comporter de la même manière que l'analyte au cours de toutes les étapes du dosage. Par ailleurs il est nécessaire que ces étalons internes génèrent suite à la protéolyse enzymatique, des peptides spécifiques qui permettront de le discriminer des peptides de l'analyte à quantifier par spectrométrie de masse. De plus afin de corriger également les biais de suppression d'ions il faut que le peptide spécifique de l'étalon interne soit co-élué avec le peptide du mAb à quantifier. Des analogues de la protéine ayant pour origine une autre espèce animale et possédant quelques différences ponctuelles dans la séquence d'acides aminés peuvent être utilisés : Dubois *et al* ont ainsi utilisés un anticorps murin dirigé contre l'EGFR comme étalon interne pour quantifier dans le sérum humain le cetuximab qui est un anticorps chimérique également dirigé contre l'EGFR [130].

Cependant cette approche présente plusieurs limites. Comme évoqué précédemment étant donné le caractère protéine et peptide dépendant de l'étape de protéolyse il n'est pas évident de prévoir le profil de protéolyse enzymatique de l'analogue protéique. Les conditions de protéolyse optimales ne seront pas forcément identiques pour les deux protéines (l'analyte et l'étalon interne). Par ailleurs étant donné la nécessité d'avoir un étalon interne chimiquement proche de la molécule d'intérêt le nombre de peptides spécifiques candidats pour monitorer ce dernier sera limité. Ainsi il paraît peu prévisible et difficile d'obtenir parmi ce faible nombre de peptides spécifiques de l'analogue un peptide présentant à la fois un profil de protéolyse, de dégradation et de rétention chromatographique semblable au peptide spécifique de l'analyte à quantifier.

#### **4. mAb entier marqué : stratégie PSAQ**

L'approche la plus rigoureuse consiste finalement à utiliser la protéine entière, marquée par un ou plusieurs isotopes stables. Elle présente tous les avantages requis pour être utilisée comme étalon interne. Sa séquence et sa structure, et donc ses propriétés physico-chimiques, sont identiques à la protéine à quantifier. Leur comportement sera donc identique lors des différentes étapes de l'analyse et ils subiront les mêmes pertes éventuelles lors de la préparation d'échantillon. De plus, il sera élué en même temps que l'analyte. Ainsi en spectrométrie de masse, le meilleur étalon interne est l'analyte marqué par des isotopes stables comme le carbone 13 ou

l'azote 15. La transposition du marquage isotopique aux macromolécules a été permise par les techniques de production de protéines recombinantes, grâce auxquelles la protéine entière, marquée par isotope stable, est obtenue par production dans un milieu enrichi (avec un acide aminé marqué par des isotopes stables par exemple). Cette approche, dénommée PSAQ pour *Protein Standard Absolute Quantification*, a été décrite par Brun *et al.* en 2007 [158]. Cette étude a notamment comparé la précision de la quantification en utilisant les trois grandes approches d'étalonnage interne (AQUA, QconCAT et PSAQ). Les résultats montrent clairement l'intérêt des protéines entières marquées pour la précision de la quantification. L'efficacité du clivage par l'enzyme pour former les peptides est ainsi parfaitement contrôlée. Les peptides générés par protéolyse sont identiques aux peptides de la protéine cible et sont différenciables en spectrométrie de masse par leurs isotopes stables. Plus récemment cette approche a été utilisée par plusieurs équipes pour la quantification plasmatique de mAbs par spectrométrie de masse [136-139, 141] sans toutefois être comparée à une autre des stratégies d'étalon interne évoquées précédemment. Cependant théoriquement les protéines d'intérêt marquées sont incontestablement les étalons internes les mieux adaptés pour la quantification des macromolécules, d'autant plus si la protéine porte des modifications post-traductionnelles et que ces étalons sont produits dans des conditions identiques à la protéine. La question du rendement, du coût et de la capacité de production d'un tel étalon interne est cependant posée et reste la principale limite à leur utilisation.

En marge des étalons internes usuels utilisés pour la quantification absolue des protéines, il est intéressant d'ajouter que trois autres approches ont été développées pour la quantification relative des protéines, mais celles-ci ont surtout été appliquées à la protéomique et à l'identification de biomarqueurs en raison de la facilité avec laquelle des expressions différentielles peuvent être mesurées. La première, dénommée ICAT (*isotope coded affinity tags*), consiste à lier de manière covalente à la protéine une petite molécule organique composée de trois parties. La première partie de la molécule permet la liaison aux cystéines réduites (réaction sur les thiols libres). La deuxième partie de la molécule est un bras de liaison sur lequel est placé ou non le deutérium, donnant ainsi un incrément de masse pour différencier les deux molécules par un spectromètre de masse. Enfin la troisième partie de la molécule est une biotine qui possède une forte affinité pour l'avidine et la

streptavidine (KD = 10 - 15 M) pour extraire par affinité le peptide lié au réactif, la biotine ayant ici le rôle d'une sonde.

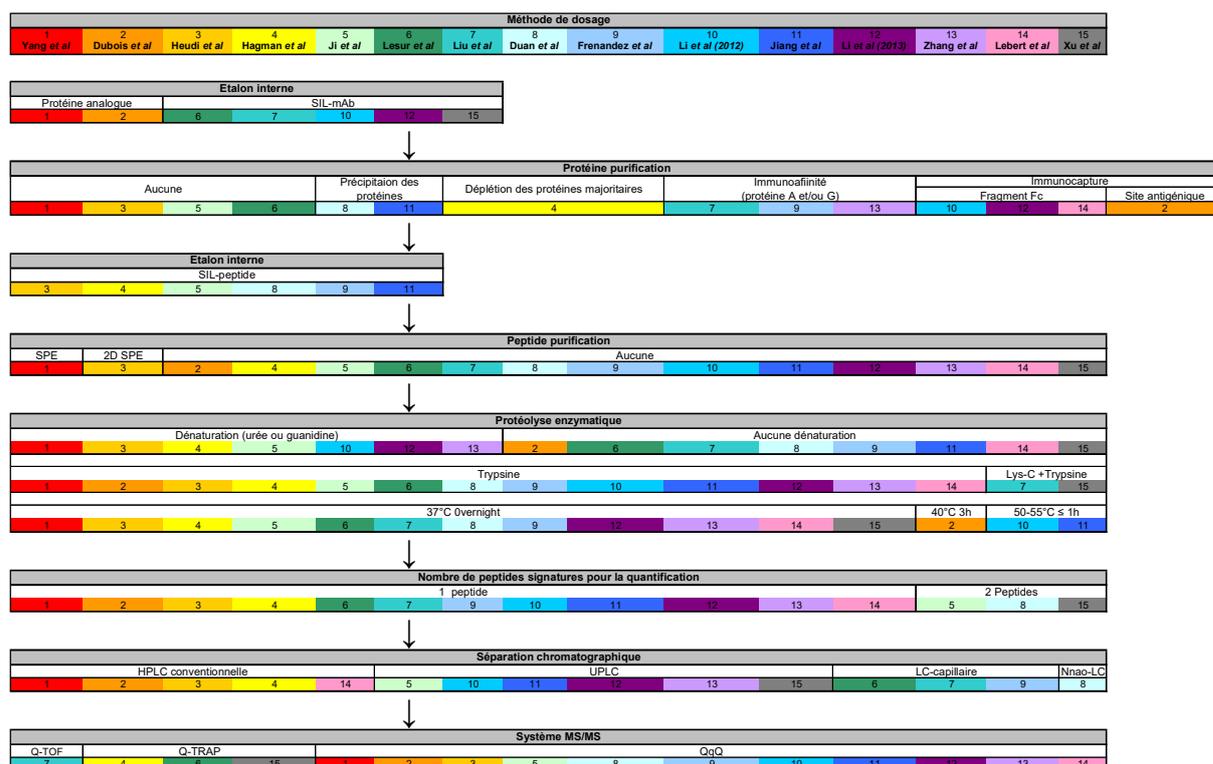
La deuxième approche développée pour la quantification relative des protéines est dénommée iTRAQ (*isotope tags for relative and absolute quantification*). Elle consiste à faire réagir de manière covalente sur les amines libres un réactif de marquage (parmi quatre prévus par le système) qui comporte une partie clivable par fragmentation dite « rapporteur » (chaque molécule possède un rapporteur de masse différente) et une partie « balance » qui fixe la masse totale de chaque étiquette à 145 Da quel que soit le réactif. Les échantillons marqués sont mélangés puis fractionnés par nano-LC et analysés par MS/MS. La fragmentation en MS/MS des peptides marqués génère les ions rapporteurs de bas poids moléculaire correspondant au réactif de marquage utilisé. Cette technique permet de différencier un peptide en fonction de son réactif de marquage donc selon le milieu d'où il provient.

Enfin ,la dernière approche, SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), consiste à faire croître des cellules dans des milieux contenant un acide aminé marqué par des isotopes stables et à comparer les intensités des protéines marquées et non marquées produites par des cellules sur deux types de milieux. Ces trois approches (ICAT, iTRAQ et SILAC) ont surtout remporté un succès pour l'analyse protéomique, et sont donc majoritairement utilisées pour effectuer une quantification relative et corrélérer différents niveaux d'expression protéiques à différents facteurs. Ces techniques ne trouvant pas leur place dans la quantification absolue des mAbs dans les milieux biologiques vis-à-vis des autres grandes stratégies d'étalonnage interne que nous venons de présenter nous ne les détaillerons pas ici.

### **III. Les difficultés liées à la quantification absolue de mAbs par spectrométrie de masse**

Quelle que soit la stratégie de dosage choisie, le développement d'une méthode de quantification absolue d'un mAb par spectrométrie de masse présente un certain nombre d'obstacles. Nous nous attacherons plus particulièrement à la quantification en milieu plasmatique, mais les mêmes difficultés peuvent être rencontrées dans d'autres matrices biologiques. Parmi ces difficultés, on trouve la complexité protéique du plasma, les faibles concentrations

auxquelles sont attendus les mAbs en thérapeutique, la spécificité des peptides signatures étant donné le fort degré d'homologie des mAbs avec les immunoglobulines endogènes, la nature de l'étalon interne et le caractère mAb et peptide dépendant de la protéolyse. Toutes ces difficultés sont autant de points à optimiser au cours du développement d'une méthode de quantification des mAbs dans les matrices biologiques pour s'assurer de la spécificité, de la sensibilité, de l'exactitude et de la précision de la méthode de dosage. La figure 27 reprend les différentes stratégies analytiques qui ont été développées par les équipes précédentes pour répondre à ces difficultés.



**Figure n° 27 : Stratégies analytiques des principales méthodes de dosages des mAbs en milieu plasmatique par spectrométrie de masse [128-142] .**

Comme nous l'avons déjà exposé précédemment, pour répondre aux difficultés du dosage liées à la complexité de la matrice biologique, il est nécessaire d'avoir recours à une ou des étapes de simplification de l'échantillon afin d'atteindre les concentrations attendues en thérapeutique. Pour améliorer la sensibilité de la méthode, une étape de concentration de l'échantillon (par évaporation et reprise du résidu par un volume plus faible, ou par ultrafiltration) peut également être envisagée. Les problèmes de sensibilité peuvent aussi être solutionnés par le recours à des spectromètres de masse de dernière génération de haute sensibilité.

La complexité de l'échantillon et la multiplicité des étapes de traitement que cela engendre nécessite l'emploi d'un étalon interne pour la quantification absolue afin de corriger les biais pouvant ainsi être introduits au cours du traitement de l'échantillon et de son analyse en LC-MS/MS. Le choix de ce dernier est crucial pour améliorer la précision de la méthode.

Le caractère protéine et peptide dépendant de l'étape de protéolyse nécessite une optimisation rigoureuse qui passe notamment par l'utilisation de trypsine purifiée et préalablement traitée pour éviter son autolyse et par l'étude de la cinétique de formation des peptides d'intérêts en fonction de différents paramètres (temps d'incubation, chauffage, agitation). Le recours à un agent dénaturant pour améliorer l'accessibilité de l'enzyme de protéolyse aux sites de clivage peut aussi être envisagé.

Enfin la spécificité de la méthode est assurée par le choix du ou des peptide(s) signature(s) sur lequel (ou lesquels) l'identification et la quantification du mAb est basée. Le caractère unique du peptide signature pour le mAb vis-à-vis des protéines endogènes doit donc être démontré. Cette évaluation est possible par l'analyse en mode *MRM* que confère la spectrométrie de masse en tandem. Cependant étant donné le fort degré d'homologie des mAbs avec les protéines endogènes le nombre de peptides spécifiques est limité, limitant ainsi le nombre de peptides pouvant être utilisés pour la quantification des mAbs car devant répondre aux exigences de la FDA relatives aux méthodes de dosage des médicaments dans les matrices biologiques [127].

#### **IV. Validation d'une méthode dosage selon les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration)**

A l'issue du développement d'une méthode de dosage il est indispensable de s'assurer, preuves expérimentales à l'appui, que cette dernière donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, pour permettre de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. A cet effet la validation analytique, étape ultime du développement d'une nouvelle méthode analytique avant son application en analyse de routine, permet d'évaluer les performances de la méthode par l'étude d'un certain nombre de paramètres appelés « critères de validation ». Ces critères de validation répondent à des exigences scientifiques et réglementaires différentes en fonction de

l'usage auquel est destiné la dite méthode (Directives Européennes, FDA, ICH, ISO,...). Dans le cadre du dosage des médicaments dans des matrices biologiques la validation de la méthode de dosage doit suivre les recommandations formulées par la FDA [127]. Les différents paramètres que ces guidelines recommandent d'évaluer sont présentés ci-dessous.

### **A. Evaluation de la spécificité**

Une méthode est spécifique si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt. Dans le cas des méthodes séparatives telles que le couplage LC-MS/MS, on parle plutôt de sélectivité : capacité à discriminer l'analyte à quantifier de n'importe quel autre composé susceptible d'être rencontré dans l'échantillon analysé. Ce paramètre est évalué en utilisant plusieurs sources de la même matrice (au moins six différentes selon la FDA [127]). Cela peut être dans notre cas des échantillons de plasma issus de donneurs différents par exemple. Chaque plasma « blanc » (c'est-à-dire un plasma exempt du ou des mAb à quantifier) doit être analysé dans les mêmes conditions que l'analyte c'est-à-dire conditions de traitement de l'échantillon, de protéolyse enzymatique et d'analyse LC-MS/MS identiques. L'absence de signal lors de la recherche des transitions *SRM (Single reaction monitoring)* spécifiques des peptides du ou des mAb à quantifier à l'issue de l'analyse d'un plasma « blanc » doit être recherchée. Dans le cas où la méthode est destinée à quantifier plusieurs mAb, la capacité de la méthode à les discriminer l'un de l'autre doit également être testée pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'interférence croisée entre les deux composés à quantifier.

### **B. Evaluation de la linéarité**

La linéarité se définit par la capacité d'une méthode d'analyse à l'intérieur d'un certain intervalle (gamme de concentrations attendues en thérapeutique), à fournir une réponse, ici un signal en spectrométrie de masse, proportionnelle à la quantité de l'analyte à doser (mAb) dans une matrice donnée (plasma humain). La détermination de la relation signal-concentration en analyte passe par l'établissement d'une droite de calibration obtenue à partir de l'analyse d'au minimum cinq points de gamme (ou standards de calibration) de concentration connue croissante et couvrant la gamme de concentration attendue en thérapeutique. Les standards de calibration

sont obtenus à partir de solutions préparées dans la même matrice biologique que les échantillons humains avec lesquels la méthode sera appliquée [127]. La droite de régression linéaire est calculée en utilisant l'équation  $y = ax + b$ , où  $y$  est le rapport des aires des pics issus de l'analyse LC-MS/MS (aire du pic du peptide du mAb/aire du pic du peptide de l'étalon interne),  $x$  la concentration en mAb et  $a$  et  $b$  deux constantes (respectivement le coefficient directeur de la droite et  $b$  l'ordonné à l'origine).

Selon la FDA [127], la linéarité est avérée lorsque le coefficient de corrélation  $r^2$  (test de Pearson's) est supérieur à 0,99 avec une valeur de l'ordonné à l'origine ( $b$ ) le plus proche possible de zéro (test de l'ordonnée à l'origine). En spectrométrie de masse il est également possible d'utiliser une droite de calibration avec une équation du second degré de la forme  $y = ax^2 + bx + c$  témoignant d'un phénomène de saturation du détecteur pour les hautes concentrations. L'évolution de la réponse en spectrométrie de masse en fonction de la concentration en analyte suit dans ce cas une régression quadratique avérée lorsque le coefficient de corrélation  $r^2$  est supérieur à 0,99 avec une valeur de l'ordonné à l'origine ( $c$ ) le plus proche de zéro. Il est important de noter que toute concentration obtenue en dehors de la zone de linéarité ne peut être acceptée (pas d'extrapolation possible).

### **C. Détermination de la sensibilité**

Elle correspond à la plus petite concentration pour laquelle il est possible de faire une mesure avec une précision et une justesse acceptables. La LLOQ (*Low Limit Of Quantification*) peut être déterminée soit visuellement par l'estimation de la concentration donnant un rapport signal sur bruit de 10 sur le chromatogramme soit expérimentalement à l'issue d'essais de répétabilité ( $n = 5$ ) par la recherche de la plus petite concentration pour laquelle le coefficient de variation (CV %) et l'exactitude sur les concentrations mesurées sont inférieurs à 20 % [127].

### **D. Evaluation de l'exactitude et de la précision**

Cette étape constitue le cœur d'une validation analytique. Il s'agit de démontrer que les résultats quantitatifs seront exacts et répétables dans le temps. Conformément aux exigences de la FDA [127], la détermination de ces paramètres passe par des essais de répétabilité conduits sur l'analyse d'échantillons

plasmatiques chargés en mAbs à au moins trois concentrations connues réparties sur toute l'amplitude de la gamme de calibration. Ces échantillons appelés contrôles qualités (CQ) ou quality Controls (QC) doivent être de concentrations différentes des standards de calibrations. Il est recommandé de définir un CQ bas (concentration en mAb d'environ trois fois la LLOQ), un CQ moyen (milieu de gamme) et un CQ haut (proche de la concentration la plus haute de la gamme). L'exactitude et la précision intra et inter-journalière sont évaluées à partir de l'analyse d'au moins 5 duplicats de chaque QC chaque jour (répétabilité intra-journalière) en répétant cette expérience sur plusieurs jours (répétabilité inter-journalière).

- **L'exactitude** est définie comme l'écart de la valeur mesurée à la valeur théorique. Elle est évaluée par le rapport de la moyenne des concentrations observées des CQ ( $C_{\text{obs}}$ ) sur la concentration théorique ( $C_{\text{théorique}}$ ), le résultat est exprimé en pourcentage selon la formule :

$$\text{Exactitude (\%)} = (C_{\text{obs}}/C_{\text{théorique}}) \times 100$$

La valeur mesurée moyenne ne doit pas dévier de plus de 15 % par rapport à la valeur théorique, excepté pour la LLOQ, où elle ne doit pas dévier de plus de 20 % par rapport à la valeur théorique [127].

- **La précision** est définie comme l'écart des valeurs mesurées par rapport à la valeur moyenne mesurée. Elle est évaluée par le coefficient de variation, pourcentage qui correspond au rapport de l'écart-type sur la concentration moyenne selon la formule :

$$\text{CV (\%)} = (\text{Ecart-type}/C_{\text{obs}}) \times 100$$

Le coefficient de variation de la valeur obtenue ne doit pas dépasser 15 %, excepté à la LLOQ, où la tolérance est là encore de 20 % [127].

## **E. Evaluation du rendement de la méthode**

Le rendement d'une méthode de dosage est défini pour un analyte dans une matrice donnée. Il permet d'évaluer la perte de l'analyte au cours des différentes

étapes du traitement de l'échantillon au cours de la méthode de dosage. Il s'évalue en comparant les résultats de l'analyse d'échantillons chargés en analyte avant la ou les étapes à étudier avec des échantillons chargés à une même concentration théorique en analyte juste après ces étapes (en considérant un rendement de 100 %). Ces expériences d'évaluation du rendement doivent être effectuées à trois concentrations connues réparties sur toute l'amplitude de la gamme de calibration [127]. En général on utilise les mêmes concentrations que celles utilisées pour l'évaluation de l'exactitude et de la précision à savoir les trois concentrations de CQ précédemment définies.

Le rendement de l'analyte ne doit pas forcément être de 100%, il n'y a pas réellement de valeur limite mais la mesure d'un analyte et de l'étalon interne doit être précise, répétable et la sensibilité suffisante pour atteindre les concentrations attendues en thérapeutiques [127]. Dans ce contexte il est tout de même préférable d'avoir des rendements au moins supérieurs à 50 voir 60 %. Un rendement trop faible démontre que les étapes de traitements de l'échantillon ne sont pas adaptées à l'analyte ce qui rend la méthode trop peu sensible, et augmente la variabilité de la méthode.

## **F. Détermination de la stabilité de l'analyte à doser**

Il est également recommandé, lors du développement d'une méthode de dosage devant satisfaire aux recommandations de la FDA, d'évaluer la stabilité de la molécule dans la matrice biologique selon les conditions de stockage des échantillons [127]. Dans le cadre du dosage des protéines par spectrométrie de masse il convient également d'évaluer la stabilité des peptides quantifiés dans le protéolysat durant toute la durée de l'analyse. L'évaluation de l'effet des cycles de congélations et de décongélations répétés sur la stabilité du produit peut également être nécessaire si les échantillons biologiques et/ou les solutions stocks sont amenées à subir ce type de cycle lors des études ultérieurement menées. Enfin il est également nécessaire de définir les conditions de stockage et la stabilité de l'analyte et de l'étalon interne dans les solutions pures utilisées pour la préparation des standards de calibration et des QC. En fonction des données bibliographiques il peut être possible de s'affranchir de certaines de ces études de stabilité en veillant toutefois à appliquer rigoureusement les même conditions de stockage (température,

contenant, matrice) que celles préconisées par les précédentes études rapportées dans la littérature [127].

Dans le cadre de nos travaux décrits dans ce manuscrit, nous avons développé une méthode analytique pour la quantification d'un mAb, le bevacizumab, dans une matrice biologique, le plasma humain. Cette méthode est développée afin de pouvoir réaliser des études PK et PK/PD complémentaires aux précédentes études menées chez les patients traités par cet anticorps et qui ont eu recours à un technique ELISA pour le dosage du bevacizumab. Pour cela nous nous sommes inspirés des précédentes techniques développées pour le dosage des mAbs par spectrométrie de masse dans des matrices biologiques que nous venons de détailler dans ce chapitre. Notre méthode sera par conséquent validée dans le respect des recommandations de la FDA dont les critères de validations viennent d'être décrits dans ce paragraphe.



## **CHAPITRE 3**

### **INSTRUMENTATION**

# CHAPITRE 3

## INSTRUMENTATION

### I. Description de la spectrométrie de masse

D'une manière générale, la spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique permettant l'ionisation des molécules d'un échantillon puis la séparation et la détection des ions ainsi produits, en fonction de leur rapport masse sur charge noté  $m/z$  ( $m$  étant la masse et  $z$  la charge). Le signal électrique fourni est proportionnel au nombre d'ions détectés. Un spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes : une source, un analyseur et un détecteur. Les espèces ionisées amenées en phase gazeuse au sein de la source sont séparées par l'analyseur suivant leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) avant d'atteindre le détecteur. On distingue deux principaux modes d'acquisition, le mode d'acquisition par spectrométrie de masse simple (MS) et le mode d'acquisition par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), dont le principe est exposé sur la figure 28, se différencie de la spectrométrie de masse simple par une étape supplémentaire de fragmentation des ions sélectionnés (ions précurseurs ou parents) qui engendre des ions fragments.

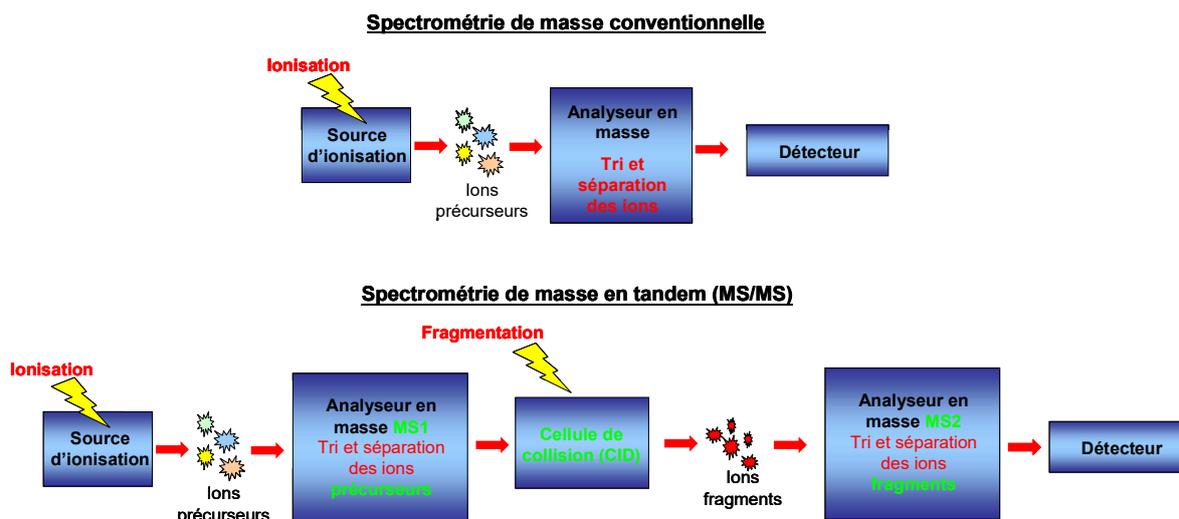


Figure n° 28 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse conventionnelle appliquée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Le mode MS/MS implique au moins deux étapes d'analyse de masse, ainsi que différents processus de fragmentation tels que la dissociation induite par collision (CID) ou la dissociation par transfert d'électron (ETD) dont les principes seront décrits dans la suite de ce chapitre. D'une manière générale lorsque la MS/MS a lieu dans l'espace, un premier analyseur (MS1) sert à isoler un ion précurseur ou parent qui subit ensuite une fragmentation donnant des ions fragments ou fils. Un second analyseur (MS2) analyse les ions fragments ou fils et les distingue en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). La combinaison des fragments est spécifique de l'ion parent dont il est issu.

Un spectromètre de masse en tandem est donc constitué des éléments suivants :

- **Une source d'ionisation** : elle a pour but de produire des ions en phase gazeuse à partir de l'échantillon étudié. Il existe de nombreuses sources d'ionisation mais pour l'analyse de peptides, deux sources d'ionisation sont principalement utilisées pour identifier et/ou quantifier des peptides ou des protéines dans un milieu biologique : le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) et l'ESI (*Electrospray Ionization*). Ces deux technologies sont intéressantes car complémentaires, la première permettant d'effectuer des analyses simples et rapides d'un échantillon simplement déposé sur une cible métallique, le second généralement couplé à la chromatographie liquide permettant d'atteindre de meilleures sensibilités. Les sources d'ionisation MALDI et ESI seront présentées dans la suite de ce chapitre.
- **Un/des analyseur(s)** : il a pour but de trier les ions en fonction de leur masse, et plus spécifiquement en fonction de leur rapport  $m/z$ . C'est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur. Ceci implique d'une part des champs électrostatiques très précis pour guider et déplacer les ions au sein de l'analyseur et d'autre part un vide suffisant (de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  mbar pour les analyseurs que nous avons utilisés) pour que les ions puissent se déplacer librement sans être détruits ou déviés par des molécules résiduelles. Pour l'étude des protéines, les analyseurs les plus employés sont : la trappe ionique (Trap), l'analyseur à temps de vol (TOF, *time of flight*) ou le quadripôle (Q). Pour la détermination des peptides spécifiques

du bevacizumab et de l'étalon interne d'une part et le développement de la méthode de quantification d'autre part nous avons eu recours à deux appareils de spectrométrie de masse différents équipés respectivement d'un analyseur hybride associant un quadripôle avec une trappe ionique (Q-Trap) et d'un analyseur quadripolaire. Par conséquent seuls ces deux types d'analyseurs seront détaillés dans ce chapitre.

- **Une cellule de collision** : elle a pour but de fragmenter les ions précurseurs à différents endroits du squelette peptidique pour générer des ions fragments dont les valeurs  $m/z$  correspondent à des enchaînements d'acides aminés donnant ainsi des informations sur la séquence en acide aminés du peptide dont ils sont issus (ions précurseur). Les séquences peptidiques sont ainsi déduites de l'analyse des spectres de fragmentations (spectre MS/MS). La cellule de collision peut être une entité différente de l'analyseur (MS/MS dans l'espace) ou correspondre à l'analyseur lui-même dans ce cas la MS/MS aura lieu dans le temps et non dans l'espace.
- **Un détecteur** : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.

Les paragraphes suivants, à vocation instrumentales et techniques, décrivent les différentes techniques d'ionisation, de fragmentations et les différents analyseurs ainsi que les configurations instrumentales associées pour les spectromètres de masse mis à contribution pour le développement des méthodes de quantification des médicaments protéiques et plus particulièrement des mAbs. Les différents modes d'analyses en spectrométrie de masse en tandem qui y sont associés seront également détaillés.

## A. Les différentes sources d'ionisations

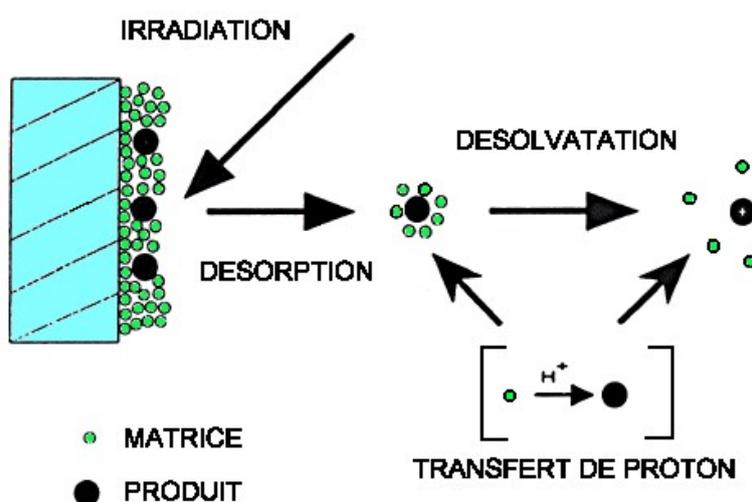
L'analyse de molécules par spectrométrie de masse passe par une étape incontournable qui est leur ionisation, seules leurs formes ionisées pouvant être séparées et analysées selon leur rapport  $m/z$  à l'aide d'un champ électrique, variable ou non, ou magnétique, selon le type d'analyseur. Selon le procédé d'ionisation utilisé, cette étape peut faire suite à une séparation des molécules par chromatographie liquide dans le cas de mélanges complexes comme ceux rencontrés en bioanalyse.

Les techniques de production des ions utilisées pour l'analyse des protéines en spectrométrie de masse font appel à des techniques d'ionisation en phase gazeuse ce qui implique, au préalable, l'évaporation de l'échantillon. Les protéines étant généralement très polaires et thermiquement fragiles, l'évaporation du solvant lors de l'analyse d'échantillons en solution nécessite des processus d'ionisation particuliers. Les deux techniques d'ionisation MALDI et ESI largement utilisées pour l'analyse des macromolécules biologiques ont comme point commun le processus de désorption et consistent en une ionisation dite « douce ». Les ions moléculaires générés par ces techniques sont relativement stables et ont une durée de vie suffisante pour traverser l'analyseur et arriver jusqu'au détecteur (ou la cellule de collision) et donc être mesurés (ou fragmentés dans la cellule de collision). Ces deux techniques d'ionisation conduisent à des espèces quasi microscopiques, les agrégats, mais qui résultent de conditions différentes utilisant : (1) des gouttelettes chargées formées sous un champ électrique à partir de nébulisation pour l'ESI ; et (2) d'un panache de matière excitée engendré par ablation laser d'une surface où l'analyte est déposé au sein d'une matrice pour le MALDI. Ces agrégats sont constitués d'un grand nombre de molécules de solvant en mode ESI ou de matrice pour le MALDI. Ils stabilisent une (ou plusieurs) biomolécules multichargées selon leur taille et leur forme. Par un jeu de transferts d'énergie, une cascade de désolvatations conduit à la libération d'ions moléculaires désolvatés, avec le minimum d'énergie interne. Les modes d'ionisation ESI et MALDI présentent la particularité de produire des ions stables à partir de biomolécules. Pour espérer obtenir une information sur la structure de ces molécules, il faut déstabiliser ces ions. C'est le rôle attribué à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

### **1. La désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI)**

En 1988, Karas et Hillenkamp [159, 160] introduisent une nouvelle source d'ionisation pour l'analyse de molécules de haute masse moléculaire : la source MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). L'ionisation par la technique MALDI se déroule en deux étapes. Dans un premier temps l'échantillon à analyser est mélangé à une matrice qui est une solution composée de petites molécules organiques possédant une bande d'absorption à la longueur d'onde d'émission du laser (le plus souvent dans l'UV). Cette solution est déposée sur une surface métallique, appelée cible MALDI, et le solvant est évaporé avant l'analyse. Le résultat est un dépôt de matrice et d'analyte co-cristallisés où les cristaux de matrice

sont dopés en molécules d'analyte. Dans un second temps, la cible est introduite dans la source du spectromètre de masse maintenue sous vide. Dans la source du spectromètre de masse, qui fonctionne sous un vide de l'ordre de  $10^{-7}$  Torr environ pour le mode MALDI classique, l'échantillon est irradié par de brèves impulsions laser (généralement avec une longueur d'onde située dans l'UV). Ce rayonnement va être absorbé par la matrice et cette irradiation va provoquer d'une part l'ionisation de la matrice, et d'autre part sa sublimation. En effet, les molécules de matrice amenées dans un état excité induisent l'accumulation d'une grande quantité d'énergie dans la phase condensée. Cet apport d'énergie très localisé cause l'ablation d'une portion de la surface du cristal et/ou la sublimation des cristaux, suivie de l'expansion d'agrégats de la matrice en phase gazeuse entraînant l'analyte intact dans le panache d'expansion. Pendant l'expansion du nuage moléculaire formé, l'analyte s'ionise par transfert de protons de la matrice vers l'analyte ou encore par collision des molécules entre elles. Notons que l'ionisation de l'échantillon peut également avoir lieu dans la phase solide, avant l'irradiation. Les protons proviennent majoritairement de la matrice (protons labiles des groupements carboxyliques ou hydroxyliques) mais aussi du solvant de l'analyte. La figure 29 représente une vue schématique du processus de désorption et d'ionisation MALDI. Les ions formés en phase gazeuse sont majoritairement des ions monochargés  $[M+H]^+$ .



**Figure n° 29 : Schéma de principe de l'ionisation MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) (figure modifiée d'après Hoffmann et al [161]).**

L'utilisation d'impulsions laser permet de transférer de l'énergie aux cristaux en un temps très court, ce qui réduit la possibilité de décomposition thermique de

l'analyte. Les ions produits sont extraits de la source par une différence de potentiel élevée (de l'ordre de 20 à 30 kV), et amenés ainsi vers l'analyseur. Les sources MALDI sont en majorité couplées à des analyseurs TOF (MALDI-TOF) mais peuvent aussi être couplées à des trappes ioniques ou des analyseurs de type Q-TOF. Le couplage MALDI-TOF est encore très utilisé de nos jours en protéomique puisqu'il permet d'identifier assez facilement les protéines présentes dans un échantillon par l'obtention majoritaire d'espèces mono-chargées permettant ainsi de générer des spectres de masses simples et facilement interprétables. Le MALDI-TOF a été plus récemment appliqué à la microbiologie clinique pour l'identification des micro-organismes par analyse de leurs protéines totales. L'identification des bactéries par MALDI-TOF est en passe de remplacer les méthodes d'identification traditionnelles des bactéries. Depuis un peu moins d'une dizaine d'année après le début de l'application de cette méthode à l'identification bactérienne, et moins de 5 ans après son intégration progressive dans les laboratoires de microbiologie, le bilan de son utilisation est glorieux. Cette technique permet d'identifier la plupart des bactéries en quelques minutes seulement. Outre l'intérêt clinique que représentent ces performances, l'utilisation du MALDI-TOF permet d'identifier de nouvelles souches pathogènes [162].

Cependant, étant donné que l'introduction dans la source de l'échantillon nécessite le dépôt sur la plaque MALDI d'un mélange échantillon/matrice, le couplage avec une méthode séparative telle que la chromatographie liquide pour simplifier un échantillon biologique n'est pas possible avec ce mode d'ionisation. De ce fait aucune méthode de quantification des mAbs n'a été développée sur un spectromètre de masse équipée d'une telle source. Bien que nous n'avons pas eu recours à ce mode d'ionisation, il méritait d'être décrit dans ce chapitre car il peut être une alternative à l'ionisation par ESI à laquelle nous avons eu recours pour l'étape d'identification des peptides générés à l'issue de la protéolyse de notre protéine d'intérêt. Cette analyse est indispensable pour la détermination expérimentale des peptides spécifiques de l'analyte à doser.

## **2. L'ionisation par électrospray (ESI)**

L'électrospray est une technique de production d'ions à pression atmosphérique qui a d'abord été proposée par Dole *et al* en 1968 [163] puis développée par Fenn et ses collaborateurs en 1989 [164]. Considérée au départ comme une source de désorption-ionisation dédiée à l'analyse de polymères, et

appliquée ensuite aux protéines, son utilisation s'est rapidement élargie à l'analyse de petites molécules. L'ionisation par une source ESI est surtout la technique de choix pour réaliser un couplage avec la chromatographie liquide. Par ailleurs, cette technique n'induit quasiment pas de fragmentation en source, c'est la raison pour laquelle elle est considérée comme une technique d'ionisation douce. Cette technique repose sur la formation, à pression atmosphérique, d'un spray de gouttelettes chargées qui s'évaporent et provoque *in fine* l'expulsion d'ions en phase gazeuse. Les mécanismes conduisant à la formation d'ions en phase gazeuse peuvent se résumer en trois étapes principales : 1) la formation de gouttelettes chargées à partir de l'extrémité d'un capillaire métallisé, 2) l'évaporation du solvant et les explosions coulombiennes, 3) la formation d'agrégats chargés et l'obtention d'ions en phase gazeuse (positifs, négatifs et adduits). La figure 30 représente une vue schématique du processus général d'ionisation en phase gazeuse par ESI.

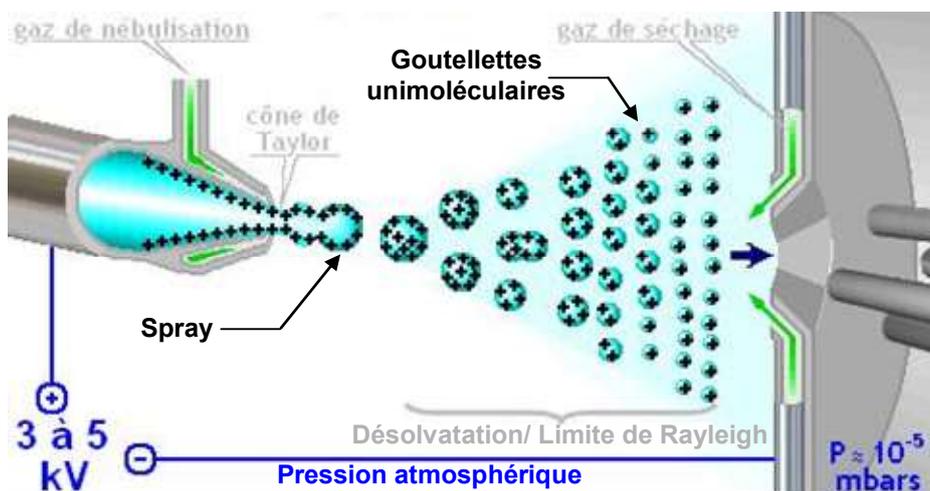
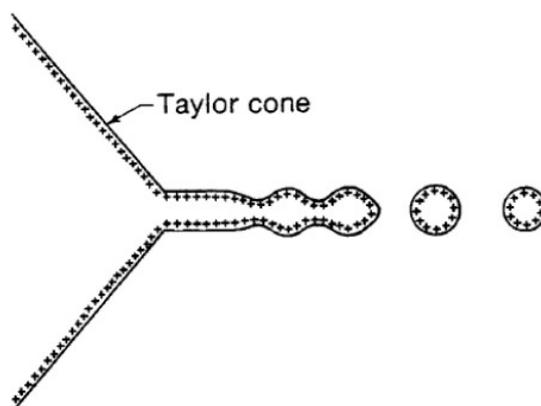


Figure n° 30 : Représentation schématique du principe général d'ionisation par ESI [165].

- **Formation de gouttelettes**

L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire métallique avec un faible débit constant (couramment de 1 à 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de plusieurs kilovolts (3 à 6 kV) entre le capillaire et la contre électrode. Le champ électrique ainsi créé est très élevé, de l'ordre de  $10^6 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$ . Ce capillaire est enchâssé dans un tube au travers duquel circule un débit constant d'un gaz inerte, appelé gaz de nébulisation (l'azote). La grande différence de potentiel induit une séparation des charges à l'intérieur du liquide par un phénomène électrophorétique de migration des électrolytes (cations et

anions). Par exemple en mode positif, les cations vont s'accumuler à l'extrémité du capillaire, tandis que les anions vont effectuer un déplacement inverse en s'accumulant à l'intérieur, jusqu'à s'oxyder à la surface du capillaire. L'interface air/liquide à l'extrémité du capillaire se polarise et va créer une déformation conique à la surface du liquide qui met en jeu un équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface de ce liquide. Lorsque l'équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface du liquide est atteint, on parle alors de cône de Taylor. Une faible augmentation du champ électrique suffit alors pour déstabiliser le cône et émettre des gouttelettes primaires possédant un excès de charges dépendant du mode de polarité. Après cette étape, les gouttelettes se déplacent sous l'influence d'un champ électrique intense mais également sous l'influence d'un gradient de pression créé entre la source et l'entrée du spectromètre de masse (figure 31). C'est au cours de ce trajet qu'à lieu l'évaporation du solvant des gouttelettes pour produire des agrégats chargés.



**Figure n° 31 : Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises (figure modifiée d'après Kebarle *et al* [166]).**

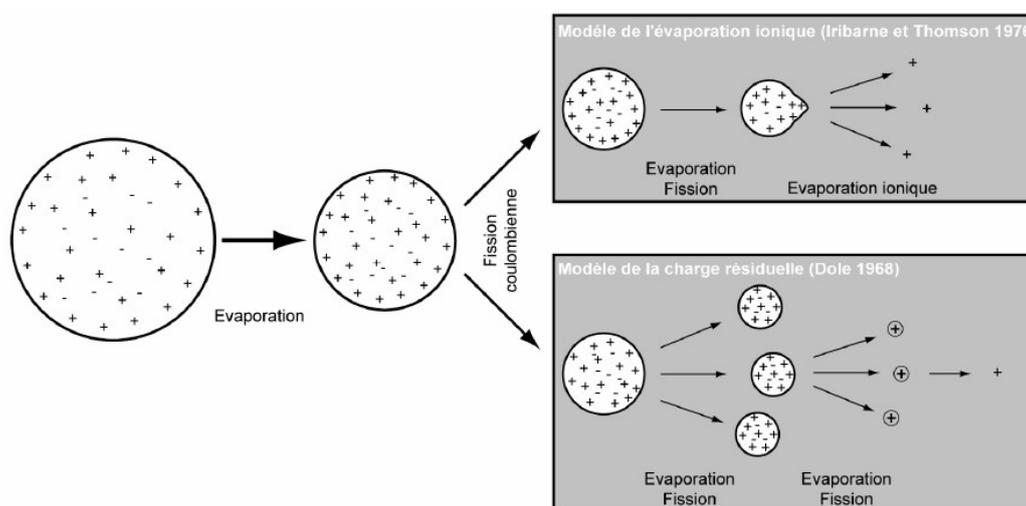
- ***Processus d'évaporation du solvant et explosions coulombiennes***

A ce stade de formation des gouttelettes primaires, les ions unimoléculaires qui nous intéressent sont encore fortement solvatés. Sous l'action du courant d'azote concomitant à la production des gouttelettes et d'un gaz séchant à contre-courant, le solvant (phase mobile de la chromatographie) va s'évaporer et les gouttes vont rétrécir conduisant à l'augmentation de la densité de charge et à la répulsion électrostatique jusqu'à ce que la tension de surface du liquide ne supporte plus les répulsions coulombiennes induites par les charges réparties à la surface. Ce point de rupture est appelé limite de Rayleigh. A cette limite, la goutte devient instable et une cascade d'explosions coulombiennes se produit.

Il en résulte des gouttelettes de taille plus petite et de densité de charge moins élevée. Ce procédé se poursuit en cascade jusqu'à la libération des ions unimoléculaires en phase gazeuse.

- **Formation d'ions désolvatés en phase gazeuse à partir des gouttelettes fortement chargées**

Après de multiples cycles d'évaporation-fission coulombienne de la goutte primaire, les ions sont générés en phase gazeuse et guidés par le champ électrique jusqu'à la contre-électrode. Depuis la fin des années 1960 ce processus a fait l'objet de nombreux débats qui ne sont toujours pas tranchés. Deux principaux sont proposés pour expliquer le passage des ions solvatés vers la phase gazeuse. Leur principe est schématisé sur la figure 32.



**Figure n° 32 : Principe schématisé des deux modèles pour l'obtention d'ions en phase gazeuse par ESI [167].**

Le premier, le modèle des résidus chargés CRM (*charged residue model*) décrit par Dole en 1968 [163] fait l'hypothèse de fissions successives aboutissant à des gouttelettes de plus en plus petite jusqu'à l'obtention de la « dernière » gouttelette contenant une ou plusieurs charges élémentaires mais une seule molécule d'analyte. Après évaporation du solvant résiduel, les charges se localisent sur les sites permettant de générer l'ion le plus stable en phase gazeuse.

Le second, le modèle de l'évaporation ionique IEM (*ion evaporation model*) qui a été proposé par Iribarne et Thomson en 1976 [168] se base sur la même théorie que celle de Dole de succession de fissions de type coulombiennes qui réduit

la taille des gouttelettes en augmentant leur densité. La différence avec la théorie de Dole réside dans le principe que lorsque les gouttelettes atteignent un rayon très petit (de l'ordre de 10 nm) et une densité de charge très élevée, le champ électrostatique à leur surface est assez intense pour expulser directement des ions en phase gazeuse. Aucun de ces deux modèles n'est aujourd'hui considéré comme la théorie unique qui permettrait de modéliser le passage de gouttelettes de solvant à des ions en phase gazeuse. Cependant un consensus semble atteint pour considérer que l'ionisation des molécules de hautes masses s'effectue selon le modèle CRM alors que le mécanisme dominant pour les petites molécules est l'IEM.

Ce processus d'ionisation conduit à la formation d'une multiplicité d'ions portant un nombre variable de charges. Cette distribution de charges portées par une macromolécule dépend du nombre de sites acides ou basiques, de la conformation de la protéine (globulaire ou dépliée), de la nature du solvant et de son pH. La génération d'ions multichargés peut être un avantage lors de l'analyse de molécules de haut poids moléculaire tels que des protéines ou de peptides. En effet, les principes physiques de séparation des ions par spectrométrie de masse font que la grandeur mesurée correspond au rapport  $m/z$  et dans le cas d'une ionisation en mode positif, des ions mono chargés et doublement chargés auront des rapports  $m/z$  différents :

$$m/z = \frac{M + (mH \times z)}{z}$$

où  $M$  est la masse moléculaire de la molécule,  $mH$  la masse du proton et  $z$  l'état de charge du pic considéré. Ainsi il est possible de détecter des molécules de hauts poids moléculaires ne rentrant pas dans la gamme de masse analysable d'un spectromètre de masse à l'état monochargé mais rendue possible par un état multichargé. La résolution de ce système permet par la suite d'accéder facilement à  $z$  et surtout à  $M$ .

Grâce à la désorption-ionisation- par MALDI ou par ESI, la spectrométrie de masse a pu être appliquée à l'étude des macromolécules biologiques. La méthode MALDI fait appel à une matrice solide, sous vide et a le principal avantage de créer des ions peu chargés. C'est une méthode d'ionisation séquentielle, très souvent couplée avec un analyseur de type temps de vol (configuration MALDI-TOF), dont le mode de fonctionnement est également séquentiel et requiert un vide poussé. L'ESI

est une méthode d'ionisation en continu et à pression atmosphérique, produisant des ions avec une plus grande distribution de charges qu'en MALDI.

Par rapport aux sources MALDI, les sources ESI présentent l'avantage de pouvoir être très facilement couplées directement avec un flux continu comme l'éluât de la colonne chromatographique permettant ainsi de fractionner et de simplifier grandement l'analyse d'un échantillon complexe tel qu'un échantillon plasmatique contenant un médicament à analyser (bioanalyse). La quantification de peptides nécessitant le couplage direct avec la chromatographie liquide, la source de référence pour cette application est l'ESI. La source MALDI est quant à elle majoritairement utilisée lorsqu'une identification de peptides dans un mélange inconnu est demandée. Que ce soit pour la détermination des peptides spécifiques du bevacizumab ou pour le développement de la méthode de quantification, les spectromètres de masse que nous avons utilisés étaient tous équipés d'une source d'ionisation ESI. Cette technique d'ionisation nous a permis de fractionner nos échantillons par le couplage avec de la chromatographie liquide (nanochromatographie pour l'établissement de la carte peptidique des protéines d'intérêt et chromatographie liquide conventionnelle pour le développement de la méthode de quantification).

## **B. Les analyseurs couplés à une source ESI**

Les ions produits par les deux techniques d'ionisation précédemment décrites sont ensuite séparés et triés en fonction de leur rapport  $m/z$  au niveau de l'analyseur. Tout comme il existe une grande variété de sources, il existe différents types d'analyseurs (nous ne développerons ici que les analyseurs utilisés au cours de nos travaux) :

- **les analyseurs à faisceaux d'ions** : comme le quadripôle qui stabilise la trajectoire d'un ion de rapport  $m/z$  défini, les autres sont éjectés du faisceau. Le spectromètre de masse API 3200 (ABSciex) sur lequel nous avons développé notre méthode de quantification, est équipé d'un analyseur quadripolaire qui sera détaillé dans la suite de ce chapitre. Parmi les analyseurs à faisceaux d'ions, on peut également citer l'analyseur à temps de vol TOF (*time of flight*), qui mesure le temps de parcours des ions. N'ayant pas eu recours à ce dernier au cours de notre étude, il ne sera pas détaillé par la suite.

- **les analyseurs à piégeage d'ions** (*ion trap*) : il est tout d'abord possible de citer le piège à ions dans lequel les ions sont piégés physiquement par des potentiels électriques et décrivent grossièrement un huit. Il existe ensuite des pièges linéaires (Q-trap ou LTQ suivant les constructeurs) qui imposent aux ions des allers et retours sur une ligne au milieu de quatre barres alimentées par des potentiels. Enfin, les analyseurs à ultra haute résolution tel que l'Orbitrap piègent des paquets d'ions et mesurent des fréquences d'oscillation. Le spectromètre de masse que nous avons utilisé pour l'établissement de la carte peptidique du bevacizumab est un appareil hybride équipé d'une trappe ionique linéaire et d'une Orbitrap™, le LTQ-Orbitrap XL™ (Thermo-Scientific).

Chacun d'entre eux possède des caractéristiques et des performances analytiques qui lui sont propres. D'une manière générale, ils peuvent être définis par ces différents paramètres :

- **Gamme dynamique** qui correspond aux limites minimale et maximale du rapport  $m/z$  au-delà desquelles l'analyseur ne pourra plus mesurer de signal.
- **Sensibilité** qui correspond à la quantité d'échantillon nécessaire pour détecter un signal (interprétable) dans le spectre de masse.
- **Résolution**, qui représente la capacité de l'analyseur à séparer deux composés de rapports  $m/z$  voisins. Plus la résolution est élevée, plus la différence entre les deux signaux voisins est faible sur le rapport  $m/z$ . Une mesure de la résolution pour un ion isolé consiste à prendre sa largeur à  $x$  % de son maximum, le plus souvent à mi-hauteur.
- **Précision** sur la mesure d'un rapport  $m/z$ , qui représente la faculté à mesurer une masse la plus proche possible de la masse théorique de la molécule analysée.

Cette précision s'exprime le plus souvent en « partie par million » (ppm) calculée selon :

$$\text{Erreur (ppm)} = \frac{|M_{\text{exp}} - M_{\text{théo}}|}{M_{\text{théo}}} \times 10^6$$

Où  $M_{\text{exp}}$  représente la masse mesurée expérimentalement et  $M_{\text{théo}}$  la masse monoisotopique réelle de la molécule analysée. Cette précision en

masse est liée à l'étalonnage de l'appareil d'une part, et à la résolution d'autre part.

Il est important de souligner qu'aucun instrument ne possède tous les avantages et toutes les performances réunies de l'ensemble des analyseurs. Le choix de l'instrument se fera en fonction du type d'information que l'on recherche. Ainsi, au cours de notre étude nous avons utilisé deux spectromètres de masse différents. L'appareil LTQ-Orbitrap XL™ ETD (Thermo-Finnigan) constitué de deux analyseurs à savoir une trappe ionique linéaire (LTQ) couplée à un piège d'ion électrostatique (Orbitrap™) pour l'établissement des cartes peptidiques des protéines d'intérêt et la détermination des peptides spécifiques, et l'appareil API 3200™ (ABSciex) équipé d'un analyseur triple quadripôle (QqQ) sur lequel la méthode de quantification a été développée. Par conséquent seuls les analyseurs correspondant à ces deux appareillages seront détaillés dans ce chapitre.

Quelques une des performances et l'application des deux appareils auxquels nous avons eu recours sont présentées dans le tableau VI.

**Tableau VI : Performances et applications des deux appareils de spectrométrie de masse utilisés au cours de notre étude.**

Analyseur	Gamme dynamique	Résolution	Précision sur le mesure (ppm)	Couplage	Utilisation
Triple Quadripôle (QqQ)	4000	3000	100	HPLC-ESI-qQq	Méthode de quantification du bevacizumab
Trappe ionique linéaire Orbitrap	3000 à 5000 4000	3000 100000	40 à 100 1 à 2	NanoLC-ESI-LTQ Orbitrap	Identification des peptides spécifiques

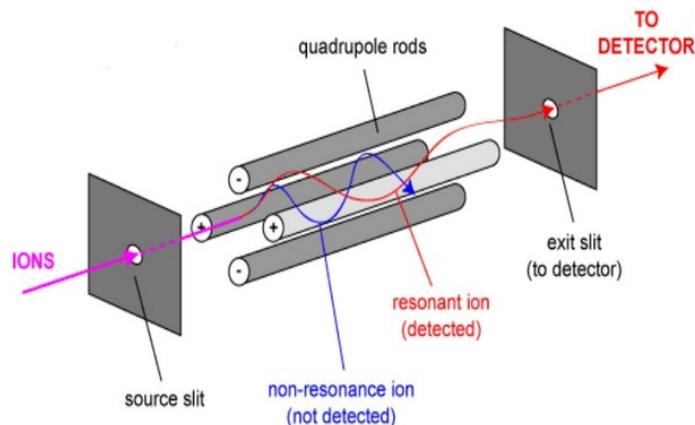
Les performances des analyseurs triples quadripôlares et à piège ionique sont relativement comparables en termes de résolution, gamme de masse et précision sur la masse. Cependant, même si le pouvoir de résolution du piège à ions peut atteindre des valeurs élevées, il n'est pas adapté à lui seul aux mesures de masse de grande précision, en particulier pour l'identification d'une protéine inconnue. Pour cela, il existe des analyseurs de plus haute résolution comme l'analyseur à temps de vol ou l'orbitrap™.

La nécessité de déterminer les peptides spécifiques du bevacizumab nous permettant de le discriminer des peptides endogènes plasmatiques justifie l'utilisation d'appareils à haute résolution au cours de la mise au point de la méthode. En effet, la complexité du milieu plasmatique et le degré élevé d'homologie du bevacizumab avec les anticorps endogènes (93 %) [99] nous impose une caractérisation précise des peptides d'intérêts. Les appareils de faible résolution sont dans l'incapacité de

fournir une mesure de masse suffisamment précise (résolution à  $\pm 0,5$  Da pour les triples quadripôles) pour permettre l'interrogation des bases de données biologiques et la discrimination des centaines de candidats potentiels. A cet effet, nous avons eu recours à l'appareil hybride LTQ-Orbitrap XL<sup>TM</sup> ETD qui permet de combiner les avantages de la trappe linéaire (haute sensibilité, gamme dynamique élevée, temps de cycle rapide), avec ceux d'un analyseur à transformée de Fourier (haute précision en masse, et haute résolution). Le couplage de ce spectromètre de masse avec un système de nano-chromatographie permet également un gain important en sensibilité et donne une information qualitative beaucoup plus précise. Les deux techniques Nano-LC-LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup> ETD et HPLC-ESI-QqQ sont complémentaires, la première par sa rapidité d'exécution et sa grande résolution en masse nous permet d'identifier très rapidement les peptides majoritaires de la protéine (aspect qualitatif), le second, plus adapté à des analyses quantitatives de routine est celui sur lequel la méthode de dosage du bevacizumab a été mise au point.

## 1. L'analyseur quadripolaire

Le quadripôle est un analyseur qui utilise la stabilité des trajectoires dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur rapport  $m/z$ . Le principe du quadripôle a été décrit par Paul et Steinwedel en 1953 et a été appliqué à des instruments commerciaux à la suite des travaux de Shoulders, Finnigan et Story. Le piège ionique (*ion trap*) utilise le même principe de base. Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres parfaitement parallèles sur lesquelles est appliqué de façon alternative un potentiel positif ou négatif. Par exemple, un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers la barre négative. Si le potentiel change de signe avant que l'ion ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. La figure 33 présente une vue schématique d'un analyseur quadripolaire.



**Figure n° 33 : Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire [169, 170].**

De façon plus précise, le quadripôle est constitué de quatre électrodes qui sont soumises deux à deux à un potentiel composé d'une tension continue  $U$  et d'une tension alternative  $V$ . Ainsi les ions cheminant suivant l'axe des  $z$  sont soumis à l'influence du champ alternatif quadripolaire superposé au champ constant créé par l'application sur les barres. Les ions accélérés suivant l'axe  $z$  pénètrent entre les barres du quadripôle et conservent leur vitesse suivant cet axe, mais ils sont soumis suivant  $x$  et  $y$  aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Leur trajectoire oscillante obéit aux équations différentielles de Mathieu (1886) qui établissent une relation entre les coordonnées (masse  $m$  et charge  $z$ ) d'un ion et le temps :

$$(d^2u/d\xi^2) + (au - 2qu \cdot \cos 2\xi) \cdot u = 0$$

Avec

$$u = x \text{ ou } y$$

$$\xi = \omega t / 2$$

$$au = 8zeU / mr_0^2 \omega^2$$

$$qu = 4zeV / mr_0^2 \omega^2$$

$r_0$  le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres,

$\omega$  la fréquence angulaire telle que  $\omega = 2\pi f$  où  $f$  est la fréquence du champ alternatif

Pour qu'un ion traverse le quadripôle, il faut que les valeurs de  $x$  et de  $y$  restent inférieures à  $r_0$ . Ces valeurs (représentées par  $u$  dans l'équation de Mathieu) étant liées aux paramètres  $au$  et  $qu$  eux-mêmes fonctions des tensions  $U$  et  $V$ , de la masse  $m$  et de la charge  $z$ , il est possible de définir selon les valeurs  $au$  et  $qu$  des zones dans lesquelles les ions seront stables : c'est le diagramme de stabilité. De manière générale, les filtres quadripolaires filtrent les ions selon leur stabilité. Hors de la zone de stabilité, si un ion touche les barres, il s'y décharge et ne sera pas

déecté. Pour chaque valeur de  $m/z$  une zone de stabilité différente est déterminée et peut être définie. Il faut donc pour laisser passer les ions un après l'autre que les valeurs  $au$  et  $qu$  (ou les potentiels  $U$  et  $V$ ) soient balayées de telle sorte qu'un seul ion présente les trajectoires stables à un moment donné. Ainsi, les ions extraits de la source, sont accélérés et focalisés par un jeu de lentilles électrostatiques jusqu'à leur entrée dans l'analyseur quadripolaire. Seuls les ions dont le rapport  $m/z$  permet une trajectoire stable dans l'analyseur atteignent le détecteur. Les autres, dont la trajectoire n'est pas stable, entrent en contact avec les barres et s'y déchargent avant d'atteindre l'extrémité de l'analyseur et ne sont pas détectés.

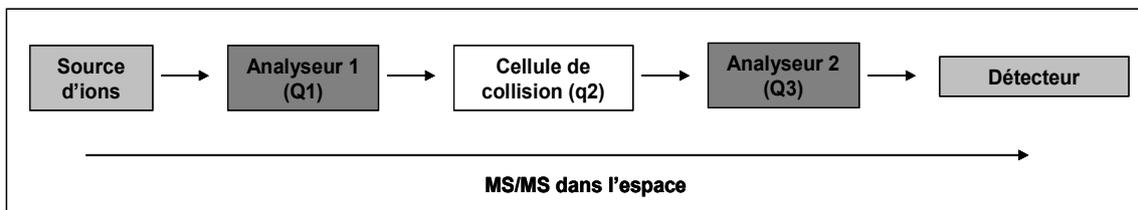
## **2. Appareillage triple quadripôle (QqQ) et modes d'analyses MS/MS**

La méthode du dosage du bevacizumab a été développée sur l'appareil API3200™ de la société Applied Biosystems Sciex (AB Sciex, Ontario, Canada) équipé d'une source ESI et d'un analyseur à triple quadripôle (QqQ), dont le modèle est représentée sur la figure 34.



**Figure n° 34 : Photographie du spectromètre de masse QqQ- API3200™ au laboratoire de pharmacocinétique et pharmacie clinique (INSERM U1034).**

Cet appareil se compose de trois analyseurs quadripolaires successifs un quadripôle Q1 (premier analyseur) suivi d'un quadripôle q2 (chambre de collision), puis d'un quadripôle Q3 (deuxième analyseur) (figure 35).



**Figure n° 35 : Représentation schématique du fonctionnement en mode MS/MS d'un analyseur QqQ (MS/MS dans l'espace).**

Il s'agit de l'appareil de référence pour la quantification. Comme son nom l'indique, un triple quadripôle est constitué de trois quadripôles successifs. En mode MS/MS le premier (Q1) a pour rôle de laisser passer et déterminer le rapport  $m/z$  des ions précurseurs qui le traversent. Le second quadripôle (q2) a quant à lui un rôle différent. En effet, il va servir de cellule de collision : dès qu'un ion a traversé le Q1, il va subir des collisions avec un gaz inerte (généralement de l'azote) dans le q2. Il en résulte la formation d'ions fragments issus de la collision des ions précurseurs en q2. C'est ce qu'on appelle la dissociation induite par collision CID (*Collision Induced Dissociation*) dont le principe de fragmentation sera détaillé dans la suite de ce chapitre. Ensuite, après avoir traversé le q2, les ions fragments arrivent à l'entrée du troisième quadripôle (Q3). Ce dernier a le même rôle que le Q1, à savoir de laisser passer et de déterminer le rapport  $m/z$  des ions sortant du q2. Le premier et le troisième quadripôle peuvent donc soit analyser une seule masse soit balayer une plage de masses.

D'une manière générale, les triples quadripôles permettent diverses configurations d'analyse MS/MS menées selon quatre modes de balayage différents que l'on utilise en fonction de l'information recherchée. Parmi les différents modes de balayage possibles les deux modes perte neutre et spectre d'ions précurseurs (mode ascendant) sont d'un usage plus restreint. Ne les ayant pas utilisés, nous ne les détaillerons pas ici. Seuls deux modes de balayages ont été utilisés au cours du développement de notre méthode de quantification et seront donc exposés.

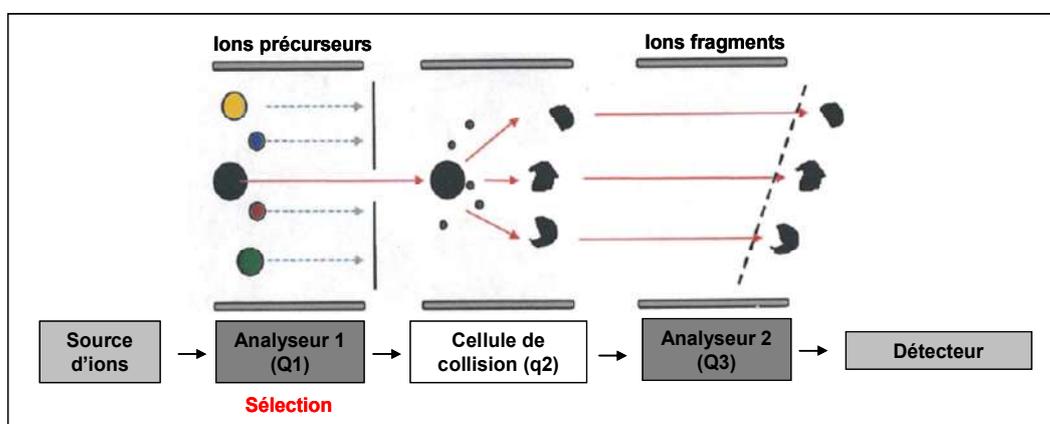
Le premier mode que nous avons utilisé est le mode descendant qui est le plus utilisé pour obtenir des informations structurales, nous l'avons utilisé pour la détermination expérimentale des peptides spécifiques du bevacizumab sur le LTQ-Orbitrap XL™ et la confirmation de ces derniers sur l'API 3200™. La différence entre ces deux analyseurs (quadripôle et piège à ion) résulte dans le fait que dans le cas d'un analyseur à triple quadripôle (QqQ, API3200™), l'analyse par MS/MS repose sur les régions distinctes de l'appareil et à donc lieu dans l'espace puisqu'elle fait appel à deux analyseurs successifs, alors que dans le cadre du LTQ-Orbitrap XL™,

l'analyse MS/MS à lieu dans le temps. Cette notion sera reprise lors de la description de ce dernier.

Le second mode de balayage que nous avons exclusivement utilisé avec l'analyseur triple quadripôle (QqQ, API3200™) est le mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), dérivé du mode descendant. Il est voué à la quantification puisqu'il permet d'atteindre une grande spécificité d'analyse à partir de mélanges complexes tels que les matrices biologiques.

- **Mode de balayage descendant ou « product ion scan »**

C'est un balayage des ions produits issus de la fragmentation d'un ion parent préalablement sélectionné et dont le principe est schématisé sur le figure 36.

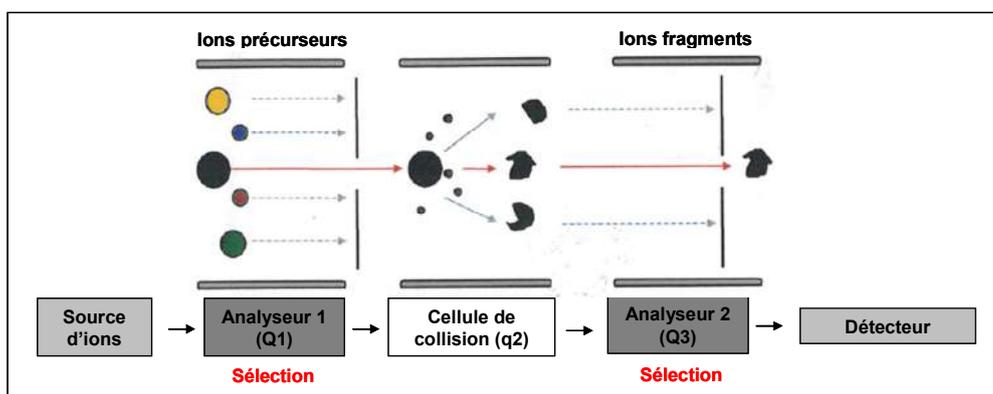


**Figure n° 36 : Représentation schématique du mode de balayage descendant ou « product ion scan » au sein d'un analyseur à triple quadripôle.**

Dans le cadre d'un analyseur quadripolaire, l'analyse consiste à focaliser un ion d'une masse choisie dans le premier analyseur (Q1). Cet ion subit des collisions dans le quadripôle central (q2) et se fragmente. Les produits de réaction sont analysés par le troisième analyseur (Q3). Il en résulte des spectres de fragmentation dont les rapports  $m/z$  sont caractéristiques de l'enchaînement peptidique du peptide ionisé précurseur dont ils sont issus. Ainsi, le mode descendant permet de générer des spectres de fragmentation fournissant des informations structurales nécessaires à l'identification des peptides générés après protéolyse trypsique. Ce mode d'analyse est utilisé en vue d'identifier les peptides présents dans un protéolysat. L'acquisition de spectres de fragmentation est également utile à l'établissement des transitions « peptide-fragment » à suivre pour la quantification en mode *MRM*.

- **Mode de balayage *MRM* ou *SRM*** (figure 37)

L'analyse inclut deux étapes de sélection d'ions de rapport  $m/z$  prédéfinis. Lors de la première étape, un ion précurseur de rapport  $m/z$  prédéfini est sélectionné dans le premier analyseur (Q1). Cet ion est ensuite fragmenté dans le second quadripôle faisant office de cellule de collision (q2) comme en mode descendant. Par la suite le troisième analyseur (Q3) sélectionne successivement plusieurs ions fragments issus du même précurseur. Lorsque l'on suit une seule réaction de fragmentation on utilise le terme *SRM* pour *Single Reaction Monitoring*. Quand il s'agit de plusieurs réactions (à partir de deux) nous parlons de mode *MRM*.

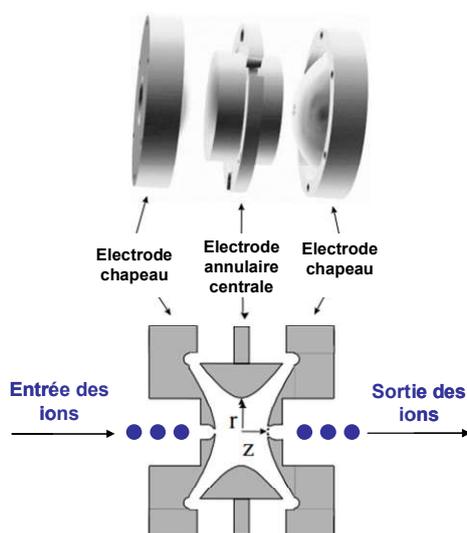


**Figure n° 37 : Représentation schématique du mode *Single Reaction Monitoring* (*SRM*).**

La spécificité analytique de la méthode *SRM* est conférée par la combinaison de la valeur du rapport  $m/z$  de la molécule à doser (peptide précurseur) et de la valeur du rapport  $m/z$  du fragment. C'est l'intensité du signal généré par ce fragment qui est utilisée pour la quantification du peptide à doser. L'association de ces deux paramètres, qui est spécifique du peptide à doser, est appelé transition. Ces valeurs doivent être définies avant l'analyse et sont utilisées pour paramétrer le spectromètre de masse. Le mode *MRM* a été retenu pour notre méthode de quantification car il présente une grande spécificité, caractéristique primordiale dans le cadre d'une stratégie de dosage de protéine-médicament dans des matrices biologiques complexes. En effet, même si les analyseurs de type quadripolaires sont de faible résolution, la probabilité pour que deux composés aient un rapport  $m/z$  identique à la fois pour leur ion précurseur et pour un ion fragment est faible. Si une séparation chromatographique est appliquée en amont, le paramètre temps de rétention permet d'augmenter la spécificité de cette analyse.

### 3. Les pièges à ions

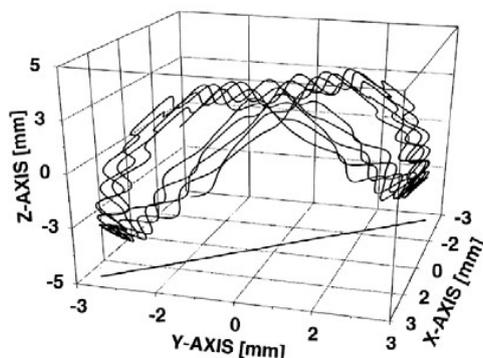
Le piège à ion (ou trappe ionique) est un développement du quadripôle qui est dû lui aussi à Paul Steinwedel. Tout comme l'analyseur quadripolaire, le fonctionnement d'un piège à ions est également basé sur l'action d'un champ électrique. Dans cet analyseur les quatre barres du quadripôle sont remplacées par trois électrodes : une électrode annulaire centrale recouverte de part et d'autre de l'espace central par deux électrodes hyperboliques (dite calotte, électrode chapeau ou *end cap*). L'entrée des ions issus de la source d'ionisation s'effectue à travers un orifice percé dans l'une des électrodes chapeau et leur sortie, par le centre de l'électrode chapeau opposée comme le présente la figure 38.



**Figure n° 38 : Représentation schématique d'un piège à ions (figure modifiée d'après de Hoffmann [161]).**

Comme dans un quadripôle classique, les électrodes chapeau d'une part et l'électrode annulaire d'autre part sont asservies à une tension respective  $+ \Phi_0$  et  $- \Phi_0$  ce qui a pour effet de créer un champ quadripolaire au sein de la trappe. Comme la trappe ionique est constituée tel un quadripôle il va de soi que le diagramme de stabilité qu'on en déduit est le même que celui d'un quadripôle. Ce dernier présente toutefois un aspect différent de celui obtenu avec les quadripôles linéaires. Dans le cas du piège à ion, le couple  $(au, qu)$  considéré se réfère à  $r_0$  et  $z_0$  (au lieu de  $x$  et  $y$ ) de la trappe définies sur la figure 38. Ainsi il est possible de déterminer des valeurs de paramètres  $au$  et  $qu$  en fonction des valeurs de  $U$  (tension continue) et de  $V_{RF}$  (amplitude de la tension alternative), pour lesquelles les trajectoires des ions n'excèdent jamais les dimensions  $z_0$  et  $r_0$  de la trappe. La sélection des valeurs de potentiels appliqués aux électrodes permet de ne conserver dans le piège que les

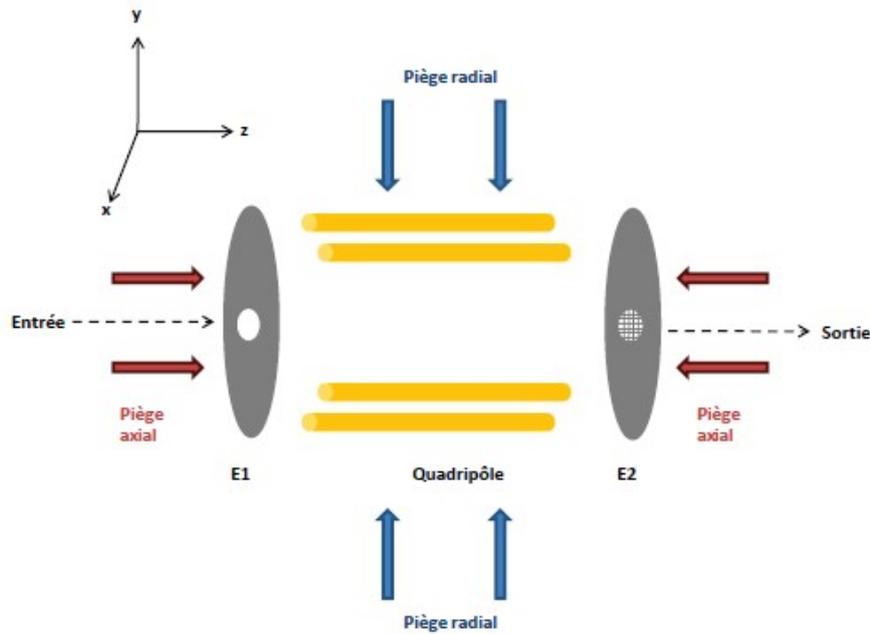
ions d'une masse choisie et d'expulser du piège tous les autres. Ainsi, à l'intérieur de ce piège, les ions sont gardés captifs en suivant une trajectoire formant une sorte de huit en trois dimensions (3D) dans l'espace (figure 39) qui obéit aux équations de Mathieu précédemment décrites pour l'analyseur quadripolaire.



**Figure n° 39 : Trajectoire d'un ion dans le champ électrique d'un piège à ion (figure modifiée d'après de Hoffmann [161]).**

Ces spectromètres sont très sensibles et ne tolèrent qu'un nombre limité d'ions dans l'enceinte. En effet, les répulsions mutuelles des ions induisent une augmentation du rayon de leur trajectoire, ce qui nuit aux résultats. Afin de garder les ions précurseurs confinés à proximité du centre, de l'hélium est introduit dans le piège et est maintenu à pression constante (environ  $10^{-6}$  bar) pour stabiliser les ions et ainsi augmenter l'efficacité de piégeage.

L'appareil LTQ- Orbitrap XL™ ETD utilisé au cours de notre étude est équipé d'une trappe ionique linéaire (représentée schématiquement sur la figure 40) qui est une variante à deux dimensions des pièges ioniques classiques 3D précédemment décrits.



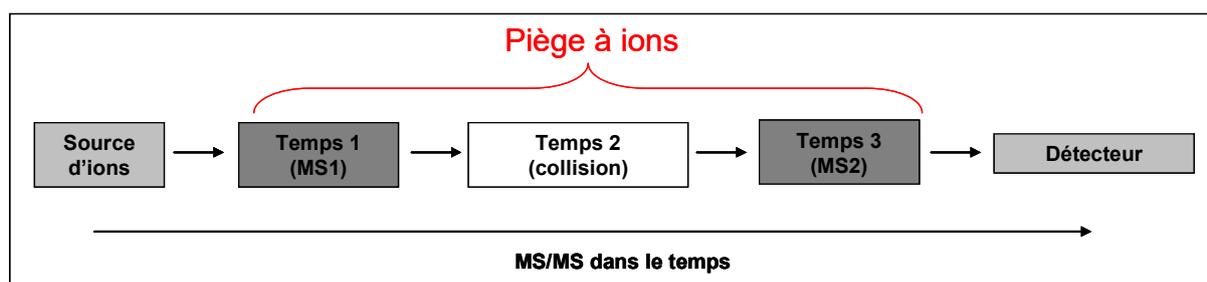
**Figure n° 40 : Représentation schématique d'un piège à ions linéaire (tiré des travaux de thèse de SIMON Romain [171]).**

Dans ce cas, l'électrode annulaire centrale est remplacée par les quatre barres métalliques d'un quadripôle et celui-ci est fermé par des électrodes d'entrée (E1) et de sortie (E2). Dans un premier temps, les ions pénètrent dans le quadripôle à travers l'électrode E1 dont le potentiel est faible. Le potentiel de la seconde électrode E2 est quant à lui élevé afin d'empêcher la sortie des ions. Ensuite, le potentiel de l'électrode E1 est également augmenté de façon à ce que les ions soient piégés selon l'axe z (piège axial). Ces électrodes permettent de conserver les ions à l'intérieur du quadripôle, en appliquant des tensions continues positives pour piéger les ions positifs, et inversement en appliquant des tensions continues négatives pour piéger les ions négatifs. Dans ce cas, les ions sont piégés en faisant des allers-retours selon cet axe z et simultanément oscillent dans le plan xy par application d'une tension alternative sur les barres du quadripôle. Le diagramme de stabilité est identique à celui d'un quadripôle mais l'éjection des ions se fait en augmentant progressivement  $V$  (et en gardant  $U = 0V$ ).

Un grand avantage des pièges ioniques linéaires est d'accepter beaucoup plus d'ions que les pièges 3D avant d'avoir un effet de charge d'espace notable. Ceci est dû à la fois à un plus grand volume disponible et à une focalisation autour de l'axe des z plutôt qu'autour d'un point central. Un autre avantage des pièges linéaires est l'efficacité supérieure lors de l'introduction des ions dans le quadripôle, le long de l'axe des z. Ces facteurs conjugués augmentent considérablement la sensibilité. La résolution dans un piège à ions est légèrement supérieure à celle rencontrée

dans un quadripôle mais l'exactitude sur la mesure de masse est du même ordre de grandeur.

Contrairement à l'analyseur à triple quadripôle, l'analyse par MS/MS avec un piège à ion ne repose pas sur des régions distinctes de l'appareil mais sur des séquences successives au sein de la même enceinte (ici les analyseurs 1 et 2 ainsi que la cellule de collision sont virtuels). La MS/MS a lieu dans le temps à la différence du triple quadripôle où elle a lieu dans l'espace. En effet, par application d'une faible tension alternative sur les électrodes chapeau à la fréquence de résonance de l'ion précurseur, celui-ci accumule de l'énergie cinétique. Après excitation, les ions précurseurs sélectionnés vont se fragmenter au cours du temps par CID *via* des collisions multiples avec les atomes d'hélium présents dans le piège. Les ions fragments produits sont ensuite expulsés. Ainsi, la MS/MS est réalisée dans le temps au lieu de l'espace (figure 41). De plus, le processus peut être répété plusieurs fois en sélectionnant des ions fragments qui deviennent à leur tour précurseurs d'autres fragments : c'est le principe de la MS<sup>n</sup>.



**Figure n° 41 : Représentation schématique du fonctionnement en mode MS/MS de l'analyseur piège ionique (MS/MS dans le temps).**

Cependant les pièges à ions ne sont pas trop adaptés à cette application puisqu'ils doivent piéger des ions avant de pouvoir générer un signal. Le temps nécessaire à ce piégeage (de l'ordre de quelques dizaines à centaines de millisecondes) n'est généralement pas compatible avec une quantification sensible et simultanée de plusieurs dizaines à centaines de composés. En revanche, couplés avec un autre analyseur comme le quadripôle ou l'orbitrap<sup>TM</sup>, les pièges à ions peuvent apporter un réel gain de spécificité qui va se traduire par un gain de sensibilité.

Le LTQ-Orbitrap XL<sup>TM</sup> ETD que nous avons utilisé au cours de nos travaux opère avec un mode d'expulsion radiale des ions : alternativement, les ions sont expulsés radialement à travers des fentes creusées dans deux barres opposées du piège à ion, en appliquant une tension alternative adaptées sur ces deux barres

(deux détecteurs sont utilisés). L'éjection radiale à travers des fentes (30 x 0.25 mm) creusées dans les deux barres opposées a été décrite pour la première fois par Senko et Schwartz de Thermo Finnigan en 2002 [172]. Les détecteurs sont placés hors axe à la sortie des fentes comme le montre la figure 42.

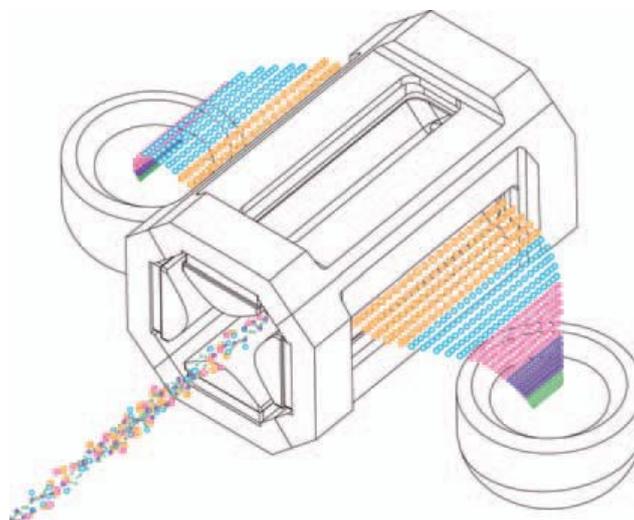


Figure n° 42 : Piège ionique linéaire à éjection radiale ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)).

#### 4. L' orbitrap XL™

L'orbitrap™ ou piège électrostatique conçu par Makarov en 1999 [173] constitue une adaptation du piège à ions. Cet analyseur se compose deux électrodes coaxiales : une électrode creuse externe en forme de cloche à l'intérieur de laquelle se trouve une électrode en forme de fuseau (Figure 43).

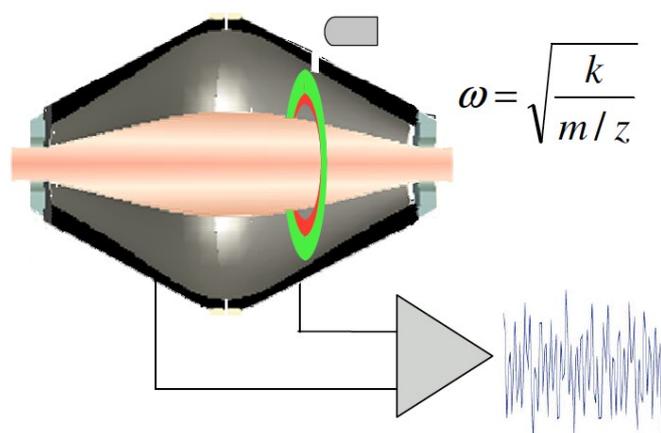


Figure n° 43 : Représentation schématique de l'orbitrap™ ou du piège électrostatique [174].

Des tensions continues sont appliquées aux électrodes. Ainsi la géométrie du piège et les tensions continues qui y sont appliquées génèrent entre les deux électrodes un champ électrostatique. Le mouvement des ions injectés tangentiellement à ce champ est défini de deux manières : un mouvement circulaire autour de l'électrode interne et un mouvement latéral de va et vient selon l'axe z. La fréquence des oscillations des ions ne dépend ni de leur vitesse ni de leur énergie mais est liée au rapport  $m/z$  selon l'équation suivante  $\omega \equiv \sqrt{\frac{k}{m/z}}$  (où k est une constante géométrique du piège). Le courant induit par les ions mesurés est converti en masses et en intensité par transformée de Fourier, produisant ainsi un spectre. La précision de masse est particulièrement excellente de l'ordre de 1 ppm, la résolution en masse atteint 100 000 et surtout la capacité de piégeage y est très bonne [175].

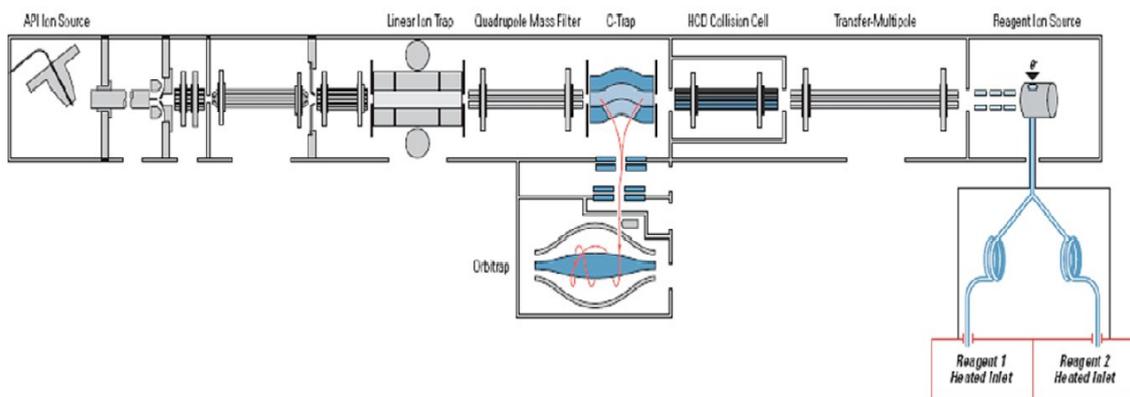
#### **5. Appareillage LTQ-Orbitrap XL™ ETD et mode d'analyse en mode MS/MS**



**Figure n° 44 : Photographie du LTQ Orbitrap XL™ ETD (Thermo-Scientific) ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)).**

Le spectromètre hybride LTQ-Orbitrap XL™ ETD fabriqué par la société Thermo Scientific (Figure 44) est constitué d'une source d'ionisation électrospray, et de deux analyseurs de masse (LTQ, trappe ionique linéaire et orbitrap) qui peuvent être utilisés indépendamment ou en association. Le couplage entre ces deux analyseurs se fait via une C-Trap, pour un stockage intermédiaire des ions. La C-trap permet également de focaliser et concentrer les ions sur une large gamme de

masse. Une rapide augmentation du voltage des électrodes de la C-Trap permet d'éjecter les ions orthogonalement vers l'orbitrap. C'est grâce à l'utilisation d'un vide très poussé (10-11 hPa) et d'une injection rapide des ions depuis la C-Trap que les ions restent stables pendant plusieurs secondes dans l'orbitrap™. Ce phénomène permet d'atteindre des résolutions très élevées (100 000), et une excellente précision de masse (< 1 ppm). L'enchaînement des différents éléments composant le LTQ Orbitrap XL™ ETD est représenté sur la figure 45.



**Figure n° 45 : Schéma de la structure interne du spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL™ ETD (Thermo-Scientific) ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)).**

Les deux analyseurs peuvent fonctionner en parallèle : tandis qu'un spectre MS de haute précision/résolution est acquis dans l'orbitrap™, la trappe linéaire (LTQ) plus rapide peut réaliser la fragmentation et la détection des spectres MS/MS des peptides les plus intenses préalablement sélectionnés (lors du « prescan »). En une 1s, on obtient l'acquisition d'un spectre (MS) de haute résolution dans l'orbitrap™ (60 000 à 100 000) et de 3 à 5 spectres de fragmentation (MS/MS) dans la trappe linéaire (LTQ) (Figure 44).



**Figure n° 46 : Analyse MS/MS avec le LTQ Orbitrap XL™ (tiré des travaux de thèse de Matondo Mariette [176]).**

Les ions issus de la source sont conduits vers la trappe linéaire et sont ensuite dirigés vers l'orbitrap™ où une MS à basse résolution est réalisée « prescan » (en jaune) et permet de transmettre les informations pour l'analyse MS/MS des ions les plus intenses dans la trappe (en bleu). Pendant ce temps un spectre MS à haute résolution est acquis dans l'orbitrap™ (orange). Cette méthode permet d'étudier des mélanges complexes et d'augmenter considérablement le nombre de protéines identifiées.

Notons que cet appareil est également équipé du module de fragmentation ETD (*Electron Transfer Dissociation*) qui génère des fragments différents de ceux observés par fragmentation par collisions avec un gaz inerte comme la Dissociation Induite par Collision (CID) qui a lieu sein du LTQ. Ce type de fragmentation permet de localiser précisément les sites de modifications post-traductionnelles labiles en mode CID classique, et d'augmenter les possibilités d'analyse de l'instrument. Cependant l'étude de la localisation des modifications post traductionnelles au sein de la séquence peptidique ne rentre pas dans les objectifs de nos travaux et peut compliquer l'analyse des spectres de fragmentation. Par conséquent, nous n'avons pas utilisé ce module pour la détermination des peptides spécifiques du bevacizumab.

De par sa conception hybride et ses performances (résolution, précision et gamme dynamique), il est particulièrement adapté à l'identification des peptides et à l'analyse qualitative des échantillons biologiques complexes. Nous avons eu accès à ce spectromètre de masse couplé à une nano chromatographie (nanoLC-LTQ-Orbitrap™) sur le site de la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux.

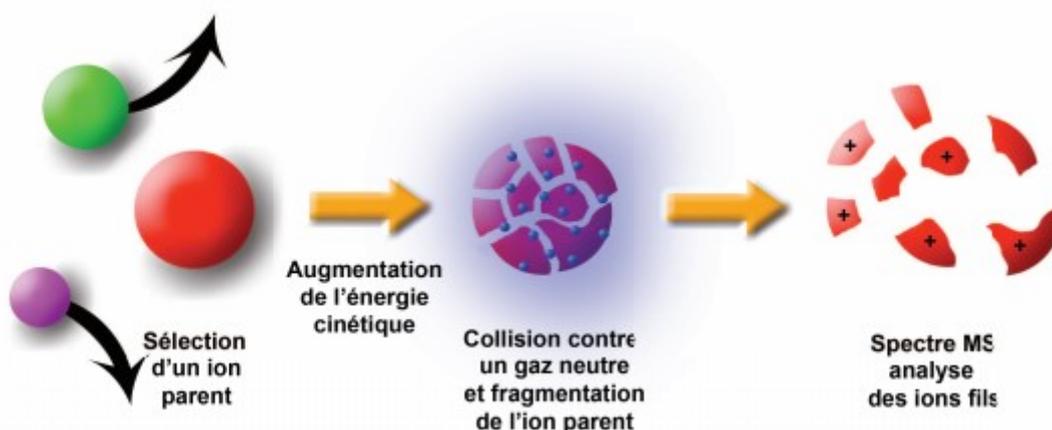
### **C. Fragmentation peptidique et identification des peptides et des protéines**

En MS/MS, un spectre de fragmentation représente la liste des rapports  $m/z$  des fragments issus de la fragmentation d'un peptide en fonction de l'intensité du signal généré par ces derniers. D'une manière générale, l'identification des protéines se fait en deux étapes. Tout d'abord, il convient de retrouver et d'associer à chaque spectre produit par l'analyse d'un échantillon le peptide correspondant. Pour cela, nous disposons à la fois de la masse du peptide et d'informations complémentaires liées à la composition en acides aminés du peptide. En combinant les peptides identifiés à partir des spectres expérimentaux, il est ensuite possible de retrouver les protéines qui ont été analysées

## 1. Principe de la fragmentation par dissociation induite par collision (CID).

Afin d'obtenir des informations sur la séquence en acides aminés d'un peptide, la molécule étudiée doit subir une fragmentation d'une ou de plusieurs liaisons de manière à relier la masse des fragments obtenus à la structure chimique des peptides par l'établissement des spectres de fragmentation de chaque ion parent. Pour cela il faut transférer aux ions stables produits lors de l'ionisation l'énergie supplémentaire nécessaire à la fragmentation. Différentes techniques de fragmentation des peptides précurseurs ont été développées et la méthode la plus utilisée permettant ce transfert d'énergie est la dissociation induite par collision (*collision induced dissociation* CID ou *collision activated dissociation* CAD). Il s'agit également de la technique à laquelle nous avons eu recours avec les deux spectromètres de masse utilisés au cours de nos travaux (ESI-QqQ, API3200™, ABSciex et LTQ-Orbitrap XL™, Thermo-Scientific).

Le processus de collision s'effectue en deux étapes (figure 47). La première correspond à la collision entre l'ion et le gaz cible amenant une partie de l'énergie cinétique de l'ion à se convertir en énergie interne et conduisant l'ion à un état d'excitation. La deuxième étape correspond à une décomposition unimoléculaire de l'ion activé : le chauffage vibrationnel global de la molécule induit sa fragmentation dès que les voies de dissociation nécessitant le moins d'énergie sont accessibles.

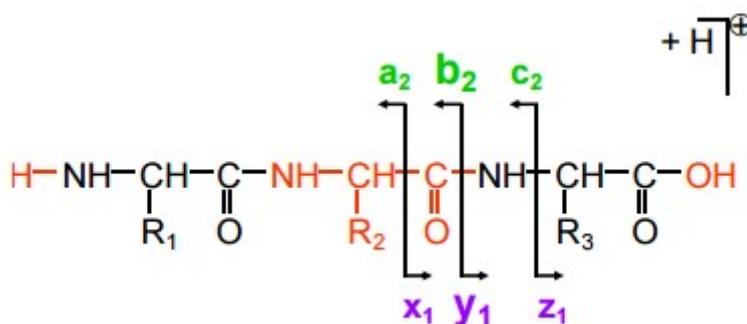


**Figure n° 47 : Principe de la fragmentation selon le procédé de dissociation induite par collision (CID) [177].**

En pratique, dans un premier analyseur, l'ion que l'on veut fragmenter (ion précurseur ou parent) est sélectionné et envoyé dans une cellule de collision (au sein

du premier analyseur ou à la suite de ce dernier) où il entrera en collision avec des atomes d'un gaz inerte (azote, argon ou hélium). Dès lors, l'énergie cinétique sera transformée en partie en énergie vibrationnelle et les fragments produits (ion produits ou fils) seront analysés par un second analyseur. On distingue deux types de collisions par CID : les fragmentations de basse énergie (quelques eV), qui ont lieu dans les appareillages de type quadripôle ou trappe ionique, et les fragmentations de haute énergie (quelques keV), produits dans les appareils de type TOF-TOF.

Les processus de fragmentation de la chaîne peptidique sont influencés par leur environnement et donc par la nature des chaînes latérales et par l'énergie apportée à l'ion parent lors de la fragmentation. Afin de caractériser ces processus, une première nomenclature des ions fragments générés lors de l'analyse MS/MS d'un peptide a été proposée par Roepstorff et Fohlman en 1984 [178] puis complétée et simplifiée par Biemann quelques années plus tard en 1990 [179] (Figure 48).



**Figure n° 48 : Nomenclature de la fragmentation des peptides par MS/MS selon Biemann [179].**

Cette nomenclature de la fragmentation des peptides a été établie en fonction de la localisation du clivage et de la partie de la chaîne peptidique portant la charge (partie N-terminale ou C-terminale). La fragmentation de la liaison peptidique donne lieu à deux types d'ions : les ions a, b et c pour lesquels la charge (positive ou négative) est portée par l'extrémité N-terminale, et les ions x, y et z pour lesquels la charge est portée par l'extrémité C-terminale.

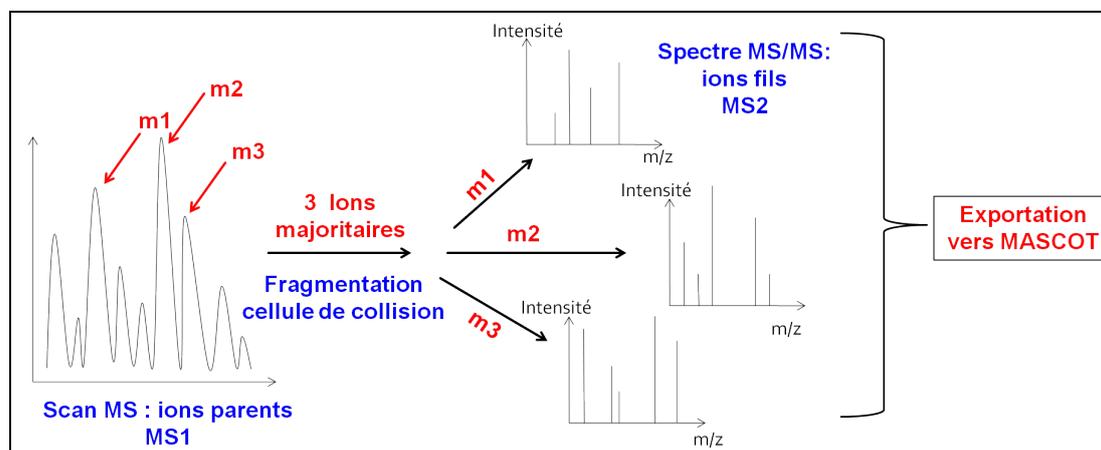
Au cours de ce travail de thèse, le processus de fragmentation observé au sein des appareillages de spectrométrie de masse utilisés fait appel à une fragmentation par CID de basse énergie. Dans ce cas, la majorité des fragments obtenus sont de type b et y ce qui facilite la déduction de la séquence en acides aminés. Des ions satellites dus à la perte de NH<sub>3</sub> ou de H<sub>2</sub>O peuvent se former. La différence de masse entre deux ions consécutifs d'un même spectre de

fragmentation permet ainsi de déduire la séquence du peptide (excepté les ions isomères leucine/isoleucine et les isobares Glutamine/lysine). Une des limites de cette technique de fragmentation CID est qu'elle n'apporte pas d'information sur la localisation des modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations...) étant donné que celles-ci sont rapidement perdues lors du mécanisme de fragmentation mis en jeu.

## **2. Analyse bio-informatique des données pour l'identification des protéines et interprétation des spectres de fragmentation**

L'identification des protéines en spectrométrie de masse est établie par comparaison des masses expérimentales peptidiques avec les masses théoriques extraites des banques de données : approche par « *Peptide Fragment Fingerprinting* (PFF) ». Ces approches permettent de définir des peptides signatures à partir desquels il est possible d'identifier sans ambiguïté une protéine dans une matrice biologique donnée au regard des autres protéines potentiellement présentes. La détermination des peptides signature est basée sur des comparaisons entre les spectres MS/MS expérimentaux issus de l'analyse d'un protéolysat contenant la protéine d'intérêt et les spectres MS/MS générés à partir de l'ensemble des peptides tryptiques théoriques des protéines contenues dans la matrice biologique étudiée et répertoriés dans des banques de données.

A cet effet, l'interprétation des spectres de fragmentation est facilitée par des logiciels de bio-informatique associés à des banques de données. Par confrontation des masses des ions fragments obtenues par l'expérimentation et exportés dans le logiciel avec les masses théoriques des fragments présents dans la banque de donnée informatique, ces outils de bio-informatique permettent d'identifier les peptides et de remonter aux protéines présentes dans l'échantillon. Le principe de cette approche est schématisé sur la figure 49.



**Figure n° 49 : Principe de l'établissement des cartes peptidiques ou PFF (Peptide Fragment Fingerprinting) d'une protéine en spectrométrie de masse.**

Les banques de données protéiques telles que Swiss Prot sont très utilisées. Les recherches de séquences dans ces banques de données se font par l'intermédiaire d'algorithmes commerciaux ou libres d'accès sur internet comme Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>), MASCOT développé par Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) ou SEQUEST développé par ThermoFinnigan (<http://fields.scripps.edu/sequest/>). Il en résulte un classement probabiliste des protéines candidates en fonction du nombre de peptides ou de fragments MS/MS qui sont attribués à la protéine et du nombre de protéines dans la banque de données. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé l'outil SEQUEST. Dans cette approche les masses des fragments MS/MS calculées à partir des peptides présents dans la banque de données sont comparées aux masses expérimentales des fragments mesurés. Un score est calculé qui reflète la significativité de la correspondance entre les spectres théoriques et expérimentaux. On obtient aussi un recouvrement de séquence qui définit le pourcentage de couverture de la séquence complète de la protéine candidate par les peptides protéolytiques détectés. Cependant, ces algorithmes ne sont pas infaillibles. A travers l'évaluation du taux de faux positifs (TFP) observés à l'issue de ce type d'analyse, Peng *et al* ont estimé qu'un TFP de 26 % pour les protéines identifiées avec un peptide unique est réduit à 1,4 % pour des identifications avec 2 peptides et devient nul pour des identifications avec 3 ou plus de peptides [180]. Ces travaux mettent en évidence l'intérêt de monitorer au moins 2 et dans l'idéal 3 peptides pour identifier sans ambiguïté une protéine dans un échantillon. Cependant étant donné le fort degré d'homologie des mAbs avec les immunoglobulines humaines, il n'est pas toujours aisé d'obtenir plusieurs peptides signatures pour un mAb lors de l'analyse d'échantillons biologiques humains. Dans ce contexte un peptide pour la

quantification est acceptable et au moins un second est requis pour l'identification [147]. Par ailleurs, en 1994, un peptide signature de 2 à 3 acides aminés était suffisant pour identifier un peptide unique dans la banque SwissProt mais aujourd'hui il a été estimé qu'une séquence de moins de 7 acides aminés n'était plus suffisante pour identifier un peptide unique [181]. Ces travaux mettent en évidence l'intérêt de la longueur de la séquence peptidique lors de la sélection des peptides signature monitorés pour identifier et quantifier une protéine par spectrométrie de masse.

Par ailleurs, il existe des logiciels disponibles sur internet qui permettent de simuler la protéolyse enzymatique d'une protéine tel que le site <http://prospector.ucsf.edu/>, qui par la requête « MS-Digest » permet d'obtenir la liste des peptides susceptibles d'être obtenus après protéolyse enzymatique d'une protéine en prenant en compte les modifications des protéines et peptides. Il suffit d'entrer la séquence correspondant à la protéine et de choisir l'enzyme de protéolyse (et les différents réactifs utilisés au cours de la protéolyse pouvant modifier les acides aminés) pour obtenir la liste des peptides qui peuvent être obtenus après protéolyse. Ce sont ces listes théoriques qui sont ensuite comparées aux cartes peptidiques obtenues expérimentalement après analyse par spectrométrie de masse.

Enfin, le logiciel de recherche par alignement de séquence BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) recherche les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences d'acides aminés (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ainsi, le BLAST est un algorithme qui permet de rechercher la similarité entre une séquence donnée (entrée par l'utilisateur) et des séquences répertoriées dans une base de données. Lorsqu'une séquence est entrée (la séquence d'un peptide signature par exemple), ce programme présente toutes les protéines dont une région de la séquence d'acides aminés présente une similarité significative avec la séquence entrée. A chaque alignement est attribué une valeur spécifique qui est une indication de la qualité de l'alignement : le score S et le E-Value. Le score S est une valeur numérique normalisée, il est exprimé en bits et permet de mesurer la similitude entre la séquence requête et la séquence repertoriée. On admet que plus sa valeur est élevée, plus les 2 séquences sont similaires. Le E-Value est le nombre d'alignements différents que l'on peut espérer trouver dans les banques avec un score supérieur ou égal au score S. C'est donc la probabilité d'observer au hasard ce score dans les banques de séquences considérées. Plus le E-value est faible plus l'alignement est significatif. Cette requête permet de sélectionner parmi les peptides spécifiques

préalablement identifiés, les peptides présentant le moins de similitudes avec les peptides issus de la protéolyse des protéines plasmatiques.

## **II. Description de la chromatographie liquide**

La complexité des échantillons et leur gamme dynamique de concentration constituent un challenge important dans la bioanalyse des protéines. Or, la spectrométrie de masse seule ne peut tolérer qu'une complexité relativement faible, et est très sensible au phénomène de suppression d'ionisation. C'est pourquoi, en spectrométrie de masse, il est nécessaire de limiter le nombre de composés à analyser en même temps dans le cas où une sensibilité élevée est requise. Grâce aux efforts de miniaturisation des colonnes et à l'introduction des techniques d'ionisation douce par désolvatation, la chromatographie liquide en phase inverse (RP-LC) couplée à la spectrométrie de masse est devenue la technique analytique de choix dans le domaine de la protéomique, et tend à se développer pour la quantification des biomédicaments ou médicaments de nature protéique. A partir d'une quantité d'échantillon limitée, des milliers de peptides peuvent être identifiés et quantifiés en routine avec une haute sensibilité.

### **A. Principe général de la chromatographie liquide**

La chromatographie est une technique analytique séparative et/ou préparative qui consiste à faire migrer les constituants d'un mélange sur une phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile (liquide ou gazeuse). La séparation s'opère suivant les interactions chimiques ou physiques entre les analytes, la phase mobile et la phase stationnaire. A partir de ce principe très général, il existe de très nombreux types de chromatographies en fonction de la nature de la phase stationnaire, de la phase mobile et des interactions entre ces phases et les molécules contenues dans l'échantillon à séparer.

- Classification selon la nature de la phase mobile : si la phase mobile est liquide la technique séparative s'appellera chromatographie en phase liquide (HPLC), si la phase mobile est un gaz la technique séparative s'appellera chromatographie en phase gazeuse (CPG).

- Classification selon la nature de la phase stationnaire : la phase stationnaire peut être liquide ou solide. Dans le cas d'une phase stationnaire liquide celle-ci doit être non miscible à la phase mobile. Dans le cas où la phase stationnaire est solide elle peut se présenter sous la forme d'une colonne dont le greffage diffère en fonction du principe de rétention et des interactions qu'elle met en jeu. Dans ce cas, la phase mobile progresse, sous l'action d'une différence de pression ou d'une pompe. Elle peut également se présenter sous la forme d'une surface plane sur laquelle la phase mobile progresse par capillarité (chromatographie sur couche mince, CCM).
- Classification selon la nature des interactions mises en jeu : cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et de ses interactions avec les molécules à séparer. En effet, les facteurs physico-chimiques qui sont impliqués dans la séparation chromatographique sont totalement différents. On distingue ainsi :
  - La chromatographie de partage qui s'appuie sur le coefficient de partage entre deux liquides non miscibles, cela implique que la phase stationnaire soit liquide.
  - La chromatographie d'adsorption qui s'appuie sur la différence de polarité entre la phase mobile et la phase stationnaire et sur le caractère hydrophobe ou hydrophile des constituants du mélange à séparer.
  - La chromatographie par échange d'ions qui s'appuie sur les interactions électrostatiques entre les constituants du mélange et la phase stationnaire porteuse de groupements chargés.
  - La chromatographie d'affinité qui s'appuie sur l'affinité des molécules contenues dans l'échantillon avec le ligand greffé sur la phase stationnaire.
  - La chromatographie d'exclusion qui s'appuie sur la taille des molécules à séparer et de leur capacité à diffuser au sein d'une phase stationnaire de porosité définie.

Le tableau VII résume les différents types de chromatographie en fonction de la nature de la phase stationnaire et du type d'interactions mis en jeu.

**Tableau VII : Les différents types de chromatographie liquide.**

Phase stationnaire	Principe de séparation	Caractéristique de la phase stationnaire	Principe de la fixation et de l'élution
Liquide	Partage	Liquide fixé sur un support inerte (papier, silice,,)	Distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage
Solide	Adsorption	Adsorbant solide polaire	Formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface absorbante
	Adsorption (phase inverse)	Molécules hydrophobes greffées sur de la silice	Interactions hydrophobes et élution en jouant sur la polarité de la phase mobile
	Echange d'ions	Résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement	Interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée
	Exclusion (filtration sur gel)	Solide poreux	Les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont "exclus" et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés
	Affinité	Support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des composants de l'échantillon à analyser	Rétention et élution par déplacement de l'équilibre de liaison [molécule-ligand greffé]

Une bonne séparation en chromatographie liquide implique tout d'abord que les divers constituants du mélange soient retenus sur la phase stationnaire ce qui implique qu'ils présentent une affinité pour cette dernière suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume interstitiel de la colonne. Par ailleurs une bonne séparation chromatographique implique que les pics de chromatographie soient bien séparés lors de la détection de plusieurs composés, ce qui pour deux pics successifs dépend de la distance séparant les sommets et leur largeur. La résolution ( $R_s$ ) est la grandeur qui caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer deux composés. Il est nécessaire d'avoir une valeur  $R_s$  supérieure à 1,5 pour pouvoir séparer deux composés à analyser. De plus un pic de chromatographie idéal doit avoir une allure gaussienne c'est-à-dire parfaitement symétrique, cette caractéristique pouvant être évaluée de plusieurs façon : par la valeur de la largeur à la base du pic ( $\omega$ ) mesurée à 13,5 % de la hauteur du pic qui doit être égale à 4 fois l'écart type du pic ( $\sigma$ ). L'écart type du pic correspond à la demi-largeur du pic mesurée à 60,6 % de la hauteur. La relation  $\omega = 4\sigma$  témoignant d'un pic parfaitement gaussien. L'allure gaussienne d'un pic peut également être évaluée par le calcul du facteur de symétrie qui correspond au rapport  $a/b$  des demi-largeurs à 10 % de la hauteur. En présence d'un pic gaussien parfait  $a = b$  donc  $a/b = 1$  mais en pratique cela n'est pas souvent le cas. On admet en principe un rapport  $a/b$  compris entre 0,83 et 1,3. Enfin, le temps de rétention est également une valeur à prendre en compte pour l'optimisation des conditions chromatographiques car le but de la chromatographie est de simplifier l'échantillon pour faciliter son analyse par le détecteur couplé (bonne résolution avec des pics gaussiens) dans un temps le plus court possible.

Le type de chromatographie retenue dépendra des propriétés physico-chimiques du composé à analyser, de la complexité de l'échantillon dans lequel il se trouve et des exigences en termes de temps d'analyse et de sensibilité attendues. Dans le cadre de l'identification et de la quantification de mélanges peptidiques la chromatographie liquide en phase inverse (RP-LC) est la technique séparative la plus couramment utilisée du fait de son couplage aisé à la spectrométrie de masse et de son pouvoir de séparation assez élevé. Au cours de notre étude nous avons eu recours à la RP-LC sur deux systèmes différents : un système de nano-chromatographie (nano-LC) pour l'établissement des cartes peptidiques du bevacizumab et de l'étalon interne, et un système de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) pour le développement de la méthode de quantification. Par conséquent seul le procédé de RP-LC sera détaillé par la suite.

## **B. Systèmes de chromatographie liquide en phase inverse**

Comme décrit précédemment, ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par un solvant (phase mobile) à travers une matrice appelée colonne chromatographique correspondant à la phase stationnaire. Dans le cas de la chromatographie dite « en phase inverse » la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile polaire. Le procédé de rétention consiste à séparer les composés d'intérêt en fonction de leur hydrophobicité par interaction avec une phase stationnaire apolaire hydrophobe. Plus le solvant de phase mobile est polaire, moins il entraîne les substances organiques peu polaires ou apolaires : ces dernières sont davantage retenues par la phase stationnaire faiblement polaire ou apolaire. En jouant sur la composition de la phase mobile, l'affinité des molécules pour la phase stationnaire et pour la phase mobile est modifiée. La chromatographie en phase inverse fournit une haute efficacité de séparation en raison du transfert de masse rapide de l'analyte entre phase mobile et phase stationnaire. Lors de l'analyse d'échantillons complexes tels que le plasma, l'élution des analytes se fait en général à l'aide d'un gradient de phase mobile permettant de moduler l'élution et de garantir une bonne séparation des composés d'un échantillon au sein de la colonne de chromatographie. Les analyses sont le plus souvent effectuées en augmentant au cours du temps le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile.

Bien qu'une chaîne de nano-LC soit composée des mêmes parties qu'une chaîne HPLC et qu'elles appliquent les mêmes principes de séparation les grandes différences résident d'une part dans les caractéristiques des colonnes employées (taille des particules, diamètre interne de 75 µm pour la nano-LC contre 2,1 à 4,6 mm en HPLC) et d'autre part dans le débit de la phase mobile qui est beaucoup plus faible en nano-LC (pouvant aller jusqu'à 20 nL/min). Il en résulte notamment une concentration plus importante des échantillons lorsque l'analyse est réalisée en nano-LC. En effet, plus le volume d'élution de la molécule à analyser est petit, plus la concentration sera importante et meilleure sera l'intensité du signal généré par le détecteur couplé (spectromètre de masse dans notre cas). Il y a cependant une difficulté liée à la diminution des tailles des particules : la pression très élevée dans le système chromatographique, même à de faibles débits. Par ailleurs l'instrumentation analytique utilisée dans la nano-LC est encore très coûteuse, ce qui limite son utilisation. En outre, une grande connaissance technique relative aux équipements nano-LC est nécessaire pour prévenir les difficultés expérimentales, en particulier ceux liés à l'arrangement instrumental. En effet, en comparaison avec l'instrumentation classique, l'instrumentation nano-LC est miniaturisée. Les pompes, les connexions, les colonnes, la boucle d'injection et l'interface de détection sont dimensionnés pour les petits volumes et pour une faible contre-pression. L'état de ces différents éléments (microfuites, obstruction facile des tubulures) peut grandement influencer l'efficacité chromatographique de la nano-LC et doit être précisément et fréquemment contrôlé pour que la séparation chromatographique soit optimale : cette technique requiert une maintenance régulière et un support technique. Nous avons fait le choix de développer la méthode de quantification du bevacizumab sur un spectromètre de masse couplée à une chaîne HPLC (ESI-QqQ API3200) étant donné la plus grande facilité d'utilisation de ce système en routine pour de multiples dosages. Par ailleurs étant donné le moindre coût d'un système HPLC notre laboratoire est exclusivement équipé avec ce type de chaîne de chromatographie liquide. Nous avons eu recours à un spectromètre de masse couplé à de la nano-LC (LTQ-Orbitrap™) pour établir la carte peptidique du bevacizumab en vue de déterminer les peptides signature du bevacizumab. Comme précisé dans le paragraphe relatif à l'instrumentation de spectrométrie de masse, nous avons eu accès à cet appareillage sur le site de la plateforme de génomique fonctionnelle (PGF) de Bordeaux.

D'une manière générale, une chaîne chromatographique est composée de plusieurs modules reliés par des tubulures courtes et de très faibles diamètres internes. Dans le cas d'un système HPLC, les tubulures sont soit en acier inoxydable soit en polymère de type PEEK (polyetheretherketone) qui est un polymère souple plus économique que l'acier et pouvant résister aux solvants sous des pressions élevées jusqu'à 350 bars. Dans le cas d'un système de nano-LC, les tubulures et les raccords utilisés à serrage manuel présentent un volume mort égale à zéro et sont capables de résister à des pressions allant jusqu'à 800 bars. Les modules constituant une chaîne de chromatographie liquide (phase inverse) sont :

- **La pompe**

Couplée à un réservoir à solvant, elle a pour but de délivrer la phase mobile dans la colonne de chromatographie avec une grande précision de débit, condition essentielle à la reproductibilité des temps de rétention. Le modèle utilisé pour le développement de la méthode de quantification est une pompe quaternaire permettant un mélange précis à basse pression. Un système de dégazage en ligne permet d'éliminer en continu l'air présent dans la phase mobile.

En règle générale les phases mobiles utilisées sont constituées d'une phase aqueuse et d'une phase organique. La phase aqueuse est le solvant le plus polaire. Le pH et le pouvoir tampon de cette dernière peuvent modifier l'état d'ionisation des molécules présentes dans l'échantillon lors de leur élution et par conséquent jouer sur leur rétention. Ainsi la phase aqueuse peut être soit une solution tamponnée soit une solution à pH ajustée à un pH défini permettant une bonne séparation de la molécule à analyser. Ainsi le choix de la composition de la phase aqueuse et des solvants organiques dépendra de la polarité des molécules à analyser mais aussi de leur compatibilité avec le système de détection.

En spectrométrie de masse, l'acétonitrile est toujours largement employé pour éluer les composés et notamment les peptides. En revanche, les tampons salins (par exemple le tampon phosphate permettant de fournir un pH acide), incompatibles avec une bonne ionisation ESI, sont prohibés. En effet, certains sels sont à proscrire dans la composition de la phase aqueuse tamponnée car ces derniers peuvent interférer avec l'ionisation des molécules dans la source d'ionisation du spectromètre de masse avec formation d'adduits. On préférera utiliser une solution aqueuse à pH ajusté avec de l'acide formique. Par ailleurs l'ionisation ESI reposant sur une désolvatation, les solvants organiques volatiles tels que l'acétonitrile ou le méthanol sont à privilégier.

L'hydrophilie/hydrophobicité recherchée de la phase mobile est obtenue par un mélange de ces différents solvants dans des proportions choisies. Les composés de l'échantillon à analyser sont élués de la colonne chromatographique par la phase mobile correspondant soit à un mélange qui ne varie pas au cours du temps (on parle de mode d'éluion isocratique), ou soit au contraire le mélange de solvants varie au cours du temps (mode d'éluion en gradient) en modifiant les proportions relatives des solvants aqueux et organiques utilisés. Lorsque l'échantillon à analyser est un mélange complexe tels que des protéolysats polypeptidiques, l'éluion est réalisée à l'aide d'un gradient de phase mobile afin d'obtenir une meilleure séparation des différents composés.

- ***Le passeur d'échantillon***

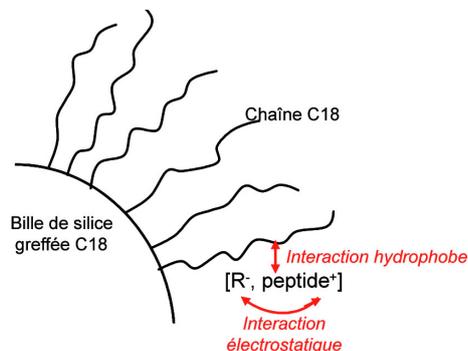
Il permet de positionner les échantillons à analyser. Ce dernier peut être thermostaté afin de permettre l'analyse d'échantillons thermosensibles.

- ***L'injecteur***

L'injection de l'échantillon dans la colonne de chromatographie se fait avec de faibles volumes (généralement 5 à 40  $\mu\text{L}$ ) pour éviter la dispersion de l'échantillon dans le système chromatographique puis un étalement de son pic sur le chromatogramme. Un modèle d'injecteur à boucle permet de garantir une excellente reproductibilités lors d'injections répétées de faibles volumes d'échantillons (5  $\mu\text{L}$  en HPLC et 1  $\mu\text{L}$  pour la nano-LC).

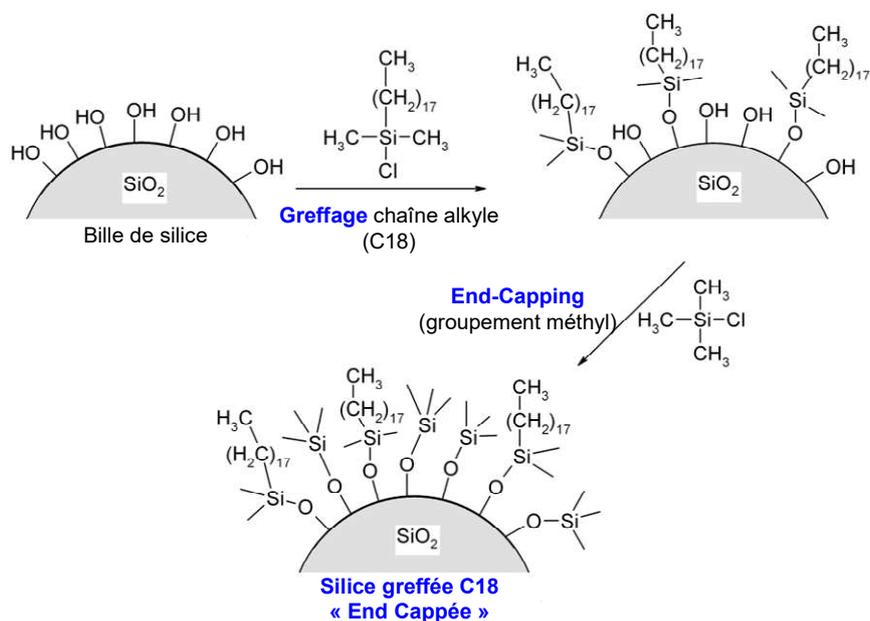
- ***La colonne de chromatographie***

En aval de l'injecteur, est placée une colonne chromatographique qui renferme la phase stationnaire. Les colonnes sont généralement en acier inoxydable et inertes chimiquement. Les phases stationnaires qu'elles contiennent sont constituées de fines particules de gel de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes carbonées apolaires sur les groupements  $-\text{OH}$  des fonctions silanols des billes de silice. Les colonnes avec des greffages à 18 carbones ( $\text{C}_{18}$ , ou ODS pour OctaDecylSilice) sont les plus couramment utilisées. La figure 50 est une représentation schématique d'un greffage  $\text{C}_{18}$ .



**Figure n° 50 : Représentation schématique du greffage C<sub>18</sub> en chromatographie liquide en phase inverse.**

Cependant, les fonctions silanols (Si-OH) qui subsistent engendrent des interactions hydrophiles parasites, qui rendent les résultats non reproductibles surtout pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte par une fonction méthyle : ainsi les fonctions silanols ne sont plus libres mais sous la forme (Si-O-CH<sub>3</sub>). Ce procédé schématisé sur la figure 51 s'appelle « *end-capping* ». Les colonnes de dernières générations résistant à des pH extrêmes sont généralement conçues avec ce procédé.

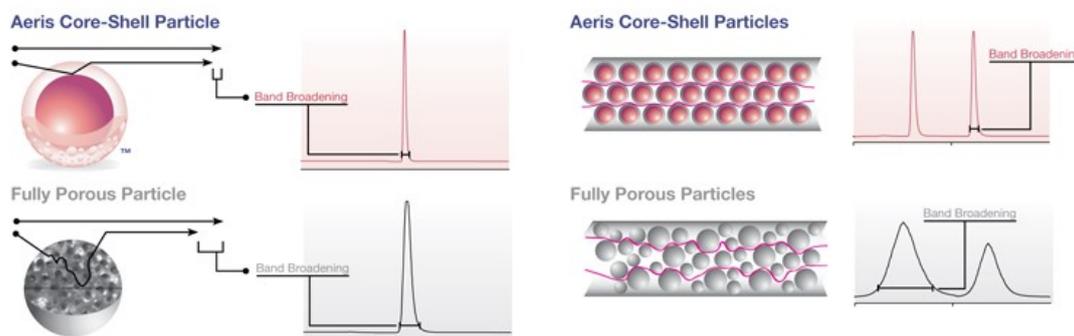


**Figure n° 51 : Représentation schématique du procédé de « end-capping ».**

Par ailleurs, avec les colonnes à particules entièrement poreuses traditionnelles de 3 à 5 µm, l'efficacité diminue sensiblement au fur et à mesure que le débit augmente. Dans la plupart des cas une perte de résolution et de sensibilité empêche la mise en place de délais d'analyses rapides. Des particules entièrement poreuses de plus petite taille (< 2 µm) permettent des séparations

chromatographiques plus rapides avec des petites hauteurs de plateaux (nombre de plateaux plus élevés, augmentant l'efficacité de la colonne) mais nécessitent des instruments capables de fonctionner à plus haute pression. La technologie Core-Shell® permet d'obtenir une efficacité comparable aux particules entièrement poreuses inférieures à 2 µm sans génération de contre-pression. La majorité des colonnes utilisées pour l'analyse d'échantillons peptidiques font aujourd'hui appel à cette technologie.

Le principe de la technologie Core Shell®, exposé sur la figure 52, repose sur des particules qui ne sont pas entièrement poreuses mais composées de deux phases : un noyau solide de silice sur lequel repose une couche poreuse durable et homogène. Ce procédé associé à une répartition granulométrique uniforme permet d'obtenir une colonne qui génère un grand nombre de plateaux (grande efficacité). En effet étant donné que les particules ne sont pas entièrement poreuses, les analytes diffusent plus rapidement entre l'intérieur et l'extérieur des pores lorsqu'ils traversent la colonne. Cet itinéraire de diffusion plus rapide permet une accélération du transfert de masse. Par conséquent, l'élargissement de la bande est moins important pour une efficacité de pic comparable ou supérieur aux particules entièrement poreuses de diamètre inférieur à 2 µm. Cette technologie permet ainsi de réduire les temps d'analyse et d'atteindre de meilleurs niveaux de sensibilités. Par ailleurs la répartition extrêmement concentrée et la granulométrie uniforme des particules réduit l'effet multi-chemins étant donné que l'espace interstitiel entre les particules est homogène. On obtient par conséquent une efficacité de colonne élevée avec une reproductibilité excellente.



**Figure n° 52 : Représentation schématique de la technologie Core Shell® ([www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)).**

Les principaux éléments à prendre en compte pour le choix de la colonne chromatographique sont :

- Le type de greffage : de la longueur la chaîne alkyle greffée sur les billes de silice dépendra la polarité de la phase stationnaire. Plus le nombre de carbones sera élevé plus la chaîne alkyle sera apolaire. Ainsi, en jouant sur leur nombre on joue sur le pouvoir de rétention de la colonne vis-à-vis des analytes à éluer.
- Son diamètre interne : le diamètre interne est généralement compris entre 1 et 4,6 mm. Lors d'un couplage avec une source d'ionisation type ESI le diamètre interne doit être suffisamment faible pour permettre de travailler à faible débit tout en garantissant une durée d'analyse convenable.
- Sa granulométrie : pour les analyses conventionnelles de petites et grosses molécules la granulométrie standard est de 5  $\mu\text{m}$  et 3  $\mu\text{m}$ . Cependant, de plus faibles granulométries (de l'ordre 2,6  $\mu\text{m}$  et 1,7  $\mu\text{m}$ ) sont aussi disponibles et permettent une plus grande efficacité et une meilleure résolution en augmentant la surface d'échanges de la phase stationnaire. La technologie Core Shell<sup>®</sup> précédemment exposée permet d'ailleurs de pouvoir travailler avec des particules de faible granulométrie sans contre pression.
- Sa longueur : la longueur des colonnes généralement utilisées est comprise entre 50 et 150 mm. Une longueur plus élevée de l'ordre de 250 mm permet d'améliorer la séparation en augmentant les échanges avec la phase stationnaire mais augmente également le temps de l'analyse.



## **CHAPITRE 4**

### **DEVELOPPEMENT ET VALIDATION ANALYTIQUE D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE EN MILIEU PLASMATIQUE : LE BEVACIZUMAB**

## **CHAPITRE 4**

### **DEVELOPPEMENT ET VALIDATION ANALYTIQUE D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE EN MILIEU PLASMATIQUE : LE BEVACIZUMAB**

L'objectif de ce développement analytique est d'obtenir une méthode de quantification fiable permettant d'avoir accès au dosage de la forme plasmatique totale du bevacizumab. A travers ce développement nous souhaitons que notre approche analytique ait un caractère universel pour être transposable à la quantification de la plupart des mAbs dans le plasma. Pouvoir disposer d'une méthode de dosage des mAbs facilement adaptable à toute nouvelle molécule est d'un intérêt évident pour les études PK et PK/PD dans la mesure où l'analyse quantitative de cette nouvelle molécule ne nécessitera pas une mise au point lourde et fastidieuse.

En tenant compte du nombre croissant d'anticorps monoclonaux sur le marché, du développement de la voie sous-cutané (SC) à dose fixe ou encore du développement des biosimilaires, il est nécessaire d'avoir une meilleure connaissance de la PK des mAbs pour permettre un choix rationnel de leur dose à administrer en thérapeutique. Cet objectif suffit à justifier une telle entreprise, mais il faut garder à l'esprit qu'il représente de nombreuses difficultés à solutionner et évoquées dans le chapitre 2 (paragraphe III).

De plus, il nous sera nécessaire de développer une stratégie pertinente permettant de satisfaire aux exigences analytiques préconisées pour le dosage des médicaments dans les matrices biologiques. La méthode devra apporter la preuve de ses performances analytiques dans plusieurs domaines, notamment en matière de : spécificité, sensibilité, justesse et reproductibilité pour garantir de doser avec fiabilité les concentrations en bevacizumab attendues en thérapeutique. Il nous faudra également tenir compte du coût de la méthode de dosage, de sa facilité de mise en œuvre et du nombre d'étapes dans le traitement des échantillons afin de minimiser les variabilités dans la mesure. Nous avons donc tenté de tenir compte de ces critères pour chaque étape de l'élaboration de la stratégie d'analyse.

Une des principales contraintes rencontrées lors de la quantification des mAbs est liée à leur masse moléculaire élevée (150 KDa). En effet comme nous

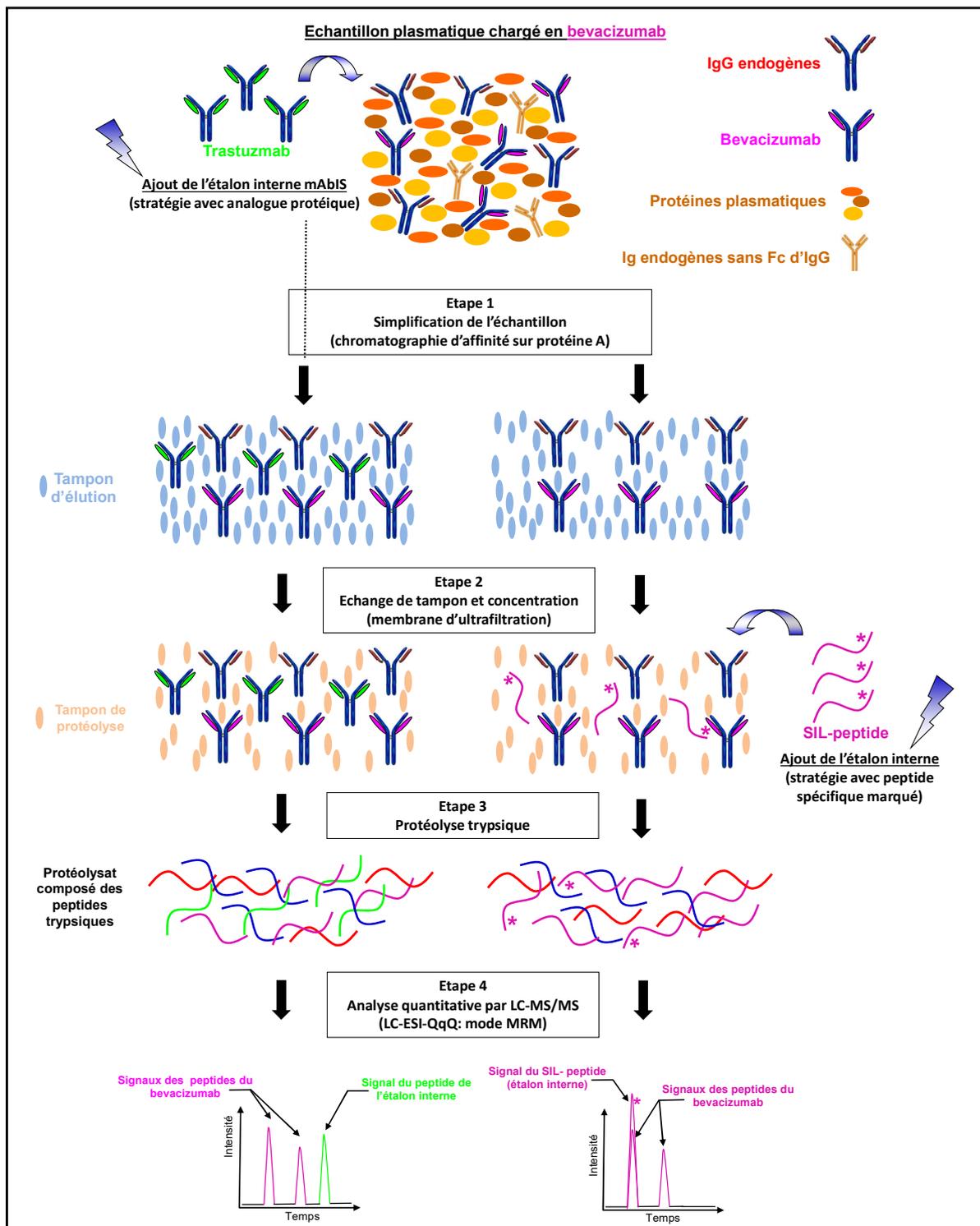
l'évoquions dans le chapitre 2 de ce manuscrit, l'analyse en spectrométrie de masse des protéines entières n'est ni assez sensible ni assez spécifique pour quantifier les mAbs sous leur forme intact dans les matrices biologiques complexes telles que le plasma humain. Nous avons donc eu recours à une étape de protéolyse enzymatique afin de générer des peptides de masse moléculaire beaucoup plus faible, présentant une faible distribution d'états de charge, permettant d'augmenter la sensibilité et la spécificité du dosage en mode MRM. Dans ce contexte notre méthode de dosage se base sur l'analyse des peptides spécifiques du bevacizumab au regard des protéines endogènes plasmatiques et obtenus après protéolyse trypsique de l'échantillon. La quantification de ces peptides est réalisée en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) utilisée en mode MRM qui permet de baser la quantification sur les transitions peptides-fragments des peptides spécifiques du bevacizumab.

De plus, la complexité du milieu plasmatique d'une part, et les nombreuses étapes de traitement de l'échantillon d'autre part, sont autant de sources de variabilité dans la mesure par spectrométrie de masse. Comme évoqué dans le chapitre 2 de ce manuscrit, pour s'affranchir des fluctuations d'une analyse à l'autre, nous avons eu recours à l'ajout en quantité connue et fixe d'une molécule étalon interne. Notre stratégie de quantification absolue est réalisée à l'aide d'une droite de calibration construite à partir du ratio des aires des pics chromatographiques correspondant aux peptides spécifiques du bevacizumab, sur l'aire des pics chromatographiques correspondant au peptide de étalon interne. Ceci impose à l'étalon interne d'avoir des propriétés physico-chimiques très proches de la molécule à doser tout en étant discriminable en spectrométrie de masse de la molécule d'intérêt, et d'être ajouté le plus tôt possible dans les échantillons à analyser. Dans ce contexte l'étalon interne idéal serait la protéine entière marquée par des isotopes stables. Etant donné le coût et la difficulté d'obtenir un tel étalon interne dans le cadre du dosage des mAbs, nous avons voulu comparer, à travers le développement de la méthode de quantification du bevacizumab deux alternatives d'étalonnage interne. La première alternative se base sur l'approche de marquage isotopique du peptide spécifique du bevacizumab retenu pour la quantification (SIL-peptide), la seconde se base sur l'utilisation d'un analogue protéique, le trastuzumab. Le trastuzumab est, au même titre que le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1. Le trastuzumab se lie au récepteur du facteur de croissance épidermique humain HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*).

Les grandes lignes de la stratégie de dosage (en fonction de l'approche d'étalonnage interne utilisée) présentées de manière schématique sur la figure 53, sont les suivantes :

- **Ajout de l'étalon interne mAbIS (trastuzumab)** : dans le cas de la stratégie de quantification utilisant un analogue protéique comme étalon interne,
- **Etape 1** : Simplification de l'échantillon plasmatique par capture des IgGs (chromatographie d'affinité sur protéine A),
- **Etape 2** : Echange de tampon et concentration des IgGs (membrane ultra-filtrante),
- **Ajout de l'étalon interne SIL-peptide** : dans le cas de la stratégie de quantification utilisant une forme marquée par des isotopes stables du peptide spécifique du bevacizumab retenu pour la quantification,
- **Etape 3** : Protéolyse trypsique,
- **Etape 4** : Analyse quantitative par LC-MS/MS (LC-ESI-QqQ en mode MRM).

Notons qu'en fonction du type d'étalon interne utilisé, ce dernier sera ajouté à des moments différents du traitement de l'échantillon. De plus, afin de simplifier l'analyse, pour chacune des approches étudiées un seul étalon interne est présent dans l'échantillon à analyser.



**Figure n° 53 : Stratégie de dosage du bevacizumab dans le plasma en fonction du type d'étalon interne utilisé.**

Plusieurs points de la stratégie de dosage développée ont fait l'objet d'une demande de brevet dont les revendications sont exposées en annexe 1 de ce manuscrit (dossier de demande de brevet déposé le 21 septembre 2015 sous le n°15 306468.8 aux noms de l'INSERM, de l'Université de Bordeaux et du CHU de Bordeaux).

Par ailleurs le développement et la validation analytique de la méthode de quantification exposée dans ce manuscrit a fait l'objet d'un article en cours de

soumission au journal Analytical Chemistry. Cet article, disponible en annexe 2 reprend les principales étapes du développement de la méthode. Cependant les principaux points méthodologiques ayant permis de mettre en œuvre cette méthode de dosage, ainsi que les principaux résultats seront développés dans ce chapitre. Il en est de même des résultats intermédiaires dont certains ont été cités dans l'article, sans pour autant être présentés dans l'article.

Dans ce chapitre, nous commencerons par détailler le travail d'identification et de sélection des peptides spécifiques pour identifier et quantifier le bevacizumab mais aussi le trastuzumab (quand ce dernier est utilisé en tant qu'étalon interne). Nous détaillerons par la suite les différentes étapes de traitement des échantillons plasmatiques. Une attention particulière sera accordée à l'optimisation de l'étape de protéolyse qui fut une étape importante de la mise point. Nous terminerons ce chapitre par la comparaison des deux stratégies d'étalonnage interne au regard des recommandations de la FDA pour la validation analytique d'une méthode de dosage des médicaments dans des matrices biologiques [127].

## **I. Identification et sélection des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab**

Le but de ce développement analytique est d'obtenir une méthode de quantification spécifique de l'anticorps thérapeutique : le bevacizumab. La masse moléculaire élevée de l'anticorps empêche d'appliquer une stratégie d'analyse par protéine entière. Une étape de protéolyse enzymatique (dans notre cas par la trypsine) permet de générer des peptides de masse moléculaire beaucoup plus faible, présentant une faible distribution d'états de charge, et donc d'augmenter la sensibilité et la spécificité du dosage.

Ainsi, la spécificité de la méthode dosage est liée au caractère unique, et spécifique des séquences des peptides choisis pour effectuer la quantification du bevacizumab. De plus étant donné qu'une des deux approches de quantification évaluée au cours de ce travail consiste en l'utilisation d'un autre anticorps monoclonal humanisé (trastuzumab) en tant qu'étalon interne, le travail d'identification et de sélection du ou des peptides spécifiques de chacun de ces deux mAbs a été réalisé en parallèle. La première étape de la mise point est donc de définir les peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab nous permettant d'une part de les discriminer des protéines endogènes et d'autre part de les discriminer l'un de l'autre.

Cette étape cruciale du développement se déroule en plusieurs temps. En premier lieu nous avons recherché les peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab de manière théorique (*in silico*) comparativement à une séquence d'IgG humaine.

Puis, nous avons recherché expérimentalement leur présence au sein des cartes peptidiques respectivement du bevacizumab et du trastuzumab établies à l'issue d'une analyse MS/MS (nano-LC-LTQ-Orbitrap) à partir de protéolysats de bevacizumab et de trastuzumab. Leur spécificité a été confirmée par leur absence dans un protéolysat d'IgGs humaines issues de plusieurs donneurs sains (spécialité pharmaceutique Tégéline®, LFB) analysé de la même façon par MS/MS.

Enfin nous avons effectué une recherche de similitudes entre les peptides tryptique spécifiques du bevacizumab (et du trastuzumab) identifiés expérimentalement et les peptides endogènes pouvant être retrouvés dans le protéome humain (référéncés dans des banques de données en ligne) à l'aide de l'algorithme BLAST précédemment décrit dans le chapitre 3. Le degré de similarité entre deux séquences rentrera en compte dans les critères de sélections des peptides signature du bevacizumab et du trastuzumab pour leur quantification. En plus du caractère unique et spécifique nous avons également considérés les autres critères de sélection supplémentaires précédemment évoqués dans le chapitre 2 pour sélectionner parmi les peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab les meilleurs candidats à leur quantification.

## **A. Détermination *in silico* des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab générés par protéolyse tryptique**

### **1. Matériel et méthode**

La liste théorique des peptides susceptibles d'être obtenus après protéolyse tryptique du bevacizumab (et du trastuzumab) a été établie à partir de la requête « *Peptide Mass* » disponible sur le site [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch) [149], après avoir renseigné :

- la séquence peptidique de l'anticorps d'intérêt ;  
Pour le bevacizumab la séquence peptidique (disponible sur la figure 54) est tirée de la monographie de l'Avastin® [25] qui est la spécialité pharmaceutique du bevacizumab commercialisée par le laboratoire Roche. Pour le trastuzumab la séquence peptidique est tirée de la monographie de

l'Herceptin® [182] qui est la spécialité pharmaceutique du trastuzumab commercialisée par le laboratoire Roche.

- l'enzyme de protéolyse (trypsine) ;
- les réactifs utilisés lors de la protéolyse susceptibles d'engendrer des modifications dans la séquence peptidique (comme l'iodoacétamide pouvant entraîner une carbamino-méthylation des cystéines) ;
- le nombre minimum d'acide aminés désirés dans la séquence des peptides spécifiques que nous avons fixé à puisqu'il a été estimé qu'une séquence de moins de 7 acides aminés n'était plus suffisante pour identifier un peptide unique [145];
- la masse limite des peptides à rechercher que nous avons fixée à 4 000 Dalton afin de pouvoir les détecter avec les spectromètres de masse utilisés ;
- le nombre de sites de clivages manqués par la trypsine. Pour cette requête nous avons fixé le nombre de clivages manqués à 2 car les conditions de protéolyse que nous utilisons pour protéolyser les échantillons lors de la recherche expérimentale des peptides spécifiques du bevacizumab ne sont pas encore optimisées à ce stade du développement. Ces conditions issues d'un protocole de protéolyse trypsique « standard » des protéines ne garantissent pas une protéolyse totale et la formation de peptides présentant 2 clivages manqués peut être attendue.

Sur la figure 54 est représentée la séquence peptidique du bevacizumab que nous avons saisie où les acides modifiés par rapport à une séquence consensuelle d'IgG humaine et les zones de complémentarité de l'antigène (CDR) sont identifiées.

### Chaîne légère :

1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYL <sup>N</sup> WYQQK <sup>P</sup>	GKAPK <sup>V</sup> LIY <sup>F</sup>	TSSL <sup>H</sup> SGVPS
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
RFGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	<sup>Y</sup> STV <sup>P</sup> WTFG <sup>Q</sup>	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP
121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
181-190	191-200	201-210	211-214		
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

### Chaîne lourde :

1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	<sup>NYGMN</sup> WVRQA	PGKLEWV <sup>GW</sup>	<sup>INTYTG</sup> EPTY
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
<sup>AADFKRR</sup> RFTF	<sup>SLD</sup> TSK <sup>STAY</sup>	LQMNSLRAED	TAVYYCA <sup>KYP</sup>	<sup>HYYGSS</sup> HWYF	<sup>DV</sup> WGQGLVT
121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
VSSASTKGPS	VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SVGHTFPAVL
181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
QSSGLYSLS	VVTVPS <sup>SS</sup> LG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKK	VEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL
241-250	251-260	261-270	271-280	281-290	291-300
LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE
301-310	311-320	321-330	331-340	341-350	351-360
QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYCKVVS	NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS
361-370	371-380	381-390	391-400	401-410	411-420
REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSDGSF	FLYSKLTVDK
421-430	431-440	441-450	451-453		
SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK		

**Figure n° 54 : Position au sein de la séquence peptidique du bevacizumab des modifications par rapport à la séquence consensus d'une IgG (acides aminés en bleu) ainsi que des CDR (acides aminés sous-lignés). La partie variable de l'anticorps est identifiée en noire et la partie constante en gris.**

La liste théorique des peptides susceptibles d'être obtenus après protéolyse trypsique d'une IgG humaine a été établie selon le même procédé précédemment décrit pour le bevacizumab. La séquence peptidique d'une IgG humaine est tirée des travaux de Presta *et al* [99] émanant du département d'immunologie de la société Genentech qui a développé le bevacizumab commercialisé par le laboratoire Roche. Cette séquence correspond à la séquence consensuelle à partir de laquelle le bevacizumab a été produit.

## 2. Résultats

Après confrontation de ces deux listes nous définissons de façon théorique 21 peptides tryptiques spécifiques du bevacizumab au regard de la séquence d'IgG

humaine consensuelle. Parmi eux, 8 n'ont pas de clivages manqués par la trypsine (2 sur la chaîne légère et 6 sur la chaîne lourde). Les séquences de ces peptides ainsi que le nombre de clivages manqués associés sont reportés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII : Liste théorique des peptides tryptiques spécifiques du bevacizumab identifiés *in silico* par comparaison avec la séquence d'IgG humaine consensuelle.**

Position	Séquence	clivages manqués
<b>Chaîne légère</b>		
19-45	VTITCSASQDISNYLWYQQ KPGKAPK	1
19-42	VTITCSASQDISNYLWYQQKPGK	0
43-61	APKVLIIYFTSSLHSGVPSR	1
46-61	VLIYFTSSLHSGVPSR	0
<b>Chaîne lourde</b>		
68-98	FTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	2
99-127	YPHYGSSHWFYFDVWGQGLVTVSSASTK	0
39-66	QAPGKGLEWVGWINTYTGPTYAADFKR	2
39-65	QAPGKGLEWVGWINTYTGPTYAADFK	1
44-67	GLEWVGWINTYTGPTYAADFKRR	2
44-66	GLEWVGWINTYTGPTYAADFKR	1
20-43	LSCAASGYFTNYGMNWVRQAPGK	1
44-65	GLEWVGWINTYTGPTYAADFK	0
77-98	STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	1
67-87	RFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR	2
68-87	FTFSLDTSKSTAYLQMNSLR	1
20-38	LSCAASGYFTNYGMNWVR	0
66-76	RRFTFSLDTSK	2
77-87	STAYLQMNSLR	0
88-98	AEDTAVYYCAK	0
67-76	RFTFSLDTSK	1
68-76	FTFSLDTSK	0

Analyse réalisée en fixant le nombre maximal de clivage manqué à 2, la longueur peptidique minimum à 7 acides aminés et la masse peptidique maximale à 4000 Dalton.

Notons que tous ces peptides sont situés dans les régions variables de l'anticorps et que certains sont situés dans les zones de complémentarité de l'antigène (CDR). Cette position dans la structure du bevacizumab et notamment dans les CDR leur confère une plus forte probabilité d'être uniques en raison de la variabilité de séquence intrinsèque dans cette partie de l'anticorps. La figure 55 présente la position de ces peptides au sein des différentes régions de la séquence de la chaîne légère et de la chaîne lourde du bevacizumab.

### Chaîne légère :

1-10 DIQMTQSPSS	11-20 LSASVGDRTV	21-30 ITCSASQDIS	31-40 NYLWYQOKP	41-50 GKAPKVLIE	51-60 TSSLHSGVPS
61-70 RFSGSGSGTD	71-80 FTLTISSLQP	81-90 EDFATYYCQQ	91-100 YSTVPWTEGQ	101-110 GTKVEIKRTV	111-120 AAPSVEIFPP
121-130 SDEQLKSGTA	131-140 SVVCLLNNFY	141-150 PREAKVQWKV	151-160 DNALQSGNSQ	161-170 ESVTEQDSKD	171-180 STYLSSTLT
181-190 LSKADYEKHK	191-200 VYACEVTHQG	201-210 LSSPVTKSFN	211-214 RGEC		

### Chaîne lourde :

1-10 EVQLVESGGG	11-20 LVQPGGSLRL	21-30 SCAASGYTFT	31-40 NYGMNWVRQA	41-50 PGKGLEWVGV	51-60 INTYTGPTY
61-70 AADPKRRFTF	71-80 SLDTSKSTAY	81-90 LQMNSLRAED	91-100 TAVYYCAKYP	101-110 HYYGSSHWYF	111-120 DVWGQGLTIV
121-130 VSSASTKGPS	131-140 VFPLAPSSKS	141-150 TSGGTAALGC	151-160 LVKDYFPEPV	161-170 TVSWNSGALT	171-180 SVGHTFPAVL
181-190 QSSGLYSLSS	191-200 VVTVPSSSLG	201-210 TQTYICNVNH	211-220 KPSNTKVDKK	221-230 VEPKSCDKTH	231-240 TCPPCPAPEL
241-250 LGGPSVFLFP	251-260 PKPKDTLMIS	261-270 RTPEVTCVVV	271-280 DVSHEDPEVK	281-290 FNWYVDGVEV	291-300 HNAKTKPREE
301-310 QYNSTYRVVVS	311-320 VLTVLHQDWL	321-330 NGKEYKCKVVS	331-340 NKALPAPIEK	341-350 TISKAKGQPR	351-360 EPQVYTLPPS
361-370 REEMTKNQVS	371-380 LTCLVKGFYP	381-390 SDIAVEWESN	391-400 GQPENNYKTT	401-410 PPVLDSDGSF	411-420 FLYSKLTVDK
421-430 SRWQQGNVFS	431-440 CSVMHEALHN	441-450 HYTQKLSLSL	451-453 PGK		

**Figure n° 55 : Position au sein de la séquence du bevacizumab des peptides trypsiques spécifiques du bevacizumab identifiés *in silico* par comparaison avec la séquence d'IgG consensuelle. Les acides aminés modifiés sont identifiés en bleu, la partie variable de l'anticorps en noire, la partie constante en gris et les CDR sont soulignés.**

Tous les peptides spécifiques identifiés *in silico* présentent des modifications dans leur séquence d'acides aminés par rapport à la séquence d'IgG humaine (acides aminés en bleu sur la figure 55). Cette caractéristique est un élément supplémentaire en faveur de leur spécificité vis-à-vis des IgG humaines avec lesquelles le bevacizumab partage 93 % d'homologie.

Nous avons appliqué la même méthodologie pour définir de façon théorique les peptides trypsique spécifiques du trastuzumab. Les séquences des 29 peptides trypsique spécifiques (20 sur la chaîne lourde et 9 sur la chaîne légère) identifiés *in silico* sont reportées dans le tableau IX.

**Tableau IX : Liste théorique des peptides trypsiques spécifiques du trastuzumab identifiés *in silico* par comparaison avec la séquence d'IgG humaine consensuelle.**

Position	Séquence	clivages manqués
<b>Chaîne légère</b>		
25-61	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY <b>SASPLY</b> SGVPSR	2
19-45	VTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	2
19-42	VTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK	1
43-66	APKLLIY <b>SASPLY</b> SGVPSRFSGSR	2
25-45	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	1
45-66	LLIY <b>SASPLY</b> SGVPSRFSGSR	1
43-61	APKLLIY <b>SASPLY</b> SGVPSR	1
25-42	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	0
46-61	LLIY <b>SASPLY</b> SGVPSR	0
<b>Chaîne lourde</b>		
60-87	YADSV <b>EGRFTISADT</b> SKNTAYLQMNSLR	2
1-30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <b>NIK</b>	1
51-76	<b>IYPTNGYTRYADSV</b> EGRFTISADTSK	2
44-67	GLEWVARI <b>IYPTNGYTR</b> YADSV <b>EGR</b>	2
20-43	LSCAASGF <b>NIKDTYIH</b> WVRQATGK	2
31-50	<b>DTYIH</b> WVRQATGK <b>GLEWVAR</b>	2
39-59	QATGK <b>GLEWVARIYPTNGYTR</b>	2
68-87	FTIS <b>ADT</b> SKNTAYLQMNSLR	1
20-38	LSCAASGF <b>NIKDTYIH</b> WVR	1
51-67	<b>IYPTNGYTRYADSV</b> EGR	1
44-59	GLEWVARI <b>IYPTNGYTR</b>	1
60-76	YADSV <b>EGRFTISADT</b> SK	1
31-43	<b>DTYIH</b> WVRQATGK	1
39-50	QATGK <b>GLEWVAR</b>	1
77-87	NTAYLQMNSLR	0
20-30	LSCAASGF <b>NIK</b>	0
31-38	<b>DTYIH</b> WVR	0
68-76	FTIS <b>ADT</b> SK	0
60-67	YADSV <b>EGR</b>	0
44-50	GLEW <b>VAR</b>	0

Analyse réalisée en fixant le nombre maximal de clivage manqué à 2, la longueur peptidique minimum à 7 acides aminés et la masse peptidique maximale à 4000 Dalton.

Parmi ces peptides, 8 n'ont pas de clivages manqués par la trypsine (6 sur la chaîne légère et 2 sur la chaîne lourde). Précisons que tous ces peptides sont situés dans les régions variables du trastuzumab. Les zones de complémentarité avec l'antigène n'étant pas renseignées par le laboratoire nous ne pouvons pas donner d'indication à ce sujet. Cependant la position des peptides spécifiques identifiés *in silico* au sein des régions variables de l'anticorps leur confère tout de même une forte probabilité d'être uniques d'autant plus que tous ces peptides présentent des mutations dans leur séquence d'acides aminés par rapport à la séquence d'IgG humaine (acides aminés identifiés en bleu dans le tableau IX). Ces caractéristiques sont autant d'arguments en faveur de leur spécificité vis-à-vis des IgG humaines.

## **B. Identification expérimentale par LC-MS/MS des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab générés par protéolyse trypsique**

### **1. Principe de l'analyse MS/MS**

La première analyse expérimentale menée pour confirmer le caractère spécifique des peptides précédemment déterminés *in silico*, consiste à établir la carte peptidique expérimentale du bevacizumab et du trastuzumab par une analyse LC-MS/MS des protéolysats trypsiques de solutions pures de bevacizumab et de trastuzumab. L'identification des peptides signature, permettant d'identifier le bevacizumab d'une part et le trastuzumab d'autre part, est établie par comparaison des masses expérimentales peptidiques avec des masses théoriques extraites des banques de données selon l'approche par « *Peptide Fragment Fingerprinting (PFF)* » (décrite précédemment dans le chapitre 3). En raison de sa conception hybride et de ses performances (résolution, précision et rapidité d'acquisition), les cartes peptidiques ont été établies avec un système de spectrométrie de masse de type ESI-LTQ orbitrap couplé à de la nano-chromatographie liquide (UltiMate™ 3000 Dionex, Thermo Scientific) et précédemment décrit dans le chapitre 3.

Par la suite nous avons mené une deuxième analyse expérimentale afin de confirmer que les peptides signatures du bevacizumab et du trastuzumab sont uniques au regard des IgGs humaines.

Pour cela nous avons comparé les cartes peptidiques du bevacizumab et du trastuzumab avec la carte peptidique d'une solution d'IgGs humaines issues de plusieurs donneurs sains (Tégéline®, LFB). La carte peptidique de la Tégéline® est établie selon la même approche que celle du bevacizumab et du trastuzumab.

### **2. Préparation des solutions mères (SM) de bevacizumab, de trastuzumab et d'IgGs humaines polyvalentes (Tégéline®)**

La SM aqueuse de bevacizumab provient de la spécialité pharmaceutique concentrée à 25 mg/mL (Avastin®, Roche, Basel, Switzerland). La SM aqueuse de trastuzumab à 21 mg/mL est obtenue après reconstitution de la spécialité pharmaceutique présentée sous forme de poudre lyophilisée (Herceptin®, Roche, Basel, Switzerland). La solution d'IgGs humaines polyvalentes issues de plusieurs donneurs sains) est obtenue à partir de la spécialité pharmaceutique Tégéline® qui

fournit une fois reconstituée une SM aqueuse concentrée à 50 mg/mL d'IgGs. Cette spécialité présente un taux en IgGs supérieur à 97 %. Selon le RCP de cette spécialité la composition en sous-classes d'IgGs est de 50 à 68 % d'IgG1, de 27 à 43 % d'IgG2, de 2,6 à 4,2 % d'IgG3, et de 1,7 à 3,3 % d'IgG4. Les solutions filles (SF) à 2,5 mg/mL de bevacizumab, trastuzumab et d'IgGs humaines polyvalentes sont obtenues après dilution de leur SM respectives dans le tampon de protéolyse (tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM pH = 8).

### **3. Protocole standard de protéolyse des solutions pures de bevacizumab, trastuzumab et d'IgGs humaines polyvalentes Tégéline®**

A cette étape du développement les conditions de protéolyse ne sont pas optimisées et le protocole de protéolyse trypsique correspond à un protocole « standard » de protéolyse couramment utilisé en protéomique au sein de la plateforme génomique fonctionnelle (PGF) de Bordeaux où ces analyses ont été réalisées. Ce protocole reprend les 3 grandes étapes de la protéolyse trypsique d'une protéine à savoir :

- (1) Réduction au dithiotreitol (DTT), pour casser les ponts disulfures des anticorps et rendre plus accessibles à l'enzyme de protéolyse les sites de clivages. 6 µL de DTT à 100 mM dans le tampon de protéolyse (QSP 10 mM final) est ajouté à 60 µL de chacune des SF de bevacizumab, trastuzumab et de Tégéline®. Les échantillons sont ensuite mis à incuber pendant 20 min à 55°C.
- (2) Alkylation des cystéines par iodoacétamide (IAA), pour prévenir l'oxydation des cystéines libres et la reformation des ponts disulfures. Les cystéines sont alkylées par ajout de 6,6 µL d'une solution d'IAA à 100 mM dans le tampon de protéolyse (QSP 10 mM). Les échantillons sont ensuite mis à incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- (3) Ajout de l'enzyme de protéolyse. La solution trypsique (dans du tampon de protéolyse) est ajoutée à un ratio enzyme/substrat de 1/20 (mole/mole d'anticorps) ce qui correspond à un ratio couramment utilisé en protéomique. Etant donné le coût important de la trypsine hautement purifiée et résistante à l'autolyse, nous avons dans un premier temps utilisé une trypsine issue du pancréas de porc (Sigma Aldrich®) non traitée au TPCK et plus sensible à l'auto-trypsinolyse. Les échantillons sont mis à incubé à 37°C toute une nuit

(soit environ 16 heures). La protéolyse trypsique est stoppée par le froid (congélation des protéolysat à - 20°C).

#### **4. Conditions de l'analyse LC-MS/MS**

10 µL de chaque protéolysat est séparé sur une colonne chromatographique C18 PepMap™ (150 mm x 75 µm de diamètre interne) à un débit de phase mobile de 200 nL/min selon le gradient de phase mobile suivant : gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B (acétonitrile/eau 80/20 (v/v) contenant 0,1 % d'acide formique) sur 70 minutes. Le second solvant entrant dans la composition de la phase mobile est le solvant A (acétonitrile/eau 5/95 (v/v) contenant 0,1 % d'acide formique). Le spectromètre de masse opère en mode MS et MS/MS avec une fragmentation de type CID. Le passage du mode MS au mode MS/MS est automatiquement réalisé par le logiciel de pilotage du spectromètre de masse et les spectres de fragmentation sont acquis sur une gamme dynamique allant de 300 à 1700 *m/z*. Le spectromètre est configuré de façon à déclencher une analyse MS/MS sur les six ions les plus intenses du scan MS en cours, s'ils dépassent le seuil de signal fixé à 500. Ces ions sont successivement sélectionnés, isolés et fragmentés en MS/MS. Une fois ce cycle terminé, un nouveau scan MS est enregistré afin de détecter au temps suivant les peptides en cours d'élution de la colonne, et recommencer un nouveau cycle de MS/MS sur les ions les plus intenses. Afin d'éviter la sélection et l'acquisition répétée de multiples scans MS/MS sur le même ion, l'analyse est réalisée avec le mode d'exclusion dynamique. Seul les ions fragments de type b et y (selon la nomenclature de Biemann [179] précédemment décrite dans le chapitre 3) ont été analysés et l'identification des peptides a été faite pour les peptides présentant jusqu'à deux clivages manqués. Les peptides signatures du bevacizumab et du trastuzumab ont été identifiés avec l'outil SEQUEST™ (Thermo Finnigan) par comparaison avec la banque de donnée UniProtKB/SwissProt *Homo Sapiens* incrémentée des séquences du bevacizumab et du trastuzumab. Une protéine était validée par l'identification de deux peptides signatures différents.

#### **5. Résultats**

L'analyse des protéolysats du bevacizumab, du trastuzumab et de la solution IgGs humaines (Tégéline®) en mode MS/MS avec la technologie ESI-LTQ-OrbiTrap™ nous permet de générer les spectres MS/MS expérimentaux des ions

précurseurs majoritairement détectés en mode scan. Pour un maximum de précision, la calibration des spectres a été effectuée après acquisition en tenant compte des peptides d'auto-trypsinolyse de la trypsine. En effet, la trypsine utilisée pour cette analyse présentait une activité résiduelle d'autolyse importante. Après exportation de ces spectres MS/MS vers le logiciel SEQUEST™, les cartes peptidiques expérimentales respectivement du bevacizumab, du trastuzumab et de la solution d'IgGs humaines sont établies et comparées au protéome humain. Le tableau X représente la carte peptidique expérimentale du bevacizumab obtenue à l'issue de cette analyse.

**Tableau X : Carte peptidique expérimentale du bevacizumab obtenue à l'issue de l'analyse MS/MS menée sur le système nano-LC-LTQ-Orbitrap.**

Carte peptidique expérimentale de la chaîne lourde du bevacizumab				
Séquences peptidiques expérimentales	Position	Masse théorique (MH+)	Erreur (masse)	Erreur (ppm)
EVQLVESGGGLVQPGGSLR	1-19	1882.003	0,007	3,560
LSCAASGYTFNYGMNWVR	20-38	2140.958	0,009	4,520
QAPGKGLEWVWGWINTYTGPTYAADFK	39-65	2999.457	0,016	5,530
QAPGKGLEWVWGWINTYTGPTYAADFKR	39-68	3155.559	0,011	3,730
GLEWVWGWINTYTGPTYAADFK	44-65	2518.193	0,011	4,310
GLEWVWGWINTYTGPTYAADFKR	44-66	2674.294	0,005	1,820
RFTFSLDTSK	67-76	1201.621	0,000	0,240
FTFSLDTSK	68-76	1045.52	0,001	1,450
STAYLQMNSLR	77-87	1283.641	0,002	1,410
AEDTAVYYCAK	88-98	1233.546	0,004	3,100
GPSVFLAPSSK	128-139	1186.647	0,002	1,690
STSGGTAALGCLVK	140-153	1264.657	0,002	2,000
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	225-254	3163.578	0,014	4,280
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	229-254	2730.415	0,007	2,700
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR	229-261	3546.831	0,014	3,870
TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	262-280	2082.006	0,007	3,200
FNWYVDGVEVHNAK	281-294	1677.802	0,005	2,950
TKPREEQYNSTYR	295-307	1671.809	0,005	3,240
EEQYNSTYR	299-307	1189.512	0,002	2,000
VVSVLTVLHQDWLNGK	308-323	1808.06	0,006	3,520
VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	308-326	2228.207	0,009	4,000
VSNKALPAPIEK	329-340	1266.742	0,002	1,350
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	377-398	2544.131	0,010	3,930

Carte peptidique expérimentale de la chaîne légère du bevacizumab				
Séquences peptidiques spécifiques	Position	Masse théorique (MH+)	Erreur (masse)	Erreur (ppm)
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK	19-45	3040.52	0,008	2,68
VLIYFTSSLHSGVPSR	46-61	1762.949	0,005	2,59
TVAAPSVFIFPPSDEQLK	109-126	1946.027	0,006	3,33
SGTASVVCLLNNFYPR	127-142	1740.874	0,009	5,37
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	146-169	2677.27	0,007	2,59
VDNALQSGNSQESVTEQDSK	150-169	2135.969	0,006	2,68
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	184-207	2690.324	0,004	1,65
HKVYACEVTHQGLSSPVTK	189-207	2084.059	0,003	1,62
VYACEVTHQGLSSPVTK	191-207	1818.905	0,004	2,16

Les séquences en gras correspondent aux séquences retrouvées dans la partie variable de l'anticorps, avec identifié en bleu les acides aminés modifiés par rapport à la séquence d'IgG humaine consensuelle. 28 peptides ont été identifiés sur

la chaîne lourde (soit un recouvrement de séquence de 58 %) et 11 sur la chaîne légère (soit un recouvrement de séquence de 65 %). Ces résultats incluent les peptides présentant 0, 1 et 2 clivages manqués. Parmi tous les peptides identifiés, 12 appartiennent à la région variable de l'anticorps (10 sur la chaîne lourde et 2 sur la chaîne légère). Notons que parmi eux, 11 peptides identifiés (surlignés en jaune sur le tableau X) présentent dans leur séquence peptidique des modifications par rapport à la séquence consensuelle d'une IgG humaine.

Après comparaison des spectres de fragmentation expérimentaux avec les spectres de la banque de donnée UniprotKB/SwissProt (*Homo Sapiens*), nous confirmons que ces 11 peptides, présentant une modification dans leur séquence, permettent d'identifier exclusivement le bevacizumab au regard du protéome humain (et du trastuzumab). L'identification du trastuzumab et des IgGs ne portent pas sur ces peptides. Ces 11 peptides correspondent donc à la signature peptidique expérimentale du bevacizumab.

Pour confirmer de leur unicité vis-à-vis des IgGs humaines, nous avons recherché ces peptides parmi les peptides préalablement identifiés par nanoLC-ESI-LTQ-OrbiTrap™ dans un protéolysat de solution d'IgGs humaines (selon l'analyse LC-MS/MS décrite précédemment). Le recouvrement de la séquence de la chaîne lourde et de la chaîne légère du bevacizumab par les peptides tryptiques détectés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines est représenté dans les figures 56 et 57 respectivement pour la chaîne légère et la chaîne lourde du bevacizumab. Sur ces figures, les peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines sont surlignés en vert et listés dans les tableaux associés. Les séquences peptidiques qui ont été identifiées dans le protéolysat du bevacizumab sont soulignées en rouge, et parmi elles les séquences surlignées en jaune correspondent aux peptides signatures expérimentaux du bevacizumab.

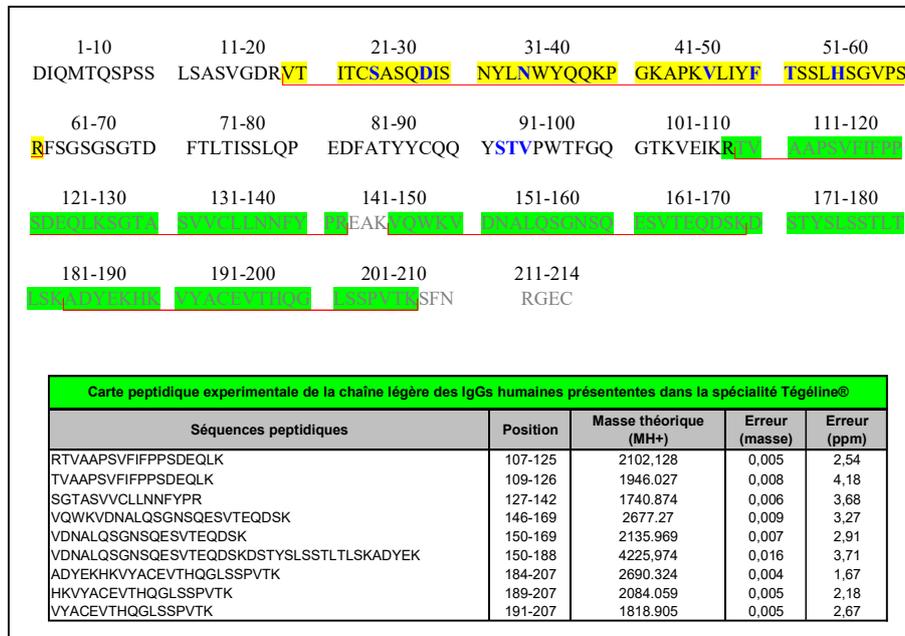


Figure n° 56 : recouvrement de la séquence de la chaîne légère du bevacizumab par les peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines sur le système nano LC-ESI-LTQ-OrbiTrap™.

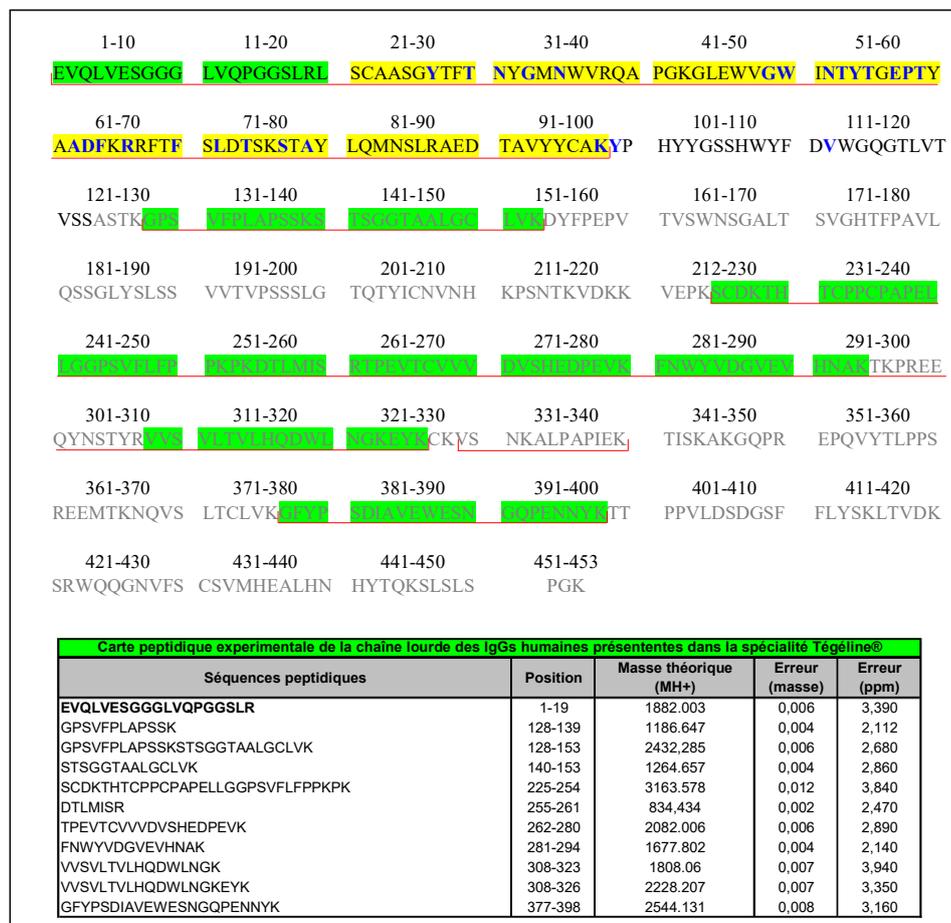


Figure n° 57 : recouvrement de la séquence de la chaîne lourde du bevacizumab par les peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines sur le système nanoLC-ESI-LTQ-OrbiTrap™.

Les peptides identifiés dans la solution d'IgGs humaines ne recouvrent pas les séquences des 11 peptides signatures du bevacizumab précédemment établis (peptides surlignés en jaune). L'absence de ces 11 peptides dans le protéolysat d'une solution d'IgGs humaines est un élément supplémentaire pour confirmer qu'ils sont spécifiques du bevacizumab. Notons également qu'aucun des peptides identifiés dans le protéolysat de la solution d'IgGs humaines ne présente dans leur séquence de modification par rapport à la séquence d'une IgG humaine.

Enfin, après élimination des peptides présentant des clivages manqués par la trypsine dans leur séquence, nous identifions expérimentalement 6 peptides spécifiques du bevacizumab (4 sur la chaîne lourde et 2 sur la chaîne légère) parmi les 8 théoriquement attendus *in silico*. Les analyses menées en parallèle sur le trastuzumab ont permis d'identifier expérimentalement 6 peptides spécifiques du trastuzumab (4 sur la chaîne lourde et 2 sur la chaîne légère) parmi les 8 peptides théoriquement attendus *in silico*.

## **C. Sélection des peptides candidats au développement de la méthode quantification parmi les peptides spécifiques préalablement identifiés**

### **1. Critères de sélections**

Une recherche des similitudes entre les peptides spécifiques sélectionnés et les peptides issus de la protéolyse trypsique des protéines plasmatiques humaines est effectuée par comparaison avec la banque de donnée UniProt KB\_HUMAN à l'aide de l'algorithme en ligne de recherche de similitude par alignement de séquence : BLAST 2.0 [150] dont le principe a été décrit dans le chapitre 3 *paragraphe I-C*). Cette requête permet de sélectionner parmi les peptides spécifiques candidats à la quantification, les peptides présentant le moins de similitudes avec le protéome humain. Comme nous l'avons vu lors du chapitre 2, les peptides spécifiques retenus pour la quantification sont également sectionnés sur les critères suivant :

- absence de clivage manqué par la trypsine dans leur séquence (peptides précédemment retenus),
- score BLAST le plus bas,
- longueur de la séquence d'acides aminés (éviter les peptides < 8 acides aminés ou les peptides > 15 acides aminés),

- absence de cystéine dans la séquence, les cystéines étant susceptibles de subir des modifications lors de la protéolyse,
- capacité à fournir un signal suffisamment intense par ESI afin de garantir une sensibilité suffisante de la méthode de dosage développée pour pouvoir mesurer les concentrations en bevacizumab attendues en thérapeutique.

## **2. Sélection des peptides candidats selon les résultats issus du BLAST**

Le tableau XI présente le score issu du BLAST obtenu pour chaque peptide spécifique du bevacizumab et du trastuzumab précédemment retenus (les 6 peptides spécifiques du bevacizumab et les 6 du trastuzumab).

**Tableau XI : Score issue du BLAST obtenu par comparaison avec la banque de donnée UniProtKB\_HUMAN pour chacun des peptides spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab précédemment retenus.**

Position	Sequence	Bit Score	E-Value	Subject identities (%) <sup>a</sup>
Bevacizumab				
68-76 (heavy chain)	FTFSLDTSK	24,4	0,7	100% (7/7→9)
77-87 (heavy chain)	STAYLQMNSLR	32,9	0,006	100% (9/9→11)
46-61 (light chain)	VLIYFTSSLHSGVPSR	39,2	1,00E-04	87% (13/15→16)
88-98 (heavy chain)	AEDTAVYYCAK	39,2	5,00E-05	100% (11/11→11)
44-65 (heavy chain)	GLEWVGVWINTYTGEPTYAADFK	53,7	2,00E-09	76% (19/21→22)
19-42 (light chain)	VTITCSASQDISNYLNWYQQK	68,9	1,00E-14	95% (20/21→24)
mAbIS				
68-76 (heavy chain)	FTISADTSK	25,7	1,3	89% (8/9→9)
31-38 (heavy chain)	DTYIHWVR	29,1	0,1	88% (7/8→8)
20-30 (heavy chain)	LSCAASGFNIK	30,3	4,80E-02	100% (9/9→12)
77-87 (heavy chain)	NTAYLQMNSLR	36,3	4,00E-04	100% (10/10→11)
46-61 (light chain)	LLIYSASPLYSGVPSR	38	2,00E-04	81% (13/16→18)
25-42 (light chain)	ASQDVNTAVAWYQQKP	43,9	3,00E-06	72% (13/18→18)

a: Subject identity correspond au nombre d'acide amines communs entre les séquences de la base de donnée et la séquence requêtee ("subject sequences" / "query sequence"). Le nombre après la flèche correspond à la longueur en acide amine de la séquence d'intérêt saisie.

En prenant en compte les critères de sélection supplémentaires (longueur peptidique et absence de cystéine dans la séquence), nous retenons pour le bevacizumab trois peptides candidats pour la suite du développement de notre méthode (surlignés en jaune sur le tableau XII) :

- le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> avec un score BLAST de 24,4 bits,
- le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> avec un score BLAST de 32,9 bits,
- et le peptide <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> avec un score BLAST de 39,2 bits.

De la même façon nous retenons pour le trastuzumab trois peptides :

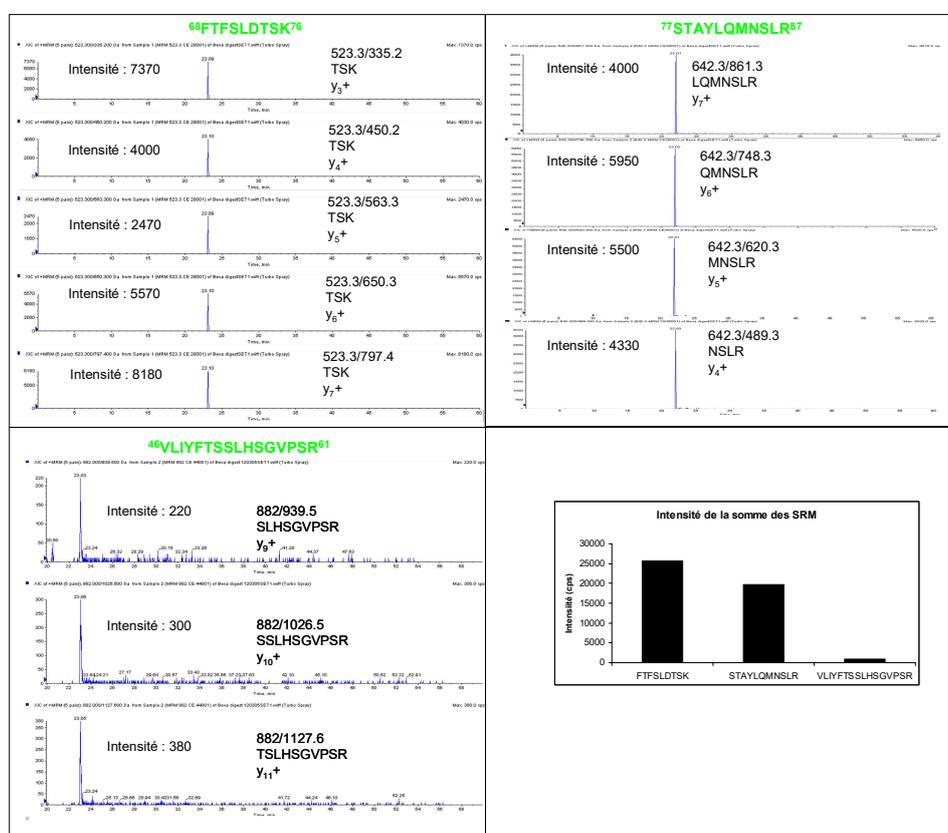
- le peptide <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup> avec un score BLAST de 25,7 bits,
- le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> avec un score BLAST de 29,1 bits,
- et le peptide <sup>77</sup>NTAYLQMNSLR<sup>87</sup> avec un score BLAST de 36,3 bits.

### **3. Sélection des peptides candidats selon l'intensité du signal généré en spectrométrie de masse**

A cours des précédentes analyses, le choix des peptides a essentiellement été influencé par leur spécificité vis-à-vis de l'anticorps dont ils sont issus. Un autre facteur est cependant important à prendre en compte, il s'agit de leur capacité à fournir un signal intense par ESI. Ainsi, le choix des peptides pour quantifier l'anticorps découle également de cette considération. La capacité des peptides retenus à générer un signal en spectrométrie de masse suffisamment intense a été évaluée sur le spectromètre de masse ESI-QqQ (API3200™, ABSciex), présenté dans le chapitre 3, qui est l'appareil sur lequel la méthode de quantification a été développée. Cette analyse a été réalisée en mode MRM qui est le mode d'acquisition utilisé pour l'analyse quantitative des protéines. En mode MRM le signal détecté est celui des ions fragments sélectionnés issus de la cassure d'un peptide préalablement sélectionné. Il est donc nécessaire de définir les transitions peptides-fragments (transitions SRM) à suivre pour chacun des peptides candidats que nous avons sélectionnés : <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> pour le bevacizumab et <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup>, <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> et <sup>77</sup>NTAYLQMNSLR<sup>87</sup> pour le trastuzumab. Après saisie de ces séquences sur le logiciel MRMPilot 1,0 (AB Sciex, Foster City, CA, USA), celui-ci génère *in silico* une liste de transitions SRM pouvant permettre la détection des peptides tryptiques sur notre spectromètre de masse ESI-QqQ ainsi que l'énergie de collision associée à chaque transition SRM. Etant donné le coût élevé de l'acquisition de poudre pure de peptide synthétisé pour chacun des peptides testé, cette analyse est conduite sur des protéolysats de bevacizumab et trastuzumab obtenus selon le protocole standard de protéolyse précédemment décrit dans ce chapitre lors des analyses menées sur le LTQ-Orbitrap™ (paragraphe I-B-3). Seules diffèrent les conditions chromatographiques. Pour cette expérience menée sur un spectromètre couplé à une chaîne de chromatographie liquide HPLC, les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées : élution des peptides sur une colonne C18 AerisPeptide™ (3,6 µm, 250 x 2,1 mm de diamètre interne) à l'aide d'un gradient de phase mobile

constitué d'un solvant aqueux A (eau/acide formique 100/0,1 v/v) et d'un solvant organique B (ACN/acide formique 100/0,1 v/v et délivré à un débit de 150 µL/min. Le gradient consiste à passer de 90 à 10 % de phase A en 40 minutes puis de 10 à 90 % de A en 20 minutes, soit une durée d'analyse de 60 minutes. A cette étape du développement les conditions chromatographiques ne sont pas optimisées, la longueur de la colonne sera par la suite diminuée (150 mm) et le gradient de chromatographique raccourci afin d'avoir une durée d'analyse plus courte (environ 30 minutes) tout en gardant une bonne séparation des peptides d'intérêts.

Les résultats obtenus pour les peptides du bevacizumab sont présentés sur la figure 58.



**Figure n° 58 : intensité du signal généré en mode MRM par les peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (a), <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (b) et <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> (c) spécifiques du bevacizumab candidats à la quantification après analyse d'un protéolysat de bevacizumab sur le système LC-ESI-QqQ.**

Pour le bevacizumab, l'intensité des signaux générés par les transitions SRM des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (figure 58-a) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (figure 58-b) est significativement plus élevée (de l'ordre d'un facteur 10) par comparaison avec le peptide <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> (figure 58-c).

Pour le trastuzumab, l'intensité totale des signaux générés par les transitions SRM du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> est la plus importante (de l'ordre d'un facteur six) par comparaison avec le peptide <sup>77</sup>NTAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Les transitions SRM du <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup> n'ont pas pu être quantifiées car trop proches du bruit de fond. Par ailleurs plusieurs pics chromatographiques ont été détectés lors de la recherche des SRM du peptide <sup>77</sup>NTAYLQMNSLR<sup>87</sup> ce qui témoigne d'un manque de spécificité de ces dernière au regard de ce peptide.

L'absence ou la faible intensité des signaux générés par les SRM des peptides <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> et <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup> ne veut pas dire qu'ils ne sont pas présents dans l'échantillon ou qu'en petite quantité. En effet, l'énergie de collision mais aussi les transitions SRM recherchées (prédites par MRM pilot) ne sont peut-être pas les plus appropriées à la fragmentation de ce peptide. En effet, la formation d'adduit avec des petites molécules présentes en solution (adduits Na<sup>+</sup>, adduits NH<sub>3</sub><sup>+</sup> par exemple) au cours de l'ionisation du peptide ou bien la perte neutre de molécules d'eau lors sa fragmentation entraîne des modifications dans la masse des fragments et des peptides détectés par rapport à leur masse théorique. Par ailleurs, la faible intensité des signaux générés par les peptides <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> et <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup> peut également s'expliquer par une protéolyse insuffisante dans les conditions de protéolyse actuelles. Il en résulte la formation de peptides avec des clivages manqués par la trypsine qui ont une masse supérieure à celle du peptide ne présentant pas de clivages manqués. Ils ne seront par conséquent pas détectés ici.

Néanmoins ces résultats préliminaires suggèrent que les peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> pour le bevacizumab et le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> pour le trastuzumab sont plus facilement générés à l'issu de la protéolyse trypsique. Ces résultats suggèrent également que ces peptides ont moins tendance à former des adduits au cours du processus d'ionisation. Par conséquent dans un souci d'obtenir une méthode de dosage qui soit à la fois suffisamment sensible pour atteindre les concentrations attendues en thérapeutiques et fiable dans les concentrations mesurées, seuls ces trois peptides (les plus intenses) sont retenus pour la suite du développement sur le système HPLC-ESI-QqQ.

## II. Développement de la méthode de quantification du bevacizumab sur le système HPLC-ESI-QqQ.

### A. Optimisation des paramètres d'analyse en spectrométrie de masse

Cette étape consiste à optimiser les paramètres d'analyse par spectrométrie de masse sur le système LC-MS/MS voué à la quantification (HPLC-ESI-QqQ ; API 3200™, ABSciex précédemment décrit dans le chapitre 3) pour chacun des peptides retenus pour la quantification du bevacizumab, du trastuzumab et pour le SIL-peptide.

En effet, l'acquisition en mode MRM nécessite de déterminer un certain nombre de paramètres qui consistent à :

- (1) définir les principaux fragments pour chacun des peptides d'intérêt en vue d'établir les transitions SRM spécifiques permettant leur identification,
- (2) optimiser l'ionisation des peptides au sein de la source d'ionisation,
- (3) optimiser la trajectoire des ions précurseurs et des fragments au sein des différentes interfaces du triple quadripôle,
- (4) optimiser la fragmentation des ions précurseurs au sein de la cellule de collision.

#### 1. Etablissement des transitions SRM pour l'identification des peptides

Compte tenu de la complexité du plasma humain et du nombre important de peptides potentiellement générés par sa protéolyse, il est important de s'assurer que les transitions SRM détectées proviennent bien de la fragmentation du peptide d'intérêt. Pour cela, les transitions SRM permettant de caractériser les peptides retenus pour le bevacizumab (<sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>) et le trastuzumab (<sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>) sont établies au regard des spectres de fragmentation acquis sur le spectromètre de masse ESI-QqQ.

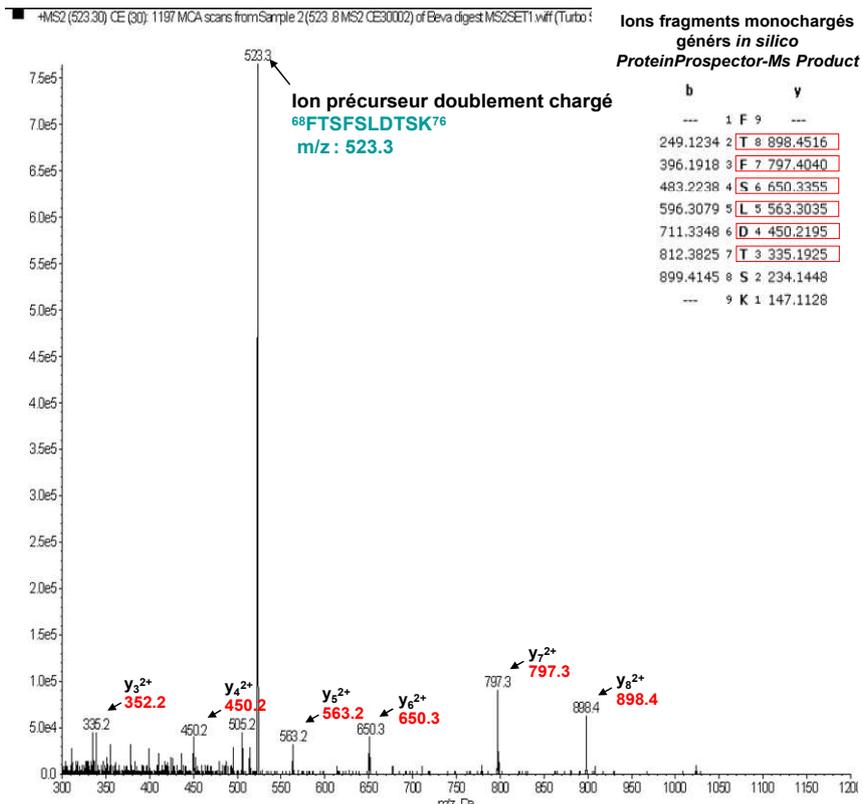
Par ailleurs, étant donné que la deuxième approche d'étalonnage interne évaluée au cours de ce travail consiste en l'utilisation d'un peptide spécifique du bevacizumab marqué par des isotopes stables (SIL-peptide), il est également nécessaire d'établir les transitions SRM spécifiques de ce dernier qu'il faudra suivre pour le quantifier en spectrométrie de masse. Le SIL-peptide utilisé est le peptide

<sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> marqué au carbone 13 à l'azote 15 sur la lysine en C-terminal (K\*) et synthétisé par la société JPT Peptide Technologies (GmbH- Berlin). Le choix du SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> par rapport au SIL-peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR\*<sup>87</sup> sera évoqué plus tard dans la mise au point. Le marquage sur la lysine en C-terminal permet une incrémentation de masse de 8 Dalton sur l'ion précurseur. Cette incrémentation en masse est retrouvée sur tous les ions fragments de type y générés après fragmentation par CID. Les ions fragments de type y sont les principaux ions générés par ce procédé de fragmentation sur le triple quadripôle : charge portée par l'ion en C-terminal du peptide et coupure de la liaison entre le groupement carboxyle et amine selon la nomenclature de fragmentation de peptides proposée par Roepstorff et Biemann [178, 179]. Ce marquage est donc très intéressant car il nous permet de différencier tous les ions fragments de type y issus du SIL-peptide des ions fragments y issus du peptide non marqué (<sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>) du bevacizumab. Ainsi, toutes les transitions SRM faisant intervenir un ion fragment y seront uniques pour chaque peptide.

Les spectres de fragmentation sont obtenus en mode « *product ion scan* » sur l'ESI-QqQ à partir des solutions pures des peptides synthétisés. Les poudres pures des peptides synthétisés <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> ont été commandées auprès de la société Thermo Fisher Scientific GmbH (Allemagne). Le logiciel MRMPilot 1.0 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) génère une liste de transitions SRM pouvant permettre la détection des peptides tryptiques ainsi que l'énergie de collision associée à chaque transition SRM. La comparaison de ces spectres expérimentaux aux spectres générés *in silico* via la requête « MS-Product » de l'outil de bio-informatique ProteinProspector [183] nous permet de confirmer l'appartenance des différents fragments détectés aux peptides d'intérêts analysés.

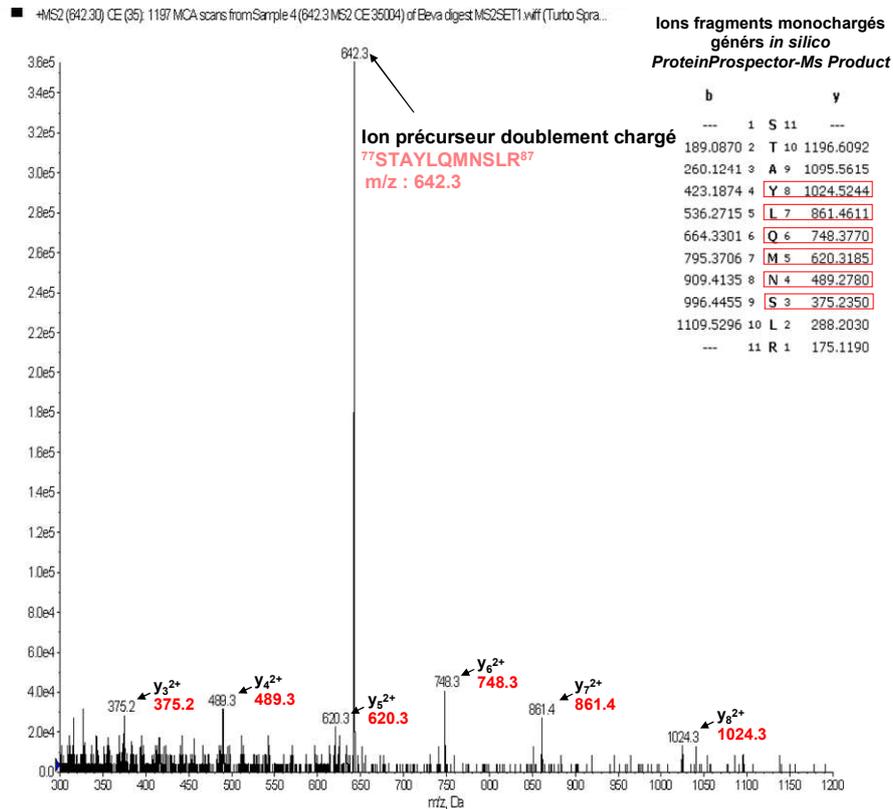
L'injection des solutions lors de l'étape d'optimisation se fait directement au niveau de la source d'ionisation à l'aide d'une seringue et d'un pousse seringue (mode « *infusion* »). L'injection des solutions est réalisée à un débit de 10 µL/min pour une solution de peptides dosée à 0,2 nmole/µL.

Les figures 59 et 60 représentent les spectres de fragmentation issus de la fragmentation respective des peptides du bevacizumab <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (énergie de collision de 30 eV) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (énergie de collision 35 eV) avec le spectre de fragmentation théorique associé.



**Figure n° 59 : Spectre de fragmentation généré par la fragmentation CID du peptide du bevacizumab doublement chargé  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  ( $m/z$  523,3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ.**

A l'issue de la fragmentation du peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  du bevacizumab, 6 ions fragments sont identifiés (en rouge sur la figure 59) par rapport aux ions fragments théoriquement attendus pour ce peptide. Ils correspondent tous à des fragments de type y, qui sont les fragments majoritairement retrouvés avec l'instrument de spectrométrie de masse que nous utilisons. Les 6 transitions SRM « peptide doublement chargé  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  ( $m/z$  523,3) - fragment monochargé » que nous établissons pour identifier ce peptide sont : 523,3→898,4 ( $y_8^+$  ; TFSLDTSK) 523,3→797,3 ( $y_7^+$  ; FSLDTSK), 523,3→650,3 ( $y_6^+$  ; SLDTSK), 523,3→563,2 ( $y_5^+$  ; LDTSK), 523,3→450,2 ( $y_4^+$  ; DTSK) et 523,3→335,2 ( $y_3^+$  ; TSK).

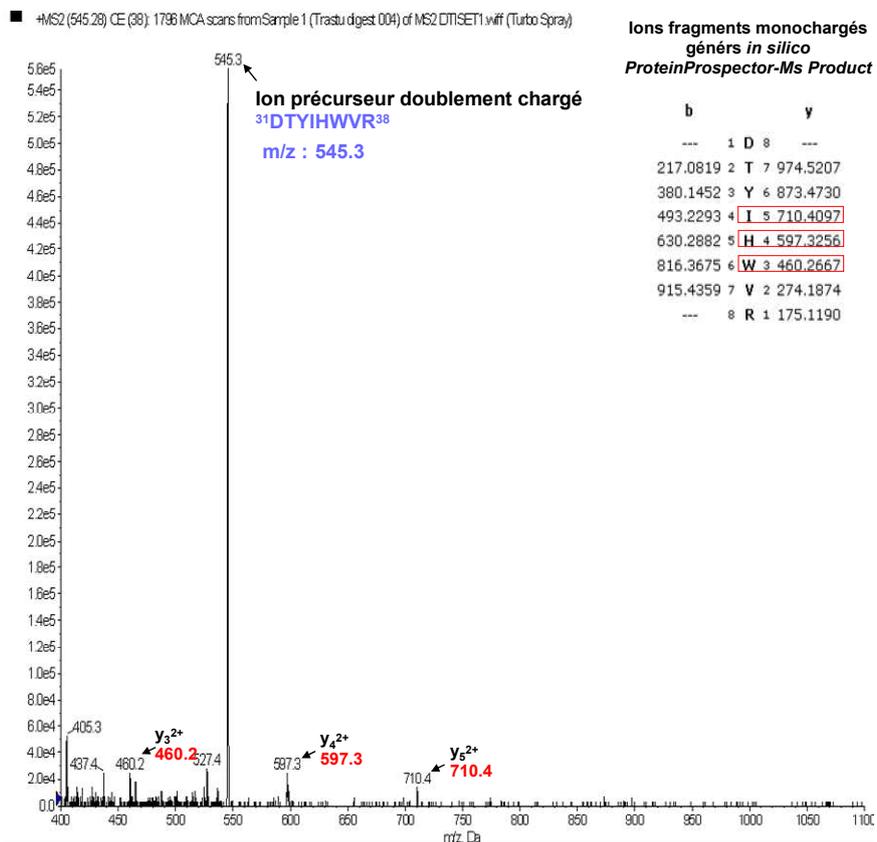


**Figure n° 60 : Spectre de fragmentation généré par la fragmentation CID du peptide du bevacizumab doublement chargé <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (m/z 642,3) sur spectromètre de masse ESI-QqQ.**

A l'issue de la fragmentation du peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> du bevacizumab, 6 ions fragments sont identifiés (en rouge sur la figure 60) par rapport aux ions fragments théoriquement attendus pour ce peptide. Les 6 transitions SRM « peptide précurseur doublement chargé <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (m/z 642,3) - fragment monochargé » que nous établissons pour identifier ce peptide sont : 642,3→1024,5 ( $y_8^+$  ; YLQMNSLR), 642,3→861,4 ( $y_7^+$  ; LQMNSLR), 642,3→748,3 ( $y_6^+$  ; QMNSLR), 642,3→620,3 ( $y_5^+$  ; MNSLR), 642,3→489,3 ( $y_4^+$  ; NSLR) et 642,3→375,2 ( $y_3^+$  ; SLR).

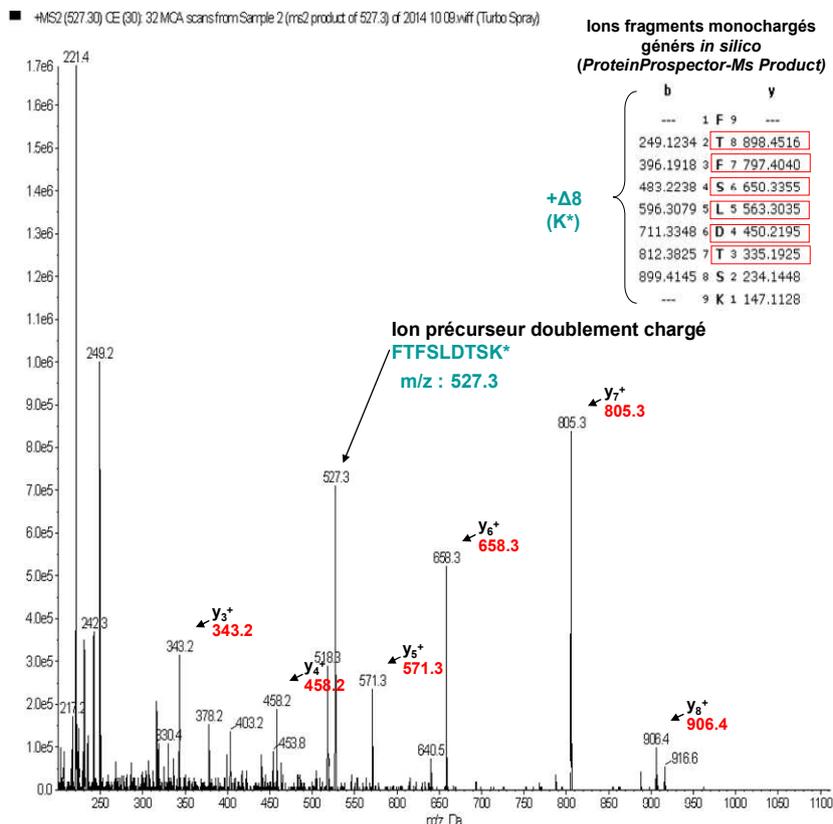
Les figures 61 et 62 représentent les spectres de fragmentation obtenus à l'issu de la fragmentation :

- du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> (énergie de collision de 38 eV, figure 61) permettant d'identifier le trastuzumab dans l'approche utilisant un analogue protéique (mAbIS) en tant qu'étalon interne
- du peptide marqué <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> (énergie de collision 30 eV, figure 62) utilisé comme étalon interne dans l'approche utilisant un peptide d'intérêt marqué par des isotopes stables (SIL-peptide).



**Figure n° 61 : Spectre de fragmentation obtenu par la fragmentation CID du peptide du trastuzumab doublement chargé  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  ( $m/z$  545,3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ.**

A l'issue de la fragmentation du peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  du trastuzumab (mAbIS), 3 ions fragments sont identifiés (en rouge sur la figure 61) par rapport aux ions fragments théoriquement attendus pour ce peptide. Les 3 transitions SRM « peptide doublement chargé  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  ( $m/z$  545,3) - fragment monochargé » que nous établissons pour identifier ce peptide sont : 545,3→710,4 ( $y_5^+$  ; IHWVR), 545,3→597,3 ( $y_4^+$  ; HWVR) et 545,3→460,2 ( $y_3^+$  ; WVR).



**Figure n° 62 : Spectre de fragmentation obtenu par la fragmentation CID du SIL-peptide doublement chargé  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76*}$  ( $m/z$  527,3) sur le spectromètre de masse ESI-QqQ.**

A l'issue de la fragmentation par CID du SIL-peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76*}$  (utilisé comme étalon interne), 6 ions fragments sont identifiés (en rouge sur la figure 62) par rapport aux ions fragments théoriquement attendus pour ce peptide. Notons qu'il est nécessaire d'incrémenter un delta de masse 8 dalton pour chacun des fragments générés *in silico* car la requête ne prend pas en compte le marquage de la lysine. Les 6 transitions SRM « peptide précurseur doublement chargé  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76*}$  ( $m/z$  527,3) - fragment monochargé » que nous établissons pour identifier ce peptide sont : 527,3→906,4 ( $y_8^+$ ; FSLDTSK\*), 527,3→805,3 ( $y_7^+$ ; TSK\*), 545,3→658,3 ( $y_6^+$ ; SLDTSK\*), 545,3→571,3 ( $y_5^+$ ; LDTSK\*), 545,3→458,2 ( $y_4^+$ ; DTSK\*) et 545,3→343,2 ( $y_3^+$ ; TSK\*).

## **2. Optimisation des paramètres d'ionisation et de fragmentation des peptides.**

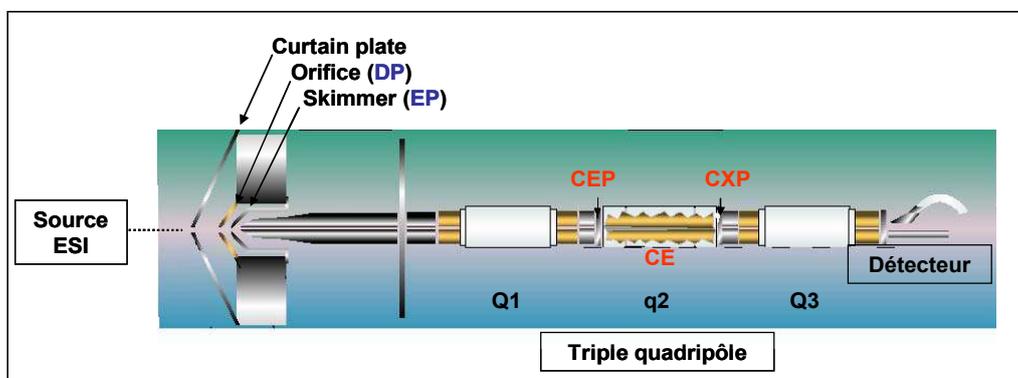
Ces paramètres peuvent être classés en deux catégories, d'une part les paramètres fixes, c'est-à-dire identiques à toutes les molécules (essentiellement

dépendants de la phase mobile), et d'autre part les paramètres variables dépendants de la molécule à doser.

Les principaux paramètres qualifiés de fixes correspondent aux paramètres de la source d'ionisation, ceux que nous avons optimisés étant :

- **Ion spray voltage (IS)** qui correspond à la tension appliqués à l'aiguille métallique au niveau de la source ESI pour obtenir l'ionisation des molécules, elle dépend surtout de la composition de la phase mobile.
- **Pression du gaz séchant et ionisant « sheath gas » (GS1)** qui assiste l'ionisation et permet la création du spray. Il sert à désolvater les molécules de la phase mobile et donc à produire des ions. La pression appliquée dépend essentiellement du débit de la phase mobile.
- **Pression du gaz rideau « curtain gaz » (CUR)** situé derrière le cône d'entrée de l'analyseur, il repulse les larges gouttelettes.
- **Pression du gaz auxiliaire (GS2)** qui assiste l'ionisation en séchant la source. Sa pression dépend aussi essentiellement du débit de la phase mobile.
- **Température du capillaire (TEM)**, l'utilisation d'une haute température sert à compléter le processus de désolvatation, la valeur de la température dépend elle aussi du débit et de la nature de la phase mobile. Toutefois, une attention particulière doit être portée à la température lors de l'analyse de composés thermolabiles.

Les principaux paramètres qualifiés de variables que nous avons optimisés pour chacun des peptides étudiés sont représentés schématiquement sur la figure 63.



**Figure n° 63 : Représentation schématique des différents paramètres variables à optimiser lors d'une analyse MS/MS sur le spectromètre de masse ESI-QqQ (API3200™).**

- **Potentiel de dissociation « *declustering potential* » (DP)** : il contrôle la tension appliquée au niveau de la source et influence la dissociation des molécules injectées. Il est utilisé pour limiter l'entrée des ions dissociés issus du solvant dans l'instrument. Les molécules sont d'autant plus fragmentées que le DP augmente.
- **Potentiel d'entrée dans l'analyseur « *entrance potential* » (EP)** qui correspond à la tension d'accélération des ions précurseurs entre la source et le premier analyseur de masse (Q1). Ce paramètre est fortement dépendant du rapport  $m/z$  de l'ion précurseur et est optimisé pour chacun des peptides étudiés.
- **Potentiel d'entrée dans la cellule de collision « *cell entrance potential* » (CEP)**, il facilite la transmission des ions précurseurs dans la cellule de collision. Ce paramètre est également fortement dépendant de la masse de l'ion précurseur.
- **Energie de collision (CE)** qui détermine le degré de fragmentation. Elle correspond à l'accélération que subit l'ion précurseur lorsqu'il entre en collision avec les molécules de gaz et les autres fragments dans la cellule de collision. Sa valeur est optimisée pour chacun des ions précurseurs analysés.
- **Potentiel de sortie de la cellule de collision « *cell exit potential* » (CXP)** qui optimisent la transmission des ions fragments jusqu'au deuxième analyseur de masse (Q3). Ce paramètre est dépendant du rapport  $m/z$  des ions fragments, il est optimisé pour chacun des ions fragments sélectionnés.

Les différents paramètres à optimiser décrits dans ce paragraphe sont « rampées » de façon automatique par le logiciel de pilotage du spectromètre de masse (Analyst® version 2.5.2). L'analyse est réalisée à partir des solutions des quatre peptides détectés (le peptide du trastuzumab, le SIL-peptide et les deux peptides du bevacizumab). Les paramètres variables dépendants de l'ion précurseur à savoir DP, EP CEP et CE sont optimisés pour chacun des peptides après avoir renseigné leur rapport  $m/z$  respectif. Le CXP qui est dépendant de l'ion fragment est optimisé pour chacune des transitions SRM précédemment établies. Les valeurs optimisées de tous ces paramètres sont résumées dans le tableau XII.

**Tableau XII : Paramètres de détection en spectrométrie de masse optimisés**

Paramètres indépendants des peptides						
	CUR					35
	Ion Spray					5000
	TEM					300
	GS1					60
	GS2					20

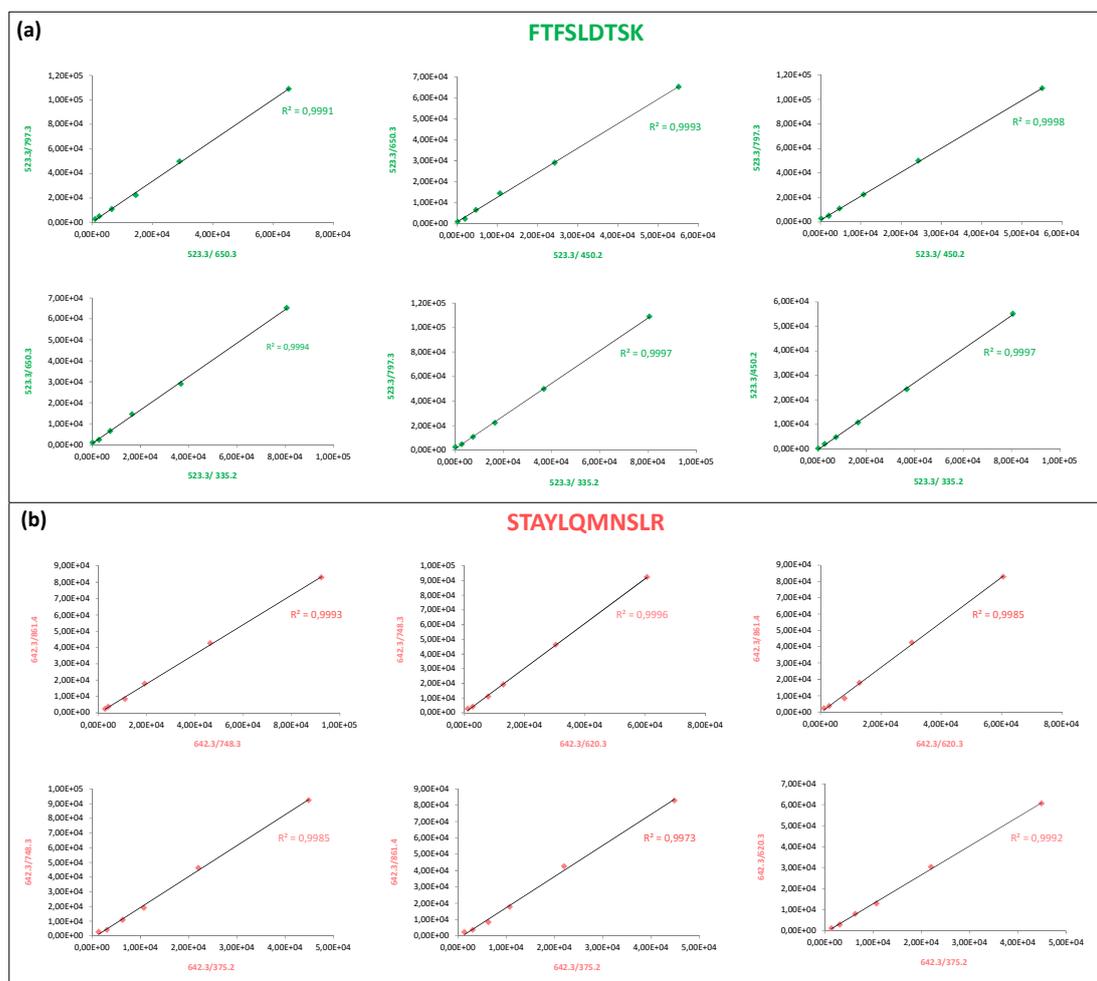
  

Paramètres dépendants des peptides						
Peptide	DP	EP	CE	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CXP
FTFSLDTSK	40	6,5	30	523,3	898,4	8,5
				523,3	797,3	8,5
				523,3	650,3	6,5
				523,3	563,2	8,5
				523,3	450,2	4,5
				523,3	335,2	6,5
STAYLQMNSLR	50	3,5	35	642,5	1024,5	10
				642,5	861,3	10
				642,5	748,3	7
				642,5	620,3	5
				642,5	489,3	5
				642,5	375,2	5
FTFSLDTSK*	40	6,5	30	527,3	906,4	8
				527,3	805,3	8
				527,3	658,3	6
				527,3	574,2	6
				527,3	458,2	6
				527,3	343,2	6
DTYIHWVR	70	10	38	545,3	597,3	4
				545,3	710,4	4

### 3. Détermination des transitions SRM pour la quantification

L'étape suivante a été de vérifier si plusieurs transitions SRM de chacun des peptides du bevacizumab étaient corrélées entre elles. En effet, en quantification absolue par LC-MS/MS, il est recommandé d'utiliser plusieurs transitions SRM. Afin d'augmenter le ratio signal sur bruit et la sensibilité de la méthode de dosage les transitions les plus intenses sont généralement les transitions de quantification et servent à déterminer la concentration en analyte. Ensuite, une ou deux autres transitions SRM, dites transitions de qualification, permettent de confirmer le temps de rétention du peptide et son identification. La recherche en mode MRM des transitions des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> permet de définir les quatre fragments les plus intenses qui

correspondent aux SRM 523,3→797,3, 523,3→650,3, 523,3→450,2 et 523,3→335,2 pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, 642,3→861,4, 642,3→748,3, 642,3→620,3 et 642,3→375,2 pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Les droites de régression linéaires obtenues pour chaque peptide entre les différentes SRM testées sont présentées dans la figure 64 avec le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle.



**Figure n° 64 : Corrélation des transitions SRM sélectionnées pour la quantification des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (a) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (b) du bevacizumab.**

Pour chaque peptide, entre chaque transition SRM retenues, le coefficient de corrélation est > à 0,99. Les quatre transitions SRM les plus intenses pour chaque peptide peuvent donc être utilisées pour leur quantification respective. Pour les deux étalons interne testés, les deux transitions SRM 545,3→710,4 et 545,3→597,3 recherchées pour le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> et les quatre plus intenses du peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (527,3→805,3, 545,3→658,3, 545,3→458,2 et 545,3→343,2) sont respectivement sommées pour leur quantification.

## **B. Choix de la méthode d'extraction du bevacizumab et du trastuzumab du plasma humain**

Nous avons choisi de séparer la protéine entière du plasma afin de simplifier au maximum l'échantillon avant l'étape de protéolyse. Chronologiquement les échantillons plasmatiques de bevacizumab subissent trois étapes en amont de l'analyse par spectrométrie de masse à savoir une première étape qui consiste à simplifier l'échantillon en séparant le bevacizumab et le trastuzumab de l'échantillon plasmatique (avant protéolyse), une seconde étape de concentration de l'échantillon purifié, et enfin une troisième étape qui consiste en la génération de peptides par protéolyse trypsique.

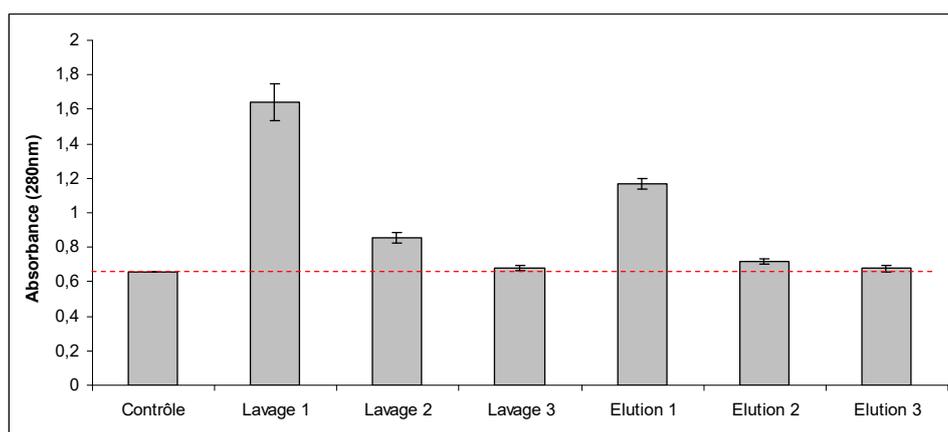
Pour le choix de la technique, il est important d'avoir à l'esprit que les IgGs font partie des protéines plasmatiques les plus abondantes (20 %) juste après l'albumine qui représente plus de 50 % des protéines plasmatiques. Ainsi, la nature protéique du bevacizumab, son fort degré d'homologie avec les IgGs endogènes, la volonté de doser la fraction totale du bevacizumab plasmatique et de transposer notre stratégie de dosage à l'ensemble des mAbs, ont fortement conditionné le choix de la technique de purification de nos échantillons plasmatiques au regard des différentes méthodes précédemment décrites dans le chapitre 2 qui s'offrent à nous. Ainsi, en raison de son caractère universel vis-à-vis de l'ensemble des mAbs de type IgG, de sa reproductibilité, de son rendement et de sa facilité de mise en œuvre, nous avons retenu la chromatographie d'affinité par protéine A pour extraire le bevacizumab et le trastuzumab du plasma humain. La capture du bevacizumab se basant sur la reconnaissance du fragment Fc et non sur le site de fixation du VEGF, cette technique permet de récupérer la fraction totale du bevacizumab pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Les gels d'agarose greffés avec des protéines A que nous utilisons sont commercialisés par la société Thermo Scientific-Pierce® sous forme de cartouches individuelles prête à l'emploi pour centrifugation et réutilisables 10 fois. Les cartouches sont conditionnées par ajout à deux reprises de 400  $\mu$ L de « binding buffer » (tampon phosphate 100 mM pH 7,2 fourni dans le Kit commercialisé) avant d'être chargées avec un volume de 55  $\mu$ L d'échantillon plasmatique chargé en bevacizumab ( $\pm$  trastuzumab selon le type d'étalon interne utilisé). La quantité de plasma chargé correspond à une quantité permettant d'obtenir une bonne sensibilité lors de l'analyse en spectrométrie de masse sans saturer les protéines A greffées (limite de purification des cartouches fixée à 1000  $\mu$ g d'IgGs par échantillon). Les

cartouches chargées en échantillon plasmatique sont incubées 10 minutes sous agitation afin que les anticorps présentant dans leur structure un fragment Fc d'IgG (bevacizumab, trastuzumab et IgGs endogènes) se lient aux protéines A. Les molécules non liées aux protéines A sont éliminées par 3 étapes de lavages successives à l'aide de 400 µL de « *binding buffer* ». La fraction contenant les molécules liées (IgGs endogènes, bevacizumab +/- trastuzumab) est éluée à l'aide de 400 µL tampon d'éluion (pH 2,8) qui permet de rompre la liaison « protéines A - Fc d'IgG ». La fraction éluée est récupérée dans un tube eppendorf contenant 40 µL de tampon Tris 1 M pH 8,5 soit un volume total d'éluât de 440 µL.

### 1. Choix de la fraction d'éluion à conserver

Dans un premier temps nous avons vérifié que les trois étapes de lavages préconisées par le fabricant étaient suffisantes pour éluer la majorité des protéines non retenus sur les cartouches. Nous avons également déterminé quelle fraction d'éluion contenait le maximum d'IgGs. Pour cela nous avons purifié sur protéine A des échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à 2,5 µg/mL et nous avons analysé par spectrophotométrie UV à 280 nm les trois solutions de lavages successives et trois fractions d'éluion successives. Les résultats de cette analyse sont exposés sur la figure 65 et exprimés en absorbance moyenne ± écart type (n=3).



**Figure n° 65 : Analyse par spectrophotométrie UV (280 nm) des différentes fractions de lavages et d'éluion obtenues au cours de la purification sur protéine A d'échantillon plasmatiques.**

L'échantillon contrôle correspond à l'absorbance mesurée dans les solutions tampon. L'absorbance mesurée dans la première fraction de lavage est la plus

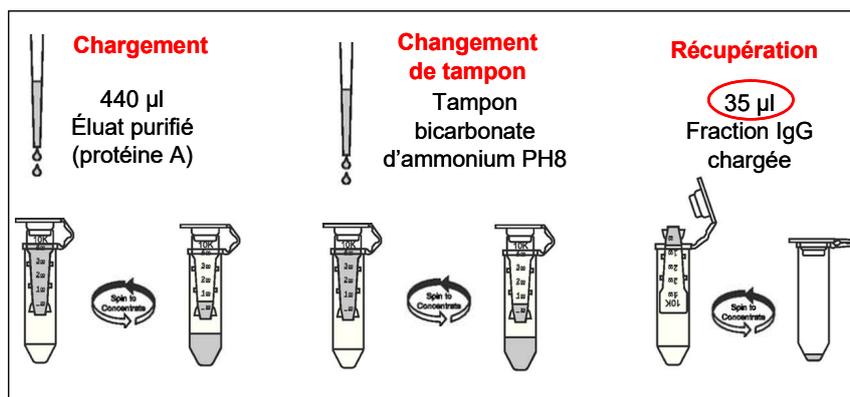
importante ce qui témoigne de l'élution d'un grand nombre de protéine au cours de cette étape puis décroît progressivement au cours des différentes étapes de lavages jusqu'à atteindre une valeur proche du contrôle dans la troisième fraction de lavage. Ces résultats mettent en évidence que les trois éluions de lavage sont nécessaires pour éliminer un maximum de protéines non retenues par les protéines A, la majorité des protéines étant éliminée au cours de la première étape de lavage.

Par ailleurs, l'absorbance mesurée dans la première fraction d'élution ré-augmente suite à l'ajout du tampon d'élution ce qui témoigne de l'élution de protéines qui n'avaient pas été éliminées lors de l'étape précédente avec le tampon de lavage (soit les protéines préalablement retenues par les protéines A). En prenant pour référence l'absorbance mesurée dans le contrôle (absorbance moyenne 0,66 +/- 0,01), on estime que plus de 85 % des protéines préalablement retenues sur les protéines A sont éluées dans la première fraction d'élution (absorbance moyenne de 1,17 +/- 0,03), 8,4 % dans la seconde (absorbance moyenne de 0,72 +/- 0,01) et 3,4 % dans la troisième (absorbance moyenne de 0,68 +/- 0,01). Un rendement de l'ordre de 85 % lors de la première élution est tout à fait acceptable et ne devrait pas diminuer la sensibilité de la méthode de dosage. Par ailleurs la collection des deux autres fractions d'élution multiplierait le volume de l'éluât par trois ce qui ne serait plus compatible avec l'étape de concentration des échantillons qui suit. La dilution des échantillons liés à la collection des fractions d'élution successives diminuerait la sensibilité du dosage sans pour autant en augmenter significativement le rendement. Par conséquent étant donné le rendement élevée de la première élution et en tenant compte des contraintes de dilution de l'échantillon nous choisissons de collecter seulement la première fraction d'élution pour la suite du développement.

## **2. Concentration des échantillons**

L'efficacité de l'activité enzymatique de la trypsine (enzyme de protéolyse) étant notamment conditionnée par le pH de l'échantillon, nous nous sommes assurés que nous nous trouvons à un pH compris entre 7,5 et 8 avant la protéolyse enzymatique. Pour cela nous utilisons suite à la chromatographie d'affinité, un procédé de filtration sur membrane ultra-filtrante type Amicon® présentant un cut-off de 100 KDa commercialisée par le laboratoire Millipore. Cette étape permet à la fois de réaliser un échange de tampon contre le tampon de protéolyse (tampon bicarbonate d'ammonium 150 mM, pH 8) et également de concentrer notre échantillon.

Les différentes étapes de cette technique d'échange de tampon/concentration des échantillons par ultrafiltration sont schématisées dans la figure 65.



**Figure n° 66 : Représentation schématique du principe de concentration des échantillons purifiés sur membrane ultra-filtrante type Amicon® 100 KDa.**

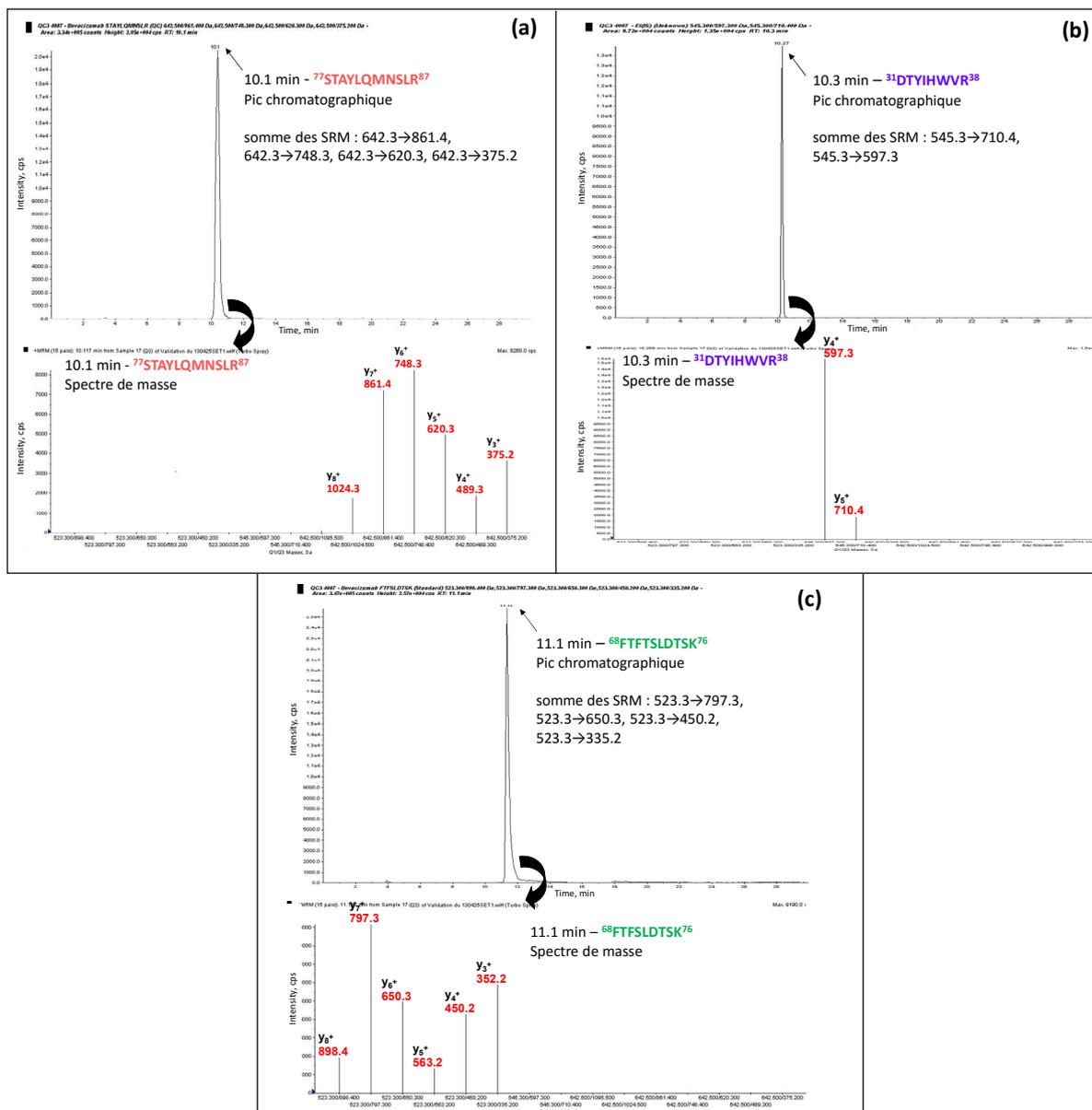
Cette étape intervient juste après l'étape de purification sur protéine A. A ce stade du traitement de l'échantillon nous nous trouvons en présence d'un éluat purifié chargé en IgGs. Par ultracentrifugation, la membrane filtrante permet de retenir les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 100 KDa (cas des IgGs endogènes et des mAbs). Après échange de tampon et retournement de la membrane nous récupérons une fraction chargée en IgGs de 35 µL dans le tampon de protéolyse (pH 8). Cette étape nous permet également de concentrer notre échantillon le faisant passer de 440 µL à 35 µL soit une solution 12 fois plus concentrée. Le fait de concentrer notre échantillon nous permet d'abaisser la limite de quantification de la méthode de dosage et d'avoir une méthode suffisamment sensible pour atteindre les concentrations plasmatiques de bevacizumab attendues en thérapeutique.

### **3. Evaluation de l'efficacité de la méthode de traitement des échantillons plasmatiques**

De façon à évaluer le comportement du bevacizumab et du trastuzumab au lors des différentes étapes du traitement des échantillons plasmatiques (purification par chromatographie d'affinité sur protéine A, concentration des échantillons par ultra-filtration suivie de la protéolyse), des échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à une concentration de 400 µg/mL (correspondant à une haute concentration plasmatique attendue en thérapeutique) auxquels le trastuzumab a été ajouté ont été soumis à l'ensemble de ces étapes. La protéolyse a été conduite selon le protocole « standard » précédemment décrit dans ce chapitre (paragraphe I-B-3).

Les échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab et trastuzumab ont été préparés à partir des SM de bevacizumab (25 µg/mL) et de trastuzumab (21 µg/mL) dilués dans du plasma humain issu de plusieurs donneurs sains exempt des molécules d'intérêt et fournit par l'établissement français du sang Aquitaine-Limousin (EFSAL, Bordeaux). Après protéolyse par la trypsine, l'analyse LC-MS/MS a été effectuée sur le système HPLC-ESI-QqQ en mode MRM selon les conditions de détection en spectrométrie de masse précédemment établies.

Pour cette expérience les conditions chromatographiques ont été optimisées et les conditions suivantes ont été utilisées : élution des peptides sur une colonne plus courte C18 AerisPeptide™ (3,6 µm, 150 x 2,1 mm au lieu de 250 mm de longueur) à l'aide d'un gradient de phase mobile constitué des mêmes solvants que précédemment à savoir un solvant aqueux A (eau/acide formique 100/0,1 v/v) et d'un solvant organique B (ACN/acide formique 100/0,1 v/v) mais délivré à un débit de 200 µL/min au lieu de 150 µL/min. Le gradient consiste à passer de 90 à 40 % de phase A en 10 minutes suivi d'un plateau de 10 minutes puis de 40 à 90 % de A en 10 minutes suivi d'un plateau de 5 minutes, soit une durée d'analyse de 35 minutes (au lieu de 60 minutes) et une élution des peptides entre 10,5 et 11,5 minutes au lieu de 23 à 25 minutes. Les chromatogrammes de masse obtenus à l'issue de cette analyse sont présentés sur la figure 67 avec les spectres de masses associés à chaque pic chromatographique identifié. Les pics chromatographiques obtenus pour chaque peptide correspondent à la somme des SRM les plus intenses précédemment sélectionnées pour la quantification.



**Figure n° 67 : Chromatogrammes et spectres de masse obtenus à l'issue de l'analyse LC-MS/MS (MRM) sur le système HPLC-ESI-QqQ d'un échantillon plasmatique chargé en bevacizumab à 400 µg/mL et en trastuzumab avant toute étape de traitement.**

La recherche des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> génère trois pics de chromatographie. Le premier (figure 67-a) élué à 10,1 minutes correspond au signal généré par les quatre SRM les plus intenses issues de la fragmentation du peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Le second (figure 67-b) élué à 10,3 minutes correspond au signal généré par les deux SRM les plus intenses issues de la fragmentation du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>. Enfin le troisième (figure 67-c) élué à 11,1 minutes correspond au signal généré par les quatre SRM les plus intenses issues de la fragmentation du peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>.

A travers ces premiers résultats on met en évidence d'une part la faculté de la stratégie de purification/concentration des échantillons plasmatiques à fournir des

échantillons suffisamment enrichis en bevacizumab et en trastuzumab pour être détectable en spectrométrie de masse et d'autre part, au regard des deux mAbs testés ici (bevacizumab et trastuzumab), son caractère transposable à l'ensemble des mAbs de type IgG. Enfin ces résultats témoignent de l'efficacité de la protéolyse en milieu biologique à générer les peptides d'intérêt en quantité suffisante pour être détectés en spectrométrie de masse à une concentration attendue en thérapeutique. Cependant il reste à évaluer le rendement, la répétabilité ainsi que la limite de quantification résultant de cette stratégie de traitement des échantillons. Un autre paramètre important à valider est la linéarité de la réponse des peptides sélectionnés en fonction de la concentration en bevacizumab. Ces paramètres seront déterminés dans un second temps et les expériences menées pour y parvenir seront décrites ultérieurement dans ce chapitre.

#### **4. Validation de la spécificité biologique des peptides détectés**

A ce stade du développement de la méthode il est nécessaire de valider la spécificité biologique des peptides détectés :

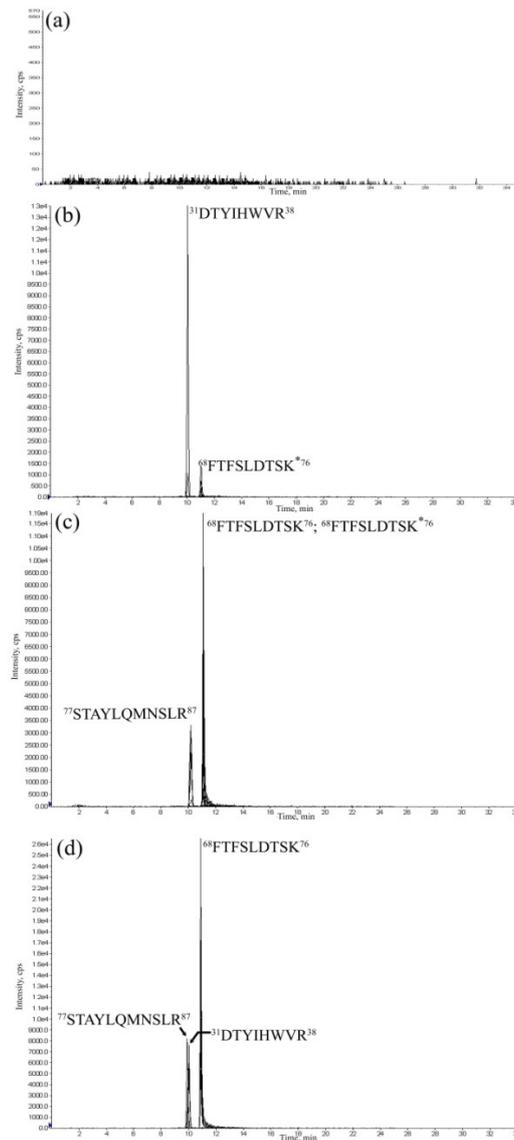
- (a) Afin de vérifier que les peptides spécifiques du bevacizumab ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ ,  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ) du trastuzumab ( $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ ) et le SIL-peptides ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ ) ne sont pas retrouvés dans un échantillon plasmatique purifié sur protéine A et protéolysé, nous avons analysé un échantillon chargé en bevacizumab, trastuzumab et SIL-peptide par comparaison avec un échantillon plasmatique non chargé (blanc plasma).
- (b) Afin de vérifier que les peptides spécifiques du bevacizumab ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ) ne sont pas retrouvés dans un échantillon plasmatique contenant le SIL-peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  et le trastuzumab nous avons recherché les peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  dans un échantillon chargé en SIL-peptide et trastuzumab.
- (c) Afin de vérifier que le peptide spécifique du trastuzumab ( $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ ) n'était pas retrouvé dans un échantillon plasmatique contenant le SIL-peptide ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ ) et du bevacizumab, nous avons recherché le peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  dans un échantillon chargé en SIL-peptide et en bevacizumab.

- (d) Afin de vérifier que le SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> n'était pas retrouvé dans un échantillon plasmatique contenant du bevacizumab et du trastuzumab nous avons recherché le SIL-peptide dans un échantillon chargé en bevacizumab et en trastuzumab.

Les échantillons plasmatiques ont été préparés à partir des SM aqueuses de bevacizumab (25 µg/mL), de trastuzumab (21 mg/mL) et de SIL-peptide diluées dans du plasma humain issu de plusieurs donneurs sains exempts des molécules d'intérêt et fournis par l'établissement français du sang Aquitaine-Limousin (EFSAL, Bordeaux). L'avantage de réaliser ces expériences sur du plasma humain issu de plusieurs donneurs nous permet d'avoir une matrice biologique contenant un grand nombre de variants d'IgGs humaines qui sont susceptibles d'être retrouvés dans le plasma des patients au cours des études cliniques.

Dans cette analyse, les échantillons sont chargés en bevacizumab à une concentration de 400 µg/mL et en étalon interne (trastuzumab et/ou SIL-peptide) à une concentration permettant d'obtenir un signal en spectrométrie de masse équivalent au signal généré par une concentration de milieu de gamme de bevacizumab.

Après traitement des échantillons l'analyse MS/MS est effectuée sur le système HPLC-ESI-QqQ utilisé en mode MRM selon les conditions de chromatographie et de détection en spectrométrie de masse précédemment décrites. Les chromatogrammes de masses obtenus à l'issue de l'analyse respective des échantillons (a), (b), (c) et (d) sont présentés figure 68.



**Figure n° 68 : Chromatogrammes de masse obtenus à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) sur le système HPLC-ESI-QqQ d'un blanc de plasma humain (a), d'un échantillon plasmatique chargé en trastuzumab et SIL-peptide (b), chargé en bevacizumab et SIL-peptide (c) et chargé en bevacizumab et trastuzumab (d).**

La recherche des peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  dans un échantillon plasmatique chargé en bevacizumab (c) et (d) génère deux pics de chromatographie. Le premier élué entre 10,0 et 10,1 minutes correspond au signal généré par les transitions SRM issues de la fragmentation du peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ . Le second élué entre 11,0 et 11,1 minutes correspond au signal généré par les transitions SRM issues de la fragmentation du peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ . La recherche du peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  dans un échantillon chargé en SIL-peptide (b) et (c) génère un pic chromatographique correspondant au signal généré par les transitions SRM issues de sa fragmentation et élué au même temps de rétention que le peptide non marqué  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  entre 11,0 et 11,1

minutes. Enfin la recherche du peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  dans un échantillon plasmatique chargé en trastuzumab (b) et (d) génère un pic de chromatographie élué à 10.1 minutes correspondant au signal généré par les transitions SRM issues de sa fragmentation.

L'absence de pic de chromatographie dans le plasma blanc (a) atteste de la spécificité de chacun des peptides détectés au regard des protéines endogènes présentes dans le plasma humain traité selon la stratégie de purification employée. Pour les trois autres expériences, l'absence de signal correspondant aux transitions SRM générées respectivement par les peptides spécifiques du bevacizumab dans l'échantillon (b), par le peptide spécifique du trastuzumab dans l'échantillon (c) et par le SIL-peptide dans l'échantillon (d) atteste de la spécificité respective de chacun des peptides détectés vis-à-vis de chacune des molécules d'intérêt dont ils sont issus.

De plus aucun autre pic parasite n'est détecté dans aucun des échantillons analysés et le bruit de fond est proche de 0 lors de l'analyse du blanc plasma (a). Ces résultats sont des éléments supplémentaires qui mettent en évidence la spécificité du mode MRM.

## **5. Etude préliminaire de sensibilité et de linéarité de la méthode de dosage**

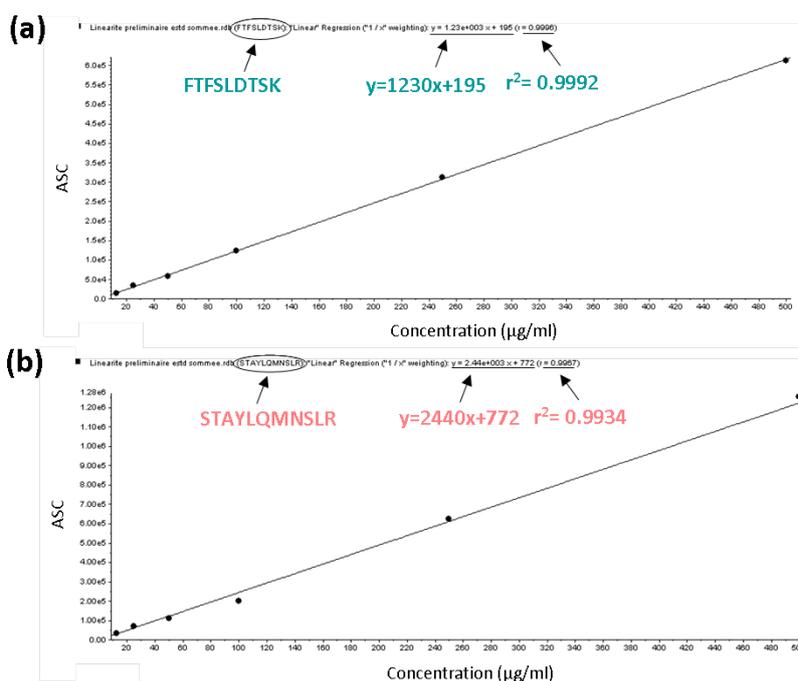
A ce stade des premiers essais de faisabilité du projet de quantification du bevacizumab par spectrométrie de masse, nous nous sommes assurés que la stratégie de traitement des échantillons plasmatiques et que les paramètres de détection en spectrométrie de masse nous permettaient d'obtenir une sensibilité suffisante pour atteindre les plus petites concentrations attendues en thérapeutique.

Dans ce même temps nous avons évalué la linéarité de la réponse en spectrométrie de masse des peptides du bevacizumab en fonction de la concentration en bevacizumab.

L'étude préliminaire de sensibilité et de linéarité a été menée sur une gamme de 7 concentrations croissantes allant de 12,5 à 500  $\mu\text{g/mL}$  (0, 12,5, 25, 50, 100, 250, et 500  $\mu\text{g/mL}$ ) couvrant ainsi la gamme des concentrations attendues chez les patients traités par bevacizumab en oncologie. Les différents standards de calibration sont préparés à partir de dilutions successives d'une solution fille plasmatique de bevacizumab concentrée à 5  $\text{mg/mL}$  et obtenue à partir d'une dilution au  $1/5^{\text{ème}}$  dans le plasma humain issu de plusieurs donneurs de la solution mère aqueuse à 25  $\text{mg/mL}$ . Après traitement des échantillons plasmatiques selon les

conditions précédemment décrites, l'analyse MS/MS est effectuée sur le système HPLC-ESI-QqQ utilisé en mode MRM selon les conditions de chromatographie et de spectrométrie de masse précédemment décrites.

Au cours de cette étude, la quantification en spectrométrie de masse est basée sur l'aire du pic chromatographique obtenu en sommant les SRM les plus intenses (ASC). La droite de calibration est construite en reportant les ASC mesurées en fonction de la concentration théorique en bevacizumab. Pour chaque peptide du bevacizumab, la linéarité entre le signal généré en spectrométrie de masse (ASC des SRM intenses sommées) et la concentration en bevacizumab est évaluée à l'aide de l'équation de la droite de régression obtenue (droite de type  $y = ax + b$  (où  $y$  correspond à la valeur de l'ASC mesurée,  $x$  la concentration en bevacizumab et  $a$  et  $b$  deux constantes) et du coefficient de corrélation  $r^2$  de la droite. Le coefficient de corrélation  $r^2$  doit être le plus proche de 1 et l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées doit être le plus proche de zéro (test de l'ordonnée à l'origine). Les droites de régression linéaires obtenues et le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle sont reportés sur la figure 69.

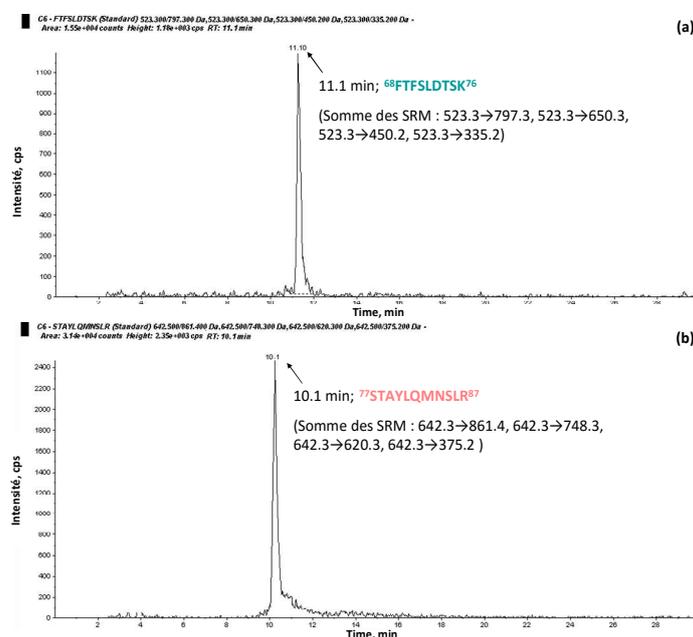


**Figure n° 69 : Droites de calibration des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> obtenues à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) d'échantillons plasmatiques chargés à des concentrations croissantes en bevacizumab allant de 12,5 à 500 µg/mL et protéolysés au 1/20<sup>ème</sup>.**

Il existe pour chaque peptide détecté une relation linéaire entre les concentrations plasmatiques en bevacizumab et le signal généré en spectrométrie

de masse mesuré par l'ASC des SRM les plus intenses avec pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  un  $r^2$  égal à 0,9992 ( $> 0,99$ ) et une valeur de l'ordonnée à l'origine  $b$  égale à 195 (assimilable au bruit de fond) et pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  un  $r^2$  égal à 0,9934 ( $> 0,99$ ) et une valeur de l'ordonnée à l'origine  $b$  égale à 772 (un peu plus élevée). La linéarité semble plus significative lorsque l'analyse porte sur le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ , cependant ces résultats doivent être confirmés au cours des essais de répétabilité en évaluant l'exactitude et la précision des valeurs mesurées en basant la quantification sur le rapport des aires des pics chromatographiques des SRM les plus intenses du peptide d'intérêt et de l'étalon interne. Ces essais seront réalisés au cours de la validation analytique de la méthode de quantification pour les deux approches d'étalonnage interne après avoir optimisé toutes les étapes de traitement de l'échantillon et notamment l'étape de protéolyse trypsique.

Pour ce qui est de l'estimation de la sensibilité de notre méthode de dosage, les chromatogrammes de masses obtenus pour les peptides du bevacizumab à l'issue de l'analyse du standard de calibration le moins concentré (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) sont présentés sur la figure 70. Pour chaque peptide, le pic de chromatographie correspond à celui issu de la somme des SRM les plus intenses.



**Figure n° 70 : Chromatogrammes de masse obtenus à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) d'un échantillon plasmatique chargé en bevacizumab à 12,5  $\mu\text{g/mL}$ .**

L'intensité des pics de chromatographie obtenus pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (a) et pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (b) à l'issue de cette

analyse est environ 10 fois supérieur au bruit de fond ce qui est tout à fait acceptable au regard des normes préconisées par la FDA qui définissent la limite de quantification d'une méthode de dosage comme la plus petite concentration donnant un rapport « signal généré sur bruit de fond » de 10. Cependant ces résultats méritent d'être confirmés par la détermination de l'écart relatif des concentrations mesurées sur plusieurs échantillons chargés en bevacizumab à 12,5 µg/mL. En effet la FDA définit également la limite de quantification comme la plus petite concentration pour laquelle l'écart relatif (coefficient de variation CV %) des concentrations mesurées est inférieur à 20 % à l'issue d'essais de répétabilité réalisés sur au moins cinq échantillons par concentration testée. Ce paramètre sera évalué au cours de la validation analytique de notre méthode pour confirmer sa capacité à quantifier le bevacizumab plasmatique à cette concentration avec suffisamment de précision pour être applicable à des études cliniques de PK.

### **C. Optimisation de l'étape de protéolyse**

Dans le but de garantir la reproductibilité des résultats, la quantité de trypsine à ajouter a été optimisée. Elle doit être suffisante pour obtenir une protéolyse la plus complète possible mais ne pas se trouver en excès, ce qui pourrait provoquer son autolyse. L'efficacité de la protéolyse enzymatique dépend également d'autres facteurs, et notamment de l'accessibilité des sites de clivage à l'enzyme. Cette accessibilité est limitée par la présence de ponts disulfures entre deux cystéines. Bien que le protocole de protéolyse précédemment décrit dans ce chapitre (paragraphe I-B-3) prévoit une étape de réduction des ponts disulfures par le DTT, afin d'améliorer l'accès de la trypsine aux sites de clivages, certains auteurs ont eu recours à une étape supplémentaire de dénaturation par des agents chaotropiques tel que l'urée, qui à forte concentration, permettent de désorganiser la structure spatiale de la protéine en fragilisant les liaisons hydrogènes (principales liaisons de faible énergie responsables du maintien des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines). La chaîne polypeptidique est alors partiellement ou totalement dépliée. C'est pourquoi nous avons évalué l'intérêt de l'ajout de l'urée à forte concentration au cours de l'étape de protéolyse enzymatique.

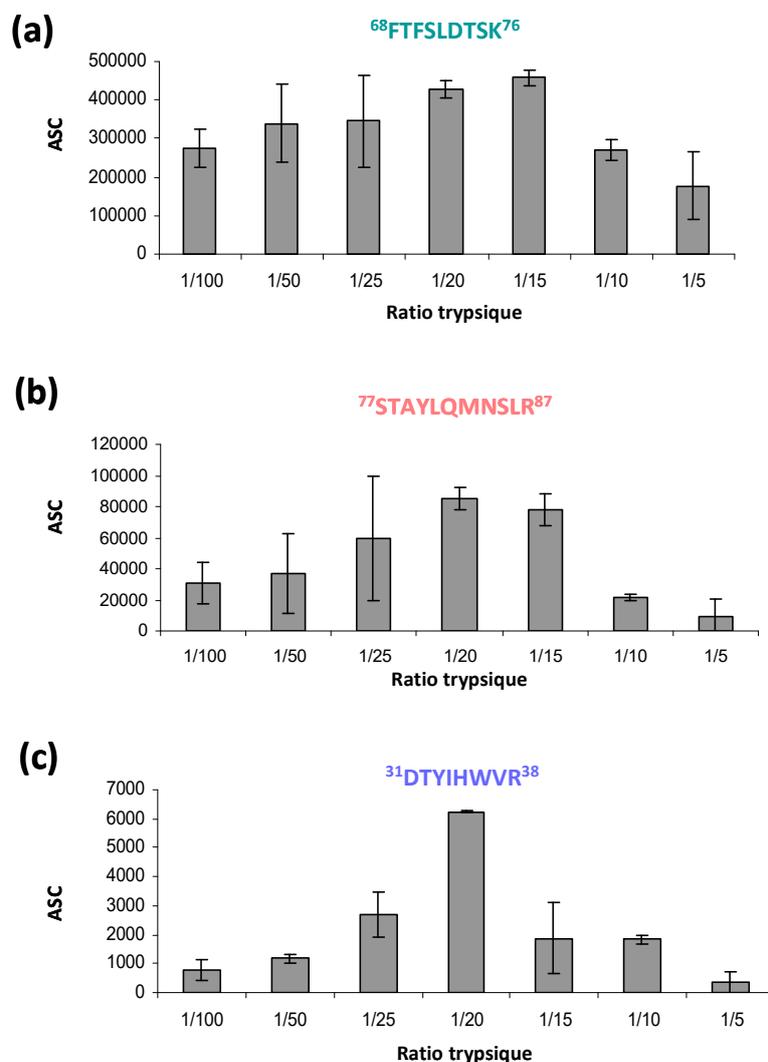
Un autre paramètre jouant sur l'efficacité de la protéolyse est la nature de la protéine. En effet, certaines protéines sont dites faciles à digérer alors que d'autres sont beaucoup plus résistantes [184]. D'autres paramètres comme la quantité de trypsine, le pH et la température du milieu sont à prendre en compte. Généralement,

il faut entre 20 et 100 fois moins de trypsine que de protéine totale (en mole), à pH proche de 8 et à 37°C. Enfin, la durée pendant laquelle se déroule la réaction est également un paramètre de capital pour qu'une protéolyse soit optimale. L'influence de la quantité de trypsine ajoutée et de la durée d'incubation tryptique ont été plus particulièrement étudiées.

### **1. Détermination de la quantité de trypsine optimale**

La détermination du ratio trypsine/substrat optimal a été effectuée par l'analyse d'échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à une concentration de 400 µg/mL, et protéolysés par des quantités croissantes de trypsine. A ce stade du développement nous utilisons toujours la trypsine porcine non traitée par TPCK commercialisée par Sigma Aldrich®.

Après analyse en mode MRM de ces échantillons, les ASCs des pics de chromatographie de chacun des peptides (somme de leurs transitions SRM les plus intenses) sont comparées en fonction du ratio enzyme/substrat utilisé pour la protéolyse. Pour chaque ratio de trypsine testé trois échantillons ont été préparés et analysés afin d'établir une ASC moyenne et d'évaluer la variabilité sur le signal mesuré à l'aide du coefficient de variation (CV %). Les résultats obtenus sont présentés figure 71 et exprimés en ASC moyenne ± écart type (n=3).



**Figure n° 71 : ASCs moyennes des peptides spécifiques du bevacizumab (a) et (b) et du peptide spécifique du trastuzumab (c) en fonction du ratio trypsine/substrat.**

Les échantillons protéolysés avec un ratio enzyme/substrat de 1/20 et 1/15 présentent, pour les peptides spécifiques du bevacizumab, les ASCs moyennes les plus importantes avec des coefficients de variation respectifs de 5,59 % et 4,05 % pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (figure 71-a), et de 8,31 % et 13,17 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (figure 71-b). Concernant le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> du trastuzumab, l'ASC moyenne la plus importante est obtenue lorsque les échantillons sont protéolysés avec un ratio enzyme/substrat de 1/20 (CV % = 0,46) (figure 71-c). Au regard de ces résultats, le ratio trypsique est fixé à 1/20 puisqu'il permet d'atteindre pour tous les peptides détectés le signal de spectrométrie de masse le plus intense avec la plus faible variabilité dans le signal généré.

Par ailleurs afin de confirmer que la protéolyse est la plus complète possible, la présence d'éventuels clivages manqués par la trypsine, des deux peptides

spécifiques du bevacizumab et du trastuzumab, sont recherchés dans les échantillons plasmatiques protéolysés au ratio 1/20. Pour cela, nous avons recherché les peptides présentant aucun, un et deux clivages manqués par la trypsine comprenant les séquences <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>. L'analyse a été réalisée sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap selon la même stratégie MS/MS que celle utilisée pour l'établissement des cartes peptidiques expérimentales du bevacizumab et du trastuzumab (cf chapitre 4- paragraphe I-B).

A l'issue de cette analyse, deux peptides présentant un clivage manqué sont détectés l'un pour le bevacizumab, il s'agit de la forme <sup>67</sup>RFTFSLDTSK<sup>76</sup> du peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, et l'autre pour le trastuzumab, et il s'agit de la forme <sup>21</sup>LSCAAGFNIKDTYIHWVR<sup>38</sup> du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>.

- L'abondance du peptide <sup>67</sup>RFTFSLDTSK<sup>76</sup> par rapport au peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> est significative avec une abondance respective de  $1,482e^{10}$  et  $1,816e^{10}$  soit un ratio d'abondance <sup>67</sup>RFTFSLDTSK<sup>76</sup> / <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> de 1,22.
- Le ratio des abondances entre le peptide <sup>21</sup>LSCAAGFNIKDTYIHWVR<sup>38</sup> par rapport au peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> est quant à lui plus faible avec un ratio <sup>21</sup>LSCAAGFNIKDTYIHWVR<sup>38</sup> / <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> de 0,05 bien que l'intensité du peptide avec un clivage manqué demeure importante ( $7,293e^9$  pour le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> contre  $3,921e^8$  pour le peptide <sup>21</sup>LSCAAGFNIKDTYIHWVR<sup>38</sup>).

Cependant, à l'issue de cette analyse, en toute rigueur on ne peut pas exclure la possibilité d'existence d'autres peptides présentant des clivages manqués et non détectés ici. On peut simplement conclure que les peptides portant des clivages manqués détectés ici présentent une abondance significative, bien au-delà du bruit de fond. Il reste à démontrer par la suite que l'existence de ces derniers n'influe pas sur la quantité de peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> générés au cours des différentes protéolyses. En effet, une protéolyse incomplète peut induire une variabilité dans le dosage du bevacizumab.

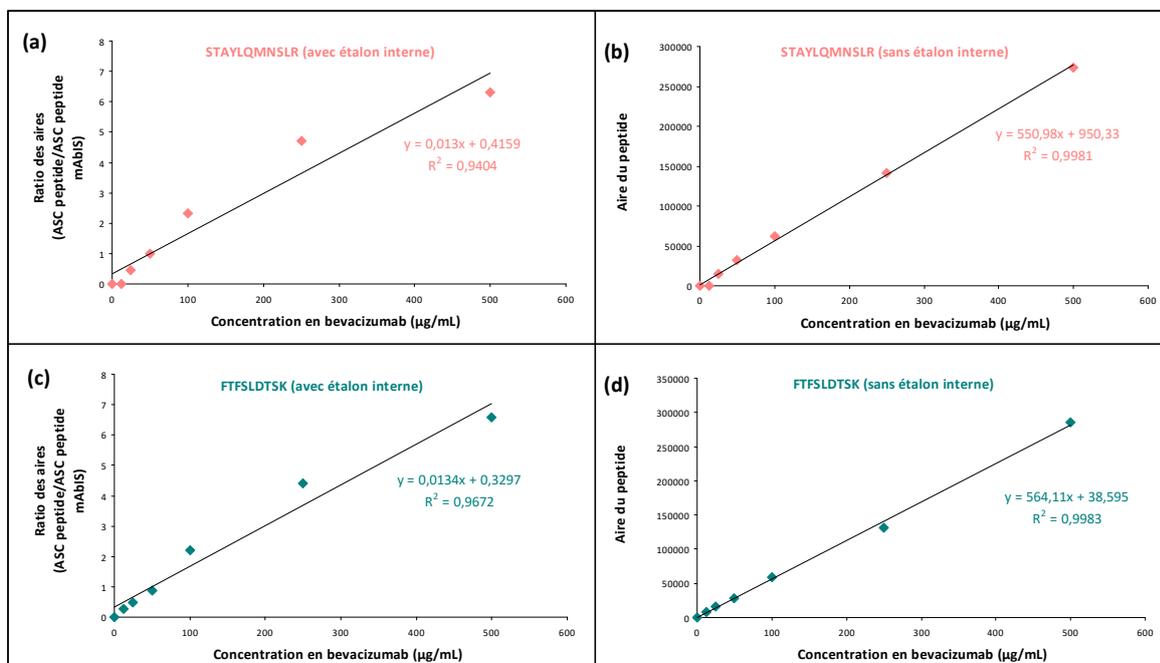
## **2. Etude préliminaire de la variabilité de la méthode avec le mAbIS**

Afin d'étudier la variabilité des concentrations mesurées, nous avons réalisé des essais préliminaires de répétabilité. Pour cela, trois concentrations sont choisies pour assurer ce contrôle qualité (CQ) : CQ1 (40 µg/mL), CQ2 (200 µg/mL), CQ3 (400

$\mu\text{g/mL}$ ). Les CQ sont préparés à partir d'une solution fille (SF) plasmatique de bevacizumab à 5 mg/mL obtenue à partir une solution mère aqueuse de bevacizumab à 25 mg/mL diluée dans le plasma humain issu de plusieurs donneurs. Six CQ de chaque concentration sont préparés et analysés par LC-ESI-QqQ (en mode MRM). L'exactitude et la précision (évaluée par le coefficient de variation CV %) sont déterminées pour chaque concentration de CQ selon les formules précédemment décrites dans le chapitre 2 (paragraphe II-D). Les concentrations sont calculées à l'aide des droites de calibration obtenues à partir de l'analyse de 7 standards de calibration de concentration croissante en bevacizumab (0, 12,5, 25, 50, 100, 250, et 500  $\mu\text{g/mL}$ ) obtenus à partir de dilutions successives d'un SF de bevacizumab dans du plasma humain.

A 65  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon (standard de calibration et CQ) sont ajoutés 5  $\mu\text{L}$  d'une solution mère aqueuse de trastuzumab à 21 mg/mL. 55  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon ainsi préparé sont chargés sur les cartouches de protéine A en vue de l'enrichissement en IgGs. Les échantillons sont ensuite traités selon les conditions précédemment décrites.

Pour comparer l'effet de l'étalon interne sur la mesure des concentrations en bevacizumab, une droite de calibration est construite pour chaque peptide du bevacizumab : l'une à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  du mAbIS (approche de quantification avec étalon interne) et l'autre uniquement à partir des ASCs du peptide d'intérêt (approche de quantification sans étalon). Les droites de régression linéaire obtenues et le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle sont présentés figure 72.



**Figure n° 72 : Droites de calibration des peptides du bevacizumab <sup>68</sup>FTFLDTSK<sup>76</sup> (b, d) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (a, c) obtenues à l'issue de l'analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillons plasmatiques chargés à des concentrations croissantes en bevacizumab allant de 12,5 à 500 µg/mL et protéolysés avec un ratio tryptique/substrat de 1/20.**

Les droites de calibration obtenues à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> du mAbIS (figure 71-a et 71-c) ont un coefficient de corrélation  $r^2$  respectivement de 0,94 pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et de 0,97 pour le peptide <sup>68</sup>FTFLDTSK<sup>76</sup> alors qu'il est supérieur à 0,99 lorsque la droite est construite sans étalon interne à partir des ASCs du peptide d'intérêt (figure 71-b et 71-d). Ces premiers résultats mettent en évidence une moins bonne linéarité de la réponse lorsque le trastuzumab est utilisé comme étalon interne. La piste d'une protéolyse incomplète pour le trastuzumab est alors évoquée. Il reste à étudier l'effet si cette protéolyse moins efficace de l'étalon interne à un impact significatif sur la répétabilité des résultats.

Pour cela, la concentration de chaque CQ analysé est calculée à partir des équations de chacune des droites de calibration. L'exactitude et la précision des concentrations mesurées sont calculés à partir du ratio des ASCs du peptide du bevacizumab d'intérêt et du peptide du mAbIS à l'issue des essais de répétabilité dont les résultats sont reportés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS pour les peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> du bevacizumab.**

Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>FTFSLDTSK</b> (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>STAYLQMNSLR</b> (µg/mL)
QC1-a	40	41,8	32,0
QC1-b	40	45,2	20,4
QC1-c	40	40,9	48,1
QC1-d	40	45,5	31,5
QC1-e	40	49,6	36,7
QC1-f	40	49,0	33,3
Exactitude % (n=6)		113,3	84,1
Précision CV% (n=6)		7,9	26,6
QC2-a	200	228,6	302,4
QC2-b	200	237,6	277,2
QC2-c	200	208,8	270,0
QC2-d	200	124,4	63,4
QC2-e	200	112,5	42,8
QC2-f	200	241,2	243,0
Exactitude % (n=6)		96,1	99,9
Précision CV% (n=6)		30,4	57,7
QC3-a	400	379,6	481,0
QC3-b	400	462,8	703,3
QC3-c	400	391,3	513,5
QC3-d	400	293,8	386,1
QC3-e	400	296,4	366,6
QC3-f	400	301,6	457,6
Exactitude % (n=6)		88,6	121,2
Précision CV% (n=6)		19,4	24,9

Pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> le CV % des concentrations calculées est compris dans l'intervalle [7,9 % ; 30,4 %] et pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> le CV % est compris dans l'intervalle [24,9 % ; 57,7 %]. Lors de ces analyses, la variabilité observée sur le signal généré par le peptide spécifique du mAbIS est de l'ordre de 30,66 %. Le manque de précision lorsque la quantification est réalisée avec cet étalon interne peut en partie être expliquée par la variabilité importante retrouvée dans le signal généré par le peptide spécifique du mAbIS.

En revanche, lorsque la quantification est réalisée en se basant sur l'ASC du peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> ou du peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> sans prendre en compte le mAbIS (approche de quantification sans étalon interne) les CV % des concentrations calculées sont moins importants. Les résultats de cette analyse sont reportés dans le tableau XIV.

**Tableau XIV : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir des ASCs du peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et du peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>.**

Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée	
		avec le peptide <sup>68</sup> FTFSLDTSK (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <sup>77</sup> STAYLQMNSLR (µg/mL)
QC1-a	40	40	40
QC1-b	40	40	51,9
QC1-c	40	39,9	44,6
QC1-d	40	44	36,7
QC1-e	40	43,9	25,9
QC1-f	40	40	49,5
	Exactitude % (n=6)	105,5	109,8
	Précision CV% (n=6)	5,9	24,8
QC2-a	200	200	200
QC2-b	200	205	168
QC2-c	200	227	225
QC2-d	200	227	245
QC2-e	200	216	170
QC2-f	200	210	248
	Exactitude % (n=6)	109,8	107,5
	Précision CV% (n=6)	5,0	17,0
QC3-a	400	326	400
QC3-b	400	384	290
QC3-c	400	395	352
QC3-d	400	340	422
QC3-e	400	374	304
QC3-f	400	400	420
	Exactitude % (n=6)	92,5	89,2
	Précision CV% (n=6)	8,2	15,6

Lorsque la quantification du bevacizumab est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> uniquement, le CV % des concentrations calculées est compris dans l'intervalle [5,0 % ; 8,2 %] (donc conforme aux normes FDA) alors qu'il est compris dans l'intervalle [15,6 % ; 24,8 %] lorsque que la quantification est basée sur le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> uniquement. Bien que la répétabilité soit meilleure avec l'approche de quantification sans étalon interne, la variabilité demeure encore trop élevée lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>.

Ces premiers résultats de répétabilité mettent en évidence un manque de reproductibilité dans les mesures lorsque l'analyse porte sur le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Ce manque de répétabilité est d'autant plus important lorsque la quantification est basée sur le ratio ASC <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>/ASC <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>. La piste d'une protéolyse incomplète est évoquée (bien qu'aucun peptide issu de sites de protéolyse manquée de ce peptide ne soit détecté). Afin de pouvoir quantifier de manière fiable le bevacizumab à partir de ces deux peptides nous avons cherché à optimiser d'autres paramètres au cours de la protéolyse.

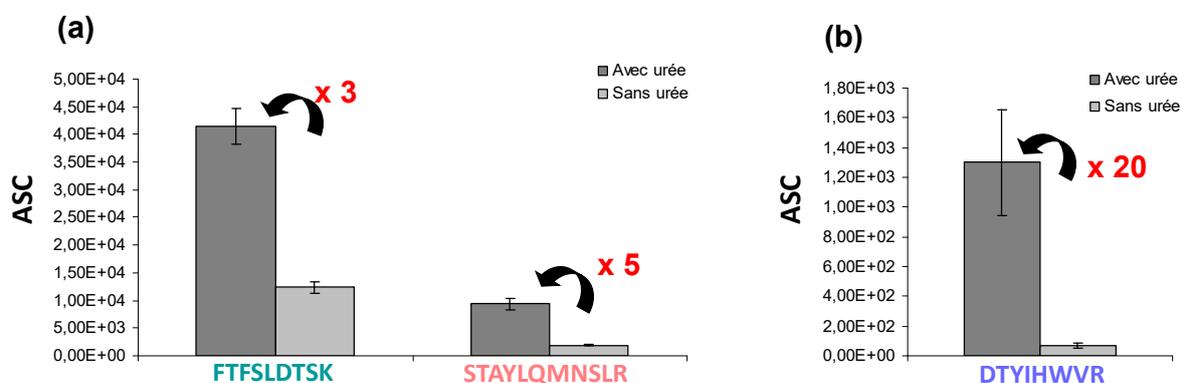
### **3. Intérêt d'une étape de dénaturation par l'urée**

Afin d'améliorer la répétabilité de la protéolyse, une étape de dénaturation par l'urée avant la protéolyse trypsique peut s'avérer intéressante. En effet, la dénaturation des anticorps permettrait de rendre plus accessibles à la trypsine les sites de clivage et éventuellement d'améliorer la reproductibilité de la quantité de peptides <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> générée par protéolyse. Cet agent dénaturant doit être introduit en forte concentration (6 à 8 M) pour avoir un effet dénaturant, mais sa concentration ne doit pas excéder 2 M pour être compatible avec l'activité de la trypsine. En effet tout comme les autres protéines, la trypsine est sensible à la dénaturation par l'urée, et ainsi une trop forte concentration en urée pourrait diminuer significativement la quantité de trypsine intacte et donc son activité enzymatique.

Afin d'évaluer l'intérêt de cette étape supplémentaire sur la protéolyse, nous avons comparé les intensités des signaux générés par les peptides du bevacizumab et du trastuzumab (mesurées par les ASCs) entre des échantillons plasmatiques, chargés en bevacizumab (400 µg/mL) et en trastuzumab, soumis à la dénaturation par l'urée et des échantillons non traités par l'urée avant l'incubation de la trypsine. Après purification sur protéine A et concentration par ultrafiltration, 75 µL d'une solution d'urée à 10 M dans du tampon de protéolyse (QSP 6 M final) sont ajoutés aux 50 µL d'ultrafiltrat récupéré pour chaque échantillon soumis à l'étape de dénaturation par l'urée. Afin d'obtenir des échantillons de concentrations identiques dans les deux conditions testées, 75 µL de tampon de protéolyse sont parallèlement ajoutés aux 50 µL d'ultrafiltrat récupérés pour chaque échantillon non traité par l'urée. 14 µL de DTT à 100 mM sont ensuite ajoutés à tous les échantillons (QSP 10 mM final) qui sont ensuite incubés pendant 30 min à 55°C (selon le protocole précédemment décrit). Après ajout de 15,5 µL d'IAA à 100 mM (QSP 10 mM final) et incubation pendant 20 minutes à température ambiante, 220,5 µL de tampon de protéolyse sont ajoutés à tous les échantillons préalablement traités par l'urée afin d'amener la concentration en urée à une valeur inférieure à 2 M avant ajout de la trypsine. Afin de pouvoir comparer les deux conditions testées, il est nécessaire de répercuter ce facteur de dilution sur les échantillons non traités par l'urée en ajoutant 220,5 µL de tampon de protéolyse à chacun d'eux. La trypsine est ensuite ajoutée avec un ratio enzyme/substrat de 1/20 (mole/mole), et les échantillons sont incubés pendant 16 heures (toute une nuit) à 37°C. Après arrêt de la protéolyse, les échantillons sont analysés par LC-ESI-QqQ en mode MRM selon les conditions de

chromatographie et de détection par spectrométrie de masse précédemment décrites. Pour les deux conditions testées, six duplicats sont analysés.

Les résultats de ces analyses sont présentés figure 73 et exprimés en ASC moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 6$ ). L'ASC représentée correspond à l'ASC de la somme des transitions SRM les plus intenses.



**Figure n° 73 : ASC moyennes des peptides du bevacizumab (a) et du peptide du mAbIS (b) obtenues après analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillons traités par l'urée et non traités par l'urée au cours de l'étape de protéolyse.**

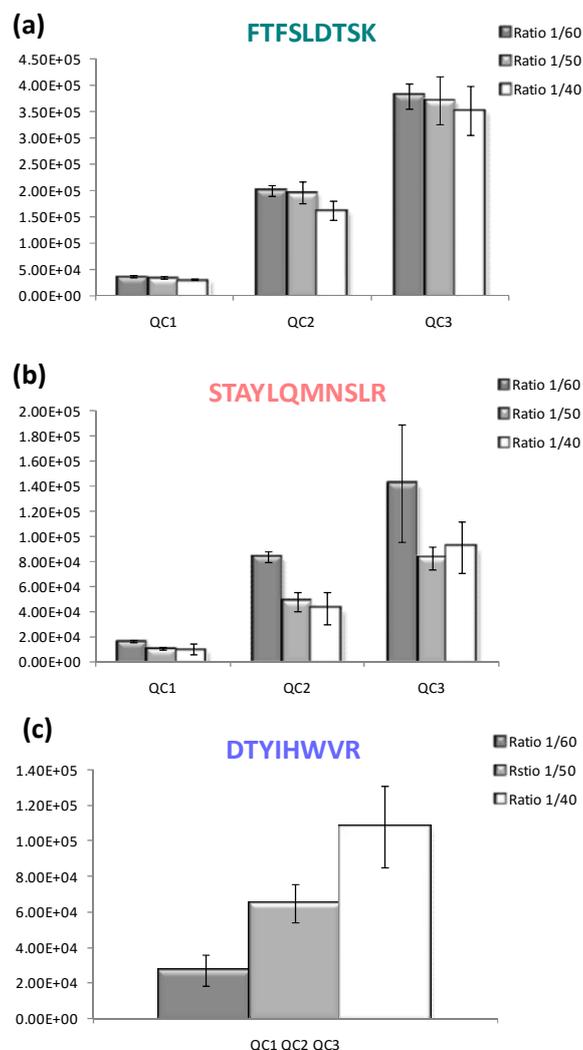
D'une manière générale, les ASCs mesurées sont plus importantes lorsque les échantillons sont soumis à l'étape de dénaturation par l'urée. On observe un facteur multiplicateur de 3, 5 et 20 sur les ASC moyennes respectivement pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ , le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  et le peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ . Cependant le CV % des ASCs mesurées ne diffère pas significativement entre les deux conditions testées. On obtient un CV % de 7,7 % pour les échantillons traités à l'urée, contre un CV de 8,5 % pour ceux non traités pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ , 11,6 % contre 9,05 % pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  et 24,3 % contre 27,3 % pour le peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ . Par ailleurs le facteur de dilution appliqué pour atteindre une concentration d'urée inférieure à 2 M avant ajout de la trypsine est de l'ordre de  $1/10^{\text{ème}}$  par rapport à une protéolyse réalisée sans urée. Par conséquent, le gain observé dans l'intensité du signal mesuré en présence d'urée ne compense pas le facteur de dilution nécessaire. Il en résulterait une diminution de l'intensité du signal mesuré par spectrométrie de masse ce fait chuter la sensibilité de la méthode. Une étape de concentration des échantillons après protéolyse serait alors nécessaire pour atteindre une limite de quantification compatible avec les concentrations plasmatiques de bevacizumab attendues en thérapeutique. Cependant, en plus d'être chronophage, cette étape de dénaturation des échantillons par l'urée avant

l'analyse par spectrométrie de masse augmente la variabilité de la méthode, et augmente également le risque de perte d'analyte au cours des différentes étapes. C'est pourquoi nous n'avons pas retenu cette solution pour la suite du développement de la méthode.

#### **4. Intérêt de l'utilisation d'une trypsine traitée par TPCK et résistante à l'autolyse**

Toujours dans le but de limiter la variabilité observée avec le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> et d'améliorer le répétabilité lorsque la quantification porte sur le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>, nous avons étudié l'intérêt de l'utilisation d'une trypsine de meilleure qualité la *Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade* (Promega) qui est une trypsine issue de pancréas de porc dont les résidus de lysine ont été modifiés par méthylation réductrice, ce qui donne une molécule très active, très stable et extrêmement résistante à l'auto-trypsinolyse [185]. La spécificité de la trypsine purifiée est encore améliorée par le traitement TPCK, qui inactive la chymotrypsine. Cette trypsine traitée est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité et lyophilisée.

Les essais réalisés avec cette enzyme consistent dans un premier temps en la détermination du ratio trypsine/substrat optimal selon la même méthodologie que celle utilisée avec la précédente trypsine (paragraphe II-C-1). Trois ratio croissants trypsine/substrat ont été testés : 1/60, 1/50 et 1/40 (mole/mole). Pour chaque ratio testé, l'analyse a été réalisée sur les trois concentrations de CQ (40, 200 et 400 µg/mL). Pour chaque concentration, trois échantillons ont été préparés et analysés afin d'établir les ASCs moyennes et d'estimer la variabilité dans la mesure (via le CV %). Les ASCs moyennes sont mesurées à l'issue de l'analyse MS/MS (en mode MRM) sur le système LC-ESI-QqQ selon les conditions de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse précédemment décrites. Les résultats obtenus à l'issue de cette analyse sont présentés figure 74 et exprimés en ASC moyenne ± écart type (n = 3). Pour chaque peptide, l'aire représentée correspond à celle de la somme des transitions SRM les plus intenses.



**Figure n° 74 : Mesure des ASC moyennes des peptides du bevacizumab (a) et (b), et du peptide du mAbIS (c) en fonction du ratio trypsine « Gold » /substrat.**

Pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (figure 74-a), les ASC moyennes sont légèrement plus faible quand les échantillons sont protéolysés avec un ratio trypsine/substrat de 1/40 (mole/mole). Cependant pour les trois ratios testés, le CV % des ASCs pour chaque CQ est toujours inférieur à 15 %.

Pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (figure 74-b), bien que l'ASC moyenne soit plus élevée quand les échantillons sont protéolysés à un ratio trypsine/substrat de 1/60 (mole/mole), la variabilité des ASC mesurées à ce ratio est la plus importante avec un CV % supérieur à 15 % pour les ASCs des CQ2 et CQ3. Un CV % supérieur à 15 % est également retrouvé sur les ASCs mesurées des échantillons protéolysés avec un ratio trypsine/substrat de 1/40 (mole/mole).

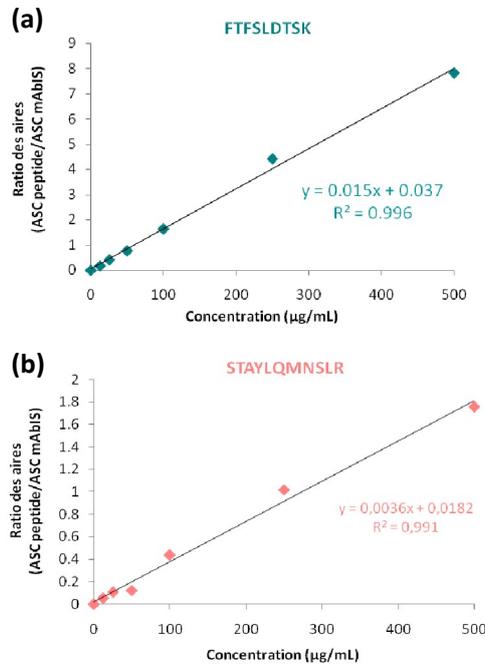
Pour le peptide du trastuzumab  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  (figure 74-c), bien que l'ASC moyenne soit plus élevée avec le ratio 1/40, la variabilité est trop importante à ce ratio (CV de 25 %). En revanche au ratio 1/50 le CV est réduit à 16 % ce qui est déjà plus satisfaisant. Néanmoins ces résultats mettent en évidence une plus grande

difficulté à obtenir une protéolyse efficace avec le trastuzumab, la quantité maximum de peptides générés n'étant pas atteint avant le ratio 1/40 alors qu'elle l'est déjà pour les peptides du bevacizumab.

Au regard de ces résultats, seul les échantillons protéolysés avec un ratio trypsine/substrat de 1/50 (mole/mole) présentent un CV sur les ASCs mesurées inférieur à 15 % pour les deux peptides d'intérêt du bevacizumab. Par conséquent le ratio trypsine/substrat optimal est fixé à 1/50 (mole/mole) pour la trypsine « Gold » puisqu'il permet d'atteindre la quantité maximum de peptide généré pour le bevacizumab avec la plus faible variabilité dans le signal mesuré pour le bevacizumab et le trastuzumab.

Afin de s'assurer que la protéolyse soit la plus complète possible au ratio retenu, la présence d'éventuels clivages manqués des deux peptides du bevacizumab par la trypsine est également recherchée dans les échantillons plasmatiques protéolysés aux 1/50 selon le même procédé que celui précédemment décrit lors des essais conduits sur la précédente trypsine. A l'issue de cette analyse aucun peptide présentant des clivages manqués par la trypsine parmi ceux recherchés n'a été détecté. Cependant là encore, il est nécessaire de rappeler que cette approche n'exclue pas la possibilité d'existence de clivages manqués non détectés.

La variabilité des concentrations de bevacizumab obtenues après utilisation de la trypsine « Gold » avec un ratio de 1/50 a été évaluée par des essais de répétabilité conduits sur les trois concentrations de CQ (40, 200 et 400 µg/mL) selon le même procédé que pour les essais de répétabilité conduits avec la précédente trypsine. Les droites de régression linéaires construites pour la quantification des CQ et le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle sont présentés figure 75.



**Figure n° 75 : Droites de calibrations des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (a) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (b) obtenues à l'issue de l'analyse MS/MS (mode MRM) d'échantillons plasmatiques chargés par des concentrations croissantes de bevacizumab et protéolysés avec un ratio trypsine « Gold »/ substrat de 1/50 (mole/mole).**

Les droites de calibration obtenues pour les deux peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> (Figure 75-a) et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (Figure 75-b) à partir des ratios des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS témoignent d'une relation linéaire entre l'intensité du signal du peptide et la concentration en bevacizumab, avec un coefficient de corrélation  $r^2$  supérieur à 0,99 pour les deux peptides du bevacizumab. Pour ce qui est de la linéarité de la réponse, l'utilisation de la trypsine « Gold » apporte une amélioration significative par rapport aux essais conduits avec la précédente trypsine lorsque la quantification est basée sur le ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS.

La concentration de chaque CQ analysé est ensuite calculée à partir des équations de chacune des droites de calibration afin d'évaluer la répétabilité des mesures. L'exactitude et la précision des concentrations calculées sont obtenues à partir de l'analyse de six duplicats pour chaque CQ. Les résultats de cette analyse sont reportés dans le tableau XV.

**Tableau XV : Exactitude et précision des concentrations en bevacizumab calculées à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS obtenus pour les peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> avec la trypsine « Gold ».**

Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée	Concentration calculée
		avec le peptide <b>FTFSLDTSK</b> (µg/mL)	avec le peptide <b>STAYLQMNSLR</b> (µg/mL)
QC1-a	40	<b>58</b>	<b>57</b>
QC1-b	40	<b>51</b>	<b>53</b>
QC1-c	40	<b>52</b>	<b>48</b>
QC1-d	40	<b>52</b>	<b>54</b>
QC1-e	40	<b>58</b>	<b>55</b>
QC1-f	40	<b>41</b>	<b>46</b>
	Exactitude % (n=6)	<b>126,7</b>	<b>130,3</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>11,6</b>	<b>8,6</b>
QC2-a	200	<b>220</b>	<b>180</b>
QC2-b	200	<b>211</b>	<b>213</b>
QC2-c	200	<b>213</b>	<b>211</b>
QC2-d	200	<b>252</b>	<b>227</b>
QC2-e	200	<b>195</b>	<b>229</b>
QC2-f	200	<b>208</b>	<b>211</b>
	Exactitude % (n=6)	<b>108,3</b>	<b>105,9</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>8,9</b>	<b>8,3</b>
QC3-a	400	<b>403</b>	<b>400</b>
QC3-b	400	<b>450</b>	<b>492</b>
QC3-c	400	<b>448</b>	<b>442</b>
QC3-d	400	<b>415</b>	<b>368</b>
QC3-e	400	<b>431</b>	<b>445</b>
QC3-f	400	<b>416</b>	<b>433</b>
	Exactitude % (n=6)	<b>106,8</b>	<b>107,5</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>4,5</b>	<b>9,8</b>

Les CV % des concentrations en bevacizumab calculées à partir du ratio des ASCs du peptide d'intérêt et du peptide du mAbIS sont conformes aux normes FDA pour les deux peptides du bevacizumab (CV < 15 %). Les CV sont compris dans l'intervalle [4,47 % ; 11,61 %] lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et dans l'intervalle [8,59 % ; 12,42%] avec le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. De plus la variabilité portant sur le peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> du mAbIS est considérablement réduite passant de 30 à 16 % lors de l'utilisation de la trypsine « Gold » comparativement à la trypsine standard précédemment utilisée.

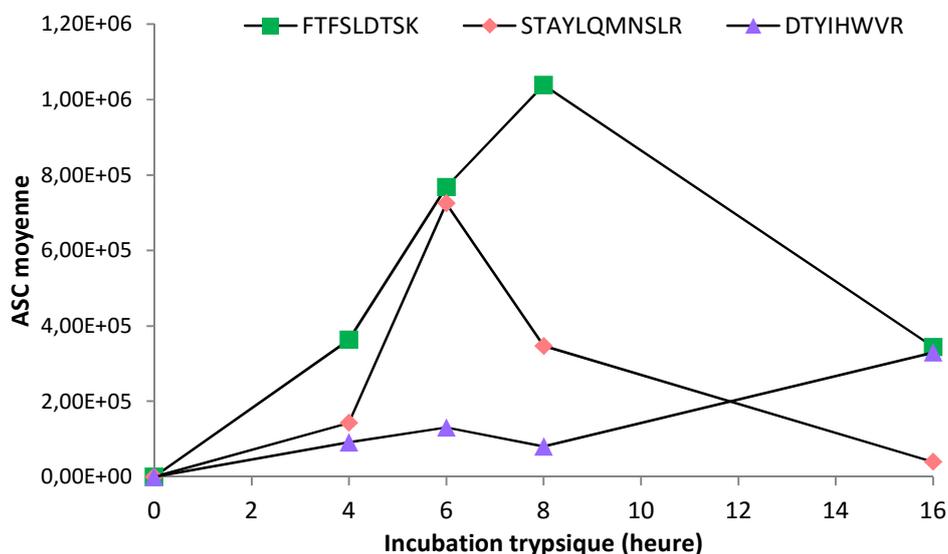
Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser une trypsine de haute qualité telle que la trypsine « Gold » pour améliorer la répétabilité et l'efficacité de la protéolyse. A travers ces résultats on met également en avant le caractère protéine et peptide dépendant de la protéolyse trypsique. Afin de pouvoir transposer plus facilement notre méthode de quantification à d'autres mAbs, l'utilisation d'une trypsine traitée au TPCK et résistant à l'autolyse semble être une nécessité bien que les travaux de de Dubois *et al* prouvent le contraire [3].

Néanmoins, bien que la variabilité portant sur le peptide du trastuzumab soit réduite avec la trypsine « Gold », l'exactitude des concentrations mesurées sur le CQ de plus basse concentration n'est pas satisfaisante quel que soit le peptide utilisé pour la quantification : une exactitude de 126,7 % est déterminée pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et une exactitude de 130,3 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Ces résultats suggèrent un manque de fiabilité de la méthode sur les concentrations basses qui est probablement lié à un signal en spectrométrie de masse plus faible. Pour augmenter la quantité de peptides détectés l'impact du temps d'incubation tryptique a été étudié.

## **5. Etude de la durée d'incubation tryptique sur la formation des peptides détectés**

L'impact du temps d'incubation de la trypsine sur la formation des peptides détectés est évalué sur des échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à une concentration de 400 µg/mL et incubés avec la trypsine à différents temps. 6,5 µL d'une solution de trastuzumab à 21 mg/mL sont ajoutés à 65 µL de chaque échantillon plasmatique. 55µL de chaque échantillon ainsi préparés sont chargés sur les cartouches de protéine A. Les échantillons sont ensuite traités selon le procédé précédemment décrit et protéolysés avec la trypsine « Gold » avec un ratio trypsine/substrat de 1/50 (mole/mole). Les échantillons sont enlevés du bain marie à 37°C après différents temps d'incubation (4, 6, 8, et 16 heures). L'ASC des peptides <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> est mesurée après ces différents temps d'incubation au bain marie. Pour chaque temps d'incubation six duplicats ont été analysés.

Les ASC mesurées pour les peptides du bevacizumab (<sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>) et pour le peptide du trastuzumab (<sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>) en fonction du temps de protéolyse tryptique sont présentées figure 76. Les résultats obtenus sont exprimés en ASC moyenne (n=6). Pour chaque peptide, l'aire représentée correspondant à l'aire de la somme des transitions SRM les plus intenses.



**Figure n° 76 : Cinétique de la protéolyse du bevacizumab et du trastuzumab mesurée par les peptides spécifiques du bevacizumab <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> et par le peptide spécifique du trastuzumab <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup>.**

L'ASC des deux peptides spécifiques du bevacizumab augmente au cours des six premières heures d'incubation et atteint son maximum au bout de six heures pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>, alors que huit heures d'incubation sont nécessaires pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>. Au-delà, une diminution de la quantité des deux peptides du bevacizumab apparaît. La variabilité des ASCs mesurées (évaluée par le CV %) est plus importante à l'issue d'une incubation de six heures par rapport à huit heures pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> avec un CV % passant respectivement de 10,6 à 4,6 % après huit heures d'incubation. En revanche, la variabilité sur les ASCs mesurées est du même ordre de grandeur pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (CV de 10,7 % au bout de six heures et de 10,8 % au bout de 8 heures). Par ailleurs, la formation du peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> est plus lente avec une ASC moyenne qui croît lentement jusqu'à 16 heures d'incubation trypsique (et peut être au-delà). Cependant que ce soit au bout de 6, 8 ou 16 heures d'incubation, le CV % sur ce peptide est toujours supérieur à 15 % allant de 27,0 à 21,3 % entre 6 et 16 heures.

Les conditions optimales de protéolyse pour le bevacizumab diffèrent de celles du trastuzumab. Ces résultats confirment le caractère protéine dépendant du temps d'incubation trypsique nécessaire de l'obtention d'une protéolyse optimale (environ 8 heures pour le bevacizumab et au-delà de 16 heures pour le trastuzumab). Le caractère peptide dépendant du temps d'incubation trypsique est également observé au regard des résultats obtenus pour les deux peptides du bevacizumab. Cependant, dans ce cas la baisse des ASCs mesurées observée sur les peptides du bevacizumab s'expliquerait plutôt par une adsorption non spécifique

de ces derniers sur les parois des tubes utilisés lors de la protéolyse. Ce phénomène a déjà été observé par plusieurs équipes [3, 155, 171]. Nous aurions pu le confirmer en menant une étude comparative estimant la perte de peptides en fonction du temps passé dans des tubes passivés à l'albumine ou non passivés. En effet, l'albumine permet la saturation des sites d'adsorption sur les parois des matériaux.

Finalement, bien qu'aucune condition ne soit optimale pour les deux mAbs à quantifier, nous avons privilégié un temps d'incubation tryptique de huit heures puisqu'il correspond à la quantité maximale de peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> généré qui est le peptide présentant jusqu'à présent le moins de variabilité dans les mesures et le meilleur candidat pour la quantification du bevacizumab. De plus, un temps d'incubation de huit heures permet d'atteindre une précision dans les mesures suffisante pour les deux peptides spécifiques du bevacizumab (CV inférieur à 15 %) tout en maintenant une quantité de peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> supérieure à celle mesurée au bout de 16 heures d'incubation. Pour la suite du développement la durée de la protéolyse enzymatique est fixée à 8 heures.

Etant donné le caractère protéine dépendant mis en évidence précédemment vis-à-vis de l'étape de protéolyse et la difficulté de définir des conditions optimales pour le bevacizumab et le trastuzumab (mAbIS), nous avons jugé intéressant de comparer deux stratégies d'étalonnage interne : l'une utilisant un mAbIS (le trastuzumab) et l'autre utilisant le SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup>. Ce dernier présente l'inconvénient de ne pas suivre la protéolyse.

### **III. Comparaison des deux approches d'étalonnage interne et validation analytique de la méthode de quantification retenue.**

Une méthode de dosage doit être impérativement validée pour pouvoir garantir la fiabilité et de la reproductibilité des résultats. En milieu biologique, il faut faire référence aux normes FDA [127]. Ces normes préconisent de déterminer les paramètres spécifiques suivants : limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), linéarité, répétabilité intra- et inter-journalières (exactitude, précision), spécificité et sélectivité.

Gardant à l'esprit la volonté d'appliquer notre méthode de dosage à des études cliniques, les deux approches d'étalonnage interne ont été comparées par rapport à leur capacité à fournir des résultats fiables à l'issue d'essais de répétabilité.

Les analyses sont menées sur des échantillons plasmatiques : chargés en bevacizumab en présence de l'étalon interne testé (trastuzumab ou SIL-peptide).

Dans le cas de l'utilisation du mAbIS trastuzumab, 6,5 µL d'une solution aqueuse de trastuzumab à 21 mg/mL est ajouté à 65 µL de chaque échantillon plasmatique chargé en bevacizumab. 55 µL de chaque échantillon ainsi préparé est ensuite chargé sur une cartouche de purification par protéine A.

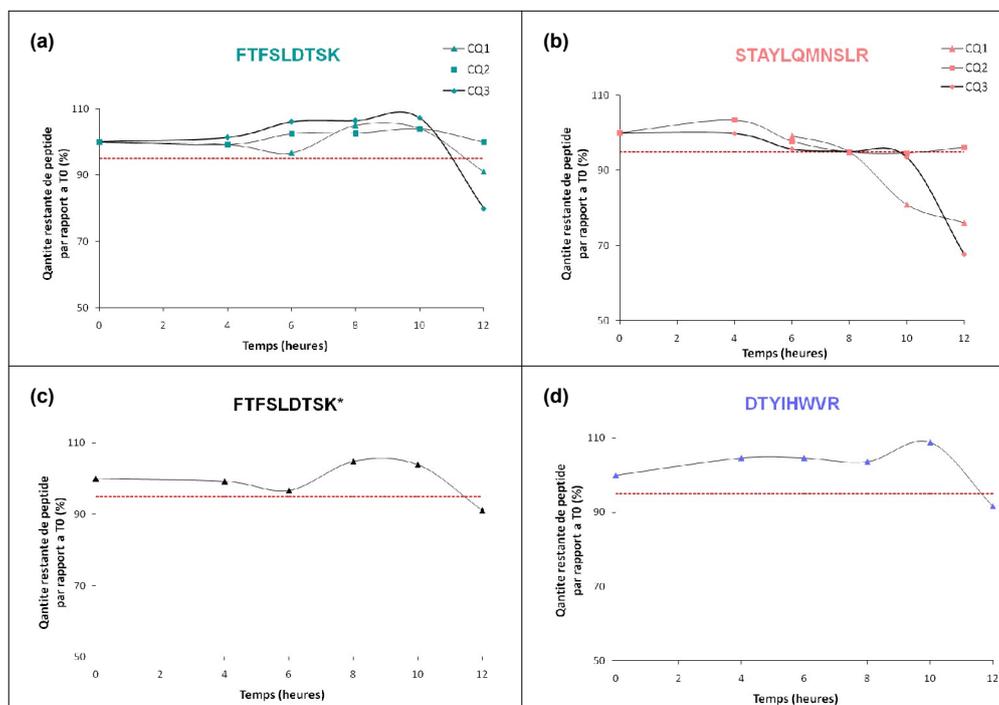
Dans le cas de l'utilisation du SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup>, 55 µL d'échantillon plasmatique chargé en bevacizumab est directement chargé sur une cartouche de purification par protéine A. Le SIL-peptide est ajoutée juste avant l'étape de protéolyse par ajout de 5 µL d'une solution pure à 2,5 µg/mL de SIL-peptide dans l'ultra-filtrat.

Les échantillons sont protéolysés selon les conditions de protéolyse précédemment définies (trypsine « Gold » avec un ratio enzyme/substrat de 1/50 (mole/mole) pendant 8 heures à 37°C).

## **A. Stabilité des peptides dans le protéolysat**

Avant d'entamer la procédure de validation analytique proprement dite faisant intervenir des essais de répétabilité, il a d'abord fallu s'assurer que les peptides détectés étaient stables dans le protéolysat pendant la durée des analyses (comprenant le temps d'attente sur le passeur d'échantillon et le temps de l'analyse de l'échantillon).

La stabilité dans le protéolysat des peptides du bevacizumab, du peptide du trastuzumab et du SIL-peptide est évaluée aux trois concentrations de CQ (400, 200 et 40 µg/mL) sur une période suffisamment longue pour pouvoir programmer des analyses en séries soit une période de 12 heures avec des analyses à t<sub>0</sub>, t<sub>4</sub> heures, t<sub>6</sub> heures, t<sub>6</sub> heures, t<sub>10</sub> heures et t<sub>12</sub> heures. Les analyses aux différents temps sont conduites en trois duplicats pour chaque concentration testée à température ambiante. La stabilité est évaluée en comparant les ASC moyennes mesurées aux différents temps de l'analyse par rapport à l'ASC moyenne mesurée au temps zéro. Pour chaque peptide, l'ASC mesurée correspond à la somme des SRM les plus intenses. Les résultats de l'étude de stabilité sont représentés sur la figure 77 et exprimés en pourcentage de peptides détectés par rapport au temps zéro.



**Figure n° 77 : Stabilité des peptides du bevacizumab (a), (b), du SIL-peptide (c) et du peptide du trastuzumab (d) dans le protéolysat au cours de l'analyse MS/MS sur LC-ESI-QqQ.**

Au-delà de 10 heures la quantité de peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ ,  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  et  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  détectés par rapport au temps zéro passe en dessous de 95 %. Pour le peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ , la diminution est plus importante pour la concentration la plus élevée. L'effet de la concentration n'a pas été évalué pour les peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  et  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  puisqu'ils sont ajoutés à une quantité fixe dans chaque échantillon (étalon interne). En revanche pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  une diminution de plus de 5 % est observée au-delà de seulement 8 heures pour la concentration la plus faible. Ceci pourrait s'expliquer par le phénomène d'adsorption déjà évoqué sur ce peptide pouvant s'ajouter à la dégradation de ce dernier dans la baisse de l'intensité du signal mesuré.

En considérant comme non significatif une perte inférieure à 5 % par rapport au temps zéro les analyses sont conduites par la suite en fixant à 8 heures le délai maximum entre la décongélation d'un protéolysat et son analyse par spectrométrie de masse.

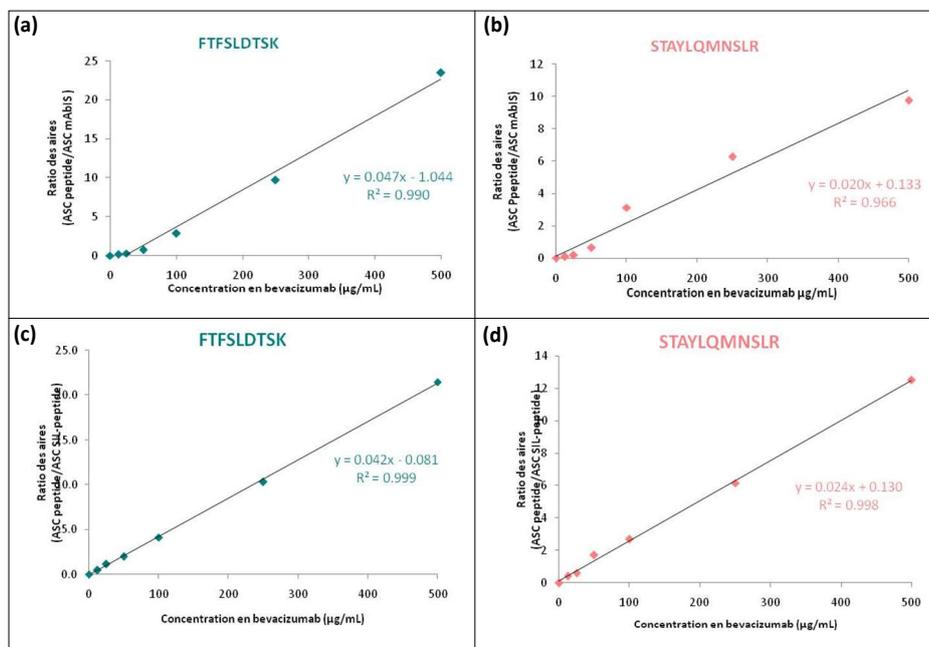
## B. Linéarité

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre 2 (paragraphe IV-B) la linéarité de la réponse en fonction des concentrations en analyte dans la matrice

étudiée fait partie des paramètres à évaluer au cours de la validation analytique d'une méthode de dosage d'un médicament dans des matrices biologiques. La linéarité est étudiée pour les deux approches d'étalonnage interne à partir de gammes de calibrations de bevacizumab préparées dans du plasma humain (plasma poolé issu de plusieurs donneurs sains) à 7 concentrations croissantes : 0, 12,5, 25, 50, 100, 250, et 500 µg/mL. Les standards de calibration sont obtenus par dilutions successives d'une solution fille plasmatique de bevacizumab à 5 mg/mL (issue d'une dilution de la solution stock aqueuse à 25 mg/mL). Pour l'approche utilisant le trastuzumab comme étalon interne (mAbIS), 6,5 µL d'une solution aqueuse à 21 mg/mL de trastuzumab sont ajoutés à 65 µL de chaque standard de calibration avant toute étape de traitement de l'échantillon. Pour l'approche utilisant le SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup>, ce dernier est ajouté juste avant l'étape de protéolyse dans le filtrat récupéré à l'issue de la concentration par ultrafiltration (soit 5 µL d'une solution pure de peptide synthétisé à 2,5 µg/mL). Les échantillons sont soumis aux différentes étapes de traitement de l'échantillon selon le procédé précédemment décrit dans ce chapitre (paragraphe II-B-1 et II-B-2). Les échantillons sont protéolysés avec un ratio de trypsine « Gold » de 1/50 et une durée d'incubation de 8 heures à 37°C selon les conditions de protéolyse établies à l'issue des travaux précédemment menés (travaux présentés dans le paragraphe précédent). Les analyses MS/MS (en mode MRM) des échantillons sont conduites sur le spectromètre de masse LC-ESI-QqQ selon les conditions de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse précédemment décrites.

Les droites de calibration pour chaque peptide du bevacizumab sont construites à partir du ratio des aires du peptide du bevacizumab et du peptide de l'étalon interne. Pour l'approche utilisant le trastuzumab le ratio « ASC du peptide du bevacizumab / ASC du peptide mAbIS » est calculé et pour l'approche utilisant le peptide marqué (SIL-peptide) <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> le ratio « ASC du peptide du bevacizumab / ASC du SIL-peptide » est calculé. L'ASC mesurée pour chaque peptide correspond à celle de la somme des transitions SRM les plus intenses.

Les droites de régression linéaires obtenues et le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle sont reportés sur la figure 78.



**Figure n° 78 : Droites de calibrations obtenues pour les deux peptides du bevacizumab avec l'approche d'étalonnage interne mAbIS (a), (b) et l'approche SIL-peptide (c), (d).**

La linéarité de la réponse en spectrométrie de masse est meilleure avec l'approche utilisant le SIL-peptide ( $r^2 > 0,99$  pour les deux peptides du bevacizumab) plutôt que le mAbIS avec un coefficient de corrélation  $r^2$  inférieur à 0,99 pour le peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (figure 78-b).

### C. Exactitude et précision

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre 2 (paragraphe IV-D), cette étape constitue le cœur d'une validation analytique. Il s'agit de démontrer que les résultats quantitatifs sont exacts et répétables dans le temps. Trois concentrations sont choisies pour assurer le contrôle qualité (CQ) : CQ1 (40 µg/mL), CQ2 (200 µg/mL), CQ3 (400 µg/mL). Les CQ sont fabriqués extemporanément à chacun des jours de la validation analytique à partir d'une solution mère aqueuse de bevacizumab à 25 mg/mL dilué dans du plasma humain.

L'exactitude et la précision intra journalière sont déterminées en préparant 6 duplicats de chaque QC. Chaque duplicat est ensuite extrait et analysé le même jour. La variabilité inter-journalière est déterminée avec les mêmes paramètres (précision et exactitude) en préparant et analysant six duplicats par jour de chaque CQ pendant quatre jours ( $n=24$ ). Les concentrations en bevacizumab des QC sont calculées à partir d'une droite de calibration allant de 12,5 à 500 µg/mL construite à partir du ratio

des ASCs du peptide du bevacizumab et du peptide de l'étalon interne des standards de calibrations.

## 1. Répétabilité intra-journalière

**Tableau XVI : Exactitude et précision intra-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne SIL-peptide.**

Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>FTFSLDTSK</b> (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>STAYLQMNSLR</b> (µg/mL)
QC1-a	40	39	35
QC1-b	40	41	40
QC1-c	40	44	41
QC1-d	40	44	37
QC1-e	40	42	39
QC1-f	40	40	39
Exactitude % (n=6)		<b>104.4</b>	<b>96.1</b>
Précision CV% (n=6)		<b>5.5</b>	<b>5.4</b>
QC2-a	200	194	171
QC2-b	200	208	160
QC2-c	200	223	184
QC2-d	200	200	154
QC2-e	200	219	198
QC2-f	200	225	184
Exactitude % (n=6)		<b>105.8</b>	<b>87.6</b>
Précision CV% (n=6)		<b>6.1</b>	<b>9.5</b>
QC3-a	400	373	355
QC3-b	400	461	456
QC3-c	400	415	427
QC3-d	400	418	377
QC3-e	400	484	456
QC3-f	400	434	434
Exactitude % (n=6)		<b>107.7</b>	<b>104.4</b>
Précision CV% (n=6)		<b>9.0</b>	<b>10.1</b>

Avec l'approche d'étalonnage utilisant le SIL-peptide, l'exactitude est comprise entre 104,4 % et 107,7 % lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et entre 87,6 % et 104,4 % avec le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. La précision évaluée par le CV est comprise entre 5,5 et 9,0 % lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et entre 5,4 et 10,1 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Ainsi, pour les deux peptides du bevacizumab l'exactitude et la précision sont comprises dans les intervalles de valeur recommandées par la FDA à savoir une exactitude comprise entre 85 et 115 % et un coefficient de variation inférieur à 15 %.

**Tableau XVII : Exactitude et précision intra-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne mAbIS.**

Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <sup>68</sup> FTFSLDTSK (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <sup>77</sup> STAYLQMNSLR (µg/mL)
QC1-a	40	40	28
QC1-b	40	54	40
QC1-c	40	52	26
QC1-d	40	51	42
QC1-e	40	45	44
QC1-f	40	43	27
	Exactitude % (n=6)	<b>118.5</b>	<b>86.8</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>11.7</b>	<b>23.9</b>
QC2-a	200	197	163
QC2-b	200	186	202
QC2-c	200	190	184
QC2-d	200	223	197
QC2-e	200	175	211
QC2-f	200	183	184
	Exactitude % (n=6)	<b>96.2</b>	<b>95.0</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>8.7</b>	<b>8.9</b>
QC3-a	400	377	423
QC3-b	400	517	546
QC3-c	400	485	470
QC3-d	400	432	375
QC3-e	400	464	464
QC3-f	400	428	440
	Exactitude % (n=6)	<b>112.6</b>	<b>113.2</b>
	Précision CV% (n=6)	<b>10.9</b>	<b>12.6</b>

Avec l'approche d'étalonnage utilisant le mAbIS trastuzumab, lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, l'exactitude est comprise entre 96,2 et 118,5 % et entre 86,8 et 113,2 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. La précision évaluée par le CV% est comprise entre 8,7 et 11,7 % lorsque la quantification est basée sur le peptide et entre 8,9 et 23,9 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. L'exactitude est très proche voire dépasse les bornes des intervalles d'acceptation préconisées par la FDA. Par ailleurs les coefficients de variation sont plus importants avec cette approche et dépassent même les 15 % préconisés par la FDA avec le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> (CV de 23,9 %).

Au regard des valeurs obtenues pour l'exactitude et la précision des mesures au cours des essais de répétabilité intra-journaliers, la quantification du bevacizumab à partir de ratio « ASC du peptide du bevacizumab / ASC du SIL-peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>\*76</sup> » donne des résultats plus fiables par comparaison avec le ratio « ASC du peptide du bevacizumab / ASC du peptide du mAbIS ». Ces résultats concordent avec les résultats obtenus lors de l'évaluation de la linéarité de la méthode qui s'était également avérés être meilleurs avec l'approche utilisant le peptide marqué. Ce constat n'est pas étonnant en considérant la difficulté que nous

avons eu à obtenir une protéolyse efficace avec le trastuzumab. Le manque de répétabilité dans les concentrations mesurées en utilisant l'approche d'étalonnage mAbIS en est sûrement une conséquence.

Par conséquent, les essais de répétabilité inter-journaliers et la suite de la validation analytique n'a été menée qu'avec l'approche d'étalonnage utilisant le SIL-peptide.

## 2. Répétabilité inter-journalière

**Tableau XVIII : Exactitude et précision inter-journalière des concentrations en bevacizumab calculées avec la stratégie d'étalonnage interne SIL-peptide.**

Jour	Echantillon	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>FFSLDTSK</b> (µg/mL)	Concentration calculée avec le peptide <b>STAYLQMNSLR</b> (µg/mL)
J1	QC1-a	40	39	35
	QC1-b	40	41	40
	QC1-c	40	44	41
	QC1-d	40	44	37
	QC1-e	40	42	39
	QC1-f	40	40	39
J2	QC1-a	40	41	40
	QC1-b	40	41	39
	QC1-c	40	40	41
	QC1-d	40	48	40
	QC1-e	40	47	42
	QC1-f	40	49	41
J3	QC1-a	40	38	37
	QC1-b	40	41	40
	QC1-c	40	41	37
	QC1-d	40	40	43
	QC1-e	40	42	44
	QC1-f	40	42	50
J4	QC1-a	40	37	40
	QC1-b	40	41	55
	QC1-c	40	34	46
	QC1-d	40	35	44
	QC1-e	40	33	42
	QC1-f	40	38	52
Exactitude % (n=24)			<b>101.7</b>	<b>104.6</b>
Précision CV% (n=24)			<b>9.9</b>	<b>11.3</b>
J1	QC2-a	200	194	171
	QC2-b	200	208	160
	QC2-c	200	223	184
	QC2-d	200	200	154
	QC2-e	200	219	198
	QC2-f	200	225	184
J2	QC2-a	200	230	222
	QC2-b	200	223	244
	QC2-c	200	244	219
	QC2-d	200	237	247
	QC2-e	200	229	177
	QC2-f	200	229	187
J3	QC2-a	200	225	226
	QC2-b	200	218	205
	QC2-c	200	208	195
	QC2-d	200	201	261
	QC2-e	200	234	258
	QC2-f	200	234	237
J4	QC2-a	200	190	233
	QC2-b	200	171	175
	QC2-c	200	219	218
	QC2-d	200	231	271
	QC2-e	200	235	285
	QC2-f	200	237	317
Exactitude % (n=6)			<b>109.7</b>	<b>108.9</b>
Précision CV% (n=6)			<b>8.1</b>	<b>19.2</b>
J1	QC3-a	400	373	355
	QC3-b	400	461	456
	QC3-c	400	415	427
	QC3-d	400	418	377
	QC3-e	400	484	456
	QC3-f	400	434	434
J2	QC3-a	400	441	400
	QC3-b	400	480	324
	QC3-c	400	494	442
	QC3-d	400	429	365
	QC3-e	400	454	343
	QC3-f	400	465	443
J3	QC3-a	400	406	394
	QC3-b	400	438	446
	QC3-c	400	440	390
	QC3-d	400	445	423
	QC3-e	400	463	448
	QC3-f	400	436	444
J4	QC3-a	400	402	485
	QC3-b	400	451	611
	QC3-c	400	488	550
	QC3-d	400	390	477
	QC3-e	400	460	563
	QC3-f	400	452	541
Exactitude % (n=6)			<b>110.6</b>	<b>110.4</b>
Précision CV% (n=6)			<b>7.0</b>	<b>16.2</b>

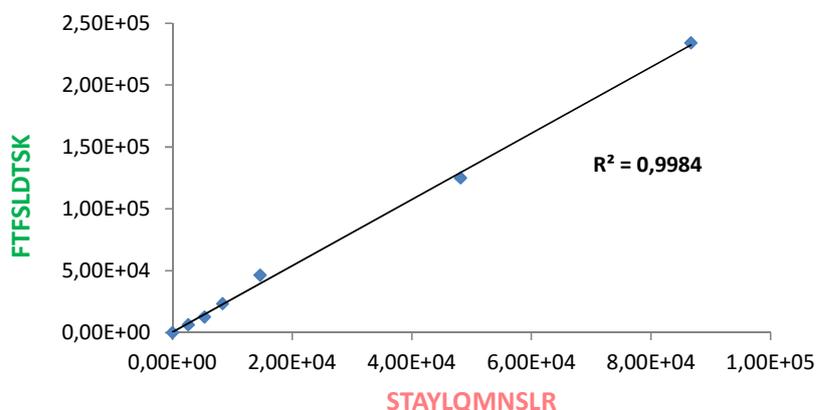
Avec l'approche d'étalonnage SIL-peptide lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> l'exactitude est comprise entre 101,7 et 110,6 % et entre 104,6 et 110,4 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. La précision évaluée par le CV est comprise entre 7,0 et 9,9 % lorsque la quantification est basée sur le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et entre 11,3 et 19,2 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>.

Pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> l'exactitude et la précision sont comprises dans les intervalles de valeurs recommandées par la FDA. En revanche, pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> le coefficient de variation est au delà des 15 % recommandés par la FDA. En considérant l'hypothèse précédemment évoquée d'une adsorption sur les parois du peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>, l'utilisation d'un SIL-peptide de séquence identique à ce dernier aurait sûrement été judicieuse et présenterait une alternative intéressante à évaluer. En effet elle permettrait de prendre en compte également sur ce peptide les phénomènes d'adsorption, de dégradation chimique et de suppression d'ionisation en source (même séquence, même temps de rétention chromatographique).

Au regard des résultats obtenus au cours des essais de répétabilité inter-journaliers, la quantification du bevacizumab à partir du ratio « ASC <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> / ASC <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> » est retenue pour la quantification du bevacizumab puisqu'elle garantit une plus grande fiabilité dans les concentrations mesurées par comparaison au ratio « ASC <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> / ASC <sup>68</sup>FTFSLDTSK\*<sup>76</sup> ». La présence des deux peptides est néanmoins nécessaire à l'identification du bevacizumab. Le second peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> peut être choisi afin de confirmer l'information donnée par le premier peptide. Puisque ce dernier fournit un signal suffisamment intense avec une linéarité et une répétabilité relativement bonne, il est un bon candidat pour une confirmation. De plus, sa spécificité pour le bevacizumab au regard des autres protéines plasmatiques et du trastuzumab a également été prouvée.

Les deux peptides étant issus d'une même protéine, le rapport entre les aires des deux peptides doit être le même quelle que soit la concentration en bevacizumab au sein de la gamme de concentrations étudiée (12,5 à 500 µg/mL). On doit obtenir une bonne corrélation entre les aires de chaque peptide puisque l'identification du bevacizumab est basée sur la proportionnalité entre les aires de ces deux peptides détectés. Ces comparaisons d'aires entre chaque peptide sont présentées figure 79. Pour chaque peptide, l'aire représentée correspond à celle des transitions SRM les

plus intenses. Une droite de régression linéaire est tracée et le coefficient de corrélation  $r^2$  associé au modèle est affiché.

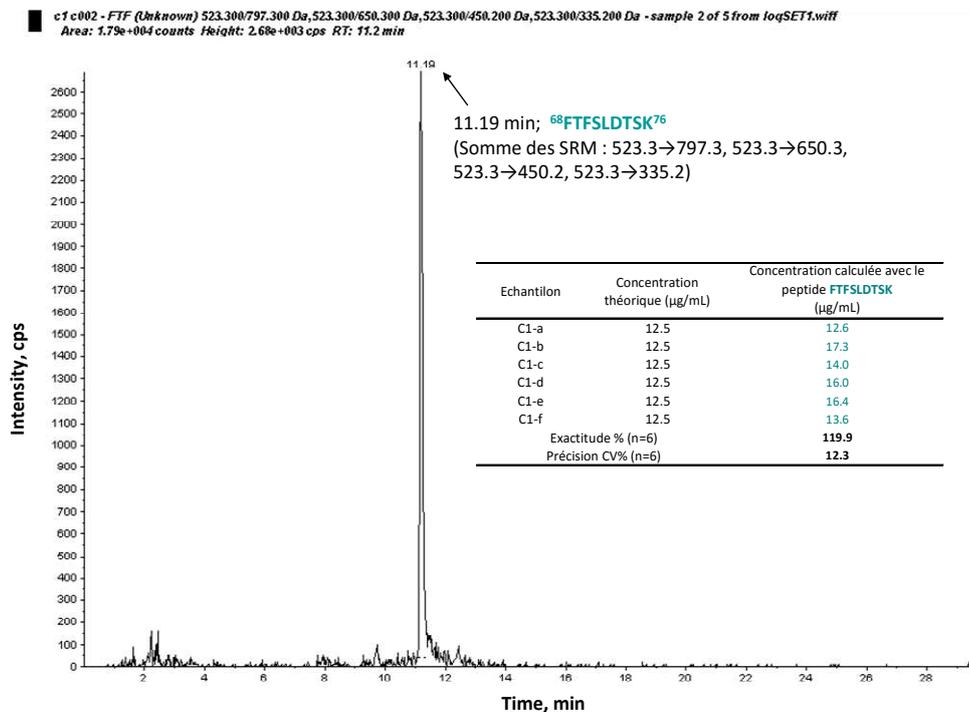


**Figure n° 79 : Corrélation entre les deux peptides du bevacizumab dans la gamme de concentration en bevacizumab étudiée (12,5 µg/mL à 500 µg/mL).**

Cette analyse montre qu'il existe une relation linéaire entre les deux peptides du bevacizumab quel que soit la concentration en bevacizumab puisque le coefficient de corrélation est supérieur à 0,99. Par ailleurs, le rapport moyen ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  / ASC  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  sur les quatre jours de la validation inter-journalière se situe autour de  $2,8 \pm 0,5$  (CV = 18,8 %). Un rapport de proportionnalité entre les ASCs des deux peptides du bevacizumab compris dans cet intervalle permet d'identifier le bevacizumab et de confirmer les résultats de quantification obtenus à partir du ratio ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  / ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ .

#### **D. Détermination de la limite de quantification**

La limite de quantification (LOQ) est plus évaluée sur le ratio ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  / ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  en analysant six duplicats d'échantillons chargés en bevacizumab à une concentration de 12,5 µg/mL. Conformément aux recommandations de la FDA, l'écart relatif sur les concentrations mesurées (CV %) pour la limite de quantification doit être inférieur à 20 %. Le pic de chromatographie d'un des six échantillons analysés et le CV % qui y est associé sont présentés dans la figure 80.



**Figure n° 80 : Chromatogramme de masse et exactitude/précision obtenus à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) d'échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab à la limite de quantification (LOQ) de 12.5 µg/mL (n = 6).**

A la concentration de 12,5 µg/mL le CV obtenu est de 12,3 % cependant l'exactitude est de 119,9 %. Aucune valeur limite pour l'exactitude n'est précisée dans les recommandations de la FDA. Cependant en admettant un seuil d'acceptation comparable à celui préconisé pour l'écart relatif de la LOQ (20 %), une concentration en bevacizumab de 12,5 µg/mL est proche de la LOQ. Par ailleurs en considérant la définition graphique de la LOQ (concentration donnant un rapport signal sur bruit de fond de 10 sur le chromatogramme), avec un rapport signal sur bruit de l'ordre de 13, une concentration en bevacizumab de l'ordre de 12,5 µg/mL est sensiblement comparable à la LOQ définie graphiquement.

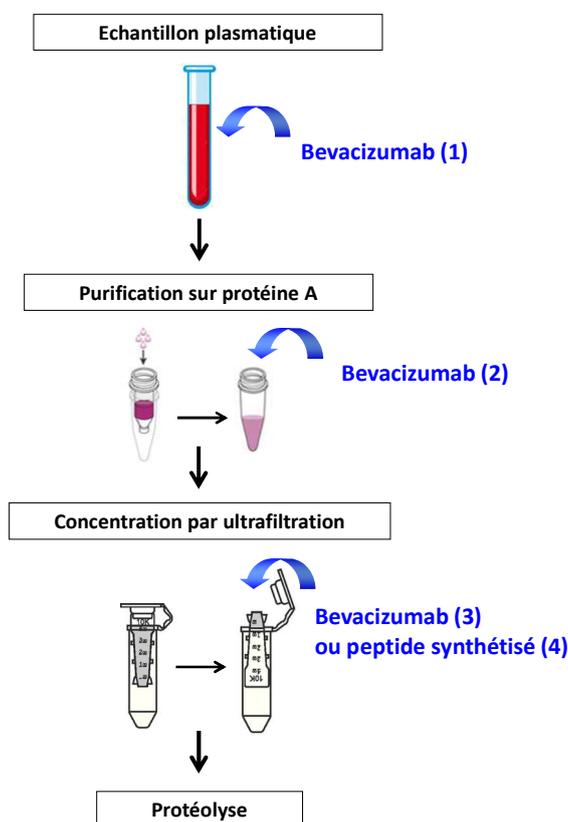
## **E. Rendement des différentes étapes de traitement des échantillons**

De façon à évaluer la perte de bevacizumab au regard des différentes étapes du traitement des échantillons, le rendement de chacune d'elles est évalué en comparant les ratios des aires « ASC <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> / ASC <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>\*76</sup> » d'échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab aux différents temps du traitement de l'échantillon. Ainsi le bevacizumab est soumis (1) à la procédure de purification par protéine A suivie de la concentration par ultrafiltration et de la

protéolyse ou (2) à l'étape de concentration par ultrafiltration et à la protéolyse ou (3) à la protéolyse seule.

Le rendement de la purification sur protéine A est évalué en comparant le ratio des aires obtenues dans la condition (1) par comparaison avec la condition (2). Le rendement de la concentration par ultrafiltration a été évalué en comparant le ratio des aires obtenu dans la condition (2) par comparaison avec la condition (3).

Le rendement de la protéolyse est évalué pour les deux peptides du bevacizumab en comparant les ratios des aires « ASC peptide d'intérêt / ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  » obtenus dans la condition (3) par comparaison avec des échantillons plasmatiques non chargés en bevacizumab et chargés en solution pure de peptide synthétisé juste avant la protéolyse (condition 4 sur la figure 81). La figure 81 reprend la méthodologie utilisée pour la détermination des différents rendements.



**Figure n° 81 : Représentation schématique de la méthodologie du calcul du rendement des différentes étapes du traitement d'un échantillon plasmatique.**

Notons que la quantité de bevacizumab (ou de solution pure de peptide) ajoutée est calculée de façon à ce que la concentration en bevacizumab (ou en peptide) soit identique dans les conditions comparées. Chaque condition est testée sur trois duplicats. Les résultats obtenus à l'issue de ces analyses sont reportés dans

le tableau XIX. Le rendement est exprimé en pourcentage de bevacizumab récupéré  $\pm$  écart type (n = 3) par rapport à la condition contrôle. Le rendement de la protéolyse est exprimé en pourcentage de peptides générés  $\pm$  écart type (n = 3).

**Tableau XIX : Rendement des différentes étapes du traitement des échantillons plasmatiques chargés en bevacizumab.**

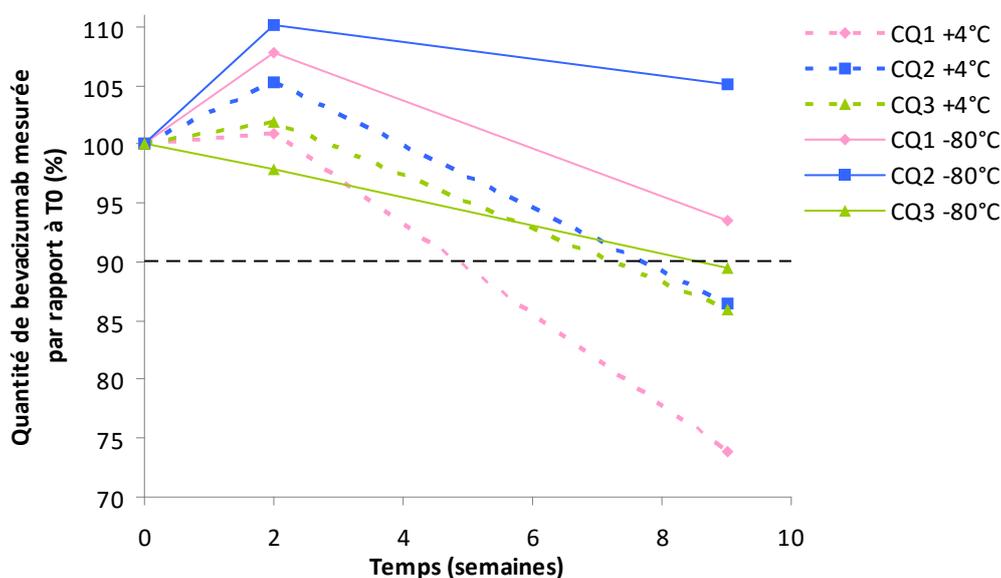
Etape	Rendement (%)	
	Moyenne	CV(%)
1) Purification sur protéine A	<b>84,3 <math>\pm</math> 4.6</b>	5,5
2) Concentration par Ultra-filtration	<b>92.0 <math>\pm</math> 9.2</b>	10.0
3) Protéolyse	<b>FTFSLDTSK</b>	1,2
	<b>STAYLQMNSLR</b>	0,8

Le rendement moyen est estimé à 84,3 % et 92,0 % respectivement pour l'étape de purification par protéine A et de concentration par ultrafiltration. Le coefficient de variation évalué à partir de trois échantillons est inférieur à 15 % pour les deux étapes. Il n'y a pas réellement de valeur limite, mais il est quand-même préférable d'avoir des rendements corrects (50 à 60 % au moins) : un rendement trop faible démontre que la technique n'est pas adaptée, ce qui rend la méthode trop peu sensible, et augmente la variabilité. Les valeurs obtenues de rendement et de variabilité sont par conséquent tout à fait satisfaisantes.

Pour ce qui est de la protéolyse, le rendement moyen est estimé à 47,7 % pour le peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> et à 47,3 % pour le peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. Là encore il n'existe pas de valeur à atteindre cependant la protéolyse doit être la plus complète possible (absence de clivages manqués) afin d'assurer une sensibilité et une répétabilité dans les mesures suffisante. Il est rare de trouver une estimation du rendement de la protéolyse dans les méthodes relatives à la quantification des mAbs par spectrométrie de masse précédemment publiées. Bien qu'un rendement plus élevé permettrait d'atteindre un seuil de quantification plus bas, notre méthode de quantification a fait ses preuves au regard des performances analytiques attendues : spécificité, sensibilité, linéarité et fiabilité (exactitude et précision). Etant donné la multitude de paramètres pouvant influencer la protéolyse d'une protéine un rendement supérieur semble néanmoins difficile à atteindre.

## F. Stabilité des échantillons plasmatiques

La validation analytique d'une méthode de dosage en vue d'une application en clinique prévoit d'évaluer la stabilité de la molécule d'intérêt dans la matrice biologique étudiée. Nous avons donc évalué la stabilité du bevacizumab dans le plasma humain afin de définir les conditions de stockage des échantillons plasmatiques au cours d'une étude clinique. La stabilité du bevacizumab dans le plasma est étudiée aux trois concentrations de CQ (40, 200 et 400 µg/mL) afin de couvrir la majorité des concentrations attendues en thérapeutiques. L'étude a été conduite sur trois duplicats pour chaque CQ et les échantillons sont analysés à T0, après deux semaines et après 9 semaines de conservation à +4°C ou à -80°C. Les résultats sont présentés figure 82 et sont exprimés en pourcentage moyen de bevacizumab détecté par rapport au temps zéro. La quantité de bevacizumab est calculée à partir du ratio  $ASC^{68FTFSLDTSK^{76}} / ASC^{68FTFSLDTSK^{*76}}$  puisque qu'il s'agit de la stratégie de quantification fournissant les résultats les plus fiables.



**Figure n° 82 : Stabilité du bevacizumab en milieu plasmatique évaluée à travers le ratio  $ASC^{68FTFSLDTSK^{76}} / ASC^{68FTFSLDTSK^{*76}}$  après conservation d'échantillons plasmatiques à +4°C (droites en pointillées) et à -80°C (droites pleines).**

En admettant une variabilité des mesures de l'ordre 10 % (écart relatif maximum obtenu au cours des essais de répétabilité inter-journaliers), une diminution de moins de 10 % est considérée comme non significative (valeur limite

correspondant à 90 % de bevacizumab restant, matérialisée en pointillé noire sur la figure 82).

Au bout deux semaines on n'observe pas de diminution significative dans la quantité de bevacizumab mesurée pour les deux conditions testées. En revanche au bout de 9 semaines de conservation, on observe une diminution significative dans la quantité de bevacizumab mesurée lorsque les échantillons plasmatiques sont conservés à +4°C avec une quantité de bevacizumab restante par rapport au temps zéro comprise entre 73,8 et 85,9 %.

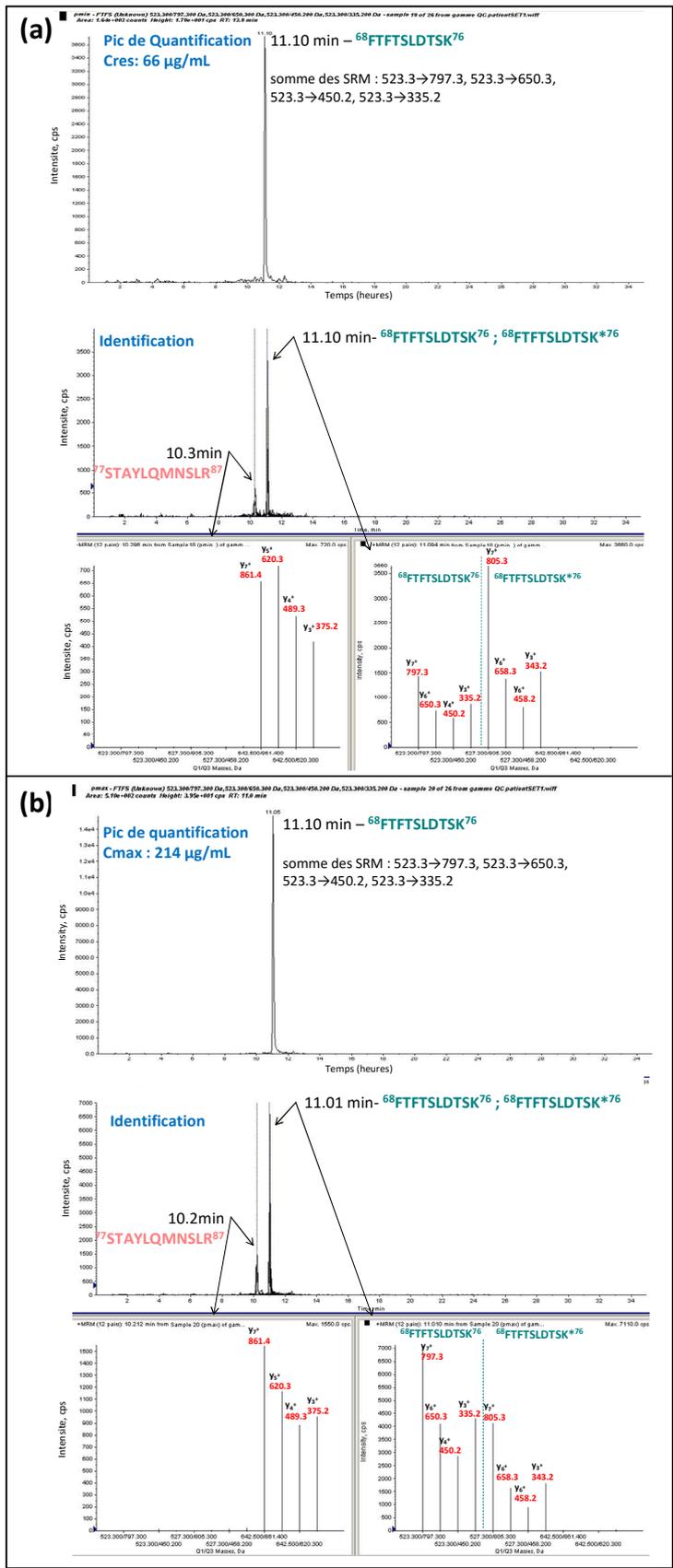
Considérant la valeur limite de 90 %, les échantillons plasmatiques sont considérés stables au regard de notre méthode de quantification du bevacizumab pendant deux semaines à +4°C et 9 semaines à -80°C.

## **G. Application de notre méthode de quantification**

La méthode de quantification du bevacizumab en milieu plasmatique est développée dans le but de réaliser des études pharmacocinétiques chez l'homme portant sur la fraction plasmatique totale. Dans ce contexte nous nous sommes assurés par un essai de faisabilité que notre méthode nous permettait de doser le bevacizumab dans un plasma issu d'un patient traité par bevacizumab dans le cadre d'un cancer colorectal métastatique.

Nous avons recueilli deux prélèvements sanguins l'un juste avant l'administration de bevacizumab (concentration plasmatique résiduelle ou Cres) et l'autre 30 minutes après la fin de la perfusion de bevacizumab (pic de concentration plasmatique en bevacizumab ou Cmax) auprès d'un patient traité à une posologie de 7,5 mg/kg de bevacizumab par voie intraveineuse toutes les trois semaines. Les prélèvements ont été réalisés qu'après avoir obtenu le consentement libre et éclairé du patient.

Les échantillons plasmatiques du patient sont directement analysés selon les conditions de traitement des échantillons, de chromatographie et de détection en spectrométrie de masse précédemment validées. Le bevacizumab est à partir du ratio  $ASC^{68FTFSLDTSK^{76}} / ASC^{68FTFSLDTSK^{*76}}$  à l'aide d'une droite de calibration allant de 12,5 à 500 µg/mL de bevacizumab. Les chromatogrammes de masse obtenus à l'issue de l'analyse de ces échantillons sont présentés sur la figure 83 avec la concentration mesurée en bevacizumab associée.



**Figure n° 83 : Chromatogrammes de masses obtenus à l'issue de l'analyse MS/MS (MRM) par LC-ESI-QqQ d'échantillons plasmatiques provenant d'un patient traité par bevacizumab et correspondant à une concentration basse (Cres-a) et à une concentration haute (Cmax-b) en bevacizumab.**

La concentration en bevacizumab mesurée à partir du ratio ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  / ASC  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  dans les échantillons est de 214,0 µg/mL et 66,3 µg/mL respectivement pour la concentration maximale et la concentration résiduelle. Le bevacizumab est identifié par la présence des deux peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  à un ratio des aires entre les deux peptides ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}/^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ) de 3,29 et 2,76 respectivement pour la concentration basse et la concentration haute.

Cette étude de faisabilité nous permet de confirmer que la méthode développée est applicable à la pratique clinique. Les concentrations mesurées chez ce patient sont du même ordre de grandeur que celles mesurées à l'issue des précédentes études pharmacocinétiques menées utilisant une technique ELISA pour quantifier le bevacizumab.

Reste à appliquer notre méthode de quantification à des études pharmacocinétiques de population sur une cohorte de patients traités par bevacizumab par comparaison avec la technique ELISA afin de définir qu'elle est la technique la plus appropriée à la quantification en milieu plasmatiques des mAbs dont la cible pharmacologique est circulante.



## **CHAPITRE 5**

### **DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

# **CHAPITRE 5**

## **DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

### **I. Discussion-Conclusion**

#### **A. Le contexte et les enjeux**

Depuis plusieurs décennies les anticorps monoclonaux ont connu un essor considérable. Cependant pour la majorité d'entre eux les relations dose-concentration et concentration-effet restent mal connues. La quantification des anticorps monoclonaux par une méthode permettant d'accéder avec une grande précision et une bonne reproductibilité aux concentrations attendues en thérapeutique dans la matrice biologique étudiée est un pré-requis essentiel pour le développement d'études de pharmacocinétique et pharmacocinétique-pharmacodynamique.

Les techniques d'immunodosage de type ELISA ne dosant que la fraction libre (non liée à sa cible) des anticorps thérapeutiques jusqu'alors utilisées, présentent plusieurs limites déjà précédemment évoquées pouvant compromettre la fiabilité des résultats notamment pour les anticorps dont la cible pharmacologique est circulante, et aboutir à une interprétation pharmacocinétique erronée.

Dans ce contexte la quantification des anticorps monoclonaux par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) couplée à la chromatographie liquide est une alternative intéressante étant donné sa spécificité, sa sensibilité et sa fiabilité pour effectuer des mesures de concentrations. Plusieurs techniques de quantification des anticorps monoclonaux faisant appel la spectrométrie de masse dans des matrices biologiques ont par ailleurs étaient développées confirmant les performances analytiques de cette technique.

Cependant, doser des protéines médicaments est en soi une tâche assez délicate dans la mesure où ces protéines sont souvent retrouvées à des faibles concentrations et cela d'autant plus que les matrices biologiques sont complexes. De plus une autre difficulté est liée à la taille de ces molécules qui ne permet pas de les doser sous leur forme entière. En effet, la masse moléculaire des anticorps est telle que les phénomènes d'ionisation de type électrospray aboutissent à la formation

d'une distribution d'états de charges compliquant l'analyse, la rendant moins sensible et moins reproductible. La solution apportée est donc de baser la quantification sur des peptides issus de la protéolyse enzymatique de l'anticorps. En divisant par 100, la taille de la molécule analysée le profil d'état de charge passe de plusieurs dizaines à un, deux voire trois états de charge.

## **B. Les ambitions et l'originalité du projet**

L'objectif de ce travail était de développer une méthode de quantification d'un anticorps monoclonal, le bevacizumab, portant sur la fraction plasmatique totale (libre et liée à sa cible circulante) et qui soit facilement transposable à la plupart des anticorps monoclonaux avec un temps de développement le plus court possible.

A travers ces travaux, nous souhaitons également mettre en évidence les points cruciaux nécessitant une optimisation particulière lors de la transposition de notre méthode à d'autres anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Il fallait également s'assurer que notre méthode fasse les preuves de ses performances en matière de sensibilité, de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de spécificité, de rapidité, et de limitation du nombre d'étapes afin de minimiser les pertes de protéines à doser, et également de coût par rapport aux techniques ELISA existantes.

## **C. La méthode de quantification développée**

### **1. Stratégie de la méthode et transposition aux autres anticorps monoclonaux**

- ***1<sup>ère</sup> étape du traitement de l'échantillon : simplification de l'échantillon plasmatique***

Les précédentes études portant sur la quantification des anticorps monoclonaux ont utilisés différentes techniques de purification des échantillons telles que la déplétion en albumine, la précipitation des protéine par des solvants organiques (la protéolyse se faisant alors sur le culot protéique), l'immunocapture basée sur le site de reconnaissance antigénique, la capture des anticorps par affinité pour les protéines A et/ou G, ou même une purification post-protéolyse par extraction sur phase solide bidimensionnelle (conjuguant une extraction utilisant l'hydrophobicité

des peptides, suivie d'une extraction par échange de cations). Tous ces exemples reflètent les différentes possibilités analytiques qui s'offraient à nous. L'approche que nous avons choisie pour la simplification des échantillons est réalisée avant l'étape de protéolyse et consiste en l'extraction des IgGs du plasma à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur protéine A. L'avantage de ce système est double puisqu'il permet de conserver la fraction totale du bevacizumab plasmatique et qu'il revêt un caractère universel vis-à-vis de l'ensemble des anticorps monoclonaux de type IgG en solution dans le plasma. La condition étant pour l'anticorps à doser de présenter dans sa structure un fragment Fc d'IgG humaine. Nous avons démontré que cette technique permettait d'extraire non seulement le bevacizumab mais aussi un autre anticorps monoclonal de type IgG le trastuzumab avec un rendement évalué pour le bevacizumab de l'ordre de 84,3 % ( $\pm 4,6$ ).

- ***2<sup>ème</sup> étape du traitement de l'échantillon : concentration et échange de tampon***

L'échantillon purifié est ensuite concentré sur membrane ultra-filtrante (Amicon® 100 KDa). Cette étape nous a permis de gagner en sensibilité en concentrant d'un facteur 12 notre échantillon. Elle offre également la possibilité de placer l'échantillon dans des conditions optimales de pH pour la protéolyse trypsique. A travers le rendement de 92,0 % ( $\pm 9,2$ ) obtenu pour le bevacizumab, nous avons montré que les techniques de concentration simples et rapides par centrifugation impliquant une membrane semi-perméable conduisaient à une perte mineure des anticorps monoclonaux par adsorption sur la membrane.

- ***3<sup>ème</sup> étape du traitement de l'échantillon : protéolyse***

Cette étape est indispensable au dosage des anticorps monoclonaux par spectrométrie de masse. L'enzyme utilisée est la trypsine. Une attention particulière doit être accordée à cette étape lors de la transposition de notre méthode à d'autres anticorps. Comme en témoignent les expériences que nous avons menées lors de son optimisation, l'étape de protéolyse trypsique revêt un caractère protéine dépendant et nécessite une optimisation rigoureuse. Nos travaux ont permis de mettre en exergue les paramètres cruciaux à considérer pour augmenter l'efficacité de la protéolyse et garantir une sensibilité suffisante et une bonne reproductibilité dans les concentrations mesurées :

1. L'importance de la qualité de la trypsine utilisée :

Bien que son coût soit élevé, une trypsine traitée au TPCK et résistant mieux à l'auto-trypsinolyse, telle que la trypsine Gold commercialisée par la société Promega® garantit une meilleure efficacité et une meilleure répétabilité de la protéolyse. Dans le cas de la transposition de notre stratégie à un autre anticorps monoclonal, l'utilisation d'une trypsine de haute qualité doit être privilégiée.

2. Le recours à une étape de dénaturation par l'urée n'est pas obligatoire :

Le gain dans la quantité de peptides générés par l'addition d'urée ne compense pas le facteur de dilution appliqué aux échantillons engendré par la dilution qui est nécessaire pour ramener la concentration en urée à au moins 2 M avant l'ajout de la trypsine. Cette étape fait donc baisser la sensibilité de la méthode sans pour autant améliorer significativement la reproductibilité de la protéolyse.

3. Le temps d'incubation trypsique peut influencer la quantité de peptides détectée :

Comme en témoignent les résultats obtenus pour le bevacizumab et le trastuzumab, certaines protéines nécessitent une incubation trypsique plus longue que d'autres pour atteindre la quantité maximale de peptides générés (durée estimée à 8 heures pour le bevacizumab et au-delà de 12 heures pour le trastuzumab avec une incubation à 37°C sans agitation par ultrasons). En plus d'allonger considérablement la durée consacrée au traitement d'un échantillon, un temps d'incubation trop long peut également avoir un effet néfaste sur la quantité de peptides détectée pouvant être lié à un phénomène d'adsorption des peptides sur les matériaux constituant les parois des tubes utilisés. Ainsi le temps d'incubation trypsique est un paramètre à optimiser individuellement pour chaque nouvel anticorps monoclonal à doser par spectrométrie de masse.

• **4<sup>ème</sup> étape analyse et quantification par LC-MS/MS**

L'analyse des échantillons est réalisée par LC-MS/MS sur un système de spectrométrie de masse en mode MRM couplé à la chromatographie liquide de type HPLC-ESI-QqQ. Les phases mobiles utilisées pour la chromatographie sont des

phases couramment employées en LC-MS/MS : eau/acide formique 100/0,1 (v/v) (A) et acétonitrile/Acide formique 100/0,1 (v/v) (B) selon un gradient de phase mobile consistant à faire passer de 90 à 10 % la proportion de phase mobile A en 10 minutes puis de revenir à 90 % de phase A en 10 minutes après un plateau de 10 minutes passées à 90% de phase A. La quantification absolue du bevacizumab est réalisée à l'aide d'une droite de calibration en se basant sur le ratio des aires du peptide du bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et du peptide marqué  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  utilisé comme étalon interne. L'identification du bevacizumab est basée sur la présence des deux peptides spécifiques du bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  avec un ratio des aires des pics des deux peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76} / ^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  de l'ordre de  $2,8 \pm 0,5$ . Au cours de ces travaux nous avons mis en évidence deux éléments clés du dosage : le choix du ou des peptides à partir du ou desquels l'anticorps est dosé et le type d'étalon interne utilisé.

La spécificité de la méthode est conférée par le mode MRM et dépend des peptides choisis. La recherche de peptides uniques et spécifiques de l'anticorps à quantifier est une étape clé du développement de notre méthode et devra être réalisée pour chaque nouvel anticorps à doser. La recherche de tels peptides est orientée vers les régions connues pour leur variabilité au sein de l'anticorps, ce qui a été montré pour le bevacizumab et le trastuzumab, à travers le choix des peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  et du peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ . Outre leur spécificité, un autre paramètre important à prendre en compte dans la sélection des peptides candidats à la quantification est l'intensité du signal généré par spectrométrie duquel dépendra la sensibilité de la méthode. La méthodologie que nous avons appliquée pour l'identification des peptides spécifiques et leur sélection a déjà fait ses preuves au cours des précédentes méthodes publiées pour quantifier les anticorps monoclonaux dans des matrices biologiques. Elle est par conséquent la méthode de référence à utiliser.

Néanmoins au regard du caractère imprévisible de la réponse des peptides en spectrométrie de masse et de leur comportement vis-à-vis de l'étape de protéolyse, il convient de sélectionner en amont plusieurs peptides spécifiques candidats à la quantification au cours du développement afin d'augmenter les chances d'obtenir au moins un peptide présentant toutes les caractéristiques attendues :

- un signal en spectrométrie de masse suffisamment intense pour atteindre les concentrations attendues en thérapeutique

- une bonne corrélation entre le signal mesuré et la concentration en anticorps contenue dans l'échantillon
- une faible variabilité du signal généré pour garantir la fiabilité de la méthode

Le second élément clé du dosage porte sur le type de standard interne utilisé. En effet le suivi simultané de plusieurs molécules dans un même échantillon est un des avantages de la spectrométrie de masse par rapport aux immunodosages. Le choix de ces molécules est crucial car il permet de compenser les variations apportées par les traitements et/ou au cours de l'analyse par LC-MS/MS. De sa nature dépendra le nombre d'étapes qu'il suivra de la même manière que l'anticorps à doser. Nous avons donc comparé au cours de nos travaux les deux types d'étalons internes les plus couramment employés au cours des précédentes méthodes développées pour la quantification des anticorps monoclonaux thérapeutiques par spectrométrie de masse, à savoir une protéine analogue pour le premier et un peptide marqué par des isotopes stables pour le second (ce peptide ayant une séquence identique à celle du peptide signature de l'anticorps d'intérêt pour l'analyse). Théoriquement un étalon interne adapté doit contrôler l'ensemble du processus analytique depuis la première étape de traitement jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse. L'utilisation d'une protéine analogue au bevacizumab telle que le trastuzumab (anticorps monoclonal également humanisé et de type IgG), présente cet avantage. Cependant le caractère protéine dépendant de l'étape de protéolyse rend difficile la détermination de conditions de protéolyse optimales pour les deux anticorps (ratio trypsine/substrat, temps d'incubation tryptique) et peut compromettre la fiabilité des résultats comme en témoignent les résultats obtenus au cours des essais de répétabilité menés avec cette approche de quantification. De plus, le phénomène d'adsorption non spécifique sur les parois des tubes et la dégradation chimique du peptide substituant l'anticorps à doser n'est pas contrôlé par ce type d'étalon interne au même titre que l'ionisation et la fragmentation en spectrométrie de masse. Contrairement à une protéine analogue, le peptide marqué est introduit juste avant l'étape de protéolyse et ne subit pas les premières étapes du traitement de l'échantillon (purification sur protéine A et concentration sur membrane ultra-filtrante). Il n'est pas non plus protéolysé par la trypsine car ne présente pas dans sa séquence de clivages manqués par la trypsine. Cependant, cette stratégie est la mieux adaptée pour contrôler la dégradation chimique au cours de la protéolyse et durant l'analyse, ainsi que l'ionisation et la fragmentation en spectrométrie de masse. En effet, le marquage isotopique des peptides permet

d'apporter un décalage de masse moléculaire pour les peptides marqués par rapport à leurs homologues non marqués, sans en modifier les caractéristiques physico-chimiques. De plus contrairement à la stratégie utilisant une protéine analogue, le recours à un peptide marqué permet de s'affranchir de l'étape chronophage d'identification et de sélection d'un peptide spécifique de l'étalon interne protéique afin de l'identifier puisqu'il s'agit de la même séquence que celle du peptide signature de la protéine d'intérêt. L'utilisation de ce type d'étalon interne permet une transposition de notre stratégie de quantification plus simple et plus rapide puisqu'elle permet de s'affranchir de certaines étapes de mise au point fastidieuses. De plus comme le montrent les résultats obtenus lors des essais de répétabilité conduits avec un peptide marqué employé comme étalon interne, la part des différentes étapes de traitement entrant dans notre stratégie de dosage et engendrant une variabilité dans les mesures reste faible et n'altère pas la fiabilité des résultats qui respectent les normes préconisées par la FDA.

## **2. Points forts et points faibles de la méthode**

Il nous faut recenser et évaluer les performances de notre approche mais également en révéler les limites et les lacunes au regard des autres points clés évoqués au début de ce travail.

Pour ce qui concerne les points forts de la méthode, les attentes en matière de performances analytiques ont été satisfaites :

- **Sensibilité** : la limite de quantification évaluée à 12,5 µg/mL permet d'atteindre les concentrations attendues en thérapeutique. Cette limite pourrait être encore repoussée un peu plus loin en augmentant le volume d'injection.

- **Spécificité** : celle-ci est assurée par le caractère unique et spécifique des peptides détectés et par le mode MRM. Plusieurs transitions SRM pour chacun des peptides détectés sont suivies pour leur identification. L'identification du bevacizumab est basée sur la présence de deux peptides spécifiques avec un ratio des aires entre ces deux peptides compris dans un intervalle défini. Chaque peptide est identifié à partir de 6 transitions SRM.

- **Répétabilité et justesse** : en basant la quantification sur le ratio des aires du peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  et du peptide marqué  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ , et au regard des résultats obtenus au cours des essais de répétabilité inter et intra-journaliers, la méthode développée garantit une exactitude et une précision de mesure conforme aux normes préconisées par la FDA.

- Nombre d'étapes : le traitement de l'échantillon est réduit à 3 étapes toutes indispensables pour atteindre les critères de performance exigés en termes de sensibilité. Au regard du rendement obtenu pour le bevacizumab à l'issue des deux étapes en amont de la protéolyse (supérieur à 80 % pour chacune des étapes) ces dernières n'entraînent pas de perte considérable de la protéine à doser.

- Volume de plasma nécessaire : la méthode développée requiert un faible volume de plasma (55 µL).

- Transposition de la méthode : au regard de la stratégie de purification et de concentration des échantillons choisis, la méthode développée laisse envisager son application à l'ensemble des anticorps monoclonaux de type IgG1 pour le dosage de leur forme totale. L'utilisation d'un peptide marqué comme étalon interne nécessite seulement d'identifier et de sélectionner au préalable les peptides spécifiques de chaque nouvel anticorps à doser avec leurs transitions peptides/fragment associées ainsi que le ratio et le temps d'incubation trypsique optimal.

Notre stratégie présente cependant quelques points faibles, dont quelques pistes pour les améliorer sont évoquées ci dessous :

- Rapidité : Près de 12 heures sont nécessaires au traitement d'un échantillon. Cette durée est essentiellement due à l'étape de protéolyse avec un temps d'incubation trypsique de 8 heures. Le recours à une incubation trypsique sous agitation par micro-ondes pourrait être testé pour en réduire la durée.

- Facilité de mise en œuvre : au maximum de ses performances, notre stratégie n'est accessible qu'aux laboratoires équipés de technologies permettant des analyses LC-MS/MS en mode MRM. Les autres étapes ne requièrent que des équipements usuels avec une difficulté de mise en œuvre très réduite.

- Robustesse : le fait que notre approche intègre une étape de protéolyse enzymatique entame sa robustesse. Cependant le passage par le stade peptide est essentiel à la sensibilité de notre approche.

- Nombre de peptides pour la quantification : il s'agit du principal point faible de notre stratégie. Le fait de pouvoir baser la quantification sur plus d'un peptide conférerait à notre méthode une meilleure fiabilité de quantification. A ce stade du développement de notre méthode un seul peptide est utilisable

pour la quantification du bevacizumab (ratio des aires des pics des peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  /  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ ) au regard des normes préconisées par la FDA vis-à-vis de l'exactitude et de la précision de la méthode, même si deux peptides ont pu être exploités. L'information donnée par le premier peptide est cependant confirmée par le second peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ . L'utilisation d'un second étalon marqué par des isotopes stables et de séquence identique au peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  serait intéressante à tester car elle permettrait de contrôler la variabilité observée sur ce peptide et certainement liée à des phénomènes d'adsorption sur les parois, de dégradation physico-chimique, d'ionisation et de la fragmentation par spectrométrie de masse. En améliorant la répétabilité sur ce peptide, la quantification du bevacizumab sur deux peptides serait alors envisageable.

- Automatisation : dans sa forme actuelle, la méthodologie n'est pas automatisée. Cependant, les étapes de protéolyse et de concentration par ultrafiltration, menées simultanément pour plusieurs échantillons, ne monopolisent pas l'opérateur. Par ailleurs, une automatisation de l'étape de purification sur protéine A ou G suivie de l'étape de protéolyse est possible à l'aide d'un automate commercialisé par la société Agilent Technologies. Cependant un tel équipement est très coûteux et ne fait pas intervenir d'étape de concentration sur membrane ultra-filtrante.

## II. Perspectives

### A. Perspectives analytiques

Notre stratégie peut être essentiellement améliorée en ce qui concerne le nombre de peptides utilisés pour la quantification du bevacizumab. Une meilleure répétabilité sur le second peptide nous aurait permis de quantifier le bevacizumab sur deux peptides. Pour cela, la meilleure solution aurait été d'utiliser le même anticorps que celui à doser, mais marqué par des isotopes stables. Cette stratégie, qui est la plus robuste pour la quantification des protéines ne soulève aucune critique puisque le produit ajouté avant la première étape de traitement du dosage contrôlera toutes les variations liées au traitement de l'échantillon (purification, concentration, protéolyse, dégradation physico-chimique des peptides) et également à l'analyse par LC-MS/MS où les peptides issus de l'étalon interne auront des séquences identiques

à celles des peptides issus de l'anticorps à quantifier contrôlant parfaitement cette dernière étape. Néanmoins, le coût et la difficulté à produire un tel étalon interne, l'utilisation d'un second peptide marqué par des isotopes stables et de séquence identique au peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> semble être une alternative intéressante et surtout plus accessible.

La méthode de dosage du bevacizumab par HPLC-MS/MS développée présente l'avantage d'être facilement transposable à d'autres anticorps monoclonaux humanisés de type IgG (à l'image du trastuzumab utilisé ici comme étalon interne). Ceci offre une alternative intéressante aux techniques ELISA pour le dosage d'autres mAbs et pour lesquels aucun kit de dosage ELISA n'est commercialisé. Les méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse offrent en effet l'avantage de ne pas dépendre du développement d'anticorps de haute affinité. Lorsque de tels anticorps sont indisponibles pour un bio-marqueur donné, la transposition de notre méthode de quantification par spectrométrie de masse à un nouvel anticorps ne nécessitera pas une mise au point lourde et fastidieuse et sera plus facile, plus rapide et d'un coût moindre que pour un immunodosage de type ELISA pour les laboratoires équipés de spectromètre de masse permettant de réaliser des analyses LC-MS/MS en mode MRM.

## **B. Applications Cliniques**

Nous envisageons d'appliquer notre méthode de dosage à une étude pharmacocinétique-pharmacodynamique du bevacizumab dans une cohorte de patients traités par bevacizumab dans le cadre d'un cancer, au travers de laquelle nous pourrions comparer notre stratégie de quantification aux techniques actuellement utilisées. Les mêmes échantillons plasmatiques seraient dosés simultanément par notre approche et par la méthode ELISA commercialisée.

Une telle étude clinique étant du ressort de la recherche biomédicale, les dispositions légales et réglementaires les encadrant font référence à la loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales (dite loi Huriot) et dont la dernière modification majeure apportée à ce dispositif résulte de la loi n° 2004-806 du 9 août 2004 de la politique de santé publique. Cette loi stipule que ce type de recherche doit être financé et ne

peut être réalisée qu'après avoir obtenu l'avis favorable d'un Comité de Protection des Personnes (CPP) et l'autorisation de l'Agence française de sécurité sanitaire.

Cette démarche a été entreprise par l'équipe au cours de mes travaux de thèse par le biais du dépôt d'un projet de recherche clinique auprès de la direction de la recherche clinique et de l'innovation (promotion CHU de Bordeaux) dans le cadre de l'Appel d'offre Interne 2014 du CHU de Bordeaux. Ce projet intitulé « Etude pilote de corrélation entre les concentrations plasmatiques du bevacizumab administré en première ligne chez les patients atteints d'un cancer colorectal-métastatique et des données d'efficacité et de tolérance » n'a malheureusement pas été retenu. D'autres demandes de financement sont en cours et nous envisageons de répondre au prochain appel d'Offre Interne du CHU de Bordeaux en tenant compte des rapports d'expertise qui ont été réalisés sur notre dossier.

Parallèlement, nous avons répondu à un second appel à projet de l'ANSM dont l'évaluation de notre dossier est en cours. Le projet que nous avons déposé dans ce contexte intitulé « Réalisation d'une investigation ancillaire de pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) dans le cadre de l'étude épidémiologique menée sur l'utilisation d'AVASTIN par voie intra-vitréenne dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) » a été élaboré en collaboration avec le service d'Ophtalmologie de l'Hôpital Pellegrin, du CHU de Bordeaux. Cette étude nous permettrait de mettre en application notre méthode de quantification et de la confronter à la méthode ELISA actuellement employée.

## **CHAPITRE 6**

### **PUBLICATIONS ET INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES**

# CHAPITRE 6

## PUBLICATIONS ET INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

### Annexe 1 : Revendications relatives à la demande de brevet

Demande de brevet intitulé *A method for quantifying Bevacizumab* déposée le 21 septembre 2015 sous le n°15 306468.8 aux noms de l'INSERM, de l'Université de Bordeaux et du CHU de Bordeaux.

#### CLAIMS

1. The use of an Internal Standard compound in a method for quantifying Bevacizumab in a sample by mass spectrometry, wherein the said Internal Standard compound is selected in a group comprising:
  - a labeled peptide selected in a group comprising the peptides of SEQ ID NO 1 (FTFSLDTSK), SEQ ID NO 2 (STAYLQMNSLR), and SEQ ID NO 3 (VLIYFTSSLHSGVPSR), and
  - a monoclonal antibody which generates upon trypsin proteolysis surrogate peptides selected in a group comprising the peptides of SEQ ID NO 4 (FTISADTSK), SEQ ID NO 5 (DTYIHWVR) and SEQ ID NO 6 (NTAYLQMNSLR).
2. The use according to claim 1, wherein the method for quantifying Bevacizumab in a sample comprises the steps of:
  - a) subjecting to trypsin proteolysis a pre-proteolysis mixture consisting of the said sample in which is present a fixed and known amount of the said Internal Standard compound, whereby an assay mixture is provided, and wherein the said assay mixture comprises
    - proteolysis peptides derived from Bevacizumab, and
    - the said labeled surrogate peptide of bevacizumab when it is used as the Internal Standard compound or proteolysis peptides derived from the said monoclonal antibody when the said monoclonal antibody is used as the Internal Standard compound,
  - b) determining by mass spectrometric analysis the ratio of (i) a selected proteolysis surrogate peptide derived from Bevacizumab to (ii) a surrogate peptide of Internal Standard selected in a group comprising (ii-a) the said labeled surrogate peptide of bevacizumab and (ii-b) a proteolysis surrogate peptide derived from the internal standard monoclonal antibody, and

c) calculating from the ratio determined at step b) the amount of Bevacizumab in the said sample by reporting the calculated ratio to a calibration curve of ratio values.

3. The use according to any one of claims 1 and 2, wherein the said Internal Standard compound is a Stable Isotope Labeled (SIL) peptide selected in a group comprising the peptides of SEQ ID N° 1 (FTFSLDTSK), SEQ ID N°2 (STAYLQMNSLR), and SEQ ID N°3 (VLIYFTSSLHSGVPSR).

4. The use according to any one of claims 1 and 2, wherein the said Internal Standard compound consists of a monoclonal antibody such as Trastuzumab.

5. The use according to any one of claims 2 to 4, wherein, at step b) of the said method, the said surrogate proteolysis peptide derived from Bevacizumab is selected in a group comprising the peptides of SEQ ID N° 1 (FTFSLDTSK), SEQ ID N°2 (STAYLQMNSLR), and SEQ ID N°3 (VLIYFTSSLHSGVPSR).

6. The use according to any one of claims 2 to 4, wherein, at step b) of the said method, the selected proteolysis surrogate peptide derived from Bevacizumab is a peptide of SEQ ID N° 1.

7. The use according to any one of claims 2 to 4; wherein, at step b) of the said method, (i) the selected proteolysis surrogate peptide derived from Bevacizumab is a peptide of SEQ ID N° 1 and (ii) the surrogate peptide of Internal Standard is a labeled peptide of SEQ ID N°1.

8. The use according to any one of claims 2 to 7, wherein, at step a) of the method, trypsin is added at a trypsin / total protein molar ratio ranging from 1/100 to 1/10, advantageously from 1/75 to 1/25 and preferably from 1/60 to 1/40.

9. The use according to any one of claims 2 to 8, wherein, at step a) of the method, trypsin is incubated during a time period ranging from 7 to 9 hours, and is preferably of about 8 hours.

10. The use according to any one of claims 1 to 9, wherein the said sample is selected in a group comprising whole blood, plasma and serum, or a sample derived therefrom.

11. The use according to any one of claims 1 to 10, wherein the said sample consists of a sample derived from a human organism.

## **Annexe 2 : Article scientifique**

Article scientifique en cours de soumission au journal *Analytical chemistry* et pas encore accepté à ce jour.

### **Title**

**A new assay method for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC-MS/MS in human serum comparing two internal standard calibration approaches**

### **Authors**

<sup>1,2,3</sup>R. Legeron<sup>†</sup>, <sup>1,2,3</sup>F. Xuereb<sup>†</sup>, <sup>4</sup>S. Chaignepain, <sup>2</sup>A.P Gadeau, <sup>4</sup>S. Claverol, <sup>4</sup>JW. Dupuy, <sup>1,2,3</sup>S. Djabarouti, <sup>1,2,3</sup>M.C. Saux, <sup>2,5</sup>T. Couffinhal, <sup>4</sup>J.M. Schmitter, <sup>1,2,3</sup>D. Breilh

<sup>1</sup>*Laboratoire de pharmacocinétique et de pharmacie clinique, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France*

<sup>2</sup>*INSERM U1034 Cardiovascular Adaptation to Ischemia, Pessac, France*

<sup>3</sup>*Pharmacie, Groupe Hospitalier Sud Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France*

<sup>4</sup>*Université de Bordeaux, UMR 5248 CNRS, Centre de Génomique Fonctionnelle, Bordeaux, France*

<sup>5</sup>*Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, Groupe Hospitalier Sud Haut-lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France*

<sup>†</sup>*Co-first authors*

**ABSTRACT:** The quantification in biological fluids of monoclonal antibodies (mAbs) such as bevacizumab, a recombinant humanized IgG1, is an essential prerequisite to any pharmacokinetic preclinical and clinical study. To date, reference techniques used to quantify mAbs, and especially bevacizumab, rely on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which lack specificity. Furthermore, the commercially available ELISA kit to quantify bevacizumab only assesses the free fraction of the drug. However, the conditions of storage and analysis of plasma samples could alter the physiological equilibrium between the free, bound and partially bound forms of bevacizumab and this could result in over- or underestimation of drug concentration. We developed a new assay for absolute quantification of total fraction of bevacizumab by an LC–MS/MS method basing identification and quantification of bevacizumab on two specific peptides. In this report we compare our assay with two internal standard (IS) calibration approaches: one using a different human mAb and the other using stable isotope labeled specific peptide as IS. After enrichment by affinity chromatography on protein A and concentration by ultrafiltration, human plasma samples were proteolyzed by trypsin. The assay was validated as

recommended by FDA guidelines. Linearity was established from 12.5 to 500 µg/mL with accuracy ranging from 101.7 to 110.6% and precision from 6.98% to 9.85%.

This study demonstrates the importance of the choice of the IS in quantifying plasma bevacizumab and indicates that our LC-MS/MS method is specific, precise and transposable to other therapeutic mAbs for pharmacokinetic studies.

## KEYWORDS

Therapeutic protein, Monoclonal antibodies (mAbs), Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), Multiple reaction monitoring (MRM), Absolute quantification, sample preparation.

## INTRODUCTION

Monoclonal antibodies (mAbs) constitute a therapeutic class which is currently undergoing the fastest rate of development in various fields of pharmaceutical biotechnology such as oncology, immunology, ophthalmology and cardiology. Among them is bevacizumab (Avastin®), a monoclonal antibody IgG1 directed against the circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) results in anti-angiogenic activity.[99] Several clinical phase II and phase III studies have shown the interest of a combination of bevacizumab with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy compared to chemotherapy alone in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC).[116, 117, 119] Bevacizumab has thus become a major drug in the therapeutic management of mCRC and also in metastatic breast cancer, non-small cell lung cancer, and kidney cancer always in combination with chemotherapy. However, although it significantly improves the therapeutic management of mCRC, it is characterized by inter-individual variability in clinical response (efficacy and safety) as seen with other mAbs whose causes remain poorly understood.[51, 58, 86] Several factors are currently being studied and among them the pharmacokinetic (PK) variability of mAbs[51, 58, 86, 186] could be a cause of response variability to treatment. Evaluation of mAb concentrations in biological fluids is an essential prerequisite for the determination of PK parameters to assess the relationship between clinical response and drug exposure and thus optimize and individualize bevacizumab treatment in cancer patients. In this context, it is necessary to develop sufficiently sensitive and specific quantification methods to ensure accurate and reliable measurement of expected therapeutic concentrations in plasma, between 75 and 270 µg/mL.

To date, reference techniques to identify and quantify mAbs and particularly bevacizumab rely on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods due to their high sensitivity and recovery[51, 58]. However ELISA methods present important limits especially in terms of reliability. Given their high sensitivity, linearity of response does not cover the full range of expected therapeutic plasma concentration. Samples therefore have to be diluted and this can lead to poorer accuracy and precision.[128, 147] In addition, the specificity of ELISA techniques can be affected by cross-reactions with other molecules present in biological matrices and this can generate false negatives or false positives.[147] Moreover, bevacizumab can be found in three different forms in the human plasma: free, bound and partially bound to its plasmatic target. The choice and the knowledge of the measured fraction are crucial to interpret the plasma concentrations and the resulting PK data. The commercial ELISA kit currently available for bevacizumab dosing in plasma only assesses the free fraction of the drug. However, it seems that storage and analysis conditions of plasma samples alter the physiological equilibrium established *in vivo* between the different plasmatic forms of mAb, resulting in over- or underestimation of the measured concentrations when quantification is conducted exclusively on free fraction.[123] An analytical method that does not

disturb the physiological equilibrium would be ideal.[120] Taking into account how difficult it is to maintain the physiological equilibrium between the different plasmatic forms of bevacizumab, we resorted to an alternative strategy to study the total plasmatic fraction of the mAb.[123] This would overcome the variability associated with *ex vivo* disruption of the *in vivo* equilibrium and result in a more reliable PK analysis.

For this purpose, we developed an analytical strategy to quantify the total fraction of bevacizumab. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), which is gaining in popularity as an analytical tool for the analysis of therapeutic proteins and proteomic biomarkers[128-131, 133, 136, 139, 187], is an ideal candidate given its high specificity, repeatability and accuracy of the measurement. Furthermore, depending on the purification method used, LC-MS/MS can quantify total plasmatic fraction of drugs. The specificity of LC-MS/MS detection is achieved through the analysis in *multiple reaction monitoring (MRM)* acquisition mode of a surrogate peptide of the protein obtained after enzymatic proteolysis of samples.[128-131, 133, 136, 139, 187] Considering the protein complexity of human plasma, the plasma sample must be purified to separate the mAb from other abundant plasma proteins to improve the sensitivity and reproducibility of the LC-MS/MS method. The choice of the purification method is crucial given that this step conditions which blood plasma fraction of the drug in question is quantified and several approaches have been used to purify samples before the proteolysis step. Yang et al.[128] and Dubois et al.[130] both used an immunocapture technique based on the recognition of the binding site of the antigen. However, the total fraction of bevacizumab in the sample cannot be quantified by this approach. Furthermore, this technique is lengthy to develop because it requires the production of an antibody with a capture system. Duan et al.[129] used a different strategy consisting of precipitating plasma proteins with an organic solvent thus conducting proteolysis on the protein pellet. Although the total bevacizumab fraction can be measured by this simple, fast and inexpensive pre-treatment, the samples obtained are not sufficiently rich in IgG and bevacizumab which damages the repeatability of the proteolysis. Another common approach involves removing the high-abundance plasma proteins from biological samples.[132] However, commercial protein depletion kits are unsuitable for measuring plasma concentrations of bevacizumab as they remove only albumin which is not sufficient, or albumin and other abundant proteins including IgGs which cannot preserve mAb IgGs before proteolysis and LC-MS/MS analysis.

Finally, given that the plasma sample pre-treatment steps and analysis by mass spectrometry can generate variability, internal calibration approaches consisting of adding a fixed and known amount of an internal standard (IS) have been developed to correct these biases and improve accuracy of the assay.[128-131, 133, 136, 139] Since MS detection of mAbs involves peptides derived from proteolysis of the protein, stable isotope labeled (SIL) surrogate peptides or a structural analogue of the intact protein are generally used as IS.[128, 130, 131, 133] One of the widely described phenomena that could lead to variability in quantification, especially in electrospray ionisation (ESI) mode, is source ion suppression caused by matrix components.[188] The degree of ion suppression may vary greatly from one matrix to another and depends largely on the chemical structure of the analyte.[188] To correct this bias, the IS should have a similar chemical structure to the analyte and should present the same characteristics in terms of chromatography retention. For this, SIL surrogate peptides are often used as a way of correcting variability resulting from ion suppression phenomenon and chemical degradation of the signature peptide. However this approach

does not take into account variations in the purification process and proteolysis. Thus, the use of an IS that would monitor all sample processing steps such as an analog of the therapeutic protein of interest emerged as another approach to consider.[128] However, structural analogs are not always available. The alternative would be to synthesize the SIL intact protein but given the complexity of the chemical structure of a protein, and the complexity of the biotechnology production process, obtaining such an internal standard is difficult, expensive and time consuming.[154]

This report presents the development and the validation of an analytical method for absolute quantification of total bevacizumab plasmatic fraction by an LC-MS/MS approach using protein A chromatography affinity – a widely used technique to purify the antibodies from various biological mixtures – to purify samples.[131, 139] Based on the high and specific affinity of protein A with the Fc region of antibodies, especially those of the IgG class, chromatography on protein A preserves the total fraction of bevacizumab in the sample before LC-MS/MS analysis. This LC-MS/MS bioassay was developed comparing two different strategies of internal calibration, one using SIL surrogate peptide and the other using another therapeutic mAb IgG (mAbIS), trastuzumab, to monitor the complete sample process.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemicals and reagents.** Bevacizumab and trastuzumab stock solutions were respectively obtained from a 25 mg/mL solution for injection (Avastin<sup>®</sup>, Roche, Basel, Switzerland) and from lyophilized powder (Herceptin<sup>®</sup>, Roche, Basel, Switzerland) reconstituted to a 21 mg/mL solution in water for injection. The solution of human IgG pooled from several healthy donors was from LFB-biomédicaments (Tegeline<sup>®</sup>, Courtaboeuf, France). SIL surrogate peptide of bevacizumab was synthesized by JPT Peptide Technologies GmbH (Volmerstrasse, Berlin, Germany) labeling lysine with <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N to obtain a sufficient mass increment relative to the unlabeled peptide (8 Dalton). Trypsin Gold, mass spectrometry grade, was purchased from Promega (Madison, WI, USA). DL-Dithiotreitol (DTT) and iodoacetamide (IAA) were from Acros organics (Geel, Belgium). The synthetic surrogate peptide of bevacizumab and mAbIS were purchased from Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm, Germany). The protein A high capacity kits were purchased from Pierce biotechnology (Nab Spin<sup>®</sup> Kits, Rockford, IL, USA). Ultracentrifugal filters with a cut-off of 100-kDa (Amicon-Ultra<sup>®</sup> 100-kDa) were obtained from Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). HPLC-MS grade acetonitrile was from Scharlau (Barcelona, Spain) and ultrapure water for HPLC was produced using a filtration system (Aquadem<sup>®</sup> EFP 310, Veolia water STI, Antony, France). Pooled human plasma used as the biological matrix was obtained from the blood of several anonymous healthy volunteers supplied by the Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin (EFSAL, Bordeaux, France) and stored at -20°C.

**Plasma sample preparation.** Sets of calibration standards used for calibration of quantitative analysis and linearity tests were obtained by diluting bevacizumab stock solution in pooled human plasma to 12.5, 25, 50, 100, 250 and 500 µg/mL to cover the expected therapeutic concentration range. The 500 µg/mL calibration point was prepared by diluting 80 µL of 5 mg/mL bevacizumab plasmatic solution (previously obtained from the bevacizumab stock solution diluted to 1/5 in human plasma) in 720 µL of human plasma. The other calibration points were then obtained by independent dilution series in human plasma from the same plasmatic stock solution at 5 mg/mL. The three quality controls (QCs) at 4, 200 and 400 µg/mL used to assess accuracy and precision of the quantification method were prepared in the same

way as the calibration points by diluting another batch of bevacizumab stock solution in pooled human plasma.

**Internal Standard preparation.** In the first internal calibration approach using mAbIS, 6.5  $\mu\text{L}$  of trastuzumab stock solution was added to 65  $\mu\text{L}$  of each plasma sample (standard, quality control or plasma patient samples) before sample treatment. In the second internal calibration approach using the SIL surrogate peptide of bevacizumab, 5  $\mu\text{L}$  of a 1.0 mg/mL SIL surrogate peptide solution was added to each plasma sample just before the proteolysis step.

**Purification on Protein A column.** IgG was purified by means of a protein A high capacity kit according to the manufacturer's protocol. Each column was conditioned by adding twice 400  $\mu\text{L}$  of binding buffer before loading them with a 55  $\mu\text{L}$  plasma sample (spiked or not with mAbIS) and then incubating them for 10 min. After three washes with 400  $\mu\text{L}$  of binding buffer (100 mM phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.2), the IgGs were eluted with 400  $\mu\text{L}$  of IgG elution buffer (pH 2.8, composition not specified by the manufacturer). This elution step was repeated twice to obtain three elution fractions which were analyzed by measuring the relative absorbance of each at 280 nm to determine which elution fraction contains the purified antibody. Measurements were performed in triplicate by the Tecan Infinite<sup>®</sup> M200 PRO microplate reader (data not shown). As most of the IgGs (more than 85%) were eluted in the first elution fraction, only this fraction was collected into a collection tube containing 40  $\mu\text{L}$  of neutralizing buffer (Tris buffer, pH 8.5).

**Sample concentration and buffer exchange by ultrafiltration.** The purified sample was placed in an Amicon Ultra<sup>®</sup> 100-kDa filter device which was then centrifuged for 10 min at 14,000xg. After discarding the filtrate, 415  $\mu\text{L}$  of 100 mM ammonium bicarbonate proteolysis buffer (pH 8) was introduced into the device and a second ultrafiltration by centrifugation was performed for 10 min at 14,000xg. To recover the concentrated IgG sample, the filter device was placed upside down in a clean microcentrifuge tube and centrifuged for 1 min at 1,000xg. This step resulted in a 15-fold concentration of the purified sample in the proteolysis buffer.

**Tryptic proteolysis.** After adding 25  $\mu\text{L}$  of proteolysis buffer to each concentrated sample, reduction step was performed by adding 5.5  $\mu\text{L}$  of DTT 100 mM (final concentration of 10 mM). Incubation time was 20 min at 55 °C. Then the alkylation step was performed by adding 6  $\mu\text{L}$  IAA 100 mM to each sample (final concentration of 10 mM). After 30 min incubation at room temperature, protected from light, 5  $\mu\text{L}$  of trypsin solution in proteolysis buffer was added to each sample (ratio trypsin/total sample proteins 1/50 mole/mole) for 8 hours of incubation at 37 °C. Trypsin proteolysis was stopped by freezing the samples. This is the optimum amount of trypsin for sufficient proteolysis of the plasma samples, avoiding missed cleavages and trypsin autolysis, in order to limit variability. These data were determined and confirmed by LC-MS/MS analysis of a purified bevacizumab plasma sample digested with an increasing ratio of trypsin.

***In silico* identification and selection of the bevacizumab and mAbIS surrogate tryptic peptides.**

In a first *in silico* study, the bevacizumab and mAbIS surrogate peptides were selected by comparing an *in silico* list of their tryptic peptides to that of human IgGs. These *in silico* lists were obtained using the query *peptide mass* on the online bioinformatics tool ExPASy[189], after entering the sequence of bevacizumab, mAbIS and human IgG in the tool. In this analysis only peptides with a mass smaller than

4000 dalton were searched so they can be detected on the mass spectrometry quantitation system. Peptides found exclusively on the bevacizumab *in silico* list on the one hand and on the mAbIS *in silico* list on the other, and not present on the human IgG *in silico* list were selected. Peptides with missed cleavage sites by trypsin were later excluded.

In a second *in silico* study, a similarity research of specificity of the previously selected peptides was performed by sequence alignment against the UniProtKB\_HUMAN database using the bioinformatics tool BLAST 2.2.29 (*Basic Local Alignment Search Tool*)[190]. Selection of the surrogate peptides for LC-MS/MS analysis took into account the BLAST score which provides statistical significance of the matches.

**Experimental identification and selection of the bevacizumab and mAbIS surrogate tryptic peptides.** In a first experimental study to confirm the uniqueness of the *in silico* selected bevacizumab and mAbIS surrogate peptides, a digest of each mAb was analyzed by LC-MS/MS on a nano-LC-ESI-LTQ orbitrap system to establish their respective experimental peptide map. The LC-MS/MS system that we used consisted of a U-3000 Ultimate nano LC system coupled to a nanospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source. 10  $\mu$ L of each protein digest were separated on an analytical 75- $\mu$ m-inner diameter x 15-cm C18 PepMap™ column (LC Packings) with a 5–40% linear gradient of solvent B (acetonitrile/water 80:20 (v/v) containing 0.1% (v/v) formic acid) for 70 min. The separation flow rate was set at 200 nL/min. Data were acquired in a data-dependent mode alternating a Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS) scan survey over the range m/z 300–1700 and six MS/MS scans in dynamic exclusion mode. The bevacizumab and mAbIS peptide signatures were identified with SEQUEST through the Bioworks 3.3.1 interface (Thermo-Finnigan, Torrance, CA, USA) by running peptides against a subset of the UniProtKB/SwissProt *Homo sapiens* database incremented by sequence of bevacizumab and mAbIS. Only b- and y-ions were considered for mass calculation and two missed trypsin cleavages were allowed. Tryptic peptides were validated using the following criteria: DeltaCN  $\geq$  0.1, Xcorr  $\geq$  1.5 (single charge), 2.0 (double charge), 2.5 (triple charge), 3.0 (Quadruple charge), and Peptide Probability  $\leq$  0.001. Proteins were validated on the condition that two different specific peptides were identified.

In a second experimental study a digest of human IgG polyvalent pharmaceutical specialty was also analysed in the same way to ensure that the previously selected specific peptides of bevacizumab and mAbIS were absent of human IgG polyvalent digest.

In a third experimental study, tryptic digest of bevacizumab and mAbIS were analyzed by the LC-ESI-QqQ system (described in the next section) used for the development of the bevacizumab quantification method in human plasma. Fragmentation of previously specific peptides identified and selected *in silico* and in the first experimental study was achieved in «*product ion scan*» mode. The selection criteria were the efficiency of peptide ionization and its MS/MS fragmentation properties to ensure sufficient intensity of the *single reaction monitoring* (SRM) transitions for optimal sensitivity.

**LC-ESI-QqQ conditions.** Bevacizumab quantification was performed on an LC-MS/MS system consisting of the Agilent 1100 HPLC Series system (Santa Clara, CA, USA) coupled to an API 3200 triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer from AB Sciex (Foster City, CA, USA) equipped with an ESI source operating in positive ion mode and using MRM mode for quantification. The LC-MS/MS system was controlled with Analyst 1.5.1 software. 20  $\mu$ L of each purified proteolyzed sample were separated on an analytical XB-C18 Aeris Peptide, 150 mm x 2.1-mm i.d., 3.6  $\mu$ m reverse phase column (Phenomenex,

Torrance, CA, USA) with an elution gradient of solvent A (water with formic acid 0.1% (v/v)) and solvent B (acetonitrile with formic acid 0.1% (v/v)) for 35 min and delivered at a flow rate of 200  $\mu$ L/min as follows (time in min/% solvent B): 0.0 min/10%; 1.0 min/10%; 10.0 min/60%; 20.0 min/10%; 30.0 min/10%. The most abundant state of charge of the bevacizumab and mAbIS signature peptides detected between  $m/z$  200 and 2000 were selected and fragmented.

SRM transitions of SIL surrogate peptide, bevacizumab and mAbIS surrogate peptides were determined after analysis of the fragmentation spectra obtained from pure solutions of synthesized peptides relative to the *in silico* fragmentation spectra generated from *MS-product* query of Protein Prospector online bioinformatics tool v 5.12.2 (University of California, San Francisco, USA). For quantitative analysis, the most intense SRM transitions were selected and summed to increase the signal-to-noise ratio and accuracy. To select these SRM transitions, six consecutive analyses were conducted on the same sample and the ratio of the peak area of each SRM transition on the sum of the peak area of the six SRM transitions monitored was determined. The selected SRM transitions have a coefficient of variation related to the ratio not exceeding 5%. Absolute quantification of bevacizumab was obtained from a calibration curve based on the peak area ratio of the bevacizumab surrogate peptide over the IS peptide (SIL surrogate peptide, or mAbIS surrogate peptide). Measured peak area corresponding to the sum of the SRM peak areas selected for quantitation. The different ionization and fragmentation parameters were optimized using the automatic tool of Analyst software (Analyst 1.5.1 software, AB Sciex) from each reference solution of the synthesized bevacizumab, mAbIS and SIL surrogate peptides. Dependent parameters of the precursor ion (DP, EP and CEP CE) were optimized for each peptide and CXP, which has an influence on the ion fragment, was optimized for each SRM transition. The optimized values of these parameters are summarized in Table 1. Other parameters were optimized by <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> infusion. IonSpray voltage was set at 5000 V and drying temperature at 300°C.

**Analytical Validation.** The assay was validated according to the Food and Drug Administration (FDA) guidelines for bioanalytical method[191] by determining linearity, accuracy, precision, specificity, sensitivity and recovery. A calibration curve was constructed from the peak area ratios (bevacizumab surrogate peptide SRM summed peak / IS SRM summed peak) obtained after LC-MS/MS analysis of the six bevacizumab calibration standards of known concentrations. Linearity between peak area ratios and bevacizumab plasmatic concentrations was assessed by determining the equation and correlation coefficient of the calibration curve. Precision and accuracy were determined after intra- and interday variability study by analyzing six replicates of each of the three QC samples every day for four days. Precision was assessed using the coefficient of variation (CV %) and accuracy using the ratio between the concentration measured on the expected concentration. Specificity of the assay was assessed by analyzing blank plasma samples versus bevacizumab plasma samples spiked or not with mAbIS or SIL IS surrogate peptide.

Recovery of each pre-treatment steps (purification on protein A and concentration by ultrafiltration) was assessed by comparing the mean peak area values obtained between blank plasma sample spiked with bevacizumab before each and blank plasma sample spiked with bevacizumab immediately after. Proteolysis recovery was achieved by comparing the mean peak area values obtained between blank plasma samples spiked with bevacizumab just before proteolysis, and blank plasma samples spiked with synthesized bevacizumab specific peptide after proteolysis at a concentration corresponding to

a recovery of 100%. To determine recovery of each step of the assay, all of these analyzes were conducted in triplicate on the lower and upper QCs (QC1 and QC3).

The quantification limit corresponds to the minimum concentration giving a coefficient of variation less than 20% obtained after the analysis of six samples per concentration tested (25, 12.5 and 10 µg/mL).

The stability of the two bevacizumab surrogate peptides (<sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>, <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>) during LC-MS/MS analysis was checked in the auto sampler at room temperature for up to 12 h. This experiment was conducted in triplicate at the three QC concentrations (QC1, QC2 and QC3) and stability was assessed by comparing the mean peak area measured at time zero with the time 2, 4, 6, 8 and 12 h

The stability of bevacizumab in human plasma was also assessed under +4°C and -80°C storage conditions for 2 months by comparing the experimental concentration obtained at each time of the stability study (1 week, 2 weeks, 2 months) with the experimental concentration obtained at time zero. This experiment was achieved in triplicate at the three QC concentrations. A decrease in concentration of less than 15% relative to time zero was considered non-significant.

## RESULT AND DISCUSSION

**Identification and selection of bevacizumab and mAbIS signature tryptic peptides.** According to the procedure describe in experimental section relative to the first *in silico* study, the comparison of the *in silico* lists of tryptic peptides of bevacizumab and mAbIS with the *in silico* list of tryptic peptides of human IgG, allowed us to determine theoretical tryptic peptides specific for each “drug antibody”. After elimination of peptides containing missed cleavages by trypsin in their sequence, eight specific tryptic peptides for bevacizumab and eight for mAbIS located in the variable regions of the antibodies were selected. The amino acid sequences of these peptides are shown in Table 2. The fact that these peptides were located in the variable region could be an additional argument to confirm their specificity, given that bevacizumab and mAbIS present more than 90% homology in their sequence with the human IgG.

To ensure specificity of the specific tryptic peptides previously selected, the second *in silico* study screening the peptides for similarity (BLAST 2.2.29) against the UniProtKB Human database allow us to exclude peptides that could be produced by trypsinolysis of proteins contained in the whole human proteome. Table 2 presents the BLAST score obtained for each specific peptide previously selected *in silico*. Peptide selection was based on the lowest identity BLAST score and on additional criteria such as the length of the amino acid sequence (from 8 to 15 amino acids) and the absence of cysteine in the sequences which can be oxidized during proteolysis. On the basis of these criteria, three interesting peptides were selected for bevacizumab: the peptide <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> with the BLAST score of 24.4 bits found, the peptide <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> with 32.9 bits and the peptide <sup>46</sup>VLIYFTSSLHSGVPSR<sup>61</sup> with 39.2 bits. Four interesting peptides were also selected for mAbIS: the peptide <sup>60</sup>YADSVEGR<sup>67</sup> with 25.2 bits, <sup>68</sup>FTISADTSK<sup>76</sup> with 25.7 bits, <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> with 29.1 bits and <sup>77</sup>NTAYLQMNSLR<sup>87</sup> with 36.3 bits

To compare these results to reality we conducted an ESI-LTQ-Orbitrap experimental analysis to establish the experimental peptide map of bevacizumab, mAbIS and human IgG, according to the procedure described in the experimental section. As reported in Table 3, for bevacizumab, 28 peptides were identified in the heavy chain (58% recovery sequence) and 11 peptides in the light chain (65% recovery sequence) including peptides with up to two missed cleavages. Among them, 12 peptides belonging to the

variable region of the antibody were specific to bevacizumab (10 belonging to the heavy chain and two to the light chain) and correspond to the experimental peptide signature of bevacizumab. All of them include modifications relative to the sequence of a human IgG in their sequence. The same strategy was applied to establish the signature peptide of mAbIS. After elimination of peptides with missed cleavages by trypsin in their sequence, six of the eight specific peptides of bevacizumab and six of the eight specific peptides of mAbIS previously selected in the first *in silico* study were identified and selected as their respective experimental signature peptide. In the same way, all the additional criteria mentioned above in the *in silico* study were considered to select among them the best peptides candidates for quantification.

In the second experimental study comparing bevacizumab and mAbIS digest with the human IgG polyvalent pharmaceutical specialty digest by nano-LC-ESI-LTQ orbitrap system, none of bevacizumab and mAbIS experimental signature peptides were found in the human IgG therapeutic digest.

In the last step of experimental selection of surrogate peptides, tryptic digests of bevacizumab and mAbIS were analyzed by the LC-ESI-QqQ system and fragmentation spectra were obtained in « *product ion scan* » mode for the best peptides candidates selected for quantification according to the selection criteria mentioned above:  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ ,  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ , and  $^{46}\text{VLIYFTSSLHSGVPSR}^{61}$  for bevacizumab and  $^{77}\text{NTAYLQMNSLR}^{87}$ ,  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ , and  $^{68}\text{FTISADTSK}^{76}$  for mAbIS. Since the two specific peptides of bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  and the specific peptide of mAbIS  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  generated the most intense SRM signal after LC-MS/MS analysis, they were selected as surrogate peptides for MRM quantification of bevacizumab and mAbIS. **LC-ESI-QqQ conditions.** SRM transitions of surrogate peptides of bevacizumab, mAbIS and SIL peptide were established after comparing the fragmentation spectra obtained from pure solutions of each of the previously synthesized selected peptides ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ ,  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ,  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  and  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ ), with *in silico* fragmentation spectra generated with MS-product query (Figure 1). Both transitions from the doubly charged  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  peptide ( $m/z$  523.3) to the six single charged y-ions, and the transitions from the doubly charged  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  peptide ( $m/z$  642.3) to the six single charged y-ions were used to unambiguously identify bevacizumab from these two signature peptides in the plasma samples (transitions 523.3→898.4 ( $y_8$ ), 523.3→797.3 ( $y_7$ ), 523.3→650.3 ( $y_6$ ), 523.3→563.2 ( $y_5$ ), 523.3→450.2 ( $y_4$ ), 523.3→335.2 ( $y_3$ ) for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  peptide and transitions 642.3→1024.5 ( $y_8$ ), 642.3→861.3 ( $y_7$ ), 642.3→748.3 ( $y_6$ ), 642.3→620.3 ( $y_5$ ), 642.3→489.3 ( $y_4$ ), 642.3→375.2 ( $y_3$ ) for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  peptide). The four most intense SRM transitions of  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  doubly charged peptides after analysis in MRM mode were summed for bevacizumab quantification to increase signal-to-noise ratio with the least variability (transitions 523.3→797.3 ( $y_7$ ), 523.3→650.3 ( $y_6$ ), 523.3→450.2 ( $y_4$ ), 523.3→335.2 ( $y_3$ ) for the doubly charged  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and transitions 642.3→861.3 ( $y_7$ ), 642.3→748.3 ( $y_6$ ), 642.3→620.3 ( $y_5$ ), 642.3→375.2 ( $y_3$ ) for the doubly charged  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ). Likewise, the four following SRM transitions 527.3→805.3 ( $y_7$ ), 527.3→658.3 ( $y_6$ ), 527.3→458.2 ( $y_4$ ), 527.3→343.2 ( $y_3$ ) and the two following SRM transitions 545.3→710.4 ( $y_5$ ), 545.3→597.3 ( $y_4$ ) for the doubly charged  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  surrogate peptide of mAbIS were summed. Under the chromatographic conditions described in the experimental section, the retention time of the two bevacizumab peptides were 10.4 min for the peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ , and 11.15 min for the peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ . The SIL IS surrogate peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  was co-eluted

with the non-labeled peptide at 11.15 min and mAbIS surrogate peptide <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> was eluted at 10.25 min (Figure 2).

**Optimization of proteolysis conditions.** In order to achieve bevacizumab therapeutic concentrations found in the plasma and also to ensure reproducibility of the assay, trypsin concentration and cleavage time were optimized. The trypsin ratio relative to the amount of substrate had to be sufficient to ensure complete proteolysis while excess trypsin could lead to trypsin autolysis. Promega trypsin was chosen for its limited self-proteolysis properties and higher ratios of trypsin were tested to find the optimal conditions for sufficient proteolysis with good repeatability. Each of the three QC samples of bevacizumab in plasma spiked with mAbIS at the same concentration were proteolyzed at three different trypsin/total protein ratios – 1/40, 1/50 and 1/60 (mole/mole) – under the conditions described in the experimental section (Figure 3). This analysis was conducted in triplicate to assess variability of the assay. Mean peak areas of <sup>68</sup>FTFSTLDTSK<sup>76</sup> peptide were slightly lower when samples were proteolyzed at the 1/40 ratio. However, for the three trypsin/total protein ratios tested, CV% was always less than 15% for the <sup>68</sup>FTFSTLDTSK<sup>76</sup> peptide. Although mean peak areas of the <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> peptide were higher when samples were proteolyzed at the 1/60 ratio, variability of the results was greater with a CV% exceeding 15% for QC2 and QC3 samples. CV% over 15% were also observed with the 1/40 ratio. However, only samples proteolyzed with the 1/50 ratio exhibited a CV% of less than 15% for the three peptides monitored. Therefore, we fixed the trypsin/total protein ratio at 1/50 (mole/mole).

To improve proteolysis efficiency we studied the effect of protein denaturation by urea. Denaturation with urea at 6 M (and brought to a concentration below 2 M just before the addition of trypsin) was tested in triplicate with blank plasma samples spiked with bevacizumab and mAbIS (QC3 samples) against a sample not treated with urea. Both experiments were subjected to the same dilution factor. Although mean peak areas were higher for the samples subjected to urea denaturation, the dilution factor necessary for this step was higher than this increase which finally decreased the sensitivity of the assay. Therefore, denaturation by urea was not used during the proteolysis step (data not shown).

To evaluate the influence of the trypsin incubation time on the formation of bevacizumab and mAbIS surrogate peptides, the mean peak area of each monitored surrogate peptide was measured after 4 h, 6 h, 8 h and 16 h of trypsin incubation. This experiment was conducted on six replicates and variability was also assessed by the CV% (Figure 4). <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> reached its maximum peak area after 6 hours of trypsin incubation, while 8 hours were required for <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup>. Formation of the <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> peptide was slower and a gradual increase was observed up to 16 h of incubation (Figure 4). Variability was greater after 6 h of proteolysis than 8 h for <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> with a CV of 10.2% at 6 h and 4.6% at 8 h while it was substantially the same for <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup> at 6 h (10.7%) or 8 h (10.8%) of trypsin incubation. However, variability (CV %) was greater at 6 h (27.0%) and 8 h (29.5%) for <sup>31</sup>DTYIHWVR<sup>38</sup> than at 16 h (21.3%). Although no condition was optimal for the three peptides, an 8 h incubation time with trypsin seems to be the best compromise since it results in the maximum concentration of <sup>68</sup>FTFSLDTSK<sup>76</sup> which is the surrogate peptide used for bevacizumab quantification (having the most intense signal with less variability). This condition gives sufficient precision (CV% less than 15%) for the two bevacizumab surrogate peptides while maintaining a sufficient amount of <sup>77</sup>STAYLQMNSLR<sup>87</sup>. The main drawbacks of the proteolysis in solution are the long proteolysis time and the risk of contamination. Use of trypsin immobilized on a support could be tested to reduce the proteolysis

time and the phenomenon of autolysis. Furthermore, enzymes could be reused and immobilized making them less sensitive to denaturing agents.

**Analytical validation and comparison of the two internal calibration approaches.** Selectivity was first checked for the two surrogate bevacizumab peptides, for the SIL surrogate peptide and for the surrogate peptide of mAbIS compared to pooled blank human plasma (Figure 5a). The absence of signal in blank human plasma at the retention time of each of the four selected peptides when their respective SRM transitions were searched, attests to their specificity for bevacizumab, SIL peptide and mAbIS respectively against endogenous plasmatic proteins.

Selectivity was then checked for the two signature peptides of bevacizumab against the proteolyzed mAbIS and SIL peptide by analysis of blank human plasma spiked with mAbIS and SIL peptide (Figure 5b). In the same way, selectivity was checked for both the mAbIS signature peptide and SIL peptide compared to respectively pooled blank human plasma spiked with bevacizumab and the SIL peptide (Figure 5c) and pooled blank human plasma spiked with mAbIS and bevacizumab (Figure 5d). For these three experiments the absence of signal at the retention time of the bevacizumab signature peptides (Figure 5b), mAbIS signature peptide (Figure 5c), and SIL peptide (Figure 5d) when their respective SRM transitions were searched, attests to their specificity against each other (Figure 5b, c, d).

To compare the two IS approaches, mAbIS and SIL peptide, we assessed linearity, accuracy and precision by intraday repeatability assays for each approach as described in the experimental section. For these two IS, linear regression was used to establish the calibration curve of the peak area ratios of the bevacizumab surrogate peptide over the IS, obtained from the analysis of the six standards by LC-ESI-QqQ, versus bevacizumab concentration (. The  $r^2$  values were 0.9904 for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and 0.9660 for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  when mAbIS was used. The  $r^2$  values were 0.9994 for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and 0.9987 for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  when the SIL peptide was used. The intraday precision of the QCs was between 8.7% and 11.7% for the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and between 8.1 % and 23.9% for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  when mAbIS was used. The intraday precision of the QCs on day 1 was between 5.49% and 8.99% for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (Table 4) and between 5.39% and 10.09% for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (Table 5) when the SIL peptide was used. Considering these preliminary results from intraday repeatability assay, we observed that the internal calibration approach using the SIL peptide provides less variability than mAbIS. Interday repeatability was therefore only assessed for the SIL peptide approach. The interday precision of the QCs was between 6.98% and 9.85% for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (Table 4) and between 11.28 % and 19.23 % for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (Table 5). Accuracy of the QCs was between 101.7% and 110.6% for the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (Table 4) and between 104.6% and 110.4% for  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (Table 5). Given these results, we opted to quantify bevacizumab with the approach using the SIL peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  as IS basing bevacizumab quantification on the peak area ratio of the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  bevacizumab surrogate peptide over the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  SIL peptide. This approach ensures sufficient precision and accuracy for bevacizumab quantification according to the FDA guidelines for bioanalytical method validation. Bevacizumab is identified by the presence of the two candidate peptides  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  showing proportionality between the generated signal and the amount of bevacizumab. The  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  bevacizumab surrogate peptide is used to confirm the quantification result obtained with the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  bevacizumab surrogate peptide. To attempt to improve interday precision for the  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  peptide, it would have been interesting to get the

SIL surrogate peptide  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87*}$  and to evaluate its use as an IS by reporting the peak area of  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  to the peak area of  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87*}$  instead of the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  SIL peptide.

Although the quantification approach using mAbIS was not retained, it could be interesting to investigate this approach with other mAbs such as chimeric antibodies (Ximab), which have less homology with endogenous IgG but contain a human Fc fragment (necessary for sufficient affinity for protein A). While the use of Ximab as IS could generate more specific tryptic peptides, it is not sure that our proteolysis conditions are optimal for such antibodies. Furthermore, the surrogate peptides of Ximab and the surrogate peptides of the mAb of interest will be different and this approach would not allow for correction of the source ion suppression phenomenon.

Finally, the best IS that could undergo all the steps of sample treatment including proteolysis and also generate similar tryptic peptides to those of the mAb of interest, is the SIL antibody. Given the difficulty of synthesizing such labeled IS, our experiments suggest that the SIL peptide approach for quantifying a mAb by mass spectrometry would be an interesting alternative.

Since  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  presents less variability in measurement than  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ , recovery of purification step on protein A and of the ultrafiltration step were determined for bevacizumab through the mean peak area of the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  surrogate peptide. According to the procedure described in experimental section, assessed recovery for protein A purification and ultrafiltration step was respectively  $84\pm 4.6\%$  (CV=5.5%) and  $92\pm 9.2\%$  (CV=10.0%). Recovery of the proteolysis step assessed for the two surrogate peptides of bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  according to the procedure described in experimental section. was  $47.7\pm 0.6\%$  (CV%=1.25 %) and  $47.3\pm 0.4\%$  (CV%=0.8 %) for  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  respectively.

**Stability study results.** The stability of bevacizumab in human plasma was assessed from bevacizumab concentration calculated from the calibration curve obtained from the peak area ratios of the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  bevacizumab surrogate peptide over the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  SIL peptide. The calculated mean concentration was compared to time zero to determine the percentage of remaining bevacizumab at each time of the stability study. After storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , the mean percentage of remaining bevacizumab was between 97.8% and 110.2% and between 89.6% and 105.2% respectively after 2 weeks and 2 months while it was between 101.0% and 105.4% and between 73.8% and 86.4% respectively after 2 weeks and 2 months of storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ . This result shows that bevacizumab human plasma samples could be stored for 2 months at  $-80^{\circ}\text{C}$  and 2 weeks at  $+4^{\circ}\text{C}$  without significant decrease in the bevacizumab concentration.

## CONCLUSION

We developed a novel HPLC-MS/MS absolute quantification method of bevacizumab in human plasma which is the first to measure the total plasmatic fraction. This is achieved through protein A purification of IgG through binding with the human Fc fragment and has the advantage of being applicable to any other therapeutic monoclonal IgG. Importantly, our method fulfils the FDA analytical requirements for bioanalytical methods and is also sufficiently sensitive for expected therapeutic concentrations in oncology with a LOQ of  $12.5\ \mu\text{g/mL}$ . The possibility of a fully automated sample treatment process including proteolysis steps, as well as the specificity, sensitivity, accuracy and precision of our method suggests it could be a useful approach for pharmacokinetic clinical studies in patients treated by bevacizumab.

Our quantification method is an alternative and complementary approach to ELISA methods that quantify free or partially free fraction of bevacizumab while maintaining a sufficient sensitivity for quantification in human plasma. Reliable quantification of the true plasmatic fraction is crucial for pharmacokinetic interpretation of the dosage of plasmatic mAbs with a circulating target. In contrast to bevacizumab, only the free fraction of mAbs with target tissue is present in plasma and the *ex vivo* disruption of physiological equilibrium between the different fractions should not impact ELISA results in this setting. However, this hypothesis needs to be verified. In future work it would be interesting to compare the results obtained with our HPLC-MS/MS technique, that assesses the total plasmatic fraction of bevacizumab, with marketed ELISA assays that assess free fraction to confirm the bias previously reported with ELISA assay.

This work confirms the potential of the HPLC-MS/MS technique and *MRM* acquisition mode to quantify therapeutic mAb using a generic process consisting of a sample treatment step by IgG purification on protein A and concentration by ultrafiltration, followed by a tryptic proteolysis step and absolute quantification normalized by a SIL surrogate peptide used as IS. This process could be potentially applicable with minimal analytical development to other monoclonal therapeutic IgGs for which we have a growing need to conduct PK studies.

## REFERENCES

- (1) Presta, L.G., et al., *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. *Cancer Res*, 1997. **57**(20): p. 4593-9.
- (2) Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
- (3) Saltz, L.B., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
- (4) Giantonio, B.J., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(12): p. 1539-44.
- (5) Gao, B., et al., *Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(32): p. 4017-25.
- (6) Lu, J.F., et al., *Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008. **62**(5): p. 779-86.
- (7) Wu, J.Y., et al., *Phase I safety and pharmacokinetic study of bevacizumab in Chinese patients with advanced cancer*. *Chin Med J (Engl)*, 2010. **123**(7): p. 901-6.
- (8) Tabrizi, M.A., C.M. Tseng, and L.K. Roskos, *Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies*. *Drug Discov Today*, 2006. **11**(1-2): p. 81-8.
- (9) Yang, Z., et al., *LC-MS/MS approach for quantification of therapeutic proteins in plasma using a protein internal standard and 2D-solid-phase extraction cleanup*. *Anal Chem*, 2007. **79**(24): p. 9294-301.
- (10) van den Broek, I., W.M. Niessen, and W.D. van Dongen, *Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. **929**: p. 161-79.
- (11) Lee, J.W., et al., *Bioanalytical approaches to quantify "total" and "free" therapeutic antibodies and their targets: technical challenges and PK/PD applications over the course of drug development*. *The APPS journal*, 2011. **13**(1): p. 12.
- (12) Kuang, B., L. King, and H.F. Wang, *Therapeutic monoclonal antibody concentration monitoring: free or total?* *Bioanalysis*, 2010. **2**(6): p. 1125-40.
- (13) Duan, X., et al., *Nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry and on-the-fly orthogonal array optimization for quantification of therapeutic monoclonal antibodies and the application in preclinical analysis*. *J Chromatogr A*, 2012. **1251**: p. 63-73.

- (14) Dubois, M., et al., *Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum*. Anal Chem, 2008. **80**(5): p. 1737-45.
- (15) Fernandez Ocana, M., et al., *Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS*. Anal Chem, 2012. **84**(14): p. 5959-67.
- (16) Heudi, O., et al., *Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(11): p. 4200-7.
- (17) Lesur, A., E. Varesio, and G. Hopfgartner, *Accelerated tryptic digestion for the analysis of biopharmaceutical monoclonal antibodies in plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(1): p. 57-64.
- (18) Liu, H., et al., *Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Biochem, 2011. **414**(1): p. 147-53.
- (19) Xuereb, F., et al., *Quantitative analysis of erythropoietin in human plasma by tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(7): p. 2073-84.
- (20) Hagman, C., et al., *Absolute quantification of monoclonal antibodies in biofluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(4): p. 1290-6.
- (21) Stokvis, E., H. Rosing, and J.H. Beijnen, *Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?* Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(3): p. 401-7.
- (22) Bronsema, K.J., R. Bischoff, and N.C. van de Merbel, *Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **893-894**: p. 1-14.
- (23) [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)
- (24) <http://web.expasy.org/blast/>
- (25) US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, *Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation*. 2001.

**Table 1** Ionization and fragmentation parameters of each identification and quantification SRM transitions from the two doubly charged surrogate peptides of bevacizumab, the doubly charged surrogate peptide of mAbIS and the doubly charged SIL peptide.

Peptide	Declustering potential DP (eV)	Entrance potential EP (eV)	Cell entrance potential CEP (eV)	Collision Energy CE (eV)	Transition (doubly charged → simply charged ion fragment)	Cell exit potential CXP (eV)
<sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>76</sup>	40	6,5	25	30	523,3→898,4	8,5
					523,3→797,3	8,5
					523,3→650,3	6,5
					523,3→563,2	8,5
					523,3→450,2	4,5
					523,3→335,2	6,5
<sup>77</sup> STAYLQMNSLR <sup>87</sup>	50	3,5	20	35	642,3→1024,5	10
					642,3→861,3	35
					642,3→748,3	7
					642,3→620,3	5
					642,3→489,3	5
					642,3→375,2	5
<sup>31</sup> DTYIHWVR <sup>38</sup>	70	10	26	38	545,3→597,3	4
					545,3→710,4	4
<sup>68</sup> FTFSLDTSK <sup>*76</sup>	40	6,5	26	30	527,3→805,3	34
					527,3→658,3	8
					527,3→458,2	6
					527,3→343,2	6

**Table 2** Specific tryptic peptides of bevacizumab and mAbIS identified *in silico* with their respective highest BLAST score obtained against UniProtKB\_HUMAN database.

Position	Sequence	Bit Score	E-Value	Subject identities (%) <sup>a</sup>
Bevacizumab				
68-76 (heavy chain)	FTFSLDTSK	24,4	0,7	100% (7/7→9)
77-87 (heavy chain)	STAYLQMNSLR	32,9	0,006	100% (9/9→11)
46-61 (light chain)	VLIYFISSLHSGVPSR	39,2	1,00E-04	87% (13/15→16)
88-98 (heavy chain)	AEDTAVYYCAK	39,2	5,00E-05	100% (11/11→11)
88-98 (heavy chain)	YPHYYGSSHWFYFDVWGQGLVTVSSASTK	43,5	1,00E-05	93% (14/15→29)
44-65 (heavy chain)	GLEWVGWINTYIGPEPTAAADFK	53,7	2,00E-09	76% (19/21→22)
20-38 (heavy chain)	LSCAASGYTFTNYGMN <sup>W</sup> VVR	57,5	8,00E-11	84% (16/19→19)
19-42 (light chain)	VTITCSASQDISNYLN <sup>W</sup> YQQK	68,9	1,00E-14	95% (20/21→24)
mAbIS				
60-67 (heavy chain)	YADSV <sup>E</sup> GR	25,2	1,7	88% (7/8→8)
68-76 (heavy chain)	FTISADTSK	25,7	1,3	89% (8/9→9)
68-76 (heavy chain)	GLEWVAR	26,5	0,53	100% (7/7→7)
31-38 (heavy chain)	DTYIHWVR	29,1	0,1	88% (7/8→8)
20-30 (heavy chain)	LSCAASGFNIK	30,3	4,80E-02	100% (9/19→12)
77-87 (heavy chain)	NTAYLQMNSLR	36,3	4,00E-04	100% (10/10→11)
46-61 (light chain)	LLIYSASPLYSGVPSR	38	2,00E-04	81% (13/16→18)
25-42 (light chain)	ASQDVNTAVAWYQQKP	43,9	3,00E-06	72% (13/18→18)

**Table 3** Tryptic peptides from bevacizumab digest identified after nanoLC-ESI-LTQ-Orbitrap analysis. Sequences in bold lettering in the text were located in the variable portion of the antibody. Underlined amino acids correspond to the modified amino acids versus human IgG.

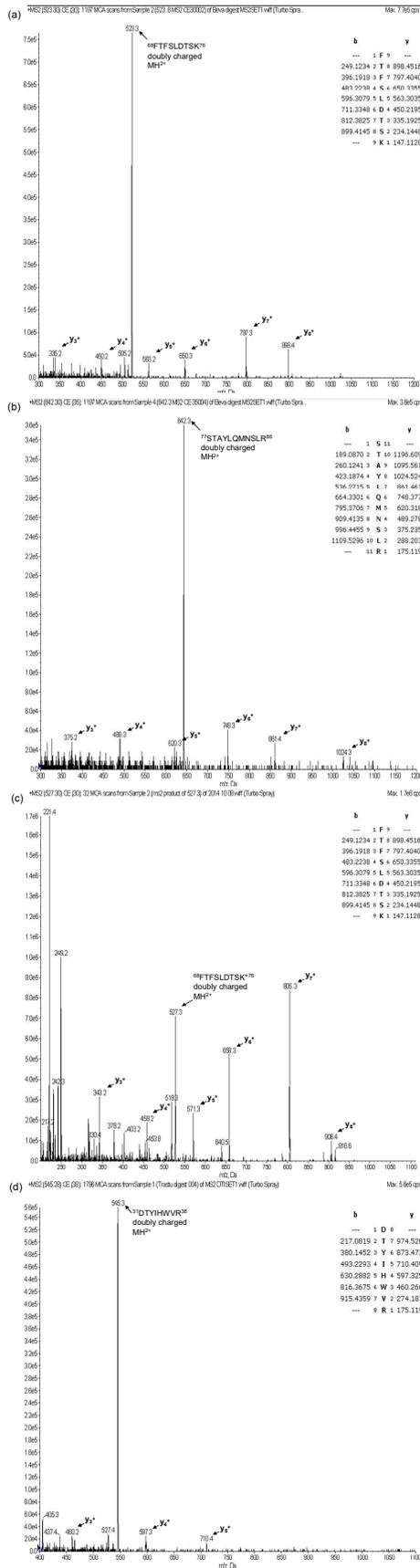
Position	Sequence	Calculated mass (MH <sup>+</sup> , Da)	Delta mass (ppm)
Heavy Chain			
1-19	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	1882,003	3,56
20-38	<b>LSCAASGYTFINYGMMNWVR</b>	2140,958	4,52
39-65	<b>QAPGKGLEWV<u>GWINTYTG</u>EPYAADFK</b>	2999,457	5,53
39-66	<b>QAPGKGLEWV<u>GWINTYTG</u>EPYAADFKR</b>	3155,559	3,73
44-65	<b>GLEWV<u>GWINTYTG</u>EPYAADFK</b>	2518,193	4,31
44-66	<b>GLEWV<u>GWINTYTG</u>EPYAADFKR</b>	2674,294	1,82
67-76	<b><u>RF</u>TFSLDTSK</b>	1201,621	0,24
68-76	<b><u>FT</u>FSLDTSK</b>	1045,520	1,45
68-87	<b><u>FT</u>FSLDTSK<u>STAYLQMN</u>SLR</b>	2310,143	1,43
77-87	<b><u>STAYLQMN</u>SLR</b>	1283,641	1,41
88-98	<b>AEDTAVYYCAK</b>	1233,546	3,10
128-139	GPSVFPLAPSSK	1186,647	1,69
140-153	STSGGTAALGCLVK	1264,657	2,00
225-254	SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	3163,578	4,28
229-254	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	2730,415	2,70
229-261	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR	3546,831	3,87
262-280	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	2082,006	3,20
262-294	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	3740,79	3,80
281-294	FNWYVDGVEVHNAK	1677,802	2,95
295-307	TKPREEQYNSTYR	1671,809	3,24
299-307	EEQYNSTYR	1189,512	2,00
299-326	EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	3398,702	2,20
308-323	VVSVLTVLHQDWLNGK	1808,006	3,52
308-326	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	2228,207	4,00
329-340	VSNKALPAPIEK	1266,742	1,35
329-344	VSNKALPAPIEKTISK	1696,000	1,40
333-344	ALPAPIEKTISK	1267,762	1,38
377-398	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2544,131	3,93
Light Chain			
19-45	<b>VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK</b>	3040,52	2,68
46-61	<b><u>VL</u>IYFTSSLSHSGVPSR</b>	1762,949	2,59
109-126	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	1946,027	3,33
127-142	SGTASVVCLLNNFYPR	1740,874	5,37
146-169	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	2677,270	2,59
150-169	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	2135,969	2,68
150-183	VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK	3619,709	2,66
150-188	VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK	4225,974	2,71
184-207	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	2690,324	1,65
189-207	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	2084,059	1,62
191-207	VYACEVTHQGLSSPVTK	1818,905	2,16

**Table 4** Results of intra- and inter-day validation on pooled human spiked with bevacizumab (QC1, QC2 and QC3) and analyzed with LC-QqQ MRM mode under ratio of the peak areas of the  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  bevacizumab surrogate peptide to the SIL peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ . All QC samples were submitted to Protein A enrichment and concentration by ultrafiltration and proteolysis during 8 hours at 1/50 (mole/mole) trypsin ratio.

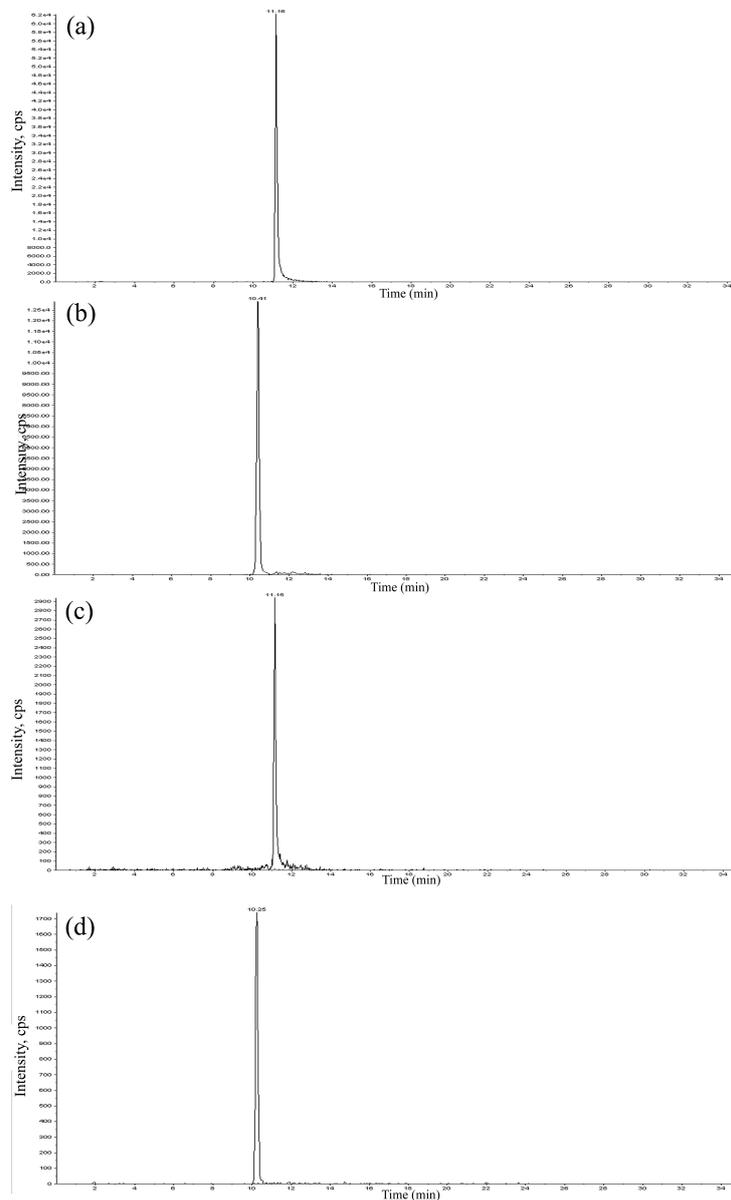
		Theoretical concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Observed (mean $\pm$ S.D.) <sup>a</sup>	Accuracy (%)	Precision (CV%)	n
$^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$						
Intra-day	Day 1	40	41,77 $\pm$ 2,30	104,42	5,49	6
		200	211,5 $\pm$ 12,82	105,75	8,06	6
		400	430,83 $\pm$ 38,75	107,71	8,99	6
	Day 2	40	44,17 $\pm$ 4,18	110,42	9,47	6
		200	229,6 $\pm$ 4,98	114,8	2,17	6
		400	453,80 $\pm$ 19,94	113,45	4,39	6
	Day 3	40	40,53 $\pm$ 1,55	101,33	3,83	6
		200	225,2 $\pm$ 11,43	112,6	5,08	6
		400	438,00 $\pm$ 18,47	109,5	4,22	6
	Day 4	40	36,23 $\pm$ 2,99	90,58	8,26	6
		200	209,2 $\pm$ 27,68	104,6	13,23	6
		400	440,50 $\pm$ 37,18	110,13	8,44	6
Inter-day	over 4 days	40	40,68 $\pm$ 4,007	101,69	9,85	24
		200	219,36 $\pm$ 17,72	109,68	8,08	24
		400	442,46 $\pm$ 30,91	110,61	6,98	24

**Table 5** Results of intra- and inter-day validation on pooled human spiked with bevacizumab (QC1, QC2 and QC3) and analysed with LC-QqQ MRM mode under ratio of the peak areas of the  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  bevacizumab surrogate peptide to the SIL peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$ . All QC samples were submitted to Protein A enrichment and concentration by ultrafiltration and proteolysis during 8 hours at 1/50 (mole/mole) trypsin ratio.

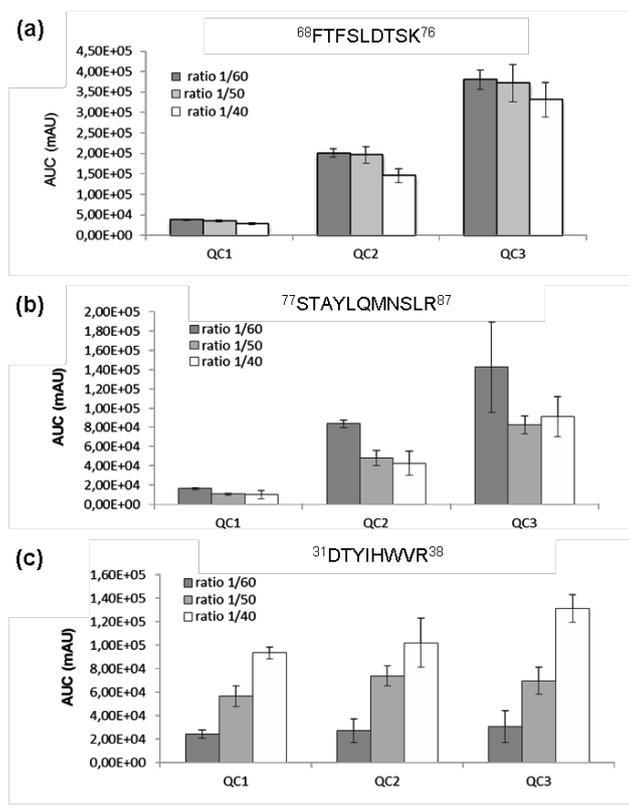
		Theoretical concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Observed (mean $\pm$ S.D.) <sup>a</sup>	Accuracy (%)	Precision (CV%)	n
$^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$						
Intra-day	Day 1	40	38,45 $\pm$ 2,072	96,13	5,39	6
		200	175,17 $\pm$ 16,57	87,53	9,46	6
		400	417,5 $\pm$ 42,13	104,38	10,09	6
	Day 2	40	40,39 $\pm$ 1,09	100,98	2,7	6
		200	216,2 $\pm$ 29,01	108,06	13,42	6
		400	386,26 $\pm$ 13,07	96,57	13,07	6
	Day 3	40	42,00 $\pm$ 4,77	105	11,35	6
		200	224,20 $\pm$ 25,15	112,1	11,22	6
		400	424,17 $\pm$ 26,52	105,04	6,25	6
	Day 4	40	46,50 $\pm$ 5,66	116,25	12,14	6
		200	249,83 $\pm$ 51,17	124,92	20,48	6
		400	537,83 $\pm$ 50,27	134,46	9,35	6
Inter-day	over 4 days	40	41,84 $\pm$ 4,72	104,59	11,28	24
		200	217,86 $\pm$ 41,89	108,93	19,23	24
		400	441,44 $\pm$ 71,33	110,36	16,16	24



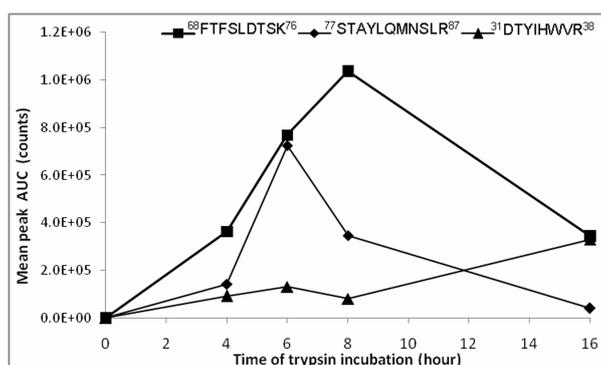
**Figure 1** Fragmentation spectra of the doubly charged precursor ion of the two surrogate peptides of bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (a) and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (b) of the SIL peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  (c) and of the mAbIS surrogate peptide  $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$  (d). All of the fragmentation spectra were analyzed against *in silico* spectra generated from Protein Prospector online bioinformatics tool.



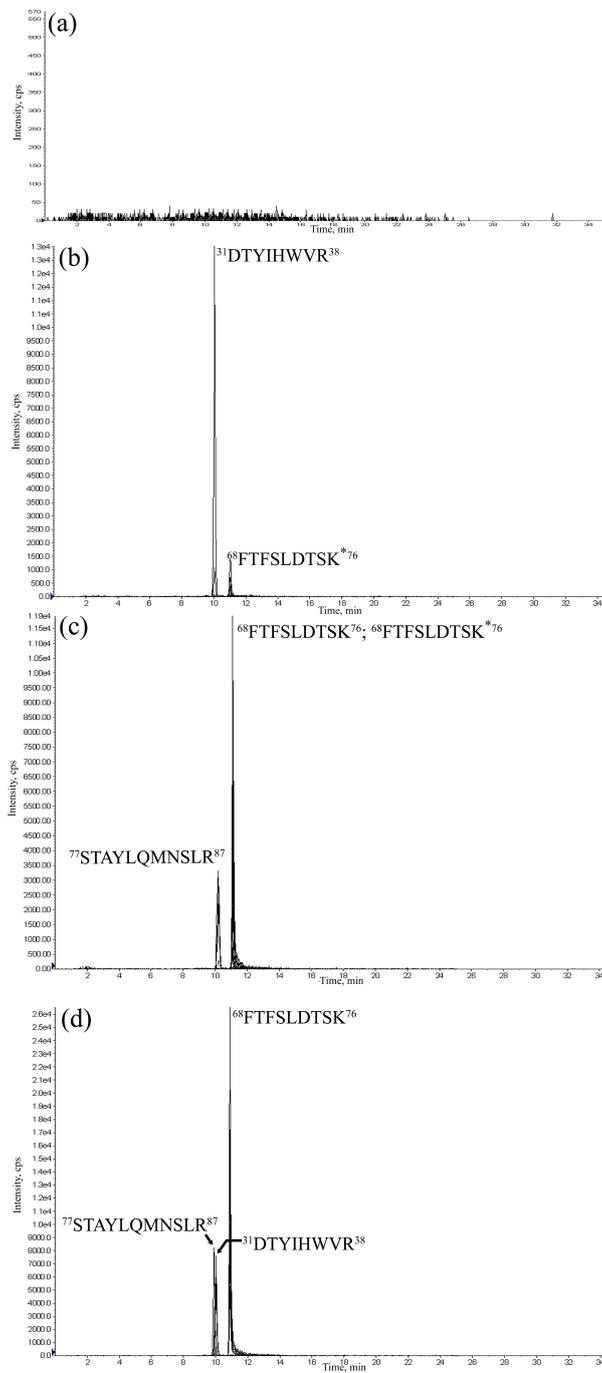
**Figure 2** LC-MS/MS chromatogram obtain after analysis of human serum sample spiked with 400  $\mu\text{g/mL}$  of bevacizumab (QC3) with SIL peptide just before proteolysis (a), (b), (c) or mAbIS before any streatment (a), (b), (d). Anlalysis was conducted on the LC-ESI-QqQ system under chromatogram and mass spectrometry conditions described in experimental section. Chromatographic peaks corresponding to the sum of the most intense SRM tranistions of the two doubly charged surrogate peptides of bevacizumab  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$  (a) and  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$  (b), the doubly charged SIL peptide  $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{*76}$  (c) and the doubly charged surrogate peptide of mAbIS (d).



**Figure 3** Assessment of bevacizumab and mAbIS trypsin proteolysis as function of trypsin/total protein ratio through measurement of mean peak area (AUC) corresponding to the two surrogate peptides of bevacizumab (a), (b) and the surrogate peptide of mAbIS (c). QC1, QC2 and QC3 plasma samples spiked with mAbIS were analyzed by LC-ESI-QqQ analysis under chromatographic separation and mass spectrometry detection described in experimental section. Results were expressed as mean AUC  $\pm$ sd (n=3).



**Figure 4.** Assessment of bevacizumab and mAbIS trypsin proteolysis as function of time of trypsin incubation (4 hours, 6 hours, 8 hours and 16 hours) through formation of the two surrogate peptides of bevacizumab ( $^{68}\text{FTFSLDTSK}^{76}$ ,  $^{77}\text{STAYLQMNSLR}^{87}$ ) and the surrogate peptide of mAbIS ( $^{31}\text{DTYIHWVR}^{38}$ ). Chromatographic separation and mass spectrometry detection were performed as described in experimental section. Results were expressed as mean AUC (n=6).



**Figure 5.** LC-MS/MS chromatograms issued from the MRM analysis of blank human plasma sample (a), human plasma sample spiked with trastuzumab and SIL peptide (b), human plasma sample spiked with bevacizumab and SIL peptide (c), human plasma sample spiked with bevacizumab and trastuzumab (d). All samples were treated according to the process previously described (protein A purification and concentration by ultra-filtration) and submitted to tryptic proteolysis step.



## Références bibliographiques

1. Lehninger, A.L., *Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires*. 1973: Ed. Flammarion Médecine/Science. 1088 p.
2. Scott, T. and Mercer, E., *Concise Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology*. 1997: 3ème Ed. Walter de Gruyter : Berlin-New-York. 548-564.
3. DUBOIS Mathieu. *Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse*. 2008. Thèse doctorale sous la direction de Eric Ezan-Paris VI, université Pierre et Marie Curie-spécialité Chimie Analytique. Disponible sur: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00341749/document>.
4. Pauling, L. and Corey, R.B., *Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1951. **37**(11): p. 729-40.
5. Pauling, L., Corey, R.B., and Branson, H.R., *The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1951. **37**(4): p. 205-11.
6. [http://aristotele.datacenter.dsi.upmc.fr/disc/docs\\_Anim/P1%20Documents%20proteines/helice-a%20structure.gif](http://aristotele.datacenter.dsi.upmc.fr/disc/docs_Anim/P1%20Documents%20proteines/helice-a%20structure.gif)
7. Darbon, H., *Structure des protéines* <http://biologie.univ-mrs.fr/masterBBSG/images/pdf/structures%20secondaires.pdf>.
8. Sakiz, E., *Les Molécules de la Vie*. 1986: Ed. Pour la Science : Paris. 39-49.
9. Lehn, J.M., *La Chimie Supramoléculaire. Concepts et perspectives*. 1997: 1ère Ed. De Boeck Université. 273 p.
10. Roitt, I.M., Brostoff, J., and Male, D.K., *Immunologie*. DeBoeck Université, 1994.
11. Mould, D.R. and Sweeney, K.R., *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2007. **10**(1): p. 84-96.
12. Lobo, E.D., Hansen, R.J., and Balthasar, J.P., *Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J Pharm Sci, 2004. **93**(11): p. 2645-68.
13. Ternant, D., *Relation dose-concentration-effet des anticorps thérapeutiques*. 2007: Ed. Universitaires Européennes. 128p.
14. Kohler, G. and Milstein, C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
15. Breedveld, F.C., *Therapeutic monoclonal antibodies*. Lancet, 2000. **355**(9205): p. 735-40.
16. Paintaud, G., Lejarre, F., Ternant, D., et al., *Monoclonals antibodies: a recent and major therapeutic advance*. Therapie, 2009. **64**(1): p. 1-7.
17. Boulianne, G.L., Hozumi, N., and Shulman, M.J., *Production of functional chimaeric mouse/human antibody*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 643-6.
18. Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., et al., *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(21): p. 6851-5.
19. Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
20. Booy, E.P., Johar, D., Maddika, S., et al., *Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. **54**(2): p. 85-101.
21. Nissim, A. and Chernajovsky, Y., *Historical development of monoclonal antibody therapeutics*. Handb Exp Pharmacol, 2008(181): p. 3-18.
22. Bernard, J. (2014) *Biomédicaments en France, Etat des lieux 2014*. **Volume**, 33p
23. *Vidal Optimal*. Application intranet-CHU de Bordeaux, 2015. **Version 2015.08.0**.

24. *Thériaque Intranet hospitalier*. Application intranet-CHU de Bordeaux, 2015. **V3.2.5**
25. Roche, L., *Monographie de l' AVASTIN® (bevacizumab) d'après le laboratoire Roche Canada*. Juillet 2015.
26. Novartis Pharma Canada Inc, *Monographie du XOLAIR® (omalizumab) d'après le laboratoire Novartis Pharma Canada Inc*. Février 2015.
27. Janssen Inc, *Monographie du REMICADE® (infliximab) d'après le laboratoire Janssen Inc*. Décembre 2011.
28. Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J., et al., *The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions*. *MAbs*, 2010. **2**(3): p. 256-65.
29. Bayer Inc, *Monographie du ZEVALIN® (ibritumomab tiuxétan) d'après le laboratoire Bayer Inc*. Décembre 2009.
30. ANSM-Pfizer, *RCP du Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin), ATU de cohorte, d'après le laboratoire Pfizer*. Avril 2015.
31. Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., et al., *Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity*. *Blood*, 2010. **115**(22): p. 4393-402.
32. Kuijpers, T., *Fc-dependent mechanisms of action: roles of FcγR and FcRn*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **178 Suppl 1**: p. 89-91.
33. Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene*. *Blood*, 2002. **99**(3): p. 754-8.
34. Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., et al., *Fc γRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γRIIIa, independently of the Fc γRIIIa-48L/R/H phenotype*. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 1109-14.
35. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., et al., *Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(11): p. 1789-96.
36. Weng, W.K., Czerwinski, D., Timmerman, J., et al., *Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(23): p. 4717-24.
37. Dornan, D., Spleiss, O., Yeh, R.F., et al., *Effect of FCGR2A and CGR3A variants on CLL outcome*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4212-4222.
38. Ghesquieres, H., Cartron, G., Seymour, J.F., et al., *Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms*. *Blood*, 2012. **120**(13): p. 2650-2657.
39. Hurvitz, S.A., Betting, D.J., Stern, H.M., et al., *Analysis of Fcγ Receptor IIIa and IIa polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(12): p. 3478-3486.
40. Mellor, J.D., Brown, M.P., Irving, H.R., et al., *A critical review of the role of Fc γ receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer*. *J Hematol Oncol*, 2013. **6**: p. 1.
41. Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., et al., *Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecule basis for type I/II distinction of CD20 antibodies*. *Blood*, 2011. **118**(2): p. 358-367.
42. Klein, C., Lammens, A., Schafer, W., et al., *Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties*. *MAbs*, 2013. **5**(1): p. 22-33.
43. Beers, S.A., Chan, C.H., French, R.R., et al., *CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies*. *Semin Hematol*, 2010. **47**(2): p. 107-14.

44. Bruno, R., Washington, C.B., Lu, J.F., et al., *Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. **56**(4): p. 361-9.
45. Dirks, N.L. and Meibohm, B., *Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies*. *Clin Pharmacokinet*, 2010. **49**(10): p. 633-59.
46. Dostalek, M., Gardner, I., Gurbaxani, B.M., et al., *Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies*. *Clin Pharmacokinet*, 2013. **52**(2): p. 83-124.
47. Frey, N., Grange, S., and Woodworth, T., *Population pharmacokinetic analysis of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis*. *J Clin Pharmacol*, 2010. **50**(7): p. 754-66.
48. Gordon, M.S., Margolin, K., Talpaz, M., et al., *Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(3): p. 843-50.
49. Jager, U., Fridrik, M., Zeitlinger, M., et al., *Rituximab serum concentrations during immuno-chemotherapy of follicular lymphoma correlate with patient gender, bone marrow infiltration and clinical response*. *Haematologica*, 2012. **97**(9): p. 1431-8.
50. Li, J., Gupta, M., Jin, D., et al., *Characterization of the long-term pharmacokinetics of bevacizumab following last dose in patients with resected stage II and III carcinoma of the colon*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013. **71**(3): p. 575-80.
51. Lu, J.F., Bruno, R., Eppler, S., et al., *Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008. **62**(5): p. 779-86.
52. Ng, C.M., Bruno, R., Combs, D., et al., *Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial*. *J Clin Pharmacol*, 2005. **45**(7): p. 792-801.
53. Panoilia, E., Schindler, E., Samantas, E., et al., *A pharmacokinetic binding model for bevacizumab and VEGF165 in colorectal cancer patients*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015. **75**(4): p. 791-803.
54. Ternant, D., Karmiris, K., Vermeire, S., et al., *Pharmacokinetics of adalimumab in Crohn's disease*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2015. **71**(9): p. 1155-7.
55. Tobinai, K., Igarashi, T., Itoh, K., et al., *Japanese multicenter phase II and pharmacokinetic study of rituximab in relapsed or refractory patients with aggressive B-cell lymphoma*. *Ann Oncol*, 2004. **15**(5): p. 821-30.
56. Vande Casteele, N. and Gils, A., *Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice*. *J Clin Pharmacol*, 2014. **55 Suppl 3**: p. S39-50.
57. Wang, W., Wang, E.Q., and Balthasar, J.P., *Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics*. *Clin Pharmacol Ther*, 2008. **84**(5): p. 548-58.
58. Wu, J.Y., Wu, X.N., Ding, L., et al., *Phase I safety and pharmacokinetic study of bevacizumab in Chinese patients with advanced cancer*. *Chin Med J (Engl)*, 2010. **123**(7): p. 901-6.
59. Xu, Z., Seitz, K., Fasanmade, A., et al., *Population pharmacokinetics of infliximab in patients with ankylosing spondylitis*. *J Clin Pharmacol*, 2008. **48**(6): p. 681-95.
60. Xu, Z.H., Lee, H., Vu, T., et al., *Population pharmacokinetics of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: impact of body weight and immunogenicity*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2010. **48**(9): p. 596-607.
61. Zhou, H., Jang, H., Fleischmann, R.M., et al., *Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis*. *J Clin Pharmacol*, 2007. **47**(3): p. 383-96.
62. Fasanmade, A.A., Adedokun, O.J., Ford, J., et al., *Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. **65**(12): p. 1211-28.

63. Ternant, D. and Paintaud, G., *Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5 Suppl 1**: p. S37-47.
64. Flessner, M.F. and Dedrick, R.L., *Tissue-level transport mechanisms of intrapetironeally-administred monoclonal antibodies*. J Control Realease, 1998. **53**(1-3): p. 69-75.
65. Tabrizi, M., Bornstein, G.G., and Suria, H., *Bioditribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease*. Aaaps J, 2010. **12**(1): p. 33-43.
66. Baxter, L.T., Zhu, H., Mackensen, D.G., et al., *Biodistribution of monoclonal natibodeis: scale-up from mouse to human using a physiologically based pharmacokinetic model*. Cnacer Res, 1995. **55**(20): p. 4611-22.
67. Baxter, L.T., Zhu, H., Mackensen, D.G., et al., *Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and frgments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice*. Cnacer Res, 1994. **54**(6): p. 1517-28.
68. Jain, R.K., *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review*. Cancer Res, 1987. **47**(12): p. 3039-51.
69. Sands, H., Jones, P.L., Shah, S.A., et al., *Correlation of vascular permeability and blood flow with monoclonal antibody uptake by human Clouser and renal cell xenografts*. Cancer Res, 1988. **48**(1): p. 188-93.
70. Fujimori, K., Covell, D.G., Fletcher, J.E., et al., *Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors*. Cancer Res, 1989. **49**(20): p. 5656-63.
71. van Osdol, W., Fujimori, K., and Weinstein, J.N., *An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor nodules: consequences of a "binding site barrier"*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4776-84.
72. Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M., et al., *Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms*. Cancer Res, 1992. **52**(12): p. 3402-8.
73. Ternant, D., Bejan-Angoulvant, T., Passot, C., et al. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies Approved to Treat Rheumatoid Arthritis*. 2015 August 2015; Clin Pharmacokinet. Disponible sur: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26123705](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26123705)
74. Ghetie, V. and Ward, E.S., *FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter*. Immunol Today, 1997. **18**(12): p. 592-8.
75. Israel, E.J., Taylor, S., Wu, Z., et al., *Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells*. Immunology, 1997. **92**(1): p. 69-74.
76. Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., et al., *Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 601-8.
77. Bartelds, G.M., Wijbrandts, C.A., Nurmohamed, M.T., et al., *Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 921-6.
78. Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., et al., *Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1552-63.
79. Hwang, W.Y. and Foote, J., *Immunogenicity of engineered antibodies*. Methods, 2005. **36**(1): p. 3-10.
80. Radstake, T.R., Svenson, M., Eijsbouts, A.M., et al., *Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(11): p. 1739-45.

81. West, R.L., Zelinkova, Z., Wolbink, G.J., et al., *Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **28**(9): p. 1122-6.
82. Van Cutsem, E., Siena, S., Humblet, Y., et al., *An open-label, single-arm study assessing safety and efficacy of panitumumab in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy*. *Ann Oncol*, 2008. **19**(1): p. 92-8.
83. Yang, B.B., Lum, P., Chen, A., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives on the clinical drug development of panitumumab*. *Clin Pharmacokinet*, 2010. **49**(11): p. 729-40.
84. Bai, S., Jorga, K., Xin, Y., et al., *A guide to rational dosing of monoclonal antibodies*. *Clin Pharmacokinet*, 2012. **51**(2): p. 119-35.
85. Iacona, I., Lazzarino, M., Avanzini, M.A., et al., *Rituximab (IDEC-C2B8): validation of a sensitive enzyme-linked immunoassay applied to a clinical pharmacokinetic study*. *Ther Drug Monit*, 2000. **22**(3): p. 295-301.
86. Gao, B., Yeap, S., Clements, A., et al., *Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(32): p. 4017-25.
87. Ternant, D., Ducourau, E., Perdriger, A., et al., *Relationship between inflammation and infliximab pharmacokinetics in rheumatoid arthritis*. *Br J Clin Pharmacol*, 2014. **78**(1): p. 118-28.
88. Ternant, D., Ducourau, E., Fuzibet, P., et al., *Pharmacokinetics and concentration-effect relationship of adalimumab in rheumatoid arthritis*. *Br J Clin Pharmacol*, 2015. **79**(2): p. 286-97.
89. Azzopardi, N., Lecomte, T., Ternant, D., et al., *Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6329-37.
90. Kay, J., Matteson, E.L., Dasgupta, B., et al., *Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate: a randomized, double-blind, placebo controlled, dose-ranging study*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(4): p. 964-75.
91. Ducourau, E., Mulleman, D., Paintaud, G., et al., *Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(3): p. R105.
92. Berinstein, N.L., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., et al., *Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma*. *Ann Oncol*, 1998. **9**(9): p. 995-1001.
93. Davis, T.A., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J., et al., *Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(6): p. 1851-7.
94. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., et al., *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. *Semin Oncol*, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 78-83.
95. Passot, C., Azzopardi, N., Renault, S., et al., *Influence of FCGRT gene polymorphisms on pharmacokinetics of therapeutic antibodies*. *MAbs*, 2013. **5**(4): p. 614-9.
96. Bardin, C., Veal, G., Paci, A., et al., *Therapeutic drug monitoring in cancer--are we missing a trick?* *Eur J Cancer*, 2014. **50**(12): p. 2005-9.
97. Adedokun, O.J., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., et al., *Association between serum concentration and efficacy in adult patients with ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(6): p. 1296-1307.
98. Fracasso, P.M., Burris, H., 3rd, Arquette, M.A., et al., *A phase I escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 986-93.

99. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., et al., *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. *Cancer Res*, 1997. **57**(20): p. 4593-9.
100. Collins, F.S. and Trent, J.M., eds. *Génétique des cancers*. Principes de médecine interne, Flammarion Medecines-Sciences ed., ed. E. Braunwald, A.S. Fauci, and D.L. Kasper. Vol. 15. 2002: Paris. 503-9.
101. Homsí, J. and Daud, A.I., *Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors*. *Cancer Control*, 2007. **14**(3): p. 285-94.
102. Hicklin, D.J. and Ellis, L.M., *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
103. Winder, T. and Lenz, H.J., *Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2163-76.
104. Scappaticci, F.A., *The therapeutic potential of novel antiangiogenic therapies*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003. **12**(6): p. 923-32.
105. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
106. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy*. *Oncologist*, 2004. **9** Suppl 1: p. 2-10.
107. Bergsland, E.K., *Vascular endothelial growth factor as a therapeutic target in cancer*. *Am J Health Syst Pharm*, 2004. **61**(21 Suppl 5): p. S4-11.
108. Robert, J., *From conventionnal chemotherapy to targeted therapies of cancer : mechanisms of oncogenesis at the molecular and cellular levels*. *Bull Cancer*, 2006. **HS**: p. 5-16.
109. Gerber, H.P. and Ferrara, N., *Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies*. *Cancer Res*, 2005. **65**(3): p. 671-80.
110. Lee, J.C., Chow, N.H., Wang, S.T., et al., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(6): p. 748-53.
111. Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer*. *Cancer Res*, 1995. **55**(18): p. 3964-8.
112. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. *Science*, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
113. Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer*. *Nat Med*, 2004. **10**(2): p. 145-7.
114. Jain, R.K., Tong, R.T., and Munn, L.L., *Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model*. *Cancer Res*, 2007. **67**(6): p. 2729-35.
115. Zhi, J., Chen, E., Major, P., et al., *A multicenter, randomized, open-label study to assess the steady-state pharmacokinetics of bevacizumab given with either XELOX or FOLFOX-4 in patients with metastatic colorectal cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(5): p. 1199-206.
116. Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(12): p. 1539-44.
117. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.

118. Kabbinavar, F.F., Hambleton, J., Mass, R.D., et al., *Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(16): p. 3706-12.
119. Saltz, L.B., Clarke, S., Diaz-Rubio, E., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
120. Kuang, B., King, L., and Wang, H.F., *Therapeutic monoclonal antibody concentration monitoring: free or total?* Bioanalysis, 2010. **2**(6): p. 1125-40.
121. *ShikariQ-Beva : Enzyme immunoassay for the quantitative determination of bevacizumab (Avastin®) in serum and plasma-Instructions for use*  
Matriks Biotek Laboratories: p. 1-12.
122. Boscatto, L.M. and Stuart, M.C., *Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays*. Clin Chem, 1986. **32**(8): p. 1491-5.
123. Lee, J.W., Kelley, M., King, S.T., et al., *Bioanalytical approaches to quantify "total" and "free" therapeutic antibodies and their targets: technical challenges and PK/PD applications over the course of drug development*. The APPS journal, 2011. **13**(1): p. 12.
124. Wu, W.W., Wang, G., Basek, S.J., et al., *Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 651-8.
125. Grothey, A., Sugrue, M.M., Purdie, D.M., et al., *Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE)*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5326-34.
126. Van Cutsem, E., Rivera, F., Berry, S., et al., *Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study*. Ann Oncol, 2009. **20**(11): p. 1842-7.
127. Food and Drug administration (FDA) U.S Département of Health and Human Services, *Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation*. May 2001.
128. Yang, Z., Hayes, M., Fang, X., et al., *LC-MS/MS approach for quantification of therapeutic proteins in plasma using a protein internal standard and 2D-solid-phase extraction cleanup*. Anal Chem, 2007. **79**(24): p. 9294-301.
129. Duan, X., Dai, L., Chen, S.C., et al., *Nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry and on-the-fly orthogonal array optimization for quantification of therapeutic monoclonal antibodies and the application in preclinical analysis*. J Chromatogr A, 2012. **1251**: p. 63-73.
130. Dubois, M., Fenaille, F., Clement, G., et al., *Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum*. Anal Chem, 2008. **80**(5): p. 1737-45.
131. Fernandez Ocana, M., James, I.T., Kabir, M., et al., *Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS*. Anal Chem, 2012. **84**(14): p. 5959-67.
132. Hagman, C., Ricke, D., Ewert, S., et al., *Absolute quantification of monoclonal antibodies in biofluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(4): p. 1290-6.
133. Heudi, O., Barteau, S., Zimmer, D., et al., *Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry*. Anal Chem, 2008. **80**(11): p. 4200-7.
134. Ji, C., Sadagopan, N., Zhang, Y., et al., *A universal strategy for development of a method for absolute quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices using differential dimethyl labeling coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2009. **81**(22): p. 9321-8.

135. Jiang, H., Zeng, J., Titsch, C., et al., *Fully validated LC-MS/MS assay for the simultaneous quantitation of coadministered therapeutic antibodies in cynomolgus monkey serum*. *Anal Chem*, 2013. **85**(20): p. 9859-67.
136. Lesur, A., Varesio, E., and Hopfgartner, G., *Accelerated tryptic digestion for the analysis of biopharmaceutical monoclonal antibodies in plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(1): p. 57-64.
137. Li, H., Ortiz, R., Tran, L., et al., *General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies*. *Anal Chem*, 2012. **84**(3): p. 1267-73.
138. Li, H., Ortiz, R., Tran, L.T., et al., *Simultaneous analysis of multiple monoclonal antibody biotherapeutics by LC-MS/MS method in rat plasma following cassette-dosing*. *Aaps J*, 2013. **15**(2): p. 337-46.
139. Liu, H., Manuilov, A.V., Chumsae, C., et al., *Quantitation of a recombinant monoclonal antibody in monkey serum by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2011. **414**(1): p. 147-53.
140. Zhang, Q., Spellman, D.S., Song, Y., et al., *Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for preclinical pharmacokinetic studies*. *Anal Chem*, 2014. **86**(17): p. 8776-84.
141. Lebert, D., Picard, G., Beau-Larvor, C., et al., *Absolute and multiplex quantification of antibodies in serum using PSAQ standards and LC-MS/MS*. *Bioanalysis*, 2015. **7**(10): p. 1237-51.
142. Xu, K., Liu, H., Maia, M., et al., *A multiplexed hybrid LC-MS/MS pharmacokinetic assay to measure two co-administered monoclonal antibodies in a clinical study*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(13): p. 1781-94.
143. Koomen, J.M., Zhao, H., Li, D., et al., *Diagnostic protein discovery using liquid chromatography/mass spectrometry for proteolytic peptide targeting*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. **19**(12): p. 1624-36.
144. Havlis, J. and Shevchenko, A., *Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2004. **76**(11): p. 3029-36.
145. Anderson, N.L., Anderson, N.G., Haines, L.R., et al., *Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA)*. *J Proteome Res*, 2004. **3**(2): p. 235-44.
146. Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 6940-5.
147. van den Broek, I., Niessen, W.M., and van Dongen, W.D., *Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. **929**: p. 161-79.
148. *ProteinProspector-requête MS-Digest*. v 5.14.2; University of California San Francisco. Disponible sur: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>.
149. *ExpASy Bioinformatics Resource Portal, requête PeptideMass*. 2011; Swiss Institute of Bioinformatics; Disponible sur: [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/).
150. *Basic Local Alignment Search Tool BLAST*. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible sur: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
151. Furlong, M.T., Ouyang, Z., Wu, S., et al., *A universal surrogate peptide to enable LC-MS/MS bioanalysis of a diversity of human monoclonal antibody and human Fc-fusion protein drug candidates in pre-clinical animal studies*. *Biomed Chromatogr*, 2012. **26**(8): p. 1024-32.

152. Barr, J.R., Maggio, V.L., Patterson, D.G., et al., *Isotope dilution-mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I*. Clin Chem, 1996. **42**(10): p. 1676-82.
153. Kebarle, P. and Verkerk, U.H., *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrom Rev, 2009. **28**(6): p. 898-917.
154. Bronsema, K.J., Bischoff, R., and van de Merbel, N.C., *Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **893-894**: p. 1-14.
155. Arsene, C.G., Ohlendorf, R., Burkitt, W., et al., *Protein quantification by isotope dilution mass spectrometry of proteolytic fragments: cleavage rate and accuracy*. Anal Chem, 2008. **80**(11): p. 4154-60.
156. Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M., et al., *Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides*. Nat Methods, 2005. **2**(8): p. 587-9.
157. Kito, K., Ota, K., Fujita, T., et al., *A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes*. J Proteome Res, 2007. **6**(2): p. 792-800.
158. Brun, V., Simpson, D.M., Robertson, D.H., et al., *Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics*. Mol.Cell.Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2139-2149.
159. Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
160. Karas, M. and Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
161. Hoffmann, E. and Stroobant, V., *Spectrométrie de masse*. 2005: 3ème Ed. Dunod : Paris. 425.
162. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., et al., *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(4): p. 543-51.
163. Dole, M., Mack, L.L., and Hines, R.L., *Molecular Beams of Macroions*. Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-&.
164. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
165. [http://atechimie.univ-lille1.fr/digitalAssets/24/24739\\_Electrospray\\_ionisation.JPG](http://atechimie.univ-lille1.fr/digitalAssets/24/24739_Electrospray_ionisation.JPG).
166. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(7): p. 804-17.
167. XUEREB Fabien. *La spectrométrie de masse appliquée à la quantification des protéines médicaments dans le plasma*. 2008. Thèse doctorale sous la co-direction du Pr Dmonique Breilh et du Pr Jean-Marie Scmitter, Université Bordeaux 1-Ecole doctorale des Sciences Chimiques-spécialité: Chimie Analytique et Environnement. Disponible sur: [http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2008/XUEREB\\_FABIEN\\_2008.pdf](http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2008/XUEREB_FABIEN_2008.pdf).
168. Iribarne, J.V. and Thomson, B.A., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys, 1976. **64** (6): p. 2287-2294.
169. [http://cbm.cnrs-orleans.fr/IMG/jpg/quadripole\\_gr.jpg](http://cbm.cnrs-orleans.fr/IMG/jpg/quadripole_gr.jpg).
170. [http://cbm.cnrs-orleans.fr/IMG/jpg/quadripole\\_gr.jpg](http://cbm.cnrs-orleans.fr/IMG/jpg/quadripole_gr.jpg).
171. SIMON Romain. *La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : développements analytiques et applications*. . 2012. sous la direction du Dr Arnaud SALVADOR Lyon1, université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon- Ecole doctorale de Chimie. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00875965/document>.

172. Schwartz, J.C., Senko, M.W., and Syka, J.E., *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(6): p. 659-69.
173. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1156-62.
174. [https://www.u-picardie.fr/plateforme/icap/images/orbitrap\\_fonctionnement.png](https://www.u-picardie.fr/plateforme/icap/images/orbitrap_fonctionnement.png).
175. Yates, J.R., Cociorva, D., Liao, L., et al., *Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis*. Anal Chem, 2006. **78**(2): p. 493-500.
176. MATONDO Mariette. *Inhibition du protéasome dans les cellules de leucémies aiguës myéloïdes : apport des approches protéomiques*. 2008. Sous la direction de Bernard MONSARRA, Université Toulouse III - Paul Sabatier- spécialité : Biochimie et Biologie cellulaire. Disponible sur: [http://thesesups.ups-tlse.fr/973/2/Matondo\\_Mariette.pdf](http://thesesups.ups-tlse.fr/973/2/Matondo_Mariette.pdf).
177. CANON Francis. *Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins*. 2010. Thèse pour obtenir le grade de docteur du centre international d'études supérieures en sciences agronomiques- sous la direction du Dr Pascale Sarni-Manchado -Ecole doctorale : Sciences des Procédés et Sciences des Aliments-Spécialité : Biochimie, chimie et technologie des aliments. Disponible sur: [http://www.supagro.fr/theses/extranet/10-0015\\_CANON.pdf](http://www.supagro.fr/theses/extranet/10-0015_CANON.pdf).
178. Roepstorff, P. and Fohlman, J., *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom, 1984. **11**(11): p. 601.
179. Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988. **16**(1-12): p. 99-111.
180. Peng, J., Elias, J.E., Thoreen, C.C., et al., *Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome*. J Proteome Res, 2003. **2**(1): p. 43-50.
181. Steen, H. and Mann, M., *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(9): p. 699-711.
182. Roche, L., *Monographie de l' HERCEPTIN® (trastuzumab) d'après le laboratoire Roche Canada*. Avril 2015.
183. *ProteinProspector-requête MS-Product*. v 5.14.2; University of California San Francisco. Disponible sur: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>.
184. Qiao, L., Liu, Y., Hudson, S.P., et al., *A nanoporous reactor for efficient proteolysis*. Chem. Eur. J. , 2008. **14**(1): p. 151-157.
185. Rice, R.H., Means, G.E., and Brown, W.D., *Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation*. Biochim Biophys Acta, 1977. **492**(2): p. 316-21.
186. Tabrizi, M.A., Tseng, C.M., and Roskos, L.K., *Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies*. Drug Discov Today, 2006. **11**(1-2): p. 81-8.
187. Xuereb, F., Chaignepain, S., Breilh, D., et al., *Quantitative analysis of erythropoietin in human plasma by tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(7): p. 2073-84.
188. Stokvis, E., Rosing, H., and Beijnen, J.H., *Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?* Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(3): p. 401-7.
189. [http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)
190. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
191. Administration, U.D.o.H.a.H.S.F.a.D., *Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation*. 2001.

